

Bull's eye プラズモニックチップによる 単一エキソソームの2色蛍光イメージング

Dual Color Fluorescence Imaging of a Single Exosome with Bull's Eye Plasmonic Chip

関西学院大理工¹ °藤本 絵里¹, 田和 圭子¹

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

E-mail: ktawa@kwansei.ac.jp

エキソソームは細胞から分泌される小胞体で、その中に microRNA やタンパク質などが包接されており、これら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、エキソソームの大きさは光の回折限界以下の直径 100 nm 程度であり、一般的な光学顕微鏡で in situ 検出することは難しい。当研究室ではこれまでに、波長サイズの周期構造をもつ基板を金属薄膜で成膜したプラズモニックチップを調製し、これを用いた格子結合型表面プラズモン共鳴の増強電場 (GC-SPR) によって、ガラス基板上より明るい蛍光分子の蛍光像が得られることを示してきた。そこで本研究では、ガラス基板上では検出困難な蛍光標識単一エキソソームを Bull's eye 構造プラズモニックチップで二種類の検出抗体 APC-anti-CD9 抗体と PE-anti-CD81 抗体を用い、単一エキソソームを検出した。

ピッチ 480 nm で直径 20 μm の Bull's eye 構造が 5 μm 間隔で六方格子状に配列したモールドを用いて、スライドガラス上に光ナノインプリント法でレプリカを形成した。これに Ti/Ag/Ti/SiO₂ を RF-スパッタ法で順に成膜し、プラズモニックチップとした。チップ表面にポリドーパミン (PDA) 薄膜を調製した後、Protein G を結合し、捕獲抗体 anti-CD63 抗体を固定化して、サンドイッチアッセイのエキソソーム捕獲界面を形成した。そこへ検出抗体 APC-anti-CD9 抗体あるいは PE-anti-CD81 抗体で標識したエキソソーム溶液を分別処理なしで注入し、捕獲抗体と結合させた。またエキソソームを含まず検出抗体だけを含む参照溶液も計測した。エキソソームは 100 x の対物レンズで正立落射蛍光顕微鏡を用いて測定した。

検出抗体とエキソソームの混合溶液をチップに注入し、アッセイ界面で捕獲したエキソソームを AFM で計測すると単一エキソソームであることが確認できた (Fig.1)。蛍光顕微鏡観察によって得られた蛍光像の各輝点については、半値幅と蛍光強度を解析して単一エキソソームを評価した。事前に行った 200 nm ϕ の蛍光シリカ粒子測定より 570 nm 未満の半値幅を単一粒子の基準値とすることが決められたので、この基準値以下の輝点を単一エキソソームとした。PE-anti-CD9 抗体を用いたエキソソーム溶液においてエキソソーム濃度に対する検出個数を Fig.2 にプロットした。このような線形関係は APC-anti-CD9 抗体でも見られ、再現性の高い結果が得られた。さらに、捕獲抗体のない界面で検出するとエキソソームは検出されなかった。プラズモニックチップによって輝点を高感度に測定し、半値幅解析法を行うことによって 2 種類の抗体で単一エキソソームの検出ができた。

【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。

1) 藤本絵里他, 第 80 回応用物理学会秋期学術講演会, 18p-E203-15 (2019).

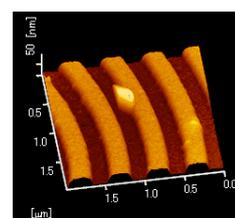


Fig.1. AFM image of a Single exosome on Bull's eye structure

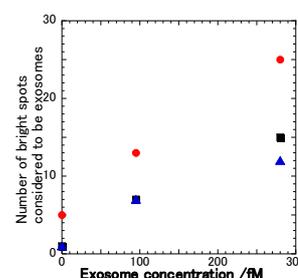


Fig.2. The number of bright spots counted as an exosome for each concentration.