

EasySep™ Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit

注意：必ず英文添付文書をご覧ください。

この説明書は英文添付文書に基づき、作成した推奨プロトコールです。

【準備】

- EasySep™ Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (ST-19655)
- 磁石：
 - ☆EasyEights™ EasySep™ Magnet (ST-18103) 14mL 用チューブ使用☆
 - ☆The Big Easy EasySep™ Magnet (ST-18001) 14mL 用チューブ使用☆
- チューブ：
 - ☆14 mL ポリスチレン・丸底チューブ各 4 本
 - ☆遠心用可能なチューブ 50mL~10mL 数本
- D-PBS(Ca⁺⁺、Mg⁺⁺を含まない)を推奨、PBS (Ca⁺⁺、Mg⁺⁺を含まない) でも可
- ACD 加採血管 2 本 (日本 BD 社 ACD 溶液入り採血管：カタログ番号 364606 採血量 8.5mL)

【方法】

1. 全血を PBS で 2 倍に希釈後、800g、室温で 10 分遠心。(ブレーキオフ)。
2. バッフィーコート (BF) を 2.0mL 各チューブから採取し、新しい 14 mL チューブ移し合計 4.0mL とする。
 ※注意：BF の上の血漿部分を先にピペットで吸い取って捨て、その後 BF 部分を採取。赤血球も少し取り込むこと (同じヘマトクリットを維持しながら、白血球を約 5 倍濃縮することが目標です)。
3. RapidSpheres™ ビーズを 30 秒間ボルテックス。
4. Isolation Cocktail を BF に添加後 (Isolation Cocktail と BF の割合は 50 μ L/mL)、しっかり混和。
BF4.0mL の場合は 200 μ L。
5. RapidSpheres™ ビーズを添加。(RapidSpheres™ ビーズと Isolation Cocktail は同量)
6. 混和後、室温 5 分間インキュベーション。
7. D-PBS(-)を約 4.0mL 添加 (total volume 約 8.0 mL)。しっかり混和。
8. マグネットに装着し、室温 5 分間インキュベーション。
9. EasyEight の場合：磁石面と反対側の透明な部分の溶液を新しい 14 mL チューブに移す。採取時は 10mL のセロジカルピペットと電動ピペッター*を使用し、上から下まで慎重に、一回で溶液を回収する (複数回で回収しないでください)。底にある赤血球は 10% まで回収してください。
 ・参考動画はこちら (約 1 分) → <https://www.youtube.com/watch?v=d4iDM05QdRA>

- BigEasy の場合：デカンテーションを行い、新しい 14 mL チューブに上清を移す。磁石を振ったりせず、静かにデカンテーションする。(多少赤血球が混入していても問題ありません)
 ・参考動画はこちら (約 3 分) → <https://www.youtube.com/watch?v=XVXhYmzv6Yk>
10. RapidSpheres™ ビーズを 5. と同量添加。

11. 混和後、室温 5 分間インキュベーション。
12. マグネットに装着し、室温 5 分間インキュベーション。
13. EasyEight の場合：磁石面と反対側の透明な部分の溶液を新しい 14 mL チューブにセロロジカルピペットと電動ピペッターで移す。一回で底まですべての透明な溶液を採取。
BigEasy の場合：デカンテーションを行い、新しい 14 mL チューブに上清を移す。磁石を振ったりせず、静かにデカンテーションする。
14. マグネットに装着し、室温 5 分間インキュベーション。
15. EasyEight の場合は磁石面と反対側の透明な部分の溶液を新しい 14 mL チューブにセロロジカルピペットと電動ピペッターで移す。BigEasy の場合は新しい 14 mL チューブにデカンテーションで移す。一回で底まですべての透明な溶液を採取。
16. 300g、ブレーキ弱、室温で 10 分遠心。(弱めにできない場合はオンのままで)。
17. ピペットで上清を除去し、ペレットに必要な量の D-PBS(-)を入れる。

【注意事項】

1. 用途：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. 全血を遠心するときブレーキオフにするのは、BF 層の面をスムーズにして壊さないようにするため。
3. BF を採取するとき赤血球を混入させること。
4. EasyEights™ (ST-18103) BigEasy(ST18001)を使用するときは必ず 14 mL のポリスチレン製丸底チューブを使用してください。10 mL チューブ等など直径のあわないチューブを使用すると、収量が落ちます。
5. 300g、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からです。
6. 分離には D-PBS(-)をお勧めしますが、STEMCELL Technologies 社の RoboSep™ Buffer (ST-20104) を代替で使用することもできます。
7. EasyEights™を用いて細胞分離をする際にセロロジカルピペットと電動ピペッターを使用してください。
14 mL チューブを使用する場合、10 mL 血清ピペット (ラベル：橙色) を推奨します。

※セロロジカルピペットと電動ピペッター

