

表面弾性波によるシグナルセル遺伝子解析用 PCR デバイスの開発

福井大学 学術研究院工学系部門 繊維先端工学講座 坂元博昭

PCR Device for Signal Cell Gene Analysis Using Surface Acoustic Waves

Department of Frontier Fiber Technology and Science, Graduate School of Engineering,
University of Fukui

細胞・組織工学において、遺伝子・タンパク質解析は不可欠な研究項目である。これまでは、細胞集団から標的分子を抽出し解析することで平均的な情報を取得し、生化学的反応が議論されてきた。しかし、個別の細胞に関する情報は取得できていなかった。その原因は、シングル細胞での培養・分析が煩雑であり研究者の操作のみではばらつきが生まれてためであった。この問題を解決するため、本研究では表面弾性波(SAW: Surface Acoustic Wave)を用いた微量液滴の攪拌・化学反応を検討した。本報告では、PCR 効率を高めることを目的に SAW による攪拌効果について遺伝子増幅効率を比較した。

Gene and protein analysis is an essential research topic in cell and tissue engineering. So far, average information has been obtained by extracting and analyzing target molecules from a cell groups, and biochemical reactions in it have been discussed. However, information on individual cells has not been obtained. This was due to culturing and analyzing single cells is complicated, and the researcher's manipulation alone can lead to variations. To solve this problem, this study examined the use of surface acoustic waves (SAW) for the agitation and chemical reaction of microdroplets. In this report, we compared the gene amplification efficiency of the agitation effect of SAW with the aim of increasing the PCR efficiency.

1. はじめに

生物の身体を構成する細胞は、組織として臓器を構成するときもあれば、単一細胞(シングルセル)として機能するなど、様々な階層的機能を有していることが近年知られ始めた。そこで、生命を真に理解するためには、シングルセルから解析していくボトムアップ型、個体から解析していくトップダウン型の2つのアプローチにより研究が進められている。トップダウン型の場合は、マクロ(細胞集団)な情報を獲得することができるため、これまでに多くの知見を得てきた。一方で、ボトムアップ型はシングルセルを操作する装置、検出器を始めとする研究実験ツールが少なく、研究の律速となってしまっている。本研究では、微小液体駆動用弾性表面波(SAW)により、数 μL のサンプル溶液を攪拌させながら液温を瞬時に加温・冷却することによって、PCR 解析することのできる高効率な解析デバイスの開発を目的とする。しかし、現在もっとも利用されている PCR 装置では、PCR による増幅を行うことは液量が少なすぎて、手作業では不可能である。本研究では、PCR

を SAW により高効率化することで、遺伝子解析ツールとしての応用をめざした。

PCRは、細胞から標的の遺伝子を抽出する工程と、PCRによって標的物を増幅・検出、という大きく分けて二つの工程に分かれている。遺伝子抽出には、スピнкаラムを用いて抽出される。しかし、スピнкаラムは、200bp以上の遺伝子をすべて分離してしまうため、標的遺伝子の純度が下がってしまっている。その結果、標的遺伝子とPCR増幅におけるポリメラーゼとの反応を阻害または反応効率が低下することが考えられ、誤反応を引き起こす要因になっている。

この問題を解決するため、磁気粒子を用いた核酸捕捉技術が有効である。これは、標的遺伝子に相補的な配列をコードしたビオチン化DNAプローブをアビジンでコーティングされた磁気粒子に結合させ、標的遺伝子のみを回収する方法である¹⁾。これにより、標的の純度を上げることが可能となる。しかし、磁気粒子表面に夾雑物が物理吸着する懸念が考えられる。磁気粒子表面へ非特異吸着した夾雑核酸は、界面活性剤などの強力な洗浄を行うことで夾雑物を除去することが可能であるが、プローブと水素結合によって結合している標的遺伝子までも一部除去されてしまう。この問題を解決するために、本研究グループはDNAプローブに光架橋性人工核酸を導入することで、夾雑物の洗浄による除去を可能とした光架橋性人工核酸プローブ修飾磁気粒子(PPMPs: photocrosslinkable probe-modified magnetic particles)を開発した(Fig.1)。光架橋性人工核酸とは、366nmの光を照射することで、ピリミジン塩基であるシトシン、ウラシルに対して架橋反応を行う物質である。これをDNAプローブに導入することで、相補的なDNAプローブにより標的遺伝子を回収、さらに光照射による光架橋反応を行うことで、界面活性剤などの強力な洗浄によって夾雑物の除去が可能となる。これにより、標的遺伝子のさらなる純度向上を可能とした²⁾。しかし、磁気粒子表面に固定化された光架橋性人工核酸を有したプローブと標的核酸との光架橋反応の効率が低いことが課題であった。これは、磁気粒子が光を妨げる障害物となることや、磁気粒子に修飾した後のプローブは、プローブ単体の時と比べて移動や回転が起こりづらく、光が一部分にしか当たらないことが考えられる。そこで、本研究では弾性表面波(SAW: Surface Acoustic Wave)デバイスを用いた溶液攪拌技術に着目した。圧電材料には、単結晶³⁾、薄膜⁴⁾、ポリマー⁵⁾、複合材料⁶⁾などがあり、アクチュエータやセンサ、超音波トランスデューサーに用いられている⁷⁾。SAWデバイスの圧電基板上に櫛歯型電極(Interdigital Transducer: IDT)があり、IDTに高周波電圧を印加することで基板が振動し、SAWが発生する(Fig.2)。発生したSAWは基板表面を伝播して反応セル内の液体まで到達し、SAWの縦

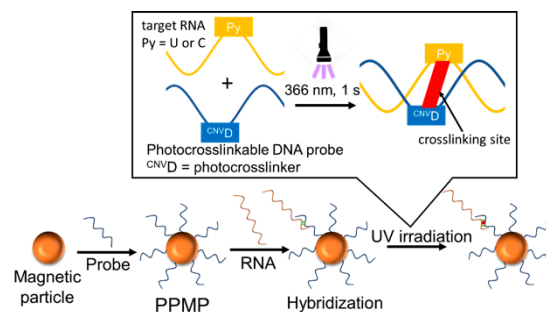


Fig.1 PPMPsによる遺伝子回収工程

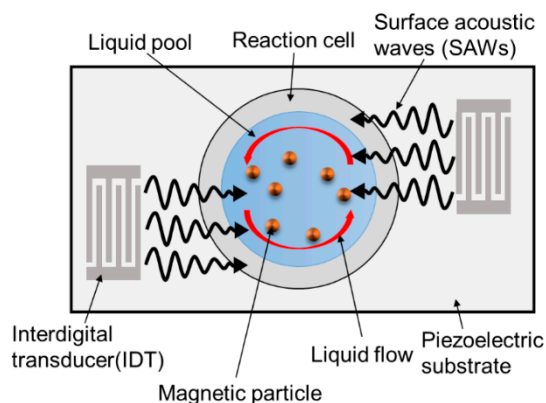


Fig.2 SAWの概略図

波放射により液体が移動する⁸⁾。ちなみに、SAWの応用例としては、液滴の移動や、閉鎖空間での回転による液体の混合が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。

本研究ではPPMPsの光架橋反応の効率を、SAWを用いた攪拌により向上させることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 SAWデバイスの作製

縦2.7cm、横4.0cmの圧電基板(LiNbO₃)上に、RFスパッタ蒸着法により50nmのCr層と1000nmのAl層を成膜した。次に、2層の金属層を形成した基板上にポジ型フォトリソレジストをスピコートし、ガラスマスクのIDT電極パターンをUVリソグラフィーによりレジスト上に転写した。この転写パターンを用いて、AlとCrをエッチングすることにより、IDT電極を作製した。3Dプリンターでポリ乳酸性Oリング状反応セルを作製し、2対のIDT電極間に接着した。Oリング状反応セルは内径5mm、高さ1mm、幅1mmとなっており、30 μ lの溶液が入るように設計されている。

2.2 PPMPsによるRNA回収

(1)PPMPsとRNAの複合体の形成

2pmolのアビジンと結合するように調製した磁気粒子に1 μ Mのプローブを0.6 μ l加えて、室温で15分間ゆっくり回転させることでビオチン-アビジン結合をさせてPPMPsを作製した。その後、TE bufferを20.4 μ l、20 \times SSPE bufferを9 μ l、1Mの標的RNAを0.6 μ l加えて45 $^{\circ}$ Cで90分間ハイブリダイゼーションを行った。今回用いた標的核酸は、SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質をコードする塩基配列の一部である1260bpを用いた。

(2)SAWによる攪拌を行いながら光架橋形成

ハイブリダイゼーション後、複合体をSAW基板上の反応セル内に移し、光源(366nm, 1600mW/cm²)から2cm離れた状態で5分間照射した。また、光照射と同時にSAWを発生させ、溶液の攪拌を行った。なお、SAW発生時のIDTへの印加電圧波形は19.1MHzの正弦波2000サイクルを19.1kHz間隔で繰り返すバースト波であり、IDTへの電力供給は415mWである。

2.3 夾雑物の除去と標的RNAの検出

光照射後、6M尿素25 μ lで1回、洗浄用bufferで3回、0.1wt% Tween20 25 μ lで1回、最後に洗浄用buffer 25 μ lで3回洗浄することで非特異吸着したRNAを除去した。最後にTE buffer 10 μ lに懸濁させた。洗浄後のサンプルにPCRを行った。24サイクル行い、2.5%のアガロースゲルで電気泳動を行った。また、リアルタイムPCRも行い、増幅量を確認した。

3. 実験結果

光照射中にSAWを発生させることで、光架橋反応の効率に影響があるのか検討した。光照射中にSAWによる攪拌を行った(a)のサンプルと、光照射のみを行った(b)のサンプルを作製した。電気泳動の結果を見るとわかるとおり、SAWによる攪拌を発生させた(a)

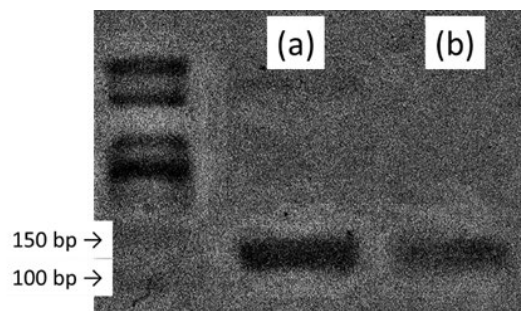


Fig.4 電気泳動の結果

(a) SAW を発生させながら UV を 5 分間照射したサンプル (b) UV のみを 5 分間照射したサンプル

Table1 リアルタイム PCR の結果

	Condition	Ct value	Concentration
(a)	UV+SAW	13.63	0.528
(b)	UV	17.40	0.041

のサンプルの方がバンドの色が濃くなった (Fig.4)。また、リアルタイム PCR の結果を見てみると、(a)の方が RNA 回収量が 12.9 倍となった (Table1)。このことから、SAW による攪拌によって、光架橋反応の効率がよくなったことが示唆された。

4. 結論

PPMPs の光架橋反応の効率を向上させるため、SAW による微小液体の攪拌を行った。使用した SAW デバイスには円筒状の反応セル (直径 5mm、溶液量 30 μ l) を設置し、415mW の電力供給を行って SAW を発生させた。その中で 366nm の光を 1600mW/cm² の放射照度で照射し、光架橋反応を行った。その結果、SAW による攪拌を行わなかった場合と比べて 12.9 倍 RNA を回収することができることがわかった。本技術はこれまでに手作業でしか行えていなかった生化学実験をすべて機械的に制御できることが特徴である。これは、これまで計測することのできなかつたシングル細胞レベルでの解析が可能となり、新たな知見を獲得することができると思われる。

4. 謝辞

本研究は、令和 3 年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝致します。

5. 参考文献

- (1) Ai-Lian Hei and Jian-Ping Cai : “Development of a Method for Concentrating and Purifying SARS Coronavirus RNA by a Magnetic Bead Capture System”, DNA and Cell Biology, Vol 24, 479-484 (2005).
- (2) Shuto Yajima, Ayako Koto, Maho Koda, Hiroaki Sakamoto, Eiichiro Takamura, and Shin-ichiro Suye : “Photo-Cross-Linked Probe-Modified Magnetic Particles for the Selective and Reliable Recovery of Nucleic Acids”, ACS Omega, 12701-12706 (2022).
- (3) Matthew Davis : “Picturing the elephant: Giant piezoelectric activity and the monoclinic phases of relaxor-ferroelectric single crystals”, Journal of Electroceramics, Vol 19, 25-47 (2007).
- (4) N. Setter, D. Damjanovic, L. Eng, G. Fox, S. Gevorgian, S. Hong, A. Kingon, H. Kohlstedt, N. Y. Park, G. B. Stephenson, I. Stolitchnov, A. K. Taganstev, D. V. Taylor, T.

- Yamada, and S. Streiffer : “Ferroelectric thin films: Review of materials, properties, and applications”, *Journal of Applied Physics*, Vol 100, 051606 (2006).
- (5) Q. M. Zhang, Vivek Bharti and X. Zhao : “Giant Electrostriction and Relaxor Ferroelectric Behavior in Electron-Irradiated Poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) Copolymer”, *Science* Vol 280, 2101-2104 (1998).
 - (6) W. A. Smith and B. A. Auld : “Modeling 1-3 composite piezoelectrics: thickness-mode oscillations”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol 38, 40-47 (1991).
 - (7) Shujun Zhang and Fei Li : “High performance ferroelectric relaxor-PbTiO₃ single crystals: Status and perspective”, *Journal of Applied Physics*, Vol 111, 031301 (2012).
 - (8) Achim Wixforth : “Acoustically driven planar microfluidics”, *Superlattices and Microstructures*, Vol 33, 389-396 (2003).
 - (9) Tsunemasa Saiki, Katsuhide Okada and Yuichi Utsumi : “Micro liquid rotor operated by surface-acoustic-wave”, *Microsystem Technologies*, Vol 16, 1589-1594 (2010).
 - (10) Tsunemasa Saiki, Katsuhide Okada and Yuichi Utsumi : “Highly Efficient Liquid Flow Actuator Operated by Surface Acoustic Waves”, *The Institute of Electrical Engineers of Japan Transactions on Electronics, Information and Systems*, Vol 130, 1717-1722, (2010)