

ソニーセルソーターSH800S : CRISPR/Cas9システムによる発現細胞のシングルセルソーティング



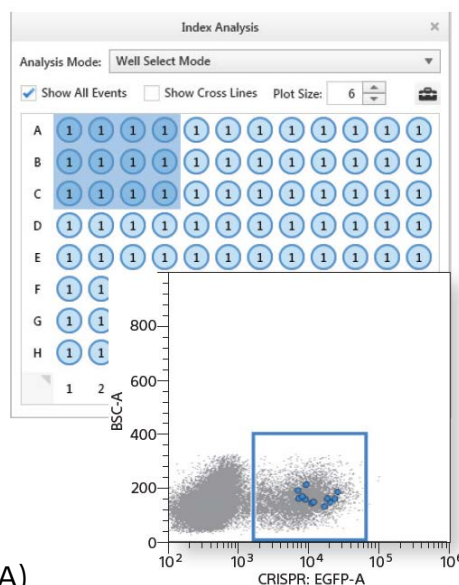
96ウェルプレートホルダー

セルソーターSH800Sのコレクションエリア

図A
CRISPR/Cas9-EGFP発現のHeLa細胞を
シングルセルで分取した結果と、
インデックスソーティング解析

Gates and Statistics

Name	Events	%Parent	%Total
All Events	96	0.00%	100.00%
A	95	98.96%	98.96%
B	95	100.00%	98.96%
EGFP+	95	100.00%	98.96%



(図A)

CRISPR/Cas9システムによる発現細胞の シングルセルソーティング

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)は、ゲノム編集における非常に重要なツールの一つとして近年注目されており、このゲノム編集はCas9ヌクレアーゼとガイドRNAの二つの分子が、標的DNA配列の認識し、DNA二本鎖切断することにより実現される¹。Cas9とガイドRNAは、トランスフェクションにより細胞内へ誘導されるが、トランスフェクションの効率は、細胞の種類やトランスフェクションの方法によって大きく左右されることが知られている。トランスフェクション効率の評価法の一つとしてCas9とガイドRNAを導入するために用いたベクターにあらかじめindicatorとして挿入された蛍光タンパク質の発現を指標とする方法がある。

ソニーセルソーターSH800は、ハイスループットで高精度なシングルセルソーティングが可能であり、96セルプレートや384ウェルプレートの各ウェルに、標的細胞をシングルセルレベルで分取可能である。SH800の持つインデックスソーティング機能では、各ソーティングイベントが検出された全イベントの内Plot上のどこに位置するかを表示させることが可能である。このインデックスソーティング機能から得られる情報は、分取した細胞のエンドポイントアッセイの結果に対して、ソーティング時に得られた蛍光強度との相関を見るメタデータ解析に使用することができる。例えば、分取されたGFP発現細胞の細胞から得られたクローンの細胞特性、ゲノム情報、成長などを比較することができる。HeLa細胞を使用した下記の実験では、CRISPR/Cas9-EGFPのコンストラクトを含んだベクターがトランスフェクションされている。

トランスフェクションの後、100 μ m Sorting chipを使い、セルソーターSH800を使用して、96ウェルプレートの各ウェルに1細胞ずつ分取した。ソーティングされたCas9 EGFPを発現する単一細胞に対してはそれぞれに対してインデックス情報が記録されている。図Aでは、96ウェルプレートに分取された単一細胞のプレートマップが示されている。このマップ上で任意のウェルを選択することにより、そのウェルに分取された単一細胞（青色のドット）のフェノタイプ（GFPの発現レベルなど）がドットプロット上に青い丸としてハイライトされる。このインデックスソーティング機能で得られる情報は、単一細胞由来のクローン化されたコロニーが形成され、その細胞集団を用いて得られた解析結果にフィードバックする事ができる。

結論

SH800では高いHeterogeneityを持つ細胞集団からのシングルセルソーティングを実施する事が可能であることから、ゲノム編集を用いた実験に於いては目的とする細胞の特異性の高い選択にSH800は優れた機能を発する。さらにSH800の持つインデックスソーティング機能はフローサイトメトリーの結果と他のアッセイの結果を結び付けることを可能とするため、遺伝子発現解析や抗体工学的な利用において、単一細胞の性質を調べるうえで非常に有用な解析技術であるといえる。

Cell Sorter SH800S

全自動セットアップ・小型化を実現した“日本発”セルソーター

Compact Size – 小型 & 4レーザー

小型ながら最大4レーザー搭載可能で、前方散乱光、後方散乱光と合計6種類の蛍光を検出可能

Automatic Setup – オペレーター不要の全自動設定

光軸調整、液滴形成、サイドストリーム調整、ディレイタイム決定を自動化し、手間のかかる設定作業が不要

Sorting Chip – コンタミネーションフリー&メンテナンフリー

細胞の種類やアプリケーションに合わせて最適なチップを3種類のオリフィスサイズ(70/100/130 μ m) から選択可能



参考文献

1 Doudna, Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9." *Science* 346.6213 (2014): 1258096.

セルソーターSH800を用いたCRISPER技術等の参考文献

- Goto, Teppei, et al. "Hypomorphic phenotype of Foxn1 gene-modified rats by CRISPR/Cas9 system." *Transgenic research* (2016): 1-12.
- Hayashi, Masayasu, et al. "Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3. 1/H3. 2." *Journal of Cellular Biochemistry* 117.3 (2016): 780-792.
- Oakes, Benjamin L., et al. "Profiling of engineering hotspots identifies an allosteric CRISPR-Cas9 switch." *Nature biotechnology* 34.6 (2016): 646-651.
- Tsunekawa, Yuji, et al. "Developing a de novo targeted knock-in method based on in utero electroporation into the mammalian brain." *Development* 143.17 (2016): 3216-3222.
- Morra, Rosa, et al. "Dual transcriptional-translational cascade permits cellular level tuneable expression control." *Nucleic acids research* (2015): gkv912.
- Miyagawa, Shuji, et al. "Generation of α 1, 3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs." *The Journal of reproduction and development* 61.5 (2015): 449.
- Nadler, Dana C., et al. "Rapid construction of metabolite biosensors using domain-insertion profiling." *Nature Communications* 7 (2016).
- Schrage, Ramona, et al. "The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes." *Nature communications* 6 (2015).
- Sluch, Valentin M., et al. "Differentiation of human ESCs to retinal ganglion cells using a CRISPR engineered reporter cell line." *Scientific reports* 5 (2015).
- Oakes, Benjamin L., Dana C. Nadler, and David F. Savage. "Protein engineering of Cas9 for enhanced function." *Methods in enzymology* 546 (2014): 491.

ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株)
ライフサイエンス営業部

〒243-0014 神奈川県厚木市旭町4-14-1
TEL: 0120-667-010 / FAX: 0120-388-060
MAIL: cytometry@sony.co.jp
http://www.sony.co.jp/LS

