

課題番号 : F-13-HK-0002
利用形態 : 技術代行
利用課題名 (日本語) : 表面プラズモン共鳴を利用した水中病原微生物検出バイオセンサの開発
Program Title (English) : Development of a biosensor for pathogenic bacteria detection in aquatic samples based on surface plasmon resonance
利用者名 (日本語) : 佐藤久
Username (English) : Hisashi Satoh
所属名 (日本語) : 北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 水代謝システム分野
水環境保全工学研究室
Affiliation (English) : Aquatic Environmental Protection Engineering, Division of Environmental Engineering, Graduate school of Engineering, Hokkaido University

1. 概要 (Summary)

本研究では、市販の抗 O157 抗体および抗ノロウイルス抗体を用いた病原微生物 SPR バイオセンサを開発した。バイオセンサにはナノテクノロジープラットフォームを利用して作製したマイクロ流路を用いた。このセンサを用いることで定量的に大腸菌を検出でき、検量線を作成できた。ノロウイルスに関しては、シグナル増幅プローブとして Virus-Binding Protein (VBP) を使ったサンドイッチ法により、センサシグナルを 4 倍に増幅できた。

2. 実験 (Experimental)

センサチップは、金蒸着高屈折率ガラス (Au-11 ; 五稜化学 (株)) を用いて作製した。0.01M の 10-Carboxy-1-decanethio エタノール溶液にガラスを 12 時間浸漬し、金薄膜上に自己組織化単分子膜を形成した。ガラスを超純水で 10 分間超音波洗浄した後、0.4M の EDC 水溶液と 0.1M の NHS 水溶液を各 10 μ L 金薄膜上に滴下し、1 時間静置した。ここに抗体を滴下した。このように作製した、抗体が固定化された高屈折率ガラス (センサチップ) にマスクアライナ (MA-20) 利用で作製した PDMS マイクロ流路 (容積 6 μ L) を重ね、フローセル型センサとした。これを光導波路分光装置に固定し、マイクロシリンジポンプを用いてセンサにサンプル溶液を供給した。サンプル溶液には非病原性大腸菌 O157:H7 (ATCC 700728) およびノロウイルスのウイルス様粒子を加えた。センサチップ上で生ずる抗原抗体反応は、SPR スペクトルの最大共鳴波長のシフト量を用いて定量した。

3. 結果と考察 (Results and Discussion)

まず、大腸菌を含まない PBS を 20 分間供給した。最

大共鳴波長が 675.6nm で安定していたので、20 分到大腸菌濃度 105 個/mL の PBS を供給した。その後 6 分間では最大共鳴波長は変化しなかった。PBS でセンサチップを洗浄した後、31 分到大腸菌濃度 106 個/mL の PBS を供給した。すぐに最大共鳴波長は増大し、36 分に 676.4nm で安定した。その後 PBS で洗浄したところ、676.2nm で安定した。47 分到大腸菌濃度 107 個/mL の PBS を供給した。最大共鳴波長は大幅に増大し、63 分に 679.7nm で安定した。その後 PBS で洗浄したところ、678.8nm で安定した。76 分到大腸菌濃度 108 個/mL の PBS を供給した。最大共鳴波長は急激に増大し、78 分に 682.5nm で安定した。このように、センサチップに抗原抗体反応により結合した大腸菌量は、大腸菌を含まない PBS 由来の最大共鳴波長と大腸菌を含む PBS 由来の最大共鳴波長との差 (波長シフト幅) と相関がみられた。この結果から、O157 用 SPR センサの検量線を作成することができた。

4. その他・特記事項 (Others)

なし。

5. 論文・学会発表 (Publication/Presentation)

(1) N. Pitakteeratham, Y. Sakamaki, K. Yamada, S. Ishii, M. Takahashi, S. Okabe, H. Satoh, 11th IWA conference on instrumentation control and automation, 19 Sep. 2013.

(1) Y. Sakamaki, K. Yamada, D. Sano, M. Takahashi, S. Okabe, H. Satoh, 11th IWA conference on instrumentation control and automation, 19 Sep. 2013.

6. 関連特許 (Patent)

なし。