

P505

蛍光性希土類錯体の水溶液中での熱安定性

早稲田・理工 CREST

○佐野浩樹・松本和子

[目的] 我々はこれまでも蛍光性希土類錯体を高感度検出のための蛍光性プローブとして用いる研究を行ってきた^{1),2),3)}。これまでは微量の目的物質を識別するためにより多くの蛍光シグナルを得る目的で BSA や Streptavidin を介した間接染色法を中心に開発してきたが、非特異染色を減らす為にも直接染色法の開発も必要である。今回我々は直接染色を行った蛍光性錯体の水溶液中での安定性、特に DNA 増幅反応時の蛍光性錯体の安定性についてテストを行った。

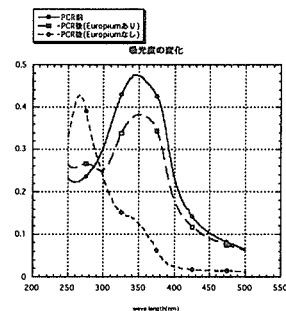
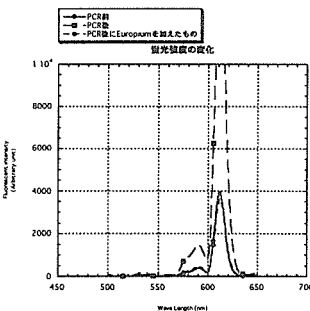
[実験・結果・考察] 蛍光性希土類錯体の配位子に BHHCT、希土類金属イオンとしてユーロピウムを用い、錯中心イオンの存在下、

非存在下において 94℃ 120sec, 55℃ 90sec, 72℃ 120sec の PCR と同様の熱サイクルを 30 サイクル繰り返した。100mM の Tris-HCl Buffer, pH7.5 の条件下で反応を行ったところ中心金属イオンが存在する条件下では錯体自身が安定化され、蛍光強度が著しく増大する。一方、中心金属イオンが存在しない場合には配位子の吸光スペクトルに大きな変化が生じ、再び錯形成が起こりにくくなるという事がわかった。このことは加熱する事によって錯体の安定性が増すということを示しており、水溶液系での錯体による直接標識条件を決める手がかりを得た。我々は今後直接標識法による蛍光顕微鏡上での測定法も計画しているが、蛍光顕微鏡で複数の蛍光希土類錯体の検出に成功していることと併せて多色同時検出法の実現に近づく結果を得ることができた。

1) Jingli Yuan and Kazuko Matsumoto, *Anal. Chem.*, 70, 596 (1998)

2) Kazuko Matsumoto, Jingli Yuan, Guilan Wang, and Hiroko Kimura, *Anal. Biochem.*, 276, 81 (1999)

3) Shinji Sueda, Jingli Yuan, Kazuko Matsumoto, *Bioconj. Chem.* (Accepted)



P506

時間分解蛍光イムノアッセイによる河川水中の 17β-エストラジールの高感度測定

科学技術振興事業団・早大理工 ○真島 桂介・袁 景利・王 桂蘭・松本 和子

[目的] 希土類蛍光錯体は強くシャープな蛍光ピーク、非常に長い蛍光寿命、そして大きなストークスシフトという蛍光特性をもつため、蛍光ラベル剤として時間分解蛍光イムノアッセイ (TR-FIA) や DNA ハイブリダイゼーションアッセイなどに用いられている。本研究では、以前当研究室で合成されたユーロピウム蛍光ラベル剤 4,4'-bis(1",1",1",2",2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexanedion-6"-yl)-chlorosulfo-o-terphenyl (BHHCT)-Eu³⁺を用いて、河川水中に存在する内分泌攪乱物質の一つである 17β-エストラジール (E2) の測定を行った。

[実験] E2 の測定は、まず E2-牛血清アルブミン (BSA) 結合体を合成し、それをプレートにコーティングした。洗浄後、抗 E2 ポリクローナル抗体と E2 標準溶液又はサンプルを等量混合した溶液を入れインキュベーション後、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を加え、更にストレプトアビジン (SA)-BHHCT-Eu³⁺結合体と反応させた後、時間分解蛍光測定を行った。その検量線を Figure.1 に示す。

河川水サンプルの測定のため、神田川の河川水 20 ml を C18 カートリッジを用いて固相抽出して、窒素雰囲気下で乾固後、測定用 buffer で 1 ml に定容したものをサンプルとして使用した。また回収率の測定は、濃縮前のサンプルに既知の標準溶液を添加することにより行った。

[結果] 測定結果は、45 pg/ml の検出限界が得られ、CV (<10 %)、回収率 (90 ~ 110 %) とともに良好な値が得られた。また以上の結果は従来法と比べて同程度の感度であり、本測定法が環境分析に応用できることを示した。

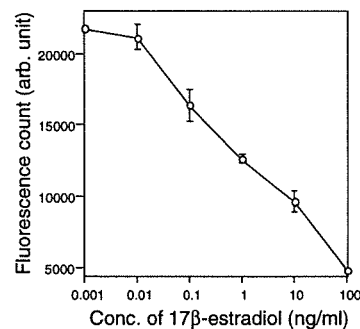


Figure.1 The calibration curve for 17β-estradiol