

ルシフェラーゼ固定化プラズモニックチップにおける D - ルシフェリン増強発光のプラズモニック構造依存性

(関西学院大学¹・北海道大学²) ○田和 圭子¹・山中 瞳¹・木畑 歩¹・福島 知宏²・板谷 昌輝²・名和 靖矩¹・村越 敬²

Plasmonic structure dependence of the enhanced luminescence of D-Luciferin with the plasmonic chip modified with Luciferase

(¹Kwansei Gakuin University, ²Hokkaido University) ○Keiko Tawa,¹ Hitomi Yamanaka,¹ Ayumu Kibata,¹ Tomohiro Fukushima,² Masaki Itatani,² Yasunori Nawa,¹ Kei Murakoshi²

Chemiluminescence by enzymatic reaction of luciferin (substrate) and luciferase (enzyme) has been studied as firefly luminescence. In our lab, fluorescence has been enhanced with a plasmonic chip, which is the silver-coated wavelength-seized grating pattern for application to sensitive biosensor. In this study, enhancement of chemiluminescence was studied using a plasmonic chip. The plasmonic chips with 4 kinds of different pitches (300, 400, 480, 600 nm) and with different patterns (hole-array, line and space, concentric circles) were prepared. Under the microscope, chemiluminescence was observed. The chip with 480 nm-pitch showed the most enhanced luminescence and the reaction rate was more than 6-fold accelerated compared with a flat silver substrate.

Keywords : Plasmon, chemiluminescence, luciferin, luciferase, enzymatic reaction

ルシフェリン（基質）・ルシフェラーゼ（酵素）反応による化学発光機構についてはホタル発光としてこれまでに多くの研究がなされており、化学発光にはアデノシン 3 リン酸(ATP)を必要とすることから、食品検査にも応用されている。当研究室では蛍光増強チップデバイスとして金属薄膜で覆われた波長サイズの構造を持つプラズモニックチップの開発を行い、プラズモン共鳴による増強蛍光を用いたバイオ検出に関わる研究を進めてきた。本研究ではプラズモニックチップをルシフェリンの化学発光増強に応用することを検討した。

プラズモニックチップは 1)異なるピッチ(Λ)の格子パターンと 2)同ピッチでパターン形状が異なる格子を調製した。1)では Λ 300, 400, 480, 600 nm の 4 種類を、2)はライン&スペース(LS)、ホールアレイ(HA)、Bull's eye 同心円(BE)パターンのレプリカを光ナノインプリント法で調製し、rf スパッタ法で Ti/Ag/Ti/SiO₂ を成膜した。プラズモニックチップにポリドーパミン膜を形成してルシフェラーゼを表面に吸着させた。そこへ、Mg²⁺と ATP を含むルシフェリンのトリス-グリシン緩衝液を加え、EM-CCD カメラを搭載した正立顕微鏡を用いて発光を検出した。Fig. 1 に示すように Λ 480 nm で最大の発光強度を検出した。Michaelis Menten 式より Λ 480 nm の HA パターンでは銀で被覆された平坦な基板の 6 倍以上の反応速度定数が得られた。

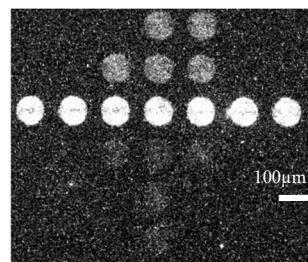


Fig.1 Chemiluminescence image of luciferin under luciferase modified to a plasmonic chip: 1st and 2nd lines (Λ 600 nm), 3rd line (Λ 480 nm), and 4th-6th lines (Λ 400 nm).