

プローブ DNA 固定化ポリマー製フォトニック結晶を用いた DNA ハイブリダイゼーション検出

Detection of DNA hybridization using probe DNA immobilized polymer-based photonic crystal

○遠藤 達郎^{1,2}、西辻 凌輔¹、末吉 健志¹、久本 秀明¹ (1. 阪府大院工、2. JST さきがけ)

○Tatsuro Endo^{1,2}, Ryosuke Nishitsuji¹, Kenji Sueyoshi¹, Hideaki Hisamoto¹ (1. Osaka Pref. Univ., 2. JST PRESTO)

E-mail: endo@chem.osakafu-u.ac.jp

[背景・目的]

特定塩基配列を有する DNA のハイブリダイゼーションを検出することは、種々の遺伝性疾患の診断等の応用が可能である。現在、遺伝性疾患を診断するには、polymerase chain reaction (PCR)法が広く用いられている。PCR 法は、特定塩基配列の DNA を増幅させる有用な手法であるが、結果が得られるまでに時間を要するという課題があった。

一方で我々は、ポリマー表面へナノ構造を転写する技術であるナノインプリントリソグラフィーを用いて、ナノメートルサイズの周期構造を有する光学素子「フォトニック結晶(Photonic crystal: PhC)」を簡便・安価に作製することに成功している。加えて作製した PhC は、周辺の屈折率変化に対して鋭敏に光学特性変化を示すことから、抗原抗体反応の非標識検出にも成功している。

これまでの我々の実績を基に前述した課題を解決するため本研究では、ポリマー製フォトニック結晶表面へ静電的相互作用あるいは共有結合にてプローブ DNA を固定化し、DNA ハイブリダイゼーションの検出および固定化方法の違いによる光学特性変化への影響を評価したので報告する。

[実験方法]

本研究では、Cycloolefin polymer (COP)を基材としたピラーアレイ構造（三角配置、直径・ピッチ：230 nm、深さ：200 nm）を有するポリマー製 PhC（SCIVAX 株式会社製）を用いた。PhC 上へのプローブ DNA 固定化は、静電的相互作用の場合、プラズマ処理（60 W, 1 min）を施した後、Poly(allylamine) (PAA) (3 g/L), Poly(4-styrenesulfonate) (PSS) (3 g/L)を交互積層(25 °C, 10 min)させた後、プローブ DNA 溶液(100 nM)を滴下、吸着(25 °C, 1 h)させることで固定化した。共有結合の場合は、プラズマ処理（100 W, 10 min）を施した後、3-Aminopropyltriethoxysilane (1%(v/v)), Glutaraldehyde (1%(v/v))を PhC 表面へ修飾し、プローブ DNA 溶液(100 nM)を滴下、反応(25 °C, 1 h)させることで固定化した。

DNA ハイブリダイゼーションの検出は、プローブ DNA 固定化ポリマー製 PhC 表面へ、異なる濃度に調製したターゲット DNA 溶液(0~100 nM)を滴下、ハイブリダイゼーション(25 °C, 1 h)させ、洗浄・乾燥後は白色光照射による PhC の反射スペクトル観察を行った。

[実験結果]

ポリマー製 PhC は、静電的相互作用、共有結合ともに表面修飾課程毎にスペクトル変化が観察された。これは、PhC 周囲で屈折率変化が生じているためと考えられる。加えて、DNA ハイブリダイゼーション検出を行った結果、静電的相互作用・共有結合のどちらの固定化法においてもターゲット DNA 濃度に依存した反射ピーク強度変化を観察することに成功した。しかし、共有結合によるプローブ DNA 固定化 PhC の方が、反射ピーク強度変化量が大きいことから、周辺屈折率変化だけではなく、表面粗さの影響も寄与していることが示唆された。