

Water-in-oilエマルション内での大腸菌培養と選択分離

イントロダクション

近年、water-in-oilエマルションのような微小水滴内での生化学反応への期待が高まっている。微小区画を用いる利点として、阻害性物質の影響低減と複数の目的産物の同時処理の2つが挙げられる。つまり、反応溶液や培養液を多数の区画に分配することにより、阻害性物質を一部の区画に閉じ込め、かつ不純物が多い条件では起こりにくい反応も行うことが可能となる。実際、エマルション内でPCR反応を行うことにより、コンタミネーションの効果を低減し、非区画化条件では起こりにくい遺伝子の増幅を効率的に行うことができるようになることが知られおり、次世代シーケンス解析のサンプル調整などにも応用されている^{1, 2, 3}。

同様に、微生物培養においても区画化による2つの効果が得られると考えられる。たとえば、自然界には未だ単離培養が確立されていない微生物種が存在するが、区画ごとに単一種を分離して増殖、さらに目的の種が封入されている区画を分種することができれば、微生物の未知機能解明に貢献することができるだろう。本報告では、当社製品のOn-chip Droplet GeneratorとOn-chip Sortを用いた区画内での微生物培養と分種を目指し、water-in-oilエマルション内で大腸菌を培養、分種できることを示す。

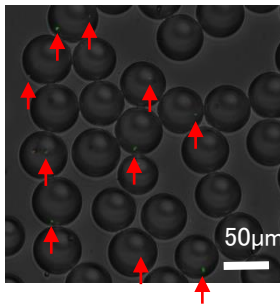
方法

GFPを発現している大腸菌をBrain Heart infusion液体培地に調整した。濃度は大腸菌を含むエマルションと含まないエマルションの数が50%ずつになるよう調整した。オイル成分にはミネラルオイル、界面活性剤にはSpan80、Tween80、TritonX-100を用いた。これらをOn-chip Droplet Generatorで処理することにより、大腸菌を含む培地をエマルション化した。その後、エマルションを室温で20時間静置し、エマルション内部の大腸菌の増殖を観察した。20時間目にOn-chip Sortにより、大腸菌が増殖した区画のみを分取した。

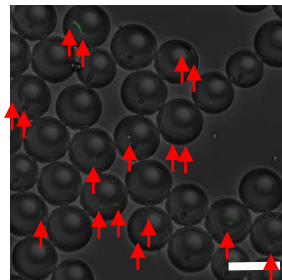
結果

大腸菌を含む区画が約50%であるようなエマルションが生成された。エマルションの直径は約40 μm、大腸菌の封入個数は1個または2個であった。2時間後、大腸菌の個数は2時間で2倍以上に増殖し、4時間では10倍近くまで増殖した。20時間後には1エマルションあたり数100匹にまで増殖していた。なお、各時間において大腸菌を含まない区画は50%ほどで変化せず、最初は大腸菌を含む区画と含まない区画が完全に分離されていることが示された。On-chip Sortで20時間目のエマルションから、蛍光強度の高い区画のみを分取した結果、大腸菌を含むものをほぼ100%に濃縮できた。

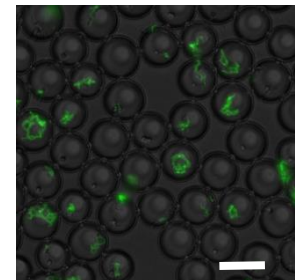
封入直後



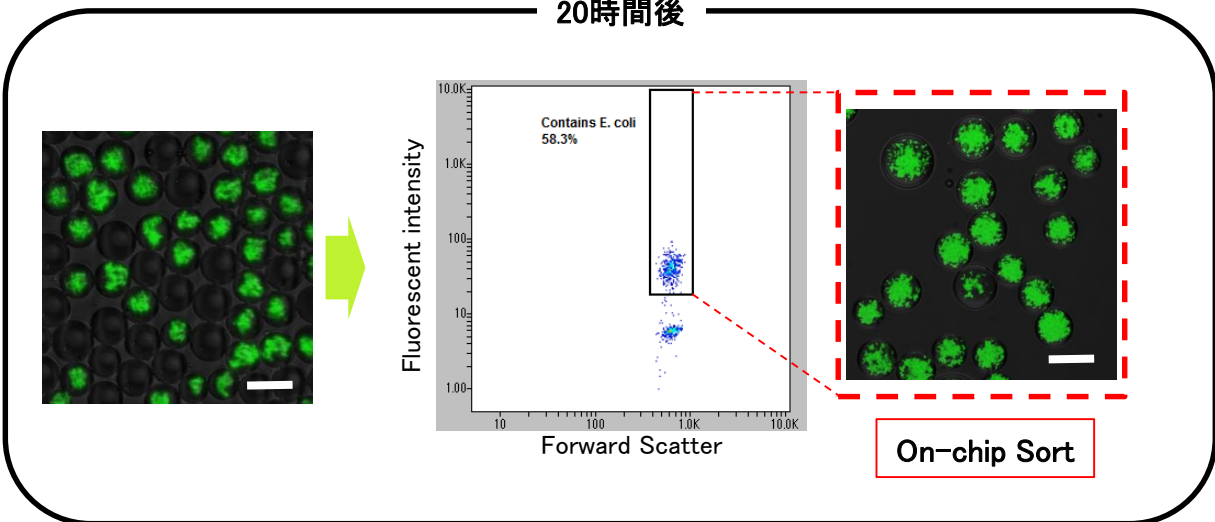
2時間後



4時間後



20時間後



まとめ

On-chip Droplet Generatorを用いて、大腸菌をエマルション内に封入し、培地の交換等を行わずに20時間まで培養することができた。

On-chip Sortを用いて、増殖した大腸菌を含む区画のみを蛍光により選択分離することができた。

本結果は、エマルション内に微生物を分離・培養し、選択を行うことが可能であることを示唆する。

1. R. Williams *et al.*, *Nat. Methods*, **3**(7), 545-550, 2006 2. J. Shendure & H. Ji, *Nat. Biotech.*, **26**, 1135-1145, 2008 3. Y. Bansho *et al.*, *Chem. & Biol.*, **19**(4), 478-487, 2012