

分子制御付きギャップ電極デバイスによる 微小電流に基づく核酸塩基鎖識別法の開発

Tunnel-Current based Oligonucleotide Identification by using with fluidics-MCBJ.

阪大産研 ○大城敬人, 横田一道, 古橋匡幸, 龍崎奏, 谷口正輝, 川合知二

Osaka University ISIR, Takahito Ohshiro, Kazumichi Yokota, Masayuki Furuhashi, Soh Ryuzaki,

Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai

E-mail: toshiro@sanken.osaka-u.ac.jp

1. 緒言

高速・高精度かつ低コストに個人の遺伝情報を読み取ることのできる次世代 DNA シーケンスの開発は, 近年世界中でしのぎを削っている. 本研究室では, 単分子 DNA 鎖を微小ギャップ電極によって電気計測する方法論を提案しており, これまでにトンネル電流を指標として核酸塩基種全種と主要な後天的修飾塩基種をコンダクタンスの値の違いから識別可能であることを示している.

本研究では, 単分子識別能をもつギャップ電極デバイスに流路付与することにより, ロングリードが可能な分子制御付きギャップで電極デバイスによる単分子計測法を開発し, これを用いて核酸塩基鎖の配列決定・識別を行った.

2. デバイス作製および測定条件

計測に用いる nano-MCBJ の作製はシリコン基板表面にポリイミド膜をスパインコートし, その上に電子線描画法および RF スパッタ法を用いて, 金ナノ接合を形成する. その後, ポリイミドのエッチングを行い, free-standing な金ナノ接合を作製する. その後 SiO₂ の CVD 膜を形成後, 流路を RIE エッチングにより作成した. この金ナノ接合を自己破断後, ピエゾ素子をもちいて電極間距離をトンネル電流測定可能な距離 (0.75 nm) に固定し, 電気計測を行った. 試料となる核酸塩基モノマーおよびオリゴマー水溶液は, ナトリウム塩をリン酸緩衝溶液中に 1μM の濃度となったものを用い, 室温・大気圧下で計測を行った. 高速電気計測で単分子計測を行った. 試料核酸塩基鎖としては, マイクロ RNA let7 ファミリーと同一配列を持つ DNA 鎖およびメチル化核酸塩基鎖を用いた. 混合試料については, 核酸塩基濃度比を調整後, 核酸塩基の濃度が 1μM となるように希釈して

用いた.

3. 結果・考察

溶液中の核酸塩基鎖は, ナノギャップ電極間を通る時, 分子を介したトンネル電流が流れるため, 分子由来の電氣的なシグナルが計測される. この時, 通過する核酸塩基の種類が転移するごとにコンダクタンス変化が起こる. この分子シグナルを, 既報の核酸塩基モノマーの固有コンダクタンスをもとに, 通過した核酸塩基分子種の識別し, リード方向の時間変化やリード数の変化について統計的解析を行った.

また, 流路構造や流路シールの方法等により影響を受けることから, 最適な構造について検討を行った結果, 従来のギャップ電極に比べ, リシーケンスに必要なロングリードの割合が上昇し, 測定時間の短縮が図れることが示された. この方法論を基に, 試料核酸塩基鎖リシーケンスおよび定量評価は, コンダクタンスの分布解析によって行うことができることが示された.

3. 結言

今回, トンネル電流に基づく電気計測デバイスに, 分子の流動・配向制御を目的とした流路を追加し, 長い鎖長の遺伝子鎖をよむ行う分子サイズの微小ギャップ電極を用いた DNA の核酸塩基分子を識別とその配列情報を読み取りに成功した. 今後, 更なるロングリードと精度を高めるため, 速度制御電極を追加したデバイスを作製し, 評価していく予定である.