

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3775799号
(P3775799)

(45) 発行日 平成18年5月17日(2006.5.17)

(24) 登録日 平成18年3月3日(2006.3.3)

(51) Int. Cl.	F I		
GO 1 N 27/02 (2006.01)	GO 1 N 27/02	Z	
GO 1 N 27/12 (2006.01)	GO 1 N 27/12	Z	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/30	3 5 3 Z	
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 N	
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483	E	

請求項の数 26 (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平9-527995</p> <p>(86) (22) 出願日 平成9年2月10日(1997.2.10)</p> <p>(65) 公表番号 特表2000-509140(P2000-509140A)</p> <p>(43) 公表日 平成12年7月18日(2000.7.18)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/AU1997/000071</p> <p>(87) 国際公開番号 W01997/029366</p> <p>(87) 国際公開日 平成9年8月14日(1997.8.14)</p> <p>審査請求日 平成15年9月26日(2003.9.26)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/011,314</p> <p>(32) 優先日 平成8年2月8日(1996.2.8)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 アンブリ・リミテッド オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2067・チャッツウッド・グレイヴイル・ストリート・126</p> <p>(74) 代理人 弁理士 志賀 正武</p> <p>(72) 発明者 ブラーチー・マクスヴィティス、ヴィジョレター・ルシージャ・プロニスラヴァ オーストラリア国 2203 ニュー・サウス・ウェールズ・ダルウィッチヒルズ・ダーリー・ストリート 9</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素検出バイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

膜と当該膜のインピーダンスを測定するための手段とを含み、当該膜はリンカーが取り付けられたイオノフォアを備え、当該リンカーは検出されるべき酵素によって切断されうるものであり、リンカーの切断によりイオノフォアを介したイオンの膜透過能力に変化が引き起こされる、サンプル中の酵素の存在を検出するために使用するためのバイオセンサー。

【請求項2】

リンカーが膜に取り付けられたことにより、イオノフォアが膜内を横方向に拡散することができない、請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項3】

リンカーが膜に設けられた膜間成分に取り付けられた、請求項2記載のバイオセンサー。

【請求項4】

リンカーがリガンド結合対を介して膜間成分に取り付けられた、請求項3記載のバイオセンサー。

【請求項5】

膜が、両親媒性分子の密接に詰め込まれた列の第一層および第二層、膜において横方向に拡散することができない複数のイオノフォアおよび複数の膜間脂質を含み、前記イオノフォアは第一半膜間モノマーおよび第二半膜間モノマーを含み、第一半膜間モノマーは第一層に設けられ、第二半膜間モノマーは第二層に設けられ、第一半膜間モノマーは第一層に

において横方向に拡散することができず、第二半膜間モノマーはリンカーを介して膜間脂質に結合された、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 6】

イオノフォアがグラミシジン又はその類似体である、請求項 1 ないし 5 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 7】

検出されるべき酵素がプロテアーゼである、請求項 1 ないし 6 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 8】

プロテアーゼが P S A である、請求項 7 記載のバイオセンサー。

10

【請求項 9】

検出されるべき酵素がヌクレアーゼである、請求項 1 ないし 6 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 10】

膜と当該膜のインピーダンスを測定するための手段を含み、当該膜は複数のイオノフォアと複数の膜間成分を備え、当該膜間成分にはリンカー分子が取り付けられ、当該リンカー分子にイオノフォアが連結され、当該リンカー分子は検出されるべき酵素によって切断されうるものであり、リンカー分子の切断によりイオノフォアを介したイオンの膜透過能力に変化が引き起こされる、サンプル中の酵素の存在を検出するために使用するためのバイオセンサー。

20

【請求項 11】

膜が両親媒性分子の密接に詰め込まれた列の第一層および第二層を含み、膜間成分が膜において横方向に拡散することができない、請求項 10 記載のバイオセンサー。

【請求項 12】

イオノフォアが第一半膜間モノマーと第二半膜間モノマーとを含み、第一半膜間モノマーが第一層に設けられ、第二半膜間モノマーが第二層に設けられ、第一半膜間モノマーが第一層において横方向に拡散することができない、請求項 10 または 11 に記載のバイオセンサー。

【請求項 13】

イオノフォアがグラミシジン又はその類似体である、請求項 10 ないし 12 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

30

【請求項 14】

検出されるべき酵素がプロテアーゼである、請求項 10 ないし 13 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 15】

プロテアーゼが P S A である、請求項 14 記載のバイオセンサー。

【請求項 16】

検出されるべき酵素がプロテアーゼである、請求項 10 ないし 13 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 17】

第一領域および第二領域、並びにプロテアーゼを含むことが疑われるサンプルを第一領域に添加させる手段を備え、前記第一領域は酵素によって切断されうるリンカーを介してキャリアーに連結されたプローブと、第一領域から第二領域へ非結合プローブを通過させる手段とを含み、前記第二領域は膜および当該膜のインピーダンスを測定する手段を含み、当該インピーダンスはプローブの存在又は不在に依存する、酵素を検出するためのバイオセンサー。

40

【請求項 18】

膜が、両親媒性分子の密接に詰め込まれた列の第一層および第二層、および第一半膜間モノマー及び第二半膜間モノマーを含む複数のイオノフォアを含み、前記第一半膜間モノマーが第一層に設けられ、第二半膜間モノマーが第二層に設けられ、第二半膜間モノマーは

50

第一半膜間モノマーとは独立の第二層内を横方向に拡散することができ、第一半膜間モノマーは第一層において横方向に拡散することができず、リガンドが少なくとも第二半膜間モノマーに設けられ、前記リガンドはプローブ又はその一部と反応性を有し、プローブのリガンドへの結合により第一半膜間モノマーと第二半膜間モノマーとの間の関係に変化が引き起こされることによって、イオノフォアを介して膜を通過するイオンが流れるかまたは妨げられる、請求項 17 記載のバイオセンサー。

【請求項 19】

検出されるべき酵素がプロテアーゼである、請求項 17 または 18 に記載のバイオセンサー。

【請求項 20】

プロテアーゼが P S A である、請求項 19 記載のバイオセンサー。

【請求項 21】

検出されるべき酵素がヌクレアーゼである、請求項 17 または 18 に記載のバイオセンサー。

【請求項 22】

半膜間モノマーがグラミシジンまたはその類似体である、請求項 17 ないし 21 のいずれか一項に記載のバイオセンサー。

【請求項 23】

プローブがイオノフォアを含む、請求項 17 記載のバイオセンサー。

【請求項 24】

請求項 1 ないし 23 のいずれか一項に記載のバイオセンサーにサンプルを添加し、かつ膜のインピーダンスにおける変化を測定することを含む、サンプル中の酵素の存在を検出する方法。

【請求項 25】

検出されるべき酵素がプロテアーゼである、請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

プロテアーゼが P S A である、請求項 25 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、バイオセンサーと、酵素活性を検出することによって酵素の存在を検出することにおけるバイオセンサーの使用を伴う方法に関する。

免疫学的診断のアナライト (analytes) および疾患マーカーとして使用できる多くのタンパク質は、特にプロテアーゼ活性等の酵素活性の付加的な特性を有する。さらに、別のクラスのタンパク質はヌクレアーゼ活性を示す。

前立腺特異的抗原 (Prostate Specific Antigen) (P S A)、すなわち前立腺ガンの診断マーカーは、プロテアーゼ活性を示すタンパク質の一例であり、セリンプロテアーゼとして知られるタンパク質のクラスに属する。重要な免疫学的診断マーカーである他のプロテアーゼの例には、血液凝固酵素、エラスターゼ、カテプシン B が含まれる。

また、ズブチリシン、パパインおよび α -アミラーゼ等の多くの工業的に重要な酵素もある。

重要なヌクレアーゼの例は、BamH1、HindIII等の制限酵素、T4 DNA ポリメラーゼのようである条件下ではヌクレアーゼとして作用するポリメラーゼ、RNアーゼHのようである条件下ではRNアーゼとして作用する逆転写酵素、並びにS1ヌクレアーゼのようなエキソ-およびエンド-ヌクレアーゼである。

現行の診断試験は、P S A を検出するためのイムノアッセイを用いている (例えば、Abbot's AXsym、Boehringer Mannheim's Elecsys および CIBA-Corning's ACS-180 等の多くの分析装置であり、いずれも E L I S A をベースとした P S A 試験を備える)。これらの試験は、P S A 分子に対抗して生じた抗体を利用し、係る抗体は当該タンパク質分子内の特異的エピトープ部位を認識する。

これらの手法の変形は、国際特許出願 No. P C T / A U 9 5 / 0 0 5 3 6 に開示されている。この参考文献には、P S A によって特異的に切断された一連の基質が開示されてい

10

20

30

40

50

る。また、この参考文献には、プロテアーゼの活性を利用したP S A等のプロテアーゼのアッセイ系も開示されている。このアッセイ系は、P S Aを捕獲するリガンドの使用と、その後のP S Aの基質の使用を含む。

本願発明者らは、タンパク質のプロテアーゼ活性を利用した酵素の検出装置並びに方法を開発した。これらの装置並びに方法は、膜をベースとしたバイオセンサーの使用を含む。これらのバイオセンサーに関する情報は、国際特許出願P C T / A U 8 8 / 0 0 2 7 3、P C T / A U 8 9 / 0 0 3 5 2、P C T / A U 9 0 / 0 0 0 2 5、P C T / A U 9 2 / 0 0 1 3 2、P C T / A U 9 3 / 0 0 5 0 9、P C T / A U 9 3 / 0 0 6 2 0、P C T / A U 9 4 / 0 0 2 0 2およびP C T / A U 9 5 / 0 0 7 6 3に見出すことができる。これらの出願の開示を参照としてここに含める。

10

本発明は、検出すべき酵素の基質を提供すること、並びに酵素による基質の分解を検知することを含む。これは多くの方法で達成されうるが、例えば基質の分解によりイオノフォアからある基が除去されてイオノフォアを放出することにより当該イオノフォアが膜内を横方向に拡散するか、あるいは単に“立体”障害の減少によってイオノフォアを經由するイオンの通過能力の増加を引き起こしてもよい。もしくは、基質が膜間成分(a membrane spanning component)に取り付けられた場合には、基質の分解によりイオノフォアの放出が引き起こされることによって、イオノフォアが膜内を横方向に拡散してもよい。明らかに、このことはイオノフォアと膜間成分の両方に取り付けられた基質の分解によって達成することもできる。

他の変更としては、基質の分解が、プローブを含むイオノフォアの放出を引き起こし、次いで膜内にそれ自身を挿入する。

20

従って、本発明の第一の態様は、サンプル中の酵素の存在を検出するのに使用するためのバイオセンサーであり、当該バイオセンサーは膜と当該膜のインピーダンスを検出するための手段を含み、当該膜はイオノフォアを備え、当該イオノフォアにリンカーが取り付けられており、当該リンカーは検出されるべき酵素によって切断されうるものであり、リンカーの切断によりイオノフォアを介したイオンの膜透過能力に変化が引き起こされる。本発明の好ましい態様では、リンカーが膜に取り付けられることにより、イオノフォアが膜内を横方向に拡散することができない。リンカーは膜に設けられた膜間成分に取り付けられていることが好ましい。この取り付けは共有結合等の多くの方法で行うことができるが、現在のところ、リガンド結合対の一方をリンカーと膜間成分の両方に設けることによ

30

って取り付けることが好ましい。好ましいリガンド結合対はビオチン ストレプトアビジンである。他の好ましい変更では、膜間成分とリンカーの両方が、同一の分子に結合した部分を備えており、例えばビオチンが膜間成分とリンカーの両方に設けられ、ストレプトアビジンを介して架橋結合したものである。

膜間成分の当該部分は、リンカーを介して取り付けられてもよい。これは、イオノフォアに設けられたものと同じリンカーであっても異なるものであってもよい。さらに好ましい態様では、両親媒性分子の密接に詰め込まれた列(a closely packed array)の第一層および第二層、膜において横方向に拡散できない複数のイオノフォアと複数の膜間脂質を含み、イオノフォアは第一半膜間モノマー及び第二半膜間モノマーを含み、第一半膜間モノマーは第一層に設けられ、第二半膜間モノマーは第二層に設けられている。第一半膜間モノマーは第一層において横方向に拡散することができず、第二半膜間モノマーはリンカーを介して膜間脂質に結合されている。酵素によるリンカーの切断後に、第二半膜間モノマーは、第一半膜間モノマーとは別の第二層内を横方向に拡散することができる。

40

本発明の第二の態様では、サンプル中の酵素の存在を検出するために使用するためのバイオセンサーであり、当該バイオセンサーは膜と当該膜のインピーダンスを測定するための手段を含み、この膜は複数のイオノフォアと複数の膜間成分を備え、当該膜間成分にはリンカー分子が取り付けられ、当該リンカー分子にイオノフォアが連結され、当該リンカー分子は検出されるべき酵素によって切断されうるものであり、リンカー分子の切断によりイオノフォアを介したイオンの膜透過能力に変化が引き起こされる。

50

好ましい実施態様では、前記膜は、両親媒性分子の密接に詰め込まれた列の第一層および第二層を含み、膜間成分は膜内において横方向に拡散することができない。好ましくは、イオノフォアが第一半膜間モノマー及び第二半膜間モノマーを含み、第一半膜間モノマーが第一層に設けられ、第二半膜間モノマーが第二層に設けられ、第一半膜間モノマーが第一層において横方向に拡散することができない。第二半膜間モノマーは、リンカー分子を介して膜間成分に連結されている。

これら両方の態様におけるイオノフォアは、好ましくはグラミシジン又はその類似体である。

一連の酵素は、本発明のバイオセンサーを用いて検出することができるが、このバイオセンサーは、プロテアーゼ、特にP S A、フィブリノーゲン等の臨床的に重要なプロテアーゼの検出に特に使用できる。

10

本発明の第三の態様は、第一領域および第二領域、並びに酵素を含むことが疑われるサンプルを第一領域に添加させる手段を備え、前記第一領域は酵素によって切断されうるリンカーを介してキャリアーに連結されたプローブと、第一領域から第二領域へ非結合プローブを通過させる手段とを含む、酵素の検出のためのバイオセンサーであり、前記第二領域は膜および当該膜のインピーダンスを測定する手段を含み、そのインピーダンスはプローブの存在又は不在に依存する。

本発明のこの態様における好ましい実施態様では、前記膜が、両親媒性分子の密接に詰め込まれた列の第一層および第二層、および第一半膜間モノマー及び第二半膜間モノマーを含む複数のイオノフォアを備え、前記第一半膜間モノマーは第一層に設けられ、第二半膜間モノマーは第二層に設けられ、第二半膜間モノマーは第一半膜間モノマーとは独立の第二層内を横方向に拡散することができ、第一半膜間モノマーは第一層において横方向に拡散することができず、リガンドが少なくとも第二半膜間モノマーに設けられており、前記リガンドはプローブ又はその一部と反応性を有し、プローブのリガンドへの結合が第一半膜間モノマーと第二半膜間モノマーとの間の関係に変化を引き起こすことによって、イオノフォアを介して膜を通過するイオンが流れるかまたは妨げられる。

20

好ましい実施態様では、プローブがストレプトアビジンを含み、リガンドがビオチンを含む。

さらに別の好ましい実施態様では、プローブがイオノフォアを含むことにより、プローブが膜と接触した際に、イオノフォアが自身を膜内に挿入し、膜のインピーダンスを変化させる。このような変更の例として、プローブは、膜内に自身を挿入するバリノマイシンを含んでもよい。

30

本発明の好ましい実施態様では、検出すべき酵素はプロテアーゼであり、特に前立腺特異的抗原である。この場合、リンカーもしくはリンカー分子は、配列A l a - V a l - T y rを含むことが好ましい。

当業者であれば理解できるように、使用される実際のリンカーは検出すべき酵素に依存する。ある酵素及び対応する基質の例は、WhittakerらによるAnalytical Biochemistry: 220, 238-243(1994)に記述されており、その開示を相互参照として含める。

さらに別の態様としては、本発明は、本発明の第一、第二もしくは第三の態様のバイオセンサーにサンプルを添加すること、および膜のインピーダンスの変化を測定することを含む、サンプル中の酵素の存在を検出する方法である。

40

明白なことではあるが、本発明のバイオセンサーと方法は、全体の酵素を検出するのではなく、活性酵素のみを検出する。多くの状況において、関心が向けられるのは、単に標準的なサンドウィッチE L I S Aで測定されるような存在する酵素の全体量ではなく、存在する活性酵素の量であることから、これは重要なことである。

また、本発明のセンサーは広範囲の酵素を検出するのに使用されることも明らかである。これらの酵素は、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ等を含む。このセンサーは、リンカーの作製を調節することによって、検出すべき特定の酵素に適合される。例えばプロテアーゼを検出するために、リンカーは酵素によって切断されるペプチド部位を一般的に含む。特異的プロテアーゼによって切断されるペプチド配列についての情報は、上記Wh

50

ittakerらの参照文献に開示されている。検出すべき酵素がヌクレアーゼであれば、リンカーは一般的に核酸配列を含む。特異的酵素によって切断される特異的配列に関する情報は、“Current Protocols in Molecular Biology” Ausebelら(1987) John Wiley & Sons, NYに開示されている。

本発明のセンサーは、DNA-薬剤結合部位を決定するための薬剤開発において使用してもよい。このセンサーは、DNA-タンパク質結合部位を決定する際にも使用することもできる。また、このセンサーは、感染を診断する際に使用してもよい。例えば、病原体と特異的に関連する酵素活性を検出するために使用することができる。

産業上かつ臨床上適切なプロテアーゼと基質は、トロンピンとPSAを含むセリンプロテアーゼを含む。溶解酵素の一覧は、“タンパク質分解の特異性(Specificity of Proteolysis)” Borivoj Keil(1992) Springer Verlag NY pp.283-323に開示されている。有益なものはセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼである。“タンパク質分解酵素(Proteolytic Enzymes)” 実用的な手法(a Practical Approach) R.J.Benyon & J.S. Bond(eds) 1989 Oxford University Press NY p232, pp.241-249も参照。本発明の技術に適した商業上重要なプロテアーゼとプロテアーゼインヒビターは、セリン、システイン、アスパラギン酸並びにメタロ(metallo)タイプが利用できる。セリンプロテアーゼは、エンドプロテイナーゼ - Arg - C、 - Glu - C、 Lys - C、 Xa因子(factor Xa)、プロテイナーゼK、ズブチリシンおよびトリプシンを含み、かつエキソペプチダーゼアシルアミノ酸遊離酵素、カルボキシペプチダーゼP、およびカルボキシペプチダーゼYを含む。システインプロテアーゼは、エンドペプチダーゼ プロメライン、カテプシンB、クロストリパイン、パパインおよびエキソペプチダーゼ カテプシンCおよびピログルタマートアミノペプチダーゼ(pyroglutamate aminopeptidase)を含む。アスパラギン酸プロテアーゼは、エンドペプチダーゼ カテプシンDおよびペプシンを含む。メタロプロテアーゼ(metallo proteases)は、エンドペプチダーゼ サーモリシンおよびエキソペプチダーゼ アミノペプチダーゼM、カルボキシペプチダーゼ - A、 - Bおよびロイシンアミノペプチダーゼを含む。この一覧は排他的なものではなく、本願発明の広い実用性を示す。他の商業上使用できるプロテアーゼは、先に引用された文献に掲載されており、これらを参照としてここに含む。例えば、既知の種類のエンドペプチド エンドプロテイナーゼ - Asp - Nも含む。

本発明の性質をより明確に理解するために、以下の実施例および添付図面を参照しながら以下にその好ましい形態を記述する。

図1は、本発明の第三の態様の装置の実施態様の図式的描写を示す。この図から判るように、装置10は第一領域11と第二領域12とを含む。第一領域11には、ペプチドリンカー15を介してストレプトアビジン14(プローブ)に結合したポリマービーズ13(キャリアー)が設けられている。このペプチドリンカー15はプロテアーゼ16によって切断される。

この図に示すように、プロテアーゼ(またはヌクレアーゼ)16の添加により、ストレプトアビジン14が遊離され、第二領域12に流れる。第二領域12は、ストレプトアビジン14の存在を検出するバイオセンサー膜17を含む。バイオセンサー膜17に到達したストレプトアビジン14は、膜のインピーダンスに変化を引き起こす。

図2は、本発明の第一および/または第二態様の実施態様を示す。図2に示すようにバイオセンサー膜20は膜21と電極22とを含む。膜21は、両親媒性分子の列の第一層23と第二層24とを備える。膜内を横方向に拡散することができない第一半膜間モノマー25が層24に含まれている。層23は第二半膜間モノマー26を含む。この膜は、膜内を横方向に拡散することができない膜間脂質27も含む。第二半膜間モノマー26は、ペプチド28を介して膜間脂質27に連結されている。ペプチド28はプロテアーゼ29で切断される。プロテアーゼ29によるペプチド28の切断により、半膜間モノマー26は自由に膜内を横方向に拡散する。この結果、膜のインピーダンスに変化が生じる。

実施例

実施例1:

10

20

30

40

50

ストレプトアビジン - グラミシジン結合のプロテアーゼ切断

第一層：9.3 nM リンカーグラミシジン B (Linker Gramicidin B) (図 3)

1.1 μM 膜間脂質 D (Membrane Spanner Lipid D) (図 4)

37 μM M A A D (図 5)

75 μM リンカー脂質 A (Linker Lipid A) (図 6)

第二層：エタノール中に 10 mM (D P E - P C (図 7) : G D P E (図 8) = 7 : 3)

: ビオチニル化グラミシジン E (Biotinylated Gramicidin E) (図 9) = 6 6 6 7 7 : 1

クロム付着層 (ガラス顕微鏡スライド上に 200 μm) 上に新たに蒸着された金 (1000 Å) を備えた電極を室温で 1 時間第一層成分のエタノール溶液中に浸し、エタノールで濯ぎ、インピーダンスの測定に使用するまでエタノール下、4°C で貯蔵した。このスライドを作用電極の範囲を約 16 mm² に限定したテフロン被覆ウェルを収容したブロック中に固定した。

5 μL の第二層を作用電極に添加した後、150 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (6.26 mM NaCl、59.4 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O、2.53 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O、50 mM EDTA pH 7.4; PBS) を添加した。電極を PBS で 4 回洗浄し、30 分以上 60°C まで温度を上げた。ストレプトアビジンをセンサーウェルに添加し (PBS 中に 0.01 mg/ml を 5 μL)、インキュベートした。ストレプトアビジンのビオチニル化グラミシジン E への結合により、最小位相におけるアドミタンスが減少した (図 10)。15 分後に過剰のストレプトアビジンを PBS で洗浄した。ストレプトアビジンを添加していないウェルを対照として用いた。

プロテイナーゼ K を検出ウェルおよび対照ウェルに添加して、12.5 mg/ml の最終的なウェル濃度とした (PBS 中に調製された Boehringer Mannheim D-68298)。対照ウェルへのプロテイナーゼ K の添加では、膜アドミタンス特性に著しい変化を生じなかった。ストレプトアビジンが結合したセンサー膜は、最小位相におけるアドミタンスの増加を示した (図 11)。最小位相におけるアドミタンスの増加の量および速度は、試験溶液中に存在するプロテイナーゼ K の量に関係しており、それゆえ試験溶液中の酵素活性を調べるために用いることができる。

実施例 2 :

DNA 結合チャネルの DNアーゼ 1 切断

第一層：9.3 nM リンカーグラミシジン B (Linker Gramicidin B)

1.1 μM 膜間脂質 D (Membrane Spanner Lipid D)

27.5 nM 膜間脂質 C (Membrane Spanner Lipid C) (図 12)

37 μM M A A D

75 μM リンカー脂質 A (Linker Lipid A)

第二層：エタノール中に 14 mM (D P E - P C : G D P E = 7 : 3) : ビオチニル化グラミシジン E = 5 0 0 0 0 : 1

クロム付着層 (ガラス顕微鏡スライド上に 200 μm) 上に新たに蒸着された金 (1000 Å) を備えた電極を室温で 1 時間第一層成分のエタノール溶液中に浸し、エタノールで濯ぎ、インピーダンスの測定に使用するまでエタノール下、4°C で貯蔵した。このスライドを作用電極の範囲を約 16 mm² に限定したテフロン被覆ウェルを収容したブロック中に固定した。

5 μL の第二層を作用電極に添加した後、180 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (10 mM NaH₂PO₄、1 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl、2.7 mM KCl; PBS) を添加した。電極を PBS で 4 回洗浄した。これらの工程は室温で行われた。以下の全ての工程は 30°C で行われた。ストレプトアビジンを全てのウェルに添加し (PBS 中に 0.01 mg/ml を 5 μL)、ビオチニル化グラミシジン E と 10 - 15 分間反応させ、過剰の非結合のストレプトアビジンを PBS で洗浄し、DNA プローブ F (200 nM) : DNA プローブ G (PBS 中に 200 nM) の 1 : 1 混合物 5 μL をセンサーウェルに添加した。DNA 非特異的結合プローブ H (PBS 中に 400 nM を 5 μL) を対照ウェルに添加した。結合プローブ H は対象の標的 DNA に非相補的であるため、標的 DNA

10

20

30

40

50

は結合しない。前記プローブを10 - 15分間ストレプトアビジンと反応させ、過剰の非結合プローブをPBSで洗い流した。PBS中の100 μ LのDNA標的I(10nM)を各ウェルに添加した。DNA標的Iのセンサーウェルに対する結合により、最小位相におけるアドミタンスが減少したが、対照ウェルにおける膜アドミタンスでは著しい変化はなかった(図13)。15分後に、非結合DNA標的IをDNアーゼ1活性化バッファーで洗浄した。DNアーゼ1活性化バッファーは、50nM Tris·HCl、pH7.6、50nM NaCl、10nM MgCl₂、10nM MnCl₂、0.2mg/mL BSAからなる。DNアーゼ1をセンサーウェルと対照ウェルに添加した(20mM Tris·HClの50% w/vグリセロール溶液、pH7.6、1mM MgCl₂中に1mg/mLを2 μ L)。DNアーゼ1の添加により、センサーウェルの最小位相におけるアドミタンスは増大したが、対照ウェルには顕著な変化が見られなかった(図14)。最小位相におけるアドミタンスの増加の量および速度は、試験溶液中に存在するDNアーゼ1の量と関係しており、それゆえ試験溶液中の酵素活性を調べるために用いることができる。

DNAプローブF:

ビオチンとDNAとの間に31原子ホスホラミダイト(phosphoramidite)リンカー基を備えた5'ビオチニル化リステリア(listeria)プローブDNA

5'-bio-L-M-ATAGTTTTATGGGATTAGC-3'

DNAプローブG:

ビオチンとDNAとの間に13原子ホスホラミダイトリンカー基を備えた5'ビオチニル化コレラ毒素プローブDNA

5'-bio-L-CTCCGGAGCATAGAGCTTGGAGG-3'

DNA非特異的結合プローブH:

ビオチンとDNAとの間に31原子ホスホラミダイトリンカー基を備えた5'ビオチニル化15マーオリゴヌクレオチド、標的DNA配列のあらゆる部分に対して非相補的である。

5'-bio-L-M-ATTGCTACGTATACG-3'

DNA標的I:

19塩基リステリア配列、10塩基“スパーサー”および23塩基コレラ毒素配列を含む52塩基DNA

10

20

30

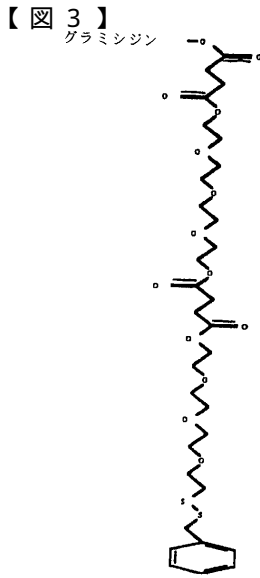


Figure 3

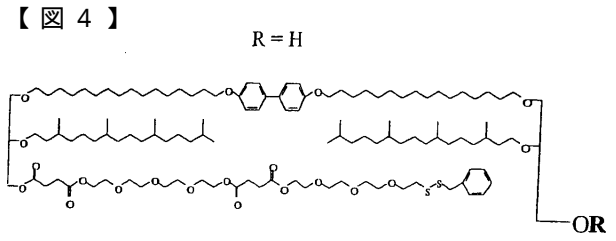


Figure 4

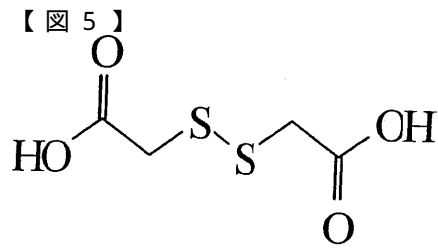


Figure 5

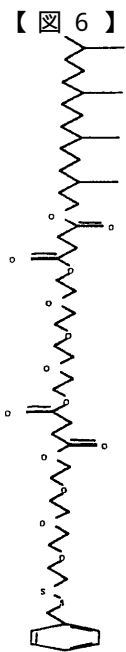


Figure 6

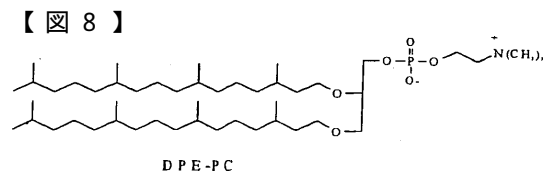


Figure 8

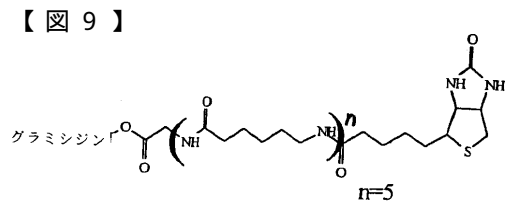


Figure 9

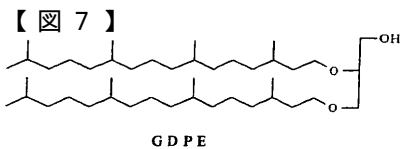


FIGURE 7

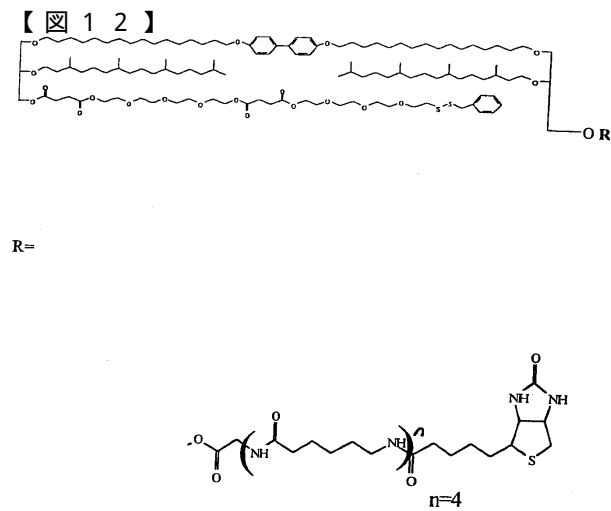
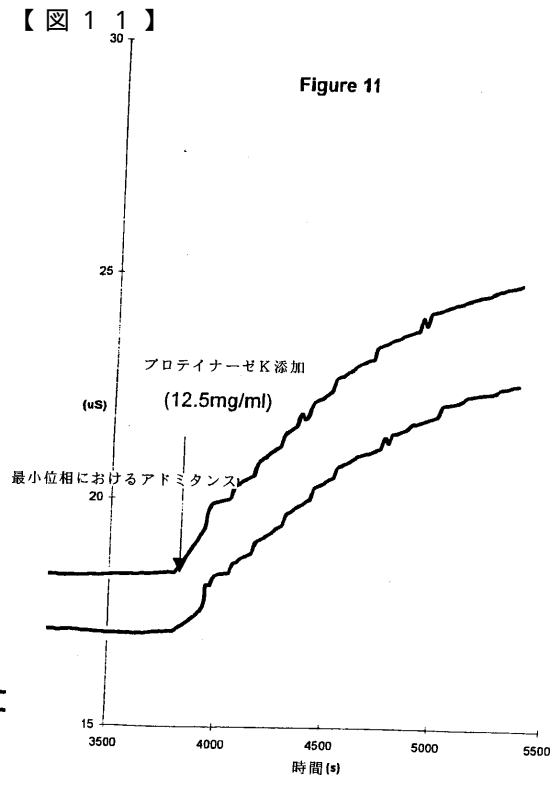
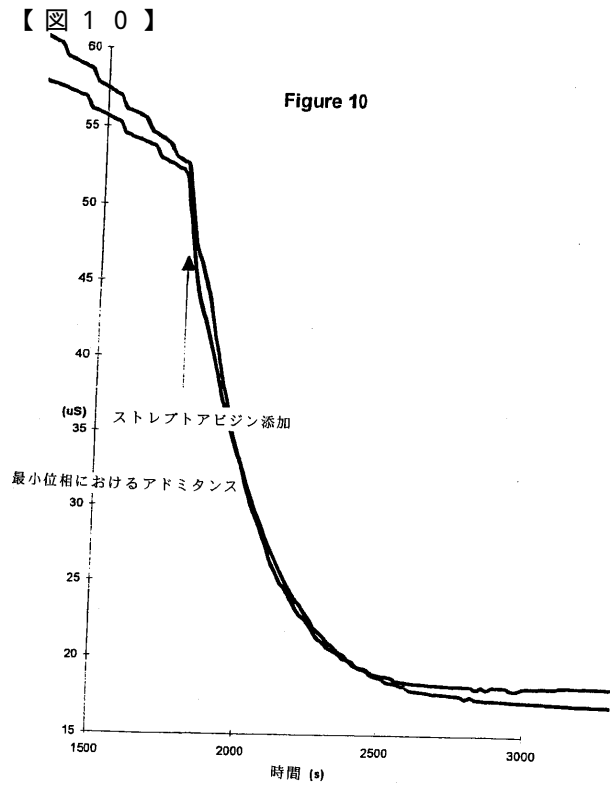
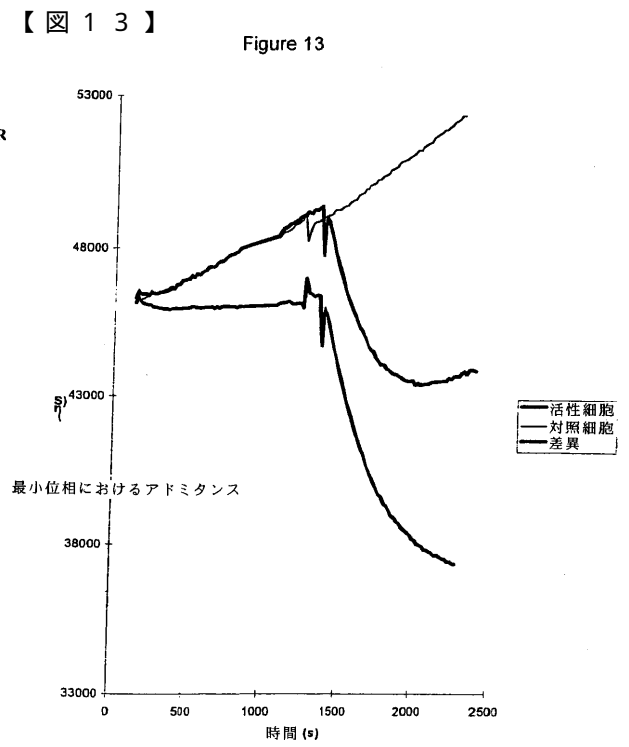
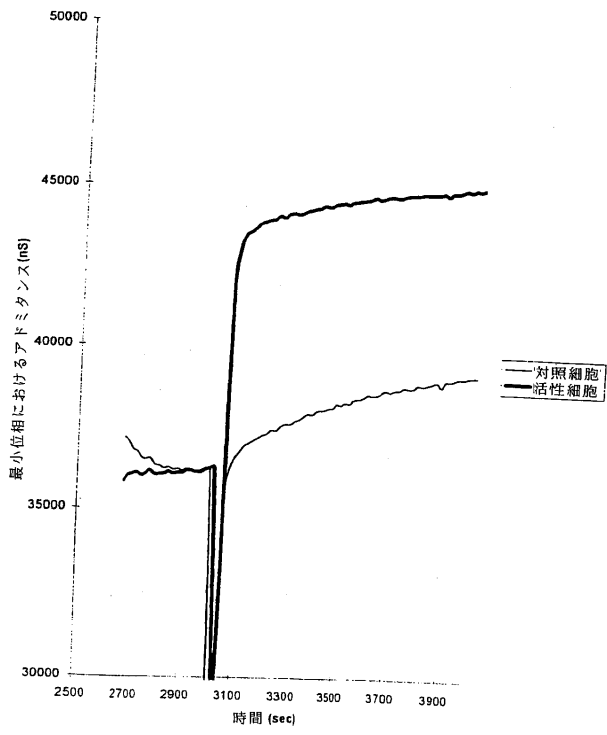


Figure 12



【 図 1 4 】

Figure 14



フロントページの続き

- (72)発明者 コーネル, ブルース アンドリュー
オーストラリア国 2089 ニュー サウス ウェールズ ニュートラルベイウィコム ロード 58
- (72)発明者 トムソン, デヴィッド ジェフリー
オーストラリア国 2250 ニュー サウス ウェールズ ナララ コニンデリー パレイド 19
- (72)発明者 ラグース, パークハード
オーストラリア国 2075 ニュー サウス ウェールズ セイント イーヴス マディース ロード 2

審査官 田中 洋介

- (56)参考文献 国際公開第90/08783 (WO, A1)
国際公開第92/17788 (WO, A1)
国際公開第94/12875 (WO, A1)
国際公開第95/16206 (WO, A1)
国際公開第96/15454 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 27/00 - 27/49
G01N 33/48 - 33/98
JICSTファイル(JOIS)