

## 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサを利用したバイオ分子検出プロトコルの検討

著者	竹内 州
雑誌名	技術報告
巻	20
ページ	55-58
発行年	2015-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	<a href="http://doi.org/10.14945/00009248">http://doi.org/10.14945/00009248</a>

# 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサを利用した バイオ分子検出プロトコルの検討

竹内 州

技術部 共同研究支援部門

## 1. はじめに

表面プラズモン共鳴(SPR)を利用したバイオ分子検出の実験について報告する。SPR センサは金属表面に付着した物質を高感度に検出することが可能で、バイオ分子などを蛍光標識を使用せずに検出する目的で広く利用されている。本報告では、検出対象のバイオ分子の一例としてインフルエンザウィルスを取り上げ、抗原・抗体反応を利用して金属表面にウィルスを選択的に付着させ検出する実験手順(プロトコル)について検討した結果を示す。

## 2. 表面プラズモン共鳴について

表面プラズモンとは、金属表面における自由電子の粗密波であり、表面プラズモン共鳴とは、特定の光入射条件において共鳴的に表面プラズモンが励起される現象を指す[1]。光で表面プラズモンを励起するためには、光の位相速度が表面プラズモンの位相速度に一致しなければならない。この条件を満たすひとつの方法として光が境界面で全反射する時に発生するエバネッセント波が用いられる。全反射を起こすためには、屈折率の異なる2つの媒質の境界面に対して、屈折率の大きい媒質側から光を入射させる。入射角をある値以上にした場合に全反射が起こり、媒質の吸収がなければ反射率は1となる。この時、屈折率の小さい媒質側に染み出した光が発生する。これは境界面に沿って伝搬する波であり、エバネッセント波と呼ばれる。この波を用いると表面プラズモンの位相速度と一致させることができ、表面プラズモンを共鳴的に励起することができる。表面プラズモンが励起されると入射波のエネルギーが表面プラズモンの励起によって奪われるため、反射率は低下する。実際の測定では、反射率が最も小さくなる光の入射角や波長が共鳴条件となる。

図1に、共鳴的に表面プラズモンを励起する光学系の代表例としてクレッチマン配置を示す。プリズムを介して金属膜の裏面からレーザー光を照射することによって、金属膜表面に表面プラズモンを励起することができる。共鳴条件が、金属表面から波長程度の距離にある試料の屈折率変化に対して敏感に変化するため高感度なセンサとして利用される。

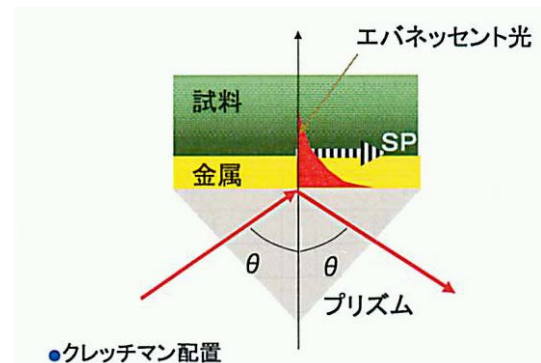


図1 クレッチマン配置による表面プラズモンの励起



図2 小型 SPR 検査装置

### 3. 実験手順

上記の SPR センサでバイオ分子を検出するためには、検出対象の分子(今回はインフルエンザウイルス)が金属表面に選択的に付着するように金属表面を修飾してやる必要がある。このために、金属表面に抗体を付着させ、抗体と抗原(インフルエンザウイルス)の選択的な結合を利用してウイルスを検出する。金属としては酸化しにくく生体分子に対して安定な金を使用する。金表面上に抗体を付着しやすくするために自己組織化単分子膜(SAM)を最初に形成する。

#### a) 金表面への SAM 形成

SAM とは基板を目的分子の溶液に浸すと自発的に分子が配列して形成される単分子膜である。SAMを形成する分子は基板と結合する官能基を1つ持つ。今回の実験では金と結合するチオール基( $-SH$ )を持つ試薬を利用する。センサチップとなる1面に金薄膜が付着したガラス基板を Cysteamine 10mM の ethanol 溶液に一晩浸漬し、ethanol 溶液及び超純水で洗浄後、窒素乾燥を行う。

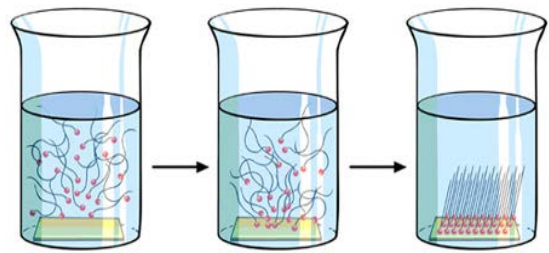


図3 SAM 形成の過程

#### b) ウィルス抗体の固定化

抗体の末端基であるカルボキシル基に 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)と N-Hydroxysuccinimide (NHS)を反応させることにより不安定なエステル結合(活性エステル)を形成する。この活性エステルが SAM の末端基であるアミン( $-NH_2$ )とアミド結合することにより抗体の固定化が行われる。EDC(4mM)と NHS (10mM)及び、抗体である Recombinant Influenza H1N1 HA の超純水溶液をセンサチップの流路に送液することで抗体の固定を行なう。図4に抗体が固定化される際に行われる化学反応式を示す。

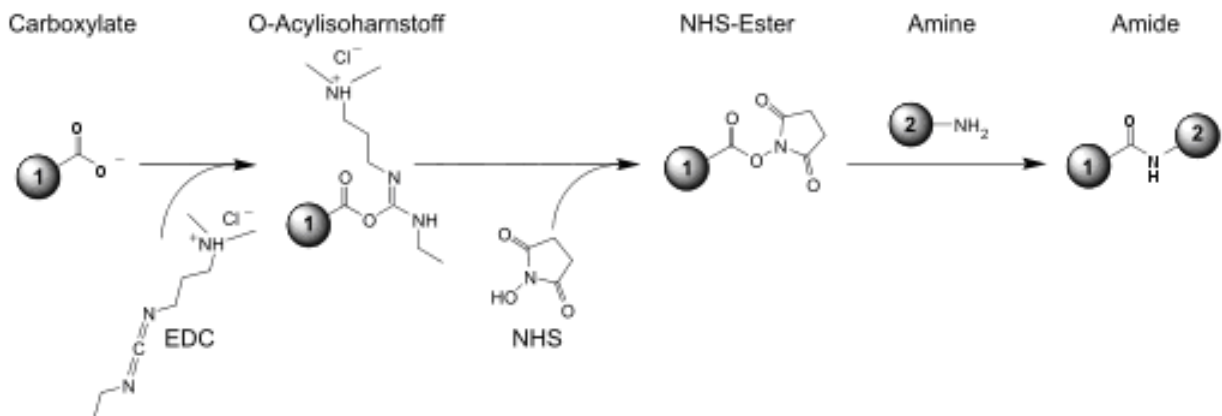


図4 EDC, NHS によるアミド結合を利用した金薄膜上への抗体の固定化

①抗体の末端基は Carboxylate、②金薄膜上の SAM の末端基は Amine

### c) ウィルス抗原の注入

抗体が固定されたセンサチップに抗原を含む溶液を送液し、抗体と抗原の反応を試みる。抗原の固定化は NHS/EDC と抗体を含む水溶液を用いて行ったが、検出対象のウィルス抗原はリン酸緩衝液 (PBS: Phosphate buffered saline) により様々な濃度に希釈してセンサチップの流路に送液する。

## 4. 測定結果

測定にはオプトクエスト社の小型 SPR 検査装置 SPR01 を使用した。抗体固定化による SPR 角度の時間変化 (センサグラム) を図5に示す。SPR 角度変化量とは、超純水の場合の共鳴角度を基準とした相対的な値である。矢印は、抗体を含む NHS/EDC 水溶液を流した後に超純水を加えた時刻を表している。超純水の送液を3回繰り返して NHS/EDC 水溶液を置換したが、抗体送液前比べると SPR 角度はシフト (変化) したままであった。これは抗体がセンサチップ上の SAM に固定化されていることを示している。また抗体が固定化されたことによる SPR 角のシフト量 (変化量) は、送液した抗体の濃度が増えるに連れて大きくなった。図6に、平衡状態 (最終時刻) の SPR 角度変化量の抗体濃度依存性を示す。抗体の結合 (固定化) と解離のレート方程式に基づく理論式 [2] へのフィッティング (図中の実線) によれば、抗体濃度 100 ug/ml の場合には、SAM に固定化可能な最大量の 68% ( $=0.52 \text{ deg}/0.77 \text{ deg}$ ) の抗体が固定化されていることが分った。また、図6のデータ点にはバラツキがあり、再現性の検討も必要である。

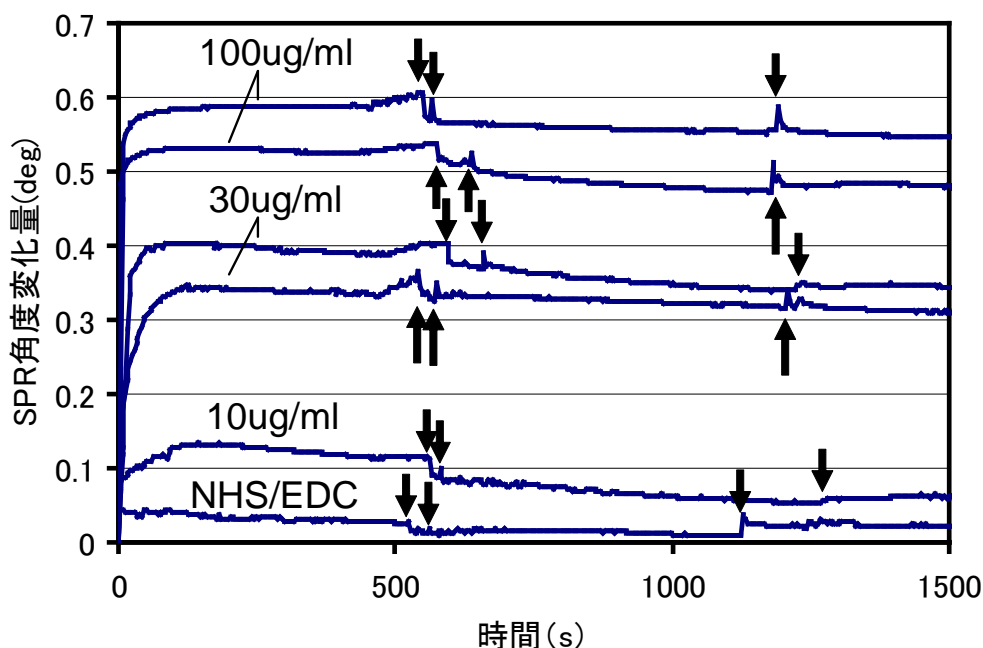


図5 各濃度の抗体を固定化した時の SPR 角度の時間変化 (センサグラム)。図中の ug/ml 値は NHS/EDC 溶液中の抗体濃度を示す  
NHS/EDC は比較対象として示している

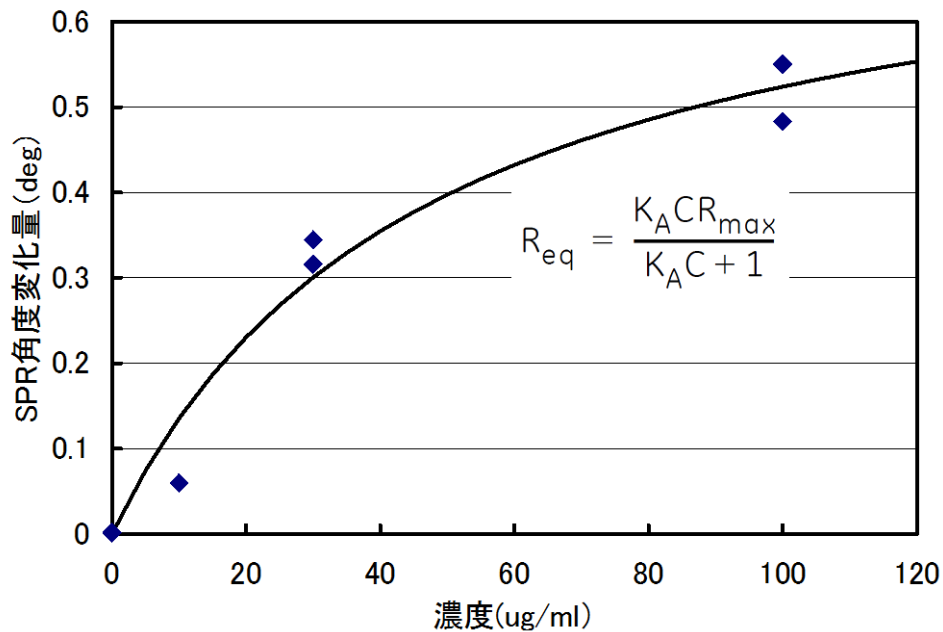


図6 平衡状態の SPR 角度変化量  $R_{eq}$  と抗体濃度  $C$  の関係。平衡結合定数  $K_A$  と最大応答値  $R_{max}$  はそれぞれ  $0.021 \text{ (ug/ml)}^{-1}$  と  $0.77 \text{ deg}$ 。

## 5. まとめと今後の予定

SPR センサを用いて、抗原・抗体反応によりウィルスを検知するための実験手順(プロトコル)の検討を行った。センサチップ金表面にアミノ基で終端された SAM を形成し、インフルエンザウィルスに対する抗体を含む NHS/EDC 水溶液に浸漬することによって飽和量の 68% の抗体を固定化することができた。今後は、抗体を固定化したセンサチップをウィルス抗原を含む溶液に曝した時の SPR 角度の変化を観測することにより、ウィルスが検知できることを確認する予定である。

## 謝辞

SPR 全般についてご指導いただいた電子工学研究所 猪川洋教授と佐藤弘明助教、ならびにバイオ分子の取扱い手順についてご指導いただいたグリーン科学技術研究所 朴龍洙教授と Syed Rahin Ahmed 博士に感謝いたします。

## 参考文献

- [1] 永島圭介、「表面プラズモンの基礎と応用」、J. Plasma Fusion Res. Vol.84, No.1, pp. 10-18 (2008).
- [2] "Biacore™ Assay Handbook" p. 57, 29-0194-00 AA 05/2012 edition, online available: [www.gelifesciences.com/biacore](http://www.gelifesciences.com/biacore).