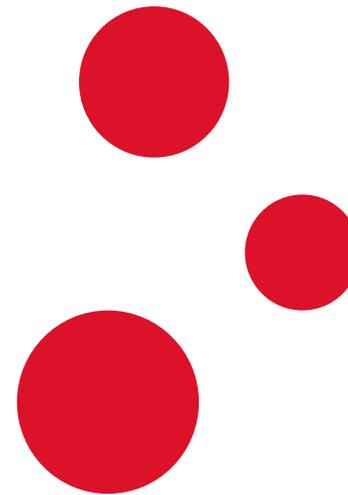


ELISpot

方法と最適化





アッセイ原理



応用

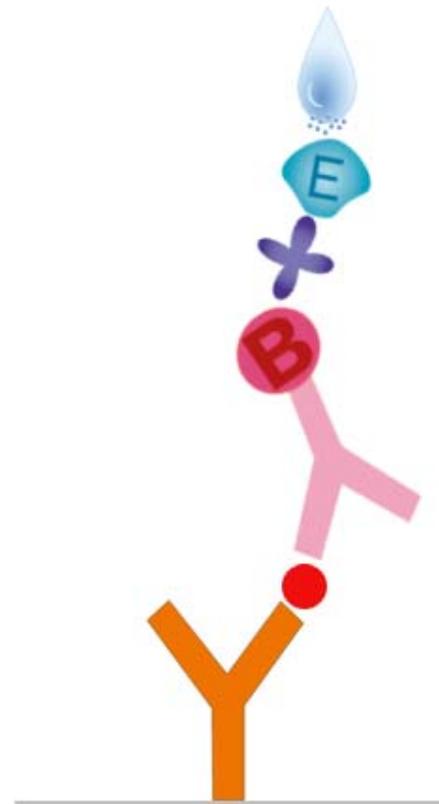


技術情報

サイトカイン ELISpot

- Capture ELISAと類似の原理
- 細胞培養と検出が一つのアッセイで実現
- 単一細胞レベルから検出が可能
- 抗原特異的T細胞の定量化

アッセイ原理



基質の沈殿

ストレプトアビジン-酵素

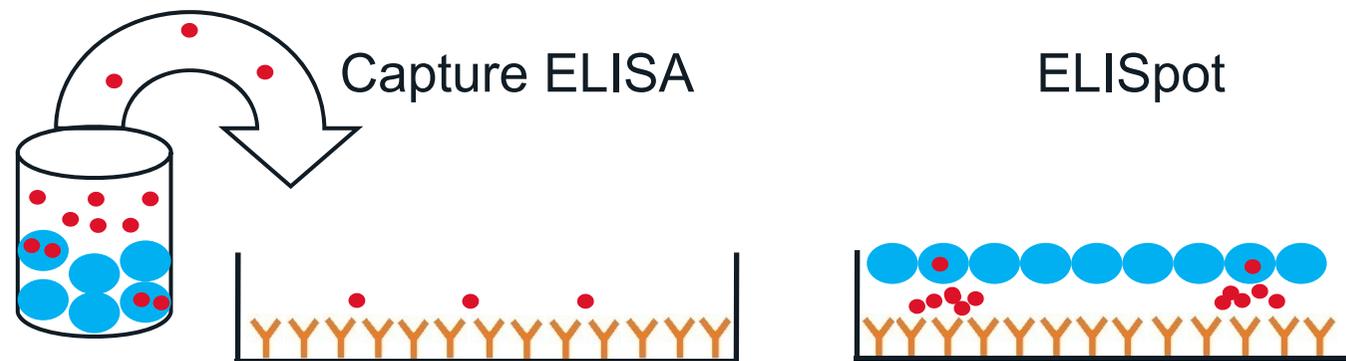
検出抗体

アナライト

捕捉抗体

ELISpot と ELISA

希釈効果



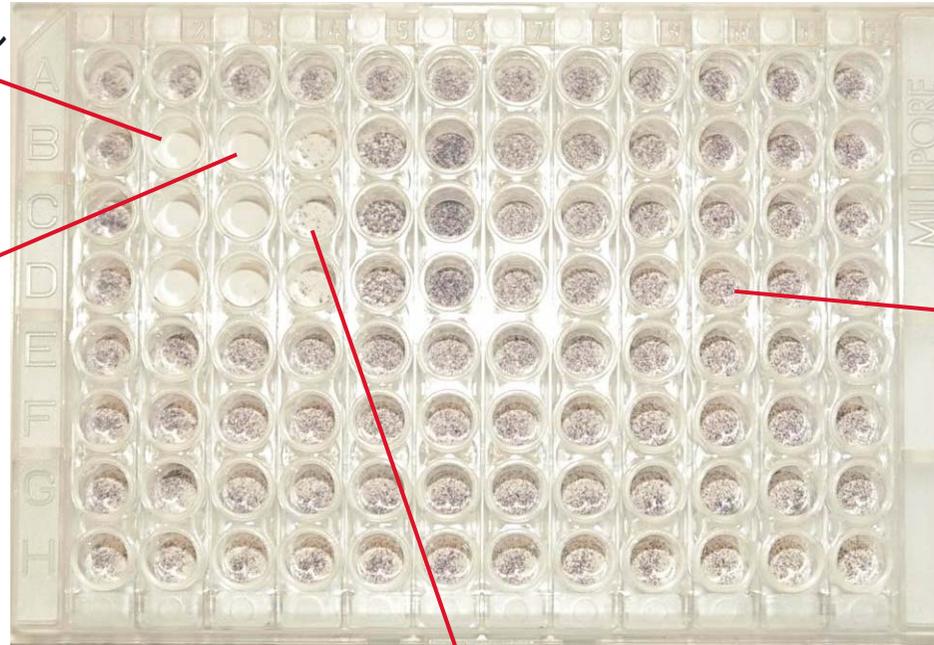
- ELISA – サイトカインは希釈効果を受ける
- ELISpot – 希釈効果なし

結果

培地のみ
ネガティブコントロール



刺激なし
250,000 cells/well



CD3刺激
ポジティブコント
ロール
50,000 cells/well



IFN- γ
PPD刺激
250,000 cells/well

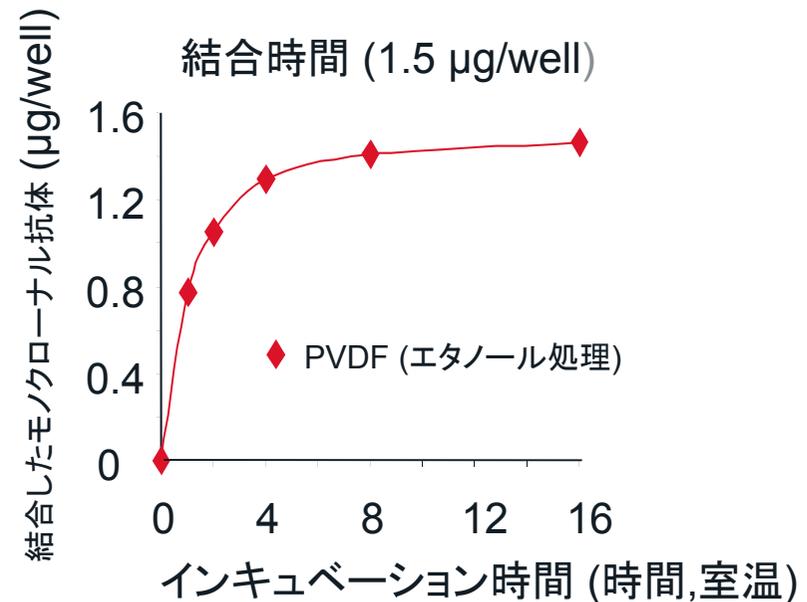
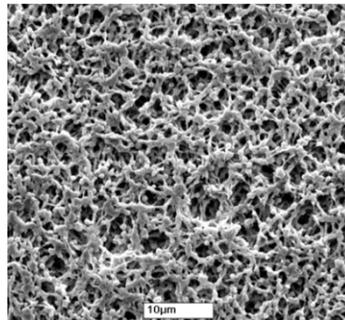
ELISpot アッセイの手順

- PVDF膜をエタノールで処理
- 捕捉抗体を4°C, オーバーナイトでコート
- 細胞を加える (刺激あり/なし)
- 37°Cで12-48時間インキュベートし、細胞を活性化、分泌されたサイトカインが捕捉抗体に結合。細胞を除去。
- ビオチン化検出抗体を添加 (2時間)
- ストレプトアビジン-酵素を添加 (1時間)
- 適した基質を添加すると、目的物質を分泌した細胞の位置にスポットが形成される(10-60分)
- 刺激無しのコントロールと比較し、スポットの数で細胞の応答を確認する。

抗体の結合容量

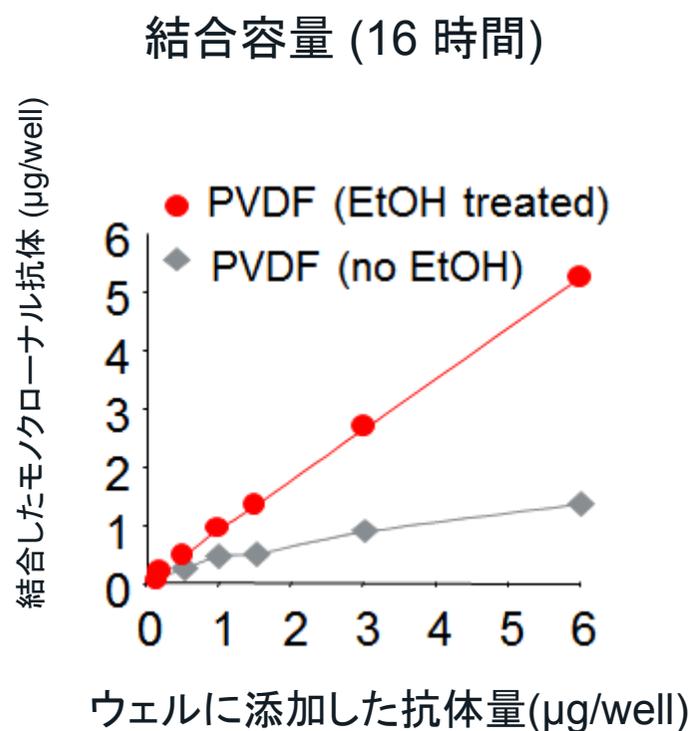
- PVDF膜 結合能 >30 μg 抗体/ウェル
- 捕捉抗体の結合に制限なし

PVDF膜の構造
(Millipore)

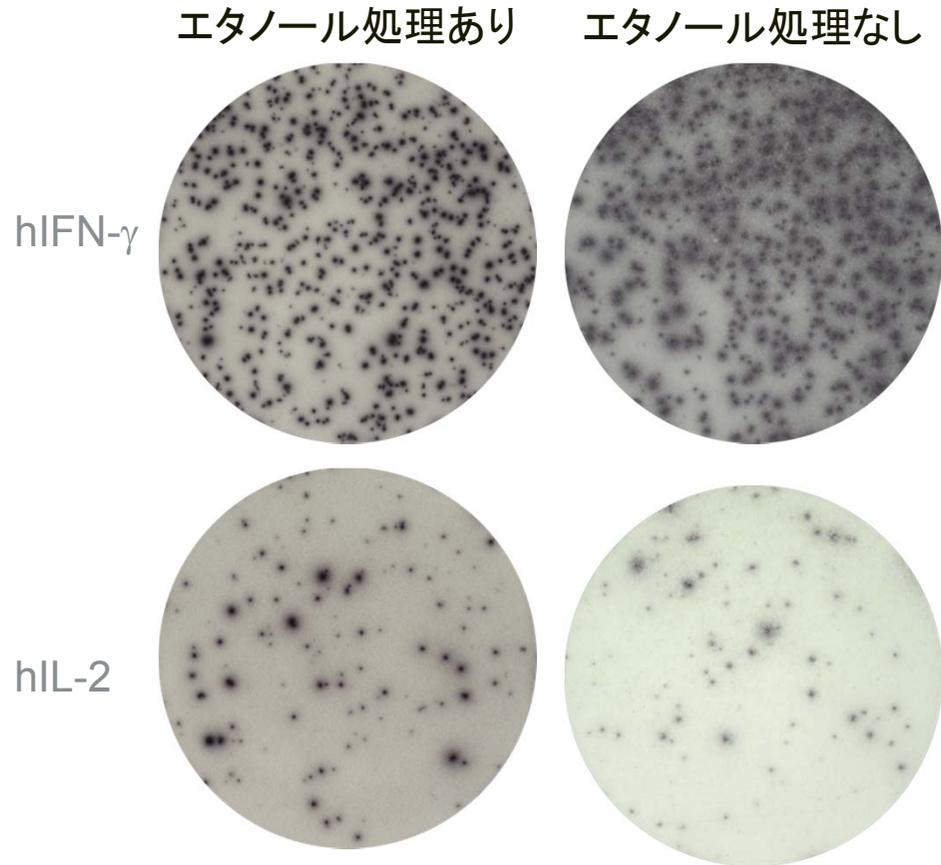


エタノールによる前処理

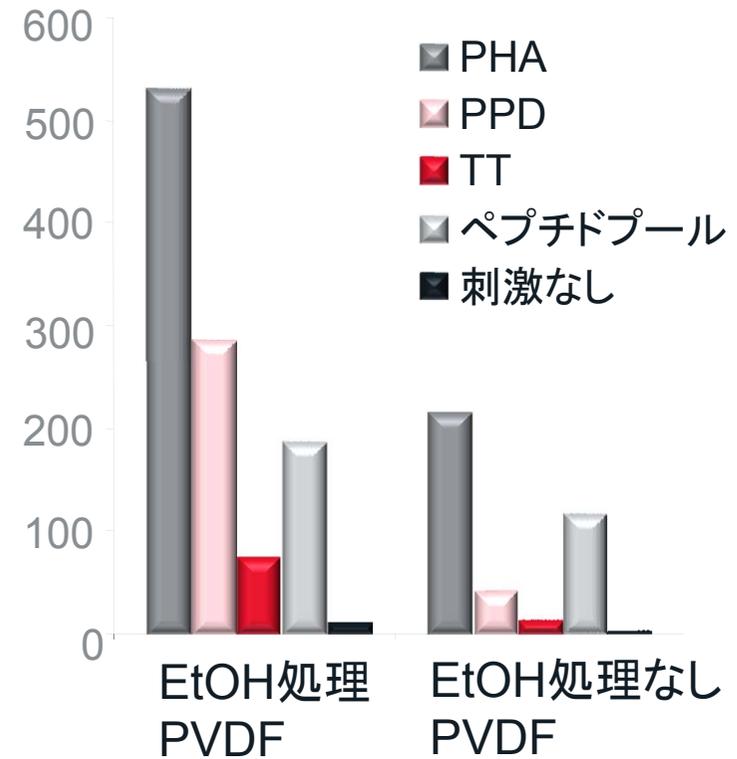
- 結合容量の増加
- スポットの識別が容易
- スポットの数増加



PVDF プレート EtOH処理あり/なし



125,000 PBMC をCEFによりオーバナイトで刺激



PBMCによるhIFN- γ の産生

PVDFプレートのエタノール処理

MAIPSWU (ELIIP)

50 μ l の70% エタノールで2分間処理

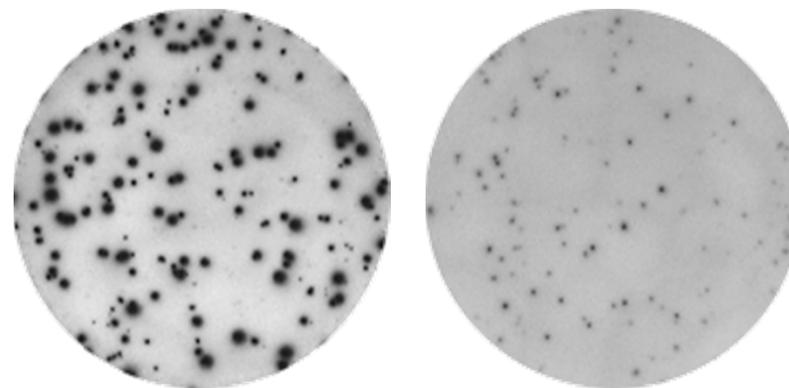
MSIP (Multiscreen HTS)

15 μ l の 35% エタノールで 最大1分間処理

- エタノールの過剰処理は致命的!

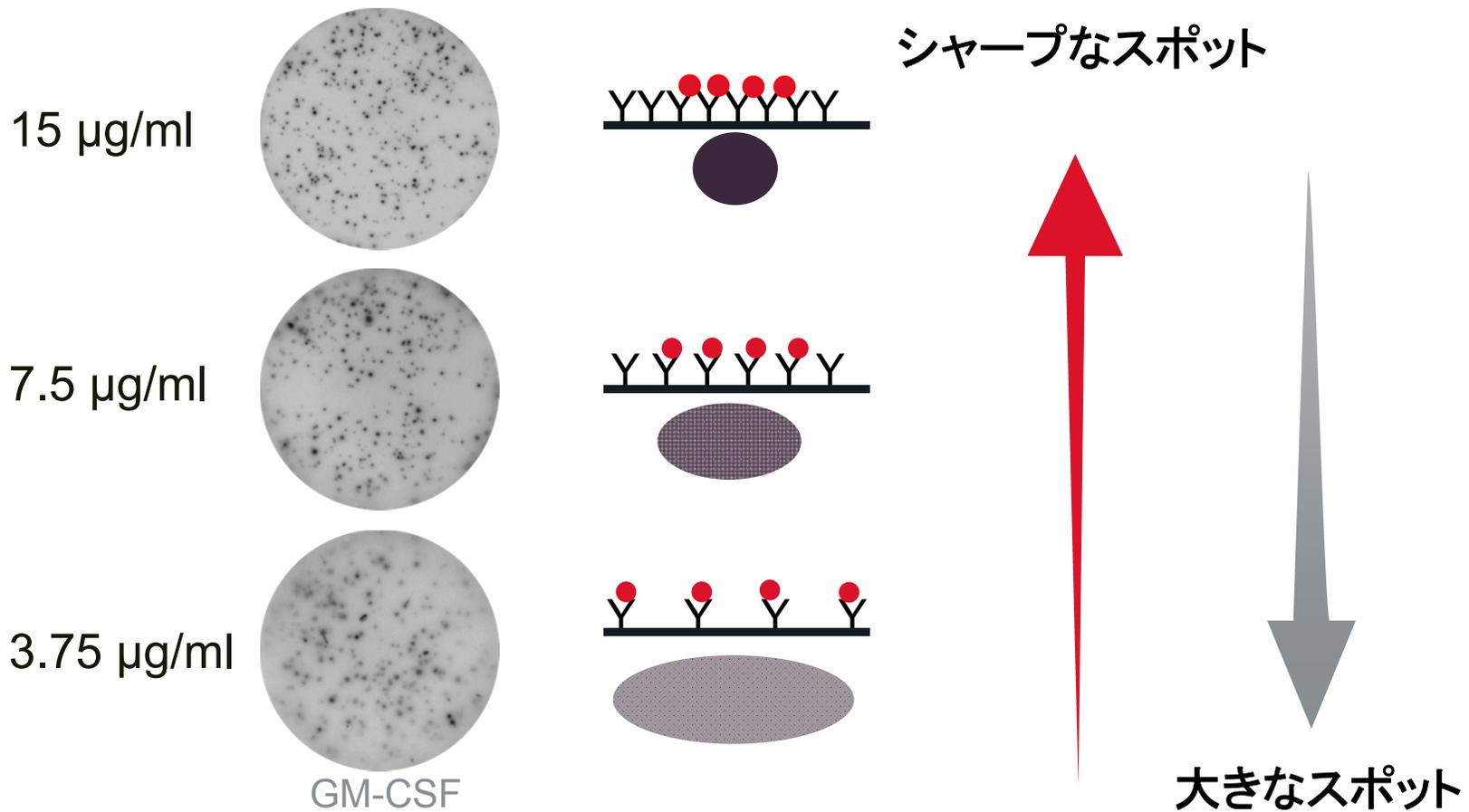
適切なエタノール処理

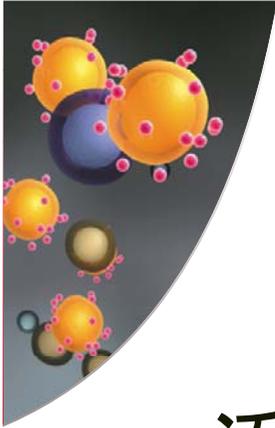
過剰なエタノール処理



CEF ペプチド刺激によるhIFN- γ の産生

捕捉モノクローナル抗体の濃度

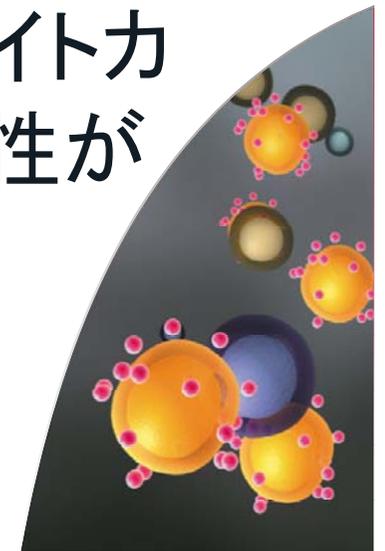




細胞

- 添加する細胞数は、刺激とサイトカインに依存。
- 最大 500,000 細胞 / ウェル
- PBMCと同様に単離された細胞集団をテスト
- 細胞は刺激と同時に、または刺激された状態でELIspotプレートでプレインキュベート可能。

- 低バックグラウンドの培地(FBS含有またはFBSフリー)を用いることが必須。
- ヒト血清は、異好性抗体の存在やサイトカインの研究に問題を引き起こす可能性がある。



Controls in ELISpot

Human IFN- γ



PHA
50,000 cells



CEF Peptide pool
(Mabtech)
250,000 cells

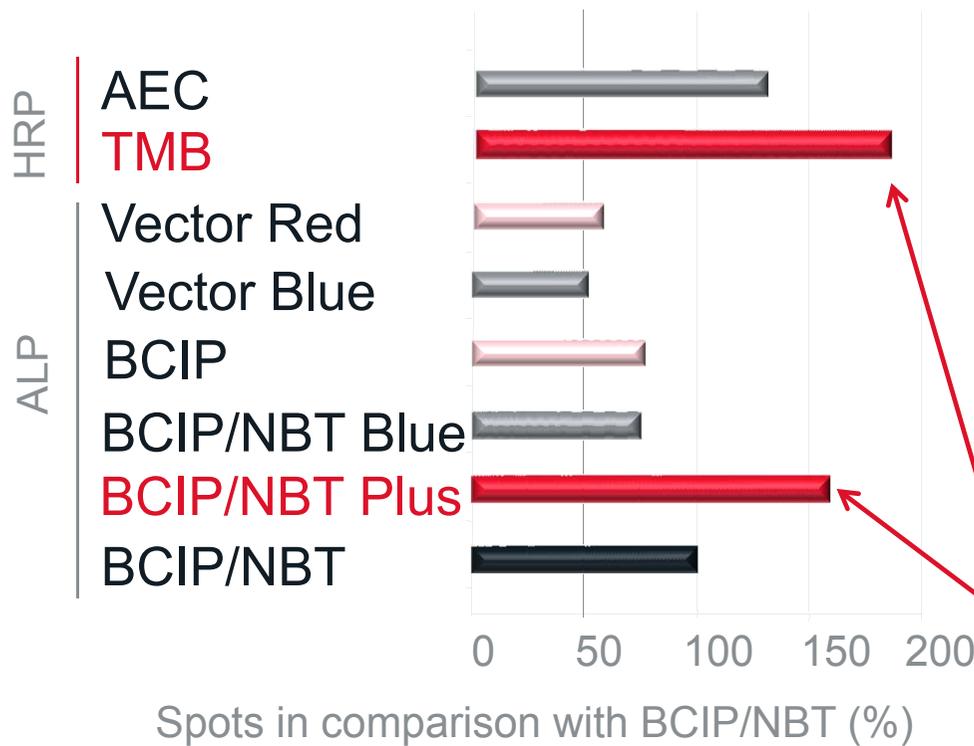


anti-CD3 mAb CD3-2
(Mabtech)
50,000 cells



No stimuli
250,000 cells

ELISpot 基質



- 沈殿
- 基質によって感度が異なる
- 製造元によっても異なる
- Mabtechで取り扱っています!

ELISpot の応用

- 特異的な免疫応答の研究に
 - 感染
 - がん
 - アレルギー
 - 自己免疫疾患
 - 移植

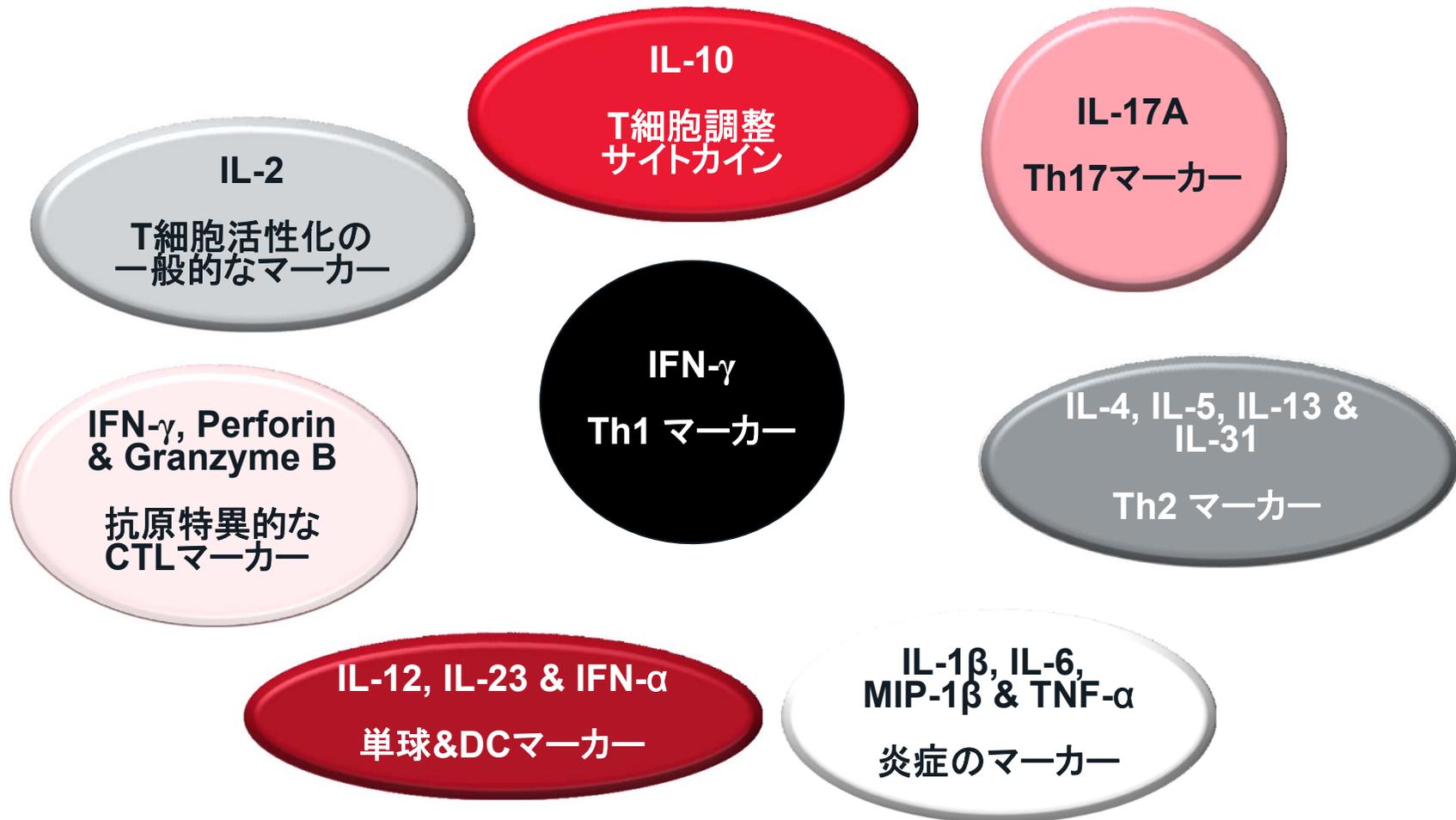


ELISpot の応用



- 新しいワクチンの評価と戦略に
 - HIV
 - マラリア
 - がん
- 免疫療法におけるT細胞応答のモニターに

サイトカインシステムの例



ELISpot キット フォーマット

ELISpot kit



構成成分: (プレート4枚分)

- 抗体ペア
- 酵素コンジュゲート

ELISpot^{PLUS} kit



構成成分:

- PVDF プレート 4枚
- 抗体ペア
- 酵素コンジュゲート
- 基質

※多くのシステムで、抗体がプレコートされたものがございます。

ELISpot^{PRO} kit



構成成分:

- プレコート PVDF プレート(2枚または10枚)
- 酵素コンジュゲート抗体
- 基質
- ポジティブコントロール

ELISpot ストリッププレートキット



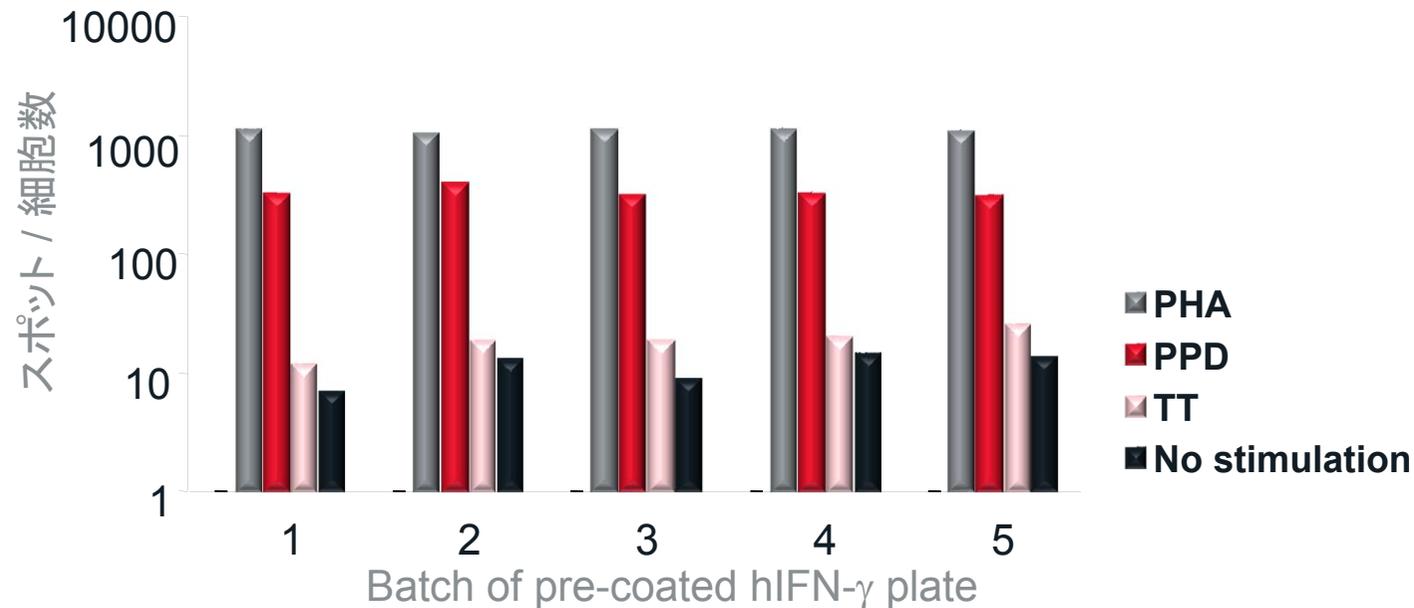
- ELISpot^{PRO}と同じパフォーマンス
- 少ないサンプル数に適合。

構成品:

- プレコート PVDF プレート(2枚または4枚)
- ビオチン化検出抗体
- 酵素コンジュゲート
- 基質
- ポジティブコントロール

プレコートプレート

- バッチ間の差がほとんどない



PBMC (1ドナーから単離); PHA, PPD, TT刺激 と刺激なし



Thank you

The Mabtech team
for more information contact
mabtech@mabtech.com