

金キャップナノピラー-LSPR 基板と低分子抗体を利用した イムノアッセイと液中経時計測検討

Immunoassay and examination of time-lapse measurement in liquid using gold-capped nanopillars LSPR substrate and low-molecular-weight antibody

阪大院工¹, 産総研・先端フォトバイオ² ○(M2) 明山 剛大¹, 斎藤 真人^{1,2}, 羅 希^{1,2}, 民谷 栄一¹

Graduate School of Engineering, Osaka Univ.¹, AIST PhotoBIO-OIL²,

○Takehiro Akeyama¹, Masato Saito^{1,2}, Xi Luo^{1,2}, Eiichi Tamiya¹

E-mail: akeyama@ap.eng.osaka-u.ac.jp

1. 緒言

生体分子相互作用の解析を行うにあたりラベルフリーな計測が可能で、また、比較的簡易な光学系で計測可能な点から Point of care testing (POCT) 計測への展開に向けて局在表面プラズモン共鳴法 (LSPR) が注目されている。我々はこれまでに、熱ナノインプリントによる金キャップナノピラー-LSPR 基板 (図 1) 【1】を開発し、大気下において各種タンパク質の LSPR バイオセンシングに成功してきた【2】。一方、液中での LSPR 計測は生体分子相互作用を経時的に計測できる点で有用であるが、センサーとしての感度に課題がある。そこで今回、液中での生体分子相互作用評価の感度向上のために、金キャップナノピラー-LSPR 基板及び低分子抗体を利用し、LSPR の吸収スペクトル計測を指標にブロッッキング条件などの基礎検討を行った。また、免疫活性評価において重要である IgA タンパク質のイムノアッセイによる検出を試み、特異的反応の液中経時計測を行った。

2. 実験

陽極酸化法により作製されたポーラスアルミナを鋳型として用い、熱ナノインプリント及びスパッタリング装置によって金キャップナノピラー-LSPR 基板を作製した。ブロッッキング剤として末端にアミノ基が修飾されたポリエチレングリコール (PEG) 誘導体 (amine-PEG)、基板に固定する低分子抗体として anti-IgA Affibody Molecule (MW:6,000) をそれぞれ用いた。基板をフローセル内に固定後、シリンジポンプを用いて送液することで基板表面に連続的に溶液を供給した。ハロゲンランプ光源及び分光器 (HR4000, Ocean Optics) を用いて透過光から吸収スペクトルを経時的に測定した。吸収強度差の変化を指標にイムノアッセイによる IgA 検出のための濃度や分子量の条件検討を行った。

3. 結果・考察

ブロッッキング剤として、amine-PEG (0.1%, MW:20,000) を用いた場合は 100 ng/ml IgA の抗原応答が見られなかったが、一方で amine-PEG (0.1%, MW:2,000) を用いた際には抗原応答が確認された。また、BSA を指標に amine-PEG (MW:2,000) の至適濃度を検討した結果、濃度 0.1% において基板表面への非特異吸着を抑制することができた。さらに特異的反応を行った結果、10 ng/ml IgA を検出することに成功した。これはフルボディ抗体を用いた場合に比べ 10 倍の検出感度であり、低分子抗体の有用性が示唆された。

【1】 M. Saito, et al, Analytical Chemistry, 84(13) 5494-5500 (2012),

【2】 H. Yoshikawa, et al, Analytical Methods, 7, 5157-5161 (2015)

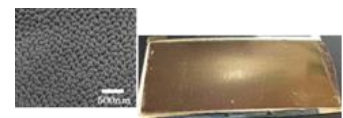


図 1 金キャップナノピラー-LSPR 基板

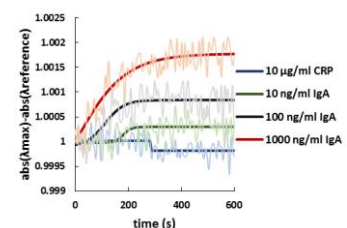


図 2 anti-IgA Affibody に対する抗原応答