



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117677839 A

(43) 申请公布日 2024.03.08

(21) 申请号 202280046798.6

(22) 申请日 2022.07.13

(30) 优先权数据

2021-118354 2021.07.18 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/027516 2022.07.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/002892 JA 2023.01.26

(71) 申请人 国立大学法人东京大学

地址 日本东京

申请人 株式会社普欧威盖特

(72) 发明人 坂田利弥 西谷象一 白鸟玲子

关水康伸 伊藤成史

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 鲁雯雯 金龙河

(51) Int.Cl.

G01N 27/02 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

权利要求书3页 说明书17页
序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

检测生物分子的方法和装置

(57) 摘要

本发明提供检测生物分子的方法,其具备如下步骤:提供电极(101)和配置在电极(101)的附近的、与对象生物分子特异性结合且具有电荷的适体(102);向配置有适体(102)的电极(101)导入具有与适体(102)的电荷相反的电荷的阳离子介体(113);使含有对象生物分子的溶液与适体(102)接触,使生物分子与适体(102)结合;以及测定由于阳离子介体(113)而在电极(101)中产生的电信号。

1. 一种检测生物分子的方法,其具备如下步骤:
提供电极和配置在所述电极的附近或固定于所述电极的、与对象生物分子特异性结合且具有电荷的适体;
向配置有所述适体的所述电极导入具有与所述适体的所述电荷相反的电荷的介质;
使含有所述对象生物分子的溶液与所述适体接触,使所述生物分子与所述适体结合;
测定由于所述介质而在所述电极中产生的电信号。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,还具备如下步骤:基于所述电信号确定所述溶液内的所述对象生物分子的量。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,测定由于所述介质而在所述电极中产生的电信号的步骤具备进行电化学阻抗谱法的步骤。
4. 根据权利要求3所述的方法,其具备如下步骤:对通过所述电化学阻抗谱法得到的、所述电极中的所述介质的氧化还原反应的电容分量进行评价。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,基于所述电极中的所述介质的氧化还原反应的所述电容分量的值,确定结合于所述适体的所述对象生物分子的量。
6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述对象生物分子为糖化蛋白。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述对象生物分子为糖化白蛋白。
8. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述对象生物分子为选自自由细胞、病毒和细胞外囊泡组成的组中的一种或两种以上。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述适体含有序列号1的碱基序列。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述介质为钌络合物。
11. 根据权利要求1或10所述的方法,其中,向配置有所述适体的所述电极导入所述介质的步骤在使所述生物分子与所述适体接触之前进行。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中,还具备如下步骤:
在向配置有所述适体的所述电极导入所述介质之后、且使所述生物分子与所述适体接触之前,实质上除去未与所述适体结合的阳离子介质。
13. 一种评价蛋白质的糖化度的方法,其具备如下步骤:
提供在其表面配置有与经糖化的对象蛋白特异性结合的适体的电极;
将含有糖化的所述对象蛋白和非糖化的所述对象蛋白的溶液导入到所述电极,使糖化对象蛋白与所述适体结合;
将具有与所述适体的所述电荷相反的电荷的介质导入到配置有所述适体的所述电极;
测定由于所述介质而在所述电极中产生的电信号;
基于测定的所述电信号确定所述溶液内的所述糖化对象蛋白的量;
确定所述溶液内的非糖化对象蛋白的量、或所述糖化和非糖化的对象蛋白的合计量;
以及
基于所述糖化对象蛋白的所述量和所述非糖化对象蛋白的量或所述糖化和非糖化的对象蛋白的合计量确定所述对象蛋白的糖化度。
14. 一种评价蛋白质的糖化度的方法,其具备如下步骤:
提供在其表面配置有与糖化对象蛋白特异性结合的适体的第一电极;
提供在其表面配置有识别对象蛋白的抗体的第二电极;

将含有所述糖化对象蛋白和所述对象蛋白的溶液导入到所述第一电极和所述第二电极,使所述糖化对象蛋白与所述适体结合,使所述对象蛋白与所述抗体结合;

将具有与所述适体的所述电荷相反的电荷的介体导入到配置有所述适体的所述第一电极和所述第二电极;

测定由于所述介体而在所述第一电极中产生的第一电信号和所述第二电极中产生的第二电信号;以及

基于测定的所述第一电信号和所述第二电信号确定所述溶液内的所述糖化对象蛋白相对于所述对象蛋白的比率。

15. 一种用于检测生物分子的装置,其具备:

电极;以及

配置在所述电极的表面且与对象生物分子特异性结合的适体;

所述装置以下述方式构成:

使含有所述对象生物分子的溶液与所述适体接触,

向配置有所述适体的所述电极导入阳离子介体;

测定由于所述介体而在所述电极中产生的电信号。

16. 根据权利要求15所述的装置,其中,

还具备配置在所述电极的表面的保护膜,所述保护膜具有允许所述介体朝向所述电极通过且抑制夹杂物朝向所述电极通过的能力。

17. 根据权利要求16所述的装置,其中,所述保护膜具有重氮铪多层膜。

18. 根据权利要求17所述的装置,其中,所述适体锚固于所述重氮铪多层膜。

19. 根据权利要求16所述的装置,其中,所述保护膜具备具有耐污染性能的第二保护膜。

20. 根据权利要求19所述的装置,其中,所述保护膜具备形成于所述重氮铪多层膜的表面的、具有耐污染性能的第二保护膜。

21. 根据权利要求19或20所述的装置,其中,所述第二保护膜实质上由聚乙二醇(PEG)或牛血清白蛋白(BSA)构成。

22. 根据权利要求19或20所述的装置,其中,所述保护膜具有识别所述对象生物分子、在其内部出现了所述适体的一端的分子模板(MIP)。

23. 根据权利要求22所述的装置,其中,所述分子模板在其内部的表面具有识别所述对象生物分子的官能团。

24. 根据权利要求15所述的装置,其中,还具备与所述电极连接的电化学阻抗谱法的测定器件。

25. 一种用于测定糖化白蛋白的器件,其具备:

电极;以及

配置在所述电极的表面且具有序列号1的序列的适体。

26. 一种求算GA值的装置,其具备:

权利要求25所述的用于测定糖化白蛋白的器件;以及

用于测定白蛋白的器件。

27. 根据权利要求26所述的装置,其中,所述用于测定白蛋白的器件具备电极和配置在所述电极的表面的抗白蛋白抗体。

检测生物分子的方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及检测生物分子的方法和装置。

背景技术

[0002] 在生物传感中,需要更准确和/或更简便地获知体液等溶液中存在的生物分子的量或有无的技术。这些技术对于即时检测(point-of-care)也有效。这些技术也被期望用于微量被检体的检查。

发明内容

[0003] 在此,认识到例如非限定性地从体液中存在的各种物质(例如蛋白质等)中更准确地识别、测定应测定的生物分子的必要性。

[0004] 本发明的若干实施方式中,提供检测生物分子的方法。若干实施方式中,该方法具备如下步骤:提供电极和配置在上述电极的附近且与对象生物分子特异性结合的适体。若干实施方式中,该方法具备如下步骤:将阳离子介体向配置有上述适体的上述电极导入。若干实施方式中,该方法具备如下步骤:使含有上述对象生物分子的溶液与上述适体接触,使上述生物分子与上述适体结合。若干实施方式中,该方法具备如下步骤:测定由于上述阳离子介体而在上述电极中产生的电信号。

[0005] 根据上述实施方式,例如,可以准确地确定体液中的生物分子的量。

[0006] 根据仅示出、说明本发明的例示性实施方式的以下的详细说明,本领域技术人员容易明确本发明的进一步方式和优点。如所理解的那样,本发明可以是其它不同的实施方式,其一些详细情况可以在不脱离本发明的情况下在各种显而易见的方面加以修正。因此,附图和说明本质上应被视为例示,而不应被视为限定。

附图说明

[0007] 图1A示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0008] 图1B示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0009] 图1C示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0010] 图2A示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0011] 图2B示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0012] 图3示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0013] 图4A示出在一个实施方式的测定中得到的、基于电化学阻抗谱法的奈奎斯特图。

[0014] 图4B示出一个实施方式的测定中得到的、基于电化学阻抗谱法的奈奎斯特图。

[0015] 图5示出由图4A和图4B所示的测定结果得到的、表示检测输出与浓度的关系的图。

[0016] 图6示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0017] 图7示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。

[0018] 图8A示出一个实施方式的测定中得到的、基于电化学阻抗谱法的奈奎斯特图。

- [0019] 图8B示出一个实施方式的测定中得到的、基于电化学阻抗谱法的奈奎斯特图。
- [0020] 图8C示出一个实施方式的、基于电化学阻抗谱法的奈奎斯特图。
- [0021] 图9示出由一个实施方式的测定结果得到的、表示检测输出与浓度的关系的图。
- [0022] 图10A示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。
- [0023] 图10B示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。
- [0024] 图11A示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。
- [0025] 图11B示意性示出一个实施方式的生物分子检测器件的剖视图。
- [0026] 图12A示出一个实施方式的测定中得到的、基于电化学阻抗谱法的奈奎斯特图。
- [0027] 图12B示出一个实施方式的测定中得到的、基于电化学阻抗谱法的奈奎斯特图。
- [0028] 图13示出由一个实施方式的测定结果得到的、表示检测输出与浓度的关系的图。
- [0029] 图14示出一个实施方式的、生物分子的测定方法的流程图。
- [0030] 图15示出一个实施方式的、生物分子的测定方法的流程图。

具体实施方式

[0031] 本说明书中使用的“生物分子”这一术语通常是指生物学上的分子、在生物体内存在的或发挥功能的分子。生物分子例如非限定性地包括蛋白质、低聚核苷酸、核酸(DNA、RNA)、氨基酸、肽、脂质、细胞、囊泡、糖、碳水化合物、抗体、它们经修饰或改造而形成的物质。

[0032] 作为对象生物分子的蛋白质例如非限定性地包括白蛋白、血红蛋白。若干方式中,对象生物分子可以为葡萄糖。对象生物分子此外例如非限定性地包括多巴胺等神经递质、代谢物质、糖尿病标志物、癌标志物、组胺等变态反应相关物质、淀粉样蛋白 β 等阿尔茨海默病相关物质等。

[0033] 本发明的生物分子例如非限定性地包括来自细菌或病毒的核酸、蛋白质等生物分子。病毒例如非限定性地包括流感病毒、冠状病毒、诺如病毒、埃博拉病毒等。若干实施方式中,生物分子包括细胞外囊泡。细胞外囊泡(EV)可以为外泌体。

[0034] 若干实施方式中,对象生物分子包括糖化生物分子。若干方式中,对象生物分子可以为糖化蛋白。若干方式中,对象生物分子可以为糖化白蛋白。

[0035] 对象生物分子例如非限定性地包括:糖化血红蛋白(HbA1c);癌细胞表面上经常表达的含有唾液酸的糖化蛋白和相关糖肽;以及包括N ϵ -羧基甲基赖氨酸(CML)、N ϵ -羧基乙基赖氨酸(CEL)、精氨嘧啶(Argpyrimidine)、戊糖素、吡咯素、交联素、GA-吡啶、N ω -羧基甲基精氨酸(CMA)、糠酰呋喃基咪唑、グルコspanの晚期糖基化终末产物(AGE)等。

[0036] 若干实施方式中,对象生物分子可以具备两种以上对象生物分子。

[0037] 生物分子可以自然生成,也可以人工生成。

[0038] 若干实施方式中,对象生物分子包含在液体(溶液)中来提供。液体可以为由对象者分泌的体液,也可以为体液以外的液体。体液以外的液体可以为附着于对象者的液体,也可以为未附着于对象者的液体。未附着于对象者的液体可以为收容于对象者的液体。

[0039] 提供的液体可以含有对象生物分子,可以可能含有对象生物分子,可以为对象生物分子的测定中使用的基准液。以下,包括这些情况在内,有时称为含有对象生物分子的液体(或溶液)。

[0040] 含有对象生物分子的液体可以为溶液。液体可以为体液,可以为来自体液的溶液,可以为体液的稀释液。液体可以为不是体液(非体液来源)的溶液,可以为体液或体液来源的溶液与非体液来源的溶液的混合液。溶液可以为样品测定中使用的溶液,可以为用于校正的测定中使用的溶液。例如,溶液可以为标准液、校正液。成为测定对象的试样可以为被检体。

[0041] 体液可以为淋巴液,可以为组织间液、细胞间液、间质液等组织液,可以为体腔液、浆膜腔液、胸水、腹水、心包液、脑脊液(髓液)、关节液(滑液)、眼房水(房水)。体液可以为唾液、胃液、胆汁、胰液、肠液等消化液,可以为汗、泪液、鼻涕、尿、精液、阴道液、羊水、乳汁。体液可以为动物的体液,可以为人的体液。“体液”可以为溶液。溶液可以包括含有测定对象物质的磷酸缓冲生理盐水(PBS)、N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸缓冲液(Tris)、羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES)等生理缓冲液。溶液只要含有测定对象物质则没有特别限定。

[0042] 若干实施方式中,体液可以为血液。若干实施方式中,可以采集血液。例如,血液可以与穿刺所致的出血同时采集。例如,血液可以插入针并进行抽吸。若干实施方式中,穿刺器具(例如针、注射针等。以下同样)可以配置在毛细管的前端。若干实施方式中,毛细管可以形成穿刺器具。

[0043] 若干实施方式中,对象者可以包括人,可以为人。若干实施方式中,对象者可以包括人以外的动物,可以为非人以外的动物。人以外的动物可以包括哺乳类动物,可以为哺乳类动物。人以外的动物例如非限定性地可以为役用动物、家畜动物、观赏动物、野生动物。

[0044] 本说明书中使用的“电极”这一术语为广义术语,本领域技术人员应赋予其通常的惯用含义(其不应被限定于特别的或特殊的含义)。若干实施方式中,电极可以用于电化学测定中。电极可以由导电性材料形成。电极可以由金属形成。电极例如非限定性地可以含有金(Au)、铂(Pt)、钯(Pd)等金属材料而形成。电极可以由非金属材料形成。例如,电极非限定性地可以由碳(C)形成。电极可以由石墨烯、碳纳米管等形成。

[0045] 电极可以与计测器、计测器件或计测元件连接,或者可以以进行连接的方式构成。

[0046] 若干实施方式中,电极可以与阻抗测定器连接。若干实施方式中,可以使用电化学阻抗谱法(EIS)对电极中的电信号进行检测或分析。由此,可以生成柯尔-柯尔图或奈奎斯特图。可以对测定系统的电容分量进行确定或分析。若干实施方式中,可以通过使用循环伏安计(CV)对电极中的电信号进行检测或分析。

[0047] 若干实施方式中,可以将适体附近的电极作为工作电极(WE)。除此以外,还可以配置对电极(CE)、以及参比电极(RE)。

[0048] 若干实施方式中,电极可以与电流计、电流表、安培计等连接。可以通过安培滴定法对电极中的电信号进行测定或分析。

[0049] 若干实施方式中,电极可以与电压计、电位计、晶体管(例如场效应晶体管)等连接。可以通过电位分析法对电极中的电信号进行测定或分析。

[0050] 若干实施方式中,器件或装置可以具备两个以上电极。若干实施方式中,两个以上电极可以具有相同适体。若干实施方式中,两个以上电极中的至少若干个或全部可以具有彼此不同的适体。由此,例如可以在一个器件上对不同的生物分子进行检测或测定。若干实施方式中,两个以上电极中的至少若干个或全部可以具有密度彼此不同的适体。由此,例如可以在不同的浓度范围内分别进行适当的测定。若干实施方式中,器件或装置可以具备以

阵列状排列的两个以上电极。由此,例如可以进行传感器的集成化。或者,例如可以测定或观察与所导入的生物分子或其适体等的反应的二维分布或空间分布、或者其时间变化。

[0051] 若干实施方式中,器件或装置可以具备两个以上电极、并且其一部分具有使用适体以外的其它传感结构。若干实施方式中,器件或装置可以具备两个以上电极、并且其一部分具有适体而另一部分或全部具有其它传感结构。例如两个以上电极的一部分可以具有识别与适体的对象生物分子不同的生物分子的传感结构。例如,这些电极可以具有识别特定的生物分子的抗体。

[0052] 本说明书中使用的“适体”这一术语可与“核酸配体”这一术语互换使用,是指与特定的靶分子结合的DNA、RNA、低聚核苷酸或肽分子。适体可以为单链。适体通常比较廉价,具有较长寿命。

[0053] 若干实施方式中,适体可以配置在电极的附近。若干实施方式中,适体可以相对于电极而固定。适体可以直接固定在电极上,也可以借助其它物质间接地相对于电极而固定。若干实施方式中,适体可以不相对于电极进行固定。若干实施方式中,电极的表面可以形成锚固层,且将适体固定在该锚固层上,或者,可以以锚固层为支架来合成适体。若干实施方式中,锚固层可以作为本发明所记载的保护膜来形成。即,可以将锚固层和保护膜定义为同一构件。若干实施方式中,可以在配置保护膜的基础上还配置锚固层,在从电极观察时,可以在保护膜的上侧(与电极相反的一侧)或下侧(电极与保护膜之间)形成锚固层。

[0054] 若干实施方式中,适体可以为与蛋白质特异性结合的适体。适体可以为单链。若干实施方式中,适体可以为与糖化白蛋白特异性结合的适体。构成适体的碱基序列可以为以下序列(表1)。

[0055] 5'-TGCGTTGTAGTACTCGTGGCCG-3' (序列号1)

[0056] 若干实施方式中,适体进行特异性结合的生物分子可以为细胞表面上表达的蛋白质,可以为细胞表面的膜蛋白。若干实施方式中,适体可以为与白血病癌细胞表面的膜蛋白特异性结合的适体,构成适体的碱基序列可以为以下序列(表1)。

[0057] 5'-AAAAAAAAAATCTAACTGCTGCGCCCGGGAAAATAC TGTACGGTTAGA-3' (序列号2)

[0058] 若干实施方式中,可以为与病毒特异性结合的适体。病毒例如非限定性地可以为冠状病毒。冠状病毒例如非限定性地可以为SARS病毒。冠状病毒可以为SARS-C冠状病毒OVID-19病毒。构成适体的碱基序列可以为以下序列(表1)。

[0059] 5'-GCAATGGTACGGTACTTCCGGATGCGGAAACTGGCTAATT GGTGAGGCTGGGGCGGT-3' (序列号3)

[0060] 5'-CAGCACCGACCTTGTGCTTTGGGAGTGTGGTCCAAGGGC GTTAATGGACA-3' (序列号4)

[0061] 5'-ATCCAGAGTGACGCAGCATTTCATCGGGTCCAAAAGGGGC TGCTCGGGATTGCGGATATGGACACGT-3' (序列号5)

[0062] 适体不限于选自上述序列号1~5中的1种或两种以上的碱基序列,可以含有其它碱基序列,或者可以为识别其它生物分子的适体。

[0063] [表1]

[0064] 表1

序列号	序列 (5'-3')
1	TGCGGTTGTAGTACTCGTGGCCG (23 mer)
2	AAAAAAAAAAATCTAACTGCTGCGCCGCCGGGA AAATACTGTACGGTTAGA (51 mer)
[0065] 3	GCAATGGTACGGTACTTCCGGATGCGGAAACTG GCTAATTGGTGAGGCTGGGGCGGT (57 mer)
4	CAGCACCGACCTTGTGCTTTGGGAGTGCTGGTC CAAGGGCGTTAATGGACA (51 mer)
5	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTTCATCGGGTCCAA AAGGGGCTGCTCGGGATTGCGGATATGGACACG T (67 mer)

[0066] 本说明书中使用的“介体”可以具有与适体相反的电荷。本说明书中使用的“阳离子介体”是指具有正电荷或带正电的、可以用于电化学测定的介体。例如，构成适体的核酸通常具有负电荷。阳离子介体可以为具有阳离子性配体的络合物。阳离子介体例如可以为钌络合物(也称为“络离子”)。若干实施方式中，钌络合物可以为钌(II)络合物。钌络合物例如可以为 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ 。阳离子介体例如可以为铱络合物。若干实施方式中，铱络合物可以为铱(II)络合物。若干实施方式中，铱络合物可以为钴(II)络合物($[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ 、 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 等)。

[0067] 介体可以含有在溶液中来提供。介体例如可以溶解或含有在水中。介体的溶液例如非限定性地可以为磷酸缓冲生理盐水(PBS)等缓冲液。

[0068] 可以在电极的表面配置有保护膜或保护层(本说明书中,这些术语以相同的含义或可互换地使用)。保护膜可以具有如下能力:实质上避免会影响对象物的测定的物质(夹杂物等)到达、接触、接近、吸附于电极而在化学上或电学上造成实质性影响,或者减少其影响。

[0069] 保护膜可以由有机物质、无机物质或它们的混合物质形成。若干实施方式中,保护膜可以实质上由高分子形成。

[0070] 保护膜可以具有如下能力:使介体以能够充分进行利用该电极的测定的程度透过。保护膜可以具有不允许或限制夹杂物透过的能力。

[0071] 若干实施方式中,保护膜可以为芳基系的单层膜或多层膜。芳基系膜可以使用电化学接枝处理而形成。可以使用重氮铕分子。关于重氮铕分子,电子重氮铕分子例如可以为4-硝基苯重氮铕盐。芳基系膜可以使用循环伏安法(CV)形成。

[0072] 芳基系膜可以使用自由基清除剂(也称为自由基消除剂、自由基除去剂)。自由基清除剂例如非限定性地可以为2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH)。可以使用自由基清除剂形成单层膜。由重氮铕分子通过电化学方式生成的重氮铕自由基在自由基清除剂存在下与电极(例如Au)的表面结合。由此,可以形成比较致密的膜。接枝的单分子层的表面覆盖率越高,则越抑制分子与电极表面的氧化还原反应。例如,可以以使介体透过的程度的密度形成单分子层。

[0073] 对于以单层膜形式接枝的重氮铕层,例如通过循环伏安法(CV)反复进行电化学聚

合,由此可以形成多层膜。若无自由基清除剂等,则通过电化学方式生成的重氮铷自由基不与电极表面反应,而是与所接枝的重氮铷进行反应。因此,能够在不改变最初的重氮铷层在电极表面上的密度的情况下通过重氮铷的接枝而形成多层膜。因此,该多层膜具有一定程度的间隙。也可以对多层膜的厚度加以控制。这样,能够抑制夹杂物接近电极表面、且使较低分子量的生物分子通过多层膜的间隙而到达电极表面。

[0074] <实施方式1>

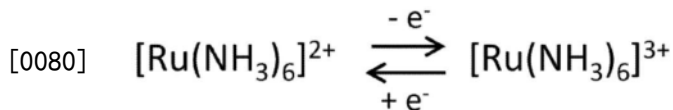
[0075] 参照图1来说明一个实施方式的电化学传感器和使用其的生物分子的测定方法。图1A和图1B分别示意性地示出体系中不存在对象生物分子时和体系中存在对象生物分子时的电化学传感器100的基本构成。图1至图1C中,例示性地,使用了糖化白蛋白(GA)作为对象生物分子,使用了与糖化白蛋白特异性结合的核酸配体、即由序列号1的碱基序列构成的适体作为适体。作为夹杂物,使用了人血清白蛋白(HSA)或免疫球蛋白(例如IgG)。但是,这些为一例,不应限定于此来解释本发明。

[0076] 图1A所示的传感器100具备电极101和配置在电极101上且具有负电荷的适体102。传感器100之类的传感器例如可以通过以下的方法来制造。首先,将芳基重氮铷盐通过电化学方式固定或电沉积在电极的表面,得到多层膜或单层膜。然后,使3-马来酰亚胺基苯甲酸-N-琥珀酰亚胺酯(MBS)(在两末端分别具有羧基和马来酰亚胺基)与多层膜或单层膜中的官能团(例如氨基)反应。由此,羧基与多层膜或单层膜中的氨基进行反应。因此,马来酰亚胺末端成为自由端。使硫醇化DNA(适体)分别对其进行反应。由此,适体分子被固定在电极表面。

[0077] 在不存在对象物质的环境中导入阳离子介体110时,一部分阳离子介体111被吸引到电学上具有适体102的相反电荷的部位。其它阳离子介体112无法感知变为电中性的适体102而到达电极101。该到达的阳离子介体112在电极101中作为电信号而被检测到。

[0078] 图1A至图1C中,作为阳离子介体110、111、112,也可以使用钌络合物 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ 。

[0079] 钌络合物在电极101中发生以下反应式所示的氧化还原反应。



[0081] 若干实施方式中,也可以使用钌络合物以外的阳离子作为介体。例如,可以使用铱络合物。

[0082] 另一方面,图1B示出存在测定对象的生物分子时的构成。传感器100与图1A相同。作为对象生物分子的糖化白蛋白120被导入体系时,与适体102结合。糖化白蛋白120在赖氨酸121和精氨酸122处具有正电荷。适体102对这些配位进行电结合。

[0083] 结合有糖化白蛋白120的适体102的周边环境为电中性。因此,被导入的阳离子介体113不进行适体102的反应而是到达电极101。

[0084] 或者,也可以先导入阳离子介体而形成图1A所示的状况,此后可以导入糖化白蛋白120。糖化白蛋白120与适体102结合。其结果是,与适体102发生了电结合的阳离子介体111从适体102释放并到达电极101,然后可被检测。

[0085] 这样,根据对象生物分子(糖化白蛋白120)的无(图1A)或有(图1B),在电极101可检测到的阳离子介体的数量会发生变化。如果换成该体系的电学等效电路的表述,则图1A

的状况下电阻 (R) 比较大、电容 (C) 比较小,图1B的状况下电阻 (R) 比较小、电容 (C) 比较大。

[0086] 根据某种说法,认为阴离子不能赋予与阳离子介体同样的效果。生物传感中,作为阴离子介体,频繁使用例如 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 。认为阴离子通常与带负电的适体相排斥。但是,本发明不应限定于这些机制来解释,也可以用其它学说或机制来说明或解释。

[0087] 若干实施方式中,可以在电极101上配置同一种类的两个以上分子的适体102。对象生物分子(糖化白蛋白120)由于溶液的流动、扩散等而随机到达适体102的附近。因此,根据溶液中的浓度,对象生物分子与适体102结合的概率依赖于溶液中的浓度。与对象生物分子120反应的适体102相对于配置在电极101上的适体102的总量的比率依赖于被导入到适体102附近的溶液中的对象生物分子120的浓度。因此,电极101所检测的电信号依赖于溶液中的对象生物分子120的浓度。可以根据要测定的对象生物分子120在溶液中的浓度而改变电极101上的适体102的数量或密度,可以提供适体102的量不同的两个以上电极101,可以改变电极101的面积。

[0088] 电极101中可检测到的阳离子介体的数量会根据对象生物分子(糖化白蛋白120)的浓度而变化。因此,可以基于电极101中的电信号求出适体102所识别的糖化白蛋白120的浓度。

[0089] 适体102与对象生物分子(糖化白蛋白120)特异性结合,因此与其它生物分子、即测定中的夹杂物实质上不反应。图1C示出体系中存在人血清白蛋白(HSA)、免疫球蛋白(例如IgG)等夹杂物130的构成。与糖化白蛋白120特异性结合的适体102不识别这些夹杂物130。因此,阳离子介体111被吸引到电学上具有适体102的相反电荷的部位。其它阳离子介体112无法感知变为电中性的适体102而到达电极101。这与图1A所示的状况相似。或者说,图1C所示的体系在电学上与图1A实质上相同。即,图1C的等效电路的电阻(R)和电容(C)与图1A相比实质上没有变化。因此,电极101对意味着对象生物分子(糖化白蛋白120)不存在的电信号进行检测。

[0090] <保护膜>

[0091] 夹杂物的一部分在电学上有活性,或者到达电极而可能导致噪声信号。若干实施方式中,可以在电极的表面设置有保护膜。由此,例如非限定性地可以除去或降低这些夹杂物对测定的影响。保护膜例如非限定性地可以实质上保持适体的功能或使其不下降、防止夹杂物到达电极或被电极检测到。保护膜可以通过各种形式或方法形成。以下例示性地对若干方式进行说明。

[0092] <保护膜的例子-1>

[0093] 图2A所示的实施例中,在电极201的表面形成重氮铕多层膜来作为保护膜240。保护膜240阻止HSA、IgG等生物分子的夹杂物靠近电极201,同时允许作为对象生物分子的糖化白蛋白靠近电极201。图2A所示的保护膜240可以为重氮铕多层膜。

[0094] 若干实施方式中,传感器可以具备电极、配置在电极上的保护膜、和配置在能够与对象生物分子结合的位置的适体。图2B示出作为其一个实施例的传感器200。传感器200具备电极201、覆盖电极201的表面的保护膜240和固定在保护膜240的表面的适体202。保护膜240也作为用于将适体202固定在电极201上的锚固物发挥作用。保护膜240也可以称为锚固层。在图2A的锚固层240的一端可形成适体202(图2B)。该适体202可以与图1A至图1C的适体102相同。适体202与对象生物分子220结合、不与夹杂物230结合。图2B所示的传感器可以通

过保护膜(锚固层)240进一步防止来自夹杂物等的成为噪声源的物质与电极201反应。由此,可以提高测定精度。

[0095] <保护膜的例子-2>

[0096] 若干实施方式中,保护膜可以具有耐污染性(污染抑制能力)。若干实施方式中,保护膜可以含有聚乙二醇(PEG)。通常PEG具有耐污染性。若干实施方式中,PEG直接生长或配置在电极上。若干实施方式中,PEG(第二保护膜)可以与形成在电极上的锚固层(第一保护膜)结合。

[0097] 图3所示的传感器300中,在电极301上形成有第一保护膜(锚固层)340,在其上形成有适体302和第二保护膜(PEG,耐污染层)341。在适体302所在的锚固层340的表面部位不存在PEG。因此,对象生物分子320可以与适体302结合。

[0098] PEG例如非限定性地可以为PEG(例如分子量可以为800、2000等)。图3所示的第一保护膜(锚固层)340可以为与图2A和图2B同样的锚固层240。图3所示的传感器可以通过耐污染层341进一步防止来自夹杂物330的成为噪声源的物质与电极301反应。由此,可以进一步提高测定精度。

[0099] 图4A中,作为一例,示出利用在电极上不具有适体、仅配置有锚固层的传感器的测定结果。

[0100] 通常,在阻抗谱的奈奎斯特图中,纵轴表示虚轴(Z''),横轴表示实轴(Z')。从横轴根据奈奎斯特图的半圆的直径求出电荷转移电阻 R_{ct} 。但是,在本说明书的实施例所示的实验中,可能是由于锚固层,根据设置而该 R 的值过大,难以示出半圆。锚固层在某种意义上被认为是绝缘性的膜,因此使用 C 分量进行评价。即,纵轴表示电容的虚轴(C''),横轴表示电容的实轴(C')。与阻抗的关系可以表示成 $C''(\omega) = Z' / \omega Z^2$ 、 $C'(\omega) = Z'' / \omega Z^2$ 。在此, ω 为角频率,与频率的关系可表示成 $\omega = 2\pi f$ 。对于其它奈奎斯特图,也采用同样的表示。

[0101] 若干实施方式中,阻抗测定可以具备对频率进行扫描的步骤。可以由奈奎斯特图的半圆的直径 D 等特性来求出浓度。例如,可以基于从对象生物分子的浓度为零时的直径 D_0 起的位移($D - D_0$)来求出浓度。例如,可以基于该位移($D - D_0$)相对于浓度为零时的直径 D_0 的比、 $(D - D_0) / D_0$ 来求出浓度。可以预先准备浓度与奈奎斯特图的特性之间的校准曲线。若干实施方式中,阻抗测定可以在两个以上频率下进行,可以在一个频率下进行。例如,可以预先求出规定的频率与浓度的关系,制作校准曲线。在实际测定中,可以基于一个或两个以上的规定频率下的测定结果来求出浓度。

[0102] 向上述传感器导入糖化白蛋白(GA)的溶液,进行EIS计测。如图4A所示,该电极的输出随着GA浓度的变化而变化。即,该传感器中虽然致密地形成有锚固层,但是作为介体的Ru络合物离子能透过锚固层。GA非特异性地吸附在锚固层的表面,防止介质侵入电极表面。即,随着GA浓度的上升,电容下降。从与以下的比较的观点而言,对未配置适体的状况下的信号进行计测。

[0103] 作为一例,图4B示出具有PEG层的传感器的测定结果。在图4A的传感器之外的电极上形成有与图4A同样的锚固层,在其上形成有PEG层。因此可认为,在图4A与图4B之间锚固层大致相同。在此,未形成适体。向该电极分别导入泪液(with tears)和PBS溶液(w/o tears),进行EIS计测。泪液中含有白蛋白、糖化白蛋白等蛋白质。PBS溶液不含这些蛋白质。如图4B所示,在电极的输出中,在泪液与PBS之间未观察到差异。

[0104] 图5示出基于图4A和图4B所示的测定结果的、溶液中的GA浓度(横轴)与 $(D-D_0)/D_0$ (纵轴)之间的关系。可知,关于 $(D-D_0)/D_0$ 的值,如果是仅锚固层的情况,特别是在1mg/mL下发生变化,在其上具有PEG层的情况下,在任一浓度下均几乎不变。因此,该结果意味着泪液中的蛋白质等夹杂物被PEG层阻挡或排斥,没有到达电极。由此确认,耐污染层(本例中为PEG)具有阻挡蛋白质的夹杂物的高能力。

[0105] <保护膜的例子-3>

[0106] 若干实施方式中,保护膜可以具有牛血清白蛋白(BSA)。通常,BSA具有耐污染性。若干实施方式中,BSA可以直接生长或配置在电极上。若干实施方式中,BSA(第二保护膜)可以与形成在电极上的锚固层(第一保护膜)结合。BSA可以固定于锚固层,也可以未固定。BSA分子可以配置在适体402之间。因此,对象生物分子420可以与适体402结合。

[0107] 图6所示的传感器400中,在电极401上形成有第一保护膜(锚固层)440,在其上形成有适体402和第二保护膜(BSA,耐污染层)441。图6所示的第一保护膜(锚固层)440可以为与图2A和图2B相同的锚固层240。图6所示的传感器400可以通过BSA层441进一步防止夹杂物430等所带来的成为噪声源的物质与电极401反应。由此,可以进一步提高测定精度。

[0108] <保护膜的例子-4>

[0109] 若干实施方式中,保护膜可以具有分子模板(MIP)。若干实施方式中,MIP可以直接生长或配置在电极上。若干实施方式中,MIP可以与形成在电极上的锚固层(第一保护膜)结合。

[0110] 图7所示的传感器500中,在电极501上形成有第一保护膜(锚固层)540,在其上形成有MIP层541。图7所示的第一保护膜(锚固层)540可以为与图2A和图2B相同的锚固层240。MIP层541例如非限定性地可以通过使2-(甲基丙烯酰氧基)乙基2-(三甲基铵)乙基磷酸酯的单体聚合而形成。由此,可以形成2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)聚合物层。

[0111] 适体542在MIP层541的分子模板的部位(MIP)542的内部在其一端伸出。若干实施方式中,如图7所示,在形成MIP层541的MCP聚合物的、露出于MIP542的内部的端部处可以配置识别对象生物分子的官能团。该官能团可以为苯基硼酸(PBA)。

[0112] 图7所示的传感器500可以通过MIP542、MIP层541抑制夹杂物的非特异吸附,并且通过MIP542、其内部的适体502、以及PBA543更特异性地识别对象生物分子520并防止其以外的夹杂物530等所带来的成为噪声源的物质与电极501反应。由此,可以进一步提高测定精度。

[0113] <实施例1:GA传感器>

[0114] 使用具有图3所示的结构传感器,对两种以上蛋白质调查电极的输出。使用的传感器具备电极、配置在其上的由重氮铍多层膜形成的锚固层(第一保护层)、位于该锚固层上的GA用的适体、和PEG层(耐污染层、第二保护层)。

[0115] 特别是在本实施例中,使用GA传感器。该传感器使用作为电极的Au电极、作为第一保护膜的重氮铍多层膜、作为第二保护层(耐污染层)的PEG层、以及作为适体的具有序列号1(表1)的序列且与GA特异性结合的核酸配体。

[0116] 测定的步骤如下所述。

[0117] 1) 首先以下述浓度准备蛋白质GA、HSA、IgG的磷酸缓冲生理盐水(PBS)溶液。

[0118] GA:0、0.01、0.1、1mg/mL

[0119] HSA:0、0.01、0.1、1mg/mL

[0120] IgG:0、0.01、0.1、1mg/mL

[0121] 在此,GA、HSA和IgG的浓度“0mg/mL”意味着使用不含任意蛋白质的PBS溶液。

[0122] 2) 将上述各浓度的各蛋白质导入到传感器。在该阶段,GA与适体结合,其以外的蛋白质不发生结合。

[0123] 3) 然后,进行B/F(Bond/Free,结合/游离)分离。例如,可以使用SDS(十二烷基硫酸钠)进行清洗。由此,从传感器上洗掉未与适体结合的物质或非特异性吸附在传感器表面、例如PEG层的表面的物质。例如,GA以外的蛋白质即夹杂物、未与适体结合的GA等无益于目标测定,可能成为噪声的原因。可以将这些噪声源除去。

[0124] 4) 然后导入钌络合物($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$),使用EIS分析电极的输出对蛋白质的浓度的依赖性。

[0125] 图8A至图8C示出关于各蛋白质的两种以上浓度的奈奎斯特图。如图8A所示,对于GA而言,观察到图形根据浓度而大幅变化。另一方面,如图8B所示,对于HSA而言,图形虽然稍有变化,但是变化不大。如图8C所示,对于IgG而言,图形几乎不变。

[0126] 图9示出基于图8A至图8C所示的测定结果的、表示各蛋白质的浓度(横轴)与奈奎斯特图的直径的位移 $(D-D_0)/D_0$ (纵轴)之间的关系。可知 $(D-D_0)/D_0$ 的值在GA的情况下依赖于浓度,且在HSA和IgG的情况下实质上不依赖于浓度或与GA相比浓度依赖性非常低。因此,使用这样的构成,可以制造特异性识别GA或测定GA浓度的传感器。

[0127] <白蛋白传感器>

[0128] 本发明还提供白蛋白传感器。若干实施方式中,白蛋白传感器具备电极和配置在电极上或电极附近的白蛋白抗体(HSA抗体、抗白蛋白抗体)。

[0129] 图10A示出一个实施方式的白蛋白传感器700。白蛋白传感器700具备电极701和配置在电极701上的白蛋白抗体(HSA抗体)702。白蛋白传感器700可以通过电极701来检测或测定所导入的介体712。

[0130] 导入作为对象生物分子的白蛋白720时,白蛋白720被白蛋白抗体720识别、捕捉(图10B)。被捕捉的白蛋白720使电极701的实质表面积减小,限制介体712向电极701的靠近。如果换成该体系的电学等效电路的表述,则在图10B的状况下,相对于图10A的状况,电阻(R)大、电容(C)小。

[0131] 图11A示出一个实施例的传感器800。传感器800具备电极801、覆盖电极801的表面的保护膜840和固定在保护膜840的表面的抗体802。保护膜840例如非限定性地可以与图2B所示的锚固层240相同。与图2B同样,可以在保护膜(锚固层)840的一端形成抗体802。抗体802与作为对象生物分子的白蛋白820结合、不与夹杂物830结合。图11A所示的传感器800可以通过保护层840进一步防止夹杂物等所带来的成为噪声源的物质与电极801反应。由此,可以提高测定精度。

[0132] 图11B示出一个实施例的传感器900。传感器900中,在电极901上形成有第一保护膜(锚固层)940,在其上形成有抗体902、和第二保护膜(PEG,耐污染层)941。在抗体902所在的锚固层340的表面部位不存在PEG。因此,对象生物分子920可以与抗体902结合。

[0133] PEG例如非限定性地可以为PEG-800、PEG-2000。图11B所示的第一保护膜(锚固层)940可以为与图2A和图2B相同的锚固层240。图11B所示的传感器900可以通过耐污染层941

进一步防止夹杂物930所带来的成为噪声源的物质与电极901反应。由此,可以进一步提高测定精度。

[0134] <实施例:HSA传感器>

[0135] 使用具有图11B所示的结构传感器对GA和HSA调查电极的输出。所使用的传感器具备电极、配置在其上的由重氮铼多层膜形成的锚固层(第一保护层)、位于该锚固层上的抗白蛋白抗体、和PEG层(耐污染层、第二保护层)。

[0136] 测定的步骤如下所述。

[0137] 1) 首先以下述浓度准备蛋白质HSA、GA的磷酸缓冲生理盐水(PBS)溶液。

[0138] HSA:0、0.1、1、10mg/mL

[0139] GA:0、0.1、1、10mg/mL

[0140] 在此,HSA和GA的浓度“0mg/mL”意味着使用不含任意蛋白质的PBS溶液。

[0141] 2) 将上述各浓度的各蛋白质导入到传感器,使其与抗体充分反应。

[0142] 3) 然后,进行B/F(Bond/Free)分离。例如,可以使用SDS(十二烷基硫酸钠)进行清洗。由此,从传感器洗掉未与适体结合的物质或非特异性吸附于传感器表面、例如PEG层的表面的物质。

[0143] 4) 之后导入钌络合物($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$),使用EIS分析电极的输出对蛋白质的浓度的依赖性。

[0144] 图12A和图12B分别示出关于HSA和GA的两种以上浓度的奈奎斯特图。如图12A所示,对于HSA而言,观察到图形根据浓度而变化。如图12B所示,对于GA而言,虽然不像图12A那样明显,但是图形也有变化。可见,来自HSA抗体的输出受到了GA影响认为是由于GA对HSA抗体的非特异吸附。但是,对于本实施例中使用的HSA抗体也识别GA的可能性的有无还有待研究。

[0145] 图13示出基于图12A和图12B所示的测定结果的、表示各蛋白质的浓度(横轴)与奈奎斯特图的直径的位移 $(D-D_0)/D_0$ (纵轴)之间的关系。可知 $(D-D_0)/D_0$ 的值在HSA的情况下依赖于浓度。因此,使用这样的构成,可以制造测定溶液中的白蛋白浓度的传感器。

[0146] 图12B和图13中观察到的GA的影响是可以除去或补正的。例如,可以使用特异性识别HSA(或非糖化白蛋白)、不识别GA的抗体。这种情况下,GA值可以作为糖化白蛋白的浓度(分子) $([\text{GA}])$ 相对于使用HSA抗体求出的非糖化白蛋白的浓度 $([\text{HSA}])$ 与使用GA适体求出的糖化白蛋白的浓度 $([\text{GA}])$ 之和(分母)的比率 $([\text{GA}]/\{[\text{HSA}]+[\text{GA}]\})$ 来求出。或者,在HSA抗体以一定程度识别GA时,具有HSA抗体的传感器的输出为非糖化白蛋白的浓度与糖化白蛋白的浓度的一部分的合计 $([\text{HSA}]+\alpha[\text{GA}])$ 。因此,可以通过确定其比率 α 而求出本来的HSA的浓度。认为其它物质、例如IgG的特异或非特异的影响也可以同样地或通过其它方法而除去或补正。

[0147] 可以基于图9所示的数据等生成校准曲线。使用该校准曲线分别求出GA浓度和白蛋白浓度。可以以GA浓度相对于白蛋白浓度的比的形式求出GA值。

[0148] 但是,GA值的求法不限于上述。通常,GA值通过将糖化白蛋白的量除以非糖化和糖化白蛋白的合计量而得到。若干实施方式中,可以基于非糖化的白蛋白(HSA)的浓度和通过其它传感器求出的GA的浓度来求出GA值。若干实施方式中,可以基于使用非糖化的白蛋白(HSA)的浓度与糖化白蛋白(GA)浓度的合计值或这两者计算出的值以及通过其它传感器求

出的GA的浓度来求出GA值。

[0149] <双传感器>

[0150] 也可以使用GA传感器和白蛋白传感器求出GA的浓度相对于HSA的浓度的比、所谓GA值。若干实施方式中,用于测定GA值的装置可以具备GA传感器和白蛋白传感器。若干实施方式中,GA传感器和白蛋白传感器可以以接收同一测定对象溶液并进行测定的方式构成。例如,可以在测定对象溶液的收容器、流路或容积的内部配置这两种传感器。例如,可以以将GA传感器和白蛋白传感器分别配置在不同的收容器的内部、将测定对象溶液分流并导入到各收容器中的方式来构成装置。

[0151] 白蛋白传感器为测定糖化和非糖化白蛋白的合计量、或非糖化白蛋白的量的传感器。本发明的双传感器中使用的白蛋白传感器的形态不应进行特别限定。

[0152] 若干实施方式中,用于测定GA值的装置可以包含GA传感器和白蛋白传感器。若干实施方式中,用于测定GA值的系统或单元可以以GA传感器与白蛋白传感器连接的方式构成。

[0153] <关于EIS和奈奎斯特图>

[0154] EIS如下进行。使用BAS的电化学分析仪,以100至1000000Hz (1MHz) 的频率进行扫描,在各频率下进行阻抗测定。初始电压为-0.14V。作为介体,使用含有Ru络合物离子的磷酸缓冲溶液 (pH7.4)。GA等蛋白质与电极的反应的测定中,不添加Ru络合物离子,使用磷酸缓冲溶液 (pH7.4)。在蛋白质与适体的反应后进行清洗、即B/F分离,进行测定。

[0155] <测定方法:例1>

[0156] 图14示出一个实施方式的生物分子的测定方法的过程。步骤S101中,提供或准备具备电极和位于其附近的与对象生物分子特异性结合的适体的器件或装置。步骤S102中,将阳离子介体导入到该体系。阳离子介体与具有相反电荷的适体结合。步骤S103中,导入对象生物分子。可以将含有或可能含有对象生物分子的溶液导入到体系。步骤S105中,读取阳离子介体与电极的反应(例如氧化还原反应)中产生的、电极中的电信号。由此确定结合于适体的对象生物分子的量、例如被导入的溶液中的对象生物分子的浓度等。

[0157] <测定方法:例2>

[0158] 图15示出一个实施方式的生物分子的测定方法的过程。步骤S201至步骤S203与步骤S101至步骤S103相同或至少在目的上相同。步骤S204中,可以除去体系中存在的夹杂物。可以将该步骤称为清洗。该步骤可以包括B/F分离。步骤S205中,读取阳离子介体与电极的反应(例如氧化还原反应)中产生的、电极中的电信号。由此确定结合于适体的对象生物分子的量、例如被导入的溶液中的对象生物分子的浓度等。通过步骤S204中的清洗,可以除去或减少可能影响测定的夹杂物,能够更准确地进行测定。

[0159] 本发明还提供以下的实施方式。

[0160] A001

[0161] 一种检测生物分子的方法,其具备如下步骤:

[0162] 提供具备电极和配置在上述电极的附近或固定于上述电极的、与对象生物分子特异性结合的适体;

[0163] 将阳离子介体向配置有上述适体的上述电极导入;

[0164] 使含有上述对象生物分子的溶液与上述适体接触,使上述生物分子与上述适体结

合;以及

[0165] 测定由于上述阳离子介体而在上述电极中产生的电信号。

[0166] A001b

[0167] 根据实施方式A001或任一实施方式所述的方法,其中,上述介体为阳离子介体。

[0168] A001c

[0169] 一种检测生物分子的方法,其具备如下步骤:

[0170] 提供电极和配置在上述电极的附近或固定于上述电极的、与对象生物分子特异性结合且具有电荷的适体;

[0171] 将具有与上述适体的上述电荷相反的电荷的介体向配置有上述适体的上述电极导入;

[0172] 使含有上述对象生物分子的溶液与上述适体接触,使上述生物分子与上述适体结合;以及

[0173] 测定由于上述介体而在上述电极中产生的电信号。

[0174] A002

[0175] 根据实施方式A001至A001c中任一项或任一实施方式所述的方法,其中,还具备如下步骤:

[0176] 基于上述电信号确定上述溶液内的上述对象生物分子的量。

[0177] A002b

[0178] 根据实施方式A002或任一实施方式所述的方法,其中,基于上述电信号的电容分量确定溶液内的上述对象生物分子的量。

[0179] A002c

[0180] 根据实施方式A002或任一实施方式所述的方法,其中,基于上述电信号的电流分量确定上述溶液内的上述对象生物分子的量。

[0181] A003

[0182] 根据实施方式A001至A002c中任一项或任一实施方式所述的方法,其中,

[0183] 测定由于上述介体而在上述电极中产生的电信号的步骤具备进行电化学阻抗谱法的步骤。

[0184] A004

[0185] 根据实施方式A003或任一实施方式所述的方法,其具备如下步骤:

[0186] 对通过上述电化学阻抗谱法得到的、上述电极中的上述介体的氧化还原反应的电容分量进行评价。

[0187] A004b

[0188] 根据实施方式A003或任一实施方式所述的方法,其具备如下步骤:

[0189] 对通过上述电化学阻抗谱法得到的、上述电极中的关于上述介体的氧化还原反应的电荷转移电阻(R_{ct})的值进行评价。

[0190] A005

[0191] 根据实施方式A004或任一实施方式所述的方法,其中,

[0192] 基于上述电极中的上述介体的氧化还原反应的上述电容分量的值确定结合于上述适体的上述对象生物分子的量。

[0193] A005b

[0194] 根据实施方式A004或任一实施方式所述的方法,其中,基于上述电极中的关于上述介体的氧化还原反应的上述电荷转移电阻(R_{ct})的上述值确定结合于上述适体的上述对象生物分子的量。

[0195] A011

[0196] 根据实施方式A001至A005b中任一项或任一实施方式所述的方法,其中,上述对象生物分子为糖化蛋白。

[0197] A012

[0198] 根据实施方式A011或任一实施方式所述的方法,其中,上述对象生物分子为糖化白蛋白。

[0199] A013

[0200] 根据实施方式A001至A005b中任一项或任一实施方式所述的方法,其中,上述对象生物分子为选自自由细胞、病毒和细胞外囊泡组成的组中的一种或两种以上。

[0201] A021

[0202] 根据实施方式A012或任一实施方式所述的方法,其中,上述适体含有序列号1的碱基序列。

[0203] A031

[0204] 根据实施方式A001至A021中任一项或任一实施方式所述的方法,其中,上述介体为钆络合物。

[0205] A041

[0206] 根据实施方式A001至A031中任一项或任一实施方式所述的方法,其中,

[0207] 将上述介体向配置有上述适体的上述电极导入的步骤在使上述生物分子与上述适体接触之前进行。

[0208] A042

[0209] 根据实施方式A041或任一实施方式所述的方法,其中,还具备如下步骤:

[0210] 在将上述介体向配置有上述适体的上述电极导入之后、且使上述生物分子与上述适体接触之前,

[0211] 实质上除去未与上述适体结合的介体。

[0212] A051

[0213] 根据实施方式A001至A042中任一项或任一实施方式所述的方法,其中,

[0214] 测定由于上述介体而在上述电极中产生的电信号的步骤具备进行阻抗测定的步骤。

[0215] B001

[0216] 一种评价蛋白质的糖化度的方法,其具备如下步骤:

[0217] 提供在其表面配置有与经糖化的对象蛋白特异性结合的适体的电极;

[0218] 将含有经糖化的对象蛋白和非糖化的对象蛋白的溶液导入到上述电极,使糖化对象蛋白与上述适体结合;

[0219] 将介体导入到配置有上述适体的上述电极;

[0220] 测定由于上述介体而在上述电极中产生的电信号;

- [0221] 基于测定的上述电信号确定上述溶液内的上述糖化对象蛋白的量；
- [0222] 确定上述溶液内的非糖化对象蛋白的量、或上述糖化和非糖化的对象蛋白的合计量；以及
- [0223] 基于上述糖化对象蛋白的上述量和非糖化对象蛋白的量或上述糖化和非糖化的对象蛋白的合计量确定上述对象蛋白的糖化度。
- [0224] B011
- [0225] 一种评价蛋白质的糖化度的方法,其具备如下步骤:
- [0226] 提供在其表面配置有与糖化对象蛋白特异性结合的适体的第一电极；
- [0227] 提供在其表面配置有识别对象蛋白的抗体的第二电极；
- [0228] 将含有上述糖化对象蛋白和上述对象蛋白的溶液导入到上述第一电极和上述第二电极,使上述糖化对象蛋白与上述适体结合,使上述对象蛋白与上述抗体结合；
- [0229] 将介质导入到配置有上述适体的上述第一电极和上述第二电极；
- [0230] 测定由于上述介质而在上述第一电极中产生的第一电信号和在上述第二电极中产生的第二电信号；以及
- [0231] 基于测定的上述第一电信号和上述第二电信号确定上述溶液内的上述糖化对象蛋白相对于上述对象蛋白的比率。
- [0232] C001
- [0233] 一种用于检测生物分子的装置,其具备:
- [0234] 电极;以及
- [0235] 配置在上述电极的表面且与对象生物分子特异性结合的适体,
- [0236] 所述装置以下述方式构成:
- [0237] 使含有上述对象生物分子的溶液与上述适体接触,
- [0238] 将介质向配置有上述适体的上述电极导入,
- [0239] 测定由于上述介质而在上述电极中产生的电信号。
- [0240] C002
- [0241] 根据实施方式C001或任一实施方式所述的装置,其中,上述介质为阳离子介质。
- [0242] C011
- [0243] 根据实施方式C001或任一实施方式所述的装置,其还具备配置在上述电极的表面的保护膜,
- [0244] 所述保护膜具有允许上述介质朝向上述电极通过且抑制夹杂物朝向上述电极通过的能力。
- [0245] C012
- [0246] 根据实施方式C011或任一实施方式所述的装置,其中,上述保护膜具有重氮镧多层膜。
- [0247] C013
- [0248] 根据实施方式C012或任一实施方式所述的装置,其中,上述适体锚固于上述重氮镧多层膜。
- [0249] C014
- [0250] 根据实施方式C011至C013中任一项或任一实施方式所述的装置,其中,上述保护

膜具备具有耐污染性能的第二保护膜。

[0251] C015

[0252] 根据实施方式C012或任一实施方式所述的装置,其中,上述保护膜具备形成于上述重氮铀多层膜的表面的、具有耐污染性能的第二保护膜。

[0253] C016

[0254] 根据实施方式C014或C015或任一实施方式所述的装置,其中,上述第二保护膜实质上由聚乙二醇(PEG)或牛血清白蛋白(BSA)构成。

[0255] C021

[0256] 根据实施方式C011至C013中任一项或任一实施方式所述的装置,其中,

[0257] 上述保护膜具有识别上述对象生物分子且在其内部上述适体的一端伸出的分子模板(MIP)。

[0258] C022

[0259] 根据实施方式C021或任一实施方式所述的装置,其中,上述分子模板在其内部的表面具有识别上述对象生物分子的官能团。

[0260] C023

[0261] 根据实施方式C021或任一实施方式所述的装置,其中,上述官能团为苯基硼酸(PBA)。

[0262] C031

[0263] 根据实施方式C001至C023中任一项或任一实施方式所述的装置,其中,还具备与上述电极连接的测定器件。

[0264] C032

[0265] 根据实施方式C011至C023中任一项或任一实施方式所述的器件,其中,上述测定器件能够进行使用电化学阻抗谱法的测定。

[0266] C101

[0267] 一种用于测定糖化白蛋白的器件,其具备:

[0268] 电极;以及

[0269] 配置在上述电极的表面且具有序列号1的序列的适体。

[0270] D001

[0271] 一种求算GA值的装置,其具备:

[0272] 实施方式C101或任一实施方式所述的用于测定糖化白蛋白的器件;以及

[0273] 用于测定白蛋白的器件。

[0274] D002

[0275] 根据实施方式D001或任一实施方式所述的装置,其中,

[0276] 上述用于测定白蛋白的器件具备电极和配置在上述电极的表面的抗白蛋白抗体。

[0277] 以上对本发明的若干实施方式和实施例进行了说明,但是这些实施方式和实施例是对本发明进行例示性说明的。例如,上述各实施方式是为了容易理解地说明本发明而详细说明的,可以根据需要追加变更尺寸、构成、材质、电路。需要说明的是,将上述列举的本发明的一个或两个以上特征任意组合而成的实施方式也包含在本发明的范围内。在不脱离本发明的技术思想的范围内,权利要求书包括针对实施方式的多种变形方式。因此,本说明

书公开的实施方式和实施例是用于例示而示出的,不应认为是对本发明的范围进行限定。

[0278] 参考文献

[0279] Shoichi Nishitani and*T.Sakata“Polymeric Nanofilter Biointerfa ce for Potentiometric Small-Biomolecule Recognition”ACS Appl.Mat er.Interfaces,11 (5), (2019),pp 5561–5569. (DOI:10.1021/acsami.8b20010)

[0280] Shogo Himori,Shoichi Nishitani and*T.Sakata“Control of Poten tial Response to Small Biomolecule with Electrochemically Grafted Aryl-Based Monolayer in Field-Effect-Transistor-Based Sensor”Lang muir,35(10), (2019),pp 3701–3709. (DOI:10.1021/acs.langmuir.9b00085)

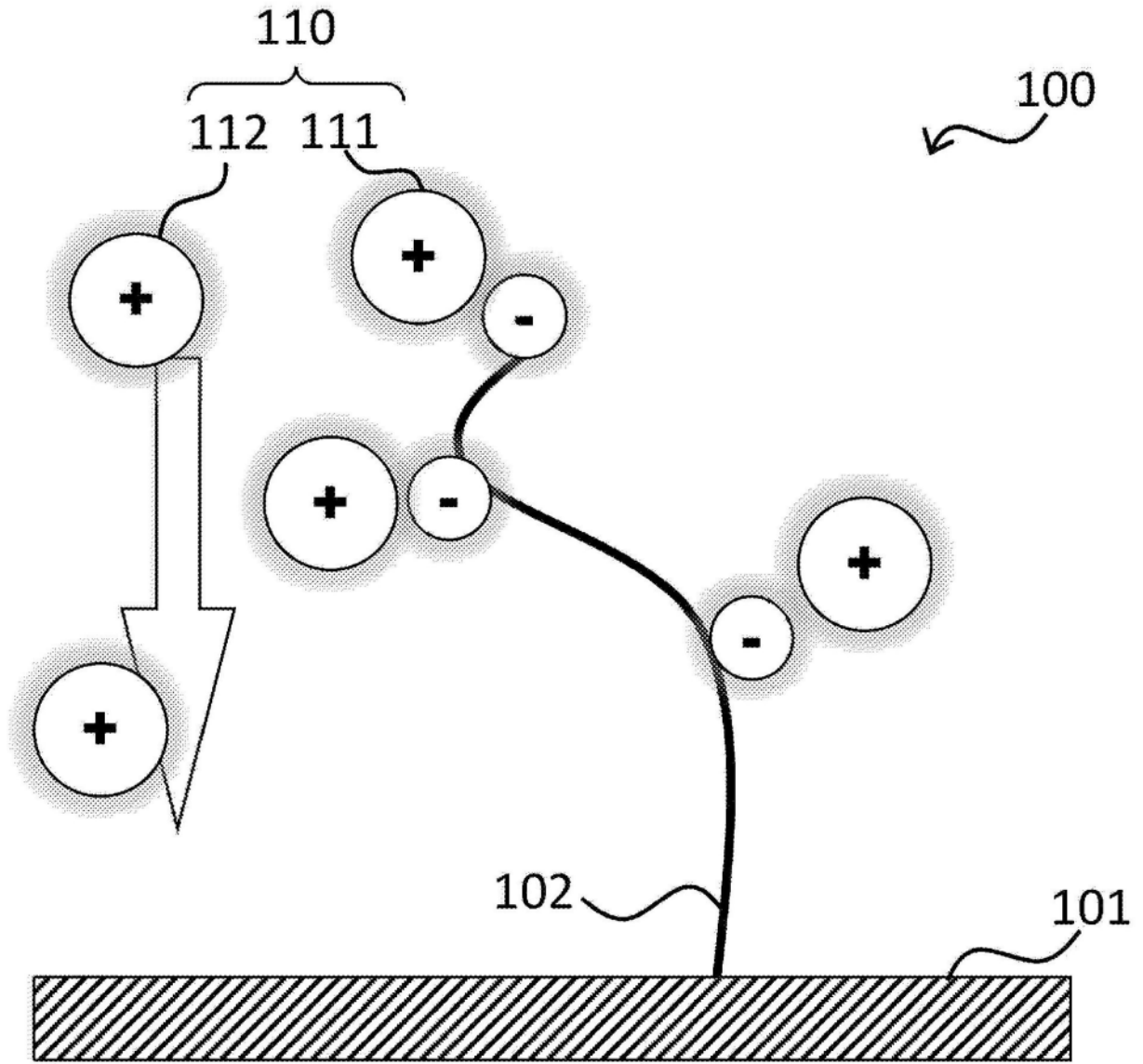


图1A

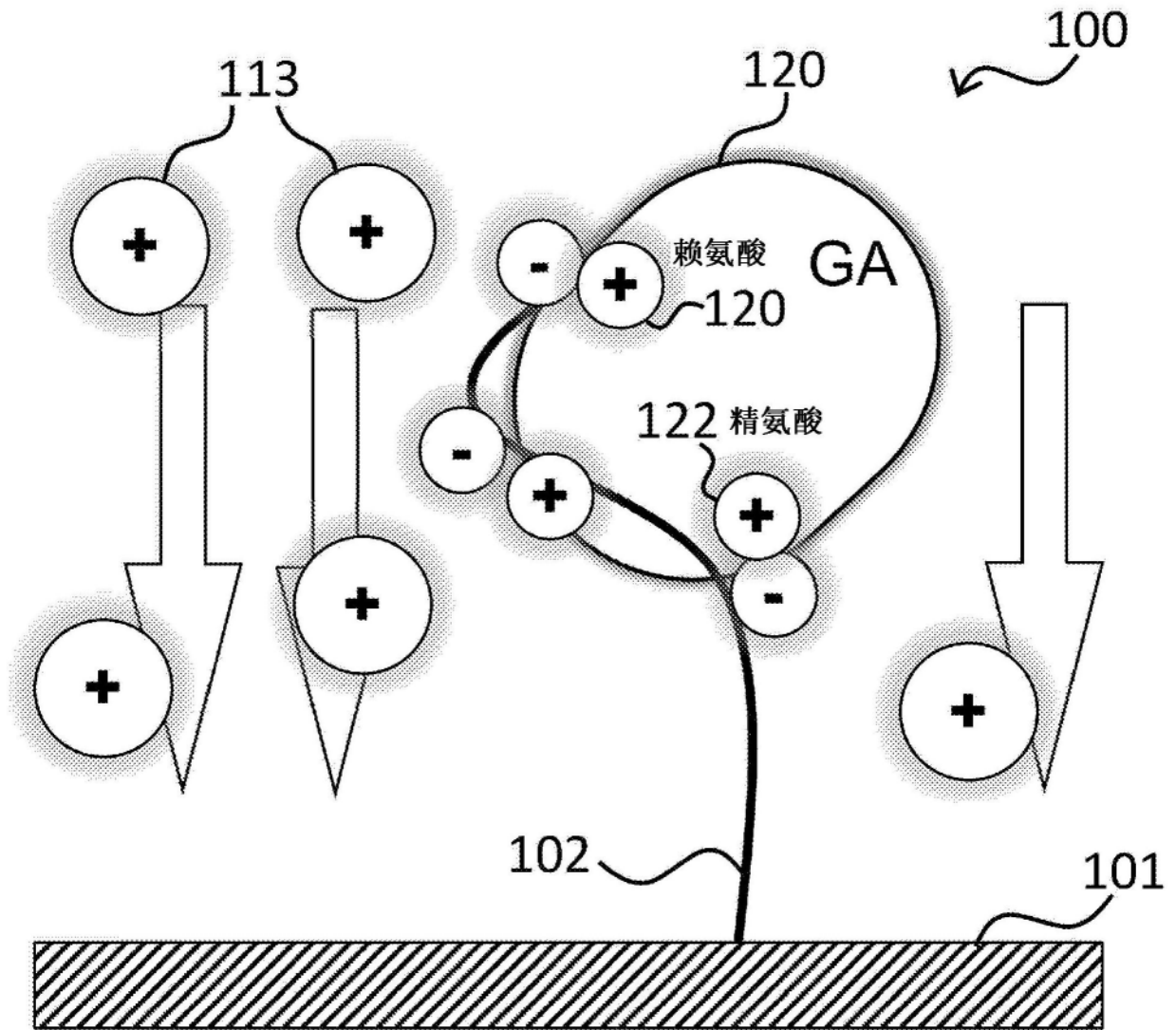


图1B

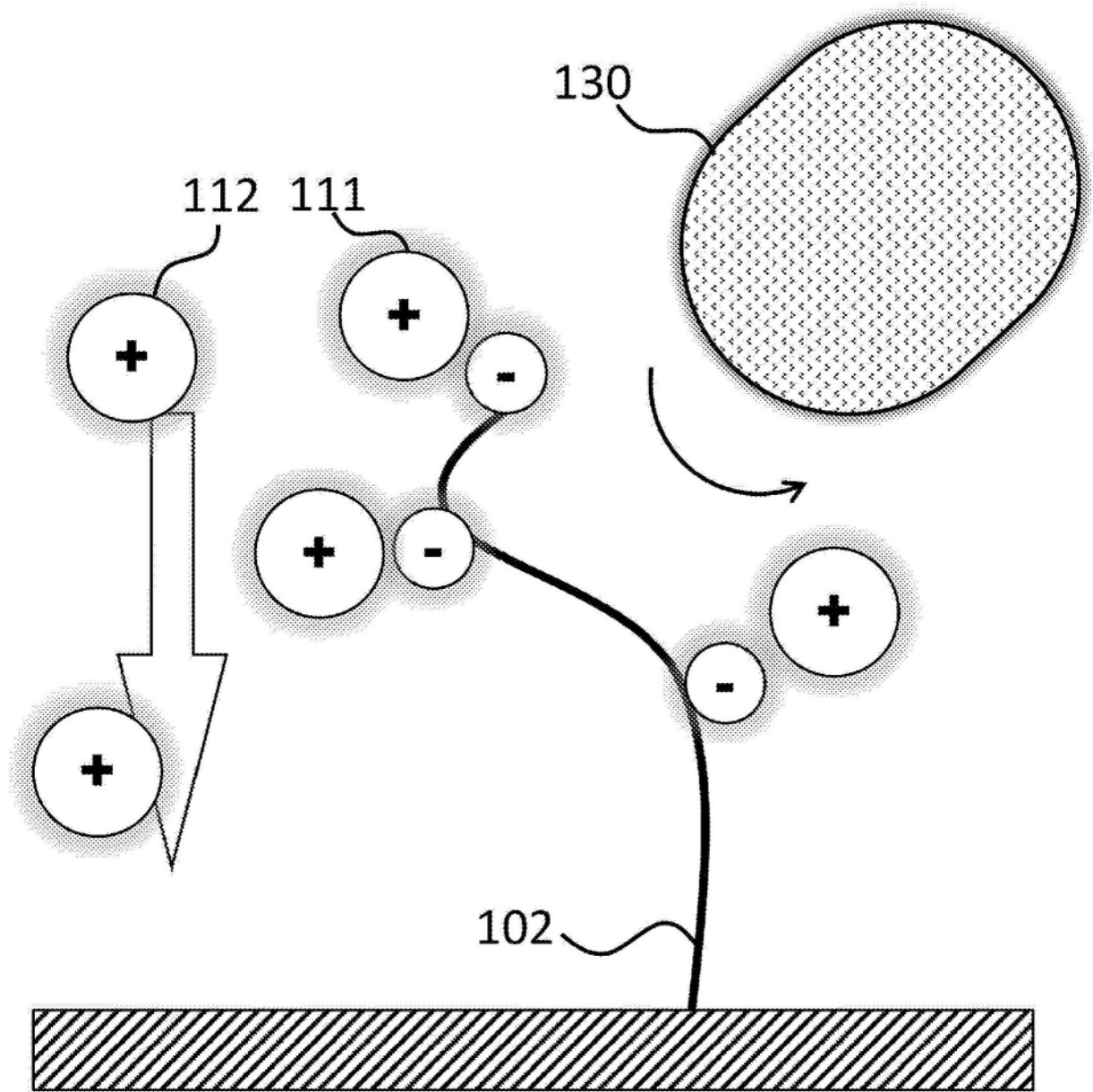


图1C

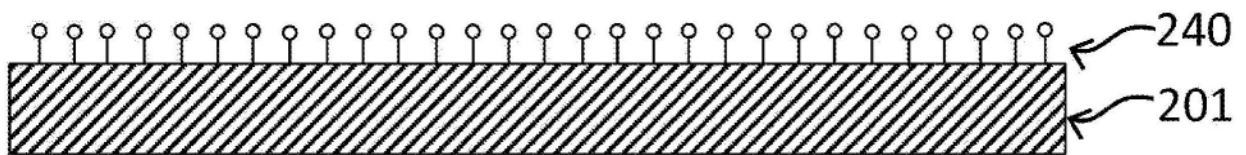


图2A

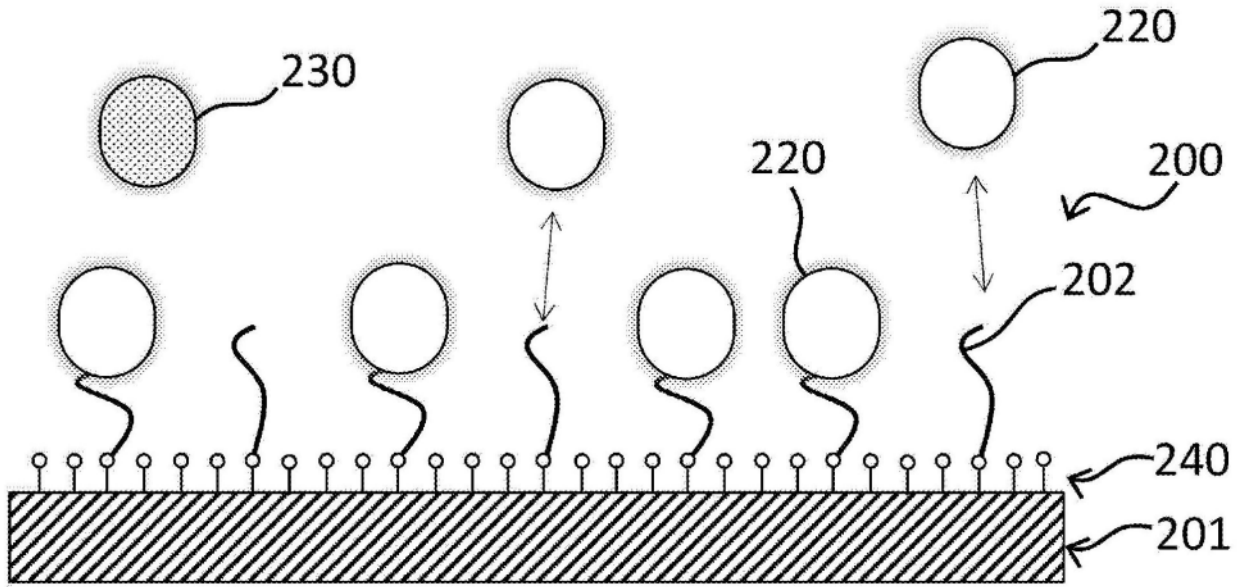


图2B

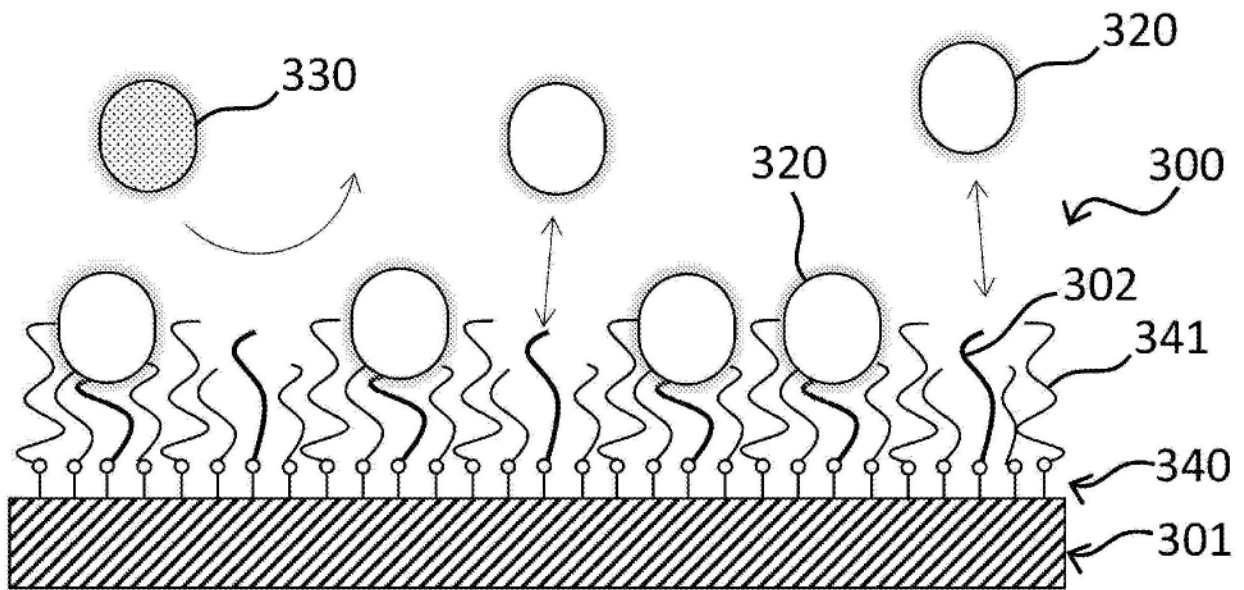


图3

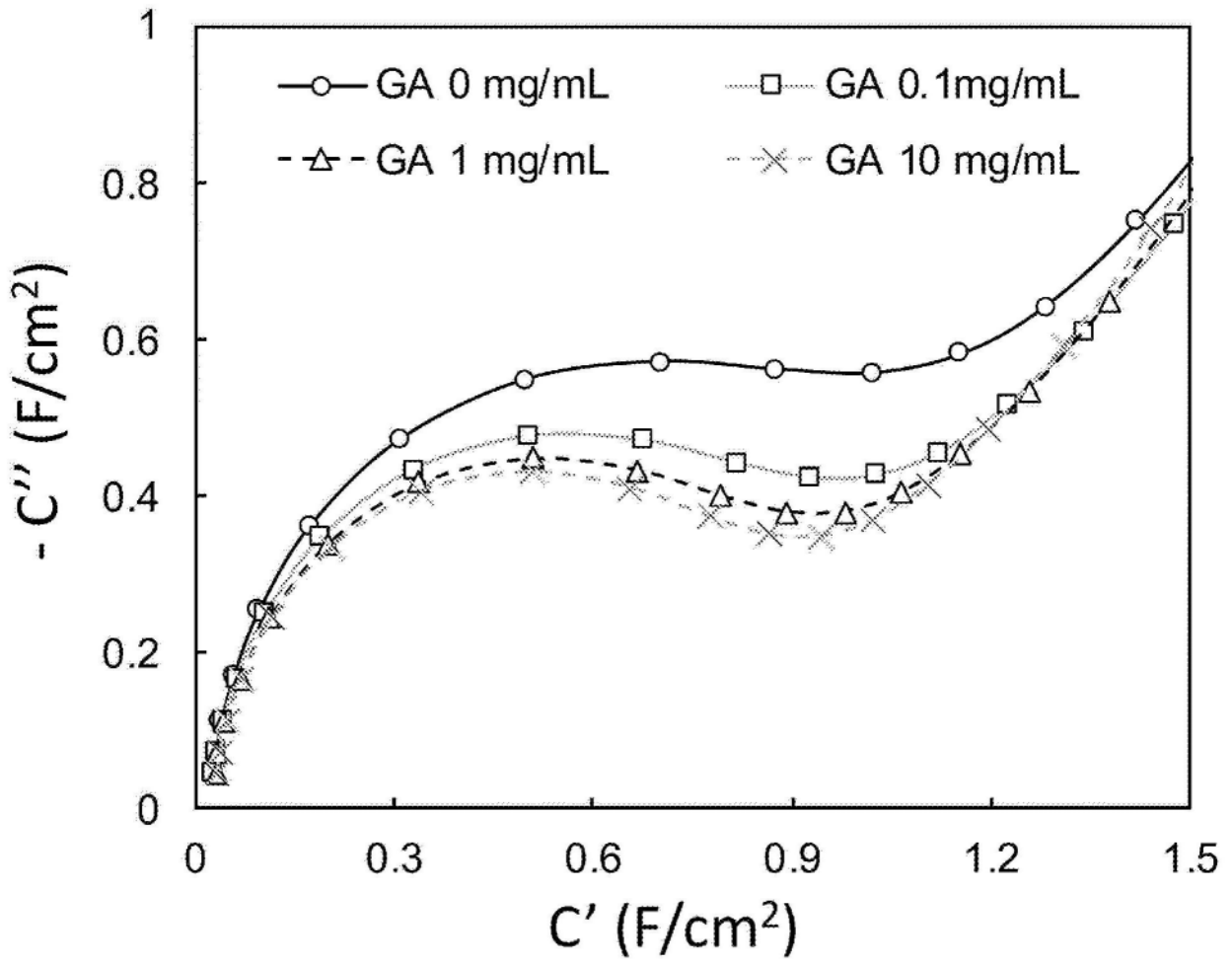


图4A

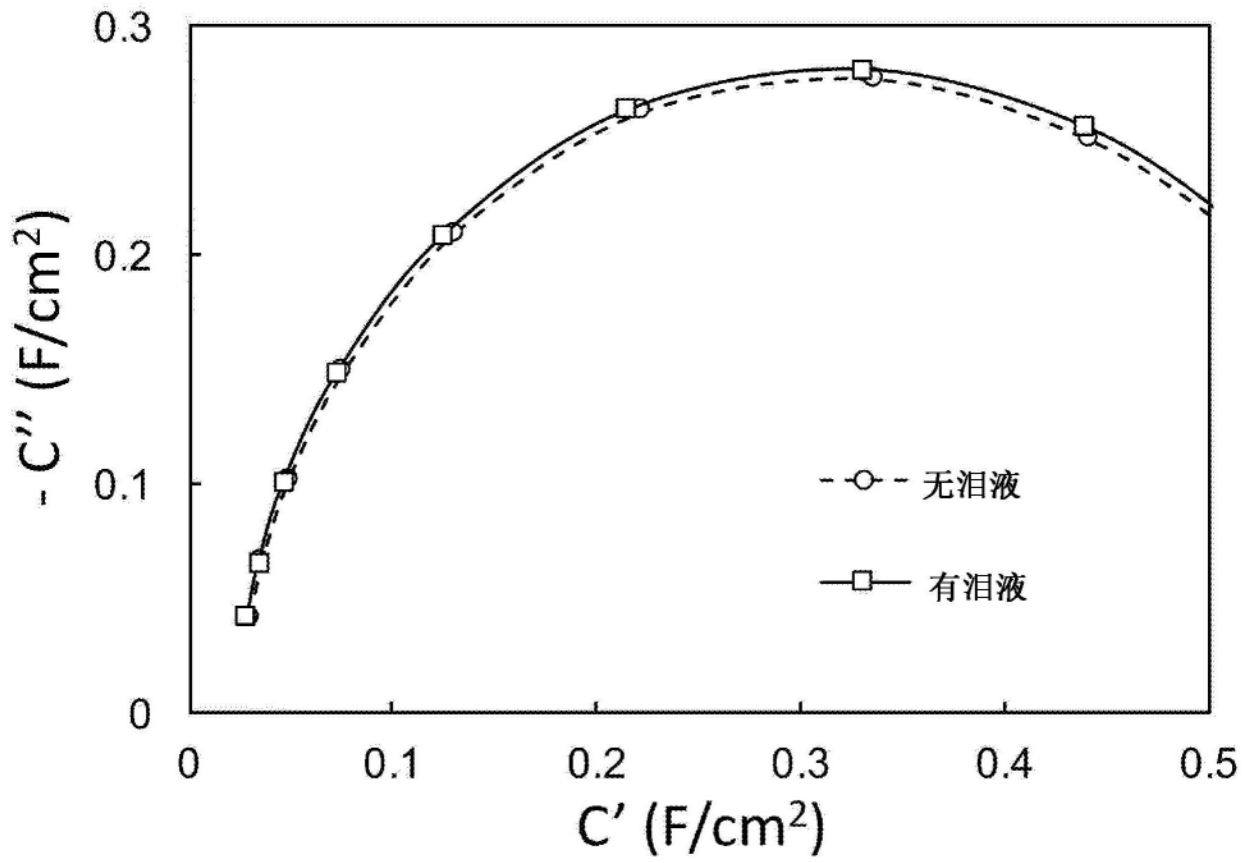


图4B

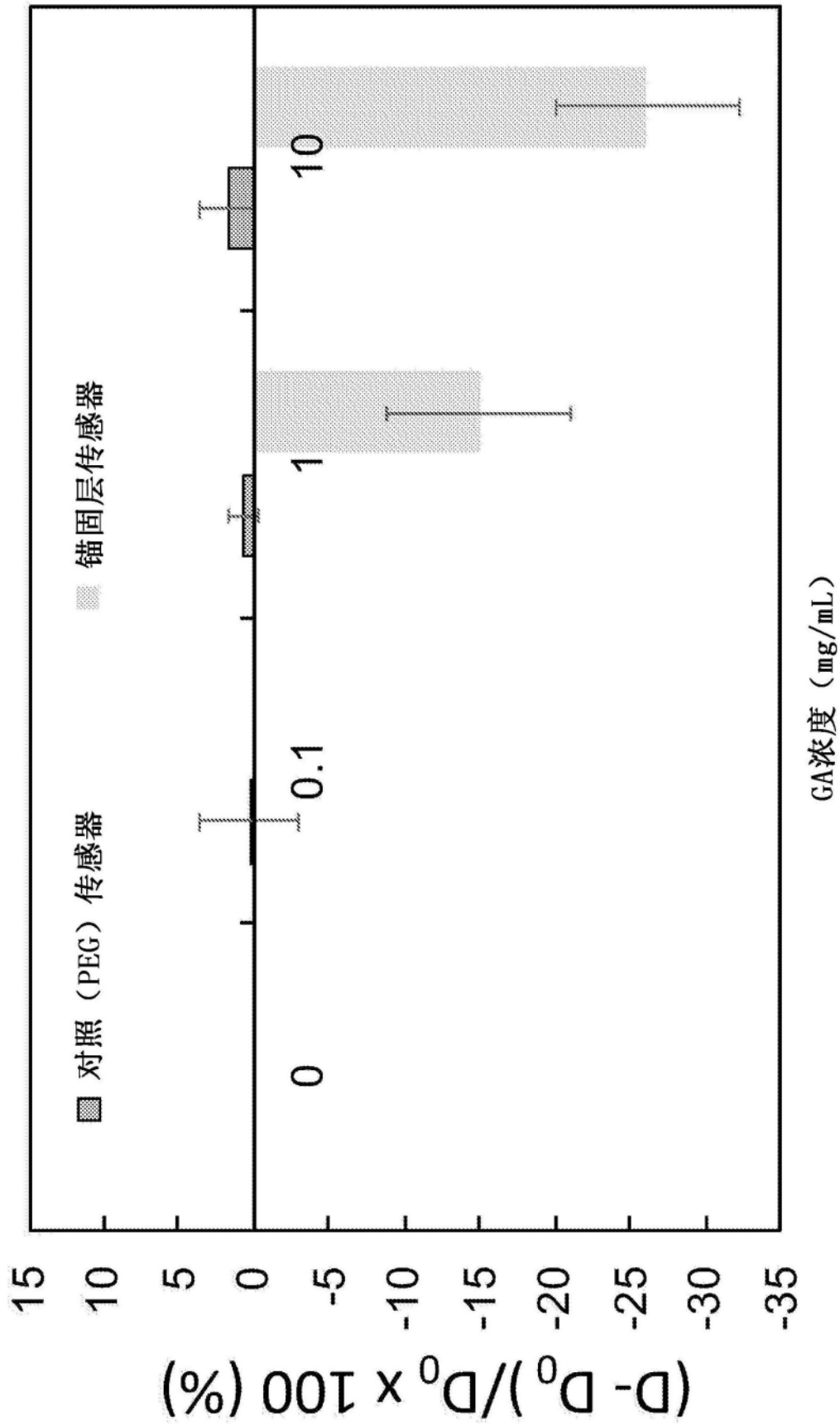


图5

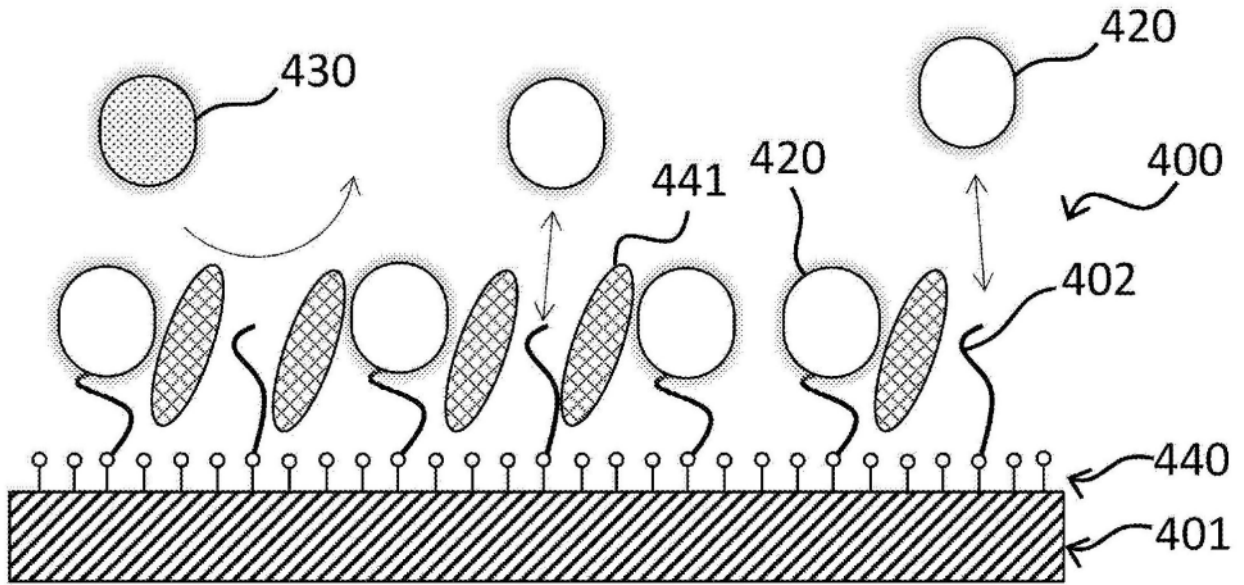


图6

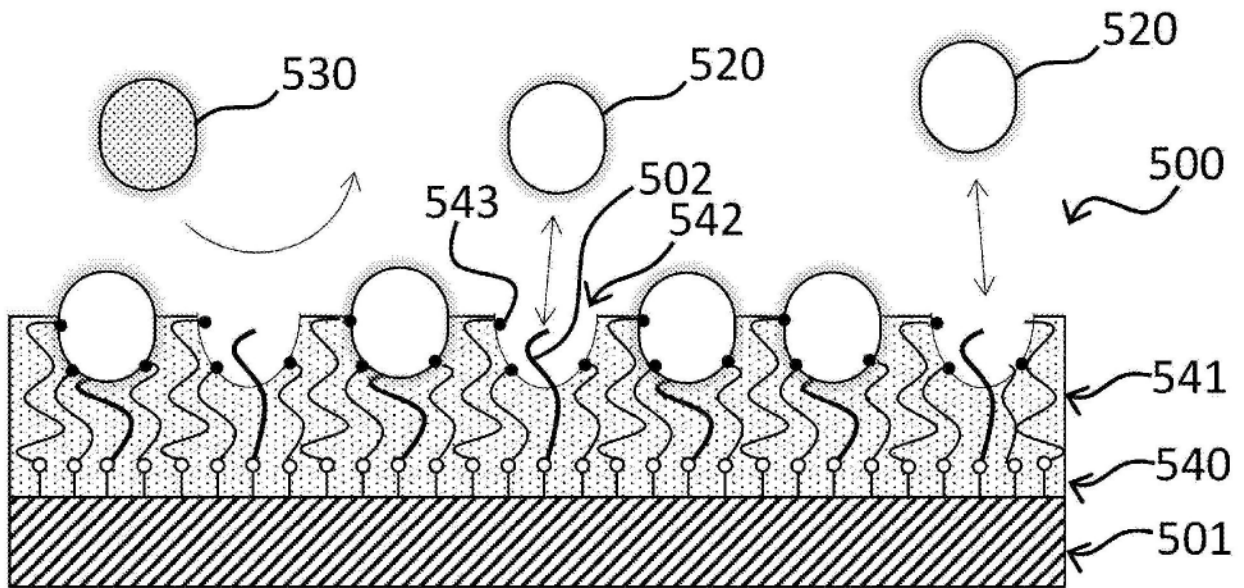


图7

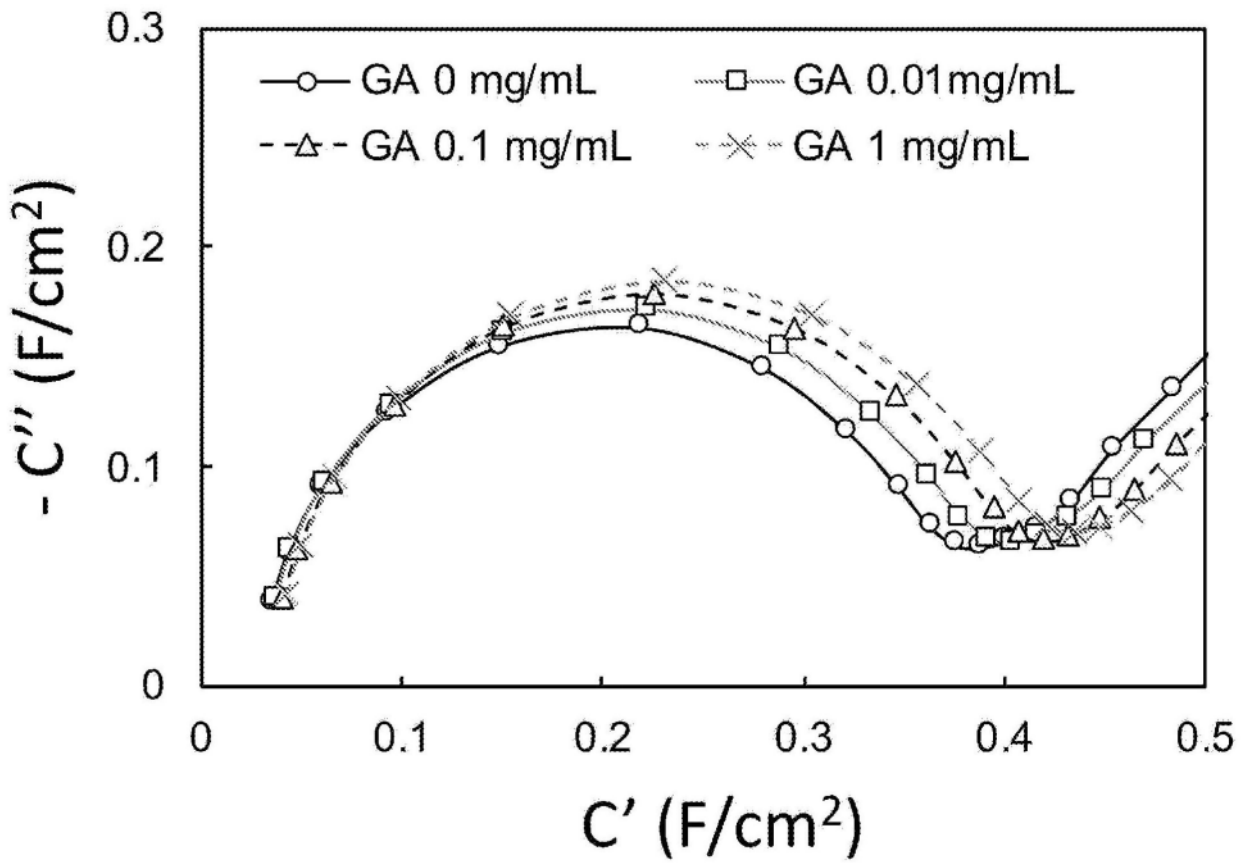


图8A

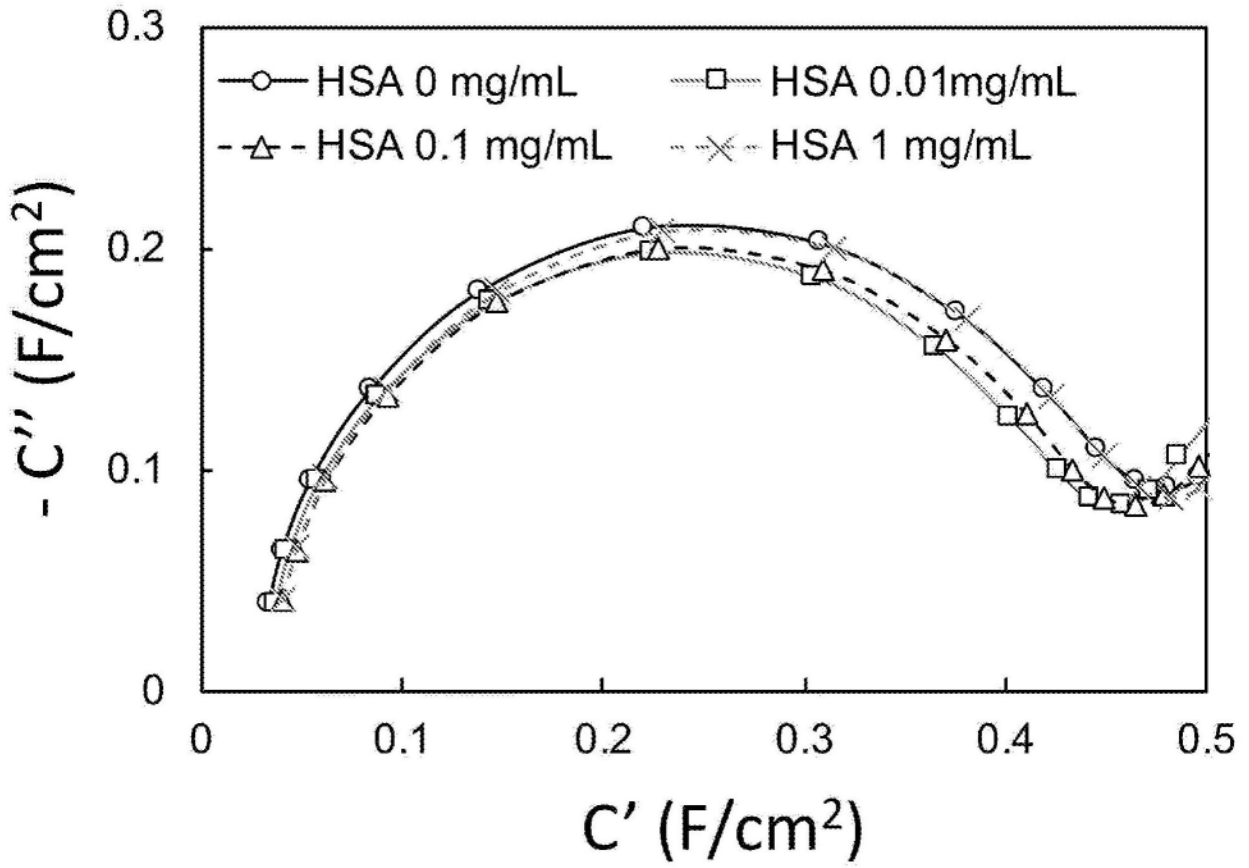


图8B

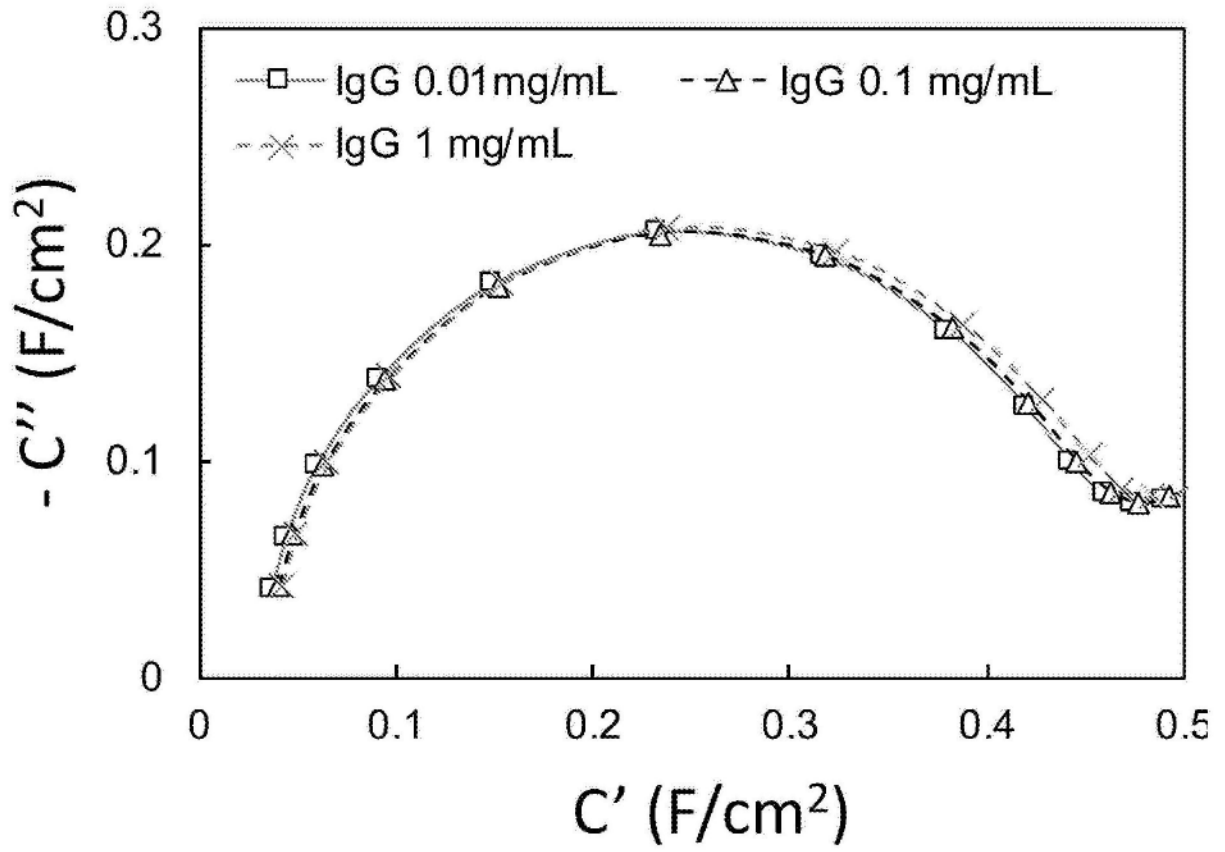


图8C

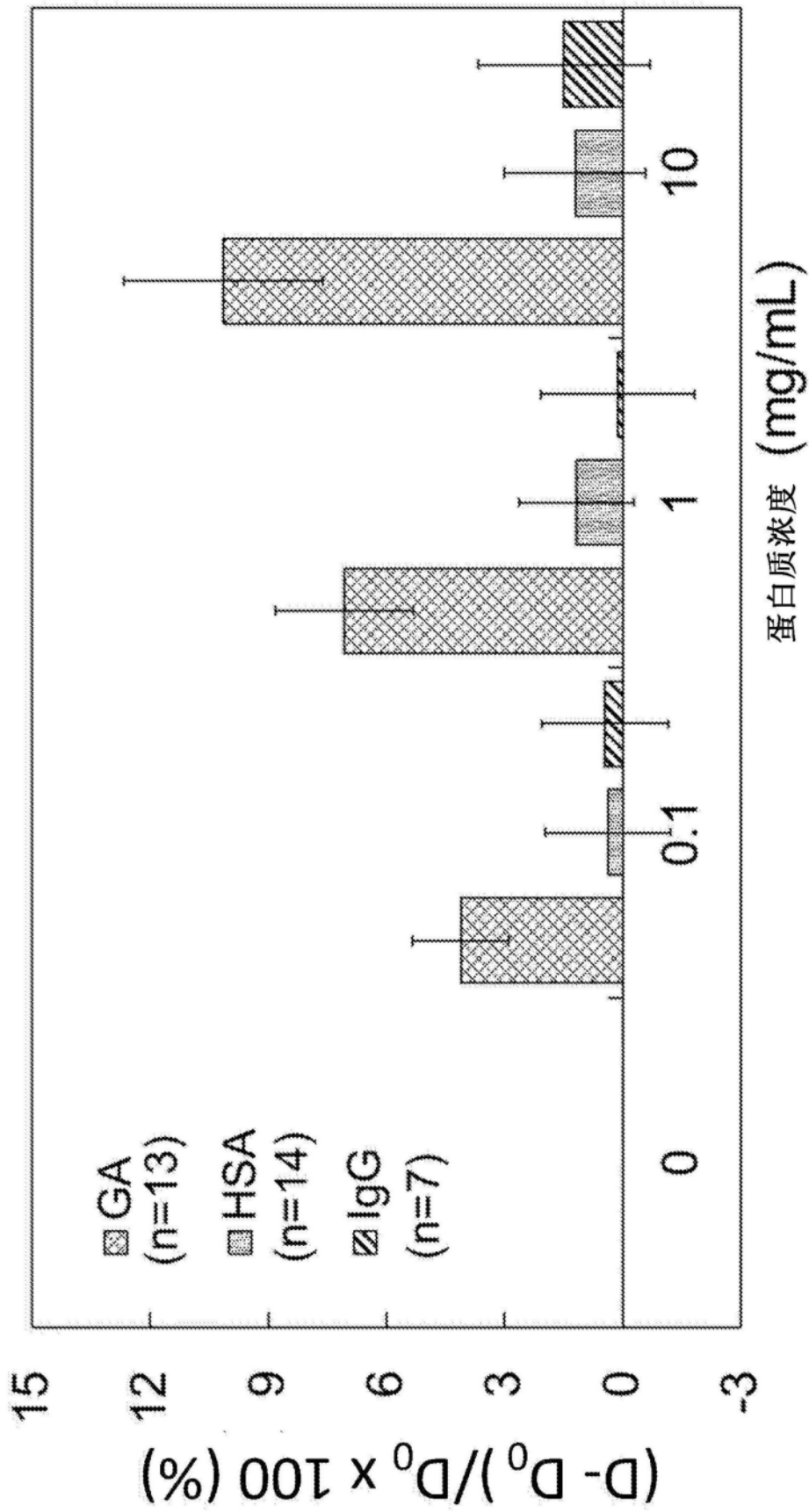


图9

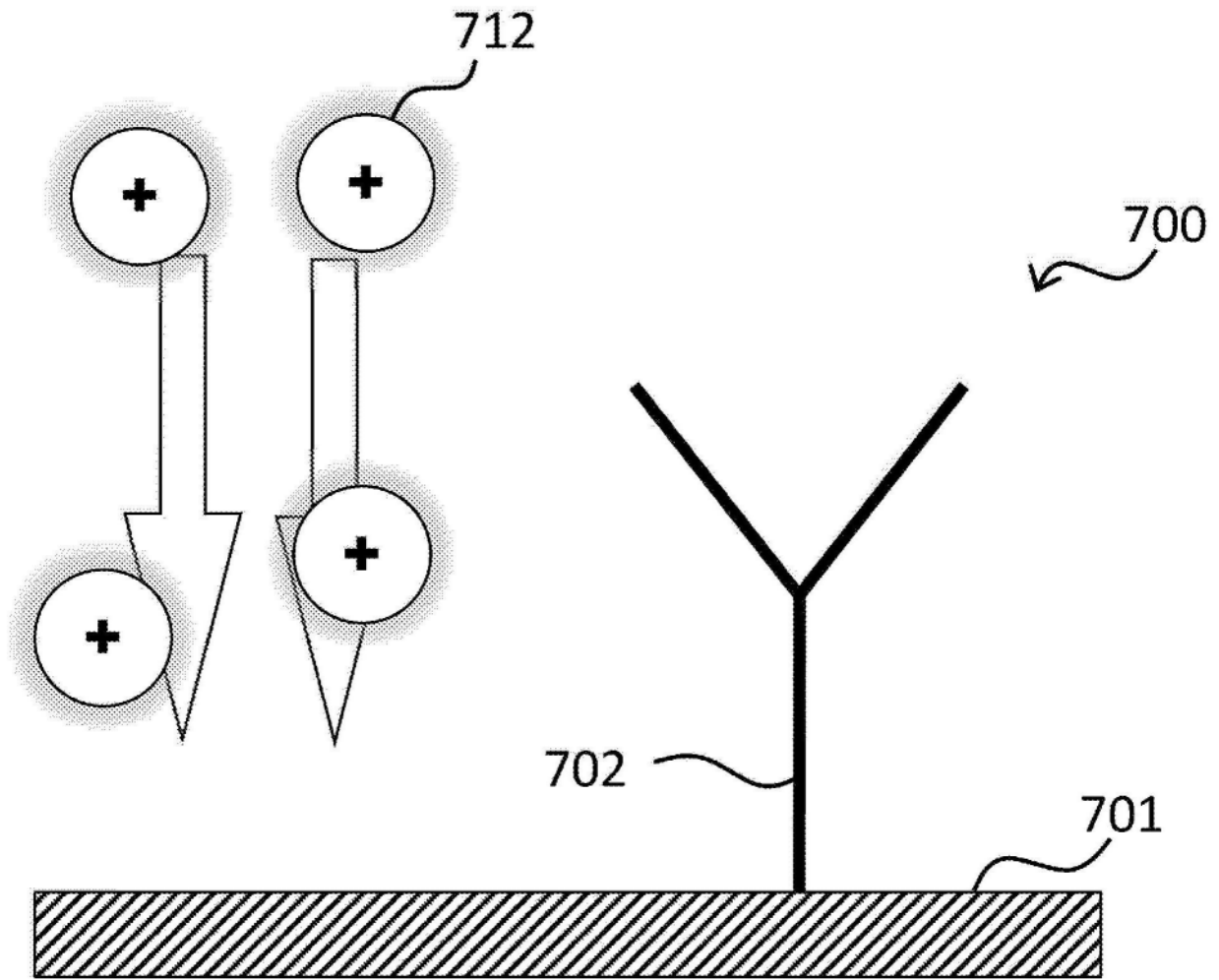


图10A

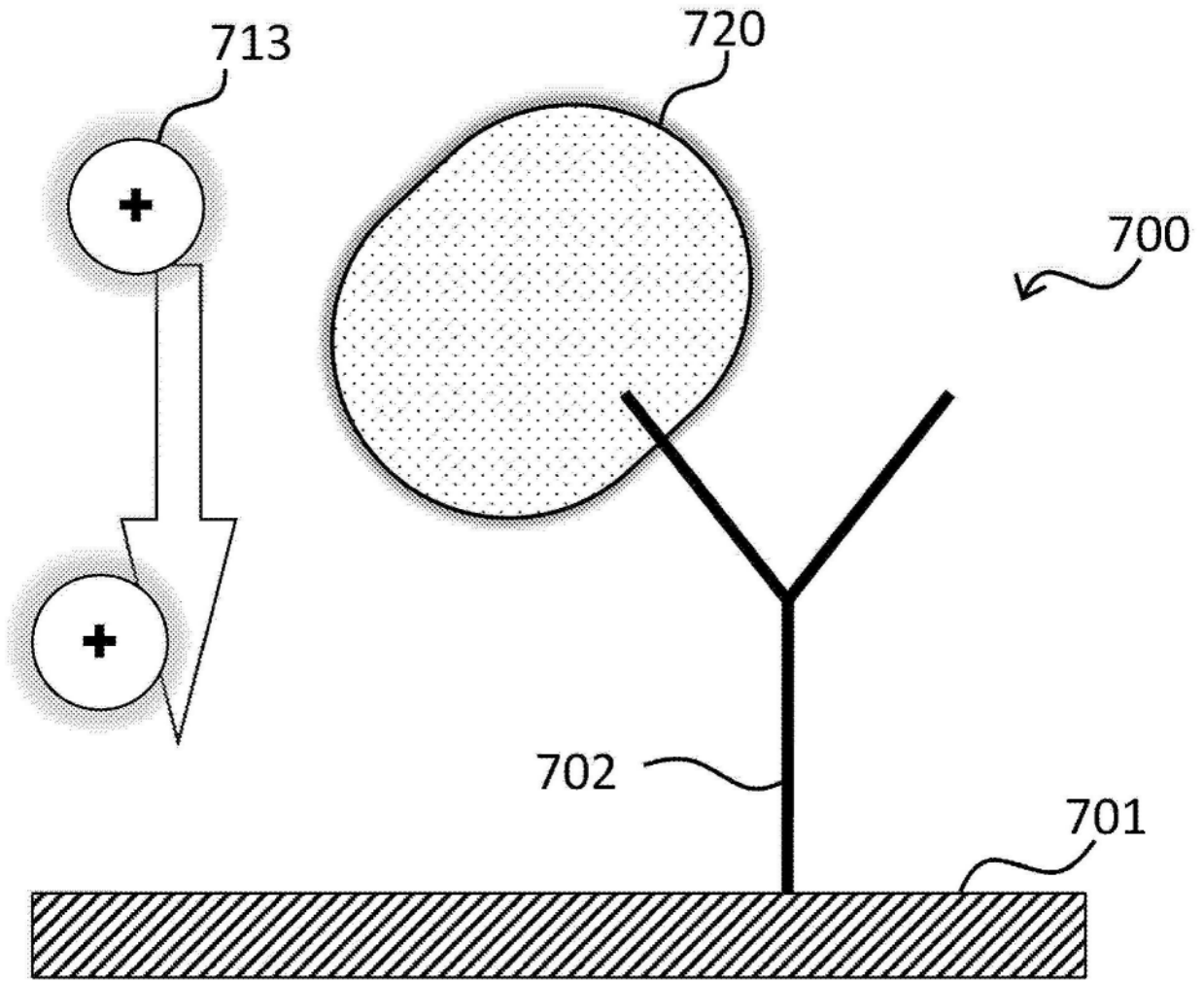


图10B

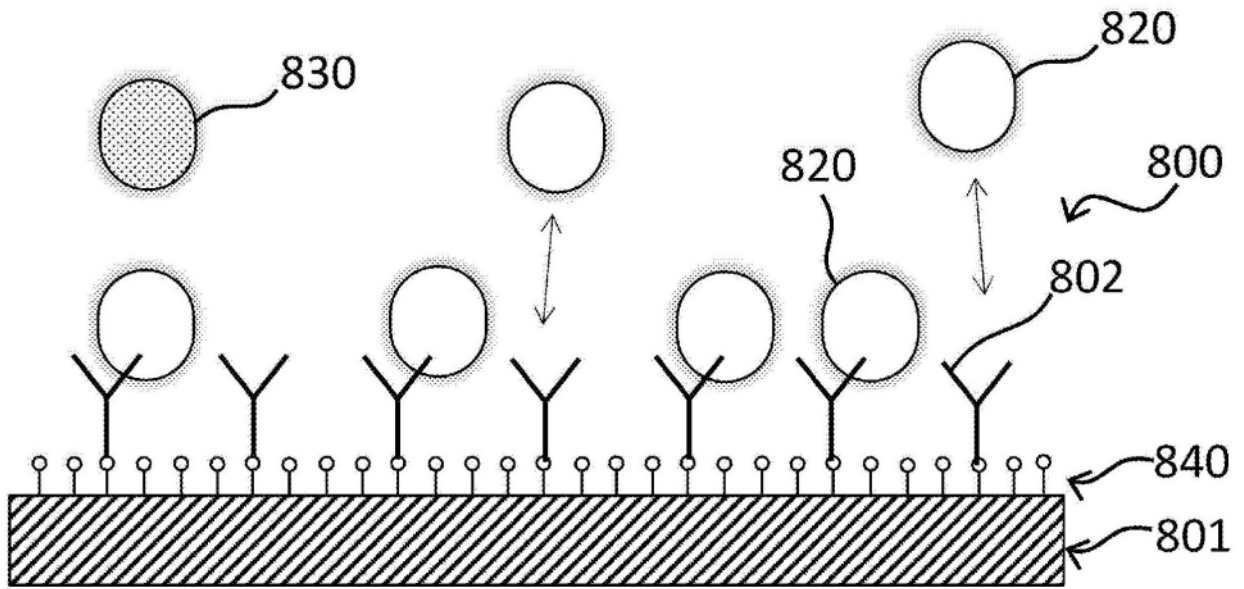


图11A

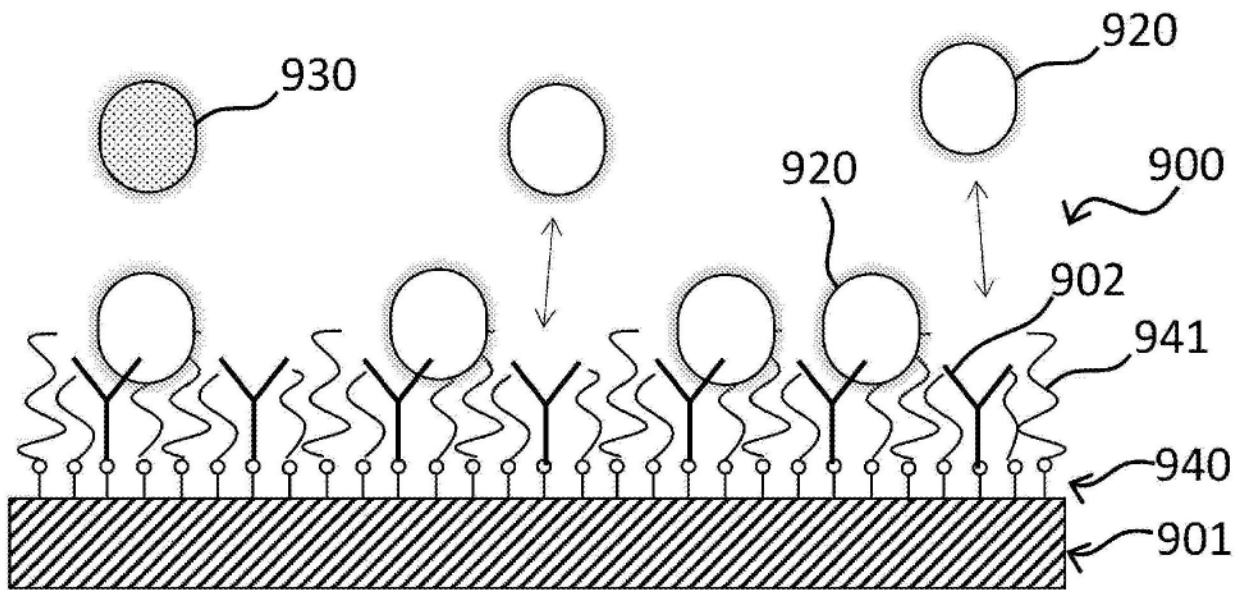


图11B

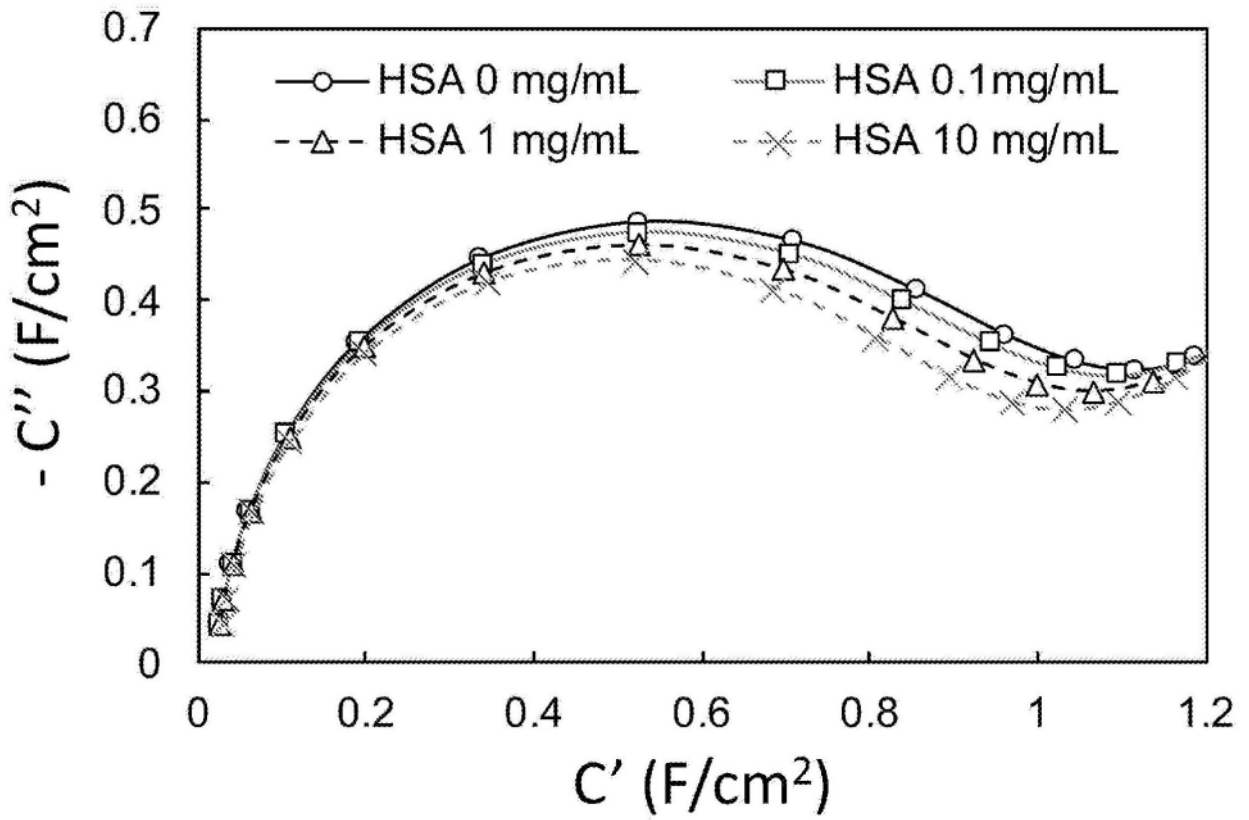


图12A

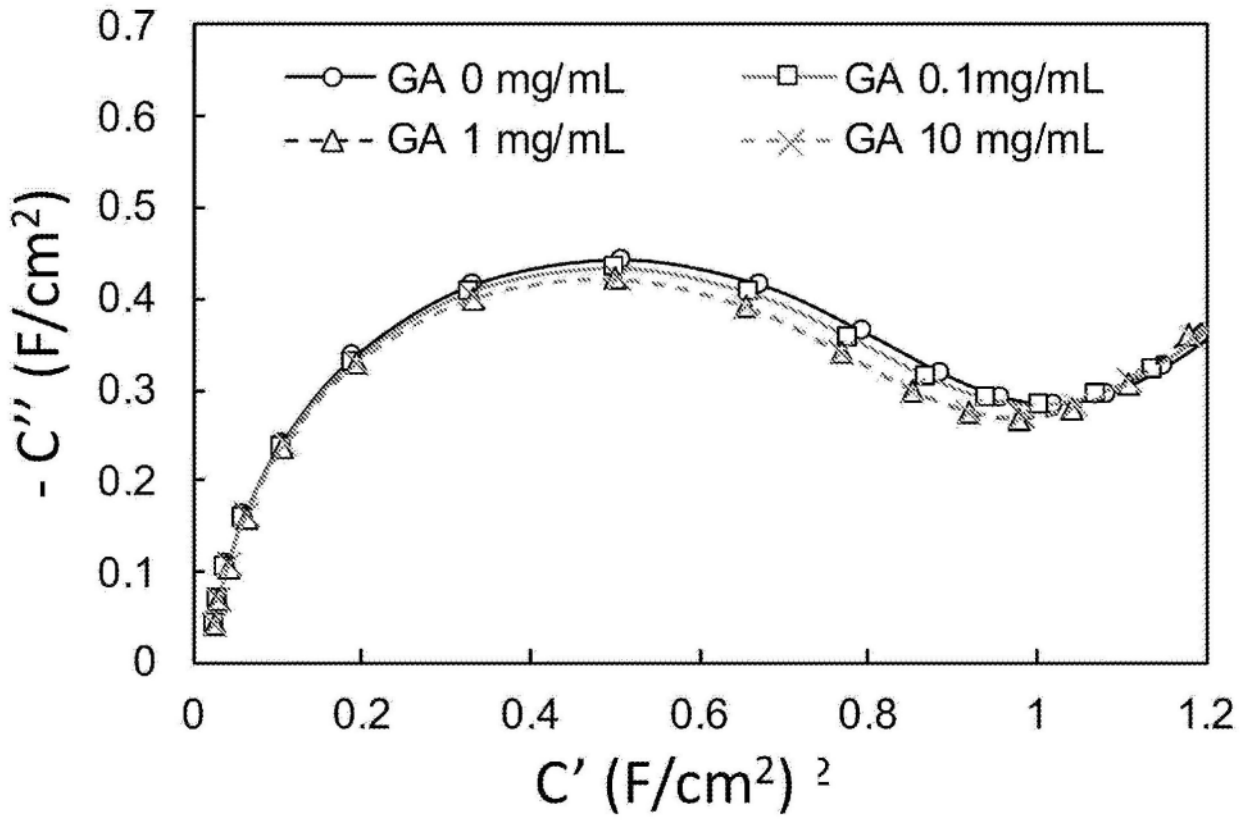


图12B

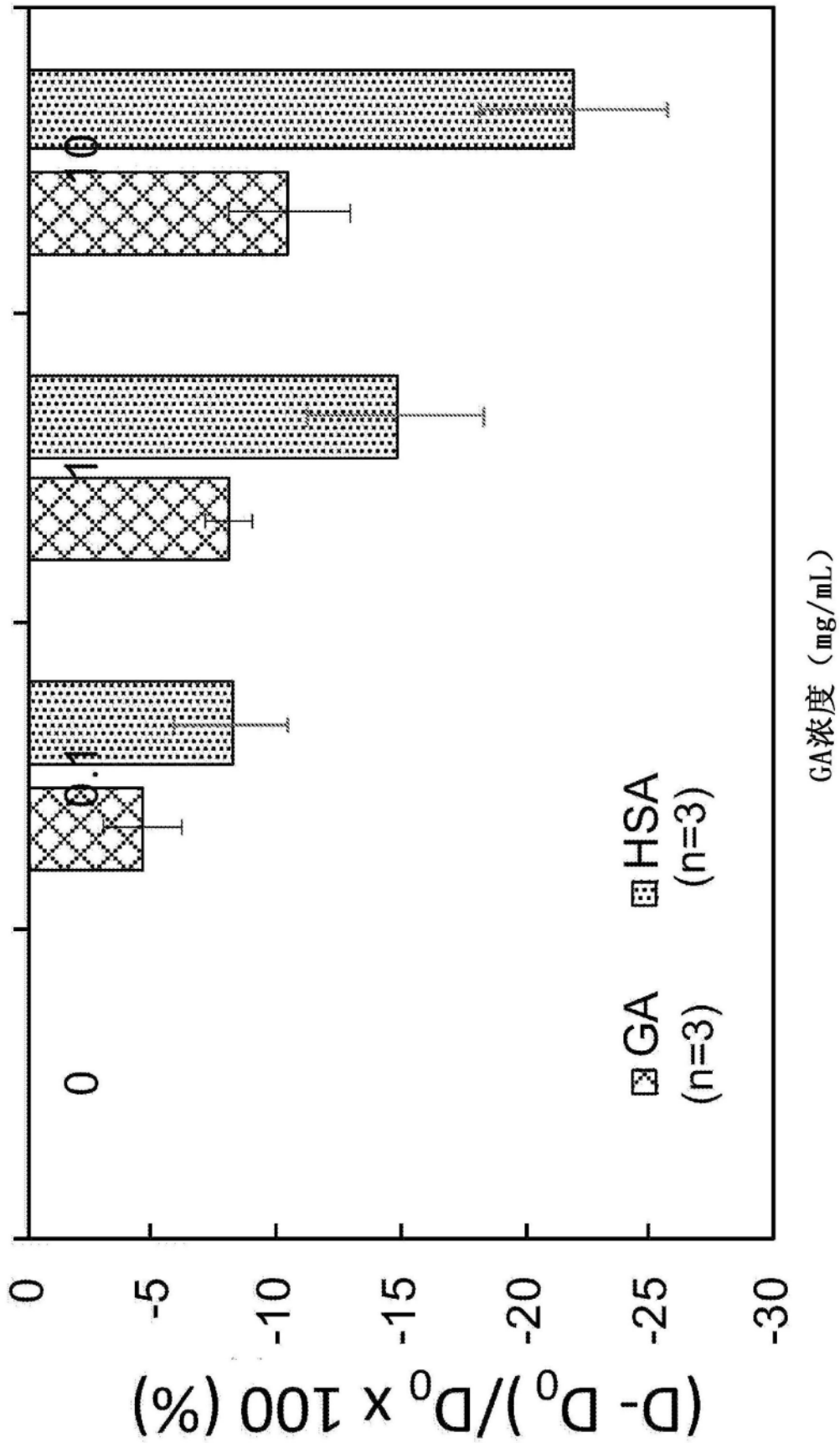


图13

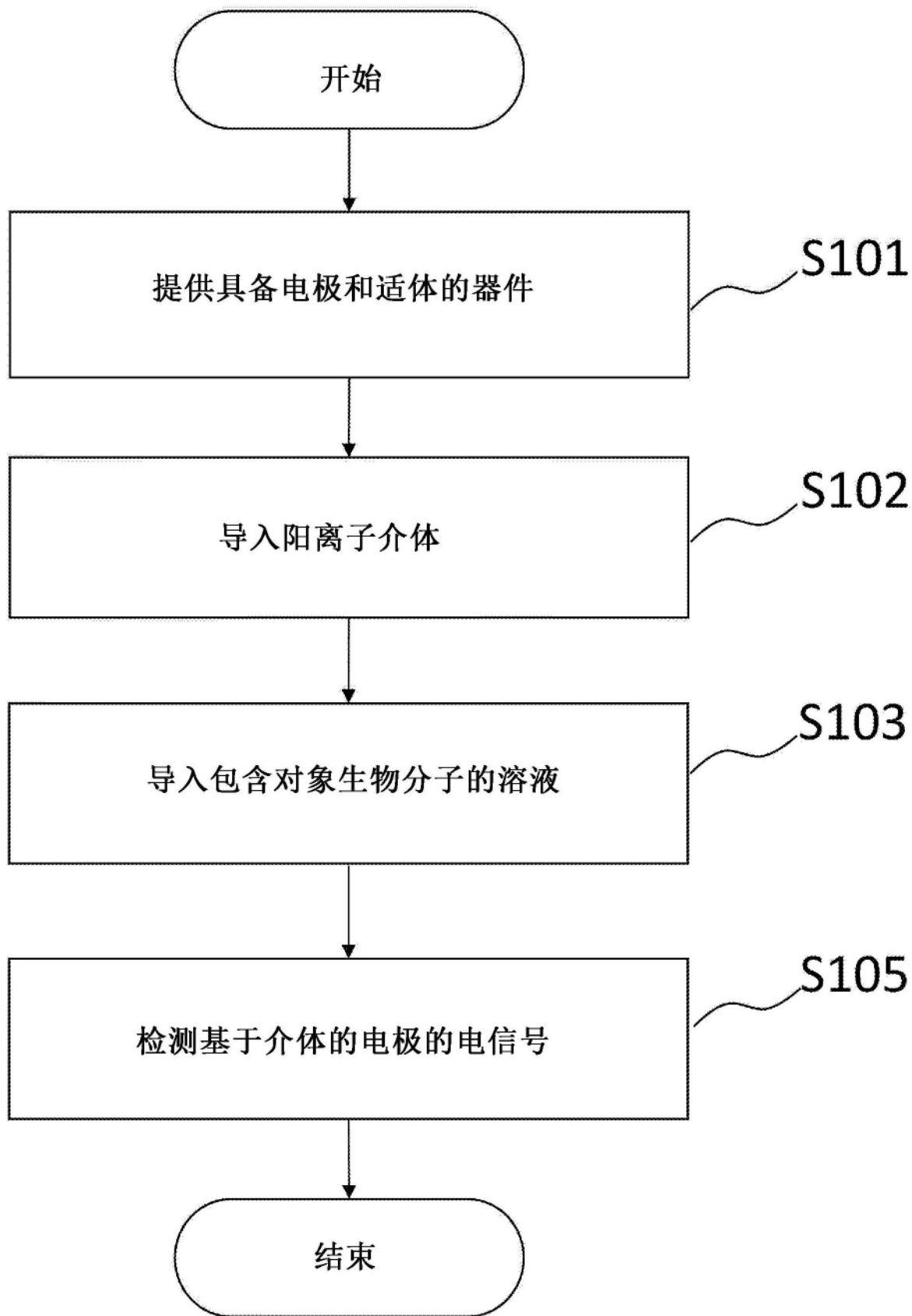


图14

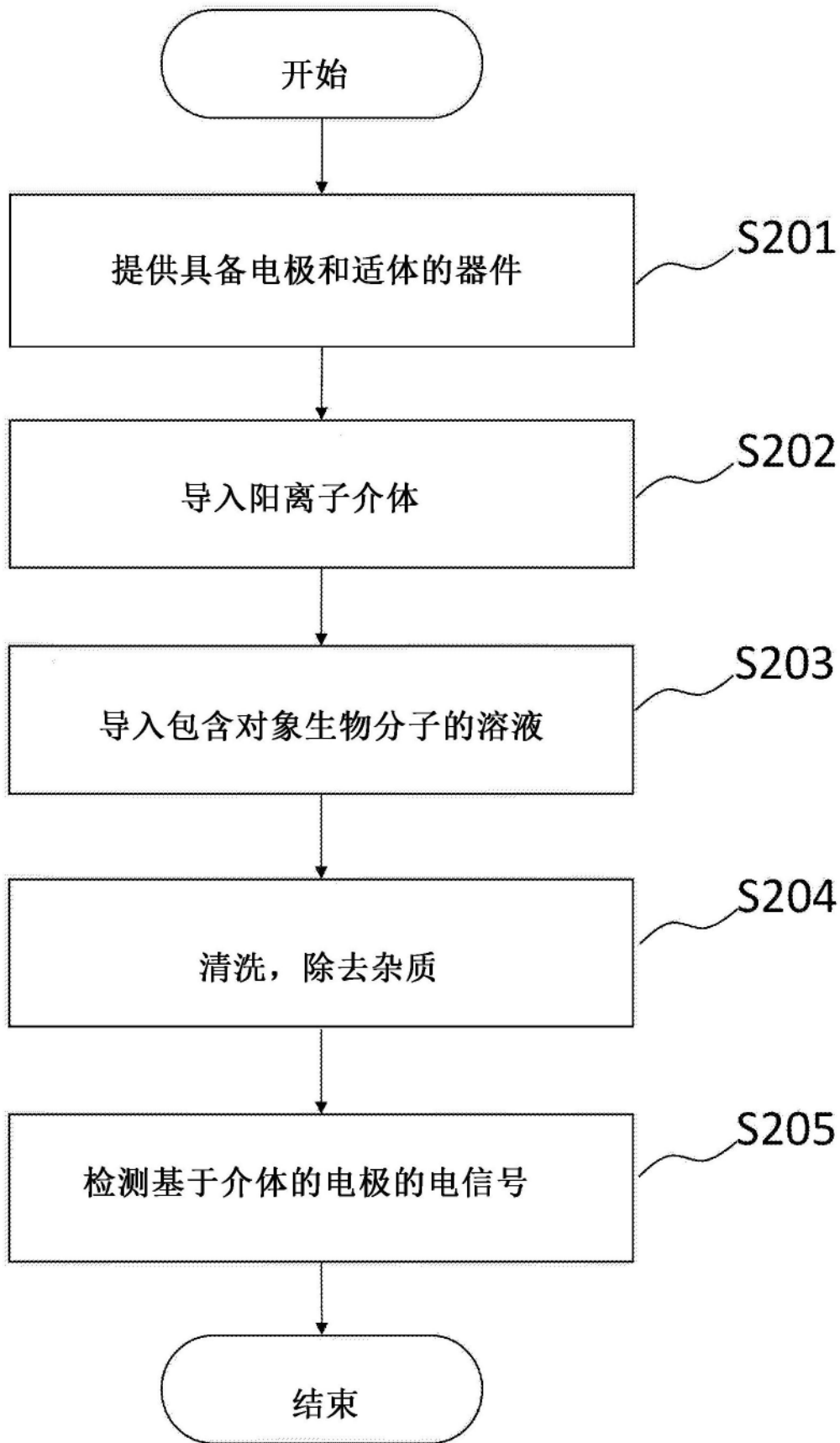


图15