

染色体を伸長解析する バイオチップの微細加工と応用

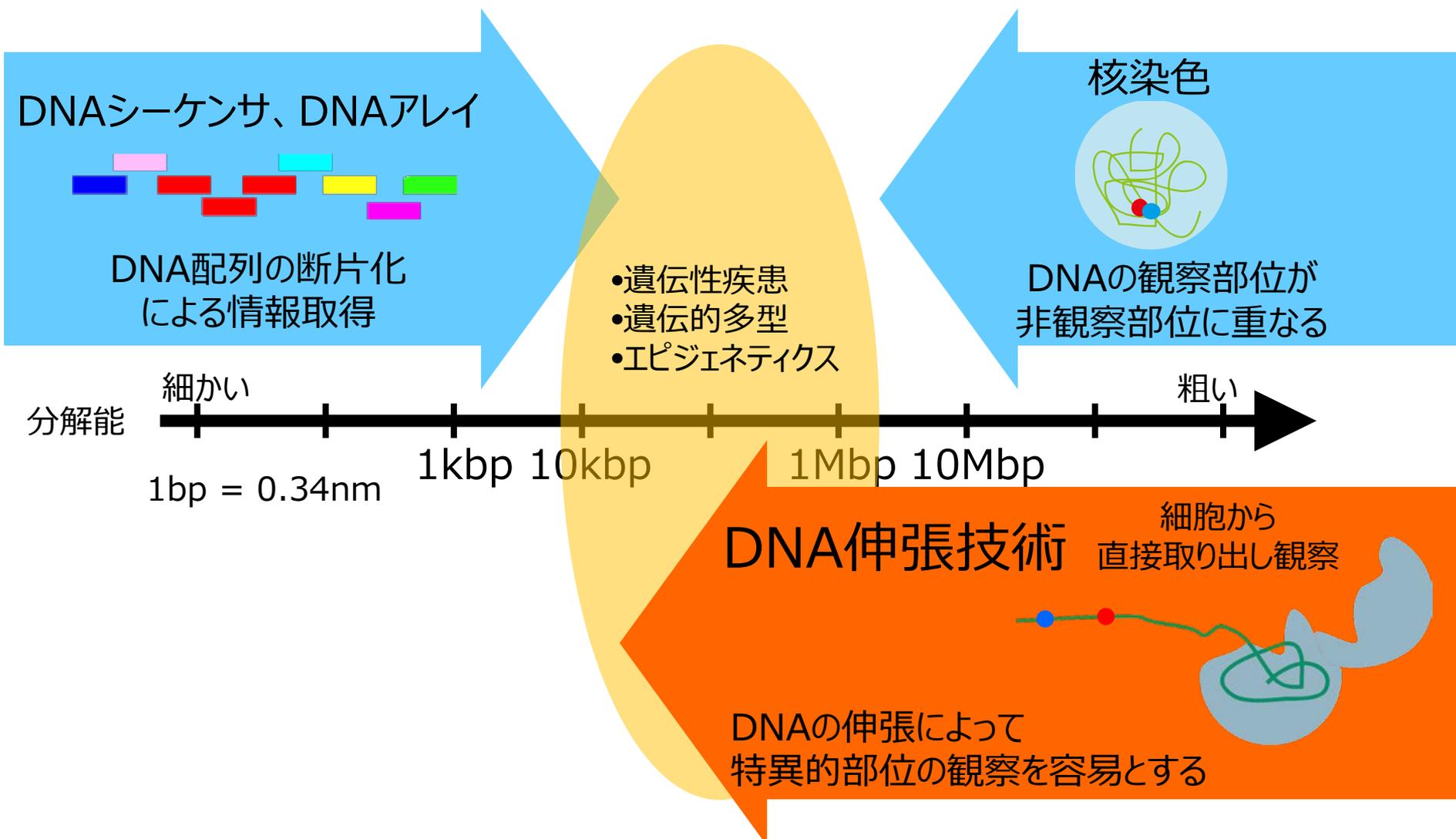


群馬大学 大学院理工学府 知能機械創製部門

教授 鈴木孝明

大学 MEMS

検索



DNAを伸張することで高分解能化



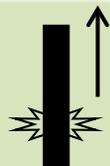
処理能力
操作性

ターゲット領域

複数サンプルの評価・操作の簡単化

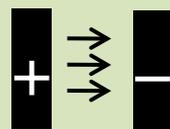
制御性

Meniscus
on a glass slide



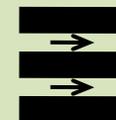
X. Michalet et al., *Science*, 1997

EOF



K. Terao et al.,
J. Physics. Condensed. Matter., 2006

Nano-
channel



H. Barseghyan et al., *Genome Medicine*, 2017

Laser

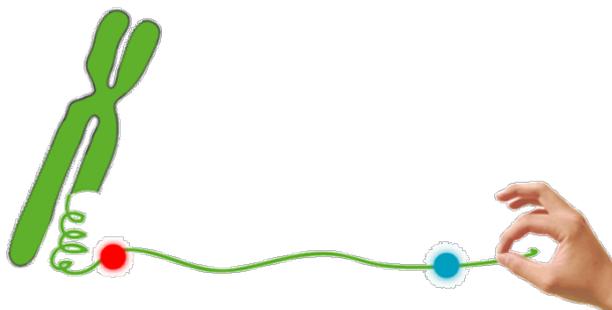


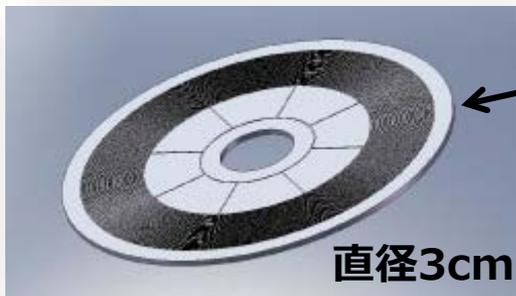
K. Hirano et al., *Appl. Phys. Lett.*, 2002

STM

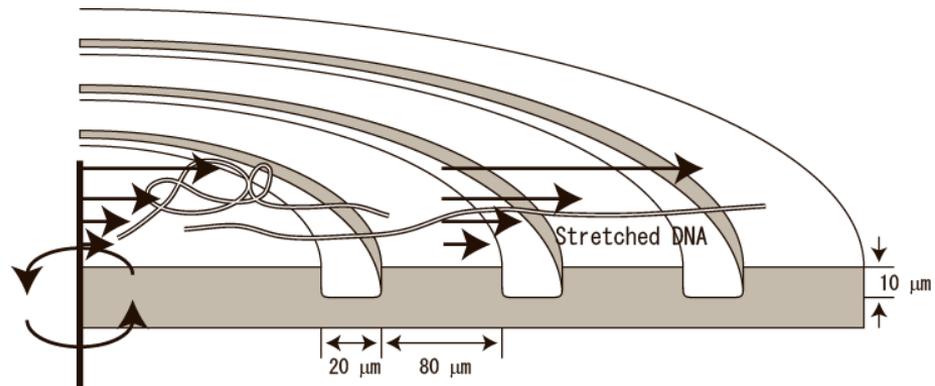


C. Bustamante, *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 1991





Point
マイクロ凹凸構造
(レコード盤の溝)



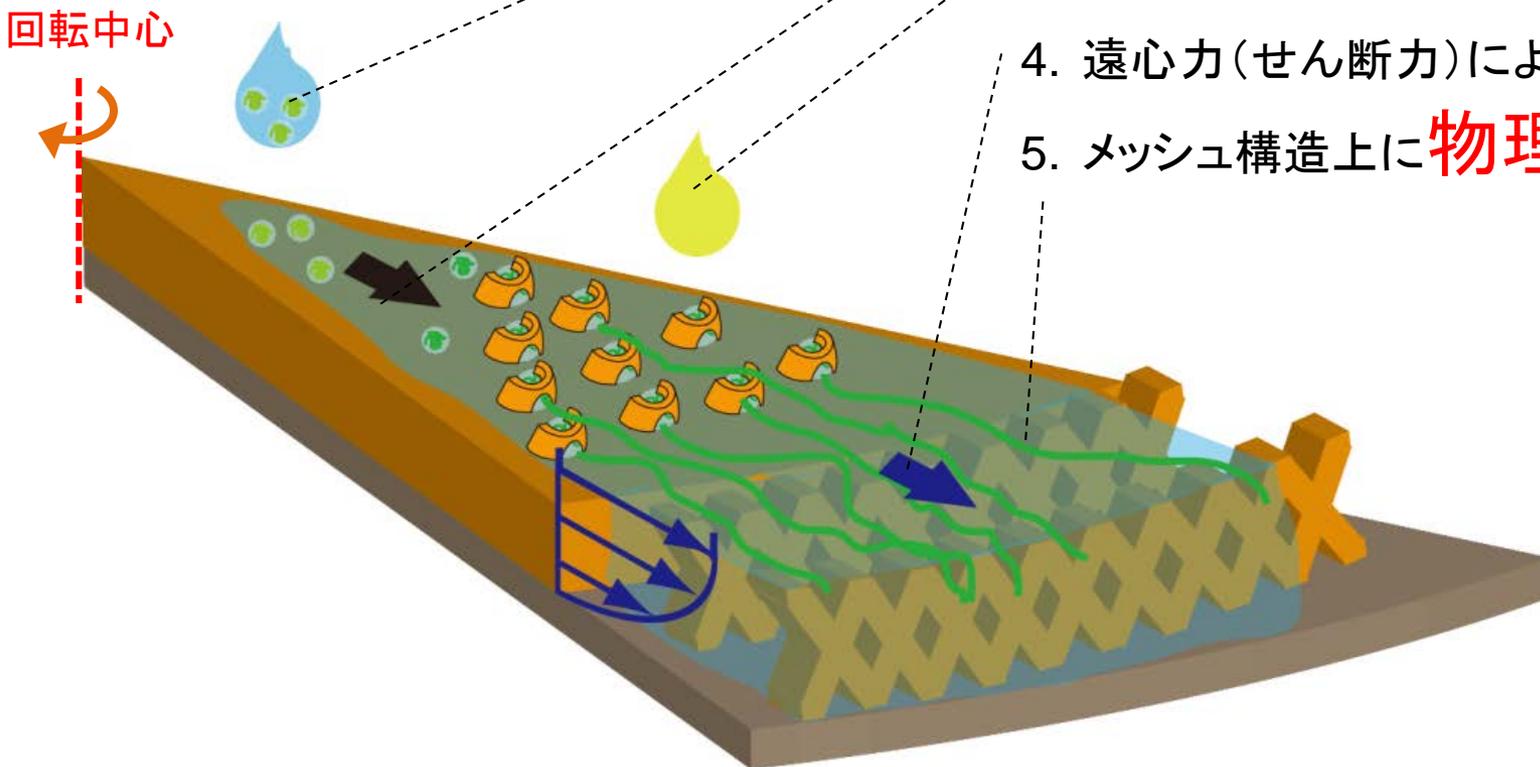
レコード盤によるイメージ映像





末梢血 → 細胞固定 → 取り出し → 伸張固定 → 可視化 → 顕微鏡

1. 細胞懸濁液の**滴下**
2. 遠心力により細胞を固定構造に**固定**
3. 溶解液による染色体の**取り出し**
4. 遠心力(せん断力)により**伸張**
5. メッシュ構造上に**物理吸着固定**

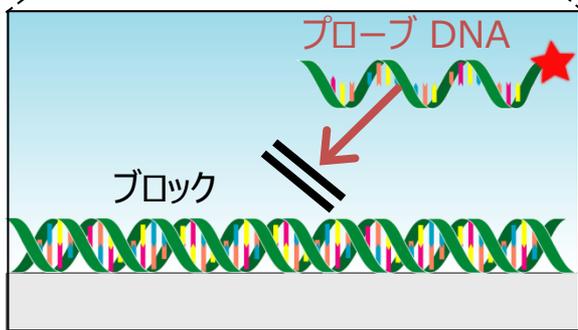


細胞の固定から染色体の伸張までを1チップ上で実現



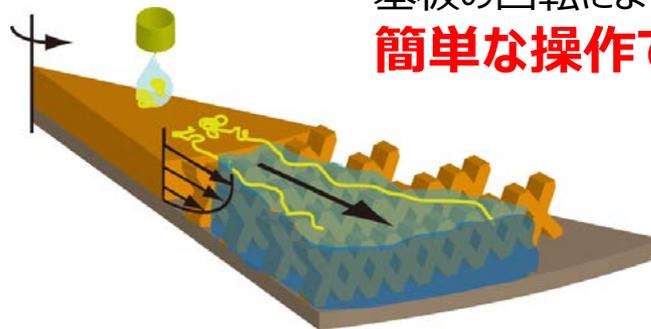
従来法における問題点

スライドガラス浸漬法



染色体全体が基板に張り付くため、DNAプローブの結合が難しい

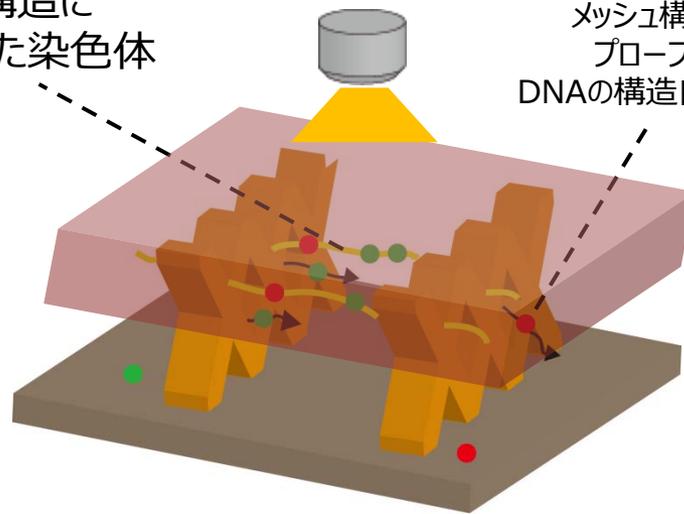
基板の回転によって複数の染色体を
簡単な操作で伸張



均等に整列
V字構造に
固定された染色体

高い結合効率

メッシュ構造の間を
プローブが拡散
DNAの構造自由度が高い



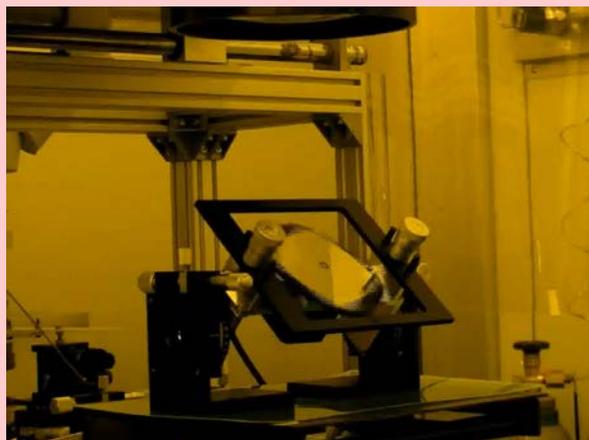
特異的結合のみを検出

顕微鏡の焦点深度を用いた観察



3Dリソグラフィ法

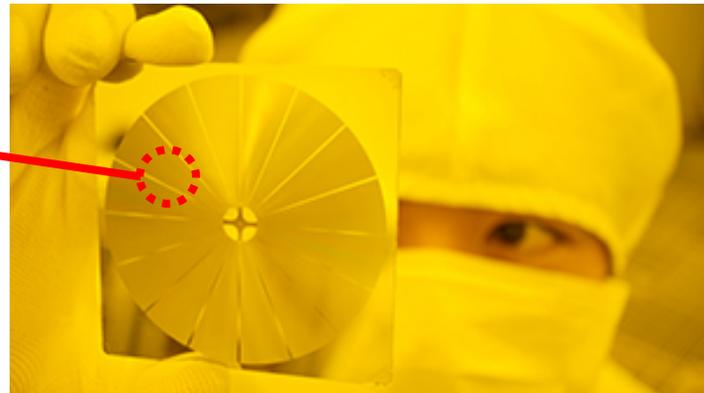
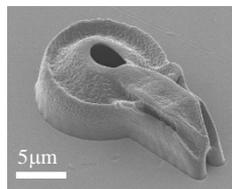
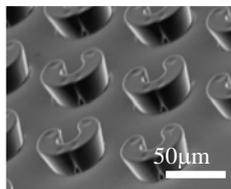
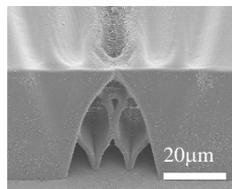
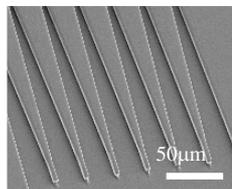
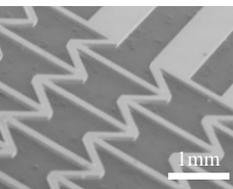
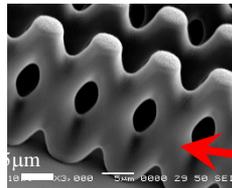
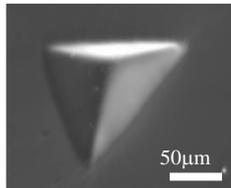
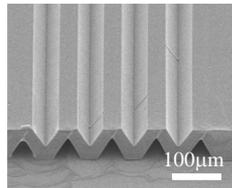
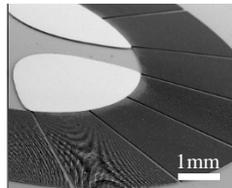
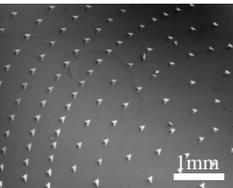
半導体製造
(2次元10 μ m以下)

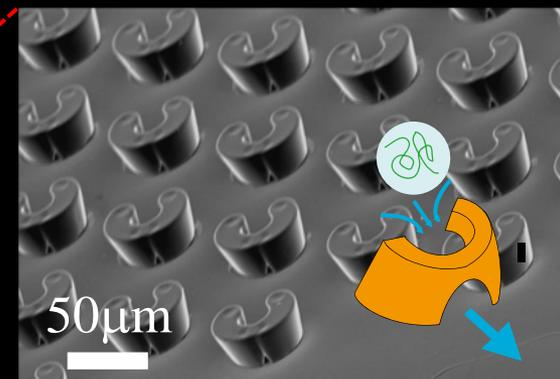
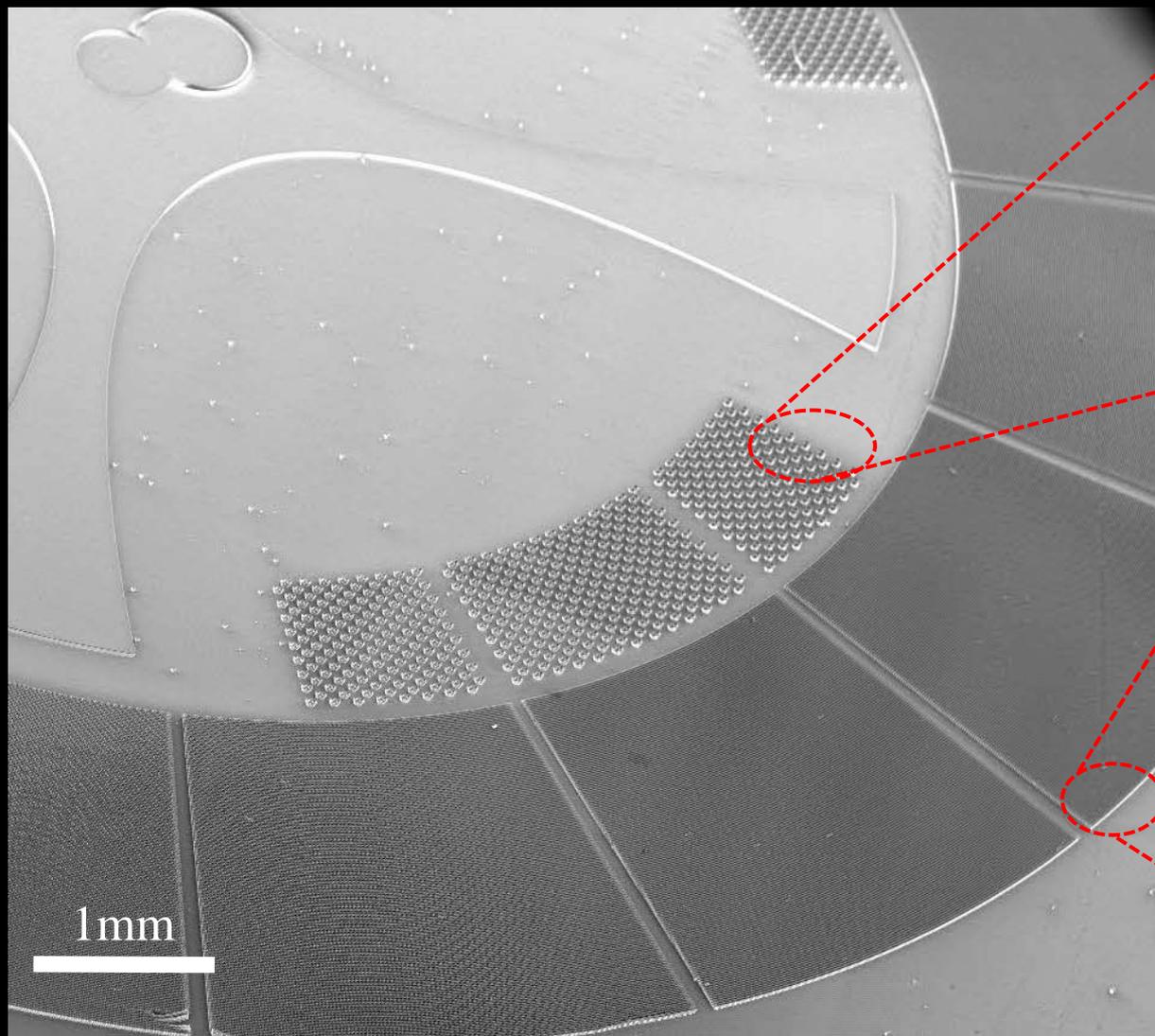


機械加工
(3次元100 μ m以上)

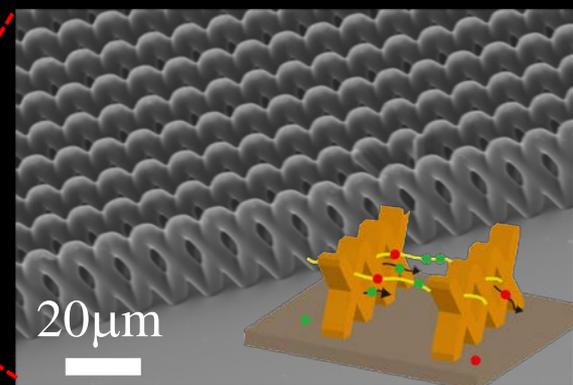
3Dマイクロ構造・ハイスループット・大面積加工

日本特許第5458241号、US Patent 8871433
文部科学大臣表彰・若手科学者賞（2015年）



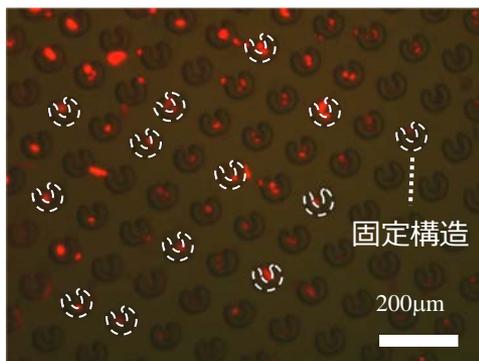


細胞固定構造
開口径: 24μm

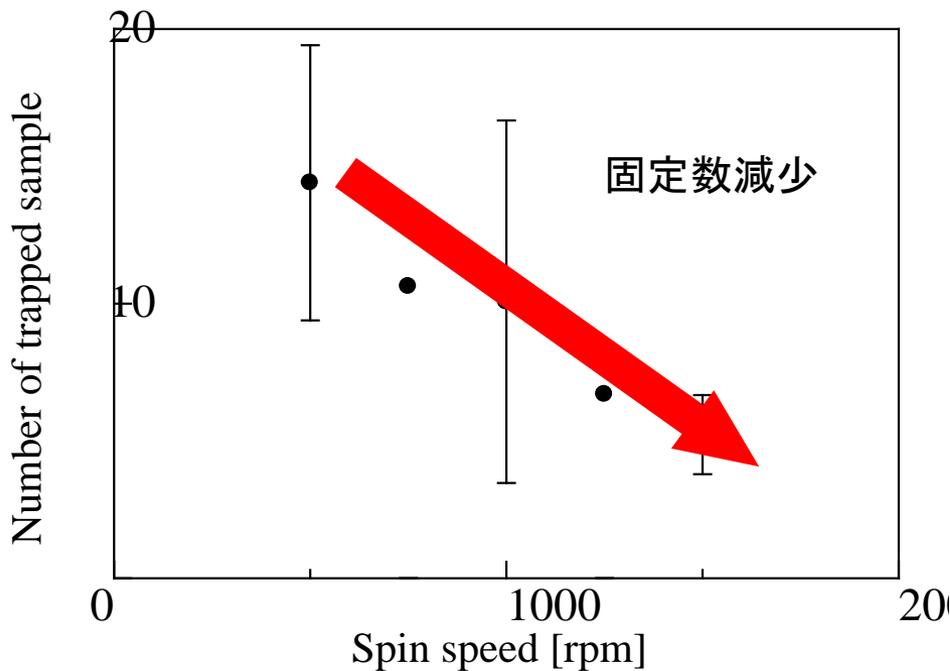
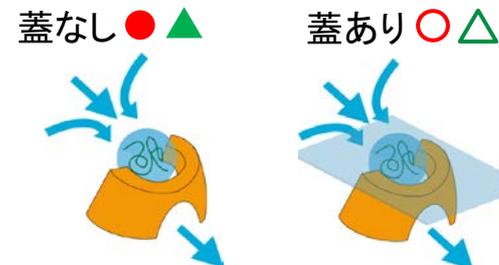


メッシュ構造
メッシュ高さ: 25μm

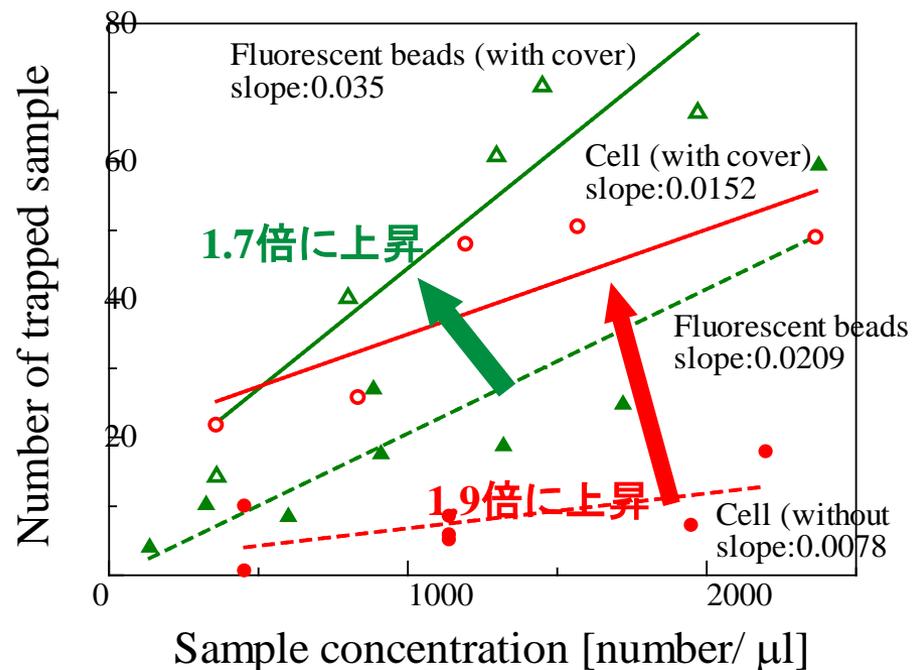
射出成型で大量生産可能な別形状も設計済み



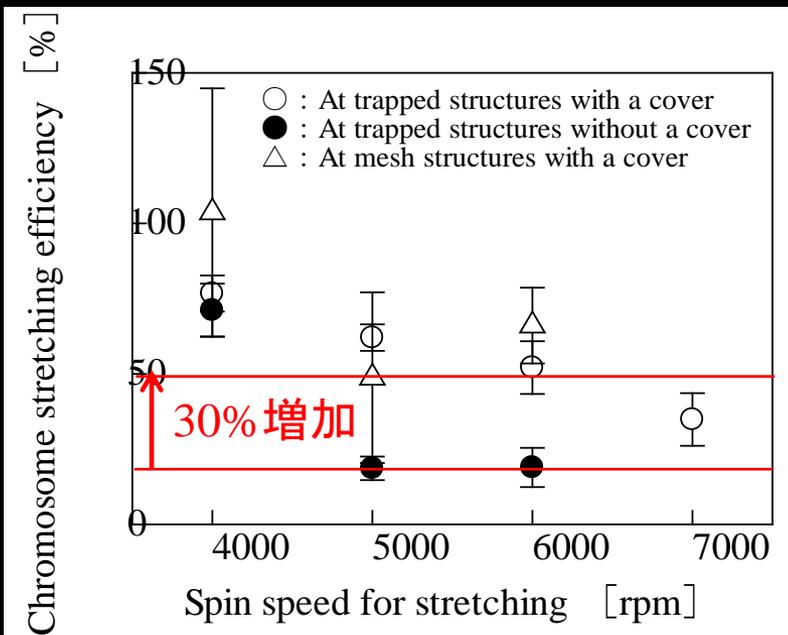
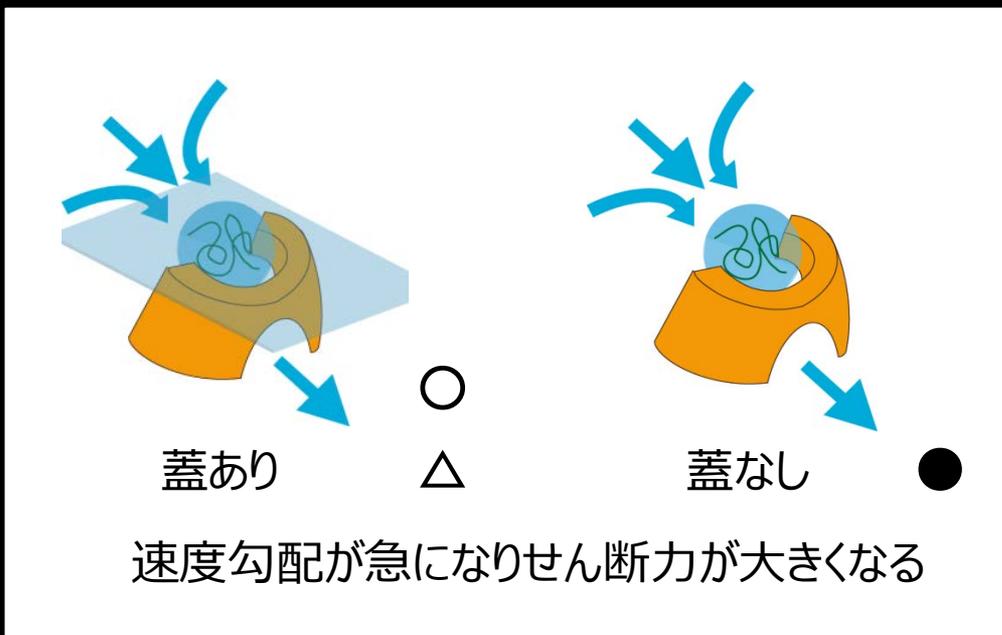
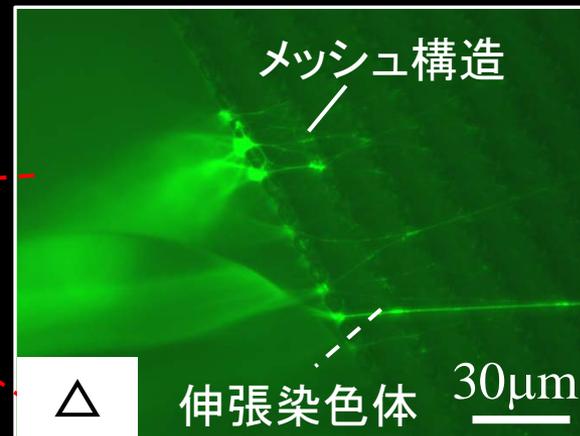
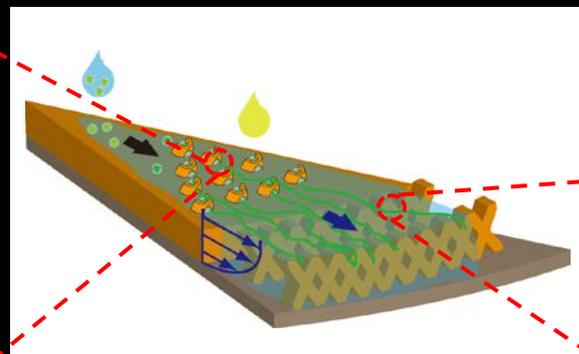
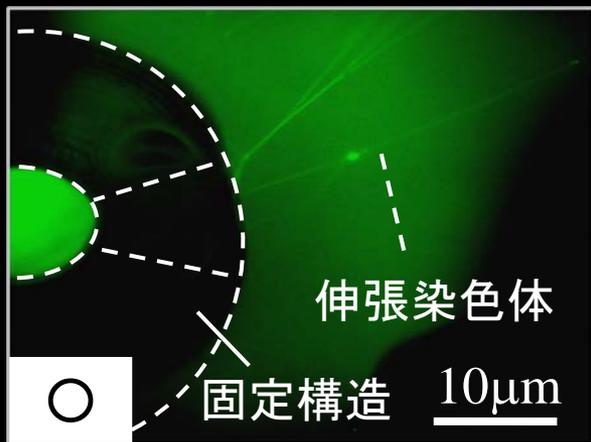
HeLa細胞 直径 10~15μm (DiI染色)



回転数が大きいと遠心力が強くなり
固定構造の上をビーズが通過しやすくなる

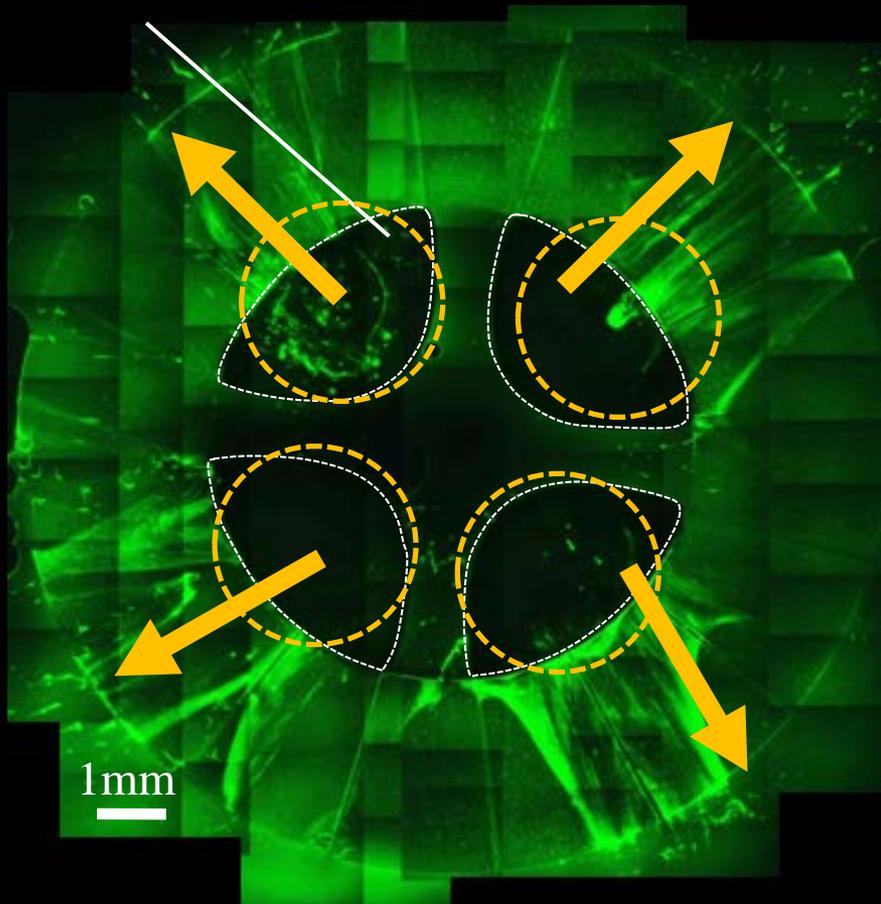


蓋によりデバイス回転時の流れが
固定構造の穴部を通過しやすくなり固定数が上昇

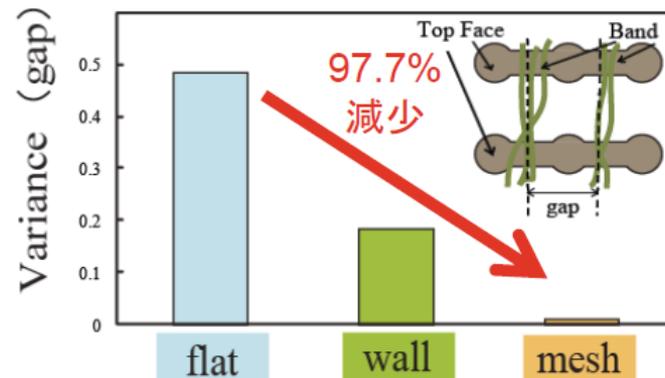


HeLa細胞より抽出した染色体を、YO-PRO-1染色液により蛍光染色

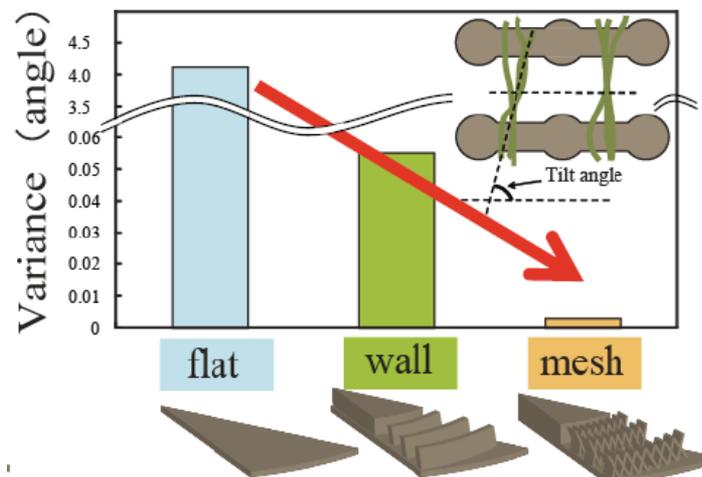
滴下台



バンド間隔



伸張方向

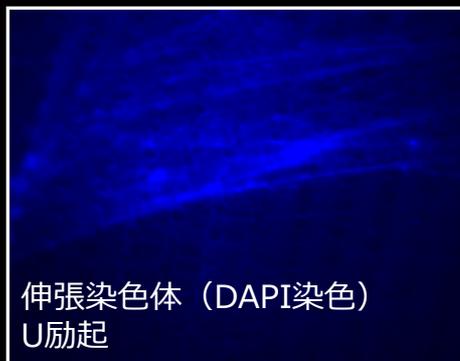


チップの回転のみで複数染色体を同時に伸張固定



myc遺伝子
全長: 291kbp (98.94 μm)
役割: 遺伝子情報の転写を抑制する
特徴: 変異すると細胞が癌化する

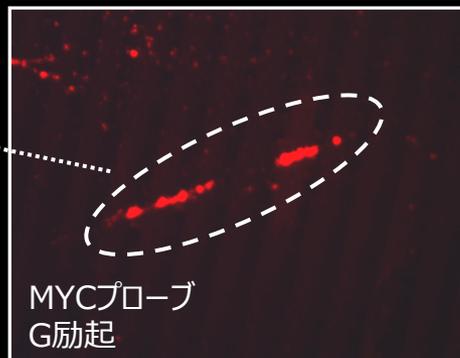
プローブ結合時間: 1時間



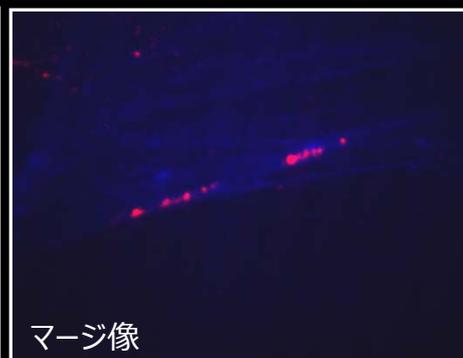
伸張染色体 (DAPI染色)
U励起



CENプローブ
B励起

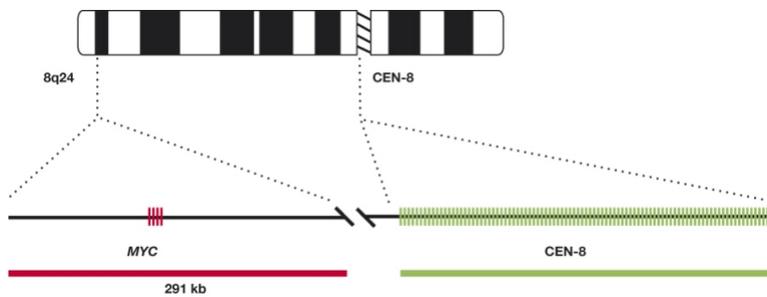


MYCプローブ
G励起



マージ像

30μm



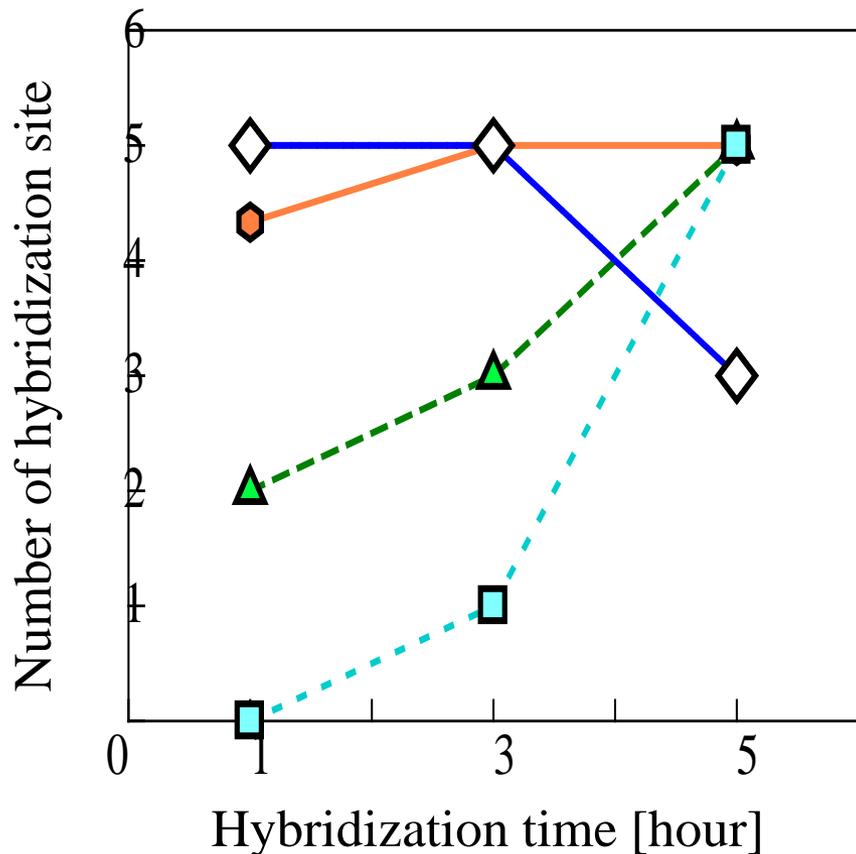
MYC/CEN-8 FISH Probe Mix (Dako社)

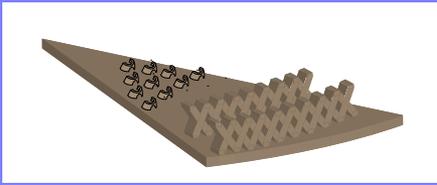
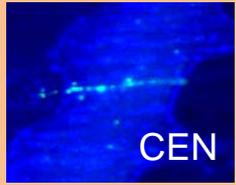
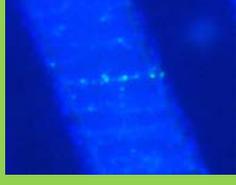
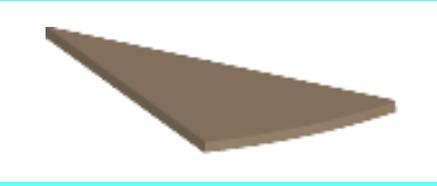
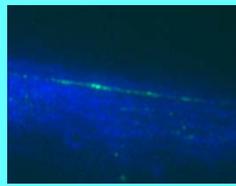
	伸張長さ [μm]	伸張長さ割合 [%]
	85	86
	61	62
	83	84
	40	40
	73	73
平均	68	69
SD	16.6	16.9



FISHプローブミックスを用いて染色体の特異部位の観察

10μm



<p>◇ Mesh cell</p>   <p>MYC</p>
<p>◡ mesh</p>   <p>CEN</p>
<p>△ wall</p>  
<p>□ flat</p>  

細胞の固定から染色体解析までを1チップ上で短時間で行うことが可能



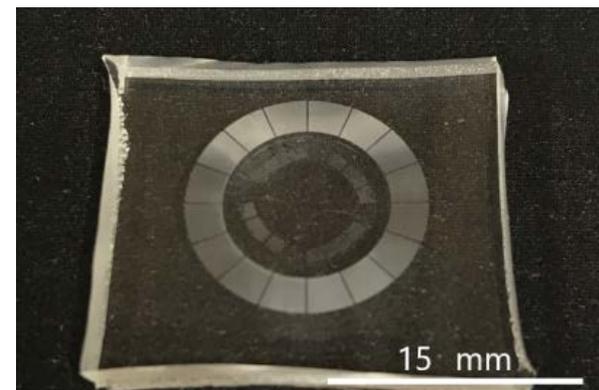
当該技術の特徴

- DNAを断片化せず（インタクト）に、染色体の特定部位の長さを可視化
- ゲノム全体の配列決定ではなく、特定遺伝子の迅速検出
- 使い捨て可能なチップを卓上遠心するだけの簡易操作



想定される用途

- 染色体異常検出：転座
- テロメア長計測：遺伝子年齢、老化
- その他：ウイルス特定、食品衛生管理、生態系保全...



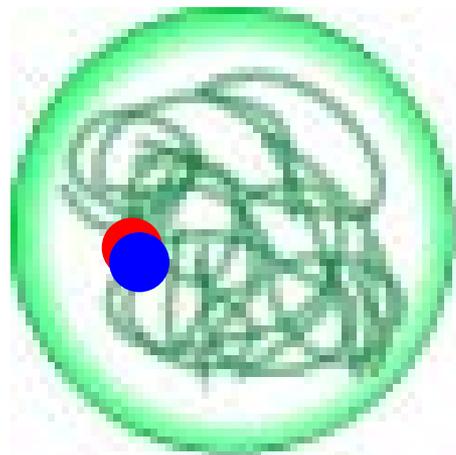
転写成型使い捨てチップ



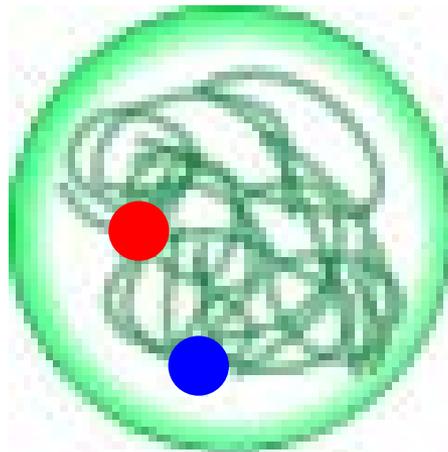
臨床診断における特異部位（転座）の観察

myc遺伝子 : 291kbp (98.94μm)

従来法 : nuc ISH

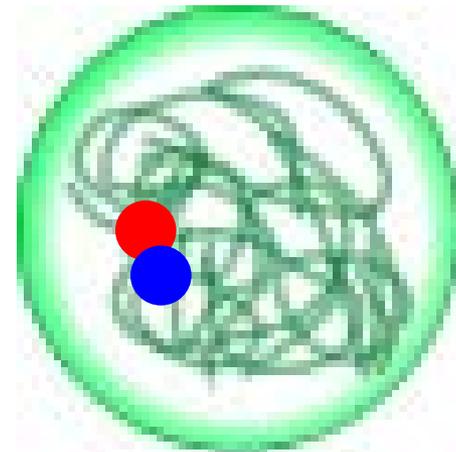


理想 陰性
正常な細胞核



遠い（転座）

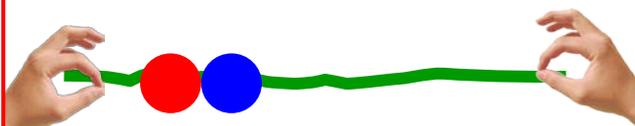
高尤度 陽性
例 腫瘍細胞中のMyc 遺伝子



近い? 遠い?

偽陰性

提案法 : ファイバー FISH



DNA fiber



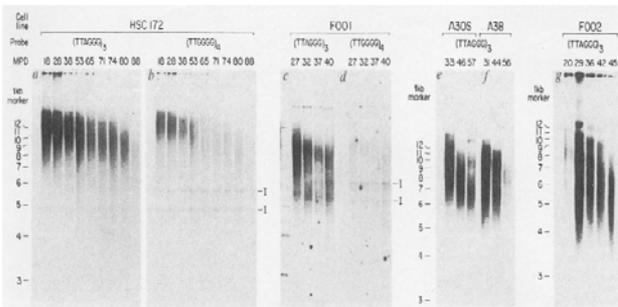
遠い!

陽性だった!



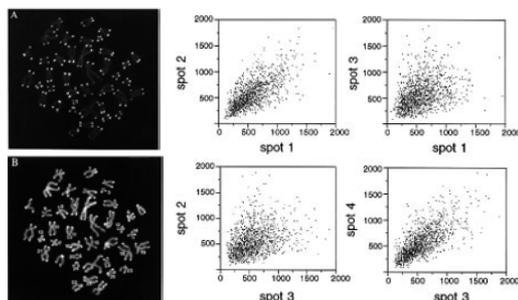
テロメア長 (ヒト: 5~15 kbp, 1.7~5.1 μm) 測定 (遺伝子年齢、老化、ガン化)

サザンブロット法



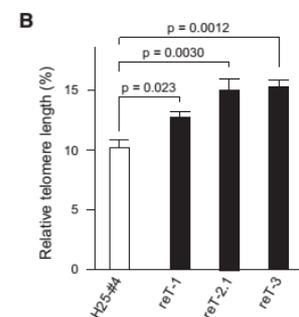
Harley, C.B et al.,
Nature, 345, 458-460, 1990.

Q-FISH法



Lansdorp, P.M et al.,
Hum. Mol. Genet., 5, 685-691, 1996.

フローサイトメトリー法



T.Nishimura et al.,
Cell Stem Cell., 12, 114-126, 2013.

	サザンブロット法	Q-FISH法	フローサイトメトリー法	提案法
簡易性 (測定・評価)	△ (画像解析)	× (蛍光画像解析)	○ (蛍光画像解析)	○ (蛍光画像解析)
再現性	×	○	○	○
正確性	×	○	○	○
必要細胞数	10 ⁶ 個以上	10 ⁵ 個程度	10 ⁵ 個程度	10 ⁵ 個程度
評価方法	絶対評価	相対評価	相対評価	絶対評価

簡易性や再現性において信頼できる絶対評価法が求められている



再現性向上

- チップ構造の最適化
- 親水化処理（材料検討）

➤ 材料メーカー、加工メーカーとの新材料や表面処理に関する共同研究

応用例の構築（基礎医学研究⇒臨床応用検討）

- 染色体異常検出：転座
- テロメア長計測：遺伝子年齢、老化、ガン化
- その他応用探索：ウイルス特定、食品衛生管理、生態系保全・・・

➤ 遺伝子検査関連企業（製造・販売・受託試験）との共同研究やライセンス
想定ユーザー（基礎実験ツール、応用探索）との共同研究

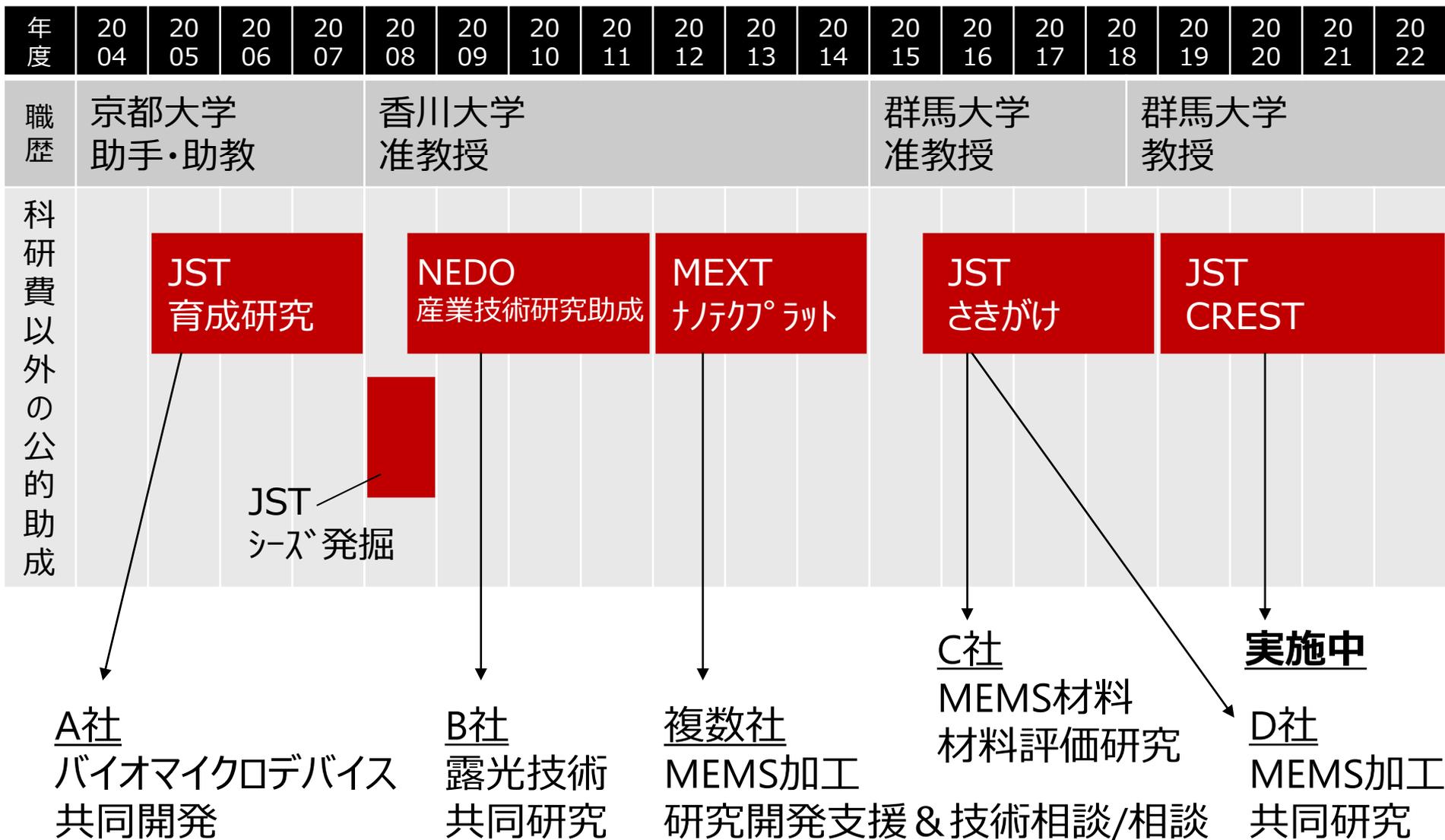
キットの開発

- 様々な種類のサンプルからのDNA抽出と精製（迅速・簡易）
- DNAプローブなどのラベリング
- データ収集と解析
- 製造、販売（ラボツールレベル～）

➤ バイオ・検査機器・実験機器の製造メーカーとの共同研究やライセンス



- 発明の名称 : 直鎖状化合物伸長用基板および方法
- 特許登録番号 : 特許第5661984号
- 特許権利者 : 群馬大学
- 発明者 : 鈴木孝明、福家有子



微細加工、MEMSデバイス開発：共同研究、ライセンス、支援、相談、いずれも経験あり



群馬大学 産学連携・知的財産活用センター

〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1 - 5 - 1

TEL 0277-30-1171~1175

FAX 0277-30-1178

e-mail tlo@ml.gunma-u.ac.jp

こちらのサイトもご覧下さい

検索

