

# 物理化学概論

## 生体と電気化学(2)

九州工業大学 竹中繁織

# Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins, Volume 1, 1st Edition, Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics

Write a review

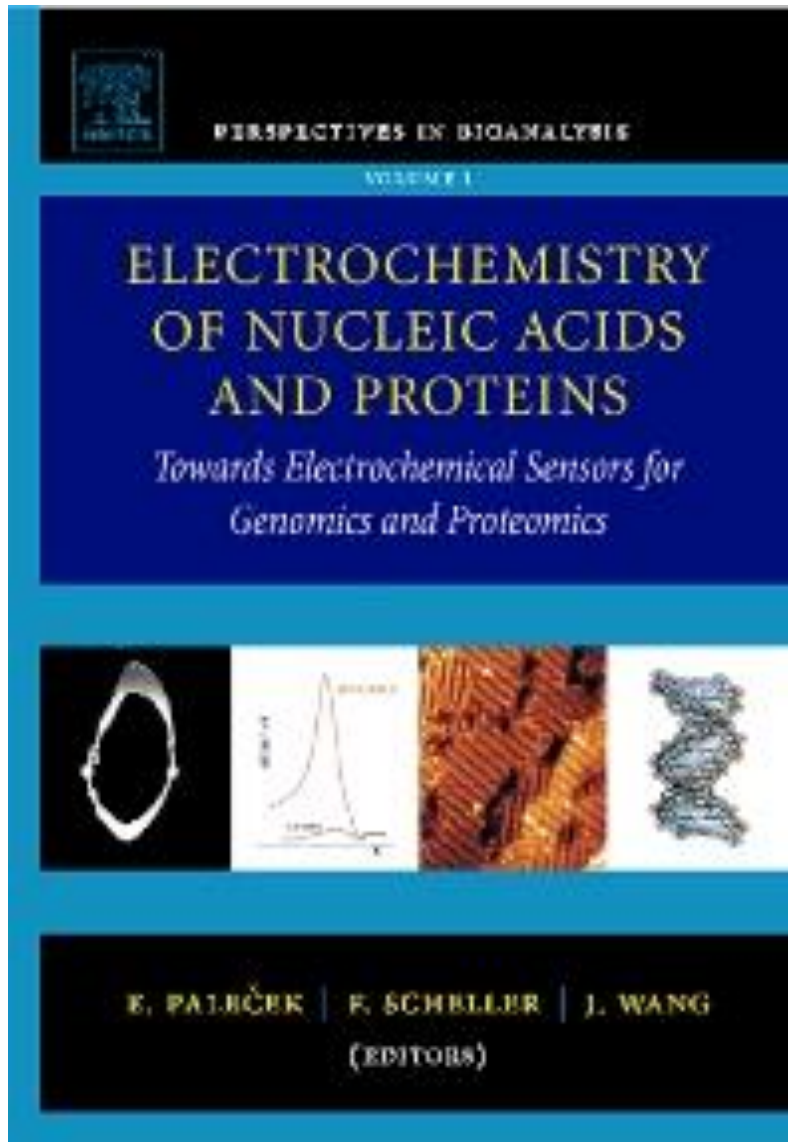
## Editors

E. Palecek

J. Wang



F. Scheller



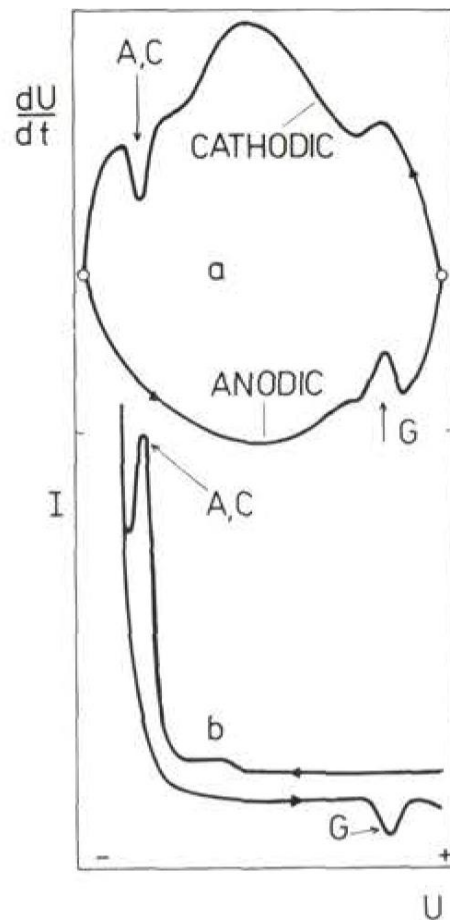
Threading intercalators as redox indicators (S. Takenaka).

Bioelectrochemistry and Bioelectronics of Macromolecules (JW70) held in Brno (Czech Republic) from June 12 to 15, 2018 on the occasion of the 70th birthday of Professor J. Wang

# Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid

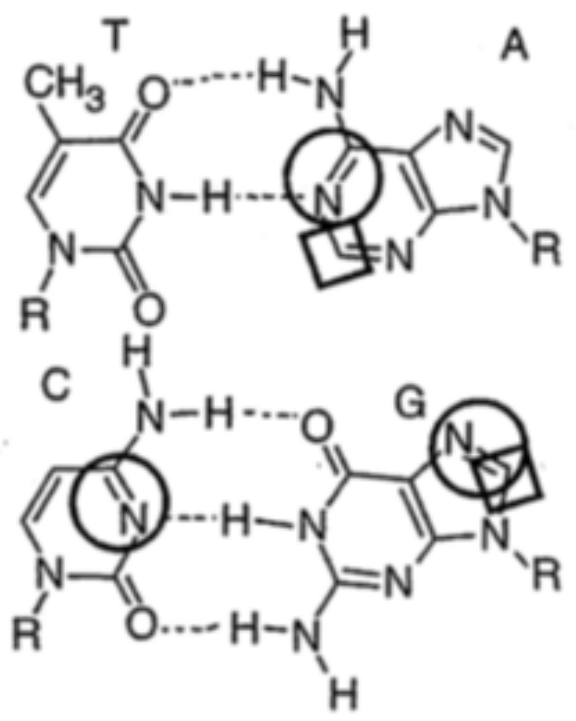
[EMIL PALEČEK](#)

*Nature* **1960**, *188*, 656–657.

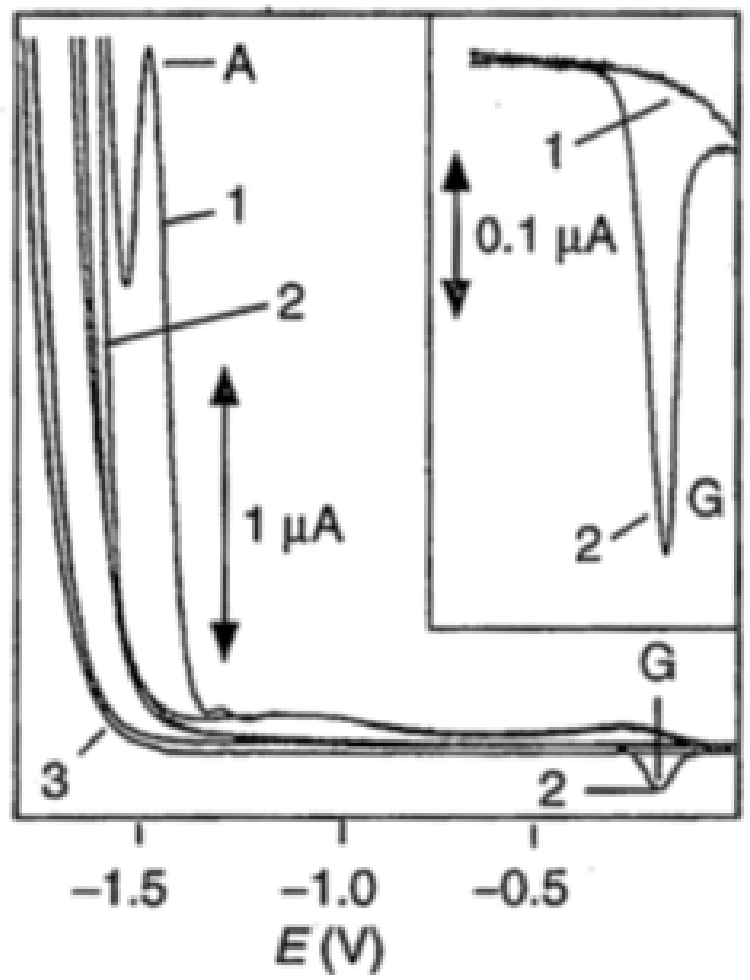


**Fig. 1.** Schematic representation of (a) oscillopolarographic and (b) cyclic voltammetric curves of denatured DNA. For the anodic signal G, guanine residues in the polynucleotide chain are responsible; this signal is observed only if the electrode was previously charged to sufficiently negative potentials (around  $-2$  V) at which guanine is reduced. Due to scanning of the potential in the anodic direction the reduction product is oxidized and the anodic CV peak (or oscillopolarographic indentation) appears. A, C, cathodic signal due to reduction of adenine and cytosine residues.

(A)



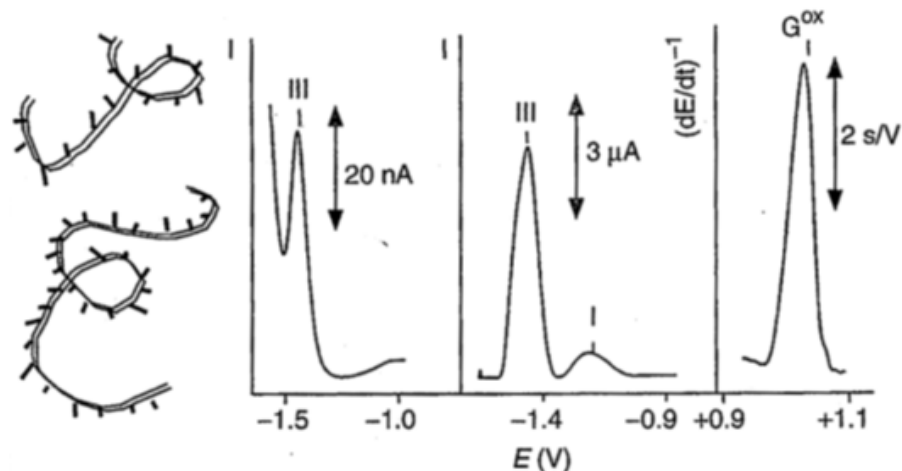
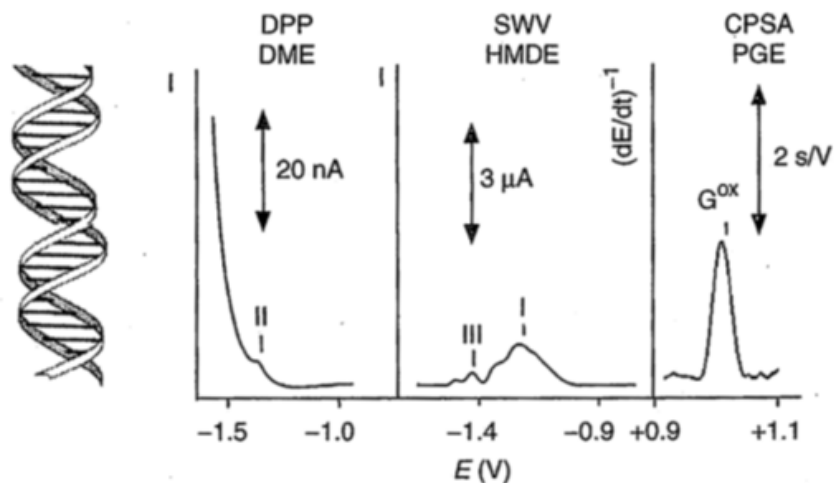
(B)



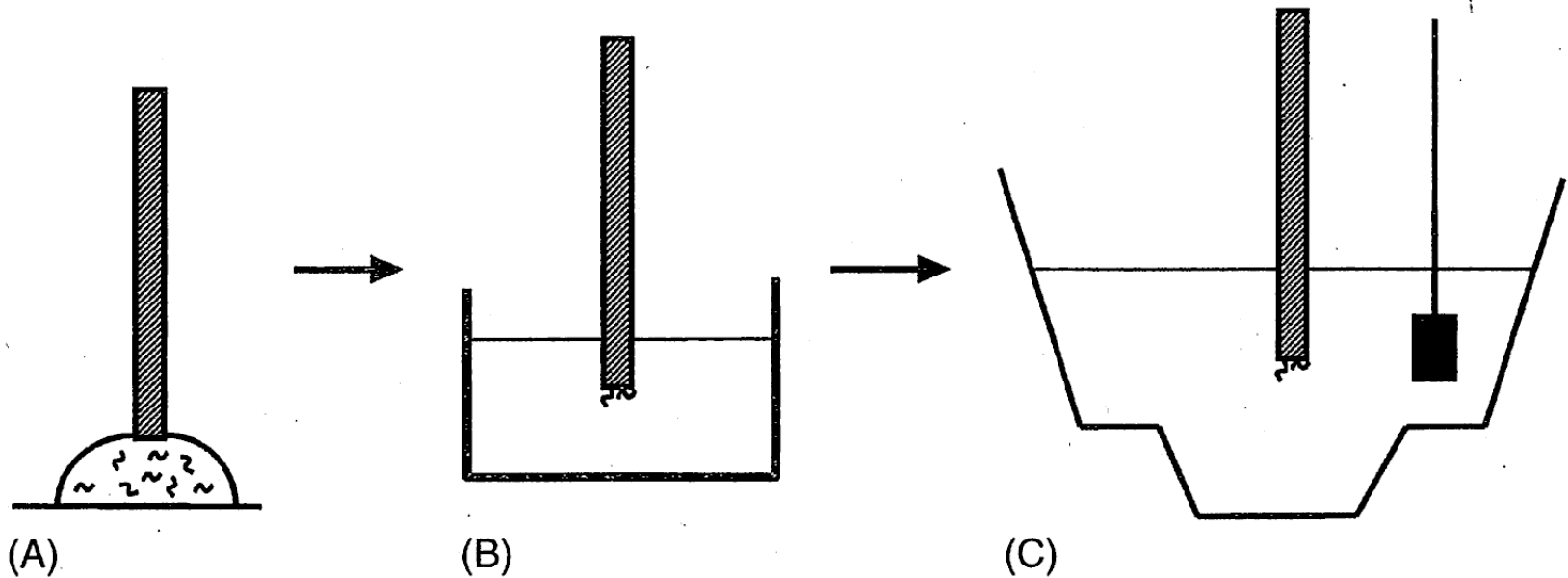
電極上における一本鎖および二本鎖核酸の酸化還元。(A)ワトソン・クリック型塩基対と電気活性基の略図。水銀電極上(円)および炭素電極上(長方形)における主要な酸化還元部位が示されている。(B)吊り下げ式水銀電極(HMDE)上で測定される生合成ポリリボヌクレオチド( $100 \mu g mL^{-1}$ )のサイクリックボルタモグラム(cyclic voltammogram)。(1)ポリアデニル酸; (2) ポリグアニル酸; (3) バックグラウンド電解液; 差し込み図、ピークG(グアニン)の詳細。

(C)

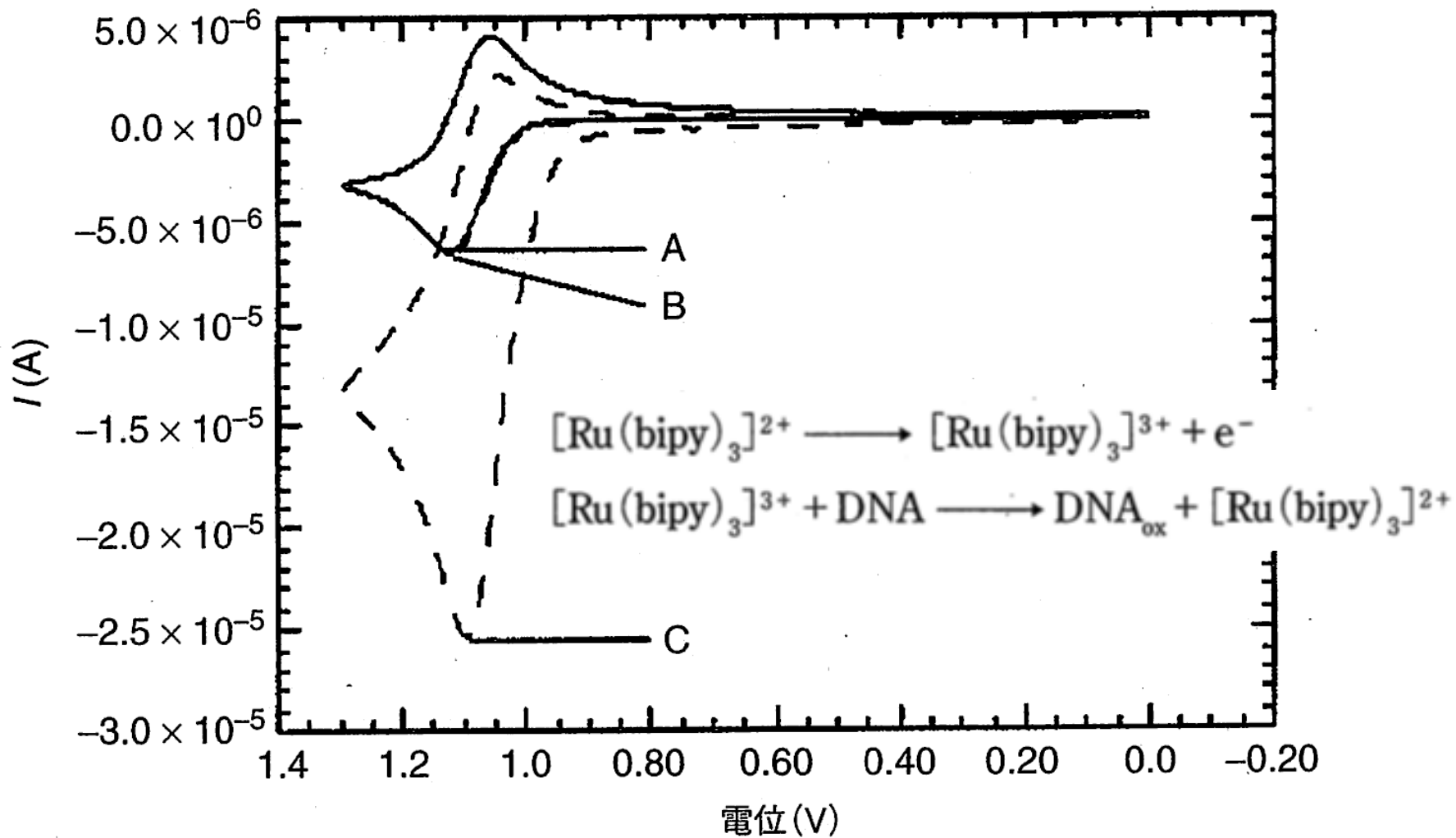
(D)



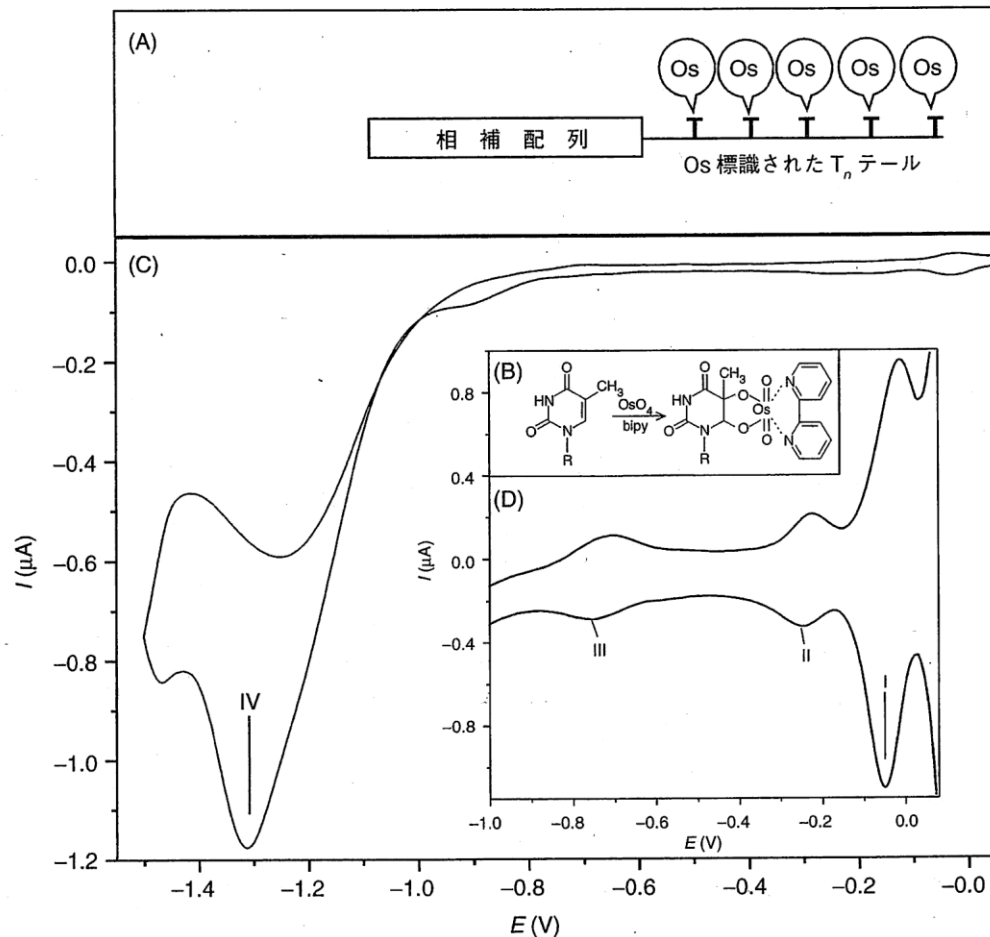
電極上における一本鎖および二本鎖核酸の酸化還元。(CとD)酸化還元信号、固定式滴水銀電極(DME)を使った微分パルスポーラログラフィー(DPP)や吊り下げ式水銀滴電極を使った吸着ストリッピング矩形波ボルタンメトリー(SWV)、熱分解グラファイト電極(PGE)を使った定電流プロニポテンシヨメトリックストリッピング分析(CPSA)によって得られた $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ の天然(二本鎖)DNAの酸化還元信号(C)、 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ の変性ssDNAの酸化還元信号(D)。



DNA修飾電極の簡単な作製法についての模式図(5.2.2.2)。裸の電極(A)を、DNA溶液の小さな液滴(通常3-10  $\mu\text{L}$ )に短い時間(例えば60秒)浸漬。(B)DNA溶液を除去した後、DNA修飾電極を洗浄、(C)電解槽中で未使用のバックグラウンド電解液にDNA修飾電極を浸し、電気化学的滴定を実施する。この手順は、吸着トランスファーストリッピング(Adsorptive Transfer Stripping: AdTS)とも呼ばれている。そのようなDNA修飾電極を簡単に調製するために水銀電極、固体アマルガム電極、炭素電極が使用できるが、金電極は使用できない。いくつかの炭素電極が試されたが、GCE(glassy carbon electrode, グラッシーカーボン電極)はこの目的のために適当では無いように見える。一方、熱分解黒鉛(pyrolytic graphite)、炭素ペースト(carbon paste)と何種類かのスクリーン印刷電極(screen-printed electrode)が優れた結果を与えた。開回路状態でDNA固定化が可能であるが、炭素電極では正電位の利用が有益かもしれない。微小電極を用いる場合、非常に少ないDNA量で良い。上記の手順は、RNA、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチドや他の生体高分子を用いた場合にもよく機能する。DNAの研究に加え、DNA修飾電極を用いた測定、核酸相補鎖との相互作用、特定のタンパク質、薬剤、DNA損傷剤などについて、種々な研究が行われている。



200 mM  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ のサイクリックボルタモグラム ( $25 \text{ mV s}^{-1}$ ) (A, 実線) 裸のITO作用極のITO作用電極から得られたデータ、(B, 点線) 1, 12-ドデカンシカルボン酸 (1,12-dodecanedicarboxylic acid: DDCA) で修飾されたITO作用電極から得られたデータ、(C, 破線) 子ウシ胸腺DNAを付着させた後にDDCA修飾した電極上から得られたデータ。参照電極、Ag/AgCl; 対極、白金ワイヤ (Pt wire); 支持電解質、50 mMリン酸緩衝液、pH7。



(A) Os, 2,2'-bipyridine (Os, bipy) のような窒素リガンドを持った四酸化オスミウム錯体 Os,L は、チミン残基と優先的に反応 (B) し、ssDNA 上で安定した付加化合物を形成。Os, bipy はいくつかの DNA 標識法に使われる。そのうちの一つは複数の電気活性標識を用いたレポータープローブの末端標識 (A)。Os, bipy DNA 標識された ssDNA のサイクリックボルタモグラム。(C) と (D) に示されるサイクリックボルタモグラム。AdTS を使い、仔牛胸腺 ssDNA (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 中性 pH, 25 $^{\circ}\text{C}$  の条件で 2 mM の Os, bipy で修飾) の測定結果。開始電位は 0.125 V, スイッチ電位は -1.5 V. 5  $\mu\text{L}$  の DNA 溶液滴下から 60 秒の累積結果。0.3 M ギ酸アンモニウム、0.05 M リン酸ナトリウム (pH 7.0) が、バックグラウンド電解質。(C) 走査速度 2.56  $\text{Vs}^{-1}$ . (D) 走査速度 0.08  $\text{Vs}^{-1}$  (L. Avra & E. Palecek, 未発表データ)



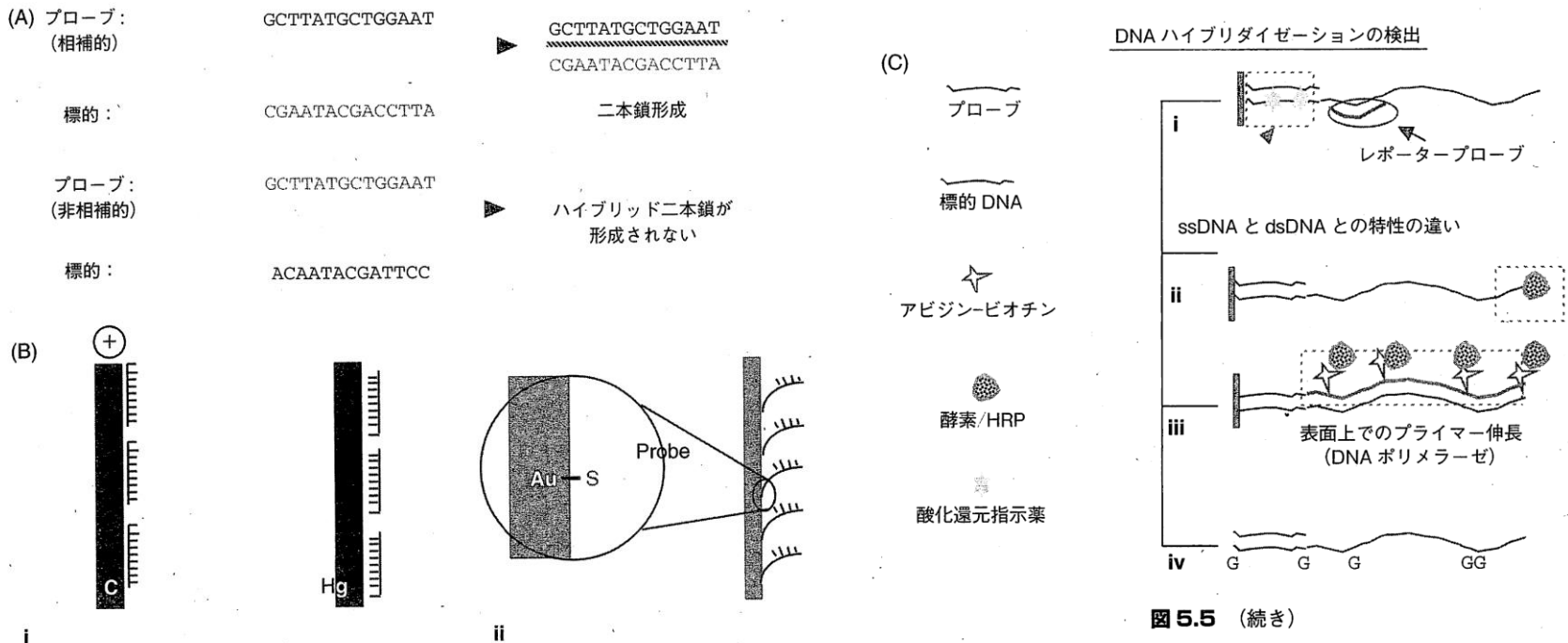
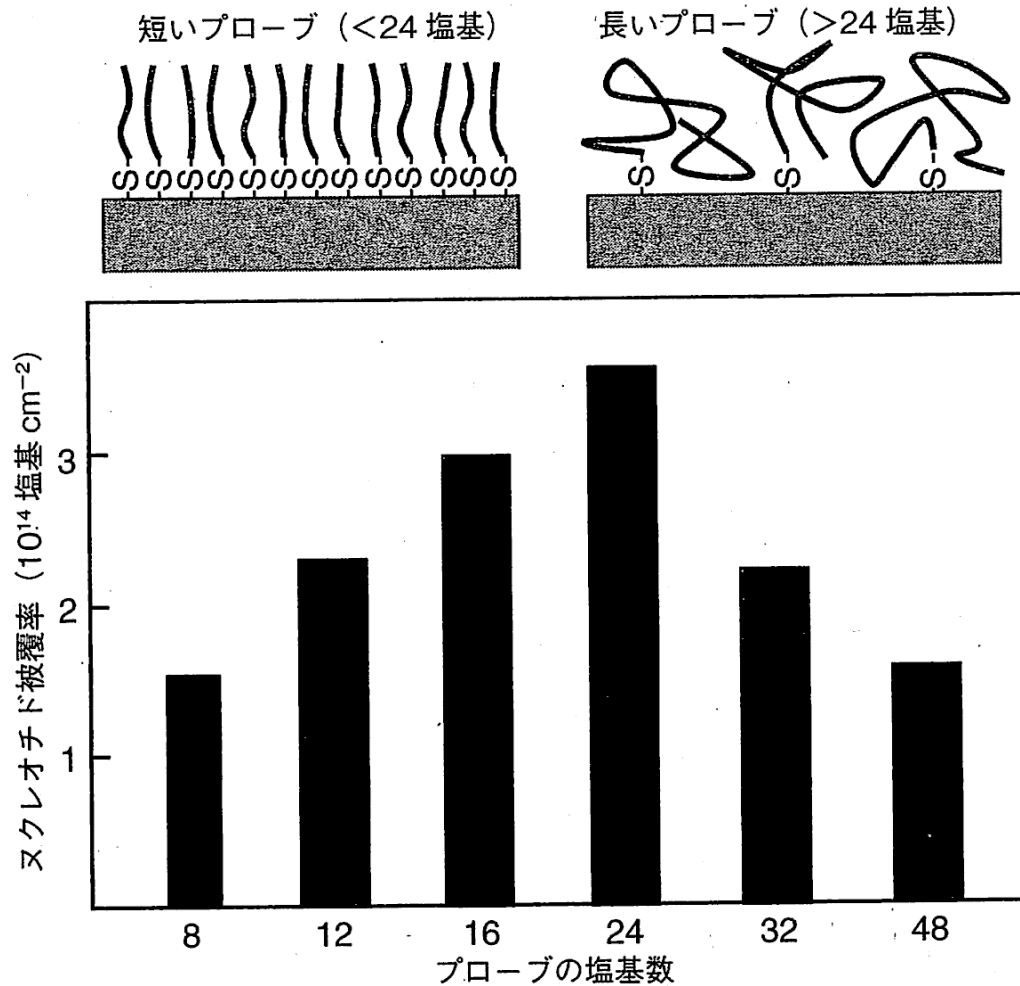


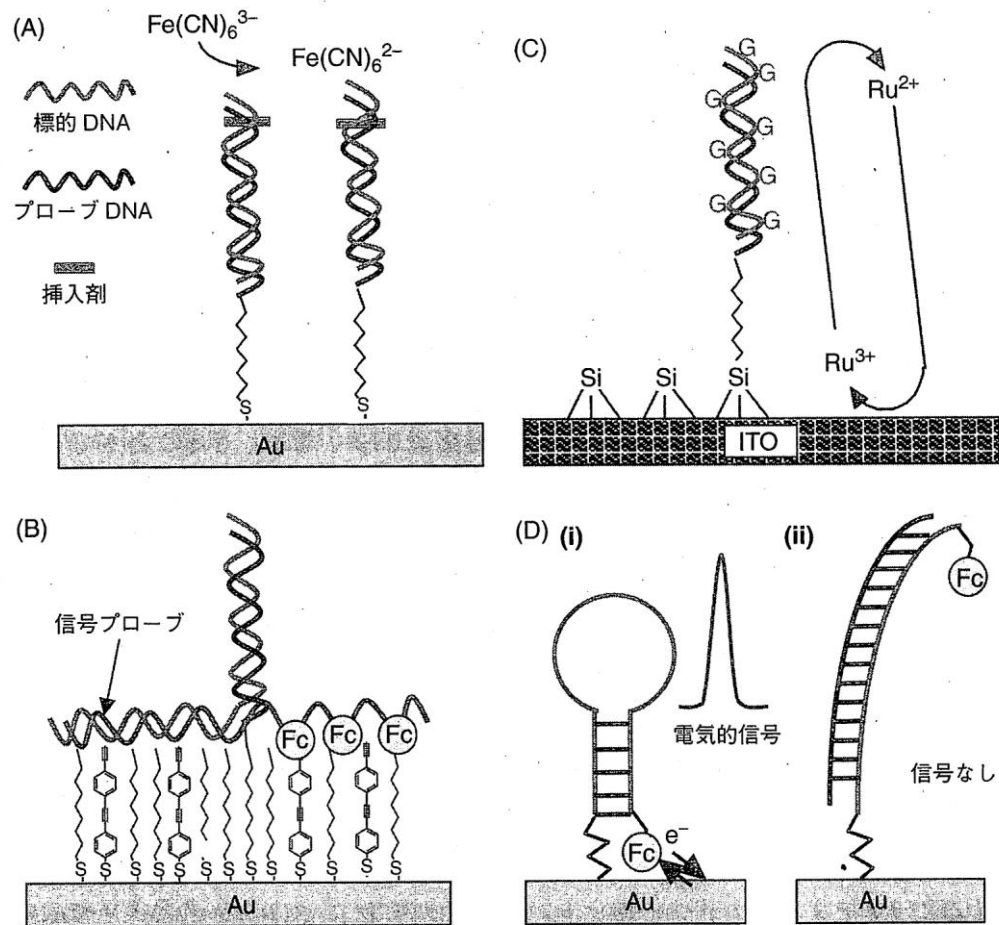
図 5.5 (続き)

**図 5.5** DNA ハイブリダイゼーションの原理と、単一表面技術による DNA ハイブリダイゼーションの電気化学的検出 (5.3.3)。(A) 二つの相補 ss オリゴヌクレオチド (ODN) から、dsDNA が形成される (DNA ハイブリダイゼーション) 仕組み。標的 DNA 配列が非相補的な場合には、dsDNA は形成されない。電気化学的ハイブリダイゼーション検出器では、二つの鎖のうちの一つがプローブとして使われ、電極面に固定される。(B) 電極表面上におけるプローブ固定化の仕組み (5.3.3.1 と 5.3.3.2)。(i) 負に帯電した糖-リン酸骨格を介して、DNA は正電荷を持つ炭素電極に静電的に吸着する。水銀電極上において、疎水性である塩基は疎水性の電極表面に強く結合する。(ii) チオールで末端標識された ODN を金電極に共有結合することにより、配向性の ODN 固定と、自己組織化単分子層 (self-assembled monolayer SAM) 構造の形成が起きる (図 5.6)。(C) DNA ハイブリダイゼーションの検出: (i) ハイブリッド dsDNA の形成に基づく方法。次のいずれかを使用する。(a) ハイブリッド dsDNA と選択的に結合して、酸化(または還元)信号を出す「酸化還元指示薬」(5.2.3.1 と 5.3.3.4)。(b) 二本鎖形成に依存した DNA 特性 (例えば電導率) 変化の測定。それ以外にも、レポーター (シグナル発生) プローブ (5.3.3.6) が、図 5.9 (A) で示されるような形で使われる (5.3.3.7)。(ii-iii) 電極表面上における標的 DNA の検出に基づく方法。(ii) 西洋ワサビペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase, HRP) のような適切な酵素を標的 DNA に結合。ハイブリダイズすると、過酸化水素還元による電気触媒電流が測定される。(iii) DNA ハイブリダイゼーション後に、DNA プローブがプライマーとして用いられる。DNA ポリメラーゼによって電極表面上で DNA 鎖が伸長し、ビオチン化されたヌクレオチドが新しく合成された鎖に取り込まれる。ストレプトアビジン-ビオチン親和力を使って HRP が DNA に結合された後、ii の場合のような測定が行われる。(iv) グアニンを含まない DNA プローブが使用される。ここでは標的 DNA 中のグアニンの存在は、ハイブリダイゼーション後に、炭素電極上におけるグアニン酸化、あるいは ITO 電極上における触媒信号を使って検出される (図 5.3. 5.2.2.4 と 5.3.3.9 を参照)。参考文献<sup>10)</sup>より許可を得て転載。

(口絵参照)



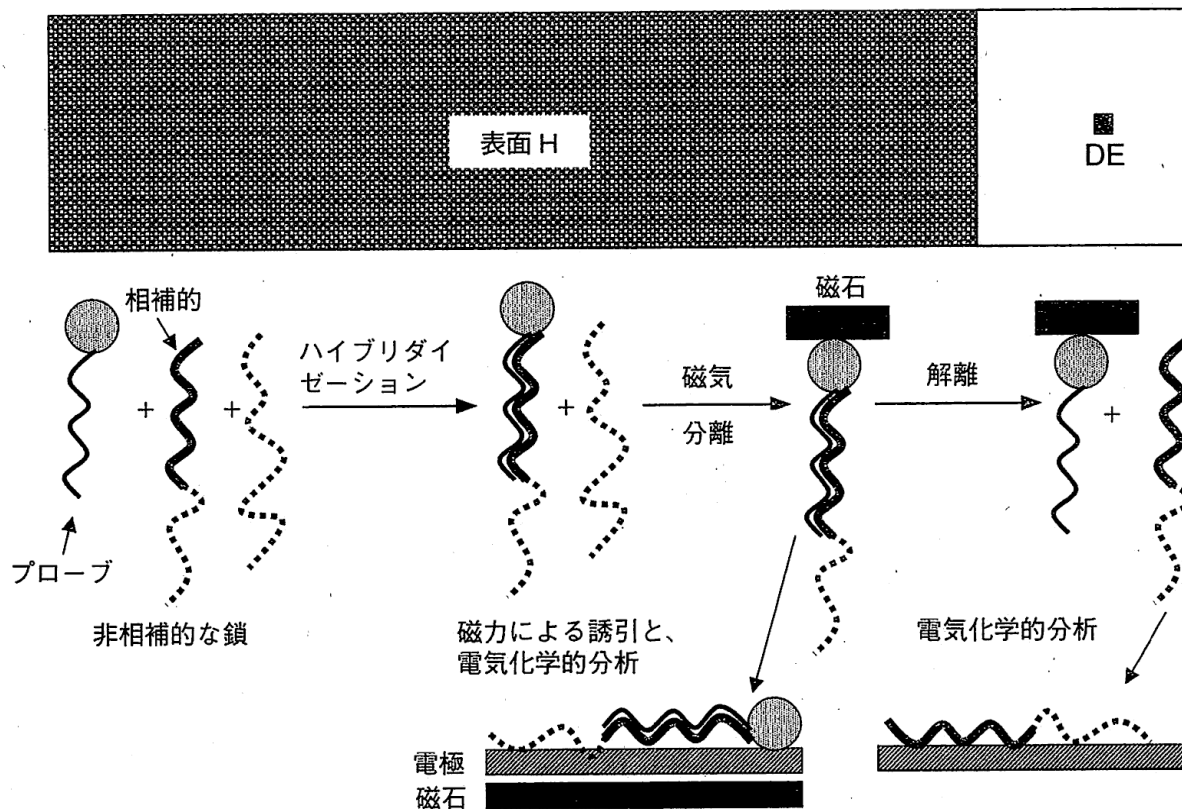
**図 5.6** 金表面上に吸着されるチオール化 DNA プローブのヌクレオチド数とヌクレオチド表面密度の関係 (5.3.3.1 と 5.3.3.2)。表面密度は放射活性物質 ( $^{32}\text{P}$ ) 標識プローブを測定して、プローブ密度にプローブ中のヌクレオチド数を掛け算することにより決定された。プローブには、自己相補性を持たない 4 塩基 (ACTG) を反復単位とする配列を用いた。グラフ上部の略図は、プローブの取り得る 2 種類の構造状態を示す。短いプローブ (< 25 のヌクレオチド) は主に伸びた構造をとる一方、長いプローブ (> 25 ヌクレオチド) はランダムコイル様構造をとる。参考文献<sup>17)</sup>よりデータを転用。



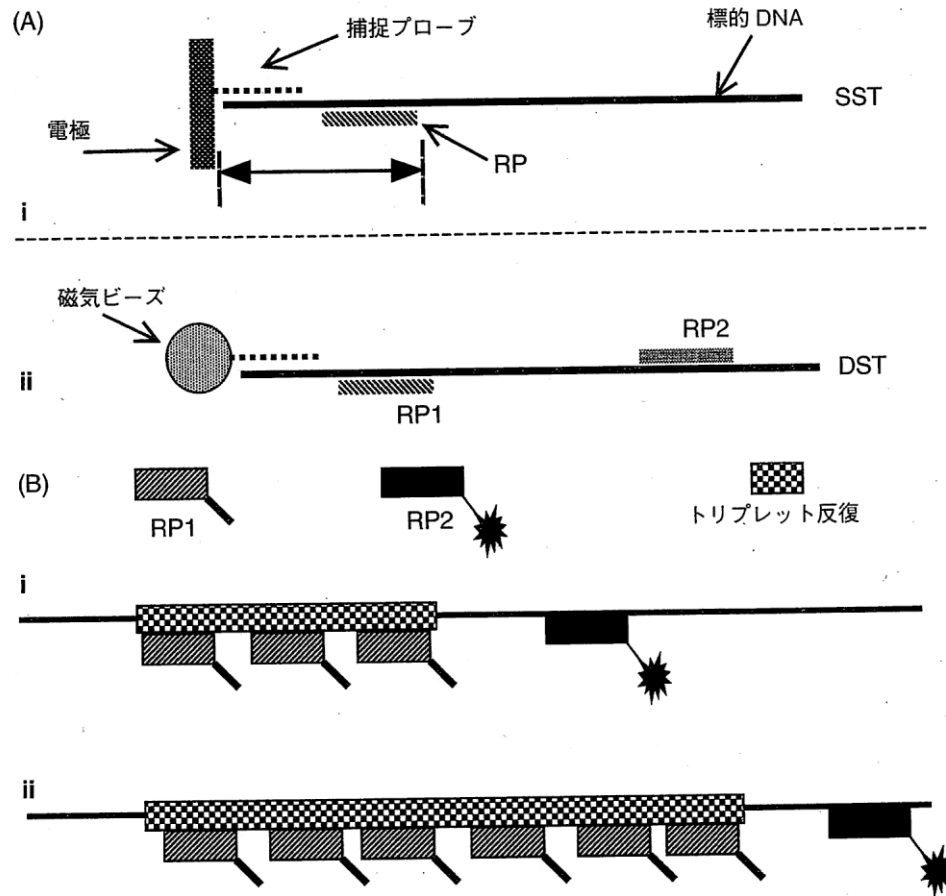
**図 5.7** 最近の単一表面 DNA ハイブリダイゼーションセンサー(5.3.3.9 参照)。(A)DNA を介した電荷輸送<sup>213)</sup>。アルカンチオール修飾プローブは金電極に結合され、標的 DNA に対してハイブリダイズする。酸化還元活性を持つ挿入剤の存在下で、溶液中でフェリシアン化物の還元が観察された。(B)信号プローブを用いたサンドイッチアッセイ<sup>215)</sup>。アルカンチオール修飾捕捉プローブは、フェニルアセチレンチオール(phenylacetylene thiol)の存在下で金表面に結合される。標的 DNA と信号プローブとのハイブリダイゼーションは、フェニルアセチレンチオールに隣接した場所にフェロセン標識物(Fc)を配置する。これによって金電極との連絡がなされる。希釈剤チオールは、末端がポリエチレングリコールになっている(図には示されていない)。(C)メディエーターを伴うグアニンの電気的触媒酸化。シラン修飾捕捉プローブが ITO 電極に結合された。標的のハイブリダイゼーションは、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$  によるグアニンの電気的触媒酸化を可能にする<sup>90)</sup>。(D)DNA 構造変化の電気化学的検出<sup>203)</sup>。

表面に取付けられた電気化学的分子ビーコン(E-DNA sensor)の模式図。(i)末端チオール標識ステムループ ODN は金表面(Au)に固定化され、SAM(5.3.3.1 参照)を形成する。ODN の反対側の末端には、電気的に活性を持つ標識(フェロセン、Fc)がある。ステムループ構造は金電極近傍に Fc 標識を保持して効果的な電子移動を確実にし、その結果電気化学的信号が得られる。(ii)補足的 tDNA とのハイブリダイゼーションが起きるとステムループ構造は失われ、強固な棒状 dsDNA が形成される。dsDNA 形成の結果、Fc 標識は電極から遠ざけられ、電気化学的信号は減少するか、あるいは消失する。

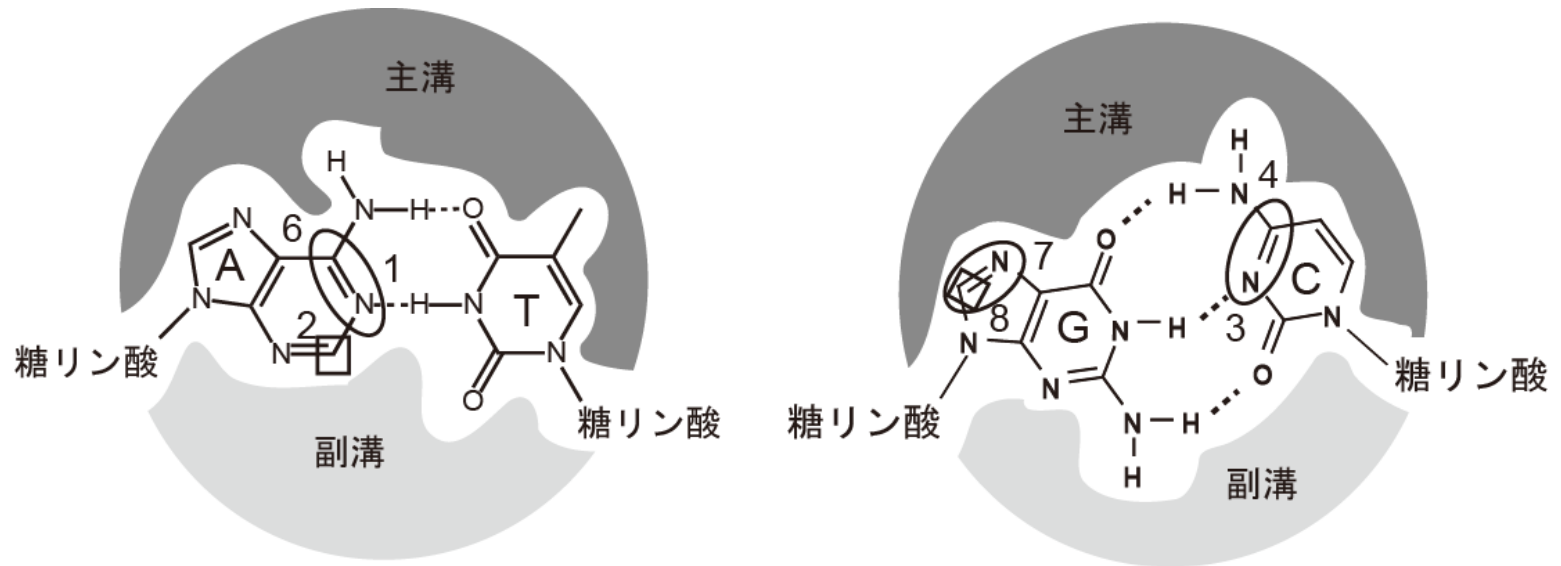
(口絵参照)



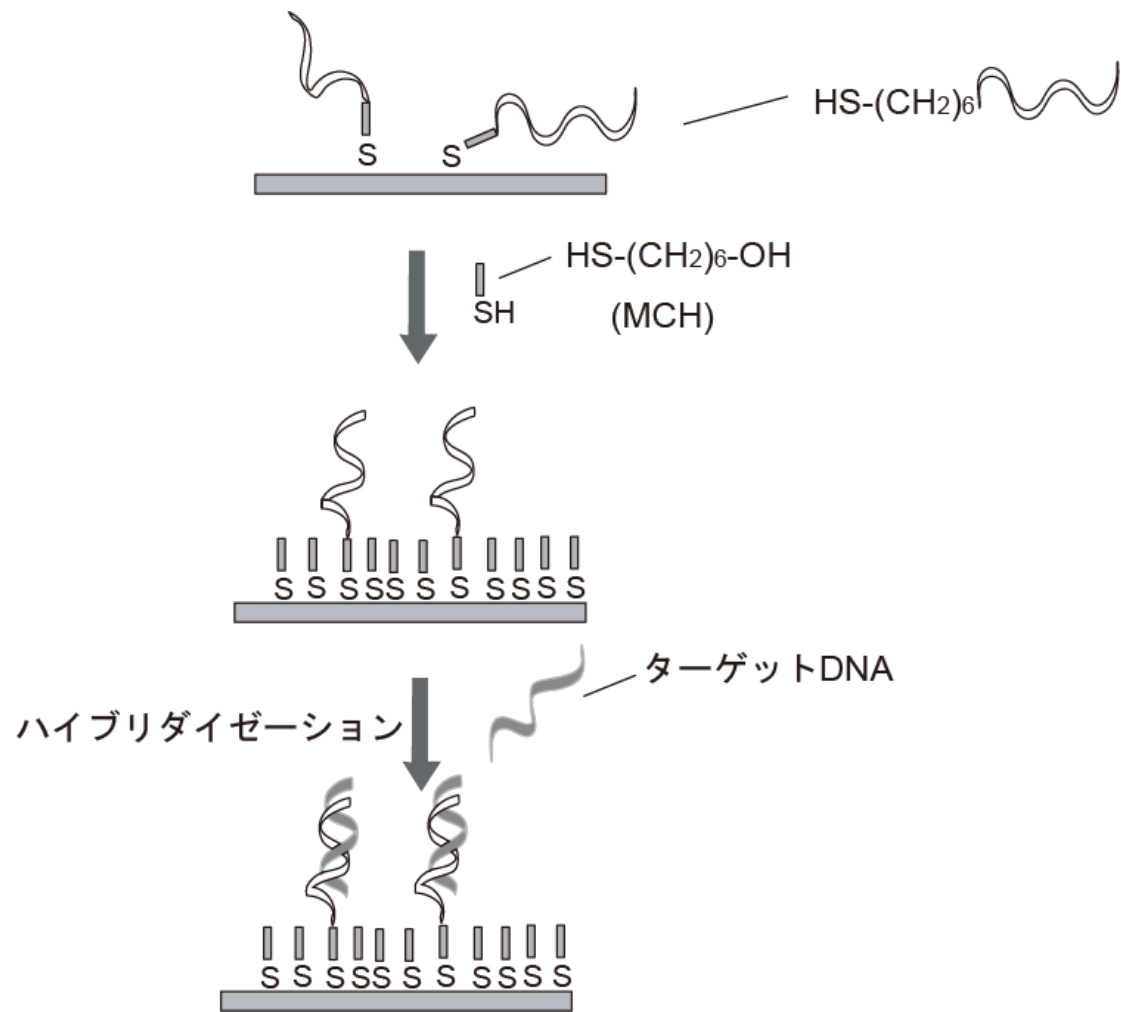
**図 5.8** 二重表面(DS)DNA ハイブリダイゼーションセンサーの原理。DS センサーの単一表面技術(SST, 図 5.5～7) (5.3.3 参照)とは異なり、DNA ハイブリダイゼーションが一方の表面(5.3.4 参照)で、もう一方の表面で電気化学的検出が行われる。ハイブリダイゼーションは、この目的に適した比較的大きな表面 H 上で行われる。例えばこの図に示されるように、DNA プローブは磁性ビーズに共有結合(またはアビジン-ビオチン結合)により結合される。次に標的 DNA は表面 H から放出されて、小さな検出電極上で測定される(測定には検出電極、マイクロ電極、ナノ電極が使用できる)。その代わりに標的 DNA を結合した磁性ビーズを電極(その下に磁石を設置)に引きつけて、DNA をビーズから分離することなく測定することもできる。電気活性を持つ様々な DNA 標識物が設計された。例えば金属ナノ粒子、オスミウム錯体、酵素、酵素結合イムノアッセイが例として挙げられる(5.3.4.1 参照)。炭素電極、固体の歯科用アマルガム電極、水銀電極が主に使用された。



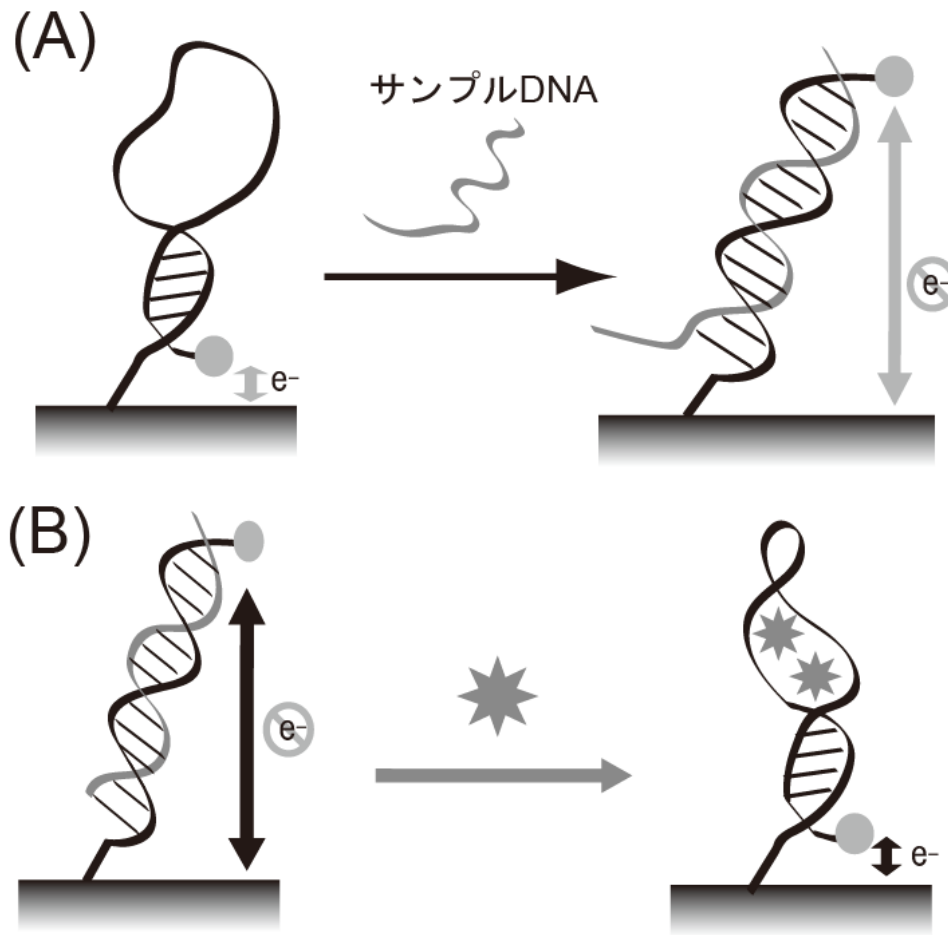
**図 5.9** 単一表面技術(SST) (5.3.3 参照)と二重表面技術(DST) (5.3.4 参照)を用いたレポータープローブ(RP)の利用。(A, i)単一表面技術において、RP 酸化還元標識は電極とやり取りを行う必要があるため、電極面に近い場所で tDNA 配列に結合しなくてはならない。この制約は、低分子化合物の形成または消失を触媒する酵素標識 RP を用いることにより克服できる。(A, ii)DST の場合、RP は表面 H(例えば磁性ビーズ)上で捕捉される tDNA と、tDNA のどの位置で結合しても良い。電気化学的分析は RP が電極に結合した次のステップで実施される(図 5.8 参照)。(B)DST においては、異なる電位で電気化学的信号を生じる様々な電気活性マーカを持つ複数の RP を使用することができる(5.3.4.1 と 5.3.4.2 参照)。神経変性疾患に対しては、トリプレット伸長の長さを測定するために、2 種類の RP が使われる。RP1 は一組のトリプレットと相補的であり、RP2 はゲノム DNA 中に一定の割合で存在する非反復配列と相補的である。トリプレット伸長の長さは、RP1/RP2 の強度比から計算される。



二本鎖DNA内の塩基対. 丸で囲ってある部分は, 水銀電極で還元される部位.  
 四角で囲ってある部位は炭素電極で酸化される部位.



金基板上へのチオール化オリゴヌクレオチドの固定化とメルカプトヘキサノール(MCH)によるマスキングの概念.



(A)シグナルオフ型のE-DNAセンサおよび(B) ATPアプタマーを例としたターゲット応答性電気化学的アプタマースイッチ (TREAS) の概念.



## 課題レポート

電気化学 (Electrochemistry), DNA検出(DNA detection), 高感度検出(high sensitive detection)をキーワードにして論文を選び、その論文の内容を要約して提出せよ。