

Title	微小テーパ状流路を用いた細胞からのDNAの抽出及び回収
Author(s)	結城, 興仁
Citation	
Issue Date	2005-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3170
Rights	
Description	高村, 材料科学研究科, 修士

微小テーパ状流路を用いた細胞からの DNA の抽出及び回収

結城 興仁 (高村研究室)

【緒言】

微小流路中のテーパ状のチャンネルに電界と圧力を逆向きに印加した時、テーパの狭小部から広大部の近接で長鎖の DNA が選択的にトラップする。この DNA トラップで溶液からの長鎖の DNA の回収、洗浄、培地交換がチップ上で容易に可能となり、細胞破碎液からの DNA の抽出が簡便化されることが期待されている。しかし、実際に細胞中の DNA を遊離させ、様々な夾雑物の存在下での抽出は未だ達成されていない。本研究では Jurkat 細胞を用いて、破碎させた細胞から DNA の抽出、濃縮操作を行い、また、PDMS チップ中にバルブを作製することにより濃縮した DNA の回収を試みた。

【実験方法】

PDMS デバイスの作製法は次の通りである。フォトリソグラフィー技術により、シリコン基板上に流路パターンを作製し、これを鋳型として、PDMS で硬化することで流路構造が転写された PDMS シートが作製される。これをガラス、もしくは他の PDMS シートと貼り合わせることで PDMS デバイスが作製される。作製したデバイスの形状は幅 100 μm 、狭小部の幅 10 μm 、高さ 10 μm の流路構造となっている。バルブシステムは PDMS で作製され三層構造になっている。DNA 溶液が流れる流路層を第 1 層、PDMS をスピコートにより薄膜とした中間膜を第 2 層、空気が通る層を第 3 層とし、シリンジポンプにより空気層の流路を減圧することで、2 層の中間膜を持ち上げ、1 層の溶液が流れる機構となっている。

細胞の破碎方法は低張液破碎法と界面活性剤による破碎法を検討した。低張液破碎法は Jurkat 細胞に低張液(0.075 M KCl)を加えた後、純水を 1 ml 加え破碎させた。界面活性剤による破碎法は Jurkat 細胞に 0.01 % SDS を 1 ml 加えて細胞を破碎させた。それぞれの破碎液中の DNA を蛍光色素 YOYO1 で染色し、0.5 TBE 緩衝液中に 1.6×10^6 個/ml なる様に調整した。PDMS デバイスに破碎した細胞溶液をいれ、圧力と電界を印加し、DNA を抽出し、濃縮した。そして、濃縮した DNA をバルブ操作により回収用流路に引き込んだ。

【結果】

作製した PDMS デバイスに、細胞破碎液を流し、圧力と電界を印加したところ、低張液、界面活性剤の両方の破碎液で DNA のトラップ・濃縮が確認できた。このうち、界面活性剤による破碎法でより高いトラップ効率を得ることができた。

Fig. 1. に DNA の濃縮、回収の様子を示す。

細胞から DNA を抽出、濃縮し、それをバルブ操作により回収することができた。そして、PCR により回収溶液中の DNA の濃縮の度合いを検討したところ、トラップ操作をおこなったものとおこなっていないものでは、反応生成物の量に違いがみられ、このデバイスの有効性が確認できた。

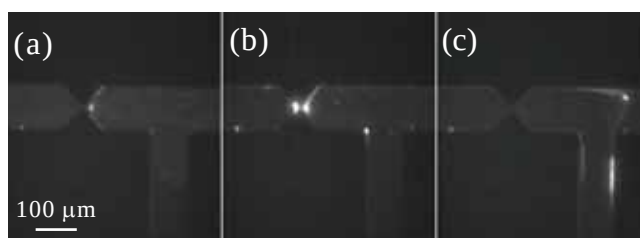


Fig. 1. DNA の抽出と回収の蛍光写真。実験条件は圧力を 10 kPa、電圧を 110 V で行った。

発表状況：応用物理学会(第 54 回、H16.3) 化学とマイクロ・ナノシステム研究会(第 9 回; H16.5)

NT2004 (H16.9) Micro TAS 2004 (H16.10) 日本化学会北陸支部大会(H16.11) 日本化学会(H17.3 発表予定)

Keywords: DNA トラップ, DNA 抽出, 選択的トラップ, 微小流体デバイス