

機関番号：24403

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21700477

研究課題名 (和文) ナノギャップを利用した DNA チップの開発

研究課題名 (英文) Development of DNA chip by using nanogap

研究代表者

床波 志保 (TOKONAMI SHIHO)

大阪府立大学・21世紀科学研究機構・講師

研究者番号：60535491

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、金ナノ粒子間に形成されたナノメートルサイズのギャップを利用したバイオセンサの開発に取り組んだ。チオールと金の化学吸着を利用することで金ナノ粒子を二次元配列させた膜の作製に成功した。さらに、導電性高分子形成と金ナノ粒子生成を一度に行うことでワンステップでの粒子間ナノギャップ作製を実現することができた。得られたナノギャップのセンサ適応を行った結果、DNA やグルコースの電気化学的検出が可能になった。

研究成果の概要 (英文)：

We have worked in research and development of biosensor using nanogap formed between adjacent gold nanoparticle (AuNP). A two-dimensional AuNP array was successfully fabricated by effectively utilizing chemical adsorption of thiol molecule and gold. Moreover, one-step preparation of nanogap was achieved by producing conductive polymer and AuNP at once. The obtained nanogap between AuNPs enabled us to electrochemically detect DNA and glucose.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料科学

キーワード：金ナノ粒子、DNA、センサ、ナノギャップ、ラベルフリー、電気抵抗検出型

1. 研究開始当初の背景

DNA チップは病気に関連する遺伝子の研究、ゲノム創薬やテーラーメイド医療の実現において不可欠なツールであり、いかにして装置およびチップのコストを低減し検出感度や操作性を向上させるかが課題となっている。従来の DNA 診断は、配列の分かって

いるプローブ DNA を基板上に固定したチップを利用し、蛍光ラベル化したターゲット DNA の添加により相補するプローブへの結合量を蛍光シグナル強度として読み取る方式で行われている。しかし、この方法はマニピュレーターや蛍光スキャナなどの特殊な装置を必要とし、チップ作製から検出までの

工程が多いなどの問題を抱えている。

そこで本研究では、バインダー分子を用い、金ナノ粒子間に形成されたナノメートルサイズのギャップを利用した電気抵抗検出型 DNA センサの開発に取り組んだ。検出目的 DNA を標識することなく（ラベルフリー）直接、DNA のハイブリダイゼーションに基づく導電性の変化を検出に利用することで操作の簡略化、装置の小型化が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、隣り合う金ナノ粒子をバインダー分子により架橋し、バインダー分子の種類または分子長を選択することで粒子間距離を任意に調整して導電性制御可能な金ナノ粒子膜の作製を試みた。最終的には、作製した膜の生体関連物質検出の適応として DNA やグルコースをターゲットとした検出システムの構築を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3項目について検討した。

(1) 金ナノ粒子を用いたナノギャップ形成技術開発とナノ粒子膜を固定する基板選定

正負一対の電極間へ金ナノ粒子膜の作製を行うことで膜の導電性計測を試みた。基本的には、金ナノ粒子膜を形成させる基板となる電極を 1,10-デカンジチオールと金ナノ粒子分散液へ交互浸漬することで膜の作製を行った。また、粒径 2, 12, 30 nm の金ナノ粒子を用いた膜形成にも取り組んだ。

さらに、分析精度、感度向上を目指し、金ナノ粒子膜を固定する基板の選定を行った。具体的には、微小白金くし形電極、スクリーンプリントカーボン電極、ポリマービーズ上への金ナノ粒子膜作製を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM) や原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて膜の表面観察を行った。さらに、各々の導電性を計測することで電気的特性評価を行った。

(2) ワンステップでのナノギャップ作製方法の確立と電気的特性評価

金ナノ粒子膜のさらなる作製方法の簡易化を目指し、金ナノ粒子作製時に粒子間に一定のギャップを持つようなマトリックス形成を可能にすることで、ワンステップでのナノギャップ作製に取り組んだ。アニリンを用いて金イオンを還元することでアニリンをバインダーとして金ナノ粒子間にナノメートルサイズのギャップを形成することに成功した。さらに、生成したマトリックスの電気的性質を詳細に調べた。

(3) 金ナノ粒子膜のセンサ特性評価

【①DNA 検出】

金ナノ粒子間へプローブ DNA を配置したセンサ膜へサンプル DNA 溶液を添加した時の粒子膜抵抗をモニタリングすることで DNA 検出を行った。

【②グルコース検出】

スクリーンプリントカーボン電極上へ金ナノ粒子膜を作製した後、グルコースオキシダーゼ、フェリシアン化カリウム混合液を滴下し、電流が安定したところでグルコース溶液を添加し、電流値をモニタリングした。定量範囲や妨害物質の影響などの基礎的な性質を調査した。さらに、ナノ粒子の粒径がセンシング感度へ与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 金ナノ粒子を用いたナノギャップ形成技術開発とナノ粒子膜を固定する基板選定

金ナノ粒子膜作製時、1,10-デカンジチオールと金ナノ粒子分散液への交互浸漬回数を制御することで膜の導電性を任意に（絶縁体～半導体～導体）制御可能であることがわかった。また、作製したナノ粒子膜の SEM 像 (図 1) から、本方法により均一なナノ粒子層が得られることがわかった。

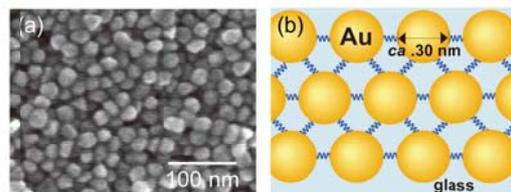


図 1. (a) 金ナノ粒子膜の FE-SEM 像, (b) 金ナノ粒子膜模式図

(2) ワンステップでのナノギャップ作製方法の確立と電気的特性評価

アニリンと塩化金酸の混合液を加熱攪拌すると溶液色は黄色から青紫色へと変化した。溶液の UV スペクトルを測定したところ 558 nm に金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴に起因する吸収ピークが得られた。従って、アニリンが金イオン (Au^{3+}) を (Au^0) へ還元すると同時に酸化されアニリン重合体が生成したと考えられる (図 2a)。

ポリアニリンは酸性溶液でドーピングすると高い電気伝導度を示し、アルカリ性溶液で脱ドーピングすると電気伝導度は劇的に減少することが知られている。作製直後の金ナノ粒子-アニリンオリゴマー複合体の電気伝導度は $3.2 \times 10^{-8} \text{ Scm}^{-1}$ であった。金ナノ粒子を集積した構造体において粒子間隔が 2 nm 以上になると、粒子間の電子ホッピングが起らなくなり、抵抗が急激に増大することが知られている。作製した金ナノ粒子-アニリンオリゴマー複合体の TEM 観察から、金ナノ粒子間隔は約 2.5 nm と見積もられた。従って、複

合体中の金ナノ粒子は孤立し、電極上に導電パスが形成されないと考えられる。また、硫酸ドープした複合体の電気伝導度は $3.1 \times 10^{-2} \text{ Scm}^{-1}$ (41 ohm) であった。一般的に、ドープ状態においてアニリンオリゴマーの電気伝導度 ($4.0 \times 10^{-3} \text{ Scm}^{-1}$) はポリアニリンよりも低いことが知られている。しかし、ポリアニリンのエメラルジン塩型と同程度の値 ($7.8 \times 10^{-2} \text{ Scm}^{-1}$) を示した。これは、(図 2b, c) に示すように、 π 軌道のスタッキングによって重なり合った粒子間のアニリンオリゴマーがポリアニリンと同等の導電パスとして働いたためと考えられる。一方、水酸化ナトリウム水溶液で脱ドープすると電気伝導度はエメラルジン塩基と同程度の $3.2 \times 10^{-8} \text{ Scm}^{-1}$ (42 Mohm) となった。これは脱ドープされることで金ナノ粒子間のアニリンオリゴマーがナノギャップとして働き、粒子間の電子ホッピングの障壁となるために電気伝導度が大きく減少したと考えられる。以上のことから、得られた金ナノ粒子-アニリンオリゴマー複合体はポリアニリンと同じ電気的特性を有し、粒子間のアニリンオリゴマーのドーピングレベルを制御することによって導電性を制御することができることがわかった。

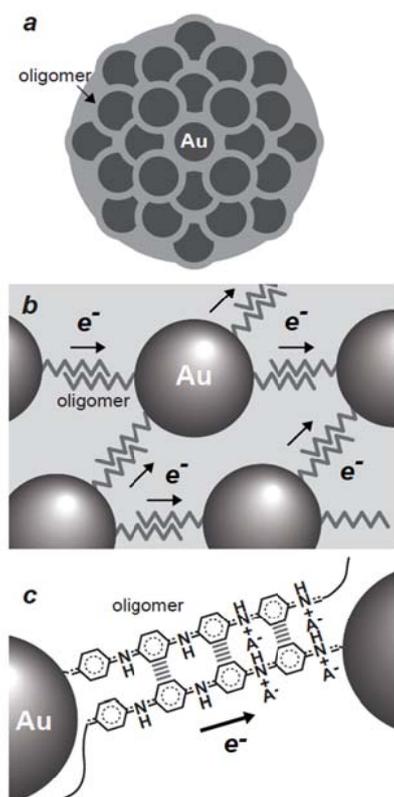


図 2. (a) 金ナノ粒子-アニリンオリゴマー複合体, (b) アニリンオリゴマーを介した電子伝達機構, (c) 金ナノ粒子間拡大図

(3) 金ナノ粒子膜のセンサ特性評価

【①DNA 検出】

ナノ粒子膜へ固定したプローブ DNA と相補的な DNA 溶液を添加すると粒子膜の抵抗は減少した。抵抗減少量は添加した DNA 濃度に依存することがわかった。さらに、1 塩基ミスマッチ DNA についても検出を行った結果、抵抗変化が相補鎖 DNA の約半分に留まったことから、簡単な構成にも関わらず精度の高い検出が行われていることが明らかとなった。

【②グルコース検出】

ナノ粒子の粒径を 2, 12, 30 nm と変化させて作製した膜へのグルコース応答を調べた結果、金ナノ粒子の粒径が小さくなるにつれ応答電流は大きくなり、2 nm の金ナノ粒子を固定した電極は、粒子未修飾の電極と比較して約 3 倍の電流値を示した。これらの結果から、粒子を均一に固定したナノ粒子膜を用いることでセンサ感度を向上させることができることがわかった。

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 5 件)

- ① R. Morita, R. Inoue, S. Tokonami, Y. Yamamoto, M. Nakayama, H. Nakao, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Organic-Inorganic Hybrid Nanoraspberry Consisted of Gold Nanoparticle and Aniline Oligomer", J. Electrochem. Soc., 査読有, 2011, 158, K95-K100.
- ② S. Tokonami, N. Morita, K. Takasaki, N. Toshima, "Novel Synthesis, Structure, and Oxidation Catalysis of Ag/Au Bimetallic Nanoparticle", J. Phys. Chem. C, 査読有, 2010, 114, 10336-10341.
- ③ S. Tokonami, Y. Yamamoto, Y. Mizutani, I. Ota, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Green Electroless Plating Method Using Gold Nanoparticles for Conducting Microbeads: Application to Anisotropic Conductive Films", J. Electrochem. Soc., 査読有, 2009, 156, D558-D563.
- ④ S. Tokonami, M. Kinjo, M. Inokuchi, N. Toshima, "Fabrication of SmCo5 Alloy Magnetic Nanoparticles by Assistance of Copper and Their Magnetic Properties", Chem. Lett., 査読有, 2009, 38, 682-683.
- ⑤ S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications", Anal. Chim. Acta, 査読有, 2009, 641, 7-13.

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 中土井祐, 床波志保, 細末健太, 椎木弘, 「長岡勉過酸化ポリピロール膜の作製と分子認識」, 分析展 2011・科学機器展 2011 Separation Science 2011, 2011 年 9 月 6 日, 幕張メッセ
- ② 床波志保, 椎木弘, 長岡勉, 「金属ナノ粒子間ギャップを利用した DNA センサの開発」, 第 58 回応用物理学関係連合講演会, 2011 年 3 月 24 日, 神奈川工科大
- ③ 中土井祐, 椎木弘, 長岡勉, 床波志保, 「分子鑄型過酸化ポリピロール膜を用いたウイルスセンサの開発」, 第 58 回応用物理学関係連合講演会, 2011 年 3 月 24 日, 神奈川工科大
- ④ 濱田大地, 飯田琢也, 戸嶋直樹, 床波志保, 「Au/Ag 二元系金属ナノ粒子の調製および構造解析・光応答解析」, 第 58 回応用物理学関係連合講演会, 2011 年 3 月 24 日, 神奈川工科大
- ⑤ 床波志保, 濱田大地, 中土井祐, 椎木弘, 長岡勉, 「ナノギャップ電極を利用したバイオセンサの高感度化」, 東京コンファレンス 2010, 2010 年 8 月 30 日, 幕張メッセ
- ⑥ 床波志保, 濱田大地, 中土井祐, 椎木弘, 長岡勉, 「金ナノ粒子固定化電極を利用した DNA センサの開発」, 東京コンファレンス 2010, 2010 年 8 月 30 日, 幕張メッセ
- ⑦ S. Tokonami, I. Ota, S. Shirai, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Open Bridge-Structured Gold Nanoparticle Film for Electrical DNA Detection” Euro Analysis 2009, Sep. 8. 2009, Innsbruck, Austria.
- ⑧ S. Tokonami, I. Ota, S. Shirai, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Development of Electrical DNA Detection System by Using Open Bridge-Structured Gold Nanoparticle Array”, Flow Analysis XI, Sep.17. 2009, Pollensa, Mallorca, Spain.
- ⑨ 床波志保, 椎木弘, 長岡勉, 「金ナノ粒子架橋構造を利用した電気抵抗型 DNA センサの開発」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日, 北海道大学

〔図書〕（計 1 件）

- ① S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka “Gold Nano Films: Synthesis, Characterization, and Potential Biomedical Applications” in “Nanostructured Thin Films and Surfaces”, Wiley VCH, 2009, 175-195.

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 2 件）

名称：金属ナノ粒子集積構造体を利用した圧力検出装置、温度検出装置、圧力検出方法、および温度検出方法

発明者：飯田琢也, 床波志保, 山本陽二郎, 椎木弘, 長岡勉

権利者：大阪府立大学

種類：特許権

番号：特願 2010-273291

出願年月日：2010 年 12 月 8 日

国内外の別：国内

名称：金属ナノ粒子集積構造体を利用した被検出物質の検出装置および方法

発明者：床波志保, 飯田琢也, 山本陽二郎, 椎木弘, 長岡勉

権利者：大阪府立大学

種類：特許権

番号：特願 2010-273284

出願年月日：2010 年 12 月 8 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

床波 志保 (TOKONAMI SHIHO)

大阪府立大学・21 世紀科学研究機構

・講師

研究者番号：60535491

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし