

# 『低分子化合物の置換法による検出』

九州計測器株式会社 ケミカルセンシンググループ  
[http://www.akk-net.co.jp/RANA\\_Site/top-r.html](http://www.akk-net.co.jp/RANA_Site/top-r.html)

【本社】福岡県福岡市博多区山王一丁目6-18 TEL:092-441-3200 FAX:092-441-3264

## 1. はじめに

置換法は、抗原抗体反応によりいったん抗体を表面に結合させ、ターゲットにより抗体を解離させ、間接的に検出する手法です。低分子を測定する場合、センサ表面にはターゲットの類似物質を固定化します。ここでは「低分子化合物A」を例として、センサ表面作製法および測定方法を解説します。

## 2. 実験方法

### 2.1 試薬

- ・アセトン
- ・エタノール
- ・2-プロパノール
- ・アンモニア水
- ・過酸化水素水
- ・超純水
- ・抗原類似物質「A」
- ・エチレンジアミン
- ・トリエチルアミン
- ・抗Aモノクローナル抗体
- ・低分子化合物A水溶液
- ・*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)
- ・50mM NaOH
- ・*N*-hydroxysuccinimide (NHS)
- ・PEG6-COOH aromatic alkanedithiol (Sensopath Technologies)
- ・*N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)
- ・10mM 四ほう酸ナトリウム溶液 (pH 8.5, 1M NaCl)
- ・10mM HEPES Buffer Saline (HBS: pH7.4, 150mM NaCl, 0.05% Tween20)

抗体溶液および低分子化合物A水溶液は、原液をHBSにより希釈しました。

### 2.2 センサ表面の作製

#### 2.2.1 センサチップの洗浄と自己組織化単分子膜 (SAM) の形成

- ①金チップをアセトン(10min)、エタノール(2min)、2-プロパノール(2min)の順に超音波洗浄。
- ②90℃に加熱しながら、アンモニア水、過酸化水素水、超純水の混合溶液(1:1:5)に金チップを浸け、20分洗浄を行い、金チップを超純水でリンスする。
- ③1mM PEG6-COOH aromatic alkanedithiolエタノール溶液(SAM溶液)に24 h浸漬。
- ④SAM溶液から金チップを取り出し、3分エタノール中で超音波洗浄を行い、その後、超純水でリンスしチッ素ブローで乾燥させる。

#### 2.2.2 ターゲット類似物質の固定化

- ①金チップにシリコーンの枠を自己吸着で貼り付け、金表面側に0.4M EDC(in 超純水) / 0.1M NHS (in 超純水)混合溶液(終濃度は0.2M EDC/0.05M NHS)を50 $\mu$ l滴下し、ピペットの先を枠の隅にあててゆっくり3回程度ボンピングする。その後、30分間静置。

②反応後の溶液をピペットで吸いとりすて、超純水で3回リンス。(ピペットでボンピングし、水を吸い上げて終わる。以下同様)

③0.1M エチレンジアミン in 10mM 四ほう酸ナトリウム溶液(pH8.5)を50 $\mu$ l滴下し、30分間静置。その後、超純水で3回リンスする。

④エチレンジアミンの固定化の作業と並行して、抗原類似物質A'のカルボキシル基の活性化を行う。10mM 抗原類似物質A' in DMF(1ml)と、0.4M EDC、0.1M NHS (in DMF)をそれぞれ50 $\mu$ lずつとり、マイクロチューブ中で混合し、1時間放置する。

⑤抗原類似物質A'の活性化溶液に100倍希釈のトリエチルアミンを適量添加し、pH8.5に調整後pH試験紙等で簡易に確認、金チップ上に50 $\mu$ l滴下し、3回ボンピング。1時間静置し反応させる。その後、超純水で3回リンス、チッ素ブローで乾燥します。

※センサチップ上にターゲット類似物質の固定化を行う際は、溶液の乾燥を防ぐため、湿らせたワイパーの上で行い、反応中はフタをして溶液の揮発を防ぐとともに、遮光する。また、滴下する溶液量は、シリコーンの枠の容積により、調整を行う。

### 2.3 置換法による測定

置換法はインキュベーションを必要としない測定方法です。抗原類似物質を固定化した金表面に抗体を流し、抗原類似物質と結合させます。抗原を流し、抗体と結合させることで抗体を解離させます。したがって、解離した抗体の量から抗原濃度を求める方法です。

抗原類似物質A'を固定化した金表面に抗体溶液を流すと、抗体が、固定化された抗原類似物質A'に結合するため、センサレスポンスが増大します。注入した抗体溶液が流れ終わると、キャリアバッファに切り替わり、抗体の自然解離が始まります。

その後、低分子化合物Aの存在しない溶液(キャリアバッファ)あるいは低分子化合物A溶液を流します。低分子化合物Aが存在していれば、抗体の解離が促進され、レスポンスが減少します。抗体と結合していた抗原類似物質A'が低分子化合物Aに置換され、抗体と低分子化合物Aの複合体が形成されるため、流されてセンサ表面から離脱します。

## 『低分子化合物の置換法による検出』

九州計測器株式会社 ケミカルセンシンググループ  
[http://www.ck-net.co.jp/RANA\\_Site/top-r.html](http://www.ck-net.co.jp/RANA_Site/top-r.html)

【本社】福岡県福岡市博多区山王一丁目6-18 TEL:092-441-3200 FAX:092-441-3264

## 3. 結果

測定例を図1に示します。抗体を60s流し、結合させ、流れ終わった20s後にHBS(ブランク)、各濃度の低分子化合物A溶液を流しました。10ppb低分子化合物Aを流すと、他の濃度の低分子化合物Aに比べ、解離が進んでいるのがわかります。

× Sampling point

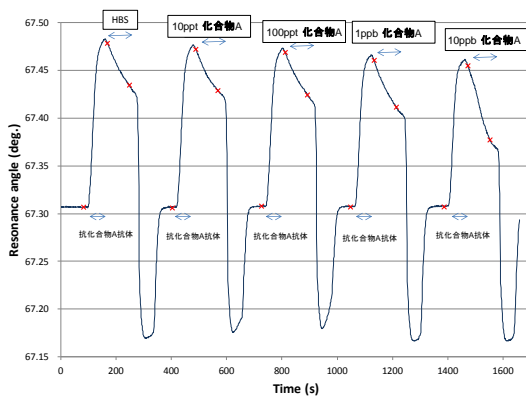


図1 センサグラム

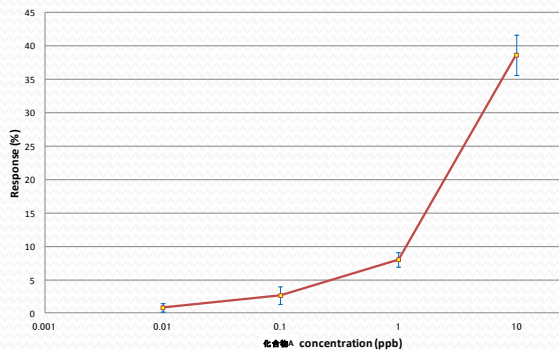


図2 応答特性

また、図2は、HBS(ブランク)の解離率を基準として、各濃度の解離率との比をとったときの特性です。1ppbでも解離が見られることがわかります。

## 参考文献 (References)

1. M. Yasuura, K. Toko, T. Onodera, Sensors and Materials, Vol. 23, No.1, pp.21-37 (2011)

2. T. Onodera, Y. Mizuta, K. Horikawa, P. Singh, K. Matsumoto, N. Miura, K. Toko, Sensors and Materials, Vol. 23, No.1, pp.38-52 (2011)