



Revised: September, 2021

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

*For the sensitive detection and quantification of  
mobilized CD107a*

# **IMMUNOCYTO**

## **CD107a Detection Kit**

CODE No. 4844

**MBL** MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.  
A JSR Life Sciences Company  
URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail [support@mbl.co.jp](mailto:support@mbl.co.jp)

**Before use, thoroughly read these instruction.**

## **Description**

When T-cell and NK-cell recognized target cells, content of the lytic granules are secreted by degranulation. As a result of degradation, CD107 present in the membrane of cytotoxic granules expose onto the cell surface. It follows that the detection of CD107 exposed on the cell surface lead to indirect evaluation of secretion of the lytic granule contents such as perforin, granzymes and granzylsin, which enables rapid assessment of cell-mediated cytotoxicity and detection of antigen specific cytotoxic T-cells.

The method "CD107a mobilization assay" is utilized for its detection. In this method, the cells are cultured in the presence of CD107a monoclonal antibody after antigen stimulation, which enables sensitive detection of CD107a.

IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit is a reagent for detection of CD107a exposed on the cell surface after antigen stimulation by CD107a mobilization assay.

## **Intended Use**

IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit is intended for the detection of CD107a in research samples.

**For research use only. Not for use in *in vitro* diagnostic procedure for clinical diagnosis.**

## **Product Components**

Each kit contains:

The following reagents are sufficient for 50 assays.

Materials	Quantity
FITC labeled anti-human CD107a monoclonal antibody	240 µL x 1 vial
FITC labeled mouse IgG1 isotype control	240 µL x 1 vial
Monensin	500 µL x 1 vial
Cell suspension solution	25 mL x 2 bottles

## **Precautions**

1. This kit is for research use only. Not recommended or intended for diagnosis of human disease. Not for use in diagnostic procedure.
2. FITC labeled anti-human CD107a monoclonal antibody and FITC labeled isotype control mouse IgG1 contain 0.09% sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form potentially explosive lead or copper azide in plumbing. To prevent forming of these compounds, flush drains thoroughly after disposing of solutions containing sodium azide.
3. Monensin contains 70% EtOH. EtOH is flammable.
4. Cell suspension solution contains formaldehyde as fixative. Formaldehyde is harmful, toxic, allergenic and a suspected carcinogen. Avoid inhalation, contact with eyes, skin and clothing.

## Expiration

Please see the label of this kit.

## Storage Conditions

All kit components must be stored at 2-8°C.

## Materials required but not supplied

- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- 5 mL test tubes
- Centrifuge
- Aspirator
- Pipettes and disposable pipette tips
- 96-well round microplate
- Medium (RPMI 1640 supplemented with 5-10% serum and 50 IU/mL IL-2)
- T-cell Stimulants (T-cell receptor epitope peptides, OKT3, etc.)
- Flow cytometer

## Protocol

1. Cells are resuspended to final concentration of  $2 \times 10^6$  cells/mL in the medium (RPMI 1640 supplemented with 5-10% serum and 50 IU/mL IL-2).
2. Add the 150  $\mu$ L of cell suspensions to each 4 wells of 96-well round microplate.
3. Add Stimulant, FITC labeled CD107a monoclonal antibody and FITC labeled mouse IgG1 isotype control to each well as the table described below. Monensin prevent reduction of fluorescence of FITC labeled monoclonal antibody which is internalized into an acidic endosomal or lysosomal compartment by neutralization of the pH within endosomes and lysosomes. However CD107a can be detected sufficiently without monensin.

	Cell suspension	Monensin	Stimulant	Medium	CD107a-FITC	IgG1-FITC
well 1	150 $\mu$ L	(2 $\mu$ L)	50 $\mu$ L		2 $\mu$ L	
well 2	150 $\mu$ L	(2 $\mu$ L)	50 $\mu$ L			2 $\mu$ L
well 3	150 $\mu$ L	(2 $\mu$ L)		50 $\mu$ L	2 $\mu$ L	
well 4	150 $\mu$ L	(2 $\mu$ L)		50 $\mu$ L		2 $\mu$ L

\* Stimulant; T-cell receptor epitope peptide (0.04-4  $\mu$ g/mL)

OKT3 (4  $\mu$ g/mL)

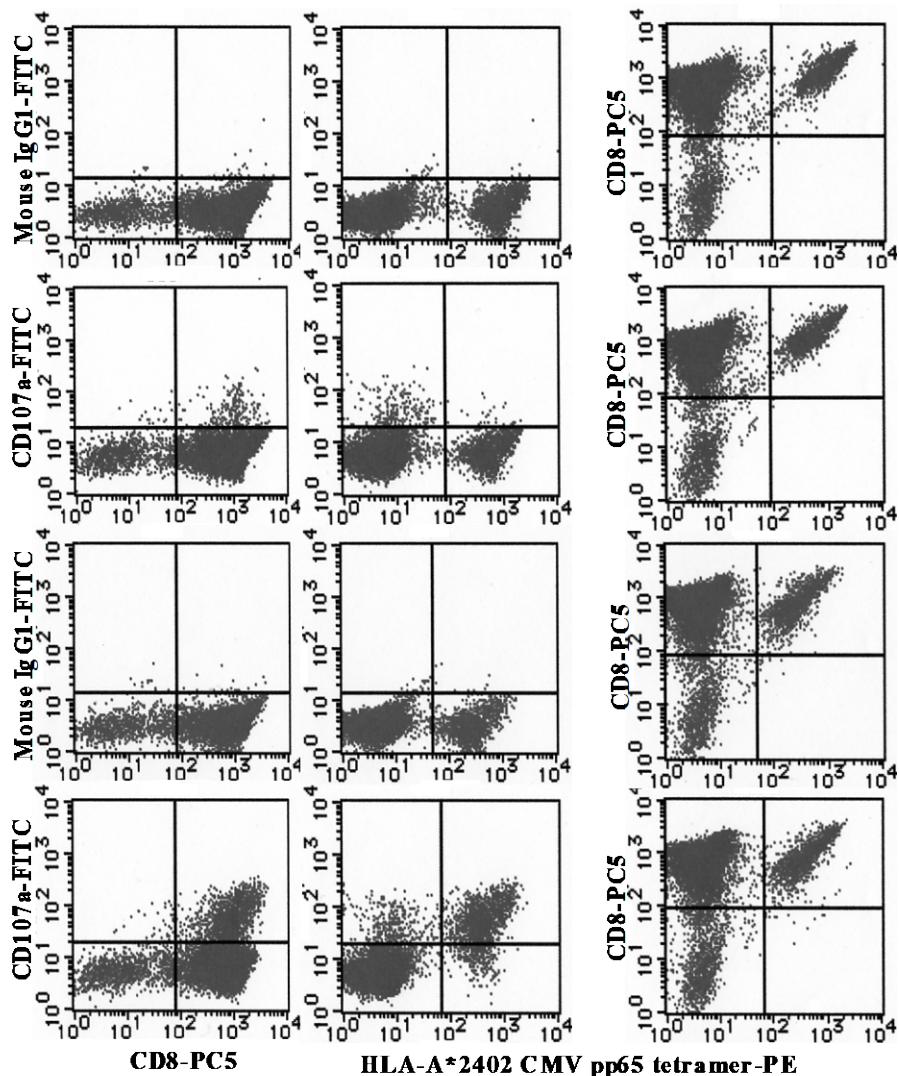
etc.

Stimulant should be diluted with Medium.

4. Mix gently by pipetting and Incubate for 1-5 hours in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

5. Transfer all cells to test tubes and add 2 mL of PBS (2% FCS and 0.1  $\text{NaN}_3$ ) to each tube.
6. Centrifuge 400 X  $g$  for 5 minutes and Decant supernatant
7. Add 100  $\mu\text{L}$  of PBS (2% FCS and 0.1%  $\text{NaN}_3$ ) to each tube after tapping.
8. If you want to multi-stain the cells with cell surface marker, add the surface marker in this step. For example, add 10  $\mu\text{L}$  of PC5 labeled CD8 and 10  $\mu\text{L}$  of PE labeled MHC tetramer.
9. Mix gently and Incubate all tubes for 15 minutes at room temperature in the dark.
10. Add 2 mL of PBS (2% FCS and 0.1%  $\text{NaN}_3$ ) to each tube.
11. Centrifuge 400 X  $g$  for 5 minutes and decant supernatant.
12. Add 200-500  $\mu\text{L}$  of Cell suspension solution to each tube after tapping, and mix gently.
13. Analysis by flow cytometry.

## Assay Example



**Figure Detection of CD107a exposed on the cell surface after antigen stimulation**  
HLA-A\*2402 restricted CTL line was stimulated by epitope peptide QYDPVAAALF (0.01  $\mu$ g/mL) in the presence of FITC-labeled CD107a monoclonal antibody and cultured for 5 hours at 37°C. After culture, the cells were stained with CD8-PC5 and HLA-A\*2402 CMV pp65 tetramer-PE

Upper column and second column; Not stimulated

Third column and bottom column; Stimulated with pp65 epitope peptide

CODE No. 4844

## References

- Rubio V. et al, *Nat Med*, **9**: 1337-82 (2003)  
Betts MR. et al, *J Immunol methods*, **281**: 65-78 (2003)

## Manufacture

**MBL** A JSR Life Sciences Company  
MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.  
URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail [support@mbl.co.jp](mailto:support@mbl.co.jp)

## はじめに

T 細胞、NK 細胞は異物の認識により活性化され、細胞内顆粒中に含まれるパーフォリン、グランザイムなどの細胞傷害因子を脱顆粒により放出します。これに伴い細胞内顆粒内膜に表出す CD107a (LAMP-1)、CD107b (LAMP-2) が細胞膜上に出現します。従って細胞表面上に出現した CD107 分子を検出することで細胞内顆粒に含まれる細胞傷害因子の放出を間接的に知ることができます、細胞傷害活性の評価に応用することができます。

また、T 細胞受容体エピトープペプチド（抗原）で刺激した場合、抗原特異的に CD107 分子が出現しますので、抗原特異的 CTL の検出にも有用です。尚、その検出には CD107a mobilization assay と呼ばれる方法が用いられます。本方法では細胞を抗原刺激後、CD107a モノクローナル抗体存在下に培養します。これにより高感度な CD107a の検出が可能となります。

IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit は抗原刺激後に細胞表面に出現する CD107a 分子を CD107a mobilization assay により検出するための試薬です。

## キット構成

CODE No. 4844 50 tests

Materials	Quantity
FITC labeled anti-human CD107a monoclonal antibody (FITC 標識抗ヒト CD107a モノクローナル抗体)	240 µL x 1 vial
FITC labeled isotype control mouse IgG1 (FITC 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロール)	240 µL x 1 vial
Monensin (モネンシン)	500 µL x 1 vial
Cell suspension solution (細胞懸濁液)	25 mL x 2 bottles

## 使用上または取扱上の注意

1. 本品は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断の目的に使用しないで下さい。
2. 本試薬の構成品のうち、FITC 標識抗ヒト CD107a モノクローナル抗体、及び FITC 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロールには、0.09% アジ化ナトリウムを添加しております。アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分量の水で洗い流して下さい。
3. Monensin (モネンシン) には 70% エタノールが含まれています。可燃性ですので注意してお取り扱い下さい。
4. Cell suspension solution (細胞懸濁液) にはホルムアルデヒドが含まれています。吸い込んだり、皮膚にふれたり、目に入ることのないよう、注意してお取り扱い下さい。

## 保存温度

2-8 °C

## 製品有効期限

キットに貼られているラベルを参照下さい。

## 準備するもの

- PBS
- 5 mL 試験管（抗体反応用チューブ）
- 卓上遠心機
- ピペット、使い捨てチップ
- アスピレーター
- 96 ウェルマイクロプレート
- 培地（5-10%血清 50 IU/mL IL-2 加 RPMI1640 など）
- T 細胞刺激因子；T 細胞受容体エピトープペプチド、OKT3 など
- フローサイトメーター

## 操作法

1. 測定する細胞を  $2 \times 10^6$  個/mL となるように培地（5-10%血清、50 IU/mL IL-2 加 RPMI1640 など）に懸濁します。
2. 細胞懸濁液を 150  $\mu\text{L}$  ずつ 96 ウェルマイクロプレートの 4 ウェルに分注します。
3. 刺激因子、FITC 標識 CD107a モノクローナル抗体、FITC 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロールを下記表に従い添加します。Monensin はエンドソームやライソゾーム内の pH を中和することにより、CD107a 分子の結合し、エンドソーム、ライソゾームに取り込まれた FITC 標識抗体の蛍光の低下を防止することが知られていますが、Monensin を添加しなくても十分測定は可能です。

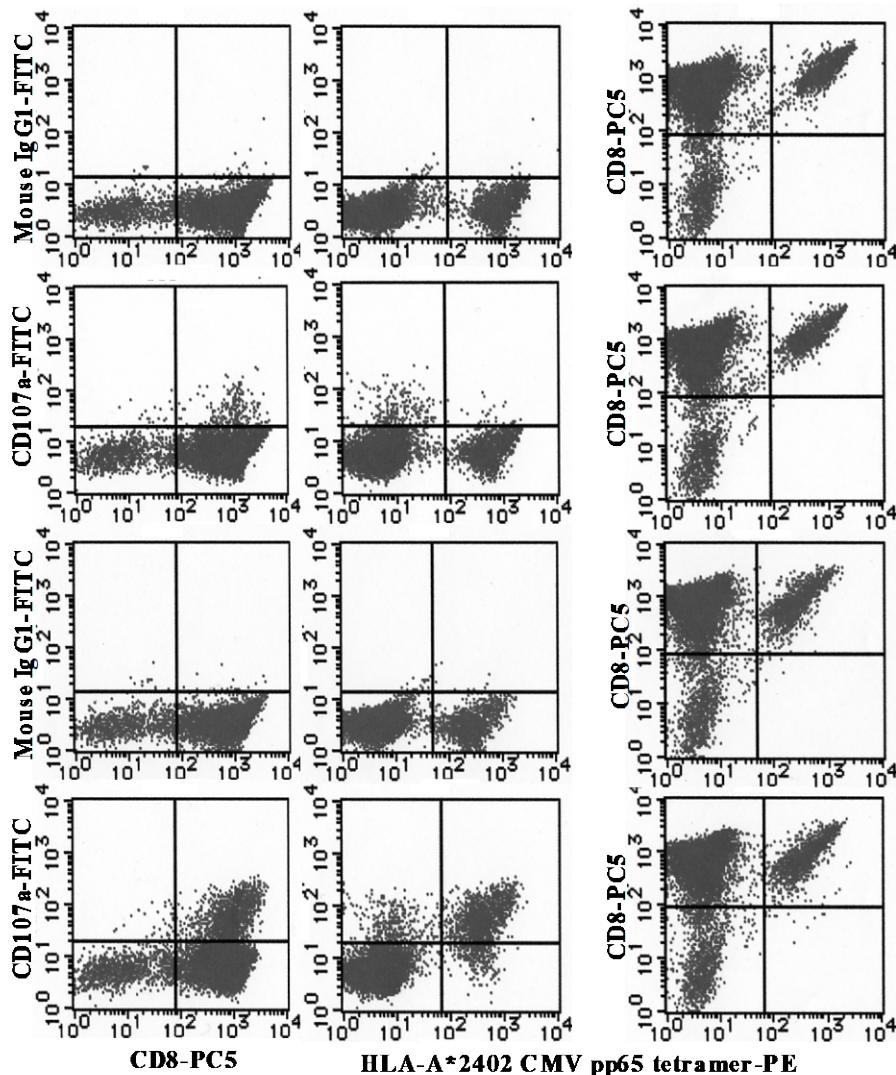
	Cell suspension	Monensin	Stimulant	Medium	CD107a-FITC	IgG1-FITC
well 1	150 $\mu\text{L}$	(2 $\mu\text{L}$ )	50 $\mu\text{L}$		2 $\mu\text{L}$	
well 2	150 $\mu\text{L}$	(2 $\mu\text{L}$ )	50 $\mu\text{L}$			2 $\mu\text{L}$
well 3	150 $\mu\text{L}$	(2 $\mu\text{L}$ )		50 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	
well 4	150 $\mu\text{L}$	(2 $\mu\text{L}$ )		50 $\mu\text{L}$		2 $\mu\text{L}$

\*刺激因子；T 細胞受容体エピトープペプチド（0.04-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）  
OKT3（4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）など  
いずれも培地で希釈調製して下さい。

4. ピペットで攪拌の後 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 37°C、1-5 時間培養します。

5. 細胞懸濁液をそれぞれ抗体反応用のチューブに移し、2 mL の PBS (2% FCS, 0.1% NaN<sub>3</sub>) を加えます。
6. 400 X g で 5 分間遠心し、上清を吸引します。
7. 細胞を 100 µL の PBS (2% FCS, 0.1% NaN<sub>3</sub>) に懸濁させます。
8. 細胞表面に対する抗体で二重染色する場合は、このステップにおいて標識抗体を加えます。例えば CD8-PC5、MHC Tetramer-PE を 10 µL 加え、混和の後、暗中、室温で 15 分間反応させます。
9. 2 mL の PBS (2% FCS, 0.1% NaN<sub>3</sub>) をそれぞれのチューブに加えます。
10. 400 X g で 5 分間遠心し、上清を吸引します。
11. 細胞をよくほぐした後、Cell suspension solution (細胞懸濁液) を 200-500 µL 加えます。
12. フローサイトメトリーにて解析します。

【測定例】



**Figure Detection of CD107a exposed on the cell surface after antigen stimulation**  
HLA-A\*2402 restricted CTL line was stimulated by epitope peptide QYDPVAAALF (0.01  $\mu$ g/mL) in the presence of FITC-labeled CD107a monoclonal antibody and cultured for 5 hours at 37°C. After culture, the cells were stained with CD8-PC5 and HLA-A\*2402 CMV pp65 tetramer-PE

Upper column and second column; Not stimulated

Third column and bottom column; Stimulated with pp65 epitope peptide

### 参考文献

Rubio V. et al, *Nat Med*, **9**: 1337-82 (2003)  
Betts MR. et al, *J immunol methods*, **281**: 65-78 (2003)

### 製造元

**MBL** A JSR Life Sciences Company  
株式会社 医学生物学研究所  
URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail [support@mbl.co.jp](mailto:support@mbl.co.jp)