

微生物 1 細胞ゲノム解析用

AGM™ (アガロースゲル・マイクロカプセル) 試薬キット (3 反応)

取扱説明書

商品コード: MCM-3

Rev.230404

研究用

はじめに

本キットは、エマルジョン中での安定なゲル化により、微生物 1 細胞を包埋する微細なアガロースゲル・マイクロカプセル (AGM) を作製するためのものです (特許第 7018685 号)。従来、微生物の 1 細胞ゲノム増幅では、酵素による DNA 増幅の偏り (バイアス) により、全長のゲノム DNA 増幅が得られにくい課題がありました¹⁾。本キットではピコリットルスケールの微小空間に微生物を包埋しますが、この中で Multiple Displacement Amplification (MDA)²⁾ を行えば、増幅ゲノム DNA の均一性の大幅な向上が期待できます。

原理

微生物の 1 細胞ゲノム解析における増幅バイアス抑制には、反応液量の微量化が有用です³⁾。従来、微量反応容器の作製には、専用機器が必要でしたが、本キットでは、市販の機器を用い、簡便にこれを実現します。

微生物を包埋したアルギン酸コアを作製後、アガロースと混和し、沈降防止用オイルを用いたエマルジョン中で安定にゲル化します。そしてコアの可溶化により、内部が液状で、周囲をゲルに覆われた AGM を作製します (Fig. 1)。

これら AGM 内の液状コア中でのピコリットルスケール MDA を行えば、増幅バイアスの抑制された、均一な増幅 DNA が 1 細胞から簡便に得られます。

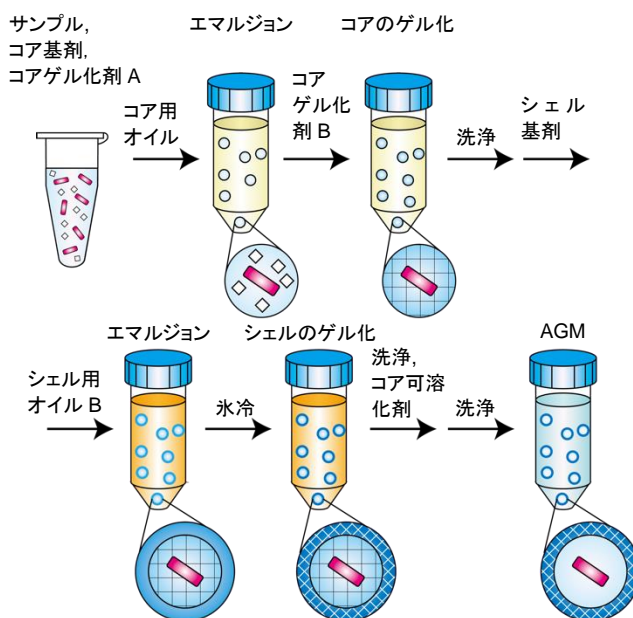


Fig. 1 AGM 作製原理

構成試薬・器具

以下の試薬・器具がキットに添付されていることをご確認ください。

試薬	保存	試薬	保存
[1-1] 滅菌超純水	室温	[1-2] 酢酸バッファ	室温
[1-3] アルギン酸コアゲル化剤 A	冷蔵	[1-4] アルギン酸コア基剤	冷蔵
[2] アルギン酸コア用オイル	冷蔵	[3-1] アルギン酸コアゲル化剤 B-1	室温
[3-2] アルギン酸コアゲル化剤 B-2	室温	[4] Tris バッファ洗浄液	室温
[5] Tris バッファ	室温	[6] アガロースシェル基剤	冷蔵
[7] アガロースシェル用オイル A	冷蔵	[8] アガロースシェル用オイル B	室温
[9] TE バッファ	室温	[10] アルギン酸ゲルコア可溶化剤	室温

器具	保存	器具	保存
100 µm セルストレーナ・3 個	室温	300 µm セルストレーナ・3 個	室温
セルカウンタープレート(フックスロー センタータイプ)・1 枚	室温		

使用上の注意

- ・本試薬キットは研究用です。医療や臨床診断用には使用しないでください。
- ・[6] アガロースシェル基剤を 80°C 加熱溶解する際、火傷にご注意ください。
- ・操作中にオイル類が 50 mL チューブなどの器具外壁等に付着することがありますので、その都度よく拭き取ってください。50 mL チューブの蓋をしっかりと閉めてから、上下振盪やボルテックスミキサーでの混和を行ってください。
- ・SDS も併せてご覧ください。下記 URL または右記 QR コードから情報をご覧ください。 <https://www.toyo.co.jp/agm/>



必要機器等

試薬: SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen)

機器: ボルテックスミキサー、遠心機(50 mL チューブ用)、蛍光位相差顕微鏡、卓上遠心機、電動ピペット、マイクロピペット、ドライバス (1.5 mL と 50 mL チューブ用)、電子天秤

滅菌器具: 50 mL 遠沈管、1.5 mL マイクロチューブ、フィルタ付きピペットチップ、10 mL ディスパーザブルピペット、フィルタ付きワイドボアチップ (ART200G、ART1,000G (Thermo Scientific) 或いは 124P-744CS、124P-844CS (WATSON) など)、グローブ、DNA Away (Thermo Scientific)

その他の器具: セルカウンタープレート (1 枚付属していますが、不足の場合) (177-512C (WATSON) など)

作業環境

本キット試薬は DNase、RNase フリーです。1 細胞ゲノム増幅時のコンタミ防止のため、グローブを着用し、DNA Away で実験器具や作業場所を拭き取り後、ご使用ください。必要に応じて、安全キャビネットで行ってください。

サンプル前処理

環境中試料から不純物を除きます。不純物が少ない場合は、滅菌水で希釈し、ステップ 6 から行ってください。サンプル前処理のための試薬および器具はキットに添付されていませんので、ご準備ください。

1. 微生物試料を、10 mL の滅菌水に懸濁
2. 50 mL 遠沈管上の 10 μm セルストレーナ (pluriSelect) に試料を添加し、大きな不純物を除去
3. 濾液を 3,000 $\times g$ 、10 分遠心し、上清をメスピペットで除去
4. 0.5 mL 滅菌水に懸濁し、Ultrafree®-MC (0.65 μm 孔径、Merck-Millipore) に分注
5. 12,000 $\times g$ 、4 分遠心し不純物除去後、フィルタ上微生物を 0.5 mL 滅菌水で懸濁し、マイクロチューブに回収
6. セルカウンターを用いて、微生物数を計測し、菌体濃度を算出
7. 50 μL ずつマイクロチューブに分注し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存

作製時の注意 (Tips)

遠心条件:

- AGM などのゲルビーズは、遠心しても固くパックされず崩れやすいため、50 mL 遠沈管の遠心は、スイングロータの使用を推奨します。3,000 $\times g$ にて、ご使用ください。
- 上清吸引時、沈殿が上清と混和する場合、同じ条件で再度遠心してください。再遠心後、残りの上清をできる限り吸引してください。
- アングルロータの場合は、16,000 $\times g$ にて、ご使用ください。

分取:

- 本キット試薬において、ゲル基剤やオイルなど高粘性試薬の分取、およびストレーナ濾過前のアルギン酸コアおよび AGM には、ワイドボアチップをご使用ください。

乳化: **(重要)この工程で粒径・形状が決まります**

- エマルジョン形成には、全体を軽く馴染ませるように上下に優しく 10 秒ほど振盪後、ボルテックスミキサーで、目視で均一になるまで 30 秒ほど混和してください。アルギン酸ゲルコアを作製する工程では、ボルテックスミキサーでの混和をマイルドに、AGM を作製する工程では

しっかり混和を行うのがコツです。VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries)を使用する場合、それぞれの工程で 4.5 および 9 に設定して混和すると良好です。

ゲル保温：

- 溶解した[6] アガロースシェル基材は、放置すると冷めてゲル化しやすいため、作業時以外はドライバスで保温してください。

複数サンプルの AGM 作製を一度に行う場合：

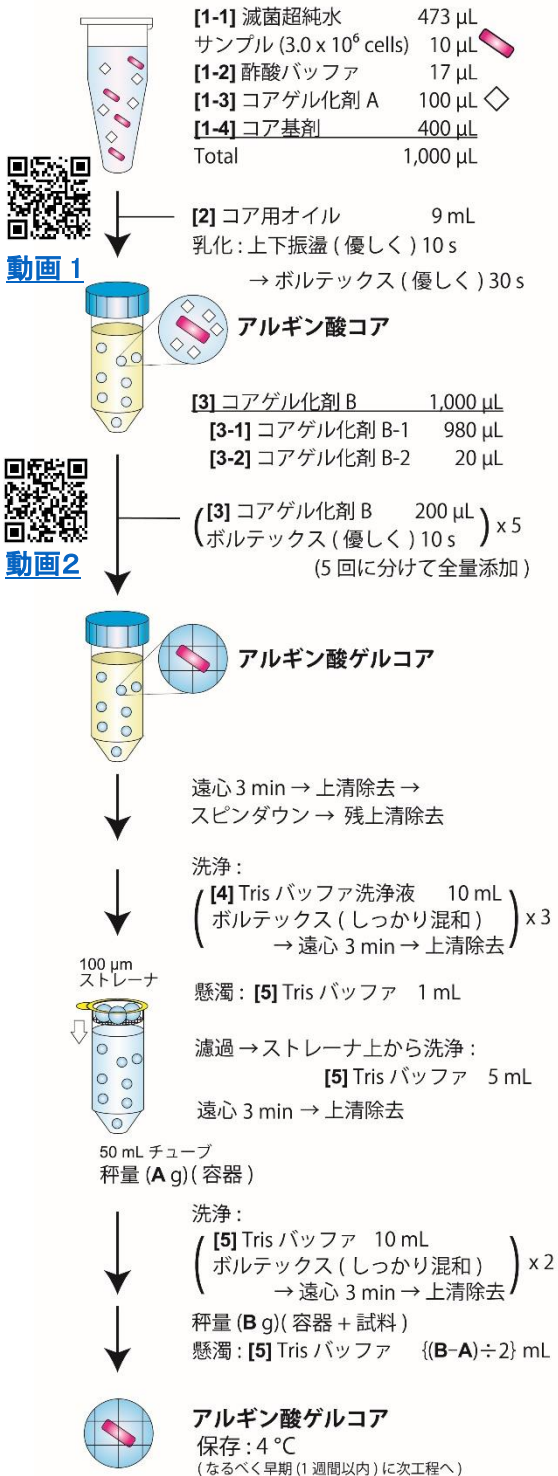
- [2] アルギン酸コア用オイルの添加・混和から[3] コアゲル化剤 B の添加・混和までの工程はアルギン酸コアの粒径を決める重要な工程なので、1つのサンプルを終えてから次のサンプルの作業を行うことを推奨します。
- [6] アガロースシェル基剤の添加・混和から[7] アガロースシェル用オイル A までの工程は AGM の粒径を決める重要な工程なので、1つのサンプルを終えてから次のサンプルの作業を行ってください。

秤量：

- 小数点第二位以下が秤量できる電子天秤をご使用ください。

AGM 作製プロトコル

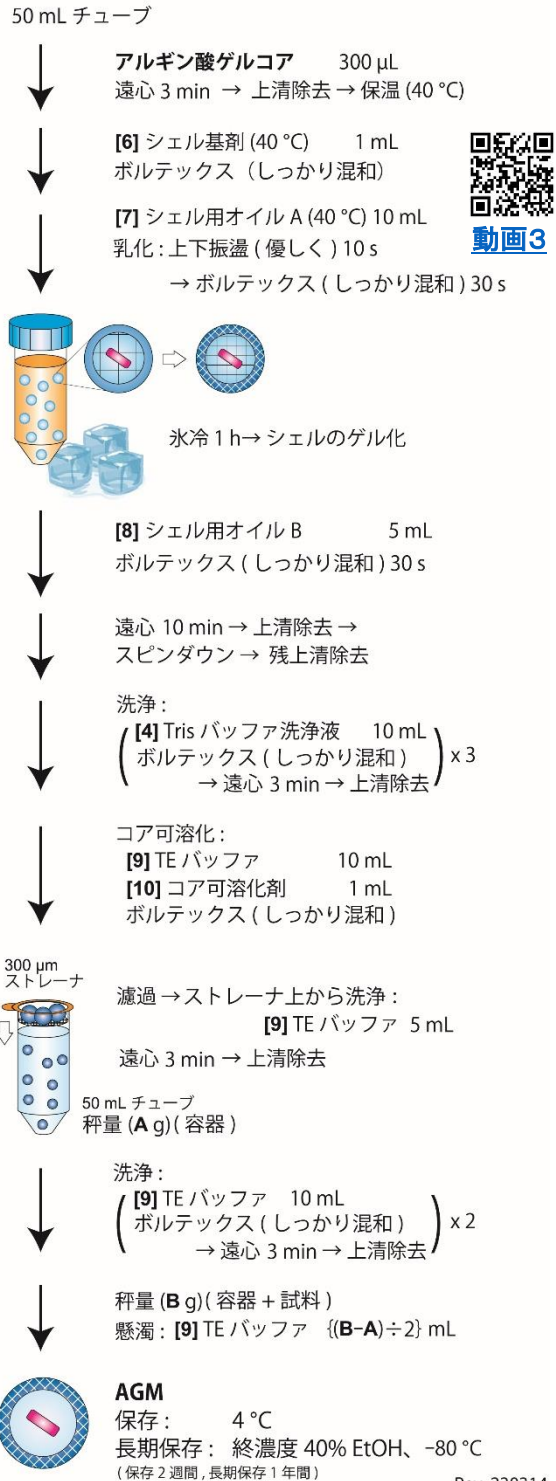
アルギン酸ゲルコア



※遠心条件

- ・スウィングロータ使用の場合 (推奨): 3,000 x g, 4 °C
- ・アングルロータ使用の場合: 16,000 x g, 4 °C

AGM



Rev. 230314

作製方法

1. アルギン酸ゲルコア

50 mL 遠沈管中に、以下の順序で試薬を添加し、混和

No.	試薬	添加量	備考
1	[1-1] 滅菌超純水	473 μ L	
2	サンプル (3.0×10^8 cell/mL)	10 μ L	3.0×10^6 細胞
3	[1-2] 酢酸バッファ	17 μ L	
4	[1-3] アルギン酸コアゲル化剤 A	100 μ L	
5	[1-4] アルギン酸コア基剤	400 μ L	



動画 1

- ↓ 9 mL の [2] アルギン酸コア用オイルを添加後、10 s 上下に優しく振盪し、30 s ボルテックスミキサーで優しく混和して、エマルジョン化 (→動画1)
- ↓ [3] コアゲル化剤 B の調製: 1.5 mL チューブに、980 μ L の [3-1] アルギン酸コアゲル化剤 B-1 と 20 μ L の [3-2] アルギン酸コアゲル化剤 B-2 を混和

200 μ L の [3] コアゲル化剤 B を添加し、ボルテックスミキサーで優しく 10 s 混和 (→動画2)

× 5

- ↓ 遠心 (4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去
- ↓ スピンドアウンし、オイルをピペットで完全に除去



動画 2

10 mL の [4] Tris バッファ洗浄液を添加後、ボルテックスミキサーでしっかり混和後、遠心 (4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去

× 3

- ↓ 1 mL の [5] Tris バッファに懸濁 (アルギン酸ゲルコア)
- ↓ 50 mL 遠沈管を秤量後(秤量値 A g)、そのチューブの上に添付の 100 μ m セルストレーナを設置後、アルギン酸ゲルコアを流し込み、大きなゲルを除去
- ↓ セルストレーナ上に 5 mL の [5] Tris バッファを滴下し、メッシュに付着したアルギン酸ゲルコアを完全に回収
- ↓ 遠心 (4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去

10 mL の [5] Tris バッファを添加後、ボルテックスミキサーでしっかり混和後、遠心 (4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去

× 2

- ↓ アルギン酸ゲルコアの重さを求めるため、50 mL 遠沈管の秤量(秤量値 B g)
- ↓ (秤量値 B - 秤量値 A) \div 2 (mL) の [5] Tris バッファに懸濁

アルギン酸ゲルコア

- ・ アルギン酸ゲルコアの保存:4°C で 1 週間程度保存できますが、できるだけ早く AGM 作製を行ってください。

2. AGM

準備するもの

- ・ **[6]** アガロースシエル基剤 … 80 °C で加熱溶解後、40 °C 保温
- ・ **[7]** アガロースシエル用オイル A … 40 °C 保温

50 mL チューブに、300 μ L のアルギン酸ゲルコアを分注し、遠心(4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去後、10 min、40 °C 保温

- ↓ 1 mL の **[6]** アガロースシエル基剤を添加後、ボルテックスミキサーでしっかり混和
- ↓ 10 mL の **[7]** アガロースシエル用オイル A を添加後、10 s 上下に優しく振盪し、30 s ボルテックスミキサーでしっかり混和して、エマルジョン化 ([→動画3](#))
- ↓ 1 h 氷冷し、アガロースシエルをゲル化
- ↓ 5 mL の **[8]** アガロースシエル用オイル B を添加後、30 s ボルテックスミキサーでしっかり混和
- ↓ 遠心(4 °C、3,000 x g、**10 min**)、上清除去
- ↓ スピンダウン、上清除去



[動画3](#)

10 mL の **[4]** Tris バッファ洗浄液を添加後、ボルテックスミキサーでしっかり混和後、遠心(4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去

× 3

- ↓ 10 mL の **[9]** TE バッファと 1 mL の **[10]** コア可溶化剤添加後、ボルテックスミキサーでしっかり混和し、コアを可溶化 (**AGM**)
- ↓ 50 mL 遠沈管を秤量後(秤量値 A g)、その遠沈管の上に添付の 300 μ m セルストレーナを設置後、AGM を流し込み、大きなゲルを除去
- ↓ セルストレーナ上に 5 mL の **[9]** TE バッファ を滴下し、メッシュに付着した AGM を完全に回収
- ↓ 遠心(4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去

10 mL の [9] TE バッファを添加後、ボルテックスミキサーでしっかり混和後、遠心 (4 °C、3,000 x g、3 min)、上清除去 × 2

↓ AGM の重さを求めるため、50 mL 遠沈管の秤量(秤量値 B g)

↓ (秤量値 B-秤量値 A) ÷ 2 (mL) の [9] TE バッファに懸濁

AGM

・ AGM の保存

- 1) 4 °C で 約 2 週間保存可能
- 2) 長期保存: AGM 懸濁液と 2/3 倍量の 99.5% エタノールを混合して(終濃度 40% エタノール)、-80 °C で約 1 年間保存可能。
- 3) 長期保存 AGM を使用する場合: 長期保存 AGM を遠心して、滅菌水または [9] TE で 3 回懸濁・遠心・上清除去による洗浄後、滅菌水または [9] TE で懸濁。

3. 1 細胞をカプセル化したアルギン酸ゲルコアおよび AGM のチェック

準備するもの

100 × SYBR™ Green I: メーカーのマニュアルに従い、SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain を DMSO で希釈

- 1) 以下の試薬とサンプルを混和後、12 μL を添付のセルカウンタープレートに注入

試薬など	添加量	添加量
[5] Tris バッファ	97 μL	79 μL
100 × SYBR™ Green I	1 μL	1 μL
アルギン酸ゲルコア	2 μL	-
AGM	-	20 μL

- 2) 位相差および蛍光観察 (Ex. 497 nm、Em. 520 nm) し、1 細胞をカプセル化した AGM の数やその粒径などをチェック

(オプションステップ) 蛍光色素の退色が気になる場合や 40 倍以上の対物レンズを使用時は、ステップ 1) に、退色防止剤 (終濃度 0.1% *p*-フェニレンジアミン) を添加してください。*p*-フェニレン

ジアミン (Wako、劇物) は、超純水で溶解し、10% に調整後、遮光マイクロチューブに小分けし、
-20 °C 保存してください。

参考文献

- 1). Woyke, T., Doud, D. F. R. & Schulz, F. The trajectory of microbial single-cell sequencing. *Nat. Methods* **14**, 1045–1054 (2017).
- 2). Dean, F. B. *et al.* Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5261–5266 (2002).
- 3). Marcy, Y. *et al.* Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS Genet.* **3**, 1702–1708 (2007).

株式会社 東陽テクニカ

ワン・テクノロジーズ・カンパニー

東京都中央区八重洲 1 – 1 – 6

サポート窓口 : agm-support@toyo.co.jp

URL: <https://www.toyo.co.jp/agm/>