

### 3J09-2 Multilayer assembly of dye-linked L-proline dehydrogenase and poly(allylamine)ferrocene by layer-by-layer adsorption method

○ Haitao ZHENG<sup>1</sup>, Yutaka HIROSE<sup>1</sup>, Tomokazu KIMURA<sup>1</sup>, Shin-ichiro SUYE<sup>1</sup>, Teruo HORI<sup>1</sup>, Hideo KATAYAMA<sup>2</sup>, Ryushi KAWAKAMI<sup>3</sup>, Toshihisa OHSHIMA<sup>3</sup>  
<sup>(1)</sup>Fiber Amenity Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ.,  
<sup>(2)</sup>Daikin Environ. Lab., <sup>(3)</sup>Dept. Biol. Sci. Tech., Fac. Eng., Univ. Tokushima)

【Introduction】L-proline is one of health implications in human. The determination of L-proline based on chromatography and spectrometry involve disadvantages such as complicated operation procedures, time-consuming, and high cost. Herein, electrochemical L-proline sensing system based on multilayer assembly of dye-linked L-proline dehydrogenase (L-proDH) from hyperthermophilic archaeon and polymeric mediator is presented.

【Methods & Results】Polymeric mediator (PAA-Fc) was synthesized from poly(allylamine) and ferrocene carboxaldehyde. Multilayer film composed of PAA-Fc and L-proDH was prepared on the electrode by layer-by-layer adsorption. Electrochemical characteristics of the modified electrode were investigated by cyclic voltammometry which not only confirmed the formation of multilayer assembly, but also suggested that efficient electron transfer between electrode and L-proDH was achieved by ferrocene groups. The performance as L-proline sensor has also been investigated.

### Multilayer assembly of dye-linked L-proline dehydrogenase and poly(allylamine)ferrocene by layer-by-layer adsorption method

○ Haitao ZHENG<sup>1</sup>, Yutaka HIROSE<sup>1</sup>, Tomokazu KIMURA<sup>1</sup>, Shin-ichiro SUYE<sup>1</sup>, Teruo HORI<sup>1</sup>, Hideo KATAYAMA<sup>2</sup>, Ryushi KAWAKAMI<sup>3</sup>, Toshihisa OHSHIMA<sup>3</sup>  
<sup>(1)</sup>Fiber Amenity Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., <sup>(2)</sup>Daikin Environ. Lab., <sup>(3)</sup>Dept. Biol. Sci. Tech., Fac. Eng., Univ. Tokushima)

**Key words** Dye-linked L-proline dehydrogenase, polymeric mediator, layer-by-layer

### 3J09-4 簡易アレルギー検出を目指した微量プロテインアッセイによるアレルギー総量の検出

○末 信一郎, 久世 康弘, 徳田 真希, 堀 照夫  
 (福井大院・工)

【目的】現在アレルギーを検出する手法としてELISA法、蛍光法等が用いられている。しかし、これらの方法は個々のアレルギーのみを検出するので、ハウスダスト等の多種類の抗原を含むサンプルから抗原量を評価するには適していない。すでに、演者らは、種々のアレルギーがタンパク質であることに着目し各種アレルギータンパクをdinitrophenyl (DNP) 化し、PVDFメンブレンに吸着させHRP標識抗DNP抗体と反応させ発色させるドットプロット法による視覚的なアレルギー総量評価法について報告し、ハウスダスト中のタンパク量を簡易的にアレルギーの総量として評価した。今回は、定量的な高感度なタンパク検出方法として、本方法のELISA法への適用を検討した。

【実験及び結果】各希釈系列のタンパク試料を塩基性条件下でDNBSによりDNP化した試料を、96穴マイクロプレートに疎水吸着し、スキムミルクでブロッキングした後、HRP標識抗DNP抗体を反応させ、TMB試薬により発色させマイクロプレートリーダーを用いて検出を行った。BSAとダニ粗抽出物について、DNP化プロテインELISA法を行った結果、BSA、ダニ粗抽出物の濃度と655 nmにおける吸光度の間に相関性が見られた。検出限界はBSAが0.1 mg/ml (2.5 ng)、ダニ粗抽出物が1 mg/ml (25 ng) であり、ブラッドフォード法と比較して約 2 オーダー高感度で検出が可能であった。

### Nano-protein ELISA assay for total allergen measurement

○Shin-ichiro SUYE, Yasuhiro KUSE, Maki TOKUDA, Teruo HORI  
 (Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

**Key words** ELISA, allergen, protein

### 3J09-3 超好熱アーキア由来色素依存性L-プロリン脱水素酵素を用いたLegionella属菌検出DNAセンサーの構築

○廣瀬 由鷹<sup>1</sup>, 木村 友和<sup>1</sup>, 鄭 海涛<sup>1</sup>, 末 信一郎<sup>1</sup>, 堀 照夫<sup>1</sup>, 片山 秀夫<sup>2</sup>, 川上 竜巳<sup>3</sup>, 大島 敏久<sup>3</sup>  
<sup>(1)</sup>福井大院・工・ファイバー, <sup>(2)</sup>ダイキン環境研, <sup>(3)</sup>徳島大・工・生物工)

【目的】近年、入浴施設や循環式風呂においてLegionella属菌による被害が大きな社会問題となっている。そこで、本研究では、Legionella属菌がコードするmip領域をTarget DNAとし、これに特異的に結合するように設計したcapture probeと、超好熱アーキア由来の耐熱性酵素で標識したreporter probeを用いることにより、電極上での直接的なサンドイッチハイブリダイゼーションが可能なDNAセンサーの構築を試みた。

【方法及び結果】*L. pneumophila*よりDNAを抽出し、PCR増幅させたmip領域をTarget DNAとした。交互積層法により金電極およびカーボン印刷電極上に高分子化メディエータ、ストレプトアビジンを積層し、Target DNAと、5'末端biotin標識probeと、3'末端耐熱性酵素標識probeをサンドイッチハイブリダイゼーションさせ電極上に固定化したところ、ハイブリッド形成温度条件下でも酵素が失活しないことが示された。酵素反応に基づく酵素-電極間の電流応答が確認され、電流応答より0.1 pmol オーダーでのTarget DNAの検出が可能であった。

### Fabrication of DNA sensor for Legionella sp. detection using dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon

○Yutaka HIROSE<sup>1</sup>, Tomokazu KIMURA<sup>1</sup>, Haitao ZHENG<sup>1</sup>, Shin-ichiro SUYE<sup>1</sup>, Teruo HORI<sup>1</sup>, Hideo KATAYAMA<sup>2</sup>, Ryushi KAWAKAMI<sup>3</sup>, Toshihisa OHSHIMA<sup>3</sup>  
<sup>(1)</sup>Fiber Amenity Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., <sup>(2)</sup>Daikin, Environ. Lab., <sup>(3)</sup>Dept. Biol. Sci. Tech., Fac. Eng., Univ. Tokushima)

**Key words** DNA sensor, dye-linked L-proline dehydrogenase, Sandwich-hybridization, *Legionella pneumophila*

### 3J09-5 GMO 検出のためのマイクロフロー型 PCR チップの開発

○中山 剛<sup>1</sup>, 小林 正昭<sup>1</sup>, 日野 明寛<sup>2</sup>, 森田 資隆<sup>1</sup>, 高村 禪<sup>1</sup>, 民谷 栄一<sup>1</sup>  
<sup>(1)</sup>北陸先端大院・材料, <sup>(2)</sup>独立行政法人・食品総合研究所)

遺伝子組み換え技術により改良された農作物 (GMO) は、その混入率により表示義務が定められ、GMOの検知が必須となっている。特にPCRを用いた検知法が広く利用されているがこのPCRを小型で迅速に行える機器の開発が求められている。そこで本研究ではPCRを数センチ各のチップ上で行い、同時にGMO検知も行えるマイクロフロー型PCRチップの作製を行った。PCRは他の生化学反応と比べて、高温の温度領域で反応がなされる。特にdenaturationは95℃前後と水の沸点領域の境界付近で反応が行われ、溶存気体の析出等と考えられる気泡が発生する。そこで、この気泡の抑制するための流速、流路構造等の条件検討を行い、これらの条件をもとにPDMS (polydimethylsiloxane)を用いたマイクロフロー型PCRチップの設計、作製を行った。

このチップを用いて遺伝子組み換えトウモロコシ MON810 を標的とするTaq Man PCRを行った結果、電気泳動および蛍光によりDNA増幅が確認された。また、流路内でのバッファとPCR溶液との拡散の影響を調べ、これを軽減するために疎水性溶液を用いた送液法についての研究も行ったのでこれらについても報告する予定である。

### Development of continous flow PCR chip for genetically modified organism (GMO) detection

○Tsuyoshi NAKAYAMA<sup>1</sup>, Masaaki KOBAYASHI<sup>1</sup>, Akihiro HINO<sup>2</sup>, Yasutaka MORITA<sup>1</sup>, Yuzuru TAKAMURA<sup>1</sup>, Eiichi TAMIYA<sup>1</sup>  
<sup>(1)</sup>Japan Advanced Institute of Science and Technology, <sup>(2)</sup>National Food Research Institute)

**Key words** GMO, Taq Man PCR