HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	カップ積層型カーボンナノチューブの発光現象とマイクロチップ電気泳動への応用
Author(s)	井上, 陽介; 岡本, 行広; 加地, 範匡 他
Citation	分析化学, 58(6), 517-521 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.58.517
Issue Date	2009-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71684
Type	journal article
File Information	bunseki.58.517.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

BUNSEKI KAGAKU Vol. 58, No. 6, pp. 517–521（2009）

© 2009 The Japan Society for Analytical Chemistry

報　文

カップ積層型カーボンナノチューブの発光現象とマイクロチップ電気泳動への応用

井上　陽介[1]，岡本　行広®[1,2]，加地　範匡[1,2]，渡慶次　学[1,2]，馬場　嘉信[1,2,3,4,5]

従来，マイクロチップ電気泳動でレーザー励起蛍光検出を用いて高感度検出を試みる際に試料の蛍光標識を行う．しかし，蛍光標識は煩雑な操作，標識に伴う分離能の低下及び低濃度試料の蛍光誘導体化効率の低下という問題を有しており，蛍光標識を不要とする高感度検出法の開発が望まれている．著者らは遠心操作によりカップ積層型カーボンナノチューブ（cup stacked carbon nanotubes，CSCNTs）が蛍光を発することを見いだし，泳動液へのCSCNTsの添加によりDNAのマイクロチップ電気泳動分離及び非標識（間接蛍光）検出に成功した．CSCNTsは蛍光を有することに加えて，製造段階でのアスペクト比の調整やCSCNTs表面への機能性分子の固定化が容易であるためにマイクロチップ電気泳動のみならず様々な分野における活用が今後期待される．

1　緒　　言

カーボンナノチューブ（CNT）[1]は直径約数nmから数十nm，長さ数十μm程度の円筒構造の炭素の結晶である．CNTは単層・多層及びグラフェンシートの巻き方の違いにより様々な形態をとり，この形状に起因する特異的な性質を示すために様々な分野への用途が期待されている[2)~7)]．特にCNTは近赤外部に光学遷移を有し，光安定性も良好なために生体試料のイメージング材料として注目されている．様々な形状のCNTの中で，カップ積層型カーボンナノチューブ（CSCNTs）は一般的な同心円状のカーボンナノチューブと異なり底の空いたカップを積み重ねた形状で，内部に大きな中空構造を有している（Fig. 1）[8)]．大きさは直径約100 nm長さ数μmから数百μmである．この特異的な構造により他のナノカーボン材料とは異なる物理的・化学的な特性が知られている[9)~11)]．また，CSCNTsの光学特性に関して著者らは遠心分離後のCSCNTsがCNTとは異なり，可視領域で蛍光を発することを発見している．更に長さの制御や表面の改質によって新たな機能の創出が期待される材料である．

マイクロチップ電気泳動では必要とする試料は微量であり，短時間で分離・分析が可能であるために，この特徴を生かした生体試料の解析例が数多く報告されている[12)~15)]．しかし，依然幾つかの問題点があり，そのひとつが検出に関するものである．マイクロチップ電気泳動では解析対象となる生体試料の多くは低濃度でサンプル中に溶解しているために，低濃度の生体試料を分離・分析する際には高感度検出が必要となる．マイクロチップ電気泳動における高感度検出法としてレーザー励起蛍光（LIF）検出が一般的に用いられているが，LIF検出は試料の蛍光標識を必要とし，これに起因する幾つかの問題点を有している．ひとつには蛍光誘導体化は煩雑な操作を伴うことである．二つ目として誘導体化による分離能の低下が挙げられる[16)17)]．更に三つ目として，低濃度試料の定量的蛍光誘導体化は非常に困難であることが挙げられる[18)]．このためLIF検出自身は高感度検出が可能であるが，低濃度試料の蛍光誘導体化は容易ではないために実際問題として低濃度試料の高感度

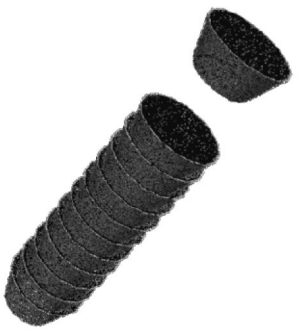


Fig. 1　Structure of cup-stacked carbon nanotubes

[1] 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻：464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町
[2] 名古屋大学予防早期医療創成センター：464-8603　愛知県名古屋市千種区不老町
[3] 名古屋大学プラズマナノ工学研究センター：464-8603　愛知県名古屋市千種区不老町
[4] 産業技術総合研究所健康工学研究センター：761-0395　香川県高松市林町 2217-14
[5] 自然科学研究機構分子科学研究所：444-8585　愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

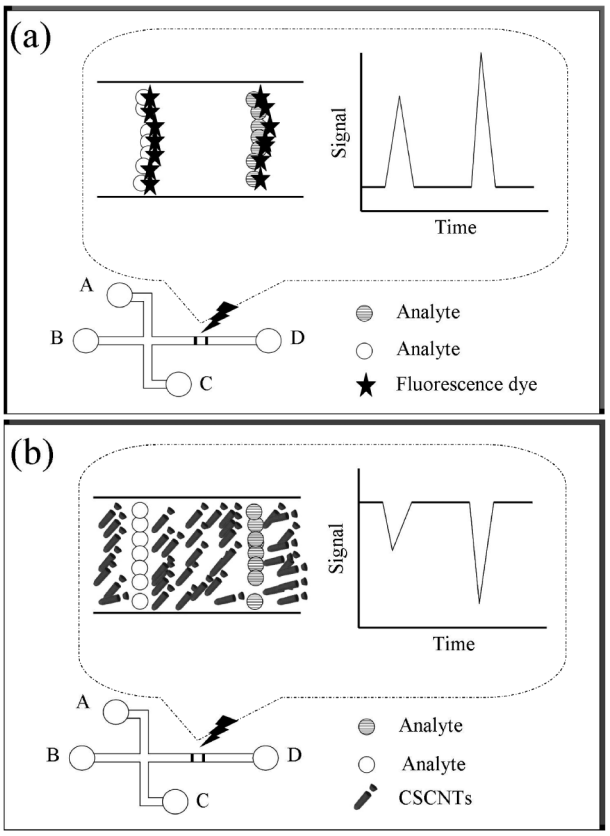


Fig. 2 Measurement principle of (a) direct detection and (b) our developed method in microchip electrophoresis

検出は困難となっている．このように，LIF 検出は幾つかの問題点を有しているために標識操作の伴わない高感度検出法の開発が望まれている．

そこで本論文では，マイクロチップ電気泳動における検出の問題点を改善するために生体試料の直接標識による検出法（Fig. 2a）ではなく，CSCNTs の蛍光及び特異的な性質を利用した生体試料の非標識分離・検出に関する基礎的検討を行ったので報告する．

2 測定原理

分子ふるい効果を有するポリマーと CSCNTs を混合した泳動液をチップ流路全体に充填することで分子サイズによる分離が達成される．また，蛍光を有する CSCNTs を泳動液へ添加することにより一定のバックグラウンドを与え，試料が検出部を通過する際に蛍光強度がバックグラウンドより低下することで間接蛍光検出を行う（Fig. 2b）[19)20)]．

3 実験

3･1 試料と前処理

20 mg の CSCNTs（GSI クレオス社より提供）を硝酸 25 mL に加えて，1 時間の超音波照射と 120℃ 24 時間の還流により CSCNTs の洗浄及び CSCNTs 表面への親水基の導入を行い[21)]，分散性の向上を図った．親水化した CSCNTs を洗浄，乾燥の後，窒素置換されたデシケーター中に保存した．

3･2 蛍光スペクトルの測定

硝酸処理した CSCNTs を蒸留水に懸濁し，CSCNTs 懸濁液（1 mg/mL）を調製した．この懸濁液と CSCNTs 懸濁液の遠心分離（15000 g，5 分）後の上澄み液について分光蛍光光度計（日本分光 FP-6500，励起波長 470 nm）を用いて蛍光スペクトルを測定した．

3･3 マイクロチップ電気泳動による DNA の分離

マイクロチップにはポリメチルメタクリレート製（日立化成工業製）の i-chip 3（Fig. 2）[22)]を使用し，電気泳動測定装置として倒立顕微鏡（Carl Zeiss Axiovert 200M，励起波長：450～470 nm，光源：水銀ランプ）と電源装置（LabSmith HVS448 3000 V）を使用した．DNA の分離媒体にはメチルセルロース（4000 cP）を用い，これを pH 8.0 の 0.5 × TBE（45 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン，45 mM ホウ酸，1 mM エチレンジアミン四酢酸）泳動液に 0.2 wt% となるように溶解した．更にこの泳動液に CSCNTs を 10 μg/mL となるように添加した．この CSCNTs の添加された泳動液を遠心分離（15000 g，5 分）後，得られた上澄み液を流路に充填し，分離・分析を行った．DNA サンプルとして制限酵素の Pst1 によって切断した 5386 bp の ΦX174 RFI DNA Pst1 digest（ニッポンジーン製）116 ng/μL と 1 kbp fragment DNA（ニッポンジーン製）100 ng/μL の 1 : 1 の混合溶液を使用した．DNA の分離流路導入にはピンチドインジェクション法[23)]を用い，電圧設定は試料導入前時にリザーバー A に 60 秒間 500 V を印加し，分離時にはリザーバー A，C に 300 V，D に 1000 V を印加した．検出点はクロス部分から 5 mm として電気泳動を行った．また，比較として同様の測定条件で，ΦX174 RFI DNA Pst1 digest 12.2 ng/μL と 1 kbp fragment DNA 10.0 ng/μL の混合溶液に蛍光試薬（分子数）と DNA（bp）が 1 : 15 になるように YOYO®-1（Molecular Probe 製）を添加し，DNA の分離・直接標識による検出を試みた．

4 結果と考察

4･1 CSCNTs の蛍光スペクトル分析

Fig. 3 に CSCNTs 懸濁液と遠心分離後の上澄み液の蛍光スペクトルを示す．この結果より上澄み液中の CSCNTs は 550 nm に蛍光極大波長を有することが分かる．通常のカーボンナノチューブが近赤外領域に蛍光を発することは知られているが[7)]，著者らの知る範囲において CSCNTs が可視領域に蛍光を発するという報告例はない．また，遠心操

作前後の蛍光特性の変化については次のように考えられる．遠心操作前にはCSCNTsは凝集体を形成しており，この凝集体中の金属CSCNTsの存在により半導体CSCNTsの蛍光が抑制されている．遠心操作により凝集体から分散した個々のCSCNTs（孤立した個々のCSCNTs）を分離することで，上澄み液にCSCNTsの蛍光が観測されたものと考えられる[24]．このように遠心分離という簡易な操作で蛍光性CSCNTsが得られることは注目に値する．

4･2　非標識（間接蛍光）検出によるDNAの分析

Fig. 4にCSCNTsを用いた間接蛍光検出によるDNAの電気泳動図を示す．本手法により2種類のDNAの分離及び非標識検出に成功したことが分かる．本手法と従来法（直接標識法）の分離性能を比較すると，本手法は従来法より若干劣ることが判明した（Table 1）．この分離性能の低下はCSCNTsとDNAの相互作用によるピークのブロード化が原因であると考えられる．このためCSCNTsの表面改質による相互作用の低減が重要である．また，一方でCSCNTsの表面改質によりマイクロチップアフィニティーゲル電気泳動への応用も期待される．検出時間の差に関しては次のように考えられる．DNAとCSCNTsの相互作用及び正電荷を帯びたYOYO-1とDNAとのインターカレーションによるDNAの負電荷の減少[25]　が影響していると思われる．更に検出限界について比較検討を行うと，本手法は従来法より検出下限が高い結果となった．この原因のひとつとしてベースラインの安定性が挙げられる．Fig. 4に示すように，本手法では安定したベースラインを得ることは不可能であった．これはCSCNTsによる散乱及びCSCNTsの物性の不均一性に起因すると考えられる．この問題に関してはチップ表面の改質[26]及びCSCNTsのアスペクト比の調整により解決できると思われる．

このように，本手法は従来法と比較すると分離性能の点で劣る結果となった．しかし，本論文は基礎的検討の段階であり，CSCNTsのアスペクト比の調整，蛍光性CSCNTsの高効率分離方法の開発，CSCNTs表面への機能性分子の固定化によりCSCNTsを用いた高性能分離非標識検出が期待される．

5　結　　論

遠心操作という簡易な操作によりCSCNTsが可視領域に蛍光を発することを見いだした．本論文ではこの蛍光性CSCNTsの泳動液への添加により，DNAのマイクロチップ電気泳動分離及び非標識検出に成功した．間接蛍光検出法は蛍光標識操作を必要としないので，分離試料の簡便な分離・分析が可能である．現段階では直接標識法に比べ分離性能及び検出下限の高さにおいて課題を有しているが，CSCNTsの物性制御（アスペクト比の制御など），蛍光性

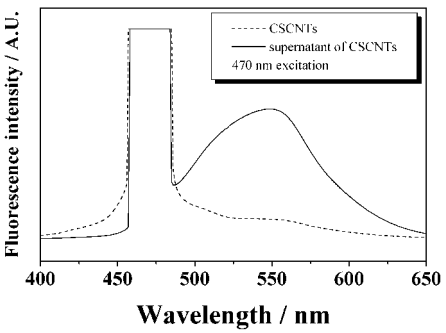


Fig. 3　Fluorescence spectra of CSCNTs suspension and supernatant of CSCNTs

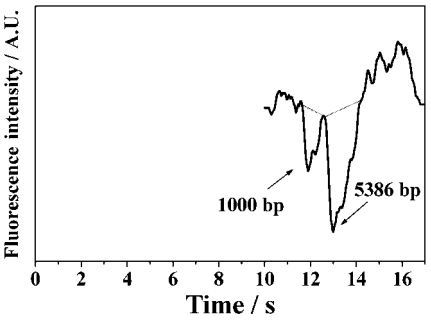


Fig. 4　Electropherogram of double-stranded DNA fragements using indirect fluorescence detection with CSCNTs

Experimental conditions—separation medium : methyl cellulose and CSCNTs dissolved 0.5 × TBE buffer ; Effective length : 5 mm ; Field strength : 208 V/cm ; Detection : 520 nm

Table 1　Comparison of separation performance between direct detection and indirect detection

	Direct detection		Indirect detection	
	1000 bp	5386 bp	1000 bp	5386 bp
Migration time/s	14.9	16.0	11.8	13.1
Theoretical plates × 10^3	7.2	5.0	1.9	1.6
Resolution	1.4		1.0	

CSCNTs の高効率精製方法の開発により一層の性能向上が期待される．加えて CSCNTs の表面改質によりクロマト要素を取り入れることで塩基配列異性体の分離などへの CSCNTs の適用も可能になると思われる．本論文では CSCNTs のマイクロチップ電気泳動への適用についてのみ検討を行ったが，CSCNTs は蛍光特性を含めた特異的な性質により今後様々な分野での適用が期待される．

文　献

1) S. Iijima : *Nature*, **354**, 56 (1991).
2) Y. Inoue, H. Fujimoto, T. Ogino, H. Iwata : *J. R. Soc. Interface.*, **5**, 909 (2008).
3) N. Sinha, J. T.-W. Yeow : *IEEE Trans. Nanobiosci.*, **4**, 180 (2005).
4) M. Valcárcel, S. Cárdenas, B. M. Simonet : *Anal. Chem.*, **79**, 4788 (2007).
5) S. J. Tans, A. R. M. Verschueren, C. Dekker : *Nature*, **393**, 49 (1998).
6) R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer : *Science*, **297**, 787 (2002).
7) B. S. Harrison, A. Atala : *Biomaterials*, **28**, 344 (2007).
8) T. Yokozeki, Y. Iwahori, S. Ishiwata : *Composite A*, **38**, 917 (2007).
9) C. Kim, Y. J. Kim, Y. A. Kim, T. Yanagisawa, K. C. Park, M. Endo, M. S. Dresselhaus : *J. Appl. Phys.*, **96**, 5903 (2004).
10) M. Endo, Y. A. Kim, T. Hayashi, Y. Fukai, K. Oshida, M. Terrones, T. Yanagisawa, S. Higaki, M. S. Dresselhaus : *Appl. Phys. Lett.*, **80**, 1267 (2002).
11) T. Hasobe, H. Murata, P. V. Kamat : *J. Phys. Chem. C*, **111**, 16626 (2007).
12) F. Dang, O. Tabata, M. Kurokawa, A. A. Ewis, L. Zhang, Y. Yamaoka, Y. Shinohara, M. Ishikawa, Y. Baba : *Anal. Chem.*, **77**, 2140 (2005).
13) F. Dang, S. Shinohara, O. Tabata, Y. Yamaoka, M. Kurokawa, Y. Shinohara, M. Ishikawa, Y. Baba : *Lab. Chip.*, **5**, 472 (2005).
14) N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba : *Anal. Chem.*, **76**, 15 (2004).
15) M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba : *Nat. Biotechnol.*, **22**, 337 (2004).
16) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs : *Science*, **222**, 266 (1983).
17) D. B. Craig, N. J. Dovichi : *Anal. Chem.*, **70**, 2493 (1998).
18) A. J. G. Mank, E. J. Molenaar, H. Lingeman, C. Gooijer, U. A. T. Brinkman, N. H. Velthorst : *Anal. Chem.*, **65**, 2197 (1993).
19) 金田　隆：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **56**, 841 (2007).
20) E. S. Yeung, W. G. Kuhr : *Anal. Chem.*, **63**, 275A (1991).
21) A. C. Dillon, T. Gennett, K. M. Jones, J. L. Alleman, P. A. Parilla, M. J. Heben : *Adv. Mater.*, **11**, 1354 (1999).
22) H. Nagata, M. Tabuchi, K. Hirano, Y. Baba : *Electrophoresis*, **26**, 2687 (2005).
23) S. C. Jacobson, R. Hergenroder, L. B. Koutny, J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 1114 (1994).
24) M. J. O'Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, R. E. Smalley : *Science*, **297**, 593 (2002).
25) S. Gurrieri, K. S. Wells, I. D. Johnson, C. Bustamante : *Anal. Biochem.*, **249**, 44 (1997).
26) W. G. Kuhr, E. S. Yeung : *Anal. Chem.*, **60**, 2642 (1988).

Luminescence of Cup-Stacked Carbon Nanotubes and Its Application to Microchip Electrophoresis

Yousuke INOUE[1], Yukihiro OKAMOTO[1,2], Noritada KAJI[1,2],
Manabu TOKESHI[1,2] and Yoshinobu BABA[1,2,3,4,5]

[1] Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Nagoya 464-8603
[2] MEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Nagoya 464-8603
[3] Plasma Nanotechnology Research Center, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Nagoya 464-8603
[4] Health Technology Reseach Center, AIST, 2217-14, Hayashi-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-0395
[5] Institute for Molecular Science, 38, Nishigo-naka, Myodaiji-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-8585

(Received 19 January 2009, Accepted 9 March 2009)

Microchip electrophoresis (MCE) is one of the most suitable methods for biomolecular separation and analysis because of its superior characteristics. In biomolecular separation and analysis, laser induced fluorescent (LIF) detection is frequently employed in MCE and attains high sensitive detection. However, LIF detection requires the labeling of analytes, which contains troublesome procedures and results in decreasing of the separation efficiency. In addition, the labeling reaction at low concentration is significantly difficult, and thus true high sensitive detection is not easily attained and has been desired. Here, we report on the possibility of cup-stacked carbon nanotubes (CSCNTs) for high sensitive label-free detection and high separation efficiency. At first we investigated fluorescence properties of CSCNTs. Our investigation revealed that supernatant solution of CSCNTs after centrifugation had fluorescence at around 500 nm, while CSCNTs suspension did not. The application of CSCNTs for MCE enabled us to successfully separate and detect DNA without labeling it. Compared to the direct detection method, our method resulted in poor separation efficiency. However, by controlling of the CSCNTs' aspect ratio and the immobilization of functional molecules on the CSCNTs surfaces, we could improve separation efficiency and attain the separation of various samples without labeling samples.

Keywords **:** microchip electrophoresis ; cup-stacked carbon nanotube ; indirect detection.