

T-Select MHC Tetramer

H-2K^b β -galactosidase Tetramer -DAPIYTNV (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 にマウス H-2K^b を、抗原ペプチドに β -galactosidase 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。 β -galactosidase は大腸菌 lac オペロン中の *lacZ* にコードされる加水分解酵素です。分子生物学的実験では、ブルーホワイトセレクションやレポーター遺伝子として利用され、ノックアウトマウスを作製する際の、マーカー遺伝子としてもよく利用されています。最近では、担癌マウスを用いた DNA ワクチンなどの免疫療法実験で、T 細胞応答を評価するためによく利用されています。

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。

MHC 拘束性: H-2K^b

抗原ペプチドの由来と配列

β -galactosidase (96-103 aa, DAPIYTNV)

β -galactosidase エピトープの参考文献

- 1) Overwijk WW, *et al. Methods* **12**: 117-123 (1997)
- 2) Hodge JW, *et al. J Immunol* **174**: 5994-6004 (2005)
- 3) Yang S, *et al. J Immunol* **175**: 3715-3723 (2005)
- 4) Koyama S, *et al. J Immunol* **179**: 4711-4720 (2007)

マウスの主な系統における 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, AKR/J

標識物

TS-M501-1: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)

励起波長: 486-580 nm

蛍光波長: 586-590 nm

TS-M501-2: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)

励起波長: 633-635 nm

蛍光波長: 660-680 nm

性状: 容量 500 μ L, 10 μ L/test

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 μ g/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。
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)
anti-CD16/32 を適量加え、4°Cで 15 分間インキュベーションします。
(オプションB)
10 μ L 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 μ L の MHC Tetramer 試薬を加えます。
4. 2-8°Cまたは室温(15-25°C)で 20~60 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°Cで 20 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 μ L の FCM buffer に再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 2-8°C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 の結合を阻害または非特異反応を助長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. 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。
- 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 8 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 μ L 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)

関連製品

T-Select Mouse Tetramers

Cancer

TS-5004-1C	H-2K ^b	TRP2 Tetramer-SVYDFVWL-PE
TS-M504-1	H-2D ^b	WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ 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
TS-M544-1	H-2K ^d	JAK1 Tetramer-SYFPEITHI-PE
TS-M545-1	H-2K ^d	Erk2 K136Q Tetramer-QYIHSANVL-PE
TS-M546-1	H-2D ^b	gp100 Tetramer-EGSRNQDWL-PE
TS-M558-1	H-2K ^b	MAGE-AX ₁₆₉₋₁₇₆ Tetramer-LGITYDGM-PE
TS-M559-1	H-2K ^b	MAGE-A5 Tetramer-HNTQYCNL-PE
TS-M561-1	H-2D ^b	hPSA Tetramer-HCIRNKSVIL-PE
TS-M562-1	H-2K ^b	mTERT Tetramer-VGRNFTNL-PE
TS-M563-1	H-2K ^b	pBM1 Tetramer-INFDFNTI-PE

Influenza

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-M533-1	H-2K ^b	Influenza PB1 Tetramer-SSYRRPVGI-PE
TS-M566-1	H-2K ^b	Influenza NS2 Tetramer-RTFSFQLI-PE

TS-M520-1 H-2K^d Influenza HA Tetramer-IYSTVASSL-PE
TS-M535-1 H-2K^d Influenza HA Tetramer-LYQNVGTYV-PE
TS-M534-1 H-2K^d Influenza NP Tetramer-TYQRTRALV-PE

LCMV

TS-5002-1C H-2D^b LCMV gp₃₃ Tetramer-KAVYNFATC-PE
TS-M512-1 H-2D^b LCMV gp₃₃ (C9M) Tetramer-KAVYNFATM-PE
TS-5009-1 H-2D^b LCMV gp₂₇₆₋₂₈₆ Tetramer-SGVENPGGYCL-PE
TS-M513-1 H-2D^b LCMV NP₃₉₆ Tetramer-FQPQNGQFI-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-M514-1 H-2L^d LCMV NP₁₁₈ Tetramer-RPQASGVYM-PE

HIV

TS-5007-1 H-2K^b HIV gag Tetramer-AMQMLKETI-PE
TS-M516-1 H-2D^d HIV P18-I10 Tetramer-RGPGRAFVTI-PE
TS-M536-1 H-2D^d HIV env Tetramer-IGPGRAFYA-PE

RSV

TS-5018-1C H-2D^b RSV Tetramer-NAITNAKII-PE
TS-M506-1 H-2K^d RSV Tetramer-SYIGSINNI-PE
TS-M567-1 H-2K^d RSV M2 Tetramer-SYIGINNI-PE
TS-M555-1 H-2K^d RSV F glycoprotein Tetramer-KYKNAVTEL-PE

SV40

TS-M539-1 H-2D^b SV40 large T Ag₂₀₈₋₂₁₅ Tetramer-SAINNYAQKL-PE
TS-M540-1 H-2D^b SV40 large T Ag₄₈₉₋₄₉₇ Tetramer-QGINNLDNL-PE

MuLV

TS-M507-1 H-2K^b MuLV p15E Tetramer-KSPWFRTL-PE
TS-M521-1 H-2L^d MuLV gp70 Tetramer-SPSYVYHQF-PE

Virus

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
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 Tax₃₉₋₄₆ Tetramer-ARLHRHALL-PE
TS-M532-1 H-2D^b HCV NS3₁₆₂₉₋₁₆₃₇ Tetramer-GAVQNEVTL-PE
TS-M537-1 H-2K^b HBV core Tetramer-MGLKFRQL-PE
TS-M538-1 H-2K^b VACV B8R Tetramer-TSYKFESV-PE
TS-5008-1C H-2D^b HPV16 E7 Tetramer-RAHYNIVTF-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
TS-M564-1 H-2D^b AdV5 E1A Tetramer-SGPSNTPPEI-PE
TS-M568-1 H-2K^d MHV M2 Tetramer-GFNKLRSTL-PE

Foreign antigen

TS-5001-1C H-2K^b OVA Tetramer-SIINFEKL-PE
TS-M008-1 H-2K^b Negative (SIY) Tetramer-SIYRYYGL-PE
TS-M525-1 H-2K^d EGFP Tetramer-HYLSTQSAL-PE
TS-M501-1 H-2K^b β-galactosidase Tetramer-DAPIYTNV-PE
TS-M511-1 H-2L^d β-galactosidase Tetramer-TPHPARIGL-PE

Bacteria

TS-M503-1 H-2K^d Listeria LLO Tetramer-GYKDGNEYI-PE
TS-M515-1 H-2K^d malaria Tetramer-SYIPSAEKI-PE
TS-M547-1 H-2K^d Plasmodium CSP Tetramer-SYVPSAEQI-PE
TS-M548-1 H-2D^b Chlamydia CrpA Tetramer-ASFVNPIYL-PE
TS-M560-1 H-2K^b TSKB20 Tetramer-ANYKFTLV-PE

Mycobacterium tuberculosis

TS-M517-1 H-2D^d BCG MPT51 Tetramer-GGPHAVYLL-PE
TS-M549-1 H-2D^b Mtb32a Tetramer-GAPINSATAM-PE
TS-M550-1 H-2K^b TB10.4 Tetramer-IMYNYPAM-PE

Others

TS-M524-1 H-2D^b HY Uty Tetramer-WMHHNMDLI-PE
TS-M551-1 H-2K^b HA-60 Tetramer-LTFNYRNL-PE
TS-M552-1 H-2K^d IGRP Tetramer-VYLKTNVFL-PE
TS-M553-1 H-2K^d NRP-V7 Tetramer-KYNKANVFL-PE
TS-M554-1 H-2K^d InsB Tetramer-LYLVCGERL-PE
TS-M557-1 H-2D^b MimA2 Tetramer-YAIENYLEL-PE

MHC Class II Tetramers

TS-M704-1 I-A^b MOG₃₅₋₅₅ Tetramer-PE
TS-M705-1 I-A^b FMLV₁₂₃₋₁₄₁ Tetramer-PE
TS-M706-1 I-A^b Eα₅₂₋₆₈ Tetramer-PE
TS-M707-1 I-A^b ESAT-6₁₋₂₀ Tetramer-PE
TS-M710-1 I-A^b OVA₃₂₃₋₃₃₉ Tetramer-PE

CD1d Tetramers

TS-MCD-1 Mouse CD1d Tetramer-PE

T-Select Peptides

TS-5001-P H-2K^b OVA peptide
TS-M008-P H-2K^b SIY peptide
TS-M501-P H-2K^b β-galactosidase peptide
TS-M511-P H-2L^d β-galactosidase peptide
TS-M701-P I-A^b HBc helper peptide
TS-M703-P I-A^b/I-A^d OVA helper peptide
TS-M704-P I-A^b MOG₃₅₋₅₅ peptide

Kit

AM-1005M IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit

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)
A07704 7-AAD Viability Dye (死細胞検出試薬)
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。

染色例

100 nmol の H-2K^b 拘束性β-galactosidase 由来の抗原ペプチド(DAPIYTNV, MBL code no. TS-M501-P)と、85 nmol のヘルパー作用の報告がある HBc 抗原ペプチド(TPPAYRPPNAPIL, MBL code no. TS-M701-P)を混合し、免疫賦活剤とエマルジョン化し、C57BL/6 マウスに7日間隔で2回腹腔免疫した。11日後に脾臓を摘出し、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β-galactosidase 由来の抗原ペプチド(10 μg/mL)で7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 7)。

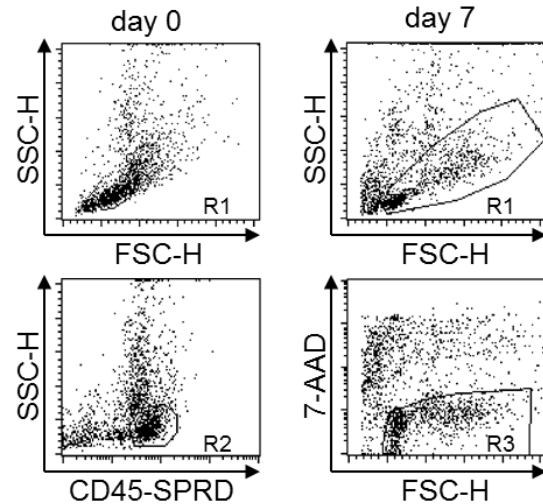
染色方法

1. C57BL/6 マウスについて、マウス脾細胞 (1 × 10⁶ cells) あるいは1週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. 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-2K^b β-galactosidase Tetramer-PE (MBL code no. TS-M501-1)、あるいは 10 μL の H-2K^b Negative (SIY) Tetramer-SIYRYYYGL-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 mouse CD8-FITC (clone KT15, MBL code no. D271-4)をそれぞれ加え、ピペティングした。(day 0)では、リンパ球を染色するために、mouse CD45-SPRD (clone I3/2.3)を 5 μL 加え、同じくピペティングした。
5. 4°Cで20分間反応させた。
6. 適量の FCM buffer を加え 400 × 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た。(day 7)では、死細胞を染色するために、7-AAD (MBL code no. A07704)を 5 μL 加えて染色した。
8. FCM にて解析した。

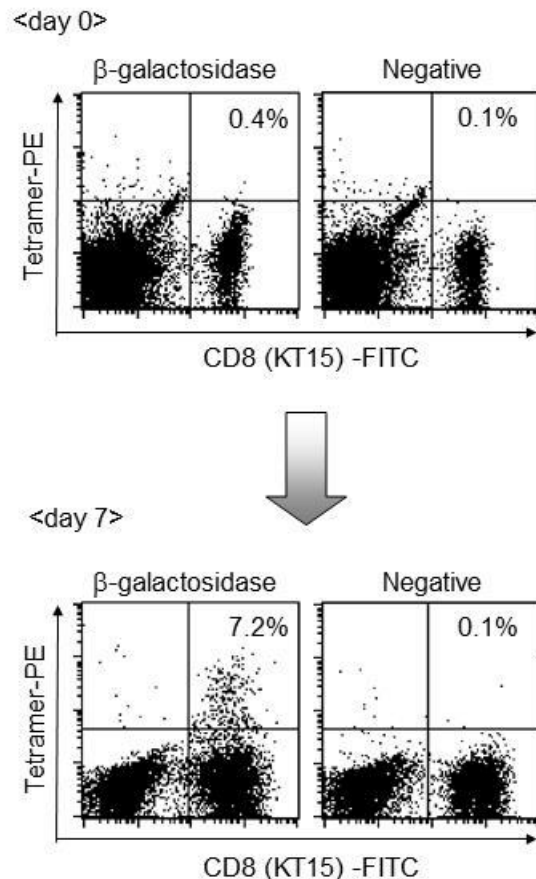
結果

T 細胞領域をゲーティングし、解析を行った。脾臓細胞摘出直後(day 0)の解析では、溶血処理後に残った赤血球をゲートアウトするためにCD45を、培養開始から7日目(day 7)では、死細胞をゲートアウトするために7-AAD を同時染色し、解析を行った。右上の数字は、CD8 陽性細胞中の MHC Tetramer 試薬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>



β-galactosidase 由来の抗原ペプチド(DAPIYTNV)を免疫したマウスにおいて、*in vitro* stimulationにより7.2%のβ-galactosidase 特異的 CTL の誘導が確認された。H-2K^b Negative (SIY) Tetramer-PE を用いた比較染色により、β-galactosidase 特異的 CTL であることが明確に示された。