

ルテニウム-白金連結錯体を鋳型特異的に脱離する DNA プローブを用いた核酸検出

○朝比奈 雄志・小嶋 美鈴・北村 裕介・勝田 陽介・井原 敏博（熊本大院先端）

Nucleic acid detection using DNA probes that release a ligated product between ruthenium and platinum complexes in a sequence specific manner. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University) ASAHINA, Takeshi; KOJIMA, Misuzu; KITAMURA, Yusuke; KATSUDA, Yousuke; IHARA, Toshihiro

標的核酸を鋳型としてプローブ核酸同士を連結し、その連結体を質量分析で確認することで、標的核酸を間接的に検出する手法は、ハイスループットな核酸分析法として高い注目を集めている。しかし、核酸のイオン化効率が低いことや、反応基質のプローブに比べ連結体が安定に標的核酸と結合し、未反応のプローブ核酸と置換されないため、シグナルの増幅が困難である。そこで本研究では、イオン化効率が高い金属錯体に着目し、特徴的な同位体存在比を有する Ru と Pt を中心金属とする錯体を用いた。これらの錯体を修飾したプローブには、プローブの核酸部位と錯体部位を連結するリンカー部位にプロテインプライミング反応を起こすペプチドユニットを導入している (Fig. 1)。そのため、両プローブが標的核酸に結合して近接するとスプライシング反応が誘発され Ru-Pt 連結錯体を脱離する。カチオン性の錯体の脱離によって二本鎖が不安定化するため、プローブを過剰に加えておけば、未反応のプローブと錯体脱離後のプローブが置換し、連結・脱離反応が繰り返し起こると予想される。本戦略により、標的の遺伝情報を生成物である連結錯体の質量とユニークな同位体パターンの変化として高感度に検出できると期待される (Fig. 2)。

Ru 錯体修飾プローブを以下の手順で合成した。まず、**Fmoc-Cys(Mmt)-NHS** (NHS : N-ヒドロキシスクシンイミド) を 3'アミノ化 DNA とカップリングし、Fmoc 脱保護後、Ru 錯体の NHS 活性エステル体 **[Ru(phen)₂Asp-NHS](PF₆)₂** と反応させた。AgNO₃/DTT により Mmt 基を脱保護することで目的物を得た。Pt 錯体修飾プローブは以下の手順で合成した。合成した **Alloc-EDA-Cys(Mmt)-Asn(Mtt)-SC-NHS** を固相担体上で 5'アミノ化 DNA とカップリングし、Alloc 脱保護後、Pt 錯体の NHS 活性エステル体 **[Pt(phen)dap-NHS]Cl₂** と反応させ、固相から切出し、単離した。AgNO₃/DTT および AcOH により Mmt 基、もしくは Mtt 基を脱保護することで目的物を得た。合成した両プローブと標的 DNA を 0°C にて 15 分間インキュベートした。マトリックスを用いずにそのまま MALDI-TOF/MS で測定を行った結果、両プローブと完全相補的な DNA 存在下では、連結錯体の質量が検出された。一方、Ru 錯体プローブと一塩基ミスマッチ部位を有する DNA 存在下では複合錯体は検出されなかった。

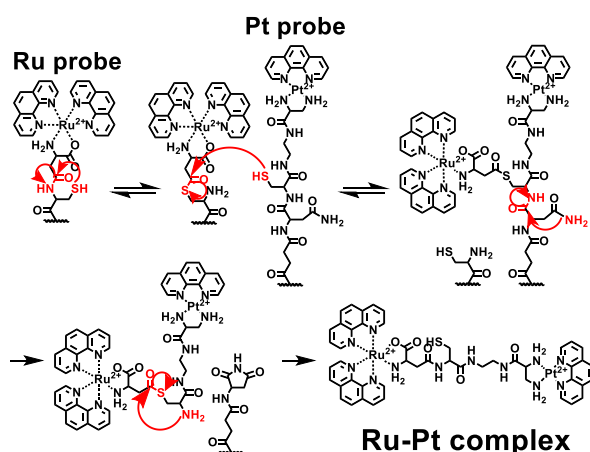


Fig. 1. Schematic representation of the formation and release of ruthenium-platinum complexes.

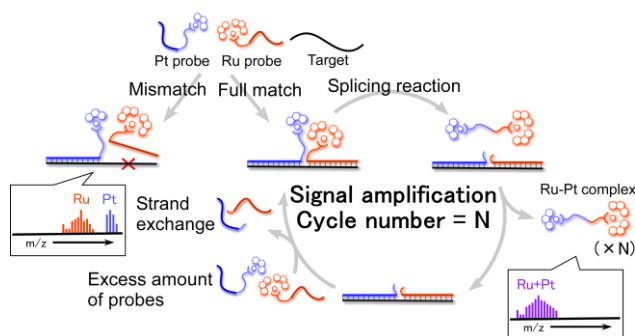


Fig. 2. Signal amplification based on the reaction cycle for the autonomous and successive formation and release of ruthenium-platinum complexes.