

自律駆動マイクロ流体チップを用いたマイクロ RNA 迅速検出

物質系専攻 47-106013 小松 仁
指導教員：前田瑞夫（教授）

キーワード：化学分析、 μ TAS、マイクロ RNA

【緒言】

マイクロ RNA（以降 miRNA）は 18~25 塩基程度のノンコーディング一本鎖 RNA であり、体液中にも存在することから、がん早期診断のマーカーとして注目されている [1]。しかし、現在検出に広く用いられているマイクロアレイは反応に十数時間という長い時間を必要とし、一般家庭や小規模な医療施設においても迅速にがんのスクリーニングを行う「その場診断」への応用のネックになっている。

マイクロ流路を用いた微小空間での反応が体積-表面積比の観点から検出の迅速化につながると考えられることから、本研究では外部動力を必要としない PDMS 自律駆動マイクロ流体チップ [2] を用いることで特定 miRNA の検出を迅速かつ微量・低濃度試料で行うことを目的とする。具体的には次の二つの手法によってその実現を図った。

- ① DNA 二重鎖修飾金ナノ粒子の遺伝子二重鎖に対する凝集現象を用いた検出法 [3] (図 1)
- ② サンドイッチ法による miRNA 捕捉と層流樹状増幅法 (図 2)

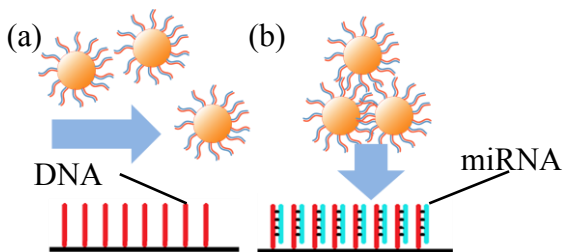


図 1. DNA 修飾金ナノ粒子の選択的凝集

基板上が単鎖状態の際は基板と金ナノ粒子に相互作用は働かず、金ナノ粒子の凝集は起こらない(a)。一方で、基板表面に二重鎖が形成されているときは基板表面と金ナノ粒子間に働く相互作用によって堆積・凝集が起こる。

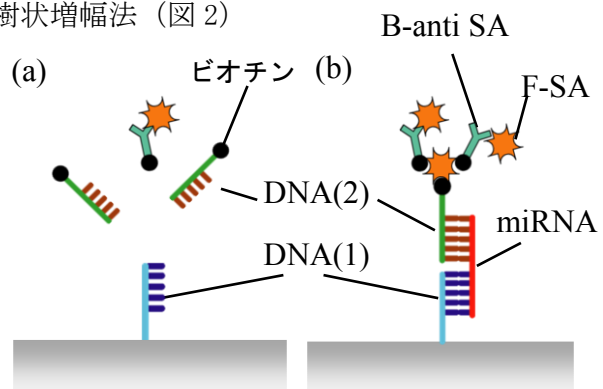


図 2. サンドイッチ層流樹状増幅

miRNA の半分と相補的な基板 DNA (1) と、残り半分と相補であるビオチン修飾 DNA (2) だけでは基板にビオチンは固定されない(a)。一方で miRNA の存在下においては、二つの DNA で miRNA を挟むことでビオチンが基板に固定される。ビオチンに吸着する FITC 標識ストレプトアビジン (F-SA) と F-SA に吸着するビオチン標識抗ストレプトアビジン抗体 (B-anti-SA) により、ビオチンが固定されている場合のみ蛍光シグナルが増幅される(b)。

【実験】

① 金ナノ粒子凝集法

1. 共有結合によってガラス基板に固定された、目的 RNA と相補的な DNA に対して自律駆動マイクロ流体チップ [2] を用いてブロッキング剤 (1% Roche BR, 0.02% (w/v) SDS, 5×SSC, 0.05% Tween 20) を流した。

2. ターゲット RNA を含むサンプル 0.5 μ l を 5 分間送液し、基板に DNA/RNA 二重鎖を形成させた。
3. Y 字型流路を用いて DNA 二重鎖修飾を施した金ナノ粒子、2.0M NaCl 溶液を送液し、金ナノ粒子の凝集について暗視野での光散乱を観察した。

② サンドイッチ樹状増幅法

1. 共有結合によってガラス基板に固定された、目的遺伝子の半分と相補的な DNA に対して自律駆動マイクロ流体チップを用いてブロッキング剤を流した。
2. Y 字流路の一方からターゲットとなる遺伝子を含むサンプル 0.5 μ l、もう一方から目的遺伝子の残り半分と相補的な、ビオチン修飾された DNA (10nM) を流し、5 分間ハイブリダイゼーションを行い、サンドイッチ構造を形成させた。
3. 同じ Y 字流路を用いて、一方からはビオチン標識抗ストレプトアビジン抗体 (B-anti-SA)、もう一方からは FITC 標識ストレプトアビジン (F-SA) を流し、シグナルの増幅をおこない、1 分毎に蛍光の観察を行った。

【結果・考察】

① 金ナノ粒子凝集法

図 3 に 30 分後の観察結果を示す。固定された基板 DNA に対して、目的 RNA を含む流路では二重鎖が形成され、金ナノ粒子の凝集が確認された。しかし、100nM 以下の低濃度では 30 分以内の凝集は観察されなかった。これは基板に形成される DNA/RNA 二重鎖が少なく、基板表面と金ナノ粒子の間に働く相互作用が強く働かなかつたためと考えられる。そのため、検出限界濃度は 100nM~1 μ M と考えられる。

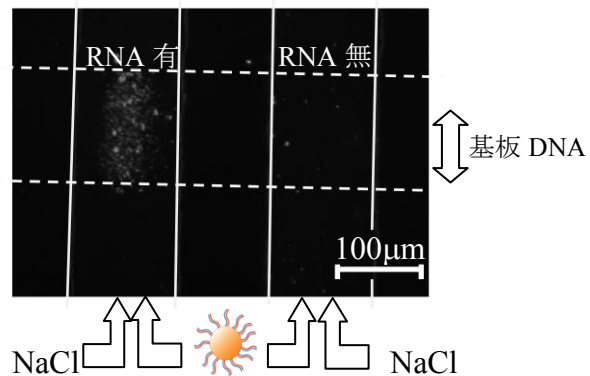


図 3. 金ナノ粒子凝集法による暗視野散乱

点線間に固定された DNA に対して左の流路では RNA により二重鎖が基板に形成され、金ナノ粒子の凝集が起きている。

② サンドイッチ樹状増幅法

図 4 にサンドイッチ樹状増幅法による増幅開始 5 分後の蛍光観察結果を示す。基板に固定された DNA に対して、左のターゲットを含むサンプルを流した流路ではサンドイッチ構造によりビオチンが固定され、その標識分子由来の蛍光が強く観察された。検出時間は総時間で 20 分以内であった。

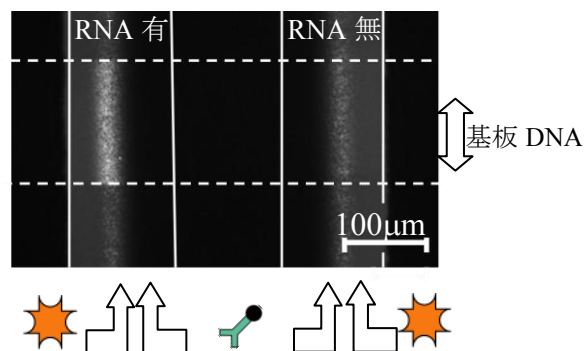


図 4. サンドイッチ樹状増幅法による蛍光観察

点線間に固定されている DNA に対し、miRNA が流された左の流路のみサンドイッチを形成し、増幅が開始されている。

図 5 にターゲット遺伝子を含む溶液とブランク溶液の代表的なシグナルの時間変化を示す。サンドイッチ形成により、ビオチンが基板に固定され、F-SA と B-anti-SA による増幅が連続的に行われていることが確認された。

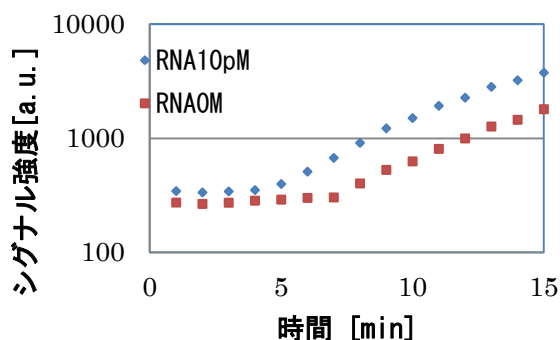


図 5. 増幅によるシグナルの時間変化

図 6 はターゲット溶液シグナルとブランク溶液シグナルとの比を各濃度においてプロットしたものである。フィッティングにより引いた検量線において、二つのブランクにおけるシグナルの差の平均+標準偏差の 3 倍 (n=6) を検出限界としたところ、対応する検出限界濃度は 0.51pM となった。

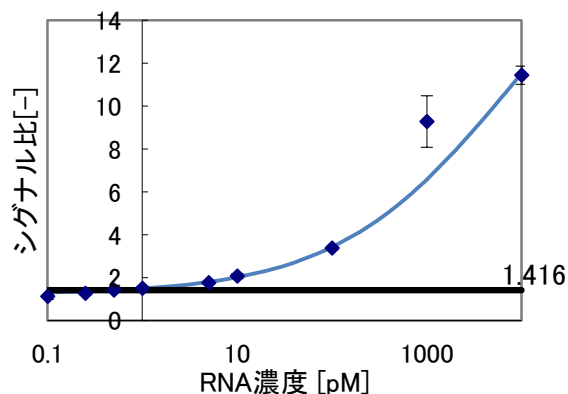


図 6. miRNA 濃度と蛍光強度比

【結言】

金ナノ粒子凝集法及び、サンドイッチ樹状増幅法という二つの方法で、標識されていない miRNA の検出を行った。金ナノ粒子凝集法では試料体積 0.5 μ L、検出時間 40 分、試料濃度 1 μ M で検出に成功した。しかし、より低濃度における RNA の検出が難しく pM オーダーでの迅速かつ高感度の検出は困難であることがわかった。

サンドイッチ樹状増幅法では試料体積 0.5 μ L、検出時間 18 分で検出限界 0.51pM という、高い感度での RNA 検出に成功した。miRNA の選択性の向上及び高感度化を目指すことで、今後のさらなる発展が期待される。

【参考文献】

1. "MicroRNA signatures in human cancers" G. A. Calin, et al., *Nature Reviews Cancer*, **6**, 857 (2006).
2. "Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis" K. Hosokawa, et al., *Lab on a chip*, **4**, 181 (2004).
3. "Detection of non-cross-linking interaction between DNA-modified gold nanoparticles and a DNA-modified flat gold surface using surface plasmon resonance imaging on a microchip" Y. Sato, et al., *Colloids and surfaces B*, **62**, 71 (2008).
4. "Rapid Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by Non-Cross-Linking" K. Sato, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8102 (2003).

【学会発表】

日本分析化学会第 60 年会「自律駆動マイクロ流体チップと金ナノ粒子によるマイクロ RNA の検出」他 2 件