

T-Select MHC class I mouse Tetramer

H-2K^b OVA Tetramer

-SIINFEKL (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 OVA 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。

トリ卵白アルブミン (Ovalbumin; OVA) は、多様な免疫反応を惹起させるモデル抗原として非常に多くの研究分野で利用されています。脾臓細胞において CD8 陽性細胞の約 90% が H-2K^b に OVA エピトープ (SIINFEKL) が提示された状態を特異的に認識する TCR を持つトランスジェニックマウス (OT-1 マウス) も作製されており、モデル抗原として、免疫担当細胞に関する研究によく使用されています。

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-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。

標識物:

TS-5001-1C: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)
励起波長; 486–580 nm
蛍光波長; 586–590 nm

TS-5001-2C: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)
励起波長; 633–635 nm
蛍光波長; 660–680 nm

抗原ペプチドの由来と配列:

OVA (257–264 aa, SIINFEKL)

H-2K^b OVA Tetramer 試薬の参考文献:

- 1) Teramoto K, *et al. Cancer Res.* **63**: 7920–7925 (2003)
- 2) Li W, *et al. Infect. Immunol.* **72**: 7005–7011 (2004)
- 3) Yajima T, *et al. J. Immunol.* **174**: 3590–3597 (2005)
- 4) Yajima T, *et al. J. Immunol.* **176**: 507–515 (2006)
- 5) Yokouchi H, *et al. Cancer Res.* **97**: 148–154 (2006)
- 6) Saito K, *et al. J. Immunol.* **176**: 2496–2504 (2006)
- 7) Chamoto K, *et al. Cancer Res.* **66**: 1809–1817 (2006)
- 8) Wakita D, *et al. Int. Immunol.* **18**: 425–434 (2006)
- 9) Taneichi M, *et al. J. Immunol.* **177**: 2324–2330 (2006)
- 10) Zhang Y, *et al. Int. Immunol.* **19**: 151–161 (2007)
- 11) Li W, *et al. J. Immunol.* **178**: 4482–4488 (2007)
- 12) Kumar H, *et al. J. Immunol.* **180**: 683–687 (2008)
- 13) Sugiyama T, *et al. Int. Immunol.* **20**: 1–9 (2008)
- 14) Wakabayashi A, *et al. J. Immunol.* **180**: 4000–4010 (2008)
- 15) Miyakoda M, *et al. J. Immunol.* **181**: 1420–1428 (2008)
- 16) Kijima M, *et al. J. Immunol.* **182**: 3566–3572 (2009)
- 17) Tang C, *et al. J. Leukoc. Biol.* **86**: 187–194 (2009)
- 18) Asano J, *et al. J. Immunol.* **184**: 736–745 (2010)
- 19) Takeshima T, *et al. Cancer Res.* **70**: 2697–2706 (2010)

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, NOD	C3H/He

保存法: 2–8°C で遮光保存してください。凍結は絶対に行わないでください。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。

MHC 拘束性: H-2K^b

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下記濃度で含まれています。

TS-5001-1: 25 µg/mL

TS-5001-2: 100 µg/mL

*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% NaN₃/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。

2. 10 µL の T-Select MHC class I mouse Tetramer を加えます。
3. 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。
4. 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。
5. 適量の FCM buffer を加え 400 x g で 5 分間遠心します。
6. 上澄みを注意深く捨てます。
7. 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。
8. 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:

*OT-1 マウス由来の細胞を H-2K^b OVA Tetramer で染色する際、同時染色する mouse CD8 抗体のクローンは必ず KT15 をご使用ください。詳しくは本添付書類の 5 ページ目 (染色例 2) をご覧ください。

- A. 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。
- B. マウス CD8 抗体は、クローン KT15 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。

- C. 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。
- D. 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。
- E. 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せん。
- F. 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。
- G. 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) 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.”

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.”

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 Mouse Tetramers****Foreign antigen**

TS-5001-1C	H-2K ^b OVA Tetramer-SIINFEKL-PE
TS-5001-2C	H-2K ^b OVA Tetramer-SIINFEKL-APC
TS-M541-1	H-2K ^b OVA E1 Tetramer-EIINFEKL-PE
TS-M542-1	H-2K ^b OVA G4 Tetramer-SIIGFEKL-PE
TS-M543-1	H-2K ^b OVA Q4H7 Tetramer-SIIQFEHL-PE
TS-M710-1	I-A ^b OVA ₃₂₃₋₃₃₉ Tetramer-PE
TS-M501-1	H-2K ^b β-galactosidase Tetramer-DAPIYTNV-PE
TS-M511-1	H-2L ^d β-galactosidase Tetramer-TPHPARIGL-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

Virus

TS-M502-1	H-2D ^b Influenza NP Tetramer-ASNENMDTM-PE
TS-M508-1	H-2D ^b Influenza NP Tetramer-ASNENMETM-PE
TS-M520-1	H-2K ^d Influenza HA Tetramer-IYSTVASSL-PE
TS-5002-1C	H-2D ^b LCMV gp33 Tetramer-KAVYNFATC-PE
TS-5002-2C	H-2D ^b LCMV gp33 Tetramer-KAVYNFATC-APC
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-RGPGRAFVTI-PE
TS-5007-1	H-2K ^b HIV gag Tetramer-AMQMLKETI-PE
TS-5007-2	H-2K ^b HIV gag Tetramer-AMQMLKETI-APC
TS-M506-1	H-2K ^d RSV Tetramer-SYIGSINNI-PE
TS-M506-2	H-2K ^d RSV Tetramer-SYIGSINNI-APC
TS-M507-1	H-2K ^b MuLV p15E Tetramer-KSPWF TTL-PE
TS-M521-1	H-2L ^d MuLV gp70 Tetramer-SPSYVYHQF-PE
TS-M509-1	H-2K ^b SeV Tetramer-FAPGNYPAL-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

Cancer

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

Others

TS-M008-1	H-2K ^b Negative Tetramer-SIYRYYYGL-PE
TS-M524-1	H-2D ^b HY Uty Tetramer-WMHNNMDLI-PE
TS-MCD-1	Mouse CD1d Tetramer-PE
TS-MCD-2	Mouse CD1d Tetramer-APC

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-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 ₁₋₂₀ peptide
TS-M708-P	I-A ^k HEL peptide

Kit

AM-1005	IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit
---------	---------------------------------------

Others

D271-4	mouse CD8-FITC (KT15)
D271-A64	mouse CD8-Alexa Fluor® 647 (KT15)
732149	mouse CD45-Biotin (I3/2.3)
732148	mouse CD45-FITC (I3/2.3)
732150	mouse CD45-PE (I3/2.3)
732151	mouse CD45-APC (I3/2.3)
732152	mouse CD45-SPRD (I3/2.3)
732121	mouse CD16/32 (93)
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 (死細胞検出試薬)
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。

T-Select Peptides

TS-5001-P	H-2K ^b OVA 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

染色例 1:

H-2K^b 拘束性 OVA peptide (SIINFEKL, MBL code no. TS-5001-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 2 個体に 1 回腹腔免疫した。10 日後に脾臓を摘出して脾細胞を調製し、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 拘束性 OVA peptide パルスした同種別個体の脾細胞と 1 週間混合培養した。これを同様に MHC Tetramer 試薬を用いて染色した (day 6)。

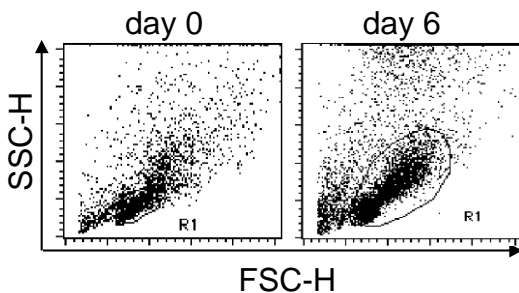
染色方法:

1. 免疫したマウスの脾細胞 (1 × 10⁶ cells) あるいは 6 日間刺激培養した細胞集団 (1 × 10⁶ 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. 適量の FCM buffer を加え 400 × g で 5 分間遠心した。
3. 10 μL の H-2K^b OVA Tetramer-PE (MBL code no. TS-5001-1C) あるいは H-2K^b Negative Tetramer-PE (MBL code no. TS-M008-1) をそれぞれ加え、4°C で 20 分間反応させた。
4. 10 μL の CD8-FITC (clone KT15, MBL code no. D271-4) をそれぞれ加え、4°C で 20 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、FCM にて解析した。

結果:

FSC/SSC 展開にて T 細胞領域を R1 として、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。

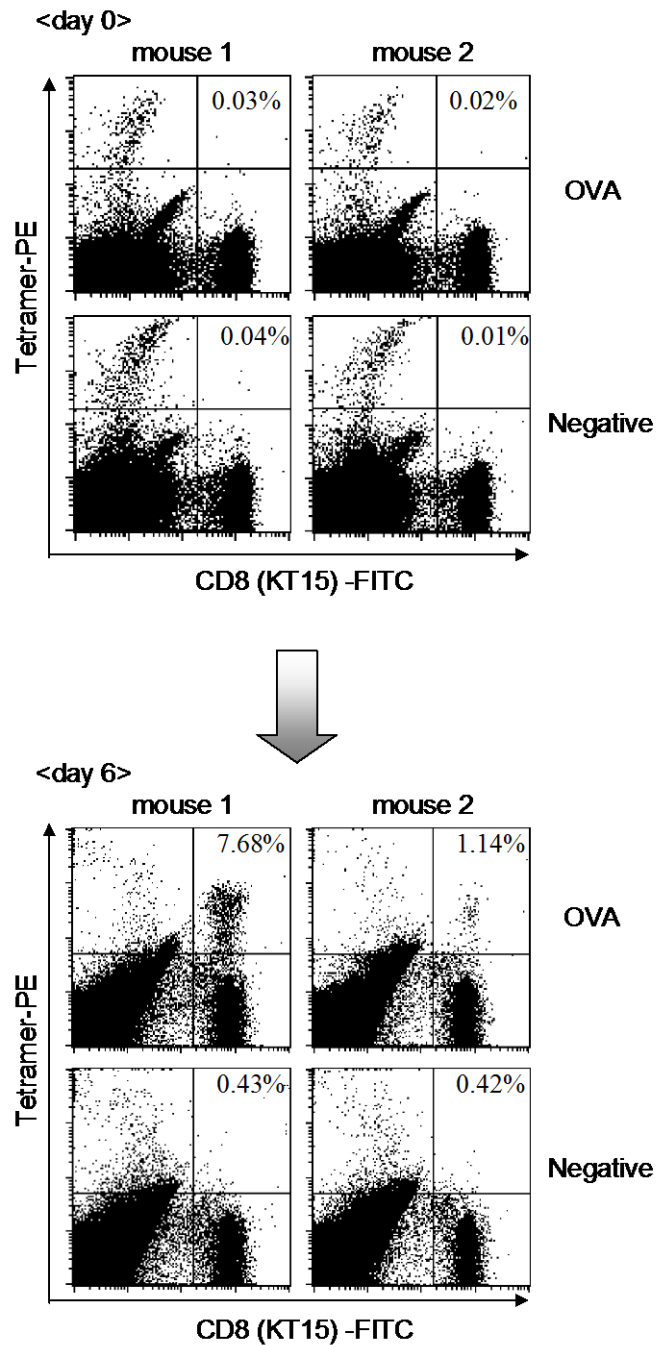
<FSC/SSC ドットプロット展開図>



*本染色例では、死細胞検出試薬である 7-AAD Viability Dye (MBL code no. A07704) を添加していません。そのため、ドットプロット展開図の中央付近に多くの死細胞による非特異染色が見られます。このような現象を防ぐため、上記染色方法のステップ 6 で、7-AAD Viability Dye を添加することをお勧めします。

*本染色例では、Negative Tetramer として H-2K^b Negative Tetramer-PE (MBL code no. TS-M008-1) を使用しておりますが、CD8 のクローンによっては相性が悪い場合があります。特にクローン 53.6.7 をご使用の場合は、Negative Tetramer として H-2K^b β-galactosidase Tetramer-PE (MBL code no. TS-M501-1) のご使用をお勧めします。

<Tetramer 染色像>



H-2K^b OVA peptide (SIINFEKL) を免疫したマウスにおいて、*in vitro* stimulation により特異的 CTL の誘導が確認できた。

H-2K^b Negative Tetramer-SIYRYGL-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。mouse 1 と mouse 2 は、全く同じ処理を行ったにもかかわらず誘導効率に大きな差が見られた。

染色例 2:

OT-1 マウスの脾臓を摘出して脾細胞を調製し、一部をサンプリングして MHC Tetramer 試薬を用いて染色した。同時染色には、mouse CD8 抗体クローン 2 種 (clone KT15 と clone 53.6.7) を用いて、total 100 μL の assay 系にて比較検討した。

染色方法:

1. OT-1 マウスの脾細胞 (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 回洗ったものを用意した。
2. 適量の FCM buffer を加え 400 x g で 5 分間遠心した。
3. 上澄みを注意深く捨て、10 μL の Clear Back (MBL code no. MTG-001) と 30 μL の FCM buffer を加え、室温にて 5 分間反応させた。
4. 10 μL の H-2K^b OVA Tetramer-PE (MBL code no. TS-5001-1C) あるいは H-2K^b β -galactosidase Tetramer-PE (ネガティブテトラマーとして使用、MBL code no. TS-M501-1) をそれぞれ加え、4°C で 20 分間反応させた。
5. anti-mouse CD8-FITC として、clone KT15 (MBL code no. D271-4, 推奨使用量 10 μL) あるいは clone 53.6.7 (MBL code no. 732023, 推奨使用量 20 μL) の各希釈系列を調整し、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 μL の FCM buffer を加えて細胞を懸濁し、FCM にて解析した。

データ解析:

FSC/SSC 展開にてリンパ球領域を R1、うち生細胞領域 (7-AAD 陰性領域) を R2 として、R1 かつ R2 領域にてゲーティングして解析を行った。

結果:

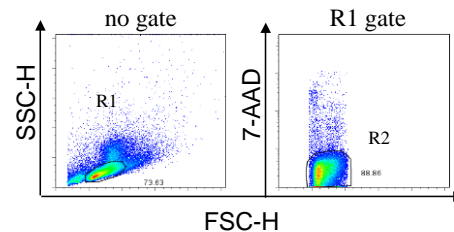
クローン 53.6.7 を用いた場合、OT-1 マウス脾臓細胞中の CD8 陽性細胞は OVA Tetramer でも β -galactosidase Tetramer でも染色された。53.6.7 を希釈して使用しても、同じく両方のテトラマーで染色された。

クローン KT15 を用いた場合、OT-1 マウス脾臓細胞中の CD8 陽性細胞は OVA Tetramer でのみ特異的に染色されたが、KT15 を 10 μL /assay で使用した場合は明らかに OVA Tetramer-PE の蛍光強度が低下していた。濃度検討の結果、KT15 を 0.63 μL /assay で使用した場合に、テトラマーの蛍光強度が比較的高くなった。KT15 に関して、これ以上希釈して使用した場合は更に KT15-FITC の蛍光強度が低下してしまつたため、推奨できないと考えられた。ただし、ペプチド免疫して特異的 CTL を誘導したマウス脾臓細胞をサンプルとして用いた場合は、KT15 を 10 μL /assay で使用しても特に問題は見られなかった。

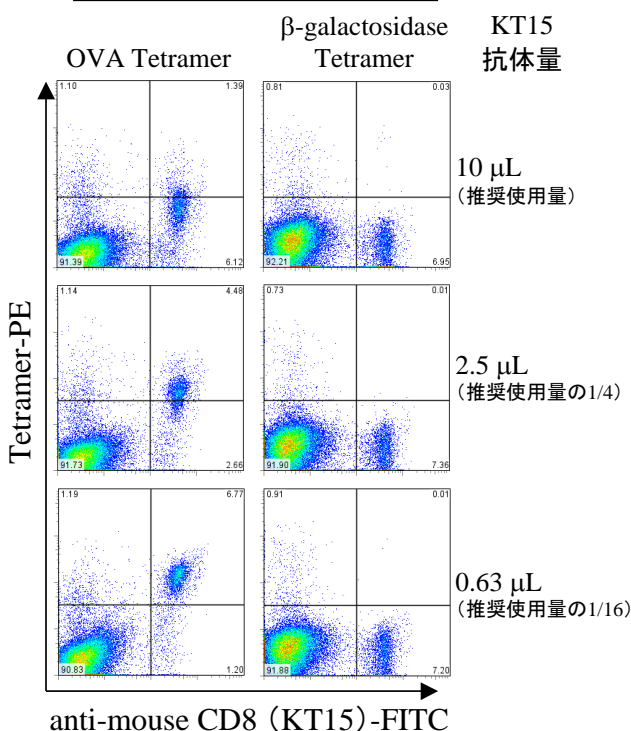
以上より、トランスジェニックマウスである OT-1 マウス由来の細胞をサンプルとして用いる場合は、mouse CD8 抗体にはクローン KT15 を適量で用いること、また、ネガティブテトラマーを必ず比較対照として置くことが重要であることが分かった。

***本検討はあくまでご使用の目安です。実験系により、必要に応じて濃度検討を行うことをおすすめします。**

<FSC/SSC ドットプロット展開図>



KT15-FITC/Tetramer-PEによる染色



53.6.7-FITC/Tetramer-PEによる染色

