

CBA Human Th1/Th2 測定上のTips & Data

このテクニカルインフォメーションではCytometric Bead Array(CBA)Human Th1/Th2による測定を行う際の留意点と、性能確認データをご紹介します。「CBA Kit Manual Human Th1/Th2 Cytokine CBA」および「BD CBA ソフトウェア ユーザーズガイド」と合わせてご覧ください。

Assay Tips

良く混和してください。

混和が不十分な場合、ビーズが凝集することにより、シングルレット ビーズの読み取りが少なくなる場合があります。ビーズは混合Captureビーズを作成する前に、必ずよく混和してください。その後、混合Captureビーズを各試験管に分注する前、およびサイトメーターで測定する前にも混和してください。サイトメーターに取り付ける前に、各試験管を3～5秒混和することにより、FL3チャンネルのビーズ集団の分離が良くなります。

スタンダードの安定時間

Human Th1/Th2 Cytokine Standardsはキットの有効期限まで安定ですが、調製後は2～8 で保存し、12時間以内にご使用ください。各実験ごとに新しくスタンダードを溶解してください。

CellQuest ドキュメント

機器調整およびデータ取り込み用のCellQuest ドキュメントは、FACStation HD内のBD Application内のBD CBA Folder内に含まれています(図1)。機器調整にはCBA Instrument set up Templateを、またデータ取り込みにはIsotype Kit Acquire Templateを使用してください。名称は"Isotype Kit"となっていますが、定量分析においても各パラメータの情報を確認しながら取り込むことができます。取り込むビーズ数および保存するパラメータについては、ご使用になるCBA KitのKit Manualを参照してください。



図1. BD CBA Folder Excel 98 ウィンドウ

BD Biosciences

Clontech
Discovery Labware
Immunocytometry Systems
Pharmingen



Acquisition Templateのビーズ用のRegion位置

Acquisition TemplateのビーズのためのRegion位置は、Kit Manualに従った機器調整をした場合において一般的にビーズイベントが現れる位置に表示されていますが、各フローサイトメーターのレーザー出力や検出器の状態により若干の移動が必要な場合があります。

データファイル名

CBAのデータファイルには一文字以上のアルファベットが含まれるようにしてください(例、20010401a.001)。Microsoft ExcelのマクロプログラムであるBD CBA ソフトウェアで解析する際、ファイル名にアルファベットが含まれていないと、数値情報として処理されてしまうからです。

デブリ、ビーズ以外のイベントについて

データ取り込み時に、FSC vs SSCプロットでデブリが検出された場合、FSC Threshold値を上げるかwash bufferによる洗浄操作を繰り返してみてください。図2のように見られる場合でも、デブリと比較してビーズ数は十分測定されており、ソフトウェアによる解析は問題ありません。

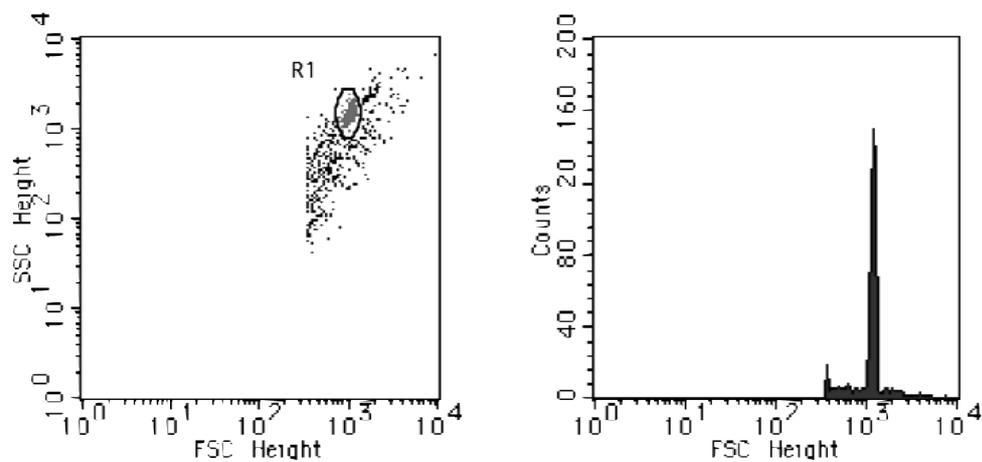


図2. FSC vs SSC plotとシングルビーズ集団へのゲーティング (両プロットとも全イベントを表示)

ビーズ集団が重なって見える場合

適切に調整されていれば、図3のようになります。Cytometer Setup Beadsを使用した機器調整手順を実行してください。特に、Compensation調整がマニュアルに記載された設定値に合うように調整されているかどうか確認してみてください。

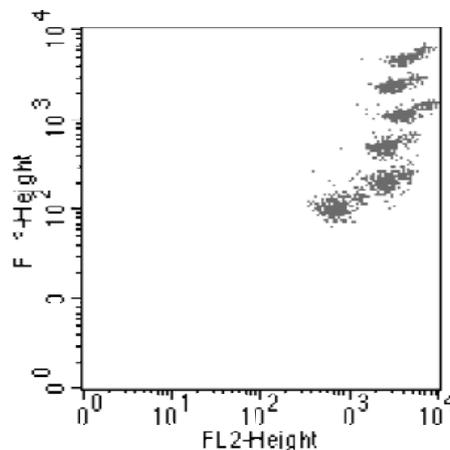


図3. 適切に機器調整されている場合のTop StandardのFL2 vs FL3 プロットにおけるビーズ検出位置

Human Th1/Th2 Cytokine CBA KitのINF- スタンダードカーブは他のサイトカインのカーブより蛍光強度が低くなります。

Human Th1/Th2 Cytokine CBA KitのINF- スタンダードカーブは他のサイトカインのカーブより蛍光強度が低く、他のサイトカインの5000 pg/mL のMFIが $10^3 \sim 10^4$ であるのに対し、INF- のMFIは $10^2 \sim 10^3$ になります(図3参照)。このことにより、測定感度はINF- は10.9 pg/mLで、他のサイトカインは1.0 ~ 4.0 pg/mLになります(表1. 測定感度参照)。相対的な蛍光強度は低いですが、測定には問題ありません。

IND-

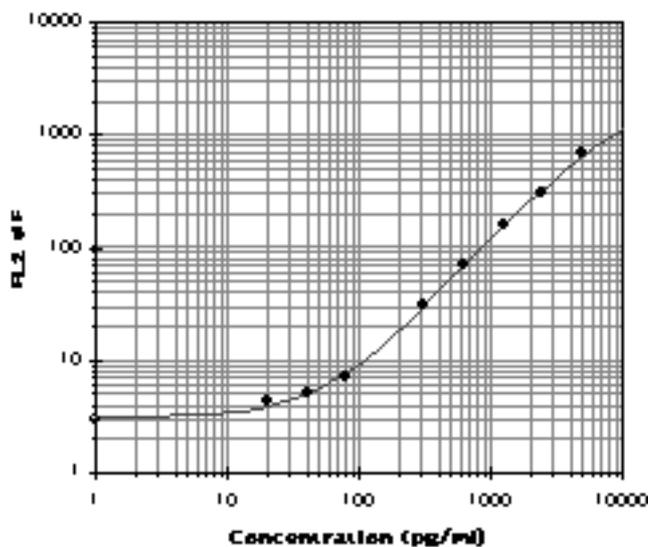


図4. 各濃度を5重測定した場合のINF- スタンダードカーブ

Cytometric Bead assayとELISA

CBAによる測定値はELISAによる測定値と直接比較することはできませんが、両者による値を比較した場合相関性はあります。ELISAと比較した利点として、測定範囲が広いことが挙げられます。感度はほぼ同等です。

性能実験データ

測定感度

測定感度は、陰性コントロールを20回繰り返し測定した時の蛍光Median +2SDを、各サイトカイン濃度に変換した値として定義しています。

表1. 測定感度

Cytokine	Median Fluorescence	Standard Deviation	Assay Sensitivity (pg/mL)
IL-2	2.3	0.2	2.1
IL-4	2.7	0.3	3.1
IL-5	2.4	0.2	1.1
IL-10	2.4	0.3	3.9
TNF-	2.4	0.3	3.3
INF-	2.4	0.2	10.9

再現性

3種類の濃度のリコンビナント human IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 、INF- γ をそれぞれ10回繰り返して測定しました。

表2. 再現性

Cytokine	IL-2			IL-4		
Actual Mean Conc(pg/mL)	26	174	782	50	354	1664
SD	1	4	22	2	9	63
% CV	4	3	3	3	3	4

Cytokine	IL-5			IL-10		
Actual Mean Conc(pg/mL)	100	718	2783	73	463	1817
SD	5	27	102	3	13	77
% CV	5	4	4	4	3	4

Cytokine	TNF- α			INF- γ		
Actual Mean Conc(pg/mL)	79	514	2088	42	375	1544
SD	3	14	93	4	14	67
% CV	3	3	4	10	4	4



輸入元

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052
ホームページアドレス: www.bdj.co.jp

製造元

BD Biosciences

お問い合わせは下記までご連絡ください。

製造関連・資料請求(お客様情報センター):

☎ 0120-8555-90

機器・メンテナンス(Life Science Support):

☎ 0120-7752-77

アプリケーション(技術研修室ホットライン):

03-5805-9960