

ノ ー ト

金基板上でのグアニン塩基の酸化電流に基づく DNA 量の測定

矢吹 聡一^{®1}, 佐藤 縁¹, 丹羽 修¹

1 緒 言

近年, 金コロイド等を用い簡便に遺伝子診断をする方法¹⁾, 電気化学遺伝子検出などの方法が開発されている。電気化学的に検出する方法には, DNA にインターカレートする分子に電気化学活性のある分子を用い, その量的変化²⁾や, 結合量³⁾を計測することで, DNA 量を測定することが可能である。しかしながらこの方法では, インターカレーターの添加という操作の増加, 分子の電極への吸着や, 一本鎖の核酸検出には適用不可能という問題を持つ。これらの問題を解決する方法として, 塩基部分を直接酸化し, その電流から簡便に DNA を計測する方法が報告されている^{4)~14)}。しかしながら, これらの測定法は, 炭素電極上での測定がほとんどである; 自己集積化によって金上に DNA を固定化させる方法はよく知られているが, 金上での DNA の測定は数少ない⁶⁾⁷⁾。特に, この方法を用いた金上での DNA 定量は, 十分に検討されていない。本研究では, 塩基部分の酸化電流に注目し, 金上に固定化された DNA 量を計測することを目的とする。そこで, 電気化学手法を用いて, 金上での一本鎖 DNA 量の測定を試みた。

2 実 験

2・1 試薬及び装置

5'末端にヘキサチオール構造を有する 21 マーの一本鎖オリゴ DNA (塩基配列は, 5'GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC 3'; 以下チオール化 ssDNA と略す) は, 北海道システムサイエンスより購入した。その後, 当社の指示に従って精製し, 濃度測定を行ってから使用した。他の試薬はすべて, 分析用グレードを使用した。蒸留水は, 2 回蒸留したものを使用した。

精製後のチオール化 ssDNA の定量は, ナノドロップ (ND-1000; NanoDrop Technologies 製, DE, USA) を用い, 分光測定により行った。

電気化学測定は, 電気化学測定装置 (ALS-1230; ビーエーエス製) を用いて測定した。

水晶振動子マイクロバランスの測定装置は, 北斗電工製

(Model HZ-3000, コントローラーは Model HQ-101B) のものを用いた。

2・2 チオール化 ssDNA の金上への固定化

チオール化 ssDNA を 0.1 mM の濃度になるように緩衝液を用いて溶解し, そこに清浄な金電極 (円盤状, 径 1.6 mm) を 2 時間浸漬した後, 金電極を洗浄し, 次の実験に供した。ssDNA の溶解に用いた緩衝液の組成は, 次の通りである: 10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7)。

2・3 電気化学測定

電気化学測定は, 通常の 3 電極法にて測定を行った。すなわち, 作用極には, DNA 修飾電極, 対極には, 白金線 (径 0.5 mmφ), 参照極には, 銀/塩化銀電極を使用し, 脱酸素した 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中で計測を行った。なお, 以下より記載してある電位はすべて, 銀/塩化銀電極に対する電位である。電気化学測定は, 次の 2 法, 微分パルスボルタンメトリー法 (DPV) と定電位電解法を利用した。DPV においては, 測定パラメータは次のように設定した; パルス高, 50 mV, パルス幅, 60 ms, 走引速度, 2 mV/s, サンプル幅, 20 ms。

2・4 水晶振動子マイクロバランスによる吸着量測定

水晶振動子マイクロバランス (QCM) 測定は, 上述の測定装置により行った。水晶振動子は, 基準周波数 10 MHz の北斗電工製のものを用いた。水晶振動子をセルホルダー (セルの容量は, 10 ml 以下) に装着し, 周波数の安定を確認後, DNA 溶液を添加して周波数の変化を追跡した。なお, 本系での測定感度は, 4.4×10^{-9} g/Hz cm² である。溶媒には, 蒸留水を用いた。

3 結果及び考察

DNA を測定する前に, 塩基, ヌクレオシド, ヌクレオチドの金電極上での電気化学酸化について検討した。グアニン, アデニン, チミン, シトシンの各塩基について, DPV により 0.6~1.25 V の範囲で酸化電流を測定した。その結果, 金電極では, グアニンのみが酸化されることが分

¹ 産業技術総合研究所生物機能工学研究部門: 305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

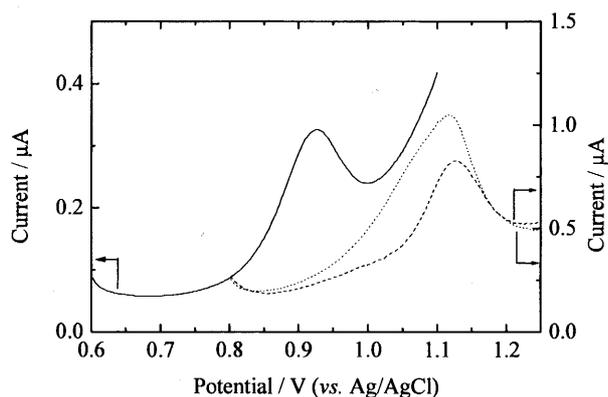


Fig. 1 Differential pulse voltammograms (DPVs) of guanine and guanine derivatives

Solid line shows the DPV of 20 μM guanine with a scale on left-hand side, broken line and dotted line, 2'-deoxyguanine and 2'-deoxyguanine-5'-monophosphate with a scale on right-hand side, respectively.

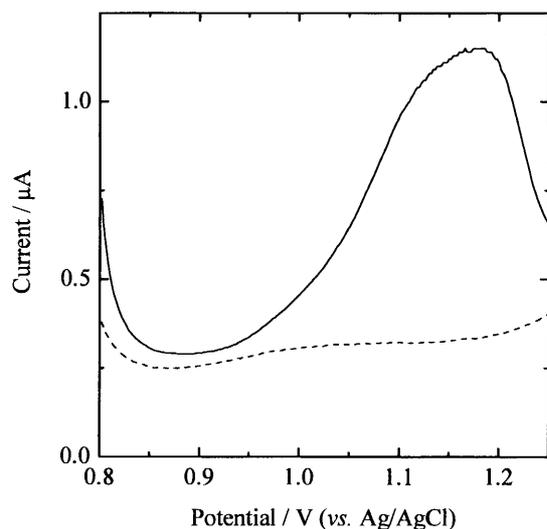


Fig. 2 Differential pulse voltammograms (DPVs) on ssDNA-modified electrode and unmodified electrode

Solid line shows the DPV on ssDNA-modified electrode, and broken line, on unmodified electrode, respectively.

かった (Fig. 1). すなわち, アデニン, チミン, シトシは, 金上では酸化できない. 炭素電極では, グアニンのほかにアデニンが酸化でき, ダイヤモンド様炭素電極では, すべての塩基が酸化可能であるが¹⁴⁾, 金電極では, 電位窓の関係から, グアニンのみが可能であることが明らかになった. また, 2'-デオキシグアノシン, 2'-デオキシグアノシン-5'-リン酸について酸化電流を同様に測定したところ, ピーク電位がやや正側にシフトするが, 明確な電流ピークを測定することができた. また, 紙面の都合上, ここには示していないが, ピーク電流は測定対象の分子種の濃度

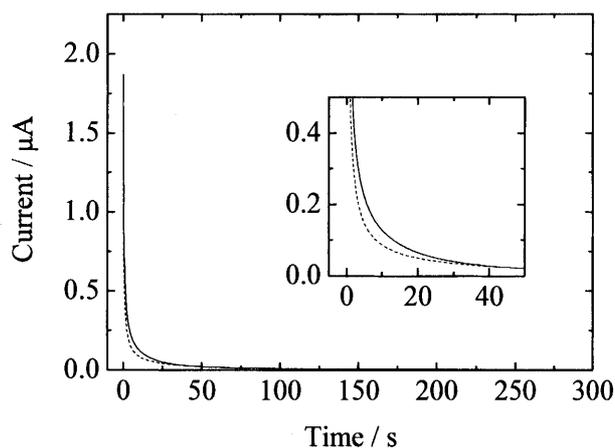


Fig. 3 Chronoamperograms on ssDNA-modified electrode and unmodified electrode

Solid line shows the results on ssDNA-modified electrode and broken line, on unmodified electrode. Inner graph is an enlargement on the initial portion of the outer graph. A potential of +1.2 V vs. Ag/AgCl was applied on the base electrode.

に比例することが分かった. 以上より, 金電極を用いても電極表面でのグアニンの濃度 (すなわち固定化されたDNA量) を計測できることが示唆された.

ついで, チオール化 ssDNA を固定化した電極に対し, DPV を行った. その結果を, Fig. 2 に示す. すなわち, この DNA 修飾電極を用いると, 1.17 V に電流ピークが観察された. 一方, 未修飾の電極 (Fig. 2, 破線) では, このような酸化電流は観察されないことから, この電流ピークは, DNA に起因するものと考えることができる. 更に, 酸化ピーク電位は, やや正にシフトしているものの, デオキシグアノシンやデオキシグアノシン-リン酸とはほぼ同様の位置にあることから, このピーク電流は, DNA 内の塩基グアニンの酸化電流であることが分かる. DNA 固定化の際の, DNA 濃度を変化させることで, 表面に結合する DNA 量がある程度変化すると考えられるが, このピーク電流の大きさも濃度に依存して変化することが確かめられている (ここではデータは示していない).

更に, グアニンによる酸化電流であることを確認するために, 定電位電解によって酸化電流を測定した; グアニンが酸化可能な電位 +1.2 V を金基板に印加し, 電流を計測した. Fig. 3 に示すように, 修飾電極による酸化電流は, 未修飾のそれよりも大きい. その差を積分すると, 8 μC (グアニン量として 1.4×10^{-10} mol/cm²) であった. 一方, ssDNA の濃度条件を同じにして, QCM により吸着量の測定を行うと, 1.7×10^{-11} mol/cm² のチオール化 ssDNA が金表面に結合していることが分かった. ssDNA 一分子内に 7 つのグアニンが存在することを考えると, 結合量測定は, 2.0×10^{-11} mol/cm² となり, ほぼ同量の結果が得

られることが分かった。QCM と定電位電解による結果の差は, DNA の物理吸着によるものと考えているが, 詳細は現在検討中である。以上より, 電気化学的手法を用いることで, 簡便に金上の ssDNA 定量を行えることが示された。

4 結 言

金電極を用いると, グアニンの酸化電流を計測できることが分かった。また, 金上にチオール化 ssDNA を自己集積法により固定化し, 固定化された DNA のグアニンの酸化電流を DPV 法と定電位電解法を用いて計測した。DPV では, +1.17 V vs. Ag/AgCl に明確な酸化ピークが得られた。基板に +1.2 V の電位を印加し, 電流を測定すると, DNA に含有するグアニンの酸化電流が得られた。未修飾電極との差の電気量は, ssDNA 中のグアニンをすべて酸化した値と考えると, 水晶振動子マイクロバランス法からの結果とほぼ一致した。すなわち, 定電位電解法により, 電極上のグアニンが定量できることが分かった。以上より, 電気化学的手法を用いると, 簡便に金上の DNA 量を計測できることが分かった。

本研究は, (独新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の基盤技術研究促進事業 (民間基盤技術研究支援制度) の助成を受けて遂行された。この場を借りて, 感謝の意を表す。

文 献

- 1) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. J. Storhoff: *Nature*, **382**, 607 (1996).
- 2) F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Sato, S. Iijima: *Bioelectrochemistry*, **63**, 257 (2004).
- 3) S. Yabuki, F. Mizutani: *Bioelectrochemistry*, **63**, 253 (2004).
- 4) J. Wang, G. Rivas, J. R. Fernandes, J. L. L. Paz, M. Jiang, R. Waymire: *Anal. Chim. Acta*, **375**, 197 (1998).
- 5) K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, A. Erdem, B. Meric, P. E. Nielsen, M. Ozsoz: *Electroanalysis*, **15**, 667 (2003).
- 6) K. Kerman, Y. Morita, Y. Takamura, E. Tamiya: *Electrochem. Commun.*, **5**, 887 (2003).
- 7) E. E. Ferapontova, E. Dominguez: *Electroanalysis*, **15**, 629 (2003).
- 8) M. L. Pedano, G. A. Rivas: *Electrochem. Commun.*, **6**, 10 (2004).
- 9) Y. K. Ye, H. X. Ju: *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 735 (2005).
- 10) M. J. LaGier, C. A. Scholin, J. W. Fell, J. Wang, K. D. Goodwin: *Marine Poll. Bull.*, **50**, 1251 (2005).
- 11) L. Y. Heng, A. Chou, J. Yu, Y. Chen, J. J. Gooding: *Electrochem. Commun.*, **7**, 1457 (2005).
- 12) Z. H. Wang, S. F. Xiao, Y. Chen: *J. Electroanal. Chem.*, **589**, 237 (2006).
- 13) K. Arora, A. Chaubery, R. Singhal, R. P. Singh, M. K. Pandey, S. B. Samanta, B. D. Malhotra, S. Chand: *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1777 (2006).
- 14) O. Niwa, J. Jia, Y. Sato, D. Kato, R. Kurita, K. Maruyama, K. Suzuki, S. Hirono: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7144 (2006).

Measurement of DNA Amount on Gold Plate Based on the Oxidation Current of Guanine

Soichi YABUKI¹, Yukari SATO¹ and Osamu NIWA¹

¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) Tsukuba Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566

(Received 12 July 2006, Accepted 23 August 2006)

Electrochemical oxidation on a nucleic acid base, such as guanine, adenine, thymine, cytosine, was examined; only guanine could be oxidized on a gold electrode. Because deoxyguanosine, deoxyguanosine monophosphate were also oxidized on the electrode, guanine in DNA would be oxidized on the electrode. To prove DNA oxidation, thiolated-single strand DNA (ssDNA) was immobilized on a gold electrode, and electrochemical measurements were performed: differential pulse voltammetry (DPV) and chronoamperometry were examined. The voltammogram of DPV on an ssDNA-modified electrode had an oxidation peak at +1.17 V *vs.* Ag/AgCl. The oxidation current was caused by the oxidation of guanine in the DNA-base. The electrical charge difference between a modified electrode and a bare electrode on chronoamperometry agreed with the guanine amount of ssDNA on gold, which was obtained from the result of a quartz crystal microbalance.

Keywords : electrochemical analysis; guanine; DNA amount; differential pulse voltammetry; single-strand DNA; thiolated-DNA.