

## 1.6

助成番号 0016

## DNA ナノスフェアを用いる遺伝子一塩基変異診断におけるマグネシウムイオンの役割

助成研究者：前田 瑞夫 (九州大学大学院工学研究院)

遺伝子の変異は、遺伝病やガンなどの疾病の原因になることが明らかになっている。そのため、配列特異的に DNA を検出する簡便かつ実用的な手段の開発は、現在の最重要課題の一つとなっている。本研究では、DNA 担持ナノスフェアの凝集・分散現象を利用して DNA 配列と鎖長を正確かつ迅速に識別する手法を提案する。本手法を用いて正常型 DNA と変異型 DNA を正確に識別するには、系中の塩濃度 ( $MgCl_2$  または  $NaCl$ ) を厳密にコントロールすることが必須である。

この DNA ナノスフェアは、1 粒子あたり約 17 分子の両親媒性高分子から構成される。この両親媒性高分子は、代表的な熱応答性高分子モノマーである *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) と 5' 末端にビニル基を導入した oligodeoxyribonucleotide (ODN) 誘導体をラジカル共重合させて得た。なお、その DNA 配列(5'-GCCACCAGC-3')は、ガン遺伝子として知られる *K-ras* 遺伝子の一部を用いている。溶液温度を polyNIPAAm の相転移温度以上にすると、両親媒性高分子は直ちに凝集し、疎水核表面に DNA を担持したナノスケールのコロイド状粒子 (DNA ナノスフェア) を形成した。

分析対象としては、完全相補的な配列である ODN I、中央の一塩基が変異している ODN II、一塩基だけ鎖長が長い ODN III および IV を使用した(Table)。DNA ナノスフェアの凝集による系の濁度上昇は、紫外可視分光光度計を用いて 500 nm の吸光度を測定することによって評価した。それぞれのターゲット DNA を添加して濁度の時間変化を追跡した結果を Figure に示す。興味深いことに、完全に相補的な配列である ODN I が系中に存在する場合のみ、急速な凝集による系の濁度上昇が観測された。一方、変異型の配列である ODN II-IV が存在する場合は、DNA ナノスフェアは完全に分散状態を保ち、系は均一のままだった。なお、このような明確な識別を行うためには、あらかじめ最適な塩濃度を設定しておくことが必要である。

以上のように、ターゲット DNA と DNA ナノスフェアの凝集行動を追跡することにより、DNA の配列と鎖長を認識することが可能である。この分析システムを簡便かつ正確な遺伝子診断に応用することが期待できる。

Table. Sequences of target ODNs

code	sequence (3'→5')
I	CGGTGGTCG
II	CGGTAGTCG
III	TCGGTGGTCG
IV	CGGTGGTCGT

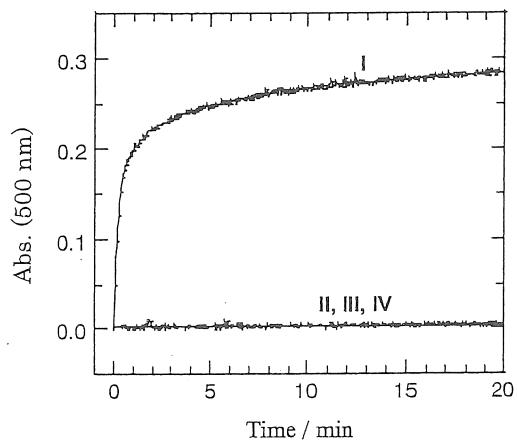


Figure. Time course for increasing turbidity by the aggregation of the nanoparticles induced by the addition of target ODNs shown in Table 1 in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 500 mM NaCl.



16

助成番号 0016

## DNAナノスフェアを用いる遺伝子一塩基変異診断におけるマグネシウムイオンの役割

助成研究者：前田 瑞夫 (九州大学大学院工学研究院)

## 1. 研究目的

2001年2月、ヒトゲノムの塩基配列がほぼ解読されたことが発表された。ポストゲノムシーケンス時代をまさに迎つつある現在、最重要課題の1つは遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs)の全容解明である<sup>1),2)</sup>。多型とは、遺伝子の塩基配列における個体差のことで、1つの塩基が別の塩基に変異しているもの (SNPs)、一塩基だけ挿入または欠如しているものなど種々のタイプがある。その中でも突出して出現頻度が高いのがSNPsであり、ヒトゲノム全体で300万から1000万個存在すると推定されている。その配列や存在位置、および機能が明らかにされれば、各個人の体質に合わせたテーラーメイド創薬に直結するため、精力的に研究が行われている。したがって、近い将来には一塩基の違いを簡単な装置で、たとえば薬局や臨床検査室で、あるいは設備が整っていない開発途上国において、迅速かつ正確に読み取ることが必要になると考えられる。

これを可能にする最新技術としてDNAチップに大きな期待が集まっているが、その実用性については原理的な問題を指摘する声も少なくない。DNAチップは、ハイブリダイゼーション (相補的な二重鎖形成) に依存した遺伝子解析方法である。しかし、DNAは完全に相補的でなくても一塩基程度の違いであれば、ある程度ハイブリダイゼーションしてしまう。たとえば、15個の塩基を含む短いDNAを考えた場合、1つの塩基に変異が生じ (あるいは多型があつて) そこで相補性が崩れたとしても、残る14個の塩基で二重鎖を形成することは可能である。実際、二重鎖の安定性を示す解離温度 ( $T_m$ ) の違いはわずかに数°Cである。一方で、二重鎖から一本鎖への解離は20°C程度の幅をもって起こる現象であるから、解離温度の数°Cの違いで正常型と変異型を完全に識別することは事実上不可能である。たとえば、完全に相補的なDNA鎖の70%が二重鎖を組む条件では、一塩基変異体も40%程度は結合してしまう。DNAチップでは、完全相補鎖であろうとミスマッチを含むものであろうと二重鎖形成しているものは全て、蛍光色素や電気化学プローブなどで標識して定量するので、応答としては70や40といった数値が得られることになる。この方法から直ちに「一塩基変異が存在する」といったデジタル的な回答が得られるわけではないのは明らかである。ゆえに、認識をハイブリダイゼーションのみに頼り、その応答をいかにデータ処理するか、というアプローチばかりでなく、一塩基変異をいかに明確に見分けるといふ本質的な問題に取り組む必要がある。

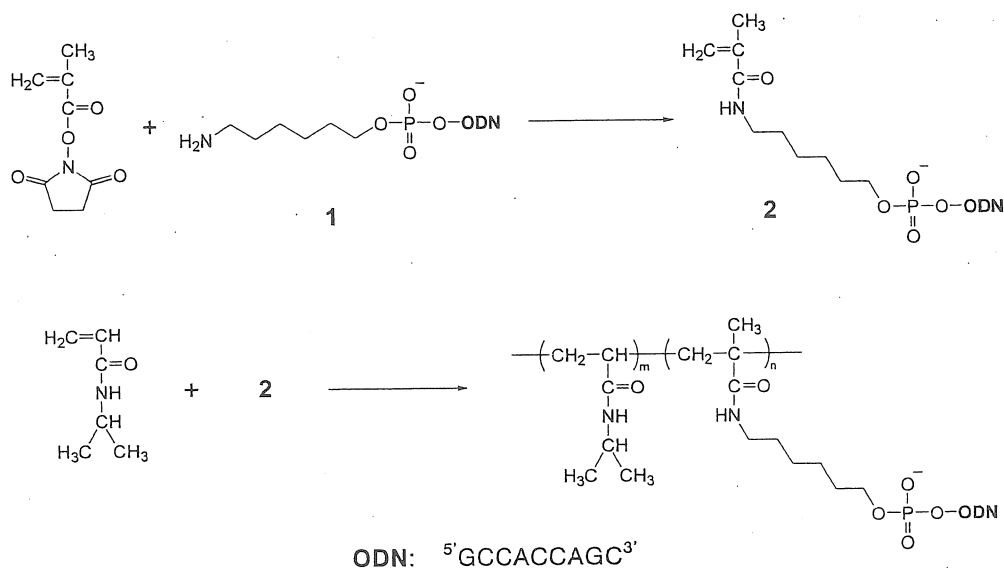
そのためには、プローブのDNAを化学的に修飾して別の物性を付与するという戦略が考えられる<sup>3)5)</sup>。本研究では、代表的な熱応答性高分子であるpoly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)とビニル化DNAを共重合させることにより、両親媒性高分子を合成した。こ

の DNA-PNIPAAm 複合体を相転移温度以上に昇温させると、安定に分散したナノスフェアが形成され、その完全相補鎖が系中に存在するときのみ、迅速な凝集現象が起きて系が白濁することを見出した。一塩基変異の有無をデジタル化かつ可視化した情報としてアウトプットできることから、簡便かつ迅速な SNPs 解析方法として応用されることが期待できる<sup>6)・8)</sup>。

## 2. 実験方法

### 2-1 DNA-PNIPAAm 複合体の合成

DNA-PNIPAAm 複合体をスキーム 1 に従って合成した。典型的な操作手順と反応条件を以下に示す。



スキーム 1 複合体の合成経路

5'末端にアミノ基を有する oligodeoxyribonucleotide (ODN) 1 は、エスベック・オリゴサービスより得た。1.5 mL のテストチューブ内で、1 を 0.65  $\mu\text{mol}$  含む 650  $\mu\text{L}$  の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  /  $\text{NaHCO}_3$  緩衝液 (pH 9.5) に、*N*-methacryloyloxysuccinimide を 32.5  $\mu\text{mol}$  含む 150  $\mu\text{L}$  の DMSO を加え、室温で 12 時間反応させた。逆相 HPLC による分取・精製後、収率 49% (3.52  $\mu\text{mol}$ ) で DNA マクロモノマー 2 を得た。

次に、0.75 mmol の *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) と 3.75  $\mu\text{mol}$  の 2 を、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 5.0 mL に溶解させた。3 分間の窒素置換後、0.43 mmol の  $\text{N,N,N',N'}$ -テトラメチルエチレンジアミンおよび 6.5  $\mu\text{mol}$  の過硫酸アンモニウムを添加し、室温で 1 時間重合反応させた。反応液を脱イオン水 3.0 L に対して一晚、透析して未

反応の原料と重合剤を除去した。ゲルろ過法(Sephadex G-100)で目的の DNA-PNIPAAm 複合体と未反応の DNA マクロモノマー 2 を分離させた後、再度透析精製して最終生成物を得た。

## 2-2 分子量測定

相転移温度以下での DNA-PNIPAAm 複合体の分子量と、これを相転移させて得られる DNA ナノスフェアの分子量(会合数)を、静的光散乱法(DLS-7000、大塚電子)によって決定した。光源には Ar イオンレーザー(488 nm)を使用した。測定セルには内径 1.0 cm の円筒状のものを使用し、セル内部のダストを除くためにエタノール蒸気で十分に洗浄した。また、測定試料溶液からもダストを排除するため、0.22  $\mu\text{m}$   $\Phi$  のフィルター(Millex GV, Millipore)を通してから測定を行った。

## 2-3 DNA ナノスフェアの調製

DNA-PNIPAAm 複合体 0.1 mg/mL を含む 5 mM  $\text{MgCl}_2$  / 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)700 $\mu\text{L}$  を調製した。この溶液を UV 吸収スペクトル測定用セルに入れ、温度コントローラー付きセルホルダーにおいて所定の温度(32-44 $^{\circ}\text{C}$ )で 30 分間放置した。これによって DNA-PNIPAAm 複合体を相転移させ、DNA ナノスフェアを調製した。ナノスフェアの形成に伴う濁度の上昇を、分散液の 500 nm の吸光度の増加で評価した。

## 2-4 DNA ナノスフェアの凝集・分散現象の評価方法

### 2-4-1 塩濃度依存性

DNA-PNIPAAm 複合体 0.1 mg/mL を含む 5 mM  $\text{MgCl}_2$  / 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)または 300 mM NaCl / 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)700 $\mu\text{L}$  を調製した。これを UV 吸収スペクトル測定用セルに入れ、温度コントローラー付きセルホルダーに 40 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間放置して DNA ナノスフェアを調製した。その後、所定の塩濃度になるように  $\text{MgCl}_2$  または NaCl を添加し、さらに 40 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間放置した。DNA ナノスフェアの凝集に伴う系の濁度の上昇は、分散液の 500 nm の吸光度の増加で評価した。

### 2-4-2 ターゲット DNA の配列依存性

前項 2-4 と同じ方法で DNA ナノスフェアを調製した後、2.8  $\mu\text{M}$  になるように種々の配列のターゲット DNA を添加して、40 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間放置して二重鎖形成させた。その後、所定の濃度になるように  $\text{MgCl}_2$  または NaCl を添加し、さらに 40 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間放置後、分散液の 500 nm の吸光度を測定することによって系の濁度を評価した。

### 3. 結果と考察

#### 3-1 DNA-PNIPAAm 複合体の合成と分子量決定

スキーム 1 に示す経路に従って DNA-PNIPAAm 複合体を合成した。DNA 配列として、ガン遺伝子として知られる *K-ras* 遺伝子のコドン 11 から 13 の部分に相補的な配列 (9 量体) を用いた。*K-ras* 遺伝子コドン 12 部位の点突然変異により、すい臓がんや大腸がん、肺がんが誘発されることが知られている。したがって、この配列の一塩基変異 (SNPs) を明確に検出することは遺伝子診断への応用につながることを期待できる。

まず、5'末端にアミノ基を有する修飾 ODN 1 と *N*-methacryloyloxysuccinimide を結合させることによって、ビニル基を導入した DNA マクロモノマー 2 を得た。次に、これと *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) を種々のモル比 (DNA マクロモノマーが 0.096–0.67 mol%) でラジカル共重合させ、目的の DNA-PNIPAAm 複合体を得た。これらの分子量を静的光散乱法によって測定した結果を表 1 に示す。複合体の分子量  $M_w$  は、 $2.4 \times 10^5$ – $4.5 \times 10^5$  であった。また、溶媒へのなじみやすさの指標である第二ビリアル係数  $A_2$  は、DNA 導入率の増加に伴って増大した。これは、極性の高い DNA が PNIPAAm に導入されることによって、分子全体の親水性が増加し、複合体が系中で分散しやすくなることを示している。

表 1 DNA-PNIPAAm 複合体の物性

sample	Fraction of DNA macromonomer		$M_w$	$A_2$	$R_g$ (nm)	DNA graft number
	mol%	wt%				
K-0	-	-	$2.1 \times 10^5$	$3.4 \times 10^{-4}$	29	-
K-0.096	0.096	2.2	$2.4 \times 10^5$	$3.6 \times 10^{-4}$	25	2.0
K-0.18	0.18	4.0	$2.9 \times 10^5$	$5.4 \times 10^{-4}$	26	4.3
K-0.35	0.35	7.1	$4.0 \times 10^5$	$8.2 \times 10^{-4}$	25	11
K-0.67	0.67	12	$4.5 \times 10^5$	$9.0 \times 10^{-4}$	38	20

#### 3-2 DNA ナノスフェアの調製

得られた DNA-PNIPAAm 複合体を 5 mM  $MgCl_2$  / 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶解させ、さまざまな温度条件 (32–44°C) で 30 分間放置した。DNA-PNIPAAm 複合体の相転移、およびそれに伴う DNA ナノスフェア形成を分散液の 500 nm の吸光度の増加で評価した。その結果を図 1 に示す。DNA を導入していない PNIPAAm では、相転移温度が約 34°C であったのに対して、DNA 導入率が高い複合体ほど吸光度が増大し始める温度は高くなり、かつ吸光度の増大の程度は小さくなった。PNIPAAm の相転移は、加熱による脱水和によって生じることが知られている。したがって、複合体の親水性が高くなるほど脱水和に必要なエネルギーが大きくなるため、相転移温度が高くなる。また、親水性が高

い複合体ほど系中に分散して会合しにくいため、濁度上昇（すなわち、500 nm の吸光度の上昇）の程度は小さい。

### 3-3 DNA ナノスフェアのみかけの分子量の決定

前項 3-2 の方法で形成させた DNA ナノスフェアのみかけの分子量（一粒子あたりの分子量）を静的光散乱法によって測定した。結果を表 2 にまとめる。一粒子あたりの分子量は、DNA の導入率が増加するにつれて  $10^8$  から  $10^6$  のオーダーへと大きく減少した。先程と同様に、複合体の親水性が大きくなるほど系中に分散して DNA-PNIPAAm 複合体が会合しにくくなることを示している。以降の実験は、相転移が明確に確認され、かつ分散状態が良好な K-0.35 を用いて行った。

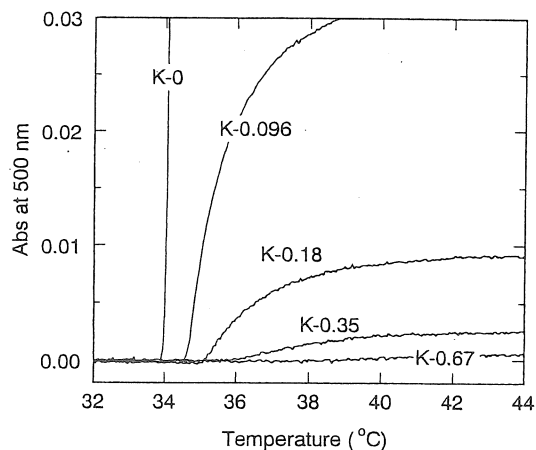


図 1 複合体水溶液の濁度の温度依存性。  
[DNA-PNIPAAm 複合体] = 0.1 mg/mL, 5 mM MgCl<sub>2</sub> / 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 操作速度: 0.5°C/min.

表 2 DNA ナノスフェアの物性

sample	$M_w$ of particle	$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	$R_g/R_h$	association number	$S_{DNA}$ (nm <sup>2</sup> /DNA)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )
K-0.096	$1.4 \times 10^8$	46	48	0.96	590	25	0.51
K-0.18	$2.4 \times 10^7$	23	30	0.75	83	32	0.35
K-0.35	$8.7 \times 10^6$	17	22	0.76	22	27	0.31
K-0.35	$6.4 \times 10^6$	15	18	0.82	16	25	0.41

### 3-4 DNA ナノスフェアの相補鎖添加による凝集現象

#### 3-4-1 正常型と一塩基変異型の識別

本研究で使用した試料 DNA（ターゲット DNA）の配列を表 3 にまとめる。DNA I は、ナノスフェアに担持されたプローブ DNA の完全な相補鎖（正常型）である。また、DNA II は、中央の塩基（A）がミスマッチになっている一塩基変異型の配列である。これらが系中に存在する場合、各塩濃度におけるナノスフェアの凝集挙動を調べた結果を図 2 に示す。DNA ナノスフェアのみで相補鎖が存在しない場合は、MgCl<sub>2</sub> 濃度が 20 mM 以上で凝集が観測された。また、この測定条件では NaCl の添加による凝集は全く観測されなかった（図 2(a)）。ナノスフェア表面には DNA の負電荷が存在することから、より大きい正電荷を有する Mg<sup>2+</sup>を用いると低濃度でナノスフェアの凝集を誘起することが可能である。

表3 研究で使したターゲット DNA の配列

code	sequence (3'→5')	
I	CGGTGGTCG	complementary
II	CGGTAGTCG	point mutant
III	TGGTGGTCG	point mutant
IV	TCGGTGGTCG	different length (one base longer)
V	TTCGGTGGTCG	different length (two base longer)
VI	TTTTTCGGTGGTCG	different length (five base longer)
VII	CGGTGGTCGT	different length (one base longer)
VIII	CGGTGGTCGTT	different length (two base longer)
IX	CGGTGGTCGA	different length (one base longer)
X	CGGTGGTCGC	different length (one base longer)
XI	CGGTGGTCGG	different length (one base longer)

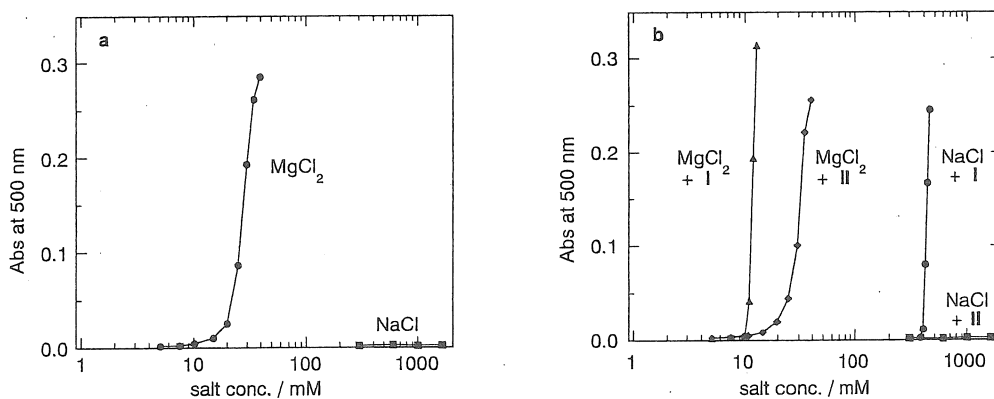


図2 (a)DNA不在下、(b)DNA存在下におけるナノスフェアの塩に対する安定性。

[K-0.35] = 0.1 mg/mL. [DNA] = 2.8  $\mu$ M. 測定温度: 40°C.

一方、相補鎖 I がナノスフェア上の DNA と同じ濃度(2.8  $\mu$ M)で存在する場合には、MgCl<sub>2</sub>が 10 mM 以上、NaCl が 400 mM 以上の濃度で急激な凝集が観測された(図 2 (b))。それに対して、中央の一塩基が変異している配列 II を添加したときには、相補鎖を加えることによる変化が全く見られず、図 2 (a)に極めて近いプロファイルになった。なお、末端の一塩基を変異させた配列 III 場合も全く同様の結果が得られた(データ省略)。

ナノスフェア表層の DNA と I が二重鎖形成をすると、ナノスフェアが凝集しやすくなる理由として次の 2 点が考えられる。まず第 1 に、コンパクトな構造をとる二重鎖は一本



鎖に比べて負電荷密度が高いため、一般的により強く金属イオンと結合することが報告されている。ゆえに、ナノスフェア表層の DNA が二重鎖形成をすると  $Mg^{2+}$  や  $Na^+$  とより強く結合し、DNA が有する負電荷が遮蔽されるため、ナノスフェア表層の荷電状態は一本鎖の場合に比べてより中性に近づくと推定される。その結果、ナノスフェアの静電反発による分散が弱まり、より凝集しやすくなったものと考えられる。第2に、二重鎖は一本鎖に比べて剛直な高分子で、半屈曲性高分子に分類される。したがって、ナノスフェア表層での可動範囲は一本鎖よりも小さく、担持された DNA 一分子が覆うことのできる面積は二重鎖形成によって小さくなる。このように、ナノスフェア表面に広く分布していた負電荷が局在化することによって無電荷状態の表面が露出し、ナノスフェアの凝集が促進されると推定できる。

以上の結果より、DNA ナノスフェアの凝集・分散現象を利用することによって、DNA9 量体の一塩基変異検出が可能であることが明らかになった。例えば、 $MgCl_2$  の濃度を 20 mM とすれば、DNA I が存在する場合は系は直ちに白濁するのに対して、DNA II の場合は均一のままである。ところが、 $MgCl_2$  濃度を 10 mM に設定するとどちらの場合も均一のまま、40 mM ならばどちらも白濁してしまっていて識別できない。その差はわずかに数 10 mM であることから、この手法による一塩基変異検出には、厳密な  $MgCl_2$  の濃度設定が必要である。

### 3-4-2 正常型と塩基延長型の識別

前項 3-4-1 と同様の手法を用いて、正常型配列と塩基延長型配列の識別を検討した。3'末端側に塩基 (T) を延長させた配列 IV、V、VI、および 5'末端側に塩基 (T) を延長させた配列 VII、VIII について、凝集の塩濃度依存性 ( $MgCl_2$  または  $NaCl$ ) を調べた結果

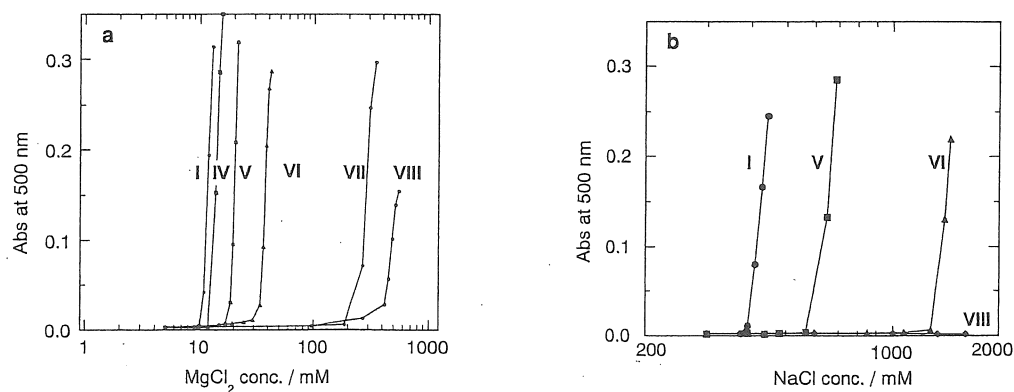


図3 突出塩基数および突出方向の異なる DNA の存在下におけるナノスフェアの (a) $MgCl_2$  および (b) $NaCl$  に対する安定性評価。

[K-0.35] = 0.1 mg/mL. [DNA] = 2.8  $\mu$ M. 測定温度: 40°C

を図3に示す。例えば、 $MgCl_2$ の濃度を20 mMに設定すれば、DNA Iが存在する場合にのみ系が白濁するのに対して、他の配列の場合はいずれも系は均一のままになる。これは、ナノスフェアに担持したプローブDNAと相補的な配列を有し、かつ長さも完全に一致したDNAのみを識別することが可能であることを意味する。

また、5'末端側に4種類の一塩基を延長させた配列(VII、IX、X、XI)について、検討した結果を図4に示す。いずれの塩基の場合も、正常型配列Iとの識別が可能であった。以上の鎖長認識を行うには、前項と同じく厳密な塩濃度設定が必要であり、例えば $MgCl_2$ 濃度を20 mMに設定すれば、いずれの変異体とも正常型から区別することができる。

### 3-4-3 検出時間の検討

これまで述べてきたように、DNAナノスフェアを用いることでDNA配列と鎖長を認識できることが明らかになった。そこで次に、検出に要する時間の検討を行った。 $NaCl$ 濃度を500 mMに設定して、40°Cにおいてナノスフェアを形成させ、ここに種々のDNAを添加した。添加後の吸光度の経時変化を追跡した結果を図5に示す。配列II、VおよびVIIIを添加した場合には、吸光度の上昇は全く見られなかった。一方、正常型配列Iを添加すると吸光度は急上昇し、その変化はわずか数分で飽和に達した。ゆえに、本研究で提案された新手法は、迅速な検出法として実用面においても優れていることが明らかになった。

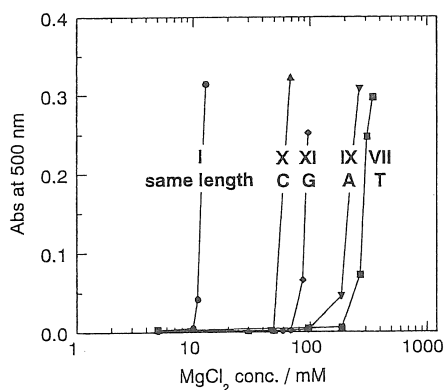


図4 突出塩基の種類が異なるDNAの存在下におけるナノスフェアの $MgCl_2$ に対する安定性評価。

[K-0.35] = 0.1 mg/mL. [DNA] = 2.8  $\mu$ M.  
測定温度: 40°C

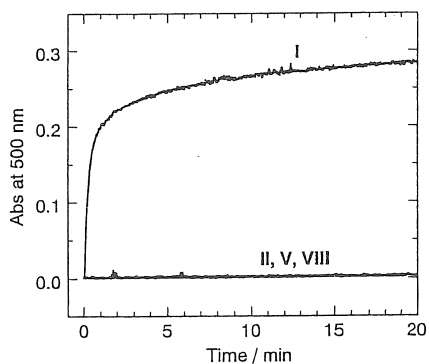


図5 DNAの比濁による検出。

500 mM  $NaCl$  / 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). [K-0.35] = 0.1 mg/mL. [DNA] = 2.8  $\mu$ M. 測定温度: 40°C

#### 4. 結論

本研究では、DNA（*K-ras* 遺伝子のコドン 11 から 13 の部分に対する相補鎖である 9 量体）と NIPAAm の複合体を合成し、これを相転移させることで表面に一本鎖 DNA を担持したナノメートル・オーダーのコロイド粒子を調製した。粒子上のプローブ DNA とターゲット DNA の二重鎖形成に伴うナノスケールの凝集・分散現象を利用することにより、遺伝子の一塩基変異と鎖長を完全に識別することに成功した。なお、その際には系中の塩濃度（ $MgCl_2$  または  $NaCl$ ）の厳密なコントロールが重要である。本研究で示された手法は、正常型遺伝子の一塩基変異、例えばガン遺伝子の簡便な検出方法などに応用されることが期待できる。

#### 5. 文献

- 1) “別冊化学 ヒトゲノム最前線”，化学同人(2001)
- 2) 榊佳之，“ヒトゲノム ー解読から応用・人間理解へー”，岩波書店(2001)
- 3) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic and J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607-609.
- 4) J.J. Storhoff, R. Elghanian, R.C. Mucic, C.A. Mirkin and R.L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **120**, 1959-1964.
- 5) T. Ihara, K. Kurohara and A. Jyo, *Chem. Lett.*, **1999**, 1041-1042.
- 6) 森健, 九州大学大学院工学研究科材料物性工学専攻博士論文(2000)
- 7) 森健, 前田瑞夫, 日本油化学会誌 **2000**, **49**, 455-461.
- 8) 前田瑞夫, 森健, 高分子 **2001**, **50**, 244-247.

## The Role of Magnesium Ion in Gene Mutation Diagnosis Using DNA-nanosphere

Mizuo Maeda, *Graduate School of Engineering, Kyushu University*

Small mutations of certain genes are the definitive origin of many heritable disorders and cancers. Consequently, the development of simple and practical method for the sequence-selective DNA detection has been one of the most important subjects in analytical biochemistry. In this work, we present the novel method for the detection of DNA sequence and chain length utilizing the aggregation of DNA-carrying nanospheres. The exact discrimination of normal DNA from mutant ones by this method requires strict control of the concentration of  $Mg^{2+}$ .

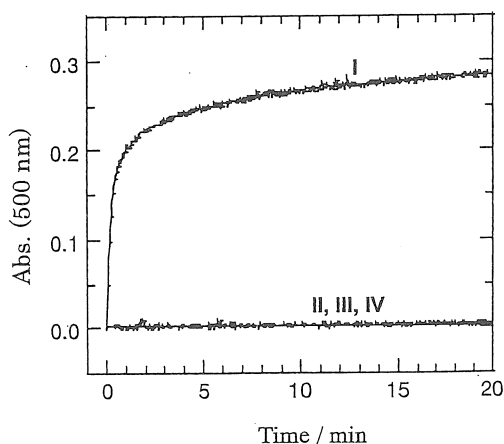
The DNA-nanosphere was composed of amphiphilic copolymers of thermo-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide) (polyNIPAAm) and oligodeoxyribonucleotide (ODN) derivative having vinyl group at its 5'-terminus. The sequence (5'-GCCACCAGC-3') is the part of *K-ras* oncogene. When the solution temperature was kept above the phase transition temperature of polyNIPAAm, the copolymers spontaneously formed DNA-nanosphere with hydrophobic core surrounded by ODNs.

The complementary ODN **I**, one base mutant ODN **II** and one base longer ODNs **III** and **IV** were employed as the target (Table 1). The increasing turbidity caused by the aggregation of nanospheres was monitored with UV-VIS spectrophotometer (Figure 1). Interestingly, the DNA-nanospheres aggregated rapidly only in the presence of the complementary ODN **I**. On the other hand, the nanospheres kept completely dispersed in the presence of other target ODNs **II-IV**. In order to achieve these clear-cut distinctions between ODN **I** and ODNs **II-IV**, the appropriate concentration of metal salt such as NaCl or  $MgCl_2$  should be determined in advance.

The assembling behaviors of the DNA-nanospheres with the target DNAs are applicable for the detection of DNA sequence and chain length. The results obtained here indicate that this system is promising method for gene diagnosis.

**Table 1** Sequences of target ODNs

code	sequence (3'→5')
<b>I</b>	CGGTGGTTCG
<b>II</b>	CGGTAGTTCG
<b>III</b>	TCGGTGGTTCG
<b>IV</b>	CGGTGGTTCGT



**Figure 1.** Time course for increasing turbidity by the aggregation of the nanoparticles induced by the addition of target ODNs shown in Table 1 in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 500 mM NaCl.