



Kaluzaにおける高度なプロットの使用 比較プロットを使用したTCR V β レパトワの可視化

目的

このアプリケーションノートでは、折れ線グラフまたは棒グラフで複数のデータセットを比較するツールとして比較プロット (Comparison Plot) を紹介します。比較プロットを使用してTCR V β レパトワの発現を視覚化する方法とKaluza Analysis ソフトウェアを使用して比較プロットを作成する方法を紹介します。

LMD間のフローサイトメトリーデータの比較

多くの場合、異なる時点または細胞培養条件などの異なるサンプルの結果を比較することにより、有意な洞察が生まれます。ヒストグラムプロットとドットプロットのオーバーレイは、この種のデータの視覚化に役立ち (図1)、ほとんどのフローサイトメトリーソフトウェアで利用できます。

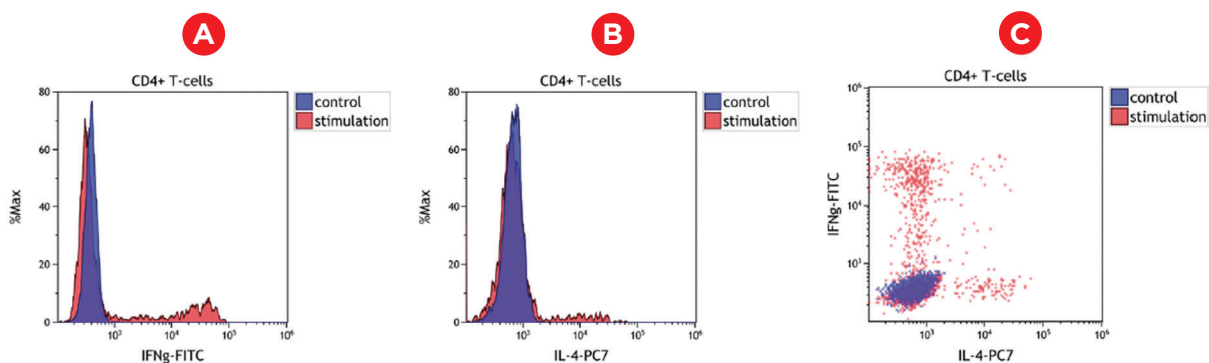


図1: 非刺激 (コントロール、青) と刺激 (赤) のCD4+ T細胞の比較。DURActive (PN: C11101) を使用して正常な全血サンプルを活性化し、添付文書に従ってDuraClone IF Tヘルパー細胞チューブ (PN: C04666) で染色しました。AおよびBは、それぞれIFN γ およびIL-4のヒストグラムオーバーレイを示しています。図Cは、IFN γ とIL-4のドットプロットオーバーレイを示しています (プロットは説明のみを目的としています)。

ただし、高度な統計解析および細胞頻度とマーカー発現量の比較を実行するには、統計結果のエクスポートと、表計算プログラムまたは統計ソフトウェアでのデータ分析が必要になることがよくあります。比較プロットを使用すると、ユーザーはデータセットと母集団全体で特定の統計を比較でき、フローサイトメトリーデータの分析に使用されるソフトウェアで折れ線グラフや棒グラフを直接視覚化できるため、ワークフローが合理化されます (図2)。

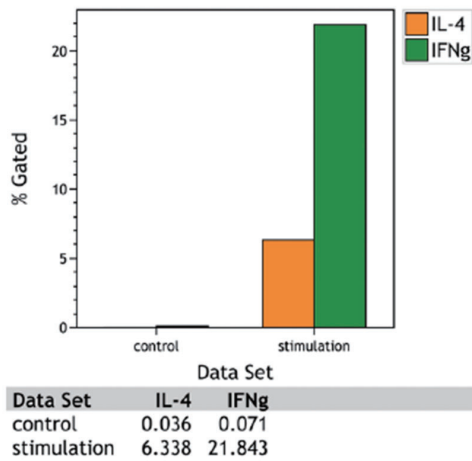


図2: コントロールサンプルと刺激サンプル中のCD4+ T細胞を発現するIL-4およびIFN γ の比較プロット棒グラフ。添付文書に従って、DURActive 1 (PN: C11101) を使用して正常な全血サンプルを活性化し、DuraClone IF Tヘルパー細胞チューブ (PN: C04666) で染色しました (プロットは説明のみを目的としています)。

T細胞TCR Vbeta レパトワのフローサイトメトリー測定

TCRレパートリーの分析は、免疫システムをより理解するために非常に価値があります。

フローサイトメトリーは、複数のT細胞サブセットにおける比例したTCR V β を細胞ごとに迅速に測定します。細胞をソーティングする必要はありません。IOTest Beta Mark TCR V β Repertoire Kit (IM3497) は、正常なヒトTCR V β レパートリーの約70%をカバーする24種類のTCR V β を評価できます。これは、レパートリーの多様性を映し出し、T細胞全体または特定のサブセット間の各TCR V β のパーセンテージ、および特定のクローンの潜在的な拡大の可視化を提供します。

V β の特異性を相互に排他的な組み合わせでグループ化できるという事実を利用して、3つのモノクローナル抗体と2つの蛍光色素のみを組み合わせた革新的な染色戦略を使用すると、1つのチューブで3つのV β 発現を検出できます。これまで、TCR V β 鎖を発現するT細胞の割合は、フローサイトメトリー分析ソフトウェアを使用して決定され、表計算プログラムに転送されて、いわゆるクロノグラムとして分布を視覚化していました。

Kaluzaの比較プロットを使用すると、別ソフトウェアにデータをエクスポートする必要なく、表計算のクロノグラムと同等の視覚化を実現できます (図3)。

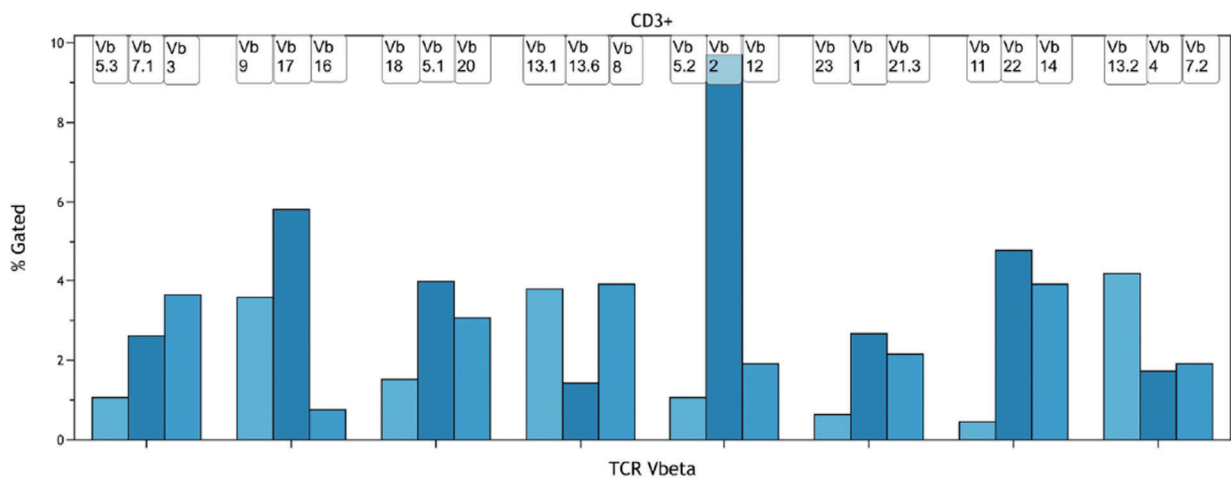


図3: CD3+ T細胞のTCRV β レパートリークロノグラム表示。正常な全血サンプルを、添付文書に従ってIOTest Beta Mark TCR V β Repertoire Kit (PN: IM3497) で染色しました (プロットは説明のみを目的としています)。

比較プロットを使用したTCR Vβクロノグラムの作成

8本のチューブでBeta Mark TCR Vβ Repertoire Kitを使用してサンプルを染色し、フローサイトメーターでデータを取得します。詳細なプロトコルと方法論についてはキットの使用説明書を参照してください。

結果として得られた8つのデータファイルをKaluzzaにロードし、分析するT細胞サブセット解析用コンポジットを作成します。CD3+ T細胞の解析例を図4に示します。Kaluzzaでプロットとゲートを作成する方法の詳細な手順については、Kaluzza IFU (PN:C10986)を参照してください。

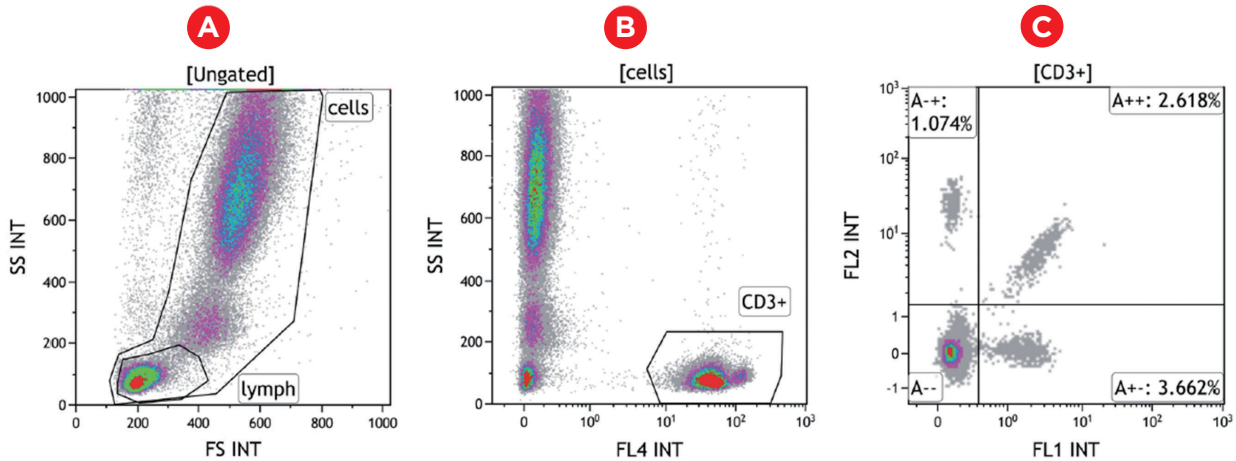


図4: データ解析例。Aで側方散乱および前方散乱を使用して白血球をゲートし、Bに展開します。BではCD3を使用してT細胞をゲートし、Cに展開します。Cでは各チューブの3つのTCR Vβがドットプロットで表示され、FITCとPEの両方に結合したTCR Vβがダブルポジティブのエリアに表示されます。添付文書に従って、正常な全血サンプルをIOTest Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (PN:IM3497)で染色しました(プロットは説明のみを目的としています)。

1. 新しく作成されたゲーティングストラテジーを含むプロトコルを、ドラッグ&ドロップを使用して、残りの7つのプロトコルファイルにコピーします。これにより、すべてのデータセットですべてのゲートとリージョンが同じ名前を持つようになります。これは、後の作業における視覚化にとって重要です。
2. 8つのファイルすべてのコンポジットを作成します。ナビゲートしやすくするために、1つのプロットシート上にすべてのサンプルに対して生成されたプロットをカット&ペーストすることも可能です。
3. オプション:T細胞サブセットを識別するために使用されるゲートのリンク。これにより、1つのデータセットのゲートに加えられた変更がほかのすべてのデータセットに適用されます。ゲートをリンクするには、マウスをゲートの上に置き、右クリックして「ラジアルメニュー」にアクセスし、「Data (データ)」メニューに移動します。「Link To Gates (リンクゲート)」を選択します。リンクに適用できるゲートのリストを含むポップアップウィンドウが表示されます。現在のゲートにリンクするゲートを選択します。
4. 新しい比較プロットを作成し、Y軸を% gatedに切り替えます。「Add series (シリーズの追加)」を選択し、ドロップダウンメニューから四分割リージョンの目的のリージョン名とパラメータ名を順に選択することにより、Vβ鎖発現細胞を識別するリージョンをシリーズに追加します。

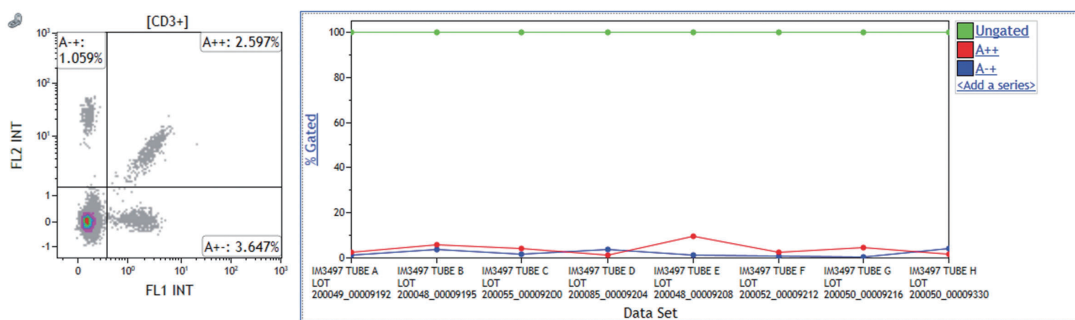


図5: 比較プロットの設定。左のDensityプロットは、Vβ鎖発現細胞の同定のために四分割リージョンを使用して表示しています。右の比較プロットには3つのデータ系列が含まれています。A++およびA+-はすでに適切に割り当てられています。添付文書の指示に従って、通常の全血サンプルをIOTest Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (PN:IM3497)で染色しました(プロットは説明のみを目的としています)。

5. 比較プロット上で右クリックし、ラジアルメニューの「Display (表示)」オプションを選択して、比較プロットを棒グラフに切り替えます。

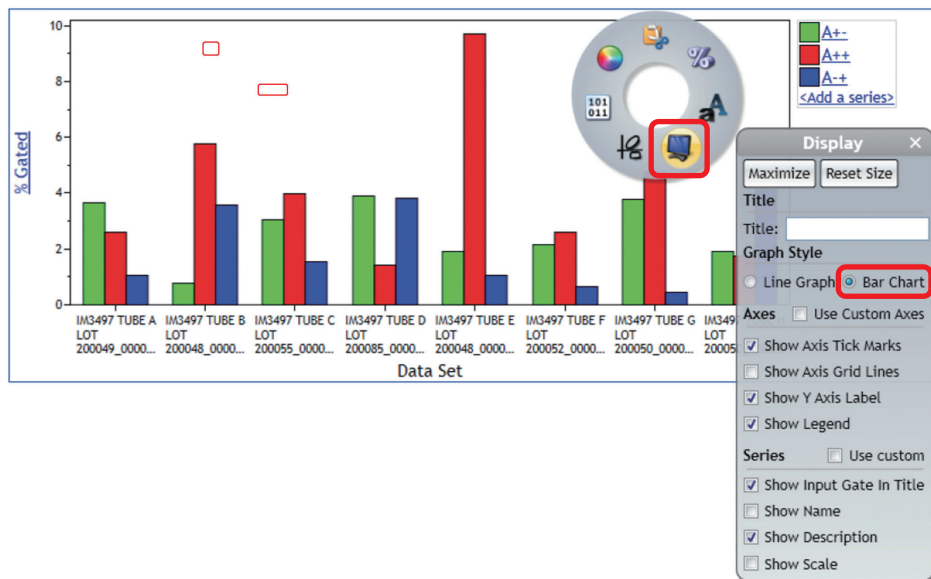


図6: 比較プロットの表示設定。添付文書に従い、通常の全血サンプルをIO Test Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (PN:IM3497) で染色しました (プロットは説明のみを目的としています)。

6. ラベルと色を変更します。図3と同様の表示を行うには、次の調整を行います。

- a. ラジアルメニューの「Color (カラー)」にアクセスして、バーの色を変更します。カラーリングは1番目、2番目、3番目の順に割り当てられ、すべてのデータセットで同じになります。(ゲート名が同じ場合)
- b. ラジアルメニューの「Display (表示)」にアクセスして、「Show Legend (レジェンドの表示)」のチェックを外し、プロットの凡例を削除します。
- c. ラジアルメニューの「Display (表示)」にアクセスし、Vβチェーンがゲートされた母集団 (ゲート名) をタイトルに入力します。
- d. ラジアルメニューの「Display」にアクセスし、「Use Custom (項目軸の編集)」オプションを選択します。X軸にタイトルとしてTCR Vbetaを入力できます。

7. バーに対応するTCRVβチェーンでラベルを付けるには、ラジアルメニューから、「Gate&Tools (ゲート&ツール)」メニューを選択します。「Annotation (注釈)」を選択します。マウスをクリックしてプロット上にドラッグし、テキストボックスを作成します。ボックスが希望のサイズになったら、マウスボタンを離します。テキストボックスを右クリックして、ラジアルメニューの「Data (データ)」にアクセスします。データフィールド内をクリックして注釈テキストを入力します。この場合、特定の四分割リージョンで検出されたTCR Vβ鎖です。対応するバーの上にテキストボックスを移動します。すべてのバーについて繰り返します。

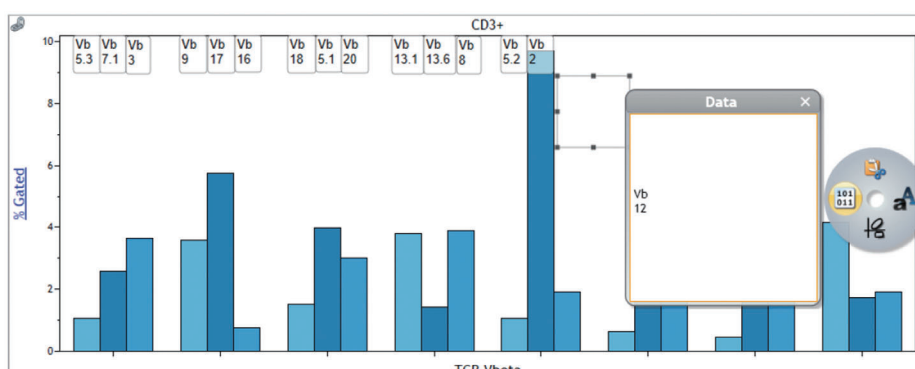


図7: 「Annotation (注釈)」機能を使用したバーラベルの追加。添付文書に従って、正常な全血サンプルをIO Test Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (PN:IM3497) で染色しました (プロットは説明のみを目的としています)。

8. Y軸のスケールを制御する場合は、ラジアルメニューにアクセスし、「Data (データ)」を選択します。「Manual Y Axis Scale (Y軸スケール設定)」にチェックを入れ、必要な最小値と最大値を入力します。

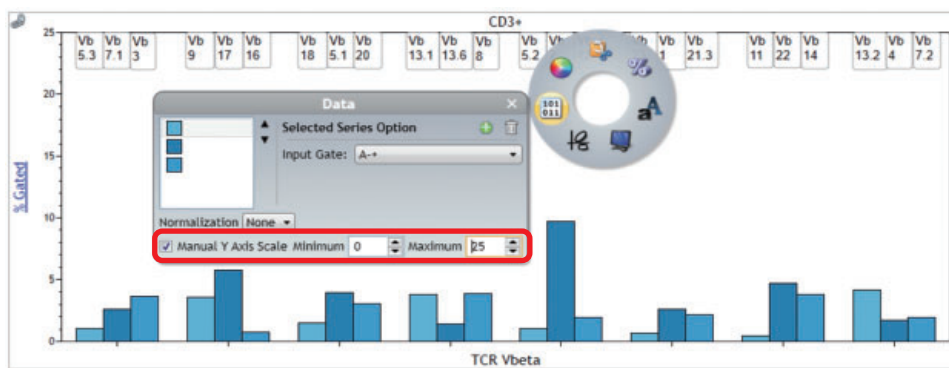


図 8: 比較プロットのマニュアルYスケール調整。添付文書に従って、正常な全血サンプルをIOtest Beta Mark TCR V β Repertoire Kit (PN:IM3497) で染色しました (プロットは説明のみを目的としています)。

概要

Kaluza 比較プロットは、データセットと入力母集団間の発現量の違いを視覚化します。フローサイトメトリーデータ分析を折れ線グラフと棒グラフで表示できるため、ワークフローが合理化され、データのエクスポートやほかのソフトウェアへの転送が不要になります。

参考文献

1. van der Geest KSM, Abdulahad WH, Horst G, et al. Quantifying Distribution of Flow Cytometric TCR-V β Usage with Economic Statistics. Turner SJ, ed. PLoS ONE. 2015;10(4):e0125373. doi:10.1371/journal.pone.0125373

Beckman CoulterおよびBeckman Coulterロゴは、Beckman Coulter, Inc.の登録商標です。

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 FAX 03-5530-2460
e-mail bckkas@beckman.com URL <https://www.beckmancoulter.co.jp>