

マイクロ流体デバイスを用いた微粒子誘電泳動による DNA 検出の高感度化

井田健一* 中野道彦** 末廣純也**
(九州大学大学院 *システム情報科学府 **システム情報科学研究所)

1 はじめに

筆者らは、誘電泳動を利用した迅速かつ簡便な DNA 検出法として、微粒子表面に DNA を結合させた微粒子を正の誘電泳動で捕集して、その捕集に伴う電極間のインピーダンス変化を計測する方法を考案した^[1]。本法は、DNA の結合によって微粒子の誘電泳動特性が負から正に変化するという性質を利用して、DNA が結合した微粒子を選択的に微細電極に捕集して検出する。そのため、微粒子誘電泳動を負から正に変化させるために必要な DNA 量により検出下限が決定される。現時点では直径 2.8 μm の微粒子 1 個当たり約 10^5 個の DNA を結合させる必要がある^[2]。ところが、DNA 結合に伴う誘電泳動の変化は連続的であるため、負の誘電泳動であっても DNA 結合量に伴って誘電泳動力は変化している。負の誘電泳動力の変化を検出できるようになれば、より少ない結合量の DNA を検出できるようになると考えられる。そこで筆者らは、DNA 結合微粒子に作用する負の誘電泳動の変化をその運動軌跡の変化から検出できるマイクロ流体デバイスを考案した^[3]。本報告では、提案したデバイスの有効性を確かめるため、実際にデバイスを作製し、DNA 結合量の異なる微粒子の運動軌跡を観察した。

2 デバイス作製

前報告^[3]では、ガラス基板上に形成した金属薄膜電極と PDMS (polydimethylsiloxane) 製の流路を組み合わせたデバイスを作製した。本報告では、流路内の粒子の挙動を顕微鏡観察できるように、電極は ITO 薄膜で形成した。流路は幅 6 mm、高さ 20 μm とした。

3 実験方法

3.1 DNA の調製

pUC19 DNA を鋳型 DNA として PCR を行い増幅した 391 bp 二本鎖 DNA を用いた。PCR プライマーのひとつに 5'末端がビオチンで修飾されたものを用いたため、増幅した DNA の片端にはビオチンが修飾されている。

3.2 微粒子と DNA の結合

ニュートラアビジン修飾ポリスチレン粒子(直径 2.4 μm)を用いた。粒子濃度 1.0×10^6 個/ μl に対して 1.5×10^0 ng/ μl , 1.5×10^1 ng/ μl , 1.5×10^2 ng/ μl の 391 bp 二本鎖 DNA 溶液を反応溶液 (5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 mM EDTA、1 M NaCl) に懸濁して、室温で反応 (24 h) させ、ビオチン/アビジン結合を介して微粒子に DNA を結合させた。その後粒子を分離してイオン交換水に懸濁した。DNA が均等に結合すると仮定すると、粒子1つあたりの DNA 結合量は 3.6×10^3 DNA/particle, 3.6×10^4 DNA/particle, 3.6×10^5 DNA/particle となる。

3.3 微粒子運動軌跡の観察

微粒子懸濁液をマイクロチャンバ内へ一定の流量 (0.1 mm/s) で供給した後、ファンクションジェネレーターを用いて電極に周波数 100 kHz、電圧値 20 V_{pp} の正弦波交流電圧を印加した。そのときの粒子の挙動を倒立顕微鏡により観察し、CCD カメラを用いて画像を取得した。

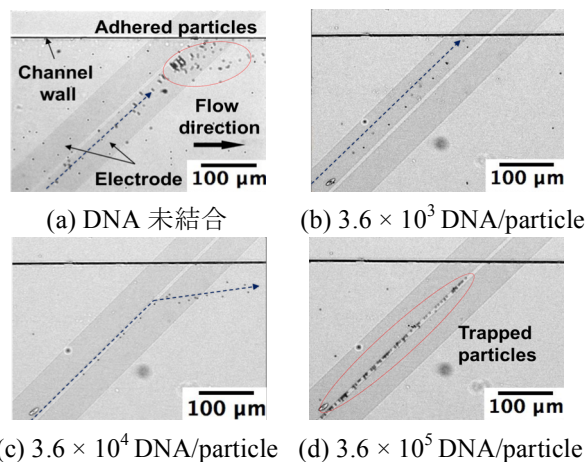


図1 微粒子運動軌跡に及ぼす DNA 修飾量の影響 (破線矢印は粒子軌跡)

4 実験結果

微粒子懸濁液をデバイス内に流入し、電極間に電圧を印加した 10 秒後の電極近傍の粒子の様子を図1に示す。DNA 未結合では電極間近傍に到達した粒子が電極に沿って移動し、かつ流路上方向への負の誘電泳動力により粒子が浮き上がり、流路上面に吸着した。 3.6×10^3 DNA/particle では粒子は浮上せず、電極に沿って移動し、流路壁面まで到達した。 3.6×10^4 DNA/particle では粒子は電極に沿って移動するものの、壁面まで到達する前に電極上を通過した。 3.6×10^5 DNA/particle では正の誘電泳動により電極間に捕集された。以上の粒子軌跡は、前報^[3]において理論計算から予測された結果とよく一致するものであった。 3.6×10^3 DNA/particle と未結合の場合で粒子軌跡が異なっていることより従来法の検出下限 10^5 DNA/particle と比較すると約 30 倍の高感度化が可能である。

5 まとめ

高感度 DNA 検出に適したマイクロ流体デバイスの効果を検証するために、実際に作製したデバイスで DNA 修飾微粒子を用いた実験を行った。デバイス内の微粒子の粒子軌跡の変化より従来の微粒子誘電泳動法に比べて約 30 倍の高感度化が可能であることを示した。今後は、粒子軌跡の変化を定量的に検出する方法を検討する予定である。

謝辞

本研究の一部は、科研費 26289125 及び 15K06111 の援助で行われた。記して謝意を示す。

参考文献

- [1] M. Nakano, *et al.* : *Europhys. Lett.*, **108**, 28003 (2014)
- [2] 笠原、他 : 第 31 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム資料, 21pm3-PS92 (2014)
- [3] 井上、他 : 平成 27 年度電気学会九州支部大会資料, 15-2A-04 (2015)