

蛍光封入リポソームを用いた蛍光アレイセンサによる ターゲット蛋白質の検出

Detection of Target Protein by Arrayed Sensor with Liposome Encapsulating Fluorescent Molecules

京都工芸繊維大¹, 岡山大²

○今村 亮太¹, 張 子洋¹, 吉川 知貴¹, 島内 寿徳², 村田 直樹¹, 福澤 理行¹, 山下 馨¹, 野田 実¹

Kyoto Inst. Tech.¹, Okayama Univ.²

○R. Imamura¹, Z. Zhang¹, T. Yoshikawa¹, T. Shimanouchi², N. Murata¹, M. Fukuzawa¹, K. Yamashita¹, M. Noda¹

E-mail: b1121002@edu.kit.ac.jp

はじめに 蛍光計測はバイオ分子と非常に親和性が高い検出手法の一つであり、環境計測や医療計測において有用である。今回、前回の報告[1]に引き続き蛍光分子封入リポソームを用いた蛍光アレイセンサを検討する。蛍光分子封入リポソームの蛍光検出のメカニズムは、リポソームの脂質膜が蛋白質との相互作用で流動化し、膜透過性が高まることでリポソームから蛍光強度が低い高濃度カルセイン溶液が漏出する。カルセイン溶液はリポソーム近傍にあるリン酸緩衝生理食塩水(PBS)により希釈されることで蛍光強度が増加し、その蛍光強度を検出することでタンパク質との相互作用が測定できると考えられる。今回、リポソームに封入するカルセイン分子の濃度の最適化を検討し、さらにターゲット蛋白質に対する蛍光検出特性を評価した。

実験内容と結果 作製した蛍光アレイの構造を図1に示す。加工したPDMSアレイを加熱・硬化し、液状PDMSを接着剤として塗布・加熱し、スライドガラス上に固定した[1,2]。アレイデバイスは700 μm×700 μmのセル(深さ約2000 μm) 3×3構成である。測定系として落射光学系を用いて、青色LEDからの励起光をアレイ直上から照射し、アレイセル内の蛍光分子が発する蛍光をCMOSイメージャにより撮像し、セル毎の蛍光強度特性を測定した。

今回、カルセイン溶液を0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 mMの8種類用意し、マイクロピペットにより0.7 μL各セルに封入し、特に揮発防止のためアレイとカバーガラスをPDMSで接着して1時間の経時変化を測定し、蛍光の濃度依存性を評価した。その結果を図2に示す。同図よりカルセイン濃度が0.001 mM(1 μM)から上昇すると蛍光強度は増加し、1 mMから5 mMの間で蛍光強度は最大となる。5 mMよりも濃度が上昇すると蛍光強度は減少することが分かる。文献[3]では、カルセイン濃度が3.1(±0.4) mMにおいて蛍光強度は最大となることが報告されており、今回の結果は文献[3]の結果と一致していることが確認された。蛍光分子封入リポソームの蛍光検出のメカニズムと今回の結果より、リポソームに封入するカルセイン溶液は、PBSにより希釈され蛍光強度が最大になる濃度より高い濃度で最適化する必要がある。

次にアレイセル中の蛍光分子封入リポソームにターゲット蛋白質(ウシ炭酸脱水酵素(CAB))を添加し、カバーガラスで密閉後1時間の経時変化を測定して同蛋白質濃度依存性を評価した。カルセイン封入リポソーム(ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC))の濃度は10 mM、ターゲットCAB濃度は100, 300, 500 μMとした。その結果を図3に示す。カルセイン封入リポソームに添加したCABの濃度が高くなるほど蛍光強度は単調に増加することが分かり、リポソームとCABの相互作用強度のCAB濃度依存性を得た。以上、カルセイン蛍光分子の濃度が最適化され、その結果明瞭なターゲット蛋白質の濃度依存性の検出結果が得られた。

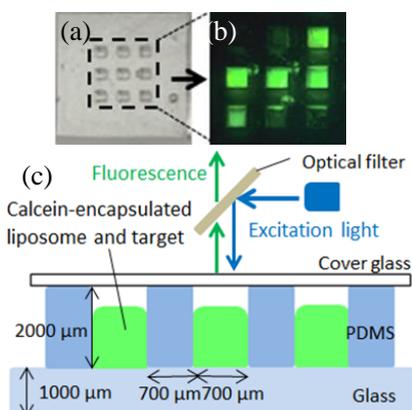


Fig.1. Structure of miniaturized array sensor device: (a) a surface photograph of array, (b) fluorescence image of array, (c) cross-sectional illustration of array.

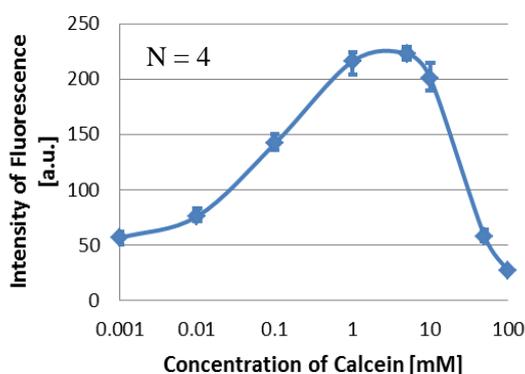


Fig.2. Intensity of fluorescence after 60 min as a function of concentration of Calcein.

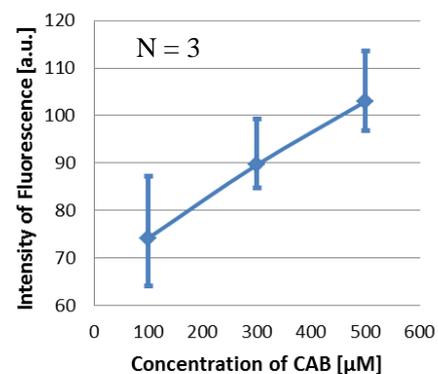


Fig.3. Intensity of fluorescence after 60 min as a function of concentration of target CAB.

謝辞: 本研究の一部は科研基盤 A(一般)25249048 の助成を受けて行われた。

参考文献 [1] 藤本 他.: 2013 春応物 29p-G17-10. [2] K. Takada, T. Fujimoto, T. Shimanouchi, M. Fukuzawa, K. Yamashita, H. Umakoshi and M. Noda, "A new discrimination method of target biomolecules with miniaturized sensor array utilizing liposome encapsulating fluorescent molecules with time course analysis", MicroTAS 2013, Freiburg, Germany, Oct. 27-31 (2013) pp.194-196.

[3] Steffen Hamann, Jens Folke Kiilgaard, Thomas Litman, Francisco J. Alvarez-Leefmans, Benny R. Winther, and Thomas Zeuthen, "Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence Self-Quenching", Journal of Fluorescence, Vol.12, No.2, June 2002(©2002)