

課題番号 : F-16-KT-0135
利用形態 : 機器利用
利用課題名(日本語) : 等速電気泳動を用いた一細胞スケール RNA 抽出における効率の評価
Program Title(English) : Extraction efficiency of RNA at single cell level via microfluidic isotachopheresis
利用者名(日本語) : 新宅 博文
Username(English) : H. Shintaku
所属名(日本語) : 京都大学大学院工学研究科
Affiliation(English) : Graduate School of Engineering, Kyoto University

1. 概要(Summary)

一細胞解析では、DNA や RNA を抽出あるいは精製するといった前処理が必要であり、この前処理の自動化にマイクロ流路が利用されている。Shintaku らは、バルブなどのない単純な十字型マイクロ流路中で、電気穿孔により細胞膜を選択的に破碎し、ITP (isotachopheresis) により、一細胞から cytoplasmic RNA を抽出する方法を開発した。ITP は、検体よりも電気泳動移動度が大きい先行イオンを含む溶液(Leading Electrolyte, 以下 LE)と電気泳動移動度が小さい終端イオンを含む溶液(Trailing Electrolyte, 以下 TE)をマイクロ流路に配置し、直流電場を印加することで LE-TE 界面にその中間の移動度を有する検体を濃縮しつつ下流に搬送できる技術である。ITP の濃縮効果によって核酸のマイクロ流路表面への非特異吸着量が増加し、抽出効率の低下を招く可能性が予想される。そこで本研究では、ITP を実施する電場やマイクロ流路の表面性状が、核酸の非特異吸着に及ぼす影響について検討した。

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】

両面マスクアライナー

【実験方法】

Si 基板上に塗布したレジストに、両面マスクアライナー露光装置を用いてマスク上の流路パターンを照射した。その後現像を行って作製した流路のモールドを鋳型として PDMS 製のマイクロ流体デバイスを作製した。

3. 結果と考察

ここでは、非特異吸着を二次反応として、マイクロ流路内部に満たした RNA を ITP により回収する数理モデルを構築し、RNA の初期濃度、流路の表面性状、電場条件を変数として抽出効率への影響を考察した。さらに種々の表面性状を有するマイクロ流路を試作し数理モデルに対応する RNA の抽出実験を行った。RNA の回収

量は RT-qPCR により定量し、抽出過程における RNA の損失量から、RNA の流路表面への非特異吸着量を推算した。以上から、RNA の抽出に適した電場条件および流路表面を検討した。

4. その他・特記事項(Others)

特になし。

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

- (1) 招待講演 : Hirofumi Shintaku, Electrical Fractionation Of Cytoplasmic RNA And Nucleus From Single Cells For Parallel RNA and DNA Analyses, 2nd Annual Next Generation Sequencing & Single Cell Analysis USA Congress, Boston, MA, USA, October 4th (2016).
- (2) Mahmoud Nady Abdel-Moez Atta, Kei Iida, Yusuke Oguchi, Sotaro Uemura, and Hirofumi Shintaku, Integrated nuclear and cytoplasmic RNA sequencing of single cells, Advances in Genome Biology and Technology (AGBT) General Meeting, Hollywood, FL, USA, 13rd-16th, February (2017).
- (3) Sangamithirai Subramanian Parimalam, Ruji Yokokawa, Hidetoshi Kotera and Hirofumi Shintaku, Massively parallel quantification of miRNA in single cells via duplex-specific nuclease reaction in pico-liter wells, 2016 International conference of Microfluidics, Nanofluidics, and Lab-on-a-chip, Dalian, China, 10th June (2016), pp.287-288(Track13-292).

6. 関連特許(Patent)

- (1) 新宅博文, 藁谷卓哉, 上村想太郎, 小口祐伴, 特許出願済み。