

## ImmunoSpot® Kit: Single-Color Enzymatic (Mouse IFN- $\gamma$ )

### キット構成

CTL 社の ImmunoSpot kit には 96-well IFN $\gamma$  ELISPOT アッセイを行うのに必要なすべての試薬とプロトコルが含まれています。すべての試薬は 4℃で保管します。

キット構成/ 2plate, 5plate, 10plate	
● m-IFN $\gamma$ Capture Ab 2plate (130 $\mu$ l), 5plate (320 $\mu$ l), 10plate (620 $\mu$ l)	● Diluent A 2plate (25ml), 5plate (55ml), 10plate (110ml)
● m-IFN $\gamma$ Detection Ab (biotin) 2plate (30 $\mu$ l), 5plate (70 $\mu$ l), 10plate (120 $\mu$ l)	● Diluent B 2plate (25ml), 5plate (55ml), 10plate (110ml)
● Strep-AP 2plate (35 $\mu$ l), 5plate (65 $\mu$ l), 10plate (115 $\mu$ l)	● Diluent C 2plate (25ml), 5plate (55ml), 10plate (110ml)
● S1* (Blue substrate component 1) 2plate (340 $\mu$ l), 5plate (850 $\mu$ l), 10plate (1.7ml)	● Diluent Blue (25ml) 2plate (25ml), 5plate (55ml), 10plate (110ml)
● S2* (Blue substrate component 2) 2plate (340 $\mu$ l), 5plate (850 $\mu$ l), 10plate (1.7ml)	● 96-well Plate 2plate, 5plate, 10plate
● S3* (Blue substrate component 3) 2plate (200 $\mu$ l), 5plate (500 $\mu$ l), 10plate (1ml)	● CTL-TEST™ medium 2plate (100ml), 5plate (100ml x 2), 10plate (500ml)

キットの構成要素は既知の毒性、発がん性はありませんが、試薬の取り扱い、廃棄については十分ご注意ください。

\*MSDS のご用意があります。

### 溶液調製

注意 1: すべての溶液は使用直前に調製します。操作手順をご一読下さい。

注意 2: 調製量はご利用のキットによって異なりますので、マウス IFN- $\gamma$  キット以外のキットをお使いの場合は添付されている英文のプロトコル“SOLUTIONS”の項をご参照ください。

- 70%エタノール (プレウエット作業をする場合に必要です。キットには含まれません)
- CTL Test Medium : 全量に対して細胞培養グレードの 200mM L-glutamine を 1%(v/v)L-glutamine を添加してください (終濃度 2mM) 。プレート 1 枚分のアッセイで最低 20mL 必要です。
- *Capture Solution* : m-IFN $\gamma$  Capture を Diluent A で希釈します。1 プレート分は 60 $\mu$ l の m-IFN $\gamma$  Capture を 10ml の Diluent A に加えます。
- *Detection Solution* : m-IFN $\gamma$  Detection を Diluent B で希釈します。1 プレート分は 10 $\mu$ l の m-IFN $\gamma$  Detection を 10ml の Diluent B に加えます。
- *Strep-AP Solution* : Strep-AP を Diluent C で希釈します(1:1000)。1 プレート分は 10 $\mu$ l の Strep-AP を 10ml の Diluent C に加えます。
- *Blue Developer Solution* : 基質溶液(S1、S2、S3)を 10ml (1 プレート分) の Diluent Blue に順番に加えて調製します。

Step 1 – 160µl の S1 を 10ml の Diluent Blue に加え、よく混合します。

Step 2 – Step 1 で調製した溶液に、160µl の S2 を加え、よく混合します。

Step 3 – Step 2 で調製した溶液に、92µl の S3 を加え、よく混合します。

Developer solution は調製後 10 分以内に使用することを推奨します。使用するまで遮光保存してください。

- Wash Buffer (キットには含まれません)
- 0.05% Tween-PBS : 200ml の PBS に 100µl の Tween 20 を加えます。
- PBS (要滅菌)
- 滅菌水

## 操作手順

Day 0 (クリーンベンチ内で作業します)

### プレコート(Precoated)プレートの場合は Day 1 からスタートしてください。

- m-IFN $\gamma$  キャプチャー溶液を調製します (溶液調製セクションをご参照ください)。
- 1 ウェルあたり 80µl の m-IFN $\gamma$  キャプチャー溶液を加えます。プレートをパラフィルムでシールして 4°C で一晩インキュベーションします (このキットの抗体はメンブレンへの結合能が高いという特徴があるため、エタノールでのプレートのプレウェッティング操作は不要ですが、スポット数が多いことが予想される場合はプレウェッティング操作をすることで、さらに抗体結合能が上昇し、より良い結果となる場合があります。)

>> (オプション) プレウェッティング

**96well white plate の場合 :** プレートからアンダードレインを除きます。70%エタノール 15uL/well を加え、1 分以内に取り除きます。150uL/well の PBS で 3 回洗います。アンダードレインを取り付け、メンブレンが乾燥する前に、すぐキャプチャー抗体溶液を加えます。

**8well ストリップタイプのプレートの場合 :** 70%エタノール 15uL/well を加え、1 分以内に取り除きます。150uL/well の PBS で 3 回洗います。メンブレンが乾燥する前に、すぐキャプチャー抗体溶液を加えます。

(プレコートキットは出荷前にプレウェットされているため、手順が少なく最適化されており、お勧めです。)

Day 1 (クリーンベンチ内で作業します)

- CTL-TEST™ Medium に L-Glutamine を加え、用意します。(溶液調製セクションをご覧ください。)
- CTL-TEST™ Medium で抗原/マイトジェン溶液を PBMC とインキュベーションするときの 2x 濃度で調製します。
- Day 0 で加えたキャプチャー抗体溶液をプレートから捨て、150uL PBS で 1 回洗います。(プレコートプレートの場合はこの手順は不要です)
- 抗原/マイトジェン溶液を 100µl/well でプレートに加えます。細胞を撒く前に、pH と温度を細胞培養に適した条件にするために、抗原/マイトジェン溶液が入ったプレートを 37°C インキュベーターに 10-20 分間においてください。
- PBMC を CTL-TEST™ Medium で適当な濃度に調整します。たとえば 300,000 cells/well でアッセイを行うならば、 $3 \times 10^6$  cells/ml に調整します (注意! 100,000 cells/well ~ 800,000 cells/well の範囲で直線性がみられるので、細胞数は予測されるスポット数によって調整してください)。PBMC はプレートに加えるまで 37°C、5~9% CO<sub>2</sub> の加湿されたインキュベーター中に置いておきます。
- PBMC を広口径チップで、100µl/well でプレートに加えます。終了後プレートの側面をやさしくタップして細胞を分

散らせてすぐに 37℃、5～9% CO<sub>2</sub> の加湿されたインキュベーターに移します。-この操作の様子は動画でご覧いただけます。<https://www.youtube.com/watch?v=40CSxWQS1DA&feature=youtu.be>

- 24 時間インキュベートします。このときプレートは重ねないでください。インキュベーターのドアの開閉はゆっくり行い、プレートに振動が伝わらないようにしてください。インキュベーション期間中はプレートに触れないでください。

## Day 2

- PBS、Tween-PBS、滅菌水など洗浄用のバッファーなどを調製します（溶液調製のセクションをご参照ください）。
- m-IFN $\gamma$  Detection Solution を調製します（溶液調製のセクションをご参照ください）。
- プレートをインキュベーターから取り出し細胞を捨て（または回収し）、各ウェルを 200 $\mu$ l/well の PBS で 2 回洗浄し、引き続き同じ容量の Tween-PBS で 2 回洗浄します。
- m-IFN $\gamma$  Detection Solution を 80 $\mu$ l/well でプレートに加えます。室温で 2 時間インキュベートします。
- インキュベーション時間中に、Strep-AP 溶液を調製します（溶液調製のセクションをご参照ください）。
- インキュベーション終了後、200 $\mu$ l/well の 0.05% Tween-PBS で各ウェルを 3 回洗浄します。
- Strep-AP 溶液を 80 $\mu$ l/well でプレートに加えます。室温で 30 分インキュベートします。
- インキュベーション時間中に、Blue Developer 溶液を調製します（溶液調製のセクションをご参照ください）。
- インキュベーション終了後、200 $\mu$ l/well の 0.05% Tween-PBS で各ウェルを 2 回洗浄し、引き続き同容量の滅菌水で 2 回洗浄します。
- Blue Developer 溶液を 80 $\mu$ l/well でプレートに加えます。室温で 15 分インキュベートします。
- プレートを水道水\*ですすぎ、水を捨て発色反応を止めます。この操作を 3 回繰り返します。-この操作の様子は動画でご覧いただけます <https://www.youtube.com/watch?v=DNYbIM-k74g&feature=youtu.be> -
- プレートのアンダードレインを取り外してプレートの裏側を水道水\*ですすぎます。  
\*White plate を数回に分けてアッセイする場合は、滅菌水をご使用下さい。
- クリーンベンチにプレート置き送風して 2 時間ほど乾燥させます。またはプレートをペーパータオルの上にひっくり返して置き一日乾燥させます。
- ImmunoSpot<sup>®</sup>アナライザーでプレートをスキャンし各ウェルをカウントします
- ImmunoCapture で撮影時は以下の plate profile をお使い下さい。詳細は装置のマニュアルをご参照下さい。  
CTL 社 ImmunoSpot kit/ 96well white plate の場合 : Millipore MSIP4W  
CTL 社 ImmunoSpot kit/ strip plate の場合 : Millipore MSIP45

## ご使用前の注意点

- この製品は in vitro での利用、研究用途でのみご利用いただけます。診断目的にはご利用しないでください。
- 作業中は必ず手袋をして、目などに保護具を着用してください。試薬を扱った後は手をよく洗ってください。
- こぼれた液体は、10%漂白剤で処理したのち 70%エタノールなどですぐに拭き取ってください。
- この作業で使用した全ての試料とピペットチップ、チューブなどの器具は施設でのガイドラインに従って処理してください。
- ストリッププレートをお使いの場合、8well ストリップをさらに分割することは避けて下さい。

## テクニカル Tips

- 1 枚の Strip plate を複数回に分けて使用する場合、Day 2 以降の手順はクリーンベンチ外で取り扱いますので、2 回目以降の ELISPOT アッセイに関しましてはプレートフレームの滅菌をお勧めしています。標準的な滅菌方法については、巻末の note をご確認ください。
- 96well white プレートを最大限活用するために、市販の滅菌済みプレートシールで使わないウェルにシールをしっかり張り付け、次回の使用までカバーすることが可能ですが、Day 2 以降も可能な限り滅菌環境を保つよう、ご注意ください。
- ポジティブコントロール: ポリクローナル刺激としてコンカナバリン A (ConA) を使用される場合、推奨濃度は終濃度 2µg/ml です。
- チューブに入っている内容量を確保するためには、使用前に短時間遠心することが重要です。
- PBMC の凍結保存、解凍時、テストには CTL 社の無血清培地の利用を強く推奨します。増殖因子が含まれる血清に短時間でも接触することで、バックグラウンドの上昇あるいは細胞機能の抑制が引き起こされます。
- 指定した温度、時間、洗浄操作の回数、試薬の液量からの違いが大きいと、アッセイの性能が変わる場合があります。
- プレートの洗浄はマニュアル操作でも、メンブレンとスポットにダメージを与えないようヘッドのピンの長さや流量を調整したプレートウォッシャーでも行えます。
- ウェル中の PVDF メンブレンのダメージを防止するために、ピペットチップまたはプレートウォッシャーがメンブレンに接触しないようにします。PVDF メンブレンは透過性でありアンダードレインによって保護されています。ウェル中の液が吸い取られないように、ペーパータオルなどが直接メンブレン、アンダードレインの排出口に接触しないようにしてください。
- プレートを処理している間、PVDF メンブレンは常にウェットな状態を保ってください。
- 最適な発色の時間は 15 分で、低頻度から中頻度のスポットカウントに合わせて設定されました。スポットの頻度によっては微調整が必要になる場合があります。
- アンダードレインと手袋が濡れていると、取り外しの時にアンダードレインが滑りやすく取り外しが難しくなる場合があります。手袋とアンダードレインをペーパータオルで拭いてから取り外します。
- 操作完了後の ELISPOT プレートを乾燥させる時、37°C 以上には置かないでください。メンブレンに亀裂が入る場合があります。
- スポットはメンブレンがウェットな状態では見えにくい場合があります。CTL ImmunoSpot<sup>®</sup>アナライザーでスキャン、カウントするときはメンブレンが完全に乾燥してからにしてください。
- ネガティブコントロールのウェルが高バックグラウンドになる場合は、以下の操作で改善できる余地があります。
  - 前培養した細胞を利用する場合、アッセイの前に CTL-Wash<sup>™</sup> メディウムで細胞を十分洗浄して前培養中に放出したサイトカインと他の物質のキャリアオーバーを防ぎます。アッセイには CTL-TEST<sup>™</sup> メディウムを使用します。
  - ImmunoSpot<sup>®</sup> ソフトウェアの SmartCount<sup>™</sup> 機能は高バックグラウンド、不均一なバックグラウンドでも自動的にスポットを認識し、バックグラウンドのばらつきを補正します。AutoGating<sup>™</sup> 機能は T 細胞由来とバックグラウンドのスポットの識別を手助けします。
- データ分析。ImmunoSpot<sup>®</sup> ソフトウェアを搭載した CTL 社の ImmunoSpot<sup>®</sup> アナライザーは自動で、客観的なスポット認識、サイズゲーティングと計数が行えます。ELISPOT データのマネジメントシステムである SpotMap ソフトウェアもハイスループットな ELISPOT 研究の促進のために用意しております。

ELISPOT アッセイに関するトラブルシューティング、ImmunoSpot<sup>®</sup>ソフトウェアでのデータ解析について、CTL 社とエムエステクノシステムズのスタッフがお客様をサポートします。メールでのお問い合わせ先は下記までお願いいたします。

[technosales@technosaurus.co.jp](mailto:technosales@technosaurus.co.jp)

解析受託サービスをご利用される場合のプレート梱包時の注意点

- ① アンダードレインを取り付ける
- ② プレートのリッドをつける
- ③ アルミホイルなどの遮光出来るもので全体を覆う
- ④ ストリッププレートの場合は元のプレートフレームにしっかりとめ込み、ストリップが脱落することがないように確かめください。
- ⑤ 複数のプレートを発送される際は、区別できるようプレート本体にプレート名の記載をお願いします。  
発送先に関しましては営業担当がご案内いたします。

**Note**

ストリッププレートホルダー、リッド、アンダードレインの滅菌方法

ストリッププレートホルダー、蓋、アンダードレインをその後の ELISPOT アッセイに再利用するためには、無菌性を確保する必要があります。

A. 最初の ELISPOT アッセイの前に行うこと

1. クリーンベンチ下でプレートホルダーから不要なストリップを取り外します。
2. 1 で外したストリップをプレートが入っていたアルミバックに戻します。キャプチャー抗体がプレコートされている場合は冷蔵保存します。

B. 1 回目の ELISPOT アッセイ終了後

1. スキャン終了後、すべてのストリップをプレートホルダーから外します。
2. 空になったプレートホルダー、リッド、（プレートホルダーから外している場合は）アンダードレインを、10% 漂白剤に 15 分浸します。
3. 水道水ですすぎ、漂白剤を除きます。
4. 70%エタノールをスプレーし、ふき取ります。
5. クリーンベンチに付属している UV ライトで 15 分照射します。
6. クリーンベンチ下で、保存していたストリップをセットし、アンダードレインもセットします。
7. 滅菌済みプレートとして、アルミバックに戻し、次のアッセイまで保存します。

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](mailto:technosales@technosaurus.co.jp)

Mouse IFN- $\gamma$  Single-Color ELISPOT