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

T-Select MHC Tetramer

HLA-A*24:02 CMV pp65 Tetramer -QYDPVAALF (50 tests)

使用は研究用に限ります。診断目的には使用しないでください。
当試薬は米国 Beckman Coulter 社のライセンスのもとに製造販売しています。

背景

T 細胞は、T 細胞受容体(TCR)を介して、抗原提示細胞、ウィルス感染細胞やがん細胞に発現する MHC 分子と抗原ペプチドの複合体(MHC/peptide complex)に結合することにより、自己・非自己を識別し、状況に応じて活性化してさまざまな免疫応答を惹起します。MHC class I 分子に提示された抗原ペプチドを認識する CD8 陽性 T 細胞は、細胞傷害性 T 細胞(CTL)と呼ばれ、ウィルス感染細胞やがん細胞の殺傷に重要な役割を担っています。一方 MHC class II 分子に提示された抗原ペプチドを認識する CD4 陽性 T 細胞は、ヘルパーT 細胞と呼ばれ、さまざまなサイトカインを産生して細胞性免疫を調節するだけでなく、液性免疫も賦活化します。

従来、抗原特異的 T 細胞を検出・定量化することは非常に困難でしたが、1996 年 Altman らによって開発された MHC-Tetramer 試薬は、抗原特異的な TCR を有する T 細胞集団をフローサイトメーターによって簡単に可視化し定量することを可能にしました。MHC-Tetramer 試薬は、ビオチン化した MHC 分子と抗原ペプチドの複合体(モノマー)を蛍光標識したストレプトアビジンで4量体化(テトラマー)した試薬です。さまざまな分化マーカーや、機能アッセイと組み合わせることで、特異的 T 細胞の分化状態や、機能を同時に解析することが可能です。

本試薬は、MHC に HLA-A*24:02 を、抗原ペプチドに CMV pp65 由来のペプチドを用いて合成しており、 これに特異的な CTL 集団を検出定量することが可能です。サイトメガロウィルス(CMV)は、ヘルペスウィルス科に属する 2 本鎖 DNA ウィルスです(学名: human herpesvirus 5, HHV-5)。1990 年に Chee らによって全塩基配列が決定され、分子生物学的な研究が飛躍的に進展しました。日本人の約 90%で潜伏感染が見られ、通常は症状を伴いませんが、免疫抑制状態で活性化することが知られています。移植患者や HIV 感染症患者による感染症では、しばしば重篤な症状を引き起こすため、CMV のモニタリングは重要視されています。

MHC-Tetramer 陽性細胞の有無を判定する際、同じ allele で、違う抗原に対する Tetramer 試薬をネガティブコントロールとして対照に用いる事をお勧めします。製品情報に関しましては、関連製品欄をご覧ください。

HLA-A*24:02 CMV pp65 エピトープの参考文献

1) Kuzushima K, *et al. Blood* **98**: 1872-1881 (2001)
2) Kondo E, *et al. J Immunol* **169**: 2164-2171 (2002)
3) Kuzushima K, *et al. Blood* **101**: 1460-1468 (2003)
4) Kondo E, *et al. Blood* **103**: 630-638 (2004)
5) Watanabe K, *et al. Int J Hematol* **88**: 311-320 (2008)
6) Kozako T, *et al. Leukemia* **23**: 375-382 (2009)

T-Select human HLA class I Tetramer の特徴

T-Select human HLA class I Tetramer は特定の HLA allele と抗原ペプチドとの複合体に特異的に結合するヒト CD8 陽性 T 細胞集団を検出できます。CD8 分子は HLA class I 分子に結合し、TCR と HLA class I/抗原ペプチド複合体との結合をサポートしています。この CD8 分子による HLA 分子への結合が、非特異的な CTL 検出の原因でした。本試薬では HLA class I 分子のα3 領域のアミノ酸配列に変異を入れることにより CD8 分子との非特異的結合を最小限に抑えたことで、特異性が飛躍的に向上しています。

French Application Number; FR9911133

HLA 拘束性: HLA-A*24:02

抗原ペプチドの由来と配列

CMV pp65 (341-349 aa, QYDPVAALF)

標識物

TS-0020-1C: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)
励起波長; 486-580 nm
蛍光波長; 586-590 nm

TS-0020-2C: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)
励起波長; 633-635 nm
蛍光波長; 660-680 nm

保存法: 2-8℃で遮光保存してください。凍結は絶対にしないでください。製品有効期限は、チューブに貼られているラベルをご確認ください。

性状： 容量 500 µL, 10 µL/test

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.09% NaN_3, 0.2% BSA にテトラマー試薬としてモノマーが 100 µg/mL の濃度で含まれています。

＊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の水で洗い流してください。

試薬の劣化について： 試薬に沈殿物などの物理的な変化が観察された場合（通常は透明でわずかにピンク色(SA-PE)または青紫色 (SA-APC)の液体）は、劣化している可能性がありますので使わないでください。

染色方法

1）全血を用いる場合

1. 適切な抗凝固剤を使用して、静脈血を採取します。
2. 10 µL の T-Select MHC Tetramer を各試験管に加えます。
3. 各試験管に 200 µL の全血を添加します。
4. ゆっくりとボルテックスをかけます。
5. 2-8℃または室温（15-25℃）で 30～60 分間インキュベーションします。
6. OptiLyse C (Beckman Coulter 社製分析機器用)、もしくは OptiLyse B (BD Biosciences 社製分析機器用)を用いて溶血・固定処理します。各々の説明書にて推奨の手順に従ってください。
7. 溶血・固定プロトコールの最終ステップ後、適量の PBS を加えて再懸濁します。
8. 400×g で 5 分間遠心します。
9. 上澄みをアスピレートします。
10. ペレットを 500 µL の PBS に再懸濁します。
11. サンプルは暗室にて 2-8℃で保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点

A. 細胞培養を行う場合は、必ずヘパリンナトリウムを抗凝固剤として選択してください。
B. CD8 等の抗体を追加する場合は、ステップ 2.で同時染色するか、ステップ 5.終了時に追加染色してください。抗 CD8 抗体（クローン T8）は、Tetramer 試薬の染色性を阻害しませんので同時染色する事が可能です。
C. 溶血処理が不十分な場合、赤血球の乱反射による非特異的染色像が観察されることがあります。CD45 を同時染色してリンパ球ゲートで解析してください。

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、2×10^7 cells/mL の濃度にて、細胞を再懸濁します。
2. 50 µL (1×10^6 cells)の細胞懸濁液に 10 µL の Clear Back（MBL code no. MTG-001）を加え、5 分間室温にて反応させてください。
3. 10 µL の T-Select MHC Tetramer を加えます。
4. 2-8℃または室温（15-25℃）で 30～60 分間インキュベーションします。
5. CD8 抗体等を加え、2-8℃で 20 分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN_3/PBS]を加え 400×g で 5 分間遠心します。
7. 上澄みを注意深く捨てます。
8. 細胞を 500 µL の 0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS に再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 2-8℃で保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点

D. PBMC を分離後、赤血球が残っている場合は、溶血処理を行ってください。溶血処理後も赤血球の混入が認められる場合は CD45 を同時染色し、リンパ球ゲートにて解析してください。
E. Blocking buffer あるいは 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。
F. CD8 抗体はクローンによっては Tetramer 試薬と TCR の結合を阻害することが報告されています。クローン T8 に阻害作用はありません。
G. 培養したリンパ球を染色する場合は、7-AAD を用いて死細胞を染色し、解析ゲート内から除去してください。
H. 染色後、数時間以内に解析する予定でしたら、パラフォルムアルデヒドによる固定処理は必要ありません。

一般的な注意事項

1. 検体、サンプル、およびそれらと接触する全ての材料は感染の可能性を持つものとして、取り扱いには十分注意してください。
2. 保管もしくは反応中、試薬に光をあてないようご注意ください。
3. 全血にて最適な結果を得るため、検体は採血管にて室温で保存し、染色操作直前にも倒立攪拌してください。冷蔵検体では異常な結果が出ることがありますので使用しないでください。
4. 静脈血液検体の推奨細胞生存率は≧90%です。
5. 細胞を溶血試薬と長時間反応させないでください。白血球の破壊や目的細胞損失の原因となります。
6. 有核赤血球、異常タンパク濃度を有する検体、もしくは異常血色素症では、必ずしも全ての赤血球が溶血されないことがあります。こうした場合、溶血されない赤血球が白血球としてカウントされることで、陽性率の低下をもたらすことがあります。

Tetramer 試薬の参考文献

1) Altman JD, *et al. Science* **274**: 94-96 (1996)
2) Mcmichael AJ, *et al. J Exp Med* **187**: 1367-1371 (1998)

3) Bodinier M, *et al.* *Nat Med* **6**: 707–710 (2000)
4) 村上昭弘, 鈴木進　臨床免疫 **42**: 134–138 (2004)

関連製品

T–Select Human Tetramers

CMV

TS–M012–1	HLA–A*11:01 CMV pp65 Tetramer–ATVQGQNLK–PE
TS–0010–1C	HLA–A*02:01 CMV pp65 Tetramer–NLVPMVATV–PE
TS–0010–2C	HLA–A*02:01 CMV pp65 Tetramer–NLVPMVATV–APC
TS–0020–1C	HLA–A*24:02 CMV pp65 Tetramer–QYDPVAALF–PE
TS–0020–2C	HLA–A*24:02 CMV pp65 Tetramer–QYDPVAALF–APC
TS–M013–1	HLA–B*15:01 CMV pp65 Tetramer–KMQVIGDQY–PE
TS–0027–1C	HLA–B*35:01 CMV pp65 Tetramer–IPSINVHHY–PE
TS–0027–2C	HLA–B*35:01 CMV pp65 Tetramer–IPSINVHHY–APC
TS–0025–1C	HLA–B*07:02 CMV pp65 Tetramer–TPRVTGGGAM–PE
TS–0025–2C	HLA–B*07:02 CMV pp65 Tetramer–TPRVTGGGAM–APC
TS–M099–1	HLA–B*07:02 CMV pp65 Tetramer–RPHERNGFTVL–PE
TS–M099–2	HLA–B*07:02 CMV pp65 Tetramer–RPHERNGFTVL–APC
TS–0024–1C	HLA–A*01:01 CMV pp50 Tetramer–VTEHDTLLY–PE
TS–0024–2C	HLA–A*01:01 CMV pp50 Tetramer–VTEHDTLLY–APC
TS–M057–1	HLA–A*02:01 CMV IE1 Tetramer–VLEETSVML–PE
TS–M057–2	HLA–A*02:01 CMV IE1 Tetramer–VLEETSVML–APC
TS–M100–1	HLA–A*03:01 CMV IE1 Tetramer–KLGGALQAK–PE
TS–M100–2	HLA–A*03:01 CMV IE1 Tetramer–KLGGALQAK–APC
TS–0026–1C	HLA–B*08:01 CMV IE1 Tetramer–ELRRKMMYM–PE
TS–0026–2C	HLA–B*08:01 CMV IE1 Tetramer–ELRRKMMYM–APC

EBV

TS–0011–1C	HLA–A*02:01 EBV BMLF1 Tetramer–GLCTLVAML–PE
TS–M006–1	HLA–A*02:01 EBV LMP1 Tetramer–YLQQNWWTL–PE
TS–M030–1	HLA–A*02:01 EBV LMP2 Tetramer–TVCGGIMFL–PE
TS–M031–1	HLA–A*02:01 EBV LMP2 Tetramer–LLWTLVVLL–PE
TS–M069–1	HLA–A*02:01 EBV LMP2 Tetramer–FLYALALLL–PE
TS–M032–1	HLA–A*02:01 EBV LMP2 Tetramer–CLGGLLTMV–PE
TS–M003–1	HLA–A*24:02 EBV BMLF1 Tetramer–DYNFVKQLF–PE
TS–M002–1	HLA–A*24:02 EBV BRLF1 Tetramer–TYPVLEEMF–PE
TS–M004–1	HLA–A*24:02 EBV EBNA3A Tetramer–RYSIFFDYM–PE
TS–M005–1	HLA–A*24:02 EBV EBNA3B Tetramer–TYSAGIVQI–PE
TS–M034–1	HLA–A*24:02 EBV LMP2 Tetramer–PYLFWLAAI–PE
TS–M001–1	HLA–A*24:02 EBV LMP2 Tetramer–IYVLVMLVL–PE
TS–M035–1	HLA–A*24:02 EBV LMP2 Tetramer–TYGPVFMSL–PE
TS–M009–1	HLA–A*24:02 EBV Mix Tetramer–PE
TS–M028–1	HLA–A*11:01 EBV EBNA3B 399–408 Tetramer–PE
TS–M029–1	HLA–A*11:01 EBV EBNA3B 416–424 Tetramer–PE

HIV

TS–M027–1	HLA–A*02:01 HIV gag Tetramer–SLYNTVATL–PE
TS–M027–2	HLA–A*02:01 HIV gag Tetramer–SLYNTVATL–APC
TS–M027–3	HLA–A*02:01 HIV gag Tetramer–SLYNTVATL–FITC
TS–0008–1C	HLA–A*02:01 HIV pol Tetramer–ILKEPVHGV–PE
TS–M007–1	HLA–A*24:02 HIV env Tetramer–RYLRDQQLL–PE
TS–M007–2	HLA–A*24:02 HIV env Tetramer–RYLRDQQLL–APC
TS–M007–3	HLA–A*24:02 HIV env Tetramer–RYLRDQQLL–FITC
TS–M054–1	HLA–B*07:02 HIV nef Tetramer–TPGPGVRYPL–PE
TS–M054–2	HLA–B*07:02 HIV nef Tetramer–TPGPGVRYPL–APC
TS–M106–1	HLA–B*35:01 HIV nef Tetramer–VPLRPMTY–PE
TS–M055–1	HLA–B*35:01 HIV RT Tetramer–NPDIVIYQY–PE

Adenovirus

TS–M058–1	HLA–A*02:01 AdV Hexon$_{913-921}$ Tetramer–YLLFEVFDV–PE
TS–M059–1	HLA–A*02:01 AdV Hexon$_{914-922}$ Tetramer–LLFEVFDVV–PE
TS–M061–1	HLA–A*02:01 AdV Hexon$_{917-925}$ Tetramer–YVLFEVFDV–PE
TS–M062–1	HLA–A*24:02 AdV Hexon$_{37-45}$ Tetramer–TYFNLGNKF–PE
TS–M063–1	HLA–A*24:02 AdV Hexon$_{37-45}$ Tetramer–TYFSLNNKF–PE
TS–M064–1	HLA–A*24:02 AdV Hexon$_{696-704}$ Tetramer–VYSGSIPYL–PE
TS–M065–1	HLA–B*07:02 AdV Hexon$_{114-124}$ Tetramer–KPYSGTAYNSL–PE
TS–M066–1	HLA–B*07:02 AdV Hexon$_{114-124}$ Tetramer–KPYSGTAYNAL–PE
TS–M067–1	HLA–B*35:01 AdV Hexon$_{320-329}$ Tetramer–MPNRPNYIAF–PE
TS–M068–1	HLA–B*35:01 AdV Hexon$_{705-713}$ Tetramer– IPYLDGTFY–PE

HTLV–1

TS–M017–1	HLA–A*02:01 HTLV–1 Tax11–19 Tetramer–PE
TS–M017–2	HLA–A*02:01 HTLV–1 Tax11–19 Tetramer–APC
TS–M019–1	HLA–A*02:01 HTLV–1 Tax178–186 Tetramer–PE
TS–M020–1	HLA–A*24:02 HTLV–1 Tax12–20 Tetramer–PE
TS–M021–1	HLA–A*24:02 HTLV–1 Tax187–195 Tetramer–PE
TS–M018–1	HLA–A*24:02 HTLV–1 Tax301–309 Tetramer–PE
TS–M018–2	HLA–A*24:02 HTLV–1 Tax301–309 Tetramer–APC
TS–M022–1	HLA–A*24:02 HTLV–1 Env11–19 Tetramer–PE
TS–M023–1	HLA–A*11:01 HTLV–1 Tax88–96 Tetramer–PE
TS–M024–1	HLA–A*11:01 HTLV–1 Tax272–280 Tetramer–PE

T–Select Peptides

TS–0010–P	HLA–A*02:01 CMV pp65 peptide
TS–0020–P	HLA–A*24:02 CMV pp65 peptide
TS–M007–P	HLA–A*24:02 HIV env gp160 peptide
TS–M012–P	HLA–A*11:01 CMV pp65 peptide
TS–M027–P	HLA–A*02:01 HIV gag peptide

Others

4844	IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit
8223	IMMUNOCYTO IFN–γ ELISPOT Kit
AM–1005	IMMUNOCYTO Cytotoxity Detection Kit
6603861	CD8–FITC (T8)
6607011	CD8–PC5 (T8)
A07704	7–AAD Viability Dye
IM–1400	OptiLyse B
A11895	OptiLyse C
MTG–001	Clear Back (Human FcR blocking reagent)

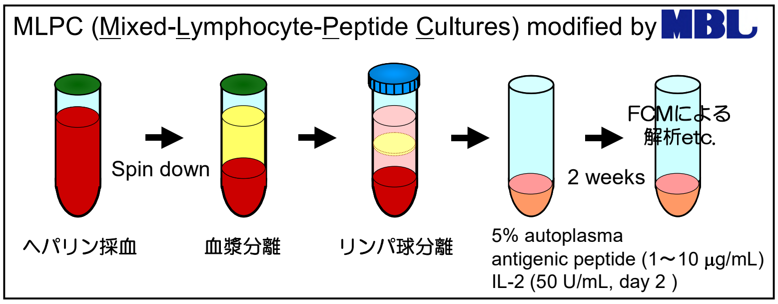
T–Select MHC Tetramer 試薬、誘導用ペプチド等の製品ラインナップ、MHC Tetramer 試薬のカスタム合成に関しましては、弊社ホームページ(http://ruo.mbl.co.jp)より最新情報をご確認ください。

染色例

HLA-A*24:02を保持する健常人末梢血よりPBMCを調製し、その一部をTetramer試薬にて染色した(fresh)。残りのPBMCは、HLA-A*24:02拘束性CMV pp65由来の抗原ペプチド(QYDPVAALF, 10 µg/mL, MBL code no. TS-0020-P)を用いて CTL を誘導し、2 週間培養して Tetramer 試薬を用いて染色した(cultured)。特異的 CTL の誘導方法は、PBMC と抗原ペプチドを混合して培養する MLPC 法を用いた。

図中右上の数値は CD8 陽性細胞中の Tetramer 陽性細胞率(%)を示す。

MBL の社内検討では、採血直後の測定において、Tetramer 陽性細胞の有無が判定不可能な検体でも、8-14 日間の培養を MLPC 法にて実施することで、HLA-A*24:02 陽性健常人全員(n=18)から CMV pp65 由来の抗原ペプチド特異的な CTL を誘導することができた。

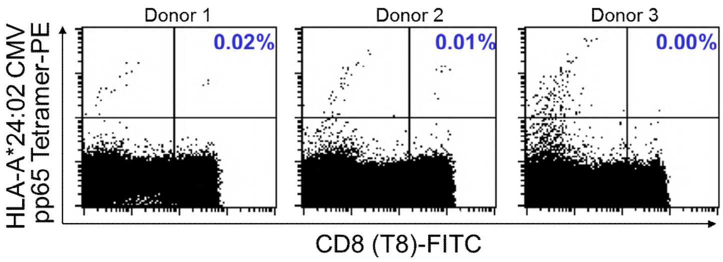


染色方法

1. ヘパリン採血後直ちに分離したPBMC(fresh)とペプチドを加えて培養したリンパ球(1×10^6 cells)を適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN_3/PBS]にて 1 回洗ったものをそれぞれ 2 本用意した。
2. 10 µL の Clear Back Human FcR blocking reagent (MBL code no. MTG-001)と 20 µL の FCM buffer を加え、室温にて 5 分間反応させた。
3. 以下の各テトラマー試薬をそれぞれ 10 µL ずつ加え、4℃で 30 分間反応させた。
   - HLA-A*24:02 Negative Tetramer-PE
   - HLA-A*24:02 CMV pp65 Tetramer-PE
4. 10 µL の CD8-FITC (clone T8, MBL code no. 6603861)をそれぞれ加え、4℃で 30 分間反応させた。
5. 適量の FCM buffer を加え 400 × g で 5 分間遠心した。
6. 上澄みを注意深く捨て、400 µL の FCM buffer を加えて細胞を懸濁した。5 µL の 7-AAD(死細胞検出薬, MBL code no. A07704)をそれぞれ加え、軽く攪拌した。
7. FCM にて解析した。

染色結果 (fresh)

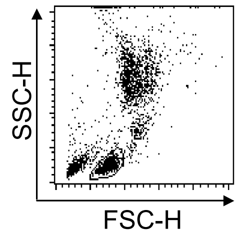
採血直後に分離した PBMC の染色結果を示す。

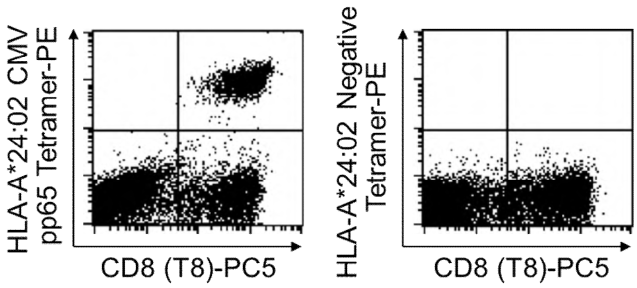


染色結果 (cultured)

PBMC に CMV pp65 ペプチドを用いて 2 週間刺激培養した染色結果を示す。

FSC/SSC ドットブロット展開図：
生細胞領域をゲーティングし、解析を行った。

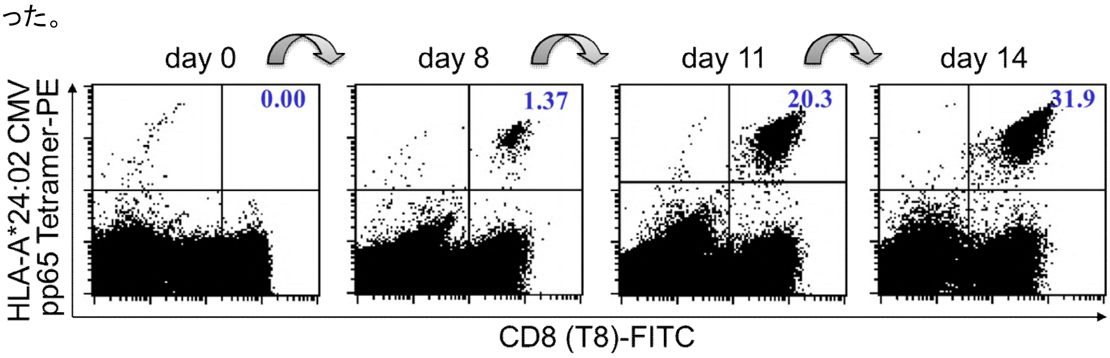




染色結果 (fresh-cultured)

PBMC に CMV pp65 ペプチドを加えて刺激培養した。day 0(刺激前), day 8, day 11, day 14 における染色結果を示す。

刺激前には HLA-A*24:02 CMV pp65 Tetramer 陽性細胞が見られなかった Donor においても、MLPC 法にて陽性細胞が増殖し、Tetramer で検出可能であることが分かった。



T-Select MHC Tetramers use patented technology (US patent No. 5,635,363, French application No. FR9911133, and Japanese patent No. P3506384) of Beckman Coulter, Inc..
MBL manufactures and distributes these products under license from Beckman Coulter, Inc..