

Single Cell Cloning

シングルセルクローニング

Introduction 序論

シングルセルクローニングは、細胞株開発における初期段階であるが、重大なステップに相当します。シングルセルクローニングの目的は、トランスフェクションまたはハイブリダイゼーションの後、単クローン性(モノクローナル)細胞集団を特定して、分離することです。単クローン性に加えて、他のパラメータ — 例えばタンパク質発現レベルと特定の成長速度 — は、しばしば追加的な選択基準として適用されます。

伝統的に、シングルセルクローニングはマイクロプレートに細胞に播種するために、限界希釈法を用いて行われます。コロニー成長の観察と単クローン性(モノクローナル)コロニーの選択は、顕微鏡観察を使用して行われます。しかしながら、手動の観察は非常に時間がかかって、信頼性に乏しく、記録するのが困難です。

以下のアプリケーションノート・ノートにおいて、我々は細胞株開発におけるシングルセルクローニング・アッセイの速度と信頼性を改善するために、Cellavista システムを利用することを概説します。

Methods 方法

トリプシン処理されたチャイニーズハムスター卵巣細胞 亜種 CHO-K1 培養細胞(10%の FCS を含む DMEM 中、25 個の細胞 mL^{-1}) 80 μl を、384 ウェル・マイクロプレート (Corning 社製 カタログ # 3712) の 192 ウェルに播種しました。細胞沈殿を可能にするために標準細胞培養条件下の 37°C で 1 時間培養した後、プレートを Cellavista を使用して解析しました。(アプリケーションノート:「Single Cell Cloning」(4 倍 対物レンズ))

最初の計測の後 8 日間、毎日プレートを計測しました。8 日目に、異なる大きさの 4 つのコロニーを選択しました。プレート表面に接着した CHO-K1 細胞のコロニーは、マニュアルで正確にコロニーあたりの細胞数をカウントできる状態でした。従って、画像はコロニーあたり細胞の数を決定するために目視で解析しました。そして、検出された数はその後、Cellavista 画像認識ソフトウェアが決定した、コロニーによって覆われた面積と比較しました。

結果として生じる細胞数/細胞面積の関係に基づき、50 個の細胞 (または 0.0436 mm^2) の値を、コロニー選択のための最小値と定義しました。その後、プレート播種後 8 日目に実施した計測から得られた全画像に対し、0.0436 mm^2 (≥ 50 個の細胞) より大きいコロニーについて解析しました。

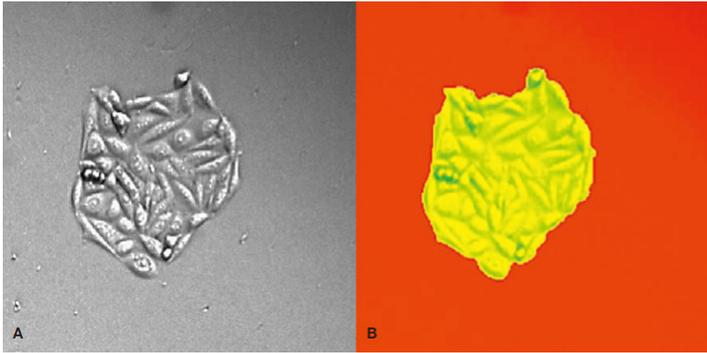


図 1：
 (A) 小さな CHO-K1 コロニーの Cellavista 画像
 (B) Cellavista 画像解析ソフトウェアから得られた結果のオーバーレイ表示

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)コロニーの細胞数・面積間の相関

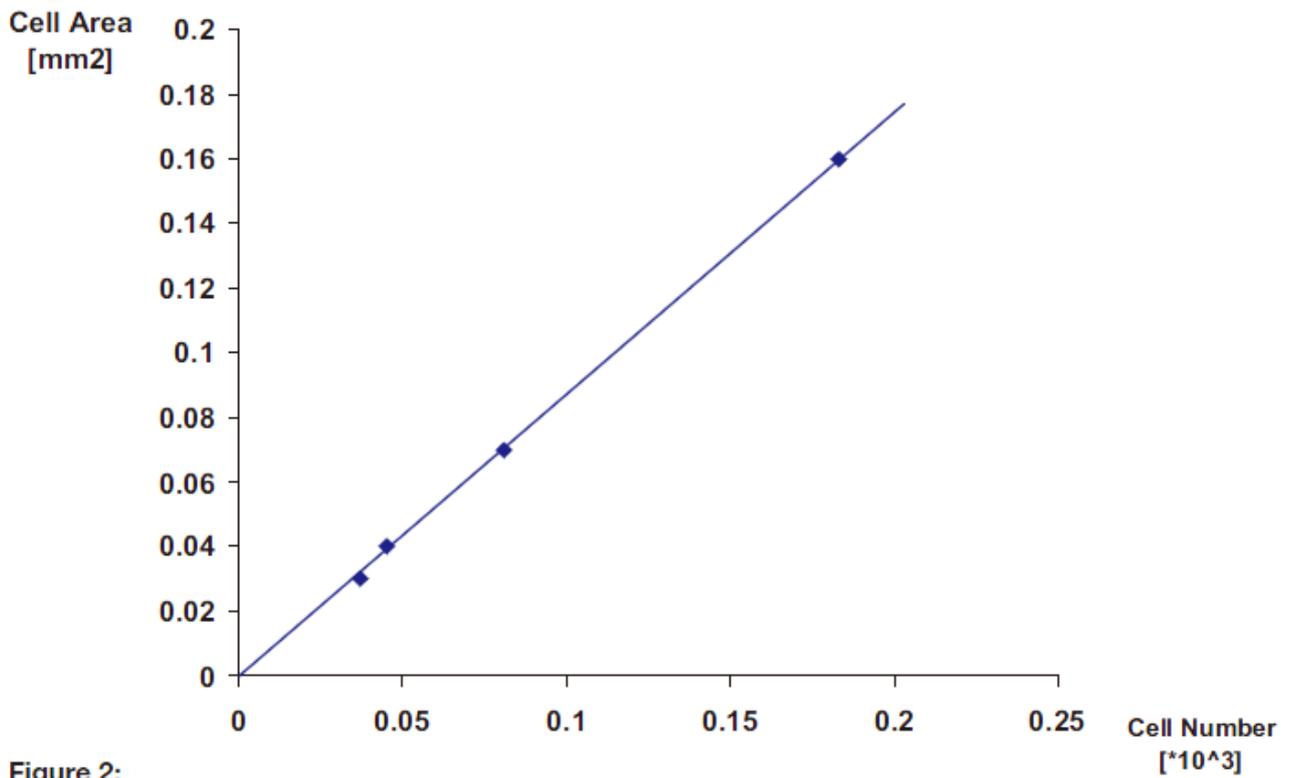


Figure 2:

図 2：
 細胞数とコロニー面積間の相関
 4 つの CHO-K1 コロニーの細胞数は Cellavista 画像に基づいて手動でカウントし、Cellavista 画像解析ソフトウェアによって決定される細胞面積の値と比較しました。細胞数と細胞面積間には、鮮明なリニア相関があります。

Results 結果

図1は、Cellavista 計測の原理を示します。

一つのコロニーが検出され、細胞によって覆われている面積が定量化されました。

大きさ・形態または成長カイネティクスに基づいて、コロニー検出の条件(幅)を狭めることができます。

例えば、特に急速に成長するクローンを排他的に選択することができます。

図2は、細胞面積と4つの選択されたコロニー（8日目）の細胞数との間のリニア関係を表します。

この曲線によれば、50個の細胞が、約0.043 mm²の面積を覆いました。

全192ウェルの解析により、34ウェルだけが、50個の細胞（図3を参照）より大きなコロニーを含むことが明らかになりました。34ウェルのうち20ウェルにおいて、他のいかなる小さなコロニーもありませんでした。

これらの20個のウェル内のコロニーは、8日間取得した画像（図4を参照）を遡ってコロニーの成長を追うことにより、それらが単クローン(モノクローナル)由来であるか調べられました。この解析の結果、5ウェルだけが明らかな単クローン由来（すなわちそれが、明らかに単細胞から生じたコロニー）の1コロニーを含むことがわかりました。15のウェルについては、細胞がプレートに播種された直後に、2つ以上の細胞がすでに存在していました。

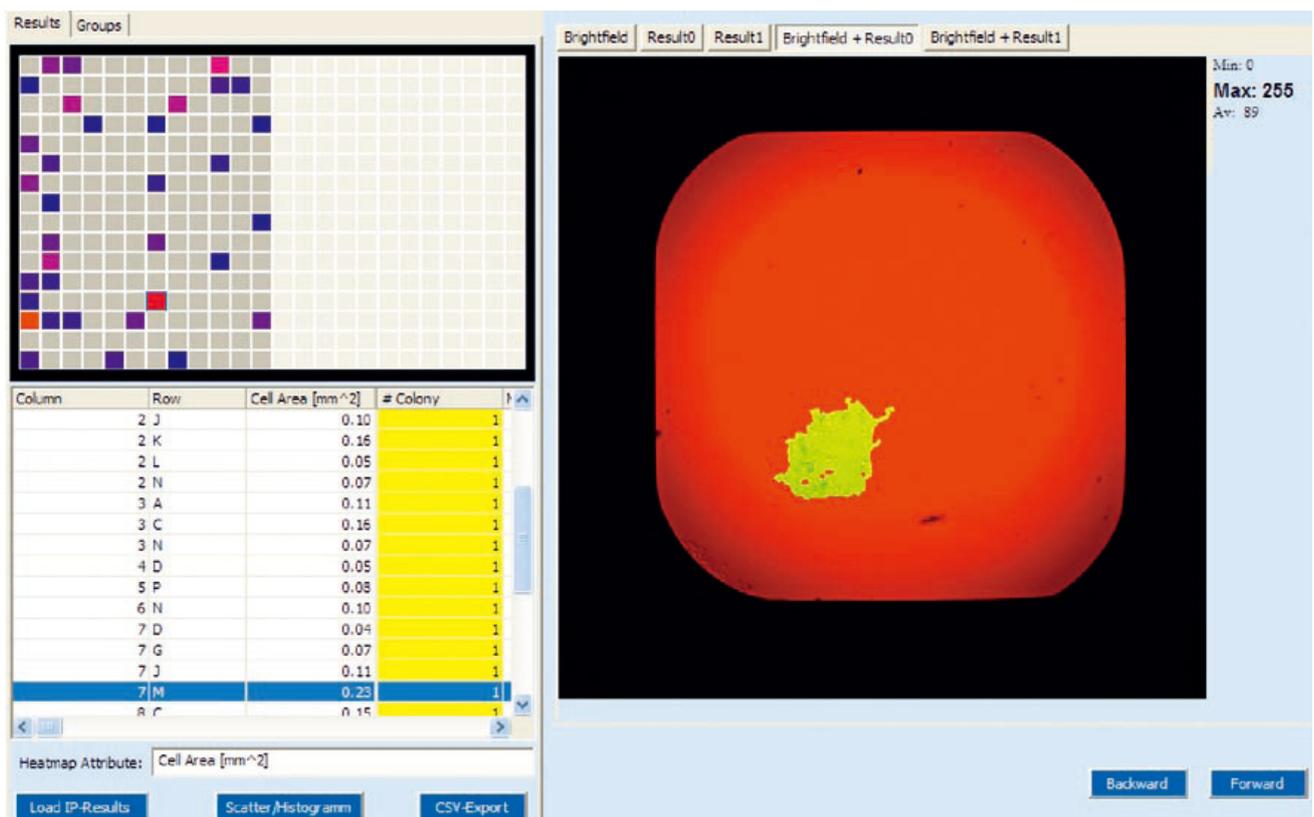


図3：

図3は、画面の左上角にプレート概観を含む、Cellavista GUI（グラフィカル・ユーザ・インターフェース）を表しています。50の細胞（0.0436mm²）と等しい、あるいは、より大きいコロニーを、少なくとも1つ含んでいるウェルだけが強調されています。ウェルの色は、ウェル内のコロニーサイズを示しています。

右の画像は、ウェル M7 についての画像解析のオーバーレイを表しています。

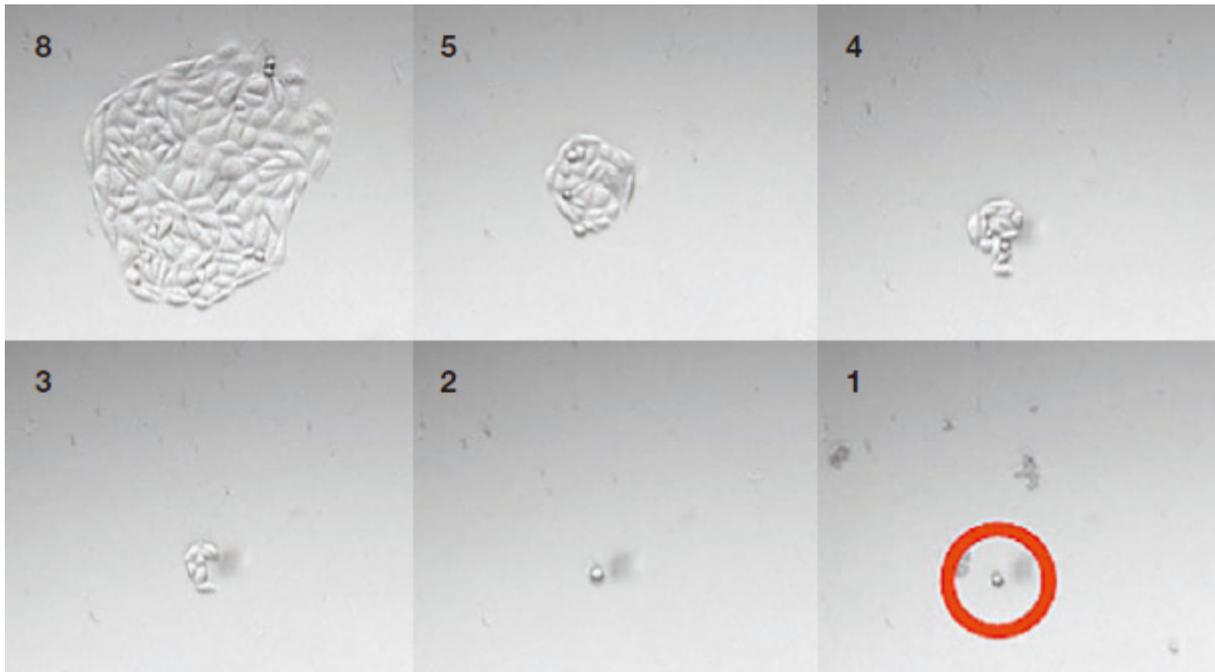


図 4 :

画像は生育の良いコロニーについての成長を、細胞播種の直後のコロニー起源まで遡ってトラッキングした例を示します。番号は、プレートに播種した日からの経過日数を示しています。このケースでは、第1日目に単細胞が見られました（赤で囲みました）。このように、コロニーの単クローン性(モノクローナル)を検証することができます。

Conclusions 結論

上記の計測は、Cellavista がシングルセルクローニング・アッセイの制御と解析に理想的に適していることを示します。特に、Cellavista は以下の課題について、サポートを提供するか、完全に引き継ぐことが可能です：

- ・ マイクロタイター・プレートのすべてのウェルの全表面について、迅速かつ自動的に画像を取得(7.5分/384ウェル・プレート全体)することで、クローン成長を記録・アーカイブする。
- ・ 下流のプロセスと解析のためのコロニー選択の基準としてのパラメータを利用 – 例：コロニー数・大きさ・成長速度。
- ・ 細胞が播種された時間まで遡ってコロニー成長をトラッキングすることによる、コロニーの単クローン由来(モノクローナル)の評価。



日本総代理店：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp

東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル9F
 Phone：【本社】03-3816-0851(代表) 【大阪】06-6310-8077
 E-mail：sales@primetech.co.jp