

# Application Note

## On-chip<sup>®</sup> Sortを用いたゲルマイクロドロップによる腸内細菌のハイスループットスクリーニングの可能性 ～嫌気チャンバー内で操作可能なOn-chip<sup>®</sup>製品～

(慶應義塾大学先端生命科学研究所 福田真嗣先生との共同研究)

### Introduction

近年、腸内細菌叢は、健康・疾患制御などの関係が明らかになりつつあり、注目を浴びている研究分野の一つになります。しかしながら、ほとんどの腸内細菌は嫌気性細菌であるため、その研究には嫌気状態を維持した操作が必須で、一般的には嫌気チャンバー内で作業をすることになります。この空間内で実施できることは限られており、研究促進の足枷となっています。研究の幅を広げて頂くため、オンチップ・バイオテクノロジーは嫌気チャンバー内に入るセルソーターおよびシングルセル分注機を販売しております。また小スペースでスクリーニングを可能とするWater in Oilドロップレットとゲルマイクロドロップ (GMD) を作製する装置を販売しております。これら装置を組み合わせ、嫌気性細菌のスクリーニングの可能性を示したいと思います。

### Methods

#### Overview of *Bifidobacterium longum* culture in Gel-balls

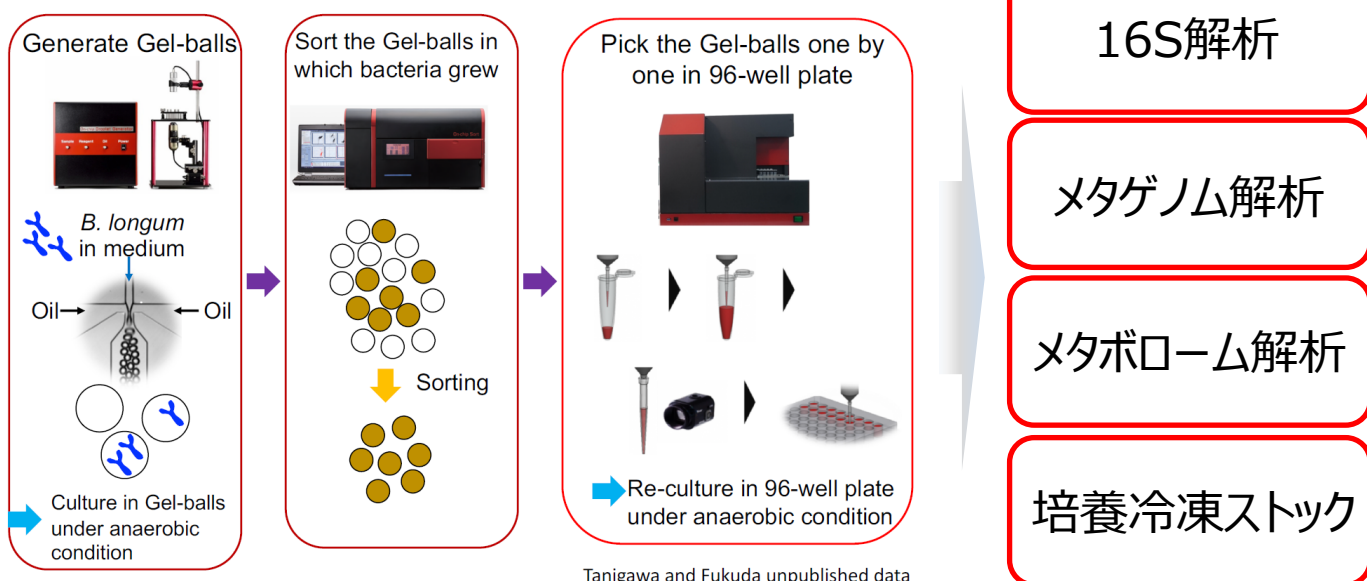
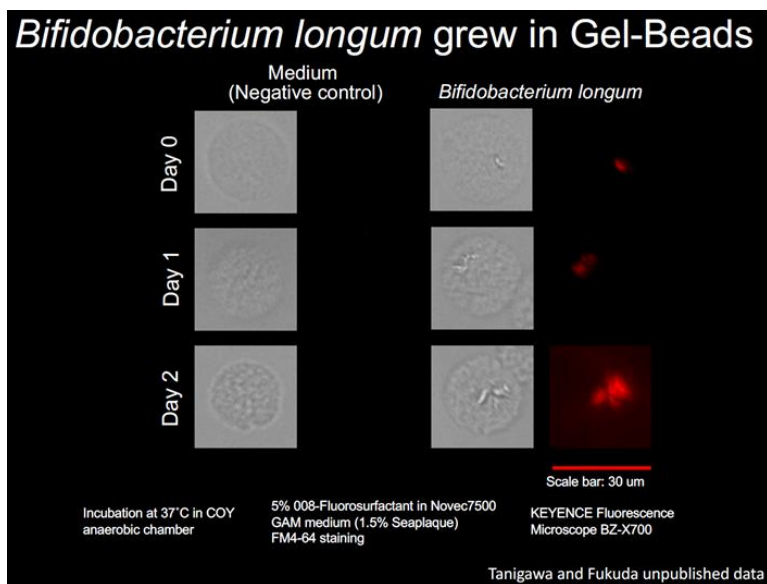


図 1. On-chip<sup>®</sup> Sortを用いたGMDによるビフィズス菌のハイスループットスクリーニングのワークフロー

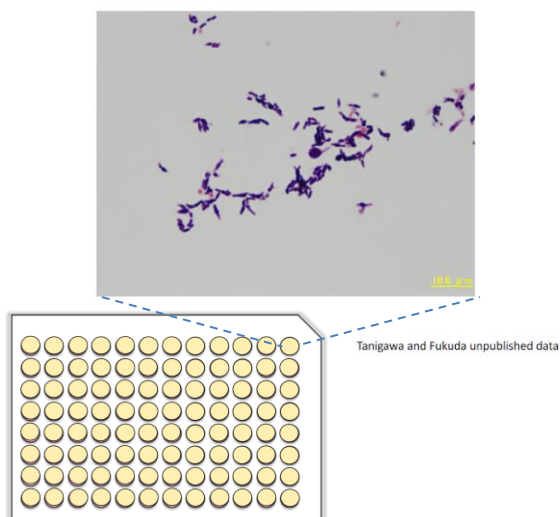
左) Water in OilドロップレットおよびGMDを作製するOn-chip<sup>®</sup> Droplet Generator。中) ドロップ内を蛍光染色後ソーティングするOn-chip<sup>®</sup> Sort。右) ソーティングしたGMDを1ウェル/1GMDになるように分注するOn-chip<sup>®</sup> SPiS。

図 1 は、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*) を封入したゲルマイクロドロップ(GMD)ソーティングによるハイスループットスクリーニングのワークフローを示しています。ビフィズス菌は偏性嫌気性菌ですが、腸内細菌スクリーニングのproof-of-conceptとするため嫌気チャンバー内で操作を実施しました。アガロースGMD中にビフィズス菌をカプセル化するために、On-chip<sup>®</sup> Droplet Generatorで約30μmのWater in Oilドロップレットを生成しました。ビフィズス菌を含むドロップレットを37℃で2日間培養してコロニーを形成させました。GMDを培地に置換した後、FM4-64 (ThermoFisher Scientific) で細胞膜を染色しました。非染色GMDおよび空のGMDが含まれる中、染色GMDを分取するためOn-chip<sup>®</sup> Sortでソーティングしました。分取した増殖ビフィズス菌を含むGMDをOn-chip<sup>®</sup> SPiSで96穴マイクロプレートへ1GMD/1wellになるように撒き、再培養しました。

# Application Note

**A****B**

Gram staining of *Bifidobacterium longum* re-cultured in 96-well plate under anaerobic condition



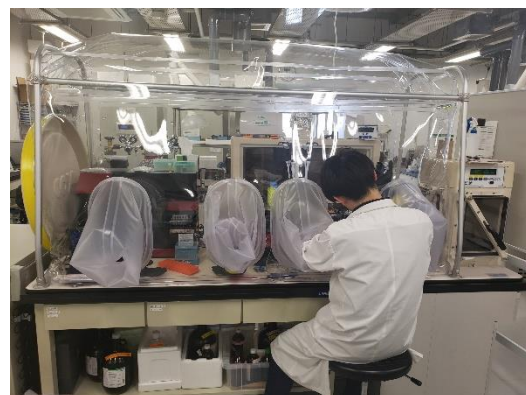
**図 2.** ビフィズス菌のGMD封入・培養後の染色性とソーティング・プレート分注後の再培養。(A) GMD封入後0日目、1日目、2日目に顕微鏡観察をしました。左は培地のみGMDにおける明視野とFM4-64染色。右はビフィズス菌1個封入したGMDにおける明視野とFM4-64染色。(B) 2日間培養しFM4-64染色で陽性になったGMDをOn-chip® SortおよびOn-chip® SPiSを使用して96穴プレートに1GMD分注したときの再培養の顕微鏡写真。

図 2は、GMD封入後嫌気チャンバー内培養0～2日目の顕微鏡写真（KEYENCE BZ-X700）です。FM4-64染色は細胞膜を染めますが、シングル封入からGMD内で増殖していることがわかります。培養2日目にOn-chip® Sortを使用してFM4-64の蛍光量が高い増殖したビフィズス菌をソーティングしました。ソーティングしたビフィズス菌はOn-chip® SPiSで1 GMD(増殖したもの) / 1ウェルになるように96穴プレートへ分注し再培養しました。その結果、GMDスクリーニング後のビフィズス菌がウェルプレート内で生存しGMDから出て増殖していることがわかりました。本結果は、嫌気チャンバー内でOn-chip®製品を使用することでソーティングを組み合わせたスクリーニングが可能になり、嫌気性細菌のスクリーニングが容易になることを示しています。

## 嫌気チャンバーとは

腸内細菌には完全嫌気性の細菌が多く、好気状態に放置されると時間経過と共に死滅する菌が多く存在します。そのままNGSなどDRYの実験をする場合は、問題にならないときも多かもしれませんが培養などをするときは一連の作業を通して嫌気状態を維持する必要があります。

嫌気チャンバーは、N<sub>2</sub> 100%でチャンバー内空気を置換し、次に標準でN<sub>2</sub> 96%、H<sub>2</sub> 4%の混合ガスで封入させ、パラジウム触媒によりチャンバー内残存O<sub>2</sub>をH<sub>2</sub>Oに変換することで嫌気（無酸素）環境の維持を可能にする装置で、嫌気性細菌の研究には必須になります。このような嫌気チャンバー内で作業をすることになりますが、効率の良い腸内細菌の単離培養を考える場合、ソーティングが必要になります。On-chip® Systemは、それら一連の流れをサポートします。



(製造元：COY LABORATORY PRODUCTS INC. (USA) )  
(撮影協力：慶應義塾大学 先端生命科学研究所 谷川様)

## 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2-24-16 農工大・多摩小金井ベンチャーポート203号室  
TEL: 042-385-0461 FAX: 042-385-0462 e-mail: info@on-chip.co.jp  
URL: https://on-chip.co.jp

