

ノ ー ト

走査電気化学顕微鏡を用いる C 反応性タンパクの
酵素免疫センシング安川 智之^{®1}, 平 野 悠², 小笠原大知¹, 本地 直美¹,
珠 玖 仁¹, 川端 莊平³, 末永 智一¹

1 緒 言

現在, エンザイムイムノアッセイ (EIA) は, 医療, バイオ, 環境等の広範囲の分野における重要な分析対象物質の定量的検出における分析技術の主流となっている. 不均一イムノアッセイにおける抗体又は抗原の固定化相として, 96 穴のマイクロタイタープレートが最も一般的である. EIA のシグナル検出方法にはプレートリーダーによる分光学的手法が用いられており, 酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) として広く普及している. 現在では, 高感度, 迅速, シンプルをキーワードとした小型で低価格のセンシングデバイスが期待されており, 電気化学的検出方法が精力的に研究されている. 電気化学 EIA には, 分析パフォーマンスを低減させることなく小型化が容易であり, 極少量サンプルのハイスループット分析に有利であるという利点がある. 特に, 半導体微細加工プロセスの急速な発展による micro-total analysis systems (μ TAS) の進歩が, マイクロ電気化学 EIA に大きく貢献している.

電気化学エンザイムイムノセンサー¹⁾²⁾において, 抗体又は抗原は電極に直接固定化されるか, 電極の近傍の局所領域に固定化される. 免疫反応により捕捉された標識酵素の反応により電極近傍に電気化学活性物質が生成されるため, 迅速性及び高感度化が期待できる. しかも, 電気化学的検出を含む抗原-抗体反応及び洗浄工程のすべてのステップを, 電極デバイスを用いて行うことができる. よって, 通常のイムノアッセイと比較してセンシングシステム全体を簡便, 迅速, 安価にするとともに, 正確性及び操作性を向上させることができる. しかし, 電極表面や微細加工技術により作製した微小領域に免疫複合体を形成させると, 電極の再利用は困難になる. 例えば, ガラス基板上に金属

及び絶縁性ポリマーを交互に積層させドライエッチングにより構築した細孔を利用した高感度免疫センサーが報告されている³⁾. これらのデバイスの作製には多大な労力とコストを要するため, 使い捨ての使用には適さない. スクリーンプリント法による電極成型が可能な炭素系材料は, コストや簡便さにおいて優位性を示すが, 使い捨てを考えた場合, ガラスやプラスチックを免疫複合体構築のための材料とすることが望ましい. また, 電極表面上にタンパク質等の生体分子を修飾すると, 電子伝達物質の拡散阻害や界面における電子移動の阻害が起こることが一般的に知られている⁴⁾.

これまで著者らは, EIA に電気化学顕微鏡 (SECM) を組み合わせたシステムを開発してきた⁵⁾. SECM は, マイクロ・ナノ電極をプローブとした走査型プローブ顕微鏡 (scanning probe microscopy, SPM) の一種であり, 界面の局所領域において進行する化学反応を電気化学的に追跡可能なシステムである⁶⁾⁷⁾. 更に電極を 3 次元に走査することにより, 局所領域における化学物質の空間的広がりをイメージとしてとらえることが可能である. 著者らは, ガラス基板表面に免疫複合体を作製し, 標識酵素活性のイメージングによりがん胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)⁸⁾ やロイコシジン⁹⁾ の高感度検出を行った. 更に局所領域に 2 種類の抗体を固定化させたガラス基板を用い, デュアルイムノアッセイを行っている¹⁰⁾. Wittstok らのグループは, SECM による固定化抗体のイメージング¹¹⁾ や磁性微粒子を免疫反応のプラットフォームとした SECM 検出について報告している¹²⁾. また, 最近では, マイクロタイタープレートを電気化学セルとして利用したアンペロメトリックな同時検出システムが開発されている¹³⁾. このシステムでは, マイクロタイタープレートのウェルの配列に一致した 8 本の電極を用いて, 複数物質の同時検出を行っている. 著者らも分離可能な電極アレイと抗体アレイを組み合わせたデバイスを作製し, マルチ検出を行った¹⁴⁾. しかし, 電気化学検出部位と免疫複合体形成部位を分離した SECM 型の ELISA 検出システムへの応用に関する報告例は少ない.

¹ 東北大学大学院環境科学研究科環境科学専攻: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11

² 独立行政法人産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門: 062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 17-2-1

³ 株式会社アイ・ティ・リサーチ: 981-3203 宮城県仙台市泉区高森 2-1-40 21 世紀プラザ研究センター内

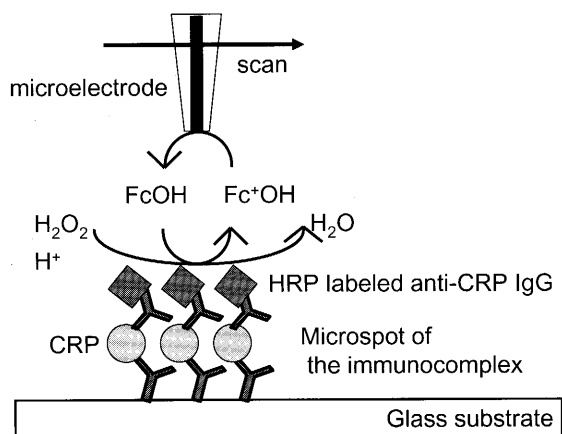


Fig. 1 Schematic illustration for the CRP detection by SECM measurements

そこで、本研究では、SECMを利用してC反応性タンパク (CRP) のEIAを行った。CRPは、急性相反応性物質と呼ばれる炎症性疾患により上昇する一群のタンパク質の一つである¹⁵⁾。Fig. 1に、SECMを用いたCRPの検出原理図を示す。まず、抗CRP抗体をガラス基板上にスポット固定化し、各種濃度のCRP及び西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗CRP抗体を連続的に反応させて、サンドイッチ型の免疫複合体スポットを構築した。次に、マイクロ電極をスポットの上方10 μm に保持し、xy平面上を走査することによりHRP酵素活性のイメージを得た。過酸化水素の存在下において、電子伝達メディエーターである還元型フェロセンメタノールはHRPの酵素反応により酸化され、酸化型フェロセンメタノールが生成される。この酸化型フェロセンメタノールをマイクロ電極によりアンペロメトリックに還元し、その還元電流量によりスポットに捕捉されたCRPを検出した。0.1~100 ng/mlの濃度範囲において、還元電流応答はCRP濃度に依存し、検量線を作成することができた。また、この手法と基板上に複数の抗体を位置規則的に配列可能な抗体アレイチップを利用した電気化学計測システムの開発を行い、複数サンプルの迅速、簡便な計測を試みた。

2 実験

2.1 試薬と溶液

マウス抗CRP抗体、HRP標識ヤギ抗CRP抗体及びCRPは、第一化学薬品からいただいた。過酸化水素は関東化学から、フェロセンメタノールはシグマアルドリッチジャパンから購入した。基板表面上へのタンパク質の非特異的吸着を低減させるために使用したウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を和光純薬工業から購入した。使用した溶液はすべて蒸留水により調製し、4°Cで保管した。電気化学計測に0.1 M Na_2HPO_4 、0.1 M

NaH_2PO_4 及び0.1 M KCl (pH 7.0) を含むリン酸緩衝液を用いた。抗体及び抗原溶液の調製に16.0 mM Na_2HPO_4 、4.0 mM KH_2PO_4 及び150 mM NaCl (pH 7.2) を含むリン酸緩衝液 (PBS) を用いた。0.05% Tween 20を含むPBS溶液 (PBST) を洗浄に用いた。

2.2 エンザイムイムノアッセイ

洗浄したガラス基板を10 mM オクタデシルトリクロロシランのベンゼン溶液に2時間浸漬し、表面の疎水化処理を行った。キャピラリースポット法を用いて500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CRP抗体溶液をガラス基板上にスポット固定し、室温で30分間インキュベートした。作製されたスポットサイズは直径50 μm である。PBSTによる洗浄後、非特異吸着を低減させるために、ガラス基板を10 mg/ml BSA溶液に1時間浸漬しブロッキングを行った。作製した抗体スポットに、CRP及びHRP標識抗CRP抗体を順に室温で30分間反応させた。サンドイッチ型の免疫複合体を形成したスポットに含まれるHRPの酵素活性を電気化学顕微鏡により検出した。

2.3 電気化学顕微鏡

電気化学顕微鏡の探針であるカーボンマイクロ電極及び金マイクロ電極は、既報の方法を利用して作製した¹⁶⁾。電気化学計測はポテンショスタット (HA1010 mM8, 北斗電工製) を用いて2極式で行い、対極及び参照極に銀塩化銀電極を用いた。作製したマイクロ電極のディスクのサイズを光学顕微鏡及び1.0 mM フェロセンメタノールのサイクリックボルタモラムにおける定常酸化電流量から評価した。カーボンディスク及び金ディスクの直径は、それぞれ10 μm 及び50 μm であった。ガラス基板とマイクロ電極先端のz方向距離は、SECMのネガティブフィードバックモードを用いて1.0 mM フェロセンメタノールの酸化電流に基づくアプローチカーブから決定した。この際、電極電位をフェロセンメタノールが十分に酸化される0.5 Vに設定した。マイクロ電極の先端をガラス基板から10 μm の位置に設置した。次に、0.5 mM 過酸化水素を添加後、マイクロ電極を免疫複合体スポット近傍において高さ一定モードで走査することにより、酵素反応により生成される酸化型フェロセンメタノールの還元電流イメージングを行った。マイクロ電極の走査速度を48.8 $\mu\text{m}/\text{s}$ 、電位を0.05 V、走査範囲を400 $\times$ 400 μm^2 とした。また、アンペロメトリック計測では、0.5 mM フェロセンメタノールを含む測定溶液に0.5 mM 過酸化水素を添加し5分間反応させた後、電極電位を開回路状態から0.05 Vにステップし、還元電流応答を経時的に測定した。

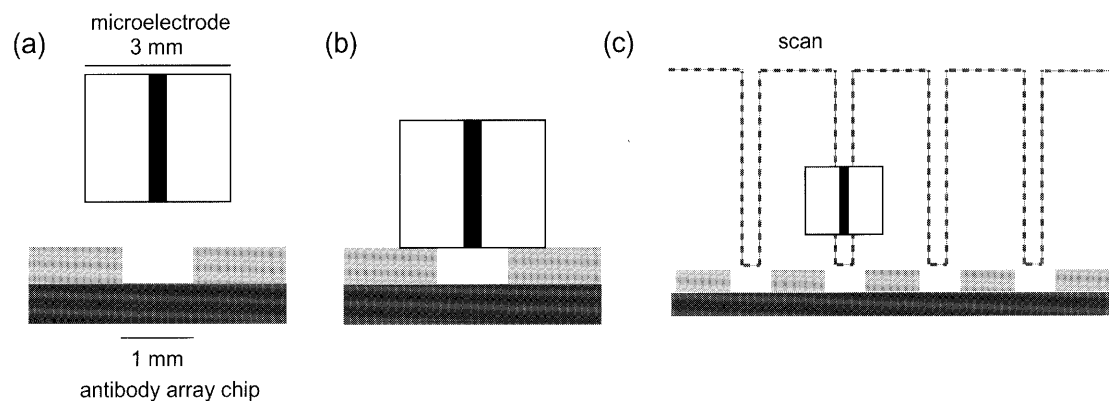


Fig. 2 Movement of the electrode attached on the developed system for the multi-samples measurement

2.4 抗体アレイチップを利用した複数サンプル計測システム

ポリスチレン板 ($10 \times 25 \times 1.7$ mm) に貫通孔を有する片面接着性のポリエチレンテレフタレートシート (PET, $50 \mu\text{m}$ 厚さ) をはり合わせて抗体アレイチップ基板とした。レーザー加工機 (Win-Laser M-Class, ユニバーサルレーザーシステム製) を用いて, 4つの貫通孔 (1×1 mm) を 1.5 mm 間隔で作製した。ポリスチレン基板上の PET の孔を抗体固相化用のウェルとして用いた。この微細孔に $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 CRP 抗体溶液を導入し, 室温で 30 分間インキュベートした。PBST により洗浄後, $10 \text{ mg}/\text{ml}$ BSA 溶液によるブロッキングを行い, 抗体アレイチップを作製した。抗体アレイチップに各濃度の CRP 溶液及び HRP 標識抗 CRP 抗体溶液を滴下し, 各微細孔においてサンドイッチ型の免疫複合体構造を構築した。この基板をポリスチレン製の測定容器に入れ, 1.0 mM フェロセンメタノール及び 0.5 mM 過酸化水素溶液を添加した。検出用電極には直径 $300 \mu\text{m}$ の金ディスク電極を用いた。直径 $300 \mu\text{m}$ の金線に銅リード線を接続し, フッ素熱収縮チューブに挿入した。ヒートガンを用いて先端部分を加熱し, チューブを収縮させ金線を封入した。先端を耐水ペーパーで研磨し, 最後にダイヤモンドグラインダー (EG-6, #5000, 成茂科学器械研究所製) で研磨した。作製した金ディスク電極の外径は約 3 mm であった。このように作製した抗体アレイチップ及び金ディスク電極を複数サンプル計測システムに搭載し, 電気化学計測を行った。電気化学計測は 3 極式で行い, 対極に白金板, 参照極に銀塩化銀電極を用いた。対極及び参照極は, 微細孔外の測定容器内に設置されている。

次に, 開発した複数サンプル測定システムの動作及び測定原理について概説する (Fig. 2)。電極ホルダーに設置された金ディスク電極は, XYZ ステージによって 3 次元に作動可能である。測定容器を所定の位置にセットすることにより, 免疫複合体を形成させた微細孔の初期位置は毎

回同じ位置に一致する。電極は xy 平面を移動し, 第 1 微細孔の真上にセットされる。ここから, 電極は z 方向に移動し (Fig. 2a), 微細孔周囲の PET シートと接触すると圧力を感知して停止する (Fig. 2b)。圧力センシングには, 高精度スイッチ (D5A-3200, オムロン) を用いた。金ディスク電極の外径 (3 mm) は微細孔サイズ ($1 \times 1 \text{ mm}$) より大きいため, 電極は微細孔内部に侵入することなく停止する。よって, PET シートの厚さ ($50 \mu\text{m}$) が電極表面-微細孔底面間距離となり, 簡便な距離制御が達成できる。そして, 電極に設定電位を所定時間印加し, 電気化学計測を行った。測定終了後, 電極は次の微細孔上に移動し順時測定を行うことができる (Fig. 2c)。この装置は, 電極駆動部, ポテンシostat及び制御用ラップトップコンピュータにより構成されている。電極駆動部は $25 \times 23 \times 34 \text{ cm}$ と小型である。

3 結果と考察

3.1 CRP の SECM イメージング

SECM により抗 CRP 抗体スポットに捕捉された HRP の酵素反応により生成された酸化型フェロセンメタノール還元電流のイメージングを行った。Fig. 3 に免疫複合体スポットの SECM イメージを示す。サンドイッチ構造は, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ CRP 溶液を用いて作製した。測定溶液中には, 1.0 mM フェロセンメタノール及び 0.5 mM 過酸化水素を添加した。イメージにおいて明るく現れた領域は, 還元電流量の高い領域であり免疫複合体スポットを構築した部位と一致した。HRP は過酸化水素を還元する際にフェロセンメタノールを酸化する。HRP の酵素反応によって生成した酸化型フェロセンメタノールは, マイクロ電極によって検出されるため, 大きな還元電流がスポット近傍で観測された。これは, 抗 CRP 抗体スポットに CRP 及び HRP 標識抗 CRP 抗体が捕捉され, サンドイッチ型の免疫複合体を構築したことを示唆している。生成された酸化型フェロセ

ンメタノールは、スポット上から半球面状に拡散するため、得られたイメージの高還元電流領域はスポットサイズの約2倍となった。

次に、CRP 濃度に対する還元電流応答について調査した。Fig. 4a に SECM イメージにおいて得られた最大電流量を有するラインの還元電流応答を示す。CRP の濃度を 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。還元電流応答は、CRP 濃度ゼロの際に得られたバックグラウンド電流を差し引いている。マイクロ電極が免疫複合体スポット上部を通過すると還元

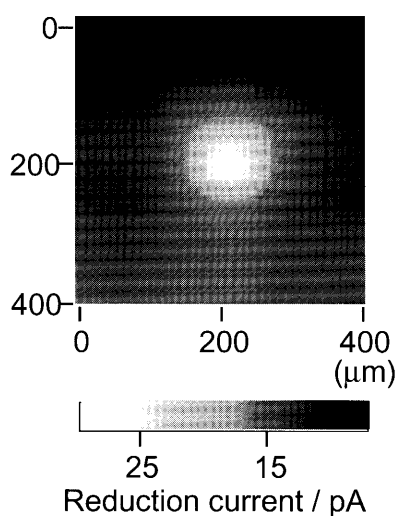


Fig. 3 SECM image obtained from the immunocomplex for the CRP

CRP solution (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added at the microspot of anti-CRP IgG antibody. A carbon microelectrode was scanned at 48.8 $\mu\text{m}/\text{s}$. The distance between the microelectrode and the substrate was 10 μm .

電流の増加が観測された。また、ピーク電流は CRP 濃度の増加に伴って増加した。CRP を含まない PBS 溶液をスポットに滴下した場合、スポットから還元電流応答は得られなかった。Fig. 4b に CRP 濃度に対する還元電流応答を示す。還元電流は、0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲において CRP 濃度の対数にほぼ比例した。このように、SECM イメージングを用いると局所領域に構築された免疫複合体スポットを可視的にとらえることが可能である。また、免疫複合体スポットのサイズは 50 μm 程度と小さいため免疫センシングシステムの小型化が可能となり、極微量のサンプルでのセンシングができる。しかし、電極を走査することによるイメージングには長い測定時間を要する。本実験で行ったイメージングでは、1 イメージを得るために約 10 分かかる。そこで、電極を免疫複合体スポットの上方に保持したアンペロメトリック計測を行い、検出時間の短縮を試みた。

3.2 アンペロメトリーによる CRP 検出

マイクロ電極を免疫複合体スポットの 10 μm 上方に保持し、HRP の酵素反応により生成された酸化型フェロセンメタノールのアンペロメトリック計測により CRP 検出を行った (Fig. 5a)。電極電位を開回路状態から 0.05 V にステップさせると、容量電流に基づく大きなスパイク上の電流応答が得られ、その後で徐々に減少し約 20 秒後に定常電流を得た。定常電流量は、CRP 濃度の増加に伴い増加した。これは、免疫複合体スポットに捕捉された HRP により生成される酸化型フェロセンメタノールの局所濃度、すなわち捕捉された HRP 量に起因している。電位ステップ後、数秒の還元電流応答は容量電流成分を含んでい

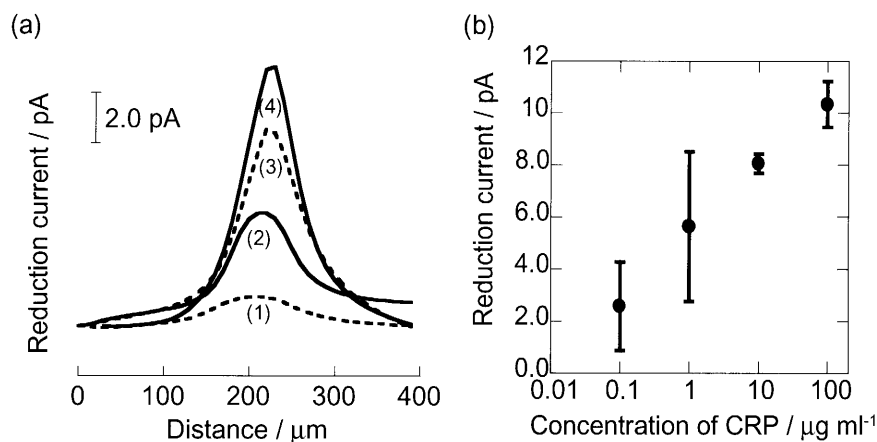


Fig. 4 (a) Sectional planes of images across the spots with the maximum reduction current of $\text{Fc}^+ \text{OH}$ generated from the spots constructed at different concentrations of CRP. The concentrations of CRP solution to construct immunocomplexes were (1) 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (2) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (3) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and (4) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (b) Variation of the current responses as a function of CRP concentration

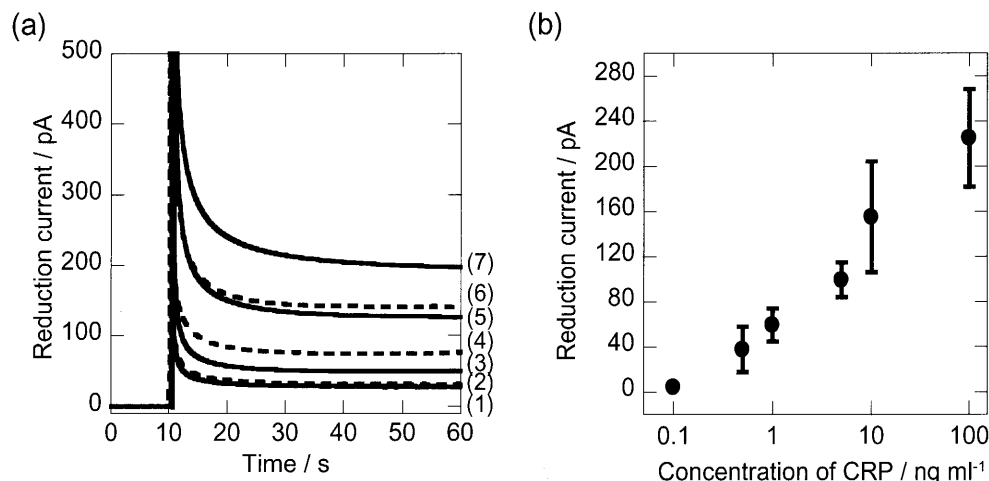


Fig. 5 (a) Amperometric responses obtained from the immunocomplex for the CRP at the microelectrode positioned 10 μm above the microspots. The concentrations of CRP solution to construct immunocomplexes were (1) 0 ng/ml, (2) 0.1 ng/ml, (3) 0.5 ng/ml, (4) 1.0 ng/ml, (5) 5.0 ng/ml, (6) 10 ng/ml and (7) 100 ng/ml. (b) Variation of the current responses as a function of CRP concentration

るが、十分にその差をとらえることが可能である。そこで、電位ステップ後 10～20 秒の電流量の平均を CRP 濃度に対してプロットした (Fig. 5b)。この際、各 CRP 濃度において得られた還元電流応答から、バックグラウンド電流 (CRP 濃度ゼロにおいて得られた電流量) を差し引いている。0.1～100 ng/ml の濃度範囲において、還元電流と CRP 濃度の対数との間には比例関係があった。このことから、電極位置を固定化したアンペロメトリックな計測により、数十秒レベルで 1 つの免疫複合体スポットに捕捉された測定対象物質を検出できることが分かった。ここで、SECM イメージングにおいて得られた検量線と比較して極めて高感度な検出が可能であることが分かる。これは、アンペロメトリーにおいて、比較的大きな直径 50 μm の金マイクロ電極を使用しているため、大きな還元電流応答が得られることに起因する。SECM イメージングで検出している電流は数 pA と極めて微小であり、現在のポテンショスタットの性能からこれ以上の微小電流を計測することは困難である。よって、直径 10 μm のマイクロ電極を用いた場合には、ng/ml レベルの高感度検出が困難であると考えられる。しかし、SECM イメージングでは、高解像度のイメージを得るために免疫複合体スポットよりも小さなマイクロ電極を使用する必要がある。

3.3 複数サンプル計測システムを用いた CRP 検出

複数のサンプルを簡便、迅速、高感度に診断することは、ハイスループットスクリーニングに直結するため極めて重要な課題である。そこで、SECM をベースとして複数の免疫複合体スポットから応答を検出できる小型で簡易な複数

サンプル計測システムの開発を行った。アンペロメトリーを用いた CRP 検出の結果から、基板上的免疫複合体スポットに固定化された酵素 (HRP) の反応を高感度に検出可能であることが分かった。しかし、電流応答は電極とスポット間距離に大きく依存する。ガラス基板上にスポットを作製した場合には、電極-スポット基板間の距離を制御するために SECM のネガティブフィードバックモードを利用した煩雑な操作が必要であった。複数の免疫複合体スポットから迅速に応答を検出するためには、電極と免疫複合体スポット間の距離を簡便に制御する技術が必要である。そこで、複数の免疫複合体スポットを規則的に配列した抗体アレイチップと複数サンプル計測システムの開発を行った。

Fig. 6 に、開発した複数サンプル測定システムを用いて得られた CRP の検量線を示す。4 つの微細孔には、10, 100 ng/ml, 1 及び 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CRP 溶液を滴下して免疫複合体を形成させた。各微細孔において 30 秒間測定を行い 20～30 秒において得られた電流量の平均を CRP 濃度に対してプロットした。また、これまでと同様に、電流量は CRP 濃度ゼロの場合に得られた還元電流シグナルをバックグラウンドとして差し引いている。この測定装置を用いた場合でも、還元電流応答は CRP 濃度の対数に比例しており、この装置の有効性が示された。4 種類のサンプルの測定に要する時間は約 4 分であり、SECM イメージングと比較して短時間計測を達成した。

4 結 言

SECM を利用したエンザイムイムノアッセイにより

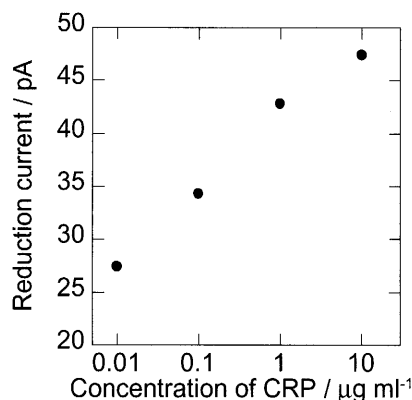


Fig. 6 Plots of the current responses as a function of CRP concentration obtained by using the developed system for the multi-samples measurement

CRP の検出を行った。酵素固定化スポット領域において HRP の酵素反応により生成された酸化型フェロセンメタノールの還元電流の増加が観測され、免疫複合体スポットに捕捉された CRP をイメージとしてとらえることができた。これより、スポット上に抗体-抗原-HRP 標識抗体のサンドイッチ構造が形成されていることが分かった。電流応答は CRP の濃度に依存し、0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲において直線関係が得られた。また、免疫複合体スポット上に金マイクロ電極を固定化したアンペロメトリーによる CRP の検出を行った。SECM イメージングと同様に、CRP 濃度の増加に伴い還元電流応答の増加が観測された。0.1~100 ng/ml の濃度範囲において直線関係が得られ、高感度な検出が可能であった。更に、複数の免疫複合体スポットを規則的に配列した抗体アレイチップと SECM をベースとした複数サンプル計測システムの開発を行った。

このシステムを用いると、これまで極めて煩雑であった電極と免疫複合体スポット間の距離の制御を簡便に達成することができ、4 分程度で 4 種類のサンプルの測定が可能であることを示した。

文 献

- 1) A. Warsinke, A. Benkert, F. W. Scheller: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 622 (2000).
- 2) M. Diaz-Gonzalez, M. B. Gonzalez-Garcia, A. Costa-Garcia: *Electroanalysis*, **17**, 1901 (2005).
- 3) Z. P. Aguilar, W. R. Vandaveer, IV, I. Fritsch: *Anal. Chem.*, **74**, 3321 (2002).
- 4) A. Bardea, E. Katz, I. Willner: *Electroanalysis*, **12**, 1097 (2000).
- 5) H. Yamada, H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **33**, 91 (1994).
- 6) R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess, S. Winkquist: *Anal. Chem.*, **58**, 844 (1986).
- 7) A. J. Bard, F.-R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev: *Anal. Chem.*, **61**, 132 (1989).
- 8) H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida: *Anal. Chem.*, **68**, 1276 (1996).
- 9) S. Kasai, A. Yokota, H. Zhou, M. Nishizawa, K. Niwa, T. Onouchi, T. Matsue: *Anal. Chem.*, **72**, 5761 (2000).
- 10) H. Shiku, Y. Hara, T. Matsue, I. Uchida, T. Yamauchi: *J. Electroanal. Chem.*, **438**, 187 (1997).
- 11) G. Wittstock, K. J. Yu, H. B. Halsall, T. H. Ridgway, W. R. Heineman: *Anal. Chem.*, **67**, 3578 (1995).
- 12) C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, H. B. Halsall, W. R. Heineman: *Electroanalysis*, **12**, 640 (2000).
- 13) T. C. Tang, A. Deng, H. J. Huang: *Anal. Chem.*, **74**, 2617 (2002).
- 14) D. Ogasawara, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, K. Kobori, K. Ushizawa, S. Kawabata, T. Matsue: *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1784 (2006).
- 15) N. Rifai, P. M. Ridker: *Clin. Chem.*, **47**, 403 (2001).
- 16) T. Yasukawa, I. Uchida, T. Matsue: *Biophys. J.*, **76**, 1129 (1999).

Enzyme Immunosensing for C-Reactive Protein with Scanning Electrochemical Microscopy

Tomoyuki YASUKAWA¹, Yu HIRANO², Daichi OGASAWARA¹, Naomi MOTOCHI¹,
Hitoshi SHIKU¹, Shohei KAWABATA³ and Tomokazu MATSUE¹

¹ Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, 6-6-11, Aramaki Aoba, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8579

² National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 062-8517

³ I. T. Research Co., Ltd., The 21st Century Plaza Research Center, 2-1-40-311, Takamori, Izumi-ku, Sendai-shi, Miyagi 981-3203

(Received 8 July 2006, Accepted 28 August 2006)

Scanning electrochemical microscopy (SECM) has been applied to enzyme immunoassay for the detection of C-reactive protein (CRP). The immunocomplexes of the sandwich type with horseradish peroxidase (HRP) labeling were constructed at the microspots of an anti-CRP IgG antibody fabricated on a hydrophobic glass substrate by capillary microspotting. In the presence of ferrocenemethanol (FcOH) as an electron mediator and hydrogen peroxide as a substrate of HRP, the oxidized form of FcOH (Fc^+OH) was generated at localized areas corresponding to the microspot of immunocomplexes by an enzymatic reaction of captured antibodies with HRP label. The reduction current of Fc^+OH was detected with a microelectrode at 0.05 V *vs.* Ag/AgCl and mapped by scanning the microelectrode to view SECM images of the spots for CRP. An amperometric determination of CRP was also performed using the microelectrode positioned at 10 μm above the microspots. Relationships between the reduction current in SECM images and the concentration of CRP, were obtained in the range of 0.1 ng/ml to 100 ng/ml. A system for multi-samples measurements has been developed using amperometric determination and antibody array chips.

Keywords : enzyme immunoassay; scanning electrochemical microscopy (SECM); microelectrode; amperometry; multi-samples; antibody array chip.