

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93130845

※申請日期：93.10.12

※IPC 分類：

C07F3/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

Gold 33/58 (2006.01)

表面電漿共振測定方法以及該方法所使用之貴金屬化合物

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

納德研究所股份有限公司/KABUSHIKI KAISHA NARD KENKYUSHO

代表人：(中文/英文) 南則雄

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國兵庫縣尼崎市西長洲町2丁目6番1號

國籍：(中文/英文) 日本/JAPAN

三、發明人：(共 4 人)

姓名：(中文/英文)

1. 小池透/KOIKE, TOHRU

2. 川崎昭彦/KAWASAKI, AKIHIKO

3. 小橋達弘/KOBASHI, TATSUHIRO

4. 高萩誠/TAKAHAGI, MAKOTO

國籍：(中文/英文)

1. 日本/JAPAN

2. 日本/JAPAN

3. 日本/JAPAN

4. 日本/JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本、2003/10/16、2003-356934

2. 日本、2004/02/20、2004-044035

3. 日本、2004/03/29、2004-094160

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於表面電漿共振測定方法以及該方法所使用之貴金屬化合物。

【先前技術】

某些生物體內的酵素，以其活性中心或異位調節部位為代表的特定部位含有絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸等殘基，藉由名為激酶的酵素進行磷酸化或去磷酸化該類殘基上的羥基而得以調節酵素的活性。再者，亦有某些酵素其活性是藉由離胺酸、精胺酸、組胺酸的胺基或亞胺基，或天門冬胺酸、穀胺酸的羧基被磷酸化(或去磷酸化)而受到調節。

此種藉由磷酸化-去磷酸化所調節的代謝機制，其中最為人熟知的便是肝醣的合成抑制及其分解機制。此代謝機制主要便是利用磷酸化-去磷酸化來調節及控制整個反應梯瀑(cascade)。

並且近年來，磷酸化-去磷酸化在疾病相關的代謝機制中扮演重要的角色一事係逐漸被明瞭。

以細胞的癌化為例，磷酸化-去磷酸化的異常被認為是原因之一。亦即，細胞週期的進行或停止是藉由多種酵素(蛋白質)的磷酸化(或去磷酸化)而控制，該磷酸化(或去磷酸化)過程中有週期蛋白與週期蛋白依賴型激酶(CDK)的參與，一旦機轉損壞便會導致磷酸化(或去磷酸化)產生混亂，結果引發細胞異常增生。

其他包括蛋白激酶 C 與造成異位性皮膚炎或花粉症等過敏疾病的原因與組織胺顆粒釋出有關，或是阿茲海默症患者腦部所發生的神經原纖維病變係由磷酸化的 T 型蛋白質 (tau protein) 所引起等亦逐漸明瞭。

有鑑於此，掌握蛋白質的磷酸化-去磷酸化的狀況，不僅有助於生物體組織細胞的基因表現探索或酵素活性評估，對於疾病的診斷或治療亦可能有所助益。

然而，目前所使用之蛋白質磷酸化(亦或蛋白質去磷酸化)的鑑定方法中尚有許多的缺點待克服。

以酵素免疫分析法為例，雖然其優點在於即使微量的對象蛋白質樣本仍可進行分析，不過要得到足夠量的必要抗體卻很困難。另外，當對象蛋白質分子量在數千道爾頓 (kDa) 以下時，則無法製備和蛋白質磷酸化部位結合的抗體。

另外，可考慮使用放射性同位素 ^{32}P 標識的磷酸檢測其與蛋白質間的特異性結合，然而，除了放射性同位素的操作必須相當注意以外，廢液的管理或處理也須符合相關規定的要求。

再者，由於磷酸化蛋白質和去磷酸化蛋白質的電性差異，亦可考慮應用二維電泳。然而，尤其當分析生物樣本的時候，因樣本中含有多種蛋白質，要確認特定的蛋白質點極為困難。此外，若是為了鑑定這些點而使用放射性同位素，又會遭遇前述的問題。

除上述磷酸化(或去磷酸化)蛋白質的鑑定技術以外，

表面電漿共振(又譯表面等離子共振，Surface Plasmon Resonance，下稱 SPR)的應用技術被開發為一般用來探索與特定化合物(配體等)專一結合之化合物(蛋白質等)的方式(參考第 1 圖)。關於此技術的詳細說明如下所述。

當光波於折射率不同的物質界面間發生全反射之際，會於全反射表面產生一道所謂“漸逝波”之光波。另外，於金屬表面上會產生一種發生於金屬層-介電層之界面、名為表面電漿波的電子疏密波。當調節入射光的角度使漸逝波與表面電漿波的相速一致而激發共振時，即可能大幅增加金屬表面的電磁場。此時，入射光的能量轉換成激發態的表面電漿能量，因而反射光的強度便減弱。

發生此種光吸收現象的入射角以及入射光的波長，會極為敏銳地隨著特別是在數百奈米(nm)以內的金屬表面狀態而變化。亦即，根據金屬表面上化合物的有無之類的狀態變化，可以敏銳的反應在反射光的強度，因此，若於金屬表面上結合配體等物質後，加入待測樣本使其作用，根據待測樣本中是否存在與配體相互作用的化合物，其反射光的強度會有所不同。因此，正如第 1 圖所示，在使金屬表面攜帶有配體等物質，進而比較加入待測樣本與未加待測樣本的反射光的強度，便能判斷是否存在會與配體等發生作用的化合物。該技術更可進一步應用於生物成像領域，即，在細胞或生物組織中，可能得以捕捉到與特定化合物發生相互作用之化合物的位置影像。

此等技術的例子有，如特表平 11-512186 號專利公報

所揭露之技術。根據該公報所記載，如第 1 圖所示，對貴金屬膜連續加入操作緩衝液(running buffer)-->待測樣本-->操作緩衝液使其作用，SPR 所觀測到的入射角隨時間變化之關係如第 2 圖所示。並且該技術可以測定該變化，求得反射率的最小值和最大值或折射率和時間的關係，根據前述關係而可推知貴金屬表面所攜帶的化合物與待測樣本中的化合物的解離常數或結合常數，以及樣本中化合物的濃度。

再者，於特表平 10-505910 號專利公報中，揭示 N-(5-胺基-1-羧戊基)亞胺基二乙酸藉由羧甲基化葡聚糖與貴金屬膜結合，之後再以鎳離子配位錯合物進行 SPR 測定之技術。由於該鎳錯合物對於含有兩個相鄰組胺酸殘基的胜肽表現出專一的親和性，因而被稱為 His 標籤(His-tag)，其可以從待測樣本中檢測出帶有兩個組胺酸殘基的胜肽。

另外，表面電漿共振的測定方法亦可考慮應用拉曼分光法。拉曼分光法其原理為利用一固定頻率(ν_0)的單色光照射物質後產生的散射光中，藉由偵測相同頻率以外 ($\nu_0 \pm \nu_i$) 的散射光(拉曼散射光)便可了解化合物的性質。更明確地說，由於該拉曼頻率 ν_i 與組成物質的分子或結晶其振動或旋轉能階差的頻率相等，因此可作為決定、鑑定與定量物質能階的情報來源(參考「化學大辭典」，東京化學同人出版)。

不過，由於拉曼散射光非常微弱，一直以來，表面電漿共振必須經過訊號放大才得以被偵測(例如，特開平

9-257578 號專利案)。也就是，一般而言，雖然光波和電子波(電漿波)並不會產生耦合，不過在金屬粒子表面卻會產生耦合。所以該技術便將待測樣本接近金屬，如此便可將增加微弱拉曼鍵的強度。

然而，利用該習知技術增強拉曼鍵，並非總是能達到令人滿意的效果，其原因在於，雖然表面電漿共振效果在標的分子與金屬的距離越近時效果越佳，但是正如特開平 9-257578 號專利案的第 1 圖所示，即使使基板(金屬)2 與樣本 3 接近，也並非所有的標的分子均能與金屬接觸。即使將金屬加入水溶液樣本中也是同樣的情況。

另外，於 Hironori Taketa 等人所發表之 RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, vol. 17, Issue 18, pp.2075-2081(2003 年)提及關於使用與磷酸基(磷酸單酯基團)專一結合的化合物，以求得磷酸化化合物分子量的方法。然於該文獻中，並未記載或教示將該專一結合的化合物及標的分子與金屬接近，或將該化合物應用在表面電漿共振測定的想法。

【發明內容】

有鑑於習知技術之不足，本發明欲克服之問題及目的在於，發展出一套可檢測出待測樣本中的磷酸化胜肽(蛋白質)、或是判斷該胜肽是否磷酸化之表面電漿共振方法，以及提供一種能夠用於該方法的貴金屬化合物，其表面擁有對磷酸單酯基團具專一性且具強大配位能力的取代基

(3)由於含有容易與金等貴金屬化合物表面結合的硫醇基或雙硫基的分子，因而得以高密度地導入取代基至貴金屬化合物表面。

本發明方法之測定原理係如前述第 1 圖及第 2 圖所示，以下將針對該 SPR 測定裝置作具體說明。如第 1 圖所示，當調整光線的入射角，使其射入稜鏡至金屬膜產生全反射，產生 SPR 使得反射光的強度變弱。由於此時入射角的角度會敏銳地隨著貴金屬膜表面所結合的化合物量，即質量變化，而有所改變，所以前述 SPR 測定裝置便可根據反射光的強度而將該質量變化以共振單位(resonance unit, $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$)的數據資料來表示。

因此，於貴金屬膜上導入對於磷酸化胜肽具有專一結合能力的取代基之後，使待測樣本與其作用並取得數據，將該數據與恆常狀態的數據作比較，即可得知待測樣本中是否含有磷酸化胜肽或其存在量。

本發明第 2 方法係可直接使用習用的拉曼分光法測定裝置操作，唯一不同的是，使待測樣本與本發明之貴金屬化合物(貴金屬粒子)作用。其結果發現，相較於無使用本發明之貴金屬化合物，使用本發明之貴金屬化合物，由於磷酸化胜肽和貴金屬化合物的結合，磷酸化胜肽的波峰不僅產生位移，更因為表面電漿共振的效果，使得訊號也增強了。因此，與無使用本發明之貴金屬化合物的拉曼光譜一比較，便能判斷胜肽是否磷酸化。

本發明之第 2 方法中，為使本發明的貴金屬化合物與

基(-NHC(=S)NH-)、生物素與抗生蛋白鏈菌素的結合體、生物素與卵白素的結合體；一端帶有下列基團的糖鏈，其中該基團可選自下列群組包括氨基、醚基、硫醚基、羰基、亞硫醯基、酯基、醯胺基、尿素基、硫脲基；以及一端帶有下列基團的 C1~C6 烯烴基，其中該基團可選自下列群組包括胺基(-NH-)、醚基(-O-)、硫醚基(-S-)、羰基(-C(=O)-)、亞硫醯基(-C(=S)-)、酯基、醯胺基、尿素基(-NHC(=O)NH-)、硫脲基(-NHC(=S)NH-)、生物素與抗生蛋白鏈菌素的結合體、生物素與卵白素的結合體；二端各帶有下列相同或不同基團的 C1~C6 烯烴基，其中該基團係選自下列群組包括氨基、醚基、硫醚基、羰基、亞硫醯基、酯基、醯胺基、尿素基、硫脲基；以及自前述基團群組中選擇 2 個以上的基團以直鏈結合形成之基團。

連結基上與貴金屬結合的一端較佳為硫醚基。該貴金屬化合物可利用硫醇化合物或雙硫化合物輕易地製得。

本發明中所述之「糖鏈」可為一般直鏈或支鏈連結的糖類，例如，D-葡萄糖藉由葡萄糖苷鍵結聚合的葡聚糖，當加入糖鏈，連結基除了上述的作用之外，由於親水性高使得與生物樣本的親和力佳，再者，由於容易合成分枝鏈狀，比起取代基(I)之主要骨架具有更容易產生結合的優點。

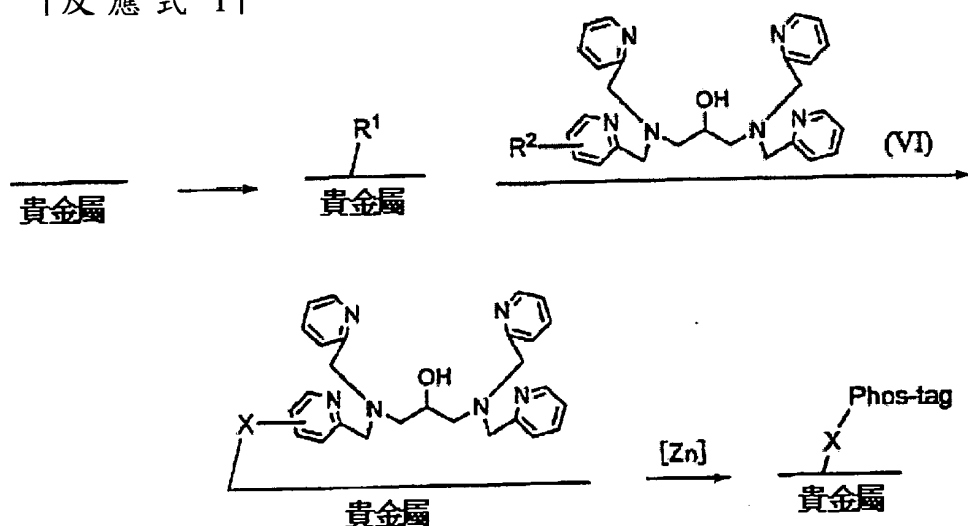
文中所述之「C1~C6 烯烴基」可為碳數 1~6 的直鏈或支鏈的二價脂肪烴，例如，甲烯、乙烯、丙烯、四甲烯、六甲烯、甲基乙烯、甲基丙烯、二甲基丙烯等，其中較佳為 C1~C4 烯烴基，更佳為 C1~C2 烯烴基。

金屬化合物的形狀較佳為粒子狀。為了和溶解或分散於待測樣本中的磷酸化胜肽結合，本發明的貴金屬化合物必須分散於待測樣本中。另外，該貴金屬化合物的平均粒徑範圍較佳介於 30~50 奈米之間。當不滿 30 奈米時，可能導致無法充分增加拉曼散射光的強度，又當超過 50 奈米時，可能有粒子過度聚集的疑慮產生。不過由於該範圍表示平均粒徑，因此即使有超出該範圍的粒子存在亦無妨。

關於平均粒徑的測量雖然並無特別限制，不過由於測定對象的粒徑範圍介於數奈米至數十奈米之間，因此可利用適合測定微粒子粒徑的雷射散射法，可藉由適用雷射散射法的裝置(雷射散射光度計)先測定粒徑分布後，再計算出平均粒徑。

本發明之貴金屬化合物，係可藉由包括反應式 1 為特徵之方法輕易地製造，但其製造方法並不受限於下述說明。

[反應式 1]



[式中，X 代表前述連結基， R^1 及 R^2 代表形成貴金屬膜表面 -X-Phostag 基團之反應性基團]

前述反應式 1 中，首先將形成貴金屬膜表面 -X-Phostag 基團之反應性基團的 R^1 置換至貴金屬上，於此，反應性基團 R^1 和貴金屬結合的種類並不需要特別明定。例如，已知硫醇化合物或雙硫化合物會自發地吸附於貴金屬表面，形成所謂自行組裝之單分子膜，因而，當反應性基團 R^1 和貴金屬經由硫原子而結合時，上述反應式中的貴金屬和硫原子的種類並無需特別限制，不論是藉由何種相互作用，只要達到結合的目的即可。

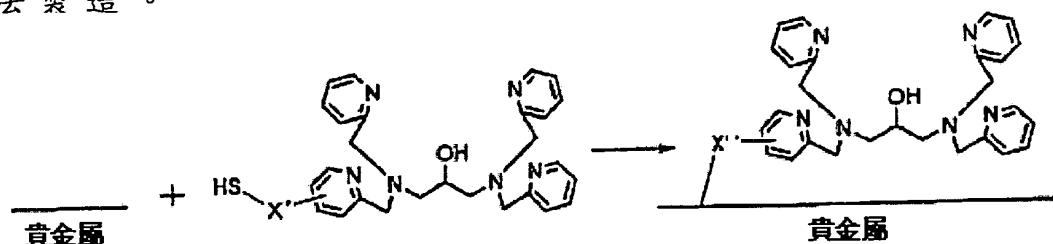
進行反應性基團 R^1 置換的貴金屬，當最終目標物為貴金屬膜時，可將原料貴金屬延展成適當的厚度後，裁成適用於 SPR 測定裝置的形狀。當為粒子時，可利用合適的習知金屬粒子製造方法製造後，以合適孔徑的濾膜篩去粒徑過大或過小的粒子以獲得所欲粒徑大小的粒子。

於上述反應式 1 中，藉由硫原子使得反應性基團的 R^1 能結合至貴金屬表面時，由於已知硫醇化合物(例如， R^1 -SH)極易與貴金屬進行反應，因此可以根據習知方法的反應條件進行，例如，只要使貴金屬表面和硫醇化合物溶液接觸，可以使兩者產生縮合反應。

接著，為形成連結基 X 與 phostag 前驅物結合，使用帶有取代基 R^2 的四(吡啶-2-基甲基)-1, 3-二氨基丙烷 2-醇(tetrakis (pyridine-2-ylmethyl)-1, 3-diaminopropane-2-ol)的衍生物(化合物(VI))進行反應。於上述反應式 1 使 R^1 和 R^2 反應的過程中， R^1 和 R^2 的種類或溶劑、反應溫度、其他試劑、純化方法等，主要係根據 X 的種類來決定。舉例

而言，利用使 R^1 和 R^2 形成醯胺鍵結結合成 X 時， R^1 和 R^2 的組合中可以是末端有胺基(一級胺)的基團以及活化羧基的組合。其一般反應條件係可適用有機合成化學領域的一般反應條件。如此，即可得到表面帶有取代基(VII)的貴金屬化合物。

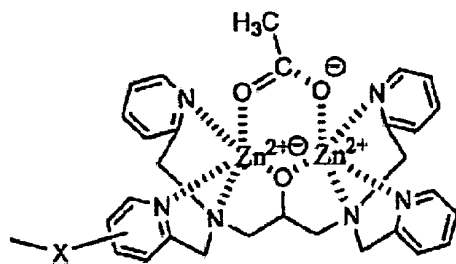
再者，表面有取代基(VII)的貴金屬化合物可利用下述方法製造。



[式中，X''表示前述連結基中和貴金屬連結的一端為硫原子，X'表示 X''中末端除了硫原子以外的部分，(不過當 X''為硫原子時，X'便僅表示兩者的結合)]

如同前述，由於硫醇化合物與貴金屬極易反應，利用和末端帶有硫醇基的基團置換，產生四(吡啶-2-基甲基)-1,3-二氨基丙烷 2-醇之衍生物，再與貴金屬反應，便可合成表面帶有 phoatag 的貴金屬化合物之前驅物。

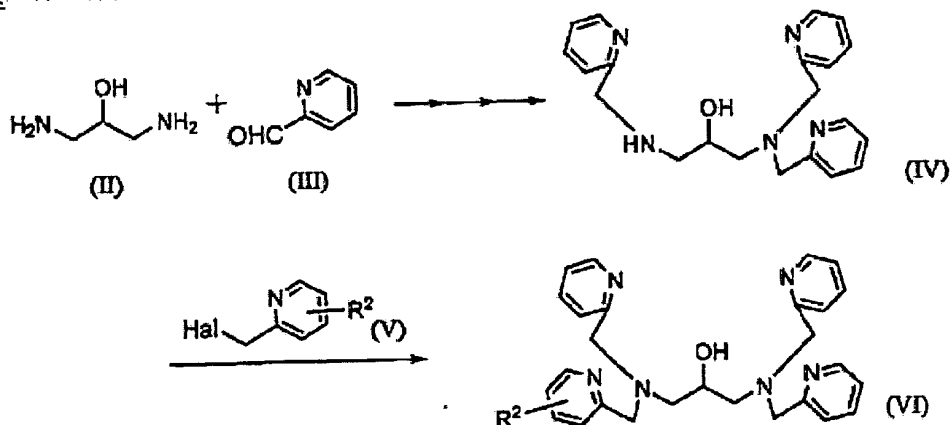
最後，加入金屬鹽至帶有取代基(VII)的貴金屬化合物中，即可形成表面帶有 phoatag 的貴金屬化合物。例如，可加入硝酸鋅(II)或醋酸鋅(II)，不過當添加醋酸鋅(II)時，一旦醋酸配位後便會形成下列化合物。



該化合物較取代基(I)來得更為安定所以方便保存，並且由於其和取代基(I)為等價物，因此和取代基(I)具相同功用。亦即，當進行 SPR 測定時，由於磷酸單酯基團可和醋酸進行配位交換，因此亦可用來檢測磷酸化的胜肽。

於上述反應式 1 中，用於將 phostag 結合至貴金屬的原料化合物(化合物(VI))係可藉由下述反應式 2 製造。

[反應式 2]



[式中， R^2 係如同前述，另外“Hal”表示鹵素原子，較佳為溴原子]

作為原料化合物的化合物(II)(1, 3-二氨基-2-丙醇)可購自市面，另外，化合物(III)及化合物(IV)由於結構較簡單，可購自市面或利用本技術領域所習知的方法合成。

於反應式 2 中，首先在催化劑存在下進行化合物(II)及(III)的縮合反應得到化合物(IV)。該反應可分段逐步導入

化合物(III)，亦可於一次使用三當量以上的化合物(III)得到化合物(IV)。

於反應式 2 中，縮合反應為還原的氯化反應，所使用的溶劑只要能溶解化合物(II)及(III)且不影響反應，其種類並無特別限制，例如，甲醇、乙醇、異丙醇等醇類；乙醚、四氫呋喃、二氧己環等醚類；水；或前述各溶劑的混合等均可使用。

還原的氯化反應中，首先可將化合物(II)及(III)在催化劑濃鹽酸的存在下進行縮合後，再利用一般的還原試劑進行還原。

反應溫度及反應時間係可根據原料化合物的種類採用合適的反應條件，例如，於 20~80°C 反應 12~100 小時。

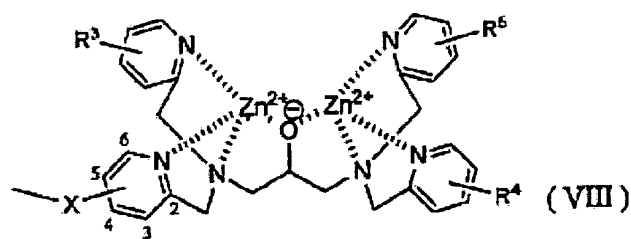
反應結束後，減壓蒸餾去除溶劑後加入水，以非水溶性溶劑萃取，將有機相以無水硫酸鎂等乾燥後，減壓蒸餾去除溶劑。其後，將殘渣利用矽膠管柱層析等習知方法進行純化，即可獲得化合物(IV)。

另外，化合物(IV)的合成方法並不限於反應式 2 所示，也可藉由，例如，使化合物(II)和鹵素化合物反應而合成化合物(IV)。

接著，可和化合物(V)進行反應而得到化合物(VI)，該反應可採用一般的三級胺合成反應。例如，在含有鹽類的溶劑中使其進行縮合反應。另外，於該步驟中，配合 R^2 的種類，可導入適當的保護基以及進行去保護。或者，也可將化合物(V)中的 R^2 取代以含有惰性取代基的化合物進行

該步驟，之後再藉由官能基轉換將該惰性取代基換成 R^2 以合成化合物(VI)。例如，可使用含有硝基的化合物做為惰性取代基，進行該反應步驟之後，再將硝基轉換成反應性基團的氨基。

本發明方法中可使用的取代基，除了取代基(I)外，也可使用下述的錯體化合物(VIII)。



[式中，X如同前述，另外 $R^3 \sim R^5$ 表示吡啶環上的第4或第6位置的電子供給取代基]

本發明方法所使用的取代基(VIII)，由於在適當位置導入電子供給取代基使得吡啶氮充分帶電，對於鋅具有優越的配位能力，不但易於製造也具安定性。其使用方法可參照取代基(I)。

以下揭露本發明之製造例及試驗例，以進一步詳細說明本發明，惟其不宜用於侷限本發明之範疇。

實施例

製造例 1 用於 SPR 分析的 phostag 感應晶片之製造

將塗佈有羧甲基葡聚糖的感應晶片(BIOCORE 公司製造，Sensor Chip CM5)裝設於 SPR 測定裝置(BIOCORE 公司製造，BIOCORE J)之上。

操作緩衝液(running buffer)係使用成分含有

$5 \times 10^{-3} \%$ (v/v) Tween 20, 0.20 莫耳濃度 (M) 的硝酸鈉及 10 微莫耳濃度 (μM) 硝酸鋅的 10 毫莫耳濃度 (mM) HEPES (2-[4-(2-羥乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸-氫氧化鈉水溶液 (pH 7.4)。感應晶片的溫度設為 25°C ，以流速 30 微升/分 ($\mu\text{L}/\text{min}$) 注入操作緩衝液。當確認表面電漿共振值達到穩定後，注入作為羧基活化劑的 EDC (1-乙基-3,4-二甲氨基丙基碳二亞胺, 200 毫莫耳濃度 (mM)) 以及 NHS (N-羥基-丁二酸亞醯胺, 50 毫莫耳濃度) 的混合水溶液 6 分鐘，以活化感應晶片上的羧基。

接著，為使感應晶片帶有 phostag，加入 6 分鐘 N,N,N'-三(2-吡啶基甲基)-N'-[5-N''-(2-胺乙基)氮甲醯基-2-吡啶基甲基]-1,3-二氨基丙烷 2-醇的 50% (v/v) 乙腈溶液 (10 毫莫耳濃度)，之後再加入乙醇胺水溶液 (1.0 莫耳濃度) 6 分鐘以阻斷剩餘的活化羧基。

藉由以上操作便可製作出結合有 phostag 感應部的樣本流路 (flow cell A)。

比較製造例 1

於上述製造例 1 中，當製作樣本流路 A 的同時，另外製作一無結合 phostag 的參考部的樣本流路 (flow cell B)，除了略去使感應晶片帶有 phostag 的步驟以外，其他包括羧基的活化以及阻斷方式均與樣本流路 A 相同。

試驗例 1

分析的樣本係使用 (i) β -酪蛋白 (五磷酸化蛋白質, Sigma 公司)，(ii) 去磷酸化 β -酪蛋白，以及 (iii) 牛血清白

蛋白(BSA, New England BioLabs 公司)。去磷酸化 β -酪蛋白的製造係將 10 毫克/毫升(mg/mL)的 β -酪蛋白(50 微升)與取自馬鈴薯的酸性磷酸酶(Sigma 公司)以及 0.20 莫耳濃度的 MES-NaOH(pH 6.8, 50 微升)所形成的混合溶液於 38 °C 培養 12 小時而製得。將各樣本溶解於上述製造例 1 的操作緩衝液, 得到濃度為 1.5 微莫耳濃度的樣本溶液。

將前述樣本溶液進行 SPR 測定。具體而言, 分別注入各樣本溶液至依照上述製造例 1 及比較製造例 1 作成、並經過操作緩衝液安定後的樣本流路 A, B 中, 使其於溫度: 25°C、流速: 30 微升/分下結合 15 分鐘, 接著單獨注入操作緩衝液 15 分鐘使其解離。各樣本溶液測定後, 注入 25 毫莫耳濃度磷酸鉀-25 毫莫耳濃度磷酸二鈉水溶液(pH 6.86)6 分鐘, 0.20 莫耳濃度乙二胺四乙酸二鈉鹽水溶液(pH 7.4)6 分鐘, 再注入上述操作緩衝液 5 分鐘, 使感應晶片再度活化(去除殘餘的結合物)。

各樣本(i)~(iii)的測定結果分別如第 3~5 圖所示, 各樣本的測定結果中, 樣本流路 A 的 RU 值與樣本流路 B 的 RU 值的差異係表示於第 6 圖。根據第 4~6 圖的結果顯示, 樣本流路 A 和 B 的變化大致相同, 且去磷酸化的 β -酪蛋白及 BSA 並不會產生專一結合。另一方面, 根據第 3 和 6 圖的結果顯示, 磷酸化的 β -酪蛋白會和結合有 phostag 的感應部產生專一性結合(最大結合量:3150RU)。由此可證實利用本發明之方法能夠檢測出磷酸化的胜肽。

試驗例 2

分析的樣本係使用(iv)磷酸化 SRC 胜肽(單磷酸化胜肽，ANA APEC 公司)，(v) SRC 胜肽(無磷酸化胜肽，ANA APEC 公司)。將各樣本溶解於上述製造例 1 中所使用的操作緩衝液，得到樣本濃度介於 1~15 微莫耳濃度的樣本溶液。

將前述樣本溶液利用上述製造例 1 及比較製造例 1 製作的樣本流路 A，B 進行 SPR 測定。具體而言，於上述試驗例 1 中，樣本的結合時間和解離時間為 5 分，感應晶片的再活化(去除殘餘的結合物)係以 0.40 莫耳濃度磷酸緩衝液(pH 7.0) 5 分鐘，0.20 莫耳濃度乙二胺四乙酸二鈉鹽水溶液(pH 7.4) 5 分鐘，再注入上述製造例 1 的操作緩衝液 5 分鐘。除此以外，其他條件均和上述試驗例 1 相同的情況下進行 SPR 測定。結果如第 7 圖所示。

根據該結果，相對於無磷酸化胜肽即使濃度到達 15 微莫耳濃度仍完全無法偵測到其變化，磷酸化胜肽不僅在 15 微莫耳濃度，即使在 1 及 5 微莫耳濃度便可明確地掌握到其存在。因此證明，即使是胺基酸序列相同的胜肽，利用本發明亦能夠明確地判斷其磷酸化的有無。

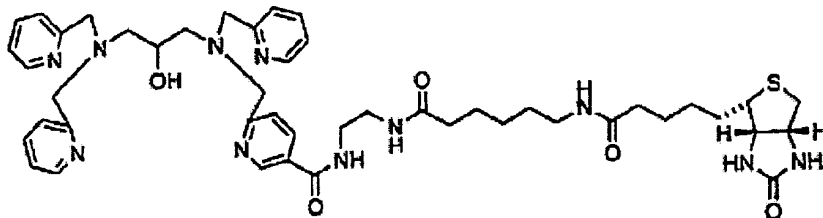
製造例 2 製造 SPR 分析用的 phostag 感應晶片

表面結合有抗生蛋白鏈菌素的抗生蛋白鏈菌素感應晶片(BIOCRE 公司製造，Sensor Chip SA) 裝設於 SPR 測定裝置(BIOCRE 公司製造，BIOCORE J)之上。

操作緩衝液係使用成分含有 $5 \times 10^{-3} \%$ (v/v) Tween 20，0.20 莫耳濃度的硝酸鈉及 10 微莫耳濃度硝酸鋅的 10 毫莫

耳濃度 HEPES(2-[4-(2-羥乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸-氫氧化鈉水溶液(pH 7.4)。感應晶片的溫度設為 25°C、以流速 30 微升/分注入操作緩衝液直到表面電漿共振值達到穩定。

接著，為使感應晶片帶有 phostag，注入末端帶有生物素結構的 N,N,N'-三(2-吡啶基甲基)-N'-[5-N''-2-(6-D-生物素醯胺六羧基醯胺乙基)氨基甲醯-2-吡啶基甲基]-1,3-二氨基丙烷 2-醇(含有下述結構的化合物)的 1.0 毫莫耳濃度之前述操作緩衝液，於溫度 25°C、流速 30 微升/分進行結合 6 分鐘。



上述化合物和操作緩衝液中的鋅離子配位後形成 phostag，且由於末端的生物素表現出對於抗生蛋白鏈菌素極高的親和性，因而可以結合於感應晶片之上。

比較製造例 2

於上述製造例 2 中，除了略去使感應晶片帶有 phostag 的步驟以外，以同樣的方法製作一 phostag 的感應晶片。

試驗例 3

分析的樣本係使用溶解於操作緩衝液(含有 $5 \times 10^{-3}\%$ (v/v) Tween 20, 0.20 莫耳濃度的硝酸鈉及 10 微莫耳濃度硝酸鋅的 10 毫莫耳濃度 HEPES-氫氧化鈉水溶液(pH 7.4))的 β -酪蛋白(五磷酸化蛋白質, Sigma 公司)。樣本濃度為 1.5 微莫耳濃度。

前述分析樣本係在溫度 25℃、流速：30 微升/分下結合 15 分鐘，解離 10 分鐘進行 SPR 測定。測定後，注入 0.40 莫耳濃度磷酸水溶液 6 分鐘，0.20 莫耳濃度乙二胺四乙酸二鈉鹽水溶液(pH 8.0)6 分鐘，再注入上述操作緩衝液 5 分鐘，使感應晶片再度活化(去除殘餘的結合物)。

測定結果如第 8 圖所示。根據該結果，當注入分析樣本時 RU 值增加了 2056，因此可得知本發明的貴金屬膜(結合 phostag 的貴金屬感應晶片)上結合有磷酸化的蛋白質。另外，在同一條件下，當以無磷酸化蛋白質的牛血清白蛋白取代磷酸化蛋白質進行實驗，則 RU 值完全沒有變化。由此可知，本發明的貴金屬膜的確能夠檢測出結合磷酸的蛋白質。

再者，比較製造例 2 所製造的感應晶片，雖然於同樣條件下進行實驗，然其 RU 值完全沒有變化。

產業上利用的可能性

根據本發明相關之表面電漿共振(SPR)的測定方法，即使如同生物樣本之類內含各式各樣化合物的待測樣本，亦可輕易地判斷磷酸化胜肽(蛋白質)的有無。此外，磷酸化胜肽的量或濃度也能夠被決定。再者，亦能判斷胜肽的磷酸化與否。由於本發明之方法適用於生物樣本，故得以應用於疾病的診斷，因而極具產業利用價值。

另外，本發明的貴金屬化合物，對於磷酸化胜肽展現出前所未有的配位結合性質，可應用於前述方法相當具實用性，其前驅化合物亦同樣具有實用性。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示一種 SPR 測定方法的示意圖。調整入射光的波長以及入射角度以便能測定 SPR(減少反射光的強度)，於結合有配體的貴金屬膜上加入待測樣本，其後觀察入射光角度的變化。圖中 1 為稜鏡，2 為貴金屬膜，3 為配體，4 為待測樣本中所含、與配體 3 發生相互作用的蛋白質。

第 2 圖為第 1 圖所示的 SPR 測定中，當連續加入操作緩衝液-->待測樣本-->操作緩衝液使其作用，所觀測到的 SPR 角度變化與時間的關係。當待測樣本中的化合物與貴金屬膜結合之際，所偵測 SPR 入射角度會產生變化。

第 3 圖為含有磷酸化 β -酪蛋白的樣本其 SPR 測定結果。

第 4 圖為含有去磷酸化 β -酪蛋白的樣本其 SPR 測定結果。

第 5 圖為含有未經磷酸化牛血清白蛋白(BSA)的樣本其 SPR 測定結果。

第 6 圖顯示第 3 至第 5 圖測定結果中，樣本流路 A 與樣本流路 B RU 值的差異。

第 7 圖為含有磷酸化胜肽(P-p60csrc)及無磷酸化胜肽(p60csrc)的樣本其 SPR 測定結果。

第 8 圖為含有磷酸化 β -酪蛋白的樣本其 SPR 測定結果。

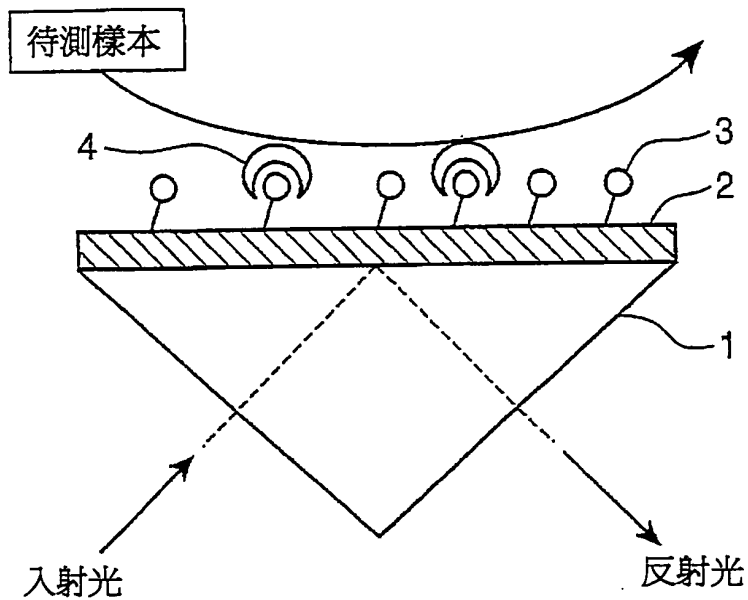
【主要元件符號說明】

1...稜鏡

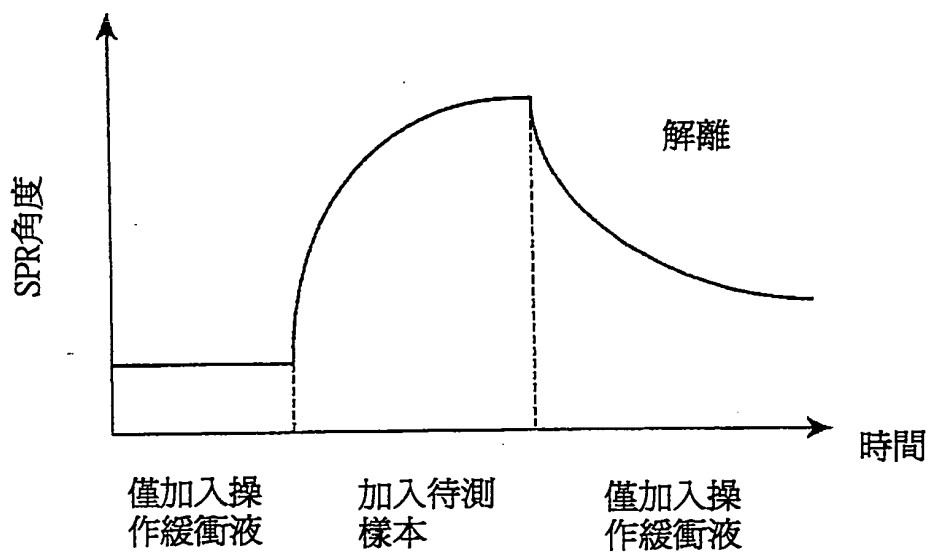
2...貴金屬膜

3...配體

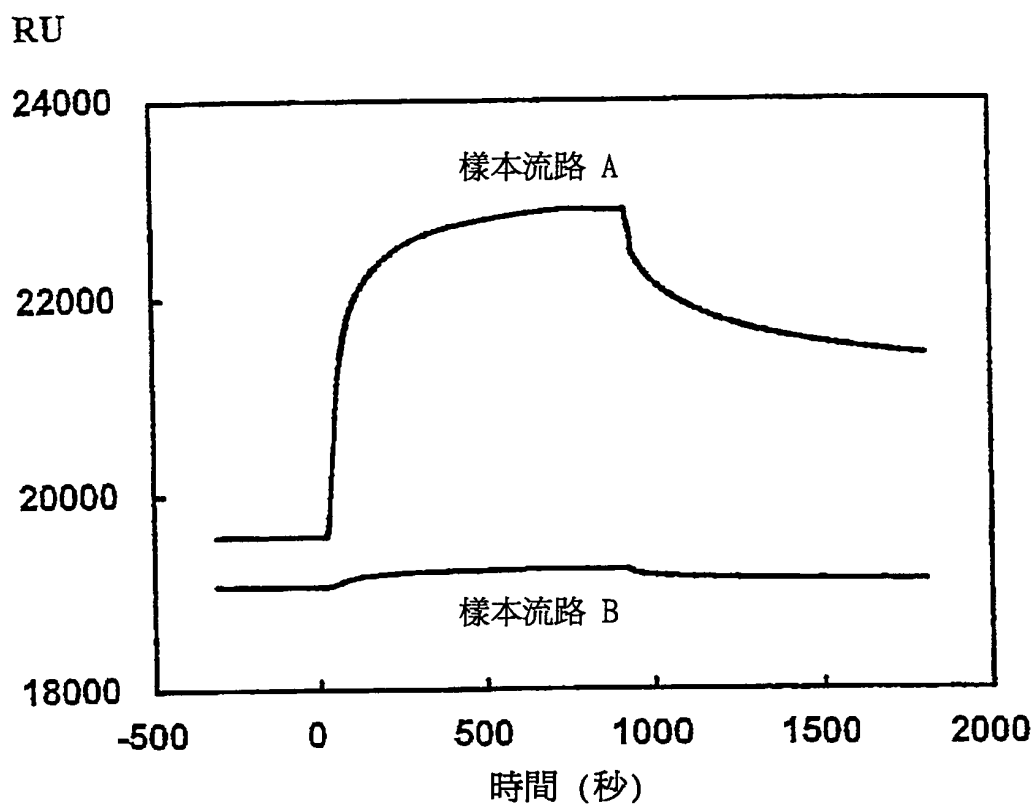
4...為待測樣本中所含、與配體 3 發生相互作用的蛋白質



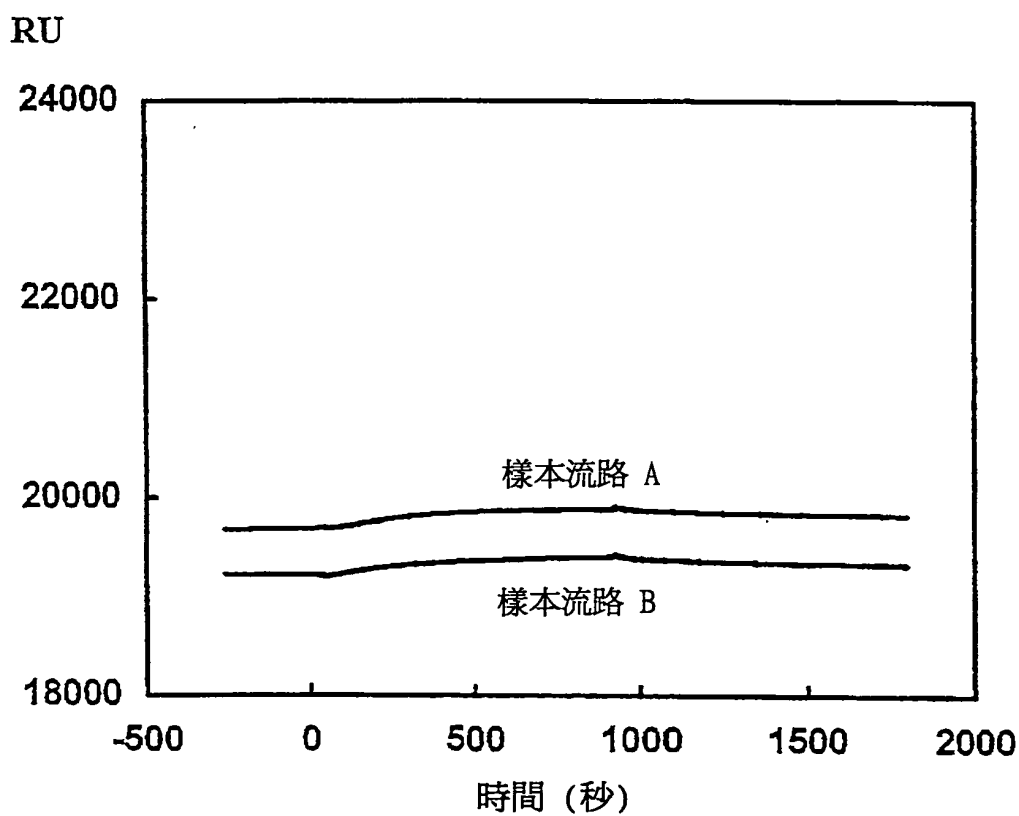
第 1 圖



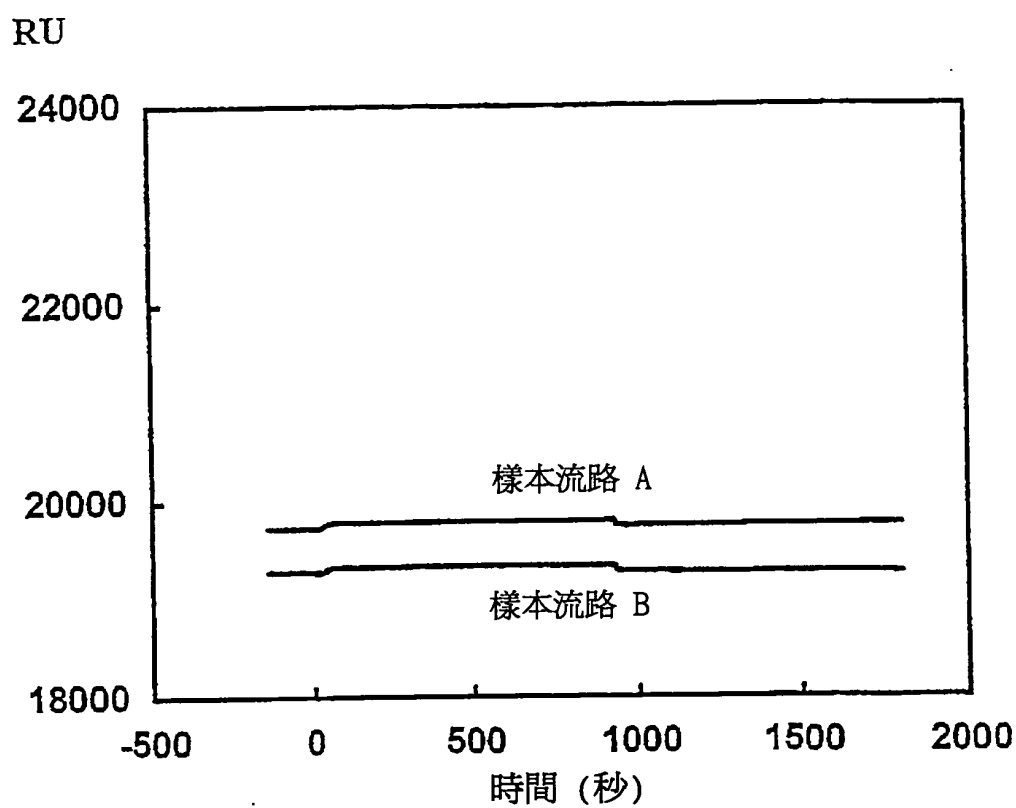
第 2 圖



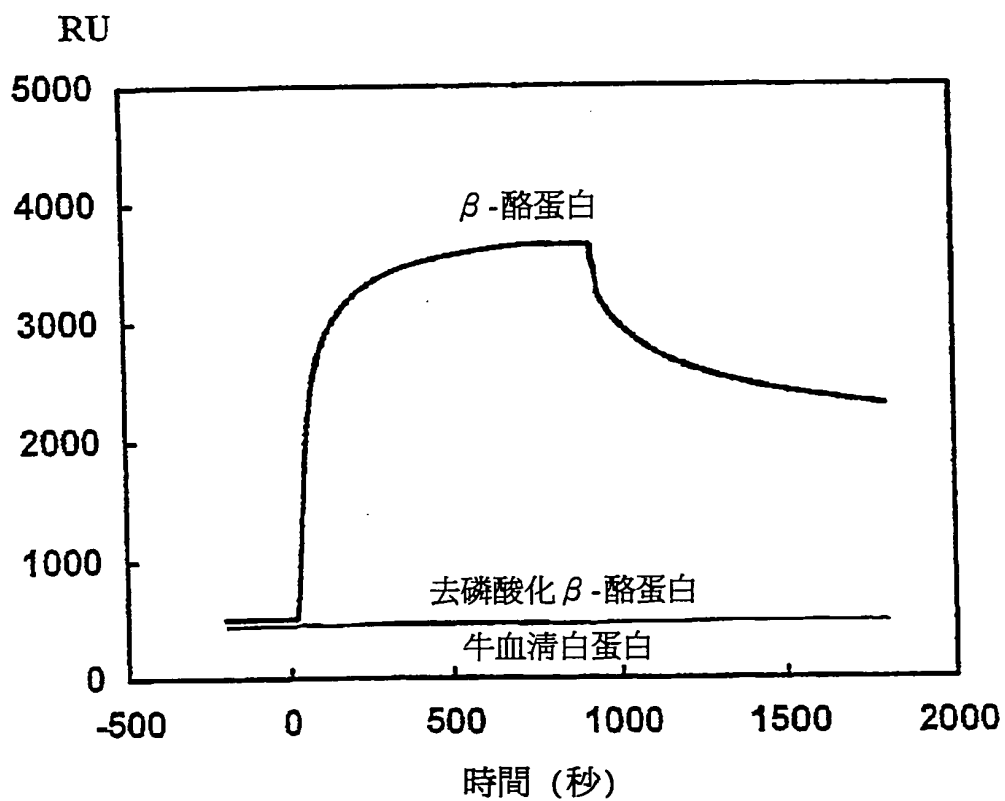
第 3 圖



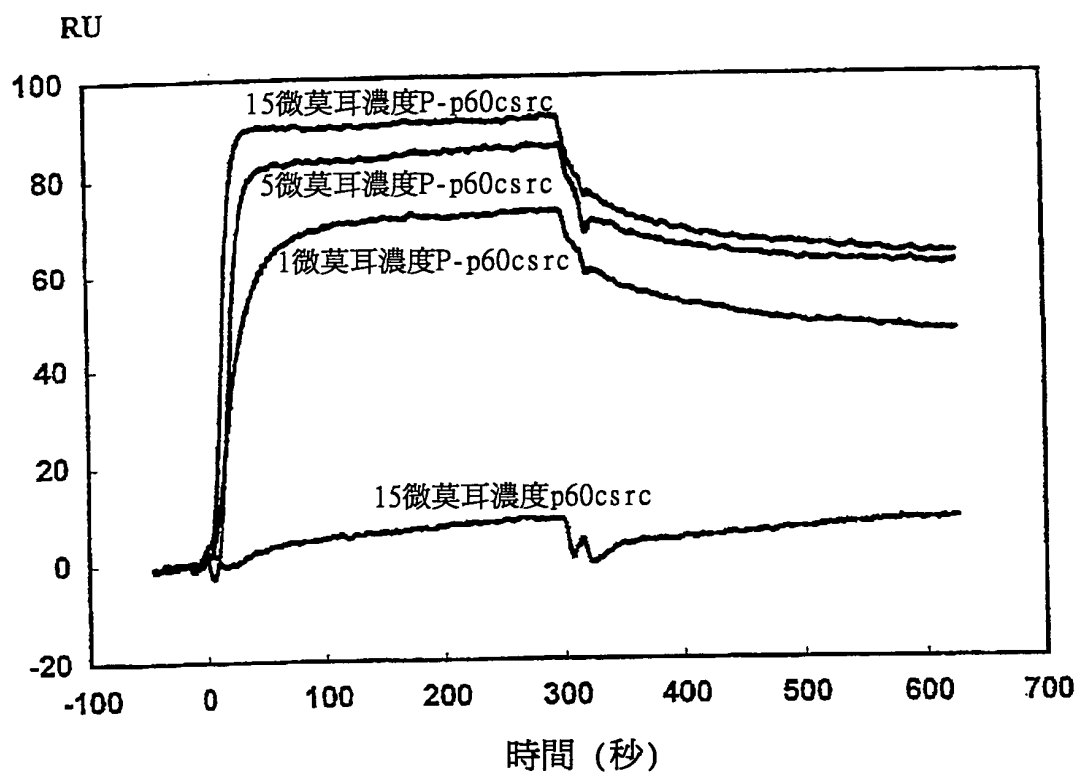
第 4 圖



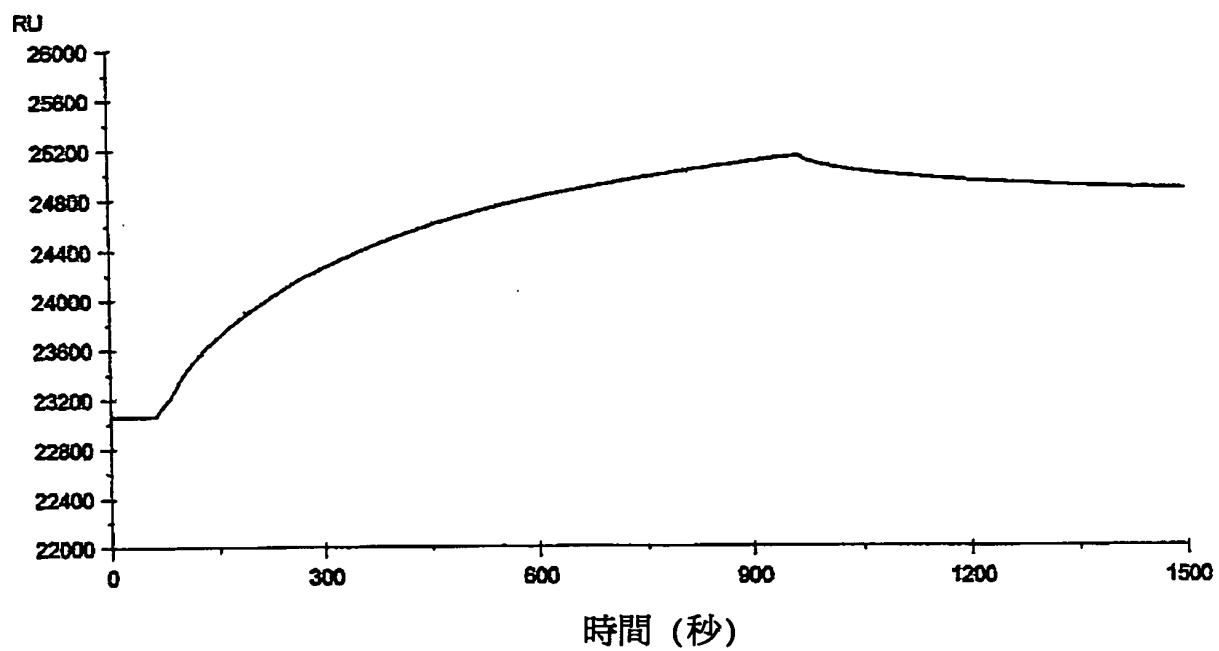
第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖



第 8 圖

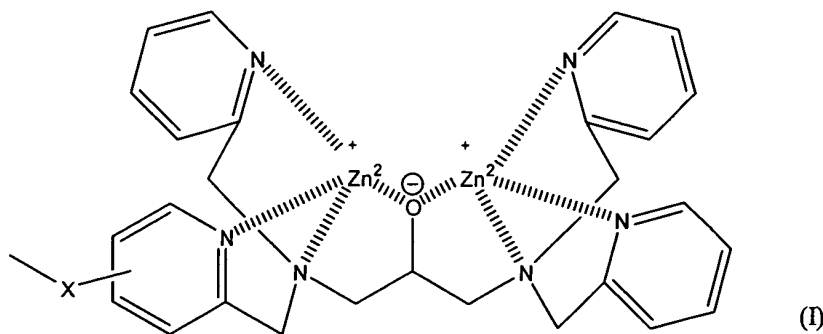
(Phos-tag)。

99年8月5日修(更)正替換頁

另外，本發明之又一目的在於提供一種前驅化合物，其可用來製造表面具有 Phos-tag 取代基的貴金屬化合物。

為解決前述問題，本發明人等致力研究以找出一種金屬錯合物，其能夠配位結合於蛋白質上的磷酸基(磷酸單酯基團)，發現了本發明相關的取代基，其對於磷酸基離子或磷酸單酯中的兩個羥基有相當高的配位結合能力，也因此對於胜肽上結合的磷酸基(磷酸單酯基團)具有優異的配位能力，即使在含有多種胜肽的混合樣本中，也能夠專一的與磷酸化的胜肽結合形成複合物。因此，若能利用本發明之取代基進行 SPR 測定，前述的問題便得以迎刃而解。

亦即，本發明之第一種表面電漿共振的測定方法，為一種於稜鏡底面鍍上一層貴金屬化合物、當光線照射該稜鏡後檢測其反射光的表面電漿共振方法，其特徵為於該貴金屬與稜鏡接觸側之相對側使用含有下列式(I)所示取代基的化合物；以及於該貴金屬化合物中含有該取代基的一側添加待測樣本。



[式中，X 代表連結基]

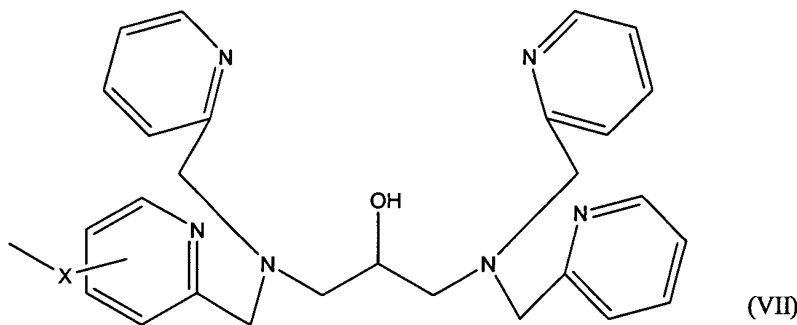
另外，本發明之第二種表面電漿共振的測定方法，其特徵為於待測樣本中加入表面含有上述式(I)所示取代基的

99年8月5日修(更)正替換頁

貴金屬化合物後，進行拉曼分光法。

本發明之貴金屬化合物為使用前述表面電漿共振的測定方法，且於其表面含有上述式(I)所示取代基之化合物。此外，當使用前述第一方法時，該貴金屬化合物較佳為膜狀，而當使用前述第二方法時，該貴金屬化合物較佳為粒子狀。

製造前述貴金屬化合物的前驅化合物，當與鋅金屬鹽等作用時能夠輕易轉換成上述貴金屬化合物，在貴金屬化合物表面上含有化學結構式(VII)所示取代基的化合物。該前驅化合物的形狀，係視終產物—前述貴金屬化合物的形狀而決定，因此可以是金屬膜狀或金屬粒狀。



[式中，X 代表連結基]

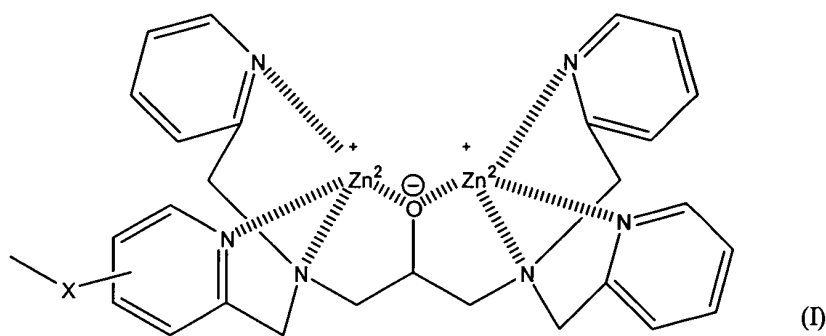
【實施方式】

以下首先揭露本發明之 SPR 測定方法。

關於本發明第 1 方法的 SPR 測定可利用習知裝置進行測定。例如，可使用美國專利第 5,313,264 號說明書中所揭示的裝置。此外，本發明之 SPR 測定法極適合用於檢測磷酸化胜肽，其優點在於：(1)無需導入螢光發光基團等標記物質進行標記；(2)對於分子量較高的分子具有高感應度；

磷酸化胜肽結合，所使用的待測樣本為水溶液或水分散液。另外，待測樣本，例如生物樣本，可以其原本的狀態直接使用，不過為了便於判斷磷酸化與否，較佳係將胜肽經過純化。拉曼分光法中，雜質的存在有可能導致無法得到令人滿意的光譜。

本發明貴金屬化合物所使用的取代基，對於磷酸化胜肽具有優越的結合能力，其結構如下：



[式中，X 代表連結基]

其中上述結構式(I)中，選擇以鋅作為配位金屬其原因在於鋅對於磷酸化蛋白質的磷酸基(磷酸單酯基團)具有極高的配位能力。

連結基為本發明之貴金屬化合物中，貴金屬部分及上述主要骨架(和磷酸化蛋白質相互作用的主要部分，以下稱為 Phos-tag)結合的部位，其作用在於讓本發明相關之貴金屬化合物容易製造；另外，增加取代基(I)之自由度，使取代基(I)和結合於胜肽上的磷酸基容易發生配位。

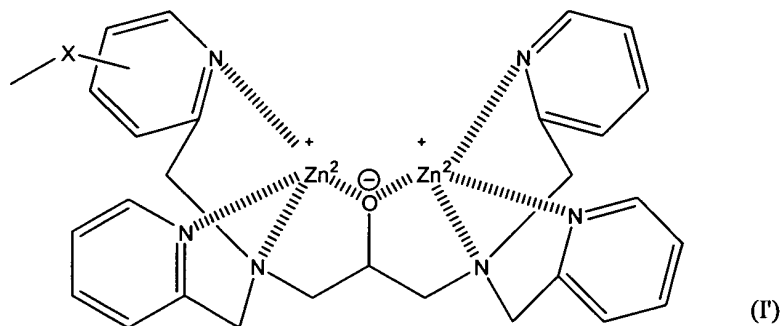
連結基只要含有上述作用，其種類並無特別限制，舉例而言，連結基可以是糖鏈、C1~C6 烯烴基、氨基(-NH-)、醚基(-O-)、硫醚基(-S-)、羰基(-C(=O)-)、亞硫醯基(-C(=S)-)、酯基、醯胺基、尿素基(-NHC(=O)NH-)、硫脲

99年8月5日修(更)正替換頁

上述連結基之長度並無特別限制，較佳為 200 奈米 (nm) 以內，更佳為 100 奈米以內。連結基之長度越短，對於磷酸化胜肽的偵測敏銳度越佳。

另外，在與本發明具有相同作用效果的情況下，亦可於取代基 (I) 上的吡啶環上導入甲基等，此類均等物亦包含於本發明之範疇中。

再者，本發明之取代基 (I) 的連結基位置亦無特別限定，也可位於下述取代基 (I') 所示之位置。



該取代基 (I') 與取代基 (I) 完全等價，合成時不需特別區分為何種取代基，實際上可以認為是兩者的混合物，當然，取代基 (I') 亦包含於本發明之範疇中。

本發明中所述之「貴金屬」可為金、銀、鉑、銻、鈦、鈹、鐵、鉍，本發明較佳可使用金、銀、鉑或銻的任一種，更佳可使用金，其原因在於金已被證實可以良好地發揮表面電漿共振的效果。

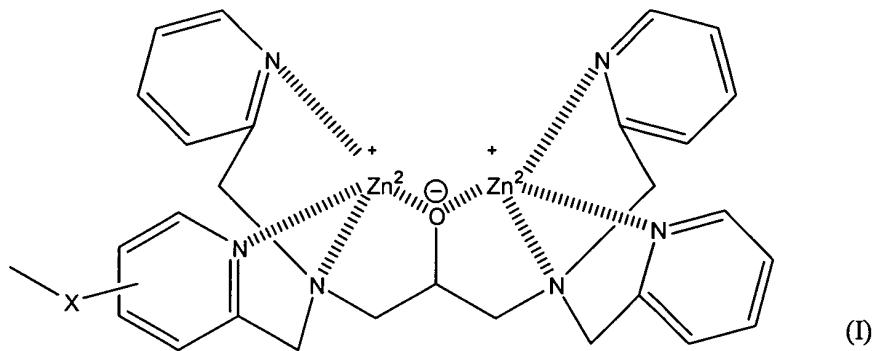
當用於前述第一方法時，本發明相關之貴金屬化合物的形狀較佳為膜狀，並且可直接適用於表面電漿共振的測定裝置。該貴金屬膜的厚度並無特別的限制，不過較佳介於 10~100 奈米，通常約為 50 奈米。

另一方面，當用於前述第 2 方法時，本發明相關之貴

99年8月5日修(更)正替換頁

五、中文發明摘要：

提供一種可輕易地判斷生物樣本中磷酸化胜肽(蛋白質)存在與否的表面電漿共振測定方法，以及一種具有高的磷酸化胜肽配位結合能、適於該方法所使用的貴金屬化合物。本發明相關之第 1 表面電漿共振測定方法係於稜鏡底面鍍上一層貴金屬化合物、當光線照射該稜鏡後檢測其反射光，其特徵為該貴金屬化合物係使用與稜鏡接觸側之相對側含有下列式(I)所示取代基的化合物



[式中，X 代表連結基]

以及，於該貴金屬化合物中含有該取代基的一側添加待測樣本。

六、英文發明摘要：

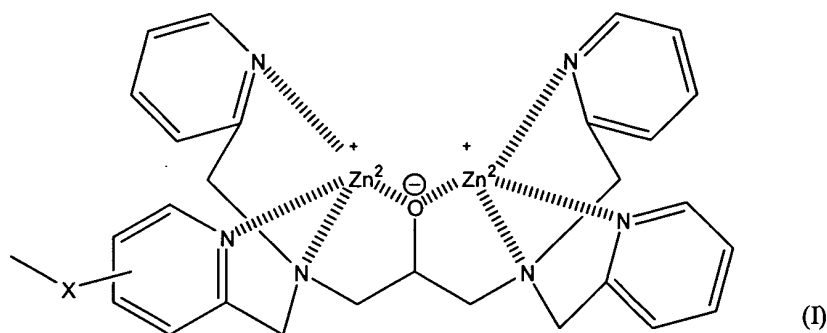
公告本

十一 申請專利範圍：

99年8月5日修(更)正本

1. 一種表面電漿共振的測定方法，其係於稜鏡底面鍍上一層貴金屬化合物、當光線照射該稜鏡後檢測其反射光，其特徵為

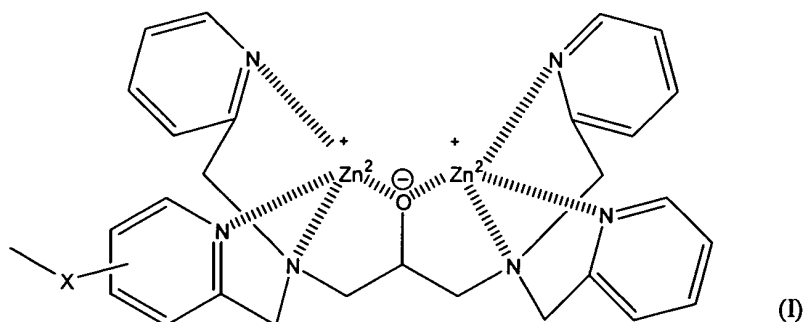
該貴金屬化合物係使用與稜鏡接觸側之相對側含有下列式(I)所示取代基的化合物



[式中，X 代表連結基]

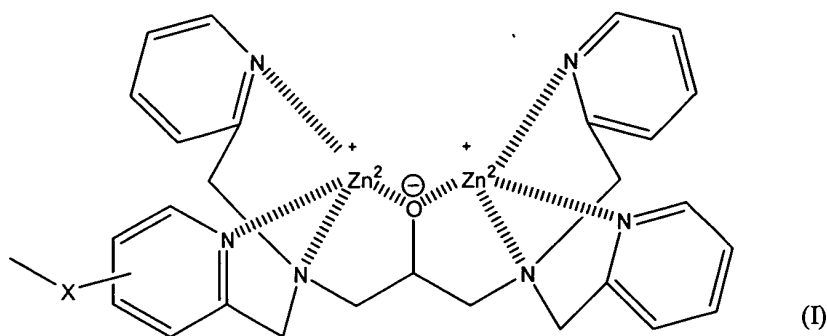
以及，於該貴金屬化合物中含有該取代基的一側添加待測樣本。

2. 一種表面電漿共振的測定方法，其特徵為於待測樣本中加入表面含有下列式(I)所示取代基的貴金屬化合物後，進行拉曼分光法



[式中，X 代表連結基]。

3. 一種貴金屬化合物，其表面含有下列式(I)所示取代基

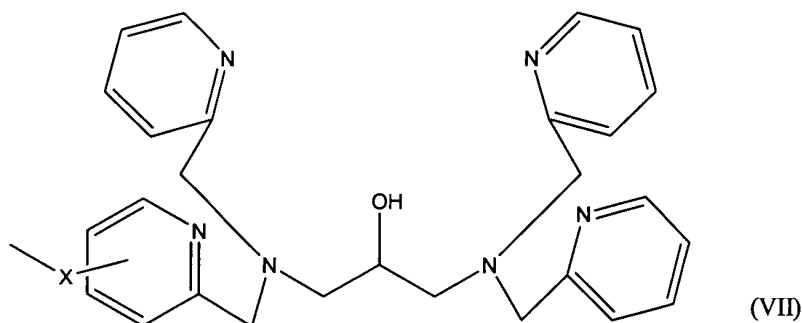


[式中，X 代表連結基]。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之貴金屬化合物，該貴金屬化合物為膜狀。

5. 如申請專利範圍第 3 項所述之貴金屬化合物，該貴金屬化合物為粒子狀。

6. 一種前趨化合物，其係在貴金屬表面含有下列式 (VII) 所示取代基



[式中，X 代表連結基]。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之前驅化合物，該前驅化合物為膜狀。

8. 如申請專利範圍第 6 項所述之前驅化合物，該前驅化合物為粒子狀。

99年8月5日修(更)正替換頁

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(6)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

