

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

今号のポイント: セルソーターを用いてシングルセルRNA-Seqを行う場合、細胞分取までの作業が重要になります。実験の成功に役立つ注意点をまとめました。

【キーワード】 細胞、セルソーター、シングルセル解析、SMART-Seq

セルソーターを用いたシングルセルRNA-Seq実験を成功させるための5つのTips

高品質のシングルセルRNA-Seqデータを得るためには、シングルかつ生きた細胞を捕獲した後に、ライブラリー調製前にRNAが分解することを防ぐため迅速かつ慎重に作業をすることが重要です。細胞のソーティングを成功させるためには、ソーティング技術の慎重な計画と最適化が必要です。

ここでは、ライブラリー調製キット使用の上流において、一般的な問題を回避し、サンプル品質を最高にするための細胞収集についての推奨事項を含む5つのヒントをご紹介します。

1. セルソーターを詰まらせない

目詰まりしたフローサイトメーターほど悪いものではありません！ ソーティングが遅くなると、サンプルが劣化する可能性があります。したがって、遠心分離、セルストレーナまたはその他の方法で細胞破片や細胞塊を除去し、それらが残存していないことを確認する必要があります。細胞生存率を維持したままシングルセル数を最大にするために、単離技術を最適化してください。マグネシウムとカルシウムは多くの接着分子に必要なため、ろ過した1×PBS (EDTA、MgおよびCa不含、1~2%BSA添加)またはBD FACS Pre-Sort Buffer (BD社、Cat No. 563503)に細胞を懸濁することをお勧めします。また、BD FACS Pre-Sort Bufferは生存率を維持するために血清タンパク質を含んでいることに注意する必要があります。培地にソーティングされた細胞は生存率が下がることもあり (Kissner 2015)、cDNA合成を阻害することもあります。生きたシングルセルを最大限に取得するために、ソーティング前に生存確認用の染色を行うことを推奨します。

2. 細胞をやさしく扱う

セルソーティングは細胞に対して優しくありませんが、ソーティング中の細胞へのダメージや溶解を最小限に抑えるために、できることがいくつかあります。Tips 1でご紹介したソーティング前のバッファーガイドライン(1×PBSまたはBD FACS Pre-Sort Buffer)に従うことに加えて、特に脆弱な細胞に対しては、ノズルのサイズを大きくしたり、流速を遅くすることをお勧めします。セルソーターを最適な設定にするため、フローサイトメーターのコア施設または機器メーカーと協力して行ってください。特に低流速で希少細胞のソーティングを行う場合、時間がかかることがあります。ソーティング前に濃縮するか、2段階のソーティングを行うことをお勧めします。

3. ウェルの底にソーティング

これは簡単に思えますが、重要な問題です。プレート/チューブのウェルの底に、細胞を含む液滴が落ちるようにセルソーターがセッティングされていることを確認してください。プレートやチューブが適切な位置にない場合、細胞がウェルの側面に集まって乾燥することで、RNAが分解する可能性があります。最悪の場合、細胞はウェル内に全く回収されないかもしれません。フローサイトメーターのコア施設または機器メーカーと協力して、ソーターを調整してください。液滴を適切に落とすために、蛍光ビーズ (Zigon *et al.* 2018)、HRPを用いたレポーター (Rodrigues and Monard 2016)、さらにはリトマス試験紙 (Baumgartner *et al.* 2014)を用いた品質管理方法を開発した研究者もいるので、それらの文献を参考にすることもできます。



裏面につづく ➡

4. 溶解バッファーにソーティング

細胞のソーティング後、RNAはできるだけ早く安定化させる必要があります。したがって、RNaseインヒビターを含む新鮮な冷却された溶解バッファーにソーティングすることをお勧めします。細胞がプレートあるいはチューブに入ったら、100×gで15~30秒間穏やかに遠心します。すぐにcDNA合成に進まない場合は、サンプルをドライアイス上に置いて急速凍結し、-80°Cで数週間保存できます。これらのステップによって、RNaseインヒビターを含む溶解バッファー中に確実に細胞をソーティングすることができます（液滴は跳ね返ることがあるため）。弊社シングルセルRNA-Seqキットにおける推奨事項は、下記の表をご覧ください。

各SMART-Seqキットの推奨溶解バッファー

キット名	推奨溶解バッファー	容量/well	内容
SMART-Seq v4	1×Reaction Buffer	11.5 µl	Lysis buffer and RNase inhibitor
SMART-Seq HT	CDS Sorting Buffer	12.5 µl	Lysis buffer, RNase inhibitor and CDS primer
SMART-Seq Stranded	1.25×Lysis Buffer Mix	8 µl	Lysis buffer and RNase inhibitor

※バッファー組成の詳細は、各キットのユーザーマニュアルに記載しています。

5. 専門家への相談

セルソーティングは複雑で、セルソーターの機種により特性が異なります。実験を始める前に、フローサイトメーターのコア施設または機器メーカーにご相談ください。正しく実験を行うための手助けをしてくれます。

◆ 参考文献

Baumgartner, T. *et al.* "Direct visual confirmation of sort material deposition alignment at the bottom of 96 and 384 well PCR plate wells." Poster presented at the XXIX Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, Ft. Lauderdale, FL, May 2014.

Kissner. How Cell Culture Medium Can Decrease Cell Viability During A Flow Cytometry Cell Sorting Experiment. *Expert Cytom.* (2015).

Rodrigues, O. R. & Monard, S. A rapid method to verify single-cell deposition setup for cell sorters. *Cytom. Part A* **89**, 594-600 (2016).

Zigon, E. S. *et al.* A rapid single cell sorting verification method using plate-based image cytometry. *Cytom. Part A* **93**, 1060-1065 (2018).

◆ シングルセルRNA-Seqで使用可能なcDNA調製キットまたはライブラリー調製キット

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing ※	48回	634890	¥803,400
SMART-Seq® HT Kit ※	48回	634456	¥280,000
SMART-Seq® Stranded Kit	48回	634443	¥658,000

※断片化とライブラリー調製のために、イルミナ社Nextera XT DNA Sample Prep Kit、Nextera XT Index Kitが別途必要です。

・本チラシで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
・本チラシに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
・本チラシ記載の価格は2019年9月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2019年9月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店