

(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2010-181155

(P2010-181155A)

(43) 公開日 平成22年8月19日(2010.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 O 1 J
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	B
<b>GO 1 N 33/552 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/552	
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2009-22217 (P2009-22217)	(71) 出願人	306037311 富士フイルム株式会社
(22) 出願日	平成21年2月3日 (2009.2.3)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	楊 博 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内

(54) 【発明の名称】 物質固定基板の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】免疫学的測定方法への適用に際してS/N比を向上させ得る物質固定基板を簡便に製造する方法及び該方法により得られる物質固定基板を提供することにある。

【解決手段】基板上に、被験物質と相互作用する物質及びブロッキング剤を0.2~2.5のモル比(物質/ブロッキング剤)で含む溶液を塗布する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

基板上に、被験物質と相互作用する物質及びブロッキング剤を 0.2 ~ 2.5 のモル比 (物質 / ブロッキング剤) で含む溶液を塗布することを含む、物質固定基板の製造方法。

**【請求項 2】**

被験物質が抗原であり、かつ被験物質と相互作用する物質が抗体である、請求項 1 に記載の物質固定基板の製造方法。

**【請求項 3】**

被験物質がホルモンであり、かつ被験物質と相互作用する物質がホルモン受容体である、請求項 1 に記載の物質固定基板の製造方法。

**【請求項 4】**

基板が、金属、プラスチック、又はガラスである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の物質固定基板の製造方法。

**【請求項 5】**

ブロッキング剤が、グロブリン、アルブミン、カゼイン、ゼラチン、スキムミルク、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンからなる群から選択される少なくとも一種である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の物質固定基板の製造方法。

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の物質固定基板の製造方法によって得られる、物質固定基板。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、基板上に、被験物質と相互作用する物質及びブロッキング剤を所定の割合で含む溶液を塗布することを特徴とする物質固定基板の製造方法に関する。さらに、本発明は該方法により得られる物質固定基板に関する。

**【背景技術】****【0002】**

現在、臨床検査等で免疫反応など分子間相互作用を利用した測定が数多く行われているが、いずれの技術の場合も、生理活性物質を固定化する表面を持つ基板が重要である。バイオセンサーの機能は、さまざまな生体触媒成分や生化学的結合反応成分をセンサー表面に固定し、分析対象物質との相互作用をセンサーで検知することによって実現されている。センサー表面に固定化された成分は、分析対象物質との反応に必要な活性を安定に保持していなければならない。また、センサー表面は、不必要なシグナルをセンサーにもたらさないように、安定である必要がある。

**【0003】**

センサー表面への物質の固定化は、物理吸着による固定化及び化学的な結合反応による固定化に大別される。物理吸着による固定化としては、疎水性樹脂表面へのタンパク質の吸着があげられる。ELISA で用いる抗体固定化プレートは、通常この方法によって作成される。抗体は物理吸着で固定化された後、ブロッキング剤で処理して、検出に用いられる。

**【0004】**

化学的な結合反応による固定化では、基板表面に導入された官能基を、固定化すべき物質の官能基と化学的に結合させる。この固定化では、共有結合による強力な結合を達成できるので、遊離の可能性を小さくすることができる。しかし、化学的な反応を伴うことから、固定化すべき物質の構造変化を伴う恐れがあることや、固定化のための反応が比較的複雑であることは避けがたい問題点である。また、基板表面に導入可能な官能基、あるいは固定化すべき物質における結合に利用可能な官能基が制限されることから、幅広い物質に応用することは難しい。

**【0005】**

10

20

30

40

50

以下、表面プラズモン共鳴（SPR）を例として、説明する。一般に使用される測定チップは、透明基板（例えば、ガラス）、蒸着された金属膜、及びその上に生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜からなり、その官能基を介し、金属表面に生理活性物質を固定化する。該生理活性物質とアナライト間の特異的な結合反応を測定することによって、生体分子間の相互作用を分析する。生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜としては、金属と結合する官能基、鎖長の原子数が10以上のリンカー、及び生理活性物質と結合できる官能基を有する化合物からなる、生理活性物質を固定化した測定チップが報告されている（特許文献1を参照）。

【0006】

生理活性物質の物理吸着による非特異結合を軽減する方法として、プラスチックプレートを用いる免疫化学分析では、ウシ血清アルブミンなどによるいわゆるブロッキングが用いられてきた。また、金属表面を用いる分析法では、末端をチオール化したDNAを金属膜に固定化し、SPRを用いるDNAセンサーを作製する場合、6-ヒドロキシ-1-ヘプタンチオールを添加することによって、非特異的吸着が起こらず、高感度で目的DNAを検出できることが報告されている（特許文献2を参照）。また、チオール化したビオチンと11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオールとを同時混合することにより、ストレプトビジンとの反応非特異結合を抑制することができると報告されている（非特許文献1を参照）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0007】

【特許文献1】特許第2815120号公報

【特許文献2】米国特許第5942397号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 6469-6478

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかし、上記した特許文献1及び2、並びに非特許文献1に記載の基板の製造方法は操作が煩雑であり、さらにこれらの方法によって得られる基板を用いた免疫学的測定方法のS/N（シグナル/ノイズ）比は低いという問題点がある。

30

【0010】

そこで、本発明の目的は、免疫学的測定方法への適用に際してS/N比を向上させ得る物質固定基板を簡便に製造する方法及び該方法により得られる物質固定基板を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本願発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、基板上に、被験物質と相互作用する物質及びブロッキング剤を所定の割合で含む溶液を塗布するという簡便な方法によって得られた物質固定基板は、免疫学的測定方法への適用に際してS/N比を向上させることを見出し、本発明を完成させた。

40

【0012】

したがって、本発明によれば、基板上に、被験物質と相互作用する物質及びブロッキング剤を0.2～2.5のモル比（物質/ブロッキング剤）で含む溶液を塗布することを特徴とする、物質固定基板の製造方法が提供される。

【0013】

本発明の物質固定基板の製造方法の好ましい態様は、被験物質が抗原であり、かつ被験物質と相互作用する物質が抗体である。

【0014】

50

本発明の物質固定基板の製造方法の好ましい態様は、被験物質がホルモンであり、かつ被験物質と相互作用する物質がホルモン受容体である。

【0015】

本発明の物質固定基板の製造方法の好ましい態様は、基板が、金属、プラスチック、又はガラスである。

【0016】

本発明の物質固定基板の製造方法の好ましい態様は、ブロッキング剤が、グロブリン、アルブミン、カゼイン、ゼラチン、スキムミルク、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンからなる群から選択される少なくとも一種である。

【0017】

本発明の別の側面によれば、本発明の物質固定基板の製造方法によって得られる、物質固定基板が提供される。

【発明の効果】

【0018】

本発明の物質固定基板の製造方法によれば、従来法に比して高いS/N比の免疫学的測定方法を実現できる物質固定基板を簡便に製造することができる。その結果、本発明の物質固定基板を用いた免疫学的測定方法やバイオセンサーは、従来法に比して、より高感度に被験物質である抗原又は抗体を定量することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、抗体/BSAモル数比とS/N比の関係図を示す。図において、抗体/BSA(モル比)が2、1及び0.5のプロットが実施例であり、同10、3及び0.1のプロットが比較例のプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の物質固定基板の製造方法は、基板上に、被験物質と相互作用する物質及びブロッキング剤を0.2~2.5のモル比(物質/ブロッキング剤)で含む溶液を塗布することを特徴とする。本発明の物質固定基板の製造方法によって得られる物質固定基板もまた、本発明の範囲内である。

【0021】

本発明の物質固定基板は、検出方法としてELISAを含む一般的な免疫学的測定方法に制限なく利用することができる。また、本発明の物質固定基板は、例えば、バイオセンサー用基板として用いることができる。本明細書でいうバイオセンサーとは、最も広義に解釈されるべきものであり、生体分子間の相互作用を電気的信号等の信号に変換して、対象となる物質を測定・検出するセンサーを意味する。通常バイオセンサーは、検出対象とする化学物質を認識するレセプター部位と、そこに発生する物理的变化又は化学的变化を電気信号に変換するトランスデューサー部位とから構成される。生体内には、互いに親和性のある物質として、酵素/基質、酵素/補酵素、抗原/抗体、ホルモン/レセプターなどがある。バイオセンサーでは、これらの互いに親和性のある物質の一方を基板に固定化して分子認識物質として用いることによって、対応させるもう一方の物質を選択的に計測するという原理を利用している。

【0022】

本発明の物質固定基板を用いたバイオセンサーとしては、例えば、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)バイオセンサーや表面プラズモン蛍光(Surface Plasmon Fluorescence; SPF)バイオセンサーを挙げることができる。SPRバイオセンサーの構成については、例えば、特公平6-27703号広報4ページ48行目から14ページ15行目および第1図から第8図、米国特許第6,829,073号のcolumn6の31行目からcolumn7の47行目および第9図A,Bに記載されている。SPFバイオセンサーの構成については、例えば、特開2008-249360号広報7ページ5行目から9ページ36行目およ

10

20

30

40

50

び第1図から第3図に記載されている。

#### 【0023】

##### 1. 基板

本発明の物質固定基板の製造方法に供される基板は、被験物質を固定することができる基板であれば特に制限されない。基板の材料として、例えば、金属、ガラス、プラスチックなどが好ましく、金属がより好ましく、金、銀、銅、アルミニウム、白金等の自由電子金属がより好ましい。基板の材料は単独又は組み合わせて使用することができる。また、基板への付着性を考慮して、基板と金属からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。基板の膜厚や構造その他基板の製造に関する事項は、常法に従い、当業者により適宜調整して決定され得る。

10

#### 【0024】

本発明の物質固定基板を、例えば、マイクロプレートリーダーを利用したELISA等に用いる場合は、金属表面や金属膜を有さない基板、例えば、上記したガラスやプラスチックなどの不溶性高分子からなる基板を用いることができる。

#### 【0025】

##### 2. 被験物質に相互作用する物質

本発明の物質固定基板の製造方法に供される基板固定用物質は、被験物質と相互作用するものであれば特に限定されず、例えば、免疫蛋白質、ホルモン受容体、酵素、微生物、核酸、低分子有機化合物、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖鎖、脂肪酸もしくは脂肪酸エステル、あるいはリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドなどが挙げられる。「被験物質と相互作用する」とは、当業界において通常使われている意味における相互作用であれば特に制限されず、例えば、被験物質と物理的、化学的又は生化学的に吸着や結合することが好ましく、被験物質と特異的に吸着や結合することがより好ましい。

20

#### 【0026】

免疫蛋白質としては、被験物質を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、IgA、IgE、IgDを使用することができる。具体的には、被験物質がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157などに対する抗体等を使用することができる。

30

#### 【0027】

ホルモン受容体は、被験物質であるホルモンを認識して特異的に結合するタンパク質であれば特に制限されない。ホルモン(hormone)は通常知られている意味で解釈されるべきものであるが、例えば、生体内において特定の器官で合成及び分泌される生理活性物質をいう。ホルモンは、通常、体液(血液)を介して体内を循環し、対象となる器官に対して作用を及ぼすことによる情報伝達を担う。一般的に、ホルモンの分泌形式は、内分泌(endocrine)と呼ばれ、ホルモンを分泌する器官は内分泌器官(endocrine organs)と呼ばれる。ホルモンの具体例としては、絨毛性ゴナドトロピンなどの性腺刺激ホルモン、インヒピン、副甲状腺ホルモン(PTH)、カルシトニン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、抗利尿ホルモン(ADH)などの蛋白質ホルモン(単純ペプチド、糖蛋白質);チロキシンなどの甲状腺ホルモン、エピネフリンやノルエピネフリンなどの副腎髄質ホルモンなどのアミン・アミノ酸誘導体ホルモン;アンドロゲン(男性ホルモン)、エストロゲン(卵胞ホルモン)やプロゲステロン(黄体ホルモン)などの女性ホルモン、電解質コルチコイド(アルドステロン)、糖質コルチコイド(コルチゾール)などのステロイドホルモンなどを挙げることができる。

40

#### 【0028】

酵素としては、被験物質又は被験物質から代謝される物質に対して活性を示すものであ

50

れば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば、酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、被験物質がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、被験物質がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

#### 【0029】

非免疫蛋白質としては、特に限定されることなく、例えばアビジン（ストレプトアビジン）、ビオチン又はレセプターなどを使用できる。免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテインG、リウマチ因子（RF）等を使用することができる。糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられる。脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ベヘン酸エチル等が挙げられる。

10

#### 【0030】

被験物質に相互作用する物質が抗体や酵素などの蛋白質又は核酸である場合、その固定化は、被験物質に相互作用する物質のアミノ基、チオール基等を利用し、基板表面の官能基に共有結合させることを行うことができる。

20

#### 【0031】

基板が金属基板である場合、被験物質に相互作用する物質は、例えば、自己組織化単分子膜を介して金属基板に固定化されてもよい。自己組織化単分子膜とは、代表的には、アルカンチオール化合物を金表面に接触、放置した際に、アルカンチオール化合物と金表面が反応して、Au-S結合を形成すると共に、アルキル長鎖同士の相互作用によって、金表面に形成される、高い配行性をもつ単分子膜として知られているもので、表面プラズモン共鳴/蛍光や、水晶発振子マイクロバランス（QCM；Quartz Crystal Microbalance）等の分野で広く利用されているものである。

#### 【0032】

自己組織化単分子膜を形成する成分は、例えば、下記式（1）で表すことができる。

30

#### 【化1】



（式中、Qは金属基板への結合基を示し、Rは置換されていてもよい炭素数3～20のアルキル基を示し、Xは水素原子又は官能基を示す。）

#### 【0033】

上記式（1）において、金属基板への結合基としては、チオール基（-SH）だけでなく、ジスルフィド基（-S-S-）やスルフィド基（-S-）なども好ましく用いることができる。上記式（1）で表される化合物としては、例えば、1-ウンデカンチオールを挙げることができる。

40

#### 【0034】

金属基板上に、自己組織化単分子膜を形成することで、金属基板表面の状態の影響を直接受けることなく、安定に物質を固定することができる。金属基板上に形成された、自己組織化単分子膜表面に、安定に物質を固定することは、該物質を介して、安定に被験物質を補足し、かつ金属基板の影響を最小限に抑えることに寄与し得る。

#### 【0035】

本発明の物質固定基板の製造方法における被験物質及び被験物質に相互作用する物質の好ましい具体例は、抗原（被験物質）及び抗体（被験物質に相互作用する物質）、ホルモン（被験物質）及びホルモン受容体（被験物質に相互作用する物質）が挙げられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0036】

50

抗体は、特に限定されるものではないが、例えば、その抗体が認識する抗原によって免疫された動物の血清から調製する抗血清、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、その抗原によって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片〔例えば、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab'、又はFv〕を用いることができる。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。さらに、その抗体がキメラ抗体などの場合のように、修飾を加えられたものでもよいし、また市販の抗体でも、動物血清や培養上清から公知の方法により調製した抗体でも使用可能である。

#### 【0037】

断片化抗体は、その動物種やサブクラス等によらず使用できる。例えば、本発明に用いることが可能な抗体は、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどに由来する抗体、具体的には、マウスIgG、マウスIgM、ラットIgG、ラットIgM、ウサギIgG、ウサギIgM、ヤギIgG、ヤギIgM、ヒツジIgG、ヒツジIgM等であり、ポリクローナルもしくはモノクローナルの両方に適用可能である。抗体のサブクラスとしてはマウスIgG1やマウスIgG2aなどがあるがこれらに限定されるものではない。断片化抗体は、少なくとも1つの抗原結合部位を持つ、完全型抗体から導かれた分子であり、具体的にはFab、F(ab')<sub>2</sub>等である。これらの断片化抗体は、酵素あるいは化学的処理によって、もしくは遺伝子工学的手法を用いて得られる分子である。

10

#### 【0038】

実施例に示したヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)及び抗hCGモノクローナル抗体は、高原及び抗体の関係ともとれるし、ホルモン及びホルモン受容体の関係ともとれるものである。

20

#### 【0039】

### 3. ブロッキング剤

本発明の物質固定基板の製造方法において、被験物質に相互作用する物質はブロッキング剤とともに基板上に塗布され固定化される。本発明に供されるブロッキング剤は、標識物質の固定化表面への非特異的吸着を抑制する物質であれば特に制限されないが、例えば、グロブリン、アルブミン、カゼイン、ゼラチン、スキムミルク、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどを挙げることができるが、アルブミンが好ましく、ウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin; BSA)がより好ましい。これらのブロッキング剤

30

#### 【0040】

従来は、被験物質を測定するための物質固定基板を製造する方法(以下、従来法ともいう)は、被験物質に相互作用する物質を基板上に塗布し、次いで基板上から被験物質に相互作用する物質を除去し、次いで基板を洗浄した後に又は基板を洗浄することなくそのまま基板にブロッキング剤を塗布し、次いで基板上からブロッキング剤を除去するという工程を含む方法であった。しかし、本発明の物質固定基板の製造方法は、被験物質に相互作用する物質とブロッキング剤とを同時に基板上に塗布することにより、従来法におけるいくつかの工程を省略せしめた簡便な方法である。しかも、基板上に塗布する被験物質に相互作用する物質とブロッキング剤のモル比を所定の割合に設定することにより、得られる物質固定基板は、従来法によって製造された物質固定基板と比べて、被験物質の測定に際して、S/N比を向上せしめ、結果として高感度な測定を実現できるという驚くべき効果を有するものであった。これらの知見は、本発明者らによってはじめて見出されたものである。

40

#### 【0041】

本発明において、基板上に塗布されるべき被験物質に相互作用する物質とブロッキング剤とのモル比(物質/ブロッキング剤)は、例えば、0.2~2.5であり、好ましくは下限が0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、又は0.5であり、かつ上限が2.5又は2.0であり、特に好ましくは0.5~2.0である。これらのモル比を採用して得られる物質固定基板は、対照(従来法によって製造された物質固定基板)

50

と比べて、被験物質の測定に際して、測定系の S / N 比を向上させるものである。

【 0 0 4 2 】

#### 4 . 物質固定基板

本発明において、被験物質に相互作用する物質とブロッキング剤を含む溶液は、基板上に直接、又は基板上の自己組織化単分子膜などを介して塗布される。被験物質に相互作用する物質とブロッキング剤を溶解する際に用いられる溶媒は、被験物質に相互作用する物質及びブロッキング剤を安定に溶解するものであれば特に制限されないが、例えば、水、緩衝液、食塩水、水混和性有機溶媒などを挙げることができるが、好ましくは食塩水が用いられる。

【 0 0 4 3 】

被験物質に相互作用する物質とブロッキング剤を含む溶液の基板への塗布は、特に制限されないが、例えば、基板上に、上記溶液を添加し、0 ~ 5 0 で、数分 ~ 数時間静置することにより実施される。なお、上記塗布の後に、被験物質に相互作用する物質及びブロッキング剤が固定されなかった部位を、さらなるブロッキング剤、例えば、B S A、ブロッキング剤、スキムミルク、カゼインなどを使ってブロッキングしてもよい。さらに、この場合において、ブロッキング剤とともに、又はブロッキング剤を除去した後に、ポリエチレングリコールや多糖類などの合成あるいは天然高分子、界面活性剤、市販の Immunoassay Stabilizer (ABI社) などの、固定化を安定化させる安定化剤を添加してもよい。これらの操作は、蒸発を防止するための手段を講じて、例えば、基板を含む容器をシールして実施することが望ましい。また、得られた物質固定基板は、乾燥器などを用いて、0 ~ 5 0 で、数分 ~ 数時間乾燥に供されることが望ましい。

【 0 0 4 4 】

上記のようにして得られた物質固定基板は、例えば、E L I S A 用プレートやバイオセンサー用測定チップとして、該物質固定基板に固定された物質と相互作用する被験物質を測定するために使用することができる。ここでいう「被験物質を測定する」とは、被験物質の存在の有無を検出すること、被験物質の量を測る、つまり被験物質を定量することなどの、最も広い概念で解釈されるべき事象である。

【 0 0 4 5 】

具体的には、上記の E L I S A 用プレートやバイオセンサー用測定チップを用いて、これらに被験物質を接触させることにより、該 E L I S A 用プレートや該バイオセンサー用測定チップの表面に固定化されている物質と相互作用する被験物質を測定することができる。

【 0 0 4 6 】

被験物質は、通常、被験試料中に含まれる。被験試料としては、測定の対象となる物質である被験物質を含む可能性のある試料である限り、特に限定されるものではなく、例えば、生物学的試料、特に動物（特にヒト）の体液（例えば、血液、血清、血漿、髄液、涙液、汗、尿、膿、鼻水、又は喀痰）若しくは排泄物（例えば、糞便）、臓器、組織、粘膜や皮膚、それらを含むと考えられる搾過検体（スワブ）、うがい液、又は動植物それ自体若しくはそれらの乾燥体を挙げることができる。

【 0 0 4 7 】

被験試料は、そのまま、あるいは、適当な抽出用溶媒を用いて抽出して得られる抽出液の形で、さらには、該抽出液を適当な希釈剤で希釈して得られる希釈液の形、若しくは該抽出液を適当な方法で濃縮した形で、用いられる。抽出用溶媒としては、通常の免疫学的測定方法で用いられる溶媒（例えば、水、生理食塩液、又は緩衝液など）、あるいは、該溶媒で希釈することにより直接的に抗原抗体反応を実施することができる水混和性有機溶媒を用いることもできる。

【 0 0 4 8 】

被験物質が抗原である場合に、抗原は、本発明の物質固定基板に固定化された物質（抗体）に特異的に認識され得るものである限りにおいて特に限定されるものではなく、抗原そのものが該抗体に認識されてもよいし、抗原の一部、つまりエピトープを介して該抗体

10

20

30

40

50

に認識されてもよい。また、抗原は、該抗体に認識される部位以外に、1又は複数の抗体に認識される部位(エピトープ)を持ち得る。

#### 【0049】

被験物質の測定は、従来用いられている、蛍光測定法(FIA)、酵素発色法(EIA)、放射能測定法(RIA)、発光法(CLEIA)、電気化学発光法(ECLA)、磁気免疫測定法(MIA)等の様々な手法を用いて、測定することができる。また、表面プラズモン共鳴(SPR)測定技術、水晶発振子マイクロバランス(QCM)測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術などの非電気化学的方法を好ましく用いることができる。

#### 【0050】

本発明の物質固定基板は、上記した被験物質を測定するための、被験物質測定用キットにも含まれ得る。

#### 【0051】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0052】

##### 1. 検出用標識物である抗hCG抗体修飾蛍光粒子(直径500nm)の作成

hCG抗体(Anti-hCG 5008 SP-5、Medix Biochemica社)を、50 mM MES-NaOH (pH6.0)を用いて2 mg/mLに調製した。2 mg/mL hCG抗体溶液250  $\mu$ Lを2mLエッペンに分注した。2% solids 蛍光粒子(直径500 nm蛍光粒子溶液(Calboxylate-Modified Microsphere, Invitrogen社, #F8812, 2%solid)を250  $\mu$ L加えた。オービタルシェイカーで攪拌した(1200rpm, 25 , 15min)。溶液全体が槽内の水に浸かるようにエッペンを超音波洗浄器にかけ(出力100%, 1min)、10 mg/mL EDC水溶液 5  $\mu$ Lを添加した。オービタルシェイカーでエッペンを攪拌した(1200rpm, 25 , 2hour)。溶液全体が槽内の水に浸かるようにエッペンを超音波洗浄器にかけた(出力100%, 1min)。エッペンに2 mol/L Glycine水溶液を25  $\mu$ L添加した(終濃度100mM)。エッペンをオービタルシェイカーで攪拌した。(1200rpm, 25 , 30min)。エッペンを遠心分離して(15000 rpm = 20400  $\times$  g, 4 , 20 min)、粒子を沈降させた。ペレットを崩さないように上清をピペットで回収した。ペレットを含むエッペンにPBS (pH7.4) (GIBCO)を500  $\mu$ L添加した。超音波洗浄器を用いてエッペン内のペレットを再懸濁させ、これを3回繰返した。1% BSA in PBS (pH7.4)を0.5 mL加えた。超音波洗浄器を用いて再懸濁させた。得られた溶液を1% solid溶液として冷蔵保存した。

#### 【0053】

##### 2. チップの作成

hCG抗体(Anti-h-alpha subunit 6601 SPR-5、Medix Biochemica社)とBSAをモル数10 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 10になるように、抗体を150 mM NaClで10  $\mu$ g/mLに調製した。抗体液(10  $\mu$ g/mL、150 mM NaCl)100  $\mu$ Lを壁に触れないように金膜が底に蒸着されたウェルプレートの各ウェル中に分注した。蒸発を防止するために、各ウェルをプレートシールで覆い、室温で1時間静置した。抗体溶液を捨てて、キムタオル上でたたくことにより、抗体溶液を除去した。Blocking Casein in TBS(pierce社)100 $\mu$ Lをリザーバーに取り、8連オートピペッターで分注した(125  $\mu$ Lチップ)。蒸発防止のために、プレートシールで覆った。室温で1時間遮光して静置した。溶液を捨てて、キムタオル上でたたくことにより、溶液を除去した。Immuno assay Stabilizer (ABI社)100 $\mu$ Lを上記と同様に分注した。蒸発防止のために、プレートシールを覆った。室温で1時間遮光して静置した。溶液を除去した。乾燥器にて室温で一晩乾燥し、抗体固定化チップを得た。また、hCG抗体のみを150 mM NaClで10  $\mu$ g/mLに調製して、後の操作を上記と同様にして、対照とした抗体固定化チップを得た。

#### 【0054】

##### 3. アッセイ評価

1%BSA/PBSを用いて抗原(hCG)を以下の濃度に調液した:0、1.8E-13M、1.8E-12M、1.

10

20

30

40

50

8E-11M、1.8E-10M、1.8E-9M。hCG抗体 (Anti-hCG 5008 SP-5、Medix Biochemica社) 結合Yellow-Green粒子 (500 nm)を、1%BSA/PBSを用いて0.02% solidに希釈した。1.5mLマイクロチューブに抗原液350 uLと上記1. で作成した蛍光粒子抗体350 uLを加えた。1200 rpm, 25 °Cで、10分間インキュベートした。ARVO (yellow-green 0.1s; パーキンエルマー社)でウェルのバックグラウンドを測定した。各チップに反応液を60uLずつ壁に触れないように添加した (n = 3)。プレートシールで覆って、700rpm, 25 °Cで4時間、インキュベーションした。キムタオル上でたたいて反応溶液を除いた。PBS-T (PBSリン酸バッファー+0.05% Twenn20) 100 uLで4回洗浄した。ARVO (yellow-green 0.1s)で反射蛍光を測定した。S/N比は各濃度の蛍光シグナル (S) と抗原0M時の蛍光シグナル (N) 比で定義した。

【 0 0 5 5 】

10

#### 4. 測定結果

抗体固定化チップを測定した結果を、実施例及び比較例の両者を含めて、表1にまとめた。同様に、種々の抗体 / B S A モル比を変えて作成した抗体固定化チップの S / N 比をグラフ化したものを図1とした。表1及び図1に示す通り、実施例である抗体 / B S A のモル比が、2、1及び0.5の抗体固定化チップは、対照に対して、S / N比及び検出感度が向上した。それに対して、比較例である抗体 / B S A のモル比が、10、3及び0.1の抗体固定化チップは、対照に対して、S / N比及び検出感度が同等又はそれ以下であった。

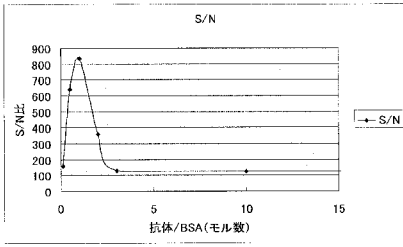
【表1】

20

抗体/BSA モル比	S/N比	検出感度(pM)	備考
対照(抗体のみ)	142	1	対照
10	125	2	比較例
3	131	2	比較例
2	360	0.5	実施例
1	835	0.1	実施例
0.5	640	0.5	実施例
0.1	157	1	比較例

30

【 図 1 】



专利名称(译)	制造物质固定基板的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010181155A</a>	公开(公告)日	2010-08-19
申请号	JP2009022217	申请日	2009-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	楊博		
发明人	楊博		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/552 G01N33/553		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/53.B G01N33/552 G01N33/553		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种易于制造的固定有物质的基板的方法，该基板在应用于免疫测定方法时能够提高S / N比，以及通过该方法获得的固定有物质的基板。 解决方案：将包含与测试物质相互作用的物质和封闭剂的摩尔比为0.2到2.5 ( 物质/封闭剂 ) 的溶液涂在基材上。 [选择图]无

抗体/BSA モル比	S/N比	検出感度(pM)	備考
对照(抗体のみ)	142	1	对照
10	125	2	比較例
3	131	2	比較例
2	360	0.5	実施例
1	835	0.1	実施例
0.5	640	0.5	実施例
0.1	157	1	比較例