PEG-biotin 修飾探針が FM-AFM 分解能に与える影響

Effect of PEG-biotin functionalized tip on FM-AFM resolution

京大工　○堀内　孝介，木南　裕陽，小林　圭，山田　啓文

Dept. of Electronic Sci. & Eng., Kyoto Univ. ○K. Horiuchi, H. Kominami, K. Kobayashi, H. Yamada

E-mail: k.horiuchi.0601@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

生体分子間の特異結合は分子標的薬やバイオセンサへの応用に向けて、精力的に研究が進められている。特に、原子間力顕微鏡(AFM)を用いたフォース分光法は、この生体分子間の特異結合の解析に広く用いられている[1]。一方で、フォース分光においては生化学修飾探針を用いることから、タンパク質分子内における結合サイトの詳細位置などの空間情報を同時に取得することは容易ではない。われわれは、これまで周波数変調 AFM(FM-AFM)を用いて DNA や IgG 抗体などの生体分子の高分解能観察を行ってきたが[2]、生化学修飾探針を用いた場合に、どの程度空間分解能が低下するかについては明らかではなかった。本講演では、streptavidin(SA)分子 の FM-AFM 観察およびフォース分光（フォースマッピング）を行う際に、PEG(polyethyleneglycol) - biotin 修飾を施した探針が測定空間分解能に与える影響について調べた結果について報告する。

測定試料には脂質膜上の SA 2 次元結晶を用いた。mica 基板上に DOPC, DOPS, biotin-DOPE の 3 種の脂質分子を 7:2:1 で混合し、ベシクル融合法で脂質 2 重膜を作製した。その後、1 mg/ml の SA 溶液を滴下して 20 分間静置し、リンスすることで SA 2 次元結晶を作製した。カンチレバー(ばね定数:0.09 N/m, Olympus 社製 BL-AC40T)を UV 洗浄後、APTES(aminopropyltriethoxysilane)溶液に 1 時間浸漬し、探針表面をアミノ基修飾し、さらに biotin-PEG-NHS(N-hydroxysuccinimide ester)に 2 時間以上浸漬することで探針への PEG-biotin 修飾を行った。Fig. 1 および Fig. 2 は、それぞれ PEG のリンカー長が 1.9 nm、9.0 nm での修飾探針を用いた際の表面形状像(1(a), 2(a))、フォースカーブ(1(b), 2(b))、および共振周波数シフトカーブ(1(c), 2(c))である。AFM 形状観察では、修飾した探針を用いても SA 結晶内の単分子が分解できていることが分かる。一方、フォースカーブ、共振周波数シフトカーブから特異結合が観測されているところから、探針は PEG-biotin 修飾されていることが確認できた。

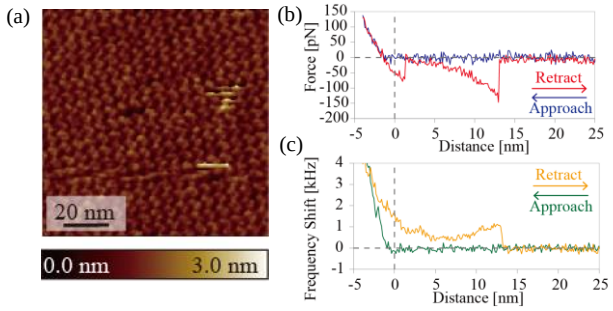

Fig. 1 (a) Topographic image of SA 2D crystals using a PEG-biotin tip (linker length : 1.9 nm). (b) and (c) are Mean force and frequency shift curves of a rupture event, respectively.

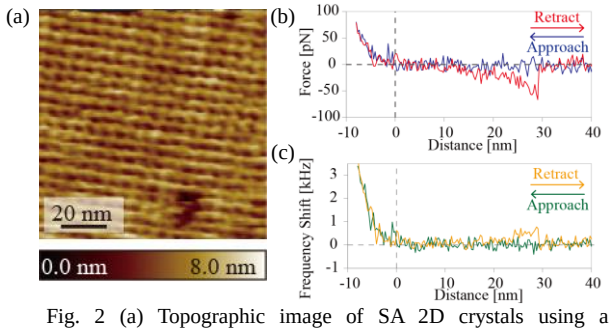

Fig. 2 (a) Topographic image of SA 2D crystals using a PEG-biotin tip (linker length : 9.0 nm). (b) and (c) are Mean force and frequency shift curves of a rupture event, respectively.

[1] E.Angelo , T.Maekawaa, T.Nyua, H.Taharaa, G.Lkhamsurena and T.Hayashi, *RSC Adv*. **9 ,** 22705(2019)
[2] H.Kominami , K.Kobayashi , S.Ido , H.Kimiya , H.Yamada, *RSC Adv*. **8 ,** 29378(2018)

© 2020年 応用物理学会