

RosetteSep Technical Tip

Buffy Coat Procedure



RosetteSep は全血での使用に最適化されていますが、Buffy Coat から細胞濃縮が可能です。その場合、下記の条件を満たす必要があります。

- ・ 有核細胞濃度が、 5×10^7 cells/mL 以下である
- ・ 有核細胞 1 つに対して少なくとも 30 の赤血球が存在している

このプロトコールを使用することによりこれまでのおよそ 10 倍の細胞を処理することが可能です。また、プロトコールが適応可能な細胞と対象となる商品は下記 Table.1 をご参考下さい。

Table.1 対象の細胞と商品

対象細胞	商品コード	商品名
T Cell	ST-15021/15061	RosetteSep Human T Cell Enrichment Cocktail
CD4+ T Cell	ST-15022/15062	RosetteSep Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail
CD8+ T Cell	ST-15023/15063	RosetteSep Human CD8+ T Cell Enrichment Cocktail
B Cell	ST-15024/15064	RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail
NK Cell	ST-15025/15055	RosetteSep Human NK Cell Enrichment Cocktail
Total Lymphocyte	ST-15223/15263	RosetteSep Human Total Lymphocyte Enrichment Cocktail
Monocytes	ST-15028/15068	RosetteSep Human Monocyte Enrichment Cocktail
Granulocytes	ST-15121/15161	RosetteSep Human Granulocyte Enrichment Cocktail

必要な試薬:

推奨メディウム

2% FBS 入り PBS (Ca⁺⁺、Mg⁺⁺を含まない物)

比重液

比重液は RosetteSep DM-L あるいは Ficoll-Paque を利用して下さい。

RosetteSep DM-L (ST-15705)-----リンパ球濃縮用。

Ficoll-Paque (ST-07957)-----すべてに使用可。(リンパ球濃縮では RosetteSep DM-L が好ましい。)

重要: サンプル、メディウム、比重液が全て室温になっている事を確認して操作を始めて下さい。

A. 全血からの Buffy Coat 調整

1. 全血サンプルをブレーキをかけずに、室温、 $200 \times g$ で 10 分間遠心する。
2. 濃縮白血球バンド (これがバフィーコート) を少量の血漿と濃縮赤血球と共に取り除く。
3. 赤血球のカウント: 少量のサンプルを PBS もしくは他の等張液で希釈し、血球計算板で細胞濃度を決定する。カウントされる細胞はほとんどが赤血球である。
4. 有核細胞のカウント: 少量のサンプルを酢酸で 1 : 10 に希釈し、赤血球を溶血させる。細胞濃度を血球計算板で決定する。
5. 二つのカウント数の比が有核細胞 1 に対して赤血球が少なくとも 30 であることを確認する。
6. 有核細胞濃度が 5×10^7 cells/mL を超えないようにサンプルボリュームを調製する。

注: 1.バフィーコート懸濁液はチューブもしくは採血バッグに採取する

2. バフィーコート懸濁液は濃縮白血球の懸濁液であり、単核球の懸濁液ではない。
顆粒球がまだ存在した状態である。
3. 血小板コンタミネーションは血漿の採取を少なくすることで減少させることができる。

B. RosetteSep 使用方法 (for Buffy Coat)

1. バフィーコート懸濁液 1mL に対して 50 μ L のカクテルを加え良く混合する。

注： Cord Blood Progenitor Cocktail(ST-15026, ST-15066)を使用する場合は、オリジナル臍帯血 10mL から得られたバフィーコートに対して 75 μ L の RosetteSep カクテルを加え使用してください。

2. 室温で 20 分間インキュベートする。
3. サンプルに対して 2 倍量の PBS + 2%FBS (ST-07905) で希釈し、よく混合する。
4. 比重液の上に希釈したサンプルを重層する。
推奨されている比重液量については、表を参照してください。

推奨される液量とチューブサイズ			
サンプル	PBS + 2% FBS	比重液	チューブサイズ
1 mL	2 mL	1.5 mL	5 mL
2 mL	4 mL	3 mL	14 mL
3 mL	6 mL	4 mL	14 mL
4 mL	8 mL	15 mL	50 mL
5 mL	10 mL	15 mL	50 mL
10 mL	20 mL	15 mL	50 mL

5. ブレーキをかけずに室温、1200 \times g で 20 分間遠心する。
6. 比重液と血漿の間の細胞層を回収する。
7. PBS + 2% FBS で細胞を洗う。
8. 濃縮した細胞は目的に応じて使用可能です。Flowcyte での分析や赤血球の混在が好ましくない場合は塩化アンモニウムを用いて赤血球を溶血する事をお勧めします。

注意事項

- RosetteSep は全血、骨髄、臍帯血での使用に最適化されており、個々の製品に添付されているマニュアルはバフィーコートのためのものではありません。上記のガイドラインはお客様ご自身の操作手順をアシストするための情報としてご使用ください。

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

TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216

技術的なお問い合わせは：TEL 03-3593-3385 E-mail techservice@veritastk.co.jp