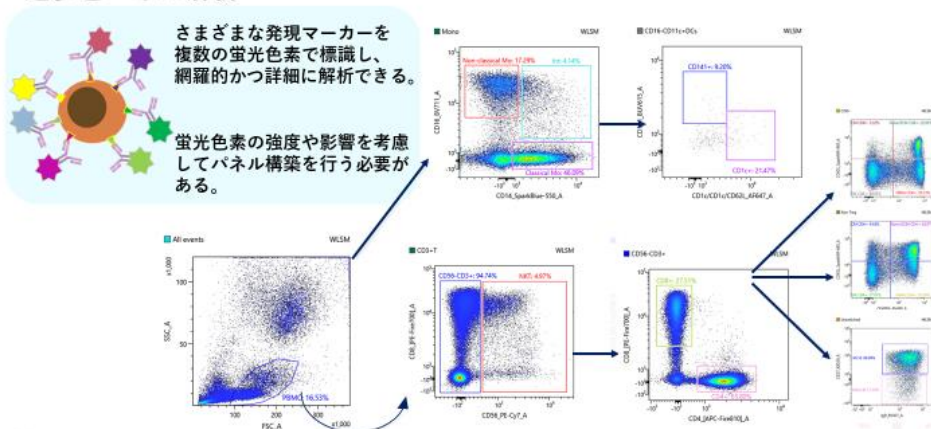


ID7000における超多色パネル解析のための 蛍光輝度強度情報と蛍光色素間の影響

超多色パネル解析

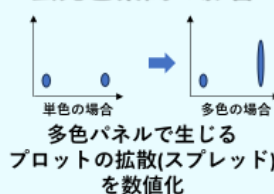


本稿の概要

蛍光色素の強度情報



蛍光色素間の影響



背景

超多色パネル解析は、細胞を複数の蛍光色素で標識して網羅的かつ詳細に解析しようという手法であり、組織などから目的の細胞を特異的に解析したい、それぞれの細胞を同時に同定したい場合に用いられる。

ID7000はスペクトル方式による超多色パネル解析を可能とするが、この装置の性能を十分発揮するには、蛍光色素強度情報や蛍光色素間の影響を加味してパネル作成を行う必要がある。

ここでは、弊社ラボで実際に測定した蛍光色素の情報をもとに、ID7000のユーザーがより精度の高い解析を行えるアプリケーション情報を提供する。



サンプル、装置

- ・ Quantum™ Simply Cellular®, Bangs Laboratories
- ・ ID7000C(5レーザー：488nm / 355nm / 405nm / 561nm / 637nm)

方法

蛍光色素で標識することが出来る細胞を模した“Beads”を使用して、下記に示す82色の蛍光色素を用いてそれぞれを染色し、ID7000において測定を行った。今回測定に使用したサンプル (Quantum™ Simply Cellular®, 以下Bangs Beads)は蛍光色素を補足できる強度が違う5種類のBeadsのセットで、一般的に細胞表面抗原の定量解析に使用される。また、解析を進めていくとBangs Beadsには特有の自家蛍光スペクトルを持っていることがわかった。これを加味し、Bangs Beadsの解析には各蛍光色素と自家蛍光のUnmixingデータ、つまり一色素ごとに自家蛍光と分離したデータで解析することとした。

— 蛍光強度情報の評価 —

従来方法である(1)Stain Index (SI)、(2)線グラフ傾き評価法、(3)プロット分離度評価を用いることとした。(2)(3)の方法に関してはBangs Beadsの特徴を活かした独自の評価である。それぞれの評価方法の詳細を下記に示した。

- (1): 【SI=(Positive MFI - Negative MFI)/2*Negative SD】によって算出された数値を比較
 - (2): Bangs Beadsの5つの集団の蛍光強度MFIとキャプチャー発現分子量から線グラフを作成
 - (3): プロット図の縦横軸を固定し、Bangs Beadsの集団の数を右から順に数えた数値で分離度を比較
- (1)に関して、ID7000では“Gate and Statistics”の“Statistics Editor”機能を使用することで、蛍光強度のMean値やMedian値を算出することが可能である。この値を用いて、各蛍光色素のSIを算出した。
- (3)に関して、評価の詳細を示した(図1)。

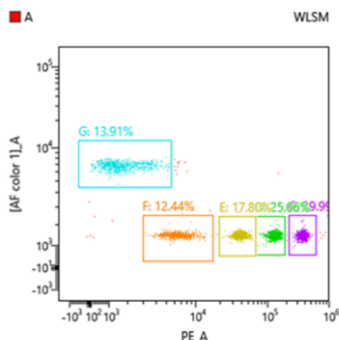


図1: PEのプロット分離度評価例

82色の蛍光色素それぞれについて、縦軸をBeadsの自家蛍光、横軸を各蛍光色素として、縦軸と横軸をすべて固定し右から順に集団の数を数える。

図1の場合、集団は右から順に5つ数えることが可能である。(1)(2)が蛍光強度の観点から評価しているのに対し、この評価方法では同じ蛍光で標識された異なる発現分子数をもつ集団の分離度を定量的に評価している。

— 蛍光色素間の影響の評価 —

蛍光色素それぞれが互いに及ぼす影響を評価するため、測定した蛍光色素から任意の超多色パネルを作成し、そのSpread Spillover Matrix (SSM)を算出した。算出にはFlowJo software v10.8.1 (BD, San Diego, CA, USA)を使用した。本稿では、42色からなるパネルの中で蛍光色素どうしに影響があるかを検討した。

結果

— 蛍光強度情報の評価 —

今回測定した蛍光色素の一覧表と、(1)(2)(3)の結果を各レーザーごとに以下に示した。(Table 1-5および図2)。(1)の結果はTableの"SI"に、(3)の結果はTableの"分離度"に示した。また、(2)の結果はTable右側の図で示し、Beads 5種類の各蛍光強度はTableの"蛍光強度"の項目に一覧として記載した。

Table 1

蛍光色素	Ex (nm)	Em (nm)	SI	蛍光強度					分離度
BUV395	355	395	93.4	77.9	2691.8	14547.2	51312.2	118858.9	5.0
AF350	355	442	6.6	-93.6	-170.6	56.4	519.7	1910.4	2.5
BUV496	355	496	186.2	15.3	1443.8	7031.0	23747.6	57046.3	5.0
BUV563	355	563	561.5	0.0	1260.5	7159.4	24251.8	59419.9	5.0
BUV615	355	615	741.3	0.0	2123.5	9941.4	33831.0	80918.5	5.0
BUV661	355	661	1232.4	0.0	3173.3	20841.0	67800.9	139185.5	5.0
BUV737	355	737	257.6	0.0	685.7	4237.9	14419.3	35800.2	4.5
BUV805	355	805	99.1	-16.4	310.5	1896.6	6427.3	14789.8	3.5

(A)

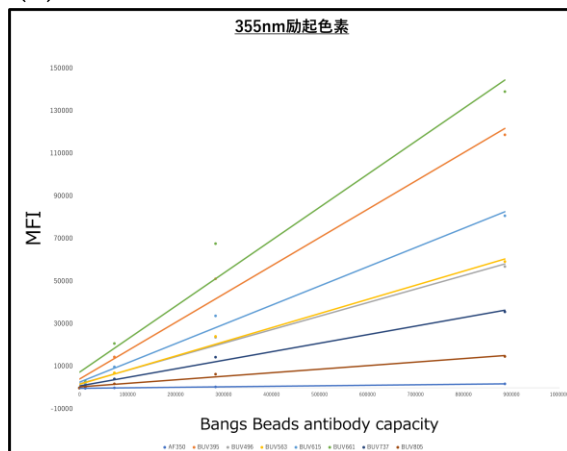


Table 2

蛍光色素	Ex (nm)	Em (nm)	SI	蛍光強度					分離度
BV421	405	421	3007.9	-143.3	8418.0	50292.9	155485.9	362067.3	5.0
Spark Violet 423	405	423	188.3	-141.4	168.4	1811.7	7062.9	21891.5	5.0
Super Bright 436	405	436	1167.8	-133.6	2504.8	18038.2	60782.2	141632.4	4.0
Super Bright Violet 440	405	440	4541.1	-133.2	12892.8	76046.6	247362.5	532904.2	5.0
eFluor 450	405	450	183.6	-118.4	284.6	2441.0	9222.6	27984.9	5.0
V450	405	450	98.4	-103.4	132.0	1395.7	5317.7	16297.7	3.5
Pacific Blue	405	455	101.1	-89.6	189.3	1577.9	5795.3	17440.1	3.5
BV480	405	478	323.7	75.5	1932.0	9996.3	34913.2	87631.4	5.0
BV510	405	510	187.4	116.3	795.1	4452.3	15664.4	40940.6	5.0
Spark Violet 538	405	538	26.2	92.6	197.9	569.7	1683.7	4845.4	5.0
Pacific orange	405	551	60.1	88.3	264.1	1030.6	3464.1	10632.9	4.5
BV570	405	570	297.5	0.0	691.1	3922.5	13740.1	34687.5	5.0
Super Bright 600	405	600	938.7	0.0	1781.1	13137.0	42379.0	95012.0	5.0
BV605	405	602	630.8	0.0	1121.3	7126.1	25237.0	63899.6	5.0
Super Bright Violet 610	405	610	1527.2	39.2	1928.4	18002.3	72203.4	182420.0	5.0
BV650	405	650	300.8	0.0	646.6	3566.4	12256.0	31591.4	5.0
Super Bright Violet 670	405	670	844.4	0.0	1547.0	10342.8	36960.6	91805.6	5.0
Super Bright 702	405	702	629.8	0.0	1008.5	6533.0	21456.8	49880.5	5.0
BV711	405	711	354.7	0.0	433.7	2703.7	9520.3	24918.8	5.0
BV750	405	750	159.7	0.0	297.1	1523.9	5603.5	14690.7	4.0
Super Bright 780	405	780	232.1	0.0	200.9	1948.6	7648.0	19669.2	4.0
BV785	405	785	109.8	-18.7	200.8	1407.4	5168.1	13576.4	4.0

(B)

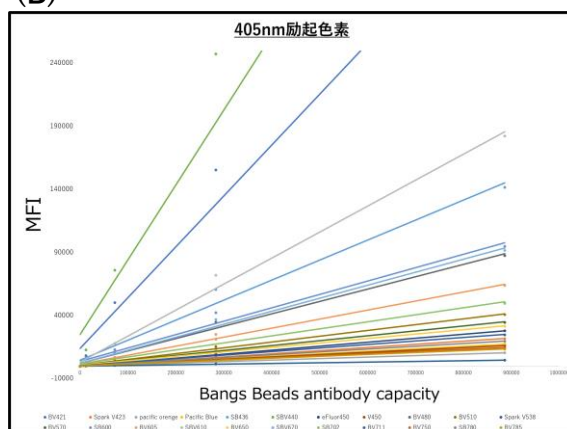


Table 1-2: 励起レーザー別蛍光色素一覧とそれぞれの(1)(2)(3)の結果

図2(A, B). 励起レーザー別線グラフ傾き評価

考察とまとめ

— 蛍光強度情報の評価 —

(1)(2)(3)それぞれメリットとデメリットを含めた評価を記載する。(1)はMFIの数値が把握できていれば比較的算出することが容易であるが、数値のみのデータとなるため定性的でない。また、算出式の特性上ネガティブの値に左右されやすい。(2)はBeadsの蛍光強度を5点とりMFIを取得することでより定量性を向上させ、定性的な線グラフで“みえる化”させている。しかし、Beadsと蛍光色素の親和性に左右される可能性があるため、細胞サンプルの結果とは必ずしも一致するとは限らない。(3)の分離度は1~5というシンプルな数値で分離度を評価できるが、蛍光強度がわからず前者と比較すると定量性に欠ける。

線グラフ傾き法はSIと相関がみられ、より定量的で視覚的に捉えやすいデータであると考えられる。一方で線グラフ傾き法とプロット分離法では結果に相違もみられた。線グラフ傾き法の最も有効な点は、輝度強度が不明な分離度と比較して発現が弱い分子に明るい蛍光色素を指標となる点にある。それに対し分離度は、蛍光強度が弱くても些細な分離の違いで集団を差別化する際に有用だと考えられる。また、蛍光色素は一般的に蛍光強度で良し悪しが比較されることが多いが、強度が強いからと言って分離が必ずしも良くなるとは限らない点には注意が必要である。上記の情報を照らし合わせて最適な蛍光色素を選定することが重要である。

— 蛍光色素間の影響の評価 —

ID7000のようなハイエンドアナライザーのユーザーが超多色パネルを作成する際は、使用する蛍光色素数が多いためどうしても類似した波長域を持つ蛍光色素を使用せざるを得ない。近接蛍光の存在はSSMの数値は上昇させ(Table7)、プロットにスプレッドを生じさせてしまう(図3A-C)。多色パネルの場合、蛍光色素の特性上このようにほかのあらゆる蛍光色素への影響を考慮する必要があるため、今回のような検討が求められる。

SSMの結果に示したパネルは一例ですが、ユーザー様が解析したいパネルに合わせて本実験の情報を使用して蛍光色素間の影響を評価することが可能であるため、蛍光強度情報も含めて超多色パネル作成時にお困りの際はぜひ一度お問い合わせください。

発行元

ソニー株式会社

ライフサイエンス事業部

〒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/LS>

