

課題番号 : F-17-HK-0016
利用形態 : 技術代行
利用課題名(日本語) : DNA 固定化金基板を用いた細菌センサーの開発
Program Title (English) : Development of biosensor for bacteria based on DNA immobilized-gold plate
利用者名(日本語) : 佐藤久
Username (English) : H. Satoh
所属名(日本語) : 北海道大学大学院工学研究院
Affiliation (English) : Faculty of Engineering, Hokkaido Univ.
キーワード/Keyword : 成膜・膜堆積、簡易分析、細菌、DNA

1. 概要(Summary)

本研究では、ガラス板に金薄膜を蒸着し、これにチオール基で修飾された DNA(捕捉プローブ)を固定し(センサ基板と称する)、センサ基板に多種多様な DNA を含むサンプルを添加し、捕捉プローブと相補的な塩基配列の DNA を持つ細菌を特異的に検出する技術を開発した。作製したセンサチップは特異的にターゲット DNA を捕捉したので、特異的にターゲット DNA を定量することに成功した。検出可能レンジは 1nM~1000nM であった。

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】

細菌センサーを開発するために、その心臓部となる DNA を固定するための金基板を、EB 加熱・抵抗加熱蒸着装置(管製作所: AV096-000)を用いて作製した。

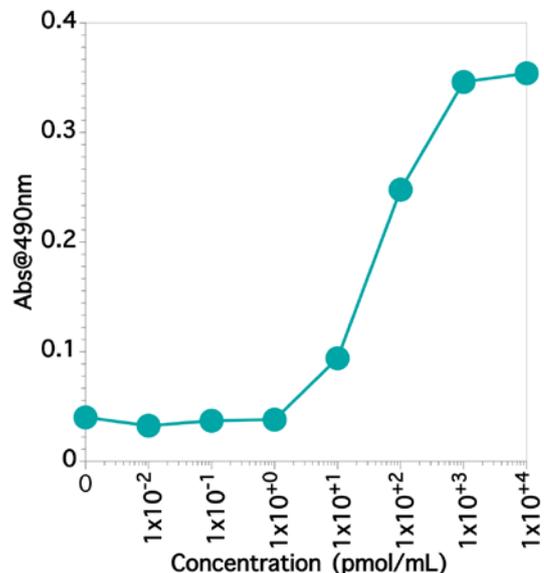
【実験方法】

上述の方法で作製した金蒸着ガラス板をピランハ溶液で洗浄した。金薄膜上に、チオール基を修飾した DNA を、TCEP でチオール基を脱保護することで固定し、センサ基板を作製した。サンプル液(4 μ L)を緩衝液(16 μ L)に添加し、攪拌し、センサ基板上に滴下した。30 分待った後、緩衝液で洗浄した。次に、ビオチンを修飾したターゲット DNA に相補的な塩基配列を持つ DNA(二次 DNA と称す)をセンサ基板上に滴下し、30 分待った後、緩衝液で洗浄した。続いて、Horseradish peroxidase(HRP、西洋ワサビペルオキシダーゼ)修飾ストレプトアビジンをセンサ基板上に滴下し、20 分待った後、緩衝液で洗浄した。ストレプトアビジンはビオチンと強固に結合するので、この方法で二次 DNA に HRP を修飾することができる。最後に酵素 HRP の基質である o-phenylenediamine dihydrochloride(OPD)を滴下し、溶液の色を確認することでサンプル中のターゲット DNA を目視で検出した。ターゲット DNA の濃度を定量する場合は、カルボキシ基が

修飾された 96 ウェルマイクロプレート(スミトモバークライト ELISA 用プレート(カルボプレート)MS-8796F)を用い、アミノ基を修飾した DNA を固定し、これ以降は上記と同じプロトコルで溶液を発色させ、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

ターゲット DNA 濃度が異なるサンプルを用意し検量線を作成した。吸光度は 1pmol/mL から増大し始め、1000pmol/mL で最大となり、これ以上の DNA 濃度では増大しなかった。このように、特異的にターゲット DNA を定量することに成功した。



4. その他・特記事項(Others)

本研究は北海道大学 微細加工プラットフォーム Agus Subagyo 氏の多大なご支援を受けて遂行された。

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

片寄由貴・平野麗子・高橋正宏・岡部聡・佐藤久、新規簡易大腸菌数測定法による下水処理水中大腸菌数の網羅的測定(下水道研究発表会 2018 年)

6. 関連特許(Patent)

なし