遠心熱対流場の集積検討と薬剤耐性遺伝子の迅速検出

An Integrated Device of Rapid PCR by Centrifugal Thermal Convection

阪大院工 [1]、産総研・フォトバイオ [2]
○ (M2)後 早希子 [1]、齋藤 真人 [1,2]、Wilfred Espulgar [1]、民谷 栄一 [1,2]
Graduate School of Engineering, Osaka Univ. [1], AIST PhotoBIO-OIL [2]
°Sakiko Ushiro[1], Masato Saito[1,2], Wilfred Espulgar[1], Eiichi Tamiya[1,2]
E-mail: saitomasato@ap.eng.osaka-u.ac.jp

薬剤耐性菌について、抗菌薬乱用による新たな薬剤耐性の獲得や、院内アウトブレイクなど世界的に懸念されていて、これらを防ぐために医療現場での迅速かつ適切な対応が重要である。また、薬剤耐性を示す遺伝子は 80 種類以上存在するため、より対応を難しくしている。一方、医療はじめ様々な分野で利用されている遺伝子検査は、薬剤耐性菌の特定に有効であるが、診断時間が長い・機器が大型・試薬調製が煩雑など現場利用への展開には課題があった。これに対し我々は、遠心によって発生した熱対流を利用し、PCR サイクルの熱交換速度を向上させた遠心促進熱対流 PCR 法を開発し、15 分以内で薬剤耐性遺伝子（IMP-6）の検出に成功してきた[1][2]。本研究ではさらに薬剤耐性遺伝子の同時多項目検知を可能にするため、微小熱反応場の集積化の検討と遠心促進熱対流 PCR による迅速 DNA 増幅検知を行った。遠心熱対流シミュレーション解析により、熱対流生成可能な環状流路・熱源構造を検討した（Fig.1）。流路構造は同一円周上に多く集積するため縦長形状で、流路間距離約 3.2mm において、各流路に同一方向の流れを生成できることが確かめられた。PDMS チップと温調可能なヒーターデバイス(Fig.2)を作製し、回転温調中の環状流路内の溶液挙動をハイスピードカメラで観察したところ、350rpm では 9 秒で周回し、また回転数変化に伴う流速変化も確認できた。これにより回転速度によるアニーリング、伸長時間の最適化が可能である。 217~21.7fg/chip の IMP-6 産生細菌 Total DNA を指標にチップ PCR（15 分間）を行ったところ、反応前後での蛍光増幅が見れらた。また、159 bp の特異的増幅（Fig.3 の電気泳動アッセイ結果）を確認できたことから、集積化可能な流路構造、熱源を用いての薬剤耐性遺伝子の増幅検出に達成した。他の薬剤耐性遺伝子検知についても報告する予定である。多種の薬剤耐性遺伝子同時検知への展開が期待できる。

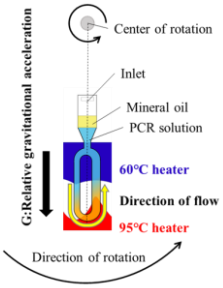

Fig.1 The structure of channels and heaters

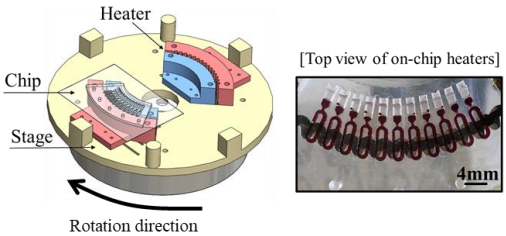

Fig.2 The overview of device

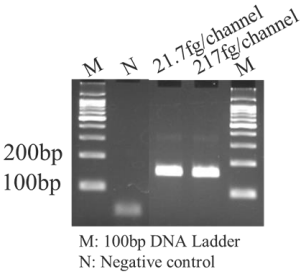

Fig.3 The gel electrophoresis

[1] M. Saito, et al., Anal. Chem., 2017, 89(23), pp12797-12804,[2] M. Saito et al, Paper presented at µTAS 2017, 1244-1245