

ダイヤモンド基板の表面制御によるアプタマーを用いた ATP 検出

ATP detection via aptamer by diamond surface control

早稲田理工学術院, ○檜村 卓朗, エヴィ スアエバ, 明道 三穂, 小林 幹典, 稲葉 優文,
平岩 篤, 川原田 洋

Waseda Univ. Takuro Naramura, Evi Suaebah, Miho Myodo, Mikinori Kobayashi,
Masafumi Inaba, Atsushi Hiraiwa, Hiroshi Kwarada

E-mail: t.naramura@akane.waseda.jp

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。我々はこれまでアミノ末端ダイヤモンド基板表面にカルボキシル基終端のプロープ分子としての核酸をアミド結合により固定し、ターゲット分子を検出してきた^[1]。アミノ末端の表面電荷は正である。この場合、核酸分子はリン酸で負に帯電するためにアミノ末端面に非特異吸着してしまう。今回表面電位が負となるカルボキシル基をダイヤモンド基板上に安定に形成させ、これにアミノ末端プロープ分子を固定することで、非特異吸着を抑制した状態で、同様のターゲット分子の検出を行った。

多結晶ダイヤモンド基板表面をマイクロ波プラズマ CVD 法により処理し、後に表面に存在するメチル基を酸化することで基板上にカルボキシル基を施した (図 1)。その基板上のカルボキシル基に、ATP に特異的に結合する DNA によるアプタマー (以下、ATP アプタマー) と相補的な配列をもつ DNA (末端アミノ基修飾、①) をプロープとして固定し、蛍光物質 Cy5 で標識化した ATP アプタマー (②) と二本鎖を形成させた (図 2a)。ここにターゲット分子である ATP を含む溶液を添加すると、二本鎖から ATP アプタマーが離れて ATP と複合体 (③) を形成する。標識付 ATP アプタマーは洗浄により流され、基板は消光する (図 2b)。この過程について蛍光観察を行った。

図 3 に検出結果 (図 3a-図 2a、図 3b-図 2b がそれぞれ対応) を示す。蛍光標識をしたアプタマーによる基板表面の蛍光、および ATP 添加後の蛍光強度の低下が共に確認された。これは、ATP アプタマーがプロープ DNA との二本鎖結合を解消して ATP と複合体を形成していることを示唆しており、したがって図 2 のような ATP の検出が可能となっている。

両者の蛍光強度に明確な差異が得られた理由として、溶液中で負に帯電することが挙げられる。同じく負に帯電するリン酸基を含む DNA アプタマーおよび ATP の非特異的な吸着 (物理吸着) を防ぐことができるため、プロープ DNA との二本鎖結合による蛍光と ATP との複合体形成による減光が明確に観察されたと考えられる。

また、同一基板を用いた繰り返しの ATP 検出においても同程度の蛍光強度の差異が確認され、プロープ DNA の繰り返し利用性が示された。再利用可能チップへの応用についての詳細・検討は、当日報告する。

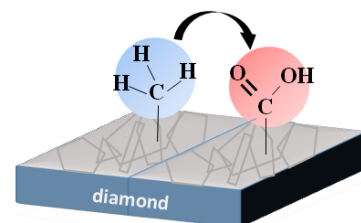


図1.酸化によるカルボキシル基形成図

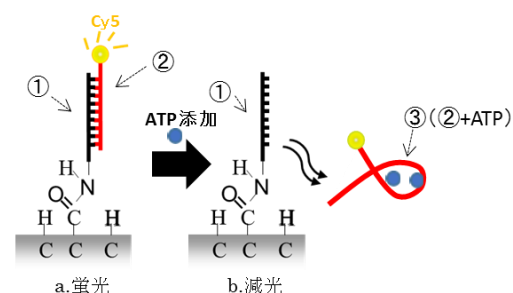
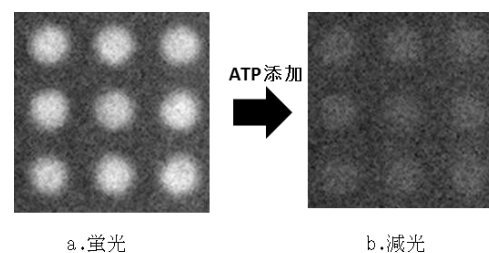


図2. 標識付アプタマーによるATP検出の模式図



a. 蛍光

b. 減光

図3. 蛍光観察結果

[謝辞] 本研究は科研費・基盤研究(S)(26220903)の助成により実施された

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

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