

Clear Back

(Human Fc receptor blocking reagent)

Code No.
MTG-001

Quantity
1 mL (50 tests) x 2 vials

製品説明: 当試薬はフローサイトメトリーや蛍光顕微鏡を用いた蛍光抗体法において、ヒト Fc receptor (FcR) を介した細胞-抗体間の非特異反応を抑制します。

また、normal goat IgG により goat 由来の 2 次抗体による非特異反応も抑制します。T-Select MHC Tetramer 染色時においても Clear Back を用いることで、マクロファージなどのエンドサイトーシスによる非特異的染色を抑制する効果が期待されます^{1), 2)}。

性状: ヤギ血清に normal human IgG と 0.09% NaN₃ が含まれています。

*当試薬に含まれるアジ化ナトリウムは、酸性条件下でアジ化水素酸という強力な毒性化合物を産生します。また金属配管に堆積されますと爆発性のアジ化合物が産生されることがありますので流水でよく洗い流して廃棄してください。皮膚や目に入った場合には十分量的の水で洗い流してください。

保存法: 2~8℃で保存してください。長期間保存が必要な場合は-20℃で保存し、凍結融解は繰り返さないでください。本品は出荷後 1 年間有効です。

使用法: 1~5 × 10⁵ の細胞に対して Clear Back を 20 μL お使い下さい。

構成: 1 mL (50 tests) /vial (code no. MTG-001-10) が 2 本入っています。

注意事項: 白い沈殿が生じることがありますが、品質上問題ありません。遠心して上清をお使い下さい。

参考文献:

- 1) Feldman, S. P., *et al.*, *Blood* **61**, 815-818 (1983)
- 2) Daniels, M. A. and Jameson, S. C., *J. Exp. Med.* **191**, 335-345 (2000)
- 3) Fleit, H. B. and Kobasiuk, C. D., *J. Leukoc. Biol.* **49**, 556-565 (1991)
- 4) Kobayashi, M., *et al.*, *J. Ovarian Res.* **7**, 48 (2014)
- 5) Honda, T., *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* **28**, 53-58 (2015)
- 6) Miyashita, T., *et al.*, *Oncol. Lett.* **14**, 5918-5926 (2017)

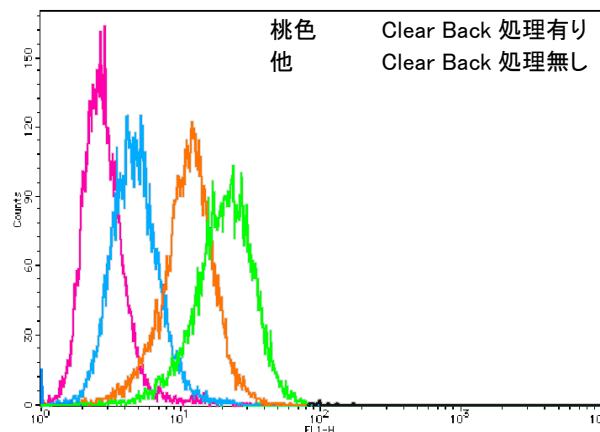
文献 4)-6)は当試薬の使用文献です。

データシート中のプロトコールは参考例です。研究によって最適な条件は異なりますので、事前に条件検討を行うことを推奨します。

染色方法:

1) 培養細胞を用いる場合

1. 細胞を FCM buffer [2% FCS, PBS, 0.05% NaN₃] で 2 回洗浄します。
2. FCM buffer で 5 × 10⁶ cells/mL に調製します。
3. 調製した細胞懸濁液を 50 μL ずつ分注し、500 × g で 1 分間遠心します。
4. 上澄みを注意深く除きます。
5. 20 μL の Clear Back を加え、5 分間室温にて反応させてください。
6. 1 次抗体を反応させます(各製品の能書に従ってください)。
7. 1 mL の FCM buffer を加え 500 × g で 1 分間遠心します。
8. 上澄みを除去します。
9. 2 次抗体を反応させます(各製品の能書に従ってください)。
10. 1 mL の FCM buffer を加え 500 × g で 1 分間遠心します。
11. 上澄みを除去します。
12. ペレットを 500 μL の FCM buffer に再懸濁します。
13. サンプルを測定します。



<染色例 1>

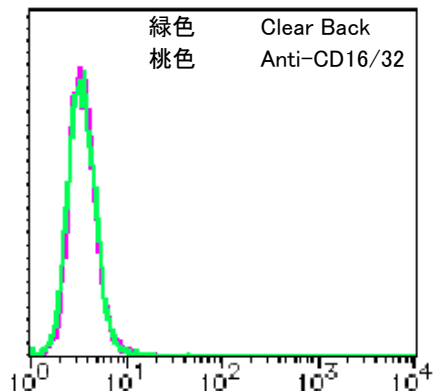
THP-1 細胞における Clear Back の効果

< FITC labeled mouse IgG2a の濃度 >

- 桃色 5 μg/mL
- 水色 0.1 μg/mL
- 橙色 0.5 μg/mL
- 緑色 5 μg/mL

*THP-1 細胞に発現している FcR を介した非特異的な抗体の結合が Clear Back を用いる事で顕著に抑制されました。

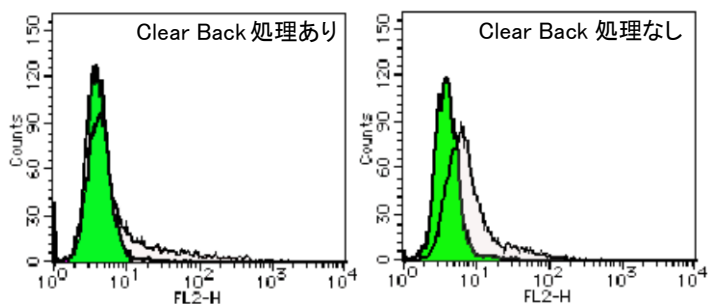
CD16/32 と Clear Back の効果の比較



THP-1 細胞を Clear Back(緑色)処理、あるいは未標識の anti-CD16/32 で処理後、FITC labeled mouse IgG2a (5 µg/mL)にて染色しました。

*FcR をブロックするために一般によく用いられる anti-CD16/32 抗体と比較しても、同等の阻害活性を有することが分かりました。

Anti-CD16 による非特異染色を抑制できた例



緑色: PE labeled isotype control (mouse IgG1)
黒色: PE labeled anti-CD16

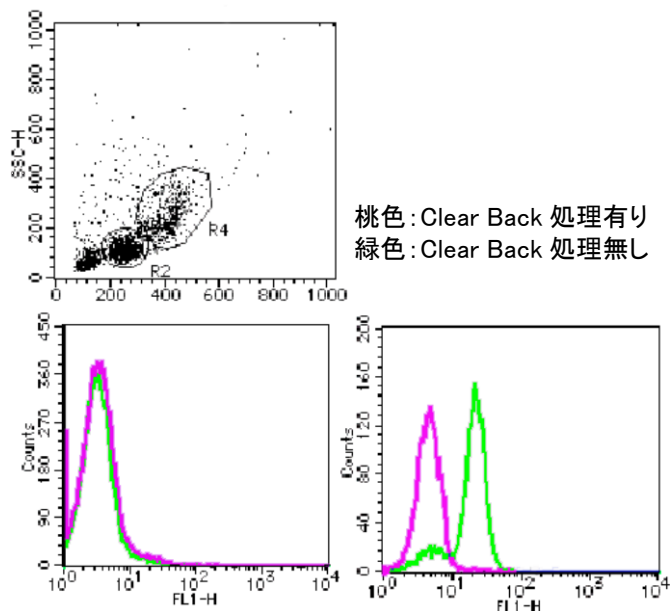
*THP-1 細胞は FcR を高発現していますが CD16 は発現していないことが報告されています³⁾。Clear Back 処理を行った結果、非特異的な CD16 抗体による染色は明らかに抑制されました。

2)末梢血単核球(PBMC)を用いる場合

1. 定法に従って PBMC を調製し、 5×10^6 cells/mL の濃度にて、細胞を再懸濁します。
2. 50 µL (2.5×10^5 cells) の細胞懸濁液に 20 µL の Clear Back を加え、5 分間室温にて反応させてください。
3. 1 次抗体を反応させます(各製品の能書に従ってください)。
4. 1 mL の FCM buffer を加え 500 x g で 1 分間遠心します。
5. 上澄みを注意深く除きます。
6. 2 次抗体を反応させます(各製品の能書に従ってください)。
7. 1 mL の FCM buffer を加え 500 x g で 1 分間遠心します。
8. 上澄みを除去します。
9. ペレットを 500 µL の FCM buffer に再懸濁します。
10. サンプルを測定します。

<染色例 2>

末梢血単核球における Clear Back の効果



桃色: Clear Back 処理有り
緑色: Clear Back 処理無し

それぞれ FITC-mouse IgG2a (5 µg/mL) を反応させました。

*リンパ球領域 (R2) では、目立った非特異的な染色像は認められませんでした。単球領域 (R4) では、Clear Back 処理により、非特異染色が抑制されました。

Clear Back

(Human Fc receptor blocking reagent)

Code No.
MTG-001

Quantity
1 mL (50 tests) x 2 vials

BACKGROUND: This reagent can block non-specific bindings of antibodies to cells caused by human FcR for such experiments as FCM, Fluorescent microscopy, etc. Normal goat IgG in this reagent can also block non-specific bindings caused by any goat secondary antibodies. In an experiment of staining cells with T-Select MHC Tetramer, Clear Back may block non-specific bindings caused by macrophages or endocytosis, resulting in clear staining^{1), 2)}.

FORMULATION: Goat sera contain normal human IgG and 0.09% NaN₃.

*Azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush plenty of water when disposing materials containing azide into drain.

STRAGE: Clear Back is stable for one year from the date of purchase when stored at 4°C~8°C or at -20°C for longer periods. Avoid repeated freezing and thawing.

APPLICATION:

Blocking buffer: Add 20 µL of Clear Back to 1-5 x 10⁵ cells.

QUANTITY: 1 mL (50 tests) / 1vial x 2

NOTE: Upon storage, a white precipitate might form in this reagent. This precipitate does not affect assay performance. The precipitate may be removed centrifugation and the supernatant can use assay.

REFERENCES:

- 1) Feldman, S. P., *et al.*, *Blood* **61**, 815-818 (1983)
- 2) Daniels, M. A. and Jameson, S. C., *J. Exp. Med.* **191**, 335-345 (2000)
- 3) Fleit, H. B. and Kobasiuk, C. D., *J. Leukoc. Biol.* **49**, 556-565 (1991)
- 4) Kobayashi, M., *et al.*, *J. Ovarian Res.* **7**, 48 (2014)
- 5) Honda, T., *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* **28**, 53-58 (2015)
- 6) Miyashita, T., *et al.*, *Oncol. Lett.* **14**, 5918-5926 (2017)

This reagent is used in the reference number 4)-6).

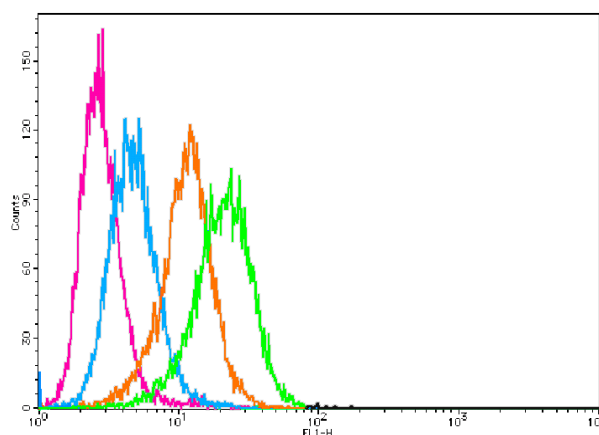
The descriptions of the following protocols are examples.
Each user should determine the appropriate condition.

PROTOCOLS:

Flow cytometric analysis for floating cells

- 1) Wash the cells 3 times with washing buffer [PBS containing 2% fetal calf serum (FCS) and 0.09% NaN₃].
- 2) Resuspend the cells with washing buffer (5x10⁶ cells/mL).
- 3) Add 50 µL of the cell suspension into each tube, and centrifuge at 500 x g for 1 minute at room temperature (20~25°C). Remove supernatant by careful aspiration.
- 4) Add 20 µL of Clear Back to the cell pellet after tapping. Mix well and incubate for 5 minutes at room temperature.
- 5) Add 40 µL of the primary antibody at the concentration as suggest in the **APPLICATION** diluted in the washing buffer. Mix well and incubate for 30 minutes at room temperature.
- 6) Add 1 mL of the washing buffer followed by centrifugation at 500 x g for 1 minute at room temperature. Remove the supernatant by careful aspiration.
- 7) Add 30 µL of the secondary antibody. (The concentration of antibody will depend on the conditions.) Mix well and incubate for 15 minutes at room temperature.
- 8) Add 1 mL of the washing buffer followed by centrifugation at 500 x g for 1 minute at room temperature. Remove the supernatant by careful aspiration.
- 9) Resuspend the cells with 500 µL of the washing buffer and analyze by a flow cytometer.

Effect of Clear Back on THP-1 cell line



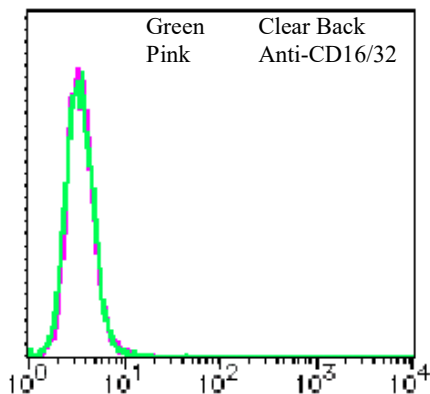
Pink: Blocking with Clear Back
Other colors: Without Clear Back

<Concentration of FITC labeled mouse IgG2a>

| | |
|--------|-----------|
| Pink | 5 µg/mL |
| Blue | 0.1 µg/mL |
| Orange | 0.5 µg/mL |
| Green | 5 µg/mL |

*Clear Back blocks non-specific bindings of antibodies caused by FcR on the THP-1 cell surface.

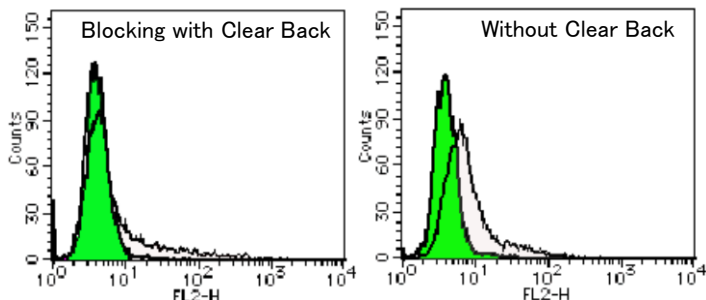
Comparison of blocking performance between CD16/32 and Clear Back



FITC labeled mouse IgG2a (5 µg/mL) staining THP-1 cells after Clear Back blocking (Green line) and after anti-CD16/32 antibodies blocking (Pink line).

*Clear Back blocks non-specific bindings to cells caused by FcR as much as anti-CD16/32 antibodies do. The anti-CD16/32 antibodies are common-used antibodies for blocking to cells of the bindings caused by FcR.

Clear Back blocks non-specific bindings of anti-CD16 antibody to THP-1 cells.



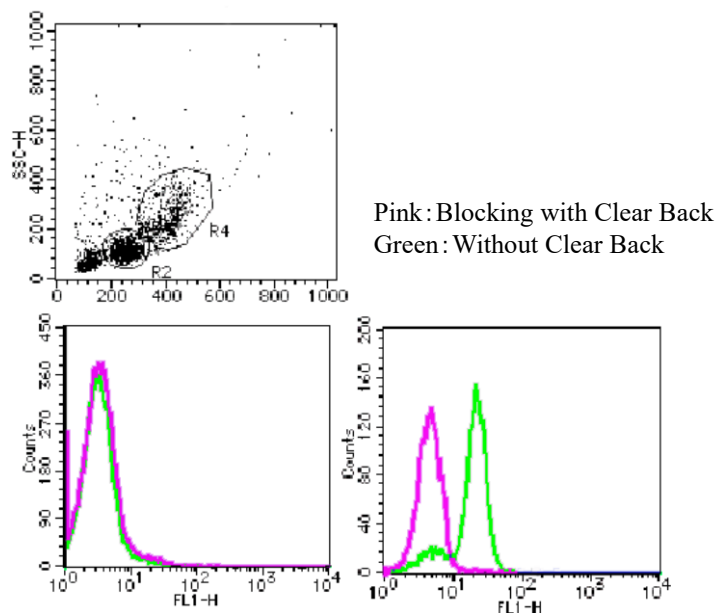
Green : PE labeled isotype control (mouse IgG1)
 Black : PE labeled anti-CD16

*FcR is expressed on THP-1 cell surface, but CD16 is not. This figure shows that Clear Back blocks non-specific bindings of anti-CD16 antibody to FcR on the surface of THP-1 cells.

Flow cytometric analysis for PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

- 1) Prepare PBMCs in accordance with the usual experimental procedure and resuspend the cells with (5x10⁶ cells/mL).
- 2) Add 20 µL of Clear Back to 50 µL the cell suspension (2.5x10⁵ cells) and incubate 5 minutes at room temperature.
- 3) Incubate the cells with primary antibody. (The concentration of antibody will depend on the conditions.)
- 4) Add 1 mL of washing buffer [PBS containing 2% fetal calf serum (FCS) and 0.09% NaN₃], followed by centrifuge at 500 x g for 1 minute.
- 5) Remove supernatant by careful aspiration.
- 6) Incubate the cells with secondary antibody. (The concentration of antibody will depend on the conditions.)
- 7) Add 1 mL of the washing buffer followed by centrifugation at 500 x g for 1 minute at room temperature. Remove supernatant by careful aspiration.
- 8) Resuspend the cells with 500 µL of the washing buffer and analyze by a flow cytometer.

Effect of Clear Back on PBMC



Pink : Blocking with Clear Back
 Green : Without Clear Back

FITC labeled mouse IgG2a (5 µg/mL) staining PBMC after Clear Back blocking (Pink line) and without Clear Back (Green line).

*Non-specific bindings are not detected on lymphocyte (R2), and Clear Back blocks non-specific bindings of the antibodies to mononuclear cells (R4).