Human IgG Single-Color Enzymatic ELISPOT Assay

キット構成

● B-Poly-S	● Diluent A
● Human Ig Capture 抗体	● Diluent B
● Strep-AP	● Diluent C
● S1(Substrate component 1)	● Diluent Blue
● S2(Substrate component 2)	● 96-well Plate
● S3(Substrate component 2)	● CTL-TEST™B medium
● Adhesive plate sealing sheet	● Protocol
● Anti-human IgG(Biotin) Detection 抗体	

【キットの他に準備が必要なもの】

・滅菌水

・滅菌 PBS

・0.05% Tween-PBS

【実験手順】

～実験日から 4 日前: in vitro での B 細胞の予備刺激[1)] ～

① CTL-Test™ B Culture Medium[2)] を調製します。【溶液の作り方】へ

② PBMC(血液から精製された PBMC もしくは 凍結 PBMC を解凍したもの)を、4×10^6 個/mL になるように、CTL-Test™ B Medium で調製します。

③ B-Polys-S™試薬を、②で調製した PBMC 溶液に対して 1:1000 の割合で加えます。(例; 10 μL の B-Polys-S™ を 10 mL の細胞溶液に加える)。

④ 37℃・7～10% CO_2 の加湿型インキュベーター内で、細胞を 4 日間培養する。[3)]

～実験日前日：ELISPOT プレートのコーティング～

① Human Ig Capture Ab 入りの Capture 溶液を準備します。【溶液の作り方】へ

② Capture Solution を、付属 PVDF プレートの各ウェルに 80 μL ずつ分注します[4)]。

③ プレートをパラフィルムでシールして、一晩 4℃でインキュベートします。

ELISPOT プロトコール

～0/1 日目 細胞播種～

・in vitro ISC/ASC – ①予備刺激後の PBMC を回収し、CTL-Test™ B で 3 回洗浄します。[5)]

・in vivo ISC/ASC – ①血液から、PBMC を分離します。

・以下、in vitro ISC/ASC, in vivo ISC/ASC 共通手順

② PBMC を CTL-Test™ B で希望の濃度に調製します[6]。
③ アッセイ用プレートの準備のために Capture solution を取り除きます。
④ 室温下で、各ウェルを 200 μL の滅菌 PBS で洗浄します。【溶液の作り方】[7]。
⑤ in vivo もしくは vitro ISC/ASC 用の PBMC 希釈系列を各ウェルに播種します。[8]
⑥ 37℃で 4～24 時間インキュベートします。[9]

～ASC 検出～

① Buffer 溶液を調製します： PBS、滅菌水、Tween-PBS 【溶液の作り方】へ
② Anti-human IgG Detection Solution を準備します 【溶液の作り方】へ
③ プレートをインキュベーターから取り出し、細胞を回収または廃棄します。
④ プレートの各ウェルを 200μL PBS で 2 回洗浄し、引き続き 200μL 0.05% Tween-PBS で洗浄します。
⑤ 各ウェルに 80 μL の Anti-human IgG Detection Solution を加え、パラフィルムで覆い、室温で少なくとも 2 時間インキュベートします。[10]
⑥ Tertiary Solution を調製します 【溶液の作り方】へ
⑦ プレートの各ウェルを 200μL 0.05%Tween-PBS で 3 回洗浄します。
⑧ 各ウェルに 80 μ の Tertiary 溶液を加え、室温で 1 時間インキュベートします。
⑨ インキュベート中に、Blue Developer 溶液を調製します。【溶液の作り方】へ
⑩ プレートの各ウェルを 200μL 0.05% Tween-PBS で 2 回洗浄し、更に 200μL 滅菌水で 2 回洗浄します。
⑪ 各ウェルに 80 μL の Blue Developer Solution を加え、室温で 15～20 分間インキュベートします。
⑫ 発色反応を止めるために、メンブレンを水道水で穏やかにリンスし、水を捨てます。この操作を 3 回繰り返します
(参考: https://www.youtube.com/watch?v=DNYbIM-k74g| 動画で操作の様子をご覧いただけます)
⑬ プレートのアンダードレンを外し、プレートの裏側を水道水で洗いします(ストリッピングタイプのプレートの場合、アンダードレンはございません)。[11]
⑭ プレートを完全に乾燥させます。[12]
⑮ プレートを ImmunoSpot アナライザーで撮影・解析します。[13]

【溶液の作り方】

全ての溶液は、使用直前に調製してください。

<ELISPOT 用の各種試薬類>

・CTL-Test™ B, B Cell Culture Medium

CTL-Test™ B Medium に、終濃度が 1 vol%になるように 200mM L-glutamine を加えます。

※1：推奨品 L-Glutamine 200 mM Solution (Gibco 型番:25030-081)

例えば 50mL の Medium を調製する場合は、CTL-Test™ Medium を 49.5 mL、L-Glutamine を 500 μL 混合します。

※2：メディウムの作成量は、細胞数やサンプル数によって変動しますが、1 プレート全てを使用する場合で 20 mL 程度です。

・Capture Solution

Human Ig Capture Ab を、Diluent A で希釈して作成します。

1 プレートの目安として、340 μL の Human Ig Capture Ab を、8.2 mL の Diluent A で希釈します。

・Anti-human IgG Detection Solution

Anti-human IgG(Biotin) Detection Ab を、Diluent B で希釈して作成します。

1 プレートの目安として、25 μL の IgG(Biotin) Detection Ab を 10 mL の Diluent B で希釈します。

・Tertiary Solution

Strep-AP と Diluent C を 1:1000 の割合で希釈して作成します。

1 プレートの目安として、10 μL の Strep-AP を 10 mL の Diluent C で希釈します。

・Blue Developer Solution

S1～S3 までの基質溶液を、3 ステップの混合過程を経て調製します。

1 プレートの目安として

Step1　10 mL の Diluent Blue に、160 μL の S1 を加えて、よく混合します。

Step2　Step1 の混合溶液に、160 μL の S2 を加えて、よく混合します。

Step3　Step2 の混合溶液に、92 μL の S3 を加えて、よく混合します。

※Developer Solution は、使用する 10 分前以内に調製し、遮光して下さい。

<洗浄用バッファー>

・0.05% Tween-PBS

100 μL の Tween-20 を滅菌 PBS に加えて、全量が 200 mL になるように調製して下さい。

・滅菌 PBS

100 mL 用意して下さい。

・滅菌水

100 mL 用意して下さい。

【補足説明】 実験手順の補足説明です。

1) 殆どの in vitro ASC 活性測定を行う場合は、4 日間の予備刺激培養が推奨されます。予備刺激培養は、無菌環境で行う事を徹底して下さい。このキットに添付されている B-Poly-S™は 4×10^6Cells/mL, 3.2×10^8 個の PBMC を刺激して頂くことができます。追加で B-Poly-S™をご購入なさる場合は、型番：#CTL-hBPOLYS-200 をご注文下さい。

2) アッセイの標準化のために、CTL-TestB™のような無血清培地のご使用をお勧めしております(CTL-TestB™は、B Cell ELISPOT 用に調製された培地です　型番：#CTLTB-005)。このほかには、プレテストした牛胎児血清(FCS) や、R10 培地(RPMI 1640 に 10%の FCS、1%の L-glutamine、1%の Penicillin-Streptomycin、1 μM の 2ME を加えたもの)もお使い頂けます。どの培地においても、フレッシュな L-glutamine を使うようにして下さい。予備刺激培養には、後のステップで使用する洗浄ステップや ELISPOT アッセイで使用するために、必要量より多めの量の培地を準備して下さい。培地は、遮光のうえ 4℃で保存して下さい。培地を細胞に添加する前に、CO_2 インキュベーター内で蓋を少し開けた状態で静置し、pH を平衡化させて下さい。

3) 24 well プレートを使われる場合、各ウェルに 1mL の浮遊細胞を播種するようにして下さい。より大きなスケールのポリクローナル刺激培養では、一般的な培養フラスコをお使い頂けます。培養フラスコ内の環境は、ほぼ 3mL で、$1cm^2$ あたり 4×10^6 cell/mL の浮遊細胞がある状態を推奨します。例えば、T-25 フラスコだと、全懸濁細胞は 8 mL で、T-75 フラスコだと 25 mL です。細胞は、幅広い CO_2 濃度で培養できますが、最適な結果を得るためには、9%を推奨します。

4) 各プレートを最大限利用するために、次回のアッセイに使用するウェルをカバーする粘着性のプレートシールがセットになっています。指で、プレートにプレートシールをしっかりと貼り付けてから、必要なウェルの部分のみをカッターの刃などで切り取るようにして下さい。

5) 予備刺激培養の時に使用した抗体のキャリーオーバーはバックグラウンドの原因となります。これを避けるために、実験の前に培地で細胞を徹底的に洗浄してください。

6) In vitro での刺激の後は、IgA や IgG1 といった特定の Ig クラスの頻度はかなり高くなり、一方で in vivo ISC/ASC と in vitro ASC では、頻度はかなり低くなる傾向があります。それ故に、頻度範囲を決定しその範囲が系列希釈でカバーできることが重要です。低い出現頻度の Ig 放出細胞の検出には、1×10^6、5×10^5、2.5×10^5、1.25×10^5 Cells/ウェルをお勧めします。非常に頻度の低い Ig 分泌細胞の場合は、磁気ビーズによる B 細胞の濃縮を推奨します(Saletti et al., Nature Protocols, 2013, 8 1073 を参照下さい)。高頻度の Ig 分泌細胞には、希釈系列を 15,000、10,000、5,000 Cells/ウェル播種するようにして下さい。希釈した PBMC は、アッセイプレートに播種するまで蓋をゆるめた状態で CO_2 インキュベーター内に置いて下さい。

7) 細胞をウェルに加える直前で、プレートにある PBS を取り除いて下さい。プレートを処理する間、ウェル底の PVDF メンブレンはウェットな状態でなければなりません。

8) ピペッティングの前に、チューブの蓋を閉めた状態で軽くはじき、細胞を注意深く再懸濁します。ピペッティングによる再懸濁は、せん断力により細胞に悪影響を与えるので避けて下さい。広径チップを使って、1 ウェル当り 100 μL の培地に PBMC を播種して下さい。播種が完了しましたら、均一に細胞が沈降するよう、プレートの四方をやさしくタッピングしてから、直ちに 37℃の加湿型インキュベーターに静置します。プレートは積み重ねないで下さい。

9) プレートに振動が伝わらないよう、インキュベーターのドアの開閉は静かに行って下さい。インキュベーション中はプレートに触れることは避けて下さい。

10) この時点から、本アッセイが完了するまでに 3.5 時間ほど必要です。時間が足りない場合は、Detection Solution のインキュベーションを 4℃で一晩行い、次の日にアッセイを行ってください。

11) アンダードレンとゴム手袋が濡れている場合、アンダードレンは滑りやすく取り外し辛くなります。取り外し操作の前に、手袋とアンダードレンをペーパータオルで拭って下さい。

12) プレートを完全に乾燥させるために、送風したクリーンベンチに 2 時間ほど置くか、卓上に敷いたペーパータオルの上にふせ、かつ隙間ができるよう傾けた状態で 24 時間静置します。ELISPOT アッセイ用プレートは、37℃を超える温度で乾燥させないでください。これにより、メンブレンが破損する可能性があります。メンブレンが完全に乾いていない状態では、スポットを目視で確認することができない可能性があり、バックグラウンドが上がるかもしれません。プレートの撮影と解析は、メンブレンが完全に乾燥してから行うようにして下さい。

13) B cell ELISPOT アッセイによって情報に富んだデータを得るためには、適切な画像解析装置が必要です。

ImmunoSpot®アナライザーをお持ちでない場合でも、CTL 社ではプレートの撮影と解析のサービスを実施しています。

詳細は株式会社エムエステクノシステムズ問い合わせメールアドレス technosales@technosaurus.co.jp までお問い合わせください。

<追加のヒント集>

・室温、時間、洗浄ステップの回数、試薬の調製量の変動は、本アッセイのパフォーマンスに影響する可能性が有ります。

・プレートの洗浄には、マニュアルのほかにプレートウォッシャーでも行って頂けます。使用するプレートウォッシャーは、ピンの長さと流速がメンブレンとスポットを傷付けないよう調製したものをお使いください。

・PVDF メンブレンへのダメージを避けるために、ピペットチップの先やプレートウォッシャーの先でメンブレンに触れないようにしてください。PVDF メンブレンは浸透性であり、アンダードレンで保護されています。ウェル底 PVDF 膜の濡れた表面の水気を取るために、ペーパータオル等で直

接触れることは避けて下さい。

アッセイのヒントとなる YouTube ビデオがございます。ぜひご覧ください。

CTL 社 YouTube チャンネル www.youtube.com/user/ImmunoSpot.

プレートのプレウェッティング

https://www.youtube.com/watch?v=xwVOWHpYUdE

細胞の播種のコツ

https://www.youtube.com/watch?v=40CSxWQS1DA

プレートのリンスとアンダードレインの外し方

https://www.youtube.com/watch?v=DNYbIM-k74g

B Cell ELISPOT Assay の概要

リンパ芽球腫/プラズマ芽球の状態で循環している B 細胞は、In vivo で抗原に遭遇後 5-10 日経過したときのみ、抗体を分泌できます。このような、In vivo で活性化された抗体分泌細胞は、プレートに播種して B cell ELISPOT として測定することができます。抗原特異性が知られている、自発的に免疫グロブリンを分泌するプラズマ芽球は、一般的に In vivo 特異的な抗体分泌細胞(in vivo ASCs)と呼ばれ、一方で、in vivo での活性化の後、抗原特異性が知られていない、免疫グロブリン分泌細胞は、in vivo ISC と呼ばれています。休止期のメモリーB 細胞は、事前に in vitro の系で mitogen を使って、これらの休止記憶 B 細胞が抗体分泌して B cell ELISPOT で検出できるようになる前に 4～10 日間、刺激する必要があります。B-Poly-S™試薬は、ヒト B 細胞に最適なポリクローナル刺激を与えます。in vitro で刺激された B 細胞の抗原特異性が既知の場合(抗原特異的な B Cell ELISPOT アッセイで試験される)、In vitro ASCs と呼ばれます。
そのような in vitro で刺激された B 細胞の抗原特異性が知られていない場合、細胞は in vitro ISCs と呼ばれます。
本キットでは、ex vivo もしくは In vitro で刺激した後に IgG 抗体を産生する全ての B 細胞を検出します。

アッセイの原理

IgG を分泌する B 細胞(ISC)を検出する原理は、下の模式図の通りです。紺色で表記されている Anti-human Ig Capture Antibody でメンブレンはコーティングされています。B 細胞が放出する抗体(下図のグレー部分)は、クラス、サブクラス、もしくは抗原特異性とは無関係に、メンブレンと結合した Anti-human Ig Capture Antibody と直接結合します。キャプチャーされた IgG は、ビオチン標識された Anti-human IgG Antibody と Streptavidin-Alkaline Phosphatase(Strep-AP)、3 つの副次成分(S1,S2,S3)を含む基質を添加する事によって、青色の沈殿"=スポット"を生じて検出されます。

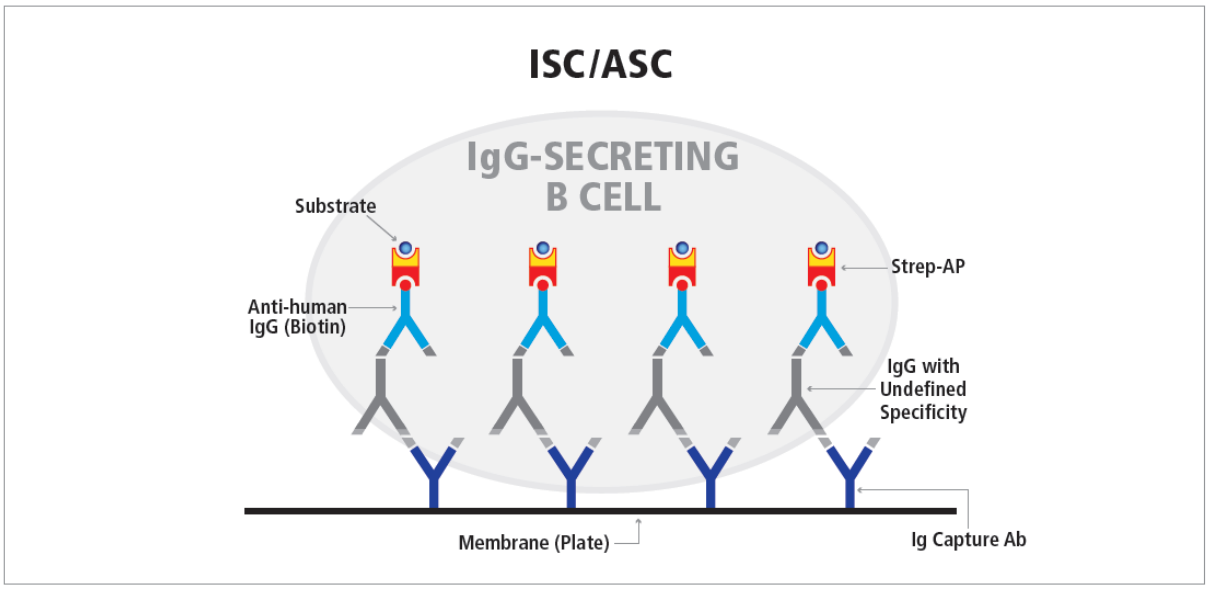
In vivo/vitro ASC の検出には、メンブレンを Ig Capture Antibody ではなく、抗原そのものでコーティングします。本メソッドの活用によって、In vivo/vitro ASC から放出された抗原特異的な抗体のみが、メンブレンと結合した抗原と結合します。このような抗原と結合した状態の抗原特異的な抗体は、In vivo/vitro ISC と同じ手順で検出できます。抗原のコーティング条件は、それぞれの抗原によって最適化してやる必要があります。CTL 社では、様々な抗原をコーティングする際の最適なコンディションについて、サポートする体制を整えています。

＜免疫グロブリン分泌 B 細胞に関する分類＞

	単独での自発的な Ig 分泌*1	ポリクローナル性刺激下における自発的な Ig 分泌*2
抗原特異性が不明	In vivo ISC	In vitro ISC
抗原特異性が定義づけられている	In vivo ASC	In vitro ASC

*1 少なくとも 12 日前から human stimulation にさらされているプラズマ芽球

*2 少なくとも 4 日間はポリクローナル性刺激を受けているメモリーB 細胞



ご不明の点は下記までお問合せ下さい。

株式会社エムエステクノシステムズ

●東日本 TEL (03)3235-0673 FAX (03)3235-0669

●西日本 TEL (06)6396-6616 FAX (06)6396-6644

e-mail: technosales@technosaurus.co.jp