P88 遺伝子診断チップ上 DNA 分子のキャラクタリゼーション (付着エネルギーと面密度)

Characterization of DNA molecules adsorbed on diagnostic chips by atomic force microscopy (Adhesion energy and surface density)

○正 加藤 勝 (秋田県産総セ) 正 村岡 幹夫 (秋田大工) 正 赤上陽一 (秋田県産総セ)

Masaru KATO, Akita Prefectural R&D Center, 4-11 Arayamachi-aza-sanuki, Akita 010-1623

Mikio MURAOKA, Akita University

Yoichi AKAGAMI, Akita Prefectural R&D Center

Key Words: Atomic force microscopy (AFM), DNA chip, Adhesion energy, Pull-off force, Energy release rate

1. 緒 言

遺伝子診断用 DNA チップの開発では、チップ(基板)表面にプローブ DNA 分子を十分な強度で固定(定着)することが肝要となる。また、その定着性評価も重要である。最近、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた蛋白質分子の力学的構造解析や結合強度の一分子計測が行われてはいるが⁽¹⁾、DNA チップの評価を目的にした研究は未だない。また、本研究で対象とする DNA 分子は、蛋白質分子の場合⁽¹⁾と異なり、分子鎖に沿って多数点で基板に結合されているため、結合強度評価にも工夫が必要となる。

本研究では、DNA の定着性評価手法の確立を目的として、液中 AFM により DNA チップのフォースカーブ計測を行う。これにより、基板からの分子引剥しに関連した特徴的な力応答を明らかにする。さらに定着 DNA 分子のエネルギー解放率を初めて導入し、定量的な付着エネルギー評価方法を考案する。

2. 定着試験とフォースカーブ計測

DNA チップ用供試材として 3 種類のプラスチック (基板 A, B, C) を取上げ、定着試験を行った。プローブ DNA (遺伝子配列既知の 1 本鎖 DNA) は特定症例の 2 種類(DNA①, ②)である。濃度 0.05~0.08 μ M の DNA 溶液 (SSC バッファ) を

Table 1 Adhesion force and relative surface density.

Chip		Adhesion force [pN]	Relative surface density [%]
A	②/② ^{*1}	56 $\pm$ 20	40
B	②/②	53 $\pm$ 25	47
C	①/① ^{*2}	58 $\pm$ 26	67
	② ^{*3}	42 $\pm$ 17	51

*1 : Probe DNA② hybridized with sample DNA②. *2 : Probe DNA① hybridized with sample DNA①. *3 : Probe DNA②.

基板上に滴下し、乾燥後 UV クロスリンカーにより DNA を基板に定着した。プローブ DNA は 400 塩基長 (症例関連の遺伝子情報部は端部の 16 塩基) であり、分子長は約 290nm である。このような高分子は溶液中で熱運動によりランダムコイル状になる。弾性ワイヤの統計力学によれば、本研究で用いる DNA 分子の平均両端距離の理論値は基板上で約 30nm となる。DNA は基板上で縮れた状態で点在していると推測できる。

各定着基板に対してそれぞれ相補的な検体 DNA (約 200 塩基長、相補的な遺伝子情報部は中央の 16 塩基) 溶液を滴下し、ハイブリダイズ反応させた。検体 DNA は色素標識されており、目視により定着の有無を確認できる。なお、基板 C では、ハイブリダイズ反応が生じない (相補的でない) 検体 DNA も用いた。

Fig. 1 Typical force curves for surface of a DNA chip (chip B).

Fig. 2 DNA mapping for chip B (image size 3 μ m $\times$ 3 μ m).

ハイブリダイズ反応後、洗浄乾燥し、各基板を純水中に保持してAFM計測を行った。付着力計測用のカンチレバーは、ばね定数 0.03N/m のシリコン製である。またシリコン探針の先端半径は約 10nm である。接触力 5nN のもとで、基板上の 3μm×3μm 領域の表面形状画像を取得した後、領域内の 100 点 (10 点×10 点) に対してフォースカーブ計測 (最大押付力 5nN) を行った。なおフォースカーブとは探針に作用する力と距離 (カンチレバーと試料表面の距離) の関係である。

図 1 にフォースカーブの一例 (基板 B) を示す。ここではカンチレバーを試料表面から引き離す場合のみを示す。なお横軸 z は、カンチレバーの高さ方向の位置を表すが、 z の原点は任意である。左側の直線的な傾斜部 (斥力部) は、探針が表面に接触している状態に対応する。図 1 のように同一基板内の場所の違い (a) と (b) により、探針が表面から離れる際に相違が現れる。図 1(a) では、探針が表面から離れても約 40nm の距離まで引力 (力が負値) が作用している。図 1(b) では、引力が作用せず、DNA 定着試験なしの基板と同様であった。

図 1(a) のような引力が及ぶ距離は約 30~100nm であった。基板上の DNA 分子が押付けによって探針に付着する場合、その接触長は接触半径から推測して約 4nm である。約 30~100nm の長距離に及ぶ引力は、探針からではなく基板表面からの DNA 分子の引剥し抵抗によるものであると考えることができる。図 2 は、形状画像 (グレースケールは高さを表す) 上に、フォースカーブから判断した DNA 分子の存在箇所を丸印で示した例である。このような計測により、定着性評価で重要な DNA 分子の面密度の相対値 (面密度比) がわかる。また表 1 に各基板の付着力と面密度比を示す。ここに付着力は、引剥し時の引力の最大値である。定着力はいずれの基板においても小さいこと (約 50pN) がわかる。

4. 付着エネルギー評価

付着に関する本質的な量として、付着力ではなく、付着エネルギーに注目する。本研究では DNA 分子の基板からの引剥し問題に対し、機器・構造物の界面破壊力学で利用されてきたエネルギー解放率を初めて導入し、付着 (結合) エネルギーの評価方法を検討する。

図 3 のようにカンチレバーにより引剥されている DNA 分子は、弾性ワイヤのように振舞い、伸張のひずみエネルギーが蓄えられる。これとカンチレバーのひずみエネルギーの総和が本システム (系) のポテンシャルエネルギー U である。前者は DNA 分子の全剥離長 $2s$ 、DNA 分子の伸張弾性率 S (一本鎖 DNA : $S=800\text{pN}^{(2)}$)、探針に作用する引力 F および基板上

Fig. 3 Peeled DNA molecule.

Table 2 Bond energy and periodical distance of bonding.

Kind of bond	Bond energy ⁽³⁾ [J]	Periodical distance of bonding [nm]	Electrostatic interactions ⁽³⁾
Covalent	(25~100)×10 ⁻²⁰	10~40	↑ Ionic bond Ion-dipole bond ↓ Dipole-dipole interaction
Hydrogen	(2~7)×10 ⁻²⁰	1~3	
van der Waals	< 0.2×10 ⁻²⁰	< 0.1	

DNA 分子の長さ (剥離半長) s とその平均両端距離 r の関係を用いて表すことができる。また、後者は $(1/2)F^2/k_c$ である。

エネルギー解放率 G は $G(s; z) = -(\partial U / \partial s)_z$ により定義できる。すなわち G は系の外部からの仕事なしで (z 一定のもとで) 剥離が単位長さ増加した際の系のポテンシャルエネルギーの減少量を意味する。図 3 のように剥離先端部は両端の 2 箇所あるのが一般であるから、剥離進展開始条件は $G=2w$ となる。ここに w は単位長さ当りの付着 (結合) エネルギーである。

剥離が十分進展したとき ($s \gg 1 \text{ nm}$)、 G は次式のように簡単な形で表すことができる。

$$G(s; z) \approx 2S \left(\frac{z-s}{2S/k_c + s} \right) + S \left(\frac{z-s}{2S/k_c + s} \right)^2 \approx F + \frac{F^2}{4S} \quad (1)$$

引剥し時の引力 F_c は、図 1(a) のように一定ではないが、平均値として $F_c = 50\text{pN}$ を用いる。なお他の測定点、他の基板についても同程度である。 $F=F_c$ のとき、すなわち剥離が安定に進展しているとき $G=2w$ が成立している。したがって式 (1) より単位長さ当りの付着エネルギー $w=25\text{pJ/m}$ を得る。

表 2 に種々の化学結合のエネルギー値⁽³⁾を示す。またこの結合エネルギーを w 値で除した値すなわち基板上 DNA 分子の長さ方向の結合周期を併せて示す。もし基板との結合が共有結合であるなら、結合周期は約 10~40nm となる。これは、引剥し時の引力が連続的であるという実験事実 (図 1(a) 参照) に反する。水素結合であれば結合周期が約 1~3nm となり、連続的な引力が期待できる。この考察から、本研究の DNA チップでは、DNA 分子が水素結合あるいはこれと同等な結合エネルギーを有するイオン-双極子結合であることが推定できる。

5. 結 言

DNA チップにおける DNA 分子の定着性を評価するため、原子間力顕微鏡によりフォースカーブ計測を行った。これにより、分子引剥しに起因した特徴的な力応答が現れることを明らかにした。また分子付着評価にエネルギー解放率を初めて導入し、付着エネルギーの評価方法を考案した。

文 献

- (1) 松永是, バイオチップの最新技術と応用, (2004), p.73, シーエムシー出版.
- (2) Smith, S. B., Cui, Y. and Bustamante, C., *Science*, **271** (1996), p.795-799.
- (3) Israelachvili, J., *Intermolecular & Surface Forces*, (1991), p. 28-136, Academic Press.