

인간 말초혈액 단핵세포의 주요 백혈구세포 아집단에 대한 심층적인 특성 규명

45가지 색상, 전체 스펙트럼 Agilent NovoCyte Opteon
스펙트럼 유세포 분석기 사용

저자

Ming Lei,
Laurissa Ouaguia,
Garret Guenther,
Peifang Ye,
Nancy Li,
Agilent Technologies, Inc.

개요

유세포 분석법은 면역 세포의 다양한 면역 세포 아집단을 심층적으로 분석하여 면역계에 대한 종합적인 평가를 수집하기 위한 강력한 기법입니다. 스펙트럼 유세포 분석법을 통해 보다 많은 마커, 향상된 유연성, 우수한 데이터 분해능을 지원하는 기능이 향상되었습니다. 본 응용 자료에서는 말초혈액 단핵세포(PBMC) 시료에서 면역 세포의 분포를 분석하기 위해 Agilent NovoCyte Opteon 스펙트럼 유세포 분석기에 대한 45가지 색상의 스펙트럼 유세포 분석법 패널을 고안했습니다.

소개

매우 복잡한 세포 네트워크를 통해 면역계는 사멸 세포와 불완전한 세포를 인식 및 제거하는 동시에 병원체로부터 신체를 보호할 수 있습니다. 말초혈액 세포는 면역계의 주요 요소로서 일련의 특정 마커 발현 및 기능을 특징으로 하는 다양한 아집단으로 활성화, 증식 및 분화를 거치게 됩니다. 말초혈액은 혈액 채취가 간편하고 비침습적이어서 기초연구, 중개연구, 임상응용 분야에서 광범위하게 사용되는 말초혈액 단핵 세포(PBMC)의 다양하게 이용 가능한 공급원이 되었습니다.¹⁻³ 건강한 기증자의 경우, PBMC는 여러 면역 세포 유형으로 구성된 이질적인 세포 집단을 나타내며, 여기에는 림프구(T 세포, B 세포, 자연 살해(NK) 세포, NKT 세포, $\gamma\delta$ T 세포, 선천성 림프구(ILC)), 단핵구, 호염구, 수지상 세포(DC)가 포함됩니다.^{1,3,4}

말초혈액 대부분의 림프구는 CD3+ 발현 T 세포(45-70% PBMC)로 구성되어 있습니다. $\alpha\beta$ TCR 또는 $\alpha\gamma\delta$ TCR의 발현에 따라 두 가지 유형의 T 세포로 추가 구분될 수 있습니다.⁵ 또한 T 세포를 발현하는 $\alpha\beta$ TCR은 일반적인 보조 CD4+ T 세포(25-60%) 및 CD8+ T 세포독성 세포(5-30%)로 더욱 세분화될 수 있습니다. 건강한 기증자 PBMC에 대한 CD4+T 세포 및 CD8+T 세포 비율은 약 2:1입니다.^{3,6} 보조 CD4+T 세포는 면역학적 항상성과 염증의 필수적인 매개 역할을 합니다. 특정 표면 마커/단백질, 사이토카인, 케모카인 수용체 및 특정 전사 인자의 발현 프로파일에 따라, CD4+T 세포는 Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, 여포 보조 (Tfh) 세포, 최근 흥선 이주 세포(RTE) 및 조절 T 세포(Treg) 아집단으로 분류될 수 있습니다.⁷⁻¹⁰ 또한 항원 제시 세포는 naive T 세포에 항원을 제시한 후 활성화되어 효과 T 세포와 기억세포로 분화됩니다. 효과 세포는 감염 부위로 이동하여 병원체를 제거합니다. 이러한 효과 세포는 수명이 짧은 반면, 형성된 기억세포 아집단은 장기적인 생존력이 있습니다.^{7,11} 일반적인 CD8+T 세포독성 세포는 세포 내 감염 및 종양 세포와 싸우는 적응 면역계의 주요 요소입니다. CD4+T 세포와 유사하게 naive CD8+T 세포의 활성화는 대체로 자율적인 증식 및 분화 프로그램을 유도하여 효과 및 기억세포를 모두 생성합니다.⁷ 기억 T 세포는 면역 시스템에서 중요한 역할을 하며, 면역 기억은 장기적인 면역과 감염 보호에 필수적입니다.⁷ 상호 배타적인 CD4-CD8 패러다임에도 불구하고 소수의 $\alpha\beta$ T 세포는 비전형적인 T 세포로 구성되어 있습니다. 이러한 비전형적인 T 세포는 이중음성 CD4-CD8-T 세포^{5,12}와 이중양성 CD4+CD8+T 세포¹³로 구성됩니다. 비전형적인 T 세포는 연구가 가장 부족한

T 세포 아집단을 나타내며 세포독성 기능(만성 바이러스 감염) 또는 조절 역할(악성)을 나타내는 다양한 조건에서 핵심 역할로 식별되었습니다. 일반적인 T 세포와 유사하게 비전형적인 T 세포 또한 활성화 마커를 발현하며 기억 세포와 같은 특징을 나타냅니다.¹³⁻¹⁵ 또한 CD3+T 세포는 건강한 PBMC에서 3-5%의 CD4+T 세포를 구성하는 조절 T 세포(Treg)로 구성됩니다.¹⁶ Treg는 CD3, CD4, CD25, CD127 마커의 상대적 발현과 같은 다양한 방식을 사용하여 식별되었습니다. Treg 세포는 흥선에서 생성된 자연 Treg(nTreg) 또는 말초 유도성 Treg(iTreg)로 세분화될 수 있습니다.^{17,18} Treg 세포는 많은 활성화 및 기억 특징을 나타내며, 자가 항원에 대한 면역 반응을 억제하고 말초 내성 유지에 중요한 역할을 합니다.^{7,18} 말초 CD3+T 세포의 또 다른 아집단은 선천성 및 적응성 면역 반응 상태에 영향을 미칠 수 있는 CD56+NKT 세포(0.04-1.3% 림프구)입니다.¹⁹ CD16 및 CD56 마커의 발현 수준에 따라 NKT 세포는 아집단으로 추가 분류될 수 있으며, T 세포와 유사하게 보조 자극 분자의 참여는 NKT 세포 활성화 및 기능에 영향을 미칩니다.^{19,20}

비전형적인 다른 T 세포에는 선천성 및 적응성과 같은 성질을 모두 가지고 있는 $\gamma\delta$ T 림프구가 포함되어 선천성 면역과 적응성 면역 사이의 교류를 구축합니다.²¹ 독특한 생물학적 특성으로 인해 이러한 기능은 $\gamma\delta$ T 세포를 적응성 세포 면역 요법의 훌륭한 선택이 되게 합니다. $\gamma\delta$ T 세포는 특정 인자 및 단백질 발현 수준에 따라 다양한 아집단으로 세분화될 수 있습니다.²²

또한 말초 림프구는 B 세포, NK 세포, ILC와 같은 T 세포가 아닌 세포를 포함합니다.^{3,23} B 세포는 항체를 분비하는 CD19+ 발현 세포입니다. 따라서 이는 체액성 면역의 주요한 요소이며 적응 면역계의 일환으로 대량의 다양한 병원체로부터 보호합니다. B 세포는 약 15%의 PBMC를 나타내며, 형질모세포, 원형질 세포, 면역 B 세포, 기억 B 세포, 여포 B 세포, 면역부 B 세포, B 조절 세포, B-1 세포로 성숙 및 분화할 수 있습니다. 각각의 B 세포 아집단은 CD27, IgM, IgG, IgD, CD38을 포함하는 일련의 단백질 및 인자의 발현에 따라 특성화될 수 있습니다.²⁴ 또한 PBMC 구성 성분에는 NK 세포(약 10%)가 포함되어 있으며, NK 세포는 병원체 감염 세포를 직접 파괴함으로써 선천적 면역계의 중요한 요소를 나타내는 세포독성 자연살해 세포입니다. CD16 및 CD56 마커의 상대적 발현에 따라 NK 세포는 다른 아집단으로 추가 분류될 수 있습니다.^{3,20} 또한 PBMC는 분류 마커 및 항원 특이적 수용체가 발현되지 않은 ILC로 구성됩니다. 이러한 특성 규명에도

불구하고 ILC는 사이토카인과 분비 단백질을 생성하여 감염 시 면역 반응을 향상시킵니다. 일부 ILC는 CD4+ T 세포 아집단과 많은 유사점을 갖는 것으로 나타났습니다. 따라서 ILC는 특정 마커 발현 및 사이토카인 생성에 따라 특정한 아집단으로 추가 분류될 수 있습니다.^{25,26}

또한 PBMC는 DC 세포(1-2%)로 구성되며, 이는 naive CD4+ 및 CD8+ T 세포를 보조 T, 세포독성 효과 T 및 기억 T 세포로 프라이밍 및 분화를 유도하는 독특한 특성을 갖는 전문적 항원 제시 세포로서 역할을 합니다. DC 세포는 온톨로지, 국소화, 표면 마커 발현, 사이토카인 생산, 항원 처리 및 제시 기능에 따라 골수계 또는 일반 수지상 세포(CD1c/cDC2 및 CD141/cDC1)와 형질세포유사 수지상 세포(CD123/pDC)로 추가 분류될 수 있습니다.^{27,28} 또한 PBMC는 단핵구(10-20%)로 구성되며, 이는 변연부에서 유의적인 이질성을 나타내는 유연성이 높은 선천성 면역 세포 유형을 나타냅니다. 표면 마커의 상대적 발현(CD16, CD14)에 대한 명확한 양식은 세 개의 단핵구 아집단(비전형, 중간형, 전형 단핵구)을 구분하기 위한 기초로 알려지고 있습니다.^{3,29} 또한 PBMC는 PBMC 분리 방법에 따라 호염구라고 하는 세포의 소부분(< 1%)으로 구성됩니다. 이러한 호염구는 HLADR 및 CD123 마커의 상대적 발현에 따라 특성 규명할 수 있습니다.³⁰

모든 혈액 면역 세포 아집단이 면역 반응을 형성하고 암 및 질병 진행에 영향을 미치며 약물 효능에 작용하는 방법을 평가하기 위해 복합적인 역할을 해독하는 것에 대한 관심이 증가하고 있습니다. 이러한 과제를 극복하기 위해, 단일 세포 수준 및 아집단 수준에서 면역계에 대한 높은 처리율, 심층 분석을 제공하는 방법 및 기기가 필요합니다. 애질런트는 말초 면역 아집단 빈도, 단백질 발현, 활성 마커, 피로 마커 및 건강한 PBMC의 주요 선천성 및 적응성 면역 세포 유형에 대해 발현되는 분화 마커를 정량화하기 위해 45가지 색상 스펙트럼 유세포 분석법 면역 표현형 패널을 개발했습니다. 각 집단에 의해 발현된 공통 표면 마커는 집단 빈도를 결정하는 데 사용되었으며, 각 집단의 추가적인 특성화는 세포 활성화 및 증식(CD69, HLA-DR, CD38), 세포 피로 및 노화(PD1, CD223, CD57), 세포 분화(CCR7, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD127) 및 세포 유연성 또는 이동 가능성(CXCR3, CCR6, CCR5, CXCR5)과 관련된 마커를 사용하여 평가되었습니다. 본 심층 분석은 Agilent NovoCyte Opteon 스펙트럼 유세포 분석기를 사용하여 진행했습니다.

검출기 수만큼 많은 형광 파라미터에서 최대 형광단 방출을 획득하는 데에 제한이 있는 기존의 세포 분석법과는 달리, 스펙트럼 세포 분석법은 모든 레이저 선에 걸쳐 모든 형광단에 대한 전체 형광 스펙트럼을 기록하기 위해 여러 검출기로 구성됩니다. 이를 통해 스펙트럼 세포 분석법은 단일 실험에서 형광색소당 더 많은 파라미터를 허용합니다.^{1,31,32}

실험

재료

표 1에는 45가지 색상 시료를 준비하는 데 사용된 재료에 대해 설명되어 있습니다.

표 1. 사용된 시약.

시약	부품 번호	제조업체
순수 염색 단핵구 차단제	426102	BioLegend
Brilliant 염색 완충액 플러스	566385	BD
CellBlox 차단 완충액	B001T02F01	Thermo Fisher Scientific
인산염 완충액 식염수(PBS)	GNM-14190	Genom Biomedical Technology
송아지 태아 혈청(FBS)	10091148	Thermo Fisher Scientific

염색 절차

다음 프로토콜에는 시료 전처리에 대해 설명되어 있습니다.

PBMC의 전처리

- 완전한 세포배양액 RPMI 1640을 37°C에서 최소 30분 동안 예열합니다
- 작은 얼음 조각만 남을 때까지 PBMC 동결 튜브(약 15×10^6 세포)를 37°C의 수조에 담가줍니다
- 동결 튜브의 내용물을 50mL 코니칼 튜브에 옮겨 담습니다
- 예열된 1mL의 완전한 세포배양액 RPMI 1640을 동결 튜브에 첨가하고 g 단계에서 사용할 수 있도록 그대로 둡니다
- 50mL 튜브의 세포에 5mL의 완전한 세포배양액 RPMI 1640을 한 방울씩 첨가합니다. 첨가 시 50mL 튜브를 천천히 섞습니다 (한 손에는 피펫을 잡고 다른 손에는 50mL 튜브를 잡은 다음 완전한 세포배양액 RPMI 1640을 첨가하면서 튜브를 천천히 섞습니다)
- 5mL의 완전한 세포배양액 RPMI 1640의 첫 번째 배치를 첨가한 후, 다음 5mL를 약간 더 빠르게(매회 몇 방울씩) 첨가해야 합니다
- 10mL를 첨가한 후, 동결 튜브의 내용물을 50mL 튜브로 옮겨 담습니다

- h. 50mL 튜브에 완전한 세포배양액 RPMI 1640를 추가하여 20mL에 맞춥니다
- i. 400g에서 8분 동안 원심분리합니다
- j. 상층액을 조심스럽게 따라주고 펠릿을 흔들지 않습니다
- k. 예열된 2mL의 완전한 세포배양액 RPMI 1640에 펠릿을 천천히 현탁시키고 20mL에 맞춥니다
- l. i 단계와 j 단계를 반복합니다
- m. 실험에 사용하기 위해 일정량의 완전한 세포배양액 RPMI 1640에 세포 침전물을 현탁시킵니다

Live/Dead 염료 및 항체 혼합물의 전처리

- a. Zombie NIR Live/Dead 염료를 해동하고 0.25μL를 더 큰 Eppendorf 튜브로 옮긴 다음 1000μL의 1x PBS(최종 희석 1:4000)를 첨가하여 사용할 때까지 빛을 피해 보관합니다
- b. 1.5mL Eppendorf 튜브 4개를 항체 혼합물 A, B, C 및 D로 표시합니다. 향상된 염색을 위해 세포를 4개 단계로 염색해야 합니다
- c. 각 항체 혼합물 튜브에 10μL의 Brilliant 염색 완충액과 5μL의 순수한 염색 단핵구 차단제를 첨가하고 항체 혼합물 튜브 A에만 5μL의 CellBlox 차단 완충액을 첨가합니다
- d. 항체 목록(표 2)에 따라 항체 혼합물을 준비하고, A군의 항체를 A로 표시된 튜브에 첨가한 다음 B군의 항체를 B로 표시된 튜브에 첨가하는 등의 과정을 진행합니다
- e. 모든 혼합물 튜브를 16,000g-18,000g에서 5분 동안 원심분리합니다. 항체를 사용하는 경우, 액체 상단에서 혼합물을 흡입하고, 튜브 바닥에 닿지 않도록 주의합니다. 항체 응집체는 바닥에 남게 됩니다

표 2. CD45RO SBUV445 항체를 제외한 항체 염색군.

	특이성	형광색소	용량(μL)
염색군 A			
1	CCR6	BV711	2.5
2	CCR5	BUV563	2.5
3	TCRγδ	PerCP-eFluor 710	0.63
4	CXCR5	BV750	0.63
5	IgG	BV605	0.63
6	CXCR3	PE-Cy7	1.25
7	CD223(LAG-3)	NovaFluor Blue 660/120S	1.25
8	CD69	StarBright Blue 765	1.25
9	CCR7	BV421	2.5
염색군 B			
1	CD20	Spark YG 593	1.25
2	CD1c	Alexa Fluor 647	2.5
3	CD28	BV650	5
4	PD-1	BV785	5
5	CD159c	PE	10
염색군 C			
1	CD127	Spark Red 718	1.25
2	CD2	PerCP-Cy5.5	2.5
3	CD337	PE-Dazzle 594	2.5
4	CD3	BV510	2.5
5	CD27	APC-H7	2.5
6	CD25	PE-Alexa Fluor 700	5
7	CD11c	eFluor 450	5
염색군 D			
1	CD45RA	BUV395	0.32
2	IgD	BV480	0.32
3	CD4	CF594	0.32
4	CD14	Spark Blue 550	0.32
5	HLA-DR	PE-Fire 810	0.32
6	CD33	StarBright Blue 580	0.32
7	CD16	BUV496	0.63
8	CD57	FITC	0.63
9	CD24	PE-Alexa Fluor 610	0.63
10	CD95	PE-Cy5	0.63
11	CD38	APC-Fire 810	0.63
12	CD31	StarBright Blue 810	0.63
13	CD141	BB515	1.25
14	CD19	Spark NIR 685	1.25
15	CD8	BUV805	1.25
16	CD159a	APC	2
17	CD314	BUV615	2.5
18	CD56	BUV737	2.5
19	CD45	PerCP	2.5
20	IgM	BV570	2.5
21	CD39	BUV661	2.5
22	CD123	Super Bright 436	2.5

염색

- a. FACS 튜브에 비염색 대조군 튜브, 단일 염색 튜브, 다색 튜브로 표시합니다
- b. 세포 현탁액 100 μ L를 각 다색 튜브(약 3×10^6 세포)에 첨가하고 동시에 10 μ L의 세포 현탁액을 각 비염색 대조군 튜브 및 단일 염색 튜브(약 3×10^5 세포)에 첨가합니다
- c. PBS로 다색 튜브와 Live/Dead 단일 염색 튜브를 세척하고 동시에 튜브당 3mL의 세척 완충액(PBS + 2% FBS)로 다른 단일 염색관과 비염색 대조군 튜브를 세척합니다
- d. 500g에서 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 조심스럽게 따라냅니다
- e. 다색 튜브와 Live/Dead 단일 염색 튜브에 100 μ L의 Zombie NIR 희석제를 첨가합니다. 잘 섞은 후 얼음 위, 어두운 곳에서 30분 동안 놓아둡니다
- f. 동시에 다른 단일 염색 튜브를 표 2에 표시된 최적의 항체 수준으로 염색한 다음 얼음 위, 어두운 곳에서 30분 동안 놓아둡니다. anti-CD223 NovaFluor Blue 660/120S 단일 염색 튜브용 CellBlox 차단 완충액을 첨가합니다
- g. 30분 동안 배양한 후 다색 튜브, Live/Dead 단일 염색 튜브 및 기타 단일 염색 튜브를 3mL의 세척 완충액으로 세척합니다
- h. d 단계를 반복합니다
- i. Live/Dead 단일 염색 튜브, 비염색 대조군 튜브 및 기타 단일 염색 튜브에 200 μ L 세척 완충액을 첨가하고 볼텍스 혼합 후 얼음 위에 보관합니다
- j. 모든 다색 튜브에 anti-CD45RO SBUV445를 첨가하고 볼텍스한 후 얼음 위, 어두운 곳에서 30분 동안 놓아둡니다
- k. 세척 없이 항체 혼합물 A를 모든 다색 튜브에 첨가하고 볼텍스한 후 얼음 위, 어두운 곳에서 30분 동안 놓아둔 다음 실온(RT)에서 20분 동안 놓아둡니다(향상된 CCR 및 CXCR 마커 염색을 얻을 수 있음)
- l. 모든 다색 튜브를 3mL의 세척 완충액으로 한 번 세척합니다
- m. d 단계를 반복합니다

- n. 모든 다색 튜브에 항체 혼합물 B를 첨가하고 볼텍스한 후 얼음 위, 어두운 곳에서 40분 동안 놓아둡니다
- o. 모든 다색 튜브를 3mL의 세척 완충액으로 한 번 세척합니다
- p. d 단계를 반복합니다
- q. 다색 튜브에 항체 혼합물 C를 첨가하고 볼텍스한 후 얼음 위, 어두운 곳에서 40분 동안 놓아둡니다
- r. 모든 다색 튜브를 3mL의 세척 완충액으로 한 번 세척합니다
- s. d 단계를 반복합니다
- t. 다색 튜브에 항체 혼합물 D를 첨가하고 볼텍스한 후 얼음 위, 어두운 곳에서 40분 동안 놓아둡니다
- u. 모든 다색 튜브를 3mL의 세척 완충액으로 두 번 세척합니다
- v. d 단계를 반복합니다
- w. 다색 튜브에 300 μ L의 세척 완충액을 첨가하고 볼텍스한 후 얼음 위에 보관합니다

결과 및 토의

항체 적정

본 응용 자료에서 해당 45가지 색상 패널의 제안된 모든 마커 및 형광색소 조합(표 3에 설명됨)은 항체 적정 분석을 통해 제공됩니다. 그림 1에 표시된 각 항체의 필요한 용량은 염색 지수에 따라 결정되며 $(MFI(양성) - MFI(음성)) / (2 * SD(음성))$, (MFI = 평균 형광 강도)으로 계산됩니다. 최적 적정 농도는 최대 또는 최대에 가까운 염색 지수 또는 더 낮은 분산 오류를 갖는 가장 낮은 농도의 항체로 선택됩니다.

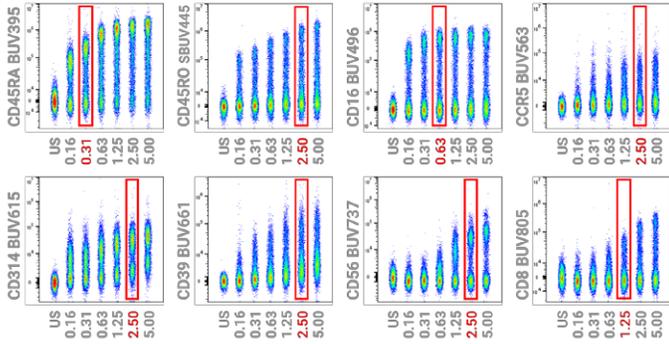
해당 패널 설계의 주요 목적은 이전 발표된 40마커 패널인 OMIP-069를 기반으로 설계하는 것입니다. 애질런트는 OMIP-069 패널 외에도 5개의 다른 마커 (CD45RO, CD33, CD233 (LAG-3), CD69, CD31)를 포함했습니다. 항체와 형광색소의 전체 패널이 표 3에 표시되어 있습니다.

입체 방해물질이로 유발되는 이러한 대형 패널을 사용한 경우 염색의 복잡한 특성으로 인해 항체-항원 결합을 최적화하기 위하여 4개의 염색군을 식별하고 순차적인 패턴으로 시료와 함께 배양하였습니다(표 2).

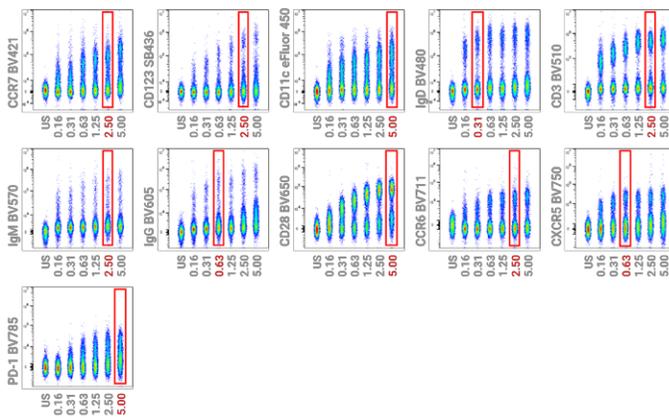
표 3. 항체 정보.

	마커	형광색소	클로닝	제조사	부품 번호
1	CD45RA	BUV395	5H9	BD Biosciences	740315
2	CD45RO	StarBright UltraViolet 445	UCHL1	Bio-RAD	MCA461SBUV445
3	CD16	BUV496	3G8	BD Biosciences	612945
4	CCR5(CD195)	BUV563	2D7/CCR5	BD Biosciences	741401
5	CD314(NKG2D)	BUV615	1D11	BD Biosciences	751232
6	CD39	BUV661	TU66	BD Biosciences	749967
7	CD56	BUV737	NCAM16.2	BD Biosciences	612766
8	CD8	BUV805	SK1	BD Biosciences	612889
9	CCR7(CD197)	BV421	G043H7	BioLegend	353208
10	CD123	Super Bright 436	6H6	Thermo Fisher Scientific	62-1239-42
11	CD11c	eFluor 450	3.9	Thermo Fisher Scientific	48-0116-42
12	IgD	BV480	IA6-2	BD Biosciences	566187
13	CD3	BV510	SK7	BioLegend	344827
14	IgM	BV570	MHM-88	BioLegend	314517
15	IgG	BV605	G18-145	BD Biosciences	563246
16	CD28	BV650	CD28.2	BioLegend	302945
17	CCR6(CD196)	BV711	G034E3	BioLegend	353435
18	CXCR5(CD185)	BV750	RF8B2	BD Biosciences	747111
19	PD-1(CD279)	BV785	EH12.2H7	BioLegend	329929
20	CD141	BB515	1A4	BD Biosciences	565084
21	CD57	FITC	NK-1	BD Biosciences	555619
22	CD14	Spark Blue 550	63D3	BioLegend	367148
23	CD33	StarBright Blue 580	WM53	Bio-RAD	MCA1271SBB580
24	CD223(LAG-3)	NovaFluor Blue 660/120S	3DS223H	Thermo Fisher Scientific	H048T02B08
25	CD45	PerCP	HI30	Agilent Technologies	8931017
26	CD2	PerCP-Cy5.5	TS1/8	BioLegend	309225
27	TCRγδ	PerCP-eFluor 710	B1.1	Thermo Fisher Scientific	46-9959-41
28	CD69	StarBright Blue 765	FN50	Bio-RAD	MCA2806SBB765
29	CD31	StarBright Blue 810	WM59	Bio-RAD	MCA1738SBB810
30	CD159c(NKG2C)	PE	134591	R&D Systems	FAB138P-100
31	CD20	Spark YG 593	2H7	BioLegend	302367
32	CD337(Nkp30)	PE-Dazzle 594	P30-15	BioLegend	325231
33	CD4	CF594	C4/206	Biotium	#BNC940206-500
34	CD24	PE-Alexa Fluor 610	SN3	Thermo Fisher Scientific	MHCD2422
35	CD95(FAS)	PE-Cy5	DX2	BioLegend	305610
36	CD25	PE-Alexa Fluor 700	CD25-3G10	Thermo Fisher Scientific	MHCD2524
37	CXCR3(CD183)	PE-Cy7	G025H7	BioLegend	353720
38	HLA-DR	PE-Fire 810	L243	BioLegend	307683
39	CD159a(NKG2A)	APC	REA110	Miltenyi	130-113-563
40	CD1c	Alexa Fluor 647	L161	BioLegend	331510
41	CD19	Spark NIR 685	HIB19	BioLegend	302269
42	CD127	Spark Red 718	A019D5	BioLegend	351376
43	Viability	Zombie NIR	N/A	BioLegend	423105
44	CD27	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560223
45	CD38	APC-Fire 810	HB-7	BioLegend	356643

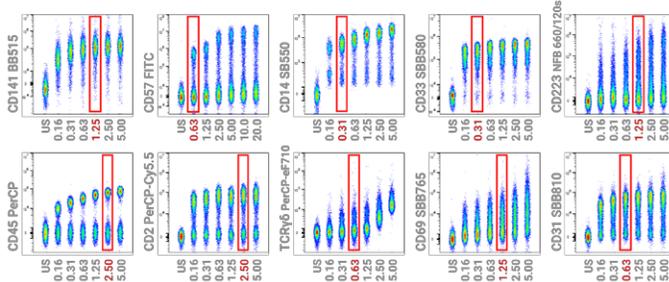
A. UV 레이저(349nm)



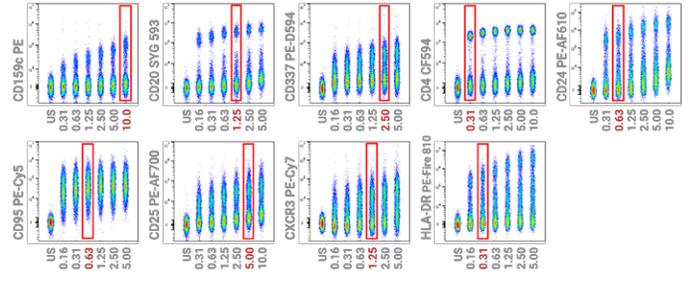
B. 보라색 레이저(405nm)



C. 파란색 레이저(488nm)



D. 노란색 레이저(561nm)



E. 빨간색 레이저(637nm)

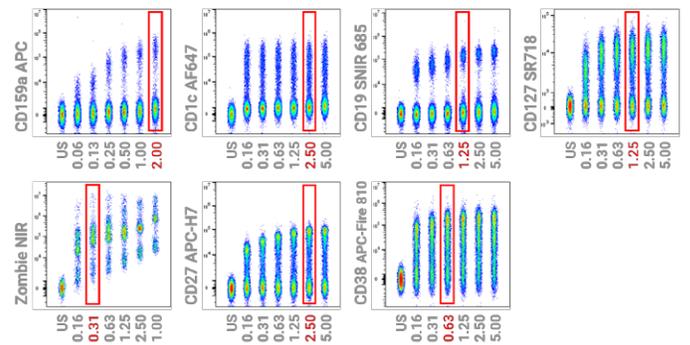
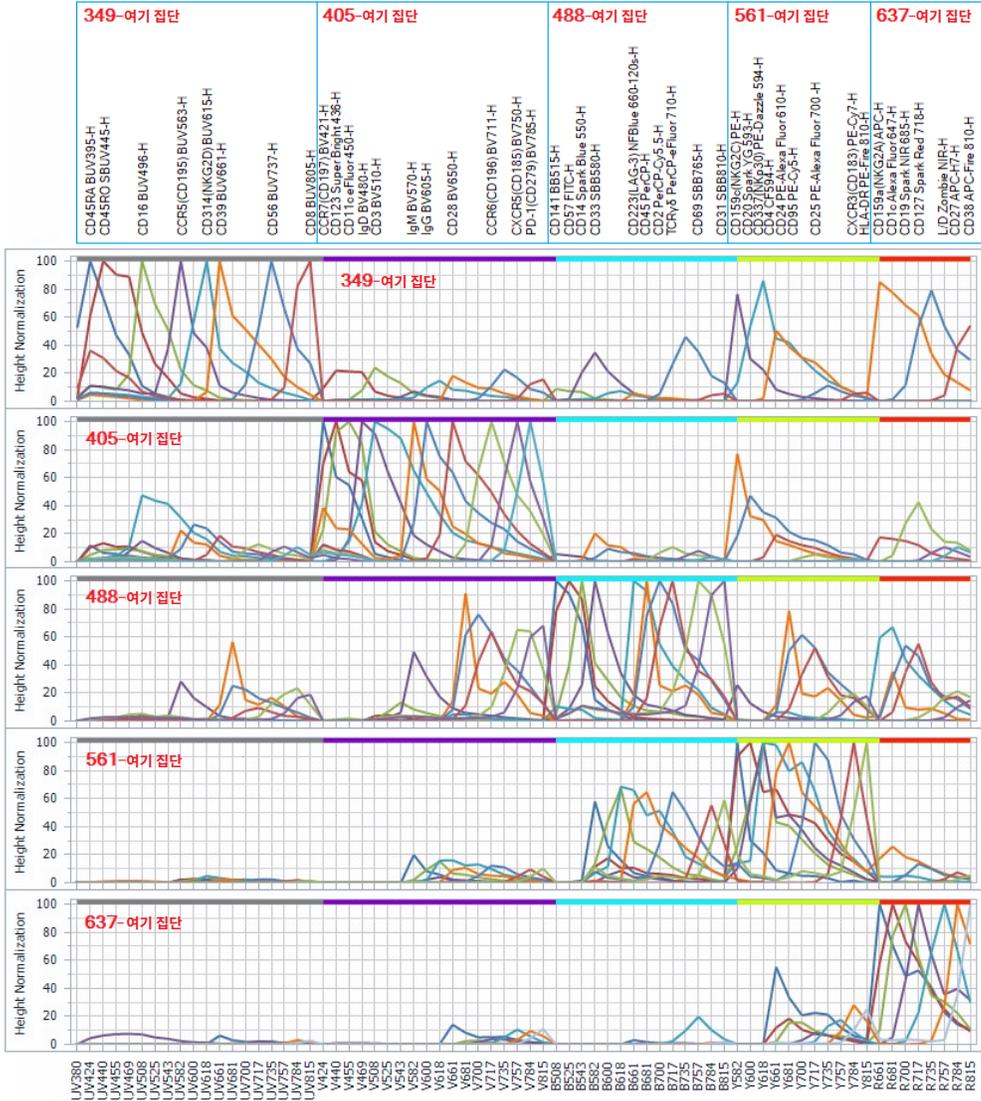


그림 1. 45가지 색상 패널에 대한 항체 적정. 모든 항체는 건강한 개인으로부터 채취된 농축백혈구(leukopak)에서 분리된 동결 보관 PBMC를 사용하여 100μL의 염색 용량당 1-20μL 시작 농도 범위로 6가지 농도에 걸쳐 적정됩니다. 6개의 희석액은 모두 동일한 플롯에 표시되며 X축은 희석 시리즈를 나타냅니다. 빨간색 사각형은 패널에 사용된 최종 선택된 적정 농도를 강조합니다. 최적 적정 농도는 염색 지수(최대 또는 최대에 가까운 염색 지수 또는 더 낮은 분산 오류를 갖는 가장 낮은 농도)에 따라 선택되며 빨간색 상자로 표시됩니다. 모든 적정 데이터는 Agilent NovoExpress 2.0.0 소프트웨어를 통해 비혼합(unmixing)되었습니다. 잔해물과 이중물(doublet)은 제외되었으며 파일은 FlowJo v10.10.0을 사용하여 연결되었습니다. (A) 349nm 레이저 여기 형광색소, (B) 405nm 레이저 여기 형광색소, (C) 488nm 레이저 여기 형광색소, (D) 561nm 레이저 여기 형광색소, (E) 637nm 레이저 여기 형광색소. 염색 지수는 (MFI(양성)-MFI(음성))/(2*SD(음성)), (MFI = 평균 형광 강도)으로 계산됩니다

참조 스펙트럼 대조군은 그림 2에 나타내는 바와 같이 자가형광 (AF) 감사를 위한 2개의 집단을 포함하여 사용된 각 마커에 대해 분석했습니다.

A. 45가지 색상 형광색소의 스펙트럼 특성



B. 2가지 색상 자가형광의 스펙트럼 특성

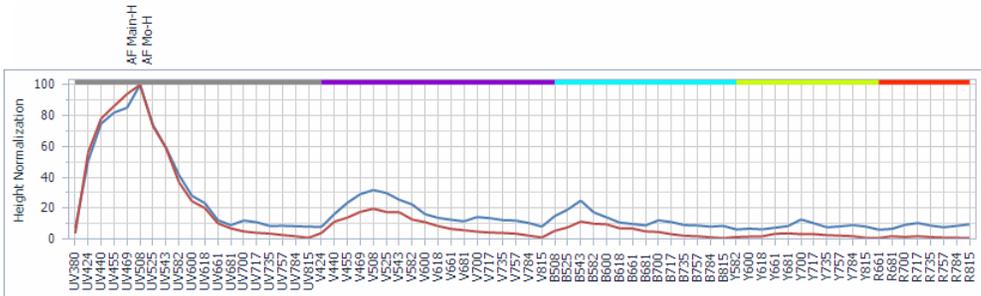


그림 2. 혼합된 45가지 색상 패널 데이터를 비혼합(unmixing)하는 데 사용되는 스펙트럼 특성(45 + 2 AF). 기본 게인 설정에서 Agilent NovoCyte Opteon 스펙트럼 유세포 분석기의 단일 염색 대조군을 획득했습니다. 형광색소 스펙트럼 특성(정규화된 방출 스펙트럼)은 1차 레이저 및 자가형광으로 그룹화된 스펙트럼 플롯으로 나타났습니다. (A) 45가지 색상 형광색소, (B) 2가지 색상 자가형광 특성

면역 세포 유형 및 아집단의 분포는 마커 발현을 기반으로 식별되었으며, 각 세포 유형을 특정하기 위해 그림 5에서 나타난 바와 같이 계층적 게이팅(hierarchical gating)이 사용되었습니다.

그림 5는 다양한 세포 유형으로 분류된 비혼합(unmixing) 데이터를 나타내며, 이 패널에서 많은 아집단을 특성 규명할 수 있는 복잡성 및 심층성을 강조하고 있습니다.

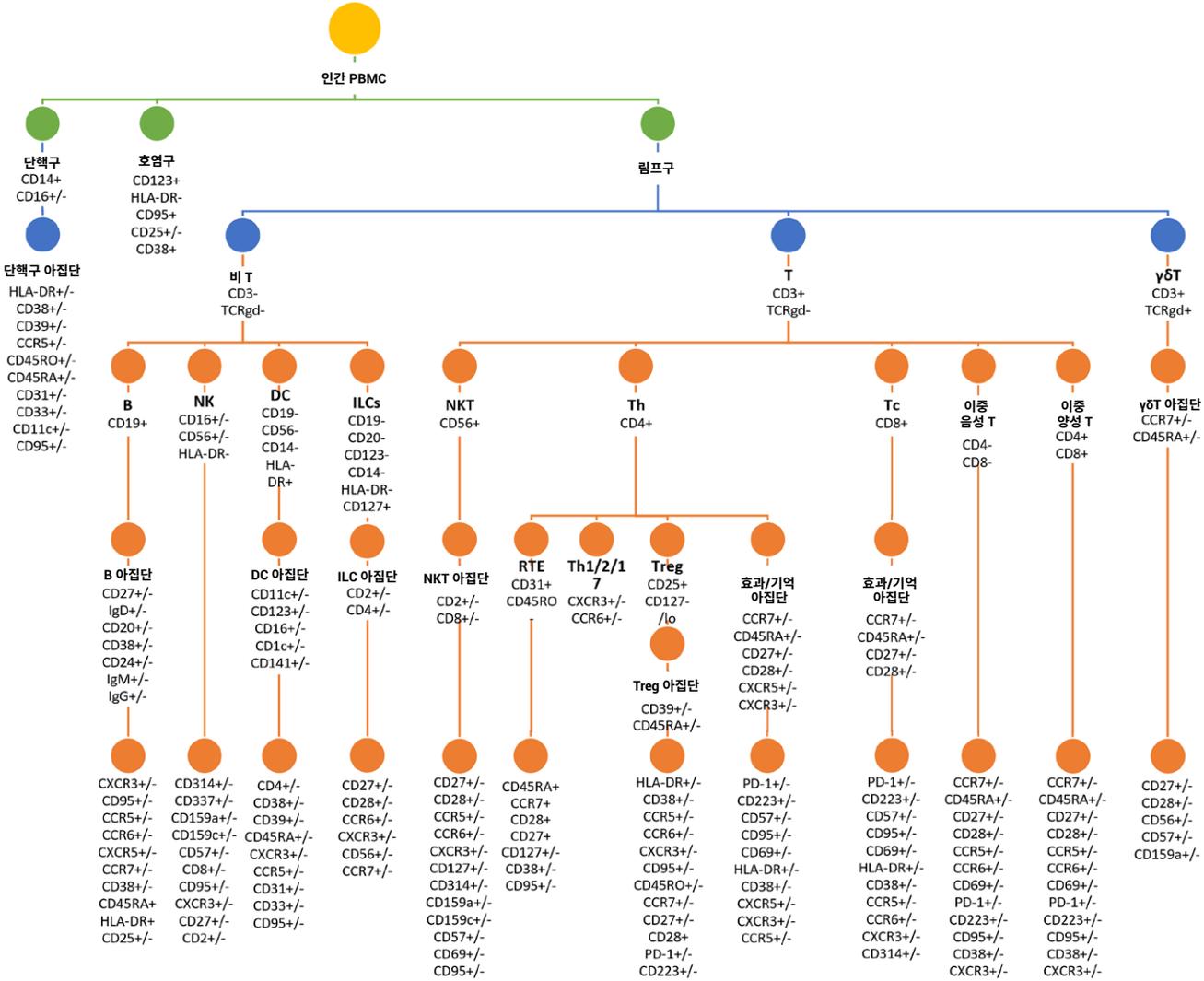


그림 5. 식별된 모든 세포 아집단의 개략도

주요 면역 세포 아집단을 식별하는 데 사용되는 수동 게이팅 전략

그림 6에 나타난 바와 같이 PBMC는 시퀀싱된 염색 절차를 설명하는 프로토콜에 따라 처리됩니다. 혈소판, 잔해물, 이중물(doublet) 및 죽은 세포가 제외된 후, 살아있는 CD45+ 집단 내에서 호염구(1)는 CD45+CD123+HLA-DR-로 설명되었습니다. 림프구와 단핵구(2)는 FSC-H/BSSC-H 특성을 기반으로 게이팅되었습니다. 그런 다음 단핵구(3)를 CD14 및 CD16 발현에 따라 비전형(CD14-CD16+), 중간형(CD14+CD16+/low) 및 전형(CD14+CD16-)으로 분류했습니다. 림프구 게이트(2)에서 CD3-TCR $\gamma\delta$ -, CD3+TCR $\gamma\delta$ +, CD3+TCR $\gamma\delta$ - (4) 집단이 확인되었습니다. CD3+TCR $\gamma\delta$ + 집단(5)은 CD45RA 및 CCR7 발현을 기반으로 특성화되었습니다. CD3+TCR $\gamma\delta$ - 집단은 CD3+CD56+(NKT 유사) 및 CD3+CD56- 아집단(6)으로 분류되었습니다. CD2 및 CD8 함유물은 NKT 유사 세포의 추가적인 분류를 가능하게 하며, CD69 및 CD57은 NKT 유사 세포 (7)의 초기 활성화 및 세포독성을 검출하는 데 사용되었습니다. CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD4-CD8- T 세포는 CD3+CD56- 게이트(8)에서 식별되었습니다. Treg 세포는 CD127 및 CD25 발현(CD127^{lo}/-CD25^{hi})을 통해 CD4+ 집단에서 식별되었으며, CD39 및 CD45RA는 이러한 세포(9)를 추가적으로 분류하는 데 사용되었습니다. CCR7, CD45RA, CD27, CD28은 기억/효과 CD4 및 CD8 T 세포 아집단을 추가적으로 분류하고, CXCR3 및 CCR6은 Th 집단을 추가적으로 분류하였습니다.

CD45RO 및 CD31은 CD4 T 세포 내의 RTE 세포를 검출하는 데 사용되었고, PD-1 및 CD223은 CD4 및 CD8 T 세포의 피로 상태를 검출하는 데 사용되었습니다(10, 11). CD19+ 및/또는 CD20+ 세포(B 세포)는 CD3-TCR $\gamma\delta$ - 집단(12)에서 제외되었습니다. CD19+CD20+/- 세포는 IgD+CD27-, IgD+CD27+ 또는 IgD-CD27+/-로 추가로 게이팅되었습니다. IgD-CD27+/- 아집단은 CD20 발현에 따라 형질모세포 또는 IgD- 기억 B 세포로 분류되었고, IgG 및 IgM 발현은 IgD-기억 B 세포 내에서 평가되었습니다. IgD+CD27- 집단은 이행(transitional) B 세포로 추가 분류되었습니다. IgD+CD27+ 집단은 MZ와 IgD- 기억세포만 B 세포로 추가 분류되었습니다(13). NK 세포는 CD3-TCR $\gamma\delta$ -HLA-DR-로 정의되었으며 초기 NK(CD56+CD16-), 성숙 NK(CD56+CD16+) 및 말단 NK(CD56-CD16+) 세포로 분류되었습니다(14). 수지상 세포(DC, 15)는 CD3-CD19-CD56-CD14-HLA-DR+에 대한 게이팅을 통해 먼저 식별되었으며, 여기서 CD123+ (pDC) 및 CD11c+ DC가 식별되었습니다. CD11c+ DC는 CD16-와 CD16+로 추가 분류되었습니다. 그런 다음 CD1c 및 CD141을 사용하여 CD11c+CD16- 및 CD11c+CD16+ DC를 추가 분류했습니다. 마지막으로, 선천성 림프구 세포(ILC, 16)는 CD3-CD19-CD20-CD14-CD123-CD127+로 식별되었으며 CD2 및 CD4 발현에 따라 추가 분류되었습니다. 제시된 모든 데이터는 한 명의 건강한 기증자의 냉동 PBMC에서 확보되었습니다.

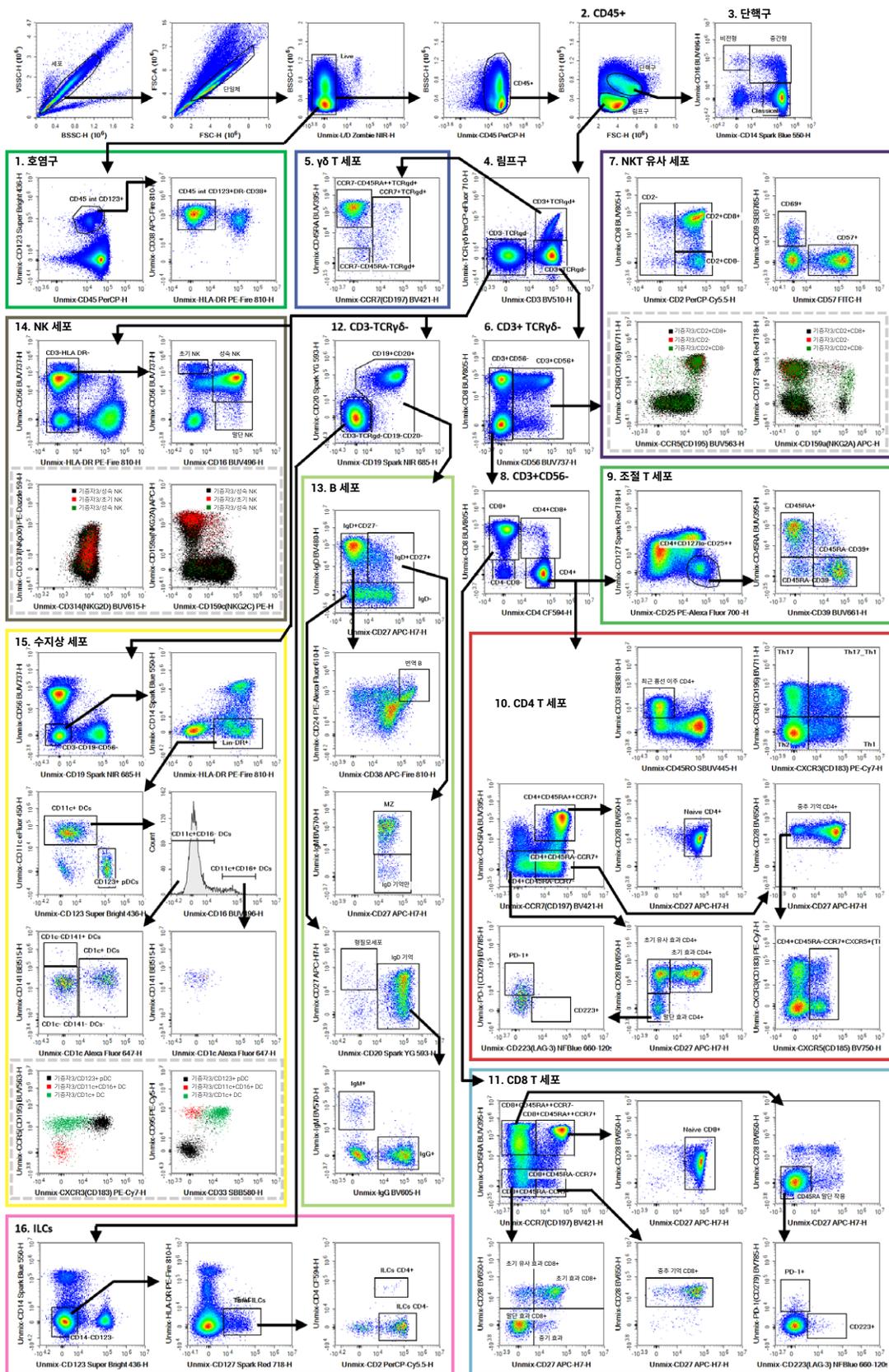


그림 6. 혈소판, 잔해물, 이중물(doublet), 사멸 세포를 제거한 후 정상적인 인간 PBMC 시료에서 특정 규명되는 세포 유형: 단핵구, 호염구, 자연살해 세포, 수지상 세포, 선천성 림프구 세포, B-, T-, NKT-유사, Treg 및 TCR $\gamma\delta$ 림프구. 또한 세포 분화, 세포 피로 또는 활성화 상태를 평가하기 위해 다른 마커가 포함되었습니다

결론

스펙트럼 유세포 분석법은 향상된 데이터 분해능 및 패널 설계 유연성을 통해 향상된 마커를 동시에 분석할 수 있는 기능을 제공합니다. 본 연구에 사용된 Agilent NovoCyte Opteon은 사용하기 편리한 Agilent NovoExpress 데이터 수집 및 분석 소프트웨어와 함께 이점을 제공합니다. 5가지 레이저(UV, V, B, Y, R)와 총 73개의 광 검출기를 갖춘 NovoCyte Opteon은 보다 세밀해지는 실험 패널의 요건을 충족하고 기존 유세포 분석법으로는 충족할 수 없었던 솔루션을 탐색하는 효율적인 워크플로를 제공합니다.

참고 문헌

1. Sen, P.; Kemppainen, E.; Oresic, M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Mol Biosci* **2017**, *4*:96.
2. Corkum, C.P.; Ings, D.P.; Burgess, C.; Karwowska, S.; Kroll, W.; Michalak, T.I. Immune Cell Subsets and Their Gene Expression Profiles From Human PBMC Isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and Standard Density Gradient. *BMC Immunol* **2015**, *16*:48.
3. Kleiveland, C.R. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. Edited by Verhoeckx K, Coter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. *Cham (CH)*; **2015**, 161–167.
4. Lozano-Ojalvo, D.; Lopez-Fandino, R.; Lopez-Exposito, I. PBMC-Derived T Cells. In: The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. Edited by Verhoeckx K, Coter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. *Cham (CH)*; **2015**, 169–180.
5. Morath, A.; Schamel, W.W. Alphabeta and Gammadelta T Cell Receptors: Similar but Different. *J Leukoc Biol* **2020**, *107*(6):1045–1055.
6. McBride, J.A.; Striker, R. Imbalance in the Game of T Cells: What Can the CD4/CD8 T-Cell Ratio Tell Us About HIV and Health? *PLoS Pathog* **2017**, *13*(11):e1006624.
7. Golubovskaya, V.; Wu, L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **2016**, *8*(3).
8. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **2008**, *133*(5):775–787.
9. Raphael, I.; Nalawade, S.; Eagar, T.N.; Forsthuber, T.G. T Cell Subsets and Their Signature Cytokines in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Cytokine* **2015**, *74*(1):5-17.
10. Pido-Lopez, J.; Imami, N.; Aspinall, R. Both Age and Gender Affect Thymic Output: More Recent Thymic Migrants in Females Than Males as They Age. *Clin Exp Immunol* **2001**, *125*(3):409–413.
11. Gatinoni, L.; Speiser, D.E.; Lichterfeld, M.; Bonini, C. T Memory Stem Cells in Health and Disease. *Nat Med* **2017**, *23*(1):18–27.
12. Li, H.; Tsokos, G.C. Double-Negative T Cells in Autoimmune Diseases. *Curr Opin Rheumatol* **2021**, *33*(2):163–172.
13. Desfrancois, J.; Moreau-Aubry, A.; Vignard, V.; Godet, Y.; Khammari, A.; Dreno, B.; Jotereau, F.; Gervois, N. Double Positive CD4CD8 Alphabeta T Cells: A New Tumor-Reactive Population in Human Melanomas. *PLoS One* **2010**, *5*(1):e8437.
14. Gonzalez-Mancera, M.S.; Bolanos, N.I.; Salamanca, M.; Orjuela, G.A.; Rodriguez, A.N.; Gonzalez, J.M. Percentages of CD4+CD8+ Double-Positive T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Adults from a Blood Bank in Bogota, Colombia. *Turk J Haematol* **2020**, *37*(1):36–41.
15. Kitchen, S.G.; Whitmire, J.K.; Jones, N.R.; Galic, Z.; Kitchen, C.M.; Ahmed, R.; Zack, J.A. The CD4 Molecule on CD8+ T Lymphocytes Directly Enhances the Immune Response to Viral and Cellular Antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*(10):3794–3799.
16. Santegoets, S.J.; Dijkgraaf, E.M.; Bataglia, A.; Beckhove, P.; Briten, C.M.; Gallimore, A.; Godkin, A.; Goutefangeas, C.; de Gruijl, T.D.; Koenen, H.J.; et al Monitoring Regulatory T Cells in Clinical Samples: Consensus on an Essential Marker Set and Gating Strategy for Regulatory T Cell Analysis by Flow Cytometry. *Cancer Immunol Immunother* **2015**, *64*(10):1271–1286.
17. Ouaguia, L.; Morales, O.; Mrizak, D.; Ghazal, K.; Boleslawski, E.; Auriault, C.; Pancre, V.; De Launoit, Y.; Conti, F.; Delhem, N. Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *ISRN Hepatol* **2013**, 2013:928485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4890904/>
18. Ouaguia, L.; Mrizak, D.; Renaud, S.; Morales, O.; Delhem, N. Control of the Inflammatory Response Mechanisms Mediated by Natural and Induced Regulatory T-Cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-Associated Cancers. *Mediators Inflamm* **2014**, 2014:564296.
19. Khan, M.A.; Khan, A. Role of NKT Cells during Viral Infection and the Development of NKT Cell-Based Nanovaccines. *Vaccines (Basel)* **2021**, *9*(9).

20. Poli, A.; Michel, T.; Theresine, M.; Andres, E.; Hentges, F.; Zimmer, J. CD56 Bright Natural Killer (NK) Cells: an Important NK Cell Subset. *Immunology* **2009**, *126*(4):458–465.
21. Melandri, D.; Zlatareva, I.; Chaleil, R.A.G.; Dart, R.J.; Chancellor, A.; Nussbaumer, O.; Polyakova, O.; Roberts, N.A.; Wesch, D.; Kabelitz, D.; et al. The $\gamma\delta$ TCR Combines Innate Immunity with Adaptive Immunity by Utilizing Spatially Distinct Regions for Agonist Selection and Antigen Responsiveness. *Nat Immunol* **2018**, *19*(12):1352–1365. <https://www.nature.com/articles/s41590-018-0253-5>
22. Yazdanifar, M.; Barbarito, G.; Bertaina, A.; Airoidi, I. Gammadelta T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy. *Cells* **2020**, *9*(5).
23. Lunt, S.Y.; Vander Heiden, M.G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2011**, *27*:441–464.
24. Pieper, K.; Grimbacher, B.; Eibel, H. B-Cell Biology and Development. *J Allergy Clin Immunol* **2013**, *131*(4): 959-971.
25. Jacquelot, N.; Seillet, C.; Vivier, E.; Belz, G.T. Innate Lymphoid Cells and Cancer. *Nat Immunol* **2022**, *23*(3):371–379.
26. Chung, D.C.; Jacquelot, N.; Ghaedi, M.; Warner, K.; Ohashi, P.S. Innate Lymphoid Cells: Role in Immune Regulation and Cancer. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*(9).
27. Sosa Cuevas, E.; Ouaguia, L.; Mouret, S.; Charles, J.; De Fraipont, F.; Manches, O.; Valladeau-Guilemond, J.; Bendriss-Vermare, N.; Chaperot, L.; Aspod, C. BDCA1(+) cDC2s, BDCA2(+) pDCs and BDCA3(+) cDC1s Reveal Distinct Pathophysiologic Features and Impact on Clinical Outcomes in Melanoma Patients. *Clin Transl Immunology* **2020**, *9*(11):e1190.
28. Ouaguia, L.; Leroy, V.; Dufeu-Duchesne, T.; Durantel, D.; Decaens, T.; Hubert, M.; Valladeau-Guilemond, J.; Bendriss-Vermare, N.; Chaperot, L.; Aspod, C. Circulating and Hepatic BDCA1+, BDCA2+, and BDCA3+ Dendritic Cells Are Differentially Subverted in Patients With Chronic HBV Infection. *Front Immunol* **2019**, *10*:112.
29. Cormican, S.; Griffin, M.D. Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Front Immunol* **2020**, *11*:1070.
30. Voskamp, A.L.; Prickett, S.R.; Mackay, F.; Rolland, J.M.; O'Hehir, R.E. MHC Class II Expression in Human Basophils: Induction and Lack of Functional Significance. *PLoS One* **2013**, *8*(12):e81777.
31. Park, L.M.; Lannigan, J.; Jaimes, M.C. OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytometry A* **2020**, *97*(10):1044-1051.
32. Shevchenko, Y.; Lurje, I.; Tacke, F.; Hammerich, L. Fluorochrome-Dependent Specific Changes in Spectral Profiles Using Different Compensation Beads or Primary Cells in Full Spectrum Cytometry. *Cytometry A* **2024**.

www.agilent.com/lifesciences/cellanalysis

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.
RA45406.3860069444

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
한국에서 발행, 2024년 5월 30일
5994-7397KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

