(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116324409 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202180065216.4

(22)申请日 2021.08.27

(30)优先权数据
2020-159008 2020.09.23 JP
PCT/JP2021/007726 2021.03.01 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/031621 2021.08.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/064960 JA 2022.03.31

(71)申请人 国立大学法人神户大学
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 33/53(2006.01)

权利要求书4页 说明书76页 附图26页

(54)发明名称

用于制作检测对象分析用传感器的基材、检测对象分析用传感器和检测对象的分析方法

(57)摘要

本发明提供一种灵敏度得到提高的生物传感器。本发明还提供一种用于制作检测对象分析用传感器的基材，其特征在于，所述基材包含分子印迹聚合物，所述分子印迹聚合物具有用于容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部和设置于上述分子印迹凹部内的、针对上述靶标的特异结合性分子的结合用基团；上述特异结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团，和/或分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

CN 116324409 A

1.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材,其特征在于,包含分子印迹聚合物,所述分子印迹聚合物具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部和设置于所述分子印迹凹部内的、针对所述靶标的结合性分子的结合用基团,所述结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

2.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材,其特征在于,包含分子印迹聚合物,所述分子印迹聚合物具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部和设置于所述分子印迹凹部内的、针对所述靶标的结合性分子的结合用基团,所述分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

3.根据权利要求1或2所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在所述分子印迹凹部内还具有信号物质的结合用基团。

4.根据权利要求3所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在所述分子印迹凹部表面,所述结合性分子的结合用基团和所述信号物质的结合用基团相互独立。

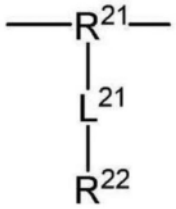
5.根据权利要求3所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在所述分子印迹凹部内,所述结合性分子的结合用基团和所述信号物质的结合用基团构成由下述式(1)表示的功能性基团,

$-R^2-L^1-R^1$　(1)

R^1表示所述结合性分子的结合用基团,L^1表示直接键合或连接基团,R^2表示包含所述信号物质的结合用基团的连接基团。

6.根据权利要求5所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,包含所述信号物质的结合用基团的连接基团由下述式(2)或(3)表示,

$-NR^3-$　(2)



(3)

R^3表示氢或可以包含聚亚烷基二醇链的碳原子数1～8的烷基,R^{21}表示氮原子或烃,L^{21}表示直接键合或连接基团,R^{22}表示所述信号物质的结合用基团。

7.根据权利要求1～6中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述结合性分子的结合用基团为选自由氨基、羧基、硼酸基、顺式二醇基、醛基、酮基、氧氨基、酰肼基、生物素(生物胞素、脱硫生物素)基、源自镍-次氮基三乙酸的基团、硫醇基和吡啶基二硫基组成的组中的基团。

8.根据权利要求1～7中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述结合性分子的结合用基团是选自由源自镍-次氮基三乙酸的基团、硫醇基和吡啶基二硫基组成的组中的基团。

9.根据权利要求1～8中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述结合性分子的结合用基团由抗体的Fc结构域结合蛋白、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、包含一个或多个权利要求7所述的结合用基团的聚合物、树状聚合物或寡聚DNA介导而适合于小型物质。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述抗体的Fc结构域结合蛋白为蛋白A、蛋白G、蛋白L或蛋白A/G。

11.根据权利要求1～10中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在所述分子印迹凹部内还具有与所述检测对象或所述分子印迹凹部的模板的相互作用基团。

12.根据权利要求1～11中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述结合性分子为特异结合性分子。

13.根据权利要求1～12中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述特异结合性分子选自由抗体模拟物、磷脂结合性蛋白、人工(高分子)受体和凝集素组成的组。

14.根据权利要求1～13中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述检测对象为具有膜结构的微粒体。

15.根据权利要求1～14中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述分子印迹凹部的模板为粒子核或生物分子。

16.根据权利要求1～15中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述分子印迹凹部的模板为二氧化硅粒子或血清蛋白。

17.根据权利要求1～16中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述分子印迹凹部的模板为血清蛋白,所述检测对象为具有膜结构的微粒体,所述靶标为在所述微粒体的表面表达的分子。

18.根据权利要求1～17中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其包含基板和设置于所述基板的表面上的聚合物膜,且所述印迹聚合物构成所述聚合物膜。

19.根据权利要求1～17中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,所述印迹聚合物为粒子状。

20.根据权利要求19所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,粒子状的所述印迹聚合物被固定在基板上。

21.一种检测对象分析用传感器,其特征在于,包含权利要求1～20中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材和结合于所述特异结合性分子的结合用基团的、针对所述检测对象的靶标的特异结合性基团,所述特异结合性基团为小型物质基团。

22.根据权利要求21所述的检测对象分析用传感器,其中,还包含结合于所述信号物质的结合用基团的信号基团。

23.一种检测对象的分析方法,其中,包括如下工序:

使包含检测对象的试样与权利要求21或22所述的检测对象分析用传感器接触,将所述检测对象结合于所述特异结合性基团的工序;以及

检测所述特异结合性基团与所述检测对象的结合的工序。

24.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,包括如下工序:

单分子膜形成工序(1-1),在基板上形成表面具有针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和聚合引发性基团的单分子膜;

工序(1-2),针对所述结合性分子的结合用基团,由第一可逆连接基团介导而引入模板;

工序(1-3),添加聚合性单体,以所述聚合性单体为基质,以所述聚合引发性基团为聚合引发剂,合成针对所述模板的部分表面的分子印迹聚合物,由此在所述基板表面形成聚合物膜;以及

工序(1-4),使所述第一可逆连接基团断裂而转化为所述结合性分子的结合用基团,并且去除所述模板,

所述结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

25.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,包括如下工序:

单分子膜形成工序(1-1),在基板上形成表面具有针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和聚合引发性基团的单分子膜;

工序(1-2),针对所述结合性分子的结合用基团,由第一可逆连接基团介导而引入模板;

工序(1-3),添加聚合性单体,以所述聚合性单体为基质,以所述聚合引发性基团为聚合引发剂,合成针对所述模板的部分表面的分子印迹聚合物,由此在所述基板表面形成聚合物膜;以及

工序(1-4),使所述第一可逆连接基团断裂而转化为所述结合性分子的结合用基团,并且去除所述模板,

该分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

26.根据权利要求16所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,包括由第二可逆连接基团介导而用聚合性官能团对所述模板的所述表面进行修饰的修饰工序,

在所述工序(1-3)中,以所述聚合性单体和所述聚合性官能团为基质,以所述聚合引发性基团为聚合引发剂,合成针对所述模板的部分所述表面的分子印迹聚合物,

在工序(1-4)中,使所述第一可逆连接基团和所述第二可逆连接基团断裂而分别转化为所述结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团,并且去除所述模板。

27.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,包括如下工序:

工序(1-11),准备分子印迹的模板,其表面由第一可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

工序(1-12),以所述聚合性官能团为基质,合成针对所述模板的部分所述表面的分子印迹聚合物;以及

工序(1-13),使所述第一可逆连接基团断裂而从所述分子印迹聚合物中去除所述模板,生成所述结合性分子的结合用基团,

所述结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

28.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,包括如下工序:

工序(1-11),准备分子印迹的模板,其表面由第一可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

工序(1-12),以所述聚合性官能团为基质,合成针对所述模板的部分所述表面的分子印迹聚合物;以及

工序(1-13),使所述第一可逆连接基团断裂而从所述分子印迹聚合物中去除所述模板,生成所述结合性分子的结合用基团,

该分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

29.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,包括如下工序:

工序(1-21),准备分子印迹的模板,其表面由第三可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

工序(1-22),以所述聚合性官能团为基质,合成针对所述模板的部分所述表面的分子印迹聚合物;

工序(1-23),使所述第三可逆连接基团断裂而从所述分子印迹聚合物中去除所述模板;以及

工序(1-24),由第三可逆连接基团介导而引入具有功能性基团的分子,所述功能性基团包含针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团,

所述结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

30.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,包括如下工序:

工序(1-21),准备分子印迹的模板,其表面由第三可逆连接基团介导而以聚合性官能团进行了修饰;

工序(1-22),以所述聚合性官能团为基质,合成针对所述模板的部分所述表面的分子印迹聚合物;

工序(1-23),使所述第三可逆连接基团断裂而从所述分子印迹聚合物中去除所述模板;以及

工序(1-24),由第三可逆连接基团介导而引入具有功能性基团的分子,所述功能性基团包含针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团,

该分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

31.根据权利要求29或30所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,在所述工序(1-22)中,还将包含与所述模板的相互作用基团的单体作为所述基质。

32.根据权利要求17～21中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,所述结合性分子为特异结合性分子。

33.一种检测对象分析用传感器的制造方法,其中,包括如下工序:

工序(1),进行权利要求24～32中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法;以及

工序(2),将所述结合性分子结合于所述结合性分子的结合用基团。

34.一种检测对象分析用传感器的制造方法,其中,包括如下工序:

工序(1),进行权利要求26、29和31中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法;

工序(2),将所述结合性分子结合于所述结合性分子的结合用基团;以及

工序(3),将信号物质结合于所述信号物质的结合用基团。

用于制作检测对象分析用传感器的基材、检测对象分析用传感器和检测对象的分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在基材上高灵敏度地检测出检测对象的技术。更具体地，本发明涉及用于制作检测对象分析用传感器的基材及其制造方法、检测对象分析用传感器及其制造方法、以及检测对象的分析方法。

背景技术

[0002] 外泌体等小胞外囊泡(Small Extracellular Vesicles;sEVs)是从细胞中释放的囊泡之一，是直径为20nm～200nm的脂质双层膜囊泡。小胞外囊泡的内部内包蛋白质以及miRNA、mRNA等核酸，而且其表面也具有蛋白质。可认为由于小胞外囊泡具有此类物质的特征，因此通过分析小胞外囊泡的特征，可以推测所分泌的细胞是哪种细胞。另外，已确认小胞外囊泡存在于各种体液中，可以相对容易地采集。

[0003] 从癌细胞中分泌的小胞外囊泡包含源自肿瘤的物质。因此，期待能够通过分析体液中的小胞外囊泡所包含的物质来进行癌症的诊断。进而，由于小胞外囊泡是由细胞主动分泌的，因此预计即使是癌症的早期阶段也会呈现出某些特征。

发明内容

[0004] 用于解决课题的技术手段

[0005] 本发明人发现：在包含具有通过分子印迹技术形成的孔的聚合物(分子印迹聚合物：MIP)、且在该孔中选择性地引入抗体的生物传感器中，故意引入小型物质来代替抗体时，尽管该小型物质的固有结合能力(在下文中，“结合能力”是指亲和性(affinity))低，但针对靶标的结合能力提升至优于引入抗体的情形的令人惊讶的水平。本发明是基于该见解并进一步反复研究而完成的。

[0006] 本发明包含用于制作检测对象分析用传感器的基材及其制造方法、检测对象分析用传感器及其制造方法、以及检测对象的分析方法。例如，本发明提供下述所示方式的发明。

[0007] 本发明提供：生物传感器中所使用的抗体因其优异的特异性和亲和性而非常有助于生物传感器的性能，结果可提高其灵敏度。

[0008] 本发明提供灵敏度得到提高的生物传感器。

[0009] (项目1)

[0010] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材，其包含分子印迹聚合物，所述分子印迹聚合物具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部和设置于上述分子印迹凹部内的、针对上述靶标的结合性分子的结合用基团，上述结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

[0011] (项目2)

[0012] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材，其包含分子印迹聚合物，所述分子

印迹聚合物具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部和设置于上述分子印迹凹部内的、针对上述靶标的结合性分子的结合用基团，上述分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

[0013] (项目3)

[0014] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，在上述分子印迹凹部内还具有信号物质的结合用基团。

[0015] (项目4)

[0016] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，在上述分子印迹凹部表面，上述结合性分子的结合用基团和上述信号物质的结合用基团相互独立。

[0017] (项目5)

[0018] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，在上述分子印迹凹部内，上述结合性分子的结合用基团和上述信号物质的结合用基团构成由下述式(1)表示的功能性基团。

[0019] [化学式1]

[0020] $-R^2-L^1-R^1$ (1)

[0021] [R^1表示上述结合性分子的结合用基团，L^1表示直接键合或连接基团，R^2表示包含上述信号物质的结合用基团的连接基团。]

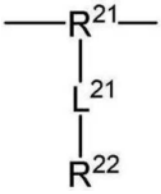
[0022] (项目6)

[0023] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，包含上述信号物质的结合用基团的连接基团由下述式(2)或(3)表示。

[0024] [化学式2]

[0025] $-NR^3-$ (2)

[0026] [化学式3]

[0027] 

(3)

[0028] [R^3表示氢或可以包含聚亚烷基二醇链的碳原子数1～8的烷基，R^{21}表示氮原子或烃，L^{21}表示直接键合或连接基团，R^{22}表示上述信号物质的结合用基团。]

[0029] (项目7)

[0030] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，上述结合性分子的结合用基团为选自由氨基、羧基、硼酸基、顺式二醇基、醛基、酮基、氧氨基、酰肼基、生物素(生物胞素、脱硫生物素)基、源自镍-次氮基三乙酸的基团、硫醇基和吡啶基二硫基(pyridinyldisulfide group)组成的组中的基团。

[0031] (项目8)

[0032] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，上述结合性分子的结合用基团为选自由源自镍-次氮基三乙酸的基团、硫醇基和吡啶基二硫基组成的组中的基团。

[0033] (项目9)

[0034] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述结合性分子的结合用基团由抗体的Fc结构域结合蛋白、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、包含一个或多个项目7所述的结合用基团的聚合物、树状聚合物(dendrimer)或寡聚DNA介导而适合于小型物质。

[0035] (项目10)

[0036] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述抗体的Fc结构域结合蛋白为蛋白A、蛋白G、蛋白L或蛋白A/G。

[0037] (项目11)

[0038] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在上述分子印迹凹部内还具有与上述检测对象或上述分子印迹凹部的模板的相互作用基团。

[0039] (项目12)

[0040] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述结合性分子为特异结合性分子。

[0041] (项目13)

[0042] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述特异结合性分子选自由抗体模拟物(antibody mimetic)、磷脂结合性蛋白、人工(高分子)受体和凝集素组成的组。

[0043] (项目14)

[0044] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述检测对象为具有膜结构的微粒体。

[0045] (项目15)

[0046] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述分子印迹凹部的模板为粒子核或生物分子。

[0047] (项目16)

[0048] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述分子印迹凹部的模板为二氧化硅粒子或血清蛋白。

[0049] (项目17)

[0050] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述分子印迹凹部的模板为血清蛋白,上述检测对象为具有膜结构的微粒体,上述靶标为在上述微粒体的表面表达的分子。

[0051] (项目18)

[0052] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其包含基板和设置于上述基板的表面上的聚合物膜,且上述印迹聚合物构成上述聚合物膜。

[0053] (项目19)

[0054] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,上述印迹聚合物为粒子状。

[0055] (项目20)

[0056] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,粒

子状的上述印迹聚合物被固定在基板上。

[0057] (项目21)

[0058] 一种检测对象分析用传感器,其包含上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材和结合于上述特异结合性分子的结合用基团的、针对上述检测对象的靶标的特异结合性基团,上述特异结合性基团为小型物质基团。

[0059] (项目22)

[0060] 根据上述项目中任一项所述的检测对象分析用传感器,其还包含结合于上述信号物质的结合用基团的信号基团。

[0061] (项目23)

[0062] 一种检测对象的分析方法,其包括如下工序:

[0063] 使包含检测对象的试样与上述项目中任一项所述的检测对象分析用传感器接触,将上述检测对象结合于上述特异结合性基团的工序;以及

[0064] 检测上述特异结合性基团与上述检测对象的结合的工序。

[0065] (项目24)

[0066] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其包括如下工序:

[0067] 单分子膜形成工序(1-1),在基板上形成表面具有针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和聚合引发性基团的单分子膜;

[0068] 工序(1-2),针对上述结合性分子的结合用基团,由第一可逆连接基团介导而引入模板;

[0069] 工序(1-3),添加聚合性单体,以上述聚合性单体为基质,以上述聚合引发性基团为聚合引发剂,合成针对上述模板的部分表面的分子印迹聚合物,由此在上述基板表面形成聚合物膜;以及

[0070] 工序(1-4),使上述第一可逆连接基团断裂而转化为上述结合性分子的结合用基团,并且去除上述模板,

[0071] 上述结合性分子的结合用基团为适合于小型物质的基团。

[0072] (项目25)

[0073] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其包括如下工序:

[0074] 单分子膜形成工序(1-1),在基板上形成表面具有针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和聚合引发性基团的单分子膜;

[0075] 工序(1-2),针对上述结合性分子的结合用基团,由第一可逆连接基团介导而引入模板;

[0076] 工序(1-3),添加聚合性单体,以上述聚合性单体为基质,以上述聚合引发性基团为聚合引发剂,合成针对上述模板的部分表面的分子印迹聚合物,由此在上述基板表面形成聚合物膜;以及

[0077] 工序(1-4),使上述第一可逆连接基团断裂而转化为上述结合性分子的结合用基团,并且去除上述模板,

[0078] 该分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

[0079] (项目26)

[0080] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方

法,其包括由第二可逆连接基团介导而用聚合性官能团对上述模板的上述表面进行修饰的修饰工序,

[0081] 在上述工序(1-3)中,以上述聚合性单体和上述聚合性官能团为基质,以上述聚合引发性基团为聚合引发剂,合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物,

[0082] 在工序(1-4)中,使上述第一可逆连接基团和上述第二可逆连接基团断裂而分别转化为上述结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团,并且去除上述模板。

[0083] (项目27)

[0084] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其包括如下工序:

[0085] 工序(1-11),准备分子印迹的模板,其表面由第一可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

[0086] 工序(1-12),以上述聚合性官能团为基质,合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物;以及

[0087] 工序(1-13),使上述第一可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板,生成上述结合性分子的结合用基团,

[0088] 上述结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

[0089] (项目28)

[0090] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其包括如下工序:

[0091] 工序(1-11),准备分子印迹的模板,其表面由第一可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

[0092] 工序(1-12),以上述聚合性官能团为基质,合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物;以及

[0093] 工序(1-13),使上述第一可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板,生成上述结合性分子的结合用基团,

[0094] 该分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

[0095] (项目29)

[0096] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其包括如下工序:

[0097] 工序(1-21),准备分子印迹的模板,其表面由第三可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

[0098] 工序(1-22),以上述聚合性官能团为基质,合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物;

[0099] 工序(1-23),使上述第三可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板;以及

[0100] 工序(1-24),由第三可逆连接基团介导而引入具有功能性基团的分子,所述功能性基团包含针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团,

[0101] 上述结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

[0102] (项目30)

[0103] 一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其包括如下工序:

[0104] 工序(1-21),准备分子印迹的模板,其表面由第三可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

[0105] 工序(1-22),以上述聚合性官能团为基质,合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物;

[0106] 工序(1-23),使上述第三可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板;以及

[0107] 工序(1-24),由第三可逆连接基团介导而引入具有功能性基团的分子,所述功能性基团包含针对检测对象的靶标的结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团,

[0108] 该分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。

[0109] (项目31)

[0110] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,在上述工序(1-22)中,还将包含与上述模板的相互作用基团的单体作为上述基质。

[0111] (项目32)

[0112] 根据上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法,其中,上述结合性分子为特异结合性分子。

[0113] (项目33)

[0114] 一种检测对象分析用传感器的的制造方法,其包括如下工序:

[0115] 工序(1),进行上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法;以及

[0116] 工序(2),将上述结合性分子结合于上述结合性分子的结合用基团。

[0117] (项目34)

[0118] 一种检测对象分析用传感器的的制造方法,其包括如下工序:

[0119] 工序(1),进行上述项目中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法;

[0120] 工序(2),将上述结合性分子结合于上述结合性分子的结合用基团;以及

[0121] 工序(3),将信号物质结合于上述信号物质的结合用基团。

[0122] (项目35)

[0123] 一种诊断或检查方法,其为使用上述项目中任一项所述的分析用传感器而对受试体进行诊断或检查的方法,该诊断方法包括如下工序:

[0124] A)从受试体采集试样(包含例如:尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液)的工序;

[0125] B)使上述试样与上述分析用传感器接触的工序;

[0126] C)检测来自上述分析用传感器的信号的工序;以及

[0127] D)对上述信号进行分析后,对上述受试体进行诊断或检查(例如:判定有无疾病或疾病的进展)的工序。

[0128] (项目36)

[0129] 一种程序,其为使计算机执行使用具备上述项目中任一项所述的分析用传感器的诊断或检查系统对受试体进行诊断或检查的方法的程序,该方法包括如下工序:

[0130] A)向上述诊断或检查系统提供从上述受试体得到的试样(包含例如:尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液)的工序;

[0131] B)以使上述试样与上述分析用传感器接触的方式启动上述诊断或检查系统的工序;

[0132] C)上述诊断或检查系统检测来自上述分析用传感器的信号的工序;以及

[0133] D)上述诊断或检查系统对上述信号进行分析后,对上述受试体进行诊断或检查(根据检测结果来判定有无疾病或疾病的进展)的工序。

[0134] (项目37)

[0135] 一种记录介质,其为存储使计算机执行使用上述项目中任一项所述的分析用传感器对受试体进行诊断或检查的方法的程序的记录介质,该方法包括如下工序:

[0136] A)向上述诊断或检查系统提供从上述受试体得到的试样(包含例如:尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液)的工序;

[0137] B)以使上述试样与上述分析用传感器接触的方式启动上述诊断或检查系统的工序;

[0138] C)上述诊断或检查系统检测来自上述分析用传感器的信号的工序;以及

[0139] D)上述诊断或检查系统对上述信号进行分析后,对该受试体进行诊断或检查(根据检测结果来判定有无疾病或疾病的进展)的工序。

[0140] (项目38)

[0141] 一种系统,其为诊断或检查系统,该系统包含:

[0142] A)提供部,提供从上述受试体得到的试样(包含例如:尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液);

[0143] B)启动部,以使上述试样与上述分析用传感器接触的方式进行启动;

[0144] C)检测部,检测来自上述分析用传感器的信号;以及

[0145] D)诊断部,对上述信号进行分析后,对上述受试体进行诊断(根据检测结果来判定有无疾病或疾病的进展)。

[0146] 项1.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材,其包含分子印迹聚合物,所述分子印迹聚合物具有容纳检测对象的靶标分子的分子印迹凹部和设置于上述分子印迹凹部内的、针对上述靶标分子的特异结合性分子的结合用基团,上述特异结合性分子是分子量为45,000以下的特异结合性蛋白或肽。

[0147] 项2.根据项1所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在上述分子印迹凹部内还具有信号物质的结合用基团。

[0148] 项3.根据项2所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在上述分子印迹凹部表面,上述特异结合性分子的结合用基团和上述信号物质的结合用基团相互独立。

[0149] 项4.根据项2所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,在上述分子印迹凹部内,上述特异结合性分子的结合用基团和上述信号物质的结合用基团构成由下述式(1)表示的功能性基团。

[0150] [化学式4]

[0151] $-R^2-L^1-R^1$ (1)

[0152] [R^1表示上述特异结合性分子的结合用基团,L^1表示直接键合或连接基团,R^2表示包含上述信号物质的结合用基团的连接基团。]

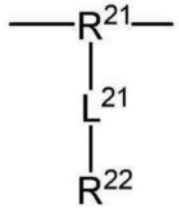
[0153] 项5.根据项4所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其中,包含上述信号

物质的结合用基团的连接基团由下述式(2)或(3)表示。

[0154] [化学式5]

[0155] $-NR^3-$ (2)

[0156] [化学式6]

[0157] 

(3)

[0158] [R^3表示氢或可以包含聚亚烷基二醇链的碳原子数1～8的烷基，R^{21}表示氮原子或烃，L^{21}表示直接键合或连接基团，R^{22}表示上述信号物质的结合用基团。]

[0159] 项6.根据项1～5中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，在上述分子印迹凹部内还具有与上述检测对象或上述分子印迹凹部的模板的相互作用基团。

[0160] 项7.根据项1～6中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，上述特异结合性分子选自由纳米抗体、抗体模拟物、磷脂结合性蛋白和凝集素组成的组。

[0161] 项8.根据项1～7中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，上述检测对象为具有膜结构的微粒体。

[0162] 项9.根据项1～8中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，上述分子印迹凹部的模板为血浆蛋白，上述检测对象为具有膜结构的微粒体，上述靶标分子为在微粒体的表面表达的分子。

[0163] 项10.根据项1～9中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其包含基板和设置于上述基板的表面上的聚合物膜，且上述印迹聚合物构成上述聚合物膜。

[0164] 项11.根据项1～9中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，上述印迹聚合物为粒子状。

[0165] 项12.根据项11所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材，其中，粒子状的上述印迹聚合物被固定在基板上。

[0166] 项13.一种检测对象分析用传感器，其包含项1～12中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材和结合于上述特异结合性分子的结合用基团的、针对上述检测对象的靶标分子的特异结合性基团，上述特异结合性基团是分子量为45,000以下的特异结合性蛋白基或肽基。

[0167] 项14.根据项13所述的检测对象分析用传感器，其还包含结合于上述信号物质的结合用基团的信号基团。

[0168] 项15.一种检测对象的分析方法，其包括如下工序：

[0169] 使包含检测对象的试样与项13或14所述的检测对象分析用传感器接触，将上述检测对象结合于上述特异结合性基团的工序；以及

[0170] 检测上述特异结合性基团与上述检测对象的结合的工序。

[0171] 项16.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法，其包括如下工序：

[0172] 单分子膜形成工序(1-1)，在基板上形成表面具有针对检测对象的靶标分子的特

异结合性分子的结合用基团和聚合引发性基团的单分子膜；

[0173] 工序(1-2)，针对上述结合性分子的结合用基团，由第一可逆连接基团介导而引入模板；

[0174] 工序(1-3)，添加聚合性单体，以上述聚合性单体为基质，以上述聚合引发性基团为聚合引发剂，合成针对上述模板的部分表面的分子印迹聚合物，由此在上述基板表面形成聚合物膜；以及

[0175] 工序(1-4)，使上述第一可逆连接基团断裂而转化为上述特异结合性分子的结合用基团，并且去除上述模板，

[0176] 上述特异结合性分子是分子量为45,000以下的特异结合性蛋白或肽。

[0177] 项17.根据项16所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法，其包括由第二可逆连接基团介导而用聚合性官能团对上述模板的上述表面进行修饰的修饰工序，

[0178] 在上述工序(1-3)中，以上述聚合性单体和上述聚合性官能团为基质，以上述聚合引发性基团为聚合引发剂，合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物，

[0179] 在工序(1-4)中，使上述第一可逆连接基团和上述第二可逆连接基团断裂而分别转化为上述特异结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团，并且去除上述模板。

[0180] 项18.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法，其包括如下工序：

[0181] 工序(1-11)，准备分子印迹的模板，其表面由第一可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰；

[0182] 工序(1-12)，以上述聚合性官能团为基质，合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物；以及

[0183] 工序(1-13)，使上述第一可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板，生成上述特异结合性分子的结合用基团，

[0184] 上述特异结合性分子是分子量为45,000以下的特异结合性蛋白或肽。

[0185] 项19.一种用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法，其包括如下工序：

[0186] 工序(1-21)，准备分子印迹的模板，其表面由第三可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰；

[0187] 工序(1-22)，以上述聚合性官能团为基质，合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物；

[0188] 工序(1-23)，使上述第三可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板；以及

[0189] 工序(1-24)，由第三可逆连接基团介导而引入具有功能性基团的分子，所述功能性基团包含针对检测对象的靶标分子的特异结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团，

[0190] 上述特异结合性分子是分子量为45,000以下的特异结合性蛋白或肽。

[0191] 项20.根据项19所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法，其中，在上述工序(1-22)中，还将包含与上述模板的相互作用基团的单体作为上述基质。

[0192] 项21.一种检测对象分析用传感器的制造方法，其包括如下工序：

[0193] 工序(1)，进行项16～20中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材

的制造方法;以及

[0194] 工序(2),将上述特异结合性分子结合于上述特异结合性分子的结合用基团。

[0195] 项22.一种检测对象分析用传感器的的制造方法,其包括如下工序:

[0196] 工序(1),进行项17、19和20中任一项所述的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法;

[0197] 工序(2),将上述特异结合性分子结合于上述特异结合性分子的结合用基团;以及

[0198] 工序(3),将信号物质结合于上述信号物质的结合用基团。

[0199] 发明效果

[0200] 根据本发明,尽管所引入的特异结合性分子的固有的结合能力低(解离常数Kd相对较大),但可提供灵敏度得到提高的生物传感器。对于带来如此优异的效果的具体机理尚未明确,但可认为:由于所引入的特异结合性分子是相对较小的分子,因此在通过分子印迹技术所形成的微小的孔中能够排列多个特异结合性分子,由此在感测时检测对象被以多个结合捕获,每个检测对象的特异结合性分子的结合能力提升至令人惊讶的水平(解离常数Kd显著降低)。

附图说明

[0201] 图1A是本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例的示意图。

[0202] 图1B-1是与图1A对应的本发明的检测对象分析用传感器的一例的示意图。

[0203] 图1B-2是与图1A对应的本发明的检测对象分析用传感器的另一例的示意图。

[0204] 图2A是本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例的示意图。

[0205] 图2B-1是与图2A对应的本发明的检测对象分析用传感器的一例的示意图。

[0206] 图2B-2是与图2A对应的本发明的检测对象分析用传感器的另一例的示意图。

[0207] 图3A是本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例的示意图。

[0208] 图3B是与图3A对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0209] 图4A是本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例的示意图。

[0210] 图4B是与图4A对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0211] 图5中,(A)是图1A的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例为设置于基板上的膜状的情形的示意图,(B)是与其对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0212] 图6中,(A)是图1A的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例为粒子的情形的示意图,(B)是与其对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0213] 图7中,(A)是图1A的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例为固定在基板上的粒子的情形的示意图,(B)是与其对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0214] 图8中,(A)是图2A的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例为设置于基板上的膜状的情形的示意图,(B1)、(B2)是与其对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0215] 图9中,(A)是图2A的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例为粒子的情形的示意图,(B)是与其对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0216] 图10中，(A)是图4A的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例为粒子的情形的示意图，(B)是与其对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0217] 图11中，(A)是图3A的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一例为固定在基板上的粒子的情形的示意图，(B)是与其对应的本发明的检测对象分析用传感器的示意图。

[0218] 图12-1a示意性地示出准备用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中的模板的一个实施方式。

[0219] 图12-1b示意性地示出准备用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中的模板的其他实施方式。

[0220] 图12-2示意性地示出用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中的工序(1-1)。

[0221] 图12-3a示意性地示出用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中的工序(1-2)(使用图12-1a中得到的模板60_1的情形)。

[0222] 图12-3b示意性地示出用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中的工序(1-2)(使用图12-1b中得到的模板60_2的情形)。

[0223] 图12-4示意性地示出用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中的工序(1-3)。

[0224] 图12-5示出用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中的工序(1-4)。

[0225] 图12-6示意性地示出图8(B)所示的基板状的检测对象分析用传感器10a-C的制造方法。

[0226] 图13-1a示意性地示出用于制作图6的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10-P'的制造方法中的工序(1-11)(使用模板60_1的情形)。

[0227] 图13-1b示意性地示出用于制作图6的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10-P'的制造方法中的工序(1-11)(使用模板60_2的情形)。

[0228] 图13-2示意性地示出用于制作图6的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10-P'的制造方法中的工序(1-12)。

[0229] 图13-3示意性地示出用于制作图6的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10-P'的制造方法中的工序(1-13)的一例。

[0230] 图13-4示意性地示出图6的(B)所示的粒子状的检测对象分析用传感器10-P的制造方法。

[0231] 图14-1示意性地示出用于制作图10的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10c-P'的制造方法中的工序(1-21)。

[0232] 图14-2示意性地示出用于制作图10的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10c-P'的制造方法中的工序(1-22)。

[0233] 图14-3示意性地示出用于制作图10的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10c-P'的制造方法中的工序(1-23)。

[0234] 图14-4示意性地示出用于制作图10的(A)所示的粒子状的检测对象分析用传感器的基材10c-P'的制造方法中的工序(1-24)。

[0235] 图14-5示意性地示出图10的(B)所示的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P的制造方法。

[0236] 图15示意性地示出在图14-3和图14-4之间将粒子状的检测对象分析用传感器的基材固定在基板上的工序。

[0237] 图16-1示意性地示出利用图10的(B)所示的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P的双重靶向的例子(分子印迹凹部21c的模板(60c)的浓度较高的环境中)。

[0238] 图16-2示意性地示出利用图10的(B)所示的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P的双重靶向的例子(分子印迹凹部21c的模板(60c)的浓度较低的环境中)。

[0239] 图17A示出利用实施例1的基板状的检测对象(外泌体)分析用传感器10a-C(引入Alexa Fluor 647作为信号物质)测得的、相对荧光强度与外泌体浓度的关系。

[0240] 图17B示出利用比较例1的未引入亲和体的分析传感器测得的、相对荧光强度与外泌体浓度的关系。

[0241] 图18示出利用实施例2的基板状的检测对象(外泌体)分析用传感器10a-C(引入罗丹明(rhodamine)作为信号物质)测得的、相对荧光强度与外泌体浓度的关系。

[0242] 图19示出利用实施例3的基板状的检测对象(外泌体)分析用传感器(其中,所述传感器为利用融合于特异结合性基团的信号物质的基板状的检测对象分析用传感器10^1型)测得的、相对荧光强度与外泌体浓度的关系。

[0243] 图20示出实施例4的粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10-PC的、粒子状分子印迹聚合物的TEM图像。

[0244] 图21示出利用实施例4的粒子状且固定在基板上的检测对象(外泌体)分析用传感器10-PC测得的、响应(response)的变化量与外泌体溶液浓度的关系。

[0245] 图22示出利用实施例5的粒子状且固定在基板上的检测对象(外泌体)分析用传感器10b-PC测得的、相对荧光强度与外泌体浓度的关系。

[0246] 图23示出在针对实施例5的粒子状且固定在基板上的检测对象(外泌体)分析用传感器10b-PC和引入抗HSA亲和体代替抗HER2亲和体的分析用传感器而添加源自HER2过表达型乳腺癌细胞株的外泌体的情形的相对荧光强度变化。

[0247] 图24示出实施例6的固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P的、粒子状分子印迹聚合物的TEM图像。

[0248] 图25示出利用实施例6的固定于基材上的粒子状的检测对象(外泌体)分析用传感器10c-P测得的、在外泌体与HSA的浓度比不同的溶液中的双重靶向。

具体实施方式

[0249] 下面,进一步详细地说明本发明。

[0250] 应理解的是,在本说明书全文中,只要未特别提及,单数形式的表述也包含其复数形式的概念。因此,应理解的是,只要未特别提及,单数形式的冠词(例如,在英语的情况下“a”、“an”、“the”等)也包含其复数形式的概念。另外,应理解的是,只要未特别提及,本说明书中所使用的术语为本领域中通常使用的含义所使用的术语。因此,除非另有定义,本说明书中使用的所有的专业术语及科学技术术语具有与本发明所属的领域的技术人员通常所理解的含义相同的含义。在存在冲突的情况下,以本说明书(包含定义在内)为准。

[0251] 在本说明书中,对本发明中所使用的术语和通常技术进行适当说明。

[0252] [1.用于制作检测对象分析用传感器的基材]

[0253] 本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材是作为用于制作后述的发明的分析用传感器的材料的基材。该用于制作分析用传感器的基材以用户可以简便地定制为能够以更高灵敏度检测出检测对象的传感器的方式来构成。

[0254] [1-1.基本构成(感测前驱部)]

[0255] 本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材,其特征在于,所述基材包含分子印迹聚合物,所述分子印迹聚合物具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部和设置于上述分子印迹凹部内的、针对上述靶标的特异结合性分子的结合用基团,上述特异结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团,和/或,分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。该基本构成构成用于制作检测对象分析用传感器的基材的感测前驱部(即,在定制为分析用传感器时构成感测部的部分)。

[0256] 在本说明书中,“靶标”是指作为目标的分子或物质。例如,靶标可以为分子或分子集合体。

[0257] 在本说明书中,“小型物质”是指小于抗体的任意物质,且可以与“小型结合性分子物质”互换使用。由于分子量的基准设为约15万,因此只要是小于该值的(即低于150,000的)分子量就可以包含在该概念中。作为优选的分子量,可举出:约14万以下、约13万以下、约12万以下、约11万以下、约10万以下、约9万以下、约8万以下、约7万以下、约7万以下、约6万以下,约5万以下、约4万以下、约3万以下、约22,000以下、约20,000以下、约19,000以下、约18,000以下、约17,000以下、约16,000以下、约15,000以下、约14,000以下、约13,000以下、约12,000以下、约11,000以下、约10,000以下、约9,000以下、约8,000以下、约7,000以下、约6,000以下等。作为小型分子的分子量,可以列举约200以上、约300以上、约400以上、约500以上、约600以上作为下限。

[0258] 作为小型物质,可以使用任意种类的物质,代表性地,可举出:蛋白质、多肽、肽、糖、脂质、核酸、核酸衍生物、人工(高分子)受体、其他有机分子、它们的复合分子等,可优选列举:蛋白质、多肽、肽,更优选为蛋白质或肽。

[0259] 在本说明书中,“人工(高分子)受体”是指识别靶标的分子印迹聚合物纳米粒子(粒径为约10nm～30nm)。可代替抗体用于夹心分析法(sandwich assay)等。作为这种人工受体,可以参照:Evan M.Peck and Bradley D.Smith,Chapter1:Applications of Synthetic Receptors for Biomolecules,in Synthetic Receptors for Biomolecules:Design Principles and Applications,2015,pp.1-38。

[0260] 在本说明书中,“结合用基团”或“分子印迹凹部”“适合于…”是指被构成为作为适合对象的物质(例如:小型物质、分子量为45,000的分子等)在具备“结合用基团”或“分子印迹凹部”的传感器用制造基材或传感器中使用时,能够在以作为适合对象的物质为对象进行检测工艺时被适当地检测到。

[0261] 代表性地,例如,“适合于小型物质的结合用基团”为适用于小于抗体的小型物质的结合用基团,可以优选利用氨基、羧基、硼酸基、顺式二醇基、醛基、酮基、氧氨基、酰肼基、生物素(生物胞素、脱硫生物素)基团、源自镍-次氮基三乙酸的基团、硫醇基、吡啶基二硫基和金属络合物等基团。另外,该结合用基团还可以由蛋白A、蛋白G、蛋白L或蛋白A/G等抗体

的Fc结构域结合蛋白、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和中性抗生物素蛋白等蛋白、包含一个或多个氨基、羧基、硼酸基、顺式二醇基、醛基、酮基、氧氨基、酰肼基、生物素(生物胞素、脱硫生物素)基团、源自镍-次氮基三乙酸的基团、硫醇基、吡啶基二硫基和金属络合物等基团的聚合物、树枝状聚合物以及寡聚DNA等介导而适合于小型物质。

[0262] 代表性地,例如,“分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成”是指:当分子印迹凹部被配置在传感器用制造基材或传感器中时,具有适合检测的形状或构成。

[0263] 对于本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的一些实例,分别作为用于制作检测对象分析用传感器的基材10’、10a’、10b’、10c’示意性地示于图1A、图2A、图3A、图4A中。这些图中所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材分别用于制作示意性地示于图1B-1、图1B-2、图2B-1、图2-2、图3B、图4B中的检测对象分析用传感器10、10_1、10a、$10a_1$、10b、10c。

[0264] 图1A所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10’包含分子印迹聚合物20,所述分子印迹聚合物20具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部21和设置于上述分子印迹凹部21内的、针对上述靶标的特异结合性分子的结合用基团22’。

[0265] 图2A所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10a’包含分子印迹聚合物20a,所述分子印迹聚合物20a具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部21和设置于上述分子印迹凹部21内的、针对上述靶标的特异结合性分子的结合用基团22’和信号物质结合用基团23’。即,除了在分子印迹凹部21内还设置有信号物质结合用基团23’以外,用于制作检测对象分析用传感器的基材10a’与图1A的用于制作检测对象分析用传感器的基材10’相同。进而,在用于制作检测对象分析用传感器的基材10a’中,在分子印迹凹部21的表面上,针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’和信号物质的结合用基团23’相互独立(即,在分子印迹凹部21的表面方向上相互隔开)。

[0266] 图3A所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10b’包含分子印迹聚合物20b,所述分子印迹聚合物20b具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部21和设置于上述分子印迹凹部21内的、针对上述靶标的特异结合性分子的结合用基团22b’和信号物质结合用基团23b’。即,在分子印迹凹部21内还设置有信号物质结合用基团23b’的方面,用于制作检测对象分析用传感器的基材10b’与图2A的用于制作检测对象分析用传感器的基材10a’相同。然而,与图2A的用于制作检测对象分析用传感器的基材10a’不同,在用于制作检测对象分析用传感器的基材10b’中,在分子印迹凹部21内,针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22b’和信号物质的结合用基团23b’构成规定的功能性基团24b。

[0267] 图4A所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10c’包含分子印迹聚合物20c,所述分子印迹聚合物20c具有容纳检测对象的靶标的分子印迹凹部21c和设置于上述分子印迹凹部21内的、针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22b’和信号物质的结合用基团23b’以及与分子印迹凹部21c的模板的相互作用基团25。即,在还包含信号物质结合用基团23b’方面、以及针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22b’和信号物质的结合用基团23b’构成规定的功能性基团24b方面,用于制作检测对象分析用传感器的基材10c’与图3A的用于制作检测对象分析用传感器的基材10b’相同。然而,与图3A的用于制作检测对象分析用传感器的基材10b’不同,用于制作检测对象分析用传感器的基材10c’还包含相互作用基团25,并且分子印迹凹部21c限定为由与相互作用基团25进行相互作用的模板形成。

[0268] 图1A、图2A、图3A、图4A所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10'、10a'、10b'、10c'分别用于制作示意性地示于图1B-1、图1B-2、图2B-1、图2B-2、图3B、图4B中的检测对象分析用传感器10、10_1、10a、$10a_1$、10b、10c时，至少使针对靶标的特异结合性基团42(小型物质基团)结合于针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22'、22b'，且使信号基团43结合于信号物质的结合用基团23'、23b'。

[0269] [1-2.形状]

[0270] 以用于制作检测对象分析用传感器的基材10-C'、10-P'、10-PC'作为图1A所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10'的更具体的实例而示于图5的(A)、图6的(A)、图7(A)中。本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-C'、10-P'、10-PC'分别用于制作示意性地示于图5的(B)、图6的(B)、图7的(B)中的检测对象分析用传感器10-C、10-P、10-PC。

[0271] 图5的(A)所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-C'是本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10'为基板状(芯片状)的情形的实例。即，用于制作检测对象分析用传感器的基材10-C'包含基板30和设置于基板30的表面上的聚合物膜，分子印迹聚合物10构成该聚合物膜。

[0272] 图6的(A)所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-P'是本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10'为粒子状的情形的实例。即，在用于制作检测对象分析用传感器的基材10-P'中，分子印迹聚合物10呈粒子状。

[0273] 图7(A)所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-PC'是本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10'为粒子状且被固定在基板上(芯片)上的情形的实例。即，图7(A)所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-PC'是图6的(A)所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-P'被固定在基板30上。

[0274] 作为分子印迹聚合物的形状的优选实例，可举出粒子状。当分子印迹聚合物为粒子状时，不仅可以通过如上述图7(A)所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-PC'那样固定在基板上而使检测对象分析用传感器成为基板(芯片)状的形状，而且还可以通过如上述图6的(A)所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-P'那样成为非固定状态而使检测对象分析用传感器成为游离(例如分散于分散介质中)的形态，在通用性方面优异。

[0275] 对于为粒子状的情形的分子印迹聚合物的平均粒径，根据检测对象或检测对象的靶标的尺寸和用途而不同，例如，以通过动态光散射法(DLS)测定的体积平均粒径计，可举出：例如为5nm～500nm，优选为8nm～170nm，更优选为10nm～100nm，进一步优选为15nm～50nm，更进一步优选为20nm～30nm。另外，以通过DLS测定的Z平均粒径计，可举出：例如为5nm～500nm，优选为50nm～350nm，更优选为80nm～200nm，进一步优选为100nm～140nm，更进一步优选为120nm～170nm。进而，以通过透射型电子显微镜(TEM)测定的数均粒径计，可举出：例如为5nm～150nm，优选为10nm～100nm，更优选为10nm～35nm或45nm～90nm，进一步优选为20nm～30nm。需要说明的是，通过透射型电子显微镜(TEM)测定的数均粒径是指：以在透射型电子显微图像中粒子的长轴和短轴的平均值作为粒径、且随机选择的100个粒子的该粒径的平均值。

[0276] 对于图2A、图3A和图4A所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材

10a’、10b’、10c’中的任一者，也可以同样地构成为基板状(芯片状)的基材、粒子状的基材或者粒子状的基材固定在基板上的基材。分别以用于制作检测对象分析用传感器的基材10a-C’、10a-P’、10c-P’、10b-PC’作为这些基材的一些实例而示意性地示于图8的(A)、图9(A)、图10的(A)、图11(A)中。这些图中所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材分别用于制作示意性地示于图5的(B)、图6的(B)、图7的(B)、图8的(B1)和(B2)、图9的(B)、图10的(B)、图11的(B)中的检测对象分析用传感器。

[0277] 当图5的(A)、图6的(A)、图7(A)、图8的(A)、图9(A)、图10的(A)、图11(A)所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-C’、10-P’、10-PC’、10a-C’、10a-P’、10c-P’、10b-PC’用于制作图5的(B)、图6的(B)、图7的(B)、图8(B1)、图8(B2)、图9的(B)、图10的(B)、图11的(B)所示的检测对象分析用传感器10-C、10-P、10-PC、10a-C、$10a_1$-C、10a-P、10c-P、10b-PC时，至少使针对靶标的特异结合性基团42(小型物质基团)结合于针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’、22b’，使信号基团43结合于信号物质的结合用基团23’、23b’。

[0278] [1-3.各构成要素]

[0279] 以下，针对构成这些用于制作检测对象分析用传感器的基板的各个要素进行详细说明。

[0280] [1-3-1.分子印迹凹部]

[0281] 分子印迹凹部21、21c是本发明的检测对象分析用传感器中的提供感测场的部分，以使其容纳检测对象的靶标的方式来形成。具体而言，分子印迹凹部21、21c是利用分子印迹聚合法中所使用的模板(后述的模板60、60c)而使聚合物模型化的部分，具有对应于该模板的部分表面形状的形状。凹部21、21c以至少能容纳检测对象的靶标的大小来形成即可。另外，凹部21、21c具有分子印迹凹部适合于小型物质的形状或构成。

[0282] 分子印迹凹部21、21c的“能容纳检测对象的靶标的大小”是指：在引入针对靶标的特异结合性基团42而成为分析用传感器的情况下，分子印迹凹部21、21c的开口足够大，至检测对象的至少一部分(例如，至少后述检测对象70的靶标72中的与特异结合性基团42的特异性结合部位)能进入分子印迹凹部21、21c内并接近特异结合性分子而结合的程度。

[0283] 因此，凹部21、21c可以将与检测对象或检测对象的靶标相同大小的物质作为模板或者将尺寸大于检测对象的物质作为模板。优选地，凹部21、21c将尺寸大于检测对象或检测对象的靶标的物质作为模板。

[0284] [1-3-2.针对靶标的特异结合性分子的结合用基团]

[0285] 针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’、22b’为通过与针对靶标的特异结合性基团(图1B-1、图1B-2、图2B-1、图2B-2、图3B、图4B中的特异结合性基团42)结合而能引入针对靶标的特异结合性分子的基团。用户可以自由选择靶标，可以将针对所选择的靶标的特异结合性分子引入结合用基团22’、22b’。

[0286] 在本说明书中，特异结合性分子是对靶标具有较高的亲和性·选择性的结合性分子。

[0287] 另外，在本发明的用于制作分析用传感器的基材包含基板30的情况下(例如，在图示的实施方式中，图5的(A)、图7(A)、图8的(A)、图11(A)所示的本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-C’、10-PC’、10a-C’、10b-PC’等的情况下)，通过在一个基板30上对一个凹部21、21c引入一种特异结合性分子，对另一个凹部21、21c引入另一种特异结合性分

子(即,与一种特异结合性分子具有不同的特异结合性基团的分子),从而也可以定制为能够在一个基板30中使用多种特异结合性基团进行检测对象的分析。

[0288] 需要说明的是,对于向一个基板30引入多种特异结合性分子的具体方法,可举出:将基板30上的区域划分成多个区域,向所划分的每个区域引入不同的特异结合性分子的方法等。作为划分的方法,可举出:在基板30上,设置不存在由分子印迹聚合物形成的聚合物膜(例如,图5的(A)、图8的(A)的膜状分子印迹聚合物20、20a)或聚合物粒子(例如,图7(A)、图11(A)的粒子状分子印迹聚合物20、20b)的部分的方法;在由分子印迹聚合物形成的聚合物膜(例如,图5的(A)、图8的(A)的膜状分子印迹聚合物20、20a)上设置不存在凹部21的部分的方法;在由分子印迹聚合物构成的聚合物膜(例如,图5的(A)、图8的(A)的膜状分子印迹聚合物20、20a)上用聚合物等凸设屏障的方法等。

[0289] 作为这种定制的具体例,通过对一个凹部21、21c引入与特定的小胞外囊泡的表面蛋白质结合的特异结合性分子、对另一个凹部21、21c引入与特定的蛋白质(不在小胞外囊泡的表面表达的蛋白质)结合的特异结合性分子,能够在一个基材30上分析小胞外囊泡和该蛋白质两者。另外,作为定制的另一个具体例,通过对一个凹部21、21c引入与特定的小胞外囊泡的表面蛋白A结合的特异结合性分子、对另一个凹部31引入与该特定的小胞外囊泡的表面蛋白质B结合的特异结合性分子,能够在一个基材30上分析小胞外囊泡上的不同种类的表面蛋白质。另外,通过向一个凹部引入针对在源自细胞类型A的细胞外囊泡A'上表达的物质的特异性结合分子、向另一个凹部引入针对在源自细胞类型B的细胞外囊泡B'上表达的物质的特异性结合分子,能够在一个基材上分析源自不同的细胞类型的小胞外囊泡。这些具体例不仅可以适用于不同种类的表面蛋白质,而且可以适用于不同种类的表面靶标(例如,蛋白质和糖链等)。

[0290] 在本发明中,每一个分子印迹凹部21、21c设置有多个针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22'、22b'。

[0291] 作为特异结合性分子的结合用基团22'、22b',可没有特别限制地从通常已知的结合性官能团中选择。

[0292] 在特异结合性分子的结合用基团22'、22b'中,作为特异结合性分子的结合用基团22',可从通常作为结合性官能团而已知的基团中选择能形成可逆连接基团(后述的第一可逆连接基团22)的基团。可逆连接基团是指断裂(开裂)和键合是可逆的直接键合或二价以上的基团。可逆连接基团(后述的第一可逆连接基团22)的可逆部分的键合方式可以是共价键和非共价键。作为特异结合性分子的结合用基团22'的具体例,可举出下述表1的第1-1栏所示的基团,作为对应的可逆连接基团(后述的第一可逆连接基团22)的具体例,可举出下述表1的第1-3栏所示的基团,但并不限定于此。

[0293] [表1-1]

[0294]

1－1	1－2	1－3	1－4
结合性官能团	结合性官能团	可逆连接基团	可逆部分的键合的方式
（针对靶标分子的特异结合性分子的结合用基团22’）	（结合性基团22”）	（第一可逆连接基团22）	
（信号物质的结合用基团23’）	（结合性基团23”）	（第二可逆连接基团23）	
（结合性基团26b’）	（结合性基团26b”）	（第三可逆连接基团26b）	
硫醇基、二硫基、吡啶基二硫基	硫醇基、二硫基、吡啶基二硫基	二硫基	共价键
二羟硼基	糖基（顺式二醇基）	硼酸顺式二醇酯	共价键
羰基·醛基	氨基	亚氨键基	共价键
氨基	羰基·醛基		
羧基	羟基	羧酸酯基	共价键
羟基	羧基·羧酸活性酯基		
氨氧基	羧基·醛基	肟基	共价键
羰基·醛基	氨氧基		
羧基·醛基	羟基	缩醛基	共价键
羟基	羧基·醛基		

[0295] [表1-2]

[0296]

金属络合物 (Ni-NTA(源自镍-次氮基三乙酸的基团)等)	聚组氨酸(His)标签 (6x His, 8 x His,10x His等)	配位键	非共价键
碱性基团 (氨基、环状仲氨基 (例如吡咯烷基)、哌啶基、吡啶基、咪唑基、胍基等)	酸性基团 (羧基·羧酸活性酯基等)	氢键	非共价键
羟基			
酸性基团	碱性基团		非共价键
(羧基等)	(氨基、环状仲氨基 (例如吡咯烷基、哌啶基)、吡啶基、咪唑基、胍基等)、羟基		
芳香族基团 (氨基苯基等苯基、氨基萘基等萘基、吡啶基等)	芳香族基团 (氨基苯基等苯基、氨基萘基等萘基、吡啶基等)	疏水键	非共价键
酰肼	羰基·醛基	腙键	共价键
羰基·醛基	酰肼		
抗生物素蛋白 (中性抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白)	生物素(生物胞素、脱硫生物素)	抗生物素蛋白-生物素键	非共价键
生物素(生物胞素、脱硫生物素)	抗生物素蛋白 (中性抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白)		

[0297] [表1-3]

[0298]

谷胱甘肽(GSH)	谷胱甘肽-S-转移酶(GST)	谷胱甘肽(GSH)-谷胱甘肽-S-转移酶(GST)键	非共价键
谷胱甘肽-S-转移酶(GST)	谷胱甘肽(GSH)		
Phos-tag	磷酸根离子	配位键	非共价键
磷酸根离子	Phos-tag		

[0299] 在这些结合性官能团中,作为特异结合性分子的结合用基团22',优选为通过共价键或配位键形成可逆连接基团的基团。通过共价键或配位键形成的可逆连接基团与氢键和疏水键相比相对稳定,在聚合反应时也保持稳定并容易形成分子印迹凹部21、21c,另一方面,由于该可逆连接基团容易因还原剂、相对低温下的加热、相对温和的条件下的水解、光照射等而断裂,因此在聚合反应后也容易去除模板。

[0300] 进而，在这些结合性官能团中，作为特异结合性分子的结合用基团22’的适合实例，可举出金属络合物、更优选镍络合物、进一步优选源自镍-次氮基三乙酸的基团等。作为这种特异结合性分子的结合用基团22’适合的情形，可举出用于制作检测对象分析用传感器的基材的分子印迹聚合物构成聚合物膜的情形(例如，图5的(A)、图8的(A)所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-C’、10a-C’等的情形)。

[0301] 另外，在这些结合性官能团中，作为特异结合性分子的结合用基团22’的其他适合实例，可举出硫醇基或吡啶基二硫基、更优选硫醇基。作为这种特异结合性分子的结合用基团22’适合的情形，可举出用于制作检测对象分析用传感器的基材的分子印迹聚合物为粒子状的情形(例如，图6的(A)、图7(A)、图9(A)所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-P’、10-PC’、10a-P’等的情形)。

[0302] 在特异结合性分子的结合用基团22’、22b’中，作为特异结合性分子的结合用基团22b’，可从通常作为结合性官能团而已知的基团中选择能形成可逆连接基团或非可逆连接基团(后述的连接基团22b)的基团。从稳定地结合特异结合性分子(后述的特异结合性分子R42)的观点出发，作为特异结合性分子的结合用基团22b’，优选为通过共价键能形成可逆连接基团或非可逆连接基团(后述的连接基团22b)的基团。作为这种特异结合性分子的结合用基团22b’的具体例，可举出下述表2的第2-1栏所示的基团，但并不限定于此。

[0303] [表2-1]

[0304]

2-1	2-2
结合性官能团	对应的结合性官能团
(针对靶标分子的特异结合性分子的结合用基团 22b’)	(结合性基团 22b”)
(信号物质的结合用基团 23b’)	(结合性基团 23b”)
(结合性基团 BG22”、BG23”、BG1’、BG6”)	(结合性基团BG22’、BG23’、BG1’、BG6’)
氨基 (一价氨基、二价氨基等)	羧酸活性酯基 (使用了 N-羟基琥珀酰亚胺、硝基苯酚、五氟苯酚等的活性酯基； NHS氨基甲酸酯等氨基甲酸活性酯基)； 羧基；醛基；异氰酸酯基；异硫氰酸酯基； 环氧基；马来酰亚胺基等
氨基	羧基
羧基	氨基
糖基 (顺式二醇基)	二羟硼基
二羟硼基	糖基 (顺式二醇基)
硫醇基	马来酰亚胺基、丙烯酸酯基等缺电子的不饱和碳基；碘乙酰胺基；硫醇基； 吡啶基二硫基；用于自由基加成系链接化学的烯烃 (乙烯基砜) ·炔基； 用于天然化学连接法的硫酯基等

[0305] [表2-2]

[0306]

马来酰亚胺基、丙烯酸酯基等缺电子的不饱和碳基；碘乙酰胺基；硫醇基；吡啶基二硫基；用于自由基加成系链接化学的烯烃（乙烯基砜）·炔基；用于天然化学连接法的硫酯基等	硫醇基
羰基·醛基	氨基
氨基	羰基·醛基
氨氧基	羰基·醛基
羰基·醛基	氨氧基
羰基·醛基	羟基
羟基	羰基·醛基
羟基、酚羟基	羧酸活性酯基
酰肼	羰基·醛基
羰基·醛基	酰肼
抗生物素蛋白（中性抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白）	生物素（生物胞素、脱硫生物素）
生物素（生物胞素、脱硫生物素）	抗生物素蛋白（中性抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白）
谷胱甘肽（GSH）	谷胱甘肽-S-转移酶
谷胱甘肽-S-转移酶	谷胱甘肽（GSH）

[0307] 需要说明的是，在本发明中，有时可以对经化学修饰形成的结合性基团进行化学修饰。

[0308] 在这些结合性官能团中，作为特异结合性分子的结合用基团22b'的适合实例，可举出硫醇基或吡啶基二硫基、更优选吡啶基二硫基。

[0309] [1-3-3.信号物质的结合用基团]

[0310] 信号物质的结合用基团23'、23b'为通过与信号基团(图2B-1、图2B-2、图3B、图4B中的信号基团43)结合而能引入信号物质的基团。用户可以自由选择信号物质，可以将信号物质引入至结合用基团23'、23b'。

[0311] 在本发明中，信号物质的结合用基团23'、23b'可以对每一个分子印迹凹部21、21c设置多个。

[0312] 作为信号物质的结合用基团23'、23b'，只要是分别与特异结合性分子的结合用基团22'、22b'不同的基团，就可没有特别限制地从通常作为结合性官能团而已知的基团中选择。

[0313] 在信号物质的结合用基团23'、23b'中，作为信号物质的结合用基团23'，可从通常已知作为结合性官能团而已知的基团中选择能形成可逆连接基团(后述的第二可逆连接基团23)的基团。可逆连接基团(后述的第二可逆连接基团23)的可逆部分的键合方式可以是共价键和非共价键。作为信号物质的结合用基团23'的具体例，可举出上述表1的第1-1栏所示的基团，作为对应的可逆连接基团(后述的第二可逆连接基团23)的具体例，可举出上述表1的第1-3栏所示的基团。

[0314] 在这些结合性官能团中，作为信号物质的结合用基团23'，优选为通过共价键或配位键形成可逆连接基团的基团。通过共价键或配位键形成的可逆连接基团与氢键和疏水键相比相对稳定，在聚合反应时也保持稳定并容易形成分子印迹凹部21、21c，另一方面，由于该可逆连接基团容易因还原剂、相对低温下的加热、相对温和的条件下的水解、光照射等而断裂，因此在聚合反应后也容易去除模板。

[0315] 进而，在这些结合性官能团中，作为信号物质的结合用基团23'的适合实例，可举出通过共价键形成可逆连接基团的基团、更优选硫醇基或吡啶基二硫基、进一步优选硫醇基。

[0316] 在信号物质的结合用基团23'、23b'中，作为信号物质的结合用基团23b'，可从通常作为结合性官能团而已知的基团中选择能形成可逆连接基团或非可逆连接基团(后述的连接基团23b)的基团。从稳定地结合信号物质(后述的信号物质R43)的观点出发，作为信号物质的结合用基团23b'，优选为通过共价键能形成可逆连接基团或非可逆连接基团(后述的连接基团23b)的基团。作为这种信号物质的结合用基团23b'的具体例，可举出上述表2的第2-1栏所示的基团。

[0317] 在这些结合性官能团中，作为信号物质的结合用基团23b'的适合实例，可举出氨基。

[0318] [1-3-4.功能性基团]

[0319] 上述特异结合性分子的结合用基团22b'和信号物质的结合用基团23b'构成功能性基团24b。对于功能性基团24b，由于在一个基团上具备特异结合性分子的结合用基团22b'和信号物质的结合用基团23b'两者，因此容易使这些基团彼此靠近地设置在用于制作检测对象分析用传感器的基材上。在用于制作检测对象分析用传感器的基材中使特异结合性分子的结合用基团22b'和信号物质的结合用基团23b'彼此靠近地设置即是在检测对象分析用传感器中使特异结合性基团42和信号基团43彼此靠近地设置，由此，在检测对象分析用传感器识别检测对象时，可以更高灵敏度地得到信号变化。

[0320] 在图示的方式中，特异结合性分子的结合用基团22b'位于功能性基团24b的前端侧，且信号物质的结合用基团23b'位于功能性基团24b的基端侧，但在功能性基团24b中，特异结合性分子的结合用基团22b'和信号物质的结合用基团23b'之间的位置关系只要是结合于特异结合性分子的结合用基团22b'的特异结合性基团42能够与检测对象的靶标特异性结合、并且在特异性结合时结合于信号物质的结合用基团23b'的信号基团43经历环境变化的位置关系即可，不限定于此。例如，特异结合性分子的结合用基团22b'和信号物质的结合用基团23b'的位置关系可以与图示的方式相反。然而，从通过更容易使检测对象的靶标与特异结合性基团42特异性结合而得到更高的识别能力的观点、和/或从通过在检测对象的靶标与特异结合性基团42的特异性结合时更可靠地使信号基团43的环境变化而更高灵敏度地得到信号变化的观点出发，优选如图所示那样使特异结合性分子的结合用基团22b'位于功能性基团24b的前端侧、且信号物质的结合用基团23b'位于功能性基团24b的基端侧。

[0321] 作为功能性基团24b的更具体的结构，可举出由下述式(1)表示的基团。

[0322] [化学式7]

[0323] $-R^2-L^1-R^1$ (1)

[0324] 式(1)中,R^1表示特异结合性分子的结合用基团,L^1表示直接键合或连接基团,R^2表示包含信号物质的结合用基团的连接基团。

[0325] 对于特异结合性分子的结合用基团R^1,如上述“1-3-2.针对靶标的特异结合性分子的结合用基团”中所述。

[0326] 直接键合或连接基团L^1介于特异结合性分子的结合用基团R^1和包含信号物质的结合用基团的连接基团R^2之间。在检测对象分析用传感器识别检测对象时,从更有效地抑制信号基团43(其与连接基团R^2所包含的信号物质的结合用基团结合)与检测对象对特异结合性基团42的特异性识别(其与特异结合性分子的结合用基团R^1结合)的干扰的观点出发,L^1更优选为连接基团。

[0327] 在L^1为连接基团的情况下,作为该连接基团,可举出:可以包含聚氧亚烷基的亚烷基(例如,C1～C8亚烷基、或聚氧C1～C3亚烷基C1～C8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。从分子设计的观点等出发,作为该连接基团,可举出:优选为可以包含聚氧亚烷基的亚烷基与酯键和/或酰胺键的组合、更优选为可以包含聚氧亚烷基的亚烷基与酯键或酰胺键的组合、进一步优选为1个或2个以上的亚烷基(该连接基团所包含的所有亚烷基的碳原子数的总数例如为1～8,优选为2～6,更优选为3～5,特别优选为4)与酯键或酰胺键的组合。

[0328] 作为包含信号物质的结合用基团的连接基团R^2中的信号物质的结合用基团,如上述“1-3-3.信号物质的结合用基团”中所述。包含信号物质的结合用基团的连接基团R^2为非支链状或支链状的二价基团。

[0329] 在连接基团R^2为非支链状的情况下,信号物质结合用基团自身形成连接基团R^2(即,连接基团R^2由信号物质结合用基团构成)。作为这样的非支链状的连接基团R^2即信号物质结合用基团,可举出由下述式(2)表示的二价氨基。

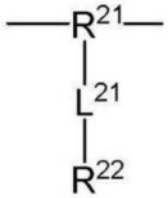
[0330] [化学式8]

[0331] $-NR^3-$ (2)

[0332] 式(2)中,R^3为氢或可以包含聚氧亚烷基的碳原子数1～8的烷基(例如,C1～C8亚烷基、或聚氧C1～C3亚烷基C1～C8亚烷基),优选表示氢。

[0333] 在连接基团R^2为支链状的情况下,信号物质结合用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)表示的二价基团。

[0334] [化学式9]

[0335] 

(3)

[0336] 式(3)中,R^{21}表示氮原子或烃,L^{21}表示直接键合或连接基团,R^{22}表示信号物质的结合用基团。

[0337] 在氮原子或烃R^{21}为烃的情况下,R^{21}为由$-C-R^{211}$表示的烃。作为R^{211},没有特别限定,可举出例如氢原子或可以包含聚氧亚烷基的碳原子数1～8的烷基(例如C1～C8烷基或聚氧C1～C3亚烷基C1～C8烷基),可优选列举氢原子。

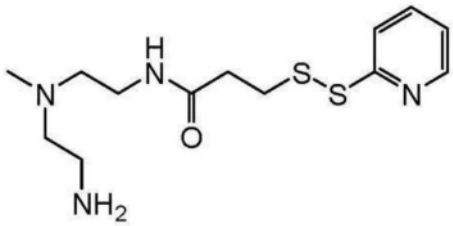
[0338] 作为直接键合或连接基团L^{21}，在检测对象分析用传感器识别检测对象时，从更有效地抑制信号基团43(其与信号物质的结合用基团R^{22}结合)与检测对象对特异结合性基团42(其与特异结合性分子的结合用基团R^{1}结合)的特异性识别的干扰的观点出发，更优选为连接基团。

[0339] 在直接键合或连接基团L^{21}为连接基团的情况下，作为该连接基团，可举出：可以包含聚氧亚烷基的亚烷基(例如C1～C8亚烷基或聚氧C1～C3亚烷基C1～C8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。从分子设计的观点等出发，作为该连接基团，可举出：优选为可以包含聚氧亚烷基的亚烷基、更优选为碳原子数1～6(优选1～4、更优选1～3、特别优选2)的亚烷基。

[0340] 对于信号物质的结合用基团R^{22}，如上述“1-3-3.信号物质的结合用基团”中所述。

[0341] 作为由上述式(1)表示的基团的非限定性具体例，可举出以下基团。

[0342] [化学式10]

[0343] 

(1a)

[0344] [1-3-5.相互作用基团]

[0345] 图4A所示的用于制作检测对象分析用传感器的基材10c中的相互作用基团25是与分子印迹凹部21c的模板中的相互作用部位(后述的相互作用部位65c)进行相互作用的基团。作为对应于相互作用基团25的模板(具有后述的相互作用部位65c的模板)，可举出蛋白质、糖蛋白等生物分子。

[0346] 相互作用基团25的具体例可根据对应的模板的表面状态、即模板具有的相互作用基团来设计。可举出例如：与构成作为模板的蛋白质或糖蛋白等的特定的氨基酸残基或糖残基等之间通过相互作用而能形成氢键、静电相互作用或弱共价键等的基团；以及与作为模板的蛋白质的特定的疏水性区域之间能形成疏水键的基团等。

[0347] 作为相互作用基团25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、和/或[7]二羟硼基(-B(OH)$_2$)。[2]取代或未取代的芳香族基团中的芳香族基团包含[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25可以是包含这些基团中的任一者的基团，也可以是包含选自这些基团中的两种以上的组合的基团。下述表中示出相互作用基团25、对应的相互作用部位(后述的相互作用部位65c)和通过它们的相互作用而形成的非共价键的键的种类的组合，但并不限定于此。

[0348] [表3]

[0349]

3-1	3-2	3-3
相互作用基团25	模板中的相互作用部位65c	非共价键的键合种类
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）	酸性氨基酸残基 （羧基等）	非共价键 （氢键、静电相互作用）
酸性基团 （羧基、磺基等）	碱性氨基酸残基 （氨基等）	非共价键 （氢键、静电相互作用）
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）	芳香族氨基酸残基 （苯基、吲哚基、咪唑基等）	非共价键 （疏水性相互作用）
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）	疏水性区域	非共价键 （疏水性相互作用）
二羟硼基	糖基（顺式二醇基）	弱共价键 （硼酸顺式二醇酯基）

[0350] 在[1]取代或未取代的氨基中，作为取代氨基中的取代基，可举出：碳原子数1～8的直链或支链的烷基、取代或未取代的芳烷基；构成环状仲氨基的碳原子数4～6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列举的基团。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。这些取代或未取代的氨基中，优选为环状仲氨基，更优选为吡咯烷基。

[0351] 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2～12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1～8的直链或支链的烷基等。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、吡嗪基、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。

[0352] 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6～16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1～8的直链或支链的烷基、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-

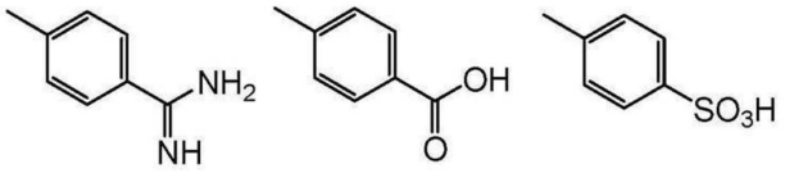
正丁基-2-萘基、二甲基苯基(2,4-二甲基苯基、2,5-二甲基苯基、3,4-二甲基苯基、3,5-二甲基苯基、2,6-二甲基苯基等)、三甲基苯基(2,3,5-三甲基苯基、2,3,6-三甲基苯基、3,4,5-三甲基苯基等)、二乙基苯基(2,4-二乙基苯基、2,6-二乙基苯基等)、2,5-二异丙基苯基、2,6-二异丁基苯基、二叔丁基苯基(2,4-二叔丁基苯基、2,5-二叔丁基苯基等)、4,6-二叔丁基-2-甲基苯基、5-叔丁基-2-甲基苯基、4-叔丁基-2,6-二甲基苯基、氟苯基(4-氟苯基、3-氟苯基、2-氟苯基等)、氯苯基(4-氯苯基、3-氯苯基、2-氯苯基等)、溴苯基(4-溴苯基、2-溴苯基等)、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。

[0353] 另外,作为包含选自上述[1]～[7]的基团中的2种以上的组合的基团,可举出包含作为[1]～[7]的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、[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。

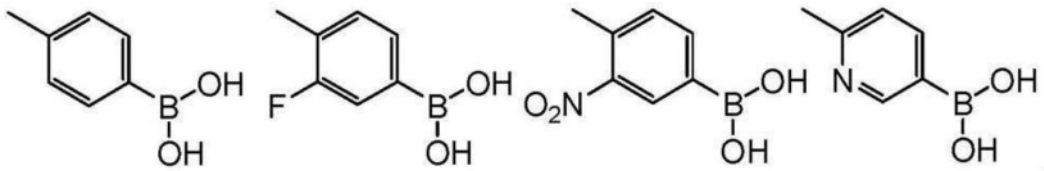
[0354] [26]取代或未取代的亚芳基中的[261]含氮亚芳基是从作为上述的[251]取代或未取代的含氮芳基所列举的基团中去除一个键合于构成芳香族环的碳的氢而成的基团。[26]取代或未取代的亚芳基中的[262]不含氮亚芳基是从作为上述的[252]取代或未取代的不含氮芳基所列举的基团中去除一个键合于构成芳香族环的碳的氢而成的基团。

[0355] 作为包含选自上述[1]～[7]的基团中的2种以上的组合的具体基团,可举出:作为[3]脒基和[26]取代或未取代的亚芳基的组合的脒基芳基、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、作为[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。

[0356] [化学式11]



[0357]



[0358] [1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物]

[0359] 作为构成分子印迹聚合物20、20a、20b、20c的聚合物的构成成分,没有特别限定。例如,该聚合物包含选自由源于生物相容性单体的单元、源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元、以及源于具有上述相互作用基团25的功能性单体的单元组成的组中的结构

单元。需要说明的是，在本说明书中，为了方便起见，将通过使用模板的印迹聚合而合成的聚合物记作“分子印迹聚合物”，在本发明中，由于也允许非分子的物质(例如具有膜结构的微粒体)作为模板，因此“分子印迹聚合物”也包含通过使用非分子的物质作为模板的印迹聚合而合成的聚合物。

[0360] (源于生物相容性单体的单元)

[0361] 构成分子印迹聚合物20、20a、20b、20c的聚合物优选至少包含源于生物相容性单体的成分。生物相容性是指不引起生物物质粘附的性质。通过包含源于生物相容性单体(例如，例示为后述的生物相容性单体M28)的成分，能够良好地抑制向分子印迹聚合物20、20a、20b、20c表面的非特异性吸附。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。

[0362] 两性离子单体在一个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。可举出例如：磷酸酯甜菜碱(phosphobetaine)、磺基甜菜碱和羧基甜菜碱等。

[0363] 更具体而言，作为磷酸酯甜菜碱，可举出侧链具有磷酸胆碱基(phosphorylcholine group)的分子，可优选举出2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)等。

[0364] 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。

[0365] 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。

[0366] 在这些两性离子单体中，优选举出磷酸酯甜菜碱，更优选举出2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)。

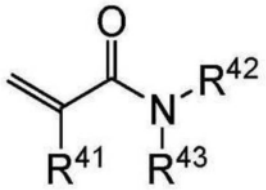
[0367] 作为分子印迹聚合物20、20a、20b、20c的全部结构单元中的源于生物相容性单体的单元的比例，可举出例如1摩尔％以上且100摩尔％以下。在抑制分子印迹聚合物20、20a、20b、20c表面处的非特异性吸附的方面，优选源于生物相容性单体的单元的含量为上述下限值以上。另外，上述源于生物相容性单体的单元的比例的优选范围可以根据分子印迹聚合物20、20a、20b、20c的形状不同而不同。例如，在分子印迹聚合物20、20a、20b、20c为膜状的情况下，作为上述源于生物相容性单体的单元的比例的优选范围，可举出：30摩尔％以上，更优选为50摩尔％以上，进一步优选为70摩尔％以上，更进一步优选为80摩尔％以上，再进一步优选为90摩尔％以上，特别优选为95摩尔％以上。另外，在分子印迹聚合物20、20a、20b、20c为粒子状的情况下，作为上述源于生物相容性单体的单元的比例的优选范围，可举出：1摩尔％～50摩尔％，优选为2摩尔％～30摩尔％，更优选为3摩尔％～10摩尔％，进一步优选为4摩尔％～6摩尔％，特别优选为4.5摩尔％～5.5摩尔％。

[0368] (源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元)

[0369] 构成分子印迹聚合物20、20a、20b、20c的聚合物可以包含源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元。特别是在分子印迹聚合物20、20a、20b、20c为粒子状的情况下，优选使构成聚合物包含源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元。

[0370] N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺(例如，例示为后述的聚合性单体M29)由下述式(4)表示。

[0371] [化学式12]

[0372]  (4)

[0373] 式(4)中,R^{41}表示氢或甲基、优选氢,R^{42}和R^{43}分别独立地表示氢、碳原子数1～6的直链状或支链状的烷基、碳原子数1～6的直链状或支链状的羟基烷基、或者碳原子数1～6的直链状或支链状的氨基烷基,它们可以彼此相同或不同;另外,R^{42}和R^{43}可以与担载它们的氮原子一起形成含氧原子的饱和5元环～7元环。

[0374] 作为碳原子数1～6的直链状或支链状的烷基,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1～6的直链状或支链状的羟基烷基,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1～6的直链状或支链状的氨基烷基,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。作为在包含氮原子的同时还包含氧原子的饱和5元环～7元环,可举出吗啉环等。

[0375] 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1～6的直链状或支链状的烷基),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。

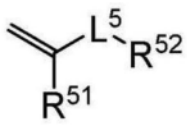
[0376] 在构成分子印迹聚合物20、20a、20b、20c的聚合物包含源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元的情况下,作为分子印迹聚合物20、20a、20b、20c的全部结构单元中的源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元的比例,可举出:例如为1摩尔%～99摩尔%,优选为10摩尔%～98摩尔%,更优选为30摩尔%～96摩尔%,进一步优选为50摩尔%～94摩尔%,更进一步优选为70摩尔%～92摩尔%,再进一步优选为80摩尔%～90摩尔%,特别优选为85摩尔%～90摩尔%。

[0377] (源于功能性单体的单元)

[0378] 构成分子印迹聚合物20c的聚合物包含源于功能性单体的单元。作为功能性单体,只要是具有上述“1-3-5.相互作用基团”中所述的相互作用基团25的单体,就没有特别限定(例如,例示为后述的包含与模板的相互作用基团的单体M25)。

[0379] 作为功能性单体的非限定性实例,可举出由下述式(5)表示的单体。

[0380] [化学式13]

[0381]  (5)

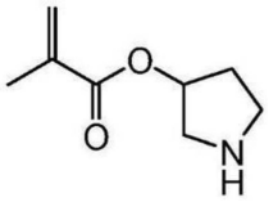
[0382] 式(5)中,R^{51}表示氢或甲基、优选氢,L^5表示直接键合或连接基团,R^{52}表示上述“1-3-5.相互作用基团”中所述的相互作用基团25。

[0383] 在直接键合或连接基团L^5为连接基团的情况下,作为该连接基团,可举出例如:碳

原子数1～6、优选2～6的亚烷基、氨基(-NH-)、醚基(-O-)、羰基(-C(=O)-)、酯基(-C(=O)-O-或-O-C(=O)-)、酰胺基(-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-)、亚砜基(-S(=O)-)、磺酰基(-S(=O)$_2$-)、以及它们中的2种以上键合而成的基团。在这些连接基团中，优选举出酯基(-C(=O)-O)。

[0384] 作为由上述式(5)表示的单体的非限定性具体例，可举出以下的单体。

[0385] [化学式14]

[0386] 

(5a)

[0387] 在分子印迹聚合物20c中，源于功能性单体的单元至少存在于凹部21c表面。在分子印迹聚合物20c中，源于功能性单体的单元不仅可以存在于凹部21c表面，而且还可以存在于凹部21c内部。作为构成分子印迹聚合物20c的聚合物的全部结构单元中的源于功能性单体的单元的比例，没有特别限定，依赖于对应的模板的表面状态(与相互作用基团25进行相互作用的部位的数量)。作为一个例子，构成分子印迹聚合物20c的聚合物的全部结构单元中的源于功能性单体的单元的比例可举出：例如为1摩尔%～30摩尔%，优选为3摩尔%～20摩尔%，更优选为5摩尔%～10摩尔%，进一步优选为6摩尔%～8摩尔%。

[0388] (源于其他单体的单元)

[0389] 在构成分子印迹聚合物20、20a、20b的聚合物的凹部21表面，还可以存在源于提供特异结合性分子的结合用基团的单体(后述的包含特异结合性分子的结合用基团和聚合性官能团的单体22)的单元、和/或源于提供信号物质的结合用基团的单体(后述的提供信号物质的结合用基团的单体M23$_1$和M23$_2$)的单元。作为存在源于提供特异结合性分子的结合用基团的单体的单元的情形，可举出分子印迹聚合物20、20a、20b为粒子状的情形。作为存在源于提供信号物质的结合用基团的单体的单元的情形，可举出分子印迹聚合物20、20a、20b为膜状的情形。

[0390] [1-3-7.基板]

[0391] 基板30的材料可以是例如选自由金属、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、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。

[0392] 基板30也可以为选自上述材料中的多种材料组合而形成的基板。例如，基板20可以为在玻璃或树脂的表面设有金属膜的基板。另外，作为基板20的形状，可以为板状或粒子状。作为优选实例，可举出金基板、玻璃基板、金纳米粒子、二氧化硅粒子(二氧化硅粒子、玻璃珠等)等。

[0393] [1-4.其他方式]

[0394] 本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材可以构成为由用户来定制特异结合性分子和信号物质中的至少任意一种。因此，作为另一个实施方式，针对靶标的特异结合性基团42可以已经结合于特异结合性分子的结合用基团22'、22b'。在该情况下，用户可

以自由选择信号物质来引入。

[0395] 需要说明的是，作为再一个实施方式，信号基团43可以已经结合于信号物质的结合用基团23’、23b’。在该情况下，用户可以自由地靶向检测对象，可以自由选择作为靶的检测对象、并引入针对检测对象的靶标的特异结合性分子。

[0396] [2.检测对象分析用传感器]

[0397] 本发明的分析用传感器包含用于制作上述检测对象分析用传感器的基材和与上述特异结合性分子的结合用基团结合的针对上述检测对象的靶标的特异结合性基团，上述特异结合性分子的结合用基团为适合于小型物质的基团。或者，本发明的分析用传感器包含：用于制作上述检测对象分析用传感器的基材和与上述特异结合性分子的结合用基团结合的针对上述检测对象的靶标的特异结合性基团，分子印迹凹部具有适合于小型物质的形状或构成。另外，在用于制作上述检测对象分析用传感器的基材具有信号物质的结合用基团的情况下，本发明的分析用传感器还包含结合于信号物质的结合用基团的信号基团。

[0398] 以检测对象分析用传感器10、10_1、10a、$10a_1$、10b、10c作为本发明的分析用传感器的实例而示于图1B-1、图1B-2、图2B-1、图2B-2、图3B、图4B中。如图所示，在检测对象分析用传感器10、10_1、10a、$10a_1$、10b、10c中，至少针对靶标的特异结合性基团42与用于制作检测对象分析用传感器的基材10’、10a’、10b’、10c’的针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’、22b’结合，信号基团43与信号物质的结合用基团23’、23b’结合。

[0399] 另外，以检测对象分析用传感器10-C、10-P、10-PC、10a-C、$10a_1$-C、10a-P、10c-P、10b-PC作为本发明的分析用传感器的更具体的实例而示于图5的(B)、图6的(B)、图7的(B)、图8的(B1)和(B2)、图9的(B)、图10的(B)、图11的(B)中。如图所示，至少针对靶标的特异结合性基团42与检测对象分析用传感器10-C、10-P、10-PC、10a-C、10a-P、$10a_1$-C、10c-P、10b-PC的针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’、22b’结合，信号基团43与信号物质的结合用基团23’、23b’结合。

[0400] [2-1.检测对象]

[0401] 本发明的分析用传感器的检测对象只要包含靶标、且该靶标对特异结合性基团42具有特异性结合能力，则原理上没有特别限定。

[0402] 关于检测对象与靶标的关系，可以使检测对象为靶标本身(即，检测对象由靶标构成；下文中，也记载为“实施方式1”)，也可以使检测对象(例如后述的检测对象70)的一部分由靶标(例如后述的靶标72)构成(下文中，也记载为“实施方式2”)。

[0403] 作为检测对象(实施方式1)或检测对象的靶标(实施方式2)的化学类型，没有特别限制，可举出例如：非源于生物体的低分子有机化合物和高分子化合物、源于生物体的低分子有机化合物和高分子化合物。在这些化学类型中，优选举出源于生物体的低分子有机化合物和高分子化合物，更优选举出源于动物的低分子有机化合物和高分子化合物，具体而言，可举出：糖或糖链；脂质(例如磷脂等)；糖蛋白或糖肽；蛋白质或肽；核苷酸或多核苷酸等。

[0404] 作为来源生物体，可举出人和除人以外的动物，作为除人以外的动物，可举出脊椎动物，优选举出哺乳动物，可举出例如小鼠、大鼠、猴子、狗、猫、牛、马、猪、仓鼠、兔子和山羊等。

[0405] 另外，作为检测对象(实施方式1)或检测对象的靶标(实施方式2)的功能类型，也

没有特别限定，可举出血浆蛋白、疾病标志物、抗原、抗体、受体、朊病毒(prion)、具有膜结构的微粒体等。另外，在以具有膜结构的微粒体作为检测对象的情况下(实施方式2)，作为其靶标，可举出：在具有膜结构的微粒体的表面上表达的抗原、抗体、受体和/或疾病标志物；在具有膜结构的微粒体的该膜结构内部表达的抗原、抗体、受体和/或疾病标志物；以及具有膜结构的微粒体分泌的抗原、抗体、受体和/或疾病标志物等。

[0406] 作为血浆蛋白，可举出：白蛋白、γ-球蛋白、纤维蛋白原等。作为疾病标志物，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、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)、糖链抗原19-9(CA19-9)、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(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)。

[0407] 作为具有膜结构的微粒体，可举出细胞外囊泡、细胞内囊泡、细胞器和细胞。作为膜结构，可举出脂质双层膜结构。作为细胞外囊泡，可举出外泌体、微囊泡(microvesicle)、凋亡小体等。作为细胞内囊泡，可举出溶酶体、核内体等。作为细胞器，可举出线粒体等。作为细胞，可举出循环肿瘤细胞(CTC)等癌细胞、其他疾病相关细胞等。在这些具有膜结构的微粒体中，优选举出细胞外囊泡和细胞，更优选举出外泌体、癌相关细胞。

[0408] 作为在外泌体的表面上表达的靶标(外泌体特异性抗原或外泌体抗原)，可举出：CD63、CD9、CD81、CD37、CD53、CD82、CD13、CD11、CD86、ICAM-1、Rab5、Annexin V、LAMP1、EpCAM、HER2等蛋白质；脂质；糖链等。

[0409] 作为在癌细胞的表面上表达的靶标(癌细胞特异性抗原)，可举出：小窝蛋白-1(Caveolin-1)、EpCAM、FasL、TRAIL、半乳糖凝集素3(Galectine3)、CD151、四跨膜蛋白8(Tetraspanin 8)、EGFR、HER2、RPN2、CD44、TGF-β等蛋白质；脂质；糖链等。

[0410] 需要说明的是，如下文所述，在将信号物质R43构成为引起荧光共振能量转移(FRET)的荧光色素对中的一者的情况下，预先使该荧光色素对中的另一者与检测对象的靶标结合。

[0411] [2-2.针对检测对象的靶标的特异结合性基团]

[0412] 在本发明中，特异结合性基团42为小型物质基团，优选为分子量45,000以下的特异结合性蛋白基或肽基。分子量是指理论分子量(calculated molecular mass)。

[0413] 在一个实施方式中，对于小型物质基团，代表性的是分子量小于抗体的分子，可为分子量低于15万的物质、优选为100,000以下的物质、更优选为45,000以下、进一步优选为22,000以下、更进一步优选为16,000以下、再进一步优选为10,000以下的基团，可以使用任意物质，但优选为蛋白质、多肽和肽。

[0414] 在本发明中，通过选择分子量小的基团作为设置于分子印迹凹部内的特异结合性基团42，从而与该特异结合性基团42对靶标的固有结合能力(未设置于分子印迹凹部的状态、例如游离状态或固定为平面状的情况下的结合能力)相比，每个靶标的结合能力显著提升(即，解离常数Kd显著降低)。从进一步提升这样的效果的观点出发，作为特异结合性基团42的分子量，可举出：优选为40,000以下，更优选为30,000以下，进一步优选为22,000以下，更进一步优选为16,000以下，再进一步优选为10,000以下，特别优选为8,000以下。

[0415] 特异结合性基团42只要具有针对检测对象的靶标的特异性结合能力、并且为小型

物质基团(其中,不包含Fab'、Fab、scFv),就没有特别限定。特异结合性基团42是通过提供特异结合性基团42的特异结合性分子(后述的特异结合性分子R42)而引入的基团,作为该特异结合性分子(后述的特异结合性分子R42)的具体例,可举出:抗体模拟物、磷脂结合性蛋白和凝集素等。这些特异结合性分子是市售的产品或者可以由本领域技术人员利用该技术领域的公知信息(例如图书馆信息等)适当制作或选择的产品,本领域技术人员可以容易地获得。

[0416] 纳米抗体(VHH抗体)具有天然重链抗体结构,且含有单个可变结构域(VHH)和2个恒定结构域(CH2和CH3)。作为具体的纳米抗体,可举出抗EGFR纳米抗体、抗HER2纳米抗体、抗MUC1纳米抗体、抗整联蛋白纳米抗体、抗TNF纳米抗体等,但并不限定于此。

[0417] 抗体模拟物是能够与抗体同样地与抗原特异性结合、但在结构上与抗体不相关的任意物质,可例示(不具有抗体结合域的)有机化合物。作为具体的抗体模拟物,可举出:亲和体(支架蛋白:蛋白A的Z结构域,分子量:约6,000,非限定性具体例:抗Her2亲和体、抗EGFR亲和体、抗TNF-α亲和体、抗HSA亲和体、抗转铁蛋白亲和体、抗纤维蛋白原亲和体、抗IgM亲和体等);Affilin(支架蛋白:γB-晶状体蛋白或泛素,分子量:约20,000或约10,000);Affimer(支架蛋白:胱抑素,分子量:约12,000～14,000);Affitin(支架蛋白:Sac7d,分子量:约7,000);Alphabody(支架蛋白:三重螺旋卷曲螺旋,分子量:约10,000);Anticalin(支架蛋白:脂质运载蛋白,分子量:约20,000,非限定性具体例:抗CTLA-4脂质运载蛋白、抗-VEGF脂质运载蛋白等);Avimer(支架蛋白:膜受体结构域,分子量:约9,000～18,000);DARPins(支架蛋白:锚蛋白重复序列模体,分子量:约10,000～19,000);fynomer(支架蛋白:Fyn的SH3结构域,分子量:约7,000);Kunitz结构域肽(支架蛋白:蛋白酶抑制剂的Kunitz结构域,分子量:约6,000);单抗体(Monobody)(也称为Adnectin。支架蛋白:纤连蛋白的第10个III型结构域,分子量:约10,000,非限定性具体例:抗EGFR1单抗体、抗HER2单抗体等);nanoCLAP(支架蛋白:碳水化合物结合模块32-2(Clostridium perfringens NagH),分子量:约16,000)、纳米抗体(例如骆驼或羊驼具有的VHH抗体的重组蛋白)等,但并不限定于此。

[0418] 磷脂结合性蛋白是对磷脂显示出结合活性的蛋白质。作为具体的磷脂结合性蛋白的实例,可举出Evectin 2、Annexin A2、Annexin V、Tim4等,但并不限定于此。

[0419] 凝集素是对糖链显示出结合活性的蛋白质。作为具体的凝集素的实例,可举出:C型凝集素、激酶样凝集素、F盒凝集素、F型凝集素、纤维胶凝蛋白-甘露糖结合凝集素、半乳糖凝集素、X-凝集素、L型凝集素、M型凝集素、P型凝集素、R型凝集素、鲎凝集素(tachylectin)、唾液酸结合凝集素等,但并不限定于此。

[0420] 除了蛋白质、肽以外的针对检测对象的靶标具有特异性结合能力的物质可以举出例如以下的物质。

[0421] 糖:作为糖,包括D-葡萄糖通过α-1,4糖苷键连接而成的环状低聚糖即α-环糊精(连接6个D-葡萄糖)、β-环糊精(连接7个D-葡萄糖)、γ-环糊精(连接8个D-葡萄糖)。这些环结构内部为疏水性空腔。由于它们识别与其空腔尺寸相匹配的分子并通过疏水性相互作用将其包合,因此可以用作针对检测对象的靶标具有特异性结合能力的分子。

[0422] 具有加成了硫酸基的双糖重复结构的糖胺聚糖:例如,由于透明质酸识别并结合作为膜蛋白的CD44,因此可用作针对CD44具有特异性结合能力的分子。作为另一个实例,肝

素存在于细胞表面并与具有肝素结合结构域的各种细胞外基质蛋白相互作用。因此，可以用作针对具有肝素结合结构域的蛋白质具有特异性结合能力的分子。另外，糖链与肽结合的蛋白聚糖也很常见，可以用作针对检测对象的靶标具有特异性结合能力的分子。

[0423] 脂质：脂质、例如具有磷酸酯的脂质通过磷酸酯可以结合各种官能团，磷脂可以与各种生物分子相互作用，因此可以用作针对检测对象的靶标具有特异性结合能力的分子。

[0424] 核酸：对于核酸，作为与特定分子特异性结合的核酸分子，已知有核酸适体。据报道其可以通过体外选择法自由地制造、且与有机小分子或蛋白质、核酸、细胞、细胞组织、微生物等各种目标物特异性结合，因此可以用作针对检测对象的靶标具有特异性结合能力的分子。

[0425] 对于本发明的分析用传感器而言，即使提供特异结合性基团42的特异结合性分子(后述的特异结合性分子R42)针对靶标的固有结合能力比抗体的固有结合能力差(解离常数Kd大于抗体)，通过在分子印迹凹部21、21c内设置特异结合性基团42，每个靶标的结合能力也会显著提升(即，解离常数Kd显著降低)，其显著提高的结合能力甚至超过在分子印迹凹部21、21c内引入抗体时的每个靶标的该抗体的结合能力。即，根据本发明的分析用传感器，即使将结合能力比抗体差的特异结合性基团42引入分子印迹凹部21、21c内，也能够显示出超过将抗体引入分子印迹凹部21、21c内的分析用传感器的灵敏度。从这样的观点出发，作为本发明的分析用传感器中的提供特异结合性基团42的特异结合性分子(后述的特异结合性分子R42)的一个实例，可举出其自身的固有结合能力比抗体的固有结合能力差(解离常数Kd大于抗体)的物质。然而，由于本发明的分析用传感器显著提升每个靶标的特异结合性基团42的结合能力，因此作为提供特异结合性基团42的特异结合性分子(后述的特异结合性分子R42)，可以使用通过实施变异等提高结合能力的改变来提高其固有结合能力的特异结合性分子。

[0426] 需要说明的是，如图1B-2所示的检测对象分析用传感器10_1那样，特异结合性基团42也可以为还结合有信号基团43的基团(具有信号基团的特异结合性基团)44。作为这样的具有信号基团的特异结合性基团44的具体例，可举出：特异结合性基团42具有信号基团43作为修饰基团的修饰蛋白质或肽；特异结合性基团42与作为蛋白质或肽的信号基团43融合而成的融合蛋白质或肽等。上述具有信号基团的特异结合性基团44中的特异结合性基团42的固有结合能力因存在信号基团43的影响而比不具有信号基团43的特异结合性基团42(例如，图1B-1、图2B-1、图3B、图4B的分析用传感器10、10a、10b、10c中的特异结合性基团42)的固有结合能力差。然而，由于本发明的分析用传感器的提高灵敏度的效果优异，因此即使使用如具有信号基团的特异结合性基团44那样固有结合能力低的特异结合性基团，也可以有效地提高结合能力，发挥优异的提高灵敏度的效果。在本发明中，如图1B-2所示的检测对象分析用传感器10_1那样，即使使用具有特异结合性基团42和信号基团43的基团44，也能够以优异的灵敏度(低解离常数)进行分析，但从提高再现性和/或降低检测限值的观点出发，对于信号基团43和特异结合性基团42，与两者相互结合的方式相比，更优选如图2B所示在分子印迹凹部的表面方向上隔开、或如图3B所示插入功能性基团24b(参照图3A)。

[0427] 进而，如图2B-2所示的检测对象分析用传感器$10a_1$那样，特异结合性基团42也可以为还结合有其他信号基团sg的基团(具有其他信号基团的特异结合性基团)42_1。上述图1B-2所示的结合于特异结合性基团42的信号基团43用于检测对象分析用传感器10_1的感

测，相对于此，该图2B-2所示的结合于特异结合性基团42的其他信号基团sg不用于检测对象分析用传感器10a_1的感测，在这方面不同。由于特异结合性基团42的分子量小，因此只不过是从容易处理提供特异结合性基团42的特异结合性分子(后述的特异结合性分子R42)等观点出发赋予了其他信号基团sg，在图2B-2所示的检测对象分析用传感器10a_1的感测中使用信号基团43而不是其他信号基团sg。

[0428] 作为这样的具有其他信号基团的特异结合性基团42$_1$的具体例，可举出：特异结合性基团42具有其他信号基团sg作为修饰基团的修饰蛋白质或肽；特异结合性基团42与作为蛋白质或肽的其他信号基团sg融合而成的融合蛋白质或肽等。上述具有其他信号基团的特异结合性基团42$_1$中的特异结合性基团42的固有结合能力因存在其他信号基团sg的影响而比不具有其他信号基团sg的特异结合性基团42(例如，图1B-1、图2B-1、图3B、图4B的分析用传感器10、10a、10b、10c中的特异结合性基团42)的固有结合能力差。然而，由于本发明的分析用传感器的提高灵敏度的效果优异，因此即使使用如具有其他信号基团的特异结合性基团42$_1$那样固有结合能力低的特异结合性基团，也可以有效地提高结合能力，发挥优异的提高灵敏度的效果。

[0429] [2-3.信号基团]

[0430] 信号基团43的功能是读出检测对象的靶标与针对该靶标的特异结合性基团42的结合信息。作为信号基团43，只要在分子印迹凹部21、21c中因靶标的结合而使检测到的信号强度发生变化或谱图发生变化(例如，峰位移)，就没有特别限定，例如，作为提供信号基团43的信号物质(后述的信号物质R43)，可举出：荧光物质、含放射性元素的物质、磁性物质等。从检测容易性等观点出发，作为信号物质，优选为荧光物质。作为荧光物质，可举出：荧光素色素、吲哚菁色素等花青色素(DY647、Cy5、DY490等)、罗丹明色素(CR110、TAMRA)、香豆素色素、EvoBlue系色素、噁嗪色素(ATTO)、Carbopyronine色素、Alexa色素等荧光色素；GFP等荧光蛋白；金胶体、量子点等纳米粒子等。作为含放射性元素的物质，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。作为磁性物质，可举出：具有铁色素等磁性体的物质、铁素体纳米粒子、纳米磁性粒子等。在上述信号物质中，从进一步提高检测限和/或灵敏度的观点出发，优选罗丹明色素。

[0431] 另外，信号基团43可以构成为引起荧光共振能量转移(FRET)的荧光色素对中的一者。作为引起FRET的荧光色素对，没有特别限定，且选择供体色素和受体色素中的哪一个作为信号基团43也没有限定。可以优选选择供体色素作为信号基团43。作为构成引起FRET的荧光色素对的供体色素/受体色素的组合的具体例，可举出：异硫氰酸荧光素(FITC)/四甲基罗丹明异硫氰酸盐(TRITC)、Alexa Fluor647/Cy5.5、HiLyte Fluor647/Cy5.5、R-藻红蛋白(R-PE)/别藻蓝蛋白(APC)等。

[0432] [2-4.用途]

[0433] 本发明的分析用传感器可用于检测对象的感测。作为更具体的用途，可根据特异结合性基团的种类来确定，例如，可以用于基于肾功能、肝功能、有无炎症或其程度、有无肿瘤或其程度等的诊断目的或治疗监测等目的。

[0434] 另外，对于本发明的分析用传感器，在分子印迹聚合物为粒子状且不固定在基板上的方式的情况下，作为感测试剂，可制剂成液体状或固体状(例如粉末状)。感测试剂包含药学上可接受的其他成分。作为其他成分，可适当选择不影响感测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、润滑剂等。

[0435] 感测用试剂可通过使用本发明的分析用传感器与上述其他成分基于通常的制剂方法进行制剂而得到。

[0436] 作为感测试剂的用途的一个实例，除了上述用途之外，还可举出利用粒子不固定在基板上的特征的体外成像和体内成像。

[0437] 作为体外成像的一个实例，可举出：制作与细胞内或表面的检测对象对应的感测试剂，并将其添加于该细胞中，用荧光显微镜等信号检测装置对细胞内或表面的生物分子的动态进行成像的方法。

[0438] 作为体内成像的一个实例，可举出：制作与存在于体内的检测对象对应的感测试剂，并将其施用至动物(例如实验动物、人等)的循环系统(例如血液)，用信号检测装置对检测；对象的药代动力学进行成像的方法。对于用于体内成像的感测试剂，在检测对象为除血浆蛋白(特别是白蛋白)以外的物质的情况下，优选以图10的(B)所示的分析用传感器10c-P为有效成分而构成。在该情况下，对于分析用传感器10c-P，分子印迹凹部21c以血浆蛋白(特别是白蛋白)为模板模型化而成，并且，相互作用基团25设计为与该血浆蛋白(特别是白蛋白)的表面进行特异性相互作用的基团。对于用于这样的体内成像的感测试剂，在以检测对象为肿瘤标志物而构成的情况下，可以用作在手术前注射后在手术中对肿瘤进行体内成像的导航药物。

[0439] [3.用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法]

[0440] 作为本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法，可以没有特别限制地使用合成分子印迹聚合物且在分子印迹凹部内引入规定的官能团的方法。以下，列举本发明的用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法的一些实例。

[0441] [3-1.用于制作基板状的检测对象分析用传感器的基材的制造方法]

[0442] 例如，用于制作图5的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10-C'的制造方法包括以下的工序(1-1)～工序(1-4)。

[0443] •单分子膜形成工序(1-1)，在基板上形成表面具有针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团和聚合引发性基团的单分子膜；

[0444] •工序(1-2)，针对上述特异结合性分子的结合用基团，由第一可逆连接基团介导而引入模板；

[0445] •工序(1-3)，添加聚合性单体，以上述聚合性单体为基质，以上述聚合引发性基团为聚合引发剂，合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物，由此在上述基板表面形成聚合物膜；以及

[0446] •工序(1-4)，使上述第一可逆连接基团断裂而转化为上述特异结合性分子的结合用基团，并且去除上述模板。

[0447] 其中，上述特异结合性分子的结合用基团为适合于小型物质的基团。

[0448] 另外，用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'(其在用于制作图5的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10-C'中还包含信号物质的结合用基团23')的制造方法还增加了以下的限定。

[0449] •在上述工序(1-3)之前，包括由第二可逆连接基团介导而用聚合性官能团对上

述模板的表面进行修饰的修饰工序；

[0450] • 在上述工序(1-3)中，以上述聚合性单体和上述聚合性官能团为基质，以上述聚合引发性基团为聚合引发剂，合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物；

[0451] • 在上述工序(1-4)中，使上述第一可逆连接基团和上述第二可逆连接基团断裂而分别转化为上述特异结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团，并且去除上述模板。

[0452] 图12-1～图12-5中示意性地示出用于制作图8的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法。具体而言，图12-1(图12-1a和图12-2b)、图12-2、图12-3、图12-4以及图12-5分别示意性地示出准备模板的工序、工序(1-1)、工序(1-2)、工序(1-3)和工序(1-4)。即，在图示的实施方式中，制造用于制作检测对象分析用传感器的基材10a-C'的方法包括以下的工序。

[0453] (I)

[0454] • 单分子膜形成工序(1-1)，在基板30上形成表面具有针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团22'和聚合引发性基团INI的单分子膜SAM；

[0455] • 工序(1-2)，针对特异结合性分子的结合用基团22'，由第一可逆连接基团22介导而引入模板60；

[0456] • 工序(1-3)，添加聚合性单体M28，以聚合性单体M28为基质，以聚合引发性基团INI为聚合引发剂，合成针对模板60的部分表面的分子印迹聚合物20a，由此在基板30的表面形成聚合物膜；以及

[0457] • 工序(1-4)，使第一可逆连接基团22断裂而转化为特异结合性分子的结合用基团22'，并且去除模板60；其中，

[0458] (II)

[0459] • 包括由第二可逆连接基团23介导而用聚合性官能团27对模板60的表面进行修饰的修饰工序；

[0460] • 在上述工序(1-3)中，以聚合性单体M28和聚合性官能团27为基质，以聚合引发性基团INI为聚合引发剂，合成针对模板60的部分上述表面的分子印迹聚合物20a；

[0461] • 在上述工序(1-4)中，使第一可逆连接基团22和上述第二可逆连接基团23断裂而分别转化为特异结合性分子的结合用基团22'和信号物质的结合用基团23'，并且去除上述模板60。

[0462] 以下，一边参照附图一边对各工序进行详细叙述。需要说明的是，如果从以下详细叙述的用于制作基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中去掉上述(II)的限定，则成为用于制作图(5)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10-C'的制造方法。

[0463] [3-1-1.准备模板的工序]

[0464] 对于以下的用于制作图12-1～图12-5所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'的制造方法中使用的模板，准备根据需要进行了适当的表面修饰的模板。

[0465] (模板)

[0466] 模板60可以是与检测对象或检测对象的靶标相同的物质，也可以是与检测对象或检测对象的靶标不同的物质。另外，作为在模板60为与检测对象或检测对象的靶标不同的

物质的情况下的60，可以是生物分子，也可以是粒子核(也称为人工粒子)。

[0467] 作为生物分子，优选举出血浆蛋白(白蛋白、γ-球蛋白、纤维蛋白原等)。另外，作为生物分子的分子量，可举出特异结合性基团42的分子量的例如1.8倍～15倍、优选3倍～14倍、更优选4倍～13.5倍、7倍～13倍、8倍～12.5倍、或10倍～12倍。作为更优选的生物分子，可举出白蛋白。

[0468] 作为粒子核，只要在可以用作分子印迹中的模板的限度内，就没有特别限定，可举出人工制造的无机粒子和有机粒子。作为无机粒子，可举出金属、金属的氧化物、氮化物、氟化物、硫化物、硼化物和它们的复合化合物、以及羟基磷灰石等，优选举出二氧化硅(silica)。另外，作为有机粒子，可举出：胶乳固化物、葡聚糖、壳聚糖、聚乳酸、聚(甲基)丙烯酸、聚苯乙烯、聚乙烯亚胺等。

[0469] 在图12-2～图12-5所示的实施方式中，作为模板60，优选使用粒子核。由于粒子核为工业产品且可控制粒径，因此容易进行在用于制作分析用传感器的基材上形成的凹部的尺寸控制和均质化，在可以由得到的用于制作分析用传感器的基材制作分析特性更进一步优异的分析用传感器方面是优选的。另外，作为粒子核，可以使用进行了表面改性以使表面具有所需结合性基团的粒子核。

[0470] 由于分子印迹凹部21的大小依赖于模板60的大小，因此模板60的大小可以根据检测对象或检测对象的靶标的大小来适当确定。为了形成用于容纳目标检测对象或检测对象的靶标的凹部21，只要使用大小同程度于或大于该检测对象或检测对象的靶标的模板60即可。例如，作为模板60的平均粒径，可举出：例如为1nm～10μm，优选为50nm～1μm，更优选为100nm～500nm，进一步优选为150nm～250nm，更进一步优选为180nm～220nm。或者，若将模板60的平均粒径设为R(nm)、将特异结合性基团42的分子量设为M，则作为模板60的平均粒径，可举出满足参数R/M为例如0.005～0.05、优选0.01～0.04、更优选0.012～0.035、0.013～0.035、0.02～0.035或0.03～0.034的粒径。需要说明的是，平均粒径是指通过动态光散射法测定的Z平均粒径。

[0471] (模板的表面修饰)

[0472] 对于60，如图12-1a、12-1b的模板60_1、模板60_2所示，能够以用结合性基团22”对其表面进行了修饰的形态来准备模板。

[0473] 作为准备这样的模板的方法，可举出：如图12-1a所示，对于模板60_1的表面，除了用结合性基团22”进行修饰之外还用结合性基团23”进行修饰的方式；以及如图12-1b所示，对于模板60_2的表面，除了用结合性基团22”进行修饰之外还由可逆连接基团23介导而用聚合性官能团进行修饰的方法等。

[0474] 例如，在图12-1a的实例中，使用表面具有结合性基团BG22”和结合性基团BG23”的模板60_1，使包含对应于结合性基团BG22”的结合性基团BG22’和结合性基团22”的分子、以及包含对应于结合性基团BG23”的结合性基团BG23’和结合性基团23”的分子适当反应，由此，得到表面除了用结合性基团22”进行了修饰之外还用结合性基团23”进行了修饰的模板60_1。

[0475] 在图12-1a中，作为结合性基团BG22”，没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-1栏中所示的基团，优选举出羧基。作为结合性基团BG22’，也没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团，优选举出氨基作为结合性基团BG22’。作为结合性基团22”，没

有特别限定(但是,为与结合性基团BG22'不同的基团),可举出上述表1的第1-2栏中所示的基团,优选举出聚组氨酸标签。另外,作为结合性基团BG23",没有特别限定,可举出例如上述表2的第2-1栏中所示的基团,优选举出羧基。作为结合性基团BG23',也没有特别限定,可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团,优选举出氨基作为结合性基团BG23'。作为结合性基团23",没有特别限定(但是,为与结合用基团22'不同的基团),可举出上述表1的第1-2栏中所示的基团,优选举出硫醇基。

[0476] 另外,在图12-1b的实例中,使用表面具有结合性基团BG22"和结合性基团BG23"的模板60_2,使包含对应于结合性基团BG22"的结合性基团BG22'和结合性基团22"的分子、以及包含对应于结合性基团BG23"的结合性基团BG23'、第二可逆连接基团23和聚合性官能团27的聚合性单体$M23_2$适当反应,得到具有聚合性官能团27和第二可逆连接基团23、以及能形成第一可逆连接基团22的结合性基团22"的模板60_2。在图12-1b的实例中,准备模板的工序包括由第二可逆连接基团23介导而用聚合性官能团27对模板60的表面进行修饰的修饰工序。

[0477] 在图12-1b中,作为结合性基团BG22",没有特别限定,可举出例如上述表2的第2-1栏中所示的基团,优选举出羧基。作为结合性基团BG22',也没有特别限定,可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团,优选举出氨基作为结合性基团BG22'。另外,作为结合性基团22",没有特别限定(但是,为与结合性基团BG22'不同的基团),可举出上述表1的第1-2栏中所示的基团,优选为聚组氨酸标签。作为结合性基团BG23",也没有特别限定,可举出例如上述表1的第2-1栏中所示的基团,优选举出氨基。作为聚合性单体$M23_2$中的结合性基团BG23',也没有特别限定,可举出例如上述表1的第2-2栏中所示的基团,优选举出羧酸活性酯基。作为第二可逆连接基团23,也没有特别限定,可举出例如上述表1的第1-3栏中所示的基团,优选举出二硫键。

[0478] 在图12-1b中,作为聚合性官能团27,只要含有乙烯基即可,优选举出(甲基)丙烯酰基。

[0479] 如图12-1b所示,通过使用预先在表面具有结合性基团BG23"的模板60_2,可以将第二可逆连接基团23仅传递至模板60的表面。

[0480] 如上所述,可以得到表面用结合性基团22"(以及根据需要的结合性基团23"或由第二可逆连接基团介导的聚合性官能团27)进行了修饰的模板60_1、60_2(下文中,合并记载为"模板60")。

[0481] 需要说明的是,根据用作模板60的物质,有些物质本来就具有结合性基团22"(例如,在选择糖蛋白作为模板的情况下,有时可以将糖蛋白本来就具有的糖基用作结合性基团22"等)。在此种情况下,模具60不需要如上述那样的工序。

[0482] [3-1-2.工序(1-1)]

[0483] 在工序(1-1)中,如图12-2所示,在基板30上形成表面具有针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团22'和聚合引发性基团INI的单分子膜SAM。

[0484] 在图示的实例中,具体而言,首先,在基材30表面,形成表面具有聚合引发性基团INI和结合性基团BG1'的单分子膜SAM。该单分子膜可以通过使用末端具有聚合引发性基团INI的分子和末端具有不同于聚合引发性基团INI的结合性基团BG1'的分子进行杂化自组装而形成为杂化自组装单分子膜(mixed SAMs)。

[0485] 作为聚合引发性基团INI，只要具有能够作为聚合引发剂起作用的结构，就没有特别限定，本领域技术人员可以根据后述的聚合工序中使用的聚合反应来适当确定。例如，作为聚合引发性基团INI，可举出具有聚合反应时产生自由基的结构的基团，具体为源于有机卤的碳-卤键基团(-CX基；X表示卤原子。)、源于偶氮化合物的偶氮基(-R-N＝N-R’-基)、源于RAFT剂的RAFT聚合用基团(例如硫代羰基硫基等)、以及源于TEMPO的基团。在图示的实施方式中，例示了聚合引发性基团INI为-CBr基的情形。

[0486] 作为结合性基团BG1’，可适当选择能够延伸设置针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团22’的基团。可举出例如上述表2的第2-1栏中所示的基团，优选举出氨基。通过使结合性基团BG1’与用于延伸设置特异结合性分子的结合用基团22’的物质结合，可在单分子膜SAM的表面进一步引入特异结合性分子的结合用基团22’。例如，作为用于延伸设置特异结合性分子的结合用基团22’的物质，可举出：具有能形成特异结合性分子的结合用基团22’的基团和对应于结合性基团BG1’的结合性基团BG1”的分子、或者具有特异结合性分子的结合用基团22’和对应于结合性基团BG1’的结合性基团BG1”的分子。作为对应于结合性基团BG1’的结合性基团BG1”，可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团。在图示的实施方式中，作为具有能形成特异结合性分子的结合用基团22’的基团和对应于结合性基团BG1’的结合性基团BG1”的分子的实例，使用作为氨基聚羧酸系螯合剂的次氮基三乙酸(NTA)，使其结合NTA，从而引入源自NTA的基团，进而，通过使镍离子与源自NTA的基团配位，从而形成源自镍-次氮基三乙酸的基团(其为特异结合性分子的结合用基团22’的非限定性实例)。

[0487] 需要说明的是，在图12-2的实例中示出了如下实施方式：在暂且制作了表面具有结合性基团BG1’的杂化自组装单分子膜后，将结合性基团BG22’延伸设置于结合性基团BG1’，从而逐步形成表面具有特异结合性分子的结合用基团22’和聚合引发性基团INI的单分子膜SAM，但本发明不限定于该实施方式。例如，在基材30表面，使用末端具有聚合引发性基团INI的分子和末端具有结合性基团BG22’的分子，通过杂化自组装而形成杂化自组装单分子膜(mixed SAMs)，从而也可以一步形成表面具有特异结合性分子的结合用基团22’和聚合引发性基团INI的单分子膜SAM。

[0488] 如上所述操作，在基板30上形成表面具有特异结合性分子的结合用基团22’和聚合引发性基团INI的单分子膜SAM。

[0489] [3-1-3.工序(1-2)]

[0490] 在工序(1-2)中，如图12-3a和图12-3b所示，针对基板30上的特异结合性分子的结合用基团22’，由第一可逆连接基团22介导而引入模板60。

[0491] 第一可逆连接基团22是通过基板30上的特异结合性分子的结合用基团22’与模板60上的结合用基团22’的结合而形成的基团，可举出例如上述表1的第1-3栏中所示的基团，优选举出配位键。

[0492] 图12-3a所示的实例表示使用图12-1a中得到的模板60_1的情形，图12-3b所示的实例表示使用图12-1b中得到的模板60_2的情形。

[0493] 在图12-3a所示的实例中，针对基板30上的特异结合性分子的结合用基团22’，由第一可逆连接基团22介导而引入尚未引入聚合性官能团27的状态的模板60，然后，在模板60固定在基板30上的状态下，使用具有信号物质的结合用基团23’和聚合性官能团27的聚

合性单体$M23_1$，可以对固定在基板30上的模板60_1的表面进行修饰。在图12-3a的实例中，在引入模板的工序之后，包括由第二可逆连接基团23介导而用聚合性官能团27对模板60的表面进行修饰的修饰工序。

[0494] 聚合性单体$M23_1$中的信号物质的结合用基团23'为如“1-3-3.信号物质的结合用基团”中所述的基团，优选举出吡啶基二硫基。作为聚合性官能团27，只要含有乙烯基即可，优选举出(甲基)丙烯酰基。

[0495] [3-1-4.工序(1-3)]

[0496] 在工序(1-3)中，如图12-4所示，添加聚合性单体M28，以聚合性单体M28和聚合性官能团27为基质，以聚合引发性基团INI为聚合引发剂，合成针对模板60的部分表面的分子印迹聚合物20a，由此在基板30表面形成聚合物膜。

[0497] 在图示的实例中，作为聚合性单体，仅示出了一种，但作为聚合性单体，也可以多种组合来使用。另外，聚合性单体为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”中所述的单体。在图示的实例中所使用的聚合性单体M28优选为生物相容性单体，生物相容性单体为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”的“(源于生物相容性单体的单元)”中所述的单体。

[0498] 在基材30表面上，构建聚合性官能团27、聚合性单体M28、聚合引发性基团INI和模板60共存的聚合反应体系，由此进行表面引发原子转移自由基聚合(SI-ATRP)。在该聚合反应体系中，优选还包含由过渡金属或过渡金属化合物与配体形成的过渡金属络合物作为聚合催化剂，更优选还使用还原剂。

[0499] 作为过渡金属或过渡金属化合物，可举出金属铜或铜化合物，作为铜化合物，可举出氯化物、溴化物、碘化物、氰化物、氧化物、氢氧化物、乙酸盐、硫酸盐、硝酸盐，优选举出溴化物。作为配体，优选为多齿胺，具体而言，可举出双齿～六齿配体。其中，优选举出双齿配体，更优选举出2,2-联吡啶、4,4'-二-(5-壬基)-2,2'-联吡啶、N-(正丙基)吡啶基甲烷亚胺、N-(正辛基)吡啶基甲烷亚胺等，更优选举出2,2-联吡啶。

[0500] 作为还原剂，可举出醇类、醛类、酚类和有机酸化合物等，优选举出有机酸化合物。作为有机化合物，可举出柠檬酸、草酸、抗坏血酸、抗坏血酸盐、抗坏血酸酯等，优选举出抗坏血酸、抗坏血酸盐、抗坏血酸酯等，更优选举出抗坏血酸。

[0501] 作为溶剂，可使用缓冲液等水系溶剂，优选举出磷酸缓冲液。另外，溶剂中优选包含NaCl，作为NaCl的浓度，例如为100mM～200mM，优选为120mM～160mM。另外，作为溶剂的pH值，例如为6～8，优选为6.8～7.8，更优选为7.2～7.6。

[0502] 以聚合性单体M28为基质，聚合物链从作为自由基产生源的聚合引发性基团INI延伸，使聚合物膜的厚度增加，并且当延伸聚合物链到达模板60表面时，对该表面进行修饰的聚合性官能团27也作为基质引入，由此以形成具有与模板60的表面形状一致的形状的凹部21的方式合成分子印迹聚合物20a。分子印迹聚合物20a的聚合物膜可以生长至相当于在基材30中引入的模板60的上下径(以图面的上方为上侧的情形)的1/3～1/2左右的厚度。由此，得到分子印迹聚合物20a的聚合物膜。

[0503] [3-1-5.工序(1-4)]

[0504] 在工序(1-4)中，如图12-5所示，通过使第一可逆连接基团22断裂而转化为针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22'，使第二可逆连接基团23断裂而转化为信号物质的

结合用基团23'，从而去除模板60。由于在上述表面修饰工序中第二可逆连接基团23仅被传递至模板60的表面，因此在去除模板60后留下的分子印迹凹部21中，特异结合性分子的结合用基团22'残留，并且仅在凹部21内配置了由第二可逆连接基团23产生的信号物质的结合用基团23'。由此，得到用于制作分析用传感器的基材10a-C'。

[0505] [3-2.用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基材的制造方法-1]

[0506] 例如，用于制作图6的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10-P'的制造方法包括以下的工序(1-11)～(1-13)。

[0507] •工序(1-11)，准备分子印迹的模板，其表面由第一可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰；

[0508] •工序(1-12)，以上述聚合性官能团为基质，合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物；以及

[0509] •工序(1-13)，使上述第一可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板，生成上述特异结合性分子的结合用基团。

[0510] 其中，上述特异结合性分子的结合用基团为适合于小型物质的基团。

[0511] 图13-1～图13-3中示意性地示出用于制作图6的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10-P'的制造方法。具体而言，图13-1、图13-2和图13-3分别示意性地示出工序(1-11)、工序(1-12)和工序(1-13)。即，在图示的实施方式中，制造用于制作检测对象分析用传感器的基材10-P'的方法包括以下的工序。

[0512] •工序(1-11)，准备分子印迹模板60，其表面由第一可逆连接基团22介导而用聚合性官能团27进行了修饰；

[0513] •工序(1-12)，以聚合性官能团27为基质，合成针对模板60的部分表面的分子印迹聚合物20；以及

[0514] •工序(1-13)，使第一可逆连接基团22断裂而从分子印迹聚合物20中去除模板60，生成特异结合性分子的结合用基团22'。

[0515] 以下，一边参照附图一边对各工序进行详细叙述。

[0516] [3-2-1.工序(1-11)]

[0517] 在工序(1-11)中，如图13-1(图13-1a和图13-1b)所示，准备分子印迹模板60，其表面由第一可逆连接基团22介导而用聚合性官能团27进行了修饰。

[0518] 在图13-1a中，通过使包含针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团22'和聚合性官能团27的单体$M22_1$，对表面用结合性基团22"进行了修饰的分子印迹模板60_1的表面发生作用，从而由使结合性基团22"与特异结合性分子的结合用基团22'反应而形成的第一可逆连接基团22介导而用聚合性官能团27进行修饰。

[0519] 在图13-1a中，作为结合性基团22"，没有特别限定，可举出例如上述表1的第1-2栏中所示的基团，优选举出硫醇基。作为聚合性单体$M22_1$中的结合用基团22'也没有特别限定，可举出例如上述表1的第1-1栏中所示的基团，优选举出吡啶基二硫基。作为第一可逆连接基团22，也没有特别限定，可举出例如上述表1的第1-3栏中所示的基团，优选举出二硫键。

[0520] 另外，在图13-1b的实例中，使用表面具有结合性基团BG22"的模板60_2，使包含对应于结合性基团BG22"的结合性基团BG22'、第一可逆连接基团22和聚合性官能团27的聚合

性单体$M22_2$反应，得到由第一可逆连接基团22介导而用结合性基团BG22”进行了修饰的模板60_2。

[0521] 在图13-1b中，作为结合性基团BG22”，没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-1栏中所示的基团，优选举出氨基。作为聚合性单体$M22_2$中的结合性基团BG22’，也没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团，优选举出羧酸活性酯基作为结合性基团BG22’。另外，作为第一可逆连接基团22，也没有特别限定，可举出例如上述表1的第1-3栏中所示的基团，优选举出二硫键。

[0522] 在图13-1a和图13-1b中，作为聚合性官能团27，只要含有乙烯基即可，优选举出(甲基)丙烯酰基。

[0523] 在图13-1a和图13-1b中，模板60_1、60_2(以下，合并记载为“模板60”)为如上述“3-1-2.模板和修饰工序”的“(模板)”中所述的模板。

[0524] 如上所述操作，得到在表面用由第一可逆连接基团22介导的聚合性官能团27进行了修饰的模板60。

[0525] [3-2-2.工序(1-12)]

[0526] 在工序(1-12)中，如图13-2所示，以聚合性官能团27为基质，合成针对模板60的部分表面的分子印迹聚合物20。

[0527] 在图示的实施方式中，示出了使用M28和M29作为聚合性单体的实例，但是，作为聚合性单体，也可以3种以上组合来使用。另外，聚合性单体为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”中所述的单体。在图示的实例中所使用的聚合性单体M28为生物相容性单体，生物相容性单体为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”的“(源于生物相容性单体的单元)”中所述的单体。在图示的实例中所使用的聚合性单体M29为N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺，N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”的“(源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元)”中所述的单体。

[0528] 作为聚合反应液中的模板60的浓度，没有特别限定，可举出：例如为1μmol/L～10μmol/L，优选为3μmol/L～8μmol/L，更优选为4.5μmol/L～7μmol/L，进一步优选为5.5μmol/L～6.5μmol/L。

[0529] 作为聚合反应液中的聚合性单体M28的浓度，没有特别限定，可举出：例如为1mmol/L～10mmol/L，优选为3mmol/L～8mmol/L，更优选为4.5mmol/L～7mmol/L，进一步优选为5.5mmol/L～6.5mmol/L。另外，作为针对模板60的聚合性单体M28的用量，以每1μmol模板60的聚合性单体M28的用量计，可举出：例如为0.1mmol～2mmol，优选为0.3mmol～1.8mmol，更优选为0.5mmol～1.5mmol，进一步优选为0.8mmol～1.2mmol。

[0530] 作为聚合反应液中的聚合性单体M29的浓度，没有特别限定，可举出：例如为50mmol/L～200mmol/L，优选为80mmol/L～130mmol/L，更优选为100mmol/L～115mmol/L。另外，作为针对模板60的聚合性单体M29的用量，以每1μmol模板60的聚合性单体M29的用量计，可举出：例如为8mmol/L～35mmol/L，优选为13mmol/L～22mmol/L，更优选为17mmol/L～20mmol/L。进而，作为相对于聚合性单体M28的聚合性单体M29的用量，以相对于1摩尔聚合性单体M28的聚合性单体M29的用量计，可举出：例如为8摩尔～35摩尔，优选为13摩尔～22摩尔，更优选为17摩尔～20摩尔。

[0531] 聚合反应液中可适当包含交联剂、引发剂和溶剂。

[0532] 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。作为交联剂的具体例,可举出由下述式(6)表示的化合物。

[0533] [化学式15]

[0534] W-Z-W (6)

[0535] 式(6)中,W表示彼此可以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1～6、优选2～6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2个以上结合而成的基团。在2个以上的上述基团结合而构成上述连接基团的情况下,作为该键的数量,优选为5个以下或4个以下,更优选为3个以下或2个。作为更具体的交联剂的实例,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。

[0536] 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1mmol/L～10mmol/L,优选为3mmol/L～8mmol/L,更优选为4.5mmol/L～7mmol/L,进一步优选为5.5mmol/L～6.5mmol/L。

[0537] 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,优选举出偶氮系聚合引发剂,更优选举出2,2'-偶氮二(2-甲基丙脒)二盐酸盐。

[0538] 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4mmol/L～40mmol/L,优选为12mmol/L～32mmol/L,更优选为18mmol/L～28mmol/L,进一步优选为22mmol/L～26mmol/L。

[0539] 作为溶剂,可使用缓冲液等水系溶剂,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～200mM,优选为120mM～160mM。另外,作为溶剂的pH值,可举出:例如为6～8,优选为6.8～7.8,更优选为7.2～7.6。

[0540] 作为具体的聚合方法,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,优选举出无乳化剂沉淀聚合法。

[0541] 通过在这样的聚合反应体系中进行聚合反应,可合成分子印迹聚合物20,形成与模板60的表面形状互补的分子印迹凹部21。另外,因模板60容易存在于聚合物界面附近而可有效地形成分子印迹凹部21。

[0542] [3-2-3.工序(1-13)]

[0543] 在工序(1-13)中,如图13-3所示,使第一可逆连接基团22断裂而从分子印迹聚合物20中去除模板60,生成特异结合性分子的结合用基团22'。由此,得到用于制作分析用传感器的基材10'(10-P')。

[0544] [3-3.用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基材的制造方法-2]

[0545] 例如,用于制作图10的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10c-P'的制造方法包括以下的工序(1-21)～(1-24)。

[0546] • 工序(1-21),准备分子印迹模板的表面,其表面由第三可逆连接基团介导而用聚合性官能团进行了修饰;

[0547] • 工序(1-22),以上述聚合性官能团和包含与上述模板的相互作用基团的单体为基质,合成针对上述模板的部分上述表面的分子印迹聚合物;

[0548] • 工序(1-23),使上述第三可逆连接基团断裂而从上述分子印迹聚合物中去除上述模板;以及

[0549] • 工序(1-24),由第三可逆连接基团介导而引入具有功能性基团的分子,所述功能性基团包含针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团和信号物质的结合用基团。

[0550] 其中,上述特异结合性分子的结合用基团是适合于小型物质的基团。

[0551] 需要说明的是,在如图11的10b-PC'那样不包含与模板的相互作用基团25的情况下,只要从上述工序(1-22)的基质中去掉包含与模板的相互作用基团的单体即可。

[0552] 图14-1～图14-4中示意性地示出用于制作图10的(A)所示的基板状的检测对象分析用传感器的基材10c-P'的制造方法。具体而言,图14-1、图14-2、图14-3和图14-4分别示意性地示出工序(1-21)、工序(1-22)、工序(1-23)和工序(1-24)。即,在图示的实施方式中,制造用于制作检测对象分析用传感器的基材10c-P'的方法包括以下的工序。

[0553] • 工序(1-21),准备分子印迹模板60c,其表面由第三可逆连接基团26b介导而用聚合性官能团27进行了修饰;

[0554] • 工序(1-22),以聚合性官能团27和包含与模板60c的相互作用基团25的单体M25为基质,合成针对模板60的部分表面的分子印迹聚合物20c;

[0555] • 工序(1-23),使第三可逆连接基团26b断裂而从分子印迹聚合物20c中去除模板60c;以及

[0556] • 工序(1-24),由第三可逆连接基团26b介导而引入具有功能性基团24b的功能性分子R24,所述功能性基团24b包含针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团22'和信号物质的结合用基团23'。

[0557] 以下,一边参照附图一边对各工序进行详细叙述。

[0558] [3-3-1.工序(1-21)]

[0559] 在工序(1-21)中,如图14-1所示,准备分子印迹模板60c,其表面由第三可逆连接基团26b介导而用聚合性官能团27进行了修饰。

[0560] 作为模板60c,可举出如上述"3-1-2.模板和修饰工序"的"(模板)"中所述的模板,优选举出生物分子,更优选举出血浆蛋白(白蛋白、γ-球蛋白、纤维蛋白原等),更优选举出白蛋白。

[0561] 在图示的实施方式中,模板60c本身在其表面上包含相互作用部位65c和结合性基团BG6"。作为相互作用部位65c,没有特别限定,可举出例如上述表3的第3-2栏中所示的基团,优选举出酸性氨基酸残基,更优选举出羧基。作为结合性基团BG6",也没有特别限定,可举出例如上述表2的第2-1栏中所示的基团,优选举出氨基。

[0562] 通过使包含对应于结合性基团BG6"的结合性基团BG6'、第三可逆连接基团26b和聚合性官能团27的单体M27作用于模板60c,从而得到其表面由第三可逆连接基团26b介导而用聚合性官能团27进行了修饰的分子印迹模板60c。

[0563] 作为结合性基团BG6',没有特别限定,可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团,优选举出羧酸活性酯基。作为可逆连接基团26b,也没有特别限定,可举出例如上述表1的第1-3栏中所示的基团,优选举出二硫基。作为聚合性官能团27,只要含有乙烯基即可,优选举出(甲基)丙烯酰基。

[0564] [3-3-2.工序(1-22)]

[0565] 在工序(1-22)中,如图14-2所示,以聚合性官能团27为基质,合成针对模板60的部分表面的分子印迹聚合物20c。

[0566] 在图示的实施方式中,示出了使用在包含与模板60c的相互作用基团25的单体M25的同时还包含聚合性单体M28、M29作为聚合性单体的实例,但作为除了单体M25以外的聚合性单体,也可以3种以上组合来使用。另外,除了单体M25以外的聚合性单体为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”中所述的单体。在图示的实例中所使用的聚合性单体M28为生物相容性单体,生物相容性单体为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”的“(源于生物相容性单体的单元)”中所述的单体。在图示的实例中所使用的聚合性单体M29为N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺,N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺为如上述“1-3-6.构成分子印迹聚合物的聚合物”的“(源于N-取代或未取代的(甲基)丙烯酰胺的单元)”中所述的单体。

[0567] 在包含与模板60c的相互作用基团25的单体M25中,相互作用基团25为如上述“1-3-5.相互作用基团”中所述的基团,优选举出吡咯烷基。

[0568] 作为聚合反应液中的模板60c的浓度、聚合性单体M28的浓度和相对于模板60c的聚合性单体M28的用量、以及聚合性单体M29、相对于模板60c的聚合性单体M29的用量和相对于聚合性单体M28的聚合性单体M29的用量,与上述“3-2-2.工序(1-12)”中所述的聚合反应液中的模板60的浓度、聚合性单体M28的浓度和相对于模板60的聚合性单体M28的用量、以及聚合性单体M29、相对于模板60的聚合性单体M29的用量和相对于聚合性单体M28的聚合性单体M29的用量相同。

[0569] 作为包含相互作用基团25的单体M25的浓度,没有特别限定,可举出:例如为1.5mmol/L～15mmol/L,优选为4.5mmol/L～12mmol/L,更优选为6mmol/L～10mmol/L,进一步优选为8.5mmol/L～9.5mmol/L。另外,作为相对于模板60的包含相互作用基团25的单体M25的用量,以每1μmol模板60的单体M25的用量计,可举出:例如为0.15mmol～3mmol,优选为0.45mmol～2.7mmol,更优选为0.75mmol～2.2mmol,进一步优选为1.2mmol～2.2mmol。另外,作为相对于聚合性单体M28的单体M25的用量,以相对于1摩尔聚合性单体M28的单体M25的用量计,可举出:例如为0.3摩尔～3摩尔,优选为0.5摩尔～2.5摩尔,更优选为1摩尔～2摩尔,进一步优选为1.3摩尔～1.7摩尔。进而,作为相对于聚合性单体M29的单体M25的用量,以相对于100摩尔聚合性单体M29的单体M25的用量计,可举出:例如为2摩尔～20摩尔,优选为5摩尔～13摩尔,更优选为8摩尔～9摩尔。

[0570] 聚合反应液中可适当包含交联剂、引发剂和溶剂。交联剂、引发剂和溶剂的详细情况、它们的用量、聚合反应的种类与上述“3-2-2.工序(1-12)”中所述的内容相同。

[0571] 在工序(1-22)的聚合反应体系中,如图14-2所示,单体成分中的包含与模板60c的相互作用基团25的单体M25由相互作用基团25介导而与模板60c的相互作用部位65c进行特异性相互作用,从而形成单体M25-模板60c的复合物。通过在形成这样的复合物的状态下进行聚合反应,可形成与模板60c的表面形状互补的分子印迹凹部21c,而且可以使第三可逆连接基团26b存在于分子印迹凹部21c表面。另外,因模板60c是亲水性的而更加容易存在于聚合物界面附近,因此可更加有效地形成分子印迹凹部21c。

[0572] 在工序(1-22)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

形成单体M25-模板60c的复合物，可以将其供于1℃～15℃、优选1℃～10℃、更优选2℃～6℃的低温条件。作为供于低温条件的时间，可举出例如20小时～30小时。作为进行聚合反应的温度条件，可举出：例如为40℃～76℃，优选为50℃～74℃，更优选为60℃～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～20小时。需要说明的是，即使在加热条件下进行聚合反应，模板60c也可保持其形状至不会发生失去分子印迹空间的特异性的改性的程度，因此可以有效地获得分子印迹凹部21c的特异性。

[0573] 如此操作，合成分子印迹聚合物20c，得到分子印迹聚合物20c与模板60c的复合物。分子印迹聚合物20c和60c的复合物通过相互作用基团25和模板60c的相互作用部位65c之间的非共价键式的结合来形成模板。

[0574] [3-3-3.工序(1-23)]

[0575] 在工序(1-23)中，如图14-3所示，使第三可逆连接基团26b断裂而从分子印迹聚合物20c中去除模板60c。由此，在分子印迹聚合物20c的凹部21c表面配置相互作用基团25和结合性基团26b'。结合性基团26b'为通过第三可逆连接基团26b的断裂而生成的基团，具体而言，可举出上述表1的第1-1栏中所示的基团，优选举出硫醇基。

[0576] [3-3-4.工序(1-24)]

[0577] 在工序(1-24)中，如图14-4所示，由第三可逆连接基团26b介导而将具有功能性基团24b的功能性分子R24引入聚合物20c的凹部21c，所述功能性基团24b包含针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团22'和信号物质的结合用基团23'。

[0578] 包含针对检测对象的靶标的特异结合性分子的结合用基团22'和信号物质的结合用基团23'的功能性基团24b为如上述"1-3-4.功能性基团"中所述的基团。具有功能性基团24b的功能性分子R24为具有针对结合性基团26b'的结合性基团26b"的分子，由下述式(7)表示。

[0579] [化学式16]

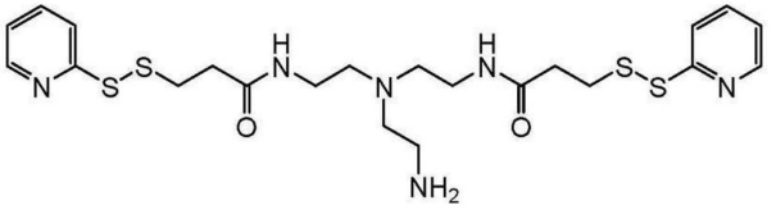
[0580] R^7-L^7-R^2-L^1-R^1 (7)

[0581] 式(7)中，R^1表示特异结合性分子的结合用基团，L^1表示直接键合或连接基团，R^2表示包含信号物质的结合用基团的连接基团，这些基团的详细情况如上述"1-3-4.功能性基团"中所述。

[0582] 式(7)中，R^7为结合性基团26b"，L^7表示直接键合或连接基团。结合性基团26b"只要针对结合性基团26b'具有结合性，就没有特别限定，可举出例如上述表1的第1-2栏中所示的基团。在直接键合或连接基团L^7为连接基团的情况下，作为该连接基团的具体例，可举出：可以包含聚氧亚烷基的亚烷基(例如C1～C8亚烷基或聚氧C1～C3亚烷基C1～C8亚烷基)、羰基、酯键(-COO-或-OCO-)、酰胺键(-CONH-或-NHCO-)和由它们的任意组合组成的基团。从分子设计的观点等出发，作为该连接基团，可举出：优选为亚烷基与酯键和/或酰胺键的组合，更优选为亚烷基与酯键或酰胺键的组合，进一步优选为1个或2个以上亚烷基(该连接基团所包含的全部亚烷基的碳原子数的总数例如为1～8、优选为2～6、更优选为3～5、特别优选为4)与酯键或酰胺键的组合。

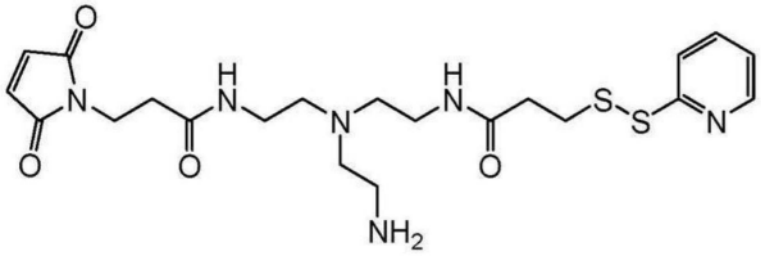
[0583] 作为具有功能性基团24b的功能性分子R24的非限定性具体例，可举出由下述式(7a)、(7b)、(7c)表示的化合物。

[0584] [化学式17]

[0585] 

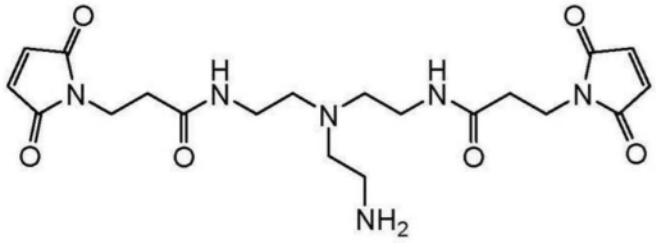
(7a)

[0586] [化学式18]

[0587] 

(7b)

[0588] [化学式19]

[0589] 

(7c)

[0590] 如上所述操作，由第三可逆连接基团26b介导而将具有功能性基团24b的功能性分子R24引入聚合物20c的凹部21c，由此，得到用于制作分析用传感器的基材10c'(10c-P')。

[0591] [3-4.用于制作粒子固定在基板上的检测对象分析用传感器的基材的制造方法]

[0592] 如图7(A)、图11(A)所示，用于制作粒子固定在基板上的检测对象分析用传感器的基材的制造方法只要将上述“3-2.用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基材的制造方法-1”和“3-3.用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基材的制造方法-2”中所述的制造方法与将聚合物粒子固定在基板30上的方法适当组合即可。

[0593] 对于将聚合物粒子固定在基板30上的工序，在上述“3-2.用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基材的制造方法-1”和“3-3.用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基材的制造方法-2”中所述的制造方法中，可以在去除模板(例如模板60、60c)而形成分子印迹聚合物(例如分子印迹聚合物10、10c)的粒子之后的任意时间进行。例如，可以在上述“3-2-3.工序(1-13)”之后，在上述“3-3-3.工序(1-23)”之后(优选上述“3-3-3.工序(1-23)”与上述“3-3-4.工序(1-24)”之间)等，将所得到的分子印迹聚合物10、10c的粒子固定在基板30上。作为将分子印迹聚合物的粒子固定在基板30上的方法，没有特别限定，本领域技术人员可以适当确定将聚合物纳米粒子固定在基板表面的通常方法。

[0594] 图15中示意性地示出在上述“3-3-3.工序(1-23)”与上述“3-3-4.工序(1-24)”之间将分子印迹聚合物20c的粒子固定在基板30上的工序。在图15所示的实例中，通过在基板30表面形成表面具有结合性基团BG9”的分子膜，使存在于分子印迹聚合物20c的表面的结合性基团BG9'结合于结合性基团BG9”，从而将分子印迹聚合物20c固定在基板30上。

[0595] 作为在基板30上所形成的分子膜表面的官能团BG9”，没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团，优选为羧酸活性酯基。作为存在于分子印迹聚合物20c的

表面的结合性基团BG9’，也没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-1栏中所示的基团。存在于分子印迹聚合物20c的表面的结合性基团BG9’可举出源于用于合成分子印迹聚合物20c的单体的基团和/或残留于分子印迹聚合物20c的构成聚合物末端的源于引发剂的基团等。

[0596] [4.检测对象分析用传感器的制造方法]

[0597] 本发明的检测对象分析用传感器的制造方法包括以下工序。

[0598] 工序(1)，进行用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法；和

[0599] 工序(2)，将上述特异结合性分子结合于上述特异结合性分子的结合用基团。

[0600] 图13-4中示意性地示出本发明的检测对象分析用传感器10(10-P)的制造方法。即，在图13-4所示的实施方式中，检测对象分析用传感器10(10-P)的制造方法包括以下的工序。

[0601] 工序(1)，进行用于制作检测对象分析用传感器的基材10’(10-P’)的制造方法；和

[0602] 工序(2)，将特异结合性分子R42结合于特异结合性分子的结合用基团22’。

[0603] 另外，在用于制作检测对象分析用传感器的基材包含信号物质的结合用基团的情况下，本发明的检测对象分析用传感器的制造方法包括以下的工序。

[0604] 工序(1)，进行用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法；

[0605] 工序(2)，将上述特异结合性分子结合于上述特异结合性分子的结合用基团；以及

[0606] 工序(3)，将信号物质结合于上述信号物质的结合用基团。

[0607] 图12-6、图14-5中示意性地示出本发明的检测对象分析用传感器10a-C、10c(10c-P)的制造方法。即，在图12-6、图14-5所示的实施方式中，检测对象分析用传感器10a-C、10c(10c-P)的制造方法包括以下的工序。

[0608] 工序(1)，进行用于制作检测对象分析用传感器的基材10a-C’、10c’(10c-P’)的制造方法；

[0609] 工序(2)，将特异结合性分子R42结合于特异结合性分子22’的结合基团；以及

[0610] 工序(3)，将信号物质R43结合于信号物质的结合用基团23’。

[0611] 工序(1)为如上述“3.用于制作检测对象分析用传感器的基材的制造方法”中所述的工序。在本发明的检测对象分析用传感器的制造方法进行工序(3)的情况下，作为工序(2)和工序(3)的顺序，可以先进行任一工序，也可以同时进行。

[0612] 特异结合性分子R42包含针对检测对象的靶标的特异结合性基团42和结合性基团22”、22b”。针对检测对象的靶标的特异结合性基团42为如上述“2-2.针对检测对象的靶标的特异结合性基团”中所述的基团。需要说明的是，虽未图示，但在分析用传感器$10a_1$-C(图8(B2))的制造方法中，除了使用包含由其他信号基团sg结合于特异结合性基团42而成的具有其他信号基团的特异结合性基团42_1(参照图2B-2)和结合性基团22”的分子作为特异结合性分子R42以外，进行与图12-6同样的步骤即可。

[0613] 另外，作为结合性基团22”，只要针对特异结合性分子的结合用基团22’具有结合性，就没有特别限定，可举出例如上述表1的第1-2栏中所示的基团。作为结合性基团22b”，只要针对特异结合性分子的结合用基团22’具有结合性，就没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团。

[0614] 信号物质R43包含信号基团43和结合性基团23”、23b”。信号基团43为如上述“2-3.

信号基团”中所述的基团。另外，作为结合性基团23”，只要针对信号物质的结合用基团23’具有结合性，就没有特别限定，可举出例如上述表1的第1-2栏中所示的基团。作为结合性基团23b”，只要针对信号物质的结合用基团23’具有结合性，就没有特别限定，可举出例如上述表2的第2-2栏中所示的基团。

[0615] 在基板状且具有信号基团43的本发明的检测对象分析用传感器(一个实例为上述检测对象分析用传感器10a-C等)的制造方法中，由于仅在基板30上的作为感测场的分子印迹凹部配置信号物质结合用基团，因此信号基团42可以根据信号物质R42的结合性基团的反应特性而仅配置在分子印迹凹部。

[0616] 另外，对于基板状且具有信号基团43的本发明的检测对象分析用传感器，可以将一种特异结合性基团42和一种信号基团43引入至一个基板30上的所有分子印迹凹部，也可以对一个分子印迹凹部引入一种特异结合性基团42，对其他分子印迹凹部引入其他种类的特异结合性基团42，并且分别对应于特异结合性基团42的种类引入不同种类的信号基团43。

[0617] [5.对象物质的分析方法]

[0618] 本发明的检测对象的分析方法包括如下工序：使包含检测对象的试样与检测对象分析用传感器接触，将上述检测对象结合于上述特异结合性基团的工序；和检测上述特异结合性基团与上述检测对象的结合的工序。

[0619] [5-1.检测对象分析用传感器]

[0620] 检测对象分析用传感器为如上述“2.检测对象分析用传感器”中所述的传感器。

[0621] [5-2.检测对象]

[0622] 作为检测对象，只要检测对象的靶标是与特异结合性基团42特异性结合的对象，就没有特别限定，可举出如上述“2-1.检测对象”中所述的对象。

[0623] 作为包含检测对象的分析试样溶液的形态，没有特别限定，从分析的迅速性的观点出发，可举出未经过对检测对象进行分离的处理的形态。作为对检测对象进行分离的处理，可举出超离心分离、超滤、连续流动电泳、使用尺寸过滤器的过滤、凝胶过滤层析等。

[0624] 作为包含检测对象的分析试样溶液，(在检测对象为细胞或细胞外囊泡的情况下)可以是从检测对象存在的环境中得到的试样，或者(在检测对象为细胞外囊泡且为来自细胞的产生物或排出物的情况下)可以是从检测对象可能出现的环境中得到的试样。具体而言，可以是包含细胞的生物试样。在检测对象为外泌体等细胞外囊泡的情况下，作为产生或排出检测对象的细胞，可举出：癌细胞、肥大细胞、树突状细胞、网织红细胞、上皮细胞、B细胞、神经细胞、粘膜细胞等。更具体而言，作为包含检测对象的分析试样溶液，可举出血液、乳汁、尿液、唾液、淋巴液、脑脊液、羊水、泪液、汗液、鼻溢液、咽拭子液、鼻咽液等体液，进而，还可举出对这些体液进行去除无用成分等前处理后的处理液、以及对这些体液中所含的细胞进行培养而得到的培养液。在这些分析试样溶液中，在非侵袭性和采集容易性方面，特别优选尿液、唾液、泪液、汗液、鼻溢液等体液。

[0625] 当使包含检测对象的试样与检测对象分析用传感器接触时，检测对象或检测对象的靶标被分子印迹凹部内的特异结合性基团42特异性捕获。

[0626] [5-3.靶向和感测]

[0627] 当检测对象或检测对象的靶标被分子印迹凹部内的特异结合性基团42特异性捕

获时，对特异结合性基团与上述检测对象的结合进行检测。

[0628] 例如，如图1B-1中示出的检测对象分析用传感器10所示，检测对象分析用传感器在分子印迹凹部内不具有信号基团43的情况下，可以通过表面等离子体共振(SPR)、反射干涉分光法等对该结合进行检测。

[0629] 另外，检测对象分析用传感器在分子印迹凹部内具有信号基团43的情况下，在结合的瞬间，信号基团43因检测对象或检测对象的靶标而经历环境变化，因此导致特异性捕获前后的信号变化。即，在该情况下，分析用传感器可以从信号变化中读出作为感测对象的检测对象或检测对象的靶标的结合信息，并通过该信号变化来检测出检测对象或检测对象的靶标。由于检测对象或检测对象的靶标的捕获与信号变化几乎同时发生，因此可以迅速进行检测而无需加入用于检测结合的试剂。

[0630] 另外，在以使信号基团43成为引起荧光共振能量转移(FRET)的荧光色素对中的一者的方式构成分析用传感器、且使该荧光色素对中的另一者预先与检测对象或检测对象的靶标结合的情况下，当检测对象或检测对象的靶标被分子印迹凹部内的特异结合性基团42特异性捕获时，在该瞬间，信号基团43中的荧光色素和检测对象中的荧光色素彼此靠近，因此通过FRET而放射荧光。通过基于该FRET的荧光放射来检测出检测对象。由于检测对象或检测对象的靶标的捕获与基于FRET的荧光放射几乎同时发生，因此可以迅速进行检测而无需加入用于检测出检测对象的试剂。作为引起FRET的荧光色素对，没有特别限定，且选择供体色素或受体色素中的哪一个作为信号基团43也没有限定。可以优选选择供体色素作为信号基团43。作为构成引起FRET的荧光色素对的供体色素/受体色素的具体例，可举出：异硫氰酸荧光素(FITC)/四甲基罗丹明异硫氰酸盐(TRITC)、Alexa Fluor647/Cy5.5、HiLyte Fluor647/Cy5.5、R-藻红蛋白(R-PE)/别藻蓝蛋白(APC)等。

[0631] [5-4.双重靶向和感测]

[0632] 另外，在图16-1和图16-2中示意性地示出：在图10的(B)所示的检测对象分析用传感器10c-P具有以白蛋白(也可以为其他血浆蛋白)为模板60c的分子印迹凹部21c和与白蛋白的特异性相互作用基团25、且用于上述“2-4.用途”中所示的用途的情形的靶向动向。在图示的实例中，举例示出了分析用传感器10c-P的检测对象70为外泌体那样的具有膜结构的微粒体、作为直接靶的靶标72为在该微粒体的表面上表达的肿瘤标志蛋白的情形(作为上述“2-1.检测对象”的“实施方式2”的情形的具体例)。另外，图16-1和图16-2均示意性地示出分子印迹凹部21c的放大图(i)和对应于(i)的检测对象分析用传感器10c-P的整体图(ii)两者。

[0633] 如图16-1所示，当将分析用传感器10c-P施用至血液中时，首先，作为在血液中大量存在的血浆蛋白的白蛋白(与模板60c相同的物质)被分析用传感器10c-P中的以白蛋白为模板的分子印迹凹部21c和与白蛋白的特异性相互作用基团25特异性捕获。由此，分析用传感器10c-P在体内获得隐身性。在该情况下，特异结合性基团42被所捕获的白蛋白(与模板60c相同的物质)掩蔽。

[0634] 另一方面，当获得隐身性的分析用传感器10c-P到达肿瘤组织时，由于肿瘤组织中的白蛋白浓度下降，因此如图16-2所示，所捕获的白蛋白脱落而露出特异结合性基团42，肿瘤标志蛋白(靶标72)特异性结合于露出的特异结合性基团42。该结合信息以基于信号基团的信号变化的形式被检出。需要说明的是，如图16-2(ii)所示，在检测对象70为具有膜结构

的微粒体、且以该靶标72为直接捕获对象的情况下，分子印迹凹部21c不必为能够容纳整个检测对象70的大小，只要为能够在其特异性结合部位附近容纳靶标72的大小即可。

[0635] 如此，在图16-1和图16-2所示的方式中，分析用传感器10c-P还能够因其所暴露的环境(白蛋白浓度)的差异而进行双重靶向。在以这样的双重靶向为目的的情况下，分子印迹凹部21c的模板60c以及相互作用基团25与特异结合性基团42的组合可以任意选择，不限定于图16-1和图16-2所示的实施方式。

[0636] 在上文中，举例说明了检测对象分析用传感器10c-P具有以白蛋白为模板60c的分子印迹凹部21c和与白蛋白的特异性相互作用基团25、且施用至血液中送达至肿瘤附近的情形，但双重靶向不限定于该实例。检测对象分析用传感器10c-P只要具有分子印迹凹部21c和与其模板的相互作用基团25，不管模板60为哪种物质，在分子印迹凹部21c的模板60c的浓度较高的环境中成为图16-1所示的方式，在分子印迹凹部21c的模板60c的浓度较低的环境中成为图16-2所示的方式。

[0637] 在一个实施方式中，涉及一种使用本发明的分析用传感器对受试体进行诊断或检查的方法，该诊断方法包括如下工序：

[0638] A)从受试体采集试样(包含例如：尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液)的工序；

[0639] B)使上述试样与上述分析用传感器接触的工序；

[0640] C)检测来自上述分析用传感器的信号的工序；以及

[0641] D)对上述信号进行分析后，对上述受试体进行诊断(例如判定有无疾病或疾病的进展)的工序。

[0642] 在一个实施方式中，涉及一种使计算机执行使用具备本发明的分析用传感器的诊断或检查系统对受试体进行诊断或检查的方法的程序，该方法包括如下工序：

[0643] A)向上述诊断或检查系统提供从上述受试体得到的试样(包含例如：尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液)的工序；

[0644] B)以使上述试样与上述分析用传感器接触的方式启动上述诊断或检查系统的工序；

[0645] C)上述诊断或检查系统检测来自上述分析用传感器的信号的工序；以及

[0646] D)上述诊断或检查系统对上述信号进行分析后，对上述受试体进行诊断或检查(例如根据检测结果来判定有无疾病或疾病的进展)的工序。

[0647] 在一个实施方式中，涉及一种存储使计算机执行使用本发明的分析用传感器对受试体进行诊断或检查的方法的程序的记录介质，该方法包括如下工序：

[0648] A)向上述诊断或检查系统提供从上述受试体得到的试样(包含例如：尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液)的工序；

[0649] B)以使上述试样与上述分析用传感器接触的方式启动上述诊断或检查系统的工序；

[0650] C)上述诊断或检查系统检测来自上述分析用传感器的信号的工序；以及

[0651] D)上述诊断或检查系统对上述信号进行分析后，对该受试体进行诊断或检查(例如根据检测结果来判定有无疾病或疾病的进展)的工序。

[0652] 在一个实施方式中，涉及一种诊断或检查系统，该系统包含：

[0653] A)提供部,提供从上述受试体得到的试样(包含例如:尿液、脑脊液、汗液、鼻涕、唾液、血液或泪液);

[0654] B)启动部,以使上述试样与上述分析用传感器接触的方式进行启动;

[0655] C)检测部,检测来自上述分析用传感器的信号;以及

[0656] D)诊断部,对上述信号进行分析后,对该受试体进行诊断或检查(例如根据检测结果来判定有无疾病或疾病的进展)。

[0657] 上述工序B)～工序D)都可以全自动执行,在全自动执行这些工序的情况下,可以使用机器学习和/或人工智能来执行,实现它们的方法、程序、记录它们的记录介质、系统也在本发明的范围内。

[0658] 通常,本发明的各种示例性实施方式可以以硬件或专用电路、软件、逻辑或它们的任意组合来实现。一些实施方式可以以硬件来实现,其他实施方式可以以能够由控制器、微处理器或其他计算设备执行的固件或软件来实现。本发明的示例性实施方式可以以框架图、流程图的形式来表示,或使用其他一些图形来表示,但应理解的是,作为非限定性实例,本说明书中记载的框架(block)、装置、系统、技术或方法可以以硬件、软件、固件、专用电路或逻辑、通用硬件或控制器、或其他计算设备或它们的任何组合来实现。

[0659] 在一个实施方式中,本发明还提供实现本发明的技术的、有形地存储在非暂时性计算机可读存储介质上的至少一种计算机程序产品。计算机程序产品包含程序模块中所包含的指令等计算机可执行指令,该计算机可执行指令是为了执行本说明书中记载的方法/过程(process)而用作为对象的真实处理器上或虚拟处理器上的设备执行的。通常,程序模块包含执行特定任务或实现特定抽象数据模型的例程、程序、库、对象、类、组件、数据结构等。在各种实施方式中,可根据需要在程序模块之间组合或拆分程序模块的功能。程序模块用的计算机可执行指令可在本地设备或分布式设备内执行。在分布式设备中,程序模块可配置于本地存储介质和远程存储介质两者。

[0660] 本发明的记录介质可以为计算机可读介质,计算机可读介质可以为计算机可读信号介质或计算机可读存储介质。计算机可读介质包含电子、磁性、光学、电磁、红外线或半导体的系统、装置或设备、或者上述任意合适的组合,但不限定于此。计算机可读存储介质的更具体的实例包含:具有一根或多根接线的电连接、便携式计算机磁盘、硬盘、随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、可擦除可编程只读存储器(EPROM或闪存存储器)、光纤、便携式压缩盘只读存储器(CD-ROM)、光学存储设备、磁性存储设备或上述任意合适的组合。

[0661] 用于执行本说明书中所公开的方法的计算机程序代码可以以一种或多种编程语言的任意组合来编写。可以将程序代码提供给通用计算机、专用计算机或其他可编程数据处理装置的处理器或控制器,以使程序代码在由处理器或控制器执行时执行流程图和/或模块图中指定的功能/操作。程序代码可以完全在计算机上执行,或作为独立软件包部分地在计算机上执行,或部分在计算机上且部分在远程计算机上执行,或完全在远程计算机上或服务器上执行。程序代码可以分配在本说明书中通常会被称为“模块”的专门编程的设备中。模块的软件组件部分可以用任意计算机语言编写,可以是整体代码库的一部分,或者可以用如典型的面向目标计算机语言那样的、更离散的代码部分开发。此外,模块可以分布在多个计算机平台、服务器、终端、移动设备等。进而,可以实现给定的模块以使所说明的功能由单独的处理器和/或计算硬件平台来执行。

[0662] 尽管以特定顺序示出了操作,但不应被理解为为了得到期望的结果而需要以所示的特定顺序或依次执行此类操作、或者需要执行所有图示的操作。在一定状况下,有时多任务处理和并行处理是有利的。同样地,尽管在上述说明中包含了一些特定实现的详细情况,但这些不应被解释为是对本发明的范围的限制,而应被解释为特定实施方式可特有的特征的说明。在单独实施方式的上下文中所说明的一定特征也可在单个实施方式中组合来实现。相反地,在单个实施方式的上下文中所说明的各种特征也可以在多个实施方式中分别或以任意的部分组合来实现。

[0663] 在使用本发明的技术的情况下,其不仅用于人,也能够用于人以外的其他动物(猫、狗、牛、马、蝙蝠、狐狸、猫鼬、浣熊等)。

[0664] (应用例)

[0665] 1.宠物动物(猫、狗、鸟类等)等动物的包括癌症在内的疾病的检查;

[0666] 2.家畜(牛、马、猪、鸡等)所携带的传染病致病病毒和传染性蛋白质(朊病毒等)、其他病原性/传染性因子的检测;

[0667] 3.有害动物(鸟类、蝙蝠、狐狸、猫鼬、浣熊等)所携带的传染病致病病毒和传染性蛋白质(朊病毒等)、其他病原性/传染性因子的检测;

[0668] 4.查验水产品的品质或新鲜度;

[0669] 5.查验农产品的品质或新鲜度;

[0670] 6.查验植物或树木等的病原菌/病毒。

[0671] 以上,为了便于理解而示出优选实施方式对本发明进行了说明。以下,基于实施例对本发明进行说明,但上述的说明及以下的实施例仅以例示的目的来提供,而不是以限定本发明的目的来而提供。因此,本发明的范围不受本说明书中具体记载的实施方式或实施例的限定,而仅由权利要求书来限定。

[0672] 实施例

[0673] 以下,基于实施例详细地说明本发明,但本发明不限定于此。所用试剂均可如各自记载那样获得,但除此以外,也可使用Merck、Sigma-Aldrich、Funakoshi和Cosmo Bio的试剂。

[0674] 需要说明的是,细胞的显微镜观察使用CKX31(OLYMPUS,Tokyo,Japan),离心分离机使用KUBOTA2800(KUBOTA,Tokyo,Japan),培育箱(incubator)使用CO2 WATER JACKETED INCUBATOR(Thermo Fisher Scientific Inc,Massachusetts,USA),高压釜使用KS-243(TOMY SEIKO Co,Ltd.,Tokyo,Japan),洁净工作台使用生物洁净工作台(ORIENTAL GIKEN INC,Tokyo,Japan)。外泌体浓度测定使用qNano Gold(Izon Science Ltd.,Christchurch,New Zealand)。另外,金基板的UV臭氧处理使用紫外臭氧清洗机(BioForce Nanosciences,Inc.),荧光测定使用带SIC自动分注装置(SYSTEM INSTRUMENTS Co.,Ltd.,Tokyo,Japan)的荧光显微镜(Olympus Corporation,Tokyo,Japan)和作为光谱软件的Andor SOLIS(Andor Technology Ltd,Belfast,Northern Ireland)。

[0675] 另外,MALDI-TOF-MS使用MALDI-TOF/MS(MALDI-7090,岛津制作所),分析软件(MALDI Solutions,岛津制作所)、校准使用蛋白质校准标准I(Bruker)。基质使用芥子酸。CD光谱使用J-725型圆二色光谱仪(日本分光,Tokyo,Japan)。为了制备缓冲液而利用台式pH计F-52(HORIBA,Kyoto,Japan)测定pH。使用Hitachi High Technology制造的荧光分光

光度计(Fluorescence spectrophotometer)F-2500(Tokyo,Japan)进行荧光光谱测定。用于超滤的超滤膜使用Amicon Ultra-4(10kDa)。吸收光谱测定使用Thermo Scientific™Nano drop™One超微量紫外可见分光光度计(Thermo Fisher)。所制作的粒子的平均粒径和多分散指数(PDI)利用ZETASIZER NANO-ZS MAL500735(Malvern,UK)通过动态光散射法(Dynamic Light Scattering,DLS)来测定,并使用Zetasizer software作为分析软件。TEM分析使用透射型电子显微镜(JEM-1230,日本电子制造)。

[0676] [实施例1:基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C(引入抗HER2亲和体作为特异结合性物质,引入AlexaFluor647作为信号物质)]

[0677] 在本实施例中,制作基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C(引入Alexa Fluor 647作为信号物质)。在该基板状的检测对象分析用传感器中,将检测对象设为作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体,将检测对象的靶标设为HER2,选择并引入抗HER2亲和体作为特异结合性分子。另外,引入Alexa Fluor 647作为信号物质。进而,使用所得到的基板状的检测对象分析用传感器进行了检测对象的分析。

[0678] 对于基板状的检测对象分析用传感器的制造方法,依据图12-1a、图12-2、图12-3a、图12-4、图12-5,制作用于制作基板状的检测对象分析用传感器的基板10a-C',进而,依据图12-6(其中,作为特异结合性分子R42,使用包含其他信号基团sg结合于特异结合性基团42而成的具有其他信号基团的特异结合性基团42_1(参照图2B-2)和结合用基团22'的分子。),制作了检测对象分析用传感器$10a_1$-C。

[0679] [1]用聚胱氨酸标签和硫醇基进行了修饰的二氧化硅粒子的制作

[0680] 按照图12-1a,制作用聚胱氨酸标签和硫醇基进行了修饰的模板二氧化硅粒子。

[0681] [1-1]试剂

[0682] ·Sicastar®-red F(micromod;平均粒径200nm;固体成分浓度25mg/Ml;粒子表面的官能团为羧基(1μmol/g);荧光特性:激发569nm、荧光585nm)

[0683] ··模板60:二氧化硅粒子

[0684] ··结合性基团BG22":羧基

[0685] ·2-氨基乙硫醇盐酸盐(东京化成工业)

[0686] ··结合性基团BG23':氨基

[0687] ··结合性基团23":硫醇基

[0688] ·聚组氨酸标签(Thermo Fisher Scientific;His-tag;Ac-KHHHHHH-NH_2;Ac表示乙酰基,K表示赖氨酸残基,H表示组氨酸残基。)

[0689] ··结合性基团BG22':氨基

[0690] ··结合性基团22":聚组氨酸

[0691] ·DMT-MM(氯化4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉;三嗪系缩合剂)

[0692] [1-2]实验步骤

[0693] 对Sicastar®-red F表面的羧基,加入20当量的2-氨基乙硫醇盐酸盐、聚组氨酸标签和DMT-MM,并进行振荡(25℃,通宵),由此制作用聚胱氨酸标签和硫醇基进行了修饰的二氧化硅粒子。然后,通过离心分离(10,000g,15分钟)将分散介质置换为水。进而,进行两次通过离心分离(10,000g,10分钟)将分散介质置换为水的操作。采集100μL所制作的二氧

化硅粒子，测定干燥重量。所得到的二氧化硅粒子的固体成分浓度为7.41mg/mL。

[0694] [2]单分子膜的形成(工序(1-1))

[0695] 按照图12-2，在基板上形成表面具有NTA-Ni络合物和聚合引发性基团的单分子膜。

[0696] [2-1]试剂

[0697] •氨基-EG_6-十一烷硫醇盐酸盐(同仁化学研究所)

[0698] ••结合性基团BG1'：氨基

[0699] •2-(2-溴异丁酰氧基)十一烷硫醇(SURF MODS)

[0700] ••聚合引发性基团INI：-CBr基

[0701] •异硫氰基苄基-NTA(同仁化学研究所)、无水$NiCl_2$(Nacalai Tesque)

[0702] ••特异结合性分子的结合用基团22'：源自镍-次氮基三乙酸的基团

[0703] [2-2]实验步骤

[0704] 将金溅射玻璃基板用乙醇洗涤后，进行UV臭氧处理(20分钟)，分解金基板表面的有机物。然后，使基板浸渍于包含0.5mM的氨基-EG_6-十一烷硫醇盐酸盐和0.5mM的2-(2-溴异丁酰氧基)十一烷硫醇的乙醇溶液中，进行静置(25℃，通宵)，形成了杂化自组装单分子膜(mixed SAMs)。

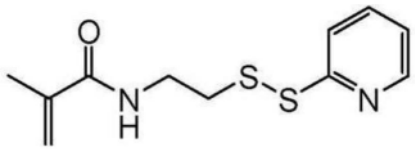
[0705] 将基板用纯水洗涤后，将5mM的异硫氰基苄基-NTA溶液(溶解于50μL的DMSO中制备成46mM后，用10mM、pH9.2的碳酸盐缓冲液进行稀释而制备的溶液)35μL滴加到基板上并静置(室温，2小时)。将基板用纯水洗涤后，使其浸渍于4mM的$NiCl_2$水溶液中并静置(室温，15分钟)，由此在基板表面的mixed SAM上形成NTA-Ni络合物(源自镍-次氮基三乙酸的基团)，然后，将基板用纯水洗涤。

[0706] [3]模板的引入(工序(1-2))

[0707] 按照图12-3a，将模板引入基板，将模板的表面用甲基丙烯酰基进行修饰。

[0708] [3-1]试剂等

[0709] •$M23_1$：2-(2-吡啶基)二硫代乙基甲基丙烯酰胺

[0710] 

[0711] 2-(2-吡啶基)二硫代乙基甲基丙烯酰胺

[0712] ••信号物质的结合用基团23'：吡啶基二硫基(转化为硫醇基)

[0713] ••聚合性官能团27：甲基丙烯酰基

[0714] ••第一可逆连接基团22：配位键

[0715] ••第二可逆连接基团23：二硫基

[0716] [3-2]实验步骤

[0717] 将上述[1]中制作的用聚组氨酸标签和硫醇基进行了修饰的二氧化硅粒子滴加到基板上并静置(室温，1小时)，由此将二氧化硅粒子固定。

[0718] 将基板用纯水洗涤后，使2-(2-吡啶基)二硫代乙基甲基丙烯酰胺溶解于50μL的DMSO中，用PBS(pH7.4)稀释，由此制备包含100μM的2-(2-吡啶基)二硫代乙基甲基丙烯酰胺

的PBS溶液。将基板浸渍于该溶液中并静置(25℃,通宵),由此通过二硫化物交换反应将甲基丙烯酰基引入二氧化硅粒子表面。

[0719] [4]分子印迹聚合物的合成(工序(1-3))

[0720] 按照图12-4,合成了分子印迹聚合物的聚合物膜。

[0721] [4-1]试剂和聚合配方

[0722] • M28:2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)

[0723] [表4]

[0724]

试剂	浓度
2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)	50mM
2,2′-联吡啶	2mM
$CuBr_2$	1mM
L-抗坏血酸	0.5mM
PBS(10mM磷酸盐、140mM NaCl、pH7.4)	10mL

[0725] [4-2]实验步骤

[0726] 根据表4的聚合配方,在上述[3]中所得到的基板上构建表面引发原子转移自由基聚合(SI-ATRP)体系,合成了分子印迹聚合物20a的聚合物薄膜。具体而言,在舒伦克(schlenk)烧瓶中制备上述聚合配方的除L-抗坏血酸以外的溶液,放入上述[3]中得到的基板并进行氮气置换后,用注射器注入L-抗坏血酸来引发聚合。聚合在40℃下进行3小时,然后,将基板用纯水洗涤。

[0727] [5]模板的裁切(工序(1-4))

[0728] 按照图12-5,从分子印迹聚合物中裁切模板,得到基板状的检测对象分析用传感器10a-C'。

[0729] 通过将100mM的EDTA-4Na的水溶液滴加到上述[4]中得到的基板上并静置(室温、15分钟)而去除Cu^{2+}。接着,将基板用纯水洗涤,滴加50mM的TCEP水溶液并静置(室温,3小时),由此还原二硫键,转化为硫醇基(信号物质的结合用基团23')。然后,将基板用纯水洗涤,并使其浸渍于含有0.5wt%的SDS的50mM乙酸缓冲液(pH4.0)中,进行振荡(25℃,通宵),由此使基板上的NTA-Ni络合物与二氧化硅粒子上的聚组氨酸标签的螯合(配位键)断裂,转化为Ni-NTA基团(针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22'),去除二氧化硅粒子。由此,得到用于制作基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'。

[0730] [6]抗HER2亲和体和Alexa Fluor 647的引入(工序(2)和工序(3))

[0731] 按照图12-6,将Alexa Fluor 647和抗HER2亲和体引入至基板状的检测对象分析用传感器10a-C'。

[0732] [6-1]试剂

[0733] • R43:Alexa Fluor 647C2-马来酰亚胺(Thermo Fisher Scientific)

[0734] • • 信号基团43:Alexa Fluor 647

[0735] • • 结合性基团23":马来酰亚胺基

[0736] • R42:Z342-EGFP-Histag

[0737] • • 特异结合性基团42:抗HER2亲和体

[0738] • • 结合性基团22":聚组氨酸标签

[0739] • •其他信号基团sg:EGFR

[0740] 由于融合EGFR的影响,与未融合EGFR的抗HER2亲和体针对HER2的固有Kd相比,Z342-EGFP-Histag中的抗HER2亲和体针对HER2的固有Kd较大(即,结合能力比未融合EGFR的抗HER2亲和体差)。实际上,Z342-EGFP-Histag中的抗HER2亲和体分子针对HER2的固有Kd为1.06×10^{-10}M。

[0741] [6-2]实验步骤

[0742] 将上述[5]中得到的用于制作基板状的检测对象分析用传感器的基材10a-C'用纯水洗涤,滴加100μM的Alexa Fluor 647C_2马来酰亚胺(20% DMSO水溶液中)并静置(室温,1小时),由此利用分子印迹凹部21内的硫醇基(信号物质的结合用基团23')来引入荧光基团Alexa Fluor 647(信号基团43)。

[0743] 将基板用纯水洗涤后,滴加包含0.3μM的Z342-EGFP-Histag的PBS(10mM磷酸盐,140mM NaCl,pH7.4)溶液并静置(室温,1小时),由此利用分子印迹凹部21内的源自镍-次氮基三乙酸的基团(特异结合性分子的结合用基团22')来引入抗HER2亲和体(特异结合性基团42)。由此,得到基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C。

[0744] [7]基于荧光测定的检测对象的分析

[0745] 使用上述[6]中得到的基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C,通过带SIC自动分注装置的荧光显微镜进行外泌体捕获试验。

[0746] [7-1]实验步骤

[0747] 如下操作从SK-BR-3细胞株(Her2高表达)的培养上清液中纯化外泌体(SK-BR-3细胞表达的外泌体)。

[0748] 对在DMEM培养基(含10% FBS(外泌体)、1%青霉素)中培养了3天的SK-BR3细胞的上清液进行离心分离1500g×10分钟、3000g×10分钟,将得到的上清液进行超滤(500g×10分钟×2次)。使用外泌体提取试剂盒qEV(Meiwafosis)对通过超滤得到的外泌体溶液进行纯化。使用q-Nano测定外泌体的粒径和浓度。

[0749] 使SK-BR-3细胞表达的外泌体以3.33×10^{-17}M、8.33×10^{-17}M、1.67×10^{-16}M、3.33×10^{-16}M、8.33×10^{-16}M、1.67×10^{-15}M、3.33×10^{-15}M和1.67×10^{-14}M的浓度溶解于PBS(10mM磷酸盐,140mM NaCl,pH7.4)中,制备外泌体溶液。将制备的外泌体溶液添加到上述[6]中得到的基板状的检测对象分析用传感器10a-C中。

[0750] 对于荧光显微镜的测定条件,测定地点为基板上的9个点,过滤器为Cy5,物镜为5倍,曝光时间为0.1秒,光量为100%,光源为汞灯。

[0751] [7-2]相对荧光强度与外泌体浓度的关系

[0752] 根据下述式计算相对荧光强度,并研究相对荧光强度与外泌体浓度的关系。将结果示于图17A中。

[0753] [数学式1]

[0754] $$\Delta I = \frac{I - I_0}{I_0}$$

[0755] AI:相对荧光强度、I_0:外泌体浓度为0的荧光强度,I:各浓度的荧光强度

[0756] 如图17A所示,在引入了Alexa Fluor 647和抗HER2亲和体的基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C中,在外泌体浓度为3.33×10^{-17}M～1.67×10^{-14}M时可确认到不足2%～

不足3%左右的消光。另一方面，如后述的比较例1所示，在未引入抗HER2亲和体的比较用的检测对象分析用传感器中，在所有外泌体浓度下均未观察到荧光强度的变化。由此表明：利用引入了Alexa Fluor 647和抗HER2亲和体的基板状的检测对象分析用传感器10a-C，检测出SK-BR-3细胞表达的外泌体。

[0757] [7-3]解离常数的推导

[0758] 基于荧光强度变化，通过使用DeltaGraph的曲线拟合，计算解离常数K_d。计算公式如下所述。

[0759] [数学式2]

[0760] $$Y=\left\{(1+K\times G+K\times H)-((1+K\times G+K\times H)^2-4\times K\times K\times H\times G)^{1/2}\right\}\times\frac{D}{2KG}$$

[0761] Y：荧光强度变化、H：外泌体浓度、G：主体分子的初始浓度

[0762] D：最大荧光强度变化、K：耦合常数(其中，假设G＝0.01。)

[0763] 其结果，基于本实施例的引入了Alexa Fluor 647的基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C得到的解离常数K_d为6.1×10^{-18}M，相对于本实施例中使用的抗HER2亲和体的固有K_d(1.06×10^{-10})，得到了8.5个数量级的格外的提高效果，与后述的比较例2相比，可看出惊人的提高结合能力的效果。另外，即使与后述的实施例3、5相比，基于本实施例的提高结合能力的效果也显著优异。

[0764] [比较例1：不包含亲和体的基板状的检测对象分析用传感器]

[0765] 除了不引入亲和体以外，与实施例1同样地操作而制作比较用的检测对象分析用传感器。对于该比较用的检测对象分析用传感器，与实施例1同样地研究了相对荧光强度与外泌体浓度的关系。将结果示于图17B。

[0766] 如图17B所示，在未引入抗HER2亲和体的比较用的检测对象分析用传感器中，在所有外泌体浓度下均未观察到荧光强度的变化。

[0767] [实施例2：基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C(引入抗HER2亲和体作为特异结合性物质，引入罗丹明作为信号物质)]

[0768] 在本实施例中，制作基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C(引入罗丹明作为信号物质)。在该基板状的检测对象分析用传感器中，与实施例1同样，将检测对象设为作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体，以检测对象的靶标为HER2，选择并引入抗HER2亲和体作为特异结合性分子。另外，引入罗丹明作为信号物质。进而，使用所得到的基板状的检测对象分析用传感器进行了检测对象的分析。

[0769] [1]实验步骤

[0770] 除了使用四甲基罗丹明(TAMRA)-5C_2马来酰亚胺代替Alexa Fluor 647C_2-马来酰亚胺作为信号物质R43以外，以与实施例1同样的方法来制作。同样地操作，制作了合计3个(N＝3)基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C(引入罗丹明作为信号物质)。

[0771] [2]基于荧光测定的检测对象的分析

[0772] 对于上述[1]中得到的各个基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C(引入罗丹明作为信号物质，N＝3)，以与实施例1同样的方法来进行SK-BR-3细胞表达的外泌体的分析。需要说明的是，外泌体的浓度为2.0×10^{-17}M、5.0×10^{-17}M、1.0×10^{-16}M、2.0×10^{-16}M、5.0×10^{-16}M、1.0×10^{-15}M，2.0×10^{-15}M和1.0×10^{-14}M。对于荧光显微镜的测定条件，测定地点为7

个点，过滤器为GW(激发)-Cy3(荧光)，物镜为5倍，曝光时间为0.1秒，光量为100％，光源为汞灯。将结果示于图18。

[0773] 其结果，在引入了罗丹明和抗HER2亲和体的基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C中，与实施例1的引入Alexa Fluor 647和抗HER2亲和体的基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C相比，在所有外泌体浓度下都确认到10倍以上的消光，可观察到非常高的灵敏度。例如，在外泌体浓度为1.0×10^{-14}M时，可观察到强于30％的消光。即使与后述的实施例3相比，这样的本实施例的灵敏度也很优异。进而可知，对于N＝3中的任何一个都可以进行这样的高灵敏度检测，并且在再现性方面也优异。与上述的实施例1和后述的实施例3相比，该优异的再现性也很显著。

[0774] [3]解离常数的推导

[0775] 与实施例1的[7]同样，基于荧光强度的变化，计算解离常数K_d。其结果，基于本实施例的引入了罗丹明和抗HER2亲和体的基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C得到的解离常数K_d为8.41×10^{-18}，相对于本实施例中使用的抗HER2亲和体的固有K_d(1.06×10^{-10})，得到了不足9个数量级的格外的提高效果，与后述的比较例2相比，可看出惊人的提高结合能力的效果。另外，与后述的实施例3、5相比，基于本实施例的提高结合能力的效果也显著优异。

[0776] [4]检测限的推导

[0777] 根据下式计算检测限(DL)。

[0778] [数学式3]

[0779] $DL=3.3s/a$

[0780] s:外泌体浓度为0的荧光强度的标准偏差

[0781] a:浓度为0、2.0×10^{-17}、5.0×10^{-17}[M]的平均荧光强度的梯度

[0782] 其结果，基于本实施例的引入了罗丹明和抗HER2亲和体的基板状的检测对象分析用传感器$10a_1$-C得到的检测限(DL)为5.19×10^{-17}M，与后述的实施例3相比也显著优异。

[0783] [比较例2:引入抗体的基板状的检测对象分析用传感器]

[0784] 除了引入抗Her2抗体(该抗Her2抗体针对Her2的固有解离常数为5.8×10^{-10}M)代替抗HER2亲和体以外，与实施例1同样地操作而制作分析用传感器。具体而言，在实施例1的[6]中，代替将Z342-EGFP-Histag结合于基板状的检测对象分析用传感器10a-C'，进行以下的步骤。

[0785] 添加溶解于PBS的100μM的聚组氨酸蛋白G，由此由聚组氨酸标签介导而将能结合抗体的蛋白G固定。将溶解于PBS的0.3μM的抗Her2抗体添加到基板，由此由蛋白G介导而将抗Her2抗体固定。

[0786] 除了上述方面以外，与实施例1同样地操作而制作分析传感器，与实施例2的[3]同样地操作而推导解离常数。其结果，基于本比较例的分析用传感器得到的解离常数K_d为6.34×10^{-16}M，相对于本比较例中使用的抗HER2抗体的固有K_d(5.8×10^{-10})，仅有6个数量级的提高效果。

[0787] [实施例3:基板状的检测对象分析用传感器(利用融合于特异结合性基团的信号物质的基板状的检测对象分析用传感器10^1类型)]

[0788] 在本实施例中，制作基板状的检测对象分析用传感器(利用融合于特异结合性基

团的信号物质的基板状的检测对象分析用传感器10^1类型)。在该基板状的检测对象分析用传感器中,与实施例1同样,将检测对象设为作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体,将检测对象的靶标设为HER2,选择并引入抗HER2亲和体作为特异结合性分子。另外,不引入信号物质而利用融合于特异结合性基团的信号物质。进而,使用所得到的基板状的检测对象分析用传感器进行了检测对象的分析。

[0789] [1]实验步骤

[0790] 除了去掉引入四甲基罗丹明-$5C_2$马来酰亚胺的工序以外,与实施例3同样地操作而制作基板状的检测对象分析用传感器(N=2)。即,本实施例的基板状的检测对象分析用传感器与实施例2的基板状的检测对象分析用传感器10a-C不同,其未引入信号物质。这里,在该传感器中,由于使用如上所述(实施例1的栏)的Z342-EGFP-Histag(具有融合了荧光基团EGFP的抗HER2亲和体和聚组氨酸标签的分子)作为提供特异结合性基团42的特异结合性分子R42,因此,严格来说,特异结合性基团42是融合了荧光基团EGFP的抗HER2亲和体、即信号基团43结合于特异结合性基团42而成的特异结合性基团44。因此,本实施例的基板状的检测对象分析用传感器是利用融合于特异结合性基团的信号物质的基板状的检测对象分析用传感器10^1类型。

[0791] [2]基于荧光测定的检测对象的分析

[0792] 对于上述[1]中得到的各个基板状的检测对象分析用传感器(利用融合于抗HER2亲和体的EGFP,N=2),以与实施例2同样的方法和条件(其中,过滤器变更为用于测定EGFP的BW(激发)-Cy3(荧光))来进行SK-BR-3细胞表达的外泌体的分析。将结果示于图19。

[0793] 其结果,在利用了融合于抗HER2亲和体的EGFP的基板状的检测对象分析用传感器10^1类型中,在外泌体浓度为1.0×10^{-14}M下的消光具有5%左右～15%左右的波动范围,但可高灵敏度地检测外泌体。

[0794] [3]解离常数的推导

[0795] 基于荧光强度变化,与实施例1的[7]同样地操作来计算解离常数K_d。其结果,解离常数K_d为2.29×10^{-17},相对于融合了荧光基团EGFP的抗HER2亲和体的固有K_d(1.06×10^{-10})而言格外提高。

[0796] [4]检测限的推导

[0797] 与实施例2同样地操作,还计算了检测限(DL)。其结果,检测限(DL)为3.70×10^{-14}M。

[0798] [实施例4:粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10-PC(引入抗HER2亲和体作为特异结合性物质)]

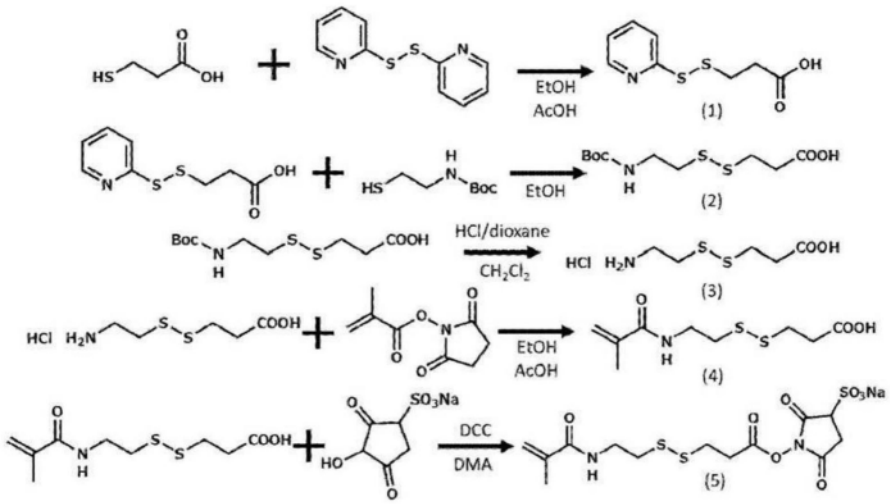
[0799] 在本实施例中,制作粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10-PC。在该粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器中,将检测对象设为作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体,将检测对象的靶标设为HER2,选择并引入抗HER2亲和体作为特异结合性分子。进而,使用所得到的粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10-PC进行了检测对象的分析。

[0800] 对于粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器的制造方法,根据图13-1b、图13-2、图13-3、图15,制作用于制作基板状的检测对象分析用传感器的基材10-PC',进而,根据图13-4,制作检测对象分析用传感器10-PC。

[0801] [1]二硫键型甲基丙烯酰基修饰试剂的合成

[0802] 根据下述方案，合成后述的[2]中使用的二硫键型甲基丙烯酰基修饰试剂(下述方案的化合物(5))。在本实施例中，使用该试剂作为包含结合性基团BG22'、第一可逆连接基团22和聚合性官能团27的单体$M22_2$。

[0803] [化学式20]

[0804] 

[0805] 使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乙醇中的2,2-二吡啶基二硫化物(3.75g，17mmol)。在25℃下使其反应3小时，由此得到化合物(1)。

[0806] 使经纯化的化合物(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乙醇中而成的溶液。在室温下使其反应3小时，由此得到化合物(2)。

[0807] 在溶解于5mL的CH_2Cl_2中的纯化化合物(2)(1.43g，5.10mmol)中，在冰冷却的条件下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，在室温下使其反应一夜，由此得到化合物(3)。

[0808] 使经纯化的化合物(3)(531.6mg，2.45mmol)分散于5mL的CH_2Cl_2中，并加入DIEA(1.28mL，7.35mmol，3eq)。在氮气气氛下，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，在室温下使其反应一夜，由此得到化合物(4)。

[0809] 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，在室温下使其反应24小时。反应后，在4℃下冷却溶液，过滤去除沉淀物。然后，通过对滤液进行减压蒸馏来去除DMA。使得到的白色固体溶解于AcOEt中，通过向其中加入己烷而使其再次沉淀，得到化合物(5)。(^{1}H-NMR图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))

[0810] [2]模板的修饰(工序(1-11))

[0811] 按照图13-1b，制作由二硫键介导而用甲基丙烯酰基进行了修饰的模板HSA。

[0812] [2-1]试剂

[0813] •白蛋白，来自人血清(HSA；人血清白蛋白)(和光纯药工业)

[0814] • •模板60:HSA

[0815] • •结合性基团BG22”:氨基

[0816] • $M22_2$:上述[1]中合成的化合物(5)

[0817] • •结合性基团BG22’:羧酸活性酯基

[0818] • •第一可逆连接基团22:二硫基

[0819] • •聚合性官能团27:甲基丙烯酰基。

[0820] [2-2]实验步骤

[0821] 将2mL溶解有HSA(100mg,2.23μmol)的10mM磷酸缓冲液(pH 7.4)和1mL溶解有上述[1]中合成的化合物(5)(20mg,44.6μmol,20eq)的10mM磷酸缓冲液(pH7.4)混合,在4℃下使其反应一夜。然后,用Amicon Ultra-4 10kDa(4℃,7500g,20min)洗涤3次,得到由二硫键介导而用甲基丙烯酰基进行了修饰的模板HSA。

[0822] [3]分子印迹聚合物的合成(工序(1-12))

[0823] 按照图13-2,合成分子印迹聚合物的粒子。

[0824] [3-1]试剂和聚合配方

[0825] • M28:2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC)

[0826] • M29:N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)

[0827] [表5]

[0828]

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)
吡咯烷基丙烯酸酯(PyA)	63.6mg(0.45mmol)
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

[0829] [3-2]实验步骤

[0830] 根据表5的聚合配方,在50mL舒伦克烧瓶中,在氮气气氛下、70℃下进行16小时无乳化剂沉淀聚合,合成分子印迹聚合物20的粒子MIP-NGs。

[0831] [4]去除模板(工序(1-13))

[0832] 按照图13-3,从分子印迹聚合物中去除模板。

[0833] 对于包含分子印迹聚合物20的粒子MIP-NGs与模板HSA的复合物的PBS溶液,通过使用Amicon Ultra-410kDa透析管的超滤(25℃,7500g,20分钟,3次)来进行溶剂的纯水置换。向该复合物中加入三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)以使其成为20mM,在25℃下使其反应一夜。由此,将模板HSA和MIP-NGs之间的二硫键还原而使其断裂,露出硫醇基(针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’)。

[0834] 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-4 10kDa透析管进行超滤(25℃,7500g,20min,3次)来去除TCEP,并且将溶剂置换为含有140mM NaCl的10mM Tris-盐酸缓冲液(pH7.4)。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20的粒子MIP-NGs。

[0835] [5]粒子解析

[0836] 对于得到的MIP-NGs,进行动态光散射(DLS)测定和透射型电子显微镜(TEM)测定。在TEM测定中,测定随机选择的100个粒子的粒径,取其平均值作为数均粒径,其中,所述粒径为透射电子显微图像中粒子的长轴和短轴的平均值。将结果示于下述表中。另外,将TEM图像示于图20。图20中,比例尺的长度为50nm。

[0837] [表6]

[0838]

DLS				TEM
Z 平均粒径	体积平均粒径	PDI	固体成分浓度	数均粒径
128.6 nm	156.4 nm	0.293	0.04	50-80nm

[0839] [6]在基板上固定粒子

[0840] 按照图15(其中,将粒子状的分子印迹聚合物20改写为粒子状的分子印迹聚合物20),将上述[4]中得到的分子印迹聚合物20的粒子MIP-NGs固定在基板上。

[0841] 将SPR金基板用纯水和乙醇洗涤后,使其浸渍于以使11-巯基十一烷酸为1mM的方式制备的乙醇溶液中,在25℃下培养一夜。用乙醇和纯水洗涤反应后的基板,用氮气使其干燥,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℃下培养10分钟。将400μg/mL的MIP-NGs溶液注入所得到的基板(基板表面被作为结合性基团BG9”的羧酸活性酯基改性),并在25℃下培养10分钟,得到固定有MIP-NGs的基板。由此,得到用于制作检测对象分析用传感器的基材10-PC’。

[0842] [7]亲和体的引入(工序(2))

[0843] 按照图13-4,在上述[6]中得到的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-PC’中,引入抗Her2亲和体。

[0844] [7-1]试剂

[0845] •Anti-Her2 Affibody(R)分子(抗Her2亲和体分子,Abcam株式会社;该分子的固有K_d为3.2×10^{-11}M,分子量为6,000左右。)

[0846] •二硫苏糖醇

[0847] ••特异结合性基团42:抗Her2亲和体

[0848] ••结合性基团22”:硫醇基

[0849] [7-2]实验步骤

[0850] 在20mM的DTT溶液(50mM PB,137mM NaCl(pH7.5))40μL中加入1mg/mL抗Her2亲和体分子的溶液(10mM PB,137mM NaCl,0.05vol%Tween20(pH7.4);PBST)10μL,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R42。

[0851] 使上述[6]中得到的用于制作检测对象分析用传感器的基材10-PC’浸渍于3.1mM的2,2-联吡啶二硫化物溶液(乙醇:水=1:1(体积比))中,在25℃下培养3小时,由此使分子印迹凹部21中的硫醇基(针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’)活化为吡啶基二硫基(针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22’)。然后,通过将10μg/mL的提供抗Her2亲和体的分子R42的溶液以20μL/分钟的流速用7分钟注入吡啶基二硫基而结合抗Her2亲和体

基团(特异结合性基团42)。然后,通过使其依次与1mg/mL脱脂牛奶水溶液、1M氨基乙醇(pH8.4)反应来进行基板表面(未用于粒子固定的结合性基团BG9")的封闭处理。由此,得到检测对象分析用传感器10-PC。

[0852] [8]基于SPR测定的检测对象的分析

[0853] 使用上述[7]中得到的粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10-PC,进行SPR测定

[0854] [8-1]实验步骤

[0855] 使SK-BR-3细胞表达的外泌体以0×10^{-16}M、0.032×10^{-16}M、0.064×10^{-16}M、0.125×10^{-16}M、0.25×10^{-16}M、0.5×10^{-16}M、1.0×10^{-16}M、2.5×10^{-16}M、5.0×10^{-16}M、10×10^{-16}M、50×10^{-16}M、100×10^{-16}M、500×10^{-16}M、1000×10^{-16}M的浓度溶解于PBS(10mM磷酸盐,140mM NaCl,pH 7.4)中,制备成外泌体溶液。将制备的外泌体溶液添加到上述[7]中得到的粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10-PC中。

[0856] 对于SPR的测定条件,如下所述。

[0857] 流速:20μL/分钟

[0858] 注入量:100μL

[0859] 温度:25℃

[0860] 数据点:注入后经过6分钟时

[0861] 运行缓冲液:PBS

[0862] [8-2]结果

[0863] 将外泌体溶液的即将注入之前和注入后经过6分钟时的共振单位(RU)值之差作为响应的变化量,绘制吸附等温线。将结果示于图21。进而,与实施例1中的[7]同样地操作,通过曲线拟合来计算解离常数K_d。其结果,解离常数K_d为2.0×10^{-18}(M),相对于本实施例中使用的抗HER2亲和体分子的固有K_d(3.2×10^{-11}M)而言格外提高。

[0864] [实施例5:粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10b-PC(引入抗HER2亲和体作为特异结合性物质,引入ATTO647N作为信号物质)]

[0865] 在本实施例中,制作粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10b-PC。在该粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器中,将检测对象设为作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体,将检测对象的靶标设为HER2,选择并引入抗HER2亲和体作为特异结合性分子。另外,引入ATTO647N作为信号物质。进而,使用所得到的粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10b-PC进行了检测对象的分析。

[0866] 粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10b-PC是从粒子状的检测对象分析用传感器10c-P固定在基板上的物质中去掉相互作用基团25的方式。因此,对于粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器10b-PC的制作方法,根据图14-1、图14-2(其中,不使用具有相互作用基团25的单体M25)、图14-3、图15和14-4,制作用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基材10b-PC',进而,根据图14-5,制作检测对象分析用传感器10b-PC。

[0867] [1]模板的修饰(工序(1-21))

[0868] 按照图14-1,制作由二硫键介导而用甲基丙烯酰基进行了修饰的模板HSA。

[0869] [1-1]试剂

[0870] •白蛋白,来自人血清(HSA;人血清白蛋白)(和光纯药工业)

[0871] • •模板60c:HSA

[0872] • •结合性基团BG6”:氨基

[0873] •M27:实施例4的[1]中合成的化合物(5)

[0874] • •结合性基团BG6’:羧酸活性酯基

[0875] • •第三可逆连接基团26b:二硫基

[0876] • •聚合性官能团27:甲基丙烯酰基。

[0877] [1-2]实验步骤

[0878] 将2mL溶解有HSA(100mg,2.23μmol)的10mM磷酸缓冲液(pH 7.4)和1mL溶解有实施例4的[1]中合成的化合物(5)(20mg,44.6μmol,20eq)的10mM磷酸缓冲液(pH7.4)混合,在4℃下使其反应一夜。然后,用Amicon Ultra-4 10kDa(4℃,7500g,20min)洗涤3次,得到由二硫键介导而用甲基丙烯酰基进行了修饰的模板HSA。

[0879] [2]分子印迹聚合物的合成(工序(1-22))

[0880] 按照图14-2(其中,不使用具有相互作用基团25的单体M25),合成分子印迹聚合物的粒子。

[0881] 具体而言,根据与实施例4的表5相同的聚合配方,在50mL舒伦克烧瓶中,在氮气气氛下、70℃下进行16小时无乳化剂沉淀聚合,由此合成分子印迹聚合物20b(分子印迹聚合物20c的没有相互作用基团25的方式)的粒子MIP-NGs。

[0882] [3]去除模板(工序(1-23))

[0883] 按照图14-3(其中,不存在相互作用基团25),从分子印迹聚合物去除模板。

[0884] 对于包含分子印迹聚合物20b(分子印迹聚合物20c的没有相互作用基团25的方式)的粒子MIP-NGs与模板HSA的复合物的PBS溶液,通过使用Amicon Ultra-4(10kDa)透析管的超滤(25℃,7500g,20分钟,3次)来进行溶剂的纯水置换。向该复合物中加入三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)以使其成为20mM,在25℃下使其反应一夜。由此,将模板HSA和MIP-NGs之间的二硫键还原并使其断裂,露出硫醇基(结合性基团26b’)。

[0885] 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-4 10kDa透析管进行超滤(25℃,7500g,20min,3次)来去除TCEP,并且将溶剂置换为含有140mM NaCl的10mM Tris-盐酸缓冲液(pH7.4)。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20b(分子印迹聚合物20c的没有相互作用基团25的方式)的粒子MIP-NGs。

[0886] [4]在基板上固定粒子

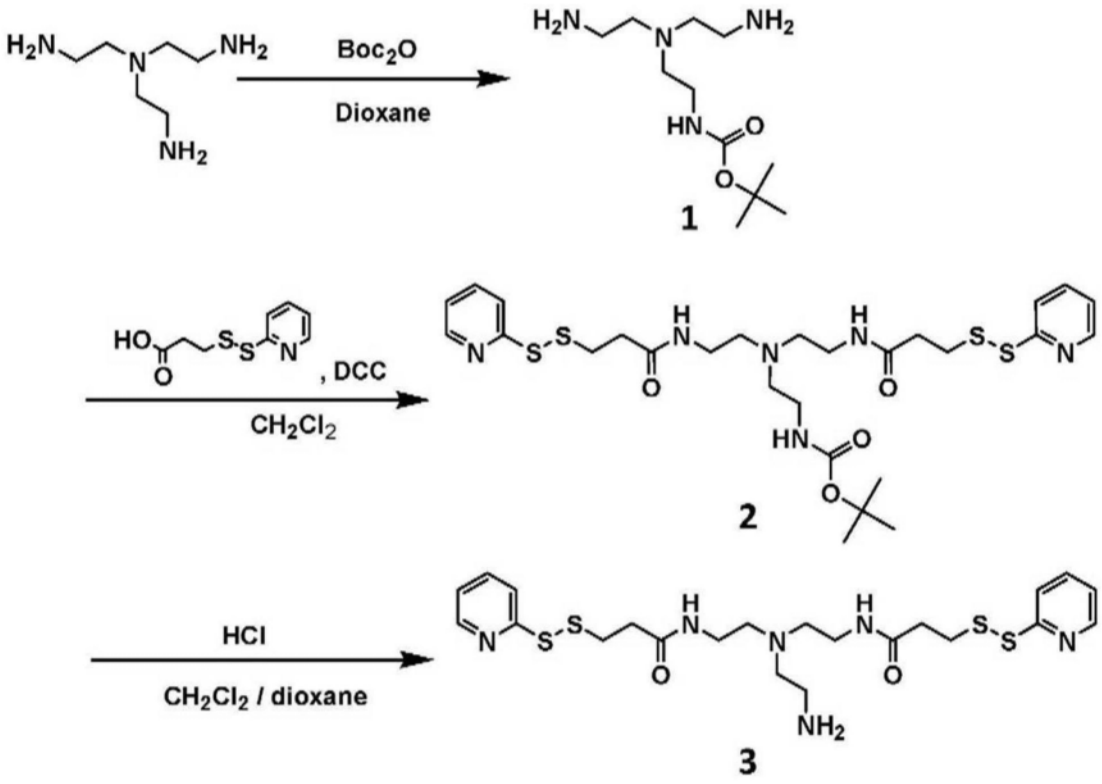
[0887] 按照图15(其中,将粒子状的分子印迹聚合物20c改写为粒子状的分子印迹聚合物20b),将上述[3]中得到的分子印迹聚合物20b(分子印迹聚合物20c的没有相互作用基团25的方式)的粒子MIP-NGs固定在基板上。具体的实验步骤与实施例4的[6]相同。

[0888] [5]功能性分子R24的合成

[0889] 根据下述方案,合成后述[6]中使用的具有功能性基团24b和针对靶标的特异结合性分子的结合用基团22b’的功能性分子R24。功能性分子R24为由上述式(7a)表示的化合物。

[0890] [化学式21]

[0891]



[0892] 使1800μL(12mmol)的三(2-氨基乙基)胺溶解于二噁烷(4mL)中,在冰冷却下进行搅拌。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,使残渣溶解于Milli-Q水中,用CH_2Cl_2(15mL)进行提取(×4)。用Na_2SO_4干燥有机层,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%)^{1}H-NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ=5.29(br,1H,碳酰胺),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)

[0893] 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,在冰冷却下进行搅拌。向其中加入130mg(0.53mmol)化合物(1),进一步搅拌1小时。反应后,通过过滤去除沉淀物,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%)^{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,碳酰胺),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)

[0894] 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/二噁烷,在冰冷却下进行搅拌。搅拌一夜(0℃→室温)后,添加过量的乙醚,通过倾析来分离沉淀物。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)^{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-)

[0895] [6]功能性基团24b的引入(工序(1-24))

[0896] 按照图14-4(其中,不存在相互作用基团25),将功能性分子R24引入分子印迹凹部

21c(其中,不存在相互作用基团25)的结合性基团26b”。

[0897] [6-1]试剂

[0898] •功能性分子R24:上述[5]中得到的、由上述式(7a)表示的化合物

[0899] ••特异结合性分子的结合用基团22b’:吡啶基二硫基

[0900] ••信号物质的结合用基团23b’:氨基

[0901] ••结合性基团26b”:吡啶基二硫基

[0902] [6-2]实验步骤

[0903] 将固定有上述[4]中得到的分子印迹聚合物20b(分子印迹聚合物20c的没有相互作用基团25的方式)的粒子MIP-NGs的基板浸渍于功能性分子R24的900μg/mL PBS溶液中,使功能性分子R24的吡啶基二硫基(结合性基团26b”)与分子印迹聚合物20b的硫醇基(结合性基团26b’)在室温下反应2小时。由此,得到用于制作检测对象分析用传感器的基材10b-PC’。

[0904] [7]亲和体和荧光物质的引入(工序(2)和工序(3))

[0905] 按照图14-5(其中,不存在相互作用基团25),在用于制作检测对象分析用传感器的基材10b-PC’中,引入抗Her2亲和体和荧光物质。

[0906] [7-1]试剂

[0907] •使用提供抗Her2亲和体的分子R42:使用Anti-Her2 Affibody®分子(抗Her2亲和体分子,Abcam株式会社)和二硫苏糖醇,实施例4的[7-2]中合成的化合物

[0908] ••特异结合性基团42:抗Her2亲和体(该分子的固有K_d为3.2×10^{-11}M,分子量为6,000左右。)

[0909] ••结合性基团22b”:硫醇基

[0910] •信号物质R43:Atto647N-NHS(ATTO-TEC)

[0911] ••信号基团43:Atto647N

[0912] ••结合性基团23b”:羧酸活性酯基

[0913] [7-2]实验步骤

[0914] 使提供抗Her2亲和体的分子R42的10μg/mL PBS溶液与上述[7]中获得的用于制作检测对象分析用传感器的基材10b-PC’反应(室温,2小时),向吡啶基二硫基(特异结合性分子的结合用基团22b’)中引入抗Her2亲和体(特异结合性基团42)。然后,通过使100μM的2-巯基乙醇溶液反应而对残留的吡啶基二硫基(特异结合性分子的结合用基团22b’的残基)进行封端。接着,使基板与Atto647N-NHS溶液反应(室温,2小时),向氨基(信号物质的结合用基团23b’)中引入Atto647N(信号基团43)。由此,得到检测对象分析用传感器10b-PC(固定在基板上的、检测对象分析用传感器10c-P的没有相互作用基团25的方式)。

[0915] [8]基于荧光测定的检测对象的分析

[0916] 使用上述[7]中得到的检测对象分析用传感器10b-PC(固定在基板上的、检测对象分析用传感器10c-P的没有相互作用基团25的方式),通过带SIC自动分注装置的荧光显微镜进行外泌体捕获试验。

[0917] [8-1]实验步骤

[0918] 使SK-BR-3细胞表达的外泌体以0M～1.0×10^{-13}M的浓度溶解于PBS(10mM磷酸盐,140mM NaCl,pH 7.4)中,制备成外泌体溶液。将制备的外泌体溶液滴加到上述[7]中得到的

检测对象分析用传感器中。

[0919] 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％，光源为汞灯。

[0920] [8-2]结果

[0921] 对于相对荧光强度，与实施例1同样地操作来计算相对荧光强度，研究了相对荧光强度与外泌体浓度的关系。将结果示于图22。

[0922] 如图22所示，在上述[7]中得到的检测对象分析用传感器10b-PC(固定在基板上的、检测对象分析用传感器10c-P的没有相互作用基团25的方式)中，确认到消光程度随外泌体的浓度依赖性地增加。即，显示出针对SK-BR-3细胞表达的外泌体的识别能力。

[0923] 与实施例1的[7]同样地操作，通过曲线拟合来计算解离常数K_d。其结果，解离常数K_d为1.0×10^{-17}(M)，相对于本实施例中使用的抗HER2亲和体分子的固有K_d(3.2×10^{-11}M)而言格外提高。另外，与实施例2的[4]同样地操作而推导检测限。其结果，检测限为5.93×10^{-18}(M)。

[0924] 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检测对象分析用传感器10b-PC(固定在基板上的、检测对象分析用传感器10c-P的没有相互作用基团25的方式)。图23中示出了在引入了抗HER2亲和体的本实施例的分析用传感器和引入了抗HSA亲和体的另一分析用传感器中添加作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体(5×10^{-17}M)的情形的相对荧光强度变化。

[0925] 如图23所示，SK-BR-3细胞表达的外泌体是利用引入了抗HER2亲和体的本实施例的分析用传感器来进行特异性检测。

[0926] [实施例6:基板状的检测对象分析用传感器10a-C(引入抗HER2纳米抗体作为特异结合性物质，引入AlexaFluor647作为信号物质)]

[0927] 除了引入抗Her2纳米抗体代替抗HER2亲和体以外，与实施例1同样地操作而制作基板状的检测对象分析用传感器10a-C(引入Alexa Fluor 647作为信号物质)。抗Her2纳米抗体分子的固有K_d为1×10^{-9}M。

[0928] 与实施例1的[7]同样地操作，通过曲线拟合来计算解离常数K_d。其结果，解离常数K_d为5.81×10^{-19}(M)，相对于本实施例中使用的抗HER2纳米抗体分子的固有K_d(1×10^{-9}M)而言格外提高。

[0929] [实施例7:固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P(引入抗HER2亲和体作为特异结合性物质，引入ATTO647N作为信号物质)]

[0930] 在本实施例中，制作粒子状的检测对象分析用传感器10c-P固定在基板上的方式。在该粒子状且固定在基板上的检测对象分析用传感器中，将检测对象设为作为HER2过表达型乳腺癌细胞株的SK-BR-3细胞表达的外泌体，将检测对象的靶标设为HER2，选择并引入抗HER2亲和体作为特异结合性分子。另外，引入ATTO647N作为信号物质。另外，该分析用传感器还具有与作为模板的HAS进行相互作用的相互作用基团25。进而，使用所得到的固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P进行了检测对象分析。

[0931] 对于固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P的制造方法，根据图14-1、图14-2、图14-3、图15和图14-4，制作固定在用于制作粒子状的检测对象分析用传感器的基板10c-P'的基板上的方式，进而，根据图14-5，制作固定在基板上的粒子状的检测对

象分析用传感器10c-P。

[0932] [1]模板的修饰(工序(1-21))

[0933] 按照图14-1,制作由二硫键介导而用甲基丙烯酰基进行了修饰的模板HSA。

[0934] [1-1]试剂

[0935] •白蛋白,来自人血清(HSA;人血清白蛋白)(和光纯药工业)

[0936] ••模板60c:HSA

[0937] 结合性基团BG6":氨基

[0938] ••相互作用部位65c:羧基

[0939] •M27:实施例4的[1]中合成的化合物(5)

[0940] ••结合性基团BG6':羧酸活性酯基

[0941] ••第三可逆连接基团26b:二硫基

[0942] ••聚合性官能团27:甲基丙烯酰基。

[0943] [1-2]实验步骤

[0944] 进行与实施例5的[1-2]相同的步骤。

[0945] [2]分子印迹聚合物的合成(工序(1-22))

[0946] 按照图14-2,合成分子印迹聚合物的粒子。

[0947] [2-1]试剂和聚合配方

[0948] •M25:吡咯烷基丙烯酸酯(PyA)

[0949] ••相互作用基团25:吡咯烷基

[0950] •M28:2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC)

[0951] •M29:N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)

[0952] [表7]

[0953]

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)
吡略烷基丙烯酸酯(PyA)	63.6mg(0.45mmol)
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

[0954] [2-2]实验步骤

[0955] 根据表7的聚合配方,在50mL舒伦克烧瓶中,在氮气气氛下、70℃下进行16小时无乳化剂沉淀聚合,合成分子印迹聚合物20c的粒子MIP-NGs。

[0956] [3]去除模板(工序(1-23))

[0957] 按照图14-3,从分子印迹聚合物20c中去除模板。具体的步骤与实施例5的[3]相同。

[0958] [4]粒子解析

[0959] 对于得到的分子印迹聚合物20c的粒子MIP-NGs,与实施例4的[5]同样地操作,进行动态光散射(DLS)测定和透射型电子显微镜(TEM)测定。将测定结果示于下述表中。另外,

将TEM图像示于图24。在图24中，比例尺的长度为50nm。

[0960] [表8]

[0961]

DLS				TEM
Z 平均粒径	体积平均粒径	PDI	固体成分浓度	数均粒径
152.5 nm	27.96 nm	0.31	0.04	20-30nm

[0962] [5]在基板上固定粒子

[0963] 按照图15，将上述[3]中得到的分子印迹聚合物20c的粒子MIP-NGs固定在基板上。具体的实验步骤与实施例4的[6]和实施例5的[4]相同。由此，得到用于制作固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器的基板10c-P'。

[0964] [6]功能性基团24b的引入(工序(1-24))

[0965] 按照图14-4，将功能性分子R24引入分子印迹凹部21c的结合性基团26b"。具体的实验步骤与实施例5的[6]相同。

[0966] [7]亲和体和荧光物质的引入(工序(2)和工序(3))

[0967] 按照图14-5，在用于制作固定在基板上的检测对象分析用传感器的基材10c-P'中，引入抗Her2亲和体和荧光物质(Atto647N-NHS)。具体的实验步骤与实施例5的[7]相同。由此，得到固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P。

[0968] [8]基于荧光测定的检测对象的分析

[0969] 使用上述[7]中得到的固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P，通过带SIC自动分注装置的荧光显微镜进行外泌体捕获试验。

[0970] [8-1]实验步骤

[0971] 制备以下述表中所示的浓度包含SK-BR-3细胞表达的外泌体和HSA的试样溶液(a)～(d)。

[0972] [表9]

[0973]

	源于SK-BR-3细胞的外泌体终浓度 (M)	HSA 终浓度 (M)
(a)	1.93×10^{-16}	0
(b)	1.93×10^{-16}	0.72×10^{-4}
(c)	1.93×10^{-16}	1.50×10^{-4}
(d)	1.93×10^{-16}	7.52×10^{-4}

[0974] 将制备的试样溶液添加到上述[7]中得到的固定在基板上的粒子状的检测对象分析用传感器10c-P中。

[0975] 对于荧光显微镜的测定条件，每个试样的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％，光源为汞灯。

[0976] [8-2]结果

[0977] 对于相对荧光强度，与实施例1同样地操作，计算相对荧光强度。将结果示于图25。如图25所示，虽然试样溶液(a)～(d)都包含相同浓度的检测对象(SK-BR-3细胞表达的外泌

体)，但在如试样溶液(d)那样HAS为某种程度的浓度的情况下完全未确认到消光，另一方面，在如试样溶液(a)～(c)那样HSA浓度为零或较低的情况下，确认到消光。在HAS为某种程度的浓度的试样溶液(d)中，如图16-1所示，HSA被相互作用基团25和以HSA为模板的分子印迹凹部21c捕获，由此屏蔽了抗Her2亲和体(特异结合性基团42)，另一方面，在HSA浓度为零或较低的试样溶液(a)～(c)中，如图16-2所示，HSA未被捕获，露出抗Her2亲和体(特异结合性基团42)，作为检测对象的SK-BR细胞表达的外泌体被捕获，可看出这是双重靶向的结果。

[0978] 表10中示出上述实施例1～7和比较例2中制作的检测对象分析用传感器的概要。

[0979] [表10]

[0980]

	实施例 1	实施例 2	比较例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7
传感器类型	$10a_1$-C	$10a_1$-C	实施例1、2的抗体取代类型	10_1	10-PC	10b-PC	10a-C	10c-P
MIP聚合物形状	膜	膜	膜	膜	粒子	粒子	膜	粒子
MIP聚合物粒径(nm)	-	-	-	-	体积平均:156.4 Z平均:128.6 数均:50-80		-	体积平均:27.96 Z平均:152.5 数均:20-30
传感器形状	基板	基板	基板	基板	基板	基板	基板	粒子
模板	二氧化硅粒子	二氧化硅粒子	二氧化硅粒子	二氧化硅粒子	HSA	HSA	二氧化硅粒子	HSA
模板大小(nm)	200	200	200	200	-	-	200	-
模板分子量	-	-	-	-	66500	66500	-	66500
信号基团 43	Alexa Flour 647	罗丹明	Alexa Flour 647	融合EGFP	-	ATTO647N	Alexa Flour 647	ATTO647N
特异结合性基团 42	抗Her2亲和体	抗Her2亲和体	抗Her2抗体	抗Her2亲和体	抗Her2亲和体	抗Her2亲和体	抗Her2纳米抗体	抗Her2亲和体
其他信号基团 sg	融合EGFP	融合EGFP	-	-	-	-	-	-
特异结合性基团 42 分子量	6,000	6,000	150,000	6,000	6,000	6,000	15,000	6,000
特异结合性基团的固有解离常数(M)	1.06×10^{-10}	1.06×10^{-10}	5.8×10^{-10}	1.06×10^{-10}	3.2×10^{-11}	3.2×10^{-11}	1×10^{-9}	-
基于传感器的解离常数(M)	**6.1×10^{-18}**	**8.41×10^{-18}**	**6.34×10^{-16}**	**2.29×10^{-17}**	**2.0×10^{-18}**	**1.0×10^{-17}**	**5.81×10^{-19}**	

[0981] [实施例8:使用PSA用感测用粒子(未固定)的免疫反应]

[0982] 在本实施例中，以未固定于基板的游离状态使用将感测对象设为猪血清白蛋白(PSA)的粒子，对与PSA和转铁蛋白分别对应的免疫应答进行了试验。

[0983] 通过与实施例7的“感测用纳米粒子的合成-3”和“感测用纳米粒子的合成-4”相同的方法来制作以感测对象为PSA的粒子(引入了荧光基团的MIP-NGs;实施例4)。

[0984] 将蛋白质溶液(包含140mM NaCl的10mM磷酸缓冲液(pH7.4)中)添加至80μg/mL的引入了荧光基团的MIP-NGs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、1000μg/mL(最终溶液量500μL)，在25℃下培养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～690nm)。将其结果示于图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。将其结果示于图17。

[0985] 如图16所示，在将PSA溶液添加至游离状态的实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs的情况下，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确认到同样的现象(实施例7)，因此表明图16所示的荧光强度的增加是与PSA结合至实施例4的引入了荧光基团的MIP-NGs相伴的荧光强度变化。另外，如图17所示，与添加作为参照蛋白质的转铁蛋白的情形的荧光变化相比，添加PSA的情形显示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发送其结合信息。

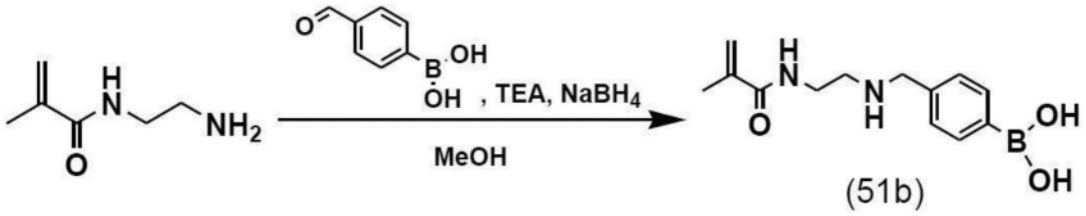
[0986] [实施例9：感测用纳米粒子的合成-5]

[0987] 在本实施例中，合成相当于图2的感测用纳米粒子10a的Fc结构域感测用(并且由Fc结构域捕获介导的IgG感测用)纳米粒子。

[0988] 9-1.功能性单体的合成

[0989] 设计式51b所示的功能性单体，根据以下方案进行合成。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。

[0990] [化学式22]

[0991] 

[0992] 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，确认到UV吸收和被茚三酮染色的斑点(Rf：0.55，紫色)的出现，因此判断为形成了席夫碱(Schiff base)，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)确认到目标物斑点(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。

[0993] 产量：175mg(0.668mmol，42.5％)

[0994] ^{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)

[0995] 9-2.Fc结构域的制备

[0996] 使10mg的IgG溶解于10mM磷酸缓冲液(pH7.4，140mM NaCl)(5mL)中，制备抗体溶液。使0.02M L-半胱氨酸、0.002M EDTA、0.1mg/mL木瓜蛋白酶(papain)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，在37℃下使其反应24小时。然后，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(Hitrap^{TM}Protein 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)。Fc结构域的纯化通过SDS-PAGE来确认。

[0997] 9-3.感测用纳米粒子的合成-5

[0998] 将下述表中所示的成分的混合物(预聚物溶液)在50℃下供于12小时无乳化剂沉淀聚合，合成聚合物纳米凝胶(工序1)。需要说明的是，对于预聚物溶液中所含的单体，为了

容易进行粒子的纯化作业，还使用了标记单体。通过超滤膜(10kDa，7500×g，20分钟×3)将聚合后的溶液(2mL)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)，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，培养5分钟，然后，添加至阴离子交换树脂(DEAE-Sephadex，10cm，1.5cm i.d.)中，并以10mM Tris-HCl缓冲液(pH7.4，140mM NaCl)为洗脱液进行洗脱(工序2)。然后，为了去除SDS而通过脱盐柱(PD-10)(洗脱液：10mM磷酸缓冲液(pH7.4，140mM NaCl))来进行纯化。

[0999] [表11]

[1000]

		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	

[1001] 对于所得到的MIP-NGs(实施例5)和NIP-NGs(比较例4)，与实施例1同样地操作，测定了粒径，结果确认到存在纳米级粒子。具体而言，以Z平均粒径计，MIP-NGs(实施例5)为21nm，NIP-NGs(比较例4)为18nm。对于Z电位，MIP-NG(实施例5)为19mV，NIP-NGs(比较例4)为2.9mV，表示带正电。可认为其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粒子。另外，根据纯化前后的粒子溶液的荧光测定(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，因此还确认到大部分Fc结构域片段可以被洗涤除去。

[1002] 进而，在纯化后的MIP-NGs(0.5mg/mL，1mL)中加入5μL的ATTO647NNHS(10mg/mL)DMSO溶液，在25℃下培养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)，去除未反应的荧光分子，得到引入了荧光基团的MIP-NGs(实施例5)。需要说明的是，根据荧光分子(ATTO647N)引入操作前后的荧光测定(激发波长：647nm)，观察到引入前未观察到的670nm附近的荧光峰，因此确认到引入了荧光。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)。

[1003] 9-4.感测用基板-4

[1004] 将金溅射玻璃基板(4.3×9.8mm)用纯水和EtOH洗涤,进行UV-O_3洗涤(20分钟)。使洗涤后的基板浸渍于1mM的11-巯基十一烷酸的EtOH溶液中,由此利用自组装单分子膜形成而在表面引入羧基(25℃,24小时)。将基板用EtOH洗涤后,使基板浸渍于溶解有0.2M EDC和0.05M NHS的水溶液中,由此进行表面羧基的活化(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、0.5mg/mL),通过胺偶合进行纳米粒子的固定(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)来进行表面封闭(25℃,0.5小时)。需要说明的是,测定在固定前后的表面上的荧光强度,由于在固定后的基板中观察到荧光强度增加,因此确认到粒子的固定。

[1005] 9-5.荧光测定

[1006] 使用带自动液体处理机器人的荧光显微镜来研究所制作的感测用基板的蛋白质的荧光检测能力。测定顺序条件如下所述。

[1007] 荧光显微镜

[1008] 过滤器:Cy5 物镜:×5 曝光时间:0.1秒

[1009] 光量:12% 光源:汞灯

[1010] ROI:基板中心部3×5的15处

[1011] 自动分注装置的顺序

[1012] 1.安装芯片

[1013] 2.吸取试样150μL

[1014] 3.反应5分钟(25℃)

[1015] 4.保持测定位置 重复进行2→4

[1016] 图18中示出了在制作的感测用基板中添加作为模板蛋白质的Fc结构域片段(0nM-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)的基板显示出较大的荧光变化,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计算表观耦合常数(K_d)为9.8×10^{-9}M。

[1017] 使用Fc结构域片段和作为参照蛋白质的全IgG以及溶菌酶(Lyz),对所制作的感测用基板的蛋白质选择性进行了试验。图19中示出了将添加Fc结构域片段(100nM)时的相对荧光强度变化设为1而添加各参照蛋白质(100nM)时的荧光响应。MIP-NGs(实施例5)在添加Fc结构域片段时显示出最大的荧光变化。另外,具有Fc结构域片段作为其部分结构的全IgG也有七成左右响应,由此表明可以识别IgG的Fc部位。即,显示出使用Fc结构域片段作为模板制作的MIP-NGs(实施例5)也可以由捕获Fc结构域介导来检测IgG。另一方面,在NIP-NGs(比较例4)中,全IgG和Lyz均显示出比Fc结构域片段更大的荧光响应。推测这是随机存在于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。全IgG的pI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。

[1018] 本发明的优选实施方式如上所述,但是本发明并不是仅限定于这些,在不脱离本

发明的主旨的情况下可做出各种其他实施方式。本申请针对2020年9月23日在日本提交的日本特愿2020-159008号和2021年3月1日提交的PCT JP2021/007726要求优先权，其全部内容作为参考而援引于此。

[1019] 附图标记说明

[1020] 用于制作分析用传感器的基材…10’、10a’、10b’、10c’

[1021] 用于制作分析用传感器的基材(基板状)…10-C’、10a-C’

[1022] 用于制作分析用传感器的基材(粒子状)…10-P’、10a-P’、10c-P’

[1023] 用于制作分析用传感器的基材(粒子固定基板状)…10-PC’、10b-PC’

[1024] 分析用传感器…10、10_1、10a、10b、10c

[1025] 分析用传感器(基板状)…10-C、10a-C、$10a_1$-C

[1026] 分析用传感器(粒子状)…10-P、10a-P、10c-P

[1027] 分析用传感器(粒子固定基板状)…10-PC、10b-PC

[1028] 分子印迹聚合物…20、20a、20b、20c

[1029] 分子印迹凹部…21、21c

[1030] 针对靶标的特异结合性分子的结合用基团…22’、22b’(硫醇、二硫化物)

[1031] 结合性基团…22”(二硫化物)

[1032] 包含特异结合性分子的结合用基团和聚合性官能团的单体…M22

[1033] 第一可逆连接基团…22

[1034] 信号物质的结合用基团…23’、23b’

[1035] 第二可逆连接基团…23

[1036] 聚合性单体(提供信号物质的结合用基团的单体)…$M23_1$、$M23_2$

[1037] 功能性基团…24b

[1038] 具有功能性基团和针对靶标的特异结合性分子的结合用基团的功能性分子…R24

[1039] (与检测对象的上述分子印迹凹部的模板的)相互作用基团…25

[1040] 包含与模板的相互作用基团的单体…M25

[1041] 结合性基团…26b”

[1042] 第三可逆连接基团…26b

[1043] 聚合性官能团…27

[1044] 聚合性单体…$M22_1$

[1045] 聚合性单体(例如化合物(5))…$M22_2$

[1046] 聚合性单体(例如生物相容性单体)…M28

[1047] 聚合性单体(例如丙烯酰胺单体)…M29

[1048] 基板…30

[1049] (基板上的)结合性基团…BG1’

[1050] (针对靶标的)特异结合性基团…42

[1051] (针对靶标的)特异结合性分子…R42

[1052] 其他信号基团…sg

[1053] 具有其他信号基团的特异结合性基团…42_1

[1054] 信号基团…43

[1055] 信号物质…R43

[1056] 具有信号基团的特异结合性基团…44

[1057] 模板…60、60_1、60_2、60c

[1058] (模板上的)相互作用部位…65c

[1059] (模板上的)结合性基团…BG6”、BG9”、BG22”、BG23”

[1060] (对应于BG6”、BG9”、BG22”、BG23”的)结合性基团…BG6’、BG9’、BG22’、BG23’

[1061] 检测对象…70

[1062] 靶标…72

[1063] INI…聚合引发性基团

[1064] SAM…单分子膜

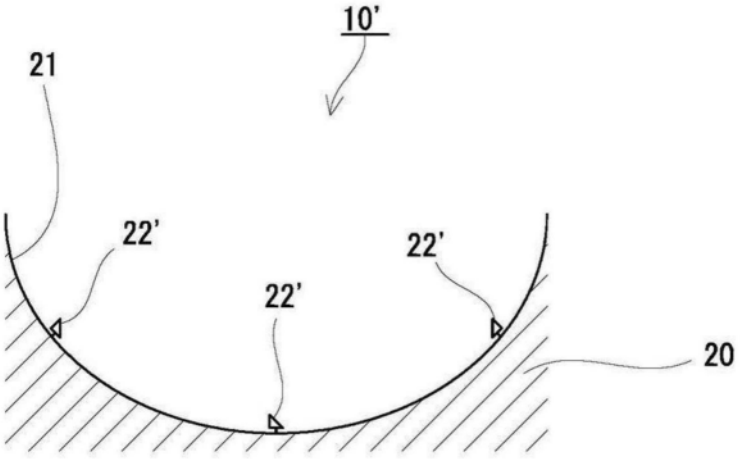


图1A

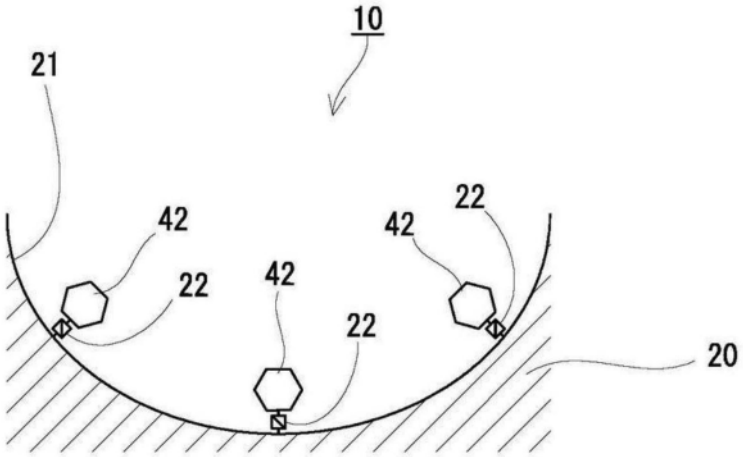


图1B-1

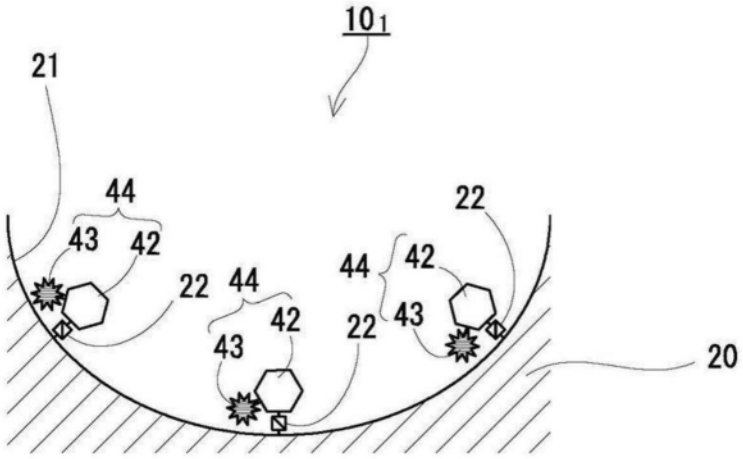


图1B-2

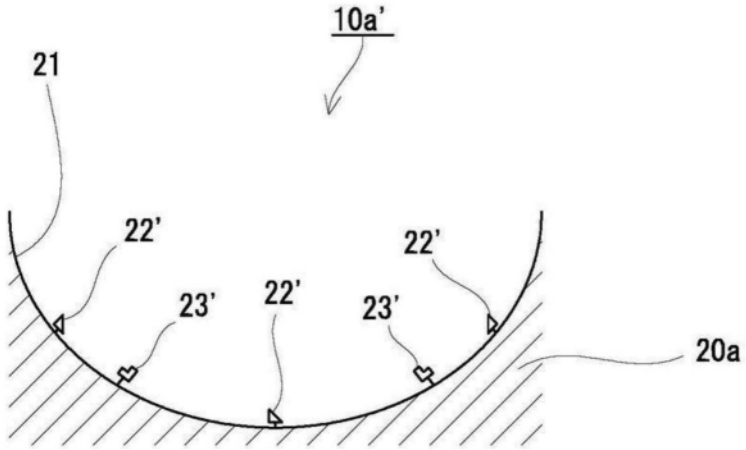


图2A

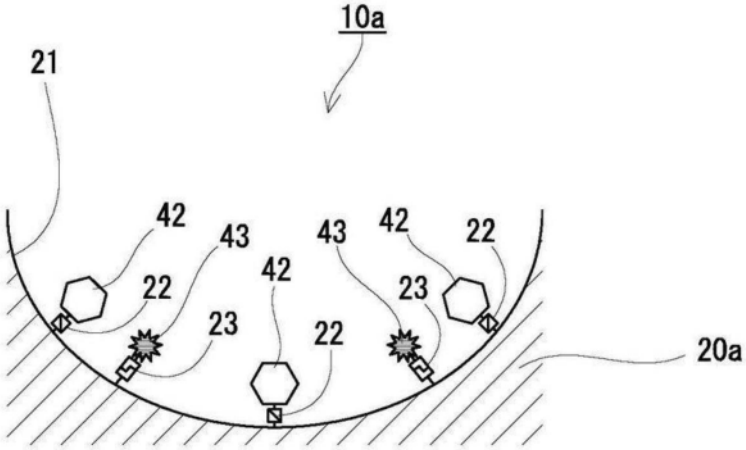


图2B-1

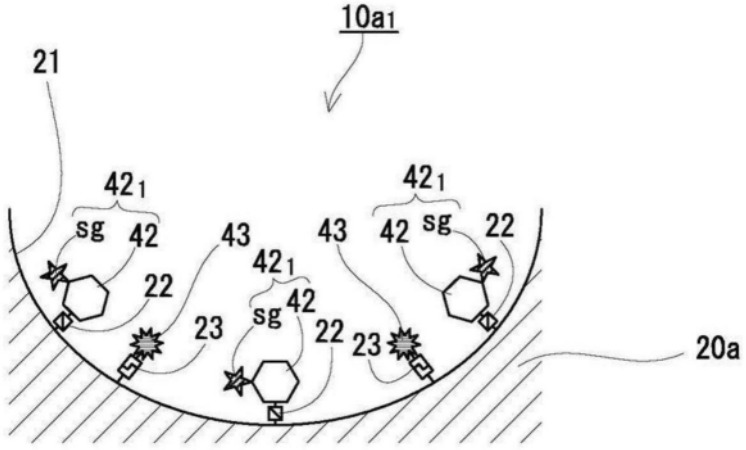


图2B-2

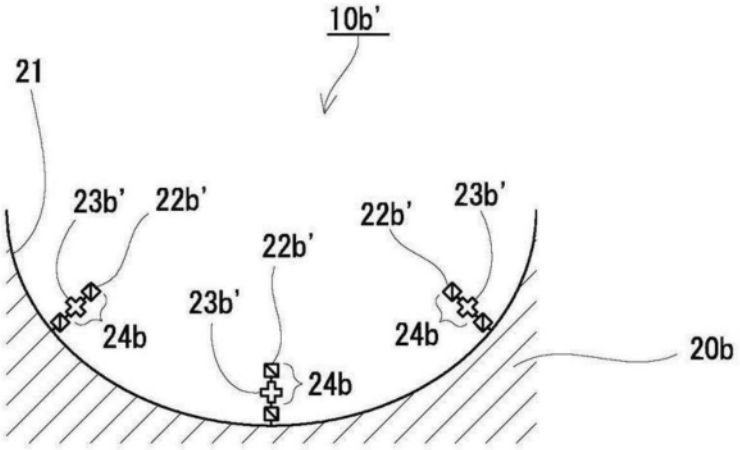

10b'
21
23b'
22b'
22b'
22b'
23b'
23b'
24b
24b
24b
20b

图3A

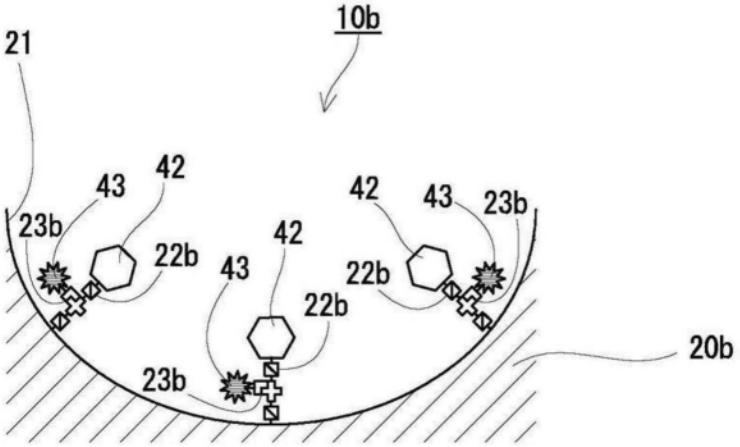

10b
21
43
42
42
43
23b
23b
22b
43
42
22b
22b
22b
23b
20b

图3B

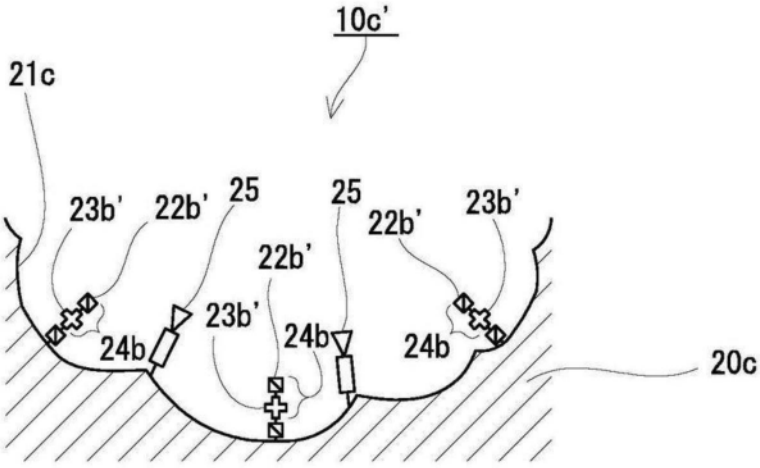

10c'
21c
23b'
22b'
25
25
22b'
23b'
22b'
23b'
24b
24b
24b
20c

图4A

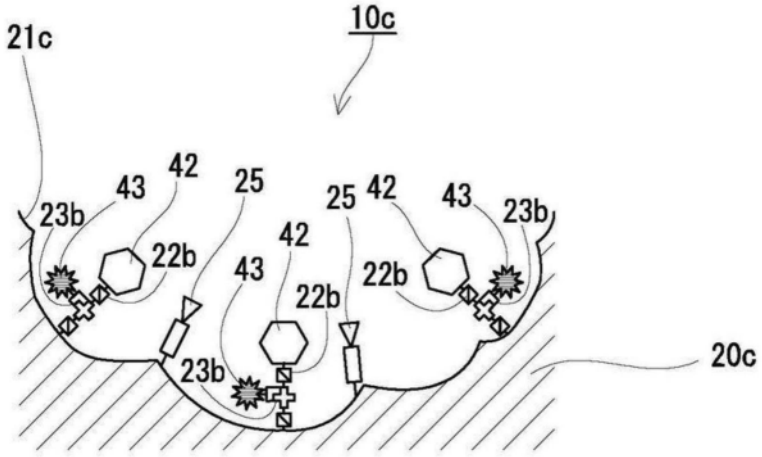

21c
10c
43
42
25
25
42
43
23b
23b
42
22b
22b
43
22b
23b
20c

图4B

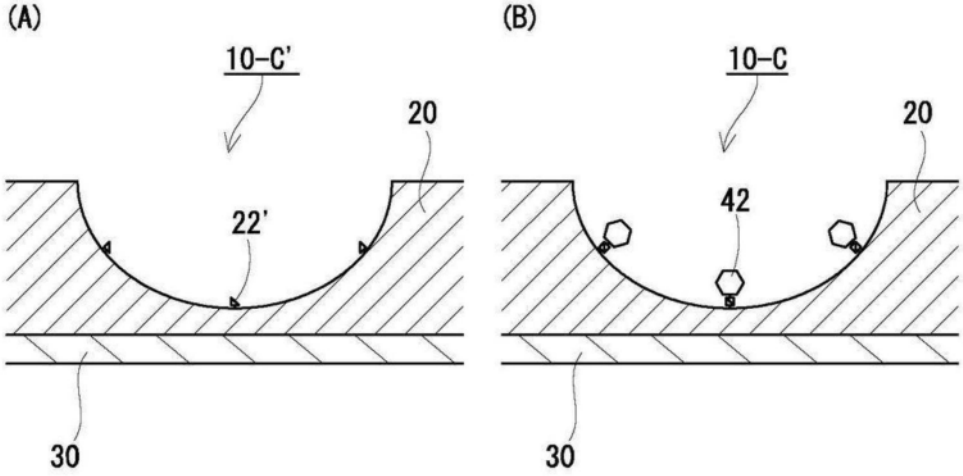

(A)
(B)
10-C'
10-C
20
20
22'
42
30
30

图5

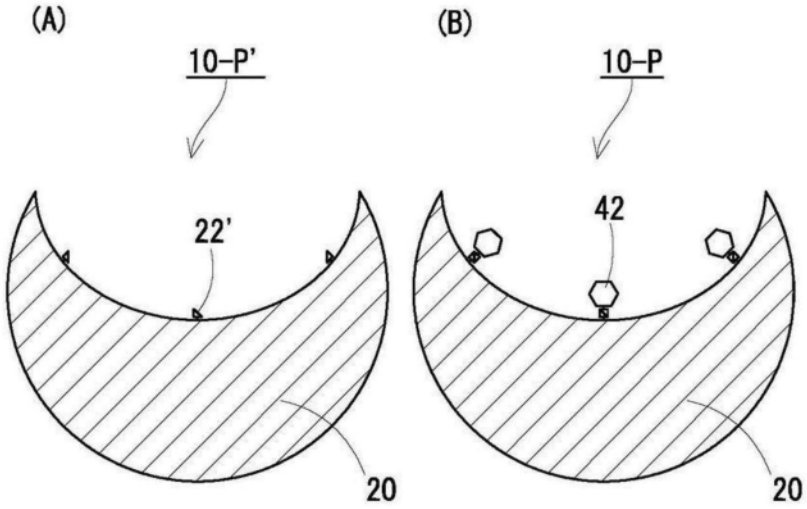

(A)
10-P'
22'
20
(B)
10-P
42
20

图6

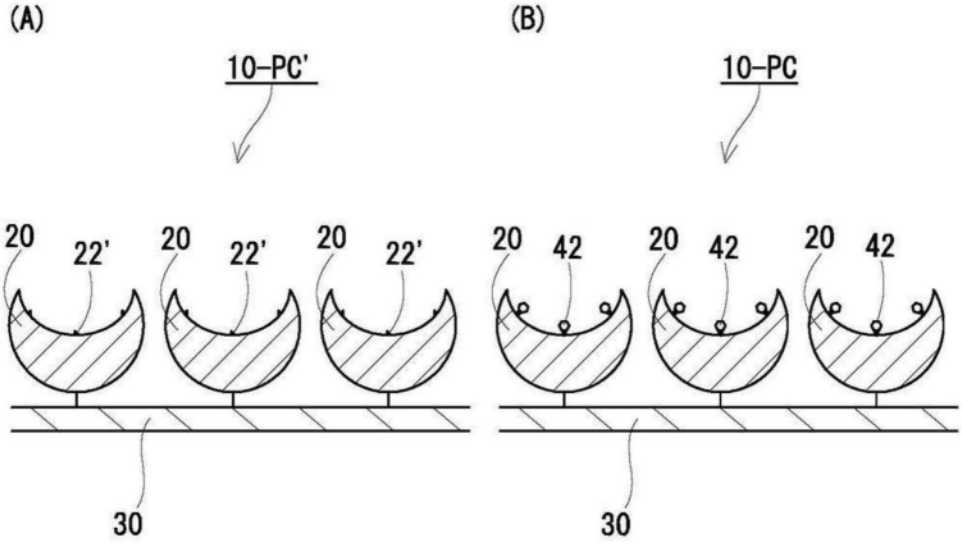

(A)
10-PC'
20
22'
20
22'
20
22'
30
(B)
10-PC
20
42
20
42
20
42
30

图7

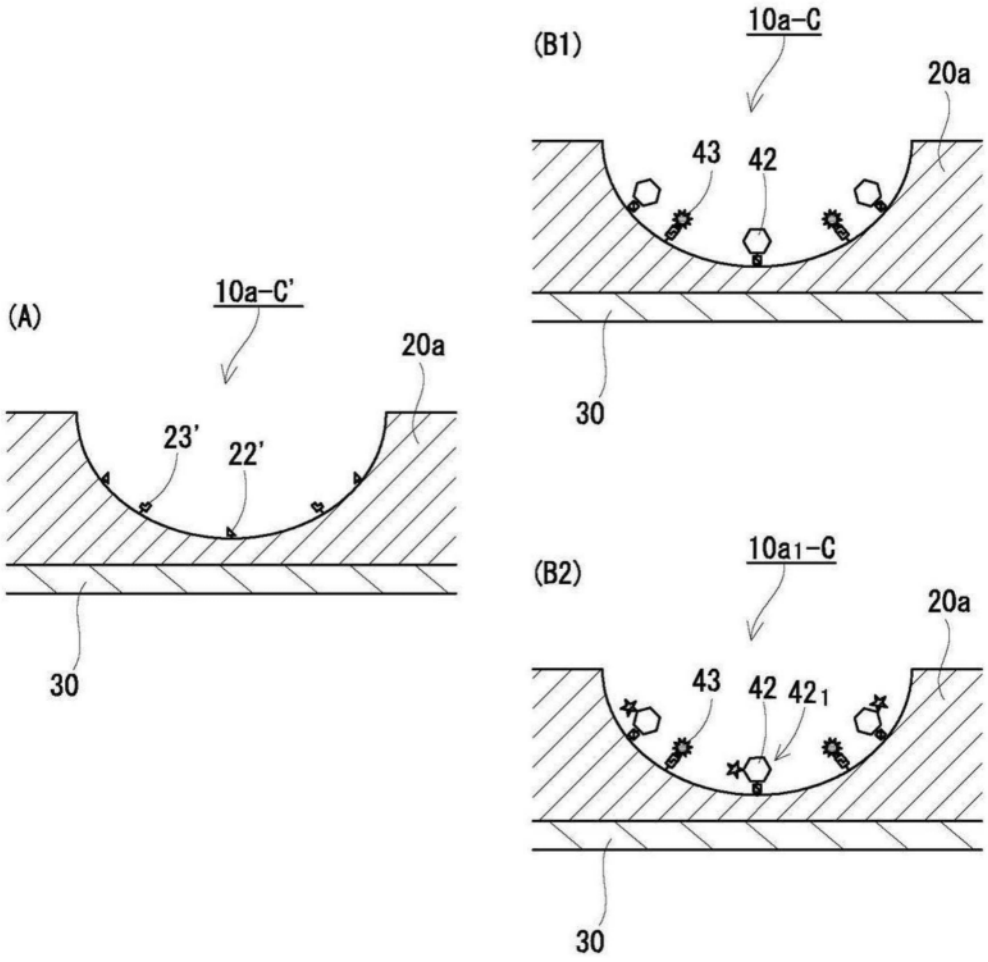

(A)
10a-C'
20a
23'
22'
30
(B1)
10a-C
20a
43
42
30
(B2)
10a1-C
20a
43
42
42 1
30

图8

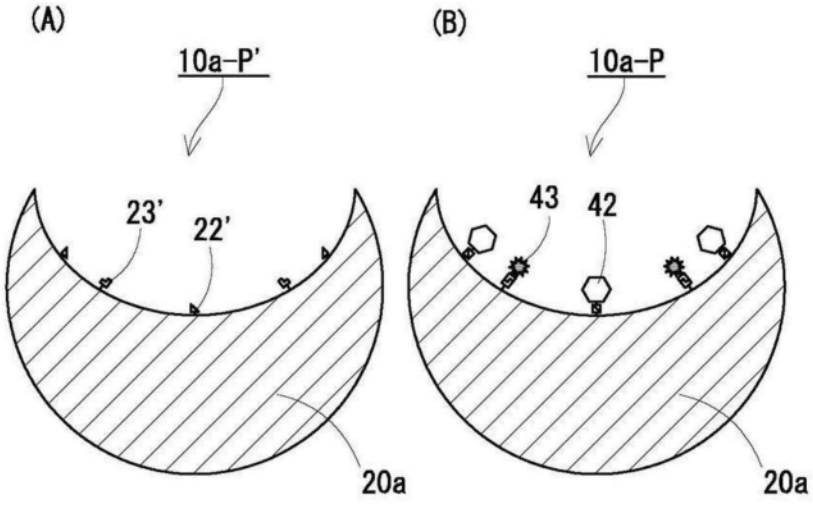

(A)
10a-P'
23'
22'
20a
(B)
10a-P
43
42
20a

图9

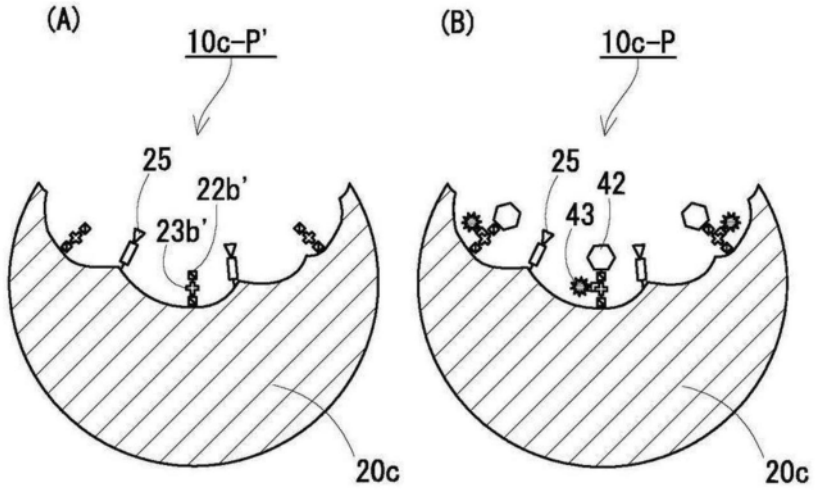

(A)
10c-P'
25
22b'
23b'
20c
(B)
10c-P
25
42
43
20c

图10

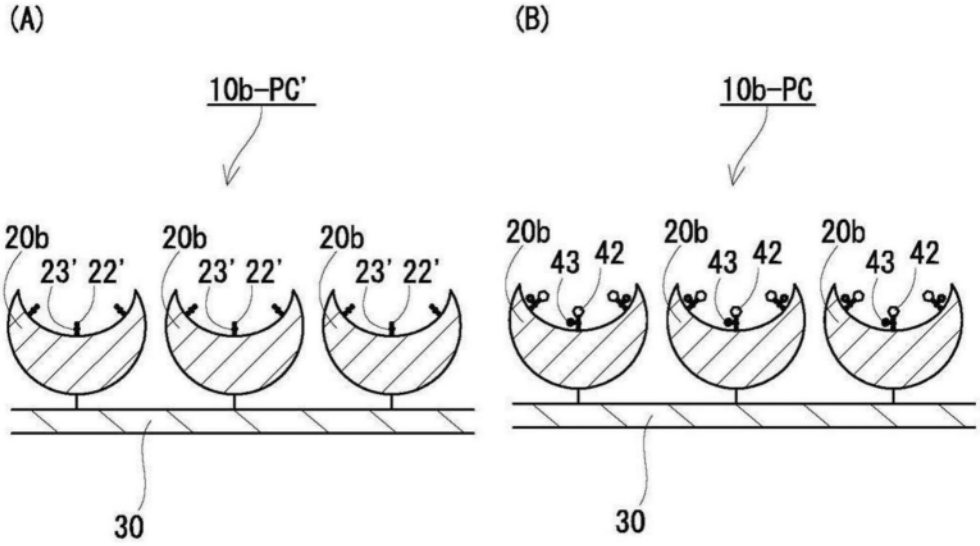

(A)
10b-PC'
20b
23' 22'
20b
23' 22'
20b
23' 22'
30
(B)
10b-PC
20b
43 42
20b
43 42
20b
43 42
30

图11

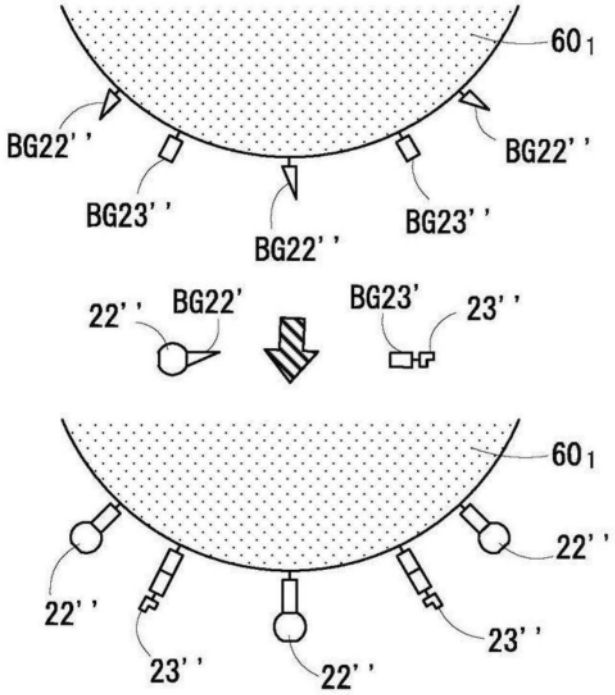

60 1
BG22''
BG22''
BG23''
BG23''
BG22''
22''
BG22'
BG23'
23''
60 1
22''
22''
23''
23''
22''

图12-1a

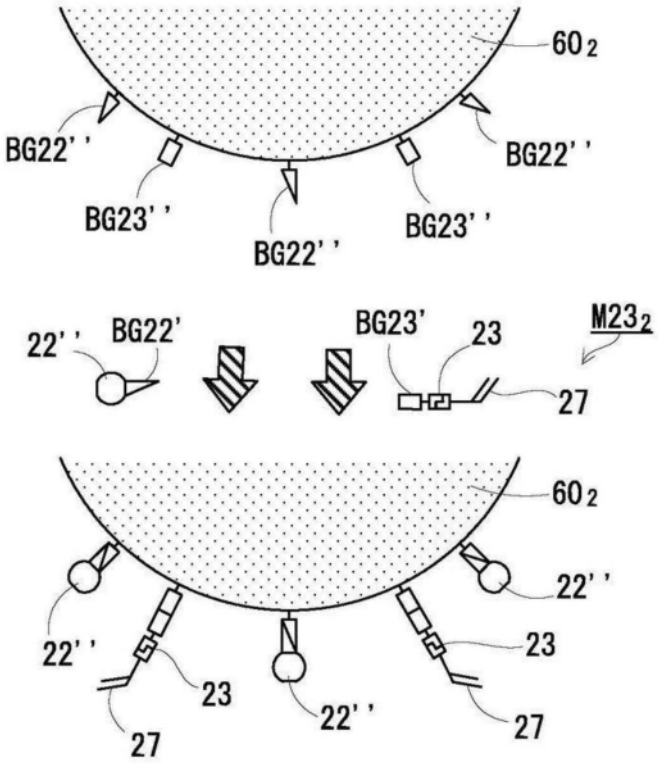

60 2
BG22''
BG22''
BG23''
BG23''
BG22''
22''
BG22'
BG23'
23
M23 2
27
60 2
22''
22''
23
23
27
22''
27

图12-1b

<工序（1-1）>

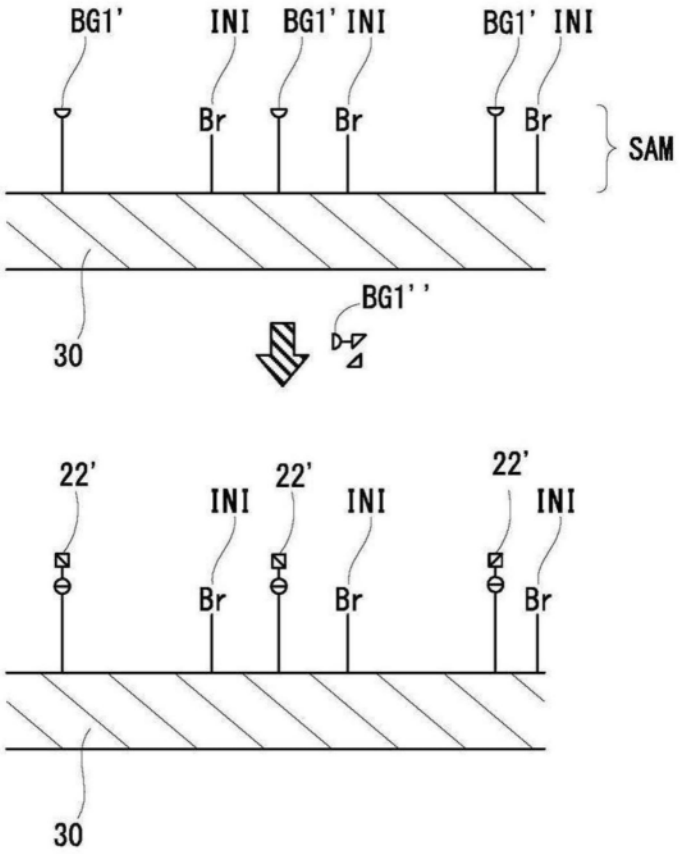

BG1'
INI
BG1'
INI
BG1'
INI
Br
Br
Br
SAM
30
BG1''
22'
22'
22'
INI
INI
INI
Br
Br
Br
30

图12-2

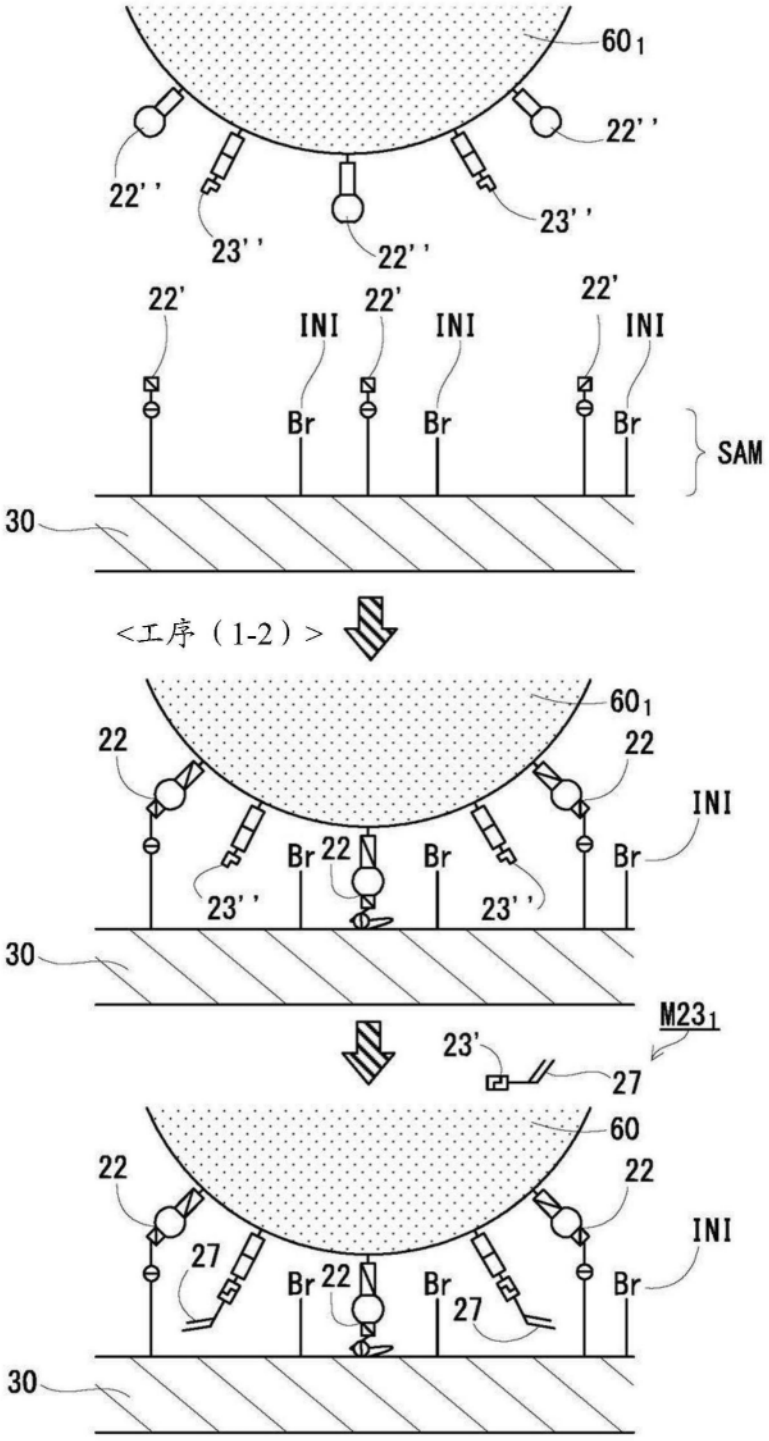

60 1
22''
22''
23''
23''
22''
22'
INI
22'
INI
22'
INI
Br
Br
Br
SAM
30
<工序（1-2）>
60 1
22
22
INI
Br
22
Br
Br
23''
23''
30
M23 1
23'
27
60
22
22
INI
27
Br
22
Br
27
Br
30

图12-3a

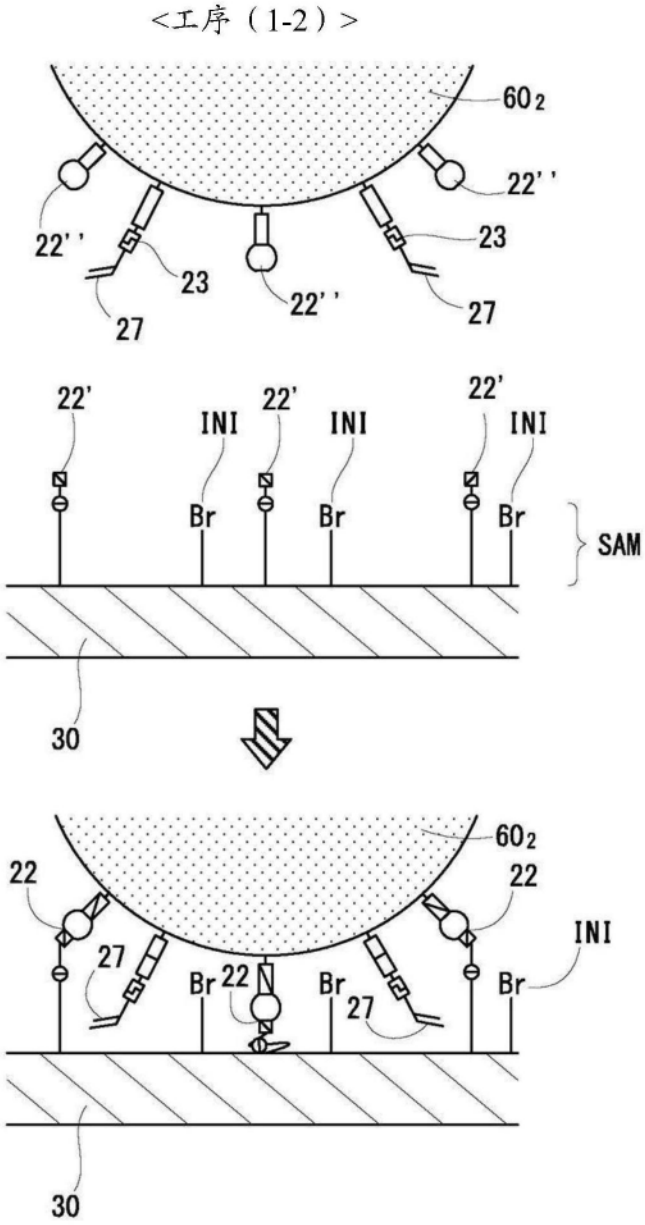

<工序（1-2）>
60_2
22''
22''
23
23
22''
27
27
22'
INI
22'
INI
22'
INI
Br
Br
Br
SAM
30
60_2
22
22
INI
27
Br
22
Br
27
Br
30

图12-3b

<工序（1-3）>

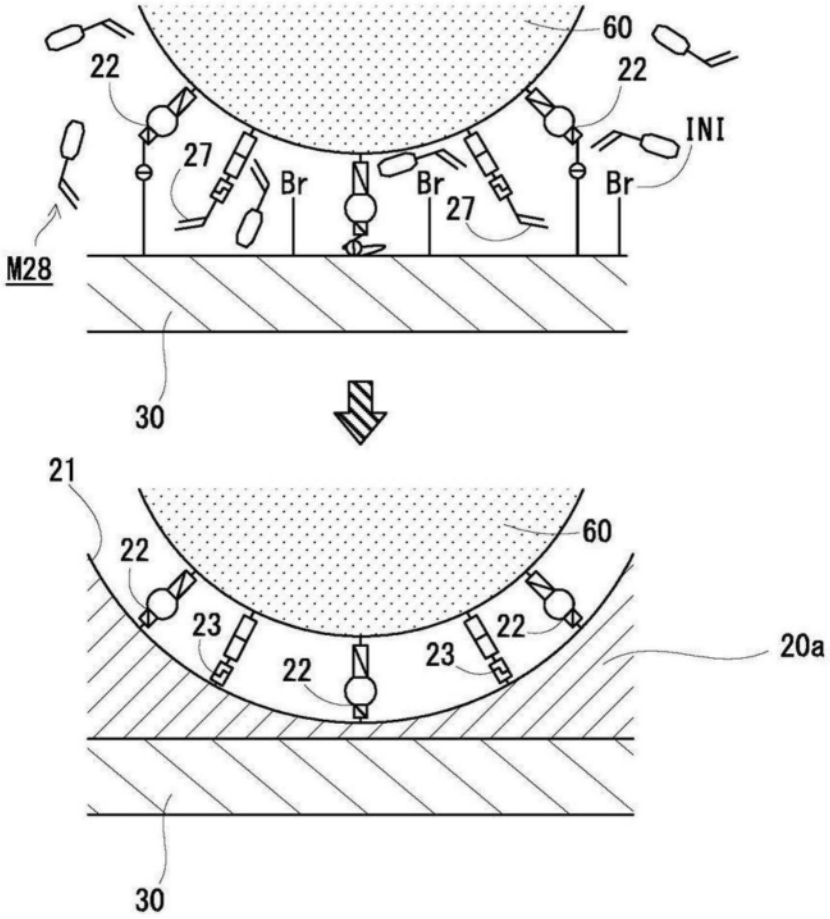


图12-4

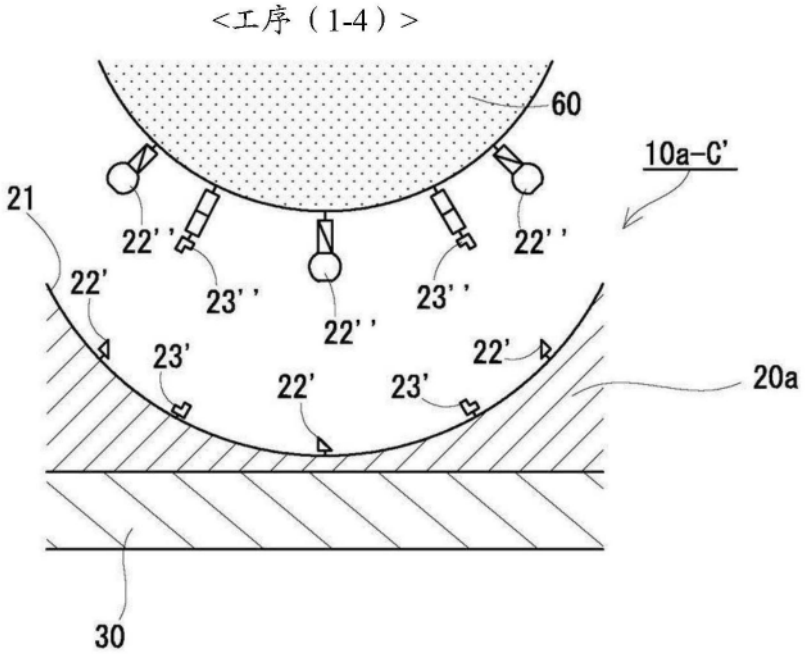

<工序（1-4）>
60
10a-C'
21
22''
23''
22'
23'
20a
30

图12-5

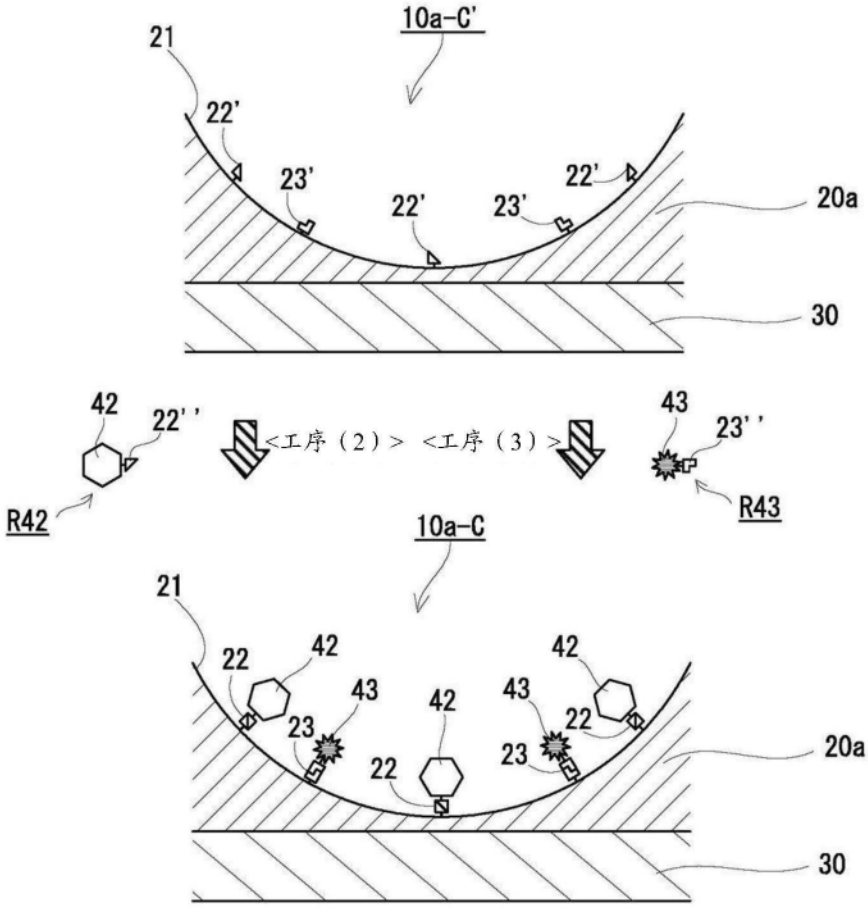

10a-C'
21
22'
23'
20a
30
42
22''
<工序（2）>
<工序（3）>
43
23''
R42
R43
10a-C
22
23

图12-6

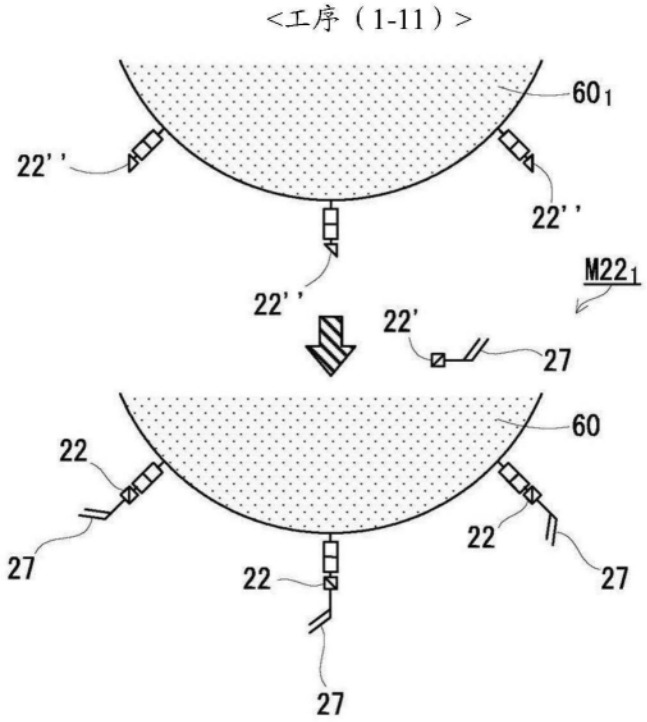

<工序（1-11）>
60_1
22''
22''
22''
$M22_1$
22'
27
60
22
22
27
22
27
27

图13-1a

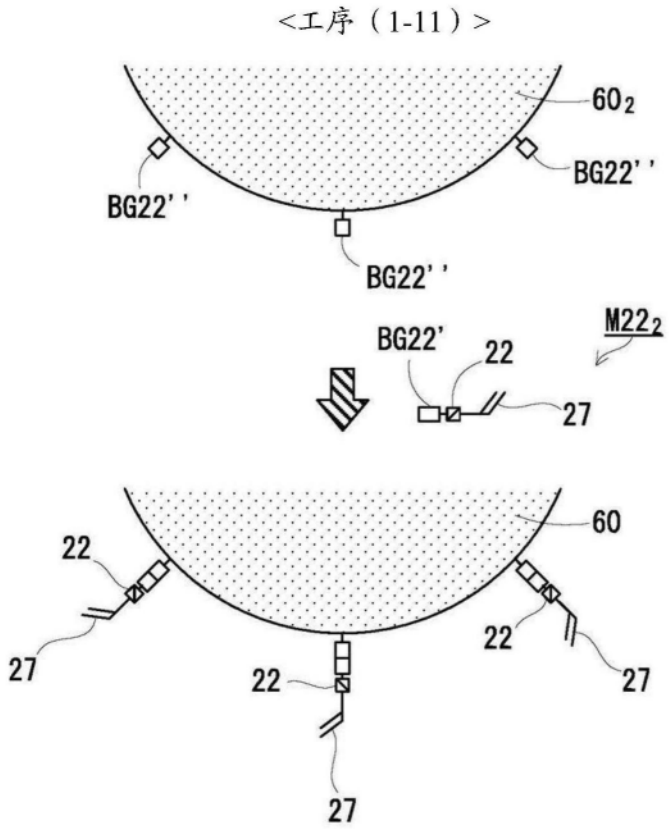

<工序（1-11）>
60_2
BG22''
BG22''
BG22''
$M22_2$
BG22'
22
27
60
22
22
27
22
27
27

图13-1b

<工序（1-12）>

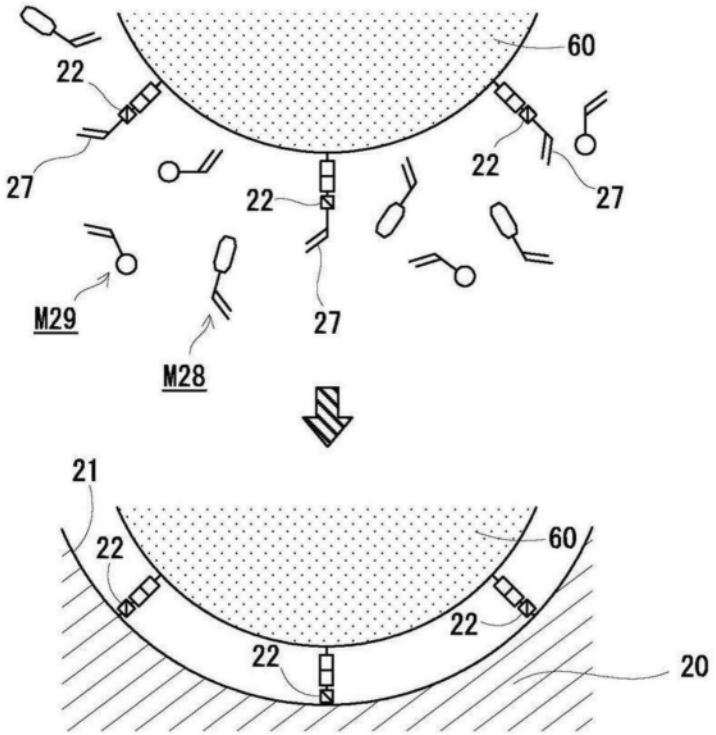


图13-2

<工序（1-13）>

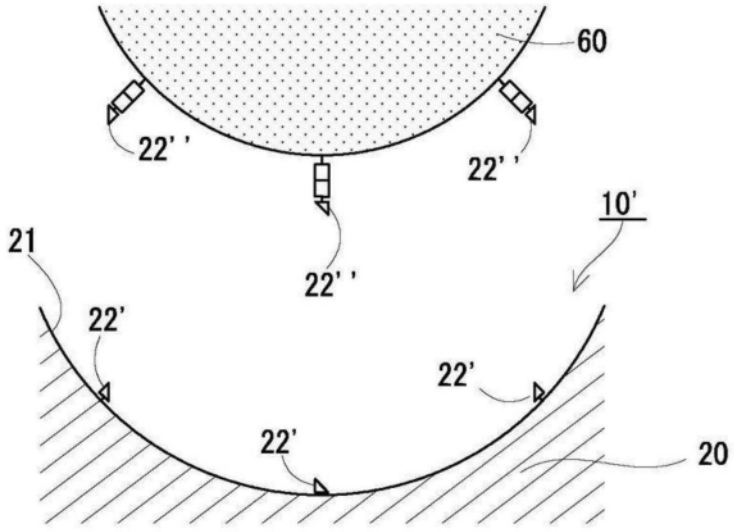


图13-3

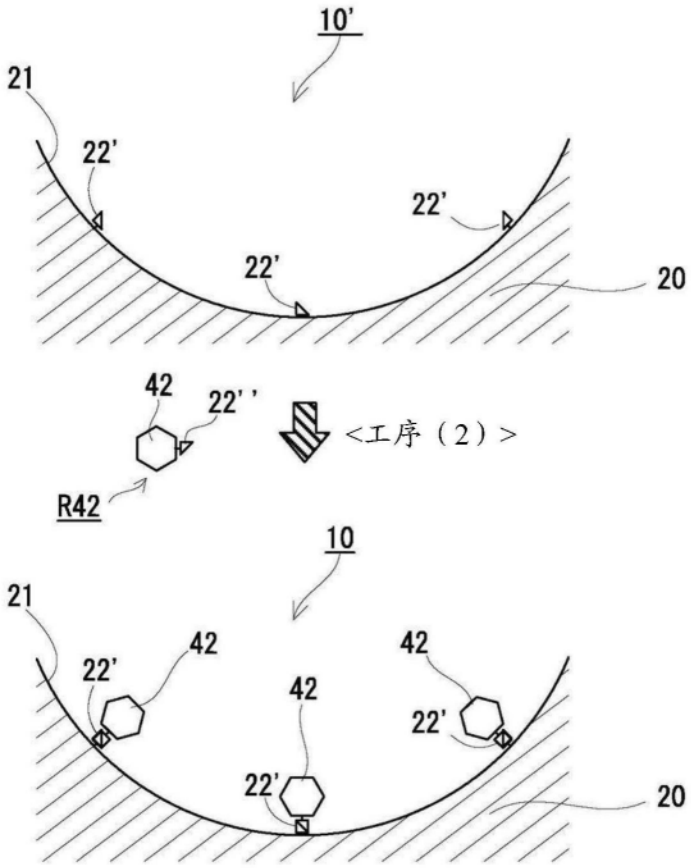


图13-4

<工序（1-21）>

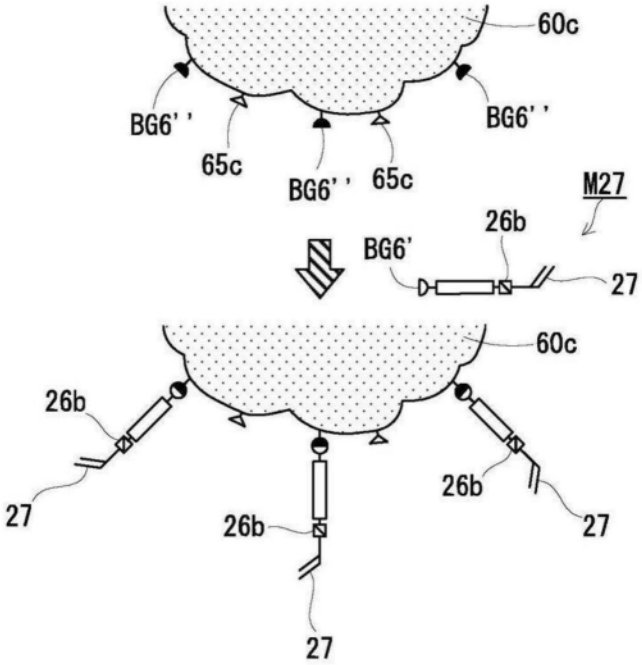


图14-1

<工序（1-22）>

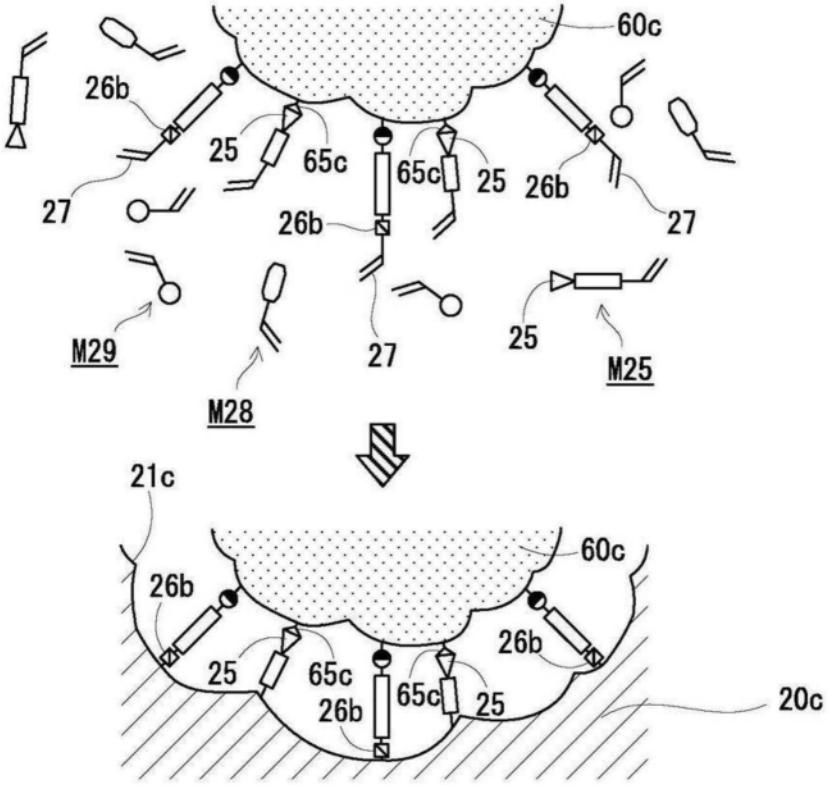


图14-2

<工序（1-23）>

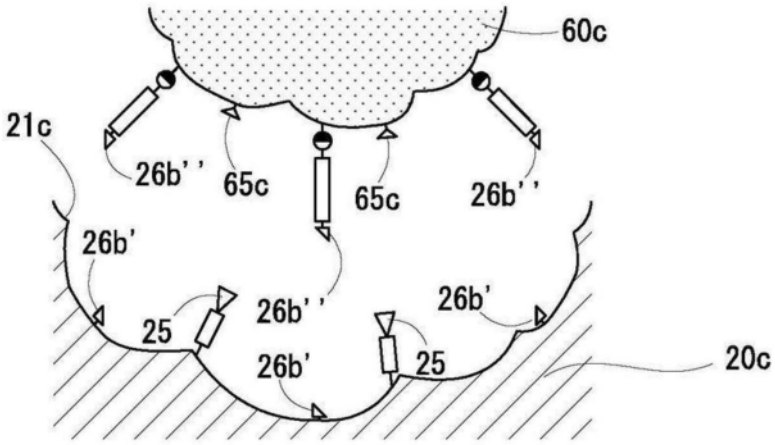


图14-3

<工序（1-24）>

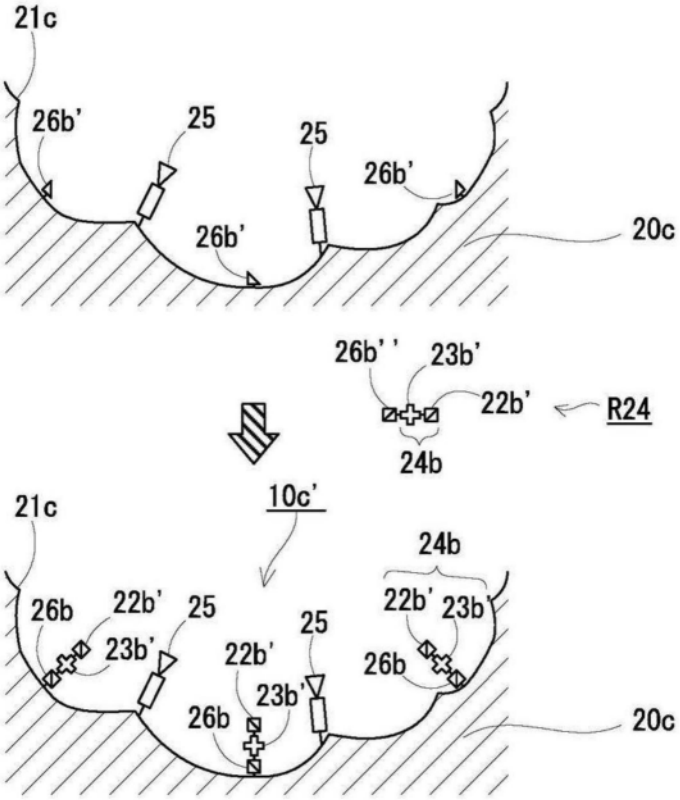


图14-4

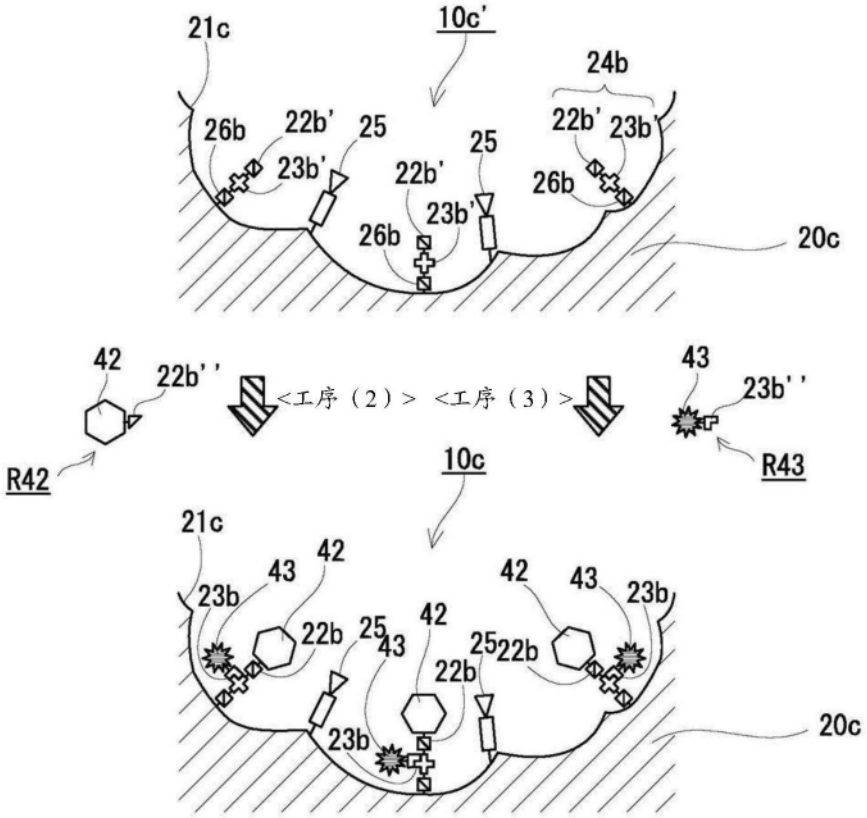

21c
10c'
24b
26b
22b'
25
23b'
22b'
25
22b'
23b'
26b
23b'
26b
20c
42
22b''
<工序（2）>
<工序（3）>
43
23b''
R42
R43
10c
21c
42
43
23b
22b
25
42
43
25
22b
22b
42
43
23b
23b
20c

图14-5

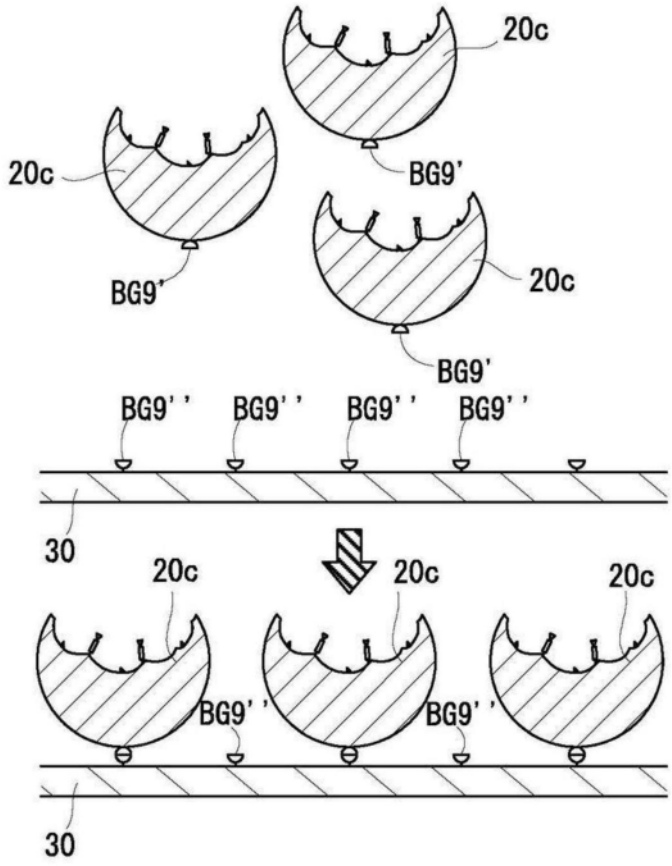

20c
20c
BG9'
BG9'
20c
BG9'
BG9''
BG9''
BG9''
BG9''
30
20c
20c
20c
BG9''
BG9''
30

图15

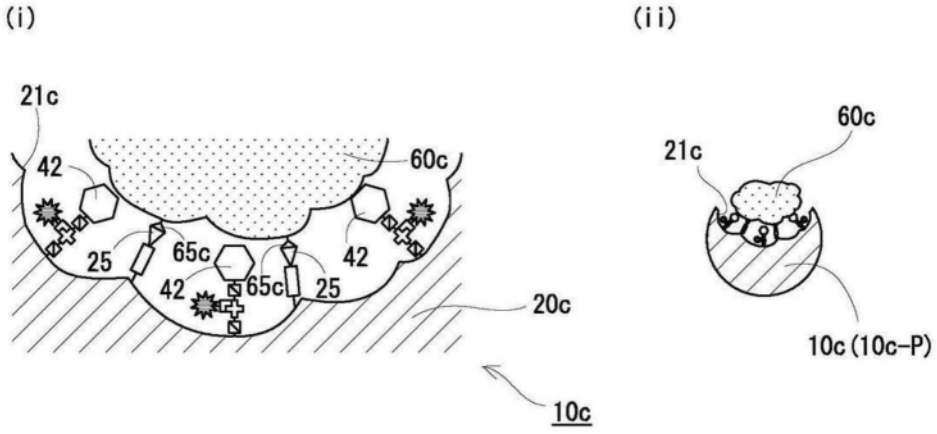

(i)
(ii)
21c
42
60c
25
65c
42
42
65c
25
20c
10c
60c
21c
10c (10c-P)

图16-1

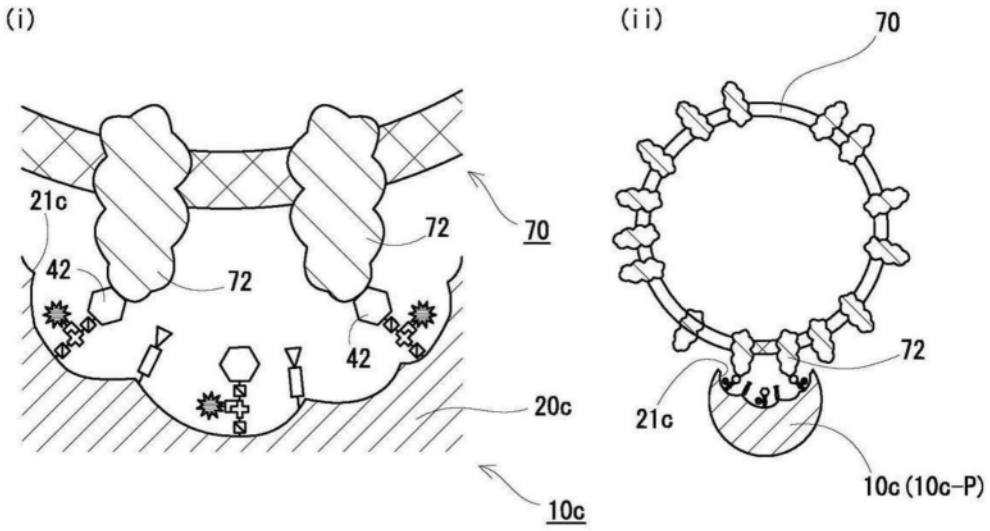

(i)
21c
42
72
72
70
42
20c
10c
(ii)
70
72
21c
10c(10c-P)

图16-2

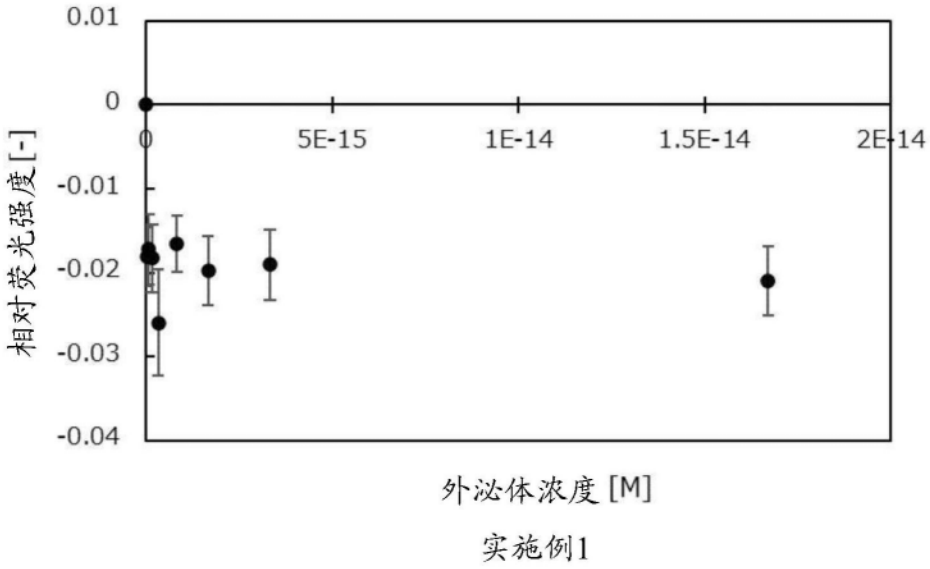
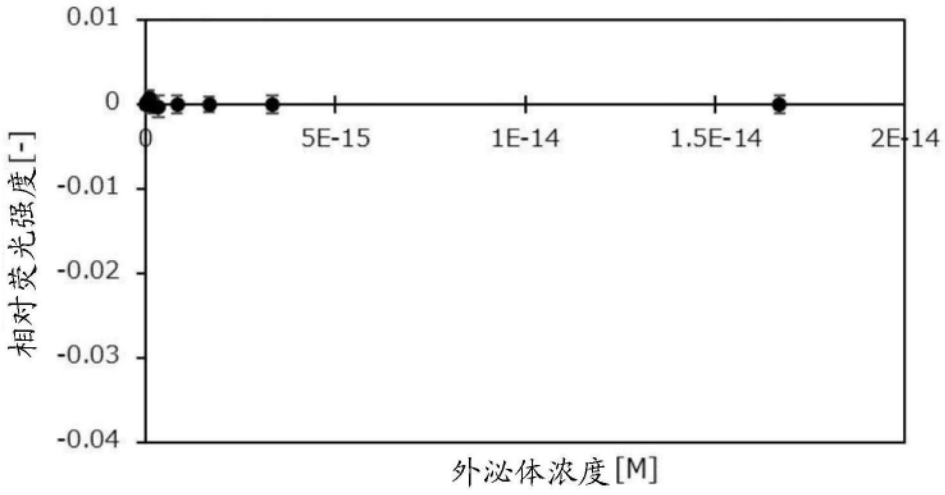
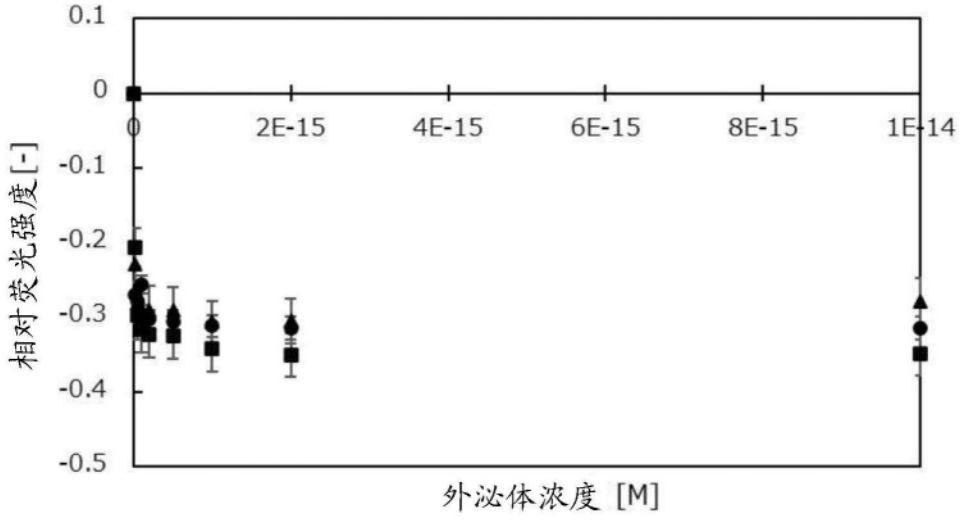

0.01
0
-0.01
-0.02
-0.03
-0.04
0
5E-15
1E-14
1.5E-14
2E-14
相对荧光强度[-]
外泌体浓度 [M]
实施例1

图17A



比较例1

图17B



实施例2

图18

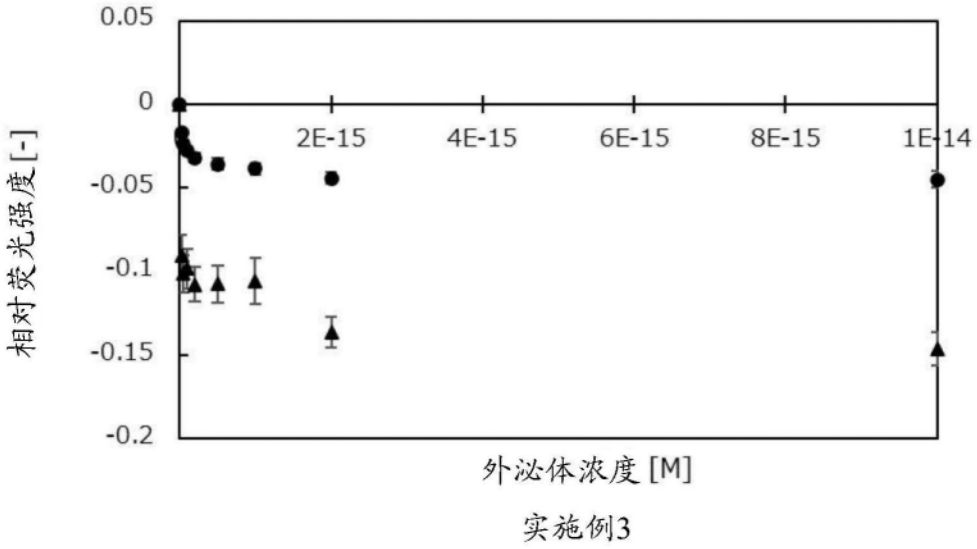

0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
-0.2
2E-15
4E-15
6E-15
8E-15
1E-14
相对荧光强度[-]
外泌体浓度[M]
实施例3

图19

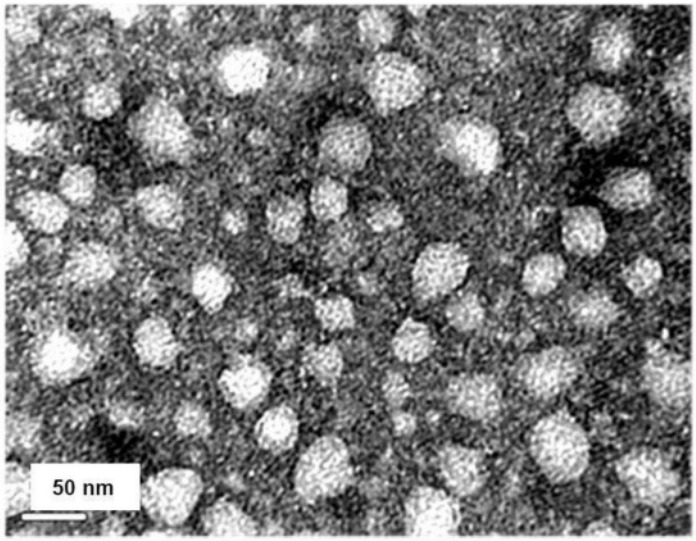

50 nm

图20

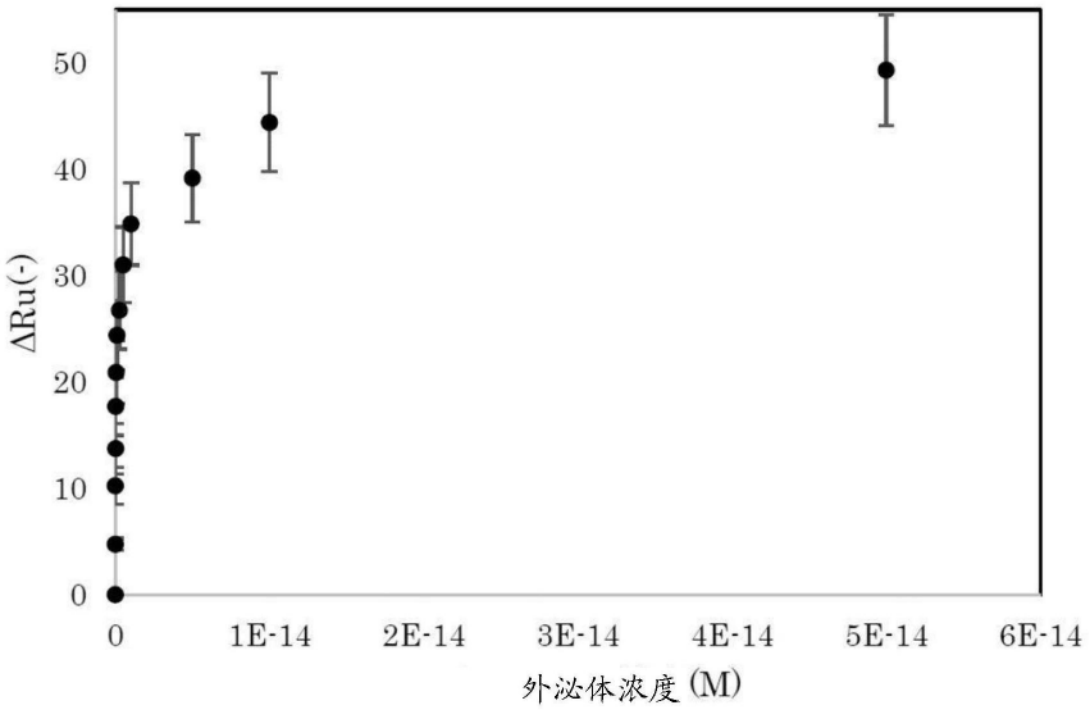

ΔRu(-)
50
40
30
20
10
0
0
1E-14
2E-14
3E-14
4E-14
5E-14
6E-14
外泌体浓度 (M)
实施例4

图21

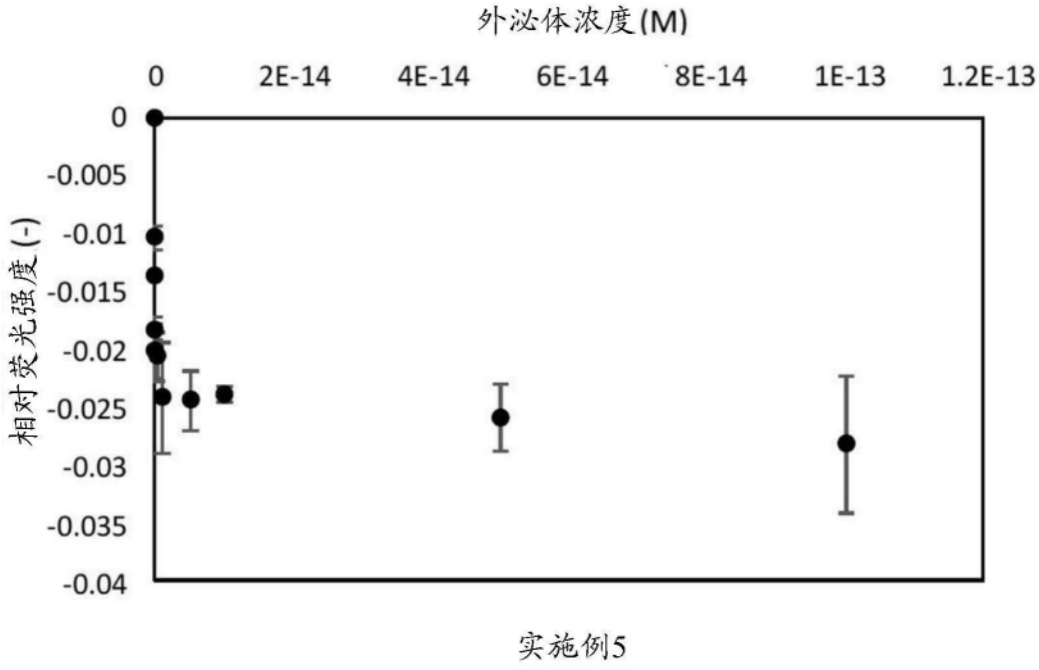

外泌体浓度(M)
0
2E-14
4E-14
6E-14
8E-14
1E-13
1.2E-13
相对荧光强度(-)
0
-0.005
-0.01
-0.015
-0.02
-0.025
-0.03
-0.035
-0.04
实施例5

图22

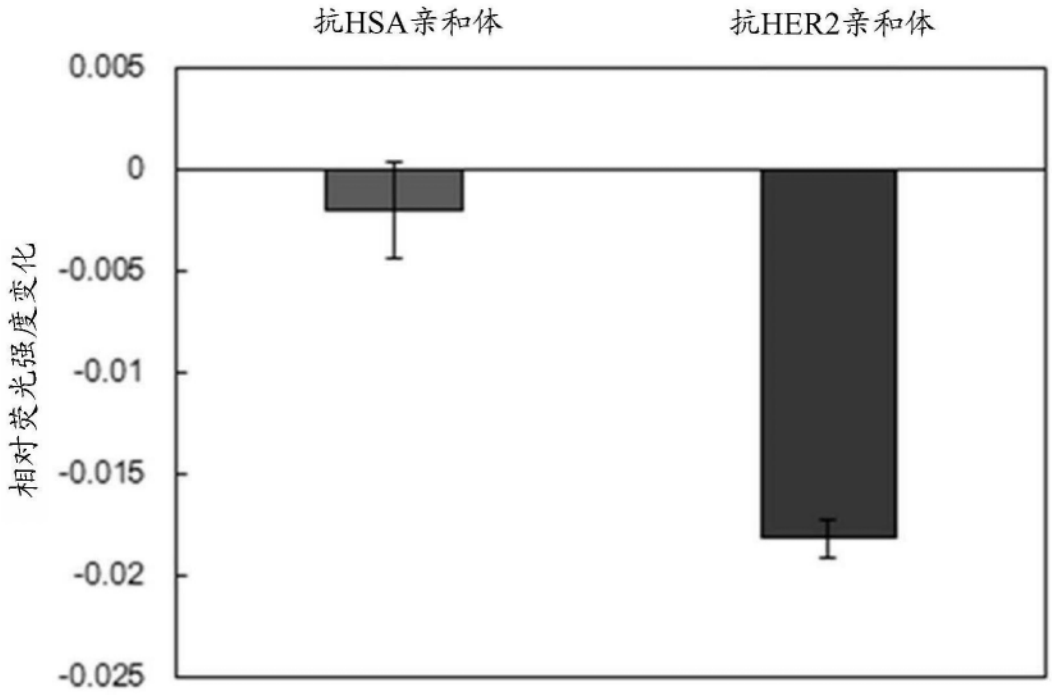

抗HSA亲和体
抗HER2亲和体
0.005
0
-0.005
-0.01
-0.015
-0.02
-0.025
相对荧光强度变化

图23

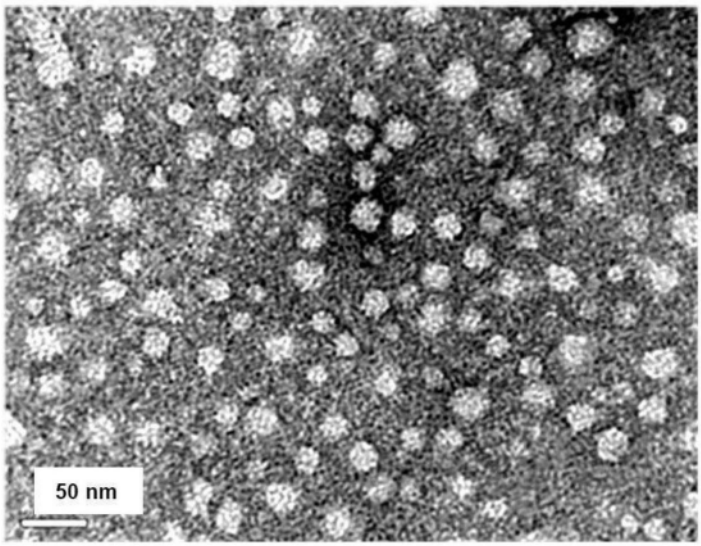

50 nm

图24

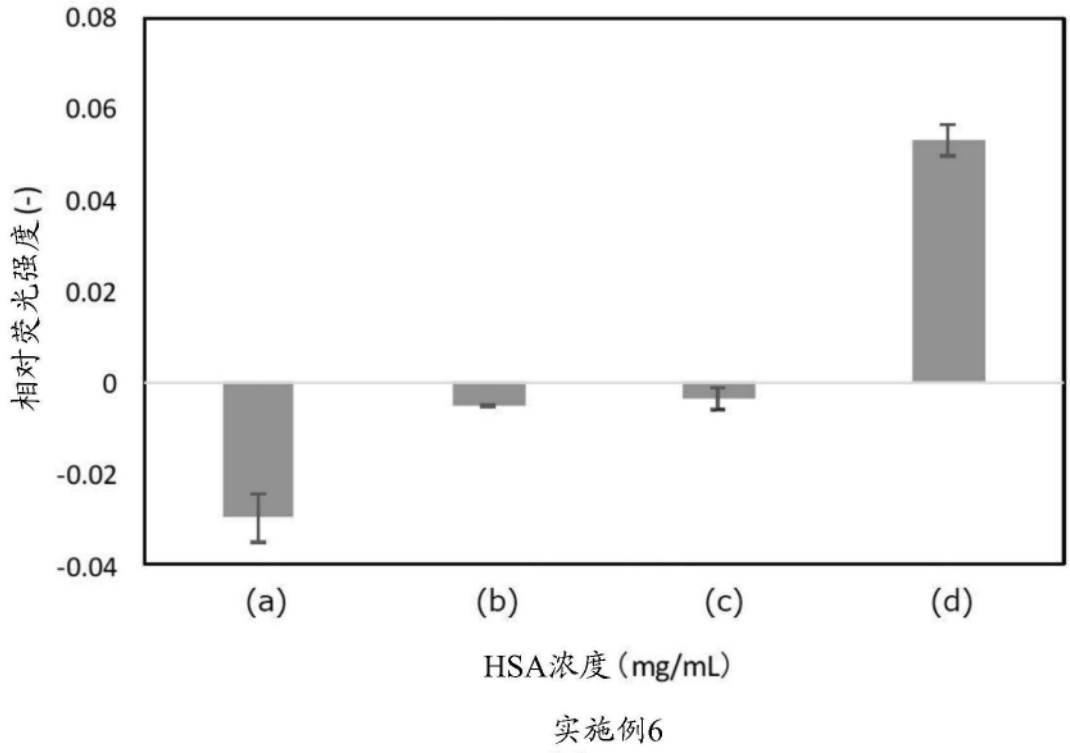


图25