



Application

横河電機社 Single Cellome™『SU10』と『SS2000』を併用した細胞「位置情報」「形態情報」が活用できる新たなシングルセル発現解析

製品名

μ-Dish 35 mm high grid-500 ibiTreat (Cat.No. ib81166)

メーカー名

ibidi社

下記のデータは、横河電機株式会社様よりご提供頂きました。

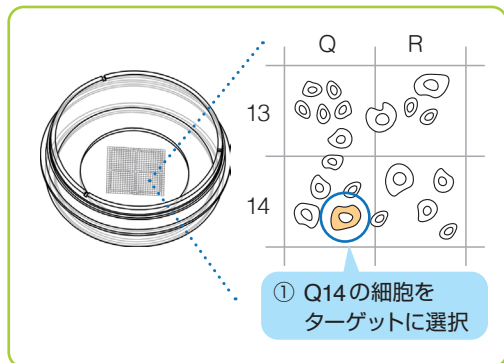
概要

顕微鏡視野にある1細胞に対し、直接、操作を行い分析することは、細胞の「位置情報」「形態情報」まで取得できるシンプルかつ情報量が多いシングルセル解析手法です。横河電機社 Single Cellome™『SU10』や『SS2000』は、顕微鏡視野の一細胞に対し試薬のデリバリーや細胞サンプリングするために開発された装置です。機械で操作を自動化したことにより、既存技術では難易度の高いこれら操作を習熟不要で実施可能にしています。このため、細胞「位置情報」「形態情報」が得られるシングルセル解析手法として今後の期待される装置です。

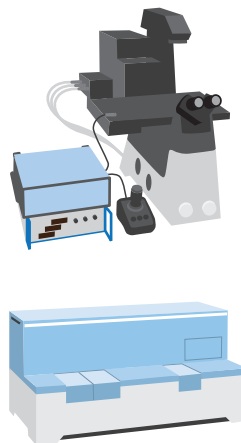
一方、ibidi社グリッドディッシュ (#ib81166) は顕微鏡観察用グリッド線付ポリマーボトムディッシュです。このグリッド線は顕微鏡視野から外れた細胞の再同定を容易にします。この機能は異なるシングルセル解析装置で同じ細胞を取り扱いたい場合に大変役立ちます。

本アプリケーションノートは、このibidi社グリッドディッシュを使用し、Single Cellome™『SU10』と『SS2000』間で共通した細胞の取り扱いを可能にした事例です。これにより、ひとつの細胞に対し、ベクター導入、シングルセルサンプリング、発現解析まで一連の操作を効率よく実施できるシステム構築ができました。また、細胞形態情報が取得できるメリットを活用し、分裂前の由来を識別した細胞サンプリングも可能にしています。このように、本システムは、顕微鏡観察の「位置情報」や「形態情報」が活用できる新たなシングルセル発現解析ツールとして今後の期待されます。

μ-Dish 35 mm high grid-500 (ibiTreat)



グリッド線を活用した細胞位置情報の共有



自動“ナノ”デリバリーシステム

Single Cellome™ Unit
SU10

② ターゲット細胞にベクターを導入

全自動サンプリングシステム
Single Cellome™ System
SS2000

③ タイムラプス観察による発現確認、およびシングルセルサンプリング

μ-Dish 35 mm high grid-500 (ibiTreat) の本実験におけるメリット

i) グリッド線

細胞位置情報を座標化し、視野から外れた細胞の再同定を容易にします。このため、異なる装置間で共通した細胞の取り扱いを可能にします。

ii) ibidi ポリマー（プラスチック）製ボトム

良好な細胞接着力が得られるibidiポリマー製ボトムは細胞形態情報を取得する本実験に最適です。また優れた光学物性は共焦点顕微鏡観察下の作業に適します。

試薬・試料

細胞

- HeLa 細胞

ベクター導入

- Single Cellome™ Unit SU10 (横河電機)
- phMGFP Vector (GFP発現プラスミド、10 ng/μL、Promega)

細胞サンプリング

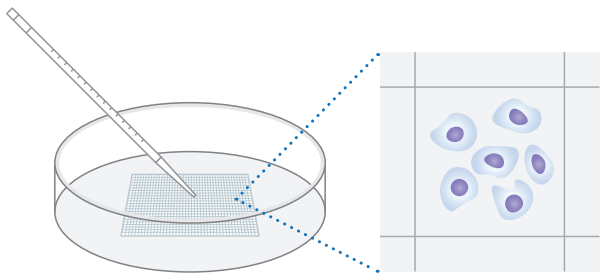
- Single Cellome™ System SS2000 (横河電機)
- Lysis buffer : 1U RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega)、10% RealTime ready Cell Lysis Buffer (Roche)、0.3% NP40 (Thermo)、RNase-free water (タカラバイオ)

シングルセル逆転写／PCR

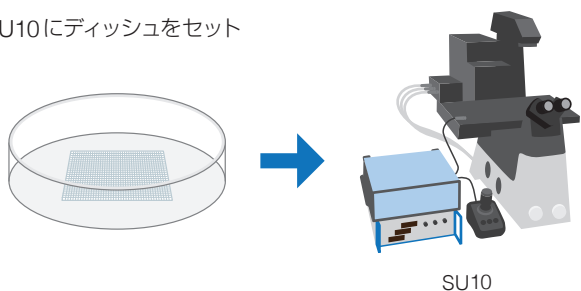
- 逆転写 : RT-RamDa 法 (Hayashi et al., 2018)
- PCR : SYBR 法

方法

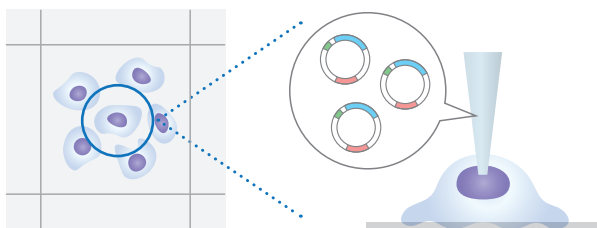
① グリッドディッシュに細胞を播種



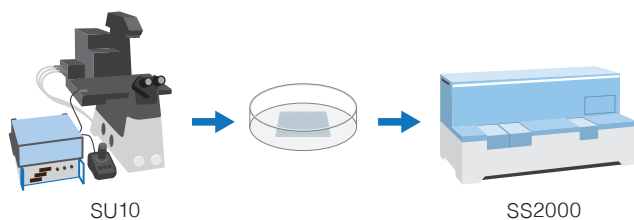
② SU10にディッシュをセット



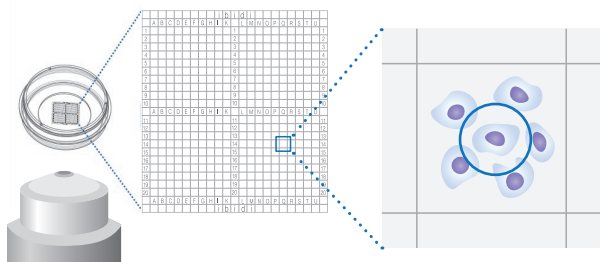
③ 顕微鏡で観察しながらターゲットの細胞を定め、SU10 を用いてプラスミドDNAを細胞内（核内）にインジェクション



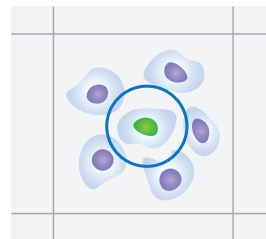
④ 作業後、ディッシュをSS2000に移動



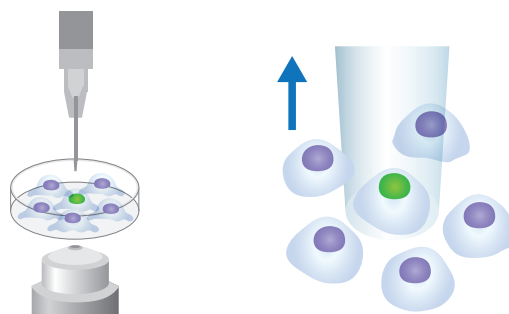
⑤ SS2000内蔵の共焦点顕微鏡で観察を行い、グリッド線をもとにSU10でインジェクションした細胞を同定



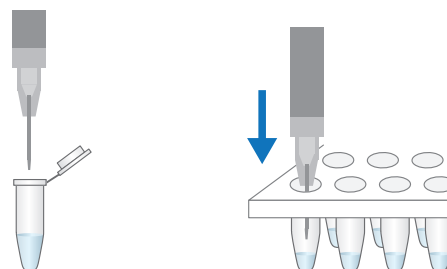
⑥ SS2000内蔵のインキュベーションローダーで培養し、発現確認のためのライブセルイメージングを実施



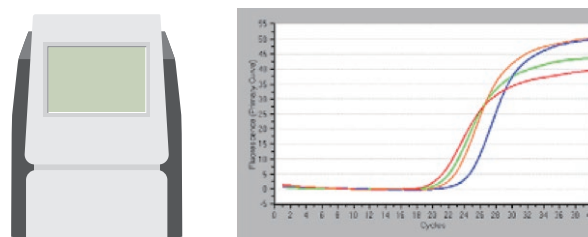
⑦ 発現した細胞をシングルセルサンプリング

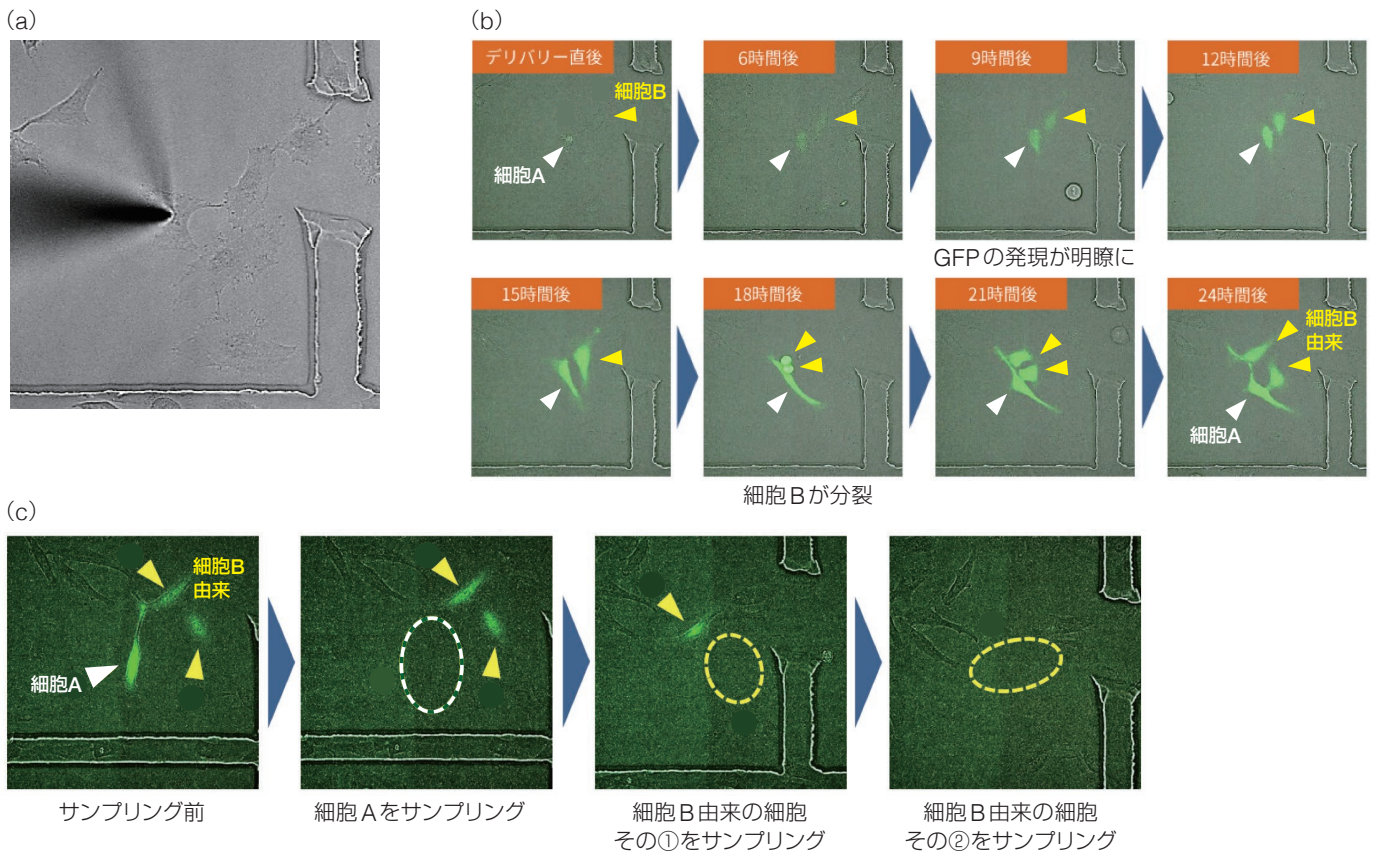


⑧ 採取したサンプルは遺伝子解析用のLysis buffer中に吐出



⑨ RT-PCRを用いてシングルセルRNA発現解析を行い、SU10で導入したベクターの発現効率を検証、RNAレベルでの発現確認

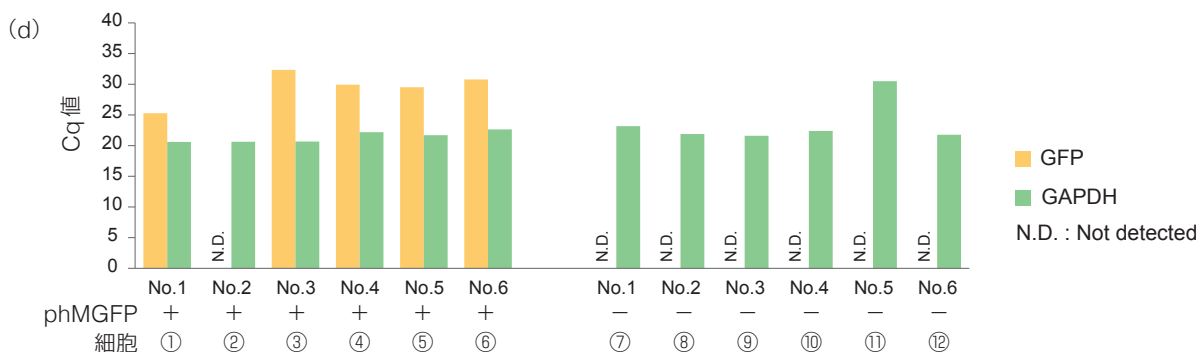


結果：ベクターをデリバリーした細胞のタイムラプス観察ならびにシングルセルサンプリング


(a) 実際のSU10を使用したベクターの細胞内デリバリー。ナノピペットが黒い陰影として確認できる。
 (b) ベクターを導入した細胞 (A/B) のSS2000内蔵の共焦点顕微鏡を使用した経時観察。6 時間後より徐々に核内にデリバリーしたベクターより GFP が発現してきている。また、18 時間後に細胞 B が分裂し、サンプリングした 3 つの細胞のうち 2 つが B に由来することがわかる。
 (c) SS2000 を使用した一細胞サンプリングの様子 (励起波長 488nm、対物レンズ 40X)。

● 結論

経時観察より得られる細胞位置や形態情報を加味することで、細胞 A および細胞 B に由来する細胞を区別してシングルセルサンプリングが可能となった。

結果：シングルセルRNA発現解析によるSU10を使用した導入ベクターの発現効率検証結果


(d) SU10 を用いて 6 個の細胞に対し MGFP をコードしたベクターを導入し、SS2000 でそれらをサンプリングした結果、83% (5/6 個) の細胞で mRNA の発現が見られた。内部コントロール GAPDH 使用。

● 結論

以下 2 点を確認でき、ベクター導入から細胞サンプリングまでが一連で実施できる系が構築できた。

- ① SU10 を使用したベクターの細胞内デリバリーが機能すること
- ② SS2000 を使用したサンプリングシステムがシングルセル RNA 発現解析ツールとして機能すること



お客様のコメント

弊社（横河電機）のSU10とSS2000はライブセルを1細胞レベルで操作できる製品です。狙った細胞を操作する際に、位置を特定できるグリッドディッシュが有効です。ibidi社のグリッドディッシュは、ポリマー（プラスチック）製のボトムを選択できるため、良い接着状態の細胞を操作できる点が魅力でした。また、ポリマー製にもかかわらずボトム厚が薄いため、SS2000の共焦点顕微鏡に基づくシングルセルサンプリングに適用できますし、SU10の自動ナノデリバリー後に蛍光顕微鏡/共焦点顕微鏡で観察したいというニーズにもお応えすることができると弊社ユーザー様にもお勧めしたい製品です。

シングルセル解析のための新たなソリューション提供をめざして

YOKOGAWA 
Co-innovating tomorrow™



シングルセル解析は細胞集団を個別の細胞に単離して解析する際に、細胞を剥離し回収した細胞懸濁液をFluorescence activated cell sorter (FACS) やマイクロチップを用いて単離/分類する方法が確立され、一般的になっています。しかしながら、これらの手法では、剥離に伴い細胞個々の「位置情報」や「形態情報」が失われるため、この点が実験的な制限になります。

この課題は、細胞や細胞組織を顕微鏡観察で観察し、その個々の細胞に直接手で操作を加える方法ができれば解決できます。しかし、既存技術では簡便かつ効率的に行うことは難しく、操作技術習得が必要となる点や、精細な作業が要求されるためスループットが非常に悪くなる点に問題がありました。

横河電機「Single Cellome™ Unit SU10」および「Single Cellome™ System SS2000」は、顕微鏡で観察している一細胞に対し、ピペットを穿刺し、細胞内への物質の注入や、細胞や細胞内画分を吸引/サンプリングするためのシステムです。これらの操作は細胞表面の自動検知機能や注入時間がソフトウェアで操作できる自動化されたシステムが採用されており、習熟度の影響を受けにくい効率の良いデリバリー操作が可能です。したがって、既述の課題点を解決するための新たなシングルセル解析のソリューションとして非常に注目されている装置です。

1 細胞レベルで細胞質や核へ物質導入可能な自動“ナノ”デリバリーシステム 「Single Cellome™ Unit SU10」

横河電機「Single Cellome™ Unit SU10」は、細胞上の特定位置にピペットを穿刺し、そのピペットを介してプラスミドや試薬などの物質をデリバリーするために用いられるシステムです。本装置の革新的な点は、先端径が非常に細い“ナノ”サイズのピペットが採用されている点です。これにより細胞ダメージが少ない穿刺が可能です。

製品紹介①

狙った細胞内の狙った標的に物質を届ける自動“ナノ”デリバリーシステム

Single Cellome™ Unit SU10

- 倒立顕微鏡や実体顕微鏡に取り付けて使用するシステム・ユニット
- 細胞質や核など顕微鏡観察で定めた特定位置へ目的の物質を直接デリバリーします
- わずか数十“ナノ”の超極細ナノピペットを用いた穿刺で細胞へのダメージを最低限に抑制
- 操作を自動化し、習熟不要で高速かつ高精度な物質デリバリーを実現
- 細胞質・核など1細胞内の特定箇所の「サンプリング」にも使用できます



ナノピペット先端部の電子顕微鏡観察像

本製品に関する
詳細/問い合わせ先はこちら



横河電機株式会社
「SU10」ウェブページ

培養、イメージング解析、サンプリングの一連の操作が自動化されたサンプリングシステム 「Single Cellome™ System SS2000」

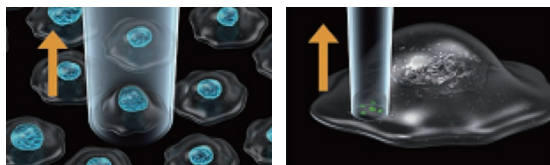
横河電機「Single Cellome™ System SS2000」は、CO₂インキュベーター、共焦点顕微鏡、チップの着脱から吸引したサンプルを吐出すユニットまでが一体化された全自動細胞サンプリング装置です。内蔵の共焦点顕微鏡による3Dイメージングと高精度のチップ位置決めにより、複数の細胞の中から特定の一細胞や、核など特定細胞の細胞内画分を正確かつ迅速にサンプリングができます。

製品紹介②

培養から共焦点顕微鏡観察まで一体型全自動サンプリングシステム

Single Cellome™ System SS2000

- 狙った細胞をチップで吸引する全自動サンプリングシステム
- 共焦点顕微鏡からカメラ、培養インキュベーター機能まで内蔵された一体型
- 共焦点顕微鏡観察と吸引位置の精密な制御により、見ている部位をそのままサンプリング
- 一細胞から細胞の特定部位まで細胞の位置・形態情報を踏まえたシングルセルサンプリングを可能にします



ホールセルサンプリング

細胞内成分サンプリング

本製品に関する
詳細／問い合わせ先はこちら



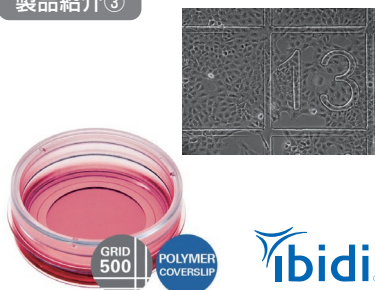
横河電機株式会社
「SS2000」ウェブページ

Single Cellome™の可能性を拡大させる”グリッド線付き”顕微鏡観察容器 「μ-Dish 35 mm grid-500」

このような「Single Cellome™ Unit SU10」や「Single Cellome™ System SS2000」のシングルセル解析における有用性は、他装置の間に互換性を持たせることができればより一層広げることができます。例えば、この二つの装置を組み合わせることにより、特定細胞に対する物質のデリバリーからサンプリングまでシングルセル解析で重要となる一連の操作ができるようになります。この際、役立つのがグリッド線付きディッシュやスライドです。グリッド線は培養面上の細胞位置情報を座標化します。座標化された位置情報は、観察ターゲットである細胞の同定を容易にし、互換性のない装置間で同一細胞の取り扱いを可能にします。

ibidi社グリッド線付培養ディッシュ/スライドには細胞位置を把握するのに適した500 μm（一部50 μm）間隔のグリッド線が刻まれた容器です。底面が高倍率顕微鏡観察に適合できるカバースリップなので横河電機社 Single Cellome™シリーズのような共焦点顕微鏡観察下で行う精細な作業に最適です。また、ガラスよりも細胞接着力が良好なポリマー製カバースリップが選択できるので、しっかり張り付いた状態の細胞位置情報、細胞形態情報が得られるので、個々の細胞の判別、同定に利用しやすい点もメリットになります。

製品紹介③



細胞位置が座標で把握できる顕微鏡観察用ディッシュ

μ-Dish 35 mm grid-500

- 細胞同定を容易にするグリッド線付
- 底面は、高倍率顕微鏡に最適な光学特性を持ちながら、良好な細胞接着力を有するibidiポリマー製
- グリッド間隔は500 μm。培養エリアを400 (A-U; 1-20) の区画に分割
- グリッド線は位相差顕微鏡観察で目視可能な掘り込み式 (5 μm未満)
- 座標を活用すれば観察ターゲットの細胞を容易に同定可能
- その他、スライドタイプ、ガラスボトムタイプ、50 μmグリッドなど多様なラインアップが提供可能

このように、横河電機 Single Cellome™シリーズにibidi社グリッド付ディッシュ/スライドは大変相性が良い製品です。そこで、今回、横河電機とibidi社日本販売総代理店である日本ジェネティクスは、シングルセル研究の発展に貢献すべく、共同企画として、両社製品を組み合わせたシングルセル解析アプリケーションを紹介することになりました。本アプリケーションノートではその第一弾として、「Single Cellome™ Unit SU10」と「Single Cellome™ System SS2000」を併用した事例を紹介します。