

課題番号 :N-16-NM-0080
利用形態 :技術代行
利用課題名(日本語) :リソグラフィ技術によるくし形バイオセンサ電極の開発
Program Title (English) :Development of immunobiosensors using interdigitated microelectrodes
利用者名(日本語) :大貫 等
Username (English) :H. Ohnuki
所属名(日本語) :東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科
Affiliation (English) :Tokyo University of Marine Science and Technology

1. 概要(Summary)

本研究では、心筋梗塞のバイオマーカーとして知られるミオグロビンの測定を行うバイオセンサの開発を行った。測定には電気化学インピーダンス法(EIS法)を用い、微細加工櫛型金電極を適用することで高感度測定が可能なセンサとした。抗ミオグロビン抗体を櫛型電極上に固定化してセンシング部分とし、ミオグロビンの吸着量をEIS法により評価した。特に本研究では、抗体を電極上に固定する際に抗体の配向制御を行うことで、抗原抗体反応が効率よく行われセンサの高感度化が実現できるのではないかと考えた。具体的には、電極上に自己組織化膜(SAM)を成膜してProtein G'(PrG')を表面に化学結合させ、ここに抗体を配向固定化することでセンシング表面を作製した。

2. 実験(Experimental)

テンパックス基板上に幅 10 μm 、長さ 7 mm の Au 電極を間隔 50 μm で交互に配置した櫛形電極の作製をNIMS 微細加工 PF の技術代行により依頼した。使用装置は以下の通りである。

【利用した主な装置】(NIMS 微細加工 PF)

全自動スパッタ装置、高速マスクレス露光装置、ダイシングソー、3次元測定レーザー顕微鏡

【実験方法】(東京海洋大学)

洗浄した Au 櫛型電極表面に 11-mercaptopundecanoic acid と 6-mercaptohexanol の SAM を形成した。表面の COOH 末端を EDC/NHS 溶液で活性化した後、PrG' 溶液中に 20 分間浸漬し、さらに BSA 溶液でブロッキングすることで PrG' 表面とした。最後に抗ミオグロビン抗体溶液に 2 時間浸漬して抗ミオグロビン抗体の配向固定化試料を得た。EIS 測定は振幅電圧 10 mV、周波数 0.1~100 kHz の正弦波電圧を印加し、5 mM の $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ を含む緩衝溶液中で行った。

抗体の配向効果を評価するため、PrG' を用いないラ

ンダム配向の抗体試料を作製した。ここでは EDC/NHS 溶液による活性化後に PrG' 溶液中に浸漬し、さらに BSA ブロッキングを行うことでランダム配向試料とした。

3. 結果と考察 (Results and Discussion)

Fig. 1 は配向性試料およびランダム配向試料のミオグロビン濃度に対する電荷移動抵抗の相対変化量をプロットしたものである。配向性試料では 0.001 ng/mL~10 ng/mL の濃度範囲において R_{ct} が上昇していることが分かる。配向性試料とランダム配向性試料の変化率を比較すると、配向性試料では R_{ct} の増加割合がランダム配向性試料に比べて約 3 倍大きい。これは抗ミオグロビン抗体の配向を揃えることで、ミオグロビンの吸着反応が行われやすくなり、その吸着量が増えるためであると考えられる。

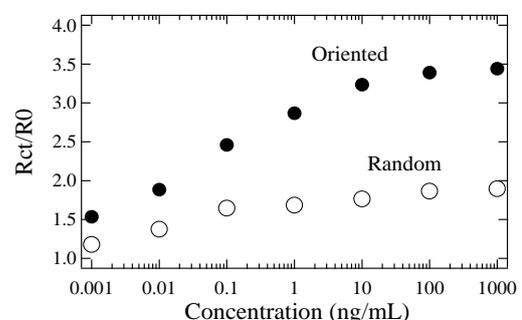


Fig. 1 Calibration curves of myoglobin biosensors with oriented antibody immobilization and randomly oriented immobilization samples.

4. その他・特記事項(Others)

なし

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

・K. Tsugimura, H. Ohnuki, et al., Biosensors2016, 平成 28 年 5 月

・K. Tsugimura, H. Ohnuki et al., The 12th International Conference on Nano-Molecular Electronics, 平成 28 年 12 月

6. 関連特許(Patent)

なし