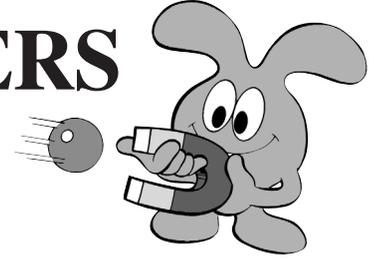


DYNABEADS LETTERS



Dynabeadsを用いた細胞分離

DYNAL HANDBOOK より抜粋：詳細はCell Separation and Protein Purificationのハンドブックを御参照下さい。

1. DYNABEADS の前処理

- 1) DYNABEADS を緩やかに混合して懸濁させる。
- 2) 必要量を試験管に移す。
- 3) 試験管を Dynal MPC に 2 分間静置する。
- 4) 上清を除き、Dynal MPC から試験管をはずす。
- 5) 充分量の Washing Buffer *を直ちに加える。 * 6.参照
- 6) DYNABEADSを緩やかに混合して懸濁させ3) ~ 5) のステップを繰り返す。
- 7) 上清を除いた洗浄後のビーズにWashing Bufferを加え再懸濁させる。

2. 一次抗体結合 DYNABEADS による細胞の分離方法

【目的細胞をビーズに結合させて分離する場合】

- 1) 細胞溶液に洗浄済みのビーズを加える。
細胞の収率をあげる為には『ビーズ濃度の条件』を満たす事が最も重要で、更に『目的細胞に対するビーズの個数の条件』を満たすことが必要です。

ビーズ濃度の条件：目的細胞に結合させて分離する場合は、反応液中のビーズの濃度が最低 1×10^7 個/ml 以上になるようにビーズを加える。

目的細胞に対するビーズの個数の条件：目的とする細胞(ビーズが結合する細胞)1個に対し、ビーズを4個以上**加える。したがって、細胞溶液を調整できる時は目的細胞の最終濃度を 2.5×10^6 個/ml 以上になるように調整し目的細胞1個あたり、ビーズ4個以上を加えると良い。

** DYNABEADS M-280の場合は、5個以上

注) 血液から直接回収する場合など、細胞濃度の調整が困難な場合は、目的とする細胞1個に対し4個以上で必ず最終濃度が 1×10^7 個/ml 以上になるようにビーズを加える。

分離後、ビーズを細胞から剥がす場合 (DETACHaBEADを使用する場合等) 「ビーズ濃度の条件」を満たしていれば、目的とする細胞 (ビーズが結合する細胞) 1個に対しビーズ3~4個で良いようである。ビーズが多すぎない方が剥離効率が良い。

- 2) 適量の DYNABEADSを加えた細胞溶液を穏やかに混合しながら (サンプルミキサーに設置する等) 20 分間4 でインキュベートする。

注) サンプルミキサーがない場合は最低 5 分間に1度緩やかに混合する。

- 3) インキュベート後 MPCに2 分間静置させ、ビーズ・細胞結合物を管壁に集め上清を除去する。
全体の液量が少ない場合、他の細胞の巻き込みを避けるため、インキュベート後にMPC の磁石の高さ位まで buffer を加えてから MPC にセットしてもよい。
- 4) MPCより試験管を外し、Buffer あるいは培地等を加えビーズ・細胞結合物を再懸濁させる。
- 5) 3) ~ 4) を2 ~ 3 回繰り返す。

【不要細胞を除去する場合】

- 1) 細胞溶液に洗浄済みのビーズを加える。
ビーズ濃度の条件 : 不要細胞を除去する場合には、反応液中のビーズの濃度が 2×10^7 個/ml 以上になるようにビーズを加える。
目的細胞に対するビーズの個数の条件 : 不要な細胞の除去を目的とする場合にはビーズが結合する細胞1 個に対し4 個以上**加える。
** DYNABEADS M-280の場合は、5個以上
- 2) 適量の DYNABEADSを加えた細胞溶液を穏やかに混合しながら30 分間4 で(サンプルミキサーに設置する 等) インキュベートする。
注) サンプルミキサーがない場合は最低 5 分間に1 度緩やかに混合する。
- 3) MPC に2 分間静置させ、ビーズ・細胞結合物を管壁に集め上清を除去する。
全体の液量が少ない場合他の細胞の巻き込みを避けるため、インキュベート後にMPC の磁石の高さ位まで buffer を加えてから MPC にセットしてもよい。
- 4) MPC より試験管を外し、Buffer あるいは培地等を加えビーズ・細胞結合物を再懸濁させる。
- 5) 3) ~ 4) を2 ~ 3 回繰り返す。

3. 二次抗体結合ビーズを用いた細胞分離方法

二次抗体結合ビーズを利用する場合、あらかじめ二次抗体結合ビーズに一次抗体を結合してから細胞を加えるdirect 法あるいは、あらかじめ細胞に一次抗体を結合してから二次抗体結合ビーズを加えるindirect 法を用いる事が可能です。

【Dynabeads M-450への抗体の結合.....直接法】

- 1) 10^7 個 (25 μ l) の Dynabeads M-450 を洗浄する。
- 2) 洗浄した Dynabeads に1.5 μ g の抗体を加える*** (精製抗体、ハイブリドーマ培養上清、腹水など) 。
- 3) PBS/BSAで100 μ l に調製して、軽くVortexをかけて混合する。Dynabeads 濃度として、 10^8 - 10^9 個/mlで結合させるのが好ましい。
- 4) ゆっくりローテートしながら、30 分間室温でインキュベートする。
- 5) MPC に2 分間静置させ、ビーズを管壁に集め上清を除去する。
- 6) MPC より試験管を外し、PBS/BSA を加えてビーズを再懸濁させる。
- 7) 5) ~ 6) を4 回繰り返す。各洗浄ステップの間は静かに振って再浮遊させる。
- 8) 細胞分離操作方法は 2. を参照。

***各二次抗体結合ビーズに結合している抗体の性質等の詳細は Cell Separation Handbook のAppendix C (153ページ) を参照して下さい。

【Dynabeads M-280 への抗体の結合……直接法】

10⁷ 個の Dynabeads M-280 あたり、0.8 - 3 μg の特異的二次抗体を加え上記の方法に準ずる。

【間接法】

二次抗体結合ビーズを利用する場合、あらかじめ細胞に一次抗体を結合してから二次抗体結合ビーズを加える indirect 法を用いる事も可能です。

- 1) 細胞試料に一次抗体を加えて 4 ℃ で30 分間 インキュベートする。利用する抗体は標的細胞及び抗原密度等によるが、通常、飽和状態になるように充分量加えることが好ましい。
- 2) 一次抗体で処理した細胞を遠心で集め（例：800 g、10 分間）上清を捨てるあるいは上清中の抗体を測定して抗体の結合量を調べる。
- 3) 一次抗体で処理した細胞をHank's balanced salt solution（HBSS）pH7.4 で洗浄して、結合しなかった抗体を除去する。洗浄操作は少なくとも2 回は行う。
- 4) 抗体で処理した試料に二次抗体結合ビーズを加えて磁石で回収すれば、特異的な抗体の結合した細胞をその他の細胞から分離することができる。細胞分離操作方法は2.を参照。

4. Dynabeads M-280 Streptavidin への抗体の結合

- 1) Dynabeads M-280 Streptavidin を洗浄する。
- 2) 洗浄したDynabeadsにビオチン化抗体を加える。(0.7 ~ 1.5 μg /10⁷個Dynabeads M-280 Streptavidin 程度を目安とする。)
- 3) ゆっくりローテートしながら、30分間 4 ℃ でインキュベートする。
- 4) MPC に2 分間静置させ、ビーズを管壁に集め上清を除去する。
- 5) MPC より試験管を外し、PBS/BSA を加えてビーズを分散させる。
- 6) 4) ~ 5) を4 回繰り返す。各洗浄ステップの間は静かに振って再浮遊させる。

5. DETACHaBEAD を用いたDynabeads の剥離

DETACHaBEADは、DYNABEADS M-450 CD4、CD8、PanB（CD19）、CD34 及びDYNABEADS Mouse CD4（L3T4）に結合したそれぞれの細胞を、迅速かつ緩やかに取りはずすための試薬です。

注)この他の一次抗体結合ビーズには有効なDETACHa BEADがありませんのでビーズの剥離が必要な場合は、CELLlection キットの御利用を御勧めします。二次抗体結合ビーズを用いた場合、使用する一次抗体の種類によってはDETACHaBEADが有効な場合もあります。

DETACHaBEAD は、マウスあるいはラットモノクローナル抗体のFab フラグメントで免疫したヤギあるいはヒツジから得た特定のポリクローナル抗体のグロブリン分画で、DYNABEADS に結合しているモノクローナル抗体のFabフラグメントと反応し、分離した細胞上の抗原決定基との間の相互作用に働いて、細胞を離脱させます。細胞上には抗体が残らず、そのままの細胞を回収できます。また、この抗体は、ヒトIgG、IgM あるいはIgAとの交差反応はありません。

前述の方法に従ってポジティブセレクションされた1 ~ 10 × 10⁶ 個の細胞（DYNABEADS 使用量、3 - 10 個/細胞）から DETACHaBEAD を用いてビーズを剥離する方法は以下の通りです。

- 1) 前述にしたがい、細胞を分離する。
- 2) ビーズ・細胞の結合物を100 μlのwashing buffer あるいは、培地に再浮遊させる。

- 3) DETACHaBEADを1単位 (10 µl) 加え2 秒間ボルテックスをかけて、完全に混合する。
- 4) 室温で静かに混合しながら40 ~ 60 分間インキュベートしてビーズを離脱させる。
注) 20 以下では剥離の効率が悪くなります。37 でインキュベーションしても特に剥離の効率は上がりません。
- 5) 剥離を促進するために細いチップをつけたピペットで5 - 10 回ピペティングしてから試験管を2 分間 MPC にセットして剥離したビーズを集める。
- 6) ビーズから剥離した細胞を含む上清を回収する。
- 7) 残っている細胞を回収するためにビーズを2 - 3 回 washing buffer あるいは、培地で洗い上清を回収する。
- 8) 残存する DETACHaBEADを 除去するために回収したフリーの細胞を再浮遊させ10分間、800 x gで遠心して洗浄する。洗浄操作は2 - 3 回を繰り返す。
注) この時の洗浄が不十分だと、残った DETACHaBEAD がその後のFACSの結果に影響します。
- 9) 希望する容量の buffer あるいは培地に再浮遊させる。

DETACHaBEADで回収された free の細胞は、細胞上には抗体が残らず、細胞は元のままの Phenotype 特異性を示し良好な Purity や Viability が得られます。

ビーズの剥離方法は他にも、酵素を用いた方法やインキュベーションによる方法などが報告されています。詳細はハンドブック、103 ~ 108ページを御参照ください。

6. バッファーと溶液

1) 推奨されるWashing Buffer の例

抗体の結合したダイナビースの洗浄には蛋白質を加えたPBSを利用して下さい。

PBS/FBS 最終濃度2% (w/v) の FBS を PBS に加える。

PBS/BSA 最終濃度0.1% (w/v) の BSA (Fraction V) を PBS に加える。

PBS/HSA 最終濃度0.1% (w/v) の Human Serum Albumin を PBS に加える。

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.16 g		NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.16 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	1.98 g	又は	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	1.48 g
NaCl	8.10 g		NaCl	8.10 g
蒸留水で	1 liter にする。		蒸留水で	1 liter にする。

微少凝血塊と細胞の凝集を避ける事が必要な場合は、クエン酸ナトリウムを 0.6% (w/v) 加えてもよい。

保存剤が必要な場合は、0.02% の NaN₃を加えてもよい。

すべての試薬は生化学用試薬を用い、FBS は細胞毒性試験済みで56、30 分間非動化した物を用いる。

2) 細胞培養培地

RPMI 1640 / 10% FCS 等

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)5593-3211(代) FAX(03)5593-3216