

Single Cellome™ Unit SU10

ゲノム編集ツールのデリバリーによる 高効率な標的遺伝子のノックアウト

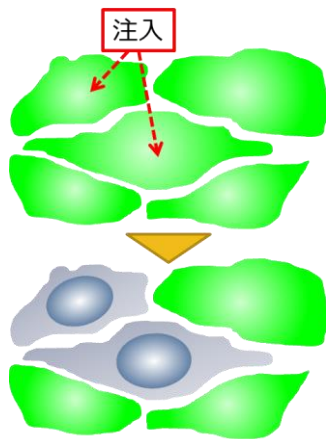


ゲノム編集は、生物のゲノムの任意の配列を特異的に編集する（ノックアウト、ノックイン、一塩基編集など）技術です。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9などのゲノム編集ツールが使用されており、認識配列の多様化や編集の正確性の向上などツールの改良が進められています。また、ゲノム編集ツールを細胞内に確実に導入する技術の開発も重要なテーマです。当社では、様々な細胞種やゲノム編集ツールに対応可能な導入技術の確立を目指し、SU10を製品化しました。SU10は、先端径が数十nmの“ナノ”ピペット（ガラスキャピラリー）により、ゲノム編集ツール等を直接細胞（核）内にデリバリーできる新規技術です。本アプリケーションノートでは、SU10の特長とSU10によるゲノム編集ツール（Cas9 RNP）導入事例をご紹介します。

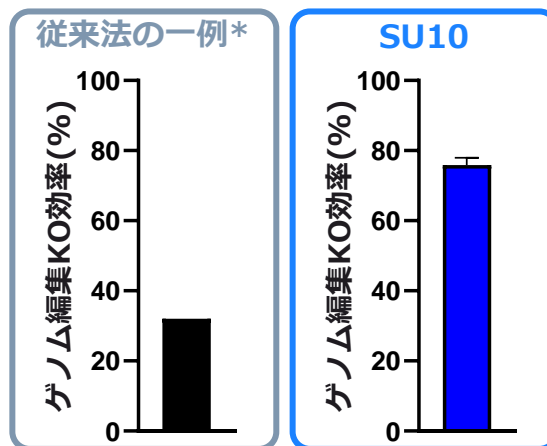
SU10によるゲノム編集ツール導入時のノックアウト効率

SU10によりCas9-sgRNAリボヌクレオタンパク質（RNP）を細胞内に導入した場合のノックアウト（KO）効率を、東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 鎌倉研究室様に評価していただきました。

GFP発現HeLa細胞に、GFP遺伝子を標的としたCas9 RNPをインジェクションし、GFP蛍光シグナルの消失を指標にして、ゲノム編集によるGFP遺伝子破壊の成否を判断しました。



注入細胞だけGFPが消える



*参考文献 : Appl. Sci. 2019, 9, 965
doi 10.3390/app9050965

- ・左の棒グラフは、従来法の一例として実験条件に近い文献(EGFP発現HeLa細胞にCas9 RNPを物理的に導入し、EGFP蛍光の消失によりKO効率を評価)のデータを引用しました。
- ・右の棒グラフは、SU10によりCas9 RNPを導入した場合の生細胞中のノックアウト効率(3本分のナノピペットの結果の平均値とSD値)を示しています。

[結果]

今回の検証結果から、以下が示されました。

- ◆ SU10によりCas9 RNPを細胞内にデリバリーできること
- ◆ 70%を超えるノックアウト効率を得られること
- ◆ 従来の物理的なタンパク質導入技術よりも導入効率が良い可能性があること

従来の導入方法ではノックアウトが難しかった細胞種においても、SU10を使用することで導入効率やゲノム編集効率が改善されることが期待されます。

実験条件

細胞：GFP遺伝子導入HeLa細胞（Cell Biolabs, Inc.、AKR-213）

注入試薬：50 ng/ μ L Cas9 RNP*

*Cas9タンパク質（Guide-it™ Recombinant Cas9、Takara、632641）とガイドRNA（sgRNA）の複合体

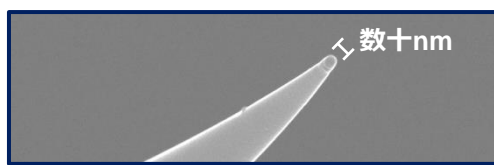
導入方法：SU10によるインジェクション ※詳細条件は弊社にお問い合わせください

観察：弊社の共焦点スキャナユニットCSU-W1使用、5日間後に評価

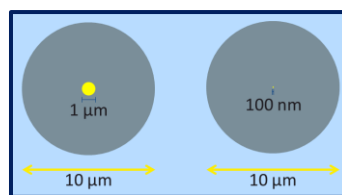
SU10の特長

■ 低侵襲細胞内デリバリー

- ・先端径が数十nmと超極細のガラスキャピラリー（ナノピペット）を使用します。
- ・目的物質を充填したナノピペットの先端部を細胞内に挿入して、目的物質をデリバリーします。
※細胞内への穿刺と注入操作は自動化されています。
- ・先端径が非常に細いため、デリバリー時のダメージを抑えることが可能です。
- ・1本のナノピペットで、複数の細胞に連続してインジェクションすることが可能です。



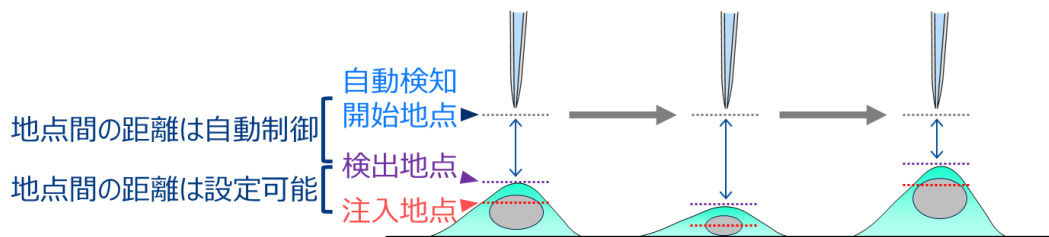
ナノピペット先端部の電子顕微鏡観察像



直径10 μ mの細胞に1 μ m(左) 100 nm(右)の穴が開いた場合のイメージ図

■ 細胞表面検知・細胞穿刺の自動化

- ・イオン電流値の変化を測定することにより、細胞表面を自動的に検知します。
- ・細胞ごとに高さが異なる場合でも、自動的に移動距離が制御されます。
- ・細胞表面を検知した地点からの降下距離を任意の値に設定できるため、核への直接デリバリーや様々な厚みの細胞への注入が可能です。
- ・“細胞表面の検知”と“細胞への穿刺”の自動化により、高いインジェクション成功率を実現します。



■ 細胞内での注入操作の自動化

- ・電気化学的機構（電気浸透流）により、ナノピペット内の溶液や溶質を注入します。
- ・注入操作は自動化しています。
- ・ソフトウェアの設定により注入量を変えることができます。
- ・注入液量は、1秒あたり数十fL（フェムトリットル、1 fL= 1×10^{-15} L）と推定しています。
※注入量は、溶質と溶媒によって変わる可能性があります。

横河電機株式会社 ライフ事業本部 営業・ソリューションセンター

〒180-8750 東京都武蔵野市中町2-9-32

TEL: 0422-52-5550

E-Mail: SingleCell@cs.jp.yokogawa.com

<https://www.yokogawa.co.jp/solutions/solutions/life-innovation/>

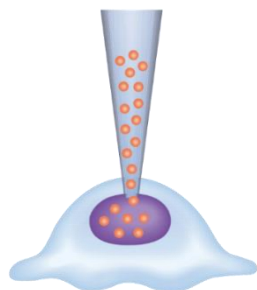
記載内容はお断りなく変更することがありますのでご了承ください。

All Rights Reserved, Copyright © 2021, Yokogawa Electric Corporation

[Ed:01]

Single Cellome™ Unit SU10

初代培養細胞、幹細胞へのデリバリー



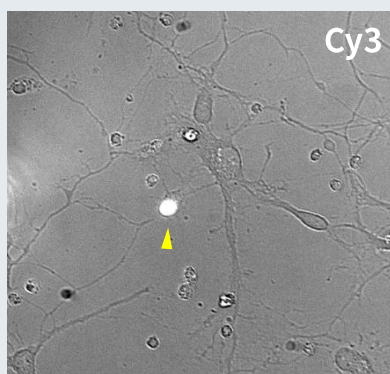
SU10は、先端外径が最小数十nmの“ナノ”ピペット（ガラスキャピラリー）により、目的の物質を直接細胞内（核、細胞質）にデリバリーすることができる新規技術です。

従来の方では導入が難しい細胞（導入効率が低い、ほとんど増殖しないため導入細胞をセレクションできない）への適用が期待されます。

本アプリケーションノートでは、SU10を用いて初代培養細胞と幹細胞に蛍光試薬やプラスミドを注入した事例をご紹介します。

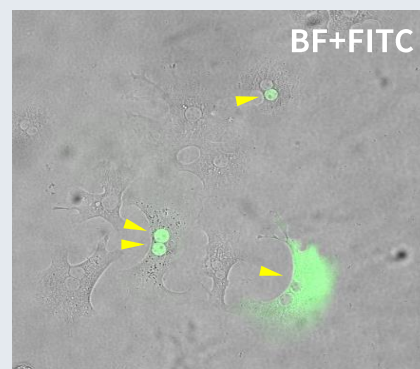
SU10による初代培養細胞、幹細胞へのデリバリー

細胞: マウス神経細胞（海馬由来）
物質: Cy3-oligonucleotide (10 μ M)

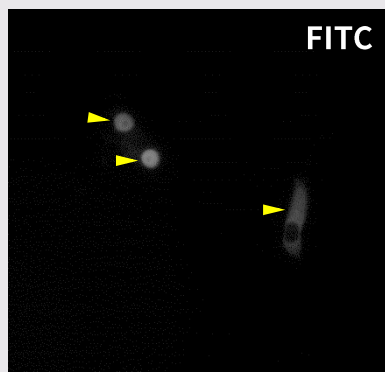


東京大学 岡田 康志 研究室
岩崎 奏子 様よりご提供

細胞: マウス肝実質細胞
物質: FITC-dextran (MW 70K, 10 mg/mL)



細胞: ヒトiPS細胞 (201B7株)
物質: FITC-dextran (MW 70K, 10 mg/mL)



理化学研究所 生命機能科学研究センター
松崎研究室様よりご提供

結果

[左上]
マウス神経細胞の核へのデリバリー例です。

[右上]
マウス肝実質細胞の核、細胞質へのデリバリー例です。
細胞核へのデリバリーに関しては細胞内の2つの核の内、片方への注入と両方への注入に成功しています。

[左下]
ヒトiPS細胞 (2次元分散培養) の核、細胞質へのデリバリー例です。

初代培養神経細胞へのプラスミドベクターの核内デリバリー

続いて、SU10を用いることで、初代培養神経細胞へのプラスミドベクターの導入効率が大幅に改善された事例をご紹介します。

SU10によるデリバリー成功率を評価するために、Cy3標識oligonucleotideをプラスミドベクターと同時に注入し、デリバリー直後にCy3蛍光シグナルを観察しました(左図)。SU10により、94.4%の成功率でデリバリーすることができたという結果が得られました(下表)。

GFP発現プラスミドベクター (pEGFP-N1) 由来のGFP蛍光は、SU10デリバリーから12時間後に観察しました(右図)。その結果、従来のリン酸カルシウム法では0.1-1%であった遺伝子発現効率が、SU10により24.8% (デリバリー総細胞中の23.4%) に増加しました(下表)。

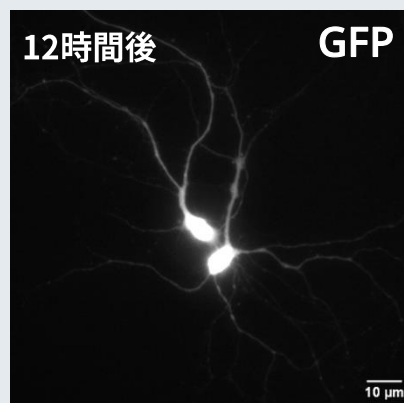
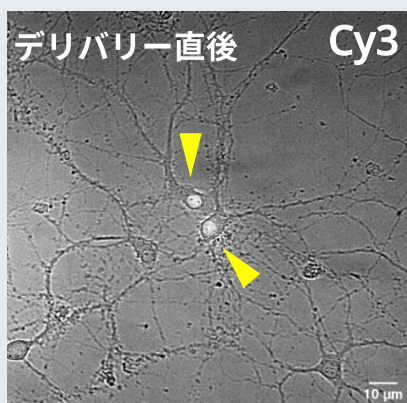
【ご使用者様の声】 SU10により、神経細胞を用いた実験とイメージングの幅が広がりました。

今後はDNAに加えて、mRNAやタンパク質の導入を検討しています。

細胞:マウス神経細胞 (海馬由来)

培養期間:12日間

物質: Cy3-oligonucleotide (10 μ M) + pEGFP-N1 (10 ng/ μ L)



デリバリー総細胞数 (使用ナノピペット:4本)	デリバリー成功率 (Cy3 ⁺ /total cells)	GFP発現率 (GFP ⁺ /Cy3 ⁺ cells)	従来法 (リン酸カルシウム法)
162	94.4%	24.8%	0.1-1%

東京大学 岡田 康志 研究室 岩崎 奏子 様よりご提供

まとめ

今回の検証結果から、以下が分かりました。

- ◆ SU10は様々な初代培養細胞と幹細胞の細胞質内、核内に目的物質をデリバリー可能である
- ◆ 従来の手法では物質の導入が難しかった細胞へも高い成功率でデリバリーできる
- ◆ 複数の試薬を同時に、かつ安定した成功率で注入できる

今回ご紹介した蛍光試薬や核酸以外にも、ゲノム編集ツール (Cas9 RNP)、タンパク質 (GFP、抗体) などのデリバリー実績がありますので、従来の方法では導入が難しい細胞と物質でもSU10を使用することで導入できることが期待されます。

横河電機株式会社 ライフ事業本部 営業・ソリューションセンター

〒180-8750 東京都武蔵野市中町2-9-32

TEL : 0422-52-5550

E-mail : SingleCell@cs.jp.yokogawa.com

<https://www.yokogawa.co.jp/solutions/solutions/life-innovation/>

記載内容はお断りなく変更することがありますのでご了承ください。
All Rights Reserved, Copyright © 2022, Yokogawa Electric Corporation



Printed in Japan, 2022 [Ed:01]