



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월11일
(11) 등록번호 10-2833537
(24) 등록일자 2025년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/535 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/548 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/535 (2013.01)
G01N 33/543 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7040159
(22) 출원일자(국제) 2021년05월21일
심사청구일자 2022년11월16일
(85) 번역문제출일자 2022년11월16일
(65) 공개번호 10-2022-0167333
(43) 공개일자 2022년12월20일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/019390
(87) 국제공개번호 WO 2021/241446
국제공개일자 2021년12월02일
(30) 우선권주장
JP-P-2020-090398 2020년05월25일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
KATSUTOSHI ITO et al., Analytical Sciences,
2003, Vol. 19, pp 105-109. 1부.*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
요코가와 덴키 가부시키키가이샤
일본국 도쿄도 무사시노시 나카쵸 2쵸메 9반 32고
(72) 발명자
아키요시 류타로
일본국 도쿄도 무사시노시 나카쵸 2쵸메 9반 32고
요코가와 덴키 가부시키키가이샤 나이
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 7 항

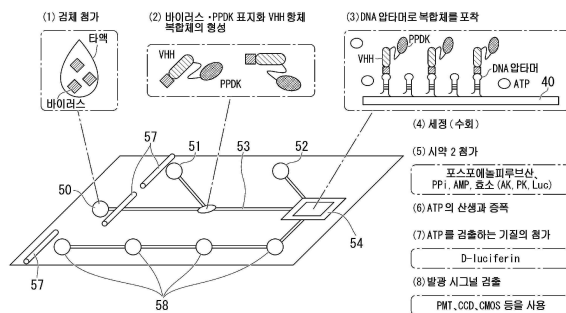
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **검체 중의 표적 분자의 검출 방법, 및 표적 분자 검출 키트**

(57) 요약

검체 중의 표적 분자와, 상기 표적 분자와 결합하는 포착 분자와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표시된, 상기 표적 분자와 결합하는 표지화 결합 분자를 반응시켜, 상기 표적 분자와 상기 포착 분자와 상기 표지화 결합 분자로 이루어지는 복합체를 형성시키는 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체 형성 공정과, 표적 분자와 결합하지 않은 상기 표지화 결합 분자를 제거하는 공정과, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체와 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질을 반응시켜 ATP 를 산생시키는 ATP 산생 공정과, 산생된 ATP 를 증폭시키는 ATP 증폭 공정과, 증폭된 ATP 를 검출하는 ATP 검출 공정을 포함하는, 검체 중의 표적 분자의 검출 방법.

대표도



(52) CPC특허분류
G01N 33/548 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
TETSUYA SATOH et al., Biosci. Biotechnol.
Biochem., 2004, Vol. 68, pp 1216-1220. 1부.*
US20200024638 A1
US20030082583 A1
JP2009060809 A
JP2001299390 A
JP2006081506 A
JP2015042156 A
JP2002535985 A
JP2013040800 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

공정 (1) : 검체 중의 표적 분자와, 상기 표적 분자와 결합하는 포착 분자와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 상기 표적 분자와 결합하는 표지화 결합 분자를 반응시켜, 상기 표적 분자와 상기 표지화 결합 분자와 상기 포착 분자로 이루어지는 복합체 (이하, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체라고 칭한다) 를 형성시키는 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체 형성 공정과,

공정 (2) : 상기 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자와 결합하지 않은 상기 표지화 결합 분자를 제거하는 공정과,

공정 (3) : 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질을 반응시켜 ATP 를 산생시키는 ATP 산생 공정과,

공정 (4) : 상기 공정 (3) 에서 산생된 ATP 를 증폭시키는 ATP 증폭 공정과,

공정 (5) : 상기 공정 (4) 에서 증폭된 ATP 를 검출하는 ATP 검출 공정을 포함하고,

상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 피루브산인산디키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 포스포에놀피루브산, 피로인산 및 AMP 이거나,

상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 아세틸-CoA 신테타아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 AMP, 피로인산 및 아세틸-CoA 이거나, 또는,

상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 II 형 폴리인산키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 AMP 및 폴리인산이고,

상기 공정 (4) 에 있어서, ATP 의 증폭을, ATP 를 증폭시키는 효소와, 상기 ATP 를 증폭시키는 효소의 기질을 사용함으로써 실시하고,

상기 ATP 를 증폭시키는 효소가 아데닐산키나아제와 피루브산키나아제로서, 상기 ATP 를 증폭시키는 효소의 기질이 AMP 및 포스포에놀피루브산이거나,

상기 ATP 를 증폭시키는 효소가 아데닐산키나아제와 폴리인산키나아제로서, 상기 ATP 를 증폭시키는 효소의 기질이 AMP 및 폴리인산이거나,

상기 ATP 를 증폭시키는 효소가 아데닐산키나아제와 크레아틴키나아제로서, 상기 ATP 를 증폭시키는 효소의 기질이 AMP 및 크레아틴인산이거나, 또는,

상기 ATP 를 증폭시키는 효소가 아데닐산키나아제와 아세트산키나아제로서, 상기 ATP 를 증폭시키는 효소의 기질이 AMP 및 아세틸인산이고,

상기 공정 (5) 에 있어서, ATP 의 검출을, 루시페라아제를 사용함으로써 실시하는, 검체 중의 표적 분자의 검출 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시키기 전에, 미리 검체 중의 ATP 를 제거하는 공정을 포함하는, 검출 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 포착 분자가, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, 검출 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 표지화 결합 분자가, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, 검출 방법.

청구항 5

표적 분자와 결합하는 포착 분자가 고정화된 불용성 담체와,

ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 상기 표적 분자와 결합하는 표지화 결합 분자와,

ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질과,

ATP 를 증폭시키는 시약과,

ATP 를 검출하는 시약을 포함하고,

상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 피루브산인산디키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 포스포에놀피루브산, 피로인산 및 AMP 이거나,

상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 아세틸-CoA 신테타아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 AMP, 피로인산 및 아세틸-CoA 이거나, 또는,

상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 II 형 폴리인산키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 AMP 및 폴리인산이고,

상기 ATP 를 증폭시키는 시약이 AMP, 포스포에놀피루브산, 마그네슘 이온, 아데닐산키나아제 및 피루브산키나아제이거나,

상기 ATP 를 증폭시키는 시약이 AMP, 폴리인산, 마그네슘 이온, 아데닐산키나아제 및 폴리인산키나아제이거나,

상기 ATP 를 증폭시키는 시약이 AMP, 크레아틴인산, 마그네슘 이온, 아데닐산키나아제 및 크레아티닌키나아제이거나, 또는,

상기 ATP 를 증폭시키는 시약이 AMP, 아세틸인산, 마그네슘 이온, 아데닐산키나아제 및 아세트산키나아제이고,

상기 ATP 를 검출하는 시약이 D-루시페린 및 루시페라아제인, 검체 중의 표적 분자 검출 키트.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 포착 분자가, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, 검출 키트.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

상기 표지화 결합 분자가, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, 검출 키트.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 검체 중의 표적 분자의 검출 방법, 및 표적 분자 검출 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역 측정법은, 인간의 체액 중의 바이러스나 식품 중의 알레르겐 등의 표적물을 검출하는 수법으로서 널리 사용되고 있다. 이뮤노크로마토그래피는, 셀룰로오스막 상을 검체가 시약을 용해시키면서 천천히 흐르는 성질(모세관 현상)을 응용한 면역 측정법으로, 임신 진단, 인플루엔자 검사 등에 응용되고 있다.

[0003] 그러나, 이뮤노크로마토그래피는, 매우 간편하게 측정이 가능하다는 메리트가 있지만, 정색(呈色)에 의한 판정 방법을 사용하고 있기 때문에 저감도이다. 인플루엔자 등의 판정에 있어서는, 발증 직후의 검체 중의 바

이러스양이 적은 경우 등에 바이러스를 검출할 수 없어, 바이러스양이 충분히 증가할 때까지 시간을 두고 나서의 재측정이 필요해지는 경우가 있다.

[0004] ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 는 여러 가지 항원 항체 반응의 조합을 이용하여, 효소 표지한 항원 혹은 항체를 반응계에 삽입하고, 효소 활성을 검출함으로써, 검체 중의 표적 분자를 검출하는 수법으로, 이뮤노크로마토그래피에서 일반적으로 채용되고 있는 금속 콜로이드에 의한 정색을 목시 판정하는 방법과 비교하여, 고감도로 표적 분자를 검출하는 것이 가능하다. ELISA 는, 효소 반응에 의해 흡광 스펙트럼이 변화하는 기질 (비색법), 형광 시그널을 내는 기질 (형광법), 발광하는 기질 (화학 발광법, 생물 발광법) 등을 이용하여, 플레이트 리더나 루미노미터 등의 측정 장치로 효소 활성이 수치화되고, 표적 분자를 검출·정량할 수 있다.

[0005] 한편, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소를 사용하여, 산생하는 ATP 를, 루시페라아제를 사용하여 발광시켜, 생성되는 발광량을 측정하는 것에 의한 ATP 의 정량법이 알려져 있다 (특허문헌 1). 또, 검체 중의 ATP 를 증폭시켜, 증폭된 ATP 를, 생물 발광법을 사용하여 정량하는 방법이 알려져 있다 (특허문헌 2). 그러나, 이들 정량 방법은, 모두 ATP 등의 ATP 변환 반응에 사용되는 분자의 정량 방법으로, 검체 중의 ATP 변환 반응에 관여하지 않는 표적 분자를, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소를 표지 효소로서 사용하여 검출하는 면역 측정 방법은 아니다.

[0006] ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소를 표지 효소로서 사용하여 검출하는 면역 측정 방법으로서, 비특허문헌 1 에, 아세트산키나아제 또는 피루브산인산디키나아제를 표지 효소로서 사용하는 표적 분자의 면역 측정 방법이 개시되어 있다. 그러나, 이 방법에서는, 아세트산키나아제 또는 피루브산인산디키나아제의 대사 회전수에만 의존한 ATP 산생량에 기초하는 발광 시그널밖에 얻을 수 없어, 미량의 ATP 의 검출은 할 수 없다. 또, 이 방법은, 분해되기 쉬운 ADP 를 사용한 아세트산키나아제에 의한 ATP 공급을 차단 반응으로 하고 있어, 검출 키트 등의 상업적 이용에는 적합하지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 평9-234099호
- (특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 2001-299390호

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Anal Sci. 2003 Jan ; 19 (1) : 105-9.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이뮤노크로마토그래피나 ELISA 와 같은 면역 측정법에서는, 항체의 표지물과 그 검출법으로 감도가 결정된다. 면역 측정법 중에서, 가장 고감도로 분자를 검출할 수 있는 생물 발광법은, 1 어세이에 있어서 10^{-20} mol (분자수로 수천 개) 정도의 분자의 검출이 가능하지만, 이 생물 발광법을 사용해도, 1 어세이당에서 수천 분자 이상의 표적 분자가 검체에 포함되어 있을 필요가 있으며, 그 이하의 분자수에서는 표적 분자를 검출할 수 없다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은, 종래의 면역 측정 방법에서는, 검체 중의 표적 분자의 양이 검출 한계 이하이기 때문에 측정할 수 없는 경우에도 측정 가능한, 검체 중의 표적 분자의 검출 방법, 및 표적 분자 검출 키트를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 이하의 구성을 채용하였다.

[0012] [1] 공정 (1) : 검체 중의 표적 분자와, 상기 표적 분자와 결합하는 포착 분자와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 상기 표적 분자와 결합하는 표지화 결합 분자를 반응시켜, 상기 표적 분자와 상기 표지화

결합 분자와 상기 포착 분자로 이루어지는 복합체 (이하, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체라고 칭한다) 를 형성시키는 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체 형성 공정과,

- [0013] 공정 (2) : 상기 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자와 결합하지 않은 상기 표지화 결합 분자를 제거하는 공정과,
- [0014] 공정 (3) : 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질을 반응시켜 ATP 를 산생시키는 ATP 산생 공정과,
- [0015] 공정 (4) : 상기 공정 (3) 에서 산생된 ATP 를 증폭시키는 ATP 증폭 공정과,
- [0016] 공정 (5) : 상기 공정 (4) 에서 증폭된 ATP 를 검출하는 ATP 검출 공정을 포함하는, 검체 중의 표적 분자의 검출 방법.
- [0017] [2] 상기 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시키기 전에, 미리 검체 중의 ATP 를 제거하는 공정을 포함하는, [1] 에 기재된 검출 방법.
- [0018] [3] 상기 포착 분자가, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, [1] 또는 [2] 에 기재된 검출 방법.
- [0019] [4] 상기 표지화 결합 분자가, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0020] [5] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 피루브산인산디키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 포스포에놀피루브산, 피로인산 및 AMP 인, [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0021] [6] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 아세틸-CoA 신테타아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 AMP, 피로인산, 및 아세틸-CoA 인, [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0022] [7] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 ATP 술폰릴라아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 아데노신5'-포스포술포이트 및 피로인산인, [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0023] [8] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 II 형 폴리인산키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 AMP 및 폴리인산인, [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0024] [9] 상기 공정 (4) 에 있어서, ATP 의 증폭을, 아데닐산키나아제와 피루브산키나아제를 사용함으로써 실시하는, [1] ~ [8] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0025] [10] 상기 공정 (4) 에 있어서, ATP 의 증폭을, 아데닐산키나아제와 폴리인산키나아제를 사용함으로써 실시하는, [1] ~ [8] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0026] [11] 상기 공정 (4) 에 있어서, ATP 의 증폭을, 아데닐산키나아제와 아세트산키나아제를 사용함으로써 실시하는, [1] ~ [8] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0027] [12] 상기 공정 (5) 에 있어서, ATP 의 검출을, 루시페라아제를 사용함으로써 실시하는, [1] ~ [11] 중 어느 한 항에 기재된 검출 방법.
- [0028] [13] 표적 분자와 결합하는 포착 분자가 고정화된 불용성 담체와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 상기 표적 분자와 결합하는 표지화 결합 분자와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질과, ATP 를 증폭시키는 시약과, ATP 를 검출하는 시약을 포함하는, 검체 중의 표적 분자 검출 키트.
- [0029] [14] 상기 포착 분자가, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, [13] 에 기재된 검출 키트.
- [0030] [15] 상기 표지화 결합 분자가, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 표적 분자와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머인, [13] 또는 [14] 에 기재된 검출 키트.
- [0031] [16] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 피루브산인산디키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질이 포스포에놀피루브산, 피로인산 및 AMP 인, [13] ~ [15] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.
- [0032] [17] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 아세틸-CoA 신테타아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을

측매하는 효소의 기질이 AMP, 피로인산 및 아세틸-CoA 인, [13] ~ [15] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.

- [0033] [18] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 측매하는 효소가 ATP 솔푸틸라아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 측매하는 효소의 기질이 아데노신5'-포스포술페이트 및 피로인산인, [13] ~ [15] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.
- [0034] [19] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 측매하는 효소가 II 형 폴리인산키나아제로서, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 측매하는 효소의 기질이 AMP 및 폴리인산인, [13] ~ [15] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.
- [0035] [20] 상기 ATP 를 증폭시키는 시약이 AMP, 포스포에놀피루브산, 마그네슘 이온, 아데닐산키나아제 및 피루브산 키나아제인, [13] ~ [19] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.
- [0036] [21] 상기 ATP 를 증폭시키는 시약이 AMP, 폴리인산, 마그네슘 이온, 아데닐산키나아제 및 폴리인산키나아제인, [13] ~ [19] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.
- [0037] [22] 상기 ATP 를 증폭시키는 시약이 AMP, 아세틸인산, 마그네슘 이온, 아데닐산키나아제 및 아세트산키나아제인, [13] ~ [19] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.
- [0038] [23] 상기 ATP 를 검출하는 시약이 D-루시페린 및 루시페라아제인, [13] ~ [22] 중 어느 한 항에 기재된 검출 키트.

발명의 효과

- [0039] 본 발명의 검체 중의 표적 분자의 검출 방법에 의하면, 종래의 면역 측정 방법에서는, 검체 중의 표적 분자의 양이 검출 한계 이하이기 때문에 측정할 수 없는 경우에도, 검체 중의 표적 분자를 검출할 수 있다. 또, 본 발명의 검체 중의 표적 분자 검출 키트에 의하면, 종래의 면역 측정 키트에서는, 검체 중의 표적 분자의 양이 검출 한계 이하이기 때문에 측정할 수 없는 경우에도, 검체 중의 표적 분자를 검출할 수 있는 표적 분자 검출 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1 은, 검체 중의 표적 분자 (10) 와, 불용성 담체 (40) 에 고정화된, 표적 분자 (10) 와 결합하는 포착 분자 (20) 와, ATP 를 산생하는 반응을 측매하는 효소로 표지된 표지화 결합 분자 (30) 를 반응시켜, 불용성 담체 (40) 상에, 표적 분자 · 표지화 결합 분자 · 포착 분자 복합체를 형성시킨 상태를 나타낸 도면이다.
- 도 2 는, ATP 의 증폭 공정과 ATP 의 검출 공정을 나누어 실시하는 경우의 표적 분자의 검출 방법의 조작 순서의 일례를 나타낸 도면이다.
- 도 3 은, ATP 의 증폭 공정과 ATP 의 검출 공정을 동시에 실시하는 경우의 표적 분자의 검출 방법의 조작 순서의 일례를 나타낸 도면이다.
- 도 4 는, ATP 의 증폭 공정과 ATP 의 검출 공정을 동시에 실시하는 경우의 표적 분자의 정량 방법의 조작 순서의 일례를 나타낸 도면이다.
- 도 5a 는, 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법을 사용한 이뮤노크로마토그래피의 구성예의 측면을 나타낸 도면이다.
- 도 5b 는, 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법을 사용한 이뮤노크로마토그래피의 구성예의 상면을 나타낸 도면이다.
- 도 6 은, 롤러로 탄성 용기에 밖에서 힘을 가하여 송액을 실시하는 카트리지를 사용하여, 표적 분자 (10) 로서 바이러스, 표적 분자 (10) 에 결합하는 포착 분자 (20) 로서 DNA 압타머, ATP 를 산생하는 반응을 측매하는 효소로 표지된 표지화 결합 분자 (30) 로서 피루브산인산디키나아제 표지화 중사슬 가변 영역 항체, ATP 를 증폭시키는 효소로서 아데닐산키나아제와 피루브산키나아제, ATP 를 검출하는 효소로서 루시페라아제, 불용성 담체 (40) 로서 시클로올레핀 폴리머 (COP) 를 각각 사용한 이뮤노크로마토그래피의 구성예와 동작의 일례를 나타낸 도면이다.
- 도 7 은, 실시예 1 의 샘플 번호 1 ~ 7 의 샘플의 발광 강도를 나타낸 그래프이다.
- 도 8 은, 실시예 2 의 PPKK 표지 항 BSA-VIII 항체와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여 사용한 경우, PPKK 표

지 향 BSA-VHH 항체를 단독으로 사용한 경우, 네거티브 컨트롤 (ATP 증폭을 실시한 경우와 ATP 증폭을 실시하지 않은 경우) 의 발광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 9 는, 실시예 2 의 PPK 표지 항 BSA-VHH 항체와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여 사용한 경우와, PPK 표지 항 BSA-VHH 항체를 단독으로 사용한 경우에 있어서, ATP 의 증폭을 실시한 경우의 네거티브 컨트롤의 발광 강도와, ATP 의 증폭을 실시하지 않은 경우의 네거티브 컨트롤의 발광 강도를 백그라운드로서 각각 감산한 발광 강도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명의 검체 중의 표적 분자의 검출 방법은,
- [0042] 공정 (1) : 검체 중의 표적 분자와, 상기 표적 분자와 결합하는 포착 분자와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 상기 표적 분자와 결합하는 표지화 결합 분자를 반응시켜, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시키는 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체 형성 공정과,
- [0043] 공정 (2) : 상기 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자와 결합하지 않은 상기 표지화 결합 분자를 제거하는 공정과,
- [0044] 공정 (3) : 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질을 반응시켜 ATP 를 산생시키는 ATP 산생 공정과,
- [0045] 공정 (4) : 상기 공정 (3) 에서 산생된 ATP 를 증폭시키는 ATP 증폭 공정과,
- [0046] 공정 (5) : 상기 공정 (4) 에서 증폭된 ATP 를 검출하는 ATP 검출 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0047] 이하, 본 발명의 검체 중의 표적 분자의 검출 방법의 실시형태에 대해 설명한다.
- [0048] 또한, 이하의 기재에 있어서, 특별히 언급하지 않는 한, 포착 분자, 표지화 결합 분자란, 각각, 표적 분자와 결합하는 포착 분자, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 표적 분자와 결합하는 표지화 결합 분자를 의미한다.
- [0049] [공정 (1)]
- [0050] 공정 (1) 은, 검체 중의 표적 분자와, 포착 분자와, 표지화 결합 분자를 반응시켜, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시키는 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체 형성 공정이다.
- [0051] 공정 (1) 에 있어서, 검체 중의 표적 분자와, 포착 분자와, 표지화 결합 분자를 반응시키는 방법으로는, 검체 중의 표적 분자와, 포착 분자와, 표지화 결합 분자를 동시에 반응시키는 방법이어도 되고, 표적 분자와 포착 분자를 반응시켜, 표적 분자와 포착 분자로 이루어지는 표적 분자·포착 분자 복합체를 형성시킨 후에, 표지화 결합 분자를 반응시키는 방법이어도 된다. 또, 표적 분자와 표지화 결합 분자를 반응시켜, 표적 분자와 표지화 결합 분자로 이루어지는 표적 분자·표지화 결합 분자 복합체를 형성시킨 후에, 포착 분자를 반응시키는 방법이어도 된다.
- [0052] 상기 포착 분자는, 불용성 담체에 고정화되어 있지 않아도 되고, 고정화되어 있어도 되지만, 고정화되어 있는 것이 바람직하다.
- [0053] 도 1 에, 상기 공정 (1) 에 있어서, 검체 중의 표적 분자 (10) 와, 불용성 담체 (40) 에 고정화되어 있는 포착 분자 (20) 와, 표지화 결합 분자 (30) 를 반응시켜, 불용성 담체 (40) 상에, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시킨 상태를 나타낸다. 포착 분자 (20) 가 불용성 담체 (40) 에 고정화되어 있는 경우, 후술하는 공정 (2) 에 있어서, 불용성 담체 (40) 를 세정액으로 세정함으로써, 공정 (1) 에 있어서 형성된 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를, 미반응 성분 (검체 유래의 성분, 표적 분자 (10) 에 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30) 등) 으로부터 용이하게 분리할 수 있다. 세정액으로는, 인산 완충화 생리 식염수 (이하, PBS 라고도 칭한다), 계면 활성제를 함유하는 PBS, 후술하는 수성 매체 등을 들 수 있다. 상기 계면 활성제로는, 예를 들어 트윈 (Tween) 20 등의 비이온성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0054] 상기 불용성 담체 (40) 로는, 상기 포착 분자 (20) 를 고정화시킬 수 있는 것이면 특별히 제한은 없다. 불용성 담체 (40) 의 바람직한 소재로는 폴리스티렌, 폴리카보네이트, 폴리비닐톨루엔, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리염화비닐, 나일론, 폴리메타크릴레이트, 젤라틴, 아가로오스, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스아세테이트, 아세트산셀룰로오스, 시클로올레핀 폴리머, 폴리에틸렌테레프탈레이트 등의 고분자 소재, 유리, 세라믹스, 자성 입자나 금속 등을 들 수 있지만, 단백질을 흡착하지 않고, 표지화 결합 분자 (30)

의 불용성 담체에 대한 비특이적 결합을 억제할 수 있는 아세트산셀룰로오스, 시클로올레핀 폴리머 등이 바람직하다. 불용성 담체의 바람직한 형상으로는 튜브 ; 비드 ; 플레이트 ; 기관 ; 라텍스 등의 미립자 ; 스틱 등을 들 수 있다.

[0055] 포착 분자 (20) 의 불용성 담체 (40) 에 대한 고정화 방법으로는, 물리학적 결합을 이용한 방법과 화학적 결합을 이용한 방법 또는 이들의 병용 등, 공지된 방법이 사용된다. 물리학적 결합으로는, 예를 들어 정전적 결합, 수소 결합, 소수 결합 등을 들 수 있다. 화학적 결합으로는, 예를 들어 공유 결합, 배위 결합 등을 들 수 있다. 예를 들어, 시클로폴리올레핀계 폴리머제의 기관을 불용성 담체 (40) 로서 사용하는 경우에는, 상기 기관에 포착 분자 (20) 의 용액을 첨가하여, 1 시간 내지 1 일간, 4 °C ~ 30 °C 에서 인큐베이트함으로써, 물리 흡착시켜 고정화시키는 방법을 들 수 있다.

[0056] 포착 분자 (20) 는, 직접 불용성 담체 (40) 에 고정화시켜도 되고, 간접적으로 불용성 담체 (40) 에 고정화시켜도 된다. 간접적인 고정화 방법으로는, 예를 들어 아비딘을 고정화시킨 불용성 담체 (40) 에, 비오틴화시킨 포착 분자 (20) 의 용액을 첨가하고, 비오틴과 아비딘의 특이적 결합을 통하여, 포착 분자 (20) 를 불용성 담체 (40) 에 고정화시키는 방법을 들 수 있다. 또, 불용성 담체 (40) 에, 포착 분자 (20) 에 특이적으로 결합하는 항체를 고정화시키고, 이 항체를 통하여 포착 분자 (20) 를 불용성 담체 (40) 에 고정화시켜도 된다. 혹은, 포착 분자 (20) 는, 링커를 개재한 공유 결합에 의해 불용성 담체 (40) 에 고정화시켜도 된다. 링커로는, 예를 들어, 포착 분자 (20) 의 관능기와 불용성 담체 (40) 가 그 표면에 유지하고 있는 관능기의 양자와 공유 결합할 수 있는 분자 등을 들 수 있다. 상기 분자로는, 포착 분자 (20) 의 관능기와 반응할 수 있는 제 1 반응 활성기와, 불용성 담체 (40) 가 그 표면에 유지하고 있는 관능기와 반응할 수 있는 제 2 반응 활성기를 동일 분자 내에 갖는 분자가 바람직하다. 그 중에서도, 제 1 반응 활성기와 제 2 반응 활성기가 상이한 기인 분자가 특히 바람직하다. 포착 분자 (20) 의 관능기 및 불용성 담체 (40) 가 그 표면에 유지하고 있는 관능기로는, 카르복실기나 아미노기, 글리시딜기, 술폰히드릴기, 수산기, 아미드기, 이미노기, N-하이드록시숙시닐기, 말레이미드기 등을 들 수 있다. 링커에 있어서의 활성인 반응성기로는, 알릴아지드, 카르보디이미드, 히드라지드, 알데히드, 하이드록시메틸포스핀, 이미드에스테르, 이소시아네이트, 말레이미드, N-하이드록시숙신이미드 (NHS) 에스테르, 펜타플루오로페닐 (PFP) 에스테르, 소랄렌, 피리딜디술파이드, 비닐술폰 등의 기를 들 수 있다.

[0057] 본 실시형태에 있어서의 검출 방법에 있어서, 검체로는 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 인간 등의 포유 동물의 혈액, 혈구, 혈청, 혈장, 수액, 요, 땀, 타액, 양수, 체액 등의 체액이나 조직 등, 식품이나 식품으로부터의 추출물, 동물 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 미생물 세포의 세포 배양액 등, 의료 기기 등의 세정액 등을 들 수 있다. 검체는, 검출 대상물로부터 채취된 것이어도 되고, 채취한 검체에 통상적으로 실시되는 희석, 농축 등의 처리를 실시한 것이어도 된다. 또, 본 실시형태의 검출 방법에 사용하는 검체는, 본 실시형태의 검출 방법의 실시시에 채취 또는 조제된 것이어도 되고, 미리 채취 또는 조제되어 보존된 것이어도 된다.

[0058] 본 실시형태에 있어서의 검출 방법에 있어서, 표적 분자 (10) 로는, 본 실시형태의 검출 방법에 있어서 검출의 대상이 되는 분자로서, 본 실시형태의 검출 방법에 의해 검출 가능하면 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 단백질, 핵산, 지질, 비타민, 다당류, 저분자 화합물 등을 들 수 있다. 핵산으로는, DNA, RNA 등을 들 수 있다. 또, 단백질로는, 효소, 호르몬, 각종 펩티드 등을 들 수 있다.

[0059] 본 실시형태에 있어서의 검출 방법에 있어서, 포착 분자 (20) 로는, 검체 중의 표적 분자 (10) 와 특이적으로 결합할 수 있는 분자이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 상기 표적 분자 (10) 와 특이적으로 결합하는 항체 혹은 항체 프래그먼트, 상기 표적 분자 (10) 와 특이적으로 결합하는 압타머 등을 들 수 있다. 상기 항체로는, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 중 어느 것도 사용할 수 있지만, 모노클로날 항체가 바람직하다. 항체 프래그먼트로는, 예를 들어, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv, 이들의 변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질 또는 융합 펩티드 등을 들 수 있다.

[0060] 상기 항체 프래그먼트로는, 낙타과 동물 항체의 중사슬 가변 영역 항체 (이하, VHH 항체라고도 칭한다) 를 사용할 수도 있다. VHH 항체는, 중사슬 가변 영역에서만 항원과 결합할 수 있다. 또, VHH 항체는, 탠덤화하여 사용할 수 있으며, 탠덤화함으로써, 표적 분자인 항원과의 결합 친화성을 향상시킬 수 있어, 항원 이외의 분자와의 비특이 결합을 경감시킬 수 있다.

[0061] 이들 항체 및 항체 프래그먼트는, 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0062] 검체 중의 표적 분자와 특이적으로 결합하는 압타머로는, DNA 압타머, RNA 압타머 등의 핵산 압타머여도 되고,

펩티드 압타머에도 된다. 핵산 압타머는, in vitro selection 법, SELEX 법 등의 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다. 또, 핵산 압타머는, 2'-불화피리미딘이나 PEG 사슬 등에 의한 분자 수식이 된 것이어도 되고, 상기 분자 수식에 의해, 핵산 압타머의 반감기를 길게 할 수 있다.

[0063] 본 실시형태에 있어서의 검출 방법에 있어서, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로는, ATP 를 산생하는 반응을 촉매할 수 있는 효소이면, 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 피루브산인산디키나아제 (Pyruvate phosphate dikinase ; 이하, PPK 라고도 칭한다), 아세틸-CoA 신테타아제 (Acetyl-CoA synthetase), ATP 술폴릴라아제 (ATP-Sulfurylase), II 형 폴리인산키나아제 등을 들 수 있지만, PPK 가 바람직하다.

[0064] PPK 는, 하기 식에 나타내는 바와 같이, 보인자로서의 마그네슘 이온 존재하에서, AMP, 포스포에놀피루브산 및 피로인산 (PPi) 에 작용하여, ATP, 피루브산 및 인산 (Pi) 을 생성하는 반응을 촉매하고, 그 반대의 반응도 촉매하는 공지된 효소로, 피루베이트오르토포스페이트디키나아제라고도 한다.

[0065] [화학식 1]



PPi: 피로인산
Pi: 인산

[0066]

[0067] 본 실시형태에 있어서의 검출 방법에 있어서, 표지화 결합 분자 (30) 로는, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 표적 분자 (10) 와 결합하는 분자이면 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된, 상기 표적 분자 (10) 와 특이적으로 결합하는, 항체 혹은 항체 프래그먼트, 또는 압타머 등을 들 수 있다. 표지화 결합 분자 (30) 는, 포착 분자 (20) 와는 상이한 부분에서 표적 분자 (10) 와 결합해도 되고, 포착 분자 (20) 와 동일한 부분에서 표적 분자 (10) 와 결합해도 된다.

[0068] 상기 표지화 결합 분자 (30) 에 있어서의 항체, 항체 프래그먼트, 및 압타머로는, 각각 전술한 포착 분자 (20) 에 있어서의 항체, 항체 프래그먼트, 및 압타머를 들 수 있다. 상기 표지화 결합 분자 (30) 와 상기 포착 분자 (20) 의 조합으로는, 항체끼리어도 되고, 항체와 항체 프래그먼트의 조합, 항체와 압타머의 조합, 항체 프래그먼트와 압타머의 조합 등 어느 것이어도 된다.

[0069] 상기 표지화 결합 분자 (30) 의 표지화는, 표적 분자 (10) 와 결합하는 분자의 관능기와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 관능기 사이에서, 링커를 개재하여 또는 개재하지 않고 공유 결합을 발생시키는 반응에 의해 실시할 수 있다. 관능기로는, 카르복실기나 아미노기, 글리시딜기, 술폰히드릴기, 수산기, 아미드기, 이민노기, 하이드록시숙시닐에스테르기, 말레이미드기, 이소티오시아네이트기 등을 들 수 있다. 이 관능기끼리의 사이에서 축합 반응을 실시하게 하는 것이 가능하다.

[0070] 링커를 개재하지 않는 결합 방법으로는 예를 들어, EDC 등의 카르보디이미드 화합물을 사용하는 방법 등을 들 수 있다. 이 경우, NHS 또는 그 유도체 등의 활성 에스테르를 사용하는 것도 가능하다. 이소티오시아네이트기와 아미노기 사이의 축합 반응은, 다른 시약을 필요로 하지 않고, 중성 ~ 약알칼리성의 조건에서 혼합하는 것만으로 진행되기 때문에 바람직하다.

[0071] 링커로는, 예를 들어, 표적 분자 (10) 와 결합하는 분자의 관능기에 반응하는 관능기와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 관능기에 반응하는 관능기의 양방의 관능기를 분자 내에 갖는 것을 들 수 있다. 상기 양방의 관능기를 분자 내에 갖는 것으로는, 상기 표적 분자 (10) 와 결합하는 분자의 아미노산 잔기와 반응할 수 있는 제 1 관능기와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 관능기와 반응할 수 있는 제 2 관능기를 동일 분자 내에 갖는 분자가 바람직하다. 그 중에서도, 제 1 관능기와 제 2 관능기가 상이한 기인 분자가 특히 바람직하다. 링커의 관능기로는, 예를 들어 전술한 관능기를 들 수 있다.

[0072] 또, 표적 분자 (10) 와 결합하는 분자가, 항체, 항체 프래그먼트 등의 단백질인 경우에는, 표적 분자 (10) 와 결합하는 분자와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소를, 하나의 융합 단백질로서 제조할 수도 있다. 상기 융합 단백질에 있어서, 표적 분자 (10) 와 결합하는 분자와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소 사이에는 수 잔기 내지 수십 잔기의 링커 펩티드를 삽입해도 된다. 또, 상기 융합 단백질에 있어서, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소는, 표적 분자 (10) 를 결합하는 분자의 N 말측과 C 말측 중 어느 것에 융합시켜도 된다.

[0073] 공정 (1) 에 있어서, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시키기 전에, 미리 검체 중의

ATP 를 제거하는 것이 바람직하다. 공정 (1) 에 있어서, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시키기 전에, 미리 검체 중의 ATP 를 제거함으로써, 후술하는 공정 (4) 에 있어서, 검체 중에 존재하는 ATP 에 의해, ATP 가 증폭되고, 의양성이 발생하는 것을 억제할 수 있어, 정확하게 검체 중의 표적 분자 (10) 를 검출할 수 있다.

[0074] 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체를 형성시키기 전에, 미리 검체 중의 ATP 를 제거하는 방법으로는, 검체 중의 ATP 를 제거할 수 있는 방법이면, 특별히 제한은 없지만, 예를 들어, 세정에 의해 ATP 를 제거하는 방법, 아데노신인산데아미나아제, 아피라아제, 헥소키나아제 등의 ATP 를 분해하는 효소를 작용시킴으로써, ATP 를 분해 제거하는 방법 등을 들 수 있다.

[0075] [공정 (2)]

[0076] 공정 (2) 는, 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자 (10) 와 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30) 를 제거하는 공정이다. 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자와 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30) 를 제거함으로써, 의양성의 발생을 억제할 수 있어, 정확하게 표적 분자를 검출할 수 있다. 또, 공정 (1) 에 있어서, 표적 분자와 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30) 이외에도, 표적 분자 (10) 이외의 검체 유래의 성분도 제거할 수 있다.

[0077] 공정 (2) 에 있어서, 표적 분자와 결합하지 않은 상기 표지화 결합 분자 (30) 를 제거하는 방법으로는, 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 세정, 원심 분리 등을 들 수 있지만, 세정이 바람직하다. 예를 들어, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체가 고정화되어 있는 불용성 담체를 세정액을 사용하여 세정하는 방법을 들 수 있다. 세정액으로는, PBS, 계면 활성제를 함유하는 PBS, 후술하는 수성 매체 등을 들 수 있다. 상기 계면 활성제로는, 예를 들어 트윈 (Tween) 20 등의 비이온성 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0078] [공정 (3)]

[0079] 공정 (3) 은, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질을 반응시켜 ATP 를 산생시키는 ATP 산생 공정이다.

[0080] 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질로는, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소에 따라 적절히 결정할 수 있다. 예를 들어, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 PPK 인 경우에는, 포스포에놀피루브산, 피로인산 및 AMP 를 들 수 있다. 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 아세틸-CoA 신테타아제 (Acetyl-CoA synthetase) 인 경우에는, AMP, 피로인산 및 아세틸-CoA 를 들 수 있다. 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 ATP 술폰릴라아제 (ATP-Sulfurylase) 인 경우에는, 아데노신5'-포스포술페이트 및 피로인산을 들 수 있다. 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 II 형 폴리인산키나아제인 경우에는, AMP 및 폴리인산을 들 수 있다. 또한, 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질과 상기 ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 반응은, 사용하는 효소에 따라 마그네슘 이온 등의 보인자 존재하에서 실시한다.

[0081] ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로서 PPK 로 표지한 표지화 결합 분자를 사용한 경우에는, 상기 공정 (1) 에서 생성한 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체에, 보인자로서의 마그네슘 이온 존재하, 포스포에놀피루브산, 피로인산 (PPi) 및 AMP 를 반응시킴으로써, 피루브산, 인산 (Pi) 및 ATP 가 산생된다. 이 산생된 ATP 를, 다음 공정 (4) 의 ATP 증폭 공정에 제공한다.

[0082] [공정 (4)]

[0083] 공정 (4) 는, 상기 공정 (3) 에서 산생된 ATP 를 증폭시키는 ATP 증폭 공정이다. ATP 를 증폭시키는 방법으로는, 특별히 제한은 없지만, ATP 를 증폭시키는 시약을 사용하는 방법이 바람직하다. ATP 를 증폭시키는 시약으로는, ATP 를 증폭시키는 효소와 그 기질을 들 수 있다. ATP 를 증폭시키는 효소와 그 기질을 사용하는 경우에는, ATP 를 증폭시키는 시약에는, 그 효소 반응에 필요한 보인자를 포함한다. ATP 를 증폭시키는 효소로는, 예를 들어, 아데닐산키나아제 (이하, AK 라고도 칭한다) 와 피루브산키나아제 (이하, PK 라고도 칭한다) 의 조합, AK 와 폴리인산키나아제의 조합, AK 와 크레아틴키나아제의 조합, AK 와 아세트산키나아제의 조합 등을 들 수 있지만, AK 와 PK 의 조합이 바람직하다.

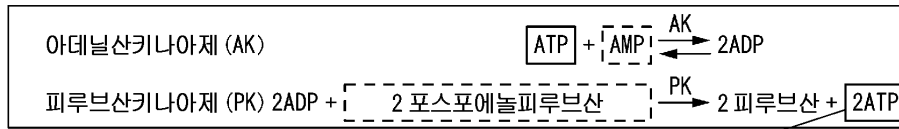
[0084] ATP 를 증폭시키는 효소의 기질 및 보인자로는, ATP 를 증폭시키는 효소에 따라 적절히 결정할 수 있다. 예를 들어, ATP 를 증폭시키는 효소가 AK 와 PK 의 조합인 경우에는, ATP 를 증폭시키는 효소의 기질로는, AMP 및 포스포에놀피루브산을 들 수 있고, 보인자로는 마그네슘 이온을 들 수 있다. ATP 를 증폭시키는 효소가 AK 와 폴리인산키나아제의 조합인 경우에는, ATP 를 증폭시키는 효소의 기질로는, AMP 및 폴리인산을 들 수 있고,

보인자로는 마그네슘 이온을 들 수 있다. ATP 를 증폭시키는 효소가 AK 와 크레아틴키나아제의 조합인 경우에는, ATP 를 증폭시키는 효소의 기질로는, AMP 및 크레아틴인산을 들 수 있고, 보인자로는 마그네슘 이온을 들 수 있다. ATP 를 증폭시키는 효소가 AK 와 아세틸산키나아제의 조합인 경우에는, ATP 를 증폭시키는 효소의 기질로는, AMP 및 아세틸인산을 들 수 있고, 보인자로는 마그네슘 이온을 들 수 있다.

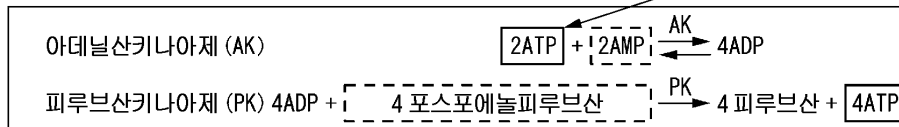
[0085] AK 와 PK 의 조합을 사용하여 ATP 를 증폭시키는 방법을, 하기의 반응식으로 나타낸다.

[0086] [화학식 2]

제 1 사이클

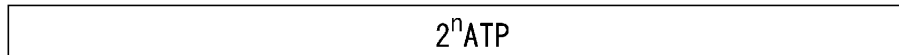


제 2 사이클



⋮

제 n 사이클



[0087]

[0088]

AK 와 PK 를 사용하는 ATP 의 증폭 방법에서는, 보인자로서의 마그네슘 이온의 존재하, AK 를 사용하여, 공정 (3) 에서 산생된 1 분자의 ATP 와, 1 분자의 AMP 로부터, 2 분자의 ADP 가 산생된다. 다음으로, 보인자로서의 마그네슘 이온의 존재하, PK 를 사용하여, 산생된 2 분자의 ADP 와 2 분자의 포스포에놀피루브산으로부터, 2 분자의 피루브산과 2 분자의 ATP 가 산생된다 (제 1 사이클). 제 1 사이클에서 산생된 2 분자의 ATP 를, 제 2 사이클에서 AK 와 PK 를 사용하는 반응계에 의해, 4 분자의 ATP 를 산생시킨다 (제 2 사이클). 이 사이클을 n 회 반복함으로써, 제 n 사이클에서는 2ⁿ 배로 ATP 가 증폭된다.

[0089]

공정 (4) 는, 상기 공정 (3) 과 동시에 실시해도 된다. 공정 (4) 를 공정 (3) 과 동시에 실시하는 경우에는, 공정 (3) 에 있어서, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체에, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질과, ATP 를 증폭시키는 시약을 첨가함으로써, ATP 의 산생과 ATP 의 증폭을 동시에 실시할 수 있다. 예를 들어, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 PPK 이고, AK 와 PK 를 사용하여, ATP 를 증폭시키는 경우, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체에, 포스포에놀피루브산, 피로인산 (PPi), AMP, AK, PK 및 마그네슘 이온을 첨가함으로써, ATP 의 산생과 증폭을 동시에 실시할 수 있다.

[0090]

[공정 (5)]

[0091]

공정 (5) 는, 상기 공정 (4) 에서 증폭된 ATP 를 검출하는 ATP 검출 공정이다. ATP 를 검출하는 방법으로는, 특별히 제한은 없지만, ATP 를 검출하는 시약을 사용하는 방법이 바람직하다. ATP 를 검출하는 시약으로는, ATP 와 반응하여 색소나 발광을 발생시키는 효소와 그 기질이나 ATP 와 반응하여 과산화수소를 산생하는 효소와 그 기질 등을 들 수 있다.

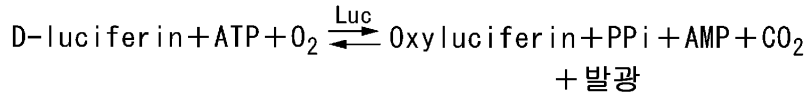
[0092]

ATP 를 검출하는 시약을 사용하는 방법으로는, 루시페라아제를 사용하여, ATP 와, D-루시페린에 의해 생성되는 발광을 측정하는 방법, ATP 를 검출하는 효소로서 글루코키나아제와 아세티트키나아제를 병용하여, ATP 와 글루코오스로부터 글루코오스-6-인산이 생성되는 반응을 증폭시키고, 추가로 글루코오스-6-인산데히드로게나아제, 및 디아포라아제를 조합하여 목시 가능한 정색 반응을 실시하는 방법 (일본 공개특허공보 2003-225098호), 핵소키나아제와 피루베이트키나아제를 병용하여, ATP 와 D-글루코오스로부터 글루코오스6-인산이 생성되는 반응을 증폭시키고, 1-메톡시-5-페나진메틸술페이트 및 이소루미놀을 사용한 화학 발광에 의해 정량하는 방법 (일본 공개특허공보 소64-23900호), ATP 에 뉴클레오시드포스포릴라아제와 크산틴옥시다아제를 첨가하여, 반응으로 생성되는 과산화수소를 정량하는 방법 (일본 공개특허공보 소63-11848호), ATP 에 ATP 분해 효소를 작용시켜, 생성된 인산과 몰리브덴의 반응에 의해 생성되는 몰리브덴청을 측정하는 방법 (일본 공개특허공보 평4-360700호 등), ATP 에, 니코틴산아미드모노뉴클레오티드와 아데닐트랜스페라아제를 작용시켜, 생성된 NAD 를, NAD 를 보효소로 하는 산화 환원 반응계와, 환원형 NAD 를 보효소로 하는 보효소 사이클링 반응을 실시하여 정량하는

방법 (일본 공개특허공보 소59-166099호) 등을 들 수 있지만, 루시페라아제를 사용하여, ATP 와, D-루시페린에 의해 생성되는 발광을 측정하는 방법이 바람직하다. 그 밖에, ATP 를 검출하는 방법으로서, 비색 또는 형광을 사용하여 ATP 양을 검출하는 시판되는 키트 (예를 들어, ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit, BioVision 사 제조) 를 사용할 수도 있다.

[0093] ATP 를 검출하는 효소로서 루시페라아제를 사용하여, 공정 (4) 에서 증폭된 ATP 와, D-루시페린에 의해 발광이 발생하는 반응식을 하기에 나타낸다.

[0094] [화학식 3]



PPi : 피로인산
Luc: 루시페라아제

[0095] 루시페라아제로는, 예를 들어, Photinus pyralis 등의 반딧불이나 클릭 비틀 등에서 유래하는 갑충 루시페라아제, 갑충 루시페라아제의 재조합체, 내열성 및/또는 내약품성을 부여한 갑충 루시페라아제의 변이체, 또는, ATP, 루시페린, 분자상 산소, 및 보인자로서의 마그네슘 혹은 다른 임의의 2 가 양이온과 반응하여 발광을 생성하는 임의의 루시페라아제를 사용할 수 있다. 또, 루시페라아제의 기질로는, D-루시페린 외에, 아미노루시페린이나 AkaLumine 등의 루시페린 아날로그를 사용할 수도 있다.

[0097] 공정 (5) 에 있어서의 ATP 의 검출 반응은, 공정 (3) 에 있어서의 ATP 산생 반응, 및 공정 (4) 에 있어서의 ATP 증폭 반응보다 반응 속도가 느리기 때문에, 공정 (5) 는, 공정 (3) 과 공정 (4) 와 동시에 실시해도 ATP 를 검출할 수 있다. 공정 (3) 과 공정 (4) 와 공정 (5) 를 동시에 실시하는 경우에는, 공정 (3) 에 있어서, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체에, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질을 첨가함과 동시에, ATP 를 증폭시키는 시약과, ATP 를 검출하는 시약을 첨가함으로써, ATP 의 산생과 증폭과 검출을 동시에 실시할 수 있다. 예를 들어, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소가 PPK 이고, ATP 의 증폭에 AK 와 PK 를 사용하고, 루시페라아제로 ATP 를 검출하는 경우, 공정 (3) 에 있어서, 상기 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체에, 포스포에놀피루브산, 피로인산, AMP, AK, PK, D-루시페린, 루시페라아제 및 보인자로서의 마그네슘 이온을 첨가함으로써, ATP 의 산생과 증폭과 검출을 동시에 실시할 수 있다.

[0098] 검체 대신에, 이미 알려진 농도의 표적 분자를 사용하여, 공정 (1) 내지 공정 (5) 를 실시함으로써, 표적 분자의 농도와 ATP 검출 공정에 있어서의 시그널의 관계를 나타내는 검량선을 작성하고, 작성된 검량선과, 검체를 사용하여, 공정 (1) 내지 공정 (5) 를 실시하고, 공정 (5) 에서 검출된 시그널의 측정값으로부터, 검체 중의 표적 분자의 농도를 정량할 수 있다.

[0099] 또, 이미 알려진 농도의 표적 분자를 사용하여, 공정 (1) 내지 공정 (5) 를 실시하고, ATP 의 검출 공정에 있어서의 시그널 발생으로부터의 시그널 강도의 경시 변화를 측정하여 시그널 강도의 증가 곡선을 작성하고, 검체를 사용하여, 공정 (1) 내지 공정 (5) 를 실시하고, 공정 (5) 에 있어서의 시그널 강도의 증가 곡선과의 커브 피팅을 실시함으로써, 검체 중의 표적 분자의 농도를 정량할 수도 있다.

[0100] 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법에 있어서, 공정 (1) 및 공정 (3) ~ 공정 (5) 는 수성 매체 중에서 실시하는 것이 바람직하다. 상기 수성 매체로는, 예를 들어, 탈이온수, 증류수, 완충액 등을 들 수 있고, 완충액이 바람직하다. 완충액의 조제에 사용되는 완충제로는, 완충능을 갖는 것이라면 특별히 한정되지 않지만, pH 1 ~ 11 의 예를 들어 락트산 완충제, 시트르산 완충제, 아세트산 완충제, 숙신산 완충제, 프탈산 완충제, 인산 완충제, 트리에탄올아민 완충제, 디에탄올아민 완충제, 리신 완충제, 바르비투르 완충제, 이미다졸 완충제, 말산 완충제, 옥살산 완충제, 글리신 완충제, 붕산 완충제, 탄산 완충제, 트리스 완충제, 굿 완충제 등을 들 수 있다.

[0101] 완충액의 농도는, 표적 분자의 검출에 적합한 농도이면 특별히 제한은 되지 않지만, 0.001 ~ 2.0 mol/L 가 바람직하고, 0.005 ~ 1.0 mol/L 가 보다 바람직하고, 0.01 ~ 0.1 mol/L 가 특히 바람직하다.

[0102] 다음으로, 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법에 의해 표적 분자를 검출 및 정량하는 조작 순서에 대해 설명한다. 도 2 는, ATP 의 증폭 공정과 ATP 의 검출 공정을 나누어 실시하는 경우의 표적 분자의 검출 방법의 조작 순서의 일례를 나타낸 도면이다.

- [0103] ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 나누어 실시하는 경우의 표적 분자의 검출 방법에 있어서는, 먼저, 검체와 표지화 결합 분자 (30)를 혼합하여, 얻어진 검체와 표지화 결합 분자 (30)의 혼합물을 포착 분자 (20)가 고정화된 불용성 담체 (40)상에 첨가한다. 그 결과, 불용성 담체 (40)상에 고정화된 포착 분자 (20)에, 표적 분자·표지화 결합 분자 복합체가 결합하여, 불용성 담체 (40)상에 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체가 형성된다. 다음으로, 불용성 담체 (40)를, 세정액을 사용하여 세정하여, 표적 분자 (10)와 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30)를 제거한다. 세정이 불충분한 경우에는, 세정을 반복한다. 세정이 충분하지는, 예를 들어, 세정액에 표적 분자 (10)에 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30)가 존재하는지의 여부에 의해 판단할 수 있다. 세정액에 표지화 결합 분자 (30)가 존재하지 않게 되면, 세정이 충분한 것으로 판단할 수 있다.
- [0104] 세정이 충분하면, 다음으로, ATP를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질과, ATP를 증폭시키는 시약과, ATP를 검출하는 효소와, 필요에 따라 상기 효소의 보인자를 포함하는 효소 반응액 (이하, 효소 반응액 1이라고도 칭한다)을 불용성 담체 (40)에 첨가하여, 표지화 결합 분자 (30)에 표지되어 있는 ATP를 산생하는 반응을 촉매하는 효소에 의해 산생된 ATP를, ATP를 증폭시키는 시약에 의해 증폭시킨다. ATP산생 반응 및 ATP 증폭 반응에 충분한 시간이 경과한 경우에는, ATP검출 공정으로 진행한다. ATP산생 반응 및 ATP 증폭 반응에 충분한 시간이 경과하지 않아, ATP의 증폭량이 불충분한 경우에는, 반응 시간을 연장한다. ATP의 증폭량이 충분한지의 여부는, 증폭된 ATP를 검출할 수 있는지의 여부로 판단할 수 있다.
- [0105] ATP의 산생 반응 및 증폭 반응 시간이 충분하여, 검출하기에 충분한 양의 ATP가 증폭된 경우에는, ATP를 검출하기 위한 기질 (이하, 효소 반응액 2라고도 칭한다)을 첨가하고, 발생하는 시그널을 측정한다. 예를 들어, 발생하는 시그널이 발광이면, 발광 시그널 강도를 측정한다. 발생하는 시그널 강도가 일정한 임계값을 초과한 경우에는, 검체 중에 표적 분자 (10)가 포함되어 있는 것으로 판정할 수 있다. 발생하는 시그널 강도가 일정한 임계값을 초과하지 않는 경우에는, 검체 중에 표적 분자 (10)가 포함되어 있지 않은 것으로 판정할 수 있다. 검체에 표적 분자 (10)가 포함되어 있는 것으로 판정하는 시그널 강도의 임계값은, 검출의 목적이나 검출 감도 등에 따라 적절히 설정할 수 있다.
- [0106] 도 3은, ATP의 증폭 공정과 검출 공정을 동시에 실시하는 경우의 표적 분자의 검출 방법의 조작 순서의 일례를 나타내는 도면이다.
- [0107] ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 동시에 실시하는 경우의 표적 분자의 검출 방법에 있어서는, 불용성 담체 (40)를, 세정액을 사용하여 세정하여, 표적 분자 (10)와 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30)를 제거하는 공정까지는, 상기 ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 나누어 실시하는 경우와 동일하다. ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 동시에 실시하는 경우에는, 불용성 담체 (40)의 세정 후, 효소 반응액 1과 효소 반응액 2를 불용성 담체 (40)에 첨가하여, 표지화 결합 분자 (30)에 표지되어 있는 ATP를 산생하는 반응을 촉매하는 효소에 의해 산생된 ATP를 증폭시키는 반응과 동시에 증폭된 ATP를 검출하는 반응을 실시한다. 반응에 충분한 시간이 경과한 경우에는, 반응으로 발생한 시그널을 측정한다. 반응에 충분한 시간이 경과하지 않아, ATP의 검출량이 불충분한 경우에는, 반응 시간을 연장한다. 반응 시간이 충분한지의 여부는, 반응으로 발생한 시그널의 강도로 판단할 수 있다.
- [0108] 반응 시간이 충분하여, 시그널이 발생하는 경우에는, 시그널 강도를 측정한다. 발생하는 시그널 강도가 일정한 임계값을 초과한 경우에는, 검체 중에 표적 분자 (10)가 포함되어 있는 것으로 판정할 수 있다. 발생하는 시그널 강도가 일정한 임계값을 초과하지 않는 경우에는, 검체 중에 표적 분자 (10)가 포함되어 있지 않은 것으로 판정할 수 있다.
- [0109] 도 4는, ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 동시에 실시하는 경우의 표적 분자의 정량 방법의 조작 순서의 일례를 나타내는 도면이다.
- [0110] ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 동시에 실시하는 경우의 표적 분자의 정량 방법에 있어서는, 불용성 담체 (40)를, 세정액을 사용하여 세정하여, 표적 분자 (10)와 결합하지 않은 표지화 결합 분자 (30)를 제거하는 공정까지는, 상기 ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 나누어 실시하는 표적 분자의 검출 방법의 경우와 동일하다. ATP의 증폭 공정과 ATP의 검출 공정을 동시에 실시하는 표적 분자의 정량 방법의 경우에는, 불용성 담체 (40)의 세정 후, 효소 반응액 1과 효소 반응액 2를 불용성 담체 (40)에 첨가하여, 표지화 결합 분자 (30)에 표지되어 있는 ATP를 산생하는 반응을 촉매하는 효소에 의해 산생된 ATP를 증폭시킴과 동시에 증폭된 ATP를 검출하는 반응을 실시하여, ATP검출 반응으로 발생한 시그널의 강도의 시그널 발생 개시 시간부터의 경시 변화를 측정한다. 반응에 충분한 시간이 경과하지 않아, 시그널 강도가 정량에 불충분한 경우에

는, 반응 시간을 연장한다.

- [0111] 반응 시간이 충분하여, 시그널 강도가 정량에 충분한 경우에는, 미리 이미 알려진 농도의 표적 분자를 사용하여 동일하게 시그널을 발생시켜 작성해 둔, 시그널 강도의 경시 변화 데이터와의 피팅을 실시하여, 검체 중에 포함되는 표적 분자의 양을 산출한다.
- [0112] 다음으로, 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법을 사용한 이뮤노크로마토그래피의 구체예에 대해 설명한다. 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법을 사용한 이뮤노크로마토그래피는, ELISA 법에서 널리 사용되고 있는 장치를 사용할 수 있다.
- [0113] 도 5a 에, 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법을 사용한 이뮤노크로마토그래피의 구성예의 측면도를 나타낸다. 도 5b 에, 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법을 사용한 이뮤노크로마토그래피의 구성예의 상면도를 나타낸다. 본 실시형태의 표적 분자의 검출 방법을 사용한 이뮤노크로마토그래피는, 검체 첨가부 (50), 제 1 시약 수용부 (51), 제 2 시약 수용부 (52), 유로 (53), 혼합/반응부 (54), 검출부 (55) 및 폐액 수용부 (56) 로 구성되어 있다. 제 1 시약 수용부 (51) 에는, 표지화 결합 분자 (30) (이하, 시약 1 이라고도 칭한다) 가 수용되어 있다. 제 2 시약 수용부 (52) 에는, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질, ATP 를 증폭시키는 시약 및 ATP 를 검출하는 효소 (이하, 시약 2 라고도 칭한다) 가 수용되어 있다. 혼합/반응부 (54) 에는, 포착 분자 (20) 가 고정화된 불용성 담체 (40) 가 수용되어 있다. 또한, 혼합/반응부 (54) 는, 검출부 (55) 를 결합 수도 있다.
- [0114] 먼저, 검체는, 피펫 등을 사용하여 검체 첨가부 (50) 에 첨가되고, 유로 (53) 에 송액된다. 검체의 송액은, 기계를 사용한 자동 송액을 사용할 수도 있다. 자동 송액은, 예를 들어, 펌프나 롤러로 탄성 용기에 밖에서 힘을 가하여 송액을 실시하는 카트리지를 사용하여 실시할 수도 있다. 도 5a, 도 5b 에서는, 롤러 (57) 를 사용한 송액의 예를 나타내고 있다.
- [0115] 다음으로, 제 1 시약 수용부 (51) 에 수용되어 있는 시약 1 이 롤러 (57) 에 의해 유로 (53) 에 송액되고, 검체와 혼합되어, 표적 분자·표지화 결합 분자 복합체가 형성되고, 혼합/반응부 (54) 에 공급된다. 혼합/반응부 (54) 에 공급된 표적 분자·표지화 결합 분자 복합체는, 혼합/반응부 (54) 에 수용되어 있는 불용성 담체 (40) 에 고정화되어 있는 포착 분자 (20) 에 포착되고, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체가 불용성 담체 (40) 상에 형성된다.
- [0116] 이어서, 혼합/반응부 (54) 를 세정액으로 세정한 후, 제 2 시약 수용부 (52) 에 수용되어 있는 시약 2 가 롤러 (57) 에 의해 유로 (53) 를 통하여 혼합/반응부 (54) 에 송액되고, 혼합/반응부 (54) 에 수용되어 있는 불용성 담체 (40) 상에 고정화되어 있는 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체에 첨가되고, ATP 가 산생되고, 증폭된다. 다음으로, 혼합/반응부 (54) 에 ATP 를 검출하는 기질을 첨가하면, 증폭된 ATP 와 ATP 를 검출하는 효소와 ATP 를 검출하는 효소의 기질이 반응하여 시그널이 발생한다. 발생한 시그널은, 검출부 (55) 에서 시그널에 따른 검출기에 의해 측정된다. 상기 검출기로는, 플레이트 리더, 루미노미터, 광전자 증배관 (PMT), 전하 결합 소자 (CCD), CMOS, 감광 소재 (사진 필름, 인스턴트 필름, 인화지 등) 등을 들 수 있다. 시그널 측정 후의 반응액이나 세정액은, 폐액 수용부 (56) 에 수용되고, 폐기된다.
- [0117] 다음으로, 롤러로 탄성 용기에 밖에서 힘을 가하여 송액을 실시하는 카트리지를 사용하여, 표적 분자 (10) 로서 바이러스, 표지화 결합 분자 (30) 로서 PPK 표지화 VHH 항체, 포착 분자 (20) 로서 DNA 압타머, 불용성 담체 (40) 로서 시클로올레핀 폴리머 (COP), ATP 를 증폭시키는 효소로서 AK 와 PK 의 조합, ATP 를 검출하는 효소로서 루시페라아제, ATP 를 검출하는 기질로서 D-루시페린을 각각 사용한 이뮤노크로마토그래피의 구성예와 동작의 일례를, 도 6 을 사용하여 설명한다.
- [0118] (1) 검체 첨가
- [0119] 검체가 검체 첨가부 (50) 로부터 카트리지에 첨가된다. 도 6 에서는, 검체로서 바이러스를 포함하는 타액을 예로서 나타내고 있다.
- [0120] (2) 바이러스·PPDK 표지화 VHH 항체 복합체의 형성
- [0121] 검체와, 제 1 시약 수용부 (51) 에 수용되어 있는 PPK 표지화 VHH 항체 (시약 1) 가 롤러 (57) 에 의해 송액되고, 검체와 PPK 표지화 VHH 항체가 혼합된다. PPK 표지화 VHH 항체는 검체 중의 바이러스와 복합체를 형성한다.

- [0122] (3) DNA 압타머의 바이러스·PPDK 표지화 VHH 항체 복합체의 포착
- [0123] 바이러스·PPDK 표지화 VHH 항체 복합체는, 불용성 담체 (40) 에 고정화된 포착 분자 (20) 인 DNA 압타머에 포착되고, 바이러스·PPDK 표지화 VHH 항체·DNA 압타머 복합체가 형성된다.
- [0124] (4) 세정
- [0125] 롤러 (57) 로 세정액 수용부 (58) 에 수용되어 있는 세정액을 송액하고, 혼합/반응부 (54) 에 수용되어 있는 COP 상에 형성되어 있는 바이러스·PPDK 표지화 VHH 항체·DNA 압타머 복합체를 세정한다. 세정은 복수회 실시한다. 이 세정에 의해, 검체 중의 ATP 나 바이러스와 결합하지 않은 PPDK 표지화 VHH 항체가 제거된다.
- [0126] (5) 시약 2 의 첨가
- [0127] 제 2 시약 수용부 (52) 에 수용되어 있는 포스포에놀피루브산, 피로인산 (PPi), AMP, AK, PK 및 루시페라아제 (Luc) 를 포함하는 시약 2 를 롤러 (57) 로 혼합/반응부 (54) 에 송액한다.
- [0128] (6) ATP 의 산생과 증폭
- [0129] 시약 2 와 COP 상에 형성되어 있는 바이러스·PPDK 표지화 VHH 항체·DNA 압타머가 반응하여, ATP 의 산생과 ATP 의 증폭이 발생한다. 반응이 충분히 진행될 때까지 정지 (靜置) 한다.
- [0130] (7) ATP 를 검출하는 효소의 기질의 첨가
- [0131] 혼합/반응부 (54) 에 ATP 를 검출하는 효소인 루시페라아제의 기질인 D-루시페린을 첨가한다. D-루시페린을 첨가하면, 시약 2 중의 루시페라아제와, 증폭된 ATP 와, D-루시페린이 반응하여, 발광 시그널이 발생한다.
- [0132] (8) 발광 시그널의 검출
- [0133] (7) 에서 발생한 발광 시그널을 광전자 증배관 (PMT), 전하 결합 소자 (CCD), CMOS 등의 검출기를 사용하여 측정한다. 발광 시그널이 미리 설정한 임계값보다 높은 경우, 검체 (타액) 중에 바이러스가 존재하는 것으로 판정할 수 있다. 발광 시그널이 미리 설정한 임계값보다 낮은 경우, 검체 (타액) 중에 바이러스가 존재하지 않는 것으로 판정된다.
- [0134] 다음으로, 본 실시형태의 표적 분자를 검출하는 키트에 대해 설명한다.
- [0135] 본 실시형태의 표적 분자를 검출하는 키트는, 본 실시형태의 표적 분자를 검출하는 방법에 사용되는 키트로서, 포착 분자, 표지화 결합 분자, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질, ATP 를 증폭시키는 시약, 및 ATP 를 검출하는 시약을 포함한다.
- [0136] 본 실시형태의 표적 분자를 검출하는 키트에 있어서의, 포착 분자, 표지화 결합 분자, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질, ATP 를 증폭시키는 시약, 및 ATP 를 검출하는 시약으로는, 각각 전술한 본 실시형태의 표적 분자를 검출하는 방법에서 예시된, 포착 분자, 표지화 결합 분자, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질, ATP 를 증폭시키는 시약, 및 ATP 를 검출하는 시약을 들 수 있다.
- [0137] 본 실시형태의 키트는, 본 실시형태의 표적 분자를 검출하는 방법에 의해, 표적 분자를 검출하기 위해 필요한 시약 및 장치를 추가로 포함하고 있어도 된다.
- [0138] 본 실시형태의 키트는, 포착 분자, 표지화 결합 분자, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질, ATP 를 증폭시키는 시약, 및 ATP 를 검출하는 시약 외에, 기관 등의 불용성 담체를 포함하고 있어도 된다. 이와 같은 키트의 경우, 기관 등의 불용성 담체 (40) 에 포착 분자 (20) 를 고정화시킨다. 포착 분자 (20) 를 고정화시킨 불용성 담체 (40) 를 포함하는 키트로는, 상기 도 5 에서 나타낸, 검체 첨가부 (50), 제 1 시약 수용부 (51), 제 2 시약 수용부 (52), 유로 (53), 혼합/반응부 (54), 검출부 (55) 및 폐액 수용부 (56) 로 구성되어 있는 카트리지가, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로 표지된 표지화 결합 분자 (30), ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질, ATP 를 증폭시키는 시약, 및 ATP 를 검출하는 시약을 포함하는 키트를 들 수 있다. 제 1 시약 수용부 (51) 에는, 표지화 결합 분자 (30) (시약 1) 를 수용할 수 있다. 제 2 시약 수용부 (52) 에는, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소의 기질과, ATP 를 증폭시키는 시약과, ATP 를 검출하는 효소를 포함하는 시약 (시약 2) 을 수용할 수 있다. 혼합/반응부 (54) 에는, 포착 분자 (20) 가 고정화된 불용성 담체 (40) 가 수용되어 있다. 또한, 제 1 시약 수용부 (51), 제 2 시약 수용부 (52) 에는, 각각 시약 1, 시약 2 를 미리 수용해 두어도 된다.

- [0139] 이와 같은 키트의 경우, 검체는, 피펫 등을 사용하여 검체 첨가부 (50) 에 첨가되고, 유로 (53) 에 송액된다. 송액은, 기계를 사용한 자동 송액을 사용할 수도 있다. 자동 송액은, 예를 들어, 펌프나 롤러로 탄성 용기에 밖에서 힘을 가하여 송액을 실시할 수도 있다.
- [0140] 본 실시형태의 키트는, 추가로, 필요한 완충액, 효소 반응 정지액, 플레이트 리더나 루미노미터 등의 검출기, 제품 설명서 등을 포함하고 있어도 된다.
- [0141] 다음으로, 본 실시형태의 키트의 사용 방법의 일례에 대해 설명한다.
- [0142] 먼저, 제 1 시약 수용부 (51) 에 수용되어 있는 시약 1 을 롤러 (57) 에 의해 유로 (53) 에 송액하고, 검체와 혼합하여, 표적 분자·표지화 결합 분자 복합체를 형성하고, 혼합/반응부 (54) 에 공급한다. 혼합/반응부 (54) 에 공급된 표적 분자·표지화 결합 분자 복합체는, 혼합/반응부 (54) 에 수용되어 있는 불용성 담체 (40) 에 고정화되어 있는 포착 분자 (20) 에 포착되고, 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체가 불용성 담체 (40) 상에 형성된다.
- [0143] 이어서, 혼합/반응부 (54) 를 세정액으로 세정한 후, 제 2 시약 수용부 (52) 에 수용되어 있는 시약 2 를 롤러 (57) 에 의해 유로 (53) 를 통하여 혼합/반응부 (54) 에 송액한다. 다음으로, 혼합/반응부 (54) 에 수용되어 있는 불용성 담체 (40) 상에 형성되어 있는 표적 분자·표지화 결합 분자·포착 분자 복합체에 시약 2 를 첨가하고, ATP 를 산생하고, 증폭시킨다. 다음으로, 혼합/반응부 (54) 에 ATP 를 검출하는 기질을 첨가하고, 증폭된 ATP 와 ATP 를 검출하는 효소와 ATP 를 검출하는 효소의 기질을 반응시켜 시그널을 발생시킨다. 발생한 시그널을, 검출부 (55) 에서 시그널에 따른 검출기에 의해 측정한다. 상기 검출기로는, 플레이트 리더나 루미노미터 등을 들 수 있다. 시그널 측정 후의 반응액이나 세정액은, 폐액 수용부 (56) 에 수용하고, 폐기한다.
- [0144] 본 발명의 적용 범위는 상기 실시형태에 한정되는 것은 아니다. 본 발명은, 면역 측정 방법에 의해 검체에 포함되는 표적 분자를 검출하는 방법 및 키트에 대해 널리 적용할 수 있다.
- [0145] 실시예
- [0146] 이하, 실시예에 기초하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0147] (실시예 1)
- [0148] ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소를 단독으로 사용한 경우와, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여 사용한 경우의 시그널 강도를 비교하였다. ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소로는, PPDK 를 사용하였다. ATP 를 증폭시키는 효소로는, AK 및 PK 를 사용하였다. ATP 를 검출하는 시약으로는, 갑충 루시페라아제와, 그 기질을 사용하였다. 이하에 본 실시예에서 사용한 시약을 나타낸다.
- [0149] · 피루브산인산디키나아제 (PPDK, BioVision 사 제조)
- [0150] · 아데닐산키나아제 (AK, Sigma 사 제조)
- [0151] · 피루브산키나아제 (PK, Sigma 사 제조)
- [0152] · 갑충 루시페라아제 (Luc, Sigma 사 제조)
- [0153] · AMP (후지 필름 와코 순약사 제조)
- [0154] · 피로인산 (PPi, 후지 필름 와코 순약사 제조)
- [0155] · D-루시페린 (후지 필름 와코 순약사 제조)
- [0156] · 포스포에놀피루브산 (PEP, 후지 필름 와코 순약사 제조)
- [0157] · ATP (후지 필름 와코 순약사 제조)
- [0158] · MgCl₂ (후지 필름 와코 순약사 제조)
- [0159] 다음으로, 이들 시약을 이하의 표 1 에 나타내는 최종 농도가 되도록 PBS (pH 7.4) 에 용해시켜, 샘플 번호 1 ~ 7 의 샘플을 조제하였다.

표 1

샘플 번호	시약																	
	10 μg/ml PPDK	1mM PPI	1mM PEP	1mM AMP	10 μg/ml PK	10 μg/ml AK	10 μg/ml Luc	10mM MgCl ₂	20 μM ATP	10 μg/ml PPDK	1mM PPI	1mM PEP	1mM AMP	10 μg/ml PK	10 μg/ml AK	10 μg/ml Luc	10mM MgCl ₂	
1																		
2																		
3	20 μM ATP																	
4																		
5																		
6	20 μM ATP																	
7																		

[0160]

[0161]

각 샘플은 96 웰 플레이트 (피킨엘머사 제조) 의 각 웰 내에 있어서, 각각 50 μl 가 되도록 조제하였다 (N = 4). 샘플 조제 후, ATP 산생 반응 및 ATP 증폭 반응을 진행시키기 위해, 실온에서 10 분간 인큐베이트하였다. 인큐베이트 후, 최종 농도 2 mM 이 되도록 D-루시페린을 첨가하고, 각 샘플의 발광 강도를, 멀티 모드 플레이트 리더 Envision (피킨엘머사 제조) 을 사용하여 측정하였다. 발광 강도의 측정은, 96 웰 플레이트의 각 웰당 1 초간의 발광량 (count per sec ; cps) 을 측정하는 방법으로 실시하였다. 그 결과를 도 7 에 나타낸다.

[0162]

도 7 에 나타내는 바와 같이, PPDK 를 단독으로 사용하고, AK 와 PK 를 사용한 ATP 증폭 반응을 실시하지 않은 경우의 샘플 번호 4 및 샘플 번호 5 의 샘플의 발광 강도의 평균값은, 각각 152520, 28410 이었다. 그에 반해, PPDK 에, AK 와 PK 를 사용한 ATP 증폭 반응을 조합하여 사용한 경우의 샘플 번호 1 및 샘플 번호 2 의 샘플의 발광 강도의 평균값은, 각각 4952945, 3451598 이었다. 샘플 번호 1 의 샘플은, 샘플 번호 4 의 샘플의 32.5 배, 샘플 번호 2 의 샘플은, 샘플 번호 5 의 샘플의 121.5 배의 발광 강도를 나타내고 있어, PPDK 가

보다 저농도인 조건에 있어서, ATP 산생 반응과 ATP 증폭 반응의 조합이 시그널 증강에 유리하게 작용하는 것이 나타났다.

[0163] 이상으로부터, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소를 단독으로 사용하는 방법과 비교하여, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여 사용하는 본 발명의 방법이, ATP 의 검출에 있어서 현저한 효과를 갖는 것이 나타났다. 또한, ATP 를 산생하는 반응을 촉매하는 효소인 PPK의 양이 적은 경우에 시그널 증강의 효율이 높아지기 때문에, 표적 분자에 결합하는 표지화 결합 분자의 양이 적은 경우, 즉, 표적 분자가 적은 경우에도, 본 발명의 표적 분자의 검출 방법은, 표적 분자를 검출할 수 있는 것으로 생각된다.

[0164] (실시예 2)

[0165] PPK 로 표지한 항 BSA-낙타과 동물 항체의 중사슬 가변 영역 항체 (이하, PPK 표지 항 BSA-VHH 항체라고도 칭한다) 를 사용하여, BSA 의 검출을 실시하고, PPK 표지 항 BSA-VHH 항체를 단독으로 사용한 경우와, PPK 표지 항 BSA-VHH 항체와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여 사용한 경우의 시그널 강도를 비교하였다. ATP 를 증폭시키는 효소로는 AK 및 PK 를 사용하였다. BSA 를 검출하는 시약으로는, 갑충 루시페라아제와, 그 기질을 사용하였다. 이하에 본 실시예에서 사용한 시약을 나타낸다.

[0166] · PPK 표지 항 BSA-VHH 항체 (RePHAGEN 사 제조)

[0167] · 비오틴 표지 항 BSA 항체 (ITEA 사 제조)

[0168] · 아데닐산키나아제 (AK, 니프로사 제조)

[0169] · 피루브산키나아제 (PK, 니프로사 제조)

[0170] · 갑충 루시페라아제 (Luc, Sigma 사 제조)

[0171] · AMP (후지 필름 와코 순약사 제조)

[0172] · 피로인산 (PPi, 후지 필름 와코 순약사 제조)

[0173] · D-루시페린 (후지 필름 와코 순약사 제조)

[0174] · 포스포에놀피루브산 (PEP, 후지 필름 와코 순약사 제조)

[0175] · MgCl₂ (후지 필름 와코 순약사 제조)

[0176] 상기의 시약을 사용하여, 이하의 순서로 BSA 를 검출하였다.

[0177] (1) 플레이트의 준비

[0178] Nunc Immobilizer Streptavidin F96 Black 플레이트 (Thermo 사 제조) 를 플레이트 워셔 Wellwash Versa (Thermo 사 제조) 를 사용하여, 300 μl 의 PBS 로 3 회 세정하였다. 다음으로, 1 μg/ml 로 조제한 비오틴 표지 항 BSA 항체를 각 웰에 100 μl 씩 첨가하고, 실온에서 1 시간 인큐베이트하였다. 각 웰 내의 비오틴 표지 항 BSA 항체 용액을 제거한 후, 플레이트 워셔를 사용하여, 300 μl 의 PBS 로 3 회 세정하였다.

[0179] (2) 샘플의 첨가

[0180] 1 μg/ml 의 BSA 용액을 각 웰에 50 μl 씩 첨가하고 (N = 3), 실온에서 1 시간 인큐베이트하였다. 또, PBS (컨트롤) 도 마찬가지로 각 웰에 50 μl 씩 (N = 3) 첨가하였다. 각 웰로부터 BSA 용액 또는 PBS 를 제거한 후, 각 웰을 300 μl 의 PBS 로 3 회 세정하였다. 다음으로, PBS 로 1 μg/ml 로 희석시킨 PPK 표지 항 BSA-VHH 항체 용액을 각 웰에 50 μl 씩 첨가하고, 실온에서 1 시간 인큐베이트하였다. 각 웰로부터 PPK 표지 항 BSA-VHH 항체 용액을 제거한 후, 플레이트 워셔를 사용하여, 각 웰을 300 μl 의 PBS 로 4 회 세정하였다.

[0181] (3) 시그널 검출

[0182] 각 웰에 종농도 10 μg/ml 로 조제한 AK 를 5 μl 씩 첨가한 후, 종농도 10 μg/ml 로 조제한 PK 효소액을 10 μl 씩 첨가하였다. 다음으로, 각 웰에 PBS 를 10 μl 씩 첨가한 후, 시약 A (1 mM PPi, 1 mM PEP, 1 mM AMP, 10 mM MgCl₂ 를 포함하는 PBS) 를 8 연 피펫터로 25 μl 씩 첨가하였다.

[0183] 상기에서 얻어진 96 웰 플레이트를 루미노미터 GloMAX navigator (Promega 사 제조) 에 세트하고, 15 분간 정치하였다. 각 웰에 시약 B (5 $\mu\text{g/ml}$ Luc, 200 μM D-루시페린을 포함하는 PBS) 를 루미노미터의 펌프로 50 μl 씩 첨가하고, 첨가 후 곧바로 각 샘플의 발광 강도를 측정하였다. 발광 강도의 측정은, 96 웰 플레이트의 각 웰당 1 초간의 발광량 (counts/second ; cps) 을 측정하는 방법으로 실시하였다. 측정 결과를 도 8 에 나타낸다.

[0184] 도 8 에 나타낸 바와 같이, PPKD 표지 항 BSA-VHH 항체를 단독으로 사용한 경우의 발광 강도는, 평균으로 1226 cps 로, ATP 의 증폭을 실시하지 않은 경우의 네거티브 컨트롤의 발광 강도인 1187 cps 와 비교하여, 차는 미소하였다. 한편, PPKD 표지 항 BSA-VHH 항체와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여 사용한 경우의 발광 강도는 19290 cps 가 되어, ATP 의 증폭을 실시한 경우의 네거티브 컨트롤의 발광 강도인 3409 cps 와 비교하여, 발광 강도는 크게 증폭되었다. PPKD 표지 항 BSA-VHH 항체와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여 사용한 경우와, PPKD 표지 항 BSA-VHH 항체를 단독으로 사용한 경우에 대해, ATP 의 증폭을 실시한 경우의 네거티브 컨트롤의 발광 강도와, ATP 의 증폭을 실시하지 않은 경우의 네거티브 컨트롤의 발광 강도를 백그라운드로서 각각 감소한 발광 강도의 그래프를 도 9 에 나타낸다.

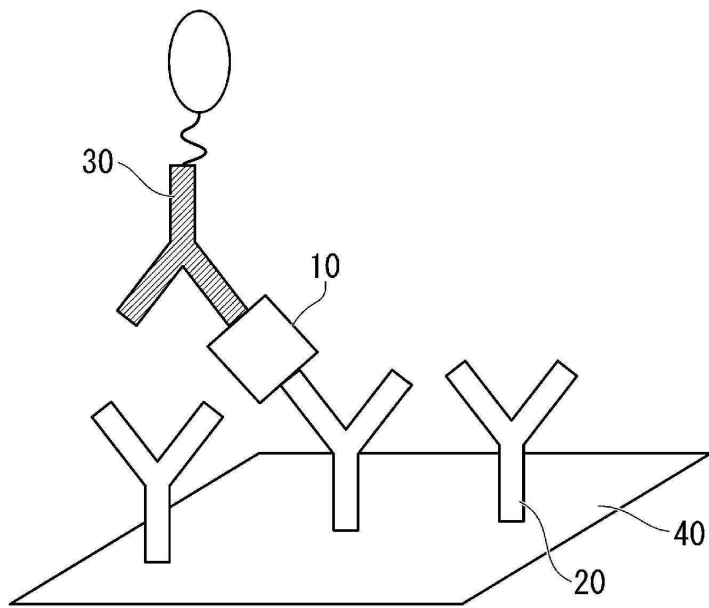
[0185] 도 9 에 나타낸 바와 같이, PPKD 표지 항 BSA-VHH 항체를 단독으로 사용하고, ATP 의 증폭을 실시하지 않은 경우와 비교하여, PPKD 표지 항 BSA-VHH 항체와 ATP 를 증폭시키는 시약을 조합하여, ATP 의 증폭을 실시한 경우에는, 발광 강도가 크게 증가되는 것을 알 수 있었다. 이상으로부터, 본 발명의 방법이, 샘플 중에 포함되는 표적 분자의 검출에 있어서 현저한 효과를 갖는 것이 나타났다. 표적 분자가 적고, ATP 산생 효소로 표지된 항체를 단독으로 사용한 경우에는 시그널 검출이 곤란한 경우에도, 본 발명의 표적 분자의 검출 방법은, 시그널을 증폭시킴으로써 표적 분자를 검출할 수 있는 것으로 생각된다.

부호의 설명

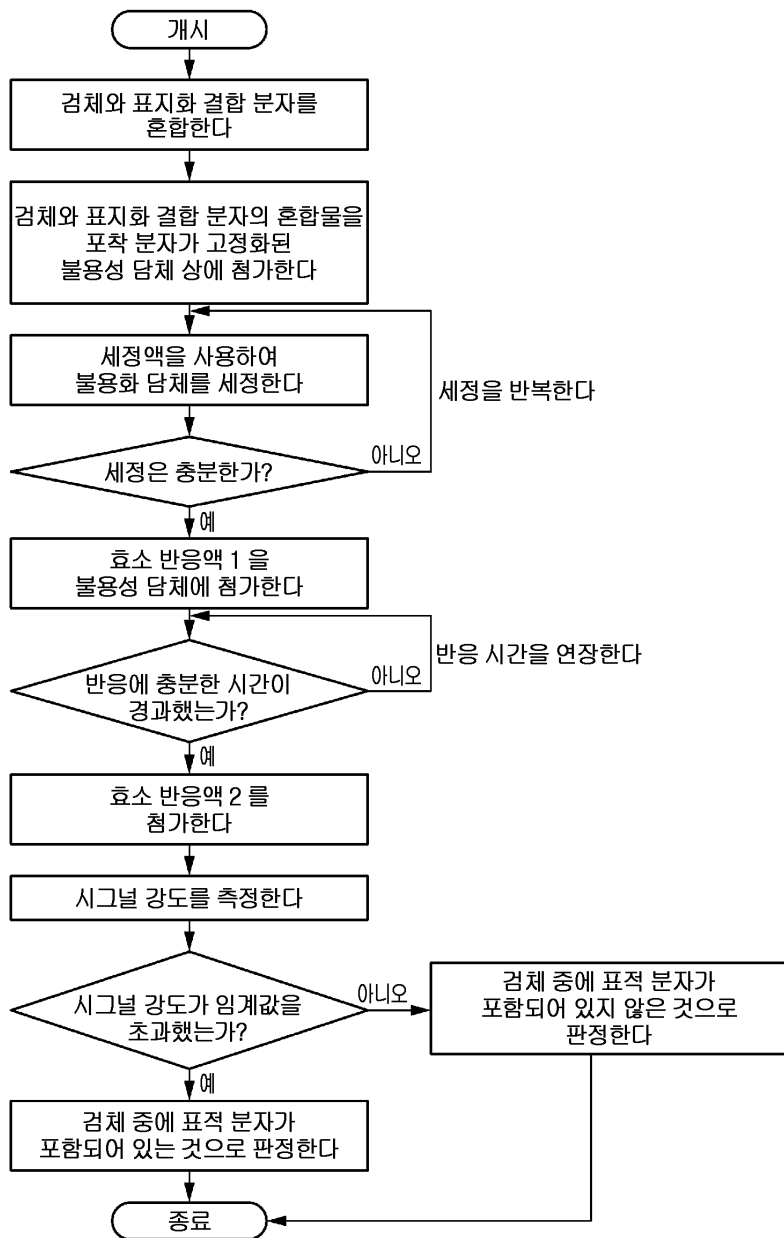
- [0186] 10 : 표적 분자
- 20 : 포착 분자
- 30 : 표지화 결합 분자
- 40 : 불용성 담체
- 50 : 검체 첨가부
- 51 : 제 1 시약 수용부
- 52 : 제 2 시약 수용부
- 53 : 유로
- 54 : 혼합/반응부
- 55 : 검출부
- 56 : 폐액 수용부
- 57 : 롤러
- 58 : 세정액 수용부

도면

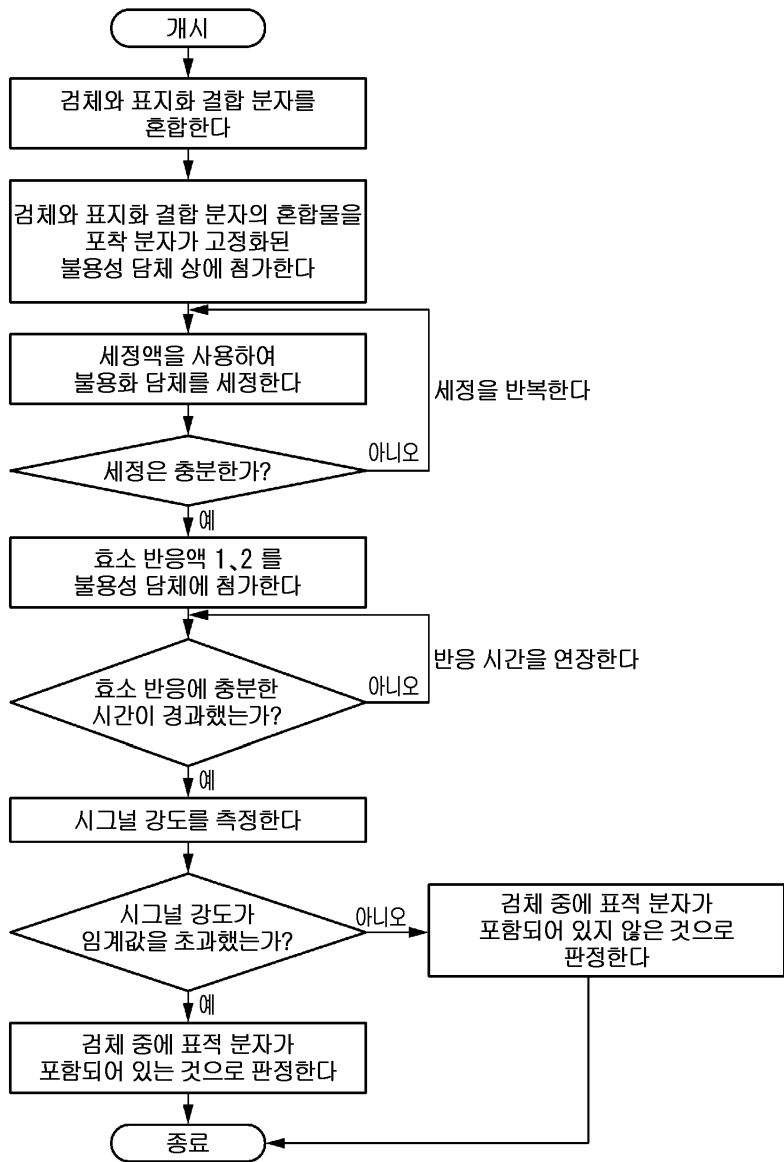
도면1



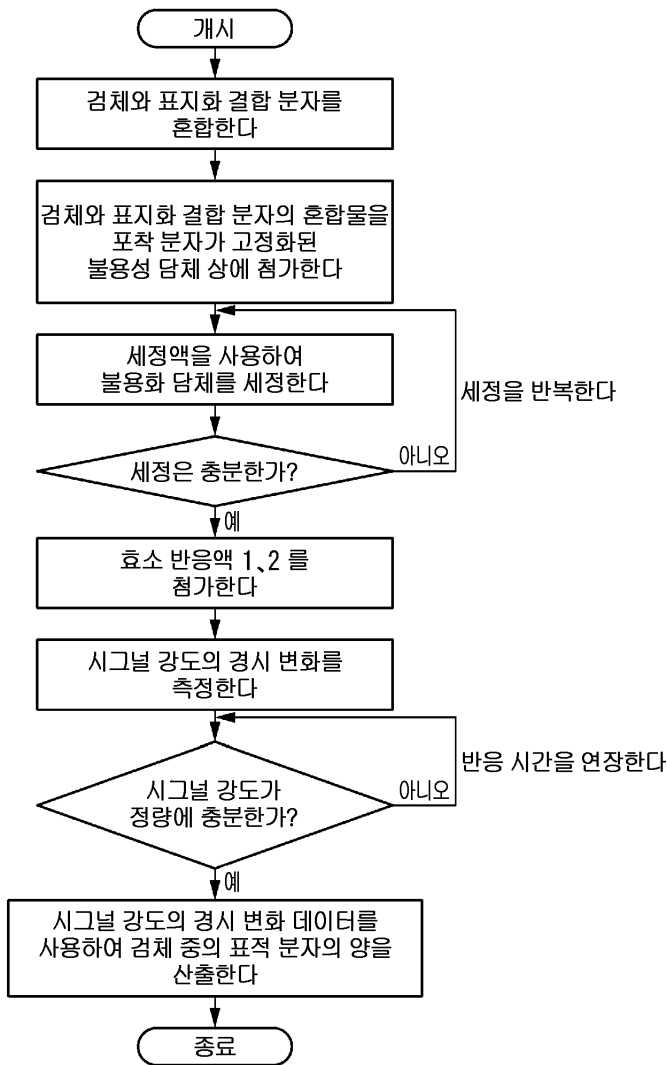
도면2



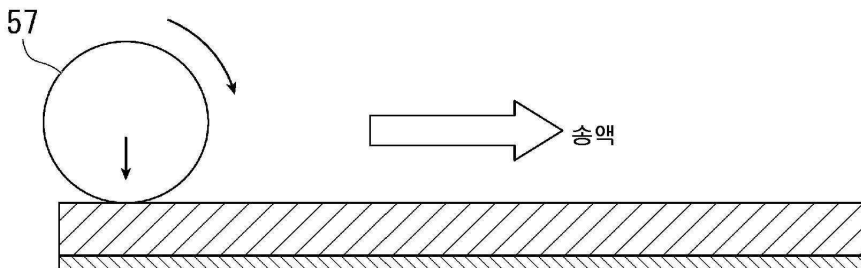
도면3



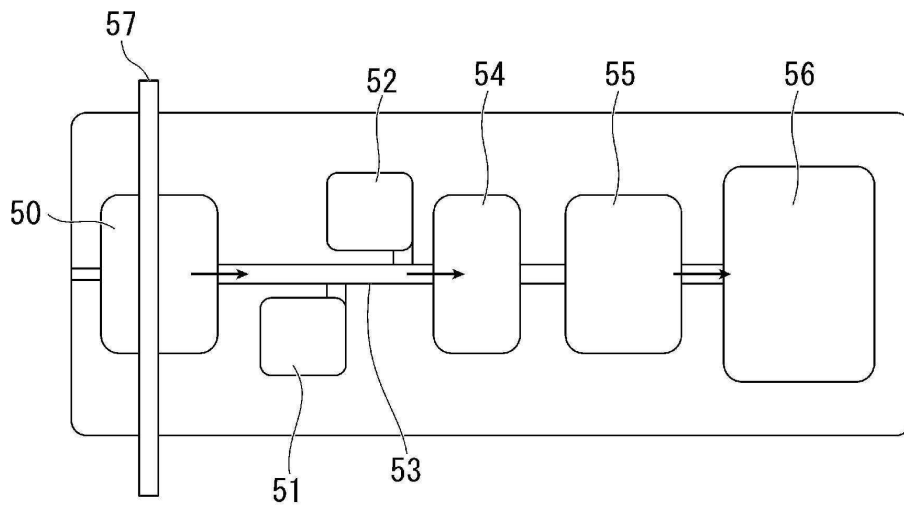
도면4



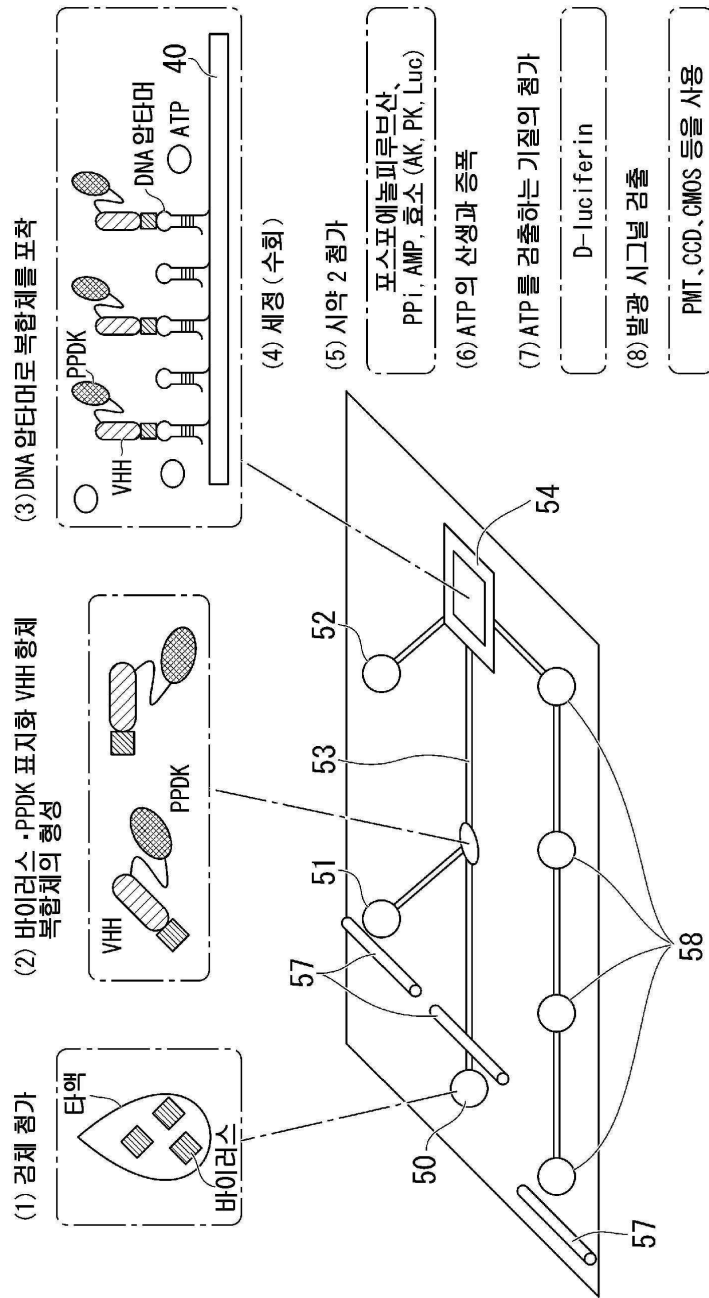
도면5a



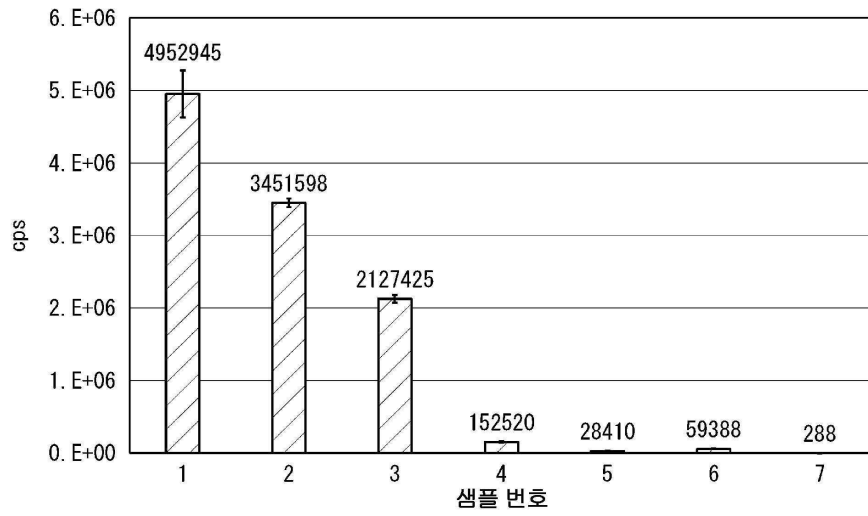
도면5b



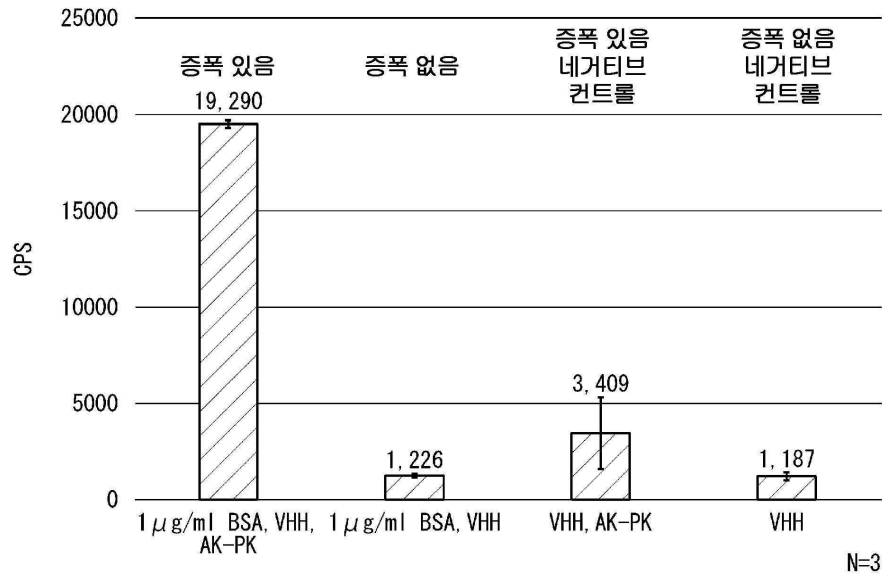
도면6



도면7



도면8



도면9

