

報 文

金ナノ粒子を標識として用いる電氣的
DNA 検出法の開発床波 志保¹, 西出 幸晃¹, 椎 木 弘¹, 長 岡 勉^{®1}

本研究は二重鎖構造の DNA が導電性を有することを利用した新しい検出法の開発に関するものである。チオール化 DNA をプローブとして固定化した金ナノ粒子を用い、電気抵抗変化型 DNA 検出法の開発を行った。正負 1 対の電極間にプローブ固定化金ナノ粒子を配置し、ターゲットを添加することで 2 種の異なるプローブ (12 塩基) とターゲット (24 塩基) がハイブリダイゼーションする。このとき、電極間ギャップには、金ナノ粒子-24 塩基 DNA-金ナノ粒子の構造が形成される。ターゲットが相補鎖、2 塩基ミスマッチでは、それぞれ 0.31, 0.18 ohm の変化が得られた。このことから配列中の 2 塩基ミスマッチを検出することが可能であることが示唆された。

1 緒 言

DNA チップは病気に関連する遺伝子の研究、ゲノム創薬やテーラーメイド医療の実現において不可欠である。従来の DNA 検出は、配列の分かっているプローブ DNA を基板上に固定したチップを利用して、蛍光ラベル化したターゲット DNA の添加により相補するプローブへの結合量を蛍光シグナル強度として読み取るといった方法で行われている。しかし、多段階洗浄や厳密な温度管理による煩雑な操作、蛍光色素の導入や大型装置の必要性に伴う高コスト化などの問題が挙げられる。これらの問題を解決するため、近年では金ナノ粒子の分散・凝集を利用した分光学的方法¹⁾²⁾、フェロセンなどの導電性物質により標識された DNA を用いた電気化学的方法^{3)~6)}及びマイクロ電極間にプローブ DNA を固定し、金微粒子を固定したターゲット DNA が結合することで電極間の抵抗が減少することを利用した電氣的な検出法⁷⁾など様々な研究が行われている。

DNA は二重らせん構造を有しており、0.34 nm 間隔で存在する塩基が π スタッキングしていることから、近年では、DNA 自身が超伝導体⁸⁾、導体⁹⁾、半導体¹⁰⁾¹¹⁾であると報告されている。このような DNA の導電性に基づいた検出が行われているが⁴⁾⁵⁾、DNA の 1 本鎖から 2 本鎖への構造変化を電氣的に検出した例はない。このような検出を可能にするには電極間ギャップを検出目的の分子サイズ (数~数十 nm) に微細化しなければならない。しかしながら、現在のリソグラフィ技術は高額な装置や熟練を要するだけでなく、最高分解能を持つ電子ビームリソグラフ

イー (線幅約 50 nm) でも十分な精度は得られていない。

著者らは金ナノ粒子間のギャップをナノメートルサイズで制御した金ナノ粒子膜を用いることで、DNA のハイブリダイゼーションにより生じる DNA 自身の微小な電気抵抗変化の直接的な検出に成功した¹²⁾。この方法は 5' 末端をチオール化したプローブ DNA を金ナノ粒子膜へ固定し、ターゲットの添加により引き起こされた DNA の構造変化により生じる抵抗変化を検出するものである。この場合、ナノギャップ間にプローブを配置する必要がある。しかしながら、金ナノ粒子膜の作製後にプローブ修飾を行ったため、検出に無関係なプローブも存在することになる。

ナノギャップを持つ金ナノ粒子膜の作製は 1,10-デカンジチオールと金ナノ粒子溶液 (粒径 80 nm) への交互浸漬の繰り返しにより得られる。著者らは最初の浸漬において金ナノ粒子がガラス基板上に非特異吸着することを見いだした¹³⁾。そこで本報告では 2 回目に金ナノ粒子へ浸漬する際、あらかじめ異なるプローブを固定した 2 種類の 12 nm 金ナノ粒子を用いた。したがって、ハイブリダイゼーションすることにより広いギャップを有する 80 nm の粒子間を架橋するように 12 nm 金ナノ粒子-DNA 二重鎖-12 nm 金ナノ粒子のハイブリッド構造が構築される。このようなハイブリッド構造の構築に伴う電気抵抗変化を利用した DNA 検出を試みた。

2 実 験

2.1 試 薬

本実験で使用した水はすべて超純水 (>18 M ohm) である。

テトラクロロ金(III)酸四水和物、クエン酸、1,10-デカ

¹ 大阪府立大学先端科学イノベーションセンター: 599-8570 大阪府堺市中央区学園町 1-2

ンジチオール, トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン, 塩化ナトリウムは和光純薬製, クエン酸ナトリウムは片山化学工業製, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)・4Na は同仁化学製の試薬特級を用いた. DNA は日清紡開発センターで合成, 高速液体クロマトグラフィーで精製されたものを使用した.

2.2 DNA 修飾金ナノ粒子の作製

金ナノ粒子 (*ca.*12 nm) は 1 mM テトラクロロ金(III)酸四水和物水溶液に 39 mM クエン酸ナトリウム 50 ml を加え 10 分間沸騰浴中で加熱かくはんした後, 室温で更に 15 分間かくはんすることにより得た. 得られた金ナノ粒子は透過型電子顕微鏡 (JEM-2000FX II/日本電子) により観察したところ平均粒径 12 nm ($\sigma = 1.6$ nm) であった¹⁴⁾.

金ナノ粒子へのプローブ DNA の修飾は以下のようにして行った. 3.6 μ M の 5'末端チオール化 DNA (5'SH-TTT TTT TTT TTT-3') を 1 ml の 12 nm 金ナノ粒子溶液に添加して 50°C で 16 時間放置した後, 0.1 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に調整した. 更に 50°C で 40 時間放置し, 遠心分離 (14000 rpm で 25 分間) を行った. 上澄みを捨て, 金ナノ粒子溶液を 1 ml の 0.1 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に再分散させ, 再び遠心分離を行った. 最終的に 1 ml の 0.3 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に再分散させた¹⁵⁾. 同様の操作を 3'末端チオール化 DNA (3'SH-TTT TTT TTT TTT-5') においても行った. 5'末端チオール化 DNA を修飾した金ナノ粒子を金ナノ粒子 A, 3'末端チオール化 DNA を修飾したものを金ナノ粒子 B とした.

2.3 金ナノ粒子への DNA 修飾量の見積もり

金ナノ粒子への DNA 修飾量の見積もりは, 蛍光マーカーである HEX (hexachloro-fluorescein phosphoramidite) で誘導体化された DNA を用いて蛍光測定 (日本分光製 FP-6300) することにより行った. まず, HEX 化 DNA の濃度範囲 0~1.0 μ M における検量線を作成した. 続いて, プローブ DNA 修飾金ナノ粒子溶液 100 μ l に 3.6 μ M の 5'末端 HEX 化 DNA (5'HEX-AAA AAA AAA AAA-3') を添加し, 2 時間放置した. 遠心分離 (14000 rpm, 20 分間) により上澄みを 90 μ l 取り除き, 残り 10 μ l のコロイド溶液の蛍光測定を励起波長 350 nm において行った. 金ナノ粒子への HEX 化 DNA の非特異吸着を考慮するため同様の操作を金ナノ粒子へ修飾したプローブ DNA と完全にミスマッチする配列の 5'末端 HEX 化 DNA (5'HEX-TTT TTT TTT TTT-3') を用いて行った.

2.4 金ナノ粒子膜電極の作製~ DNA 修飾金ナノ粒子の固定

80 nm 金ナノ粒子は 24 mM テトラクロロ金(III)酸四水和物水溶液 6 ml 及び 0.16 M クエン酸水溶液 10 ml に水を加え全量を 200 ml とした後, 20 分間水温を 80°C に保ちながらかくはんして赤紫色のコロイド溶液 (0.14 g/l) として得た¹⁶⁾.

微小白金くし形電極 (幅 10 μ m, 高さ 0.1 μ m, 間隔 5 μ m, 長さ 2.5 mm, 65 対, ビー・イー・エス製) を作用極として, 0.1 M HCl 中, 参照極に Ag/AgCl, 対極に白金コイルを用いて電位サイクル (掃引速度 200 mV/s, 掃引範囲 -0.25 ~ +1.3 V) を行い, 典型的な白金の電流-電位曲線が得られるまで洗浄した. これを 5 mM 1,10-デカンジチオールを含むエタノール溶液中に 30 分間浸漬した後, 80 nm 金ナノ粒子溶液に 30 分間浸漬することで電極間ギャップに金ナノ粒子を固定し, これを金ナノ粒子膜電極とした¹³⁾.

この電極にプローブ DNA を修飾するために 1,10-デカンジチオール溶液中に 30 分間浸漬した後, 2.2 で作製した金ナノ粒子 A 及び金ナノ粒子 B の混合液 10 μ l を膜に滴下した. 2 時間放置し, 膜表面を超純水で洗浄した. 走査型電顕微鏡 (SEM, Hitachi 製 S-4700) により膜の表面観察を行った (加速電圧 15 kV).

2.5 電気的 DNA 検出

TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7.4) 1 μ l を添加し膜抵抗が安定した後, 100 μ M のターゲット DNA (完全ミスマッチ, 2 塩基ミスマッチ及び相補鎖 DNA) 5 μ l を添加し膜の抵抗を直流二端子法 (Agilent model 34970A, 印加電流: 1 mA) によりモニタリングした. 各測定終了後, 85°C の湯浴中に 3 分間浸漬, 洗浄することにより二重鎖 DNA を融解させ, 次のターゲットに対する測定を行った. また, すべての測定は恒温室中 25°C で行った¹²⁾.

3 結果及び考察

3.1 DNA 修飾金ナノ粒子への DNA 修飾量の見積もり

金ナノ粒子に修飾したプローブ DNA (5'HS-TTT TTT TTT TTT-3') と相補的な 5'末端 HEX 化 DNA (5'HEX-AAA AAA AAA AAA-3') を添加したとき (実線) と完全にミスマッチする 5'末端 HEX 化 DNA (5'HEX-TTT TTT TTT TTT-3') を添加したとき (破線) の励起波長 350 nm における蛍光スペクトルを Fig. 1 に示す. 相補鎖, 完全ミスマッチ共に 550 nm 付近に HEX に起因する蛍光ピークが検出された. 完全ミスマッチの場合, 得られたピークは HEX 化 DNA の金ナノ粒子への非特異吸着に起因するものと考えられる. 相補鎖及び完全ミスマッチ DNA を添

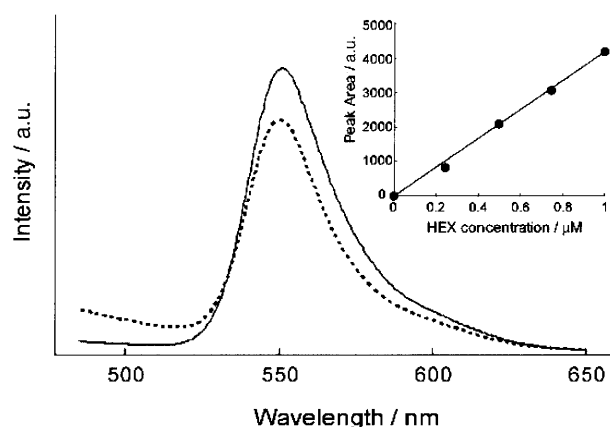


Fig. 1 Fluorescence spectrum of HEX-labeled complementary (straight line) and completely mismatched sequence (dashed line) at excitation wavelength of 350 nm

The inset is the analytical curve for the HEX.

加したときのスペクトルのピーク面積と検量線（挿入図）からそれぞれの吸着濃度は 0.69, 0.45 μM であることが分かった。したがって、修飾された DNA 濃度は HEX 化 DNA の非特異吸着量を差し引いた 0.24 μM となり、金ナノ粒子（粒径 12 nm）には 1 cm^2 当たり 16 pmol の DNA が修飾されていると求められた。ここで、直径約 2.0 nm の DNA が金ナノ粒子に密に吸着したと仮定すると、1 cm^2 当たり 53 pmol 吸着すると算出され、実際の吸着量は、密に吸着した状態の約 30% 程度であると考えられる。Mirkin らは 12~32 塩基のプロープ DNA の金ナノ粒子（16 nm）への修飾量が 1.3~35 pmol/ cm^2 と見積もっており、その値とほぼ一致する値が得られた¹⁷⁾。

3.2 ターゲット DNA の添加による抵抗変化

金ナノ粒子 A 及び B を固定した電極にターゲットとしてプローブと相補的な DNA（24 塩基）を添加したときの抵抗の経時変化を Fig. 2 に示す。矢印の部分で相補鎖 DNA を添加すると同時に抵抗は減少し、約 30 秒で安定した。抵抗変化 (ΔR) は DNA を添加する前の定常値から添加後の定常値を差し引くことにより求めた。このとき、 ΔR は 0.31 ohm ($S/N > 10$) となった。5 回以上の繰り返し測定における ΔR の分析精度は $\pm 4\%$ 程度であり、 S/N も変化しなかった。また、SEM 観察を行ったところ再生処理前後において電極に変化は見られなかった。

プローブ修飾した金ナノ粒子 A 及び B を固定したときの電極表面の電界放型 (FE)-SEM 像を Fig. 3 (a) に示す。疎に吸着した大きい粒子（80 nm）の間に小さい粒子（12 nm）が密に配置されている様子が観察された (b)。このことから、相補鎖 DNA を添加したときに生じる抵抗変化は金ナノ粒子 A, B 間の距離に起因すると考えられ

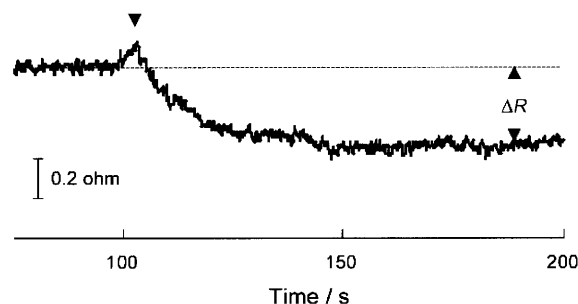


Fig. 2 Time profile for the resistance change in adding a target DNA at the arrow mark to the film

る¹⁸⁾。相補鎖 DNA が金ナノ粒子 A, B に修飾されているそれぞれのプローブ DNA とハイブリダイゼーションすることで、12 nm の粒子間の距離が縮まる (c)。このとき 80 nm の粒子が 12 nm 粒子と二重鎖 DNA によりブリッジされる。したがって、それぞれの粒子間の電子ホッピングが容易になり抵抗が減少するものと推測される。

3.3 DNA 検出

ターゲット DNA として相補鎖、2 塩基、完全ミスマッチ DNA を用いたときの ΔR を Table 1 に示す。相補鎖 DNA を添加したときの ΔR は最大となり、0.31 ohm であった (Fig. 2 参照)。配列中のミスマッチ塩基の増加に伴い ΔR は減少し、2 塩基ミスマッチでは 0.18 ohm、完全ミスマッチでは 0.11 の変化にとどまった。24 塩基配列中のミスマッチ塩基数が 24 塩基から 2 塩基に減少したときはわずかな ΔR (0.07) しか見られなかったのに対して、2 塩基から 0 塩基に減少したときは、0.13 ohm であった。これは塩基数当たりに直すと、前者では 3.2×10^{-3} ohm/base に対して、後者では 6.5×10^{-2} ohm/base となり、ハイブリダイゼーションによる抵抗変化は金ナノ粒子間の距離の変化だけでなく、DNA 自身の導電性に起因することを意味している。

DNA の塩基対は約 0.34 nm の間隔で密に隣接しており、それぞれの塩基対は π 電子を有しているため、相補鎖 DNA により二重鎖構造が構築されると π スタッキングし、二重鎖中の電子ホッピングが容易になる。このとき粒子間の電子ホッピングが容易になることで膜の電気抵抗が減少する。一方、ミスマッチ塩基が存在すると π スタッキングが疎になり二重鎖中の電子ホッピングが困難になる。したがって、粒子間の電子ホッピングは抑制され抵抗変化が小さいと考えられる^{9)~12)19)20)}。このような金ナノ粒子間に存在する DNA の導電性の違いが 2 塩基のミスマッチによる抵抗変化を増幅させるものと考えられる。

TE buffer のみ（ターゲット DNA を含まない）を滴下した場合は ΔR が 0.05 ohm 以下であったことから、完全

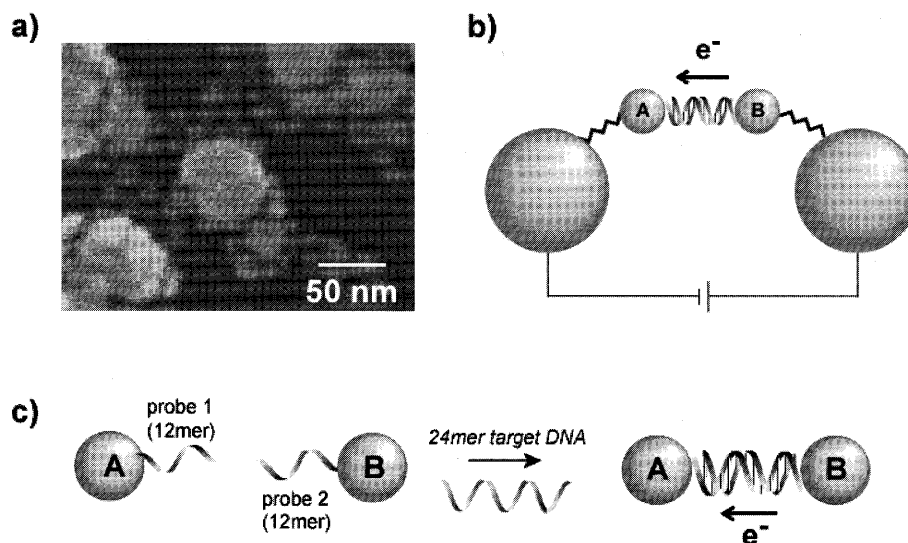


Fig. 3 FE-SEM image of the Au particle film (a) and illustration for the formation of double helix structure by hybridization between Au particles (b) and (c)

Table 1 Resistance changes by hybridization for target DNA

Target DNA	Number of mismatch ^{a)}	$\Delta R^{b)}/\text{ohm}$
Complementary ^{c)}	0	0.31
2 bp mismatch ^{d)}	2	0.18
24 bp mismatch ^{e)}	24	0.11

a) Mismatching number in the DNA sequence. b) Resistance change caused by hybridization was calculated by taking the steady value after the addition of target DNA from before. Accuracy of each measurement was $\pm 4\%$. c) 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA-3'. d) 5'-AAA AAA TAA AAA AAA AAT AAA AAA-3'. e) 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'

ミスマッチ DNA を添加した場合の ΔR の変化は、完全ミスマッチ DNA の金ナノ粒子への非特異吸着による粒子間距離の変化がもたらすと考えられる。

4 結 言

金ナノ粒子-DNA 二重鎖-金ナノ粒子のハイブリッド構造の構築に伴う電気抵抗変化を利用した新しい DNA 検出方法の提案を行った。本法は、プローブを固定した金ナノ粒子膜電極にターゲット DNA を添加するといった簡便な方法にもかかわらず $S/N > 10$ で、30 秒程度の迅速な DNA 検出を可能にした。抵抗変化はターゲット配列中のミスマッチ塩基数の増加に伴い減少し、相補鎖、2 塩基ミスマッチ、完全ミスマッチを判別することができた。今後、1 塩基ミスマッチ検出やミスマッチ部位の違いが抵抗変化に影響を与えるかなどの検討を行っていきたいと考えている。

この研究の一部は平成 17 年度産業技術研究助成 (NEDO) 及び日本学術振興会特別研究員奨励費により行われた。

文 献

- 1) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff: *Nature*, **382**, 607 (1996).
- 2) K. Sato, K. Hosokawa, M. Maeda: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8102 (2003).
- 3) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo: *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 4) M. Inouye, R. Ikeda, M. Takase, T. Tsuru, J. Chiba: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11606 (2005).
- 5) T. Liu, J. K. Barton: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10160 (2005).
- 6) 椎木 弘: *ぶんせき (Bunseki)*, **2006**, 173.
- 7) 椎木 弘: *生物工学会誌*, **81**, 537 (2003).
- 8) A. Y. Kasumov, M. Kociak, S. Gueron, B. Reulet, V. T. Volkov, D. V. Klinov, H. Bouchiat: *Science*, **291**, 280 (2001).
- 9) H.-W. Fink, C. Schonenberger: *Nature*, **398**, 407 (1999).
- 10) D. Porath, A. Bezyadin, S. de Vries, C. Dekker: *Nature*, **403**, 635 (2000).
- 11) Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka, M. Shimomura: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6165 (1998).
- 12) H. Shiigi, S. Tokonami, H. Yakabe, T. Nagaoka: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3280 (2005).
- 13) S. Tokonami, M. Iwamoto, K. Hashiba, H. Shiigi, T. Nagaoka: *Solid State Ion.*, **177**, 2317 (2006).
- 14) K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer, M. J. Natan: *Anal. Chem.*, **67**, 735 (1995).
- 15) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998).
- 16) J. Turkevich, G. Garton, P. C. Sevenson: *J. Colloid Sci.*, **9**, 26 (1954).
- 17) L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G.

- Viswanadham: *Anal. Chem.*, **72**, 5535 (2000).
18) H. Shiigi, Y. Yamamoto, H. Yakabe, S. Tokonami, T. Nagaoka: *Chem. Commun.*, **2003**, 1038.
19) J. Richter: *Physica E*, **16**, 157 (2003).
20) M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmin, J. K. Barton, A. Hormann, E. J. C. Olson, P. F. Barbara: *Science*, **273**, 475 (1996).

Development of Electrical DNA Detection Method Using Gold Nanoparticle Marker

Shiho TOKONAMI¹, Yukiteru NISHIDE¹, Hiroshi SHIIGI¹ and Tsutomu NAGAOKA¹

¹ Frontier Science Innovation Center, Osaka Prefecture University, 1-2, Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 599-8570

(Received 1 August 2006, Accepted 22 September 2006)

Electrical DNA detection, using a gold nanoparticle modified by a thiolated probe DNA, based on the conductivity of double-strand DNA is described. In this method, probe-modified Au particles are immobilized between the electrodes (quantity of modified DNA on the Au surface, 16 pmol/cm²). Two different probes (12 mer) are hybridized by the addition of target DNA (24 mer) in which the formation of a Au particle-24 mer double-strand DNA-Au particle is structured between the electrode gap. The resistance decrease was observed immediately after the addition of target DNA, which became stable within 30 s with high *S/N* ratios (>10). The resistance change of the Au particle film depended on the number of mismatching base pairs (bp) in the DNA sequence. The difference in the resistance change was obtained between complementary (0.31 ohm) and 2 bp mismatch (0.18) DNA, which indicates that the Au particle film rapidly discriminates only a 2 bp mismatch in the sequence.

Keywords : DNA sensing; electrical detection; gold nanoparticle.