

ソニーSH800シリーズによる大腸菌ソート

フローサイトメーター/ソーターは、もともとリンパ球の解析/分取を目的に開発された装置であり、細胞の取扱いを主要な用途として広く用いられていますが、原理的には溶液に懸濁されたあらゆる微粒子の取扱いが可能です。こうしたことから、細菌やプランクトンなどの微生物の取扱いも重要なアプリケーションの一つとなっています。

しかし、特に大腸菌などサブミクロンサイズの対象を扱おうとする場合、径5umないしそれ以上が殆どである細胞とは異なる取扱いが必要になります。

このテクニカルノートでは、サブミクロンサイズの対象の例として、散乱光による大腸菌の識別とソーティングを取り上げます。

ソニーフローサイトメーターでは、FSCトリガでの大腸菌検出が可能なので、大腸菌を染色することなく識別し、チューブへのソートはもちろん、96プレート/384プレート(オプション)に高精度なソーティングが可能です。

384Wellプレートソート結果

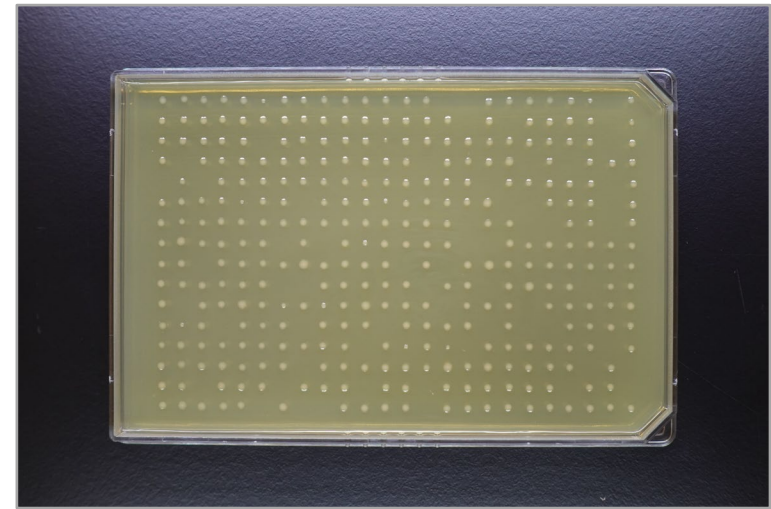
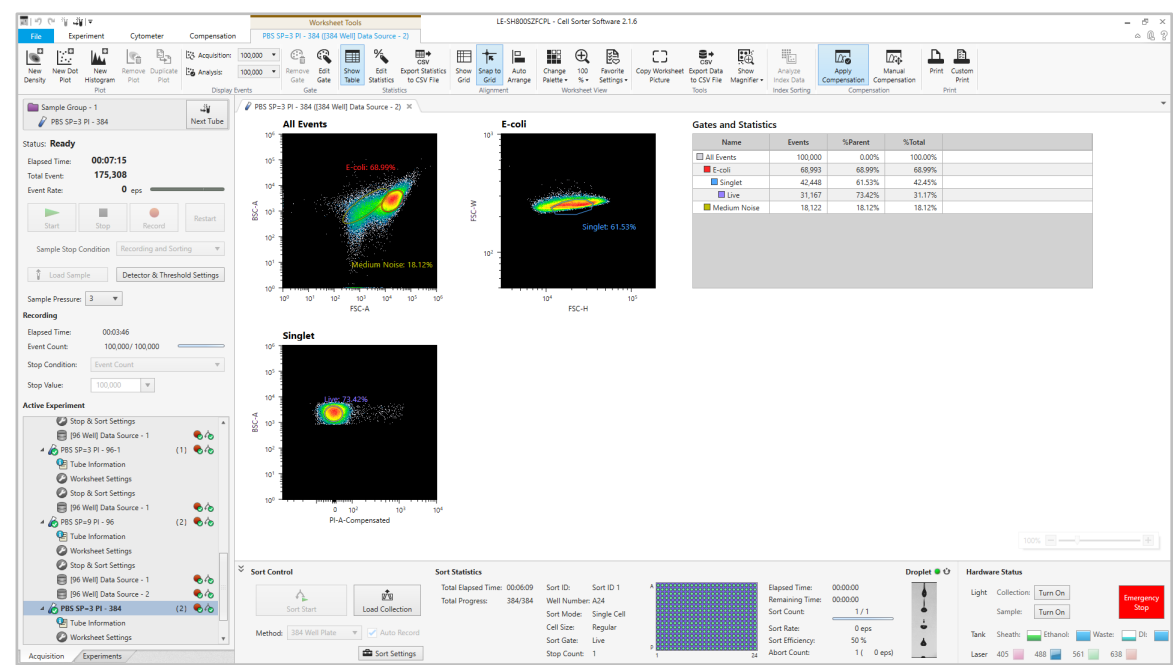


Fig.1(上): ソーティング時のゲート設定
100umソーティングチップ/Targeted Mode、Sample Pressure=3にてイベントレート約400eps.になるよう濃度調整した培養大腸菌サンプルを無標識にてPIで死細胞除去し、生菌を主とする分画をLB寒天培地にシングルセルソート。

Fig.2(左): シングルセルコロニー
ソート後、37°C/24時間インキュベートを行って形成されたコロニーの例。散乱光のみの解析でデブリとの分離が出来ているため、死菌除去のみ無標識のソーティングにもかかわらず、高確率でコロニーが形成されている。

SH800シリーズによる大腸菌ソート

散乱光識別における一般的な注意点

1. 散乱光による対象識別

ソニーフローサイトメーターでは、FSCトリガでの大腸菌検出が可能で、無染色の大腸菌を識別することが出来ますが、大腸菌は細胞の1/10程度のサイズなので、**細胞と同じ設定のままではThresholdで足切りされ、フローサイトメーターに認識されません**。従って、以下の方針での対応が必須です。

1. FSCゲインは高く/Thresholdは低めに設定

ゲインを高く設定することで微小ターゲット(=相対的に低いFSC輝度)の信号を出来るだけ引き上げ、Thresholdを低く設定することにより出来るだけ拾い上げるのが基本です。

2. 散乱光(FSC/SSC or BSC)プロットはLog表示

通常リニア表示を使う散乱光プロットですが、**Log表示**を使うことで、微小ターゲットを見やすく表示することが出来ます。

2. ノイズとの区別

ただ単にThresholdを低くしますと、デバイスや回路自体が発生させる**電気ノイズをイベントとして拾ってしまう**ことがあります。他方、ゴミなどのノイズ(Debris)は出来るだけ識別して排除することが望ましいので、電気ノイズを検出しないギリギリを狙って設定します。

1. まずMilliQなどの微粒子が除去された溶液を流し、サンプル液に含まれる微粒子による信号が、極力観測されない状態にした上で、Thresholdを最低レベルに設定し、電気ノイズの領域を確認します。確認後、ノイズ信号を識別対象と見做さないよう、少しずつThresholdを上げて、電気ノイズを認識しなくなるギリギリにThresholdを設定します。これにより、検出限界まで使って解析を行うことが出来ます。
2. 必要に応じて、培地など懸濁前のサンプル懸濁溶液を流して、懸濁溶液中にある微小成分などのノイズの領域を予め確認します。このノイズ領域ではない部分に出てきた集団が、目指すターゲットです。

ソーティングにおける一般的な注意点

1. ソーターの設定(サンプル流量とイベントレート)

大腸菌は径0.5um程度と、細胞の1/10以下のサイズなので、**細胞と同じサンプル流量では、CVが劣化してデータのバラツキが大きくなったり、流路内速度分布の影響が出て、ソーティングの回収率が劣化する場合があります**。従って、以下の点に注意して機器設定を行います。

1. 低めのサンプル流量(Flow Rate)

細胞に適したサンプル流量のままでは、**CVや回収率が劣化する場合があります**。大腸菌に適した低いサンプル流量での解析、ソーティングを推奨します。

2. 特に高純度ソーティングを行う場合はイベントレートは液滴生成数の1/5~1/10を目安に
ソーティングは、液滴内にターゲットを閉じ込めて取り出しますので、毎秒生成される液滴数よりも高いイベントレートは、原理的に扱えません。
サンプル流量は低めに保つのが望ましいので、**サンプル濃度を調整して、適切なイベントレートになるようにしてください。**

3. プレートソートの場合、**所要時間の多くを占めるのは、実はターゲットWellの移動時間です**。
移動時間中はソーティング不可能なので、ソート対象は全てAbortされてしまいます。
従って、**プレートソートの場合、イベントレートを高めても、必ずしもソーティング時間の短縮には繋がりません。**

SH800シリーズによる大腸菌ソート

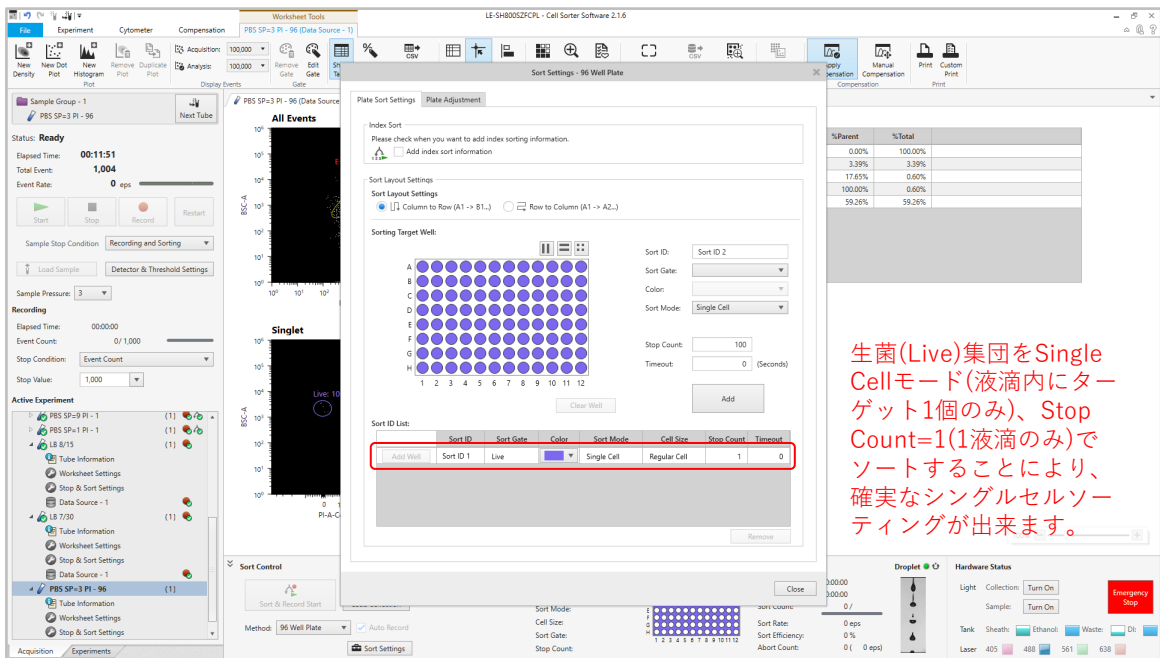
サンプル調製

今回、無染色の培養大腸菌を散乱光で識別した上でPIで生死判定し、生菌のみをソートしてプレートにシングルセルソートするアプリケーションを取り上げます。

- 大腸菌: DH5 α (バイオダイナミクス研究所 DS220)
 - LB寒天培地プレート(抗生剤無添加)(ユニテック LBA-ABF)
 - LB液体培地(抗生剤無添加)(ユニテック LB-ABF-L)
 - LB寒天培地, Miller(ナカライテスク 20069-65)
 - DPBS, no calcium, no magnesium(Gibco 14190144)
 - Propidium Iodide(PI) Solution(Sony 2706505)
- メーカー所定のプロトコルにより大腸菌DH5 α を解凍懸濁し、LB寒天培地プレートに塗布して裏返して一晩37°Cインキュベート。
 - LB寒天培地プレート上に出来たコロニーを一つ選び、液体培地に移して37°Cでインキュベート/培養
 - 大腸菌が増殖した液体培地から適量を取って1mLのPBSに懸濁、測定直前にPIを1uL添加して測定、ソーティングを行った。

プレートソートの設定例

SH800シリーズは、自動調整により、96Wellプレートまでは、ソート位置の微調整無しで、全Wellに正確なソーティングが可能です(384Wellプレートをご利用の際は微調整による位置調整が必要です)。
今回の例では、PIで生死判定を行った生菌を主とする分画を96Wellプレート相当サイズのLB寒天培地全面にシングルセルソートし、37°Cで24時間インキュベートした後のコロニーを観察しました。



生菌(Live)集団をSingle Cellモード(液滴内にターゲット1個のみ)、Stop Count=1(1液滴のみ)でソートすることにより、確実なシングルセルソーティングが出来ます。

Fig.3: プレートソートの設定例(96Well)

SH800シリーズによる大腸菌ソート

96Wellプレートソート結果

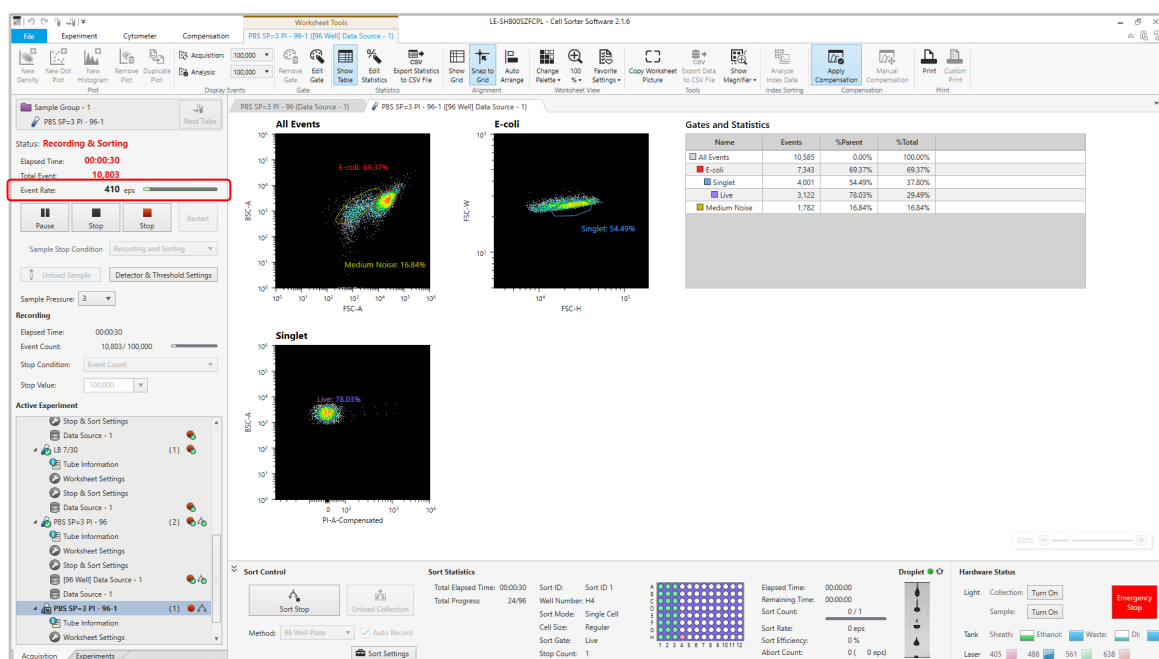


Fig.4(上): ソーティング時のゲート設定
100umソーティングチップ/Targeted Mode、Sample Pressure=3にてイベントレート約400eps.になるよう濃度調整した培養大腸菌サンプルを無標識にてPIで死細胞除去し、生菌を主とする分画をLB寒天培地にシングルセルソート。

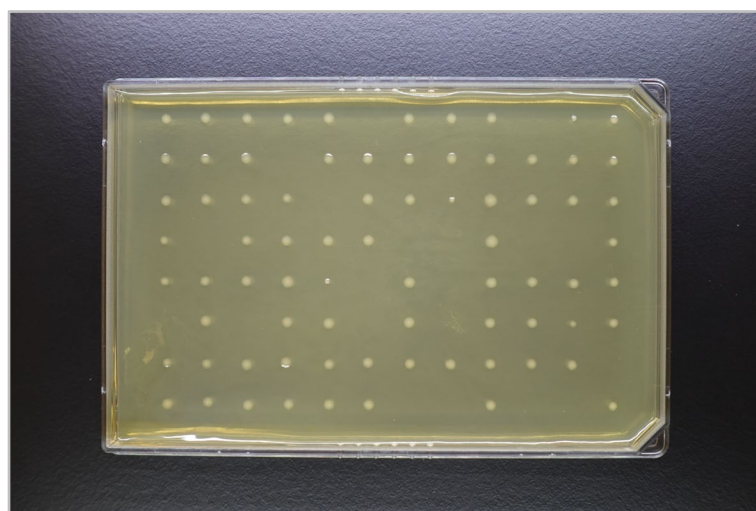


Fig.5(左): シングルセルコロニー
ソート後、37°C/24時間インキュベートを行って形成されたコロニーの例。散乱光のみの解析でデブリとの分離が出来ているため、死菌除去のみ無標識のソーティングにもかかわらず、高確率でコロニーが形成されている。

セルソーターSH800S

簡単セットアップ・小型化を実現した“日本発”セルソーター

- ・ 96/384シングルセルソート（SPモデル/384はオプション）
- ・ 目的に応じてオリフィスサイズを選択できるディスポーザブルソーティングチップ
- ・ 直感に訴えるユーザーフレンドリーなソフトウェア



発行元

ソニー株式会社

ライフサイエンス&テクノロジー事業部

ライフサイエンス事業部門

〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1

Tel: 0120-667-010

URL: <http://www.sony.co.jp/Products/LifeScience/>

