

## Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 使用方法

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ください。

### 内容:

コード No.	品名	梱包単位	保存温度	輸送温度
DB11456	Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28	1 × 0.4 ml	2-8°C	冷蔵
DB11452 *	Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28	1 × 2 ml	2-8°C	冷蔵
DB11453 *	Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28	5 × 2 ml	2-8°C	冷蔵

### 必要な試薬:

- Buffer: PBS with 0.1% BSA, 2mM EDTA pH7.4
- マグネット: DynaMag™ (サンプルボリュームにあわせて最適なサイズを選択ください)
- 培地: Advanced RPMI Medium 1640 with 2 mM L-Glutamin, 10%FCS/FBS, 100U/mL penicillin/streptomycin, または同等の培地
- 非動化FCS
- Recombinant mouse IL-2 (human IL-2も使用可能です)
- 平底組織培養プレートまたは適したサイズの組織培養フラスコ
- 加湿型CO<sub>2</sub>インキュベーター

### 1. 準備:

- 細胞を準備します。
- Treg細胞の分離の注意 (flow sotingまたは磁気ビーズ分離) : 抗CD25抗体がIL-2の結合をブロックしないような抗体を使用することが重要です。Dynabeads™ FlowComp™ Mouse CD4+CD25+ Treg Cells (ST-11463)は、使用可能です。
- 細胞培養用培地を準備します。

### 2. 操作方法:

#### 2.1 Dynabeads の洗浄操作

Dynabeads は、使う前に洗浄して下さい。

1. バイアル内でDynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28を再懸濁します。
2. チューブに必要な量のDynabeadsを移します。
3. 等量または、少なくとも1 mLのBufferを加え、混和します (5秒間vortexまたは、少なくとも5分間ローテーターで混和)。
4. 磁石にチューブを1分間セットし、上清を除去します。
5. 磁石からチューブを外し、step 2でバイアル内から取り出した初期量のDynabeadsと同量の培地で再懸濁します。

#### 2.2 Mouse T細胞の活性化

1. 96-well組織培養プレートに、100-200 μ Lの培地にて8 x 10<sup>4</sup> 個の精製したT細胞を調整します。
2. ビーズと細胞が1:1の割合になるように2 μ LのDynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28を加えます

(Table 1をご参照下さい)。

3. 37°C、加湿型CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養します。
4. 活性化したT細胞を回収し、さらなる解析のために使います。
5. フローサイトメトリーで解析する際は、ビーズを除去します。溶液からビーズを分離するために磁石にチューブを1-2分間セットします。新しいチューブへ細胞を含む上清を移します。

### 2.3 Mouse T細胞の増殖

1. 適した組織培養プレートまたは組織培養フラスコに、精製T細胞を培地にて 1-1.5 x 10<sup>6</sup> 個/mLに調整し加えます。
2. ビーズと細胞が1:1の割合になるようにDynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28を加えます (Table 1をご参照下さい)。
3. 30 U/mL rIL-2を加えます。
4. 37°C、加湿型CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養します。
5. 細胞サイズおよび形に注意して、毎日培養細胞を観察します。細胞の収縮および増殖率減少は、一般的に消耗した培養細胞において観察されます。
6. 少なくとも週2回、よく再懸濁した後セルカウントします。
7. 細胞濃度が、2.5 x 10<sup>6</sup> 個/mLを上回った時または、メディアウムが黄色に変わった時、30U/mL rIL-2を含む培地で、0.5-1 x 10<sup>6</sup> 個/mLの濃度に調整し、wellを分割します。

### 2.4 再刺激

消耗のサインを示す (一般的に増殖 7-10 日) 培養細胞は、新鮮な Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 および rIL-2 を加えることによって数回の再刺激を行うことができます。CD8+ T 細胞は、再刺激を繰り返した後でも、細胞障害性を維持します。

再刺激は、一般的に細胞の収縮および増殖率の減少が観察された場合に必要です。再刺激の為のガイドラインは、Table 2 をご参照ください。しかし、特定のアプリケーションに応じて最適化をお勧めします。細胞に対する Dynabeads 量が過剰な場合、増殖を抑制する可能性がございますので過剰量の Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 を使用しないで下さい。

再刺激の前に、使用した Dynabeads は、適したチューブへ細胞を移すことによって除去します。Dynabeads がチューブの壁に移動するまで 1-2 分磁石にチューブをセットします。新しいチューブへ細胞を含む上清を移します。以下の操作を続けて下さい。

1. セルカウントし、適した培養プレートまたは組織培養フラスコに、培地にて1 x 10<sup>6</sup> 個/mLの濃度に調整し加えます。
2. ビーズと細胞が1:1の割合になるようにDynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28を加えます。
3. 30U/mL rIL-2を加えます。
4. 37°C、加湿型CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養します。
5. 細胞サイズおよび形に注意して、毎日培養細胞を観察します。細胞の収縮および増殖率減少は、一般的に消耗した培養細胞において観察されます。
6. 少なくとも週2回、よく再懸濁した後セルカウントします。
7. 細胞濃度が、2.5 x 10<sup>6</sup> 個/mLを上回った時または、メディアウムが黄色に変わった時、30U/mL rIL-2を含む培地で、0.5-1 x 10<sup>6</sup> 個/mLの濃度に調整し、wellを分割します。

### 2.5 Mouse Regulatory T細胞の増殖

1. 適した組織培養プレートに、培地にて  $1-1.5 \times 10^6$  個/mLに調整し加えます（96 well plateで1 wellあたり  $10^5$ 個の細胞、24 well plateで1 wellあたり  $1-1.5 \times 10^6$ 個の細胞）。
2. ビーズと細胞が2:1の割合になるようにDynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28を加えます。
3. 2000 U/mL rIL-2を加えます。
4. 37°C、加湿型CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養します。
5. 細胞サイズおよび形に注意して、毎日培養細胞を観察します。細胞の収縮および増殖率減少は、一般的に消耗した培養細胞において観察されます。
6. 少なくとも週2回、よく再懸濁した後セルカウントします。
7. 細胞濃度が、 $2.5 \times 10^6$  個/mLを上回った時または、メディアウムが黄色に変わった時、2000U/mL rIL-2を含む培地で、 $0.5-1 \times 10^6$  個/mLの濃度に調整し、wellを分割します。  
Treg 細胞は 2 週間増殖後、FoxP3 発現を維持します。

### 注意事項

- ご使用前にバイアル中のDynabeadsを良く再懸濁して下さい（例えば、>30秒vortexまたは、5分間ローターで混和）。
- MPC-1 マグネットは磁力が十分でないため使用しないで下さい。
- 推奨よりも少ない量でDynabeads を使用しないで下さい。
- 推奨したピペッティング容量に沿って行って下さい。
- ピペッティング時に泡ができないよう注意して下さい。
- フローサイトメトリー解析を行う場合は、DynabeadsおよびDynabeadsの結合した細胞は除去して下さい。活性化の後2-3日間は、いくつかの細胞は、ビーズに強く結合しています。細胞の回収を上げる為に、Dynabeadsの結合した細胞の懸濁液をよくピペッティングし、磁石で分離し、T細胞を含む上清を回収します。ビーズが細胞に結合したままの分画は、overnightで培養することができ、T細胞の回収をさらに上げる為に上記の操作を繰り返すことができます。プロテオミクスや遺伝子発現の研究に細胞をご使用の場合は、ビーズを除去する前にLysisして下さい。

Table 1: ビーズと細胞の割合(1:1)の推奨量

	$8 \times 10^4$ T cells	$1 \times 10^6$ T cells	$35 \times 10^6$ T cells*
Type of culture plate/flask	Per well in 96-well plate	Per well in 24-well plate	175 cm <sup>2</sup> tissue culture flask
Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28	2 µl	25 µl	875 µl
rIL-2	30 U/ml	30 U/ml	30 U/ml
Seeding volume (medium)	100-200 µl	1-2 ml	35-70 ml

\*一匹のマウス脾臓から得られる平均T細胞数

Table 2: 抗CD3/CD28培養の為の再刺激のガイドライン

Cell type	First re-stimulation**	Subsequent re-stimulations**
CD4+ (polyclonal)	8-10 days	8-11 day intervals
CD8+ (polyclonal)	7-9 days	7-10 day intervals
T cells	7-9 days	10-12 day intervals

\*\*これらの遺伝子のガイドラインを参考に、細胞に応じて最適時間を確立して下さい。

### 株式会社ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目18-16 住友浜松町ビル6階  
TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0086

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [Tech\\_support@veritastk.co.jp](mailto:Tech_support@veritastk.co.jp)