

核酸増幅反応を適用した RNA 検出インピーダンスバイオセンサの開発

Development of impedimetric biosensor with nucleic acid amplification reaction for RNA detection

林 宏樹

HAYASHI, Hiroki

早稲田大学 先進理工学部 応用化学科

Department of Applied Chemistry, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University

h-hayashi@aoni.waseda.jp

新型コロナウイルスの感染拡大時に問題となった検査体制の不足解消のため、RNA 検出に向けた交流インピーダンスバイオセンサの開発を目指した。電気化学バイオセンサの測定原理のひとつとして、対象 RNA の存在下において酵素活性を有する DNAzyme を界面に形成することで、過酸化水素の還元反応に由来する電流値変化を検出する方法がある。そして、これまでの研究において、核酸増幅法の適用により DNAzyme の多数形成による電流値変化量を増大させることで、対象 RNA 検出の高感度化を検討してきた。同検出手法では、酵素反応を引き起こすために試薬を多数使用することから、再現性への影響が懸念された。そこで本研究では、交流インピーダンス法と等温核酸増幅法を組み合わせることで上記課題解決を試みた。交流インピーダンス法により、電極表面上における核酸増幅反応の定量的な解析により対象 RNA を検出した。本手法は、測定時に多数の試薬を必要とせず、酸化還元反応種のみを使用する。初めに、電極表面で核酸増幅反応を進行するべく、反応開始点となる DNA プライマーを金-チオール反応によって固定化した。その結果、交流インピーダンス法によって測定したナイキストプロットより、DNA プライマー固定化を示唆する電荷移動抵抗 R_{ct} および電気二重層容量 C_{dl} の変化を確認した。続いて、対象 RNA 存在下において核酸増幅反応前後における交流インピーダンス測定を行った。その結果、反応後のナイキストプロットにおいて、高周波側の半円の増加に伴う R_{ct} の増大を確認から、対象 RNA の検出可能性が確認された。したがって、本研究から核酸増幅反応前後の電極界面状態変化をインピーダンス解析することにより、対象 RNA の検出可能性が示唆された。

To address the shortage of testing capacity during the COVID-19 pandemic, I aimed to develop an impedimetric biosensor for RNA detection. One of the principles of

electrochemical biosensors involves forming a DNAzyme with enzymatic activity in the presence of target RNA. This allows the detection of current changes due to the reduction of hydrogen peroxide. Previous research enhanced RNA detection sensitivity by increasing current changes through numerous DNAzyme formations using nucleic acid amplification. However, this method's reliance on multiple reagents for enzyme reactions raised concerns about reproducibility. To overcome these challenges, this study combined electrochemical impedance spectroscopy (EIS) with isothermal nucleic acid amplification. I attempted to detect target RNA through quantitative analysis of nucleic acid amplification reactions on the electrode surface. This approach, using only redox species during measurement, aims to resolve the reproducibility issues mentioned. Initially, DNA primers were immobilized on the electrode surface via gold-thiol reactions to initiate the nucleic acid amplification reaction. Nyquist plots measured by EIS indicated changes in charge transfer resistance (R_{ct}) and double-layer capacitance (C_{dl}), suggesting successful DNA primer immobilization. I then performed EIS measurements before and after the nucleic acid amplification reaction in the presence of target RNA. The Nyquist plots showed an increase in the high-frequency semicircle after the amplification, indicating an increase in R_{ct} . These findings demonstrated the potential of this method for detecting target RNA. Therefore, this study suggested that analyzing changes in the electrode interface state before and after nucleic acid amplification through impedance analysis can enable the detection of target RNA.