

# 유세포분석법에 의한 마우스 흉선세포에서의 세포표면의 CD4와 CD8 및 세포형질내 CD3항원 발현의 동시측정법

이화여자대학 의과대학 내과학교실, 의과학연구소 면역학부

조 영 주

= Abstract =

## Simultaneous Detection of Intracytoplasmic CD3 $\epsilon$ and Surface CD4 and CD8 Expression by Murine Thymocyte by Flow Cytometry

Young Joo Cho

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Ewha Womans University  
Division of Immunology, Ewha Medical Research Center*

T-lymphocytes regulate the expression of a number of surface antigens such as CD4, CD8 and T cell receptor/CD3 complex, during their intrathymic development. The appearance of surface CD3 is heralded by cytoplasmic CD3 expression in T cell precursors. Thus early T cell progenitors may be distinguished by the presence of cytoplasmic CD3 in the absence of surface CD3. In this study, I described a technique for the simultaneous detection of intracytoplasmic CD3 and other surface antigens, CD4 and CD8 in the cells permeabilization by NP-40 following formaldehyde fixation. The technique results in no shift in the light scatter property and no changes in the expression of surface antigens. The present technique permitted the detection of cytoplasmic CD3 $\epsilon$  and may prove useful in studying the expression of several cytoplasmic and surface antigens during early T cell development.

## 서 론

세포표면 및 세포내 항원을 동시에 측정하기 위한 방법에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔으며, 그중 세포표면에 발현되는 항원의 발현에는 유세포분석기(Flow cytometry)가, 세포내 항원의 감지에 대하여서는 면역조직화학(Immunohistochemistry) 법이 주로 이용되고 있다<sup>1-3)</sup>. 하지만 최근에는 세포내 항원의 검출에도 유세포분석

기를 사용하는 방법들이 개발되고 있으며 이를 위하여서는 세포들은 aldehyde, alcohol 혹은 ketone 등으로 고정시켜 세포의 구조를 안정화시키고, 목적하는 항원에 대한 항체가 세포내로 침투할 수 있게 세정제(detergent)를 사용하여야 되는 것으로 알려져 있다<sup>4,9)</sup>. 그러나 이러한 원칙에 입각한 많은 방법들이 특정한 세포의 종류, 항원의 특성 혹은 항체에 대하여서는 부적합한 것으로 알려져 있으며, 더 나아가서 세포의 구조를 잘 유지하여 세포표면의 항체와 동시에 측정하기 위하여서는 각각의 세포의 중

류에 따른 적절한 방법을 확립하여 적용해야 하겠다. 특히 세포의 크기 및 과립도를 기준으로 특정한 세포의 종류를 분리하여 분석하게되는 유세포분석의 경우 세포의 구조적 변화를 최소로 할 수 있는 고정이나 투과과정법은 매우 중요한 과정이라 하겠다.

T림프구는 흉선내에서의 발달과정중 CD4, CD8, CD5와 T세포수용체복합체(T cell receptor: TCR/CD3 complex)를 세포표면에 발현하게 된다. 즉 각각 합성된 CD3와 TCR는 Golgi에서 조립되어 세포형질에서 표면으로 이동되게 되며 분화과정이 진행될 수록 세포표면에 CD3를 발현하게 되며 이러한 과정은 전구 T세포에서 세포형질내 CD3의 발현이 선행되어야 한다. 따라서 초기단계의 T세포 전구체의 경우 세포내 CD3는 있으나 세포표면의 CD3는 없는것으로 구분 될 수 있겠다<sup>10,13</sup>.

본 논문에서는 formaldehyde로 고정 후 NP-40으로 세포의 투과성을 높이는 방법을 사용하여 세포표면의 CD3와 세포내 CD3를 동시에 측정하여 세포표면 및 세포형질내 세포의 항원의 발현법을 확립하고자 하였으며 이는 앞으로 T세포의 분화 및 발달과정에서의 다른 항원들의 세포표면 및 세포내 발현에 대한 연구에 도움을 주고 더 나아가 면역계 세포들의 여러 항원들의 발현과정 및 발달과정의 연구에 유용하게 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 방 법

### 1. 실험동물

실험동물로는 5~6주된 C57BL/6(B6) 숫놈의 마우스를 사용하였다.

### 2. 시 약

염색완충액은 1%의 BSA와 0.1%의 sodium azide를 첨가한 PBS(Sigma, 미국)용액으로 하였다. CD3의 측정을 위하여서는 FITC가 접합된 145-2C11 monoclonal antibody를 생산하는 hybridoma를 American type culture collection(Rockville, 미국)에서 구입하여 생산된 항체의 F(ab')<sub>2</sub> fragments를 protein G를 이용하여 affinity chromatography로 정제 및 투과과정을 거친 후 FITC로 접합시켜서 사용하였다.

그이외의 CD8, CD4 항원의 측정은 Becton Dickinson사(미국)의 biotin 혹은 cyanine이 접합된 mono-

clonal antibody를 사용하였다.

### 3. 흉선세포

마우스의 흉선에서 세포를 얻는 방법은 Ballas등의 방법으로 분리하였다<sup>14</sup>.

간단히 보면, 마우스를 경추골절방법으로 희생시킨 후의 외과적으로 흉선을 적출하여 RPMI 1640로 세척하였으며 다음 세포분쇄기로 분쇄 후 낮은 속도로(800RPM) 10초간 원심분리하여 상층의 세포 현탁액을 15ml의 원심관에 옮겨 시험관 아래에 고여 있는 세포debris를 제거하여 얻었다.

### 4. 세포표면항원의 3색 염색

모든 반응은 microtiter wells(10<sup>6</sup>cells/well)에서 시행되었다. 세포들을 염색완충액으로 세정 후 50ul의 biotin-labelled anti-NK1.1 antibody와 FITC-anti-2C11 antibody 혹은, FITC B76 antibody를 넣은후 상온에서 15분간 incubation하였다. 2회 완충액으로 세정 후 phycoerythrin(PE)-streptavidine(Biomedica Corp. 미국)와 cyanine 5.18이 접합된 항체를 넣고 15분간 incubation 한 후 2회 세정하였다.

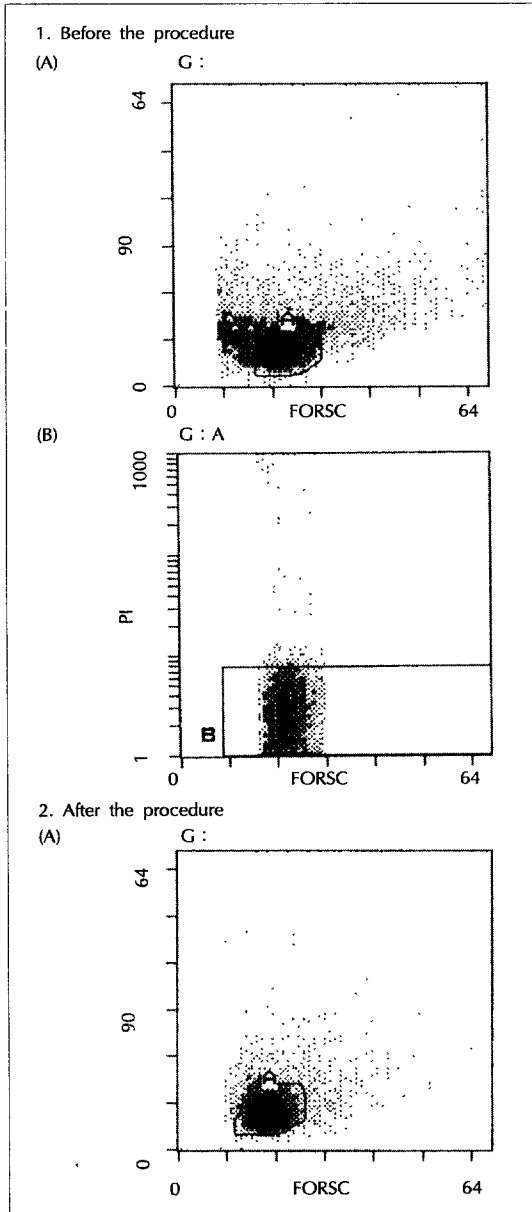
### 5. 세포표면 및 세포형질내의 항원의 동시 염색

세포형질내 항원의 검출을 위하여서는 Levelt등의 방법을 변형하여 시행하였다<sup>15</sup>. 즉 FITC가 접합된 항체를 사용하였고 세포표면의 항원은 biotin-PE, cyanine 5.18이 접합된 항체를 사용하였다.

세포형질내 항원의 동시 검출을 위하여 먼저 FITC항체를 첨가하는 것 만 제외하고는 위의 방법대로 세포표면의 항원에 대한 염색을 하였다. 세포표면의 염색이 끝난 후 세포들을 formaldehyde(Sigma, 미국)(3.7% in PBS)로 5 분간 상온에서 고정한 후 2회 세척하였다. 다음 세포의 투과성을 높이기 위하여 0.01%의 N-P40(Sigma)로 5분간 상온에서 처리 한 후 2회 세척하였다. 다음 FITC-anti-CD3 mAb(2C11) 50ul를 넣고 30분간 incubation하였다.

### 6. 유세포분석기에 의한 분석

유세포분석기에 의한 삼색분석은 Becton-Dickinson(미국)사의 FACS440기계를 사용하였으며, argon-ion laser 및 두번째 argon laser에 의하여 유출되는 rhodamine 6G dye-headed laser가 장착되어 있었다. 1회의



**Fig. 1.** The Effect of the fixation and permeabilization procedure on the cell morphology(size in FSC and granularity in SSC). There is no shift in lighter scatter signals except the diappearance of dead cells by the procedure. Most of cells which is gated by cell size were alive presented by propidium iodide(PI) staining before the procedure. Horizontal axis represent forward scatter, while vertical axis represent 90 degree side scatter(A, C) or PI intensity(B).

분석에 세포의 수는 20000개의 세포를 분석하였다.

## 7. 통계처리

실험기법의 재연성을 확인하기 위하여 모든 실험은 11~12회씩 반복하였으며, 위의 과정에 따른 양성세포의 percentage를  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였고, paired t-test로 Macintosh의 statview program으로 통계처리 하였다.

## 결 과

### 1. 세포의 고정 및 투과 과정 후의 세포의 형태 및 세포표면 항원의 변화

세포들을 고정 및 투과성증대 과정을 거친후 세포내 항원의 염색을 한 경우와 이러한 과정 없이 세포표면의 항원만을 염색하였을때 유세포분석기상 forward scatter(FSC)에서 나타나는 세포의 크기 및 side scatter(SSC)에서 나타나는 세포의 과립성에 차이 없이 거의 같은 위치에서 세포가 감지되었다. 그러나 죽은 세포들이 위치하고 있는 FSC상 낮은 channel의 세포들이 고정 및 투과의 과정을 거치면서 소실되는 양상을 보였다 (Fig. 1).

세포표면항원을 먼저 염색하고 고정 및 투과과정을 한 경우와 그렇지 않은 경우를 비교 한결과 CD4, CD8모두 양성인 세포(double positive cells : DP)의 분포는 이러한 과정 전 후가 각각  $83.5 \pm 3.2\%$ ,  $85.2 \pm 2.5\%$ , CD8만 양성인세포가 각각  $6.2 \pm 1.3\%$ ,  $6.1 \pm 1.0\%$ , CD4만 양성인 경우가  $7.6 \pm 1.2\%$ ,  $7.1 \pm 1.3\%$  모두음성인 세포가  $2.4 \pm 0.3\%$ ,  $1.6 \pm 0.1\%$ 로 유의한 변화없이 분석되었다 (Table 1, Fig. 2).

**Table 1.** The percentage of CD4 and CD8 positive cells before and after the procedure of fixing and permeabilization

	Before	After
CD4+, CD8+(DP)	$83.5 \pm 3.2\%$	$85.2 \pm 2.5\%$
D4+SP	$6.2 \pm 1.3\%$	$6.1 \pm 1.0\%$
D8+SP	$7.6 \pm 1.2\%$	$7.1 \pm 1.3\%$
D4 -, CD8 - (DN)	$2.4 \pm 0.3\%$	$1.6 \pm 0.1\%$

DP : Double Positive cells  
P : Single Positive cells  
N : Double negative cells

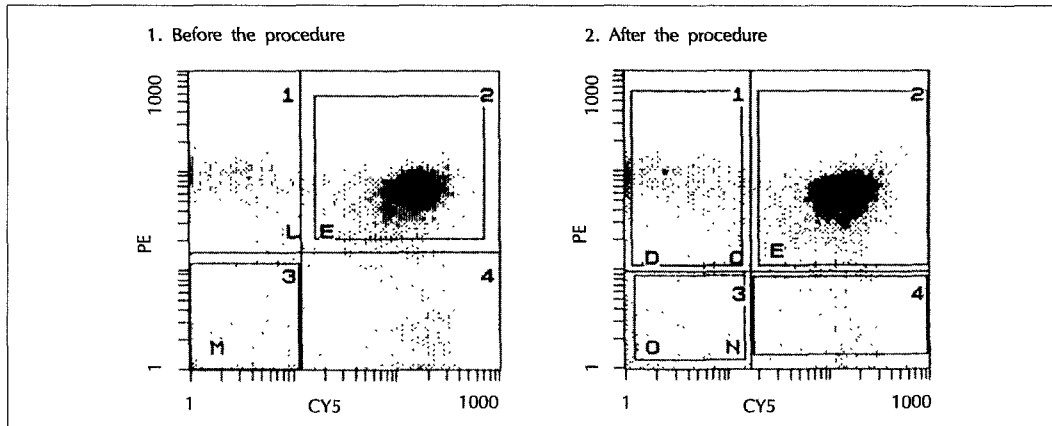


Fig. 2. The effect of fixation and permeabilization procedure on the the expression of surface antigen, CD4 and CD8. There was no significant changes by present procedure. Horizontal axis represent the fluoescenc intensity of PE-conjugated anti-CD4 antibody, while vertical axis represent the fluorescence of cyanine conjugated anti-CD8 antibody. The cell in area 4 indicate CD4 and CD8 double positive cells.

### 2. 세포형질내 및 세포표면의 CD3 $\epsilon$ 의 발현

세포표면의 CD3 $\epsilon$ 은 mouse의 흉선세포의  $17.0 \pm 1.5\%$ 에서 양성을 보였다. 이에 반하여 세포의 고정 및 투과 과정 후 염색한 경우에는  $88.2 \pm 5.2\%$ 에서 양성반응을 보였다. 이에 대한 negative control로서 B세포에만 나타나는 면역글로불린의 항체인 B76항체를 이용하여 염색하였는데 이에겐 전혀 양성인 세포가 없었다.

### 3. Paraformaldehyde와 saponine을 이용한 경우와의 비교

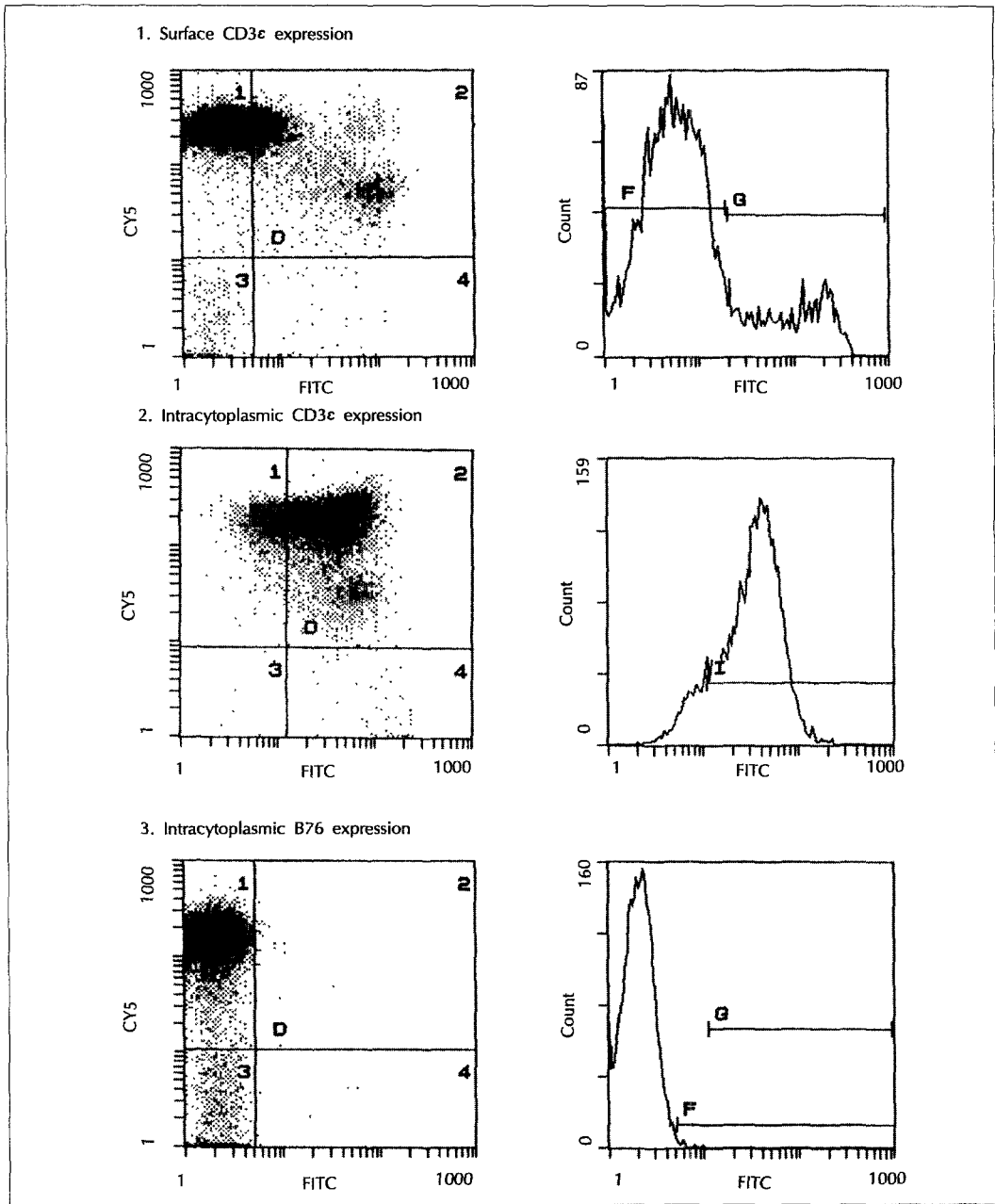
고정액으로 paraformaldehyde를, 투과제로 saponine을 사용하여 같은 방법으로 표면 CD3 및 세포내 CD3를 측정하였는데 세포표면의 항원에는 두방법에서 유의한 차이는 없었으며, 세포내 CD3는 paraformaldehyde와 saponine을 사용한 경우  $90.0 \pm 8.1\%$ , 위의 방법으로는  $88.2 \pm 5.2\%$ 로 전자의 경우 fluorescence intensity의 전체적인 오른쪽으로의 이동이 있었으며, 양성세포의 percentage에는 유의한 차이는 없었다.

## 고 찰

세포내 항원의 검출을 위하여서는 조직을 formaldehyde, paraformaldehyde, ethanol등으로 고정 후 NP-40, Tween 20, saponine등의 detergent를 이용하여 세포막의 투과성을 높인 후 염색을 하는 면역조직화학적 방

법을 이용해 왔다<sup>1-3)</sup>. 최근에는 조직이 아닌 부유세포에서 세포내 항원의 검출을 조직에서와 같은 방법을 적용하여 유세포 분석기로 검출하는 법이 개발되고 있다<sup>4,6)</sup>. 특히 부유상태로 있는 세포내 항원의 검출법은 세포의 표면의 항원을 동시에 염색하여 multiparameter로 분석을 할 수 있으므로 세포의 종류별, 특성별 세포내 항원의 발현을 연구 할 수가 있어서 특히 면역학에 관련된 다양한 연구에 응용될 수 있겠다<sup>5,16)</sup>.

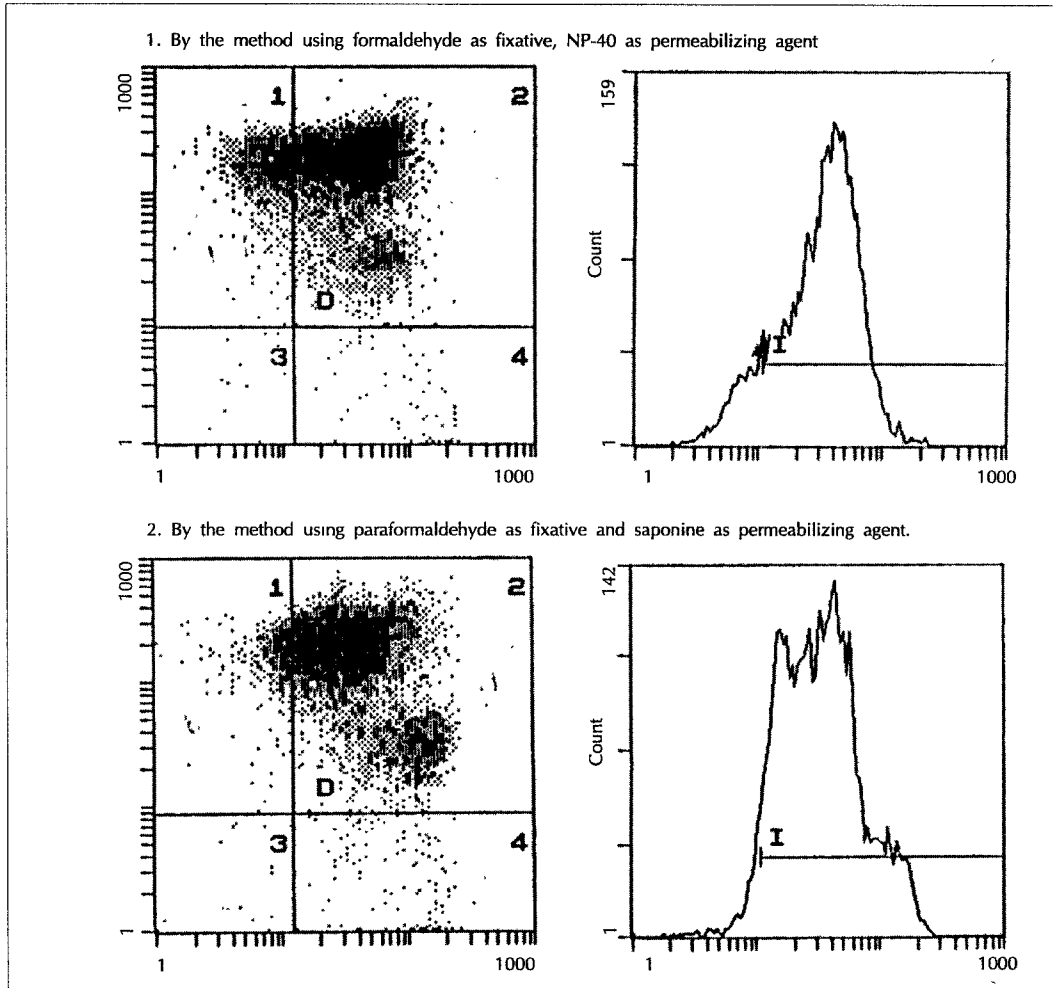
본 논문에서는 마우스의 흉선 세포에서 세포표면 및 세포내 CD3를 다른 세포표면의 항원인 CD4, CD과 함께 동시에 염색하는법을 확립하였다. 이러한 고정 및 투과과정을 거쳐서 염색을 할때 첫째, 세포의 형태학적인 변화 둘째, 세포표면항원의 변화 셋째, 항체의 비특적 반응 넷째, 항체의 충분한 세포내로의 침투 여부가 가장 문제되는 것으로 알려져 있다<sup>3,7)</sup>. 그러므로 연구하려는 세포의 종류와 항체에 따라 가장 적합한 방법을 확립하는데, 본 연구에서 제시된 방법을 위의 네가지 각각의 사항들을 중심으로 분석해 보면 다음과 같다. 먼저 세포의 형태학적인 변화를 볼때, 일반적으로 세포를 고정하고 투과과정을 거치는 경우 세포의 크기가 작아지게 되는 것이 가장 큰 문제로 만약 여러 종류의 세포들이 같이 있어 gating으로 세포의 종류를 나누어 분석 해야 할 때에는 특히 이러한 형태학적인 변화는 큰 문제로 지적되고 있다<sup>17)</sup>. 그러나 본 연구에서 시행한 방법에 의하면 이러한 과정을 하기전 이후의 유세포 분석기의 FSC와 SSC상 세포의 이동이 없이



**Fig. 3.** The differential expression of the intracytoplasmic CD3 and surface CD3 of thymocyte. The 17% of thymocyte expressed CD3 on their surface, however 87% of these cells expressed CD3 in their cytoplasm. As a negative control, FITC-conjugated B76 antibody for B cells were stained, and these were all negative. Horizontal axis represent fluorescence intensity of FITC-anti-CD3 $\epsilon$  antibody(1, 2) or B76(3), while vertical axis represent fluorescence intensity of cyanine conjugated anti-CD8 and anti-CD4 antibody.

모양이 잘 유지되고 있었으며, 다만 이러한 과정 이전에 이미 죽어 있던 세포들이 이 과정을 거친 후 사라지는 양상이 관찰된 것인데 이는 이미 죽어 있는 세포들은 고

정 및 투과의 과정에 의하여 완전 분해되어 제거되기때문으로 오히려 죽은세포에서 생기는 비특이적결합의 요소가 없었으므로 바람직한 현상이라 하겠다. 이 실험의 전 실



**Fig. 4.** The comparison of intracytoplasmic CD3 $\epsilon$  expression and surface CD4, CD8 expression between different fixatives and permeabilizing agent. Both methods had no significant effect on the surface CD4 and CD8 expression, however more intracytoplasmic CD3 positive cells were detected by the method using paraformaldehyde and saponine because of the shift of fluorescence.

Horizontal axis represent fluorescence intensity of FITC-anti-CD3 $\epsilon$  antibody(1, 2), while vertical axis represent fluorescence intensity of Cyanine conjugated anti-CD8 and anti-CD4 antibody.

힘단계로 세포의 투과성을 높이기 위하여 NP-40 이외에 Tween 20와 Triton $\times$ 100을 0.01부터 1%의 농도로 사용하여 보았는데 세포내 CD3의 염색에는 별 문제 없었으나, 세포표면 CD3의 손실이 커서, NP-40를 사용하게 되었다. 고정액으로 쓰는 formaldehyde를 paraformaldehyde와 비교해 보았는데 이 두 제제는 차이가 없었다. 또한 요즘 많이 사용하는 saponin을 투과제로 사용하여 비교하여 보았는데 세포의 모양이나, 세포표면의 항원의 변화를 주지 않는 점에서는 차이가 없었으며, 세포내 항원의 감지농도 5%이내의 차이가 있었다. 하지만

실험간의 재생력이 떨어지고 시간이 1시간정도 더 소요되는 단점이 있었다.

한편 T림프구는 흉선내에서의 발달과정중 CD4, CD8, CD5와 T세포수용체복합체(T cell receptor : TCR/CD3 complex)를 세포표면에 발현하게 된다. 각각 합성된 CD3와 TCR는 Endoplasmic reticulum(ER)에 모이게 되고 ER-Golgi에서 조립되어 세포형질에서 표면으로 이동되게 되어 분화과정이 진행될 수록 세포표면에 CD3을 발현하게 되며 이는 전구 T세포에서 세포내 CD3의 발현이 선행되어야 하는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 최근 Levelt등

<sup>15)</sup>에 의하면 CD3항원을 통한 세포내 전달체계는 흉선세포의 발달단계에 매우 중요하며, 이러한 CD3의 발현과 TCR의 발현과의 상호관계에 대한 연구가 아직까지 논란이 많은 흉선세포의 초기 발달과정의 이해에 많은 도움을 줄것을 시사하였다. 또한 Franek등<sup>11)</sup>은 saponin과 digitonine을 사용한 실험에서 골수에 존재하는 흉선이전의 전구 T세포는 대부분이 세포내 및 세포표면에 CD3 없는 세포들로 구성되어 있으며 나머지는 골수로 돌아오는 세포중 세포내 및 세포표면에 CD3를 동시에 발현하는 세포들과 세포내 및 세포표면 모두에 CD3 양성인 세포, 흉선으로 돌아가는 소수의 세포만이 세포내 CD3양성 세포표면 CD3음성세포로 구성되어 있음을 밝힌 바 있다. 이는 본 논문에서의 세포내 CD3발현에 따라서 초기단계의 T세포 전구체의 경우 세포내 CD3는 있으나 세포표면에 CD3는 없게 나타나는것과 일치하는 것이라 하겠다. 이러한 과정의 확인을 위하여 이전에는 전이RNA의 발현과 표면항원을 분석하여 mRNA로 분석하는 법에 의하여 연구하였으나<sup>19)20)</sup> 이러한 방법은 실험과정이 복잡하고 또한 각각의 세포군에 따른 특성별 발현의 차이를 알기 어려운 단점이 있었고, 이를 위하여서는 유세포분석기로 세포분리(sorting)하여 확인해야 하는 번거로움이 있었다. 하지만 본논문의 실험의 방법으로 세포의 표면 항원 CD4와 CD8 두가지와 세포내 CD3를 동시에 측정할 수 있게 됨으로써 세포내 CD3는 CD4 CD8 모두양성인 세포군에서 주로 발현됨을 알 수 있었다. 또한 이방법을 CD3 이외의 다른 세포내 항원을 측정하는 능력을 보기위하여 TCR를 염색하여 보았는데 역시 CD3와 마찬가지로 세포표면보다 세포내에 CD3와 같은 양으로 발현됨을 알 수 있었다. 이상의 결과들에서 본 논문에서의 방법이 충분히 세포내 항원을 측정할 수 있음을 알 수 있었다. 다음으로 문제되는 것이 비특이적 반응인데 이를 배제하기위하여서는 음성대조가 꼭 필요하겠다. 이를 위하여 2C11항체와 똑같은 IgG와 B세포의 표지자인 B76항체를 사용하였는데 모두음성으로 이러한 비특이적 결합에 의한 양성반응을 배제시킬 수 있었다.

결론적으로 본실험에서 확립한 유세포분석기를 이용한 세포내 항원과 세포표면 항원의 동시 측정법은 흉선세포의 세포표면의 CD4, CD8과 세포내 CD3를 측정하는데 유용한 검사법임을 알 수 있으며 이 방법은 향후 세포내 cytokine이나 다른 항원의 측정에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

고정액으로 formaldehyde와 투과제 NP-40를 이용하여 마우스 흉선세포에서 세포내CD3와 세포표면의 CD3, 세포표면의 CD4와 CD8을 동시 삼색염색을 하여 유세포 분석기로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 고정 및 투과과정후에도 세포들은 유세포분석상 FSC와 SSC 상 나타나는 형태학적인 변화를 초래하지 않았다.

2) 세포표면의 CD4와 CD8을 염색 후 고정 및 투과과정으로 처리한 후 에도 유의한 발현률의 변화는 없었다.

3) 마우스 흉선세포의 17.0 ± 1.5%에서 CD3를 표면에 발현하고 있었으나, 세포내에는 88.0 ± 5.2%에서 CD3가 발현되고 있었다.

4) Paraformaldehyde와 saponine을 사용하여 같은 방법으로 표면 CD3 및 세포내 CD3를 측정하였는데 세포표면의 항원에는 두방법에서 유의한 차이는 없었으며, 세포내 CD3는 paraformaldehyde와 saponine의 경우에는 90.0 ± 8.1%, 위의 방법으로는 89.2 ± 5.2%로 유의한 차이는 없었다.

결론적으로 위의 방법을 이용한 세포내항원 및 세포표면항원의 동시 측정법은 흉선 T 세포의 분화 및 성숙과정의 연구에 유용한 방법임을 증명하였다.

## References

- 1) Anderson P, Blue M, OBrien C, Schlossman SF : *Monoclonal antibodies reactive the T cell receptor delta chain : production and characterization using new method. J Immunol* 1989 : 143 : 1899
- 2) Glaouert AM, Dingle JT, Lucy JA : *Action of saponine on biological membranes. Nature* 1962 : 196
- 3) Sander B, Anderson J, Anderson U : *Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. Immunol Review* 1991 : 119 : 65
- 4) Hallden G, Abderson U, Johanson SGO : *A new membrane permeabilization for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. J Immunol Methods* 1989 : 124 : 103
- 5) Jacob MC, Favre M, Bensa JC : *Membrane cell per-*

- meabilization with saponine and multi-parametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* 1991 : 12 : 550
- 6) Jacobberger JW, Fogelman D, Lehman JM : Analysis of intracellular antigens by flow cytometry. *Cytometry* 1986 : 7 : 356
  - 7) Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C : Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993 : 156 : 125
  - 8) Schmid I, Christel HU, Giorgi JV : A gentle fixation and permeabilization Method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA Quantification. *Cytometry* 1991 : 12 : 279
  - 9) Knapp W, Strobl H, Majdic O : Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 1994 : 18 : 187
  - 10) Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J, Klausner RD : The T cell receptor : Assembly and expression of multisubunit complex. *Intracellular Trafficking of Proteins*, Steer CJ, Hanover JA(eds) Cambridge University Press. Cambridge 1991 : 549
  - 11) Franek KJ, Wolcott RM, Chervenak R : Reliable method for the simultaneous detection of cytoplasmic and surface CD3 $\epsilon$  expression by murine lymphoid cells. *Cytometry* 1994 : 17 : 224
  - 12) Levelt CN, Ehrfeld A, Eichmann K : Regulation of thymocyte development through CD3. *J Exp Med* 1993 : 177 : 707
  - 13) Petrie HT, Pears M, Scollay R, Shortman K : Developments of immature thymocyte : Initiation of CD3, CD4, and CD8 acquisition parallels down-regulation of the interleukin 2 receptor. *Eur J Immunol* 1990 : 20 : 2813
  - 14) Ballas ZK, Rasmussen WL : Lymphokine activated killer cells : NK1.1+, CD3+ LAK cell effectors are derived from CD4-, CD8-, NK1.1- precursors. *Cell Immunol* 1991 : 134 : 296
  - 15) Levelt CN, Carsette R, Eichmann K : Correlation between Expression of TCR-b CD3 $\epsilon$  and thymocyte maturation. *J Exp Med* 1993 : 178 : 1876
  - 16) 조영주 : Multiparameter flow cytometry의 응용. *생화학뉴스* 1992 : 12 : 84
  - 17) Berglund DL, Starkey JR : Introduction of antibody into viable cells using electroporation. *Cytometry* 1991 : 12 : 64
  - 18) Chirgwin JM, Przybyla RJ, Ruttner WJ : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 1979 : 18 : 5294
  - 19) Rosen KM, Lamperti ED, Villa-Komaroff L : Optimizing the northern blot procedure. *Biotechniques* 1990 : 8 : 398
  - 20) Crispe IN, Moor MW, Smith HL, Bevan MJ, Shimonkevitz RO : Differentiation potential of subsets of CD4-CD8- thymocytes. *Nature* 1987 : 329 : 336