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

T-Select MHC Class I Mouse Tetramer

Allele and Peptide Specificity

The T-Select MHC Class I Mouse Tetramers recognize murine $CD8^+$ T cells which are specific for a particular peptide in combination with the H-2 murine alleles.

Background

T lymphocytes play a central role in immune system. Total T cell and T cell subset counts are measured by detection of various cell surface molecules. Enumeration of $CD8^+$ antigen-specific T cells requires cognate recognition of the T cell receptor (TCR) by a class I MHC/peptide complex. This can be done using class I MHC Tetramers which are composed of a complex of four H-2 MHC class I molecules each bound to the specific peptide[1), 2)] and conjugated with a fluorescent protein. Thus, T-Select MHC Tetramer assays allow quantitation of the total T cell population specific for a given peptide complexed in a particular MHC molecule. Furthermore, since binding does not depend on functional pathways, this population includes all specific $CD8^+$ T cells regardless of functional status. Measurements may be performed in whole blood or isolated lymphocyte/splenocyte or thymocyte cell preparations[3)]. Specific cell staining is accomplished by incubating the sample with the T-Select MHC Tetramer reagent, then washing away excess Tetramer. The number of Tetramer positive lymphocytes is then determined by flow cytometry.

Reagents

500 μL liquid - 10 μL/test
The Tetramer is dissolved in an aqueous buffer containing 0.5 mM EDTA, 0.2% BSA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 0.09% NaN_3.

Conjugates

・Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)
Excites at 486-580 nm
Emits at 586-590 nm

・Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)
Excites at 633-635 nm
Emits at 660-680 nm

・Streptavidin-Fluorescein Isothiocyanate (SA-FITC)
Excites at 465-495 nm
Emits at 515-555 nm

・Streptavidin-Brilliant Violet™ 421 (SA-BV421)
Excitation maximum 405 nm
Emission maximum 421 nm

Storage Conditions

Store at 2 to 8°C. Do not freeze. Minimize exposure to light.
The expiration date is indicated on the vial label.
If the expiration date is not indicated, T-Select MHC Tetramers are stable for 90 days from the date of purchase. Stability data are not available for custom T-Select MHC Tetramers.

Evidence of Deterioration

Any change in the physical appearance of this reagent may indicate deterioration and the reagent should not be used. The normal appearance is a clear, colorless (SA-BV421) to pink (SA-PE), light blue (SA-APC), or light yellow (SA-FITC).

Reagent Preparation

No preparation is necessary. These T-Select MHC Tetramer reagents are used directly from the vial after a brief vortex on low setting.

Usage

This reagent is for use with standard flow cytometry methodologies.

Statement of Warnings

1. This reagent contains 0.09% sodium azide. Sodium azide under acid conditions yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Azide compounds should be flushed with running water while being discarded. These precautions are recommended to avoid deposits in metal piping in which explosive conditions can develop. If skin or eye contact occurs, wash excessively with water.
2. Specimens, samples and material coming in contact with them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.
3. Never pipet by mouth and avoid contact of samples with skin and mucous membranes.
4. Minimize exposure of reagent to light during storage or incubation.
5. Avoid microbial contamination of reagent or erroneous results may occur.
6. Use Good Laboratory Practices (GLP) when handling this reagent.

Materials Required But Not Supplied

- 12 x 75 mm polypropylene test tubes
- Transfer pipettes
- Pipettors and disposable pipette tips
- Vortex mixer
- Centrifuge capable of 150 x g or 400 x g
- Aspirator
- PBS
- Red blood cell lysis reagent
- Anti-mouse CD8-FITC (clone KT15), MBL, PN K0227-4
- Anti-mouse CD8-Alexa Fluor™ 647 (clone KT15), MBL, PN K0227-A64
- 7-AAD Viability Dye, Beckman Coulter, Inc., PN A07704
- Clear Back (human FcR blocking reagent) MBL, PN MTG-001

Procedure for Whole Blood

1. Collect venous blood specimen according to established protocol into a blood collection tube using an appropriate anti-coagulant. If the mouse line that is being used is transgenic and the T cell receptor is specific for the peptide, 100 μL of whole blood should be adequate. If the blood specimen is not being derived from a transgenic line, you may require more than 100 μL in order to perform the rare event analysis.
2. To each 12 x 75 mm test tube add 10 μL of T-Select MHC Tetramer.
3. Add 100 μL of whole blood into each test tube.
4. Vortex gently.
5. Incubate for 30-60 minutes at 2-8°C or room temperature (15-25°C) protected from light.
6. Add any additional antibodies (e.g. anti-CD8) and vortex gently.
7. Incubate for 30 minutes at 2-8°C protected from light.
8. Lyse red blood cells using commercially available reagents.
9. Prepare samples according to description of the package insert.
10. Store prepared samples at 2-8°C protected from light for a minimum of 1 hour (maximum 24 hours) prior to analysis by flow cytometry.

Procedure for Cell Preparations and Cell Suspensions

1. Collect lymph node, spleen or thymus and prepare a single-cell suspension according to an established protocol. Cells should be re-suspended at a concentration of 2 x 10^7 cells/mL. 50 μL of sample is required for each T-Select MHC Tetramer determination.
2. Add 10 μL of Clear Back (human FcR blocking reagent, MBL, PN MTG-001) to each 12 x 75 mm test tube.
3. Add 50 μL of cell suspension into each test tube (e.g. 1 x 10^6 cells per tube).
4. Incubate for 5 minutes at room temperature (15-25°C).
5. Add 10 μL of T-Select MHC Tetramer and vortex gently.
6. Incubate for 30-60 minutes at 2-8°C or room temperature (15-25°C) protected from light.
7. Add any additional antibodies (e.g. anti-CD8) and vortex gently.
8. Incubate for 30 minutes at 2-8°C protected from light.
   If red blood cell lysis is necessary, proceed to step 8-9 in the **Procedure for Whole Blood** section. If red blood cell lysis is not necessary, continue to step 9 below.
9. Add 3 mL of PBS or FCM buffer (2% FCS/0.09% NaN_3/PBS).
10. Centrifuge tubes at 400 x g for 5 minutes.
11. Aspirate or decant the supernatant.
12. Suspend the pellet in 500 μL of FCM buffer and analyze it immediately, or suspend it in 0.5% paraformaldehyde/PBS and store the sample in a dark room at 2-8°C. Be sure to analyze it within 24 hours.

Limitations

1. For optimal results with whole blood, retain specimens in blood collection tubes at room temperature, while rocking, prior to staining and analyzing. Refrigerated specimens may give aberrant results.
2. Recommended cell viability for venous blood specimens is > 90%.
3. Prolonged exposure of cells to lytic reagents may cause white blood cell destruction and loss of cells in the population of interest.
4. All red blood cells may not lyse under the following conditions: nucleated red blood cells, abnormal protein concentration or hemoglobinopathies. This may cause falsely decreased results due to unlysed red blood cells being counted as leukocytes.

Technical Hints

A. If cell cultivation is needed, we recommend the use of heparin as an anti-coagulant.
B. Clear Back reagent (human FcR blocking reagent) may effectively block non-specific binding caused by macrophages or endocytosis, resulting in clear staining when cells are stained with MHC Tetramer and antibodies. Please refer to the data sheet (MBL, PN MTG-001) for details
C. A Tetramer, which is constructed with the same allele of interest and an irrelevant peptide, may also be used as a negative control.
D. We recommend the use of the CD8 antibody (clone KT15), because some CD8 antibodies inhibit Tetramer–specific binding to TCR.
E. In the case of OT-I TCR transgenic mice, it is necessary to perform a cross-titration experiment

with the Tetramer and the CD8 antibody (clone KT15) to determine the optimal concentration of both reagents.

F. The use of CD45 antibody and gating of the lymphocyte population are recommended in order to reduce contamination of unlysed or nucleated red blood cells in the gate.

G. Apoptotic, necrotic, and/or damaged cells are sources of interference in the analysis of viable cells by flow cytometry. Cell viability should be determined by 7-aminoactinomycin D (7-AAD) staining; intact viable cells remain unstained (negative).

H. Cells do not require fixation prior to analysis if the stained cells are analyzed by flow cytometry within several hours.

Selected References

1) Altman JD, Moss PH, Goulder PJR, Barouch DH, McHeyzer W, Bell JI, McMichael AJ, and Davis MM. 1996. Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes. Science 274:94-96.
2) McMichael AJ, and O ‘Callaghan CA. 1998. A New Look at T Cells. J. Exp. Med. 187:1367-1371.
3) Skinner PJ, Daniels MA, Schmidt CS, Jameson SC, and Haase AT. 2000. In Situ Tetramer Staining of Antigen-Specific T Cells in Tissues. J. Immunol. 165:613-617.
4) Nugent CT, Morgan DJ, Biggs JA, Ko A, Pilip IM, Pamer EG and Sherman LA. 2000. Characterization of $CD8^+$ T Lymphocytes That Persist After Peripheral Tolerance to a Self Antigen Expressed in the Pancreas. J. Immunol. 164:191-200.

Related Products

Please check our website (https://ruo.mbl.co.jp) for up-to-date information on products and custom MHC Tetramers.

MBL manufactures and distributes these products under license from Beckman Coulter Inc.
Brilliant Violet™ 421 is a trademark of Sirigen, and Sirigen is an entity of Becton, Dickinson and Company.

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

T-Select MHC class I mouse Tetramer

H-2L^{d} HBsAg Tetramer -IPQSLDSWWTSL-PE (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-2L^{d} を、抗原ペプチドに B 型肝炎ウィルス抗原 (hepatitis B virus antigen, HBsAg) 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。

B 型肝炎ウィルス(Hepatitis B Virus, HBV)は、ヘパドナウイルス科オルソヘパドナウイルス属に属する環状二本鎖 DNA ウィルスです。外被 (envelope) に HBs 抗原 (hepatitis B surface antigen)、内部 (core) に HBc 抗原 (hepatitis B core antigen) を有し、HBV の増殖が盛んな時期には感染者の血液中に、可溶性蛋白である HBe 抗原 (hepatitis B e antigen) が分泌されることが知られています。1985 年に HBsAg トランスジェニックマウスが作製されており[1]、本配列は immunodomnant なエピトープであることから、現在も広く研究に用いられています。

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-2L^{d})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。

MHC 拘束性： H-2L^{d}

抗原ペプチドの由来と配列：

HBsAg (28-39 aa, IPQSLDSWWTSL)

HBsAg エピトープの参考文献：

1) Chisari FV, *et al.* *Science* **230**: 1157-1160 (1985)
2) Moriyama T, *et al.* *Science* **248**: 361-364 (1990)
3) Ando K, *et al.* *J. Exp. Med.* **178**: 1541-1554 (1993)
4) Ando K, *et al.* *J. Immunol.* **152**: 3245-3253 (1994)
5) Kakimi K, *et al.* *J. Exp. Med.* **194**: 1755-1766 (2001)

マウスの主な系統による H-2L allele：

H-2L allele	H-2L^{d}	H-2L^{q}
Mouse strains	BALB/c, DBA/2, B10D2	DBA/1 SWR/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% 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。

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

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 µL の FCM buffer ［2% FCS/0.05% NaN_3/PBS］ に懸濁します。
2. オプションAとBのいずれかでブロッキング処理をします。

（オプション A）
blocking 試薬として抗 CD16/32 抗体を適量加え、4℃で 15 分間インキュベーションします。

（オプション B）
10 µL の Clear Back（MBL code no. MTG-001）を加え、5 分間室温にて反応させます。

3. 10 µL の T-Select MHC class I mouse Tetramer-PE 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. マウス CD8 抗体等を加え、2-8℃で 30 分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer を加え 400 x 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 FCM buffer に再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 2-8℃で保管し、数時間以内に分析してください。

染色の注意点：

A. 免疫したマウスを使用する場合、免疫応答には個体差が生じる可能性があります。最低 2 個体以上での検証をお勧めします。

B. 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。

C. マウス CD8 抗体は、クローン KT15（MBL code no. D271）を推奨しています。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。

D. 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 を同時染色してリンパ球ゲートで解析してください。

E. 抗 CD16/32 抗体で処理することで 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。

F. Clear Back (MBL code no. MTG-001)を用いることで、成分中のアジ化ナトリウムにより、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。

G. 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。

H. 染色後、数時間以内に解析できない場合は、ステップ 8 で細胞を 500 µL の 0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS に再懸濁してください。

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） 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)

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."

特許第 3506384 号
抗原特異的な T 細胞の検出および精製のための MHC 抗原複合体

関連製品：

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（https://ruo.mbl.co.jp）より最新情報をご確認ください。

染色例:

H-2L^d 拘束性 B 型肝炎ウィルス抗原(HBsAg)由来の抗原ペプチド(IPQSLDSWWTSL, MBL code no. TS-M522-P)と、ヘルパー作用の報告がある抗原ペプチド(MBL code no. TS-M703-P)を混合し、免疫賦活剤とエマルジョン化してマウス背面に 3 回皮下注射した。11 日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-2L^d HBsAg peptide (final conc. 0.01 μg/mL) で 6 日間刺激培養した。これを同様に MHC Tetramer 試薬を用いて染色した(day 6)。

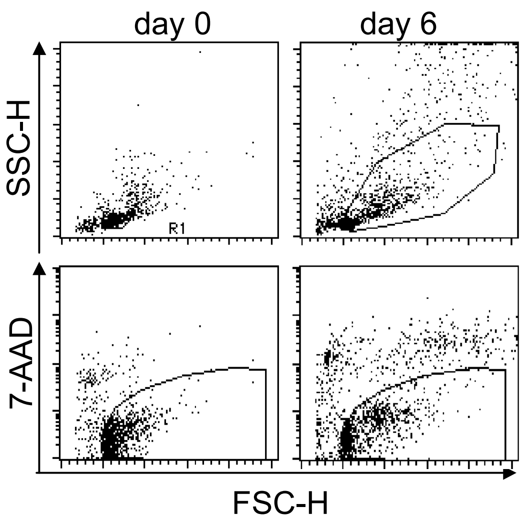
染色方法:

1. 免疫したマウスの脾細胞 (1×10^6 cells) あるいは 6 日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% NaN$_3$/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 μL の Clear Back (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. 10 μL の H-2L^d HBsAg Tetramer-PE あるいは 10 μL の H-2L^d β-galactosidase Tetramer-PE (Negative Tetramer として使用, MBL code no. TS-M511-1) をそれぞれ加え、4℃で 20 分間反応させた。
4. 10 μL の mouse CD8-FITC (clone KT15) をそれぞれ加え、4℃で 20 分間反応させた。
5. 適量の FCM buffer を加え 400 x 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。このとき、死細胞を染色するために、7-AAD を 5 μL 加えた。
7. FCM にて解析した。

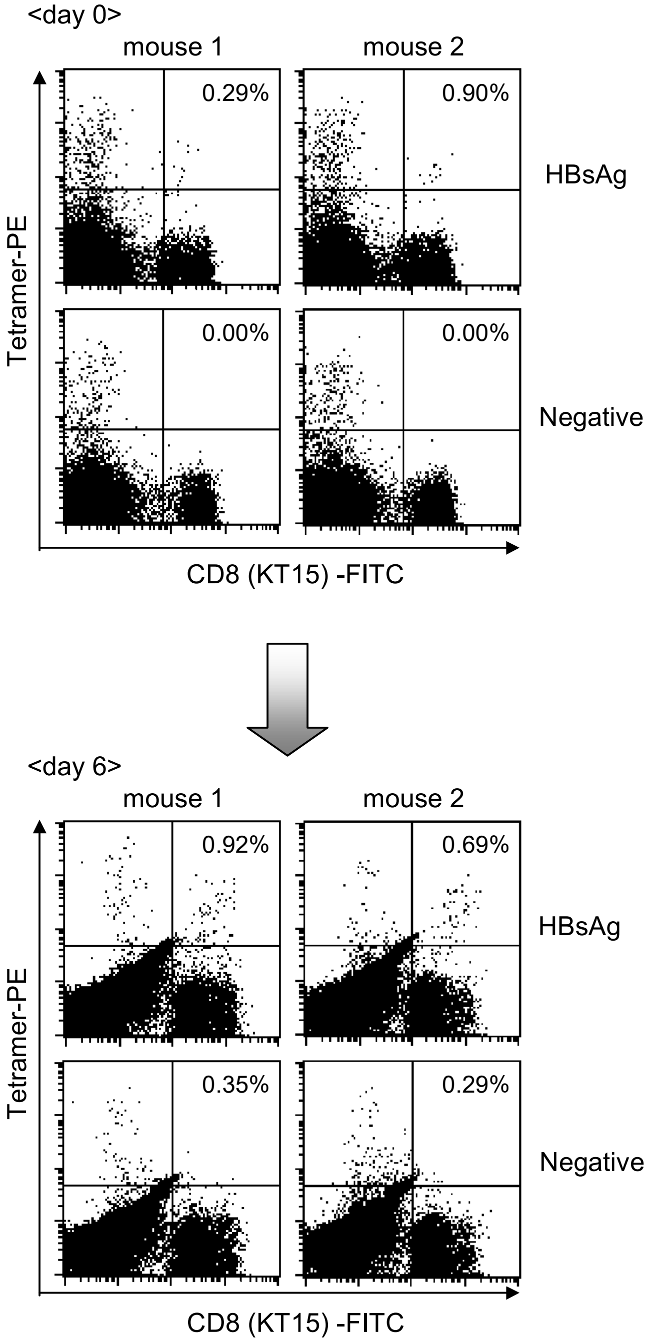
結果:

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。ドットブ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＞



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

Negative Tetramer (H-2L^d β-galactosidase Tetramer-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。