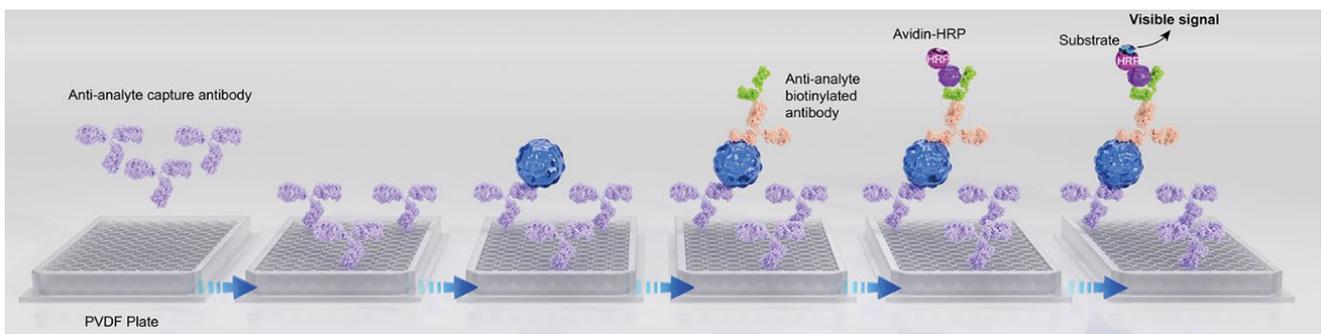


## 【今更聞けない、、ELISpot ってなにができるの??】

フローサイトメトリー実験に関する、今更聞けない質問にお答えする「今更聞けない、、」シリーズですが、今回は ELISpot アッセイというアプリケーションをご紹介します。

ELISpot (Enzyme-Linked Immunospot) アッセイは、サイトカイン等液性因子のキャプチャー抗体を固相化したメンブレン上で細胞を培養し、その細胞が分泌するサイトカインをその直下のメンブレンでキャッチし、呈色させることで、サイトカイン産生細胞を検出する実験手法です。シングルセルレベルでサイトカイン分泌細胞を検出できるため、抗原や薬剤の投与による免疫応答を簡便にモニタリングできます。

実験の原理としては、ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) と同様抗原をキャプチャー抗体とデテクション抗体で検出します。ELISA は培養上清などの溶液サンプルに含まれるサイトカインの定量を目的とする一方、ELISpot アッセイでは、細胞から分泌されたサイトカインをスポットとして同定という違いがあります。このスポットの数やサイズ、発色の強さを測定することで、サンプルの刺激応答性やサイトカイン分泌細胞の数を判別できます。



下記に LPS 刺激を加えていないヒト PBMC サンプルと、LPS 刺激を加えた細胞の IL-6 を分泌する細胞のスポット量を示します。

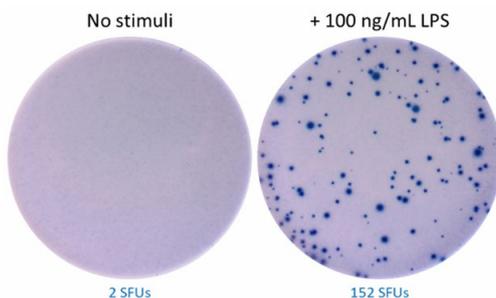


図 1: ELISpot MAX™ Deluxe Set Human IL-6 (Cat # 430524) を使用

LPS 刺激なしと 100 ng/mL LPS 刺激条件によるヒト PBMC の IL-6 分泌スポット数。

ヒト IL-6 を捕捉するキャプチャー抗体を、PVDF (Polyvinylidene fluoride) 膜でコートされたプレートに固相化します。

ヒト PBMC サンプルに対し 100 ng/mL LPS の刺激を加えた条件 (右図) と加えない条件 (左図) を作製し、それぞれの条件で  $2.5 \times 10^3$  [cells/well] ずつプレートに播種して 20 時間の培養を行いました。培養の間、分泌されたヒト IL-6 はキャプチャー抗体に捕捉されて、局所的な複合体を形成します。捕捉された複合体をヒト IL-6 デテクション抗体と反応させ、デテクション抗体に HRP 酵素を付加し、TMB 基質と反応させた際の発色を測定します。LPS 刺激を加えたものではヒト IL-6 を分泌する細胞の SFU (Spot Forming Unit) のカウントの増加が見られました (右図)。

シングルセルレベルでサイトカインを検出できる実験系として、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン染色もあります。しかし、細胞内染色試験では固定及び透過処理後のサンプルを解析するため、細胞外への分泌の有無に関して議論することはできません。

ELISpot アッセイでは、生細胞のサイトカイン分泌をプレート上で直接捕捉しているため、細胞が活性化し、サイトカイン産生していることを目視できるという利点があります。

また、細胞表面から分泌されたサイトカインはすぐにキャプチャー抗体に捕捉されるので、プロテアーゼ活性の影響を受けることもほぼありません。サイトカインを分泌する細胞を同定する手法として、是非ともご活用ください。

BioLegend 社では、ELISpot アッセイに必要な試薬を含む ELISpot MAX™ Deluxe Set の販売を開始しました。



ELISpot MAX™ Deluxe Set
<b>構成品</b>
キャプチャー抗体
デテクション抗体
リコンビナントプロテインスタンダード
Avidin-HRP
アッセイバッファー / Assay Diluent
コーティングバッファー
サブストレート / TMB Solution
※PVDF ELISpot プレートは、別途購入が必要です

ELISpot アッセイの詳細は[こちら](#)

ELISpot MAX™ Deluxe Set の製品リストは[こちら](#)

「今更聞けない、、、」シリーズ 記事まとめページは[こちら](#)