(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115667932 A
(43)申请公布日 2023.01.31

(21)申请号 202180031163.4
(22)申请日 2021.03.01
(30)优先权数据
2020-031457 2020.02.27 JP
2020-159008 2020.09.23 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/007726 2021.03.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/172591 JA 2021.09.02
(71)申请人 提尔埃克斯奥股份有限公司
地址 日本兵库县
(72)发明人 竹内俊文 砂山博文 高野惠里
(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
专利代理师 李雪 姚开丽
(51)Int.Cl.
G01N 33/566(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书41页 附图12页

(54)发明名称

传感用纳米颗粒及其制造方法

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种容易制造且特异性优异的人工生物传感器及其制造方法。传感用纳米颗粒包含具有生物物质的分子印迹空间的分子印迹聚合物,上述分子印迹聚合物包含源于具有功能性基团的功能性单体的结构单元,其中,所述功能性基团包含与上述生物物质的相互作用基团以及不同于上述相互作用基团的信号物质结合基团;上述功能性基团存在于上述分子印迹空间表面。该传感用纳米颗粒可用作容易制造且特异性优异的人工生物传感器。

CN 115667932 A

1.一种传感用纳米颗粒,其中,包含具有生物物质的分子印迹空间的分子印迹聚合物;

所述分子印迹聚合物包含源于具有功能性基团的功能性单体的结构单元,所述功能性基团包含与所述生物物质的相互作用基团以及不同于所述相互作用基团的信号物质结合基团;

所述功能性基团存在于所述分子印迹空间的表面。

2.根据权利要求1所述的传感用纳米颗粒,其中,所述功能性基团由下述式(1)所示,

[化学式1]

$-R^2-L^1-R^1$　　(1)

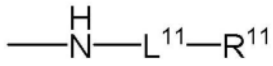
式(1)中,R^1表示与所述生物物质的相互作用基团,R^2表示包含所述信号物质结合基团的连接基团,L^1表示直接键合或连接基团。

3.根据权利要求1或2所述的传感用纳米颗粒,其中,所述相互作用基团选自由取代或未取代的氨基、取代或未取代的芳香族基团、脒基、胍基、羧基、磺基、二羟硼基以及所述生物分子的配体组成的组。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述信号物质结合基团选自由氨基、羧基、硫醇基、含二硫基的基团、氨基氧基、醛基以及羟基组成的组。

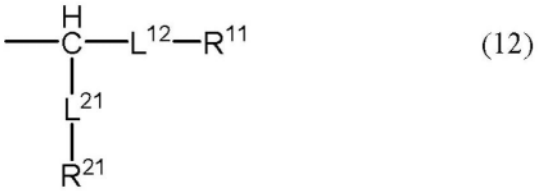
5.根据权利要求1至4中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述功能性基团由下述式(11)或式(12)所示,

[化学式2]

　　(11)

式(11)中,R^{11}表示羧基芳基或磺基芳基,L^{11}表示碳原子数1～4的亚烷基;

[化学式3]

　　(12)

式(12)中,R^{11}表示羧基芳基或磺基芳基,L^{12}表示二价连接基团,R^{21}表示氨基、羧基、硫醇基、含二硫基的基团、氨基氧基、醛基或羟基,L^{21}表示二价连接基团。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述传感用纳米颗粒包含结合于所述信号物质结合基团的信号基团。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述分子印迹聚合物包含源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺和/或生物相容性单体的结构单元。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述生物物质选自由蛋白质、糖链、脂质、以及这些物质中两种以上的复合分子组成的组。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述生物物质为白蛋白。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述传感用纳米颗粒用于所述生物物质的检测。

11.根据权利要求1至9中任一项所述的传感用纳米颗粒,其中,所述生物物质为附着或

结合于膜结构体的生物膜的物质、相当于所述生物膜暴露的部分结构的分子或特定的生物分子的片段，并且用于通过利用所述相互作用基团捕获所述生物分子来检测所述膜结构或所述特定的生物分子。

12.根据权利要求11所述的传感用纳米颗粒，其中，所述膜结构体为细胞、病毒、细胞外囊泡或细胞器，所述特定的生物分子为抗体。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，所述生物物质为源于对应于哈拉姆的动植物的生物物质，用于清真检查。

14.一种传感用基板，其包括基板和固定在所述基板上的权利要求1至13中任一项所述的传感用纳米颗粒。

15.一种传感用试剂，其包含权利要求1至13中任一项所述的传感用纳米颗粒。

16.一种传感用纳米颗粒的制造方法，其包含如下工序：

工序1，通过以生物物质为模板、使包含具有功能性基团的功能性单体的单体成分聚合，合成分子印迹聚合物，其中，所述功能性基团包含与所述生物物质的相互作用基团以及不同于所述相互作用基团的信号物质结合基团；以及

工序2，从所述分子印迹聚合物中去除所述模板。

17.根据权利要求16所述的传感用纳米颗粒的制造方法，其包含工序3，即，在所述工序2之后，使信号物质与所述分子印迹聚合物中的信号物质结合基团结合。

传感用纳米颗粒及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及传感用纳米颗粒及其制造方法。

背景技术

[0002] 蛋白质等生物物质参与新陈代谢、信号转导、免疫、生物结构的形成等诸多生命现象，为诊断疾病等提供有用的信息。为了进一步提高这种生物分子的实用价值，正在进行将识别生物分子的材料应用于生物传感器的研究。

[0003] 在生物传感器中用作识别生物分子的受体的抗体因其优异的特异性和亲和性而极大地促进了生物传感器的性能。另一方面，由于抗体是生物分子，因此存在容易受热和pH等外部刺激的影响以及成本高等固有问题。

[0004] 鉴于抗体的固有问题，尝试应用分子印迹来人工获取抗体的特异性和亲和性。分子印迹被确立为在聚合物中模制生物分子模板的技术。具体而言，形成模板生物分子与功能性单体的复合物，并与交联剂一起共聚，然后去除模板，从而得到具有与模板互补的结合空间(分子印迹空间)的分子印迹聚合物(MIP)。已经报道有在基板上制膜这样的MIP膜的各种人工生物传感器基板。

[0005] 例如，非专利文献1中报道了一种人工生物传感器基板，其能提高结合于分子印迹空间的生物标志物的检测灵敏度。在该人工生物传感器基板中，通过创建分子印迹空间而在初始结合时无需使用抗体，并且，该人工生物传感器基板通过用电容依赖性生物传感器替代二级标记抗体，提高了检测和定量复杂样品中的低浓度的生物分子的灵敏度，快速且无需高灵敏度标记。

[0006] 另外，非专利文献2中报道了一种人工生物传感器基板，其可提高分子印迹空间的特异性和亲和性，而且通过荧光变化读出结合信息。在该人工生物传感器基板中，通过将具有各自不同的可逆键(二硫基和氧亚氨基)的两种功能性单体经共价键引入模板α-甲胎蛋白(AFP)中，并通过分子印迹而形成MIP膜后，断裂可逆键而去除AFP，从而使源于可逆键的两种官能团(硫醇基和氧氨基)定位于分子印迹空间内。通过将与AFP相互作用的基团引入这两种官能团中的一种官能团中，可提高AFP对分子印迹空间的特异性和亲和性，通过将荧光报告分子引入另一种官能团中，可通过荧光变化读出AFP与分子印迹空间的结合信息。

[0007] 现有技术文件

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Journal of Visualized Experiments,132,e57208,doi:10.3791/57208(2018)

[0010] 非专利文献2:Angewandte Chemie International Edition.,55,13023-13027(2016)

发明内容

[0011] 发明要解决的课题

[0012] 如上所述,对于在基板上制膜了MIP膜的人工生物传感器基板,虽然进行了提高其性能的研究,但不得不说仍有改进的余地。

[0013] 非专利文献1的技术是利用分子印迹空间代替抗体,以提高识别分子的检测灵敏度为主旨。然而,利用分子印迹空间所发挥的识别能力仅仅为基于目标分子表面的互补形状所发挥的程度,对于其特异性和亲和性远不能令人满意。

[0014] 非专利文献2的技术在分子印迹空间内追加与对象分子的相互作用基团,从而通过不仅利用所述空间形状、而且利用与相互作用基团的相互作用来提高分子印迹空间与对象分子的亲和性。另外,通过用于将相互作用基团定位于分子印迹空间内的分子印迹方案,可减少在该空间以外的非特异性吸附。然而,为了得到这些优异的性能,需要预先将两种功能性单体共价键合于模板上的特殊工序,导致制法复杂化。

[0015] 本发明人对非专利文献2的技术进行了研究,通过舍去其中的上述特殊工序而使制法简单化。具体而言,通过使用具有与模板生物分子以非共价键形式(通过非共价键或类似于非共价键的弱共价键)相互作用的官能团(相互作用基团)的功能性单体,尝试在聚合体系中使该功能性单体吸附于模板表面,并将相互作用基团定位于分子印迹空间中。另外,在该尝试中,为了将引入荧光报告分子的基团(信号物质结合基团)也定位于分子印迹空间中,以使该功能性单体具有相互作用基团和信号物质结合基团两者的方式来进行设计。然而,即使使用这样的制造方法,也面临所得到的人工生物传感器基板的特异性差的问题。

[0016] 因此,本发明的目的在于提供一种容易制造且特异性也优异的人工生物传感器及其制造方法。

[0017] 用于解决课题的技术手段

[0018] 本发明人进行了深入研究,结果发现,通过使用具有相互作用基团和信号物质结合基团两者的单体,并以使其为颗粒状的方式来形成MIP,尽管是未对模板进行特殊工序的简单制法,仍可得到特异性优异的人工生物传感器。基于这些见解,通过进一步反复研究而完成了本发明。

[0019] 即,本发明提供下述所示的发明。

[0020] 项1.一种传感用纳米颗粒,其中,包含具有生物物质的分子印迹空间的分子印迹聚合物,

[0021] 上述分子印迹聚合物包含源于具有功能性基团的功能性单体的结构单元,其中,所述功能性基团包含与上述生物物质的相互作用基团以及不同于上述相互作用基团的信号物质结合基团,

[0022] 上述功能性基团存在于上述分子印迹空间的表面。

[0023] 项2.根据项1所述的传感用纳米颗粒,其中,上述功能性基团由下述式(1)所示。

[0024] [化学式1]

[0025] $-R^2-L^1-R^1$ (1)

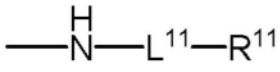
[0026] [R^1表示与上述生物物质的相互作用基团,R^2表示包含上述信号物质结合基团的连接基团,L^1表示直接键或连接基团。]

[0027] 项3.根据项1或项2所述的传感用纳米颗粒,其中,上述相互作用基团选自由取代或未取代的氨基、取代或未取代的芳香族基团、脒基、胍基、羧基、磺基、二羟硼基(borony1)以及上述生物分子的配体组成的组。

[0028] 项4.根据项1～3中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，上述信号物质结合基团选自由氨基、羧基、硫醇基、含二硫基的基团、氨基氧基、醛基以及羟基组成的组。

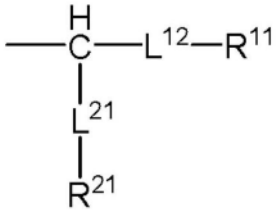
[0029] 项5.根据项1～4中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，上述功能性基团由下述式(11)或式(12)所示。

[0030] [化学式2]

[0031]  (11)

[0032] [R^{11}表示羧基芳基或磺基芳基，L^{11}表示碳原子数1～4的亚烷基。]

[0033] [化学式3]

[0034]  (12)

[0035] [R^{11}表示羧基芳基或磺基芳基，L^{12}表示二价连接基团，R^{21}表示氨基、羧基、硫醇基、含二硫基的基团、氨基氧基、醛基或羟基，L^{21}表示二价连接基团。]

[0036] 项6.根据项1～5中任一项所述的传感用纳米颗粒，其包含结合于上述信号物质结合基团的信号基团。

[0037] 项7.根据项1～6中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，上述分子印迹聚合物包含源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺和/或生物相容性单体的结构单元。

[0038] 项8.根据项1～7中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，上述生物物质选自由蛋白质、糖链、脂质，以及这些物质中两种以上的复合分子组成的组。

[0039] 项9.根据项1～8中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，上述生物物质为白蛋白。

[0040] 项10.根据项1～9中任一项所述的传感用纳米颗粒，其用于上述生物物质的检测。

[0041] 项11.根据项1～9中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，上述生物物质为附着或结合于膜结构体的生物膜的物质、相当于上述生物膜暴露的部分结构的分子或特定的生物分子的片段，并且用于通过利用上述相互作用基团捕获所述生物分子来检测上述膜结构或上述特定的生物分子。

[0042] 项12.根据项11所述的传感用纳米颗粒，其中，上述膜结构体为细胞、病毒、细胞外囊泡或细胞器，上述特定的生物分子为抗体。

[0043] 项13.根据项1～12中任一项所述的传感用纳米颗粒，其中，上述生物物质为源于对应于哈拉姆(haram)的动植物的生物物质，用于清真(halal)检查。

[0044] 项14.一种传感用基板，其包括基板和固定在上述基板上的项1～13中任一项所述的传感用纳米颗粒。

[0045] 项15.一种传感用试剂，其包含项1～13中任一项所述的传感用纳米颗粒。

[0046] 项16.一种传感用纳米颗粒的制造方法，其包含如下工序：

[0047] 工序1，通过以生物物质为模板、使包含具有功能性基团的功能性单体的单体成分聚合，合成分子印迹聚合物，其中，上述功能性基团包含与上述生物物质的相互作用基团以及不同于上述相互作用基团的信号物质结合基团；以及

[0048] 工序2,从上述分子印迹聚合物中去除上述模板。

[0049] 项17.根据项16所述的传感用纳米颗粒的制造方法,其包含工序3,即,在上述工序2之后,使信号物质与上述分子印迹聚合物中的信号物质结合基团结合。

[0050] 发明效果

[0051] 根据本发明,提供了容易制造且特异性也优异的人工生物传感器及其制造方法。

附图说明

[0052] 图1示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的一个例子。

[0053] 图2示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的其他例子。

[0054] 图3示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的使用方式的例子。

[0055] 图4示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的制造方法的一个例子中的工序1。

[0056] 图5示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的制造方法的一个例子中的工序2和工序3。

[0057] 图6示意性地示出本发明的传感用基板的一个例子。

[0058] 图7示意性地示出本发明的传感用基板的其他例子。

[0059] 图8示出试验例5中得到的、基于实施例2(相当于图7的传感用基板)测定的蛋白质吸附试验的结果。

[0060] 图9示出试验例5中得到的、基于比较例2(设有MIP膜的对比用的传感用基板)测定的蛋白质吸附试验的结果。

[0061] 图10示出试验例6中得到的、基于BCP法测定的HSA浓度与基于用传感用基板测定的HSA结合的相对荧光强度之间的相关性。

[0062] 图11示出试验例7中得到的、对于其上固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的传感用基板而得到的相对荧光强度与PSA浓度之间的相关性。

[0063] 图12示出试验例7中得到的、基于传感用基板(其上固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs)(相当于图7的传感用基板)测定的蛋白质吸附试验的结果。

[0064] 图13示出试验例7中得到的、基于传感用基板(其上固定有比较例3的引入了荧光基团的NIP-NGs)测定的蛋白质吸附试验的结果。

[0065] 图14示出试验例7中得到的、基于传感用基板(其上固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs)(相当于图7的传感用基板)测定的、PSA掺杂的牛肉提取物样品中的PSA吸附试验的结果。

[0066] 图15示出试验例7中得到的、基于传感用基板(其上固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs)(相当于图7的传感用基板)测定的、猪肉提取物样品掺杂的牛肉提取物样品中的荧光响应试验的结果。

[0067] 图16示出试验例8中得到的、针对实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的非固定(游离)颗粒添加PSA时的荧光光谱变化(λex=647nm)。

[0068] 图17是试验例8中得到的、实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的非固定(游离)颗粒针对PSA(传感对象蛋白质)或转铁蛋白(参照蛋白质)的选择性实验,并且示出以规定浓度添加每种蛋白质时的667nm处的相对荧光强度变化。

[0069] 图18示出试验例9中得到的、针对Fc结构域传感用(并且通过Fc结构域捕获的IgG

传感用)基板添加Fc结构域片段时的相对荧光强度变化。

[0070] 图19示出试验例9中得到的、针对Fc结构域传感用(并且通过捕获Fc结构域的IgG传感用)基板添加Fc结构域片段、完整IgG或溶酶体时的相对荧光强度变化。

[0071] 图20示出试验例10中得到的、基于通过捕获HER2的外泌体传感用基板测定的相对荧光强度与外泌体浓度之间的关系。

[0072] 图21示出试验例10中得到的、对于通过捕获HER2的外泌体传感用基板和引入了抗HSA亲和体代替抗HER2亲和体的传感用基板添加源于HER2过表达型乳腺癌细胞株的外泌体时的相对荧光强度变化。

具体实施方式

[0073] [1.传感用纳米颗粒]

[0074] 本发明的传感用纳米颗粒包含具有生物物质的分子印迹空间的分子印迹聚合物;上述分子印迹聚合物包含源于具有功能性基团的功能性单体的结构单元,其中所述功能性基团包含与上述生物物质的相互作用基团以及不同于上述相互作用基团的信号物质结合基团;上述功能性基团存在于上述分子印迹空间的表面。下面,对本发明的传感用纳米颗粒进行详细说明。

[0075] 图1中示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的一个例子。如图1所示,传感用纳米颗粒10包含分子印迹聚合物20(具有生物物质的分子印迹空间21);分子印迹聚合物20包含源于功能性单体(具有功能性基团22)的结构单元,其中,所述功能性基团22包含与生物物质的相互作用基团(图中,用R^1示意性地表示)以及不同于上述相互作用基团的信号物质结合基团(图中,包含于用R^2示意性地表示的结构中);功能性基团22存在于分子印迹空间21的表面。传感用纳米颗粒10具有游离的信号物质结合基团,并且可通过在信号物质结合基团中引入信号基团以形成传感用纳米颗粒10a的形式来用作识别生物物质的传感器。传感用纳米颗粒10可以由用户自由选择应该引入信号物质结合基团中的信号基团来定制。

[0076] 另外,图2示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的其他例子。对于图2所示的传感用纳米颗粒10a,预先在图1所示的传感用纳米颗粒10的信号物质结合基团中引入信号基团31。因此,传感用纳米颗粒10a本身可以用作识别生物物质的传感器。

[0077] 进而,图3示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的使用方式的例子。图3中示出图2所示的传感用纳米颗粒10a(用于识别生物物质的传感器)识别并捕获作为传感对象的生物物质90的方式。

[0078] [1-1.分子印迹聚合物]

[0079] [1-1-1.形状]

[0080] 分子印迹聚合物20为颗粒状,具有成为传感对象的生物物质(图3所示的生物物质90)的分子印迹空间(凹部)21。对于设置在一个分子印迹聚合物分子20中的印迹空间21的数量,可以如图示那样为一个,也可以为多个(例如2至3个,优选为2个)。由于分子印迹空间21是通过以成为传感对象的生物物质为模板的分子印迹而形成的,因此具有与该生物物质的表面形状互补的形状。

[0081] 分子印迹聚合物20为颗粒状实质上有助于传感用纳米颗粒10a的优异特异性的表现。以与分子印迹聚合物20相同的单体结构在基板上制膜平膜状的分子印迹聚合物(MIP

膜)、并引入信号基团而制备用于识别生物物质的传感器基板,这样的传感器基板无法表现出与本发明的传感用纳米颗粒一样优异的特异性。虽然能够得到如此优异的特异性的表现作为本发明特有的效果的具体机理尚不明确,但是可考虑以下原因作为一种考察。可考虑:在以生物物质为模板来形成膜(聚合)时,由于模板容易随机存在,因此不均匀地(分子印迹空间的开口径的大小波动较大的状态)形成分子印迹空间,由此,相对于所有分子印迹空间而言,会产生非特异性吸附的分子印迹空间(例如,因开口径过小而无法发挥足够的选择性的分子印迹空间)的比例较大,相对于此,在以生物物质为模板来形成聚合物颗粒(聚合)时,由于对聚合物为相对亲水性的生物物质模板容易存在于聚合物和聚合反应液的界面附近,因此可以以高均匀性(分子印迹空间的开口径的大小波动较小的状态)形成分子印迹空间,由此,相对于所有分子印迹空间而言,会产生非特异性吸附的分子印迹空间的比例非常小。

[0082] 进而,对于分子印迹聚合物20为颗粒状,作为用于识别具体的生物物质的传感器的形状不受基板形状的限定,因此,例如可以以液体状的传感试剂的形式进行制剂,在通用性方面也优异。

[0083] 作为分子印迹聚合物20的平均粒径,依据于为传感对象的生物物质的大小和用途等而不同,但是例如以通过动态光散射法(DLS)测定的体积平均粒径(体积粒径分布的累计50%的值)计可为5nm至500nm,可举出以通过DLS测定的Z平均粒径计为5nm至500nm。更具体而言,作为在给药至生物体内而使用时、以及用于观察细胞内部的体外成像时的分子印迹聚合物20的平均粒径,可举出以通过动态光散射法(DLS)测定的体积平均粒径计为5nm至100nm,可举出以通过DLS测定的Z平均粒径计为5nm至100nm。另外,作为在不给药至生物体内而使用时的分子印迹聚合物20的平均粒径,可举出以通过动态光散射法(DLS)测定的体积平均粒径计为5nm至500nm,可举出以通过DLS测定的Z平均粒径计为5nm至500nm。作为优选的分子印迹聚合物20的平均粒径,可举出以体积平均粒径计为7nm至50nm、8nm至40nm、15nm至30nm或20nm至25nm,可举出以Z平均粒径计为7nm至50nm、8nm至40nm、15nm至30nm或20nm至25nm。

[0084] [1-1-2.在分子印迹空间内排列的功能性基团]

[0085] 在分子印迹聚合物20中,分子印迹空间21中存在功能性基团22。功能性基团22有助于识别成为传感对象的生物物质以及提供基于此的信号信息。在本发明中,只要分子印迹空间21中存在功能性基团22,就允许分子印迹空间21以外的分子印迹聚合物20的表面存在功能性基团22,但是分子印迹空间21中,利用塑造成为传感对象的蛋白质的形状和功能性基团22的存在,可抑制由成为传感对象的生物物质以外的分子导致的非特异性吸附,发挥优异的特异性。

[0086] [1-1-3.功能性基团的结构]

[0087] 如上所述,功能性基团22包含与为传感对象的生物物质的相互作用基团(图中,用R^1示意性地表示)和信号物质结合基团(图中,包含于用R^2示意性地表示的结构中)。进而,相互作用基团和信号物质结合基团被设计为彼此不同的基团。

[0088] [1-1-3-1.相互作用基团和信号物质结合基团的功能]

[0089] 相互作用基团为如下基团,该基团能够与作为传感对象的生物物质相互作用而形成非共价键的键合。图3中,可参照相互作用基团(R^1)与成为传感对象的生物物质90表面相

互作用的情形。对于非共价键的键合，包含非共价键以及共价键中与非共价键一样弱的键。作为非共价键的种类，可举出：氢键、基于静电相互作用的键(离子键)、疏水键、范德华力。作为与非共价键一样弱的共价键，可举出仅通过改变液体性质(而不添加氧化剂或还原剂等示出较强的氧化作用或还原作用的裂解用试剂)就能裂解的共价键，具体而言，可举出：在该生物物质为糖蛋白质的情况下，在糖蛋白质的糖基和硼酸基之间形成的共价键。由此，在分子印迹中，在合成分子印迹聚合物颗粒后，容易去除为模板的生物物质。

[0090] 另外，对于相互作用基团，在与该蛋白质的表面形状互补的形状的分子印迹空间21表面中，存在于与该生物物质的上述特定的氨基酸残基和/或上述特定的疏水性区域相对应的位置。因而，由于分子印迹聚合物20的分子印迹空间21具有该生物物质特有的形状，且存在于分子印迹空间21的相互作用基团位于该生物物质特有的位置，因此其可发挥优异的识别该生物物质的能力。

[0091] 信号物质结合基团为能够与信号物质结合的基团。通过信号物质结合基团与信号物质结合，如传感用纳米颗粒10a那样引入信号基团31。由于信号基团31因作为传感对象的生物物质与相互作用基团进行非共价键合而经历环境变化，因此，引起该生物物质在结合前后的信号变化。图3示出了图2(识别生物物质90前)中暴露的信号基团31因作为传感对象的生物物质90与相互作用基团(R^1)非共价键合而经历环境变化的情形。即，传感用纳米颗粒10a可以从信号变化中读出作为传感对象的生物物质的结合信息。

[0092] 需要说明的是，对于因与作为传感对象的生物物质的相互作用而导致信号基团31经历的环境变化，没有特别限制，只要是该变化由于接近作为传感对象的生物物质而引起信号变化即可。例如，作为该环境变化的例子，可举出：(i)由于作为传感对象的生物物质中的极性基团接近信号基团31附近而使得信号基团31的电子被该极性基团吸引；(ii)作为传感对象的生物物质中的极性基团接近信号基团31附近而可排除存在于信号基团31附近的水分子，从而使得信号基团31的电子从被位于附近的水分子吸引的状态释放出来；(iii)作为传感对象的生物物质中的极性基团接近信号基团31附近而将位于信号基团31侧的能量传递至向所结合的为传感对象的生物物质；(iv)作为传感对象的生物物质中的极性基团接近信号基团31附近而屏蔽信号基团31，从而导致激发能无法到达信号基团31等。

[0093] [1-1-3-2.相互作用基团与信号物质结合基团的位置关系]

[0094] 在图示的方式中，相互作用基团位于功能性基团22的前端侧，且信号物质结合基团位于功能性基团22的基端侧，而对于功能性基团22中相互作用基团和信号物质结合基团之间的位置关系而言，只要是作为传感对象的生物物质与相互作用基团可以非共价键合、并且在进行非共价键合时信号基团31经历环境变化那样的位置关系，就不限定于此。例如，相互作用基团和信号物质结合基团的位置关系可以与图示的方式相反。然而，从通过促进该生物物质和相互作用基团的非共价键合而得到更高的识别能力的观点和/或从通过在该生物物质和相互作用基团的非共价键合时更可靠地使信号基团31的环境变化而可以更高灵敏度地得到信号变化的观点出发，优选如图所示相互作用基团位于功能性基团22的前端侧、且信号物质结合基团位于功能性基团22的基端侧。

[0095] [1-1-3-3.功能性基团的具体例]

[0096] (通式)

[0097] 功能性基团的优选例由下述式(1)所示。

[0098] [化学式4]

[0099] $-R^2-L^1-R^1$ (1)

[0100] 式(1)中,R^1表示相互作用基团,R^2表示包含信号物质结合基团的连接基团,L^1表示直接键合或连接基团。

[0101] (相互作用基团R^1)

[0102] 相互作用基团R^1可根据作为传感对象的生物物质的表面状态来设计。例如,作为相互作用基团R^1,可举出在与构成该生物物质的特定结构之间通过相互作用而能够形成选自由氢键、基于静电相互作用的键(离子键)、疏水键、范德华力组成的组中的一种或多种键的基团。作为相互作用基团R^1的具体例,可举出:[1]取代或未取代的氨基、[2]取代或未取代的芳香族基团、[3]脒基(-C(=NH)NH_2)、[4]胍基(-NHC(=NH)NH_2)、[5]羧基、[6]磺基、[7]二羟硼基(-B(OH)$_2$)和/或[8]配体。[2]取代或未取代的芳香族基团中的芳香族基团包括[21]取代或未取代的含氮芳香族基团和[22]取代或未取代的不含氮芳香族基团,另外,可举出[25]取代或未取代的芳基([251]含氮芳基和[252]不含氮芳基)和[26]取代或未取代的亚芳基([261]含氮亚芳基和[262]不含氮亚芳基)。相互作用基团R^1可以是包含这些基团中的任一个的基团,也可以是包含选自这些基团中的两种以上的组合的基团。

[0103] 在生物物质为蛋白质的情况下,作为相互作用基团R^1的具体例,可举出:在与构成该蛋白质的特定氨基酸残基之间通过相互作用而能够形成氢键和/或静电相互作用的基团,以及在与该蛋白质的特定疏水性区域之间能够形成疏水键的基团等。下述表中示出氨基酸残基或疏水性区域、作为相互作用基团R^1所选择的具体基团和通过它们的相互作用而形成的非共价键的键合的种类的组合。

[0104] [表1]

[0105]

成为分析对象的蛋白质的相互作用部位	相互作用基团 R^1	非共价键的键合种类
酸性氨基酸残基(羧基等)	碱性基团(取代或未取代的氨基、取代或未取代的含氮芳香族基团、脒基、胍基等)	非共价键(氢键、静电相互作用)
碱性氨基酸残基(氨基等)	酸性基团(羧基、磺基等)	非共价键(氢键、静电相互作用)
芳香族氨基酸残基(苯基、吲哚基、咪唑基等)	取代或未取代的芳香族基团(取代或未取代的芳基、亚芳基等)	非共价键(疏水性相互作用)
疏水性区域	取代或未取代的芳香族基团(取代或未取代的芳基、亚芳基等)	非共价键(疏水性相互作用)
糖基(顺式二醇基)	二羟硼基	弱共价键(硼酸顺式二醇酯基)

[0106] 作为[1]取代氨基中的取代基,可举出:碳原子数1至8的直链烷基或支链烷基、取代或未取代的芳烷基;构成环状仲氨基的碳原子数4至6的烯基;取代或未取代的芳基等。取

代或未取代的芳基的具体例可举出在后述的[251]取代或未取代的含氮芳基以及[252]取代或未取代的不含氮芳基中所举出的基团。作为[1]取代或未取代的氨基的具体例，可举出：氨基(未取代)；N-甲基氨基、N-乙基氨基、N-正丙基氨基、N-异丙基氨基、N-正丁基氨基、N-异丁基氨基、N-叔丁基氨基、N-苄基氨基、N-苯基氨基、N-甲磺酰基氨基、N-甲苯磺酰基氨基等仲氨基；N,N-二甲基氨基、N,N-二乙基氨基、N,N-二苄基氨基、N-乙基-N-甲基氨基、N,N-二正丙基氨基、N,N-二异丙基氨基、N,N-二苯基氨基、N-甲基-N-苯基氨基、N-甲基-N-苄基氨基、N-甲磺酰基-N-甲基氨基等仲氨基；哌啶基、吡咯烷基等环状仲氨基等。

[0107] 作为[2]取代或未取代的芳香族基团中的、[251]取代或未取代的含氮芳基中的含氮芳基，可举出碳原子数2至12的含氮芳基。作为取代含氮芳基中的取代基，可举出碳原子数1至8的直链烷基或支链烷基等。作为[251]取代或未取代的含氮芳基的具体例，可举出：吡啶基、嘧啶基、哒嗪基(pyridazyl)、吡嗪基(pyrazyl)、咪唑基、三唑基、甲基吡啶基(2-甲基吡啶基、3-甲基吡啶基、4-甲基吡啶基等)、二甲基吡啶基(2,6-二甲基吡啶基等)、甲基乙基吡啶基(2-甲基-6-乙基吡啶基等)、甲基咪唑基(1-甲基咪唑基等)、二甲基咪唑基(1,2-二甲基咪唑基等)、乙基咪唑基(1-乙基咪唑基等)、丙基咪唑基(1-正丙基咪唑基等)、丁基咪唑基(1-正丁基咪唑基等)、戊基咪唑基(1-正戊基咪唑基等)、己基咪唑基(1-正己基咪唑基等)等。

[0108] 作为[2]取代或未取代的芳香族基团中的、[252]取代或未取代的不含氮芳基中的不含氮芳基，可举出：碳原子数6至16的苯基、萘基(1-萘基、2-萘基等)等。作为取代芳基中的取代基，可举出：碳原子数1至8的直链烷基或支链烷基、硝基、卤基(氟基、氯基、溴基等)等。作为[252]取代或未取代的芳基的具体例，可举出：苯基、萘基、甲苯基(邻甲苯基、间甲苯基、对甲苯基等)、乙基苯基(4-乙基苯基、3-乙基苯基、2-乙基苯基等)、丙基苯基(4-正丙基苯基等)、异丙基苯基(4-异丙基苯基、2-异丙基苯基等)、丁基苯基(4-正丁基苯基、4-异丁基苯基、4-叔丁基苯基、3-叔丁基苯基、2-叔丁基苯基等)、戊基苯基(4-正戊基苯基、4-异戊基苯基、2-新戊基苯基、4-叔戊基苯基等)、己基苯基(4-正己基苯基等)、4-(2-乙基丁基)苯基、4-正庚基苯基、4-正辛基苯基、4-(2-乙基己基)苯基、4-叔辛基苯基、4-乙基-1-萘基、6-正丁基-2-萘基、二甲基苯基(2,4-二甲基苯基、2,5-二甲基苯基、3,4-二甲基苯基、3,5-二甲基苯基、2,6-二甲基苯基等)、三甲基苯基(2,3,5-三甲基苯基、2,3,6-三甲基苯基、3,4,5-三甲基苯基等)、二乙基苯基(2,4-二乙基苯基、2,6-二乙基苯基等)、2,5-二异丙基苯基、2,6-二异丁基苯基、二叔丁基苯基(2,4-二叔丁基苯基、2,5-二叔丁基苯基等)、4,6-二叔丁基-2-甲基苯基、5-叔丁基-2-甲基苯基、4-叔丁基-2,6-二甲基苯基、氟苯基(4-氟苯基、3-氟苯基、2-氟苯基等)、氯苯基(4-氯苯基、3-氯苯基、2-氯苯基等)、溴苯基(4-溴苯基、2-溴苯基等)、氯萘基(4-氯-1-萘基、4-氯-2-萘基等)、6-溴-2-萘基、二氯苯基(2,3-二氯苯基、2,4-二氯苯基、2,5-二氯苯基、3,4-二氯苯基、3,5-二氯苯基等)、2,5-二溴苯基、2,4,6-三氯苯基、二氯萘基(2,4-二氯-1-萘基、1,6-二氯-2-萘基等)、氯甲基苯基(2-氯-4-甲基苯基、2-氯-5-甲基苯基、2-氯-6-甲基苯基、3-氯-4-甲基苯基、2-甲基-3-氯苯基、2-甲基-4-氯苯基、3-甲基-4-氯苯基等)、三氟甲基苯基(4-三氟甲基苯基等)、硝基苯基(4-硝基苯基等)等。

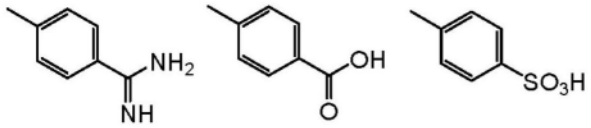
[0109] 另外，作为包含选自上述[1]至[7]的基团中的两种以上的组合的基团，可举出包含为[1]至[7]基团中的一价基团的、[1]取代或未取代的氨基、[251]含氮芳基、[252]不含

氮芳基、[3]脒基、[4]胍基、[5]羧基、[6]磺基或[7]二羟硼基与[26]取代或未取代的亚芳基([261]含氮亚芳基,[262]不含氮亚芳基)的组合的基团。

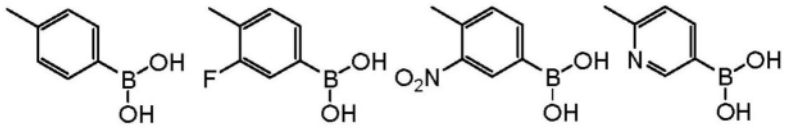
[0110] [26]取代或未取代的亚芳基中的[261]含氮亚芳基是从上述的作为[251]取代或未取代的含氮芳基所举出的基团中去除一个键合于碳(是构成芳香族环的碳)的氢而成的基团。[26]取代或未取代的亚芳基中的[262]不含氮亚芳基是从上述的作为[252]取代或未取代的不含氮芳基所举出的基团中去除一个键合于碳(是构成芳香族环的碳)的氢而成的基团。

[0111] 作为包含选自上述[1]至[7]基团中的两种以上的组合的具体的基团,可举出:为[3]脒基与[26]取代或未取代的亚芳基的组合的脒基芳基、为[5]羧基与[26]取代或未取代的亚芳基的组合的羧基芳基、为[6]磺基与[26]取代或未取代的亚芳基的组合的磺基芳基、为[7]二羟硼基和[26]取代或未取代的亚芳基的组合的二羟硼基芳基等。以下示出这些基团中优选的基团。

[0112] [化学式5]



[0113]



[0114] 作为[8]配体,没有特别限定,只要其是在将传感对象的生物物质作为分析物时的、对应于该分析物的配体即可。在该生物物质为抗原的情况下,可举出抗体模拟物(亲和体等)、纳米抗体等。在该生物物质为糖链的情况下,可举出凝集素等。在该生物物质为磷脂的情况下,可举出磷脂结合蛋白(Evectin 2、Annexin A2、Annexin V、Tim4)等。在该生物物质为酶的情况下,可举出酶底物或酶抑制剂。

[0115] (包含信号物质结合基团的连接基团R^2)

[0116] 在包含信号物质结合基团的连接基团R^2中,信号物质结合基团根据成为引入的信号物质31来源的信号物质(后述图5的信号物质30)所具有的结合基团(后述图5的结合基团32)来设计。作为信号物质结合基团的具体例,可举出:氨基(包含一价氨基和二价氨基)、羧基、硫醇基、含二硫基的基团(一价基团)、氨基氧基、醛基和羟基。

[0117] 连接基团R^2为非支链状或支链状的二价基团。

[0118] 在连接基团R^2为非支链状的情况下,信号物质结合基团自身形成连接基团R^2(即,连接基团R^2由信号物质结合基团构成)。作为这样的非支链状连接基团R^2即信号物质结合基团,可举出由下述式(2)所示的二价氨基。

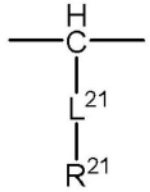
[0119] [化学式6]

[0120] $-NR^3-$ (2)

[0121] 式(2)中,R^3为氢或碳原子数1至8的直链烷基或支链烷基,优选表示氢。

[0122] 在连接基团R^2为支链状的情况下,信号物质结合基团为存在于支链中的一价基团。作为这样的连接基团R^2,可举出由下述式(3)所示的二价基团。

[0123] [化学式7]

[0124]  (3)

[0125] 式(3)中,R^{21}表示氨基(一价)、羧基、硫醇基、含二硫基的基团(一价基团)、氨基氧基、醛基或羟基,优选表示硫醇基或含二硫基的基团。作为氨基(一价),可举出作为上述相互作用基团R^1的一个例子的[1]取代或未取代的氨基所举出的基团。

[0126] 含二硫基的基团(一价基团)由下述式(4)所示。

[0127] [化学式8]

[0128] $-S-S-R^{211}$ (4)

[0129] 式(4)中,R^{211}表示取代或未取代的烷基。作为取代或未取代的烷基中的烷基,可举出碳原子数1至8的直链烷基或支链烷基。作为取代烷基中的取代基,本领域技术人员可以适当选择可确保化合物整体的水溶性而不干扰相互作用基团R^1与作为模板的生物物质的相互作用、且不干扰二硫键与信号物质的反应的任意官能团,具体而言,可举出:羟基、氨基(具体而言,可举出作为上述相互作用基团R^1的一个例子的[1]取代或未取代的氨基所举出的基团)、羧基、烷氧基(例如,碳原子数1至4、优选为1至3、更优选为1至2、进一步优选为1的烷氧基)、聚乙二醇基(作为环氧乙烷加成数,可举出1至6)、烷基(例如,可举出碳原子数1至4的烷基)、酰胺基、磺基、胍基、脒基等。作为取代烷基中的取代基的位置,可举出连接基团R^2的支链末端。

[0130] 式(3)中,L^{21}表示直接键或连接基团。作为该连接基团,可举出:亚烷基、羰基、酯键(-COO-或-OCO-)、酰胺键(-CONH-或-NHCO-)、以及由它们的任意组合构成的基团,优选举出亚烷基。作为亚烷基,可举出:碳原子数1至4、优选为1至3、更优选为1至2、进一步优选为1的亚烷基。

[0131] (直接键或连接基团L^1)

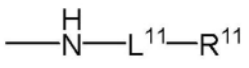
[0132] 直接键或连接基团L^1介于相互作用基团R^1与包含信号物质结合基团的连接基团R^2之间。当传感用纳米颗粒10a识别作为传感对象的生物物质90时,从更有效地抑制引入连接基团R^2的信号物质结合基团的信号基团31与生物物质和相互作用基团R^1的结合的干扰的观点出发,L^1更优选为连接基团。

[0133] 作为该连接基团,可举出:亚烷基、羰基、酯键(-COO-或-OCO-)、酰胺键(-CONH-或-NHCO-)、以及由它们的任意组合构成的基团。作为亚烷基,可举出碳原子数1至4的亚烷基。

[0134] (更具体的例子)

[0135] 作为功能性基团22的更具体的结构,可举出下述式(11)或式(12)。

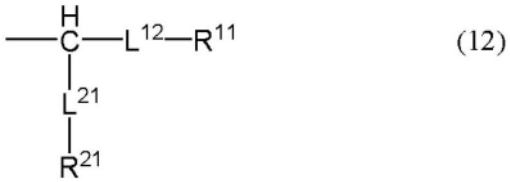
[0136] [化学式9]

[0137]  (11)

[0138] 式(11)中,R^{11}相当于式(1)的相互作用基团R^1,二价氨基(-NH-)相当于式(1)中的包含信号物质结合基团的连接基团R^2(其本身构成信号物质结合基团),L^{11}相当于式(1)的直接键合或连接基团L^1。

[0139] 式(11)中，R^{11}表示羧基芳基或磺基芳基，具体而言，如上述作为[5]羧基和[26]取代或未取代的亚芳基的组合的羧基芳基、作为[6]磺基和[26]取代或未取代的亚芳基的组合的磺基芳基所述。另外，式(11)中，L^{11}表示碳原子数1至4的亚烷基。式(11)所示的功能性基团中，作为相互作用基团R^1的R^{11}和作为信号物质结合基团的二价氨基(-NH-)的距离越近，在传感用纳米颗粒10a识别作为传感对象的生物物质90时可以更高灵敏度地得到信号变化。从该观点出发，作为L^{11}，优选举出碳原子数1至3、更优选为1至2、进一步优选为1的亚烷基。

[0140] [化学式10]

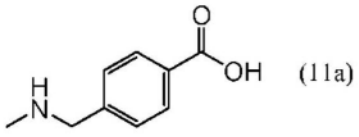
[0141] 
(12)

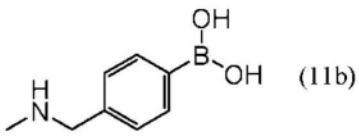
[0142] 在式(12)中，R^{11}相当于式(1)的相互作用基团R^1，二价基团(-CH(L^{21}-R^{21})-)相当于式(1)的包含信号物质结合基团的连接基团R^2。L^{12}相当于式(1)的直接键合或连接基团L^1。

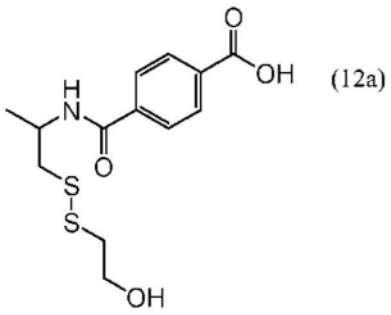
[0143] 式(12)中，R^{11}表示羧基芳基或磺基芳基，具体而言，如上述的作为[5]羧基和[26]取代或未取代的亚芳基的组合的羧基芳基、作为[6]磺基和[26]取代或未取代的亚芳基的组合的磺基芳基所述。另外，式(12)中，二价基团(-CH(L^{21}-R^{21})-)如作为上述式(3)所述。此外，式(12)中，L^{12}表示二价连接基团，作为该二价连接基团，可举出：亚烷基、羰基、酯键(-COO-或-OCO-)、酰胺键(-CONH-或-NHCO-)、以及由它们的任意组合构成的基团，优选举出酰胺键。

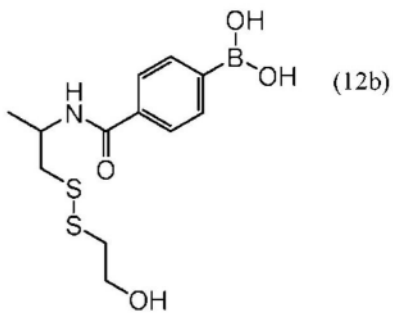
[0144] 对于下述式(11)和式(12)所示的基团的进一步的具体实例，分别示于下述式(11a)、式(11b)以及下述式(12a)、式(12b)。

[0145] [化学式11]


(11a)


(11b)

[0146] 
(12a)


(12b)

[0147] 这些功能性基团22在每个传感用纳米颗粒中可以仅存在一种，也可以存在多种，可以仅存在一个，也可以存在多个。另外，这些功能性基团22在每个分子印迹空间中可以仅存在一种，也可以存在多种，可以仅存在一个，也可以存在多个。

[0148] [1-1-4.分子印迹聚合物的构成单体]

[0149] 构成分子印迹聚合物20的聚合物至少包含源于具有功能性基团22的功能性单体的结构单元。另外，构成分子印迹聚合物20的聚合物可以包含源于功能性单体的结构单元

以及源于N-取代或未取代的丙烯酰胺和/或生物相容性单体的结构单元。优选构成分子印迹聚合物20的聚合物包含源于功能性单体的结构单元以及源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺和/或生物相容性单体的结构单元。需要说明的是,构成分子印迹聚合物20的聚合物还可以包含源于与功能性单体、N-取代或未取代的丙烯酰胺、生物相容性单体不同的单体的结构单元。

[0150] (功能性单体)

[0151] 具有功能性基团22的功能性单体没有特别限制,只要其是包含功能性基团和烯键式不饱和基团的单体即可,例如由下述式(5)所示。

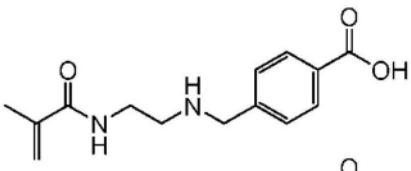
[0152] [化学式12]

[0153] $X-L^5-R^2-L^1-R^1$ (5)

[0154] 式(5)中,X表示烯键式不饱和基团,L^5表示连接基团,$-R^2-L^1-R^1-$表示功能性基团。作为烯键式不饱和基团,可举出丙烯酰基(acrylic groups)和甲基丙烯酰基(methacrylic groups)。作为连接基团,可举出:亚烷基、羰基、酯键(-COO-或-OCO-)、酰胺键(-CONH-或-NHCO-)、以及由它们的任意组合组成的基团,优选举出亚烷基以及酰胺键分别以任意数量结合而成的基团。作为功能性基团,如上述"1-1-3.功能性基团的结构"中的详细说明所述。

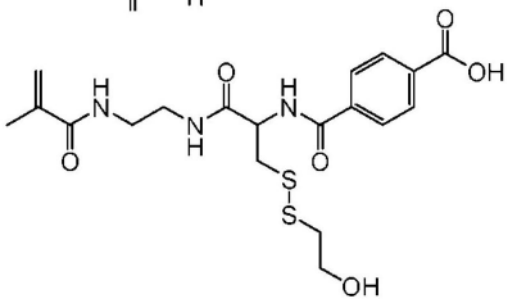
[0155] 作为由式(5)所示的功能性单体的具体例,可举出下述式(51a)、式(52a)、式(51b)、式(52b)所示的功能性单体。

[0156] [化学式13]



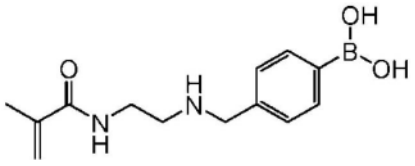
(51a)

[0157]



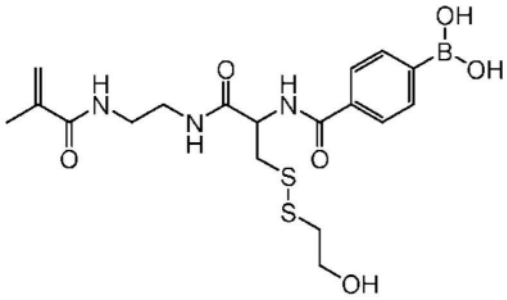
(52a)

[0158]



(51b)

[0159]

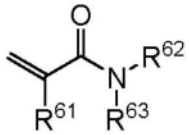


(52b)

[0160] (N-取代或未取代的丙烯酰胺)

[0161] 对于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺,N-取代(甲基)丙烯酰胺由下述式(6)所示。

[0162] [化学式14]

[0163] 

(6)

[0164] 式(6)中,R^{61}表示氢或甲基,优选表示氢;R^{62}和R^{63}分别独立地表示氢、碳原子数1至6的直链状烷基或支链状烷基、碳原子数1至6的直链状羟基烷基或支链状羟基烷基、或碳原子数1至6的直链状氨基烷基或支链状氨基烷基,它们可彼此相同或不同(其中,不包括R^{62}和R^{63}均为氢的情况);另外,R^{62}和R^{63}与负载它们的氮原子一起可以形成含氧原子的饱和5元至7元环。

[0165] 作为碳原子数1至6的直链状烷基或支链状烷基,可举出:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、正己基等。作为碳原子数1至6的直链状羟基烷基或支链状羟基烷基,可举出:羟基甲基、1-羟基乙基、2-羟基乙基、1-羟基正丙基、2-羟基正丙基、3-羟基正丙基、1-羟基异丙基、2-羟基异丙基、1-羟基正丁基、1-羟基正戊基、1-羟基正己基等。作为碳原子数1至6的直链状氨基烷基或支链状氨基烷基,可举出:氨基甲基、1-氨基乙基、2-氨基乙基、1-氨基正丙基、2-氨基正丙基、3-氨基正丙基、1-氨基异丙基、2-氨基异丙基、1-氨基正丁基、1-氨基正戊基、1-氨基正己基等。作为含氧原子以及氮原子的饱和5元至7元环,可举出吗啉环等。

[0166] 在这些N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺中,优选举出N-取代(甲基)丙烯酰胺,更优选举出N-单取代(甲基)丙烯酰胺,进一步优选举出N-烷基(甲基)丙烯酰胺(烷基为上述碳原子数1至6的直链状烷基或支链状烷基),更进一步优选举出N-异丙基(甲基)丙烯酰胺,特别优选举出N-异丙基丙烯酰胺。

[0167] (生物相容性单体)

[0168] 生物相容性是指不引起生物物质粘附的性质。通过包括源于聚合物生物相容性单体(构成分子印迹聚合物20)的成分,能够更进一步抑制非特异性吸附。作为生物相容性单体,优选举出亲水性单体,更优选举出两性离子单体。

[0169] 两性离子单体在一分子中包含源于酸性官能团(例如:磷酸基、硫酸基和羧基等)的阴离子基团和源于碱性官能团(例如:伯氨基、仲氨基、叔氨基和季铵基等)的阳离子基团两者。作为两性离子单体的种类,可举出:磷酸甜菜碱、磺基甜菜碱和羧基甜菜碱等。

[0170] 作为磷酸甜菜碱,可举出侧链具有磷酸胆碱基的分子。优选举出2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)等。作为磺基甜菜碱,可举出:N,N-二甲基-N-(3-磺基丙基)-3'-甲基丙烯酰基氨基丙铵内盐(SPB)、N,N-二甲基-N-(4-磺基丁基)-3'-甲基丙烯酰基氨基丙铵内盐(SBB)等。作为羧基甜菜碱,可举出:N,N-二甲基-N-(1-羧甲基)-2'-甲基丙烯酰氧基乙铵内盐(CMB)、N,N-二甲基-N-(2-羧乙基)-2'-甲基丙烯酰氧基乙铵内盐(CEB)等。

[0171] 在这些生物相容性单体中,优选举出磷酸甜菜碱,更优选举出侧链具有磷酸胆碱基的分子,进一步优选举出2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)。

[0172] [1-2.信号基团]

[0173] 信号基团31的功能是提供作为传感对象的生物物质90与分子印迹空间21中的相

互作用基团R^1之间的结合信息。信号基团31没有特别限制，只要在因作为传感对象的生物物质与相互作用基团R^1的结合而经历环境变化时信号发生变化即可。作为信号变化的方式，可举出信号强度的变化和谱图的变化(例如峰的位移)。

[0174] 作为信号基团31的例子，可举出：荧光基团、含放射性元素的基团、磁性基团等。从容易检测等观点出发，作为信号基团31，优选为荧光基团。作为荧光基团，优选为非生物物质系的基团，可举出例如：荧光素系色素、吲哚菁色素(诸如花青系色素)、荧光色素(诸如罗丹明系色素)等。作为含放射性元素的基团，可举出：用^{18}F等放射性同位素标记的糖、氨基酸、核酸、用^{19}F标记的MRI探针等。作为磁性基团，可举出具有铁色素等磁性物质的基团等。

[0175] [1-3.其他结构]

[0176] 如上述在[1-1-2.在分子印迹空间内排列的功能性基团]中所述，在本发明中，只要分子印迹空间21中存在功能性基团22，就允许分子印迹空间21以外的分子印迹聚合物20表面存在功能性基团22。在本发明的传感用纳米颗粒中，当分子印迹空间21以外的分子印迹聚合物20表面存在功能性基团22时，封端修饰基团可以键合在存在于分子印迹空间21以外的分子印迹聚合物20表面的功能性基团22上。

[0177] 封端修饰基团是指由阻碍功能性单体的功能的化合物引入的基团。作为阻碍功能性单体的功能的化合物(封端化合物)，可举出作为非信号物质的用于抑制生物物质的吸附等的化合物(例如，具有低聚乙二醇链的化合物)和具有糖链结构的化合物等。作为封端修饰基团的键合位置，可举出功能性基团22的相互作用基团R^1和/或信号物质结合基团。由于这样的封端修饰基团从外部屏蔽功能性基团22，因此可以获得更高的抑制非特异性结合和背景信号的效果。

[0178] [1-4.作为传感对象的生物物质]

[0179] 本发明的传感用纳米颗粒的传感对象为生物物质。在本发明中，生物物质是指被分类成为构成生物体的基本材料的分子的分子种类，通常为含碳和氢、进而包含氮、氧、磷和/或硫等作为构成元素、且具有生物学功能或生物学意义的分子。作为生物物质的具体例，可举出：蛋白质(包括肽，以下相同)、糖链、脂质(例如磷脂等)、这些物质中的两种以上的复合分子、以及包含蛋白质和辅因子(可举出例如辅酶和辅基，具体可举出蛋白质以外的有机分子和金属离子)的复合分子等。本发明中，作为生物物质，可以是天然产物或者人工材料。图3中，为了方便，示出了人血清白蛋白(HSA)作为成为传感对象的生物物质90，但该生物物质90是指本发明作为传感对象的所有生物物质。

[0180] 作为生物物质的优选例，可举出蛋白质。在以下的说明中，蛋白质涵盖不具有任何糖、脂质、辅因子的普通蛋白质，以及包含糖、脂质、辅因子中的至少一种的复合蛋白质(例如糖蛋白、脂蛋白、金属蛋白等)。作为蛋白质可以是天然蛋白质或者人工蛋白质。天然蛋白质为自然选择的结果产生的蛋白质。作为人工蛋白质，可举出：人为地改变天然蛋白质的氨基酸序列的一部分而成的蛋白质、针对天然蛋白质人为地引入或去除修饰基团而成的蛋白质等。

[0181] 作为生物物质90，从在生物体内的存在形式的观点出发，可举出：分泌到体液中的游离分子(例如：游离蛋白、游离糖链等)、附着或结合于膜结构体(例如：细胞、病毒、细胞外囊泡(外泌体等)或细胞器等)的生物膜上的物质(例如：膜蛋白、膜糖链)、以及相当于生物膜暴露的部分结构的分子(例如磷脂酰丝氨酸等磷脂质等)。另外，作为生物物质90，还可以

为特定生物分子的片段。作为这样的片段，可举出：从特定生物分子(例如抗体等)切出特定区域(例如结构域)而得到的分子，以及人为地仅制作该区域部分而得到的分子。进而，作为生物物质90，从其功能的观点出发，可举出：血浆蛋白、生物标志物、结构域、酶、激素等。作为血浆蛋白，可举出：白蛋白、γ-球蛋白、纤维蛋白原等。作为生物标志物，可举出：肾功能标志物、肝功能标志物、炎症标志物、肿瘤标志物等，更具体而言，可举出：尿中白蛋白、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、转铁蛋白、血浆铜蓝蛋白、乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(ALP)、γ-谷氨酰转肽酶(γ-GTP)、C-反应蛋白(CRP)、甲胎蛋白(AFP)、各种抗原(例如糖类抗原19-9(CA19-9)、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异抗原(PSA)、外泌体特异性抗原(CD63、CD9、CD81、CD37、CD53、CD82、CD13、CD11、CD86、ICAM-1、Rab5、Annexin V、LAMP1等)等。作为生物物质90，从来源生物的观点出发，可举出：源于人类的生物物质和源于非人类生物体的生物物质等。作为非人类生物体，没有特别的限制，可举出：鱼类、两栖类、爬行类、哺乳类等脊椎动物；刺胞动物、甲壳类等无脊椎动物；种子·裸子植物、藻类等植物等所有生物体。非人类生物优选为哺乳动物，可举出例如：小鼠、大鼠、猴子、狗、猫、牛、马、猪、仓鼠、兔子和山羊等。进而，作为生物物质90，从伊斯兰教的戒律的观点出发，还可举出源于对应于哈拉姆的动植物的生物物质。

[0182] [1-5.用途]

[0183] 本发明的传感用纳米颗粒可以用于检测上述生物物质的用途。需要说明的是，在该生物物质为附着或结合于膜结构体(例如：细胞、病毒、细胞外囊泡或细胞器等)的生物膜上的物质(例如：膜蛋白、膜糖链)时，或者为与生物膜暴露的部分结构相当的分子(例如磷脂酰丝氨酸等磷脂等)时，或者为特定生物分子的片段(例如结构域等特定区域)时，本发明的传感用纳米颗粒可以用于通过上述生物物质来检测具有该生物物质的膜结构体(细胞、病毒、细胞外囊泡(例如外泌体等)或细胞器等)或具有片段(例如结构域等特定区域)作为部分结构的特定生物分子(例如抗体等)的用途。

[0184] 作为本发明的传感用纳米颗粒的更具体的用途，根据生物物质的种类而不同，例如，在本发明的传感用纳米颗粒设计为用于传感肾功能标志物、肝功能标志物、炎症标志物、肿瘤标志物等生物标志物的情况下，可举出基于肾功能、肝功能、有无炎症或其程度、有无肿瘤或其程度等的诊断用途等。

[0185] 另外，本发明的传感用纳米颗粒基于优异的特异性能够识别不同生物体之间的相同种类生物物质，因此，作为本发明的传感用纳米颗粒的更具体的用途，还可举出清真检查的用途，即，在上述生物物质为源于对应于哈拉姆的动植物的生物物质的情况下，确认食品中有无掺杂源于对应于哈拉姆的动植物的生物物质(例如猪血清白蛋白等)。

[0186] [2.传感用纳米颗粒的制造方法]

[0187] [2-1.制造方法1]

[0188] 本发明还提供了上述[1.传感用纳米颗粒]中所述的本发明的传感用纳米颗粒的制造方法。本发明的传感用纳米颗粒的制造方法包含如下工序：工序1，通过以生物物质为模板、使包含具有功能性基团的功能性单体的单体成分聚合，合成分子印迹聚合物，其中，所述功能性基团包含与上述生物物质的相互作用基团以及不同于上述相互作用基团的信号物质结合基团；以及，工序2，从上述分子印迹聚合物中去除上述模板。另外，本发明的传感用纳米颗粒的制造方法可以包含工序3，即，在上述工序2之后，使信号物质与上述分子印

迹聚合物中的信号物质结合基团结合。在本发明的制造方法中，工序1中的单体成分可以进一步包含N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺和/或生物相容性单体。

[0189] 需要说明的是，在该制造方法1中，在工序1之前，不需要对成为模板的生物物质进行通过共价键进行的表面修饰(例如，为了将相互作用基团和信号物质结合基团定位于分子印迹空间而进行的处理)等。另外，该制造方法1可以应用于上述[1.传感用纳米颗粒]中所述的本发明的传感用纳米颗粒中的任一种，但优选应用于上述相互作用基团选自取代或未取代的氨基、取代或未取代的芳香族基团、脒基、胍基、羧基、磺基、二羟硼基的情况。

[0190] 图4示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的制造方法的一个例子中的工序1。另外，图5示意性地示出本发明的传感用纳米颗粒的制造方法的一个例子中的工序2和工序3。以下，参照这些附图对本发明的传感用纳米颗粒的制造方法进行详细说明。

[0191] [2-1-1.工序1]

[0192] 工序1中，如图4所示，通过以生物物质90'为模板、使包含具有功能性基团22的功能性单体M22的单体成分聚合来合成分子印迹聚合物，其中，所述功能性基团22包含与生物物质90'的相互作用基团R^1以及不同于相互作用基团R^1的信号物质结合基团。在图4的例子中，单体成分包含功能性单体M22以及N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺M23和生物相容性单体M24。

[0193] 用作模板的生物物质90'是与成为传感对象的生物物质90相同种类的生物物质。例如，如果作为传感对象的生物物质90为HSA，则也可以使用HSA作为用作模板的生物物质90'。因而，用作模板的生物物质90'包括上述“1-4.作为传感对象的生物物质”中所举出的生物物质。

[0194] 作为聚合反应液中的用作模板的生物物质90'的浓度，没有特别限定，可举出：例如为0.5μmol/L至5μmol/L，优选为1μmol/L至3μmol/L，更优选为1.5μmol/L至2.5μmol/L。

[0195] 作为功能性单体M22，如上述“1-1-4.分子印迹聚合物的构成单体”的“(功能性单体)”中所述。

[0196] 作为聚合反应液中的功能性单体M22的浓度，没有特别限定，可举出：例如为1mmol/L至6mmol/L，优选为2mmol/L至4mmol/L，更优选为2.5mmol/L至3.5mmol/L。另外，作为相对于用作模板的生物物质90'的功能性单体M22的用量，以相对于1μmol用作模板的生物物质90'的功能性单体M22的用量计，可举出：优选为0.5mmol至4mmol，更优选为1mmol至2mmol，进一步优选为1.3mmol至1.7mmol。

[0197] 作为N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺M23，如上述“1-1-4.分子印迹聚合物的构成单体”的“(N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺)”中所述。

[0198] 作为聚合反应液中的N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺M23的浓度，没有特别限定，可举出：例如为20mmol/L至60mmol/L，优选为30mmol/L至50mmol/L，更优选为35mmol/L至40mmol/L。另外，作为相对于用作模板的生物物质90'的N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺M23的用量，以相对于1μmol用作模板的生物物质90'的N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺M23的用量计，可举出：优选为5mmol至40mmol，更优选为10mmol至33mmol，进一步优选为15mmol至20mmol。进而，作为相对于功能性单体M22的N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺M23的用量，以相对于1mol功能性单体M22的N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺M23的用量计，可优选为5mol至30mol，更优选为8mol至20mol，进一步优选为10mol至15mol。

[0199] 作为生物相容性单体M24，如上述“1-1-4.分子印迹聚合物的构成单体”的“(生物相容性单体)”中所述。

[0200] 作为聚合反应液中的生物相容性单体M24的浓度，没有特别限定，可举出：例如为0.5mmol/L至5mmol/L，优选为1mmol/L至3.5mmol/L，更优选为1.5mmol/L至2.5mmol/L。另外，作为相对于用作模板的生物物质90’的生物相容性单体M24的用量，以相对于1μmol作为模板的生物物质90’的生物相容性单体M24的用量计，可举出：优选为0.3mmol至3.5mmol，更优选为0.5mmol至2mmol，进一步优选为0.8mmol至1.2mmol。进而，作为相对于功能性单体M22的生物相容性单体M24的用量，以相对于1mol功能性单体M22的生物相容性单体M24的用量计，可举出：优选为0.1mol至1.5mol，更优选为0.2mol至1mol，进一步优选为0.4mol至0.8mol。

[0201] 聚合反应液中可适当包含交联剂、引发剂和溶剂。

[0202] 作为交联剂，可以举出两个以上烯键式不饱和基团通过连接基团结合而成的化合物。作为具体的交联剂的例子，可举出由下述式(7)所示的化合物。

[0203] [化学式15]

[0204] W-Z-W (7)

[0205] 式(7)中，W表示彼此相同或不同的烯键式不饱和基团，Z表示连接基团。作为烯键式不饱和基团，可举出丙烯酰基和甲基丙烯酰基。作为连接基团，可举出例如：碳原子数1至6、优选为2至6的亚烷基、氨基(-NH-)、醚基、羰基、酯键(-COO-或-OCO-)、酰胺键(-CONH-或-NHCO-)、亚砜基(-SO-)、磺酰基(-SO_2-)以及这些基团中的两个以上结合而成的基团。在两个以上的上述基团结合而构成上述连接基团的情况下，键的数目优选为5个以下或4个以下，更优选为3个以下或两个。作为更具体的交联剂的例子，可举出：N,N’-亚甲基双丙烯酰胺、乙二醇二甲基丙烯酸酯等低分子交联剂，优选举出N,N’-亚甲基双丙烯酰胺。

[0206] 作为聚合反应液中的交联剂的浓度，没有特别限定，可举出：例如为0.5mmol/L至5mmol/L，优选为1mmol/L至3.5mmol/L，更优选为1.5mmol/L至2.5mmol/L。

[0207] 作为引发剂，可举出：过硫酸铵和过硫酸钾等过氧化物、偶氮二异丁腈、2,2’-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐等偶氮系聚合引发剂，优选偶氮系聚合引发剂，更优选2,2’-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐。

[0208] 作为聚合反应液中的引发剂的浓度，没有特别限定，可举出：例如为1mmol/L至15mmol/L，优选为3mmol/L至12mmol/L，更优选为5mmol/L至10mmol/L。

[0209] 作为溶剂，可使用缓冲液等水性溶剂，优选举出磷酸缓冲液。另外，优选溶剂中包含NaCl，作为NaCl的浓度，可举出：例如为100mM至200mM，优选为120mM至160mM。另外，作为溶剂的pH值，可适当选择不会使模板90’改性的pH值，可举出：例如为6至8，优选为6.8至7.8，更优选为7.2至7.6。

[0210] 在工序1的聚合反应体系中，如图4所示，单体成分中的功能性单体M22通过相互作用基团R^1与模板90’的给定部位进行特异性相互作用，从而形成功能性单体M22-模板90’的复合体。通过在形成这样的复合体的状态下进行聚合反应，可形成与模板90’的表面形状互补的分子印迹空间(凹部)，而且可以使功能性基团22存在于分子印迹空间(凹部)的表面。另外，因模板90’容易存在于聚合物界面附近而可有效地形成分子印迹空间。

[0211] 作为用于得到分子印迹聚合物的纳米颗粒的具体的聚合方法，可举出：无乳化剂

沉淀聚合法、分散聚合法、乳液聚合法、种子乳液聚合法等，优选为无乳化剂沉淀聚合法。

[0212] 在工序1中，在将聚合反应液供于进行聚合反应的温度条件之前，为了充分形成功能性单体M22-模板90'的复合体，优选供于1℃至15℃、优选1℃至10℃、更优选2℃至6℃的低温条件。作为供于低温条件的时间，可举出例如为20小时至30小时。作为进行聚合反应的温度条件，可举出：例如为40℃至76℃，优选为50℃至74℃，更优选为60℃至72℃。作为供于进行聚合反应的温度条件的时间，可举出例如10小时至15小时。需要说明的是，即使聚合反应在加热条件下进行，模板也可保持其形状而不会引起失去分子印迹空间的特异性的改性，因此可以有效地获得分子印迹空间的特异性。

[0213] 如此操作而合成分子印迹聚合物20部分，得到了分子印迹聚合物20和模板90'的复合体。分子印迹聚合物20和模板90'的复合体通过相互作用基团R^1和模板90'之间的非共价键的键合(包含非共价键以及共价键中与非共价键一样弱的键。)而形成。

[0214] [2-1-2.工序2]

[0215] 在工序2中，如图5所示，从分子印迹聚合物20和模板90'的复合体中去除模板90'。在分子印迹聚合物20与模板90'的复合体中，相互作用基团R^1与模板90'的键合为较弱的非共价键的键合，因此可以在不添加氧化剂或还原剂等显示出较强的氧化作用或还原作用的裂解用试剂的情况下容易地分离去除模板90'。

[0216] 在此，与本发明的制造方法不同，在针对模板预先引入具有可逆键(二硫基、肟基等共价键)的功能性单体并通过分子印迹聚合而形成纳米颗粒后，用裂解用试剂切断可逆键而去除模板，将源于可逆键的官能团(硫醇基、氧氨基等作为信号物质结合基团和/或相互作用基团起作用的基团)定位于分子印迹空间内的情况下，由于模板与分子印迹聚合物之间为共价键，因此即使使用裂解用试剂也无法容易地去除模板。在该情况下，为了更可靠地去除模板，不仅需要预先将功能性单体引入模板中，而且需要将这种模板负载在如二氧化硅那样的载体上，并且在分子印迹聚合后去除模板时，连载体一起去除。另一方面，由于本发明的制造方法不需要在分子印迹聚合前将功能性单体引入模板90'的工序，也不需要将模板90'负载在载体上的工序，而且易于从分子印迹聚合物20和模板90'的复合体中去除模板90'，因此在易于制造方面也优异。

[0217] 本领域技术人员可以基于相互作用基团R^1与模板90'之间的结合方式来适当确定模板90'的去除。优选地，将完成工序1后的反应液供于层析(优选为阴离子交换层析)，通过将此时使用的流动相用作模板分子的洗脱液，可以去除模板90'。通过层析从分子印迹聚合物20中分离所去除的模板90'，可纯化分子印迹聚合物20。

[0218] 作为流动相，优选举出Tris-盐酸缓冲液。另外，优选流动相包含NaCl，作为NaCl的浓度，可以与工序1中使用的溶剂中的浓度相同，可举出：例如为100mM至200mM，优选为120mM至160mM。另外，流动相的pH值可以与工序1中使用的溶剂的pH值相同，可例如为6至8，优选为6.8至7.8，更优选为7.2至7.6。

[0219] 如此操作而合成传感用纳米颗粒10。

[0220] [2-1-3.工序3]

[0221] 在工序3中，如图5所示，使信号物质30结合于分子印迹聚合物20中的信号物质结合基团。

[0222] 信号物质30包含信号基团31和结合基团32。信号基团31与如上述“1-2.信号基团”

中所述的基团相同。结合基团32为能够与信号物质结合基团共价键合的基团。具体而言，本领域技术人员可以根据信号物质结合基团的种类(氨基(包含一价氨基和二价氨基)、羧基、硫醇基、含二硫基的基团(一价基团)、氨基氧基、醛基或羟基)来适当确定结合基团。

[0223] 对于将信号物质30引入分子印迹聚合物20的具体条件，本领域技术人员可以基于结合基团32的种类和信号物质结合基团的种类来适当确定两者发生化学反应而可以形成共价键的条件。

[0224] 如此操作而合成传感用纳米颗粒10a。

[0225] [2-1-4.其他工序]

[0226] 在得到上述“1-3.其他结构”中所述的具有封端修饰基团的传感用纳米颗粒的情况下，可以对所合成的传感用纳米颗粒10进行以下工序。另外，在该情况下，优选在引入封端修饰基团后进行信号基团的引入。

[0227] 首先，在传感用纳米颗粒10中添加极少量的生物物质(与作为传感对象的生物物质90和用作模板的生物物质90’相同种类的生物物质)，并通过用该生物物质封闭分子印迹空间21来进行保护(保护工序)。接着，使阻碍功能性单体功能的化合物(封端化合物)反应，从而使封端修饰基团与位于分子印迹空间21以外的分子印迹聚合物20表面的功能性基团22的相互作用基团R^1和/或信号物质结合基团结合(封端修饰工序)。作为阻碍功能性单体的功能的化合物(封端化合物)，可举出作为非信号物质的、通常用于抑制生物物质的吸附等的化合物(例如，具有低聚乙二醇链的化合物)和具有糖链结构的化合物等。接着，通过去除所结合的该生物物质来再现分子印迹空间21(脱保护工序)。

[0228] [2-2.制造方法2]

[0229] 上述“1.传感用纳米颗粒”中所述的本发明的传感用纳米颗粒的制造方法并不限于上述“2-1.制造方法1”中所述的方法。本发明的传感用纳米颗粒的制造方法可以包含如下工序：工序11，准备分子印迹的模板，其中生物物质的表面通过可逆连接基团被聚合性官能团修饰；工序12，以上述聚合性官能团为基底，合成针对上述模板的上述表面的一部分的分子印迹聚合物；工序13，使上述可逆连接基团裂解而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板；工序14，通过可逆连接基团引入具有功能性基团的分子，所述功能性基团包含用于结合与上述生物物质的相互作用基团的基团和信号物质结合基团。进而，该制造方法2除了进行上述工序11至工序14的工序以外，还可以包含如下工序：使提供与上述生物物质的相互作用基团的分子与用于结合与上述生物物质的相互作用基团的基团结合的工序；和使信号物质与上述信号物质结合基团结合的工序。

[0230] 该制造方法2可应用于上述“1.传感用纳米颗粒”中所述的本发明的传感用纳米颗粒中的任一种，优选应用于上述相互作用基团为生物分子的配体的情况。

[0231] [3.传感用基板和传感用试剂]

[0232] 作为上述“1.传感用纳米颗粒”中所述的本发明传感用纳米颗粒的应用例，可举出传感用基板和传感用试剂。

[0233] [3-1.传感用基板]

[0234] 传感用基板包括基板和固定在上述基板上的传感用纳米颗粒。图6示意性地示出传感用基板的一个例子。另外，图7示意性地示出传感用基板的其他例子。图6所示的传感用基板1包括基板40和固定在基板40上的传感用纳米颗粒10。图7所示的传感用基板1a包括基

板40和固定在基板40上的传感用纳米颗粒10a。

[0235] 作为基板40的材料，可举出选自由金属、玻璃和树脂组成的组中的材料。作为金属，可举出：金、银、铜、铝、钨、钼等。作为树脂，可举出：聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、ABS(丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物)、聚碳酸酯、聚酯、聚乙烯、聚丙烯、尼龙、聚氨酯、有机硅树脂、含氟树脂、甲基戊烯树脂、酚醛树脂、三聚氰胺树脂、环氧树脂、氯乙烯树脂等。

[0236] 基板40也可以为选自上述材料的多种材料组合而形成的基板。例如，基板40可以为在玻璃或树脂的表面设有金属膜的基板。

[0237] 基板40可以使用适于信号基团31的传感手段的基板。例如，作为基板40，可举出：表面等离子体共振(SPR)基板、表面增强拉曼散射(SERS)基板等。

[0238] 固定于基板40的传感用基板1与上述“1.传感用纳米颗粒”中所述的传感用纳米颗粒10所述的那些相同。在图示的实施方式中，为了方便，传感用纳米颗粒10的取向是统一的，但传感用纳米颗粒10的取向可以是随机的。

[0239] 图6所示的传感用基板1是通过将上述“1.传感用纳米颗粒”中所述的传感用纳米颗粒10固定于基板40表面而得到的。

[0240] 将传感用纳米颗粒10固定在基板40表面的方法没有特别的限制，本领域技术人员可以适当确定将聚合物纳米颗粒固定在基板表面的常用方法。例如，这样的方法可以通过如下工序来进行：在基板40表面形成表面具有结合性官能团的分子膜的分子膜形成工序；和使传感用纳米颗粒10结合于所形成的分子膜表面的结合性官能团的工序。需要说明的是，作为与分子膜表面的结合性官能团结合的传感用纳米颗粒10表面的官能团，可举出例如：残留于该表面的源于功能性单体的相互作用基团和/或信号物质结合基团，和/或残留于构成传感用纳米颗粒10的聚合物末端的源于引发剂的官能团等。

[0241] 在图示的方式中示出的例子是：在基板40表面形成表面具有羧基作为结合性官能团的分子膜，并且在该羧基与传感用纳米颗粒10表面的氨基之间形成酰胺键，从而使传感用纳米颗粒10结合。

[0242] 另外，图7所示的传感用基板1a可以通过将信号基团引入上述传感用基板1而得到。信号基团的引入方法与上述“2-3.工序3”中所述的方法相同。另外，图7所示的传感用基板1a可以使用传感用纳米颗粒10a代替传感用纳米颗粒10作为固定于基板40的传感用纳米颗粒，与上述传感用基板1的制造方法同样地操作来得到。

[0243] 传感用基板可以用于检测上述项目1-4所示的生物物质的用途。需要说明的是，当该生物物质为附着或结合于膜结构体(例如：细胞、病毒、细胞外囊泡或细胞器等)的生物膜上的物质(例如：膜蛋白、膜糖链)时，或者为相当于生物膜暴露的部分结构的分子(例如磷脂酰丝氨酸等磷脂质等)时，或者为特定生物分子的片段(例如结构域等特定区域)时，传感用基板可以用于通过上述生物物质来检测具有该生物物质的膜结构体(细胞、病毒、细胞外囊泡(例如外泌体等)或细胞器等)或具有片段(例如结构域等特定区域)作为部分结构的特定生物分子(例如抗体等)的用途。作为更具体的用途，根据作为传感对象的生物物质的种类而不同，例如，可举出：设计为用于传感肾功能标志物、肝功能标志物、炎症标志物、肿瘤标志物等生物标志物的传感用基板可用于基于肾功能、肝功能、有无炎症或其程度、有无肿瘤或其程度等的诊断用途等。另外，作为本发明的传感用基板的更具体的用途，还可举出清真检查的用途，即，在上述生物物质为源于对应于哈拉姆的动植物的生物物质的情况下，确

认食品中有无掺杂源于对应于哈拉姆的动植物的生物物质(例如猪血清白蛋白等)。

[0244] [3-2.传感用试剂]

[0245] 传感用试剂包含传感用纳米颗粒。传感用试剂中的传感用纳米颗粒不固定在基板等散装基材上。

[0246] 传感用试剂可制剂成液体状或固体状(例如粉末状)。传感用试剂包含药学上可接受的其他成分。作为其他成分,可适当选择不影响传感用试剂的稳定性和识别能力的固体和/或液体,可举出例如:水、NaCl等盐、缓冲剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、pH调节剂、表面活性剂、赋形剂、粘合剂等。

[0247] 传感用试剂可使用传感用纳米颗粒10或传感用纳米颗粒10a与上述其他成分基于通常的制剂方法进行制剂而得到。

[0248] 作为传感用试剂的用途的一个例子,可举出与上述作为传感用基板的用途举出的用途相同的用途。作为传感用试剂的用途的其他例子,可举出利用传感用纳米颗粒不固定在基板上的特征的体外成像和体内成像。作为体外成像的一个例子,可举出:制作以细胞内或表面的生物物质为传感对象的传感用纳米颗粒10a,并将纳米颗粒添加于该细胞中,用荧光显微镜等信号检测装置对细胞内或表面的生物物质90的动态进行成像的方法。作为体内成像的一个例子,可举出:制作以存在于体内的生物物质为传感对象的传感用纳米颗粒10a,并给药于实验动物等动物的循环系统、例如血液,用信号检测装置对生物物质90的体内动态进行成像的方法。

[0249] 实施例

[0250] 以下,基于实施例详细地说明本发明,但本发明不限于此。

[0251] [试验例1:传感用纳米颗粒的合成-1]

[0252] 在本试验例中,合成了人血清白蛋白(HSA)传感用纳米颗粒(以下,也记载为“MIP-NGs”),其对应于图1中的传感用纳米颗粒10。作为对比,除了不进行分子印迹以外,以同样的方式来合成纳米颗粒(以下,也记载为“NIP-NGs”)。

[0253] 1-1.分子印迹聚合物的合成(工序1)

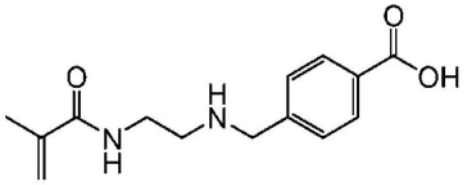
[0254] 在50mL的舒伦克烧瓶中准备下述表所示的成分的混合物(预聚物溶液),并在4℃下孵育24小时以使功能性单体和HSA充分地相互作用后,在氮气环境、70℃下进行无乳化剂沉淀聚合12小时。另一方面,对于对比用的NIP-NGs,除了预聚物溶液中不包含HSA以外,在同样的条件下进行无乳化剂沉淀聚合。

[0255] [表2]

[0256]

		实施例1 MIP-NGs	比较例1 NIP-NGs
模板蛋白质	人血清白蛋白(HSA)	6.70 mg (0.101 μmol)	—
功能性单体	式(51a)所示的功能性单体	39.3 mg (0.15 mmol)	39.3 mg (0.15 mmol)
N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺	N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)	204 mg (1.81 mmol)	6.70 mg (0.101 μmol)
生物相容性单体	2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)	29.5 mg (0.100 mmol)	29.5 mg (0.100 mmol)
交联剂	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)	16.5 mg (0.108 mmol)	16.5 mg (0.108 mmol)
引发剂	2-2'-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐(V-50)	109 mg (0.400 mmol)	109 mg (0.400 mmol)
溶剂	10mM PBS 缓冲液 pH 7.4 (含140mM NaCl)	50 mL	50 mL

[0257] [化学式16]

[0258]  (51a)

[0259] 需要说明的是,式51a所示的功能性单体具有苯环、羧基和仲氨基,在MIP-NGs中,可认为苯环与HSA的疏水袋相互作用,羧基与HSA的赖氨酸残基所代表的带正电的部位相互作用,进而,仲氨基用于在后述的印迹后修饰(工序3)中引入荧光分子。

[0260] 1-2.模板的去除(工序2)

[0261] 如下操作,使用阴离子交换层析进行颗粒的纯化。在本工序中,通过利用阴离子交换层析载体与HSA的强相互作用,从分子印迹聚合物中去除模板。

[0262] 使用Amicon Ultra-4、10kDa的透析管对聚合反应后的溶液进行3次超滤(25℃,7500×g,20分钟)。去除未反应的单体,并将溶剂从PBS置换为含有140mM NaCl的pH 7.4、10mM的Tris-盐酸缓冲液以得到未纯化样品。

[0263] 将1.0g阴离子交换层析用层析填充剂DEAE-Sephadex加入35mL含有140mM NaCl的Tris-盐酸缓冲液(pH7.4)中,使其膨润24小时,并填充到聚丙烯制Big LibraTube®中至高度约5.5cm左右。向其中添加1mL未纯化样品,并使用含有140mM NaCl的10mM Tris-盐酸缓冲液(pH7.4)作为流动相,将洗脱液分级为各1.5mL。使用Hitachi High-Technologies F-2500测定分级的部分的源于功能性单体(功能性基团)的荧光(在280nm的激发波长下为400nm)和源于HSA的荧光(在280nm的激发波长下为340nm),以确认已去除HSA。将第2级分至第7级分全部混合,使用10kDa的透析管将溶剂置换为PBS并浓缩至5mL。由此,得到MIP-NGs或NIP-NGs的纯化样品溶液。

[0264] 1-3.粒径的测定

[0265] 对于得到的MIP-NGs和NIP-NGs的粒径,如下操作通过DLS测定(Malvern公司制造

的ZETASIZER NANO-ZS MAL500735)进行评价。

[0266] 将500μL纯化样品溶液添加到1.5mL微管中,在90℃下干燥一夜。根据干燥前后的质量,基于下述式(式中,w_0表示1.5mL微管的重量(g),w_1表示干燥前的重量(g),w_2表示干燥后的重量(g))计算出固体成分浓度。将结果示于下述表中。

[0267] [数学式1]

[0268] $$固体成分浓度(\%)=\frac{w_2-w_0}{w_1-w_0}\times 100$$

[0269] [表3]

[0270]

	体积平均粒径	固体成分浓度
实施例1 MIP-NGs	8.07 nm	0.0429 wt%
比较例1 NIP-NGs	7.90 nm	0.166 wt%

[0271] 如表3所示,对于MIP-NGs和NIP-NGs,可确认存在纳米级颗粒。

[0272] [试验例2:传感用基板的制作-1]

[0273] 在本试验例中,如下操作而将试验例1中得到的MIP-NGs(实施例1)和NIP-NGs(比较例1)固定在基板上。具体而言,将试验例1中得到的MIP-NGs固定在基板上,制作相当于图6的传感用基板1的人血清白蛋白(HSA)传感用基板。另外,对于NIP-NGs,也同样地操作而固定在基板上。

[0274] 2-1.在基板上固定颗粒

[0275] 将SPR金基板(GE Healthcare公司制造的SIA Kit Au)用乙醇和纯水洗涤后,浸渍于1mM的11-巯基十一烷酸的乙醇溶液中,并在25℃下孵育24小时。用乙醇和纯水洗涤反应后的基板,并用氮气进行干燥。

[0276] 使用基于SPR的分子间相互作用分析仪(GE Healthcare公司制造的Biacore 3000),以20μL/分钟的流速注入0.1M的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和0.4M的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的1:1的混合溶液7分钟而形成分子膜,然后以20μL/分钟的流速注入试验例1的工序2中得到的纯化样品(466μg/mL)7分钟,将颗粒固定在基板上。在该固定中,通过使分子膜表面的NHS酯和颗粒表面的官能团(该官能团可以为源于功能性单体的氨基和/或源于残留在构成颗粒的聚合物末端的引发剂的脒基)反应,颗粒被固定在基板上。接下来,通过以20μL/分钟的流速注入1M的2-氨基乙醇(pH8.5)7分钟,封闭分子膜表面的未反应NHS酯。

[0277] 2-2.蛋白质吸附实验

[0278] 在以下条件下,将溶解于PBS(10mM,pH7.4,含有140mM NaCl)的人血清白蛋白(HSA;Mw:66.5kDa,pI:4.6)、细胞色素C(Cyt c;Mw:11.7kDa,pI:10.3)或转铁蛋白(Trf;80kDa,pI:6.1)注入至固定在基板上的颗粒来进行吸附实验。

[0279] [表4]

[0280]

流速	20 μL/min
注入体积	100 μL
温度	25℃
数据点	注入后6分钟
运行缓冲液	PBS
吸附试验用蛋白质 (浓度)	HSA, Cyt c, Trf (0, 1.5, 3, 6.02, 12.0, 24.1, 48.1, 96.2, 192 nM)

[0281] 另外,根据所得到的吸附等温线,通过曲线拟合算出结合常数。使用DeltaGraph 5.4.5v(JapanPoladigital公司制造),基于下述式(式中,K表示结合常数,G表示蛋白质浓度,D表示SPR信号强度的最大变化量,以及H表示自变量)来进行拟合。结果示于下述表中。

[0282] [数学式2]

[0283] $$y = \frac{D}{2KG}\left\{(1 + K \times G + K \times H) - ((1 + K \times G + K \times H)^2 - 4 \times K \times K \times H \times G)^{1/2}\right\}$$

[0284] [表5]

[0285]

	结合常数M^{-1} (vs HSA)
实施例1 MIP-NGs	4.98×10^7
比较例1 NIP-NGs	6.00×10^6

[0286] [表6]

[0287]

	蛋白质	结合常数M^{-1}
实施例1 MIP- NGs	HSA (传感对象)	4.98×10^7
	Cyt c	6.28×10^6
	Trf	5.63×10^6

[0288] 如表5所示,与NIP-NGs相比,MIP-NGs的结合常数明显变大。由此,可确认利用分子印迹效果,MIP-NGs对HSA示出高亲和性。此外,如表6所示,在三种蛋白质中HSA的结合常数明显变大,可推测MIP-NGs对HSA具有特异的结合空间。

[0289] [试验例3:设有MIP膜的对比用的传感用基板的制作]

[0290] 为了后述的试验例5的对比试验,使用与试验例1中使用的单体相同的单体,在基板上形成平膜状的MIP膜,制作了对比用的HSA传感用基板。

[0291] 3-1.聚合性官能团固定化基板的制作

[0292] 将镀金玻璃基板(5mm×10mm)用乙醇和纯水洗涤后,进行UV-O_3处理30分钟。将处理后的基板浸渍于1mM的11-巯基-1-十一烷醇的乙醇溶液中,并在25℃下孵育24小时。然后,用乙醇和纯水洗涤基板,并用氮气进行干燥。将得到的基板浸渍于溶解有10mM甲基丙烯

酰氯和10mM三乙胺的CH_2Cl_2溶液中，并在25℃下孵育24小时。然后，用乙醇和纯水洗涤基板，并在氮气中使其干燥。由此，得到聚合性官能团固定化基板。

[0293] 3-2.MIP膜的合成

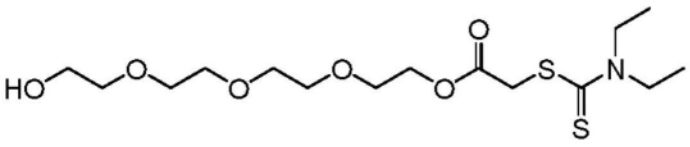
[0294] 混合下述表中所示的成分而制备预聚物溶液。将贯穿有半径3mm孔的硅橡胶片(厚度:0.5mm)覆盖在聚合性官能团固定化基板上，将预聚物溶液滴加于其孔内金基板表面的暴露部分，并从上方覆盖盖玻片。将其置于光反应器(KeyChem-Lumino，YMC Co.,Ltd.)中进行光聚合反应(λ_{em}＝365nm、4℃、10分钟)，由此得到了MIP膜(比较例2)。

[0295] [表7]

[0296]

		比较例2 MIP膜
模板蛋白质	人血清白蛋白(HSA)	0.134 mg (0.02 μmol)
功能性单体	式(51a)所示的功能性单体	0.79mg (3.0 μmol)
N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺	N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)	4.08 mg (36 μmol)
生物相容性单体	2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)	0.59 mg (2 μmol)
交联剂	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (MBAA)	0.33 mg (2.1 μmol)
引发剂	式(8)所示的光引发剂	3.07 mg (8.0 μmol)
溶剂	10mM PBS 缓冲液 pH 7.4 (含140mM NaCl)	1 mL

[0297] [化学式17]

[0298] 

(8)

[0299] 3-3.去除模板

[0300] 将设有MIP膜(比较例2)的基板用纯水洗涤后，浸渍于1M的NaCl水溶液和0.5wt％的SDS水溶液中(各2小时)，以去除HSA。

[0301] 3-4.引入荧光

[0302] 将10μL的50μg/mL的ATTO647N NHS溶液(在包含10mM PBS的0.5％DMSO中)滴加于洗涤后的基板的MIP膜部分上，在室温下静置1小时。然后，用纯水洗涤基板。

[0303] 由此，得到对比用的HSA传感用MIP膜基板。该对比用的HSA传感用MIP膜基板在设置于基板上的MIP膜的表面具有HSA的分子印迹空间(凹部)，并且至少在分子印迹空间(凹部)内配设有源于功能性单体的功能性基团和荧光基团。需要说明的是，该荧光基团根据印

迹空间(凹部)吸附传感对象时的环境变化而增加荧光。

[0304] [试验例4:传感用纳米颗粒的合成-2]

[0305] 在本试验例中,合成了相当于图2的传感用纳米颗粒10a的HSA传感用纳米颗粒。

[0306] 信号物质(荧光物质)的引入(工序3)

[0307] 在1mL试验例1的工序2中得到的MIP-NGs(实施例1)的纯化样品(466μg/mL)中,加入5μL包含10mg/mL的荧光物质(ATTO647N NHS,激发波长:646nm,荧光波长:664nm)的10mM PBS的0.5wt%DMSO溶液,并在25℃下孵育2小时。然后,通过使用Amicon Ultra-4 10kDa进行超滤(25℃、7500×g、20分钟、3次),并用PBS洗涤MIP-NGs,得到引入了荧光基团的MIP-NGs。

[0308] [试验例5:传感用基板的制作-2]

[0309] 在本试验例中,制作了相当于图7的传感用基板1a的HSA传感用基板。

[0310] 5-1.在基板上固定引入了荧光基团的MIP-NGs

[0311] 将镀金玻璃基板(5mm×10mm)用乙醇和纯水洗涤后,浸渍于1mM的11-巯基十一烷酸的乙醇溶液中,并在25℃下孵育24小时。用乙醇和纯水洗涤反应后的基板,并用氮气进行干燥。

[0312] 滴加100μL包含0.2M的EDC和50mM的NHS的水溶液,并在室温下孵育1小时。用纯水洗涤后,滴加100μL试验例4中得到的引入了荧光基团的MIP-NGs(47μg/mL),并使其在室温下反应2小时而进行固定。用纯水洗涤后,通过滴加100μL 1M的2-氨基乙醇(pH8.5)而使其反应30分钟来进行封闭。由此,得到在基板上固定有引入了荧光基团的MIP-NGs的HSA传感用基板。

[0313] 5-2.蛋白质吸附试验-1

[0314] 对于所得到的固定有引入了荧光基团的MIP-NGs的HSA传感用基板,与试验例2同样地操作,进行了蛋白质吸附试验。结果示于下述表中。

[0315] [表8]

[0316]

	蛋白质	结合常数M^{-1}
实施例2 引入了荧光的MIP-NGs	HSA 传感对象	3.17×10^{8}
	Cyt c	3.00×10^{7}
	Trf	7.10×10^{6}

[0317] 如表8所示,通过引入荧光基团,进一步提高了HSA的结合常数。可推测这是因为引入的荧光基团在分子印迹空间中不仅没有阻碍作为传感对象的HSA与相互作用基团的结合,而且由于引入的荧光基团为疏水性,因此在相互作用基团中的苯环和HSA的疏水性区域的相互作用中还叠加了疏水性的荧光基团和HSA的疏水性区域的相互作用。

[0318] 5-3.蛋白质吸附试验-2

[0319] 对于得到的固定有引入了荧光基团的MIP-NGs的HSA传感用基板和试验例3中得到的设有MIP膜对比用的HSA传感用基板,基于选择性因子进行了蛋白质吸附试验。对比的各

自的HSA传感用基板的特征如下述表所示。

[0320] [表9]

[0321]

	固定在基板的MIP的形状	构成单体	模板，传感对象	荧光基团
实施例2	颗粒状	式（51a）所示的功能性单体 NIPAm MPC	HSA	ATTO647N
比较例2	平膜状			

[0322] 对于传感用基板，将溶解于PBS(10mM，pH7.4，含有140mM NaCl)的人血清白蛋白(HSA；Mw：66.5kDa，pI：4.6)、细胞色素C(Cyt c；Mw：11.7kDa，pI：10.3)或转铁蛋白(Trf；80kDa，pI：6.1)在25℃下孵育10分钟，并使用配备有SIC自动分液器的荧光显微镜在以下条件下进行测定。

[0323] (配备有SIC自动分液器的荧光显微镜的测定条件)

[0324] • 荧光显微镜

[0325] 过滤器：Cy5

[0326] 物镜：×5

[0327] 曝光时间：0.1秒

[0328] 光量：12％

[0329] 光源：水银灯

[0330] • SIC自动分液器顺序

[0331] 1.安装芯片

[0332] 2.吸取样品(150μL)

[0333] 3.孵育(25℃，10分钟)

[0334] 4.保持测定位置(测定端口)

[0335] *对每种蛋白质重复进行2→4的步骤。

[0336] 通过用在传感用基板上添加各蛋白质前后的荧光强度的变化率除以作为传感对象的HSA的荧光强度变化率，来计算选择性因子。具体而言，选择性因子由下述式所示。式中，F_0表示上述缓冲液中的基板表面的荧光强度，$F_{样品}$表示包含各蛋白质的样品中的基板表面的荧光强度，F_{HSA}表示包含作为传感对象的HSA的样品中的基板表面的荧光强度。

[0337] [数学式3]

[0338] $$选择性因子 = \frac{(F_{样品}-F_0)/F_0}{(F_{HSA}-F_0)/F_0}$$

[0339] 图8示出了固定有引入了荧光基团的MIP-NGs(颗粒)的HSA传感用基板(实施例2)的结果。图9示出了试验例3中得到的设有MIP膜的对比用的HSA传感用MIP膜基板(比较例2)的结果。

[0340] 如果选择性因子的值小于1，则表示对HSA有识别能力。如图8和图9所示，可看出所有的传感用基板对HSA都有识别能力。然而，如图9所示，对于设有MIP膜的对比用的HSA传感用基板(比较例2)，可观察到：不仅对作为传感对象的HSA表现出较大的荧光变化，而且对并非传感对象的Cyt c和Trf也表现出较大的荧光变化，可知特异性较差。相对于此，如图8所

示，在将颗粒状的MIP固定在基板上的HSA传感用基板(实施例2)中，可看出对作为传感对象的HSA具有较高的特异性。

[0341] [试验例6：血清样品中的HSA的测定]

[0342] 在本试验例中，使用试验例5中制作的相当于图7的传感用基板1a的HSA传感用基板(实施例2)进行血清样品中的HSA的测定。

[0343] 使用经神户大学医学研究生院医学伦理委员会批准的8份人血清样品，接收编号为180128。首先，通过溴甲酚紫(BCP法)测定这些样品中的各自的HSA浓度并进行确认。所确认的HSA浓度示于下述表中。

[0344] [表10]

[0345]

标本编号	1	2	3	4	5	6	7	8
HSA浓度(g/dL)	3.6	4.2	4	3	4.8	4.2	4.4	4.2

[0346] 接着，将各个标本用缓冲液(PBS(10mM，pH7.4，含140mM NaCl))稀释1000倍，使用试验例5中制作的相当于图7的传感用基板1a的HSA传感用基板以与试验例5的蛋白质吸附试验-2同样地操作，求出相对荧光强度。

[0347] 图10示出了所得到的相对荧光强度和通过BCP法得到的浓度的相关性。需要说明的是，相对荧光强度用$F-F_0/F_0$(F_0表示上述缓冲液中的基板表面的荧光强度，F表示标本中的基板表面的荧光强度)表示。如图10所示，发现在通过BCP法得到的HSA浓度和用HSA传感用基板测定的基于HSA结合的相对荧光强度之间具有较高的相关性。由此表明HSA传感用基板可以检测和定量人血清中的HSA。

[0348] [试验例7：使用PSA传感用基板的清真检查]

[0349] 在本试验例中，制作将以猪血清白蛋白(PSA)为传感对象的颗粒固定在基板上的PSA传感用基板，并且基于PSA用作清真食品中掺杂猪源成分的标志物，使用该基板进行清真检查。

[0350] 7-1.传感用纳米颗粒的合成-3

[0351] 首先，合成相当于图1的传感用纳米颗粒10的PSA传感用纳米颗粒。具体而言，除了使用PSA作为模板蛋白质以外，使用下表所示成分的混合物(预聚物溶液)，与试验例1同样地操作，合成MIP-NGs(实施例3)。

[0352] [表11]

[0353]

		实施例3 MIP-NGs	比较例1 NIP-NGs
模板蛋白质	猪血清白蛋白(PSA)	6.70 mg (0.101 μmol)	—
功能性单体	式(51a)所示的功能性单体	39.3 mg (0.15 mmol)	39.3 mg (0.15 mmol)
N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺	N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)	204 mg (1.81 mmol)	6.70 mg (0.101 μmol)
生物相容性单体	2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)	29.5 mg (0.100 mmol)	29.5 mg (0.100 mmol)
交联剂	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)	16.5 mg (0.108 mmol)	16.5 mg (0.108 mmol)
引发剂	2-2'-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐(V-50)	109 mg (0.400 mmol)	109 mg (0.400 mmol)
溶剂	10mM PBS 缓冲液 pH 7.4 (含140mM NaCl)	50 mL	50 mL

[0354] 7-2.粒径的测定

[0355] 对于所得到的MIP-NGs和NIP-NGs,与试验例1同样地操作来测定粒径,结果确认存在纳米级颗粒。

[0356] [表12]

[0357]

	体积平均粒径
实施例3 MIP-NGs	24.55 nm
比较例1 NIP-NGs	20.7 nm

[0358] 7-3.传感用纳米颗粒的合成-4

[0359] 接着,合成相当于图2的传感用纳米颗粒10a的PSA传感用纳米颗粒。具体而言,通过与试验例4同样地操作而将荧光物质ATTO647N NHS引入实施例3的MIP-NGs中,得到引入了荧光基团的MIP-NGs(实施例4)。

[0360] 7-4.传感用基板-3

[0361] 接着,如下操作而将实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs固定在基板上。

[0362] 将镀金玻璃SPR基板(5mm×10mm)用乙醇和纯水洗涤后,用UV-O_3清洁器处理20分钟,使其浸渍于1mM的11-氨基-1-十一烷辛硫醇盐酸盐的乙醇溶液中,并在25℃下孵育24小时。用乙醇和纯水洗涤反应后的基板,并用氮气进行干燥。由此,得到表面形成分子膜的基板。进而,将溶解有EDC(0.4M)和NHS(0.1M)的水溶液(100μL)滴加于基板上的分子膜上,静置1小时。通过在其中滴加100μL(300μg/mL)的实施例3的引入了荧光基团的MIP-NGs,并使其反应2小时来将颗粒固定在基板上。在该固定中,通过使分子膜表面的氨基与颗粒表面的官能团(源于功能性单体的羧基)反应,颗粒被固定在基板上。通过滴加100μL的10mM磺基-NHS乙酸盐水溶液、并使其反应30分钟来封闭表面的氨基。

[0363] 7-5.样品中的PSA的测定

[0364] 对于比较例1的NIP-NGs，与上述同样地引入荧光物质，得到引入了荧光的NIP-NGs(比较例3)。以同样的方式将比较例3的引入了荧光基团的NIP-NGs固定在基板上，以制作比较用的传感用基板。使用固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的PSA传感用基板和固定有比较例3的引入了荧光基团的NIP-NGs的传感用基板，与试验例6同样地操作来测定缓冲液(PBS(10mM，pH7.4，含140mM NaCl))中PSA浓度为0nM至20nM的样品中所含的PSA浓度。检测限为12ng/mL。

[0365] 对于固定有实施例4的引入荧光基团的MIP-NGs的PSA传感用基板，将得到的相对荧光强度与PSA浓度的相关性示于图11。需要说明的是，相对荧光强度与试验例6同样。如图11所示，发现在PSA浓度与用该PSA传感用基板测定的基于PSA结合的相对荧光强度之间具有较高的相关性。由此表明，如果改变印迹凹部的模板，则不仅能够检测和定量人血清白蛋白HSA，而且能够检测和定量猪血清白蛋白PSA。另一方面，对于固定有比较例3的引入了荧光基团的NIP-NGs的传感用基板以同样的方式进行了荧光测定，但几乎没有观察到荧光变化。进而，下表示出了由得到的荧光变化率计算表观结合常数的结果。

[0366] [表13]

[0367]

	结合常数M^{-1} (vs PSA)
实施例4 MIP-NGs	1.87×10^{8}
比较例3 NIP-NGs	9.00×10^{7}

[0368] 如表13所示，与NIP-NGs(比较例3)相比，MIP-NGs(实施例4)的结合常数明显变大，因此可确认利用分子印迹效果，MIP-NGs对PSA示出高亲和性。

[0369] 7-6.对PSA的特异性

[0370] 将猪血清白蛋白(PSA)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(LyZ)或转铁蛋白(Trf)以40nM的浓度溶解于缓冲液(PBS(10mM，pH7.4，含140mM NaCl))中而制备样品。对于这些样品，使用固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的PSA传感用基板和固定有比较例3的引入了荧光基团的NIP-NGs的传感用基板，以试验例6相同的方式来进行测定。需要说明的是，选择性因子为样品中的荧光变化相对于40nM的PSA中的荧光变化的比例，由下述式所示。式中，F_0表示上述缓冲液中的基板表面的荧光强度，$F_{样品}$表示样品中的基板表面的荧光强度，F_{PSA}表示40nM的PSA中的基板表面的荧光强度。

[0371] [数学式4]

[0372] $$选择性因子 = \frac{(F_{样品}-F_0)/F_0}{(F_{PSA}-F_0)/F_0}$$

[0373] 图12示出了固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的传感用基板的结果，图13示出了固定有比较例3的引入了荧光基团的NIP-NGs的传感用基板的结果。

[0374] 如果选择性因子的值小于1，则表示对PSA有识别能力。如图12和图13所示，可看出所有的传感用基板对PSA都有识别能力。然而，如图13所示，在固定有比较例3的引入了荧光基团的NIP-NGs的传感用基板中，可观察到：不仅对作为传感对象的PSA表现出较大的荧光变化，而且对并非传感对象的蛋白质也表现出较大的荧光变化，可知特异性较差。相对于

此，如图12所示，在固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的传感用基板中，可看出对作为传感对象的PSA具有较高的特异性。

[0375] 7-7.清真检查-1

[0376] 将1g碎牛肉添加至4mL的磷酸缓冲液(pH7.4)中，并用均质器以10000rpm将牛肉均质化1分钟。将通过离心分离(16000×g，30分钟，4℃)得到的上清液用0.2μm过滤器过滤3次，用磷酸缓冲液(pH7.4)稀释500倍，得到牛肉提取样品。

[0377] 将PSA以各种浓度添加至所得到的牛肉提取样品中，以制备掺杂PSA的牛肉提取样品。此外，将PSA以相同的浓度添加至磷酸缓冲液(pH7.4)中，以制备PSA样品。对于掺杂PSA的牛肉提取样品和PSA样品，使用固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的传感用基板来测定荧光变化，以上述同样的方式导出相对荧光强度变化。结果示于图14。

[0378] 如图14所示，可看出固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的传感用基板也可以与磷酸缓冲液中(在PBS缓冲液中)的PSA同样的方式定量牛肉提取物样品中(在500×牛肉提取物中)掺杂的PSA。

[0379] 7-8.清真检查-2

[0380] 制作掺杂了猪肉提取物样品的牛肉提取物样品。首先，与上述同样的方式得到稀释500倍的牛肉提取物样品。另外，除了用猪肉代替牛肉以外，以同样的方式得到稀释500倍的猪肉提取物样品。以使牛肉提取物样品的含有率和猪肉提取样品的掺杂率为下表中所示的比率方式将两种提取样品混合，得到掺杂猪肉提取物样品的牛肉提取物样品。需要说明的是，表中所示的比率表示与提取物样品中的蛋白质量(重量基准)相当的量。

[0381] [表14]

[0382]

	猪肉提取物样品掺杂率(wt%)	牛肉提取物样品含有率(wt%)
项目1 (阴性对照)	0	100
项目2	0.1	99.9
项目3	1	99

[0383] 对于这些掺杂猪肉提取物样品的牛肉提取物样品，使用固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的传感用基板测定荧光变化，以上述同样的方式导出相对荧光强度。结果示于图15。图15中，横坐标表示猪肉提取物样品掺杂率，纵坐标表示相对荧光强度。

[0384] 由图15可以清楚地看出，在没有掺杂猪肉提取物样品的100％牛肉提取物样品的阴性对照中，与PBS缓冲液同样地几乎未观察到荧光变化。相对于此，在掺杂猪肉提取物样品的牛肉提取物样品中，可以检测到猪肉提取物样品中所含的PSA。特别是，即使猪肉提取物样品的掺杂率为0.1wt％，也可以检测到PSA，因此可看出固定有实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的传感用基板适用于高灵敏度的清真检查。

[0385] [试验例8:使用PSA用传感用颗粒(未固定)的免疫反应]

[0386] 在本试验例中，以未固定于基板的游离状态使用以猪血清白蛋白(PSA)为传感对象的颗粒，分别试验了对PSA和转铁蛋白的免疫反应。

[0387] 通过与试验例7的“传感用纳米颗粒的合成-3”和“传感用纳米颗粒的合成-4”相同的方法来制作以PSA为传感对象的颗粒(引入了荧光基团的MIP-NGs;实施例4)。

[0388] 在80μg/mL的引入荧光基团的MIP-NGs中，添加蛋白质溶液(包含140mM NaCl的

10mM磷酸缓冲液(pH7.4)中),以使蛋白质(PSA或转铁蛋白)的最终浓度为5μg/mL、10μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、500μg/mL或1000μg/mL(最终溶液量500μL),将混合物在25℃下孵育15分钟。然后,用荧光分光光度计(F-2500,Hitachi High-Technologies)测定溶液的荧光光谱(激发波长λex:647nm,λem:658nm至690nm)。结果示于图16。另外,标绘出相对于PSA和转铁蛋白各自的蛋白质浓度(PSA:5μg/mL、10μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、500μg/mL、1000μg/mL;转铁蛋白:10μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、500μg/mL、1000μg/mL)的荧光波长667nm的相对荧光强度。结果示于图17。

[0389] 如图16所示,在游离状态的实施例4的引入荧光基团的MIP-NGs中添加PSA溶液的情况下,可观察到荧光强度随着浓度增加而增加。在将实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs固定于基板的情况下也可观察到同样的现象(试验例7),因此表明图16所示的荧光强度的增加是与向实施例4的引入荧光基团的MIP-NGs中的PSA结合相伴随的荧光强度变化。另外,如图17所示,与添加作为参照蛋白质的转铁蛋白时的荧光变化相比,添加PSA时表现出较大的荧光强度变化。由此表明,即使实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs是未固定于基板的游离状态,也能够选择性地吸附PSA,并以荧光信号的形式传递其结合信息。

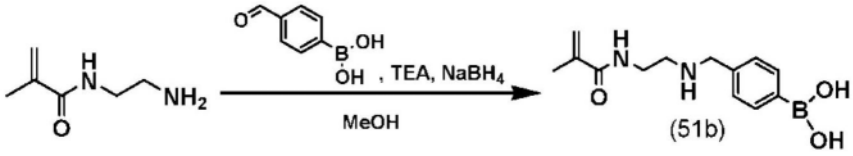
[0390] [实施例9:传感用纳米颗粒的合成-5]

[0391] 在本试验例中,合成相当于图2的传感用纳米颗粒10a的、Fc结构域传感用(并且Fc结构域捕获介导的IgG传感用)纳米颗粒。

[0392] 9-1.功能性单体的合成

[0393] 设计式51b所示的功能性单体,根据以下方案来合成。需要说明的是,式51b所示的功能性单体具有二羟硼基芳基和二价氨基,在MIP-NGs中,二羟硼基芳基与IgG的Fc结构域的糖链相互作用,仲氨基用于在印迹后修饰中引入荧光分子。

[0394] [化学式18]

[0395] 

[0396] 使乙二胺单甲基丙烯酰胺盐酸盐(ca.1.57mmol)和4-甲酰基苯基硼酸(215mg,1.5mmol)以及三乙胺(210μL,1.5mmol)溶解于甲醇(10mL)中,在室温下进行搅拌(0.5h)。通过TLC(MeOH→UV@254nm和茚三酮)进行反应跟踪,并确认UV吸收和被茚三酮染色的斑点(Rf:0.55,紫色)的出现,因此确定形成了席夫碱,向其中加入$NaBH_4$(120mg,9.0mmol)。添加后,进一步在室温下搅拌一夜(8小时)。通过TLC(MeOH→UV@254nm和茚三酮)观察到目标物斑点(Rf:0.25,黄色)后,终止反应,用旋转蒸发仪减压蒸馏去除溶剂。使用全自动层析柱(二氧化硅:universal premium,MeOH/DCM=70/30→100/0,GR)纯化残渣,得到目标物。

[0397] 产量:175mg(0.668mmol,42.5%)

[0398] ^{1}H-NMR(500MHz,D_2O):δ=7.62(d,2H,苯基),7.30(d,2H,苯基),5.69(s,1H,乙烯基),5.44(s,1H,乙烯基),3.97(s,2H,N-CH_2-),3.47(t,2H,-CH_2-),2.99(br,2H,-CH_2-),1.89(s,3H,-Me)

[0399] 9-2.Fc结构域的制备

[0400] 将10mg的IgG溶解于10mM磷酸缓冲液(pH7.4,140mM NaCl)(5mL)中,制备抗体溶

液。将0.02M的L-半胱氨酸、0.002M的EDTA、0.1mg/mL木瓜蛋白酶溶解于10mM磷酸缓冲液(pH7.4,140mM NaCl)中,制备酶溶液。将抗体溶液和酶溶液等量混合,并在37℃下反应24小时。然后,通过对反应液应用10kDa的超滤膜(7500g,20分钟×3),将溶剂置换为20mM磷酸缓冲液(pH7.0)。接着使用100kDa的超滤膜(Amicon Ultra)(7500g,20分钟×3)分离未反应的IgG。使用蛋白A柱(HitrapTMProtein A HP,Cytiva)对所得到的溶液(1mL)进行纯化。使用20mM磷酸缓冲液(pH7.0)作为结合缓冲液,使用0.1M柠檬酸缓冲液(pH3.0)作为洗脱缓冲液,用注射器(流速:约1mL/分钟)进行纯化。对纯化后的溶液应用10kDa的超滤膜(7500g,20分钟×3),将溶剂置换为10mM碳酸缓冲液(pH9.2)。通过SDS-PAGE确认Fc结构域的纯化。

[0401] 9-3.传感用纳米颗粒的合成-5

[0402] 使下表所示的成分的混合物(预聚物溶液)在50℃下进行无乳化剂沉淀聚合12小时,来合成聚合物纳米凝胶(工序1)。需要说明的是,为了容易进行颗粒的纯化作业,预聚物溶液中所含的单体也可以使用标记单体。对聚合后的溶液(2mL)应用超滤膜(10kDa,7500×g,20分钟×3),置换为10mM磷酸缓冲液(pH7.4,140mM NaCl)。使得到的溶液(2mL)通过尺寸排阻层析(Sephadex G-100)以去除未反应的单体。将由此得到的溶液(1mL)和40mg/mL的SDS水溶液(1mL)混合,孵育5分钟。然后,将混合物添加至阴离子交换树脂(DEAE-Sephadex,10cm,1.5cm i.d.)中,并用10mM Tris-HCl缓冲液(pH7.4,140mM NaCl)作为洗脱液进行洗脱(工序2)。然后,为了去除SDS,将所得物通过脱盐柱(PD-10)(洗脱液:10mM磷酸缓冲液(pH7.4,140mM NaCl))进行纯化。

[0403] [表15]

[0404]

		实施例5 MIP-NGs	比较例4 NIP-NGs
模板蛋白质	Fc结构域(IgG片段)	2.50 mg (0.050 μmol)	—
N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺	N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)	102 mg (0.90 mmol)	
生物相容性单体	2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)	3.69 mg (0.0125 mmol)	
交联剂	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)	7.71 mg (0.050 mmol)	
标记单体	甲基丙烯酰氧基乙基硫代氨基甲酰基罗丹明B(MTRB)	0.42 mg (0.625 μmol)	
功能性单体	式(51b)所示的功能性单体	15.73 mg (0.060 mmol)	
引发剂	2-2'-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐(V-50)	54.2 mg (0.20 mmol)	
溶剂	10mM 碳酸盐 缓冲液 2% DMSO (pH 9.2)	25 mL	

[0405] 对于得到的MIP-NGs(实施例5)和NIP-NGs(比较例4),与试验例1同样地操作测定粒径,结果可确认存在纳米级颗粒。具体而言,以Z平均粒径计,MIP-NG(实施例5)中为21nm,

NIP-NGs(比较例4)中为18nm。MIP-NG(实施例5)中Z电位为19mV,NIP-NGs(比较例4)中Z电位为2.9mV,表示带正电荷。可认为这些电荷源于功能性单体的仲氨基(和聚合引发剂)。由此表明,合成了插入功能性单体部位的颗粒。另外,根据纯化前后的颗粒溶液的荧光测定(λ_{ex}=280nm)的结果,由于纯化前可看到的340nm附近的Fc区域所含的源于色氨酸的荧光消失,因此确认大部分Fc结构域片段可以被洗掉。

[0406] 进而,在纯化后的MIP-NGs(0.5mg/mL,1mL)中加入5μL的ATTO647N NHS(10mg/mL)DMSO溶液,在25℃下孵育2小时(工序3)。通过将反应后的溶液进行超滤(10kDa,7500×g,20分钟×3),以去除未反应的荧光分子,并得到引入了荧光基团的MIP-NGs(实施例5)。需要说明的是,根据引入荧光分子(ATTO647N)操作前后的荧光测定(激发波长:647nm),可观察到引入前观察不到的670nm附近的荧光峰,因此确认了引入了荧光。对于NIP-NGs也进行同样的操作,得到引入了荧光基团的NIP-NGs(比较例4)。

[0407] 9-4.传感用基板-4

[0408] 将溅射金的玻璃基板(4.3×9.8mm)用纯水和EtOH洗涤后,用UV-O_3处理(20分钟)。将洗涤后的基板浸渍于1mM的11-巯基十一烷酸的EtOH溶液中,利用自组装单分子膜形成而在表面引入羧基(25℃,24小时)。用EtOH洗涤基板后,将基板浸渍于溶解有0.2M的EDC和0.05M的NHS的水溶液中以活化表面羧基(25℃,1小时)。在反应后的基板上添加50μL的引入了荧光基团的MIP-NGs(实施例5)或引入了荧光基团的NIP-NGs(比较例4)的溶液(PBS中,为0.5mg/mL),通过胺偶合进行纳米颗粒的固定(25℃,1小时)。然后,通过将1M氨基乙醇水溶液(50μL)滴加到未反应的活性酯中来进行钝化(25℃,0.5小时)。最后,滴加无蛋白封闭缓冲液(50μL)来封闭表面(25℃,0.5小时)。需要说明的是,在固定前后测定表面的荧光强度,由于观察到固定后的基板上荧光强度增加,因此确认颗粒的固定。

[0409] 9-5.荧光测定

[0410] 使用配备有自动液体处理机器人的荧光显微镜来研究所制作的传感用基板检测蛋白质荧光的能力。测定顺序条件如下。

[0411] 荧光显微镜

[0412] 过滤器:Cy5

[0413] 物镜:×5

[0414] 曝光时间:0.1秒

[0415] 光量:12%

[0416] 光源:水银灯

[0417] ROI:基板中心部3×5的15处

[0418] 自动分液器的顺序

[0419] 1.安装芯片

[0420] 2.吸取样品:150μL

[0421] 3.反应:5分钟(25℃)

[0422] 4.保持测定位置

[0423] 重复进行2→4

[0424] 图18中示出了在制作的传感用基板中添加作为模板蛋白质的Fc结构域片段(0nM至1600nM)时的相对荧光强度变化。与固定有NIP-NGs(比较例4)的基板进行对比,固定有

MIP-NGs(实施例5)的基板表现出较大的荧光变化,因此表明MIP-NGs(实施例5)中通过分子印迹形成Fc结构域片段的结合空间,而且在该空间内插入功能性单体,通过印迹后修饰进行荧光标记,由此可以将Fc结构域片段的结合转化为荧光信号。另外,由得到的荧光变化率算出表观结合常数(K_d)为9.8×10^{-9}M。

[0425] 使用Fc结构域片段和作为参照蛋白质的完整IgG以及溶菌酶(Lyz),针对制作的传感用基板的蛋白质选择性进行了试验。以添加Fc结构域片段(100nM)时的相对荧光强度变化为1,将添加各参照蛋白质(100nM)时的荧光响应示于图19。MIP-NGs(实施例5)在添加Fc结构域片段时表现出最大的荧光变化。另外,具有Fc结构域片段作为其部分结构的完整IgG也有70%左右响应,由此表明可以识别IgG的Fc部位。亦即,证实了使用Fc结构域片段作为模板制作的MIP-NGs(实施例5)也可以通过捕获Fc结构域来检测IgG。另一方面,在NIP-NGs(比较例4)中,完整IgG和Lyz均表现出比Fc结构域片段更大的荧光响应。推测这是由于随机存在于NIP-NGs(比较例4)表面的功能性单体残基与引入其中的荧光分子的非特异性结合。完整IgG的pI约为8.5,Lyz为11.2,在中性溶液中带正电荷。由此可认为,与功能性单体的二羟硼基芳基的静电相互作用、与酰胺键部位的氢键等有助于结合。

[0426] [试验例10]

[0427] 在本试验例中,制作具有将HER2(生物物质)作为传感对象的分子印迹凹部且在分子印迹凹部具有功能性基团的颗粒,作为通过捕获HER2的外泌体(作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体)传感用纳米颗粒,其中所述功能性基团具有与HER2相互作用的抗HER2亲和体(与生物物质的相互作用基团)和信号物质ATTO647N。

[0428] 10-1.模板的修饰(工序11)

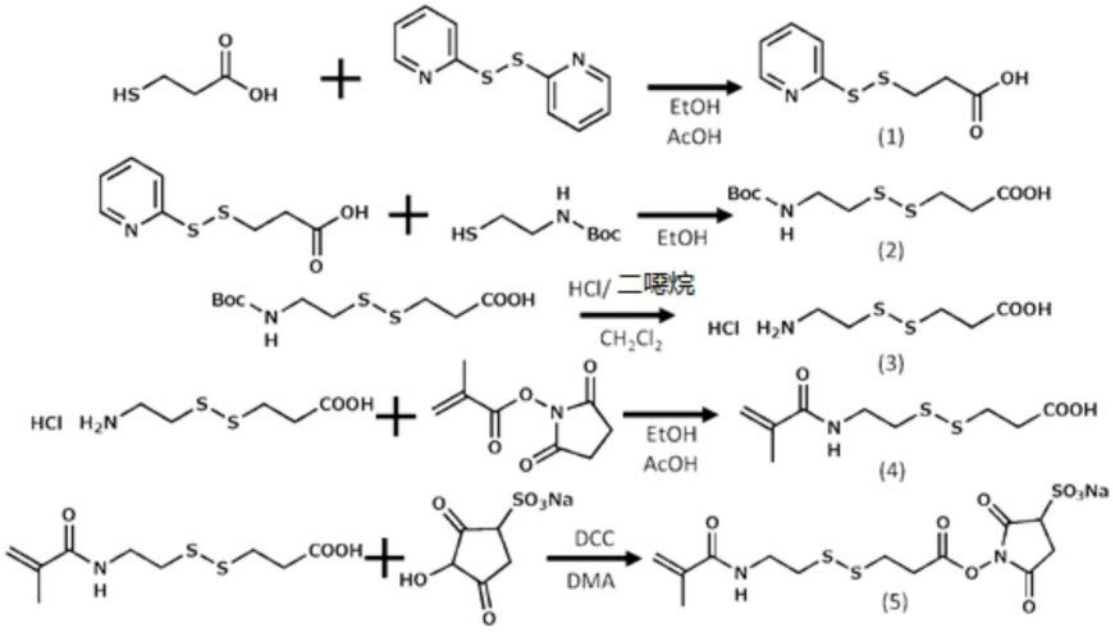
[0429] 如下操作,制作通过二硫键(可逆连接基团)被甲基丙烯酰基(聚合性官能团)修饰的模板HSA。

[0430] 10-1-1.试剂

[0431] •白蛋白,来自人血清(HSA;人血清白蛋白)(和光纯药工业)

[0432] •用以下方法合成的化合物(5)

[0433] [化学式19]

[0434] 

[0435] 将3-巯基丙酸(0.900g,8.50mmol)溶解于20mL乙醇中,并加入1.6mL乙酸。在室温下一边搅拌一边向其中滴加溶解于30ml乙醇的2,2-二吡啶基二硫化物(3.75g,17mmol)。使混合物在25℃下反应3小时,由此得到化合物(1)。

[0436] 将经纯化的化合物(1)(1.43g,3.97mmol)溶解于15mL乙醇中,然后加入使2-(Boc-氨基)乙硫醇(1.69mL,9.99mmol,2eq)溶解于20mL乙醇中而成的液体。在室温下反应3小时,由此得到化合物(2)。

[0437] 在溶解于5mL的CH_2Cl_2中的纯化化合物(2)(1.43g,5.10mmol)中,在冰水浴中一边搅拌一边滴加溶解于10mL的CH_2Cl_2中的4N HCl二噁烷(6.60mL,25.5mmol,5eq)。然后,在室温下反应一夜,由此得到化合物(3)。

[0438] 将经纯化的化合物(3)(531.6mg,2.45mmol)分散于5mL的CH_2Cl_2中,并加入DIEA(1.28mL,7.35mmol,3eq)。在氮气环境下,向其中滴加溶解有甲基丙烯酸N-琥珀酰亚胺酯(670mg,3.68mmol,1.5eq)的3.5mL的CH_2Cl_2,在室温下反应一夜,由此得到化合物(4)。

[0439] 将经纯化的化合物(4)(290mg,1.16mmol,1.1eq)、磺基-NHS(230mg,1.1mmol)和DCC(304.5mg,1.54mmol,1.4eq)溶解于5mL的DMA中,并在室温下反应24小时。反应后,将溶液冷却至4℃,过滤去除沉淀物。然后,将滤液通过减压蒸馏去除DMA。将得到的白色固体溶解于AcOEt中,通过向其中加入己烷使其再次沉淀,得到化合物(5)。

[0440] (^{1}H-NMR chart 7(500MHz,CD_3OD):δ=8.1(t,1H,-CO-NH-C-),5.7-5.3(s,2H,CH_3-C=CH_2),4.0-3.8(d,1H,-CO-CH-SO_3Na),3.4-3.3(m,2H,$NaSO_3$-CH-CH_2-),3.3-2.7(m,8H,-NH-CH_2-CH_2-S-S-CH_2-CH_2-),1.85(s,3H,CH_3-C=CH_2))

[0441] 10-1-2.实验步骤

[0442] 将2mL溶解有HSA(100mg,2.23μmol)的10mM磷酸缓冲液(pH7.4)和1mL溶解有化合物(5)(20mg,44.6μmol,20eq)的10mM磷酸缓冲液(pH7.4)混合,在4℃下反应一夜。然后,用Amicon Ultra-4 10kDa(4℃,7500G,20min)洗涤3次,得到通过二硫键(可逆连接基团)被甲基丙烯酰基(聚合性官能团)修饰的模板HSA。

[0443] 10-2.分子印迹聚合物的合成(工序12)

[0444] 如下操作合成分子印迹聚合物的颗粒。

[0445] 具体而言，根据下表的聚合配方，在50mL舒伦克烧瓶中，于氮气环境、70℃下进行无乳化剂沉淀聚合16小时，合成分子印迹聚合物的颗粒MIP-NGs。

[0446] [表16]

[0447]

试剂	用量
甲基丙烯酰基修饰的HSA	18.3mg(0.30μmol)
N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)	610mg(5.40mmol)
2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)	88.5mg(0.30mmol)
N,N′-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)	46.2mg(0.30mmol)
2-2′-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐(V-50)	316mg(1.20mmol)
PBS(10mM磷酸盐、140mM NaCl、pH7.4)	50mL

[0448] 10-3.模板的去除(工序13)

[0449] 从分子印迹聚合物中去除模板。

[0450] 对于包含分子印迹聚合物的颗粒MIP-NGs与模板HSA的复合体的PBS溶液，使用Amicon Ultra-4(10kDa)透析管，通过超滤(25℃，7500g，20分钟，3次)，进行溶剂的纯水置换。向该复合体中加入三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)直至达到20mM，在25℃下反应一夜。该反应使模板HSA和MIP-NGs之间的二硫键(可逆连接基团)还原并断裂，露出硫醇基。

[0451] 进而，通过使用尺寸排阻层析用层析填充剂Sephadex G-100进行筛分，使用Amicon Ultra-410kDa透析管进行超滤(25℃，7500g，20min，3次)，以去除TCEP以及进行向140mM NaCl10mM Tris-盐酸缓冲液pH7.4的溶剂置换。进而，通过阴离子交换层析法去除模板HSA。由此，得到分子印迹聚合物的颗粒MIP-NGs。

[0452] 10-4.在基板上固定颗粒

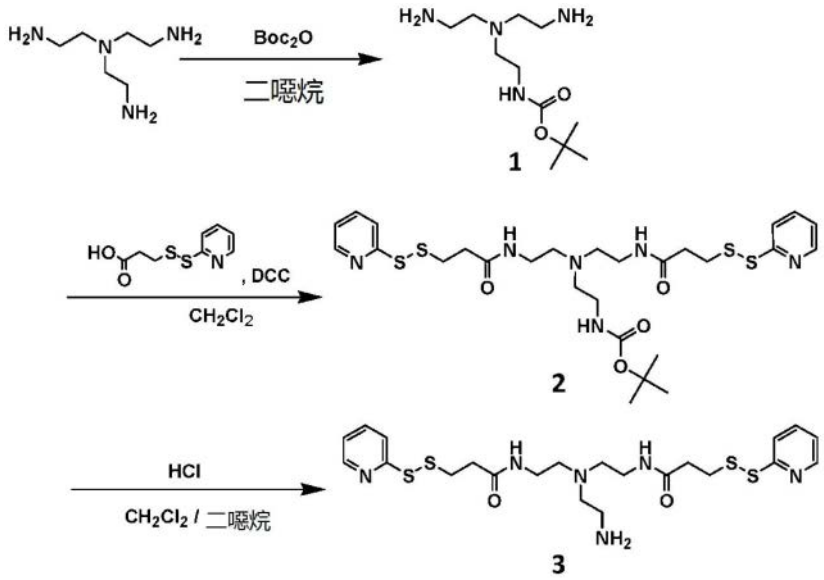
[0453] 如下操作而将得到的分子印迹聚合物的颗粒MIP-NGs固定在基板上。

[0454] 将SPR金基板用纯水和乙醇洗涤后，浸渍于以使11-巯基十一烷酸为1mM的方式制备的乙醇溶液中，在25℃下孵育一夜。用乙醇和纯水洗涤反应后的基板，并用氮气进行干燥，然后使用Biacore 3000，注入0.1M的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和0.4M的1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的PBS溶液，在25℃下孵育10分钟。将400μg/mL的MIP-NGs溶液注入得到的基板(是基板表面用作为结合基团的羧酸活性酯基改性的基板)，并在25℃下孵育10分钟，由此得到其上固定有MIP-NGs的基板。

[0455] 10-5.功能性分子的合成

[0456] 根据以下方案，合成后述的项目10-6中使用的具有功能性基团的功能性分子(下述化合物(3))，所述功能性基团包含用于结合与生物物质的相互作用基团的基团和信号物质结合基团。

[0457] [化学式20]

[0458] 

[0459] 使1800μL(12mmol)的三(2-氨基乙基)胺溶解于二噁烷(4mL)中,在冰水浴中进行搅拌。向其中缓慢滴加溶解有440mg(2.0mmol)Boc_2O的二噁烷(10mL),进一步搅拌一夜(0℃→室温)。减压蒸馏去除反应后的溶剂,将残渣溶解于Milli-Q水中,用CH_2Cl_2(15mL)进行提取(×4)。用Na_2SO_4使有机层干燥,通过旋转蒸发仪减压蒸馏去除溶剂,进行真空干燥而得到透明油状的目标物(1)。(产量:364mg,74%)

[0460] ^{1}H-NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ=5.29(br,1H,尿素),3.18(t,2H,-CH_2-NH-Boc),2.75(t,4H,H_2N-CH_2-),2.53(m,6H,-CH_2-),1.45(s,9H,Boc)

[0461] 使323mg(1.5mmol)(3-吡啶基二硫代)丙酸、330mg(1.6mmol)DCC溶解于CH_2Cl_2(10mL)中,在冰水浴中进行搅拌。向其中加入130mg(0.53mmol)化合物(1),进一步搅拌1小时。反应后,通过过滤去除析出物,通过旋转蒸发仪减压蒸馏去除溶剂。将残渣用硅胶层析(EA/Hx=45/55→100/0,EA/MeOH=99/1→80/20)纯化,得到化合物(2)。(产量:230mg,68%)

[0462] ^{1}H-NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ=8.44(d,2H,吡啶基),7.70-7.60(m,4H,吡啶基),7.18(br,2H,酰胺),7.12-7.07(m,2H,吡啶基),5.01(br,1H,尿素),3.34-3.29(m,4H,H_2N-CH_2-),3.14-3.07(m,6H,-CH_2-NH-Boc,-CH_2-),2.68(t,4H,-CH_2-),2.61-2.51(m,6H,-CH_2-),1.43(s,9H,Boc)

[0463] 使230mg(0.36mmol)化合物(2)溶解于CH_2Cl_2(5mL)中,向其中添加0.5mL的4N HCl的二噁烷溶液,在冰水浴中进行搅拌。搅拌一夜(0℃→室温)后,添加过量的乙醚,通过倾析分离沉淀物。将得到的固体用乙醚洗涤并真空干燥,得到目标物(化合物(3))。(产量:255mg,定量)

[0464] ^{1}H-NMR(300MHz,D_2O)δ=8.51(d,2H,吡啶基),8.14(t,2H,吡啶基),8.01(d,2H,吡啶基),7.56(m,2H,吡啶基),3.67-3.3.56(m,6H,HN-CH_2-),3.43(t,6H,-CH_2-N),3.09(t,4H,-CH_2-),2.74(t,4H,-CH_2-)

[0465] 10-6.功能性基团的引入(工序14)

[0466] 如下操作而将功能性分子通过二硫键(可逆连接基团)引入分子印迹凹部的结合基团。

[0467] 将固定有上述10-4中得到的分子印迹聚合物的颗粒MIP-NGs的基板浸渍于上述

10-5中得到的功能性分子(化合物(3))的900μg/mL PBS溶液中,在室温下反应2小时,由此将功能性分子的吡啶基二硫基和分子印迹聚合物的硫醇基转化为二硫键(可逆连接基团)。

[0468] 10-7.亲和体和荧光物质的引入

[0469] 在上述10-6中得到的基板中,如下操作引入抗Her2亲和体分子(提供与生物物质的相互作用基团的分子)和荧光物质(信号物质)。

[0470] 在40μL的20mM的DTT溶液(50mM PB,137mM NaCl(pH7.5))中加入10μL的Anti-Her2 Affibody(R)分子(抗Her2亲和体分子,Abcam株式会社)的1mg/mL溶液(10mM PB,137mM NaCl,0.05vol%Tween20(pH7.4);PBST),在25℃下反应2小时后,使用Amicon Ultra-0.5(MWCO:10kDa)进行3次超滤(4℃,14000×g,15分钟),用PBST进行纯化,由此得到提供抗Her2亲和体的分子。

[0471] 使抗Her2亲和体分子(提供与生物物质的相互作用基团的分子)的10μg/mL PBS溶液与上述10-6中得到的基板反应(室温下,2小时),以向吡啶基二硫基(用于结合与生物物质的相互作用基团的基团)中引入抗Her2亲和体基团(与生物物质的相互作用基团)。然后,通过使100μM的2-巯基乙醇溶液反应,对残留的吡啶基二硫基进行封端。接着,使基板与Atto647N-NHS溶液反应(室温下,2小时),以在氨基(信号物质结合基团)中引入Atto647N(信号基团)。由此,得到固定有具有以HER2为模板的分子印迹凹部,且在分子印迹凹部具有功能性基团的颗粒的传感用基板,所述功能性基团具有与HER2相互作用的抗HER2亲和体和信号物质ATTO647N。

[0472] 10-8.通过荧光测定分析检测对象

[0473] 使用上述10-7中得到的传感用基板,通过配备有SIC自动分液器的荧光显微镜进行外泌体捕获试验。

[0474] 10-8-1.实验步骤

[0475] 将SK-BR-3细胞表达的外泌体以0至1.0×10^{-13}M的浓度溶解于PBS(10mM磷酸盐,140mM NaCl,pH 7.4)中而制备外泌体溶液。将制备的外泌体溶液滴加到上述10-7中得到的用于分析检测对象的传感器中。

[0476] 对于荧光显微镜的测定条件,测定地点为基板上的三个点,过滤器为Cy5,物镜为5倍,曝光时间为0.1秒,光量为100%,光源为水银灯。

[0477] 10-8-2.结果

[0478] 计算相对荧光强度,以研究相对荧光强度与外泌体浓度的关系。结果示于图20。

[0479] 如图20所示,在上述10-7中得到的传感用基板中,可确认外泌体的消光程度随浓度依赖性地增加。即,证实了对SK-BR-3细胞表达的外泌体具有识别能力。另外,通过曲线拟合计算解离常数K_d,其结果是解离常数K_d为1.0×10^{-17}(M)。

[0480] 另外,除了使用抗HSA亲和体代替抗HER2亲和体以外,与上述同样地操作而得到另一个传感用基板。图21示出了在引入了抗HER2亲和体的传感用基板和引入了抗HSA亲和体的另一传感用基板中添加作为HER2过表达型乳腺癌细胞株SK-BR-3细胞表达的外泌体(5×10^{-17}M)时的相对荧光强度变化。

[0481] 如图21所示,利用引入了抗HER2亲和体的通过捕获HER2的外泌体传感用基板,可特异性检测SK-BR-3细胞表达的外泌体。

[0482] 符号说明

[0483] 1、1a...传感用基板

[0484] 10、10a...传感用纳米颗粒

[0485] 20...分子印迹聚合物

[0486] 21...分子印迹空间

[0487] R^1...相互作用基团

[0488] R^2...包含信号物质结合基团的连接基团

[0489] 22...功能性基团

[0490] F22...功能性单体

[0491] F23...丙烯酰胺

[0492] F24...生物相容性单体

[0493] 30...信号物质

[0494] 31...信号基团

[0495] 40...基板

[0496] 90...生物物质(传感对象)

[0497] 90'...生物物质(模板)

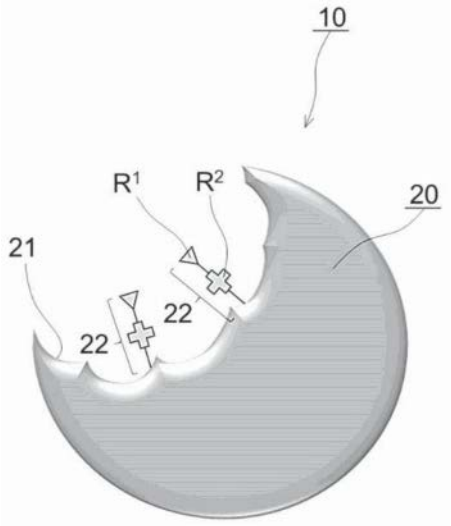


图1

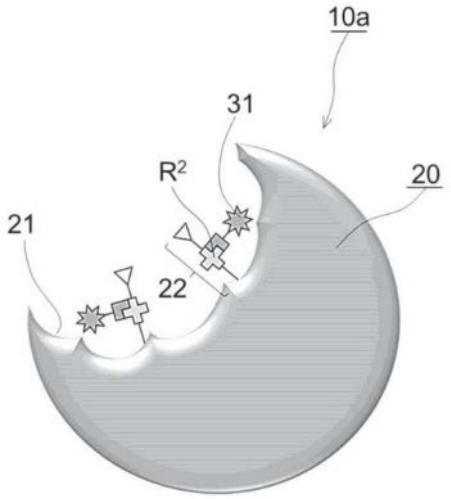


图2

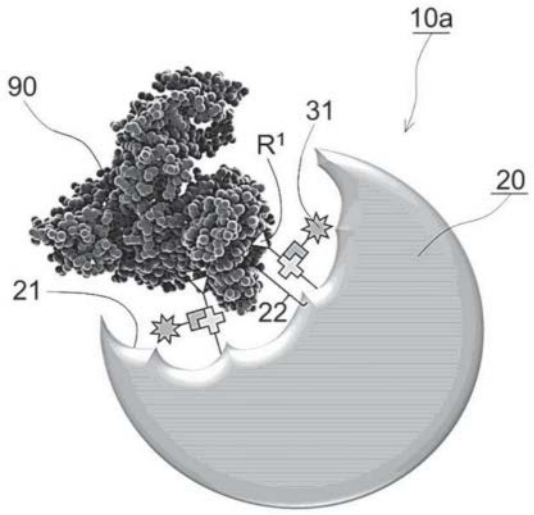


图3

<工序1>

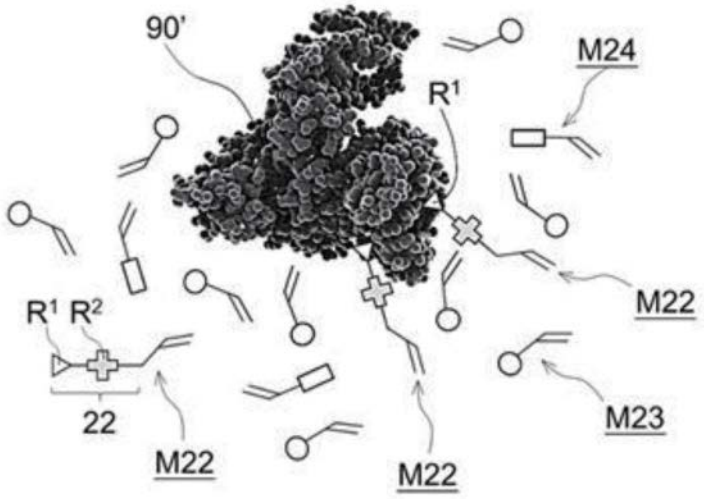


图4

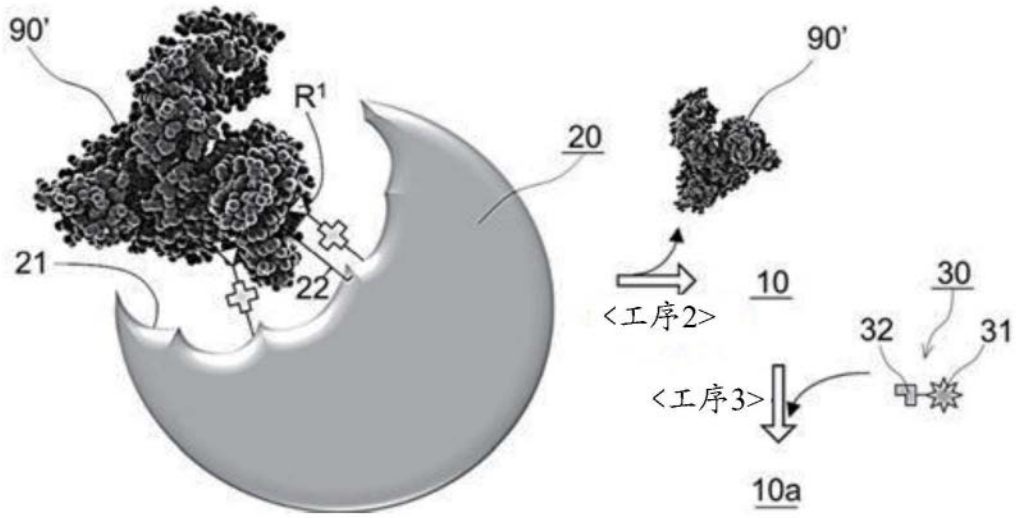

90'
R1
20
21
22
90'
10
<工序2>
30
32
31
<工序3>
10a

图5

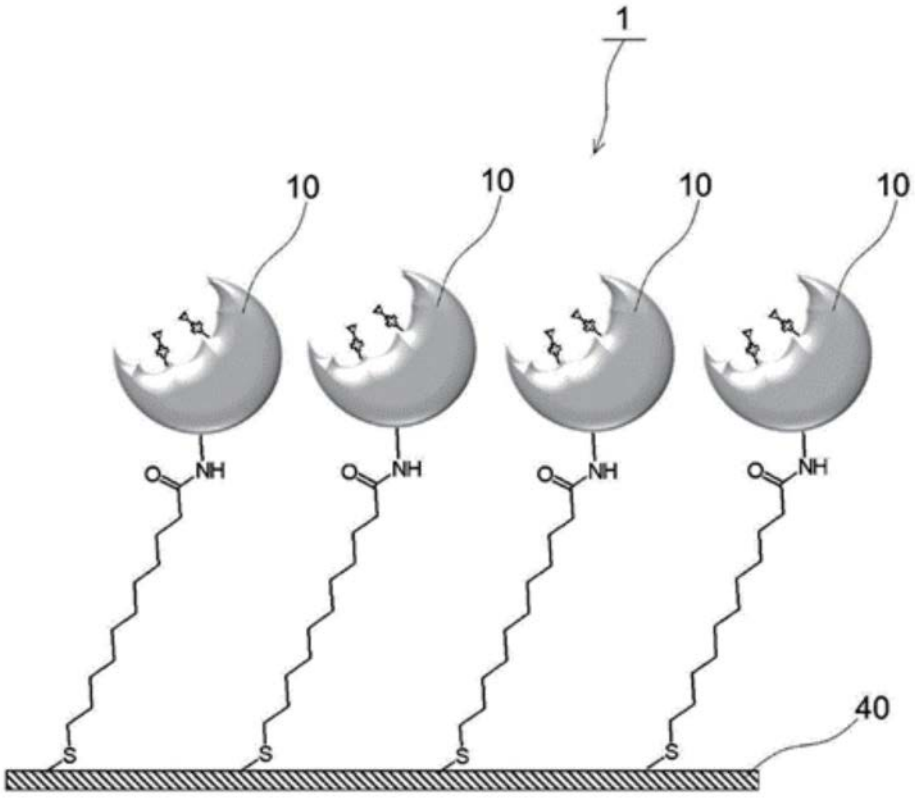

1
10
10
10
10
NH
NH
NH
NH
S
S
S
S
40

图6

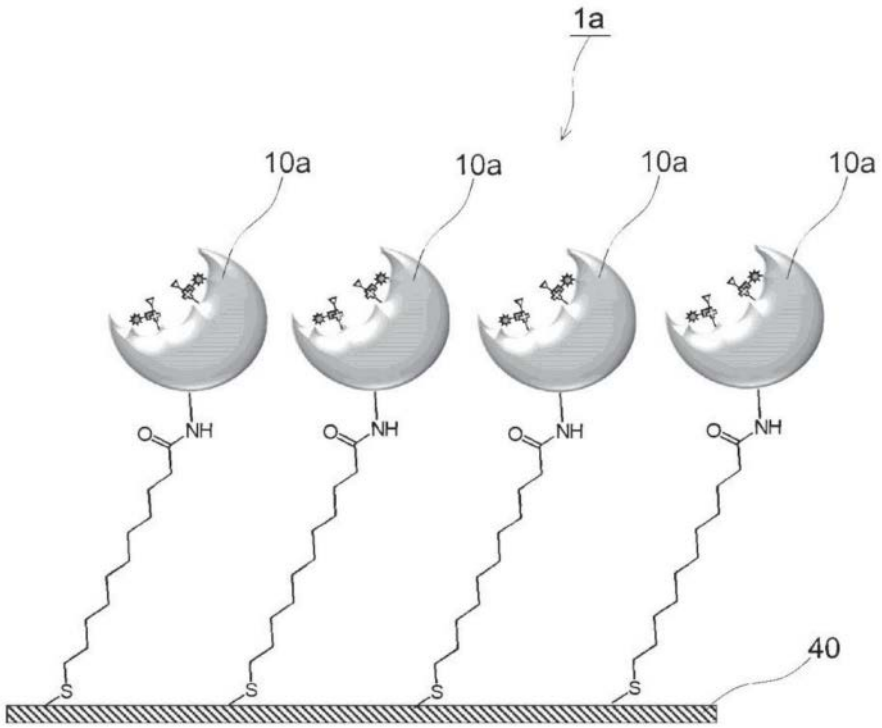

1a
10a
10a
10a
10a
NH
NH
NH
NH
S
S
S
S
40

图7

实施例2

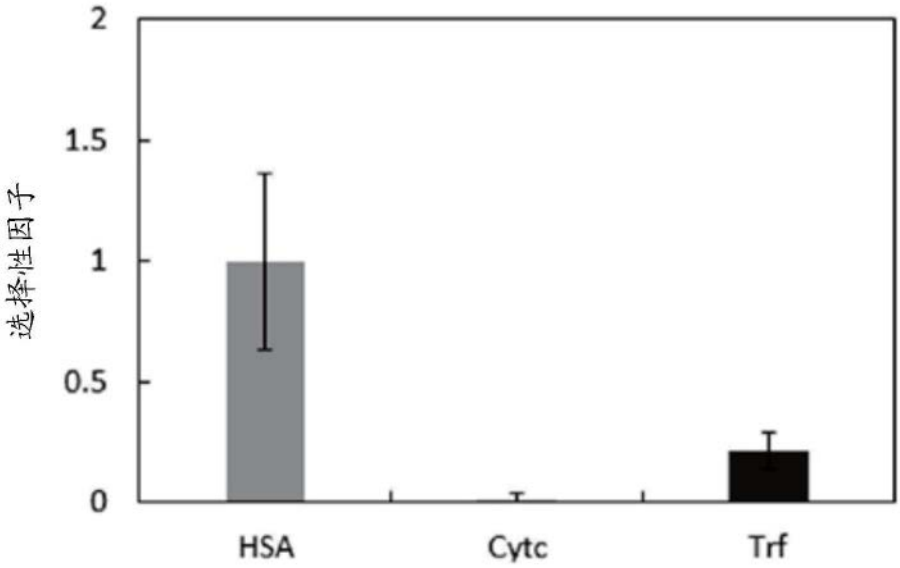

2
1.5
1
0.5
0
选择性因子
HSA
Cytc
Trf

图8

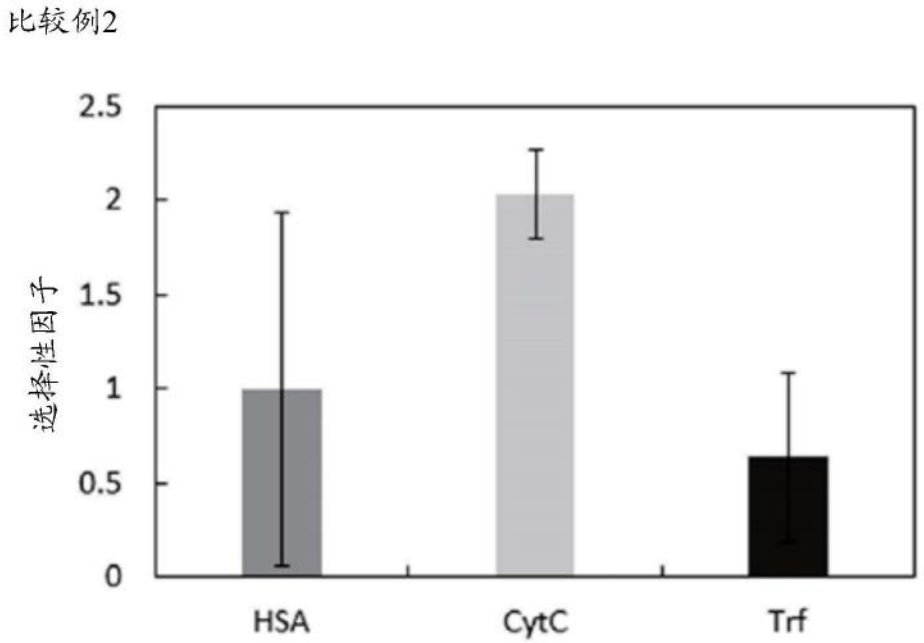

比较例2
选择性因子
2.5
2
1.5
1
0.5
0
HSA
CytC
Trf

图9

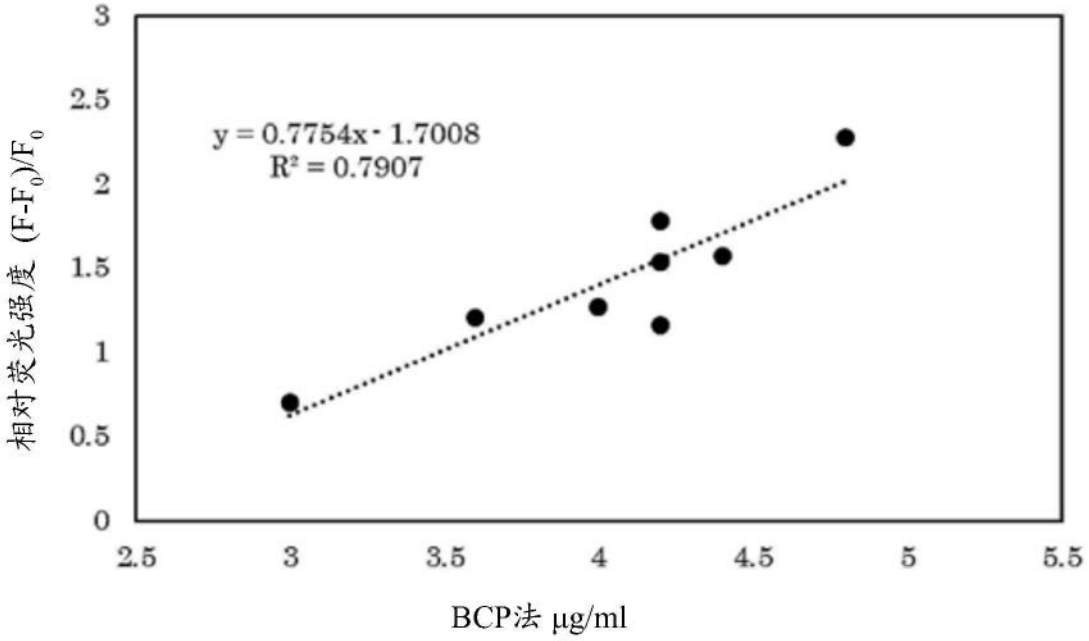

y = 0.7754x - 1.7008
R² = 0.7907
相对荧光强度 (F-F0)/F0
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2.5
3
3.5
4
4.5
5
5.5
BCP法 μg/ml

图10

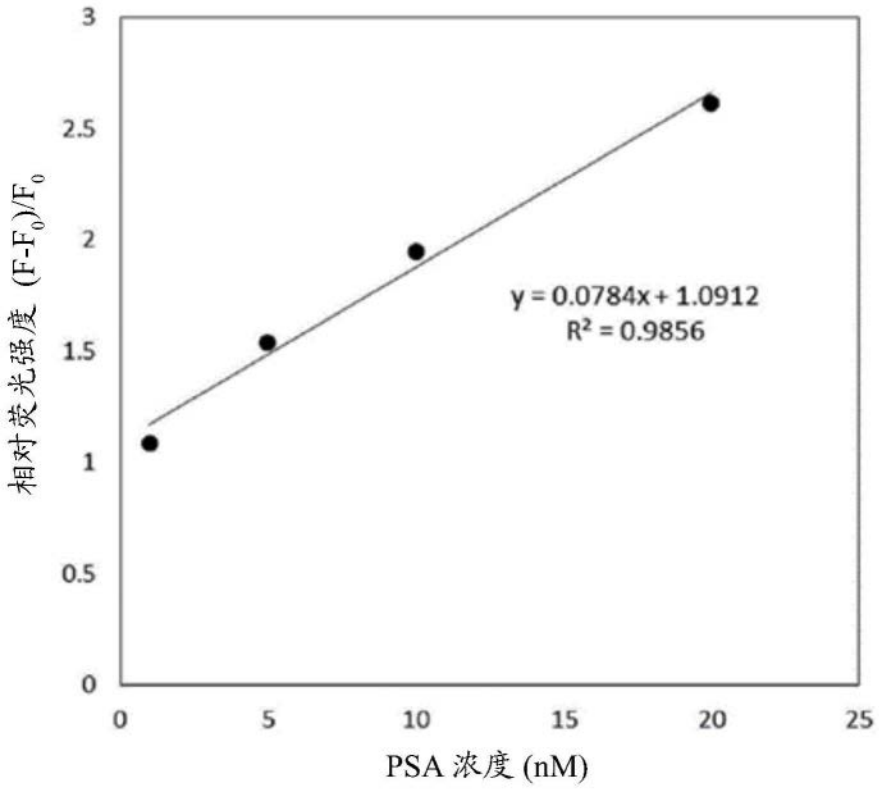

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
相对荧光强度 (F-F0)/F0
PSA 浓度 (nM)
y = 0.0784x + 1.0912
R² = 0.9856

图11

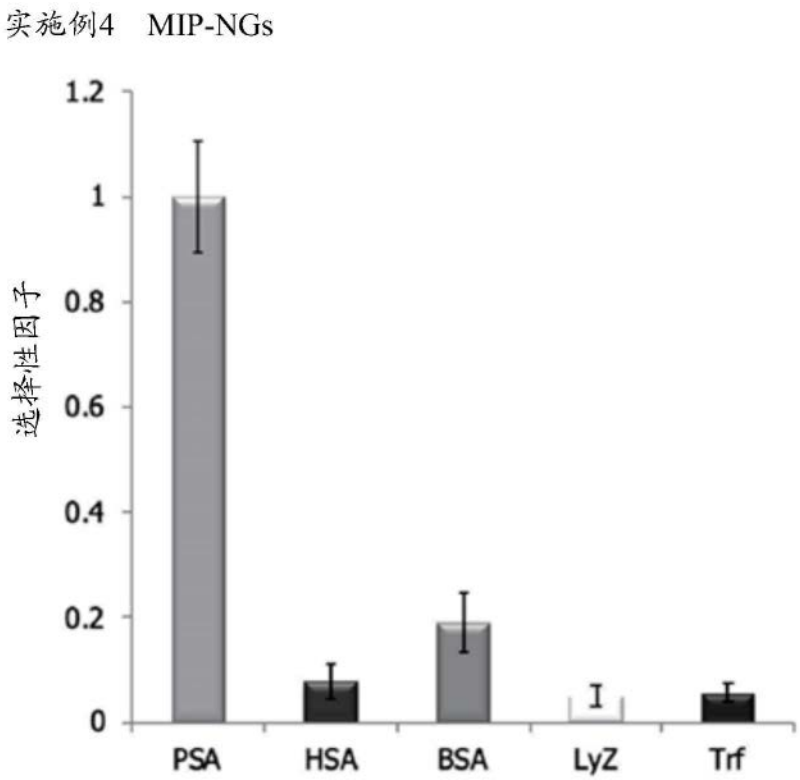

实施例4 MIP-NGs
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
选择性因子
PSA
HSA
BSA
LyZ
Trf

图12

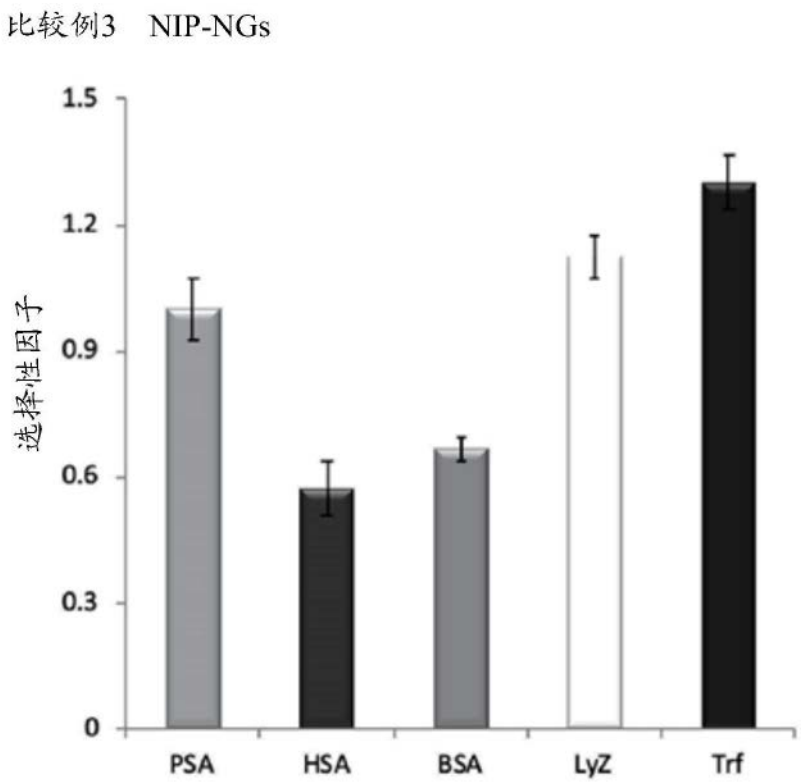


图13

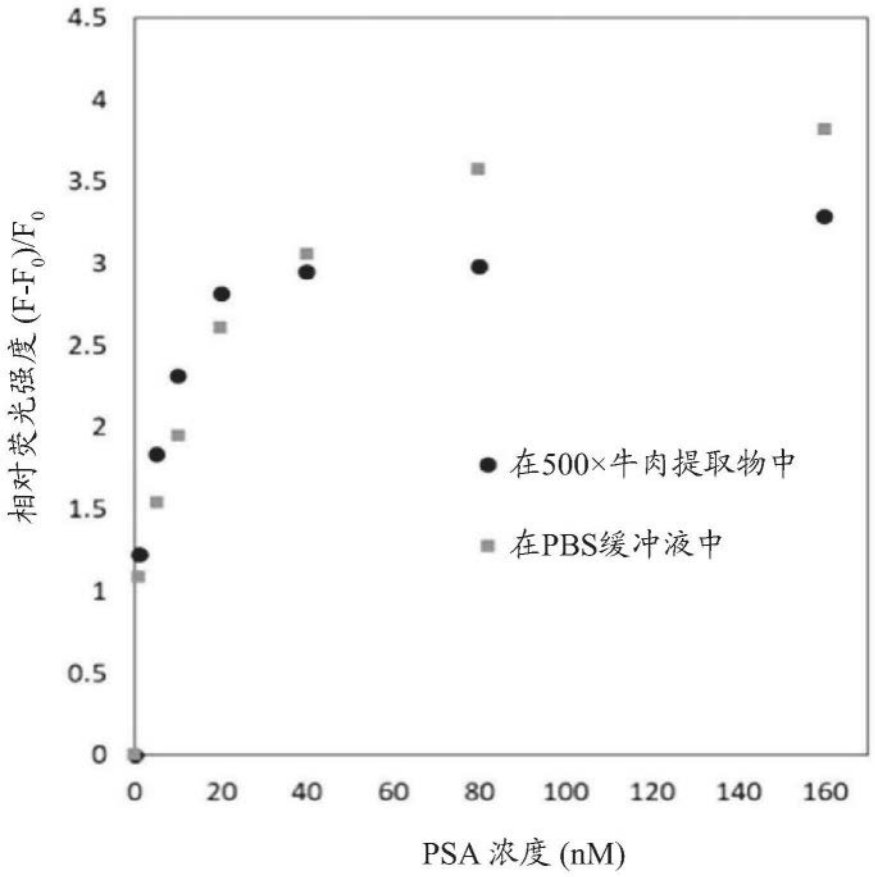

4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
相对荧光强度 (F-F0)/F0
PSA 浓度 (nM)
在500×牛肉提取物中
在PBS缓冲液中

图14

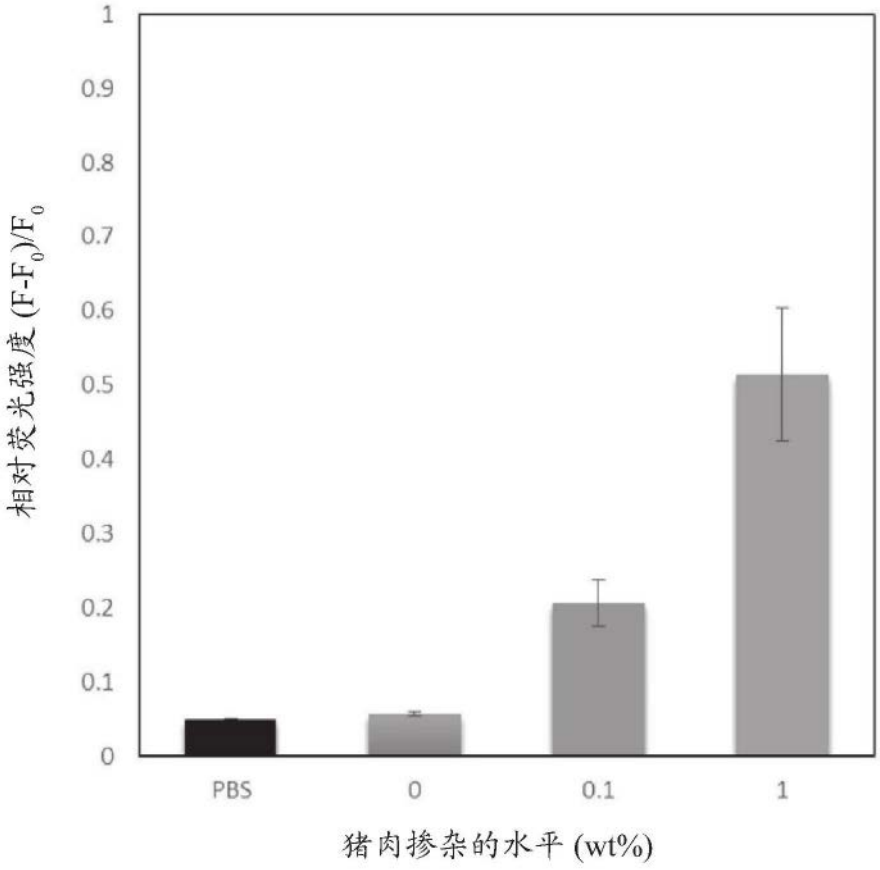

1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
相对荧光强度 (F-F0)/F0
PBS
0
0.1
1
猪肉掺杂的水平 (wt%)

图15

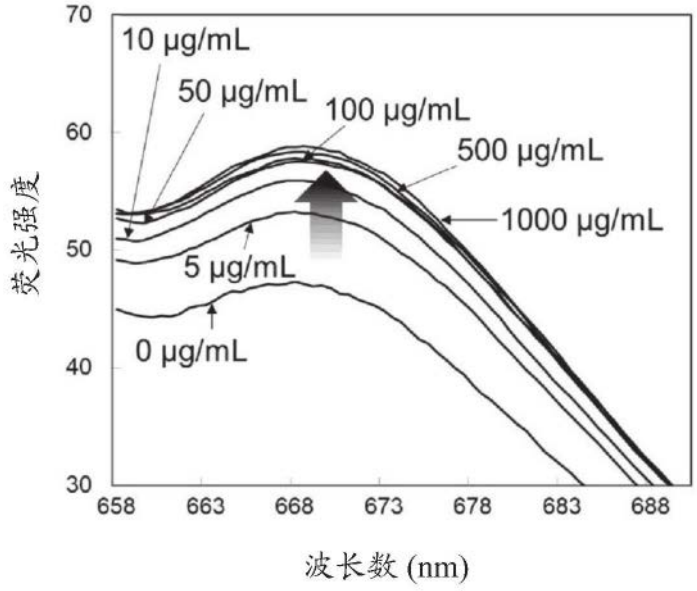

70
60
50
40
30
荧光强度
10 μg/mL
50 μg/mL
100 μg/mL
500 μg/mL
1000 μg/mL
5 μg/mL
0 μg/mL
658
663
668
673
678
683
688
波长数 (nm)

图16

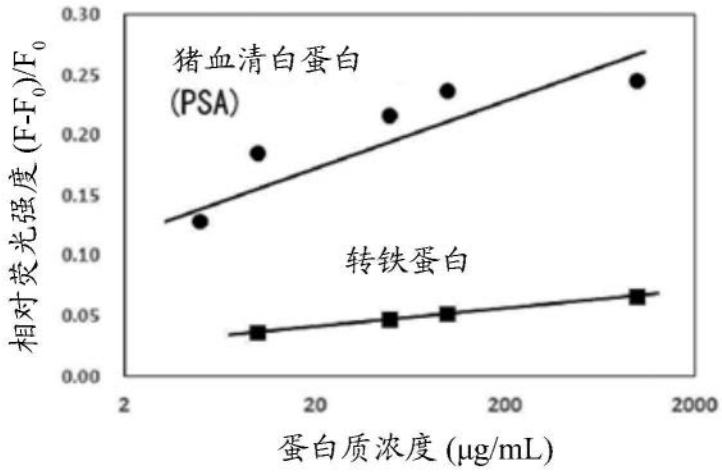

猪血清白蛋白
(PSA)
转铁蛋白
相对荧光强度 (F-F0)/F0
蛋白质浓度 (μg/mL)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
2
20
200
2000

图17

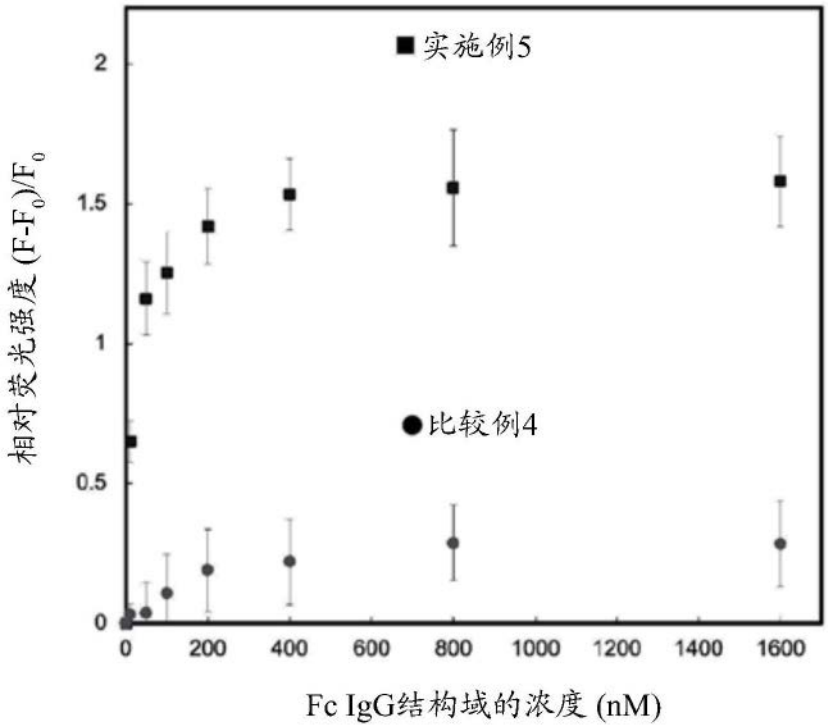

实施例5
比较例4
相对荧光强度 (F-F0)/F0
Fc IgG结构域的浓度 (nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600

图18

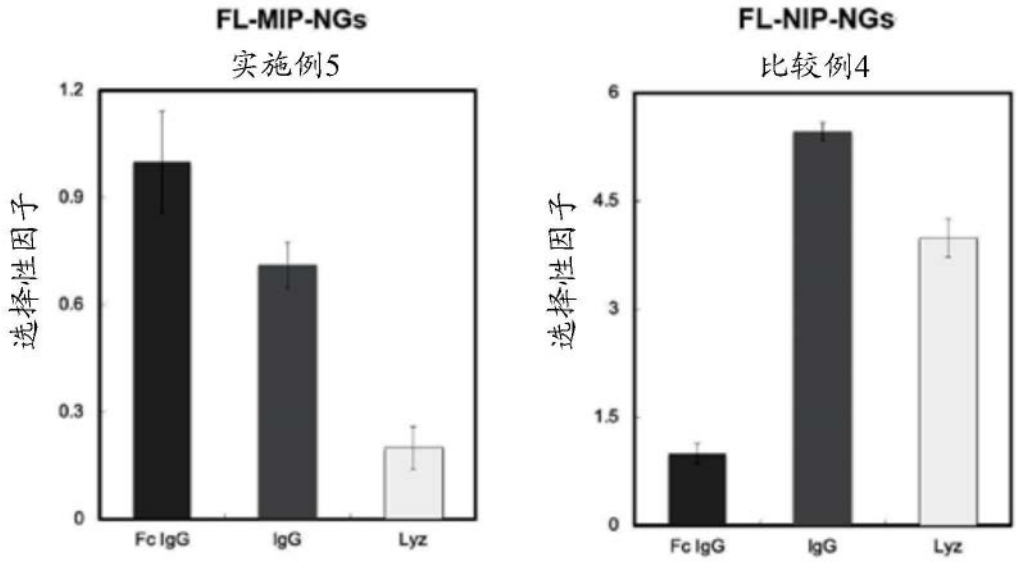

FL-MIP-NGs
实施例5
选择性因子
1.2
0.9
0.6
0.3
0
Fc IgG
IgG
Lyz
FL-NIP-NGs
比较例4
选择性因子
6
4.5
3
1.5
0
Fc IgG
IgG
Lyz

图19

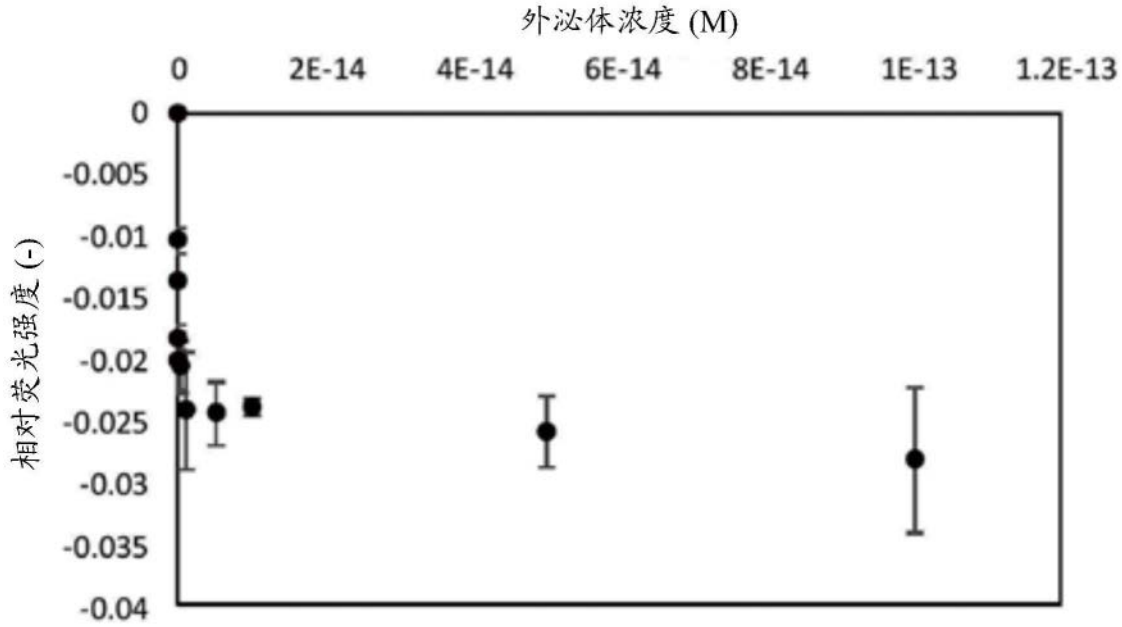

外泌体浓度 (M)
0
2E-14
4E-14
6E-14
8E-14
1E-13
1.2E-13
相对荧光强度 (-)
0
-0.005
-0.01
-0.015
-0.02
-0.025
-0.03
-0.035
-0.04

图20

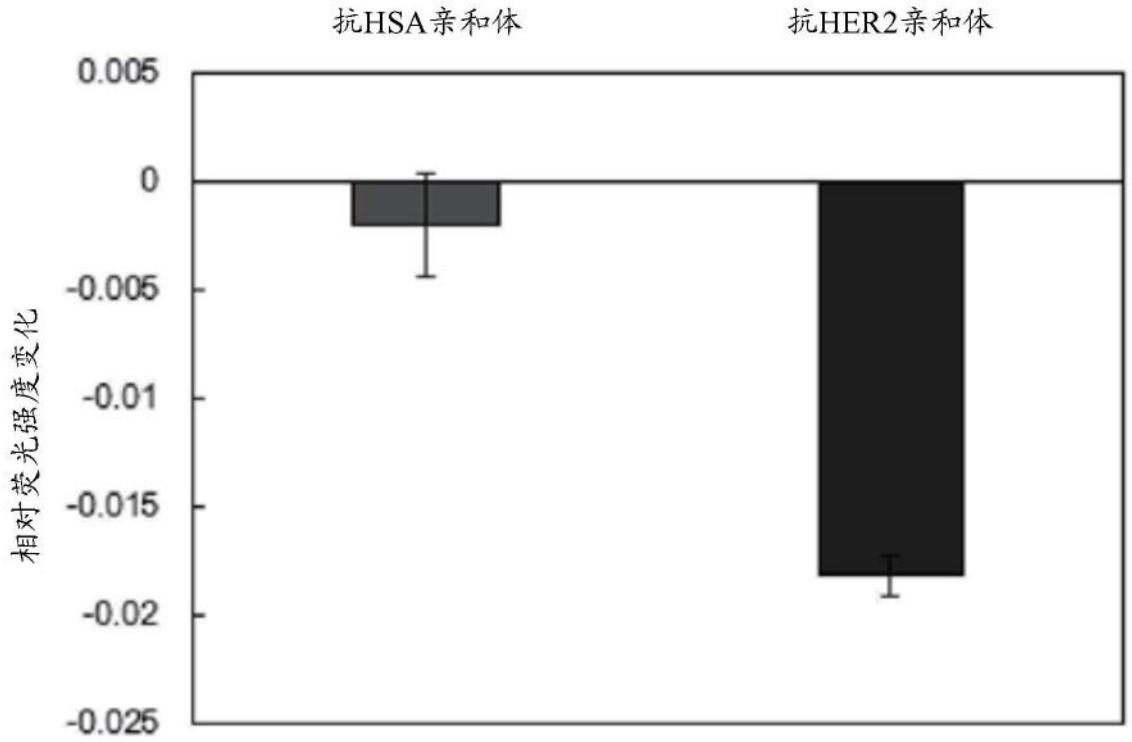


图21