

簡易な電気化学計測法での DNA 配列内一塩基差異の検出

Detection of one base-mismatch in a DNA strand using simple electrochemical measurement method

○古澤 宏幸¹, 吉嶺 浩司², 時任 静士²

(¹山形大院理工, ²山形大 ROEL)

○Hiroyuki Furusawa¹, Hiroshi Yoshimine², Shizuo Tokito²

(¹Grad. Sch. of Sci. and Eng., Yamagata Univ., ²ROEL, Yamagata Univ.)

E-mail: hfurusaw@yz.yamagata-u.ac.jp

【はじめに】近年、18～25 塩基程度の短い様々な RNA (マイクロ RNA) が生体組織で遺伝子発現制御に深く関わっていることが明らかにされつつあり、特にがん組織においては各マイクロ RNA の発現が変化していることが指摘されている。そのため、組織より流出し血中や唾液、尿に含まれる様々なマイクロ RNA はがん診断のバイオマーカーの有力候補として注目されている。これまで DNA や RNA といった核酸を検出する方法として、一般的には既知配列の核酸分子と二重鎖核酸に特異的吸着する標識剤と共に混合し光学装置によって検出したり核酸吸着メディエーターを用いて電気化学的に検出する方法が用いられてきた。一方でこうした核酸吸着標識剤は発がん性の危険性が完全には排除できない問題があり、家庭用ポイント・オブ・ケア向け核酸センサ開発の懸念材料となっていた。本研究では、DNA などの核酸を非標識かつ汎用的な電気化学デバイスのみで簡易に検出するためのシステム構築を目指し、核酸本来の負電荷を一般的なポテンシオメリー法で検出できるように検出条件を検討することを目的とした。

【実験】センサーチップとして平面基板に金蒸着した電極を用いた。この金電極上に目的核酸を捕捉する Probe DNA 鎖として 10 塩基の 5' 末端がアミノ化されたものをアミンカップリング法により固定化した。Probe DNA 固定化電極および Ag/AgCl 参照電極を測定用ビーカー内の水溶液に浸し、これら電極を電位差測定モードのデジタルマルチメーターに接続した (Fig. 1A)。両電極間の電位差 ΔE を 1 秒間隔で取得し、検出対象として相補的配列の 10 塩基 DNA 鎖 (Match DNA) もしくは 1 塩基だけ配列の異なる DNA 鎖 (Mismatch DNA) を測定ビーカー内に添加した際の電位差変化を観察した (Fig. 1B)。

【結果・考察】測定水溶液として一般的な生理食塩水中で測定した場合、電極上での DNA 二重鎖形成に伴う電位差変化は観察されなかった。塩が全く無い条件下でも観察されなかった。一方、一価の塩ではなく多価の生体由来のポリアミンを希薄に用いた場合には Match DNA と Mismatch DNA とで電位差に変化が観察された。電気化学的に電位差測定に有利な低塩濃度条件をポリアミンによって実現したことで、DNA の一塩基差異を検出できたと考えられる。

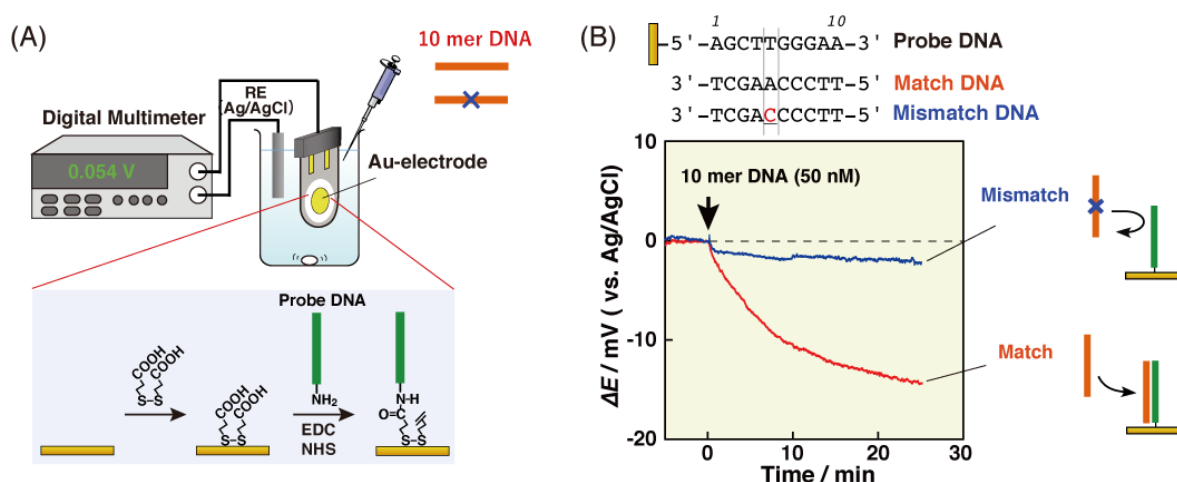


Fig. 1 (A) Setup for electrochemical detection of DNA hybridization and (B) time courses of a potential difference change (ΔE) of Probe DNA-immobilized Au-electrodes, responding to the addition of Match DNA (red curve) or Mismatch DNA (blue curve).