

自己組織化単分子膜(SAMs)をつくりたい

使用製品

One shot type

NTA-SAM Formation Reagent	[N475]
Biotin-SAM Formation Reagent	[B564]
Carboxylic acid-SAM Formation Reagent	[C488]
Amine Coupling Kit	[A515]

Amino type

Amino-EG ₆ -undecanethiol, hydrochloride	[A483]
Amino-EG ₆ -hexadecanethiol, hydrochloride	[A505]
16-Amino-1-hexadecanethiol, hydrochloride	[A458]
11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride	[A423]
8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride	[A424]
6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride	[A425]

Carboxy type

Carboxy-EG ₆ -undecanethiol	[C445]
Carboxy-EG ₆ -hexadecanethiol	[C463]
15-Carboxy-1-pentadecanethiol	[C429]
10-Carboxy-1-decanethiol	[C385]
7-Carboxy-1-heptanethiol	[C386]
5-Carboxy-1-pentanethiol	[C387]
10-Carboxydecyl disulfide	[C404]
7-Carboxyheptyl disulfide	[C405]
5-Carboxypentyl disulfide	[C406]

Carboxy disulfide type

4,4'-Dithiodibutyric acid	[D524]
Dithiobis(succinimidyl undecanoate)	[D537]
Dithiobis(succinimidyl octanoate)	[D538]
Dithiobis(succinimidyl hexanoate)	[D539]

Ferrocenyl type

11-Ferrocenyl-1-undecanethiol	[F246]
8-Ferrocenyl-1-octanethiol	[F247]
6-Ferrocenyl-1-hexanethiol	[F269]

Hydroxy type

Hydroxy-EG ₃ -undecanethiol	[H354]
Hydroxy-EG ₆ -undecanethiol	[H355]
Hydroxy-EG ₃ -hexadecanethiol	[H395]
Hydroxy-EG ₆ -hexadecanethiol	[H396]
16-Hydroxy-1-hexadecanethiol	[H394]
11-Hydroxy-1-undecanethiol	[H337]
8-Hydroxy-1-octanethiol	[H338]
6-Hydroxy-1-hexanethiol	[H339]

Amido type

10-Amido-1-decanethiol	[A510]
7-Amido-1-heptanethiol	[A509]
5-Amido-1-pentanethiol	[A508]

その他のアルカンチオール類

Sulfobetaine3-undecanethiol	[S350]
-----------------------------	--------

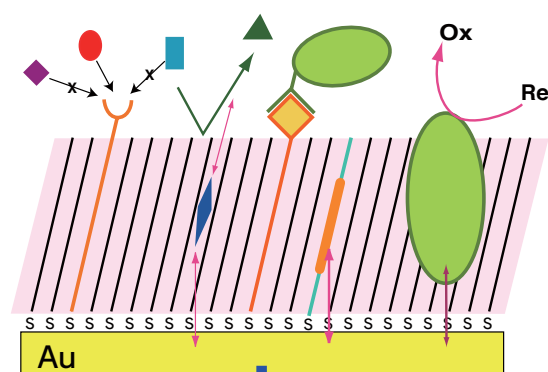
NTA type

Dithiobis(C ₂ -NTA)	[D550]
--------------------------------	--------

I はじめに

固体表面に結合、集積し、自発的にナノレベルの薄膜を形成する自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers; SAMs) は、その作製の簡便さと、用途の広さから、近年盛んに研究されている。チオールやジスルフィドの誘導体は金¹⁻⁵⁾、銀^{4, 6, 7)}、銅^{4, 8, 9)}、パラジウム^{10, 11)}、白金¹²⁻¹⁴⁾等の貴金属表面に高密度な薄膜を形成することが知られており、特に金基板上的チオールやジスルフィドの形成する SAMs は、SPR¹⁵⁻¹⁷⁾ や QCM¹⁸⁻²⁰⁾等のバイオセンサ、金ナノ粒子の機能化²¹⁻²⁴⁾、電子材料への応用 (リソグラフィ^{25, 26)}、光-電気変換^{27, 28)}、分子電子デバイス²⁹⁾など様々な用途で使用されている (図 1)。

ここでは、アルカンチオールやジスルフィド類が金属表面で形成する SAMs の特性とバイオセンサへの応用例について概説する。



電気化学的特性・光学特性・物理的特性の変化 (情報交換)

分子認識・検出/定量・生体メカニズム・デバイス化 etc.

図 1 自己組織化単分子膜の機能化の模式図

II SAMs 形成のメカニズム

SAMs を形成する分子の条件としては、1) 基板表面の金属原子と反応する官能基を有すること、2) 自己組織的に集合し、高密度な薄膜を形成する分子間相互作用を有することである。チオール誘導体の場合、1) はチオール (-SH) やジスルフィド (-S-S-) であり、Au-S のような強固な結合を形成する。2) はアルキル鎖間の van der Waals 力や芳香環間の π - π スタッキングである。

チオール誘導体の溶液に金基板を浸漬すると、Au-S の結合により、アルカンチオールが金基板に結合する。結合量が増え、密度が高くなると、分子間相互作用により、更に高密度に集積し、最終的に高配向な単分子膜が形成される。

図 2 はデカンチオールが Au(111) 面上で最密充填されたときの *in situ* STM 像とその模式図である。明るいスポット間の距離は 0.5 nm で、Au 原子間の距離 (0.29 nm) の $\sqrt{3}$ に対応している。単位格子が Au のその $\sqrt{3}$ 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、 $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ 構造と呼ばれる³⁰⁾。

アルカンチオール類は、Au(100)、Au(200)、Au(220)、Au(311) など様々な金の結晶面で SAM を形成することが知られており^{3, 31, 32)}、バイオセンサ作製など、用途によっては、必ずしも Au(111) の単結晶基板を用意する必要は無い。

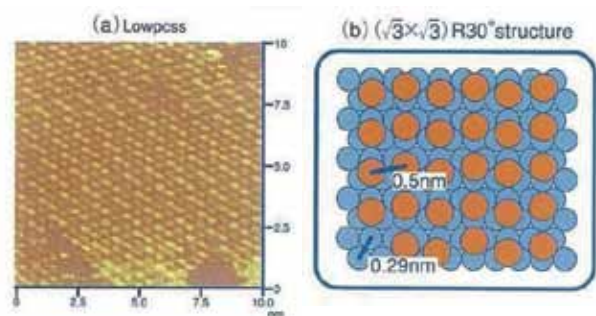


図 2 (a) Au(111) 上の C10SH SAM の *in situ* STM 像
(b) Au(111) 上の吸着したチオール分子の模式図
北海道大学 魚崎先生提供

III SAMs の調製法

SAMs の特長の一つは、その調製法が容易であることである。特殊な装置を必要とせず、適当な濃度の溶液に基板を浸漬するだけで、作製することができる。金基板への SAMs の調製法の概略と注意点は下記の通りである。

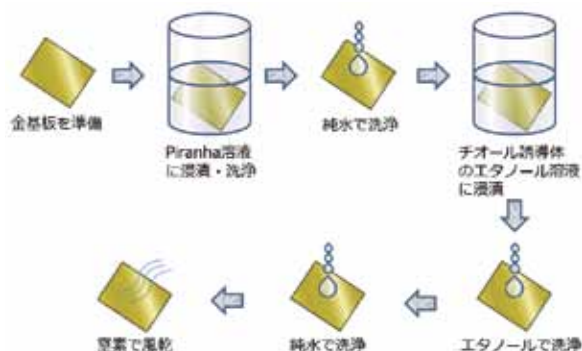


図 3 SAM 調製法

<調製法>

- (1) Piranha 溶液などで洗浄した金基板を用意する^{*1)}。
- (2) 数十 μ ~ 数 mmol/l のチオール誘導体のエタノール溶液に、数十分~数時間、金基板を浸漬し SAM を作製する^{*2)}。
- (3) エタノール、純水の順に金表面を洗浄する^{*3)}。
- (4) 必要であれば、基板表面を窒素雰囲気下で乾燥させ、保管する^{*4)}。

※ 1 Bare な金属表面は、有機物を吸着しやすく、SAM 形成前に何らかの方法で有機物を除去する必要がある。

金や白金の洗浄には Piranha 溶液 (硫酸 : 30% 過酸化水素水 = 3:1) の利用が便利である。Piranha 溶液に基板を 10 ~ 15 分間浸漬後、純水で洗浄するだけで、SAM 形成に使用できる基板を得ることができる。ただし、Piranha 溶液は強力な酸化力を持ち、多くの有機化合物と激しく反応するので、取扱い及び廃棄には注意が必要である。その他、特殊な装置が必要ではあるが、UV-オゾンによる洗浄も効果的であり、汎用されている。

金は SAMs の応用で最も汎用される金属基板である。その理由として、i) 入手が容易である、ii) 薄膜化、パターン化が容易である、iii) 酸化皮膜が形成され難い、iv) SPR、QCM、RAIRS やエリプソメトリーなどの分析機器の一般的な基板である、ことなどが挙げられる。その他の金属でも SAMs の形成は可能であるが、酸化皮膜の形成には注意が必要である。詳細は論文^{4, 6-14)}を参照いただきたい。

※ 2 SAM の形成には、チオール誘導体の濃度、浸漬時間、溶媒、浸漬温度などが影響する。

<濃度と浸漬時間>

濃度と浸漬時間は互いに関連するパラメータである。低濃度のチオール溶液ではより長い浸漬時間を必要とする^{33, 34)}。mmol/l オーダーの濃度では、~数分で高密度のチオール誘導体が基板に結合し、数時間で再配向し、結合量が最大となる。濃度が高いほど、SAM 形成のための時間は短くなるが、低濃度で長時間浸漬する方が、より配向性の高い SAMs が得られるといわれている。

<溶媒>

溶媒としてはエタノール以外にも、チオール誘導体が均一に溶解する溶媒であれば使用可能である。エタノールは様々な極性や分子量のチオール類を溶解すること、高純度品が入手できること、毒性が低いこと、などから汎用されている。溶媒の効果については、あまり調べられてはいないが、非極性の溶媒で作製された SAMs はエタノールで作製された SAMs よりも、配向性が悪いとの報告もある^{33, 35)}。

また、活性基を有するチオール誘導体を使用する場合は化学反応しない溶媒を選択する必要がある。溶媒中の溶存酸素は金基板で用いる場合には大きな影響は無いが、それ以外の酸化を受けやすい金属基板を用いる際は、留意が必要である。

<温度>

25°C 以上で SAM 形成すると、形成速度が上がり、SAM の欠陥が減少することが知られている^{35, 36)}。室温よりも高い温度では、不純物の脱着が促進され、再配向が加速される。

※ 3 Dithiobis(succinimidyl undecanoate) など、水で分解する可能性のあるものは水洗しない。適切な溶媒で洗浄し、乾燥させるだけに留める。

※ 4 作製した SAM 修飾基板を保存する場合、溶媒に浸漬した状態ではなく、乾燥状態で保管の方が安定である³⁷⁾。また、チオール部位の酸化を防止するため、窒素置換、遮光での保存が望ましい。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

IV アルカンチオール誘導体の分子構造の影響

SAM を形成するアルカンチオール誘導体は、(1) チオールまたはジスルフィド、(2) アルキル鎖長、(3) 末端官能基、(4) オリゴエチレングリコール含有などの構造上の違いにより、種々の特性を持つ SAMs を形成する。また、異なる誘導体を複数用いる「混合 SAMs」によっても、SAMs の特性をコントロールすることが可能である。

(1) チオールとジスルフィドの違い

金上でチオールやジスルフィド誘導体から形成される SAMs は、それぞれ同様の構造であることが知られている³⁸⁻⁴⁰⁾。同様の Au-S 構造をとる場合、チオールでは水素が発生すると考えられるが、検出された例が無いなど、不明な点もある。ジスルフィドに比べ、チオールは分子量が半分であり、溶解性で有利なことから、一般的にはチオールが用いられることが多い。しかしながら、末端官能基がチオールと反応性である場合(活性エステルやマレイミドなど)にはジスルフィドとする必要がある(図4)。



図4 アルカンチオール、アルキルジスルフィド誘導体の模式図

(2) アルキル鎖長の影響

アルキル鎖長が長いほど、形成された SAMs の安定性は向上する。後に示す図 P-39-5 は種々の長さのアミノアルカンチオールで形成された SAMs の還元脱離を示したサイクリックボルタモグラムである。アルキル鎖長が長いほど、吸着種が金電極から外れにくく、安定な SAMs を形成していることが示唆される。

また、SAMs を介した電子移動を測定する場合にも、アルキル鎖長が大きく影響することが知られている⁴¹⁻⁴³⁾。

(3) 末端官能基

様々な官能基を有するアルカンチオール誘導体が、販売されており、用途に合わせ選択できる。親水化、撥水化など金属材料の表面改質から、バイオセンサでのタンパク質や抗原の固定化など、幅広い応用範囲がある。バイオセンサへの利用法に関しては、「VI .SAMs のバイオセンサへの応用例」に記載するので、参照頂きたい。

(4) オリゴエチレングリコール部位の効果

一般的に、疎水的な表面はタンパク質を吸着し易く、親水的な表面ほどタンパク質の吸着は抑えられる。オリゴエチレングリコール(-EG_nOH)は、水酸基(-OH)とアミド

(-CONH₂) の中間の極性を有するが、その極性以上に、非特異的な吸着が抑えられることが報告されている⁴⁴⁾。これは、オリゴエチレングリコール鎖の立体斥力の効果であると考えられており、非特異的な吸着の少ないセンサの作製に有効であることから、SAMs を用いたバイオセンサの作製にはオリゴエチレングリコール含有アルカンチオール類が汎用されている。

(5) 混合 SAMs

混合 SAMs の作製方法としては、複数のアルカンチオールの混合溶液を用いる方法と、非対称なジスルフィドを用いる方法がある。形成される SAMs の組成は、エネルギー的に安定な構造となるため、どちらの方法を用いても、当初の混合比率とは必ずしも一致しない。特に、異なるアルキル鎖長のチオール誘導体を用いると、より長いアルキル鎖長の比率が大きくなり⁴⁵⁾、同じ長さのもの同士が集まった相分離構造をとる⁴⁶⁻⁴⁸⁾。

混合 SAMs の有用な応用例の一つは、先に述べたオリゴエチレングリコール含有アルカンチオール類を用いたバイオセンサである。抗原や抗体を SAMs を介して基板に結合するためには、カルボキシル基やアミノ基を有するチオール誘導体を用いられる。それらを単独で用いると、静電的な相互作用による非特異吸着が起こるが、電荷を有しない末端水酸基のオリゴエチレングリコール含有アルカンチオールとの混合 SAMs として用いると、劇的に非特異吸着が抑制される⁴⁹⁾。

V SAMs の評価法

SAMs の形成過程や配向構造に関しては、走査プローブ顕微鏡 (STM/AFM)、X 線電子分光 (XPS)、エリプソメトリー、表面プラズモン共鳴 (SPR)、水晶共振子マイクロバランス (QCM)、接触角、サイクリックボルタメトリー (CV) などで詳細に検討されている。

以下に、CV で種々の長さのアミノアルカンチオール類の還元脱離を評価した例を紹介する。

< CV での SAM 還元脱離の評価 >

(1) 試薬

- ・11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride(Code: A423)
(以下 11-AUT,HCl)
- ・8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride(Code: A424)
(以下 8-AOT,HCl)
- ・6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride(Code: A425)
(以下 6-AHT,HCl)

(2) SAMs 作製方法

劈開したマイカの上に基板温度 350℃で金を真空蒸着した後、3 時間アニールして (111) 単結晶面を持つ金薄膜を作製する。作製した金薄膜(膜厚 1,000 Å 以上)を 30 秒間水素炎でアニールし(金表面の不純物を除去)、金 (111) 表面を得る。各チオールの 0.1 mmol / l エタノール(蒸留したエタノールを使用)溶液に 5 分間浸漬後、エタノール、超純水の順に金表面を洗浄する。

(3) CV による評価

1) 測定条件

作用電極: SAMs 修飾電極、参照電極: Ag/AgCl 電極 (KCl 飽和)、対極: Pt Plate、開始電圧: -0.1 V、最大掃引電圧: -0.1 V、最小掃引電圧: -1.3 V、掃引速度: 50 mV/sec、0.1 mol/l KOH 水溶液中、窒素雰囲気下で CV 測定した (測定前に 15 分間窒素バブリングを行ない、溶存酸素を除去した)。

2) CV より得られる知見

金電極上に SAMs を形成していることを、金表面からのチオレートアニオンの脱離に由来する不可逆なカソード電流の存在で確認することができる。

その不可逆なカソード電流の面積の積分値から、金電極表面の吸着種の吸着量を見積もることができる。図 5 のサイクリックボルタモグラムでは、アルキル鎖の異なる各アミノアルカンチオール塩酸塩の吸着量は、浸漬時間 5 分では鎖長にかかわらずほぼ 1.3 nmol/cm² であった。この結果から鎖長にかかわらず SAM 形成速度に変化がないことが推察される。

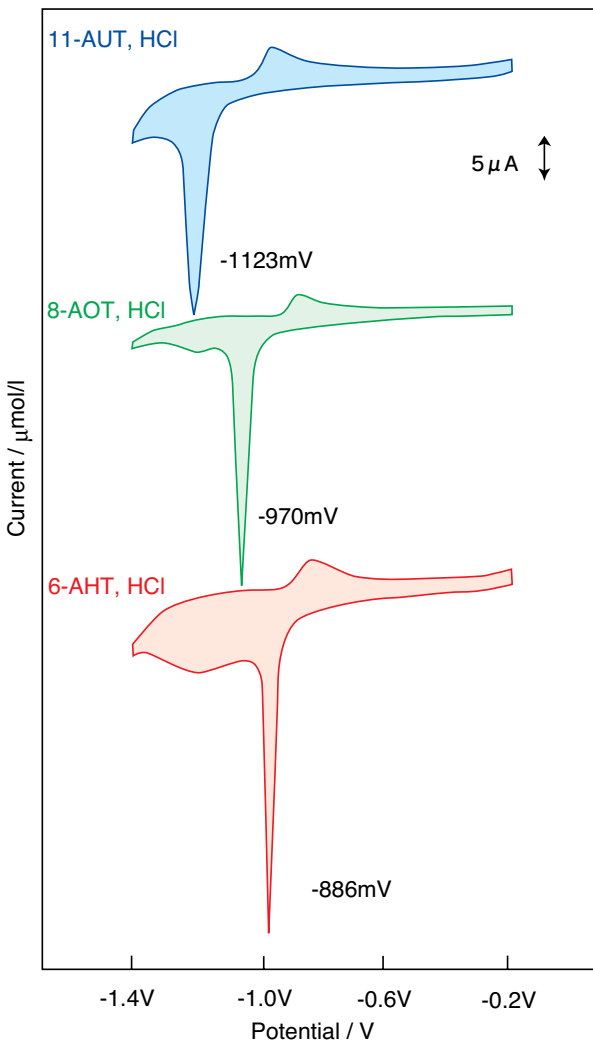


図 5 アミノアルカンチオール塩酸塩のサイクリックボルタモグラム

還元脱離ピーク電位から、吸着種が金電極から外れる電位を知ることができる。図 5 のサイクリックボルタモグラムでは、アルキル鎖が長くなるほど負電位側にシフトした。アミノアルカンチオール塩酸塩のアルキル鎖が長くなるほど、アルカンチオール類と同様に、吸着種が金電極から外れにくく、安定な SAM を形成することが示唆された。

VI SAMs のバイオセンサへの応用例

SPR や QCM は測定対象を標識することなく、それぞれ屈折率の変化や水晶の振動数変化で分子間相互作用を測定できることから、バイオセンサ用途で広く用いられている。それぞれ、金薄膜を基板として用いていることから、抗体や抗原、DNA などの固定化に SAMs が広く利用されている。SAMs を用いた固定化法としては、次のような方法がある。

- 1) カルボン酸末端 SAMs
 - ◇WSC(EDC)/NHS で活性エステル化
 - ◇目的物質のアミノ基と結合
- 2) アミノ基末端 SAMs
 - ◇グルタルアルデヒドを反応
 - ◇目的物質のアミノ基と結合
- アミノ基末端 SAMs
 - ◇二価試薬でマレイミド化
 - ◇目的物質の SH 基と結合
- 3) NTA 末端 SAMs
 - ◇Ni 錯体化
 - ◇His-Tag 導入目的物質と結合
- 4) ビオチン末端 SAMs
 - ◇ストレプトアビジンを固定化
 - ◇ビオチン標識目的物質と結合

これらの固定化法を用いた SAMs のバイオセンサへの応用例を以下に紹介する。

VI-1 カルボン酸末端 SAMs を利用したセンサ作製

抗体などのタンパク質は反応性のリジン残基を有することから、活性エステル法は、タンパク質の固定化に最も汎用される方法の一つである。カルボン酸末端 SAMs を固定化後、WSC(EDC) [Code: W001] と *N*-Hydroxy succineimide(NHS) を用いて、カルボン酸を反応性の NHS エステルとした後、タンパク質のアミノ基とアミド結合で連結して固定化する (図 6)。

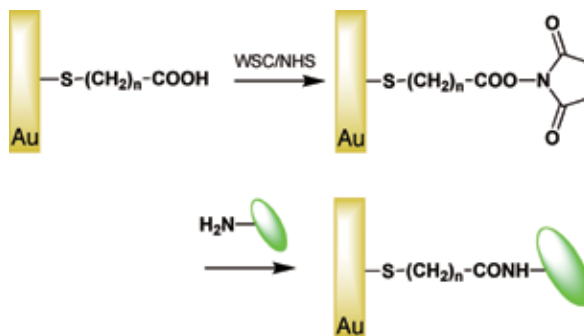


図 6 カルボン酸末端 SAMs の活性化によるタンパク質の固定化

Kyo らは、10-Carboxy-1-decanethiol (Code: C385) 単独、Carboxy-EG₆-undecanethiol (Code: C445) 単独、Carboxy-EG₆-undecanethiol と Hydroxy-EG₃-undecanethiol (Code: H354) の 9:1 混合で作製した SAM に、活性エステル法で抗体を固定化し比較した結果、混合 SAM を用いることで、非特異吸着を劇的に低減できることを示している⁴⁹⁾。センサーチップの作製法は下記の通りである。

<センサーチップ作製法>

- 1) 金基板を Hydroxy-EG₃-undecanethiol の 1 mmol/l エタノール溶液に浸漬する。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

- 2) クロム / 石英マスク下、40 mW/cm² の UV 光で光パターンニングする。
- 3) 下記 3 種類のエタノール溶液で、末端カルボン酸の SAMs を形成する。
 - A : 1 mmol/l 10-Carboxy-1-decanethiol
 - B : 1 mmol/l Carboxy-EG₆-Undecanethiol
 - C : 0.1 mmol/l Carboxy-EG₆-Undecanethiol + 0.9 mmol/l Hydroxy-EG₃-undecanethiol
- 4) 0.2 mol/l WSC、0.05 mmol/l NHS の溶液に 1 時間浸漬し、カルボン酸を活性化する
- 5) 純水で洗浄後、風乾する。
- 6) 100 ~ 1,000 µg/ml の抗体溶液をスポットし、2 時間反応する。
- 7) 2 mg/ml の NH₂-PEG₄-OH 溶液で 2 時間反応し、未反応の NHS エステルをブロックする。
(全ての反応は 10 mmol/l リン酸緩衝液 pH7.2, 150 mmol/l NaCl で行った。)

VI-2 アミン末端 SAM を用いた DNA ハイブリダイゼーションの SPR イメージング

SH 基を表面にもつ SAMs を作製後、チオール化 DNA を表面に固定化した例を記す⁵⁰⁾(図 7)。さらに、この DNA 固定化 SAMs を使用して DNA array を構築し、SPR を用いて相補鎖 DNA との相互作用のイメージングを行っている^{50, 51)}。

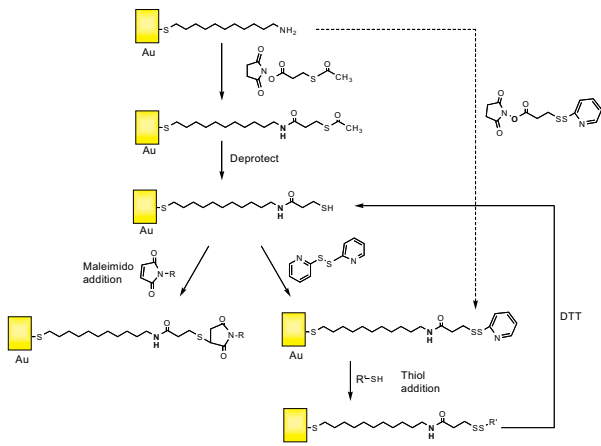


図 7 MUAM SAMs 表面の化学修飾及び DNA 固定化の模式図

(1) 試薬

- 11-Mercaptoundecylamine (MUAM)[塩酸塩である 11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride(Code: A423)]
- *N*-Succinimidyl-*S*-acetylthiopropionate (SATP)
- Sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SSMCC)
- Triethanolamine hydrochloride (TEA)
- Dithiothreitol (DTT)
- 2,2-Dipyridyl disulfide (DPDS)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate(EDTA)[EDTA · 2Na(Code: N001)]
- 1-Octadecanethiol (ODT)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Sodium chloride
- Sodium dihydrogenphosphate monohydrate
- Sodium hydroxide
- Ethanol

(2) 溶液調製

- 2.0 mmol/l SATP 溶液: SATP を、DMF と TEA 緩衝液 (pH7.0) を 1 : 9 で混合した溶液に溶解して調整する。
- DPDS 溶液: DPDS 1 mg を、0.1 mmol/l TEA 緩衝液 (pH8.0) と DMF 溶液を 1:1 で混合した溶液 1 ml に溶解して調製する。
- 1 mmol/l チオール化 DNA 溶液: チオール化 DNA を 0.1 mmol/l TEA 緩衝液 (pH8.0) に溶解して調製する。
- 0.2% SDS / 2×SSPE 溶液 (pH7.4) : 300 mmol/l NaCl, 20 mmol/l NaH₂PO₄ · H₂O, 2 mmol/l EDTA · 2Na, 6.9 mmol/l SDS を、水酸化ナトリウムで pH7.4 に調整する (20x SSPE: Code: MB07)。

(3) 操作

- 1) DNA アレイの構築と *in situ* SPR イメージング
 - a) SPR イメージングに使用する基板は、SF10 ガラススライド (Schotto Glass technologies 社) の上にクロミウム層 (膜厚 5 nm) を持ち、その上に金薄膜 (膜厚 45 nm) を持つ基板を使用する。
 - b) a) の基板を 1.0 mmol/l ODT / エタノール溶液に一晩浸漬し、ODT SAMs を作製する。
 - c) ODT 単分子膜の一部に光照射し (水銀-キセノンアーク灯で 1.5 時間 UV 照射)、ODT 分子を取り除いて、パターンニングする。
 - d) c) の基板表面を 1.0 mmol/l MUAM / エタノール溶液に 2 時間浸漬し、500 µm 四方のフォトパターンニングされた部分に MUAM SAMs を持つ基板を作製する。
 - e) d) の SAMs 表面と 40 nl, 2.0 mmol/l SATP 溶液を反応させた後、1~2 時間放置し、反応させる。
 - f) e) の基板を 40 nl の 0.5 mol/l Hydroxylamine, 0.05 mol/l DTT, 0.025 mol/l EDTA, 0.05 mol/l リン酸緩衝液を含む溶液 (pH7.5) と 20 分間反応させ、脱保護操作を行い、SH 基表面をもつ SAMs を作製する。
 - g) f) の SAMs 表面と 40 nl の DPDS 溶液と 2 時間反応させ、dithiopyridyl 末端を持つ SAMs を作製する (e), f), g) の代わりに弊社 SPDP を使用し、d) の SAMs 表面と反応させることで同様の SAMs を作製することが可能であると思われる。その後、十分に水で洗浄後、窒素雰囲気下で乾燥する。SAMs 表面に反応溶液を滴下する場合は、空気ピコポンプを使用して 40 nl の各反応溶液を供給する。
 - h) チオール化 DNA 溶液をジスルフィド結合を持つ表面に滴下し、一晩チオール-ジスルフィド交換反応を行う。作製した表面は、直ちに SPR イメージング実験に使用する。
 - i) 1 µmol/l に濃縮された相補鎖 DNA を h) の基板表面に導入し、10 分間反応させる。
 - j) リン酸緩衝液で洗浄後、SPR イメージングを行う。この評価系は、8 mmol/l の尿素溶液を 15 分間反応させて二本鎖 DNA を変性させ、一本鎖 DNA アレイに再生することができるため、ハイブリダイゼーションを繰り返し、行うことができる。

文献では、SPR イメージングの装置は自作しており、P 偏光で分光された光を角度を固定させて照射している。反射光はフィルターを通り CCD カメラで検出される。表面プラズモン共鳴による反射光強度の減衰がハイブリダイゼーションの有無を反映するため、二次元イメージングが可能である。Texas Instruments 社に類似した装置がある。

上記の金表面の各修飾過程の結果を、PM-FTIRAS (積算回数 1,000 回、分解能 4 cm⁻¹、narrow-band HgCdTe 検出器) により確認し、また基板に固定化した DNA を蛍光標識させた相補鎖 DNA とハイブリダイゼーションさせ、蛍光法により確認している。SAMs を用いて作製した DNA アレイが正しく相補鎖 DNA を検出したことを示している。

VI-3. 活性エステル修飾電極を電極を用いたタンパク質のセンシング

末端に活性エステルを持つ SAMs 修飾電極を作製後、タンパク質または酵素を固定化し、タンパク質固定化電極を作製した例^{35,36)}を記す。論文ではさらに、このタンパク質固定化電極を使用して、固定化したタンパク質固有の性質とインピーダンス変化の関係を観測している。

(1) 試薬

- ・ Dithiobis(succinimidyl undecanoate)(Code: D537) (以下 DSU)
- ・ フェロシアン化カリウム
- ・ フェリシアン化カリウム
- ・ 塩化カリウム
- ・ アルブミン (子牛血清由来)
- ・ グルタミン酸オキサロ酢酸転移酵素 (GOT、ブタ心臓由来)
- ・ グルタミン酸ピルビン酸転移酵素 (GPT、ブタ心臓由来)
- ・ 1,4-Dioxane(特級品で、特に精製せずに使用)

(2) 操作

1) 金基板へのタンパク質の固定化

- a) 電気化学測定 (サイクリックボルタメトリー: CV) で使用する金ディスク電極 (直径 1.6 mm) を、アルミナ (粒径 0.05 μm) で研磨した後、純水中で超音波照射する。
- b) スライドガラスに金を蒸着し、赤外吸収スペクトル測定用の金基板を作製し、前処理としてクロム酸混液で洗浄をする。
- c) DSU / ジオキサン溶液に前処理した基板を 12 ~ 24 時間、室温で浸漬し DSU SAMs を作製する。
- d) 基板は、十分にジオキサンで洗浄し、減圧下で乾燥する。
- e) 所定のタンパク質溶液 (1 mg/ml, pH7) に低温下 (5~10°C) で 24 時間浸漬し、SAMs 表面にタンパク質を固定化する。
- d) 調製した基板は、純水で洗浄後、CV 測定する。赤外吸収スペクトル測定を行う場合は、純水で洗浄後、減圧下で乾燥し、測定する。

2) タンパク質固定化電極の特性評価

CV により、タンパク質が電極表面に固定化されたことを評価し、赤外吸収スペクトルから、タンパク質が金電極に固定化されていることを証明し、固定化量とタンパク質修飾層の厚みを算出している。電気化学インピーダンス測定から、タンパク質固定化電極上での電極パラメータと固定化したタンパク質固有の性質との関連を評価している。

インピーダンス変化が、固定化されたタンパク質の生体分子固有の性質に反映されることを利用し、電極でのタンパク質等のセンシングへの応用が期待される。

参考文献

- 1) I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 1032.
- 2) R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4481.
- 3) C. D. Bain and G. M. Whitesides, *Science*, **1988**, 240, 62.
- 4) P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y. T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7152.
- 5) G. E. Poirier, E. D. Pylant, *Science*, 1996, 272, 1145.
- 6) M. M. Walczak, C. Chung, S. M. Stole, C. A. Widrig, M. D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 2370.
- 7) P. Fenter, P. Eisenberger, J. Li, N. Camillone, S. Bernasek, G. Scoles, T. A. Ramanarayanan, K. S. Liang, *Langmuir*, **1991**, 7, 2013.
- 8) D. Taneichi, R. Hanada, K. Aramaki, *Corros. Sci.*, **2001**, 43, 1589.
- 9) I. Platzman, C. Saguy, R. Brenner, R. Tannenbaum, H. Haick, *Langmuir*, **2010**, 26(1), 191.

- 10) J. C. Love, D. B. Wolfe, R. Haasch, M. L. Chabinyc, K. E. Paul, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 2597.
- 11) A. Carvalho, M. Geissler, H. Schmid, B. Micel, E. Delamar, *Langmuir*, **2002**, 18, 2406.
- 12) Z. Li, S.-C. Chang, R. S. Williams, *Langmuir*, **2003**, 19, 6744.
- 13) D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, A. Opdahl, L. J. Richter, M. J. Tarlov, L. J. Whitman, *Langmuir*, **2006**, 22, 2578.
- 14) S. Lee, J. Park, R. Ragan, S. Kim, Z. Lee, D. K. Lim, D. A. A. Ohlberg, R. S. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5745.
- 15) W. Muller, H. Ringsdorf, E. Rump, G. Wildburg, X. Zhang, L. Angermaier, W. Knoll, M. Liley and J. Spinke, *Science*, **1993**, 262, 1706.
- 16) M. Mrksich, G. B. Sigal, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **1995**, 11, 4383.
- 17) J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 8044.
- 18) K. Shimizu, I. Yagi, Y. Sato, K. Uosaki, *Langmuir*, **1992**, 8, 1385.
- 19) T. W. Schneider, D. A. Buttry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 12391.
- 20) G. S. Bang, J. Park, J. Lee, N.-J. Choi, H. Y. Baek, H. Lee, *Langmuir*, **2007**, 23, 5195.
- 21) M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801.
- 22) D. V. Leff, P. C. Ohara, J. R. Heath and W. M. Gelbart, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 7036.
- 23) T. Yonezawa, K. Yasui, and N. Kimizuka, *Langmuir*, **2001**, 17, 271.
- 24) G. Han, N. S. Chari, A. Verma, R. Hong, C. T. Martin, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 1356.
- 25) J. Huang, J. C. Hemminger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3342.
- 26) P. L. Ross, M. V. Johnston, *J. Phy. Chem.*, **1993**, 97, 10725.
- 27) Y. S. Obeng, A. J. Bard, *Langmuir*, **1991**, 7, 191.
- 28) Y. Sato et al., *J. Electroanal. Chem., Interfacial Electrochem.*, **1995**, 384, 57.
- 29) J. Chen, M. A. Reed, A. M. Rawlett, *J. M. Tour, Science*, **1999**, 286, 1550.
- 30) R. Yamada and K. Uosaki, *Langmuir*, **1997**, 13, 5218.
- 31) Z. Hou, N. L. Abbott, P. Stroeve, *Langmuir*, **1998**, 14, 3287.
- 32) M. Schweizer, H. Hagenstrom, D. M. Kolb, *Surf. Sci.*, **2001**, 490, L627.
- 33) C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 321.
- 34) F. Bensebaa, R. Voicu, L. Huron, T. H. Ellis, E. Kruus, *Langmuir*, **1997**, 13, 5335.
- 35) R. Yamada, H. Sakai, K. Uosaki, *Chem. Lett.*, **1999**, 667.
- 36) M. Kawasaki, T. Sato, T. Tanaka, K. Takao, *Langmuir*, **2000**, 16, 1719.
- 37) K. Jans, K. Bonroy, R. De Palma, G. Reekmans, H. Jans, W. Laureyn, M. Smet, G. Borghs and G. Maes, *Langmuir*, **2008**, 24, 3949.
- 38) H. A. Biebuyck, C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **1994**, 10, 1825.
- 39) C. D. Bain, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **1989**, 5, 723.
- 40) J. Noh, T. Murase, K. Nakajima, H. Lee, M. Hara, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 7411.
- 41) M. T. de Groot, T. H. Evers, M. Merckx, M. T. M. Koper, *Langmuir*, **2007**, 23, 729.
- 42) H.-G. Hong and W. Park, *Langmuir*, **2001**, 17(8), 2485.
- 43) H. Yue, D. H. Waldeck, K. Schrock, D. Kirby, K. Knorr, S. Switzer, J. Rossmund and R. A. Clark, *J. Phys. Chem. C*, **2008**, 112(7), 2514.
- 44) G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 3464.
- 45) P. E. Laibinis, M. A. Fox, J. P. Folkers, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **1991**, 7, 3167.
- 46) S. J. Stranick, S. V. Atre, A. N. Parikh, M. C. Wood, D. L. Allara, N. Winograd, P. S. Weiss, *Nanotechnology*, **1996**, 7, 438.
- 47) S. J. Stranick, A. N. Parikh, Y. T. Tao, D. L. Allara, P. S. Weiss, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 7636.
- 48) K. Tamada, M. Hara, H. Sasabe, W. Knoll, *Langmuir*, **1997**, 13, 1558.
- 49) M. Kyo, K. Usui-Aoki, H. Koga, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 7115.
- 50) E. A. Smith, M. J. Wanat, Y. Cheng, S. V. P. Barreira, A. G. Frutos, R. M. Corn, *Langmuir*, **2001**, 17, 2502.
- 51) J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 8044.
- 52) K. Nakano, H. Taira, M. Maeda, M. Takagi, *Anal. Sci.*, **1993**, 9, 133.
- 53) 中野幸二, 平浩昭, 前田瑞夫, 高木誠, 分析化学, **1998**, 47, 929.

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料