

(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2007-101339

(P2007-101339A)

(43) 公開日 平成19年4月19日(2007.4.19)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 1 1 B | 2 GO 5 4 |
| GO 1 N 33/544 (2006.01) | GO 1 N 33/544 A | |
| GO 1 N 21/78 (2006.01) | GO 1 N 21/78 C | |
| GO 1 N 27/416 (2006.01) | GO 1 N 27/46 U | |

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁)

| | | | |
|-----------|------------------------------|----------|---------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2005-290995 (P2005-290995) | (71) 出願人 | 500230129 江頭 直義 広島県三次市南畑敷町103-8 |
| (22) 出願日 | 平成17年10月4日(2005.10.4) | (74) 代理人 | 100081422 弁理士 田中 光雄 |
| | | (74) 代理人 | 100116311 弁理士 元山 忠行 |
| | | (74) 代理人 | 100122301 弁理士 富田 憲史 |
| | | (72) 発明者 | 江頭 直義 広島県三次市南畑敷町103-8 |
| | | (72) 発明者 | 宇田 泰三 広島県三次市十日市東3丁目16-13-902 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電解発光物質を内包するリポソームによるイムノアッセイ方法

(57) 【要約】

【課題】 タンパク質の簡便で高感度のイムノアッセイ方法の提供。

【解決手段】 被検タンパク質と、該タンパク質を表面に結合させた、ルテニウム(II)錯体を内包したリポソームとを、電極基盤上に固定した該タンパク質と抗原抗体反応する物質と競合反応させ、ついで、電極基盤に結合したリポソームを破壊してルテニウム(II)錯体を漏出させ、電極に吸着させ、電解液を添加して、ルテニウム(II)錯体の電解発光を測定し、その発光強度に基づいて被検タンパク質を定量することを特徴とするイムノアッセイ方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検タンパク質と、該タンパク質を表面に結合させた、ルテニウム (I I) 錯体を内包したリポソームとを、電極基盤上に固定した該タンパク質と抗原抗体反応する物質と競合反応させ、ついで、電極基盤に結合したリポソームを破壊してルテニウム (I I) 錯体を漏出させ、電極に吸着させ、電解液を添加して、ルテニウム (I I) 錯体の電解発光を測定し、その発光強度に基づいて被検タンパク質を定量することを特徴とするイムノアッセイ方法。

【請求項 2】

ルテニウム (I I) 錯体が、トリス (2 , 2 ' - ビピリジン) ルテニウム (I I) 錯体である請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 3】

ルテニウム (I I) 錯体が、側鎖を有するビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - { 4 , 4 ' - ビス [フタルイミノブチル] - 2 , 2 ' - ビピリジン } ルテニウム (I I) 錯体、ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - [4 , 4 ' - ビス (4 - アミノブチル) - 2 , 2 ' - ビピリジン] ルテニウム (I I) 錯体、ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - (4 - アミノブチル - 4 ' - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン) ルテニウム (I I) 錯体またはビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - [4 , 4 ' - ビス (4 - メルカプトブチル) - 2 , 2 ' - ビピリジン] ルテニウム (I I) 錯体である請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

リポソームの破壊を、炭素数 1 ~ 4 のアルコールの添加により行う請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 5】

アルコールが、エタノールまたはプロパノールである請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

電解発光強度の測定を、金作用電極を用いたチップリーダーで行う請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

トリス (2 , 2 ' - ビピリジン) ルテニウム (I I) 錯体、ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - { 4 , 4 ' - ビス [フタルイミノアミノブチル] - 2 , 2 ' - ビピリジン } ルテニウム (I I) 錯体、ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - [4 , 4 ' - ビス (4 - アミノブチル) - 2 , 2 ' - ビピリジン] ルテニウム (I I) 錯体、ビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - (4 - アミノブチル - 4 ' - メチル - 2 , 2 ' - ビピリジン) ルテニウム (I I) 錯体またはビス (2 , 2 ' - ビピリジン) - [4 , 4 ' - ビス (4 - メルカプトブチル) - 2 , 2 ' - ビピリジン] ルテニウム (I I) 錯体を内包するイムノアッセイ用リポソーム試薬。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微量なタンパク質の高感度な分析を可能とする電解発光物質を内包するリポソームによるイムノアッセイ方法に関する。 40

【背景技術】

【0002】

タンパク質の分析は迅速高感度分析方法が望まれている。現在、様々な分析方法があるが、抗体または抗原を酵素で標識化したものを用いる E L I S A 法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) が広く使用されている。一般に、E L I S A 法の感度は概ねタンパク質 0 . 0 0 1 ~ 0 . 1 μ g といわれており、分析ステップとしては被検物質のタンパク質との抗原抗体反応、二次抗体との抗原抗体反応、酵素反応による発色反応の 3 ステップから構成されており (例えば、特許文献 1 および 2 参照)、リポソームによる感度増幅が知られている (非特許文献 1 参照)。

しかし、2つの抗原抗体反応と1つの酵素反応が必要であるため比較的分析時間が長く、ELISA法より更に短時間で簡便な分析方法が望まれている。

また、最終ステップとして、発色反応の他に蛍光および化学発光があるが、最近では温和な条件での発光が可能である電解発光法が利用されている。電解発光する化学物質としてトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム錯体を基本構造とするものが最も多く用いられ、タンパク質のアミノ基と結合できる反応活性な側鎖を有するルテニウム錯体も報告されている(非特許文献1参照)。

しかし、従来のルテニウム錯体を利用した電解発光によるタンパク質の定量はやはり反応時間が長く、感度も十分ではないという問題がある。そのため高価で特殊な検出器が必要となる。

10

【特許文献1】特開昭63-502958号公報

【特許文献2】特表2000-5-9494号公報

【非特許文献1】Danke Xu, Quan Cheng, J. Am. Chem. Soc., 124, 14314-14315 (2002)

【非特許文献2】Gary F. Blackburn, Haresh P. Shah, John H. Kenten, Jonathan Leland, Ralph A. Kamin, John Link, Jeff Peterman, Michael J. Powell, Arti Shah, David B. Talley, Surendera K. Tyagi, Elizabeth Wilkins, Tai-Guang Wu, and Richard J. Massey, Clin. Chem. 37(9), 1534-1539 (1991)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

20

本発明は、ELISA法における分析ステップを簡略化し、タンパク質の簡便で高感度のイムノアッセイ方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意研究を重ね、リポソームによる感度増幅に着目し、ルテニウム錯体を内包したリポソームを用い、かつルテニウム錯体として金電極への吸着が強い錯体を合成し、これを使用することによりさらに電解発光の感度増幅できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

30

(1)被検タンパク質と、該タンパク質を表面に結合させた、ルテニウム(II)錯体を内包したリポソームとを、電極基盤上に固定した該タンパク質と抗原抗体反応する物質と競合反応させ、ついで、電極基盤に結合したリポソームを破壊してルテニウム(II)錯体を漏出させ、電極に吸着させ、電解液を添加して、ルテニウム(II)錯体の電解発光を測定し、その発光強度に基づいて被検タンパク質を定量することを特徴とするイムノアッセイ方法、

(2)ルテニウム(II)錯体が、トリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体である上記(1)記載の方法、

(3)ルテニウム(II)錯体が、側鎖を有するビス(2,2'-ビピリジン)-{4,4'-ビス[フタルイミノブチル]-2,2'-ビピリジン}ルテニウム(II)錯体、ビス(2,2'-ビピリジン)-[4,4'-ビス(4-アミノブチル)-2,2'-ビピリジン]ルテニウム(II)錯体、ビス(2,2'-ビピリジン)-(4-アミノブチル-4'-メチル-2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体またはビス(2,2'-ビピリジン)-[4,4'-ビス(4-メルカプトブチル)-2,2'-ビピリジン]ルテニウム(II)錯体である上記(1)記載の方法、

40

(4)リポソームの破壊を、炭素数1~4のアルコールの添加により行う上記(1)記載の方法、

(5)アルコールが、エタノールまたはプロパノールである上記(4)記載の方法、

(6)電解発光強度の測定を、金作用電極を用いたチップリーダーで行う上記(1)記載の方法、および

50

(7) トリス(2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体、ビス(2, 2'-ビピリジン) - {4, 4'-ビス[フタルイミノブチル] - 2, 2'-ビピリジン}ルテニウム(II)錯体、ビス(2, 2'-ビピリジン) - [4, 4'-ビス(4-アミノブチル) - 2, 2'-ビピリジン]ルテニウム(II)錯体、ビス(2, 2'-ビピリジン) - (4-アミノブチル - 4'-メチル - 2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体またはビス(2, 2'-ビピリジン) - [4, 4'-ビス(4-メルカプトブチル) - 2, 2'-ビピリジン]ルテニウム(II)錯体を内包するイムノアッセイ用リポソーム試薬を提供するものである。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、リポソームと金電極に強い吸着を示すルテニウム錯体を組み合わせることにより、ELISA法における抗原抗体反応ステップを簡略化でき、タンパク質の簡便で高感度の、生化学、医学、薬学等の分野で有用な、また、環境汚染物質の分析にも有用なイムノアッセイ方法(被検タンパク質にもよるが、一般に、所要時間は6~24時間、感度はタンパク質0.1~10ng)が提供できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明のイムノアッセイ方法は、検体液またはそれから調製した被検タンパク質含有液と、被検タンパク質を表面に結合させた、ルテニウム(II)錯体を内包したリポソーム含有液を、電極基盤上で、電極基盤に固定した該タンパク質と抗原抗体反応する物質と競合反応させることにより実施できる。競合反応により、リポソームは、被検タンパク質濃度に依存して電極表面に結合される。ついで、電極上に結合したリポソームを破壊すると、リポソームに内包されたルテニウム(II)錯体が漏れ出し、電極に吸着する。好ましくは、吸着の促進のため、電極を加熱する。その後、電極表面に残るリポソームの残骸を緩衝液で洗浄して除去し、吸着されたルテニウム(II)錯体に電解液を加え、電圧を印加して電解発光させて発光強度を測定し、予め被検タンパク質の標準品を用いて同様な操作により作成した検量線により検体中のタンパク質を定量する。

【0008】

検体および被検タンパク質は特に限定するものではなく、検体は、特殊な前処理を必要とせず、要すれば、適宜濃縮または蒸留水、各種緩衝液[例、リン酸緩衝食塩水(PBS)緩衝液、トリス-塩酸緩衝液等]で分散、溶解、希釈して使用する。被検タンパク質は抗原たるタンパク質でも、抗体たるタンパク質(モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を含む)でもよい。

【0009】

本発明ではルテニウム(II)錯体として、トリス(2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体を基本骨格とする、金電極への吸着能が高いチオール基、ジスルフィド基およびアミノ基を有する側鎖を持つ錯体を使用する。アミノ基側鎖を1~6個有し、側鎖の炭素数が1~6の錯体、特に水溶性が高く取り扱いが容易なアミノ基を2個有する錯体が好ましい。これらのルテニウム(II)錯体は、公知であるか、例えば、後の参考例に示す方法により製造することができる。

本発明において使用するルテニウム(II)錯体の具体例としては、トリス(2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体、ビス(2, 2'-ビピリジン) - {4, 4'-ビス[フタルイミノブチル] - 2, 2'-ビピリジン}ルテニウム(II)錯体、ビス(2, 2'-ビピリジン) - [4, 4'-ビス(4-アミノブチル) - 2, 2'-ビピリジン]ルテニウム(II)錯体、ビス(2, 2'-ビピリジン) - (4-アミノブチル - 4'-メチル - 2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体またはビス(2, 2'-ビピリジン) - [4, 4'-ビス(4-メルカプトブチル) - 2, 2'-ビピリジン]ルテニウム(II)錯体が挙げられる。

【0010】

本発明で使用するリポソームは、多重層膜リポソーム、一枚膜リポソームいずれでもよ

10

20

30

40

50

く、好ましくは一枚膜リポソームである。リポソームは、所望により修飾された不活性または負に帯電したリン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール等を使用し、ルテニウム(II)錯体含有液の存在下、常法により調製することができ、各種架橋剤を使用し、ハプテン化、さらにはリガンドを会合させ、被検タンパク質を表面に結合させて調製する。ハプテン化、リガンドの会合は、被検タンパク質に応じて自体公知の方法により行うことができる。

【0011】

本発明の方法は、通常、金作用電極(図1参照)を用いたチップリーダーで電解発光(ECL)強度を測定することが好ましく、この電極基盤上に、被検タンパク質と抗原抗体反応する物質、例えば、被検タンパク質が抗原であれば、それに対する抗体、被検タンパク質が抗体であれば、それに対する抗原を固定する。この固定も、固定すべき物質に応じて自体公知の方法により行うことができる。

10

【0012】

本発明における電極基盤上での被検タンパク質と、被検タンパク質を表面に結合させた、ルテニウム(II)錯体を内包したリポソームとの電極基盤に固定した抗原または抗体に対する競合反応は、被検タンパク質の種類にもよるが、通常、4 ~ 室温において、5 ~ 120分間行うことにより完了する。

【0013】

ついで、上記のような緩衝液で電極を洗浄後、電極基盤に結合したリポソームを破壊してルテニウム(II)錯体を漏出させ、電極に吸着させる。リポソームの破壊は、炭素数1 ~ 4のアルコール、好ましくはエタノールまたはプロパノール、特にプロパノールを添加することにより行う。好ましくは、電極を30 ~ 60 に加熱し、5 ~ 60分間静置し、ルテニウム(II)錯体の電極への吸着を促進する。吸着後、同様な緩衝液で洗浄し、リポソームの残骸を除去する。

20

【0014】

洗浄後、トリエチルアミンを含有する上記の緩衝液のような電解液を添加して、電極に電圧を印加し、吸着したルテニウム(II)錯体を電解発光させ、その発光強度を測定し、それに基づいて、別途作成した検量線を用いて被検タンパク質を定量する。

以下に参考例および実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。以下の実施例は、ウシ血清アルブミン(BSA)抗体を被検タンパク質とした例であるが、他のタンパク質についても同様に測定することができる。

30

参考例、実施例中で使用する略号は以下の意味を有する。

BSA : ウシ血清アルブミン

PBS : リン酸緩衝食塩水

DPPE : ホスファチジルエタノールアミンジパルミトイル

DPPC : ホスファチジルコリンジパルミトイル

SPDP : N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート

DTP - DPPE : N - 3 - (2 - ジチオピリジル) プロピオニル ジパルミトイル
ホスファチジルエタノールアミン

DTT : ジチオソレイトール

40

WSC : 水溶性カルボジイミド

NHS : N - ヒドロキシスクシンイミド

DMF : ジメチルホルムアミド

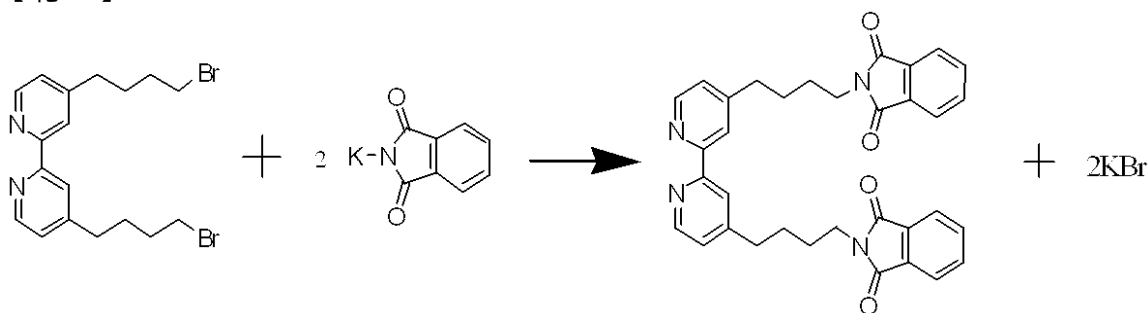
TLC : 薄層クロマトグラフィー

【参考例1】

【0015】

4, 4' - ビス〔 (フタルイミノブチル) - 2, 2' - ピピリジンの合成

【化 1】



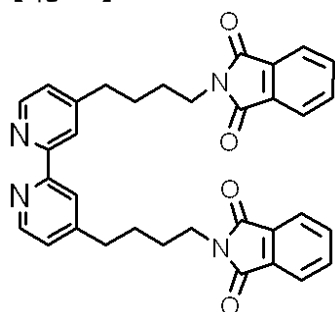
10

反応装置内を窒素置換し、加熱乾燥した後に 4, 4' - ビス (4 - ブロモブチル) - 2, 2' - ビピリジン 1.94 g (4.54×10^{-3} mol)、フタルイミドカリウム 1.85 g (1.00×10^{-2} mol) を入れ、上記反応式に従って反応させた。窒素置換したシリンジを用いて DMF (脱水) を 20 mL 測り取り、注入した (黄色溶液)。160 ~ 170 で加熱還流し、TLC で反応を追跡した。

5 時間後に反応を終了した (濃茶色溶液)。反応溶液をクロロホルムと飽和食塩水から抽出した後、クロロホルム層に 0.2 M の水酸化ナトリウム水溶液 50 mL を加えて抽出する操作を 2 回行った。蒸留水で 3 ~ 4 回洗浄した後、硫酸ナトリウムを加えて攪拌し、自然ろ過をした。エボレーターでクロロホルムを留去し、得られた黄土色物質をクロロホルムとジエチルエーテルを用いて再結晶した後、真空乾燥 (60、3 時間) し、黄土色針状結晶の式：

20

【化 2】



30

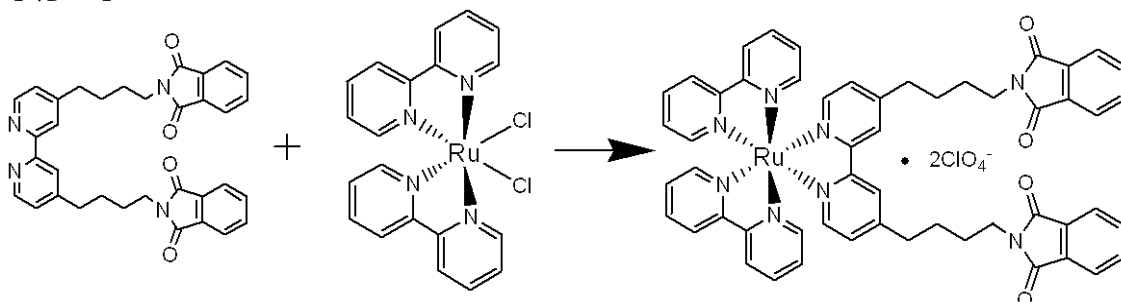
で表される標記化合物を得た。収量：1.85 g、収率：72.55%、融点：212.6 ~ 215.7

【参考例 2】

【0016】

ビス (2, 2' - ビピリジン) - { 4, 4' - ビス [フタルイミノブチル - 2, 2' - ビピリジン] ルテニウム (II) 錯体の合成

【化 3】



40

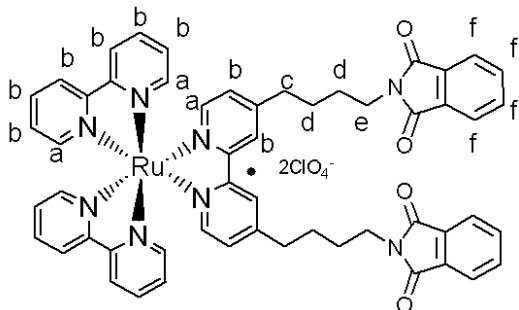
反応装置を加熱乾燥、窒素置換させた後に、参考例 1 で得られた 4, 4' - ビス [フタルイミノブチル] - 2, 2' - ビピリジン 503.40 mg (8.99×10^{-4} mol) を入れた。窒素置換したシリンジを用いてエタノール 80 mL を注入した。120 ~ 130 で加熱還流して 4, 4' - ビス [(フタルイミノブチル) - 2, 2' - ビピリジン

50

を溶解させた後、室温まで冷却してビス(2, 2'-ピピリジン)ルテニウム錯体 480.90 mg (9.93×10^{-4} mol) を加えて 120 ~ 130 で加熱還流し(黒色溶液)、上記式に従って反応させた。

TLCで反応を追跡し、5時間後に反応を終了した(深赤色溶液)。エタノールをエバポレーターで留去し、蒸留水を 150 mL 加えて自然ろ過した(深赤色溶液)。ろ液に 1.0 M 過塩素酸溶液を加え、攪拌した。得られた橙色沈殿物を吸引ろ過により採取した後、メタノールとテトラヒドロフランを用いて再結晶し、真空乾燥(45、5時間)し、赤色針状結晶の式:

【化4】



10

で表される標記化合物を得た。収量: 887.90 mg、収率: 84.56% 表1に標記化合物の¹H-NMRの帰属を示す。

20

【表1】

| δ (ppm) | 多重度 | 帰属 | 実測値 | 理論値 | 合計実測値 | 合計理論値 |
|----------------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|
| 1.71 | m | d | 4.12 | 4 | | |
| 2.86 | t | c | 1.76 | 2 | | |
| 3.70 | t | e | 1.98 | 2 | | |
| | | | | | 24.54 | 23 |
| 7.00~8.20 | m | b, f | 13.68 | 12 | | |
| 8.45 | w | a | 3.00 | 3 | | |
| s=1重線 | d=2重線 | t=3重線 | m=多重線 | | | |

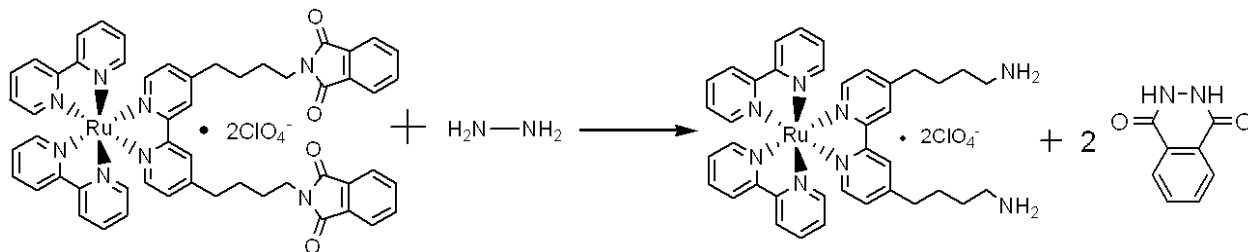
30

【参考例3】

【0017】

ビス(2, 2'-ピピリジン) - [4, 4'-ビス(4-アミノブチル) - 2, 2'-ピピリジン]ルテニウム(II)錯体の合成

【化5】



40

反応装置に、参考例2で得られたビス(2, 2'-ピピリジン) - {4, 4'-ビス(4-アミノブチル) - 2, 2'-ピピリジン}ルテニウム(II)錯体 703.70 mg (6.00×10^{-4} mol)、ヒドラジン水和物 120 mL (2.40×10^{-3} mol) を入れた。シリンジを用いてメタノール 30 mL を注入した。100 ~ 110 で加熱還流し、上記式に従って反応させ、TLCで反応を追跡した。

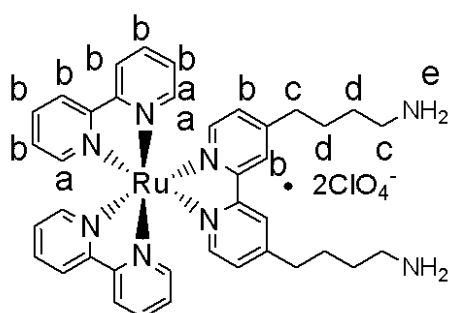
6時間加熱還流した後、室温まで冷却した。蒸留水 15 mL を加え、メタノールをエバポレーターで留去した。反応液(赤褐色溶液)に濃塩酸 1.1 mL (3.58×10^{-2} mol) を加えた。3時間加熱還流した後、室温まで冷却し、水中で一晩冷却した。析出

50

した白色沈殿物を自然ろ過により除去し、ろ液（赤褐色溶液）の塩酸を炭酸水素ナトリウムで気泡が出なくなるまで中和した後、2 Mの水酸化ナトリウム溶液でpH 11に調整し、水中で一晩冷却した。析出した褐色物質を自然ろ過により除去し、ろ液（赤褐色溶液）の水をエバポレーターで留去した。アセトニトリルを加え、析出した褐色物質を吸引ろ過して除去し、エバポレーターでアセトニトリルを留去した。得られた粗生成物を少量のアセトニトリルに溶解し、シリカゲルを充填したカラム（ $1.5 \times 10 \text{ cm}$ ）2本を用いて、アセトニトリル：蒸留水：飽和硝酸カリウム水溶液 = 45 : 4 : 1で展開した。採取したフラクション（各10 mL）をTLC（アセトニトリル：蒸留水：飽和硝酸カリウム水溶液 = 10 : 4 : 1）で分析し、生成物が確認されたフラクションを濃縮した。これをアセトニトリルに溶解し、吸引ろ過により硝酸カリウム、シリカゲルを除去した。エバポレーターを用いてアセトニトリルを留去し、残渣をアセトンに溶解し、吸引ろ過により除去しきれなかったシリカゲルを除いた。エバポレーターを用いてアセトンを留去し、真空乾燥（50、15時間）を行い、式：

10

【化6】



20

で表される標記化合物を得た。収量：280.20 mg、収率：49.48%

表2にビス(2,2'-ピピリジン)-[4,4'-ビス(4-アミノブチル)-2,2'-ピピリジン]ルテニウム錯体の¹H-NMRの帰属を示す。

【表2】

| δ (ppm) | 多重度 | 帰属 | 実測値 | 理論値 | 合計実測値 | 合計理論値 |
|----------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1.72 | m | d | 3.81 | 4 | 25.34 | 21 |
| 2.86 | m | c | 3.58 | 4 | | |
| 3.43 | s | e | 3.15 | 2 | | |
| 7.20~8.20 | m | b | 11.80 | 8 | | |
| 8.75 | w | a | 3.00 | 3 | | |
| s=1重線 | | d=2重線 | t=3重線 | m=多重線 | | |

30

【実施例1】

【0018】

リポソームの調製

(1) ホスファチジルエタノールアミンジパルミトイルの活性化(DTP-DPPE調製)

40

10 μmol のDPPE(6.92 mg / 700 μL (CHCl_3 : CH_3OH = 9 : 1))と12 μmol のSPDP(3.75 mg / 300 μL (CH_3OH))さらに30 μmol のトリエチルアミン(2.8 μL / 200 μL (CHCl_3))を加え、室温で2時間攪拌しながら反応させた。ついで、PBS(0.1 M、pH 7.4)を2 mL加え、攪拌後、振とうすると2層に分かれるので、その水層を除去した。この操作を3回繰り返した後、得られた下層(クロロホルム層)を N_2 気流下でエバポレートし溶媒を留去した。得られた活性型のDTP-DPPEを濃度が4 mMになるようにクロロホルム：メタノール = 9 : 1溶液で溶解した。

(2) DTP-DPPEを含むリポソームの調製

50

DPPC 10 μmol 、コレステロール 5 μmol 、DTP-DPPE 0.15 μmol から脂質フィルムを形成し、参考例 3 で合成したルテニウム (II) 錯体 (5 mM) を含む 1 mL PBS 加え水和し、多重層リポソーム (MLV) を得た。超音波を 10 分間照射し、さらに遠心によりチタンを取り除いた後、ゲルろ過クロマトグラフィー、蛍光強度測定 (励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm) を行い目的の一枚膜リポソーム (SUV) を得た。

(3) 抗体の活性化

1 mg (5.2×10^{-9} mol) / 1 mL (PBS) の BSA 抗体 (コスモ・バイオ株式会社製) に、1.3 μL (2.6×10^{-8}) の 20 mM SPDP 架橋剤を加え (mol 比で SPDP : BSA 抗体 = 5 : 1)、室温で 30 分間インキュベートした。この反応溶液を 3 日間 4 で透析した (再生セルロース分画分子量 : 1000 ダルトン)。透析外液は酢酸緩衝生理食塩水 (pH 4.5) で行った。

10

ついで、50 mM の DTT 還元剤 500 μL と、SPDP 修飾抗体 1 mL を混ぜ、室温 30 分間インキュベートし、SPDP 部位を還元した。ゲルろ過クロマトグラフィー (セファデックス G-25) に付し、PBS (pH 7.4) で溶出して DTT、ピリジン-2-チオンを除去して活性化抗体を得た。

(4) 活性部位をもつリポソームと活性化 BSA 抗体の結合

PBS (pH 7.4) 中、リポソーム (DTP-DPPE として 5×10^{-5} M) と活性化 BSA 抗体 (200 $\mu\text{g}/\text{mL} = 1.33 \times 10^{-6}$ M) を窒素雰囲気下、室温で 24 時間反応させた。ついで、ゲルろ過クロマトグラフィー (セファロース 4B) に付し、PBS (pH 7.4) で溶出して遊離した抗体を除去し、BSA 抗体結合リポソームを得た。

20

【実施例 2】

【0019】

イムノアッセイ

(1) BSA の電極基盤上への固定

図 1 に示す金電極基盤を室温で、ピラニア液 (濃 H_2SO_4 : H_2O_2 (30%) = 3 : 1) 4 μL で 1 分間洗浄し、金電極表面を清浄にした。その後、蒸留水で洗浄した。この金電極をジチオジブチリック酸溶液 (71.5 mg / 30 mL エタノール) に浸漬し、12 時間室温で攪拌することにより金表面に Au-S 結合を形成した。その後エタノールで洗浄した。金電極表面に結合したカルボキシル基を活性化するために、WSC 50 mg および NHS 30 mg / 10 mL PBS の溶液に室温で 60 分間電極基盤を浸漬し、その後 PBS で洗浄した。BSA 0.2 mg / 10 mL PBS (10 mM、pH 7.4) 溶液に電極基盤を加え、4 で 15 時間反応させ、BSA を金電極表面に化学結合させ、ついで PBS 溶液で洗浄した。金電極上の未反応の活性化カルボキシル基をつぶすために電極基盤を 0.1 M 2-アミノエタノール (61.0 mg / 10 mL PBS) 溶液に 4 で、1 時間浸漬した。室温で 15 分間静置した後、0.02% Tween 20 含有 PBS 溶液で洗浄して、BSA 固定電極基盤を得た。

30

(2) BSA 抗体の定量

以上のようにして調製した電極基盤に、実施例 1 で調製した BSA 抗体結合リポソーム PBS 溶液 5 μL と各種濃度の BSA 抗体 PBS 溶液 25 μL を加え、室温 1 で時間インキュベートして競争的な抗原抗体反応を行った。その後 PBS で電極洗浄し、PBS 溶液をマイクロピペットで吸いだした。

40

この電極基盤にエタノール (7 μL) を加えることにより電極上に結合したリポソームを破壊した後、60 で 10 分間加熱した。この電極基盤を室温で 10 分間放置し、PBS で洗浄した。

電極基盤に電解液 (0.05 M トリエチルアミン含有 0.1 M PBS) を 60 μL 加えた後、+1.2 V (vs. 金参照電極) を印加し、電解発光測定を行った。

種々の BSA 抗体濃度について測定した電解発光強度から図 2 に示す検量線を得た。

この検量線を用い、同様にして、検体中の BSA 抗体を定量することができる。

50

【参考例 4】

【0020】

電極基盤に吸着されたリポソームの破壊条件の検討

実施例 1 (1) および (2) と同様にして調製した、トリス (2, 2' - ビピリジン) ルテニウム (II) 錯体を内包するリポソームを含む水溶液を図 1 に示すとき作用電極に滴下し、室温で 30 分間静置後、洗浄、乾燥し、種々のアルコールを滴下し、発光強度を測定した。

結果を表 3 に示す。

【表 3】

| アルコール | 発光強度 / カウント ($\times 10^4$) |
|----------|-------------------------------|
| メタノール | 4.5 |
| プロパノール | 12.5 |
| イソプロパノール | 7.0 |
| ブタノール | 5.0 |
| 冷凍破壊 | 4.0 |

10

表 3 から明らかなごとく、プロパノールによる破壊が最も効率がよい。

【参考例 5】

【0021】

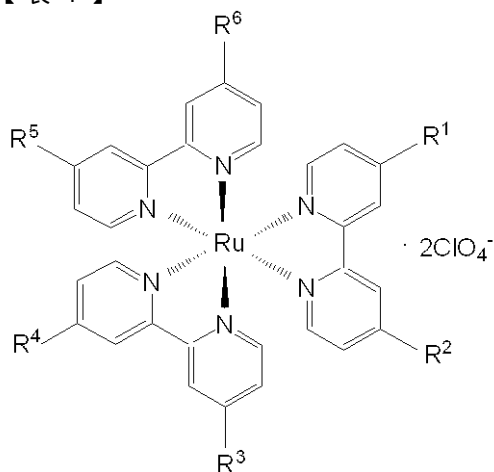
ルテニウム (II) 錯体の電極への吸着能の比較

種々のルテニウム (II) 錯体溶液 (1.0×10^{-6} M) に作用電極を 5 分間浸漬し、洗浄後の吸着による発光強度を測定した。

結果を表 4 に示す。

20

【表 4】



10

| R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | R ⁶ | 発光強度 /カウント (×10 ⁵) |
|---|---|--|--|--|--|--------------------------------------|
| H | H | H | H | H | H | 12.8 |
| CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | 4.6 |
| (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | 3.1 |
| H | H | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | 4.0 |
| (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -OH | H | H | H | H | 20.0 |
| (CH ₂) ₃ CH ₂ -フタルイミノ | (CH ₂) ₃ CH ₂ -フタルイミノ | H | H | H | H | 23.1 |
| (CH ₂) ₃ CH ₂ -NH ₂ | (CH ₂) ₃ CH ₂ -NH ₂ | H | H | H | H | 24.5 |
| (CH ₂) ₃ CH ₂ -NH ₂ | CH ₃ | H | H | H | H | 26.3 |
| (CH ₂) ₃ CH ₂ -SH | (CH ₂) ₃ CH ₂ -SH | H | H | H | H | 29.9 |

20

30

表 4 から明らかなごとく、トリス(2, 2'-ビピリジン)ルテニウム(II)錯体を基本骨格とする、チオール基、ジスルフィド基およびアミノ基を有する側鎖を持つ錯体が金電極への吸着能が高い。

40

【産業上の利用可能性】

【0022】

本発明によれば、タンパク質の簡便で高感度の、生化学、医学、薬学等の分野で有用な、また、環境汚染物質の分析にも有用なイムノアッセイ方法が提供できる。

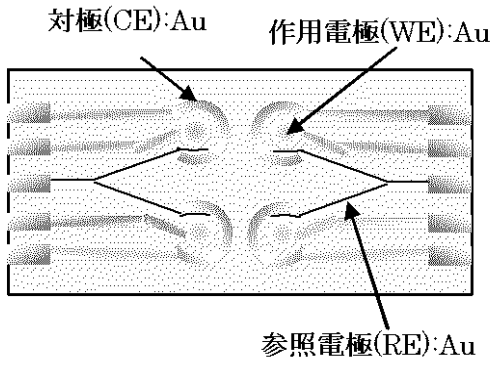
【図面の簡単な説明】

【0023】

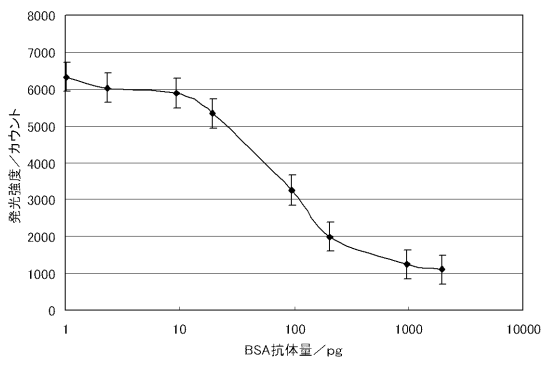
【図 1】本発明の方法で使用する金作用電極を用いたチップリーダーの模式的平面図である。

【図 2】実施例 2 で作成した検量線である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 三苦 好治

広島県庄原市戸郷町2 - 1 8 戸郷公舎1号棟302号室

Fターム(参考) 2G054 AB04 CA23 EA01