

マイクロ流路内の気液界面移動による DNA 分子の伸長・固定と 一分子の超解像イメージング

Stretching and fixing DNA molecule using air-liquid interface and its super-resolution
imaging performed in a microchannel

名大工¹ ○東 直輝¹, 福澤 健二¹, 伊藤 伸太郎¹

Nagoya Univ.¹

E-mail: naoki.azuma@mac.nagoya-u.ac.jp

DNA マッピングは、ランダムコイル状の DNA 分子を伸長し、蛍光顕微鏡を用いて一分子レベルに分析する手法である。近年、光学顕微鏡の回折限界を克服した超解像イメージング法が開発され、DNA マッピングにこれを応用することで分析の高精度化が可能となった。特に STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy) の面内分解能は原理的にそれを数 nm レベルにまで向上できる [M. J. Rust et al., Nature Methods 3, 793 (2006)]。一方で、STORM は数分から数十分を要するため、伸長した DNA 分子を固定する必要がある。一般的な伸長・固定法として、DNA 溶液内から基板を引き上げた際の気液界面移動を用いて分子を伸長し、APTES などのシランカップリング剤を用いて表面修飾された基板上に固定する方法があるが、この方法では少量の DNA 試料の分析には適用できない。本研究では、マイクロ流路内の圧力制御による気液界面移動を用いて DNA 一分子を伸長・固定し、STORM を用いてその超解像イメージングを実現することを目的とした。

DNA 一分子のイメージングのためには、基板上に伸長・固定された DNA 分子の重なりを防ぐ必要がある。一般に利用されるシランカップリング剤は、固定される DNA 分子数を増加するため、DNA 分子同士の重なりを増加する。そこで本研究では、空気プラズマ処理によって表面を活性化させたガラス基板を用いた。フォトリソグラフィによって一本の直線形状にレジストをパターンニングし、それを PDMS に転写した。PDMS 基板とプラズマ処理したガラス基板を接合し、微小流路を形成した。微小流路の幅と深さはそれぞれ 100 μm と 2 μm とした。DNA サンプルとして、48.5kbp DNA を用いた。Figure 1 に実験方法を示す。リザーバ A から圧力によって空気を導入することで気液界面を移動し、DNA 分子を伸長・固定することに成功した。その伸長度は 70% を達成した。さらに、マイクロ流路内に STORM バッファを導入し、YOYO-1 を点滅させることで STORM を実施した。著者らは、微小流路内に伸長・固定された DNA 一分子の STORM イメージングに成功した。STORM の面内分解能は 150 nm であり、通常の落射顕微鏡と比較して 3 倍に向上することに成功した。本研究の手法は、微量試料かつ高精度な DNA 一分子マッピング法として、様々な DNA 分析に利用できると考えられる。

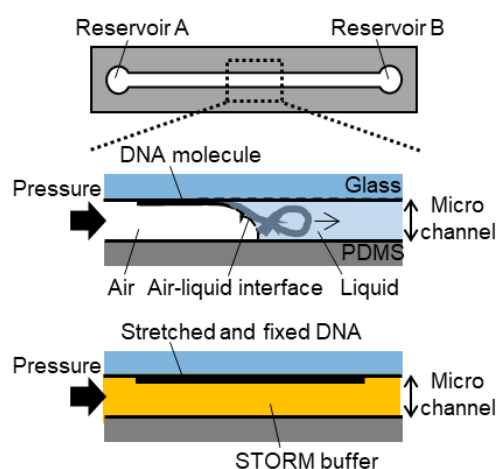


Fig.1 Stretching and fixing DNA and its super-resolution imaging in a microchannel