

受託ソーティング利用に際しての手引

受託での利用

「受託用利用登録申請書 A1」の提出

受託のみによる機器利用の方は、記入後提出してください。

I. サンプルの初回のソーティング受託

- ① なるべく早く（できれば1週間前までに）にメールにてお知らせください。
分取方法、実施時期等、依頼者と支援員間で事前の打ち合わせを（メールにて）行います。同じサンプルをフローサイトメーターで解析したデータがあれば事前にお送り頂くととても参考になります。日程調整後、こちらにて機器の予約を行います。使用可能な蛍光色素は当支援室のホームページを参考にしてください。掲載していない蛍光色素に関しては事前にお問い合わせいただくか、打ち合わせ時に検討いたします。機器の予約状況は当支援室 HP にてご覧ください。
- ② その後、「MoFlo 利用申請書 B」を作成し、メールにて送付願います。
学生の方は当日連絡のつく指導教員の連絡先を必ず記入してください。利用申請書の受け取りの確認のため、依頼者（依頼者が学生の場合は指導教員にも）へ依頼内容のメールを送ります。
- ③ 当日は、細胞の調整や抗体などによる標識等は依頼者に行っていただきます。依頼者は細胞を標識した後、適当な緩衝液にて細胞浮遊液を作り（おおよそ $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$ ）、お持ちください。また、**negative control** の細胞もご用意ください。複数の蛍光色素で標識された細胞をソーティングする場合は、それぞれの色素で単染色した細胞（**compensation** 用）が必要な場合があります。**negative** および **compensation** 用の細胞は、 $10^5 \sim 10^6/\text{ml}$ が 0.5ml 程度必要です。全てのサンプルは、持参する直前に **pore size 40 micro** 程度のナイロンメッシュを用いて濾過して下さい。また、培地を入れた細胞回収用のチューブやプレートをお持ちください。培地やチューブの予備があると安心です。
- ④ 細胞濃度および総細胞数を支援員にお知らせいただき、始めに、測定条件および分取条件を依頼者と支援者と共同で行います。条件が決まった後の細胞分取は支援員が行います。
- ⑤ ソーティング終了時には、こちらからご連絡いたします。お渡しするものは、分取した細胞と、印刷した解析結果です。測定データを持ち帰りたい場合は、取り込む **USB メモリ**（ウイルスチェック必須）をお持ちください。このデータは **FCS** フ

ファイルですので、FlowJo、Kaluzaなどで解析が行えます。プロトコール（ヒストグラムやドットプロット）は添付されませんので、解析ソフト上で新たに作って、そこに測定データを読み込ませることになります。Kaluza(ベックマンコールター)は、当支援室にてご利用いただけます。

II. 同じプロトコールでの2回目以降のソーティング受託

- ① 同条件で行った最後のソーティングの日時とご希望の実験日時をメールでスタッフまでお知らせください。相談後、こちらで機器の予約を行います。
- ② 実験日が決まったら、速やかに「MoFlo 利用申請書 **B**」をメールで支援員まで提出してください。学生の方は当日、連絡のつく指導教員の連絡先を必ず記入してください。利用申請書の受け取りの確認のため、依頼者（依頼者が学生の場合は、指導教員にも）へ依頼内容のメールを送ります。

以下、Iの③から⑤と同様。

<MoFlo 利用時に提出していただく書類>

- ・ MoFlo 利用申請書 **B**
- ・ sorting 予定 sample の FACS profile

<sorting 時に用意していただくもの>

- ・ sample 10⁶ ~ 10⁷ cells /ml
- ・ negative control 10⁵~ 10⁶/ml が 0.5~ 1ml
- ・ compensation 用 sample (必要な場合) 10⁵~ 10⁶/ml が 0.5~ 1ml
- ・ 回収用試験管・プレート

試験管は、5mL FACS tube か、50mL conical tube あるいは、1.5mL tube に限ります。15mL conical tube はチューブの口の位置から不純物の混入の可能性が高いので使用を控えていますのでご注意ください。回収細胞数 10⁵ 個で約 0.3 mL (100 ノズルの場合) となりますが、あふれない程度になるべくたくさんの培地を入れてお持ちください。最低でも約 1/2 量。 96well plate なら 200μl/well。

<サンプルに関する注意事項>

- ・ Phenol red は蛍光の background をあげるので入れないでください。接着しやすい細胞、互にくっつきやすい細胞は、ソートされないではじかれてしまうので効率も悪く、流路を詰まらせる場合がありますので、EDTA を添加してください。
- ・ 全てのサンプルはろ過してください。場合によっては現場でもう一度ろ過が必要な

場合があります。細胞調整後あまり時間を置かず、機械にかける直前のろ過が効果的とされています。

- ・効率よくソーティングするコツは、サンプル中に死細胞や、細胞のカスなどのゴミが少ないこと、なるべくソートしたい細胞の割合を大きくすることです。

機械の不調でご迷惑をおかけすることもあります。ご協力をお願いいたします。

【受託時の課金に際して】

「利用時間」は、サンプルを流し始めてから、ソーティングを終了するまでとします。

「MoFlo 利用申請書 **B**」の中の利用時間の欄に、支援員と一緒に利用時間を確認して記入させていただきます。



研究者本人によるソーティング

なるべく、受託にてできるように検討してください。それでもどうしても、夜間や休日にソーティングする必要がある場合、下記をクリアして使えるようになっている方のみ、本人によるソーティングが可能です。

「**利用登録申請書 A2**」の提出

以下の項目をクリアしている方のみご自身での運転が可能です。

- ① メーカー講師による講習を受講（丸2日間）
- ② 実機を用いたトレーニング（数回以上）、ノズルチップの詰まりに対応したノズル洗浄や交換、ストリームの調整や光軸調整ができるようになっている必要があります。以上を確認できるように申請書に記入して提出してください。

新たに講習会を予定していませんが、必要がありましたら、スタッフまでまずはお相談ください。

これまで、ご自身でのご利用のための登録をされていた方は、改めての提出は必要ありません。

登録から予約カレンダー利用まで

利用登録申請書の提出後登録が認められましたら、こちらの案内に従って、(1)機器別の yahoo group に参加、(2)予約カレンダーとしての yahoo カレンダーbeta 版の共有設定をしていただきます。その作業が済みますと、予約カレンダーに記入ができます。

オペレーターの作業可能な日時のご利用はなるべく避けて、ご利用をお願いいたします。予約時には「タイトル」に、氏名・分野・内線番号を記入して下さい。予定変更がありましたら、速やかにカレンダーに反映させてください。

利用手順

- ① 予約カレンダーに記入する。
- ② ①と同時に、「MoFlo 利用申請書 B」をメールにて支援員まで提出してください。
学生の方は、当日連絡のつく指導教員の連絡先を必ず記入してください。利用申請書の受け取りの確認のため、使用者（使用者が学生の場合は、指導教員にも）へ利用予定受理のメールを送ります。
- ③ 当日は、前述【受託での利用】の I の③から⑤の流れでソーティングを進める。
- ④ 終了後には必ず、本機脇に設置の機器別の「使用記録簿(C)」に必要事項を記入して下さい。

【本人によるソーティング時の課金に際して】

「利用時間」は、サンプルを流し始めてから、ソーティングを終了するまでとします。ソーティング中にノズルの詰まりなど、トラブル対処の時間が発生した場合は、それらの対処時間は除きます。

「使用記録簿(C)」の中の「ソート(解析)時間」(下段)欄の記入に基づいて利用料を計算させていただきます。

幹細胞支援室 連絡先 内線 4777
Mail : kansaibou.scl@mri.tmd.ac.jp
スタッフ : 豊田(Toyoda)・齊藤(Saito)