

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658206

研究課題名（和文） キャピラリー電気泳動デバイスを用いた作物栄養診断用デバイス

研究課題名（英文） Diagnosis device for crop nutrient using capillary electrophoresis

研究代表者

鳥居 徹 (Toru Torii)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60172227

研究成果の概要（和文）：

植物工場における作物のヘルスケア管理として、作物に含まれるビタミン類の分析をリアルタイムで行うことを目的として、キャピラリー電気泳動装置とデジタルマイクロfluidicsデバイスを組み合わせた Lab on a Chip デバイスの開発を目指した。

液滴を囲む液相にフロリナートを用いることで、油性および水性試料ともに分注・搬送・合体を行うことが出来た。本方式による、液滴分注-合一までのプロセスを行うことが可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Lab on a Chip device for real time monitoring of various vitamins at green plant factory was developed using digital fluidics technique and capillary electrophoresis. Fluorinert was used as surrounding material for sample/reagent droplets, and both oil-soluble and aqueous samples were dispensed, transported, merged on the same electrode. This method has potential for Lab on a Chip device, in which dispensing transportation, and merge was performed, using this technique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業情報工学

キーワード：静電気、搬送、分注、混合、液滴、誘電泳動

## 1. 研究開始当初の背景

① 植物工場における作物のヘルスケア管理のためのデバイスとしてリアルタイムデバイスはほとんどないため、植物工場内の作物からサンプリングした試料をリアルタイムで計測し、その結果にもとづいて施設の環境制御を行うことが求められている。

## 2. 研究の目的

チップ上で反応・分離・検出等を行う実験操作場、Lab on a chip の方式の一つにデジタルマイクロfluidics (Digital micro Fluidics: DMF) がある。DMFとは  $\mu\text{L}$  レベルの液滴を操作単位として電極基板上で

電氣的駆動力による液滴の分注・搬送・融合・解析を行う液滴操作技術であり、特に分析化学的用途において試料体積の縮小・反応時間の短縮・機器設備の縮小・操作の自動化が容易であるなどの利点を持つ。DMF では水滴操作の研究がなされてきたが、様々なサンプルを取り扱うことを目指して、フロリナート（フッ素系不活性液体）を溶媒として水滴と油滴を単一デバイスで操作する方式が考案された。この方式では溶媒の蒸発によって液滴-電極間の距離が変化してしまう、液滴が浮いている為揺れ動いてしまうという問題があった。本研究は液槽上面に電極を設置する新しい装置構成の導入によりこれらの問題を解決し、油滴、水滴の同時操作することを目的とした。

### 3. 研究の方法

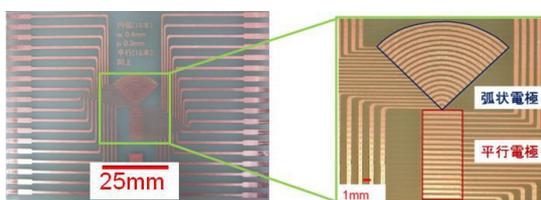


図1 実験1用電極

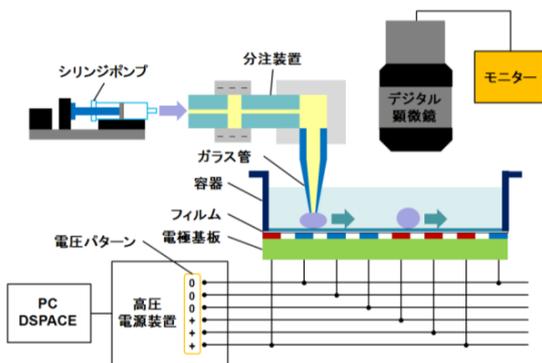


図2 実験1用装置概略

#### [実験1]

作製した電極基板を図1に示す。電極基板1は弧状電極と平行電極を、電極基板2は2つの弧状電極を組み合わせたものである。電極幅は400  $\mu\text{m}$ 、ピッチは700  $\mu\text{m}$ である。分注実験装置の構成を図3に示す。本装置は従来の装置3)を改良したもので、分注を行うガラス管と、搬送・混合を行う電極基板から構成される。ガラス管は先端に疎水処理が施され、試料の入ったシリンジポンプをテフロンチューブにつなげた。チューブの途中にはステンレス部分があり、ジョイント部分で試料に-1Vの電圧を印加した。電極基板と液滴の間には絶縁膜として塩化ビニリデンフィルムを設置し、絶縁膜の表面をテフロンで撥水加工した。液滴の周りにはシリコンオイルで満たし、液滴の蒸発を防いだ。

図2に示すように電極にプラスと0を組み合わせたパターン電圧を印加し、一つずつシフトして進行電界を生じさせ、液滴に静電気を加えることで、分注、搬送を行った。

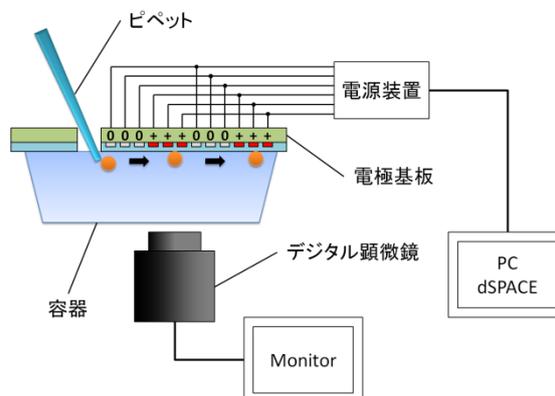


図3 実験装置

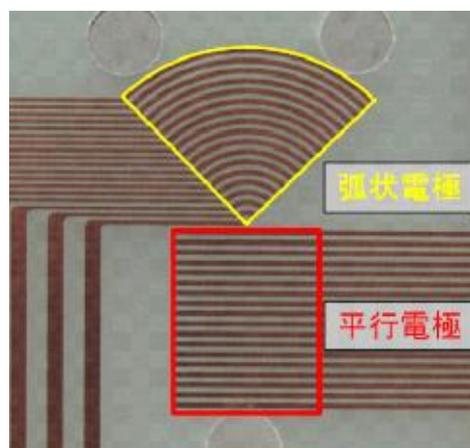


図4 電極

#### [実験2]

本研究で使用した装置の構成を図3に示す。6系統の電極には6出力の高電圧電源装置が接続され、印加パターン+++000の電圧をシフトさせながら印加した。パターン電圧の電圧(0~350V)およびシフトする周波数(0.5~2.0 Hz)はDigital Signal Processor (DS1104, dSPACE)で制御した。DMFは原理的に低誘電率液槽中での高誘電率液滴の駆動を行うものであるため、液滴の駆動にはその液滴材料よりも誘電率が低い液槽材料が必要である。同時に、液滴と混合しあうことがなくかつ化学的にも不活性な物質を液滴周囲の液槽材料として用いることが必要となる。そこで液槽材料としてフロリナートTM (FC-3283、住友スリーエム、比誘電率1.91)を選択した。使用した電極を図4に示す。

電極は平行電極と弧状電極からなり、基板材料はガラスエポキシ樹脂、電極材料はエッ

チングされた銅箔であり、電極幅が 400  $\mu\text{m}$ 、電極間ピッチが 700  $\mu\text{m}$  である。実験の際には絶縁性・撥水撥油性を持つ PTFE テープ（チューコーフローASF-110 FR、中興化成）を基板に貼り、ポリスチレン製のシャーレを容器として接着し、容器内にフロリナートを満たした。本研究では液滴の搬送、合一、分注の 3 種の操作について実験を行った。搬送実験では平行電極下に 0.3~1.0  $\mu\text{L}$  の液滴をマイクロピペットで分注し、印加電圧・搬送速度を変えながら液滴の搬送が可能な条件を調査した。合一実験では弧状電極下で水滴同士、水滴と両親媒性液滴、油滴同士の合一が可能か調査した。分注実験ではシリンジポンプに接続した U 字型テフロンチューブに 100  $\mu\text{L/h}$  で送液し、条件を変えて液滴サイズを計測した。

#### 4. 研究成果

##### [実験 1]

液滴の分注性能を調査する実験 1、生化学反応への応用の有用性を評価する実験 2、3 の 3 つの実験を行った。

実験 1 では電極基板 1 を使用して、酵素反応溶液 1（ルシフェラーゼ）、酵素反応溶液 2（ルシフェリン、アデノシン三リン酸（ATP: Adenosine Tri-Phosphate））、結晶化溶液 1（リゾチーム（37.5 mg/ml）、酢酸バッファ）、結晶化溶液 2（塩化ナトリウム（7.5 wt%）、酢酸バッファ）の 4 種類の溶液を分注し、液滴体積を測定した。酢酸バッファは酢酸と酢酸ナトリウムの混合溶液で、pH が 4.7 になるように濃度を調製した。

実験 2、3 では電極基板 2 を使用して、2 種類の溶液を分注・搬送し、混合した。実験 2 では酵素反応溶液 1・2 を 1 対 1 で混合し、ルシフェリンの発光を観察した。実験 3 では結晶化溶液 1・2 の混合する体積比を変化させ、タンパク質と沈殿剤の濃度を变化させた母液を作製し、マイクロプレート中とガラス管内の 2 種類で結晶化の様子を観察した。pH は常に 4.7 になるように溶液を調製した。分注実験条件は以下の通りである。液層（シリコンオイル）、印加電圧（250 V）、パターン電圧の切り替え周波数（0.5 Hz）、試料の流量（70  $\mu\text{L/h}$ ）、ガラス管と電極基板の距離（0.3mm）。

表 1 に実験 1 で分注された溶液の体積と CV 値を示す。この結果をもとに実験 2、3 の実験を行った。

図 5 に実験 2 の結果を示す。左から順に合一前、合一後（明視野）、合一後（蛍光）となっている。蛍光時にルシフェリンが発光しているのが確認できた。

表 2 に実験 3 の結果を示す。表 3 の写真は結

晶化溶液 1、2 を 1:2 の割合で混合し、7 日間経過した結晶である。分注装置を用いて作製した母液の結晶はサイズが大きく、数が少なくなった。

本研究では以下の成果を得た。複数液滴の独立分注・搬送に成功した。上述の技術を用いて、デバイス上で L-L 酵素反応、及び、リゾチームの結晶母液の作製に成功した。タンパク質と沈殿剤の濃度を变化させたリゾチームの結晶化に成功した。

表 1 分注結果

表 2 溶液の体積と CV 値 (n=20)

溶液	体積 (nl)	CV 値 (n=20)
酵素反応溶液 1	514	20
酵素反応溶液 2	471	23
結晶化溶液 1	404	16
結晶化溶液 2	396	14

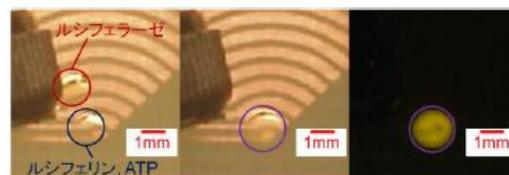


図 5 ルシフェリン、ルシフェラーゼ反応実験

表 2 結晶化結果

	分注装置	ピペット
マイクロプレート		
ガラス管		

[実験 2]

搬送実験では電圧を 0 V から昇圧し、液滴が搬送される最小搬送電圧を調べた。水滴、油滴、両親媒性液滴の搬送を行い、最小搬送電圧を計測した。結果の例としてニンジンジュース、イソプロパノールの滴の最小搬送電圧と搬送速度の関係を図 6 に示す。搬送速度を増大すると最小搬送速度が増大する結果となった。より速く滴を操作するにはより大きいエネルギーが必要になった為と思われる。合一実験では水滴同士、水滴と両親媒性液滴、油滴同士の合一に成功し、混合の様子を観察した。図 7 にフェノールフタレイン液滴と NaOH 水溶液滴の合一の様子を示す。アルカリ化呈色反応により滴が赤褐色になっているのが分かる。連続分注実験では純水とイソボロニルアクリレートの連続分注を行い、分注高さを増大すると滴径が増大し、搬送周波数を増大すると滴径が減少するという結果を得た。

また、分注を行った時の液滴径と分注高さとの関係を図 8 に示す。

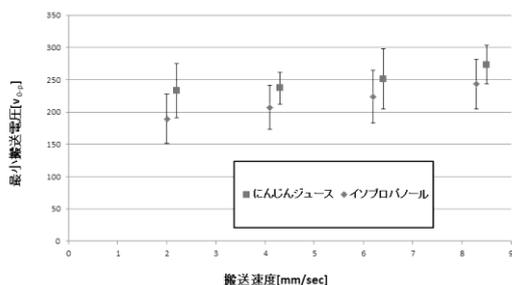


図 6 液滴の搬送結果

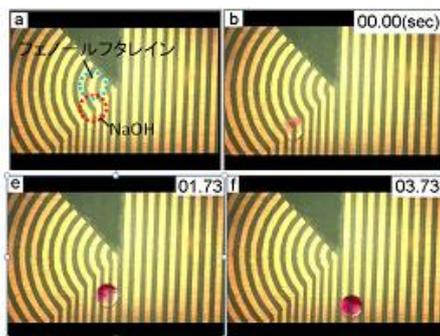


図 7 液滴の化学反応 (フェノールフタレインと水酸化ナトリウム)

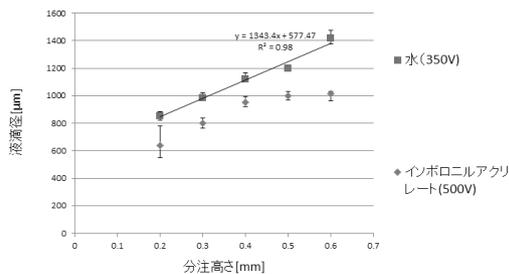


図 8 分注結果

本研究は天井側に電極を設置した新しい DMF デバイスを提案し、液滴の搬送、合一、連続分注が可能であるか調査した。水滴、油滴、両親媒性液滴の搬送、合一ならびに、水滴、油滴の連続分注に成功した。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yusuke Sugiura, Jo Kuroda, Hirotsada Hiram, Toru Torii  
Rapid Bacterial Count Device for Green Plant Factory  
IFAC Bio-robotics conference 2013  
HOTEL AGORA REGENCY SAKAI, Sakai-shi, Osaka, Japan, 2013, March 28
- ② 吉井聡、鳥居徹  
デジタルフルイデックスの有機物分析、合成への応用  
日本生物環境工学会 2012 年東京大会  
東京大学農学部、2012 年 9 月 7 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.dt.k.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 鳥居 徹 (Toru Torii)  
東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号：6 0 1 7 2 2 2 7

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：