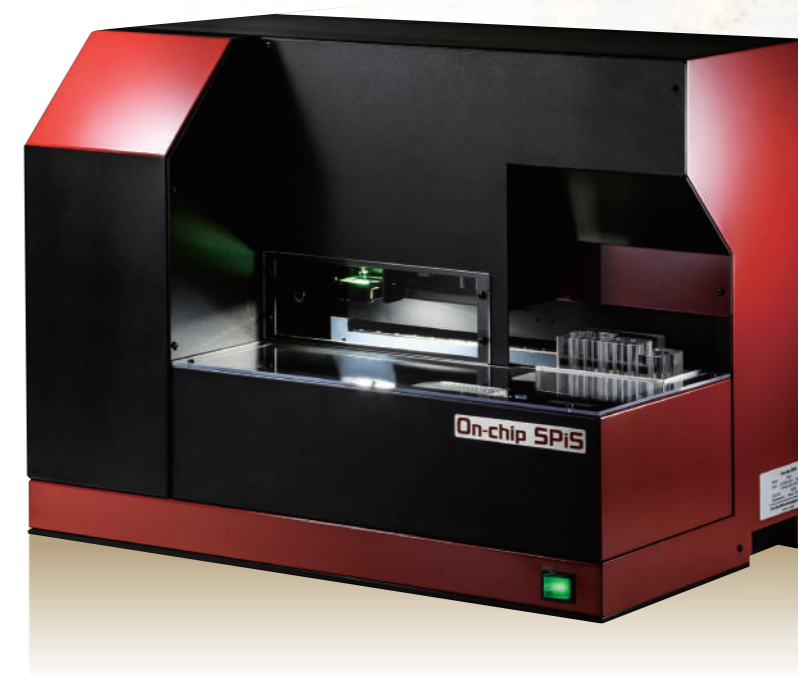




On-chip® SPiS Single Particle isolation System

簡単・確実に1細胞をウェルプレートに分注

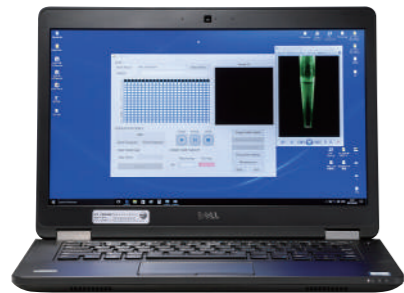


株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

〒184-0012 東京都小金井市中町2丁目16-17
TEL.042-385-0461 FAX.042-385-0462

ONCHIP-03B-J002

On-chip® SPiS : Single Particle isolation System



近年、1細胞解析技術が注目されています。例えば、がん研究では多種類のクローンが含まれていることから、がん細胞を1個ずつ解析し各細胞のサブタイプや遺伝子変異を見分ける必要性が高まっています。

しかし、現在普及しているシングルセル解析装置は、操作性や技術的な面において満足できる精度に至っていません。限界希釈法は簡便かつ低コストな手法ですが1細胞分注の精度は約21%であり、リクローニング操作を繰り返しおこなう必要も生じます。

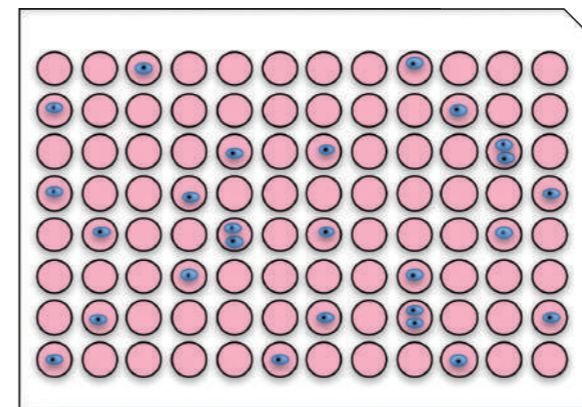
オンチップ・バイオテクノロジーズはこの問題を解決するため、On-chip® SPiSを開発しました。本装置を用いることで簡単操作・短時間で、90%を超える1細胞分注精度を実現しました。

On-chip® SPiS(オンチップ・スパイス)の特徴

自動で高精度に細胞をウェルプレートに分注

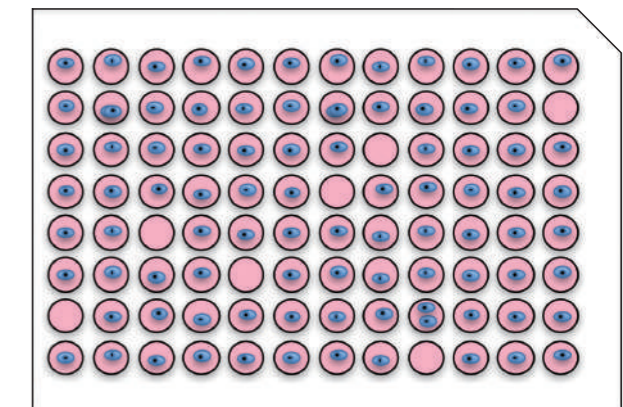
1. 簡単・自動操作
2. 使い捨てピペットチップ分注方式
3. 自動希釈機能+CCDカメラの画像認識
4. サンプルサイズは200 μmまで分注可能
5. 手頃価格

従来の方法
(例:平均0.3個での限界希釈法)



1 ウェル 1 細胞の精度=約21%

On-chip® SPiS



1 ウェル 1 細胞の精度=約92%

1細胞分注のフローワーク

①自動限界希釈



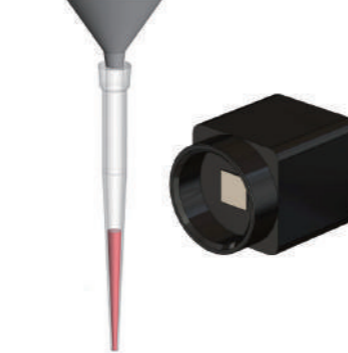
分注液量に対して1細胞となるように自動で限界希釈 [1細胞/ 0.2 μL]

②吸引



サンプルチューブから1個の細胞となる液量を吸引

③細胞数確認



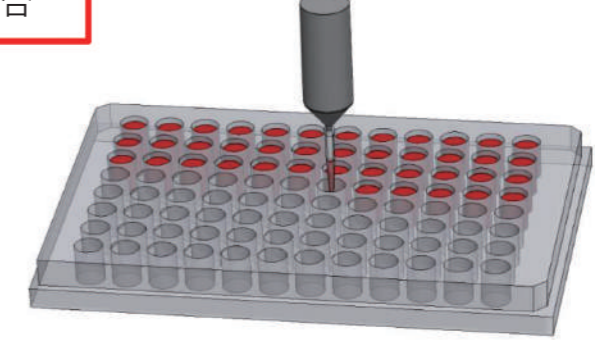
CCDカメラで吸引された細胞数を計測

1個となるまでリトライ

1個のみの場合

0個、2個の場合

④ウェルに分注



確実に1細胞ずつ分注

On-chip® SPiSの1細胞分注の精度と解析速度

A549細胞株を1細胞/1 wellで分注した。その結果、96 wellを54分で分注することができた。また、1細胞分注されたwellは90であり、そのうち83 wellで増殖が確認された。

分注時間: 54分/96 well

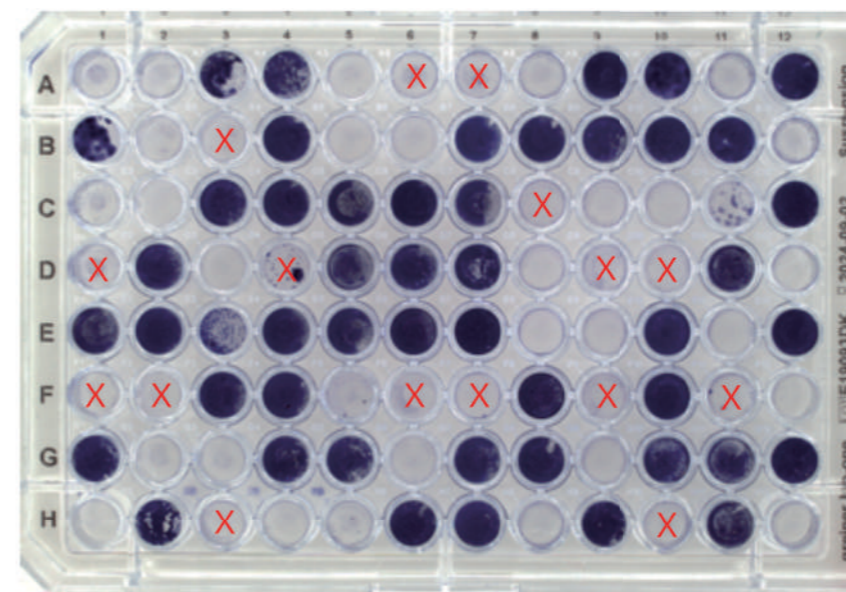
分注された細胞数	ウェル数 (割合)	増殖したwell (割合)
0	4 (4.2%)	-
1	90 (93.8%)	83 (92.2%)
2	2 (2.1%)	2 (100%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
F	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
G	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

区画ひとつひとつはwellを、数字は分注された細胞数を示す

ノックアウト株の1細胞分注

On-chip® SPiSはゲノム編集後のスクリーニングにも有用である。CRISPR-Cas9によりポリオウイルス (PV) 受容体のノックアウト細胞株を作製した。1細胞ずつウェルプレートに分注し、培養後にウイルス感染を行った。その結果、PV耐性を獲得した49種のクローンの樹立に成功した。



PV耐性が49クローン得られた
49 well / 96 well = 51 %

- PV耐性を獲得した細胞
- 増殖しなかった細胞
- ✕ KOできずに感染で死んだ細胞

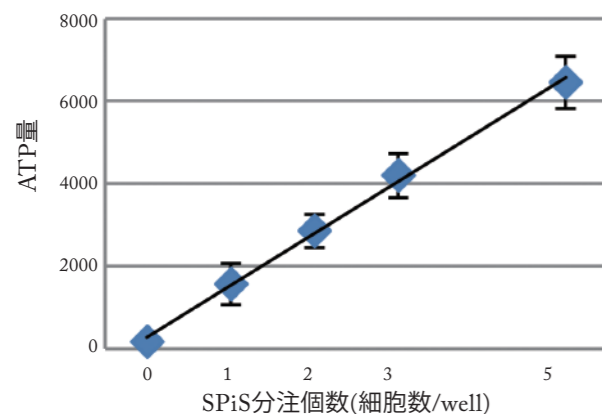
*ポリオウイルス受容体をノックアウトすることで細胞は感染せず、生存可能

Collaboration with Dr. Koike, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

On-chip® SPiSによる個数指定分注の確認(ATPアッセイ)

個数指定分注

PC9細胞を1, 2, 3, 5細胞/wellで各ウェルに分注して、ATP量を測定すると細胞数に相関して良好な検量線が描ける。



細胞: PC9
1 wellに1, 2, 3, 5細胞の分注を指定

ATP量による分注精度検証

PC9細胞を1細胞/wellで96ウェルプレートに分注した。各ウェルのATP量を測定することで約90%の1細胞分注精度を実証した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1560	1833	2893	710	1580	2213	986	893	860	2086	1020	726
B	886	840	793	1790	1276	1933	1796	766	1283	883	1970	810
C	1790	2703	3163	1676	2893	1840	1840	1640	2446	2720	2076	1670
D	2363	2173	1896	1713	2113	1706	3430	1583	2543	1400	2763	1783
E	1873	2223	2153	1710	1710	2693	1783	2030	1990	2163	3130	2753
F	2036	4021	2416	1186	1040	1110	1003	1233	1123	1243	2946	1846
G	950	1243	1756	2713	3303	2403	2150	1796	1666	2050	2483	2120
H	2356	3443	1700	2256	2076	4497	2756	2006	1950	2580	2483	2796

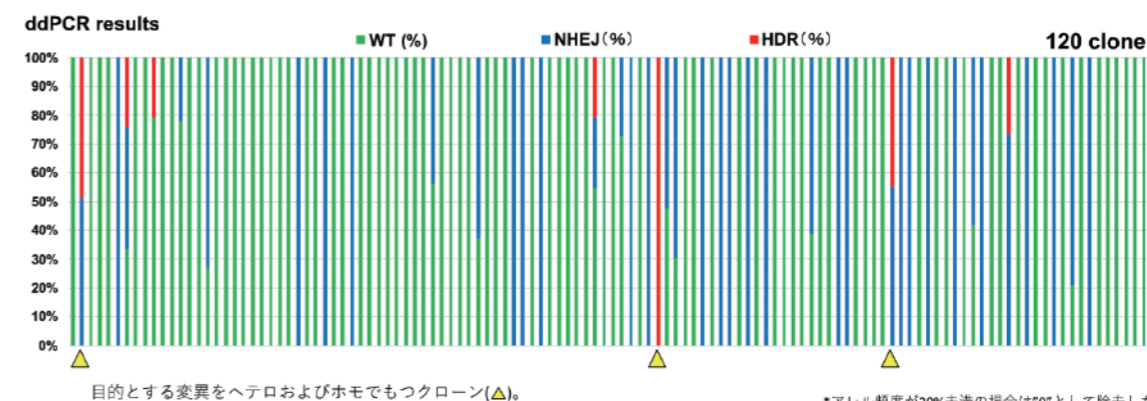
分注精度90%
•1細胞分注: 86 well
•2細胞分注: 10 well

HDR変異クローンのセレクション

トランスフェクションしたHEK293T細胞をOn-chip® Sort(当社開発のセルソーター)により陽性株を分取し、On-chip® SPiSで1細胞分注を実施した。

その結果、ゲノム編集されたクローンを効率的にシングルセルで得ることができた。また、一度の実験でホモ変異をもつクローンを得る効率の高さも実証された。

分注した細胞数 384
得られたクローン数 120
ゲノム編集が生じたクローン数 41
目的変異HDRをもつクローン数 7
(ホモでもつクローン数) (1)



目的とする変異をヘテロおよびホモでもつクローン(△)。

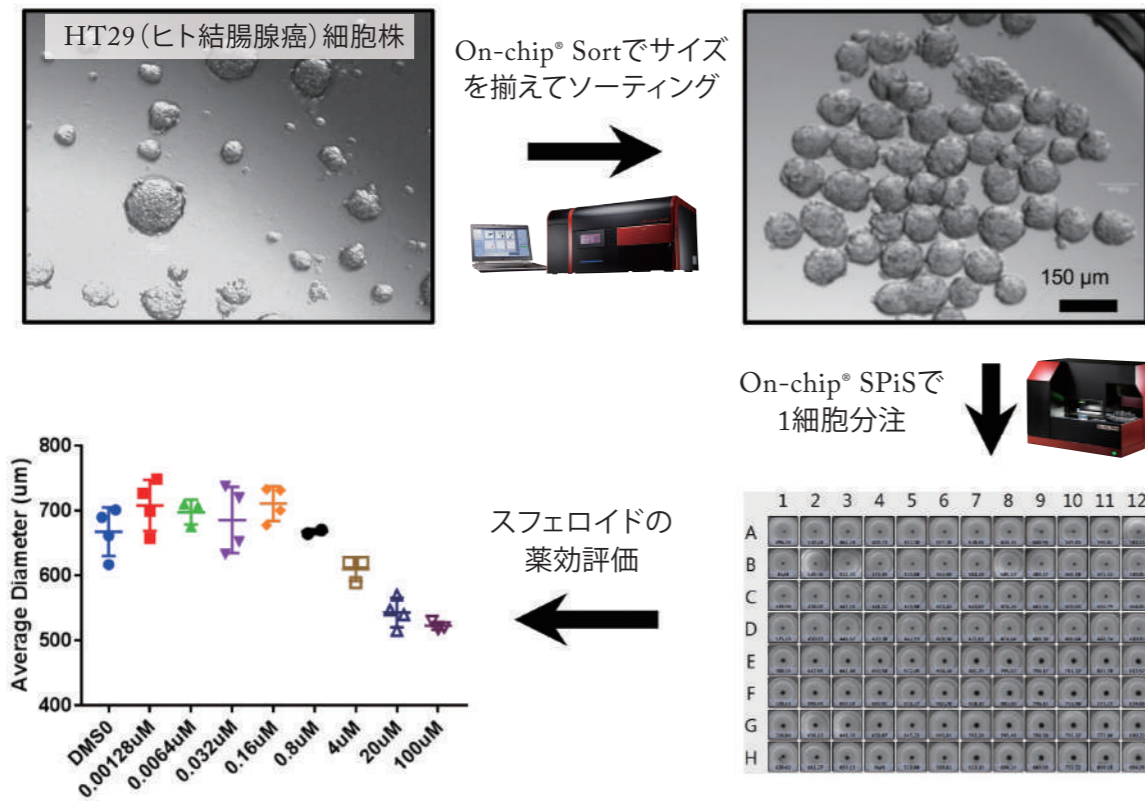
*アレル頻度が20%未満の場合は"0"として除きました

Collaboration with Dr. Miyaoka, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

サイズを揃えたスフェロイド塊の分注と薬剤評価試験

生体環境を再現できるスフェロイド（細胞塊）の利用は、抗癌剤などの薬剤評価において注目されているが、高精度な評価にはスフェロイドのサイズの均一化が必要である。

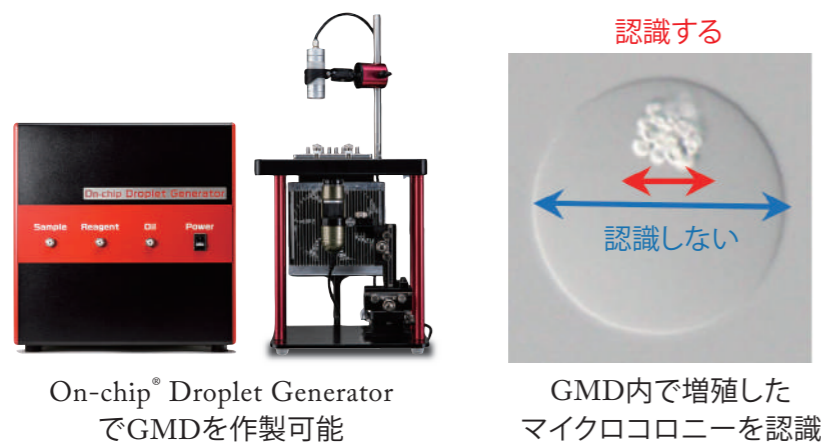
そこでOn-chip® SortおよびOn-chip® SPiSを利用することで、一定サイズのスフェロイドを回収、そして単一スフェロイドを簡便・迅速に分注することでより精度の高い薬剤アッセイが可能となる。



Collaboration with Mr. McClellan, Mitchell Cancer Institute

細菌を培養したゲルマイクロドロップ(GMD)の分注

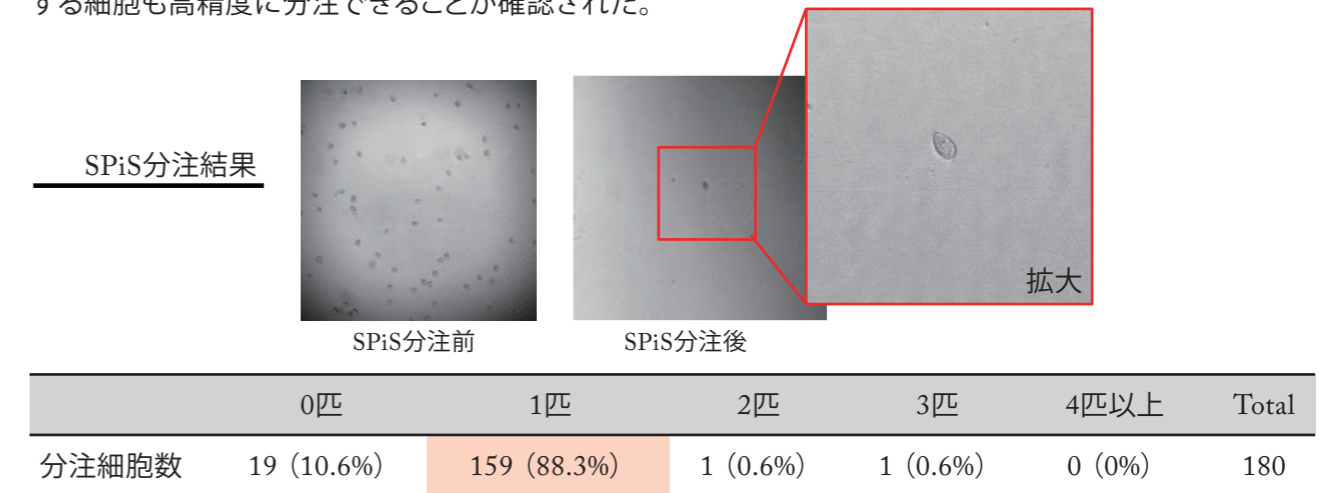
On-chip® SPiSは細胞に限らず、GMD（ゲルで固まった微小液滴）も分注することが可能である。1細胞から増殖した細菌はGMD内部にてマイクロコロニーを形成することで、CCDカメラによる認識を可能とす



応用例:
環境微生物や変異体ライブラリーに対するスクリーニングと単離

遊泳するテトラヒメナの分注と培養

原動物のテトラヒメナを合計180 wellに1細胞/wellで分注し、3日間培養した。その結果、159 wellで1細胞分注され、そのうち137 wellで増殖した。このことから、遊泳運動する細胞も高精度に分注できることが確認された。



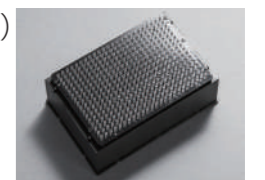
- 増殖したwell : 137 (86.2%)
- 増殖が弱いwell : 22 (13.8%)

Collaboration with Dr. Nakano, Tsukuba University

装置情報

製品名	On-chip® SPiS (オンチップ・スパイス)
製品番号	70001
装置構成	本体、制御PC (Windows)
本体サイズ	610 x 365 x 450 / W x D x H (mm)
分注方式	使い捨てピペットチップ
認識方法	解像度5メガピクセルCMOセンサー内蔵カメラによる画像認識
チップ内容量	0.2 μL
サンプル	細胞、花粉、原生動物、細胞集塊、人口粒子(ビーズ)、ゲルマイクロドロップなど
認識サイズ	10 - 200 μm (培養細胞株で確認)
分注精度	90%以上(サンプル状態に依存)
バイオセーフティー	安全キャビネット内に設置可能
ダメージ	細胞等へのダメージは低い
攪拌方法	使い捨てピペットチップによる自動攪拌
溶液	水、培養液、海水など
処理速度	60分/ 96 well (参考時間: 設定条件とサンプルの状態による)
対応プレート	96ウェルプレート、384ウェルプレート
電源入力	AC 100-120V, 50/60Hz
消費電力	1.0A typ (ACIN 100V)

On-chip® SPiS専用分注ピペットチップ(滅菌済)
使用方法: 分注用ピペットチップとして使用します。
滅菌済のため無菌的な分注操作が可能です
品番: 1007001 品名: Chip-384S



お問い合わせ
先

株式会社 オンチップ・バイオテクノロジーズ

Phone: 042-385-0461 Fax: 042-385-0462

E-mail: info@on-chip.co.jp Home page: https://on-chip.co.jp/

