

Single Cellome™ System SS2000

様々な細胞におけるサンプリング事例

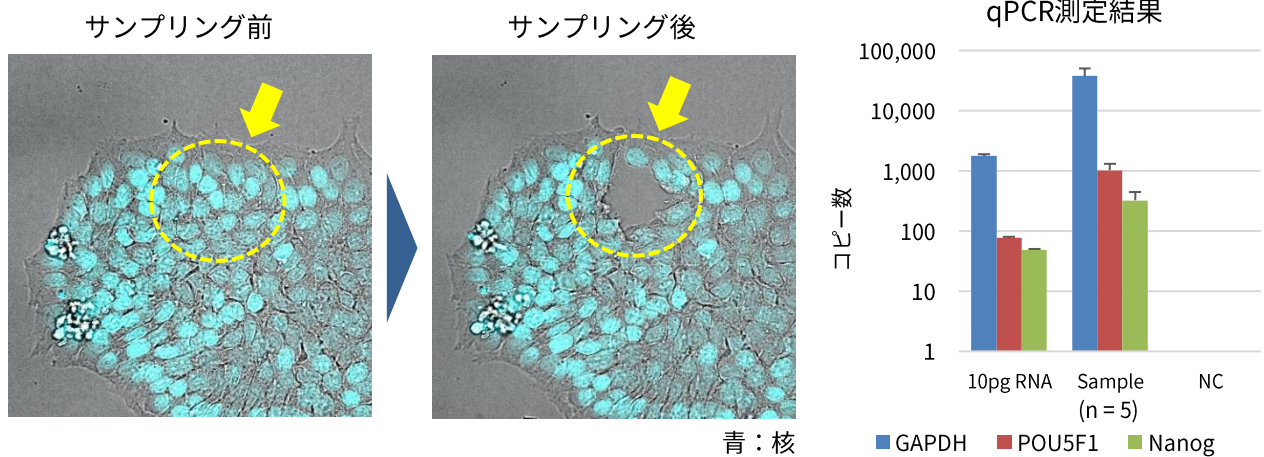


近年、分析技術の高感度化や新しい分析技術の広まりに伴いシングルセルを対象とした研究が盛んに行われるようになってきました。

SS2000は共焦点顕微鏡で撮像しながら先端径が数μmのチップ（ガラスキャピラリー）により、細胞内成分や1細胞をサンプリングできる画期的な装置です。本アプリケーションノートでは、様々な細胞からサンプリングした事例をご紹介します。

幹細胞のサンプリング

二次元培養したヒトiPS細胞コロニーから、一部の細胞をまとめてサンプリングしました。採取したサンプルからRT-RamDA法にてcDNAを合成し、qPCRにてGAPDH（ハウスキーピング遺伝子）、POU5F1およびNanog（多能性遺伝子）の発現量を測定したところ、いずれの遺伝子も数細胞分相当量のコピー数を検出しました（10pg RNA = 1細胞相当量として計算）。画像データからも7～8細胞をサンプリングしていることが確認でき、qPCRの結果と一致しました。ヒトiPS細胞のような幹細胞から多能性を維持したままサンプリングできることが確認できました。

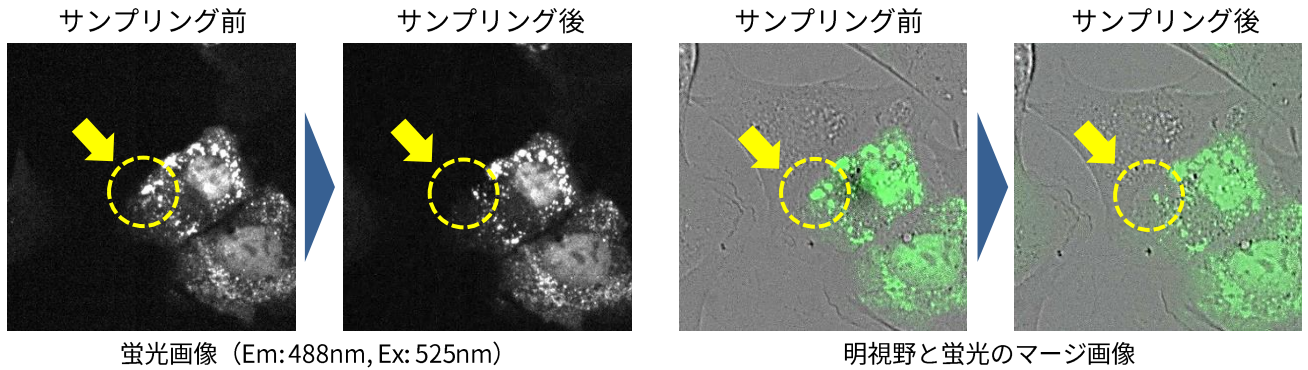


実験条件

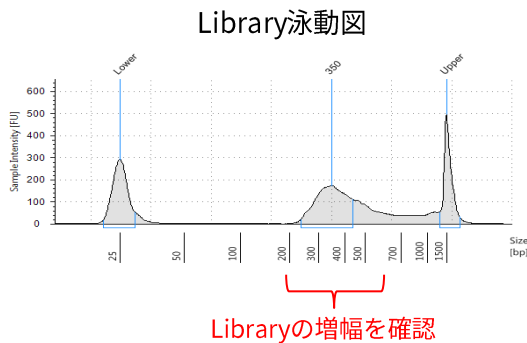
細胞：	ヒトiPS細胞（PBMC由来）
標識試薬：	Hoechst
サンプリング：	内径10μmのガラスチップでコロニーの一部の細胞を丸ごとサンプリング
cDNA合成法：	RT-RamDA法
Primer情報：	GAPDH Human Housekeeping Gene Primer Set（タカラバイオ） POU5F1 Oct4 (POU5F1) Human qPCR Primer Pair（OriGene Technologies） Nanog NANOG Human qPCR Primer Pair（OriGene Technologies）
Real-time PCR：	SYBR Green法

細胞内顆粒のサンプリング

NIH/3T3細胞に遺伝子導入によりGFP発現細胞内顆粒を発現させ、複数の細胞から細胞内顆粒をサンプリングして同じウェル内に回収しました。採取したサンプルからRNAを精製し、Library調製が可能であることを確認しました。特定の細胞内成分を選択的にサンプリングし、RNA-seqが可能であることが示唆されました。



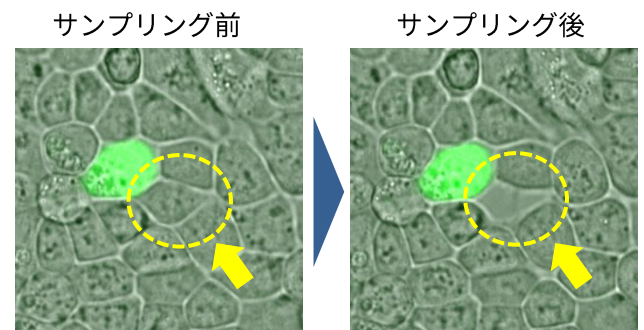
画像データは明視野画像、蛍光画像および明視野と蛍光のマージ画像いずれも取得することが可能です。



位置情報を保持したサンプリング

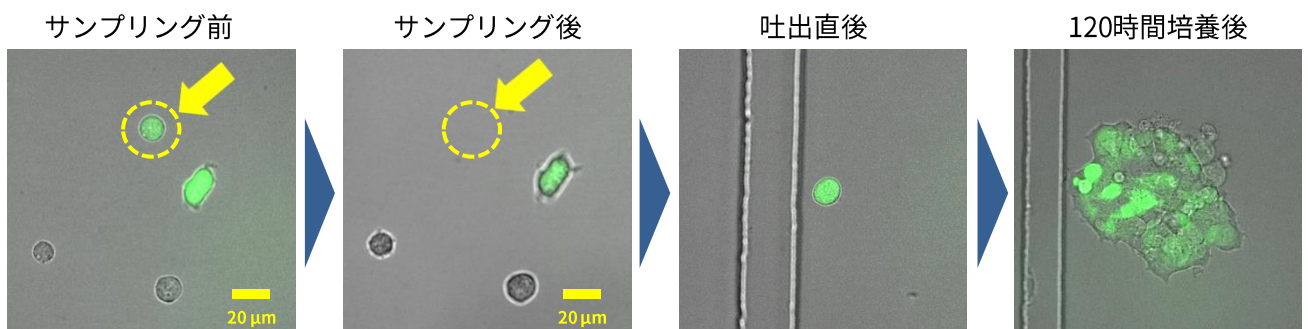
正常なMDCK細胞と緑色蛍光標識した異常のあるMDCK細胞を50:1で共培養後、蛍光シグナルを示す異常細胞に隣接する正常細胞をサンプリングしました（内径10 μ mのガラスチップ使用）。癌細胞に隣接する細胞と離れた場所に位置する細胞等を取り分けることが可能です。

実験条件	
細胞：	NIH/3T3細胞
サンプリング：	内径3 μ mのガラスチップを使用
RNA精製：	Trizolにより精製
Library調製：	SMART-Seq Stranded Kit (タカラバイオ) を使用
Library泳動：	TapeStation (アジレント) を使用



シングルセルクローニング

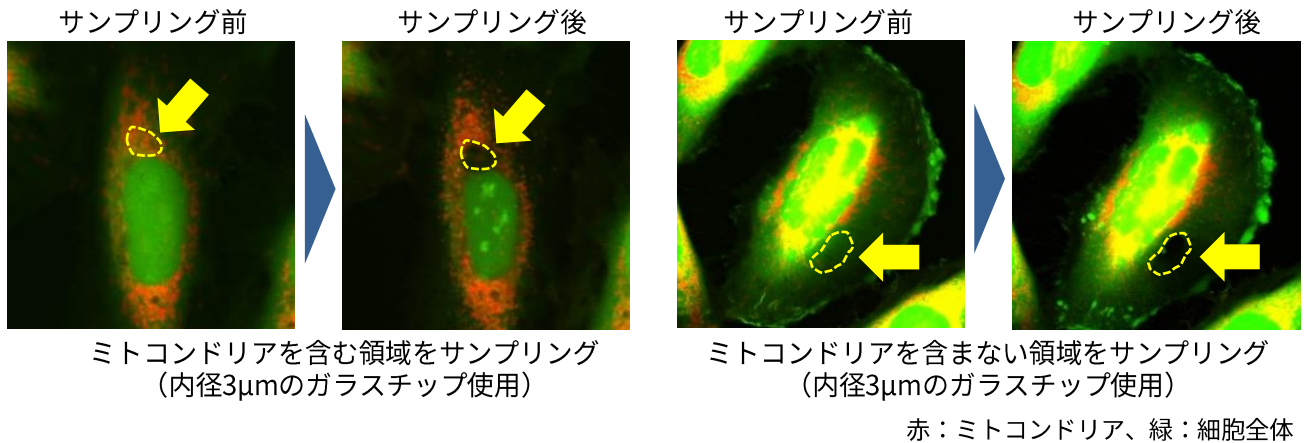
GFP発現HEK293細胞と通常のHEK293細胞を共培養し、GFP発現HEK293細胞をシングルセルでサンプリングしました（内径10 μ mのガラスチップ使用）。別の培養容器へ吐出して培養したところ、GFP発現HEK293細胞のみが増殖することを確認しました。顕微鏡で観察しながら特異的な挙動や形態変化を示す細胞等、特定の細胞からシングルセルクローニングすることが可能となります。



※細胞によってはサンプリングや吐出後の培養が難しい場合があります。

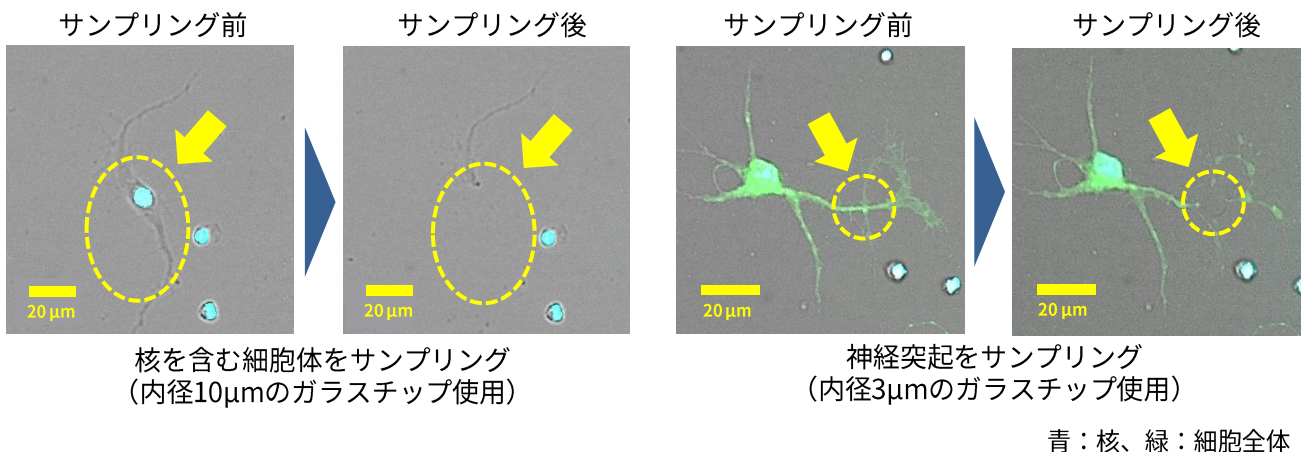
ミトコンドリアのサンプリング

HeLa細胞からミトコンドリアを含む領域と含まない領域をそれぞれサンプリングしました。特定のオルガネラを選択的にサンプリングすることで、その機能をより詳細に解析することが可能となります。また、特定のオルガネラを避けてサンプリングすることで、対照サンプルとすることや解析に影響を与えるオルガネラを除外することも可能です。



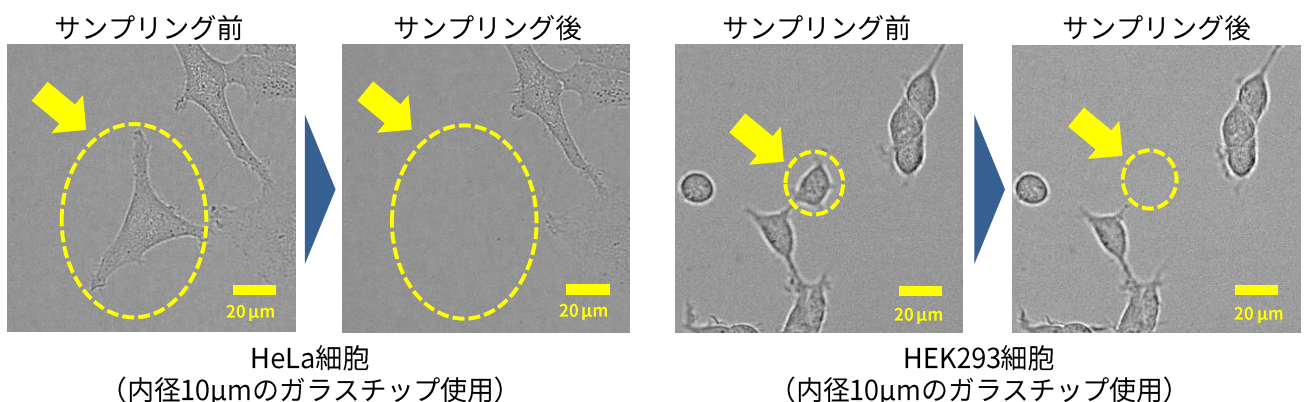
細胞の部位別サンプリング

初代培養ニューロンから核を含む細胞体と神経突起をそれぞれ部位別にサンプリングしました。細胞の特定の部位や領域を選択的に解析することが可能となります。



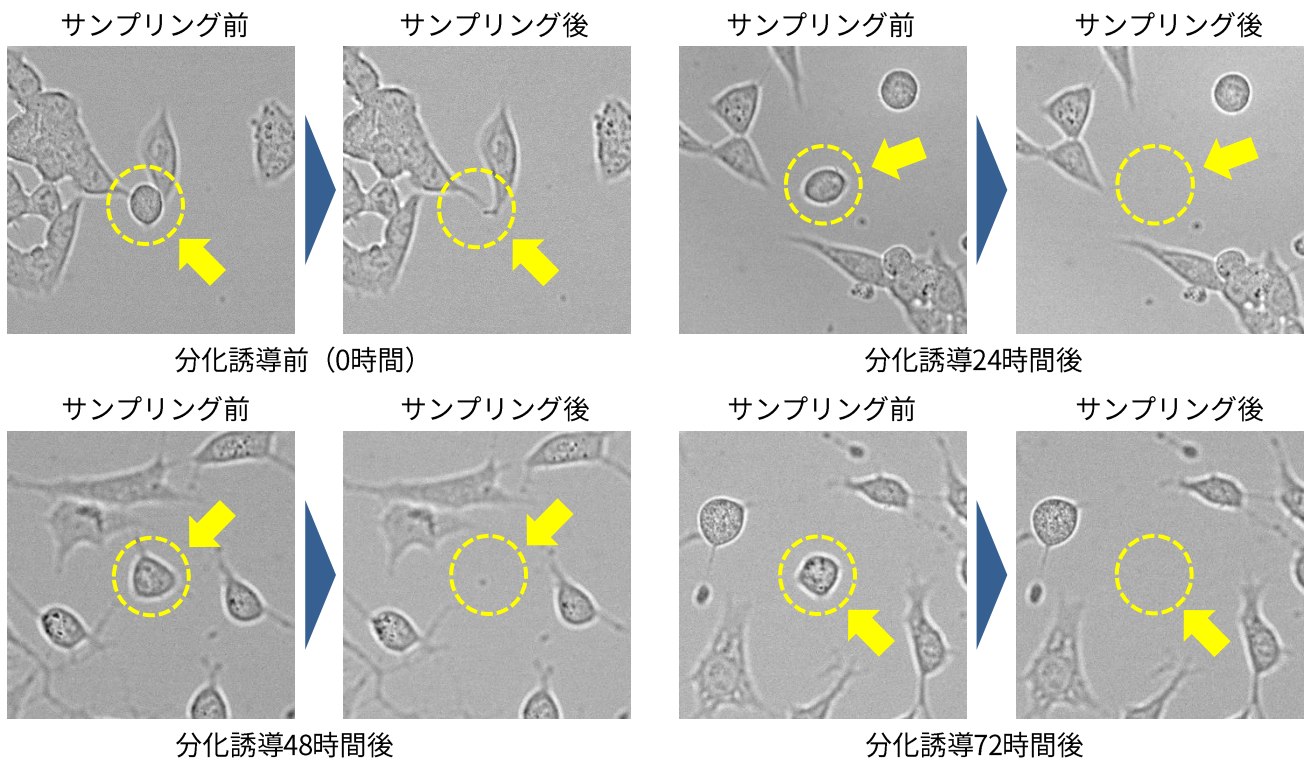
様々なサイズの細胞のサンプリング

HeLa細胞およびHEK293細胞をサンプリングしました。SS2000はサイズが20 μm 以上のHeLa細胞など、様々なサイズの細胞でも丸ごとサンプリングできることを確認しました。



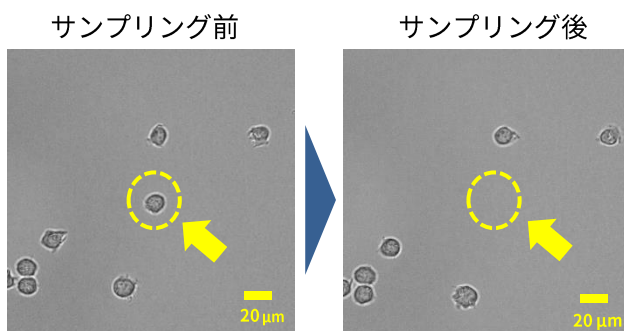
同じ培養容器から異なる時点でサンプリング

マウスES細胞から原始外胚葉細胞（PrE細胞）に分化する過程の細胞を継時的にサンプリングしました（いずれも内径10 μ mのガラスチップ使用）。サンプリング時に培養中の細胞を懸濁液にする必要が無いため、同じディッシュから異なる時点で繰り返しサンプリングすることが可能です。継時的な細胞の変化を解析したい場合に、サンプリング時点の数だけディッシュを用意する必要が無く、後解析時にディッシュ間のバラつきを補正する必要もありません。



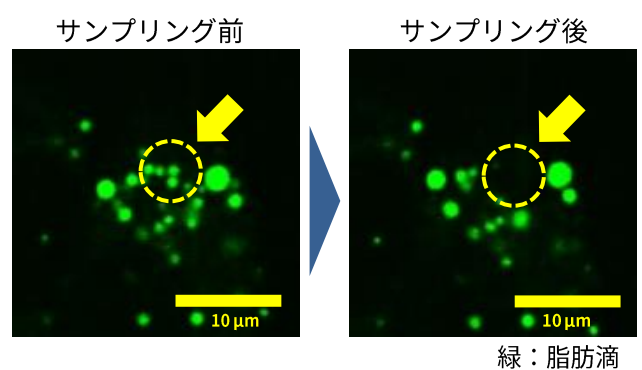
浮遊細胞のサンプリング

Jurkat細胞のような浮遊細胞でも、ディッシュのコーティング等により細胞を接着させ、サンプリングできることを確認しました（内径10 μ mのガラスチップ使用）。



脂肪滴のサンプリング

HepG2細胞にアミオダロンを添加した際に凝集が見られる脂肪滴をサンプリングしました（内径3 μ mのガラスチップ使用）。薬剤の細胞内局在や代謝レベルの解析等が可能となります。



横河電機株式会社 ライフ事業本部 営業・ソリューションセンター

〒180-8750 東京都武蔵野市中町2-9-32

TEL : 0422-52-5550

E-mail : SingleCell@cs.jp.yokogawa.com

<https://www.yokogawa.co.jp/solutions/solutions/life-innovation/>

記載内容はお断りなく変更することがありますのでご了承ください。

All Rights Reserved, Copyright © 2022, Yokogawa Electric Corporation

