

接着力の弱い細胞の穏やかな洗浄

Tecan Cell Protection™洗浄設定搭載の HydroSpeed™プレートウォッシャーを使用

緒言

このアプリケーションノートでは、特に接着細胞や接着力の弱い細胞を穏やかに洗浄するためCell Protection洗浄設定を搭載した Tecanの新しいハイドロスピード プレートウォッシャー(96および384ウェルプレート形式)について、良好な評価が得られた試験結果を報告している。

Tecanの新しいハイドロスピード プレートウォッシャーは、細胞を用いたアッセイやELISA、マグネティックビーズ分離、バキュームフィルトレーションによる濾過洗浄などのアプリケーションの分野で最先端の機能を提供している。

ハイドロスピードは吸引力、穏やかに分注する流速設定および洗浄ヘッドの位置決め等、重要な洗浄パラメータをそれぞれ制御し、様々な細胞の特性に適合するように洗浄プロトコルを微調整できるようにしている。

特に接着力の弱い細胞の洗浄結果を最適化するため、Cell Protection洗浄設定により細胞の回収率が改善された。また、非常に穏やかなドロップワイズ分注機能と、Move機能を利用した分注位置と液面の微調整機能とを兼ね備えている

さらに、ハイドロスピードは、調節可能な吸引機能によって吸引速度を完全に制御し、細胞生存率にほとんどまたは全くといっていいほど影響を及ぼすことなくウェルからアッセイ用試薬を除去する。

洗浄効率および様々な細胞株の生存率を明らかにするため、本試験において接着細胞(A431)と非常に接着力の弱い細胞(P815)とを用いた実験を実施した。さらに、洗浄前と後の細胞層をモニタリングし、穏やかな洗浄を視認した。

材料および方法

機器

- 細胞洗浄、マグネティックビーズ洗浄、ELISA 洗浄に適切な 96 インデックス洗浄ヘッド(96i)を備えたハイドロスピード プレートウォッシャー(96 および 394 ウェルプレート形式)(図 1)。本試験では、96 および 384 ウェルプレート用高速処理洗浄ヘッド(96HT および 384HT)も使用した。
- Quad4 Monochromators™テクノロジーを備えた Infinite® M200 PRO マルチ検出モードリーダー

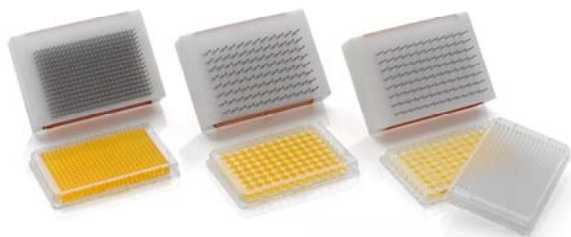


図 1 Tecan のハイドロスピードプレートウォッシャーに使用できる洗浄ヘッド (左から右へ): 高速 384 チャンネル洗浄ヘッド(384HT)、専用 96 チャンネル洗浄ヘッド(96HT)および汎用 96 インデックス洗浄ヘッド(96i)

細胞培養用マイクロプレート

- 透明な平底 96 ウェルプレート(グライナーバイオワン)
- 透明な平底 384 ウェルプレート(グライナーバイオワン)

試薬

- ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM, PAA Laboratories)
- PBS 洗浄バッファー
- MTT (3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド)
- トリパンブルー(TB)

細胞培養およびアッセイの手順

37°Cおよび5% CO₂の湿潤環境下にて、10 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、1 mMピルビン酸ナトリウム、ペニシリン100 U/mL、ストレプトマイシン0.1 mg/mLおよび5% (v/v) ウシ胎児血清(FCS) (すべてPAA Laboratories社製)

[オーストリア] 補充DMEM中で、ヒト類表皮癌(A431)およびマウス肥満細胞腫(P815)細胞を増殖させた。

2週間にわたり、一連の洗浄手順により非常に接着力の弱いP815細胞を選択し、上清(懸濁した細胞含有)を上記の新鮮な補充DMEMと交換した。

いずれのアッセイでも、補充DMEM 100 μL中の各細胞株2 × 10⁴個または補充DMEM 50 μL中の各細胞株7 × 10³個のいずれかを、それぞれ96ウェルおよび384ウェルマイクロプレートに播種した。

ハイドロスピード プレートウォッシャーの洗浄効率は、有色溶液の除去状態をモニタリングすることで明らかになった。この試験では、96ウェルプレートには0.05% TB 20 μLあるいは384ウェルプレートには0.05% TP 10 μLを各ウェルに添加し、インフィニットM200 PROマルチモードリーダーにより吸光度565 nmで測定後、洗浄した。洗浄後、吸光度565 nmを用いてTBの残量を測定した。マイクロプレートに播種したP815細胞のすべてがウェルの底に軽く接着したわけではないことに留意する。依然としてウェル中で浮遊しているP815細胞は、通常、マニュアルまたは自動化洗浄時に消失するが、これを細胞回収率の計算に組み込んだ。

細胞の生存率を測定するため、洗浄前および洗浄後にMTTアッセイを実施した。このアッセイは、代謝的に活性している生存細胞は、ミトコンドリア脱水素酵素の作用を利用して可溶性の黄色のテトラジリウム塩(MTT)を不溶性の黒いホルマザンへ還元するという原理に基づいている。結果生じるホルマザンは、直接吸光度にて測定し、生存細胞数を求める事に使用できる(1)

希釈洗浄プロトコルを用いた細胞洗浄

希釈洗浄プロトコルは、通常は吸引ステップから開始する一連の吸引・分注ステップである。細胞回収を最適化するため、ハイドロスピード プレートウォッシャーにより特に穏やかな設定で吸引・分注ステップを実行する。このような設定には、洗浄プロトコルにおける各吸引ステップの吸引高さを個別に規定し、各ウェルに規定された残量を残すオプションなどが含まれる。

洗浄プログラム

この評価試験時に使用したハイドロスピード洗浄プログラムを最適化し、良好な細胞生率と高効率の洗浄を実現した(詳細については、表 1 および表 2 参照)。

ハイドロスピード プレートウォッシャーで得られたすべての洗浄結果と、対応するマニュアル洗浄手順とを比較した。マニュアル洗浄手順では、バッファ分注用のハンディタイプの分注器および吸引用バキュームポンプに接続される先端が屈曲したガラス管を使用した。マニュアル洗浄で使用した吸引位置は、ウェルの底部に設定した。各ウェルの残量を制御するオプションは付いていない。マニュアル洗浄プロトコルは、96 ウェルおよび 384 ウェルプレート用に、それぞれ 100 μ L または 50 μ L を用いた洗浄サイクル 1 回の実施であった。

96 ウェルプレート用ハイドロスピード洗浄プロトコル

コーティングしていない 96 ウェル細胞培養マイクロプレートに細胞を播種し、各ウェルに DMEM 増殖培地 100 μ L を用いて、37°C にて 16 時間培養した。

表 1 に示した通り、プログラムの第 1 サイクルの効率を上げるため、吸引前に洗浄プロトコルと初回分注ステップ (Move 機能の作動により) を開始し、部分的に PBS バッファ 150 μ L を充填したウェルに補給した。

吸引速度を 1 とし、吸引点は各ウェルの中央部 1 カ所に設定するなど、特に穏やかな吸引設定を用いて細胞回収を最適化した。

洗浄プログラム	パラメータ
第 1 サイクル (オプション)	サイクル数: 1
分注	カスタム z-pos: 8 mm (Move 機能オン) 分注量: 150 μ L、分注速度: 2 (90 μ L/秒)
第 2 サイクル	サイクル数: 2
吸引	モード: ノーマル カスタム z-pos: 6.8 mm 吸引時間: 1 秒 ヘッドスピード: 2 mm/秒
分注	カスタム z-pos: 7 mm (Move 機能オン) 分注量: 300 μ L、分注速度: 2 (90 μ L/秒)
第 3 サイクル	サイクル数: 1
吸引	モード: ノーマル カスタム z-pos: 8 mm 吸引時間: 1 秒 ヘッドスピード: 1 mm/秒

表 1 96i または 96HT 洗浄ヘッドを備えたハイドロスピードを使用した 96 ウェルプレートの希釈洗浄プログラム

96i または 96HT 洗浄ヘッドを用いたときの細胞剥離を最小限にするため、分注速度を 1 または 2 に設定することを推奨する(分注速度約 70 μ L/秒~90 μ L/秒に相当)。

384 ウェルプレート用ハイドロスピード洗浄プロトコル

コーティングしていない 384 ウェル細胞培養マイクロプレートに細胞を播種し、各ウェルに DMEM 増殖培地 50 μ L を用いて、37°C にて 16 時間培養した。

表 2 に示した通り、プログラムの第 1 サイクルの効率を上げるため、吸引前に洗浄プロトコルと初回分注ステップ (Move 機能の作動により) を開始し、部分的に PBS バッファ 50 μ L を充填したウェルに補給した。

384 ウェルプレートを用いて最適な洗浄結果を得るため、吸引速度を 1 とし、吸引点は各ウェル 1 点を使用した。

洗浄プログラム	パラメータ
第 1 サイクル (オプション)	サイクル数: 1
分注	カスタム z-pos: 7 mm (Move 機能オン) 分注量: 50 μ L、分注速度: 2 (90 μ L/秒)
第 2 サイクル	サイクル数: 3
吸引	モード: ノーマル カスタム z-pos: 8.2 mm 吸引時間: 1 秒 ヘッドスピード: 1mm/秒
分注	カスタム z-pos: 8.5 mm (Move 機能オン) 分注量: 80 μ L、分注速度: 2 (90 μ L/秒)
第 3 サイクル	サイクル数: 1
吸引	モード: ノーマル カスタム z-pos: 8 mm 吸引時間: 1 秒 ヘッドスピード: 1mm/秒

表 2 384 ウェルプレート処理用 96i 洗浄ヘッドを備えたハイドロスピードの希釈洗浄プログラム

384 ウェルプレートを用いた穏やかな細胞洗浄のため、96i および 384HT 洗浄ヘッドの分注速度は、それぞれ 2 (90 μ L/秒) および 3 を推奨する。

384HT 洗浄ヘッドを用いた P815 および A431 細胞株の高速処理パラレル洗浄に推奨の洗浄プロトコルは、Tecan から入手できる。

結果

洗浄前と洗浄後に接着細胞 A431 (図 1) および非常に接着力の弱い細胞 P815 (図 2) の顕微鏡像を撮影し、ハイドロスピード プレートウォッシャーの洗浄性能を評価した。

これらの画像が示すとおり、ハイドロスピードで洗浄したあとの細胞層に孔は認められず、細胞がほとんど剥離しない穏やかな洗浄性能を示している。

これらの結果から、ハイドロスピードプレートウォッシャーが接着細胞株および接着力の弱い細胞株を穏やかに処理するのに十分適しており、洗浄後も細胞層が無傷であることが確認された。

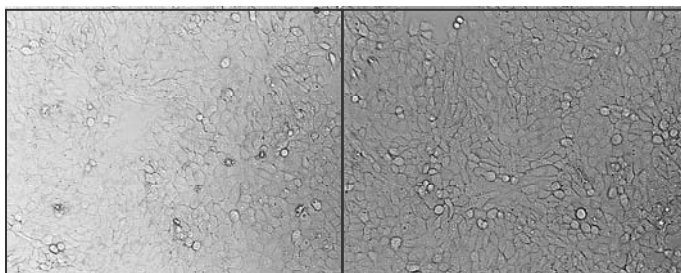


図 1 PBS による洗浄前(左)および洗浄後(右)の接着細胞 A431

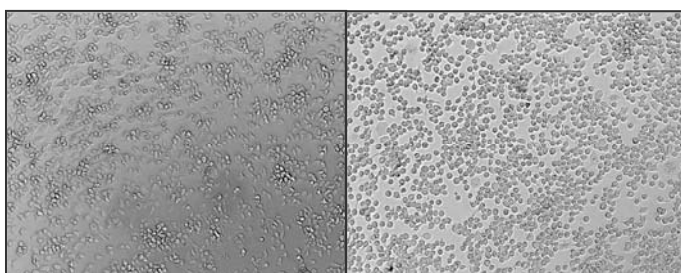


図 2 PBS による洗浄前(左)および洗浄後(右)の非常に接着力の弱い細胞 P815

さらに、ハイドロスピード プレートウォッシャーを使用したときの細胞生存率および洗浄効率とマニュアル洗浄とを比較した。細胞生存率 (MTT) および洗浄効率 (TB) 試験の比較結果を表 3 に示す。

96 ウェルプレート洗浄

表 3 に示されるとおり、ハイドロスピードプレートウォッシャーの Cell Protection 洗浄設定により、96 ウェルを用いたマニュアル洗浄に比べて優れた洗浄性能が得られる。

洗浄手順	96i 洗浄ヘッドを備えたハイドロスピードプレートウォッシャー	マニュアル洗浄
A431 細胞:		
細胞の生存率[%]	80.3	18.7
洗浄効率[%]	95.6	98.9
P815 細胞:		
細胞の生存率[%]	73.0	10.5
洗浄効率[%]	95.4	97.3

表 3 ハイドロスピードプレートウォッシャーとマニュアル洗浄を使用したときの接着細胞 (A431) および非常に接着力の弱い細胞 (P815) の生存率および洗浄効率を比較した結果

ハイドロスピード プレートウォッシャーを用いて穏やかにかつ効率的に洗浄した後の生存細胞の回収率は、マニュアル洗浄後よりも非常に接着力の弱い細胞 P815 で約 7 倍、接着細胞 A431 で 4 倍高かった。

96HT 洗浄ヘッドで得られた結果 (本稿では示さず) は、96i 洗浄ヘッドで得られたデータとほぼ同じであった。

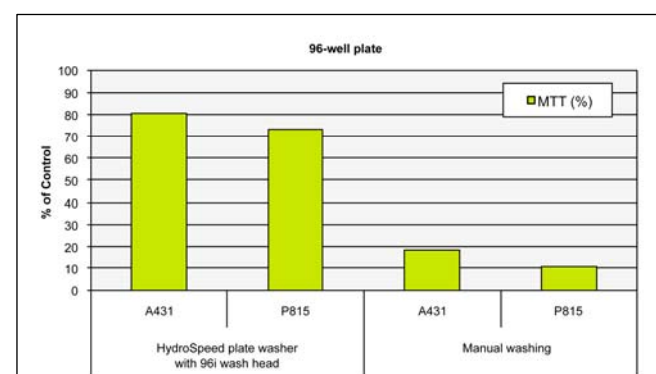


図 3 ハイドロスピードプレートウォッシャー (表 1 のプログラム使用) およびマニュアル洗浄 (96 ウェル) で得られた細胞生存率 (MTT) の未洗浄対照との比較結果

384 ウェルプレート洗浄

表 4 に示されるとおり、ハイドロスピード プレートウォッシャーの特に穏やかな Cell Protection 洗浄設定により、384 ウェルプレートを用いたマニュアル洗浄技術に比べて優れた細胞洗浄性能が得られる。

洗浄手順	96i 洗浄ヘッドを備えたハイドロスピード プレートウォッシャー	マニュアル洗浄
A431 細胞		
細胞の生存率[%]	60.8	32.0
洗浄効率[%]	96.8	98.1
P815 細胞		
細胞の生存率[%]	58.0	3.0
洗浄効率[%]	93.1	98.5

表 4 ハイドロスピードプレートウォッシャーとマニュアル洗浄を使用したときの接着細胞 (A431) および非常に接着力の弱い細胞 (P815) の生存率および洗浄効率を比較した結果

ハイドロスピード プレートウォッシャーを用いて穏やかにかつ効率的に洗浄したあとの細胞生存率は、マニュアル洗浄後よりも非常に接着力の弱い細胞 P815 で 15 倍超、接着細胞 A431 で約 2 倍高かった。

高速処理 384HT 洗浄ヘッド (本稿では示さず) で得られた結果によると、A431 および P815 細胞の生存細胞の回収率は 77% を超えた。

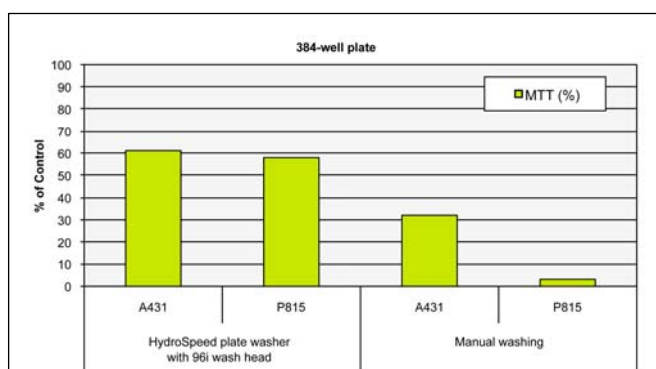


図 4 ハイドロスピード プレートウォッシャー (表 2 のプログラム使用) およびマニュアル洗浄 (384 ウェル) で得られた細胞生存率 (MTT) の未洗浄対照との比較結果

考察

接着力の弱い細胞の穏やかかつ効率的な洗浄は、吸引力、吸引高さおよび分注速度等、重要な様々な洗浄パラメータに影響される。

ハイドロスピード プレートウォッシャーは、ユーザーが各吸引ステップの吸引高さを個別にカスタマイズできる高度な細胞洗浄設定を提供する。調節可能な吸引速度 (吸引力) と合わせて、これにより評価対象の細胞株の特性に応じてハイドロスピード プレートウォッシャーの洗浄パラメータを微調整することができる。

特に穏やかなドロップワイズ分注速度と Move 機能を組み合わせることで、ハイドロスピード プレートウォッシャーは重要な洗浄パラメータを完全に制御し、特に接着力の弱い細胞株において最適な結果が得られる。

この評価試験で得られたデータによると、ハイドロスピード希釈洗浄プロトコルと「オーバーフロー」位置 (結果は示さず) で実行中の洗浄プログラムは、効率よく穏やかに細胞を洗浄する (96 および 384 ウェルプレート)。

ハイドロスピード プレートウォッシャーは、非常に接着力の弱い細胞 P815 および接着細胞 A431 に優れた洗浄性能を提供し、マニュアル洗浄に比べて生存細胞を十分に回収する。

96i 洗浄ヘッド搭載のハイドロスピード プレートウォッシャーは、96 および 384 ウェルプレートにて接着力の弱い細胞を穏やかに洗浄するための、柔軟性と高機能洗浄を兼ね備えた有用なソリューションを提供する。

384 ウェルプレートの迅速な平行洗浄を可能にし、接着力の弱い細胞でもその性能が失われない高速処理アプリケーションには、オプションの 384HT 洗浄ヘッドを推奨する。

結論

Tecan の新しいハイドロスピード プレートウォッシャーは、接着細胞および接着力の弱い細胞の自動化洗浄において優れた性能を実証した。本機器は、穏やかかつ効率的な洗浄、高い細胞保存率、優れた細胞生存率を合わせ持っている。

ハイドロスピード プレートウォッシャーは吸引速度、分注速度および洗浄ヘッドの位置等、重要な洗浄パラメータを高度に制御し、広範な接着細胞株および接着力の弱い細胞株の洗浄条件を容易に微調整できるようにする。

略語一覧

A431 ヒト扁平上皮癌細胞
 DMEM ダルベッコ変法イーグル培地
 FCS ウシ胎児血清
 HEPES 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンサルホン酸

MTT3-[4.5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2.5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド
 P815 マウス肥満細胞腫
 PBSリン酸緩衝生理食塩水
 TB トリパンプルー

参考文献

(1) Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays; Journal of Immunological Methods、1983 Dec. 16; 65(1-2):55-63.

謝辞

細胞培養および実験にご協力いただいたザルツブルク大学材料科学・物理科物理・生物物理部門 Kristjan Plaetzer 博士、Julia Knaup 氏、Verena Ziegler 氏(ザルツブルク大学)に心より感謝いたします。

2011 年 2 月(オーストリア、Groedig)

Austria +43 62 46 89 33 Belgium +32 15 42 13 19 China +86 21 2898 6333 Denmark +45 70 23 44 50 France +33 4 72 76 04 80 Germany +49 79 51 94 170
 Italy +39 02 92 44 790 Japan +81 44 556 73 11 Netherlands +31 18 34 48 174 Singapore +65 644 41 886 Spain +34 93 490 01 74 Sweden +46 31 75 44 000
 Switzerland +41 44 922 89 22 UK +44 118 9300 300 USA +1 919 361 5200 Other countries +41 44 922 8125

Tecan Group Ltd.では本文書において正確かつ最新の情報をご提供するよう最善の努力を尽くしておりますが、誤謬や脱漏が生じる可能性があります。したがって、Tecan Group Ltd.では明示的または暗示的にかかわらず、本文書における情報の正確性または完全性につき、何らの表明または保証を行うものではありません。また、本文書は予告なく変更する場合があります。記載された商標はすべて法律によって保護されています。本文書に記載された仕様書の技術的詳細および詳しい手順については、テカンの担当者までご連絡ください。本文書で取り上げたアプリケーションおよび製品は一部の市場で入手困難な場合がありますので、営業担当者にお問い合わせください。

Tecan, Infinite は主要諸国における Tecan Group Ltd.(スイス、Männedorf)の登録商標です。HydroSpeed、Cell Protection、Quad4 Monochromators は同商標です。Greiner はドイツ Greiner GmbH の商標です。
 ©2010 Tecan Trading スイス、著作権所有