

# Dynabeads® FlowComp™使用方法

\*単核球用と全血用の2種類のプロトコルがあります。

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認下さい。

## キット内容:

	梱包単位	保存温度
FlowComp™ Antibody	1 mL	2-8°C
FlowComp™ Dynabeads	3 mL	
FlowComp™ Release Buffer	2 x 20 mL	

## 必要な試薬:

- Isolation buffer: Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free PBS with 0.1% BSA, 2mM EDTA pH7.4
- tiltingとrotationが同時に可能なミキサー
- マグネット: DynaMag-15™, DynaMag-50™ (MPC-1は使用不可)
- 評価用抗体

## — 単核球用のプロトコル —

### 単核球用プロトコルの対象製品

コード No.	品名	処理可能な MNC 数
DB11361	Dynabeads® FlowComp™ Human CD4	2x10 <sup>9</sup> cells
DB11362	Dynabeads® FlowComp™ Human CD8	
DB11364	Dynabeads® FlowComp™ Human NKp46	
DB11365	Dynabeads® FlowComp™ Human CD3	
DB11461	Dynabeads® FlowComp™ Mouse CD4	
DB11462	Dynabeads® FlowComp™ Mouse CD8	
DB11464	Dynabeads® FlowComp™ Mouse CD49b	
DB11465	Dynabeads® FlowComp™ Mouse Pan T (CD90.2)	

## 1. 準備:

- 標準法により、MNC を分離します
- 5x10<sup>7</sup>の細胞に対して約 10 mL の cold Isolation Buffer を準備します

## 2. 操作方法:(本プロトコルは 5x10<sup>7</sup>MNCからの分離用ですので細胞数に応じてスケールアップして下さい)

1. 5x10<sup>7</sup>MNC を 500 μ L の cold Isolation Buffer で懸濁し、25 μ L の FlowComp Antibody を加えます。
2. よく混和し 2-8°C で 10 分間インキュベートします。
3. 2 mL の cold Isolation Buffer を加えた後、350xg で 8 分間遠心分離します。
4. 上清を静かに取り除きます。

5. 1 mL の cold Isolation Buffer で再懸濁します>(\*NK細胞(human, mouse)の場合は、0.5 mL の cold Isolation Buffer を使用)
6. 75  $\mu$ L の再懸濁した FlowComp Dynabeads を加えてよく混和します。
7. 2-8°C で 15 分間インキュベートします (ローテーターを必ず使用してください)。( \*NK 細胞(human)の場合は、20 分間インキュベーション)
8. 磁石にチューブを 1 分間セットします。
9. 上清を静かに除去します。
10. チューブをマグネットからはずした後、1 mL の cold Isolation Buffer で再懸濁し、穏やかに 5 回ピペッティングします。( \*NK 細胞(human, mouse)の場合は、2 mL の cold Isolation Buffer を使用)
11. 磁石にチューブを 1 分間セットします。
12. 上清を除去します。
13. 1 mL の FlowComp™ Release Buffer で再懸濁します。
14. 室温で 10 分間混合しながらインキュベートします (ローテーターを必ず使用してください)。( \*NK 細胞(human, mouse)の場合は、20 分間インキュベーション)
15. 穏やかに 5 回ピペッティングし細胞をミックスした後、チューブをマグネットに 1 分間セットします。( \*NK 細胞(human, mouse)の場合は、10 回ピペッティング)
16. ビーズフリーの細胞を含む上清を新しいチューブに移し、このチューブを再びマグネットに 1 分間セットします (ビーズを完全に除去します)。
17. ビーズフリーの細胞を含む上清を別の新しいチューブに移し、2 mL の cold Isolation Buffer を加え、350 x g で 8 分間遠心分離します。
18. 上清を取り除き、お好みのメディアウムで再懸濁してください。細胞は下流のアプリケーションに使用するまで 2-8°C で保存します。

### 本マニュアルの対象製品

コード No.	品名	使用可能量
DB11361	Dynabeads® FlowComp™ Human CD4	全血 80 mL
DB11362	Dynabeads® FlowComp™ Human CD8	
DB11365	Dynabeads® FlowComp™ Human CD3	

#### 1. 準備:

- 適した凝固剤（例：EDTA、ヘパリン、ACD、クエン酸塩）の入ったコレクションチューブに全血を回収します。
- 全血2 mLに対して約20 mLのIsolation Buffer を準備します。
- Dynabeads® FlowComp™ Human CD3の場合：CD3分子の内部移行を避けるため、分離より前にon iceで全血を2-8°Cに冷やす。

#### 2. 操作方法:(本プロトコルは全血 2 mLからの分離用ですのでサンプル量に応じてスケールアップして下さい)

\*室温でのインキュベーションは、2-8°Cでも行えます。

1. 15 mLチューブに入った抗凝固剤を含む2 mLの全血をon iceに移し、25  $\mu$  LのFlowComp Antibody を加えます。
2. よく混和しon iceで10 分間インキュベートします。
3. 4 mL のIsolation Buffer を加えよく混和した後、ブレーキをかけずに、350 x g で15 分間遠心します。
4. Step.3で加えた量の吸引により上清を取り除きます（白血球のロス避ける為、少なくともペレットの上1 cmを維持する）。
5. 75 $\mu$ l の再懸濁したFlowComp Dynabeads を加えてよく混和します。
6. 室温で15 分間インキュベートします（ローテーターを必ず使用してください）。
7. 4 mL のIsolation Buffer を加えよく混和します。
8. 磁石にチューブを3 分間セットします。
9. 上清を静かに除去します。
10. Step.7-9を2回繰り返し、合計3回の洗いを行って下さい。
11. 1 mLのFlowComp™ Release Buffer を加えて3-4回ピペッティングし、再懸濁します。
12. 室温で10 分間混合しながらインキュベートします（ローテーターを必ず使用してください）。
13. 10 回ピペッティングし細胞をミックスした後、チューブをマグネットに1 分間セットします。
14. ビーズフリーの細胞を含む上清を新しいチューブに移し、このチューブを再びマグネットに1 分間セットします（ビーズを完全に除去します）。
15. ビーズフリーの細胞を含む上清を別の新しいチューブに移します。
16. 2 mLのIsolation Buffer を加え、350 x g で8 分間遠心分離します。
17. 上清を取り除き、お好みのメディアウムで再懸濁してください。細胞は下流のアプリケーションに使用するまで2-8°Cで保存します。

## 補足情報（単核球用、全血用 共通）

### —トラブルシューティング—

- ガンマグロブリンやFc ブロッキング試薬を使用することで細胞の凝集を防ぐことができます
- 洗浄のステップを繰り返したり、FlowComp Release Buffer を加える前に新しいチューブに移すなどの操作で純度を上げることが可能です。
- Dynabeads とのインキュベーションには必ずローテーターを使用してください
- MPC-1 マグネットは磁力が十分でないため使用しないでください
- 推奨よりも少ない量でDynabeads を使用しないでください
- ピペッティング容量とインキュベーション時間は正確に行ってください
- ピペッティング時に泡ができないよう注意してください
- 染色抗体は一次抗体を使用し、蛍光標識二次抗体を使用しないでください

### —Isolation Buffer—

- 推奨の Isolation Buffer の代わりに PBS with 2% FCS, 1mM EDTA でも使用可能です