



Title	Studies on Ligand Immobilized Sensors for Polymerase Chain Reaction (PCR) Application
Author(s)	Sabani, Norhayati
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67107
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/resource/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (NORHAYATI BINTI SABANI)	
Title	Studies on Ligand Immobilized Sensors for Polymerase Chain Reaction (PCR) Application (リガンド固定化センサーのPCRへの応用に関する研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Polymerase Chain Reaction (PCR) becomes a popular technique to amplify specific DNA sequence for the diagnostic analysis. Lately, there is a demand for PCR to be used as a part of point-of-care (PoC) diagnostic device in market. The current detection method for PCR used optical detector. Since the PCR for PoC needs to be compact, the optical transducer need to be replaced by electrical or electrochemical detection transducer. Usually, the complementary target DNA sequence immobilized on the biosensor electrode is used to detect the target DNA hybridization as PCR progresses.</p> <p>This project proposes a new sensing device utilizing ligand interaction. Ligand, a small molecule, is immobilized on the sensing surface and catches a specific PCR primer. This primer has an additional sequence, the part of which forms a cytosine or thymine bulges. The primer was named hair-pin primer (HP primer). The ligand that was used in this project is 2,7-diamino-1,8-naphthyridine derivative (DANP). DANP has special and unique properties of forming hydrogen bond with cytosine or thymine bulges. PCR progress could be monitored by the fluorescent intensity from the DANP. DANP has a high fluorescence intensity when intercalated in the bulge structure and decreases when dissociated. As PCR progresses, the HP primers are consumed and fluorescent intensity decrease. Based on this work, DANP is immobilized on the Silicon oxide (SiO₂) channel of the Poly Silicon Nanowire Field Effect Transistor (Poly SNWFET) and on Gold electrode for Electrochemical Impedance Microscopy (EIS), respectively. The characterization of the surface modification were done by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Contact Angle (CA), and Atomic Force Microscopy (AFM) measurements. In Poly SNWFET, each step of the SiO₂ gate surface modification of Poly-SiNW FET was traced by surface potential change. All data obtained indicated that both transducer sensing surfaces are successfully immobilized with the DANP.</p> <p>Ionic concentration for Poly SNWFET measurement is very important. Low ionic concentration condition suggested that there was high electrostatic binding interaction between DANP and HP primers. It could be said that there was no selectivity between the DANP and the HP primers. Meanwhile for the EIS measurement, primer recognition was successfully distinguished between C-Bulge Hairpin primer and Full Match Hairpin Primer with the DANP in high Ionic concentration buffer.</p> <p>In SNWFET case, specific DANP and HP primer interaction was not observed under low ionic strength condition which was needed for SNWFET to perform its high sensitivity. DANP attracted double strand DNA and HP primer without bulge structure under low ionic strength, too. It was suggested that the electrostatic screening distance, i.e. Debye length, is long and electrostatic attractive force between DANP and phosphate-backbone was not weakened. Under high ionic conditions, the Debye length is too short for SNWFET to detect the surface charge variation as a threshold voltage (V_{th}) shift, even HP primer was supposed to bind DANP selectively.</p> <p>On the other hand, the Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) measurement under high ionic condition could detect the DANP and HP primer interaction as an impedance variation. EIS measurement with DANP ligand surface could distinguish C-bulge HP primer from HP primer without a bulge structure (Full match HP primer). The results indicated that EIS measurement method could be applied to the real time PCR monitoring.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (NORHAYATI BINTI SABANI)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	中谷 和彦
	副 査	教 授	小川 琢治
	副 査	教 授	久保 孝史
	副 査	特 任 教 授	山下 一郎
論文審査の結果の要旨			
<p>申請者は、DNA 結合性低分子を表面に固定化したセンサーの開発とその PCR への応用に関する研究に取組み、以下の成果を上げている。</p> <p>1) DNA 結合性分子 DANP 固定化 SiO₂ 表面作成法の確立とポリシリコンナノワイヤー電解効果型トランジスターによる検出</p> <p>従来の DNA 検出バイオセンサーは、センサー表面に検出対象の DNA の相補鎖を固定化し、センサー上での標的 DNA との二本鎖形成を検出原理としている。DNA の二本鎖形成の高い選択性、標的特異性を利用できるものの、反面、検出できる DNA の配列が極めて限定されるために汎用性に欠ける。また、DNA を固定化したバイオセンサーを作成するために、コスト、品質保持などに課題が残る。この問題点を解決するために、申請者は DNA に結合する有機分子が固定化されたセンサー表面をもつバイオセンサーを検討した。低分子が持つ DNA 配列選択性を利用するために、汎用性が確保できる。申請者は、低分子としてジアミノナフチリジン誘導体 (DANP) を固定化した電界効果型トランジスターと DANP が結合選択性を示すシトシンバルジ構造をもつ DNA をプローブとして用いた PCR 検出センサーを検討した。SiO₂ 表面への DANP 結合を種々検討した結果、エポキシ基をもつシリコンカップラー、アジド化、アルキン修飾 DANP とのクリック反応により、また、各段階の表面を XPS、AFM で分析することにより、DANP 固定化シリコンナノワイヤー-FET の作成に成功した。</p> <p>2) DANP 固定化金電極の作成と Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) 法による、PCR モニタリング</p> <p>DANP 固定化 SiFET を用いた PCR 検出では、PCR 溶液の塩濃度を大幅に低減することが必要となり、汎用的な PCR 条件ではデバイ長が短く検出が難しいことが明らかとなった。申請者は低塩濃度の PCR 条件も検討しているが、塩濃度の影響をほとんど受けない電気化学インピーダンス測定法による PCR 検出を検討した。金表面への低分子 DANP の固定化は、チオールカルボン酸、アミドカップリングにより行い DANP 固定化金電極を作成した。DANP を蛍光標識試薬とするヘアピンプライマー法に準じて、PCR 前後の溶液中に存在する DANP に結合するシトシンバルジ構造を持つプライマーの量を評価した。その結果、予想どおり DANP に結合するシトシンバルジの量に応じてナイキストプロットが大きく変化することを明らかにした。</p> <p>上記の成果は、DNA 結合性低分子を固定化したバイオセンサーに関する表面構造形成と PCR の進展を調べるセンサーとしての作動に必要な条件ならびにその可能性を示す貴重な実験結果を提示すると同時に、将来的なリアルタイム PCR と連動したセンサーの可能性を示しており、高く評価できる。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			