

Lyse/No-Washを用いた全血の直接蛍光染色

概要

この方法を利用すると、特定の膜抗原を持った細胞が検出できます。まず、細胞表面抗原に特異的に結合する蛍光標識モノクローナル抗体に全血を加えます。次に染色したサンプルをFACS Lysing Solutionを用いて、緩やかな低張条件下で、白血球をそのままに保ちながら赤血球を溶血します。最後に細胞をフローサイトメーターで解析します。この方法はMultiTest（マルチテスト）とTriTEST（トライテスト）試薬、TruCOUNTチューブを利用した絶対数測定に最適です。

必要な試薬と装置

使用目的と注意に関する製品表示をご参照下さい。

1. EDTA3K バキュティナ採血管（BDカタログ番号 367660）または同等品
2. FALCONディスプレイブル12×75mmキャップ付きポリスチレン試験管（BDカタログ番号 352058）または同等品。
3. チップ付きマイクロピペットまたは同等品
4. ヒト細胞表面抗原に対するBD社製蛍光色素標識モノクローナル抗体（例えば、MultiTESTまたはTriTEST試薬）。詳細は試薬パッケージ内の取扱説明書をご覧ください。
5. Vortexミキサー
6. FACS Lysing Solution（10×）（BDカタログ番号 349202）。希釈方法と注意事項についてはFACS試薬の取扱説明書をご覧ください。
7. FACSブランドのフローサイトメーター。詳細は装置それぞれのユーザーズガイドをご覧ください。

操作手順

検体採取と調製

血液は無菌的静脈穿刺^{1,2}により滅菌EDTA3K バキュティナ採血管または同等品に採取します。最低採血量については、採血管メーカーの説明書に従って下さい。抗凝固処理済み血液は、染色と溶血の準備ができるまで室温（20～25℃）で保存します。染色前の保存条件については取扱説明書をご覧ください。

警告：作業中に接触する全ての生物検体と材料については感染の危険があるものとして取り扱い、国、地方などの規則に従い適切に廃棄する必要があります。□でのピペット操作は絶対にしないで下さい。検体が皮膚や粘膜に触れないようにして下さい。

溶血と染色

1. 全血50 μ Lが入ったFALCON 12 \times 75mm (BDカタログ番号 352058)のチューブに蛍光標識モノクローナル抗体20 μ Lを加えます。
2. 穏やかに攪拌し、暗所、室温(20~25 $^{\circ}$ C)で15分間反応させます。
3. 10倍に希釈したFACS Lysing Solution 450 μ Lを加えます。
4. 穏やかに攪拌し、暗所、室温で15~30分間反応させます。
5. FACSブランドのフローサイトメーターで解析します。測定前にサンプルをよく混合します。解析前の保存条件については取扱説明書をご覧ください。

推奨事項

1. 抗凝固剤にはEDTA3Kを使用して下さい。BDでは、ヘパリンおよびその他の抗凝固剤を用いての十分な検討をしていないため、これ等に関して提供できる資料はありません。
2. 10倍に希釈したFACS Lysing SolutionはBD社FACSブランドフローサイトメーターでの使用に適するように調製されています。
3. 10倍に希釈したFACS Lysing Solutionは有核赤血球を溶血しないため、有核赤血球を含むサンプルの溶血は不十分になることがあります。また、同様の現象は骨髄線維症、鎌形赤血球貧血、サラセミア、球状赤血球症の様な赤血球の溶血が困難な一部の血液疾患の患者サンプルでも起こることがあります³。
4. 血清免疫グロブリンと反応するモノクローナル抗体を使用するときは、血液サンプルを染色、溶血する前に1 \times PBSか生理食塩水で洗浄してください⁴。
5. 血漿中に放出される細胞表面抗原あるいはレセプター(例えばIL-2レセプター)、または血漿成分により占拠される細胞表面抗原あるいはレセプター(例えば、補体レセプター)に対するモノクローナル抗体は、全血をそのままサンプルとして用いた場合、染色性が低下することがあります。

参考文献

1. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document H42-T.
2. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document H3-A3.
3. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. Clin Immunol Immunopath. 1989;52:48-60.
4. Nicholson JKA, Rao PE, Calvelli T, et al. Artifactual staining of monoclonal antibodies in two-color combinations is due to an immunoglobulin in the serum and plasma. Cytometry. 1994;18:140-146.