

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-89532
(P2008-89532A)

(43) 公開日 平成20年4月17日(2008.4.17)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 T
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 O 1 B

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2006-273652 (P2006-273652)
 (22) 出願日 平成18年10月5日 (2006.10.5)

(71) 出願人 305051185
 有限会社 サイトローブ
 東京都文京区湯島3丁目21番5号
 (72) 発明者 伊藤 徹
 東京都足立区中川1-3-11-503

(54) 【発明の名称】 多孔質担体上における抗原抗体反応を高速で行う方法および装置

(57) 【要約】

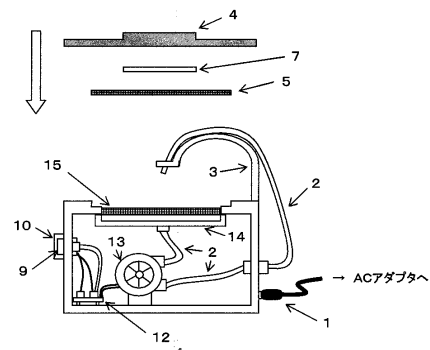
【課題】

ウエスタンブロッティングに代表される多孔質担体上で抗原抗体反応を行う方法において、従来行われている振とうによる免疫染色の方法では、ブロッキングから二次抗体の洗浄工程に渡り4時間から一晩の時間をかけて行う必要があった。本発明ではこの工程を高速で行うための方法および装置を提供する。

【解決手段】

流体制御装置により、溶液（抗体溶液または抗原溶液）を多孔質担体に対し流した後溶液を循環させることにより再度多孔質担体へ持続的に流すこと、ならびに多孔質担体に対し溶液（抗体溶液または抗原溶液）を流す工程ならびに溶液の流れを止める工程を交互に行いそれを繰り返すことにより、一定の濃度と量の溶液に対し抗原抗体反応を促進させ反応を高速で行う。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多孔質担体上で抗原抗体反応を行う方法において、抗原（または抗体）が固定された多孔質担体に対し抗体溶液（抗体が多孔質担体に固定された場合は抗原溶液）を流し、その後溶液を循環させることにより多孔質担体に対し持続的に溶液を流すことにより、一定の濃度と量の溶液に対し抗原抗体反応を促進させ反応を高速で行う方法。

【請求項 2】

多孔質担体上で抗原抗体反応を行う方法において、抗原（または抗体）が固定された多孔質担体に対し抗体溶液（抗体が多孔質担体に固定された場合は抗原溶液）を流す工程ならびに溶液の流れを止める工程を交互に行いそれを繰り返すことにより、一定の濃度と量の溶液に対し抗原抗体反応を促進させ反応を高速で行う方法。

10

【請求項 3】

多孔質担体上で抗原抗体反応を行う方法において、請求項 1 に記載の方法と請求項 2 に記載の方法を組み合わせた方法。

【請求項 4】

多孔質担体上で抗原抗体反応を行うための装置において、多孔質担体上から流体制御装置により溶液を流した後循環させ多孔質担体に対し持続的に流す手段を有することを特徴とする装置。

【請求項 5】

多孔質担体上で抗原抗体反応を行うための装置において、多孔質担体上から流体制御装置により溶液を流す工程と溶液の流れを止める工程を繰り返すためのパルススイッチを有することを特徴とする装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、ウエスタンブロッティングに代表される多孔質担体上における免疫染色工程における方法およびそれを実現するための装置に関する。

【背景技術】

【0002】

従来のウエスタンブロッティングに代表される多孔質担体上における免疫染色工程では、ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応、洗浄の各工程において、トレーに入れた各溶液中に多孔質担体を浸した状態でトレーを振とうさせることにより、各反応を行っている。

30

【0003】

トレー内の溶液に多孔質担体を浸し振とうさせることにより各工程を行う従来の方法では、反応を完了させるまでに相当の時間がかかる。各工程の典型的な所要時間は、室温でブロッキング - 1 時間、洗浄 - 1 分 ~ 15 分、一次抗体反応 - 1 時間、洗浄 - 30 分、二次抗体反応 - 1 時間、洗浄 - 30 分であり、合計 4 時間以上である。（非特許文献 1、2、特許文献 1）

【0004】

例えば非特許文献 2 では、多孔質担体を溶液中に浸し振とうする方法について記載している。それによればブロッキングで 1 時間 5 分、一次抗体反応で 1 時間、その後の洗浄で約 30 分、二次抗体反応で 1 時間、その後の洗浄で 40 分、合計 4 時間 15 分かかる工程を標準的な方法としている。

40

【0005】

したがって、従来の方法では作業の開始から終了に至るまで長時間かかるという欠点があった。

【非特許文献 1】改訂第 3 版 タンパク質実験ノート 下巻 分離同定から機能解析へ
岡田雅人，宮崎 香 / 編 1997 羊土社

【非特許文献 2】バイオ実験イラストレイテッド 5 タンパクなんてこわくない 西方

50

敬人 1996 秀潤社

【特許文献1】特許2942587

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は以上のような従来の方法の欠点に鑑み、ウエスタンブロッティングに代表される多孔質担体上における抗原抗体反応を高速で行う方法および装置を提供することを目的としている。

【0007】

ウエスタンブロッティングに代表される多孔質担体上における抗原抗体反応に要する時間は、用いられる多孔質担体に固定されている抗原分子（または抗体分子）と抗体溶液中の抗体分子（固定されている分子が抗体分子の場合は抗原分子）が単位時間あたりに会合する数に依存すると考えられる。すなわち会合の回数が単位時間あたり少なければ反応が完了するまでにそれだけ時間を要し、多ければ短時間で反応が完了する。

10

【0008】

従来振とうによる方法では抗原分子と抗体分子の会合の数に限界があること、ならびに常に溶液が動いているため抗原と抗体の結合が安定化される時間がないことから、反応が完了するまでに一次抗体、二次抗体それぞれの反応時間を1時間以上かけて反応させる必要があった。

【0009】

本発明では、一つには一定の濃度と量の溶液を用いて単位時間あたりの抗原分子と抗体分子の会合の数を増加させることを課題としている。

20

【0010】

また抗原分子と抗体分子の会合の数を単純に増加させようとして多孔質担体に対する溶液の流速を上げた場合、溶液の流速が抗原分子と抗体分子の安定的な結合を妨げることが問題となる。そこで本発明では、抗原分子と抗体分子の単位時間あたりの会合の数を増加させつつ、抗体分子と抗原分子の間の安定的な結合を形成することも課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は、上記事情に鑑み、鋭意研究の結果、抗原分子（または抗体分子）を固定した多孔質担体に対し抗体溶液（抗体が多孔質担体に固定された場合は抗原溶液）を流した後さらに溶液を循環させることにより、一定の濃度と量の溶液を用いて、抗原分子と抗体分子の単位時間あたりの会合の数を増やすことができ、その結果抗原抗体反応を促進させ反応を高速で行うことができることを見出した。

30

【0012】

また抗原分子（または抗体分子）を固定した多孔質担体に抗体溶液（抗体が多孔質担体に固定された場合は抗原溶液）を流す工程ならびに溶液の流れを止める工程を交互に行いそれを繰り返すことにより、抗体の安定的な結合が形成され、その結果一定の濃度と量の溶液に対し抗原抗体反応が促進され反応が高速で行われることを見出しこの発明を完成するに至った。

40

【発明の効果】

【0013】

本発明による多孔質担体上における抗原抗体反応を高速で行う方法および装置では、
（1）一定の濃度と量の抗体溶液（または抗原溶液）を用いて抗原分子と抗体分子の単位時間あたりの会合の数を増加することができる

（2）一定の濃度と量の抗体溶液（または抗原溶液）を用いて、抗原分子と抗体分子の単位時間あたりの会合の数を増加させつつ、抗体分子と抗原分子の間の安定的な結合を形成することができる

従って抗原抗体反応が促進され反応を高速で行うことができるという効果を有する。同時に本発明による装置を用いることにより、免疫染色工程におけるブロッキングの所要時間

50

を削減するという利点も持つ。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明を実現するための装置を図面を用いて詳細に説明する。図1は装置の側面図である。装置上面に設置される部品を分解して示した。筐体上面には溶液排出部(15)があり、その上に樹脂製あるいは金属製の網目状支持板(5)が設置される。その上に多孔質担体(7)が設置される。網目状支持板は、多孔質担体の全面から均等に溶液を流し通すことができる例えばナイロンメッシュのような樹脂製または金属製の板である。多孔質担体は市販され一般にウエスタンブロッティング用に用いられている例えばポアサイズ0.45 μmのPVDFメンブレン(Immobilon、MILLIPORE社製)で十分である。多孔質担体の上には貯水窓を持つシリコンゴム製の多孔質担体カバー(4)が設置される。多孔質担体の四辺が多孔質担体カバーの下に位置し、多孔質担体カバーの弁の働きで溶液が多孔質担体の外側から溶液貯留区へ流れ出すのを防ぐ。

10

【0015】

貯水窓部分(図3の6)多孔質担体上に各種溶液を加えた後、電気ポンプ(13)を駆動させる。溶液は電気ポンプに吸引され、溶液排出部(15)、溶液貯留区(14)を通過する。電気ポンプを通過した溶液は排液チューブ(2)を通り、チューブ固定具(3)により多孔質担体上に注がれる。電気ポンプが駆動している間、溶液は循環し続け抗原分子と抗体分子の会合が起こることになる。

【0016】

装置は図2に示すようにポンプのON/OFFスイッチ(9)、ポンプのパルススイッチ(11)ならびに電圧調節つまみ(10)を持つ。

20

【0017】

貯水窓へ各種溶液を加えた後、ポンプ電源をONにすることにより溶液を排液チューブ先より多孔質担体上へと循環させたり外部へ排出させたりする。

【0018】

パルススイッチにより電気ポンプは一定時間の稼働と停止を交互に繰り返す。

【0019】

次に該装置を用いて行う多孔質担体上の抗原抗体反応の方法を説明する。一次抗体溶液、二次抗体溶液、洗浄溶液は、従来法と同様の組成のものを用いる。

30

【0020】

典型的な反応方法を示す。ブロッキング工程では溶液を貯水窓に加えた後、5分間溶液を循環させる。一次抗体反応では、電気ポンプの稼働と停止を5秒ずつ繰り返しながら、15分間溶液を循環させる。二次抗体反応では、電気ポンプの稼働と停止を5秒ずつ繰り返しながら、15分間溶液を循環させる。二次抗体反応の後だけ洗浄工程を行う。洗浄工程では、洗浄溶液を0.5-2ml/cm²使用して溶液を循環させずに排出させる。これにより合計約40分間で免疫染色工程が完了する。ここに書いた方法および装置は発明を実施するための最良の形態を示したものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0021】

〔実施例1〕本発明によるウエスタンブロッティングの免疫染色工程として一次抗体として / -Tublin抗体を用いて、〔0022〕～〔0030〕に示す請求項1記載の溶液の循環による方法と請求項2記載のポンプの稼働と停止を繰り返す方法を組み合わせた方法で免疫染色を行った。

40

【0022】

ヒト各組織由来全タンパク質を各20 μgずつブロッティングしたPVDFメンブレン(INSTA-Blot、IMGEX社製)を77mm×87mmに切り、図1に示す本発明の装置のナイロンメッシュ上に設置した。次に60mm×75mmの貯水窓を切ったシリコンシートを装置上に設置した。その際、メンブレンの縁にシリコンシートの貯水窓の縁がかぶるようにメンブレンの位置を調整した。実験はすべて室温で行った。

50

【0023】

カゼインバッファ（Blocker Casein in TBS, 1x, Pierce社製）に最終濃度0.1%となるようTween-20を加えブロッキング溶液とした。

【0024】

貯水窓内部メンブレン上に10mlのブロッキング溶液を満たし、排液チューブの先を貯水窓上に設置した後、ポンプ電源を入れブロッキング液がメンブレン微細孔内部を通過する状態で5分間循環させた。その後、ブロッキング液を排出した。

【0025】

/ -Tublin抗体（Cell Signaling Technology社製）を1/1000(v/v)の濃度となるようにブロッキング液に溶解し、一次抗体溶液とした。

10

【0026】

貯水窓内部メンブレン上に10mlの一次抗体溶液を満たし、排液チューブ先を貯水窓上に設置した後、ポンプ電源を入れ一次抗体溶液がメンブレン微細孔を通過する状態で10分間溶液を循環させた。その間ポンプの稼働と停止の切り替えを5秒おきに行った。その後、一次抗体溶液を排出した。

【0027】

HRP結合Anti-rabbit IgG抗体（Cell Signaling Technology社製）を1/1000(v/v)の濃度となるようにブロッキング液に溶解し、二次抗体溶液とした。

【0028】

貯水窓内部メンブレン上に10mlの二次抗体溶液を満たし、排液チューブ先を貯水窓上に設置した後、ポンプ電源を入れ二次抗体溶液がメンブレン微細孔を通過する状態で10分間溶液を循環させた。その間ポンプの稼働と停止の切り替えを5秒おきに行った。その後、二次抗体溶液を排出した。

20

【0029】

貯水窓内部メンブレン上に10mlの1×TBST溶液を洗浄溶液として満たし、ポンプ電源を入れ洗浄溶液をメンブレン微細孔を通過させた後、洗浄溶液を排出した。同工程を計4回繰り返した。

【0030】

メンブレンを装置から取り出し、1×TBST溶液で軽く濯いだ後、化学発光検出システム（ECL Plus Western Detection Reagents、GE Healthcare社製）を用いて、発光反応を行った。その後、イメージアナライザー（LAS-1000、富士写真フィルム社製）を用いて検出を行った。露光は20秒行った。結果を図5に示す。

30

【0031】

本発明による請求項1記載の溶液の循環による方法と請求項2記載の流体制御装置の稼働と停止を繰り返す方法を組み合わせた方法は、後に記載する溶液の循環のみによる方法（結果：図6）ならびに従来法を改変した短時間の免疫染色工程（結果：図8）に比べ、反応が促進されていることがわかる。

【0032】

次に本発明によるウエスタンブロッティングの免疫染色工程として請求項1記載の溶液の循環による方法で免疫染色を行った。実験の各種条件は〔0022〕～〔0030〕記載の方法と同じ条件で行い、一次抗体溶液、二次抗体溶液の制御のみ、ポンプの稼働と停止の切り替えを行わず溶液が流れ続ける状態に変更して、各10分間反応を行った。

40

【0033】

〔0030〕に記載の方法で、化学発光ならびに検出を行った。結果を図6に示す。

【0034】

本発明による請求項1記載の溶液の循環による方法では、溶液の循環による方法と流体制御装置の稼働と停止を繰り返す方法を組み合わせた方法（結果：図5）に反応の促進で及ばないものの、従来法を改変した短時間の免疫染色工程（結果：図8）に比べ、反応が促進されていることがわかる。

【0035】

50

対照実験(1)として〔0036〕～〔0041〕に示す従来法でウエスタンブロッティングの免疫染色工程を行った。ヒト各組織由来全タンパク質をプロットしたメンブレン、ブロッキング溶液、一次抗体溶液、二次抗体溶液ならびに洗浄溶液は、本発明による方法〔0021〕～〔0029〕で用いたものと同じものを用いた。

【0036】

実験はすべて室温で行った。90mm×90mmのプラスチックトレー内にブロッキング溶液を10ml満たし、その中にメンブレンを浸した。その後、振とう装置を用いて1時間、プラスチックトレーを振とうした。

【0037】

プラスチックトレーからブロッキング溶液を除いた後、一次抗体溶液を10ml、プラスチックトレーに加え、1時間、プラスチックトレーを振とうした。

10

【0038】

プラスチックトレーから一次抗体溶液を除いた後、洗浄溶液を10ml、プラスチックトレーに加え、2分間、プラスチックトレーを振とうした。その後、洗浄溶液を交換し振とうする工程をさらに2分間振とう、15分間振とう、15分間振とうと繰り返した。

【0039】

プラスチックトレーから洗浄溶液を除いた後、二次抗体溶液を10ml、プラスチックトレーに加え、1時間、プラスチックトレーを振とうした。

【0040】

プラスチックトレーから二次抗体溶液を除いた後、洗浄溶液を10ml、プラスチックトレーに加え、2分間、プラスチックトレーを振とうした。その後、洗浄溶液を交換し振とうする工程をさらに2分間振とう、15分間振とう、15分間振とうと繰り返した。

20

【0041】

〔0030〕と同じ方法で、化学発光ならびに検出を行った。結果を図7に示す。

【0042】

本発明により抗原抗体反応が加速されていることを、より明確に示すため対照実験(2)として従来法を改変した振とうによる短時間の免疫染色工程を行った。全工程は〔0036〕～〔0041〕に準じ、ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応におけるメンブレンの溶液中の振とうの時間を本発明の方法に模し1時間から10分間に変更した。また一次抗体反応および二次抗体反応の後の洗浄工程では、5分間の振とうを2回ずつ行った。

30

【0043】

〔0030〕と同じ方法で、化学発光ならびに検出を行った。結果を図8に示す。

【0044】

図5～図8に示す4つの実験が示すように、本発明による方法(結果:図5、図6)では一次抗体反応、二次抗体反応、各10分、免疫染色工程全部で約30分という所要時間で、同様の所要時間の振とうによる方法(結果:図8)よりも明らかに反応が進み、所要時間4時間以上かかる従来法(結果:図7)に近いシグナルが得られることがわかる。したがって本発明による方法および装置を用いて、多孔質担体上の抗原抗体反応が促進され反応が高速で行われることが示された。

40

【産業上の利用可能性】

【0045】

本発明によれば、簡単な構造の装置を用いて簡便な操作により、これまでに長時間かかっていたウエスタンブロッティングに代表される多孔質担体上の免疫染色工程の所要時間を著しく短縮できるため、従来ウエスタンブロッティング等が広く行われている生命科学分野の研究開発や食品検査、臨床検査等において利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】多孔質担体上における抗原抗体反応を高速で行うための装置側面の断面図

【図2】多孔質担体上における抗原抗体反応を高速で行うための装置の正面図

【図3】多孔質担体上における抗原抗体反応を高速で行うための装置の平面図

50

【図4】制御要素およびそれらの関係を示すブロックダイヤグラム

【図5】この発明の溶液の循環による方法とポンプの稼働と停止を繰り返す方法を組み合わせた方法による抗ヒト / チューブリン抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロットティング免疫染色の結果

【図6】この発明の溶液の循環による方法による抗ヒト / チューブリン抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロットティング免疫染色の結果

【図7】通常の従来振とう法による抗ヒト / チューブリン抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロットティング免疫染色の結果

【図8】短時間の振とう法による抗ヒト / チューブリン抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロットティング免疫染色の結果

【符号の説明】

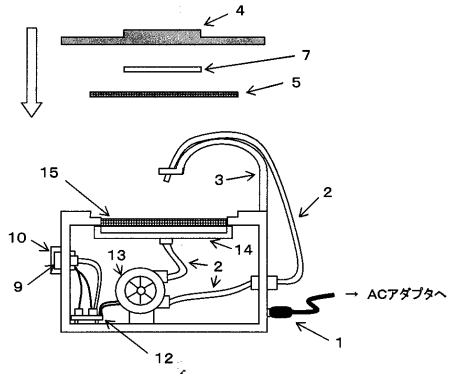
【0047】

- 1 . ACアダプタプラグ
- 2 . 排液チューブ
- 3 . チューブ固定具
- 4 . 貯水窓を持つシリコンゴム製の多孔質担体カバー
- 5 . 網目状支持板
- 6 . 貯水窓
- 7 . 多孔質担体
- 8 . 電源スイッチ
- 9 . ポンプスイッチ
- 10 . 電圧調節つまみ
- 11 . パルススイッチ
- 12 . 制御基盤
- 13 . 電気ポンプ
- 14 . 溶液貯留区
- 15 . 溶液排出部

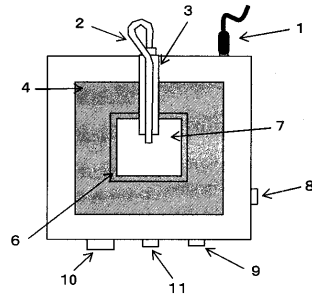
10

20

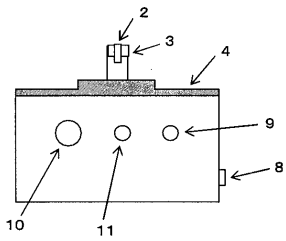
【 図 1 】



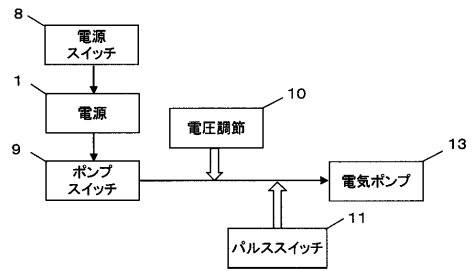
【 図 3 】



【 図 2 】



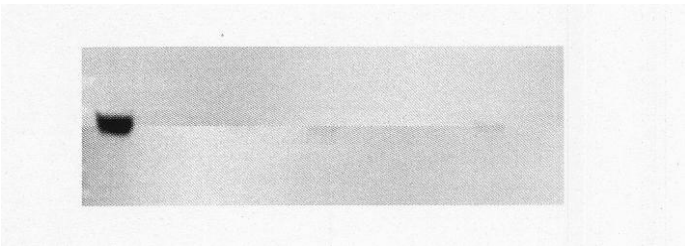
【 図 4 】



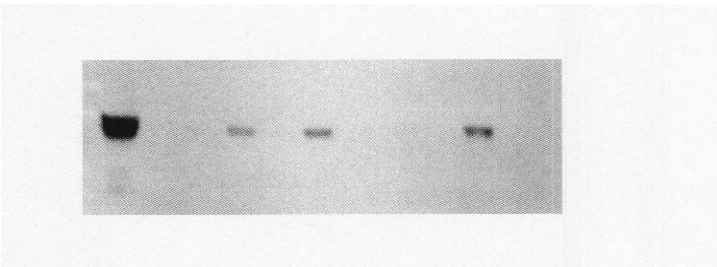
【 図 5 】



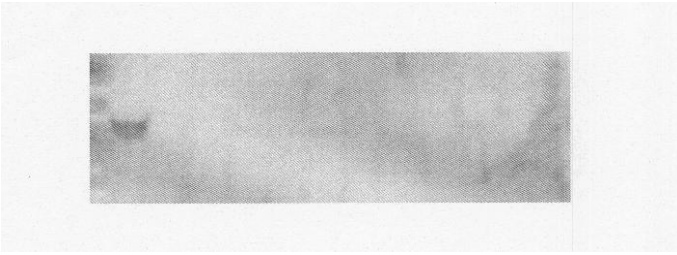
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成19年4月17日 (2007.4.17)

【 手続補正 1 】

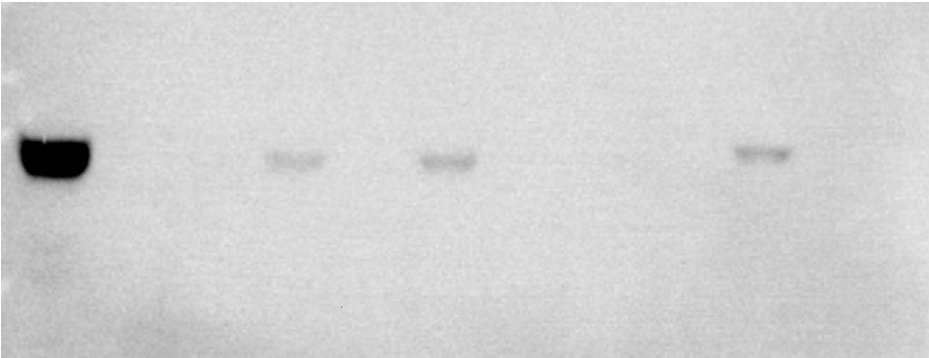
【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 5

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 5 】



【 手続補正 2 】

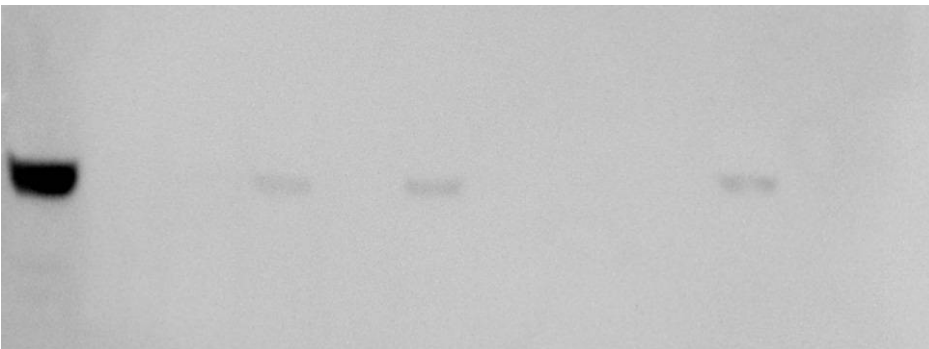
【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 6

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 6 】



【 手続補正 3 】

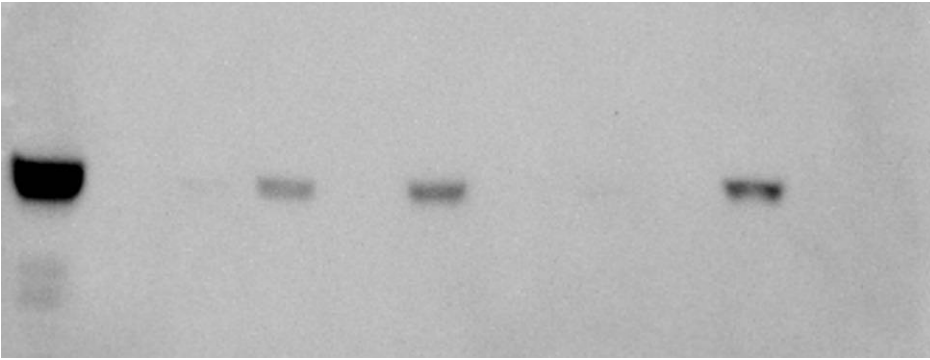
【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 7

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 7 】



【 手続補正 4 】

【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 8

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 8 】



专利名称(译)	用于在多孔载体上高速进行抗原 - 抗体反应的方法和装置		
公开(公告)号	JP2008089532A	公开(公告)日	2008-04-17
申请号	JP2006273652	申请日	2006-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	网站长袍		
申请(专利权)人(译)	有限公司网站法袍		
[标]发明人	伊藤 徹		
发明人	伊藤 徹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.T G01N33/543.501.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为了提供一种从阻断到清洗过程的方法，在常规的免疫染色方法中，通过摇动对于在孔隙率上进行抗原 - 抗体反应的方法，需要跨越4小时到过夜。以Western印迹为代表的载体。解决方案：已经使孔隙载体中流动的溶液（抗体溶液或抗原溶液）再次通过流体控制装置在孔隙载体中连续循环；一组由使溶液（抗体溶液或抗原溶液）流入孔隙载体的过程组成；通过交替重复停止溶液流动的过程，通过促进对固定浓度和体积的溶液的反应，高速进行抗原 - 抗体反应。Z

