

※課題番号 : F-12-WS-0008
※支援課題名 (日本語) : 金ナノドット集積化電気泳動分析用ポリマーマイクロチップの作製
※Program Title (in English) : Development of gold nanodots-integrated polymer microchips for electrophoretic analysis
※利用者名 (日本語) : 末吉 健志, 大塚 浩二
※Username (in English) : Kenji Sueyoshi, and Koji Otsuka
※所属名 (日本語) : 京都大学大学院工学研究科
※Affiliation (in English) : Graduate School of Engineering, Kyoto Univ.

※概要 (Summary) :

近年、マイクロチップ電気泳動 (MCE) による DNA 分析において、微小流路内へのナノ構造体の形成による分離能の制御に関する研究が盛んに行われている [1-3]。そこで、本研究では、マイクロ流路内に金ナノドットパターンが集積化された電気泳動分析用マイクロチップを作製し、金ナノドットパターン周囲において電場印加時に発生する誘電力を利用した DNA の高速分離に関して基礎的な検討を行った。

※実験 (Experimental) :

実験には、以下の装置を用いた。

- ・ CCP-RIE (サムコ製 RIE10NR)
- ・ マスクレス電子線描画システム (エリオニクス 7700)
- ・ ICP-RIE (サムコ製 RIE-101PH)
- ・ コンタクトアライナ (ズース製 MA6)
- ・ DEEP-RIE (住友精密製 STS-RIE 100W SR)
- ・ 真空蒸着装置 (EBX-6D)
- ・ エキシマ照射装置 (ウシオ)
- ・ ウェハボンダー (Suss MicroTec)

MCE 分析:

- ・ 5 チャンネル高圧電源 (島津製作所)

蛍光画像解析:

- ・ 倒立型顕微鏡 (オリンパス)
- ・ CCD カメラ (日立製作所)

LIF 検出:

- ・ 多チャンネル型光検出器 PMA-12

(浜松フォトニクス)

これらの装置を用い、COP 製の金ナノドット集積化チップは以下の手順によって作製した。

まず、電子線描画によってナノドットパターン保護膜

を作製した。続いて、誘導結合型 RIE によって、シリコンをエッチングし、シリコン基板上にナノドットパターンを形成させた。さらに、deep RIE によって流路部以外のシリコンをエッチングし、レジストを除去してナノドットパターンを有する凸型鋳型とした。作製した鋳型を COP 基板に熱転写した後、ナノドットパターン部にのみ金を電子線熱蒸着し、金ナノドットパターンを形成させてから、蓋側の COP 基板を張り合わせた。

上記のナノ加工技術によって作製した金ナノドット集積化チップの流路形状およびドットパターンの概略を図 1 に示す。各リザーバーに試料溶液および泳動液を注入してから、クロス型の試料導入部を利用した挟み込み試料注入法により試料を分離チャンネルに導入し、MCE 分析を行った。

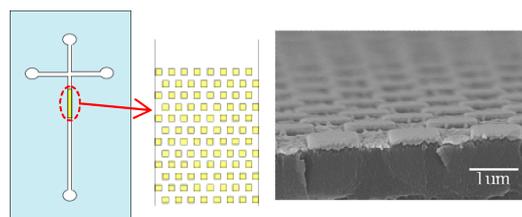


図 1. 作製した金ナノドット集積化電気泳動分析用ポリマーマイクロチップの概略図。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

過去の検討において気泡の発生が報告されていなかった COP 製の金ナノドット修飾マイクロチップを作製し、検討を行った。作製したチャンネル深さ $3.5 \mu\text{m}$, $8.5 \mu\text{m}$, および $19 \mu\text{m}$ の COP 製チップの内、張り合わせに問題がなかった 3.5 および $8.5 \mu\text{m}$ のものを実験に使用した。

その結果、ウラニンの安定した導入が可能となった

(図2)。また、YOYO-1で蛍光染色されたDNAの分離チャンネルへの導入も同様に確認することができた。

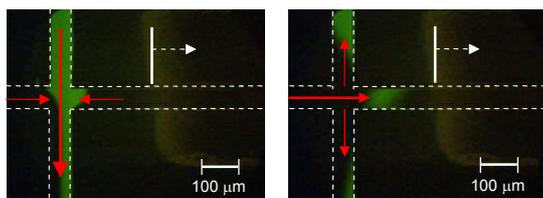


図2. 金ナノドット集積化COP製チップを用いた際の試料導入の様子。(左)試料をクロス部に挟み込みながら導入、(右)クロス部に挟み込まれた試料を分離チャンネルに導入。赤矢印は電気浸透流の向きを示す。白線より右側が金ナノドット集積化部。

また、鎖長が長く、誘電力によるトラップ効果がより大きく働くことが期待できる λ -DNA (48.5 kbp) および T4 DNA (165 kbp) についても、印加電圧を変更してMCE分析を行ったところ、図3に示す結果が得られた。遊離の色素と思われるピーク (3~4 秒付近) と、各 DNA 由来と思われるピーク (4~6 秒付近、赤: 5 kbp, 黒: λ -DNA (48 kbp), 青: T4 DNA (156 kbp)) については分離が達成された。一方、DNA 試料については、検出感度の問題もあり、分子鎖長に応じたトラップ効果を確認するのに十分な分離が確認できなかった。

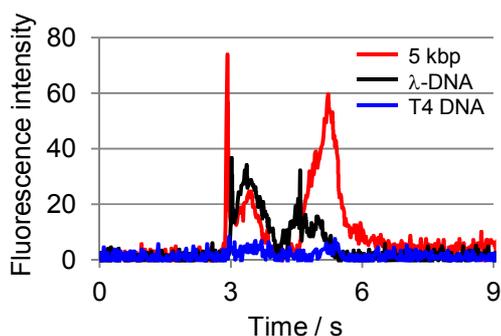


図3. 金ナノドット集積化COP製マイクロチップを用いた長鎖DNA試料の電気泳動分析。泳動液, 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0); 試料, YOYO-1 染色 5 kbp DNA フラグメント, λ -DNA (48.5 kbp), T4 DNA (165 kbp)/泳動液。

※その他・特記事項 (Others) :

・今後の課題等

作製したデバイスを用いたDNA分離では、塩基対数が大きいDNAほど金ナノドットによる捕捉効果が

が高まることが期待される。今後、試料調製時の染色試薬濃度の上昇や凍結乾燥処理、また分析時の試料導入量の増加によって、DNA試料の高感度検出を実現し、本デバイスの分離性能に関する評価を進めたい。また、金ナノドットの大きさ、配置パターン、集積化部の長さ、チャンネル深さなどが電気泳動に与える影響についても検討し、分離対象のDNAサイズに合わせてドット設計を最適化することで、迅速なDNA分離が可能なデバイスの構築を目指す。

・参考文献

[1] Mohamadi, M. R. et al. *Nanotoday*, **2006**, *1*, 1.
[2] Yasui, T. et al. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6635–6640.
[3] Li, B. et al. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4743–4751.

共同研究者等 (Coauthor) :

水野潤 (早稲田大学准教授)

論文・学会発表

(Publication/Presentation) :

なし

関連特許 (Patent) :

なし