



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103492879 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 01

(21) 申请号 201180070414. 6

(22) 申请日 2011. 09. 07

(30) 优先权数据

2011-129893 2011. 06. 10 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 10. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/005037 2011. 09. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/168988 JA 2012. 12. 13

(73) 专利权人 松下健康医疗控股株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 畠冈由香利

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王灵菇 白丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101065665 A, 2007. 10. 31,

CN 101936943 A, 2011. 01. 05,

WO 2010146563 A1, 2010. 12. 23,

US 2010233827 A1, 2010. 09. 16,

WO 0004382 A1, 2000. 01. 27,

审查员 肖吉

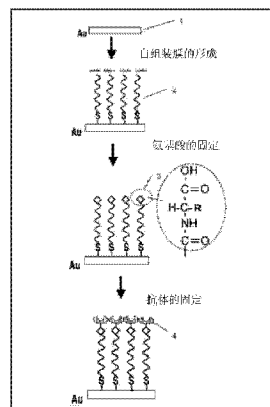
权利要求书4页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

将抗体固定到自组装膜上的方法

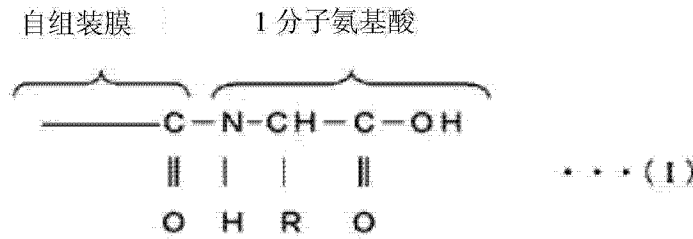
(57) 摘要

本发明的目的在于使自组装膜上所固定的抗体的量增加。本发明方法的特征在于进入了自组装膜与抗体之间的1分子氨基酸。例如一种将抗体固定到自组装膜上的方法,其依次具备以下的工序(a)~(b),工序(a):准备具备1分子氨基酸及所述自组装膜的基材;工序(b):将抗体供给至所述基材上,作为所述1分子氨基酸的羧基与所述白蛋白的氨基反应的结果形成由规定化学式表示的肽键。



1. 一种将抗体固定到自组装膜上的方法,其具备以下工序:

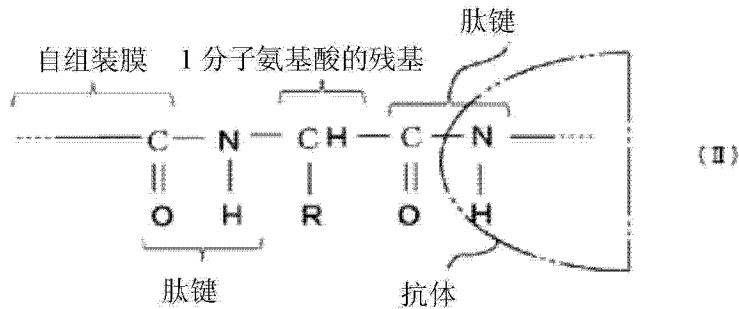
工序 (a):准备具备 1 分子氨基酸及自组装膜的基材,其中,所述 1 分子氨基酸通过以下的化学式 (I) 所示的肽键键合于所述自组装膜,



R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链,

所述 1 分子氨基酸选自半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、蛋氨酸、丝氨酸、色氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸及缬氨酸组成的 20 种氨基酸,

工序 (b):将抗体供给至所述基材上,作为所述 1 分子氨基酸的羧基与所述抗体的氨基反应的结果形成以下的化学式 (II) 所示的肽键,



R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,

所述工序 (a) 具备以下的工序 (a1) 及 (a2):

工序 (a1):准备表面上具备自组装膜的基材,其中,所述自组装膜在一端具有羧基,

工序 (a2):将所述 1 分子氨基酸供给至所述基材,在所述化学式 (I) 所示的所述自组装膜的一端的所述羧基与所述 1 分子氨基酸的氨基之间形成肽键。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,

在所述工序 (a) 及所述工序 (b) 之间还具备下述工序 (ab):

工序 (ab):将所述 1 分子氨基酸的羧基用 N- 羟基琥珀酰亚胺及 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐的混合液活化。

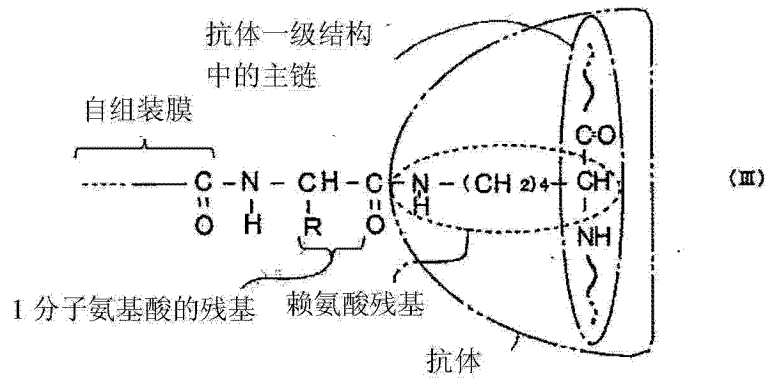
4. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,

在所述工序 (a1) 及所述工序 (a2) 之间还具备下述工序 (a1a):

工序 (a1a):将所述自组装膜的羧基用 N- 羟基琥珀酰亚胺及 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐的混合液活化。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,

所述化学式 (II) 如以下的化学式 (III) 所示:



R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链。

6. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中,

所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸及异亮氨酸组成的组。

7. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中,

所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸及苏氨酸组成的组。

8. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中,

所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸及谷氨酸组成的组。

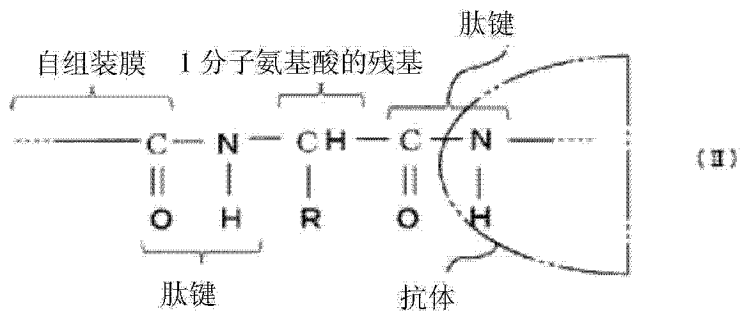
9. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中,

所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺及酪氨酸组成的组。

10. 一种传感器, 其具备自组装膜、1 分子氨基酸及抗体, 其中,

所述自组装膜及所述抗体之间夹有所述 1 分子氨基酸,

所述抗体通过以下的化学式 (II) 所示的 2 个肽键键合于自组装膜,

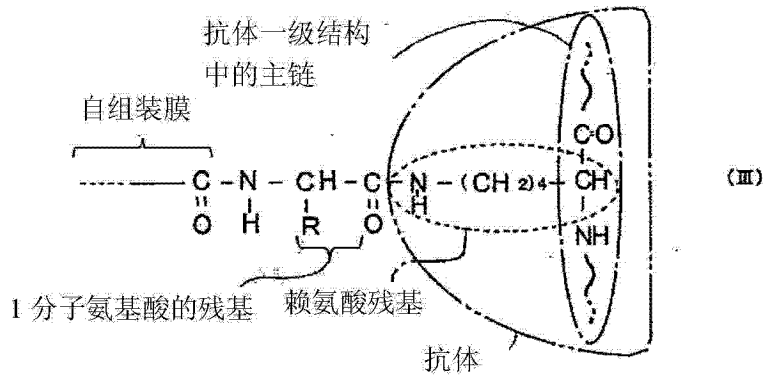


R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链,

所述 1 分子氨基酸选自由半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、蛋氨酸、丝氨酸、色氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸及缬氨酸组成的 20 种氨基酸。

11. 根据权利要求 10 所述的传感器, 其中,

所述化学式 (II) 如以下的化学式 (III) 所示：



R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链。

12. 根据权利要求 10 所述的传感器, 其中,

所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸及异亮氨酸组成的组。

13. 根据权利要求 10 所述的传感器, 其中,

所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸及苏氨酸组成的组。

14. 根据权利要求 10 所述的传感器, 其中,

所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸及谷氨酸组成的组。

15. 根据权利要求 10 所述的传感器, 其中,

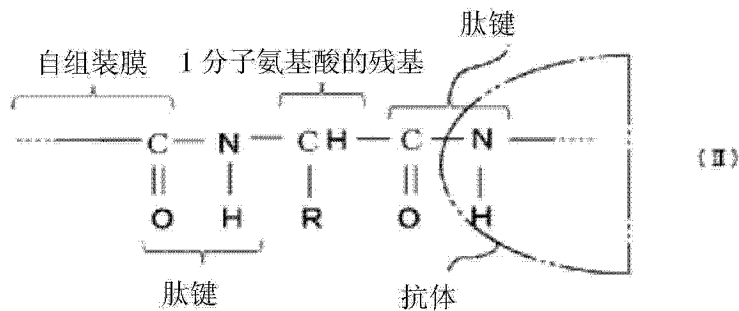
所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺及酪氨酸组成的组。

16. 一种使用传感器对试样所含的抗原进行检测或定量的方法, 其具备以下工序：

工序 (a) : 准备具备自组装膜、1 分子氨基酸及抗体的传感器, 其中,

所述自组装膜及所述抗体之间夹有所述 1 分子氨基酸,

所述抗体通过以下的化学式 (II) 所示的 2 个肽键键合于自组装膜,



R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链,

所述 1 分子氨基酸选自由半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、蛋氨酸、丝氨酸、色氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨

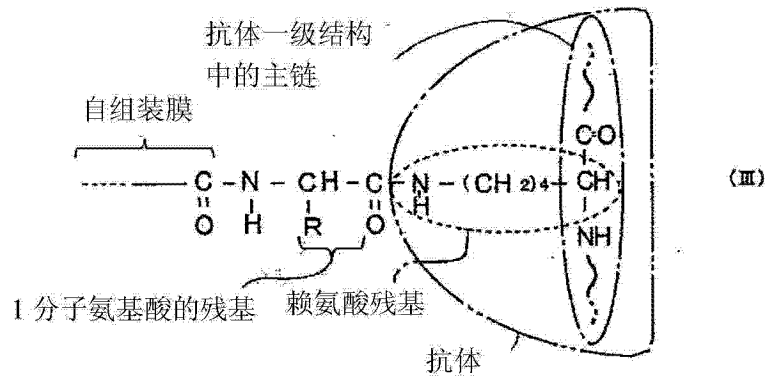
酸、天冬氨酸、精氨酸及缬氨酸组成的 20 种氨基酸；

工序 (b) :将所述传感器供给至所述试样,使抗原与所述抗体结合 ;及

工序 (c) :对工序 (b) 中结合的抗原进行检测、或根据工序 (b) 中结合的抗原的量对所述试样中所含的抗原进行定量。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,

所述化学式 (II) 如以下的化学式 (III) 所示 :



R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链。

18. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,

所述 1 分子氨基酸选自自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸及异亮氨酸组成的组。

19. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,

所述 1 分子氨基酸选自自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸及苏氨酸组成的组。

20. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,

所述 1 分子氨基酸选自自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸及谷氨酸组成的组。

21. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,

所述 1 分子氨基酸选自自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺及酪氨酸组成的组。

将抗体固定到自组装膜上的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及将抗体固定到自组装膜上的方法。

背景技术

[0002] 为了对试样中所含的抗原进行检测或定量,使用生物传感器。抗原与抗体之间的高亲和性可被用到生物传感器中。具体而言,将抗体固定到该生物传感器上。当将抗原供给至生物传感器时,由于抗原与抗体之间的高亲和性,抗原被固定到生物传感器上。

[0003] 专利文献 1 公开了具备抗体的现有的生物传感器。该专利文献 1 与日本特表 2002-520618 号公报对应(参照专利文献 1 的第 24 页第 23 行~26 行、第 25 页第 3 行~第 20 行、第 25 页第 27 行~第 26 页第 13 行、及第 26 页第 14 行~第 22 行、第 28 页第 21 行~第 23 行、或对应公报的第 0080、0082、0084、0085、0095、0109、0118 及 0119 段)。图 2 表示专利文献 1 的图 7 所公开的生物传感器。

[0004] 根据专利文献 1 的图 7 有关的描述,该生物传感器用于对生物体分子的活性进行筛选。该生物传感器具备单层 7、亲和性标记物 8、衔接子分子 9 及蛋白 10。单层 7 由化学式 X-R-Y 表示的自组装膜构成(参照专利文献 1 中的第 24 页第 23 行~26 行、第 25 页第 3 行~第 20 行、第 25 页第 27 行~第 26 页第 13 行及第 26 页第 14 行~第 22 行。或者,参照对应公报的第 0080、0082、0084、0085 段)。X、R 及 Y 的一个例子分别是 HS-、链烷基及羧基(参照专利文献 1 中的第 25 页第 3 行~第 20 行、第 25 页第 27~第 26 页第 13 行及第 28 页第 21 行~第 23 行。或者参照对应公报的第 0084、0085 及 0095 段)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献 1 :国际公开第 00/04382 号公报

发明内容

[0008] 发明欲解决的课题

[0009] 为了提高抗原的检测灵敏度或定量精度,需要增加固定在该生物传感器上的抗体的量。

[0010] 本发明者发现,通过使自组装膜与 1 分子氨基酸键合、然后将抗体固定,能够显著增加每单位面积所固定的抗体的量。基于该认识完成了本发明。

[0011] 本发明的目的在于提供使自组装膜上所固定的抗体的量增加的方法及具有通过该方法固定的抗体的传感器。

[0012] 用于解决课题的手段

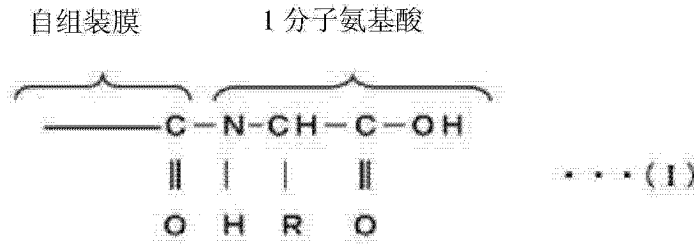
[0013] 以下的第 1~21 项解决了上述课题。

[0014] (1) 一种将抗体固定到自组装膜上的方法,其具备以下工序:

[0015] 工序(a):准备具备 1 分子氨基酸及自组装膜的基材,其中,

[0016] 所述 1 分子氨基酸通过以下的化学式(I)所示的肽键键合于所述自组装膜,

[0017]

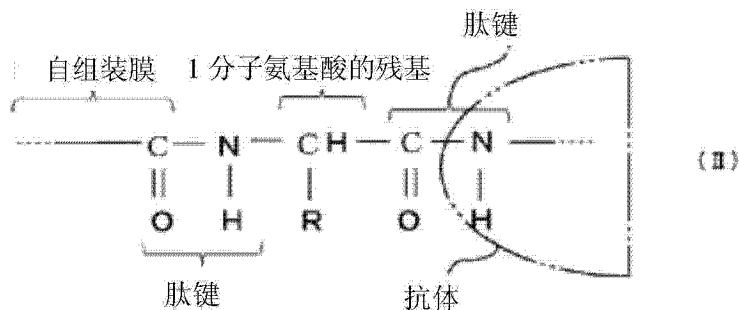


[0018] (R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链)

[0019] 所述 1 分子氨基酸选自由半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、蛋氨酸、丝氨酸、色氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸及缬氨酸组成的 20 种氨基酸，

[0020] 工序(b):将抗体供给至所述基材上,作为所述 1 分子氨基酸的羧基与所述抗体的氨基反应的结果形成以下的化学式(II)所示的肽键：

[0021]



[0022] (R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链)。

[0023] (2) 根据第 1 项所述的方法,其中,

[0024] 所述工序(a) 具备以下的工序(a1) 及(a2)：

[0025] 工序(a1):准备表面上具备自组装膜的基材;其中,所述自组装膜在一端具有羧基,

[0026] 工序(a2):将所述 1 分子氨基酸供给至所述基材,在所述化学式(I)所示的所述自组装膜的一端的所述羧基与所述 1 分子氨基酸的氨基之间形成肽键。

[0027] (3) 根据第 1 项所述的方法,其中,

[0028] 在所述工序(a) 及所述工序(b) 之间还具备所述工序(ab)：

[0029] 工序(ab):将所述 1 分子氨基酸的羧基用 N- 羟基琥珀酰亚胺及 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐的混合液活化。

[0030] (4) 根据第 2 项所述的方法,其中,

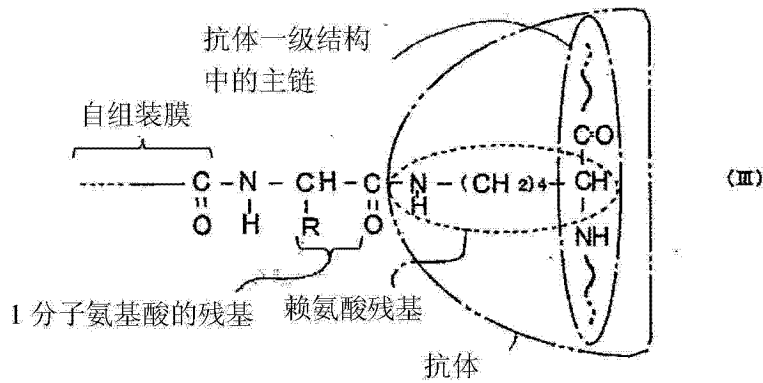
[0031] 在所述工序(a1) 及所述工序(a2) 之间还具备所述工序(a1a)：

[0032] 工序(a1b):将所述自组装膜的羧基用 N- 羟基琥珀酰亚胺及 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐的混合液活化。

[0033] (5) 根据第 1 项所述的方法,其中,

[0034] 所述化学式(II) 如以下的化学式(III) 所示：

[0035]



[0036] (R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链)。

[0037] (6) 根据第 1 项所述的方法, 其中,

[0038] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸及异亮氨酸组成的组。

[0039] (7) 根据第 1 项所述的方法, 其中,

[0040] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸及苏氨酸组成的组。

[0041] (8) 根据第 1 项所述的方法, 其中,

[0042] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸及谷氨酸组成的组。

[0043] (9) 根据第 1 项所述的方法, 其中,

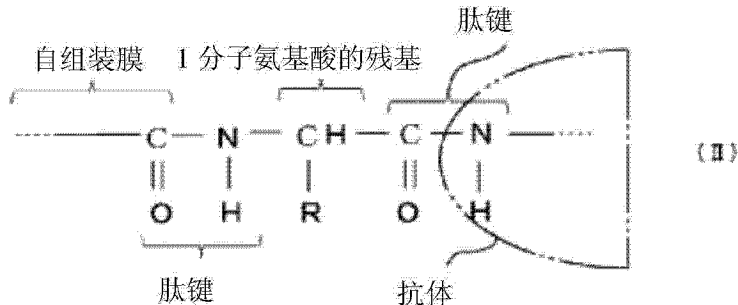
[0044] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺及酪氨酸组成的组。

[0045] (10) 一种传感器, 其具备自组装膜、1 分子氨基酸及抗体, 其中,

[0046] 所述自组装膜及所述抗体之间夹有所述 1 分子氨基酸,

[0047] 所述抗体通过以下的化学式 (II) 所示的 2 个肽键键合于自组装膜,

[0048]



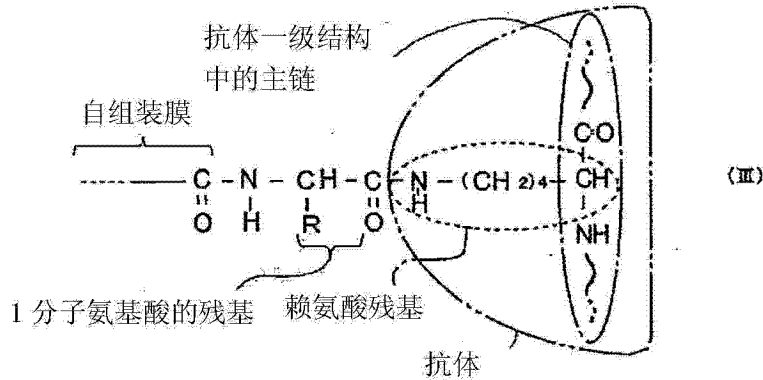
[0049] (R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链)

[0050] 所述 1 分子氨基酸选自由半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、蛋氨酸、丝氨酸、色氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸及缬氨酸组成的 20 种氨基酸。

[0051] (11) 根据第 10 项所述的传感器, 其中,

[0052] 所述化学式(II) 如以下的化学式(III) 所示:

[0053]



[0054] (R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链)。

[0055] (12) 根据第 10 项所述的传感器, 其中,

[0056] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸及异亮氨酸组成的组。

[0057] (13) 根据第 10 项所述的传感器, 其中,

[0058] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸及苏氨酸组成的组。

[0059] (14) 根据第 10 项所述的传感器, 其中,

[0060] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸及谷氨酸组成的组。

[0061] (15) 根据第 10 项所述的传感器, 其中,

[0062] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺及酪氨酸组成的组。

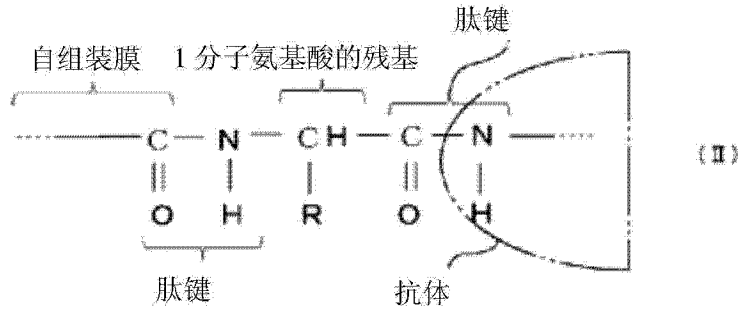
[0063] (16) 一种使用传感器对试样所含的抗原进行检测或定量的方法, 其具备以下工序:

[0064] 工序(a): 准备具备自组装膜、1 分子氨基酸及抗体的传感器, 其中,

[0065] 所述自组装膜及所述抗体之间夹有所述 1 分子氨基酸,

[0066] 所述抗体通过以下的化学式(II) 所示的 2 个肽键键合于自组装膜,

[0067]



[0068] (R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链)

[0069] 所述 1 分子氨基酸选自由半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、蛋氨酸、丝氨酸、色氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸及缬氨酸组成的 20 种氨基酸；

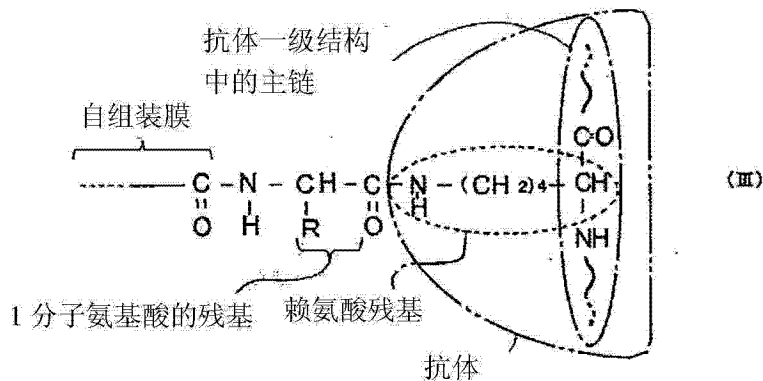
[0070] 工序(b):将所述传感器供给至所述试样,使抗原与所述抗体结合;及

[0071] 工序(c):对工序(b)中结合的抗原进行检测、或根据工序(b)中结合的抗原的量对所述试样中所含的抗原进行定量。

[0072] (17) 根据第 16 项所述的方法,其中,

[0073] 所述化学式(II)如以下的化学式(III)所示:

[0074]



[0075] (R 表示所述 1 分子氨基酸的侧链)。

[0076] (18) 根据第 16 项所述的方法,其中,

[0077] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸及异亮氨酸组成的组。

[0078] (19) 根据第 16 项所述的方法,其中,

[0079] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸及苏氨酸组成的组。

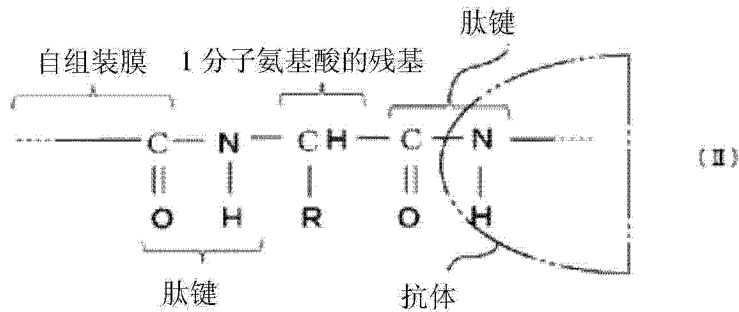
[0080] (20) 根据第 16 项所述的方法,其中,

[0081] 所述 1 分子氨基酸选自由组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸及谷氨酸组成的组。

[0082] (21) 根据第 16 项所述的方法,其中,

[0101] 接着,将抗体 4 供给。抗体 4 的 5'末端的氨基与氨基酸 3 的羧基反应。抗体 4 中所含的赖氨酸的氨基也与氨基酸 3 的羧基反应。如此,形成了以下的化学式(II)所示的 2 个肽键。如此获得传感器。

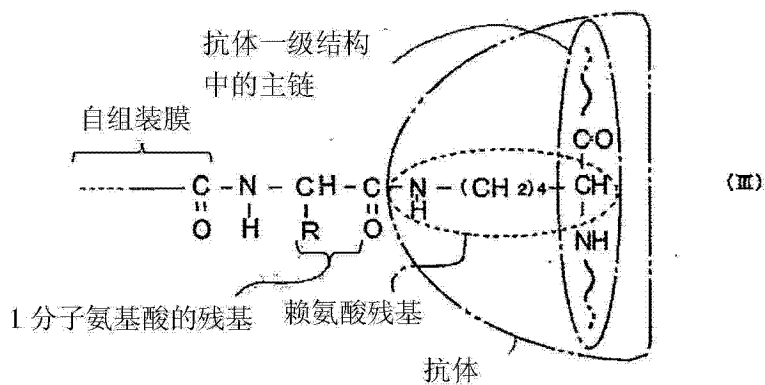
[0102]



[0103] (R 表示 1 分子氨基酸的侧链)

[0104] 1 分子的抗体 4 仅具有 1 个 5'末端,另一方面,1 分子的抗体 4 具有多个赖氨酸基。因此详细而言,几乎全部的化学式(II)如以下的化学式(III)所示。

[0105]



[0106] (R 表示 1 分子氨基酸的侧链)

[0107] 得到的传感器用于对试样中所含的抗原进行检测或定量。

[0108] 具体而言,将试样供给至传感器,使试样中所含的抗原与抗体结合。显而易见,抗原与抗体特异性地结合。

[0109] 如此结合的抗原可采用表面等离子体激元共振 (SPR) 分析法等通常的分析法进行检测或定量。也可以使用 QCM (石英晶体微天平测定法:Quartz Crystal Microbalance) 等其他分析法。

[0110] (实施例)

[0111] 以下的实施例及比较例是对本发明的进一步详细说明。本申请说明书中记载的实施例仅仅是为了示例,可以理解本领域技术人员可根据它们进行的各种改变及变形例,而且应理解这样的改变及变形例也当然地包含在本申请说明书的主旨及范围以及所附的权利要求书中。

[0112] (比较例)

[0113] 如图 3 所示,使抗体直接通过酰胺偶联反应与位于在金表面上形成的经自组装的

链烷硫醇的上端的羧基键合,将抗体固定。顺序及结果如下所述。

[0114] [试样溶液的制备]

[0115] 制备具有最终浓度为 10mM 的 16- 巯基十六烷酸(16-Mercaptohexadecanoic acid) 的试样溶液。溶剂为乙醇。

[0116] [自组装膜的形成]

[0117] 作为基材 1, 使用在玻璃板上具有蒸镀而成的金的金基板(GE HEALTHCARE 公司制 ;BR-1004-05)。将该基材 1 用含有浓硫酸及 30% 过氧化氢水的 piranha 溶液洗涤 10 分钟。该 piranha 溶液中所含的浓硫酸相对于 30% 过氧化氢水的体积比为 3 :1。之后, 将基材 1 用纯水洗涤, 并且干燥。

[0118] 接着, 将金基板浸渍到试样溶液中 18 小时, 在金基板的表面形成自组装膜。最后, 用纯水洗涤基材 1 并干燥。

[0119] [抗体的固定]

[0120] 使抗体与位于用于形成自组装膜的 16- 巯基十六烷酸的上端的羧基键合, 将抗体固定。

[0121] 具体而言, 用 0. 1M N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS ;N-Hydroxysuccinimide)及 0. 4M 1- 乙基 -3- (3- 二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC ;1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)的 35 微升的混合液将位于 16- 巯基十六烷酸的上端的羧基活化。之后, 将 35 微升的抗体(2. 5 微克 /ml) 以 5 微升 / 分的流速添加。如此, 将 16- 巯基十六烷酸的羧基偶联到抗体的氨基上。

[0122] (实施例 1)

[0123] 在自组装膜的形成与抗体的固定之间, 供给甘氨酸作为 1 分子氨基酸, 除此以外, 与比较例同样地进行实验。顺序及结果如下所述。

[0124] [氨基酸(甘氨酸)的固定化]

[0125] 使甘氨酸与位于形成自组装膜 2 的 16- 巯基十六烷酸(16-Mercaptohexadecanoic acid) 的上端的羧基键合, 将甘氨酸固定。

[0126] 具体而言, 在与比较例同样地将羧基活化后, 将 35 微升的 0. 1M 甘氨酸(pH :8. 9) 以 5 微升 / 分的流速添加。如此, 将 16- 巯基十六烷酸的羧基偶联到甘氨酸的氨基上。

[0127] [抗体的固定]

[0128] 接着, 使抗体与甘氨酸的羧基键合, 将抗体固定。具体而言, 在与上述同样地将甘氨酸的羧基活化后, 将 35 微升的抗体(浓度 :2. 5 微克 /ml) 以 5 微升 / 分的流速添加。如此, 将甘氨酸的羧基偶联在抗体的 5' 末端的氨基或抗体中所含的赖氨酸的氨基上。

[0129] [固定量的比较]

[0130] 使用表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance ;SPR) 装置 Biacore3000 (GE HEALTHCARE 公司制) 测定实施例 1 及比较例中抗体的固定量。用语“固定量”是指每单位面积所固定的抗体的量。实施例 1 中所测定的固定量与比较例中所测定的固定量之比为约 18 :1。

[0131] (其它实施例)

[0132] 代替甘氨酸, 使用苏氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸、组氨酸、丙氨酸、赖氨酸、亮氨酸、谷氨酸、缬氨酸、天冬氨

酸、精氨酸及酪氨酸,与实施例 1 同样地测定各固定量。这些氨基酸为 20 种天然氨基酸。表 1 示出了所得的固定量。

[0133] 表 1

[0134]

组氨酸	23.86045
半胱氨酸	22.74856
赖氨酸	20.91865
苯丙氨酸	18.86891
甘氨酸	18.63296
色氨酸	17.46708
甲硫氨酸	16.50562
丝氨酸	16.01948
天冬酰胺	15.96672
酪氨酸	15.85254
丙氨酸	15.40134
谷氨酸	14.41335
苏氨酸	13.00732
亮氨酸	8.816629
缬氨酸	5.974514
异亮氨酸	5.701262
天冬氨酸	3.676188
脯氨酸	3.276342
精氨酸	2.457678
谷氨酰胺	1.171725
(无)	1

[0135] ←比较例

[0136] 本领域技术人员从表 1 可理解以下内容。

[0137] 使用 20 种氨基酸时,与比较例相比,固定量增加。并且,随着所使用的氨基酸的不同,固定量发生变化。

[0138] 优选组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸及异亮氨酸。这是因为,当供给选自这些氨基酸中的一种氨基酸时,所测定的各固定量为 5 以上。

[0139] 更优选组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸及苏氨酸。这是因为,当供给选自这些氨基酸中的一种氨基酸时,所测定的各固定量为 10 以上。

[0140] 进一步优选组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、丙氨酸及谷氨酸。这是因为,当供给选自这些氨基酸中的一种氨基酸时,所测定的各固定量在平均值(13)以上。

[0141] 最优选组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、天冬酰胺及酪氨酸。这是因为,当供给选自这些氨基酸中的一种氨基酸时,所测定的各固定量为 15.6 (该值等于平均值 13 的 1.2 倍) 以上。

[0142] 产业上的可利用性

[0143] 本发明使每单位面积所固定的抗体的量显著增加。由此,能够提高生物传感器的灵敏度。该生物传感器可用于临床现场中需要对患者来源的生物体试样中所含的抗原进行检测或定量的检查及诊断中。

[0144] 符号说明

[0145] 1 : 金基材

[0146] 2 : 链烷硫醇

[0147] 3 : 氨基酸

[0148] 4 : 抗体

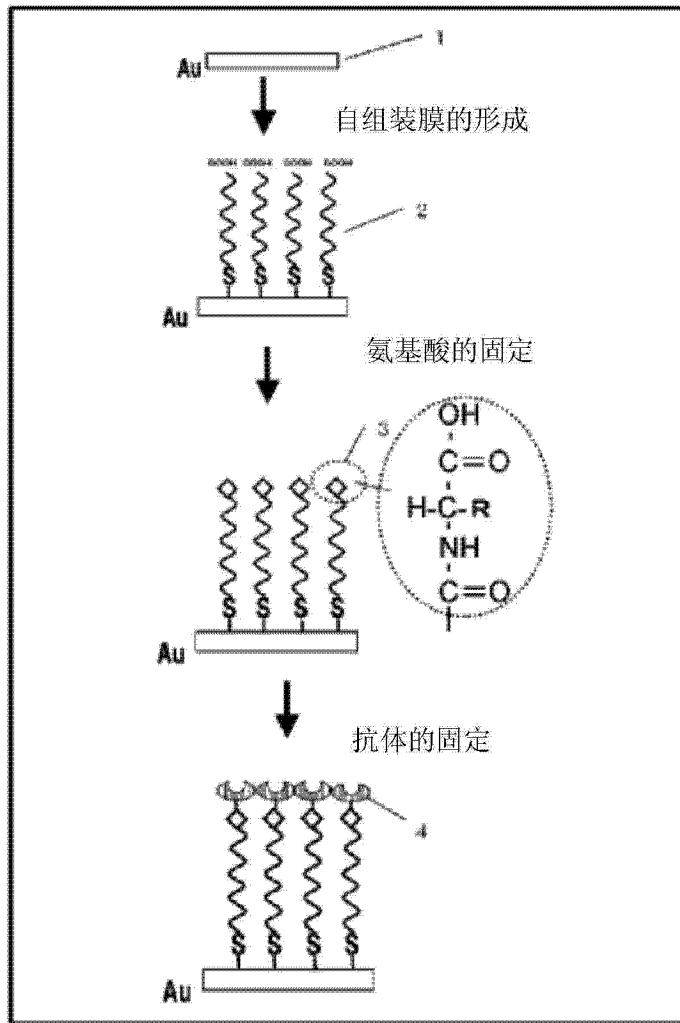


图 1

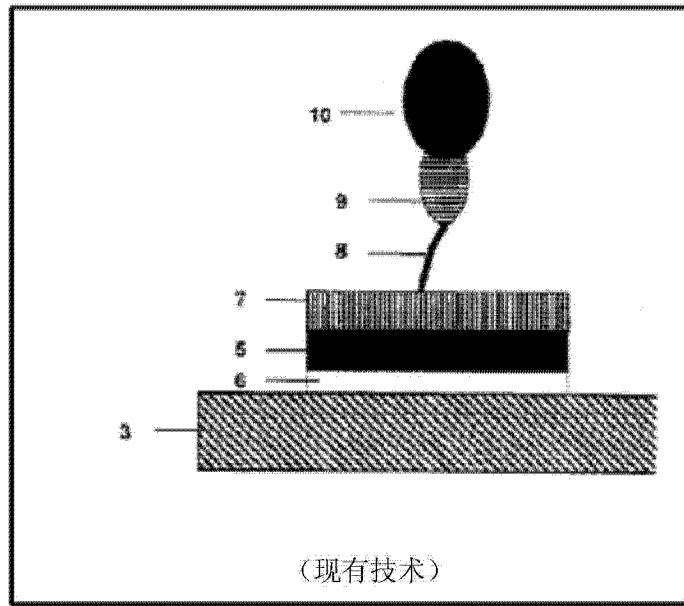


图 2

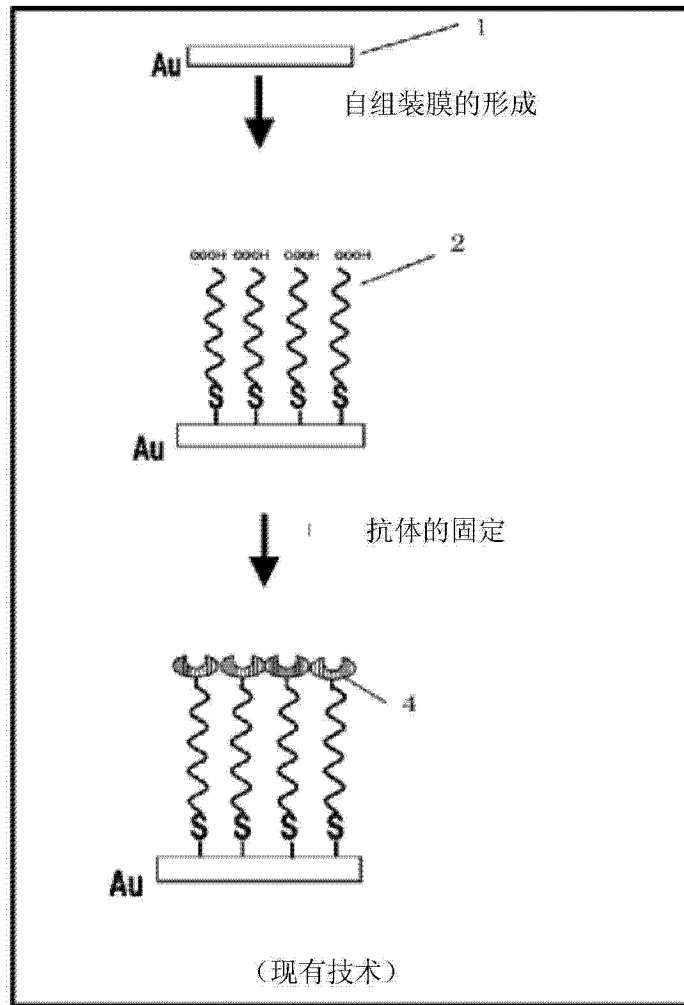


图 3