

遠心促進熱対流型 PCR チップの作製と迅速 PCR への応用

Microfluidic chip for rapid PCR device driven by centrifugal thermal convection

阪大院工, [○]桐山雄一郎, 齋藤真人, 民谷栄一

Osaka Univ., [○]Yuichiro Kiriya, Masato Saito, Eiichi Tamiya

E-mail: saitomamoto@ap.eng.osaka-u.ac.jp

【はじめに】PCR 法を利用した遺伝子検査技術を POCT に展開することで、医療分野のみならず食品の微生物検査や遺伝子組み換え植物の検査など、広域かつ多様なケースにおいてターゲットの検出・同定を遺伝子レベルで迅速に行うことが可能となる。サーマルサイクラーとサンプリングチューブを利用した従来のチューブ PCR、マイクロ流路を利用したフローPCR、熱対流による温度交換を利用した熱対流型 PCR (*SCIENCE* 298, 793, 2002) など多様な手法が開発されているが、実際に現場で使用する際に試料調製が煩雑である、装置が大型である等の課題がある。そこで我々は、ベナール対流を表す基礎方程式の重力に依存するパラメータに着目し、このパラメータを遠心場に置き換える事で対流速度の制御を行い、PCR における熱交換の迅速性の向上による増幅反応の迅速化を達成した。また同時に、遠心力と熱対流を利用した溶液充填と混合も可能とし、検体液を注入するだけで PCR が行えるよう PCR 操作の簡便化にも成功した。しかし、本法を行うためのマイクロ流体チップに関して、操作性や量産性に課題があった。そこで遠心促進熱対流型 PCR におけるチップ材料の検討を行った。

【実験】リング状ヒーターを有するステージとこれを DC モーターによって回転させる装置を作製した。回転数の制御は印加電圧の調整によって行っている。流路幅 500 μ m、深さ 400 μ m のリング状流路を有する PDMS/ガラス製のマイクロ流体チップをソフトリソグラフィーにより、シクロオレフィン樹脂(COP)製のマイクロ流体チップを切削加工により作製した。作製したチップに水と食紅液を充填し、装置ヒーター上に設置した後、ステージを回転させ、ハイスピードカメラを用いて対流の様子を観察した。PCR 溶液を作製したチップに充填し、装置ヒーター上に設置した後、20 分間ステージを回転させ、PCR 法によりヒトゲノム DNA から β -Actin の増幅を行った。

【結果・考察】マイクロ流体デバイスを用いた PCR を行うにあたり、95 $^{\circ}$ C付近において発生する流路内の気泡が大きな課題となる。PDMS/ガラス製チップにおいては、PDMS 流路内にミネラルオイルを充填させた結果、PCR 時の気泡発生を防ぐことができた。これは PDMS 内にミネラルオイルが浸潤することでガス供給を妨げられたことによると考えられる。一方、COP 製チップにおいては、流路表面を光学面レベルの切削加工で試作し、PEG 溶液で表面処理を行ったところ、気泡の発生を防ぐことができた。これは表面を親水化することで、PCR 溶液充填時に COP 表面と溶液間に空気が残留しなくなったためであると考えられる。ハイスピードカメラによって得られた画像より、相対重力加速度と対流速度の関係が得られた。5G における流路中の溶液の周回時間は PDMS/ガラス製チップの場合は 6 秒、COP チップの場合は 11 秒であった。エンドポイントにおけるチップ流路の蛍光測定を行い、得られた蛍光強度および電気泳動像よりヒトゲノム DNA から β -Actin(295bp)の増幅が確認された。これらの結果より、本装置およびチップを用いて遠心力により対流速度を制御し、目的 DNA の PCR 増幅を行うことが可能であることを示すことができた。