

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4956715号  
(P4956715)

(45) 発行日 平成24年6月20日(2012.6.20)

(24) 登録日 平成24年3月30日(2012.3.30)

(51) Int.Cl.

F I

<b>GO 1 N 27/414</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 27/30	3 O 1 N
<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 9 3
<b>GO 1 N 27/416</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 27/30	3 O 1 V
		GO 1 N 27/46	3 8 6 G

請求項の数 5 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-312057 (P2007-312057)  
 (22) 出願日 平成19年12月3日(2007.12.3)  
 (65) 公開番号 特開2009-133800 (P2009-133800A)  
 (43) 公開日 平成21年6月18日(2009.6.18)  
 審査請求日 平成22年7月9日(2010.7.9)

特許法第30条第1項適用 平成19年9月4日 第6  
 8回応用物理学会学術講演会講演予稿集にて発表

(73) 特許権者 504137912  
 国立大学法人 東京大学  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号  
 (74) 代理人 110000109  
 特許業務法人特許事務所サイクス  
 (72) 発明者 川上 雅之  
 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地  
 富士フイルム株式会社内  
 (72) 発明者 坂田 利弥  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大  
 学法人東京大学内  
 (72) 発明者 官原 裕二  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大  
 学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 目的物質の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

目的物質の測定方法において、

(a) 目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド(A)又は目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチド(B)の何れか一方が固定化された、電界効果トランジスタのゲート部に、ポリペプチド(A)又はポリペプチド(B)の何れか他方、及び目的物質を接触させることによって、ポリペプチド(A)、ポリペプチド(B)、及び目的物質からなる複合体を形成させる工程：及び

(b) 工程(a)で形成された複合体を電界効果トランジスタセンサにより測定する工程：

を含む上記の測定方法。

【請求項2】

ポリペプチド(A)又はポリペプチド(B)の何れか一方が、共有結合により前記ゲート部に固定化されている、請求項1に記載の測定方法。

【請求項3】

ポリペプチド(A)又はポリペプチド(B)の何れか一方が、該ポリペプチドを認識するペプチドまたはタンパク質により前記ゲート部に固定化されている、請求項1に記載の測定方法。

【請求項4】

ポリペプチド(A)又はポリペプチド(B)の何れか一方が、ピオチンと、アビジン又は

ストレプトアビジンとの結合を介して前記ゲート部に固定されている、請求項1に記載の測定方法。

【請求項5】

前記測定方法は目的物質の量を測定する方法である、請求項1から4の何れか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル中の目的物質の測定方法に関する。より詳細には、電界効果トランジスタセンサを利用した、抗体に特異的に結合する目的物質（抗原）の測定方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

電界効果トランジスタ（Field Effect Transistor, FET）は、p型半導体上にn型半導体でドレインとソースを形成し、p型半導体のチャネル上をケイ素酸化物で絶縁してゲートを形成したもので、ゲートに与える電位によってチャネルに電子空乏層を生じ、ドレインとソースの間に流れる電流を変化させることができる。

【0003】

抗原抗体反応を検出するFETセンサ（Immuno-FET）は、従来、ゲート絶縁膜表面に抗体もしくは抗原を固定化し、抗原抗体複合体が形成されるとゲート絶縁膜表面の電荷が変化し、ソース・ドレイン間の電気伝導性の変化が生じる。通常は、ドレイン電流の変化、もしくはソース・ドレイン間にチャネルが形成される時のゲート電圧（しきい値電圧 $V_{th}$ ）の変化が計測される。

20

【0004】

抗原抗体反応を検出するFETセンサについてはこれまでも研究がなされているが、良好な結果は得られていない。その主な要因は、抗体などの蛋白質の大きさと溶液/ゲート絶縁膜表面の電気二重層の幅（デバイ長）に関係している。抗体の典型的な大きさは約10nmであるのに対し、生理学的塩溶液中でのデバイ長は約1nmである。抗体をゲート絶縁膜表面に固定化する場合、溶液中の抗原は電気二重層の外で抗体と結合することになり、抗原の電荷はカウンターイオンによって遮蔽され、原理的にFETで検出することが困難となっている。

30

【0005】

そのため、免疫測定法で一般的に利用されるサンドイッチ法では、「固定化抗体 抗原 二次抗体」複合体の形成を直接FETで検出することは困難な場合は多く、特許文献1に開示されているように、二次抗体に標識した酵素の酵素反応により生成した電気化学的に活性な化合物を検出する方法を採用するケースが多い。しかし、この方法では、発色や化学発光により抗原量を検出する従来のELISA法と原理的には同じであり、洗浄工程や酵素標識した二次抗体を必要とするという問題点がある。

【0006】

上記の通り、Immuno-FETは、原理的には、タンパク質に色素などの検出用シグナル分子の標識や洗浄工程を必要とせず、小型化も可能な優れた検出方法であるが、従来の抗体サンドイッチ法では、その分子の大きさが問題となるため、良好な検出方法は開発されていない。

40

【0007】

一方、特許文献2には、抗原を特異的に認識する抗体のVH領域ポリペプチドおよびVL領域ポリペプチドを調製し、一方のポリペプチドをレポーター分子で標識して標識化ポリペプチドとし、他方のポリペプチドを固相に固定して固定化ポリペプチドとし、抗原含有試料および標識化ポリペプチドを固相に接触させ、固定化ポリペプチドに結合した標識化ポリペプチドのレポーター分子の量を測定する方法において、レポーター分子が酵素または蛍光色素であることを特徴とする抗原濃度測定方法が記載されている。

【0008】

50

【特許文献1】特表2007-505319号公報

【特許文献2】特開平10-78436号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上記の通り、電界効果トランジスタ(FET)はゲート絶縁膜表面の電荷密度変化に敏感である性質を持ち、様々なセンサに應用されている。FETと抗原-抗体反応を組み合わせた免疫FETセンサは、ゲート絶縁表面に抗体を固定化し、抗原-抗体反応に伴う電荷の変化を検出するデバイスであるが、実現が困難であると考えられている。その原因は、抗体の大きさがゲート絶縁膜界面の電気二重層の幅(デバイ長)よりも大きく、抗原抗体反応がデバイ長の外側で起こることにある。また、電荷的に中性な抗原や電荷の小さな低分子を検出することは困難である。本発明は、これらの問題を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、サンドイッチ式免疫測定方法において、抗原・抗体の複合体を、二次抗体などを使用することなく直接、電界効果トランジスタ(FET)を用いて検出することが可能となる測定方法を提供することを解決すべき課題とした。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、抗体を、VH領域とVL領域とに分割して使用し、VH領域を含むペプチドとVL領域を含むペプチドと目的物質とからなる複合体を形成させ、この複合体を電界効果トランジスタセンサにより測定することによって、抗原・抗体の複合体を、二次抗体などを使用することなく直接、電界効果トランジスタを用いて検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

【0011】

即ち、本発明によれば、目的物質の測定方法において、

(a) 目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチド、及び目的物質からなる複合体を形成させる工程：及び

(b) 工程(a)で形成された複合体を電界効果トランジスタセンサにより測定する工程：

を含む上記の測定方法が提供される。

30

【0012】

好ましくは、工程(a)において、目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、又は目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチドの何れか一方を固定化した固相に、目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、又は目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチドの何れか他方、及び目的物質を接触させることによって、目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチド、及び目的物質からなる複合体を形成させる。

【0013】

好ましくは、目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、又は目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチドの何れか一方が、共有結合により固相に固定化されている。

40

【0014】

好ましくは、目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、又は目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチドの何れか一方が、該ポリペプチドを認識するペプチドまたはタンパク質により固相に固定化されている。

【0015】

好ましくは、目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、又は目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチドの何れか一方が、ビオチンと、アビジン又はストレプトアビジンとの結合を介して固相に固定されている。

50

## 【発明の効果】

## 【0016】

本発明による目的物質の測定方法によれば、サンドイッチ式免疫測定方法において、抗原・抗体の複合体を、二次抗体などを使用することなく直接、電界効果トランジスタ(FET)を用いて検出することが可能である。従って、本発明によれば、抗原などの目的物質を簡便かつ迅速に測定することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0017】

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

本発明による目的物質の測定方法は、

(a) 目的物質を特異的に認識する抗体のVH領域を含むポリペプチド、目的物質を特異的に認識する抗体のVL領域を含むポリペプチド、及び目的物質からなる複合体を形成させる工程：及び

(b) 工程(a)で形成された複合体を電界効果トランジスタセンサにより測定する工程：

を含むことを特徴とする。

## 【0018】

本発明で言う目的物質の測定方法とは、目的物質の存在の有無の検出、又は目的物質の量の測定などを含む、全ての測定を意味するものである。

## 【0019】

工程(a)に記載されるように、抗体のVH領域を含むポリペプチド、抗体のVL領域を含むポリペプチド、及び目的物質からなる複合体を形成させるイムノアッセイは、一般に、オープンサンドイッチイムノアッセイとも称される。オープンサンドイッチイムノアッセイは、抗体の可変領域ドメインVH及びVLが抗原依存的に会合するという現象を利用するアッセイ方法である。オープンサンドイッチイムノアッセイでは、一種類の抗体のみで測定可能であることや、特に通常のサンドイッチ法では測定不可能な低分子抗原(ハプテン)の非競合的測定を可能にする点が特徴である。従来から知られている通常のオープンサンドイッチイムノアッセイでは、VHもしくはVLのいずれかに酵素標識し、もう一方を固定化することでELISA法によって、もしくは、VHおよびVLの両者に蛍光分子を標識することでFRET法などによって、抗原を定量することが行われている。それに対して、本発明においては、電界効果トランジスタ(FET)センサを利用することによって、VHもしくはVLのいずれかを固定化し、ゲート絶縁膜表面上に形成したVH、VL、抗原から成る三者複合体の形成を電荷分布の変化として検出することによって、目的物質(即ち、抗原)の測定を行うことができる。従って、本発明の方法においては、VHおよびVLを標識する必要がない。しかも、この三者(VH、VL、抗原)の複合体のサイズは、ほぼゲート表面からデバイ長と一致するために、高感度に検出することができる。固定相上での複合体形成を非標識的に検出する方法としてSPRやQCMなどが挙げられるが、それらと比較してもFETはより高感度化を達成することができ、さらに半導体加工技術によりゲート面積も数ミリ単位で作製可能であるために、集積化や多機能化が実現できる。以下、本発明の特徴である(1)オープンサンドイッチイムノアッセイ、及び(2)電界効果トランジスタセンサについて説明する。

## 【0020】

## (1) オープンサンドイッチイムノアッセイ

蛋白質性の抗原は、サンドイッチ法と呼ばれる2種類の抗体を使う方法で測定されることが一般的である。サンドイッチ法は、抗原に同時に結合できる2種類の抗体を用意する必要があるが、特異性と感度が高いという利点を有している。しかし、分子量1000以下の小分子は小さすぎて、2種類の抗体でサンドイッチすることが困難である。即ち、分子量1000以下の小分子は抗原決定基が一つしかない単価抗原であるため、2種類の抗体でサンドイッチすることが困難となる。そのためこのような小分子は通常、競合法と呼ばれる方法で測定される。しかし競合法は、条件設定が難しく、感度が低い、測定操作にかなりの

10

20

30

40

50

注意深さが必要、といった難点を有している。

【 0 0 2 1 】

このような欠点のない、小分子でも非競合的に測定できる方法として、本発明者らは、オープンサンドイッチイムノアッセイという免疫測定法を報告している。この方法は基本的に、「抗体の可変領域（抗原結合部位）は抗原がないと不安定だが、抗原が結合すると安定化される」という原理を利用した方法である。抗体はH鎖とL鎖の2本の鎖で構成されるが、それぞれの抗原結合部位は V H, V L と呼ばれこれらが抗原を認識できる最小単位である可変領域Fvを構成する。最近ではファージ提示法などを用いて容易に V H と V L をコードする遺伝子断片をクローニングすることができるが、V H と V L の間の結合は非共有的で多くの場合不安定であり、これらをペプチドで結んで一本鎖抗体(scFv)として使

10

【 0 0 2 2 】

本発明者らは、この不安定なFvが、抗原が結合すると安定化する場合があります、それを利用すれば抗原濃度を従来より簡便かつ迅速に、さらに感度よく測定できることを見出した。すなわち、V L断片をプレートに固定化しておき、これにV H断片にファージあるいはアルカリフォスファターゼを結合させたものと抗原（この場合鶏卵白リゾチーム）を含むサンプルとを混ぜて一回洗浄した後にプレートに固定化されたファージあるいは酵素の量を測定すれば、それは抗原量と非常によい相関を示すことを見いだしたのである(UEDA, H. et al. Nature Biotechnol. 14, 1714-1718(1996))。

【 0 0 2 3 】

さらに、本発明者らは、手持ちの抗体がサーブンスンドイッチ法に向いているか向いていないかを簡便に調べるための方法を開発した(Aburatani, T. et al., Anal. Chem. 75, 4057-4064 (2003); 上田 宏. 小分子を非競合的に測定可能な新しい免疫測定法 Bio Medical Quick Review Nets No.027 (2004); 及び上田 宏. "競合法によらない小分子の免疫測定". 生化学, 76(7), 670-674 (2004))。市販のファージ抗体システムに良く似たこの方法(split Fvシステム)を用いれば、手持ちのハイブリドーマの抗体可変領域の抗原結合能とV H/V L相互作用の強弱の両方を、ファージを作る大腸菌を変えることで手軽に調べることができ、またより良い性質の抗体の選択ができる。

20

【 0 0 2 4 】

本発明の方法においては、測定対象となる目的物質（即ち、抗原）を特異的に認識する抗体のV H領域を含むポリペプチドと、上記抗体のV L領域を含むポリペプチドを別々に調製する。各ポリペプチドの長さは、それらが対合した状態で、測定対象の目的物質と結合することのできる長さであれば特に限定されず、抗体のV H領域およびV L領域よりも長くても短くてもよい。

30

【 0 0 2 5 】

抗体のV H領域を含むポリペプチド、及び抗体のV L領域を含むポリペプチドは、例えば、以下の通り調製することができる。

【 0 0 2 6 】

すなわち、目的物質を特異的に認識するモノクローナル抗体を公知の方法（例えば、Kohler, G. and Milstein, C. Nature 256, 495-496, 1975などを参照）によって作製し、この抗体の可変領域をコードする遺伝子を特定し、この遺伝子をクローニングする。そして、この組換え体ベクターからV Hおよび/またはV L領域をコードするDNA配列を取得し、これをクローニングして、宿主細胞内で発現させることにより、必要量のV H領域を含むポリペプチドおよびV L領域を含むポリペプチドを取得することができる。抗体遺伝子からV H又はV Lをコードする塩基配列を得るためには、所望の配列領域を制限酵素で切り出し、これをクローニングベクターで増幅させてもよく、あるいは所望の配列をPCR法で増幅してもよい。V Hおよび/またはV Lを宿主細胞で発現させる場合には、任意のレポーター分子をコードする遺伝子をも発現ベクターにクローニングし、V Hおよび/またはV Lをレポーター分子との融合蛋白またはキメラ蛋白として発現させることができる。

40

50

## 【 0 0 2 7 】

本発明における工程 ( a )、即ち、目的物質を特異的に認識する抗体の V H 領域を含むポリペプチド、目的物質を特異的に認識する抗体の V L 領域を含むポリペプチド、及び目的物質からなる複合体を形成させる工程においては、好ましくは、目的物質を特異的に認識する抗体の V H 領域を含むポリペプチド、又は目的物質を特異的に認識する抗体の V L 領域を含むポリペプチドの何れか一方を固定化した固相に、目的物質を特異的に認識する抗体の V H 領域を含むポリペプチド、又は目的物質を特異的に認識する抗体の V L 領域を含むポリペプチドの何れか他方、及び目的物質を接触させることによって、目的物質を特異的に認識する抗体の V H 領域を含むポリペプチド、目的物質を特異的に認識する抗体の V L 領域を含むポリペプチド、及び目的物質からなる複合体を形成させることができる。

10

## 【 0 0 2 8 】

ポリペプチドの固相への固定化方法は、公知の方法を採用することができる。例えば、ポリペプチドは、共有結合により固相に固定化されていてもよいし、該ポリペプチドを認識するペプチドまたはタンパク質により固相に固定化されていてもよいし、あるいはビオチンと、アビジン又はストレプトアビジンとの結合を介して固相に固定されていてもよい。例えば、固相に固定化すべきポリペプチドをビオチン化しておけば、アビジン又はストレプトアビジンを吸着させた固相 ( 測定用プレート ) に容易に固定することができる。

## 【 0 0 2 9 】

## ( 2 ) 電界効果トランジスタセンサ

電界効果トランジスタ ( Field Effect Transistor, FET ) は、 p 型半導体上に n 型半導体でドレインとソースを形成し、 p 型半導体のチャネル上をケイ素酸化物で絶縁してゲートを形成したもので、金属酸化半導体 ( Metal Oxide Semiconductor, MOS ) 構造を持ったトランジスタの一種である。FETは、ゲートに与える電位によってチャネルに電子空乏層を生じ、ドレインとソースの間に流れる電流を変化させることができる。1970年にBergveidは、MOS - FETのゲート金属を取り去って溶液中に浸すと、ゲート絶縁物 / 溶液界面にイオン濃度に依存した電位が発生することを見い出し ( BERGVEID, P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements, IEEE Trans. Biomed. Eng., 17: 70-71 (1970) )、Ion Sensitive Field Effect Transistorと名付けた。さらにBergveidは、1972年に、このFETがNa<sup>+</sup>とH<sup>+</sup>に感受性があることを報告した ( BERGVELD, P. Development operation, and application of the ion-sensitive field effect transistor as a tool for electrophysiology, IEEE Trans. Biomed. Eng., 19: 342-352 (1972) )。その後、窒化シリコンをゲート表面上に蒸着することにより、水素イオンだけに感受性をもつFETが開発されて、Ion Selective Field Effect Transistor ( ISFET ) と呼ばれ、pHメーター等に応用されるようになった。

20

30

## 【 0 0 3 0 】

ISFETは、種々のバイオセンサのトランスデューサとしても応用可能であり、抗原抗体反応を検出するFETセンサ ( Immuno-FET ) は、1978年にその概念がSchcnckらによって紹介された ( SCHENCK, J.F., 1978. In: Cheung, P.W. (ed.), Theory, Design and Biomedical Application of Solid State Chemical Sensors. CRC press, Boca Raton, FL, pp.165-173 )。Immuno-FETでは、ゲート絶縁膜表面に抗体もしくは抗原を固定化し、抗原抗体複合体が形成されるとゲート絶縁膜表面の電荷が変化し、ソース・ドレイン間の電気伝導性の変化が生じる。通常は、ドレイン電流の変化、もしくはソース・ドレイン間にチャンネルが形成される時のゲート電圧 ( しきい値電圧V<sub>th</sub> ) の変化が計測される。1982年にCollinsとJanataによって免疫センサが報告されている ( COLLINS, S. and J. JANATA, A critical evaluation of the mechanism of potential response of antigen polymer membranes to the corresponding antiserum, Anal. Chem., 136: 93-99 (1982) )。

40

## 【 0 0 3 1 】

ISFETを利用したバイオセンサは、酵素を固定化したEnzyme-FETが盛んに研究されている。Enzyme-FETでは、酵素反応によって生じた生成物によって電気二重層内のpHやイオン濃度が変化する現象を利用している。CarasとJanataは、1980年にISFETゲート表面上に

50

ペニシリナーゼを固定化し、ペニシリンの濃度を測定することに成功した(CARAS, S. and J. JANATA, Field effect transistor sensitive to penicillin, Anal. Chem., 52: 1935-1937 (1980))。さらに、1983年に鈴木らは、ウレアーゼを固定化した尿素センサ(宮原裕二他：半導体技術と酵素固定化技術を組み合わせた小型尿素センサ。日本化学会誌, 1983: 823 - 830 (1983) ; 及びANZAI, J., et al Urea sensor based on ion sensitive field effect transistor coated with cross-linked urease-albumin membrane, Bunseki Kagaku, 33: E131-E136 (1983))、Nakakoらがりパーゼを用いた中性脂肪センサ(NAKAKO, M., et al, Neutral lipid enzyme electrode based on ion sensitive field effect transistors, Anal. Chim. Acta., 185: 179-185 (1986))、軽部らがATPaseを用いたATPセンサ(GOTOH, M., et al. A microsensor for adenosine-5'-triphosphate pH-sensitive field effect transistors, Anal. Chim. Acta., 187: 287-291 (1986))、1987年に富田らがグルコキナーゼを用いたグルコースセンサ(川辺 健 他：好熱蘭の耐熱性酵素グルコキナーゼを用いるISFET型グルコースセンサ。日本化学会誌, 1987: 1719 - 1724 (1987))やグルタミンシンターゼを用いたL-グルタミン酸センサ(飯田武揚 他：好熱繻の耐熱性酵素グルタミンシンターゼを用いるISFET型L-グルタミン酸センサ, 日本化学会誌, 1987: 1817 - 1821 (1987))、軽部らがアセチルコリンレセプタを用いたアセチルコリンセンサ(GOTOH, M., E, et al., Acetylcholine sensor based on ion sensitive field effect transistor and acetylcholine receptor, Anal. Lett., 20: 857-870 (1987))、微生物を用いたアルコールセンサ(KITAGAWA, Y, et al., Microbial-FET alcohol sensor, Anal. Lett., 20: 81-96 (1987))をそれぞれ報告している。また、最近では一本鎖DNAをゲート絶縁膜表面に固定化し、相補的な非標識DNAを高感度に検出するDNAセンサが報告されている(SAKATA, T., M. KAMAHORI and Y. MIYAHARA, DNA Analysis Chip Based on Field Effect Transistors, Japanese J. Appl. Phys., 44 No. 4B, 2854-2859, (2005) ; SAKATA, T., and Y. MIYAHARA, Potentiometric detection of single nucleotide polymorphism using genetic field effect transistor, ChemBioChem, 6: 703-710, (2005) ; SAKATA, T., M. KAMAHORI and Y. MIYAHARA, Immobilization of oligonucleotide probes on Si3N4 surface and its application to genetic field effect transistor, Mat. Sci. Eng. C, 24: 827-832, (2004) ; 特開2006-275670号公報 ; 特開2005-337771号公報 ; 特開2005-218310号公報 ; 及び特開2005-77210号公報など)

【0032】

本発明では、上記したような電界効果トランジスタセンサを用いることができる。

【0033】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0034】

実施例1：抗Bisphenol A抗体のVHの調製

抗Bisphenol A抗体のVHは以下のように調製した。まず、VHはマルトース結合蛋白質(以下、MBP)との融合蛋白質として発現させるために、そのcDNAをpMAL-P2G(New England Biolab社)のマルチクローニングサイト(EcoRI-HindIIIサイト間)に挿入した。その後、VH cDNAをその分泌シグナルを含むMBP遺伝子とともにPCR法で増幅した後、pET32ベクター(ノバジェン社)のNdeI-NotIサイト間に挿入した(pET-MBP-VH)。この融合蛋白質は、VHがMBPのC末端にAsn-Ser-Ser-Ser-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Asn-Leu-Gly-Pro-Gly-Ala-Ala-His-Tyr-Valのアミノ酸配列を持つリンカーを介して融合されており、さらにVHのC末端にはHis-tagが付与されている。次に、pET-MBP-VHは、大腸菌BL21(DE3)pLysSケミカルコンピテントセル(ノバジェン社)にノバジェン社のプロトコールに従って導入された。形質変換された大腸菌は、4ml LB培地(100µg/mlアンピシリンおよび30µg/mlクロラムフェニコール入り)中で一晩30℃にて培養後、800ml LB培地(100µg/mlアンピシリンおよび30µg/mlクロラムフェニコール入り)に植菌し、30℃にて培養した

。600 nmにおける吸光度が0.6 - 0.7に達した時点で、Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosideを最終濃度0.4 mMになるように添加し、さらに25℃にて約10時間培養した。その後、培養上清及びペリプラズム画分から、それぞれ硫酸沈殿及びスクロース浸透圧ショックによって回収されたMBP-VH融合蛋白質を、クロンテック社のコバルトキレートカラム、TALONを用いて精製を行った。蛋白質溶液は、50 mM Tris-HCl緩衝液 (200 mM NaCl, 10% sucrose, pH8) へと溶媒を置換した後、容積800 μl、濃度約300 μg/mlと調節した。そこに5 μg genenase I (New England Biolabs) を加えて、20 2時間反応させることで、MBP-VH間のリンカー部分を切断した。反応後VHは、TALONを用いて精製を行い、さらに10% sucroseを含むPBSへと溶媒置換し、小分けして測定まで-80℃にて保存した。

【0035】

実施例2：抗Bisphenol A抗体のVHの調製

抗Bisphenol A抗体のVHとMBPの融合蛋白質の調製は、pET-MBP-VHのVH遺伝子部分をVL遺伝子と置き換えた発現ベクターであるpET-MBP-VLを用いてMBP-VH融合蛋白質と同様に行い、10% sucroseを含むPBSへと溶媒置換し、小分けして測定まで-80℃にて保存した。

【0036】

実施例3：n-チャネルデプレッション型FETの作製

本実施例に用いたn-チャネルデプレッション型FETの作製過程を以下に示す。まず、6 - 12 cmの抵抗率を有するN型シリコンにBF<sub>2</sub>+を注入エネルギー60 keV、ドーズ量2 x 10<sup>12</sup> atom cm<sup>-2</sup>の条件でイオン注入することで、P型ウェルを形成し、さらに加湿条件下において850℃に加熱することによりゲート酸化膜を成長させた。次に、ソース及びドレイン領域をP+を注入エネルギー40 keV、ドーズ量5 x 10<sup>15</sup> atom cm<sup>-2</sup>の条件下でイオン注入によって形成した。その後、厚さ140 nmのSi<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を790℃で減圧化学蒸着法によって蒸着した。さらに、ソース及びドレイン接点をAl-Cu-Siスパッタリングによって作製した。このウエハは、水素雰囲気下で450℃、30分間アニールさせた後、5 mm x 5 mmのチップを切り出し、フレキシブルプリント回路基盤上に設置し、側面を防水加工するためにエポキシ樹脂 (ZC-203, ペルノックス株式会社) でコーティングした。

【0037】

本実施例で用いたFETは、nチャネルデプレッション型、そのゲート絶縁膜はSi<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>であるものを用い(図1)、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>層とSiO<sub>2</sub>層の厚さは、それぞれ140、35 nmであった。FETチップは、ゲート領域を除いて、エポキシ樹脂 (ZC-203, Nippon PeInox) で被膜した。FETの電気特性測定には、半導体パラメーターアナライザー (Agilent, 4155C) を用い、V<sub>G</sub> (ゲート電流) - I<sub>D</sub> (ドレイン/ソース間電流) 伝達特性を評価した。電気的特性の評価には、Ag/AgCl参照電極と塩橋を用いてゲート電圧を印加した。

【0038】

実施例4：FETのゲート絶縁膜表面 (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) へのVH断片の固定化

FETのゲート絶縁膜表面 (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) へのVH断片の固定化は以下のように行った。まず、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>絶縁膜表面を洗浄するために、プラズマ表面処理を行った。その後、2質量% 3-amino-propyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich) を含む純水溶液に室温下で4時間浸漬し、さらに純水でリンスした後、110℃で1時間乾燥させ、ゲート表面にアミノ基を導入した。そこに、150 μg/ml VHと10 mg/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (WSC) を含むPBSバッファを加え、ゲート表面のアミノ基とVH表面のアスパラギン酸とグルタミン酸に由来するカルボキシル基との間でカップリング反応を室温で一晩行った。反応後、脱イオン水で洗浄した後にBovine Serum Albumin (BSA) 溶液を加えてブロッキングを行った。また、参照実験用として、VHの代わりにBSAを固定化したゲートを同様に作製した。

【0039】

実施例5：オープンサンドイッチFETによる測定

オープンサンドイッチ反応では、あらかじめMBP-VL溶液 (約150 μg/ml) に抗原であるBisphenol Aを最終濃度が0.1もしくは1 mMとなるように加えた後に、VHもしくはBSAを固定化したゲート表面に添加した。約1時間反応させた後に、25 mMリン酸バッファで

10

20

30

40

50

洗浄し、FETの $V_G$ - $I_D$ 伝導特性を計測した。その結果、図2に示すような $V_G$ - $I_D$ 特性が得られ、 $I_D$ 一定(700  $\mu$ A)条件下では、抗原100  $\mu$ M存在下でのオープンサンドイッチ反応前後で、しきい値電圧 $V_T$ が正方向に約+7.7 mVシフトしていることがわかる。正方向へのシフトからゲート絶縁膜表面には負電荷が誘起されていることがわかる。これは、MBPがマイナス電荷に帯電していることと一致する。また、より抗原濃度が高い時には、しきい値電圧変化はより大きく(約+40 mV)、MBP-V Lの代わりにBSAを固定化した場合には、ほとんど有意なしきい値電圧変化が観測されなかった(図3)。これらの結果から、抗原濃度としきい値電圧変化に良好な相関関係が示され、オープンサンドイッチ・イムノアッセイのFETによる検出の妥当性が明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】図1は、本実施例で用いた電界効果トランジスタ(FET)の構造を示す。

【図2】図2は、電界効果トランジスタ(FET)を用いてオープンサンドイッチFETを行った場合の $V_G$ - $I_D$ 伝導特性を計測した結果を示す。

【図3】図3は、各抗原濃度におけるしきい値電圧変化を示す。

10

【図1】

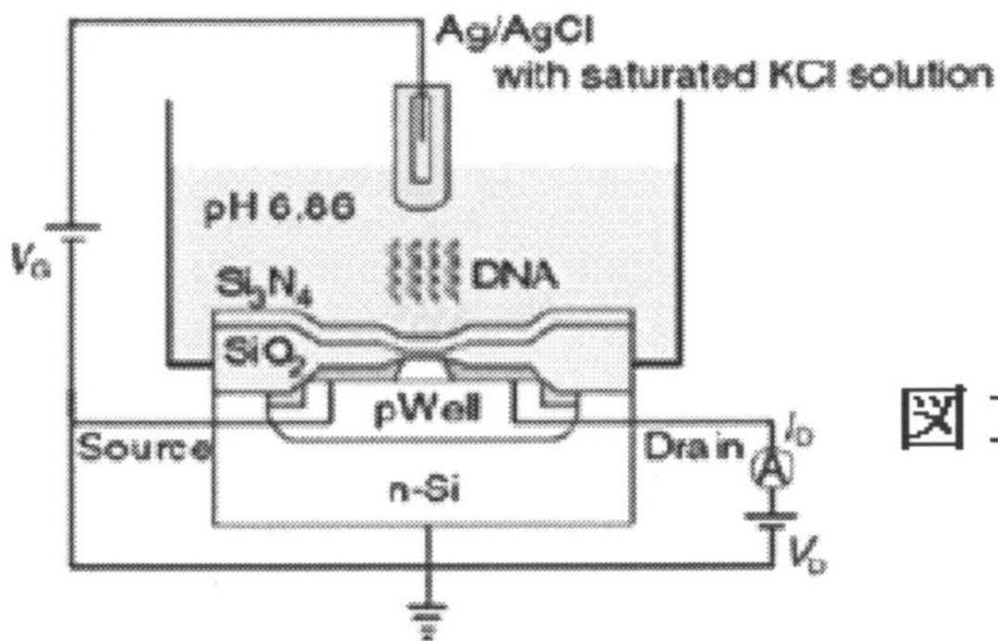
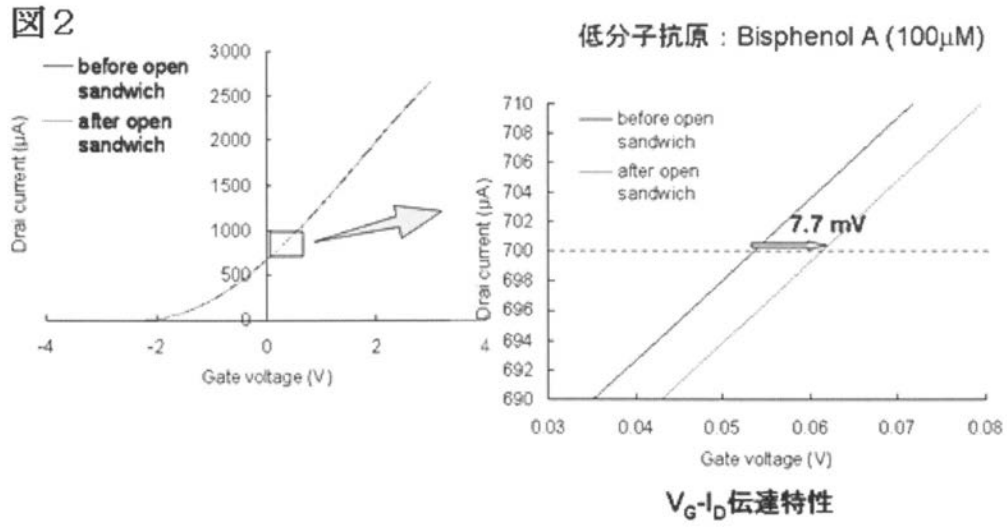


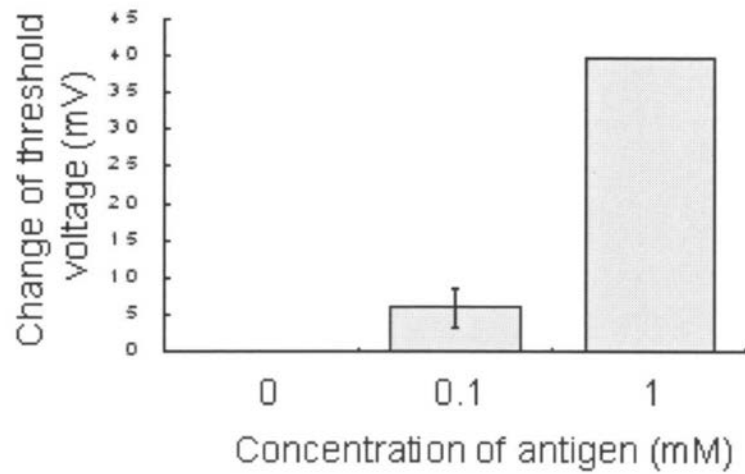
図 1

【 図 2 】



【 図 3 】

図 3



【 配列表 】

0004956715000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/53 U

(72)発明者 松元 亮  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 上田 宏  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 伊原 正喜  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 土岐 和雅

(56)参考文献 特開平01-119753(JP,A)  
国際公開第2006/033413(WO,A1)  
特開平10-078436(JP,A)  
特表2007-505319(JP,A)  
特表2007-506085(JP,A)  
特開2006-275788(JP,A)  
ABERL F, MODROW S, WOLF H, KOCH S, WOIAS P, An ISFET-based FIA system for immunosensing, Sens Actuators B, スイス, 1992年 1月, Vol.6 No.1/3, 186-191  
TSURUTA H, YAMADA H, MOTOYASHIKI Y, OKA K, OKADA C, NAKAMURA M, An automated ELISA system using a pipette tip as a solid phase and a pH-sensitive field effect transistor as a detector., J Immunol Methods, NL, 1995年 6月28日, Vol.183 No.2, 221-229

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 2 7 / 2 6 ~ 2 7 / 4 9、3 3 / 4 8 ~ 3 3 / 9 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )

专利名称(译)	测量目标物质的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4956715B2</a>	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	JP2007312057	申请日	2007-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社 国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社 东京大学		
当前申请(专利权)人(译)	东京大学		
[标]发明人	川上雅之 坂田利弥 宫原裕二 松元亮 上田宏 伊原正喜		
发明人	川上 雅之 坂田 利弥 宫原 裕二 松元 亮 上田 宏 伊原 正喜		
IPC分类号	G01N27/414 G01N33/543 G01N27/416 G01N33/53		
FI分类号	G01N27/30.301.N G01N33/543.593 G01N33/543.525.U G01N27/30.301.V G01N27/46.386.G G01N33/53.U G01N27/414.301.N G01N27/414.301.V G01N27/416.386.G		
其他公开文献	JP2009133800A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够通过使用场效应晶体管（FET）而不使用二抗等直接检测抗原或抗体的复合物的测量方法，涉及夹心型免疫测定方法。解决方案：该靶材料的测量方法包括以下过程：（a）形成包含多肽的复合物，所述多肽包括用于特异性识别靶材料的抗体的VH结构域，包含用于特异性识别靶标的抗体的VL结构域的多肽材料和目标材料；（b）通过场效应晶体管传感器测量工艺（a）中形成的复合物。Ž

