

特異的高分子リガンド修飾プラズモニックチップを用いた C 反応性タンパク質の高感度蛍光検出

Highly Sensitive Fluorescent Sensing of C-Reactive Protein by Polymeric Ligand-Modified Plasmonic Chips

神戸大院工¹, 産総研² ○松浦 亮¹, 北山 雄己哉¹, 田和 圭子², 竹内 俊文¹

Graduate School of Engineering, Kobe University¹, AIST²

○Ryo Matsuura¹, Yukiya Kitayama¹, Keiko Tawa², Toshifumi Takeuchi¹

E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

1. 緒言

バイオマーカータンパク質の高感度検出に関する研究は種々の疾病の早期診断に繋がることから世界中で盛んに行われている。タンパク質検出法の代表例として表面プラズモン共鳴(SPR)や Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)が挙げられるが、それぞれ低感度及び測定に時間を要するという問題点があった。最近、これらに代わるセンシングツールとして、SPRによる光の局在化現象により蛍光増強を生じさせる格子結合型表面プラズモン励起増強蛍光 (GC-SPF) を利用して高感度検出を行うプラズモニックチップが開発された。本研究で用いるプラズモニックチップは、光の波長レベルの二次元周期構造をもつ金属薄膜を表面に有しており、そのため従来のプリズム結合型SPRでは困難な蛍光顕微鏡による高感度検出・イメージングが可能である。これまでに田和らは抗体をプラズモニックチップ上に固定化することで、簡便・迅速でありながらELISAと同程度の高感度検出を種々のタンパク質に対して可能であることを明らかにしてきた。

本研究では、抗体の代わりに人工高分子レセプターをプラズモニックチップと組み合わせることで、新たな人工バイオチップの構築が可能かどうか検討した。心疾患早期診断のためのバイオマーカータンパク質である C 反応性タンパク質(CRP)をモデル標的タンパク質とし、それに対する特異的リガンドであるホスホリルコリンを側鎖にもつ Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC)を人工高分子レセプターとして表面に修飾したプラズモニックチップを用いて、蛍光顕微鏡によるサンドイッチ型高感度検出を試みた。

2. 実験

Ti/Ag/Ti/SiO₂ 薄膜でコートされたプラズモニックチップをアミノ化後、2-Bromoisobutyryl bromide を用いて Br 基を導入した。得られた Br 修飾プラズモニックチップ上にMPCを含むプレポリマー溶液を滴下し、表面開始原子移動ラジカル重合を行うことでPMPC膜を構築した。このPMPC修飾プラズモニックチップにCRPを相互作用させ、その後Biotin-Anti-CRP、Cy5-streptavidinを順次加え、蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度のCRP濃度依存性を調べた。

3. 結果・考察

CRP サンドイッチアッセイの蛍光顕微鏡観察の結果、CRP 1 nM をPMPC修飾プラズモニックチップと相互作用させた際の蛍光強度がCRPなしの時に比べ大きくなっていることから、nM オーダーのCRPが蛍光顕微鏡により検出できることが示された。また、相対蛍光強度比は周期構造内部が周期構造外部よりも約5倍大きくなっていることから、プラズモニックチップの周期構造に由来する蛍光増強効果が表れていることが明らかとなった。さらに、検出限界および希釈ヒト血清中におけるCRPの高感度検出について検討を行ったので報告する。

謝辞 光硬化性樹脂をご供与頂きました東洋合成工業株式会社に感謝いたします。

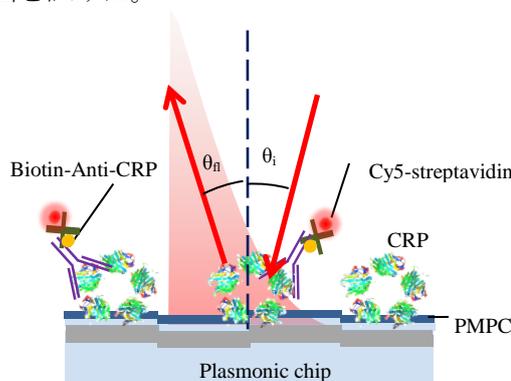


Figure.1 High sensitivity detection of CRP on Plasmonic chip

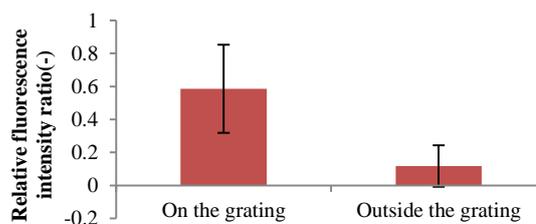


Figure 2 Relative fluorescence intensity ratios in CRP 1 nM by on the grating and outside the grating.