

Dynabeads FlowComp 日本語マニュアル

Human CD4, Human CD8, Mouse CD4, Mouse CD8 共通

注：詳細は英文の商品添付文書でご確認ください

商品構成

- FlowComp™ Antibody 1 ml
- FlowComp™ Dynabeads (15 mg/ml) 5 ml
- FlowComp™ Release Buffer 2 x 20 ml
- 🚫 1 kit で処理可能な MNC 数：2x10⁹ cells
- 🚫 保存温度：2-8℃

その他必要な器具試薬

- ➡ Isolation buffer: Ca²⁺, Mg²⁺ free PBS with 0.1% BSA, 2mM EDTA pH7.4
- ➡ tiltingとrotationが同時に可能なミキサー
- ➡ マグネット：MPC-L, MPC-15, MPC-50 (MPC-1は使用不可)
- ➡ フローサイトメトリー用抗体

準備

- ・標準法により、MNC を分離します。
- ・5x10⁷ の細胞に対して約 10ml の cold Isolation Buffer を準備します。
- 🚫 メーカー推奨の細胞調整方法は以下のページでご確認ください
(<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11199>)

分離操作 (本プロトコルは 5x10⁷MNC からの分離用ですので細胞数に応じてスケールアップしてください)

1. 5x10⁷MNC を 500 μl の Isolation Buffer で懸濁し、25 μl の FlowComp Antibody を加えます。
2. よく混和し 2-8℃で 10 分間インキュベートします。
3. 2mL の cold Isolation Buffer を加えた後、350xg で 8 分間遠心分離します。
4. 上清を静かに取り除きます。
5. 1mL の cold Isolation Buffer で再懸濁します
6. 75 μl の再懸濁した FlowComp Dynabeads を加えてよく混和します
7. 2-8℃で 15 分間インキュベートします (ローテーターを必ず使用してください)
8. 磁石にチューブを 1 分間セットします。
9. 上清を静かに除去します。
10. チューブをマグネットからはずした後、1ml の cold Isolation Buffer で再懸濁し、穏やかに 5 回ピペティングします。
11. 磁石にチューブを 1 分間セットします。
12. 上清を除去します。
13. 1ml の FlowComp™ Release Buffer で再懸濁します。
14. 室温で 10 分間混合しながらインキュベートします。(ローテーターを必ず使用してください)
15. 穏やかに 5 回ピペティングし細胞をミックスした後、チューブをマグネットに 1 分間セットします。
16. ビーズフリーの細胞を含む上清を新しいチューブに移し、このチューブを再びマグネットに 1 分間セットします (ビーズを完全に除去します)。
17. ビーズフリーの細胞を含む上清を別の新しいチューブに移し、2ml の Isolation Buffer を加え、350xg で 8 分間遠心分離します。

18. 上清を取り除き、お好みのメディアで再懸濁してください。細胞はダウンストリームアプリケーションに使用するまで 2-8℃で保存します。

補足情報

・トラブルシューティング

- ✚ ガンマグロブリンや Fc ブロッキング試薬を使用することを推奨することで細胞の凝集を防ぐことができます
- ✚ 洗浄のステップを繰り返したり、FlowComp Release Buffer を加える前に新しいチューブに移すなどの操作で純度を上げることが可能です。
- ✚ Dynabeads とのインキュベーションには必ずミキサーを使用してください
- ✚ MPC-1 マグネットは磁力が十分でないため使用しないでください
- ✚ 推奨よりも少ない量で Dynabeads を使用しないでください
- ✚ ピペッティング容量とインキュベーション時間は正確に行ってください
- ✚ ピペッティング時に泡ができないよう注意してください
- ✚ 染色抗体は一次抗体を使用し、蛍光標識二次抗体を使用しないでください

・Isolation Buffer

- ✚ 推奨の Isolation Buffer の代わりに PBS with 2% FCS, 1mM EDTA でも使用可能です

Dynabeads FlowComp シリーズ一覧

| コード No. | 品名 | 純度 | 回収率 |
|---------|------------------------------|------|-----|
| DB11361 | Dynabeads FlowComp Human CD4 | 99% | 86% |
| DB11362 | Dynabeads FlowComp Human CD8 | >95% | 80% |
| DB11461 | Dynabeads FlowComp Mouse CD4 | 97% | 83% |
| DB11462 | Dynabeads FlowComp Mouse CD8 | >90% | 62% |

推奨マグネット一覧

| コード No. | 品名 | 製品説明 |
|---------|--------------|-------------------------------|
| DB12021 | Dynal MPC-L | 5mL の FACS チューブもしくは標準採血管 6 本用 |
| DB12029 | Dynal MPC-15 | 15mL チューブ用 |
| DB12024 | Dynal MPC-50 | 50mL チューブ用 |

DYNAL®
invitrogen bead separations

 株式会社
ベリタス
VERITAS
〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八州ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp
<http://www.veritastk.co.jp/>