

多点結合導入によるタンパク質/アプタマー相互作用の高感度電気検出

The high sensitive electric detection of the protein/aptamer interaction by the many points bonding introduction

○東大樹¹, 合田達郎², 松元亮², 星徹³, 澤口孝志³, 宮原裕二²*Daiki Higashi¹, Tatsuro Goda², Akira Matsumoto², Toru Hoshi³, Takashi Sawaguchi³, Yuji Miyahara²

Abstract: An aptamer-modified field-effect transistor (FET) is developed for the detection of thrombin. An oligonucleotide aptamer as a sensitive and specific ligand for these model proteins was covalently immobilized on a gold electrode extended to the gate of FET together with thiol molecules to make a densely packed self-assembled monolayer (SAM). Specific protein binding altered the charge density at the gate/solution interface. The technique is all within a complementary metal oxide semiconductor (CMOS) compatible format, and is thus promising for highly efficient and low cost manufacturing with the readiness of downsizing and integration by virtue of advanced semiconductor processing technologies.

1. 緒言

バイオマーカーとなるタンパク質等を迅速かつ高感度に定量測定することが、様々な疾病の早期診断・予後診断につながるため、医療・健康分野において求められている。近年新たな手法として核酸アプタマーを用いた電気的アプローチによるタンパク質の定量測定の研究が活発に行われている。しかし、一般的には核酸アプタマーは抗体と比較して親和性が低いため、感度の向上に向けた取り組みが必要である。臨床医療に応用するためには、電位測定での検出限界を高める必要がある。

本研究では、電界効果トランジスタ (FET: Field Effect Transistor) をベースとした電位計測バイオセンサーのゲート部分に二種類の核酸アプタマー配列を固定し、タンパク質と多点で結合させ、親和性を上げることにより検出感度を高めることを目指す。そこでアプタマーの固定化方法、スペーサー分子の長さ、固定化密度といった要素の最適な条件を検討することを目的とし、各条件下での電位測定における電位シグナルの比較を試みる。

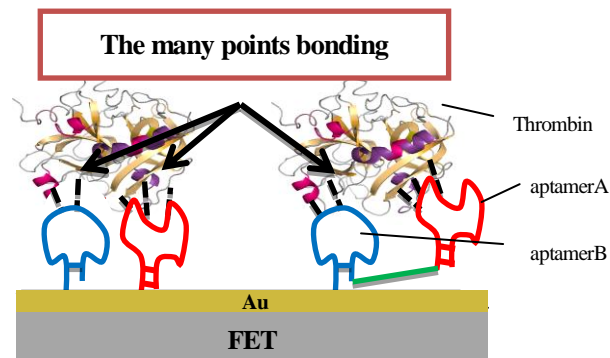


Figure 1. Detection protein

2. 実験

➤ 基板作製・基板修飾

- ① 10 チャンネル円形 Au 微小電極 (直径 500 μm), 導線部分をエポキシ SU-8 でコーティングしたものを用意した。
- ② マイクロアレイの上に反応チャンバ (180 μL) とガラスチューブ (内径 5.6 mm) を熱硬化性の絶縁樹脂で固定した。ガラスチャンバーは使用前に 1 M NaOH と 1 M HCl で洗浄した。
- ③ トロンビン結合 DNA アプタマーの 5'末端に HS- (CH₂)₆-T_n- (n=3, 6, 9) を修飾したものを用了。
(15-mer) HS- (CH₂)₆-T_n-GGTTGGTGTGGTTGG-3' : Bock アプタマー
(29-mer) HS- (CH₂)₆-T_n-AGTCCGTGGTATAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3' : Tasset アプタマー
- ④ SAM を次の方法で作製した。

A, B 二種類のアプタマーを基板に Tris-buffer (pH 8.0) 中で 24 h 修飾させてから Sulfobetaine-3-undecanethiol (SB) を 24 h 修飾させるが、二種類のアプタマーの修飾の条件を次のように検討した。

Table 1. Modified aptamer condition

| Bock/Tasset | TT ₃ | TT ₆ | TT ₉ |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| BT ₃ | High/Low | High/Low | High/Low |
| BT ₆ | High/Low | High/Low | High/Low |
| BT ₉ | High/Low | High/Low | High/Low |

※ High : 10 μM (5 μM Bock アプタマー, 5 μM Tasset アプタマー)

※ Low : 2 μM (1 μM Bock アプタマー, 1 μM Tasset アプタマー)

※ Tris-buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 1 mM TCEP を混合し, pH 8.0 に調製したもの)

➤ QCM (Quartz Crystal Microbalance) 測定

1 : 日大理工・学部・応化 2 : 東医歯大・生材研・バイオエレクトロニクス分野・宮原研 3 : 日大理工・教員・応化

- ① 洗浄した QCM 用の金電極 (CRYSTAL UNIT:30 MHz) 公称周波数 (f_0) を NAPICOS QCM SYSTEM を用いて、25 °C で測定した。
- ② CRYSTAL UNIT の電極部分にアプタマーを 24 h 修飾した (Table.1 の条件と同様に)。その後周波数を測定した。
- ③ CRYSTAL UNIT の電極部分に 10 nM SB (in 10 nM TCEP) 水溶液を 24 h 修飾した。その後周波数を測定した。

➤ タンパク質の電気検出

- ① 100 °C に加熱した測定 buffer を加え、Au 基盤に修飾したアプタマーを熱変性させ、その後ゆっくり冷ました。
- ② 作製した基板を参照電極と共に Keithley 6517B エレクトロメーター/高度抵抗性メーターのゲート部分につなげ、10 チャンネルマイクロアレイの電気電圧の時系変化を home-built data logger を用いてモニタリングした。
参照電極 : Ag/AgCl in 3.3 M KCl, 25 °C, 測定間隔 : 10 秒, バイアス電圧 : 0 V
- ③ ①の buffer をフレッシュな測定 buffer 100 μ L に交換し、参照電極をさしたのち電位計測をスタートさせて、2 時間 30 分、25 °C で平衡状態にした。30 分おきにフレッシュな測定 buffer に交換した。
- ④ 電位が安定したらピペッティングし (タンパク質濃度 0 nM), 10 分おきにストックタンパク質溶液を 0.5, 1, 2, 4, 10, 25, 50 μ L ずつ加えた。
※ 測定 buffer 組成:10 mM Tris-HCl,5 mM KCl,3 mM NaCl,1 mM CaCl₂,1 mM MgCl₂ (pH 8.0)

3. 結果

➤ 基板評価

QCM 測定よりアプタマー, SB の修飾後の面積当たりの質量変化を算出した。その結果, アプタマー修飾溶液濃度 High の場合平均 96 ng/cm², SB は平均 700 ng/cm² 質量が増えたことが確認された。電極表面が乾燥していると仮定し, 式[1]からアプタマーと SB の固定化密度 (d [本/nm²]) をそれぞれ求めたところ, およそ 0.11 本/nm², 9.3 本/nm² となったが, Δf は水重量を反映するため実際の密度はこの結果よりも低くになると考えられる。

$$d = \frac{\Delta f \times 0.46 \times 10^{-23} \times N_A}{M_w} \quad [1]$$

ここで, Δf : 反応前後の周波数変化[Hz], 0.46×10^{-23} : 1Hz あたりの重量換算定数[g/nm²·Hz], N_A : アボガドロ定数 [分子数/mol], M_w : 分子量[g/mol]とする。

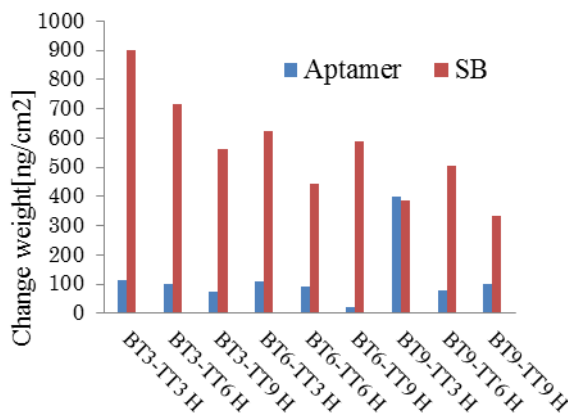


Figure 2.Result of QCM measurement

➤ タンパク質の電気検出

各条件で修飾した基板をエレクトロメーターで電位計測を行い, 特異性と感度の評価をした。Figure 4.は Thrombin 濃度とその濃度における電位の変化量をフィッティングしたものであるが, SB だけの基板とアプタマーを修飾した基板で違いが表れた。このことから SB で非特異吸着が抑制されたことが確認できた。また, 感度の評価基準としてアプタマーと Thrombin の解離度 (K_d) を式[2]より算出した,

$$K_d = \frac{[A](V_{max} - V)}{V} \quad [2]$$

ここで, [A]:Thrombin 濃度[μ M], V : 電位[mV], V_{max} : Thrombin 濃度が最高濃度のときの電位[mV]とする。現段階で最も高感度に測定できた基板の条件は, BT₉-TT₃ の Low であり, $K_d=158$ nM であった。

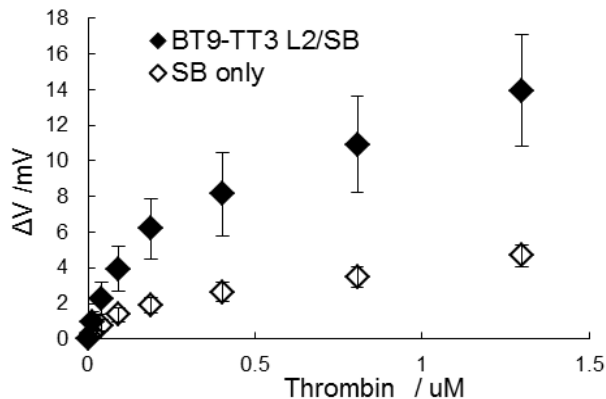


Figure 3.Result of potential measurement

4. 結言

今回の実験結果から電位計測より SB で非特異吸着が抑制されることを確認し, 各条件で修飾したアプタマーと Thrombin の K_d を比較できた。今後は, 1 種類のアプタマーを修飾したものに, 2 種類のアプタマーをリンカーで並列につなぎ修飾したものの電位計測, QCM, CV (Cyclic voltammetry) を行い, 最も高感度に検出できる条件を検討する。

5. 参考文献

[1] Goda.et al. Label-free and reagent protein biosensing using aptamer-modified extended-gate field-effect transistors. Biosensors and Bioelectronics.45, 89-94(2013).