

細胞表面免疫染色プロトコール

I 組織由来の細胞および培養細胞

細胞の準備

1. 脾臓、リンパ節、胸腺、骨髄等の組織あるいは培養細胞はCell Staining Buffer (BioLegend Cat. #420201)でシングルセルサスペンションにします。in vitroで刺激した細胞を用いる場合は、事前に刺激培養した後にCell Staining Bufferで再懸濁し、ステップ2に進みます。
2. 15ml未満のCell Staining Bufferを加え、350 g、5分間遠心した後に上清を除きます。

溶血操作

3. 脾臓細胞の場合のように溶血操作が必要な場合は、Lysis Buffer を用います。10倍濃縮のLysis Buffer (BioLegend Cat. #420301)を蒸留水で作業用の1倍濃度を作成し、細胞ペレットに3ml加え再浮遊し氷上に5分間置きます。
4. 溶血反応を止めるため10mlのCell Staining Bufferを加え、350 x gで5分間遠心し上清を除きます。
5. ステップ2の洗浄を繰り返します。
6. Cell Staining Bufferで再懸濁し細胞数、生存率を確認し、細胞濃度を $5 \sim 10 \times 10^6$ cells/mlにします。細胞懸濁液を12 X 75 mmのプラスチック試験管に100 μ l ($5 \sim 10 \times 10^5$ cells/tube)を分注します。

Fcレセプターのブロッキング

7. Fcレセプターブロッキング試薬は細胞表面免疫染色の非特異反応を防ぐために有効です。マウスの場合抗マウスCD16/CD32精製抗体(BioLegend Cat. #101302, clone 93)でFc γ R II/IIIをブロッキングして非特異的な反応を防ぎます。使用条件は氷冷中で5-10 μ g/mlのCD16/CD32抗体を10分間です。ヒトやラットFcレセプターの効果的なブロッキング抗体は抗ヒト、抗ラットのものを uses。

抗体反応

8. 蛍光標識、ビオチン標識もしくは精製抗体(例 anti-CD3-FITC, anti-CD4-Biotin, anti-CD8-APC)は事前に最適濃度を確認してから用います。氷冷中で15~20分間暗所で反応します。
9. Cell Staining Bufferを2ml以上加え350 x g 5分間の遠心で2回洗浄します。
10. 精製抗体を用いた間接法の場合、細胞ペレットを残ったバッファーで再懸濁してから最適濃度をあらかじめ確認した蛍光標識2次抗体(例 FITC anti-mouse Ig)を加え、氷冷中で15~20分間暗所で反応します。ビオチン標識抗体を用いた間接法の場合は、細胞ペレットを残ったバッファーで再懸濁してから最適濃度をあらかじめ確認したStreptavidin (SAV) (例 SAV-PE BioLegend Cat. # 405204)を加え、氷冷中で15~20分間暗所で反応します。
11. ステップ9を繰り返します。
12. 細胞ペレットを0.5mlのCell Staining Bufferで再懸濁し、死細胞除去用に7-AAD (BioLegend Cat. #420403)を5 μ l (0.25 μ g)/million cellsを加え、3~5分氷上に置きます。PE-Cy5やPE-Cy7標識抗体をご使用の場合には7-AADとの同時使用はお勧めしません。

FCM

13. 氷冷中に置き、FCM解析します。

細胞表面免疫染色プロトコール

II 末梢血

抗体反応

1. 蛍光標識、ビオチン標識もしくは精製抗体 (例 anti-CD3-FITC, anti-CD4-Biotin, anti-CD8-APC) は事前に最適濃度を確認してから用います。
抗凝固剤を用いて採取した末梢全血100 μ lに対して最適濃度の抗体を加えます。
2. 室温で15~20分間暗所で反応します。

溶血

3. 10倍濃縮のLysis Buffer (BioLegend Cat. #420301)を蒸留水で作業用の1倍濃度を作成し室温に戻します。
2ml加え直ちにボルテックスし、室温で10分間暗所に置きます。

洗浄

4. 350 x g 5分間遠心し上清を除きます。
5. Cell Staining Bufferを2ml以上加え、350 x g 5分間遠心し上清を除きます。

2次抗体の反応

6. 精製抗体を用いた間接法の場合、細胞ペレットを残ったバッファーで再懸濁してから最適濃度をあらかじめ確認した蛍光標識2次抗体 (例 FITC anti-mouse Ig) を加え、氷冷中で15~20分間暗所で反応します。
ビオチン標識抗体を用いた間接法の場合、細胞ペレットを残ったバッファーで再懸濁してから最適濃度をあらかじめ確認したStreptavidin (SAv) (例 SAv-PE BioLegend Cat. # 405204) を加え、氷冷中で15~20分間暗所で反応します。

洗浄

7. ステップ5を繰り返します。
8. 細胞ペレットを0.5mlのCell Staining Bufferで再懸濁、もしくは2% paraformaldehyde / PBSで再浮遊し固定します。

FCM

9. 氷冷中に置き、FCM解析します。

トミーデジタルバイオロジー株式会社

カスタマーサポート

〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1

TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813

mail : Biolegend@digital-biology.co.jp