



Repertoire Genesis 株式会社  
テクニカルガイド

## 検体処理と発送方法について

Ver.2019.02.01

### 目次

1 : はじめに .....	1
2 : 検体種類別の処理、発送方法について .....	2
3 : 血液（全血）の場合 .....	3
4 : 血液（PBMC）の場合 .....	4
5 : 培養細胞・ソート細胞の場合 .....	7
6 : 組織の場合 .....	10
7 : Total RNA の場合 .....	11

※本資料についてご不明な点がございましたらご連絡ください

Repertoire Genesis 株式会社  
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-15  
彩都バイオインキュベータ 402 号  
TEL : 072-657-8686 FAX : 072-657-8687 E-mail : info@repertoire.co.jp

## 1 : はじめに

本資料は、TCR/BCR レパトア解析を行うための検体を適切に処理、弊社へ発送するためのプロトコールです。弊社では Total RNA を元にしてレパトア解析を実施します。Total RNA は大変分解されやすいものです。Total RNA が分解されてしまいますと、良好な結果を得ることができません。そのため、弊社ではお預かりしました検体の全てにおいて Agilent 2200 TapeStation にて Total RNA の QC を行います。検体処理を開始する前に必ず本資料をご確認ください。本テクニカルガイドでは、ISOGEN、ISOGEN-LS、RNAlater、RNAProtect Cell Reagent を用いた抽出例を紹介します。他の抽出試薬をお使いの場合は、その製造者マニュアルに従い、実施してください。

## 2：検体種類別の処理、発送方法について

弊社レパトア解析では、T細胞およびB細胞の mRNA が含まれる検体（血液、培養細胞、ソート細胞、組織、抽出済 Total RNA）を対象とします。必要な前処理と発送方法について、検体別に以下のような流れになります。詳しい操作手順は検体別に後述します。

検体種	血液（全血）	血液（PBMC）・ 培養細胞・ソート細胞		組織	Total RNA
前処理	凝固防止 （ヘパリン、 EDTA 等）	RNAprotect cell reagent <sup>※</sup>	ISOGEN もしくは ISOGEN-LS	RNAlater <sup>※</sup>	-
発送	常温	クール便 もしくは 冷凍便	冷凍便 （ドライアイ ス梱包）	クール便 もしくは 冷凍便	冷凍便 （ドライアイス 梱包）
利点	操作が簡便	検体を溜めておける			
注意点	随時発送	長期保管は-80℃ 冷蔵で 1 か月 保管可	長期保管のみ -80℃必須	長期保管は- 80℃ 冷蔵で 1 か月 保管可	分解の 恐れ

※発送はクール便でも可であるが、一度-80℃保管された場合は冷凍便が望ましい。

### <弊社へ検体を発送する際の一例（ドライアイス梱包）>

- ・検体は 1.5mL チューブ、もしくは 2mL チューブに入れ、さらにふたの付いたプラスチック製もしくは紙製のサンプル箱に入れます（図 1）。
- ・発泡スチロール製の検体箱に、適当なサイズに砕いたドライアイスを敷き詰め、サンプル箱を収めます。必要に応じて緩衝材でサンプル箱のガタツキを抑えてください。ビニール袋に入れた形で「発送検体一覧表」を貼付して頂きますと間違いがありません。
- ・**ドライアイスは絶対に密閉容器（魔法瓶等）の中に入れてください（爆発します）。**
- ・発泡スチロール製の検体箱のふたを閉じ、紐をしっかり引き上げ、輪ゴムをかけた後、写真のように外周を（完全気密にならないように）布ガムテープで巻きます。
- ・**発送は「冷凍便」を指定、必ず平日の午前中に弊社へ到着するようお願いします。**

発送先：  
Repertoire Genesis 株式会社  
〒567-0085  
大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-15  
彩都バイオインキュベータ 402 号  
TEL：072-657-8686



### 3：血液（全血）の場合

※採血後、時間が経つと細胞の状態が変化し Total RNA が劣化します。ただちに以下の処理を実施してください。

#### 一般的な操作手順

---

- 1：ヘパリン入り真空採血管に全血 5～10mL を採取します。
  - 2：なるべく早く（採血後 1～2 日以内） 弊社に到着する方法（遠方であれば航空便、速達等）で発送します（常温輸送）。
- 

#### ご注意：

- ・健常者のリンパ球数は全血 1mL あたり  $10^6$  個程度ですが、血液検査などの事前の情報で存在数が低下している恐れがある場合は、採血量を増やしてください。
- ・採血後、2～3 日以内に PBMC を分離、ISOGEN などに溶解しないと、細胞の状態が変化するため、良好な Total RNA が抽出できなくなります。
- ・検体数が少数の場合は、クッション付き封筒等の緩衝材を入れたもので発送されてもよろしいですが、検体の漏えいを防ぐため、採血管を 2 重のビニール袋等で包装してください。
- ・クール便で輸送しますと、検体によって血液が凝固する可能性がありますので、常温輸送をお願いします。

## 4：血液（PBMC）の場合

※PBMC 分離を行える施設（ウエットラボ）をお持ちの場合は、以下の手順で血液を処理し、長期にわたって検体を安定に保管（RNAprotect cell reagent を添加もしくは ISOGEN 溶解で -80℃保管）することができます。

※採血後、時間が経つと細胞の状態が変化し Total RNA が劣化します。ただちに以下の処理を実施してください。

※所定のプロトコールがある場合は、その方法に従って PBMC 分離を行ってください。

### 使用試薬・機器

- |   |                   |
|---|-------------------|
| ・リンパ球分離溶液 1077 (ヒト用)<br>(Wako : 126-04871)        | ・15mL 遠沈管         |
| ・メディウム (HBSS (-) 培養液)<br>(Invitrogen : 14170-112) | ・パストツールピペット       |
| ・ISOGEN (Wako : 311-02501)                        | ・10mL スピッツ管       |
| ・RNAprotect cell reagent<br>(QIAGEN : 76526)      | ・1.5mL チューブ       |
| ・シリンジ、針 (22G)                                     | ・冷却遠心機            |
| ・ヘパリンもしくは EDTA 入り真空採血管                            | ・ボルテックス           |
|   | ・ピペッター            |
|   | ・顕微鏡、血球計算板、チュルク氏液 |

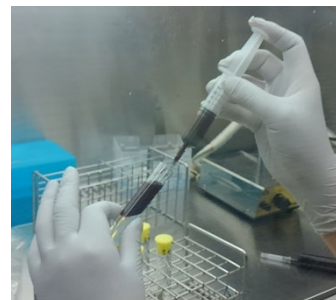
### 一般的な操作手順

#### (1) PBMC 分離

1：ヘパリンもしくは EDTA 入り真空採血管に全血 5～10mL を採取します。

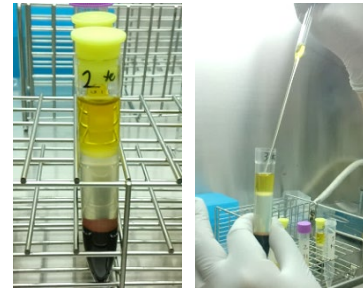
2：スピッツ管に、室温に戻した 5ml のリンパ球分離液を加えます（1 検体あたり 2 本用意）。

3：比重分離液の上に、5mL の血液を静かに重層します（採血管からシリンジ、針（22G）で吸い上げることで、塊をほぐすことができ、分離が良好になる。スピッツ管を傾けながら重層すると境界面が乱れない）。



4：室温、1200g、20min、加速減速「最小」で遠心します。

5：遠心後、パスツールピペットで上層の血漿成分を吸い取りながら、中間の白血球層（白いもやもや）を吸い取り、新しい 15mL 遠沈管に加えます（蛋白成分を取ることでガラス表面をコートし、細胞のガラスへの貼り付きを防止する）。



6：冷蔵した HBSS を 15mL 遠沈管に加え、14mL までメスアップし転倒混和します（ボルテックスはできない）。



7：4℃、430g、5min、加速減速を最大で遠心します。

8：遠心後、15mL 遠沈管の底部にペレットがあることを確認し、上清を除去します。

9：再度 HBSS で 14mL までメスアップ、軽くボルテックスし、同条件で 5min 遠心します。

10：遠心終了後、上清を 2mL 残してボルテックスします。

## (2) セルカウント

11：90μL のチュルク氏液と 10μL の PBMC 浮遊液を混和します（96 穴プレート等の適当なプラスチック製品でよい）。

12：血球計算板で細胞数をカウントします（全細胞数/視野数×10<sup>4</sup>×希釈倍率×液量）  
（例：125 個/2 視野×10<sup>4</sup>×10 倍×2mL = 1.25×10<sup>7</sup> 個/total 2mL 浮遊液）。

13：細胞数が 5×10<sup>6</sup> 個未満（ISOGEN 1mL に対して 5×10<sup>6</sup> 個の細胞）になるように 1.5mL チューブに分注します（よくピペティングしてペレットをほぐして分注）。

※健常者のサンプルであれば、10mL 全血で 10<sup>7</sup> 個採取できます。細胞数が規定値を超えないよう、安全を取って 3 本のチューブに分注します。

## (3a) RNAprotect cell reagent を添加

14a：細胞浮遊液に対して 5 倍量の RNAprotect cell reagent を添加、よくピペティングします（例：細胞浮遊液 200μL 分注では試薬は 1,000μL、細胞浮遊液量が多い場合は、一度ペレットダウンを行い、液量を調整する）。

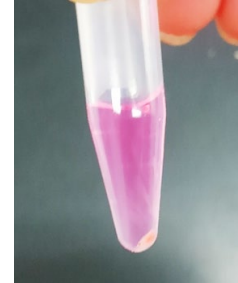
15a：冷蔵庫で 1 か月、-80℃で長期間、保管が可能です。状況に応じてお選びください。

## (3b) ISOGEN に細胞を溶解

14b : 1.5mL チューブを遠心機でフラッシング (10 秒、最高速度)

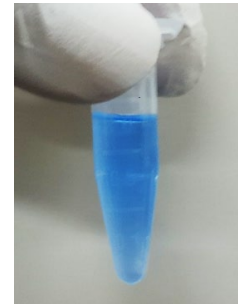
し、ペレットを確認してから上清を捨てます。

※この時、上清が残りすぎると ISOGEN が薄まり、Total RNA が分解する恐れがあります。



15b : ペレットをほぐし、ISOGEN を 1mL 加えて、よくピペッティングして細胞を完全に溶解させます。

※この時、細胞が塊で残り溶解が不十分ですと、Total RNA が分解する恐れがあります。



16b : -80℃で保管します。

### ご注意 :

- ・ 健常者のリンパ球数は全血 1mL あたり  $10^6$  個程度ですが、血液検査などの事前の情報で存在数が低下している恐れがある場合は、採血量を増やしてください。
- ・ 採血後、1~2 日以内に PBMC を分離、RNAprotect cell reagent の添加および ISOGEN などに溶解しないと、細胞の状態が悪化するため、良好な Total RNA の抽出が困難となります。
- ・ Total RNA 抽出を普段実施していない施設で抽出処理されたサンプルは、何らかの問題を抱えることが多いため、細胞に RNAprotect cell reagent を添加もしくは ISOGEN で溶解されたまま、クール便もしくは冷凍便 (ドライアイス梱包) で発送、当方で抽出する流れが安全です。
- ・ 以降の操作 (Total RNA 抽出) をご自身で実施される場合は、Total RNA 抽出キット (QIAGEN : RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 等) を用いることをお勧めします。
- ・ その際は、本資料の 11 ページ、「7 : Total RNA の場合」に記載された「ご注意」について、ご確認のうえ、作業を実施してください。



## 5：培養細胞・ソート細胞の場合

※採取後もしくは分離後、時間が経つと細胞の状態が変化し Total RNA が劣化します。ただちに以下の処理を実施してください。

### 使用試薬・機器

- |   |                   |
|---|-------------------|
| ・メディウム (HBSS (-) 培養液)<br>(Invitrogen : 14170-112) | ・15mL 遠沈管         |
| ・ISOGEN (Wako : 311-02501)                        | ・1.5mL チューブ       |
| ・ISOGEN-LS (Wako : 311-02621)                     | ・冷却遠心機            |
| ・RNAprotect cell reagent<br>(QIAGEN : 76526)      | ・ボルテックス           |
|   | ・ピペッター            |
|   | ・顕微鏡、血球計算板、チュルク氏液 |

### (1) セルカウント (培養細胞のみ)

※ソート細胞は、ソーターで表示される細胞数を採用します。

- 1 : 90 $\mu$ L のチュルク氏液と 10 $\mu$ L の細胞浮遊液を混和します (96 穴プレート等の適当なプラスチック製品でよい)。
- 2 : 血球計算板で細胞数をカウントします。(全細胞数/視野数 $\times 10^4 \times$ 希釈倍率 $\times$ 液量)  
(例 : 125 個/2 視野 $\times 10^4 \times 10$  倍 $\times 2$ mL =  $1.25 \times 10^7$  個/total 2mL 浮遊液)
- 3 : 細胞数が  $5 \times 10^6$  個未満 (ISOGEN 1mL に対して  $5 \times 10^6$  個の細胞) になるように 1.5mL チューブに分注します (よくピペティングしてペレットをほぐして分注)。

### (2a) RNAprotect cell reagent を添加

※細胞数が  $1 \times 10^6$  個未満の場合は細胞のロスが発生しやすいため、ISOGEN-LS の利用を強く推奨します。

- 4a : 細胞浮遊液に対して 5 倍量の RNAprotect cell reagent を添加し、よくピペティングします (例 : 細胞浮遊液 200 $\mu$ L 分注の場合、試薬は 1,000 $\mu$ L、チューブの容量に注意、細胞浮遊液量が多い場合は、一度ペレットダウンを行い、液量を調整する)。
- 5a : 冷蔵庫で 1 か月、 $-80^\circ\text{C}$  で長期間、保管が可能です。状況に応じてお選びください。



## (2b) ISOGEN に細胞を溶解

4b : 1.5mL チューブを 10 秒、最高速度で遠心し、17 ページ、  
図 3 左のような細胞ペレットを確認してから上清を 50 $\mu$ L  
程度残して捨てます。

※この時、上清が残りすぎると ISOGEN が薄まり、Total RNA  
が分解する恐れがあります。

5b : ペレットをほぐし、ISOGEN を 1mL 加えて、よくピペッ  
ティングして細胞を溶解させます。

※細胞数が  $1 \times 10^6$  個よりも少ない場合は ISOGEN 量を 500 $\mu$ L  
に減量しても構いません。

※この時、細胞が塊で残り溶解が不十分ですと、Total RNA が  
分解する恐れがあります。

6b : -80 $^{\circ}$ C で保管します。



## (2c) ISOGEN-LS に細胞を溶解

※細胞数が  $10^6$  個未満の検体で有用です。

4c : 1.5mL チューブを 10 秒、最高速度で遠心し、ペレットを確認（細胞数によっては見えな  
い場合もある）し、250 $\mu$ L を残して上清を除去します。

5c : ISOGEN-LS を 750 $\mu$ L 加えて、よくピペティングして細胞を溶解させます。

※この時、細胞の溶解が不十分ですと、Total RNA が安定化されずに分解する恐れがあります。

6b : -80 $^{\circ}$ C で保管します。

### ご注意 :

- ・採取後、ただちに RNAprotect cell reagent の添加および ISOGEN などに溶解しない  
と、細胞の状態が変化するため、良好な Total RNA が抽出できなくなります。
- ・Total RNA 抽出を普段実施していない施設で抽出処理された検体は、何らかの問題を  
抱えることが多いため、細胞に RNAprotect cell reagent を添加もしく、は ISOGEN  
等で溶解されたまま、クール便もしくは冷凍便（ドライアイス梱包）で発送、当方で抽  
出する流れが安全です。
- ・以降の操作（Total RNA 抽出）をお客様ご自身で実施される場合は、Total RNA 抽出キ  
ット（QIAGEN : RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 等）を用いることをお勧めします。

- ・その際は、本資料の 11 ページ、「7 : Total RNA の場合」に記載された「ご注意」について、ご確認のうえ、作業を実施してください。
- ・細胞数が少ない検体 ( $1 \times 10^6$  個未満) では、処理の工程で細胞をロスする可能性が増大します。特に RNAProtect cell reagent を添加された検体では、弊社到着後の抽出操作時に再度ペレットダウンの工程が含まれるため、細胞のロスが予測されます。
- ・ISOGEN は、細胞ペレット (水分が少ない検体) に使用しますが、細胞数が少ない検体では、上清の除去が細胞数のロスのリスクとなります。
- ・ISOGEN-LS は ISOGEN を濃縮した試薬で、細胞浮遊液 : ISOGEN-LS を 1 : 3 の割合で混合し、上清を完全に除去することなく (細胞のロスを抑制した状態で)、RNA を安定化することができます。
- ・この際、細胞浮遊液を別チューブに移動させること自体がロスの原因となりますので、「細胞分離したチューブ」のまま遠心し、上清除去後、チューブを変えることなく、ISOGEN-LS を添加し、溶解させることを推奨します。
- ・検体処理時のトラブルを避けるため、必ずどの試薬を使用したかについて正確に明記してください。
- ・溶液の色について、TRIzol および TRIzol LS は共に赤色、ISOGEN は青色、ISOGEN-LS は赤色です。

## 6：組織の場合

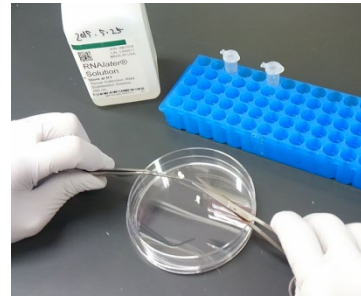
※採取後、時間が経つと細胞の状態が変化し Total RNA が劣化します。ただちに以下の処理を実施してください。

### 使用試薬

- ・ RNAlater Stabilization Solution (Ambion : AM7024)
- ・ 1.5mL チューブ

### 一般的な操作手順

- 1：あらかじめ 1.5mL チューブに RNAlater を 1mL ずつ分注しておきます。
  - 2：発生した組織検体を重量 100mg（見た目では大豆大の半分程度）にトリミングします。
  - 3：さらに 5mm 角四方にカットして RNAlater に浸漬させます。
- ※この時、組織の浸漬が不十分ですと、Total RNA が分解する恐れがあります。
- 4：浸漬後は、なるべく早めに冷蔵庫（4℃）で保管します（1 晩～4 週間）。
  - 5：長期保存の場合は、1 晩以上浸漬した後、RNAlater の液体を除去したのち、-80℃で保管します。
  - 6：検体が溜まったら、保存方法に応じて弊社にクール便もしくは冷凍便（ドライアイス梱包）で発送します。



### ご注意：

- ・ 検体の種類によっては浸漬する組織重量が異なる場合があります。操作を行う前に RNAlater Stabilization Solution の操作手順書をご確認ください。
- ・ Total RNA 抽出を普段実施していない施設で抽出処理されたサンプルは、何らかの問題を抱えることが多いため、RNAlater 浸漬済の組織をそのまま、保存方法に応じてクール便もしくは冷凍便（ドライアイス梱包）で発送、当方で抽出する流れが安全です。
- ・ 以降の操作（Total RNA 抽出）をお客様ご自身で実施される場合は、Total RNA 抽出キット（QIAGEN : RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 等）を用いることをお勧めします。
- ・ その際は、本資料の 11 ページ、「7：Total RNA の場合」に記載された「ご注意」について、ご確認のうえ、作業を実施してください。

## 7 : Total RNA の場合

### ご注意 :

- ・お客様ご自身が抽出された Total RNA を検体として依頼することができます。
- ・ただし、施設によって Total RNA の扱いに関する条件が異なり、弊社でのレパトア解析の品質に満たない場合もあります。
- ・つきましては、抽出前の細胞数、抽出時の操作、RNA 濃度 (ng/ $\mu$ L)、量 ( $\mu$ L)、品質 (RINe もしくは RIN 値) 等を、事前に情報をご提供ください。
- ・検体到着後、弊社にて QC を行います (検体の余剰が無い場合は省略致します)。
- ・目安としましては、細胞数は  $10^6$  個以上、RNA 濃度は 50ng/ $\mu$ L 以上、RNA 液量は 10  $\mu$ L 以上、RINe もしくは RIN 値は 7 以上で望ましいです。
- ・レパトア解析では 1 検体当たり 3.75 $\mu$ L を 1 反応として合成に用いますので、RNA 濃度が薄い場合は、状況に応じて弊社で濃縮作業を実施致します。
- ・組織検体では、検体の性質によって TCR および BCR 遺伝子の存在量が異なるため、必ずしも RNA 濃度が多様性の担保となるとは限りませんので、ご不明な点がありましたら事前にご相談ください。