

テクニカルノート 基板アッセイと解析 (1)

自作マイクロアレイを用いて検体測定の方法を説明します
既製品にはない自由な実験系の構築が可能です

1. 概要

PepTenChip®基板を用いたアッセイ法を解説します。バイオチップはサンプルに含まれるたんぱく質や毒素の簡易検出、モニタリングやスクリーニングなど実験室レベルでも様々な応用が可能です。

本テクニカルノートでは、ビオチンを捕捉分子として固定化した基板を用い、TAMRA修飾したストレプトアビジンを含む溶液をサンプルとしています。また蛍光の測定を蛍光検出器 PepTenCam で行いました。

Webではに操作動画もございますのであわせてご覧ください。



「PepTenCamデモ動画」
YouTube

2. 基板アッセイ手順

サンプル溶液を基板にアプライしてインキュベート行い、蛍光検出器により測定する手順を示します。なお基板誘導体化およびアレイ手順は別紙テクニカルノート「[基板誘導体化とマニュアルアレイ\(T014J\)](#)」をご参照下さい。

2-1 ブランク測定

1. 誘導体化、アレイ化した基板にブランク試料 (1xPBS) を10 μ L滴下する。
2. カバーガラスを被せ溶液を誘導体化部全体へ広げる (図1)。
3. 反応容器に入れ60分インキュベートする (室温、遮光)。なお調湿のため予め反応容器に水を数滴入れておく。
4. 基板を反応容器から取り出しカバーガラスを除く。基板表面を水でよく濯ぐ。
5. 基板をスピン乾燥により乾燥させる。
6. 蛍光画像を測定する (励起531 nm 蛍光593 nm) (図2)。rawデータ (PepTenCam使用の場合は.sif形式) およびTIFF画像データを保存する。
7. 基板を洗浄しH₂Oで濯ぎスピン乾燥により乾燥させる。

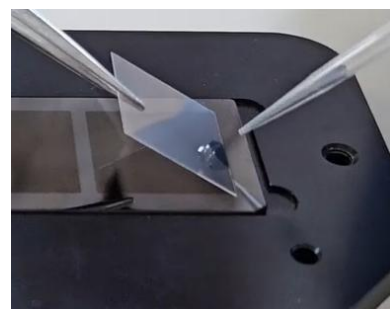


図1 カバーガラスを被せる(動画0:13)

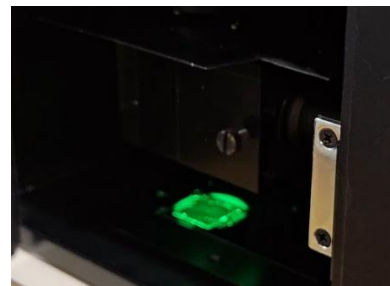


図2 PepTenCam(動画0:46)

2-2 サンプル測定

1. TAMRA修飾ストレプトアビジンを1xPBSに溶解し、1 mg/mLに調製する。
2. ブランク試料の代わりにサンプル溶液を用いて同様に操作する (図3)。

TIPS

- ◆ 基板の取り扱い、実験用手袋を着用して下さい。
- ◆ 濃度、インキュベーション時間等は固定化したい捕捉分子によって異なる場合があります。
- ◆ PepTenChip®は市販のスライドガラスと同サイズのため、お持ちの蛍光光度計もご利用できます。
- ◆ サンプル溶液に吸着しやすい物質を含む場合は必要に応じて洗浄操作を行ってください。
- ◆ 蛍光画像測定について露光時間は1 sを基準に白飛びする場合は短くし、全体が暗い場合は長くしてください。絞りなどについても同様です。

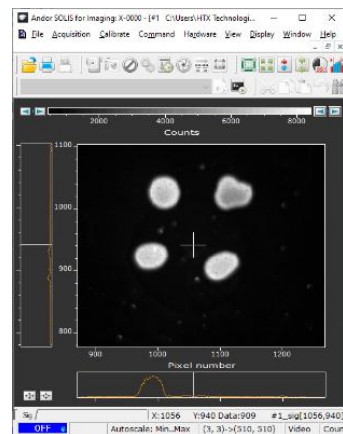


図3 蛍光測定

テクニカルノート 基板アッセイと解析 (2)

3. 画像解析

基板のアッセイにより得られたデータの解析作業を行います。解析方法は実験の目的によって異なりますが、ここでは、①蛍光画像の解析と数値化と ②アッセイ前後の蛍光強度の比較を例に示します。

画像解析と蛍光強度変化率の算出

1. 画像解析ソフトを起動しTIFF画像データを読み込む。
2. スポット部を指定し領域のintensityの中央値を読む (スポット強度)。
3. スポット周辺部を指定し領域のintensityの中央値を読む (バックグラウンド)。(図4)
4. スポット強度からバックグラウンドを差し引いて「純粋なスポット強度」を求める。
5. ブランク測定データ、サンプル測定データの全てのスポットについて同様に行う。
6. 蛍光強度の比較など実験の目的に応じた解析を行う。(図5, 図6)

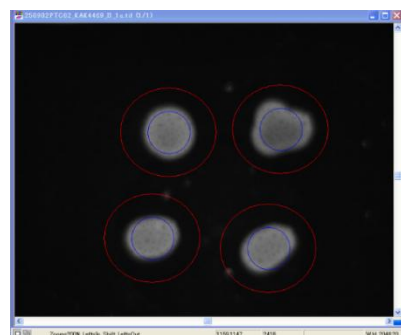


図4 画像解析

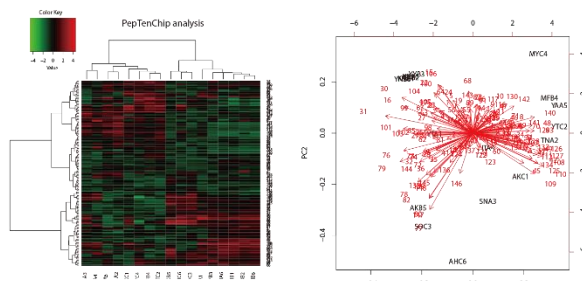


図6 応用例 ヒートマップと主成分分析

TIPS

- ◆ 弊社ではArray-Pro® Analyzer(MediaCybernetics, Inc.)を画像解析に用いていますが、オープンソースソフトウェアの ImageJ など他の画像処理ソフトウェアでも同目的の操作が可能です。

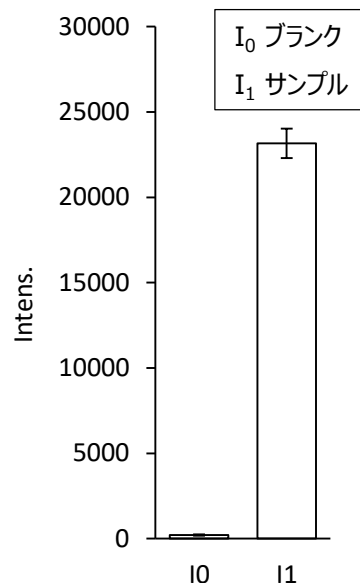


図5 蛍光強度の比較

4. PepTenCam仕様

項目	規格
構成	sCMOSカメラ(420万画素), LED光源
サイズ	H37×D25.3×W13.2
重量	約6 kg
波長	励起531±20 nm 蛍光593±20 nm (TAMRA用フィルター)(標準搭載) 励起475±20 nm 蛍光530±20 nm (FAM用フィルター) (オプション)
制御	イメージキャプチャソフトウェアAndor SOLIS(Oxford Instruments plc.)付属 ※PCは含まれません

※仕様は予告なく変更される場合があります

5. 製品

P/N	品名
PTC-CA02-01	PepTenChip® CA (表面カルボキシ基、3ブロック加工) ※
PTC-FD15-ex	PepTenCam

※他にも様々な官能基・加工パターン・基板サイズがあります

References

- 1) Tominaga, Y., and Nokihara, K., *Anal. Methods*, 2025, **17**, 4590.
- 2) 軒原, 化学工学第88巻2号, 61-64, 2024
- 3) Tominaga, Y., et. al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2026, **268**, 117210

関連Webページ

PepTenChip® <https://hipep.jp/?p=781>
オリジナルマイクロレイ <https://hipep.jp/?p=5825>

HiPep YouTube <https://www.youtube.com/@HiPep/featured>