

2H14-5 ATP 増幅反応による高感度細菌検出法の開発

○松野 忠宏¹, 野田 健一¹, 坂田 稔¹, 常田 明彦¹, 麻見 安雄², 黒田 章夫³
(¹株式会社物産ナノテク研究所, ²広島産科研, ³広島大・先端・分子生命)

【目的】アデノシン三リン酸 (ATP) は生命活動を担う重要なエネルギー物質であり、微生物中にもATPが存在している。近年、このATPを指標として、細菌内ATPをルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による発光によって検出する技術 (ATP 法) が衛生管理などに利用されている。しかしながら、細菌あたりのATP量が極微量のため、ATP法による微生物数の検出感度には限界があった。今回、連鎖的ATP増幅反応を応用することによって、ATP検出感度の向上及び迅速化を行うとともに、微生物検査法への適用について検討したので報告する。【方法・結果】従来のATP法にATP増幅反応系を導入することで検出感度を大幅に向上させることが可能であるが、増幅反応に要する時間や操作の複雑さの点で問題であった。そこで、より迅速かつ簡便な手法としてATP増幅と発光反応を同一反応系で行う手法を開発した。この技術を用いることで、およそ20 fmol/L (2.0 amol/assay) のATPを10分程度の反応時間で検出することに成功した。また、大腸菌を用いて検証を行ったところ、検体中1個レベルの大腸菌を検出することが可能であることがわかり、この反応系が細菌検査システムに対して適用可能であることが示された。

Development of high sensitive bacteria detection method using ATP amplification

○Tadahiro MATSUNO¹, Kenich NODA¹, Minoru SAKATA¹, Akihiko TOKIDA¹, Yasuo ASAMI², Akio KURODA³
(¹Bussan Nanotech Research Institute Inc., ²Hiroshima Pref. Inst. of Ind. Sci. Tech., ³Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words ATP amplification, ATP assay, bacteria detection

2H15-2 ATP増幅反応を利用した微量ATPの発色検出技術

○麻見 安雄¹, 松野 忠宏², 坂田 稔², 常田 明彦², 黒田 章夫³
(¹広島産科研, ²(株) 物産ナノテク研究所, ³広島大・先端・分子生命)

【目的】ATP (アデノシン三リン酸) は、全ての生命体に存在するエネルギー物質である。簡便で高感度なATP検出方法としてルシフェリン・ルシフェラーゼによる生物発光法が用いられている。しかしながらこの方法は発光によって生じる光子を検出しているので高価な光学装置を必要とし、機器の小型化・単純化に限界がある。一方、発色法はコストが安く特殊な機材が必要ではないので様々な場所で利用することが可能である。これまでも発色によるATP検出法は存在したが、検出感度は非常に低く反応溶液中でおよそ300pmolが限界であった。そこで当研究室において開発したポリリン酸によるATP増幅反応を利用して、より高感度にATPの検出が出来る発色検出技術の開発を行った。【方法及び結果】まずグルコースキナーゼによって消費されたATPをポリリン酸とポリリン酸キナーゼでATPの再生を行うことにより色原体の蓄積量を増加させる事とした (ATPサイクリング法)。その結果、検出感度は約1,000倍向上し、およそ300fmolのATPが検出できた。さらにATP増幅反応と組み合わせることによってさらに約1,000倍向上し、反応溶液中でおよそ300amolのATPが検出可能となった (ATP増幅-サイクリング法)。最終的に従来法と比較して約100万倍の高感度化を達成し、視覚的に微量のATPを検出することができた。

Development of a viable optical detection of a low level ATP by means of ATP amplification reaction

○Yasuo ASAMI¹, Tadahiro MATSUNO², Minoru SAKATA², Akihiko TOKIDA², Akio KURODA³
(¹Hiroshima Pref. Inst. of Ind. Sci. Tech., ²Bussan Nanotech Research Institute Inc., ³Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words ATP, microorganism, polyphosphate kinase, detection

2H15-1 ATP 増幅反応とマイクロ流体チップを用いた細菌検査システム

○小暮 智也¹, 松野 忠宏¹, 川田 栄二¹, 坂田 稔¹, 常田 明彦¹, 黒田 章夫²
(¹株式会社物産ナノテク研究所, ²広島大院・先端・分子生命)

【目的】近年、食品検査や臨床検査において培養法に代わる簡便迅速な微生物検査が必要とされている。これまでに様々な検査方法が開発されており、その中のひとつにATP法がある。ATP法は細菌内ATPを発光させることで細菌数を測定する方法であり、測定時間は短く約1時間である。しかし、細菌あたりのATP量は微量なため1個の細菌は検出できない。また、操作手順が多く菌体外のATPが混入する危険性も高い。これらの問題点を解決するために、ATP増幅反応とマイクロ流体チップを用いた細菌検査システムを開発した。【方法】大腸菌を用い、菌体外ATP除去、菌体内ATP溶出、ATP増幅発光をマイクロ流体チップ内で連続的に行った。マイクロ流体チップ内には反応に必要な試薬を固定化または封入しておく。細菌検査手順は、(1) 検体液をマイクロ流体チップに注入 (2) マイクロ流体チップを測定器にセット (3) 測定器のスタートボタンを押す、だけである。測定器はプログラム可能な圧力制御機能と光検出機能を有しており、自動的な細菌検査が可能である。【結果】本システムを使うことで、5分以内に大腸菌1個の検出感度で細菌測定することができた。今後は細菌同定も可能な細菌検査システムの開発を目指す。

Bacteria detection system using ATP amplification technique with a microfluidic device

○Tomonari KOGURE¹, Tadahiro MATSUNO¹, Eiji KAWATA¹, Minoru SAKATA¹, Akihiko TOKIDA¹, Akio KURODA²
(¹Bussan Nanotech Research Institute Inc., ²Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words ATP amplification, bacteria counting, microfluidic device

2H15-3 細胞膜チップデバイスの構築と特性解析

○米谷 智, 村橋 瑞穂, 高村 禪, 民谷 栄一
(北陸先端院・材料)

【目的】平面脂質膜は細胞膜を解析するための非常に有効な細胞膜モデルとして研究が行われており、生命現象を解き明かす上で、脂質膜における化学反応を解析することは大変重要なことである。しかし、脂質膜モデルの形成方法は、人為的な操作や形成方法によって膜の安定性を大きく左右する問題がある。そこで本研究では、微細加工技術を用いて実験系を構築することにより、安定した脂質膜の作製、膜タンパク質の融合確率の増大を目的とした。【実験と結果】Auをスライドガラス上に蒸着させ、その上にシリコンポリマーの一種であるPDMSを反応容器の材料としてアレイ型デバイスを作製し、微小孔基板の材料はフッ素系樹脂を用いて開孔角 90 度、口径 200 μ m とした。電気測定にはパッチクランプ用アンプ解析装置 (Axopatch200B, Axon Instruments) を用い、銀/塩化銀, Au蒸着されたスライドガラスを電極として膜特性を観察した。また、本実験で用いた脂質はphosphatidylcholine (PC) 20 mg/ml in decane, 反応容器に満たした溶液は100 mM KClaqとした。上記の実験系によって膜特性を観測したところ、膜キャパシタンスは約19~30pF, 膜抵抗は数G Ω , 膜持続時間は約15~30分程度の安定した脂質膜を形成させることができた。次に、黒膜実験チャンバーにチャネル形成ペプチド溶液である Gramicidin A 0.1mg/ml in Methanolを添加し反応を観察すると、Gramicidin A特有の矩形波を測定することができた。本実験系によって、安定した脂質膜の形成を確認し、さらに反応容器の微少化、複数の脂質膜の電気測定が可能となり、より膜タンパク質の融合が容易となった。

Development and characterization of cell membrane chip device

○Satoshi KOMETANI, Mizuho MURAHASHI, Yuzuru TAKAMURA, Eiichi TAMIYA
(Sch. Mat. Sci., JAIST)

Key words lipid bilayer membrane, chip device