

Title	酸化物TFTを用いた病原体・ウイルスセンサの開発
Author(s)	呉, 維東
Citation	
Issue Date	2023-09
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/18784
Rights	
Description	Supervisor: 高村 禪, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	WU, Weidong		
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 573 号		
学位授与年月日	令和 5 年 9 月 22 日		
論文題目	Development of pathogen and virus sensor employing isothermal amplification and oxide TFT		
論文審査委員	高村 禪	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	水田 博	同	教授
	長尾 祐樹	同	教授
	平塚 祐一	同	准教授
	山口 孝浩	金沢大学	准教授

論文の内容の要旨

Introduction

Owing to the scarcity of readily accessible diagnostics, the time-consuming nature of available diagnostic detection, and the delay in detecting emerging pathogens, severe infectious diseases often lead to high mortality rates, social instability, and economic losses worldwide. As such, the rapid detection of infectious diseases is of great significance to the containment of infectious diseases. In this study, we endeavor to employ the potential of high transconductance oxide Thin-Film Transistor (TFT) biosensors in tandem with the isothermal amplification Recombinase Polymerase Amplification (RPA), aiming to realize the rapid detection of nucleic acids for infectious diseases.

Experiments

First, we investigated the factors that cause the instability of I_d variation in the blank measurements. High salt concentration buffer and low salt concentration buffer were used to do blank measurements. Next, we found that the water content(or moisture) of TFT biosensors may affect the I_d - V_g curves measurement stability. Thus, 2 TFT biosensors were kept in the measurement buffer and desiccator, respectively. Then measured their I_d - V_g curves variation. After that, we measured the DNA sample and compared the I_d variation shift situation before and after incubation. In the same time, fluorescent labels were also used to analyze DNA hybridization on the TFT biosensor's surface. Finally, we optimized the RPA reaction system, employing TFT biosensors to detect the RPA products. This allowed us to determine the limit of detection (LOD) of TFT biosensors for *Leishmania* heat shock protein 70 (*HSP70*) RPA products.

Results and discussion

1. Buffer from low concentration (1mM PB+1mM NaCl) to high concentration (1mM PB+100mM NaCl) had been used for measurement. The TFT biosensors perform unstable in low concentrations, one of the main reasons is the reference electrode. According to Nernst-equation $E=E_0-RT/nF*\ln(a_{red}/a_{ox})$, the $\ln(a_{red}/a_{ox})$, value is small because the low concentration buffer contains less Cl^- ion. What's more, the Cl^- ion in the reference electrode will come out to buffer in measurement, which will cause the measured potential change. Therefore, high concentration buffer can improve the oxide TFT biosensors measurement stability.

2. After keeping the TFT biosensors in deionized water or measurement buffer, the I_d - V_g curves measurement became stable. It indicates high water moisture can improve biosensor stability.

3. Compared to linker APTES with glutaraldehyde, another linker, GPTMS-treated TFT biosensors that without LaZrOx can successfully detect the target RPA products. It shows that the combination of the RPA and TFT biosensors is feasible, which provides the possibility for the POCT of DNA detection.

4. *Leishmania HSP70* was selected as the target nucleic acid for RPA. After optimizing the RPA reaction system, we found that the RPA products treated with proteinase K and SDS exhibited the greatest changes in their Id-Vg curves. Finally, we applied this method to process RPA products under different template DNA concentration, 0 copies/ μL and 10^1 copies/ μL - 10^6 copies/ μL , discovered that the TFT biosensors could detect at the lowest concentration of 10^1 copies/ μL . Moreover, we designed a pair of universal probes for the TFT biosensors, namely the anti-probe and probe. The anti-probe is incorporated into the primer, ensuring that a majority of the RPA products carry the anti-probe sequence after amplification. The probe is pre-immobilized to the TFT biosensors' surface, allowing RPA products containing the anti-probe to specifically bind to the TFT biosensors' surface. This innovative approach significantly reduces the complexity and time of probe design, while offering the flexibility for these probes to be used with other target nucleic acids as well.

Keywords: Point-of-care testing, DNA detection, recombinase polymerase amplification, phase change materials, high transconductance oxide thin-film transistor biosensor

論文審査の結果の要旨

本論文は、 42°C という比較的低温での等温増幅法である Recombinase Polymerase Amplification (RPA)法と、高感度な酸化物 Thin film Transistor (TFT)を組み合わせ、より短い増幅時間で病原体やウイルスを迅速・高感度に検出する実用的なセンサの開発に関するものである。

第1章では、従来の病原体検出法と酸化物 TFT の特徴と課題についてまとめ、本研究の目的を明らかにした。

第2章では、寄生虫疾患である *Leishmania* 症を題材として、これを RPA 法で検出するための条件を精査した。さらに電気や物資が限られている地域・状況での感染症のその場検査を目的として、電氣的な温度制御の代わりに Phase Change Material を温度制御に用いて、RPA で *Leishmania* 症を検出できるデバイスを開発した。

第3章では、酸化物 TFT による核酸検出において結果を不安定にする要因を精査した。特に従来あまり疑われていなかった参照電極によるゲート電圧印加方式が、様々な要因で結果を不安定にすることを明らかにし、安定に動作する条件や、回避方法を明らかにした。また TFT 表面へのプローブ DNA の固定化条件が大きく結果に影響することを示し、リンカーを変更して安定化に成功した。さらに本 TFT 材料に特有の要因として、TFT 保管時の湿度が特性に影響し、高い湿度で保管した方が特性を安定することを示した。これは液中で使われるバイオセンサ用途にとっては有利である。

第4章では、RPA と酸化物 TFT を組み合わせ、迅速で高感度な核酸センサの開発を目指した。3章の成果取り入れて安定化された TFT センサを2個使い、Test 用と Reference 用に分けて差をとることにより、更なる安定化を図った。またプライマに増幅後も一本鎖となる領域を設け、これと TFT 上のプローブ分子を結合させることで室温でも増幅産物を容易に TFT に結合させる方式を新たに開発した。さらに RPA 増幅産物中に TFT 検出の阻害因子があることを突き止め、その非活性化によって、*Leishmania* 症の遺伝子を、等温増幅後、安定に TFT で迅速・高感度に検出できる一連の手法を確立した。

第5章では、これらの成果をまとめた。

以上、本論文は、等温増幅と TET を組み合わせた核酸の検出方法について、その原理的・基礎的な問題とその解決法を明らかにしたものであり、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。