

抗体電極チップ及び検出装置の開発

(財) 千葉県産業振興センター (研究員) 今井 雄一郎

【目的】

本研究では蛋白質間の相互作用を電気化学的に検出するために、半導体製造技術を応用し多試料測定可能な電極チップと測定装置の作製と評価を行うことを目的とした。

【背景】

一般的に蛋白質間の相互作用の検出方法としてはウエスタンブロット法、EILSA 法、マイクロアレイ法等が知られている。とりわけ近年注目のマイクロアレイ法は少量の試料よりハイスループットに検出できることが優れている。しかし、通常マイクロアレイ法は試料を蛍光標識し蛍光スキャナーで検出するために実験コストがかかり、また検出装置も高額化しやすい。そこで、これらのデメリットを解消するため電流検出方式による検出を試みた。電流検出方式は蛍光検出方式とは異なり試料を蛍光標識する必要がないためその分のコストダウンが期待される。また、光学系の設備を使用せず電流・電圧系を制御するために装置自体の小型化や作製費用の抑制が期待された。

【1年半の研究成果】

1. 電極チップの作製と評価

半導体製造技術を応用し集積化した36個のセンシング部位を持つ電極チップの作製を行った。図1に作製した電極チップの写真を示した。具体的にはガラスもしくはシリコン基板上(17 mm×17 mm)にクロム層を介して白金層を形成し作用電極と対電極を作製した。また、銀層を形成し参照電極とした。チップ最表面には絶縁層としてポリイミドを構成した。

電極チップによる検出工程としては、電極チップ上に予め調査したい蛋白質(抗体等)を固定化し試料をふりかける事で試料中の蛋白質と電極上の抗体が結合する。次いで結合した蛋白質に対して2次抗体やグルコースオキシダーゼ(GOD)標識抗体を結合させる。最後にグルコース溶液を滴下することで図2の反応により過酸化水素を発生させる。発生した過酸化水素はポテンショスタット(測定装置)により一定の電位を印加することで電気化学的に酸化され電子が放出される。この時に発生した電子は過酸化水素の濃度に比例する。実際に検量線の作成を行ったところ、複数の電極で50 μMから1 mMの範囲において電流値と過酸化水素濃度は比例関係になることがわかった。この事より作製した電極チップはバイオセンサーとして機能しうることが伺えた。

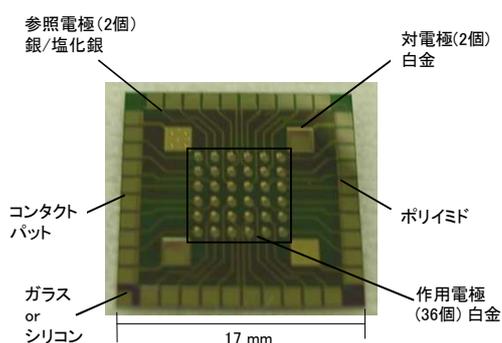


図1 作製した抗体電極チップ

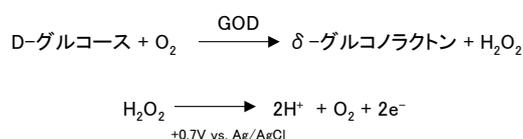


図2 GOD とグルコースの反応と検出原理

電極チップは平面的な構造をしており、ELISA プレートの様な個別のウェルは存在しない。そのために、GOD により間接的に発生した過酸化水素を電流値として検出する際に、反応電極以外の電極に過酸化水素が拡散し干渉することがないかが問題となる。そこで、GOD を 9 つの作用電極中央に固定化し、グルコース添加により電流の増加が見られるかどうか、また、その際の周辺電極へ影響を検討した。その結果、GOD を固定化した中央電極では基質であるグルコース添加による電流値の増加が見られた。一方、中央電極の周辺では GOD を固定化していないために過酸化水素は発生せず電流値の増加が見られなかった。また、中央とその近傍作用電極に電気化学的干渉があれば GOD 未固定の周辺電極でも電流値の増加が見

られるはずであるが、そのような現象は見られなかったことから、本電極チップでは作用電極間の干渉はほとんど無視できると考えられた(図 3)。

9個の電極の中央にGODを固定化

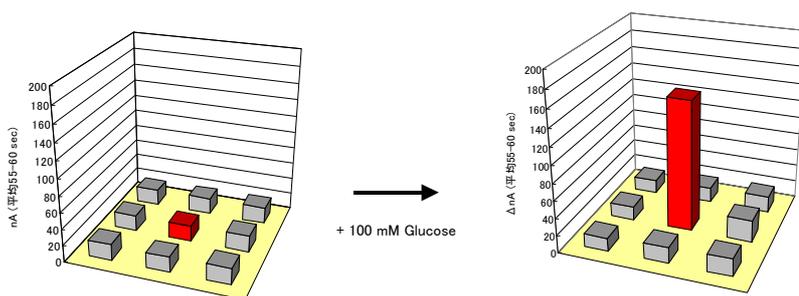


図 3. 過酸化水素の検出とクロストークの影響 (+0.7V vs.Ag/AgCl on Chip, 測定環境 24°C)

2. 検出装置の作製と評価

当初、測定(検出)装置は電極チップ上の 36 電極を同時に測定する方式を考えていたが、電流-時間の挙動が単電極の場合に比べて著しく不可解であったため、複数電極を単電極ずつ連続的に測定する方式へと変更した。このようなハード面の変更に伴い制御ソフトウェアも大幅に変更して操作性が向上するよう調整した。

そして、自作した測定装置と市販の測定装置のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中での電流変動を比較したところ、自作測定装置の方が市販品に比べてはるかに変動が抑えられており、低ノイズで安定した装置であることが確認された(図 4)。

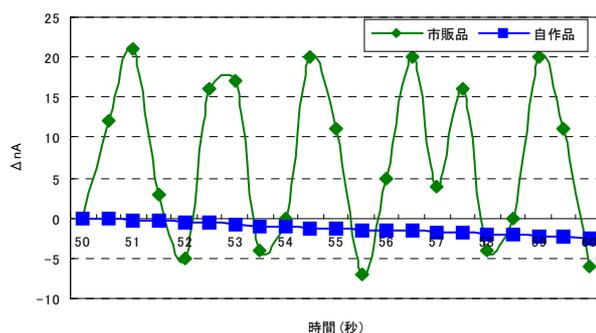


図 4. 市販品と自作装置の電流変動レベルの比較

+0.7V vs.Ag/AgCl on Chip

3. 電極チップを使用した蛋白質の固定化と検出

作製した電極チップの作用電極表面に適する蛋白質固定化を以下の 3 種類の方法で検討した。

- ① ポリエチレンイミン(PEI)/グルタルアルデヒド(GA)/GOD
- ② システアミン(Cys)/GA/GOD
- ③ システアミン(Cys)/光反応性試薬/GOD

検討の結果、同条件では①PEI/GA/GOD が最も強い電流値を示したことから、高い固定化能を持つことが示唆された。そこで、PEI/GA を介して抗体(抗ヒト血清アルブミン; Anti-HSA)を電極チップ上に固定化し抗原-抗体反応の検出を行った。その結果、シグナルがコントロール (PBS のみ) と 0.1M グルコース添加時とを比較した場合、ノイズレベルは低く抑えられていたものの、顕著な差が観察されなかった。抗原-抗体反応は別途機能することを蛍光マイクロアレイ法で確認していたために反応自体に問題があるのではなく、最終的な GOD の酵素活性がそれほど高くなかったことが原因と考えられた。

【フェーズⅢについて】

事業化を考えた場合、電極チップに限らず生体分子間相互作用の検出には検出対象を何にするかが重要であり弊社だけでは補足できない市場調査や潜在/顕在需要などの把握が必要である。現時点で本研究を直ちに事業化する予定はないものの、チップ作製のノウハウや検出装置作製時に得た知見は今後様々な分野への展開の可能性もあり弊社の独自検討と提携先の模索を通じて方向性を考えたい。 以上