

透過型蛍光顕微鏡下のプラズモニックチップによる 単一エキソソーム検出

Single exosome detection on a plasmonic chip under the transmitted-light fluorescence microscopy

関西学院大理工¹ ○(B)福富 一真¹, 藤本 絵里¹, 田和 圭子¹

Kwansei Gakuin Univ.¹, °Kazuma Fukutomi¹, 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直径約 100 nm の大きさを持つ小胞体の 1 つで、その中に含まれる microRNA やタンパク質は分泌源の細胞の特徴を反映し、疾病予測に役立つことが知られている。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ックチップを用い、格子結合型表面プラズモン共鳴法(GC-SSPR)による増強蛍光を利用し、正立落射蛍光顕微鏡で単一エキソソームを検出できることを示してきた^[1]。本研究では、プラズモン共鳴による蛍光増強度が落射光学系より大きいことが期待されている透過光学系を用いて蛍光標識単一エキソソームをプラズモニックチップ上で観察した。

チップの構造にはケーラー照明の顕微鏡下でより大きな蛍光増強が得られる同心円状パターン of 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、ピッチ 480 nm で直径が 20 μm の Bull's eye パターンが並ぶレプリカを作製した。この上に RF-スパッタ法を用いて Ag と SiO₂ を成膜し、エキソソームに含まれる膜たんぱく質 CD9 と CD63 をターゲットとしたサンドイッチアッセイを以下のように調製した。まず、チップ表面にポリドーパミンコーティングをし、Protein G を結合後、捕獲抗体として anti-CD63 抗体を結合させた。検出抗体の APC-anti-CD9 抗体をエキソソーム溶液に混合したものを分離操作せずにチップ上に流し、インキュベーション後にりん酸緩衝液で洗浄した。単一エキソソーム検出には EM-CCD カメラ (正立側)、Xe ランプ (正立側)、Hg ランプ (倒立側)、cy5 フィルターユニット (両側)、100 倍 (正立側)、20 倍 (倒立側) の対物レンズを搭載した正倒立顕微鏡を用いた。透過系と落射系の蛍光観察において同一のエキソソーム観察を行った。Fig.1 は透過系正倒立顕微鏡で観察された蛍光像の結果である。蛍光像の輝点の半値幅解析をすると落射光学系とほぼ同様の半値幅が透過光学系でも得られ、これが APC-anti-CD9 で標識された単一エキソソームと考えられた。よって透過型蛍光顕微鏡下でも単一エキ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。

Reference [1] 藤本絵里 他, 第 80 回応用物理学会秋季学術講演会, 18p-E203-15 (2020)

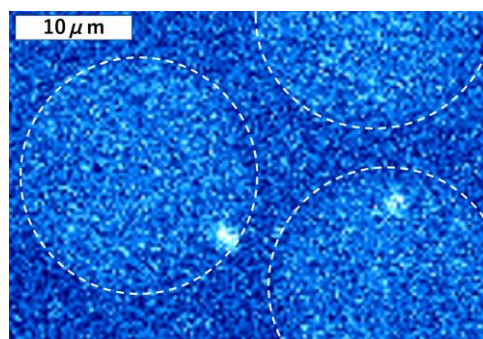


Fig.1. Fluorescent image of exosomes on a plasmonic chip. Bright spots correspond to single exosomes. Bull's eye-pattern edge were shown as broken lines