

X線反射率測定による ZnO 基板上固定化酵素の評価 Characterization of Enzymes Immobilized on ZnO Substrates by X-ray Reflectometry

尾形 健一^a, ミハウ コズブ^b
Ken-ichi Ogata^a, Michał Kozub^b

^a大阪工業大学ナノ材研, ^bブロツワフ工科大学物理研
^aNanomaterial Research Center, Osaka Institute of Technology,
^bInstitute of Physics, Wrocław University of Technology

ZnO 基板上に酵素(グルコースオキシダーゼ)固定化を行い, その液体中での膜厚等を X 線反射率法により検討した.

キーワード: 酵素固定化 X線反射率測定

背景と研究目的:

生活習慣病の増加だけでなく健康状態の維持という点からも, バイオセンサの必要性は大きくなってきている. 我々は酸化亜鉛(ZnO)を毒性元素を含まない化合物半導体材料として注目してきた. そのことに加えZnOは等電点(isoelectric point, IEP)が9程度と高く, IEPが低い酵素の直接固定が可能という特徴を有するため, バイオセンサ材料としても期待される材料である. これまでの研究でZnO膜およびZnOナノロッドに酵素を固定化し高感度バイオセンサを実現してきた[1,2]が, 酵素固定化技術に関しては十分に制御されているとは言い難い. 特に電気的検出の場合, 単にZnO表面に固定化されているというだけではなく, 固定化酵素からZnOへの直接電子移動を起こすことが望ましいため, 酵素の量や酵素とZnOの距離に加え酵素の配向も重要となってくる. 具体的にはグルコース検出のためのグルコースオキシダーゼ(glucose oxidase, GOx)をZnO上に固定することを念頭に置いているが, この酵素は水溶液中で $60 \times 52 \times 77 \text{ \AA}$ の大きさをとるとされている. 3次元的な構造を有する酵素の配向を評価することは容易ではないと考えられるが, その膜厚を求めることで酵素の配向に関する情報を得, 検討を行いたいと考え, 実験を行った.

実験:

反射率測定において薄膜試料を用いると, 下地の基板の影響が表れやすい. そこで本研究では薄膜ではなく東京電波製のc軸カット ZnO 基板を用いた. 基板の極性は Zn 極性(+c)及び O 極性(-c)

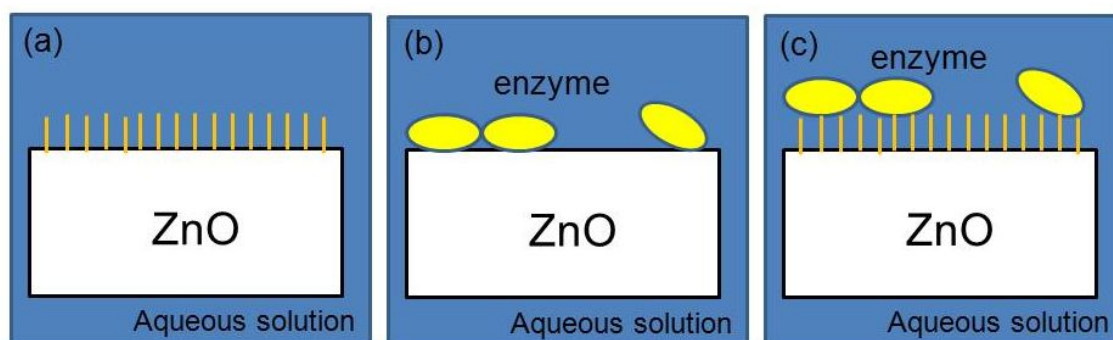


図 1. X線反射率測定に用いた試料構造図

- (a)スペーサ分子/ZnO, (b)酵素/ZnO(酵素直接固定化),
(c)酵素/架橋分子/スペーサ分子/ZnO(共有結合法による酵素固定化)

であり, そのサイズは $10 \times 10 \times 0.5 \text{ mm}$ である. 両者とも原子間力顕微鏡(AFM)で原子ステップが観察される程度に表面は平坦である. 酵素固定化は上記で述べたように, IEP の違いによる

直接固定化法，及びスペーサ分子(3-アミノプロピルメトキシシラン，APTMS)・架橋分子(グルタルアルデヒド，GA)の2種類の有機分子を介して共有結合で固定する共有結合法の2通りで行った[3]．直接固定化はpH 7.4のリン酸緩衝溶液を用い，スペーサ分子のAPTMSのみをZnO表面に修飾したものを比較用として準備した．これらの試料の模式図を図1に示した．

試料は図2に示す逆 π 字型のアルミニウム製セルの底部に置きセル内を純水で満たし，X線のパス上に固定した．また試料は測定直前まで冷蔵庫のリン酸緩衝液中で保管した．セルのX線が通過する部分はカプトンが用いられている．X線のエネルギーは吸収が少ない20 keVとして測定を行った．X線反射率測定装置条件については以下の通りである．入射X線形状0.1 mm \times 6.0 mm(縦0.1 mm 横幅6.0 mm)，Huber社製多軸回折装置，受光側コリメーションは4象限スリット2器によるdouble slitで開口は0.5 mm \times 8.0 mmである．また検出器はNaIシンチレーションカウンターである．

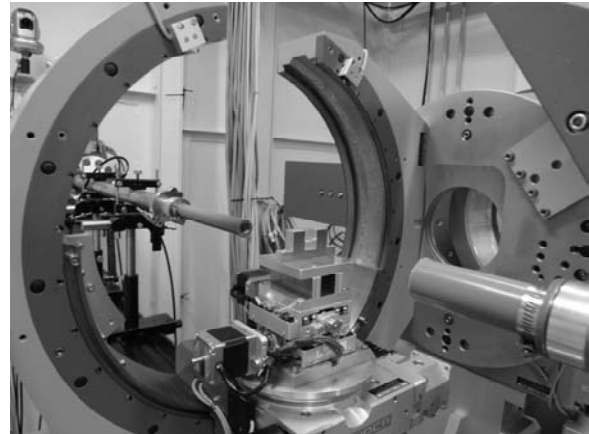


図2. X線反射率測定に用いたセルと測定系における配置

結果および考察：

ラボのX線回折装置での反射率測定からO極性ZnO基板は研磨に関連すると思われる層が表面付近にあることが示唆される一方，Zn極性ZnO基板からはそのような層の存在は確認できず，単層であると思われる．そこでZn極性ZnO基板に対してスペーサ分子修飾(APTMS/ZnO)，直接の酵素固定化(GOx/ZnO)，及び共有結合による酵素固定化(GOx-GA-APTMS/ZnO)のX線反射率測定の結果を図3に示す．APTMS/ZnOでは比較的緩やかに反射率が減少しているのに対し，GOx/ZnOでは急激に減少し，GOx-GA-APTMS/ZnOではさらに急激に減少しているのがわかる．このことは，これらの順番に表面粗さが増加していることを示唆している．詳細な解析は現在行っている段階である．

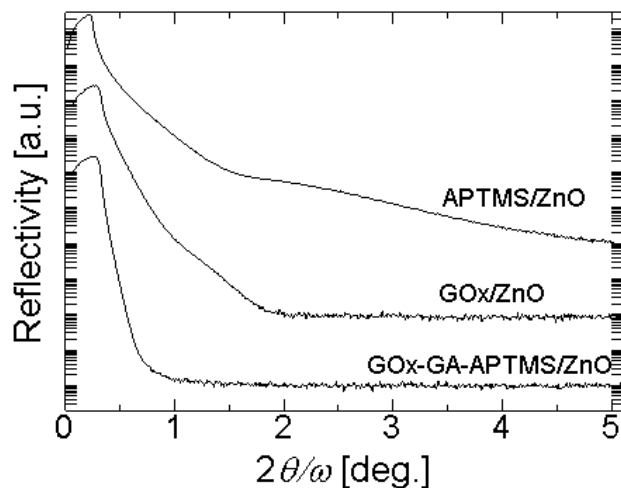


図3. 各試料のX線反射率

参考文献：

- [1] Koike et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* **46**, L865 (2007).
- [2] Yano et al., *Phys. Stat. Sol. c* **9**, 1570 (2012).
- [3] Ogata et al., *Physica E* **42**, 2880 (2010).