

アトリットル容積を持つナノセルを用いた酵素 1 分子の高速検出

High-speed detection of single enzyme molecule in attoliter reactor array, Nanocell

東大院工・応用化学¹, JST-CREST², 東大院工・バイオエンジニアリング³○(PC)小野 堯生^{1,2}, 一木 隆範³, 野地 博行^{1,2}Dept. Appl. Chem., Sch. Eng., Univ. Tokyo¹, JST-CREST², Dept. Bioeng., Sch. Eng., Univ. Tokyo³,○(PC)Takao Ono^{1,2}, Takanori Ichiki³ and Hiroyuki Noji^{1,2} E-mail: ono@nojilab.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】生体分子の 1 分子検出は、超高感度な生化学分析や医療診断への応用が期待されている。検出対象の分子を、抗体を介して酵素分子に結合させ、マイクロリアクターに封入することで、リアクター内で高濃度化した酵素反応産物を指標にして 1 分子検出が可能である[1]。しかし、従来用いられている mm- μ m スケールのリアクターでは、反応産物の濃度上昇に長時間を要する。例えば、様々な抗体との複合体が市販されている β -galactosidase (β -gal) は、fluorescein di(β -D-galactopyranoside) を分解してフルオレセインを生成するが、 β -gal 1 分子を μ m スケール・fL 級の容積に封入しても、フルオレセインの検出までには数時間以上必要である。本研究では、サブ μ m スケール・aL 容積のリアクターアレイ「ナノセル」を作製し、酵素 1 分子の高速検出を試みた。

【実験方法及び結果】熱ナノインプリントを用いて直径 300, 500, 700, 1000 nm、深さ 260 nm、容積 8~200 aL のナノセルを作製した。pM オーダーの β -gal 分子をナノセルに分配し、ナノセル上面を空気で封じた。封入された β -gal 1 分子は、数分以内にフルオレセイン蛍光輝点として観察された(Fig. 1 (a))。輝点数は β -gal 濃度に比例した。このことは、 β -gal を 1 分子ずつ、ランダムに分配できている事を示している(Fig. 1 (b))。さらに、異なる至適 pH を持つ二種類の酵素を併用して、マルチカラーの 1 分子検出を行った(Fig. 2)。ナノセルは、活性の低い酵素であっても速やかに反応産物を高濃度化して検出可能であるため、1 分子検出の適用範囲を大きく拡張できる。

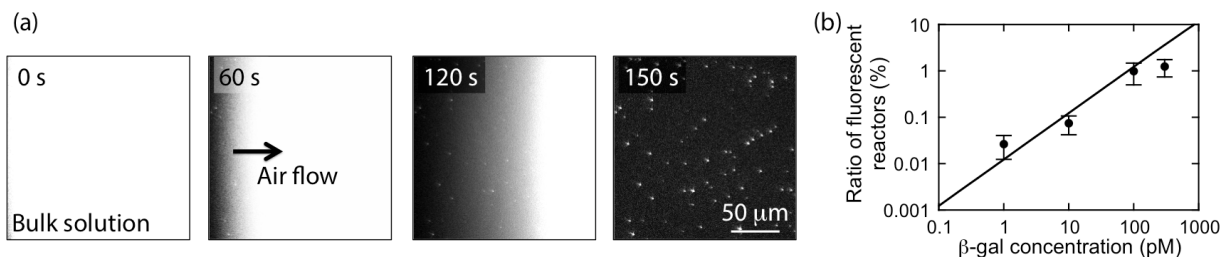
[1] S.H. Kim, R. Iino, S. Iwai, S. Araki, S. Sakakihara and H. Noji, *Lab Chip* **12**, 4986 (2012).

Figure 1. (a) Fluorescent images of Nanocell sealed with air. Encapsulated β -gal molecules (300 pM) can be detected as bright spots, several minutes after sealed. (b) Concentration dependency of the ratio of fluorescent reactors. Line represents the dependency expected from Poisson distribution. Error bars: S.D., Chamber volume: 200 aL.

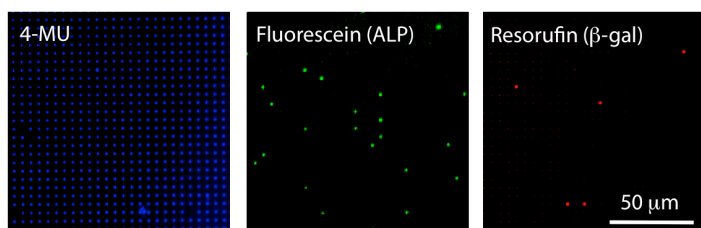


Figure 2. Multicolor detection of single-molecule enzymes at pH 7.4. 4-Methylumbelliferone (4-MU), fluorescein from fluorescein diphosphate and resorufin from resorufin- β -D-galactopyranoside show the number of reactors, alkaline phosphatase molecules (ALP, optimum pH: 9.25) and β -gal molecules (optimum pH: 7.4), respectively. Chamber volume: 200 aL.