

ImmunoSpot® Kit: Single-Color Enzymatic (human IFN- γ)

はじめに

CTL ImmunoSpot®プラットフォームは、科学的に有効な単一細胞レベルの ELISPOT アッセイの可能性を、最大限にします。ImmunoSpot アッセイは 800,000 個までならその中の 1 個を検出可能という類を見ない解像度で、抗原に刺激された個々の T 細胞からのエフェクター分子の分泌を測定しています。そこから ImmunoSpot®アッセイは、PBMC に代表される試験した細胞集団中に存在する抗原特異的 T 細胞の数という情報を与えます。この PBMC 中の特異的 T 細胞の存在頻度（数）は **T 細胞免疫の強度**を反映しています。また、さまざまなスポットサイズは個々の細胞が産生したサイトカイン量を記録しています。スポットサイズは多機能な T 細胞と直近に活性化された T 細胞によって増大し、免疫抑制またはアネルギーの状態によって縮小します。T 細胞集団が放出した各分子について測定することで、T 細胞免疫の**エフェクターシステムに関する情報**が得られます。

テストの原理

アッセイは、フレッシュな PBMC でも凍結保存されて適切なプロトコールによって解凍された PBMC でも行うことができます。ImmunoSpot®トライアルキットと併せて、CTL 社では抗原とセットでその抗原に対する反応性があらかじめ調べられた PBMC を販売しています（ePBMC® Reference Sample QC Set）。このようなリファレンスサンプルはアッセイ系開発、適格性、妥当性の確認に必要不可欠です。

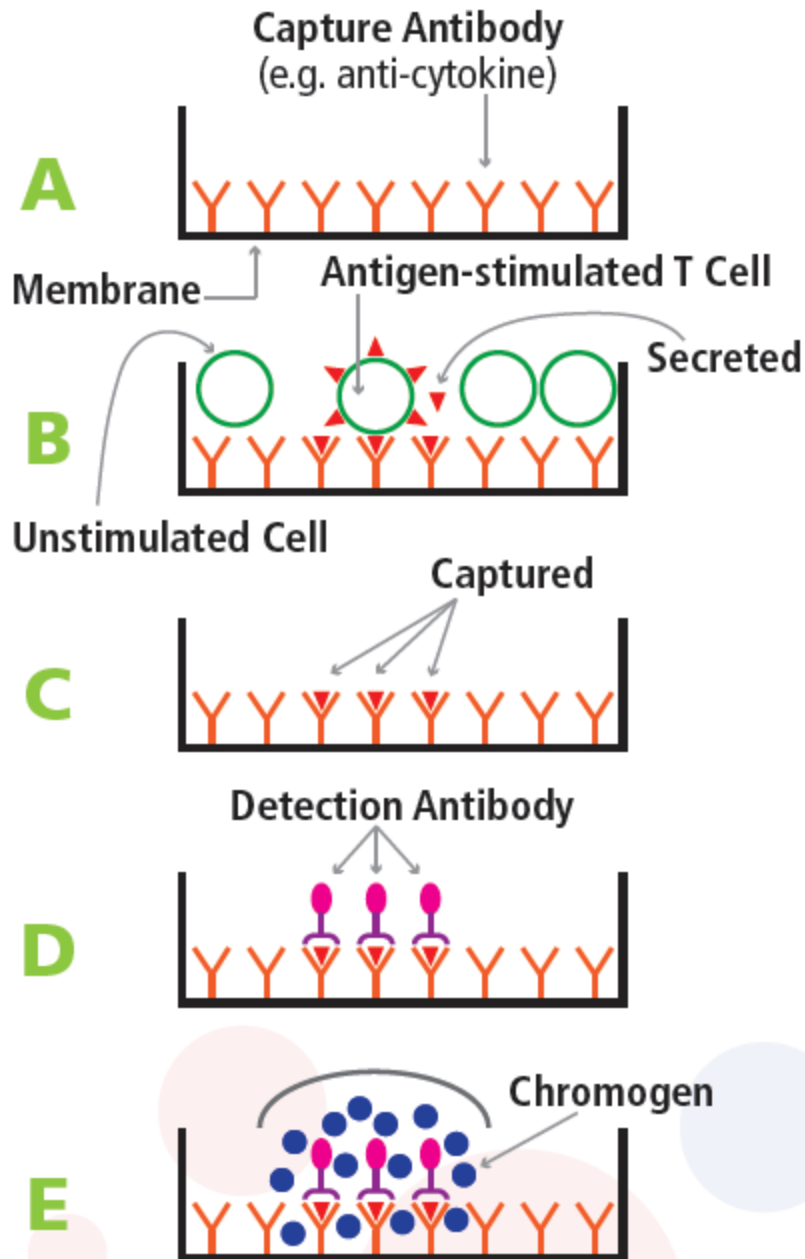
ELISPOT アッセイ用にデザインされた 96-well PVDF プレートは、サイトカイン特異的なモノクローナルキャプチャー抗体（例えば IFN γ 特異的抗体）によってコーティングされます。PBMC（または抗原提示細胞と精製された T 細胞のサブセット）はこのプレートされたウェルに分注されて、さらに抗原と一緒にインキュベートされます。

ネガティブコントロールウェルでは試験と無関係な抗原を加えるか、抗原なしで PBMC と培地のみにします。

ポジティブコントロールウェルでは、CD8 細胞を誘導するために CEF ペプチドを、CD4 細胞の活性化にサイトメガロウイルスを、両方の T 細胞のサブセットの活性化のためには PHA の利用を推奨します。

ePBMC® Reference Sample QC set はアッセイの妥当性をみるリファレンススタンダードとして理想的に適しています。ELISPOT アッセイでは最適な結果のために、細胞は最大のサイトカイン（または他のアナライト）産生を誘導する時間を抗原とともにインキュベーションしなければなりません。T 細胞による IFN γ 分泌の測定では 24 時間です。この活性化のインキュベーション時間経過後、細胞は取り除かれるかさらなるキャラクタリゼーション、増殖のために別のプレートに移され、標識されたサイトカイン特異的検出抗体がプレートに加えられます。引き続き、プレートに結合した検出抗体は酵素反応または蛍光によって可視化されます。ImmunoSpot®アッセイは個々の細胞の分泌活性のフットプリントである各色の沈殿（スポット）の検出と定量に最適化されています。スポット数はウェルにあった全細胞中の抗原特異的 T 細胞の正確な存在頻度の情報を与えます。さらにスポットサイズと形状は細胞の分泌活性のカイネティクスと規模という追加的な情報をもたらします。

HOW ELISPOT ASSAYS WORK



サイトカイン検出の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISPOT)アッセイの原理。PVDF メンブレンの ELISPOT フィルタープレートはアナライト特異的抗体でコーティングされます(A)。培養細胞、解凍された細胞、フレッシュな細胞は抗原特異的 T 細胞の活性化のために対象の抗原と一緒に共培養されて、それらからのサイトカイン放出を誘導します(B)。細胞は洗い流しウェルには抗体に結合したアナライトが残ります(C)。アナライトの別の抗原決定基を認識する特異的検出抗体が加えられ (図では直接ここに酵素が結合しています) (D)、検出抗体の標識化がストレプトアビジン-ビオチン反応によって間接的に行われます。発色用基質の添加によって酵素反応によるスポット形成が引き起こされます(E)。

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。
- 血液サンプル、PBMC、単離した細胞は、潜在的な感染性の試料としてお取扱いください。組織由来の試料は BSL II の扱いになります。
- 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、医療廃棄物として処理するなど施設でのガイドラインに従って処理してください。

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。
- 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と張り付け、次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。
- 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℃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[®]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。
- 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™ 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™ メディウムを使用します。
- ImmunoSpot®ソフトウェアの SmartCount™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™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®ソフトウェアを搭載した CTL 社の ImmunoSpot®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®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

キット構成

トライアルキットは 2 枚の 96-well ヒト IFN γ 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。(その他のサイトカイン、動物種のキットに含まれる容量は各キットの英文プロトコルをご確認ください。)

キット構成

● h-IFN γ Capture Ab (90 μ l)	● Diluent A (25ml)
● h-IFN γ (biotin) Detection Ab (90 μ l)	● Diluent B (25ml)
● Strep-AP (35 μ l)	● Diluent C (25ml)
● S1* (Blue substrate component 1) (340 μ l)	● Diluent Blue (25ml)
● S2* (Blue substrate component 2) (340 μ l)	● 96-well Plate (2)
● S3* (Blue substrate component 3) (200 μ l)	● CTL-TEST™ medium

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整してください

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、ヒト *IFN- γ* 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ール“*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、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：h-IFN γ Capture を Diluent A で希釈します。1 プレート分は 40 μ l の h-IFN γ Capture を 10ml の Diluent A に加えます。

Detection Solution：h-IFN γ Detection を Diluent B で希釈します。1 プレート分は 40 μ l の h-IFN γ 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 μ 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 – 160 μ l 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、160 μ l の S2 を加え、よく混合します。

Step 3 – Step 2 で調製した溶液に、92 μ l 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 100 μ l 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）**プレコートプレートの場合は Day 1 からスタートしてください。**

- h-IFN γ 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 80 μ l の h-IFN γ 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 $^{\circ}$ 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エット操作は不要ですが、スポット数が多いことが予想される場合はプレウエット操作をすることで、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）プレウエット

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 15 μ l/well を加え、1 分以内に取り除きます。150 μ l/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 15 μ l/well を加え、1 分以内に取り除きます。150 μ l/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エ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、 3×10^6 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% CO₂ 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させてすぐに 37°C、5~9% CO₂ 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)。
- h-IFN γ 検出溶液を調製します(溶液調製のセクションをご参照ください)。
- 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 200µl/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。
- h-IFN γ 検出溶液を 80µl/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、200µl/well の 0.05% Tween-PBS で各ウェルを 3 回洗浄します。
- Strep-AP 溶液を 80µl/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、200µl/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 80µl/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[®]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（トライアルキットにはスキャンングサービスが付属しています）。

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

1. 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