新規バイオセンサーの開発

化学応用工学科　本仲純子

Introduction

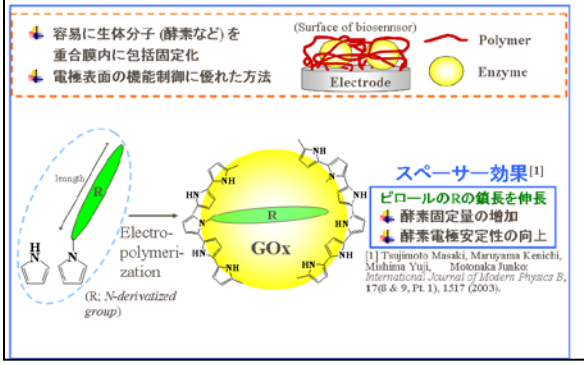
酵素電極に求められる特性

- 簡便な電極作製法
- 高感度と高選択性
- 電極の長期安定性

固定化酵素の特性が大きく影響するため
酵素固定化法の選択が重要

電解重合法

- 容易に生体分子 (酵素など) を重合膜内に包括固定化
- 電極表面の機能制御に優れた方法



スペーサー効果[1]

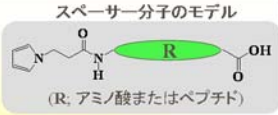
ピロールのRの鎖長を伸長
- 酵素固定量の増加
- 酵素電極安定性の向上

[1] Tsujimoto Masaki, Maruyama Kenichi, Mishima Yuji, Motonaka Junkor, *International Journal of Modern Physics B*, 17(8 & 9, Pt. 1), 1517 (2003).

アミノ酸導入ピロールに着目

アミノ酸を用いる利点
- 多様な種類と性質を有する
- 末端にカルボキシル基を有する
  → 電子メディエーターなどの固定化が可能
- 合成が容易

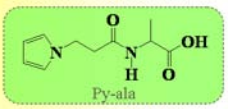
スペーサー分子のモデル



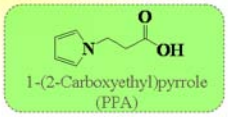
(R; アミノ酸またはペプチド)

具体的には
- 固定化対象分子に分子量の異なる酵素を使用
  - グルコースオキシダーゼ (GOx, M.W. = 186 kDa)
  - ペルオキシダーゼ (HRP, M.W. = 44 kDa)
- スペーサー機能を有するピロールを合成
  - アラニン導入ピロール (Py-ala)
  - 1-(2-Carboxyethyl)pyrrole (PPA)

電解重合法による酵素分子の固定化に及ぼす影響について、比較検討



Py-ala



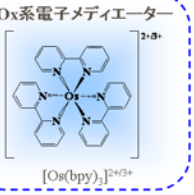
1-(2-Carboxyethyl)pyrrole (PPA)

- 電子メディエーター の固定化

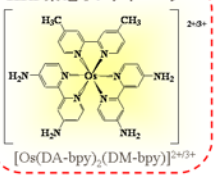
電子メディエーター

測定溶液
酵素-基質反応による電子移動を電極まで媒介
高感度な測定を行うための電子メディエーター(Os錯体)
を溶解させたpH 7.0 リン酸緩衝溶液

GOx系電子メディエーター



HRP系電子メディエーター



bpy ; 2,2'-Bipyridine
DA-bpy ; 4,4'-Diamino-2,2'-bipyridine
DM-bpy ; 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridine

実サンプル測定

Table 1 The determination value of D-Amino acid in human urine with D-Pro DH / agar immobilized GC electrode

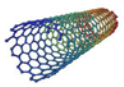
Sample	Determination value(mM) ± S.D.[a]	R.S.D.[b] (%)
Human urine	1.39 ± 0.12	8.9

a) [Mean±standard deviation], which was estimated from triplicate measurements
b) Relative standard deviation

ヒト尿中のD-アミノ酸の定量可能

高導電性カーボンナノチューブ(CNT)ゲルに着目[3]

- CNTを媒体とした新規導電性ゲル
- 電極への修飾が容易



(既存) CNTゲル
- ナフィオン・PVI・キトサン・イオン性液体
  - 均一な分散
  - 加熱重合による容易なゲル形成

[3] T. Aida et al, Science, 2003 300 2072

検討項目

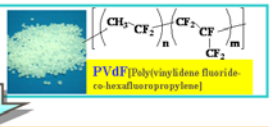
- CVによる電気化学評価
- CNT電極作製条件の最適化
- CNT未修飾電極との感度比較
- 実サンプル測定

D-Pro DH/CNTゲル電極の作製

①単層CNTとイオン性液体($BMIBF_4$)を乳鉢で混合

粉末状のCNTがペースト状へと変化

②ペースト状CNTとPVdFを4-メチル-2-ペンタノン溶液中でと加熱重合



③CNTゲルとD-ProDH/寒天溶液を順次電極上にスピンコート

食品中Dアミノ酸の定量

Table 4 The determination value of D-Amino acid in vinegar and alcohol with D-Pro DH / CNT immobilized GC electrode

Sample	Determination value(mM) ± S.D.[a]	R.S.D.[b] (%)
Vinegar	0.55 ± 0.05	7.2
Alcohol	0.0210 ± 0.0002	0.8

a) [Mean±standard deviation], which was estimated from triplicate measurements
b) Relative standard deviation

CNT / D-Pro DH電極で食品中のD-アミノ酸を定量可能