

微粒子誘電泳動を用いたDNA検出法による 豚DNAの選択的検出

山崎 達郎*, 丁 震昊*, 中野 道彦**¹, 末廣 純也**

(2016年1月17日受付; 2017年3月23日受理)

Selective Detection of Pig DNA Extracted from Mixed Meat Using DNA Detection Method Based on Microbead Dielectrophoresis

Tatsuro YAMASAKI*, Zhenhao DING*, Michihiko NAKANO**¹ and Junya SUEHIRO**

(Received January 17, 2017; Accepted March 23, 2017)

We proposed a rapid electrical DNA detection method using dielectrophoresis (DEP) of microbeads for polymerase chain reaction (PCR) amplified DNA. The amplified DNA is attached on the microbeads, then, the DNA-labeled microbeads are collected and detected by dielectrophoretic impedance measurement method. In this study, it was investigated that detection of pig DNA extracted from raw meat or one mixed with beef. Detection of impurity in not only processed foods but also raw one by nucleic acid amplification test (NAT) such as PCR are increasingly demanded in food industry. Pork is one of the important detection targets because of religious demand. To show application of our method on that, DNA extraction from raw meats, PCR and detection of the amplicon using microbeads DEP were carried out consecutively. At first, purified mtDNA was used to investigate detection limit of the method. It was showed the method detected 10^5 copies of pig mtDNA in the mixture of 10^8 copies of cow mtDNA. Then, the experiments using raw meats were carried out. As the results, 5 mg of pork in 50 mg of meat mixed with beef was detected. These results suggest that the method can be used for NAT of food.

1. はじめに

筆者らは、迅速かつ簡便な細菌検出技術として、誘電泳動インピーダンス計測 (DEPIM, Dielectrophoretic Impedance Measurement) 法¹⁾を研究している。誘電泳動とは、不平等電界中の誘電体粒子に、誘電体及び溶媒の誘電率と導電率、電界分布と強度、誘電体の大きさ等に依存する力が働く現象である。電界の強い方向に働く場合は正の誘電泳動、弱い方向に働く場合は負の誘電泳動と呼ばれる。誘電泳動はマイクロ粒子だけでなく、DNAやカーボンナノチューブといったナノ材料の操作、集積技術としても活発な研究が行われている²⁾。

我々は、DEPIM法を応用し、PCR (polymerase chain reaction) 後のDNAを迅速かつ低コストで検出する方法

を考案した^{3,4)}。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高感度検出法として利用されている⁵⁾。PCRは原理的に一分子のDNAから増幅DNAを得ることが可能な高感度DNA検出法である。PCRによりDNAを増幅した後、なんらかの手法でその増副産物を検出しなければならない。PCR後に行われる一般的なDNA検出法であるアガロースゲル電気泳動やDNAプローブ法には、1~3時間程度が必要である。一方、Real-time PCR法は、PCRによるDNA増幅を光学的手法で逐次モニタリングし、反応終了と同時に結果がわかるが、装置および試薬が非常に高額である。このような現状であるので、PCR後のDNAを迅速かつ低コストで検出する方法が求められている。

筆者らが新しく考案したDNA検出法は、誘電体微粒子にPCR増幅DNAを結合させて、そのDNA結合粒子を誘電泳動捕集して、それをDEPIMで検出する^{3,4)}。本手法は、微粒子の誘電泳動特性がDNAの結合によって大きく変化するという現象を利用している。すなわち、DNA結合前の微粒子は負の誘電泳動を示し、DNA結合に伴って正の誘電泳動を示す。本手法によって15分程度でPCR後のDNAを測定できる。従来の研究では合成DNAを用いており、実際の生体サンプルから抽出したDNAへの適用性は未だ十分には検討していない。

本手法は、PCR増幅後の増幅DNAを検出する手法で

キーワード: DNA 検出, 誘電泳動, PCR, 微粒子

*九州大学大学院 システム情報科学府
(〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744)

Graduate school of information science and electrical engineering, Kyushu University, 744, Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 819-0395, Japan

**九州大学大学院 システム情報科学研究院
(〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744)

Faculty of information science and electrical engineering, Kyushu University, 744, Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 819-0395, Japan

¹ nakano@ees.kyushu-u.ac.jp

あるが、その感度はアガロースゲル電気泳動による検出とほぼ同程度である。Real-time PCRは高感度な蛍光検出システムを採用しているため、その感度は高い。しかし、増幅DNAを検出することから、結果として、PCR + 電気泳動とReal-time PCRには、初期DNA量に対する感度に大きな差はない。Real-time PCRは、通常のPCRよりも広い範囲での定量性を有している点に特徴がある。アガロースゲル電気泳動による手法では、電気泳動に1時間程度、蛍光染色に1時間程度必要であり、測定後には有害な蛍光色素を含有する廃棄物が残される(数百 ml)。Real-time PCRは、反応後に直ちに結果が得られるが、最適な反応を設計するためにノウハウが必要であり、かつ通常のPCRに比べて高価な蛍光色素を必要とすることから1回あたりの反応に必要なコストが大きい。本手法は、微量な誘電体微粒子を用いているため廃棄物の量は少なく(1 ml以下)、後述の通り、電極を使い捨てにしてもそのコストは高くない。

DNA検出法には、従来のアガロースゲル電気泳動(蛍光染色)や分光光度計による計測に加えて、最近では、固相へ対象DNAを結合してからそのDNAを化学発光、表面プラズモン共鳴、電気化学、電流、蛍光、核酸クロマトグラフィー等によって検出する手法が示されている⁶⁸⁾。微粒子誘電泳動を用いたDNA検出法は、これらの手法と比較して、操作が簡便であること、低コストであることに特徴がある。操作の簡便さは、試料調製が混合・静置によって行えること、測定を容易にプログラミングできることから、特別な訓練等がなくても結果を得ることができる点にある。また、測定時間が1分程度と非常に短いこと、本法に必要な消耗品は微粒子と電極であり、どちらも安価に準備できることから低コストであると言える。例えば、市販のDEPIMを用いた口腔内細菌検出装置⁹⁾は使い捨て電極を使用するが、そのランニングコストは150円/回程度である。

本研究では、微粒子誘電泳動を用いたDNA検出法の食肉検査への応用を目的として、食肉から抽出した豚DNAを検出可能か検証した。安全衛生の観点以外にも宗教的な観点からも、原材料表示されているもの以外のものが食品中に含まれてはならない(例:イスラム圏における豚肉の忌避)。このような背景の下、種々の食品検査が行われているわけであるが、特に、生物由来の混入物に関しては、その遺伝子を検出することが、最も感度が高く、信頼できる¹⁰⁾。食品の迅速遺伝子検査法としては、例えば、倉敷紡績株式会社の核酸クロマトグラフィー検査キット「GeneFields-Meat」がある¹¹⁾。これは、PCR後のDNAをクロマトグラフィーにより40

分で0.01%の異種肉の混入を検出可能としている。本研究では、豚肉の混入を想定し、豚DNAをPCR増幅し、微粒子誘電泳動を用いた手法でその増幅DNAを検出できるかどうかを検討した。実験にはまず、精製された豚ミトコンドリアDNAを用い、次に、市販の食肉(豚肉、牛肉)から抽出したDNAを用いた。

2. 実験方法

2.1 微粒子誘電泳動によるDNA検出法

DNA結合に伴う微粒子の誘電泳動特性の変化を利用したDNA検出法を図1に示す。本手法では、ビオチン/アビジン結合を利用し、PCR後にDNAを粒子へと結合させる。ビオチン修飾プライマーを用いてPCRを行い、増幅DNAの末端にビオチンを修飾し、そのビオチン修飾DNAとアビジン修飾微粒子を結合させる。DNAの結合によって微粒子の誘電泳動特性が変化し、DNA未結合時には負の誘電泳動力が働き電極間から反発されていたものが、DNA結合により正の誘電泳動力が働き、電極間に捕集される。これによりDNA結合粒子のみを捕集し、PCRで増幅されたDNAを検出する。DEPIMは溶液中の細菌を検出する方法で、誘電泳動によって微細電極に細菌を捕集し、その捕集に伴う電極間のインピーダンス変化から細菌を1分以内に定量的に検出することができる。

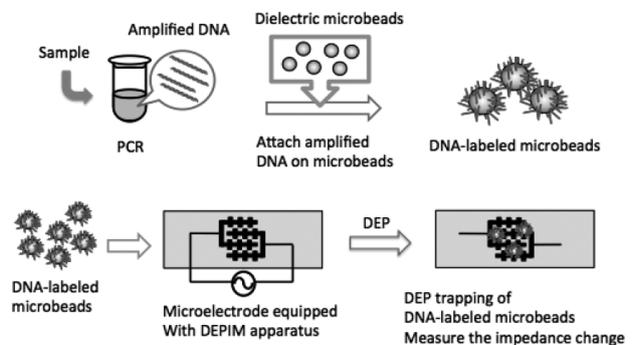


図1 微粒子の誘電泳動を用いたDNA検出法
Fig.1 DNA detection method based on microbead dielectrophoresis.

2.2 精製豚ミトコンドリアDNAの検出

PCR増幅対象を豚ミトコンドリアDNA上の83 bp領域とした(以下、83 bp DNAと呼ぶ)。まず、精製豚ミトコンドリアDNAに対してその検出感度を調査した。豚ミトコンドリアDNA(MD-PIG 15000, Promega, 約16 kbp)を用い、DNA量を $10^7 \sim 10^4$ copyの間で変化させた。PCRには、豚ミトコンドリア特異プライマーセット¹²⁾(PPA6-F (20 μ M): 5'-Biotin-GAGATTGTGCGGTTATTAATG, PPA6-R (20 μ M): CTACCTATTGTCACCTTAGTT), AmpliTap Gold 360 (Thermo Fisher Science, 4398876)を

用いた。PCR 後の DNA 濃度を Qubit 蛍光定量装置 (Life technologies) で測定した。

次に、PCR 増幅 DNA と微粒子の結合を以下の手順で行った。微粒子にはストレプトアビジン修飾粒子 (Dynabeads M-280 Streptavidin, 直径 2.8 μm , Life Technologies) を用いた。PCR 溶液 10 μl と微粒子を結合溶液 (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) に懸濁し、15 分間結合させた。結合反応時の微粒子の濃度は 3.5×10^4 個/ μl とした。結合反応後、微粒子を Milli-Q 水で 3 回洗浄し、50 μl Milli-Q 水に懸濁した。

DNA 結合微粒子の DEPIM 検出は以下のとおり行った。微細電極にはガラス基板上に真空蒸着したクロム薄膜をフォトリソグラフィによりパターンニングして作製したキャスルウォール型電極 (最短ギャップ長 5 μm) を用いた⁴⁾。この電極上に DNA で修飾した微粒子の懸濁液 50 μl を滴下し、1 分間静止した後、2 Vpp, 100 kHz の正弦波電圧を印加し、ロックインアンプを用いて電極間コンダクタンスを測定することで DEPIM 応答を取得した。

また、精製豚ミトコンドリア DNA に精製牛ミトコンドリア DNA (MD-COW 15000, Promega, 約 16 kbp) を混合して、豚ミトコンドリア DNA を選択的に検出できるかどうか検討した。牛ミトコンドリア DNA (10^8 copy) と豚ミトコンドリア DNA ($10^8 \sim 10^2$ copy) を混合した。PCR 及び DNA 結合微粒子の測定は上記と同様に行った。

2.3 豚肉抽出DNAの選択的検出

生肉から DNA を抽出し、その DNA を検出できるかどうかを検討した。DNA 抽出から PCR まではミトコンドリア DNA 抽出法¹³⁾ 及び公定法¹⁴⁾ を参考に行った。NucleoSpin Tissue (TAKARA BIO INC., U0952A) を用いて、豚肉及び牛肉 100 mg からそれぞれのミトコンドリア DNA を抽出し、5 mM Tris-HCl (pH8.5) 100 μl に懸濁した。ミトコンドリア DNA 懸濁液とその 10 倍及び 100 倍希釈液 1 μl を PCR (50 μl) に用いた。PCR 後の DEPIM による DNA 結合微粒子の測定は、上記と同様に行った。

2.4 混合肉試料から豚DNAの選択的検出

豚肉と牛肉の混合肉試料から DNA を抽出し、そこから豚 DNA を検出できるか調査した。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、TE バッファー 25 μl を加えた。抽出 DNA 溶液 1 μl を PCR (50 μl) し、2.3 節と同じ方法で DEPIM 検出を行った。また、豚肉と牛肉の混合比を変化させて同様の実験を行った。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

3.1 精製豚ミトコンドリアDNAの検出

図 2 は精製豚ミトコンドリア DNA から PCR 増幅した 83 bp DNA を結合させた微粒子の DEPIM 応答である。豚ミトコンドリア DNA 量を変化させた。初期 DNA 量 10^5 copy 以上で応答が得られた。

豚ミトコンドリア DNA と牛ミトコンドリア DNA を混合したものに対して、83 bp DNA を対象に PCR を行った後、微粒子誘電泳動によって測定した結果を図 3 に示す。牛ミトコンドリア DNA の量を 10^8 copy に固定して、豚ミトコンドリア DNA 量を変化させた。図 2 の結果と同様に、豚ミトコンドリア DNA が 10^5 copy 以上で応答が得られた。この結果より、牛ミトコンドリア DNA が 10^8 copy 混在していても、 10^5 copy 以上の豚ミトコンドリア DNA を特異的に検出できることが示された。

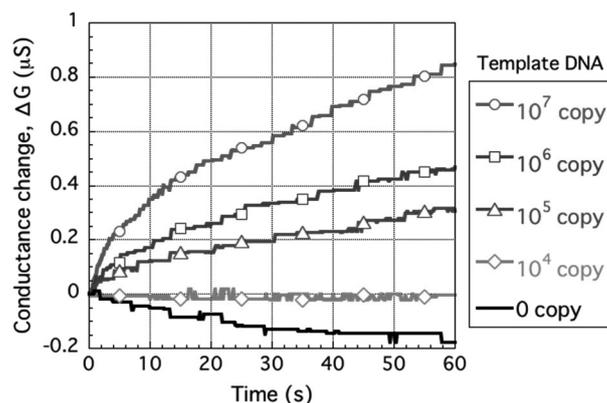


図 2 精製豚ミトコンドリア DNA の検出
Fig.2 Detection of DNA amplified from purified pig mitochondrial DNA.

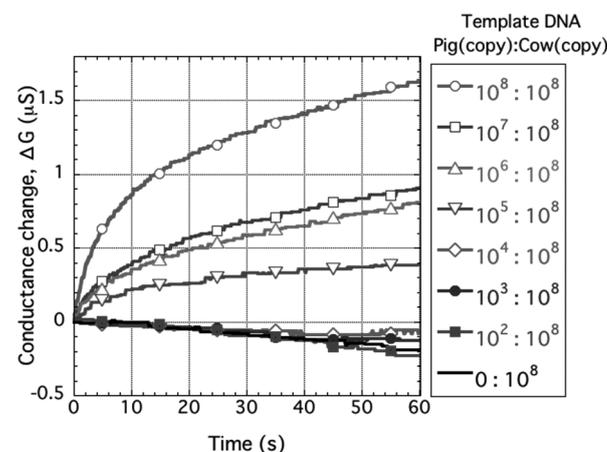


図 3 豚・牛ミトコンドリア混合 DNA 中の豚ミトコンドリア DNA の検出
Fig.3 DEPIM of microbeads labeled with DNA amplified from the mixture of pig and cow mitochondrial DNA.

3.2 豚肉抽出DNAの検出

図4は豚肉と牛肉から抽出したDNAを用いてPCRを行った後の増幅産物のアガロースゲル電気泳動像を示す。豚肉から抽出したDNAからは目的の増幅産物が得られたが、牛肉の場合は得られなかった。また、豚肉抽出DNA溶液を10倍希釈すると増幅産物が得られなかった。豚肉と牛肉から抽出したDNAを用いてPCRを行った後で、DEPIMによってDNA検出した結果を図5に示す。アガロースゲル電気泳動で増幅産物が確認されたサンプルではDEPIMにおいても応答が得られた。これにより、生肉から抽出したDNAも検出できることが示された。

本実験では100mg程度の生豚肉から抽出したDNAを100μl溶液に懸濁して、そのうち1μlを反応に利用した場合に、豚DNAを検出した。これが本実験における検出下限であるが、図4の結果から、この検出下限はPCRの感度に依存するといえる。



図4 豚肉および牛肉抽出DNAのPCR産物のアガロースゲル電気泳動
 Fig.4 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified DNA using DNA extracted from pork and beef.
 Lane M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1, 2, 3: Pig (1: as extracted, 2: 1/10 dilution, 3: 1/100 dilution), Lane 4, 5, 6: Cow (4: as extracted, 5: 1/10 dilution, 6: 1/100 dilution)

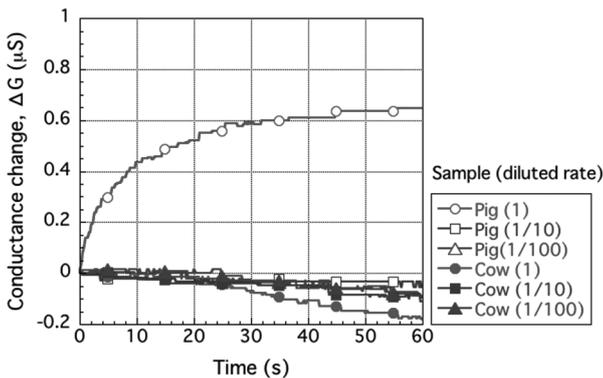


図5 豚肉および牛肉を用いた豚DNAの検出
 Fig.5 DEPIM results for amplified DNA using DNA extracted from pork and beef.

3.3 混合肉試料から豚DNAの選択的検出

図6は豚と牛の生肉単体及びそれぞれを混合した試料から抽出したDNAをPCRで増幅した後の増幅産物のアガロースゲル電気泳動を示す。試料に豚肉が含まれているときのみ目的の増幅産物が得られた。これらのPCR増

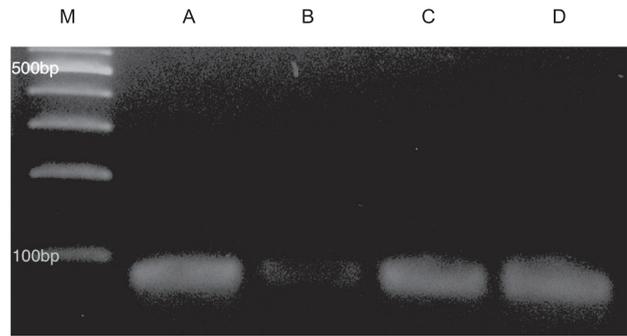


図6 混合肉抽出DNAのPCR産物のアガロースゲル電気泳動
 Fig.6 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified DNA using DNA extracted from mixed meats.
 Lane M: 100 bp DNA ladder marker, Lane A: Pork 50 mg, B: Beef 50 mg, C: Pork 30 mg + Beef 20 mg, D: Pork 25 mg + Beef 25 mg.

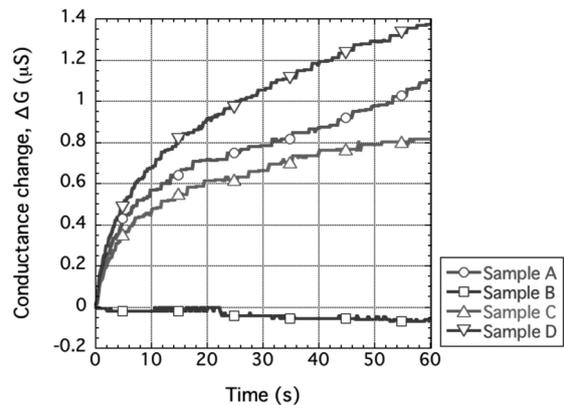


図7 混合肉中の豚DNAの検出
 Fig.7 DEPIM results of DNA amplified by using DNA extracted from mixed meats.

副産物で修飾した微粒子のDEPIM応答を図7に示す。アガロースゲル電気泳動で増幅産物が確認された試料はDEPIMにおいても応答が得られた。サンプルA, C, DのDEPIM応答を比べると初期豚肉量はA > C > Dであったが、DEPIM応答ではD > A > Cになった。この要因として、生肉からのDNA抽出の再現性とPCR増幅のプラトーの二つが考えられる。後者に関しては、一般にPCRでは、そのサイクルごとにDNAが指数関数的に増幅されるが、あるサイクル後にはそれ以上はDNAが増幅されなくなる(プラトー(飽和))。そのため、プラトーに達したあとの増幅DNA量は初期DNA量にほとんど関係なく、ほぼ等しい。微粒子誘電泳動を用いたDNA検出法は定量的に対象DNAを検出できる¹⁵⁾ため、プラトーを考慮したPCRサイクル数の最適化によって、定量的に豚DNAを検出できるようになると考えている。

豚肉と牛肉の混合比を変化させた時の結果を図8に示す。牛肉のみの試料以外でコンダクタンスの上昇が計測された。また、応答量は豚肉量が相対的に増大するほど大きくなった。図7とは結果が異なっているのは、初期

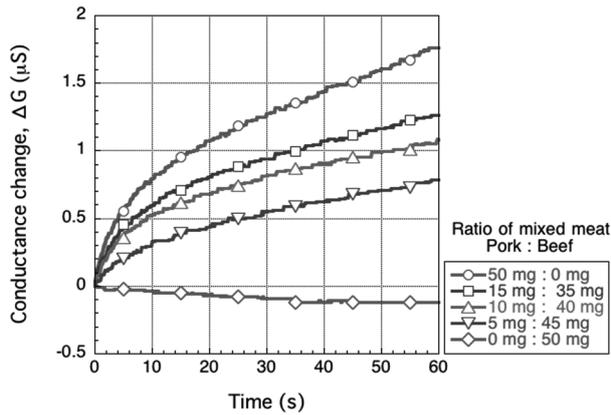


図8 混合比率を変化させた場合の混合肉中の豚DNAの検出
Fig.8 DEPIM of DNA amplified by using DNA extracted from different ratio of mixed meats.

豚肉の量が少ないため、15 mg～5 mgの範囲ではPCR増幅がプラトーに達していなかったためであると考えている。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検出法を食品の遺伝子検査へと応用できるかどうか検討した。本研究は、本手法を利用し、豚と牛のミトコンドリアDNA及び食肉(豚肉、牛肉)から抽出したDNAを用い、豚DNAをターゲットとして検出を試みた。結果として、豚肉及び豚と牛の混合肉試料から豚DNAを検出可能であることを示した。また、豚ミトコンドリアDNAが 10^5 copy以上の場合に本手法により検出可能であることを示した。豚ミトコンドリアDNAの他に牛ミトコンドリアDNAが混在している場合においても豚ミトコンドリアDNAが 10^5 copy以上の場合に検出可能であることを示した。食品表示の正確性に対する要求は年々高まっており、それを担保するための検査には、特異性が高く高感度でかつ迅速であることが求められる。本研究で示したPCRと微粒子誘電泳動を組み合わせたDNA検出法は、特異性と感度を高感度な遺伝子増幅法であるPCRによって担保し、その増幅DNAを高速DNA検出法である微粒子誘電泳動による方法で検出することで検査全体の迅速性を達成している。このことから本手法が食品分野における遺伝子検査に貢献できる可能性は高いと考えている。

謝辞

本研究の一部は、科研費26289125及び15K06111, JST マッチングプランナー「探索試験」(MP27215668071)の援助で行われた。記して謝意を示す。

参考文献

- 1) J. Suehiro, R. Yatsunami, R. Hamada and M. Hara: Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **32** (1999) 2814
- 2) R. Hamada, J. Suehiro, M. Nakano, T. Kikutani and K. Konishi: Development of rapid oral bacteria detection apparatus based on dielectrophoretic impedance measurement method. *IET Nanobiotechnol.*, **5** (2011) 25
- 3) M. Nakano, Z. Ding, H. Kasahara and J. Suehiro: Rapid microbead-based DNA detection using dielectrophoresis and impedance measurement. *Europhys. Lett.*, **108** (2014) 28003
- 4) 中野道彦, 丁 震昊, 笠原弘道, 尾原稜司, 末廣純也: DNA結合に伴う誘電体微粒子の誘電泳動特性変化の特性. *静電気学会誌*, **40** (2016) 20
- 5) D. N. Fredrickes and D. A. Relman: Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.*, **29** (1999) 475
- 6) J. Chao, D. Zhu, Y. Zhang, L. Wang and C. Fan: DNA nanotechnology-enabled biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **76** (2016) 68-79
- 7) X. Mao, Y. Ma, A. Zhang, L. Zhang, L. Zeng and G. Liu: Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Anal. Chem.*, **81** (2009) 1660-1668
- 8) S. Hongo, J. Okada, K. Hashimoto, K. Tsuji, M. Nikaido and N. Gemma: Development of an automated DNA detection system using an electrochemical DNA chip technology. *SICE JCMSI*, **1** (2008) 265-270
- 9) 細菌カウンタ, パナソニックヘルスケア株式会社, <http://www.panasonic-healthcare.com/jp/dental/bacterial-counter>
- 10) F. Postollec, H. Falentin, S. Pavan, J. Combrisson and D. Sohler: Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, **28** (2011) 848
- 11) GeneFields-Meat, 倉敷紡績株式会社, <http://www.kurabo.co.jp/bio/product/products.php?M=D&PID=171>
- 12) T. Yoshida, T. Nomura, N. Shinoda, T. Kusama, K. Kadowaki and K. Sugiura: Development of PCR Primers for the Detection of Porcine DNA in Feed Using mtATP6 as the Target Sequence. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **50** (2009) 89
- 13) Sutarno, J. M. Cummins, J. Greeff and A. J. Lymbery: Mitochondrial DNA polymorphisms and fertility in beef. *Theriogenology*, **57** (2002) 1603
- 14) 試料分析基準 第16章動物由来DNA (2008-4-1・19消安第14729号)
- 15) Z. Ding, H. Kasahara, M. Nakano and J. Suehiro: Bacterial detection based on polymerase chain reaction and microbead dielectrophoresis characteristics. *IET Nanobiotechnol.*, accepted, DOI: 10.1049/iet-nbt.2016.0186