

CD56 マイクロビーズ(ヒト)による細胞分離

オーダー番号: 130-050-401

▲ 原理

CD56⁺ 細胞をCD56 マイクロビーズで磁気標識する。

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 (CD56⁻ 細胞) を回収する。《ネガティブフラクション》

カラムを磁場からはずし、CD56⁺ 細胞を回収する。《ポジ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解析のための蛍光標識抗体: [CD3-FITC\(#130-080-401\)](#)、[CD3-PE\(#130-091-374\)](#)、[CD45-FITC\(#130-080-202\)](#)、[CD45-PE\(#130-080-201\)](#)、もしくはCD56 抗体など。
▲ CD56 抗体は、クローンAF12-7H3 のエピトープとは異なるCD56 エピトープを認識するクローン(例: NCAM16.2)を使用して下さい
- (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—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](#)

抗凝固処理した末梢血、またはバフィコートの場合には、密度勾配遠心法により末梢血単核細胞を調製して下さい。

▲密度勾配遠心後には、血小板を除去して下さい。細胞をバッファーに再懸濁し、遠心(200xg, 10-15分, 20°C)し、上清を注意して取り除きます。この洗浄操作をもう一度繰り返します。

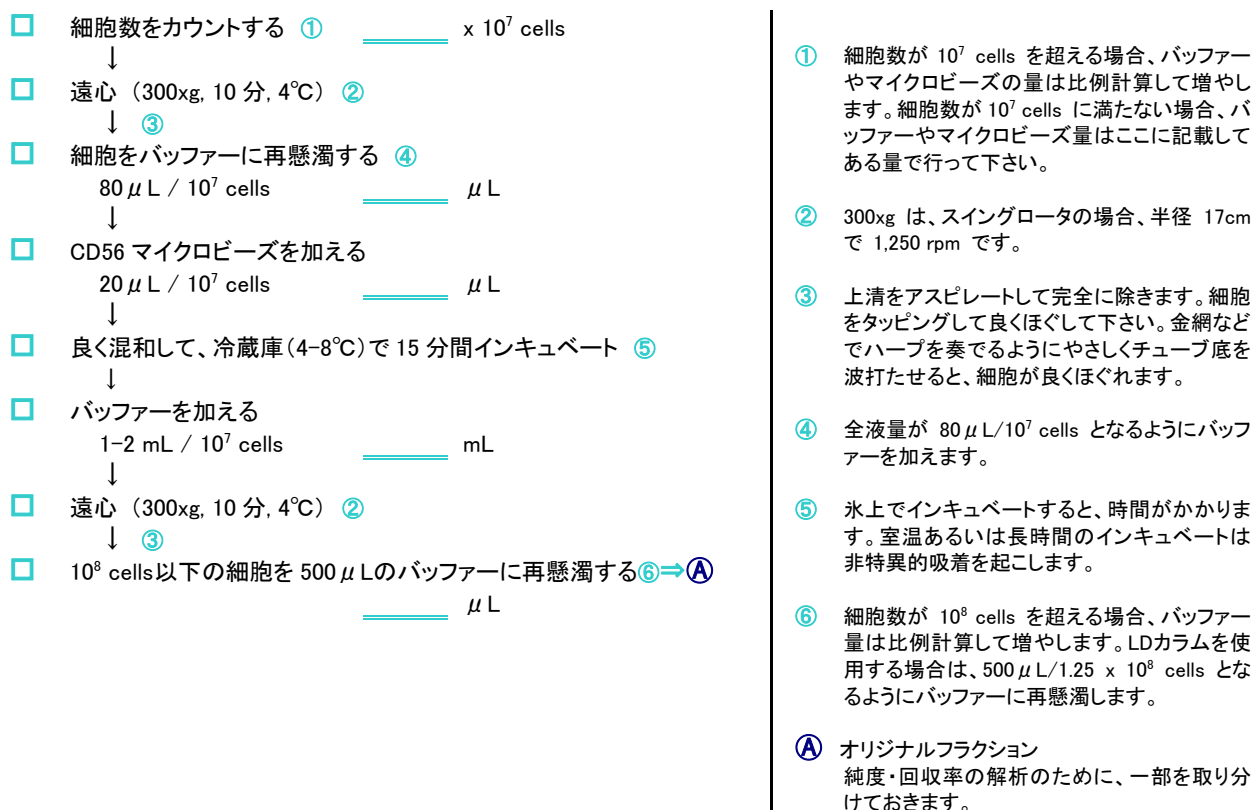
組織や溶血した血液の場合には、スタンダード法により、単細胞懸濁液を調製して下さい。

▲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。

★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下さい。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

★カラムにかける全細胞数とカラムに保持させるCD56⁺細胞の数により、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

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> □ カラムを MACS Separator の磁場に挿入する ① <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを適量のバッファーでリンスする ②
MS: 500 μL LS: 3 mL <li style="text-align: center;">↓ □ 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 ⇒B <li style="text-align: center;">↓ □ カラムをバッファーで3回洗浄する ③
MS: 3x500 μL LS: 3x3 mL ⇒B <li style="text-align: center;">↓ □ 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 <li style="text-align: center;">↓ □ 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 ⇒C
MS: 1 mL LS: 5 mL | <ul style="list-style-type: none"> ① 詳しくはカラムのデータシートをご覧ください。 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。 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。 ④ より純度を上げるために、新しいカラムを用いて磁気分離を繰り返すことができます。 B 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非標識細胞のフラクション C ポジティブフラクション
CD56 マイクロビーズで標識された細胞のフラクション |
|--|---|

3-2. XS カラムによる磁気分離

カラムのアセンブリ及び分離については、XS Column data sheet をご覧ください。

3-3. LD カラムによるディブリーション

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> □ LD カラムを MACS Separator の磁場に挿入する ① <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを 2 mL のバッファーでリンスする ② <li style="text-align: center;">↓ □ 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 ⇒B <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを 1 mL のバッファーで2回洗浄する ③ ⇒B | <ul style="list-style-type: none"> ① 詳しくは LD カラムのデータシートをご覧ください。 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。 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。 B 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非標識細胞のフラクション |
|--|---|

3-4. CS カラムによるディプリーション

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> □ CS カラムを組み立て、MACS Separator の磁場に挿入する ① <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを 60 mL のバッファーでリンスする ② <li style="text-align: center;">↓ □ 22G flow resistor をカラムの 3-way-stopcock に装着する ① <li style="text-align: center;">↓ □ 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 <li style="text-align: center;">↓ □ カラムを 30 mL のバッファーで洗浄する ③ ⇒ ③ | <ul style="list-style-type: none"> ① 詳しくは CS カラムのデータシートをご覧ください。 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。 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ください。 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非標識細胞のフラクション |
|---|---|

3-5. D カラムによるディプリーション

カラムのアセンブリ及び分離については、D Column data sheet をご覧ください。

3-6. autoMACS 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℃以上にしてください。

★ 最適なプログラムは、分離のストラテジー、磁気標識の強さ、磁気標識細胞の存在率により、変わります。autoMACS ユーザーズマニュアルの「分離プログラム」の項を参考にして最適なプログラムを選択してください。下記は、ヒト PBMCs から分離する場合の推奨プログラムです。

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
ポジティブセレクション	Possel	pos1
ディプリーション	Depletes	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
ポジティブセレクション	Possel	C
ディプリーション	Depletes	B

4. (オプション)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①、②、③)は、蛍光標識抗体で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。