

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 11 月 16 日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750076

研究課題名（和文）DNA増幅と金ナノ粒子を利用した目視超高感度免疫分析法の開発

研究課題名（英文）Development of a highly sensitive visual immunoassay method based on DNA amplification and gold nanoparticles.

研究代表者

佐藤 香枝（SATO KAE）

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：40373310

研究成果の概要（和文）：免疫分析はその特異性の高さから最も主要な検査方法である。検査の簡便化のためには高感度に目視検出できることが強く望まれている。無機材料である金ナノ粒子と生体分子である DNA の複合体と酵素を用いて、免疫分析を行う基盤技術を確立した。効果的な反応場である固相基板を作成すること、DNA 修飾した抗体を作成すること、検出する金ナノ粒子が速やかに DNA 増幅産物に結合するような条件を見つけることを目的に検討した。

研究成果の概要（英文）：Immunoassay is one of the most important analytical methods because of its specificity. To simplify the analysis, a new method based on highly sensitive visual test is strongly required. We established fundamental technologies for immunoassays using enzymes and conjugates of inorganic materials (gold nanoparticle) and biomolecules (DNA). We investigated to develop solid substrates used as efficient reaction fields, make DNA-modified antibodies, and optimize the reactions of gold nanoparticles and amplified products of DNA samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：DNA、RCA、ビーズ

1. 研究開始当初の背景

無機材料と生体分子の複合体は、検出法や反応場など新しい分析化学の技術としての可能性が期待されている。現在、環境分析からがん診断まで様々な検査法があり、それらの迅速化、高感度化に、この無機材料と生体

分子の複合体の利用が有効ではないかと着想した。

免疫分析はその特異性の高さから最も主要な検査方法である。検査の簡便化のためには高感度に目視検出できることが強く望まれている。DNA 修飾抗体・酵素による DNA

増幅反応・DNA 修飾金ナノ粒子を利用した今までにない高感度・高精度な目視免疫分析法を構築することを着想した。血液検査などをゴールとした場合は特に複数項目同時検出が重要になると考え、これらの反応を固相化してアレイを構築できるようなプロセスも必要である。

この DNA 増幅と金ナノ粒子を利用した免疫分析法を開発するには、効果的な反応場である固相基板を作成すること、DNA 修飾した抗体を作成すること、検出する金ナノ粒子が速やかに DNA 増幅産物に結合するような条件を見つけることが必要であると考え、研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)DNA 伸長・増幅産物の金ナノ粒子による検出法の開発、(2)PLA の金ナノ粒子による検出法の開発、(3)全行程の固相化について、それぞれの基盤技術を確認することとした。

3. 研究の方法

(1)DNA 伸長・増幅産物の金ナノ粒子による検出法の開発

金ナノ粒子は BB インターナショナル製の直径 15 nm のものを用いた。金ナノ粒子に結合させる DNA は 5'末端をチオール基で修飾したものをを用いた。5 nmol のチオール化 DNA へ 15 nm 金ナノ粒子溶液 1 mL を添加し 50°C で 4~24 時間加温、その後、NaCl およびリン酸緩衝液 (pH7) を最終濃度 0.1 M および 10 mM に成るように NaCl とリン酸緩衝液添加し、さらに 50°C で 40 時間加温することで金ナノ粒子に DNA を結合させた。遠心分離をして溶液中に存在する過剰な DNA を取り除き、実験に使用した。

(2)PLA の金ナノ粒子による検出法の開発

抗体に結合する DNA は、チオール化したものを用いた。抗体のアミノ基と結合させるクロスリンカーを用いて抗体に DNA を修飾した。

(3)全行程の固相化

固相化する表面として、アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、ガラス基板を用いた。

4. 研究成果

(1)DNA 伸長・増幅産物の金ナノ粒子による検出法の開発

これまで固相表面での DNA の伸長・増幅法においては蛍光プローブ DNA を用いて検出をしていた。そのプローブを DNA 修飾金ナノ粒子に変更した。配列によりハイブリダイズの起こりやすさが異なっていることが予想された。そこで、配列をいくつか検討したところ、DNA 修飾金ナノ粒子への結合が早い配列を見つけることができた。

(2)PLA の金ナノ粒子による検出法の開発

2-1 DNA 修飾抗体の作製： PLA に使用する DNA 修飾抗体を作成した。抗体と DNA の結合は、抗体のアミノ基とチオール化 DNA を結合することで達成した。ゲル電気泳動で抗体に DNA が修飾されていることが確認できた。

(3)全行程の固相化

固相化法としての確立を目指し、抗体の固定化法と非特異吸着を防止する方法について検討した。アビジンは非特異吸着が容易に起こることが示された。市販のブロッキング剤を使用することで、非特異吸着は減少した。

RCA に適する基板の検討として、マイクロビーズを用いる方法とマイクロチャンネル内壁の表面に固定した DNA を用いる方法の二種類の反応系を構築した。マイクロビーズ法としては、ポリスチレンビーズ (SPHERO ストレプトアビジン標識ビーズ 平均粒径 19 μm、Spherotech) およびアガロースビーズ (NHS HP SpinTrap 平均粒径 34 μm、GEヘルスケア) 10000 粒子と 1 fmol の DNA を使用して PCR チューブ内で Padlock/RCA 反応を行い、3 個のビーズに対してビーズ表面に観察された RCA 産物を検出、イメージ J を用いてカウントしたところ、計数結果はアガロースビーズの場合は平均 700 個/粒子、ポリスチレンビーズの場合は 67 個/粒子であった。したがってアガロースビーズの方が反応系として有効であることが確認できた (図 1)。

一方、マイクロチャンネル内壁に直接プライマーを固定する方法でも RCA 産物を得ることができた。この方法では、ガラス表面に APTES を修飾し、さらに末端に NHS 基を持

つ PEG (n=12) を修飾、さらに Benzophenone-4-isothiocyanate を UV 照射により結合させた。この表面に padlock プローブが結合できる配列を持つアミノ化 DNA を修飾した。この表面で RCA 反応を行ったところ Padlock/RCA 産物を検出することに成功した。しかしながらマイクロチップ内に導入した試料量 (200 zmol=12×10⁴ 分子) に対して検出された RCA 産物は 15 ドットとわずかであった。効率が悪いことから、反応場として適していないものと考えられた。

定量分析のモデル実験として Padlock probe を 0~1.5 nM の濃度にして、前述と同じビーズに固相化した DNA を標的配列にする RCA を行った。その結果、濃度に依存した RCA 産物数が観察され、定量分析に用いることが可能なことが示唆された。次にサルモネラ菌の配列を持つオリゴヌクレオチドをサンプルにみため、その濃度を 1 nM に固定し、Padlock probe の濃度を 1 nM~10 μM にして最適な濃度を検討した。その結果、サンプルの 100 倍である 100 nM のときに、最も良い値が得られた。次に Padlock probe の濃度を 100 nM に固定して、サンプル DNA の濃度を 0~1.5 nM にして RCA を行ったところ、濃度に依存した RCA 産物数が観察され、定量分析に用いることが可能なことが示された (図 2)。このときの検量線の傾きは、ビーズに固相化した DNA を標的配列にする RCA のときと同じであった。検出限界は 0.05 nM であり、菌から抽出した DNA を用いて RCA をするには、さらに一桁低い値を検出する必要があった。そこで、ビーズ 10 個あたりの RCA 産物数で検量線を作ったところ、10 pM から直線性を確認できた。

これらの成果により、環境中の微生物を定量する基盤技術ができた。また、この方法をオリゴヌクレオチドが修飾した抗体と組み合わせ、抗原抗体反応の検出技術とすることで、非常に高感度な免疫分析ができる可能性がある。がん診断への応用などが期待できる。

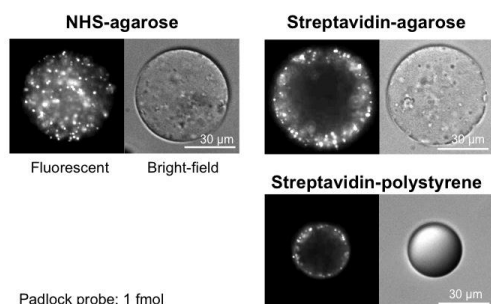
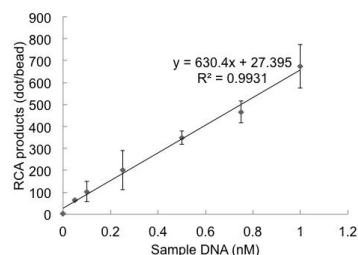


図 1 ビーズを用いた Padlock/RCA



Padlock probe: 100 nM (100 fmol in 1 μL)
Sample DNA: 0.05 - 1 nM (0.05 - 1 fmol in 1 μL), Beads: 1.0×10⁴

図 2 サンプル濃度と Padlock/RCA 産物数の関係

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) R Ishi¹, N Sasaki, K Sato, K Mawatari, M Nilsson, T Kitamori, K Sato, Counting Single DNA Molecule By On-Bead Rolling Circle Amplification For Quantitative Analyses, microTAS2011, 2011 年 10 月 3-7 日,シアトル
- (2) K. Sato, Y. Kitamura, N. Sasaki, K. Sato, K. Mawatari, M. Nilsson, T. Kitamori, Single DNA Molecule Detection by on-Bead Rolling Circle Amplification Using Microchip for Efficient Detection, microTAS 2010, 2010 年 10 月 3-7 日,オランダ、フローニンゲン。
- (3) 佐藤 香枝・北村 友理・佐々木 直樹・Nilsson Mats, マイクロビーズを用いた padlock/RCA 法による単一 DNA 分子カウンティング, 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月 15-17 日, 東北大学。

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
佐藤 香枝 (SATO KAE)
日本女子大学・理学部・准教授
研究者番号: 40373310

- (2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし