



倒立顕微鏡Ti2-EとCARTANAの*in situ*シーケンシングを使用し、脳の細胞タイプをマッピング

CARTANAが提供する*in situ*シーケンシング(ISS)キットを利用し、高いスループットと一細胞レベルの分解能で、組織切片内の数百の遺伝子から転写産物を直接検出することが可能です。ニコンの倒立型顕微鏡Ti2-Eは、自動焦点維持装置パーフェクトフォーカスシステムと自動化ステージ、広画像撮影機能の組み合わせにより、このアプリケーションを実現します。本アプリケーションノートでは、ISSを使用してマウスの脳切片の空間内における転写細胞タイプをマッピングする方法を紹介します。

*in situ*シーケンシング(ISS)

ISSは、形態学的に保持された組織切片内の元々の場所において、数百の遺伝子の分析を細胞以下の分解能で実現する技術です。これは、遺伝子特異型プローブのライゲーションによってバーコードシーケンスを導入し、クローン増幅して、切片内で直接生成しシーケンスすることで実現します。ISSは、他の多重*in situ*ハイブリダイゼーションや空間的シーケンス法と比較して、特異性と高スループットの点において優れています(1週間あたり、顕微鏡1台で最大で15cm²の組織面積)。

CARTANA (www.cartana.se)はISSを市販化し、カスタマイズ可能な遺伝子パネルを含むサンプル調製キット(図1a)と解読ケミストリーを最適化したISSキットを提供しています。サンプル調製手順により、検出したRNA分子の元々の場所に、0.5~1μmのバーコード化したDNAスポットを生成します(図1b-d)。その後このDNAスポットを、ISSキットと落射蛍光顕微鏡を使用して、組織切片内で直接シーケンスします。ISSの反応サイクルの間、蛍光標識されたプローブが反復的に連結、撮影、除去されることにより、DNAスポット内のバーコードシーケンスを読み取ることができます(図1e-g)。CARTANA ISSケミストリーの最大の利点は、高い輝度と優れたS/N比であり、低倍率の対物レンズでも撮影が可能です。そのため、大きな組織領域のISS反応も高速で撮影でき、他の*in situ*トランスクリプトーム分析法と比べて、スループットが大幅に向上します。

ISSにおける蛍光イメージング

ニコンの倒立顕微鏡Ti2-Eは、ISSリードの高スループットイメージングに最適です。自動焦点維持装置パーフェクトフォーカスシステム(PFS4)と電動ステージにより、スムーズな高スループット解析に不可欠な高い安定性を実現しています。これにより、広視野イメージン

Iván Hernández, Xiaoyan Qian, Jana Laláková,
Toon Verheyen, Markus Hilscher, Malte Kühnemund*

CARTANA AB, Nobels väg 16, 17165 Solna, Sweden
*Eメール: malte@cartana.se, john.allen@nikon.com

グ、Zスタックイメージング、多色蛍光イメージングなどの、複雑な多次元データ取得が確実に行えます。Ti2-Eは、実験ごとに最大9枚のスライドを同時に使用し、複数の組織切片全体で高品質のISSが行えます。

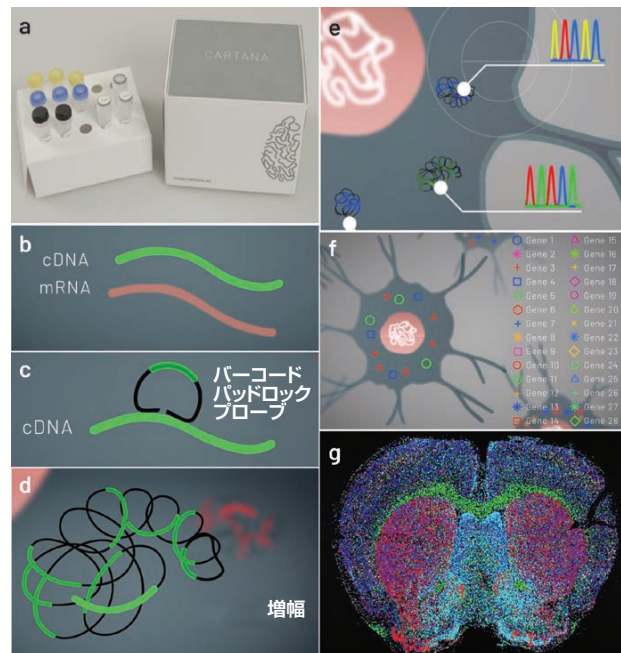


図1. CARTANAのISS技術による高スループット空間トランスクリプトーム解析。a. CARTANAサンプル調製試薬キット。b. 保存組織上の細胞タイプマーカーのmRNAsを、固定したcDNAに逆転写。c. バーコード化されたプローブをハイブリダイゼーションし、ターゲットとなるcDNAに連結。d. 連結したプローブを局所的に増幅し、バーコードの複数のコピーを含むDNAスポットを生成。e. 5サイクルのISSケミストリーによってバーコードを組織内でシーケンスし、蛍光イメージング。f. バーコードシーケンスを解読し、検出された遺伝子マーカー情報を各DNAスポットに割り当て。g. ターゲット遺伝子を組織切片全体の中で可視化。

APPLICATION NOTES

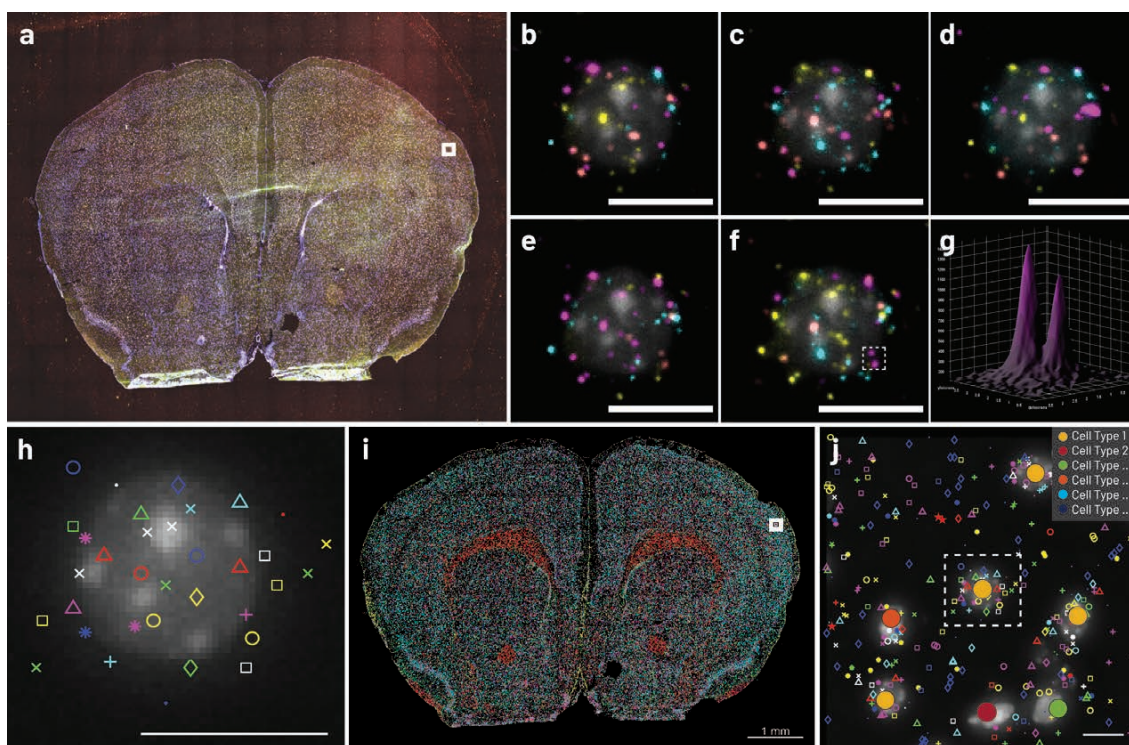


図2. CARTANA ISSによる脳細胞タイプの分類。a、サンプル調製後に1サイクルのISSを行い、ニコンの倒立顕微鏡Ti2-Eで撮影した多色の組織切片全体の元画像。b-f、画像aの白い四角の領域の拡大図。5サイクルのISSを行った単一細胞画像。g、画像fの点線の四角の領域の3D表面プロット。シーケンスした2つのDNAスポットの蛍光輝度(a.u.)表示。h、バーコードを読み取り、遺伝子マーカー(疑似カラーの記号)を各DNAスポットに割り当て。i、生成された組織切片全体の細胞タイプマップ。近接した遺伝子マーカーおよび教師なしクラスタリングに基づいて、各細胞を細胞タイプに割り当て。j、画像iの白い四角の領域の拡大図。点線の四角は画像hの細胞に対応。スケールバー:10 μ m(b-f,h,j)。

ISSの適用により、マウス脳切片の単一細胞におけるRNA分子を定量化

急速凍結した10 μ mのマウス脳切片を固定し、CARTANAサンプル調製キットを使用してISSの準備を行います(図2a)。キットには、150の中枢神経系マーカー遺伝子をターゲットとするカスタマイズ済みのプローブパネルが含まれます。その後、高S/N比のCARTANA ISSキットケミストリーを使用して、生成されたバーコードDNAスポットをシーケンスします(図2b-g)。次に、すべてのDNAスポットの特徴を解読し、150のターゲット遺伝子を、細胞以下の分解能で空間的にマッピングします(図2h-j)。

脳組織切片(8.3mm \times 6.2mm \times 10 μ m)の各ISSサイクルの撮影には、20X対物レンズとsCMOSカメラを搭載した倒立顕微鏡Ti2-Eを使用します。予備撮影でスライドガラス内の組織領域を特定し、ニコンのNIS-Elementsソフトウェアを使用してカメラの露出の最適化や、その他の設定を調節します。

その後、5つの蛍光チャンネル(細胞核を可視化するためのDAPIとISSケミストリー用の4チャンネル)について、165の視野(各視野が10%が重なった)と15のZ面(0.8 μ mステップ)の画像を自動取得します。このサイズの組織に対する1回のISS撮影サイクルは1時間以内に完了できます。150のターゲット遺伝子のバーコードを解読するには5回のISSサイクルが必要です。オプションとして抗体染色のサイクルを追加することも可能です。画像取得後、NIS-Elementsソフトウェアにより、マキシマム・インテンシティ・プロジェクション(MIP)や画像タイリング、画像の出力が行えます。

ISSによる*In situ*細胞タイプ分類

解読された各DNAスポットを統合して分析することにより、組織領域全体にわたる高密度の遺伝子発現マップ(図2i)が生成できます。DAPIの核染色により、各細胞をセグメントし、空間的に近接してISS遺伝子リードを割り当てることができます(図2j)。ISSは高スループットであるため、これまでは単一細胞RNAシーケンスによって定義されてきた組織切片の細胞タイプマッピングに最適です。大きな空間的細胞地図を生成することにより、固有の遺伝子発現パターンや組織の構造を構成するさまざまな細胞タイプの関係性を分析できます。

まとめ

CARTANAが開発したサンプル調製キットとISSキット、およびニコンの倒立顕微鏡Ti2-EやNIS-Elementsソフトウェアを使用することにより、細胞以下のレベルの分解能や高スループット、高い特異度で、数百の遺伝子の空間的定量分析に強力なソリューションを提供します。この技術は、神経科学、腫瘍学、免疫学、胚発生などのさまざまな研究分野における科学的進歩を実現し、ひいては細胞生物学や分子生物学に関する新たな知見を育み、診断や治療の開発に役に立つ可能性があります。