

## Human Natural Killer Target cell Visualization Assay (TVA™)

Cat No. NK-TVA-5 (5 plates)

NK-TVA-10 (10 plates)

### キット内容

### 操作手順

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● CTL-TVA™ Dye<br/>10 <math>\mu</math>l (NK-TVA-5)<br/>20 <math>\mu</math>l (NK-TVA-10)</li> <li>● CTL-Wash™ supplement<br/>10X<br/>30 ml (NK-TVA-5)<br/>60 ml (NK-TVA-10)</li> <li>● CTL-TEST™ Medium<br/>150 ml (NK-TVA-5)<br/>300 ml (NK-TVA-10)</li> <li>● CTL-LDC™ Cell Counting Reagent<br/>4 ml (NK-TVA-5)<br/>7 ml (NK-TVA-10)</li> <li>● プレート: 96 well clear, Flat bottom,<br/>5 枚 (NK-TVA-5)<br/>10 枚 (NK-TVA-10)</li> <li>● 96 well clear round bottom<br/>2 枚 (NK-TVA-5)<br/>4 枚 (NK-TVA-10)</li> <li>● 2 室血球計算盤(アナライザー用)<br/>25 枚 (NK-TVA-5)<br/>50 枚 (NK-TVA-10)</li> <li>● Adhesive plate sealing sheets</li> <li>● 取扱説明書</li> </ul> | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;">1. エフェクター細胞の調製 (滅菌条件下)</div> <ul style="list-style-type: none"> <li>a 全血から Ficoll®精製したのちにフレッシュ PBMC を利用する場合、キットの CTL-Wash™ supplement 10X を CTL ヒト PBMC 調製プロトコールに従ってご使用下さい。凍結保存 PBMC を CTL 解凍プロトコールに従って溶解する際、細胞の凝集を防ぐため、CTL Anti-Aggregate Wash™ 20x を使用してください。(本キットには含まれません。カタログ番号 CTL-AA-001/5)</li> <li>b PBMC を遠心分離し、CTL-Test™ Medium に <math>2\sim 3\times 10^6</math> cells/mL の濃度になるように懸濁します。</li> <li>c ポリスチレン培養プレートまたはフラスコで、<math>3.2\text{cm}^2</math> 当たり 1mL の密度で培養し、PBMC を一晩 <math>37^\circ\text{C}</math> で培養します。</li> <li>d 翌日、培養容器から非接着細胞を回収し、遠心分離します。約 <math>0.5\sim 3\times 10^6</math> cells/ml となるように細胞を再懸濁します。</li> <li>e CTL-LDC™ 試薬と CTL Cell Counting Software を用いて細胞をカウントします。(セクション 5 参照)</li> <li>f 遠心分離し、細胞を最終濃度: <math>5\times 10^6</math> cells/ml となるように CTL-Test™ Medium に再懸濁します。</li> </ul> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;">2. ターゲット細胞の TVA Dye 染色(滅菌条件下)</div> <ul style="list-style-type: none"> <li>a <math>2.5\times 10^5\sim 1\times 10^6</math> 個の K562 細胞を 1ml の CTL-Test™ Medium に懸濁し、1 <math>\mu</math>l の TVA™ Dye を直接チューブに加えます。チューブは遮光してください。<b>Note:</b> 4 ドナーのエフェクター細胞に対して約 <math>2.5\times 10^5</math> 個の K562 細胞が必要です。</li> <li>b 静かに混合し、<math>37^\circ\text{C}</math> で 10~15 分間インキュベートします。</li> <li>c 330g で 10 分間遠心し、上清を捨てます。</li> <li>d 細胞を 5ml の CTL-Test™ Medium に懸濁します。</li> <li>e ステップ c) と d) を繰り返し、合計 2 回洗浄して未結合の色素をすべて除去します。</li> <li>f ターゲット細胞を 2ml (最初に使用した K562 1ml あたり) の CTL-Test™ Medium に懸濁します。</li> <li>g CTL Cell Counting ソフトウェアを用いて細胞をカウントします。(セクション 4 参照)</li> <li>h 遠心分離し、染色した K562 細胞を CTL-Test™ Medium に最終濃度 <math>5\times 10^4</math> cells/mL で再懸濁する。</li> </ul> |
|--|---|

- 5 プレートキット 必要なターゲット細胞量 約 20 ml (エフェクター-20 ドナー)

- 10 プレートキット 必要なターゲット細胞量 約 40 ml (エフェクター-40 ドナー)

3. Target Cell Visualization Assay (TVA: 滅菌条件下)

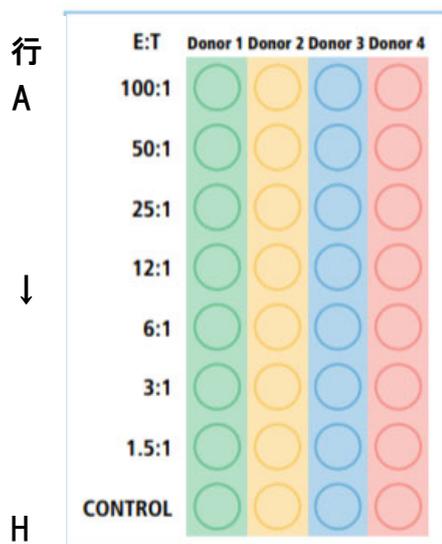


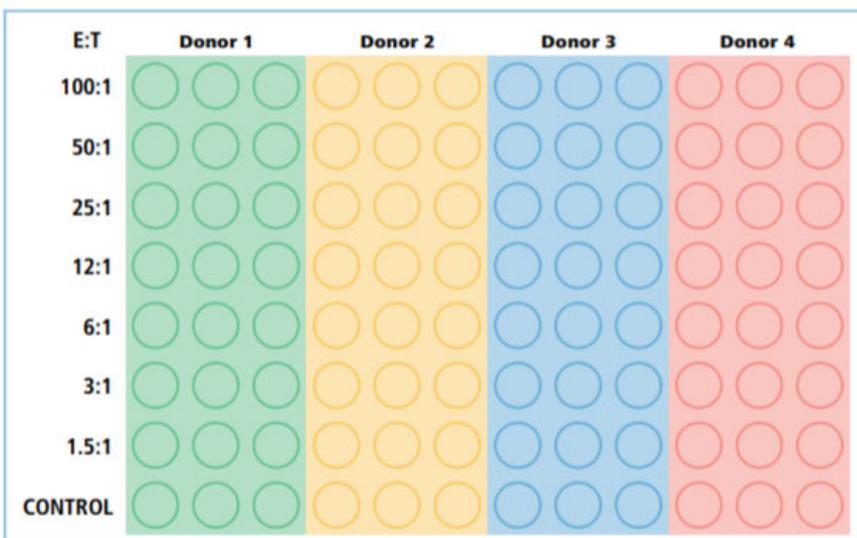
Figure 1: 丸底培養プレートのレイアウト  
5x10<sup>3</sup> K562(T) cells/well + PBMC (E)

- a エフェクター細胞 (セクション 1-f) 100μl を 96 ウェル丸底培養プレートの A 行に加える。Figure 1 で Donor 1 の場合は A1 ウェルに添加する。
- b エフェクター-PBMC の系列希釈を培養プレートの続きの 6 ウェルに調製する。(Donor 1 の場合は B1 から G1 ウェル, 1 ウェル当たり 100μl)
- c 8 番目のウェル(H 行)に CTL-Test™ Medium のみを 100μl 加えます。(コントロール)
- d 染色した K562 (セクション 2-h) 細胞を各ウェルに 100μl ずつ加えます。

**Note:** 培養プレートの未使用部分を次回以降のアッセイ用のために保存したい場合は、粘着性のプレートシーリングシート (付属) を使用し、無菌状態で保存してください。

- e プレートアダプターを用い、330g で 5 分間遠心します。
- f 37°C で 3~4 時間インキュベートします。
- g 細胞をプレート内で再懸濁し、培養プレートの各ウェルから 50μl の細胞溶液を 96 ウェル平底イメージングプレートの対応するウェルに移します。サンプル毎にさらに 2 ウェルずつ繰り返します。(各ドナー Triplicate)

Figure 2: 平底イメージングプレートのレイアウト  
1.25x10<sup>3</sup> K562(T) cells / well + PBMC (E).



- h プレートの側面を軽く叩き、ウェル内の細胞の均一な分布を確認します。
- i ImmunoSpot® S6 Analyzer を使用し、CTL Cell Counting Software の NK-TVA™ アプリケーションを使用して、蛍光 Target K562 細胞を撮影します。

**4. 細胞数計数 - ターゲット細胞 (K562) セクション 2-g で記述されている操作です。**

- a 2-f で調製した細胞を使用します。
- b 細胞計数の直前に、細胞の入ったチューブを 2 回、転倒混和します。
- c チューブから 10  $\mu$ l の細胞懸濁液を取り、キット付属の血球計算盤のチャンバー部分にゆっくりと加えます。チャンバー部分全体に懸濁液が行きわたるように加えてください。
- d この操作を繰り返し、合計 2 つのチャンバーでカウントします。
- e 細胞は、蛍光顕微鏡または適切な ImmunoSpot® Analyzer を用いて数えることができます。(生細胞は励起波長 500nm、発光波長 525nm で緑色に蛍光を発します)。
- f 細胞の計数、品質管理および計算には、ウィザードガイド付き CTL Cell Counting Software と “Tumor Cells” プレートタイプを使用します。

**5. 細胞計数 - エフェクター細胞 (PBMC) セクション 1-e で記述されている操作です。**

- a 1-d で調製した細胞を使用します。
- b 計数する各エフェクターサンプルについて、1 ウェル当たり 50  $\mu$ l の CTL-LDC™ 試薬を別の丸底 96 ウェルプレートに加えます。(キットに含まれるカルチャープレートは使用しないでください。)
- c エフェクター細胞の入ったチューブを、細胞計数の直前に 2 回、転倒混和し懸濁します。
- d 細胞懸濁液を 50  $\mu$ l とり、50  $\mu$ l の CTL-LDC™ 試薬に加え、上下に 3 回ピペティングして再懸濁します。
- e 同じピペットチップを使用して、15  $\mu$ l の細胞と色素の混合液を吸引し、血球計数装置チャンバー部分にゆっくりと加えます。チャンバー部分全体に懸濁液が行きわたるように加えてください。
- f さらに 2 つのチャンバーで繰り返します。(N=3)
- g 細胞は、蛍光顕微鏡または適切な ImmunoSpot® Analyzer を用いて数えることができます。(生細胞は励起波長 500nm、発光波長 525nm で緑色に蛍光を発し、死細胞は励起波長 530nm、発光波長 620nm で赤色に蛍光を発します。)
- h 検体の計数および品質管理と計算には、ウィザードガイド付き CTL 細胞計数ソフトウェアと「PBMC」プレートタイプを使用してください。

**TECHNICAL TIPS**

- ① PBMC を系列希釈した後、マルチチャンネルピペットで標的細胞をプレートの 1 列に同時に添加することが出来ます。
- ② 遠心する場合は、滅菌性を保つためにプレートアダプターを使用し、プレートの側面をテープで固定し誤って蓋が外れないようにしてください。
- ③ 丸底の培養用プレートから平底イメージングプレートに細胞を移す際は、溶液中の細胞を均一にし、腫瘍細胞の凝集を避けるために 5-10 回ピペティングする必要があります。
- ④ プレートの側面をタップするときは、隣接するウェルに溶液が飛散しないように穏やかにタップしてください。
- ⑤ 標準化されたデータを得るためには、CTL 細胞計数ソフトウェアを使用して PBMC と腫瘍細胞の生存率を決定します。ソフトウェアを使うことで、細胞を再懸濁するために容量も計算します。
- ⑥ エフェクター細胞の凝集を避けるために、PBMC を CTL-Wash Medium で洗浄します。
- ⑦ PBMC 内の NK 細胞のポピュレーションを変えることを避けるために、TVA アッセイは無血清の CTL-Test Medium を使用することを強くお勧めします。

- ⑧ 指定された洗浄ステップ、濃度、タイミング要件、および試薬要件からの逸脱は、結果が変更される可能性があります。
- ⑨ アッセイが正常に完了すると、ImmunoSpot アナライザーで撮影した生存腫瘍細胞は緑に表示されます。
- ⑩ ウェルのふちに細胞が偏っているように見える場合は、プレートをアナライザーから取り出し、側面を軽くタップしてください。
- ⑪ ImmunoSpot アナライザーとソフトウェアには客観的な検出、カウント、分析を可能にする高度な機能があります。
- ⑫ ImmunoSpot アナライザーを使用する場合は、細胞計数ソフトウェアと NK-TVA アプリケーションを使用します。ソフトウェアウィザードの指示に従ってカウントを行い、データ解析、Excel シートへのエクスポートを行うことができます。
- ⑬ 細胞と色素の混合液を血球計算版のチャンバーに添加した後、サンプルは 15 分以内にカウントしてください。
- ⑭ 染色された細胞を連続的に露光させるとブリーチングの原因となりますのでお気を付け下さい。サンプルはブリーチングをせずに 5 回程度までカウントすることができます。ImmunoSpot アナライザーの一部モデルでは、カウントが進行していないときはトレイが自動的に排出されます。
- ⑮ Cell Counting Software を使用して細胞をカウントする際には、ターゲット細胞とエフェクター細胞の希釈倍率が異なることに注意してください。