

T-Select MHC class I mouse Tetramer

H-2K^b SeV Tetramer

-FAPGNYPAL-PE (50 tests)

使用は研究用に限り、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、ウイ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、ウイ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 にマウス H-2K^b を、抗原ペプチドにセンダイウイルス (sendai virus; SeV, SEV, HVJ) 由来のペプチド配列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。SeV は、パラミクソウイルス科に属する 1 本鎖 RNA ウイルスです。マウスに肺炎を引き起こすウイルスとして、1953 年に東北大学の石田らにより発見されました。強い細胞融合活性を持つことから、膜融合機構の解析やハイブリドーマ技術に貢献しました。I 型 IFN の産生を強く誘導することがよく知られており、一方で、SeV の C 蛋白質は、JAK/STAT 系の阻害や転写因子の活性化抑制による、抗 IFN 活性を持つことが報告されています。SeV を構成する蛋白質の機能や構造の研究だけでなく、産業的にも注目を集めており、センダイウイルスベクターを用いての治療用途を視野に入れた研究も進んでいます。多方面から今後の研究が期待されているウイルスのひとつです。

MHC-Tetramer 陽性細胞の有無を判定する際、同じ allele (本試薬の場合は H-2K^b) 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。

SeV NP324-332 エピトープの参考文献:

- 1) Schumacher TN, *et al. Cell* **62**: 563-567 (1990)
- 2) Schumacher TN, *et al. Nature* **350**: 703-706 (1991)
- 3) Stevenson PG, *et al. PNAS* **95**: 15565-15570 (1998)
- 4) Usherwood EJ, *et al. J. Virol.* **73**: 7278-7286 (1999)
- 5) Masopust D, *et al. J. Immunol.* **172**: 4875-4882 (2004)

MHC 拘束性: H-2K^b

抗原ペプチドの由来と配列:

SeV NP (SV9, 324-332 aa, FAPGNYPAL)

マウスの主な系統による H-2K allele:

H-2K allele	H-2K ^b	H-2K ^d	H-2K ^k
Mouse strains	C57BL/-, BXSB/Mp, 129/-	BALB/c, DBA/2, B10D2	C3H/He AKR/J

標識物: PE

励起波長: 486-580 nm

蛍光波長: 586-590 nm

性状: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.09% NaN₃, 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。

保存法: 2-8°C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。

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の液体)は、劣化している可能性がありますので使用しないでください。

染色方法:

マウス脾細胞を用いる場合

目的とする抗原特異的 CTL の誘導方法や条件は、それぞれの研究目的に合った方法で行ってください。

1. 1×10^6 個の細胞を 50 μ L の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN_3 /PBS] に懸濁します。

(オプション)

- blocking 試薬として anti-CD16/32 (MBL code no. 732121) を適量加え、4°Cで 15 分間インキュベーションします。
- 10 μ L の T-Select MHC class I mouse Tetramer-PE を加えます。
- 室温で 20 分間、あるいは 4°Cで 20 分間インキュベーションします。
- マウス CD8 抗体等を加え、4°Cで 20 分間インキュベーションします。
- 適量の FCM buffer を加え 400 x g で 5 分間遠心します。
- 上澄みを注意深く捨てます。
- 細胞を 500 μ L の 0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS に再懸濁します。
- サンプルは暗室にて 4°Cで保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点:

- CD8 分子は MHC 分子と結合し、MHC 分子と TCR の結合を補助します。このため MHC Tetramer 試薬にも非特異的に CD8 分子が結合する可能性があります。染色に用いる MHC Tetramer 試薬と抗 CD8 抗体の使用量に関しては、十分な条件検討を実施してください。
- マウス 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。マウス CD8 抗体として、クローン KT15 を推奨しております。
- 染色する細胞集団に赤血球の残存が認められる場合は、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。
- アジ化ナトリウムを用いることで、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。
- anti-CD16/32 で処理することで FcR を介した非特異

的な CD8 抗体の結合を抑制する効果が期待されま

- す。
6. 培養したリンパ球を染色する場合は、ステップ 7 で 7-AAD を加えて死細胞を染色し、解析ゲート内から除去してください。
7. 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. 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。
4. 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。

MHC Tetramer 試薬の参考文献:

- 1) Bodinier M, *et al. Nat. Med.* **6**: 707-710 (2000)
- 2) Altman JD, *et al. Science* **274**: 94-96 (1996)
- 3) Mcmichael AJ, *et al. J. Exp. Med.* **187**: 1367-1371 (1998)
- 4) 村上昭弘, 鈴木進 臨床免疫 **42**: 134-138 (2004)

ライセンスを受けている特許:

US Patent Number 5,635,363

Inventors: Altman JD, et al. (Stanford University)

“Compositions and methods for the detection, quantitation and purification of antigen-specific T cells.”

French Application Number FR9911133

Inventors: Lang F, et al. (INSERM)

“Means for detecting and for the purifying CD8+ T-lymphocyte populations specific for peptides presented in the HLA context.”

関連製品:

T-Select Mouse Tetramers

Virus

TS-M502-1	H-2D ^b	Influenza NP Tetramer-ASNENMDTM-PE
TS-M508-1	H-2D ^b	Influenza NP Tetramer-ASNENMETM-PE
TS-M527-1	H-2D ^b	Influenza NP Tetramer-ASNENMDAM-PE
TS-M528-1	H-2D ^b	Influenza PA Tetramer-SSLENFRAYV-PE
TS-M520-1	H-2K ^d	Influenza HA Tetramer-IYSTVASSL-PE
TS-5002-1C	H-2D ^b	LCMV gp33 Tetramer-KAVYNFATC-PE
TS-5009-1	H-2D ^b	LCMV gp276-286 Tetramer-SGVENPGGYCL-PE
TS-5010-1C	H-2K ^b	LCMV gp34-41 Tetramer-AVYNFATC-PE

TS-5011-1 H-2K^b LCMV gp34-43 Tetramer-AVYNFATCGI-PE
TS-5012-1 H-2K^b LCMV gp118-125 Tetramer-ISHNFCNL-PE
TS-5014-1 H-2K^b LCMV L protein Tetramer-LEYDFNKL-PE
TS-5015-1 H-2K^b LCMV NP205-212 Tetramer-YTVKYPNL-PE
TS-M512-1 H-2D^b LCMV gp33 (C9M) Tetramer-KAVYNFATM-PE
TS-M513-1 H-2D^b LCMV NP396 Tetramer-FQPQNGQFI-PE
TS-M514-1 H-2L^d LCMV NP118 Tetramer-RPQASGVYM-PE
TS-M516-1 H-2D^d HIV P18-I10 Tetramer-RGPGRFVTI-PE
TS-5007-1 H-2K^b HIV gag Tetramer-AMQMLKETI-PE
TS-5008-1C H-2D^b HPV16 E7 Tetramer-RAHYNIVTF-PE
TS-M506-1 H-2K^d RSV Tetramer-SYIGSINNI-PE
TS-5018-1C H-2D^b RSV Tetramer-NAITNAKII-PE
TS-M507-1 H-2K^b MuLV p15E Tetramer-KSPWFITL-PE
TS-M521-1 H-2L^d MuLV gp70 Tetramer-SPSYVYHQF-PE
TS-M510-1 H-2L^d MCMV IE1 Tetramer-YPHFMPTNL-PE
TS-M522-1 H-2L^d HBsAg Tetramer-IPQSLDSWWTSL-PE
TS-M523-1 H-2K^b HSV-1 gB Tetramer-SSIEFARL-PE
TS-M529-1 H-2K^b VSV NP Tetramer-RGYVYQGL-PE
TS-M530-1 H-2D^k polyomavirus MT Tetramer-RRLGRTLLL-PE
TS-M531-1 H-2D^k HTLV-1 Tax38-46 Tetramer-ARLHRHALL-PE
TS-5016-1 H-2D^b MoMSV Tetramer-(Abu)(Abu)L(Abu)LTVFL-PE
TS-5017-1C H-2D^b SIV gag Tetramer-AAVKNWMTQTL-PE

Cancer

TS-5004-1C H-2K^b TRP2 Tetramer-SVYDFVWL-PE
TS-M504-1 H-2D^b WT1 Tetramer-RMFPNAPYL-PE
TS-M505-1 H-2D^b human gp100 Tetramer-KVPRNQDWL-PE
TS-M518-1 H-2D^b CEA Tetramer-EAQNTTYL-PE
TS-M519-1 H-2L^d P815 Tetramer-LPYLGWLVF-PE
TS-M526-1 H-2K^d HER2 Tetramer-TYLPTNASL-PE

Foreign antigen

TS-5001-1C H-2K^b OVA Tetramer-SIINFEKL-PE
TS-M525-1 H-2K^d EGFP Tetramer-HYLSTQSAL-PE
TS-M503-1 H-2K^d Listeria LLO Tetramer-GYKDGNEYI-PE
TS-M515-1 H-2K^d malaria Tetramer-SYIPSAEKI-PE
TS-M517-1 H-2D^d BCG MPT51 Tetramer-GGPHAVYLL-PE
TS-M501-1 H-2K^b β -galactosidase Tetramer-DAPIYTNV-PE
TS-M511-1 H-2L^d β -galactosidase Tetramer-TPHPARIGL-PE

Others

TS-M524-1 H-2D^b HY Uty Tetramer-WMHHNMDLI-PE
TS-M008-1 H-2K^b Negative Tetramer-SIYRYGYL-PE
TS-M704-1 I-A^b MOG₃₅₋₅₅ Tetramer-PE
TS-M707-1 I-A^b ESAT-6₁₋₂₀ Tetramer-PE
TS-MCD-1 Mouse CD1d Tetramer-PE

T-Select Peptides

TS-5001-P H-2K^b OVA peptide
TS-5002-P H-2D^b LCMV gp33 peptide
TS-M501-P H-2K^b β -galactosidase peptide
TS-M502-P H-2D^b Influenza NP peptide
TS-M503-P H-2K^d Listeria LLO peptide
TS-M505-P H-2D^b human gp100 peptide
TS-M506-P H-2K^d RSV peptide
TS-M507-P H-2K^b MuLV peptide
TS-M508-P H-2D^b Influenza NP peptide
TS-M509-P H-2K^b SeV peptide

TS-M510-P H-2L^d MCMV IE1 peptide
TS-M511-P H-2L^d β -galactosidase peptide
TS-M512-P H-2D^b LCMV gp33 (C9M) peptide
TS-M513-P H-2D^b LCMV NP396 peptide
TS-M514-P H-2L^d LCMV NP118 peptide
TS-M515-P H-2K^d malaria peptide
TS-M516-P H-2D^d HIV P18-I10 peptide
TS-M517-P H-2D^d BCG MPT51 peptide
TS-M518-P H-2D^b CEA peptide
TS-M519-P H-2L^d P815 peptide
TS-M520-P H-2K^d Influenza HA peptide
TS-M521-P H-2L^d MuLV gp70 peptide
TS-M522-P H-2L^d HBsAg peptide
TS-M523-P H-2K^b HSV-1 gB peptide
TS-M524-P H-2D^b HY Uty peptide
TS-M525-P H-2K^d EGFP peptide
TS-M526-P H-2K^d HER2 peptide
TS-M527-P H-2D^b Influenza NP peptide
TS-M528-P H-2D^b Influenza PA peptide
TS-M529-P H-2K^b VSV NP peptide
TS-M530-P H-2D^k polyomavirus MT peptide
TS-M531-P H-2D^k HTLV-1 Tax38-46 peptide
TS-M008-P H-2K^b SIY peptide
TS-M701-P I-A^b HBc helper peptide
TS-M702-P I-A^d Tetanus toxin p30 helper peptide
TS-M703-P I-A^d OVA 323-339 helper peptide
TS-M704-P I-A^b MOG peptide
TS-M707-P I-A^b ESAT-6 peptide
TS-M708-P I-A^k HEL peptide

Kit

AM-1005 IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit

Others

D341-4 mouse CD4-FITC (GK1.5)
D271-4 mouse CD8-FITC (KT15)
D271-A64 mouse CD8-Alexa Fluor[®] 647 (KT15)
732121 mouse CD16/32 (93)
732151 mouse CD45-APC (I3/2.3)
732152 mouse CD45-SPRD (I3/2.3)
K0221-3 anti-mouse TCR DO11.10 (KJ1.26)
K0221-5 anti-mouse TCR DO11.10-PE (KJ1.26)
K0222-3 anti-mouse TCR 3DT-52.5 (KJ12.98)
A07704 7-AAD Viability Dye
MTG-001 Clear Back (Human FcR blocking reagent)

T-Select MHC Tetramer 試薬、CTL 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:

H-2K^b 拘束性 SeV 由来の抗原ペプチド (FAPGNYPAL, MBL code no. TS-M509-P) と、ヘルパー作用の報告がある抗原ペプチド (MBL code no. TS-M701-P) を混合し、免疫賦活剤とエマルジョン化して C57BL/6 マウスに腹腔免疫した。2 回免疫後に脾臓を摘出して脾細胞を調製後、一部をサンプリングして MHC Tetramer 試薬を用いて染色した (day 0)。これらの脾細胞は、*in vitro* において H-2K^b SeV peptide で 1 週間刺激培養した。これを同様に MHC Tetramer 試薬を用いて染色した (day 6)。

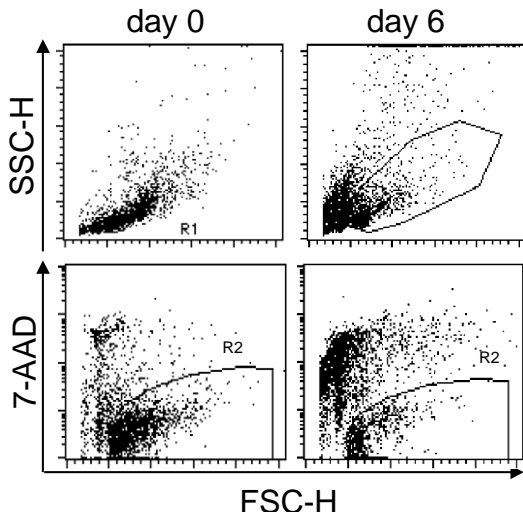
染色方法:

1. 免疫したマウスの脾細胞 (1×10^6 cells) あるいは 1 週間刺激培養した細胞集団 (1×10^6 cells) を ACK lysis buffer にて溶血処理し、適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN₃/PBS] にて 1 回洗ったものをそれぞれ 2 本ずつ用意した。
2. 10 μ L の Clear Back (MBL code no. MTG-001) と 20 μ L の FCM buffer を加え、室温にて 5 分間反応させた。
3. 10 μ L の H-2K^b SeV Tetramer-FAPGNYPAL-PE あるいは 10 μ L の H-2K^b β -galactosidase Tetramer-DAPIYTNV-PE (Negative Tetramer として使用、MBL code no. TS-M501-1) をそれぞれ加え、4°C で 20 分間反応させた。
4. 10 μ L の mouse CD8-FITC (clone KT15, MBL code no. IM-2778) をそれぞれ加え、ピペティングした。
5. 4°C で 20 分間反応させた。
6. 適量の FCM buffer を加え 400 x g で 5 分間遠心した。
7. 上澄みを注意深く捨て、400 μ L の FCM buffer を加えて細胞を懸濁した。このとき、死細胞を染色するために、7-AAD (MBL code no. A07704) を 5 μ L 加えた。
8. FCM にて解析した。

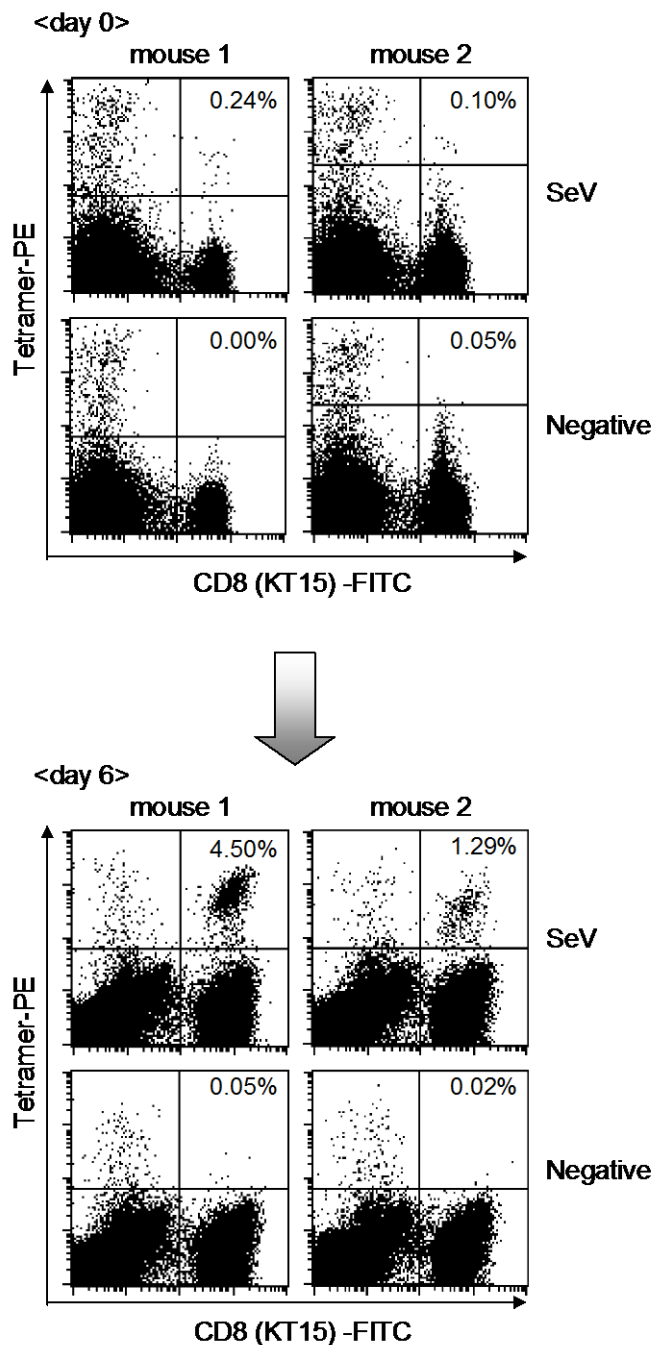
結果:

FSC/SSC 展開にて T 細胞領域を R1 とし、7-AAD 陰性細胞領域を R2 とした。この R1 かつ R2 領域にて解析を行った。ドットプロット展開図右上の数字は、CD8 陽性細胞中の MHC Tetramer 陽性細胞の割合を示す。

<FSC/SSC ドットプロット展開図>



<Tetramer 染色像>



SeV 由来の抗原ペプチド (FAPGNYPAL) を免疫したマウスにおいて、*in vitro* stimulation により SeV 特異的 CTL の誘導が確認された。

Negative Tetramer (H-2K^b β -galactosidase Tetramer-DAPIYTNV-PE) を用いた比較染色により、特異的 CTL であることが明示された。