

ハイブリダイゼーションを精密制御した mRNA のマイクロインタリオプリンティング

The microintaglio printing of mRNA via precise control of hybridization

東大院工¹⁾, JST-CREST²⁾

○小林 遼¹⁾, 小野 愛子¹⁾, 倉持 宏実¹⁾, 上野 真吾^{1),2)}, マニッシュビヤニ^{1),2)}, 一木 隆範^{1),2)}

Sch. Eng. Univ. of Tokyo¹⁾, JST-CREST²⁾,

○R. Kobayashi¹⁾, A. Ono¹⁾, H. Kuramochi¹⁾, S. Ueno^{1),2)}, M. Biyani^{1),2)}, T. Ichiki^{1),2)}

E-mail: kobayashi.r@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】核酸やタンパク質など生体分子のチップ上での微細パターン形成技術はバイオデバイスを支える基盤技術である。我々は、簡便に高集積なマイクロアレイの作製を目指し、微細な凹構造を有するモールドに生体分子を含む溶液を充填し、基板を押し付けてパターンを転写するマイクロインタリオプリンティング法を開発している[1]。本法は、生体環境に近いウエット状態を維持したまま生体分子の微細パターン形成が可能であるが、基板を押し付ける時に溶液が基板全面に広がるため、分子固定反応の制御が必要となる。そこで、相補的な核酸分子間のハイブリダイゼーションを利用して温度制御方式のマイクロインタリオプリンティング技術を達成したので報告する。

【実験および結果】分子固定用基板には、金被覆ガラスにチオール修飾核酸プローブと 6-mercapto-1-hexanol による 2 成分の Self-assembled monolayer(SAM)を形成し使用した。凹版モールドには、直径 60 μm 、高さ 60 μm の凹構造をもつ PDMS シートをソフトリソグラフィにより作製し使用した。核酸プローブと相補的な 20 塩基を 3' 末端に持つ Cy3 標識した GFP の mRNA(801 塩基) 1 μM を上記の凹版に充填後 4°C に冷却し、分子固定用基板を上から密着させた。その後、各温度(30, 50, 70 °C)で所定の時間(1, 5, 15, 30, 60, 120 min)保持後、0.1 °C/s で除冷し、25°C(室温)で 10 min 保持する温度制御を行い、mRNA を核酸プローブにハイブリダイゼーションさせ固定した。基板を洗浄後、共焦点顕微鏡で蛍光像を取得し、その蛍光強度から mRNA の固定量の評価を行った。各温度・各保持時間に対する蛍光強度を Fig.1 に示す。各温度とも 60 min 程度までに固定が進行し、その後飽和する事がわかる。さらに、調べた 3 温度の中では 70°C が最も速く固定が進行することがわかった。70°C ではプローブと mRNA のハイブリダイゼーションが促進されるためと考えられる。なお、昇温に伴う金-チオール結合の解離・再結合も起こっていると考えられるが、その程度や mRNA の固定量への影響については現時点では不明である。

さらに、異なる直径(4~50 μm)の凹構造を持つ凹版モールドを用いて Cy3 標識 mRNA をプリンティングすることで、マイクロインタリオプリンティングのサイズ依存性を検証した。結果を Fig.2 に示す。4~50 μm の範囲で蛍光強度はほぼ一定でありサイズ依存性は認められなかった。4 μm 径のマイクロアレイパターンを形成した場合には 10,000 spot/ mm^2 の高集積化が可能であり、さらなるパターンニングの微細化・高集積化も可能であると期待される。

【参考文献】 [1] M. Biyani, T. Osawa, N. Nemoto and T. Ichiki, Appl. Phys. Express, 4, 047001 (2011)

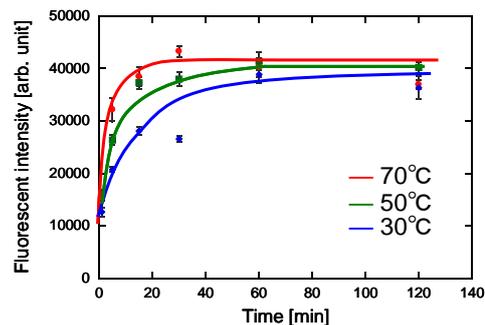


Fig.1 Fluorescent intensity vs. printing time at different temperatures

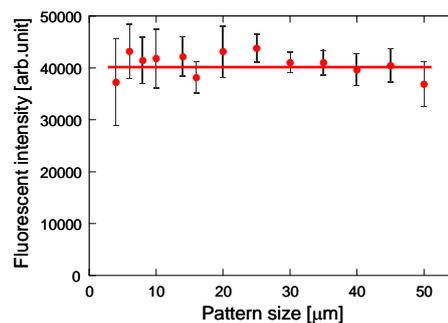


Fig.2 Fluorescent intensity vs. pattern size