

ノ ー ト

アビジン修飾ガラス基板の作製と安定性の比較

佐藤 雅俊¹, 柳田 孝治¹, 田中 絢子¹, 菅原 正雄^①

1 緒 言

固体基板上にアビジンやビオチンサイトを導入することは、バイオセンシングシステムをデザインする際にタンパク質や DNA, リポソームなどの生体素子を固体表面へ導入するために重要である。ガラスやポリマー表面^{1,2)}, シリコン表面^{3,4)}, マイクロ流路表面⁵⁾, 金属や炭素表面^{6)~10)}, ポリスチレン被覆石英結晶¹¹⁾にビオチンサイトを光パターニングにより導入することが行われている。紫外光 (350 nm) を用いたパターニングにはケージドビオチン^{1)7)~9)}, フォトビオチン^{3)4)10)~12)}及びベンゾフェノン^{6)12)~14)}が使用される。一方, Ar⁺/Kr⁺レーザー (波長 488 nm) を用いてビオチン-4-フルオレセイン (B4F) からビオチンサイトを光パターニングすることも報告⁵⁾¹⁵⁾されている。

ガラスを基板として用いることにより, 蛍光や可視光による測定が容易になる。著者らは, アビジン修飾ガラス基板上に吸着させた DNA 中の脱塩基部位を色素封入のビオチン化リポソームを用いて高感度に蛍光検出できること¹⁶⁾及びビオチン化グルコース酸化酵素をアビジン-ビオチン結合により固定化して虚血下の急性脳海馬スライス内のグルコースフラックスをリアルタイムに可視化イメージングできること¹⁷⁾を報告した。Casford ら¹⁸⁾は溶融シリカキャピラリーの一端にビオチン化したグルタミン酸脱水素酵素を固定化したバイオセンサーを報告した。

本研究では, ガラス基板上にアビジンサイトをパターニングする簡便な方法の開発を目的として, 紫外光によって B4F をガラス基板上にパターニング, その後アビジンを固定化することを検討した。その結果, トランスイルミネーターからの紫外光を用いてガラス基板表面にビオチンサイトを導入できることを見いだした。B4F の光パターニングにはレーザー光が用いられてきたが, 本アプローチでは通常のトランスイルミネーターからの紫外光を用いることができるために, ビオチンサイトの形成を手軽に行うことができる。また, 既報¹⁶⁾の手順により作製したアビジン修飾ガラス基板と比較して保存安定性が優れることが分かった。

2 実 験

2.1 試 薬

シラン化剤として信越化学製の 3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン (MTS) をトルエン (和光純薬製, 無水物) で 4 倍希釈したものを用いた。2 価性架橋試薬 *N*-スクシンイミジル-4-ブチルマレイミド (GMBS, Fluka 製) はジメチルスルホキシド (DMSO, 無水物, 和光純薬製) を用いて調製した。ウシ血清アルブミン (BSA), アビジン及び B4F は Sigma-Aldrich 製のものを使用した。いずれもリン酸緩衝液に溶解した。2-アミノエタノール (EA, 東京化成製) はリン酸緩衝溶液 (pH 8.5) で希釈した。ビオシチンオレゴングリーン (BOG, invitrogen 製) はリン酸緩衝液に溶解して使用した。0.1 M NaH₂PO₄ と 0.1 M NaOH によるリン酸緩衝液 (pH 7.0) 及びリン酸緩衝液を含む 1 M NaCl 溶液 (NaCl) を調製した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。アビジン固定化の基板としてカバーガラス (18 mm × 24 mm, 厚さ 0.17 ~ 0.25 mm, 松浪硝子製) を使用した。超高純度溶融石英ガラス (70 mm × 70 mm, 厚さ 1 mm) は藤原製作所製 S グレードを使用した。カバーガラスは 1 M NaOH 溶液中に 1 晩浸漬した後, ミリ Q 水で洗浄, 70℃ のオーブンで 30 分間乾燥, 放冷したものを使用した。実験にはすべてミリ Q 水 (ミリポア製 Mill-Q システム) を使用した。

2.2 装 置

光パターニングには, 紫外 (UV) トランスイルミネーター TFS-20 (UVP 製, 強度 12.3 mW cm⁻², ピーク波長 254 nm) を使用し, 洗浄にはウェブミキサー WEB-30 (井内盛栄堂製) を用いた。またパターニングされた B4F の検出及びアビジン修飾サイトの検出は, 蛍光イメージャー (Molecular Dynamics 製, FluorImager595) を用い, 励起波長 488 nm, 蛍光波長 530 nm で行った。

2.3 2 価性架橋試薬を用いるアビジン化学修飾基板の作製

既報¹⁶⁾に従ってガラス基板上にアビジンを化学修飾した。清浄なカバーガラスの片面へ 25% MTS のトルエン溶

¹ 日本大学文理学部化学科: 156-8550 東京都世田谷区桜上水 3-25-40

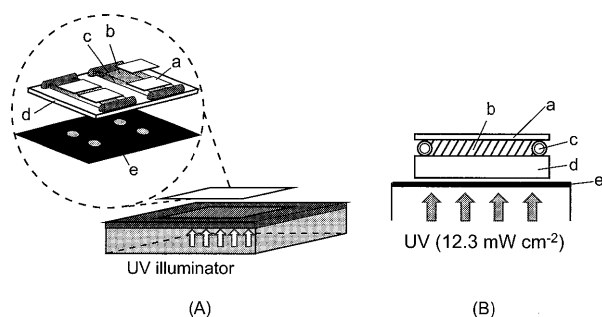


Fig. 1 Experimental setup used for UV patterning of biotin-4-fluorescein on the surface of BSA-modified glass slips

(a) Cover glass; (b) biotin-4-fluorescein solution; (c) glass tube; (d) quartz glass; (e) photo mask. (A) Apparatus and (B) cross section

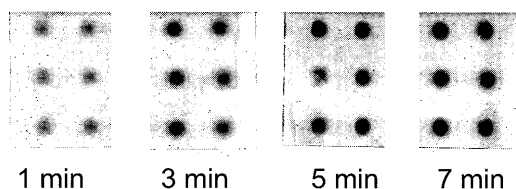
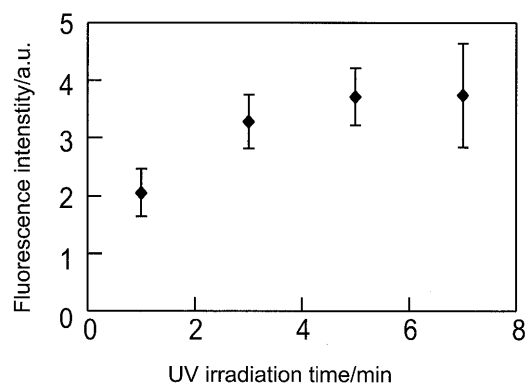


Fig. 2 Effect of UV irradiation time on patterning of biotin-4-fluorescein (0.20 mg mL^{-1}) at pH 7.0 and fluorometric images of patterned biotin sites

UV light (12.3 mW cm^{-2} , peak wavelength 254 nm) from transilluminator was irradiated on BSA-adsorbed glass slips. The average of three measurements was plotted.

液を $150 \mu\text{L}$ のせ、暗所、室温で 1 時間静置した。トルエンで洗浄後、白色光を 30 分間照射して表面に残留した溶媒を蒸発させた。放冷後、 2 mM GMBS の DMSO 溶液を $150 \mu\text{L}$ のせ、暗所、室温で 1 時間静置した。ミリ Q 水で洗浄した後、カバーガラス中央部に 0.1 mg mL^{-1} アビジン溶液 $30 \mu\text{L}$ をスポットとしてのせ、暗所、室温で 30 分間静置した。アビジン溶液をキムワイプで吸い取った後、NaCl 溶液及びリン酸緩衝液を用いて順次洗浄した。次に

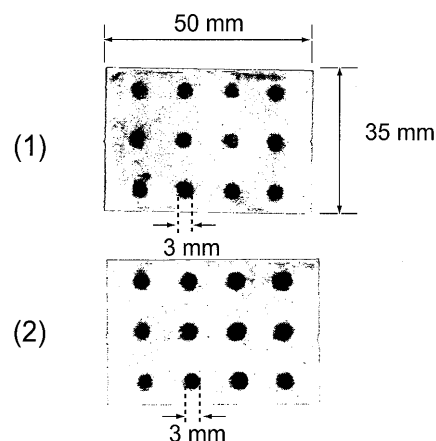
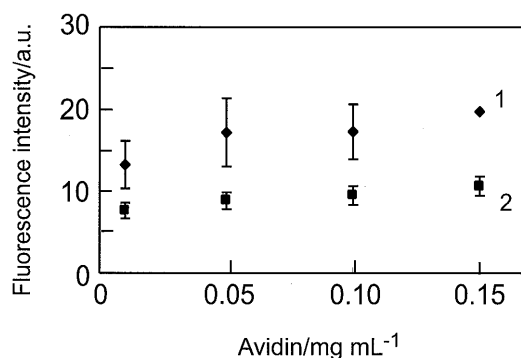


Fig. 3 Effect of avidin concentration on immobilization and fluorometric images of avidin arrays

Biotin sites were patterned on (1) BSA-adsorbed and (2) BSA-modified glass plates from biotin-4-fluorescein by UV irradiation. The biotin sites were incubated with avidin in a phosphate buffer (pH 7.0) for 30 min. The average of three measurements was plotted.

未反応のスクシンイミジル基を不活性化するために、 0.5 M EA 溶液を $150 \mu\text{L}$ のせ、30 分間静置し、リン酸緩衝液で洗浄した。以下ではこの基板をアビジン化学修飾基板と呼ぶ。

2・4 BSA の化学修飾及び光パターニングによるアビジン修飾基板の作製

2・3 と同じ手順で、清浄なカバーガラスに MTS, GMBS を順次修飾した。次に 1 mg mL^{-1} BSA 溶液を $150 \mu\text{L}$ のせ、暗所、室温で 30 分間静置した。NaCl 溶液及びリン酸緩衝液で洗浄した後、 0.5 M EA を $150 \mu\text{L}$ のせ、室温で 30 分間静置した。リン酸緩衝液で洗浄した BSA 修飾基板への B4F の光パターニングは以下のように行った。黒の画用紙に直径 5 mm の穴を開け、これをマスクとして用いた。熔融石英ガラスの縁を粘土 (BLUTACK, Bostik 製) で囲い、UV トランスイルミネーターの透過面上にマスク、熔融石英ガラスの順に重ねて置いた (Fig. 1)。スぺーサ

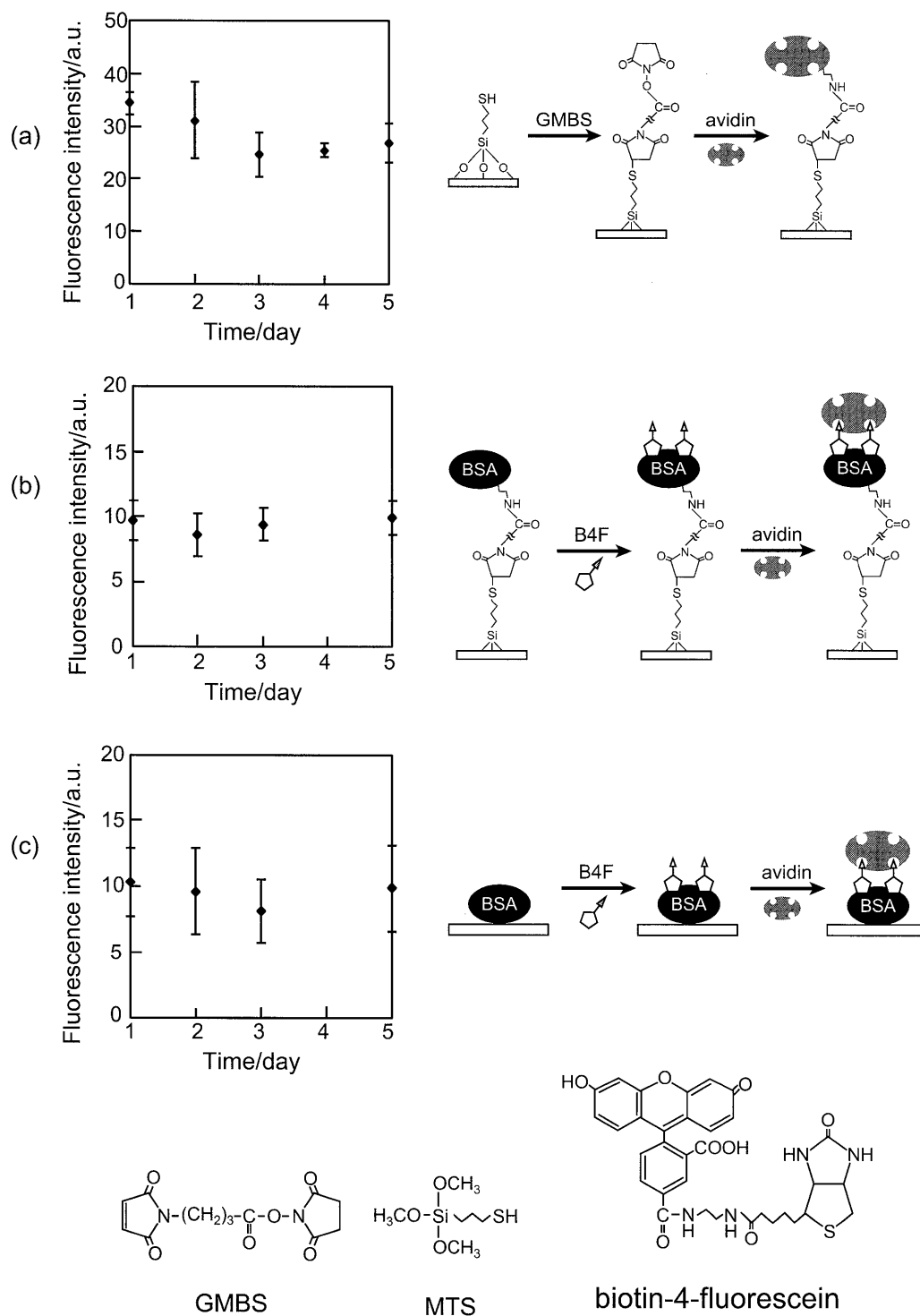


Fig. 4 Stability of avidin-modified plates and fluorometric images of avidin arrays

The plates were stored in dark at 4°C. Each plate was treated with 1.0 μM biocytin oregon green (BOG) and washed with 0.10 M phosphate buffer and subjected to fluorescence measurements with FluorImager 595 (excitation 488 nm and emission 530 nm). (a) Avidin sites were introduced by the amine coupling method, (b) biotin sites were patterned on BSA-modified glass plates from bitoin-4-fluorescein by UV irradiation and (c) biotin sites were patterned on BSA-adsorbed glass plates from bitoin-4-fluorescein by UV irradiation. The average of three measurements was plotted.

ーとしてガラス管（直径 0.7 mm）を熔融石英ガラス上に平行に置き、その上に BSA 修飾面を下向きにして BSA 修飾基板を配置した。熔融石英ガラス上に 0.20 mg mL^{-1} B4F 溶液を注ぎ、UV 光を 5 分間照射した。基板は NaCl 溶液、リン酸緩衝液で順次洗浄した。パターンニング部分に 0.1 mg mL^{-1} アビジン溶液を $50 \mu\text{L}$ のせ、室温、暗所で 30 分間静置した後、NaCl 溶液及びリン酸緩衝液で洗浄した。以下、これをアビジン-BSA 化学修飾基板と呼ぶ。

2.5 BSA の物理吸着及び光パターンニングによるアビジン修飾基板の作製

清浄なカバーガラスに 1 mg mL^{-1} BSA 溶液を $200 \mu\text{L}$ のせ、暗所、室温で 15 分間静置することによってガラス表面に BSA を吸着させた。リン酸緩衝液で洗浄後、2.4 と同じ手順で、B4F の光パターンニング、アビジン修飾を行った。以下では、この基板をアビジン-BSA 吸着基板と呼ぶ。

2.6 アビジンを修飾した基板の安定性の評価

アビジン修飾基板の保存安定性を評価するために、作製したアビジン修飾基板は窒素雰囲気下で 4°C の暗所に保存し、1 日ごとに BOG と反応させ、蛍光強度を測定した。アビジンを修飾した基板に $1.0 \mu\text{M}$ BOG 溶液を $50 \mu\text{L}$ のせ、室温、暗所で 30 分間静置し、BOG を反応させた。NaCl 溶液及びリン酸緩衝液で洗浄した後、蛍光強度（励起 488 nm 、蛍光 530 nm ）を測定した。観測された平均蛍光強度をアビジン量の指標として安定性を評価した。

3 結果と考察

3.1 アビジン修飾基板の作製

B4F は紫外部に吸収をもつため、UV 光によるパターンニングが可能と考えた。BSA を吸着させたガラス基板を用いて、UV トランスイルミネーターからの UV 光を 1 分から 7 分の間で変化させて照射後、ビオチンサイトからの蛍光を観測することにより、パターンニングの進行状況を観察した。その結果、Fig. 2 に示すように、UV 照射によりビオチンサイトが形成され、5 分以上の照射で蛍光強度は一定になることが分かった。BSA を化学修飾した場合にも同様な結果が得られた。アビジン-BSA 吸着基板を作製する際のアビジン濃度の影響及び作製したアビジンアレイの蛍光イメージを Fig. 3 に示す。いずれもビオチンサイトに異なる濃度のアビジンを反応させ、BOG 溶液で処理後の蛍光強度を測定した。アビジン濃度が $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ から 0.15 mg mL^{-1} の範囲で蛍光強度は一定となった。アビジン濃度が増すと溶液の粘性が高くなるために、以下では 1.0 mg mL^{-1} のアビジン溶液を用いた。アビジン-BSA 化学修飾及びアビジン-BSA 吸着基板のいずれも、マスク

に開けた穴（直径 3 mm ）の形状にほぼ対応したアビジンスポットが観察された。

3.2 アビジン修飾基板の安定性の検討

上記の操作により作製したアビジン修飾基板を窒素雰囲気下、 4°C の冷蔵庫中で保存した。1 日ごとに蛍光色素 BOG と反応させたときの蛍光強度を Fig. 4a に示す。アビジン修飾基板は作製 1 日目から 2 日目までは蛍光強度に変化はなかった。2 日目以降は蛍光強度の減少が観察されたが、その強度は BSA 化学修飾基板及び BSA 吸着基板と比較して大きかった。この結果から、アビジン修飾基板ではアビジンサイトを形成後 2 日以内に使用することが望ましいが、3 日目以降でも高いアビジンサイト量をもつ基板が得られることが分かった。一方、アビジン-BSA 化学修飾基板のアビジンサイトを BOG で検出した結果（Fig. 4b）は、アビジンサイトを形成してから 5 日目まで蛍光強度はほぼ一定となった。アビジン-BSA 吸着基板（Fig. 4c）でも 5 日目まで蛍光強度に変化がなかった。これらの結果は、ガラス基板表面を BSA で被覆することでアビジンがガラス表面に直接接することがなくなり、アビジンの変性が起こりにくくなったことを示している。アビジン-BSA 吸着基板では蛍光強度がばらつく傾向が見られた。これはガラス基板への BSA の修飾は物理吸着によるため、洗浄の際に基板上の BSA が剥離するためと考えられる。しかし、物理吸着による方法はガラス基板に BSA をあらかじめ化学修飾する必要がないため、基板の作製に要する時間は大幅に短縮される。

4 結 言

上述の結果は、紫外光による B4F の光パターンニングにより、アビジン修飾アレイを容易に作製できることを示している。また、少なくとも 5 日間は保存できることから、今後、様々なバイオ素子をアビジンに結合させることで、バイオ分子の高感度なセンシング法を開発するための基板として有用と考えられる。また、アビジン修飾基板もアビジンサイト量が多いため目的に応じて使用できる。

文 献

- 1) A. S. Blawas, T. F. Oliver, M. C. Pirrung, W. M. Reichert: *Langmuir*, **14**, 4243 (1998).
- 2) D. S. Shin, K.-N. Lee, K.-H. Jang, J.-K. Kim, W.-J. Chung, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee: *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 485 (2003).
- 3) D. J. Pritchard, H. Morgen, J. M. Cooper: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 91 (1995).
- 4) D. J. Pritchard, H. Morgen, J. M. Cooper: *Anal. Chem.*, **67**, 3005 (1995).
- 5) M. A. Holden, S.-Y. Jung, P. S. Cremer: *Anal. Chem.*, **76**, 1838 (2004).
- 6) E. Delamarche, G. Sundarababu, H. Biebuyk, B.

- Michel, C. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu: *Langmuir*, **12**, 1997 (1996).
- 7) N. Dontha, W. B. Nowall, W. G. Kuhr: *Anal. Chem.*, **69**, 2619 (1997).
- 8) Z. Yang, W. Frey, T. Oliver, A. Chilkoti: *Langmuir*, **16**, 1751 (2000).
- 9) M. C. Pirrung, C. Y. Huang: *Bioconjugate Chem.*, **7**, 317 (1996).
- 10) L. M. Wilde, G. Farace, C. J. Roberts, M. C. Davies, G. G. W. Snaders, S. B. Tendler, P. M. Williams: *Analyst*, **126**, 195 (2001).
- 11) X. Su: *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **290**, 962 (2002).
- 12) M. Hengsakul, A. E. G. Cass: *Bioconjugate Chem.*, **7**, 249 (1996).
- 13) M. Y. Balakirev, S. Porte, M. Vermaz-Gris, M. Berger, J.-P. Arié, B. Fouqué, F. Chatelain: *Anal. Chem.*, **77**, 5474 (2005).
- 14) L. F. Rozsnyai, D. R. Benson, S. P. A. Fodor, P. G. Shultz: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 759 (1992).
- 15) M. A. Holden, P. S. Cremer: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8074 (2003).
- 16) H. Yanagisawa, A. Hirano, M. Sugawara: *Anal. Biochem.*, **332**, 358 (2004).
- 17) N. Moridera, M. Yamamoto, W. Okumura, M. Sugawara: *Anal. Sci.*, **23**, 39 (2007).
- 18) R. J. O. Casford, W. G. Kuhr: *Anal. Chem.*, **68**, 2164 (1996).

Preparation and Stability of Avidin-Modified Glass Slips

Masatoshi SATO¹, Koji YANAGIDA¹, Ayako TANAKA¹ and Masao SUGAWARA¹

¹ Department of Chemistry, College of Humanities and Sciences, Nihon University, 3-25-40, Sakurajosui, Setagaya-ku, Tokyo 156-8550

(Received 16 December 2006, Accepted 22 January 2007)

The formation of avidin sites on the surface of glass slips by chemical modification and an avidin-biotin technique was investigated. In a chemical modification approach, a glass surface was treated with 3-mercaptopropyltrimethoxysilane, on which avidin was introduced by an amine coupling method. In the avidin-biotin technique, biotin sites were formed on glass slips by the patterning of biotin-4-fluorescein on bovine serum albumin (BSA)-modified and BSA-adsorbed glass slips by UV irradiation. Avidin-modified glass slips were prepared by treating the biotin sites with an avidin solution. The avidin slips prepared by UV patterning were able to be kept in the dark at 4°C for at least 5 days, while the chemically modified slips were able to be kept for one day. The preparation of avidin arrays by UV patterning was also demonstrated. The avidin slips appeared to be useful for introducing biomolecules to design a variety of sensing systems.

Keywords : avidin-modified glass slip; UV-driven patterning of biotin-4-fluorescence; avidin array.