

銀・金ナノコロイド微粒子を用いた抗原抗体反応の高感度 SERS 検出

(<sup>1</sup> 関西学院大学理工、<sup>2</sup> 産業技術総合研究所健康工学研究部門、香川大学<sup>3</sup>)

○荒木大知<sup>1</sup>、伊藤民武<sup>2</sup>、北濱康孝<sup>2</sup>、山本裕子<sup>3</sup>、尾崎幸洋<sup>1</sup>

High sensitive SERS detection of antigen-antibody reaction using silver  
and gold colloidal nanoparticles

(Kwansei Gakuin Univ.<sup>1</sup>, Health Research Institute, National Institute of  
Advanced Industrial Science and Technology (AIST)<sup>2</sup>)

Daichi Araki<sup>1</sup>, Tamitake Itoh<sup>2</sup>, Yuko S. Yamamoto<sup>2</sup>, Yasutaka Kitahama<sup>2</sup>,  
Yukihiro Ozaki<sup>1</sup>

[序] 表面増強ラマン散乱(Surface-enhanced Raman scattering: SERS)は金属ナノ微粒子間の増強電場を用いてラマン散乱をより高感度に検出する方法である。特に近年、生体分子計測への応用が試されている。これまで、様々な SERS による検出が行われてきたが[1]、免疫系で重要な働きをする抗原抗体反応などは蛍光色素などを修飾して検出されていた。そこで本研究では、抗原抗体反応の蛍光色素などを修飾しないラベルフリーな検出を目標にして、銀・金ナノコロイド微粒子を用いて抗原抗体反応前後における SERS スペクトルを測定し、その違いを観察した。また、励起波長を変化させてみてどのような違いがあるのかを調べた。

[実験] 銀ナノコロイド分散液は、水に硝酸銀とクエン酸三ナトリウムを加えて攪拌しながら約 1 時間還流して調製した。また、金ナノコロイド分散液は、クエン酸三ナトリウムを水に溶かし、それから H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> を入れてから NaBH<sub>4</sub> を入れ攪拌し、2~4 時間放置して調製した。

まず、銀ナノコロイド微粒子を用いて測定した。抗原として働く一次抗体(免疫グロブリン G: IgG)と銀コロイド分散液を混合して基板上に滴下した後に、種類の異なる二次抗体をそれぞれ滴下してスペクトルを測定した。また、金ナノコロイド微粒子を用いた実験も同様の手法で行った。このときラマン検出に用いた励起波長は 785 nm であった。

次に、励起波長を先ほどから変更した 514 nm のレーザーを用いて実験を行った。尚、実験方法に関しては上記の手法と同様であった。

実験に用いた試薬は一次抗体 3 種類、二次抗体 5 種類である。

[結果と考察]

まず、IgG+銀コロイド分散液と各二次抗体との実験および IgG+金コロイド分散液と各二次抗体との実験結果を図 1 に示す。この 2 つの実験結果を比べてみると、銀コロイド分散液を用いた場合には 560 cm<sup>-1</sup> 付近(図 1 中青く囲った部分)にブロードなピークが見られた。しかし、金コロイド分散液を用いた場合だとそのようなピークを観測することが出来なかった。また、このピークは初めに一次

抗体を加えてピークが出ており(図 1 最下部)、二次抗体を加えても Biotin が修飾されたもの以外では変化が無かった。

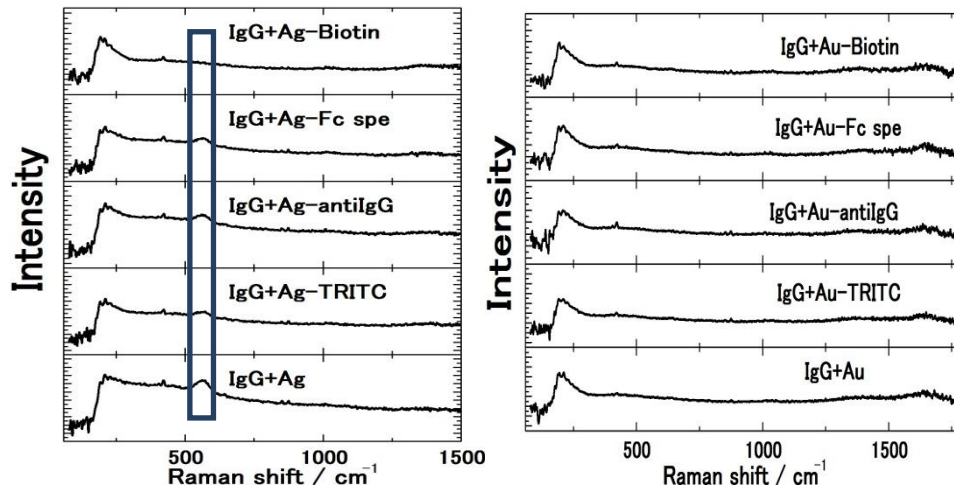


図 1 一次抗体に銀錯体溶液を混ぜたもの(左)と金錯体溶液を混ぜたもの(右)に二次抗体を滴下した場合のスペクトル

この銀コロイド分散液を用いた時に出てきたピークは、銀と IgG による電荷移動錯体形成による共鳴ラマンのピークではないかと考えている[2]。

また、図 1 中でビオチンが修飾された二次抗体を用いるとそのピークは消えているが、これはビオチンが、抗体の銀への吸着を引きはがす作用を起こして共鳴ラマンのピークが見えなかったのではないかと考えている[3]。この他にもある抗体領域に特異的に結合する二次抗体(ビオチン修飾)とそれぞれの抗体領域(Fab, Fc)を反応させてみたが、図 2 のように結合を起こさない場合ではピークが見えていた。この事から、溶液中のビオチンが銀に吸着して一次抗体の吸着を引きはがす力は無いと考えられる。これは、吸着した一次抗体の量が少ない(ただし SERS での検出は可能)なために、ビオチンが一次抗体を選択的に排除するには至らないためと思われる。一方、抗原抗体反応によって吸着部位に接近すると、選択的に一次抗体の吸着を引きはがすことができるのではないかと考察している。

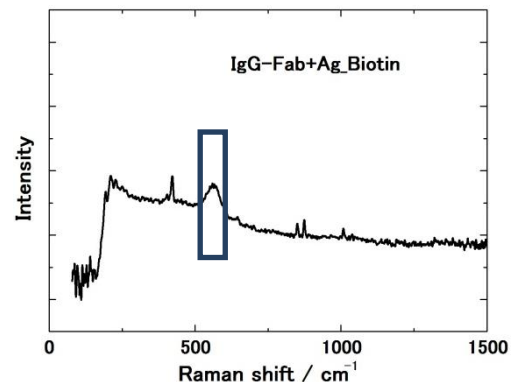


図 2 一次抗体 Fab 領域と銀コロイド分散液に Fc 領域に特異的に反応する二次抗体(Biotin 修飾)を滴下した場合のスペクトル

#### [参考文献]

- [1] Y. Kitahama, T. Itoh, P. Pienpinijtham, S. Ekgasit, X. X. Han and Y. Ozaki, ACS Symp. Ser., 2013, 1113, 181.
- [2] J. R. Lombardi, R. L. Birke, T. Lu and J. Xu, J. Chem. Phys., 1986, 84, 4174.
- [3] G. G. Huang, M. K. Hossain, X. X. Han and Y. Ozaki, Analyst, 2009, 134, 2468