

# Aptamer を用いた DNA 抽出を介さない微生物検出技術の開発

長岡工業高等専門学校 学生会員 ○ 柳澤茉依      長岡工業高等専門学校 正会員 川上周司  
長岡技術科学大学 正会員 幡本将史      岐阜工業高等専門学校 正会員 角野晴彦

## 1. はじめに

従来、微生物の検出・定量には、培養法や real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) 法が用いられてきた。前者の技術は、結果を得るのに数日を必要とし、また微生物のなかには難培養な微生物が存在することから、普遍的な検出・定量技術とは言い難い。後者の方法も DNA の抽出に専用の装置やコンタミネーションを防ぐクリーンな実験室の施設を必要とすることから、屋外等の現場レベルでの作業は困難である。さらに定量結果に DNA の抽出効率、標的遺伝子数、PCR 増幅効率などの様々なバイアスが伴うことも課題となる。そのため、DNA を抽出することなく、短時間で容易に微生物を検出・定量する技術が求められている。

本研究では、標的分子に特異的に結合する DNA aptamer と real-time PCR 法を組み合わせることで DNA 抽出を介さずに試料中の任意の細菌数を定量できないかと考えた。aptamer は一本鎖の DNA もしくは RNA で、配列に依存して安定な固有の立体構造を形成することで特定の標的に強固に結合する性質を持つ。aptamer を細菌の系統分類に基づいて作成し、それを定量することができれば、任意の系統分類で細菌を検出することが可能となるはずである。そこで、本研究では、特定の細菌にのみ結合する aptamer を使い、標的の細菌と非標的の細菌とを任意の割合で混合し、段階希釈により存在数の異なる細菌サンプルを作成し、それらに結合した aptamer の数を real-time PCR 法で計測した。これら結果から、DNA 抽出を介さない微生物検出・定量技術の実現可能性について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 標的細菌と DNA aptamer

標的細菌は、*Escherichia coli* K 12 株 NBRC3033 (以降 *E.coli* とする) を選定した。*E.coli* は LB 培地で培養後、対数増殖期に回収し、OD 値からおおよその細菌数を算定した。それらを段階希釈し、 $10^8$  cell/mL から  $10^5$  cell/mL まで計 4 つのサンプルを作成した。また、DNA aptamer は *E.coli* を検出する P12-55 aptamer の配列情報を既報<sup>1)</sup>から参照し、DNA 合成会社に依頼して作成したものを用いた。さらに、P12-55 aptamer と結合しにくい細菌として *Klebsiella aerogenes* NBRC 15034 (以降 *K.aerogenes* とする) を選定し、*E.coli* 同様  $10^8$  cell/mL から  $10^5$  cell/mL まで計 4 つのサンプルを作成した。*K.aerogenes* と *E.coli* を混合した系も作成し純菌系と結果比較に使用した。

### 2.2 aptamer との結合と分離

標的細菌と aptamer とを結合させ、結合した aptamer のみを分離、回収する操作を行った。実験は Yilmaz *et al.*<sup>2)</sup>の方法を参考に以下の通り行った。低吸着チューブに細菌を 398  $\mu$ L と 10 pmol/ $\mu$ L の P12-55 aptamer を 2  $\mu$ L 入れ、室温で 15 分間インキュベートしたのち、8000 rpm で 5 分間の遠心を行った。結合力の弱い aptamer を除去するため、上澄み液を捨て、1 $\times$ PBS を 700  $\mu$ L 入れ再懸濁後、8000 rpm で 5 分間の遠心を行った。この 1 $\times$ PBS による洗浄は 2 回繰り返した。その後、加熱によって水素結合を切断し、標的細菌と aptamer を分離させるため 20 mM NaOH を 400  $\mu$ L 入れてピペティングし、75 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 3 分間加熱した。その後、溶液を中和させるために 6 mol/L HCl を 4  $\mu$  添加し、8000 rpm で 15 分間遠心した。上澄み液を 10 kDa cut-off tube (Millipore 社製) に回収し、14000 rpm で 30 分間遠心した。残留物を処理するため、RNase-free Water を 100  $\mu$ L 入れ、14000 rpm で 15 分間遠心した。フィルターに残った上澄み液を回収するため、RNase-free Water を 10  $\mu$ L 加え、10 分放置したのち、新しいチューブにフィルターを逆さにセットし、8000 rpm で 3 分間遠心した。これにより回収した上澄み液を 95 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 3 分加熱後、保冷剤と冷却台を用いて 1 分間冷却しこの回収液を次の real-time PCR による aptamer の定量に用いた。

## 2.3 Real-time PCR

2.2 より得られた aptamer が浮遊する上澄み液を template として real-time PCR を行った。PCR に用いたプライマーは既報<sup>1)</sup>の BRf-r プライマーペアを用いた。PCR 条件は、95°Cで 15 sec, 65°Cで 30 sec の 2stepPCR, 40 cycle とした。

## 3. 結果および考察

段階希釈した *E.coli* に対し P12-55 aptamer を結合させ、熱変性によって剥がされた aptamer の数を real-time PCR で計測した結果を Fig. 1(A) に示す。結果、すべてのサンプルから aptamer が検出された。増幅曲線の立ち上がりは  $10^8$  cell/mL が最も早く、段階希釈に応じてその立ち上がりは遅くなっていく傾向が見られた。このことから、初期菌体量と aptamer の量は相関性が見られ、細菌数を定量できる可能性を示すものだと判断できた。しかしながら、初期菌体量と PCR 増幅の立ち上がりにおけるサイクル数 (Ct 値) の両者間には、通常の遺伝子定量時における検量線サンプルで見られるような均等な間隔での立ち上がりにはならなかった。これは細菌の段階希釈の作業中において細胞固定をしないため、実験過程の中でも細菌の増殖が見られたことなどが要因と考えられる。

段階希釈した *K.aerogenes* に対し P12-55 aptamer を結合させた結果を Fig. 1(B) に示す。*E.coli* に結合した aptamer の検出結果と比較して、*K.aerogenes* ではほとんど aptamer が検出されていないことがわかる。

段階希釈した *E.coli* と *K.aerogenes* を混合した系に対し P12-55 aptamer を結合させた結果を Fig. 1(C) に示す。結果、*E.coli* 単体に aptamer を結合させた場合と同様に全てのサンプルから aptamer が検出された。また、 $10^8$  cell/mL が最も立ち上がりが早くなる傾向は同様であった。しかしながら、初期菌体量が  $10^6$  cell/mL より少ないサンプルに関しては aptamer の量に相関性が見られなかった。さらに Fig. 1(A)と比較して、2種の細菌を混合した系は増幅曲線の立ち上がりが遅い傾向にあることがわかった。

## 4. まとめ

本研究は、特定の細菌にのみ結合する aptamer の数を real-time PCR 法で計測することで DNA 抽出を用いず、短時間で容易に細菌を定量する技術の実現可能性について検討した。その結果、細菌数が1種の場合は定量できる可能性を示す結果を得ることができた。しかし、他の細菌と混合した場合は、検出は可能であるが、定量性に関しては得られる結果の再現性が低かった。今後は実験方法の検討とともに、2種以上の細菌を混合した系や、培養法との定量結果の比較などの検討を行う必要がある。

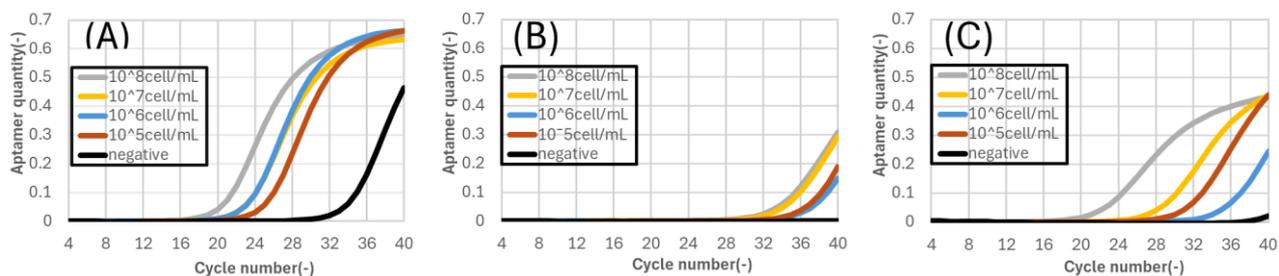


Fig.1 (A) *E.coli* のみに結合させた場合の aptamer 数 (B) *K.aerogenes* のみに結合させた場合の aptamer 数 (C) *E.coli* と *K.aerogenes* を混合させた系に結合させた場合の aptamer 数

## 謝辞

この研究の一部は、(公財)天野工業技術研究所研究助成金、科学研究費基盤研究(24K07743, 24K07742, 24H00333)からのご支援により遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Marton *et al.*, *PLoS One*, 11(4) : e0153637(2016)
- 2) Yilmaz *et al.*, *Journal of Biotechnology*, Vol.354, Pages 10-20, (2022)