

## 報 文

## 種々の添加物存在下における単一 DNA の顕微誘電泳動挙動

西川 綾佳<sup>1</sup>, 塚原 聡<sup>®1</sup>, 藤原 照文<sup>1</sup>Microscopic Dielectrophoresis of Single DNA in the Presence of  
Some Substances in Aqueous SolutionsAyaka NISHIKAWA<sup>1</sup>, Satoshi TSUKAHARA<sup>1</sup> and Terufumi FUJIWARA<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Chemistry, Graduate School of Science, Hiroshima University, 1-3-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-shi, Hiroshima 739-8526

(Received 17 December 2004, Accepted 16 March 2005)

A newly designed planar quadrupole microelectrode of gold (thickness, 50 nm) and chromium (5 nm) was fabricated by photolithography. The radius of its working area was 125  $\mu\text{m}$ . Two kinds of large DNAs,  $\lambda$ DNA (48 kbp; bp, base pair) and T4GT7DNA (166 kbp), labeled with cationic fluorophores, were taken as a sample DNA. The dielectrophoretic (DEP) behaviors of DNA in the quadrupole electrode were measured with a fluorescence microscope by applying an alternating current with a frequency of 1 kHz  $\sim$  15 MHz and a root-mean-square voltage of 7.1 V. All of the single DNAs migrated radially to the edge of the electrode in the whole frequency range, that is, positive DEP, caused by a dynamic ion cloud around DNA. The DEP behaviors of DNAs confirmed that the fabricated quadrupole electrode made an ideal nonuniform electric field in the working area. Some aqueous substances were added and their influence on the DEP of DNA was examined. The longer T4GT7DNA migrated a little faster than  $\lambda$ DNA, and an intercalating fluorophore slightly enhanced the DEP velocity of DNA. Aqueous polyethylene glycol (PEG) at a high concentration was known to induce a globule transition of DNA, but the viscosity of the solution at the PEG concentration was about 60-times higher than that of water. The dominant effect of PEG on the DEP of DNA was not the globule transition but the enlarged friction force that DNAs underwent from the solution, that is, a slow DEP migration. Anionic and nonionic surfactants had only a small influence on the positive DEP of DNA. A cationic surfactant (hexadecyltrimethylammonium chloride, CTAC) was strongly bound to DNA with an electrostatic interaction, but the DEP behavior of DNA was not measured because CTAC eliminated the interaction of DNA with the cationic fluorophores. Nonionic O/W emulsions showed negative DEP, independent of the DNA of positive DEP.

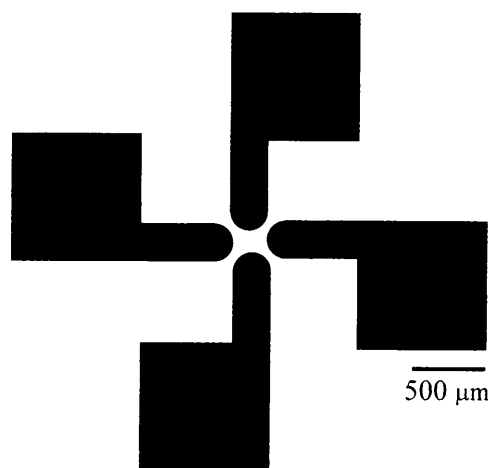
**Keywords :** microscopic dielectrophoresis; planar quadrupole microelectrode; DNA; coil-globule transition; surfactant.

## 1 緒 言

DNA は遺伝に関与する最も重要な生体高分子であり、染色体中の遺伝情報をすべて担っている。DNA では、通常 2 本の相補的なポリマー鎖が、右巻きの 2 重らせんの形に巻きあっており、それぞれの鎖はポリヌクレオチドで

ある。幾つかの夾雑物<sup>きょうさつぶつ</sup>の中から特定の DNA だけを分離し、遺伝子治療や医薬品開発に役立てようとする動き<sup>1)</sup>が活発化している。DNA を分離する一般的な方法として幾つかのものが知られているが、代表的なものとしてゲル電気泳動がある<sup>2)</sup>。この分離法は DNA を大きさで分離するものであるが、約 40 kbp (bp: 塩基対) までの大きさの DNA に対して有効である。40 kbp を超える大きな DNA に関する分離法は、パルスフィールドゲル電気泳動法<sup>3)</sup>以外まだ

<sup>1</sup> 広島大学大学院理学研究科化学専攻: 739-8526 広島県東広島市鏡山 1-3-1



**Fig. 1** A whole figure of a fabricated planar quadrupole electrode ( $r_c$  125  $\mu\text{m}$ )

An original drawing that was used for producing a photomask was 20 times larger than this figure.

ほとんど確立されていない。

誘電泳動とは、不均一な電場内に存在する微粒子に誘起された双極子と電場の相互作用を駆動力とする泳動である<sup>4)</sup>。また、誘電泳動力の大きさや方向は、微粒子と媒体の伝導率と誘電率、微粒子の大きさ、及び不均一電場の周波数などに依存する。著者らは、大きな DNA を高い効率で分離する方法を開発するため、DNA の誘電泳動に注目し、研究を行っている。既に約 40 kbp の DNA が、双曲線形のマイクロ四重極電極において誘電泳動することを報告しているが<sup>5)</sup>、それに及ぼす蛍光ラベル化剤やその他の添加物の影響についてはほとんど検討されていない。

近年、DNA 溶液にポリエチレングリコールや 3 価のポリアミン（スベルミジン）を添加すると、その濃度に応じて DNA のコイル-グロビュール転移が引き起こされると報告されている<sup>6)~8)</sup>。このような DNA の分子内運動や転移が誘電泳動に及ぼす効果についても興味深い。本論文では、まず著者らが設計した四重極電極の作製と、その電極性能の評価について報告し、続いて、DNA の誘電泳動に及ぼす種々の添加物の影響について記す。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

$\lambda$ DNA (48 kbp) は東洋紡、T4GT7DNA (166 kbp, 以下では T4DNA と略す) は日本ジーンから購入した。これらは 2 本鎖の DNA である。DNA を蛍光ラベル化する色素として使用した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) はシグマ、アクリジンオレンジ (AO) はナカライテスク、4-[[3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene]methyl]-1-{3-(trimethylammonio)propyl}quinolinium diiodide (YO-

PRO-1) は Molecular Probes から購入した。DNA 溶液に添加した塩化カリウム (KCl) は 2 回再結晶したものである。その他、添加物として、ポリエチレングリコール (PEG, 分子量 7400~10200)、ショ糖、ドデシル硫酸ナトリウム [SDS,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$ ]、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム [CTAC,  $\{\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-\}$ ] を使用したが、これらはいずれも市販品をそのまま用いた。ポリオキシエチレンオクタフルフェニルエーテル [Igepal® CA630  $\{4\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_9\text{H}\}$ ] 及び Igepal CA520  $\{4\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{H}\}$ 、ポリオキシエチレノニルフェニルエーテル [Igepal CO520  $\{4\text{-C}_9\text{H}_{19}\text{C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{H}\}$ ] は、アルドリッチ製のものを使用した。またこれらの試薬の調製及び試料の希釈には、日本ミリポア製超純水製造装置 (Milli-Q SP システム) で精製した超純水を用いた。

### 2.2 平面マイクロ四重極電極の作製

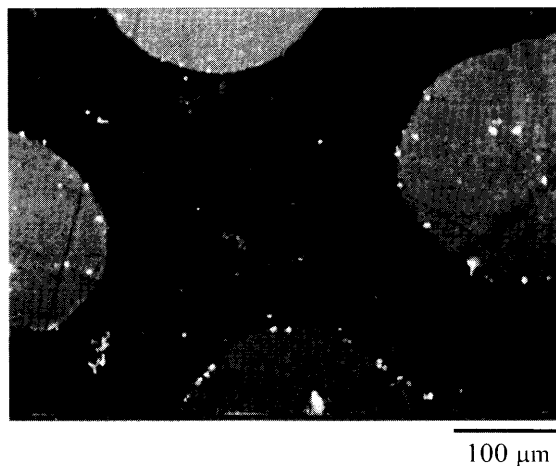
平面マイクロ四重極電極は、フォトリソグラフィー法<sup>9)</sup>により作製した。まず 20 cm  $\times$  20 cm (厚さ 1.1 mm) のガラス板にクロム、金をこの順で真空蒸着させ (アクア・ラボ)、このガラス基板を 2 cm  $\times$  2 cm に切断した。クロムと金の厚さはそれぞれ 5 nm, 50 nm であった。一方、実際の電極の 20 倍の大きさで原図を描き、それをガラス乾板上に 1/20 倍で写真撮影し、Fig. 1 のようなフォトマスクを作製した。2 cm  $\times$  2 cm に切断したガラス基板にフォトレジストを塗布し、このフォトマスクを重ねて露光した。これを現像し、金とクロムをそれぞれ化学的にエッチングし、最後に残ったレジストをアセトンで除去した。完成したマイクロ四重極電極の写真を Fig. 2 に示す。

### 2.3 測定装置

本研究では、DNA の誘電泳動を測定するために、40 倍の対物レンズ (UPlanFI, オリジナル製) を備えた正立型蛍光顕微鏡 (BX-60, オリジナル製) を使用した。蛍光色素として AO, YO-PRO-1 を用いる場合には、励起光 470~490 nm 蛍光 510~550 nm, DAPI を用いる場合には、励起光 330~385 nm 蛍光 420~800 nm の波長範囲で行った。また、必要に応じて透過光による測定も行った。顕微鏡のステージ上においた四重極電極を交流関数発生器 (SG-4105, 岩崎通信製) と接続して交流電圧を印加し、そのときの様子を CCD カメラ (WAT-100N, ワテック製) で撮影し、ビデオレコーダーを用いて録画した。

### 2.4 測定操作

平面マイクロ四重極電極の対向する電極が、交流関数発生器の同じ極になるように配線した。四重極電極には、以前使用していた双曲線形のもの (電極間距離 360  $\mu\text{m}$ ) と



**Fig. 2** A microscopic image of a fabricated quadrupole electrode

The four sectors are electrodes (gold 50 nm/chromium 5 nm/glass).

今回作製したもの（電極間距離 250  $\mu\text{m}$ ）の 2 種類を用いた。 $\lambda\text{DNA}$  ( $9.3 \times 10^{-11} \text{ M}$ ,  $1 \text{ M} = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) 又は T4DNA ( $4.6 \times 10^{-11} \text{ M}$ ) を, AO ( $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), DAPI ( $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), YO-PRO-1 ( $1.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) のいずれかで蛍光染色し, KCl ( $1.0 \times 10^{-5} \sim 4.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) を加え, 1~2 時間放置したものを試料溶液とした。この DNA 溶液を四重極電極の中心部分に滴下してカバーガラスで覆い, 周波数 ( $f$ ) 1 kHz~15 MHz, 振幅 7.1 V (二乗平均) の交流電圧を印加した。DNA の誘電泳動の様子は, 一定の時間間隔でパーソナルコンピュータへ静止画として取り込み, 位置と時間の解析を行った。実験は, 20~25°C で行った。

### 3 結果と考察

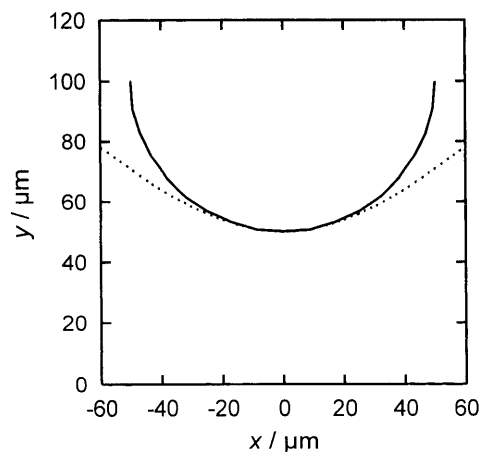
#### 3.1 マイクロ四重極電極の性能の評価

表面に電荷を持った微粒子が不均一電場内に存在するとき, その微粒子に働く誘電泳動力  $F_{\text{DEP}}$  は, 次式で表される<sup>10)</sup>。

$$\langle F_{\text{DEP}} \rangle = 2\pi n_{\text{DEP}}^3 \epsilon_m \text{Re}[\underline{Kc}] |\nabla| E_{\text{rms}}|^2 \quad (1)$$

ここで,  $r_{\text{DEP}}$  は表面に生成する動的イオン雲を含んだ微粒子の半径,  $\epsilon_m$  は媒体の誘電率,  $\underline{Kc}$  はクラウジウス-モソッティ因子,  $\text{Re}[\ ]$  は実数部,  $\nabla$  はナブラ演算子,  $E_{\text{rms}}$  は二乗平均の電場強度である。また,  $\langle \rangle$  は時間平均した値を, 下線は複素数であることを意味している。

四重極電極の中心部分に形成される電場については, 既に理論計算が行われている<sup>11)</sup>。その結果, 原点を電極中心とした  $xy$  平面において, 双曲線形の四重極電極の形状は



**Fig. 3** Forms of one electrode of quadrupole electrode for dielectrophoresis

The origin corresponds to the center of quadrupole electrode.  $r_{\text{ic}}$  is 50  $\mu\text{m}$ . —, circular form; ..., hyperbolic form

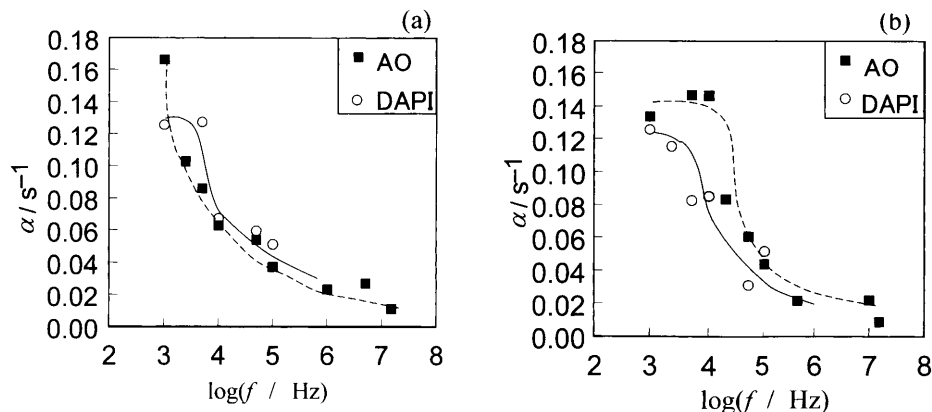
式(2)で表現され, この電極の中心部分に形成される  $|\nabla|E_{\text{rms}}|^2$  は, 式(3)で表される。

$$y^2 = x^2 + r_{\text{ic}}^2; y^2 = x^2 - r_{\text{ic}}^2 \quad (2)$$

$$|\nabla|E_{\text{rms}}|^2 = 2RU_{\text{rms}}^2/r_{\text{ic}}^4 \quad (3)$$

ここで,  $r_{\text{ic}}$  は内接円の半径 (対向する電極の間の距離の 1/2),  $R$  は電極中心からの距離 ( $R \leq r_{\text{ic}}$ ),  $U_{\text{rms}}$  は二乗平均の交流電圧である。Fig. 3 は, 双曲線形の四重極電極の一つの極の形状 ( $y = \sqrt{x^2 + r_{\text{ic}}^2}$ ) を,  $r_{\text{ic}}$  が 50  $\mu\text{m}$  の場合について例示している。

電極作製を依頼した広島県立西部工業技術センターでは, 一般の製図用ソフトウェアのデータ形式である CAD 形式の図形データに対して, 高精度にパターン作成が可能である。CAD 形式とは, 単純な図形の組み合わせ (円や長方形など) で構成されるものである。しかし, 双曲線形の電極の形状は, 式(2)のような特殊な関数で表現されるため, CAD 形式では対応することが難しかった。そこで, 単純な図形の組み合わせで, できるだけ理想に近い四重極電極の形状を再現することを試みた。質量分析装置に用いられている四重極には, 円柱状の電極が用いられていることから, 円形による電極形状の近似を考えた。様々な大きさと位置で円を描き, Fig. 3 の双曲線形のものと比較した結果,  $(0, 2r_{\text{ic}})$  を中心とした半径  $r_{\text{ic}}$  の円が最も高い精度で双曲線の曲率を再現することを見いだした。Fig. 3 にその円の一部を重ねて示す。不均一電場を作製するために重要と考えられる電極先端部分 (Fig. 3 では,  $-30 \mu\text{m} < x < 30 \mu\text{m}$  の範囲) においては, 両者は  $0 \sim 1.7 \mu\text{m}$  の範囲で一致している。Fig. 1 で示したように, 新た



**Fig. 4** Effects of the alternating current frequency ( $f$ ) on the DEP mobility coefficients ( $\alpha$ ) of (a)  $\lambda$ DNA and (b) T4DNA in the planar quadrupole electrode

$r_{ic}$ , 180  $\mu\text{m}$ ;  $U_{rms}$ , 7.1 V

に作製した電極の中心部分はこのような円4つから構成されており、実際には Fig. 2 のような電極が完成した。

双曲線形の四重極電極の中心部分に、式(3)で示される電場が生じているとして、式(1)と式(3)から誘電泳動力が求められている<sup>11)</sup>。一方、媒体中で泳動する微粒子には、次式で表される粘性抵抗力が働く。

$$F_s = 6\pi r_c \eta \frac{dR}{dt} \quad (4)$$

$r_c$  は微粒子の流体力学的半径、 $\eta$  は媒体の粘性率、 $t$  は時間である。誘電泳動力と粘性抵抗力は釣り合いながら、微粒子が泳動すると考え、次の式を導いた<sup>12)</sup>。

$$\ln R = \alpha t + \ln R_0 \quad (5)$$

$\alpha$  は誘電泳動移動度で、今回実験した交流の周波数範囲では、近似的に次式で表される。

$$\alpha = \frac{2\eta_{DEP}^3 \epsilon_m U_{rms}^2}{3r_c \eta_{ic}^4} \text{Re}[Ke] \approx \frac{2\eta_{DEP}^3 \epsilon_m U_{rms}^2}{3r_c \eta_{ic}^4} \frac{\sigma_{DNA} - \sigma_{aq}}{\sigma_{DNA} + 2\sigma_{aq}} \quad (6)$$

$\sigma$  は伝導率、下付の DNA, aq はそれぞれ DNA と水溶液を意味する。本研究で作製した四重極電極の中心部分に、式(3)で表される電場が生じていることは、実験データが式(5)の直線関係を満足することによって確認できる。

顕微画像の各静止画において、DNA と電極中心の間の距離  $R$  を測定し、 $\ln R$  を  $t$  に対してプロットした。その結果、良好な直線関係を得ることができた。このことは、式(3)で表されるように、 $R$  にほぼ比例する  $\nabla|E_{rms}|^2$  が生

じていることを示している。したがって、今回新たに作製した電極は、誘電泳動の研究に有効であるといえる。

### 3・2 単一 DNA の誘電泳動挙動

溶液中に観察される DNA には、見掛けの大きさや蛍光強度が共に大きいものが一部見られたが、他のほとんどは、大きさ、蛍光強度共に均一であった。本研究では、このように均一な蛍光を発するものを単一 DNA と考えて<sup>5)</sup>、その誘電泳動挙動を測定した。

式(6)に示されているように、伝導率の項は、 $\alpha$  の値、すなわち、DNA の泳動に大きく影響する。DNA の伝導率が媒体の伝導率よりも大きいとき、DNA は電場勾配  $\nabla|E_{rms}|^2$  の大きな方向へ泳動する。四重極電極の場合、電極方向への泳動に相当する。これは正の誘電泳動と称され、 $\alpha$  は正の値になる。逆に、DNA の伝導率が媒体の伝導率よりも小さいとき、DNA は電場勾配の小さな方向へ泳動する。四重極電極では電極中心への泳動である。これは負の誘電泳動であり、 $\alpha$  は負になる。

Fig. 4(a) に  $\lambda$ DNA を AO 又は DAPI で蛍光ラベル化した場合の誘電泳動移動度  $\alpha$  の周波数依存性を示す。DNA は、測定した全周波数領域で正の誘電泳動を示した。すなわち、電極方向へ泳動した。また、 $\alpha$  は低周波数側で大きく、高周波数になるに従って小さくなった。DNA が正の誘電泳動を示す理由は、次のように考えられる。多数のリン酸基が存在し、陰イオンである DNA が水溶液に分散すると、表面に陽イオンが多く存在することになる。この陽イオンが、低周波数領域で外部の交流電場によって揺らぎ、動的イオン雲を生成する。この動的イオン雲の大きな寄与により<sup>10)13)</sup>、DNA の伝導率が水溶液のそれよりも大きくなるため、式(6)より  $\alpha$  が正になる。高周波数領域では、イオンの動くことのできる距離は低周波数領域より

短くなるため, DNA と水溶液の伝導率に差がなくなって,  $r_{\text{DEF}}$  と  $\alpha$  が小さくなるものと考えられる.

### 3.3 DNA の誘電泳挙動に及ぼす蛍光色素の影響

あらかじめ DNA と蛍光色素の混合比を計算すると, AO:  $\lambda$ DNA (bp) = 3.1:1, AO: T4DNA (bp) = 1.8:1, DAPI:  $\lambda$ DNA (bp) = 4.5:1, DAPI: T4DNA (bp) = 2.6:1 であった. ただし, これらは DNA の 1 塩基対当たりの比率であり, DNA と溶液の明るさの差が明瞭になるように検討して決めたものである. ここでの検討には, 電極間距離 360  $\mu\text{m}$  の双曲線形の四重極電極を用いた.

Fig. 4(b) に T4DNA の誘電泳移動度  $\alpha$  の周波数依存性を示した. T4DNA も,  $\lambda$ DNA と同様に, 測定した全周波数領域で正の誘電泳動を示した. しかし, 低周波数領域で T4DNA のほうが  $\lambda$ DNA より  $\alpha$  の値が大きかった.

ここで, DNA の半径について考察する. DNA の塩基対の数から計算される全長 ( $\lambda$ DNA, 17  $\mu\text{m}$ ; T4DNA, 58  $\mu\text{m}$ ) と 2 重らせんの半径から, 単一 DNA の固体状態の半径を球体と仮定して求めると,  $\lambda$ DNA では 23 nm, T4DNA では 35 nm であった. 一方, 水溶液中における DNA の流体力学半径については, ブラウン運動の解析式を用いて求めた. 水溶液中に浮遊する微粒子の運動は次式で表される<sup>14)</sup>.

$$(\Delta d)^2 = 4Dt \quad (7)$$

$$r_c = \frac{kT}{6\pi D\eta} \quad (8)$$

ここで,  $(\Delta d)^2$  は時間  $t$  の間の二乗変位距離,  $D$  は拡散係数,  $k$  はボルツマン定数,  $T$  は温度である. DNA のブラウン運動から, これらの式を用いて  $\lambda$ DNA と T4DNA の流体力学半径  $r_c$  を求めたところ, それぞれ 0.8, 1.1  $\mu\text{m}$  であった. このように, 水溶液中の DNA は, 水和や分子内運動により固体状態よりも約 30 倍大きくなっていることが分かった. また, T4DNA のほうが流体力学半径も大きかった. これらのことより, サイズの大きな DNA のほうがリン酸基の数も多く, 水溶液中でより多くの陽イオンが DNA 表面に存在し, 動的イオン雲が大きいために, 式(6) からより大きな  $\alpha$  になると考えられる. また,  $\lambda$ DNA では蛍光色素による違いはほとんどなかったが, T4DNA では低周波数領域で AO を用いたときのほうが DAPI を用いたときより  $\alpha$  の値が大きかった. 前記のように, AO や DAPI は, DNA の塩基対よりも過剰量添加されており, その吸着量には大きな差がないと考えられる. したがって, これらの蛍光色素による違いは, 主に DNA との結合様式の相違に由来すると考えられる. すなわち, DAPI は DNA の副溝の部分で結合し, アデニン, チミン

に選択性を示すが, AO は DNA と結合するとき, 塩基対間にインターカレートすることが知られている<sup>15)16)</sup>. インターカレートした AO によって, DNA が多少伸長することも報告されており<sup>17)</sup>, 誘電泳移動度の増大を引き起こしていると考えられる.

### 3.4 水溶液の粘性率の影響

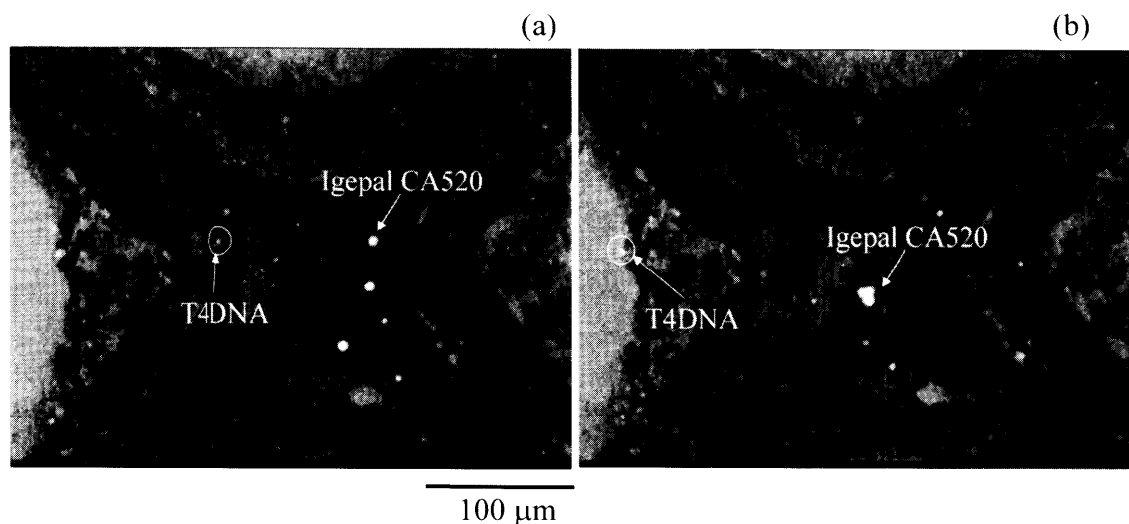
DNA 水溶液に PEG を高濃度で添加すると, 濃度に応じて DNA がグロビュール転移する<sup>6)7)</sup>. 特に PEG の濃度が 8 M (モノマーとして) の水溶液では, DNA のほとんどがグロビュール状態であると報告されている. AO で蛍光ラベル化した T4DNA 溶液に, PEG を 2, 6, 8 M 添加し, 電極間距離 360  $\mu\text{m}$  の四重極電極で誘電泳動を測定した. このとき, PEG を添加しない場合より, DNA の  $\alpha$  の値が 0.01 ~ 0.02 倍と非常に小さくなった. 水の粘性率は 1 mPa $\cdot$ s であるが, これらの PEG 水溶液の粘性率は 10 ~ 60 mPa $\cdot$ s である<sup>18)</sup>. 式(6) と比較すると, 粘性率の増加に反比例して  $\alpha$  は小さくなるはずであり, この実験値と計算値はほぼ一致している. PEG によって DNA のグロビュール転移が起こり, DNA の流体力学半径が小さくなったとしても, その溶媒の高い粘性率のため, 誘電泳挙動に差異が生じなかったものと考えられる.

DNA 溶液に 70% のショ糖を添加した場合は, DNA はほとんど泳動しなかった. このショ糖濃度の水溶液の粘性率は 460 mPa $\cdot$ s になるが, その高い粘性率のために粘性抵抗が増大したものと考えられる.

### 3.5 界面活性剤存在下における DNA の誘電泳挙動

AO で蛍光ラベル化した T4DNA 溶液に, 陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を  $6.2 \times 10^{-6} \sim 6.2 \times 10^{-5}$  M 添加し, 電極間距離 360  $\mu\text{m}$  の四重極電極で誘電泳動を測定した. SDS を添加しないときと類似の周波数依存性のある正の誘電泳動を示した. しかし, SDS を添加しない場合より  $\alpha$  は 1 ~ 100 kHz の周波数範囲で約 0.5 倍になった. これは, DNA の周りの陽イオンによる動的イオン雲の広がりを SDS が抑制したためであると考えられるが, 詳細な機構は不明である.

陽イオン性界面活性剤である塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAC) は, 陰イオンである DNA と強く静電相互作用をすることが知られている<sup>19)</sup>. CTAC を  $3.3 \times 10^{-10} \sim 3.3 \times 10^{-3}$  M 添加し, YO-PRO-1 で染色することを試みた.  $3.3 \times 10^{-10} \sim 3.3 \times 10^{-6}$  M の低濃度域では, T4DNA は蛍光ラベル化され, 電極間距離 250  $\mu\text{m}$  の四重極電極上, 1 ~ 100 kHz の周波数範囲で正の誘電泳動を示した. これは CTAC が入っていないときとほぼ同じ挙動である. 一方, CTAC の濃度が  $3.3 \times 10^{-5} \sim 3.3 \times 10^{-3}$  M の高濃度領域では,  $\text{CTA}^+$  が DNA と強く会合するため, 陽



**Fig. 5** Dielectrophoretic behaviors of T4DNA and O/W emulsions of Igepal CA520 at (a) 0 s and (b) 15 s  
 $r_{ic}$ , 180  $\mu\text{m}$ ;  $f$ , 10 kHz;  $U_{rms}$ , 7.1 V

イオン性である YO-PRO-1 と DNA の結合を阻害した。AO, DAPI でも試みたが、同様に蛍光ラベル化できなかった。CTA<sup>+</sup>と DNA の会合により、誘電泳動は影響を受けていると予想されるが、本法ではそれを蛍光検出することはできなかった。

非イオン性界面活性剤である Igepal CA630 は、水に可溶であった。AO で蛍光ラベル化した T4DNA 溶液に CA630 を  $6.7 \times 10^{-3}$  M 加え、電極間距離 360  $\mu\text{m}$  の四重極電極で誘電泳動の測定を行った。DNA は 1 ~ 100 kHz の範囲で正の誘電泳動を示しており、CA630 の効果は小さかった。これは、次節で明らかになるが、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルと DNA の間には、ほとんど相互作用が働かないためであると考えられる。

### 3.6 DNA の誘電泳動挙動に及ぼす O/W エマルションの影響

2 種類のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (Igepal CA520 又は CO520) を  $3.3 \times 10^{-3}$  M 添加した場合、それらは水に完全には溶解せず、微小液滴 (直径 2 ~ 6  $\mu\text{m}$ ) すなわち O/W エマルションとして存在した。前記の Igepal CA630 には、親水基であるオキシエチレン基が 9 つ存在するが、ここで示した CA520 と CO520 には、いずれもこの基が 5 つしかない。そのため、親水性が減少し、O/W エマルションになったものと考えられる。

いずれのエマルションも AO を抽出して、蛍光を示すようになったが、それらは周波数 1 kHz ~ 1 MHz の範囲において負の誘電泳動を示した。その様子を Fig. 5 に示す。これらの液滴を構成している CA520, CO520 は、非イオン性なので、水溶液よりも伝導率が小さく、式 (6) から

負の誘電泳動を示したものと考えられる。一方、T4DNA は、エマルションとは独立に正の誘電泳動を示した。このことは、DNA のみを蛍光ラベル化できる YO-PRO-1 によって再確認した。すなわち、蛍光検出された T4DNA は正の誘電泳動を示し、透過光により検出されたエマルションは負の誘電泳動を示した。エマルション、DNA 共に AO によって蛍光染色されるが、両者を誘電泳動法によって区別することが可能である。

更に、非イオン性エマルションの表面に CTAC を吸着させて修飾し、DNA をエマルションとともに誘電泳動させることを試みた。CTAC の濃度が  $3.3 \times 10^{-5}$  ~  $3.3 \times 10^{-3}$  M の範囲では、3.5 と同様に、CTA<sup>+</sup>が DNA と蛍光色素の結合を妨げた。また、これより低い  $3.3 \times 10^{-10}$  ~  $3.3 \times 10^{-6}$  M の濃度範囲では、エマルションと DNA はそれぞれ独立に誘電泳動を示した。蛍光ラベル化した DNA を O/W エマルション表面に吸着させるには至らなかった。

## 4 結 言

本研究で設計し、フォトリソグラフィー法によって作製したマイクロ四重極電極は、従来の双曲線形のものと同様の不均一電場を作ることが確認され、誘電泳動の基礎研究に有用であった。

DNA の蛍光色素によって誘電泳動速度にわずかな違いが生じたが、これは主に DNA と蛍光色素の結合様式の差によるものと考えられる。DNA の長さが長いほど誘電泳動速度は大きい。インターカレートする AO では、この差を増大する効果が認められた。DNA のグロビュール転移を引き起こすことが知られている PEG の高濃度溶液で

は, その高い粘性率が粘性抵抗力の増大に大きな影響を及ぼしており, 誘電泳動力に対する転移の寄与は小さく, 判別できなかった. 陰イオン性界面活性剤 SDS や非イオン性界面活性剤 Igepal CA630 が DNA の誘電泳動に及ぼす影響はわずかであった. これらは, 陰イオン性である DNA と強い相互作用をしないためであると考えられる. 一方, DNA と陽イオン性界面活性剤 CTAC は強い静電相互作用を示した. しかし, DNA を蛍光ラベル化することが難しく, 誘電泳動を観察することはできなかった. 非イオン性の O/W エマルションは負の誘電泳動を示したが, DNA と相互作用が見られなかった. 以上の結果は, 今後, 誘電泳動による DNA の分離システムを設計する上で基礎的に重要な知見である.

四重極電極を作製するに当たり, 多大なご協力をいただいた広島県立西部工業技術センターの縄雅典生氏に深謝する. また, 本研究は文部科学省科学研究費補助金萌芽研究 (13554032) による援助を受けて行ったものである.

(2004 年 5 月, 日本分析化学会第 65 回分析化学討論会において一部発表)

## 文 献

- 1) C. Eng, J. Vijn: *Nature Biotech.*, **15**, 422 (1997). B. Ponder: *Science (Washington, D. C.)*, **278**, 1050 (1997).
- 2) F. M. オースベル, 西郷 薫, 佐野弓子: “分子生物学実験プロトコル 1 (Short protocols in molecular biology)”, (1997), (丸善).
- 3) T. Kotaka, S. Adachi, T. Shikata: *Electrophoresis*, **14**, 313 (1993).
- 4) H. A. Pohl: “*Dielectrophoresis*”, (1978), (Cambridge University Press: Cambridge).
- 5) S. Tsukahara, K. Yamanaka, H. Watarai: *Chem. Lett.*, **2001**, 250.
- 6) 吉川研一: 応用物理, **67**, 1183 (1998).
- 7) H. Shinyama, T. Iwataki, K. Yoshikawa: *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 113 (1999).
- 8) N. Makita, K. Yoshikawa: *FEBS. Lett.*, **460**, 333 (1999).
- 9) 増原極微変換プロジェクト編: “マイクロ化学 (Microchemistry)”, p. 35 (1993), (化学同人).
- 10) S. Tsukahara, T. Sakamoto, H. Watarai: *Langmuir*, **16**, 3866 (2000).
- 11) Y. Huang, R. Pethig: *Meas. Sci. Technol.*, **2**, 1142 (1991).
- 12) H. Watarai, T. Sakamoto, S. Tsukahara: *Langmuir*, **13**, 2417 (1997).
- 13) S. Suzuki, T. Yamanashi, S. Tazawa, O. Kurosawa, M. Washizu: *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **34**, 75 (1998).
- 14) 米沢富美子: “ブラウン運動 (Brown Motion)”, p. 125 (1999), (共立出版).
- 15) E. B. Brauns, C. J. Murphy, M. A. Berg: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2449 (1998).
- 16) R. P. Hangland: “*Handbook of Fluorescent Probes and Research Products* (Ninth Edition)”, p. 279, (2002), (Molecular Probes: OR, USA).
- 17) 松原謙一, 中村桂子, 三浦謹一郎監訳: “遺伝子の分子生物学”, p. 254, (1988), (トッパン); J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner: “*Molecular Biology of the Gene*”.
- 18) K. Yoshikawa, Y. Matsuzawa: *Physica D*, **84**, 220 (1995).
- 19) 日本化学会編: “コロイド科学 III (Colloidal Science)”, p. 115 (1996), (東京化学同人).

## 要 旨

40 kbp (bp: 塩基対) を超える DNA の新しい分離法を確立するために, DNA の誘電泳動に注目して研究を行った. フォトリソグラフィ法によって新たに作製した平面マイクロ四重極電極に DNA 溶液を滴下し, 交流電圧を印加して DNA の誘電泳動を蛍光顕微鏡を用いて測定した. DNA にインターカレートする蛍光試薬のアクリジンオレンジを用いた場合では, より大きな誘電泳動移動度を示した. また DNA のグロビュール転移を引き起こすポリエチレングリコールの高濃度溶液では, 転移の効果より, 粘性抵抗力の増大の効果のほうが大きかった. 陰イオン性と非イオン性の界面活性剤では, DNA の誘電泳動に対する効果はほとんどなかった. 陽イオン性界面活性剤である塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAC) を添加した場合には, CTAC が DNA と強く結合するため, 蛍光色素との結合が阻害され DNA の検出が困難であった. 非イオン性の O/W エマルションは, 負の誘電泳動を示し, 正の誘電泳動を示す DNA とは相互作用しなかった.