

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4654414号
(P4654414)

(45) 発行日 平成23年3月23日(2011.3.23)

(24) 登録日 平成23年1月7日(2011.1.7)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 575
GO 1 N 33/551 (2006.01)	GO 1 N 33/551
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C
CO 1 B 19/04 (2006.01)	CO 1 B 19/04 C

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2005-348157 (P2005-348157)	(73) 特許権者 301021533
(22) 出願日 平成17年12月1日(2005.12.1)	独立行政法人産業技術総合研究所
(65) 公開番号 特開2007-155395 (P2007-155395A)	東京都千代田区霞が関1-3-1
(43) 公開日 平成19年6月21日(2007.6.21)	(74) 代理人 100065215
審査請求日 平成20年3月27日(2008.3.27)	弁理士 三枝 英二
特許法第30条第1項適用 J. AM. CHEM. SO C. 誌、第127巻(2005年)第9328-932 9頁に発表	(74) 代理人 100076510
	弁理士 掛樋 悠路
	(74) 代理人 100124431
	弁理士 田中 順也
	(72) 発明者 ルミアナ バカロヴァ
	佐賀県鳥栖市宿町807-1 独立行政法 人産業技術総合研究所九州センター内
	(72) 発明者 ジフコ ジェレフ
	佐賀県鳥栖市宿町807-1 独立行政法 人産業技術総合研究所九州センター内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫化学的検出方法、及びその検出用試薬キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験物質を免疫化学的方法により検出する方法であって、

(1) 被験物質を固相上に固定化してなる固相化被験物質と、当該被験物質に特異的に結合するビオチン標識物質とを反応させる工程、

(2) 前記工程(1)で固相化被験物質に捕捉されたビオチン標識物質と、アビジン又はストレプトアビジンとを反応させる工程、

(3) 前記工程(2)でビオチンに捕捉されたアビジン又はストレプトアビジンと、ビオチン標識量子ドットとを反応させる工程、及び

(4) 前記工程(3)でアビジン又はストレプトアビジンに捕捉されたビオチン標識量子ドットの蛍光強度を測定する工程

を含み、

前記工程(2)と(3)とを順次行うことを一連の工程として、これが2回以上実施される、検出方法。

【請求項2】

前記ビオチン標識量子ドットが、ビオチン標識CdSeナノ粒子である、請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】

免疫化学的方法としてウエスタンブロット法を使用する、請求項1又は2に記載の検出方法。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の検出方法を実施するための検出用試薬キットであって、
前記工程 (2) において使用するためのアビジン又はストレプトアビジンを含む試薬、及び

前記工程 (3) において使用するためのビオチン標識量子ドットを含む試薬
を含有することを特徴とする、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビオチン標識量子ドットを使用して、高感度且つ簡便に、被験物質を免疫化学的に検出する検出方法に関する。更に、本発明は、当該検出方法に使用される検出用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

従来、免疫化学的手法を用いて、被験物質の検出を行う方法として、被験物質に対して特異的に結合する 1 次抗体、及び当該 1 次抗体に結合する標識化 2 次抗体を使用する方法が知られている。この 2 次抗体の標識化には、一般に、蛍光物質、酵素（例えば、パーオキシダーゼ）、ビオチン等が使用されており、それぞれの標識化物質の種類に応じた呈色方法や検出方法が採用されている。しかしながら、従来の方法では、1 次抗体に対する 2 次抗体の結合反応が必須であり、測定時間が長いだけでなく、検出感度も低いという欠点があった。このような従来技術を背景として、高感度且つ簡便に、被験物質を免疫化学的に検出する検出方法の開発が望まれていた。

【0003】

一方、量子ドットに関する技術についても、年々著しい進歩を遂げており、様々なタイプの量子ドットが開発されている。例えば、特許文献 1 には、量子効率に優れ、点滅現象を示さない量子ドットが提案されている。しかしながら、免疫化学的手法による被験物質の検出に関する量子ドットの応用例としては、従来、前記 2 次抗体に結合される標識物質として使用すること以外は、具体的に知られていない。

【特許文献 1】特開 2005 - 187314 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、高感度且つ簡便に、被験物質を免疫化学的に検出する検出方法、及び当該検出方法に使用される検出用キットを提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討したところ、被験物質を免疫化学的に検出する検出方法において、被験物質に特異的に結合するビオチン標識抗体を被験物質に結合させた後、これにアビジン又はストレプトアビジンを反応させ、更にビオチン標識量子ドットを反応させることによって、高感度且つ簡便に被験物質の検出を行えることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて、更に改良を重ねることにより完成したものである。

【0006】

即ち、本発明は、下記に掲げる検出方法及び検出用キットを提供する：

項 1 . 被験物質を免疫化学的方法より検出する方法であって、

(1)被験物質を固相上に固定化してなる固相化被験物質と、及び当該被験物質に特異的に結合するビオチン標識物質とを反応させる工程、

(2)前記工程(1)で固相化被験物質に捕捉されたビオチン標識物質と、アビジン又はストレプトアビジンとを反応させる工程、

10

20

30

40

50

(3)前記工程(2)でビオチンに捕捉されたアビジン又はストレプトアビジンと、ビオチン標識量子ドットとを反応させる工程、及び

(4)前記工程(3)でアビジン又はストレプトアビジンに捕捉されたビオチン標識量子ドットの蛍光強度を測定する工程を含む、検出方法。

項2． 前記ビオチン標識量子ドットが、ビオチン標識CdSeナノ粒子である、項1に記載の検出方法。

項3． 免疫化学的方法としてウエスタンブロット法を使用する、項1又は2に記載の検出方法。

項4． 項1乃至3のいずれかに記載の検出方法を実施するための検出用試薬キットであって、アビジン又はストレプトアビジンを含む試薬、及びビオチン標識量子ドットを含む試薬を含有することを特徴とする、キット。

10

【0007】

以下、本発明について詳細に説明する。

1. 検出方法

以下、本発明の検出方法について、工程毎に説明する。

工程(1)

まず、被験物質を固相上に固定化してなる固相化被験物質と、及び当該被験物質に特異的に結合するビオチン標識物質とを反応させる。

【0008】

20

ここで被験物質とは、検出対象となる物質であり、免疫化学的方法において測定可能な物質であれば特に制限されない。当該被験物質として、具体的には、生体内タンパク質、ウイルスの表面抗原、腫瘍マーカー、ハプテン、抗体等が例示される。

【0009】

また、工程(1)で使用される「被検物質に特異的に結合するビオチン標識物質」とは、前記被検物質と免疫化学的に結合する物質であって、ビオチン標識されたものを意味する。被検物質と免疫化学的に結合する物質として、具体的には、被検物質が抗原物質の場合は抗体が挙げられ、被検物質が抗体の場合は抗原物質が挙げられる。なお、被検物質と免疫化学的に結合する物質として、抗体を使用する場合、当該抗体としてはポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の別を問わず、更にF(ab)₂やFab'等のフラグメントであってもよい。また、被検物質と免疫化学的に結合する物質に対するビオチン標識は、公知の方法に従って行うことができる。本発明の一実施態様として、「被検物質に特異的に結合するビオチン標識物質」としてビオチン標識抗体を使用する方法が好適に例示される。

30

【0010】

本発明の検出方法において、固相とは、被検物質をトラップするための不溶性の担体である。当該固相としては、免疫化学的方法で一般的に使用されるものを用いることができる。当該固相の構成素材としては、具体的には、ガラス、セルロース粉末、セファデックス、セファロース、ポリスチレン、ポリアクリル、ポリカーボネート、ポリメタクリエート、濾紙、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂、デキストラン、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ナイロン、ガラスビーズ、絹、ポリアミン-メチルビニルエーテル-マレイン酸共重合体、アガロース、アミノ酸共重合体、エチレン-マレイン酸共重合体、ポリビリニデンジフルオライド(PVDF)等が挙げられる。当該固相の形状も特に限定されず、例えば、ビーズ、プレート、スティック、ゲル、カラム充填用樹脂、シート、カプセル、試験管等が挙げられる。

40

【0011】

被験物質を固相上に固定化する方法についても特に制限はなく、物理的結合及び化学的結合のいずれをも使用できる。固定化方法としては、物理的吸着による固相化が最も一般的であり、好ましい。

【0012】

50

また、被験物質を固定化した固相は、添加する試薬等が吸着するのを抑制するためにブロッキング処理に供されることが望ましい。このブロッキング処理は、免疫化学的方法で一般的に使用されている方法を採用でき、ブロッキング処理に使用される物質としては、例えば、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、スキムミルク等が挙げられる。

【0013】

本工程(1)において、「固相化被験物質」と「被検物質に特異的に結合するビオチン標識物質」とを反応させる条件としては、特に制限されず、一般的な免疫反応における条件が採用される。一般的には、上記反応は、「被検物質に特異的に結合するビオチン標識物質」を0.05～0.2重量%、好ましくは0.075～0.1重量%の濃度で含む溶媒の適量を、「固相化被験物質」に対して添加することにより行われる。また、上記反応は、通常、20～35 10
程度、好ましくは25～30 程度の温度条件下で、0.5～1.5時間程度、好ましくは0.75～1時間程度、必要に応じて穏やかに攪拌しながら、インキュベートすることにより実施される。

【0014】

なお、前記反応において使用される溶媒としては、通常の免疫化学的方法（サンドイッチ法）で用いられるものが使用される。具体的には、具体的にはクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩緩衝液、酢酸緩衝液等のpHが約5～9程度の緩衝液を例示することができる。

【0015】

斯くして、固相上に固定化してなる固相化被験物質に、「被検物質に特異的に結合する 20
ビオチン標識物質」が結合して、固相上に複合体（被験物質 - ビオチン標識物質）が形成される。得られた固相上の複合体は洗浄されて、次工程(2)に供せられる。洗浄条件についても、通常の免疫化学的方法（サンドイッチ法）で用いられる条件と同様、若しくはそれに準じた条件等を採用して行うことができる。当該洗浄に使用される洗浄液としては、具体的には、pHが約5～9程度の緩衝液（例えば、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩緩衝液、酢酸緩衝液等）に、Tween20等の界面活性剤を適量添加したものが例示される。

【0016】

工程(2)

次いで、前記工程(1)で固相上に捕捉されたビオチン標識物質と、アビジン又はストレプトアビジンとを反応させる。 30

【0017】

本工程(2)において、「固相上に捕捉されたビオチン標識物質」と「アビジン又はストレプトアビジン」とを反応させる条件としては、特に制限されず、一般的な免疫化学的方法において採用されているビオチン - アビジン（又はストレプトアビジン）複合体の形成反応の条件が採用される。一般的には、上記反応は、「アビジン又はストレプトアビジン」を0.1～1重量%、好ましくは0.3～0.5重量%の濃度で含む溶媒の適量を、「固相上に捕捉されたビオチン標識物質」に対して添加することにより行われる。また、上記反応は、通常、20～35 程度、好ましくは25～30 程度の温度条件下で、0.1～0.6時間程度、好ましくは0.3～0.5時間程度、必要に応じて穏やかに攪拌しながらインキュベートすることにより実施される。 40

【0018】

なお、前記反応において使用される溶媒としては、前記工程(1)で使用されるものと同様である。

【0019】

斯くして、「固相上に捕捉されたビオチン標識物質」に、「アビジン又はストレプトアビジン」が結合して、固相上に複合体 [被験物質 - ビオチン標識物質 - アビジン(又はストレプトアビジン)] が形成される。得られた固相上の複合体は洗浄され、次工程(3)に供せられる。洗浄条件については、前記工程(1)の場合と同様である。

【0020】

工程(3)

次いで、前記工程(2)でビオチンに捕捉されたアビジン又はストレプトアビジンと、ビオチン標識量子ドットとを反応させる。

【0021】

本工程で使用されるビオチン標識量子ドットとは、ビオチンが化学結合により結合している量子ドットである。参考のため、ビオチン標識量子ドットのモデル構造の一例を図1に示す。

【0022】

ビオチン標識量子ドットに使用される量子ドットとしては、通常採用される検出方法で検知可能な光を発する限り、特に制限されないが、一例として、金属原子と5B族若しくは6B族原子とからなる量子ドット；好ましくは、Cd、Zn、Hg、Cu、Ag、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Zr、Mo、Ta、W、Ir、Eu、Sm及びMgからなる群より選ばれる少なくとも1種の金属原子と、S、Se及びTeからなる群より選ばれる少なくとも1種の5B族若しくは6B族原子からなる量子ドット；更に好ましくはCdSeが例示される。

10

【0023】

上記ビオチン標識量子ドットに使用される量子ドットの平均粒子径としては、通常2~6nm、好ましくは2.5~5nm、更に好ましくは2.5~3nmが挙げられる。

【0024】

量子ドットは、従来公知の方法（好ましくは、上記特許文献1に記載の方法）に従って製造できる。また、ビオチン標識量子ドットは、一般的には、量子ドットを親水化処理した後に、ビオチンを結合させることにより製造される。また、量子ドットの親水化処理方法、及び親水化処理した量子ドットにビオチンを結合させる方法については、後述する通りである。

20

【0025】

本工程(3)において、「固相上に捕捉されたアビジン又はストレプトアビジン」と「ビオチン標識量子ドット」とを反応させる条件としては、特に制限されず、一般的な免疫化学的方法において採用されているビオチン-アビジン(又はストレプトアビジン)複合体の形成反応の条件が採用される。一般的には、上記反応は、「ビオチン標識量子ドット」を50~100重量%、好ましくは95~100重量%の濃度で含む試薬の適量を、「固相上に捕捉されたアビジン又はストレプトアビジン」に対して添加することにより行われる。また、上記反応は、通常、20~35 程度、好ましくは25~30 程度の温度条件下で、0.1~0.3時間程度、好ましくは0.2~0.25時間程度、必要に応じて穏やかに攪拌しながらインキュベートすることにより実施される。

30

【0026】

前記反応において使用される溶媒としては、前記工程(1)で使用されるものと同様である。

【0027】

斯くして、「固相上に捕捉されたアビジン又はストレプトアビジン」に、「ビオチン標識量子ドット」が結合して、固相上に複合体〔被験物質-ビオチン標識物質-アビジン(又はストレプトアビジン)-ビオチン標識量子ドット〕が形成される。得られた固相上の複合体は洗浄され、次工程(4)に供せられる。洗浄条件については、前記工程(1)の場合と同様である。

40

【0028】

なお、本工程(3)を行った後に、再度、前記工程(2)及び(3)を繰り返し行っても良い。このように、再度前記工程(2)及び(3)を繰り返し実施することによって、被験物質の検出感度を一層向上させることが可能になる。本発明の検出方法において、工程(2)及び(3)の操作を2回以上、好ましくは2~4回実施することが望ましい。

【0029】

参考のため、本工程(3)が終了した時点での固相上に形成されている複合体(被験物質

50

- ビオチン標識物質 - アビジン - ビオチン標識量子ドット) のモデル構造の一例を図 2 に示す。

【 0 0 3 0 】

工程(4)

次いで、前記工程(3)でアビジン又はストレプトアビジンに捕捉されたビオチン標識量子ドットの蛍光強度を測定する。

【 0 0 3 1 】

本工程(4)において、蛍光強度の測定は、使用する量子ドットの発光スペクトルに応じて、従来公知の方法で行うことができる。例えば、量子ドットとして、CdSeナノ粒子を使用した場合には、475 ~ 625 nmの波長域の蛍光強度を測定すればよい。

10

【 0 0 3 2 】

このようにビオチン標識量子ドットの蛍光強度を測定することによって、被験物質を定性的又は定量的に検出することができる。

【 0 0 3 3 】

実施形態

本発明の検出方法は、通常、免疫化学的方法として採用されている方法であれば、例えば、ウエスタンブロッティング法やELISA法等のいかなる実施形態で行ってもよい。被験物質がタンパク質である場合には、好ましくは、ウエスタンブロッティング法が採用される。

【 0 0 3 4 】

20

2. 検出用試薬キット

本発明は、更に、前記する検出方法を実施する為の検出用試薬キットをも提供する。

【 0 0 3 5 】

該検出用試薬キットは、アビジン又はストレプトアビジンを含む試薬、及びビオチン標識量子ドットを含む試薬を含有する。当該試薬キットには、測定の実施の便益のために、更に適当な反応液、希釈液、洗浄液等が含まれていてもよい。

【 0 0 3 6 】

<量子ドットの親水化処理方法>

以下、量子ドットの親水化処理方法に関して、好適な一例を記載する。

【 0 0 3 7 】

30

量子ドットの親水化は、メルカプト基及び/又はセレノメルカプト基を有する化合物を親水性化合物として用いて、量子ドットの表面をコーティングすることにより実施される。

【 0 0 3 8 】

ここで、メルカプト基を有する親水性化合物としては、メルカプト基(-SH)と共に、カルボキシル基、アミノ基、水酸基等の親水性の基を有する化合物であって、量子ドットに対して親水性を付与できる限り、特に制限されない。メルカプト基を有する親水性化合物の具体例としては、モノメルカプトコハク酸、ジメルカプトコハク酸、メルカプトプロピオン酸、D,L-システイン、システアミン、2-メルカプトシステアミン、メルカプト酢酸、及びこれらの塩(例えば、塩酸塩等の有機酸塩)等が例示される。

40

【 0 0 3 9 】

また、セレノメルカプト基を有する親水性化合物としては、セレノメルカプト基(-SeH)と共に、カルボキシル基、アミノ基、水酸基等の親水性の基を有する化合物であって、前記工程(1)で得られたナノ粒子に対して親水性を付与できる限り、特に制限されない。かかる化合物としては、具体的には、セレノ-L-メチオニン等が例示される。

【 0 0 4 0 】

上記の親水性化合物は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を組み合わせ使用してもよい。

【 0 0 4 1 】

上記の親水性化合物の中で、好ましくはメルカプト基を有する親水性化合物であり、更

50

に好ましくはモノメルカプトコハク酸である。これらの親水性化合物を使用することにより、反応を簡便に実施できる共に、得られる反応産物を凝集し難くすることもできる。

【0042】

上記の親水性化合物を量子ドットの表面にコーティングするには、例えば、疎水性溶媒中に量子ドットを分散させ、これに親水性化合物を添加して混合することにより行われる。

【0043】

ここで、量子ドットを分散させるために使用される疎水性溶媒としては、具体的には、クロロホルム、ヘキサン、メタノール、ブタノール等が挙げられる。

【0044】

また、量子ドットは、上記疎水性溶媒中において、通常30～40g/l、好ましくは20～30g/l、更に好ましくは15～20g/lとなる濃度に調整するとよい。

【0045】

そして、量子ドットを分散させた疎水性溶媒に、上記親水性化合物を添加するには、量子ドットを分散させた疎水性溶媒100重量部に対して、上記親水性化合物を通常300～400重量部、好ましくは200～300重量部、更に好ましくは100～150重量部となる添加割合で実施することが望ましい。

【0046】

また、量子ドットを分散させた疎水性溶媒と、上記親水性化合物との混合は、30～40、好ましくは25～35、更に好ましくは20～30の温度条件下で、0.5～1.0時間、好ましくは0.2～0.5時間、更に好ましくは0.1～0.2時間程度、攪拌することにより実施される。

【0047】

このように、量子ドットを分散させた疎水性溶媒と、上記親水性化合物とを添加・混合することによって、量子ドットの表面に上記親水性化合物のメルカプト基及び/又はセレンメルカプト基が結合して、水溶性量子ドット(親水化処理された量子ドット)が生成される。目的物である親水性量子ドットは、上記の混合液中の親水性画分に存在しているので、当該親水性画分から公知の手段で分離、回収することにより得ることができる。

【0048】

<親水性量子ドットへのビオチンの結合>

以下、親水性量子ドットにビオチンを結合させる方法に関して、好適な一例を記載する。

【0049】

また、量子ドットにビオチンを結合させる方法としては、例えば、ヒドラジン化されたビオチン(biotin hydrazide)と親水性量子ドットとを反応させる方法が例示される。具体的には、ヒドラジン化されたビオチンを0.025～0.1M、好ましくは0.035～0.075M、更に好ましくは0.045～0.05Mに調整した溶媒中で、ヒドラジン化されたビオチン1モルに対して、親水性量子ドットを0.00005～0.0002モル、好ましくは0.000075～0.00015モル、更に好ましくは0.000095～0.0001モルとなるように添加して、両者を反応させる方法が例示される。

【0050】

また、親水性量子ドットとビオチンとの反応は、脱水縮合反応を促進のために、例えば、EDC(1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl] carbodiimide Hydrochloride)等の架橋促進剤の存在下で行うことが望ましい。このような架橋促進剤の存在下で反応を行う場合、該架橋剤の添加割合としては、例えばヒドラジン化されたビオチン1モルに対して、0.005～0.02モル、好ましくは0.0075～0.015モル、更に好ましくは0.010～0.0104モルとなる割合が例示される。

【0051】

当該反応に使用される溶媒としては、具体的には0.08～0.1MのMES [(2-N-morpholino)ethanesulfonic acid]緩衝液が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

当該反応において、親水性量子ドットとビオチンとの反応を効率的に行うために、反応を実施している間、反応液中のpHを3.8~5.7、好ましくは4~5.5の範囲に適宜コントロールしておくことが望ましい。

【 0 0 5 3 】

当該反応は、例えば、30~40、好ましくは25~35、更に好ましくは20~30の温度条件下で、0.5~1時間、好ましくは0.2~0.5時間、更に好ましくは0.1~0.2時間実施される。また、当該反応は、遮光条件下で実施することが望ましい。

【 0 0 5 4 】

反応後、合成されたビオチン標識量子ドットは、例えば遠心濾過等の公知の精製手段により精製することができる。

【 発明の効果 】

【 0 0 5 5 】

本発明の検出方法によれば、被験物質に結合した1次抗体を、アビジン又はストレプトアビジンを架橋剤として複数結合させたビオチン化量子ドットにより高度に増幅して検出できるので、従来法に比べて高感度に被験物質を検出可能であるという利点がある。また、量子ドット(特にCdSeナノ粒子)は、光照射による分解、消光が起こりにくいため、長時間安定して結果を観察でき、イメージアナライザー等を用いた観察、定量を正確に行うことが可能になる。

【 0 0 5 6 】

また、前述するように、本発明の検出方法によれば、被験物質を高感度で検出できるので、微量タンパク質と被験物質として検出する際にも、被験物質の精製等の前処理(被験物質の濃縮処理)を行う必要がない。かかる点においても、本発明の検出方法は、従来の免疫化学的方法に比べて有利であるといえる。

【 0 0 5 7 】

更に、本発明の検出方法によれば、免疫化学的方法において、2次抗体を使用することなく、1次抗体のみを使用して実施されるので、安価で、しかも簡便且つ短時間で、被験物質を検出できるという利点もある。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 5 8 】

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、これらの例によってなんら限定されるものではない。

実施例 1

以下に示す試薬を用いて、以下の方法で白血病細胞株K562細胞の溶菌液中に含まれるタンパク質(TRF1(Telomeric Binding Factor 1)、Tin2(TRF1-interacting nuclear Protein 2)、及び-Actin)の検出を行った。なお、TRF1及びTin2は、K562細胞に微量存在することが知られているタンパク質である。

< 使用した主な試薬 >

溶菌液：組成 10 mM Tris, pH 7.8, 1 % Nonidet P-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 及び protease inhibitor cocktail

2 x Laemmly buffer：組成 1.1 M Tris-HCl, pH 6.0, 3.3% SDS, 22% glycerol, 10% b-mercaptoethanol, 0.001% bromphenol blue

Tris-Glycine-SDS 溶液：組成 3 g/L Tris, 14.4 g/L Glycine, 1 g/L SDS, 蒸留水 残部

Protein transfer buffer：組成 3.03 g/L Trizma-base, 14.4 g/L Glycine, 200 ml/L Methanol, 蒸留水 残部

ブロッキング溶液：組成 100mM phosphate-buffered saline, 0.1% Tween-20, 2-5% dry skimmed milk

洗浄液：10xPBS-T (100 mM phosphate-buffered saline, containing 1% Tween-20)

PVDF膜：商品名Hybond-P PVDF transfer membranes、Amersham Bioscience catalog # 25

10

20

30

40

50

006203

NeutrAvidin : Pierce catalog # 31000

ビオチン標識量子ドット : 後述する参考例 1 に示す方法により製した。

【 0 0 5 9 】

< 実験方法 >

白血病細胞株K562細胞 (1×10^6 cells) を溶菌液中で4、1時間インキュベートし、細胞溶解液を得た。次に、得られた細胞溶解液を14,000 x g で10分間遠心し、上澄み液を回収した。得られた上澄みを2x Laemmly bufferと1:1の割合で混合し、懸濁液を得た。得られた懸濁液を95 で10分間あたため、4-12%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にアプライし、Tris-Glycine-SDS溶液中、室温で80Vで15分間泳動した後、120Vで2-4時間泳動した。ゲル電気泳動後、ゲルを取り出して、protein transfer bufferに冷温下で浸した。

10

【 0 0 6 0 】

次いで、PVDF膜を目的のゲルのサイズに切り取り、膜を10秒間メタノールに浸した。その後、蒸留水で5分間洗浄した後、protein transfer buffer で10分間平衡化した。このときのすべての作業において膜は乾燥させないように行った。

【 0 0 6 1 】

次に、ゲルからPVDF膜へのタンパク移動を行うために、以下の操作を行った。まず、電気プロットカセット (XCell II Blot Module) を、以下に示す1)~10)をその順番で、上から下までサンドイッチのように組み立てた: 1) 負電荷帯電プレート、2) 冷温下protein transfer bufferに浸した2枚の濾紙、3) 冷温下protein transfer bufferに浸したスポンジパット、4) 冷温下 protein transfer bufferに浸した3枚の濾紙、5) 活性化PVDF膜、6) ゲル、7) 冷温下protein transfer bufferに浸した3枚の濾紙、8) 冷温下protein transfer bufferに浸したスポンジパット、9) 冷温下protein transfer bufferに浸した2枚の濾紙、10) 正電荷帯電プレート。ここで、濾紙中、PVDF膜中、ゲル中のすべての気泡は取り除いておいた。ゲルからPVDF膜へのタンパク質の移動は、4、35Vで18時間泳動することにより行った。

20

【 0 0 6 2 】

ゲルからPVDF膜へのタンパク質の移動操作終了後、PVDF膜はメタノールで10秒間洗浄し、その後蒸留水で5分間洗浄した。次いで、PVDF膜は、ブロッキング溶液中、室温で1時間、かき混ぜながらインキュベートした。なお、この際、ブロッキング溶液の量は $> 4\text{mL/cm}^2$ (PVDF膜面積) とした。その後、PVDF膜をそれぞれビオチン標識された抗体 (anti-TRF-1 - rabbit, Calbiochem, 1mg/ml ; anti-Tin2 - mouse, Calbiochem, 1 mg/ml ; 又は anti-b-actin- mouse, Calbiochem ; それぞれ 1 万倍希釈したもの) と1時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、PVDF膜を洗浄液で合計3回洗浄した (1回当たり5分間)。次いで、5 $\mu\text{g/ml}$ のNeutrAvidinを添加して、かき混ぜながら室温で30分間インキュベートした。その後、洗浄液で合計2回洗浄した (1回当たり5分間)。次いで、0.5 mg/ml のビオチン標識量子ドットを添加して、かき混ぜながら室温で15分間インキュベートした後、洗浄液で合計2回洗浄した (1回当たり5分間)。このNeutrAvidinの添加操作、及びビオチン標識量子ドットの添加操作を合計2回行った。PVDF膜は最後に洗浄液で合計3回洗浄 (1回当たり5分間) した後、3 mM Glutathioneを添加して、10分間インキュベートした。PVDF膜を数種の蛍光検出システム (Fluor-STM MultiImager, BioRad; FluorChemTM, AlphaInnothec) により解析した結果、いずれの抗体を使用した場合でも蛍光が発せられていることが観察された (図3の(a)参照)。いずれの蛍光イメージも475-625 nm のエミッションフィルターの使用がもっとも適していた。なお、使用したPVDF膜はPBS中4の条件下において2週間保持することができることも確認された。

30

40

【 0 0 6 3 】

また、比較として、白血病細胞株K562細胞の溶菌液中のTRF1及びTin2を、通常のウエスタンブロッティング法 (Bakalova, R., Ohba, H., Zhelev, Z., Kubo, T., Fujii, M., Ishikawa, M., Shinohara, Y., Baba, Y. Antisense inhibition of bcr-abl/c-abl syntheses

50

is promotes telomerase activity and upregulates tankyrase in human leukemia cell s., FEBS Letters 2004, 564(1-2), 73-84、及びOhba, H., Zhelev, Z., Bakalova, R., Ewis, A., Omori, T., Ishikawa, M., Shinohara, Y., Baba, Y. Inhibition of bcr-abl and/or c-abl gene expression by small interfering, double-stranded RNAs: cross-talk with cell proliferation factors and other oncogenes., Cancer. 2004 Sep 15;101(6):1390-403.に記載の方法)を用いて検出を行った。この結果、一部の条件においてTRF1及びTin2の検出はできたものの、その感度は、本発明の方法に比して著しく低いことが確認された(図3の(b)参照)。

【0064】

参考例1 ビオチン標識量子ドットの製造

<量子ドットの合成>

1. セレン化トリオクチルホスフィン(Tri-n-octylphosphine selenide; TOP-Se, Lancaster)溶液の調製

Se粉末(0.7896 g, 10 mM, Aldrich)をTOP (7.413 g, 20 mM)溶液に溶解して、100 でアルゴン雰囲気下2時間インキュベートとした後、反応溶液の温度を室温まで下げることにより、セレン化トリオクチルホスフィン溶液を調製した。

【0065】

2. Cd分散液の調製

酢酸カドミウム(1 g, 3.75 mM, Wako)を丸底フラスコ中で2 mLのトリオクチルホスフィン(Tri-n-octylphosphine; TOP)溶液にアルゴン雰囲気下で分散させ100 で20分間強く

【0066】

3. CdSeナノ結晶(量子ドット)の調製

100mLのフラスコを用いて4mLのセレン化トリオクチルホスフィン溶液と4mLのCd分散液を混合し、(1/6)時間、室温(25)で攪拌しながら強く反応させた。反応中、CdSeナノ結晶の形成はUV/VIS 吸収スペクトルと蛍光スペクトルでモニターしながら確認した。反応は30mLのクロロホルムを添加することによって停止した。斯くして得られた粗製溶液はクロロホルム中に存在する未反応の酢酸カドミウムが不溶なため若干濁りが観られた。この粗製溶液は遠心分離(16,000rpm×20min)し、上清は新しいフラスコに移して、沈殿不溶物を除去した。純粋なCdSeナノ結晶が分散した上清は極めて透明であった。

【0067】

得られたCdSeナノ結晶(量子ドット)について、蛍光スペクトルをHitachi F-4500 fluorescence spectrometerにより測定(励起波長420nm)したところ、475~625 nmの波長域で発光スペクトルを示すことが確認された。また、得られたCdSeナノ結晶(量子ドット)の表面形態について、高分解透過型電子顕微鏡(JEOL (model JEM 3010, Japan) transmission electron microscope operating at 300 kV)を用いて評価したところ、粒子径が2 nm程度であることも確認された。なお、高分解透過型電子顕微鏡による観察は、サンプル(CdSeナノ結晶)をメタノール中で超音波処理により分散させた後、カーボン被覆した銅グリッド上に滴下して乾燥させることにより準備した。

【0068】

<量子ドットの親水処理>

上記で得られたCdSeナノ結晶(量子ドット)に水溶性を付与するために表面修飾剤としてモノメルカプトコハク酸を用いて、以下の方法で反応を行った。

【0069】

上記で得られたCdSeナノ結晶(量子ドット)をクロロホルム中で分散させ、430 nmでの吸光度(OD_{430nm})が0.5になるように調整した。この溶液3 mLに対して3 mLのモノメルカプトコハク酸(Sigma-Aldrich, dissolved in 100 mM PBS, pH 7.3 at concentration 30 mg/mL)を添加した。混合溶液が黄色になるまで5~10分間激しくシェイクした。混合後、遠心分離(80xg for 10 min)により有機溶媒層と水層に分離した。水溶性CdSeナノ結晶(水溶性量子ドット)を含む水層部分を注意深く回収し、直ぐに遠心ろ過濃縮を行う

10

20

30

40

50

ことにより水溶性CdSeナノ結晶を精製した。水溶性CdSeナノ結晶（水溶性量子ドット）の精製の全ての操作はVivaspin concentrator (Vivascience, Sartorius)を用いて4で行った。具体的には、まず、Vivaspin-20（フィルター分画分子量：3,000MW、ザルトリウス社製）を用いた遠心ろ過濃縮（3,000 x g for 15 min）により、分子量3,000以下のもの（未反応のモノメルカプトコハク酸を含む）を除いた後、6 mLの100 mM PBS（Phosphate buffered saline；pH 7.3）で3回フィルター上を洗浄した。フィルター上清を回収し、Vivaspin-20（フィルター分画分子量：10,000MW、ザルトリウス社製）を用いた遠心ろ過（3,000xg for 10 min）濃縮により分子量10,000以下のもの（水溶性ナノ結晶）を下層に回収し、さらに分画分子量が5,000のフィルターで濃縮し、PBS(-)溶液（pH7.3）中で目的の濃度（ $OD_{430nm} = 0.1$ ；約 $7.6 \mu M$ ）に調整した。PBS(-)の組成は100 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 100 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 2 mM KClである。

10

【0070】

最終的には、約90%の親水性ナノ結晶（水溶性量子ドット）が分画分子量10,000のフィルターを通過し、95%の親水性ナノ結晶（水溶性量子ドット）が分画分子量5,000のフィルター上に回収できた。フィルターのサイズから考えて、この結果は精製した結晶の大きさが1.8-2.1 nmであることを示している。

【0071】

このようにして、官能基としてカルボキシル基を持つ親水性CdSeナノ結晶（水溶性量子ドット）を得、これを上記のCdSeナノ結晶（量子ドット）と同様の方法で蛍光スペクトル及び表面形態について評価した。この結果、親水性CdSeナノ結晶（水溶性量子ドット）は、親水化処理前のCdSeナノ結晶（量子ドット）と同等の蛍光スペクトル及び表面形態を有していることが確認された。

20

【0072】

<量子ドットへのビオチンの結合>

ヒドラジン化ビオチン（D-biotin hydrazide；Pierce社製）を使用直前に無水ジメチルスルホキシド（DMSO）に添加して、50 mMのヒドラジン化ビオチン溶液を調製した。また、別途、上記で得られた親水性CdSeナノ結晶（水溶性量子ドット）を、0.1 M MES緩衝液（pH 5.5）に溶解して、5 μM の量子ドット含有溶液を調製した。更に、別途、100mgのEDCを使用直前に0.1 M MES緩衝液（pH 5.5）に溶解して、EDC含有溶液を調製した。

【0073】

次いで、25 μL のヒドラジン化ビオチン溶液と25 μL のEDC含有溶液を、950 μL の量子ドット含有溶液に添加し、室温、遮光下で2時間インキュベーションした。なお、インキュベーション中は、反応液のpHを4~5.5の間に維持した。

30

【0074】

斯くして合成されたビオチン標識量子ドットは、Vivaspin filter（5,000 MW）を用いた遠心ろ過法により精製して、反応に用いたMES緩衝液も同法によりPBS（50-100 mM, pH 7.3）に置換した。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】本発明の検出方法においてビオチン標識量子ドットのモデル構造の一例を図1に示す図である。

40

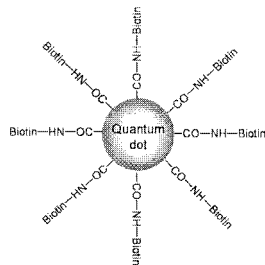
【図2】本発明の検出方法において、本工程(3)が終了した時点での固相上に形成されている複合体（被験物質 - ビオチン標識物質 - アビジン - ビオチン標識量子ドット）のモデル構造の一例を示す図である。

【図3】図中、(a)は、本発明の方法で、白血病細胞株K562細胞の溶菌液中に含まれるタンパク質（TRF1、Tin2及び -Actin）の検出を行った結果（実施例1）である。また、(b)は、通常のウエスタンブロッティング法で、白血病細胞株K562細胞の溶菌液中のTRF1及びTin2の検出を行った結果である。図中、(a)及び(b)において、レーン1 - 5にアプライしたK562細胞溶菌液は以下の通りである：レーン1：タンパク質量10 μg に相当する量のK562細胞溶菌液 レーン2：タンパク質量20 μg に相当する量のK562細胞溶菌液 レーン3：

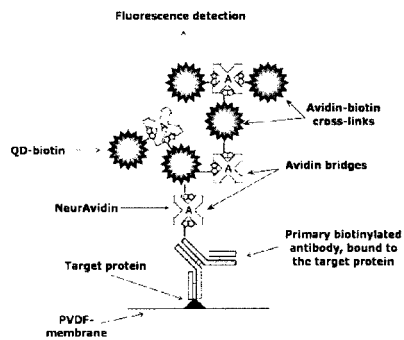
50

タンパク質量30 μgに相当する量のK562細胞溶菌液 レーン 4 : タンパク質量40 μgに相当する量のK562細胞溶菌液 レーン 5 : タンパク質量50 μgに相当する量のK562細胞溶菌液
。

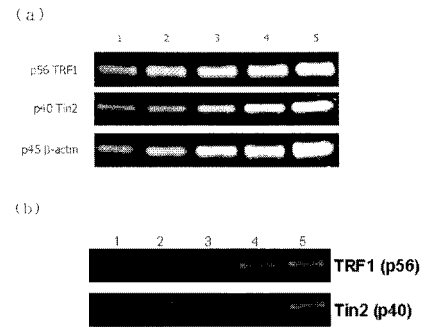
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

- (72)発明者 大庭 英樹
佐賀県鳥栖市宿町807-1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内
- (72)発明者 久保 貴紀
佐賀県鳥栖市宿町807-1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特開2004-132838(JP,A)
特開2005-274569(JP,A)
特開2004-300253(JP,A)
特表2002-544488(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53
C01B 19/04
G01N 21/78
G01N 33/543
G01N 33/551

专利名称(译)	免疫化学检测方法和用于检测的试剂盒		
公开(公告)号	JP4654414B2	公开(公告)日	2011-03-23
申请号	JP2005348157	申请日	2005-12-01
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	ルミアナバカロヴァ ジフコジェレフ 大庭英樹 久保貴紀		
发明人	ルミアナ バカロヴァ ジフコ ジェレフ 大庭 英樹 久保 貴紀		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/551 G01N21/78 C01B19/04		
FI分类号	G01N33/53.U G01N33/543.575 G01N33/551 G01N21/78.C C01B19/04.C B82Y15/00 B82Y30/00		
F-TERM分类号	2G054/AB04 2G054/BB03 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CB02 2G054/CB03 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02		
代理人(译)	田中纯弥		
其他公开文献	JP2007155395A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测方法，用于以高灵敏度简单地免疫检测待检物质。ZOLUTION：在用于免疫检测待检物质的检测方法中，使待检物质与固定在固相上的待检测固相物质特异性结合的生物素标记物质反应，捕获生物素标记物质通过待检测的固相物质与抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白反应，同时使生物素捕获的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白与生物素标记的量子点反应，并且由抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白捕获的生物素标记的量子点的荧光强度为测量。Z

