

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6449309号
(P6449309)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
	GO 1 N 33/532 Z

請求項の数 17 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2016-547006 (P2016-547006)	(73) 特許権者	302037630
(86) (22) 出願日	平成26年10月14日 (2014.10.14)		中国科学院生物物理研究所
(65) 公表番号	特表2017-503180 (P2017-503180A)		中華人民共和国100101北京市朝▲陽
(43) 公表日	平成29年1月26日 (2017.1.26)		▼区大屯路15号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2014/088540	(73) 特許権者	516211341
(87) 国際公開番号	W02015/106588		吉尔生物科技(天津)有限公司
(87) 国際公開日	平成27年7月23日 (2015.7.23)		中華人民共和国300270天津市經濟技
審査請求日	平成28年9月2日 (2016.9.2)		術開発区南崗工業区紡四路輕紡大厦183
(31) 優先権主張番号	201410015610.9		室
(32) 優先日	平成26年1月14日 (2014.1.14)	(74) 代理人	100101454
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		弁理士 山田 卓二
		(74) 代理人	100062144
			弁理士 青山 稜
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

液体サンプルにおける被測定物を検出するためのナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法であって、前記方法は順に以下のステップを含む：

- 1) 磁性ナノ粒子を前記被測定物と特異的に結合できる第一分子とカップリングすることによって調製される検出プローブを提供する；
- 2) 固定化した、前記被測定物と特異的に結合できる第二分子である捕獲プローブを提供する；
- 3) 前記液体サンプルを前記検出プローブと接触させる；
- 4) 前記検出プローブと接触した前記液体サンプルを前記捕獲プローブと接触させる；
- 5) ステップ4)を通った前記捕獲プローブに、水素供与基質と過酸化物を加え、発色反応を行う。

【請求項2】

前記磁性ナノ粒子の粒径は10nmから500nmまでの範囲内にある請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記磁性ナノ粒子はFe₃O₄磁性ナノ粒子又は外層に二価鉄イオン試薬で修飾されているFe₂O₃磁性ナノ粒子である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記被測定物はタンパク質、ポリペプチド又は核酸である請求項1～3のいずれか1項

に記載の方法。

【請求項 5】

前記被測定物はタンパク質であり、且つ前記第一分子と前記第二分子は前記タンパク質に対する特異性抗体である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第一分子と前記第二分子は前記タンパク質に対するモノクローナル抗体である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第一分子と前記磁性ナノ粒子は EDC - NHS 法によりカップリングする請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記水素供与基質は、テトラメチルベンジジン (TMB)、テトラメチルベンジジン硫酸塩 (TMB₂S)、o - フェニレンジアミン (OPD)、ジアミノベンジジン (DAB)、ジアミノベンジジン四塩酸 (DAB - 4HCl)、5 - アミノサリチル酸 (5 - AS)、o - トリジン (OT) 又は 2, 2' - アジノ - ビス (3 - エチルベンズチアゾリン - 6 - スルホン酸) (ABTS) を含む請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記過酸化物は過酸化水素と過酸化尿素を含む請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

液体サンプルにおける被測定物を検出するためのナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出装置であって、

前記液体サンプルを受け入れ、且つ前記液体サンプルにおける不純物をろ過するためのサンプルパッドと、

前記被測定物と特異的に結合できる第一分子とカップリングした磁性ナノ粒子を含む磁性ナノ粒子パッドと、

前記被測定物と特異的に結合できる第二分子を含むテストラインと、

吸水材料から作成され、クロマトグラフィーの動力を提供するための吸収パッドと、

いう順に基板上に設けられている各ものを含む

ことを特徴とするナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出装置。

【請求項 11】

前記磁性ナノ粒子の粒径は 10 nm から 500 nm までの範囲内にある請求項 10 に記載の検出装置。

【請求項 12】

前記磁性ナノ粒子は Fe₃O₄ 磁性ナノ粒子又は外層に二価鉄イオン試薬で修飾されている Fe₂O₃ 磁性ナノ粒子である請求項 10 または 11 に記載の検出装置。

【請求項 13】

前記被測定物はタンパク質、ポリペプチド又は核酸である請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の検出装置。

【請求項 14】

前記被測定物はタンパク質であり、且つ前記第一分子と前記第二分子は前記タンパク質に対する特異性抗体である請求項 10 に記載の検出装置。

【請求項 15】

前記第一分子と前記第二分子は前記タンパク質に対するモノクローナル抗体である請求項 14 に記載の検出装置。

【請求項 16】

前記磁性ナノ粒子は前記第一分子が EDC - NHS 法によりカップリングされたものである請求項 14 又は 15 に記載の検出装置。

【請求項 17】

前記テストラインの後に、さらにコントロールラインが設けられており、前記コントロ

10

20

30

40

50

ールラインには前記第一分子と特異的に結合できる第三分子が固定されている請求項10～16のいずれか1項に記載の検出装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ナノ材料及び生物医学ナノ技術分野に属す。本発明は、磁性ナノ粒子モデル酵素に関し、且つそれが免疫クロマトグラフィー生物分子検出に応用する方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

金コロイド免疫クロマトグラフィー法は20世紀90年代初に発展された金コロイドをマーカーとする検出方法であり、それは免疫親和技術、インプリンティング技術とドット薄層クロマトグラフィー技術を組み合わせたものである。このクロマトグラフィー試験片で検出する時、全てのサンプルはいずれも狭いセルロース膜の持続性反応を経るため、実際に被測定物質に対して濃縮、凝集作用を奏し、反応の感度を高め、反応速度を加速し、全体の操作時間は僅かに3～15分間しか必要としない。その原理は特異的な抗体（又は抗原）を先に硝酸セルロース膜のある領域に固定し、乾燥した硝酸セルロース膜の一端がサンプルに浸入した後、毛細管作用によって、サンプルはこの膜に沿って先へ移動し（クロマトグラフィー）、抗体や抗原が固定されている領域に移動したとき、サンプルにおける対応する抗原は当該抗体と特異的に結合を生じ、免疫金コロイドをマーカーとして用い

10

20

【0003】

磁性ナノ粒子は良好な生物適合性を有し、それはナノ材料に特有な性質も有し（例えば粒径が小さく、比表面積が大きく、カップリング容量が高い）、磁気応答性及び超常磁性も有する。定磁場において集中や定位することができ、交番磁場において電磁波を吸収して発熱し、これらの特性を利用し、磁性ナノ粒子は磁気共鳴造影剤、磁気標的薬物キャリアー、細胞と生物分子分離、生物検知と検出、及び磁気誘導腫瘍熱療法等の生物学分野に広く応用されている。

30

【0004】

近年、磁性免疫クロマトグラフィー（Magnetic Immunochromatographic Test、MICT）は新世代の一人分高速定量検出技術として徐々に発展してきて、それは、伝統的なマーカー（金コロイド、エマルジョン粒子等）の代わりに、超常磁性ナノ粒子で免疫クロマトグラフィーを行い、最後に磁気信号読取装置により、テストラインに結合している磁気粒子の磁場強度を読み取ることによって、測定するサンプルに対して定性定量判断を行う。現在では、国内でできた磁気信号読取装置は未だに発売されておらず、国際的にも少数の国外会社（例えば、アメリカMagnaBioSciences社）しかこの技術を有しないが、高価であるため、磁性免疫クロマトグラフィーの発展と普及が制限された。

40

【0005】

近年、われわれの課題グループの研究により、磁気ナノ粒子は内在的なモデル酵素活性を有し、ペルオキシダーゼの代わりに免疫検出を行えることを見出した（閻錫蘊ら、Nature Nanotechnology、2007）。最近、われわれの課題グループはまた、三つの機能（識別、触媒、磁性）を一体化した新型免疫組化検出試薬を開発し、磁気粒子表面にタンパク分子を包んだ後にも酵素活性を有することを見出した（閻錫蘊ら、Nature Nanotechnology、2012）。このような触媒活性はホースラディッシュペルオキシダーゼと似ており、過酸化水素の存在下で、磁性ナノ粒子は

50

ホースラディッシュペルオキシダーゼの基質を触媒でき、例えば 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を触媒して青い生成物を生じ、ジアミノベンジジン (DAB) を触媒して茶褐色沈殿を生じ、o-フェニレンジアミン (OPD) を触媒してオレンジ色の生成物を生じることができ、触媒活性は pH 値、温度と過酸化水素の濃度に依存し、その触媒メカニズムはピンポン機構に相応しい。さらに、磁性ナノ粒子の触媒活性は粒子粒径が減少するとともに強くなり、粒子の粒径が小さいほど、その触媒活性が高くなることも発見した。磁性粒子の粒径はミクロンレベルになった後、触媒活性はゼロ近くまで低下する。磁性ナノ粒子のモデル酵素活性は、タンパク製剤のホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) に比べて、より多くのメリットを有する。つまり、(1) タンパク酵素は極限 pH と温度において変性しやすくとともに、タンパク酵素によって分解されやすく、それに対して、磁性ナノ粒子は極限条件下で安定である。(2) タンパク酵素の生産コストは高く、磁性ナノ粒子の調製は簡単で、格安である。(3) 磁性ナノ粒子は超常磁性を有するため、磁鉄で回収して繰り返し利用できる。さらに、磁性ナノ粒子の磁気制御可能性に基づいて、モデル酵素としての応用分野を広げた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、従来免疫クロマトグラフィー技術に存在する欠陥を解消することであり、ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法を提供し、その基本原理は金コロイド試験片と同じであり、まず、ある特定の抗原特異的な抗体 A を磁性ナノ粒子とカップリングさせ、磁気粒子パッドを調製し、そしてその他のこの抗原に対する抗体 B を硝酸セルロース膜の特定領域に固定してテストライン (Tライン) を形成し、抗体 A に抗する抗体 (二次抗体) も硝酸セルロース膜の特定領域に固定してコントロールライン (Cライン) を形成し、Tラインに平行し、磁性免疫クロマトグラフィー試験片を組み立てて調製した。乾燥した硝酸セルロース膜の一端をサンプルに浸入した後、毛細管作用により、サンプルはこの膜に沿って先へ移動し、磁気粒子パッドまで移動した時、磁気粒子における抗体 A は抗原と反応し、抗原-抗体 A-磁気粒子の複合物を生成し、続いて毛細管作用により他の抗体 B が固定されている Tライン領域まで移動した時、サンプル中の抗原はこの抗体 B と反応し、最終的に抗体 B-抗原-抗体 A-磁気粒子複合物を生成する；抗原を結合しなかった磁気粒子抗体プローブは続けて先へ移動し、Cラインのところで二次抗体と結合して二次抗体-抗体 A-磁気粒子複合物を形成し、磁気粒子は Tラインと Cラインのあたりに集中する。サンプル中の抗原濃度が比較的に高ければ、Tラインのところで集中している磁気粒子も多く、磁気粒子の色を示す；サンプル中の抗原濃度がとても低い場合であれば、Tラインのところで集中している磁気粒子がとても少なく、磁気粒子の色を示すには十分ではなく、この際に過酸化水素と水素供与基質、例えば TMB、DAB 等を加え、磁気粒子のペルオキシダーゼ触媒作用により大量な沈殿を生成して検出シグナルを強め、低濃度の抗原物質を検出する。この技術は磁性ナノ粒子ペルオキシダーゼ触媒活性及び磁気分離特性を一体化し、クロマトグラフィーの後に過酸化水素と水素供与基質、例えば o-フェニレンジアミン (DAB) 等を加えることにより、磁気粒子の酵素触媒作用により茶褐色沈殿を生じることによって、検出シグナルを強め、感度を上げ、検出結果が目視観察により判定できるようにし、機械に対する依存性をなくし、この新技術に基づく生物サンプルの検出は、簡便かつ高速であり、非常に現場使用に適している。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、以下の技術形態により実現される。

【0008】

ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法であって、前記方法は以下を含むものである。1) 適当なサイズの磁性ナノ粒子を用いて、特異的に結合測定用抗原の生物分子をその表面にカップリングして特異性ナノ粒子プローブを調製し、磁気粒子パッドを調製

10

20

30

40

50

する。2) 磁性免疫クロマトグラフィー試験片を組み立てて調製する。3) クロマトグラフィー反応、測定用抗原は磁気ナノプローブ、テストライン抗体、コントロールライン抗体と反応してサンドイッチ複合物を形成し、陽性サンプルはTラインのところで磁気粒子集中を形成する。4) 発色反応、過酸化水素と水素供与基質、例えばTMB、DAB等を加え、磁気粒子の酵素触媒作用により大量な沈殿が生じて検出シグナルを強める。5) 実験結果により、標的分子に対する定性と半定量検出を実現する。

【0009】

さらに、本発明はナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法を提供し、前記磁性免疫クロマトグラフィー試験片を組み立てて調製することは、コーティング膜、測定用抗原に対応する抗体を結合した磁気粒子パッド、サンプルパッド、吸水パッドを互いに交錯するように基板上に順次貼り付け、そして上層に透明なプラスチック密封膜を被覆して組み立てることであり、前記コーティング膜には、測定用抗原のテストラインとコントロールラインをコーティングしておいた。

10

【0010】

またさらに、上述したナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法の特徴は以下の通りである。前記磁性ナノ粒子は球状、棒状、立方体、三角形、多角形等の形状のいずれかのものであってもよい。その粒径は10nmから500nmまでの範囲内にある。それが露出している磁気粒子であってよく、タンパク外被、例えばウイルス外被、トランスフェリン外被、フェリチン外被でコーティングされた磁気粒子であってよく、それが Fe_3O_4 磁気粒子であってよく、外層に二価鉄イオン試薬で修飾されている Fe_2O_3 磁気粒子であってよく、

20

【0011】

またさらに、上述したナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法の特徴は以下の通りである。前記水素供与基質は、テトラメチルベンジダイン(TMB)、テトラメチルベンジダイン硫酸塩(TMBS)、o-フェニレンジアミン(OPD)、ジアミノベンジダイン(DAB)、ジアミノベンジダイン四塩酸(DAB-4HCl)、5-アミノサリチル酸(5-AS)、o-トリジン(OT)又は2,2'-アジノ-ビス(3-エチルペンズチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)を含む。前記過酸化水素又は過酸化尿素等を含む。

【0012】

またさらに、上述したナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法の特徴は以下の通りである。前記特異性生物分子は、タンパク、核酸、ポリペプチドを含む。前記標的分子は、溶液又は体液中に存在する。

30

【0013】

本発明の技術形態の際立った実質的な特徴と顕著な進歩は主に以下のように表される。

【0014】

本発明は、現在の金コロイドはシグナル拡大機能を有さず、感度が比較的に低いような欠陥に対し、最新の科学発見に基づいて、ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法を提供し、この技術は磁性ナノ粒子ペルオキシダーゼ触媒活性及び磁気分離特性を一体化し、クロマトグラフィーの後に過酸化水素と水素供与基質、例えばo-フェニレンジアミン(DAB)等を加えることにより、磁気粒子の酵素活性により大量な茶褐色沈殿を生じ、検出シグナルを10-100倍拡大し、検出結果は目視観察により判定できるようになって、機器に対する依存性をなくし、この新技術に基づく生物サンプルの検出は、簡便かつ高速であり、感度が高く、非常に現場使用に適しており、新規性、創造性、実用性を有する新技術である。

40

【0015】

より具体的に、本発明は以下のものを提供する。

1. 液体サンプルにおける被測定物を検出するためのナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法であって、前記方法は順に以下のステップを含む：

1) 磁性ナノ粒子を前記被測定物と特異的に結合できる第一分子とカップリングするこ

50

とによって調製される検出プローブを提供する；

2) 固定化した、前記被測定物と特異的に結合できる第二分子である捕獲プローブを提供する；

3) 前記液体サンプルを前記検出プローブと接触させる；

4) 前記検出プローブと接触した前記液体サンプルを前記捕獲プローブと接触させる；

5) ステップ4)を通った前記捕獲プローブに、水素供与基質と過酸化物を加え、発色反応を行う。

2. 前記磁性ナノ粒子の粒径は10 nmから500 nmまでの範囲内にある項目1に記載の方法。

3. 前記磁性ナノ粒子は Fe_3O_4 磁性ナノ粒子である項目1に記載の方法。

4. 前記被測定物はタンパク質、ポリペプチド又は核酸である項目1に記載の方法。

5. 前記被測定物はタンパク質であり、且つ前記第一分子と前記第二分子は前記タンパク質に対する特異性抗体であり、好ましくはモノクローナル抗体である項目1に記載の方法。

6. 前記第一分子と前記磁性ナノ粒子はEDC-NHS法によりカップリングする項目5に記載の方法。

7. 前記水素供与基質は、テトラメチルベンジジン(TMB)、テトラメチルベンジジン硫酸塩(TMBS)、*o*-フェニレンジアミン(OPD)、ジアミノベンジジン(DAB)、ジアミノベンジジン四塩酸(DAB-4HCl)、5-アミノサリチル酸(5-AS)、*o*-トリジン(OT)又は2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)を含む項目1に記載の方法。

8. 前記過酸化物は過酸化水素と過酸化尿素を含む項目1に記載の方法。

9. 前記液体サンプルを受け入れ、且つ前記サンプルにおける不純物をろ過するためのサンプルパッド、と

前記被測定物と特異的に結合できる第一分子とカップリングする磁性ナノ粒子を含む磁性ナノ粒子パッド、と

前記被測定物と特異的に結合できる第二分子を含むテストライン、と

一般的に比較的厚い紙、又は類似したような吸水材料から作成され、クロマトグラフィーの動力を提供するための吸収パッド、と

を順に基板上に設けられている各ものを含むナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出装置であって、

前記磁性ナノ粒子の粒径は、10 nmから500 nmまでの範囲内にあることが好ましく、

前記磁性ナノ粒子は Fe_3O_4 磁性ナノ粒子であることが好ましく、

前記被測定物は、タンパク質、ポリペプチド又は核酸であることが好ましく、そしてより好ましくは、前記被測定物はタンパク質であって前記第一分子と前記第二分子は前記タンパク質に対する特異性抗体であり、好ましくはモノクローナル抗体であり、

前記第一分子と前記磁性ナノ粒子はEDC-NHS法によりカップリングすることが好ましく、

前記水素供与基質は、テトラメチルベンジジン(TMB)、テトラメチルベンジジン硫酸塩(TMBS)、*o*-フェニレンジアミン(OPD)、ジアミノベンジジン(DAB)、ジアミノベンジジン四塩酸(DAB-4HCl)、5-アミノサリチル酸(5-AS)、*o*-トリジン(OT)又は2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)を含むことが好ましく、且つ

前記過酸化物は過酸化水素と過酸化尿素を含むことが好ましい液体サンプル中の被測定物を検出するためのナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出装置。

10. 前記テストラインの後に、さらにコントロールラインが設けられており、前記コントロールラインには前記第一分子と特異的に結合できる第三分子が固定されている項目9に記載の検出装置。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0016】

以下、本発明の技術形態につき図面を参照しつつさらに説明する。

【図1】金コロイド免疫クロマトグラフィー法の概略図である。

【図2】本発明のナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー法のある実施形態による概略図である。

【図3】酵素結合免疫吸着（ELISA）法で高い親和力のトウアズキ毒素モノクローナル抗体を選別する。

【図4】トウアズキ毒素モノクローナル抗体のサブタイプ判定。

【図5】抗体によって識別されたトウアズキ毒素の抗原エピトープを、免疫プロット（Western blotting）方法で判定する。

【図6】二重抗体サンドイッチ酵素結合免疫吸着（ELISA）方法でトウアズキ毒素の抗体ペアを選別する。

【図7】磁性ナノ粒子の調製。

【図8】磁気粒子抗体プローブの調製及びドットプロット（Dot blot）検証。

【図9】磁気粒子ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー方法と金コロイド免疫クロマトグラフィー方法でトウアズキ毒素を検出する感度の比較。

【図10】ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー法と伝統的な金コロイド法がインフルエンザウイルス検出に対する感度の比較。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、具体的な実施例につき本発明を説明するが、本発明の範囲は具体的な実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0018】

【実施例1】ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法でトウアズキ毒素を検出する。

1) 交雑腫細胞の調製

トウアズキ毒素は豆科植物トウアズキの種における成分であり、今まで発見された毒性の最も強い植物毒素の一種であり、人、動物と昆虫のいずれに対しても大きな毒性を有し、一粒のトウアズキの種は十分に人を致死でき、本発明はトウアズキ毒素（トウアズキ毒素及び後述するリシンは、いずれも軍事医学科学院より提供される）を検出することを例として、ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法の感度と実用性を説明した。実験に使用する抗トウアズキ毒素のモノクローナル抗体Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4はそれぞれモノクローナル抗体Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4を分泌する交雑腫細胞に由来し（モノクローナル抗体の調製方法は本分野において既知なものであり、例えばKohlerとMilstein、Nature 256:495、1975；Yehら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1979；Yehら、Int. J. Cancer、1982に参照することができる）、具体的に、硫酸アンモニウム沈殿法によりトウアズキ種における粗毒素を取得し、さらに分子篩クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、冷凍乾燥等のステップにより高純度な毒素を得た；ホルムアルデヒドで不活化したトウアズキ毒素のホロ毒素を免疫原としてBALB/Cマウスに免疫接種を行い、毎回20µgタンパク/マウス1匹、二週間に一回、計三回経皮注射した。脾細胞を取る前に免疫を一回高める。免疫を高めてから三日目に、脾臓を取り、脾細胞をRPMI培地に懸濁させる。ポリエチレングリコール（PEG）の存在下で、脾細胞とSP2/0-Ag14マウス骨髓腫細胞を融合させ、且つHAT選択性培地（ヒポキサンチン（hypoxanthin）、アミノプテリン（aminopterin）とチミジン（thymidin）を含む培地）で交雑腫に対して選別を行い、交雑腫細胞を得る。ELISAの方法で天然トウアズキ毒素と強い結合能力を有する抗体を選別し、4株の抗体を得て、それぞれAbrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4と命名し、同時にこ

10

20

30

40

50

これらの抗体を分泌する交雑腫細胞を得て、順にA b r i n - 1、A b r i n - 2、A b r i n - 3、A b r i n - 4である。

【0019】

2) E L I S A方法でモノクローナル抗体A b r i n - 1、A b r i n - 2、A b r i n - 3、A b r i n - 4のトウアズキ毒素に対する親和力を判定する

具体的な方法は以下の通りである。まずは96穴のE L I S A板において50 μ lの2 μ g / m lトウアズキ毒素タンパクを一晩コーティングした；P B S Tで三回洗浄し、5% B S A - P B Sを加え1時間密封した；それぞれモノクローナル抗体の交雑腫細胞を加えて上澄みを培養し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした；P B S Tで三回洗浄し、H R Pで標記したヒツジ抗マウス抗体を加えて1時間インキュベートした；P B S Tで三回洗浄し、T M B発色基質(200 n g / m lのT M B、0.03%のH₂O₂、p H 4.5)を加えて発色させ、50 μ l / 穴、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応し、50 μ l / 穴2 Mの硫酸溶液を加えて反応を終了させ、マイクロプレートリーダー450 n mで読み取った。E L I S A結果からわかるように、A b r i n - 3、A b r i n - 4の親和力は1 : 5000に達したが、A b r i n - 1、A b r i n - 2の親和力は1 : 50000と高い(図3)。

10

【0020】

3) アフィニティークロマトグラフィーでモノクローナル抗体を精製する

具体的な方法は以下の通りである。交雑腫細胞A b r i n - 1、A b r i n - 2、A b r i n - 3、A b r i n - 4を大量に培養して増殖させ、それぞれ細胞懸濁液に調製し、6週齢のB A L B / Cマウスを取ってプリスタン(Sigma - Aldrich) 0.5 m l / 匹を腹腔内注射し、約十日間後に、腹水を収集し、遠心して上澄みを取った。タンパクGアフィニティークロマトグラフィー(Roche)により、腹水からモノクローナル抗体を精製した。精製できたモノクローナル抗体を無菌ろ過し、冷蔵又は冷凍保存した。

20

【0021】

4) モノクローナル抗体サブタイプの判定

マウス抗体サブタイプ判定キット(BD Pharmingen)を用いて、説明書に従って操作し、抗体A b r i n - 1はI g G 2 aに属し、A b r i n - 2、A b r i n - 3、A b r i n - 4はI g G 1サブタイプに属することを判定した(図4)。

30

【0022】

5) 免疫ブロット(Western blotting)方法で、抗体がトウアズキ毒素抗原のエピトープを識別することに対する判定

具体的な方法は、0.1 Mのジチオトレイトール(DTT)でトウアズキ毒素A、B鎖のジチオ結合を還元して切断し、Western blotting方法により抗体がトウアズキ毒素のエピトープを識別することを判定する。結果より、A b r i n - 1、A b r i n - 2、A b r i n - 3、A b r i n - 4はいずれも26 k Dの位置でバンドが現れたが、34 k Dの位置ではバンドがなかったことを見出し(図5)、これら四種類の抗体はいずれもトウアズキ毒素のA鎖(分子量は約30 k Dである)を識別したことを証明した。

40

【0023】

6) 二重抗体サンドイッチE L I S A方法で抗体ペアを選別する

具体的な方法は、まず、ペルオキシダーゼH R Pをグルタルアルデヒド二段法又は過ヨウ素酸ナトリウム法により抗体A b r i n - 1に標記し、そしてA b r i n - 2、A b r i n - 3、A b r i n - 4抗体を0.02 MのP B S (p H 7.2)で2 μ g / m lまで希釈し、そして50 μ l / 穴の量で96穴板に加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩コーティングした；P B S Tで三回洗浄し、5% B S A - P B Sを加えて1時間密封した；それぞれ100、10、1、0.1 n g / m lのトウアズキ毒素及び10 n g / m lのリシンを陰性対照(C t r l)として加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした；P B S Tで三回洗浄し、1 μ g / m l濃度のH R Pで標記したA b r i n - 1抗体を加えて1時間インキュベートした

50

; P B S Tで三回洗浄し、T M B発色基質(200 ng/mlのT M B、0.03%のH₂O₂、pH4.5)を加えて発色させ、50 μl/穴、37 °Cで15分間反応し、50 μl/穴2 Mの硫酸溶液を加えて反応を終了させ、マイクロプレートリーダー450 nmで読み取った。E L I S A結果からわかるように(図6)、A b r i n - 1とA b r i n - 2がペアリングした後の効果が最も良い。

【0024】

7) Fe₃O₄磁性ナノ粒子の調製

王水で浸漬されたビーカーにおいて、それぞれCoCl₂・6H₂Oを0.3 g、FeCl₃・6H₂Oを0.675 g、及びエチレングリコールを20 mL加え、完全に溶解するまで攪拌した; 無水NaAcを1.5 g、PAAを0.15 g加え、続いて30分間攪拌した; 反応器の中に置き200 °Cで14時間反応した; 温度を下げ、中の溶液を遠心管に入れ、磁気分離して上澄みを除去し、エタノールを加えて超音波で4回洗浄し、50 - 60 °Cで乾燥し、調製した磁気粒子M N P sの粒径は約350 nm程度である(図7)。

【0025】

8) 磁気粒子プローブの調製

まず、E D C - N H S (E D C : 炭化ジイミン塩酸塩、N H S : ヒドロキシスクシンイミド)を用いて、磁気粒子表面のカルボキシ基を活性化し、そしてトウアズキ毒素モノクローナル抗体A b r i n - 1を350 nmの四酸化三鉄磁性粒子にカップリングしてM N P s @ A b r i n - 1を形成した。具体的なステップは以下の通りである。適量の四酸化三鉄磁性粒子を秤量し、50 mg/mlのN H S、E D Cにそれぞれ50 μlを加え、室温で30分間インキュベートし、脱イオン水で洗浄し、余分なN H S / E D Cを除去した。pH6.0の酢酸ナトリウム溶液を1 ml加え、A b r i n - 1抗体を100 μg加え、均一に混合し、4 °Cで2時間インキュベートし、P B S洗浄し、pH7.4 Tris - C lを50 mM加えて活性化したカルボキシ基を封じ、P B S再懸濁し、4 °Cで保存した; カップリング効果はドットプロット(D o t b l o t)方法で検出し、即ち硝酸セルロース膜上にそれぞれ1 mg/mlのヒツジ抗マウス抗体、トウアズキ毒素A b r i n、リシンを各々1 μlの点を打ち、乾燥した後にM N P s @ A b r i n - 1溶液を加え、反応後の実験結果より、このような磁気粒子プローブはヒツジ抗マウス抗体、トウアズキ毒素A b r i nだけと結合し、リシンと結合しないことを示し、これは、カップリングしたM N P s @ A b r i n - 1抗体プローブの特異性はとても良いことを証明した(図8)。

【0026】

9) ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー法試験片の組み立て(図2)

a. コーティング膜の調製: コーティング緩衝液(0.02 M リン酸塩緩衝液、pH7.2)でトウアズキ毒素の抗体A b r i n - 2、会社から購入したヒツジ抗マウス抗体(二次抗体)をそれぞれ0.5 mg/mlと1 mg/mlに希釈し、定量噴膜装置を用いて1 μl/cmの量で順番に両者を0.8 cmの間隔で3.5 cm幅の硝酸セルロース膜上に均一にスプレーし、テストライン(Tライン)抗体バンドとコントロールライン(Cライン)抗体バンドをそれぞれ形成した。室温で30分間乾かしてからブロッキング溶液(0.5% B S Aの0.02 M P B Sを含む、pH7.2)において10分間浸漬した後に25 - 35 °Cで8時間乾燥し、乾燥剤を加えて密封保存した。

【0027】

b. 磁気粒子プローブパッドの調製: 噴膜機の専用ノズルを用いて、処理できた磁気粒子プローブ(例えば8)に調製されたものを50 μl/cmの量で0.8 cm幅のガラス繊維パッドに均一にスプレーし、一晩冷凍乾燥し、乾燥剤を加えて密封保存した。

【0028】

c. サンプルパッドの処理: 1.8 cm幅のサンプルパッド(親水性のガラス繊維)をサンプルパッド処理液(1 - 5% C a s e i n(カゼイン)、0.1 - 1% P V A(ポリビニルアルコール)、0.01 - 0.2% T w e e n 2 0、0.02 M P B S、p

10

20

30

40

50

H7.2)に浸入して1時間処理し、取り出してから25-35で8時間乾燥した。

【0029】

d. 試験片の組み立て及び切断：3.5cmコーティング膜、0.8cm磁気粒子プローブパッド、1.8cmサンプルパッド、2.5cm吸水パッドを交互に2mm交差するように順次バックプレート(基板)に貼り付け(積層順番は図2に示される通りである)、透明なプラスチック密封膜を一枚被覆し、試験片板に組み立てた；ストリップカッターを用いて、組み立てられた試験片板を0.5cm幅の製品試験片に切り出す；切り出した試験片をプラスチックの低いチャックのチャック内に置き、上蓋をかけ、プレス機を用いて上下二枚のプラスチックのチャックを押しつけ、乾燥剤を加えて室温で密封保存した(上述のコーティング膜、磁気粒子プローブパッド、サンプルパッド、吸水パッドのサイズ及び交互に交差する幅は実際の必要に応じて当業者によって適宜調製できる)。

10

【0030】

10) サンプルを加えて検出する

マイクロピペットで、勾配濃度を有するトウアズキ毒素サンプル溶液(濃度は順に100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml、0ng/mlである)を50µl取り、検出カードにおけるサンプルパッドに加え、さらに50µlクロマトグラフィー緩衝液(1% Tween 20、0.5% Triton X-100、1% NP-40、0.05% Na₂CO₃、2.0mM PBS、pH7.2)を加え、反応が15分間進行するのを待った。磁気粒子にトウアズキ毒素のモノクローナル抗体Abrin-1がカップリングされているため、それはサンプル溶液におけるトウアズキ毒素と結合した後に形成された複合物は引き続き先へ移動するとき、テストライン(Tライン)にあるトウアズキ毒素のもう一方の抗体Abrin-2と結合して磁気粒子の集中を形成するが、トウアズキ毒素を結合しなかった磁気粒子Abrin-1抗体プローブは引き続きコントロールライン(Cライン)に移動して、その二次抗体と作用することによって磁気粒子の集中を形成する。

20

【0031】

11) 酵素触媒で検出シグナルを拡大する

テストラインTライン(Abrin-2抗体バンド)とコントロールラインCライン(ヒツジ抗マウス抗体バンド)のところで50µlの発色溶液(過酸化水素H₂O₂濃度は530mMである；ペルオキシダーゼの発色基質ジアミノベンジジン(3,3'-diaminobenzidine, DAB)濃度は816mMである)を加え、5分間反応した；磁気粒子の過氧化物モデル酵素活性により、磁気粒子が集中するTラインとCラインのところで大量な茶褐色の不溶性沈殿物を生じることで、検出シグナルを拡大し、その検出感度は伝統的な金コロイド試験片検出法の100倍である(図9に示される通りである)。

30

【0032】

[実施例2] ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法でインフルエンザウイルスを検出する

【0033】

1) 抗体源：会社から購入され、番号はFluA-1とFluA-2(生産者：Medix Biochemica、商品番号：FluA-1：100081、FluA-2：100083)。

40

【0034】

2) Fe₃O₄ 磁性ナノ粒子の調製は実施例1と同様である。

【0035】

3) 磁気粒子プローブの調製は実施例1と同様であるが、カップリングした抗体をインフルエンザウイルスの抗体FluA-1に替える必要がある。

【0036】

4) ナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー法試験片の組み立ては実施例1と同様であるが、テストライン(Tライン)にある抗体をインフルエンザウイルスの抗体FluA-

50

2に替える必要がある。

【0037】

5) サンプルを加えて検出する

マイクロピペットで、勾配濃度を有するインフルエンザウイルスサンプル溶液（ウイルス価はPFUで順に 1.25×10^4 、 6.25×10^3 、 3.1×10^3 、 1.56×10^3 、 7.8×10^2 、 3.9×10^2 、 1.95×10^2 である）を50 μ l取り、検出カードにおけるサンプルパッドに加え、さらに50 μ lクロマトグラフィー緩衝液（1% Tween 20、0.5% Triton X-100、1% NP-40、0.05% NaN_3 、20mM PBS、pH 7.2）を加えて、反応が15分間進行するのを待った。磁気粒子にインフルエンザウイルスのモノクローナル抗体FluA-1がカップリングされているため、それはサンプル溶液におけるインフルエンザウイルスと結合した後に形成された複合物は引き続き先へ移動するとき、テストライン（Tライン）にあるインフルエンザウイルスのもう一方の抗体FluA-2と結合して磁気粒子の集中を形成するが、インフルエンザウイルスを結合しなかった磁気粒子FluA-1抗体プローブは引き続きコントロールライン（Cライン）に移動して、その二次抗体と作用することによって磁気粒子の集中を形成する。

10

【0038】

6) 酵素触媒で検出シグナルを拡大する

テストラインTライン（FluA-2抗体バンド）とコントロールラインCライン（ヒツジ抗マウス抗体バンド）のところで50 μ lの発色溶液（過酸化水素 H_2O_2 濃度は530mMである；ペルオキシダーゼの発色基質ジアミノベンジジン（3,3'-diaminobenzidine、DAB）濃度は816mMである）を加え、5分間反応した；磁気粒子の過氧化物モデル酵素活性により、磁気粒子が集中するTラインとCラインのところで大量な茶褐色の不溶性沈殿物を生じ、検出シグナルを拡大し、その検出感度は伝統的な金コロイド試験片検出法の8倍である（図10に示される通りである）。

20

【0039】

前記のように、本発明はナノモデル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法であり、この技術は磁性ナノ粒子ペルオキシダーゼ触媒活性及び磁気分離特性を一体化し、免疫クロマトグラフィーの後に過氧化物と水素供与基質、例えばo-フェニレンジアミン（DAB）等を加え、磁気粒子の酵素活性により大量な茶褐色沈殿物を生じることにより、検出シグナルを10-100倍拡大し、検出結果は目視観察により判定できるようになって、機器に対する依存性をなくした。この方法の操作ステップは簡単で、迅速であり、感度が高く、非常に現場検出での使用に適しており、粒子ペルオキシダーゼの機能、非常に広い応用可能性を有し、新規性、創造性、実用性を有する新技術である。

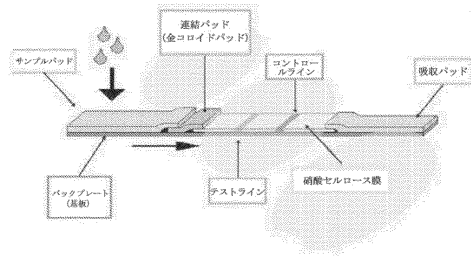
30

【0040】

以上は本発明の具体的な応用範例である。これらの実施例は、本特許を説明するだけに用いられ、本発明の範囲制限するものではない。

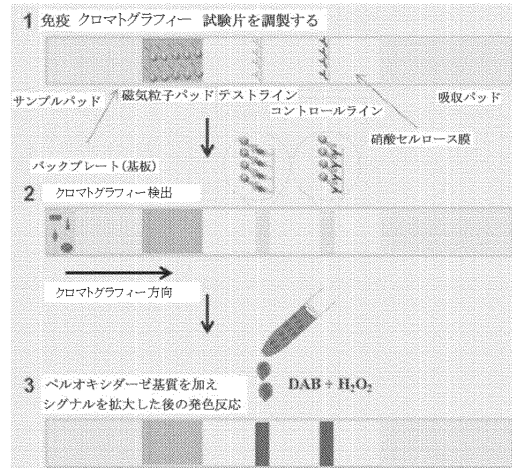
【 図 1 】

図 1



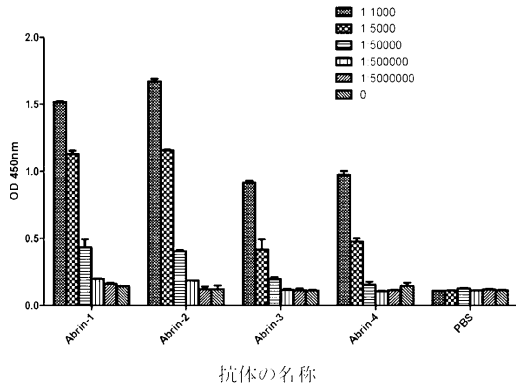
【 図 2 】

図 2



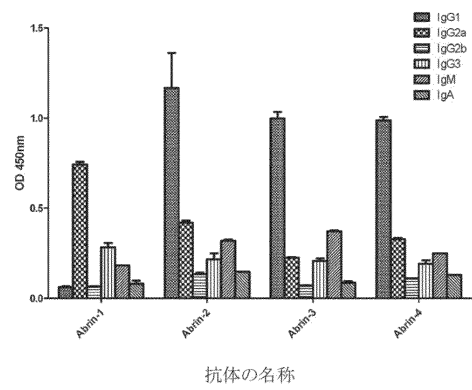
【 図 3 】

図 3



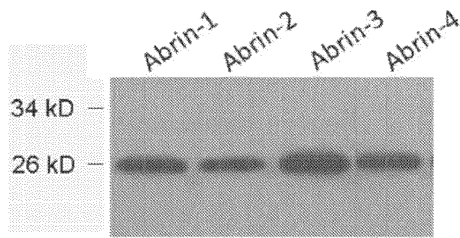
【 図 4 】

図 4



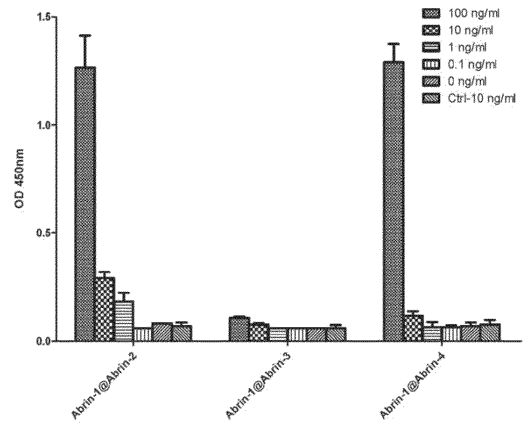
【 図 5 】

図 5



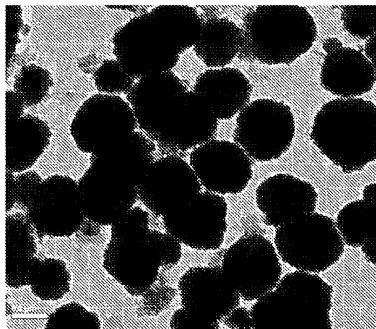
【 図 6 】

図 6



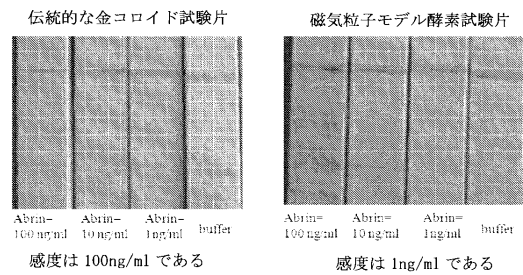
【 図 7 】

図 7



【 図 9 】

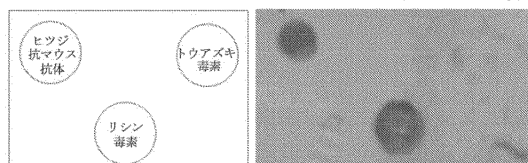
図 9



【 図 8 】

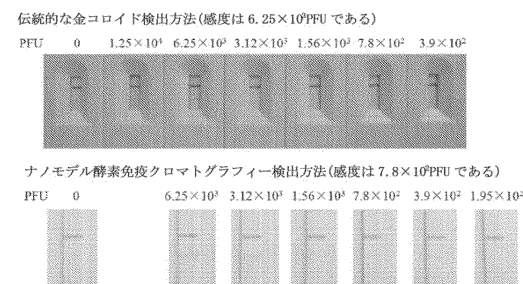
図 8

ドットブロット (Dot Blot) 点様式概略図 MNP@Abrin-1 を加えた後



【 図 10 】

図 10



フロントページの続き

- (74)代理人 100165892
弁理士 坂田 啓司
- (72)発明者 閻 錫蘊
中華人民共和国100101北京市朝陽区大屯路15号
- (72)発明者 段 徳民
中華人民共和国100101北京市朝陽区大屯路15号
- (72)発明者 張 徳璽
中華人民共和国100101北京市朝陽区大屯路15号
- (72)発明者 楊 東玲
中華人民共和国100101北京市朝陽区大屯路15号
- (72)発明者 馮 静
中華人民共和国100101北京市朝陽区大屯路15号
- (72)発明者 桑 建彬
中華人民共和国100101北京市朝陽区大屯路15号

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 中国特許出願公開第101672771(CN, A)
特開2001-074740(JP, A)
特開2001-013144(JP, A)
特開平07-327694(JP, A)
特開2013-205335(JP, A)
特開2006-145256(JP, A)
国際公開第2012/152222(WO, A1)
LIZENG GAO et al., Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles,
Nature Nanotechnology, 2007年 8月, Vol.2, No. 9, pp.577-583

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	纳米模型酶免疫层析检测方法		
公开(公告)号	JP6449309B2	公开(公告)日	2019-01-09
申请号	JP2016547006	申请日	2014-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院生物物理研究所 吉尔生物科技天津有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国科学院生物物理研究所 吉尔生物科技(天津)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院生物物理研究所 吉尔生物科技(天津)有限公司		
[标]发明人	閻錫盞 段德民 張德璽 楊東玲 馮靜 桑建彬		
发明人	閻錫盞 段德民 張德璽 楊東玲 馮靜 桑建彬		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/5308 G01N33/54346 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/577 G01N2333/11 G01N2333/42		
FI分类号	G01N33/543.541.Z G01N33/543.521 G01N33/53.D G01N33/532.Z		
代理人(译)	山田卓司 坂田启二		
优先权	201410015610.9 2014-01-14 CN		
其他公开文献	JP2017503180A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测液体样品中待测物体的纳米模型酶免疫色谱检测方法，所述方法包括以下步骤：1) 通过将磁性纳米颗粒与能够特异性结合待测物体的第一分子偶联而制备的检测探针。2) 捕获探针，其是固定的并且是能够特异性结合待测物体的第二分子。3) 使液体样品与检测探针接触。4) 使与检测探针接触的液体样品与捕获探针接触。5) 将氢供体底物和过氧化物加入到通过步骤4) 的捕获探针中，并进行显色反应。本发明还提供了一种纳米模型酶免疫层析检测装置，用于检测液体样品中的待测物体。 .The

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)
GO 1 N 33/53 (2006.01)
GO 1 N 33/532 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 4 1 Z
GO 1 N 33/543 5 2 1
GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/532 Z

請求項の数 17 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2016-547006(P2016-547006)
(86) (22) 出願日 平成26年10月14日(2014.10.14)
(65) 公表番号 特表2017-503180(P2017-503180A)
(43) 公表日 平成29年1月26日(2017.1.26)
(86) 国際出願番号 PCT/CN2014/088540
(87) 国際公開番号 W02015/106588
(87) 国際公開日 平成27年7月23日(2015.7.23)
審査請求日 平成28年9月2日(2016.9.2)
(31) 優先権主張番号 201410015610.9
(32) 優先日 平成26年1月14日(2014.1.14)
(33) 優先権主張国 中国(CN)

(73) 特許権者 302037630
中国科学院生物物理研究所
中華人民共和国100101北京市朝▲陽
▼区大屯路15号
(73) 特許権者 516211341
吉尔生物科技(天津)有限公司
中華人民共和国300270天津市經濟技
術開發区南崗工業区紡四路經紡大厦183
室
(74) 代理人 100101454
弁理士 山田 卓二
(74) 代理人 100062144
弁理士 青山 薫
(74) 代理人 100106518
弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノモザル酵素免疫クロマトグラフィー検出方法