For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.

T-Select MHC Class I Human Tetramer

Allele and Peptide Specificity

The T-Select MHC Class I Human Tetramers recognize human $CD8^+$ T cells which are specific for a particular peptide in combination with the HLA allele. The HLA molecule in this reagent has been modified to minimize CD8 mediated binding[1].

Background

T lymphocytes play a central role in immune system function. Total T cell and T cell subset counts are measured by detection of various cell surface molecules. Enumeration of $CD8^+$ antigen-specific T cells requires cognate recognition of the T cell receptor (TCR) by a class I MHC/peptide complex.
This can be done using class I MHC Tetramers which are composed of a complex of four HLA class I molecules each bound to the specific peptide[2, 3] and conjugated with a fluorescent protein. Thus, T-Select MHC Tetramer assays allow quantitation of the total T cell population specific for a given peptide complexed with a particular MHC molecule. Furthermore, since binding does not depend on functional pathways, this population includes all specific $CD8^+$ T cells regardless of functional status. Measurements may be performed in whole blood or isolated lymphocyte/mononuclear cell preparations. Specific cell staining is accomplished by incubating the sample with the T-Select MHC Tetramer reagent, then washing away excess Tetramer. The number of Tetramer positive lymphocytes is then determined by flow cytometry.

High Specificity

The T cell surface CD8 enhances T cell antigen recognition by binding to HLA class I molecules. Therefore, MBL produced T-Select MHC class I human Tetramers with one point mutation at the HLA $\alpha 3$ domain known to alter the interaction with CD8. These mutated Tetramers showed a greatly diminished nonspecific binding but retained specific binding. Alterations of CD8 binding by mutation of the MHC greatly improved the specificity of MHC-peptide multimers, thus providing efficient tools to sort specific human T cells for immunotherapy.

Reagents

500 μL liquid - 10 μL/test
The Tetramer is dissolved in an aqueous buffer containing 0.5 mM EDTA, 0.2% BSA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 0.09% NaN_3.

Conjugates

・Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)
Excites at 486-580 nm
Emits at 586-590 nm

・Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)
Excites at 633-635 nm
Emits at 660-680 nm

・Streptavidin-Fluorescein Isothiocyanate (SA-FITC)
Excites at 465-495 nm
Emits at 515-555 nm

・Streptavidin-Brilliant Violet™ 421 (SA-BV421)
Excitation maximum 405 nm
Emission maximum 421 nm

Storage Conditions

Store at 2 to 8°C. Do not freeze. Minimize exposure to light.
The expiration date is indicated on the vial label.
If the expiration date is not indicated, T-Select MHC Tetramers are stable for 90 days from the date of purchase. Stability data are not available for custom T-Select MHC Tetramers.

Evidence of Deterioration

Any change in the physical appearance of this reagent may indicate deterioration and the reagent should not be used. The normal appearance is a clear, colorless (SA-BV421) to pink (SA-PE), light blue (SA-APC), or light yellow (SA-FITC).

Reagent Preparation

No preparation is necessary. These T-Select MHC Tetramer reagents are used directly from the vial after a brief vortex on low setting.

Usage

This reagent is for use with standard flow cytometry methodologies.

Statement of Warnings

1. This reagent contains 0.09% sodium azide. Sodium azide under acid conditions yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Azide compounds should be flushed with running water while being discarded. These precautions are recommended to avoid deposits in metal piping in which explosive conditions can develop.

If skin or eye contact occurs, wash excessively with water.
2. Specimens, samples and material coming in contact with them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.
3. Never pipet by mouth and avoid contact of samples with skin and mucous membranes.
4. Minimize exposure of reagent to light during storage or incubation.
5. Avoid microbial contamination of reagent or erroneous results may occur.
6. Use Good Laboratory Practices (GLP) when handling this reagent.

Materials Required But Not Supplied

- 12 x 75 mm polypropylene test tubes
- Transfer pipettes
- Pipettors and disposable pipette tips
- Vortex mixer
- Centrifuge capable of 150 x g or 400 x g
- Aspirator
- PBS
- Red blood cell lysis reagent
- Anti-CD8a (Human) mAb-FITC, MBL, PN K0226-4
- 7-AAD Viability Dye, Beckman Coulter, Inc., PN A07704
- Clear Back (human FcR blocking reagent), MBL, PN MTG-001

Procedure for Whole Blood

1. Collect blood by venipuncture into a blood collection tube containing an appropriate anti-coagulant.
2. Add 10 μL of T-Select MHC Tetramer to each 12 x 75 mm test tube.
3. Add 200 μL of whole blood into each test tube.
4. Vortex gently.
5. Incubate for 30-60 minutes at 2-8°C or room temperature (15-25°C) protected from light.
6. Add any additional antibodies (e.g. anti-CD8) and vortex gently.
7. Incubate for 30 minutes at 2-8°C protected from light.
8. Lyse red blood cells using commercially available reagents.
9. Prepare samples according to description of the package insert.
10. Store prepared samples at 2-8°C protected from light for a minimum of 1 hour (maximum 24 hours) prior to analysis by flow cytometry.

Procedure for Peripheral Blood Mononuclear Cells

1. Prepare peripheral blood mononuclear cells (PBMC) according to established procedures. Cells should be re-suspended at a concentration of 2×10^7 cells/mL. 50 μL of sample is required for each T-Select MHC Tetramer determination.
2. Add 10 μL of Clear Back (human FcR blocking reagent, MBL, PN MTG-001) to each 12 x 75 mm test tube.
3. Add 50 μL PBMC into each test tube (e.g. 1×10^6 cells per tube).
4. Incubate for 5 minutes at room temperature.
5. Add 10 μL of T-Select MHC Tetramer and vortex gently.
6. Incubate for 30-60 minutes at 2-8°C or room temperature (15-25°C) protected from light.
7. Add any additional antibodies (e.g. anti-CD8) and vortex gently.
8. Incubate for 30 minutes at 2-8°C protected from light.
9. Add 3 mL of PBS or FCM buffer (2% FCS/0.09% NaN_3/PBS).
10. Centrifuge tubes at 400 x g for 5 minutes.
11. Aspirate or decant the supernatant.
12. Suspend the pellet in 500 μL of FCM buffer and analyze it immediately, or suspend it in 0.5% paraformaldehyde/PBS and store the sample in a dark room at 2-8°C. Be sure to analyze it within 24 hours.

Limitations

1. For optimal results with whole blood, retain specimens in blood collection tubes at room temperature, while rocking, prior to staining and analyzing. Refrigerated specimens may give aberrant results.
2. Recommended cell viability for venous blood specimens is > 90%.
3. Prolonged exposure of cells to lytic reagents may cause white blood cell destruction and loss of cells in the population of interest.
4. All red blood cells may not lyse under the following conditions: nucleated red blood cells, abnormal protein concentration or hemoglobinopathies. This may cause falsely decreased results due to unlysed red blood cells being counted as leukocytes.

Technical Hints

A. If PBMC culture is performed, we recommend the use of heparin as an anti-coagulant.

B. In an experiment where cells are stained with T-Select MHC Tetramer and antibodies, Clear Back (human FcR blocking reagent) may effectively block non-specific binding caused by macrophages or endocytosis, resulting in clear staining. Please refer to the data sheet (MBL, PN MTG-001) for details.

C. A Tetramer, which is constructed with the same allele of interest and an irrelevant peptide, may also be used as a negative control.

D. We recommend the use of anti-CD8 antibody, clone Hit8a (MBL, PN K0226-4) or SFCI21Thy2D3 (T8) because some anti-CD8 antibodies inhibit Tetramer–specific binding to TCR.

E. To reduce contamination of unlysed or nucleated red blood cells in the gate, we recommend the use of CD45 antibody and gating of the lymphocyte population.

F. Apoptotic, necrotic, and/or damaged cells are sources of interference in the analysis of viable cells by flow cytometry. Non-viable cells should be evaluated and discriminated following 7-AAD-positive labeling when viable cells remain unstained (negative).
G. The cells do not need to be fixed before analysis if stained cells are analyzed by flow cytometry within several hours.

Selected References

1) Bodinier M, Peyrat M-A, Tournay C, Davodeau F, Romagne F, Bonneville M, and Lang F, 2000. Efficient Detection and Immunomagnetic Sorting of Specific T Cells Using Multimers of MHC Class I and Peptide with Reduced CD8 Binding. Nat. Med., 6:707-710.
2) Altman JD, Moss PH, Goulder PJR, Barouch DH, McHeyzer W, Bell JI, McMichael AJ, and Davis MM. 1996. Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes. Science 274:94-96.
3) McMichael AJ, and O 'Callaghan CA. 1998. A New Look at T Cells. J. Exp. Med. 187:1367-1371.

Related Products

Please check our website (https://ruo.mbl.co.jp) for up-to-date information on products and custom MHC Tetramers.

For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.

T-Select HLA class I human Tetramer

HLA-A*24:02 EBV mix Tetramer-PE

使用は研究用に限ります。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、ウィ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、ウィ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・定量化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。

EBV(Epstein-Barr virus)は、乳幼児期に初感染し、世界中で 95%以上の成人が感染しているといわれています。B リンパ球に持続感染しますが、CTL を中心とした免疫監視機構により感染 B リンパ球は傷害され、多くは不顕性感染になります。しかしながら、移植や AIDS などの免疫不全状態において顕在化し、リンパ腫を起こします。またバーキットリンパ腫、ホジキン病、鼻咽頭がん、胃がんなどの発がんにも関連している事が報告されています。EBV 特異的 CTL を用いた細胞免疫療法は、移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)に対する治療法として期待されています。

EBV 特異的 CTL エピトープの研究は 1990 年代から盛んに行われています [1), 2)]。愛知県がんセンター 腫瘍免疫学部の葛島らは、日本人の約 7 割が保持する HLA-A*2402 拘束性の EBV 特異的 CTL エピトープを同定し、Tetramer 試薬を用いて EBV 特異的 CTL を簡便に測定できる事を報告しました [3)]。

本試薬は、下記 5 種類の HLA-A*24:02 EBV Tetramer 試薬をミックスした製品です。抗原由来タンパク質にこだわることなく、EBV 特異的 CTL を検出する場合にご利用ください。

TS-M001-1 HLA-A*24:02 EBV LMP2 Tetramer-PE
TS-M002-1 HLA-A*24:02 EBV BRLF1 Tetramer-PE
TS-M003-1 HLA-A*24:02 EBV BMLF1 Tetramer-PE
TS-M004-1 HLA-A*24:02 EBV EBNA3A Tetramer-PE
TS-M005-1 HLA-A*24:02 EBV EBNA3B Tetramer-PE

MHC-Tetramer 陽性細胞の有無を判定する際、ネガティブ Tetramer 試薬を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。

EBV CTL エピトープの参考文献

1) Rickinson AB and Moss DJ, *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 405-431 (1997)
2) Khanna R, *et al. Eur. J. Immunol.* **28**: 451-458 (1998)
3) Kuzushima K, *et al. Blood* **101**: 1460-1468 (2003)

T-Select HLA class I human Tetramer の特徴

T-Select HLA class I human Tetramer は特定の HLA アリルと抗原ペプチドとの複合体に特異的に結合するヒト CD8 陽性 T 細胞集団を検出できます。CD8 分子は HLA class I 分子に結合し、TCR と HLA class I/抗原ペプチド複合体との結合をサポートしています。この CD8 分子による HLA 分子への結合が、非特異的な CTL 検出の原因でした。本試薬では HLA class I 分子の・ 3 領域のアミノ酸配列に変異を入れることにより CD8 分子との非特異的結合を最小限に抑えたことで、特異性が飛躍的に向上しています。

French Application Number; FR9911133

HLA 拘束性: HLA-A*24:02

抗原ペプチドの由来と配列:

EBV LMP2 (222-230 aa, IYVLVMLVL)
EBV BRLF1 (198-206 aa, TYPVLEEMF)
EBV BMLF1 (320-328 aa, DYNFVKQLF)
EBV EBNA3A (246-254 aa, RYSIFFDYM)
EBV EBNA3B (217-225 aa, TYSAGIVQI)

標識物: PE
励起波長; 486-580 nm
蛍光波長; 586-590 nm

性状: 容量 500 μL, 10 μL/test
10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA,

0.09% NaN_3, 0.2% BSA にテトラマー試薬としてモノマーが 100 μg/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℃で遮光保存してください。凍結は絶対にしないでください。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の液体)は、劣化している可能性がありますので使わないでください。

染色方法:

1)全血を用いる場合

1. 適切な抗凝固剤を使用して、静脈血を採取します。
2. 10 μL の T-Select HLA class I human Tetramer-PE を各試験管に加えます。
3. 各試験管に 200 μL の全血を添加します。
4. ゆっくりとボルテックスをかけます。
5. 2-8℃または室温(15-25℃)で 20～60 分間インキュベーションします。
6. OptiLyse C (Beckman Coulter 社製分析機器用)、もしくは OptiLyse B (BD Biosciences 社製分析機器用)を用いて溶血・固定処理します。各々の説明書にて推奨の手順に従ってください。
7. 溶血・固定プロトコールの最終ステップ後、適量の PBS を加えて再懸濁します。
8. 400 x g で 5 分間遠心します。
9. 上澄みをアスピレートします。
10. ペレットを 500 μL の PBS に再懸濁します。
11. サンプルは暗室にて 2-8℃で保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点:

A. 細胞培養を行う場合は、必ずヘパリンナトリムを抗凝固剤として選択してください。
B. CD8 等の抗体を追加する場合は、ステップ 2.で同時染色するか、ステップ 5.終了時に追加染色してください。抗 CD8 抗体(クローン T8)は、Tetramer 試薬の染色性を阻害しませんので同時染色する事が可能です。
C. 溶血処理が不十分な場合、赤血球の乱反射による非特異的染色像が観察されることがあります。CD45 を同時染色してリンパ球ゲートで解析してください。

2)末梢血単核球(PBMC)を用いる場合

1. 定法に従って PBMC を調製し、2×10^7 cells/mL の濃度にて、細胞を再懸濁します。
2. 50 μL (1×10^6 cells)の細胞懸濁液に 10 μL の Clear Back(human FcR blocking reagent, MBL code no. MTG-001)を加え、5 分間室温にて反応させてください。
3. 10 μL の T-Select HLA class I human Tetramer-PE を加えます。
4. 2-8℃または室温(15-25℃)で 20～60 分間インキュベーションします。
5. CD8 抗体等を加え、2-8℃で 20 分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN_3/PBS]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 μL の 0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS に再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 2-8℃で保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点:

A. PBMC を分離後、赤血球が残っている場合は、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、リンパ球ゲートにて解析してください。
B. Clear Back を用いることで、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。
C. CD8 抗体はクローンによっては Tetramer 試薬と TCR の結合を阻害することが報告されています。クローン T8 に阻害作用はありません。
D. 培養したリンパ球を染色する場合は、7-AAD を用いて死細胞を染色し、解析ゲート内から除去してください。
E. 染色後、数時間以内に解析する予定でしたら、パラフォルムアルデヒドによる固定処理は必要ありません。

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. 全血にて最適な結果を得るため、検体は採血管にて室温で保存し、染色操作直前にも倒立攪拌してください。冷蔵検体では異常な結果が出ることがありますので使用しないでください。
4. 静脈血液検体の推奨細胞生存率は≧90%です。
5. 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。
6. 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。

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：

EBV

TB-0011-1	HLA-A*02:01 EBV BMLF1 Tetramer-GLCTLVAML-PE
TS-M006-1	HLA-A*02:01 EBV LMP1 Tetramer-YLQQNWWTL-PE
TB-0146-1	HLA-A*02:01 EBV LMP1 Tetramer-YLLEMLWRL-PE
TS-M030-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 Tetramer-TVCGGIMFL-PE
TS-M161-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 I6M Tetramer-TVCGGMMFL-PE
TS-M159-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 Tetramer-QLSPLLGAV-PE
TS-M160-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 Tetramer-GLGTLGAAL-PE
TS-M031-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 Tetramer-LLWTLVVLL-PE
TS-M069-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 Tetramer-FLYALALLL-PE
TS-M157-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 Y3C Tetramer-FLCALALLL-PE
TS-M032-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 Tetramer-CLGGLLTMV-PE
TS-M155-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 C1S Tetramer-SLGGLLTMV-PE
TS-M156-1	HLA-A*02:01 EBV LMP2 L6I Tetramer-CLGGLITMV-PE
TB-0131-1	HLA-A*02:01 EBV BALF4 Tetramer-FLDKGTYTL-PE
TS-M124-1	HLA-A*03:01 EBV BRLF1 Tetramer-RVRAYTYSK-PE
TS-M033-1	HLA-A*03:01 EBV EBNA3A$_{603-611}$ Tetramer-RLRAEAQVK-PE
TS-M028-1	HLA-A*11:01 EBV EBNA3B$_{399-408}$ Tetramer-AVFDRKSDAK-PE
TS-M029-1	HLA-A*11:01 EBV EBNA3B$_{416-424}$ Tetramer-IVTDFSVIK-PE
TS-M111-1	HLA-A*11:01 EBV LMP2 Tetramer-SSCSSCPLSK-PE
TS-M135-1	HLA-A*11:01 EBV LMP2 S9T Tetramer-SSCSSCPLTK-PE
TS-M003-1	HLA-A*24:02 EBV BMLF1 Tetramer-DYNFVKQLF-PE
TS-M002-1	HLA-A*24:02 EBV BRLF1 Tetramer-TYPVLEEMF-PE
TS-M004-1	HLA-A*24:02 EBV EBNA3A Tetramer-RYSIFFDYM-PE
TS-M005-1	HLA-A*24:02 EBV EBNA3B Tetramer-TYSAGIVQI-PE
TS-M034-1	HLA-A*24:02 EBV LMP2 Tetramer-PYLFWLAAI-PE
TS-M001-1	HLA-A*24:02 EBV LMP2 Tetramer-IYVLVMLVL-PE
TS-M154-1	HLA-A*24:02 EBV LMP2 Tetramer-TYGPVFMCL-PE
TS-M035-1	HLA-A*24:02 EBV LMP2 C8S Tetramer-TYGPVFMSL-PE
TS-M009-1	HLA-A*24:02 EBV Mix Tetramer-PE
TS-M142-1	HLA-B*07:02 EBV EBNA3A Tetramer-RPPIFIRRL-PE
TB-0123-1	HLA-B*07:02 EBV EBNA6 Tetramer-QPRAPIRPI-PE
TS-M036-1	HLA-B*08:01 EBV BZLF1$_{190-197}$ Tetramer-RAKFKQLL-PE
TS-M123-1	HLA-B*08:01 EBV EBNA3A Tetramer-FLRGRAYGL-PE
TB-0101-1	HLA-B*15:01 EBV EBNA4 Tetramer-GQGGSPTAM-PE
TS-M037-1	HLA-B*35:01 EBV BZLF1$_{54-64}$ Tetramer-EPLPQGQLTAY-PE
TB-0168-1	HLA-B*35:01 EBV EBNA1 Tetramer-HPVGEADYFEY-PE
TB-M038-1	HLA-B*35:01 EBV LMP2$_{1-9}$ Tetramer-MGSLEMVPM-PE
TS-M150-1	HLA-C*03:03 EBV EBNA1 Tetramer-FVYGGSKTSL-PE

CMV

TS-0024-1C	HLA-A*01:01 CMV pp50 Tetramer-VTEHDTLLY-PE
TS-0010-1C	HLA-A*02:01 CMV pp65 Tetramer-NLVPMVATV-PE
TB-M057-1	HLA-A*02:01 CMV IE1$_{316-324}$ Tetramer-VLEETSVML-PE
TS-M100-1	HLA-A*03:01 CMV IE1$_{184-192}$ Tetramer-KLGGALQAK-PE
TS-M012-1	HLA-A*11:01 CMV pp65 Tetramer-ATVQGQNLK-PE
TS-0020-1C	HLA-A*24:02 CMV pp65 Tetramer-QYDPVAALF-PE
TB-M099-1	HLA-B*07:02 CMV pp65 Tetramer-RPHERNGFTVL-PE
TS-0025-1C	HLA-B*07:02 CMV pp65 Tetramer-TPRVTGGGAM-PE
TS-0026-1C	HLA-B*08:01 CMV IE1 Tetramer-ELRRKMMYM-PE
TB-0147-1	HLA-B*08:01 CMV IE1 Tetramer-QIKVRVDMV-PE
TS-M013-1	HLA-B*15:01 CMV pp65 Tetramer-KMQVIGDQY-PE
TB-0027-1	HLA-B*35:01 CMV pp65 Tetramer-IPSINVHHY-PE

T-Select PEPTIDEs

TS-0011-P	HLA-A*02:01 EBV BMLF1 peptide, GLCTLVAML
TS-M003-P	HLA-A*24:02 EBV BMLF1 peptide, DYNFVKQLF
TS-M002-P	HLA-A*24:02 EBV BRLF1 peptide, TYPVLEEMF
TS-M004-P	HLA-A*24:02 EBV EBNA3A peptide, RYSIFFDYM
TS-M005-P	HLA-A*24:02 EBV EBNA3B peptide, TYSAGIVQI
TS-M069-P	HLA-A*02:01 EBV LMP2 peptide, FLYALALLL
TS-M001-P	HLA-A*24:02 EBV LMP2 peptide, IYVLVMLVL
TS-M035-P	HLA-A*24:02 EBV LMP2 C8S peptide, TYGPVFMSL
TS-M111-P	HLA-A*11:01 EBV LMP2 peptide, SSCSSCPLSK
TS-M135-P	HLA-A*11:01 EBV LMP2 S9T peptide, SSCSSCPLTK
TS-M803-P	HLA-DRB1*01:01 EBV EBNA1$_{515-527}$ peptide

Kits

4844	IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit
AM-1005M	IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit
TB-7300-K1	QuickSwitch™ Quant HLA-A*02:01 Tetramer Kit-PE
TB-7301-K1	QuickSwitch™ HLA-A*02:01 Tetramer Kit-PE
TB-7302-K1	QuickSwitch™ Quant HLA-A*24:02 Tetramer Kit-PE
TB-7303-K1	QuickSwitch™ HLA-A*24:02 Tetramer Kit-PE

Others

6603861	CD8-FITC (T8)
6607011	CD8-PC5 (T8)
A07750	Anti-CD4 (Human) mAb-FITC
A07704	7-AAD Viability Dye
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 試薬のカスタム合成に関しましては、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

HLA-A24 陽性の MBL 健常人末梢血から PBMC を調製し、Tetramer 試薬を用いて染色した（染色像1）。約 2 年後、同一ドナーより採血し、PBMC を調製して Tetramer 試薬にて染色した（染色像2）。

染色方法

1. ヘパリン採血後直ちに分離した PBMC（1×10^6 cells）を適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN_3/PBS]にて 1 回洗ったものを 7 本用意した。
2. 10 μL の Clear Back (Human FcR blocking reagent, MBL code MTG-001) と 20 μL の FCM buffer を加え、室温にて 5 分間反応させた。
3. 以下の各テトラマー試薬をそれぞれ 10 μL ずつ加え、4℃で 30 分間反応させた。
   - HLA-A*24:02 Negative Tetramer-PE
   - HLA-A*24:02 EBV mix Tetramer-PE
   - HLA-A*24:02 EBV LMP2 Tetramer-PE
   - HLA-A*24:02 EBV BRLF1 Tetramer-PE
   - HLA-A*24:02 EBV BMLF1 Tetramer-PE
   - HLA-A*24:02 EBV EBNA3A Tetramer-PE
   - HLA-A*24:02 EBV EBNA3B Tetramer-PE
4. 10 μL の CD8-FITC (clone T8, MBL code no. 6603861) をそれぞれ加え、4℃で 20 分間反応させた。リンパ球を染色する為に、CD45-PC5 (clone J.33, MBL code no. A07785) を 10 μL 加えた。
5. 適量の FCM buffer を加え 400 x g で 5 分間遠心した。
6. 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。
7. FCM にて解析した。

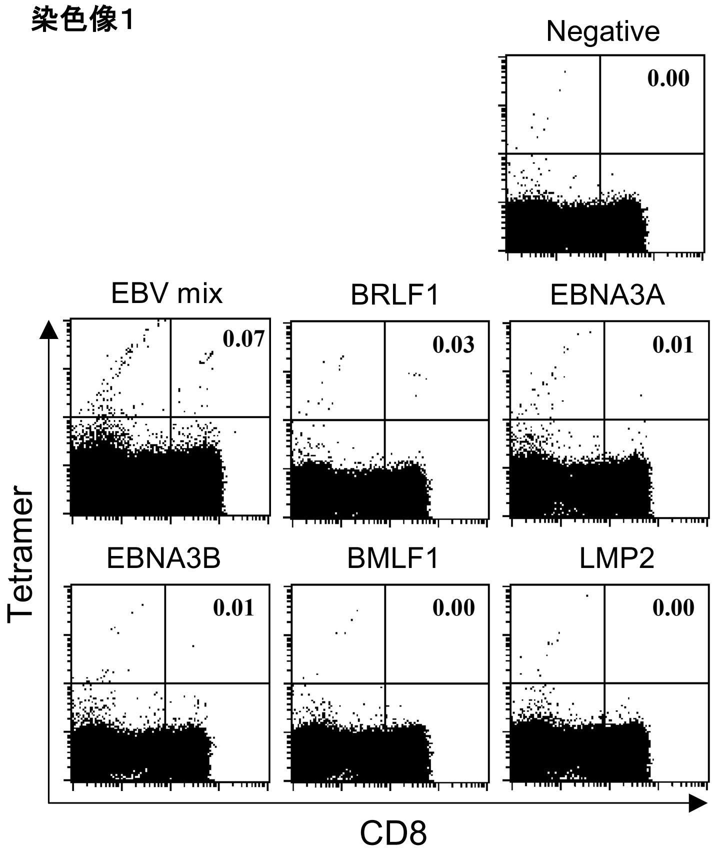
染色結果

採血直後に分離した PBMC の染色結果を示す。ドットプロット展開図中の右上の数字は CD8 陽性細胞中のテトラマー試薬特異的 CTL の割合（%）を示す。

EBV mix Tetramer と、それに含まれる 5 種類の EBV Tetramer 試薬で染色した結果、それぞれのテトラマーでの染色性が観察できた。下記に MBL 健常人 13 名における EBV 各抗原の Tetramer 染色結果を表で示す。

抗原名	陽性Donor数（13名中）	割合
BRLF1	7	54%
EBNA3A	5	38%
EBNA3B	3	23%
BMLF1	3	23%
LMP2	2	15%

染色像1



染色像2