

金ナノ粒子を用いた迅速・簡便な新規核酸検出法の開発

東北大学大学院 学生会員 ○林諒一
東北大学大学院 正会員 久保田健吾、原田秀樹
産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 関口勇地

1. はじめに

核酸は生物およびウイルスに共通であり、それぞれに固有な塩基配列を用いて特定の生物を検出することができる。現在最も広く用いられている核酸の検出方法はPCR法であり、標的遺伝子に特異的なプライマーを設計し、それを用いて標的遺伝子を増幅させた後、核酸染色剤等を用いて検出する。しかしながら、PCRにはプライマー、増幅効率、ポリメラーゼ等によりバイアスがかかるため、PCR反応を介さない、迅速かつ簡便な核酸検出手法が求められている。

近年になって金ナノ粒子がいくつかの優れた性質を持っていることが報告され、盛んに研究が行われている。具体的には金ナノ粒子は以下のような性質を持っている。1. 一本鎖核酸は吸着するが、二本鎖核酸は吸着しない、2. 何も吸着していない状態で電解質を加えると、凝集し溶液の色が変化する、3. 金ナノ粒子の近傍にある蛍光物質からの蛍光を消光する。

そこで我々はこの金ナノ粒子の性質を利用してPCRを介さない迅速かつ簡便な核酸検出技術の開発を試みた。その検出技術の原理は以下に述べる(2. 検出の原理)。本研究では、まず金ナノ粒子の合成を行い、その性能を確認した後、核酸の検出を行った。

2. 検出の原理

本技術は蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブ(以下蛍光プローブ)から得られる蛍光を検出する事で標的核酸の有無を判断しようとするものである。反応液中に蛍光プローブと相補的な配列の核酸が存在しない場合(非相補鎖)、蛍光プローブは金ナノ粒子に吸着され、その蛍光は消光される。一方、相補的な配列の核酸が存在し(相補鎖)蛍光プローブと交雑した場合、蛍光プローブは金ナノ粒子に吸着されないためその蛍光は残存する。この蛍光を、蛍光分光光度計などを用いて検出することにより、標的核酸が検出できる。

3. 実験方法

3.1 金ナノ粒子の合成

金ナノ粒子の合成は塩化金とクエン酸ナトリウムを反応させ、塩化金を還元させて行った。蛍光の消光を起こすことができる金ナノ粒子は吸収波長のピークが約520 nmのあたりに現れるため、これを合成の成否の指標とした。塩化金と反応させるクエン酸ナトリウムの比を変化させることによって、合成する金ナノ粒子の粒径が13 nmになるようにコントロールした。

3.2 金ナノ粒子の性能実験

金ナノ粒子が一本鎖核酸を特異的に吸着することを確かめるため、人工的に合成した一本鎖核酸およびPCR産物の二本鎖核酸を用意し、それぞれに対して金ナノ粒子を投入し、その後すぐに電解質として塩化ナトリウムを添加し、溶液の色の変化を観察した。

また、金ナノ粒子の蛍光消光能力を確かめるため、蛍光プローブに金ナノ粒子を加え、その蛍光強度を測定した。

3.3 蛍光による検出及び定量実験

本実験では蛍光プローブを、核酸を含む溶液中に添加し交雑反応を行った。その後、金ナノ粒子を添加し、蛍光強度を測定した。

蛍光プローブの塩基長は18 merで蛍光物質にはCy5を用いた。プローブと反応させる核酸の塩基長は18 mer, 50 mer, 140 merで、50 mer, 140 merのものは塩基配列中の中央にプローブの相補的配列を有するものと、端に有するものについて実験を行った。ネガティブコントロールにはプローブと相補的な配列を持たない核酸を18 merについては1つ、50 mer, 140 merについては2つ用いた。

また、本技術の定量性を評価するため、一定量のプローブに対して交雑させる核酸の量を変化させ、得られる蛍光強度の線形性の有無を調べた。

キーワード：核酸検出、金ナノ粒子、一本鎖核酸の吸着、蛍光の消光

連絡先：〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻
環境保全工学研究室 Tel: 022-795-3584

4. 結果及び考察

4.1 金ナノ粒子の合成

合成した金ナノ粒子を TEM で観察した結果、粒子直径約 13 nm の金ナノ粒子の生成を確認することができた(図 1)。また、合成した金ナノ粒子の吸収波長のピークは 520 nm であった。

4.2 金ナノ粒子の性能実験

金ナノ粒子の一本鎖核酸への特異的吸着を確認する実験では、一本鎖核酸の系では色の変化が起こらずに溶液はピンク色であったのに対し、二本鎖核酸の系では金ナノ粒子が凝集して溶液の色が青色に変化した

(図 2)。このことは金ナノ粒子に吸着された一本鎖核酸が金ナノ粒子の凝集を阻害していることを示しており、一本鎖核酸への特異的な吸着が確認できた。

また、金ナノ粒子の蛍光消光能力を確認する実験では、蛍光プローブに金ナノ粒子を加えると蛍光強度が著しく減少したため、蛍光の消光能力が確認できた。

4.3 蛍光による検出及び定量実験

18 mer の標的核酸を用いて実験を行った結果、相補鎖と非相補鎖で得られる蛍光強度に差が生じ、検出を確認することができた(図 3a)。また 50 mer の標的核酸を用いた実験においても蛍光プローブを塩基配列中央に交雑させた系と、端に交雑させた系の 2 系列において 2 つの非相補鎖よりも高い蛍光強度を検出することができた(図 3b)。しかし、中央に交雑させた系では端に交雑させた系と比べて蛍光強度が小さくなり、2 つの非相補鎖間でも蛍光強度の違いが見られた。これは 140 mer の標的核酸を用いた場合も同様であった。図 3b 中の標的核酸は濃度、長さとも同じであるため、この蛍光強度の差は交雑させた核酸の塩基配列に起因していると考えられる。つまり、中央に交雑させた系と端に交雑させた系における蛍光強度の差はプローブの標的核酸への交雑効率の差によるものと推察され、2 つの非相補鎖において、より強い蛍光が得られた非相補鎖 1 においては非特異的な交雑が起こっている可能性が考えられる。そこで我々は、交雑温度をコントロールしてこれらを解決する方法を現在検討している。

さらに、線形性の有無を調べる実験では、一定量のプローブに対しての標的核酸の比を変化させて蛍光強度を測定した結果、蛍光強度は標的核酸の量に比例して増加した(図 4)。このことは本手法が標的核酸の定量に利用できる可能性を示唆している。

今後は相補鎖と非相補鎖の混合した系で実験を行い、標的核酸にもさらに長いものを用い、本手法を実用化したいと考えている。

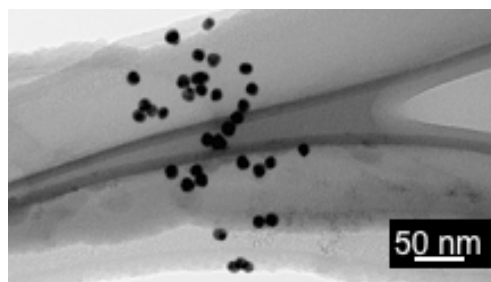


図 1 合成した金ナノ粒子の TEM 写真



図 2 一本鎖核酸または二本鎖核酸と反応させた金ナノ粒子を含む溶液に電解質を加えた時の色の違い(左：一本鎖核酸，右：二本鎖核酸)

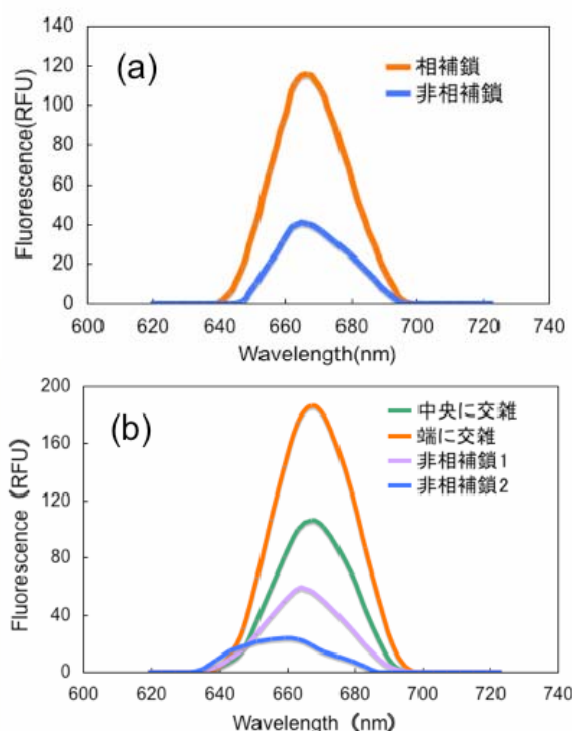


図 3 標的核酸の蛍光による検出(標的核酸の塩基長：(a) 18 mer, (b) 50 mer)

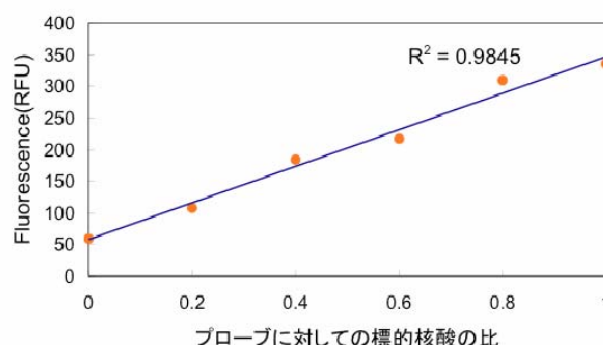


図 4 一定量のプローブに対しての標的核酸の比と蛍光強度の関係