

微粒子誘電泳動を用いた混合肉試料からの豚 DNA の選択的検出

山崎 達郎* 丁 震昊* 中野 道彦** 末廣 純也**
(九州大学大学院 *システム情報科学府 **システム情報科学研究所)

1 はじめに

DEPIM (Dielectrophoretic Impedance Measurement) ⁽¹⁾法は、誘電泳動とインピーダンス計測を組み合わせた迅速・簡便な微粒子検出法である。誘電泳動とは、不平等電界中の誘電体粒子に、誘電体及び溶媒の分極、電界分布、誘電体の大きさなどに依存する力が働く現象である。我々は、DEPIM 法を応用し、PCR (polymerase chain reaction) 後の DNA を迅速に検出する方法を提案した⁽²⁾。

PCR は、DNA を特異的かつ指数関数的に増幅する手法であり、病原性細菌やウイルスの検出にも用いられる⁽³⁾。原理的には一分子の DNA から増幅 DNA を得ることが可能であり、感度が非常に高い。一方で、PCR で増幅された DNA の検出には、数時間程度が必要である。

我々が考案した迅速な DNA 検出法は、DNA の結合によって微粒子の誘電泳動が負から正に変化することを利用し、DNA 結合粒子を選択的に微細電極に誘電泳動捕集して DEPIM によって検出する。本研究では、本手法の食肉検査への応用を目的として、同手法を用いて豚肉と牛肉の混合肉試料から豚 DNA を選択的に検出可能か検証した。

2 実験方法

各生肉サンプル(A:豚肉 50 mg、B:牛肉 50 mg、C:豚肉 30 mg+牛肉 20 mg、D:豚肉 25 mg+牛肉 25 mg)から mtDNA エキストラクターキット(和光純薬)を用いてミトコンドリア DNA を抽出した。検出対象を豚ミトコンドリア DNA 上の 83bp 領域(以下、83bpDNA)として PCR を行った。PCR には、豚ミトコンドリア特異プライマーセット⁽⁴⁾を用いた。DNA 抽出から PCR まではミトコンドリア DNA 抽出法⁽⁵⁾、及び公定法⁽⁶⁾を参考にした。次に、PCR 増副産物である 83bpDNA と微粒子(Dynabeads M-280 streptavidin、直径 2.8 μm)を結合させた。DNA 溶液 10 μl と微粒子 10 μl を結合溶液(5 mM Tris-HCl(pH7.5)、0.5 mM EDTA、1 M NaCl)に懸濁し、ビオチン/アビジン結合により、DNA と微粒子を結合させ、Milli-Q 水で 3 回洗浄し、最後に 50 μl Milli-Q 水に懸濁した。

最後に、DEPIM により測定を行った。微細電極に、最短ギャップ長 5 μm であるキャッスルウォール型電極を用いた。DNA 修飾微粒子 50 μl を滴下し、2 V_{pp}、100 kHz の正弦波電圧を印加し、DEPIM 応答を取得した。

また、豚肉と牛肉の混合比を変化させて検出感度について検討した。混合比は DNA 抽出対象生肉量を 50 mg とし、豚肉のみ、豚肉 15 mg+牛肉 35 mg、豚肉 10 mg+牛肉 40 mg、豚肉 5 mg+牛肉 45 mg、牛肉のみ、とした。

3 実験結果と考察

図 1 は混合肉試料から抽出し、PCR により増幅された 83bpDNA を結合した微粒子の DEPIM 応答である。牛肉のみ(Sample E)以外でコンダクタンスの上昇が計測された。このことから、混合肉試料から豚 DNA を選択的に検出可能であることが示された。

図 2 は豚肉と牛肉の混合比を変化させたときの結果である。牛肉のみのサンプル以外でコンダクタンスの上昇が計測された。またその時間上昇率は混合されている豚肉量に依存していた。以上の結果より、混合肉 50 mg 中に含まれる豚肉 5 mg(重量比 10%)を本手法で検出可能であること、混合肉中の豚肉量に応じた応答が得られることが示された。

4 まとめ

微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法により、混合肉試料に重量比 10%で混入した豚肉から豚 DNA を選択的に検出可能であることを示した。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会化学研究費補助金(No.26289125, No.15K06111)の援助により行われた。記して謝意を示す。

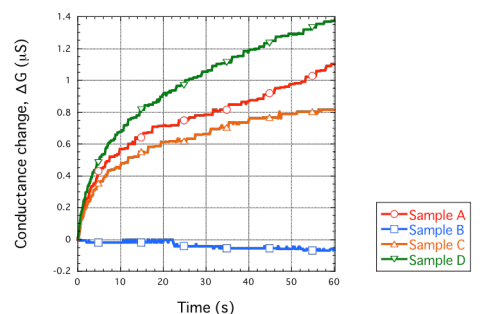


図 1 混合肉試料抽出 DNA の増幅産物と結合した粒子の DEPIM 応答

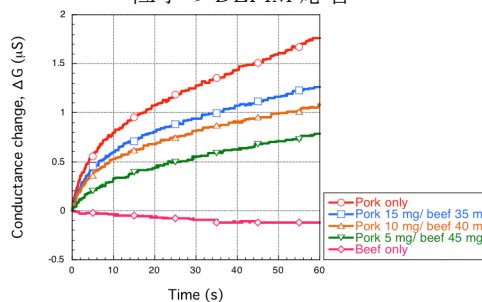


図 2 混合比率を変化させて抽出した DNA の増幅産物と結合した粒子の DEPIM 応答

参考文献

- [1] J. Suehiro, *et al.*: Appl.Phys., 32, 2814-2820 (1999)
- [2] M. Nakano, *et al.*: Europhys. Lett., 108, 28003 (2014)
- [3] D. N. Fredrickes, *et al.*: Clin. Infect. Dis., 29, 25-31 (2012)
- [4] T. Yoshida, *et al.*: J. Food Hyg. Soc. Japan, 50, 89-92 (2009).
- [5] J.M. Sutarno, *et al.*: Theriogenology, 57, 1603-1610 (2002).
- [6] 試料分析基準 第 16 章動物由来 DNA (平成 20 年 4 月 1 日・19 消安第 14729 号)。