

ノ ー ト

水晶振動子マイクロバランスと電気化学計測による
金電極への 5'-チオール化 DNA の吸着挙動解析森田耕太郎¹, 内田 達也², 桜井 千鶴¹, 寺前 紀夫^{®1}Adsorption of 5'-Thiolated DNA on a Gold Electrode Surface as
Studied by a Quartz Crystal Microbalance and
Electrochemical MeasurementsKotaro MORITA¹, Tatsuya UCHIDA², Chizuru SAKURAI¹ and Norio TERAMAE¹¹ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8578² School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 190-0392

(Received 15 December 2004, Accepted 18 February 2005)

The adsorption and desorption processes of 5'-thiolated DNA oligomers onto a gold electrode were investigated using a quartz crystal microbalance (QCM). The morphology of the DNA layer adsorbed on the gold surface was observed and characterized using scanning tunneling microscopy (STM) and electrochemical measurements. The results of QCM experiments showed that the surface coverage of thiolated DNA was estimated to be *ca.* 30%. The STM observation and electrochemical measurements revealed the flexibility of the immobilized DNA on the gold electrode surface.

Keywords : DNA; quartz crystal microbalance; scanning tunneling microscopy; reductive desorption; differential pulse voltammetry.

1 緒 言

DNA を固体基板上に配置した DNA マイクロアレイは、バイオテクノロジーを支える基板技術として近年注目を集めている。DNA を利用したバイオセンサーや遺伝子の配列解析システムの開発において、ハイブリダイゼーション効率や検出感度の向上を目的として様々な手法を用いて基板表面への DNA 固定化は検討されている。その中で、末端をチオール化した DNA と金電極表面の結合を利用した DNA の固定化¹⁾は、簡便かつ安定な手法として電気化学²⁾や表面プラズモン共鳴³⁾を利用した DNA 検出に応用さ

れている。しかし、電極上に固定化されたチオール化 DNA 分子膜の修飾量並びに電極表面上での吸着状態についてはいまだに明らかにされていない部分が多い。そこで、本研究ではチオール化 DNA 修飾金電極の修飾量について水晶振動子マイクロバランス法 (quartz crystal microbalance, QCM) 及び電気化学水晶振動子マイクロバランス法 (electrochemical quartz microbalance, EQCM) を用いて吸着時と脱離時の質量変化に着目して検討を行った。また、走査型トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscopy, STM) 観察及び、DNA と強く相互作用する 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)-21*H*,23*H*-porphine (TMPyP) の電気化学応答変化を利用して電極上の DNA の吸着状態について検討した。

¹ 東北大学大学院理学研究科化学専攻: 980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

² 東京薬科大学生命科学部環境生命科学科: 192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

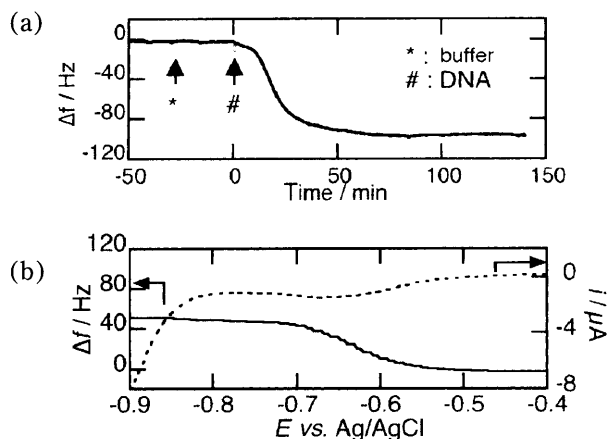


Fig. 1 (a) Time course of QCM frequency change in a TE buffer solution upon addition of (*) the TE buffer solution and (#) a ds-DNA solution. (b) Frequency-potential (solid line) and current-potential changes of a ds-DNA modified gold EQCM electrode in TE buffer

Scan rate = 10 mV s⁻¹

2 実 験

2.1 試 薬

緩衝液及びその他の試薬は和光純薬から購入した特級試薬を使用した。溶液調製には日本ミリポア・リミテッド製の Milli-Q システムで生成したイオン交換水を使用した。チオール化 2 本鎖 DNA (HS-ds-DNA; 20 bp, Takara Co. 製) は 20 量体のアデニンから成る 5' 末端チオール化 1 本鎖 DNA と 20 量体のチミンから成る 1 本鎖 DNA をハイブリダイゼーションさせて得た。DNA の濃度は $\lambda = 260$ nm におけるモル吸光係数 $\epsilon_{dA20} = 243400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{dT20} = 162600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて紫外可視吸光度測定から求めた。

2.2 装 置

2.2.1 QCM 計測 水晶振動子発振回路として北斗電工製 HQ-530 を用い、周波数カウンタ (北斗電工製 HQ-101B) により水晶振動子の共振周波数を計測した。水晶振動子は北斗電工製金蒸着水晶基板 (基本周波数 $f_0 = 10 \text{ MHz}$, 表面積 $A = 0.17 \text{ cm}^2$) を用い、発煙硝酸中で 30 分洗浄処理後、水洗した後アルゴン気流下で乾燥させたものを計測に用いた。測定溶液としてトリス緩衝液 (TE: pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.2 M NaCl) を用いた。計測は循環水 ($25 \pm 0.5^\circ\text{C}$) によって温度管理した恒温グローブボックス内で行った。測定溶液は窒素ガスを一定時間通気することで脱酸素を行い、計測中も測定系内に窒素ガスを通気させた。振動による周波数変化が無視できなかったために、測定溶液内のかくはんは行わな

った。

2.2.2 電気化学及び EQCM 計測 電極系として作用電極, 対電極, 参照電極の三電極系を用い, ポテンシオスタット (北斗電工製 HZ-3000) により電位制御した。計測された周波数及び電流-電位データは GP-IB (general-purpose interface bus) インターフェイスを通じてポテンシオスタット制御用コンピュータに転送した。作用電極は QCM 用金蒸着水晶基板及び金薄膜を用いた。参照電極として Ag/AgCl 電極, 対電極として Pt 線を用いた。測定溶液は TE 緩衝液及びリン酸緩衝液 (pH 7, 5 mM リン酸, 50 mM KCl) を用いた。

2.2.3 STM 観察

STM 観察は Nanoscope E (Digital Instruments 製) を用いて大気中で行った。探針はタングステン線を 0.6 M KOH 中で電解研磨 (交流 15 V) して作製した。観察対象となる Au(111) 基板は Clavilier⁴⁾ の方法に従って, 水素炎中で金線 (0.8 mm) を溶融させて作製した。白金基板に固定した Au(111) 表面を水素炎でアニールし, Milli-Q 水中でクエンチすることで清浄表面を得た。Au(111) 表面上に HS-ds-DNA 溶液約 5 μl を滴下し, 飽和水蒸気下で 2 時間静置後に水洗, 窒素気流下で乾燥させて試料とした。

3 結果及び考察

3.1 QCM 及び EQCM によるチオール化 DNA の吸着量評価

Fig. 1a に HS-ds-DNA の金電極表面への吸着時の QCM 振動数変化を示す。緩衝液中に試料電極を浸漬し, 振動数が一定となったことを確認した後に測定溶液中の全 DNA 濃度が 1 μM になるように DNA 溶液を添加した。DNA 溶液添加後およそ 100 分程度で振動数は一定値に達し, その減少量は 98 Hz であった。緩衝液のみを測定溶液に添加しても振動数変化は観測されなかったことから, DNA 溶液の添加による振動数減少は金電極表面への DNA の吸着に起因すると考えられる。QCM で計測される振動数変化は質量変化のみでなく粘性変化によっても影響される。Okahata ら⁵⁾ は 20 bp 程度の DNA 鎖においては水晶振動子表面での粘性変化による影響は非常に小さいと報告しており, 本研究でも得られた振動数変化を質量変化として換算した。

Fig. 1a で得られた DNA 修飾電極を緩衝液でよく洗浄した後に EQCM 測定系に設置し, 電位掃引によりチオール化 DNA の還元的脱離⁶⁾による振動数変化を計測した。一般にアルカンチオール単分子膜の吸着量は還元的脱離に要した電荷量から見積もることが可能である。これに対して DNA 修飾電極では容量成分変化の寄与が大きく, 電流電位曲線のみから DNA の吸着量を見積もることはできない⁷⁾。そこで本研究では EQCM の振動数変化に着目し,

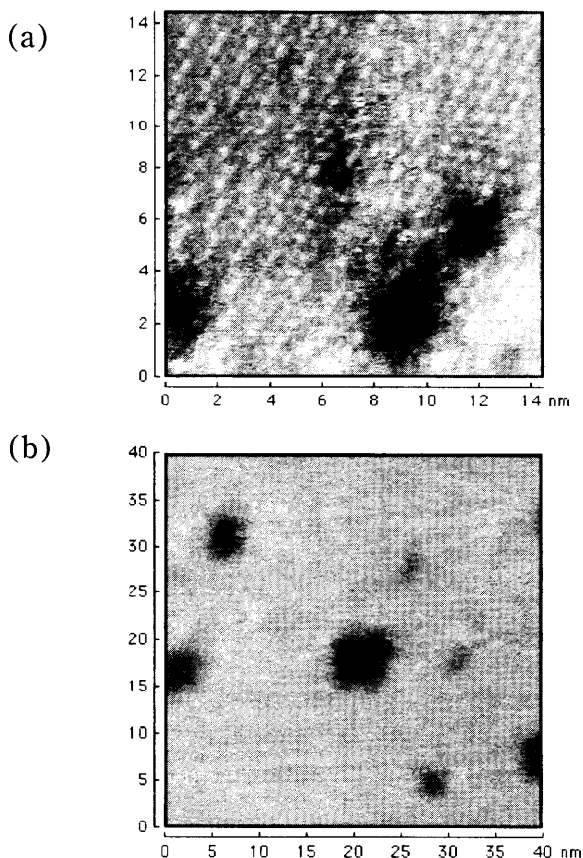


Fig. 2 STM image of (a) mercaptohexanol modified and (b) ds-DNA modified Au(111) substrates

Bias = +0.45 V, I_t = 0.3 nA, Z = 0.5 nm

金電極表面での質量変化から被覆率の算出を行った (Fig. 1b). DNA 修飾金電極 (ds-DNA/Au) の電位を -0.4 V から -0.9 V に掃引したところ -0.6 V 付近でブロードな還元電流とともに振動数増加が観測された. この振動数増加は, 電位掃引によって HS-ds-DNA が脱離したことによる振動子表面での質量減少を意味し, その値は 54 Hz であった. また, Fig. 1b 計測後に繰り返し電位掃引したところ, -0.6 V 付近のブロードな還元電流及びそれに伴う振動数増加は観測されなかった. このことから, 一度の電位掃引によって電極上に結合した HS-ds-DNA がすべて脱離したものと考えられる. 吸着時の振動数減少量 (98 Hz) と脱離時の振動数増加量 (54 Hz) に差が見られたことは以下のように説明できる. Fig. 1a に示した DNA の吸着過程では金電極表面と特異的に Au-S 結合を形成した DNA だけでなく, 非特異的に物理吸着した DNA による質量変化も同時に観測されているものと考えられる. チオール部位を持たない DNA を含む溶液を長時間金電極に接触させることでも, 金電極上に DNA が物理吸着する⁸⁾ことが知られている. しかし, この吸着力は比較的弱く, 洗浄操作によって取り除かれることが同位体ラベル化した

DNA を用いて報告⁹⁾されている. このことから, 本研究で観測された吸着時と脱離時における振動数変化量の差異は, 非特異的に吸着した HS-ds-DNA が洗浄操作により電極表面から取り除かれたことを示すと考えられる.

本研究で用いた HS-ds-DNA の分子量及び飽和単分子吸着量の計算値 (6.0×10^{-11} mol cm⁻²)¹⁰⁾ から予測される最大振動数変化は約 178 Hz である. 以上の結果から水晶振動子上で金電極と特異的に Au-S 結合を形成した HS-ds-DNA の吸着量は還元的脱離時の振動数増加量から, およそ 18 pmol cm⁻² であり, 被覆率にして 30% 程度あることが明らかとなった. この値は Tarlov¹¹⁾¹²⁾ らが [HS-DNA] = 1 μ M の溶液から作製した DNA 修飾金電極についてクロノクーロメトリーを用いて定量した結果とよく一致している. また, Barton ら¹⁰⁾は [HS-DNA] = 100 μ M の溶液から作製した DNA 修飾金電極において ³²P 同位体を用いて 75% の値を得ている.

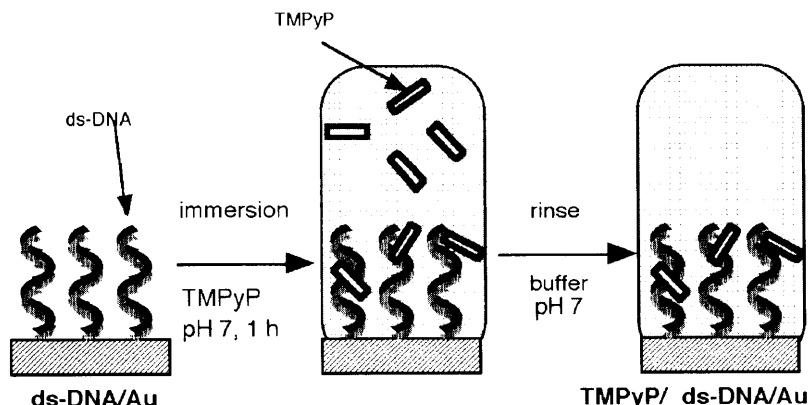
本研究では, QCM 計測と EQCM 計測を併用することで DNA 修飾電極作製時に, 非特異的に電極上に吸着した DNA 分子が存在することも明らかとなった. 特異的に電極表面に結合した DNA 分子の電気化学還元的脱離による質量変化に着目して算出した吸着量は, 過去に報告された異なる計測手法で求められた値と同等の値であり, QCM 計測と電気化学測定を併用することの有効性を示すものである.

3.2 STM 観察

金電極上に形成した DNA 分子膜の吸着状態について STM による観察を行った. Mercaptohexanethiol 修飾 Au (111) 基板では Fig. 2a に示すように, ピット構造と呼ばれるくぼみとその周囲にアルカンチオール分子による規則構造¹³⁾が観測される. これに対して, DNA 修飾 Au(111) 基板ではピット構造が形成されていることは確認されたが, 規則構造は観察されなかった. 本研究で作製した ds-DNA/Au 電極の被覆率は EQCM 計測の結果から, 30% 程度である. 電極上の DNA は, DNA 鎖のリン酸部位が負電荷を有するために分子間の相互作用が弱いこと, また吸着部位であるチオール基に比べて DNA 鎖の立体障害が大きいことなどから, 規則的かつ高密度にパッキングした膜を形成しにくいと予想される. この結果として, 電極上の DNA 分子の配向性やコンホメーションは一様ではなく, ランダムな吸着形態をとっていると考えられる. このため, STM 観察によって規則的な構造を観測することは困難であったと考えられる.

3.3 ds-DNA/Au 電極での TMPyP の電気化学応答

Bard¹⁴⁾ らは, DNA と結合したマーカー分子の酸化還元電位は, DNA 内部との疎水的相互作用が支配的な場合



Scheme 1 Schematic illustration of TMPyP/ds-DNA/Au electrode preparation

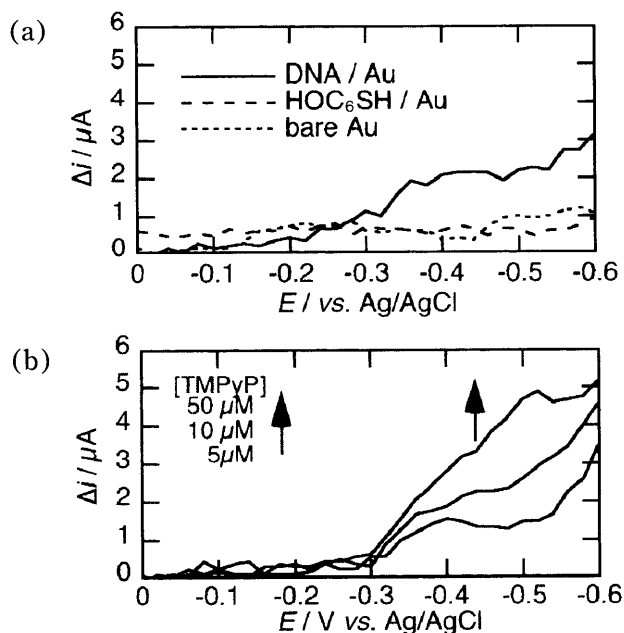


Fig. 3 DPVs of TMPyP adsorbed electrodes in 50 mM KCl (5 mM phosphate, pH 7)

Pulse periods: 200 ms; Scan rate: 100 mV s⁻¹; Pulse amplitude: 50 mV; Pulse width: 50 ms. (a) Dependence of the modified layer for TMPyP adsorption. DNA/Au, HOC₆SH/Au, and bare Au electrodes were immersed to 10 μM TMPyP solution. (b) Dependence of the DPV responses on the concentration of a TMPyP solution for TMPyP/ds-DNA/Au electrode preparation. Concentrations of a TMPyP solution were 5, 10, and 50 μM, respectively.

(インターカレーション)には還元電位は正電位へシフトし、DNA外部のリン酸部位との静電相互作用が支配的な場合(マイナーグループバインディング)には負電位へシフトすると報告している。そこで、本研究でもDNAと強く相互作用する5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)-21*H*,23*H*-porphine (TMPyP)の電気化学応答により電

極表面上のDNA吸着状態について検討した。Scheme 1に示すように、ds-DNA/Au電極を10 μM TMPyP溶液に一時間浸漬、緩衝液でよく洗浄することでTMPyP/ds-DNA/Au電極を作製し、緩衝液中での電気化学計測を行った。TMPyP/ds-DNA/Au電極の比較としてHOC₆SH修飾及び未修飾の金電極でも同様のTMPyP溶液への浸漬操作を行い、(differential pulse voltammetry, DPV)を計測した結果をFig. 3aに示す。TMPyP/ds-DNA/Au電極では-0.4 V付近に還元電流が観測されたのに対し、HOC₆SH修飾及び未修飾の金電極では還元電流は観測されなかった。これはTMPyPが電極上のDNAに吸着し、洗浄操作によってもDNAとTMPyPとが電極表面上で強く相互作用していることを支持する結果である。ds-DNA/Au電極を浸漬させるTMPyP溶液の濃度に対する応答の変化について測定を行った。Fig. 3bにTMPyP浸漬溶液の濃度を5 μMから50 μMの範囲で変化させて作製したTMPyP/ds-DNA/Au電極で計測したDPVを示す。5~10 μM TMPyP溶液から電極上のDNAに吸着したTMPyP還元電位は-0.40 Vへシフトし、50 μM TMPyP溶液から吸着させた場合には-0.50 V付近へシフトすることが観測された。未修飾の金電極で計測したバルク溶液中のTMPyPの還元電位は-0.45 Vであった。

本研究で得られたTMPyP溶液の濃度に依存するTMPyP/ds-DNA/Au電極上のTMPyPの電位シフトは以下のように説明される。低濃度域(5~10 μM)から電極上のDNAに吸着したTMPyPはDNA内部にインターカレーションし、TMPyP濃度が上昇(~50 μM)するにつれて、DNA外部のリン酸基と相互作用するものであると考えられる。

4 ま と め

本研究において、金電極上に固定化されたDNAの吸着状態の解析を目的として、EQCMによる被覆率算出、

STM による形態観察, DNA に結合したポルフィリンを利用した電気化学計測を行った. その結果, 吸着過程で非特異的に吸着した DNA は洗浄操作によって取り除かれ, 金電極と特異的に結合を形成した DNA の修飾量は電気化学還元に伴う脱離量によって定量可能であることが明らかとなった. 本研究で作製した DNA/Au 電極の被覆率は 30% 程度であり, STM 観察により電極上の DNA 分子はランダムな配向をとることが確認された. また, DNA に吸着した TMPyP の電気化学応答から, 電極上での DNA との相互作用形態によって電気化学応答が変化することも明らかとなった.

文 献

- 1) M. Maeda, Y. Mitsuhashi, K. Nakano, M. Takagi: *Anal. Sci.*, **8**, 83 (1992).
- 2) A. Yamaguchi, S. Joudkakis, S. Matsuo, H. Misawa: *Chem. Lett.*, **31**, 190 (2002).
- 3) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo: *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 4) J. Clavilier, R. Faure, G. Guinet, R. Durand: *J. Electroanal. Chem.*, **107**, 205 (1980).
- 5) Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, Y. Ebata: *Anal. Chem.*, **70**, 1288 (1998).
- 6) C. A. Widrig, C. Chung, M. D. Porter: *J. Electroanal. Chem.*, **310**, 335 (1991).
- 7) H. Wackerbarth, M. Grubb, J. Zhang, A. G. Hansen, J. Ulstrup: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 198 (2004).
- 8) Y. D. Zhao, D. W. Peng, Z. L. Wang, J. K. Cheng, Y. P. Qi: *J. Electroanal. Chem.*, **431**, 203 (1997).
- 9) M. Yang, H. C. M. Yau, H. L. Chan: *Langmuir*, **14**, 6121 (1998).
- 10) S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson M. G. Hill: *Bioconjugate Chem.*, **8**, 31 (1997).
- 11) T. M. Herne, M. J. Tarlov: *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8916 (1997).
- 12) A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov: *Biophys. J.*, **79**, 975 (2000).
- 13) G. E. Poirier: *Chem. Rev.*, **97**, 1117 (1997).
- 14) M. T. Cater, A. J. Bard: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7528 (1987).