

PDMS (Polydimethylsiloxane) を用いた 電気泳動デバイスによる DNA の分離

DNA Separation using a PDMS (Polydimethylsiloxane)-based Electrophoresis Device

金 田 祥 平*・藤 井 輝 夫**

Shohei KANEDA and Teruo FUJII

1. はじめに

近年、マイクロマシン技術を用いて微小な流路構造をもつマイクロチップを製作し、化学・生化学関連装置の小型化、集積化を目指す研究が盛んにおこなわれている。このような研究分野は、マイクロ化学分析システム (Micro Total Analysis: μ TAS)¹⁾ などと呼ばれ、サンプル・試薬・廃液の節減、処理の高速化・高効率化、システムの小型化・自動化などの効果が期待されており、これまで、電気泳動や PCR (Polymerase Chain Reaction) などの機能を持つマイクロチップが多数発表されている^{2~12)}。特に、チップ上でおこなう電気泳動に関する研究例が最も多い。これはチップ化することにより、従来のキャピラリーに比べ、泳動によるジュール熱を効率よく放熱することができるので、より強い電界中での泳動が可能となるなど、高速な分析がおこなえる。これまで、電気泳動などの分析チップの材料としては、ガラスが最も広く使用されているが、ガラス上に微小流路を形成する場合、フッ酸等によるウェットエッチングをおこなわなければならない上、構造を流路としてシールするためには、溶融接合などの高温を用いる接合過程が必要となる^{2~8)}。

それらをふまえて筆者らは、チップ製作コスト削減や、製作の簡便化をはかるため、シリコンエラストマーの 1 種である、ポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane: PDMS) を型成形し、微小な流路を製作する手法の開発を進めてきた^{13~19)}。PDMS は以下に示す有用な特性を持つ。

- 1) サブミクロンスケールまで忠実に型の形状を転写できる
 - 2) フラットな表面に対して自己接着性を有するため、特別な接合過程を必要としない
 - 3) 無色透明であり、流路内の観察が容易
 - 4) 生体物質とほとんど相互作用しない
- また、型成形では、微細な流路構造に対応する型を用意し

さえすれば、比較的簡便かつ、低コストでチップを製作することができる。

以下では、PDMS を材料としたチップの製作技術と、製作した電気泳動デバイスでおこなった DNA の分離実験について述べる。

2. 設計および製作

本研究の電気泳動デバイスは、電気泳動用の微小流路をもつ PDMS のチップ (24 mm × 35 mm) を、電極構造をもつガラス基板 (50 mm × 72 mm) に貼り合わせたものである。図 1 に示すように、PDMS チップには十字型の流路構造 (幅 w 100 μ m, 高さ h 115 μ m) が形成してあり、流路の末端にはそれぞれ、サンプルおよび、分離用支持体を導入するための円形のポート (図 1 B 中 1~4) ($\phi = 3$ mm) を設けてある。

一方、ガラス基板には、クロムと金を積層した電極構造が設けられている。このガラス基板をカードエッジコネクタに接続し、電圧を印加する。従来の研究では、電極部分に白金線などを用いていたが^{2,3,7,11,14,15,18,19)}、ガラス基板上に電極構造を作りこむことにより、電極をポートに差し込む操作や、電極を固定する操作を省くことができ、より簡便に電気泳動をおこなうことができる。

このデバイスの製作工程を図 2 に示す。工程はおおまかに、PDMS チップを型成型する工程 (図 2 A~D) と、ガラス基板上に電極構造をエッチングにより製作する工程 (図 2 F~H) からなる。まず、PDMS チップを型成型するための反転型を製作する。ここでは、超厚膜フォトレジスト (SU-8 50; MicroChem, MA) をスピコートにより塗布し、露光、現像することにより PDMS チップ上に形成すべき流路構造の反転型 (凸型) をシリコン基板上に形成する (図 2 A)。続いて、PDMS の離型を容易にするため、 CHF_3 プラズマによる表面処理を反転型に対しておこなった後に、未重合の PDMS (Sylgard 184; Dow Corning, USA) を流し込み、オープンで加熱し、重合させ硬化させる。

*中央大学大学院

**東京大学生産技術研究所 海中工学研究センター

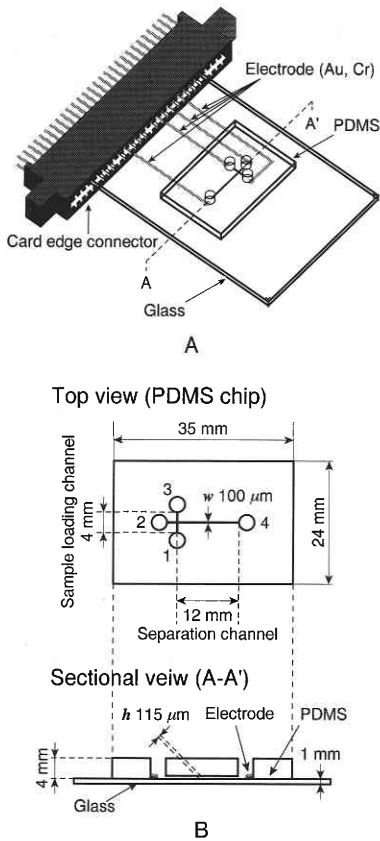


図1 電気泳動デバイスのデザイン。(A) 全体図, (B) PDMS チップとデバイスの断面図

(図2B), 硬化したPDMSを反転型から剥がしとり(図2C), PDMSをチップ単位にダイシングする(図2D). ここで, 製作した反転型は10回程度再利用可能である.

また, ガラス基板の電極構造は, クロムおよび, 金の蒸着(図2E, F), エッチング保護膜としてのフォトリソグ(S1813, Shipley, MA)のパターニング(図2G), クロム, 金のエッチングにより作製される(図2H). 両者の製作後, PDMSチップをガラス基板側に対して, 位置合わせをしながら貼り合わせることで, 流路をシールする(図2I). なお, PDMSチップにはあらかじめ, 流路末端のポートを, 金属パイプを用いて穴あけしておく. 硬化したPDMSは, フラットな表面に対して自己接着性を有するため, 特別な接合過程を経ない点においても, ガラスやシリコンを素材としたチップと比較して, 簡便に流路をシールできる利点を持つ. さらに, 必要に応じて, チップを引き剥がして洗浄, 再使用することも可能である. また, あらかじめ, PDMSの接着面をO₂プラズマ処理したうえで, ガラス基板に貼り付ければ, 半永久的な接合も可能である¹⁵⁾.

3. 評価実験

マイクロチップ上での電気泳動を利用したDNAの分離においては, 非架橋ポリアクリルアミド, セルロース誘導体, ポリエチレンオキシド等のポリマー溶液を分離支持体とする研究が主流となっている^{3-7, 10, 11, 14, 15)}. これらのポリマー溶液は, ある一定の濃度を超えると, ポリマー同

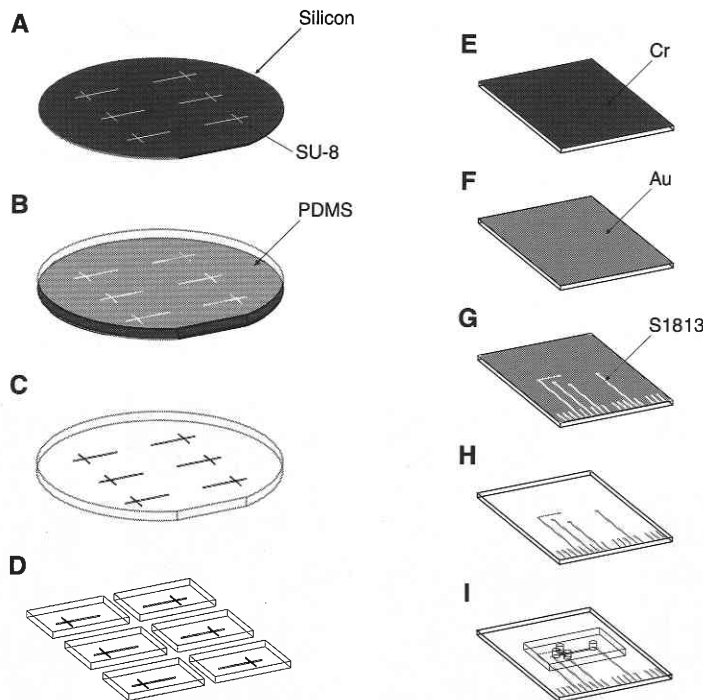


図2 電気泳動デバイスの製作工程。(A) 超厚膜レジストによる反転型の形成, (B) PDMSの型成形 (C) 離型, (D) ダイシング, (E) クロム蒸着, (F) 金蒸着, (G) レジストのパターニング, (H) クロム・金のエッチング, (I) 組み立て

士の絡み合いがおこり、動的ポアを形成する。このポアはゲルの様に固定したサイズを有するものではないが、その平均的メッシュサイズはポリマー濃度に依存する。DNA 分子はポリマー溶液中を泳動する間にゲルと同様の分子ふるい効果により分離が達成される。従って、DNA は網目状になったポリマー溶液中を移動しながらその分子量によって分離されることとなる。具体的には、図3に示すように、ポート4からポリマー溶液を十字の流路内に満たした後(図3A)、サンプルDNAをポート1にローディングす

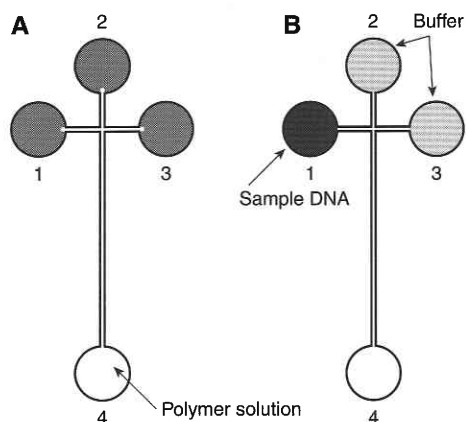


図3 分離支持体およびサンプルのローディング。(A) ポリマー溶液の導入、(B) サンプルローディング

る。他のポートは緩衝液で満たしておく(図3B)。DNA の分離は図4に示すように、印加電圧を操作することでおこなわれる。まず、サンプル導入用の短い流路に電圧を加えることで導入用流路内にサンプルを満たす(図4A)。続いて、印加電圧を分離用の長い流路に切り替えることで、流路クロス部分のDNA を分離用流路にインジェクションする(図4B)。その後、DNA は分子量ごとのバンドとなって分離される(図4C)。

実験では分離支持体のポリマー溶液として、ヒドロキシエチルセルロース (Hydroxyethyl cellulose; Polysciences, USA) 溶液を用い、サンプルDNA(100 bp Molecular Ruler; BIO RAD, USA) を核酸染色剤 (SYGR® Green I; Molecular Probes, USA) にて蛍光染色し、蛍光検出することで分離の観察をおこなった様子を図5に示す。図4と同様に、サンプルDNA が導入用流路に満たし(図5A)、印加電圧の切り替えにより、分離用流路へDNA がインジェクションされ(図5B)、バンドとなって分離されることが確認できる(図5C, D)。図5Aで、ポート3側(図中向かって右方向)の導入用流路の蛍光部分の幅が狭くなっているのは、電気浸透流の影響によるピンチング効果が生じているからである。流路クロス部分から下流地点でバンドの蛍光強度を測定した結果を図6Aに示す。このサンプルでは、100 bp から、1 kbp まで、100 bp おきに分子量の異なる

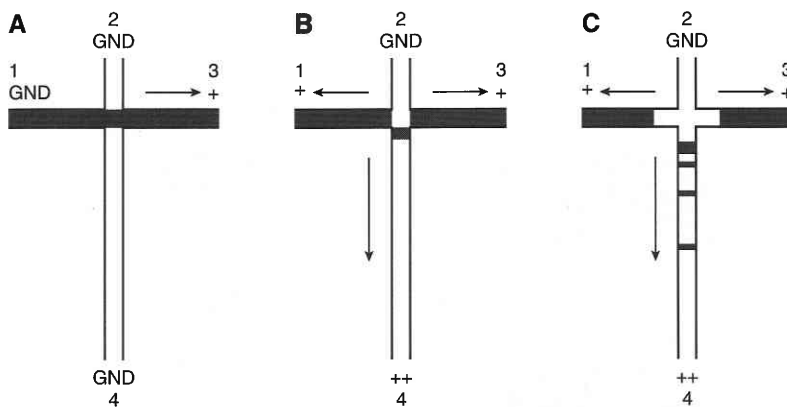


図4 印加電圧操作によるDNA の分離。(A) サンプル導入、(B) サンプルインジェクション、(C) 分離

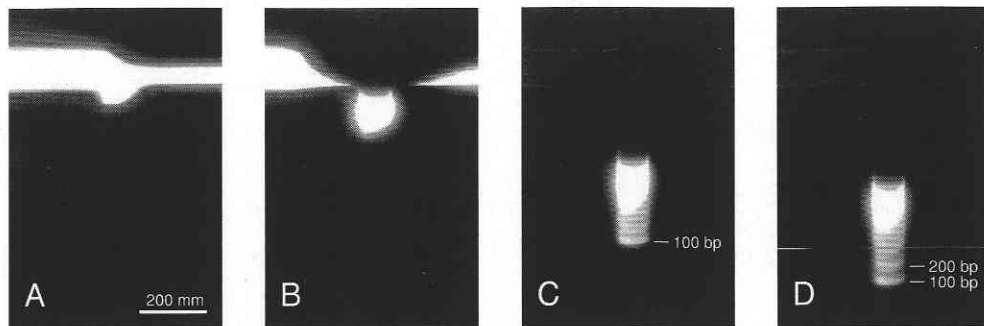


図5 サンプルDNA 分離の様子。(A) サンプル導入、(B) サンプルインジェクション、(C) 分離開始、(D) 分離

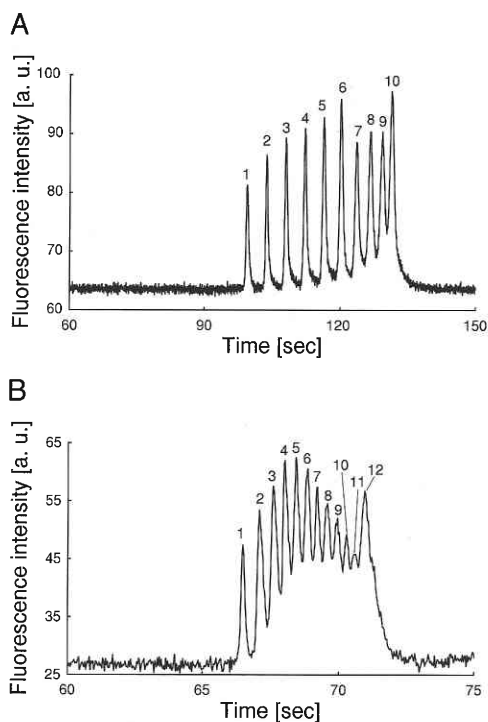


図6 デバイスによる電気泳動の結果。(A) サンプル: 100 bp DNA ruler, ポリマー濃度: 1.0% HEC in $1 \times$ TBE buffer, 検出部位: 5.64 mm (流路クロス部分より下流), サンプル導入時の電圧: 100 V, 分離時の電圧: 180 V; ピーク1: 100 bp, 2: 200 bp, 3: 300 bp, 4: 400 bp, 5: 500 bp, 6: 600 bp, 7: 700 bp, 8: 800 bp, 9: 900 bp, 10: 1 kbp。(B) サンプル: 25 bp DNA ruler, ポリマー濃度: 1.4% HEC in $1 \times$ TBE buffer, 検出部位: 5.20 mm., サンプル導入時の電圧: 100 V, 分離時の電圧: 300 V, ピーク1: 25 bp, 2: 50 bp, 3: 75 bp, 4: 100 bp, 5: 125 bp, 6: 150 bp, 7: 175 bp, 8: 200 bp, 9: 225 bp, 10: 250 bp, 11: 275 bp, 300 bp.それぞれ, サンプル導入開始より60秒後に, 分離流路へと印加電圧を切り替えた。

るフラグメントが含まれるが, それぞれ10本のピークとなって確認できる. ここでは, サンプルDNAの分子量の範囲に応じて適切なポリマー溶液の濃度と, 印加電圧を設定することでDNAを分離することができる. より分子量の小さい範囲のサンプル (25 step DNA ladder; Promega, USA) を用いた場合の分離結果を図6Bに示す. 25 bpから, 300 bpまで, 25 bpおきに12本のピークを確認できる.

この種の分離操作を通常のスラブゲル電気泳動でおこなう場合, 数十分の時間を要するが, マイクロチップを用いた場合, 冒頭に述べたようにわずか2分半程度で高速に分離をおこなうことが確認できた.

4. おわりに

PDMSチップと電極構造を持つガラス基板によって構成される電気泳動デバイスについて, その製作技術と, DNA

の分離実験の結果を報告した. また, 藤井研究室では, 電極構造を持つガラス基板と電源との接続プラットフォームとして同様のカードエッジコネクタを用いており, 基板上にヒータおよびセンサーを作りこみ, PDMSチップ上で, タンパク質合成や, PCRなどの反応操作をおこなうデバイスを開発している²⁰⁻²⁴⁾. 今後は, それらのデバイスと機能を集積させた統合型デバイスの開発に取り組む予定である.

(2002年1月18日受理)

参考文献

- 1) A. van den Berg, et al. eds., *Micro Total Analysis Systems* 2000; Kluwer Academic Publishers: 2000.
- 2) Stephen C. Jacobson, et al., *Analytical Chemistry*; 1998; 70; 3476-3480.
- 3) Adam T. Woolley, et al., *Analytical Chemistry*; 1997; 69; 2181-2186.
- 4) Stephen C. Jacobson, et al., *Analytical Chemistry*; 1996; 68; 720-723.
- 5) Larry C. Waters, et al., *Analytical Chemistry*; 1998; 70; 158-162.
- 6) Karl Fluri, et al., *Analytical Chemistry*; 1996; 68; 4285-4290.
- 7) Shaorong Liu, et al., *Analytical Chemistry*; 1999; 71; 566-573.
- 8) Zhenhua Liang, et al., *Analytical Chemistry*; 1996; 68; 1040-1046.
- 9) Martin U. Kopp, et al., *Science*; 1998; 280; 1046-1048.
- 10) Mark A. Burns, et al., *Science*; 1998; 282; 484-487.
- 11) Adam T. Woolley, et al., *Analytical Chemistry*; 1996; 68; 4081-4086.
- 12) M. Sofi Ibrahim, et al., *Analytical Chemistry*; 1998; 70; 2013-2017.
- 13) Emmanuel Delamarche, et al., *Science* 1997; 276; 779-781.
- 14) Carlo S. Effenhauser, et al., *Analytical Chemistry*; 1997; 69; 3451-3457.
- 15) David C. Duffy, et al., *Analytical Chemistry*; 1998; 70; 4974-4984.
- 16) Kazuo Hosokawa, et al., *Analytical Chemistry*; 1999; 71; 4781-4785.
- 17) Kazuo Hosokawa, et al., Proc. MEMS'99, Orlando, 1999; 388-393.
- 18) Jong Wook Hong, et al., Proc. Transducer'99, Sendai, 1999; 760-763.
- 19) Jong Wook Hong, et al., *Electrophoresis*; 2001; 22; 328-333.
- 20) Takatoki Yamamoto, et al., Proc. Pacificchem'2000, Honolulu, 2000.
- 21) Takatoki Yamamoto, et al., Proc. Nanotech'2000, Montreux, 2000.
- 22) Takatoki Yamamoto, et al., Proc. SPIE'2000, Santa Clara, 2000; 72-79.
- 23) Tatsuhiro Fukuba, et al., Proc. Lab-Chips and Microarrays, Japan, Tokyo, 2000.
- 24) Tatsuhiro Fukuba, et al., Proc. the 2nd OHP/ION Joint Symposium, Yamanashi, 2000; 320-321.