

第二世代型表面プラズモンによる増強蛍光チップ

高感度な蛍光顕微鏡システムおよびバイオセンサーの開発



田和 圭子

たわ けいこ

tawa-keiko@aist.go.jp

セルエンジニアリング研究部門
分子創製研究グループ
(関西センター)

1995年旧大阪工業技術研究所に入所。2000-2002年にマックスプランク高分子研究所(ドイツ)で取り組んだ研究をきっかけに、以来、「表面プラズモン共鳴励起増強蛍光法」を計測の主軸としてバイオチップに関する研究に従事しています。2007年よりハイテクものづくりプロジェクトにて、高倍率での高感度蛍光イメージングシステムとして、サブ波長オーダーの周期構造チップを利用した蛍光顕微鏡システムの開発を進めています。

関連情報:

● 共同研究者

西井 準治、金高 健二、清末和之、達 吉郎、堀 博伸、明石 直子(産総研)

● 参考文献

[1] K. Tawa *et al.*: *Biophysical J.*, 89, 2750-2758 (2005).

[2] K. Morigaki *et al.*: *Biophysical J.*, 91, 1380-1387 (2006).

[3] K. Tawa *et al.*: *Optics Express*, 16, 9781-9790 (2008).

[4] 田和 圭子他: 周期構造を有するマイクロプレートおよびそれを用いた表面プラズモン励起増強蛍光顕微鏡または蛍光マイクロプレートリーダー(特願2008-000291)

表面プラズモン共鳴を励起場とする増強蛍光

表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いた生体分子の極微量検出システムが実用化されていますが、金属微粒子を用いた局在型SPR、あるいはプリズムを用いて光を基板に誘導する伝播型のプリズムカップリング(PC)-SPRが主流になっています。産総研では、SPR電場を励起場として基板表面の蛍光分子を選択的に励起し、数10倍に増強された蛍光を検出する表面プラズモン励起増強蛍光法(SPFS)の研究を進めてきました^[1,2]。SPFSはSPRよりも高感度に測定できますが、多くの人に使ってもらうためにはコストダウンを含めた装置の小型化や、操作の簡易化、二次元計測によるイメージングといった要請に応えることが必要でした。

サブ波長周期構造チップを利用した高感度蛍光検出

私たちは、光学系を大掛かりにしていたプリズムを使わずにSPRを実現する伝播型の格子カップリング(GC)-SPRの原理に注目しました^[3,4]。GC-SPRは、サブ波長オーダーの周期構造をもつ表面で起きる現象で、PC-SPR計測で必要となる角度よりも低角の入射角で表面プラズモン共鳴を生じさせることが可能なため、光学系の単純化が期待できます。また、高倍率のイメージングには大きな開口数のレンズを用いる必要がないため、既存の蛍光顕微鏡が利用でき、低倍率のマルチアレイチップのイメージングには既存の蛍光マイクロプレート

リーダーをそのまま用いることが可能です。このGC-SPRにより励起増強蛍光を機能させるチップの作製を目指しました。光干渉露光法とドライエッチングによりガラス基板表面に400nmや480nmの周期構造を構築し、その上にAgとSiO₂を成膜してチップに仕上げます(図1)。これらのチップが増強蛍光を与えるかどうか調べるため、チップ上にGFP(緑色蛍光タンパク質)融合細胞を吸着させ、落射型の蛍光顕微鏡で明視野像および蛍光像を観察したところ(図2)、スライドガラス上に比べて数10倍増強された蛍光像が得られました。このチップの作製にはガラス表面への周期構造作製過程において専門的な作業が必要ですが、これをモールド(型)として、光硬化樹脂を用いた光インプリント法によって、プラスチックチップを大量に作製することも可能です。

今後の展開

チップのディスプレイ化およびコストダウンを狙ったナノインプリント法による高精度なチップ開発を進めると同時に、顕微鏡にとりつける対物レンズやフィルター、ピンホールなどの光学系の最適化も行い、表面選択的な高S/Nの高感度蛍光顕微鏡システムの完成を目指します。また、検出光学系が簡単であるメリットを生かし、このサブ波長周期構造チップを臨床診断に応用し、迅速かつ高感度な多項目同時診断チップへの展開も期待できると考えています。

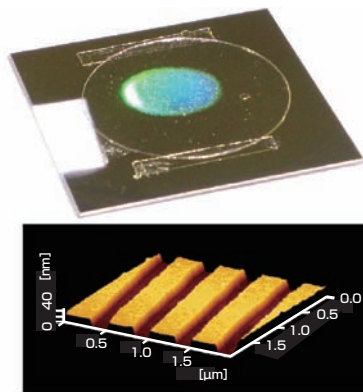


図1 作製したサブ波長周期構造チップの写真(上)とチップの走査型プローブ顕微鏡による計測結果(下)

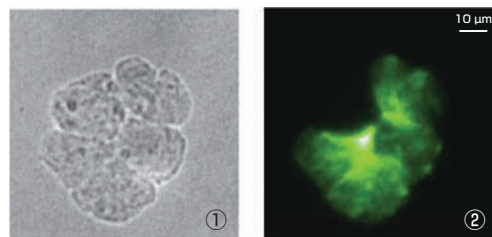


図2 サブ波長周期構造チップ上に吸着させたGFP融合細胞の①明視野像、②GFP蛍光像。