

MA900の高い汎用性を活かしたパネルデザイン

MA900は最大4レーザーを搭載可能、12色の蛍光検出と4wayソートに対応したソニーのハイエンドセルソーターである。機器セットアップの自動化、直感的に使用できるソフトウェア、各種ウィザードによるガイド機能など、ユーザーの負担を軽減する機能がいくつも盛り込まれており、気軽に多色解析と高精度ソーティングを実施可能な装置となっている。

このことに加えて、MA900では蛍光色素の選択の自由度が大きくなるような独自の光学設計が採用されており、装置設定を変えずに幅広い蛍光色素に対応することができる。このアプリケーションノートでは、3レーザー搭載の他のソーターで使用されていた10色のイムノフェノタイピングパネル実験系を、2レーザーモデル(488nmと405nm)のMA900で代替(Table 1)し、更にターゲット細胞の4wayソーティングを行った事例を紹介する。

Sorter A (3 laser)		MA900 (2 laser)	
488nm	Alexa Fluor® 488	488nm	Alexa Fluor® 488
	PE		PE
	PerCP-Cy5.5		PerCP-Cy5.5
	PE-Texas Red®		PE/Dazzle
	PE-Cy7		BV421
405nm	Horizon V450	405nm	BV510
	Horizon V450		BV605
638nm	APC		BV650
	Alexa Fluor 700		BV711
	APC-Cy7		BV750

Table 1. 2レーザーモデルのMA900で代替した10色パネル

方法

全血をRBC Lysis Bufferにて溶血処理した後、Alexa Fluor® 488-CD3、PE-CD19、PerCP-Cy™5.5-CD8、PE/Dazzle™-CD16、Brilliant Violet 421™-CCR7、Brilliant Violet 510™-CD27、Brilliant Violet 605™-CD20、Brilliant Violet 650™-CD45RA、Brilliant Violet 711™-HLA-DR、Brilliant Violet 750™-CD4(全てSony Biotechnology社)(Table 2)を適量加え、氷上で20分間インキュベートした。その後、染色バッファーで2回洗浄した後にPBSで細胞を再懸濁し、MA900での分析に使用するまで氷上に保管した。

MA900セルソーターは70µm/100µm/130µmの3種のソーティングチップが選択できる。今回は100µmチップを選択し、自動キャリブレーション機能を使用して装置セットアップを行った。各蛍光色素に対するシングルステインコントロールを調製し、コンペンセーションウィザード機能に従ってスピルオーバーマトリックスを作成し、蛍光補正を行った。マルチステインサンプルを測定後、下記に示すゲーティング戦略で各サブpopulationを分析し、ソートする細胞集団を特定した。

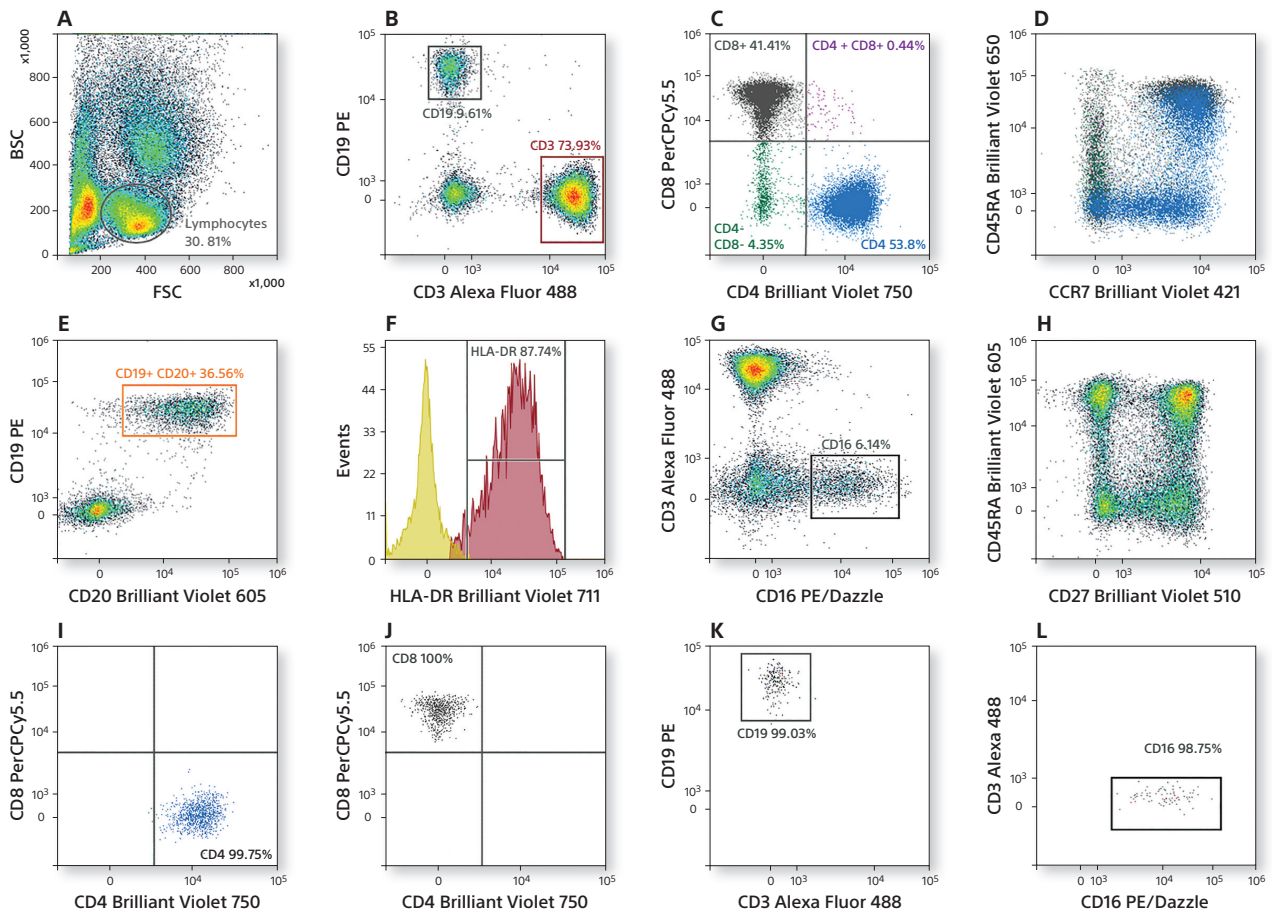
Channel	Laser	Fluorochrome	Antibody
FL1 (525/50)	488nm	Alexa Fluor® 488	Anti-Mouse CD3
FL2 (585/30)		PE	Anti-Mouse CD19
FL3 (617/30)		PE-Dazzle	Anti-Mouse CD16
FL4 (685/40)		PerCP-Cy5.5	Anti-Mouse CD8
FL5 (785/60)		PE-Cy7	Not used
FL6 (450/50)	405nm	BV421	Anti-Mouse CCR7
FL7 (525/50)		BV510	Anti-Mouse CD27
FL8 (585/30)		BV570	Not used
FL9 (617/30)		BV605	Anti-Mouse CD20
FL10 (665/30)		BV650	Anti-Mouse CD45RA
FL11 (720/60)		BV711	Anti-Mouse HLA-DR
FL12 (785/60)		BV750	Anti-Mouse CD4

Table 2. MA900の各検出チャンネルと蛍光色素・抗体パネルの例

結果

前項の方法で染色した細胞サンプルを、MA900 を使用して分析した結果を示す (Figure 1. A ~ H)。A. 散乱光プロットからリンパ球分画をゲートした。B. A のリンパ球分画から CD3+ と CD19+ 細胞をそれぞれ見出した。C. B で見出された CD19+ 群から、CD4+/- および CD8+/- をそれぞれ分画するゲートを作成した。D. B で見出された CD3+ 細胞群における CCR7+、CD45RA+ を解析した。E. A のリンパ球分画から CD19+、CD20+ の B 細胞をゲートした。F. E で見出された B 細胞集団の HLA-DR 発現を解析した。G. A のリンパ球分画中の CD16+ NK 細胞をゲートした。H. A のリンパ球分画中の CD45RA+ サブセットの CD27 発現細胞を解析した。

次に、MA900 セルソーターの 4way ソート機能を用いて、CD4+ および CD8+ T 細胞 (プロット B より)、CD19+ B 細胞 (プロット C より)、CD16+ NK 細胞 (プロット G より) をソーティングした。分離した各細胞サンプルを再解析した結果をそれぞれ示す。(Figure 1. I ~ L)



まとめ

488nm と 405nm の 2 レーザーを搭載した MA900 セルソーターモデル (LE-MA900CP) を用いて、10 色パネルを用いて免疫フェノタイピング解析を行った。その結果、T 細胞、B 細胞、NK 細胞の各細胞群を構成する 11 種のサブセットを同定することができた。これらのサブセットのうち、4 種ターゲット集団を 4way ソーティングによって分離した。

分離された細胞サンプルを再解析したところ、その純度は 98% ~ 100% と非常に高いことが分かった (Table 3)。

Alexa Fluor® and Texas Red® are registered trademarks of Life Technologies Corporation.
Cy is a trademark of GE Healthcare. PE/Dazzle is a trademark of BioLegend.

Subset	Pre Sort: % Parent	Post Sort: % Parent
CD4+ T cells	40.67%	99.75%
CD8+ T cells	53.25%	100%
CD19+ B cells	9.82%	99.03%
CD16+ NK cells	3.05%	98.75%

Table 3. 4wayソートの結果

©2021 Sony Corporation Sony and the Sony logo are trademarks of Sony Corporation. For non-clinical research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures, or for any other clinical purpose. All other trademarks are property of their respective owners. The MA900 cell sorter is classified as a Class 1 laser product. Specifications subject to change without notice. For Research Use Only.
8.03.052119.0

ソニー株式会社

メディカルビジネスグループ 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
<http://www.sony.co.jp/LS>

