# biotin 修飾 AFM 探針による分子分解能特異的相互作用力マップ

## Molecular-scale spatial mapping of specific interaction by biotin-modified AFM tip

京大工，°宮本 眞之、木南 裕陽、山本 悠樹、小林 圭、山田 啓文
Dept. of Electronic Sci. & Eng., Kyoto Univ.
°M. Miyamoto, H. Kominami, Y. Yamamoto, K. Kobayashi, H. Yamada
E-mail: miyamoto.masayuki@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

【はじめに】近年、生体分子間の特異的結合を利用するバイオセンシングや分子標的治療の確立に向け、その基礎研究として streptavidin (SA) - biotin 系についての研究が精力的に進められている。われわれは最近、脂質二重膜上 SA 2 次元結晶上において biotin 修飾探針を用いてフォースカーブ測定することで、特異的相互作用の検出頻度を飛躍的に向上させることに成功した[1]。本研究では、streptavidin を DNA オリガミに吸着させ、その上で biotin 修飾した探針による 3 次元フォースマップを取得することで、局所領域の特異的相互作用の検出に成功したので、その結果について報告する

【実験方法と結果】試料として、10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$ の溶液に、10 nM 1 本鎖 DNA (M13mp18)、40 nM staple DNA を加え、85℃から 15℃まで 72 分かけてアニールすることで、図 1 内左上に示す構造の DNA オリガミを作製した。DNA オリガミは、へき開したマイカ基板に吸着させ、さらに 0.25 mg/ml SA 溶液を 10 μL 滴下し、10 分静置することで、DNA オリガミの窓部に位置する biotin と結合させることで単一の SA 分子を DNA オリガミに固定した。探針修飾分子には、先端の biotin 分子に自由度を持たせるため、、N-hydroxysuccinimide (NHS) 終端した、長さ約 5 nm の polyethylene glycol (PEG)を用いた。Si カンチレバー (ばね定数: 0.2 N/m) を 0.1 %の APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) に浸漬して探針をアミノ基修飾した後、中性環境下で修飾溶液に浸漬し、最終的に biotin 修飾探針を得た。これらの試料・探針を用いて、3 次元フォースマッピングを行った。図 1 に streptavidin を吸着させた DNA オリガミの通常探針による表面形状像を示す。図 1 では設計通りの DNA オリガミを観察することができ、窓部に見られる輝点は SA 分子に相当する。図 2 に biotin 修飾探針による 2 次元フォースマップを示す(探針後退時)。窓部に対応する領域では、明暗境界がやや低くなっているが、この境界のすぐ上にはやや暗い領域が存在する。これは、探針接近時に形成された SA-biotin 間の結合が、探針後退時に破断したことを意味している。図 3 と図 4 に 3 次元フォースマッピングによって再構成された表面形状像と結合を破断した力のマップを示す。図 4 より、DNA オリガミの窓部分で SA-bioitn 間の結合が破断している様子を確認できる。

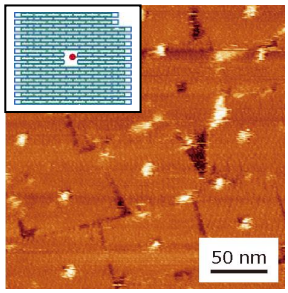


図 1 : SA 吸着後 DNA オリガミの表面形状像. インセット: DNA オリガミの設計図. 赤点は biotin の位置を示す.

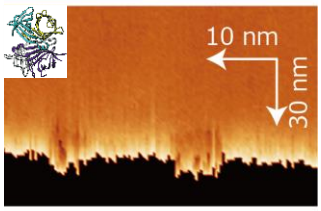


図 2 : biotin 修飾探針による探針後退時のフォースマップ (探針後退時). インセット: SA 分子のリボンモデル.

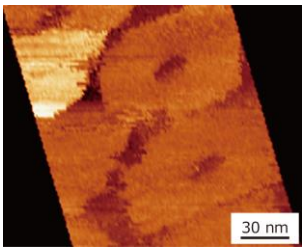


図 3 : 3 次元フォースマッピング法によって再構成された表面形状像.

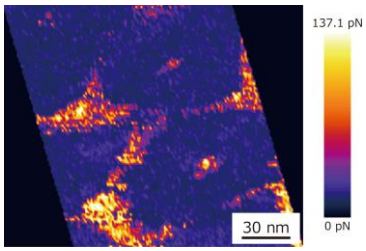


図 4 : 3 次元フォースマッピング法によって再構成された破断力マップ.

[1] 宮本他、2015 年第 77 回応用物理学会秋季学術講演会、13a-B10-2