

29-0322 W127-2

生物発光酵素イムノアッセイによるミュータンス連鎖球菌遺伝子の同時検出法の検討

○赤羽 正明¹, 伊藤 克敏¹, 唐沢 浩二¹, 荒川 秀俊¹, 五十嵐 武², 前田 昌子¹ (¹ 昭和大薬,² 昭和大歯)

【目的】当教室ではこれまでに Acetate Kinase (AK) と, Pyruvate Phosphate Dikinase (PPDK) の 2 酵素を用いた生物発光による高感度同時測定法を開発してきた¹⁾。う蝕 (虫歯) には *S. mutans* と *S. sobrinus* の 2 菌種がもっとも深く関与し, さらにそのう蝕能は, 2 菌種が共存することにより促進されることが明らかである。従って, これら 2 菌種の同定及び棲息比率を求めることは临床上重要とされている。本研究では *S. mutans* と *S. sobrinus* の遺伝子を対象とした, PCR 増幅産物の生物発光酵素イムノアッセイ (BL-EIA) による高感度同時検出法を検討した。

【方法】2 菌種の遺伝子に特異的な修飾プライマー 2 組 (*S. mutans* 用; biotin F primer, FITC R primer, *S. sobrinus* 用; biotin F primer, digoxigenin R primer) を用い duplex PCR を行った。得られた増幅産物を希釈し, アビジン固相化マイクロタイタープレート の各ウェルに加え室温で 1 時間放置した。洗浄後 AK 標識抗 FITC-Fab' 抗体溶液, PPDK 標識抗 digoxigenin-Fab' 抗体溶液を各々添加し室温で一時間反応させた。再洗浄後 AK 用発光基質を添加し 37°C で 20 分間反応させた。生じた発光を 5 秒間積算することで固相上の AK 活性を測定し *S. mutans* の遺伝子の検出を行った。次いで PPDK 用発光基質を添加し, 37°C で 20 分間インキュベートした。生じた発光を同様に積算し, 固相上の PPDK 活性を測定し *S. sobrinus* の遺伝子の検出を行った。

【結果】鋳型 DNA 2 ng, PCR 25 cycle で得られた増幅産物を希釈し, エチジウムブロミド染色ゲル電気泳動法と BL-EIA で検出したところ, BL-EIA の方が 70 倍以上高感度に検出することが可能であった。現在, PCR の特異性などを含めた実試料への適用のための諸条件を検討している。

1) K. Ito, *et al.*, *Anal. Sci.*, 2003, **19**, 105