平成 19 年 12 月 7 日

T/B LYMPHO　KWIK・T/B リンフォクイック

研究用試薬

リンフォクイックは、モノクロナル抗体を用いてリンパ球を分離採集する等張溶液です。本品は死体採血血液、患者血液、B27 型血液、古い血液及び少量の血液からのリンパ球の採集に有用です。
以下のプロトコール１は必要最小限のセルを得る使用法です。プロトコール２は最大収量を得る使用方法です。

➢　用途

T/B リンパ球採集用

➢　使用上の注意

1）１検体あたり「0.1mL 以内」のバフィーコートを使用してください。それ以上使用するとリンパ球に他のセルが混入することがあります。
2）蛍光抗体を使用する場合はセルを最終調整の前に１％EDTA で洗浄してください。この洗浄により蛍光抗体法による測定を阻害するリンパ球表面の残存抗体タンパクを取り除くことが出来ます。
3）インキュベーションにはインキュベーターを使用せず、ウォーターバスかヒートブロックを使用してください。

➢　プロトコール１

１）抹消血(ヘパリン加もしくはクエン酸加)5 ～ 15mL を 1,000ｇ5 分間遠心。
２）0.1mL(100μＬ・パスツールピペットの先端の細い部分位)のバフィーコートを採取し１mL の PBS で希釈し 1,000ｇ1 分間遠心洗浄し上清をすてる。
３）0.8mL のリンフォクイックを加え良くピペティングにより、混和しウォターバスもしくはヒートブロックにより 37℃で 30 分間インキュベートする。
４）インキュベート終了後ピペッティングによりクランプをほぐす。約 0.2mＬ（1 滴）のメディウム（ＰＢＳ、ハンクス液、マッコイ液等）をゆっくり重層し 2,000ｇ2 分間遠心する。
５）リンパ球ペレットを 1,000ｇ1 分間の遠心で 2 回洗浄する。マッコイメディウムに浮遊させたセル数を調整する。（２×10^6個）
※　本法は、キャピラリーチューブで採取された血液にも使用できます。血液

を洗浄しセルペレットを形成させた後、0.1mL バフィーコートを採取し、0.8mL のリンフォクイックをフィッシャーチューブ内で混和させプロトコールに従ってリンパ球を分離する。

➢　プロトコール２

与えられた血液からセルを最大限回収したい場合にはプロトコール１を以下プロトコール２に示す通りに変更する。

1)　バフィーコートを全て１mL フィッシャーチューブに移し、3,000ｇ1 分間遠心。
2)　形成されたバフィーコートを3本のフィッシャーチューブに等量に分注しPBS で１mL まで希釈する。
3)　1,000ｇ1 分間遠心し上清をすて各ペレットにそれぞれ 0.8mL のリンフォクイックを加えて混和する。

➢リンフォクイック使用上のトラブルと解決法

トラブル１：0.1mL 以上のバフィーコートを採取してしまった場合

解決法）PBS で１mL に希釈し 1500ｇ1.5 分間遠心し、上清を捨てペレットの白い部分のみを 0.8mL のリンフォクイックに希釈しプロトコールに従って分離を行う。

トラブル２：赤血球の購入

解決法）インキュベーション後上清が著しく赤く曇っている場合は赤血球が破壊されずに残存している可能性がある。そのような場合はインキュベーション時間が短いか又は温度が低すぎることが考えられるので、温度を確認の上 5～10 分間インキュベーションを追加する。

トラブル３：顆粒球の混入

解決法）0.8mL のリンフォクイックに対し 0.1mL 以上のバフィーコートを加えた場合顆粒球が混入することがある。1,000ｇ1 分間遠心しリンパ球ペレットを作りもう一度やり直す。

トラブル４：血小板の混入

解決法）１．混入がさほど多くない場合はリンパ球を 750ｇで 1 分間遠心し血小板より重いリンパ球を沈めて血小板を含んだ上清を捨てる。新しいハンクス

液にリンパ球を浮遊させる。必要であれば処理を繰り返す。
２．混入が著しく多い場合は後述の『顆粒球の混入』の項を参照しトロンビンを用いる。
３．40%パーコールの使用も有用
リンパ球ペレットを 1mL の 40%パーコール液に浮遊させ、2000 g で 2 分間遠心し上清をすてハンクス液で 2 回（1000 g 1 分間）洗浄する。

トラブル 5：洗浄時に赤血球もしくは顆粒球のクランプが発見された場合
解決法）1,000 g 3 秒間の『やさしい』遠心でクランプを沈め上清（リンパ球）を新しいチューブに移し 2 回洗浄する。

➢リンフォクイックの準備と保存
１）-70℃以下で保存してください。
２）リンフォクイックは 40mL で販売されているので使用前に下記方法を守って 1 回分毎に分注し保存してください。
(ア)リンフォクイックの入ったボトルを冷水で解凍する。
(イ) 1 mL のしっかりキャップのできるチューブをクラッシュアイスに立てて冷やし解凍されたリンフォクイックを良く混和してから 0.8mL ずつ分注する。
(ウ)分注中もリンフォクイックの入ったボトルはチューブと共にクラッシュアイスの中に立てて冷却する。
(エ)分注冷凍したリンフォクイックは使用直前まで-70℃で保存する。
(オ)分注保存後は使用直前まで解凍しない。解凍は分注時と使用時の 2 回とし、誤って 3 回以上解凍した場合や有効期限を過ぎたものは力値が低下している恐れがあるので使用しない。

株式会社ベリタス
〒105-0001
東京都港区虎ノ門 2-7-14
八洲ビル

One Lambda, Inc.
2001 Kittridge St, Canoga Park,
CA 91304
(818)702-0042