

1243 DNAプローブ固定化磁性細菌粒子による病原性微生物*Legionella pneumophila*の特異的検出

(東京農工大学・工・生命工、†国立感染症研究所・寄生動物部)○加藤大介、田中剛、竹山春子、八木田健司†、遠藤琢郎†、松永 是

【目的】 病原性微生物*Legionella pneumophila*は、呼吸器系感染の原因細菌であり、空調用冷却水や給湯水からの感染、あるいは噴水によるエアロゾルの吸入による感染が問題となっている。現在*L. pneumophila*の検出は選択培地によるものが殆どであるが、検出までの時間が1～2週間かかることから迅速な検出法が求められている。そこで本研究ではDNAプローブ固定化磁性細菌粒子を用いた遺伝子レベルでの*L. pneumophila*の特異的検出を行った。

【方法及び結果】 ストレプトアビジン固定化磁性細菌粒子(SA-BMPs)の作製は、架橋剤グルタルアルデヒドを用いて行った。この粒子に対して*L. pneumophila*のMicrophage infectivity potentiator(*mip*)遺伝子5'末端に特異的なビオチン標識DNAプローブを反応させプローブ標識磁性細菌粒子を作製した。検出する*mip*遺伝子断片(699bp)は、PCRによって増幅した。このPCR産物にプローブ標識磁性細菌粒子を混合し、55°Cでハイブリダイゼーションを行った。磁気回収・洗浄後、*mip*遺伝子5'末端に特異的なTIRTC標識プローブを添加し、再びハイブリダイゼーションを行った。このサンプルを蛍光顕微鏡観察した結果、蛍光発光が確認された。またコントロールのDNA断片を用いて実験を行った場合は蛍光が観察されず、特異的検出が可能であることが示された。

Specific detection of enteropathogenic bacterium *Legionella pneumophila* using DNA probe immobilized on bacterial magnetic particles.

○Daisuke Kato, Tsuyoshi Tanaka, Haruko Takeyama, Kenji Yagita, Takuro Endo, Tadashi Matsunaga (Dept. of Biotechnol., Tokyo Univ. of Agric. & Technol.; Dept. of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases)

【Key Words】 *Legionella pneumophila*, Bacterial magnetic particles, Specific detection

1244 プロテインA-磁性細菌粒子複合体を用いた免疫微量分析法の確立

(東京農工大・工・生命工、†TDK秋田研究所)○田中 剛、佐藤りか†、神谷晋司†、松永 是

【目的】 磁性細菌*Magnetospirillum* sp. AMB-1から分離される磁性細菌粒子はリン脂質二重膜で覆われており、鉄輸送膜タンパク質MagAが局在することが明らかになっている。MagAの遺伝子配列を基に融合遺伝子を作製し、外来タンパク質を磁性細菌粒子上でディスプレイすることが可能となっている。本研究では、プロテインAをディスプレイした磁性細菌粒子の免疫測定への利用性の確認、さらに微量分析が可能な測定システムへの適応を目的とした。

【方法及び結果】 プロテインAとMagAの融合遺伝子を含むプラスミドpRZMを接合伝達法により磁性細菌*Magnetospirillum* sp. AMB-1内に導入した。形質転換体を7日間培養し、集菌後、フレンチプレスにより菌体破碎を行い、プロテインA-磁性細菌粒子複合体の抽出を行った。磁性細菌粒子上のプロテインAの活性は、アルカリホスファターゼ(ALP)標識抗体の結合の有無を発光により確認することにより行った。モデル抗原としてIgG、磁性細菌粒子上には抗IgG抗体、二次抗体にはALP-抗IgG抗体を用い、サンドイッチイムノアッセイにより測定を行った。溶液の攪拌・磁気回収・洗浄等の一連の操作は、マイクロタイタープレート上で行った。その結果、1 pg/mlの濃度まで検出が可能であることが示唆され、高感度測定が可能であることが確認された。また、反応容量の微量化について検討を行った結果、20µlの反応容積で免疫測定が可能であることが示唆された。Chemiluminescence enzyme immunoassay using proteinA-bacterial magnetic particle complex for a microtiterplate assay.

○Tsuyoshi Tanaka, Rika Sato, Shinji Kamiya, Tadashi Matsunaga (Dept. of Biotechnol., Tokyo Univ. of Agric. & Technol.; TDK Akita Laboratory Co.)

【Key Words】 bacterial magnetic particle, proteinA, enzyme immunoassay, IgG