

単一エクソソーム検出のためのプラズモニクチップ 蛍光顕微鏡イメージング

Fluorescence microscopy imaging of single exosome by plasmonic chip

関西学院大理工¹ ○(M1) 藤本 絵里¹, 田和 圭子¹

Kwansei Gakuin Univ.¹, °Eri Fujimoto¹, Keiko Tawa¹

E-mail: k.tawa@kwansei.ac.jp

エクソソームは細胞から分泌される小胞体で、その中に包接されている microRNA やタンパク質を調べることで将来罹患する疾病が予測できると言われている。しかし、直径 100 nm 程度の小さいエクソソームを *in situ* 検出することは難しい。当研究室ではこれまでに、金属薄膜でコーティングされた波長サイズの周期構造基板であるプラズモニクチップを用いた格子結合型表面プラズモン共鳴法(GC-SSPR)を利用して、ガラス基板上より明るい蛍光像が得られることを示してきた。本研究では、ガラス基板上では検出困難な蛍光標識単一エクソソームをプラズモニクチップで観察し、定量的な評価を行うことを目指した。そのため、顕微鏡下でより強い増強発光が期待できる、同心円状パターンでの Bull's eye 構造を用いた。

ガラス基板上に、光ナノインプリント法を用いてピッチ 480 nm で直径 20 μm の Bull's eye パターンが配列しているレプリカを調製した。これに RF-スパッタ法で Ti/Ag/Ti/SiO₂ 膜を順に成膜し、サンドイッチアッセイ界面をプラズモニクチップ上に構築した。チップ表面にポリドーパミン(PDA)薄膜を調製し、Protein G を結合した後、捕獲抗体 anti-CD63 抗体を結合した。そこへ予め APC-anti-CD9 抗体を標識したエクソソーム溶液をチップ上に展開した。単一エクソソーム検出は正立落射蛍光顕微鏡を使用し EM-CCD カメラ、水銀ランプ、Cy5 フィルターユニットと 100 倍の対物レンズを用いて行った。また参照溶液としてエクソソームを含まない APC-anti-CD9 抗体だけを展開した系についても計測した。

Fig.1 に APC-anti-CD9 抗体標識エクソソームの蛍光像を示す。蛍光像における輝点の半値幅(FWHM)および蛍光強度の値を解析し、Fig.2 のプロットより単一エクソソームを評価した。半値幅が回折限界に近い 600 nm 未満の値をエクソソームによる輝点とした。参照溶液では輝点の半値幅は 600 nm 以上と大きいものが多く、APC 抗体の凝集体と考えられる。蛍光像の中の 1 つの Bull's eye パターン内におけるエクソソームについて、数を数えた。参照溶液では 2 個であったが、エクソソームを導入した溶液では 19 個であった。プラズモニクチップによって単一エクソソームの検出ができたと考えられる。

【謝辞】 光硬化性樹脂をご提供いただいた東洋合成工業に感謝いたします。

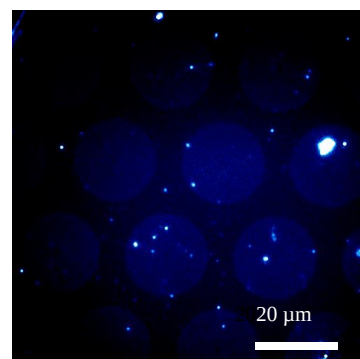


Fig.1. Fluorescent image of exosome on chip.

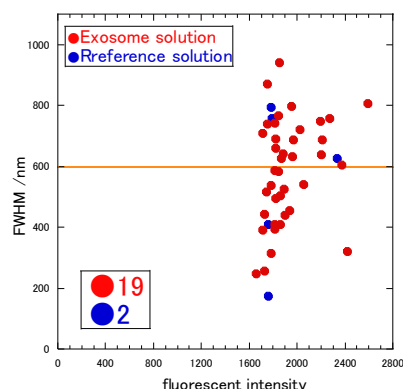


Fig.2. FWHM value plotted against the fluorescence intensity for individual spot. (●: exosome solution, ●: reference solution (without exosome but with APC-CD9 antibody))