

## CTL 社 PBMC 解凍プロトコール

### <はじめに>

CTL の ePBMC ライブラリからご提供する cryopreserved ePBMC は、その機能を十分に保ったままお届けいたします。cryopreserved ePBMC のバイアルをお受け取りになった後は、直ちに液体窒素容器に移して下さい。ご使用までは、出来る限り液体窒素温度下で保存して下さい。正しい保存条件下では、数年間保存して頂けます。安定した結果を出して頂くため、CTL 社は、Cryopreserved ePBMC に最適な、無血清培地をご用意しています。CTL 社の無血清培地の使用時には、PBMC は低バックグラウンドを保ったまま、より高い T 細胞の抗原特異性を発揮します。また、血清培地でも、同様に PBMC を用いて実験を行って頂けます。その際には、血清のバッチ試験を念入りに行って頂き、血清由来の分裂促進作用や抑制作用が起こらないようにご注意ください。以下に、CTL 社の無血清培地を用いた PBMC の解凍工程を記載いたします。

### <使用する試薬のご案内>

CTL-AA-001 CTL Anti-Aggregate Wash (20x concentration) 1 ml

CTL-AA-005 CTL Anti-Aggregate Wash (20x concentration) 5 ml

(オプション・ELISPOT アッセイを行う場合、培養を行う場合) CTLT-010 CTL-Test Medium (assay, short-term cell culture) 100 ml CTLT-005 500 ml

25030-081 L-グルタミン-200 mM (100×), 液体

メーカー GIBCO

### <製品概要>

本製品は PBMC 解凍時の細胞のアグリゲーションを防ぐ洗浄用メディウムです。

解凍時の細胞の凝集を防ぐほかに、凍結溶解ストレスによって引き起こされる代謝上昇に見合う栄養分を含みます。本製品は DNase、アミノ酸、ビタミン、無機塩類、ヒトアルブミン、などが適切に配合されており、PBMC の生存率を高めるような環境に保ちます。

### <準備>

コンタミのリスクを最小限にするために、温める際の恒温槽はビーズバスをおすすめしますが、ウォーターバスもお使いいただけます。

解凍する PBMC のバイアル 1 本につき、CTL Anti-Aggregate Wash (20x) を 1 ml 用意し、37°C の恒温槽で 10 分間温めて溶かします。解凍後、19 ml の RPMI-1640 を加えて 20 倍希釈してください。この希釈後の 1x 溶液は、PBMC バイアル 1 本に対し、20 ml 必要となります。

同時に解凍処理可能な CTL ePBMC は同ロット 4 本までです。(50 ml のコニカルチューブにプールするため、最大液量を 40 ml に抑えることが推奨されます。)

最良の結果のためには、本製品を準備した後で、1 時間以内にご使用下さい。ご使用されるまで、希釈した本製品の入ったチューブのキャップを緩め、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 20 分以上静置して、pH と温度を調整します。

### <オプション・CTL-TEST™ 溶媒の準備>

CTL-TEST™ Medium には、使用する直前に全量に対して 1%の L-glutamine を添加して下さい。冷凍保存されている L-glutamine を解凍して 1 vol %添加し、終濃度を 2mM に調製します。(ex.500 ml の CTL-TEST™ Medium には、5 ml の 200 mM L-glutamine を添加する)。

PBMC へ加える前に、CTL-TEST™ Medium(L-glutamine 添加済)は容器の蓋を緩めた状態で、37°Cの CO<sub>2</sub> インキュベーターで 20 分以上静置し、pH と温度を調整します。L-glutamine を添加済みの CTL-TEST medium の取扱いに関しまして、実験中は、容器をアルミホイル等で遮光することをお勧めします。また、ご使用後は 4°Cで保存いただけます。

### <PBMC 解凍プロトコール>

1. 凍結 PBMC が入ったバイアルを 37°Cの恒温槽で急速に温めます。
2. バイアルを 2 回 転倒混和し、PBMC を懸濁させます。
3. 1 ml のピペットを用いて、バイアル中の細胞溶液をすべて 50 ml のコニカルチューブに移します(チューブにサンプル ID のラベルを貼っておきます)。
4. バイアルに残った細胞を回収するため、準備しておいた 1×CTL Anti-Aggregate Wash™溶液(37°C)を 1 ml、バイアルに入れ、再び回収して 3 のチューブに移します。
5. 10 ml ピペットを用い、1×CTL Anti-Aggregate Wash™(37°C)8.5 ml を 3 のチューブに入れます。このとき最初の 3 ml はチューブを穏やかに回しながらゆっくり加えます(1 ml/5 秒)。残りの 5 ml は少し早く加えます。これで、PBMC は～10 ml 溶液に懸濁している状態になります。
6. 細胞溶液を室温で 330g 10 分間、急速加速、急速減速設定で遠心分離します。
7. 遠心が終わりましたら、上澄みを捨て、チューブをタップして細胞を懸濁させます(ピペッティングやボルテックスにかけるとは避けて下さい)。37°Cの 1×CTL Anti-Aggregate Wash™を 10 ml 添加します。その後、キャップをしっかりとしめ、バイアルを 2 回転倒混和します。このサンプル中の細胞数を計測して下さい
8. 細胞溶液を室温で 330g 10 分間、急速加速、急速減速設定で遠心分離します
9. 遠心操作後、上澄みを捨て、チューブをタップして細胞を懸濁させます。その後のアッセイに則した 37°Cの CTL-Test™ Medium を加え、濃度を調整します(ELISPOT アッセイの場合:1 ウェルあたり  $3 \times 10^5$  個/100  $\mu$ l の PBMC をまく場合なら  $3 \times 10^6$  / ml に調整します)。

上述のプロトコルは、“Optimal Thawing of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Use in High-Throughput Human Immune Monitoring Studies,” Cells, 2012. 1:313–324. Ramachandran, et al.に記載された、理想的な解凍条件から決定したものです。

CTL は ePBMC の“overnight resting”を推奨しませんが、解凍後の細胞が正常であることを確かめております (“Resting of Cryopreserved PBMC Does Not Generally Benefit the Performance of Antigen-Specific T Cell ELISPOT Assays,” Cells, 2012. 1:409–427. S. Kuerten, et al.)。

ELISPOT アッセイと PBMC に関する、映像資料を ImmunoSpot® チャンネルにご用意しております。是非お役立て下さい。(http://www.youtube.com/user/ImmunoSpot)