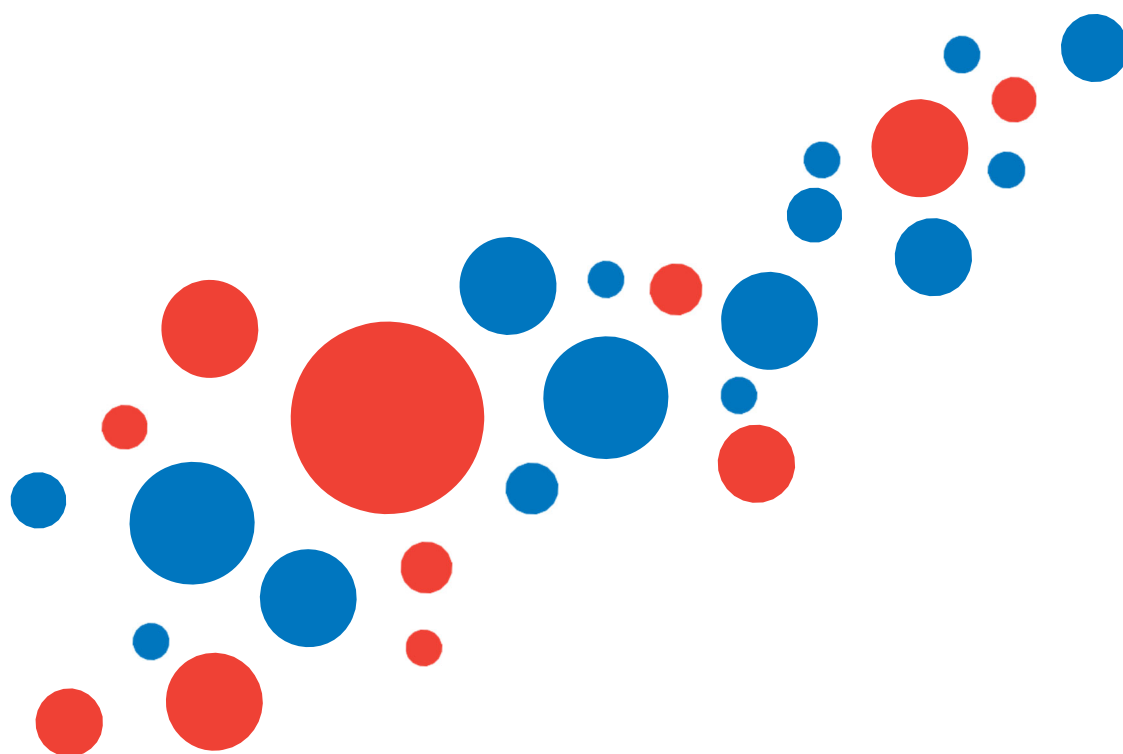


IMMUNOSPOT[®]

High content ELISPOT

Mouse 脾臓細胞

単離・保存・解凍ガイド





はじめに

CTL は、凍結保存された脾臓細胞を使用した標準化アッセイのために、最適化された Serum-free Media プラットフォームを開発しました。その結果、CTL Serum-free プラットフォームを使用して脾臓細胞のアッセイを行うと、バックグラウンドを抑え、優れた抗原特異的 T 細胞応答を得られます。これらの脾臓細胞は、血清を含む培地でも処理して検査することができますが、血清が媒介するマイトジェニックな、または抑制的な効果を避けるために、血清バッチの慎重な選択が推奨されます。以下のプロトコールは、CTL 無血清培地プラットフォームを使用した脾臓細胞の処理、凍結および解凍のための手順を提供します。

プロトコール: 単離

必要な試薬:

CTL-W-010	CTL-Wash supplement 10X	100 ml
RPMI-1640 培地		

(推奨) L-グルタミン-200mM (100×)

凍結保存する場合:

CTL-C-ABC	CTL Cryo™ ABC Kit	10 ml
-----------	-------------------	-------

(1×10^7 cells/ml で凍結保存する場合、10ml キットで約 10×10^7 cells の凍結保存が可能です。

その他の容量: CTL-C-ABC-100, CTL-C-ABC-150, CTL-C-ABC-300, CTL-C-ABC-500

(ELISPOT アッセイを行う場合: CTL 社の ELISPOT キットには CTL-TEST Medium が添付されます)

CTL-T-010	CTL-Test Medium	100 ml
-----------	-----------------	--------

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。

脾臓の摘出: 適切なプロトコールに従い、マウスをサクリファイスします。マウスにエタノールをスプレーし、クリーンベンチの下に移動します。エタノールを吹き付けたペーパータオルの上にマウスを置き、鉗子を使用して、腹部の上に毛皮を持ち上げ、滅菌ハサミを使用して毛皮と表皮を 0.5cm 切開します。もう 1 セットの器具で腹壁を露出させ、皮膚を引っ張ります。鉗子で脾臓を持ち上げ、筋膜から脾臓を分離します。5ml の温めた希釈済み CTL-Wash medium を入れた小さなシャーレに脾臓を入れます。

脾臓の処理: 5cc 滅菌シリンジのストッパーヘッドの平らなエッジで、脾臓を完全にすりつぶします。50ml のコニカルチューブの上部に $50 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュセルストレーナーをセットします。すりつぶした脾臓懸濁液を加えてろ過します。温めた希釈済み CTL-Wash medium を 15ml 添加し、室温、



330x g で 10 分遠心します。このとき急加速、ブレーキは High の設定にしてください。

細胞計数：遠心終了後、10ml の温めた CTL-wash medium を加えます。より正確な細胞計数の方法として、トリパンブルーではなく CTL-LDC. Live/Dead Cell Counting Kit (CTL-LDC-100) のような蛍光 2 重染色法を強くお勧めします。

Note: 細胞を ELISPOT アッセイに使用する場合は、赤血球の溶血処理は不要です。溶血処理によって、細胞の活性に影響を及ぼすことがあります。

プロトコール: 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は、PBMC の凍結と解凍のために制御する必要があります。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:

1. CTL-Cryo™ A と CTL-Cryo™ B を 80%と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。
2. CTL-Cryo™ A-Bは室温 (37°Cが望ましい) に温め、CTL-Cryo™ CはCO₂インキュベーターに入れてください。このステップは細胞計数をしている間に、このステップを開始することをお勧めします。
3. 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。1.8mlのクライオチューブに1mlずつ分注します。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。細胞数に従い、クライオチューブにラベリングをして準備をしておきます。

手順:

1. 細胞計数の後、細胞懸濁液を室温、330x gで10分間、急加速/ ハイブレーキの設定で遠心します
2. 上清をデカンテーションした後、用途によって以下の2通りに進みます。

オプション1 - ELISPOTアッセイのためにこのまま細胞を播種する場合は、チューブを指でタップする操作で細胞ペレットをほぐし、プレートに直接添加するために希望する濃度の2倍の濃度になるよう37°C CTL-Test™Mediumに細胞を再懸濁します。



オプション2：PBMCを凍結保存する場合は、チューブを指でタップする操作で細胞ペレットをほぐし、細胞濃度を 20×10^6 /ml（最終濃度の2倍）にするために温めたCTL-Cryo™ Cで細胞を再懸濁します。次に、ゆっくりと、約2分間かけて、脾臓細胞を含むCTL-C溶液に、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）

3. 事前にラベリングされたクライオバイアルに脾臓細胞を含むCTL-Cryo™ A-B-C懸濁液を1mlずつ分注します。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。このときピペティングで余分な混合をすることは避けて下さい。細胞は、CTL-Cryo™ A-B-C培地中に10～20分間、生存性や機能を失うことなく留まることができます。
4. 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℃の冷凍庫に移して12～48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℃の専用ディープフリーザーをご利用ください。

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

必要な試薬:

CTL-AA-001	CTL Anti-Aggregate Wash (20x concentration)	1 ml
CTL-AA-005		5 ml
(オプション：ELISPOT アッセイを行う場合)		
CTLT-010	CTL-Test Medium (assay, short-term cell culture)	100 ml
CTLT-005		500 ml
25030-081	L-グルタミン-200mM (100×) , 液体 メーカー GIBCO	

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。

準備：

Anti-Aggregate wash の準備：解凍する脾臓細胞のバイアル1本につき、本製品を1 ml 用意し、37℃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。この希釈溶液は、脾臓細胞バイアル1本に対し、20 ml 必要となります。

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℃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。



CTL-Test Medium の準備: CTL-TEST Medium は、L-グルタミンを添加する必要があることを除き、Ready-to-use の培地です。L-グルタミンを解凍し、1 % (vol) （例えば 500ml の CTL-Test Medium に 5ml の L-グルタミンを添加します。L-グルタミンを添加した CTL-Test Medium を 37°C の CO₂ インキュベーターに入れ、キャップを緩めておき 20 分以上静置します。(pH と温度をなじませます) 培地は、実験台の作業中は光から保護する必要がありますので、アルミホイルで包んで下さい。

解凍手順：

1. 凍結脾臓細胞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. 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、脾臓細胞は ~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™ を凍結時の細胞濃度に応じて 5-10 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カウントします。CTL はトリパンブルーではなく、蛍光色素による 2 重染色法カウントを強くお勧めします。
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。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 10×10^4 個 / 100 μ l の細胞を播種する場合は 10×10^5 / ml に調整します）。



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>