大気圧プラズマ照射によって生じるDNA損傷のmolecular beaconによる迅速計測

Use of molecular beacons for the rapid detection of DNA damage induced by exposure to an atmospheric pressure plasma

○ 栗田 弘史、宮近 沙希、安田 八郎、高島 和則、水野 彰 (豊橋技科大)
○Hirofumi Kurita, Saki Miyachika, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, Akira Mizuno
(Toyohashi Univ. of Tech.)
E-mail: kurita@ens.tut.ac.jp

近年、プラズマ照射により水溶液中に生成する活性酸素種・活性窒素種 (RONS) がプラズマ医療応用において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。従って、水溶液中のRONSと生体分子損傷の関連はメカニズム解明に向けて重要な知見になり得る。水溶液中に生成するRONS計測には、電子スピン共鳴、蛍光プローブ、紫外線吸収などの方法が有効であり、特に蛍光プローブを用いると迅速･簡便にRONSを計測できる。一方、DNA損傷はアポトーシス誘導などのシグナル伝達経路と深く関わることから重要なターゲットであるが、従来の電気泳動に基づく解析は迅速性・定量性に欠ける。そこで本研究では、5' 末端を蛍光物質で、3' 末端を消光物質で修飾した、ステムループ構造をとりうるオリゴヌクレオチド (Molecular beacon: MB) を利用した、蛍光プローブによるROS検出の迅速・簡便さとDNA損傷特異性を兼ね備えた方法を提案する。酸化ストレスなどによりMBのステム部位が切断されると、それまで近接していた蛍光物質と消光物質が分離し、蛍光増大が生じる。この蛍光増大はDNA損傷を反映しており、迅速かつ定量的計測が可能であると考えた。

プラズマ源として大気圧低温アルゴンプラズマジェットを用い、溶液試料は24穴プレートに分注し、プラズマジェット発生装置の先端と試料液面との距離は50 mmとした。40塩基のMolecular beaconは、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、95°C、3分間加熱した後ゆっくりと室温まで下げてステムループ構造を形成させた。この溶液400 μl に対してプラズマジェットを所定の印加電圧・照射時間で照射し、照射後の溶液の蛍光強度を測定した。Fig. 1に示すように、蛍光強度は照射時間依存的に有意に増大し、その時間変化率は放電電力に比例した。また、抗酸化剤を添加すると蛍光増大は有意に減少した。溶液中RONSがDNA損傷に寄与することを明確に示した。

謝辞　本研究は科研費 (24108005、26390096) の助成を受けたものである。

[1] H. Kurita, *et al.*, Appl. Phys. Lett. **107**, 263702 (2015)

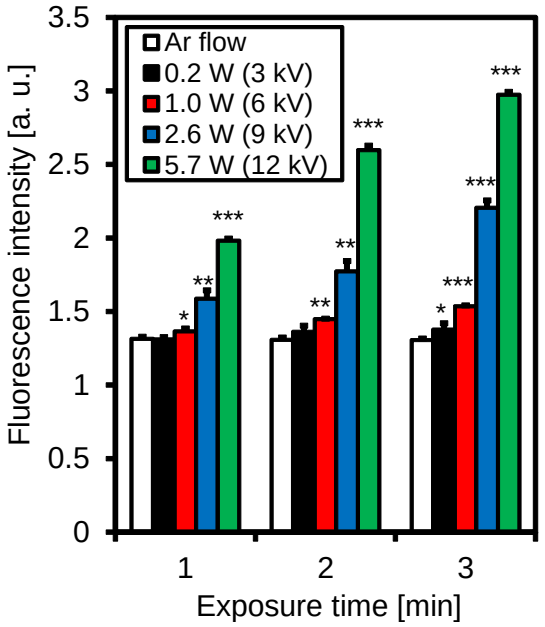

Fig. 1. Fluorescence intensity after exposure to an APPJ. Data are expressed as the mean±standard deviation (SD) (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's t-test. Statistical significance was recognized at $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, and $^{***}p < 0.001$ vs. argon gas flow.

© 2016年 応用物理学会