

水晶振動子による高精度免疫センサーの評価

－方式の違いによる特性の比較－

○日大生産工(院)

産総研

日大生産工(院)

小澤 佑佳

愛澤 秀信

山田 和典・木村 悠二

1. まえがき

環境モニタリングや臨床検査の分野では、予知、予防の対策技術として微量物質を迅速かつ高精度に検出可能な測定法が求められている。微量物質の迅速な測定によって、環境モニタリングでは大気や水質汚染の兆候把握、臨床検査においては感染症や癌などの早期発見や治療の経過観察が可能になると考えている。高精度な微量分析は、機器分析が主流であるが、機能性材料を用いた化学センサーや生体分子を用いたバイオセンサーなどによる測定法も知られている。センサー中でも水晶振動子センサー(QCM: Quartz crystal microbalance)はシンプルな測定システムでありながら高精度センサーとしてガスセンサー、バイオセンサーなど多数の研究報告がある¹⁾。QCMは発振素子、フィルターを担う電子デバイスとして我々の生活を支えているが、分析化学分野では1 ngの重さを計測可能な超微量天秤²⁾の特性を生かした多くの研究報告がある^{3,4)}。本研究では、生体分子を用いるバイオセンサーの中でも特異性と選択性が高い抗体を用いる免疫センサー構築を目指している。抗体固定化量を増やす工夫として、センサー上にポリマーブラシを導入し、そのポリマーブラシ上を固定場とすることで、抗体固定化量や検出精度の制御が可能となる。鎖長の揃ったポリマーブラシの重合は、精密重合法として知られている原子移動ラジカル重合(ATRP: Atom Transfer Radical Polymerization)⁵⁾を用いた。本研究では生体分子固定化への影響を考慮して、従来のATRPの1/1000未満の銅触媒でも精密重合可能なARGET (Activators ReGenerated by Electron Transfer)⁶⁾と、ICAR (Initiators for Continuous Activator Regeneration)⁷⁾の2つのATRP反応によるQCM上のポリマーブラシ重合条件の探索および物性評価した。

2. 実験方法及び測定方法

QCMセンサーはSi電極9MHzを用いた。放電出力100W、Ar圧力100Pa、反応時間60sの条件のArプラズマでQCM電極表面を洗浄した。QCMへのアミノ基導入は、2% 3-Aminopropyltriethoxysilane水溶液にQCMを入れて室温で1時間振盪した。アミノ基をポリマーブラシの重合開始点である臭素基導入では、アミノ基導入後のQCMを2.10 mmolの2-Bromoisobutryl bromideとTriethylamineを入れたシャーレに浸漬して0℃で1時間振盪によりアミノ基から臭素基に官能基変換した。

ポリマーブラシは、ICARとARGETの2つのATRP反応で重合した。ICAR-ATRP反応は狭い分子量分布のポリマーを得ることができる優れた重合法であるが、触媒となるCuBrが重合反応への導入前にCuBr₂になることで重合停止するなどの問題が生じていた。本検討では通常触媒として加えるCuBrをCuBr₂に変えてポリマー重合を試みた。触媒: CuBr₂、配位子: tris[(2-pyridyl)methyl]amine を 溶媒: N,N-dimethylformamideで溶解した。N₂パージ後のネジロ試験管にモノマー: *tert*-Butyl Acrylate (tBA)と還元剤: azobisisobutyronitrileを混ぜ合わせたところに触媒、配位子の溶液を添加し、開始剤: Ethyl 2-Bromobutyrate (E2B)を添加後にN₂パージしながら密閉した。

もう一方のARGET-ATRPは、反応系に過剰の還元剤を添加によって反応系に蓄積する酸素によるCuBrの失活を低減可能な重合法である。N₂ガスパージしたネジロ試験管に予め溶媒: Anisole、触媒: CuCl₂、配位子: Tris[2-(dimethylamino)ethyl]amine (Me₆TREN)を溶解させたところに還元剤: Tin(II) 2-EthylhexanoateとMe₆TREN、モノマー: tBA、開始剤: E2B添加後の試験管内をN₂パージしながら官能基変換後のQCMを入れて密閉した。ICAR-ATRP、ARGET-ATRPともに試験管を65℃のオイル

Construction of High-Sensitive Immunosensors

－ with Polymer Brushes －

Yuka OZAWA, Hidenobu AIZAWA, Kazunori YAMADA and Yuji KIMURA

バスで15時間攪拌しながら重合反応した。重合度100と200の2条件で重合した。

重合後にQCM取り出してDichloromethaneで洗浄して余分なポリマーを除去後、10% Trifluoroacetic acid含有Dichloromethaneに浸漬して室温で5時間振盪させてPoly(tBA: *tert*-ButylAcrylate)の加水分解 (脱保護基反応)によりPoly(AA: Acylic acid)を得た。Poly(tBA)は、GPC (Gel Permeation Chromatography)分析を行うためTHFで溶解し、超純水を加えて未重合物や夾雑物を分離し、残ったポリマーは50℃で減圧乾燥した。

ICAR-ATRPおよびARGET-ATRPの2つの反応で重合したPoly(tBA)はGPCで分子量、多分散性を測定した。各反応プロセスで形成したセンサー表面の化学構造は、XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy)で測定しデータ解析した。

3. 実験結果と評価

Fig.1 にQCM上に重合したPoly(AA)の異なるpHの緩衝液に対する周波数変化を示す。緩衝液は、pH4.0、4.5、5.4の酢酸-酢酸ナトリウムを用いた。測定は、フローセルにQCMを装着し、純水中で周波数が安定したところでpH4.0、4.5、5.4の順で緩衝液を注入した。pH4.0では周波数変化量が小さいがpHが大きくなるにつれて周波数の変化量も大きくなった。これは、緩衝液に含まれるHイオンとNaイオンとQCM上のPoly(AA)の相互作用し、pHが小さいすなわちHイオンが多い場合は、ポリマーがセンサー表面に縮んだ状態であり、pHが大きくなるとNaイオンが増加するためポリマーが伸張し、水溶液による影響で周波数が大きく変化する。本図では各pHで1回ずつ測定したものを示したが、各pHの緩衝液の注入によって周波数変化が再現することを確認できていることから、本法で重合したPoly(AA)はQCMセンサー上に固定化できていることを明らかにした。

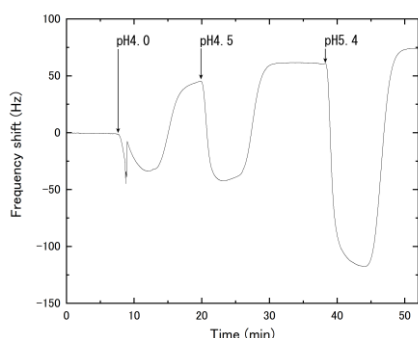


Fig.1 ポリアクリル酸の pH 変化に対する周波数変化

次にICAR、ARGET ATRPの2種類の合成による各重合度におけるPAA合成を行った際の平均分子量や多分散度を表1より比較した。

表1 GPC 結果

ATRP 種類	重合度	Mw	Mw/Mn
ICAR	100	12944	1.07
ICAR	150	16377	1.07
ICAR	200	18658	1.10
ARGET	200	12043	1.10
ARGET	200	19266	1.22

表1 の結果より、ICAR-ATRP、ARGET-ATRP共に分散度が小さくほぼ設計通りのポリマーが重合出来ていることが明らかとなった。これは従来のATRPによる分子アーキテクチャのこれまでにない制御の実現により、重合反応における停止反応が抑制され優れていることが確認できた。以上の結果から免疫センサーの基盤となるポリマーブラシの合成条件の確立およびQCMセンサー上への直接の重合プロセスも構築できた。

その他、XPSを用いたQCM上の各表面修飾プロセスの評価結果は当日報告する。

4. 参考文献

- 1) C. Lu, A. W. Czanderna, "Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances", Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, NL (1984).
- 2) G. Sauerbrey, **Z. Phys.**, 155 (1959) 206-222.
- 3) D. A. Buttry, M. D. Ward, **Chem. Rev.**, 92 (1992) 1355-1379.
- 4) A. Janshoff, H. J. Galla, C. Steinem, **Angew. Chem. Int. Edit.**, 39 (2000) 4004-4032.
- 5) V. N. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, **Chem. Rev.**, 107 (2007) 2270-2299.
- 6) W. Jakubowski, K. Matyjaszewski, **Angew. Chem. Int. Edit.**, 45 (2006) 4482-4486.
- 7) K. Matyjaszewski, W. Jakubowski, K. Min, W. Tang, J. Huang, W. A. Braunecker, N. V. Tsarevsky, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 103 (2006) 15309-15314.