

FACSCalibur ソートオプションにおける非無菌ソーティングのヒントと推奨事項

FACSCalibur ソートオプションで最高のソーティング性能を得るには、いくつかの要素を考慮に入れる必要があります。本書には、それらの要素を多数示してあり、簡単に参照できます。ソーティング手順に関する説明は、FACSCaliburユーザーズガイドを参照してください。

シース液

- ・ ソーティングを行うときは、シース液として、0.22 μ mのミリポアフィルターまたは同等のフィルター（BDカタログ番号 357111）にて濾過したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH 7.2~7.4)等を使用します。
留意：ソーティング細胞用のシース液としてFACSFlowを使用することができません。この場合、ソートした細胞の生存率に影響を与えることがあるので、各自使用する細胞にて確認してください。
 - ・ ソーティングを開始するときは、シースタンクに3Lのシース液を入れて、ソーティング中のシース液の再充填を避けます。
-

細胞の回収と生存率

- ・ 細胞のロスを少なくし、生存率を維持するために、4%ウシ血清アルブミン(BSA)入りPBS(アジ化ナトリウム含有)でコレクションチューブをコートします。この作業はチューブ使用の1時間前に行い、チューブは2~8℃で保管します。
 - ・ ソーティングが終わればサンプル試験管を取り外し、シース液の入った試験管をサンプルインジェクションポート(SIP)に取り付け、20秒間ソーティングを再開または継続して、ソート済み細胞がすべてコレクションチューブに回収されるようにします。
-

Threshold 設定

- ・ Thresholdレベル以下のイベントは、装置では検出されません。しかし、システムで検出されないイベントは、ソーティングからは除外されません。例えば、赤血球と血小板がサンプルに含まれていて、これをソートフラクションから除去したい場合、赤血球と血小板が検出できるように散乱光Thresholdレベルを低く設定する必要があります。
 - ・ Thresholdレベルが低すぎると、デブリが検出されます。デブリとターゲット細胞が同時に検出されると、ターゲット細胞がソートされないことがあります。
-

フローレート

- ・ ソーティング性能は、LOフローレートで確認されています。HIとMEDのフローレートを使用した場合の純度はLOフローレートと、同じではないことがあります。

サンプル濃度

- ・ 図1に示すのは、Single Cellモードでソーティングを行った場合の、ソートレートとイベントレートとの関係です。一般に、ソートレートが最大になるのは、イベントレートが約2,000 events/secのときであることに注意してください。これに必要なサンプル濃度は、LOフローレートを使用する場合、約 10^7 cells/mLになります。

ターゲット細胞集団が30~35%より低い場合は、Single Cellモードで、300 sorts/secの最大ソートレートを得ることができません。例えば、10%のターゲット細胞集団を2,000 events/secでソートすると、得られるソートレートは50~60 sorts/secになるはずで、サンプル濃度が上下いずれに変化しても、ソートレートは下がります。

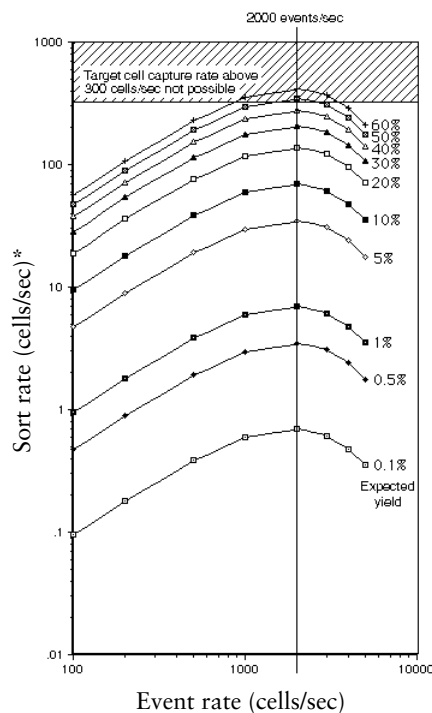


図1 さまざまなイベントレートとターゲット細胞パーセンテージにおけるソートレート

* ソートされた細胞数(Cells/mL)を計算するには、ソートレートを12倍する。

Single CellモードやExclusionモードとは異なり、Recoveryモードでのソートレートは、総レートが2,000 events/sec以上(少なくとも25,000 events/secまで)になっても、300 sorts/secのレートを超えない限り、上昇し続けます。Recoveryモードでは、パーセント純度はサンプルレートの上昇に伴って低下します。これは、ソートエンベロープにターゲット以外の細胞が入る確率が高まり、Recoveryモードで同時検出が無視されるからです。

FACSCaliburソートオプションにおける非無菌ソーティングのヒントと推奨事項

- ・ サンプル濃度として 10^7 cells/mLを使用した場合、サンプル濃度を再調整しないと、2,000 events/secのイベントレートは得られないことがあります。これが起こり得るのは、LOフローレートが正確に $12 \mu\text{L}/\text{min}$ ($12 \pm 2 \mu\text{L}/\text{min}$)になっていないためか、フローサイトメーターでは検出できる赤血球、血小板、デブリを、血球計数器では正確に計数できないためです。
- ・ 極端に少ない数の細胞でソーティングを開始する場合は、2,000 events/sec未満のイベントレートで同時通過を減らし、Single Cellモードでの回収を最大にした方がよいことがあります。Recoveryモードを用いるのは、ターゲット細胞の回収が第一の目的である場合です。
- ・ ソートラインとステーションの電気回路を点検し、ソート中にコレクションステーションに液滴が見られることを確認します。
- ・ 長時間のソートであれば、サンプルをときどき攪拌して沈殿を防ぎます。
- ・ 3本のコレクションチューブがすべて一杯になれば、新しい空のBSAをコートした試験管をコレクションステーションに取り付けます。

再解析

- ・ フローサイトメーターで再解析を行う場合、純度を良くするにはキャリーオーバーを取り除いてから、ソートしたサンプルの測定を行います。
- ・ サンプルの純度を確認するには、サイトスピンプレパラートを調べるか、フローサイトメーターで再解析を行います。
- ・ フローサイトメーターで再解析を行って回収率を評価するには、ビーズと共にソートした細胞のピークを調べます。
ソート細胞の数を推定する(つまり回収)方法の1つは、既知の濃度のビーズをソート済み細胞の試験管に加え、フローサイトメーターで再解析する方法です。

$$\frac{\text{分取したビーズの数}}{\text{加えたビーズの総数}} = \text{再解析した総数のうちの分取の割合}$$

$$\frac{\text{分取した細胞数}}{\text{再解析した総量のうちの分取の割合}} = \text{回収される細胞の総数}$$

洗浄

- ・ ソートラインを洗浄して塩の析出を防ぎ、ソーティング部分前後のラインを清浄に保ちます。
- ・ 推奨されている定期メンテナンス手順については、『FACSCaliburユーザーズガイド』を参照してください。