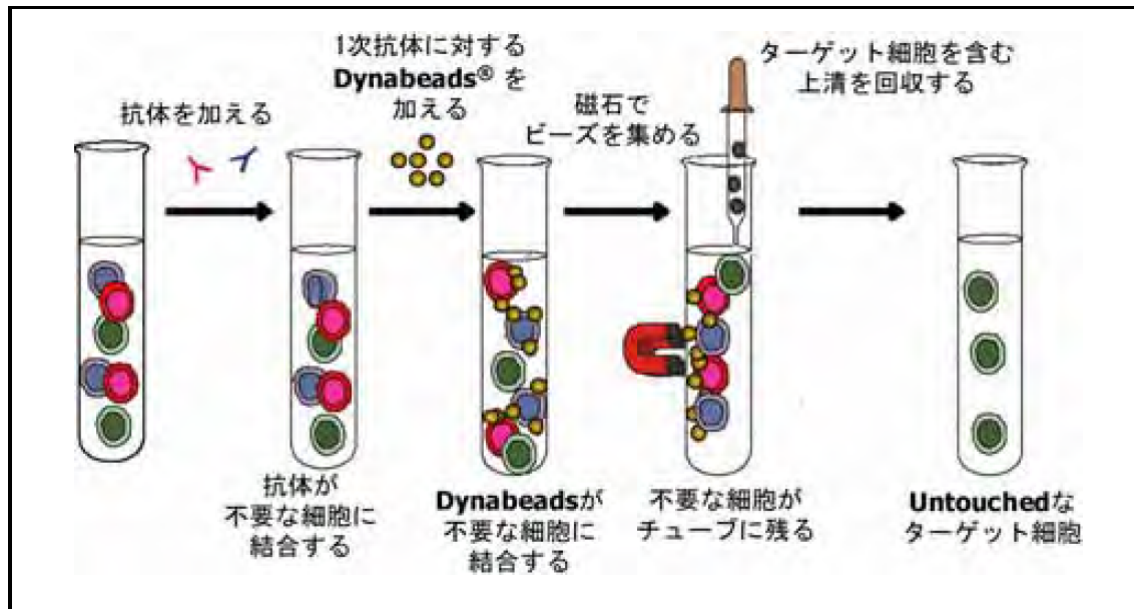


Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes 簡易プロトコル

詳細は商品添付文書をご覧ください。

ネガティブ細胞分離のワークフロー



使用するバッファー

Isolation Buffer = PBS (-Ca²⁺, -Mg²⁺)/ 0.1%BSA, 2mM EDTA

Dynabeads のウォッシュ

1. Dynabeads をよく懸濁して必要量をとる
2. 同量のIsolation Bufferを加えてピペットでミックスする
3. チューブを1分間マグネットにセットする
4. バッファーを取り除く (チューブはマグネットにセットした状態)
5. マグネットからチューブをはずす
6. 最初と同じボリュームのIsolation Bufferで再懸濁する

PBMCの準備

- PBMC懸濁液は、推奨されたサンプル準備のプロトコルに従って準備する
- Isolation Bufferで1 x 10⁸ PBMC/mlに懸濁する

モノサイトの分離操作

Table 1. ヒト用モノサイトの試薬使用量

	Volumes per 5×10^7 PBMC	Volumes per 5×10^8 PBMC
チューブサイズ	15 ml	50 ml
Cell volume (step 1)	500 μ l	5 ml
Blocking reagent (step 2)	100 μ l	1 ml
Antibody Mix (step 3)	100 μ l	1 ml
Washing (step 5)	10 ml	40 ml
Resuspension (step 6)	500 μ l	5 ml
Depletion MyOne SA Dynabeads (step 7)	500 μ l	5 ml
Volume Buffer added (step 10 and 13)	5 ml	20 ml

(5×10^7 のPBMCを基準にしています。必要に応じてスケールアップもしくはスケールダウンしてください)

・このプロトコルのスタートの細胞数は 5×10^7

・モノサイトの減少を減らすために低温 (2-8°C) を維持する。予めIsolation Bufferを2-8°Cにする

1. 500 μ lのIsolation Bufferで 5×10^7 のPBMCを懸濁する
2. 5×10^7 のPBMCに対して100 μ lのBlocking Reagentを加え、ピペッティングで混ぜる
3. 5×10^7 のPBMCに対して100 μ lのAntibody Mixを加え、ピペッティングで混ぜる
4. 2-8°Cで20 分間インキュベートする(オプション:わずかに傾けてローテーションする)
5. 10mL のIsolation Bufferを加えて細胞をウォッシュする。チューブは、数回、転倒混和にてよく混ぜ、2-8°Cで8分、350 x gで遠心する。上清を除去する
6. 500 μ lのIsolation Bufferで細胞を懸濁する
7. 500 μ lの前洗浄したDepletion MyOne SA Dynabeadsを加える
8. 2-8°C、回転下で15 分間インキュベートする
9. 広い口のチップを使いビーズの結合した細胞を10回以上よく懸濁する(例えば、1 mlまたは5 mlピペット用チップ)
10. Isolation Bufferを5 ml加える (ビーズとのインキュベーションの間1 mlより少ない量の場合、再懸濁する前に1 mlのIsolation Bufferを加える)

11. チューブを2分間マグネットにセットする
12. 上清を別のチューブに回収する（チューブはマグネットにセットした状態）
13. Dynabeadsを含むチューブへIsolation Bufferを5 ml加える
14. Step.9と同様、広い口のチップを使いビーズの結合した細胞を10回以上よく懸濁する
15. チューブを2分間マグネットにセットする
16. 上清を先ほど回収したチューブに回収する（チューブはマグネットにセットした状態）
17. オプション：ビーズを除去するためにチューブを2分間マグネットにセットした後、上清を新しいチューブに回収する（チューブはマグネットにセットした状態）

注意事項

- ・バッファー中のBSAは、Human serum albumin(HAS),2% FBS/FCSで置き換えることも可能です。EDTAは、0.6%のクエン酸ナトリウムで置き換えることも可能です
- ・Ca²⁺、Mg²⁺を含むPBSは、推奨致しません
- ・Dynabeadsは使用前に洗浄して下さい
- ・ビーズとのインキュベーションの間、傾きとローテーションの動作が可能な適切な混和装置が必要です（DynaL サンプルミキサーをお奨めします）
- ・ビーズに結合した細胞にモノサイトがトラップされるのを防ぐため粗く推奨した回数で、ピペッティングして下さい。また、ピペッティング時に泡ができないよう注意して下さい
- ・推奨量及びインキュベーション時間を厳守下さい。推奨量よりも少ない量でDynabeads を使用しないで下さい
- ・モノサイトを処理するとき、細胞およびIsolation Bufferを低温（2-8℃）に維持して下さい
- ・詳細な情報やサンプル調整につきましては英文の商品添付文書をご覧ください

マグネット・サンプルミキサー

コード No.	品名	製品説明
DB12320	DynaMag-SPIN	1.5mL マイクロ遠心チューブ 6 本用
DB12321	DynaMag-2	1.5-2mL マイクロ遠心チューブ 16 本用
DB12301	DynaMag-15	5mLFACS チューブ 4 本もしくは 15mL チューブ 4 本用
DB12302	DynaMag-50	50mL チューブ 2 本用
DB15907	DynaL MX-1	1-15ml サイズ 12 本用
DB15908	DynaL MX-2	50ml サイズ 8 本用