

ヒト末梢血リンパ球のCD抗原発現解析 CyFlow™抗体による3カラー解析

ヒト末梢血に存在する白血球(CD45)は、主としてリンパ球、単球、顆粒球(好中球、好酸球、好塩基球)の5種に分類され、免疫機能で重要な役割を果たしています。リンパ球はさらにCD抗原発現の違いからT細胞(CD3)、B細胞(CD19あるいはCD20)、ヘルパーT細胞(CD4)、細胞傷害性T細胞(CD8)、ならびにナチュラルキラー(NK)細胞(CD56,CD16など)に分類されます。本アプリケーションレポートでは、フローサイトメーター RF-500とCyFlow抗体を用いたヒト末梢血リンパ球CD抗原発現の3カラー解析例をご紹介します。

結果

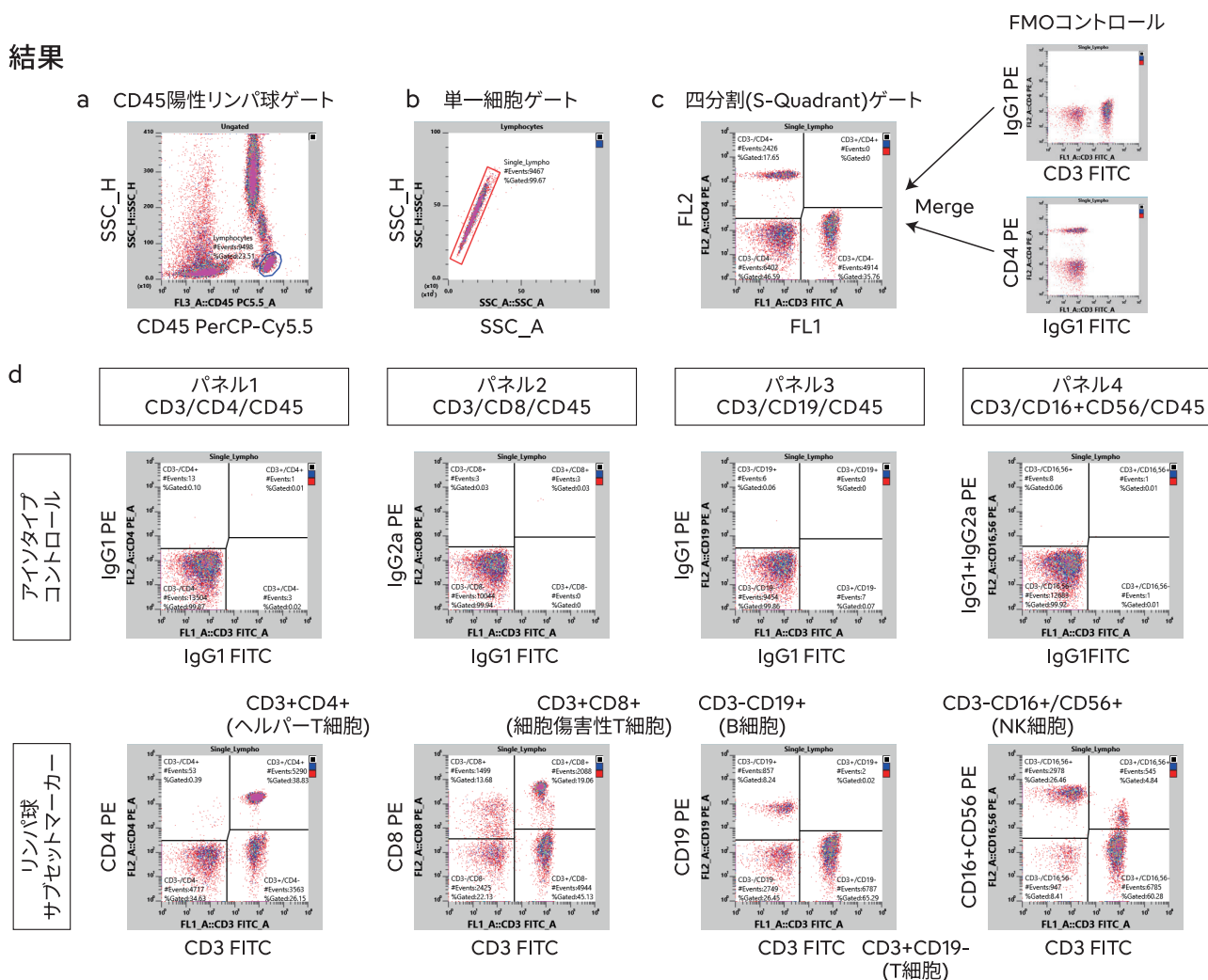


図1. RF-500とCyFlow抗体を用いたヒト末梢血リンパ球のCD抗原発現解析

a.側方散乱光(Side scatter, SSC)とCD45 PerCP-Cy5.5で展開しCD45陽性リンパ球をゲーティング

b.SSC_AとSSC_Hで展開し単一細胞をゲーティング

c.FMO(Fluorescence Minus One)コントロールのデータを結合、FL1とFL2で展開し四分割ゲートを設定

図はパネル1(CD3/CD4/CD45)の例、CD3 FITC/IgG1 PE/CD45 PerCP-Cy5.5とIgG1 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP-Cy5.5のデータを結合しFL1とFL2で展開したプロットに四分割(S-Quadrant)ゲートを設定

d.パネルごとに三重染色した結果をFL1とFL2で展開

サンプル調製・測定

- 各パネルで7本のチューブを用意し全血を50 μ Lずつ分注する。
なお測定条件作成後、CD抗原発現解析には各パネルでTube 5(アイソタイプコントロール抗体カクテル)とTube 4(マーカー抗体カクテル)の2本のみが必要。
- 下表の通り推奨量の各抗体を加え、eBioscience Flow Cytometry Staining Bufferで総量100 μ Lに調製する。Tube 1, 2, 3は蛍光補正に使用する単染色。Tube 6, 7はFMOコントロール。

	パネル1 CD3/CD4/CD45	パネル2 CD3/CD8/CD45	パネル3 CD3/CD19/CD45	パネル4 CD3/CD16+CD56/CD45
Tube 1.	CD3 FITC	CD3 FITC	CD3 FITC	CD3 FITC
Tube 2.	CD4 PE	CD8 PE	CD19 PE	CD16 PE + CD56 PE
Tube 3.	CD45 PerCP-Cy5.5	CD45 PerCP-Cy5.5	CD45 PerCP-Cy5.5	CD45 PerCP-Cy5.5
Tube 4.	CD3 FITC CD4 PE CD45 PerCP-Cy5.5	CD3 FITC CD8 PE CD45 PerCP-Cy5.5	CD3 FITC CD19 PE CD45 PerCP-Cy5.5	CD3 FITC CD16 PE + CD56 PE CD45 PerCP-Cy5.5
Tube 5.	IgG1 FITC IgG1 PE CD45 PerCP-Cy5.5	IgG1 FITC IgG2a PE CD45 PerCP-Cy5.5	IgG1 FITC IgG1 PE CD45 PerCP-Cy5.5	IgG1FITC IgG1 PE + IgG2a PE CD45 PerCP-Cy5.5
Tube 6.	CD3 FITC IgG1 PE CD45 PerCP-Cy5.5	CD3 FITC IgG2a PE CD45 PerCP-Cy5.5	CD3 FITC IgG1 PE CD45 PerCP-Cy5.5	IgG1FITC IgG1 PE + IgG2a PE CD45 PerCP-Cy5.5
Tube 7.	IgG1 FITC CD4 PE CD45 PerCP-Cy5.5	IgG1 FITC CD8 PE CD45 PerCP-Cy5.5	IgG1 FITC CD19 PE CD45 PerCP-Cy5.5	IgG1FITC CD16 PE + CD56 PE CD45 PerCP-Cy5.5

- 遮光条件下、4°Cで20分間静置する。
- 1 × EXCELLYSE Easyを加え、室温で10分間静置し溶血する。
- eBioscience Flow Cytometry Staining Bufferで洗浄・再懸濁し、CellTrics 30 μ mフィルターでろ過後、フローサイトメーター RF-500で測定する。

試薬・機器

- CyFlow™ CD3 FITC (RUO), Anti-Hu; clone UCHT1 (Sysmex, cat# AB614014)
- CyFlow™ CD4 PE (RUO), Anti-Hu; clone MEM-241 (Sysmex, cat# BQ490560)
- CyFlow™ CD8 PE (RUO), Anti-Hu; clone MEM-31 (Sysmex, cat# CQ514449)
- CyFlow™ CD19 PE (RUO), Anti-Hu; clone LT19 (Sysmex, cat# AU096347)
- CyFlow™ CD16 PE (RUO), Anti-Hu; clone 3G8 (Sysmex, cat# AE330059)
- CyFlow™ CD56 PE (RUO), Anti-Hu; clone LT (Sysmex, cat# AB614014)
- CyFlow™ CD45 PerCP-Cy5.5 (RUO), Anti-Hu; clone MEM-28 (Sysmex, cat# AT214143)
- CyFlow™ IgG1 FITC (RUO), Mouse Isotype Control; clone MOPC-21 (Sysmex, cat# CD051682)
- CyFlow™ IgG1 PE (RUO), Mouse Isotype Control; clone MOPC-21 (Sysmex, cat# BV655324)
- CyFlow™ IgG2a PE (RUO), Mouse Isotype Control; clone MOPC-173 (Sysmex, cat# BY503796)
- eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific, cat# 00-4222-57)
- EXCELLYSE Easy (Exbio, cat# ED7780)
- CellTrics 30 μ m (Sysmex, cat# BP486257)
- フローサイトメーター RF-500 (Sysmex, cat# BF209548)

※ 本製品は研究用であり、診断には使用できません。

お問合せ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業推進部

神戸 神戸市西区室谷 1-3-2 〒651-2241

東京 東京都品川区大崎 1-2-2 〒141-0032

sysmex-fcm.jp