

技術資料

簡易型酵素センサの試作

小久保弘樹*¹ 松生秀正*²

Fabrication of a Simplified Enzyme Sensor

Hiroki KOKUBO and Hidemasa MATSUO

微小電極型酵素センサのプロトタイプとしてグルコースセンサを試作した。回路基板用の製版フィルムをマスクとして用い、リフトオフ法により金電極をガラス基板に形成させたところ、35 μm程度の線幅を持つ櫛形電極が作製できた。グルコースオキシダーゼをグルタルアルデヒドとの架橋反応により櫛形金電極に固定し、タレピンから試料溶液を電極上に滴下したときの応答特性を評価したところ、3分程度経過したところで、試料溶液濃度に対して正の相関を持つ応答特性が現れることがわかった。

1. はじめに

近年、急速に発展しつつある生命科学は新たな主要産業へ発展していく可能性を秘めており、生命科学とエレクトロニクスの融合を図るバイオエレクトロニクスに対しても、多くの関心が寄せられるようになってきている。特に、酵素や免疫系の持つ高度な分子識別能力を応用するバイオセンサは、バイオエレクトロニクスの中でも期待されている技術の一つであり、センサの信号変換方式や伝達系の改良、新規の酵素を用いたセンサの開発等が盛んに行われてきた。最近では、攪拌を行うことなく定常もしくは準定常電流での測定が可能であること、電極反応電流と無関係な充電電流を小さくできること等の理由から、微小電極を用いたバイオセンサに注目が集まりつつある¹⁾。そこで本研究では、微小電極による酵素センサを試作し、得られたセンサの特性評価を行った。

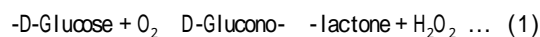
2. 実験方法

2.1 作製方法

微小電極は、リフトオフ法によりガラス基板上に形成させた。電極用薄膜の形成では、SEM試料調整用の簡易なスパッタ装置を用い、装置の都合上、電極材料は金とし、金とガラスとの間にはクロム等の接着層は設けなかった。電極の基板への付着力改善法として、あらかじめガラス基板を表面粗さ Ra = 0.5 μm程度まで粗面化する方法を用いた²⁾。パターン製作用マスク

は、回路基板用の製版フィルムを用いて作製し、また、レジストはHPR1183(富士フィルム)を使用した。

酵素は、次式の反応を触媒するグルコースオキシダーゼ(EC1.1.3.4、和光純薬: Aspergillus niger 由来、以下GOD)を用いた。



また、微小電極上への酵素の固定化は、牛血清アルブミン(和光純薬: 和光一級、以下BSA)とグルタルアルデヒド(和光純薬: 生化学用70wt%、以下GA)を用いた架橋法により行った。具体的には、GOD溶液(0.1M、pH6.1リン酸緩衝液中のGOD濃度が4,000U/mLになるように調整したもの)3 μLとBSA溶液(0.1M、pH7.5リン酸緩衝液中のBSA濃度が110mg/mLになるように調整したもの)30 μL、GA溶液(0.1M、pH7.5リン酸緩衝液中のGA濃度が7wt%になるように調整したもの)4 μLを十分に混合し、その混合液4.5 μL(GOD: 1.46U)を基板上に固定した。基板が粗面化されているため、酵素膜の基板への付着は良好であり、センサの特性評価中に酵素膜の剥離は一切なかった。

2.2 評価方法

微小電極及び酵素センサの評価には、0.1M塩化カリウムを含むリン酸緩衝液(0.1M、pH7.5)に、過酸化水素またはグルコースを所定の量溶かしたものをを用いた。微小電極の評価では、試料溶液を入れたピーカに電極を浸し、スタラーにより一定レベルで攪拌しながら測定した(図1(a))。酵素センサの評価では、タレピン

*1 機械電子部 *2 現)(財)科学技術交流財団

から試料溶液を酵素膜上に2滴垂らし、その応答特性を測定した(図1(b))。なお、試料溶液1滴当たりの質量は $53.5 \pm 3.8 \text{ mg}$ であり、その分布はきれいな正規分布であった(図2)。微小電極の評価は、ピーカとスターを低温恒温水槽に設置することにより、また、酵素センサの評価は作製したセンサホルダ(写真1)と温度コントローラ(図3)を用いることにより、温度を35に保った状態で行った。微小電極及び酵素センサの電流応答特性はデジタルエレクトロメータ(アドバンテスト製TR8652)を用いて測定し、酵素センサの特性評価ではノイズ除去のため、デジタルフ

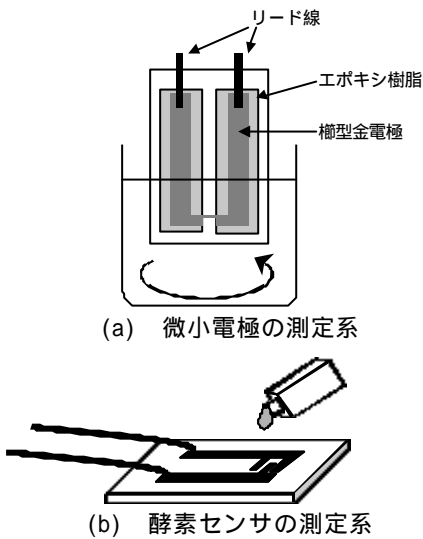


図1 測定系

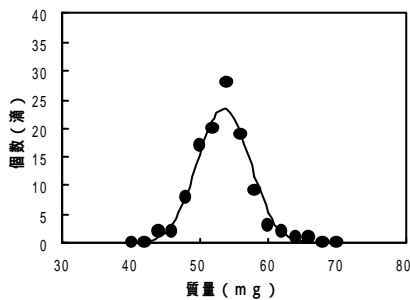


図2 タレピン1滴当たりの質量分布

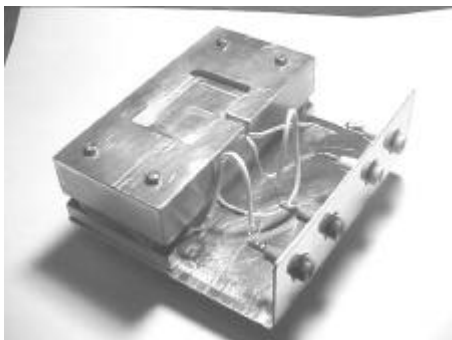


写真1 センサホルダ

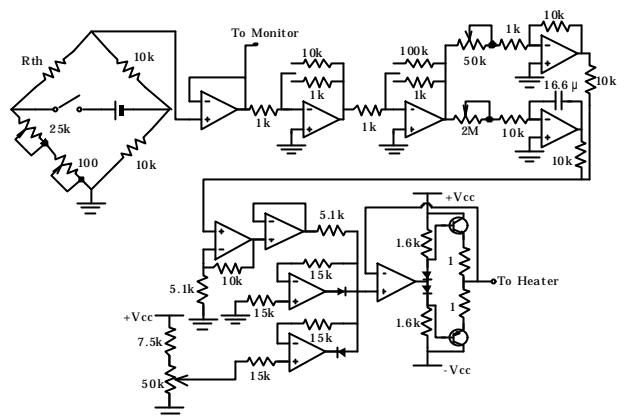
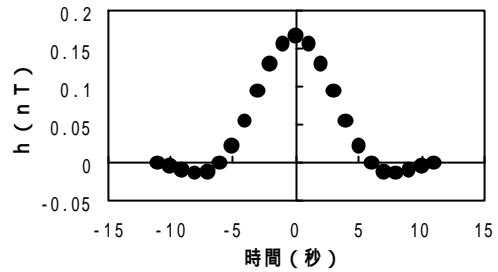
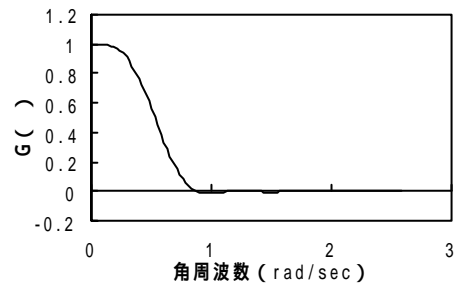


図3 P I 温度コントローラ



(a) フィルタのインパルス応答



(b) フィルタの伝達関数

図4 デジタルフィルタ($f_c=1/12 \text{ Hz}$)

ィルタも挿入した。デジタルフィルタは、位相が周波数と関係なく一定になるように、最小自乗設計法により設計した³⁾(図4)。

3. 実験結果及び考察

写真2に今回試作した微小電極を、また、図5にその電気的特性を示す。回路基板用製版フィルムをマスクとして用いる本方法では、最小線幅 $35 \mu\text{m}$ 程度まで作製可能であった。

電気的特性において電極のアノード及びカソードで

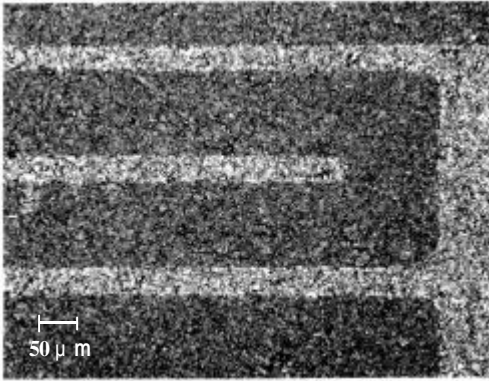
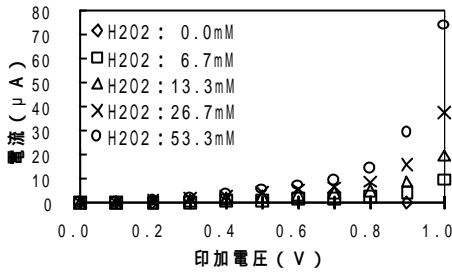
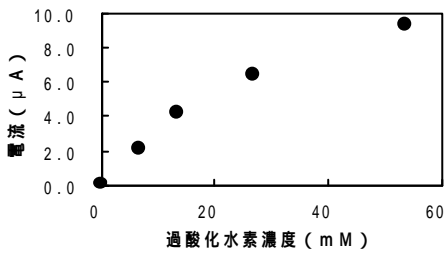


写真2 櫛形微小電極

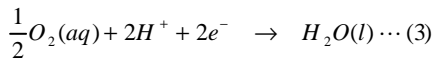
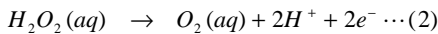


(a) 微小電極の電圧電流特性



(b) 電極電流の過酸化水素濃度依存性 (印加電圧: 0.7V)

図5 微小電極の電気的特性



の反応が起きているとした場合の電流の流れ始める電圧を見積もると次のようになる。但し、(2)、(3)式の括弧内の *aq* は、その物質が水溶液中に存在していることを表し、*l* は液体状態にあることを表している。標準生成エンタルピーを $\Delta H_f^0(T)$ 、標準エントロピーを $S^0(T)$ 、標準生成ギブスエネルギーを $\Delta G_f^0(T)$ 、標準溶解ギブスエネルギーを $\Delta G_{sol}^0(T)$ として、(4)~(8)式の近似を用いる。

$$\Delta H_f^0(308K) = \Delta H_f^0(298K) \dots (4)$$

$$\Delta S^0(308K) = \Delta S^0(298K) \dots (5)$$

$$\Delta G_f^0(308K) = \Delta H_f^0(298K) - 308 \times \Delta S_f^0(298K) \dots (6)$$

$$\Delta G_{sol}^0(308K) = \Delta G_{sol}^0(298K) \dots (7)$$

ここで、 $\Delta S_f^0(T)$ は反応に伴う標準生成エントロピーである。表1の値を用いて計算すると、電極反応におけるギブスの自由エネルギー変化は80.9kJ/molであり、これはeV換算で0.84eVとなる。従って、反応に伴うギブスの自由エネルギー変化は電極電圧で0.42Vに相当することになり、それ以上の電圧で電流が流れ得ることになる。本実験でも0.5V前後から急激に電流が流れ始め、その値が過酸化水素濃度の増加に伴って単調に増加することから、観測された電流が過酸化水素の分解反応に伴うものであることがわかる。

表1 反応に関わる物質の熱力学的な諸量⁴⁾

() 内の *g*、*l* はそれぞれ気体、液体を表す。

物質	$\frac{\Delta H_f^0(298K)}{kJ mol^{-1}}$	$\frac{S^0(298K)}{J K^{-1} mol^{-1}}$	$\frac{\Delta G_{sol}^0(298K)}{kJ mol^{-1}}$
$H_2(g)$	0	130.575	18
$H_2O(l)$	-285.83	69.91	—
$H_2O_2(l)$	-187.78	109.6	-28.5
$O_2(g)$	0	205.029	16

電流の増加する割合は、高濃度側において、やや飽和傾向を示す結果になった。一般に、電極表面での反応が十分速い場合、十分に攪拌していても電極近傍の一定領域では拡散のみによって物質の移動が行われること、また、拡散方程式は線形方程式であることを考慮すれば、電流値は過酸化水素濃度に比例するはずである。従って、本実験で電流に飽和傾向が現れた原因として、電極表面上での反応速度が十分でなかったことが考えられる。

微小電極の櫛形部分にGODを固定し、残りの部分をエポキシ樹脂で覆った酵素センサと、そのグルコース溶液に対する応答特性を写真3及び図6に示す。試料溶液滴下後3分程度で、電流値とグルコース濃度が単調増加の関係になったが、実験時間内に定常電流は観測できなかった。これは、電極材料の触媒能の問題に加えて、電極のサイズが微小電極の特性を引き出せると考えられている値(数十μm程度⁵⁾)と同程度であり、微小化の効果が顕著に現れにくい状況になっていたためであると思われる。

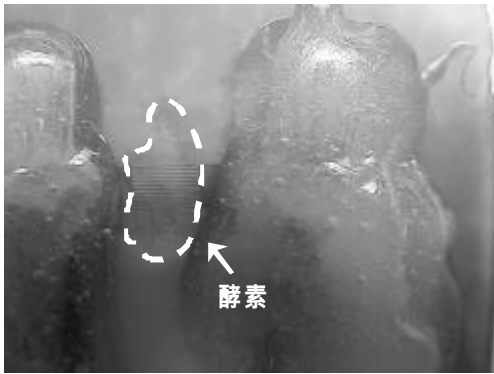
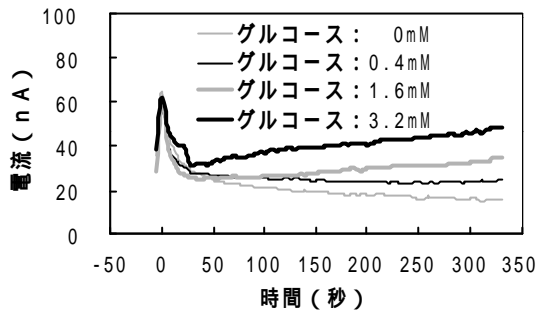
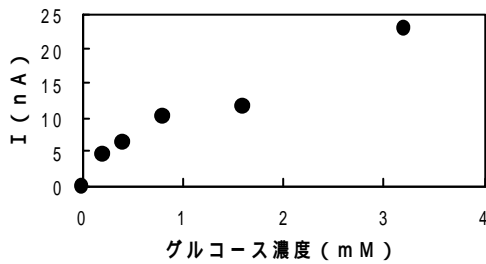


写真3 酵素センサ



(a) 試料溶液滴下後の電流変化



(b) 電流増加量の過酸化水素濃度依存性
(試料溶液滴下して3分後)

図6 酵素センサの応答特性(印加電圧: 0.7V)

4. まとめ

本研究では、新規酵素によるバイオセンサ作製の前段階として、GODによる酵素センサを試作し、その特性評価を行った。今回は実験に用いることのできる電極材料に制限があったため、問題点の原因を断定するに至らなかったが、今後は電極材料の変更や作製方法の改良について検討していく予定である。また、酵素膜の膜厚が応答特性に与える影響や、マイコン等による実測値からの推定方法についても検討していく予定である。

参考文献

- 1) 青木ほか：微小電極を用いる電気化学測定法，電子情報通信学会(1998)。
- 2) 小久保，松生，室田：愛知県工業技術センター報告,35,39(1999)。
- 3) P.Bloomfield：Fourier Analysis of Time Series; An Introduction, John Wiley & Sons(1976)。
- 4) 日本化学会編：化学便覧 基礎編，丸善(1984)。
- 5) 北村房男：Electrochemistry, 68(1), 63(2000)。