

Title	CRISPR/Casによるシグナル増幅を利用した折り紙イムノアッセイデバイス
Sub Title	Origami paper-based immunoassay device with CRISPR/Cas12a signal amplification
Author	Citterio, Daniel
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	イムノアッセイは、生体の免疫反応（抗原抗体反応）を利用した分析手法であり、医療をはじめ様々な分野で、微量物質の測定に汎用されている。近年、標的物質をより迅速・簡便に検出するため、イムノアッセイを紙基板上で行う方法が開発されており、注目を集めている。しかし、その検出感度は十分なものではなく、臨床検査への応用に向けて感度の向上が課題である。 そこで、迅速・簡便・高感度なイムノアッセイの実現を志向し、核酸切断酵素CRISPR/Cas12aを利用した紙基板分析デバイスを開発した。本デバイスは折り紙型であり、サンプルの滴下後紙を複数回折り合わせることで、全ての反応を紙基板上で行う。各パッドには必要な試薬が予め保存されており、分析時に追加で試薬を準備する必要はなく、蛍光強度の測定により標的分子の定量を行う。また、検出抗体は、アビジン-ビオチン結合により複数のActivator DNAで標識されており、Cas12aのトランス切断活性と同様にシグナル増幅をもたらす。 本研究では、検出対象として基礎評価にはヒトIgGを、臨床への応用可能性の実証にはB型肝炎ウイルス表面抗原（HBs抗原）を使用した。開発したデバイスは、ヒトIgGとHBs抗原の両方を高い感度で検出することに成功した。特に、HBs抗原の検出限界は12pg/mLと算出され、これは米国食品医薬品局（FDA）の推奨するHBs抗原検査の検出能力（500pg/mL以下）を十分に満たし、さらに市販のHBs抗原ELISAキット（検出限界200pg/mL）よりも高い感度であった。また、HBs抗原以外のタンパク質には交差反応しないこと、28日間の冷凍保存後も80%以上のシグナル強度を維持できることが確認された。さらに、豚血漿中、豚全血中にスパイクしたHBs抗原の検出にも成功し、これらのHBs抗原濃度に対する蛍光応答はスマートフォンによる画像の撮影でも確認された。総じて本デバイスは、POCTに適した分析プラットフォームであり、HBs抗原の臨床検査への応用可能性が示唆された。 Immunoassays, which are based on antigen-antibody interactions, are among the commonly used approaches to determine analytical target compounds at low concentration levels. In recent years, immunoassays on paper platforms have been developed to detect target substances more quickly and easily, and therefore have been attracting attention as a simple testing method. However, the improvement of sensitivity still remains an issue for clinical applications. Here, we have developed a paper-based analytical device for simple, rapid, and highly sensitive immunoassays utilizing the CRISPR/Cas12a nuclease. This device is an origami-type paper-based platform with fluorescence signal readout, on which all required assay reagents are pre-deposited. The reaction is performed by folding the paper after sample application, with no additional reagents needed. In addition, the detection antibody is labeled with multiple activator DNA through streptavidin-biotin bonds, which together with the highly efficient catalytic activity of CRISPR/Cas12a leads to signal amplification. This dual signal amplification system is expected to improve the sensitivity of paper-based immunoassays. As detection targets in this work, human IgG for basic evaluation and hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) for clinical applicability demonstration were used. The developed device successfully detected both human IgG and HBsAg with high sensitivity. In particular, the limit of detection (LOD) for HBsAg was estimated to be 12 pg/mL, satisfying the FDA (Food and Drug Administration) recommendation for HBsAg assays (500 pg/mL) and represents over 10-fold higher sensitivity compared to commercially available HBsAg ELISA kits (LOD: 200pg/mL). In addition, negligible cross-reactivity against different types of proteins was confirmed. The stability test of the device showed signal intensities maintained at more than 80% after 28 day-storage at -20°C. Furthermore, the developed device successfully detected HBsAg spiked into porcine blood plasma and whole blood with LODs of 26 pg/mL and 210 pg/mL, respectively. The fluorescence response towards different HBsAg concentrations was also confirmed by capturing images with a smartphone, demonstrating potential applicability of the device for clinical HBsAg tests at the point of care.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230215

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 学事振興資金（個人研究） 研究成果実績報告書

研究代表者	所属	理工学部	職名	教授	補助額	500千円 (特B)
	氏名	チッテリオ ダニエル	氏名(英語)	Citterio, Daniel		
研究課題（日本語）						
CRISPR/Casによるシグナル増幅を利用した折り紙イムノアッセイデバイス						
研究課題（英訳）						
Origami Paper-Based Immunoassay Device with CRISPR/Cas12a Signal Amplification						
1. 研究成果実績の概要						
イムノアッセイは、生体の免疫反応（抗原抗体反応）を利用した分析手法であり、医療をはじめ様々な分野で、微量物質の測定に汎用されている。近年、標的物質をより迅速・簡便に検出するため、イムノアッセイを紙基板上で行う方法が開発されており、注目を集めている。しかし、その検出感度は十分なものではなく、臨床検査への応用に向けて感度の向上が課題である。 そこで、迅速・簡便・高感度なイムノアッセイの実現を志向し、核酸切断酵素CRISPR/Cas12aを利用した紙基板分析デバイスを開発した。本デバイスは折り紙型であり、サンプルの滴下後紙を複数回折り合わせることで、全ての反応を紙基板上で行う。各パッドには必要な試薬が予め保存されており、分析時に追加で試薬を準備する必要はなく、蛍光強度の測定により標的分子の定量を行う。また、検出抗体は、アビジン-ビオチン結合により複数のActivator DNAで標識されており、Cas12aのトランス切断活性と同様にシグナル増幅をもたらす。 本研究では、検出対象として基礎評価にはヒトIgGを、臨床への応用可能性の実証にはB型肝炎ウイルス表面抗原（HBs抗原）を使用した。開発したデバイスは、ヒトIgGとHBs抗原の両方を高い感度で検出することに成功した。特に、HBs抗原の検出限界は12 pg/mLと算出され、これは米国食品医薬品局（FDA）の推奨するHBs抗原検査の検出能力（500 pg/mL以下）を十分に満たし、さらに市販のHBs抗原ELISAキット（検出限界200 pg/mL）よりも高い感度であった。また、HBs抗原以外のタンパク質には交差反応しないこと、28日間の冷凍保存後も80%以上のシグナル強度を維持できることが確認された。さらに、豚血漿中、豚全血中にスパイクしたHBs抗原の検出にも成功し、これらのHBs抗原濃度に対する蛍光応答はスマートフォンによる画像の撮影でも確認された。総じて本デバイスは、POCTに適した分析プラットフォームであり、HBs抗原の臨床検査への応用可能性が示唆された。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
Immunoassays, which are based on antigen-antibody interactions, are among the commonly used approaches to determine analytical target compounds at low concentration levels. In recent years, immunoassays on paper platforms have been developed to detect target substances more quickly and easily, and therefore have been attracting attention as a simple testing method. However, the improvement of sensitivity still remains an issue for clinical applications. Here, we have developed a paper-based analytical device for simple, rapid, and highly sensitive immunoassays utilizing the CRISPR/Cas12a nuclease. This device is an origami-type paper-based platform with fluorescence signal readout, on which all required assay reagents are pre-deposited. The reaction is performed by folding the paper after sample application, with no additional reagents needed. In addition, the detection antibody is labeled with multiple activator DNA through streptavidin-biotin bonds, which together with the highly efficient catalytic activity of CRISPR/Cas12a leads to signal amplification. This dual signal amplification system is expected to improve the sensitivity of paper-based immunoassays. As detection targets in this work, human IgG for basic evaluation and hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) for clinical applicability demonstration were used. The developed device successfully detected both human IgG and HBsAg with high sensitivity. In particular, the limit of detection (LOD) for HBsAg was estimated to be 12 pg/mL, satisfying the FDA (Food and Drug Administration) recommendation for HBsAg assays (500 pg/mL) and represents over 10-fold higher sensitivity compared to commercially available HBsAg ELISA kits (LOD: 200 pg/mL). In addition, negligible cross-reactivity against different types of proteins was confirmed. The stability test of the device showed signal intensities maintained at more than 80% after 28 day-storage at -20℃. Furthermore, the developed device successfully detected HBsAg spiked into porcine blood plasma and whole blood with LODs of 26 pg/mL and 210 pg/mL, respectively. The fluorescence response towards different HBsAg concentrations was also confirmed by capturing images with a smartphone, demonstrating potential applicability of the device for clinical HBsAg tests at the point of care.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Daniel Citterio, Hikaru Suzuki, Guodong Tong, Yohei Tanifuji, Yuki Hiruta	Paper-Based Analytical Devices with CRISPR/Cas Signal Amplification(Invited oral presentation)	Pittcon Conference, San Diego, USA	February 2024			

Hikaru Suzuki, Guodong Tong, Yuki Hiruta, Daniel Citterio	Origami Paper-Based Immunoassay Device with CRISPR/Cas12a Signal Amplification(Oral presentation)	The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2023), Katowice, Poland	October 2023
鈴木 輝, 童 国棟, 蛭田 勇樹, チッテ リオ ダニエル	CRISPR/Cas12aによるシグナル増 幅を利用した折り紙イムノアッセイ デバイス (ポスター発表)	日本分析化学会第72年会, 熊本	2023年9月
Hikaru Suzuki, Guodong Tong, Yuki Hiruta, Daniel Citterio	Origami Paper-Based Immunoassay Device with CRISPR/Cas12a Signal Amplification(Poster presentation)	RSC Tokyo International Conference 2023, Chiba, Japan	September 2023