

異種プローブの光濃縮による迅速・高感度な DNA 定量分析法の開発

Development of Rapid and Sensitive Quantitative Analysis Method of DNA

Based on Optical Condensation of Heterogeneous Probe Particles

大阪公立大 LAG-SYS 研¹, 大阪公立大院理², 大阪公立大院工³, 阪大院基礎工⁴

○豊内秀一¹, 大間知誠也^{1,2,3}, 林康太^{1,2,3}, 高木裕美子¹, 田村守^{1,4}, 床波志保^{1,3}, 飯田琢也^{1,2}

RILACS¹, Grad. Sch. Sci.², Grad. Sch. Eng.³, in Osaka Met. Univ., Grad. Sch. Eng. Sci. in Osaka Univ.⁴

○Shuichi Toyouchi¹, Seiya Oomachi^{1,2,3}, Kota Hayashi^{1,2,3}, Yumiko Takagi¹,

Mamoru Tamura^{1,4}, Shiho Tokonami^{1,3}, Takuya Iida^{1,2}

E-mail: t-iida@omu.ac.jp

様々な生物の遺伝情報を担う DNA は、生命機能の維持にかかわるタンパク質などの生体分子の生成に必要不可欠であり、医療や製薬、食品などの幅広い分野の検査に活用されている。近年では、デジタル PCR や次世代シーケンサーなどによる DNA 定量検出が可能となりつつあるが、これら従来法では複雑な工程や検出時間・精度に課題があり、新しい検出法が望まれている。一方、標的分子と選択的に結合(分子認識)するホスト分子を修飾されたプローブ粒子を含む液中において、光の電磁気学的な相互作用に由来する光誘起力と流体力学的相互作用の相乗効果を利用した分子認識の「光誘導加速」の原理が提案された[1,2]。我々は、この光誘導加速を応用した、迅速・高感度な DNA 定量検出を可能とする『ヘテロプローブ法』の開発に取り組んできた[3]。同手法では、Mie 散乱により光誘起力が強く作用するマイクロ粒子(Probe1)と、局在表面プラズモンの電場増強や発熱効果が顕著に発現する金ナノ粒子(Probe2)の各々に DNA を修飾してプローブ粒子としている。マイクロウェル中の静的流体中において、レーザー照射により固液界面でプローブ粒子が集積化され、その過程で標的 DNA をプローブ粒子間での二重鎖形成により特異的に光濃縮する技術である。本研究では、蛍光染色した標的 DNA を用いて、集積構造体中にトラップされた標的 DNA を蛍光像によって観測した。また、標的 DNA 濃度 1 nM 以下の低濃度の範囲での DNA 定量検出の可能性と検出限界について評価を行った。

具体的には、蛍光染色した標的 DNA と Probe1,2 の混合溶液(約 7 μ L)を自作のマイクロウェル内に封入し、倒立型顕微鏡を用いてマイクロウェル天井の固液界面に下方から打ち上げ式で近赤外レーザー照射を 3 分間行い、その後に蛍光像を取得した。Fig.1 に標的 DNA 濃度を 1 nM 以下の低濃度範囲で変化させた時に得られた蛍光強度を、マッチ DNA (赤丸)とミスマッチ DNA (青丸)を標的 DNA として用いた場合についてそれぞれ示している。マッチ DNA の場合のみ、蛍光強度と標的 DNA 濃度に顕著な正の相関を確認し、高い直線性を示す検量線を得る事が出来た。また、検出下限は DNA 濃度 100 pM 程度であると見積もられ、デジタル PCR と同程度の高感度検出が僅か 3 分間の光照射によって実現できる事を示唆しており、ミスマッチ数の依存性も調査中である。得られた成果は、光誘導加速による DNA の特異的かつ迅速・超高感度な定量検出の新機構を提供するものである。

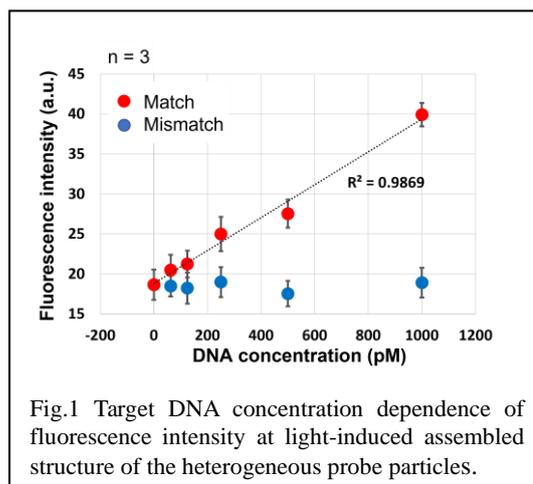


Fig.1 Target DNA concentration dependence of fluorescence intensity at light-induced assembled structure of the heterogeneous probe particles.

References

- [1] T. Iida, Y. Nishimura, S. Tokonami, *et al.*, *Sci. Rep.*, 6, 37768 (2016)
- [2] T. Iida, S. Hamatani, Y. Takagi, K. Fujiwara, M. Tamura, S. Tokonami, *Commun. Biol.* 5, 1053 (2022).
- [3] S. Oomachi *et al.*, Abs. of 2022 Spring Meeting of JSAP.