研究用

MBL
A JSR Life Sciences Company

QuickSwitch™ Quant Tetramer Kit スターターガイド

詳細については製品添付のデータシートをご確認ください。

製品名	Code No.		
	PE標識	APC標識	BV421標識
QuickSwitch™ Quant HLA-A*01:01 Tetramer Kit	TB-7308-K1	TB-7308-K2	TB-7308-K4
QuickSwitch™ Quant HLA-A*02:01 Tetramer Kit	TB-7300-K1	TB-7300-K2	—
QuickSwitch™ Quant HLA-A*03:01 Tetramer Kit	TB-7306-K1	TB-7306-K2	TB-7306-K4
QuickSwitch™ Quant HLA-A*11:01 Tetramer Kit	TB-7304-K1	TB-7304-K2	TB-7304-K4
QuickSwitch™ Quant HLA-A*24:02 Tetramer Kit	TB-7302-K1	—	TB-7302-K4
QuickSwitch™ Quant H-2Kb Tetramer Kit	TB-7400-K1	TB-7400-K2	TB-7400-K4

キット構成

構成品名		用途	容量	保存温度
QuickSwitch™ Tetramer		Exiting Peptide搭載テトラマー	500 µL	2-8℃
Peptide Exchange Factor		ペプチド交換因子	13 µL	-20℃以下
Magnetic Capture Beads		抗テトラマー抗体結合磁性粒子	500 µL	2-8℃
Exiting Peptide Antibody-FITC (25x)		ペプチド交換測定用試薬 (Exiting Peptideを認識する抗体)	25 µL	2-8℃
Reference Peptide 1 mM		ポジティブコントロールペプチド	13 µL	-20℃以下
Assay Buffer (10x)		洗浄/希釈バッファー	1.7 mL	2-8℃

必要な試薬・装置

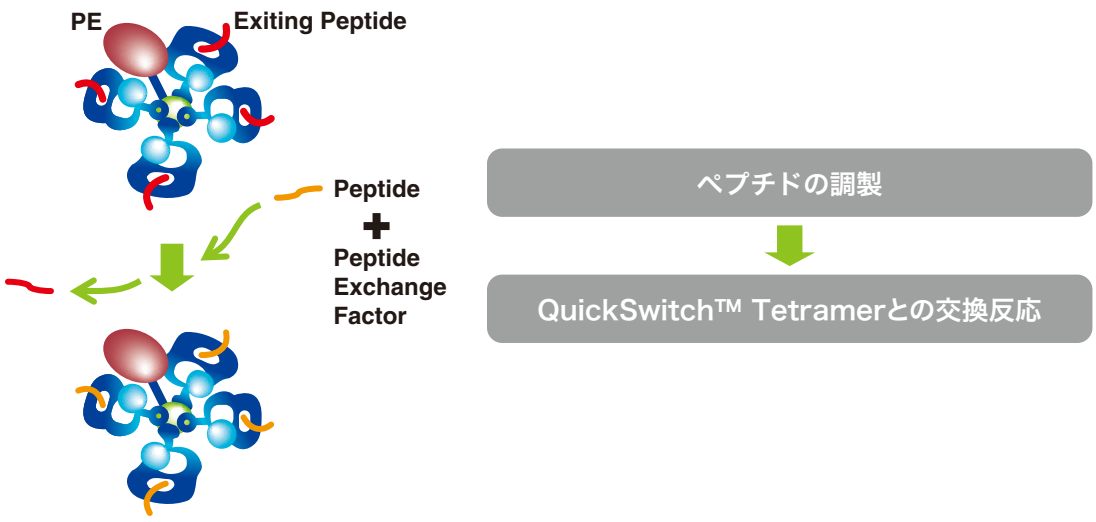
- ■ペプチド（交換用）
- ■マグネットプレート
- ■マイクロチューブ
- ■マイクロピペットとディスポーザブルチップ
- ■超純水
- ■プレートシェイカー（Labline model 4625もしくは同等品）
- ■ウォーターバスソニケーター（Branson Ultrasonic Cleaner Model #B200 もしくは同等品）
- ■フローサイトメーター
- ■ボルテックスミキサー
- ■丸底もしくはコニカル底 96ウェルマイクロプレート
- ■アルミホイル
- ■DMSO

注意書き

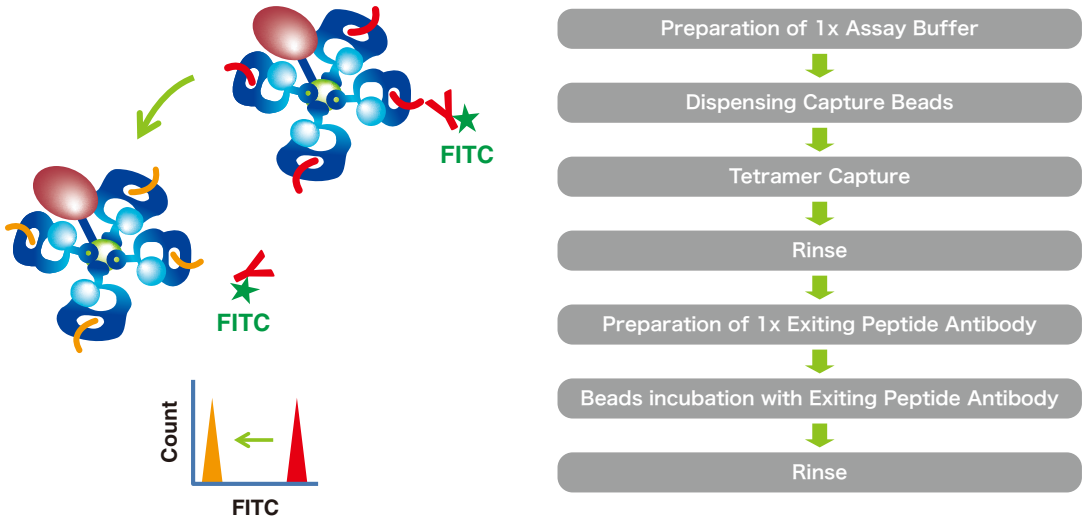
1. ご使用前に必ずReference PeptideとAssay Buffer (10x) を室温 (20～25℃) に戻してください。
2. Assay Buffer (10x) を2-8℃に保存した場合、沈殿物や混濁物が認められる場合があります。その際は、ご使用前に30℃で数分間インキュベーションし、溶解してください。
3. 希釈した試薬 (1x Assay Buffer、1x Exiting Peptide Antibody-FITC) は、調製した日にご使用してください。
4. QuickSwitch™ TetramerとExiting Peptide Antibody-FITCは遮光した状態で実験作業や保管をしてください。
5. クロスコンタミネーションがおこらない様に注意して、実験作業をしてください。
6. 試薬にはアジ化ナトリウム (≦0.09%) を防腐剤として含有しています。皮膚等に付着した場合、多量の水で洗い流してください。そして、直ちに医師に連絡してください。
7. マグネットプレートが無い場合には、プレートローター遠心機をご使用ください。

ワークフロー

A ペプチド交換ステップ



B フローサイトメトリーによるペプチド交換効率の測定



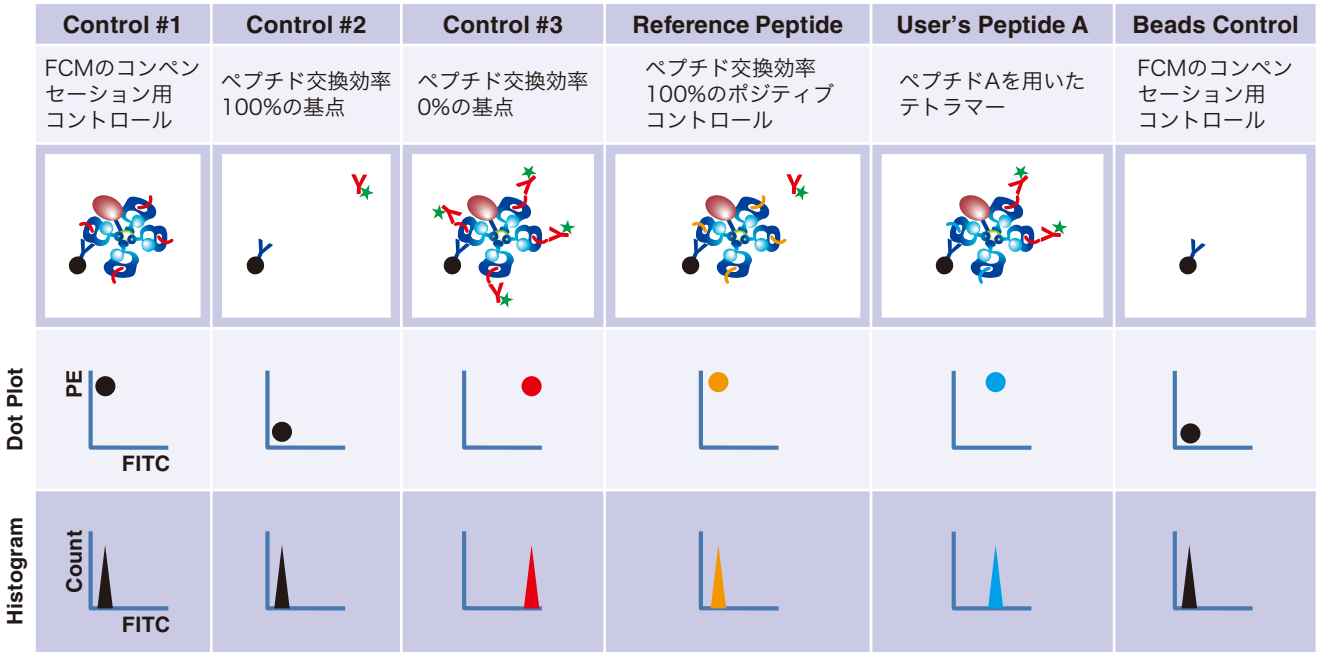
プロトコル

A ペプチド交換ステップ

1. 交換するペプチドをDMSOで10 mMに調製します。
   （高アフィニティーのペプチドの場合、1 mMに調製して使用することが可能です。）
2. 50 μLのQuickSwitch™ Tetramerをマイクロチューブに分注します。
3. ステップ❶で用意した1 μLのペプチド溶液を加え、ピペッティングで混合します。
4. 1 μLのPeptide Exchange Factorを加え、ピペッティングで混合します。
5. 他にも交換をするペプチドがあれば、ステップ❶～❹を繰り返してサンプルを用意します。
6. Reference Peptide用のサンプルを用意します。
   50 μLのQuickSwitch™ Tetramerをマイクロチューブに分注します。
   1 μLのReference Peptide 1 mMを添加し、ピペッティングで混合します。
   続けて、1 μL のPeptide Exchange Factorを加え、ピペッティングで混合します。
7. 遮光して、室温にて4時間以上*インキュベーションします。
   （*製品により反応時間が異なります。詳しくはデータシートをご覧ください。）
8. その後、遮光した状態で、2～8℃に保管します。

B フローサイトメトリーによるペプチド交換効率の測定

フローサイトメーターを用いて、各ペプチドの交換効率を測定します。コントロールサンプルを下図の様に用意して、測定解析を行います。データ取得後、QuickSwitch™ Calculatorを用いて、ペプチド交換効率を計算します。QuickSwitch™ Calculatorはこちらからダウンロード可能です。
(http://www.mblintl.com/quickswitch-peptide-exchange-calculator/)



Control #3　　：ペプチド交換を行わないサンプルです。FITC標識抗体が、Exiting Peptideを認識します。
Reference Peptide：100%のペプチド交換効率だった場合を想定しています。この場合、FITC標識抗体は、Reference Peptideを認識しません。
User's Peptide　　：ユーザーが準備したペプチドです。上図では50%の交換が起こった場合を想定しています。

<Preparation of 1x Assay Buffer>

1. 1x Assay Bufferの調製をします。
   ・1～5種類のペプチド交換の場合：１つのチューブに750 μLの10x Assay Bufferを加え、続けて6.75 mLの超純水を加えます。
   ・6～8種類のペプチドの場合：上記の液量を2倍にして調製します。

<Dispensing Capture Beads>

2 使用する前にTetramer Capture Beadsのチューブを30秒間、ウォーターバスソニケーターもしくはボルテックスミキサーで撹拌します。ウォーターバスソニケーターが無い場合、ボルテックスミキサーで30秒間、追加撹拌します。

3 丸底もしくはコニカル底 96ウェルマイクロプレートを用意します。

4 20 μLのTetramer Capture Beadsをウェル 1〜7に分注します。
コントロール3種とReference Peptide（ポジティブコントロール）の他、「**A ペプチド交換ステップ**」で用意したテトラマーの数に合わせてウェルを用意し、分注してください。
ここではUser's Peptideが3種類のケースを想定しています。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control

<Tetramer Capture>

5 5 μLの1x Assay Bufferをウェル 2に分注します。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control

6 5 μLのQuickSwitch™ Tetramerをウェル 1とウェル 3に分注します。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control

7 「**A ペプチド交換ステップ**」で用意した5 μLのテトラマーをウェル 4〜7に分注します。

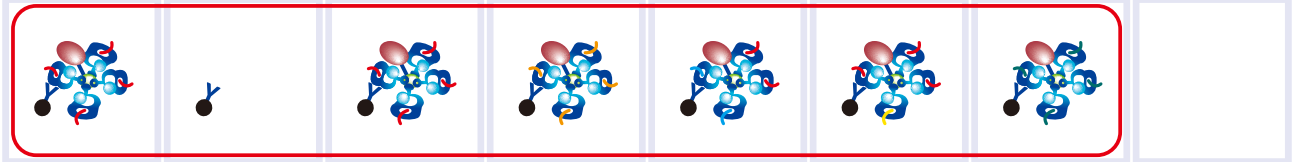
ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control

8 アルミホイル等で遮光後、マイクロプレートをプレートシェイカーに設置して、550 rpmで45分間撹拌します。

<Rinse>

9 150 μLの1x Assay Bufferをウェル 1〜7に分注します。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control



10 マイクロプレートをマグネットプレートにセットし、5分間静置します。※

11 クロスコンタミネーションに注意して、上清を捨てます。

12 マグネットプレートにマイクロプレートをセットした状態で2秒間、ボルテックスミキサーで撹拌し、その後、マグネットプレートからマイクロプレートを外します。

※マグネットプレートが無い場合には、プレートローター遠心機を用いて、1,000 x gで5分間遠心してください。

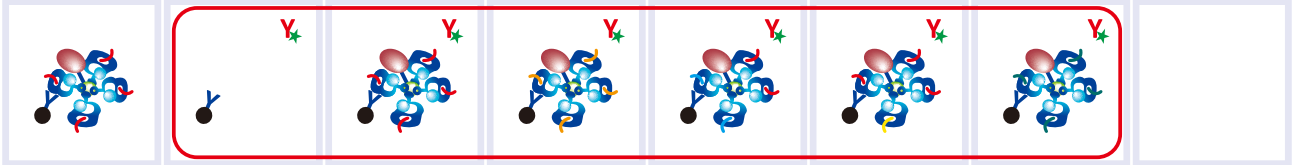
<Preparation of 1x Exiting Peptide Antibody>

13 Exiting Peptide Antibody-FITC (25x) から1xの調製の為、「サンプル数」を確認します。
「サンプル数」は、コントロール用で2種類とReference Peptide (ポジティブコントロールペプチド) で1種類、
「**A ペプチド交換ステップ**」で用意したテトラマーの種類を合計した数になります。
マイクロチューブを用意し、（「サンプル数」＋1）x 24 μLの1x Assay Bufferを加え、
続けて（「サンプル数」＋1）x 1 μLのExiting Peptide Antibody-FITC (25x) を加えます。
ピペッティングで混合し、1x Exiting Peptide Antibody-FITCを用意します。

<Beads incubation with Exiting Peptide Antibody>

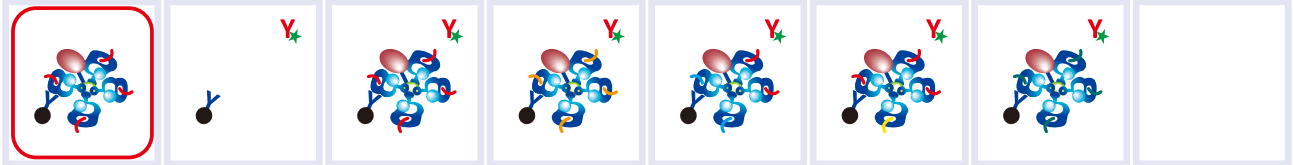
14 ステップ13で用意した1x Exiting Peptide Antibody-FITCをウェル 2〜7に25 μLずつ分注します。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control



15 25 μLの1x Assay Bufferをウェル 1に分注します。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control

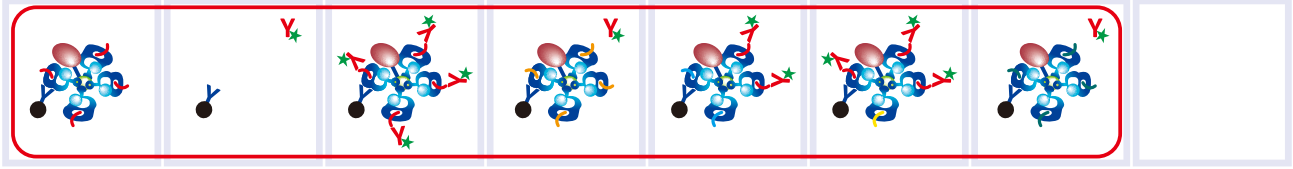


16 アルミホイル等で遮光後、マイクロプレートをプレートシェイカーに設置して、550 rpmで45分間撹拌します。

<Rinse>

17 150 μLの1x Assay Bufferをウェル 1〜7に分注します。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control



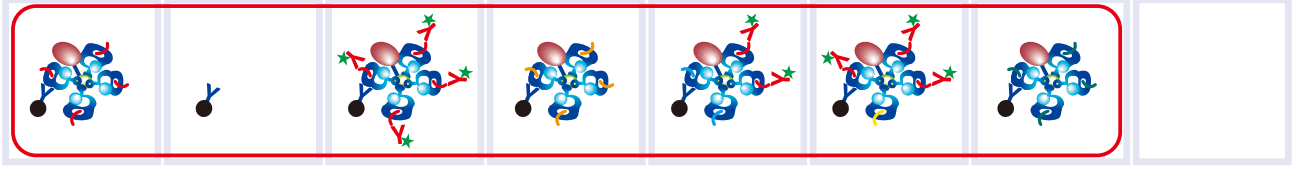
18 マイクロプレートをマグネットプレートにセットし、5分間静置します。※

19 クロスコンタミネーションに注意して、上清を捨てます。

20 マグネットプレートにマイクロプレートをセットした状態で2秒間、ボルテックスミキサーで撹拌し、その後、マグネットプレートからマイクロプレートを外します。

21 200 μLの1x Assay bufferをウェル 1〜7に添加し、混合します。

ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control

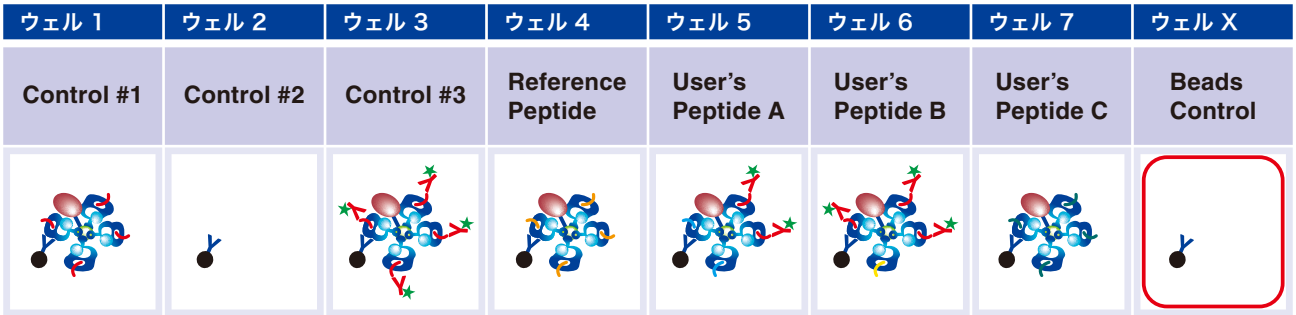


※マグネットプレートが無い場合には、プレートローター遠心機を用いて、1,000 x gで5分間遠心してください。

フローサイトメトリー解析用ビーズコントロールサンプルの準備

1 ウェル Xに200 μLの1x Assay Bufferを加え、続けて5 μLのMagnetic Capture Beadsを加え、混合します。

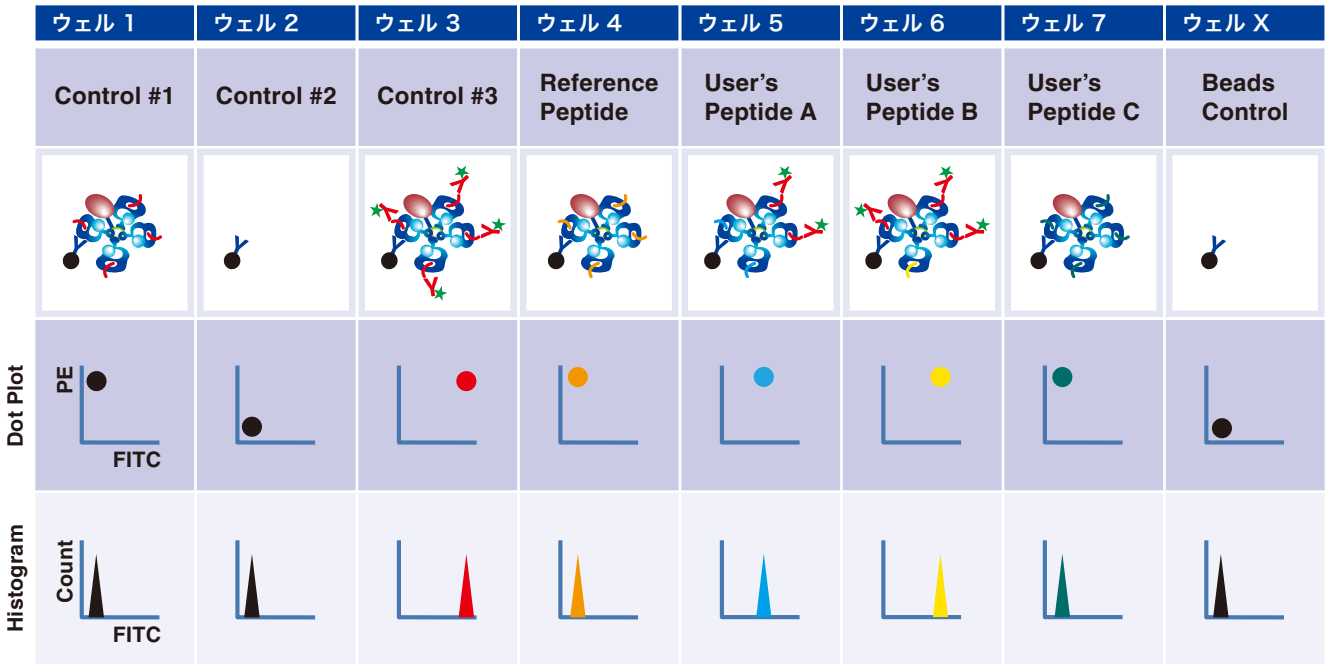
ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 4	ウェル 5	ウェル 6	ウェル 7	ウェル X
Control #1	Control #2	Control #3	Reference Peptide	User's Peptide A	User's Peptide B	User's Peptide C	Beads Control



以上でフローサイトメトリー解析用サンプルの準備は完了です。

フローサイトメトリー解析

詳細については製品添付のデータシートをご確認ください。



ペプチド交換効率の計算には、QuickSwitch™ Calculatorをご利用ください。
QuickSwitch™ Calculatorはこちらからダウンロード可能です。
(http://www.mblintl.com/quickswitch-peptide-exchange-calculator/)

MHCテトラマーは、T細胞上のT細胞受容体（TCR）と3つのPeptide-MHC複合体を介することで安定的な結合状態を維持します。その為、ペプチド交換効率が75%以上のQuickSwitch™ Tetramerを細胞染色にご利用ください。

本紙記載の製品は研究用です。診断および治療目的には使用いただけません。
記載内容は2022年6月時点の情報です。最新の情報は当社までお問い合わせください。ご使用の際には、データシートをよくお読みください。

Copyright © 2022 MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. All Rights Reserved.

2022.06 154042-22061000

MBL 株式会社 医学生物学研究所
A JSR Life Sciences Company https://ruo.mbl.co.jp/
◎ 学術部
〒105-0012
東京都港区芝大門2丁目11番8号 住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL : 03-6854-3614 E-mail : support@mbl.co.jp