

MA900を用いた12色免疫パネル解析と4wayソーティング

MA900は最大4レーザーを搭載可能、12色の蛍光検出と4wayソートに対応したソニーのハイエンドセルソーターである。機器セットアップの自動化、直感的に使用できるソフトウェア、各種ウィザードによるガイド機能など、ユーザーの負担を軽減する機能がいくつも盛り込まれており、気軽に多色解析と高精度ソーティングを実施可能な装置となっている。

このアプリケーションノートでは、3レーザー搭載のMA900を用いて12色パネルでのイムノフェノタイピング解析を行い、更にターゲット細胞の4wayソーティングを行った事例を紹介する。

Channel	Laser	Fruorochrome	Antibody
FL1 (525/50)	488nm	Alexa Fluor® 488	Anti-human CD3 Antibody
FL2 (585/30)		PE	Anti-human TCR γ / δ Antibody
FL3 (617/30)		PE-Dazzle	Anti-human CD16 Antibody
FL4 (685/40)		PerCP-Cy5.5	Anti-human CD4 Antibody
FL5 (785/60)		PE-Cy7	Anti-human CD56 Antibody
FL6 (450/50)	405nm	BV421	Anti-human CD19 Antibody
FL7 (525/50)		BV510	Anti-human CD27 Antibody
FL8 (585/30)		BV570	Anti-human CD8a Antibody
FL9 (617/30)		BV605	Anti-human CD20 Antibody
FL10 (665/30)	638nm	APC	Anti-human CD45RA Antibody
FL11 (720/60)		Alexa Fluor® 700	Anti-human HLA-DR Antibody
FL12 (785/60)		APC-Cy7	Anti-human CD14 Antibody

Table 1. MA900 instrument configuration

方法

全血をRBC Lysis Bufferにて溶血処理した後、Alexa Fluor® 488-CD3, PerCP-Cy™5.5-CD4, Brilliant Violet 570™-CD8, APC-Cy™7-CD14, PE/Dazzle™-CD16, Brilliant Violet 421™-CD19, Brilliant Violet 605™-CD20, Brilliant Violet 510™-CD27, APC-CD45 RA, PE-Cy7-CD56, Alexa Fluor® 700-HLA-DR, PE-TCR γ / δ (全て Sony Biotechnology 社) (Table 1) を適量加え、氷上で20分間インキュベートした。その後、染色バッファーで2回洗浄した後にPBSで細胞を再懸濁し、MA900での分析に使用するまで氷上に保管した。

MA900セルソーターは70 μ m/100 μ m/130 μ mの3種のソーティングチップが選択できる。今回は100 μ mチップを選択し、自動キャリブレーション機能を使用して装置セットアップを行った。各蛍光色素に対するシングルステインコントロールを調製し、コンペンセーションウィザード機能に従ってスピルオーバーマトリックスを作成し、蛍光補正を行った。マルチステインサンプルを測定後、下記に示すゲーティング戦略で各サブpopulationを分析し、ソートする細胞集団を特定した。

Subset	Pre Sort: % Parent	Post Sort: % Parent
CD3+ T cells	62.2%	99.49%
CD19/20+ B cells	31.59%	99.65%
CD16/56+ NK cells	57.33%	99.21%
CD14+ monocytes	3.1%	97.13%

Table 2. Sort Performance

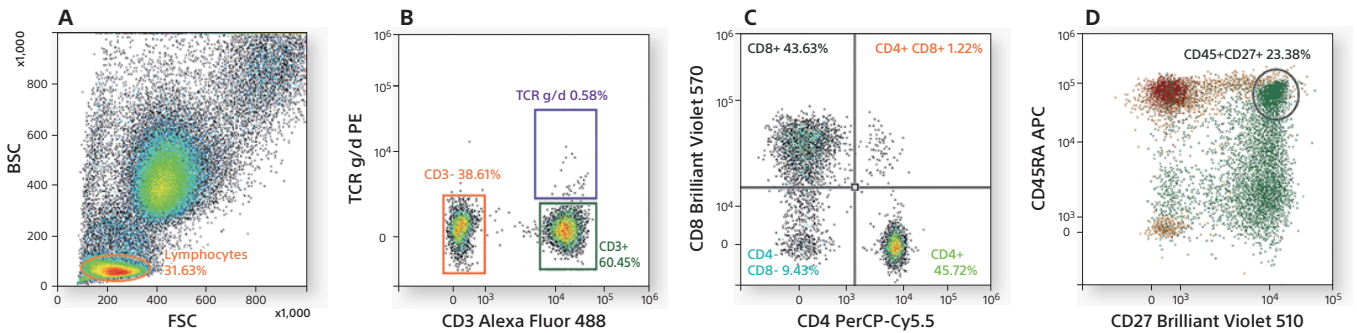
結果

T細胞サブセットの同定 (A ~ D) : A. 散乱光プロットからリンパ球分画をゲートした。B. A のリンパ球分画から CD3+ 細胞群を見出した。C. B で見出された CD3+ 細胞群から、CD4+/- および CD8+/- をそれぞれ分画するゲートを作成した。D.C の CD4+ 細胞群における CD45RA+/-、CD27+/- を解析することにより CD4+ T 細胞を見出してゲートした。

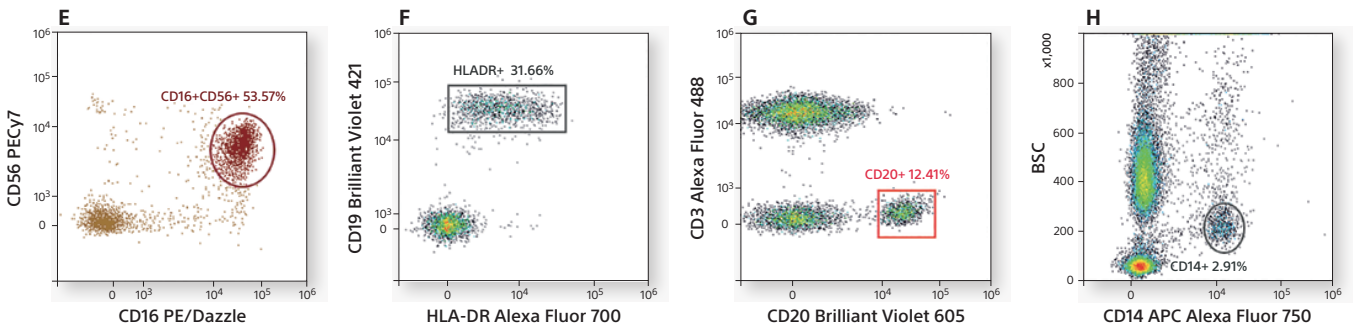
NK細胞・B細胞・単球の同定 (E ~ H) : E. B における CD3- 細胞群から、CD19+ CD56+ の NK 細胞を見出しゲートした。F. CD19+ HLA-DR+ の B 細胞を見出してゲートした。G. CD20+CD3- の B 細胞を見出してゲートした。H. 散乱光プロットから CD14+ の単球を見出してゲートした。

4wayソーティング再解析の結果 (I ~ L) : MA900 セルソーターの 4way ソート機能を用いて、下記の各細胞群を分離し、各細胞サンプルを再解析した結果をそれぞれ示す。I. プロット B より CD3+ 細胞をソートした。J. プロット E より CD16+CD56+ NK 細胞をソートした。K. プロット F より CD19+HLA-DR+ B 細胞をソートした。L. プロット H より CD14+ 単球をソートした。ソート結果は Table 2 にまとめた。

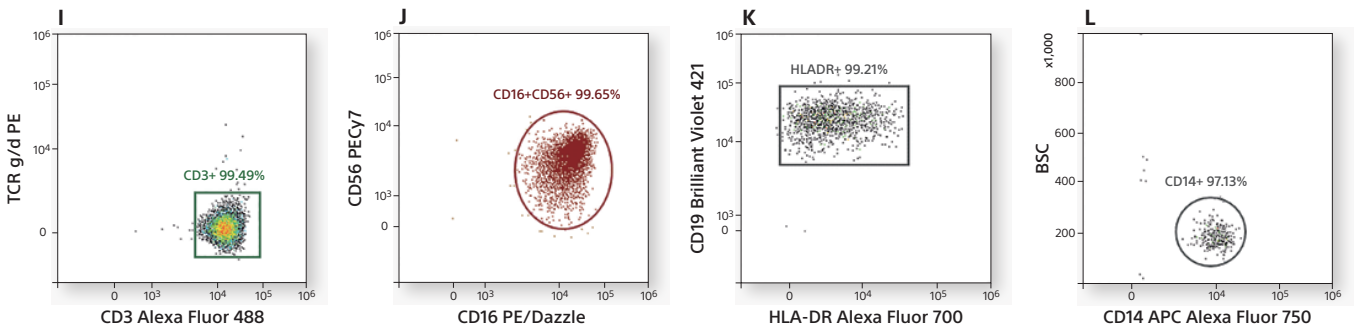
T細胞サブセットの同定 (A ~ D)



NK細胞・B細胞・単球の同定 (E ~ H)



4wayソーティング再解析の結果 (I ~ L)



©2021 Sony Corporation Sony and the Sony logo are trademarks of Sony Corporation. For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures, or for any other clinical purpose. All other trademarks are property of their respective owners. The MA900 cell sorter is classified as a Class 1 laser product. Specifications subject to change without notice. 803.092520.1

