

光ピンセットを用いたDNA操作

量子・物質工学科 清水研究室
0613088 藤本 有紀

1. 背景

光ピンセットは分子生物学分野の研究において、サブミクロンオーダーの微小物体を操作できるツールとして、その利用と技術の研究が盛んに行われている。また、生体生物学の分野では細胞融合などの実用化が進んでいる。

DNAは二重らせん構造をもち、その直径は約2nmであるのに対し、全長は数 μm から数cmにも及ぶ細く長い高分子である。溶液中ではランダムコイル状態であるDNAを、光ピンセットを用いて引き伸ばし、一分子レベルの力学応答を得ることが可能である。

2. 研究目標・目的

光ピンセットはレーザー光を対物レンズで集光させ、その光の放射圧によって1 μm から数十 μm ほどの大きさの粒子を捕らえ、非接触・非破壊で操作できるというものである。本研究では光ピンセットを用いてDNAを操作し、DNAのばね定数などの物理量を測定することを目標に掲げ、DNAを光ピンセットで操作できるように試料を作製し、その試料を用いたトラップ実験を行うことを目的とした。

3. 原理

光が物体にあたると、その衝突によって物体に力が働く。その力を放射圧という。

レーザー光は粒子に入射すると、境界面で周辺媒質の屈折率 n_1 と粒子の屈折率 n_2 の違い ($n_1 < n_2$) から反射光と屈折光に分かれる。その時、光の進行方向が変化し、運動量が変化する。そのため、運動量保存の法則により境界面に力が作用し、粒子をトラップすることができる。

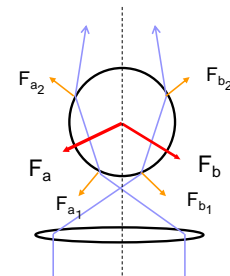


図 1.運動量変化

DNA (deoxyribonucleic acid)は核酸の一種でデオキシリボ核酸と呼ばれ、デオキシリボースとリン酸、塩基から構成される。DNAは4種類の塩基を含んでおり、アデニン (A) とグアニン (G) というプリンと、シトシン (C) とチミン (T) というピリミジンからなる。

DNAが二重らせん構造をとるには、大きなプリン塩基 (AあるいはG)が小さなピリミジン塩基 (CあるいはT)と対になる必要がある。

AはTと2本の水素結合で対になり、GはCと3本の水素結合で対になる。このA-T、G-C対はWatson-Crick型塩基対と呼ばれる。

4. 実験

光ピンセットは透明な誘電体の粒子を捕獲対象物とし、レーザー光を用いてトラップする。本研究ではDNAを操作するにあたり、DNAの両端に直径約2nmの透明なビーズをつけることで操作可能とさせる。

4.1 光学系の組み立て

DNAの両端についたビーズをトラップし、一方のビーズをトラップしているレーザーの集光点を固定し、もう一方の集光点を動かすことで、DNAを伸長・緩和させる。

そのために、二ヶ所でビーズをトラップできるように光学系を組む必要があったので、色素レーザーを用いて図2のような光学系を組み立てた。

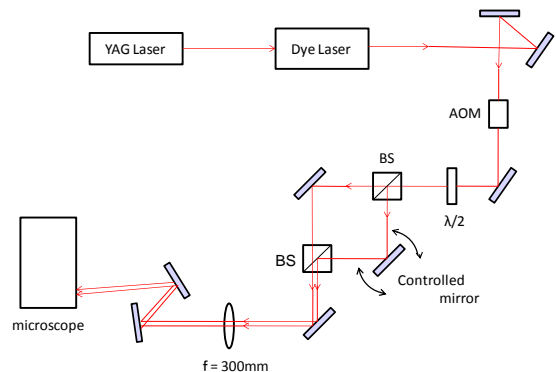


図 2. 光学系

4.2 試料の作製

購入した試薬

- Streptavidin でコートされたビーズ
- Biotin1 (Oligo 3 bio 1)
塩基配列 : AGGTCGCCGCC - bio
- Biotin2 (Oligo 3 bio 2)
塩基配列 : GGGCGGCGACCT - bio
- λ-DNA (鎖長 : 48,502bp)

試料作製にあたり、緩衝液となるTE bufferとTE+BSAを作製した。TE bufferはTris-HClとEDTAからなる緩衝液で、2価の金属イオン (Ca^{2+} など) をキレートし、DNAの分解を防ぐ働きがある。

• TE bufferの作製

Tris Base 0.606gを500mlビーカーに入れ、400ml程度の滅菌水と0.5M EDTAを1.0mlを加えて溶解した。そこにpHを測定しながら5mol/lのHClを加え、pH 7.4になるように調整した。その溶液をメスシリンダーに移して、全量が500mlになるまで滅菌水を加え、500ml広口瓶に入れてオートクレーブで滅菌した。

• TE+BSAの作製

TE 50mlを100mlビーカーに移し、0.5g BSAを加えて溶解した。そこにpHを測定しながら5mol/l HClを加え、pH 7.4になるように調整した。

I) ビーズの洗浄

まずStreptavidinでコートされたビーズをTE+BSAで洗浄する。そのため、beads原液 (1.25% solid) を40 μ l、TE+BSAを960 μ l混合しvortex後、5分間遠心分離機 (13,000rpm) にかけた。その後上清を捨て、1mlのTE+BSAを加えてvortexした後、5分間遠心した。これを2回繰り返すことでビーズを洗浄した。

II) ビーズとBiotin1の結合

洗浄済みビーズを $5.0 \mu\text{l}$ 、 $10 \text{pmol}/\mu\text{l}$ Biotin1(Olig 3bio1) を $1.0 \mu\text{l}$ 混合し、室温で8時間incubateした。その後、溶液中のBiotin1を取り除くため、TE+BSAを1 ml加えて5分間遠心した。これを3回繰り返す、TE+BSA $10 \mu\text{l}$ 加えて懸濁することでビーズとBiotin2を結合させた。

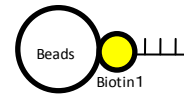


図 3.ビーズと Biotin1

III) λ -DNAとBiotin2の結合

$360 \mu\text{g}/\text{ml}$ λ -DNAを $2.78 \mu\text{l}$ 、 $0.01 \text{pmol}/\mu\text{l}$ Biotin2(Olig 3bio2)を $3.0 \mu\text{l}$ 、TE(pH7.4)を $15 \mu\text{l}$ 加え、混合した。 λ -DNAはCOS siteで環状構造になろうとするので、 70°C で10分温めることで環状を切った。その後、室温で3時間incubateし、結合させた。

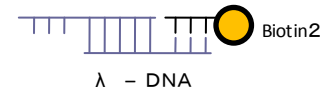


図 4. λ -DNA と Biotin2

IV) 試料の完成

TE+BSAを緩衝液とし、洗浄したビーズを $2.5 \mu\text{l}$ 、ビーズとBiotin1が結合したものを $10 \mu\text{l}$ 、 λ -DNAとBiotin2が結合したものを $2.0 \mu\text{l}$ 加え、混合した。室温で12時間incubateすることで図5のような試料ができる。

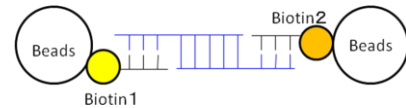


図 5. 試料

4.3 セルの作製

ビーズがカバーガラスに付着するのを防ぐため、カバーガラスを $10 \text{mg}/\text{ml}$ のBSA溶液に数時間浸しておき、TEで洗い流したものを使用した。

捕獲対象物： 両端にビーズつけた λ -DNA

周辺媒質：TE (pH7.4)

セル：BSAでコートしたカバーガラス

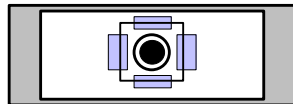


図 6 .上から見た

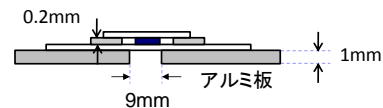


図 7.セルの断面図

4.4 蛍光観測

試薬

- $36 \mu\text{g}/\text{ml}$ λ -DNA $1.39 \mu\text{l}$
- $10 \mu\text{M}$ YOYO -1 $1.0 \mu\text{l}$
- 2% p-phenyl $50 \mu\text{l}$
- TE $948 \mu\text{l}$

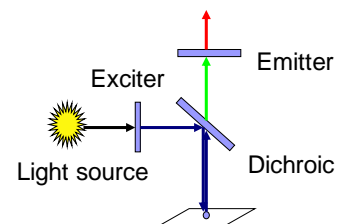


図 8 .顕微鏡内の様子

DNAは蛍光物質YOYOが塩基対に入り込むこと（インターカレーション）により蛍光観測できる。本研究では蛍光物質を励起させる光源には水銀ランプを用いた。

蛍光物質YOYOは最大励起波長が491nmのため、励起光フィルター（Exciter）を入れることで450~500nmの波長の光をセルへ通すようにした。DNAに入り込んだYOYOは励起されて蛍光を発する。その蛍光波長は最大で509nmである。

Dichroicによって波長が490nm以上の光だけを通し、Emitterで500~540nmの波長を取り出し、微弱な蛍光を観測する。

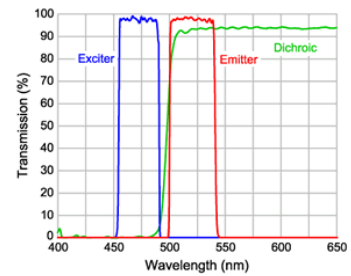


図9.フィルターの透過率

5. まとめと今後の課題

今回の実験では、試料として λ -DNAの両端に直径 $2\mu\text{m}$ のビーズを結合させたものを作製した。その作製した試料を用いてセルを作製し、セルの中でブラウン運動している粒子の様子を見ることができた。また、二ヶ所でトラップできるような光学系を組んだことで、ブラウン運動をしているDNAの両端のビーズをトラップし、操作することができた。

現在、DNAの蛍光観測を試みているが、蛍光寿命が短いため観測するまで至らなかった。今後の課題としては、蛍光観測をすることでDNAの存在を確認すること、また蛍光観測することばね定数を測定することである。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、様々なご指導を頂きました東京農工大学の村山能宏先生、オートクレーブやインキュベーターなどの実験装置を貸してくださいました三瓶巖一先生に深く感謝いたします。

7. 参考文献

- H.Lodish,D.Baltimore,J.Darnell『分子細胞生物学（上）第4版』東京化学同人（2001）
Keir C.Neuman,Steven M.Block, Rev.Sci.Instrum **75**,2728(2004)
Hirofumi Wada, Yoshihiro Murayama, and Masaki Sano, Phys. Rev. E **66** 061912(2002)
Yoshihiro Murayama,Yoshihiko Sakamaki,Masaki Sano, Phys.Rev.Lett. **90** 018102 (2003)