

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：22760541
研究課題名（和文） グラフェントランジスタを用いたバイオセンシング技術の開発

研究課題名（英文） Biosensors based on graphene field-effect transistors

研究代表者

大野 恭秀（OHNO YASUhide）
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：90362623

研究成果の概要（和文）：現在最も移動度が高いグラフェンをチャネルとしたトランジスタを用いたバイオセンサの開発を行った。作製したデバイスは溶液の pH を 0.025 の分解能を持って検出することが可能であることが分かった。また、抗体を用いたバイオセンシングは電界効果トランジスタを用いたセンサでは難しいため、代わりにアプタマーまたはフラグメント抗体を用いたバイオセンシングを行い、グラフェンがバイオセンサに適していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：Biosensing applications based on graphene field-effect transistors were investigated. Solution pH can be detected with the resolution of 0.025 using the graphene devices. Although the antibodies cannot be used for FET-based biosensors due to the thickness of the electrical double layer, we applied the aptamer and fragment antigen-binding. The results show that the graphene field-effect transistors have high potentials for the biosensors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究代表者の専門分野：半導体工学

科研費の分科・細目：材料工学・構造・機能材料

キーワード：グラフェン、電界効果トランジスタ、バイオセンサ、イオンセンサ、抗原抗体反応、電気二重層、フラグメント抗体

1. 研究開始当初の背景

炭素一原子層からできるグラフェンは理論的には 1940 年代には予言されていたが、実際に結晶が発見されたのは 2004 年のことである。黒鉛とセロテープを用いるだけ、という非常に原始的な手法であるが、世に存在す

る物質中最も高い移動度を有することや、ほとんど質量を持たない粒子が運動している事などから、非常に注目を集め、2010 年には発見者に早くもノーベル賞が受賞されている。また、表面に非常に敏感であることから、ガスセンサとしての報告はすでになされ

ていたが、生体分子検出に関しては当時ほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

近年、高齢化社会到来、生活習慣病の蔓延への警鐘が叫ばれる中、小型で簡便なバイオセンサの開発は日本だけでなく世界中で求められている。このようなセンサは高感度な検出法として光学的な手法が確立されているが、非常に価格が高くなってしまいうという問題点が挙げられる。一時的な診断として、家庭内や屋外で簡便に測定できるセンサが開発されると、異常があったときにネットワークを介して精密な診断を受けることができる、という次世代の医療診断システムが実現できる。

3. 研究の方法

実験に用いたグラフェンは黒鉛から粘着テープを用いて劈開・剥離を行って得られた物である。この手法で得られるグラフェンは大きさが小さい(数ミクロン角)であるものの、現状では最も結晶的に品質がよいため、高移動度が期待できる。SiO₂/Si 基板上にグラフェンを転写した後、層数を Raman 散乱法で調べて単層のみを選び、電子線リソグラフィによって金電極を形成した。デバイス上にシリコーンゴムのコンテナを置き、緩衝液を満たした。トップゲート電極として Ag/AgCl 参照電極を用いた。

4. 研究成果

(1) 溶液 pH の検出

何も修飾していないグラフェントランジスタを用いて溶液 pH(水素イオン濃度)の変化を検出できるか確かめた。図 1 に示すように電圧を固定化して 10 分経過毎に溶液の pH を変化させた時、ドレイン電流の値は階段状に上昇した。

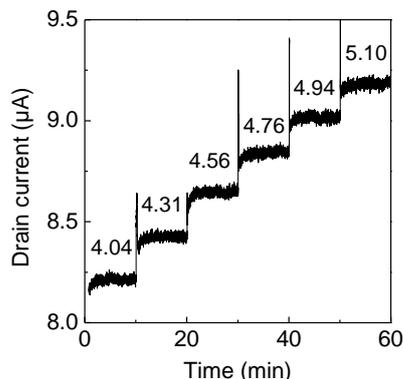


図 1 溶液 pH の検出実験

この図が示すことは、グラフェントランジスタは溶液 pH に対して感度を持つということである。さらに、ノイズの大きさとシグナル

の大ききの比が 3 となるように分解能を定義すると、グラフェントランジスタの pH 分解能は 0.025 になった。これまで報告してきたカーボンナノチューブトランジスタの pH 分解能は約 0.6 であったことを考えると、非常に高感度であることが分かる。これはカーボンナノチューブトランジスタに比べて 1000 倍以上多いことでノイズに対して強くなったものと考えられる。

(2) タンパク質の電荷検出

タンパク質はアミノ酸から構成され、アミノ酸はカルボキシル基とアミノ基の両方を持つために、溶液中では pH の値に応じて正または負に帯電する。この時タンパク質全体で電荷の総量が 0 となる pH を等電点と呼ぶ。グラフェントランジスタではこの電荷を検出するため、仮用いた緩衝液の pH が等電点である場合、そのタンパク質の電荷を検出できないことになる。図 2 に何も修飾していないグラフェントランジスタにおける規格化したドレイン電流の時間依存性を示す。10 分後に様々なタンパク質を約 100 nM 含んだリン酸緩衝液(pH 6.8)を滴下した。使用したタンパク質は牛血清アルブミン(BSA)、ストレプトアビジン(SA)、免疫グロブリン E (IgE) である。

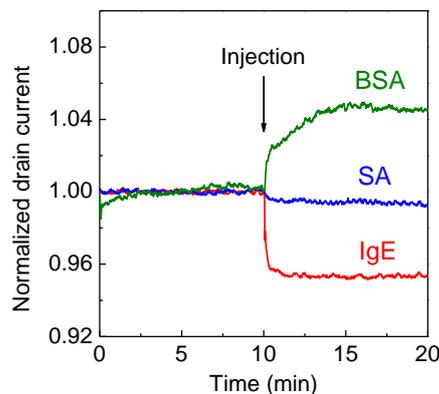


図 2 様々なタンパク質吸着の検出

ドレイン電流は BSA を滴下後、上昇したのに対し、SA または IgE を滴下後に減少したことが分かる。BSA と SA の等電点はそれぞれ 5.3 と 7.0 であるため、この緩衝液の pH(6.8)ではそれぞれ負、正に帯電している。このことは電流値の変化と対応しており、グラフェントランジスタはタンパク質の正負を検出できていると考えられる。IgE に関しては、一般的に免疫グロブリンの等電点は広い範囲を持つことが知られている。これはグロブリンの大きさが大きいことが原因だと思われるが、本実験では電流の減少が観測され、正に帯電した部分がグラフェン側にある

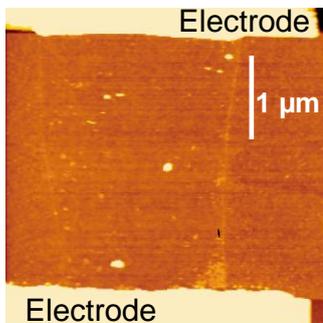
と考えられる。

(3) 特定タンパク質の検出

上記の結果はグラフェン自体ではタンパク質の電荷の正負を検出はできるものの、特定のタンパク質を検出することはできない。そのため、グラフェン上に特定のタンパク質と結合する物質を修飾しなければならない。この際、グラフェン上部に形成される電気二重層の内側で反応が起きる必要がある。本実験条件では電気二重層は 5 nm 程度であり、修飾する物質の大きさはこれ以下の大きさでなければならない。一般的に用いられる抗体は 10~15 nm の大きさを持つため利用できない。本研究ではこの抗体の代わりにアプタマーという DNA を用いた。アプタマーは大きさが 2~3 nm であることが非常に重要であり、本研究で用いたアプタマーは IgE と特異的に結びつくことが知られている。

アプタマーをグラフェンに修飾するため、リンカーとして 1 ピレンブタン酸スクシンイミジルエステルを用いた。これはピレン基がグラフェンと π 相互作用によって結合し、スクシンイミドの部分がアミノ基と反応することで結合する。このリンカーを用いることで、グラフェンに欠陥を導入することなくアプタマーを修飾できると考えられる。図 3 は修飾前後でのグラフェンチャンネルの原子間力顕微鏡像であり、修飾後にグラフェン上のみ 3 nm 程度の構造物ができていることが分かる。

(a) Bare graphene



(b) Aptamer-modified graphene

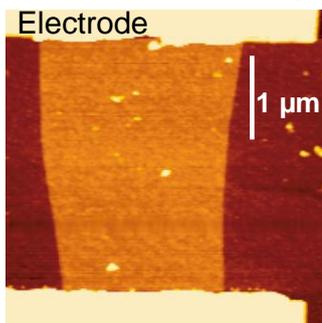


図 3 修飾前後の AFM 像

このアプタマー修飾グラフェントランジスタを用いて特定タンパク質検出の実験を行った。図 4 にドレイン電流の時間依存性を示す。

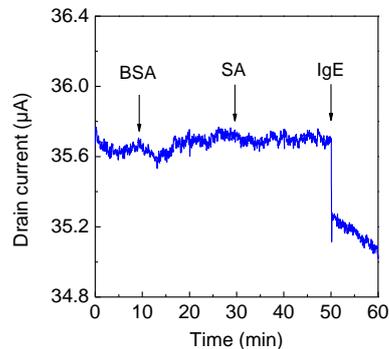


図 4 特定タンパク質の検出

10、30 分後にアプタマーとは結合しない BSA と SA を投入したが、電流値に大きな変化は見られなかったのに対し、50 分の時点で IgE を投入すると、電流値は減少した。以上の結果はアプタマー修飾グラフェントランジスタが特定タンパク質の検出に成功したことを示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① S. Okamoto, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, and K. Matsumoto, Immunosensors Based on Graphene Field-Effect Transistors using Antigen-Binding Fragments, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol. 51 (2012) in press (June).
- ② Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, and K. Matsumoto, Label-Free Aptamer-Based Immunoglobulin Sensors Using Graphene Field-Effect Transistors, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol. 50, No. 7, (2011) pp. 070120.
- ③ Y. Sofue, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, and K. Matsumoto, Highly Sensitive Electrical Detection of Sodium Ions Based on Graphene Field-Effect Transistors, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol. 50, No. 6, (2011) pp. 06GE07.
- ④ Y. Ohno, K. Maehashi, and K. Matsumoto, Label-Free Biosensors Based on Aptamer-Modified Graphene Field-Effect Transistors, J. Am. Chem. Soc., 査読有, Vol. 132, No. 51 (2010) pp. 18012-18013.

- ⑤ Y. Ohno, K. Maehashi, and K. Matsumoto, Chemical and biological sensing application based on graphene field-effect transistors, Biosens. Bioelectron., 査読有, Vol. 26, No. 4, (2010) pp. 1727-1730.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Y. Ohno, Chemical and Biological Sensors Using Graphene Field-Effect Transistors, TeraNano PIRE Kick-Off Meeting 2011, 2011年10月7日, Houston, USA.
- ② Y. Ohno, Graphene field-effect transistors for label-free chemical and biological sensors, 2011 SPIE Defense Security+Sensing, 2011年4月28日, Orlando, USA. (招待講演)
- ③ Y. Ohno, Label-free Aptamer-Based Immunosensors using Graphene Field-Effect Transistors, 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2010年11月10日, 小倉
- ④ Y. Ohno, Graphene Field-Effect Transistors for Label-Free Biological Sensors, IEEE Sensors 2010 Conference, 2010年11月1日, Waikoloa, USA (招待講演)
- ⑤ Y. Ohno, Chemical- and Bio-sensors Based on Graphene Field-Effect Transistors, International Symposium on Graphene Devices: Technology, Physics, and Modeling, 2010年10月27日, 仙台
- ⑥ Y. Ohno, Label-Free Immunosensors Based on Aptamer-Modified Graphene Field-Effect Transistors, 2010 International Conference on Solid State Device and Materials, 2010年9月23日, 東京

- ⑦ Y. Ohno, Electrical detection of biomolecules based on graphene field-effect transistors, 20th Anniversary World Congress on Biosensors, 2010年5月27日, Glasgow, UK.

[図書] (計 1 件)

- ① Y. Ohno, K. Maehashi, and K. Matsumoto, Intech, Physics and Applications of Graphene - Experiments, 2011, pp. 509-524.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 恭秀 (OHNO YASUhide)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：90362623

(2) 研究分担者

該当なし