〈CALTAG사 신제품〉
CALTAG Counting beads

TaKaRa Code PCG-100 100회분

최근 절대 세포 수(Absolute cell counts)를 결정하는 기술이 소개 되어 다양한 분야에서 적용하고 있다. 임상에서 세포와 세포아형의 절대 수를 결정하려는 기술은 HIV 감염 환자에서 CD4 및 CD8을 발현하는 T-림파구 수를 측정하려는 시도와 골수 세포 자가이식을 준비하는 환자에서 CD34 양성 hematopoietic cell과 원구 세포의 수를 측정하고자 하는 시도에서 출발하였다. 절대 세포 수의 측정은 flow cytometry를 단독으로 이용하거나 flow cytometry와 haematology analyzer를 함께 사용하여 분석한다. Flow cytometry만을 이용하여 절대 세포 수를 측정하는 것을 흔히 "Single-platform technique"라 부르는데, 이 방법은 haematology analyzer를 함께 사용하는 방법보다 분석자에 따른 변동이 작아 보다 광범위하게 사용되고 있다.

서론

CALTAG Counting Beads는 Alberto Orfa 박사에 의하여 개발되었으며, 두 개의 다른 형광을 가지는 구슬을 함께 사용하여 immunophenotyping과 절대 세포 수 측정을 동시에 할 수 있도록 디자인 된 제품이다.

본 제품에 사용되는 두 개의 형광 구슬(A and B)은 혈액의 양을 계산하기 위한 내부 표준자 역할을 하며, Lysis-no-wash 방법으로 염색된 혈액의 일정량에 Caltag Counting Beads 일정량을 첨가하여, 형광 구슬과 세포를 함께 분석할 수 있다. 형광 구슬의 농도는 일반적으로 제조사에서 정보를 제공하며 더해진 형광 구슬의 수와 세포 수를 비교하여 형광구슬 일정량에 존재하는 세포 수를 계산할 수 있다. 세포 수는 일정 부피 단위에 존재하는 형광구슬의 숫자를 곱하여 절대 세포 수로 계산된다.

본 제품은 두 가지의 다른 형광 구슬을 일정 비율로 제공하기 때문에 두 개의 구슬 비율을 확인하여 분석의 정확성을 보장할 수 있다. 최종 절대 세포 수의 계산은 아래의 수식을 통하여 도식화 할 수 있다.

최종 절대 세포 수 =
(측정된 세포 수/측정된 형광 구슬의 합) X 형광 구슬의 수/㎕

형광 구슬 A와 B는 동일한 시료에서 분석하기 위하여 독특한 특징을 가지도록 설계되었다. 형광 구슬 A는 6.4 ㎛로, flow cytometry를 이용하여 FSC(Forward scatter)와 SSC(Side scatter)로 분석할 경우 낮은 FSC와 그보다 다소 더 낮은 SSC 값을 보인다.

형광 구슬 A는 argon laser를 이용하여 488 nm 파장으로 조사하였을 경우 흥분상태로 전이 되고 넓은 파장의 빛을 방출한다. 반면 Red diode laser에 의해 조사되는 635 nm 파장에서는 형광을 방출 하지 않는다. 형광구슬 B는 6.36 ㎛로, 낮은 FSC 값과 그 보다 상대적으로 더 낮은 SSC 값을 나타낸다.

형광구슬 B는 argon laser를 사용한 488 파장으로 조사할 경우 흥분상태로 전이되어 형광구슬 A보다 높은 형광값을 나타낸다. 형광구슬 B는 A와 다르게 Red laser에 의해 흥분상태로 전이될 수 있고 형광을 방출하게 된다.

Lysing reagent 종류를 달리 사용하거나 항체 부피를 달리하는 등 실험적 변형이 있어도 CALTAG Counting Beads 사용이 가능하다. 그러나 혈액과 형광 구슬을 분주하는 단계에 있어서 고도의 정확성을 필요로 한다. 따라서 CALTAG Counting Beads를 사용할 경우 Pipette Tip에 여분의 혈액과 형광 구슬이 남아 있지 않도록 주의해야 한다.

- 분석되는 세포는 면역형광염색으로 염색된 세포에 한한다.
- Pipette을 정확하게 사용하여야 결과의 정밀도가 증가한다.
- Threshold는 염색된 세포와 두 종류의 형광구슬을 포함하도록 조절하여야 한다.
- 분석의 신뢰성을 위한 최소 분석 형광구슬 수는 1,000개 이다.

특징

1. CALTAG Counting Beads는 두 개의 형광 구슬로 구성된 내부 표준자를 가지며 flow cytometry을 사용하여 absolute cell count를 분석할 수 있도록 고안되었다. 두 가지 형광 구슬의 비율을 확인함으로써 분석의 정확성을 평가할 수 있다.
2. 두 가지 형광 구슬의 군집과 양성 염색된 세포를 FSC/SSC를 기준으로 확인할 경우 SSC 조절이 별도로 필요하지 않아 편리하다.
3. 형광 구슬의 수와 농도, 형광 구슬 간의 비율 및 안정성에 대한 엄격한 품질관리를 통하여 생산된다.
4. 형광 구슬은 BSA를 포함하는 수용액에 부유 상태로 존재하기 때문에 튜브 벽면에 고착되거나 침전되지 않는다.

실험방법

A. 시료의 준비

1. D.W.(1㎕ Distilled water = 1mg)를 사용하여 Pipette을 보정한다. 일반적으로 신선한 시료일수록 좋으며 시료 채취 후 48시간 내에 분석을 완료한다. 얼려진 시료는 분석에 적당하지 않으며 시료 혼합 시 vortex 등을 통한 과격한 혼합을 피한다.
2. 시료를 채취하는 과정에서 파이펫을 사용할 때 정확성과 정밀도를 높이기 위하여 반복적으로 파이펫을 밀어내어 tip 끝에 시료가 남지 안도록 주의하면서 각각의 튜브에 혈액 100 ㎕를 분주한다.
3. 각각의 튜브에 염색하고자 하는 항체용액을 첨가한다. 조심스럽게 섞어 주고 암실에서 10분간 방치한다. Cal-Lyse™ lysing solution을 각각

의 튜브에 100 ㎕씩 첨가하고 vortex 한다. 10 분간 암실에서 방치하고 상온의 D.W.를 1 ml을 첨가하고 상온에서 5분 동안 방치한다.

4. CALTAG Counting Beads를 30-45 초간 조심스럽게 섞어주고(vortex 사용금지) 시료를 분주할 때 사용하던 동일한 파이펫을 사용하여 각각의 튜브에 100 ㎕씩 첨가한다.
5. Flow cytometry 분석 직전에 parafilm으로 튜브를 덮어 30 초간 충분히 섞어준다.

B. Flow cytometry setup

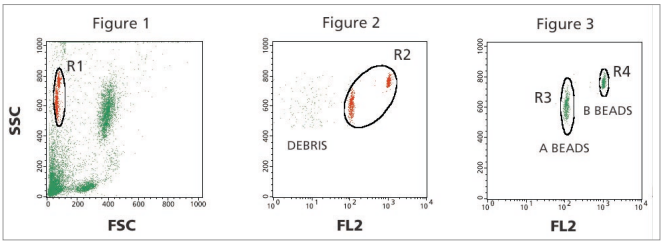
1. Flow cytometry 제조사의 염색에 사용된 항체의 형광에 따라 flow cytometry를 setup 한다. 항체가 첨가되지 않은 시료를 flow cytometry에 연결하여 FSC threshold를 조절한다. 형광 구슬은 부가적인 FSC 및 SSC detector의 조절 없이 관찰된다. CALTAG Counting Bead는 형광 channel 뿐만 아니라 FSC/SSC dot plot에서도 관찰이 가능하다.
2. FSC/SSC dot plot에서 백혈구와 형광 구슬 군집을 포함하도록 region을 그려 넣어 선택한다.

C. Acquisition of data

1. 신뢰성 있는 결과를 얻기 위하여 최소 1,000 개의 형광구슬을 포획하고, 동시에 일정 수의 세포를 함께 포획(Acquisition)한다.

D. Analysis of results

1. 형광구슬 비율분석
   - FSC/SSC dot plot 상에서 형광구슬을 포함한 gate를 설정한다(Figure 1).
   - FL2/SSC dot plot 상에서 Region 1을 나타낸다. 형광구슬 분석에 염색된 세포가 방해될 경우 다른 Channel을 사용한다. Debris를 포함하지 않는 형광구슬을 선택하기위한 새로운 Region 2 설정한다(Figure 2)
   - 새로운 FL2/SSC dot plot 상에 Region 2를 나타내고 형광구슬을 구분하여 새로운 Region 3 와 Region 4를 설정한다(Figure 3)
   - Gate 내에 존재하는 형광구슬의 비율을 Gate statistics table을 이용하여 확인한다.
   - 이후 계산을 위하여 전체 형광구슬의 수를 기록한다.



2. 분석하고자 하는 세포군집을 포함하는 Region을 설정한다.
   - 설정된 Gating Region내에 존재하는 세포의 숫자를 기록한다.
3. Gate 내에 존재하는 절대 세포 수를 계산한다.
   - 아래의 수식을 이용하여 관심 있는 절대 세포 수를 계산한다.

절대 수(Absolute Count, cells/㎕)
=포집된 세포수/포집된 전체 형광구슬 수 × CALTAG Counting Bead의 수/㎕

일반적인 분석데이터

분석치 및 범위는 일반적으로 표시되며 Lot Number에 따라 동일하다.

Proportion of beads type A/type B with respect to	A: 52.33% ± 1.00
Total number of bead	B: 47.67% ± 1.00
Acceptable RNNGE of this proportion	A: 47.33% - 57.33% B: 42.67% - 52.67%
Number of CALTAG Counting Beads per ㎕	1027±

관련제품

Cal-Lyse™ Lysing Solution:

TaKaRa Code: GAS-010	25ml	250 회
TaKaRa Code: GAS-010s	100ml	1,000 회

CALTAG LABORATORIES

CALTAG Antibody Launching 기념
30% 할인 행사에 여러분을 초대합니다.

기간 : ~2005년 3월 31일
품목 : CALTAG Laboratories사 전 제품

고품질(동일 Clone)! 저렴한 가격!!
더 이상 비싼 제품을 사용할 필요가 있습니까?