

朝向奈米電子學與生命科學融合的 目標邁進

宮原 裕二(Miyahara, Yuji)

東京醫科齒科大學生體材料工學研究所 教授

【摘要】

1. 前言

1970年 P. Bergveld 首次發表將絕緣閘極場效電晶體(Insulated Gate Field Effect Transistor, IGFET) 浸泡於水溶液中，並應用於量測離子濃度的研究，他將其命名為 Ion-sensitive FET、ISFET (1)。其後進行了許多研究，如設置參考電極的必要性(2)，在閘極上形成之離子感應膜研究(3,4)，與穩定性、飄移機制等(5-7)，如今已實用化為 pH 量測用感測器。不但作為離子感測器進行應用，學界也發表了與固定化酵素搭配的酵素 FET (Enzyme FET) (8-11)，以及與抗原—抗體反應搭配的免疫 FET (Immuno FET) (12) 等研究，還有與生物分子之特殊反應搭配的生物 FET 相關研究。免疫 FET 雖是能檢測出閘極絕緣膜表面上抗原、抗體電荷的元件，但一般對其的見解是其無法得到可重現的結果，且實現此項技術相當困難。主要與抗體等蛋白質大小、溶液／閘極絕緣膜界面的雙電層寬度(元件長度)有關。相較於抗體的典型大小約 10nm，生理食鹽水溶液中元件長度約為 1nm。若要將抗體固定化在閘極絕緣膜表面上時，溶液中的抗原會在雙電層外與抗體結合，抗原的電荷會因為相對離子而受遮蔽，原理上還難以使用 FET 來檢測出。但最近有幾項研究提出可以克服這些問題。本演講會提及最近的生物電晶體研究，並主要介紹我們團隊進行的核酸及細胞相關研究。

2. 分析核酸用生物電晶體

使用場效電晶體 (Field Effect Transistor, FET) 的 DNA 量測類如 Fig. 1 所示。將寡核苷酸探針固定化於 FET 的閘極絕緣膜表面上，並與 Ag/AgCl 參考電極一起浸泡在試驗溶液中。溶液的電位會因為參考電極而受控制、固定。由於 DNA 帶有來自磷酸基的負電荷，只要在閘極表面上固定化 DNA 探針，或是使其與目標

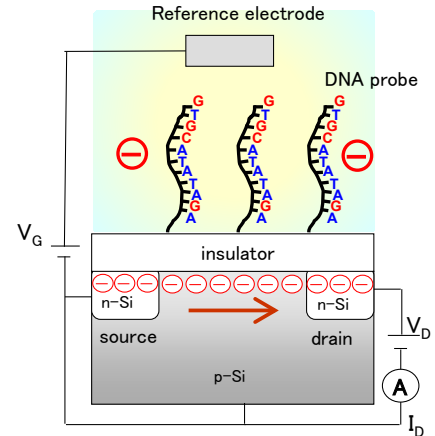


Fig. 1 使用 FET 的生物感測器

DNA 雜交 (Hybridization)，閘極表面附近的電荷密度便會有所變化。藉由 FET 檢測出此電荷密度變化，便能得知其是否有帶有試驗材料中目的之核酸序列的 DNA。在閘極絕緣膜上的引子延伸反應中，將 4 種的去氧核糖核苷酸 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 個別與 Taq DNA 聚合酶依序加入，量測 FET 的閾值電壓變化。若與目標 DNA 的鹼基互補，會因單一鹼基延伸反應只合成一個鹼基；若不互補便不會產生合成反應。因此只要依序添加 4 種鹼基，並量測各閾值電壓的變化，就能知道目標 DNA 的未知鹼基序列。依序加入 4 種去氧核糖核苷酸，並量測單一鹼基延伸反應，若加入的去氧核糖核苷酸與目標 DNA 鹼基互補時，因為單一鹼基延伸之故，會有 4mV 左右的閾值電壓 V_T 變化；若非互補時，閾值電壓幾乎沒有任何變化。

由此可知 FET 能夠檢測出單一鹼基延伸反應。透過上述內容，得知只要反覆添加 4 種去氧核糖核苷酸，並量測閾值電壓變化，便能得到反映目標 DNA 鹼基序列的訊號 (13)。DNA 定序儀會不斷在 FET 的閘極絕緣膜上進行單一鹼基延伸反應，用離子感測 FET 來檢測所產生的氫離子，並分析 DNA 鹼基序列，這項技術已經實用化。目前已研發了能在 1cm 大小的矽晶片上，高密度化集積 100 萬到 1000 萬個電晶體的晶片，並透過能在閘極捕捉到的微粒上，同時進行許多單一鹼基延伸反應，達到高速且高產出量的定序。實際上，次世代的 DNA 定序儀已產品化，且在歐洲流行病原性大腸桿菌時，對短時間定序大腸桿菌之類型做出極大貢獻 (14, 15)。

3. 透過細胞電晶體分析運輸蛋白／受質相互作用之動力學

運輸蛋白存在於細胞膜中，是非常重要的蛋白質，也就是胜肽，其肩負使物質主動於細胞膜上運輸之重任。藥物作用會依作用部位的藥物濃度而定，這與藥物的吸收、分佈、代謝、排泄等體內動態有相當大的關係。由於吸收、分佈、代謝、排泄包含在全細胞膜的穿透製程中，負責運輸藥物的運輸蛋白便在藥物的藥效、副作用上扮演重要的角色。因此在研發新藥時，需要迅速分析細胞膜表面的運輸蛋白及藥物候補化合物（受質）相互作用的技術。本節中將說明，在場效電晶體之閘極絕緣膜表面上，設置會發現的運輸蛋白的細胞，並以非侵入式的方式量測運輸蛋白與受質相互作用的細胞電晶體。

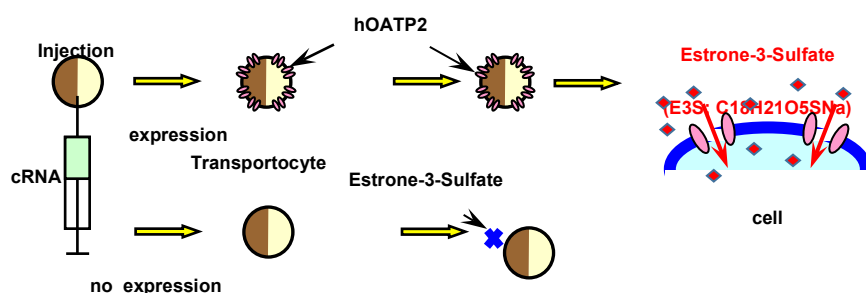


Fig. 2 運輸蛋白與受質相互作用分析的概要

細胞使用非洲爪蟾的卵母細胞，運輸蛋白使用人類有機陰離子運輸器（human Organic Anion Transporting Polypeptide; hOATP），受質則使用 Estrone-3-Sulfate (E3S) 等有機負離子。卵母細胞的直徑約 1mm，使用上非常容易。如 Fig. 2 所示，在卵母細胞中注入人類有機陰離子運輸器之基因，並使其發現在細胞膜上的人類有機陰離子運輸器。將發現運輸蛋白的卵母細胞，以及作為對照組的未發現卵母細胞，都分別固定在 FET 的閘極絕緣膜表面上。若將受質的 Estrone-3-Sulfate (E3S) 導入溶液裡，在發現運輸蛋白的卵母細胞中，E3S 就會藉由運輸蛋白被攝入細胞內。另一方面，在未發現運輸蛋白的卵母細胞中，E3S 則不會被攝入。此外，使用 3 種 FET 調查對受質反應的結果，如 Fig. 3 所示，第一種 FET 是將發現細胞膜上人類有機陰離子運輸器（hOATP2）的卵母細胞設置在閘極絕緣膜上的 FET；再者是設置了不會發

現運輸蛋白之卵母細胞的對照組 FET；最後是不設置卵母細胞的 FET。僅擁有發現人類有機陰離子運輸器之卵母細胞的 FET 在與受質相互作用後，出現了 10mV 左右的訊號變化。在添加受質後約 30 分鐘便出現一定數值的反應，可知道與受質 E3S 等相關的細胞膜運輸達到了穩定狀態。另一方面，未發現運輸蛋白之卵母細胞的電位訊號幾乎沒有變化。

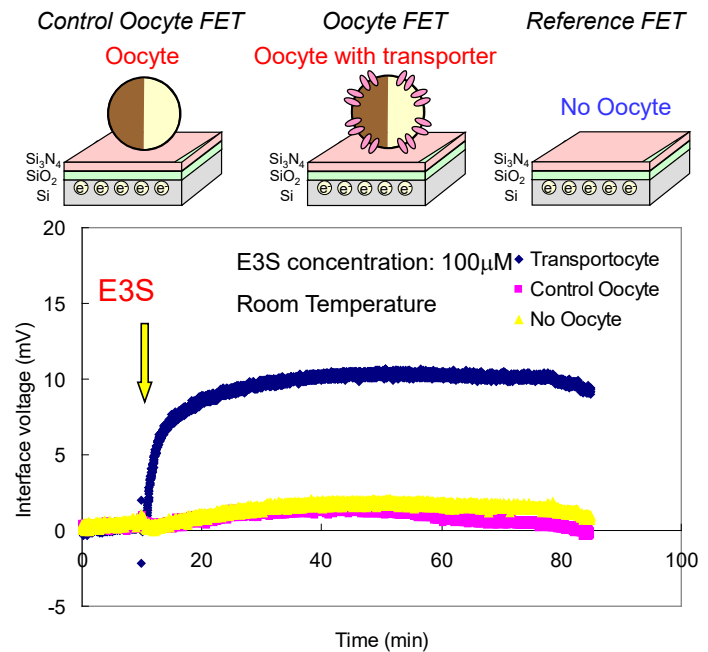


Fig. 3 透過添加受質後細胞電晶體的反應

已知細胞膜中有離子通道或離子幫浦等膜蛋白，Estron-3-Sulfate (E3S) 透過人類有機陰離子運輸器 hOATP 被攝入細胞內時，E3S 以外的離子等會同時流入細胞內或從細胞中流出。

可認為是因氫離子流入或流出，讓閘極附近的 pH 有所反應。透過以上內容，確認到可使用非侵入的方式，分析在細胞膜表面上運輸蛋白與受質相互作用的動力學。

眾所周知的，hOATP 運輸蛋白有幾種基因多型性，且受質對細胞的攝入效率會因多型種類而有所不同。製作可發現與野生型 thOATP-C*1a 更換 2 胺基酸殘基後的突變型 hOATP-C*15 的卵母

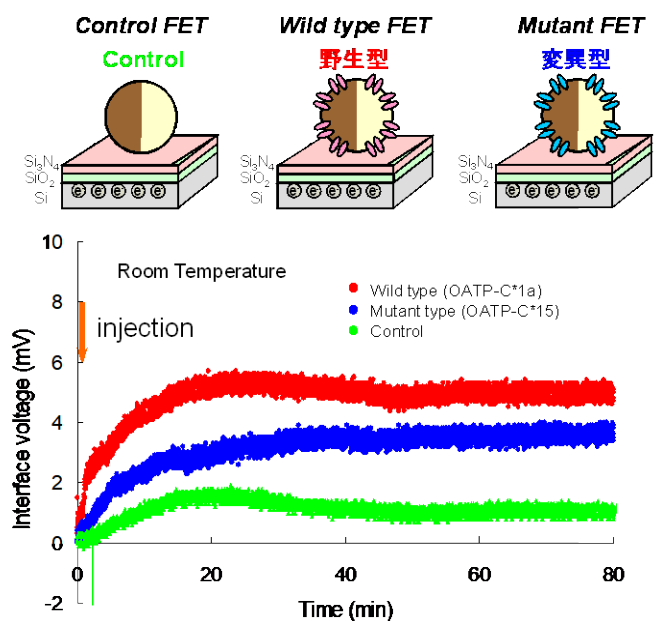


Fig. 4 野生型、突變型運輸蛋白的反應

細胞，並各設置於 FET 的閘極絕緣膜表面上，調查其對受質的反應。Fig. 4 所示為野生型、突變型、對照組 FET 的反應。

FET 擁有發現野生型運輸細胞的卵母細胞，其電位反應約是突變型 FET 電位反應的兩倍。由此結果可知，使用放射性同位素為標記的攝入實驗也會是相同的結果，可透過運輸蛋白的多型性來得知膜運輸效率的差異(16,17)。如上所述，在細胞電晶體中，由於能用非標誌、非侵入的方式量測在細胞膜所發生的電現象，所以可有效得知運輸蛋白與受質的相互作用，或是分析膜蛋白質功能的高產出性。

4. 結語

以上介紹了使用各種功能性界面的生物感測器，而其中幾種感測器已在生命科學領域中蓬勃發展。在人類基因組計劃解開人類所有鹼基序列後，對 DNA 定序的需求不斷提高。如以上報告，使用生物電晶體的 DNA 定序儀已實用化，並開始應用於癌症基因組分析等醫療領域中。

另一方面，使用電子化學元件的核酸增幅監控在量測的簡便度、將量測系統小型化、低價化都有長足的發展。為了實現居家醫療和即時檢驗，使用 miRNA 檢測的癌症檢查等，與為了達到精準醫學的液態生物檢體，都是備受期待的有用診斷元件。如今，IoT (Internet of things) 使我們能共享龐大的資訊，社會也越發傾向將核酸分析的基因資訊資料庫化，液態生物檢體在實現超早期診斷、預防醫療、醫療照護將扮演舉足輕重的角色，可期待今後其蓬勃的發展。

5. 文獻

- (1) P. Bergveld: IEEE Trans. Biomed. Eng. 17,70 (1970) .
- (2) T. Matsuo and K.D. Wise: IEEE Trans. Biomed. Eng. 21, 485 (1974) .

- (3) 松尾正之、江刺正喜、応用物理、49、588 (1980)
- (4) P. T. McBride, J. Janata, P. A. Comte, S. D. Moss, and C. C. Johnson, *Anal. Chim. Acta*, 108, 161 (1979) .
- (5) P. Hein, and P. Egger, *Sensors and Actuators B*, 1-3, 655 (1993) .
- (6) Y. Ito, *Sensors and Actuators B*, 64, 152 (2000) .
- (7) Y. Miyahara, K. Yamashita, S. Ozawa and Y. Watanabe, *Anal. Chim. Acta*, 331, 85 (1996) .
- (8) S. Caras and J. Janata, *Anal. Chem.* 52, 1935 (1980) .
- (9) Yuji Miyahara, Shoko Shiokawa, Toyosaka Moriizumi, Hideaki Matsuoka, Isao Karube, and Shuich Suzuki, *Biosensor using ISFET with immobilized enzyme membrane, Proceedings of the 2nd Sensor Symposium (Tsukuba)* , 91 (1982)
- (10) 宮原裕二、森泉豊栄、塩川祥子、松岡英明、軽部征夫、鈴木周一、*日本化学会誌*, No.6, 823 (1983) .
- (11) Y. Miyahara, T. Moriizumi, and K. Ichimura, *Sensors and Actuators*, 7, 1 (1985) .
- (12) S. Collins and J. Janata, *Anal. Chim. Acta*, 136, 93 (1982) .
- (13) Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, *Angew. Chem. Int. Edn.*, 2006, 45 (14) , 2225-2228
- (14) Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. *Nature* 2011, 475 (7356) : 348-352.
- (15) Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. *Nature Biotechnology* 2012, 30 (5) : 434
- (16) Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, *Anal. Chem.*, 2008, 80 (5) , 1493-1496
- (17) Daniel Felix Schaffhauser, Monica Patti, Tatsuro Goda, Yuji Miyahara, Ian Cameron Forster and Petra Stephanie Dittrich, *PLoS ONE*, 2012, 7 (7) , e39238