

SPMによるプラスミドDNAの観察

Observation of plasmid DNA by SPM

生体の遺伝情報を担うDNA (デオキシリボ核酸) は、SPM (走査型プローブ顕微鏡) による観察対象として興味深い生体高分子であり、AFM (原子間力顕微鏡) の開発当初より多くの研究者によって報告されてきました^(*)。

右図 (Fig.1) は、遺伝子組換え等のベクター^(*)として利用される環状のプラスミド^(*) DNA分子 (pGEM-3Zf(+), Promeg、a社製) を島津SPM-9500J2により、天然マイカ基板上、大気中、ダイナミックモードAFMにて観察した三次元像です。

プラスミドDNA試料の処理手順をFig.2に示しています。

DNA分子を観察する際には、

一般的なマイカ基板 (muscovite、 $[KAl_2(OH)_2AlSi_3O_{10}]$) 表面は負電荷を帯びているため、基板とDNAのリン酸基との親和性を高めるためにMg等の二価金属イオンを試料溶液に加えます。また、マイカ基板表面は新鮮劈開面で、表面が充分清浄であることが必要です。このプラスミドDNAは約3000塩基対からなり、画像上から計測される約1ミクロンの周囲長は、X線回折等による解析から良く知られている基本単位長 (3.4 /塩基対) (Fig.3) からの計算値と良く一致しています。

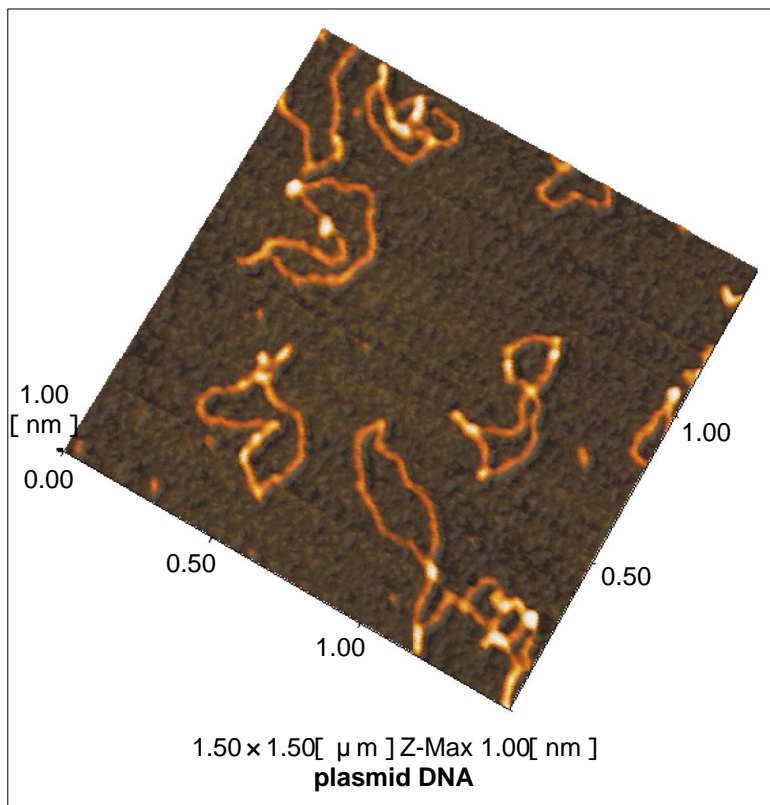


Fig.1 プラスミドDNAの三次元像
AFM image of plasmid DNA

プラスミドDNAを10mM MgCl₂で希釈し、約2ng/μL程度の濃度に調製する

天然マイカ基板を適当なサイズ（10mm角以下）に切り、試料ホルダに固定する

マイカの新鮮劈開面を得るために、針先をマイカの側面から挿入して静かにはがし、
新しい表面が露出されるようにする

20μLの純水をマイカ基板に滴下し、10秒間放置後、試料ホルダを振り溶液を除く（洗浄）

20μLの10mM MgCl₂を滴下し、10秒間放置後、溶液を振り除く（DNAの吸着を高める）

希釈されたプラスミドDNAを5μL以下の量で滴下し、5分間放置後、溶液を振り除く

20μLの純水を滴下し、10秒間放置後、溶液を振り除く（洗浄）

20μLの純水を滴下し、10秒間放置後、溶液を振り除く（洗浄）

10～15分放置して風乾、あるいは減圧乾燥後、SPM-9500J2にて観察する

Fig.2 プラスミドDNA試料の処理手順（一例）

SPMは、電子顕微鏡に匹敵する高い空間分解能を持ちながら、大気中、溶液中、生理的環境下等さまざまな条件のもとでの観察を可能とします。

今後、SPMを利用して、

- ・カーボンナノチューブ探針による高分解能観察
- ・DNA-蛋白質相互作用の測定
- ・試料表面の化学特性のマッピング

など、他の手段では得ることのできないデータの取得が期待されています。

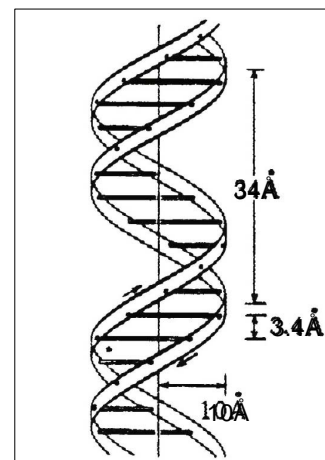


Fig.3 DNAの分子構造モデル
Molecular model of DNA

(*1)参考資料

Atomic Force Microscopy for Biologists, V.J. Morris, A.R. Kirby, A.P. Gunning,
Imperial College Press, 1999

(*2, *3)遺伝子組換え操作で特定の遺伝子や塩基配列を別の細胞などに導入するために使用される特殊な機能を有する分子はベクターと呼ばれ、このような遺伝子組換え操作においては、閉鎖環状の二本鎖DNAであるプラスミドが最も頻繁に利用されている。

⊕ 島津製作所 分析計測事業部

島津総合分析試験センター

● 京都 ☎(075)823-2355
● 秦野 ☎(0463)88-8680

SHIMADZU CORPORATION
INTERNATIONAL MARKETING DIVISION

3, Kanda-Nishikicho 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8448, Japan
Phone : (03) 3219-5639 FAX : (03) 3219-5710
Cable Add. : SHIMADZU TOKYO

4701-02408-500-1K