BUNSEKI KAGAKU Vol. 51, No. 6, pp. 455–460 (2002) © 2002 The Japan Society for Analytical Chemistry

報文

金(111)面上に共吸着によって形成させた二成分系チオール 自己組織化単分子膜のナノメートルスケールドメイン上への 西洋ワサビペルオキシダーゼの選択的固定化

保原 大介*, 鵜野 雄介*, 垣 内 隆^{@*}

Immobilization of horseradish peroxidase on nanometer-scale domains of phase-separated binary self-assembled monolayers formed by coadsorption on Au(111)

Daisuke HOBARA, Yusuke UNO and Takashi KAKIUCHI*

*Department of Energy and Hydrocarbon Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 606-8501

(Received 25 January 2002, Accepted 1 April 2002)

The surface distribution and emzyme activity of horseradish peroxidase (HRP) selectively immobilized on binary self-assembled monolayers (SAMs) of dithiobis-N-succinimidyl propionate (DTSP) and 1-tetradecanethiol (TDT) have been studied. Scanning tunneling microscopic images of the phase-separated binary SAMs formed by coadsorption on Au (111) substrates show nanometer-scale domains which are $10 \sim 40$ nm in diameter and $0.3 \sim 0.7$ nm in height. HRP was covalently immobilized on the DTSP domains by immersing the SAM-modified substrate into an HRP solution, followed by washing with a 1 M KCl solution. A tapping-mode atomic force microscopic image of the HRP-immobilized substrate shows holes having a similar diameter to those of the binary SAMs and a depth of 3.6 ± 1.9 nm, indicating the selective immobilization of HRP molecules on the DTSP domains. The enzymatic activity of the immobilized HRP has been confirmed using cyclic voltammetry in the presence of ferrocenecarboxylic acid as an electron-transfer mediator.

Keywords : horseradish peroxidase; self-assembled monolayer; thiol; scanning tunneling microscopy; atomic force microscopy.

1 緒 言

電極表面に固定化された,西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)と協同的に働くことによって機能するバイオセン シングシステム^{1)~6)}において,複数種の固定化酵素の相対 的な位置や配向⁷⁾を精密に制御することは,酵素反応のメ カニズムの解明や,酵素間のシグナル伝達の最適化を行う 上で重要である.酵素周辺のミクロな環境を分子レベルで 議論するためには,酵素自身の分子サイズに近いナノメー トルレベルで酵素の固定化を制御する必要性がある.

アルカンチオール分子を用いた自己組織化単分子膜 (SAM)⁸⁾⁹⁾は、金属表面に規則的に配向した単分子膜を容 易に形成させる手法として優れている。末端官能基やアル キル鎖長を変化させることで、膜表面の化学的性質や膜厚 をコントロールすることができるため、SAM を利用して 酵素を固定化することで^{10)~12)}、電極表面との相互作用 ¹³⁾¹⁴⁾、電極からの距離、配向^{7)15)~18)}、更には、異なる官能 基を持つ二成分から単分子膜を形成させることで、酵素の 二次元分布を制御することが可能である¹⁹⁾²⁰⁾.

これまでに著者らは、相分離した 3-メルカプト-1-プロ

^{*} 京都大学大学院工学研究科:606-8501 京都府京都市左京区 吉田本町

パノール (MPOH) と 1-テトラデカンチオール (TDT) の二成分 SAM²¹⁾ を出発系として, MPOH をジチオビス-*N*-サクシンイミジルプロピオネート (DTSP) に選択的置 換^{22)~24)}することよって形成させた, ナノメートルスケー ルで相分離した DTSP-TDT の二成分 SAM 上に, DTSP のアミノ基とのアミド結合形成反応を利用して²⁵⁾²⁶⁾, HRP を選択的に固定化する方法を報告した²⁰⁾. 本研究では, 共 吸着法を用いることで相分離した DTSP と TDT の二成分 SAM を, より直接的に金 (111) 面上に形成させるため の条件を, サイクリックボルタンメトリー (CV) と走査 トンネル顕微鏡 (STM) を用いて検討し,得られた二成 分 SAM 上に HRP を位置選択的に固定化することを試み た. その表面分布状態と酵素活性を, それぞれ原子間力顕 微鏡 (AFM), CV により調べた.

2 実 験

2.1 試 薬

HRP (Sigma 製, Type I) は, 30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し 200 μ M とした. DTSP (Fluka 製)及 び TDT (東京化成製) は, アセトン (ナカライテスク製, 特級) に溶解し 1 mM とした. SAM の還元的脱離の CV²⁷⁾²⁸⁾ には, 0.5 M KOH (Merck 製, GR grade) 水溶液 を用いた. 固定化した HRP の活性測定には, ferrocenecarboxylic acid (Aldrich 製)を, 30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し 200 μ M とした溶液に, 過酸化水素水 (和光純薬製, 30%, 特級)を加えて行った. その他の試 薬は特級品を用いた. 試料調製に用いた水は, Elix システ ム (Millipore 製) により脱イオンした後, Milli-Q システ ム (Millipore 製) で精製した.

2·2 SAM の形成及び HRP の固定化法

(111)単結晶面を有する金薄膜基板は、薄くへき(劈)
 開したマイカ上に、真空度1×10⁻⁵ Torr 以下、基板温度
 580℃で真空蒸着して作製した²⁹⁾⁵⁰⁾.金基板は使用直前に、
 いすず製作所製マッフル炉(ETR-15K)にて、530℃で7
 時間アニール処理した.

DTSP 及び TDT の単一成分 SAM は, それぞれの1 mM アセトン溶液に, 金基板を 24±3 時間浸漬させて形成さ せた. DTSP と TDT の二成分 SAM は, それぞれの1 mM アセトン溶液を DTSP: TDT = 350:1, 500:1, 800:1 の比率で混合した溶液に, 金基板を 24±3 時間浸漬させ て形成させた. 測定に用いる前に溶液から取り出し, 多量 のアセトンで洗浄し, 空気中で乾燥させた.

二成分 SAM が形成した金基板を 200 µM の HRP 溶液に 4℃ で 12 時間浸漬させ, HRP を DTSP に共有結合で固定 化した. TDT ドメインや多層に吸着した HRP を除去する ため, HRP 溶液から取り出した基板を, 30 mM リン酸緩 衝液 (pH 7.2) で洗浄し,1 M の KCl 水溶液に 30℃ で 2 時間浸漬させた. 測定前に溶液から取り出し,多量の精製 した水で洗浄した.

2・3 装置及び測定法

SAM の還元的脱離の CV²⁷⁾²⁸⁾ は、アルゴンガスで脱気した 0.5 M の KOH 水溶液中にて、掃引速度 20 mV s⁻¹で測定した. 固定化した HRP の活性測定は、メディエーターとして 200 μ M の ferrocenecarboxylic acid を溶解させた 30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中に過酸化水素を加え、掃引速度 5 mV s⁻¹で CV 測定し、150 mV における還元電 流を過酸化水素の濃度に対しプロットすることで行った. すべての CV 測定は、ALS 製電気化学アナライザー (Model 600A) にて、直径 4 mm の O-リングを介して三角セルに固定した金 (111) 電極を用いて行った.参照電 極に Ag/AgCl (KCl 飽和)、対極に白金線を用いた.

二成分 SAM を形成させた金基板の STM 測定は,30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で,アピエゾンワックスで コーティングした Pt-Ir (8:2) 製チップにて行った. STM 測定には,Molecular Imaging 製の STM ヘッドを装 着した Digital Instruments 製の NanoScope IIIa を用いた.

AFM は、マルチモードヘッド(Digital Instruments)を 装着した NanoScope IIIa を用い、タッピングモードで空 気中で測定した.カンチレバーは、Si₃N₄製のものを用い た.

3 結果と考察

3·1 DTSP と TDT の二成分 SAM 構造の評価

Fig. 1 に金(111) 表面に形成させた DTSP と TDT の 二成分 SAM の,還元的脱離のサイクリックボルタモグラ ムを示す. DTSP の単一成分 SAM のボルタモグラム (Fig. 1, a) では, -690 mV に半値幅が約 12 mV の鋭いピーク が観察された.これは,吸着した DTSP の還元的脱離に 由来すると考えられるが、ピーク電位及び特徴的な鋭いピ ークは、3-メルカプトプロピオン酸 SAM の還元的脱離の ボルタモグラム³⁰⁾で観察されるものに類似している.これ は、サクシンイミジル基がアルカリ溶液中で加水分解 し³¹⁾, 測定時にはカルボキシル基として還元脱離している ためだと考えられる. Fig. 1, a では, また-950 mV 付近 にブロードなピークが観察された. メインピークのほか に、このような-900~-1000 mV に出現するサブピーク は、これまでにもチオール SAM のボルタンメトリーで報 告されており³²⁾³³⁾,チオールの還元脱離に伴う金(111) 面の再配列³⁴⁾,あるいは不純物として吸着した硫黄の還元 脱離³⁵⁾に起因すると考えられる.

一方, TDT の単一成分 SAM のボルタモグラム (Fig. 1,
 e) では, -1105 mV に吸着した TDT の還元的脱離に由



Fig. 1 Cyclic voltammograms for the reductive desorption of a: a DTSP SAM, $b \sim d$: DTSP-TDT binary SAMs, e: a TDT SAM, in a 0.5 M KOH solution at 20 mV s⁻¹

The DTSP-TDT binary SAMs were formed by coadsorption from mixed solutions of DTSP and TDT (b: DTSP : TDT = 800 : 1, c: DTSP : TDT = 500 : 1, d: DTSP : TDT = 350 : 1)

来する1本のピークが観察された. Fig. 1, b~dに示し た混合溶液から二成分 SAM を形成させた場合は,溶液中 のTDTの割合が増加するにつれ, -700 mV 付近の DTSP 由来のピークの減少とともに, -1100 mV 付近のピーク の増加が観察された. ピークの面積(電荷量)の比が,表 面に吸着した二成分の存在比に対応すると仮定して,ボル タモグラムから吸着した TDT の存在比を見積もると³⁶⁾, 10.6% (Fig. 1, b), 24.9% (Fig. 1, c), 65.4% (Fig. 1, d) となった. 二成分が表面でほぼ均一に混合した二成分 SAM の場合,還元的脱離のボルタモグラムにおいて二成 分の存在比にかかわらず,常に1本のピークのみが観察 されるが³⁷⁾, Fig. 1のように,二成分のそれぞれの還元脱 離に起因する2本のピークが、常にほぼ同じ電位に観察 されるボルタモグラムは、二成分が表面で相分離している ことを示している³⁶⁾.

実際に、DTSPとTDTの二成分 SAMのナノメートルス ケールの構造を調べるために STM 測定を行った.Fig. 2 に、Fig. 1, b 及び d と同じ条件で作製した二成分 SAM の STM 像を示した.Fig. 2, a に示した DTSP:TDT = 800:1 の比率の混合溶液から形成させた二成分 SAM の STM 像では、中央部分のほぼ全体を占める一つの金 (111) テラス上に、1) 直径が 5~20 nm 程度、高さが 0.48 ± 0.01 nm で最も明るく観察されるドメイン、2) 直 径 3~5 nm,深さが 0.25 ± 0.11 nm で最も暗く観察され るピット¹⁵⁾³⁸⁾³⁹⁾,及び、3) 中間的な明るさで観察される 最も広い面積を占めるドメイン、の3種類の領域が存在 することが分かる.

TDT の割合を増加させた DTSP: TDT = 350:1 の比率 の混合溶液から形成させた二成分 SAM の STM 像(Fig. 2, b) では, Fig. 2, a に比べ, 最も明るく観察されるド メインの総面積が明らかに増加していることが分かる.こ れらのドメインの直径は、10~30 nm 程度、高さは 0.61 ± 0.19 nm 程度であった. STM 像を二値化して,明 るいドメインの面積比を求めると, Fig. 2, a では 6.2 ± 1.0%, Fig. 2, b では 55.8 ± 12.1% (それぞれ, 異なる 5 か所の平均値)となった.これらの値は、ボルタモグラム から求めた吸着した TDT の割合とほば一致したことか ら,明るい領域は主に TDT からなるドメイン,相対的に 暗く観察されいる領域(ピットを含む)は、主に DTSP に由来するドメインであると考えらる. DTSP が大過剰で 存在する混合溶液から二成分 SAM を形成させる⁴⁰⁾ことで、 ナノメートルスケールで相分離したドメインを形成するこ とが明らかとなった.

3・2 DTSP と TDT の二成分 SAM 上に固定化した HRP の表面分布

Fig. 2, bと同じ条件である DTSP: TDT = 350: 1 の混 合溶液から二成分 SAM を形成させた金(111) 基板を, HRP 溶液に浸漬し, HRP を吸着した DTSP に共有結合に より固定化した. TDT に物理吸着した HRP を除去するた めに, 1 M KCI 水溶液に 2 時間浸漬させた後,精製した水 で基板を洗浄後,乾燥させて AFM 測定を行った. Fig. 3 は,空気中において,タッピングモードで測定した HRP 固定化後の金基板表面の AFM 像である. 直径が 10~60 nm で, 3.2 ± 1.9 nm の深さのホールが観察された. ホー ルの直径が HRP 固定化前の二成分 SAM の TDT ドメイン のサイズにほぼ匹敵することから, Fig. 3 における明るい 領域は,主に DTSP ドメイン上に HRP が固定化されてい るドメイン,暗く観察されている領域は, HRP が存在し



Fig. 2 STM images of DTSP-TDT binary SAMs formed from a: a DTSP : TDT = 800 : 1 solution, and b: a DTSP : TDT = 350 : 1 solution

The images were taken in a 30 mM phosphate buffer solution (pH = 7.2). Electrode potential: -100 mV; Bias potential: 300 mV; Setpoint: 400 pA. The cross-sectional profiles were measured along the solid lines shown on the STM images.

ない TDT ドメインであることが示唆された.

Fig. 2, bに示した STM 像における DTSP と TDT のド メインの高さの差から, HRP の見掛けの高さを見積もる と約 3.8 nm となり, X 線結晶構造解析から得られた HRP の分子サイズ⁴¹⁾⁴²⁾に近いことが分かった.しかし, Fig. 3 の AFM 像では, 直径が小さいホールほど見掛けの深さが 浅く観察された.これは, AFM 測定に用いたチップ先端 の尖鋭度の限界から,小さいホールではホールの底までチ ップがとどいていないために,ホールの深さが過小評価さ れているためであると考えられる⁴³⁾.これは,本研究で得 られた固定化された HRP 分子の見掛けの高さ (約 3.8 nm) が,以前に数十 nm スケールの大きさのドメインを形成さ せて測定された,著者らの結果 (約 6 nm)²⁰⁾ やガラス上 に固定化した HRP の AFM 測定の結果 (6~9 nm)⁴⁴⁾に比 べて小さいことにも矛盾しない.

AFM 像を二値化して, HRP が存在していないと考えら れる暗く観察された領域の割合を見積もったところ, 46 ± 7.2% となった. CV や STM から得られた表面にお ける TDT の存在割合(それぞれ, 65.4%, 55.8±12.1%) と比べて小さい値になったのは, KCI 水溶液による洗浄に よって除去できなかった,TDTドメインに物理吸着した HRP分子の存在を示唆している.

3・3 DTSP と TDT の二成分 SAM 上に固定化した HRP の酵素活性

DTSP:TDT = 350:1の混合溶液から二成分 SAM を形 成させた,金(111) 基板上に固定化された HRP の酵素 活性を CV により調べた.電子伝達メディエーターとし て,200 µM のカルボキシルフェロセンを含むリン酸緩衝 液中で,異なる濃度の過酸化水素存在下でボルタモグラム を測定したところ,過酸化水素の濃度の増加に伴って,カ ルボキシルフェロセンの還元電流が増加した.Fig.4は, ボルタモグラムの+150 mV における還元電流値を過酸化 水素の濃度に対してプロットしたものである.還元電流値 と過酸化水素濃度は,1µM から20µM の領域でほぼ直線 関係が成り立った.このような電流と過酸化水素濃度の関 係は,同じ方法で HRP を固定化した電極で,再現性良く 得られた.また,同一電極を用いた繰り返し測定におい て,測定時間内では再現性の良い応答が得られた.Fig.4 の還元電流値の増加は,固定化された HRP の触媒反応に



Fig. 3 AFM image of an HRP-immobilized DTSP-TDT binary SAM

The SAM was formed from a DTSP : TDT = 350 : 1 solution. The image was taken in tapping mode under ambient conditions. The cross-sectional profile was measured along the solid line shown on the AFM image.

よるもの⁶⁾であると考えられ,固定化された HRP が酵素 活性を保っていることが示唆された.

DTSPとTDTの二成分 SAM の形成条件を検討した結 果,アセトン溶液から DTSP 過剰の条件で共吸着するこ とにより,ナノメートルスケールで相分離した二成分 SAM を金(111)面上に形成させることができた.この ような二成分 SAM ドメインが,HRPを酵素活性を保った まま位置選択的に電極表面に固定化するための,ナノメー トルスケールのテンプレートとして有効であることを示し た.このような系に,基質を酸化して過酸化水素を放出す るオキシダーゼ類を導入することにより,複数種の酵素の 相対的な位置をナノメートルスケールで制御した表面にお いて,酵素間のシグナル伝達を調べることが可能になると 考えられる.

文 献

1) J. J. Kulys, V.-S. A. L. Vicius, M. V. Pesliakiene, V. V. Gureviciene: Anal. Chim. Acta, 148, 13 (1983).



Fig. 4 Dependence of the reduction current of the cyclic voltammograms of the HRP-immobilized Au (111) substrate on the concentration of hydrogen per-oxide

The gold substrate was modified with the binary SAM formed from a DTSP : TDT = 350 : 1 solution. The voltammograms were recorded in a 30 mM phosphate buffer solution containing 200 μ M ferocenecarboxylic acid; Initial potential: +500 mV; Switching potential: +150 mV; Scan rate: 5 mV s⁻¹. The current measured at +150 mV was used for the plot.

- 2) L. Gorton, G. Bremle, E. Csöregi, G. Jönsson-Pettersson, B. Persson: Anal. Chim. Acta, 249, 43 (1991).
- 3) M. S. Lin, M. Hare, G. A. Rechnitz: *Electroanalysis*, 4, 521 (1992).
- 4) R. Maidan, A. Heller: Anal. Chem., 64, 2889 (1992).
- 5) T. Tatsuma, T. Watanabe, T. Watanabe: J. *Electroanal. Chem.*, **356**, 245 (1993).
- T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga: Anal. Chim. Acta, 330, 123 (1996).
- 7) H. Zimmermann, A. Lindgren, W. Schuhmann, L. Gorton: Chem. Eur. J., 6, 592 (2000).
- C. D. Bain, E. B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo: *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 321 (1989).
- A. Ulman: "An Introduction to Ultathin Organic Films From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly", (1991), (Academic Press, Boston).
- 10) F. M. Hawkridge, I. Taniguchi: Comments Inorg. Chem., 17, 163 (1995).
- 11) M. Mrksich, G. M. Whitesides: Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 25, 55 (1996).
- 12) I. Willner, E. Katz, B. Willner, R. Blonder, V. Heleg-Shabtai, A. F. Bückmann: *Biosens. Bioelectron.*, 12, 337 (1997).
- 13) M. Mrksich, G. B. Sigal, G. M. Whitesides: Langmuir, 11, 4383 (1995).
- 14) G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides: J Am. Chem. Soc., 120, 3464 (1998).
- 15) L. Häussling, B. Michel, H. Ringsdorf, H. Rohrer:

BUNSEKI KAGAKU

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 30, 569 (1991).

- 16) S. E. Creager, K. G. Olsen: Anal. Chim. Acta, 307, 277 (1995).
- 17) S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas: *Mikrochim. Acta*, **128**, 127 (1998).
- 18) J. Lahiri, L. Issacs, B. Grzybowski, J. D. Carbeck, G. M. Whitesides: Langmuir, 15, 7186 (1999).
- 19) M. Mrksich, G. M. Whitesides: *Trends Biotechnol.*, 13, 228 (1995).
- 20) D. Hobara, Y. Uno, T. Kakiuchi: Phys. Chem. Chem. Phys., 3, 3437 (2001).
- 21) D. Hobara, T. Kakiuchi: *Electrochem. Commun.*, **3**, 154 (2001).
- 22) S. Imabayashi, D. Hobara, T. Kakiuchi, W. Knoll: Langmuir, 13, 4502 (1997).
- 23) D. Hobara, T. Sasaki, S. Imabayashi, T. Kakiuchi: Langmuir, 15, 5073 (1999).
- 24) M. Satjapipat, R. Sanedrin, F. Zhou: Langmuir, 17, 7637 (2001).
- 25) I. Willner, E. Katz, A. Riklin, R. Kasher: J. Am. Chem. Soc., 114, 10965 (1992).
- 26) M.-C. Parker, M. C. Davies, S. J. B. Tendler: J. Phys. Chem., 99, 16155 (1995).
- 27) C. A. Widrig, C. Chung, M. D. Porter: J. Electroanal. Chem., 310, 335 (1991).
- 28) M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung, M. D. Porter: *Langmuir*, 7, 2687 (1991).
- 29) J. A. DeRose, T. Thundat, L. A. Nagahara, S. M. Lindsay: Surf. Sci., 256, 102 (1991).
- 30) S. Imabayashi, M. Iida, D. Hobara, Z. Q. Feng, K. Niki, T. Kakiuchi: J. Electroanal. Chem., 428, 33

(1997).

- M. Mosbach, H. Zimmermann, T. Laurell, J. Nilsson,
 E. Csöregi, W. Schuhmann: *Biosens. Bioelectron.*, 16, 827 (2001).
- 32) C.-J. Zhong, M. D. Porter: J. Electroanal. Chem., 425, 147 (1997).
- 33) D. Hobara, K. Miyake, S. Imabayashi, K. Niki, T. Kakiuchi: Langmuir, 14, 3590 (1998).
- 34) D. Hobara, M. Yamamoto, T. Kakiuchi: Chem. Lett., 2001, 374.
- 35) S. Yoshimoto, M. Yoshida, S. Kobayashi, S. Nozute, T. Miyawaki, Y. Hashimoto, I. Taniguchi: J. Electroanal. Chem., 473, 85 (1999).
- 36) D. Hobara, M. Ota, S. Imabayashi, K. Niki, T. Kakiuchi: J. Electroanal. Chem., 444, 113 (1998).
- 37) T. Kakiuchi, M. Iida, N. Gon, D. Hobara, S. Imabayashi, K. Niki: Langmuir, 17, 1599 (2001).
- 38) L. Sun, R. M. Crooks: J. Electrochem. Soc., 138, L23 (1991).
- 39) Y.-T. Kim, A. J. Bard: Langmuir, 8, 1096 (1992).
- 40) C. D. Bain, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides: Langmuir, 5, 723 (1989).
- M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos: *Nature Struct. Biol.*, 4, 1032 (1997).
- 42) A. Henriksen, D. J. Schuller, K. Meno, K. G. Welinder, A. T. Smith, M. Gajhede : *Biochemistry*, 37, 8054 (1998).
- 43) T. Han, T. P. Beebe, Jr.: Langmuir, 10, 2705 (1994).
- 44) F. Vianello, L. Zennaro, M. L. D. Paolo, A. Rigo, C. Malacarne, M. Scarpa: *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 488 (2000).

要 旨

金(111)単結晶表面でナノメートルスケールで相分離したジチオビス-N-サクシンイミジルプロピオネ ート(DTSP)と1-テトラデカンチオール(TDT)の二成分チオール自己組織化単分子膜(SAM)のDTSP ドメイン上に,西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を選択的に共有結合で固定化し,その表面分布状態 と酵素活性を調べた.DTSPとTDTの共吸着によって形成させた,HRP固定化前の二成分チオールSAM の走査トンネル顕微鏡(STM)測定では,直径が10~40 nm程度,見掛けの高さが0.3~0.7 nmの相分離 によって形成されたドメインが観察された.このような基板をHRP溶液に浸漬させてDTSPにHRPを共 有結合させた後,1MKCI溶液で洗浄し,HRPを固定化させた.HRP固定化後の金基板表面の原子間力顕 微鏡(AFM)像では,HRP固定化前のSTM像で観察されたドメインと同程度の大きさで,深さが3.6± 1.9 nmのホールが観察され,HRP分子がDTSPドメイン上にほぼ選択的に固定化されていることが示唆さ れた.カルボキシルフェロセンをメディエーターとして用いたボルタンメトリーから,固定化されたHRP の酵素活性が保たれていることが確認された.