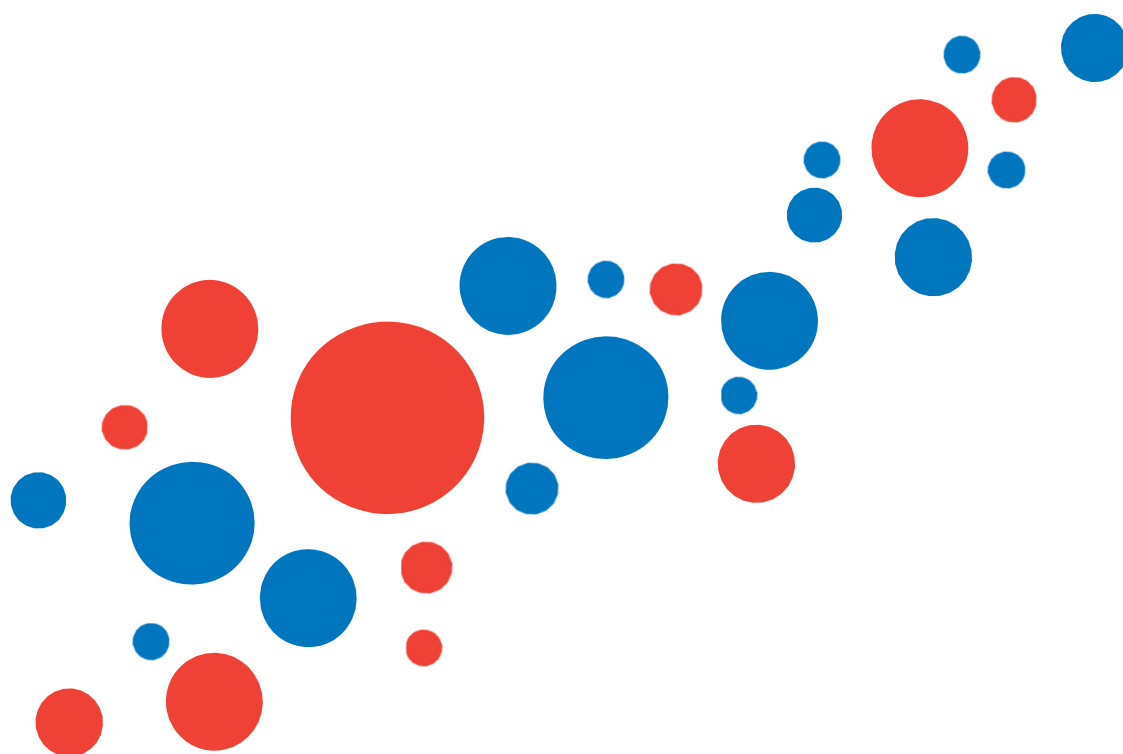


IMMUNOSPOT[®]

High content ELISPOT

Human PBMC

単離・保存・解凍ガイド





プロトコール: 全血から PBMC を単離する

静脈血の採血: 抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを使用します。完全に混合します。採血後出来るだけ早く（24 時間以内に）処理を行います。処理前に保存が必要な場合は、室温で遮光をし、振とう機にかけて保管してください。細胞は常に 20～37℃で保存し、冷蔵しないでください。

細胞の計数: CTL-LDC™ 試薬 (CTL-LDC-100) など、生細胞と死細胞を区別する蛍光色素を用いて細胞数をカウントします。

使用する試薬

Ca²⁺フリーPBS

Ficoll®または市販の Ficoll®精製用キット

CTL-Wash supplement 10X （品番 CTL-W-010）

RPMI-1640 培地

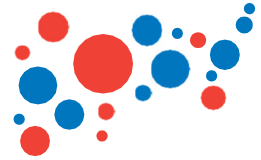
（推奨）L-グルタミン-200mM（100×）

凍結保存する場合：CTL Cryo ABC Kit（品番 CTLC-ABC）

準備: CTL-Wash supplement （品番 CTL-W-010）を市販の RPMI-1640 で 10 倍に希釈します。

（推奨）L-グルタミンを添加し、1%濃度に調整してください。

1. 個々のドナーのヘパリン化された血液とCa²⁺フリーPBSとを1:1で希釈します。（例えば、15 mL の血液に15 mLのPBSを追加）PBSは室温（20～37℃）でなければなりません。チューブ/フラスコを2回反転させてゆっくりと混ぜます。
2. 滅菌した50 mLのコニカルチューブに、15 mLのFicoll®を加えます。2層が混ざらないように、滅菌した血清用ピペットを使用して、希釈した血液30 mLをFicoll®の層に静かに重ねます。あるいは、希釈した血液をFicoll®の上に静かに注ぎ入れるか、または先に希釈した血液を添加し、血清用ピペットを用いてFicoll®を下層に注ぐこともできます。この様子はCTL社のYoutubeチャンネルでご覧いただけます。 (<https://www.youtube.com/watch?v=vwCV3ZoztjA>)
3. チューブの重量バランスに注意し、試料を 740x g 室温で 30 分間遠心するか、またはFicoll®精製キットの製造元の指示に従って遠心します。ゆっくりと加速し、グラジエントが混ざらないようにしてください。減速によって密度勾配が乱されないようにブレーキをOFFにしてください。
4. 遠心停止後、直ちに血漿/Ficoll® の中間層にある単核細胞を回収し、滅菌した 新しい50 mL コニカルチューブに移します。細胞を回収する際には、できるだけFicoll®を吸引しないようにしてください。最大2本の50 mLチューブから回収した中間層の細胞溶液を1本のチューブにまとめることができます。Ficoll®の割合が高すぎると（>5 mL）、重大な細胞損失が発生します。チューブに37℃の希釈済みCTL-Wash supplementを45 mLのマークまで充填します。（注意）この段階でCa²⁺フリー



- 一のPBSを使用すると、細胞の生存率や機能が低下したり、細胞が凝集したりする可能性があります。
- 細胞を再び遠心し、今度は330x g、室温で10分間遠心します。加速度は高くし、遠心ブレーキはONにしておきます。遠心分離が完了したら、上清を慎重にデカンテーションして廃棄します。塊が見えなくなるまでチューブを叩いて細胞ペレットを再懸濁させます。せん断力の発生により細胞を損傷するので、細胞をボルテックスにかける、ピペッティングする等はしないでください。また細胞を長時間（1分以上）ペレットに入れたままにしないでください（ペレット化した細胞は、すぐに再懸濁しないと死滅し始めます）37°Cの希釈済み CTL-Wash supplement（またはCTL-Test™ mesium）を50 mLのチューブに5 mLずつ速やかに加えます。
 - 同じドナーの細胞をプールし、細胞を数えます（上記のセルカウントを参照）。細胞の収量は、採血された血液の各 mLに対して $1-2 \times 10^6$ PBMCが妥当です。温めたCTL-wash™（またはCTL-Test™）Mediumを45 mLのマークまで注ぎ、ブレーキをONで10分、330x gで遠心します。
 - 上清をデカンテーションで除去し、以下のどちらかのオプションに従ってください。
オプション1 - ELISPOT アッセイのために細胞を播種する場合は、プレートに直接添加するために希望する濃度の2倍の濃度で37°C CTL-Test™メディウムに細胞を再懸濁する。
オプション2 : PBMC を凍結保存する場合は、細胞濃度を 20×10^6 / mL（最終濃度の2倍）に調整し、温めた CTL-Cryo™ C に細胞を再懸濁する。
 - PBMCをすぐにELISPOTアッセイで使うことができない場合は、プレートに播種するまでチューブの蓋を緩めた状態で37°CのCO₂インキュベーターに細胞を入れておきます。最適な機能性と生存率を得るためには、PBMC 単離後、可能な限り速やかにプレーティングまたは凍結されることをお勧めします。

プロトコール: 単離した PBMC を凍結保存する

CTL Cryo ABC Kit（品番 CTLC-ABC）を利用した PBMC の凍結保存

凍結する際には、細胞透過性、試薬の毒性、および冷却速度をそれぞれの細胞タイプごとに考慮する必要があります。DMSO によって引き起こされる浸透圧（DMSO の固有毒性よりも）は、PBMC の凍結と解凍のために制御する必要がある主要な要因の一つです。細胞が浸透圧とその膜脂質の流動性を補うことができるように、細胞の代謝活性を維持することが重要です。すべての試薬は室温（好ましくは 37°C）で使用する必要があります。

準備:

- CTL-Cryo™ A と CTL-Cryo™ B を 80%対20% (v/v) の比率 (4:1) で混合するために、CTL-Cryo™ B をゆっくりと CTL-Cryo™ Aに添加します。（CTL-Cryo™ B には DMSO が含まれていますの



で、同梱の SDS を参照してください) CTL-Cryo™ A-B 混合液を 0.22 μ m のフィルターでろ過します。

- CTL-Cryo™ A-Bは室温 (37°Cが望ましい) に温め、細胞を含むCTL-Cryo™ CはCO₂インキュベーターに入れてください。(前項 7. オプション2からの続きです)

このステップはFicoll®グラジエントで精製している間に、このステップを開始することをお勧めします。

- 各クライオチューブの細胞数は約10-15x10⁶となるように調整します。1本のチューブあたりの細胞数を多く凍結させると、細胞が失われる可能性があります。予測される細胞数に基づいて、サンプルごとに適切な数のクライオチューブにラベル付けします(採血した血液の mLあたり1-2x10⁶ PBMCを想定しています)。

Ficoll 精製、洗いの後の手順:

- Ficoll® 精製および洗浄後、温かいCTL-Cryo™ CにPBMCを再懸濁し、細胞濃度を20x10⁶/mL (または最終濃度の2倍濃度) に調整します。(前項の7. オプション2の工程です)
- ピペットを使用せず、泡を立てないようにチューブをはじくように細胞を穏やかに混合します
- ゆっくりと、約2分間かけて、PBMCを含むCTL-Cに同量の温めたCTL-Cryo™ A-Bミックスを加えます。(2つの溶液を完全に混合するためにチューブを静かに回転させながら、CTL-Cryo™ A-Bミックスを一滴ずつ追加します)。
- 事前にラベリングされたクライオバイアルにPBMCを含むCTL-Cryo™ A-B-C懸濁液を分注します。せん断力を最小限に抑えるために、穏やかにゆっくりと分注します。このときピPETTINGで余分な混合をすることは避けて下さい。
- クライオバイアルをプロパノールが充填された室温のクライオフリージング容器 (Nalgene® Mr.Frosty 等) に入れ、-80°Cの冷凍庫に移して最低12時間保存します。この間は冷凍庫を開けないでください。サンプルの揺れや開封による冷凍庫の温度変動を防ぐため、-80°Cの専用ディープフリーザーをご利用ください。
最適な機能性と生存率は、細胞を凍結保存容器内のクライオバイアルに移し、-80°Cの冷凍庫に遅滞なく入れたときに得られます。
- 12-48時間経過した後、クライオバイアルを細胞保存用の液体窒素タンク (気相) に移して保管します。



プロトコール: PBMC を解凍する

<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 CO₂ 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 CO₂ 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ことは避けて下さい)。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 3×10^5 個/100 μ l の PBMC をまく場合なら 3×10^6 /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)



プロトコール：PBMCをELISPOT アッセイに利用する

1. CTL-Test™培地で希望の濃度に調整した PBMC を、37°C CO₂ インキュベーターに入れ、チューブの蓋を少し緩めた状態で播種するまで保管します（細胞を入れたチューブをクリーンベンチに置く時間は出来るだけ短くしてください）。
2. 抗原または任意の薬剤を先にELISPOTプレートに添加します。細胞を添加する前に、プレートを37°C CO₂インキュベーターに10分以上入れ、インキュベーターの温度とCO₂レベルに平衡化させます。
3. 広口径ピペットチップで細胞を播種します。細胞はチューブ内に沈降しており、すぐに再沈殿するので、プレートに撒く前に穏やかに細胞を再懸濁させてください。プレートをインキュベーターに入れる前に、プレートの上面と底面をしっかりと握って、ウェル内に細胞を均等に分散させるために、プレートを四方から優しくタップします。

細胞を添加したらすぐにプレートをインキュベーターに入れて下さい。プレートを重ねないようにして下さい。

ご不明の点は下記までお問合せ下さい。

株式会社エムエステクノシステムズ

●東日本 TEL (03)3235-0673 FAX (03)3235-0669

●西日本 TEL (06)6396-6616 FAX (06)6396-6644

e-mail: technosales@technosaurus.co.jp

📄 C.T.L 社製品 web ページ

<https://www.mstechno.co.jp/categories/view/10>