

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19350043

研究課題名（和文） ナノ粒子複合構造化膜を用いる高感度センシング手法の開発

研究課題名（英文） Development of a highly sensitive sensing technique using a nanoparticle hybrid array

研究代表者

長岡 勉 (TSUTOMU NAGAOKA)

大阪府立大学・産学官連携機構・教授

研究者番号：00172510

研究成果の概要：

金ナノ粒子を 1 nm 程度の間隔で配列した 2 次元アレイを作製し、電流検出型 DNA センサに応用した。50 nm の金ナノ粒子からなるアレイを作製し、その上に DNA を修飾した 2 nm プローブ金ナノ粒子を配置した。このアレイで起こる DNA のハイブリッド化を電流測定により検討した。その結果、50 fmol までの DNA 量の検出が可能であり、1 塩基ミスマッチも高選択的に検出することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：金ナノ粒子, DNA, 脱蛍光技術, 電気抵抗検出, ナノ粒子アレイ

1. 研究開始当初の背景

DNA 解析など、大量試料のハイスループット・センシングシステムには並列化と微小化が要求され、2 次元イメージング手法を駆使したアレイ機器が開発されている。この種の機器の多くは光学的な計測に基づいており、高感度である反面、コスト削減は困難で、装置の小型化に関しても制約が多く、その用途は研究用途にとどまっているのが現状である。

最近、著者らはナノ粒子をプラスチック表面に被覆する技術の開発を行ってきたが、この過程において、ナノメータ程度の粒子間隔

を有する配列は電流を流すことに着目した。すなわち、2 mm 角の楕形電極上に 50～80 nm 径のナノ粒子をデカンジチオールで相互に結合した配列は数百オームの抵抗を示した。この抵抗は粒子間に存在する物質の導電性に依存すると考えられたので、分子の導電性を利用するセンサの開発が可能と考え、DNA の検出に応用した。現在、DNA マイクロアレイとして市販されている計測システムは蛍光検出に基づく装置が主流であり、機器および運用コストの面で問題が多い。従って、電気抵抗検出により同等の機能が達成できれば機器の小型化・省コスト化が実現でき、

臨床レベルの普及に進展が期待できる。

そこで、作製した配列膜上に一端をチオール化したプローブ DNA を固定し、試料 DNA を添加したところ導電性に変化が現れた。最近の研究によれば DNA はある程度の分子導電性を示す。導電性の変化は直ちに観測され、また、一塩基のミスマッチに対しても高い認識能力を持つことが分かった。

2. 研究の目的

DNA 検出に関する上記問題を解決するため、我々は最近、金ナノ粒子の 2 次元構造体（アレイ）を用いる電流検出型 DNA センサの開発に成功した。従って、このアレイはナノ粒子間の空間導電率を測定するセンサとして機能し、原理的にナノサイズのセンサも作製が可能である。しかも電流計のみで検出が可能であるので、次世代ナノサイズ・システムの要件を満たし、同時に低コスト化も実現できると期待される。

このセンサシステムは電流検出のみで機能するのでラベル化操作が不要であり、装置の小型化も可能である。従って、ナノ粒子配列は分子デバイスセンサとしての発展の可能性も大きい。電子的分子デバイス (Molecular electronic device) は、分子サイズ (~1 nm) で隔てられた 1 対の電極間に分子を配置し、その分子の電気的性質を観測する。この分子として適当なレセプタ分子を用いれば、ナノサイズのセンサおよび高密度アレイ型センサの実現が可能となるが、現在の加工技術では 1 nm ギャップを持つ電極の作製は容易ではない。一方、我々の開発したナノギャップ・デバイスは、自己組織化により自動的に作製できる特徴がある。また、ここで報告するナノギャップ電極はデバイスサイズに制約がなく、基板の電極間隔に応じてナノからマクロサイズのまでの自由なデバイス設計が可能となる。したがって、作製時点での技術およびコストに見合った微小化が可能となる利点も有している。

この研究課題では、ナノ粒子アレイを用いたセンサの高感度化を試みた。

3. 研究の方法

図 1 はアレイを模式的に示したもので、ガラス基板上に固定したナノ粒子は保護層（デカンジチオール; HS-C₁₀H₂₀-SH）によりそれぞれがナノメートルサイズで独立している。このアレイの両端に配置した金属電極に電圧を加えると電流が流れ、その大きさはナノ粒子間のバリアエネルギーによって制御される。従って、この粒子間に導電性物質が挿入される場合にはアレイの抵抗が低下し、アレイはその物質のセンサとして機能する。

このような着想の基、DNA センサの開発を行い、基本的な動作確認にはすでに成功し

た。そこで、この研究課題では DNA 検出に対する感度の向上を目指して検討を行った。

その結果、2 nm プローブ Au 粒子を 40 nm Au 粒子の近傍に配置した 2 次構造膜（アレイ）を使用した場合に顕著な感度向上がみられた。

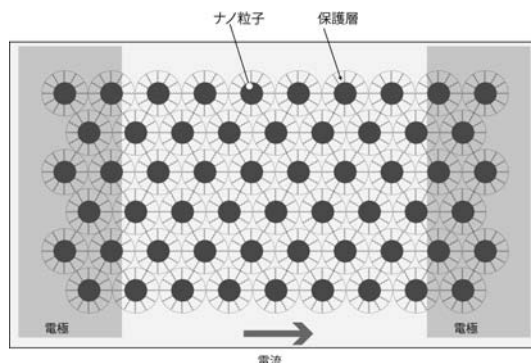


図 1 ナノ粒子アレイの模式図

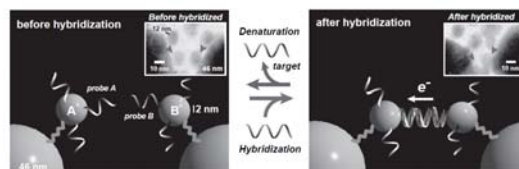


図 2 ナノ粒子複合化アレイの応答機構

図 2 は本研究で開発した複合ナノ粒子アレイ配列の一部を模式的に示したもので、主粒子 (40 nm Au) に 2 種の 12 塩基長 DNA を固定したプローブ粒子 (A および B ; それぞれ 2 nm Au からなる) をアルカンジチオールで取り付けている。このような 2 次構成で、プローブ粒子同士の会合が試料 DNA により起こるとプローブ粒子の近接により電流が流れ、アレイ全体で応答として現れる。

具体的には、デカンジチオールで主粒子同士を結合させたナノ粒子 2 次元配列を市販楕形電極 (ガラス基板 ; BAS 社製) 上に作製した。このとき粒子間には 1 nm 程度のナノギャップが存在すると考えられる。この様にして作製した配列上に 2 種の異なるチオール化 12 塩基 DNA を固定したプローブ粒子 A および B をデカンジチオールを用いて 50 nm 粒子に固定し、複合化配列を作製した。試料 DNA (24 塩基) を添加したところ、導電性に変化が直ちに現れた。また、一塩基のミスマッチも高精度に観測することが可能であった。

この配列を用いて、本研究では種々の DNA 試料の応答、塩基ミスマッチに関する選択性を検討した。

4. 研究成果

以前行った 50 nm 金ナノ粒子に DNA を直接取り付けた 1 次構造アレイセンサに比べ、

本手法では3桁程度の劇的な感度の向上が再現性よく検出された。また、DNA 添加に伴う抵抗変化は1分程度で定常状態となり、応答速度においても優秀な性能を確認することができた。

図3はDNA 検出に関する応答を示したものである。図より試料 (DNA 24 塩基長) の添加後、初期スパイクをへて100秒以内で迅速に定常状態が得られていることが分かる。また、塩基のミスマッチ数の増大に対応して応答が小さくなっており、応答に選択性があることも分かる。

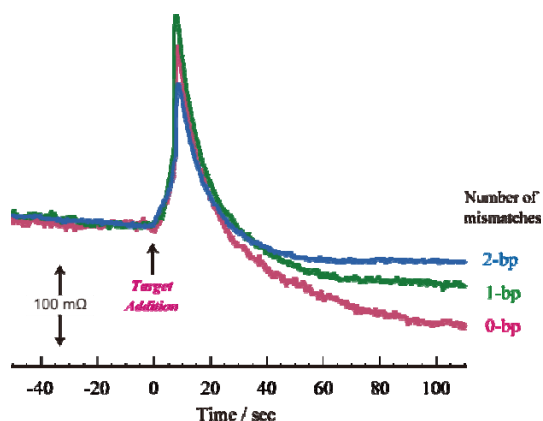


図3 ナノ粒子複合化アレイ上での DNA 応答

図4はこの応答を解析した結果である。検量線 (A) と塩基ミスマッチに関する応答の変化 (B) を示している。

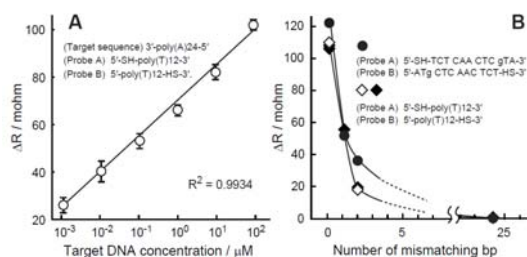


図4 検量線 (A) および塩基ミスマッチ選択性 (B)

図より明らかなように、定量下限として 50 fmol 量の DNA が測定でき、また応答の直線性は5桁にも及び極めてダイナミックレンジが広い。また、1塩基のミスマッチに対して、その応答が半減することから、本アレイにおいても1次構造アレイと同様の高いミスマッチ選択性が観測され、一塩基多型 (SNP) 診断等への応用展開が可能であることが分かった。

この感度向上のメカニズムとして DNA 会合体の生成に伴うプローブ粒子間の距離の減少が起こるためと推測した (図2)。現時点で詳細な検出機構は不明であるが、このプ

ローブ粒子近接メカニズムにより DNA のように分子導電性の小さい試料においても電流増感が起こり、感度が1次構造化膜に比べて大幅に向上したものと考えている。

現在、ナノ粒子を用いるセンサ技術は質的にも量的にも拡大の一途にあり、今後も発展が期待できる新しい分析技術の一つである。今後更に検討を加え、微小アレイ等の実用的な展開を行いたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Label-Free DNA Detection Based on Opening Bridge Structured Gold- Nanoparticle Array," *Anal. Chem.*, **80**, 8071-8075, 2008, 査読有

② S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Label-free DNA Detection of Nano-Gapped Gold Nanoparticle Array Electrode," *J. Electrochem. Soc.*, **155**, J105-J109, 2008, 査読有り

③ S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Preparation of Nano-Gapped Gold Nanoparticle Array For DNA detection," *Electroanalysis*, **20**, 355-360, 2008, 査読有

④ 長岡 勉, 「金ナノ粒子を利用する増感化学センサー技術」, *分析化学*, **56**, 201-212, 2007, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① T. Nagaoka, "Electrical DNA detection with gold nanoparticle arrays," REMSEA 2008, 2008年8月5日, Singapore

② T. Nagaoka "A nanoparticle-array detector based on optical and conductivity observation," 14th International Conference on Flow Injection Analysis, 2007年9月6日, Berlin

[図書] (計 2 件)

① S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Gold Nano Films Synthesis, Characterization, and Potential Biomedical Applications," in *Nanomaterials for the Life Sciences*, Ed. Dr. Challa S. S. Rl. Kumar, Wiley-VCH, *in press*

② 長岡 勉 (分担執筆), 「産学官連携活動の実例 第13章」, 177-188, 2008, 中央経済社

[その他]

ホームページ

<http://tokachi.riast.osakafu-u.ac.jp/%7Esentan1/home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長岡 勉 (TSUTOMU NAGAOKA)
大阪府立大学・産学官連携機構・教授
研究者番号：00172510

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

椎木 弘 (SHIIGI HIROSHI)
大阪府立大学・産学官連携機構・准教授
研究者番号：70335769