

scRNA-Seq、scATAC-Seqのための Countess 3 FL 自動セルカウンターを 活用したシングルセルや核の自動カウント



Cell analysis

はじめに

Single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq) や single-cell sequencing assay for transposase-accessible chromatin (scATAC-Seq) 技術は、シングルセルレベルでのデータ解像度を提供することにより、遺伝子の発現および制御に関する新たな洞察を可能にします。scRNA-Seq や scATAC-Seq で高品質のシングルセルデータを得るためには、細胞凝集体や死細胞の影響を最小限に抑えるとともに、生細胞または核を正確にカウントすることが重要です。

Invitrogen™ Countess™ 3 FL 自動セルカウンターは、細胞や核を正確にカウントし、生存率を評価し、凝集を評価するための信頼できるソリューションです。この資料では Countess 3 FL 自動セルカウンターが最適なパフォーマンスを発揮できるように、ベストプラクティスガイドを提供します。

必要な装置、試薬

- Countess 3 FL 自動セルカウンター (製品番号 AMQAF2000)
- Invitrogen™ Countess™ Cell Counting Chamber Slide (製品番号 C10228)
- 必要な scRNA-Seq または scATAC-Seq 試薬キット (10x Genomics 社製品など)
- 染色試薬 (代表的なものを以下のリストで紹介します)

製品番号	製品名	Dye	Light cube
T10282	Invitrogen™ Trypan Blue Stain (0.4%)	—	—
A49905	Invitrogen™ ReadyCount™ Green/Red Viability Stain	Acridine orange, Propidium iodide	GFP, Texas Red
A49903	Invitrogen™ ReadyCount™ Red Dead Cell Stain	Propidium iodide	Texas Red
A49904	Invitrogen™ ReadyCount™ Blue Nuclear Stain	Hoechst™ stain	DAPI
L3224	Invitrogen™ LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit	Calcein-AM, Ethidium homodimer-1	GFP, Texas Red

機器のセットアップ

- Countess 3 FL 自動セルカウンターに、Invitrogen™ EVOS™ Light Cube を取り付けます。
Invitrogen™ ReadyCount™ Green/Red Viability Stain を使用する場合は、GFP と Texas Red™ 2.0 Light Cube が必要です。各染色試薬と Light Cube の組み合わせは上表を参照ください。
- Countess Cell Counting Chamber Slide を用意します。
- Countess 3 FL 自動セルカウンターの電源を入れます。

シングルセルの調製とカウント

scRNA-SeqやscATAC-Seqキットで推奨されているサンプル調製プロトコルに従い、組織サンプル、細胞懸濁液、または組織培養細胞から実験を開始します。

scRNA-Seq実験においてシングルセルデータを最大限に活用するためには、開始サンプルに細胞凝集体が含まれていないことが非常に重要です。これは、シングルセルライブラリーの調製プロセスにおいて、各細胞を確実に分離し、バーコード化するためです。細胞凝集体が存在すると、凝集体内の細胞が同じバーコードでラベル付けされてしまいます。これらの凝集体由来のバーコードを取り除くためには、データ解析時にフィルタリングを追加する必要があります。ここで、Countess 3 FL自動セルカウンターを使用すると、サンプル中の細胞凝集体の割合を確認することができます。最適な解析データを得るために、サンプル中の細胞凝集体が5%未満に抑えられていることを確認しましょう。

明視野 (BF) モードによる細胞凝集の評価

1. Trypan Blueで1:1に染色した細胞懸濁液 10 μ Lを、Countess Chamber Slideに載せます。
2. Countess Chamber SlideをCountess 3 FL自動セルカウンターに挿入します。
3. “BF” がチェックされていることを確認し、“Count” をタップします。この時、BF以外のチェックを外してあることを確認してください。
4. 表示された結果において、凝集した細胞数のパーセンテージが5%未満であることを確認します (この数値は、Total cells 中の細胞凝集体の割合)。

ここで、凝集した細胞が5%以上になっている場合は、ピペティング、ボルテックス、フィルター処理を繰り返し行い、細胞を分散させてから続行してください。

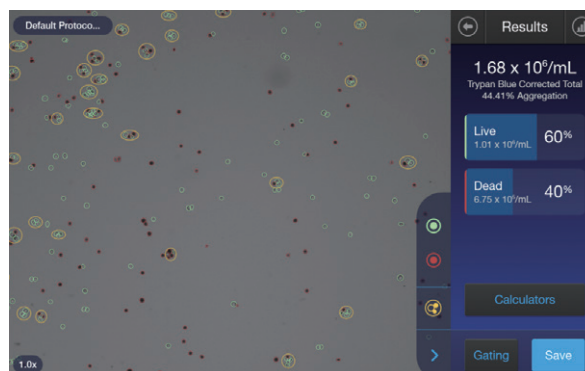


図 1

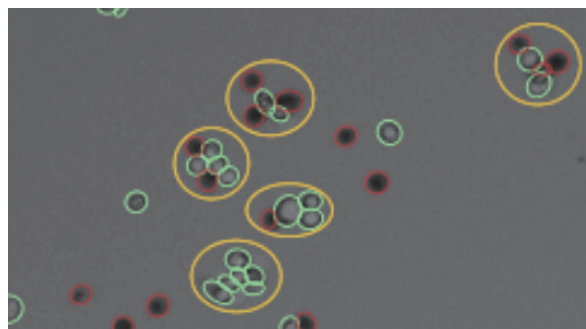


図 2

オプション: 凝集体の割合を生細胞に絞って確認する場合は、以下の手順で行います。

1. Trypan Blueで1:1に染色した細胞懸濁液 10 μ Lを、BFモードで測定します。
2. 結果画面で“Gating”を押します。
3. “Dead”を強調表示 (赤丸表示) させた状態で、画面上に赤丸がなくなるまで各パラメーターを調整します (図 3)。
4. “Apply”を押すと、生細胞のみに絞った結果が画面に表示されます。



図 3

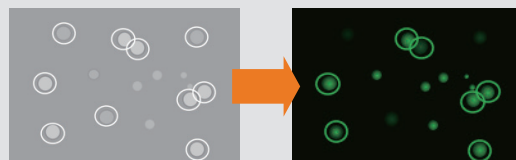
FL-based countによる細胞の生存率確認

scRNA-Seqを実施する際には、正確な生細胞数を把握することが非常に重要です。なぜなら、開始サンプルのカウントが正確でないと、システムの詰まりの原因や、反応に最適な試薬濃度の取得の障害となる可能性があるからです。

正確な生細胞計数を行うために、Countess 3 FL 自動セルカウンターのFL-based count (Software update 3 ver1.3以降) を利用して計数することをお勧めします。FL-based countは、全ての蛍光物質を検出できます。つまり、明視野画像において細胞残骸や焦点が合っていない細胞があるサンプルでも、より正確なカウントが行えるのです。

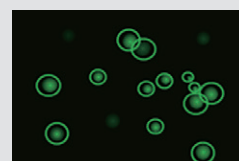
従来の蛍光測定

明視野で細胞を認識・カウントしてから、その細胞における蛍光を検出します。サイズが小さい核や、デブリが多いサンプルでは、細胞の認識が上手くいかないこともあります。



FL-based count

蛍光視野で蛍光が検出される対象物の数をカウントします。
明視野での細胞認識が上手くいかない核などのサンプルに適しています。
明視野画像を同時に取得することも可能です (カウントに影響なし)。



蛍光色素は、ReadyCount Green/Red Viability Stain (製品番号A49905) などを使用されることをおすすめしています。その他の蛍光試薬に関しては、[Fluorescent cell viability assays on Countess Automated Cell Counters](#)を参照してください。

FL-based count プロトコルの作成手順

1. 起動画面で“Protocols”を押します。
2. “Create”を押します (図4)。
3. 作成するプロトコルに名前を付けます。
4. “Setup”を押します (図5)。
5. 使用するLight cube (GFPとTexas Red Light cube) をチェックします。明視野画像を取得する場合は、BF ボックスもチェックします。
6. “FL-based count”をチェックします。
7. “Apply”を押します。
8. “Calculators”を押します (図5)。
9. “Pre-dilution calculator”を押します。
10. 細胞懸濁液と蛍光試薬の量を入力します。ReadyCount Viability Stain の場合、“Sample volume”と“Buffer volume”に10 μ Lと入力します。
11. “Apply”を押します。
12. オプション: 必要に応じて画面右のGatingを調節します。
13. “Save”を押すと、プロトコルが保存されます (図5)。
14. プロトコルを使用するには“Load”を押します。

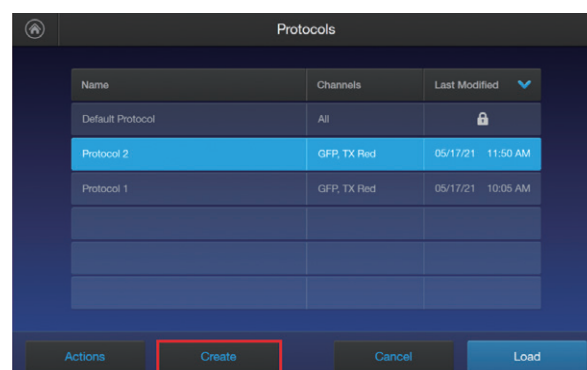


図4

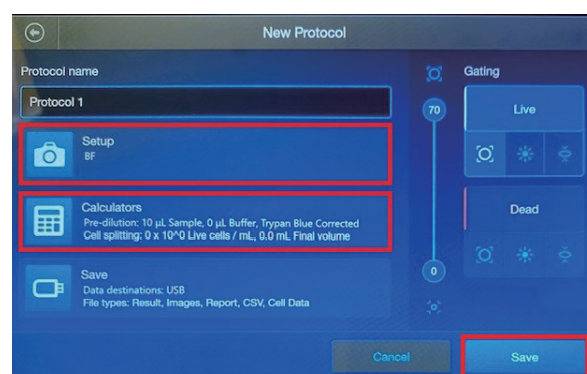


図5

FL-based count

1. 細胞を蛍光試薬で染色します。ReadyCount Viability Stainを使用する場合は、細胞と染色液を 10 μ L ずつ混合します。
2. 細胞を指定された時間インキュベートします。ReadyCount Viability Stainを使用する場合は、少なくとも2分間インキュベートします。
3. インキュベーション中、Countess 3 FL自動セルカウンターでプロトコルを選択または作成します。
4. 10 μ Lの染色済み細胞懸濁液をCountess Chamber Slideに載せます。
5. 細胞がスライドの底に沈むまで、20秒間静置します。
6. Countess 3 FL自動セルカウンターにスライドを挿入します。
7. 使用するLight cubeと“FL-based count”にチェックが入っていることを確認します (図6)。
8. “Count”を押します。
9. 結果が画面に表示されます。

Total concentrationは、全ての蛍光細胞の組み合わせに基づいて算出されます。各Light cubeの数値は、そのLight cubeで検出された細胞の総数を報告します。両方のLight cubeで蛍光が検出された細胞は、二重陽性細胞としてカウントされます。

ただし二重陽性細胞が存在する場合、その数は同じLight cubeの単一陽性細胞のカウント数にも含まれます (図7)。

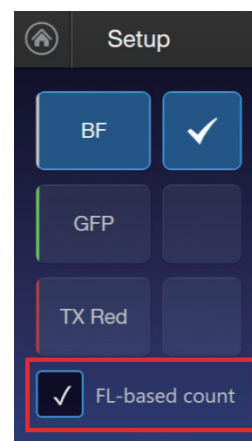


図6

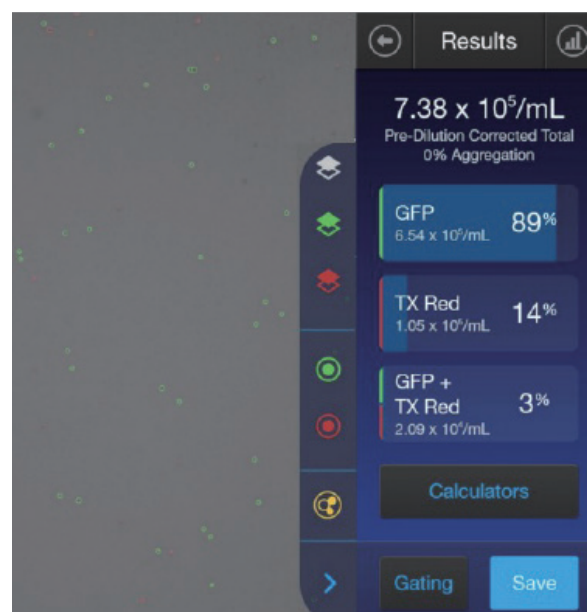


図7 ReadyCount Green/Red Viability Stainの場合、Total cells – Tx red positive=生細胞となる。

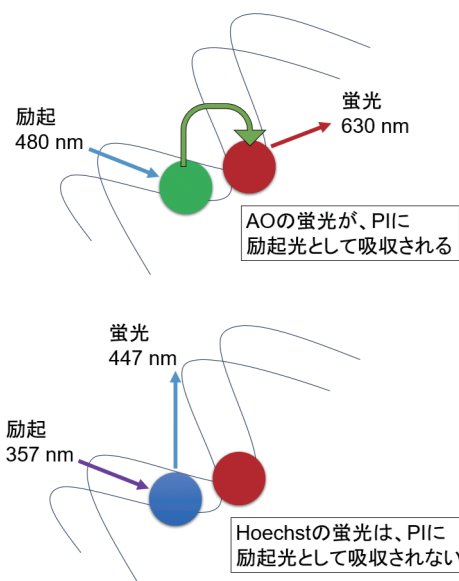
Tips: FRETの影響

ReadyCount Green/Red Viability Stainを使用する場合、AOとPIは核内で近接するため、FRETが起こります。AOは全ての細胞の核酸を染色しますが、FRETが起こることで死細胞は赤色の蛍光のみを示します。

なお細胞の状態によってはFRETが起こらず、二重陽性細胞としてカウントされる場合があります。この場合も、赤色蛍光が検出されたものは死細胞である点は変わりません。

青色蛍光とPIなどの波長が離れた色素を利用すると、色素同士が近接してもFRETが起こりません。その結果全ての細胞がHoechst陽性となり、死細胞はPIとHoechstの二重陽性となります。

FRETによる結果の変動を避けたい場合は、この2つの色素の利用が有効です。

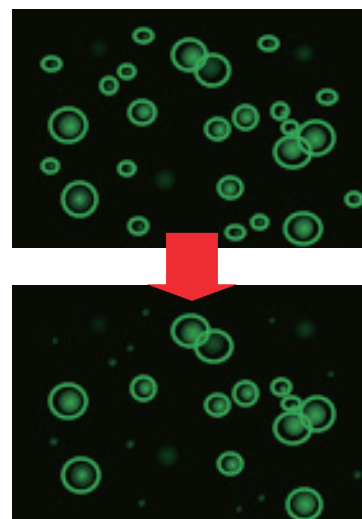


Tips: Gating

scRNA-Seq用の細胞懸濁液を調製する際、特に組織切片から調製する場合、赤血球や細胞の破片などが残り細胞カウントに影響を及ぼすことがあります。

FL-based countを使用すると、蛍光が検出された対象物のみをカウントします。そのため明視野画像で確認できる物体でも、蛍光を発しないものはカウント対象外となります。

微弱な蛍光が検出された対象物を除外したい時は、GatingのLight sourceパラメーターのしきい値を調節しましょう。細胞画像を確認しながらGatingを行うことで、より正しい結果を得ることができます。



Tips: FL-lockによるスピードアップ

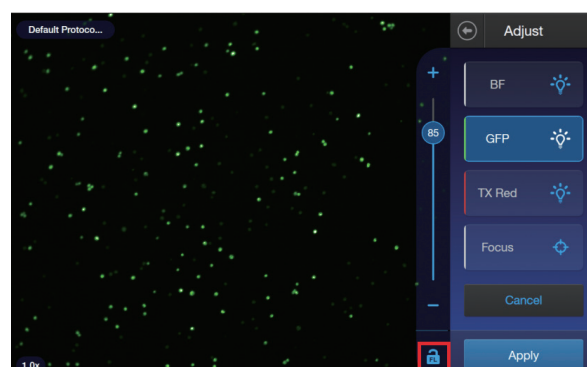
scRNA-Seq用の細胞調製は、細胞が健康で生存していることを確認するため、可能な限り迅速に行う必要があります。

Countess 3 FL自動セルカウンターでは、スライドを挿入すると自動でフォーカスと蛍光強度の調節が行われます。時間を短縮したい場合は“FL-lock”をONにすることで、自動での蛍光強度調節をスキップし、設定した蛍光強度でカウントできるようになります。

FL-lockの手順

1. 最初のスライドを挿入した後、“Adjust”（調整）を押します。
2. 必要に応じて蛍光強度の微調整を行います。
3. FL-lockを選択して、Applyを押します。

次回測定より自動での蛍光強度調節がスキップされます。



Tips:最適な細胞濃度は？

Countess 3 FL自動セルカウンターでは細胞の画像を取得し、その画像を解析することで細胞数をカウントします。

$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ cells/mLの濃度範囲のサンプルをカウントできますが、濃度下限に近い条件では視野中に細胞が数個しかなく、手技の影響で結果がぶれやすくなります。そのため細胞数の変動による影響が少ない $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ cells/mLの濃度での測定がお勧めです。

Countess 3 FL自動セルカウンターを使用して 1×10^5 cells/mL未満の濃度を測定する場合は、精度を向上させるために、n=3のレプリケートを測定して平均を取ることも有効です。これらのカウントにばらつきがある場合は、穏やかに遠心分離して細胞を濃縮・再懸濁し、細胞濃度を上げて再測定しましょう。

またサンプルが 2×10^6 cells/mLを超える場合は、計数の前にサンプルを希釈することをお勧めします。

FL-based countによる単離核のカウント

scATAC-Seqは、単離した核を解析することで、ゲノム内のクロマチン領域のアクセス性を調べる技術です。Countess 3 FL自動セルカウンターは、核のような小さな対象物(3 μm 程度)を正確にカウントすることができます。核のカウントを正確に行うために、Countess 3 FL自動セルカウンターを利用して核分離プロトコルに従ってください。

試薬

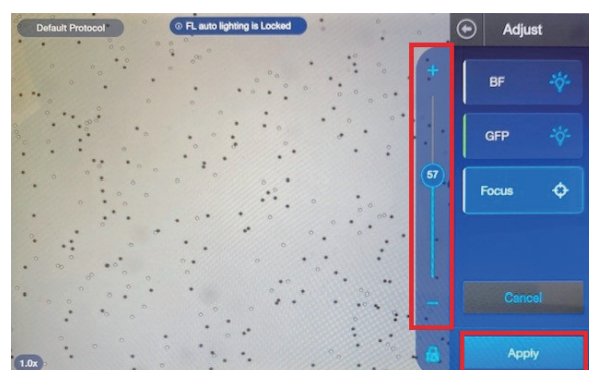
細胞残屑の染色により核を過剰にカウントしがちなTrypan Blueに比べ、蛍光染色は精度が高いです。そのため核の懸濁液の評価およびカウントに強く推奨されます。なお、ReadyCount Viability Stainは室温で安定し、Countess 3 FL自動セルカウンターで核や有核細胞を簡単に染色・計数できるように最適化されています。



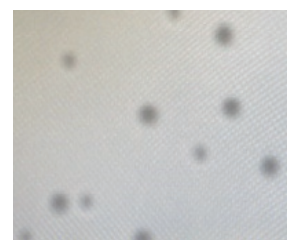
図8 細胞片などの夾雑物が多いと、明視野では核を識別できない

アッセイのセットアップ、フォーカスの調整

1. 核単離キットまたはシーケンスキットのプロトコルに従って核を単離します。
2. Countess 3 FL自動セルカウンターで蛍光測定プロトコルを作成します。作成方法は3ページを参照してください。
3. 蛍光染色した核を載せたCountess Chamber Slideを挿入します。
4. セットアップ画面で蛍光核を確認します。(Propidium iodideを使用している場合は、Texas Red light cubeを利用します)
フォーカスとLight sourceを調節して、核をよりよく識別できるようにします。
5. “Adjust”を押します。
6. “Focus”(フォーカス)を押します。
7. フォーカスバーを上下にドラッグしてフォーカスを変更します(図9)。
注意:フォーカスは明視野画像を見ながら調節します。
8. 蛍光チャンネルを選択して、フォーカス調整によりFL画像が改善されたことを確認します。
9. 核をより識別しやすくするため、Light sourceを手動で調整します。
10. **オプション:**次回以降Light sourceを固定してカウントするために、FL lockアイコンを押します。
11. Applyを押すと変更が反映されます。
12. “Count”を押します。



フォーカスが合っている状態



フォーカスが合っていない状態

図9 フォーカスの調整

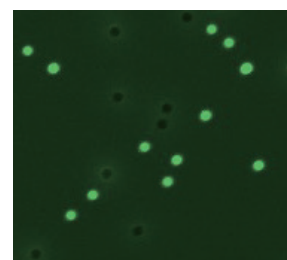
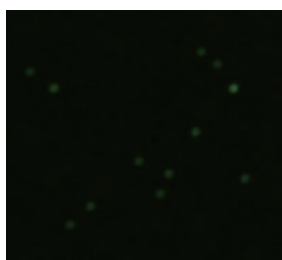


図10 Light sourceの調整

Gating

1. 結果画面で、核のFL light cubeレイヤーと、カウントされた細胞数を示す対応する円に注目します。
2. サイズ、明るさ、真円度について、背景のFLオブジェクトではなく核を特定するために必要なパラメーターを調整します。
3. **オプション**: 測定条件をプロトコルとして保存します (図11)。
 - a. 画面左上の“Protocols”を押します。
 - b. “Create”を押します。
 - c. 現在のGating設定がプロトコルに適用されていることを確認します。
 - d. プロトコル名を作成します。
 - e. “Save”を押します。
 - f. 結果画面に戻るには“Cancel”を押します。
4. “Apply”を押して、現在のカウントにGating設定を適用します。
5. “Save”を押して結果とカウントを保存します。
6. カウントの精度を上げるために、同じプロトコルとGatingパラメーターを使用してレプリケート・カウント (n=2~3) を行うことを推奨します。

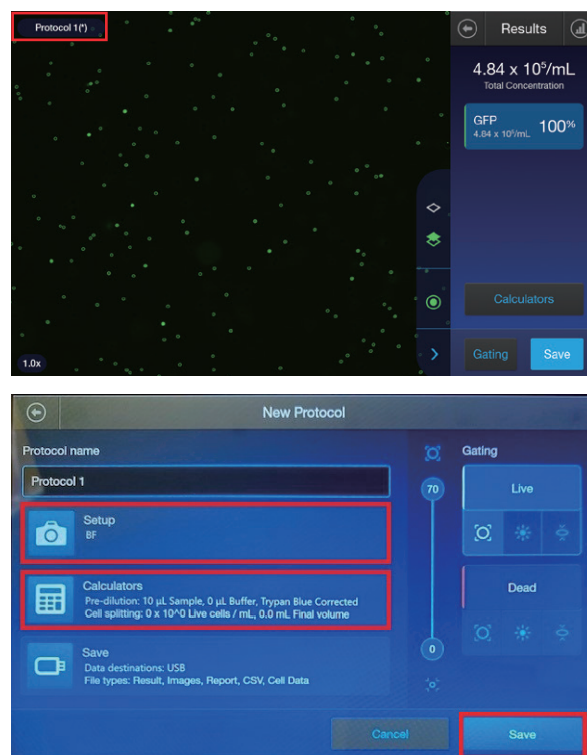


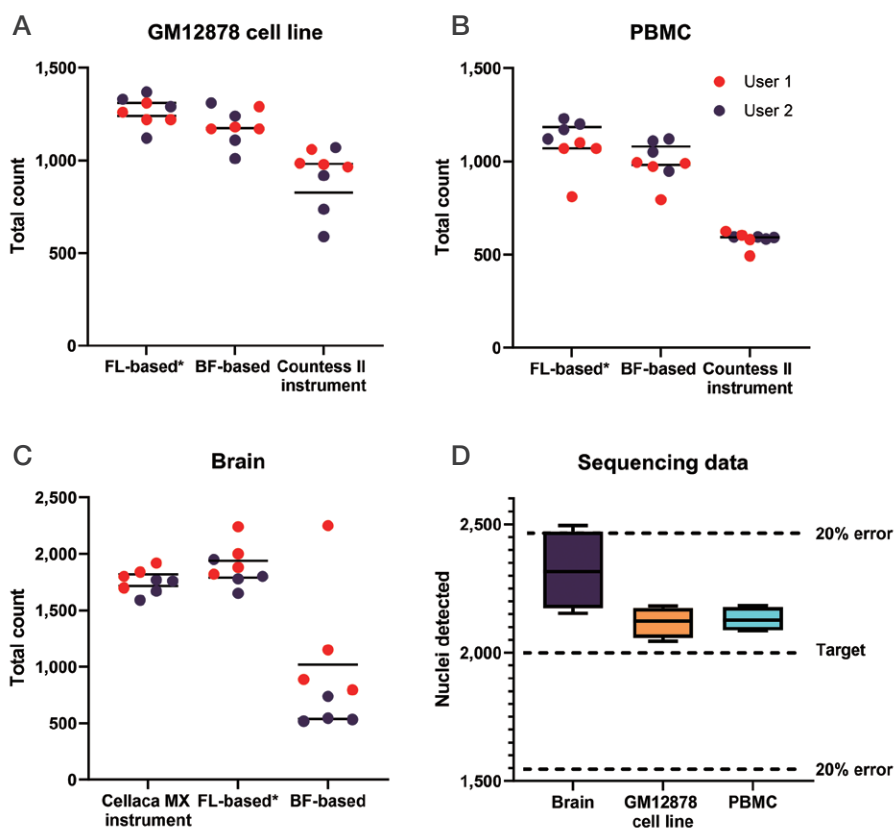
図 11

検証例の紹介

2つの異なる細胞タイプと脳組織から単離した核をカウントした結果を図12にてご紹介します。

図12 Countess 3 FL自動セルカウンターでFL-based count^{*}を用いて核をカウントした。その結果、正確なカウントが得られ、シーケンシングにより検証された。GM12878細胞株 (A) および PBMC (B) から単離した核のFLベースの計数では、BFベースまたはCountess II装置の計数よりも多くの核が計数された。(C) 脳組織から単離した核は、Cellaca™ MX High-Throughput Automated Cell Counterによるカウントに匹敵する正確なFL-based countを示した。(D) 次世代シーケンス (NGS) により、FL-based countから得られた2,000個の標的核の正確なローディングが確認された。

^{*}FL-based countは、software ver 1.3以降をインストールしたCountess 3FL自動セルカウンターで利用可能。データは10x Genomics R&Dにより取得。



結論

Countess 3 FL自動セルカウンターは、細胞や核を正確に計数し、シングルセル分析を行うための信頼できるソリューションです。このガイドを使用して、細胞凝集体や死細胞の存在を最小限に抑えながら、生存可能なシングルセルや核の懸濁液を正確にカウントすることで、高品質のシングルセル解析データを取得いただけます。

Ordering information

製品名	サイズ	製品番号
Countess 3 FL Automated Cell Counter	一式	AMQAF2000*
消耗品・アクセサリ		
Countess Cell Counting Chamber Slides	50 slides	C10228
	500 slides	C10312
Invitrogen™ Countess™ Reusable Slide	1 unit	A25750
EVOS Light Cube, DAPI 2.0	1 each	AMEP4950
EVOS Light Cube, GFP 2.0	1 each	AMEP4951
EVOS Light Cube, RFP 2.0	1 each	AMEP4952
EVOS Light Cube, Texas Red 2.0	1 each	AMEP4955
Trypan Blue Stain (0.4%)	2 × 1 mL	T10282
ReadyCount Red Dead Cell Stain	100 assays	A49903
ReadyCount Blue Nuclear Stain	100 assays	A49904
ReadyCount Green/Red Viability Stain	100 assays	A49905
Invitrogen™ LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells	1 kit	L3224

* 蛍光測定機能をご使用いただくには、別売のライトキューブが必要です。

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/countess

研究用에만使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

Hoechst is a trademark of Hoechst GmbH. Cellaca is a trademark of Revvity Health Sciences, Inc.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc **MP163-A24060B**

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

お問い合わせはこちら thermofisher.com/contact

invitrogen