

ダイヤモンド基板上的のアプタマーによる ATP 検出 Detection of ATP via Aptamer on Diamond Surface

早稲田理工学術院, °檜村 卓朗, 明道 三穂, 稲葉 優文, 石山 雄一郎,
ルスリンダ アブドル ラヒム, 平岩 篤, 川原田 洋
Waseda Univ. °Takuro Naramura, Miho Myodo, Masafumi Inaba, Yuichiro Ishiyama,
A. Rahim Ruslinda, Atsushi Hiraiwa, Hiroshi Kawarada
E-mail: t.naramura@akane.waseda.jp

緒言

ダイヤモンドは表面修飾性に富み、生体適合性が高いことからバイオセンサに適した材料として注目されている。我々はこれまでダイヤモンド基板表面にプローブ分子を固定してターゲット分子の吸着・検出に成功してきた^[1]。今回、アミノ基末端を施したダイヤモンド基板上で標識付 ATP 検出と ATP に標識を付けない duplex-complex 法^[2]を用いた 2 通りの ATP の検出について比較検討を行った。

実験方法

多結晶ダイヤモンド基板表面をマイクロ波プラズマ CVD 法により水素終端化し、アンモニア雰囲気中において UV 照射して基板表面をアミノ基で終端した。

[標識付 ATP 検出] 基板上的のアミノ基に ATP アプタマーを固定した。Cy5 で標識化した ATP を含む溶液を添加し、この過程について蛍光観察を行った(図 1)。

[duplex-complex 法^[2]] 基板上的のアミノ基に ATP アプタマーと相補的な配列をもつ DNA をプローブとして固定し、Cy5 で標識化した ATP アプタマーと二本鎖を形成させた(duplex)。ここに ATP を含む溶液を添加すると、二本鎖からアプタマーが離れて ATP と複合体を形成し(complex)、洗浄により流され消光する。この過程について蛍光観察を行った(図 2)。また、アプタマー濃度を変化させてそれぞれの蛍光強度を測定した。

結果

[標識付 ATP 検出] Cy5 で標識化した ATP アプタマーの結合前後でシャープなコントラストを得るには至らなかった。アプタマーは基板に固定されて自由度を失ったためか、あるいは ATP が Cy5 で標識化されたためか、アプタマー-ATP の結合が起こりにくかったと考えられる。

[duplex-complex 法] プローブとして固定した DNA に ATP アプタマーを pre-hybridization させたとき、ATP を添加することで二本鎖からアプタマーが離れ ATP と結合したときの蛍光強度に差があることが確認され、duplex-complex 法によるダイヤモンド基板上的の ATP の検出に成功した(図 2)。図 3 に 0.1 μ M、1.0 μ M、10 μ M のアプタマー濃度に対する、ATP 添加前後の消光度(蛍光強度の減少度)を示した。アプタマー濃度に応じて消光度の上昇がみられた。ATP 検出における duplex-complex 法の有効性については当日報告する。

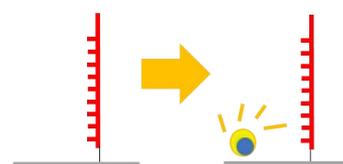


図1. 標識付ATP検出の模式図。
(ATPとアプタマーが結合しない)

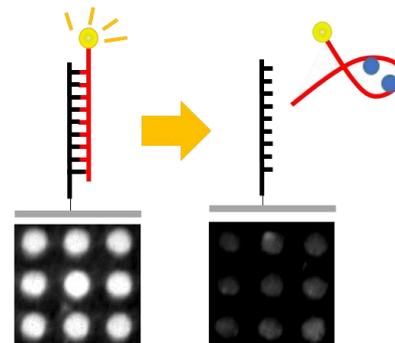


図2. duplex-complex法の模式図

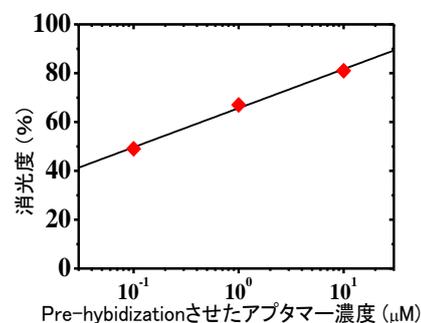


図3. 異なるアプタマー濃度に対し pre-hybridization させた時の消光度変化 (ATP 1 μ M)

[1] A. Rahim Ruslinda, Y. Ishiyama, H. Kawarada et al., *J Elec Soc*, **159** (5) J182-J187 (2012)

[2] Y. Wang, Y. Wang, and B. Liu, *Nanotechnology*, **19**, 415605 (2008).