

On-chip SPiSを使用したシングルセル分注

イントロダクション

がん研究を中心にシングルセルレベルの解析が重要視されるようになってきている。進行性の腫瘍には多種のクローンが含まれており、それぞれのクローンが特有の薬物応答を示したりする^{1, 2, 3}。これはがん細胞を1個ずつ解析し、各細胞のサブタイプや遺伝子変異を見分ける必要があることを意味している。この解析を可能にするために

(株) オンチップ・バイオテクノロジーズは細胞を1つずつ1wellに撒く装置”On-chip SPiS”を開発した。On-chip SPiSは画像認識方式で微量ピペット(吸引0.3μL)中に何個細胞があるのか判断し分注する能力がある。今回はOn-chip SPiSを使用してシングルセル分注(細胞1個を1wellずつ落とす)したものをATPアッセイで評価した。

方法

準備: GloMax System (Promega), Cell Titer Glo (Promega, Cat. G7570)
 On-chip SPiS(On-chip Biotechnologies),
 SPiS用1000μlチップ ブルー(WATSON, Cat. 110-502B), SPiS用384分注ピペット(Biotec, Cat. BST5-384S)
 On-chip T Buffer(On-chip Biotechnologies, Cat. 2001014), BSA(Millipore, Cat. .82-100-6)
 PC9細胞株(ヒト肺腺癌由来)

操作:

- ①On-chip SPiSのプレ分注機能を使用して20μL/1wellになるようにPBSを96穴に分注した。
- ②PC-9細胞株濃度1700cells/500μLになるように1:10=PBS:0.5%BSA-T bufferで懸濁したサンプル(1.5mLチューブ)を使用しOn-chip SPiSにより1wellあたり1個になる設定で96well撒いた。
(2個の場合は3400cell/500μL・3個の場合は5100cell/500μL・・・となる)
- ③分注したサンプルにPromega社cell Titer Gloを等量加えて攪拌・10分静置後各ウェルのATP値を測定した。

結果

On-chip SPiSを使用してPC-9細胞株を1wellに1個、2個、3個、5個と指定分注し、ATPアッセイにて測定した。その結果、綺麗な検量線が引けることがわかった(図1)。またOn-chip SPiSを使用して1wellに1個ずつ1時間57分かけて96穴プレートにPC-9細胞株を分注した。ATPアッセイで評価した結果、分注精度が89.5%であった(図2A, 2B)。

比較対象は顕微鏡で確実に1個、2個であることを確認分注したものをを使用した(図2A)。

図1

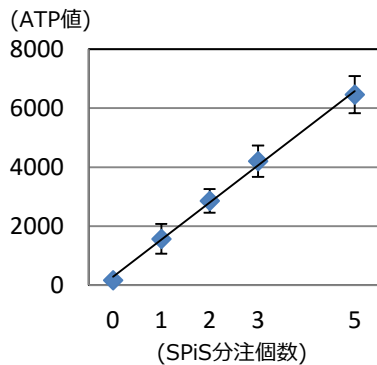


図2A

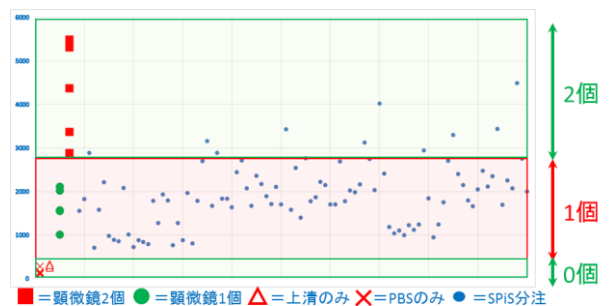


図2B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1560	1833	2893	710	1580	2213	986	893	860	2086	1020	726
B	886	840	793	1790	1276	1933	1796	766	1283	883	1970	810
C	1790	2703	3163	1676	2893	1840	1840	1640	2446	2720	2076	1670
D	2363	2173	1896	1713	2113	1706	3430	1583	2543	1400	2763	1783
E	1873	2223	2153	1710	1710	2693	1783	2030	1990	2163	3130	2753
F	2036	4021	2416	1186	1040	1110	1003	1233	1123	1243	2946	1846
G	950	1243	1756	2713	3303	2403	2150	1796	1666	2050	2483	2120
H	2356	3443	1700	2256	2076	4497	2756	2006	1950	2580	2483	2796

分注精度89.5% (1個:86well/96well 2個:10well/96well)

(ATP値)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	平均
5個分注	6285	6759	6344	6859	6500	6213	5640	7976	5526	6136	7049	6207	6458
3個分注	3977	3900	4078	5360	3633	3845	5229	4067	3658	4417	4200	3999	4197
2個分注	3550	2586	2479	2463	2417	2596	2984	2624	3131	2641	3551	3279	2858
1個分注	1337	2987	1487	1204	1248	2194	1288	1446	1281	1729	1329	1292	1569
PBS(0細胞)	200	163	126	193	160	156	146	176	183	146	130	190	164

まとめ

On-chip SPiSはATPアッセイにおいて綺麗な検量線が引けるほど正確に細胞数を判別して分注できる装置である。これは画像認識方式を使用している強みであり、時間は少しかかるものの確実に分注しているという安心感につながる。また分注した後に解析画像を確認することも可能である。この正確性が今後のシングルセル解析には重要だと考えられる。

1. Gerlinger M., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 366: 883-892
 2. Landau D. A., et al. (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. Cell 152: 714-726
 3. Navin N. E. and Hicks J. (2010) Tracing the tumor lineage. Mol Oncol 4: 267-283