

Application Note

蛍光核酸プローブを用いた細菌を含む油中水型ドロプレットのソーティング

Collaboration with Prof. Naohiro Noda (AIST, Biomedical Research Institute)

Introduction

ドロプレットマイクロ流体をベースとしたシステムでは、均一な大きさの油中水型(W/O)ドロプレットを高効率で生成し、各ドロプレットを反応器として使用することができます。このような微小容量の反応器は、細菌の培養、ドロプレットデジタルPCR、ハイスループットスクリーニング、酵素動態の解析などに利用されます。特に、単一の細菌を個々のドロプレットに封入することで、成長の速い種と遅い種間の増殖競争を防ぐことができます。これは膨大な量の早生菌を含む細菌混合物とは別に、稀少菌や遅生菌を培養する場合に有用です。しかしながら、細菌を液滴に封入する工程の後、細菌を含むドロプレットと細菌を含まない液滴とを分離することは技術的に困難なままであり、その結果、W/Oドロプレットから環境微生物の単離培養に成功した文献は非常に限られた数しかありません。この課題を克服するために、マイクロ流路チップ型セルソーター、On-chip® Sortを使用してドロプレット中の細菌を分離することができるソーティング方法を開発しました。ドロプレット中の細菌は、ドロプレット内に封入された蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型RNAプローブとの相互作用により発生する蛍光に基づいて分取できます。この方法は、Fluorescent Nucleic Acid Probe in droplets for Sorting bacteria (FNAP-sort) と名付けられています。(Ota, Y., Saito, K. *et al.* PLoS ONE 14(4): e0214533. Under the licence of Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Methods

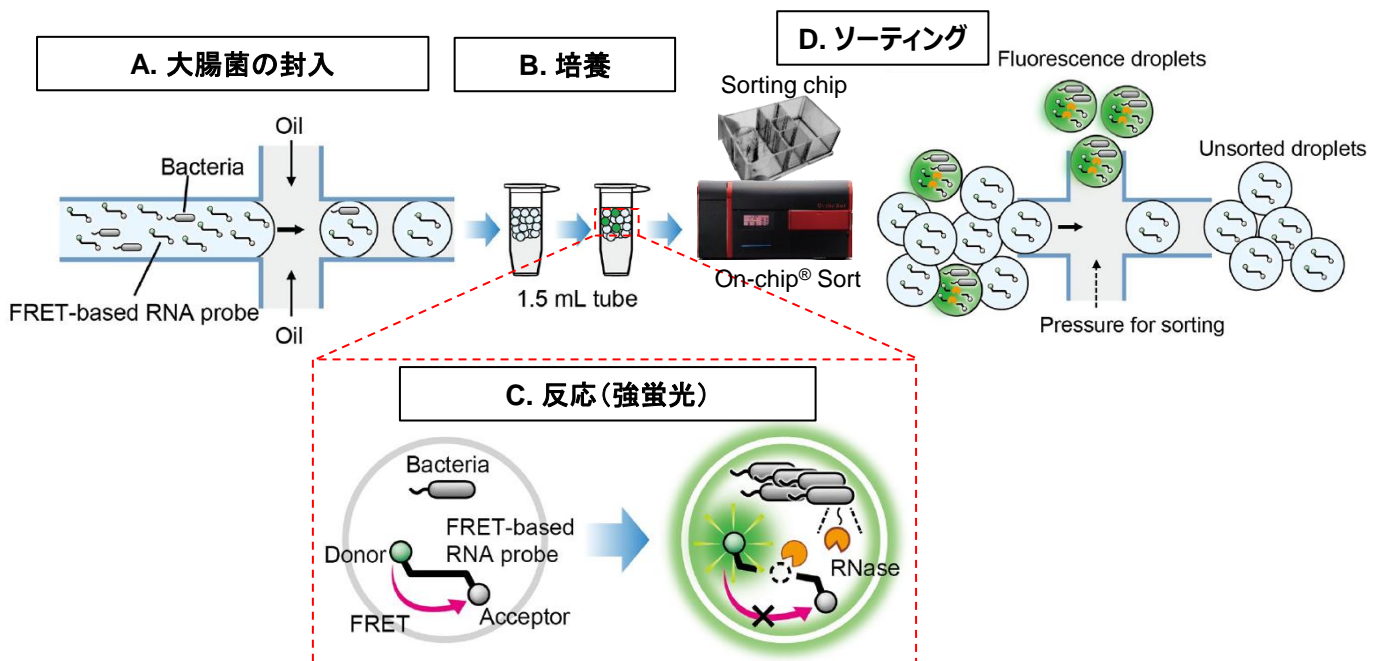


図1. FNAP-sortのワークフロー (Ota, Y., Saito, K. *et al.* PLoS ONE 14(4): e0214533. Under the licence of Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Application Note

前頁図1は、FNAP-sortのワークフローを示しています。FRET型RNAプローブで培地に懸濁した単一の大腸菌または細菌を、ナノリットルレベルのW/Oドロップレットに封入します(図1A)。ドロップレットを1.5 mLのチューブに移し、封入した細菌を37°Cで1日間培養します(図1B)。インキュベーション中、FRET型RNAプローブはそれ自体では蛍光を発しませんが、細菌の存在下において増殖している細菌から分泌されるリボヌクレアーゼ(RNase)がFRET型RNAプローブを切断し、ドロップレット内で強い蛍光を発します(図1C)。150 μ m流路幅(2D-chip Z1000-w150)のマイクロ流路チップとOn-chip[®] Sortを使用して、増殖している細菌を含む高蛍光のドロップレットを分離します(図1D)。

Results

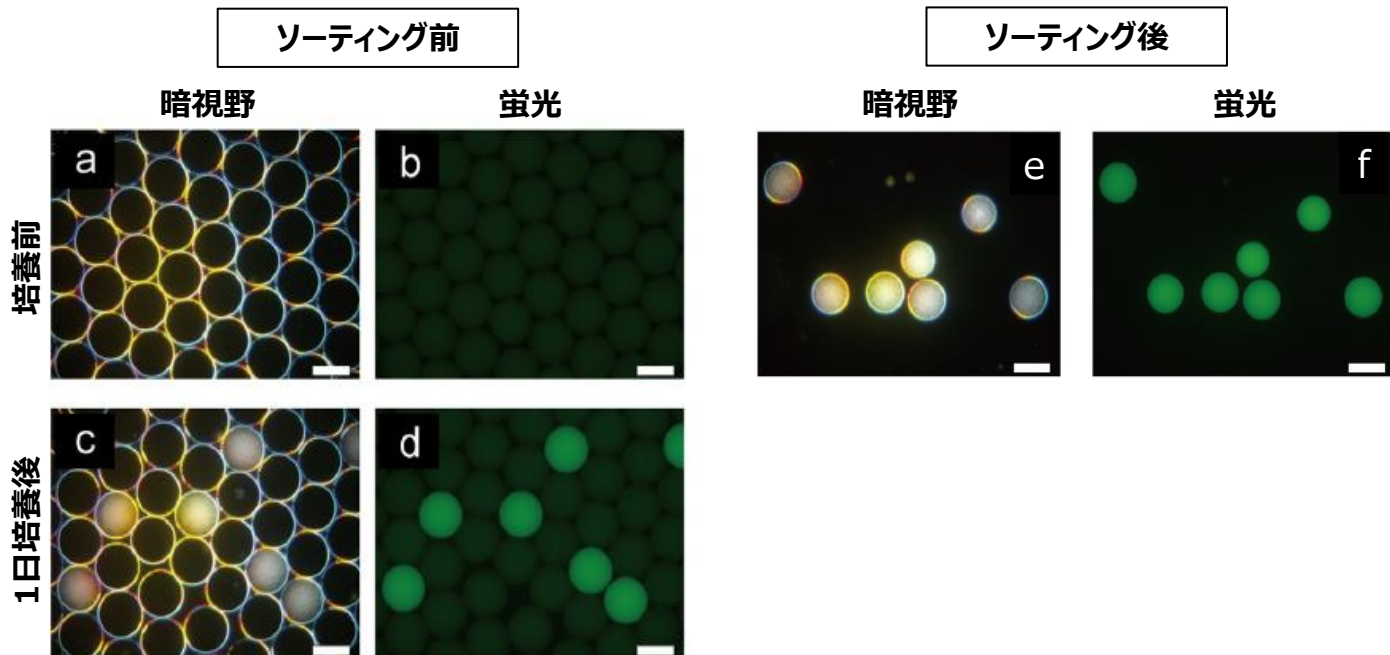


図2. 大腸菌を含むエマルジョンの暗視野および蛍光の顕微鏡写真。培養前 (a, b) と培養後 (c, d)、On-chip[®] Sortを用いて純化した増殖大腸菌による高蛍光のエマルジョン (e, f)。スケールバーは100 μ mを示します。(Ota, Y., Saito, K. *et al.* PLoS ONE 14(4): e0214533. Under the licence of Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

大腸菌とFRET型RNAプローブを含むドロップレットは、ドロップレット生成直後に弱い蛍光を発することが観察されました(図2a, b)。大腸菌とFRET型RNAプローブを含むエマルジョンは、37°Cで1日間培養すると強い蛍光を発することが観察されました(図2c, d)。これらの結果は、FRET型RNAプローブと生育大腸菌をドロップレット内に封入した場合、蛍光顕微鏡で観察可能な蛍光を発生させることに成功したことを示しています。1日培養後の増殖した大腸菌を含む強い蛍光を発するドロップレットは、On-chip[®] Sortにより分取することに成功しました(図2e, f)。このようにドロップレット内の生育細菌から分泌されるRNaseがFRET型RNAプローブを切断して強い蛍光を発生させ、On-chip[®] Sortでその蛍光エマルジョンを分取するシステムFNAP-sortは、W/Oドロップレット中の環境試料をハイスループットで培養し、単離するための有用なツールとなる可能性があります。