

Title	チップ内プローブ合成によるプログラマブルバイオセンサの開発
Author(s)	Bhardwaj, Rahul
Citation	
Issue Date	2014-09
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/12309
Rights	
Description	Supervisor:高村 禪, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏名	RAHUL BHARDWAJ		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 361 号		
学位授与年月日	平成 26 年 9 月 24 日		
論文題目	DEVELOPMENT OF PROGRAMMABLE BIOSENSOR BASED ON ON-CHIP PROBE SYNTHESIS (チップ内プローブ合成によるプログラマブルバイオセンサの開発)		
論文審査委員	主査	高村 禅	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		芳坂 貴弘	同 教授
		松見 紀佳	同 教授
		平塚 祐一	同 准教授
		篠原 寛明	富山大学 教授

論文の内容の要旨

A novel programmable biosensor system using solid phase probe synthesis (SPPS) for on-site and on-demand detection was developed. This programmable biosensor system is capable of changing the target molecule on-site and on-demand by changing the sequence of probe molecule on the chip. Probe sequence, on the chip can be changed by synthesizing the different sequence. On-chip synthesis of probe molecule is expected to avoid the problem of conventional biosensor system like flexible changing of target molecule, the immobilization method for probe attachment and stability of attached probe molecule. Hence a programmable biosensor system using SPPS on microchip was proposed.

In the first step, to demonstrate the concept of programmable biosensor system, a new design of PDMS chip for on-chip probe synthesis with optical detection using fluorescent labeling method was developed. Oligopeptides, utilized as probes for the biosensor, were synthesized by the on-chip SPPS on a single bead trapped at the center of a micro channel. After the completion of probe synthesis, a sample solution containing target was exposed to the beads. The binding and the selectivity of on-chip synthesized probe was confirmed with different target biomolecule.

In the next step, a label free electrochemical programmable biosensor for heavy metal ion detection was developed. A new design of electrochemical chip having three electrodes system, made of gold was developed. Metal ion selective peptide probe sequence was synthesized on the chemically modified gold working electrode surface using PDMS microfluidic chip for the first time. After probe synthesis, working electrode was preconcentrated by copper ion solution, and copper ion was detected in micromolar range using differential pulse voltammetry (DPV) analysis. Other heavy metal ions can also be detected by synthesizing the metal ion specific probe on gold surface. Further, a label free electrochemical programmable biosensor for DNA hybridization detection was

developed. Oligonucleotide as a probe sequence was used for DNA hybridization. The oligonucleotide sequence was synthesized on chemically modified gold working electrode, using PDMS chip via novel deprotecting reagent. New deprotecting reagent enables the synthesis of oligonucleotide on PDMS chip. Using as grown oligonucleotide probe, label free detection of DNA hybridization for on-site and on-demand sequence was achieved by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) technique.

Hence, step by step progress confirmed the development of programmable biosensor using on-chip solid phase probe synthesis for on-site and on-demand detection of biomolecules, heavy metal ion, DNA hybridization and other malfunctions. This programmable biosensor system flexibly changes the target molecule by synthesizing the target selective probe sequence on the chip.

Keywords: Programmable biosensor, On-chip solid-phase probe synthesis, Biosensor, Single bead, Electrochemical detection, Heavy metal detection, DNA hybridization

論文審査の結果の要旨

本論文は、測定したいターゲット分子を、オンサイトでフレキシブルに変更可能な「プログラマブルバイオセンサ」のコンセプトの実証と、そのために必要な要素技術の開発に関するものである。

第1章では、現状のバイオセンサの方式とその問題点、ペプチド・DNAのプローブ分子としての利用法、及びプログラムバイオセンサのコンセプトと期待できる利点についてまとめている。

第2章では、オリゴペプチドを用いたプログラムバイオセンサの開発について述べている。任意の配列のペプチドを、より短時間で均一に固相合成可能なマイクロ流体チップをデザインし、その作製のためPDMSに正確なサイズ・形状の貫通穴をあけるプロセスを新たに開発した。これらにより従来の1/3の時間でペプチドが固相合成できることを示した。また配列の異なるペプチドプローブ分子をチップ上で合成し、光学的な検出方法と組み合わせることにより、合成したペプチドと任意の分子との選択的な結合を評価可能とした。さらにDNAやNiビーズに対して、配列を変えることでアフィニティーが変化することを示し、プログラマブルバイオセンサのコンセプトを実証した。

第3章では、事前にサンプルへのラベル付加が不要で、よりコンパクトで実用的な電気化学的な検出法を用い、メタルイオンを高感度に測定可能なプログラマブルバイオセンサの開発について述べている。電極としてガラス基板上にパターニングした金膜を用い、リンカを工夫して金の上に直接にオリゴペプチドを固相合成できる系を確立し、銅イオンに特異的に結合することで知られているペプチド配列を合成した。検出用の電極の上にペプチドを直接合成することでプローブ分子の配向性させることができ、密度も制御できる。これと、Differential pulse voltammetryを組み合わせて銅イオンが高感度に測定できることを示した。また、これにより、プログラマブルバイオセンサが、生体分子だけでなく無機

イオンに対しても有効であることを示した。

第4章では、より実践的なバイオセンサとして、任意の配列の DNA を「プログラマブル」に測定可能なセンサの開発について述べている。まず、チップ材料である PDMS を侵さない溶媒のみを使用するオリゴヌクレオチドの固相合成系を新たに確立し、チップ内に配した金電極の上にプローブ分子を合成した。次に高感度・非標識な電気化学測定法である、**Electrochemical Impedance Spectroscopy** の手法を用いて、合成したプローブ分子に対する DNA の選択的ハイブリダイゼーションを、高感度に検出できることを示した。

第5章では、これらの成果をまとめている。

以上、本論文は、センシング用途に特化したペプチド及びオリゴヌクレオチドのチップ内での合成法を確立し、また効果的なセンシング法と組み合わせ、プログラマブルバイオセンサのコンセプトを初めて実証したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。