

利用課題番号 : F-13-NM-0018
利用形態 : 技術代行
利用課題名 (日本語) : スパッタリングによるバイオセンサ用金電極パターンの形成
Program Title (English) : Fabrication of sputtered Au electrodes for biosensors
利用者名 (日本語) : Bo Yao¹⁾, 田畑 美幸²⁾, 宮原 裕二²⁾
Username (English) : Bo Yao¹⁾, M. Tabata²⁾, Y. Miyahara²⁾
所属名 (日本語) : 1) 浙江大学, 2) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
Affiliation (English) : 1) Zhejiang University, 2) Tokyo Medical and Dental University

1. 概要 (Summary) :

現在広く利用されているリアルタイム PCR は専用の核酸プローブと蛍光色素を用いた蛍光検出方式であるが、装置及び蛍光標識つき核酸プローブが高価であり、主に専門研究者による分子生物学的あるいは臨床研究に用いられている。本研究では核酸プローブ設計技術及び核酸増幅技術と、電気化学計測技術を組み合わせ、電気的検出方式の非標識リアルタイム核酸増幅技術を開発することを目的としている。電気化学的検出手法として、酸化・還元試薬を用いたクロノクーロメトリー (CC)、核酸増幅技術として RCA (Rolling circle amplification) を例として、RCA 産物の電気的検出を検討した。本システムは微小反応ウェルと金属電極から構成されているので、集積化・アレイ化が容易であり、複数試料の並列解析が可能な高スループット解析システムに適している。本システムは高価なレーザーや複雑な光学系を必要とせず、核酸を直接に電気化学的に検出することができるので、小型、簡便操作、低価格を特徴とする遺伝子検査システムを構築することができる。

2. 実験 (Experimental) :

【利用した主な装置】

- ・レーザー露光装置
- ・全自動スパッタ装置
- ・ダイシングソー

【実験方法】

ガラス基板に3つの金薄膜電極をパターン形成し、それぞれ作用電極、対極、参照電極とした。この電極系の中で RCA による核酸増幅反応を行わせ、クロノクーロメトリーにより電流値の変化を測定した。クロノクーロメトリーの測定には電気化学アナライザー Autolab (Eco Chemie, The Netherlands) を用いた。金電極表面上での RCA 反応には、まず、金電極表面

にアルカンチオール自己組織化膜を形成し、その上に核酸プローブを固定化した。一方、ターゲット核酸と相補的な塩基配列を有する円形プローブを調製し、上記核酸プローブとハイブリダイゼーションを行わせ、酵素 ϕ 29DNA ポリメラーゼにより伸長反応を行わせた。一定時間後、酸化・還元標識 Ruhex を二本鎖 DNA に導入してその電荷量のクロノクーロメトリーで測定した。

3. 結果と考察 (Results and Discussion) :

ハイブリダイゼーション後及び RCA 反応後の電荷量を CC で測定した結果を比較して図 1 に示す。

1nM の核酸試料に対するハイブリダイゼーション信号より、500fM の核酸試料に対する RCA/CC 信号の方が大きく、核酸を高感度に測定可能であることが確認された。

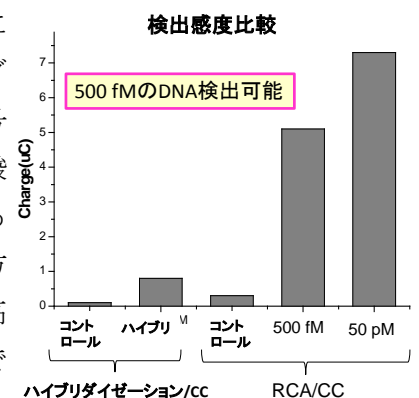


図 1 RCA/CC による核酸測定

現在のところ、DNA 検出の感度は 500fM であり、さらに高感度化の研究を進めている。また、本方法をマイクロ RNA 検出にも応用し、50pM の miRNA143 を検出できることがわかった。

4. その他・特記事項 (Others) :

今後、ターゲット核酸の初期濃度依存性、反応時間依存性などを検討し、定量性の確認を行う。

5. 論文・学会発表 (Publication/Presentation) :

なし

6. 関連特許 (Patent) :

なし