

DOJIN NEWS

ドージンニュース

Review

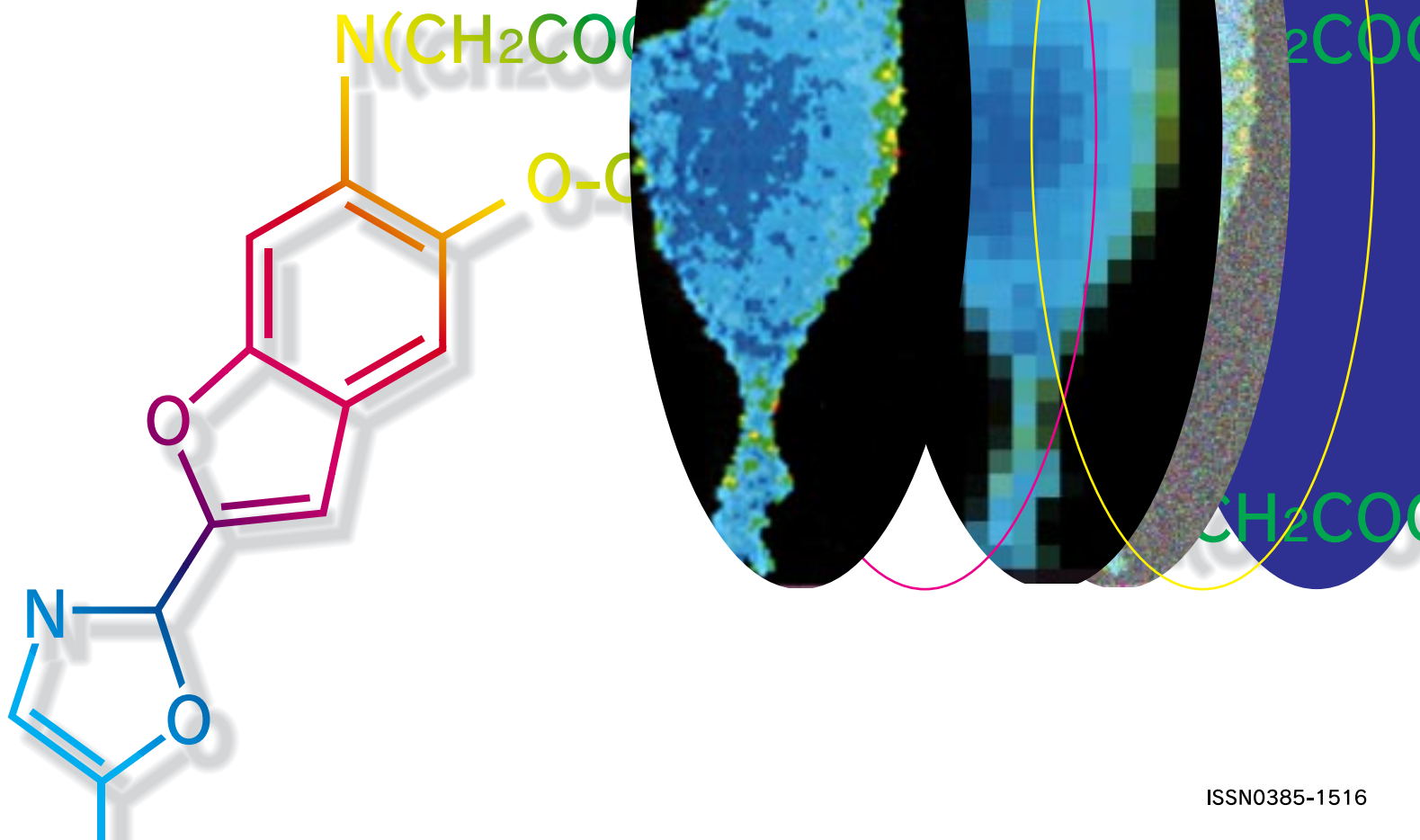
自己組織化単分子層：
構造規制界面の構築と
固体表面への機能付与
近藤敏啓・魚崎浩平

Topics on Chemistry

酸素ラジカルと
8-オキソグアニン
(株)同仁化学研究所 富永英之

連載

実用的蛍光誘導体化
山口政俊・能田 均



目次

Review

自己組織化単分子層：

構造規制界面の構築と固体表面への機能付与

北海道大学大学院理学研究科 近藤敏啓、魚崎浩平..... 3

実用的蛍光誘導体化 2

福岡大学 薬学部 山口政俊、能田 均.....10

Topics on Chemistry

酸素ラジカルと8-オキソグアニン.....14

Commercial

新製品案内

Self-Assembled Monolayer (SAM) 研究用試薬

- チオール誘導体シリーズ - 8

(株)クマモト抗体研究所新製品.....12

DNA損傷部位ビオチン化キット.....16

組織染色用試薬溶液.....20

近日発売

Nitrosothiol Assay Kit..... 9

お知らせ

会員専用ページのご案内15

新規容量追加のご案内19

新製品案内

1. **新製品** Self-Assembled Monolayer (SAM) 研究用試薬

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride	10mg	12,800
		100mg	38,500
Request	6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride	10mg	12,800
		100mg	38,500
Request	11-Ferrocenyl-1-undecanethiol	10mg	11,500
		100mg	34,000
Request	8-Ferrocenyl-1-octanethiol	10mg	11,500
		100mg	34,000
Request	6-Ferrocenyl-1-hexanethiol	10mg	11,500
		100mg	34,000

2. **新製品** (株)クマモト抗体研究所新製品

メーカーコード	品名	容量	価格(¥)
KY008	Anti S19 Ribosomal Protein polyclonal antibody	100 μ g	45,000
KA009	Anti Metallothionein monoclonal antibody (clone No. 1A12)	100 μ g	45,000
KH010	Anti Pyrraline monoclonal antibody (clone No. H12)	20 μ g	55,000

3. **新製品** DNA損傷部位ビオチン化キット

コード番号	品名	容量	価格(¥)
347-07861	ARP Kit	1プレート	29,000

4. **新製品** 組織染色用試薬溶液

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	TMBZ solution	100ml	13,000
Request	AEC solution	1set	18,000
Request	DAB solution	1set	17,000
Request	BCIP / Nitro-TB solution	100ml	11,500



(株)同仁化学研究所

自己組織化単分子層：構造規制界面の構築と固体表面への機能付与 (Self-Assembled Monolayers (SAMs); Construction of Ordered Interface and Functionalization of Solid Surface)



近藤 敏啓

(Toshihiro KONDO)

北海道大学大学院理学研究科



魚崎 浩平

(Kohei UOSAKI)

北海道大学大学院理学研究科

Summary

To construct a molecular device of specific functionality, it is essential to arrange molecules on a solid surface in ordered manner at a molecular level. Self-assembly (SA) technique, which makes use of a chemical bond between surface atoms of solid substrates and molecules and attractive lateral interaction between adsorbed molecules, has been very widely employed to construct ordered molecular layers. Self-assembled monolayers (SAMs) of alkanethiols on gold have been the most well-studied system because they have wide varieties of potential applications such as sensors, corrosion inhibition, wetting control, and biomolecular and molecular electronic devices and highly stable monolayers can be formed very easily.

To construct well-designed SAMs, it is important to understand their fine structure and growth process. The molecular arrangements of the SAMs of alkanethiols on gold at the saturation coverage have been investigated by scanning tunneling microscopy (STM) and other methods. The formation processes of the SAMs of alkanethiols in solution have been monitored by *in situ* STM and quartz crystal microbalance (QCM). Many applications of the SAMs such as catalysis, efficient photoinduced electron transfer, ion and molecular recognition, fixation of biomolecules, and nanofabrications have been investigated.

キーワード：自己組織化単分子層、チオール、光誘起電子移動、界面電子移動

1. はじめに

種々の機能を持った分子を固体（金属・半導体）表面上に固定・配列させることで構造規制され、かつ所望の機能をもった界面を構築可能である。近年、オングストロームオーダーで分子の環境や幾何学的配置を操作し、それらを反応が起こっているその場で観測することが可能となり、機能性分子を固体表面上に配列させた機能性表面による種々の生体機能の模倣や分子素子構築の研究が急速に進展してきた。固体表面への分子の固定法のうち、自己組織化（Self-Assembly, SA）法¹⁻⁷⁾は高配向・高密度な分子層が形成可能であることが知られており、近年非常に広い分野における研究対象となっている。ここでは、SA法によって作製される自己組織化単分子層（Self-Assembled Monolayer, SAM）について述べた後、金上のアルキルチオールSAMにしぼって、SAMによる構造規制界面の構築およびSAM修飾による機能性表面の構築の研究例について紹介する。

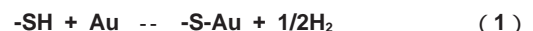
2. 自己組織化単分子層（SAM）

固体表面に種々の機能をもった分子層を固定し、表面特性を制御しようとする試みは比較的古くから行われている。中でも両親媒性の分子を水面上に展開・圧縮し、単分子層を形成した後、固体基板上に移しとるラングミュア・プロジェクト（Langmuir-Blodgett: LB）法は、高度に配向した分子層を種々の基板上に形成可能であり、しかも積層を繰り返すことで多層膜も簡単に作製できることから、幅広く用いられている。しかし、LB法では特別な装置が必要である。また、形成された分子層は基板表面に物理的に吸着しているのみで基板構造との整合性など高度な機能は期待しにくい、といった制限がある。これに対して Sagiv は1980年にトリメトキシシリル（ $-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ ）基やトリクロロシリル（ $-\text{SiCl}_3$ ）基を持った長鎖アルキル化合物と表面水酸（ $-\text{OH}$ ）基を持った固体を反応させると、共有結合で分子が表面に固定されるとともに、アルキル鎖同士の相互作用によって高度な配向性が実現できることを見出し、LB法との類似性を指摘した⁸⁾。自発的に

高度な配向性を持った分子膜が形成できることから、この過程は自己組織化（Self-assembly: SA）、形成された分子膜は自己組織化単分子膜（Self-assembled Monolayer: SAM）と呼ばれる。その後、1983年にAllaraがアルカンチオールは金と反応してAu-S結合を形成するとともにアルキル鎖同士の相互作用によって配向性の高い単分子層（自己組織化単分子膜）が形成されることを見出したこと⁹⁾によって、導電性基板上的高配向性分子層が実現され、基礎・応用両面の可能性が飛躍的に広がり、活発に研究が展開されるようになった。最近では結合性官能基もチオール（ $-\text{SH}$ ）基に限らずジスルフィド基やスルフィド基、また基板も金の他、白金、銀、銅などの金属に加えてGaAs、CdS、 In_2O_3 などの半導体にも拡張されており、さらに $-\text{SH}$ 基とは反対側のアルキル鎖末端に機能性官能基を導入することで、種々の機能を固体表面に導入可能であることから、その面での発展も著しい。

SAMを形成可能な分子は Fig. 1(a) に示すように3つの部分から構成される。第一の部分は表面原子と反応する結合性官能基（ $-\text{SH}$ 基など）であり、この部分が金表面の特定部分に分子を固定する。なお、S原子を含む官能基をもった有機化合物がAuと強い共有結合を形成して安定な有機薄膜を形成することは、「自己組織化」という言葉が使われる前からすでに谷口らの報告で知られていた¹⁰⁾。第二の部分は通常アルキル鎖であり、SAMの二次元的な規則構造は主としてこのアルキル鎖間のvan der Waals力によって決まる。そのため一般にアルキル鎖の炭素数がある程度以上多い場合に、安定・高密度・高配向な膜が形成される。第三の部分は末端基で、アルカンチオールの場合はメチル基であるが、末端基を機能性官能基とすることで、固体表面の機能化が可能となる。

室温で十分洗浄した金基板を適当な濃度のチオールの入った溶液に浸すと、数分～数十分で分子の吸着が起こる。これは以下の反応が自発的に起こる結果であると考えられている。但し、実際に水素分子が検出された例はない。



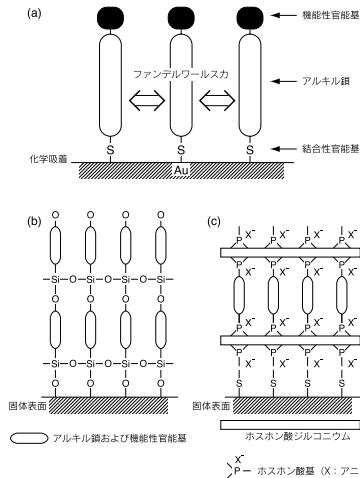


Fig. 1 (a) 金表面に形成したアルキルチオールSAMの模式図。(b)、(c) 多分子層の模式図。ここでは修飾分子が基板表面に対して垂直に配列した場合を示したが、実際には30°程度傾いていることが多い。

このとき吸着分子のアルキル鎖間に引力的相互作用が働く結果、高度に配向した分子膜、すなわち自己組織化単分子層 (SAM) が形成される。規則正しく原子配列した表面をもつ基板 (Au(111) などの単結晶基板) を用いると、SAMも二次元規則構造を示す。この構造は基板の原子間距離と分子の大きさや形に依存する。

また、SAMを利用した多層膜構築法も考案されており (Fig. 1 (b) (c))、オングストロームオーダーで均一な膜厚の多層膜が構築されている^{11,12)}。

3. SAMの形成過程と構造

真空中の走査型トンネル顕微鏡 (Scanning Tunneling Microscope, STM) や電子線回折法などによる検討の結果、Au(111) 単結晶表面上に形成したSAMには数nmサイズのピットや単分子太さの線欠陥 (missing row) が含まれていること、分子配列には (3 × 3) R30° 構造だけでなく、(4 × 3 × 2 × 3) 構造も存在することなどがわかっている^{13,14)}。このような構造はアルキル鎖同士の疎水性相互作用とSと基板の化学結合によるSAM形成という単純な吸着モデルからは予想しにくい。したがって、より高度なSAMの構造規制を行う上で、その形成過程を詳細に理解することは非常に重要である。

一定の振動数で振動している水晶の表面に物質が吸着するとその質量分だけ振動数が下がり、脱離すると振動数が上がる。この原理を応用した水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal

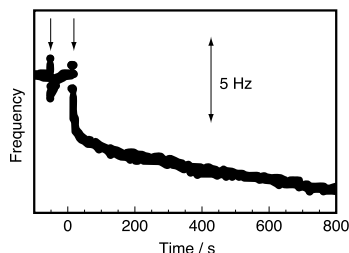


Fig. 2¹⁵⁾ FcC₁₁SHの自己組織化過程の振動数変化。最初の矢印では溶媒 (ヘキサン) だけ滴下。2つ目の矢印でFcC₁₁SHのヘキサン溶液を滴下。

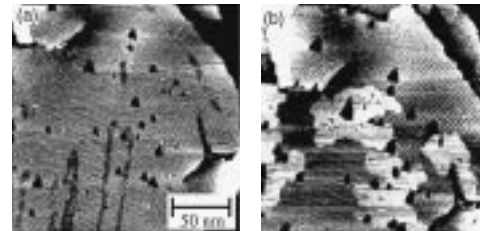


Fig. 3^{16,17)} Au(111) 上のC₁₀SH SAMの形成過程の*in situ* STM像。(a) 10分後、(b) 20分後。

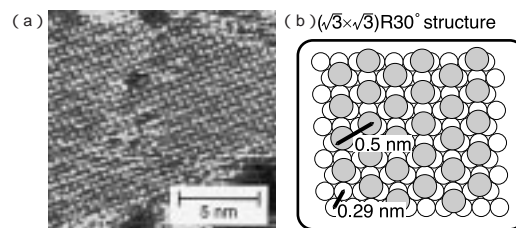


Fig. 4^{16,17)} (a) Fig. 3 (b) の明るく見える島の部分の拡大図。(b) Au(111) 上に吸着したチオール分子の(√3 × √3)R30° 構造の模式図。

Microbalance, QCM) 法を利用すると、吸着 / 脱着した物質の質量変化をng程度の感度で観測可能である。Fig. 2 はヘキサン中にフェロセニルウンデカンチオール (FcC₁₁SH) を滴下したときの金基板 (水晶振動子の表面に金薄膜を真空蒸着したもの) 表面の振動数変化を観測した結果である¹⁵⁾。振動数は滴下した瞬間 (2つ目の矢印) から急激に減少し、その後振動数の減少はゆるやかになった。チオール分子の吸着は初期に急速に吸着し、その後ゆっくりと吸着していく2つの吸着過程が存在することを示している。他のチオール誘導体においても同様の結果が得られている。

最近になって我々はデカンチオール (C₁₀SH) の自己組織化過程をSTMによりその場追跡することに成功した^{16,17)}。Fig. 3 はC₁₀SHを0.5 μM含むヘプタン溶液中で (a) 10分後および (b) 20分後に得られたAu(111) 表面のSTM像である。Fig. 3 (a) では金のテラス上にいくつかの三角形のピットと、間隔が2 ~ 3 nmの縞模様が観察されている。ピットは飽和吸着後に観察されるものと対応しており、膜形成時の金のエッチングあるいはAu(111) 再構成表面のリフティングによって生じたものであると考えられている。縞模様は、熱脱離や真空中で気相から成長させSAMを作った場合など表面被覆率が低い場合に見られており、表面に吸着したC₁₀SH分子が基板の上に寝ているような状態と考えられる。時間が経過するにつれ (Fig. 3 (b))、明るく見える島が発生し、二次元成長する様子が観察された。島の上を拡大すると、明瞭な規則構造が観測された (Fig. 4 (a))。明るいスポット間の距離は約5 ÅでAu原子間の距離 (2.885 Å) の3倍に対応しており、Fig. 4 (b) に示す配列をしているものと考えられる。単位格子がAuのその3倍であり、分子列の方向が下地の原子配列と30°ずれていることから、(√3 × √3) R30° 構造と呼ばれる。赤外分光法などの結果から、アルカンチオールSAMの分子軸は基板の法線方向に対して約30度傾いていることもわかっており、この構造は吸着分子の最密充填構造である。以上の結果から、初期の速い吸着過程が縞状構造 (準安定状態) の形成に、遅い吸着過程が最密充填構造の形成に対応しているものと考えられる。

表1 SAM中に導入されている主な機能性官能基

機能	主な官能基
電気化学活性	フェロセン ^{15, 18-21} 、キノン ^{22, 23} 、Ru(NH ₃) ₆ ²⁺ ^{24, 25} など
光(電気)化学活性	ポルフィリン ^{26, 27} 、Ru(bpy) ₃ ²⁺ ^{28, 29} など
触媒活性	Niサイクラム ³⁰ 、金属ポルフィリン ³¹⁻³³ など
SHG活性	フェロセニルニトロフェニルエチレン ³⁴ 、
センサー	シクロデキストリン ^{35, 36} 、各種酵素・補酵素 ^{37, 38} など
構造異性化	アゾベンゼン ³⁹ 、スピロピラン ^{40, 41} など
メディエーター	フェロセン ¹⁹ 、ピリジン ¹⁰ など
親水・疎水性	カルボン酸 ^{1, 42} 、水酸基 ^{1, 42} 、メチル基 ^{1, 42} など
結合性	カルボン酸 ^{43, 44} 、アミン ¹² 、リン酸 ^{1, 11, 12} 、スルホン酸 ⁴⁵ 、 ホスホン酸 ^{46, 48} 、チオール ^{49, 50} など

4. SAMを利用した機能性表面の構築

先に述べたように、SAMを形成させることによって、表面の特性を制御できる。たとえば、長鎖のアルカンチオールSAMで修飾すると、金電極はほとんどの電気化学活性種に対して不活性となる。また、このようなSAMをリソグラフィ用のマスクとすることもできる。さらに、末端基をメチル基から機能性の官能基に置き換えることによって、固体表面により高度な機能を導入可能である。また、末端に結合性の官能基(アミン、カルボン酸、リン酸、チオールなど)をもつSAMで金表面を修飾すると、生体試料(酵素やDNAなど)や金属・半導体微粒子、機能性高分子などの表面への固定化や多層膜への展開につながる¹⁻⁶。このようなアプローチは、センサーなどのより実用的なデバイスへの応用を考える上で重要である。これまでSAM中に導入されている主な機能性官能基を表1にまとめた。ここではSAM修飾による機能性表面構築の例として、触媒作用、光誘起電子移動、イオン・分子の認識、生体機能の付与、および固体表面の微細加工について紹介する。

4.1 触媒作用

単純な一電子酸化還元反応を行うフェロセン(Fc)基を末端官能基とするフェロセニルアルカンチオール誘導体のSAMで修飾した金電極の電気化学的挙動が広範に調べられている^{15, 18-21}。このSAMは溶液内鉄イオンの酸化還元(Fe^{2+/3+})反応に対して整流性を示す¹⁹。未修飾金電極では+450 mV付近に溶液内化学種の酸化還元による可逆な電流ピークが観測されるが(Fig. 5(c))、修飾電極上ではこのようなピークは見られず、鉄イオンを含まない溶液中で見られるフェリシニウムカチオン(Fc⁺)がFcに還元されるピーク(Fig. 5(a))がFe³⁺の添加により大きくなった(Fig. 5(b))。このピーク電流値はFe³⁺の濃度に比例して増加し、Fe³⁺の還元にとまなうものである。これらの結果は、金表面に固定されたフェロセニル基が以下のプロセスにしたがって電極からFe³⁺への電子移動メディエーター(触媒)として機能していることを示している。



一方、Fe²⁺からFe³⁺への酸化反応は単分子層の存在により、完全にブロックされている。このような整流作用の発現は、生体内の

電子ベクトル輸送との関連で重要な課題である。

また、pHに依存した酸化還元反応を行うキノン/ヒドロキノン基を持つアルカンチオールとフェロセニル基を持つアルカンチオールの混合SAMをマイクロ電極上に固定し、超微細pHセンサーの可能性が示されている⁵¹。

酸素還元能を持つ金属錯体を電極上に固定することは、特に燃料電池の分野で注目されている。末端にSH基を有するアルキル鎖を持つポルフィリン錯体のSAMにおいて、その酸素還元能が比較されている³¹⁻³³。未修飾金電極のCVでは0 V付近から酸素還元電流が流れ始めるのに対し、コバルトポルフィリン誘導体SAM修飾金電極のCVでは+0.3 V付近から酸素還元電流が立ち上がった。また、末端にSH基を有するアルキル鎖を1つ持つコバルトポルフィリン誘導体(CoP1)と2つ持つコバルトポルフィリン誘導体(CoP2)のSAM修飾金電極におけるCVの比較から、CoP1よりCoP2のポルフィリン環のほうが電極表面に対してより平行に配向していると考えられ、つまり、ポルフィリン環の中心のコバルトが酸素還元能に深く関与していることがわかっている。中心金属をコバルトから亜鉛に代えると、酸素還元能はまったくなくなる。

4.2 光誘起電子移動

光増感色素(S)、電子受容体(A)および電子供与体(D)を電極上に規則正しく配置すれば、光合成反応中心を模したアップヒルの光誘起電子移動系を構築できる(Fig. 6(a)(b))。我々はSとしてポルフィリン、DとしてFc基をもつ分子(Fig. 6(c): PC₈FcC₁₁SH)のSAM修飾金電極において、Aとしてメチルピオロゲン(MV²⁺)の入った溶液中で高効率な光誘起電子移動を実証した²⁶。

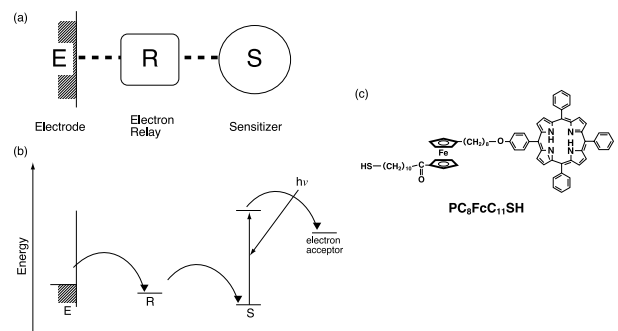


Fig. 6²⁶ (a) SAM修飾電極による光誘起電子移動系の模式図。(b)(a)のエネルギーダイアグラム。(c) PC₈FcC₁₁SH分子。

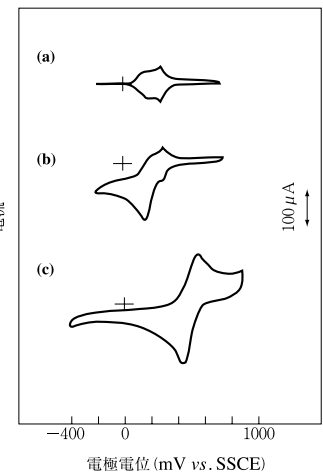


Fig. 5¹⁹ 金基板をFcC₁₁SHの1 mMヘキサソラン溶液に96時間浸漬させて作製したSAM修飾金電極の(a) 1 M HClO₄、(b) 1 M HClO₄ + 1 mM Fe(ClO₄)₃溶液中、および(c)未修飾金電極の1 M HClO₄ + 1 mM Fe(ClO₄)₃溶液中のCV。掃引速度: 100 mV/s。

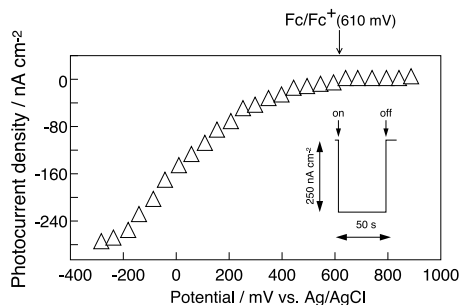


Fig. 7²⁶⁾ 5 mM MV^{2+} 電解質溶液中、 $PC_8FcC_{11}SH$ SAM修飾金電極 () に照射したときの光電流値の電極電位依存性。励起光強度は本文参照。図中は -200mVに電位を保持したときの照射をon/offしたときの電流応答。

5 mM MV^{2+} を含む電解質溶液中で電極電位を一定に保持して光を照射すると、照射と同時にカソード光電流が流れ、照射を止めると同時に元にもどるといふ電流応答が観測された (Fig. 7 中)。分光した430 nmの光 ($40 \mu W/cm^2$) を照射したときに観測された光電流と保持した電極電位との関係をFig. 7に示す。保持する電位が +600 mVより負の電位で、光電流が観測された。これはFc基の酸化還元電位が +610 mVであることから、Fc基がDとして機能していることを示している。また、 MV^{2+}/MV^{+} (メチルビオロゲンカチオンラジカル) の酸化還元電位が -630 mVであることから、1.2 eVのアップヒルの電子移動を実現したことになる。なお、吸収スペクトルとアクションスペクトルが一致したことから、ポルフィリン基がSとして働いていることも確認されている。

吸収光子数に対する -200 mVでの量子収率は11%であった。この値は、有機薄膜修飾金属電極における世界最高の値であり、SAM修飾金電極によって非常に高効率な光誘起電子移動が達成されたことを示している。この理由としては $PC_8FcC_{11}SH$ SAMは機能部位間のアルキル鎖によって高度に配向していること、アルキル鎖による機能部位間の距離が大きくなり逆電子移動やエネルギー移動を抑えたこと、およびDであるFc基と電極との間の電子移動速度が比較的速いこと、が考えられる。

この他にも、人工光合成への展開を意識して、光エネルギーと電気エネルギーの相互変換を目指した研究は活発で、たとえば、ホスホン酸とジルコニアをベースにした多分子層内にポルフィリンとMVを交互に導入した分子層間電子移動²⁷⁾ や、金およびITO基板上的ルテニウム錯体SAMからの電気化学的発光 (Electrogenerated Chemiluminescence, ECL)^{28, 29)} などが報告されている。

4.3 イオン・分子の認識

適当な末端官能基をSAM中に導入すれば、イオンや分子を認識する表面を構築できる。例えば、Fig. 8に示すように金基板上に2, 2-チオビスエチル酢酸 (TBEA) とオクタデカンチオール ($C_{18}SH$) の混合SAM修飾電極において、 Cu^{2+}/Fe^{3+} 混合溶液中で電気化学測定を行うと、完全に Fe^{3+} の応答は抑えられ、 Cu^{2+} の応答のみが選択的に観測された⁵²⁾。TBEA内の2つの -ケトエステル基がキレート中心となり、2価の銅イオンとのみ1:1で錯形成する結果、銅イオンと電極との距離が近くなり電子移動が可能となるが、溶液中にのみ存在する鉄イオンの還元は単分子層が障壁になって起

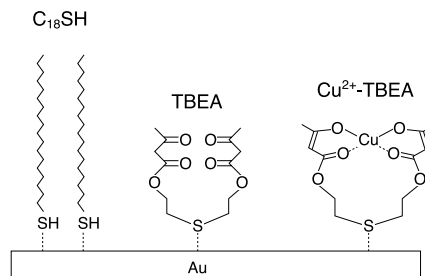


Fig. 8⁵²⁾ 金基板上、 $C_{18}SH$ およびTBEA、 Cu^{2+} -TBEA錯体をもつチオール誘導体のSAMの模式図。

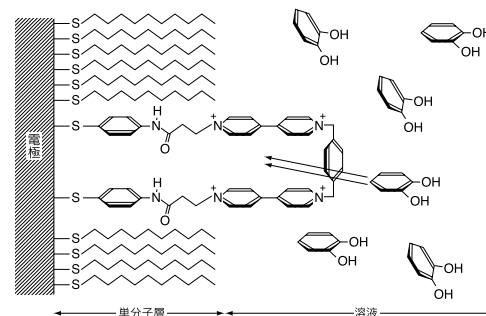


Fig. 9⁵⁴⁾ cyclobis(paraquat-p-phenylene)基をもつチオール誘導体と $C_{18}SH$ の混合SAM修飾電極と、カテコールのcyclobis(paraquat-p-phenylene)基中への出入りを表わす模式図。

こらないものと考えられる。

ブルシアンブルー修飾電極の電気化学応答が溶液中のカチオン種によって大きく変化することにヒントを得た、 $Ni[Fe(CN)_6]$ の二次元単分子層によるカリウムイオンの認識が行われている⁵³⁾。ここでは金表面に3, 3'-チオジプロピオン酸を固定した後、 $NiCl_2$ 溶液中で H^+ を Ni^{2+} で置換する。ついで、 $K_3Fe(CN)_6$ を含む溶液中で、電位を0Vと0.7Vの間30分間サイクルさせることによって所望のSAMを得る。この修飾電極のCVでは溶液中のカリウムイオン濃度(0.01 M ~ 1.0 M)に応じたピーク電位を示し、またナトリウムイオンを含む溶液中でのCVとは大きく形状が異なることから、アルカリ金属イオンの認識が可能である。

分子間のホスト/ゲスト作用を利用して、SAMによって分子を認識することも可能である。Fig. 9のようなホスト作用のある官能基 (cyclobis(paraquat-p-phenylene)) をSAM中に導入すると、緩衝溶液中でホスト基中のピリジル基の酸化還元反応が容易に観測される⁵⁴⁾。この溶液中へゲスト分子としてインドール、カテコール、ベンゾニトリル、ニトロベンゼンを少量添加すると、インドールとカテコールを加えたときにだけ、添加量に応じてピリジル基の還元電位が負にシフトし、ベンゾニトリル、ニトロベンゼンを加えても還元電位は変化しなかった。インドール、カテコールはゲストとなってホスト基の内部に固定され、ホスト基とゲスト分子の結合同士の相互作用によりピリジル基の還元電位が負にシフトしたものと考えられる。ベンゾニトリルやニトロベンゼンは強い電子吸引性のニトリル基やニトロ基を持つため、ゲストとなれずホスト基内に固定されない。これらの結果はまだ定性的なもので、固定されたゲスト分子の量とピリジル基の還元電位との間の定量的な解析はなされておらず、今後の発展が期待される。

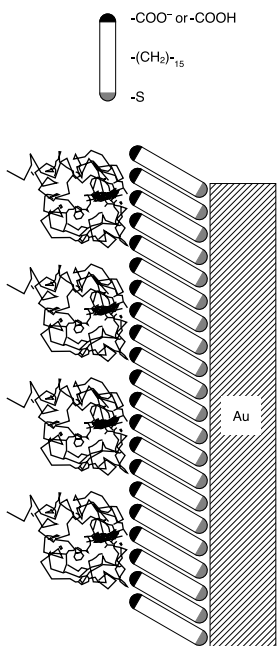


Fig.10⁴³⁾メルカプトヘキサデカン酸のSAM修飾金基板上に吸着・配列したチトクロームcの模式図。

DNAの一本鎖を電極表面に固定できれば、これと相補的なDNA鎖の塩基配列の決定が可能なDNAバイオセンサーが構築できる。このような観点から、SAMによるDNA固定の試みがすでに行われている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。たとえば、金表面をメルカプトブチルホスホン酸で修飾した後、アルミニウムとビスホスホン酸を交互に累積した (Fig. 1(c) 参照) 上に末端のホスホン酸基を利用してDNAや塩基対が固定された。その後の塩基対中に埋め込まれたルテニウム錯体からのECL⁴⁷⁾や角度分解X線光電子分光 (Angle Resolved X-ray Photoelectron Spectroscopy, ARXPS)⁴⁸⁾測定により、上記のDNAが基板上に固定されたこと、および相補的な塩基対が形成していること、つまりハイブリッドしたことが証明されている。

この他、前述したPQQを末端にもつSAMを構築し、その電気化学特性を調べたり^{37, 56, 57)}、NADHおよびNADPHの酸化に利用したり³⁸⁾、またPQQを補酵素として含むグルコース脱水素酵素のアポ体を固体表面に固定・再構成しようとする試みも見られる³⁸⁾。

4.5 SAMのナノファブリケーションへの利用

高機能分子デバイス作製のためには、分子レベルでの二次元的な構造制御が必須であり、SAMを利用したナノファブリケーション技術についても現在活発に研究されている。チオール分子は電気化学的に吸着/脱着させることができる⁵⁸⁾ことから、原理的にはSTMの探針を利用して、目的の場所だけSAMを形成させたり、逆に均一に形成しているSAM中の任意の部分だけ分子を脱離させることができる。SAMを形成している分子の大きさはnmの単位であるため、SAMとSTMの組み合わせによりnmオーダーで構造規制された表面 (ナノファブリケーション) を創製することが可能となる。しかし、実際にはこのようなサイズでのファブリケー

この他にキノイド補酵素 (ピロロキノリンキノン、PQQ) を末端にもつSAMによるカルシウムイオンセンサーへの応用などの例がある³⁷⁾。

4.4 生体関連機能の付与

固体表面上に酵素や補酵素など、生体関連物質を固定し、機能を付与することも可能である。例えば、金表面上の末端カルボン酸をもつSAMを利用して、電子移動をつかさどる蛋白質であるチトクロームcを吸着・固定できる (Fig.10)^{3, 55)}。この修飾電極では、チトクロームcの酸化還元中心の $Fe^{2+/3+}$ に由来する酸化還元応答が安定に観察されている。この場合表面カルボン酸とチトクロームcのリジン残基との静電的相互作用により吸着しているものと考えられる。

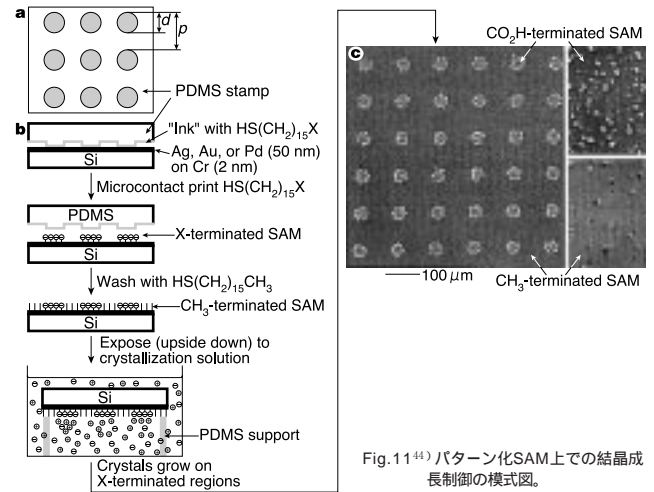


Fig.11⁴⁴⁾パターン化SAM上での結晶成長制御の模式図。

ションは将来の課題であり、現在は μm スケールでの研究が中心である。

Whitesidesらは、 μm オーダーの適当な形状のパターンを持ったポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のスタンプをチオール溶液に浸してチオールをインクのようにしてつけた後、基板に押しつけることによって、スタンプの形状通りにSAMのパターンを形成するというマイクロコンタクトプリンティング法を考案し、多様な展開を図っている。例えば、金基板上にアルキルチオールSAMのパターンをスタンプで形成した後、末端が水酸基やカルボン酸基のチオール溶液に浸漬すると、もともとSAMが存在していない部分に別の分子のSAMができる。つまり、疎水部分と親水部分の形状を自由に設計できる。このような表面ではパターンに応じた水の凝縮が起こり、適当な凝縮段階では回折格子として働く⁴²⁾。

さらに最近、同様な方法で作成した親水性SAMと疎水性SAMのパターンを持つ表面をカルシウムイオンを含む中性水溶液に浸すと親水性SAMの上のみ結晶 (CaCO_3) 成長することが報告された (Fig.11)⁴⁴⁾。しかも、結晶成長の方向が基板と末端親水基の組み合わせで異なるという非常に興味深い結果も得られており、この手法が単分子層レベルの制御にとどまらず、セラミックスなどを用いたデバイスの構築にも応用可能であることが実証された。

5. おわりに

金表面上に形成したアルキルチオール自己組織化単分子膜 (SAM) の構築については、基礎・応用の両面で近年活発に研究が行われており、本稿では成果のほんの一部を概説したにとどまったが、非常に幅広い展開がなされていることはご理解いただけたと思う。現在、膜の欠陥密度を下げたり、また、単分子膜形成後に水素結合や重合化を利用することによって安定性・耐久性を高めるといった実用化を意識した研究も、新規自己組織化分子の設計・合成と並行して進んでいる。近い将来、任意の機能性部位を持ったチオール系分子を設計・合成し、固体基板表面に構造・配向を制御して配列・固定することで、所望の機能を持ったデバイスを構築できる道が開けるものと期待される。

参考文献

- 1) A. Ulman, "An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly", Academic Press, New York (1991)
- 2) H. O. Finklea, "Electroanalytical Chemistry", A. J. Bard and I. Rubinstein Eds., Marcel Dekker, New York (1996) Vol. 19, p. 109.
- 3) 魚崎浩平, 佐藤謙, 化学工業, 45 (1994) 182.
- 4) 魚崎浩平, 佐藤謙, 近藤敏啓, 化学工業, 45 (1994) 945.
- 5) 佐藤謙, 水谷文雄, 魚崎浩平, 触媒, 37 (1995) 364.
- 6) 近藤敏啓, 魚崎浩平, 光化学, 20 (1995) 69.
- 7) 近藤敏啓, 魚崎浩平, ぶんげき, 270 (1997) 457.
- 8) J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 92.
- 9) R. G. Nuzzo and D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 4481.
- 10) I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, and K. Yasukouchi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1982) 1032.
- 11) H. Lee, L. J. Kopley, H.-G. Hong, S. Akhter, and T. E. Mallouk, *J. Phys. Chem.*, 92 (1988) 2597.
- 12) S. W. Keller, H.-N. Kim, and T. E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 8817.
- 13) C. Schönenberger, J. Jorritsma, J. A. M. Sondag-Huethorst, and L. G. J. Fokkink, *J. Phys. Chem.*, 99 (1995) 3259.
- 14) N. Camillone III, C. E. D. Chidsey, G. Liu, and G. Scoles, *J. Phys. Chem.*, 98 (1993) 3503.
- 15) K. Shimazu, I. Yagi, Y. Sato, and K. Uosaki, *Langmuir*, 8 (1992) 1385.
- 16) R. Yamada and K. Uosaki, *Langmuir*, 13 (1997) 5218.
- 17) R. Yamada and K. Uosaki, *Langmuir*, 14 (1998) 855.
- 18) K. Uosaki, Y. Sato, and H. Kita, *Langmuir*, 7 (1991) 1510.
- 19) Y. Sato, H. Itoigawa, and K. Uosaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 66 (1993) 1032.
- 20) Y. Sato, B. L. Frey, R. M. Corn, and K. Uosaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 67 (1994) 21.
- 21) S. Ye, Y. Sato, and K. Uosaki, *Langmuir*, 13 (1997) 3157.
- 22) Y. Sato, M. Fujita, F. Mizutani, and K. Uosaki, *J. Electroanal. Chem.*, 409 (1996) 145.
- 23) S. Ye, A. Yashiro, Y. Sato, and K. Uosaki, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 92 (1996) 3813.
- 24) H. O. Finklea and D. D. Hanshaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 3173.
- 25) M. S. Ravenscroft and H. O. Finklea, *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 3843.
- 26) K. Uosaki, T. Kondo, X.-Q. Zhang, and M. Yanagida, *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 8367.
- 27) S. B. Ungashe, W. L. Wilson, H. E. Katz, G. R. Scheller, and T. M. Putvinski, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 8717.
- 28) Y. S. Obeng and A. J. Bard, *Langmuir*, 7 (1991) 195.
- 29) Y. Sato and K. Uosaki, *J. Electroanal. Chem.*, 384 (1995) 57.
- 30) K. V. Gobi, F. Kitamura, K. Tokuda, and T. Ohsaka, *J. Phys. Chem.*, 103 (1999) 83.
- 31) J. Zak, H. Yuan, M. Ho, L. K. Woo, and M. D. Porter, *Langmuir*, 9 (1993) 2772.
- 32) J. E. Hutchison, T. A. Postlethwaite, and R. W. Murray, *Langmuir*, 9 (1993) 3277.
- 33) K. Shimazu, M. Takechi, H. Fujii, M. Suzuki, H. Saiki, T. Yoshimura, and K. Uosaki, *Thin Solid Films*, 273 (1996) 250.
- 34) T. Kondo, S. Horiuchi, I. Yagi, S. Ye, and K. Uosaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (1999) 391.
- 35) Y. Wang and A. E. Kaifer, *J. Phys. Chem. B*, 102 (1998) 9922.
- 36) M. W. J. Beulen, J. Bugler, B. Lammerink, E. A. J. Geurts, E. M. E. F. Biemond, K. G. C. Vanleerdam, F. C. J. M. Vanveggel, J. F. J. Engbersen, and D. N. Reinhoudt, *Langmuir*, 14 (1998) 6424.
- 37) E. Katz, T. Lötzbeier, D. D. Schlereth, W. Schuhmann, and H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.*, 373 (1994) 189.
- 38) E. Katz, D. D. Schlereth, H.-L. Schmidt, and A. J. J. Olshoorn, *J. Electroanal. Chem.*, 368 (1994) 165.
- 39) H. Z. Ye, H. L. Zhang, Z. F. Liu, S. Ye, and K. Uosaki, *Langmuir*, 14 (1998) 619.
- 40) R. Blonder, I. Willner, and A. F. Buckmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, (1998) 9335.
- 41) E. Katz and I. Willner, *Langmuir*, 13 (1997) 3364.
- 42) A. Kumar and G. M. Whitesides, *Science*, 263 (1994) 60.
- 43) S. Song, R. A. Clark, E. F. Bowden, and M. J. Tarlov, *J. Phys. Chem.*, 97 (1993) 6564.
- 44) J. Aizenberg, A. J. Black, and G. M. Whitesides, *Nature*, 398 (1999) 495.
- 45) G. D. Rees, R. Evans-Gowing, S. J. Hammond, and B. H. Robinson, *Langmuir*, 15 (1999) 1993.
- 46) X.-H. Xu, H. C. Yang, T. E. Mallouk, and A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 8386.
- 47) X.-H. Xu and A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 2627.
- 48) A. J. Leavitt, L. A. Wenzler, J. M. Williams, and T. P. Beebe, Jr., *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 8742.
- 49) D. Bethell, M. Brust, D. J. Schiffrin, and C. Kiely, *J. Electroanal. Chem.*, 409 (1996) 137.
- 50) T. Nakanishi, B. Ohtani, and K. Uosaki, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 36 (1997) 4053.
- 51) J. J. Hickman, D. Ofer, P. E. Laibinis, M. Whitesides, and M. S. Wrighton, *Science*, 252 (1991) 688.
- 52) I. Rubinstein, S. Steinberg, Y. Tor, A. Shanzler, and J. Sagiv, *Nature*, 332 (1988) 426.
- 53) S. Bharathi, V. Yegnanaman, and G. P. Rao, *Langmuir*, 11 (1995) 666.
- 54) M. T. Rohas and A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 5883.
- 55) M. Collinson, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *Langmuir*, 8 (1992) 1247.
- 56) E. Katz, D. D. Schlereth, and H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.*, 367 (1994) 59.
- 57) E. Katz, M.-L. Dagan, and I. Willner, *J. Electroanal. Chem.*, 408 (1996) 107.
- 58) C. A. Widrig, C. Chung, and M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.*, 310 (1991) 335.

著者紹介

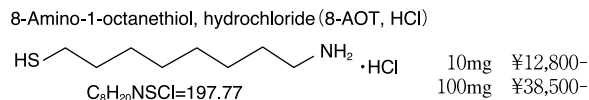
氏名 近藤 敏啓 (Toshihiro KONDO)
 役職・学位 北海道大学大学院理学研究科・助手・博士(工学)
 経歴 平成元年東京工業大学大学院総合理工学研究所修士課程修了、平成3年北海道大学理学部助手、平成7年改組により現職。
 専門 物理化学(光電気化学・界面電気化学)
 趣味 料理、アウトドア
 連絡先 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目(勤務先)

氏名 魚崎 浩平 (Kohei UOSAKI)
 役職・学位 北海道大学大学院理学研究科・教授・Ph.D.
 経歴 昭和46年大阪大学大学院工学研究科修士課程修了、同年三菱油化(株)入社、昭和49-51年プリンターズ大学大学院博士課程留学、昭和53年英国オックスフォード大学無機化学研究所研究員、昭和55年北海道大学理学部化学科講師、昭和56年助教授、平成2年教授、平成7年改組により現職。
 専門 物理化学(表面電気化学・光電気化学)
 趣味 スキー、テニス
 連絡先 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目(勤務先)

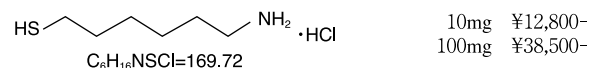
新製品

Self-Assembled Monolayer (SAM) 研究用試薬

Amine type

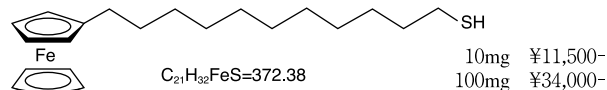


6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride (6-AHT, HCl)

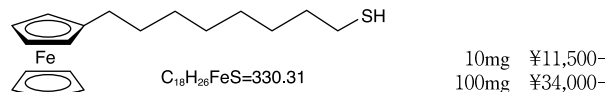


Ferrocene type

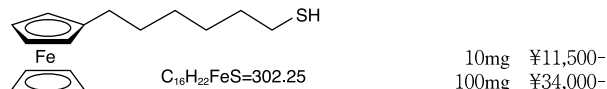
11-Ferrocenyl-1-undecanethiol (11-FUT)



8-Ferrocenyl-1-octanethiol (8-FOT)



6-Ferrocenyl-1-hexanethiol (6-FHT)



近年、長鎖アルキル化合物を共有結合を介して固体表面に結合させると共に、アルキル鎖間の van der Waals 力を利用し、簡便に高密度・高配向な自己組織化単分子膜 (SAM, Self-Assembled Monolayer) を作製できることがわかり、その応用が注目されています¹⁻⁴⁾。

なかでも、アルキルチオール類を金表面に吸着させた SAM は金修飾電極、表面プラズモン共鳴 (SPR⁵⁻⁷⁾、水晶発振子マイクロバランス (QCM⁸⁻¹⁰⁾ 等に利用されています。いずれも基板となる金表面に、チオール化合物やジスルフィド化合物を用いてプロープ分子を固定し、ターゲット分子との相互作用をそれぞれ電気的信号変化、屈折率変化、振動数変化として検出しています。

自己組織化する分子は、固体基板の表面と反応する結合性官能基、分子間の配向を決める主鎖、及び種々の機能性を持つ末端官能基の3つの部位から構成されています。また、主鎖の長さや親水性、及び末端官能基の選択により多彩な機能をもたせることができるかと期待されています¹⁾。

SAM の作製上の特徴は、単分子膜の作成に特殊な装置を必要とせず、分子を含む溶液中に基板を浸漬するだけで容易に単分子層を構築できることです。基板の種類や浸漬条件 (溶媒、濃度、温度、時間) により構造・配向を制御することも可能です。

8月5日発売予定

Nitrosothiol Assay Kit

弊社では、固体基板への吸着部位としてチオールを有し、末端官能基としてアミノ基を有するアルキル鎖C11のものと、カルボキシル基を有するアルキル鎖C10、7、5のチオールを既に発売しています^{11,12)}。

末端官能基としてアミノ基を有するアミノアルカンチオール類を用いた報告は多数ありますが、そのほとんどは、アルキル鎖の短いものです。例えば、Takeharaらは、アミノアルカンチオール($H_2N-C_nH_{2n+1}-SH$)($n=2, 5, 8$) SAMを用い金上にNaphthoquinone (NQ)を固定化し、電気化学的挙動より、NQ酸化還元サイトと電極表面の間の距離を、アミノアルカンチオール単分子膜のメチレン鎖の長さによりコントロールできると報告しています¹³⁾。また、アルキル鎖が長くなることで金電極上に高密度・高配向なSAMを作製できることが知られています³⁻⁴⁾。弊社では、アルキル鎖がC8とC6のアミノアルカンチオール塩酸塩を発売することとなりました。これらは、既に販売しているアルキル鎖がC11の11-アミノウンデカンチオール塩酸塩(11-AUT, HCl)と同様に、タンパクやペプチドや、他の分子認識サイトを導入する際に有用だと思われます^{11,12)}。

フェロセニル基(Fc)を有するものは、電気化学的活性を持つことから、機能性分子を電極上に配列させた分子修飾電極による種々の生体機能の模倣や、センサーへの応用等の研究に利用されています^{3,14-18)}。例えば、Uosakiらは、金電極表面に11-Ferrocenyl-1-undecanethiolの単分子膜を形成し、溶液内化学種の酸化還元による可逆な電流ピークをCVを用いて観察し、Fc基が電子移動メディエーターとして機能することを報告しています¹⁵⁻²¹⁾。今回、アルキル鎖がC11、8、及び6のフェロセニルアルカンチオールを発売することとなりました。

参考資料

- 1) 近藤敏啓、魚崎浩平、ぶんせき、6,457 (1997)
- 2) K. Kajikawa *et al.*, *Molecular Electronics and Bioelectronics*, 7 (1), 2 (1996)
- 3) M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3559 (1987)
- 4) A. Ulman, "An Introduction to Ultra Thin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly", Academic Press, San Diego (1991)
- 5) 河田聡、高木俊夫、蛋白・核酸・酵素、37,3005 (1992)
- 6) 笠井献一、蛋白・核酸・酵素、37,2997 (1992)
- 7) 橋本せつ子、ぶんせき、5,362 (1997)
- 8) 岡畑恵雄、新倉謙一、蛋白・核酸・酵素、40 (2), 165 (1995)
- 9) Y. Okahata, Y. Ijiri *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 8299 (1992)
- 10) K. Niikura, K. Nagata, Y. Okahata, *Chem. Lett.*, 863 (1996)
- 11) M. Collinson, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *Langmuir*, 8, 1247 (1992)
- 12) S. Song, R. A. Clark, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *J. Phys. Chem.*, 97, 6564 (1993)
- 13) F. Mukae, H. Takemura, K. Takehara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69 (9), 2461 (1996)
- 14) J. L. Anderson, E. F. Bowden, P. G. Pickup, *Anal. Chem.*, 68, 379R (1995)
- 15) K. Uosaki, Y. Sato, H. Kita, *Langmuir*, 7, 1510 (1991)
- 16) C. E. D. Chidsey, C. R. Bertozzi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 4301 (1990)
- 17) J. J. Hickman, D. Ofer, P. E. Laibinis, *Science*, 252, 688 (1991)
- 18) E. Katz *et al.*, *J. Electroanal. Chem., Interfacial Electrochem.*, 373, 189 (1994)
- 19) K. Uosaki *et al.*, *Langmuir*, 10, 3658 (1994)
- 20) K. Uosaki *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, 372, 117 (1994)
- 21) T. Kondo *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, 381, 203 (1994)

【はじめに】

ニトロソチオール (R-SNO) は、寿命の長いNOの供給体であり、生体内では血管の弛緩等NO類似の生理活性を示すと言われていています。また、EDRF (内皮細胞由来血管弛緩因子)の本質はニトロソチオールだという考えもあります。

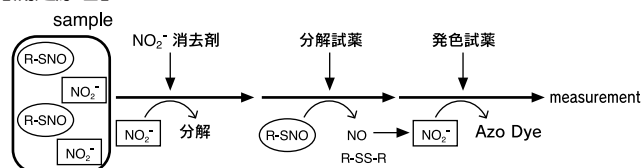
本キットは、ニトロソチオールのS-N結合を切断し、放出されたNOの代謝物であるNO₂⁻を、Griess法で検出することでニトロソチオールを定量するキットです。元々試料中に存在するバックグラウンドのNO₂⁻は、亜硝酸イオン消去剤により分解・消去されますので、ニトロソチオール由来のNO₂⁻のみを検出することができます。

また、現在ニトロソチオールのS-N結合の切断には水銀が最も一般的に使われていますが、本キットは環境面にも配慮し、水銀を一切使用しておりません。

【本キットの特長】

1. Hgフリーで安全。
2. バックグラウンドのNO₂⁻は完全に消去されるため、一回の測定でニトロソチオールのみを検出することができます。
3. 1 Kitで96穴プレート1枚測定できます。
4. 1μM以上の濃度のニトロソチオールを検出することができます。

【測定原理】



【操作方法】

1. S-Nitrosoglutathione (GSNO) を用いて検量線を作成します。
2. 測定試料中のNO₂⁻を亜硝酸イオン消去剤で消去します。
3. 測定試料中のニトロソチオールを分解試薬で分解させてNOを放出させます。
4. 放出されたNOが酸化されて生じるNO₂⁻をGriess試薬で発色させます。
5. プレートリーダーで吸光度を測定し、1. で作成した検量線により試料中のニトロソチオールを定量します。

【注意事項】

本キットは冷凍保存品です。

測定試料中のバックグラウンドのNO₂⁻に対して、亜硝酸イオン消去剤が過剰になっても測定には全く影響はありません。

測定試料は前処理として除蛋白が必要です。

実用的蛍光誘導体化

2

福岡大学薬学部

山口政俊・能田 均

2. アミン類の蛍光誘導体化

生体中には、神経伝達物質を初めとする多種類の生理活性アミンが含まれており、またその多くは極く微量で存在している。アミン類は、一般に、他の官能基より反応性が高いため、その蛍光誘導体化試薬は数多く開発されている。

誘導体化試薬の使用に当たっては、次の点を考慮し、選択することが重要である（これは、アミン類に限らず、すべての誘導体化試薬の選択に共通する事項である）。

目的成分の化学的性質〔毒性、分子量（光、熱、酸素、pHなどに対する）安定性など〕を考慮し、試薬を選択することが大事である。例えば、目的成分が水に可溶性であれば、試薬も同じく水溶性であり、かつ水溶液中で反応が進行することが望まれる。また目的成分が熱に不安定であれば、低温で反応が進行する試薬を選ぶべきである。

生体試料内に共存し、目的成分の測定に妨害となる化合物についても考慮すべきである。また、目的成分の測定すべき濃度範囲や検出限界についても留意すべきである。

計測の目的に対応し、試薬を選択することも考えたほうがよい。多検体処理や自動化が念頭にあるならば、ポストカラム誘導体化試薬の選択が望ましい（プレカラム誘導体化についても、装置が複雑になるが可能である）。これら以外にも選択の要素が種々考えられるが、個々についての要素は、各項目で記す。

要は、誘導体化試薬の特質を充分に知ったうえで、試料の状態、目的成分の化学的性質や測定の目的などを考慮し、試薬を選択することが肝要である。

… 考えすぎて決定できないなら、「論より証拠」、実行することを勧める …

2.1. アミノ基用ラベル化試薬とその特性

(1) 第1アミノ基 (Fig. 1) オルトフタルアルデヒド (OPA : A) やフルオレッサミン (FLA : B) が第1アミノ基のプレ及びボ

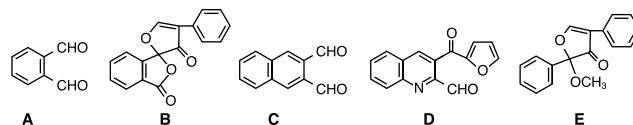


Fig. 1 第1アミノ基のラベル化試薬

ストラベル化試薬として広く使われている。OPAは2-メルカプトエタノールの存在下、ホウ酸塩緩衝液（アミン、pH 6 ~ 8 ; アミノ酸、pH 9.5 ~ 10）中で反応（室温、2分以内）する。ナフタレン-2, 3-ジカルボキシアルデヒド (NDA : C) が、OPAより高感度な試薬として開発されている。本試薬はシアン化物イオンの存在で第1アミン類と反応（pH9.1、室温、15分）し、安定な蛍光を与える（検出限界、数十fmol）。NDA反応は、アルゴンレーザーを用いるレーザー励起蛍光検出により約100倍の高感度化が達成できる。これと同種の試薬であるDが報告され、これによりfmolレベルの第1アミンを検出している。FLAはホウ酸塩緩衝液（pH 9.5 ~ 10）中で第1アミンと反応（室温、数分以内）するが、蛍光生成物が不安定である。類似試薬にEがあり、工夫することにより第1及び第2アミンの段階的定量も可能である。

(2) 第1及び第2アミノ基 (Fig. 2) 発蛍光団に、反応活性基としてスルホニルクロリドやカルボニルクロリド基を導入した試薬がプレラベル化用として使用されている。前者の試薬の中では、ダンシルクロリド (DNS-Cl : A) が古くから利用されている。

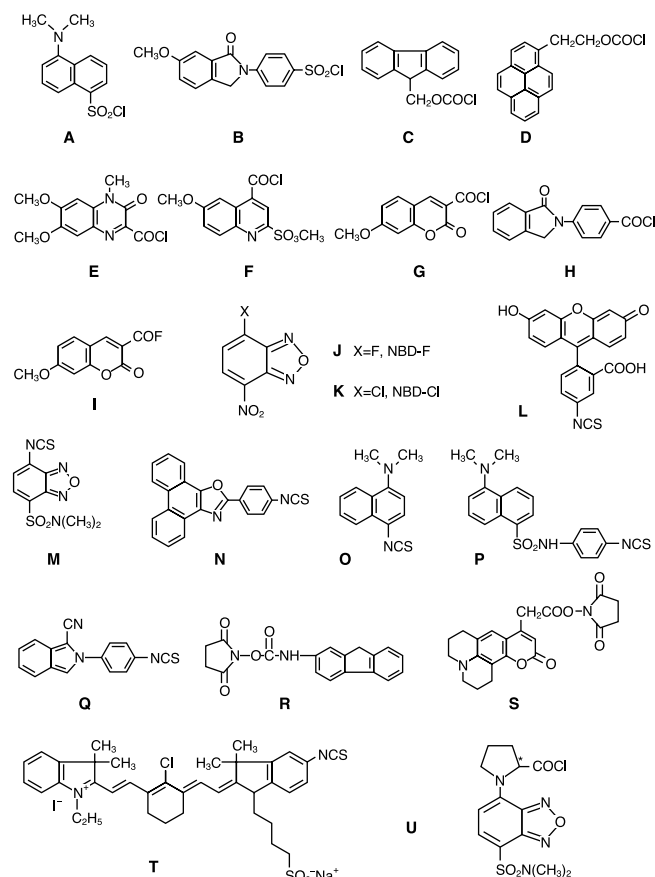


Fig. 2 第1及び第2アミノ基のラベル化試薬

DNS-CIは弱アルカリ性で第1及び第2アミン類と反応(反応時間はアミン類により異なる)し、安定な誘導体を与える。Bはアミン類と反応(50、15分)し、0.2 pmolの検出限界を与える。後者の試薬として、9-フルオレニルメチルクロロホルメート(FMOC-CI:C)がある。FMOC-CIはホウ酸塩緩衝液(pH 8)中でアミン類と反応(室温、2分以内)する。Dは、FMOC-CIより高感度で反応時間も短い。キノキサリン骨格の強蛍光性を利用し、この骨格にカルボニルクロリドを配した3,4-ジヒドロ-6,7-ジメトキシ-4-メチル-3-オキソキノキサリン-2-カルボニルクロリド(DMEQ-COCl:E)が開発されている。その他、F、G、Hなどの試薬がある。カルボニルフルオリドを活性基として持つ試薬(7-メチルクマリン-3-カルボニルフルオリド:I)は、トリエチルアミン、キヌクリジンなどの塩基の共存下、アセトニトリル中、30秒でアミン類と反応(検出限界、100 fmol)する。

ベンゾフラザン構造を有する種々の試薬類が用いられている。NBD-F(J)はNBD-CI(K)より反応性に優れ、アミン類とホウ酸塩緩衝液(pH 8)中で反応(50~60、1分以内)する。類似のDBD試薬(NBD試薬のニトロ基がジメチルアミノスルホニル基に置換した試薬)も開発されている。これらベンゾフラザン試薬は、試薬自身が無蛍光性なのでプレ及びポストラベル化のいずれにも使用できる。

発光団に、イソチオシアネートを配した試薬を蛍光性エドマン試薬と呼び、アミン類のラベル蛍光試薬に用いられている。フルオレッセインイソチオシアネート(L)、DBD-NCS(M)などの多数の試薬(N~Q)が開発され、一部はペプチドのアミノ酸配列の決定に適用されている。その他、反応基にスクシンイミドを持つRやSがある。近赤外半導体レーザー蛍光法は、近赤外領域(750~1500 nm)に蛍光を有する化合物が少ないことでバックグラウンドノイズが低く、特に生体物質の高感度測定に有効である。ポリメチン色素にイソチオシアネート基を導入したエドマン試薬(T)が開発されている。

(3) 光学活性アミノ基(Fig. 2) 光学異性体をジアステレオマーに誘導して分離・定量する場合、これに用いるラベル化剤は、キララな構造、反応活性基、及び検出器に対し高感度に応答する化学構造をあわせ備えることが重要である。

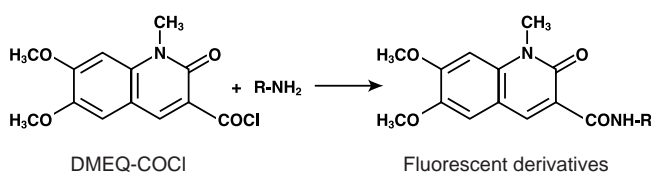
光学活性アミノ基の蛍光ラベル化に、種々のベンゾフラザン試薬(DBD-Pro-COCl(Fig. 2 U)、NBD-Pro-COCl)が合成されている。(+)1-(1-イソシアネートエチル)ナフタレンや(+)1-(9-フルオレニル)エチルクロロホルメートも使用されている。

OPA反応においてホモキララなチオール化合物(N-アセチル-L-システインなど)を用いることにより、アミノ酸のラセミ体を分離・定量した例もある。

2.2.3. 4-ジヒドロ-6,7-ジメトキシ-4-メチル-3-オキソキノキサリン-2-カルボニルクロリド(DMEQ-COCl:E)の実用例

DMEQ-COClは、アセトニトリル中、炭酸カリウム存在下で室温で瞬時にアミン類と反応する極めて高感度(検出限界、2~10 fmol)な試薬である。本試薬は以下の生体関連物質に適用されて

いる。



(1) アマンタジンの血中濃度モニタリング¹⁾

アマンタジンはN-methyl-D-aspartate受容体拮抗作用を有し、パーキンソン症候群治療薬のみならず、脳梗塞後遺症などによる意欲低下の改善薬として幅広く臨床の場で用いられている。また、近年、抗ウイルス薬としてインフルエンザ対策にも使用されている。アマンタジンはその適用上、高齢者に対して長期間投与されることが多く、本剤を有効かつ安全に用いるためには患者ごとの血中濃度測定と病態時の体内動態学的解析データの蓄積が必要と思われる。このため、高感度かつ簡便なHPLC蛍光測定法が必要である。

操作法をChart 1に示す。本法は、血漿をアルカリ性にした後、トルエンを用いてアマンタジン及び内標準物質[1-(1-アダマンチル)エチルアミン]を溶媒抽出した後、DMEQ-COClで誘導体化することに基づく。

健康人血漿及びアマンタジン添加血漿を操作法に従い処理したときに得られるクロマトグラムをFig. 3に示す。アマンタジンの

Chart 1 Procedure for the determination of amantadine in human plasma

Plasma	50 μ L
(1-Adamantyl) ethylamine (1 μ g/mL H ₂ O)	10 μ L
1 M NaOH	50 μ L
Toluene	2 mL
Vortex-mix for ca. 2 min	
Organic layer	ca. 1.5 mL
Evaporate to dryness	
1.0mM DMEQ-COCl in CH ₃ CN	100 μ L
5.0mM Triethylamine in CH ₃ CN	50 μ L
Stand at room temp. for ca. 5 min	
Apply onto HPLC (20 μ l)	

HPLC conditions

Column: YMC Pack C8 (250 \times 4.6 mm i. d.; 5 μ m)
Mobile phase: CH ₃ OH - CH ₃ CN - H ₂ O (35:35:30, v/v)
Flow-rate: 1.0 mL/min
Fluorescence detection: Ex. 400 nm; Em. 500 nm

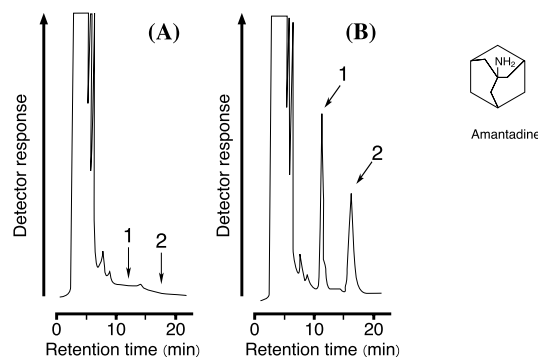


Fig. 3. Chromatograms obtained with(A) drug-free plasma and (B) plasma spiked with amantadine and IS (200 ng/mL each). Peaks: 1 = amantadine; 2 = IS.

定量限界は、54 pg/mL血漿である。

(2) ヒト血漿中 -フェネチルアミン (PEA) の定量²⁾

生体、特に中枢神経系に、極く微量でニューロモデレーターとして作用するアミン類が存在している。PEAはこれらアミン類の1つであり、構造的にアンフェタミンと類似しているため内在性の覚醒剤物質の可能性が示唆されている。分裂病やうつ病患者尿中排泄量の異常が報告されており、ヒト血液中のPEAの定量法の確立は、同アミンの臨床、生化学的研究に有用である。

Chart 2 に、前処理及び誘導体化操作の手順を示す。陽イオン交換樹脂を用いる固相抽出法及び酢酸エチル (アルカリ条件下) を用いる溶媒抽出法により、血漿からPEA及び内標準物質 (p-メチルベンジンアミン) を選択的に回収後、蛍光誘導体化を行う。誘導体化において、界面活性剤 (Triton X-405) 含有アセトニトリルを使用しているが、これは前号にも述べたように、ガラス試験管へのPEAの吸着を防ぐためである。界面活性剤が無い場合は、再現性が得られない。

健康人血漿を操作法に従い処理したときに得られるクロマトグラムをFig. 4 に示す。PEAの定量限界は、0.3 pmol/mL血漿である。

Chart 2 Procedure for the determination of PEA in human plasma

Plasma	1 mL
p-Methylbenzylamine	50 μ L
70 mM HCl	0.5 mL
Apply into Toyopak SP cartridge	
Wash with 5 mL of H ₂ O (twice)	
Wash with 1.8 mL of 40% CH ₃ CN (twice)	
Elute with 3 mL of CH ₃ CN - 1.0M NaCl (2:3, v/v)	
0.5 M NaOH	0.6 mL
Ethyl acetate	6 mL
Shake for 10 min	
Organic layer	ca. 5 mL
Evaporate to dryness	
CH ₃ CN containing 2% triton X-405	200 μ L
K ₂ CO ₃	ca. 3 mg
2 mM DMEQ-COCl in CH ₃ CN	100 μ L
Stand at room temp. for ca. 1 min	
Apply onto HPLC (20 μ l)	

HPLC conditions

Column: TSK gel ODS-120T(250×4.6mm i. d.; 5 μ m)
 Mobile phase: CH₃CN - 50mM CH₃COONH₄ (33:67, v/v)
 Flow-rate: 1.0 mL/min
 Fluorescence detection: Ex. 406 nm; Em. 485 nm

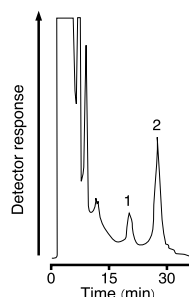


Fig. 4. Chromatogram of the DMEQ derivatives of PEA and IS in human plasma. Peaks: 1 = PEA(4.1 pmol/mL); 2 = IS.

参考文献

- 1) T. Iwata, H. Fujino, J. Sonoda and M. Yamaguchi, *Anal. Sci.*, Vol. 13, SUPPLEMENT, 467 (1997).
- 2) J. Ishida, M. Yamaguchi and M. Nakamura, *Anal. Biochem.*, 184, 86 (1990)

新製品

(株)マモト抗体研究所新製品

Anti S19 Ribosomal Protein polyclonal antibody

Anti Metallothionein monoclonal antibody (clone No. 1A12)

Anti Pyrraline monoclonal antibody (clone No. H12)

Anti S19 Ribosomal Protein polyclonal antibody

S19タンパク質は、リボソーム由来のタンパク質として同定されました。近年、その架橋二量体の形成によって補体C5aとの類似構造が出現し、その二量体が単球特異的な走化活性をもつことが発見されました。

慢性リュウマチ等の組織像においては単球/マクロファージの浸潤がメインのイベントであり、これらの病態解明のため、本タンパクの解析は非常に注目されております。また、アポトーシス細胞がS19二量体を遊離して自己の単球/マクロファージによる貪食を促進することも示唆されており、形態形成や組織再構築等アポトーシスが関与する系でもS19タンパク質の解析は有用と考えられます。

抗S19タンパク質ポリクローナル抗体は、大腸菌で発現した組み換え体S19タンパク質をウサギに免疫して得られた抗体で、各種免疫染色やELISAに使用でき、上記の解析に非常に有用です。

免疫原 組み換え体S19タンパク質 (大腸菌発現)

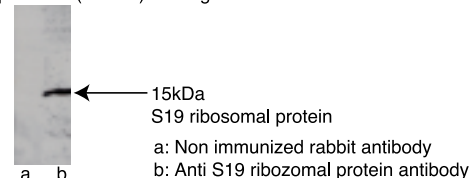
種 ウサギポリクローナル抗体

内容量 100 μ g/vial

形状 凍結乾燥品 (1% BSA含有PBS溶液。安定化剤として0.1% proclin含有)

特異性 ヒト肝細胞株 (HepG2) 及びモルモット肝抽出液のウエスタンブロットにおいてS19タンパク質を明瞭なバンドで検出しています。

HepG2 Cell (human) Homogenate



参考文献

- 1) Yamamoto T, *et al.*, Monocyte Chemotactic Factor in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue, *J. Biol. Chem.*, vol.271, No.2, 878-882 (1996)
- 2) 山本哲郎, 生化学, 第69巻, 第5号, 324-328 (1997)
- 3) Yamamoto T, *et al.*, A Monocyte Chemotactic Factor, S19 Ribosomal Protein Dimer, in Phagocytic Clearance of Apoptotic Cells, *Laboratory Investigation*, vol.78, No.5, 603-617 (1998)

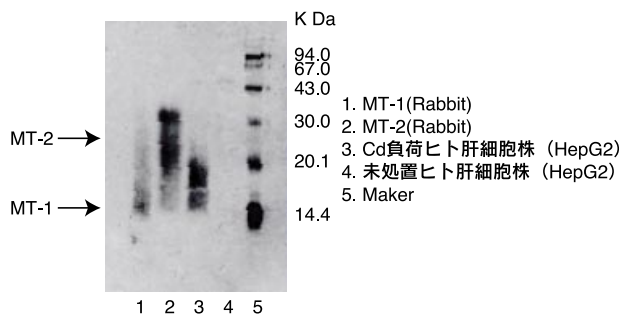
(株)クマモト抗体研究所新製品

Anti Metallothionein monoclonal antibody(clone No. 1A12)

メタロチオネインは構成アミノ酸の約1/3をシステインが占めながらS-S結合を1つも持たないというユニークな特徴をもち、銅や亜鉛等の重金属と結合することから生体防御能を有するタンパクとして発見されました。カドミウム汚染等の研究分野でそれら重金属と結合することにより毒性発現の軽減を促すことが証明され、注目されています。

本抗体は、ウサギより精製したメタロチオネインをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体で、各種免疫染色やELISAに使用でき、上記の解析に非常に有用です。

免疫原 ウサギ由来精製メタロチオネイン
種 マウスモノクローナル抗体 (IgG1)
内容量 100 μg/vial (100 μl/vial)
サブクラス IgG1
形状 凍結溶液 (1 mg/ml、1% BSA含有PBS溶液。安定化剤として0.1% proclin含有)
特異性 本抗体はマウスおよびヒトメタロチオネインに反応します。



参考文献

- 1) Yasutake A, *et al.*, Induction by Mercury Compounds of Brain Metallothionein in Rats : HgO Exposure Induces Long-lived Brain Metallothionein, *Arch. Toxicol.*, vol.72, No.4, 187-191 (1998)
- 2) Mullins JE, *et al.*, Immunohistochemical Detection of Metallothionein in Liver, Duodenum and Kidney after Dietary Copper-Overload in Rats, *Histol. Histopathol.*, vol.13, No.3, 627-633 (1998)
- 3) Kikuchi Y, *et al.*, Induction of Metallothionein in a Human Astrocytoma Cell Line by Interleukin-1 and Heavy Metals, *FEBS Lett.*, vol.317, No.1-2, 22-26 (1993)

Anti Pyrraline monoclonal antibody (clone No. H12)

タンパク質の糖化反応は、糖尿病合併症、動脈硬化、老化に深く関与しており、近年盛んに研究が行われております。その中でもアマドリ転移を経て形成される糖化反応後期段階の最終生成物 (Advanced Glycation End Products, AGE) は加齢による増加が確認されており、非常に注目されています。また、糖尿病や動脈硬化等の分野でも注目されています。

AGE構造体の一つであるピラリンは、糖尿病患者の組織や尿中で高値であり、当該疾患の臨床マーカーとして注目されており、また、アルツハイマー病患者の老人斑や神経原線維の変化部位にも高濃度に存在していることが確認され、脳疾患の分野でも重要視されています。

本抗体はピラリンを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体で、組織染色等により、生体内のピラリンに関する解析に有用です。

免疫原 カプロイル-ピラリン構造体
種 マウスモノクローナル抗体
内容量 20 μg/vial (80 μl/vial)
サブクラス IgG1
形状 凍結溶液 (0.25mg/ml、50% ブロックエース含有PBS溶液。安定化剤として0.1% proclin含有)

参考文献

- 1) Miyagi S, *et al.*, Immunohistochemical Detection of Advanced Glycosylation End Products in Diabetic Tissues Using Monoclonal Antibody to Pyrraline, *J. Clin. Invest.*, vol.89, No.4, 1102-1112 (1992)
- 2) Smith MA, *et al.*, Advanced Maillard Reaction End Products are Associated with Alzheimer Disease Pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.91, No.12, 5710-5714 (1994)
- 3) Odetti P, *et al.*, Early Glycoxidation Damage in Brains from Down's Syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.243, No.3, 849-851 (1998)

Anti Pyrraline monoclonal antibodyは明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所との共同開発商品です。

クマモト抗体研究所製品

メーカーコード	品名	容量	価格(¥)
KY008	Anti S19 Ribosomal Protein polyclonal antibody	100 μg	45,000
KA009	Anti Metallothionein monoclonal antibody (clone No. 1A12)	100 μg	45,000
KH010	Anti Pyrraline monoclonal antibody (clone No. H12)	20 μg	55,000
メーカーコード	品名	容量	価格(¥)
KH001	Anti AGE monoclonal antibody (clone No. 6D12)	10 μg	55,000
KH002	Anti AGE monoclonal antibody Fab' Peroxidase	20 μg	70,000

Topics on Chemistry

酸素ラジカルと8-オキソグアニン

(株)同仁化学研究所 富永 英之

好氣的代謝を行う生物は酸素を利用することにより、大量のATPを産生し、大きな力を手に入れることができた。しかしその代償としてスーパーオキシドやヒドロキシラジカルなどのROS (Reactive Oxygen Species) の脅威に身をさらすことになった。ROSは生細胞中で代謝物として持続的に形成し、外的因子からもたらされ、DNAと反応し、塩基損傷などのDNA障害が起こる。

酸素ラジカルによる障害の種類は数十種類に及ぶが、グアニンのプリン環の8位が酸化された8-オキソグアニンはこれまで最もよく研究されている障害の一つである。8-オキソグアニンはUV、ionizing irradiationや酸素ラジカルを生成するような変異原化学物質で細胞を処理後に増加することが観察されている。8-オキソグアニンがもたらすDNA障害は癌や老化の一因と考えられている。よって、酸素ラジカルで生成した8-オキソグアニンは効率よくDNAから除去されなくてはならない。ヒトでは8-オキソグアニン-DNAグリコシラーゼ (hOGG1) が精製され、塩基除去修復 (Base excision repair) の研究に寄与している。塩基除去修復には二つの経路があり、一つはポリメラーゼ (pol) によって行われる経路で^{1,2)}、もう一つはPCNA (proliferating cell nuclear antigen) に依存する経路である^{2,3)}。

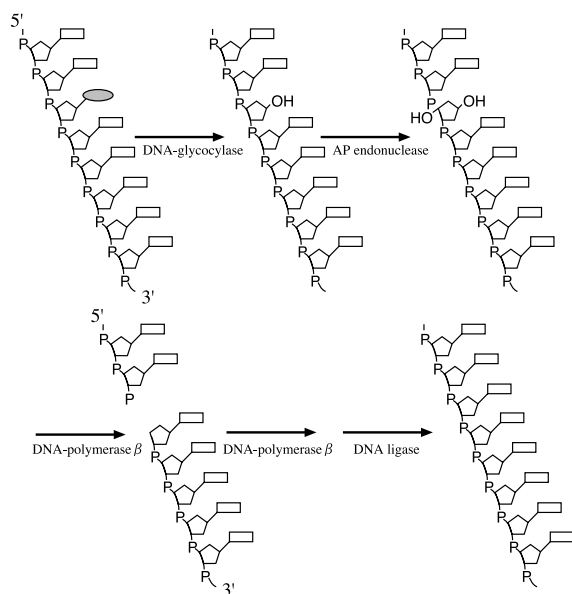


Fig.1 pol 依存性の塩基修復

pol 依存性の塩基修復の概要についてはFig.1に示す。

まずDNAグリコシラーゼが損傷塩基を認識除去し、塩基脱落部位 (AP site; apurinic/aprimidinic site) が出現する。そのAP siteはAPエンドヌクレアーゼにより認識され、塩基の脱落した糖の5'位を切断し、DNAポリメラーゼ (pol) が働く。ここで働くpolはDNA合成を行う酵素であるが、合成する前にAP siteに残っているデオキシリボースリン酸基の5'位の脱離を触媒すると言われており、脱離によって生じるヌクレオチドギャップをDNA合成で埋めていく。DNAリガーゼにより切れ目 (nick) が繋がれて修復

は完了する¹⁾。

pol 欠損細胞の抽出物ではこの修復機構は働かなくなり、PCNA依存性の塩基修復が主要な修復経路となる^{3,4)}。PCNA依存性経路はDNAグリコシラーゼやAPエンドヌクレアーゼの他にフラップエンドヌクレアーゼであるPCNA、DNAポリメラーゼ (pol) とDNAリガーゼが構成している。DNAポリメラーゼが修復部位の3'末端側に結合し、その後フラップエンドヌクレアーゼが修復部位の5'末端のデオキシリボースリン酸に作用し、修復が実行されていく。最後にDNAリガーゼによって繋ぎ合わされる。これらの結果、2~5個のヌクレオチドの長さの修復を行う (Fig.2)。

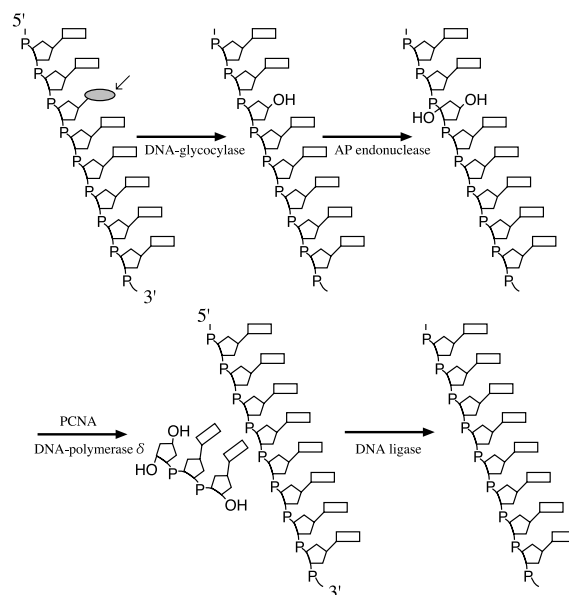


Fig.2 PCNA依存性の塩基修復

これらの塩基修復は塩基除去と複製を繰り返しながら行われていく。また、ヌクレオチドの立体配位は、その核酸を構成する塩基と糖残基の間の結合のねじれの角度によりsyn型とanti型に分けられるが、8-オキソグアニンはsyn型であるためにanti型のアデニンと高頻度にペアをなす (Fig.3)。このように本来グアニンはシトシンとペアになるべきであるが、8-オキソグアニンはアデニンともシトシンともペアとなる。このことより、もともとA:TのペアがC:Gペアに変換するトランスポージョン変異を誘導し、いわゆるミスマッチ修復となる^{5,6)}。8-オキソグアニンの排除修復に対して大腸菌から見い出された三つの蛋白質 (MutM, MutY, MutT) が着目され、トランスポージョン変異を伴う修復に関する研究も数多く行われている⁷⁻⁹⁾。

MutM⁷⁾ (8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼ) はシトシンと8-オキソグアニンとのペアに作用し、8-オキソグアニンを除去する蛋白質であり、MutY⁸⁾ (アデニンDNAグリコシラーゼ) はアデニンと8-オキソグアニン、またはアデニンとグアニンのミスペア

に作用し、アデニンを除去する。MutT⁷⁾(8-オキシ dGTPase) は8-オキシ dGTPを8-オキシ dGMPに分解し、8-オキシグアニンがDNAに組み込まれるのを抑制する。A:T C:GトランスバージョンとMutMTYとの関係についてはFig. 4 にまとめる。

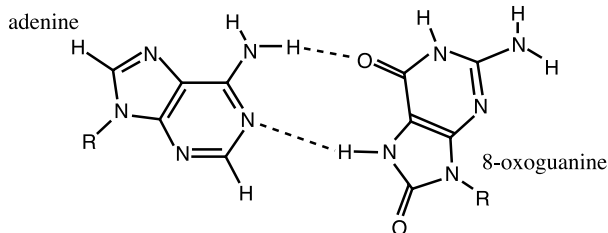


Fig. 3 anti型アデニンとsyn型8-オキシグアニン

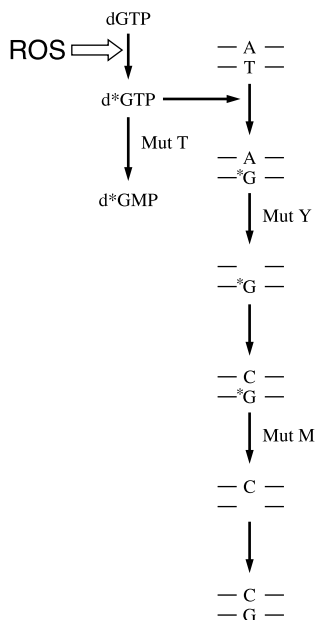


Fig. 4 A:T C:GトランスバージョンとMutMTY
A: アデニン、T: チミジン、C: シトシン、G: グアニン、
*G: 8-オキシグアニン

MutTで分解できなかった8-オキシ dGTPがA:Tに作用し、A:*Gのペアが複製される。MutYがアデニンを除去し、複製後、MutMがC:*Gペアの8-オキシグアニンを除去する。複製後、A:TペアはC:Gに変換した修復となる。

これらの三つの蛋白質のうちMutTだけが8-オキシ dGTPに作用するために、A:T C:Gトランスバージョンを起こさずに、修復することができる。しかし、MutTは全ての8-オキシ dGTPを8-オキシ dGMPにすることはできない。また、DNA鎖上のグアニンが8-オキシグアニンに変異してしまうとMutTでは修復のしようがない。よってA:T C:Gトランスバージョンは伴うがMutM、MutYは8-オキシグアニンから守るという点では重要な蛋白質である。

MutMTYは大腸菌由来であるが、ヒトの細胞においてもMutTと類似性蛋白質が確認されており¹⁰⁾、ヒトにおいても大腸菌と類似した損傷修復機能が働いている。MutM、MutYについても類似物

質が存在し^{11,12)}、種を超えた修復機構であると考えられる。DNA修復に関してはこれ以外にも多種の遺伝子・蛋白質などが関与している。酸素ラジカルがミトコンドリアにも働いているという報告もされている。これからの研究の発展を期待したい。

参考文献

- 1) A. Klungland, T. Lindahl, *EMBO J.*, 16, 3341-3348 (1997)
- 2) 松本吉博, 実験医学, 14, 1548-1552 (1996)
- 3) S. Biade, R. W. Sobol, S. H. Wilson, Y. Matsumoto, *J. Biol. Chem.*, 273, 898-902 (1998)
- 4) 康 東天, 竹重公一朗, 生化学, 68, 289-294 (1996)
- 5) S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollman, *Nature*, 349, 431-434 (1991)
- 6) H. Maki, M. Sekiguchi, *Nature*, 355, 273-275 (1992)
- 7) J. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M. H. Chung, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4690-4694 (1991)
- 8) K. G. Au, S. Clark, J. H. Miller, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2709-2713 (1991)
- 9) C. Yanofsky, E. C. Cox, V. Horn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7022-7025 (1992)
- 10) K. Sakumi, M. Furuichi, T. Tsuzuki, T. Kakura, S. Kawabata, H. Maki, M. Sekiguchi, *Biochemistry*, 34, 89-95 (1998)
- 11) J. P. McGoldrick, Y. C. Yeh, M. Solomon, J. M. Essigmann, A. L. Lu, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 989-996 (1995)
- 12) T. Bascho, K. Tano, H. Kasai, E. Ohtsuka, S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 268, 19416-19421 (1993)

弊社では、ここで紹介したAP siteに着目し、DNA損傷部位ビオチン化キットを発売しました。詳細については本号の新製品案内をご覧ください。

お知らせ

会員専用ページのご案内

ホームページに会員専用ページを開設しました。会員ページは、お客様と同仁化学研究所とのより密接な関係づくりを目的とした登録無料のページです。掲載は「キャンペーンのご案内」「特許情報」「試作品の提供」など最先端情報が盛りだくさんです。皆様のご研究のお役にたてれば幸いです。会員ページに入るためには、ID及びパスワードが必要ですので、下記方法に従い、登録を行ってください。ご研究者若しくはその関連の方に限定させていただきます。

《会員登録方法》

- 1) 同仁化学ホームページ右上の「会員のページ」を押す。
- 2) 「会員登録をする」ボタンが現れる。
- 3) 「会員登録をする」を押す。
- 4) 登録画面に必要事項を記入。
- 5) 「Submit」ボタンを押す。

以上で登録操作は終了です。後ほど、同仁化学からID及びパスワードをメールにてお送り致します。

お問い合わせにつきましては、info@dojindo.co.jpまでお寄せください。

新製品

DNA損傷部位ビオチン化キット

ARP Kit -DNA損傷部位ビオチン化キット (AP Site) -
 347-07861 1プレート用 ¥29,000-

【はじめに】

生物の遺伝情報を保持しているDNAは、複製時のDNA polymeraseのエラーに加えて、環境中の放射線や紫外線、またはアルキル化剤等の化学物質、生体内における活性酸素等の代謝産物により損傷を受けます。これらのエラーや損傷が正しく修復されなければ突然変異を誘発し、これが癌や老化の原因となります。

DNA損傷部位には修復機構が働き、その一つとして塩基除去修復があります。この時AP site (apurinic / apyrimidinic site) と呼ばれる塩基除去部位が出現します。よってAP siteを検出することはDNA損傷部位を測定し得る有効な方法となります。

ARP (N'-Aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin) はこのAP siteと特異的に結合し、ビオチン化できる試薬として知られています。ARP Kitは、ARPを用いてDNAをビオチン化し96穴マイクロプレートに固相化して検体DNA中のAP siteを簡便に定量するキットです。

このキットには、AP site数が規定された標準DNAが含まれておりますので、既存のビオチン検出法を用いることによってAP siteの定量ができます。

1. キット内容

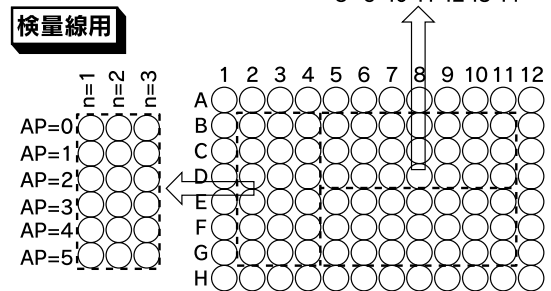
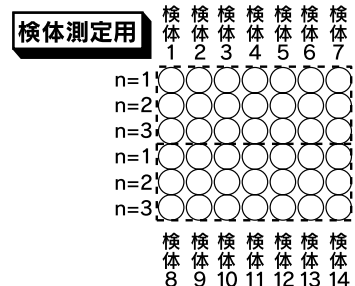
標準ARP-DNA (5 AP sites / 10,000 nucleotides, 0.2 μg/ml)	3 ml
希釈用ARP-DNA (0 AP sites / 10,000 nucleotides, 0.2 μg/ml)	3 ml
BSA (ブロッキング用)	0.8 g
PBS (BSA希釈用)	40 ml
ARP	5 mg
アミノプレート	1 枚

保存方法：冷蔵保存, 安定性：6ヶ月間 (4 保存)

2. 推奨レイアウト

プレートを右上図の様に標準DNAを用いた検量線用のエリアと、検体測定用のエリアにレイアウトして測定を行います。

このキットでは以下のレイアウトで最大14種類の検体が測定できます。ここでは、検体の測定について n = 3 で設定しておりますが、n = 6とした場合はこのプレートで測定することができる検体数は7検体になります。また、このレイアウトでは周縁のウェルを使用しておりません。これは次頁に記載しております96穴マイクロプレート周縁効果を防ぐためです。



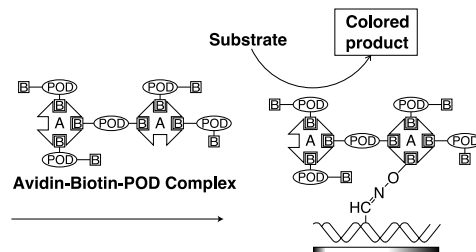
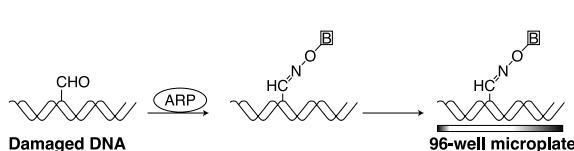
3. 測定原理

- 1) 検体DNAのAP siteをARPで選択的に標識します。
- 2) ARP標識検体DNAと標準DNAを96穴マイクロプレートに固相化します。
- 3) ARPはビオチン構造を持つため、酵素標識したアビジンで認識されます。
- 4) アビジンの標識酵素活性を利用してAP site数を定量します。

注意)

- ・このキットはARPによってDNAのAP siteをビオチン化するキットです。よって、弊社ではビオチン化の過程 (操作手法 4 - 4) までを保証いたします。
- ・本プロトコルでは、ビオチンの検出方法として VECTASTAIN ABC Kit (PODタイプ) を使った系を載せていますが、その他のKit (POD conjugate Avidin, ALP conjugate Avidin等) を用いた常法でも使用可能です。ABC Kitを用いた場合、試薬の濃度や保存期間によって多少発色速度が変わってきます。
- ・ビオチン検出に発色試薬等を使う場合、その発色速度はペルオキシダーゼ (POD) 活性、発色温度、発色剤の組成等によって変わってきます。その際は、発色の度合いによって発色時間を調整して下さい。その他の諸条件によっても感度が変わってきますので、標準DNAとの比較は同一プレート上で同時に行って下さい。

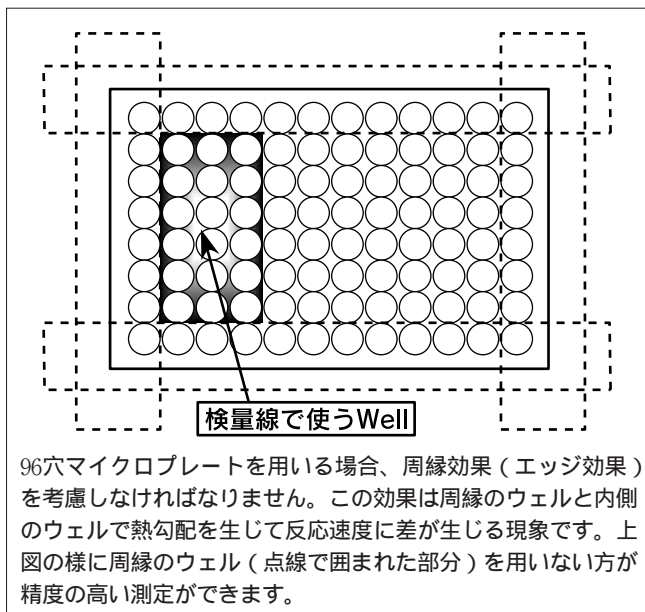
・ ARP kit 原理図



DNA損傷部位ビオチン化キット

4. 操作方法

この方法は、ウェルの底面に存在するアミノ基の陽イオン性を利用し、DNAを固相化します。よって短時間での固相化が可能ですが、他の検出試薬の非特異吸着を防ぐために、BSA等でのブロッキングを必要とします。キットに含まれるアミノプレートはコーニング・コースター製のものを使用しております。このプレートは、ストリップ型で1レーンずつ切り離して使用する事ができます。表面の活性を保つため、開封後は再び遮光、密閉して保存して戴きますよう、お願いいたします。



96マイクロプレートを用いる場合、周縁効果（エッジ効果）を考慮しなければなりません。この効果は周縁のウェルと内側のウェルで熱勾配を生じて反応速度に差が生じる現象です。上図の様に周縁のウェル（点線で囲まれた部分）を用いない方が精度の高い測定ができます。

4 - 1 試薬溶液の調製

- ・ ARP : キットに含まれているARP (5 mg) を1.5 mlの純水に溶解させる (以下「ARP溶液」とします)
- ・ ブロッキング用BSA溶液: キットに含まれているBSA (0.8g) にPBS 40 mlを加えて溶解する (2 %溶液)
- ・ TE-バッファー : Tris 10 mmol/l、EDTA 1 mmol/lになるように滅菌水に溶解し、6 mol/l HClでpHを7.5に調整し、オートクレーブ処理する。
- ・ PBST : Tween 20を0.1%になるようにPBS (137 mmol/l NaCl, 2.7 mmol/l KCl, 4.3 mmol/l Na₂HPO₄, 1.4 mmol/l KH₂PO₄) に溶解する。

4 - 2 検体DNAのARP標識

本キットの標準DNAの精製法は5章に記載しています。検体DNAの精製法もこの方法に準じて行ってください。

- 1) 検体DNAをTE-バッファーに溶解させ、溶液の吸光度 (260 nm) を測定する。その吸光度値から100 μ g/mlになるようTE-バッファーで希釈調製する。
(DNA濃度は50 μ g/mlのときの吸光度を1.0として算出。)

- 2) 検体DNA溶液100 μ lにARP溶液100 μ lを添加する。
- 3) 37 °C、1時間反応させる。
- 4) 200 μ lのイソプロピルアルコールを添加し、-30 °Cで50分間冷却する。
(DNAの回収は汎用的なエタノール沈殿法でも可能です。)
- 5) 遠心分離しDNAを沈降させる (10,000 xg, 15分間)
- 6) 上層のイソプロピルアルコールを捨て、75 % エチルアルコール200 μ lを添加し、再び遠心分離しDNAを沈降させる (10,000 xg, 15分間)
- 7) 上層の75 % エチルアルコールを捨て、遠沈管のDNAを風乾する。(室温, 5分間)
- 8) TE-バッファーを1 ml添加し再び溶解してDNA溶液とする。
(約10 μ g/ml)
- 9) このDNA溶液の吸光度 (260 nm) を測定し、1)と同様にDNA濃度を算出する。
- 10) TE-バッファーにより、DNA 濃度が0.2 μ g/mlになるように希釈し、検体DNA溶液とする。

dsDNAは、陰イオン性のため、タンパクの固相化等に用いられるポリスチレン表面のプレートにはほとんど吸着しません。DNAをプレートに固相化させる方法は多く紹介されていますが、このキットではアミノプレートに固相化させる方法を用いております。この方法は、比較的バックグラウンドが低く、再現性も高い方法です。

4 - 3 AP sites標準液の調製

キットに含まれる標準ARP-DNAと希釈用ARP-DNAを下記のように混合し、0 ~ 5 AP sites標準液を調製します。

AP sites / 10,000 nucleotides	0	1	2	3	4	5
標準ARP-DNA (μ l)	0	200	400	600	800	1000
希釈用ARP-DNA (μ l)	1000	800	600	400	200	0

4 - 4 DNAの固相化方法

- 1) 同梱のアミノプレートを開封し、4 - 2でARP化した検体DNA溶液を1ウェルにつき、200 μ l添加する。また、比較用として別のウェルに4 - 3で調製した標準DNAを濃度の順に添加しておく。
- 2) 37 °Cで1時間インキュベートする。
- 3) PBSTでプレートを10回洗浄する。
- 4) ブロッキング用BSA溶液を1ウェルにつき、300 μ l添加する。
- 5) 37 °Cで2時間インキュベートする。
- 6) PBSTでプレートを10回洗浄する。

注意) プレートの洗浄によって、バックグラウンドの吸光度が大きく変わってきますので、十分に洗浄液をきってください。以下の洗浄も同様に行ってください。

DNA損傷部位ビオチン化キット

4 - 5 発色方法

4 - 4 で固相化したプレート上のビオチン化AP siteは、通常のビオチン検出法で発色させ検出することができます。ここではアビジン - ビオチン - PODコンプレックス (ABC試薬, Vector社製) でビオチンを認識し、そのペルオキシダーゼ (POD) 活性によって基質 (*o*-フェニレンジアミン (OPD) SAT-blue) を発色させる方法を記載しております。なおSAT-blueは弊社で市販しているPOD基質のことを指します。

- 1) 1 ウェルにつき、200 μ l のABC試薬 (使用法に記載されている濃度に希釈しておく) を添加する。
- 2) 37 °C で1時間インキュベートし、ビオチンとABC試薬を反応させる。
- 3) PBSTで10回洗浄する。
- 4) POD発色基質溶液 (OPD + H₂O₂またはSAT-blue溶液) を1 ウェルにつき、160 μ l 添加する。
- 5) 30分間、37 °C にて反応させる。
- 6) 4 mol/l H₂SO₄ を40 μ l 加えて、反応を停止させる。
- 7) 490 nmにおける吸光度を測定する。

標準DNAの吸光度から検量線を作成し、AP site数を算出する。バックグラウンドを補正した標準DNAの検量線を下図に示す。

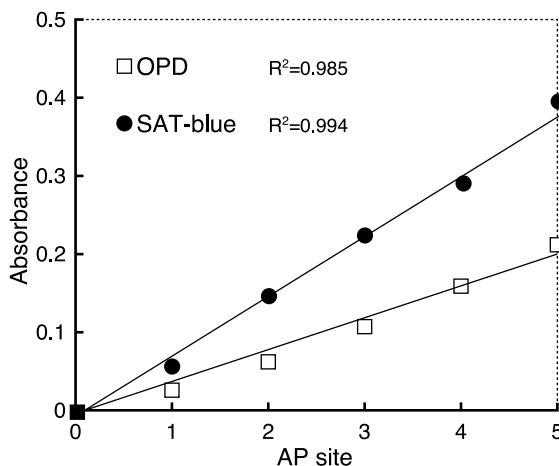


Fig. SAT-blue, OPDによる AP siteの検出

5 . DNAの精製法

標準DNAを調製した際の方法を以下に記載します。

5 - 1 試薬

- ・牛胸腺DNA (市販品)
- ・タンパク変性用溶液 20ml
 - 4 mol/l グアニジンチオシアネート
 - 25 mmol/l クエン酸ナトリウム
 - 0.5% ラウロイルサルコシン ナトリウム
 - 0.15 mol/l 2-メルカプトエタノール

- ・TE-バッファー：滅菌水にTrisが10 mmol/l、EDTAが1 mmol/lになるように溶解し、6 mol/l HClでpHを7.5に調整し、オートクレーブ滅菌する。
- ・TE-飽和フェノール：70 °C で融解させたフェノールに等量のTE-バッファーを加えて攪拌後、静置して、2層分離したところで下層のフェノールを分離する。再びTE-バッファーを加えてフェノール層のpHが7.5になるまで上記の操作を続ける。
- ・フェノール/クロロホルム溶液：TE-飽和フェノールに等量のクロロホルムを加える。
- ・酢酸ナトリウム溶液：3 mol/l 酢酸ナトリウム水溶液を酢酸でpH 5.2に調整する。
- ・RNase 溶液：市販のRNaseを滅菌水で希釈し10 mg/mlに調整する。
- ・AP-バッファー：滅菌水にクエン酸ナトリウムが10 mmol/l、塩化ナトリウムが100 mmol/lになるように溶解し、6 mol/l-HClでpHを5.0に調整した。
- ・イソプロピルアルコール
- ・75% エチルアルコール

5 - 2 精製操作法

- 1) 50 mlのポリプロピレン製遠沈管 に市販の牛胸腺DNAを20 mg秤量して20 ml のタンパク変性用溶液を添加し、DNAが溶解するまで4 分で振とうする。DNAは繊維状であり、溶解しにくいので細かく割いて、緩やかに振とうしながら溶解する。

* DNAはガラスに吸着し易いため、使用する容器の材質はポリプロピレンをお勧めします。
- 2) 20 mlのTE-飽和フェノールを添加し、室温で1時間振とうして混和する。更に10 mlのクロロホルムを加え室温で30分間混和する。
- 3) 3,000 xgで15分間遠心分離し、上層をピペットで回収する。(上層と下層の間に白い変性蛋白質が現れるので上層に混入しない様にピペットで回収してください。)
- 4) そこに12 mlのフェノール/クロロホルムを添加し15分間混和して再び3,000 xgで15分間遠心分離し、中間層の変成蛋白質が無くなるまで数回操作を繰り返す。
- 5) 20 mlイソプロピルアルコール、4 mlの3 mol/l 酢酸ナトリウムを添加し-20 °C で50分間静置する。
- 6) 0 °C に冷却しながら10,000 xgで15分間遠心分離し沈殿を回収する。
- 7) 沈殿を75%エチルアルコールで2、3回洗浄して塩を除く。エチルアルコール層を吸い取った後、室温でエタノールを風乾させる(乾燥させすぎるとDNAの溶解性が落ちますので注意してください)。DNAを再び20 mlのTE-バッファーに溶解する。
- 8) RNase 溶液を20 μ l 添加し37 °C で2時間反応させる。

DNA損傷部位ビオチン化キット

- 9) 12 mlのフェノール/クロロホルムを添加し、30分振とう後3,000 xgで15分間遠心分離し、上層を回収して2 mlのクロロホルムを添加する。この操作を2回行った後、3,000 xgで15分間遠心分離し、上層を回収する。
- 10) 20 mlイソプロピルアルコール、4 mlの3 mol/l 酢酸ナトリウムを添加し、-20 で50分間静置し、0 に冷却しながら、10,000 xgで15分間遠心分離し沈殿を回収する。
- 11) 沈殿を75%エタノールで2、3回洗浄して塩を除く。エタノール層を吸い取った後、室温でエタノールを風乾させる(乾燥させすぎるとDNAの溶解性が落ちますので注意してください)。DNAを再び20 mlのTE-バッファーに溶解しDNA溶液とする。

参考文献

- 1) Sancar, A. and Sancar, G. B., *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 29-67 (1988)
- 2) Lindahl, T. and Nyberg, B., *Biochemistry*, 11, 3610-3618 (1972)
- 3) Liuzzi, M. and Talpaert-Borle, M., *J. Biol. Chem.*, 260, 5252-5258 (1985)
- 4) Weinfeld, M., Liuzzi, M. and Paterson, M. C., *Biochemistry*, 29, 1737-1743 (1990)
- 5) Chen, B. X., Kubo, K., Ide, H., Erlanger, B. F., Wallace, S. S. and Kow, Y. W., *Mutat. Res.*, 273, 253-261 (1992)

ARP Kit Q&A

発色にはアビジン-POD試薬、POD検出用発色試薬が別途必要になります。これらの試薬は、メーカーの違いや保存期間によってそれぞれ活性が違ってきます。つきましては、別のウェルで活性を確認していただく必要がございます。

Q 1 : 発色しないのですが、どうしてでしょうか？

A 1 : コンジュゲートPODは失活していませんか？ 一般的に期限の限られている試薬が多いので、用いている試薬が古ければ、試薬を交換して試してください。

A 1 : 発色試薬の過酸化水素は失活していませんか？ 新たに過酸化水素を入れて確認してみてください。

Q 2 : 検量線がばらつくのですが、なぜでしょうか？

A 2 : PBSTによる洗いが不十分な場合にばらつきます。ウェルにあふれる位まで洗浄液を入れ、液を吸い取ります。その後、敷いたキムワイプ上などで叩いて洗浄液を十分にきるようにしてください。

Q 3 : バックグラウンドが高いのですが、低くする方法はありませんか？

A 3 : ABC試薬等のPODコンジュゲートアビジン試薬が非特異吸着していることが考えられます。Q 2 に準じ十分に洗浄操作を行ってください。

A 3 : ブロッキングが十分でないことが考えられます。ブロッ

キングはウェルの側壁まで行う必要があります。よって、1ウェルに300 µl以上ブロッキング液を入れてください。

Q 4 : 操作を2日に分けて行いたいのですが、どの段階で中断すればいいですか？

A 4 : ブロッキング液を入れた状態であれば、1晩おいても変りない結果が得られます。常温で放置しておくようにしてください。

Q 5 : ブロッキングの時の温度は何度に設定すればいいのでしょうか？

A 5 : ブロッキングは37で行ってください。また、一晩置く場合は常温で行ってください。4で放置した場合は、十分なブロッキング効果が得られない場合がございます。

Q 6 : ABC試薬の濃度は、どのくらいにすればよろしいのでしょうか？

A 6 : Vector社のマニュアルには1%に調製するようになっていますが、保存期間やLOT間で感度に差が生じてきます。濃度にほぼ比例して感度(検量線の傾き)が上昇しますので、感度を調整する時は、ABC試薬の希釈率を変えて行ってください。

Q 7 : 標準DNAはどのくらい安定でしょうか？

また、最適な保存方法を教えてください。

A 7 : 溶液状態でも冷蔵保存しておけば、感度、DNA濃度共に1年以上安定です。冷凍すると1回の凍結・融解操作で感度が数%落ちますので、保存は冷蔵にてお願いします。

Q 8 : ARPの溶液での安定性はどのくらいでしょうか？

A 8 : 水溶液の状態ではアミノオキシ基が次第に失活しますので、溶液での長期保存はできません。純水に溶解後は冷蔵で保存し、1週間以内に使い切るようにしてください。

Q 9 : 吸光度が振り切れてしまう場合はどうすればいいのでしょうか？

A 9 : エンハンサを含む発色試薬等は感度が高い為、振り切れてしまう場合があります。その時は、試薬を希釈して使ってくださいか、ABC試薬を希釈してお使いください。

お知らせ

新規容量追加のご案内
従来包装に加えて、下記容量の製品を追加しました。

キレート試薬				
コード番号	品名	容量	価格(¥)	
342-01314	GEDTA (EGTA)	100g	24,800	
細胞増殖・細胞毒性測定用試薬				
コード番号	品名	容量	価格(¥)	
349-01824	MTT	5g	44,000	

新製品

組織染色用試薬溶液

TMBZ solution
AEC solution
DAB solution
BCIP / Nitro-TB solution

- 特長1 粉末計量の必要なしに調製できる
 特長2 保存安定性に優れている
 特長3 安全性が高い

組織染色やイムノプロット等では、様々な酵素基質が用いられています。しかし、これらの基質の中には体内への蓄積性や変異原性の危険を持つ試薬も含まれており、また、一般にこれらの試薬は溶液にした場合その溶液安定性が悪い場合用時調製を余儀なくされます。今回、弊社で溶状タイプ4種を開発しました。

TMBZ solution (1液系POD基質)

Western, Northern, Southern Blottingにおいて、PODラベル化されたプローブを検出することができ、反応によって安定な濃青色の沈殿物を生じます。

《包装》100 ml

《組成》TMBZ : 1.13 mmol/l, H₂O₂: 1.91 mmol/l, DMSO : 1%未満, 80 mmol/l 酢酸緩衝液, pH = 4.9, 安定化剤

《保存》室温

《操作法》

- 1) HRP標識のプローブを使って最終的な固定化を行った後、0.1%のTween 20を含んだリン酸緩衝液でよく洗う。
- 2) 最終的な洗浄が終わったら本溶液を加え緩やかに揺り動かしながら、5 - 30分インキュベートする。
- 3) 純水で洗浄し発色反応を停止する。
- 4) 乾燥メンブランは遮光して保存する。

AEC solution (2液系POD基質)

免疫組織染色、イムノプロット、またはドットプロットで使用可能。3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) はDAB程感度は高くないものの赤色の沈着を呈するため、2重染色などにおいて有用です。

《包装》AEC濃縮液 2.0 ml, AEC濃縮緩衝液 10 ml

《組成》AEC: 95 mmol/l, 安定化剤 (AEC濃縮液)

《保存》室温

《操作法》

- 1) 希釈用緩衝液を純水で10倍に希釈する。
- 2) AECの濃縮液を1)の希釈緩衝液で50倍に希釈する。

- 3) 組織切片等を固定化したカバーガラスに2)の発色液を加え、10~30分室温(23-28)でインキュベートする。
- 4) 発色を確認した後、組織等を純水で洗浄し、反応を停止する。
- 5) 染色した組織等は遮光して保存する。

DAB solution (2液系POD基質)

最も頻りに用いられているDABの溶液で、POD標識の抗体を用いた免疫組織染色、プロットに用いることができ、紫色または褐色の染色をすることができます。

《包装》DAB濃縮液(25倍) 4 ml, 希釈緩衝液 100 ml

《組成》DAB: 69.2 mmol/l, 安定化剤 (DAB濃縮液)

《保存》冷蔵

《操作法》

- 1) 希釈液: DAB濃縮液を50:2に遮光下で混合する。
- 2) 組織切片等を固定化したカバーガラスに1)の発色液を加え、5~15分室温(23-28)でインキュベートする。
- 3) 発色を確認した後、組織等を純水で洗浄し反応を停止する。
- 4) 染色した組織等は遮光して保存する。

BCIP / Nitro-TB solution (1液系ALP基質)

5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate / Nitroterazolium blue (Nitro-TB) を発色試薬に用いたアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗体検出用基質溶液。ALPを標識酵素とした組織染色、プロットに用いる事ができ、酵素活性によって青紫の不溶沈殿を生じます。

《包装》100 ml

《組成》BCIP : 0.69 mmol/l, Nitro-TB: 0.73 mmol/l / 2-Amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 9.8)

《保存》室温

《操作法》

- 1) アルカリフォスファターゼ標識のプローブを使って最終的な固定化を行った後、0.1%のTween 20を含んだTris/HCl緩衝液でよく洗う。
- 2) 最終的な洗浄が終わったら本溶液を加え緩やかに揺り動かしながら、遮光下で5 - 15分インキュベートする。
- 3) 純水で洗浄し発色反応を停止する。
- 4) 乾燥メンブランは遮光して保存する。

コード番号	品名	容量	価格(¥)
Request	TMBZ solution	100ml	13,000
Request	AEC solution	1set	18,000
Request	DAB solution	1set	17,000
Request	BCIP / Nitro-TB solution	100ml	11,500

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
 E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
 フリーダイヤル 0120-489548