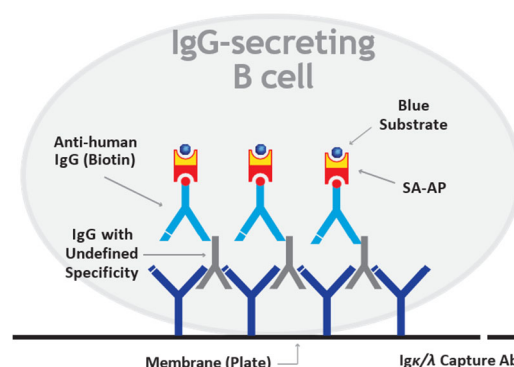


Human IgG Single-Color Enzymatic ELISPOT Assay

キット構成

- | | |
|---|-----------------|
| ● B-Poly-S | ● Diluent A |
| ● Human Ig Capture 抗体
(Anti-Igλ Ab, Anti-Igκ Ab) | ● Diluent B |
| ● Strep-AP | ● Diluent C |
| ● S1(Substrate component 1) | ● Diluent Blue |
| ● S2(Substrate component 2) | ● 96-well Plate |
| ● S3(Substrate component 3) | ● Protocol |
| ● Anti-human IgG(Biotin) | |
| ● Detection 抗体 | |



トータル IgG ELISPOT の模式図

【キットの他に準備が必要なもの】

- ・滅菌水
- ・滅菌 PBS
- ・無血清培地⇒【溶液調製】へ
- ・L-Glutamine 200 mM Solution (Gibco 型番:25030-081) ⇒【溶液調製】へ
- ・0.05% Tween-PBS ⇒【溶液調製】へ
- ・70% エタノール ⇒【溶液調製】へ

【操作手順】 脚注 1)～6)と TECHNICAL TIPS もお読みください。

(オプション) ～実験日から 4-6 日前:

in vitro での予備刺激を行う場合に必要となります～クリーンベンチ内作業

- ① アッセイ用無血清培地¹⁾を調製します。⇒【溶液調製】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、 $1 \sim 4 \times 10^6$ 個/mL になるように①で用意した培地で調整します。
- ③ B-Polys-STM試薬²⁾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-STMを 10 mL の細胞溶液に加える)。
- ④ 37℃・5～10% CO₂の加湿型インキュベーター内で、細胞を 4～6 日間培養する。

～実験日前日:

ELISPOT プレートのコーティング～ クリーンベンチ内作業

- ① 70%エタノールと Human Ig Capture Ab 入りの Capture 溶液を準備します。⇒【溶液調製】へ
- ② 【Pre-wetting】プレートの底のアンダードレーンを取り外します。15μL の 70%エタノールをウェルに添加し、すぐに 180

μL PBS を添加します。溶液を捨て、さらに 180μL PBS で洗います。8well strip plate の場合はアンダードレインを取り外さず行ってください。

Note: エタノールによるメンブレンの活性化は一瞬で起こり、メンブレンの色がグレイに変化します。最初の PBS 洗浄液を加える前に、エタノール溶液がすべてのウェルの膜全体に浸透していることを確認することが重要です。



操作を動画でご覧いただけます。

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

- ③ **【キャプチャー抗体または抗原のコーティング】** PBS を捨てた後、ペーパータオルにプレートをふせ、余分な水分を吸収させてアンダードレインを戻します。このときアンダードレインの底を押して圧力をかけず、プレート全体に力を均等に分散させてとりつけます。

80μl/ウェルのキャプチャー溶液すばやく各ウェルに分注します。抗原特異的抗体を検出する場合は、ここで抗原をコートします³⁾。

- ④ プレートをパラフィルムでシールした状態または加湿チャンバー内で一晚、4℃でインキュベートします。



加湿チャンバーの作り方

<https://www.youtube.com/watch?v=GjeLnKbVrU>

ELISPOT プロトコール

1 日目 細胞播種～クリーンベンチ内で作業してください

- ・in vitro 予備刺激あり – ①予備刺激後の細胞を回収し、無血清培地で 2 回洗浄し、希望の濃度に調製します⁴⁾
- ・in vivo – ①血液から、PBMC を分離し、無血清培地で希望の濃度に調製します⁴⁾
- ・以下、共通手順です

【洗いとブロッキング】

- ② プレートから Coating solution(キャプチャー抗体または抗原)を取り除きます。
- ③ 各ウェルを 150 μL/well の PBS を添加します。
- ④ PBS を捨て、ペーパータオルで余分な水分を吸い取り、150μL/well の無血清培地を添加します。
- ⑤ 室温で少なくとも 1 時間インキュベートします。
- ⑥ 培地を捨て、100μL/well の無血清培地を添加します。
- ⑦ ①で調整した PBMC を、広口径チップを使い 100μL/well で播種します⁴⁾。
- ⑧ プレートのサイドを穏やかにタップし（細胞がウェル内で偏らないようにするため）、すぐに 37℃・5～10% CO₂ の加湿型インキュベーターに静置します。



操作を動画でご覧いただけます。

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

- ⑨ 4～8 時間⁵⁾ 37℃で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

つくり行い、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。

～検出～細胞を回収後は実験台での作業となります

- ① wash 溶液を調製します： PBS、滅菌水、Tween-PBS ⇒【溶液調製】へ
- ② Anti-human IgG Detection Solution を準備します ⇒【溶液調製】へ
- ③ プレートをインキュベーターから取り出し、細胞をプレートから取り除きます。
- ④ プレートの各ウェルを 150μL PBS で 2 回洗浄し、引き続き 150μL 0.05% Tween-PBS で 2 回洗浄します。最後の洗い溶液を除去後、プレートをペーパータオルに伏せて置き、余分な水分を吸収させます。このときプレート底のメンブレンを乾燥させないよう手早く行ってください。
- 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、遮光、室温で 2 時間インキュベートします。
このステップは冷蔵温度帯でオーバーナイトのインキュベーションに替えることが可能です。⇒【注釈】5)
- ⑥ Tertiary Solution を調製します ⇒【溶液調製】へ
- ⑦ Detection solution を取り除きます。
- ⑧ プレートの各ウェルを 150μL 0.05% Tween-PBS で 2 回洗浄します。2 回目の洗い溶液を除去後、プレートをペーパータオルに伏せて置き、余分な水分を吸収させます。このときプレート底のメンブレンを乾燥させないよう手早く行ってください。
- ⑨ 各ウェルに 80 μL の Tertiary 溶液を加え、室温、遮光で 30 分インキュベートします。
- ⑩ インキュベート中に、Blue Developer 溶液を調製します。 ⇒【溶液調製】へ
- ⑪ Tertiary 溶液を取り除きます。
- ⑫ プレートの各ウェルを 150μL 蒸留水で 2 回洗浄します。最後の洗い溶液を除去後、プレートをペーパータオルに伏せて置き、余分な水分を吸収させます。このときプレート底のメンブレンを乾燥させないよう手早く行ってください。
- ⑬ 各ウェルに 80 μL の Blue Developer Solution を加え、室温、遮光で 10 分間インキュベートします。
- ⑭ 溶液を除去し、アンダードレインを取り外します。水場へ移動し、蛇口から出る水道水でプレート底のメンブレン表裏両面を穏やかにリンスし、水を捨てます。この操作を数回繰り返します。最後の水道水を除去後、プレートをペーパータオルに伏せて置き、余分な水分を吸収させます。



操作を動画でご覧いただけます。

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

- ⑮ 送風させたベンチフード下でプレートを置き、プレート完全に乾燥させます。または遮光、室温でペーパータオルに伏せた状態で 24 時間おきます。
- ⑯ プレートを ImmunoSpot アナライザーで撮影・解析します。^{6) 7)}

【溶液調製】

全ての溶液は、使用直前に調製してください。また、キットに含まれる試薬のチューブを軽く遠心することで無駄なく分注することが出来ます。

<70% エタノール> 純度 95%以上のエタノールを滅菌水で調整してください。

➤ 培地：

無血清培地（例：RPMI 1640 に pre-tested 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 8mM HEPES, 50μM 2-mercaptoethanol を添加した培地）に、終濃度が 1 vol%になるように 200mM L-glutamine※1 を加えます※2。

※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、無血清培地を 49.5 mL、L-Glutamine を 500 μL 混合します。

※2：メディアムの量は、細胞数やサンプル数によって変動しますが、1 プレート分 35 mL 程度必要です。培地は細胞に添加する前にあらかじめ 37℃にあたためてからお使い下さい。

➤ キャプチャー溶液：Capture Solution （抗原をコートする、抗原特異的抗体の検出の場合は不要です）

Human Ig Capture Ab を、Diluent A で希釈して作成します。1 プレーットの目安として、Anti-λ Ab と Anti-κ AB をそれぞれ 85 μL、8.3 mL の Diluent A で希釈します。

➤ 検出溶液：Anti-human IgG Detection Solution

Anti-human IgG(Biotin) Detection Ab を、Diluent B で希釈して作成し、低吸着 0.1μm フィルター(Millipore, Cat# SLVV033RS)でろ過します。

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

➤ ターシャリー溶液：Tertiary Solution

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

1 プレーットの目安として、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 プレーットの目安として

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、使用直前まで遮光して下さい。

➤ 洗浄用バッファー

・0.05% (v/v) 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 200 mL 用意して下さい。

➤ 滅菌水 200 mL 用意して下さい。

【TECHNICAL TIPS～アッセイ前にご一読下さい～】

- このキットでは、IgG スポットは青で検出されます。
- 指定された温度、タイミング、洗浄ステップの数、および指定された試薬調製量からの逸脱は、アッセイのパフォーマンスを変える可能性があります。（基質のインキュベーション時間が長くなると、スポットが濃くなります。スポットが明るい（薄い）ほど、RGB 値の差が大き

くなり、分析中に色を分離しやすくなります。したがって、2color 発色アッセイでは基質のインキュベーション時間を短くすることをお勧めします。

- メンブレンの乾燥を防ぐために、各ステップの最後の洗いのステップは次に添加する溶液を準備してから行ってください。
- プレートは、手動で洗浄することも、ピンの長さや流量を調整した適切な自動プレート洗浄機で洗浄することもできます。
- ウェル内の PVDF 膜への損傷を避けるため、ピペットチップやプレートワッシャー、アンダードレインで膜に触れないでください。PVDF 膜は透過性があり、アンダードレインで保護されています。プレウェット後にアンダードレインをプレートに押し上げすぎたり、アンダードレインが落ちたりすると膜が漏れる原因となります。細胞培養後にアンダードレインが落ちて問題ありませんが、手や濡れた表面、吸収材などに直接膜が触れないようにしてください。
- プレートを処理している間、PVDF 膜は濡れたままでなければなりません。洗浄時にプレートをペーパータオルに伏せることは、膜を完全に乾燥させずに余分な洗浄バッファ量を排除することが目的です。
- ELISPOT プレートは光を避けて保管しておけば、数週間後から数ヶ月後にも信号を失うことなくスキャンすることができます。FluoroSpot プレートは暗所に保管し、最適なシグナルを得るために 1 週間以内にスキャンする必要があります。

【脚注】

- 1) **【培地の選択について】**アッセイの標準化のために、無血清培地のご使用をお勧めしております。(例) RPMI 1640 に pre-tested 10% FCS, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin, 8mM HEPES, 50μM 2-mercaptoethanol を添加した培地もお使い頂けます。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。予備刺激から ELISPOT アッセイまでを通して統一した培地を使用してください。
- 2) B-Poly-S™は小分けにし、冷凍保存することをお勧めします。B-Poly-S™は単体で購入いただくことも可能です。型番：CTL-hBPOLYS-200, 品名：CTL Human B-Poly-S 80μl (for IgM, IgG, IgA stimulation)
- 3) **【抗原コーティングについて】**ELISPOT / FluoroSpot アッセイに使用される抗原のコーティング濃度は、エンドユーザーが最適化する必要があります。
- 4) **【細胞数について】**抗原特異的アッセイのためには、細胞数は $1-5 \times 10^5$ cells/well 程度が必要です。例えば、 3×10^5 cells/well でアッセイを行う場合は、 3×10^6 cells/mL となるように細胞懸濁液を調整してください。
最適な細胞数の決定のために系列希釈した細胞数をお試しください。トータル Ig 検出アッセイや、インキュベーションを 8 時間以上行う場合は、より少ない細胞数 ($1-5 \times 10^4$ cells/well) でスタートすることが適切な場合があります。CTL では正確な生細胞/死細胞数を算出するために、蛍光 2 色を使用したカウント方法 (CTL-LDC kit 等) を推奨しています。
- 5) 培養時間はプロトコル上の推奨時間の範囲内で行ってください。1 日ですべてのステップを行うことが難しい場合、オーバーナイトでできるステップは、**検出**⑤の検出抗体のインキュベーションです。室温で 2 時間のところを、冷蔵でオーバーナイトしていただけます。この時水分が蒸発しないようお気をください。
- 6) 膜が完全に乾燥した後にのみ、プレートをスキャンしてカウントしてください。蛍光プレートは、真空マニホールドを使うか、暗所で乾燥させるために一晩放置すると、膜の自家蛍光が低下することがあります。
- 7) 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。

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.

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お確かめください。
- 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 2 回目以降の 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。
- B. 1 回目の ELISPOT アッセイ終了後
 1. スキャニング終了後、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。

B Cell ELISPOT Assay の概要

B 細胞は、生体内で適切な刺激を受けると、リンパ芽球／プラズマブラストの表現型を獲得し、独自の B 細胞受容体である免疫グロブリン (Ig)（一般的には抗体と呼ばれる）を分泌し始めます。このような Ig を分泌するプラズマブラストは、抗体分泌細胞 (ASC) としても知られており、B cell ImmunoSpot®アッセイでプレートに播種し、数を測定することができます。

しかし、安静時のメモリーB 細胞を B cell ImmunoSpot®アッセイで検出するためには、事前に in vitro で刺激して Ig 分泌型プラス

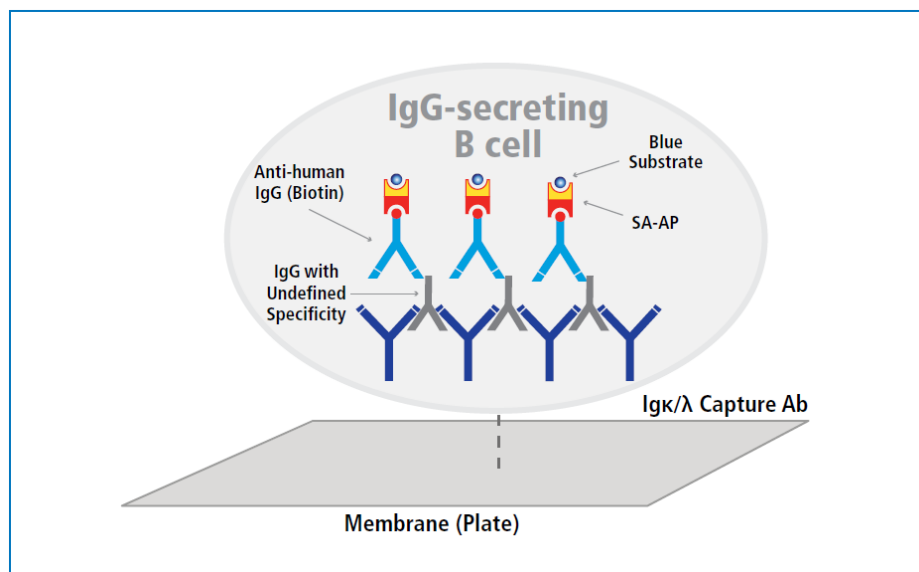
マブラストに分化させる必要があります。

このキットでは、IgG 抗体を分泌する B 細胞を ex vivo で直接、または in vitro で事前刺激した後に測定することができます。

アッセイの原理

IgG を分泌している全ての B 細胞を検出する原理を下図に示します。メンブレンには Anti-human Igκ/λ Capture Ab (紺色で表示) がコートされています。B 細胞が抗体 (灰色で表示) を分泌すると、これらの抗体はクラス、サブクラス、抗原特異性に関係なく、直接キャプチャーされます。プレートに結合した IgG は、ビオチン化した抗ヒト IgG 抗体を添加した後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (SA-AP) と 3 つのサブコンポーネント (S1、S2、S3) からなる基質を添加することで検出され、青色の沈殿物または「スポット」が生成されます。

抗原特異的 IgG ASC の検出には、抗ヒト Igκ/λキャプチャーAb ではなく、抗原そのものをメンブレンにコーティングする必要があります。この方法では、十分な結合力を持つ抗体のみが抗原コートされたメンブレンに結合したままとなります。これらの抗原特異的な抗体は、上記と同様の手順で検出することができます。最大限の感度を得るためには、各抗原に対してコーティング条件を最適化する必要があります。CTL は、様々な抗原に対するコーティング条件の最適化をお手伝いします。



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