

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390050

研究課題名(和文)新規櫛型電極による非標識バイオセンサの高感度化

研究課題名(英文) Development of highly sensitive affinity biosensor with interdigitated microelectrodes

研究代表者

大貫 等 (OHNUKI, Hitoshi)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：60223898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：電気化学法インピーダンス法によるセンシングは優れた特性を有する。しかし、インピーダンス信号の微弱さが測定精度の低下を引き起こしている。そこで本研究では、信号強度の増大のための試みを行った。まず櫛形電極の側面部を絶縁層で覆い、平滑な表面となる電極中央部に電場を集中させた。しかし、信号強度は逆に低下する傾向が見られた。そこで分子長および末端基の異なる二種類の分子を用いて混合比の異なる単分子膜を作製し、欠陥構造を意図的に導入した。測定の結果、多くの欠陥構造を導入した試料(75%)で高いシグナル強度が得られた。これらの結果に基づき、構造欠陥によるシグナル増強のメカニズムを提案した。

研究成果の概要(英文)：Affinity biosensor based on electrochemical impedance spectroscopy possesses attractive advantages. But the small signal intensity limits the detection performance. In this study, we examined several attempts to increase the intensity using the interdigitated microelectrodes. First, we intended to optimize the distribution of electric field on the electrode. The edge lines of interdigitated electrodes were covered with SiO₂ layer to locate the electric field on the central area of electrode. However, the sensing performance was not as good as normal ones. The result suggested that a disordered surface may increase the performance. To examine this idea, we employed a mixed SAM. One of the SAM molecule has a short and inactive terminal group, and the domains act as pin-hole defects. It was found that the biosensor contains the 75% areal pin-holes significantly improved the sensing performance. We proposed a model to increase sensing performance by the pin-holes.

研究分野：有機薄膜工学

キーワード：電気化学インピーダンス バイオセンサ 免疫センサ

1. 研究開始当初の背景

抗原-抗体反応など選択的な吸着反応を検知するアフィニティー型バイオセンサは、アレルギー診断、病原菌、DNA 解析など医療分野における適用範囲が広く、将来の発展が期待されている。この吸着現象をインピーダンス変化として捉える電気化学インピーダンス(EIS)法は、発光酵素などの標識を必要としない非標識な手法であり、簡易計測用の測定方法として実用性が高い。しかし EIS 信号は非常に微弱であり、医療応用に必要な高信頼性・高精度測定には到達していない [1]。

本研究では、くし形電極の電極構造の改良と表面修飾の工夫を行うことで信号強度の増大を目指した。

2. 研究の目的

EIS によるアフィニティーバイオセンシングは非標識・簡易・迅速性など優れた特性を有する。しかし界面での分子吸着が引き起こす僅かなインピーダンス変化を捉える本手法では、その微弱な信号変化が低い測定精度の原因となっている。そこで本研究では、整った電極表面部に電場を集中させる電極構造の開発と、抗体の配向固定化技術の開発により、分子吸着に伴う信号変化を画的に増大させる手法を開発する。

3. 研究の方法

従来のくし形電極に電位を印加すると、最短距離となる側面部分に電場ベクトルが集中するが、この部分は乱れた表面を形成しやすい。他方、最も平滑な表面となる上面部分にはほとんど電場がない [2]。すなわち従来のくし形電極は高精度測定に非常に不利な電場分布をとる。そこで本研究では、図 1 に示すように側面部分を SiO₂ 絶縁層で覆った電極構造を作製し、上面部分に電場ベクトルが集中するようにした。

電極表面への、選択的結合を形成する抗体等の認識分子の固定化は自己組織化膜(SAM)を通じて行った。ここでは COOH 末端を有する SAM 膜を電極上に形成し、EDC/NHS により活性化して認識分子を化学結合により固定化した。

EIS 測定はレドックス種として働くフェリシアン化カリウムとフェロシアン化カリウムを 1mM ずつ溶かしたリン酸バッファ(PBS)

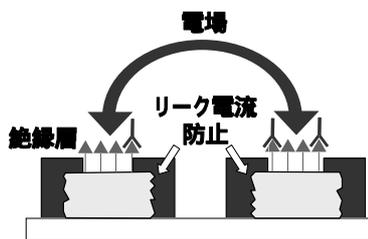


図 1

溶液中(pH = 7.0)で行った。印加電圧は 0 ±

10 mV、周波数は 100 kHz から 1 Hz であった。

4. 研究成果

(1) 側面絶縁層カバーによる効果

初めに側面部を SiO₂ でカバーしたくし形電極基板の特性を、安定な選択的結合を形成するアビジン-ビオチン反応を利用して評価した。ここでは、カバーのない従来型の基板との比較を行うため、両試料の表面に SAM を通じてアビジン分子を固定化した。EIS 測定によりアビジンへのビオチン吸着による信号強度の大きさを調べたところ、予想に反して側面部カバーのくし形電極において信号強度が小さくなる現象が得られた。すなわち、実験結果としては、構造の乱れた表面で行う方がインピーダンス変化が大きくなることが明らかになった。そこで本研究では、このメカニズムの解明とセンサへの応用を目指し、構造の乱れがどのようにして特性向上を引き起こすかに関して研究を進めた。

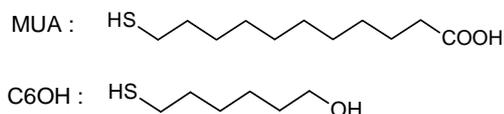


図 2

(2) 混合 SAM 膜による構造欠陥の導入

制御された乱れを導入するため、長さ及び末端基の異なる分子による混合 SAM 膜を利用した。具体的には図 2 の 2 種類の分子, MUA, C6OH の混合比を様々に変化させた SAM を形成した。ここで C6OH は不活性な OH 末端基の短い分子であるため構造欠陥とみなすことが可能である。その結果、作製時の分子混合比により SAM 中の欠陥構造の数が制御可能となる。

混合 SAM による EIS 信号強度への効果は、Protein G - 免疫グロブリン G(IgG)間での選択的結合により評価した。様々な混合比で形成した SAM 表面上に Protein G を固定化し、EIS 測定により IgG 吸着に伴う表面抵抗の変化率を測定した(図 3)。測定に際しては、試料を PBS に溶かした IgG 溶液に 30 分間浸漬し、よく洗浄した後に EIS 測定を行うというサイクルを IgG の低濃度から高濃度にかけて繰り返した。

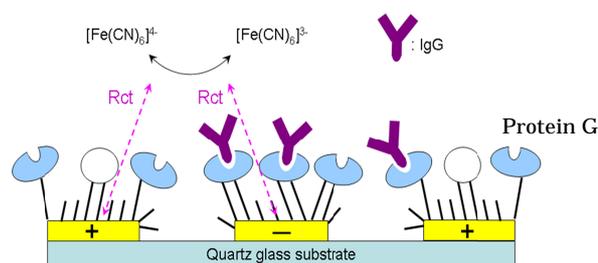


図 3

(3) 混合 SAM の EIS 信号への効果

Nyquist プロットで示された結果の一部 (MUA 25 %) を図 4 に示す. このプロットでは半円状プロファイルの直径が表面抵抗の大きさ (Rct) に対応する. IgG 濃度上昇と共に半円直径が増加しており, IgG 分子の Protein G への吸着によって Rct が増加したものと考えられる. しかし 10 ng/mL 以上の IgG 濃度領域では Rct の増加が停止した. これは 10 ng/mL で Protein G の吸着サイトがすべて IgG と結合し, 飽和したためと考えられる.

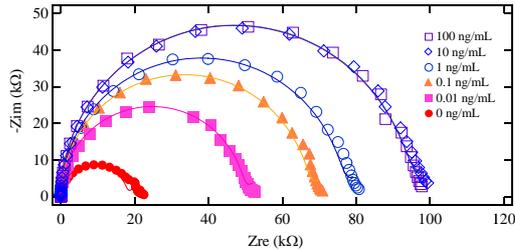


図 4

一方, 構造欠陥の少ない MUA 100 % では作製直後の Rct 値が非常に大きな値となり, IgG 濃度の上昇により値は増大するが, MUA 25% に比べて初期値に対する変化割合は小さい (図 5). また濃度に対する Rct のばらつきも非常に大きく, 一様な上昇とは言えない.

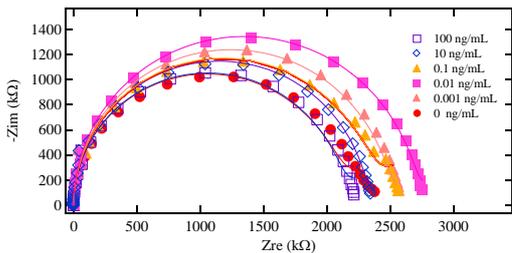


図 5

これらの実験より得られた IgG 濃度と Rct の増加割合の関係を, SAM の混合比ごとにプロットしたグラフを図 6 に示す. このグラフから明らかなように, MUA 100 % では濃度上昇に対する Rct の増加割合は非常に小さな値に留まる. 一方, 構造欠陥となる C60H の割合を増やすと, Rct 増加率は大きく増大していくことがわかる. 増加率は MUA 25 % で最も大きな値となった.

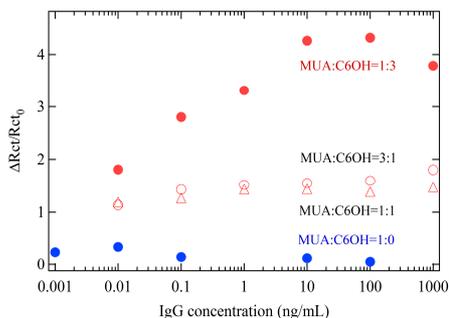
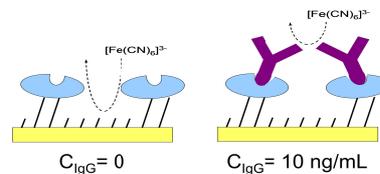


図 6

混合 SAM による上記の実験結果は, 図 7 に示すモデルで説明できると考えている. まず MUA 25 % 試料では C60H の欠陥構造が多数存在するためレドックスプローブが内部まで侵入しやすく, 初期 Rct が小さくなる. この表面に抗体が吸着すると, 欠陥構造に入り込むレドックスプローブが効果的にブロックされ, Rct の変化幅が大きく拡大される. 一方, MUA 100 % 試料では欠陥構造がない均一な表面となるため初期 Rct が大きい. その結果, 抗体吸着による抵抗の増加割合が非常に小さな値となり信号強度が減少する.

(a) MUA 25 % SAM



(b) MUA 100 % SAM

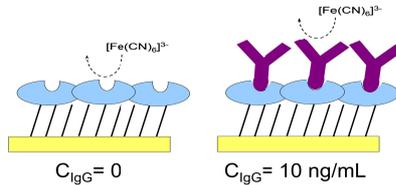


図 7

(4) EIS 信号強度の増大と構造欠陥

本実験により「均一で構造欠陥のない SAM 膜上に抗体分子を固定化することが高感度センサ作製につながる」という一般的な認識が, 実はあいまいな視点に立った不確かな考えであることが判明した. すなわち, 長鎖アルキル基を有する MUA 100% は緻密な面内パッキングを形成するが, これは高い Rct 初期値を与えてしまい, 表面での分子吸着に対して鈍感な EIS センサになってしまう. 一方, 短い分子長の C60H を導入した混合 SAM では, C60H ドメイン部分が構造欠陥 (ピンホール) を形成し, レドックスプローブの内部侵入が容易となって低い Rct 初期値を与える. また, 分子吸着の際にはこのピンホールが効果的にブロックされ, 見かけ上の Rct 値が大きく拡大される効果を生み出す.

EIS によるセンサでは SAM による抗体固定化が一般的に行われている. 本研究で明らかになった混合 SAM でのピンホール効果は特別な系を想定していない. 従って, ここで明らかになった混合 SAM による EIS 信号増大の手法は, SAM を用いた様々な系において手軽に適用できる手法であると言える.

<引用文献>

[1] J. S. Daniels and N. Pourmand, "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges", *Electroanalysis* 19, 2007, 1239-1257.

[2] K. V. Singh, A. M. Whited, Y. Ragineni, T. W. Barrett, J. King, and R. Solanki, "3D nanogap interdigitated electrode array biosensors", *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2010, 1493-1502.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

K. Tsugimura, H. Ohnuki, H. Endo, D. Tsuya, and M. Izumi, "Protein-G-based human immunoglobulin G biosensing by electrochemical impedance spectroscopy" *Jpn. J. Appl. Phys.* 55, 2016, 02BE06-1 - 02BE06-4.

H. Wu, A. Aoki, T. Arimoto, T. Nakano, H. Ohnuki, M. Murata, H. Ren, and H. Endo, "Fish stress become visible: A new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress", *Biosens. Bioelectron.* 67, 2015, 503-510.

H. Wang, H. Ohnuki, H. Endo, and M. Izumi, "Impedimetric and amperometric bifunctional glucose biosensor based on hybrid organic-inorganic thin films", *Bioelectrochemistry* 101, 2015, 1-7.

[学会発表](計 6 件)

次村海輝, 大貫 等, 吳 海雲, 津谷大樹, 遠藤英明, 和泉 充, 「配向制御した抗体表面によるミオグロビンの電気化学インピーダンス計測」, 電気化学会第 83 回大会, 2016 年 3 月 29-31 日, 大阪大学(吹田市).

K. Tsugimura, H. Ohnuki, H. Endo, D. Tsuya, M. Izumi, "Fabrication and characterization of non-labelled IgG immunosensor", 第 25 回日本 MRS シンポジウム, 2015 年 12 月 8-12 日, 横浜開港記念館(横浜市).

H. Ohnuki, K. Tsugimura, Y. Kusaka, H. Endo, D. Tsuya, M. Izumi, "Label Free Biosensor for Immunodetection by Electrochemical Impedance Spectroscopy", 第 25 回日本 MRS シンポジウム, 2015 年 12 月 8-12 日, 横浜開港記念館(横浜市).

次村海輝, 大貫 等, 津谷大樹, 遠藤英明, 和泉 充, 「櫛型電極を用いた非標識 IgG インピーダンス型バイオセンサの開

発」, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 2015 年 9 月 13-16 日, 名古屋国際会議場(名古屋市).

K. Tsugimura, H. Ohnuki, H. Endo, D. Tsuya, and M. Izumi, "Protein G based human immunoglobulin G biosensor by electrochemical impedance spectroscopy", The 5th International Symposium on Organic and Inorganic Electronic Materials and Related Nanotechnology, 2015 年 6 月 16-19 日, 朱鷺メッセ(新潟市).

S. Mukoyama, H. Ohnuki, H. Endo, D. Tsuya, and M. Izumi, "Application of Pt-Au interdigitated array electrodes for biosensing" *Biosensors 2014*, 2014 年 5 月 27-30, Melbourne Convention and Exhibition Centre (Melbourne, Australia).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大貫 等 (OHNUKI, Hitoshi)
東京海洋大学・学術研究院・准教授
研究者番号: 60223898

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

遠藤 英明 (ENDO, Hideaki)
東京海洋大学・学術研究院・教授
研究者番号: 50242326