

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-544939

(P2009-544939A)

(43) 公表日 平成21年12月17日(2009.12.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 35/08 (2006.01)	GO 1 N 35/08 A	2 G O 5 8
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
	GO 1 N 37/00 1 O 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2009-520682 (P2009-520682)  
 (86) (22) 出願日 平成19年7月19日 (2007.7.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年3月4日 (2009.3.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2007/003499  
 (87) 国際公開番号 W02008/010677  
 (87) 国際公開日 平成20年1月24日 (2008.1.24)  
 (31) 優先権主張番号 10-2006-0067708  
 (32) 優先日 平成18年7月20日 (2006.7.20)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

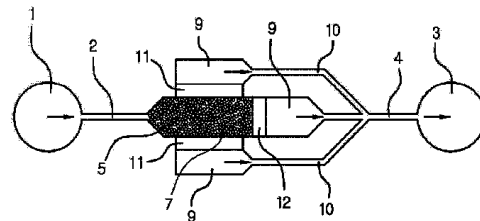
(71) 出願人 509019129  
 ソウルインバイオサイエンス株式会社  
 SEOULIN BIOSCIENCE  
 CO., LTD.  
 大韓民国ソウル・カンドング・ソンネドン  
 452-2 ソウルインビルディング  
 452-2, Seoulin Bldg  
 ., Songnae-Dong, Ka  
 ng-dong-Gu, Seoul,  
 KOREA

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質固定化用マイクロチップ

(57) 【要約】

本明細書に開示されているのは、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF/MS)などの微量分析工程中に微量のタンパク質を検出するように、アルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリン、またはケラチンなどの特定タンパク質をビーズに固定化するタンパク質固定化用マイクロチップである。前記タンパク質固定化用マイクロチップは試料量を低減し、反応時間を短縮し、結果の信頼性を高め、さらに分析工程を簡素化する。このため、表面に付着された抗体を有するビーズが有機ポリマー、すなわち(ポリ)ジメチルシロキサン(PDM)を用いた重層構造を持つマイクロチップのチャンバに含まれ、前記チャンバを通過する微量試料の圧力が前記ビーズの全てに均一に分布され、さらに前記微量試料が、前記特定タンパク質を効果的に固定化するように大きな表面積を有し、かつ最適速度で外部に円滑に排出される前記ビーズを通過する。よって、タンパク質固定化用マイクロチップは、前記マイクロチップを通過する前記試料の速度を最適化



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

タンパク質固定化用マイクロチップにおいて、チャンバが入口の片側に形成された入口チャンネルと出口の片側に形成された出口チャンネルとの間に形成され、カバーガラスが前記入口、前記入口チャンネル、前記出口、前記出口チャンネルを封止し、前記チャンバの周りの分離壁の上端部と、前記入口を除いた前記チャンバの前部と両側部における前記カバーガラスと、の間にビーズの直径よりも低い高さを有する排出空間が形成されるようになっており、さらに、前記チャンバが移動チャンネルによって前記出口チャンネルに接続されることを特徴とするタンパク質固定化用マイクロチップ。

**【請求項 2】**

リザーバが、前記分離壁と前記移動チャンネルとの間に設置され、かつ移動チャンネルによって前記出口チャンネルに接続されることを特徴とする請求項 1 に係るタンパク質固定化用マイクロチップ。

**【請求項 3】**

前記ビーズに付着される抗体が抗アルブミン抗体であることを特徴とする請求項 1 に係るタンパク質固定化用マイクロチップ。

**【請求項 4】**

前記ビーズに付着される抗体が抗トランスフェリン抗体であることを特徴とする請求項 1 に係るタンパク質固定化用マイクロチップ。

**【請求項 5】**

前記ビーズに付着される抗体が抗免疫グロブリン G 抗体であることを特徴とする請求項 1 に係るタンパク質固定化用マイクロチップ。

**【請求項 6】**

前記ビーズに付着される抗体が抗ケラチン抗体であることを特徴とする請求項 1 に係るタンパク質固定化用マイクロチップ。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、タンパク質固定化用マイクロチップに関し、特に、アルブミン、免疫グロブリンなどを選択的に固定化するタンパク質固定化用マイクロチップに関する。

**【背景技術】****【0002】**

公知のように、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF/MS)などの微量試料を分析する機器が開発されている。しかしながら、微量のタンパク質を分析する工程中、アルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリン、ケラチンなどの特定タンパク質に関しては、微量のタンパク質を検出することが困難である。

**【0003】**

上記問題を解決するために、LC/MSやMALDI-TOF/MSを行う前に、上記の特定タンパク質を固定化する色素クロマトグラフィーが行われる。しかしながら、この方法には分析しようとするタンパク質も固定化されてしまうという欠点がある。

**【0004】**

上記欠点を補正するために、イムノクロマトグラフ法が行われる。この方法では、これらのタンパク質に結合した抗体を用いて免疫学的に特定タンパク質を固定化するため、微量の標的タンパク質を分析することができる。

**【0005】**

しかしながら、かかるイムノクロマトグラフ法では、試料がカラムを用いて精製され、そのカラムは各試験後に洗浄されなければならない、洗浄されたカラムは再使用される。それ故、この方法は手間が多く、タンパク質を分析するのに長い時間を要する。さらに、前記方法実施後のタンパク質は抗体樹脂に付着されている可能性もあり、前記カラムが繰り返

10

20

30

40

50

返して使用される場合、引き続き行われる LC / MS や MALDI - TOF / MS などの分析工程における測定結果の信頼性が低くなる可能性もある。

【 0 0 0 6 】

さらに、前記イムノクロマトグラフ法は、少なくとも 250 μm の試料を必要とするため、試料の量が過剰に小さい場合は使用できず、また、20 ~ 30 分の反応時間を必要とするため、結果を迅速に得ることができない。また、イムノクロマトグラフ法で使用される樹脂量は試料量の 1.8 倍である。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

従って、本発明は上記問題点に鑑みてなされたものであり、反応時間を短縮し、結果の信頼性を高め、さらに分析工程を簡素化するタンパク質固定化用マイクロチップを提供することが本発明の目的である。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明の態様によれば、表面に付着された抗体を有するビーズが、有機ポリマー、すなわちポリジメチルシロキサン ( P D M ) を用いた重層構造を持つマイクロチップのチャンバに含まれ、前記チャンバを通過する微量試料の圧力が、前記ビーズの全てに均一に分布され、さらに、前記微量試料が、特定タンパク質を効果的に固定化するように大きな表面積を有しかつ最適速度で外部に円滑に排出される前記ビーズを通過するタンパク質固定化用マイクロチップを提供することによって上記とその他の目的を達成できる。

【 発明の効果 】

【 0 0 0 9 】

よって、本発明のタンパク質固定化用マイクロチップは、前記マイクロチップを通過する前記試料の速度を最適化し、前記微細ビーズの十分な表面積のために前記ビーズに付着された前記抗体への特定タンパク質の固定化効率を向上させ、それによって迅速な反応結果を達成する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 0 】

本発明の前述及び他の目的、特徴及び利点は、以下の添付図面を併用して以下の詳細説明からより明確に理解されるであろう。

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 図 1 は本発明によるタンパク質固定化用マイクロチップの斜視図である。

【 図 2 】 図 2 は、カバーガラスが除去された状態の本発明によるマイクロチップの平面図である。

【 図 3 】 図 3 は、カバーガラスが除去された状態の本発明によるマイクロチップの斜視図である。

【 図 4 】 図 4 は本発明によるマイクロチップの動作状態を例示する概略図である。

【 図 5 】 図 5 は本発明によるマイクロチップのビーズを周回する試料の状態を例示する概略図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

ここで、本発明を添付図面を参照して詳細に説明する。

【 0 0 1 3 】

本発明によるタンパク質固定化用マイクロチップは、ポリジメチルシロキサン ( P D M ) が所望構造のチャンネル、チャンバ、分離壁などを形成するようにエッチングなどの半導体処理技術を用いてシリコンウェーハ上に形成されたフレームに注入されるような工程からなるソフトリソグラフィによって製造される。

【 0 0 1 4 】

本発明のタンパク質固定化用マイクロチップは、入口 1 及び入口チャンネル 2 と、出口 3

10

20

30

40

50

及び出口チャンネル４と、の間にチャンバ５が形成され、カバーガラス６が上記部分を封止し、さらに、前記入口１を除いた前記チャンバ５の前部と両側部とにおいて、前記チャンバ５の周りにおける分離壁１１，１２の上端部と、前記カバーガラス６と、の間にビーズ７の直径よりも低い高さを有する排出空間８を形成するように加工される。上記の３部分では、リザーバ９が前記排出空間８内に選択的に形成され、かつ移動チャンネル１０によって前記出口チャンネル４に接続される。

#### 【００１５】

本発明のタンパク質固定化用マイクロチップでは、微量試料が前記入口１から入り、前記入口チャンネル２を通過し、前記チャンバ５に到達する。図４に示すように、前記チャンバ５が複数のビーズ７で充填されているので、前記試料は前記ビーズ７の表面に沿って流れる。ここで、前記ビーズ７の表面に前記試料による液圧がかかる。前記チャンバ５が前記ビーズ７で充填されているので、前記ビーズ７に前記試料が流出できる方向に高圧力がかかる。ここで本発明では、前記ビーズ７は、前記試料が流出できる方向、すなわち前方向と両側方向とに押される。しかしながら、図５に示すように、前記分離壁１１，１２と前記カバーガラス６との間に形成された前記排出空間８の高さ（ $d_1$ ）が前記ビーズ７の直径（ $d_2$ ）よりも小さいため、前記ビーズ７が前記チャンバ５から放出されることを防止できるとともに、前記試料は円形状の前記ビーズ７同士の間隙を通過することができ、かつ前記分離壁１１，１２を介して前記リザーバ９に供給され得る。前記リザーバ９内に回収された前記試料は前記移動チャンネル１０を介して前記出口チャンネル４に供給され、前記出口３に排出される。上記工程中、前記ビーズ７は前記分離壁１１（両側）と前記分離壁１２（前方）とに移動方向に分散されるので、前記ビーズ７が片側に密集するために生じる過剰に高い圧力による変形や損傷を防止することが可能であり、前記ビーズ７の密集に起因する前記試料の拘束状態を防止することも可能であることから、安定的かつ効果的な反応を誘導できる。本発明では、前記ビーズ７の直径は $100\ \mu\text{m}$ 以下と小径であるため、大きな表面積を有する。それ故、抗体は前記ビーズ７の十分に大きな表面積に付着される。

#### 【００１６】

従って、前記ビーズ７の表面と接触してから上記の工程を介して排出される前記試料の特定タンパク質を、前記ビーズ７の表面に付着された抗体に結合させることができる。よって、前記試料の特定タンパク質は前記抗体と効果的に反応して迅速に回収されてから外部に排出される。本発明のタンパク質固定化用マイクロチップには、その中に設置される小型の内部構造物が含まれていることから、微量試料を連続的に通過させることができる。よって、本マイクロチップの構造物を通過する試料が微量である場合でさえも、効果的かつ十分な反応を実現できる。本発明では、前記チャンネルの分離壁１１，１２の高さは、前記ビーズ７の直径と、前記チャンバ５内の前記ビーズ７の数量とに従って調整される必要がある。さらに、本発明では、複数の構造物がシリコンウェーハ上でエッチング加工されるため、複数のタンパク質固定化用マイクロチップの量産を繰り返して行うことができる。

#### 【００１７】

前記リザーバ９は選択的に設置してもよく、前記リザーバ９は、前記分離壁１１，１２と前記移動チャンネル１０との間に設置され、マイクロポンプとマイクロピペットによって移動された前記試料を安定的に精製して排出する働きをする。

#### 【００１８】

本発明では、前記ビーズ７に付着される抗体を多様化できる。

#### 【００１９】

つまり、前記ビーズ７に付着される抗体は、抗アルブミン抗体、抗トランスフェリン抗体、抗免疫グロブリンG抗体、または抗ケラチン抗体であってもよい。

#### 【００２０】

本発明では言及していないが、前記ビーズ７に固定化された特定タンパク質は目的に応じて任意に選択されるので、前記ビーズ７に付着される抗体は具体的な目的に適切なもの

10

20

30

40

50

に変更してもよい。

【産業上の利用可能性】

【0021】

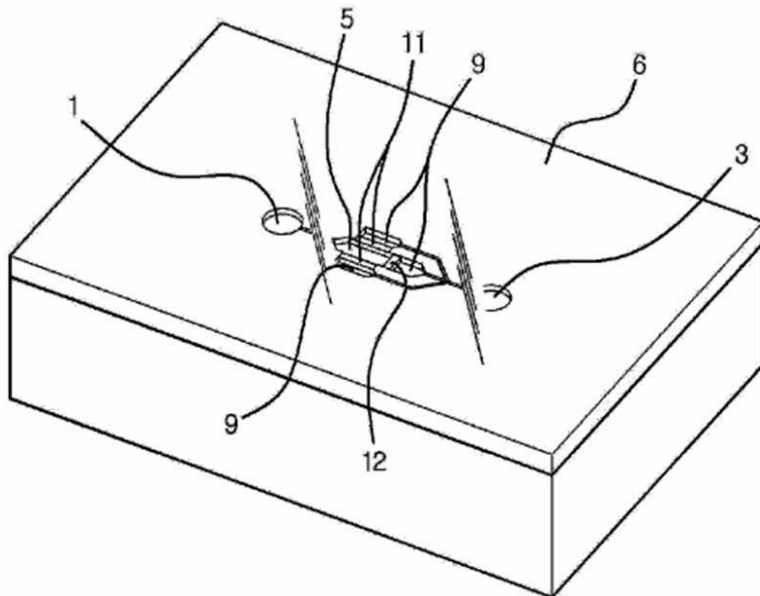
上記のように、本発明のタンパク質固定化用マイクロチップでは、 $10\ \mu\text{m}$ 以下の試料を使用することから、特定タンパク質が除去される精巧な工程を実現できるが、前記従来のイムノクロマトグラフ法では約 $250\ \mu\text{m}$ の試料が必要であり、十分な表面積を有するビーズに付着される抗体の種類に応じて所望の特定タンパク質を選択的に捕獲するため、さまざまな目的に選択的に使用することができる。さらに、本発明のタンパク質固定化用マイクロチップでは、反応時間が前記従来のイムノクロマトグラフ法の $30\sim 50\%$ と大幅に短縮されることから、迅速な反応結果を得ることができ、さらに、試料とビーズの使用率も $10:1$ と、前記従来法の $1/18$ に低減される。また、本発明のタンパク質固定化用マイクロチップは、ソフトリソグラフィーによって量産され、その製造コストが低いいため、単回使用（使い捨て）ではあるが、経済的である。

10

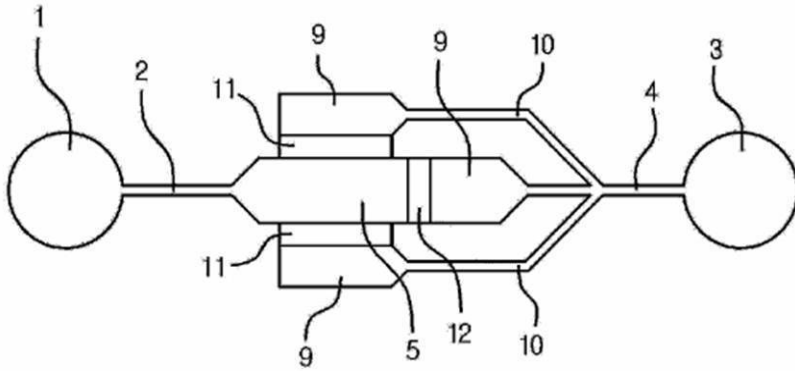
【0022】

本発明の好適な実施形態は例示的な目的で開示したものであって、当業者であれば、種々の変更、付加および代替を添付の特許請求の範囲で開示した本発明の範囲および真の趣旨から逸脱することなく行い得ることを理解されるであろう。

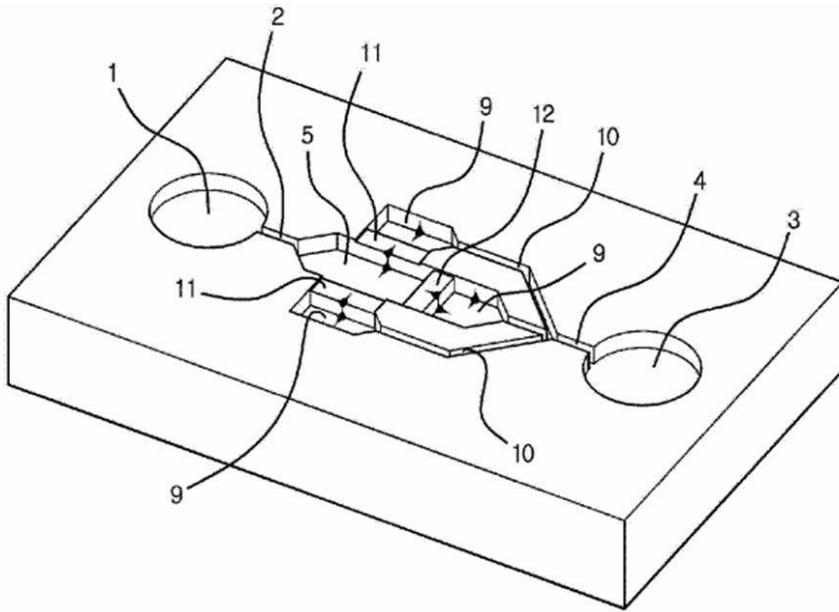
【図1】



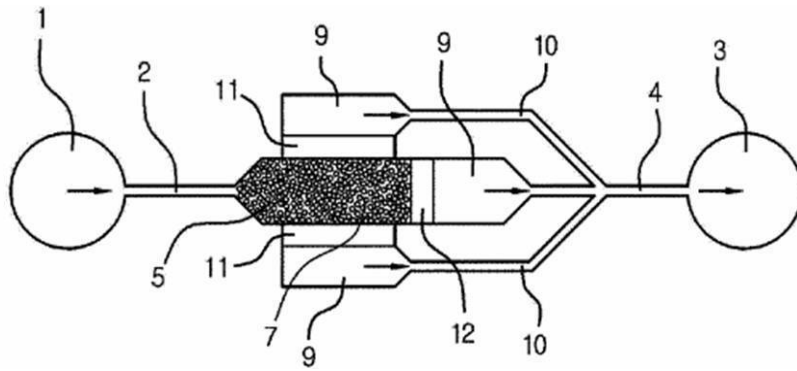
【 図 2 】



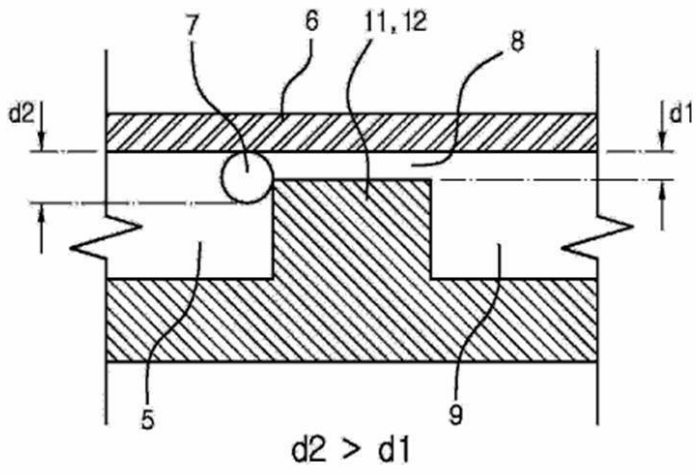
【 図 3 】





【 図 4 】



【 図 5 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2007/003499</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/53(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 8, G01N 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models since 1975 Japanese Utility models and application for Utility models since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS (KIPO internal), Delphion (chip*, micro*, channel, protein, antibody and similar terms)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-004628 A2 (KANAGWA ACAD OF SCI. & TECHNOL.) 12 January 2001 See the abstract, [0012], claims, figure 1.	1-6
A	KR 1020050019957A (DANKOOK UNIVERSITY FOUNDATION) 4 March 2005. See the whole document especially abstract, claims.	1-6
A	US 2005/0239210 A1 (KAZUHIRO IIDA) 27 October 2005. See the whole document.	1-6
A	US 2003/0096268 A1 (MICHAEL WEINER, et al.) 22 May 2003. See the whole document.	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 25 OCTOBER 2007 (25.10.2007)		Date of mailing of the international search report <b>25 OCTOBER 2007 (25.10.2007)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer  AHN, Kyu Jeong  Telephone No. 82-42-481-8158  

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2007/003499**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP2001004628A2	12.01.2001	None	
KR102005019957A	04.03.2005	None	
US20050239210A1	27.10.2005	US2005239210AA WO2004036194A1	27.10.2005 29.04.2004
US20030096268A1	22.05.2003	US2003096268A1 US2003096268AA	22.05.2003 22.05.2003

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 309023690

オ ヒョン ジク

大韓民国キョンギド・アニャンシ・マナング・バクタル1トン31-1 テヤンヴィラ502  
502 Taeyang Villa, 31-1, Bakdal 1-dong, Manan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do, KOREA

(71) 出願人 309023715

ユン テ ジュン

大韓民国キョンギド・スウォンシ・チャンアング・ソングジュクトン ミョンムンヴィラ202  
202 Myeongmun Villa, Songjuk-dong, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, KOREA

(71) 出願人 309023726

イ サン フン

大韓民国キョンギド・アンサンシ・タヌオング・コジャンドン720 ホスゴンウォンデイリンア  
パートメント136-102  
136-102, Hosugongwon Daelim Apt., 720 Gojan-dong, Danwon-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do, KOREA

(74) 代理人 100096105

弁理士 天野 広

(72) 発明者 オ ヒョン ジク

大韓民国キョンギド・アニャンシ・マナング・バクタル1トン31-1 テヤンヴィラ502

(72) 発明者 ユン テ ジュン

大韓民国キョンギド・スウォンシ・チャンアング・ソングジュクトン ミョンムンヴィラ202

(72) 発明者 イ サン フン

大韓民国キョンギド・アンサンシ・タヌオング・コジャンドン720 ホスゴンウォンデイリンア  
パートメント136-102

Fターム(参考) 2G058 BA00 DA07 DA09 GA20

## 【要約の続き】

し、前記微細ビーズの十分な表面積のために前記抗体への前記特定タンパク質の固定化効率を向上させ、それによって迅速な反応結果を得られる。

## 【選択図】 図1

专利名称(译)	Microchip用于蛋白质固定化		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009544939A</a>	公开(公告)日	2009-12-17
申请号	JP2009520682	申请日	2007-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	Ohyonjiku Yuntejun Isanfun		
申请(专利权)人(译)	在首尔生物科学公司星 哦炫轴 恽特军 裔孙红		
[标]发明人	オヒョンジク ユンテジュン イサンフン		
发明人	オヒョンジク ユンテジュン イサンフン		
IPC分类号	G01N35/08 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/6848 G01N2333/4742 G01N2333/765 G01N2333/79		
FI分类号	G01N35/08.A G01N33/53.D G01N33/53.N G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G058/BA00 2G058/DA07 2G058/DA09 2G058/GA20		
优先权	1020060067708 2006-07-20 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文所公开的是液相色谱/质谱 ( LC / MS ) 或基质辅助飞行时间质谱 ( MALDI-TOF / MS ) 的过程中微量微量分析, 如激光解吸电离飞行时间检测蛋白质, 白蛋白, 免疫球蛋白, 转铁蛋白或ke它是一种固定蛋白质的微芯片, 可将特定蛋白质如拉丁固定在珠子上。用于蛋白质固定在微芯片减少了样品的量, 反应时间缩短, 以增加结果的可靠性, 进一步简化分析过程。因此, 具有附着于表面的抗体的珠子包含在具有使用有机聚合物的多层结构的微芯片的腔室中, 即 ( 聚 ) 二甲基硅氧烷 ( PDM ), 并且通过腔室的微量样品的压力是其中珠子均匀地分布在所有珠子中, 并且其中微珠子它通过具有大表面积的珠子, 以便有效地固定, 并以最佳速度平稳地排出到外面。因此, 用于蛋白质固定的微芯片优化了样品通过微芯片的速度, 由于细珠的足够表面积, 提高了特定蛋白质在抗体上的固定效率, 可以获得快速的反应结果。

