

オープン型バイポーラ電極を利用した電気化学バイオセンサ

栩木 有理沙, 近藤 みずき, 桑原 敬司*

長岡技術科学大学 生物機能工学専攻 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

*kuwataka@vos.nagaokaut.ac.jp

Electrochemical biosensor with an open bipolar electrode

Arisa TOCHIGI, Mizuki KONDO, Takashi KUWAHARA*

Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology

(1603-1, Kamitomioka-machi, Nagaoka 940-2188, Japan)

(Received April 15, 2022; Accepted May 9, 2022)

Abstract

This study proposes a new biosensing method using open bipolar electrodes (OBPEs). OBPEs have the advantage of high flexibility in the configuration of electrochemical cells and electrodes. However, there are few examples of their use in electrochemical biosensors because the electrochemical reaction system is complex and there are fewer electrochemical detection methods to select for comparing closed bipolar electrodes. Therefore, in this study, we aimed to realize a simple biosensor with OBPEs. To achieve the goal, we fabricated a new sensing system with OBPEs and used the system for biomolecule detection. Non-faradic impedance spectroscopy was used for detection. As a result, the sensing system detected the presence of bipolar electrodes as an impedance change. The change rate of impedance was affected by the concentration of electrolytes and the distance between electrodes. Moreover, the sensing system detected proteins immobilized on the bipolar electrodes. These results are significant because they provide new uses for OBPEs and contribute to the development of detection methods for biomolecules.

Keywords: bipolar electrochemistry, biosensor, open bipolar electrodes

1. はじめに

バイポーラ電気化学を検出反応に利用した電気化学バイオセンサが報告されている [1,2]。バイポーラ電気化学では、外部電源と接続した駆動電極 (DE) 間に形成される電界内に挿入した導体 (バイポーラ電極, BPE) が分極する現象を電気化学反応や検出に利用する。外部と直接接続されていない電極が主な反応場となることから、通常の3電極系では実現が難しい電気化学反応系を構築すること

が可能となる。例えば、稲木らは繊維の形態や電位勾配を有するユニークな材料の作製を行っている [3,4]。筆者らも局所的な電解重合による基板上へのスポット状の導電性高分子膜の作製を報告している [5]。バイオセンシングにおいて、BPE の存在は分子認識部位と検出部位の分離を実現する。この特性はセンサの構成やサイズの自由度を拡大し、新たな検出反応の利用を可能とする。したがって、バイポーラ電気化学はバイオセンシングの幅を広げる新たなツールとして期待されている。

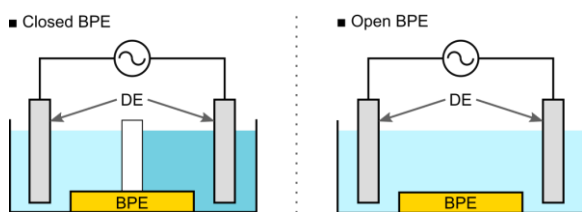


Fig. 1 Two types of BPE.

BPEには、複槽式のクローズ型（CBPE）と単層式のオープン型（OBPE）が存在する（Fig. 1）。電解槽が分かれているCBPEは、特定の槽内のみで狙った電気化学反応を生じさせることが可能である。そのため、電気化学発光のように電極反応により生成した物質を検出する仕組みのバイオセンサに頻りに利用されている [6-9]。実際に、これまで報告されているバイポーラ電気化学を利用したバイオセンサの多くはCBPEを利用している。しかし、クローズ型のバイオセンサには、BPEを区切り、少なくとも二つの電解液に接触させるための仕組みが必要であり、シンプルな構成のOBPEと比較すると、電解槽や電極の設計は煩雑である。

バイオセンサの作製において、OBPEの単純な構成は、センサの構造に多くの選択肢を与えることから魅力的である。OBPEは、バイポーラ電気化学を利用した物質の生産や基板修飾で頻りに使用されている [10,11]。しかし、DEとBPEが同一槽内に存在するため、OBPEをバイオセンシングに利用するには、①両電極で同じ電気化学反応が起こる可能性がありCBPEと比較して検出に利用可能な反応の選択肢が少ない、②電気化学反応系が複雑でありその解釈が難しい、といった課題がある。したがって、OBPE

の利点を生かしたバイオセンサを作製するためには、これらを考慮し適切な検出の仕組みを構築する必要がある。

本論文では、OBPEを利用したシンプルな構造の新たなバイオセンシング法を提案する。検出にはノンファラデー的な電気化学インピーダンス測定法を用いた。電気化学インピーダンス測定は、電極反応を要素として分離可能であり、複雑な導電経路から生じる応答の解析に有利である。また、ノンファラデー的な測定系であれば、電気化学反応生成物の問題も生じにくい。ここでは、作製したOBPEを利用した電気化学センサの基本特性の評価、チオール自己組織化単分子層やモデルタンパク質として用いた牛血清アルブミン（BSA）でBPE表面を修飾した際のインピーダンス変化について述べる。

2. 実験

2.1 材料

1-プロパンチオール（PT）、1-オクタデカンチオール（ODT）、3-メルカプトプロピオン酸（MPA）は東京化成工業株式会社から購入した。1-デカンチオール（DT）は関東化学株式会社から購入した。BSAはロシュ・ダイアグノスティックス株式会社から購入した。縮合剤として利用した4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM）は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。その他の試薬は特級試薬もしくは分析用試薬を精製せず用いた。

2.2 電気化学測定

OBPEを利用したインピーダンス測定は、自作の装置を使用して行った（Fig. 2A）。装置は、高精度ステッピング

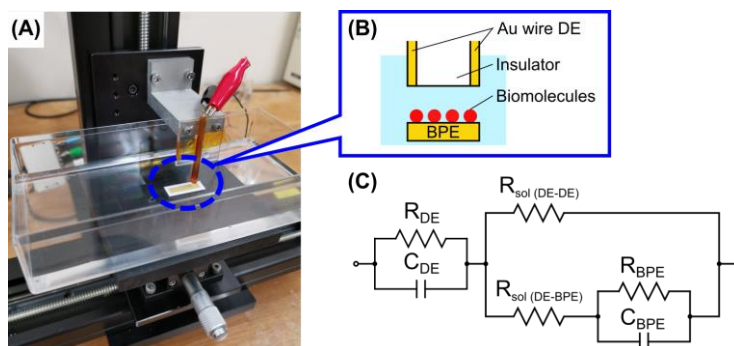


Fig. 2 (A) Photo image and (B) schematic illustration of the sensor with OBPE. (C) A simple equivalent circuit model for the sensing system.

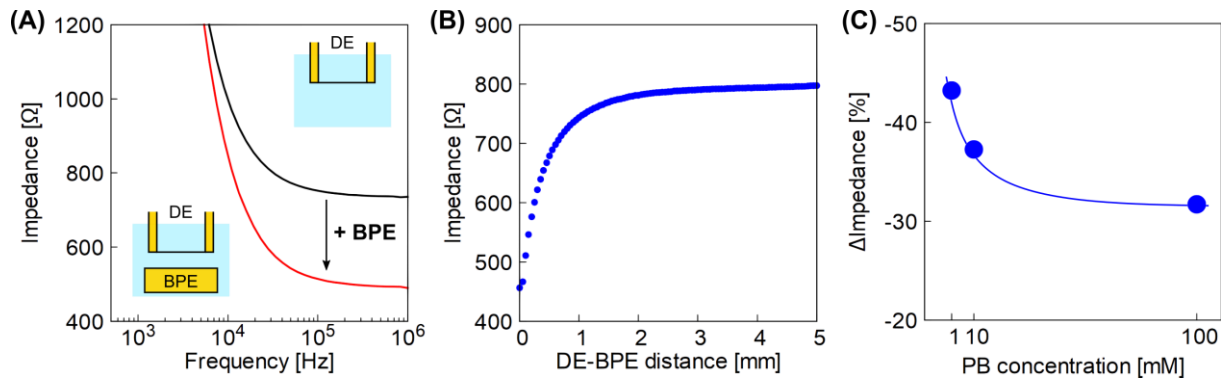


Fig.3 (A) Impedance spectra of open bipolar sensing system with and without BPE. (B) Influence of distance between DE and BPE on impedance at 100 kHz. (C) Influence of PB concentration on the impedance change rate at 100 kHz in the sensing system between with and without BPE.

モーターステージ (PM80B-100X, PM80B-100Z, コムス株式会社) とポリスチレン製トレーの電解槽 (W180×D90×H40 mm) からなり、モーターステージはポジションコントローラ (CP-700M, コムス株式会社) および専用のソフトウェア (CP-700tool, コムス株式会社) を利用して制御した (位置決め精度 8 μm)。DE には 2 本の金ワイヤ (φ 0.50 mm, 株式会社ニラコ) を 5 mm 角の亚克力棒の対面に固定したものを用いた。金ワイヤの下から 1 mm とインピーダンスアナライザに接続する部分以外はポリイミドテープを用いて液体と触れないように被覆した。DE はアームを介して Z 軸ステージに固定した。測定の際には、100 mM のリン酸緩衝液 (PB, pH 7.0) を電解槽に満たし、電解槽の底に BPE を配置した後、自動ステージにて DE および BPE の位置を調整した。

インピーダンス測定は、DE とインピーダンスアナライザを接続して行った。インピーダンスアナライザには IM3570 (日置電機株式会社), もしくは IM6 (ZAHNER-elektrik GmbH & Co. KG) を用いた。測定周波数範囲は 1 Hz~1 MHz, 振幅は 0.02 V, DC バイアスは 0 V とした。測定は、室温 (25°C) で各条件 3 回以上行った。結果は平均値, エラーバーは標準誤差で示した。

2.3 バイポーラ電極

BPE には、金電極 (5 mm × 20 mm, サンライズ工業株式会社) を用いた。金電極は使用前に、エタノールおよび蒸留水で洗浄した。自己組織化単分子層で修飾した BPE は、各チオール分子のエタノール溶液 (10 mM) に金電極を室温で 24 時間浸漬することで作製した。修飾した電極はエタノールによる洗浄後、空气中、室温で保存した。BSA を固定化した BPE は以下の手順で作製した。まず、MPA

のエタノール溶液 (10 mM) 中に金電極を 1 時間浸漬し、MPA 修飾電極 (MPA/Au) を得た。MPA/Au はエタノールおよび蒸留水で洗浄後、100 mM PB (pH 7.0) 中で保存した。次に、BSA (1.0 mg/mL) および DMT-MM (10 mM, 縮合剤) を含む水溶液 20 mL 中に MPA/Au を 0 ~ 180 分間浸漬し、MPA のカルボキシ基と BSA のアミノ基との間でアミド結合を形成させることで電極上に BSA を固定した。作製した BSA 固定化金電極 (BSA/MPA/Au) は蒸留水で洗浄後、測定まで 4°C で 100 mM PB (pH 7.0) 中に保存した。

3. 結果・考察

3.1 センサの基本特性の評価

本論文で提案する OBPE を使ったセンシング法では、DE の近傍に設置した BPE 表面への生体分子の結合をインピーダンスの変化により検知する (Fig. 2B)。測定で得られるインピーダンススペクトルの解釈には、Fig. 2C に示した等価回路を利用した。測定されるインピーダンススペクトルは本研究の測定周波数範囲において、主に DE 間、DE-BPE 間の溶液抵抗, 各電極の電気二重層容量を含む。

作製したセンサの基本特性を評価するため、まず未修飾の BPE を用いてインピーダンスの測定を行った。その結果、BPE の挿入により、インピーダンスの値は 32% 減少した (Fig. 3A)。これは、BPE を測定系に組み込むことにより、DE 間の導電経路に加えて、DE-BPE 間の経路が新たに形成されたことを示している。BPE 存在下で測定されるインピーダンスの値が、DE-BPE 間の距離の増加に応じて増加し、BPE 非存在下のインピーダンス値と同程度となることも同様に新たな経路の形成を支持している (Fig. 3B)。

本研究の測定系では、DE-BPE 間の距離 2 mm 以上で、インピーダンス変化がほぼ見られなくなった。Fig. 2C の等価回路を考慮すると、BPE 由来のインピーダンス値が大きくなったため、測定系全体の変化として検知できなくなったといえる。また、BPE の挿入により生じるインピーダンス変化の割合は、測定溶液として用いた PB の濃度増加にともない減少した (Fig. 3C)。各電極間の距離は一定であることから、この結果は電解質濃度由来する IR ドロップの減少により、BPE の分極がインピーダンスに及ぼす影響が小さくなったことに起因する [12]。以上の結果から、本研究で作製したセンサは BPE をインピーダンス変化として検知可能であり、その検知性能は測定条件に応じて変化することがわかった。

3.2 BPE のアルカンチオール修飾によるインピーダンス変化

次に、BPE 表面への物質の結合が本測定法により検知可能かを明らかにするため、鎖長の異なる 3 種のアルカンチオールにより修飾した BPE を用いてインピーダンス測定を行った。いずれのアルカンチオールで修飾した場合にも、未修飾の場合 (Au) と比較してインピーダンスは増加した (Fig. 4)。また、修飾に使用したチオールのアルキル鎖長の増加にともなってインピーダンスの変化量は増加した。電極をアルカンチオールで修飾した場合、通常の 3 電極系を利用したインピーダンス測定では、主に容量減少に由来するインピーダンス変化が観察される [13]。また、アルカンチオールの長さの増加は、誘電体層の厚みの増加を意味するため、より大きなインピーダンス変化を示す。本測定法では、作用電極に注目する 3 電極系での測定とは異なり、チオール修飾した電極 (BPE) のみならず、DE が関

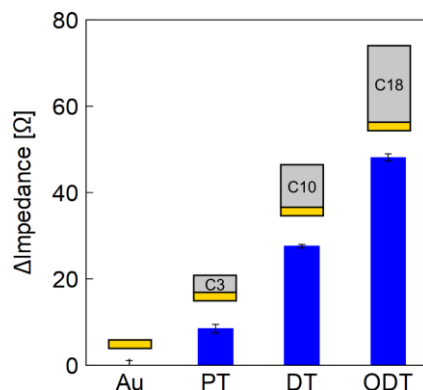


Fig. 4 Impedance change at 10 kHz by modification of BPE with alkanethiols.

連するインピーダンスも合わせて測定している。したがって、本測定法と通常の 3 電極系で測定した場合とは、チオール修飾前後のインピーダンススペクトルの変化は一見異なる。しかしながら、BPE であっても表面修飾によりインピーダンスが変化する要因は同様であると考えられる。したがって、Fig. 4 の結果は主にチオール修飾による容量減少によるものであるといえる。また、チオール自己組織化単分子層のようにインピーダンスとの関係が詳しく研究されている材料を利用することで、今後 OBPE を利用した測定系のインピーダンススペクトルのより詳細な解析が可能となると考えられる。

3.3 BPE 表面への BSA 固定によるインピーダンスの変化

本測定法により BPE 上に固定した生体分子の検知が可能かを調べるため、モデルタンパク質として BSA を固定

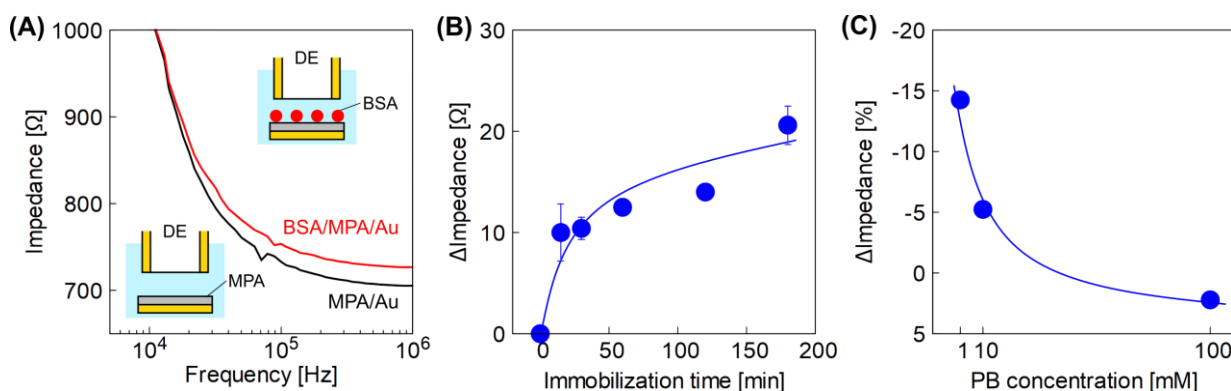


Fig. 5 (A) Impedance spectra of MPA/Au and BSA/MPA/Au. (B) Time dependence of impedance at 100 kHz in BSA immobilization. (C) Influence of PB concentration on the impedance change rate at 100 kHz between MPA/Au and BSA/MPA/Au.

した BPE を用いて測定を行った。結果として、MPA 修飾面への縮合による BSA の固定化処理は、緩衝液濃度 100 mM において、固定化時間 180 分で 2.8% (21 Ω) のインピーダンス増加を示した (Fig. 5A)。また、BSA 固定化処理時間の増加にともなったインピーダンス変化量の増加についても検知することに成功した (Fig. 5B)。さらに、インピーダンス測定時の PB 濃度の影響を調べた結果、本実験の濃度範囲 (1~100 mM) においては、PB 濃度が最も低い 1 mM の時にインピーダンスの変化率は最も大きくなった (Fig. 5C)。しかし、バイオセンシングは生体内環境に近い条件で行われる場合が多いため、実際には検出感度の増大を期待して電解質の濃度を極端に低くすることは難しい。例えば、生理食塩水には 150 mM 程度の塩が含まれている。

以上の結果から、OBPE を利用したセンシング法により BPE 上に固定した生体分子の検出が可能であり、電解質濃度や電極間距離といった測定条件が検出性能に影響することが明らかとなった。複雑な電気化学反応系であるため詳細な解析は容易ではないが、測定条件が検出性能を決めるための変数であると考え、本手法は通常の 3 電極系を利用したバイオセンサよりも任意に変更可能な変数が多いとも考えられる。特に、通常の電気化学バイオセンシングには存在しない、DE-BPE 間の距離は、容易に調整可能な興味深い変数である。

4. まとめ

本論文では OBPE を利用した新たな電気化学バイオセンシングについて報告した。本センシング法は、OBPE を利用したシンプルな構造でありながら、BPE 上に形成したアルカンチオール自己組織化単分子層のアルキル鎖長 (C3-C18) の違いを検知した。また、BSA 固定化処理時間の増加にともなったインピーダンス変化量の増加を示した。測定条件の検出性能への影響は複雑であるが、今後インピーダンススペクトルとの関係を網羅的に解析することにより詳細は明らかになると予想される。本報告の範囲では、定置測定にとどまったが、将来的には DE と BPE が分かれているという特徴を生かし、走査型のバイオセンサの開発に取り組む計画である。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 21K04075、TAKEUCHI 育英奨学会、内田エネルギー科学振興財団の助成を受けたものであり、ここに謝意を表します。

引用文献

- [1] X. Zhang, Q. Zhai, H. Xing, J. Li, E. Wang, Bipolar Electrodes with 100% Current Efficiency for Sensors, *ACS Sens.*, 2, 320-326 (2017).
- [2] E. Rafatmah, B. Hemmateenejad, Colorimetric and visual determination of hydrogen peroxide and glucose by applying paper-based closed bipolar electrochemistry, *Microchim. Acta*, 186, 684 (2019).
- [3] M. Ohira, Y. Koizumi, H. Nishiyama, I. Tomita, S. Inagi, Synthesis of linear PEDOT fibers by AC-bipolar electrochemistry in a micro-space, *Polym. J.*, 49, 163-167 (2017).
- [4] N. Shida, F. Kitamura, T. Fuchigami, I. Tomita, S. Inagi, Signal-Amplified Analysis of Molecular Layers Prepared through Bipolar Electrochemistry, *ChemElectroChem*, 3, 465-471 (2016).
- [5] T. Kuwahara, K. Sato, M. Kondo, M. Shimomura, Targeted deposition of a conducting polymer based on bipolar electrochemistry, *Synth. Met.*, 198, 274-276 (2014).
- [6] H.-W. Shi, W. Zhao, Z. Liu, X.-C. Liu, M.-S. Wu, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, Joint enhancement strategy applied in ECL biosensor based on closed bipolar electrodes for the detection of PSA, *Talanta*, 154, 169-174 (2016).
- [7] F. Wang, C. Fu, C. Huang, N. Li, Y. Wang, S. Ge, J. Yu, Paper-based closed Au-Bipolar electrode electrochemiluminescence sensing platform for the detection of miRNA-155, *Biosens. Bioelectron.*, 150, 111917 (2020).
- [8] W. Zhao, Y. Ma, J. Ye, Development of a novel sensing platform based on molecularly imprinted polymer and closed bipolar electrochemiluminescence for sensitive detection of dopamine, *J. Electroanal. Chem.*, 888, 115215 (2021).
- [9] J.-T. Cao, L.-Z. Zhao, Y.-Z. Fu, X.-M. Liu, S.-W. Ren, Y.-M. Liu, Tyramide signal amplification and enzyme biocatalytic precipitation on closed bipolar electrode: Toward highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay, *Sens. Actuators, B*, 331, 129427, (2021).
- [10] S. McWilliams, C.D. Flynn, J. McWilliams, D.C. Arnold, R.A. Wahyuono, A. Undisz, M. Rettenmayr, A. Ignaszak, Nanostructured Cu₂O Synthesized via Bipolar Electrochemistry, *Nanomaterials*, 9, 1781 (2019).
- [11] L. Jin, J. Qiao, J. Chen, N. Xu, M. Wu, Combination of area controllable sensing surface and bipolar electrode-electrochemiluminescence approach for the detection of tetracycline, *Talanta*, 208, 120404 (2020).
- [12] Y. Koizumi, S. Inagi, Bipolar Electropolymerization for the Synthesis of Conducting Polymer Materials, *Kobunshi Ronbunshu*, 74, 460-471 (2017).
- [13] S.-J. Ding, B.-W. Chang, C.-C. Wu, M.-F. Lai, H.-C. Chang, Impedance spectral studies of self-assembly of alkanethiols with different chain lengths using different immobilization strategies on Au electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 554, 43-51 (2005).