

マイクロプレートでの穏やかな培養細胞洗浄

HydroFlex™のドリップモード



はじめに

本稿では、Tecan HydroFlex プラットフォームが接着力の強い A431 も接着力の弱い P815 も 96 ウェルプレートで穏やかに洗浄できるかどうかを評価したところ、良好な結果を得たことを報告する。

Tecan の新しい HydroFlex プラットフォームは、バキュームフィルトレーション、マグネティックビーズ、マイクロプレート洗浄を可能にする拡張機能を備えている。

穏やかな細胞洗浄のために、HydroFlex プラットフォームは吸引・分注の速度設定や洗浄ヘッドの位置など、重要な洗浄パラメータを個々にコントロールすることが可能である。これによって、使用する細胞のタイプ毎に洗浄プロトコルを細かく調整することができる。

きわめて穏やかなドリップ分注モードと移動機能とを組み合わせることによって、洗浄ヘッドの位置をウェルの上昇液面に照らして最適化することができる。これにより、接着の弱い細胞でも、細胞剥離を最小にして、必ず良好な洗浄成績が得られるようにする。

本稿に記載した細胞ベースアッセイでは、ELISA や細胞洗浄に適した標準洗浄ヘッドを備えた HydroFlex プラットフォームを使用した。

細胞ベースアッセイでは、HydroFlex プラットフォームを用いることによって、使用している細胞の生存率にほとんど影響を与えることなく、アッセイ反応物を除去することができる。

洗浄効果と細胞生存率を測定するため、接着力の強い細胞と、中等度の細胞とを用いて試験を実施した。さらに、洗浄の前後に細胞層を観察して、穏やかに洗浄できていることを視覚的に確認した。

材料と方法

機器

標準の 8 連マニフォールドおよび 2 チャンネル洗浄バッファー吸引機能を備えた Tecan HydroFlex プラットフォーム

マイクロプレート

Greiner Bio-One 製 96 ウェルマイクロプレート (Greiner Bio-One)

試薬と測定方法

試薬

トリパンプルー (TB)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、PAA Laboratories)、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プロモド (MTT)

アッセイプロトコール

細胞培養

ヒト表皮癌細胞 (A431、ATCC-No.CRL-1555) およびマウスマスト細胞腫細胞 (P815、ATCC-No.TIB-64) を、10 mM HEPES、4 mM L-グルタミン、1 mM ビルビン酸ナトリウム、100 U/ml¹ ペニシリン、0.1 mg/ml¹ ストレプトマイシン、5% (v/v) ウシ胎児血清 (FCS) (いずれもオーストリア、リンツの PAA-Laboratories から入手) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて、37 °C、5%CO₂、湿潤状態で培養した。

4 週間のあいだに実施した何回かの洗浄操作によって、P815 細胞系から付着細胞を選択した。この洗浄操作は、(浮遊細胞を含む) 上清を、上記を添加した新鮮 DMEM と置換するというものである。どのアッセイにも、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、100 μl DMEM 中の各系列 2.10⁴ 細胞を播種した。

HydroFlex プラットフォームの洗浄効率を、着色溶液の除去をモニタリングすることによって測定した。具体的には、0.05% トリパンブルー (TB) 20 μl を各ウェルに添加し、565 nm の吸光度を求め (= 100%)、洗浄操作を開始した。洗浄ののち、残った TB を吸光度測定により再度求めた。

生存率を求めるため、洗浄処理なしの細胞 (= 生存率 100%) と、洗浄処理を実施した細胞 (= 生存率 x%) とに対して MTT アッセイを実施した。MTT アッセイは、代謝活性のある生存細胞であれば、ミトコンドリアの脱水素酵素によって、可溶性で黄色の MTT テトラゾリウム塩 [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] を還元し、不溶性で濃色のホルマザンを生産するという原理に基づいている。還元されてきたホルマザンの吸光測定値を用いて、生存率および生細胞数を求める。

洗浄プログラム

下に挙げた各プログラムで、洗浄容積 (プログラム 1 では 600 μl、プログラム 2 では 800 μl) および洗浄回数 (洗浄ステップ 1 回または 2 回) が、洗浄効率や細胞生存率に及ぼす影響を試験した。

プログラム 1	
Wash 1x / 2x	
Z-position	10.5 mm + Move
Volume	600 μl
Head speed	1 mm / s
Wash rate	ドリップモード
Aspirate	
Mode	通常
Z-position	8500 μm
Time	1 s
Head speed	1 mm / s
Aspiration rate	1

プログラム 2	
Wash 1x / 2x	
Z-position	10.5 mm + Move
Volume	800 μl
Head speed	1 mm / s
Wash rate	ドリップモード
Aspirate	
Mode	通常
Z-position	8500 μm
Time	1 s
Head speed	1 mm / s
Aspiration rate	1

A431 細胞にも P815 細胞にも、全試験を実施した。

どの試験でも、100 μl の添加 DMEM に懸濁した各系列 2 × 10⁴ 細胞を、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに播種した。

結果

図1および図2は、接着力が弱いP815細胞および接着力の強いA431細胞に対するプログラム1実施前後の光学顕微鏡像の1例である。

この像から、細胞層に穴がないことがわかる。

このような結果は、HydroFlex プラットフォームが、接着力の強い細胞および弱い細胞を穏やかに操作するのに適しており、洗浄後も細胞層が損なわれていないことを確認するものである。

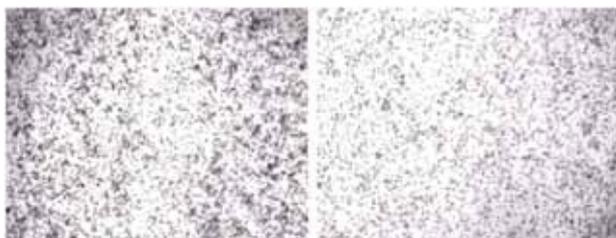


図1：PBSを用いたプログラム1による洗浄前（左）および洗浄後（右）のP815細胞（接着力弱）

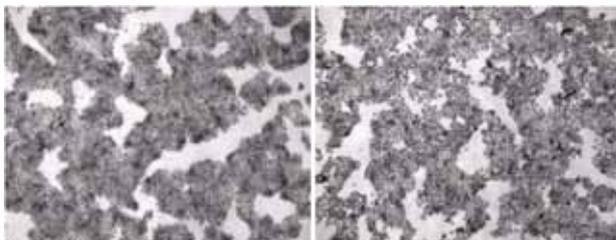


図2：PBSを用いたプログラム1による洗浄前（左）および洗浄後（右）のA431細胞（接着力強）

表1に、プログラム1または2で、洗浄回数1回または2回を実施したあとの洗浄効率試験（TB 試験）および細胞生存率試験（MTT 試験）の結果を示す。各洗浄プログラムにつき、A431 および P815 をそれぞれ播種した2枚のプレートを使用した。

	プログラム1		プログラム2	
	洗浄			
	1 × 600	2 × 600	1 × 800	2 × 800
A431 細胞				
洗浄効率 [%]	95.6	98.3	97.3	98.6
細胞生存率 [%]	81.0	84.1	76.1	75.96
P815 細胞				
洗浄効率 [%]	94.9	99.1	97.4	99.0
細胞生存率 [%]	73.0	70.7	73.8	64.7

表1：洗浄操作後のTBおよびMTTの吸光度 [%]

上の値から、HydroFlex プラットフォームを使用した場合に、洗浄効率が高く、細胞の損傷が小さいことがわかる。

細胞生存率はA431細胞では75%超、P815細胞では70%超である（表1）。

プログラム2でP815細胞を洗浄するのに容積800 μlとした場合に、生存率がわずかに低かったのは、細胞アッセイ時によくみられる接着のわずかな低下による。

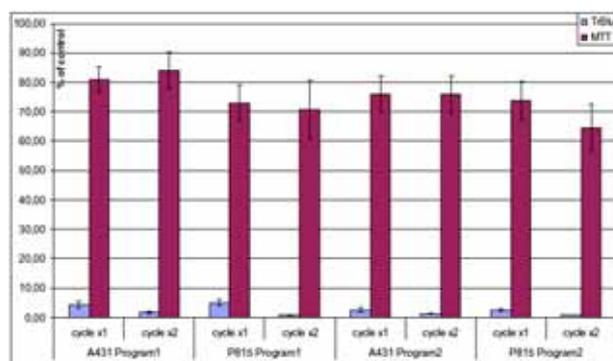


図3：プログラム1および2を実施した後のTBおよびMTTの量

このデータは、洗浄・吸引プログラムが1回の場合、洗浄効率が約95%、細胞生存率が75%超であることを示している。

結論

Tecan HydroFlex プラットフォームは、接着力が強い細胞に対しても弱い細胞に対しても、自動洗浄に優れた性能を発揮した。穏やかかつ効率のよい洗浄で、剥離率がきわめて低く、細胞生存率が高かったのである。

吸引・分注の速度設定や洗浄ヘッドの位置など、重要な洗浄パラメータを高度にコントロールできることから、マイクロプレートで培養する細胞が接着力の強いタイプか弱いタイプかに応じて、洗浄コンディションを簡単に細かく調整することが可能である。

謝辞

ザルツブルグ大学分子生物学科の Tobias Kiesslich 修士、Juergen Berlanda 修士 (B. Krammer 教授研究グループ) に感謝いたします。

www.uni-salzburg.at/pdt

2007 年 3 月

参考文献

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

Tecan Group Ltd.は、本稿に正確かつ最新の情報を記載するよう努力していますが、遺漏や誤りがないとは限りません。このため、本稿にある情報の正確性、完全性について、Tecan Group Ltd.は明示的であれ黙示的であれ、一切の言明も保証も致しません。本稿を、随時、予告なく変更することがあります。このなかで言及した商標はいずれも、法律により保護されています。本稿に記載されている仕様の技術的詳細および操作の詳細については、最寄の Tecan 販売店に御連絡ください。本稿は、市場によっては入手できない製品について記載することがあります。最寄の販売店に御確認ください。

©2007, Tecan Trading AG, スイス、著作権所有。Tecan®は、主要諸国で、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の登録商標です。HydroFlex™プラットフォームは、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の商標です。Greiner®は、Greiner Labortechnik GmbH の登録商標です。

Austria T +43 62 46 89 33 **Belgium** T +32 15 42 13 19 **China** T +32 15 42 13 19 **Denmark** +45 70 23 44 50
France +33 4 72 76 04 80 **Germany** +49 79 51 94 170 **Italy** +39 02 215 21 28 **Japan** +81 44 556 73 11
Netherlands +31 18 34 48 174 **Portugal** +351 21 000 82 16 **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
ROW +43 62 46 89 33

