

# サンプル調製手順・保存方法

本手順書は、TCR/BCR レパトア解析のためのサンプル調製手順を示したものです。  
解析に使用するサンプルは、本手順に従って調製したものを提出ください。

- ・PBMC サンプルの調製手順・・・p.1
- ・PBMC サンプルの保存方法・・・p.2
- ・組織サンプルの保存方法・・・p.3

## ● PBMC

リンパ球比重分離液を用いた密度勾配遠心法によりPBMCを分離後、遺伝子解析に必要な核酸を安定化させるため、核酸安定化試薬を使用して保存（もしくは液体窒素凍結により保存）してください。

### I. PBMC サンプルの調製（分離）手順

試薬・資材	<ul style="list-style-type: none"><li>・リンパ球比重分離液：Ficoll 液もしくは Lymphoprep™</li><li>・緩衝生理食塩水（DPBS 等）</li><li>・50 mL 遠心チューブ</li></ul>
手順	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 真空採血管（EDTA-2Na 入り）にて血液を採取した後、室温保存のうえ、30 時間以内に 2. 以降の操作を実施してください。</li><li>2. 50 mL 遠心チューブにリンパ球比重分離液を分注し、緩衝生理食塩水にて 2 倍希釈した血液を重ねてください。（血液：リンパ球比重分離液 = 1 : 1~2 : 1）</li><li>3. 900 G, 20℃にて 30 分間遠心後、緩衝生理食塩水を 20 mL 分注した 50 mL 遠心チューブに PBMC 層を回収してください。</li><li>4. 回収した PBMC に緩衝生理食塩水を添加して 50 mL にし、PBMC を懸濁後、550 G, 20℃にて 10 分間遠心してください。</li><li>5. 上清を除去後、ペレットを緩衝生理食塩水の 30 mL に懸濁し、400 G, 20℃にて 5 分間遠心してください。</li><li>6. 上清を除去後、ペレットを緩衝生理食塩水の 30 mL に懸濁し、細胞数を計測後、400 G, 20℃にて 5 分間遠心してください。</li><li>7. 上清を除去後、分離した PBMC を II. に従って保存してください。</li></ol>
備考	<ul style="list-style-type: none"><li>●単核球分離用採血管は使用いただけません。</li><li>●採血量の目安 血液 1 mL あたり PBMC <math>1 \times 10^6</math> cells 程度（分離できる PBMC 数には個人差がありますので、ご注意ください。） →必要細胞数 <math>5 \sim 10 \times 10^6</math> cells の場合、採血量 5~10 mL が目安になります。</li><li>●遠心機回転数の計算式 <math display="block">G = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times n^2</math> r : 遠心機のローター半径 (cm) n : 1 分間あたりの回転数 (rpm)</li></ul>

## II. PBMC サンプルの保存方法

### ① 酸安定化試薬を用いたサンプルの保存（推奨）

遺伝子解析に必要な核酸を安定化させるため、以下の保存方法を推奨いたします。

試薬・資材	<ul style="list-style-type: none"> <li>・核酸安定化試薬※</li> <li style="padding-left: 20px;">※以下の製品を推奨いたします。</li> <li style="padding-left: 40px;">RNAprotect Tissue Reagent (QIAGEN, Cat. No. 76104 もしくは 76106)</li> <li style="padding-left: 40px;">もしくは RNAprotect Tissue Tubes (QIAGEN, Cat. No. 76154)</li> <li>・RNase-free ピペットチップ（推奨）</li> <li>・滅菌クライオチューブ（1.5~2 mL）</li> </ul>
手順	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 採取した細胞を滅菌クライオチューブに移し、500 <math>\mu</math>L 以上の核酸安定化試薬を添加してください。</li> <li>2. 冷蔵で一晩浸漬してください。</li> <li>3. 一晩浸漬後、サンプル提出まで冷蔵で保存、もしくは溶液を除去し冷凍で保存してください。 （保存期間：冷蔵にて1ヶ月、冷凍にて1年間）</li> </ol>

### ② 液体窒素凍結によるサンプルの保存

試薬・資材	<ul style="list-style-type: none"> <li>・液体窒素</li> <li>・滅菌クライオチューブ（1.5~2 mL）</li> </ul>
手順	<p>細胞を採取後、滅菌クライオチューブに移し、すみやかに液体窒素にて凍結してください。</p> <p>凍結させたサンプルは、サンプル提出まで超冷凍にて保存してください。（保存期間：1年間）</p>

## ● 組織サンプルの保存法

以下の①（推奨）もしくは②の方法で保存してください。

### ① 核酸安定化試薬を用いたサンプルの保存（推奨）

遺伝子解析に必要な核酸を安定化させるため、以下の保存方法を推奨いたします。

試薬・資材	<ul style="list-style-type: none"> <li>・核酸安定化試薬入りマイクロチューブもしくは核酸安定化試薬<sup>*</sup>と滅菌クライオチューブ（1.5~2 mL）  <ul style="list-style-type: none"> <li>※以下の製品を推奨いたします。</li> <li>RNAprotect Tissue Reagent（QIAGEN, Cat. No. 76104 もしくは 76106）</li> <li>もしくは RNAprotect Tissue Tubes（QIAGEN, Cat. No. 76154）</li> </ul> </li> <li>・RNase-free ピペットチップ（推奨）</li> </ul>
手順	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 採取した組織を 3 mm 角に細断してください。（提出するサンプル量の目安：重量 30 mg 以上を 2 個、もしくは 3 mm 角を 4 個程度）</li> <li>2. 組織を核酸安定化試薬入りマイクロチューブ（もしくは核酸安定化試薬 500 μL 以上を添加した滅菌クライオチューブ）に移し、完全に浸漬させてください。チューブ 1 本あたり、組織片 1 個を保存してください。</li> <li>3. 冷蔵で一晩浸漬してください。</li> <li>4. 一晩浸漬後、サンプル提出まで冷蔵で保存、もしくは溶液を除去し冷凍で保存してください。（保存期間：冷蔵にて 1 ヶ月、冷凍にて 1 年間）</li> </ol>

### ② 液体窒素凍結によるサンプルの保存

試薬・資材	<ul style="list-style-type: none"> <li>・液体窒素</li> <li>・滅菌クライオチューブ（1.5~2 mL）</li> </ul>
手順	<p>組織を採取後、滅菌クライオチューブに移し、すみやかに液体窒素にて凍結してください。</p> <p>凍結させた組織は、サンプル提出まで超冷凍にて保存してください。（保存期間：1 年間）</p>