

金属ナノ粒子標識オリゴヌクレオチドプローブの作製

東北大学工学部 学生会員 ○白瀧 康浩

東北大学大学院工学研究科 正会員 久保田健吾, 李 玉友, 原田 秀樹

1. はじめに

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は, rRNA に相補的なオリゴヌクレオチドの末端に蛍光物質を標識したプローブを用いて, 標的とする微生物を in situ で特異的に検出する革新的技術として確固たる地位を築いた。

しかし, 従来の FISH 法では, 標的とする微生物から十分な蛍光シグナルを得る事ができない場合があり, その際には高感度な FISH 法を行う必要がある。現在, 高感度 FISH 法として知られている tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法では, 蛍光シグナルを増幅するために, 蛍光物質に比べて分子量が格段に大きい酵素を, 菌体内に浸透させなければならず, そのために細胞壁処理が必要となる。しかし, 細胞壁処理について適切な知見が得られている微生物は限られており, 細胞壁処理が困難であるゆえに TSA-FISH 法を行う事ができない微生物が数多く存在している。

そこで, 我々は細胞壁処理なしで菌体に浸透可能だと思われる数 nm サイズの金属ナノ粒子に着目した。金属ナノ粒子は, silver enhancement などによってその粒径を増大できる事が知られており, 金属ナノ粒子から得られるシグナルを silver enhancement によって増幅できると考えられる。ここでは, まず金属ナノ粒子を用いた微生物の特異的検出が可能であるか検証した後, 金属ナノ粒子を標識したプローブの作製を行い, 細胞壁処理不要の高感度 ISH の開発を行う事にした。

2. 実験方法

(1) biotin 標識プローブと金属ナノ粒子標識 streptavidin による微生物の特異的検出

Escherichia coli と *Methanococcus maripaludis* の混合物をアガロースでスライドに包埋固定し, biotin 標識 Eub338 プローブをハイブリダイズさせた。その後, 金属ナノ粒子標識 streptavidin を, プローブに標識されている biotin と結合させた。金属ナノ粒子は顕微鏡で検出する事が困難であったため, silver enhancement により可視化した。

(2)金属ナノ粒子標識プローブの作製

プローブへの金属ナノ粒子の標識は, 反応バッファー中で sulfo-N-hydroxy-succinimido ester (NHS-ester) 基のついた金属ナノ粒子とアミノ基を標識したプローブを混ぜ

あわせて, 室温で数時間インキュベートして行った。

プローブの精製は PAGE およびエタノール沈殿について検討を行い, 最終的にエタノール沈殿で行う事とした。

3. 実験結果および考察

(1) biotin 標識プローブと streptavidin 標識金属ナノ粒子による微生物の特異的検出

まず, 金属ナノ粒子を用いた微生物の特異的な検出が可能か確認するために, biotin 標識プローブと金属ナノ粒子標識 streptavidin による検出を試みた。しかしながら金属ナノ粒子を顕微鏡下で視覚的に検出する事は困難であった。そこで silver enhancement (標識した金属ナノ粒子の周りを銀粒子で覆ってその粒径を増大すること) を行ったところ, *E. coli* のみを特異的に検出する事ができた。その際の同一視野での写真を, 写真-1 に示す。明視野観察で撮影した写真-1 (b) では, 位相差観察で撮影した写真-1 (a) で見られる *M.maripaludis* が写っておらず, *E.coli* のみが黒い影として特異的に検出されている。また silver enhancement を長時間行くと, 金属ナノ粒子が増大しすぎるため, 菌体が破裂し, 検出が困難となった。そのため silver enhancement は, 金属ナノ粒子を可視化可能な範囲で, 必要以上に大きくしないようにコントロールする必要がある。本研究で得られたその反応時間は 5-20 分である。

(2) 金属ナノ粒子標識プローブの作製

金属ナノ粒子標識プローブを用いた ISH を行うためには, 純度の高いプローブを得る必要がある。標識反応溶液中には, 未標識プローブや, 余剰な金属ナノ粒子が含まれているため, 金属ナノ粒子標識プローブを精製する必要がある。そこでまず, プローブの精製方法について検討を行った。

まず PAGE により 18 塩基と 24 塩基の Cy3 標識オリゴヌクレオチドの混合物の分離を試みたところ, 両者を分子量の違いにより分離することができた。金属ナノ粒子の分子量は 6 塩基 (約 1, 900 Da) よりも大きいため, この分解能は標識プローブを未標識プローブから分離するのに十分であると判断した。そこでゲルから TE バッファーにオリゴヌクレオチドを溶出させて, スピンカラムを用いて精製, 回収した。PAGE で精製したオリゴヌク

レオチドの回収率（PAGE にかけたオリゴヌクレオチドの量を回収したオリゴヌクレオチドの量で除したもの）は、18 塩基のオリゴヌクレオチドの場合 22.7%であり、24 塩基のオリゴヌクレオチドの場合は、ブランクの方が回収物よりも濃度が高いという結果になったため値を得る事ができなかった。精製物を分光光度計で測定すると、図-1(a)のような吸光スペクトルが得られた。オリゴヌクレオチドにはCy3が標識されているため、550 nmでCy3、260 nmでオリゴヌクレオチドのピークが現れる。ところが、図-1(a)では550 nmに現れるピークをほとんど観察する事ができず、波形にも乱れが多い。この事から、PAGEでは精製したオリゴヌクレオチドをほとんど回収できない上に、精製物中に多くの不純物が含まれている事が分かった。回収率および純度を上げるためには、オリゴヌクレオチドをゲルから溶出させる方法および溶出産物の精製方法について更なる検討が必要である。

そこで、エタノール沈殿によるオリゴヌクレオチド精製を試みた。18 塩基のオリゴヌクレオチドをエタノール沈殿したところ、オリゴヌクレオチドの回収率は $58.4 \pm 11.0\%$ であった。さらに、精製物を分光光度計で測定すると、図-1(b)のような吸光スペクトルが得られた。図-1(b)では550 nm、260 nmに明らかなピークを観察する事ができ、波形の乱れもない。この結果よりプローブへの金属ナノ粒子標識後の精製は、エタノール沈殿で行う事にした。なお、エタノール沈殿では金属ナノ粒子未標識プローブの除去ができないため、金属ナノ粒子標識の反応時に、アミノ基標識プローブに対して大過剰な金属ナノ粒子を投入する事で、未標識プローブの割合を減らす事とした。

次に、アミノ基標識プローブに対して金属ナノ粒子の標識を行った。金属ナノ粒子に結合した NHS-ester は、第一級アミンに反応する性質を持っており、アミノ基を標識したプローブに共有結合させる事ができる。しかし、金属ナノ粒子標識の作業は今現在成功に至っていない。反応に用いるバッファー等実験条件を変えて検討を行ったが、特に効果は現れなかった。失敗の原因として、アミノ基の欠陥や金属ナノ粒子の NHS-ester 基の欠陥が考えられるが、原因は今のところ不明である。現在原因究明に取り組んでいる。

4. まとめ

biotin 標識プローブを rRNA に交雑させた後、金属ナノ粒子標識 streptavidin を結合させ、silver enhancement を行うことで、微生物を特異的に検出する事ができ、金属ナノ粒子が ISH 法へ適用可能であることが分かった。ま

た silver enhancement の際に菌体を破裂させないため、反応時間をコントロールする必要がある事が分かった。金属ナノ粒子標識後のプローブ精製方法としては、精製能力や回収率の面で優れているエタノール沈殿が適当であると判断できた。アミノ基標識プローブに対して金属ナノ粒子を標識する事はできなかったが、今後も引き続き取り組んでいく予定である。

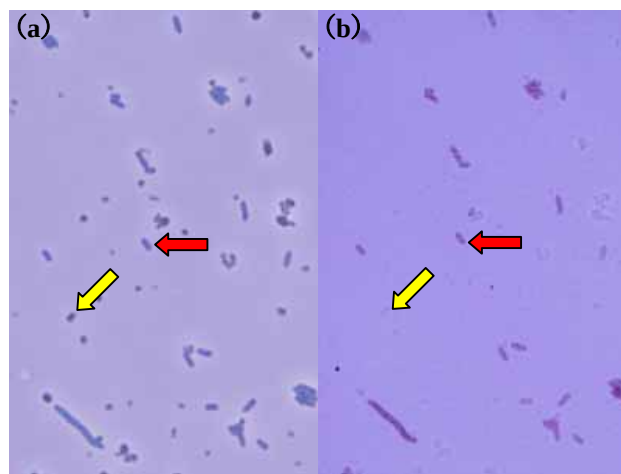


写真-1 金属ナノ粒子による *E. coli* の検出

(a) 位相差観察での検出, (b) 明視野観察での検出
赤矢印は *E. coli*, 黄矢印は *M. maripaludis* を指している

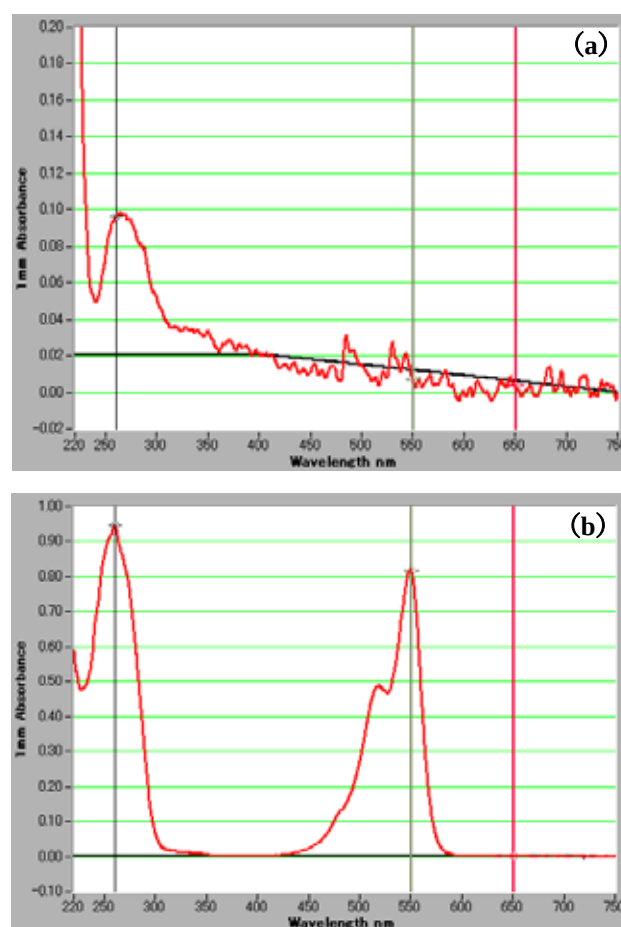


図-1 精製方法による吸光スペクトルの違い

(a) PAGE による精製, (b) エタノール沈殿による精製