

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K03921

研究課題名（和文）磁性カーボンナノ粒子の光発熱効果を利用した高効率 PCR 法の開発

研究課題名（英文）Development of an efficient PCR method utilizing the photothermal effect of magnetic carbon nanoparticles

研究代表者

森本 久雄（Morimoto, Hisao）

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：00385957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000 円

研究成果の概要（和文）：磁性カーボンナノ粒子の光発熱効果を利用した PCR 法を開発した。本手法では、鉄のコアを炭素で被覆したナノ粒子を反応溶液中に分散させ PCR を行う。ナノ粒子表面の炭素の層は近赤外光を吸収して発熱する。本研究では、近赤外光の照射によって溶液を内部から加熱し、PCR を行うために必要な温度変化、いわゆる温度サイクリングをより高速で行うことに成功した。本手法による 3 段階 PCR では、従来法に比べて副産物が少ないことがわかった。またナノ粒子のコアは鉄であるため、磁石を用いて反応溶液から回収することができる。本研究では、回収したナノ粒子を再利用して PCR を行う事にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCR は分子遺伝学、生理学、法医学などの研究において用いられ、また食品検査や医学的検査における基本技術として広く利用されている。特に現在では新型コロナウイルス感染症の診断技術の一つとして良く知られている。本研究では磁性カーボンナノ粒子の光発熱効果を利用した温度サイクリング法を開発し、これにより従来に比べより高速で PCR を行うことに成功した。また 3 段階 PCR では、副産物量が従来法に比べて少ないという結果が得られた。本研究成果は PCR の高効率化、高精度化に貢献するものであり、今後 PCR が用いられている上記広範な分野への応用化が期待される。

研究成果の概要（英文）：A PCR method utilizing the photothermal effect of magnetic carbon nanoparticles was developed. The nanoparticles used in the present study were composed of an iron core and a carbon shell, and they were dispersed in a PCR solution. The carbon shells of the nanoparticles absorb near-infrared (NIR) light and release energy as heat. Therefore, the PCR solution can be heated from the inside by irradiating NIR light. In this study, PCR was carried out performing thermal cycling via the on/off operation of NIR irradiation to the nanoparticles. The total time of PCR was reduced as compared with that in the case of the conventional PCR method thanks to rapid and efficient heating by the nanoparticles. In the case of three-step PCR, the amount of by-products produced by the present method was smaller than that by the conventional method. We also successfully amplified target DNA by our PCR method using spent nanoparticles, which had been recovered from reaction solution using a magnet.

研究分野：複雑流体，ソフトマター科学，バイオ・ナノ融合科学技術

キーワード：PCR ナノ粒子 光発熱効果

## 1. 研究開始当初の背景

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) とは特定の DNA 断片を大量に複製する反応であり、以下の 3 つのプロセスから成立っている: (1) 約 94-95 °C における二本鎖 DNA の一本鎖への解離 (熱変性), (2) 約 50-55 °C におけるプライマー (短い DNA 断片でこの後の DNA 合成のいわば「起点」となるもの) の DNA 標的領域への結合 (アニーリング), (3) 約 72 °C における DNA ポリメラーゼによる上述プライマーを起点とした伸長反応. これらを繰り返し行うことで特定の DNA 断片の複製を行うことができる. すなわち PCR を進行するには 3 段階の温度変化を繰り返し行う必要があり、このいわゆる温度サイクリングをいかに高速かつ正確に行うかが PCR の効率化・高精度化の鍵となる. PCR の温度サイクリングは、通常はサーマルサイクラーと呼ばれるペルチェ素子によって温度制御を行う装置を用いて行われるが、PCR をより高速で行うにはこれに代わる新しいサーマルサイクリング法の開発が必要である. これまでに抵抗加熱 [1], 赤外線加熱 [2] やマイクロ波加熱 [3] などを利用したサーマルサイクリング手法が提案されているが、より高速かつ簡便で低コストな手法が望まれている. 一方、炭素ナノ材料は近赤外光を吸収し熱を発する (これを光発熱効果という) ことが知られており、近年その応用化に関する様々な研究成果が報告されている [4]. このような背景のもと、磁性カーボンナノ粒子の光発熱効果を利用したサーマルサイクリング法を着想するに至った.

高速で温度サイクリングを行った場合、これが PCR のダイナミクス、特に 2 本鎖 DNA の 1 本鎖への解離およびプライマーの結合のプロセスに大きな影響をおよぼし、目的とする DNA 断片の複製量だけでなく副産物 (目的とする配列・サイズとは異なる DNA 断片) の生成量にも変化が現れることが予想される. これまで PCR の高速化について様々な研究報告が行われているものの、この点について着目した研究はほとんどない. 副産物の生成は PCR の精度を評価するにあたり重要なファクターであり、検討が必要である.

## 2. 研究の目的

本研究では、鉄のコアを炭素で被覆した磁性カーボンナノ粒子を用い、その光発熱効果を利用した PCR のためのサーマルサイクリング法を開発する. 本手法における PCR の所要時間および標的 DNA の増幅量を解析する. さらに副産物の生成量も解析し、これにより PCR の精度を評価する. また本研究で使用するナノ粒子は鉄のコアを含むため磁石を用いた回収が可能である. 本研究ではナノ粒子の再利用性についても評価を行う.

## 3. 研究の方法

### (1) 実験試料

本研究では鉄のコアを炭素で被覆した磁性カーボンナノ粒子を用いた. これは Sigma-Aldrich から購入したものである (product No. 746827). ナノ粒子は PCR を行う反応溶液中に分散させた. その際に伸長反応 (DNA の合成) を触媒する DNA ポリメラーゼが粒子表面に吸着して失活することを防ぐためにウシ血清アルブミン (BSA) を用いて粒子表面を以下のようにブロッキングした. まずナノ粒子を BSA 水溶液に加えた. この溶液をホモジナイザーによって混合し粒子表面に BSA を吸着させた. 次に粒子を磁石によって集め、上澄みを除去した後に滅菌水を加えて粒子を再分散させた. このようなナノ粒子のウォッシュ作業 (粒子の磁石による収集、上澄みの除去、滅菌水への粒子の再分散) を 3 回繰り返し、溶液中の BSA を除去した. BSA で表面修飾したナノ粒子を透過型電子顕微鏡によって観察したところ、ナノ粒子の粒径は約 10-190 nm 程度であり、また一部の粒子は溶液中でクラスターを形成していることが確認された (図 1 参照).

TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ, 10X Ex Taq バッファー, pUC19 (テンプレート DNA), dNTP mixture およびプライマーを混合した PCR 溶液に上述の磁性カーボンナノ粒子を加え PCR を行った. なおこの混合溶液中におけるナノ粒子の濃度は 0.6 mg/mL であった.

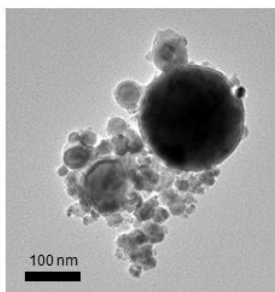


図 1. BSA で表面修飾した磁性カーボンナノ粒子の TEM 観察像.

## (2) 実験装置および手順

本研究で使用した実験システムの概略図を図 2 に示す。本システムでは、テストチューブ内の磁性カーボンナノ粒子が分散した PCR 溶液はその一部が氷水に浸漬したコイルによって常時冷却されている（図 2 参照）。Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> レーザ（Chameleon Ultra, Coherent, Inc.）により波長 800 nm の近赤外光が溶液に照射されると溶液内のナノ粒子の光発熱効果によって溶液は内部から加熱され温度が上昇する。本研究では、溶液の温度を近赤外光の照射・非照射によって制御し、PCR の温度サイクリングを行った。なお近赤外光の照射・非照射はコンピュータに接続されたシャッター（SSH-S, SIGMAKOKI CO., LTD.）およびシャッターコントローラ（SSH-C2B, SIGMAKOKI CO., LTD.）を用いて行った。溶液の温度変化はサーモカメラを用いて観察した。3 段階 PCR の各ステップ（熱変性、アニーリング、伸長反応）を行う際には近赤外光の照射・非照射を迅速に繰り返し行い、各ステップに適した条件となるよう温度を一定の範囲内に保った。なお、本研究では 2 ステップ PCR も行うが、この場合にはアニーリングと伸長反応は両者の最適温度の中間の温度で行った。

PCR によって得られた生成物は 1% のアガロースゲル内で 769 V/m の電場中において 30 分間電気泳動させた。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、画像解析によって標的 DNA の増幅量および副産物の生成量を評価した。

本手法と従来の PCR 法を比較することを目的に、市販のサーマルサイクラー（Veriti 96-well Thermal cycler, Thermo Fisher Scientific, Inc.）を用いて PCR を行った。PCR 溶液にナノ粒子を分散させた場合とそうでない場合について実験を行い、本研究で使用した磁性カーボンナノ粒子が PCR におよぼす効果についても解析した。

## 4. 研究成果

(1) 3 段階 PCR により得られた生成物の電気泳動パターンを図 3 に示す。ここで 1000 bp のバンドが標的 DNA に対応している。レーン 1, 2 はそれぞれ、従来のサーマルサイクラーを用いて磁性カーボンナノ粒子を含まない溶液およびナノ粒子を分散させた溶液により PCR を行った結果に対応している。ナノ粒子が存在する場合においても粒子濃度が本実験条件のように低い場合（0.6 mg/mL）には DNA が増幅されることが確認された。ただし図 3 から標的 DNA の増幅量を評価すると、粒子が存在する場合の増幅量は存在しない場合の約 81% であり、わずかに減少した。

(2) 磁性カーボンナノ粒子の光発熱効果を利用した 3 段階 PCR により標的 DNA の増幅に成功した。図 3 のレーン 3 は生成物の電気泳動パターンである。図 3 から標的 DNA の増幅量を評価すると、従来のサーマルサイクラーを用いてナノ粒子を含まない反応溶液で PCR を行った場合（図 3 のレーン 1）に比べて約 65% であった。本研究では PCR に際して温度サイクリングを 25 回行ったが、これに要した時間は従来法では約 69 分であり、本手法では約 51 分まで短縮することができた。理論的には、PCR によって増幅される DNA の分子数,  $N$ , は以下の式で与えられる [5]：

$$N = N_0 (1 + E)^n, \quad (1)$$

ここで  $N_0$  と  $n$  はそれぞれ、初期の分子数およびサイクル数である。 $E$  は増幅の効率を表す係数であり、適切な条件下で PCR が行われた場合 0.8-0.97 程度の値となる [5]。式 (1) によると、本手法でサーマルサイクリングの回数を 26 として PCR を行った場合、 $E = 0.8$  と仮定すると増幅量はサイクル数 25 の従来法に対して約 117% となる。ただしこの場合、PCR の所要時間は長くなり、 $(26/25) \times 51 = 53$  分となるが、それでもサイクル数 25 回の従来法の場合（69 分）

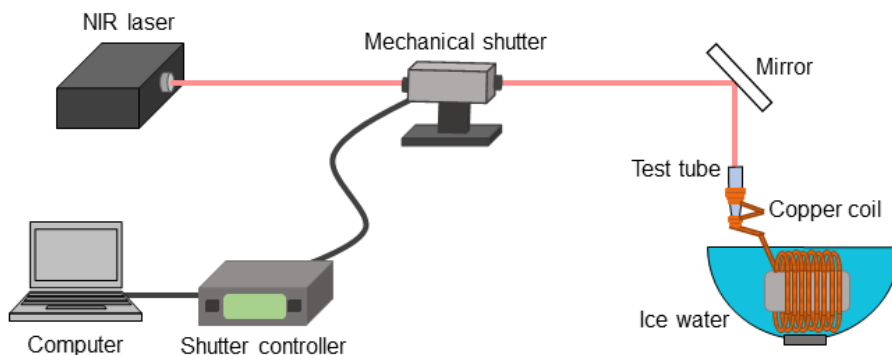


図 2. 実験システムの概略図。

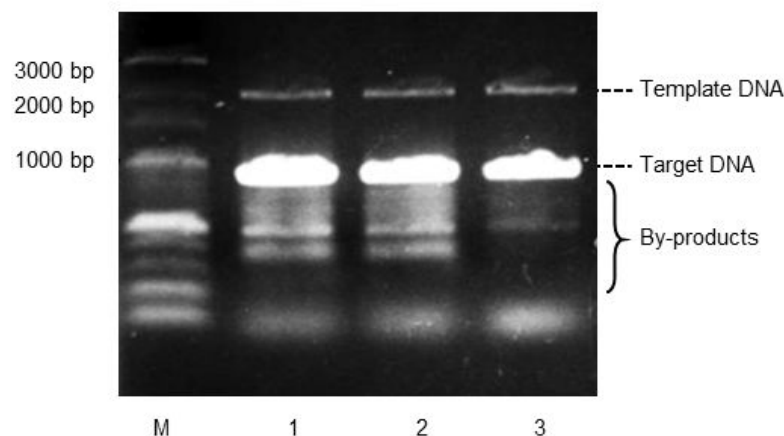


図 3.3 段階 PCR により得られた生成物の電気泳動パターン．レーン M は DNA ラダーマーカーであり，レーン 1 と 2 はそれぞれ，従来のサーマルサイクラーを用いて磁性カーボンナノ粒子を含まない PCR 溶液およびナノ粒子を含む溶液で得られた生成物である．レーン 3 は本手法により得られた生成物である．標的 DNA のサイズは 1000 bp である．

に比べて依然として短い．図 3 からわかるように本手法による 3 段階 PCR では，標的 DNA よりもサイズが短い副産物（図 3 では 1000 bp のバンドの下部にみられる）が従来法に比べて少なく，これはより高速で温度サイクリングを行ったことに起因していると考えられる．図 3 から約 200-900 bp の副産物の総量を評価すると，本手法は従来法（ナノ粒子を含まない溶液で行った場合）に対して約 37% であった．さらに標的 DNA の増幅量の副産物生成量に対する比を計算すると，本手法と従来法ではそれぞれ 4.5 および 2.5 であり，本手法の方が生成比が高いことがわかる．温度サイクリングの速度と副産物の生成量の関係については今後より詳細な解析が必要である．

(3) 本研究では，磁性カーボンナノ粒子の光発熱効果を利用した 2 段階 PCR による標的 DNA の増幅にも成功した．標的 DNA のサイズをより短い 200 bp として実験を行ったところ，25 PCR サイクルに要した時間は従来法では約 42 分であったが，本手法では約 30 分まで短縮された．標的 DNA の増幅量は，従来法（磁性カーボンナノ粒子を含まない溶液の場合）に対して約 55% であった．しかしながら 3 段階 PCR の場合と同様に，式 (1) よりサイクル数を 26， $E = 0.8$  とした場合の増幅量を計算すると，従来法とほぼ同等（約 99%）となる．26 サイクルの場合の所要時間は  $(26/25) \times 30 = 31$  分と長くなるが，従来法で 25 サイクル行う場合（42 分）と比べるとやはり短い．

(4) 使用済み磁性カーボンナノ粒子を再利用して 2 段階 PCR による DNA の増幅に成功した．まず本手法により 2 段階 PCR を行い，溶液中のナノ粒子を磁石により一か所に集めた．上澄み液を回収し標的 DNA の増幅量を解析した．一方，ナノ粒子はホモジナイザーを用いて滅菌水に再度分散させた．このような粒子のウォッシュ作業（磁石によるナノ粒子の収集，上澄みの除去，滅菌水への再分散）を 3 回繰り返した後に新しい PCR 溶液と混合し，初回と全く同じ条件下で 2 段階 PCR を行った．ここで近赤外光を照射した際の溶液の温度上昇率は初回とほぼ同じであったことから，初回の PCR で使用したナノ粒子のほぼ全てが回収されており，したがって 2 回目の PCR における反応溶液中の粒子濃度も初回とほぼ同一であったと考えられる．200 bp の DNA 断片を増幅対象として実験を行ったところ，使用済み粒子を使用した 2 回目の PCR においても標的 DNA の増幅がみられた．ただし，増幅量は初回の約 33% であった．本研究では PCR 溶液中の DNA ポリメラーゼのナノ粒子表面への吸着，さらにはこれに起因した失活を防ぐためにナノ粒子を BSA で表面修飾した．2 回目の PCR で増幅量が減少した理由としては，初回の PCR を行った際に粒子の表面温度上昇に起因して BSA が一部脱離したことが考えられる．今後は，初回 PCR 後の BSA 脱離について解析を行うとともに，その対策（修飾方法の改善など）について検討が必要である．

#### 参考文献

1. R. A. Mendoza-Gallegos and J. L. Garcia-Cordero, *Anal Chem.* **90**, 5563 (2018).
2. Y. Yu, B. Li, C. A. Baker, X. Zhang and M. G. Roper, *Anal Chem.* **84**, 2825 (2012).
3. D. J. Marchiarullo, A. H. Sklavounos, K. Oh, B. L. Poe, N. S. Barker and J. P. Landers, *Lab Chip.* **13**, 3417 (2013).
4. L. M. Dean, A. Ravindra, A. X. Guo, M. Yourdkhani and N. R. Sottos, *ACS Appl Polym Mater.* **2**, 4690 (2020).
5. S. Surzycki, *Basic techniques in molecular biology* (Springer-Verlag, Berlin, 2000).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Y. Oyoshi, M. Suzuki, T. Maekawa and H. Morimoto
2 . 発表標題 Development of a PCR method utilizing the photothermal effect of magnetic carbon nanoparticles
3 . 学会等名 21st International Symposium on Applied Electromagnetics and Mechanics (ISEM 2023) (国際学会)
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------