

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 binding¹⁾.

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 α 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 μ L liquid - 10 μ L/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% NaN₃.

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 μ L of T-Select MHC Tetramer to each 12 x 75 mm test tube.
3. Add 200 μ L 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 μ L of sample is required for each T-Select MHC Tetramer determination.
2. Add 10 μ L of Clear Back (human FcR blocking reagent, MBL, PN MTG-001) to each 12 x 75 mm test tube.

3. Add 50 μ L PBMC into each test tube (e.g. 1×10^6 cells per tube).
4. Incubate for 5 minutes at room temperature.
5. Add 10 μ L 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% NaN₃/PBS).
10. Centrifuge tubes at 400 x g for 5 minutes.
11. Aspirate or decant the supernatant.
12. Suspend the pellet in 500 μ L 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 SFC121Thy2D3 (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.

T-Select HLA class I human Tetramer

HLA-A*1101 HTLV-1 Tax272-280

Tetramer-QSSSFIFHK-PE (50 tests)

使用は研究用に限りません。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、ウイ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、ウイ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。

本試薬は、MHC に HLA-A*1101 を、抗原ペプチドに HTLV-1 Tax タンパク質由来のペプチドを用いて合成しており、これに特異的な CTL 集団を検出定量することが可能です。

レトロウイルスの一種である HTLV-1 (Human T-cell leukemia virus type 1) は、T 細胞に感染して成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) を引き起こすことが知られています。HTLV-1 のキャリアは九州、沖縄を中心に日本全国で約 120-150 万人と言われています。ATL や HAM/TSP、その他の HTLV-1 関連炎症性疾患の発症が見られるのはそのうちの約 5% ですが、ATL の予後は他の白血病と比較しても非常に悪く、5 年生存率は 12-17% と言われています。地域的な偏りが激しいことや発症率が低いことを理由に対応が遅れていることが指摘されており、HTLV-1 感染者の多さと、関連疾患発症後における症状の重篤性から、非常に注目されているウイルスのひとつです。

HTLV-1 感染とそれに対する宿主免疫応答は、さまざまな関連疾患の発症と深い関わりがあると考えられています。1990 年 Jacobson らは、HTLV-1 の Tax が CTL の主要な標的抗原であることを報告し¹⁾、1992 年、現東京医科歯科大学の神木らは、Tax の 11-19 番目のアミノ酸配列が、HLA-A2 拘束性を示す CTL エピトープであることを世界に先駆けて報告しました²⁾。同じく東京医科歯科大学の原嶋らは、HLA-A*1101 拘束性のエピトープとして、Tax88-96 および Tax272-280 を同定しました。このエピトープ特異的 CTL は、造血幹細胞移植後の ATL 患者体内で移植片対白血病 (GVL) 効果に寄与している事が示唆されました³⁾。

HTLV-1 Tax272-280 の参考文献

- 1) Jacobson S, *et al. Nature* **348**: 245-248 (1990)
- 2) Kannagi M, *et al. J. Virol.* **66**: 2928-2933 (1992)
- 3) Harashima N, *et al. J. Virol.* **79**: 10088-10092 (2005)

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 $\alpha 3$ 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。

HLA 拘束性: HLA-A*1101

抗原ペプチドの由来と配列:

HTLV-1 Tax (272-280 aa, QSSSFIFHK)

標識物: PE

励起波長: 486-580 nm

蛍光波長: 586-590 nm

性状: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.09% NaN₃, 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°Cで遮光保存してください。凍結は絶対に行わないでください。

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. 室温で 20 分間、あるいは 4°C で 30 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 (Becton Dickenson 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 4°C 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ウ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 40 µL の blocking buffer [1 mg/mL human IgG, normal goat serum, 0.09% NaN₃] あるいは、Clear Back (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. 室温で 20 分間、あるいは 4°C で 30 分間インキュベーションします。
5. CD8 抗体等を加え、4°C で 20 分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer [2% FCS, PBS, 0.05% NaN₃] 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 PBS/0.5% パラフォルムアルデヒドに再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 4°C で保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点:

- D. 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。
- E. Blocking buffer あるいは 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。
- F. 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。
- G. 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。
- H. 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. 試薬の細菌感染を避けてください。誤った結果が出る場合があります。
4. 当試薬の取り扱いには Good Laboratory Practice (GLP) をご参照ください。
5. 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場合がありますので使用しないでください。
6. 静脈血液検体の推奨細胞生存率は $\geq 90\%$ です。

7. 細胞を溶血試薬と長時間反応させないで下さい。白血球の破壊や目的細胞損失の原因となります。
8. 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:

HTLV-1

TS-M017-1	HLA-A*0201 HTLV-1 Tax11-19 Tetramer-PE
TS-M019-1	HLA-A*0201 HTLV-1 Tax178-186 Tetramer-PE
TS-M020-1	HLA-A*2402 HTLV-1 Tax12-20 Tetramer-PE
TS-M021-1	HLA-A*2402 HTLV-1 Tax187-195 Tetramer-PE
TS-M018-1	HLA-A*2402 HTLV-1 Tax301-309 Tetramer-PE
TS-M022-1	HLA-A*2402 HTLV-1 Env11-19 Tetramer-PE
TS-M023-1	HLA-A*1101 HTLV-1 Tax88-96 Tetramer-PE
TS-M024-1	HLA-A*1101 HTLV-1 Tax272-280 Tetramer-PE

CMV

TS-M012-1	HLA-A*1101 CMV pp65 Tetramer-ATVQGQNLK-PE
TS-0010-1	HLA-A*0201 CMV pp65 Tetramer-NLVPMVATV-PE
TS-0010-2	HLA-A*0201 CMV pp65 Tetramer-NLVPMVATV-APC
TS-0020-1	HLA-A*2402 CMV pp65 Tetramer-QYDPVAALF-PE
TS-0020-2	HLA-A*2402 CMV pp65 Tetramer-QYDPVAALF-APC
TS-M013-1	HLA-B*1501 CMV pp65 Tetramer-KMQVIGDQY-PE
TS-0027-1	HLA-B*3501 CMV pp65 Tetramer-IPSINVHHY-PE
TS-0027-2	HLA-B*3501 CMV pp65 Tetramer-IPSINVHHY-APC
TS-0025-1	HLA-B*0702 CMV pp65 Tetramer-TPRVTGGGAM-PE
TS-0025-2	HLA-B*0702 CMV pp65 Tetramer-TPRVTGGGAM-APC
TS-0024-1	HLA-A*0101 CMV pp50 Tetramer-VTEHDLLY-PE
TS-0024-2	HLA-A*0101 CMV pp50 Tetramer-VTEHDLLY-APC
TS-0026-1	HLA-B*0801 CMV IE1 Tetramer-ELRRKMMYM-PE
TS-0026-2	HLA-B*0801 CMV IE1 Tetramer-ELRRKMMYM-APC

EBV

TS-0011-1	HLA-A*0201 EBV BMLF-1 Tetramer-GLCTLVAML-PE
TS-0011-2	HLA-A*0201 EBV BMLF-1 Tetramer-GLCTLVAML-APC
TS-M003-1	HLA-A*2402 EBV BMLF1 Tetramer-DYNFVKQLF-PE
TS-M002-1	HLA-A*2402 EBV BRLF1 Tetramer-TYPVLEEMF-PE
TS-M004-1	HLA-A*2402 EBV EBNA3A Tetramer-RYSIFFDYM-PE
TS-M005-1	HLA-A*2402 EBV EBNA3B Tetramer-TYSAGIVQI-PE

TS-M006-1	HLA-A*0201 EBV LMP1 Tetramer-YLQQNWWTL-PE
TS-M001-1	HLA-A*2402 EBV LMP2 Tetramer-IYVLVMLVL-PE
TS-M009-1	HLA-A*2402 EBV Mix Tetramer-PE

HIV

TS-0007-1	HLA-A*0201 HIV gag Tetramer-SLYNTVATL-PE
TS-0008-1	HLA-A*0201 HIV pol Tetramer-ILKEPVHGV-PE
TS-M007-1	HLA-A*2402 HIV env Tetramer-RYLRDQQLL-PE

HBV

TS-0018-1	HLA-A*0201 HBV core Tetramer-FLPSDFFPSV-PE
TS-0018-2	HLA-A*0201 HBV core Tetramer-FLPSDFFPSV-APC
TS-0022-1	HLA-A*2402 HBV core Tetramer-EYLVSFGVW-PE
TS-0022-2	HLA-A*2402 HBV core Tetramer-EYLVSFGVW-APC
TS-0023-1	HLA-A*2402 HBV pol Tetramer-KYTSFPWLL-PE
TS-0023-2	HLA-A*2402 HBV pol Tetramer-KYTSFPWLL-APC

HPV

TS-0031-1	HLA-A*0201 HPV E7 Tetramer-YMLDLQPET-PE
TS-0031-2	HLA-A*0201 HPV E7 Tetramer-YMLDLQPET-APC

Influenza

TS-0012-1	HLA-A*0201 Influenza-M1 Tetramer-GILGFVFTL-PE
TS-0012-2	HLA-A*0201 Influenza-M1 Tetramer-GILGFVFTL-APC

Control

TS-M007-1	HLA-A*2402 Negative Tetramer-RYLRDQQLL-PE
TS-M007-3	HLA-A*2402 Negative Tetramer-RYLRDQQLL-FITC
TS-0029-1	HLA-A*0201 Negative Tetramer-PE
TS-0029-2	HLA-A*0201 Negative Tetramer-APC

Others

4844	IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit
TS-8005	T-Select MHC IFN- γ Kit
TS-9004	T-Select Antibody Gating Kit
6603861	CD8-FITC (T8)
6607011	CD8-PC5 (T8)
A07782	CD45-FITC (J.33)
A07783	CD45-PE (J.33)
A07785	CD45-PC5 (J.33)
A07704	7-AAD Viability Dye (死細胞検出試薬)
IM-1400	OptiLyse B
A11895	OptiLyse C
MTG-001	Clear Back (Human FcR blocking reagent)