

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25790037

研究課題名(和文)電極集積化マイクロ流体デバイスとDNA増幅による細菌の迅速・高感度・現場分析

研究課題名(英文)Rapid, sensitive, and on-site detection of bacteria using DNA amplification on an electrode-integrated microfluidic device

研究代表者

佐々木 直樹 (Sasaki, Naoki)

東洋大学・理工学部・講師

研究者番号：30462691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では電極集積化マイクロ流体デバイスをプラットフォームとする細菌の迅速・高感度・現場分析法の開発を目指して研究を進めた。マイクロ交流電場を用い、マイクロ流路内で試料を濃縮するための基礎検討を行った。ローリングサークル増幅法を用い、細菌を培養せずそのDNAを増幅・検出する原理を実証した。反応系にポリエチレングリコールを加えることで産物数が増大し高感度検出が実現できることを示した。

研究成果の概要(英文)：This project is a proof-of concept study of rapid, sensitive, and on-site detection of bacteria using DNA amplification on an electrode-integrated microfluidic device. Concentration of samples under alternating electric fields in a microfluidic channel was demonstrated. DNA detection by rolling circle amplification (RCA) was also demonstrated. Poly(ethylene glycol) (PEG) was used to facilitate RCA by molecular crowding effects. The number of RCA products increased in the presence of PEG.

研究分野：マイクロ分析化学

キーワード：RCA マイクロ流路 分子クラウディング マイクロ電極 交流電場

1. 研究開始当初の背景

微量の細菌を現場で迅速・高感度に検出する技術は、社会の様々な場面で必要とされている。例えば、サルモネラ菌は食中毒の原因菌として知られている。市場で、或いは食品工場や飲食店で検査ができれば、食中毒を未然に防ぐことができる。他にも、大腸菌や緑膿菌といった細菌は、敗血症の原因菌として知られている。原因菌を早期に同定することで、適切な抗菌薬を選定し治療に役立てることができる。しかし、従来の細菌分析法の問題として、細菌を培養して分析するため、一般に長時間(日~週)を要することが挙げられる(図1a)。細菌を培養しない検出法として、目的の細菌のDNAに特異的な塩基配列をポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、ゲル電気泳動で分離・検出する手法がある(図1b)。しかし、本法は実験室的手法であり、現場分析への応用は困難である。

Rolling Circle Amplification (RCA)法はDNA増幅・検出法の一つである。本法ではまず、パドロックプローブとよばれる合成DNAとリガーゼを用い、検出対象のDNAが存在する場合にのみパドロックプローブを環化する。次にこの環状DNAを鋳型とし、ポリメラーゼを用いてプライマーDNAを伸長することで、長鎖一本鎖DNAを産物として得ることができる。ここに、産物と相補的な配列を有する蛍光標識DNAを加えることで、1個の増幅産物に多数の蛍光標識DNAが結合し、蛍光顕微鏡で容易に検出可能となる。従って、RCA法を用いて細菌のDNAを検出することで、迅速分析が期待できる。

RCA法において問題となるのは、標的DNAの検出効率である。RCA法では1個の増幅産物が1分子の標的DNAに対応するため、原理的には1分子の標的DNAを検出可能である。しかし、実際の検出効率(標的DNAの分子数に対する増幅産物数の比)は約0.02%と見積もられる[1]。この原因の一つとして、増幅産物が反応溶液中に拡散し、ごく一部しか検出できないことが考えられる。この問題を解決すべく、研究代表者は過去の研究において、プライマーDNAをマイクロビーズに結合させてRCAを行った。この方法では増幅産物がビーズに濃縮され検出が容易となるが、それでもなお検出効率は1.3%に留まっている[2]。この原因として、RCA法における酵素反応の効率が低いことが考えられる。すなわち、検出効率の改善を図るには、反応産物を効率良く濃縮して検出するのみならず、反応条件を検討してRCA法の反応効率自身を向上させ、なるべく多くの標的DNAからRCA産物を得ることが必須である。

研究代表者は、微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスを用いる分析化学の研究に一貫して取り組んできた。とりわけ、マイクロ流路内に電極を配して交流電圧を印加し、マイクロ交流電場下の流動・泳動現象を

利用した独自の生体分子濃縮法を開発してきた[3-5]。加えて、上述のRCA法を用いるDNA分析の研究にも取り組んできた[2]。これらの経験を基に研究代表者は、電極集積化マイクロ流体デバイスを用いて試料を濃縮して検出すること、さらには合成高分子によって誘起される分子クラウディング効果に着目し、反応系に高分子を多量に加えることでRCA法の反応効率を改善し、検出効率を向上できると考えた(図1c)。

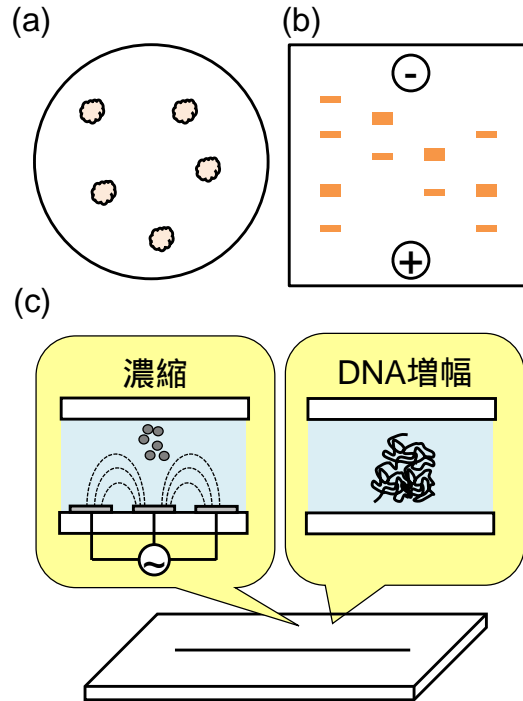


図1 細菌検出法。(a)培養・コロニー形成。(b)ゲル電気泳動。(c)本研究。

2. 研究の目的

本研究では、電極集積化マイクロ流体デバイスをプラットフォームとする細菌の迅速・高感度・現場分析法の開発を目指して研究を進めた。電極を利用して試料をマイクロ流路内で高効率に捕捉し、さらにRCA法によりDNAを迅速かつ高効率に増幅・検出する原理の実証を目的として検討を進めた。詳細を以下に示す。

(1) マイクロ電極による試料濃縮

マイクロ流路中に電極を配し、これを利用して試料を濃縮する。試料を単に圧送しただけでは濃縮されないため、電極に交流電圧を印加する研究代表者独自の生体分子濃縮法を応用して試料を濃縮する。

(2) RCA法によるDNA検出

RCA法を用い、DNAを増幅して検出する。さらに反応系に高分子を加え、分子クラウディング効果により感度向上を図る。

3. 研究の方法

(1) 電極集積化マイクロ流体デバイスの作製
ガラス基板に電極パターンを、ポリジメチ

ルシロキサン基板にマイクロ流路のパターンを、それぞれ微細加工技術により作製した。これらの基板を直接貼り合わせて電極集積化マイクロ流体デバイスとした。作製後、流路に溶液を導入し、顕微鏡で観察した。

(2)マイクロ交流電場を利用する試料濃縮

上記(1)で作製したデバイスを用い、PEG、デキストラン、及び非イオン性界面活性剤 Tween20 から成る試料溶液を流路に導入し、電極に交流電圧を印加して濃縮の様子を蛍光観察した。

(3)RCA 法による DNA 増幅・検出の実証

N-ヒドロキシスクシンイミドで修飾されたアガロースマイクロビーズ(平均粒径 34 μm)に、5'末端にアミノ基を修飾したプライマー-DNA を固定した。ここに、プライマー-DNA を検出するパドロックプローブ、及び T4 リガーゼを加えて反応させ、パドロックプローブを環化させた。その後、phi29 ポリメラーゼを用いてプライマー-DNA を伸長し産物を得た。産物に相補的な配列を有する蛍光標識 DNA を加えてハイブリダイズさせたのち、蛍光顕微鏡でビーズを観察した。

(4)分子クラウディング環境下での RCA 法による DNA 検出

クラウディング剤として、平均分子量 200, 8000, もしくは 35000 の PEG を用いた。上記(3)と同様にプライマー-DNA を固定したアガロースマイクロビーズの懸濁液に、標的 DNA、パドロックプローブ、T4 リガーゼ、PEG を加え、あとは(3)と同様に実験した。反応後のビーズを蛍光顕微鏡で観察し、産物数と PEG の分子量及び濃度との関係を検討した。

4. 研究成果

(1)電極集積化マイクロ流体デバイスの作製

作製後のデバイスを顕微鏡で観察し、流路内に電極を配置できていることを確認した。デバイスに溶液漏れなどは見られず、設計通りに作製できた。

(2)マイクロ交流電場を利用する試料濃縮

結果を図2に示す。蛍光脂質をモデル物質として用いたところ、電圧印加に伴い試料溶液が相分離し、PEG を多く含む相が電極近傍に濃縮され、原理の実証に成功した。

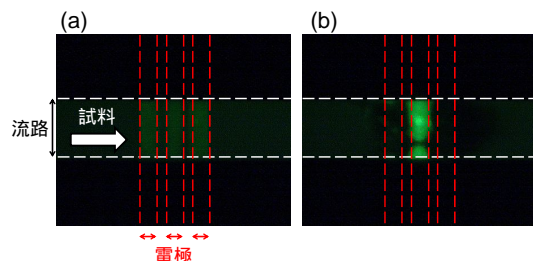


図2 ミクロ交流電場を利用する試料濃縮。(a)電圧印加前。(b)電圧印加後。

(3)RCA 法による DNA 増幅・検出

反応後のビーズを蛍光顕微鏡で観察し、多数の蛍光輝点を観察できた。対照実験では輝点は観察されず、RCA 法により生じる産物を検出できていることを確認した。

(4)分子クラウディング環境下での RCA 法による DNA 検出

結果の一例を図3に示す。PEG を加えない場合、反応産物に由来する輝点はほとんど観察されなかった。一方、平均分子量 8000 の PEG を濃度 10 wt%となるように反応系に添加して実験すると、反応後に多くの輝点が観察された。これはPEGを加えることによってRCA法の反応効率、具体的にはパドロックプローブの環化反応の効率が向上し、多くの産物が生成したものと考えられる。

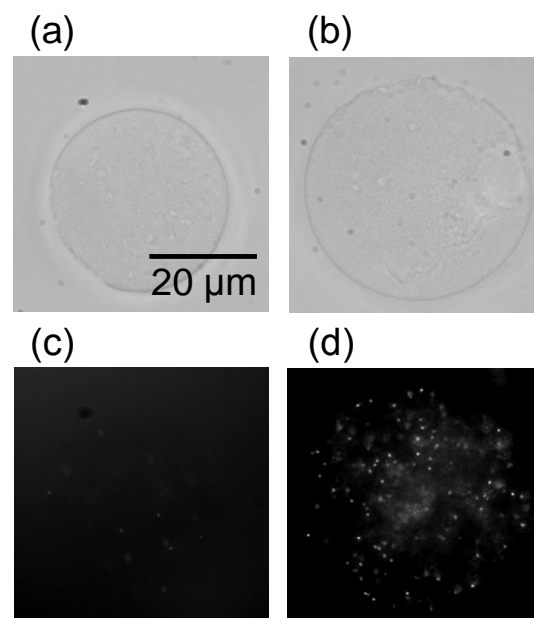


図3 反応後のビーズの蛍光像。(a,b)明視野像。(c,d)蛍光像。(a,c)PEG なし。(b,d)10% PEG(平均分子量 8000)。

PEG の分子量及び濃度を変えて同様の実験を行った。平均分子量 8000 の PEG を用いた場合の結果を図4に示す。産物数は PEG 濃度の増加に伴い増加し、その後減少した。これは、PEG が低濃度であれば排除体積効果により反応効率が上昇するが、高濃度になると反応成分が会合できず、反応が阻害されるためと考えられる。また、PEG の分子量が大きいほど、産物数が最大となる PEG 濃度は低下した。これは PEG の分子量が大きいほど個々の分子の立体障害が大きくなって排除体積効果が大きくなり、分子クラウディング効果が増して反応が阻害される濃度も低くなるためと考えられる。

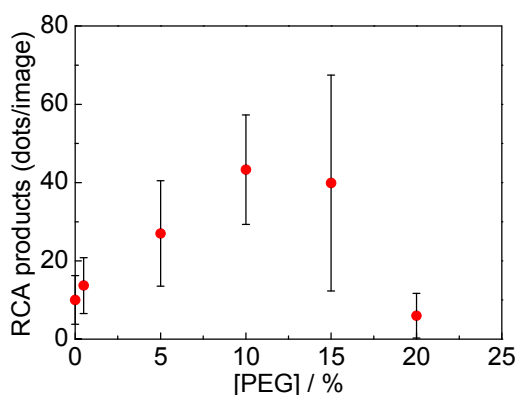


図4 産物数のPEG濃度依存性．N=10．

引用文献

1. J. Jarvis et al., Nature Methods 3 (2006) 725-727
2. K. Sato, R. Ishii, N. Sasaki et al., Analytical Biochemistry 437 (2013) 43-45
3. N. Sasaki et al., Lab on a Chip, 9(9), 1168-1170 (2009)
4. N. Sasaki et al., Electrophoresis, 33(21), 3159-3165 (2012)
5. N. Sasaki et al., Electrophoresis, 36(3), 424-427 (2015)

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 7 件)

1. 郡司良隆、佐藤香枝、佐々木直樹、分子クラウディングを利用したマイクロビーズ Padlock/RCA 法の高感度化、第 75 回分析化学討論会、2015 年 5 月 23 - 24 日、山梨大学甲府キャンパス (山梨県・甲府市)
2. Yoshitaka Gunji, Kae Sato, Naoki Sasaki, Molecular crowding improves single DNA molecules detection by on-bead rolling circle amplification, RSC Tokyo International Conference 2014, 2014 年 9 月 4 - 5 日、幕張メッセ (千葉県・千葉市)
3. 青山春樹、佐藤香枝、佐々木直樹、分子クラウディングを利用したマイクロビーズ Padlock/RCA 法の高機能化、第 74 回分析化学討論会、2014 年 5 月 24 - 25 日、日本大学工学部 (福島県・郡山市)
4. 佐々木直樹、安達堯史、マイクロチップ交流曇点抽出法の水性二相系への展開、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 29 回研究会、2014 年 5 月 22 - 23 日、日本女子大学目白キャンパス (東京都・文京区)
5. 青山春樹、佐藤香枝、佐々木直樹、分子クラウディング環境下でのマイクロビーズ Padlock/RCA 法による単一 DNA 検出、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 29 回研究会、2014 年 5 月 22 - 23 日、日本女子大学目白キャンパス (東京都・文京区)
6. 安達堯史、佐々木直樹、水性二相系を用い

たマイクロチップ交流曇点抽出法の開発、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27 - 30 日、名古屋大学東山キャンパス (愛知県・名古屋市)

7. 佐々木直樹、マイクロチップ交流曇点抽出法の開発、第 33 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2013 年 11 月 13 - 15 日、東京大学本郷キャンパスおよび日本女子大学目白キャンパス (東京都・文京区)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.toyo.ac.jp/~nsasaki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 直樹 (SASAKI, Naoki)

東洋大学・理工学部・講師

研究者番号 : 30462691