

## T-Select

# Human CD1d Tetramer

使用は研究用に限り、診断目的には使用しないでください。  
本試薬に  $\alpha$ -GalCer は含まれておりません。

### 容量:

Code no.	Quantity
TS-HCD-1	500 $\mu$ L (50 tests)
TS-HCD-2	500 $\mu$ L (50 tests)

### 背景:

CD1d 分子は、 $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m) と非共有結合した細胞膜タンパク質で、ヒト、マウス間でホモロジーが非常に高いことが知られています。ヒトもしくはマウスの CD1d 分子は、海綿から分離・合成された糖脂質である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を提示することで、CD1d 拘束性のヒトおよびマウスの Natural Killer T 細胞 (NKT 細胞) を活性化できます。NKT 細胞とは、NK 細胞マーカーを表出し、NK 細胞の性質をあわせもつ珍しい T 細胞で、その T 細胞受容体は、通常の T 細胞と比べて、多様性が非常に乏しいことが知られています。NKT 細胞は、CD1d 分子に提示された糖脂質を認識することで、大量の IFN- $\gamma$  と IL-4 を産生します。また、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、糖尿病等の自己免疫疾患、腫瘍免疫、アレルギーにも関与していることが報告されており、免疫系において様々な役割を担っている細胞であると考えられています。CD1d 拘束性の NKT 細胞を正確に検出する技術は、免疫学だけでなく、臨床研究においても極めて有用であると考えられます。

T-Select Human CD1d Tetramer は、human CD1d と  $\beta$ 2m の複合体を蛍光標識されたストレプトアビジンにより 4 量体化した試薬です。本試薬に  $\alpha$ -GalCer を結合させることで、CD1d 拘束性の NKT 細胞をフローサイトメーターにより高感度に検出できます。他の NKT 細胞関連抗体と組み合わせることで、より簡便に NKT 細胞の機能解析を行うこともできます。

**特異性:** T-Select Human CD1d Tetramer は、CD1d 分子と  $\alpha$ -GalCer 複合体に特異的に結合するヒト NKT 細胞を認識します。

**性状:** 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.2% BSA, 0.09% NaN<sub>3</sub> を含む水溶性バッファーに溶解されています。

\*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る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。

### 標識物:

TS-HCD-1: Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)  
励起波長: 486-580 nm  
蛍光波長: 586-590 nm

TS-HCD-2: Streptavidin-Allophycocyanin (SA-APC)  
励起波長: 633-635 nm  
蛍光波長: 660-680 nm

**保存法:** 2-8°C で遮光保存してください。凍結は絶対にしてしないでください。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 (SA-PE) または青色 (SA-APC) 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。

**試薬の調製:** T-Select Human CD1d Tetramer には、 $\alpha$ -GalCer は含まれていません。従いまして、以下の手順で、 $\alpha$ -GalCer を結合後、使用してください。

- $\alpha$ -GalCer を 1 mg/mL の濃度となるように pyridine で溶解します。これを stock 溶液として 0.5% Tween-20、0.9% NaCl で 200  $\mu$ g/mL の濃度となるように希釈します。
- 5  $\mu$ L の希釈した  $\alpha$ -GalCer を、100  $\mu$ L の T-Select Human CD1d Tetramer-PE に加えて、全体を穏やかにピペッティングします。暗所室温 (20°C ~ 30°C) もしくは 37°C で、12 ~ 18 時間静置します。
- 静置後、そのままの状態 で 4°C に保存します。

### 染色方法:

- 定められた手順に従い、末梢血などから細胞懸濁液を調製します。染色には  $\sim 1 \times 10^7$  cells/mL の濃度にて、細胞を FCM buffer (2% FCS/0.05% NaN<sub>3</sub>/PBS) で再懸濁します。
- 各試験管に 100  $\mu$ L の細胞懸濁液を加え、400 x g で 5 分間遠心分離します。上澄みをアスピレートします。
- 10  $\mu$ L の Clear Back (human Fc receptor blocking reagent, MBL code no. MTG-001) と、30  $\mu$ L の FCM buffer を加えて穏やかに攪拌後、室温で 5 分間インキュベートします。

- 10  $\mu\text{L}$  の T-Select Human CD1d Tetramer を加え、よく混ぜます。暗所 4°C にて 20 分間インキュベートします。
- 1 mL の FCM buffer を加えます。
- 400 x g で 5 分間遠心分離します。上澄みをアスピレートします。同様の操作を 3 回繰り返します。
- ペレットを 500  $\mu\text{L}$  の FCM buffer で再懸濁し、フローサイトメーターで解析します。直ちに分析しない場合は、0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS にて再懸濁し、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。  
\*CD3 などの抗体を追加する場合はステップ 4 で追加してください。

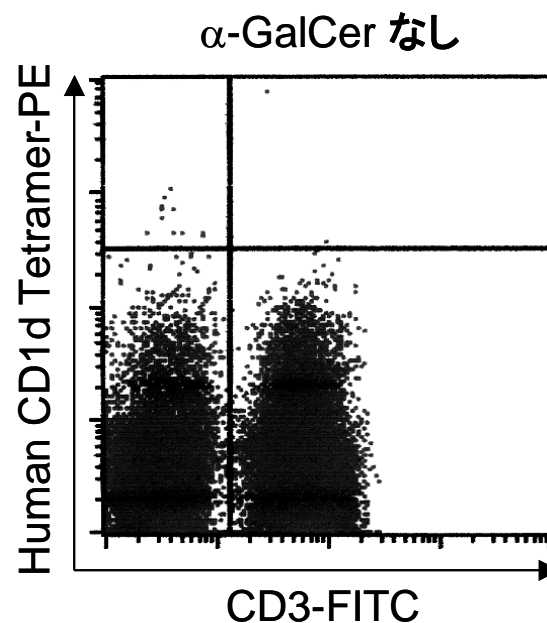
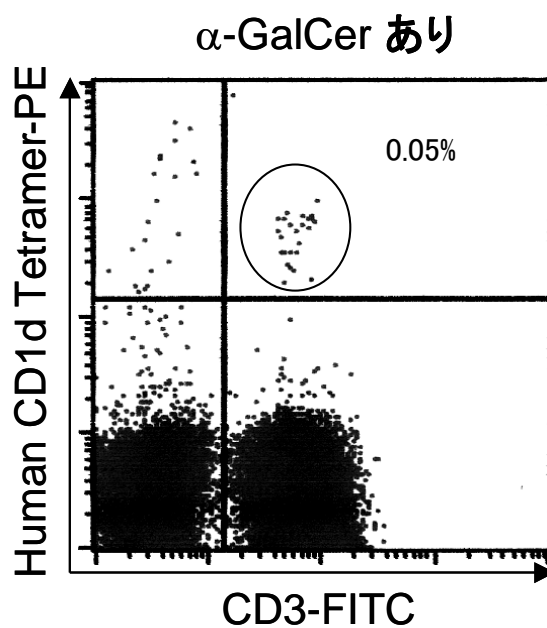
#### 染色の注意点:

- 染色する細胞集団に赤血球の残存が認められる場合は、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。
- 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。
- 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。
- 染色後、数時間以内に解析する場合、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:

- 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もつものとして、取り扱いには十分注意してください。
- 保管もしくは反応中、試薬に光をあてないようにご注意ください。
- 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。
- 静脈血液検体の推奨細胞生存率は  $\geq 90\%$  です。
- 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。
- 有核赤血球、異常タンパク質濃度を有する検体、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。

染色例: 健康人由来の末梢血単核球を用いた染色例



## Background :

Natural Killer T (NKT) cells, a type of T cell that plays a significant role in immune response, produces a large quantity of INF- $\gamma$  and IL-4 in response to glycolipids that presented by CD1d molecules. In recent years, NKT cells are reported to play a part in diabetes and tumor immunity. Therefore, a technology allowing quantitative measurement of CD1d-positive NKT cells would be a useful tool for immunology and clinical laboratory examinations.

The development of MHC Tetramer technology has provided a breakthrough in the ability to follow T cell populations defined by their antigen specificity. Tetramers have been used widely to obtain a detailed analysis of the distribution and frequency of conventional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> antigen-specific T cells during a variety of immune responses. T-Select Human CD1d Tetramer is a reagent created by tetramerizing biotinylated human CD1d/ $\beta$ 2m complexes with streptavidin labeled phycobiliprotein.  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer), a glycosphingolipid originally isolated from marine sponges, appears to be presented by CD1d to activate both human and mouse NKT cells.  $\alpha$ -GalCer loaded T-Select Human CD1d Tetramer is a highly specific reagent for detection of NKT cells. Measurement can be performed using isolated lymphocytes/monocytes.

## Specificity:

T-Select Human CD1d Tetramer recognizes human NKT cells that bind specifically with CD1d molecule and  $\alpha$ -GalCer complex.

## Storage:

Store protected from light at 2-8°C. Do not freeze.

## Fluorescent labeling :

Phycoerythrin

Excitation wavelength: 486 - 580 nm

Fluorescent wavelength: 586 - 590 nm

Allophycocyanin

Excitation wavelength: 633 - 635 nm

Fluorescent wavelength: 660 - 680 nm

## Formulation:

The reagent is dissolved in aqueous buffer that contains 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.2% BSA and 0.09% NaN<sub>3</sub>.

\*Azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush plenty of water when disposing materials containing azide into drain.

## Stability:

The product is stable for at least 2 year when stored as recommended. If the reagent shows physical change (usually it is a slightly pinkish or blue liquid), do not use the reagent because it may be degraded.

## Preparation of reagent:

T-Select Human CD1d Tetramer does not contain  $\alpha$ -GalCer. Please combine with  $\alpha$ -GalCer before use according to the procedure described below.

1. Dissolve  $\alpha$ -GalCer in pyridine to make a concentration of 1 mg/mL. Use this as a stock solution, and dilute it with 0.5% Tween-20, 0.9% NaCl to make a concentration of 200  $\mu$ g/mL.
2. Add 5  $\mu$ L of diluted  $\alpha$ -GalCer to 100  $\mu$ L of T-Select Human CD1d Tetramer-PE, and pipette the whole solution slowly. Incubate it at room temperature (20-30°C) or 37°C for 12 to 18 hours. Minimize exposure to light.
3. After that, store the reagent as is at 4°C.

## Cell staining procedure:

1. Prepare single cell suspension from anticoagulated human peripheral blood according to the standard procedure. For staining, suspend the cells in FCM buffer (2% FCS/0.05% NaN<sub>3</sub>/PBS) at a concentration of up to  $1 \times 10^7$  cells/mL.
2. Add 100  $\mu$ L of cell suspension to each test tube and centrifuge it at 400 x g for 5 minutes. Aspirate the supernatant.
3. Add 10  $\mu$ L of Clear Back (human Fc receptor blocking reagent, MBL code no. MTG-001) and 30  $\mu$ L of FCM buffer to the cell pellet after tapping. Mix well and incubate for 5 minutes at room temperature.
4. Add 10  $\mu$ L of T-Select Human CD1d Tetramer-SA-PE to each test tube and mix well. Incubate the cells in the dark for 20 minutes at 4°C.
5. Add 1 mL of FCM buffer.
6. Centrifuge at 400 x g for 5 minutes. Aspirate the supernatant. Repeat the same operation for three times.
7. Suspend the pellet with 500  $\mu$ L of FCM buffer. Analyze it immediately, or suspend it with 0.5% paraformaldehyde/PBS, and store the sample in dark room at 4°C. Be sure to analyze it within 24 hours.

\* To add antibodies such as CD3, add them at the step 4.

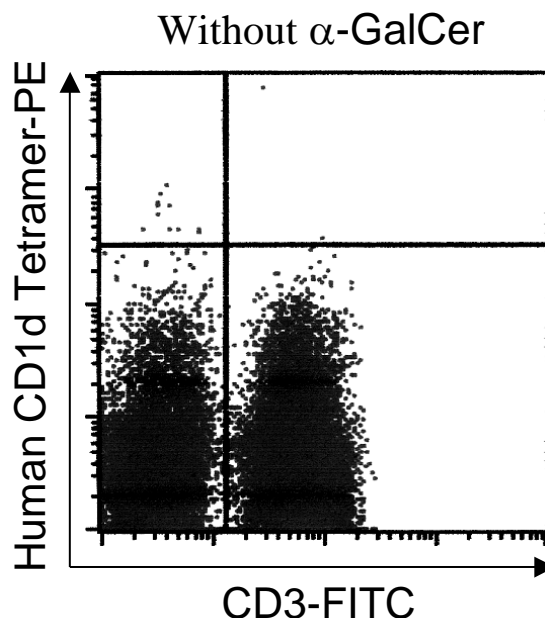
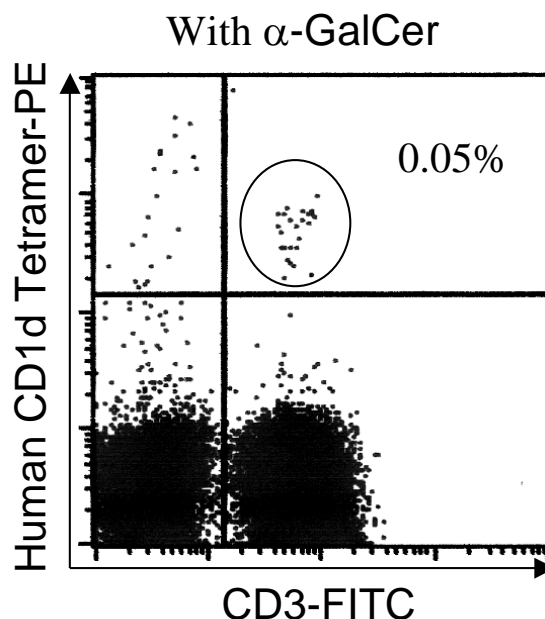
## Consideration :

- A. If the blood erythrocyte remains in the cell sample, we recommend hemolyzing them. If the blood erythrocyte still remains after being hemolyzed, we recommend staining the cells with anti-CD45 antibody simultaneously and analyzing the result with lymphocyte gating.
- B. We recommend using Clear Back (MBL code no. MTG-001) to reduce nonspecific staining of cells by endocytosis in the macrophages.
- C. For staining of *in vitro* cultured lymphocyte, we recommend staining with 7-AAD for exclusion of dead cells and non-viable cells.
- D. Paraformaldehyde fixation of cells is not needed if the cells are analyzed within a couple of hours after staining.

**Precautions:**

1. The reagent contains 0.09% of 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. Samples and all materials 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 reagents to light during storage or incubation.
5. Recommended cell survival rate of venous blood specimen is  $\geq 90\%$ .
6. To obtain appropriate result with whole blood, we recommend to keeping the test sample in a blood collection tube at room temperature and turning upside-down repeatedly just before staining. Do not use cold test blood in order to have appropriate result.
7. Do not incubate the cells for a long time with the hemolysis reagent. The long incubation results in the disruption of leukocyte.
8. Erythrocyte of abnormal test blood, such as nucleated erythrocyte, blood of abnormal hemoglobin disease, can not be hemolyzed well. In such case, the unhemolyzed erythrocyte is improperly counted as a leukocyte. This improper count results in increasing the number of leukocyte and decreasing the number of the positive rate of NKT cells.

Example of human PBMC staining using T-Select Human CD1d Tetramer-PE with (upper) or without  $\alpha$ -GalCer (lower)



**References:**

- 1) Matsuda JL, *et al. J. Exp. Med.* **192**: 741-754 (2000)
- 2) Karadimitris A, *et al. PNAS* **98**: 3294-3298 (2001)
- 3) Kita H, *et al. Gastroenterology* **123**: 1031-1043 (2002)
- 4) Sidobre S, and Kronenberg M, *J. Immunol. Methods* **268**: 107-121 (2002)
- 5) Wu D, *et al. PNAS* **102**: 1351-1356 (2005)
- 6) Li D, *et al. J. Immunol.* **182**: 1033-1040 (2009)

**Related Products:**

**CD1d Tetramers**

TS-HCD-1	Human CD1d Tetramer-PE (50 tests)
TS-HCD-2	Human CD1d Tetramer-APC (50 tests)
TS-MCD-1	Mouse CD1d Tetramer-PE (50 tests)
TS-MCD-1S	Mouse CD1d Tetramer-PE (10 tests)
TS-MCD-2	Mouse CD1d Tetramer-APC (50 tests)

**Antibody for NKT**

IM-1588	anti-TCR V $\alpha$ 24	(clone C15)
IM-1589	FITC labeled anti-TCR V $\alpha$ 24	(clone C15)
IM-2283	PE labeled anti-TCR V $\alpha$ 24	(clone C15)
IM-2027	Biotin labeled anti-TCR V $\alpha$ 24	(clone C15)
IM-1582	anti-TCR V $\beta$ 11	(clone C21)
IM-1586	FITC labeled anti-TCR V $\beta$ 11	(clone C21)
IM-2290	PE labeled anti-TCR V $\beta$ 11	(clone C21)
IM-2018	Biotin labeled anti-TCR V $\beta$ 11	(clone C21)

6604629	CD3	(clone UCHT1)
A07746	CD3-FITC	(clone UCHT1)
A07747	CD3-PE	(clone UCHT1)
A07749	CD3-PC5	(clone UCHT1)
IM-2467	CD3-APC	(clone UCHT1)

IM-0398	CD4	(clone 13B8.2)
A07750	CD4-FITC	(clone 13B8.2)
A07751	CD4-PE	(clone 13B8.2)
A07752	CD4-PC5	(clone 13B8.2)
IM-2468	CD4-APC	(clone 13B8.2)

6602139	CD8	(clone T8)
6603861	CD8-FITC	(clone T8)
A07757	CD8-PE	(clone B9.11)
6607011	CD8-PC5	(clone T8)
IM-2469	CD8-APC	(clone B9.11)

A07782	CD45-FITC	(clone J.33)
A07783	CD45-PE	(clone J.33)
A07785	CD45-PC5	(clone J.33)
IM-2473	CD45-APC	(clone J.33)

IM-0780	CD69	(clone TP1.55.3)
IM-1943	CD69-PE	(clone TP1.55.3)
IM-2656	CD69-PC5	(clone TP1.55.3)

IM-1610	CD94	(clone HP-3B1)
IM-2276	CD94-PE	(clone HP-3B1)

K0061-3	CD161	(clone HP-3G10)
K0061-4	CD161-FITC	(clone HP-3G10)

**Antibody for NK**

6604894	CD16-FITC	(clone 3G8)
A07766	CD16-PE	(clone 3G8)
A07767	CD16-PC5	(clone 3G8)
6607118	CD16-PC7	(clone 3G8)

6602705	CD56	(clone N901)
A07788	CD56-PE	(clone N901)
A07789	CD56-PC5	(clone N901)
A21692	CD56-PC7	(clone N901)
IM-2474	CD56-APC	(clone N901)

IM-1166	CD57	(clone NC1)
IM-0466	CD57-FITC	(clone NC1)

**Others**

MTG-001	Clear Back (Human FcR blocking reagent)
A07704	7-AAD Viability Dye
IM-1981	IL-4 EIA Kit
IM-1743	IFN- $\gamma$ EIA Kit
TS-8005	T-Select MHC IFN- $\gamma$ Kit
IM-1400	OptiLyse B
A11895	OptiLyse C

Please check our web site (<http://ruo.mbl.co.jp>) for up-to-date information on products and custom MHC Tetramers.