

## EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit

### 参考プロトコール

#### リンパ球採取手順

##### 【準備】

- EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (ST-19655)
- EasyEights 専用マグネット (ST-18103)
- ACD 加採血 7.5mL
- 14mL ポリスチレン・ラウンドボトムチューブ 4本
- D-PBS(Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>を含まない)を推奨、PBS (Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>を含まない) でも可

##### 【血液検体】

細胞分離用として、ACD 加採血管 2本の血液

##### 【方法】

※バッフィーコート (BF) を採取するにあたり以下の3方法があります。

<血液準備>

ケース1. <50mL ファルコンチューブ用遠心機がある場合>

50mL のファルコンチューブに全血液を入れます。D-PBS(-)で2倍に希釈します。(total volume 30mL)

ケース2. 全血液を D-PBS(-)で2倍希釈して (total volume 30mL)、2本のチューブに分けます。

ケース3. 採血管の血液をそのまま使用。

◇ 推奨順はケース1、ケース2、ケース3

1. 上記の血液を 800g で 10分遠心します。(ブレーキオフ)
2. チューブからバッフィーコート (BF) を採取し、新しい 14mL チューブに移します。

ケース1の場合：BFを3mL採取

ケース2の場合：BFを3mL (各チューブ1.5mL) 採取

ケース3の場合：BFを3mL (各チューブ1.5mL) 採取

※注意：BFの上の血漿部分を先にピペットで吸い取り捨てます。その後BF部分を採取します。

3. RapidSpheres 30秒間ボルテックスします。
4. Isolation Cocktail を BF に対して 50  $\mu$ L/mL を添加します。

**BFが3mLなので150  $\mu$ L 添加**

5. RapidSpheres を Isolation Cocktail と同量入れます。
6. 混和して、室温5分間インキュベーションします。

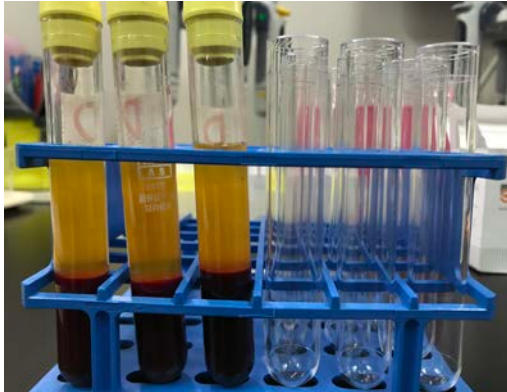
7. D-PBS(-)を約 3mL 入れます。(total volume 約 6mL)
8. マグネットに装着して 5 分間インキュベーションします。
9. 磁石面と反対側の透明な部分の溶液を新しい 14mL チューブに血清ピペットで移します。採取時は大きい血清ピペットを使用し、素早く一回で溶液を回収するようにします。
10. RapidSpheres を BF に対して 50  $\mu$ L/mL を添加します。  
**BF が 3mL なので 150  $\mu$ L 添加**
11. 混和して、室温 5 分間インキュベーションします。
12. マグネットに装着して 5 分間インキュベーションします。
13. 磁石面と反対側の透明な部分の溶液を新しい 14mL チューブに血清ピペットで移します。採取時は大きい血清ピペットを使用し、底まですべての溶液を採取します。
14. マグネットに装着して 5 分間インキュベーションします。
15. 磁石面と反対側の透明な部分の溶液を新しい 14mL チューブに血清ピペットで移します。採取時は大きい血清ピペットを使用し、底まですべての溶液を採取します。
16. 300g でブレーキ弱めで、オフにはしないで 10 分遠心します。(弱めにできない場合はオンのままで)
17. 血清ピペットで上清を除去し、ペレットに必要な量の D-PBS(-)を入れます。

## 【注意事項】

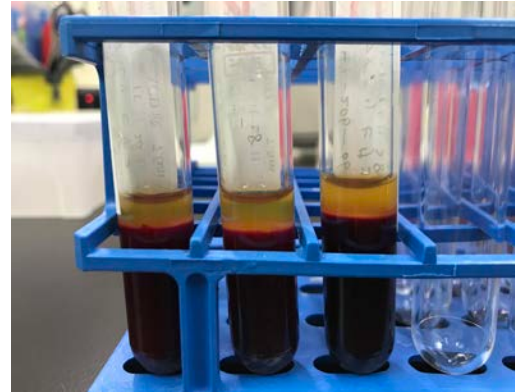
1. 用途としてフローサイトクロスマッチのための最適な細胞を提供します。
2. 全血液を D-PBS (-) で希釈することにより血液の粘度を下げます。それで遠心後にバッフィーコート層がもっとはっきり見えるようになり、細胞がしっかりと分離され、収量がよくなります。そのため、最初の全血液+D-PBS(-)の推奨はケース 1、ケース 2 となります。
3. 全血液の遠心するとき、ブレーキオフにするのは、バッフィーコート層の面をスムーズにして壊さないようにするためです。
4. バッフィーコートを採取する時赤血球が混入していても構いません。
5. 必ず 14 mL のポリスチレン製ラウンドボトムチューブを使用してください。EasyEights ( ST-18103) に最適です。 10 mL チューブ等など直径のあっていないチューブを使用すると磁石にぴったりとつかないため収量が落ちます。
6. ステップ 9 で、透明な部分の溶液を移すとき、素早くに行い、下部に残った赤血球部分は吸い取らないようにします。純度が下がります。
7. 300g でブレーキ弱めで、オフにはしないで 10 分遠心するのは、強い遠心だとペレットの底の細胞が圧縮され固くなり懸濁されにくくなるためです。
8. 分離には D-PBS(-)をお勧めしますが、それが無い場合は STEMCELL 社の RoboSep buffer(ST-20104)を使用することもできます。
9. 細胞分離をする際に血清ピペットを使用してください。  
EasyEights の 14 mL チューブを使用する場合、オレンジ色の 10 mL ピペットを推奨します。



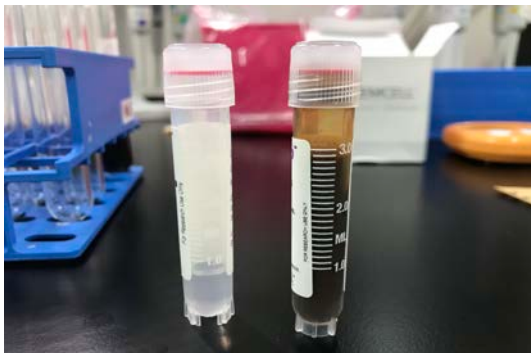
【分離イメージ図】



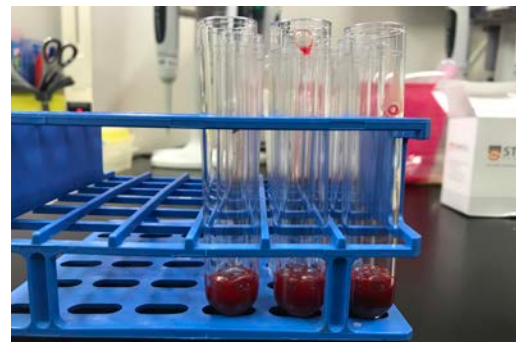
1. 全血液遠心後



2. バッファーコートを採取



4. 5 で使用する  
Rapid Spheres (右側茶色液)  
Isolation Cocktail (左側透明液)



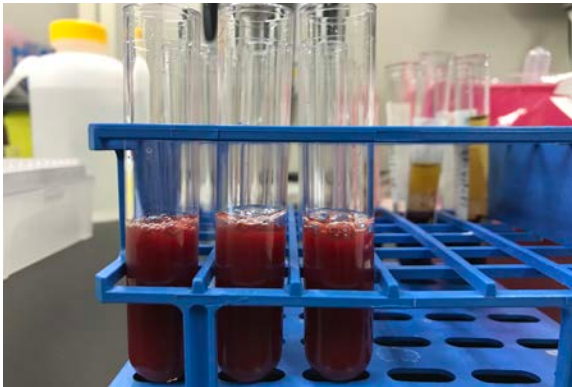
6. 5 分間インキュベーション



7. PBS 添加後 5 分間磁石にセット



8. 5 分間磁石に静置



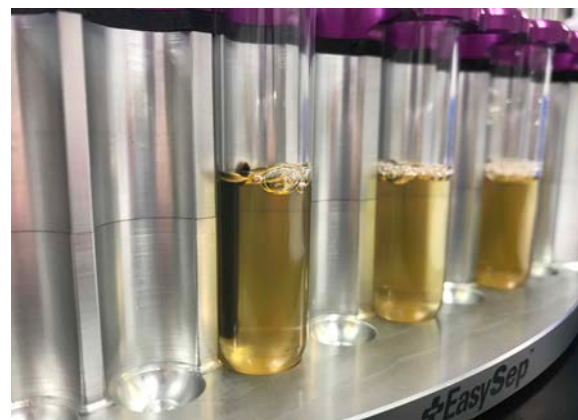
9. 上清を新しいチューブに移動



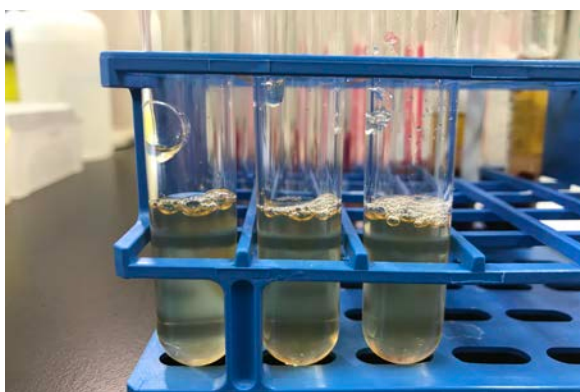
10&11. Rapid Spheres を添加、5 分間  
インキュベーション



12. 5 分間 磁石に 静置



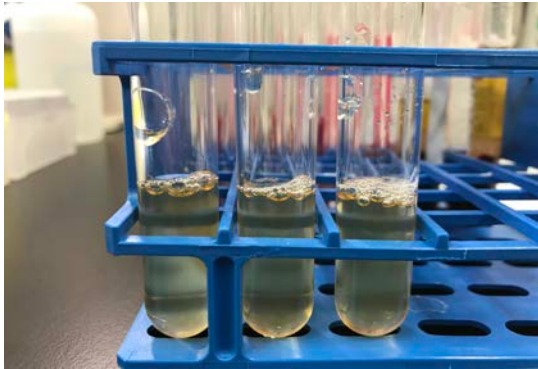
12. 上清がクリアになっていきます



13. 新しいチューブに上清を移す



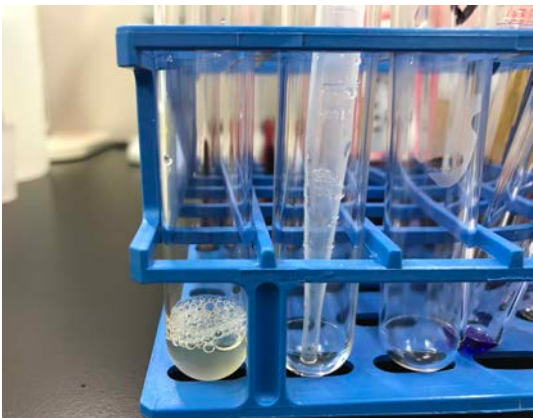
14. 5 分間 磁石に 静置



15. 新しいチューブに上清を移す



16. 遠心後、チューブの底にリンパ球



17. 遠心後、上清を除き必要な PBS を添加