チタン酸化物ナノファイバーを用いた直接電子移動型バイオセンサー

Biosensor based on direct electron transfer with titanium oxide nanofiber

○高井まどか, So-Yoon Lee (東大院工)

Madoka TAKAI, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo, Japan
 So-Yoon Lee, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

Direct electron transfer (DET) from biomolecules to electrode is a process without electron-mediator, thus superior selectivity and sensitivity is expected in order to monitor electron transfer between electrode and biomolecules without any mediator interference. However, DET occur hard because a redox center which is an electron active center of proteins such as enzymes is buried deep. So, unique electrode nanostructure to reach the redox center is a critical factor. Here we have systematically investigated terms for DET using various nanofiliform electrode morphology and enzyme concentrations. It is pointed out that the reaction-site is below 100 nm, the ration amounts of adsorbed enzyme per surface area are below 1.0 are contributed to the DET. As a great application, we have developed a biosensor monitoring the hydrogen peroxide (H_2O_2) detecting capability from peroxidase directly. The fabricated HRP/nTOF/Ti-electrodes observed the catalytic current value was linear according to increase in the concentration of H_2O_2 up to 100 μM , which indicates a good potential for H_2O_2 biosensor.

titanium oxide film, nanofiliform, direct electron transfer, biosensor

1. 緒言

ナノ構造を有するチタン酸化物は、ナノ構造特有の物性の発現、さらにチタン酸化物特有の生体適合性、電気特性、光物性を示すなど様々な興味深い物性をあわせもつ材料である。チタン酸化物のナノ構造体を作製する手法として、ゾルゲル法、アノード酸化法などがある。我々は高濃度のアルカリ溶液中でチタンを腐食させると、ナノ構造を有するチタン酸化膜が形成されること[1]、また、ナノファイバー状のチタン酸化物は優れた電気伝導性を示すことを見いだした[2]。このアルカリ腐食法は他の方法と比較し、簡便に低コストでナノ構造体が得られることに特徴がある。本報告は、アルカリ腐食により作製された、カリウムが含有するチタン酸化物ナノファイバーを、固定化した酵素から電子メディエータを介さず直接電子移動を行う新規バイオセンサーへ応用することを目的とした。

2. 実験

2.1) アルカリ腐食によるチタン酸化物ナノファイバーの作製と物性評価

研磨により酸化物を除去した純チタン金属(Ti > 99.8%, Nilaco Co., Tokyo, Japan)を、KOH溶液 (1.0, 5.0, 10, 15, 20, 25 M) に24時間浸漬した。純粋で洗浄後表面を、走査型電子顕微鏡 (FE-SEM; JEOL JSM-6500F) により表面構造観察を行った。またチタングリッドを用いて同様なアルカリ腐食処理を多量したサンプルを用いて、透過型電子顕微鏡(TEM; Hitachi H-700)により構造解析した。処理したチタンに含まれる成分を、ラマン散乱および蛍光X線(XRF; JEOLJSX-3202M)により同定し、エネルギー分散X線分析(EDXA; JEOL JSM-6500F)にて組成を、また化合物の状態分析を、X線光電子分光 (XPS; Kartos/Shimadzu AXIS-His 166) により行った。

2.2) チタン酸化物ナノファイバーの電気物性評価

アルカリ腐食により形成されたチタン酸化膜の電気物性は、擬似金属-酸化物-半導体電界効果トランジスタ(MOSFET)で評価した。

2.3) チタン酸化物ナノファイバーを用いたバイオセンサーの作製

アルカリ腐食で形成されたチタン酸化物ナノファイバー表面へ、酵素 (ペルオキシターゼ; HRP) を直接固定化した。固定化には、1000, 1500, 2000 U/mL の濃度の溶液を用い、4°C の条件で、12 時間浸漬させた。この電極を作用電極、陽極に白金を用いて電気化学測定をお行い、酵素の電極への直接電子移動を評価し、さらにこの電極を用いて、過酸化水素の測定を行った。

3. 結果

3.1) アルカリ腐食により形成されたチタン酸化物ナノファイバーの物性

Fig.1 に各 KOH 濃度で処理したチタンの表面構造と、結晶構造を Fig.2 に示す。

Fig.1 FESEM images of 45° tilted nanostructure treated with (a) 5.0 mol/L KOH solution, (b) 10 mol/L KOH solution, and (c) 25 mol/L KOH solution. The scale bar in the images is 100 nm. (All the inserted images are top views and the scale bar is 100nm bar.)

Fig.2 (a) Typical TEM image and (b) SAED pattern of nanostructure treated with 5.0 mol/L KOH solution. (c, d) Typical TEM images, (e) SAED pattern, and (f) HRTEM images of nanostructure treated with 10 mol/L KOH solution.

これらの結果より、アルカリ腐食溶液として、高濃度の KOH 溶液を用い、金属チタンを溶液に数時間浸漬するという簡単なプロセスで、様々な長さ、太さ、形状をもつチタン酸化物ナノファイバーがチタン上に形成されることが確かめられた。ラマン分光および、XRF, EDXA, XPS 分析により、ナノファイバーは、酸化チタンにカリウムが含有したチタン酸カリウムと酸化チタンの混合相から構成されている構造であることを確かめた。さらに、このチタン酸化物の電気特性を疑似 MOSFET 構造のデバイスにて評価を行い、チタン酸化膜中のカリウム濃度に依存して、良好な電気伝導性を示すものから、半導体物性を示すものまで作製できた。Table 1 にカリウムのドーピング量と導電率を示している。この表より、

Table 1 Characterization of TOFs with treated by various KOH concentrations.

Concentration of KOH solution [M]	Content of potassium in TOF [mass %]	Conductivity [$1/\Omega\text{cm}$]
1M	0.03	2.0×10^3
5M	0.10	2.3×10^3
10M	0.18	1.4×10^3
15M	0.24	8.1×10^2
20M	0.27	2.0×10^2
25M	0.64	1.2×10^2

良好な導電性が得られるカリウムの含有量は 0.3~0.18% である。そこで次に、これらの電気伝導性の優れたチタン酸化膜をバイオセンサーの電極として評価した。

3.2) チタン酸化物ナノファイバーを用いた直接電子移動 (DET) バイオセンサー

KOH の濃度により表面のナノファイバー構造が異なることを Fig.1 で示した。ここでは、酵素の活性中心からナノファイバーへ直接電子移動が可能であるかを、ナノファイバーが集合した構造体 AFP (aggregated filiform projections) の直径との関係から調べた。1.0M, 5M, 10M, 15M, 20 M, 25M の KOH 濃度で処理したチタン酸化物のナノファイバーは、35, 70, 100, 200, 400, 1800nm の AFP 直径であった。それぞれ形態と導電率の異なるチタン酸化膜を電極として用い、直接 HRP を固定化させた後、ターフェルプロットを用いて、酵素と電極間の電子移動を解析した。どの電極を用いても、電流値の大小関係はあるものの、酵素から AFP への電子伝達が起こることが確かめられた。Fig.3 は、35nm と 200nm の AFP の表面での酵素固定化の有無によるサイクリックボルタモグラム(CV)を示す。これらの CV より、AFP が 35nm と小さい突起構造をもつ酵素固定化電極表面で、電子移動が起こりやすいことがわかる。反応サイトの大きさと DET 反応の関連について検討している過去の論文[3]から、50nm 以下の反応サイトが電子移動を起こすと報告されている。我々の今回の系で検討を行ったところ、100nm 以下の反応サイトで DET が効率よく起こることがわかった。

そこで、70nm の AFP をもつ表面を電極として、HRP を固定化させ、過酸化水素(H_2O_2)センサーとしての特性を評価した。結果を Fig.4 に示している。低濃度領域で他の DET センサーと比較すると、例えば、HRP/SAM-nano Au センサー(4)では、0.5mM, HRP/Carbon nanotube バイオセンサー(5)では、12.8mM, 今回作製したセンサーでは、1.5 μM の H_2O_2 が測定できた。また、4 $^\circ\text{C}$ で 18 日間保存した状態でも初期値と比較し 93%の感度が得られた。チタン酸化物ナノファイバーは、高感度で長期安定性に優れた DET 型バイオセンサーである(5)。

Fig.3 CV of ((a), (b)) 35 nm reaction site electrode (a), HRP-immobilized 35 nm reaction site electrode (b). ((c), (d)) 200 nm reaction site electrode (c), and HRP-immobilized 200 nm reaction site electrode (d).

Fig.4 Calibration plot for the fabricated HRP/nTOFs/Ti-biosensors having 70 nm diameter reaction site at -0.35 V.

4. 結論

KOH を使ったアルカリ腐食法という簡便な手法でナノファイバー状構造を有するチタン酸化物が容易に作製でき、このチタン酸化物ナノファイバーのカリウム含有量により電気伝導性を制御できた。さらにナノファイバーの集合体構造、AFP の直径と DET の関係から、100nm 以下の AFP で効率的に DET が起こることが分かった。また HRP を固定化したバイオセンサーで過酸化水素が低濃度領域まで高感度に計測でき、さらに安定性にも優れた特性を示した。チタン酸化物ナノファイバーを用いたこの電極は、様々なバイオエレクトロニクスデバイスとして応用が期待できる。

引用文献

- (1) S.-Y. Lee, M. Takai, H.-M. Kim, and K. Ishihara: *Curr. Appl. Phys.* **9** (2009) e266.
- (2) S.-Y. Lee, R. Matsuno, K. Ishihara, and M. Takai, *Applied Physics Express*, **4** (2011) 025803.
- (3) Y. Xiao, F. Patolsky, F. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner, *Science*, **299**, (2003) 1877.
- (4) S. Xu, B. Peng, X. Han, *Biosens. Bioelectron.* **22** (2007) 1807.
- (5) H. Chen, S. Dong, *Biosens. Bioelectron.* **22** (2007) 1811.
- (6) S.-Y. Lee, R. Matsuno, K. Ishihara, and M. Takai, *Biosens. Bioelectron.* in press