

増幅遺伝子による病原菌のイムノクロマト検出と電気化学検出

荻堂 裕・山中 啓一郎^{*}・斎藤 真人^{**}・民谷 栄一^{**}・

片山 誠一^{***}・宮原 敏郎^{****}・永谷 尚紀^{****}

岡山理科大学大学院工学研究科応用化学専攻

^{*}大阪大学フォトリニクスセンター

^{**}大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻

^{***}岡山理科大学理学部臨床生命学科

^{****}岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

1. はじめに

1-1 緒言

私たちは、毎年多くの病原性細菌の危険性に曝されている。事例を挙げると、1982年にアメリカのオレゴン州とミシガン州で発生したハンバーガー食中毒事件がある。真っ赤な下痢便から今では有名な腸管出血性大腸菌O-157が検出された。日本では1996年に大阪府堺市で小学生を中心としたO-157の集団感染が発生し、散発例を含めて1年間に全国から17,877名の患者が報告され、12名が亡くなった。また、2011年4月に焼肉チェーン店を原因施設とする腸管出血性大腸菌O-111の集団食中毒が発生し、5月に富山県と福井県で合わせて4名の方が亡くなった。

食材を栽培・飼育する農家や食材を加工し販売する食品加工業者、また、それらを販売、調理するものにとっては、病原性細菌がいけないことが大原則である。しかし、いくら除菌しているとはいえ、完全に除菌ができていないとは限らない。実際に病原性細菌の有無を確認するとなると、高価な装置や精密な機械などが必要なり、時には、時間までも必要になってくる。こうなると設備の整った専門機関に頼るのが現状で、検査結果が出るまでかなりの時間を有することになる。

病原性細菌を検出する手法としては、PCR (Polymerase Chain Reaction) によって病原性細菌に特異的な遺伝子を増幅し検出する手法がある。PCRを用いて増幅させた遺伝子を検出する手法は、電気泳動法、蛍光試薬を用いたリアルタイム測定などがあるが、操作が煩雑なことと、ある程度の時間を必要とすることである。また、リアルタイム測定では装置が高価であるという問題点がある。

その問題点を改善するために、本研究ではPCR後

の検出操作を迅速かつ感度よく行えないかと考えている。そこで、比較的操作简单で、かつ、コスト効率の良いイムノクロマト法と使い捨てのスクリーン印刷電極を使用し、PCRを用いて増幅させた遺伝子に対して金ナノ粒子を標識した後、イムノクロマト法をベースとした目視検査と電気化学測定法を検討し、病原性細菌の増幅遺伝子の迅速な検出方法の検討を行った。

1-2 イムノクロマト法について

イムノクロマト法は、測定器を必要とせず、目視により判定が可能である。したがって、コスト効率が良く、短時間で簡便に測定できることから、医療、環境、食品などの様々な分野で利用されている。検出感度が、PCRを用いた遺伝子検査に比べて劣るため、様々な高感度検出法¹⁻⁴⁾や増幅遺伝子を検出する手法⁵⁾などが報告されている。

本研究では、FITC (fluorescein isothiocyanate)、Biotinで標識したプライマーを用いてPCRにて遺伝子の増幅を行うことによってイムノクロマト法での増幅遺伝子の検出を可能としている⁵⁾。図1に本研究で使用したイムノクロマト法の原理とイムノクロマト法で使用するイムノクロマトテストストリップの構造を示す。イムノクロマトテストストリップは、バックグランドシートで補強されたニトロセルロース膜上に、テストラインとなる抗FITC抗体が固定されている。コントロールラインには、サンプルが上端まで到達したことを示すための抗FITC抗体に対する抗IgG抗体が固定されている。増幅遺伝子とコンジュゲートパッドにある直径数十nmの金ナノ粒子で標識された抗Biotin抗体が複合体を形成し、これが毛細管現象によって膜上を移動する。テストライン上では、

抗FITC抗体に捕捉され、金ナノ粒子が集積することによって赤色のラインを呈する。したがって、増幅遺伝子が存在する場合はテストラインおよびコントロールラインの2本、増幅遺伝子がない場合はコントロールラインのみが確認できる。

本研究では、コンジュケートパッドを備えたフルストリップとコンジュケートパッドの無いハーフストリップをそれぞれ用いて検討を行った。

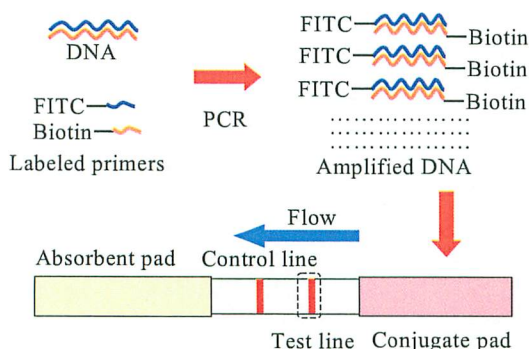


図1 イムノクロマト法の原理

1-3 電気化学検出について

化学物質の性質を電氣的に計測する方法を電気化学測定といい、化学物質の濃度や種類、電極上での酸化還元反応の詳細な機構などについての情報が得られる。測定対象の抗体を電極表面に固定し、金ナノ粒子で標識した測定対象の抗体とでサンドイッチ状に電極表面に捕らえ、金ナノ粒子を電極上で電気化学的に測定することによって高感度にタンパク質濃度を測定する方法も報告されている⁶⁾。本研究では直径40nmの金ナノ粒子を使用して電極表面表に増幅遺伝子を抗体—金ナノ粒子標識抗体でサンドイッチ状に捕らえ、微分パルスボルタンメトリー (DPV: Differential pulse voltammetry) という電気化学測定法を行うことによって増幅遺伝子の検出を行った。図2に電気化学測定法の原理を示す。この方法もイムノクロマト法での増幅遺伝子の検出と同様に抗FITC抗体を電極表面に固定し、FITC、Biotinで標識されたプライマーを用いてPCRで増幅させた遺伝子を検出する原理となっている。測定を行う場合は、溶出用塩酸を電極に滴下し、捕捉されている金ナノ粒子に電流を流して酸化した後、金ナノ粒子の還元ピーク電流値を測定する。結果として、金ナノ粒子で標識した増幅遺伝子が存在する場合は、電流値が大きく降下する。本研究における電気化学検出とは、この電流値の大きさを比較して、遺伝子増幅の検出をおこなうことである。

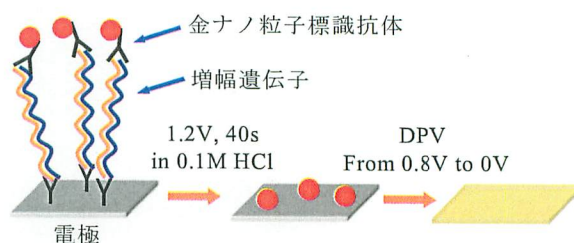


図2 電気化学測定の原理

本研究では使い捨ての印刷電極を使用している。電極の構造を図3に示す。電極は柔軟な材質の絶縁シート上に導電性インクを用いて電極パターンを印刷し、この電極パターンから電極を切り出し使用するチップ状のスクリーン印刷電極を使用した。また、この電極は作用極、参照極から構成される三電極系であり、作用極が炭素でできており、コネクタ接続を介して小型ポテンショスタットにし、電極チップ上に試料を滴下して電気化学測定を行うようになっている。

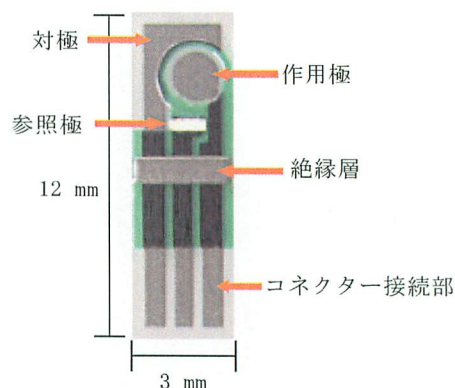


図3 使い捨てスクリーン印刷電極の構造

2. 実験方法

2-1 試料・試薬

病原菌としてウェルシュ菌(NTCT8237)及び病原菌のモデルケースとして大腸菌(JM109)(TOYOBO)を使用した。PCRには、*Premix Taq*[®](Ex Taq Version 2.0) (タカラバイオ株式会社)、SYBR Green 1 Nucleic Acid Gel Stain (タカラバイオ株式会社) を使用し、増幅遺伝子を確認するための電気泳動試薬としてTAE (Tris / Acetic acid / EDTA) Buffer (Bio-Rad Laboratories)、Agarose XP (和光純薬工業・ニッポンジーン)、Quick-Load 100 bp DNA Ladder (BioLabs)、6×Loading Buffer Double Dye (和光純薬工業・ニッポンジーン) を使用した。ウェルシュ菌ではα毒素⁷⁾、大腸菌では16s rRNA⁸⁾を標的とした5'末端にFITCま

たはBiotinを標識したプライマーの合成を行った(表1)。イムノクロマト法、電気化学測定のために40nm金ナノ粒子(田中貴金属工業)、ウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma Aldrich Japan)、Goat anti-Biotin Affinity Purified(抗Biotin抗体)(BETHYL Laboratories)、Goat anti-FITC Affinity Purified(抗FITC抗体)(BETHYL Laboratories)を使用した。イムノクロマトストリップは、フルストリップ、ハーフストリップともに有限会社バイオデバイステクノロジーに作製を依頼した。使い捨ての印刷電極は、作用極、対極ともカーボンの市販の電極(有限会社バイオデバイステクノロジー)を使用した。でその他の試薬は、市販の特級の試薬を購入して行った。

表1 使用したプライマー配列

	Sequence (5' to 3')
ウェルシュ菌	F-TCCAAAAATGAACCAGAAAGTGTA B-TTTTCTTATTTGTGATTCCTGT
大腸菌	F-GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC B-AGCCCGGGGATTTACATCTGACTTA

F: FITC, B: Biotin

2-2 病原性細菌の遺伝子の増幅

1) 病原性細菌の遺伝子増幅

PCR用チューブにPremix Taq[®] 25 μ L、大腸菌用またはウェルシュ菌用の10 μ M Primer mix 2 μ L、Template(大腸菌またはウェルシュ菌のCFU(colony forming unit)が既知の溶液) 1 μ L、Distilled milliQ Water(D.W.) 22 μ Lを加え、全量を50 μ Lとし、25 μ Lずつ分注した。Non-Template Control(NTC)としてTemplateの代わりにD.W.を加え、全量を50 μ Lとし25 μ Lずつ分注したものを作製した。サーマルサイクラー(Applied Biosystems StepOne[™])でのPCR条件として、大腸菌では、遺伝子の熱変性を98 $^{\circ}$ Cで10秒、アニーリングを60 $^{\circ}$ Cで30秒、伸長を72 $^{\circ}$ Cで60秒のセットを30サイクルに設定し、ウェルシュ菌では熱変性を94 $^{\circ}$ Cで60秒、アニーリングを55 $^{\circ}$ Cで60秒、伸長を72 $^{\circ}$ Cで60秒のセットを30サイクルにてPCRを行った。大腸菌では、さらに同様の条件で25サイクルに設定したPCRも行った。

2-3 電気泳動での遺伝子増幅の確認

TemplateとNTCの試料でPCRを行った溶液(PCR産物溶液) 3.5 μ Lに6 \times Loading Buffer Double Dyeを2.5 μ L加え全量を6 μ Lとし、アガロースゲルの穴に流し込んだ。さらに、別の穴にサイズマーカーとしてQuick-Load 100 bp DNA Ladderを6 μ L流し込んだ。その後、100Vで60分間電気泳動を行った。

電気泳動後のアガロースゲルをTAE Bufferに対してSYBR Green 1 Nucleic Acid Gel Stainを1ppmになるように添加した溶液に浸け、40分間振動を与えながら反応させた。その後、紫外線を照射してゲルの写真を撮影した。

2-4 金ナノ粒子標識抗体の調製

金コロイド溶液900 μ Lをエッペンチューブに分注し、5 mM KH₂PO₄溶液(pH 7.5)で50 μ g/mLに調製した抗Biotin抗体を100 μ L加えて軽く混ぜた後、約10分間放置した。その後、10%(w/v) BSA/50 mM KH₂PO₄溶液(pH 9.0)を100 μ L、1.0%(w/v) PEG/50 mM KH₂PO₄溶液(pH 7.5)を50 μ L添加した軽く混ぜた。

次に、小型高速冷却遠心分離機を用いて12,000 rpm 15min / 4 $^{\circ}$ C (8,000G)で遠心分離を行い、上澄みを約100 μ Lだけ残して取り除いた。残った沈殿物をソニケーターで分散させた後、金コロイド保存液を600 μ L加えて混和させた。再度、12,000 rpm 15min / 4 $^{\circ}$ C (8,000G)で遠心分離を行い、上澄みを約100 μ Lだけ残して取り除き、残った沈殿物をソニケーターで分散させた。作製した金ナノ粒子標識抗体溶液を分光光度計にて520 nmの吸光度を測定し、金コロイド保存液で希釈してO.D.6になるように調製した。

2-5 イムノクロマト法を用いた増幅遺伝子検出

1) 大腸菌の遺伝子増幅の検出

PCR産物溶液5 μ Lと調製した金ナノ粒子標識抗体溶液10 μ Lを混合し、D.W.を40 μ L加えて全量を55 μ Lとした。混合した溶液をマイクロタイタープレートに注ぎ、イムノクロマトハーフストリップをその溶液に浸して大腸菌増幅遺伝子の検出を行った。

2) ウェルシュ菌の遺伝子増幅の検出

PCR産物溶液7 μ LとD.W.を53 μ L加えて全量を60 μ Lとした。混合した溶液をマイクロタイタープレートに注ぎ、イムノクロマトフルストリップをその溶液に浸してウェルシュ菌増幅遺伝子の検出を行った。

2-6 抗体固定化印刷電極の作製

Coating Bufferで80 μ g/mLに調製した抗FITC抗体を2 μ Lずつ印刷電極の作用極にのせ、プレートミキサーで振動を与えながら1時間固定した。その後、余分な溶液をエアダスターで吹き飛ばした。さらに、上からBlocking溶液を2 μ Lずつ印刷電極の作用極にのせ、プレートミキサーで振動を与えながら1時間固定した。固定終了後、エアダスターで余分な溶液を吹き飛ばし、洗浄液で3回洗浄し乾燥させ、抗体固定化印刷電極とした。

2-7 電気化学測定を用いた増幅遺伝子検出

PCR産物溶液10.5 μ Lと金ナノ粒子標識抗体溶液3.5 μ Lを混合し、作製した二次抗体固定化印刷電極の作用極に2 μ Lずつのせ、プレートミキサーで振動を与えながら30分間反応させた。反応終了後、洗浄液でよく洗浄し乾燥させ、最終電極（抗FITC抗体-PCR産物-金ナノ粒子標識抗Biotin抗体固定化印刷電極）とした。測定の際には、0.1N溶出用塩酸15 μ Lを電極にのせ、電気化学測定装置（ μ Autolab III）にて電気化学測定（DPV）を行った。電気化学測定の条件は、initial potential 0.8 V、end potential 0 V、step potential 0.1 V、modulation amplitude 0.5 Vとした。

3. 結果と考察

3-1 イムノクロマト法を用いた増幅遺伝子検出

大腸菌templateのCFUを変えてPCRを行ったところ、1 CFUから電気泳動法、イムノクロマト法共に遺伝子増幅が確認できた。また、菌体数が少なくなるとともに、電気泳動法では522 bpの所の増幅遺伝子のバンドの濃さが薄くなるとともに、イムノクロマト法では、テストラインの色が薄くなっていくのが確認できた。1000 CFU、100 CFUの大腸菌でのバンドの濃さはほぼ同一であるが、イムノクロマト法においてもテストラインの濃さが、ほぼ同一となった。ウェルシュ菌の増幅遺伝子の検出においてもウェルシュ菌templateのCFUを変えてPCRを行ったところ、8 CFUから電気泳動法で222 bp付近に薄い増幅遺伝子のバンドが確認できる。フルストリップを用いてウェルシュ菌の増幅遺伝子の検出を行ったイムノクロマト法でも同様に8 CFUから写真では見にくい、薄い赤いラインが確認できる。また、菌体数が少なくなるとともに、電気泳動法でのバンドは薄くなり、イムノクロマト法でのテストラインの濃さも薄くなっていった（図4）。これらのことから、増幅遺伝子を検出するためのイムノクロマト法は電気泳動法と同等の検出感度であることが明らかである。また、電気泳動法は、マーカーと比較することによって増幅遺伝子の大きさが分かるが、結果がでるまでに約1時間を必要とする。一方、イムノクロマト法は、増幅遺伝子の大きさの判別は不可能であるが、増幅遺伝子が有るか無いかの判断が3分程度で判断可能である。サーマルサイクラーでの遺伝子増幅は、装置が持ち運べない、時間が掛かるなどの問題点もあるが、近年、半導体技術を応用した小型で迅速なインフルエンザウイルスRNAの遺伝子増幅も可能なバイオチップが報告されている⁹⁾。また、そのバイオチップによって増幅したインフルエンザウイルスRNAの遺伝子を本研究と同様にイムノクロマト法で

検出することで迅速かつ極微量のPCR反応液で検出が可能であることも報告されている⁵⁾。

バイオチップ技術を適用することで病原性細菌の検出も、きわめて迅速な検出技術となり食品流通、加工食品工場の現場でも利用可能な技術となり得ることが期待できる。

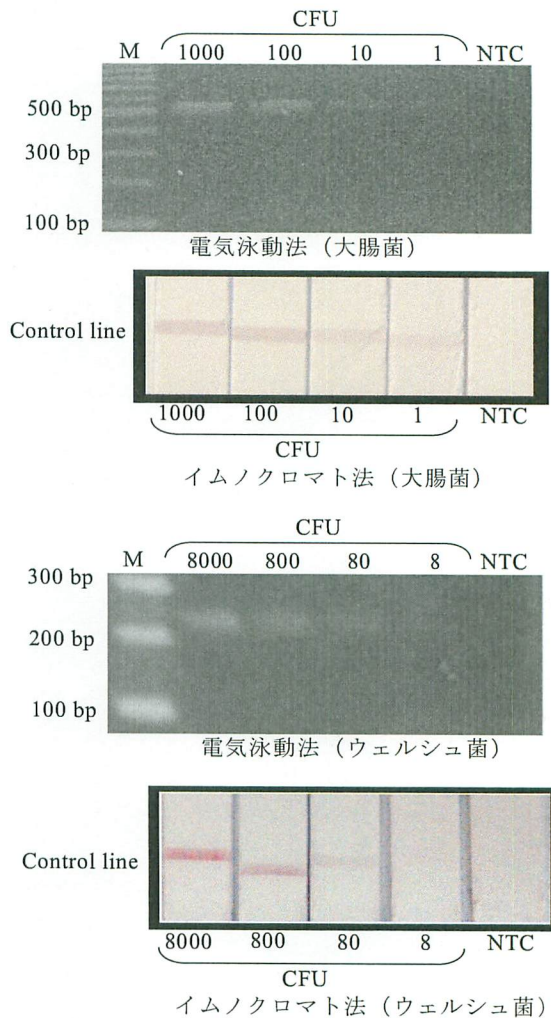


図4 イムノクロマト法を用いた増幅遺伝子の検出

3-1 電気化学測定を用いた増幅遺伝子の検出

イムノクロマト法を用いた増幅遺伝子の検出で使った大腸菌の増幅遺伝子の電気化学測定を行ったところ、1000 CFUからのPCR反応液と100 CFUからのPCR反応液の電気化学測定結果が、ほぼ同一のピーク電流値を示した（図5）。この結果は図4の大腸菌の電気泳動法、イムノクロマト法の結果を見れば、明らかなように増幅遺伝子の濃度に差がないためと考えられる。図4の電気泳動法、イムノクロマト法で差が見られた8000 CFUと800 CFUのウェルシュ菌の

PCR反応液では、電気化学測定の結果でもピーク電流値に差が見られ、電気泳動法、イムノクロマト法に極めて一致した結果となっている。大腸菌のNTCのピーク電流値がウェルシュ菌に比べ大きくなっているが、これは洗浄操作のミスであると考えられる。

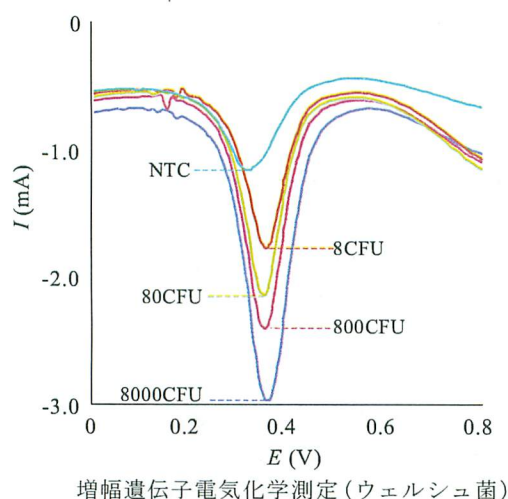
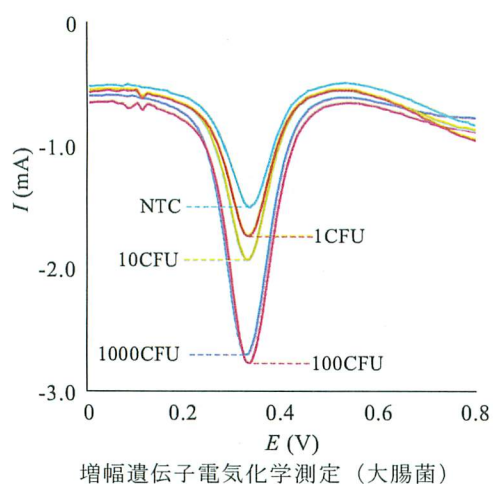


図5 電気化学測定を用いた増幅遺伝子の検出

ウェルシュ菌での電気化学測定の結果を見ると電気泳動法、イムノクロマト法に比べ8 CFUとNTCのピーク電流値に大きな差が見られる。そこで、より増幅遺伝子量が少ないことが予想される25サイクルでの大腸菌のPCRを行い、電気泳動法、電気化学測定の比較を行った(図6)。10 CFU、1 CFUの大腸菌からのPCR反応液は、電気泳動法ではバンドが確認できない。しかしながら、電気化学測定の場合、NTCのピーク電流値よりも1 CFU、10 CFUは大きく検出可能であることが分かる。1000 CFU、10 CFUでのピ

ーク電流値も30サイクルでのPCR反応液に比べ25サイクルのPCR反応液は小さくなっているが、電気泳動法でのバンドの濃さも30サイクルに比べ薄くなっている。これらのことから、増幅遺伝子の量に応じてピーク電流値の大きさが変化していることが明らかである。

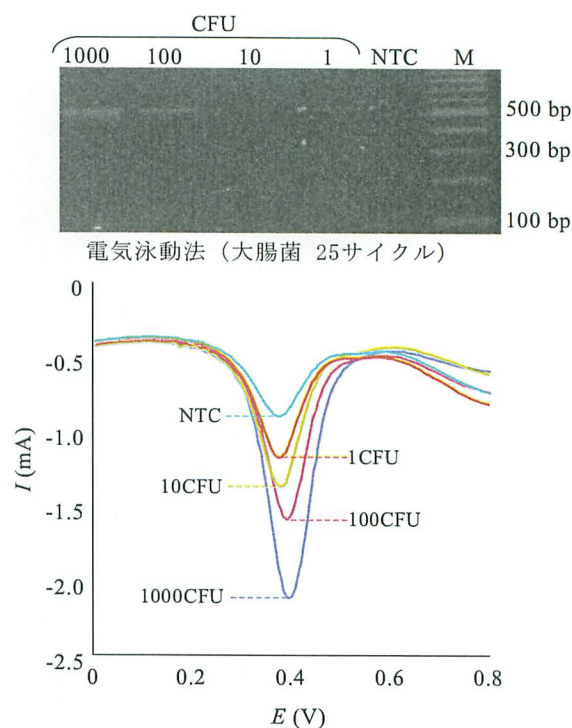


図6 大腸菌増幅遺伝子の検出結果 (25サイクル)

4. 結言

増幅遺伝子を抗体で捕らえ、イムノクロマト法で検出可能とする本報告の方法は、電気泳動法と同等の感度を有していた。また、目視での検出も可能であり、検出に要する時間もPCR終了後の反応液を希釈しストリップに滴下するだけで5分以内である。半導体技術を応用した小型で迅速な遺伝子増幅が可能なバイオチップと組み合わせることで現場での迅速な測定が可能となる手法となることが期待できる。

電気化学測定による増幅遺伝子の検出は、抗体固定電極と金ナノ粒子標識抗体と増幅遺伝子の複合体の反応、洗浄という操作が必要であり迅速な測定方法であるとは言えないが、電気泳動法よりも極めて高感度に増幅遺伝子の検出が可能である。また、バイオチップ技術を応用することで、電極上での抗体との反応、洗浄、電気化学測定の一連の操作は、自動化することができ、検出時間の短縮も可能となる。

実際、本研究報告では、電極上の抗体と金ナノ粒子標識抗体と増幅遺伝子の複合体の反応時間を30分で行っているが、15分でも増幅遺伝子の検出が可能であることは確認している。また、本報告では、25サイクルでPCRを行った反応液での増幅遺伝子の検出を行っているが、サイクル数を減らすことによって遺伝子の増幅から検出までの時間を短縮することも可能となる。

本報告では、病原菌のモデルケースとしての大腸菌、ウェルシュ菌を用いているが、イムノクロマト法を用いた方法、電気化学測定も増幅遺伝子を対象とした検出技術であり、FITC、Biotinで標識されたプライマーの設計を変えることで様々な測定が可能となる。病原菌、ウイルスの検出だけでなく、例えば、食品中のアレルゲン物質、遺伝子組み換え作物の混入などの食品検査など増幅遺伝子を検出する全ての検査方法に適応可能な検出技術である。

microfluidic RT-PCR chip and electrochemical DNA sensor, *Analyst*, **136**, 2064-2068 (2011)

参考文献

- 1) N. Nagatani, R. Tanaka, T. Yuhi, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strip, *Sci. Technol. Mater.*, **7**, 270-275 (2006)
- 2) R. Tanaka, T. Yuhi, N. Nagatani, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 1414-1420 (2006)
- 3) A. Takahashi, S. Uchiyama, Y. Kato, T. Yuhi, H. Ushijima, M. Takezaki, T. Tominaga, Y. Moriyama, K. Takaeda, T. Miyahara and N. Nagatani, Immunochromatographic assay using gold nanoparticles for measuring salivary secretory IgA in dogs as a stress marker, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **10**, 034604(5p) (2009)
- 4) 清水秀明, 石丸陽子, 藤本嗣人, “白金-金コロイドイムノクロマトグラフ法を使用したアデノウイルス検査キットの有用性” 感染症学会誌, 第83巻, 第1号, 64-65 (2009)
- 5) N. Nagatani, K. Yamanaka, H. Ushijima, R. Kouketsu, T. Sasaki, K. Ikuta, M. Saito, T. Miyahara and E. Tamiya, Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip, *Analyst*, **137**, 3422-3426 (2012)
- 6) K. Idegami, M. Chikae, K. Kerman, N. Nagatani, T. Yuhi, T. Endo and E. Tamiya, Gold nanoparticle-based redox signal enhancement for sensitive detection of human chorionic gonadotropin hormone, *Electroanalysis*, **20**, 14-21 (2008)
- 7) A. Okabe, T. Shimizu and H. Hayashi, Cloning and sequencing of a phospholipase C gene of *Clostridium perfringens*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 33-39 (1989)
- 8) G. Sabat, P. Rose, W.J. Hickey and J.M. Harkin, Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 844-849 (2000)
- 9) K. Yamanaka, M. Saito, K. Kondoh, M.M. Hossain, R. Kouketsu, T. Sasaki, N. Nagatani, K. Ikuta and E. Tamiya, Rapid detection for primary screening of influenza A virus:

Detection of pathogenic bacterium using electrochemical and immunochromatographic assay for amplified gene by PCR

Yutaka OGIDO, Keiichiro YAMANAKA*, Masato SAITO**, Eiichi TAMIYA**,
Seiichi KATAYAMA***, Toshiro MIYAHARA**** and Naoki NAGATANI****

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,
Okayama University of Science,*

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

**Photonics Center, Osaka University,*

2-1, Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

***Department of Applied Physics, Graduate School of Science,
Osaka University*

2-1, Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

****Department of Life Science, Faculty of Science,
Okayama University of Science,*

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

*****Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Okayama University of Science,*

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

For the detection of pathogenic bacteria, polymerase chain reaction (PCR) has been used for amplified specific gene of the bacteria. *Escherichia coli* (*E.coli*) is utilized as an indicator for assessing food safety because it forms a part of the intestinal micro flora of many animals, and the presence of the micro flora in food causes fecal contamination. Recently, rapid diagnostic kits based on immunochromatographic assay using the antigen-antibody reaction for *E. coli* are commercially available. We have developed an electrochemical and immunochromatographic assay for the detection of amplified *E. coli* and *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) DNA by PCR. The gene of *E.coli* (JM109) and *C. perfringens* (NTCT8237) was amplified by PCR using the primer labeled with Biotin and fluorescein isothiocyanate (FITC).

Keywords: immunochromatographic assay; electrochemistry; polymerase chain reaction; *Escherichia coli*; *Clostridium perfringens*.