

December 30, 2022

1:100 (E6)

Monocytes # 9

Specimen	Status	Location	Conc	Date	Tasks	Volume	Ly	Ly+Mon	Total	3E+6	.3E+6
Ny058	Adult		10E6	12-16-18		5	7.18	10.7	35.9	417 $\mu$ l	(139 $\mu$ l) 42 $\mu$ l

Allied Health closed  
5:49 am antibody prep

6:41 am Also prepped

7:17 am Post-11am spin

~~7:40 am~~ 7:40 am count incubation

8:02 am Aliquot

4/0 @ 8:40 am  $\rightarrow$  55

55 added through 8:56

4/0 wash @ 8:59 am

9:02 am scb into 37°C + 48 stems

$\rightarrow$  (9:32 am)

Beads @ 9:08 am  $\rightarrow$  9:38 am

Hot samples @ 9:14 am  $\rightarrow$  44 am

(e6 only going w/ it into incubator)

Rbc lyse @ 9:41

5's RBC lysed & FBS sed @ 9:41 am

Hot wash / se FBS wash spin @ 9:50 am

(Zanbe NIR got bead washed)

10:02 / 10:10 am Samples 4°C  $\rightarrow$  10:40 am

Sc's done @ 10:17 am

Done @ 10:58 AM  $\checkmark$  [~5 hrs]

$$\begin{array}{r} 7.6 \\ \times 5 \\ \hline 38.0 \end{array}$$

☐ unstained

☐ Spark 550

☐ \*CD4 BV750

☐ +CD4 APC

☐ PeDazide 574

☐  $\rightarrow$

☐ APC 750

7 \* 2 = 14 million cells //

☐ All Hot

☐ All cold

+ sc's :

31 sc's

$\times 3$

[9.3]

+ 1 m und + 8

$\times 3$

24

$\rightarrow$  3 tubes to be safe.

15/ml

$$35.9 - 34.3 = 1.6 \text{ extra } \checkmark$$

539  $\mu$ l in my unstained

Did we add CD3 to the  
All Hot / All cold?

... I don't think we did...

UltraComp

30 min 4°C

2-3 ml FCS BSA

400-600 3-5 min



Monocyte SFC panel #9

#	Filter	Single color (u)	Ref ctrl type	Unmixing ctrl name	Fluorochrome	Marker	Clone	Vial Lot #	LD + FC1 blocker 3ul/rxn	HotStain 30min @37C	Coldstain 30min @4C	
1	UV2	1.95	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
2	UV9	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
3	UV10	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
4	UV11	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
5	UV16	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
6	V3	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
7	V7	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
8	V8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
9	V10	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
10	V11	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
11	V13	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
12	V14	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
13	V15	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
14	B3	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
15	B6	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
16	B8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
17	B10	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
18	B13	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
19	R2	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
20	R4	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
21	R6	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
22	R7	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
23	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
24	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
25	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
26	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
27	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
28	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
29	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
30	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
31	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
32	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
33	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
34	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
35	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
36	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
37	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
38	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
39	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
40	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
41	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
42	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
43	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
44	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
45	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
46	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
47	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
48	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
49	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
50	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
51	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
52	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
53	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
54	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
55	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
56	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
57	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
58	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
59	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
60	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
61	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
62	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
63	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
64	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
65	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
66	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
67	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
68	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
69	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
70	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
71	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
72	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
73	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
74	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
75	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
76	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
77	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
78	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
79	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
80	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
81	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
82	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
83	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
84	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
85	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
86	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
87	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
88	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
89	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
90	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
91	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
92	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
93	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
94	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
95	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
96	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
97	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
98	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
99	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
100	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
101	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
102	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
103	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
104	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
105	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
106	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
107	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
108	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
109	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
110	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
111	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
112	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
113	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
114	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
115	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
116	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
117	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
118	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
119	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
120	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
121	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
122	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
123	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
124	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
125	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
126	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
127	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
128	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
129	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
130	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
131	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
132	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
133	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
134	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
135	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)			0.6	3.6	6
136	R8	1.25	cells	CD18	AF	AF	(6.7)					

## Simplified Protocol

## Thaw cells, DNase, count.

Collect, count, aliquot cells 2.0E+6 Cells R10 / 5ml polystyrene tube

Bring volume up to <500> uL R10, add <>

Cap and incubate at 37°C for 6 hours

Cap and incubate at 37°C for 6 hours

Wash with 2 ml PBS, spin down 1300rpm 8min

800  $\mu$ l of LiveDead mix (1:2500) @RT for 15min

Wash 2 ml 2% PBS-FBS + EDTA, spin 1300 rpm, 8min

**Add tetramers for 40 minutes at RT**

Wash with 2 ml PBS, spin down 1300rpm 8min

Add HotStain mix, incubate @37C for 30 min

Wash 2 ml 2% PBS-FBS + EDTA 1400 rpm, 6min

Add ColdStain mix, incubate @ 4C for 30min

Add 300-500  $\mu$ l 1x RBC Lysis for 3 minutes

Wash 2 ml 2% PBS-FBS + EDTA 1400 rpm, 6min

Resuspend in 100  $\mu$ l 0.4% PFA-PBS

cap tubes, wrap rack in foil, store at 4°C

100

85

7 Oct

3

6900

CD 163

10



## 12/6/2022

[illegible]

Beard lot 1 had a split in its v2-v8 detection

DATE	TIME	WIND	TEMP	WAVE	SEA	WIND	TEMP	WAVE	SEA
10/10/54	0800	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0900	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1000	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1100	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1200	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1300	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1400	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1500	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1600	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1700	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1800	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	1900	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	2000	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	2100	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	2200	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	2300	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0000	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0100	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0200	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0300	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0400	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0500	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0600	10	18	1	1	10	18	1	1
10/10/54	0700	10	18	1	1	10	18	1	1

10/10/54 2400 10 18 1 1 10 18 1 1



December , 2022

Monocytes #

holding off All Hot/All cold for now until after unmix and verify. worst case add it in & then return.... → Just going to run, will exclude FSC/HLA-DR...

Weird signature in 1st batch beads (doublet  $V_1 - V_1$ )

hopefully no major panel change w/o

100M events or 50  $\mu$ l volume

○ → 600M events / or 50  $\mu$ l volume

Unstained 11,000 events

100  $\mu$ l volume or 10M cells

Sample 8000 events 1.7M total

★ Clog on sparl CD4AP250  
Appeared or after 100M events

★ Bols in a Toolchest ★

Tired thoughts

→ SC bead approximates cell lineage  
fluorescence

falls smaller

← Cells approach pre  
on main pops

→ ★ does unmixing on average pop  
benefit us? or targeting indiv better? ★





December , 2022

Monocytes #



December , 2022

Monocytes #

