

Pan T Cell アイソレーションキット（マウス）による細胞分離

オーダー番号: 130-090-861

▲ 原理

非 T 細胞を Biotin-Antibody カクテルと Anti-Biotin マイクロビーズで間接磁気標識する。

MACS Separator の磁場内に置いたカラムに細胞懸濁液をアプライする。

カラムのフロースルー(T 細胞)を回収する。《ネガティブフラクション》

▲ 準備するもの

- バッファー(脱気済): 0.5% BSA, 2 mM EDTA を含む PBS (リン酸緩衝食塩水) pH 7.2 (保冷: 4-8°C)
調製法は、こちらをご覧ください。 ⇒ [【準備】MACSバッファーの調製](#)
- MACS カラムと MACS Separator:
データシートを参照して細胞数と目的に合ったカラムと分離装置をお選びください。
- (オプション)フローサイトメーターまたは蛍光顕微鏡解析のための蛍光標識抗体: [CD90 抗体](#)、または[CD3 ε 抗体](#)、及び[Anti-Biotin抗体](#)など。
- (オプション)フローサイトメーター解析より死細胞を除くための染色試薬:
[PI \(propidium iodide, #130-093-233\)](#)、もしくは 7-AAD (7-Amino-actinomycin D) など。
- (オプション)細胞塊を除去するための[プレセパレーションフィルター\(# 130-041-407\)](#)

▲ プロトコール

1. サンプルの調製

脾臓またはリンパ節から、単細胞懸濁液を調製

⇒ サンプル調製用の英語プロトコールは[こちらをご覧ください](#)

▲脾臓またはリンパ節からNK細胞を調製する場合は、赤血球溶血または密度勾配遠心による赤血球の除去は必要ありません。Biotin-Antibody カクテルには、赤血球特異抗体(Ter-119)が含まれます。

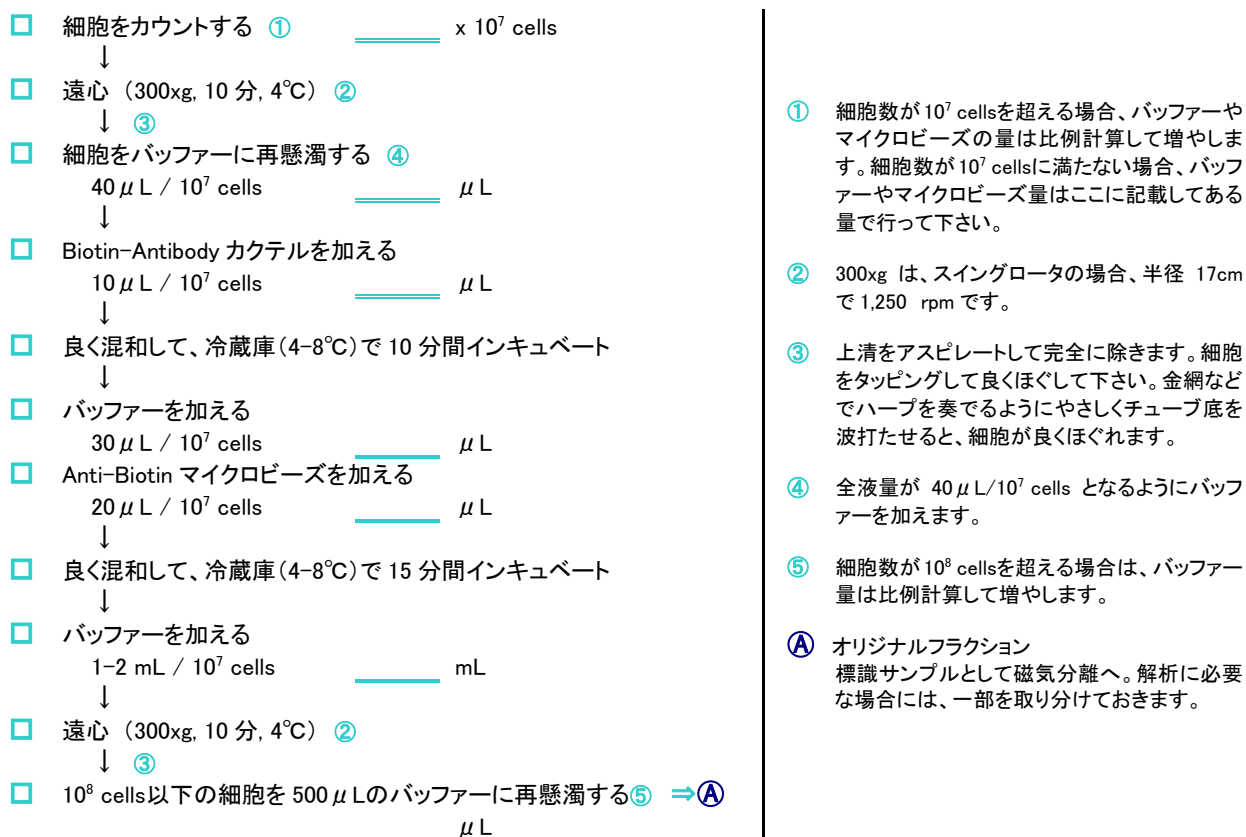
▲死細胞は、非特異的にマイクロビーズに付着する可能性があります。死細胞の除去には、密度勾配遠心、もしくは[死細胞除去キット\(# 130-090-101\)](#)をお勧めします。

2. 磁気標識

★操作は手早く、細胞は常に冷却し、バッファーは前もってよく冷やしてお使いください。これにより、抗体のキャッピングと非特異的吸着を防ぎます。

★室温及び長時間のインキュベートは非特異的な吸着や収率の低下を起こします。また、氷上でインキュベートすると、時間がかかります。インキュベーションは冷蔵庫(4-8°C)で行ってください。

★サンプル中に細胞の塊があると分離精度が低下しますので、単細胞懸濁液にしてください。塊がある場合、[プレセパレーションフィルター\(# 130-041-407\)](#)に通します。プレセパレーションフィルターは使用前に1mLのバッファーを流してフィルターをリンスします。



3. 磁気分離

★カラムに保持させる細胞数により、適したカラムと分離装置を選択してください。

3-1. MS カラム/LS カラムによる磁気分離

- | | |
|---|---|
| <p>□ カラムを MACS Separator の磁場に挿入する ①</p> <p>↓</p> <p>□ カラムを適量のバッファーでリンスする ②</p> <p style="margin-left: 20px;">MS: 500 μL LS: 3 mL</p> <p>↓</p> <p>□ ネガティブフラクション回収用のチューブをセットし、細胞懸濁液をカラムにアプライする ⇒ ③</p> <p>↓</p> <p>□ カラムをバッファーで 3-4 回洗浄する ③ ⇒ ③</p> <p style="margin-left: 20px;">MS: 3x500 μL LS: 4x3 mL</p> <p>↓</p> <p>□ (オプション)カラムを磁石からはずし、ポジティブフラクション回収用チューブの上に置く</p> <p>↓</p> <p>□ (オプション)適量のバッファーをカラムに添加し、添付のプランジャーで磁気標識された細胞を押し出す ⇒ ④</p> | <p>① 詳しくはカラムのデータシートをご覧ください。</p> <p>② リンスした液にはカラムのコーティングが溶け出しているため、捨ててください。</p> <p>③ カラム上部の液が落ちきってから、次のバッファーを加えて下さい。</p> <p>③ ネガティブフラクション
細胞懸濁液のフロースルーとカラムの洗浄液を合わせた T 細胞(非標識細胞)のフラクション</p> <p>④ ポジティブフラクション
間接磁気標識された非 T 細胞のフラクション</p> |
|---|---|

3-2. autoMACS Separator による磁気分離

★autoMACSのマニュアルは、こちらよりご覧いただけます。 ⇒ [マニュアル](#)

★autoMACS Separator、auto MACS Pro Separator にて使用するバッファーは、10°C以上にしてください。

autoMACS Separator

分離ストラテジー	推奨プログラム	アウトレットポート
ディプリーション	Deplete	neg1

auto MACS Pro Separator

分離ストラテジー	推奨プログラム	チューブラック
ディプリーション	Deplete	B

4. (オプション) T 細胞の分離精度の評価

各フラクションから分取したサンプル(フラクション③、④、⑤)を染色することにより、フローサイトメーターまたは蛍光顕微鏡で分離精度を確認することができます。Pan T細胞マーカーに対する蛍光標識抗体([CD90 抗体](#)、または[CD3 \$\epsilon\$ 抗体](#)など)で染色します。Biotin-Antibodyカクテルでの標識は、蛍光標識[Anti-Biotin抗体](#)による対比染色で視覚化できます。