

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22655022

研究課題名（和文） PCR 不要な超高感度 DNA センサーの創出

研究課題名（英文） Realization of a PCR-free, highly-sensitive DNA sensor

研究代表者

水谷 文雄 (MIZUTANI FUMIO)

兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・教授

研究者番号：80118603

研究成果の概要（和文）：

クロロ(2,2':6',2"-テルピリジン)白金(II)錯体は二本鎖 DNA 中にインターカレートし、その状態では錯体は立体障害等の影響で電極上で電解還元・白金析出を起こさない。DNA 存在下での、この白金析出電流の低下は白金を触媒とするプロトン還元電流の減少として、白金錯体の還元電流自身を検出するのに比べて高感度に捉えられる。この知見に基づき、プローブ DNA 存在下でターゲット DNA のアンペロメトリック測定を行った。

研究成果の概要（英文）：

A novel electrochemical technique for ds-DNA detection has been developed by combining chloro(2,2':6',2"-terpyridine)Pt(II) and a glassy carbon electrode. The intercalation of the Pt(II) complex into ds-DNA caused suppression of the electroreduction of the Pt(II) complex owing to the steric hindrance, and subsequently, the electroreductive current for proton that is catalyzed by the platinum deposited on the electrode by the reduction of the Pt(II) complex. A target DNA content was determined from the decrease in the catalytic activity of the electrode for reducing proton in the presence of probe DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：バイオセンサー, DNA, 高感度測定, PCR-フリー

1. 研究開始当初の背景

特定の塩基配列を持つ DNA 断片の有無の判別あるいは定量を行う場合、通常、分析の前段階として PCR(ポリメラーゼ増幅反応)を介して、対象とする DNA 断片の量を、濃度数百 ng/mL 以上となるまで $10^6 \sim 10^8$ 倍の増幅を行っている。しかし PCR には長時間を要するのみならず、試薬、手順の基本が米国

特許で押さえられてしまっている。

ここでもし、定量下限が 1 pg/mL レベルの簡易な測定法があれば、基本的には PCR の操作無しに目的とする DNA 断片の有無の判別あるいは定量するセンサーの構築が可能となる。

我々は、DNA の G-G あるいは G-A 部位に結合するシスプラチンのグラッシーカーボ

ン電極上への析出について研究を進める過程で、析出電流が DNA 添加に伴い低下すること、析出電流の低下はプロトン還元電流の極めて大きな減少を伴うことを見出した。析出電流の低下は主としてシスプラチンが DNA と結合したことによる立体障害に基づくものであり、これに伴い白金微粒子の数、径の低下が電極触媒機能の低下として観測され、10 pg/mL オーダーの DNA の測定が可能なことを明らかとした (*Analyst*, 134 [2009] 2113)。そこで、二本鎖 DNA と選択的に結合する白金錯体を探索し、より S/N 比を向上させるための研究と併せ、PCR-フリーでの特定塩基配列の DNA 断片の測定に展開しようとするに至った。

2. 研究の目的

特定の塩基配列を持つ DNA 断片を、他の DNA 断片存在下で定量下限 1 pg/mL レベルで測定することを目的とする。すなわち、一本鎖 DNA には結合せず、二本鎖 DNA と選択的に結合する白金錯体を選択し、ターゲット DNA を含む試料中に相補的な塩基配列を持つプローブ DNA を添加し、二本鎖 DNA を得、これに伴う白金錯体の還元・白金析出の速度の低下をプロトン還元電流の低下として高感度に検知しようとするものである。

3. 研究の方法

(1)白金錯体の探索

研究期間を短縮して迅速に原理を確認するために、二本鎖 DNA へのインターカレーターを示す白金錯体を独自に開発することは行わず、適用可能性の高い白金錯体の検索、あるいは既存のインターカレーターと金属錯体のコンジュゲートを合成、利用するという方法を採用した。

(2)金属析出、機能評価に適した電極の評価/利用

電極としてはそれ自体でのプロトン還元過電圧が大きく、かつバックグラウンド電流の小さい材料から選択することが有用である。グラッシーカーボン電極の他、非特異吸着の抑制効果等が期待されるナノカーボン材料等についても検討を行う。

(3)ターゲット DNA の測定

白金錯体およびターゲット DNA を含む種々の DNA を含む試料中にターゲット DNA と相補的な塩基配列を持つプローブ DNA を添加する。ターゲット DNA とプローブ DNA とから形成される二本鎖 DNA の量、すなわち試料中のターゲット DNA の量に依存する白金錯体の還元・白金析出の速度の低下をプロトン還元電流の低下として高感度に検知する。

(4)DNA 測定用センサーの試作

取り扱いが容易な三電極/マイクロセルをベースとするセンサーを試作する。

4. 研究成果

(1)白金錯体の探索

数種の白金錯体についてサイクリックボルタモグラム測定を行い、i)還元電流ピークが明瞭に観察されるか否か、ii)白金錯体の還元ピークに次いでプロトン還元電流の急増が認められるか否か、iii)プロトン還元電流が一本鎖 DNA 添加により余り変化せず、二本鎖 DNA 添加により減少するか、の三点を基準に選択し、クロロ(2,2':6',2''-テルピリジン)白金(II)錯体が目的に合うことを見出した。図 1 曲線(b)は 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7)中、グラッシーカーボン電極で測定したサイクリックボルタモグラムで電流は殆ど検出されていない。これに対し(a)は 0.1 mM の白金錯体を添加した溶液中でのサイクリックボルタモグラムで、-1.0 V vs. Ag/AgCl 付近に錯体の還元電流が認められ、この出現に伴い、-1.1 V vs. Ag/AgCl 付近から顕著なプロトン還元電流が観察される。

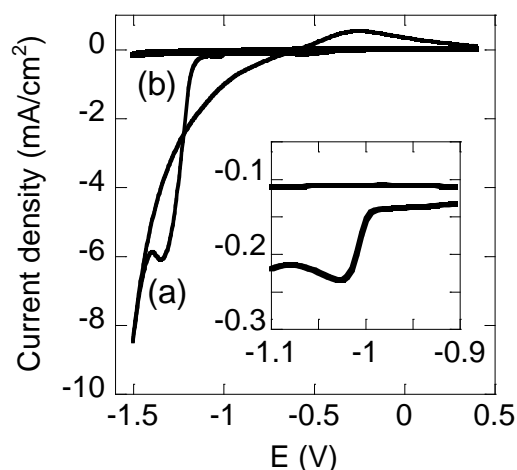


図 1. Electrochemical property for Pt-complex on the glassy carbon electrode by cyclic voltammetry. Cyclic voltammograms of first cycle on the glassy carbon electrode (a) in the presence and (b) in the absence of 0.1 mM Pt-complexes.

また、図 2 は 5 μ M 白金錯体および種々の濃度の二本鎖 DNA(ニシン精子由来)を含む溶液中で、電位 -1.1 V vs. Ag/AgCl でアンペロメトリー測定を行った結果である。電解時間の経過と共に白金錯体からの白金微粒子の還元・析出が進み、プロトン還元電流が増加しているが、この増加速度は DNA の濃度の増大、すなわちフリーの白金錯体濃度の減

少に伴い減少していることが分かる。一方、一本鎖 DNA の添加はプロトン還元電流の増加速度にほとんど影響せず、この白金錯体が二本鎖 DNA を選択的に識別し、かつその定量に用い得ることが分かった。

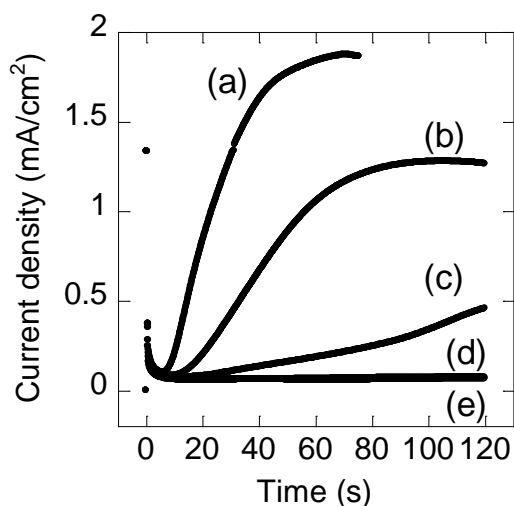


図 2. Variations of reduction currents on GC electrode in 0.1 M phosphate buffer containing Pt-complexes at -1.1 V. Concentrations of complexes are (a) 10, (b) 5.0, (c) 2.5, (d) 0.5 and (e) 0 μM .

(2) 金属析出，機能評価に適した電極の評価/利用

本提案の測定方法を実試料に適用した場合、試料中に共存するタンパク質等の吸着等に伴い電極表面の汚染が起り、これが応答電流の低下などを引き起こす可能性がある。このような非特異的な吸着を抑制するためには、電極表面の平坦性が高く、 sp^3 含量の比較的高いカーボン材料が適していると考えられる。実際、我々はダイヤモンドライクカーボンの一種が、この目的に合致することを見出した。現在、他のナノカーボン材料等について試験を行っている。

(3) ターゲット DNA の測定

図 3 は 20mer の 2.5 μM プローブ DNA を含む溶液に各濃度の相補的塩基配列を持つターゲット DNA を添加，ハイブリダイゼーションを行わせた後に，5 μM 白金錯体を加え，電位 -1.1 V vs. Ag/AgCl でアンペロメトリ測定を行った場合の電流増加速度とターゲット DNA 濃度との関係を示すグラフである。プローブ DNA と非相補的な塩基配列を持つ DNA を添加しても電流増加速度の変化は認められない。すなわち電流増加速度からターゲット DNA 濃度が定量出来ることが分った。

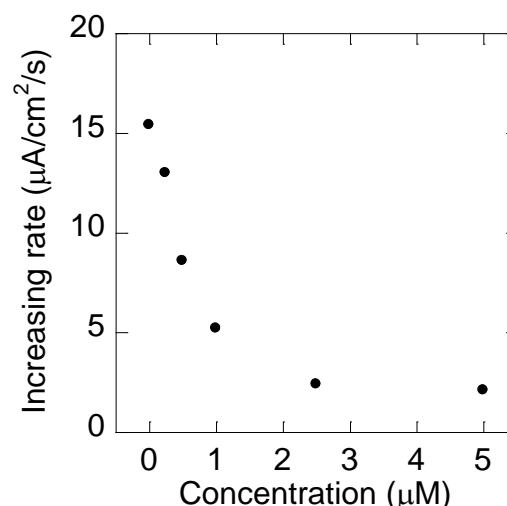


図 3. Relationship between the target DNA concentration and the average increasing rates of reduction currents obtained 60–70 s after applying the potential.

(4) DNA 測定用センサーの試作

プロトン還元触媒能が無く，エッチングにより電極のマイクロファブリケーションが容易な ITO 電極を用いてセンサーを試作した。

以上のようにクロロ(2,2':6',2''-テルピリジン)白金(II)錯体を共存させ，その還元に伴うプロトン触媒電流を観測するという簡易な実験操作で，ターゲット DNA の測定が可能であることを示した。しかしながら，検出下限濃度に関しては 0.1 μM レベル(DNA モノマー換算，100 pg/mL レベルに相当)に留まっている。白金錯体の還元後，プロトン還元電流を酸性溶液中で測定するなどの測定条件の検討によりさらに感度を向上させることが必要となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①安川智之，吉本芳美，後藤卓也，水谷文雄：Highly-sensitive electrochemical immunosensing method based on dual amplification systems, *Biosens. Bioelectron.*, 査読有，in press.

②畠中啓伸，安川智之，水谷文雄：Rapid detection of surface antigen on the living cells by incorporating immuno-recognition into distinct positioning of cells with positive and negative dielectrophoresis, *Anal. Chem.*, 査読有，**81**, 7207-7212 (2011).

③Ramon-Azcon Javier, 安川智之, 水谷文雄: Sensitive and spatially multiplexed detection system based on dielectrophoretic manipulation of DNA-encoded particles used as a platform for immunoreactions, *Anal. Chem.*, 査読有, **83**, 1053-1060 (2011).

④飯島誠一郎, 加藤 大, 矢吹聡一, 丹羽 修, 水谷文雄: Enzymatically-amplified electrochemical detection for lipopolysaccharide using ferrocene-attached polymixin B and its analogue, *Biosens. Bioelectron.*, 査読有, **26**, 2080-2084 (2011).

⑤後藤卓也, 安川智之, 神田一浩, 松井真二, 水谷文雄: Inhibition of electrochemical fouling against biomolecules on a diamond-like carbon electrode, *Anal. Sci.*, 査読有, **27**, 91-94 (2011).

〔学会発表〕(計 9 件)

①安川智之, 山下裕也, 中山大地, 飯島誠一郎, 水谷文雄: 白金錯体の電解還元による触媒電流を利用した DNA センシング, 第 53 回化学センサ研究発表会(浜松), 2012.3.

②加藤 大, 飯島 誠一郎, 矢吹 聡一, 丹羽 修, 水谷文雄: フェロセン誘導体を用いたエンドトキシンの電気化学検出, 第 53 回化学センサ研究発表会(浜松), 2012.3.

③水谷文雄, 後藤卓也, 吉本芳美, 安川智之: Highly sensitive immunoassay with dual signal amplification system, 9th Asian Conference on Chemical Sensors (Taipei), 2011.11.

④安川智之, 後藤卓也, 吉本芳美, 水谷文雄: Highly sensitive immunosensing systems based on electrochemical charge accumulation system, Shikata Discussion 2011 (淡路), 2011.5.

⑤後藤卓也, 安川智之, 水谷文雄: 高感度免疫測定のための酵素生成物返還濃縮デバイスの開発, 電気化学会第 78 回大会 (横浜), 2011.3.

⑥安川智之, Javier Ramon-Azcon, 水谷文雄: 誘電泳動による微粒子の集積化と DNA ハイブリダイゼーションを用いた捕捉, 第 22 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (名古屋), 2010.11.

⑦後藤卓也, 安川智之, 水谷文雄: ダイヤモンドライクカーボン電極へのタンパク質吸着の電気化学的評価, 分析化学会第 59 年会 (仙台), 2010.9.

⑧飯島誠一郎, 加藤 大, 矢吹聡一, 丹羽 修, 水谷文雄: Electrochemically-amplified detection for lipopolysaccharide using ferrocene-attached polymixin B, The 13th International Meeting on Chemical

Sensors (Perth), 2010.7.

⑨水谷文雄, 吉本有希, 安川智之: Cisplatin-based DNA sensing with enhanced electrochemical response, The 13th International Meeting on Chemical Sensors (Perth), 2010.7.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/imdex-j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 文雄 (MIZUTANI FUMIO)

研究者番号: 80118603

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

飯島 誠一郎 (IJIMA SEIICHIRO)

研究者番号: 00356403

丹羽 修 (NIWA OSAMU)

研究者番号: 70392644