

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25600049  
研究課題名(和文) SERS\_DNAシーケンサの創生

研究課題名(英文) SERS-DNA sequencer

## 研究代表者

山口 佳則 (Yamaguchi, Yoshinori)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20386634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、表面増強ラマン散乱分光法を用いてDNA配列を決定できるDNAシーケンサを創生するための基礎実験を行った。ホットスポットと呼ばれるナノ構造を持つプラズモン基板を新規に設計、作製し、そのホットスポット表面でのDNA塩基のひとつであるアデニンの表面増強ラマン散乱の測定に成功した。アデニンの一分子がプラズモン基板のホットスポットによって活性化されることによって検出されるプリンキングと呼ばれる表面増強ラマン散乱について濃度依存があることを発見した。本研究によって、新規に作成したプラズモン基板を用いてDNA塩基の一分子測定が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, as the first step for DNA sequencer based on surface enhanced Raman spectroscopy (SERS), we invented the SERS active substrate that enable to detect the surface enhanced Raman signal from single molecule. This result and invention of the SERS active nano-needle mountain is the big step for the SERS based DNA sequencer.

研究分野：分光・分析化学

キーワード：DNAシーケンサ 表面増強ラマン散乱 マイクロチップ 普及型DNAシーケンサ ナノ剣山増強ラマンデバイス

### 1. 研究開始当初の背景

DNA シーケンスによって、感染症の病原菌となる微生物、ウイルスを現場にて特定することは世界中で切望される診断技術です。これまで、DNA シーケンスは十分なサンプルの前処理と研究所に設置された大型の装置を利用して行われてきました。したがって、現場での DNA シーケンスを達成するには現行の原理技術とは異なった、新規原理からの研究開発が必要です。我々は現場での DNA シーケンスを達成できる新規技術として、表面増強ラマン散乱による単一分子の測定技術を応用した DNA シーケンサを本研究にて提案しました。表面増強ラマン散乱を原理として DNA シーケンスを達成するためには(1)一本鎖にした DNA を一直線に伸張させること。(2)伸張したことによって露出した DNA の塩基を表面増強ラマン散乱によって検出すること。の2つが大きな課題です。

### 2. 研究の目的

DNA シーケンスの測定方法をその原理から発明することによって、現在の方法では原理的に不可能である DNA シーケンサの手のひらサイズまでの小型化を達成し、全世界における感染症の早期発見のための装置を提供することです。本研究課題の範囲では、新規原理として金属表面におけるラマン散乱の増強効果(表面増強ラマン散乱, SERS)を利用することを原理として提案し、増強効果を達成できるナノ金属構造の構造体とその表面における DNA の一塩基の単一分子感度を達成することです。

### 3. 研究の方法

本研究課題の範囲における課題の達成のためには、(1) SERS 現象を検出できる顕微システムの新規作成、(2) DNA 塩基からのラマンシグナルを増強できる金属基盤(ナノ剣山)の作成が必要です。(1)について、蛍光顕微鏡を基本とした顕微システムに、ラマン散乱を測定することを可能とする分光システム、あるいは、フィルターシステムを新規に加えることによって SERS を測定することを可能とする顕微システムを構築しました。(2)については、光リソグラフィとウェットエッチングを利用して、剣先が数十ナノメートルのナノ剣山を製作することにしました。ナノ剣山に金属を蒸着し、その表面における SERS を測定します。

### 4. 研究成果

(1) 表面増強ラマン散乱の測定を可能にする顕微表面増強ラマン散乱分光システムの構築

ラマンイメージングのシステムは、電気泳動システム、特に内径が数 $\mu$ の制限された空間で、DNA の伸張を行い、さらに検出系として、ナノ構造の表面における DNA の分析を行うことが必要です。そのために、顕微鏡を

母体として電気泳動システム、光源を高輝度水銀ランプとし、さらに、CCD カメラを主体とする画像分析システムが実装できる実験装置として構築しました。(図1) 画像分析アルゴリズムのプログラミングについても計画通り進行中ではあるが、使用する開発言語とそのシステム処理のためのハードウェアが高価なために、マイコン処理の P I C 言語にまでプログラミングを行う必要性があり、相当な時間を必要としました。光源について、高輝度水銀ランプを使用することによって、出力については十分でした。ラマン散乱検出用の CCD カメラについて、単一分子を検出するには、フレームレートを 1frame/sec 程度にする必要がありました。

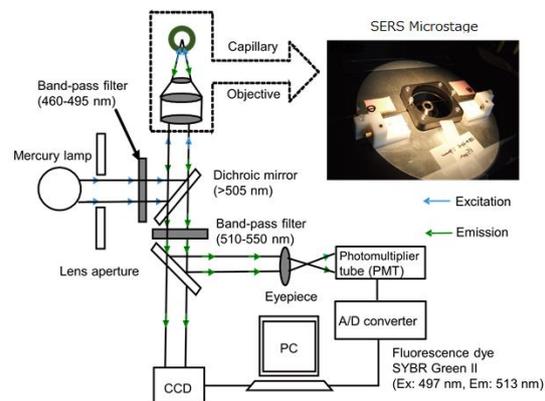


図1. SERS の検出を可能とする顕微 SERS 装置の構築

(2) DNA 一塩基からの表面増強ラマン散乱の生成を可能にするナノ剣山の作成  
DNA/RNA シーケンサチップの基本原理であるナノ構造を持つプラズモン基板の作成に成功しました。ナノ構造を持つ、ナノ剣山の作成については、ガラス表面のウェットエッチングによる方法について着実に手法が形成できました。(図2)。

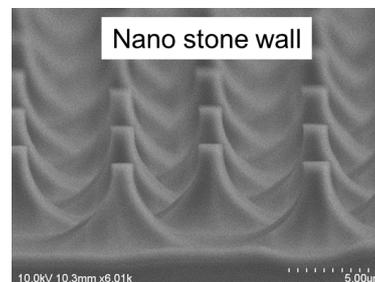


図2. 一塩基からの SERS シグナルの生成を可能とするナノ剣山

(3) ナノ剣山からのアデニン分子、一分子の表面増強ラマン散乱の測定  
独創的な工夫から作製したナノ剣山の表面に金属の蒸着を行い、ナノ剣山増強ラマンデバイスとして、アデニンバッファ溶液のラマ

ン散乱を測定しました。ナノ剣山増強ラマンデバイスの表面からは、アデニン分子からのラマンシグナルが検出され、単一分子からの特有の現象であるブリッキングを確認しました。これにより、開発したナノ剣山増強ラマンデバイスはアデニン分子の一分子の検出感度を持つことを実証できました (図 3)。

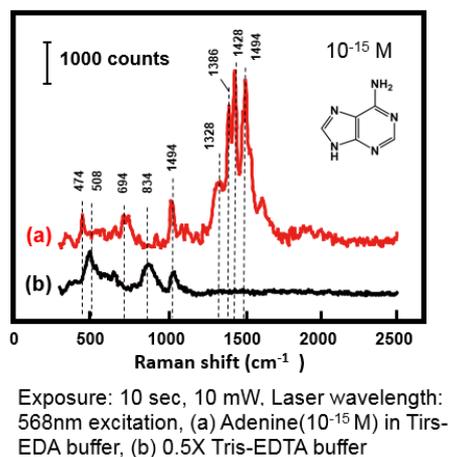


図 3. ナノ剣山の表面におけるアデニン溶液の SERS シグナル。10 秒積算。

(4) 本研究課題で得られた成果とその範囲  
本研究課題では、(1)DNA の伸張について、厚さ方向 (Z 軸方向) への拡散を数 nm に制限された空間に DNA を電気泳動させることで、酢酸を混合した緩衝液を使用することで、可能であることが分かりました。一方では、厚さ方向への拡散を数 nm に制限する空間に DNA を直接に導入することが困難でした。さらに(2)露出した DNA 塩基について単一分子での表面増強ラマン散乱を測定するために単一分子感度を達成できるプラズモン電場を発生することのできるナノ剣山増強ラマンデバイスを製作しました。ナノ剣山増強ラマンデバイスは針自身の先が 100nm の平面で、平面の下部がさらに細くエッチングされた絶壁構造で、金属を蒸着することで、表面プラズモンを強く発生できると同時に絶壁構造に DNA 分子が絡み合うことができるデザインにしました。作製したナノ剣山を利用して、DNA のひとつの塩基であるアデニンの分子を測定し、ナノ剣山の絶壁における単一分子の特徴であるブリッキングを計測しました。この結果は、表面増強ラマン散乱を DNA シーケンサの原理技術として利用できる可能性を示したことになります。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

①Zhenqing Li, Chenchen Liu, Xiaoming Dou, Yi Ni, Jiakuan Wang, Yoshinori Yamaguchi, "Electromigration behavior of nucleic acids in

capillary electrophoresis under pulsed-field conditions", *Journal of Chromatography A*, 1331, (28), 100-107 (2014), DOI: 10.1016/j.chroma.2014.01.021

②Zhenqing Li, Chenchen Liu, Yoshinori Yamaguchi, Yi Ni, Qingxiang You, Xiaoming Dou, "Capillary electrophoresis of wide range DNA fragments in mixed solution of hydroxyethyl cellulose", *Analytical Methods*, 6, 2473-2477 (2014), DOI: 10.1039/C3AY41965G

③Aya Hashimoto, Liang-da Chiu, Keigo Sawada, Katsumasa Fujita, Masahide Takedachi, Yoshinori Yamaguchi,\* Satoshi Kawata, Shinya Murakami, Eiichi Tamiya, "In situ Raman imaging of osteoblastic mineralization", *Journal of Raman Spectroscopy*, Volume 45, Issue 2, 157-161 (2014), DOI: 10.1002/jrs.4438

④Zhenqing Li, Shaoxiong Chen, Chenchen Liu, Dawei Zhang, Xiaoming Dou, Yoshinori Yamaguchi, "Quantification of Periodontal Pathogens Cell Counts by Capillary Electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, Volume 1361, 286-290 (2014)

⑤Zhenqing Li, De Li, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi, "Determination and quantification of Escherichia coli by capillary electrophoresis", *Analyst*, 139, 6113-6117, (2014)

⑥Zhenqing Li, Ronglin Yang, Q Wang, Dawei Zhang, Songlin Zhuang, Yoshinori Yamaguchi, "Electrophoresis of Periodontal Pathogens in Poly (ethyleneoxide) Solutions with Uncoated Capillary", *Analytical Biochemistry* 471, 70-72 (2015) | doi:10.1016/j.ab.2014.11.002

⑦Yoshinori Yamaguchi, Zhenqing Li, Xifang Zhu, Chenchen Liu, Dawei Zhang, Xiaoming Dou, " Polyethylene Oxide (PEO) and Polyethylene Glycol (PEG) Polymer Sieving Matrix for RNA Capillary Electrophoresis ", *PLoS One*, 10(6):e0131265. Epub 2015 Jun 18 (2015) | doi:10.1371/journal.pone.0123406

⑧Chenchen Liu, Yoshinori Yamaguchi\*, Xifang Zhu, Zhenqing Li, Yi Ni, Xiaoming Dou, "Analysis of small interfering RNA by capillary electrophoresis in hydroxyethylcellulose solutions", *Electrophoresis*, 36, 1651-1657 (2015) | doi:10.1002/elps.201500018

⑨ Aya Hashimoto, Yoshinori Yamaguchi\*, Liang-da Chiu, Chiaki Morimoto, Katsumasa Fujita, Masahide Takedachi, Satoshi Kawata, Shinya Murakami, Eiichi Tamiya, "Time-lapse Raman imaging of osteoblast differentiation", *Scientific reports*, Vol5, Article# 12529, (2015) | doi: 10.1038/srep12529

⑩Zhenqing Li, Chenchen Liu, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi\*, "Capillary electrophoresis of RNA in hydroxyethylcellulose polymer with various molecular weights." *Journal of Chromatography B*, 1011:114-120 (2016) | DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.12.057

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 佳則 (YAMAGUCHI YOSHINORI)

大阪大学・大学院工学研究科・招聘教授

研究者番号：20386634