

微小液滴で microRNA 検出を実現する セラミック薄膜バイオセンサの創製

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 田畑美幸

Fabrication of a Ceramic Thin Film Biosensor and its Application for MicroRNA Detection
with a Small Droplet

Miyuki Tabata

Institute of Biomaterials and Tokyo Medical and Dental University

本研究では、等温核酸増幅法である 3WJ-PGRCA (Three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification) と酸化イリジウム薄膜マイクロ pH センサを用いた電気化学計測を組み合わせることでラベルフリーに核酸増幅をモニタリングする安価デバイスの開発を試みた。直径 0.3mm の薄膜型 Ir / IrO_x 電極 9 個と直径 1mm の Ag 電極を含む絶縁体 (SU-8) で覆われたチップを作製し、反応性スパッタリングにより形成した Ir/IrO_x 電極の電気特性を評価した。塩橋を有する参照電極にて計測した pH 感度は -58.6 mV/pH であり、室温での理論値である -59.2 mV/pH に近い値を示した。乳がんに関連している miRNA (micro RNA) 16-5p について、100 fM の Target miR16-5p が存在する場合 3WJ-PGRCA の蛍光増幅検出を確認した。また、3WJ-PGRCA とイリジウム薄膜マイクロ pH センサを組み合わせることで miRNA 検出を検討した。その結果ターゲット miRNA が存在する場合において pH の減少が認められた。微量な体液サンプルからのセンシングを実現する本デバイスは、計測温度の厳密な制御や適切な前処理技術を組み合わせることでリキッドバイオプシーの新規プラットフォームとなることが期待される。

A low-cost device for monitoring nucleic acid amplification in a label-free manner was developed by combining two technologies: an isothermal nucleic acid amplification method (3 WJ-PGRCA, *i.e.*, three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification) and electrochemical measurement using micro pH sensor based on an iridium oxide thin film. A chip covered with an insulator (SU-8) was composed of nine thin-film Ir/IrO_x electrodes (fabricated with a reactive sputtering method) with a diameter of 0.3 mm and an Ag electrode with a diameter of 1 mm. When the electrical characteristics of the Ir/IrO_x electrodes were measured, the pH sensitivity was -58.6 mV/pH and was close to the theoretical value according to the Nernst equation. For breast cancer-related micro RNA (miRNA) 16-5p, 3WJ-PGRCA fluorescence amplification detection was confirmed in the presence of 100 fM of the targeted miR 16-5p. miRNA detection by 3WJ-PGRCA was also confirmed with an iridium thin film micro pH sensor. As a result, a decrease in pH was observed in the presence of the targeted miRNA. The developed device enabled pH sensing even when the sample was a small amount of body fluid. Strict control of measurement temperature and appropriate pretreatment of the sample would further enhance the sensing robustness toward a new platform for liquid biopsy.

1. はじめに

核酸定量技術は我々の社会や生活と密接に関連しており医療、生命科学、食品など、幅広い分野において不可欠な技術である。特に配列特異的な核酸定量技術は生物学的脅威となる病原体の検出あるいは疾病の早期診断といった臨床医療に関わる場面においてますます重要な検出技術となっている。一般に、核酸の定量技術としてリアルタイム PCR (Polymerase chain reaction) が用いられている。その核酸増幅反応の検出は蛍光検出法が主流である。一方で、小型化、迅速化、および簡便化を目的とした電気化学的な核酸増幅検出法が注目されている。例えば DNA 二重鎖にインターカレートする性質をもつ酸化還元プローブを用いた電気化学的検出法が報告されている¹⁻²。また、核酸増幅過程におけるポリメラーゼ伸長反応において、一分子のヌクレオチドが結合するごとにピロリン酸と水素イオンが放出されることを利用して、水素イオンを指標とした DNA シーケンサがすでに実用化されている³⁻⁵。半導体技術や微細加工技術を駆使することによりセンサを高度に集積化し、高スループットな計測を可能にしている。同様に PCR や LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法と組み合わせたトランジスタ型核酸検出デバイスも報告されている⁶。しかしながら、PCR はその増幅反応に正確な温度サイクル制御を要し、半導体は温度変化により電気特性が著しく変化する性質を持っているため、低消費電力化とともに測定中に生じる電位不安定性、ノイズの低減が課題であった。

そこで本研究では、電位安定性の向上およびデバイスの小型・簡易な等温核酸増幅法と酸化イリジウム薄膜マイクロ pH センサを用いた電気化学計測を組み合わせることでラベルフリー・リアルタイムに核酸増幅をモニタリングする安価デバイスの開発を行った。等温核酸増幅にはワンステップ反応で miRNA を検出するために、PG-RCA を改変した 3WJ-PGRCA を利用した⁷。また、安定電位計測を目指し、イリジウム薄膜型のマイクロ pH センサチップを利用した。このイリジウム薄膜マイクロ pH センサは先行研究のワイヤ型 Ir/IrOx 電極と比較して小型・集積化デバイスの実現に有効である。3WJ-PGRCA とイリジウム薄膜マイクロ pH センサを組み合わせることで微量な体液サンプルからの複数項目の同時センシングの実現を提案する本デバイスは、リキッドバイオプシーの新規プラットフォームとなることが期待される。

2. 実験方法

2.1 pH センサチップの構造

デザインしたチップの詳細を図 1 に示した。ガラス基板に、直径 0.3 mm の薄膜型 Ir / IrOx 電極を 9 個配置した。このとき Ir/IrOx 薄膜は、Ir スパッタリングの際に酸素ガスを混合した反応性スパッタリングにて成膜した。さらに参照電極一体化型のチップとするため中央には直径 1 mm の Ag 薄膜をスパッタリングにより成膜した。それぞれの電極間でのクロストークを避けるため、各電極及び読み取り部以外は SU-8 で覆われた構造とした。Ag 薄膜上には化学的に AgCl 層を堆積させた。

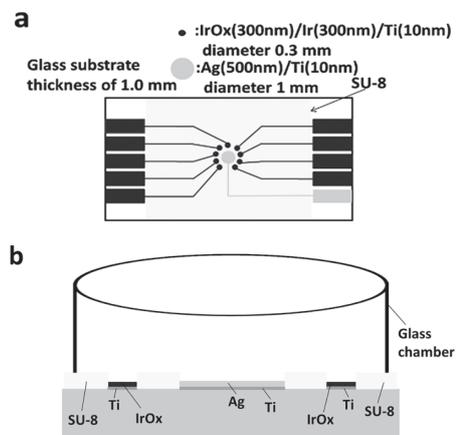


図 1 pH センサチップの構造
a) 上面図、b) 断面図

2.2 3WJ-PGRCAの蛍光モニタリング

表1に示した組成で3WJ-PGRCA反応溶液10 μ Lを調製し、SYBR green IIを用いた蛍光検出法により3WJ-PGRCA反応の進行を確認した。ここで3WJ probeとは、図7におけるTarget RNA、3WJ template、3WJ primerがハイブリダイゼーションした核酸プローブのことを指す。反応温度を60 $^{\circ}$ C、反応時間を4時間とし、リアルタイムPCR装置を用いてその進行を確認した。

表1 3WJ-PGRCA反応溶液組成

試薬	終濃度
2.5 mM dNTP _{mix}	100 μ M
Circular probe	15 nM
Vent (exo-) DNA polymerase	0.5 U
Nb.Bsml	1 U
10x PG-RCA buffer pH8.8	1 x
DEPC-treated water	-
10x SYBR Green II	1 x
10x Rox	1 x
3WJ probe or 1x PG-RCA buffer	100 fM、NC

10x PG-RCA buffer : pH 8.8, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 6 mM MgSO_4

2.3 Ir/IrOx薄膜電極による3WJ-PGRCAの電位モニタリング

表2に示した組成で50 μ Lの3WJ-PGRCA反応溶液をPCRチューブに調製した。反応溶液をイリジウム薄膜マイクロpHセンサに滴下し、核酸伸長反応際に放出されるプロトンを経電的に計測することでmiRNA定量検出を検討した。

表2 pH計測用3WJ-PGRCA反応溶液組成

試薬	終濃度
2.5 mM dNTP _{mix}	100 μ M
Circular probe	15 nM
Vent (exo-) DNA polymerase	0.5 U
Nb.Bsml	1 U
10x PG-RCA buffer pH8.8	1 x
DEPC-treated water	-
3WJ probe or 1x PG-RCA buffer	100 fM、NC

10x PG-RCA buffer : pH 8.8, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 6 mM MgSO_4

3. 結果と考察

3.1 Ir/IrOx薄膜電極のH⁺感度評価

スパッタリングによるIr薄膜の作製は容易であるがIrOxは焼結中に還元されてしまう上に展延性の課題からスパッタリングターゲットとして使用することは困難である。そのため、Irのスパッタ中にArガスとO₂ガスの混合ガスを使用する反応性スパッタを行い、pH計測において良好なネルンスト応答を示すIr/IrOx薄膜形成条件を見出す必要がある。Ir/IrOxのH⁺感度を評価するにあたり、塩橋を有するAg/AgCl参照電極を用いて、室温

にて pH を 9 から 4 に変化させた緩衝液中での電位変化を確認した。8 チャンネル同時計測したところ、pH 感度は -58.6 mV/pH であり、室温での理論値 -59.2 mV/pH に近い値が得られた。理想的なネルンストの傾きを実現するには IrO_x の酸化の価数を制御する必要があり、酸素ガスを混合した反応性スパッタリングでは厳密に価数をコントロールすることは難しいが、本 Ir/IrO_x 薄膜電極においては十分な感度を有していることが明らかになった。

3.2 3WJ-PGRCA 蛍光リアルタイムモニタリング

デザインしたオリゴ核酸配列を用いた 3WJ-PGRCA により miRNA の検出を検討した。一本鎖核酸でも感度よく検出するとされる SYBR green II を用いた蛍光リアルタイムモニタリングにより 3WJ-PGRCA 反応の進行を評価した。その結果、系に 3WJ probe を添加していない、すなわち miRNA が存在しない Negative Control (NC) と比較して、100 fM miRNA が存在する場合 3WJ-PGRCA の蛍光強度が大きく増加することが確認された(図 2)。

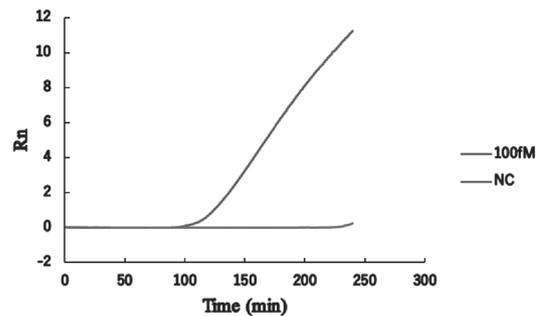


図 2 3WJ-PGRCA 反応進行の確認

3.3 3WJ-PGRCA を利用した miRNA 検出のエンドポイントアッセイ

3WJ-PGRCA による miRNA の検出が可能であったことから、ゲル電気泳動および反応前後での pH 変化を計測することにより、miRNA 検出のエンドポイントアッセイが可能かどうかを検証した。乳がんの発現に関連している miRNA16-5p について、1 nM の miRNA が存在する場合において、RCA 系に特徴的なスミアなバンドが見られたことから、増幅産物の存在が認められた(図 3)。さらに、開発した参照電極一体化型マイクロ pH センサを用いて 3WJ-PGRCA の前後での pH 変化を簡易的に確認したところ、1 nM miRNA が存在する場合において pH の減少が認められた(表 3)。これらの結果から、3WJ-PGRCA 後のエンドポイントアッセイにより 1 nM miRNA の検出が可能であることを実証した。リアルタイムモニタリングを今後の課題としており、検出感度や特異性を詳細に評価する。

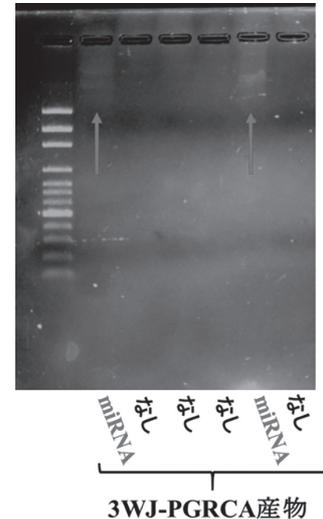


図 3 ゲル電気泳動による 3WJ-PGRCA 産物の確認

表 3 3WJ-PGRCA の前後の pH 変化

	Before	After
With target 1 nM microRNA	8.65	8.38
Without target microRNA	8.70	8.72

4. 結論

本研究では、近年リキッドバイオプシーの新しいバイオマーカーとして注目されている乳がんに関連した miRNA を検出対象とし、伸長反応時に放出されるプロトンのセンシングを行うことでラベル化剤不要な簡便計測を実現するがん診断センサの開発を目指して、参照電極一体化型の Ir/IrO_x 薄膜マイクロ pH センサの作製に取り組んだ。その結果、微細加工された Ir/IrO_x 薄膜電極および Ag/AgCl 電極の一体化により、小型で複数の miRNA を同時に解析可能なセンサデバイスを開発する見通しが得られた。一方、酵素を用いた核酸増幅反応の至適温度の精密な制御などの課題も明らかになった。今後はこれらの課題の解決に向けてさらに研究開発を進める必要がある。

5. 謝辞

本研究は平成 30 年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝いたします。

6. 参考文献

1. Thibaut D, Michel D, David E, et al. Real-Time Electrochemical PCR with a DNA Intercalating Redox Probe. *Anal. Chem.*, 2011;83 (5): 1815-1821
2. Kivlehan F, Mavre F, et al. Real-time electrochemical monitoring of isothermal helicase-dependent amplification of nucleic acids. *Analyst*, 2011;136:3635–3642
3. Merriman B, Ion Torrent R.D. Team, Rothberg JM. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, 2012;33:3397-3417
4. Toshinari S, Yuzuru H. Real-Time Monitoring of DNA polymerase Reactions by a Micro ISFET pH Sensor. *Anal. Chem.*, 1992;64: 1996-1997
5. Rothberg JM, Wolfgang H, Todd MR, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 2011;475 (7356):348-352
6. Toumazou C, Shepherd LM, Reed SC, et al. Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system. *Nat. Methods*, 2013;10 (7):641-646
7. Taku Murakami, Jun Sumaoka, Makoto Komiyama. Sensitive RNA detection by combining three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.*, 2012;40 (3):e22