

開催

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

平成 28 年 07 月 08 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所 属 部 局 工学研究科マイクロエンジニアリング専攻

職 名 D2

氏 名 Subramanian Parimalam Sangamithirai

助成の種類	平成 年度 ・ 研究成果公開支援 ・ 国際会議開催助成			
事業内容	2016 International Conference of Microfluidics, Nanofluidics and Lab-on-a-Chip			
開催期間	平成 28 年 06 月 10 日 ~ 平成 28 年 06 月 12 日			
開催場所	中華人民共和国、大連			
参加者	総 数 278 名	内 訳 6月10日 109 名、6月11日 103 名、6月12日 66 名		
成果の概要	タイトルは「成果の概要/報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有( )			
会計報告	事業に要した経費総額	150,000 円		
	うち当財団からの助成額	150,000 円		
	その他の資金の出所	(機関や資金の名称)		
	経 費 の 内 訳 と 助 成 金 の 使 途 に つ い て			
	費 目	額 (円)	財団助成充当額 (円)	
	学会参加登録費	34907	34907	
	ビザ代	4000	4000	
	航空券チケット代	31960	31960	
	宿泊費	67446	67446	
タクシー代	11687	11687		
当財団の助成について	<p>(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)</p> <p>I sincerely thank Kyoto University foundation for providing me travel grant to attend the conference.</p> <p>このたびは本国際会議に参加するため、助成いただき京都大学教育振興財団の皆さまには大変感謝申し上げます。</p>			

成果報告書および成果の概要は、財団に郵送(あるいは持参)するとともに、Excel・Wordファイルでメール送信して下さい。  
。メール送信分の印鑑は不要です。

## Grant report

**Name of the conference:** 2016 International Conference of Microfluidics, Nanofluidics and Lab-on-a-Chip, Dalian Maritime University, Dalian, China

**Presentation date and time:** June 10<sup>th</sup>, 2016, 12.00 PM - 12.15 PM

**Paper title:** Massively parallel quantification of miRNA in single cells via duplex-specific nuclease reaction in pico-liter wells

### Abstract

#### Novelty:

We report a one-step assay for the parallel quantification of miRNA in tens of thousands of single cells. Our protocol leverages DSN (duplex-specific nuclease) induced signal amplification and uses pico-liter sized micro-wells, which confine single cells and the enzymatic reaction. We demonstrated our assay with triplexed miRNA detection in K562 cells and a detection limit of miRNA at 5.7 copies per well.

#### Background:

Existing techniques in single cell miRNA analyses require labor-intensive sample preparations and do not have capability to realize massively parallelized single cell measurements within several hours. Here we present a 60 min protocol for detecting miRNAs in tens of thousands of single cells.

#### Experimental method:

Our protocol uses a PDMS chip consisting of 100,000 wells (20  $\mu\text{m}$  diameter and 30  $\mu\text{m}$  deep) to confine the enzymatic reaction triggered via miRNAs from single cells. MiRNA released upon lysis of single cell hybridizes with complementary linear molecular beacon (LMB), which has a quencher and a fluorophore at 3' and 5' ends, respectively. DSN enzyme then cleaves only LMB in the hybrid duplex, releasing a free fluorescence molecule. Because the reaction can recycle the miRNA target, it creates multiple free fluorescence molecules, resulting in increase of the fluorescence signal. We demonstrated our protocol with simultaneously detecting three miRNA targets: miR200a, miR16, and miR92 in K562 cells. In this demonstration we spread approximately 100,000 K562 single cells over a chip and then added a reaction mix containing three kinds of LMBs (100 nM for each), DSN enzyme (0.1 U/ $\mu\text{L}$ ), and Triton X-100 (0.1%). We sealed the chip with a glass slide and incubated at 50°C for 60 min. Our protocol lysed the single cells upon application of the reaction mix over the chip and reduced indigenous nuclease activity while keeping DSN activity. We measured the resulting fluorescence intensity in each well using an automated epifluorescence microscope (the scanning of the 100,000 wells took for 100 min).

**Results and discussion:**

We observed significant fluorescence in cell containing wells after the incubation and measured mean signal to noise ratio (SNR) of single cell containing wells were 4.1, 4.6, and 2.6 respectively for miR200a, miR16, and miR92. We determined as  $SNR=(f_{cd}-f_c)/(f_{ed}-f_c)$ , where  $f_{cd}$ , and  $f_{ed}$  are fluorescence intensities of wells with and without single cells, respectively. We used the background level,  $f_c$ , of the mean fluorescence intensity of single cell containing wells in a control experiment sans DSN. We also determined the limit of detection of our protocol was 1 pM (5.7 copies per well) and the dynamic range was two orders of magnitude ranging from 1 pM to 100 pM with spiking synthetic miRNAs into the reaction mix.

**Outcome of attending conference:**

I was able to present my research to the scientific community and also received comments. I could meet international researchers related to my field and had scientific discussions.

## 報告書

**学会名 :** 2016年ナノマイクロ流体, Lab-on-a-Chip国際学会, 中国, 大連, 大連海事大学

**発表日時 :** 2016年6月10日 PM12:00-PM12:15

**論文名 :** ピコリットルウェル内における二本鎖特異的ヌクレアーゼを使用した一細胞miRNAの大規模並列定量

## 概要

### 新規性 :

我々は数万個の一細胞内miRNAの1ステップ並列定量方法について報告する. 我々のプロトコルはDSN(二本鎖特異的ヌクレアーゼ)をシグナル増幅に活用し, ピコリットルサイズのマイクロウェルを利用する. マイクロウェルは一細胞と酵素反応をウェル内に制限する. 本アッセイを用いたK562細胞株のmiRNA3種類の検出を示し, また検出限界が1ウェルあたり5.7コピーであることを示した.

### 背景 :

現在の一細胞miRNA解析技術はサンプルの準備に非常に大きな労力を割いており, また数時間に及ぶ一細胞大規模並列計測を行うことができない. そこで, 本研究では数万個の一細胞のmiRNAを60分で検出する方法を提示する.

### 実験方法 :

本プロトコルでは10万個のウェル(直径20  $\mu\text{m}$ , 深さ30  $\mu\text{m}$ )を含むPDMSチップを使用する. 一細胞からのmiRNAによる酵素反応はこのウェル内に限定される. 一細胞の破壊により放出されたmiRNAは相補的なlinear molecular beacon (LMB)と結合する. LMBは3'末端と5'末端にそれぞれクエンチャーと蛍光物質を持つ. DSN酵素はmiRNAに結合し二本鎖を形成しているLMBのみを切断し, LMBの蛍光分子は遊離し蛍光を発する. ターゲットのmiRNAは未反応のLMBと再結合することができるため反応を繰り返すたびに遊離する蛍光分子が増え, 結果蛍光シグナルが増大する. 我々はK562内の3つのmiRNA, miR200a, miR16, miR92, の同時検出により本プロトコルを示した. 本プロトコルではまず約10万個のK562細胞をチップの上にまき, 反応溶液を導入した. 反応溶液は3種類のLMB(それぞれ100 nM), DSN酵素(0.1 U/ $\mu\text{L}$ ), Triton X-100(0.1%)を混合した. チップをスライドガラスでシールし, 50°Cで60分インキュベーションを行った. 本プロトコルにより反応溶液をチップに導入することでウェル内の細胞を破壊し, DSNの活性を維持している間生来のヌクレアーゼの活性を抑えた. 反応後, 10万個のウェルそれぞれの蛍光を自動落射蛍光顕微鏡を用いて100分でスキャンを行い, それぞれの蛍光強度を計測した.

## 結果と考察：

インキュベーション後、細胞を含むウェル内が強い蛍光を発することを観察した。一細胞を含むウェルの平均SN比はmiR200a, miR16, miR92それぞれに対して4.1, 4.6, 2.6であった。ここでSN比= $(f_{cd}-f_c)/(f_{ed}-f_c)$ と定義した。 $f_{cd}$ と $f_{ed}$ はそれぞれ一細胞をウェル内に含む場合、含まない場合の蛍光強度である。 $f_c$ はバックグラウンドの蛍光強度としてDSNを使用しないコントロール実験における一細胞を含むウェルの蛍光強度の平均値を使用した。また、本プロトコルにおける検出限界を1 pM (1ウェルあたり5.7コピー)とし、ダイナミックレンジは合成miRNA と反応溶液を混合により1 pMから100 pMの範囲と決定した。

## 学会参加における成果：

私は科学コミュニティにおいて本研究を発表したコメントをいただくことができた。本分野に関係のある国際的な研究者に会い、彼らと議論をすることができた。