

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/081567

発行日 平成18年6月15日 (2006. 6. 15)

(43) 国際公開日 平成16年9月23日 (2004. 9. 23)

(51) Int. Cl.

GO 1 N 33/547 (2006. 01)

F I

GO 1 N 33/547

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

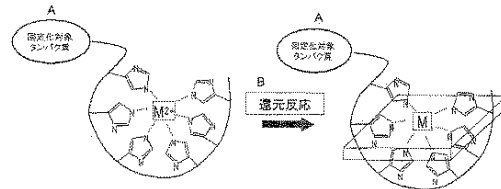
出願番号	特願2005-503480 (P2005-503480)	(71) 出願人	802000031 財団法人北九州産業学術推進機構 福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/002410	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(22) 国際出願日	平成16年2月27日 (2004. 2. 27)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(31) 優先権主張番号	特願2003-69924 (P2003-69924)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
(32) 優先日	平成15年3月14日 (2003. 3. 14)	(72) 発明者	春山 哲也 日本国福岡県北九州市若松区ひびきの2番 4号 九州工業大学大学院 生命体工学研 究科 内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2003-207081 (P2003-207081)		
(32) 優先日	平成15年8月11日 (2003. 8. 11)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体物質固定化チップおよびその利用

(57) 【要約】

金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を金属イオンと配位結合させたのち、導電性支持体に近接させ、導電性支持体に還元電位を印加することにより、金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を導電性支持体上に固定化し、生体物質固定化チップを作製する。



A... PROTEIN TO BE IMMOBILIZED
B... REDUCTION

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

導電性支持体、および、該導電性支持体上に金属原子を介して固定化された生体物質を含む生体物質固定化チップであって、前記生体物質が金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質であり、前記金属原子が金属イオンの還元により生ずる金属原子である、生体物質固定化チップ。

【請求項 2】

導電性支持体が先鋭化された先端部を有し、生体物質が導電性支持体の先鋭化された先端部に金属原子を介して固定化されたことを特徴とする、請求項 1 に記載の生体物質固定化チップ。

10

【請求項 3】

導電性支持体が基材上に担持されていることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の生体物質固定化チップ。

【請求項 4】

金属イオンに配位結合する部位がポリヒスチジンである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップ。

【請求項 5】

導電性支持体が金属である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップ。

【請求項 6】

導電性支持体が金、銀、銅、アルミニウム、および白金からなる群より選ばれる一または二以上の金属である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップ。

20

【請求項 7】

金属原子が、2 価の金属イオンの還元により生ずる金属である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップ。

【請求項 8】

前記生体物質がタンパク質である請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップ。

【請求項 9】

金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を金属イオンと配位結合させたのち、導電性支持体に近接させ、該導電性支持体に還元電位を印加することにより、金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を導電性支持体上に固定化する工程を含む、生体物質固定化チップの製造方法。

30

【請求項 10】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップに固定化された生体物質と、該生体物質に特異的に結合し得る物質を含む試料とを反応させ、前記固定化された生体物質との結合を介してチップに間接的に結合した物質を検出することにより、生体物質固定化チップに固定化された生体物質、または、試料中の結合物質を分析する方法。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップに固定化された生体物質と、該生体物質に特異的に結合し得る物質を含む試料とを反応させ、反応により生じた、固定化された生体物質とこれに特異的に結合した物質との複合体を、生体物質固定化チップの導電性支持体に酸化電位を印加することによって導電性支持体より脱離させた後、固定化された生体物質、または、試料中の結合物質を分析する方法。

40

【請求項 12】

金属イオン及び該金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を含む溶液中に導電性支持体を浸し、該導電性支持体に還元電位を印加して前記生体物質を該導電性支持体に固定化する工程、並びに前記工程で得られた前記生体物質が固定化された導電性支持体を脱離用溶液中に浸し、該導電性支持体に酸化電位を印加して前記生体物質を該導電性支持体より脱離させる工程を含む、生体物質の精製方法。

50

【請求項 1 3】

金属イオンに配位結合する部位を有する物質を金属イオンと配位結合させたのち、導電性支持体に近接させ、該導電性支持体に還元電位を印加することにより、前記物質を導電性支持体上に固定化する工程を含む、物質の固定化方法。

【請求項 1 4】

前記物質がタンパク質である請求項 1 3 に記載の固定化方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

本発明は、生体物質固定化チップ、および、その製法、利用に関する。具体的には、導電性支持体と該導電性支持体上に金属原子を介して固定化されたタンパク質などの生体物質を含む生体物質固定化チップに関する。 10

【背景技術】

プロテインチップはタンパク質結合物質の解析等に有用であるが、かかる目的を達成するためにはタンパク質を一定の配向性のもとで安定に固定化する必要があった。タンパク質の固定化技術として代表的なものとしては、包括法 (Journal of Electroanalytical Chemistry, 1993, vol. 347, pp 293-301)、および、重合法 (Journal of Electroanalytical Chemistry, 2001, vol. 511, pp 128-133) が知られていたが、いずれも、固定化されるタンパク質の配向性を制御できないという問題点を有していた。また、金など結晶性の高い金属表面にシステイン等の硫黄原子がメルカプト結合により結合することを利用した自己集積法 (Sensors and Actuators B, 1995, vol. 24-25, pp 113-116) も知られていたが、システインはタンパク質構造中の各所に存在するため、それぞれのシステイン残基で反応が進行し、活性の低下、配向性の低下などの問題があった。また、上記の固定化法は非可逆的固定化法であったため、タンパク質を再脱離させることができず、基材およびタンパク質の再利用、および、固定化したタンパク質に結合した試料の詳細な解析は困難であった。 20

一方で、固定化するタンパク質の配向性を制御するため、タンパク質に結合させたポリヒスチジン等の金属結合ポリペプチドを用いて、タンパク質と金属イオンとを結合させる技術も知られていた (特開 2001-083155 号公報)。しかし、金属結合ポリペプチドと金属イオンとの結合は、競争的な配位結合反応であるため解離しやすく、安定に固定化することはできなかった。 30

【発明の開示】

本発明は、タンパク質などの生体物質を導電性支持体上に一定の配向性のもとで安定に固定化した生体物質固定化チップを提供することを課題とする。また、本発明は生体物質固定化チップを用いた分析方法、生体物質の精製方法を提供することを課題とする。

本発明者は、金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質を金属イオンと結合させたのち、導電性支持体と近接させ、導電性支持体に還元電位を印加することによって導電性支持体上にタンパク質を安定に固定化できることを見出し、さらにこの固定化技術を用いてタンパク質を導電性支持体上に一定の配向性のもとで安定に固定化したプロテインチップを作製できることを見出した。また、タンパク質が固定化された導電性支持体に酸化電位を印加することにより、タンパク質を再び脱離させることができることを見出した。これらの知見に基づいて研究を続け、本発明を完成するに至った。 40

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 導電性支持体、および、該導電性支持体上に金属原子を介して固定化された生体物質を含む生体物質固定化チップであって、前記生体物質が金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質であり、前記金属原子が金属イオンの還元により生ずる金属原子である、生体物質固定化チップ。

(2) 導電性支持体が先鋭化された先端部を有し、生体物質が導電性支持体の先鋭化された先端部に金属原子を介して固定化されたことを特徴とする、(1)の生体物質固定 50

化チップ。

(3) 導電性支持体が基材上に担持されていることを特徴とする、(1)または(2)の生体物質固定化チップ。

(4) 金属イオンに配位結合する部位がポリヒスチジンである、(1)～(3)のいずれか一項に記載の生体物質固定化チップ。

(5) 導電性支持体が金属である、(1)～(4)のいずれかの生体物質固定化チップ。

(6) 導電性支持体が金、銀、銅、アルミニウム、および白金からなる群より選ばれた一または二以上の金属である、(1)～(4)のいずれかの生体物質固定化チップ。

(7) 金属原子が、2価の金属イオンの還元により生ずる金属である、(1)～(6)のいずれかの生体物質固定化チップ。

(8) 前記生体物質がタンパク質である(1)～(7)のいずれかの生体物質固定化チップ。

(9) 金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を金属イオンと配位結合させたのち、導電性支持体に近接させ、該導電性支持体に還元電位を印加することにより、金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を導電性支持体上に固定化する工程を含む、生体物質固定化チップの製造方法。

(10) (1)～(8)のいずれかの生体物質固定化チップに固定化された生体物質と、該生体物質に特異的に結合し得る物質を含む試料とを反応させ、前記固定化された生体物質との結合を介してチップに間接的に結合した物質を検出することにより、生体物質固定化チップに固定化された生体物質、または、試料中の結合物質を分析する方法。

(11) (1)～(8)のいずれかの生体物質固定化チップに固定化された生体物質と、該生体物質に特異的に結合し得る物質を含む試料とを反応させ、反応により生じた、固定化された生体物質とこれに特異的に結合した物質との複合体を、生体物質固定化チップの導電性支持体に酸化電位を印加することによって導電性支持体より脱離させた後、固定化された生体物質、または、試料中の結合物質を分析する方法。

(12) 金属イオン及び該金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を含む溶液中に導電性支持体を浸し、該導電性支持体に還元電位を印加して前記生体物質を該導電性支持体に固定化する工程、並びに前記工程で得られた前記生体物質が固定化された導電性支持体を脱離用溶液中に浸し、該導電性支持体に酸化電位を印加して前記生体物質を該導電性支持体より脱離させる工程を含む、生体物質の精製方法。

(13) 金属イオンに配位結合する部位を有する物質を金属イオンと配位結合させたのち、導電性支持体に近接させ、該導電性支持体に還元電位を印加することにより、前記物質を導電性支持体上に固定化する工程を含む、物質の固定化方法。

(14) 前記物質がタンパク質である(13)の固定化方法。

【図面の簡単な説明】

図1は固定化の原理を示す概念図である。

図2は発光値を示すグラフ図である。

図3はCCDカメラによる発光イメージを示す図(写真)である。

図4は大腸菌破砕物からのポリヒスチジン融合プロテインAの精製を示す模式図である。

【発明を実施するための最良の形態】

本発明を以下で詳細に説明する。

<1>本発明の生体物質固定化チップ

本発明の生体物質固定化チップは、導電性支持体、および、導電性支持体上に金属原子を介して固定化された生体物質を含む生体物質固定化チップであって、前記生体物質が金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質であり、上記金属原子が金属イオンの還元により生ずる金属原子である、生体物質固定化チップである。生体物質固定化チップとしては、タンパク質が固定化されたプロテインチップ、核酸が固定化されたDNAチップなどの核酸チップなどが挙げられる。

以下に、プロテインチップについて説明する。

金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質の長さは特に制限されず、ペプチドであってもよい。

金属イオンに配位結合する部位の種類は特に制限されず、金属に配位結合可能な原子（窒素原子、硫黄原子、酸素原子など）を含む分子鎖・分子骨格などが挙げられる。このような分子鎖・分子骨格はペプチドであってもよいし、それ以外の化合物であってもよい。具体的には、ポリヒスチジンを含むペプチド（ポリヒスチジntag）、ポルフィリン、チオール基を含むペプチドや化合物などが挙げられる。この中で、特に好適には、ポリヒスチジntagが挙げられる。ここで、ポリヒスチジntagとはヒスチジンを2個以上含むポリペプチドをいう。ヒスチジンの個数としては、2個以上であれば、固定化されるタンパク質の機能に影響を及ぼさない範囲の個数でよいが、好ましくは6個である。なお、ポリヒスチジンは必ずしも連続している必要はなく、各ヒスチジンの間に他のアミノ酸が1～数個挿入されたものであってもよい。ポリヒスチジntagなどの金属イオン配位結合部位は固定化されるタンパク質のどの部位に導入してもよいが、アミノ末端またはカルボキシ末端が好ましい。

10

20

本発明のプロテインチップは、例えば、標的タンパク質に結合する医薬のスクリーニング、抗体などを利用した診断、固定化酵素を利用した有用物質の生産、タンパク質の精製、または、SPMを用いたタンパク質構造解析等に有用である。これらの目的等に用いるために本発明のプロテインチップにおいて金属イオンに配位結合する部位を介して固定化するタンパク質としては、具体的に以下のようなタンパク質が挙げられる。すなわち、インシュリン、ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）、オキシトシン等のタンパク質ホルモンもしくはペプチドホルモン、コリンエステラーゼ、アミラーゼ、ペプシン等の酵素又はその前駆体、HBs抗原、HIV抗原等の抗原を認識する抗体、プロテインAのような抗体結合性タンパク質が挙げられる。また、ランダムなタンパク質をタンパク質ライブラリーとして用いてもよい。なお、本発明において固定化されるタンパク質は化学合成したような非天然のものであってもよい。また、本発明において固定化されるタンパク質にはペプチドも含まれる。

本発明のプロテインチップにおいて、金属イオンの還元により生ずる金属原子は、タンパク質の金属イオン配位結合部位と配位結合を形成することが可能な金属イオンが還元されて生ずる金属が好ましい。特に、金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質としてポリヒスチジン融合タンパク質を用いた場合には、2価の陽イオン、すなわち、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} などが還元されて生ずる金属が好ましい。一方、本発明のプロテインチップを構成する導電性支持体は電位を印加しうる支持体を意味するが、例として、金属からなる支持体、ITO（インジウムオキシサライド）、GaAs、シリコン等の半導体からなる支持体、またはカーボンからなる支持体等が挙げられる。このうち、金属からなる支持体が好ましく、特に金、銀、銅、アルミニウム、又は白金からなる支持体が好ましい。

30

本発明はまた、金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質が、金属原子を介して、先鋭化された先端部を有する導電性支持体の先鋭化された先端部に固定化されたことを特徴とするプロテインチップを提供する。ここで、先鋭化された先端部を有する導電性支持体としては、例えば、先端が先鋭化された白金棒のように伝導性支持体自身が先鋭化された先端を有するものが挙げられる。また、先鋭化された先端部を有するシリコン等の基材上に伝導性支持体が担持された結果、タンパク質を先鋭化された先端部に固定化することが可能となったものも含まれる。この例としては、シリコン等の基材上に白金等の伝導性支持体がコートされたSPM（走査プローブ顕微鏡）（特開平05-026614号公報など）、または原子プローブ顕微鏡（特開平05-018742号公報など）等を使用されるカンチレバーの探針が挙げられる。導電性支持体の先鋭化された先端部にタンパク質を固定化すると、一の導電性支持体上に対して一分子、または数分子の割合でタンパク質を固定化することができ、かかるプロテインチップはSPMや原子プローブ顕微鏡の試料等に特に有用である。かかるプロテインチップは、先端を先鋭化した導電性支持体に

40

50

電位を印加することによって作製することができる。先鋭化した導電性支持体に電位を印加すると、電位がエッジ効果 (Pure Appl. Chem. Vol. 72 No. 8, pp 1483-1492, 2000) により先鋭化された先端に集中するため、タンパク質の単分子または数分子での固定化が可能である。

本発明のプロテインチップは、導電性支持体上に、金属原子を介して、金属イオン配位結合部位を有するタンパク質が結合したようなものでもよいが、このようなプロテインチップにおいて、なおかつ、導電性支持体が基材上に担持されたプロテインチップが好ましい。ここで、「導電性支持体が基材上に担持された」とは基材の全面に連続して導電性支持体を結合させたものであってもよいし、基材上に複数の導電性支持体が一定の間隔で配置するように、複数の導電性支持体を基材に結合させたものであってもよい。なお、本発明のプロテインチップが複数のタンパク質が固定化されたものである場合、必ずしも全てのタンパク質が金属原子を介して導電性支持体上に固定化されている必要はなく、少なくともその一部が金属原子を介して固定化されていればよい。すなわち、一部のタンパク質の結合状態が金属原子を介さない状態、例えば、金属イオンを介する状態で結合していてもよい。

基材として用いることのできる素材としては、プラスチック、無機高分子、天然高分子およびセラミックなどが挙げられる。プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミドおよびアクリル樹脂などが、無機高分子としては、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル、およびグラファイト等が、天然高分子としては、セルロース、セルロース誘導体、キチン、キトサン、アルギン酸およびアルギン酸塩等が、セラミックとしては、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素および炭化ホウ素などを例示することができる。

上記基材の形状としては、例えば、フィルム、平板、粒子、成型品（ビーズ、ストリップ、マルチウェルプレートのウェルまたはストリップ、チューブ、メッシュ、連続発砲フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライドおよび細胞培養容器）、ラテックス、カンチレバーの探針を挙げることができ、またその大きさについては、当然であるが特に制限はない。

以上、プロテインチップを例に挙げて説明したが、他の生体物質が固定化されたチップについても、金属イオンに配位結合部位、導電性支持体、金属原子、基材等は同様のものを用いることができる。

<2>生体物質固定化チップの製造法

本発明の生体物質固定化チップは、金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を金属イオンと配位結合させたのち、導電性支持体に近接させ、導電性支持体に還元電位を印加することにより、金属イオンに配位結合する部位を有する生体物質を導電性支持体上に固定化する工程を含む製造法により、製造することができる。

以下に、プロテインチップの製造法について説明する。

本発明のプロテインチップに固定化する金属イオン配位結合部位を有するタンパク質は、例えば、金属イオン配位結合ペプチドを有する融合タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、網状赤血球破碎物 (Reticulocyte Lysate) などのインビトロ、または大腸菌や昆虫細胞等の宿主細胞で発現させ、精製することによって得ることができる。また、化学合成することによっても得ることができる。さらに、金属イオン結合部位を、別途調製したタンパク質に化学的に結合させてもよい。本発明に好適なタンパク質であるポリヒスチジンタグを含むタンパク質は、例えば、目的タンパク質をコードするDNAを公知のポリヒスチジン融合タンパク質発現ベクター（例えば、pETシリーズ、Novagen社）に組み込み、該ベクターで大腸菌等を形質転換して融合タンパク質を発現させ、アフィニティカラム等で精製することによって得ることができる。また、ポリヒスチジンタグをコードする配列を含むオリゴヌクレオチドとその相補鎖を合成し、両鎖をハイブリダイズさせて、目的タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクター

に融合タンパク質が発現されるように組み込み、これで大腸菌等を形質転換することによって融合タンパク質を発現させ、精製することによっても得ることができる。

上記の製造方法においては、金属イオン配位結合部位を有するタンパク質を特異的にプロテインチップに固定化することができるため、固定化に用いる金属イオン配位結合部位を有するタンパク質は、必ずしも精製したタンパク質を用いる必要はない。すなわち、該タンパク質を含む大腸菌や鎌状赤血球などの破碎液、抽出液などを直接固定化に用いることができ、この場合、精製過程を省略できるという利点がある。

本発明の製造法において、金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質と配位結合を形成する金属イオンとしては、タンパク質のかかる部位に配位結合しうる金属イオンを意味するが、金属イオン結合部位を有するタンパク質としてポリヒスチジン融合タンパク質を用いた場合には、金属イオンとして Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} などの2価陽イオンが好適に用いられる。これらの金属イオンと、金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質との配位結合は、タンパク質を含む緩衝液中に NiCl_2 等の上記金属イオンに対応する塩を加えることによって達成できる。なお、遊離の金属イオンを除くために、配位結合反応を行った後に、金属イオンとタンパク質との配位結合体を金属イオンを含まない緩衝液に対して透析することが好ましい。

上記製造方法において、「導電性支持体に近接させ」とは、金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質と金属イオンとの配位複合体を、導電性支持体の近傍に配置することをいうが、好ましくは、上記配位複合体を含む溶液中に導電性支持体を浸すことをいう。導電性支持体を浸す溶液は、電位の印加が可能な限り特に限定されないが、例えば、リン酸緩衝液等を用いることができる。

上記製造法において、導電性支持体への電位の印加は、例えば、金属イオンとタンパク質との配位結合体を含む電解液中に、導電性支持体と参照電極とを浸し、通常の電源を用いて電位を印加することにより行うことができる。ここで、参照電極としては、例えば、銀塩化銀電極等が挙げられる。印加する電位は還元電位であるが、還元電位とは、参照電極に対してマイナスとなる電位をいう。還元電位として、好ましい電位は、導電性支持体の種類により異なるが、導電性支持体として白金を用いた場合には、参照電極に対して -10 mV 以下の電位が好ましく、参照電極に対して -100 mV 以下の電位がより好ましく、参照電極に対して -200 mV 以下の電位が特に好ましい。

本発明の導電性支持体が基材上に担持されたプロテインチップの製造において、導電性支持体の基材上への結合は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレATING法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。

以上、プロテインチップの製造法を説明したが、他の生体物質が固定化されたチップについても、同様にして製造することができる。

<3>本発明の分析法

本発明の分析法は、本発明の生体物質固定化チップに固定化された生体物質と、この生体物質に特異的に結合し得る物質を含む試料とを反応させ、前記固定化生体物質との結合を介してチップに間接的に結合した物質を検出することにより、固定化生体物質、または、試料中の結合物質を分析する方法である。

以下に、プロテインチップを用いた分析法について説明する。

プロテインチップに固定化されたタンパク質に特異的に結合しうるタンパク質結合物質を含む試料としては、例えば、タンパク質（ペプチドも含む）、抗原性物質、核酸、医薬化合物を含む試料を挙げることができる。これらのタンパク質結合物質は一種類の物質であってもよいが、ランダムなタンパク質の混合物をタンパク質ライブラリーとして用いてもよい。また、ランダムな化合物の混合物を化合物ライブラリーとして用いてもよい。さらに、これらのタンパク質結合物質を含む試料としては、これらの物質を適当な緩衝液に溶解させた溶液であってもよいし、血液や細胞抽出液等の生体試料であってもよい。

本発明の分析法は種々の用途に用いることができる。例えば、固定化タンパク質として、特定の疾患に関与する医薬標的タンパク質を用い、タンパク質結合物質として医薬化合物のライブラリーを用いた場合には、標的タンパク質に結合する医薬のスクリーニングに

用いることができる。また、特定抗原に対する抗体を固定化タンパク質として、抗原を含む可能性のある血液等の試料をタンパク質結合物質を含む試料に用いた場合には、抗原の有無によって病気を診断するための測定装置にも用いることができる。さらに、ランダムなタンパク質の混合物をタンパク質ライブラリーとして固定化タンパク質に用い、特定タンパク質または特定化合物をタンパク質結合物質に用いた場合には、特定タンパク質または特定化合物に結合するタンパク質を探査するような、タンパク質の機能解析にも用いることができる。

なお、分析対象は、固定化タンパク質であっても、タンパク質結合物質であってもよい。固定化タンパク質との結合を介して担体に間接的に結合したタンパク質結合物質の検出は、例えば、以下のようにして行うことができる。なお、反応の際、導電性支持体または基材へタンパク質結合物質等が非特異的に結合することを防ぐために、タンパク質を固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン (BSA)、カゼイン、サケ精子DNA等を担体に接触させ、導電性支持体をブロックしておくことが好ましい。

固定化タンパク質とタンパク質結合物質を含む試料とを反応させた後、固定化タンパク質に結合したタンパク質結合物質を検出するには、通常の固相のイムノアッセイと同様に行えばよい。例えば、固定化タンパク質が測定対象である場合には、標識物質で標識しておいたタンパク質結合物質をプロテインチップと反応させ、導電性支持体に固定化された標識物質を検出又は定量することにより、タンパク質結合物質を検出又は定量することができ、結果として、固定化タンパク質を検出又は定量することができる。

また、タンパク質結合物質が測定対象である場合には、プロテインチップとタンパク質結合物質とを反応させる際に、反応系に標識物質で標識されたタンパク質結合物質をさらに加え、固定化タンパク質に結合した標識された物質の結合量により、間接的に試料中のタンパク質結合物質の量を定量することができる (阻害法)。

さらに、固定化タンパク質に結合したタンパク質結合物質の検出は、その物質に特異的に結合し得る抗体等を反応させることによっても行うことができる。例えば、タンパク質結合物質が抗原であり、固定化タンパク質がこの抗原に対する抗体 (第1抗体) である場合、導電性支持体-第1抗体-抗原複合体に、標識された他の抗体 (第2抗体) を反応させて導電性支持体-第1抗体-抗原-第2抗体複合体を形成させ、複合体中の第2抗体を検出することにより、タンパク質結合物質を検出することができる (サンドイッチ法)。

また、必ずしも標識物質自体が検出することができないものであってもよい。例えば標識物質としてビオチンを用いた場合には、これに特異的に結合するアビジン又はストربتアビジンを結合させた酵素等を用いることにより、間接的に検出することができる。

本発明は、また、プロテインチップに固定化されたタンパク質と、このタンパク質に特異的に結合し得るタンパク質結合物質を含む試料とを反応させ、反応により生じた、固定化されたタンパク質とこれに特異的に結合したタンパク質結合物質との複合体を、導電性支持体に酸化電位を印加することによって導電性支持体より脱離させた後、固定化されたタンパク質、または、試料中のタンパク質結合物質を分析する方法を提供する。

導電性支持体からの脱離は、酸化電位をタンパク質が固定化された導電性支持体に印加することによって達成できる。具体的には、タンパク質結合物質との反応に用いたプロテインチップを電解液に浸し、さらに、参照電極を用いて、プロテインチップの導電性支持体に酸化電位を印加することによって、プロテインチップに固定化された上記複合体を脱離させることができる。ここで、印加する電位は参照電極に対してプラスの電位であればよいが、導電性支持体に白金を用いた場合には、参照電極に対して+10mV以上が好ましく、参照電極に対して+100mV以上の電位がより好ましい。また、本発明の分析法においては、導電性支持体より脱離した、上記複合体を、複合体のまま分析してもよいし、固定化タンパク質とタンパク質結合物質とを分離してから分析してもよい。さらに、本発明の分析法は、固定化タンパク質、または、試料中のタンパク質結合物質の分析は、上記の定量的な分析に加えて、各種クロマトグラフィーや質量分析のような定性的な分析も含む。

< 4 > 本発明の生体物質精製方法

10

20

30

40

50

本発明はまた、本発明の生体物質固定化チップを利用した生体物質の精製方法を提供する。生体物質としては、タンパク質が好ましい。本発明のタンパク質精製方法は、金属イオン及び該金属イオンに配位結合する部位を有するタンパク質を含む溶液中に導電性支持体を浸し、該導電性支持体に還元電位を印加して前記タンパク質を該導電性支持体に固定化する工程、並びに前記工程で得られた前記タンパク質が固定化された導電性支持体を脱離用溶液中に浸し、該導電性支持体に酸化電位を印加して前記タンパク質を該導電性支持体より脱離させる工程を含む、精製方法である。本発明の精製方法においては、夾雑タンパク質を減らすために、固定化する工程と脱離させる工程の間に洗浄操作を行ってもよい。

上記方法においては、金属イオン、タンパク質、導電性支持体等は既述したものをを用いることができ、印加する電位等の反応条件も既述のとおりである。また、脱離用溶液も、電位を印加することができる限り特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液を用いることができる。精製はバッチ系でもフロー系でも行うことができる。精製に用いる導電性支持体は種々の形状のものを用いることができるが、精製効率を向上させるために、例えば、ホウキ状やスポンジ状などの表面積が大きくなるような形状が好ましい。本発明の方法によれば、通常精製に使用されるようなタンパク質の吸着及び溶出用の緩衝液が不要であり、目的タンパク質が希釈されることなく精製を行うことができる。

<5>本発明の固定化方法

本発明はさらに、金属イオンに配位結合する部位を有する物質を金属イオンと配位結合させたのち、導電性支持体に近接させ、該導電性支持体に還元電位を印加することにより、金属イオンに配位結合する部位を有する物質を導電性支持体上に固定化する工程を含む、物質の固定化方法を提供する。固定化する物質としては特に制限されず、タンパク質、核酸などの生体物質であってもよいし、低分子ポリマーなどの非生体物質であってもよい。具体的な固定化方法は、上述の「生体物質固定化チップの製造方法」と同様にして行うことができる。

【実施例】

以下実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

(1) ポリヒスチジン融合プロテインAの発現プラスミドの構築、大腸菌での発現、精製

固定化を行うタンパク質として、プロテインAのBサブユニット（アミノ酸配列：配列番号4）を5つ連結させたタンパク質にポリヒスチジンを連結したタンパク質を作製した。まず、プロテインAのBサブユニットをコードするDNAをPCR法により増幅した。鋳型には化学合成した配列番号3のポリヌクレオチドとその相補鎖である配列番号5のポリヌクレオチドの混合物を用いた。また、プライマーにはPst IとAcc Iサイトを有する5'側プライマー（配列番号1）とKpn IとAcc Iサイトを有する3'側プライマー（配列番号2）を用いた。PCR反応は95℃、60秒→60℃、30秒→72℃、60秒を30サイクル行った。

得られたPCR産物をAcc Iで消化し、ligationキット（宝酒造）を用いてプロテインAのBサブユニットをコードするDNAを複数連結させた。なお、Acc Iの認識配列は非回文配列なので、本酵素を用いることにより一方向にプロテインAを連結させることができる。次に、連結反応物をアガロースゲル電気泳動で確認し、5個連結された長さのものを切り出し、Blunting kit（宝酒造）を用いて平滑末端化して、pBluescript II SK（STRATAGENE）のEcoRVサイトに導入した。大腸菌を形質転換して得られたコロニーよりプラスミドを単離し、塩基配列をシーケンサーを用いて常法により決定した。得られたプラスミドをpBluescript II SK-protein Aと名付けた。

ポリヒスチジンを含むポリペプチド（アミノ酸配列：配列番号8）をコードするDNAは、合成DNA（配列番号6および7）を用いることにより、プロテインAをコードするDNAのカルボキシ末端に以下の手順で組み込んだ。配列番号6および7の合成DNAを

同一試験管内で10 mMのTris-EDTAバッファーに溶解し、64℃で1分加熱後、室温まで放冷することによりハイブリダイズさせ、HindIIIおよびKpnIで消化したpBluescript II SK-proteinAに導入した。塩基配列の確認は上記と同様にして行った。得られたプラスミドをpBluescript II SK-proteinA-Hisと名付けた。

pBluescript II SK-proteinA-Hisを大腸菌M15のコピペントセルにエレクトロポレーションによって導入し、アンピシリン耐性で選択することによって組換え大腸菌を得た。得られた組換え大腸菌を、LB培地において37℃で培養し、菌体濃度として600 nmでの吸光度が0.8になった時点で、Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosideを最終濃度0.1 mMとなるよう加えてさらに4時間培養し、タンパク質の発現を誘導した。発現したタンパク質は菌体を超音波破碎して得た可溶性画分からIgGセファロースカラム（ファルマシア）により精製し、ポリヒスチジン融合プロテインAを得た。

(2) ポリヒスチジン融合プロテインAの電気化学固定化

(1) で得たポリヒスチジン融合プロテインAを1 mlの0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 5.8) 中に最終濃度が0.3 mg/mlとなるように溶解し、さらに、最終濃度が200 mMとなるようにNiCl₂を添加して4℃で、2時間反応させ、Ni²⁺をポリヒスチジン融合プロテインAに配位させた。その後、遊離のNi²⁺を除去するため、透析カセット（スライドAライダー、Pierce社）にこのポリヒスチジン融合プロテインA-Ni²⁺溶液を1 ml入れ、Ni²⁺を含まないリン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 5.8) 1000 mlに対して透析を20分間ずつ2回行い、Ni²⁺配位ポリヒスチジン融合プロテインA溶液を得た。Ni²⁺の配位は原子吸光装置AA-670（島津製作所）を用いた原子吸光分析法により確認した。

このNi²⁺配位ポリヒスチジン融合プロテインAを含む溶液中に、固定化する担体として白金微小電極を挿入し、この白金電極を作用極とし、対極として白金コイル、参照電極として銀塩化銀電極を用いた3電極系により電位を印加し、固定化反応を行った。電位は、初期電位+300 mVを5秒間印加した後、定電位-100 mVを5分間印加した。なお、白金微小電極としては、ソーダガラス管（外径1.2 mm）に外径50 μmの白金線を挿入し、ヒーターで封入後、先端をダイヤモンドペーパー（0.1 μmメッシュ）で研磨したものをを用いた。

通常、電位を印加すると充電に基づく非ファラデー電流が流れるが、還元反応があると非ファラデー電流に加えてファラデー電流が観測される。電位を印加したことにより2価のニッケルイオンがゼロ価のニッケル原子に変化したことは、このファラデー電流を測定することにより確認できる。ファラデー電流の値は、実際の電流値とNi²⁺を含まない反応系で測定された非ファラデー電流の電流値との差から求めた。その結果、上記固定化反応において、320 μA/cm²のファラデー電流が観測され、2価のニッケルイオンがゼロ価のニッケル原子に変化したことが確認できた。

(3) ポリヒスチジン融合プロテインAの固定化状態の評価

Ni結合ポリヒスチジン融合プロテインAの固定化状態の評価は、プロテインAが抗体IgGタンパク質と特異的に結合することを利用して行った。0.5 mg/mlの濃度の西洋わさびペルオキシダーゼ標識IgG（和光純薬）を含んだ0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に、前記(2)で得たポリヒスチジン融合プロテインAを固定化した微小電極を浸漬し、室温で1時間インキュベートした。その後、この微小電極を、ペルオキシダーゼ標識IgG（和光純薬）を含まない0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で超音波洗浄器W-113（ホンダ製作所）を用いて超音波洗浄した。次に、この電極をペルオキシダーゼ発光基質溶液DuoLux（Pierce社）に浸漬し、ルミノメータGene Light 55（マイクロテックニチオン）で発光量を測定した。さらに、高感度CCDカメラL-1100（キーエンス社）を用いることにより、発光状態の観察も行った。

図2に発光量の測定結果を示した。Ni²⁺を配位したポリヒスチジン融合プロテイン

A溶液を用いて、電位を印加せずに浸漬のみ行った電極においては発光反応は起こらなかった。一方、 Ni^{2+} を配位したポリヒスチジン融合プロテインA溶液に微小電極を挿入し、 -100 mV の還元電位を印加した微小電極では発光反応が確認された。発光量を光電増倍管で測定したところ 1.4×10^{10} cps (count per second)であった。なお、図2には示していないが、 Ni^{2+} を配位させなかったポリヒスチジン融合プロテインAを用いて上記と同様にして電位を印加した電極では、発光反応は起こらなかった。

図3に高感度CCDカメラにより発光反応を行った電極の写真に示した。 Ni^{2+} を配位させなかったポリヒスチジン融合プロテインAを用いて電気化学固定化を行った電極(A)では発光反応は起こらなかった。また、 Ni^{2+} を配位したポリヒスチジン融合プロテインA溶液を用いて、電位を印加せずに浸漬のみ行った電極においても発光反応は起こらなかった(B)。一方、 Ni^{2+} を配位したポリヒスチジン融合プロテインA溶液に微小電極を挿入し、 -100 mV の還元電位を印加した微小電極では発光反応が確認された(C)。なお、図3においては、A、Bでは発光が観察されなかったため、電極の位置を破線で示した。以上より、ポリヒスチジン融合プロテインAに配位した Ni^{2+} を電気化学的に還元してNi原子にすることにより、ポリヒスチジン融合プロテインAが安定に固定化できたことが示された。

また、固定化可能な電位の範囲を調べるため、 $+200\text{ mV} \sim -400\text{ mV}$ の範囲で電位を印加して固定化を行い、得られた固定化電極を西洋わさびペルオキシダーゼ標識IgGを用いた発光実験で評価した。その結果、データは示さないが、 -100 mV 以上の電位であれば固定化が可能であることが確認できた。

(4) 固定化したポリヒスチジン融合プロテインAの脱離

上記の手順で白金電極上に固定化したポリヒスチジン融合プロテインAを、 $+250\text{ mV}$ の電位を印加することによって脱離させた。図は示さないが、ポリヒスチジン融合プロテインAが電極より脱離されたことは、上記と同様に、西洋わさびペルオキシダーゼ標識IgGを用いた発光法によって確認できた。また、脱離可能な電位の範囲を調べたところ、 $+100\text{ mV}$ 以上の電位を印加することによって脱離できることがわかった。

(5) 先端を先鋭化した白金支持体へのポリヒスチジン融合プロテインAの固定化

シリコン基材の先鋭化した先端に白金をコートした探針を有するカンチレバー(Micro cantilever with platinum coat、オリンパス社)を電極に用い、以下の手順で、ポリヒスチジン融合プロテインAを固定化した。すなわち、カンチレバーに5%ウシ血清アルブミン水溶液を滴下し、ブロッキングを行ったのち、上記と同様にして Ni^{2+} を配位させたポリヒスチジン融合プロテインA溶液にカンチレバーを浸漬し、銀塩化銀参照電極に対して -50 mV の電位を5分間印加した。固定化は電子顕微鏡を用いることにより確認できた。

(6) 大腸菌破砕物からのポリヒスチジン融合プロテインAの精製

上記のpBluscript II SK-proteinAで形質転換した大腸菌を、6穴プレートに $15\text{ mL}/穴$ で入れたLB培地中、 37°C で、4時間培養した後、IPTGを加えてさらに4時間培養した。培養後、プレート遠心分離機により菌体を沈殿させ、上澄のLB培地を Ni^{2+} を含むリン酸緩衝液(組成は上記と同じ)に交換した。次に、プレート各穴において、プローブ式超音波破砕機を用いて菌体を破砕した。その後、図4のようにして、ホウキ状の精製用支持体を破砕後の溶液に挿入し、支持体に -100 mV を印加して溶液中のポリヒスチジン融合プロテインAを支持体に固定化した。

次に、上記溶液から精製用支持体を抜き、図4と同様にして、別の6穴プレートに入れた脱離用緩衝溶液($0.1\text{ M KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M KCl pH 7.0)に支持体を浸し、該支持体に $+250\text{ mV}$ の電位を印加し、固定化されたポリヒスチジン融合プロテインAを該緩衝溶液中に脱離させた。その結果、1穴あたり 0.45 mg のポリヒスチジン融合プロテインAを精製することができた。以上により、カラムでの溶出緩衝液による希釈などを伴わずに、タンパク質の精製を、迅速かつ簡便に行うことができた。

【産業上の利用の可能性】

本発明の生体物質固定化チップは、タンパク質などの生体物質を一定の配向性のもと、安定に保持することができ、医薬のスクリーニング等に好適に用いられる。また、生体物質を脱離させることも可能なため、基材や生体物質の再利用ができ、反応後の生体物質の解析も可能であるため、研究用にも好適である。さらに、生体物質の迅速かつ簡便な精製にも有用である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>	Kitakyushu Foundation for the Advancement of Industry Science and Technology	10
<120>	生体物質固定化チップおよびその利用	
<130>	OP-C4005-PCT	
<150>	JP 2003/69924	
<151>	2003-03-14	20
<150>	JP 2003/207081	
<151>	2003-08-11	
<160>	8	
<170>	PatentIn version 3.1	
<210>	1	30
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	1	40
	gctgcagtag acaacaaatt caacaagaa c	31
<210>	2	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		50

<223> primer

<400> 2

cggtagcgtc tacttttggt gcttgagcat c 31

<210> 3

<211> 177

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus 10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(177)

<223>

<400> 3

gac aac aaa ttc aac aaa gaa caa caa aat gct ttc tat gaa att tta 48 20
 Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 1 5 10 15

cat tta cct aac tta act gaa gaa caa cgt aac ggc ttc atc caa agc 96
 His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 20 25 30

ctt aaa gac gat cct tca gtg agc aaa gaa att tta gca gaa gct aaa 144 30
 Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys
 35 40 45

aag cta aac gat gct caa gca cca aaa gct aga 177
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Arg
 50 55

<210> 4

<211> 59

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus 40

<400> 4

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 1 5 10 15

His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 20 25 30

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys 10
 35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Arg
 50 55

<210> 5

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial 20

<220>

<223> complementary

<400> 5

tctagctttt ggtgcttgag catcgtttag ctttttagct tctgctaaaa tttctttgct 60

cactgaagga tcgtctttaa ggctttggat gaagecgtta cgttgcttct cagttaagtt 120 30

aggtaaagt aaaatttcat agaaagcatt ttgttgttct ttgttgaatt tgttgtc 177

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

40

<400> 6

ccatcatcac caccatcact a

21

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

10

<400> 7

agcttagtga tgggtgat gatgggtac

29

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> poly Histidin

<400> 8

Gly Thr His His His His His His

1

5

30

【図 1】

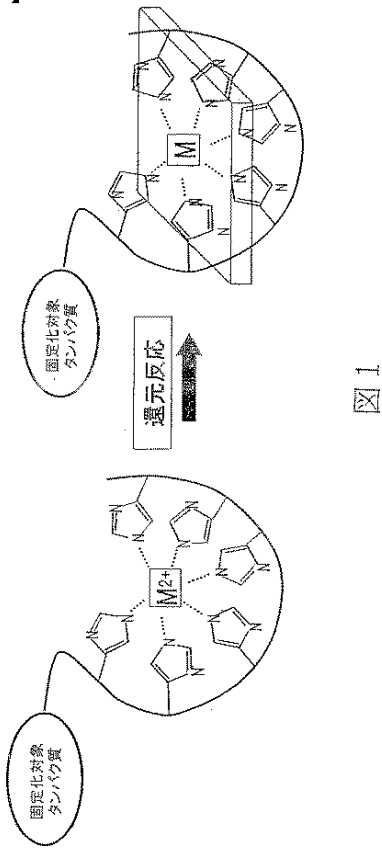


図 1

【図 2】

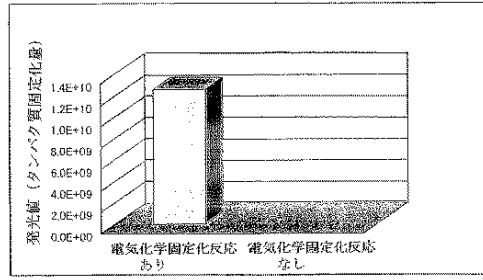


図 2

【図 3】

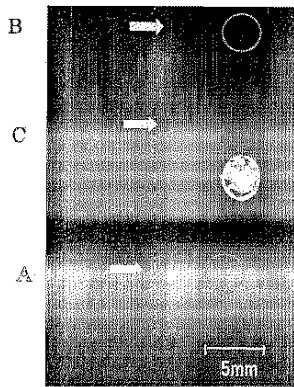


図 3

図 3

【図 4】

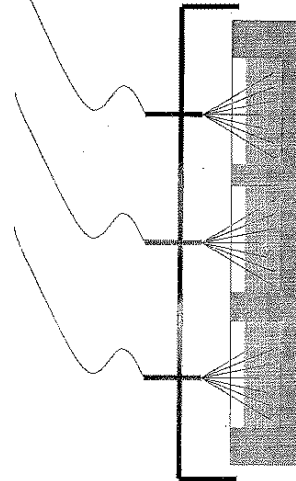


図 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2004/002410
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JOIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-017352 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 22 January, 2002 (22.01.02), & US 2001005322 A	1-14
A	JP 2001-343386 A (NGK Insulators, Ltd.), 14 December, 2001 (14.12.01), & WO 00/1029561 A & EP 1143252 A & US 6365378 A	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 June, 2004 (24.06.04)		Date of mailing of the international search report 13 July, 2004 (13.07.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/002410
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2004年 日本国登録実用新案公報 1994-2004年 日本国実用新案登録公報 1996-2004年		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JOIS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-017352 A (富士写真フィルム株式会社) 2002.01.22 & US 2001005322 A	1-14
A	JP 2001-343386 A (日本碍子株式会社) 200 1.12.14 & WO 00/1029561 A & EP 1143252 A & US 6365378 A	1-14
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		の日の後に公表された文献
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」 同一パテントファミリー文献
国際調査を完了した日	24.06.2004	国際調査報告の発送日
		13.7.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典
		2J 9507
		電話番号 03-3581-1101 内線 3251

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于检查样本的方法和用于容纳用于该方法的样本的容器		
公开(公告)号	JPWO2004081568A1	公开(公告)日	2006-06-15
申请号	JP2005503524	申请日	2004-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社		
[标]发明人	小堀樹一郎 川本道子 牛澤幸司		
发明人	小堀 樹一郎 川本 道子 牛澤 幸司		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 B01L3/14 G01N33/53		
CPC分类号	B01L3/50825 B01L2300/046 B01L2300/0681 G01N33/5304 G01N2333/11		
FI分类号	G01N33/543.597 G01N33/569.L		
代理人(译)	石井雄 后藤早苗		
优先权	2003063832 2003-03-10 JP		
其他公开文献	JPWO2004081568A5 JP4229943B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在样品免疫学测试方法中，将含有浸渍有标记抗体的过滤器的盖子的盖子连接到含有稀释样品液体的容器体上，并将稀释的样品液体从容器注入测试装置中以观察反应以及测试样品以检查样品中是否存在物体的方法。它减少了检查者之间个体差异的影响，防止了非特异性反应的发生，并且是一种检测方法，其具有丰富的诊断结果的再现性和试剂的储存稳定性。一种用于上述检查方法的样品储存容器，其中含有浸渍有标记抗体的过滤器的盖子的盖子附着在容器体上，用于储存稀释的样品液体。它适合作为简单诊断试剂盒的组件。

