

光ファイバセンサを用いた電気泳動下における DNA の検出

1220074 佐野 実柚 (光計測工学研究室)

(指導教員 田上 周路 准教授)

1. 背景・目的

電気泳動法は1807年に行われた Alexander Reuss による実験が始まりとされており、それ以降、生化学分野におけるタンパク質の分離・分析へと発展し、近年のプロテオミクス研究の一躍を担ってきた。また、インフルエンザや肺炎ワクチンの抗生物質に対して、どの細菌に耐性があるかの分析においても利用されている。さらに、近年ではデータをデジタル化させてソフトを使用し分離から分子用の決定や成分評価方法が広がっている。^[1]

しかし、電気泳動法は DNA などのタンパク質に蛍光色素を付着させて泳動分離し、その分離状況を蛍光画像として取得する間接測定であるため、定量性や精度および感度の問題がある。

本研究では、電気泳動中の DNA を光ファイバセンサによって直接検出することで、従来法の問題点の改善を目的とする。

2. 光ファイバと電気泳動の原理

電気泳動は、溶液やゲル内部に存在する DNA などの荷電物質が、電界によって移動する現象である。この現象を利用すると、網目立体構造であるゲル中の泳動では、大きい分子ほど網目に引っかかるため移動速度が遅くなる。^[2]このため、分子量によって移動速度が異なることで図1のように分子量によって分離して観測できる。

DNA の検出には、マルチモード干渉(MMI)構造を有する光ファイバ屈折率センサを用いる。^[3]MMI 構造の光ファイバセンサは、センサ部分にクラッド層をもたない光ファイバを用いるため、光の伝搬は外部物質との境界面で光をしみ出ししながら全反射して伝搬する。これをエバネッセント光といい、そのしみ出し長は外部物質の屈折率に依存するため、センサ内部における光の干渉に変化が生じる。センサが均一媒質中では干渉スペクトルのシフトとして観測できるが、センサの一部に屈折率変化が生じた場合は、干渉スペクトルの部分的な変化が生じると考えられる。よって、泳動分離された DNA による部分的な屈折率変化を測定することで、横切る DNA の検出が可能となる。

3. 実験方法

光ファイバセンサの固定にはシリコン樹脂を用い、ゲル内部で DNA 泳動方向と垂直となるように設置した。ゲル(アガロース, SeaKem® LE Agarose)の濃度は1.5%とし、泳動させる DNA (OneSTEP Ladder 100(0.1-2kbp))は GR Green Loading Buffer で染色し、ゲルに開けられた3つのスロットに計 30 μ l を注入した。泳動中の DNA の位置をカメラで確認し、泳動中の DNA がセンサを横切る際の出力信号の変化を観測した。まず、白色光源 (HL-2000) と光スペクトラムアナライザ (AQ6374) を用いてセンサの出力スペクトルを観測し、DNA 通過前と通過中で変化する波長を特定した。次に、

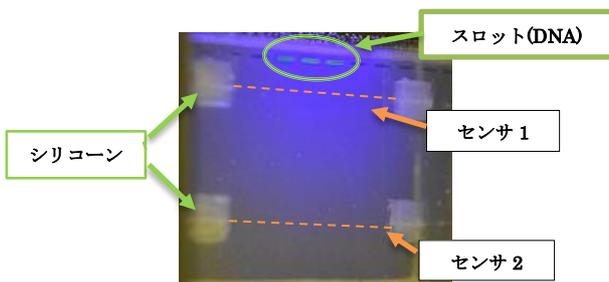


図1. ゲル中に光ファイバセンサを固定した様子

特定した波長を単一波長光源 (Agilent,8168C) から出力し、DNA の通過による透過光強度の変化をフォトディテクタ (DET08CFC/M) によってリアルタイムに観測した。

4. 測定結果

図2に白色光源と光スペクトラムアナライザを用いて得られたセンサの出力スペクトルを示す。DNA 通過前と通過中を比較すると、1550 nm 付近においてスペクトルの変化が確認できる。この結果より、単一波長光源の波長を 1550 nm に定めてリアルタイム測定を行った。図3にその結果を示す。

約 1400 秒までは、電界印加にともなうゲルの発熱によって屈折率が変化しており、出力信号強度が大きく変動している。ノイズや温度変化の影響を受けていることから出力の変化が読み取りにくい。出力の変動から DNA が通過することで出力に変化が捉えられていると考えられるが、今回は変動するノイズが大きく、明確な信号変化を捉えることができなかった。

5. まとめ

電気泳動に光ファイバセンサを適用し、DNA の直接検出に取り組んだ。電界によるゲルの発熱や DNA の通過による出力の変化をリアルタイムに測定できるシステムを構築した。今回の測定では、温度変化やゲル中で起こる変動のようなノイズの影響が大きく現れてしまったため、DNA による変動のみを正確に読み取るまでには至らなかった。今後、温度の安定やゲルの濃度・電圧を調節しノイズを取り除くことが課題となる。

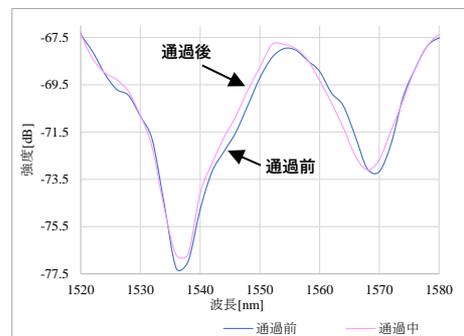


図2.DNA の通過による出力スペクトル変化

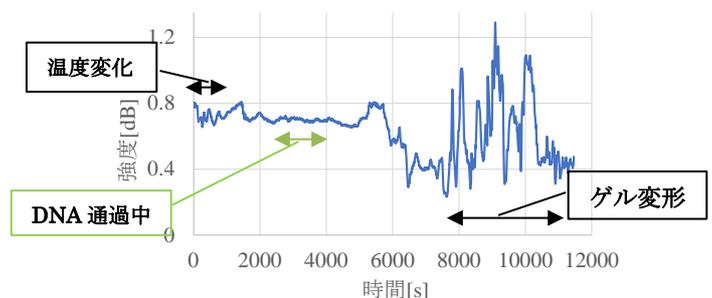


図3.単一波長光源による出力

参考文献

- [1]アト一株式会社,「初めての電気泳動」
- [2] 流石啓司 他,「寒天とアガロースについて」 *The Chemical Times*, **4**, 2011, 関東化学株式会社
- [3] 田上周路, 高橋毅, 深野秀樹, “半球形先端をもつ反射型光ファイバセンサ”, 光アライ アンス 2016年5月号, 日本工業出版, 東京, 2016年