

細胞表面マーカーのサンプル調製と染色方法

．各種溶血手順とフローチャート(ヒト全血)

1. Non-wash p. 2
2. Wash p.3

．試薬・材料および検体

1. 試薬・材料 p.4
2. 検体
 - ヒト全血 p.5
 - ヒト骨髄サンプル p.5
 - 単核細胞分離サンプル p.6
 - リンパ節浮遊液 p.6

．直接免疫蛍光法(ヒト全血)

- 1.No-wash
 - (1) TQ-Prep p.7
 - (2) OptiLyse B オーツ社、B.D社フローサイトメーター用溶血試薬 p.8
 - (3) OptiLyse C ベックマン・コールター社フローサイトメーター用溶血試薬 p.9
- 2.Wash
 - (1) TQ-Prep変法 p.10
 - (2) 全血ライジングキット p.11
 - (3) OptiLyse B オーツ社、B.D社フローサイトメーター用溶血試薬 p.12
 - (4) OptiLyse C ベックマン・コールター社フローサイトメーター用溶血試薬 p.13

．直接免疫蛍光法(ヒト細胞浮遊液)

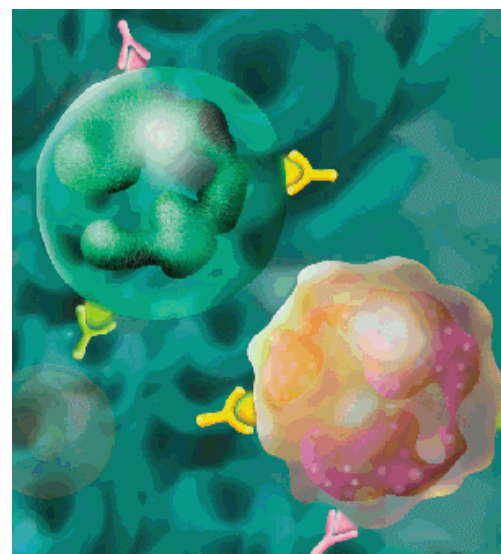
1. 細胞浮遊液の調製 p.14
2. 抗体染色 p.15

．間接免疫蛍光法(ヒト細胞浮遊液およびヒト全血)

1. 細胞浮遊液の調製 p.16
2. 1 カラー抗体染色 p.17
3. 2～5 カラー解析(ビオチン標識抗体 / 蛍光標識抗体) p.18
4. 2～4 カラー解析(精製抗体 / 蛍光標識抗体) p.19

．マウス、ラットのサンプル調製








1. マウス、ラットの細胞浮遊液の作製 p.20
2. 操作
 - 組織の摘出 p.21
 - 浮遊細胞の調製
 - a. 脾細胞 p.22
 - b. 胸腺細胞 p.23
 - c. リンパ節細胞 p.23



各種溶血手順フローチャート








1. No-wash

注)CYTO-STAT、OptiClone で使用できます。

	TQ-Prep (No-wash)	OptiLyse B (No-wash)	OptiLyse C (No-wash)
抗体の反応	抗体規定量 + ヒト全血 100 μ L	抗体規定量 + ヒト全血 100 μ L	抗体規定量 + ヒト全血 100 μ L
	室温 10 ~ 15 分	室温 10 ~ 15 分	室温 10 ~ 15 分
溶血	TQ-Prep にかける	溶血剤 100 μ L	溶血剤 500 μ L
		10 分 室温放置	10 分 室温放置
反応停止		蒸留水 1mL (10 分放置)	PBS500 μ L (15 分放置)
			
測定 (保存時間)	2 ~ 8 で保存 (24 時間以内)	2 ~ 8 で保存 (24 時間以内)	2 ~ 8 で保存 (24 時間以内)

2. Wash

注) いずれの抗体のタイプでも使用できます。

	TQ-Prep 変法(Wash)	全血ランジグ キット	OptiLyse B (Wash)	OptiLyse C (Wash)
抗体の反応	抗体規定量 + ヒト全血 100 μ L	抗体規定量 + ヒト全血 100 μ L	抗体規定量 + ヒト全血 100 μ L	抗体規定量 + ヒト全血 100 μ L
	室温 30 ~ 45 分	室温 30 ~ 45 分	室温 30 ~ 45 分	室温 30 ~ 45 分
洗浄		PBS 2 ~ 3mL 添加 400 \times g、5 分		
		1mL (原液を 25 倍希釈)		
溶血	TQ-Prep にかける		溶血剤 100 μ L	溶血剤 100 μ L
		30 秒 ~ 2 分室温放置	10 分室温放置	10 分室温放置
反応停止		フィクサティブ 250 μ L	蒸留水 1mL (10 分放置)	PBS 500 μ L (15 分放置)
				
PBS で洗浄	PBS 2mL	PBS 2mL		
	400 ~ 450 \times g、5 分	400 ~ 450 \times g、5 分		
PBS で洗浄		PBS 2mL	PBS 2mL	PBS 2mL
		400 ~ 450 \times g、5 分	400 ~ 450 \times g、5 分	400 ~ 450 \times g、5 分
再浮遊	PBS 500 μ L	PBS 500 μ L	PBS 500 μ L	PBS 500 μ L
				
測定 (保存時間)	2 ~ 8 で保存 (24 時間以内)*	2 ~ 8 で保存 (24 時間以内)*	2 ~ 8 で保存 (24 時間以内)*	2 ~ 8 で保存 (24 時間以内)*

*0.5%パラホルムアルデヒド溶液に再浮遊した場合

試薬・材料および検体

1. 試薬・材料

PBS(リン酸緩衝液)

- a. 0.1%アジ化ナトリウム加PBS
(Ca²⁺、Mg²⁺ 不含)

- b. 血清加 PBS

- c. 5%パラホルムアルデヒド加 PBS
ストック溶液

- d. 0.5%パラホルムアルデヒド加
PBS 溶液

自己血漿または
正常ヒト AB 型血漿

マウスイムグロブリン
またはヒト グロブリン

リンパ球比重分離液

溶血試薬

- a. イムノプレップ
(製品番号 7546999)

用手法

- b. OptiLyse B
(製品番号 IM1400)

用手法

- c. OptiLyse C
(製品番号 IM1401)

用手法

- d. 全血ライジング・キット
(製品番号 6603152)

用手法

蒸留水

12x75mm サンプルチューブ

遠心機

Voltex ミキサー

アスピレーター

マイクロピペッタおよびチップ

アイスバス

15mL 遠沈管

細胞洗浄、細胞再浮遊に用います。

- a. アジ化ナトリウム (NaN₃) 不含 PBS:市販 Dulbecco's PBS(-) 使用可

【調製法】

NaCl 8.0g

KCl 0.2g

Na₂HPO₄ 1.15g

KH₂PO₄ 0.2g

NaN₃ 1g

これらを蒸留水 1L に溶解します。

- b. COULTER CLONE 抗体およびヒト骨髄サンプルの希釈に用います。

【調製法】

-a に 2%NBS(新生子ウシ血清)または 0.1%BSA(ウシ血清アルブミン)を加えます。

- c. 【調製法】

1. 5g パラホルムアルデヒドを 1N NaOH 10mL に溶解します。

2. PBS を加えて 80mL にします。

3. 4N HCl で pH7.2±0.1 になるように調整します。

4. PBS を加えて 100mL にします。

- d. 【調製法】

-c を PBS で 10 倍希釈します。

TQ-Prep で溶血するヒト全血検体の細胞濃度を調整する場合に用います。

非特異反応の起こりやすいサンプルの場合にブロッキング試薬として用います。

単核球を分離する場合に用います。

[試薬・材料および検体の 2.検体 単核球分離サンプル](#)を参照してください。

用途に合わせてお選びください。

- a. 自動サンプル調製システム ベックマン・コールター社 TQ-Prep、Q-Prep 用
溶血試薬

- b. オーツ社、B.D 社フローサイトメーター用溶血試薬

- c. ベックマン・コールター社フローサイトメーター用溶血試薬

- d. ベックマン・コールター社、オーソ社、B.D 社フローサイトメーター用溶血試薬

【調製法】

イムノライズ 1 容を PBS 24 容で希釈します(25 倍希釈、用時調製)。1 検体当たり希釈液 1mL 用います。

凍結乾燥製品の溶解および OptiLyse B による溶血処理の際に用います。

製品番号 6199306 または 619930

20 μL 以下用、20 ~ 200 μL 用、100 ~ 1000 μL 用

2. 検体

ヒト全血

EDTA(2K または 3K)またはヘパリン採血したもの。(EDTA 3K 推奨)

注意

全血検体は採血後、室温(20~25)保存し、6 時間以内のものを用いてください。

【白血球数の調整法】

白血球数をCOULTER LH700 シリーズ等の血球計算機にて測定し、 $3 \sim 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ であることを確認します(白血球分画を行う場合は、EDTA採血のみとなります)。

$10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ を越える場合は、検体の希釈が必要です。

TQ-Prepを用いる場合は、検体を同一患者の血漿または正常ヒトAB型血漿で、希釈してください。

その他の溶血試薬の場合は、PBSで希釈してください。

また、 $3 \times 10^3 / \text{mm}^3$ より少ない場合は、遠心してパフィーコートを採取してください。

a. 白血球数が多い場合

a. 白血球数が多い場合 ($> 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$)

白血球数	希釈倍率
10~20($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	2 倍
20~30($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	3 倍
30~40($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	5 倍
40~50($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	6 倍
50~100($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	10 倍
100~200($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	20 倍

注意

白血病やリンパ腫検体で見られるタンパク質異常による非特異結合を減らすには、あらかじめ 37 の PBS で洗浄してください。

b. 白血球数が少ない場合

b. 白血球数が少ない場合 ($< 3 \times 10^3 / \text{mm}^3$)

【パフィーコート法】

1. 検体を 25 で 500×g、5 分間遠心します。
2. 白血球層をピペットで採取します。この際、白血球全部を確実に回収するため、赤血球および血漿も一部回収します。
3. 数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
4. 血球計算機または血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
5. 細胞濃度を $10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ に調整します。

ヒト骨髄サンプル

ヘパリン採血したもの。

【調製法】

1. 血清加 PBS をほぼ等量加え、よく攪拌し、4 で、400×g、4 分間遠心します。
2. 上清を吸引除去し、沈渣に同一患者血漿または正常ヒトAB血漿(TQ-Prep処理の場合)、あるいはPBS(その他のサンプル処理の場合)を加え、細胞濃度を $3 \sim 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ($3 \sim 10 \times 10^6 / \text{mL}$) に調整します(脂肪や異物の混入が著しい場合は、40 μm ナイロンメッシュで濾過してください)。
3. Fc レセプタによる非特異染色が予想される場合は、抗体反応の 10~15 分前にヒト グロブリンを最終濃度 1mg / mL になるよう加えます。表面イムノグロブリンを染色する場合は、ヒト グロブリンは入れないでください。

2. 検体(続き)

単核細胞分離サンプル (比重遠心法)

【調製法】

リンパ球比重分離液を用いて、ヒト全血やヒト骨髓サンプルより単核細胞を分取し、 1×10^7 個/mLに調整します。

1. 15mL 遠沈管にヒト全血(抗凝固剤を含む)を4mLとり、ほぼ等量のPBSを加え、転倒混和します。
2. 別の遠沈管にリンパ球分離液を4mL入れ、その上に1.の希釈血液を重層します。
3. 4 *で、400×g、30分間遠心します。
4. 分離液と血漿の間の層をピペットでとり、別の試験管に移します。
5. PBSを加え、よく攪拌し、4 で、400×g、8分間遠心します。
6. 上清を吸引除去し、沈渣にPBSを加え、よく攪拌し、4 で、400×g、4分間遠心します。
7. 吸引除去し、沈渣にPBSを加え、よく攪拌し、4 で、400×g、3分間遠心します。
8. 吸引除去し、沈渣にPBSを加え、細胞濃度を $1 \times 10^4 / \text{mm}^3$ ($1 \times 10^7 / \text{mL}$)に調整します。
9. Fcレセプタによる非特異染色が予想される場合は、抗体反応の10~15分前にヒトγグロブリンを最終濃度1mg/mLなるよう加えます。**表面イムノグロブリンを染色する場合は、ヒト グロブリンは入れないでください。**

*：リンパ球分離液により遠心時の温度設定や回数が異なります。リンパ球分離液の添付説明書をご参照ください。

注意

末梢血を分離したサンプル中に赤血球が少量残っている場合は、塩化アンモニウム溶血剤で溶血します。

塩化アンモニウム溶血剤

【調製法】

NH ₄ Cl	8.26g / L	これらを蒸留水 1L に溶解します。
KHCO ₃	1.0g / L	
EDTA-4Na	0.037g / L	

IOTest 3 溶血試薬(製品番号 IM3514)が使用可能です。

リンパ節浮遊液

【調製法】

1. 切り取られた組織塊をPBSで洗浄し、付着した血液を除きます。また、組織塊の周辺部は取り除きます。
2. シャーレに少量の培養液を入れ、組織塊を浸してください。幅の広い鉗子で組織を圧搾するか、あるいはピンセットで組織塊を解きほぐすようにすると、培養液中にリンパ球が遊出てきます。また、目の細かい金属メッシュの上に組織塊を置き、2本のメスを鉛直にして組織塊をはさんで交叉し、細切しても結構です。
3. リンパ球が培養液中に充分遊出したら、培養液をピペットで吸い上げ(組織の破片を吸わないように)、遠沈管に移し、数分静置して沈殿物を除きます。あるいは、リンパ球が遊出てきた培養液から比重遠心法によりリンパ球を採取します(☉単核分離サンプル(比重遠心法)を参照してください)。

直接免疫蛍光法(ヒト全血)

1. No-wash

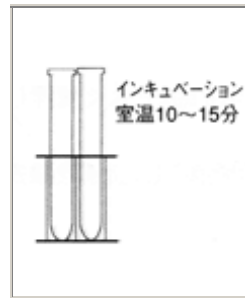
サンプル処理 1~5 カラー解析(FITC / PE / ECD / PC5 または PE-Cy5 / PC7 または PE-Cy7)

(1) TQ-Prep (No-wash)



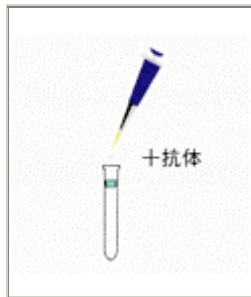
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管(12x75mm)を測定項目数+1本用意し、1本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



4. インキュベーション

室温(20~25)、暗所で10~15分インキュベーションします。




2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



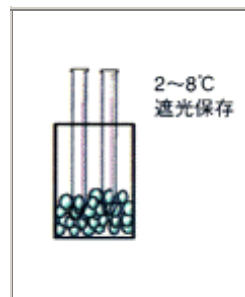
5. 溶血*3

検体をカラーセルにセットします。
TQ-Prep にカラーセルをセットし、のボタンを押します。



3. 検体の添加*2

ヒト全血 100 μL*2を加え、よく攪拌します。
試験管の壁に血液が付着しないよう注意してください。
もし、付着した場合は、濡らした綿棒で拭き取ってください(溶血不良の原因になります)。



6. 測定

そのまま、測定します。
溶血終了後、測定まで2時間以上放置する場合は、2~8℃で遮光保存してください。
24時間以内に測定してください。

*1 1テストあたりの抗体規定量
CYTO-STAT : 10 μL
OptiClone : 20 μL

*2 白血球数が $3 \sim 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ である検体を用いてください。
検体の白血球数の調整は、『試薬・材料および検体』のヒト全血の項(2.検体)をご参照ください。

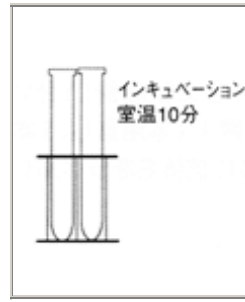
*3 TQ-Prepの詳細な操作は、マニュアルをご参照ください。
B/D社、オーソ社のフローサイトメーターをご使用の場合は、スクリーンの試薬モードを切り替えてください。または、溶血終了後、蒸留水を500 μL添加してください。

(2) OptiLyse B (No-wash) オーソ社、B.D.社フローサイトメーター用溶血試薬 (No-wash)



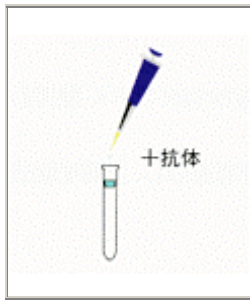
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12x75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



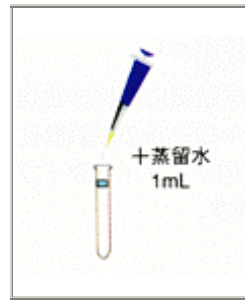
6. インキュベーション

室温(20~25℃)、暗所で 10 分 インキュベーションします。



2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



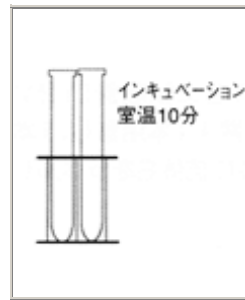
7. 蒸留水の添加

蒸留水を 1mL 加え、よく攪拌します。



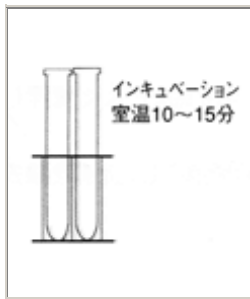
3. 検体の添加*2

ヒト全血 100 μL*2を加え、よく攪拌します。



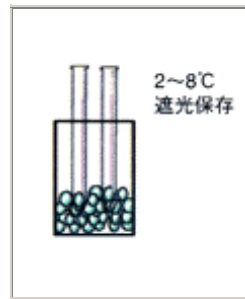
8. インキュベーション

室温(20~25℃)、暗所で 10 分 インキュベーションします。



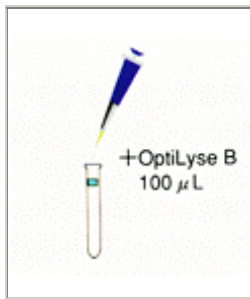
4. インキュベーション

室温(20~25℃)、暗所で 10~15 分 インキュベーションします。



9. 洗浄

そのまま、測定します。溶血終了後は、測定まで2~8℃で遮光保存してください。24 時間以内に測定してください。



5. 溶血剤の添加

OptiLyse B を 100 μL 加え、よく攪拌します。

*1 1 テストあたりの抗体規定量
CYTO-STAT : 10 μL
OptiClone : 20 μL

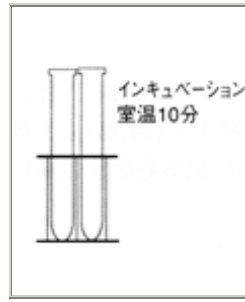
*2 白血球数が $3 \sim 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ である検体を用いてください。
検体の白血球数の調整は、『試薬・材料および検体』の ヒト全血の項(2. 検体) をご参照ください。

(3) OptiLyse C (No-wash) ベックマン・コールター社フローサイトメーター用溶血試薬



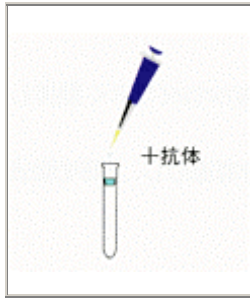
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12×75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



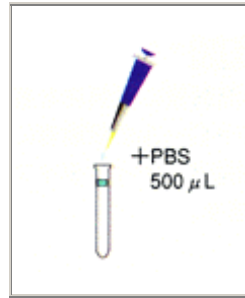
6. インキュベーション

室温 (20 ~ 25 °C)、暗所で 10 分 インキュベーションします。(2 時間までインキュベーション可能です。)



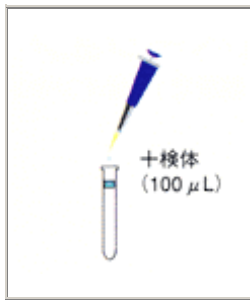
2. 抗体の添加*1

検体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



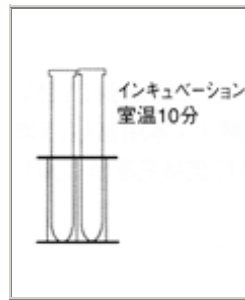
7. PBS の添加

PBS を 500 μL 加え、よく攪拌します。



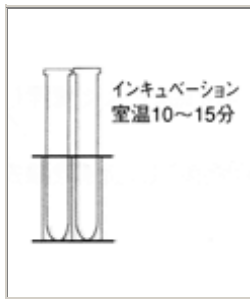
3. 検体の添加*2

全血 100 μL*2を加え、よく攪拌します。



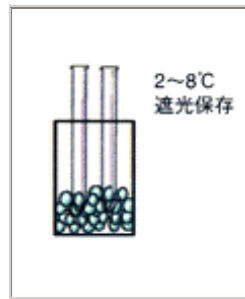
8. インキュベーション

室温 (20 ~ 25 °C)、暗所で 15 分 インキュベーションします。



4. インキュベーション

室温 (20 ~ 25 °C)、暗所で 30 ~ 45 分 インキュベーションします。



9. 測定

そのまま、測定します。溶血終了後、測定まで 2 ~ 8 °C で遮光保存してください。24 時間以内に測定してください。



5. 溶血の添加

OptiLyse C を 500 μL 加え、よく攪拌します。

*1 1 テストあたりの抗体規定量
CYTO-STAT : 10 μL
OptiClone : 20 μL

*2 白血球数が $3 \sim 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ である検体を用いてください。
検体の白血球数の調整は、『試薬・材料および検体』の「ヒト全血の項(2. 検体)」をご参照ください。

2. Wash

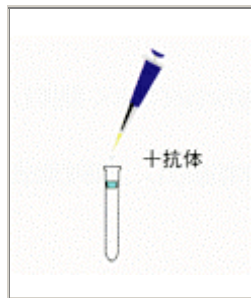
サンプル処理 1~5 カラー解析(FITC / PE / ECD / PC5 または PE-Cy5 / PC7 または PE-Cy7)

(1) TQ-Prep 変法



1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12x75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



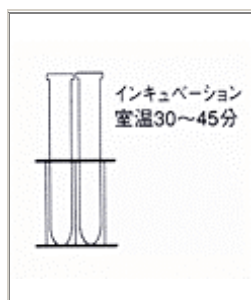
2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



3. 検体の添加*2

全血 100 μL*2を加え、よく攪拌します。試験管の壁に血液が付着しないよう注意してください。もし、付着した場合は、濡らした綿棒で拭き取ってください(溶血不良の原因になります)。




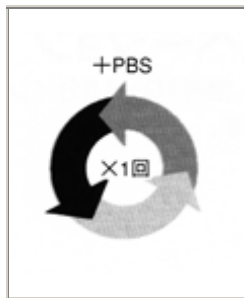
4. インキュベーション

室温 (20 ~ 25 °C)、暗所で 30 ~ 45 分 インキュベーションします。



5. 溶血*3

検体をカラーセルにセットします。TQ-Prep にカラーセルをセットし、 のボタンを押します。



6. 測定

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。400 ~ 450xg、5 分間遠心し、上清を除去します。



7. 測定

PBS 500 μL に再浮遊後、測定まで 2 ~ 8 °C で遮光保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターにて測定してください。すぐに測定できない場合は、0.5% パラホルムアルデヒド PBS 500 μL に再浮遊し、24 時間以内に測定してください。

*1 1 テストあたりの抗体規定量

COULTER CLONE : 使用前に 5 μL に血清加 PBS195 μL の割合で希釈し、200 μL ご使用ください。

CYTO-STAT : 10 μL

OptiClone : 20 μL

IOTest : 20 μL または 10 μL

*2 白血球数が $3 \sim 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ である検体を用いてください。

検体の白血球数の調整は、『試薬・材料および検体のヒト全血の項(2. 検体)』をご参照ください。

*3 TQ-Prep の詳しい操作は、マニュアルをご参照ください。

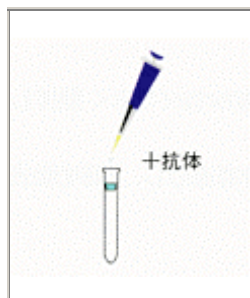
B/D 社、オーソ社のフローサイトメーターをご使用の場合は、スクリーンの試薬モードを切り替えてください。または、溶血終了後、蒸留水を 500 μL 添加してください。

(2) 全血ライジングキット



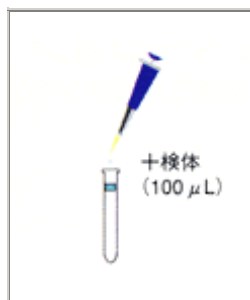
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12x75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



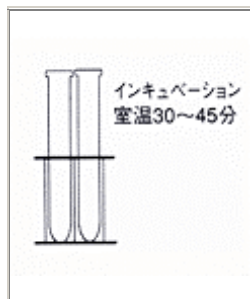
2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



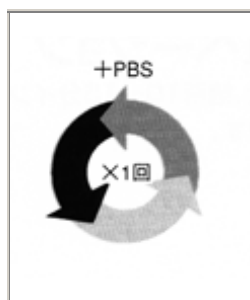
3. 検体の添加*2

ヒト全血 100 μ L*2を加え、Vortexでよく撹拌します。



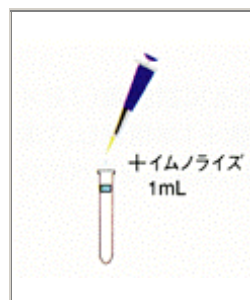
4. インキュベーション

室温 (20 ~ 25)、暗所で 30 ~ 45 分インキュベーションします。



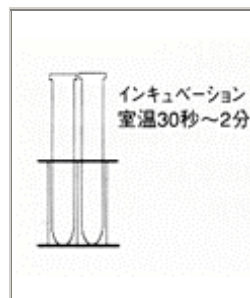
5. 血漿の除去

PBS を 2mL 加え、よく撹拌します。500xg、5 分間遠心し、上清を吸引除去します。もう 1 回、繰り返します。



6. 溶血剤の添加*3

イムノライズ希釈液*3を各試験管に 1mL ずつ加え、よく撹拌します。



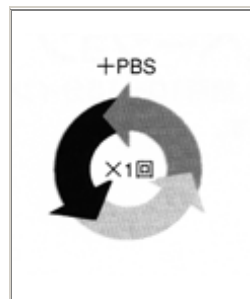
7. インキュベーション

室温 (20 ~ 25) で、30 秒 ~ 2 分インキュベーションします (サンプルの濁りがなくなれば、溶血は完了です)。



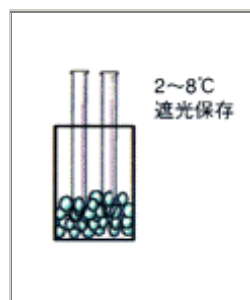
8. 固定剤の添加

キット添付のフィクサティブを 250 μ L 加え、Vortex でよく撹拌します。



9. 洗浄

PBS を 2mL 加え、Vortex でよく撹拌します。400 ~ 450xg、5 分間遠心し、上清を除去します。もう 1 回、繰り返します。



10. 測定

PBS 500 μ L に再浮遊後、測定まで 2 ~ 8 で遮光保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターで測定してください。すぐに測定できない場合は、0.5% パラホルムアルデヒド PBS 500 μ L に再浮遊し、24 時間以内に測定してください。

*1 1 テストあたりの抗体規定量
 COULTER CLONE : 使用前に 5 μ L に血清加 PBS195 μ L の割合で希釈し、200 μ L ご使用ください。
 CYTO-STAT : 10 μ L
 OptiClone : 20 μ L
 IOTest : 20 μ L または 10 μ L

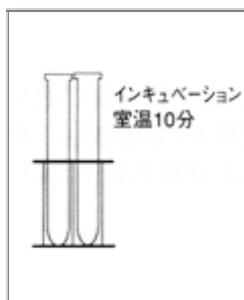
*2 白血球数が 3 ~ 10x10³ / mm³ である検体を用いてください。
 検体の白血球数の調整は、『試薬・材料および検体』の ヒト全血の項(2. 検体) をご参照ください。
 *3 イムノライズ 1 容を PBS 24 容で希釈します (25 倍希釈、用時調製)。
 1 検体当たり希釈液 1mL 用います。

(3) OptiLyse B (Wash) オーソ社、B.D 社フローサイトメーター用溶血試薬



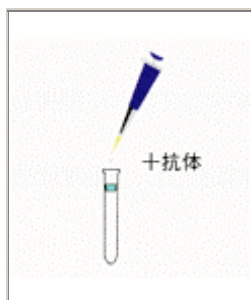
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12x75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



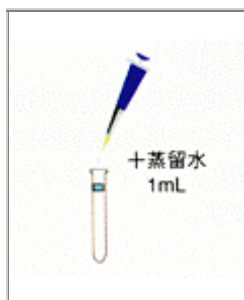
6. インキュベーション

室温(20~25℃)、暗所で 10 分 インキュベーションします。



2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



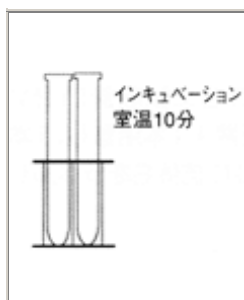
7. 蒸留水の添加

蒸留水を 1mL 加え、よく攪拌します。



3. 検体の添加*2

ヒト全血 100 μL*2を加え、よく攪拌します。



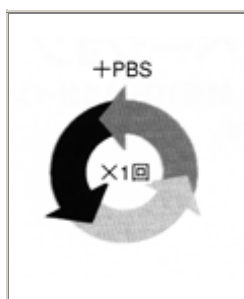
8. インキュベーション

室温(20~25℃)、暗所で 10 分 インキュベーションします。



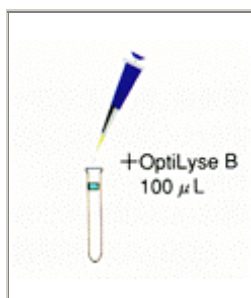
4. インキュベーション

室温(20~25℃)、暗所で 30~45 分 インキュベーションします。



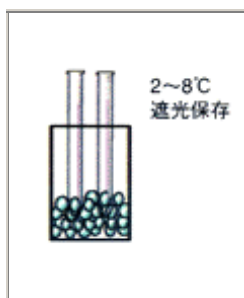
9. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。
400~450xg 5 分間遠心し、上清を除去します。



5. 溶血剤の添加

OptiLyse B を 100 μL 加え、よく攪拌します。



10. 測定

PBS 500 μL に再浮遊後、測定まで 2~8℃ で遮光保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターで測定してください。
すぐに測定できない場合は、0.5% パラホルムアルデヒド PBS 500 μL に再浮遊し、24 時間以内に測定してください。

*1 1 テストあたりの抗体規定量
CYTO-STAT : 10 μL
OptiClone : 20 μL

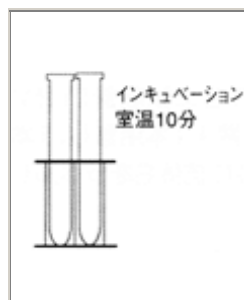
*2 白血球数が $3 \sim 10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ である検体を用いてください。
検体の白血球数の調整は、『試薬・材料および検体』の ヒト全血の項(2. 検体)をご参照ください。

(4) OptiLyse C (Wash) ベックマン・コールター社フローサイトメーター用溶血試薬



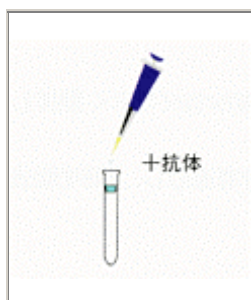
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12x75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



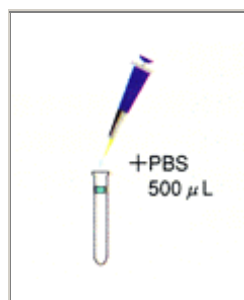
6. インキュベーション

室温 (20 ~ 25 °C)、暗所で 10 分 インキュベーションします。(2 時間までインキュベーション可能です。)



2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



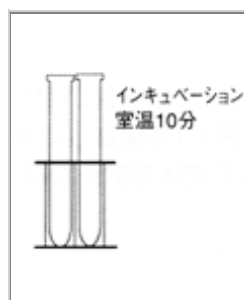
7. PBS の添加

PBS を 500 μL 加え、よく攪拌します。



3. 検体の添加*2

全血 100 μL*2を加え、よく攪拌します。



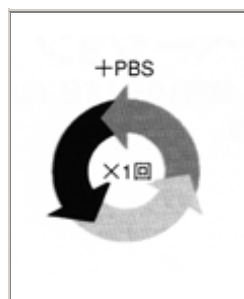
8. インキュベーション

室温 (20 ~ 25 °C)、暗所で 15 分 インキュベーションします。



4. インキュベーション

室温 (20 ~ 25 °C)、暗所で 30 ~ 45 分 インキュベーションします。



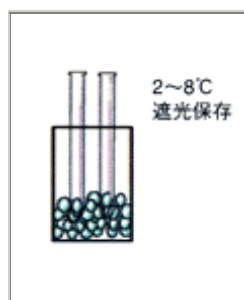
9. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。400 ~ 450xg、5 分間遠心し、上清を除去します。



5. 溶血の添加

OptiLyse C を 500 μL 加え、よく攪拌します。



10. 測定

PBS 500 μL に再浮遊後、測定まで 2 ~ 8 °C で遮光保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターで測定してください。すぐに測定できない場合は、0.5 % パラホルムアルデヒド PBS 500 μL に再浮遊し、24 時間以内に測定してください。

* 1 テストあたりの抗体規定量

- 1 COULTER CLONE : 使用前に 5 μL に血清加 PBS195 μL の割合で希釈し、200 μL ご使用ください。
- CYTO-STAT : 10 μL
- OptiClone : 20 μL
- IOtest : 20 μL または 10 μL

*2 白血球数が 3 ~ 10x10³ / mm³ である検体を用いてください。検体の白血球数の調整は、『試薬・材料および検体』の「ヒト全血の項(2. 検体)」をご参照ください。

直接免疫蛍光法(ヒト細胞浮遊液)

1. 細胞浮遊液の調製

単核細胞分離サンプル
(比重遠心法)

「 . 試薬・材料および検体 単核細胞分離サンプル(比重遠心法)」に従って、サンプル処理を行ってください。ヒト末梢血を分離したサンプル中に赤血球が少量残っている場合は、塩化アンモニウム溶血剤で赤血球を溶血しておいてください。

リンパ節からの浮遊液調整については、「 . 試薬・材料および検体」の [リンパ節浮遊液\(2. 検体\)](#)を参照してください。

【調製法】

リンパ球比重分離液を用いて、ヒト全血やヒト骨髄サンプルより単核細胞を分取し、 1×10^7 個/mLに調整します。

1. 15mL 遠沈管に全血(凝固剤含む)を 4mL とり、ほぼ等量の PBS を加え、転倒混和します。
2. 別の遠沈管にリンパ球分離液を 4mL 入れ、その上に 1.の希釈血液を重層します。
3. 4 *で、400×g、30 分間遠心します。
4. 分離液と血漿の間の層をピペットでとり、別の試験管に移します。
5. PBS を加え、よく攪拌し、4 で、400×g、8 分間遠心します。
6. 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加え、よく攪拌し、4 で、400×g、4 分間遠心します。
7. 吸引除去し、沈渣に PBS を加え、よく攪拌し、4 で、400×g、3 分間遠心します。
8. 吸引除去し、沈渣にPBSを加え、細胞濃度を $1 \times 10^4 / \text{mm}^3$ ($1 \times 10^7 / \text{mL}$) に調整します。
9. Fc レセプタによる非特異染色が予想させる場合は、抗体反応の 10～15 分前に、ヒトγグロブリンを最終濃度 1mg/mL になるよう加えます。
表面イムノグロブリンを染色する場合は、ヒト γグロブリンは入れないでください。

* : リンパ球分離液により遠心時の温度設定が異なります。リンパ球分離液の添付書をご参照ください。

注意

末梢血を分離したサンプル中に赤血球が少量残っている場合は、塩化アンモニウム溶血剤で溶血します。

塩化アンモニウム溶血剤

【調製法】

NH₄Cl 8.26g / L

KHCO₃ 1.0g / L

EDTA-4Na 0.037g / L

これらを蒸留水 1L に溶解します。

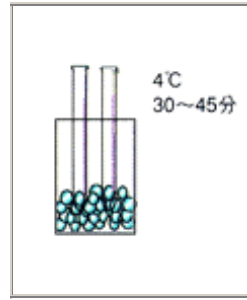
IOTest 3 溶血試薬(製品番号 IM3514)が使用可能です。

2. 抗体染色



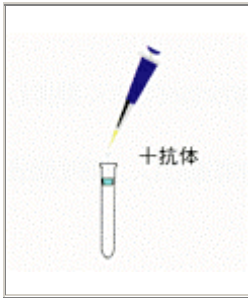
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12x75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



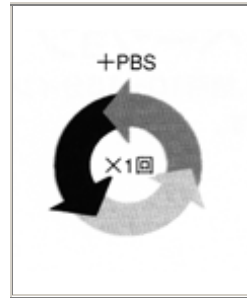
4. インキュベーション

4 で、暗所 30~45 分インキュベーションします。



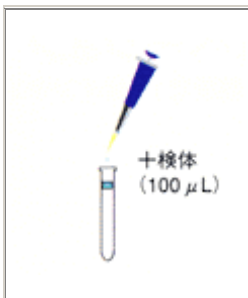
2. 抗体の添加^{*1}

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量^{*1}加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



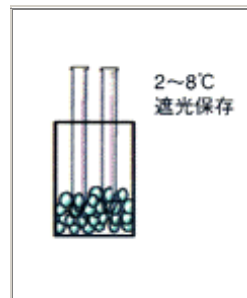
5. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。
400~450xg、5 分間遠心し、上清を除去します。
もう 1 回、繰り返します。



3. 検体の添加

分離単核球サンプル ($1 \times 10^7 / \text{mL}$) を 100 μL 加えます。



6. 測定

PBS 500 μL に再浮遊後、測定まで冷暗所に保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターで測定してください。すぐに測定できない場合は、0.5% パラホルムアルデヒド PBS 500 μL に再浮遊し、24 時間以内に測定してください。

*1 1 テストあたりの抗体規定量

COULTER CLONE : 使用前に 5 μL に血清加 PBS195 μL の割合で希釈し、200 μL ご使用ください。

IOtest : 20 μL または 10 μL

・ 間接免疫蛍光法 (ヒト細胞浮遊液およびヒト全血)

1. 細胞浮遊液の調製

単核細胞分離サンプル
(比重遠心法)

「[1. 試薬・材料および検体 単核細胞分離サンプル\(比重遠心法\)](#)」に従って、サンプル処理を行ってください。末梢血を分離したサンプル中に赤血球が少量残っている場合は、塩化アンモニウム溶血剤で赤血球を溶血しておいてください。

ヒト全血サンプルで分析する場合は「[1. 試薬・材料および検体](#)」の [全血\(2. 検体\)](#)を参照してください。

リンパ節からの浮遊液調整については、「[1. 試薬・材料および検体](#)」の [リンパ節浮遊液\(2. 検体\)](#)を参照してください。

【調製法】

リンパ球比重分離液を用いて、ヒト全血やヒト骨髓サンプルより単核細胞を分取し、 1×10^7 個/mLに調整します。

1. 15mL 遠沈管にヒト全血(凝固剤含む)を4mLとり、ほぼ等量のPBSを加え、転倒混和します。
2. 別の遠沈管にリンパ球分離液を4mL入れ、その上に1.の希釈血液を重層します。
3. 4 *で、400×g、30分間遠心します。
4. 分離液と血漿の間の層をピペットでとり、別の試験管に移します。
5. PBSを加え、よく攪拌し、4 で、400×g、8分間遠心します。
6. 上清を吸引除去し、沈渣にPBSを加え、よく攪拌し、4 で、400×g、4分間遠心します。
7. 吸引除去し、沈渣にPBSを加え、よく攪拌し、4 で、400×g、3分間遠心します。
8. 吸引除去し、沈渣にPBSを加え、細胞濃度を $1 \times 10^4 / \text{mm}^3$ ($1 \times 10^7 / \text{mL}$)に調整します。
9. Fcレセプタによる非特異染色が予想させる場合は、抗体反応の10~15分前にヒトγグロブリンを最終濃度1mg/mLになるよう加えます。**表面イムノグロブリンを染色する場合は、ヒト γグロブリンは入れないでください。**

*: リンパ球分離液により遠心時の温度設定が異なります。リンパ球分離液の添付書をご参照ください。

注意

末梢血を分離したサンプル中に赤血球が少量残っている場合は、塩化アンモニウム溶血剤で溶血します。

塩化アンモニウム溶血剤

【調製法】

NH ₄ Cl	8.26g / L
KHCO ₃	1.0g / L
EDTA-4Na	0.037g / L

これらを蒸留水1Lに溶解します。

IOTest 3 溶血試薬(製品番号IM3514)が使用可能です。

2. 1 カラー抗体染色



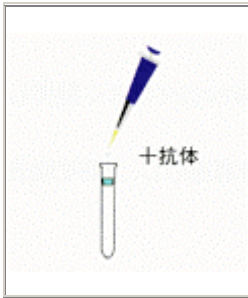
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管(12x75mm)を測定項目数+1本用意し、1本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



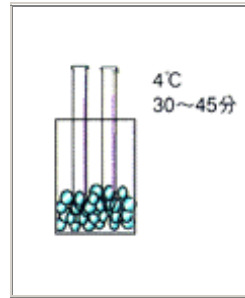
6. 2次抗体または蛍光標識アビジンの添加

精製抗体を用いた場合は、2次抗体の FITCまたはPE標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)F(ab')₂を加えます。または、1次抗体の動物種およびアイソタイプにマッチした2次抗体を加えます。ビオチン標識抗体を用いた場合は、抗体名の試験管に至適濃度に調整した蛍光標識ストレプトアビジンを加えます。



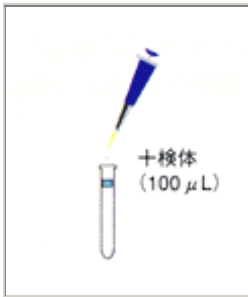
2. 精製抗体またはビオチン標識抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



7. インキュベーション

4 で、暗所 30~45 分インキュベーションします。



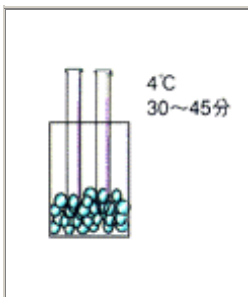
3. 検体の添加

サンプル 100 μLを加え、よく攪拌します。



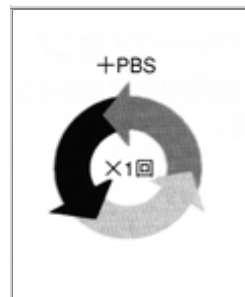
8. 溶血処理(ヒト全血のみ)

ヒト全血検体の場合は、溶血操作を行います。溶血試薬の種類により、目次の直接免疫蛍光法(ヒト全血)をから該当する溶血剤を選び手順をご参照ください。細胞浮遊液の場合は、9へ進んでください。



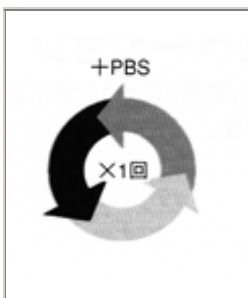
4. インキュベーション

4 で、暗所 30~45 分インキュベーションします。



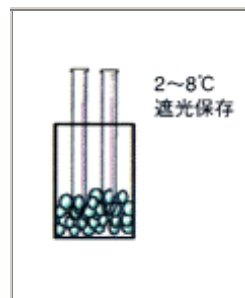
9. 洗浄

PBSを2mL加え、よく攪拌します。400~450xg、5分間遠心し、上清を除去します。



5. 洗浄

PBSを2mL加え、よく攪拌します。500xg、5分間遠心し、上清を除去します。



10. 測定

PBS 500 μLに再浮遊後、測定まで2~8で遮光保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターで測定してください。すぐに測定できない場合は、0.5%パラホルムアルデヒド PBS 500 μLに再浮遊し、24時間以内に測定してください。

*1 1テストあたりの抗体規定量

COULTER CLONE : 使用前に5 μLに血清加 PBS195 μLの割合で希釈し、200 μLご使用ください。

CYTO-STAT : 10 μL

IOTest : 20 μLまたは10 μL

OptiClone : 20 μL

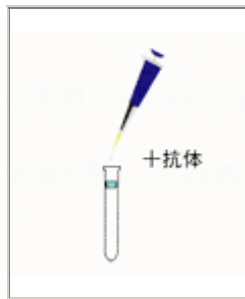
IM : 添付データシートをご参照ください。

3. 2~5 カラー解析



1. 準備

インキュベーション測定する患者検体ごとに試験管(12x75mm)を測定項目数+1本用意し、1本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



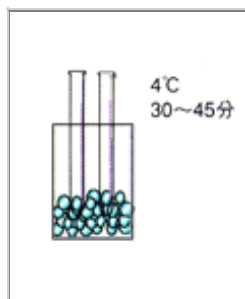
2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管にピオチン標識抗体とFITC、PEまたはPC5標識抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



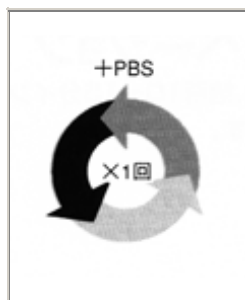
3. 検体の添加

PBSを2mL加え、よく攪拌します。



4. インキュベーション

4で、暗所30~45分インキュベーションします。



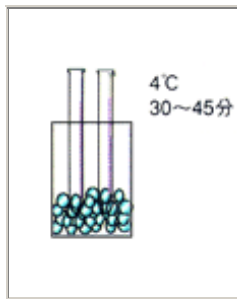
5. 洗浄

PBSを2mL加え、よく攪拌します。400~450xg、5分間遠心し、上清を除去します。



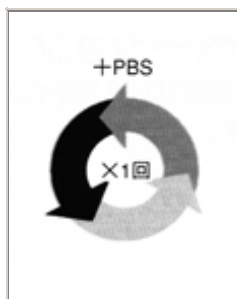
6. 蛍光標識アビジンの添加

各試験管に至適濃度に調整した蛍光標識ストレプトアビジンを加えます。



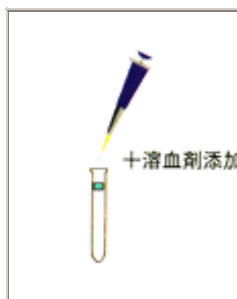
7. インキュベーション

4で、暗所30~45分インキュベーションします。細胞浮遊液の場合は、終了後10へ進んでください。



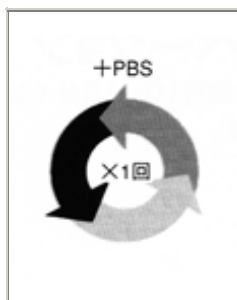
8. 洗浄

400~450xg、5分間遠心し、上清を除去します。サンプル100μLを加え、よく攪拌します。



9. 溶血処理(ヒト全血のみ)

ヒト全血検体の場合は、溶血操作を行います。溶血試薬の種類により、目次の直接免疫蛍光法(ヒト全血)をから該当する溶血剤を選び手順をご参照ください。

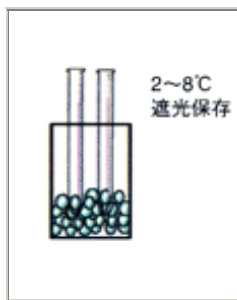


10. 洗浄

PBSを2mL加え、よく攪拌します。400~450xg、5分間遠心し、上清を除去します。もう1回、繰り返します。

11. 測定

PBS 500μLに再浮遊後、測定まで2~8で遮光保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターで測定してください。すぐに測定できない場合は、0.5%パラホルムアルデヒドPBS 500μLに再浮遊し、24時間以内に測定してください。



*1 1テストあたりの抗体規定量

COULTER CLONE : 使用前に5μLに血清加PBS 195μLの割合で希釈し、200μLご使用ください。

IOTest : 20μLまたは10μL

IM : 添付データシートをご参照ください。

4. 2~4 カラー解析



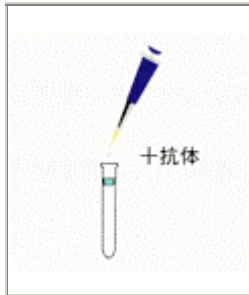
1. 準備

測定する患者検体ごとに試験管 (12×75mm) を測定項目数 + 1 本用意し、1 本にコントロール、残りに抗体名をラベルします。



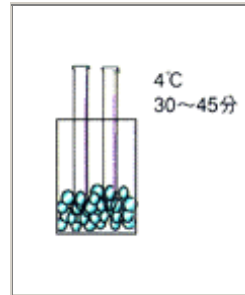
6. 2 次抗体の添加

2 次抗体の FITC または PE 標識 ヤギ 抗 マウス IgG (H + L) F (ab)₂ を加えます。または、1 次抗体の動物種およびアイソタイプにマッチした 2 次抗体を加えます。



2. 抗体の添加*1

抗体名をラベルした試験管に各抗体を規定量*1加えます。コントロールの試験管には、調べたい抗体に対応するアイソタイプコントロールを加えます。



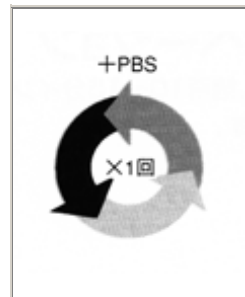
7. インキュベーション

4 で、暗所 30 ~ 45 分インキュベーションします。



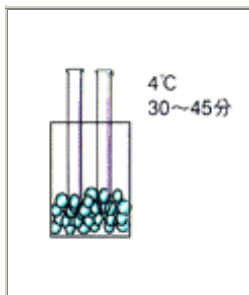
3. 検体の添加

サンプル 100 μL を加え、よく攪拌します。



8. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。400 ~ 450×g、5 分間遠心し、上清を除去します。もう 1 回、繰り返します。



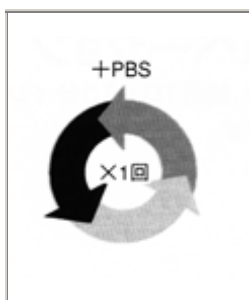
4. インキュベーション

4 で、暗所 30 ~ 45 分インキュベーションします。



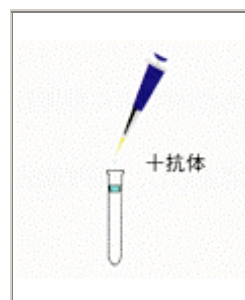
9. 2 次抗体のブロッキング

マウスイムノグロブリン 1mg / mL または、一次抗体と同じ動物種の正常血清を 100 μL 加え、室温 15 分反応させます。



5. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。400 ~ 450×g、5 分間遠心し、上清を除去します。



10. ビオチン標識抗体・FITC または PE、PC5 標識抗体の添加*1

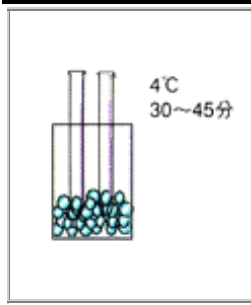
抗体名の試験管にビオチン標識抗体、FITC、PE、PC5 標識抗体を規定量*1加えます。

*1 1 テストあたりの抗体規定量

COULTER CLONE : 使用前に 5 μL に血清加 PBS 195 μL の割合で希釈し、200 μL ご使用ください。

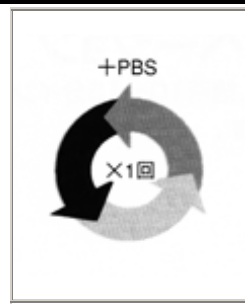
IOTest : 20 μL または 10 μL

IM : 添付データシートをご参照ください。



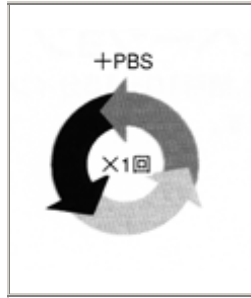
11. インキュベーション

4 で、暗所 30 ~ 45 分インキュベーションします。



15. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。400 ~ 450xg、5 分間遠心し、上清を除去します



12. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。400 ~ 450xg、5 分間遠心し、上清を除去します。もう 1 回、繰り返します。



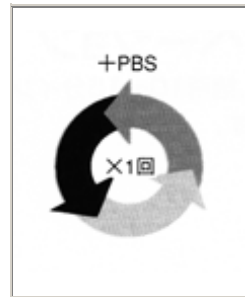
16. 溶血処理(ヒト全血のみ)

ヒト全血検体の場合は、溶血操作を行います。溶血試薬の種類により直接免疫蛍光法(ヒト全血)(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)をご参照ください。



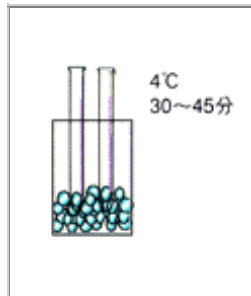
13. 蛍光標識アビジンの添加

ビオチン標識抗体を用いた場合は、抗体名の試験管に至適濃度に調整した蛍光標識streptavidinを加えます。FITC、PE、PC5 標識抗体のみを用いた場合は、15.へ進んでください。



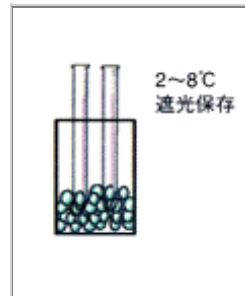
17. 洗浄

PBS を 2mL 加え、よく攪拌します。400 ~ 450xg、5 分間遠心し、上清を除去します。もう 1 回繰り返します。



14. インキュベーション

4 で、暗所 30 ~ 45 分インキュベーションします。細胞浮遊液の場合は、終了後 17.へ進んでください。



18. 測定

PBS 500 μL に再浮遊後、測定まで 2 ~ 8 で遮光保存し、なるべく速やかにフローサイトメーターで測定してください。すぐに測定できない場合は、0.5% パラホルムアルデヒド PBS 500 μL に再浮遊し、24 時間以内に測定してください。

マウス、ラットのサンプル調製

1. マウス、ラット細胞浮遊液の作製

用意するもの

得られた細胞を培養する際は、すべて滅菌済みのものを使用してください。

Hank's BSS (HBSS) または
RPMI-1640(10mM HEPES 加、血
清不含)
ペトリディッシュ(直径5~10cm 程度)
50mL コニカルチューブ
解剖用ハサミおよびピンセット

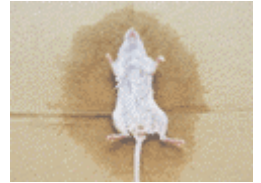
溶血剤(0.83% NH_4Cl)
Tris 塩酸バッファ(20mM、pH6.8)に塩
酸アンモニウムを0.83%濃度に溶解
ピペット
スライドガラス(フロスト付)
40~60 μm ナイロンメッシュ

1. 操作

組織の摘出

組織の摘出

1. 頸椎脱臼などによりと殺したマウスを仰向けにして、全身に消毒用(70%)エタノールをかけます。



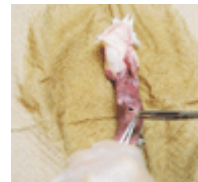
2. 腹部(中心よりやや下の辺り)に解剖用ハサミで切り込みを入れます。



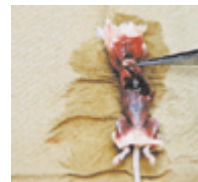
3. 切り込みから上下に引っ張って皮を剥ぎ取ります。



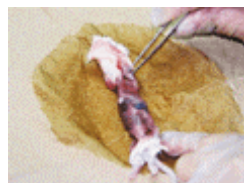
4. 脾臓は左脇腹に位置します。腹膜に切り込みを入れて、摘出します。



5. 胸腺は胸骨の背面(心臓の上に覆い被さるよう)に位置します。胸骨の下辺りからハサミを入れて横隔膜を肋骨から切り離し、肋骨にもハサミを入れたら上方向に捲り上げると心臓の上を覆うようにある白いハート型の組織が胸腺です。心臓を傷つけないように気をつけながら摘出します。



6. 腋窩リンパ節は、腕をバンザイさせた時に腋の下に見える、半透明の組織です。できるだけ脂肪組織は切り取らないように摘出します(ピンセットでつまみ取れます)。膝窩リンパ節は、下肢から剥ぎ取った皮の方にくっついてきます。膝の辺りにあったと思われる皮の部分で、毛細血管が3本交わった中央に、膝窩リンパ節が存在します。



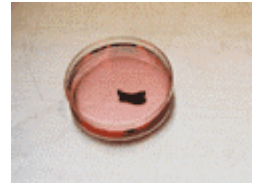
2. 操作(続き)

浮遊細胞の調製

a. 脾細胞

-a. 脾細胞の場合

1. 摘出した脾臓は、冷 HBSS もしくは RPMI-1640 中に保存します。
2. 冷 HBSS を 10 ~ 20mL 入れたペトリディッシュに脾臓を取り出します。
3. ピンセットで脾臓の片側をつまんで、もう 1 本のピンセットの背中で脾臓をしごくようにしてほぐし(脾臓を泳がせるようにしながら)、細胞を分散させます。
スライドグラスを用いる場合は、ハサミで組織をある程度細切し、力を入れすぎないようにフロスト部分ですりつぶします。



4. ピペットで細胞をコニカルチューブに集め、氷中に 5 分間静置します。
-
-
5. ピペットを用いて、沈降した組織塊を入れないように注意しながら浮遊液を別のコニカルチューブに移します。
 6. 300xg、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。
 7. HBSS を 20mL 加え、ピペティング後、300xg、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。
 8. 細胞ペレットをほぐし、溶血剤*を 1 mL 加えてピペティングします。
溶血剤* : 0.83% NH₄CITris 塩酸バッファ (20mM、pH6.8) に塩化アンモニウムを 0.83% の濃度に溶解
 9. 室温で 2 ~ 5 分放置後、冷 HBSS を 20mL 加え、300xg、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。溶血が悪い場合は 8 ~ 9 の操作を繰り返します。
 10. HBSS を 20mL 加え、ピペティング後、300xg、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。
 11. HBSS を 10mL 加え、細胞懸濁液をナイロンメッシュに通します。
 12. 血球計算板等を用いて細胞数をカウントします。
 13. 残りの浮遊液を 300xg、5 分間遠心分離して、上清をデカントまたは吸引除去します。
 14. 細胞濃度が 5 ~ 10x10⁶/mL となるように HBSS を加えて、十分にピペティングを行い、染色まで氷中に保存します。直ちに染色、測定しない場合は、2% FCS を加えてください。

2. 操作(続き)

浮遊細胞の調製

b. 胸腺細胞

-b. 胸腺細胞の場合

1. 摘出した胸腺は、冷 HBSS もしくは RPMI-1640 中に保存します。
2. HBSS を 10 ~ 20mL 入れたペトリディッシュに胸腺を取り出します。
3. ハサミで組織を大まかに細切り、2 枚のスライドガラスのフロスト部分を使ってすりつぶします。
4. ピペットで細胞をコニカルチューブに集め、氷中に 5 分間静置します。
5. ピペットを用いて、沈降した組織塊を入れない様に注意しながら浮遊液を別のコニカルチューブに移します。
6. 300×g、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。
7. HBSS を 20mL 加え、ピペッティングします。
8. 300×g、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。
9. HBSS を 10mL 加え、細胞懸濁液をナイロンメッシュに通します。
10. 血球計算板等を用いて細胞数をカウントします。
11. 残りの浮遊液を 300×g、5 分間遠心分離して、上清をデカントまたは吸引除去します。
12. 細胞濃度が $5 \sim 10 \times 10^6$ /mL となるように HBSS を加えて、十分にピペッティングを行い、染色まで氷中に保存します(直ちに染色、測定しない場合は、2%FCSを加えてください)。

c. リンパ節細胞

-c. リンパ節細胞の場合

1. 摘出したリンパ節は、冷 HBSS もしくは RPMI-1640 中に保存します。
2. HBSS を 10 ~ 20mL 入れたペトリディッシュにリンパ節を取り出します。
3. ピンセットで脂肪組織を取り除き、2 枚のスライドガラスのフロスト部分を使ってすりつぶします。
4. ピペットで細胞をコニカルチューブに集め、氷中に 5 分間静置します。
5. ピペットを用いて、沈降した組織塊を入れない様に注意しながら浮遊液を別のコニカルチューブに移します。
6. 300×g、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。
7. HBSS を 20mL 加え、ピペッティングします。
8. 300×g、5 分間遠心分離を行い、上清をデカントまたは吸引除去します。
9. HBSS を 10mL 加え、細胞懸濁液をナイロンメッシュに通す。
10. 血球計算板等を用いて細胞数をカウントします。
11. 残りの浮遊液を 300×g、5 分間遠心分離して、上清をデカントまたは吸引除去します。
12. 細胞濃度が $5 \sim 10 \times 10^6$ /mL となるように HBSS を加えて、十分にピペッティングを行い、染色まで氷中に保存します(直ちに染色、測定しない場合は、2%FCSを加えてください)。