

DNAの固定化と遺伝子センサーへの応用

中野, 幸二
九州大学大学院工学研究院応用化学部門

<https://hdl.handle.net/2324/7325076>

出版情報 : Hyomen Kagaku. 25 (12), pp.744-751, 2004-12-10. Surface Science Society Japan
バージョン :
権利関係 : Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International



DNA の固定化と遺伝子センサーへの応用

中 野 幸 二

九州大学大学院工学研究院応用化学部門 ☎ 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

(2004 年 9 月 6 日受理)

DNA Immobilization and Its Application to Gene Sensors

Koji NAKANO

Department of Applied Chemistry, Kyushu University
6-10-1 Hakozaki, Fukuoka 812-8581

(Received September 6, 2004)

Chemical derivatization of the terminal phosphate group of DNA, as well as the backbone linker phosphates, with sulfur-containing functional groups were developed for covalent attachment of DNA on gold surfaces *via* chemisorption. Results of IR measurements and quartz crystal microbalance analyses for the DNA-modified gold substrates were described and the immobilization chemistry of the present system was discussed. Next, the techniques of DNA immobilization were applied to develop a biosensor that can discriminate and respond to specific genes (gene sensor). Two examples of gene sensors both of which were coupled with electrochemical signal readouts have been successfully introduced; the first example of gene sensor was taking advantage of a redox-active psoralen compound that binds covalently with DNA and the next was achieved by the use of redox active surface adlayer having a DNA/ferrocene/Au interfacial structure. The basic feasibility of the gene sensor was also discussed.

1. は じ め に

核酸の科学がかつてない広がりを見せている。周知のように、2003 年 4 月、「ヒトゲノムの全シーケンスを解析してがんをはじめ、あらゆる病気の克服につなげよう」というヒトゲノム計画の終了が宣言された。これを受けて、ゲノムに書き込まれている機能情報を読み取って解析しようとする、さまざまな研究が行われている。具体的には、ヒトゲノムの多型解析に代表されるゲノム構造と機能との関連づけ、遺伝子の調節と発現プロフィールを収集するトランスクリプトーム解析、全タンパク質をカタログ化しそれらの相互作用（細胞生物学的な視点から）を網羅的に調べようとするプロテオーム計画などがある。これらは疾患の発症に関する遺伝子の解明、創薬や遺伝子治療、遺伝的体質に応じた薬物投与（オーダーメイド医療）など、私たちの生活に直結しているものが多く、医学や薬学はもとより、農学、工学などの分野を

巻き込んで急速に拡大しつつある。

遺伝子の機能解析を指向した研究では、DNA がホスト分子となる反応が鍵となる。そこでは遺伝子を取り巻くケミカルな相互作用と、それを通じた分子認識作用を効果的に検知する方法、いわゆる分子情報の読み出しが従来にも増して重要になる。しかし、DNA そのものは測定に適したユニークな性質に欠けるのでさまざまな工夫を凝らす必要が生じる。筆者らは、以前より DNA の構造と機能から類推して「DNA=材料」と捉え、バイオセンサーにおけるアフィニティリガンドとしての利用について研究してきた。最近では、DNA と合成低分子とのコンジュゲート系に展開させている。今回、DNA の固定化とバイオセンサー応用に関して執筆の機会を頂いた。そこで関連する最近の研究について紹介するとともに、DNA コンジュゲートを用いた私たちの取り組みについてまとめた。なお筆者らの初期の研究については、前報を参照して頂ければ幸甚である¹⁾。

Table 1. Typical methods of DNA immobilization.

Functional group	Position in ODN	Scheme of immobilization
-C ₆ H ₁₂ -SH	5', 3'	[Au] -S-C ₆ H ₁₂ -ODN
-C ₆ H ₁₂ -NH ₂	5', 3'	[E] -CO-NH-C ₆ H ₁₂ -ODN
O ₃ -P=S	backbone	[Au] -S-ODN
Biotin	5', 3', backbone	[E] -Av-Biotin-ODN

ODN, oligodeoxynucleotide; E, electrode; Av, Avidin

2. DNA の固定化

固相担体への DNA の固定化は、メッセンジャー RNA やタンパク質のクロマトグラフィー分離を目的に古くから行われてきた。私たちは、これらの方法を改変して DNA の末端に含硫黄置換基を導入することで、チオール基の化学吸着を利用した固定化法を開発した²⁾。その後、スルフィドリル誘導体化アミダイト試薬を用いて化学合成したチオール化オリゴヌクレオチド (ODN) の利用が報告され³⁾、分子生物学関連の企業によるカスタム合成サービスの普及も手伝って現在の主流となっている。

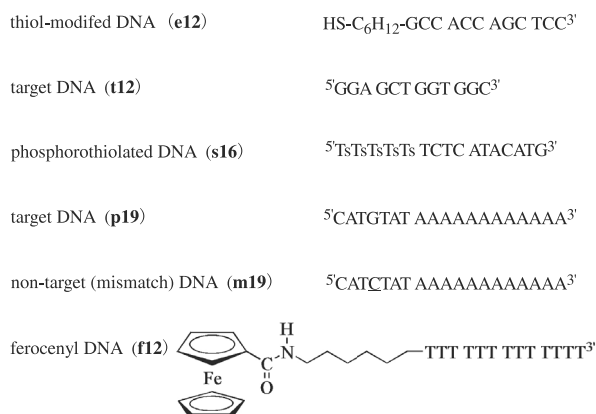
2.1 DNA 固定化反応のバリエーション

Table 1 に代表的な固定化スキームを示した。なおピオチン化 ODN は、ピオチン (ビタミン B 群のひとつ) 結合タンパク質であるアビジンやストレプトアビジンと組み合わせて用いられる。生成する複合体は特定の共有結合を形成するわけではないが、結合の解離定数は 10^{-15} M^{-1} 程度と十分な安定性を持っている。なおいずれの化学修飾 ODN も、カスタム合成サービスを利用して入手することができる。

現状での DNA 固定化の主流はチオール化 ODN と金基板との組み合わせである。この方法は液相吸着で固定化が行え、修飾電極とした場合も $+0.8 \sim +1.0 \text{ V}$ (Ag/AgCl) までの電位掃引であれば十分な安定性が得られる。また **Table 1** 以外にも種々の取り組みがなされている。例えばチオール化 ODN では、3-メルカプトトリメトキシシラン単分子膜⁴⁾、あるいはアルカンチオール単分子膜表面のチオール修飾⁵⁾と組み合わせることで、ジスルフィド結合生成を利用した固定化に利用されている。チオール化単分子膜とアクリルアミド誘導体化 ODN を組み合わせた付加反応による固定化法も興味深い⁶⁾。

2.2 固定化反応のキャラクタリゼーション

代表的な測定法として赤外吸収スペクトル (IR) 測定、水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いた重量測定の結果をまとめる。用いた ODN の構造を **Fig. 1** に示しているが、**s16** は、後述する **p19** (ターゲット DNA)

**Fig. 1.** Structure of DNA molecules.

と **f12** (レポーター DNA) と組み合わせた遺伝子アッセイの研究に用いた。また **e12** および **t12** は通常のハイブリダイゼーションアッセイのためのものであるが、肺、または結腸腫瘍細胞の遺伝子 (K-ras 12) のコドン 11 から 14 に対応するフラグメントである。

2.2.1 IR スペクトル

固体電極系なので高感度反射法を適用してスペクトルを得るケースが多い。**Fig. 2** に結果の一例をまとめた。吸収の強度はごく小さいので、測定雰囲気中の水 (水蒸気) によるバックグラウンドの影響を受けやすく、分光器内部を乾燥空気や窒素ガスでパージした状態で測定しなければならない。可能であれば、真空排気が可能な光学系を備えた機器の利用が望ましい。実際の測定では、バックグラウンドの除去が十分になされていれば、入射角 80° の条件で p 偏光の 1 回反射で十分なシグナルが得られる。なお 256 回程度スキャンして積算・平均化すればノイズ低減も十分である。

Fig. 2 に示す IR スペクトルのうち、(a) は仔ウシ胸腺由来の DNA をチオール修飾し固定化に用いた場合の結果である。糖リンカー由来の C-O-C 伸縮振動 (1032 cm^{-1})、リン酸由来の非対称、対称伸縮振動 (1216 cm^{-1} および 1121 cm^{-1})、および C=O 伸縮振動 (1662 cm^{-1}) など、DNA を特徴づける吸収が確認できる。なお 1500 cm^{-1} 付近のピークはプリン塩基由来の吸収と考えられ

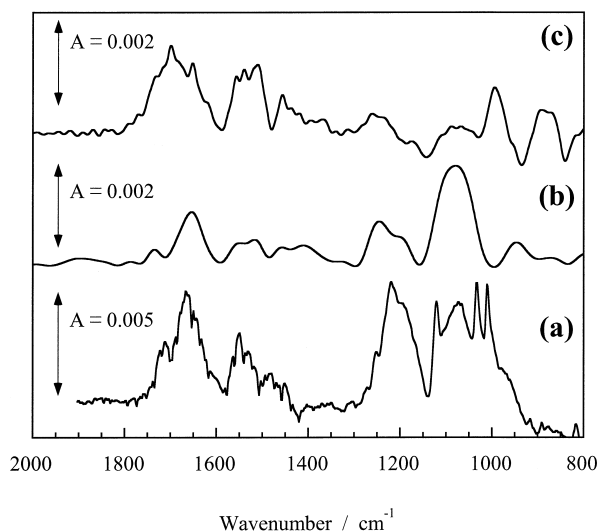


Fig. 2. IR spectra of gold substrates treated with (a) thiol-derivatized calf-thymus DNA, (b) thiol-terminated oligodeoxynucleotide duplex (**e12-t12**), and (c) oligodeoxynucleotide phosphorothioester (**s16**).

る。また (b) は、**e12** および **t12** の合成 ODN 二重鎖を固定化した基板について得られたデータである。後述するソラレン誘導体からの DNA コンジュゲートについてのデータであるが、スペクトル (a) と類似の特徴を備えていることが確認できる。最後に (c) は、s-オリゴ (**s16**, ホスホロチオエート型 ODN) についてのものである。やはり (a) に類似のスペクトルを示しており、s-オリゴでも金表面への固定化が起こることが確認できる。

2.2.2 QCM による重量測定

QCM 測定の結果、**s16** では固定化後の表面密度は 484 pmol cm^{-2} となった。この結果から、**s16** の占有面積として 0.34 nm^2 ($0.58 \text{ nm} \times 0.58 \text{ nm}$) が得られる。DNA 二重らせんは直径 2 nm の円柱様構造なので、この値はかなり小さいといえ、**s16** は凝集した状態ないしは多重層として吸着しているものと考えられる。しかし、ハイブリダイゼーションアッセイに伴う質量増加はごく小さなものに止まった。**p19-f12** 二重鎖換算で 45 pmol cm^{-2} の表面密度が得られ、占有面積 3.7 nm^2 (1.9 nm 四方) と理論値に近い。**s16** は、単独ではランダムコンホメーションで吸着しているものの、**p19-f12** とのハイブリダイゼーションによって二重らせんへのコンホメーション変化を起こすものと考えられる。

一方 **e12-t12** では 24 pmol cm^{-2} が得られ、占有面積に換算して 6.9 nm^2 であった。この値を DNA 二重らせんの断面積と比較すると、被覆率 45% と見積もることができる。私たちの経験では、DNA 修飾電極を用いる電気化学測定において、ファラデー電流の変化に着目する

と 50% 程度の面積減少を経験することが多い。QCM 測定の結果はこれに矛盾しない。なお参考までに、天然の DNA 二重鎖 (仔ウシ胸腺) をチオール修飾した場合には、固定化の表面密度は 34 pmol cm^{-2} となった。以上の結果から、チオール修飾を利用した DNA の固定化では、DNA の種類によらずほぼ一定の表面密度を示すことがわかる。

私たちの研究以外にも Petrovykh らによる光電子分光法を用いた評価⁷⁾, Kelly らによる原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた形態観察⁸⁾ などが報告されているので参照されたい。またハイブリダイゼーション効率から見た DNA の最適固定化密度にも興味を持たれるが、センサー素子表面での ODN 固相合成と組み合わせた Watterson らの研究⁹⁾ が参考になる。

2.3 コンジュゲート形成を利用した DNA 固定化法

DNA の配向状態は表面での反応性と密接に関連するので、Table 1 に示したような反応点 1 か所での固定化ではどのような配向状態をとるのかに興味を持たれる。文献⁸⁾ では、15 量体 ODN を固定化した金基板についての AFM 測定 (高さ) から、基板法線に対して 45° の配向角をとると結論づけている。しかし DNA の鎖長が長くなれば形態の自由度が増し、このため表面での構造は不可測のものになってしまうことが考えられる。対照的に、基板面に DNA を這わせるように固定化できれば、そういった不都合は生じない。東らは、単分子膜表面をインターカレーター (核酸塩基対間のスペースに平行に挿入された状態で結合する分子の総称) で修飾すると、DNA の固定化が起こることを報告している¹⁰⁾。これとは別に、私たちはソラレンと核酸塩基との光架橋反応を利用した固定化の研究を行っている。

ソラレン (フロクマリン) 化合物は UV 光 (350 nm 付近) 照射によりピリミジン塩基と架橋反応を起こす。この結合は、 250 nm 付近の光を照射して解離させることもできる。そこでアルカンチオール単分子膜と組み合わせた固定化法について検討した (Fig. 3)。これまでと同様に、水晶振動子を用いた重量測定では ODN (**K-ras 12**) の固定化量は 20 pmol cm^{-2} であった。また DNA 修飾基板を作用極に用いてボルタモグラムを測定すると、 $+1 \text{ V}$ (Ag/AgCl) 付近に不可逆な酸化ピークが観察された。これはプリン塩基の酸化反応 (6 電子) に由来するので、これを利用して 20 pmol cm^{-2} の固定化密度を得た。**K-ras 12** 二重鎖の鉛直方向の断面積は 8.2 nm^2 なので、単純に計算して飽和被覆量は $20.4 \text{ pmol cm}^{-2}$ となり、実験値と良く一致した。これまでの固定化法と比べて、本法ではより理想的な表面被覆が行えるものと結論づけられる。

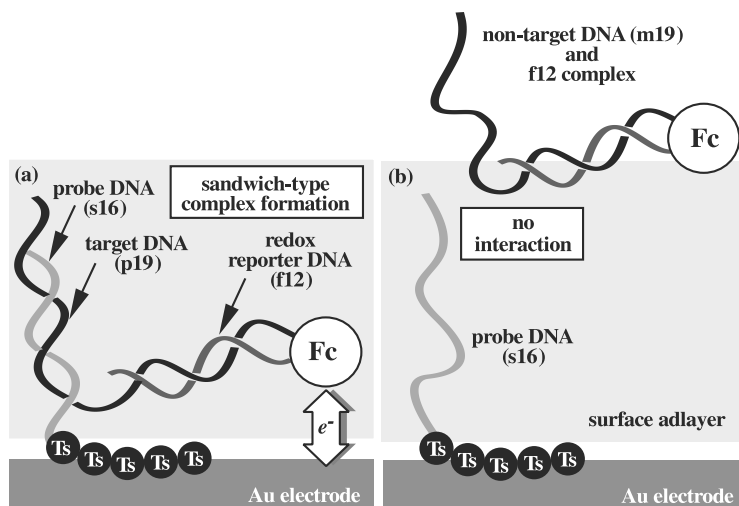


Fig. 4. Schematic illustration of electrochemical gene sensor based on sandwich-type ternary complex formation. Formation of the **s16-p19-f12** ternary complex makes the surface adlayer redox active (a) while the non-target DNA, **m19**, does not form a stable complex with **s16** (b).

私たちは、redox 活性なソラレン誘導体 (**FcPso**) を新たに合成し共有結合を介した不可逆なラベル化反応に応用した (Fig. 5)¹⁶。実験は **e12** と **t12** とのハイブリダイゼーション反応をモデルに行った。Fig. 5 に示すように、**e12-t12** 二重鎖の状態では容量性電流しか示さないのに対し、**FcPso** ($E^\circ + 184 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$) によるラベル化後には明確な酸化還元波を示すことがわかる。ボルタモグラムは表面反応特有の挙動を示し、式量酸化還元電位も $+200 \text{ mV (Ag/AgCl)}$ と、フェロセニル基由来の反応と考えて差し支えない結果であった。なお 2.2.1 に述べた IR 測定のうち、(b) のスペクトルは本系についてのものである。吸収ピークの重畳によりスペクトル解析は不十分であるが、フェロセンおよびソラレンに対する個別の測定から、各々の特性吸収帯が含まれることを確認している。

CV の酸化ピークから求めた **FcPso** の結合量は 72 pmol cm^{-2} であった。これは **e12-t12** の固定化量 (QCM 測定より 72 pmol cm^{-2}) の 3 倍となっている。**e12-t12** の配列中に含まれるチミンは 3 分子なので、ラベル化は定量的に起こるといって良い。なお **e12** 修飾電極単独では、**FcPso** 処理後にも明確な応答は認められなかった。以上のように、モデル系での検討ではあるが、K-ras 12 遺伝子の電気化学検出に成功している。

3.2 DNA コンジュゲート形成を利用したラベルフリー遺伝子センサー

最近になって、レポーター分子を必要としない遺伝子センサーの研究が活発になっている。例えば、電界効果

トランジスタセンサー¹⁷や交流電気化学測定¹⁸)の利用が検討されている。DNA はポリアニオンなので、センサーの表面電荷、あるいは電気容量に着目するのは妥当なことと考えられる。またテラヘルツパルス分光法の利用¹⁹など、従来にない取り組みも注目される。

一方、DNA の構造を工夫して、本来であれば分子認識作用しか示さない DNA に情報応答性を持たせる試みも種々検討されている。例えば Youssofi らは、電解酸化重合ポリピロール膜から修飾電極を調製し、続いてアミノ化 ODN (一本鎖) を化学結合させる方法を報告した²⁰。ポリピロール膜の酸化還元挙動から、ODN のハイブリダイゼーション反応が検出可能であるとしている。Lassalle らはさらに進んで、ピロール置換型アミダイト試薬を用いるピロール修飾 ODN の合成について報告し、一段階でのセンサー作製法を実現した²¹。これらとは別に、私たちも電極表面の感応物質層を工夫したラベルフリーセンサーの研究を行っている²²。

Fig. 6 に電極の調製スキームを示す。単分子膜修飾電極にフェロセンジカルボン酸 (**Fc**) を結合させ、さらに、表面に残存するカルボキシル基を介して ODN の固定化を行う。ややトリッキーな方法ではあるが、IR 測定から、ODN/**Fc**/電極という構造の修飾電極が作製できることを確認している。Fig. 6 には電極の CV も併せて示した。まず **Fc** 固定化電極は $+500 \text{ mV (Ag/AgCl)}$ 付近に明瞭な酸化波を示すことがわかる。均一系での酸化電位は $+200 \text{ mV (Ag/AgCl)}$ 付近なので、電極界面では酸化体の生成が抑制されているものと考えられる。

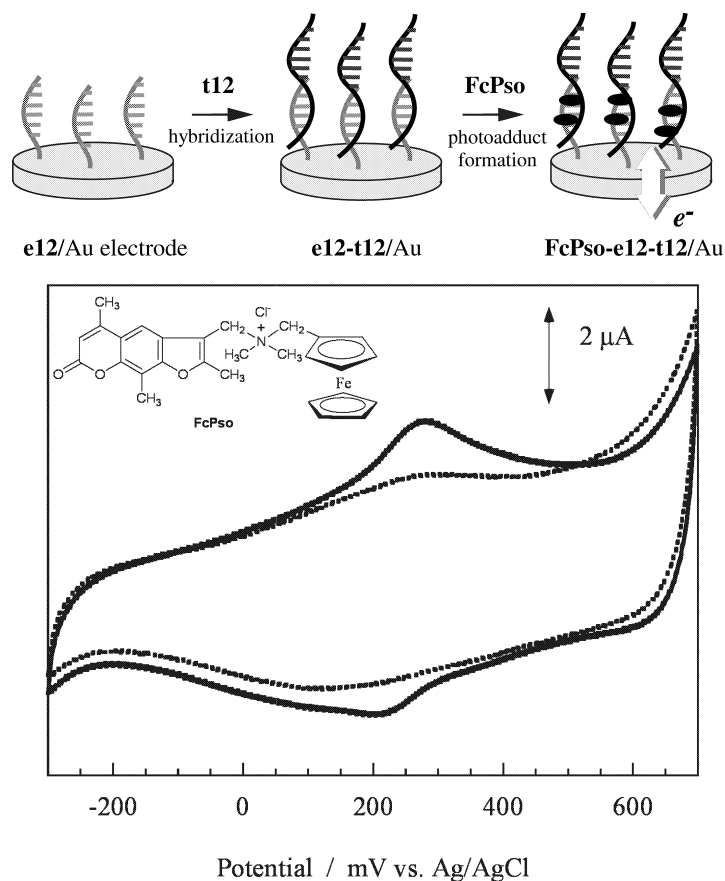


Fig. 5. Cyclic voltammograms of DNA-modified electrode prepared from **e12-t12** duplex (dotted line) and after treatment with **FcPso** (solid line). Scan rate 50 mV s^{-1} , room temperature, electrolyte 200 mM KCl .

Fc の酸化反応が円滑に進行するためには、生成するフェリシニウムイオン由来の電荷が対イオンによって中和されなければならない。現状では推論にすぎないが、電極表面の単分子膜が対イオンの拡散・供給を阻害し、これが反応の抑制につながっているものと考えている。

修飾電極に **T12** を固定化すると、ピーク電流値の抑制（約 50 %）が見られた。**A12** とのハイブリダイゼーションはより一層の反応の抑制につながり、ピーク電流値は 20 % 程度にまで低下した。なお **Fc** 修飾電極単体では繰り返しの電位掃引でも安定した CV が得られ、**T12-A12** 二重鎖形成後に熱変性させた場合には **T12** 修飾電極と同等の CV を示した。以上の結果は、一連の CV 応答がフェロセニル基の脱着や分解によるものではなく、表面構造の変化を反映したものであることを示している。

この系では、別途 QCM による重量測定も行っている。まずアルカンチオール単分子膜の吸着量は $1.77 \text{ nmol cm}^{-2}$ と、金-硫黄配位結合を仮定して見積もられている理論値（ 760 pmol cm^{-2} ）よりもかなり大きくなった。

このことから、配位結合の生成なしに単分子膜形成に関与しているチオール分子がかなりの程度を占めているものと考えている。一方 **Fc** の固定化量は $1.34 \text{ nmol cm}^{-2}$ となった。したがって固定化反応はほぼ定量的に進み、配位結合に関与していないチオール分子でも、膜に取り込まれることで安定に存在することがわかる。これに対し **T12** の固定化量は 90 pmol cm^{-2} と、全フェロセン分子の 15 % しか反応しなかった。**A12** とのハイブリダイゼーションはさらに限られた程度に止まり、 32 pmol cm^{-2} と全 **T12** 量の 36 % であった。これらの結果は ODN の分子サイズや立体障害の影響といえよう。**T12-A12** 二本鎖では 2.2.2 に述べた結果と良く一致していることもこれを支持する。

以上のように QCM 測定と CV 応答が結びつけられたことから、より詳細な応答の機構の解明も含めてラベルフリーなハイブリダイゼーションアッセイへの応用について検討している。

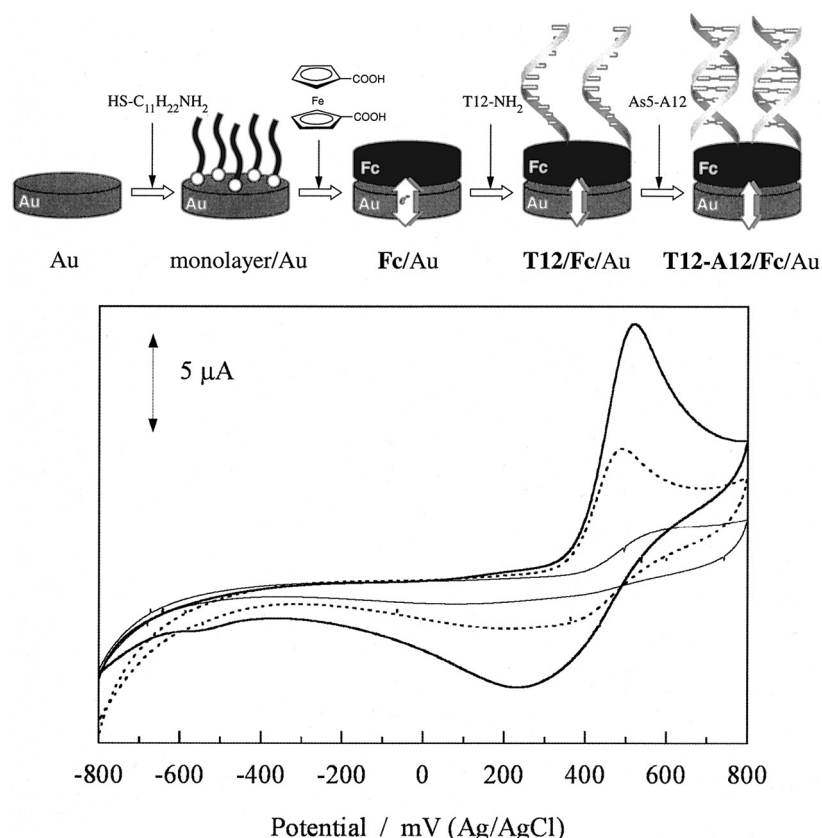


Fig. 6. Scheme of electrode preparation and cyclic voltammetric responses for **Fc/Au** electrode (thick line), **T12/Fc/Au** (dotted line), and **T12-A12/Fc/Au** (thin line). Scan rate 25 mV s^{-1} , room temperature, electrolyte 100 mM KCl.

4. ま と め

本報告ではDNAの固定化に関する基礎的キャラクターゼーションの結果についてまとめ、併せてその応用研究として電気化学遺伝子センサーについて紹介した。最後に今後の研究の方向付けについて考えてみたい。

まず、最近のゲノム研究の動向として一塩基多型現象 (single-nucleotide polymorphism, SNP) に興味が集まっていることを指摘すべきであろう。ヒトの遺伝子は個々人で少しずつ異なっており (ゲノム全体で100万~300万箇所存在するといわれている), 遺伝疫学からの取り組みの結果, SNPが遺伝的性質, 疾患の発症と薬効, さらに性格などにも関連があると考えられるようになってきているためである。しかしSNPは単純なハイブリダイゼーションアッセイでは判別できず, プライマー伸張反応の利用に期待が寄せられている。遺伝子センサーでもこのようなアプローチの取り込みが始まっている。具体的には, 電極に固定化したキャプチャーDNAとターゲットDNAをハイブリダイゼーションさせる。このとき標的サイトを挟んで電極側が二重鎖に, 溶液側が一

本鎖のままに残るように設計する。この状態でポリメラーゼを作用させ, 適宜ラベル化した基質ヌクレオチドを取り込ませ検出に利用する。Willnerらは, アルカリフォスファターゼと組み合わせた電気化学的な酵素アッセイ法について報告している²³⁾。

次に, ゲノム研究は大規模なデータ収集と分かちがたく結びついていることを改めて指摘すべきであろう。さほど大きくはない10量体遺伝子でもその組み合わせは100万種類に達する ($4^{10}=1,048,576$)。したがってハイスループット化が絶対条件といえ, 2Dアレイセンサーはその有力候補といえよう。アレイ状に配列させた電極を独立して作用させれば, 多検体の一斉分析が可能になる。一方, アレイセンサーを補完する測定法として, 走査電気化学顕微鏡 (SECM) の利用が考えられる。SECMは, 試料表面を微小電極 (直径数十 μm 程度) で走査しながら定電位電解を行う方法であり, 2Dアレイセンサーの電気化学イメージングを基礎としたハイスループット分析が期待される。しかしSECMでは, メディエーターのリサイクリング (微小電極で生成した酸化体が試料電極側で還元されたのちに再酸化される) を利用して

イメージングを行う。このため、単なるガラス基板に作製した DNA マイクロアレイでは、肝心の還元反応が起こらないので何らかの工夫が必要になる。Wang らは、ガラスベースのマイクロアレイを用いながらも、表面の DNA スポット選択的に Ag (0) 析出反応を行わせることで *in-situ* にて電気化学系を作りだし、これにより SECM イメージングに成功している²⁴⁾。

私たちは、微小電極アレイをベースに、3.2 に述べた DNA コンジュゲートによる表面修飾を組み合わせた系で SECM イメージングの実験をしている。このような系では、1) メディエーターリサイクリングが保証でき、2) 試料側成分の電極触媒反応に着目した高感度分析も可能というメリットがある。2D イメージングは、アレイセンサー系でのハイスループット分析の強力な武器になるので注力して実験を行っており、結果については機会を改めて紹介させて頂きたい。

文 献

- 1) 中野幸二：ぶんせき **2001**, 125 (2001).
- 2) M. Maeda, Y. Mitsuhashi, K. Nakano and M. Takagi: Anal. Sci. **8**, 83 (1992).
- 3) Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijio, M. Mukae, A. Murakami and K. Makino: J. Am. Chem. Soc. **114**, 8299 (1992).
- 4) R. Lenigk, M. Carles, N.Y. Ip and N.J. Sucher: Langmuir **17**, 2497 (2001).
- 5) E.A. Smith, M.J. Wanat, Y. Cheng, S.V.P. Barreira, A.G. Frutos and R.M. Corn: Langmuir **17**, 2502 (2001).
- 6) L.M. Demers, D.S. Ginger, S.-J. Park, Z. Li, S.-W. Chung and C.A. Mirkin: Science **296**, 1836 (2002).
- 7) D.Y. Petrovykh, H.K.-Suda, L.J. Whitman and M.J. Tarlov: J. Am. Chem. Soc. **125**, 5219 (2003).
- 8) S.O. Kelly, J.K. Barton, N.M. Jackson, L.D. McPherson, A.B. Potter, E.M. Spain, M.J. Allen and M.G. Hill: Langmuir **14**, 6781 (1998).
- 9) J.H. Watterson, P.A.E. Piuino, C.C. Wust and U.J. Krull: Langmuir **16**, 4984 (2000).
- 10) N. Higashi, M. Takahashi and M. Niwa: Langmuir **15**, 111 (1999).
- 11) 中野幸二, 松永英士：未発表データ.
- 12) K. Hashimoto, K. Miwa, M. Goto and Y. Ishimori: Supramol. Chem. **2**, 265 (1993).
- 13) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto and H. Kondo: Anal. Chem. **72**, 1334 (2000).
- 14) T. Ihara, M. Nakayama, M. Murata, K. Nakano and M. Takagi: J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1997**, 1609 (1997).
- 15) C.J. Yu, Y. Wan, H. Yowanto, J. Li, C. Tao, M.D. James, C.L. Tan, G.F. Blackburn and T.J. Maeda: J. Am. Chem. Soc. **123**, 11155 (2001).
- 16) K. Nakano, S. Shirakawa, S. Taguchi and M. Maeda: Anal. Sci. **17** (Supplement), i 291 (2002).
- 17) J. Fritz, E.B. Cooper, S. Gaudet, P.K. Sorger and S.R. Manalis: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 14142 (2002).
- 18) H. Berney, J. West, E. Haeefe, J. Alderman, W. Lane and J.K. Collins: Sensors and Actuators, B **68** (1-3), 100 (2000).
- 19) M. Nagel, F. Richter, P. H-Bolivar and H. Kurz: Phys. Med. Biol. **48**, 3625 (2003).
- 20) H. K-Youssoufi and A. Yassar: Biomacromolecules **2**, 58 (2001).
- 21) N. Lassalle, A. Roget, T. Livache, P. Mailley and E. Vieil: Talanta **55**, 993 (2001).
- 22) K. Nakano, T. Anshita, M. Nakayama, H. Irie, Y. Katayama and M. Maeda: ACS Symposium Series **815**, 71 (2002).
- 23) F. Patolsky, A. Lichtenstein and I. Willner: Nat. Biotechnol. **19** (March 3), 253 (2001).
- 24) J. Wang, F. Song and F. Zhou: Langmuir **18**, 6653 (2002).