

T-Select MHC Tetramer

# Mamu-A\*90120-5 SIV gag Tetramer -SSVDEQIQW (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。

## 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 Mamu-A\*90120-5 を、抗原ペプチドに SIV gag 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。

Simian Immunodeficiency Virus (SIV) は宿主の CD4 陽性 T 細胞に感染して増殖を続け、免疫系を破壊して、後天的に免疫不全を発症させるウイルスです。SIV は近年世界的な流行をみせている Human Immunodeficiency Virus (HIV) の起源であると考えられており、HIV 感染メカニズムやワクチン開発の研究において利用されています。

東京大学 医科学研究所 俣野らは SIV に感染したアカゲザルをモデル動物とし、CTL エピトープを発現するセンダイウイルスベクターをワクチンとして投与した所、血中の SIV ウィルス量が大幅に減少した事を報告しました。また SIV gag の 241-249 番目のアミノ酸配列が、Mamu-A\*90120-5 拘束性を示す CTL エピトープである事を世界に先駆けて報告しました<sup>1)</sup>。

MHC Tetramer 陽性細胞の有無を判定する際、ネガティブ Tetramer 試薬を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。

## Mamu-A\*90120-5 SIV gag<sub>241-249</sub> の参考文献

- 1) Tsukamoto T, *et al. J Virol* **83**: 9339-9346 (2009)
- 2) Ishii H, *et al. J Virol* **86**: 738-745 (2012)

MHC 拘束性: Mamu-A\*90120-5

## 抗原ペプチドの由来と配列

SIV gag (241-249 aa, SSVDEQIQW)

## 標識物

TS-M901-1: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)

励起波長: 486-580 nm

蛍光波長: 586-590 nm

TS-M901-2: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)

励起波長: 633-635 nm

蛍光波長: 660-680 nm

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<sub>3</sub>, 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。凍結は絶対にしてしないでください。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 (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

### 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、 $2 \times 10^7$  cells/mL の濃度にて、細胞を再懸濁します。
2. 50  $\mu$ L ( $1 \times 10^6$  cells)の細胞懸濁液に 10  $\mu$ L の Clear Back (human FcR blocking reagent, MBL code no. MTG-001)を加え、5 分間室温にて反応させていただきます。
3. 10  $\mu$ L の T-Select MHC Tetramer を加えます。
4. 2-8°Cまたは室温(15-25°C)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°Cで20分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer [2% FCS/0.09%  $\text{NaN}_3$ /PBS]を加え400  $\times$  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  $\mu$ L 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°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

- A. 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。
- B. 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。
- C. 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。
- D. 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。
- E. 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にご注意ください。
3. 細胞を溶血試薬と長時間反応させないで下さい。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)

## 関連製品

### T-Select MHC Tetramers

TB-5017-1	H-2D <sup>b</sup> SIV gag Tetramer-AAVKNWMTQTL-PE
TB-5003-1	Mamu-A*01 SIV gag Tetramer-CTPYDINQM-PE
TB-5003-2	Mamu-A*01 SIV gag Tetramer-CTPYDINQM-APC
TB-5003-4	Mamu-A*01 SIV gag Tetramer-CTPYDINQM-BV421
TB-5021-1	Mafa-A1*063 SIV nef RM9 Tetramer-RPKVPLRTM-PE
TB-5022-1	Mafa-A1*063 SIV gag GW9 Tetramer-GPRKPIKCW-PE
TB-5023-1	Mafa-A1*063 SIV nef HW8 Tetramer-HPAQTSQLW-PE
TB-5024-1	Mafa-B*104:01 SIV gag NA9 Tetramer-NCVGDHQA-PE
TB-5025-1	Mafa-B*104:01 SIV nef LT9 Tetramer-LNMADKKET-PE
TS-M901-1	Mamu-A*90120-5 SIV gag Tetramer-SSVDEQIQW-PE
TB-M951-1	BF2*1201 IBDV VP2 Tetramer-ALRPVTLV-PE
TS-M952-1	BF2*1501 IBV NP Tetramer-WRRQARYK-PE

### Kits

AM-1005M	IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit
TB-7400-K1	QuickSwitch™ Quant H-2K <sup>b</sup> Tetramer Kit-PE
TB-7401-K1	QuickSwitch™ H-2K <sup>b</sup> Tetramer Kit-PE

### Others

D341-4	mouse CD4-FITC (GK1.5)
D271-4	mouse CD8-FITC (KT15)
D271-5	mouse CD8-PE (KT15)
D271-A64	mouse CD8-Alexa Fluor® 647 (KT15)
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)

MHC Tetramer 試薬、誘導用ペプチド等の製品ラインナップ、MHC Tetramer 試薬のカスタム作製に関しましては、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。