



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201043960 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：098118317

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 06 月 03 日

(51)Int. Cl. :

G01N33/573 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：林志生 LIN, CHIH SHENG (TW)；莊曜禎 CHUANG, YAO CHEN (TW)；陳思豪 CHEN, SZ HAU (TW)

(74)代理人：陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：6 共 35 頁

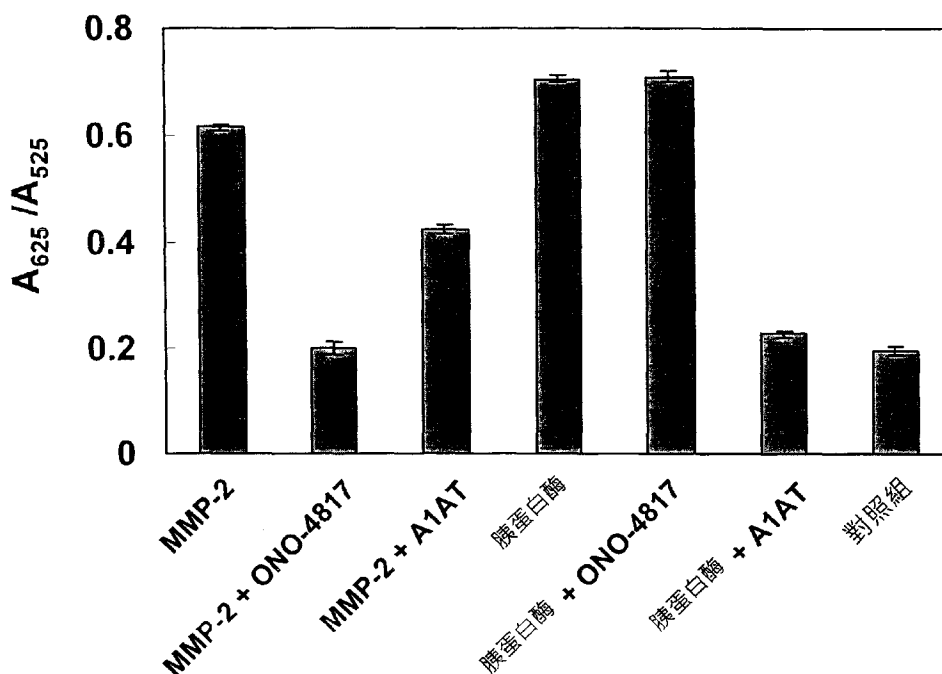
(54)名稱

感測平台

SENSING PLATFORM

(57)摘要

一種感測平台，包括複數奈米金屬粒子；聚集誘導子，包括兩個彼此不同之官能基，且經由該聚集誘導子之一該官能基與該奈米金屬粒子接觸；以及辨識分子，係與該奈米金屬粒子結合並經由該辨識分子與欲辨識之標的物作用以辨識該標的物，其中，該聚集誘導子之另一未與該奈米金屬粒子接觸之官能基係用以於該標的物與該辨識分子作用後，誘導該複數奈米金屬粒子聚集。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 098 118 317

※申請日： 98 6 3 ※IPC 分類：

G01N³³/573 (2006.01)G01N³³/574 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

感測平台

SENSING PLATFORM

二、中文發明摘要：

一種感測平台，包括複數奈米金屬粒子；聚集誘導子，包括兩個彼此不同之官能基，且經由該聚集誘導子之一該官能基與該奈米金屬粒子接觸；以及辨識分子，係與該奈米金屬粒子結合並經由該辨識分子與欲辨識之標的物作用以辨識該標的物，其中，該聚集誘導子之另一未與該奈米金屬粒子接觸之官能基係用以於該標的物與該辨識分子作用後，誘導該複數奈米金屬粒子聚集。

三、英文發明摘要：

A sensing platform comprises a plurality of metal nanoparticles; an aggregation inducer(s), for inducing aggregation of the metallic cores, having two different functional groups, which contact with the metal nanoparticles through one of the functional groups; and the recognition molecule(s) for reacting with the target(s) from environment via specific recognition between the recognition molecules and the targets, which are bounded to the metal nanoparticles, and wherein an aggregation of the metal nanoparticles is achieved through the another functional group provided that the recognition molecules are recognized.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(6)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種感測平台，尤其係關於一種包括經聚集誘導子與辨識分子修飾之奈米金粒子的感測平台。

【先前技術】

在生物科技和醫療領域中，隨著技術的快速發展，利用特定的分子標記或利用特定分子的特異活性而進行選擇性測定之分子生物檢測逐漸成為研發重點。尤其是可以高專一性與高敏感性的感測生物體內或環境中以微量存在之酵素、核酸、蛋白質、或化合物等的分子生物檢測，在醫學、藥物研發、生命科學等領域中至為重要，例如早期疾病診斷、潛在藥物篩選、環境因子測定等。其中，發展高靈敏度、迅速、準確、可大量篩選及低成本的檢測方法，是目前主要的發展趨勢。

近來對於金屬粒子的奈米性質的研究逐步增加，尤其是對於奈米金粒子（gold nanoparticles，下文中可簡稱AuNPs）在化學檢測、生物檢測、醫療檢測及生物顯影上已有相當數量的研究報告。已知當奈米金粒子溶液為分散（dispersed）型式時，溶液呈現紅色至酒紅色；而當奈米金粒子溶液為聚集（aggregated）型式，亦即粒子間的距離短於粒子之平均粒徑時，溶液顏色會轉變為藍紫色至紫黑色，該等顏色之轉變可透過肉眼觀察到，係為奈米金粒子應用在檢測上的優點之一。

已報導奈米金屬粒子在感測平台上之應用，包括美國

專利公開案第 20080166706 號，係揭露一種包含奈米金粒子及含有硫-氧分子之殼體粒子之感測平台，其中該粒子係經點阻濾波器 (notch filter) 及電磁輻射而選擇性尺寸化，於該案中，係以量子點 (quantum dot) 與標的物結合，再將該粒子與該結合物結合及測定；係利用拉曼散射 (Raman scattering) 之方式藉由奈米金粒子之聚集而增強訊號強度。美國專利公開案第 20050059042 號係揭露檢測寡核苷酸之方法，係利用奈米金粒子之聚集呈色及螢光標定之單股核酸探針之雙重檢測，判斷標的物之存在與否。在上述前案中，係僅以金粒子作為檢測輔助，因此，皆須額外的檢測標定物質，且皆未探討奈米金粒子及其修飾物對於標的物之專一性。

美國專利公開案第 20080089836 號係揭露一種具有雙層結構之奈米粒子，其中，第一層為與奈米金粒子直接連結之包括疏水性部分及結合部分之表面結合分子，第二層為兩性分子，且第一層與第二層間以疏水性交互作用而結合。

另外，亦有多篇期刊探討奈米金粒子在檢測應用上的特性，例如 Liu 等人係揭露以合成的受質，經 β -內醯胺酶作用後會產生帶有硫醇基之片段，硫醇基可吸引金粒子聚集而可觀察到呈色改變，進而應用於檢測酵素之存在 (Liu et al., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007, 46:8799-8803)。惟須視待測酵素而合成經降解後可形成硫醇基之受質，在應用上較為不便。

Wang 等人係揭露於奈米金粒子上帶有修飾有生物素之胜肽受質，以及帶有卵白素之奈米金粒子，經由生物素及卵白素間的專一性鍵結使奈米金粒子聚集，造成奈米金粒子波長產生紅移，並以吸收值變化作為判斷依據，以檢測對該受質作用之酵素 (Wang et al., J Am Chem Soc. 2006, 128:2214-2215)。惟此種檢測必須於奈米金粒子上分別修飾兩種分子，步驟較為繁雜，且易因金粒子的尺寸而造成波形重疊的現象。

Chen 等人係揭露以人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 作為探針以修飾奈米金粒子 (HSA-AuNPs)，而可經由靜電力結合溶菌酶，產生倫敦-凡得瓦力作用之非交聯聚合而產生呈色改變。HSA-AuNPs 對溶菌酶的檢測靈敏度具有 HAS 濃度依賴性，而選擇性則可經由改變溶液 pH 值及鹽濃度而顯著改善 (Chen et al., Langmuir 2008, 24:3654-3660)。Zhao 等人亦揭露利用奈米金粒子間的非交聯聚合而檢測標的物 (Zhao et al., Chem Commun (Camb.) 2007, 36:3729-3731)。Jena 及 Raj 係揭露以奈米金粒子之可逆性聚集/分散作用檢測魚精蛋白 (protamine) 及肝素 (heparin)。

習知技術主要利用奈米金粒子本身具負電荷的原理而應用於檢測，藉由中和其負電性而使奈米金粒子聚集，再以聚集程度作為檢測依據。因而容易因檢測環境或待測樣本中所包含之帶正電金屬離子而干擾檢測結果，且檢測環境或待測樣本之 pH 值亦對奈米金粒子聚集造成影響，

使得習知奈米金粒子之檢測器在實際應用上有所侷限。

因此，仍需要能改善上述缺點、並能以較低成本製備、容易操作、以及能迅速獲得檢測結果之感測平台及檢測方法。

【發明內容】

鑒於前述先前技術之缺點，本發明提供一種感測平台 (sensing platform)，包括複數奈米金屬粒子；包括兩個彼此不同之官能基的聚集誘導子，且經由該聚集誘導子之一該官能基與該奈米金屬粒子接觸；以及辨識分子，係與該奈米金屬粒子結合並經由該辨識分子與欲辨識之標的物作用以辨識該標的物，其中，該聚集誘導子之另一未與該奈米金屬粒子接觸之官能基係用以於該標的物與該辨識分子作用後，誘導該複數奈米金屬粒子聚集。

於本發明之感測平台的具體實施例中，該奈米金屬粒子之金屬的實例包括，但非限於金、銀、銅、鋁、鐵或鎳之金屬，其中，該奈米金屬粒子可為單一種金屬所構成，亦可為上述金屬之兩種或更多種之組合而構成，亦可為上述金屬之合金所構成，或者，該奈米金屬粒子係具有前述任一金屬之金屬核以及殼體，且該殼體之金屬材質不同於金屬核之材質。因此，該奈米金屬粒子係包括一種或多種選自由金、銀、銅、鋁、鐵或鎳之元素。金屬粒子的選擇係以金屬粒子之光學特性會隨著粒子在環境中為分散型式或聚集型式而改變者為佳。在一態樣中，該奈米金屬粒子係為金。

於本發明之感測平台中，該金屬粒子係為奈米 (nanometer) 尺寸，具體而言，例如，該金屬粒子之粒徑為 5 至 60 奈米。

於本發明之感測平台中，該聚集誘導子具有至少兩個官能基，例如至少兩個彼此不同之官能基，其中一個官能基係與該奈米金屬粒子以共價鍵結的方式接觸。於一具體實施例中，該聚集誘導子具有第一官能基及不同於第一官能基之第二官能基，該第一官能基及第二官能基皆係選自硫基 (-S)、羥基 (-OH)、硫醇基 (-SH)、胺基 (-NH₂) 及羧基 (-COOH) 所組成之群組之一者。

於一態樣中，該聚集誘導子同時具有羥基 (-OH) 與硫醇基 (-SH)。

又，於一態樣中，該聚集誘導子為 6-巰基己-1-醇 (HS(CH₂)₆OH，下文中可簡稱 MCH)。

於本發明之感測平台中，該辨識分子係依欲檢測標的物而決定，本領域具有通常知識者可理解，只要能與標的物產生專一性作用，並結合至奈米金屬粒子即可，而無須特別限制辨識分子。通常，該辨識分子之實例包括，但不限於抗體、抗原、酵素、酵素受質、核酸、胺基酸、蛋白質、脂質、醣類、脂多醣及醣蛋白的任何一者等，其中，在非限制性實施例中，該辨識分子係以酵素受質為佳。

於一例示性實施例中，當感測平台中的辨識分子與標的物反應後，經由與標的物之作用而令辨識分子自奈米金屬粒子完全脫離或部分脫離，減少奈米金屬粒子間的空間

障礙，而該聚集誘導子可利用該另一未與該奈米金屬粒子接觸之官能基誘導該複數奈米金屬粒子聚集，例如產生共價鍵結，進而使奈米金屬粒子聚集。

於一例示性實施例中，聚集誘導子及辨識分子係以共價鍵結至奈米金屬粒子。

本發明之感測平台不受環境中帶正電的金屬離子所干擾，於酸性、鹼性以及高鹽度的環境中皆為穩定狀態。因此，與習知感測平台相較，本發明之感測平台更可應用於強酸、強鹼及高鹽溶液之環境中以檢測標的物之存在。

本發明提供一種製備上述感測平台之方法，係包括下列步驟：

添加以緩衝溶液作為溶劑之辨識分子溶液至奈米金屬粒子溶液中，予以震盪俾使辨識分子與該奈米金屬粒子結合以得到混合物；以及於所得混合物中添加聚集誘導子溶液，並予以震盪使該聚集誘導子溶液中之聚集誘導子的其中一官能基與該奈米金屬粒子接觸以得到包括經該辨識分子及該聚集誘導子所修飾之奈米金屬粒子的感測平台。

於一態樣中，該奈米金屬粒子係選自為金、銀、銅、鋁、鐵或鎳，該奈米金屬粒子可為單一種金屬所構成，亦可為上述金屬之兩種或更多種之組合而構成，亦可為上述金屬之合金所構成，或者，該奈米金屬粒子係具有前述任一金屬之金屬核或殼體，且該殼體之金屬材質不同於金屬核之材質。

於一態樣中，該奈米金屬粒子為金。

於一態樣中，該辨識分子係依欲檢測標的物而決定。通常，該辨識分子係選自抗體、抗原、酵素、酵素受質、核酸、胺基酸、蛋白質、脂質、醣類、脂多醣、及醣蛋白所組成群組之一者。

於一態樣中，該聚集誘導子具有第一官能基及不同於第一官能基之第二官能基，該第一官能基及第二官能基皆係選自硫基(-S)、羥基(-OH)、硫醇基(-SH)、胺基(-NH₂)及羧基(-COOH)所組成之群組之一者。

於一態樣中，本發明之製備方法所使用之奈米金屬粒子溶液之濃度可為 0.5-50 奈莫耳/升 (nM)，較佳為 1-10 nM；辨識分子溶液之濃度為 0.1-10 毫克/毫升(mg/mL)，較佳為 0.5-5 mg/mL；聚集誘導子溶液之濃度為 0.1-10 毫莫耳/升 (mM)，較佳為 0.5-5 mM。

更具體言之，當奈米金屬粒子溶液之濃度為 0.5-50 nM，而辨識分子溶液之濃度為 0.1-10 mg/mL 時，該奈米金屬粒子溶液與該辨識分子溶液之體積比為 10-30：1，較佳為 5-20：1，更佳為 19：1。

將上述辨識分子與奈米金屬粒子結合得到混合物後，添加聚集誘導子溶液至該混合物中；當該聚集誘導子溶液之濃度為 0.1-10 mM 時，聚集誘導子溶液與前述混合物之體積比為 1：60-200；較佳之體積比為 1：60-150；較佳之體積比為 1：80-140。

另外，本發明亦提供一種於待測溶液中檢測標的物存在之方法，係包括下列步驟：提供經聚集誘導子及辨識分

子修飾之奈米金屬粒子，其中，該聚集誘導子包括兩個彼此不同之官能基，以經由該聚集誘導子其中之一官能基與該奈米金屬粒子接觸，俾在該辨識分子與該奈米金屬粒子結合後，令該辨識分子與欲辨識之標的物作用以辨識該標的物，且該聚集誘導子之另一未與該奈米金屬粒子接觸之官能基係用以於該標的物與該辨識分子作用後，誘導該複數奈米金屬粒子聚集；將待測溶液與該奈米金屬粒子接觸；以及測定該待測溶液之光學特性變化，以於該辨識分子與該標的物作用後，令該聚集誘導子誘導奈米金屬粒子之聚集而產生光學性質之改變。

於本發明之檢測方法中，該光學變化係為顏色變化及吸收波長紅移 (red shift)；又，該光學變化可以肉眼直觀測定及/或以光學儀器，如分光光度計測定。

於一態樣中，該奈米金屬粒子係選自為金、銀、銅、鋁、鐵、或鎳，該奈米金屬粒子可為單一種金屬所構成，亦可為上述金屬之兩種或更多種之組合而構成，亦可為上述金屬之合金所構成，或者，該奈米金屬粒子係具有前述任一金屬之金屬核或殼體，且該殼體之金屬材質不同於金屬核之材質。金屬粒子的選擇係以金屬粒子之光學特性會隨著粒子在環境中為分散型式或聚集型式而改變者為佳。

於一態樣中，該奈米金屬粒子之金屬為金，即奈米金粒子。當以經聚集誘導子及辨識分子修飾之奈米金粒子進行檢測時，分散型式之奈米金粒子呈現紅色至酒紅色，而聚集型式之奈米金粒子呈現藍紫色至紫黑色，該等顏色變

化一般可以肉眼直觀判斷，亦可經由分光光度計測定波型變化。於一態樣中，該波形變化係為波長 400 nm 至 700 nm 之吸收讀值的變化。

於一態樣中，該光學變化係以金粒子聚集後的最大吸收波長（625 nm）與原本的吸收波長（525 nm）之比值作為依據，藉此，可修正因金粒子尺寸變化所造成之波形重疊之誤差。

為使奈米金屬粒子聚集，該聚集誘導子具有第一官能基及不同於第一官能基之第二官能基，該第一官能基及第二官能基皆係選自硫基(-S)、羥基(-OH)、硫醇基(-SH)、胺基(-NH₂)及羧基(-COOH)所組成之群組之一者。

於一具體實施例中，該聚集誘導子同時具有羥基(-OH)與硫醇基(-SH)；具體而言，該聚集誘導子可為 6-巰基己-1-醇[HS(CH₂)₆OH]。

於一具體實施例中，該辨識分子係選自抗體、抗原、酵素、酵素受質、核酸、胺基酸、蛋白質、脂質、醣類、脂多醣及醣蛋白所組成群組之一者。

本發明所提供之經聚集誘導子及辨識分子修飾之奈米金屬粒子穩定性高，除了可維持長期穩定之外，並可廣泛應用於強酸、強鹼及高鹽溶液之檢測環境中。

與習知的感測平台或檢測方法相較，以本發明所提供之感測平台或檢測方法測定樣本中標的物之存在所須的反應時間相對較短，可迅速獲得檢測結果。在操作上，無須使用複雜的步驟或精密的儀器即可獲得檢測結果，大幅提

昇實際應用的便利性。

另外，本發明所提供之感測平台或檢測方法所使用的奈米金屬粒子，可由本領域習知方法製備，例如，舉例但非限制以檸檬酸鈉還原法製備奈米金粒子，可大幅降低生產成本，有利於商業量產。

【實施方式】

以下係藉由特定的具體實施例說明本發明之實施方式，熟習此技藝之人士可由本說明書所揭示之內容瞭解本發明之其他優點與功效。

於下列實施例中，除非特別敘明，否則所使用之緩衝溶液為包含 50 mM NaCl (購自 USB, Cleveland, USA)、50 mM 之 pH 7.5 之 Tris-HCl (購自 Invitrogen, USA)、5 mM CaCl₂ (購自 Sigma-Aldrich, USA) 及 0.05% 體積百分濃度之 Triton X-100 (購自 Sigma-Aldrich) 之緩衝溶液。

一、感測平台之製備

(1) 奈米金粒子之製備

取 50 mL 之 1 mM 之 HAuCl₄·3H₂O 溶液，以油浴方式加熱至 130°C，於溶液沸騰後立即加入 5 mL 之 38.8 mM 之檸檬酸鈉進行還原反應，當溶液顏色呈紅色後即停止加熱，藉此而獲得奈米金粒子之溶液（奈米金粒子之粒徑約 5-60 奈米）。

(2) 感測平台之製備

以緩衝溶液溶解明膠（購自 Sigma-Aldrich），以製備

濃度為 0.1-0.15% 重量百分濃度之明膠溶液。

將 50 微升(μL)之依前述製備所得之明膠(1 mg/mL)添加至 950 μL 之奈米金粒子(濃度為 5 nM) 該溶液中 (使奈米金粒子溶液與明膠溶液之體積比為 19:1)，迅速混合均勻後，將所得之混合物置於可控溫培養箱以 37°C 震盪反應 2 小時，獲得經明膠修飾之奈米金粒子(即 AuNPs-gelatin)。

接著，於混合物中添加 10 μL 之 1 mM 之 MCH (使前述經明膠修飾之奈米金粒子之溶液與 MCH 溶液之體積比為 100:1)，迅速混合均勻後，將所得混合物置於可控溫培養箱以 37°C 震盪反應 2 小時。

以離心去除未經修飾之奈米金粒子、未反應之明膠及 MCH；收集沈澱物，以緩衝溶液復溶該沈澱物，獲得最高吸收波峰濃度為 $\text{OD}_{525}=1$ 之經明膠及 MCH 經修飾之奈米金粒子 (即 AuNPs/MCH-gelatin)。

將依上述製備所得之 AuNPs/MCH-gelatin 置於掃瞄式電子顯微鏡下觀察，係如第 1 圖所示。第 1A 圖為 AuNPs/MCH-gelatin 之懸浮型式，並未聚集；第 1B 圖為 AuNPs/MCH-gelatin 經第二型基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase-2，簡稱為 MMP-2) 作用後，奈米金粒子之聚集型式(詳細步驟如後述)。

二、感測平台之穩定性測試

(1) 對照組

取 50 μL 的 1 倍濃度的 PBS 緩衝溶液 (包含 137 mM

之 NaCl、2.7 mM 之 KCl、10 mM 之 Na_2HPO_4 、2 mM 之 KH_2PO_4 ，pH 7.4) 加入 200 μL 之 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，置於 37°C 水浴 30 分鐘，利用分光光度計量測波長變化。

(2) 在強酸的條件下

取 50 μL 的 1 莫耳當量 (N) 之鹽酸 (pH 1)，加入 200 μL 之 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，置於 37°C 水浴 30 分鐘，利用分光光度計量測波長變化。

(3) 在強鹼的條件下

取 50 μL 的 1 N 之氫氧化鈉 (pH 12)，加入 200 μL 之 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，置於 37°C 水浴 30 分鐘，利用分光光度計量測波長變化。

(4) 在高鹽度的條件下

取 50 μL 的 10 倍濃度的 PBS 緩衝溶液(包含 1,370 mM 之 NaCl、27 mM 之 KCl、100 mM 之 Na_2HPO_4 、20 mM 之 KH_2PO_4 ，pH 7.4) 加入 200 μL 之 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，置於 37°C 水浴 30 分鐘，利用分光光度計量測波長變化。

結果如第 2 圖所示，相較於對照組，本發明之感測平台於無蛋白酶作用時，在強酸、強鹼、高鹽度的條件下，AuNPs/MCH-gelatin 之最高吸收波長座落於 525 nm，且波形並未有明顯變化，顯示本發明之感測平台即使在極端條件下，AuNPs/MCH-gelatin 仍可維持懸浮，並未產生金粒子聚集，證實本發明之感測平台之高度穩定性。

三、蛋白質水解酶活性檢測

以不同濃度之胰蛋白酶(trypsin)進行檢測。將 1.25×10^3 單位/毫升(U/mL)之胰蛋白酶以十倍序列稀釋方式稀釋至 1.25×10^{-3} U/mL。將序列稀釋之胰蛋白酶各取 50 μ L，加入 200 μ L 之 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，置於 37°C 水浴，反應 10 分鐘後以分光光度計量測波型變化，將各組依胰蛋白酶濃度，由低濃度至高濃度分別標記為 A(對照組，胰蛋白酶之濃度為 0)至 H(胰蛋白酶之濃度為 1.25×10^3 U/mL)。

AuNPs/MCH-gelatin 溶液之顏色變化隨著 A 至 H 之胰蛋白酶濃度逐漸增加，溶液顏色也自 A 所呈現的紅色逐漸轉變為 H 所呈現的紫色，此顏色變化為肉眼直接觀察即可分辨。

分光光度計量測波型變化之結果如第 3A 至第 3H 圖所示，相較於對照組，經胰蛋白酶作用之本發明之感測平台產生波型變化，奈米金粒子之光譜吸收波峰產生紅移現象。

取波長 625 nm 及 525 nm 之測量值的比值作為檢測依據，藉此，可修正因奈米金粒子尺寸變化所造成之波形重疊之誤差，各組之比值 (A_{625}/A_{525}) 如下：A 為 0.2127、B 為 0.2131、C 為 0.2134、D 為 0.2554、E 為 0.4236、F 為 0.5674、G 為 0.6114、H 為 0.6484。該比值與胰蛋白酶之濃度之結果如第 3I 圖所示，其中，於胰蛋白酶之濃度為

1.25×10^{-1} U/mL 至 1.25×10^2 U/mL 時，該波長變化與胰蛋白酶濃度呈正相關。

四、本發明之感測平台於藥物篩檢之應用

已知基質金屬蛋白酶(MMPs)為癌細胞轉移之重要因子，因此 MMPs 活性抑制劑具有抑制癌細胞轉移之功能，可被發展為癌症治療藥物。而 ONO-4817 (購自 Tocris, USA) 為已知之廣效性 MMPs 抑制劑，對各種 MMPs 的酵素抑制常數(K_i)分別為對 MMP-2 為 0.72 nM、對 MMP-3 為 42 nM、對 MMP-7 為 2,500 nM、對 MMP-8 為 1.1 nM、對 MMP-12 為 0.45 nM，對 MMP-13 為 1.1 nM 對 MMP-9 為 2.1 nM。於本實施例中，以 MMP-2 與 ONO-4817 測試本發明之感測平台在藥物篩檢應用的可能性。

(1) MMP-2 酵素活性檢測

將 0.16、0.10、0.08、0.04 及 0.02 U/mL 之 MMP-2 (購自 Sigma-Aldrich, USA) 各取 50 μ L，加入 200 μ L 之 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，置於 37°C 水浴，反應 30 分鐘後以分光光度計量測波長變化，將各組依 MMP-2 濃度，由低濃度至高濃度分別標記為 A(對照組，MMP-2 之濃度為 0)至 F(MMP-2 之濃度為 0.02U)。

結果如第 4A-4F 圖所示，顯示經 MMP-2 作用後，感測平台之奈米金粒子之光譜吸收波型產生紅移現象；其中，各組之 A_{625}/A_{525} 比值如下：A 為 0.2196、B 為 0.2756、C 為 0.3127、D 為 0.3625、E 為 0.4128 及 F 為 0.5035。第

4G 圖顯示了該比值與 MMP-2 濃度之關係。

(2) MMP-2 酵素抑制劑之活性檢測

以 MMP-2 酵素抑制劑 ONO-4817 進行測試。將不同濃度之 ONO-4817 之緩衝溶液分別加入 AuNPs/MCH-gelatin，並將各管 AuNPs/MCH-gelatin 之溶液濃度調整至 $OD_{525}=1$ 。

於 200 μL 之上述 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，加入濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 0.5 μL MMP-2，置於 37°C 水浴中反應 30 分鐘，以分光光度計量測波長變化。

結果如第 5 圖所示，第 5A 圖顯示了經 MMP-2 及 ONO-4817 作用後之感測平台之波型變化；第 5B 圖顯示了比值 (A_{625}/A_{525}) 與 ONO-4817 濃度之關係。

(3) MMP-2 酵素抑制劑之專一性檢測

以 MMPs 抑制劑 ONO-4817 及胰蛋白酶抑制劑 A1AT 進行本發明之感測平台之專一性測試，其中，ONO-4817 無法抑制胰蛋白酶活性，而 A1AT 無法抑制 MMPs 活性。

於 200 μL 之上述 AuNPs/MCH-gelatin 溶液中，分別加入 0.5 μL 之濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 MMP-2 或胰蛋白酶，並於溶液中添加高濃度蛋白質酶抑制劑 ONO-4817 或 A1AT (濃度為 10 mM)，置於 37°C 水浴中反應 30 分鐘，以分光光度計量測波長變化，並取波長 625 nm 及 525 nm 之測量值的比值 (A_{625}/A_{525})，結果如第 6 圖所示。

第 4 圖及第 5 圖之結果證實，當僅有 MMP-2 存在於待測樣本中時，AuNPs/MCH-gelatin 所帶有的受質(即明膠)

因與 MMP-2 作用，而與奈米金粒子分離，使奈米金粒子彼此間的距離可縮短，加上奈米金粒子所帶有的 MCH 的誘導作用，使得奈米金粒子聚集，造成波型改變。然而，當基質金屬蛋白酶抑制劑 ONO-4817 存在於待測樣本中時，ONO-4817 可抑制 MMP-2 之作用，故 AuNPs/MCH-gelatin 所帶有的受質不會被 MMP-2 分解，因此，奈米金粒子仍維持懸浮狀態，並未聚集，故不會造成檢測平台之波型變化。因此，本發明之檢測平台可用於篩檢基質金屬蛋白酶之抑制劑。

第 6 圖之結果證實，當基質金屬蛋白酶抑制劑 ONO-4817 存在於待測樣本中時，ONO-4817 可抑制 MMP-2 之作用，故 AuNPs/MCH-gelatin 所帶有的受質不會被 MMP-2 分解，因而吸收波長比值 (A_{625}/A_{525}) 與對照組相比差異不大。然而，當 A1AT 存在於待測樣本中時，由於 MMP-2 活性不受 A1AT 抑制，因此 MMP-2 仍能降解 AuNPs/MCH-gelatin 所帶有的受質，進而導致奈米金粒子聚集，因而吸收波長比值 (A_{625}/A_{525}) 明顯增加。

同理，A1AT 可有效抑制胰蛋白酶活性，因此，當 A1AT 與胰蛋白酶同時存在於待測樣本中時， A_{625}/A_{525} 比值與對照組相似；而加入 ONO-4817 時，由於胰蛋白酶活性不受 ONO-4817 抑制，因此， A_{625}/A_{525} 比值與僅加入胰蛋白酶者相似，皆明顯增加。證實 AuNPs/MCH-gelatin 感測平台應用於蛋白質酶抑制劑的篩選上確實具備專一性。

綜上述，本發明之檢測平台可應用於藥物篩檢。

上述實施例僅例示性說明本發明之組成物與製備方法，而非用於限制本發明。任何熟習此項技藝之人士均可在不違背本發明之精神及範疇下，對上述實施例進行修飾與改變。因此，本發明之權利保護範圍如後述申請專利範圍所載。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明感測平台以掃描式電子顯微鏡所攝圖片，其中，第 1A 圖為經明膠及 MCH 修飾之奈米金粒子 AuNPs/MCH-gelatin 之懸浮型式，第 1B 圖為 AuNPs/MCH-gelatin 經 MMP-2 作用後奈米金粒子聚集之型式；

第 2 圖為本發明感測平台在不同環境條件下之穩定性測試結果，其中，係測定 AuNPs/MCH-gelatin 溶液在不同環境條件下於 400 nm-700 nm 吸收波形，▲為對照組，△為強酸條件，○為強鹼條件，●為高鹽條件；

第 3A 至 3H 圖為本發明感測平台對不同濃度之胰蛋白酶活性檢測之呈色結果，其中，第 3A 圖為對照組，第 3B 圖為 1.25×10^{-3} U 之胰蛋白酶，第 3C 圖為 1.25×10^{-2} U 之胰蛋白酶，第 3D 圖為 1.25×10^{-1} U 之胰蛋白酶，第 3E 圖為 1.25×10^0 U 之胰蛋白酶，第 3F 圖為 1.25×10^1 U 之胰蛋白酶，第 3G 圖為 1.25×10^2 U 之胰蛋白酶，第 3H 圖為 1.25×10^3 U 之胰蛋白酶；

第 3I 圖為於吸收波長 625 nm 及 525 nm 之測量值的比值 (A_{625}/A_{525}) 與胰蛋白酶濃度之關係圖；

第 4A 至 4F 圖為本發明感測平台對不同濃度之 MMP-2 活性檢測結果，其中，第 4A 圖為對照組，第 4B 圖為 0.02 U 之 MMP-2，第 4C 圖為 0.04 U 之 MMP-2，第 4D 圖為 0.08 U 之 MMP-2，第 4E 圖為 0.10 U 之 MMP-2，第 4F 圖為 0.16 U 之 MMP-2；

第 4G 圖為於吸收波長 625 nm 及 525 nm 之測量值的比值與 MMP-2 濃度之關係圖；

第 5A 圖為 MMPs 活性抑制劑 ONO-4817 用於本發明感測平台中抑制 MMP-2 活性之檢測結果，其中，△為對照組，▲為 0.125 nM 之 ONO-4817，○為 0.5 nM 之 ONO-4817，●為 2 nM 之 ONO-4817，□為 8 nM 之 ONO-4817，■為 32 nM 之 ONO-4817，◇為 128 nM 之 ONO-4817，◆為 512 nM 之 ONO-4817；

第 5B 圖為於吸收波長 625 nm 及 525 nm 之測量值的比值與 ONO-4817 濃度之關係圖；以及

第 6 圖為蛋白酶活性抑制劑專一性之檢測結果，係於吸收波長 625 nm 及 525 nm 測量值的比值 (A_{625}/A_{525})。

【主要元件符號說明】

無。

七、申請專利範圍：

1. 一種感測平台，包括

複數奈米金屬粒子；

聚集誘導子，包括兩個彼此不同之官能基，且經由該聚集誘導子之一該官能基與該奈米金屬粒子接觸；以及

辨識分子，係與該奈米金屬粒子結合並經由該辨識分子與欲辨識之標的物作用以辨識該標的物，

其中，該聚集誘導子之另一未與該奈米金屬粒子接觸之官能基係用以於該標的物與該辨識分子作用後，誘導該複數奈米金屬粒子聚集。

2. 如申請專利範圍第 1 項之感測平台，其中，該奈米金屬粒子係包括一種或多種選自由金、銀、銅、鋁、鐵或鎳之元素。

3. 如申請專利範圍第 2 項之感測平台，其中，該奈米金屬粒子之金屬係為金。

4. 如申請專利範圍第 1 項之感測平台，其中，該奈米金屬粒子之粒徑為 5 至 60 奈米(nm)。

5. 如申請專利範圍第 1 項之感測平台，其中，該聚集誘導子具有第一官能基與不同於第一官能基之第二官能基，該第一官能基及第二官能基皆係選自硫基(-S)、羥基(-OH)、硫醇基(-SH)、胺基(-NH₂)及羧基(-COOH)所組成群組之一者。

6. 如申請專利範圍第 1 項之感測平台，其中，該聚集誘

導子為 6-巰基己-1-醇[HS(CH₂)₆OH]。

7. 如申請專利範圍第 1 項之感測平台，其中，該辨識分子係選自由抗體、抗原、酵素、酵素受質、核酸、胺基酸、蛋白質、脂質、醣類、脂多醣及醣蛋白所組成群組之一者。
8. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之感測平台之方法，係包括下列步驟：

添加以緩衝溶液作為溶劑之辨識分子溶液至奈米金屬粒子溶液中，予以震盪俾使辨識分子與該奈米金屬粒子結合以得到混合物；以及

於所得混合物中添加聚集誘導子溶液，並予以震盪使該聚集誘導子溶液中之聚集誘導子的其中一官能基與該奈米金屬粒子接觸以得到包括經該辨識分子與該聚集誘導子所修飾之奈米金屬粒子的感測平台。
9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中，該奈米金屬粒子係包括一種或多種選自由金、銀、銅、鋁、鐵或鎳之元素。
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中，該奈米金屬粒子係為金。
11. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中，該辨識分子係選自由抗體、抗原、酵素、酵素受質、核酸、胺基酸、蛋白質、脂質、醣類、脂多醣及醣蛋白所組成群組之一者。
12. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中，該聚集誘導子

具有第一官能基，以及不同於第一官能基之第二官能基，該第一官能基與第二官能基皆係選自硫基(-S)、羥基(-OH)、硫醇基(-SH)、胺基(-NH₂)及羧基(-COOH)所組成之群組之一者。

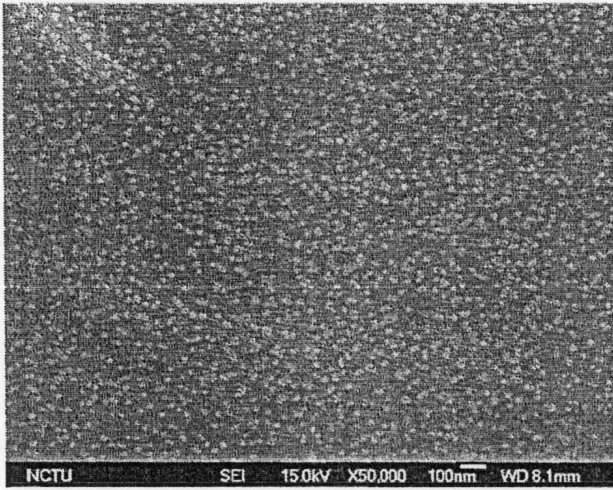
13. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中，該奈米金屬粒子溶液之濃度為 0.5-50 nM，以及該辨識分子溶液之濃度為 0.1-10 mg/mL。
14. 如申請專利範圍第 13 項之方法，其中，該奈米金屬粒子溶液與該辨識分子溶液之體積比為 10-30：1。
15. 如申請專利範圍第 8、13 及 14 項中任一項之方法，其中，該聚集誘導子溶液之濃度為 0.1-10 mM。
16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中，該聚集誘導子溶液與該辨識分子與奈米金屬粒子之混合物溶液之體積比為 1：60-200。
17. 一種於待測溶液中檢測標的物存在之方法，係包括下列步驟：

提供經聚集誘導子和辨識分子修飾之奈米金屬粒子，其中，該聚集誘導子包括兩個彼此不同之官能基，以經由該聚集誘導子其中之一官能基與該奈米金屬粒子接觸，俾在該辨識分子與該奈米金屬粒子結合後，令該辨識分子與欲辨識之標的物作用以辨識該標的物，且該聚集誘導子之另一未與該奈米金屬粒子接觸之官能基係用以於該標的物與該辨識分子作用後，誘導該複數奈米金屬粒子聚集；

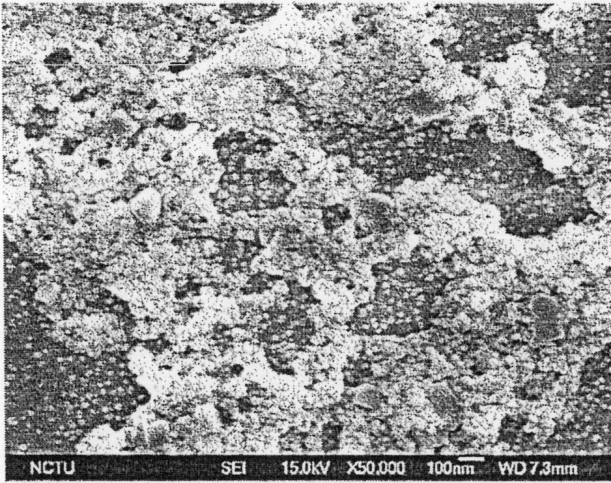
將待測溶液與該奈米金屬粒子接觸；以及

測定該待測溶液之光學變化，以於該辨識分子與該標的物專一性作用後，令聚集誘導子誘導奈米金屬粒子之聚集而產生光學性質之改變。

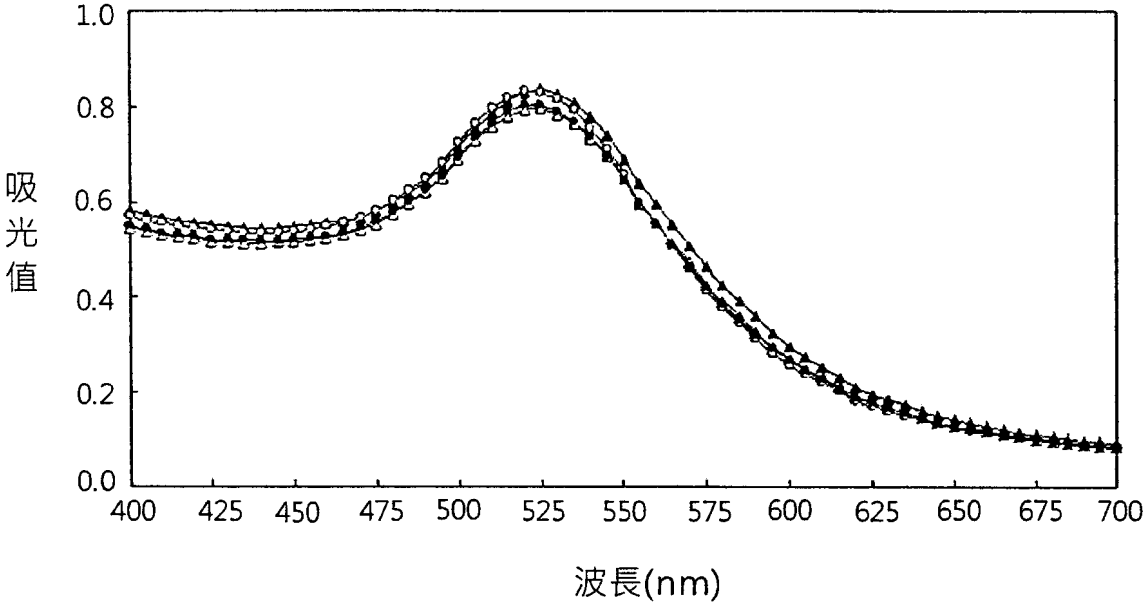
18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中，該光學變化係以肉眼及/或以分光光度計測定。
19. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中，該光學變化係為顏色變化。
20. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中，該奈米金屬粒子係包括一種或多種選自由金、銀、銅、鋁、鐵或鎳之元素。
21. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中，該奈米金屬粒子為金。
22. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中，該聚集誘導子具有第一官能基與不同於第一官能基之第二官能基，該第一官能基與第二官能基皆係選自硫基(-S)、羥基(-OH)、硫醇基(-SH)、胺基(-NH₂)及羧基(-COOH)所組成之群組。
23. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中，該聚集誘導子為 6-巰基己-1-醇[HS(CH₂)₆OH]。
24. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中，該辨識分子係選自由抗體、抗原、酵素、酵素受質、核酸、胺基酸、蛋白質、脂質、醣類、脂多醣及醣蛋白所組成群組之一者。



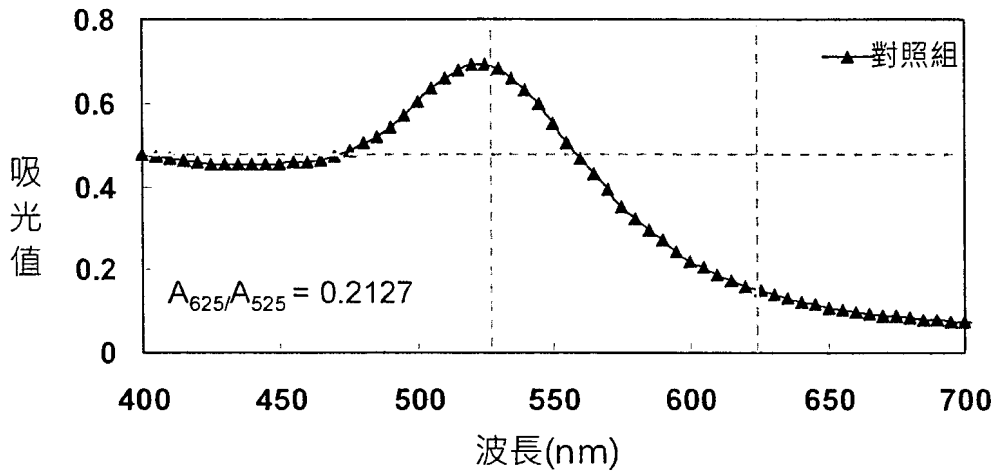
第 1A 圖



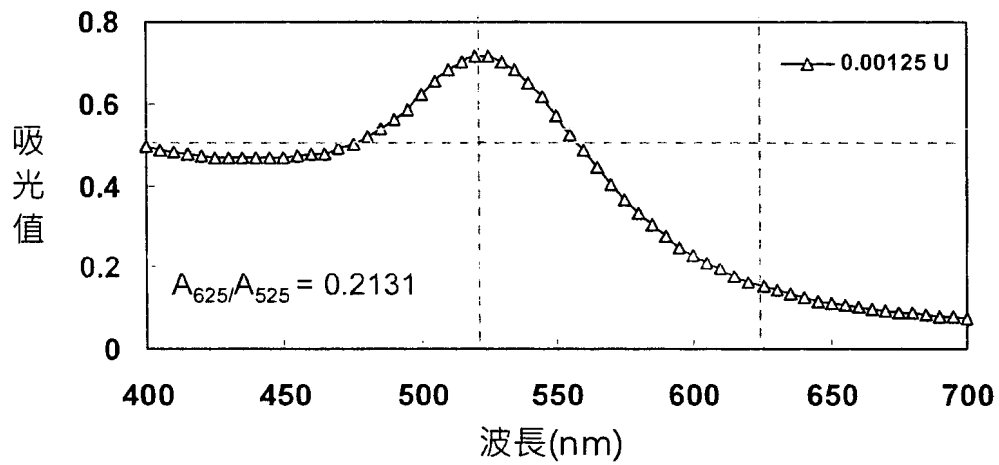
第 1B 圖



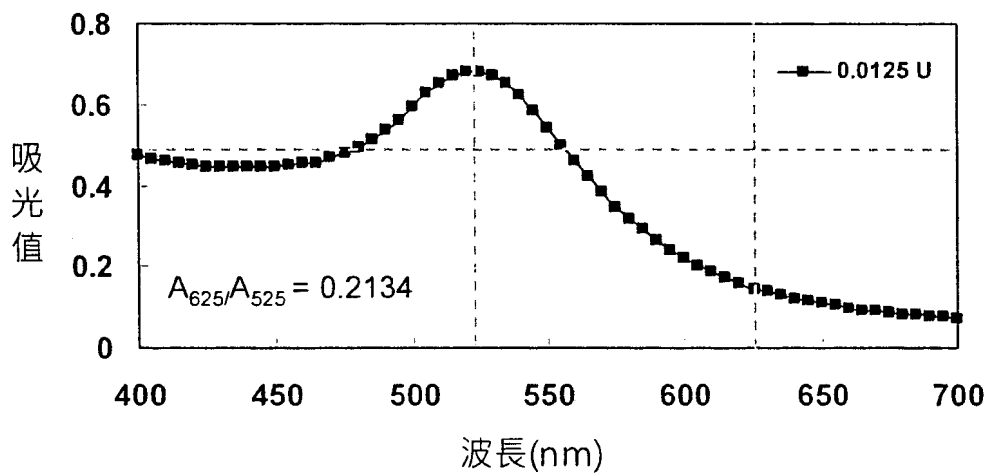
第 2 圖



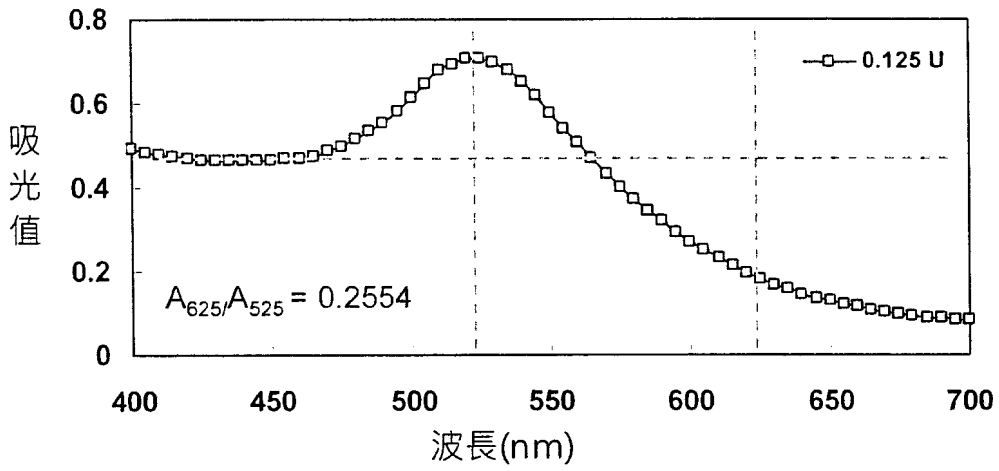
第 3A 圖



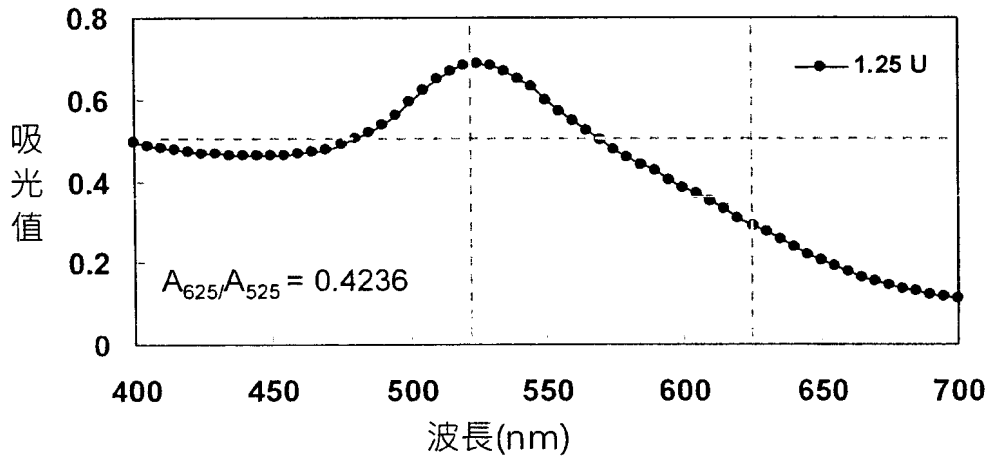
第 3B 圖



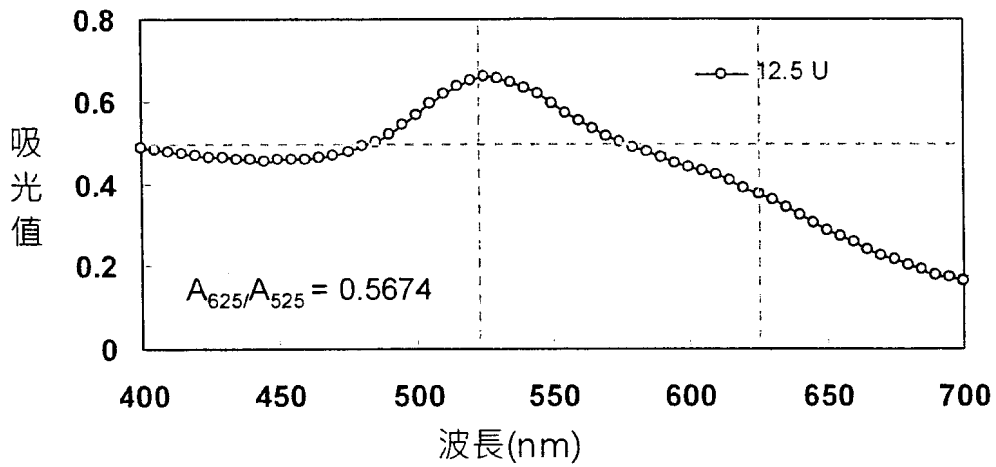
第 3C 圖



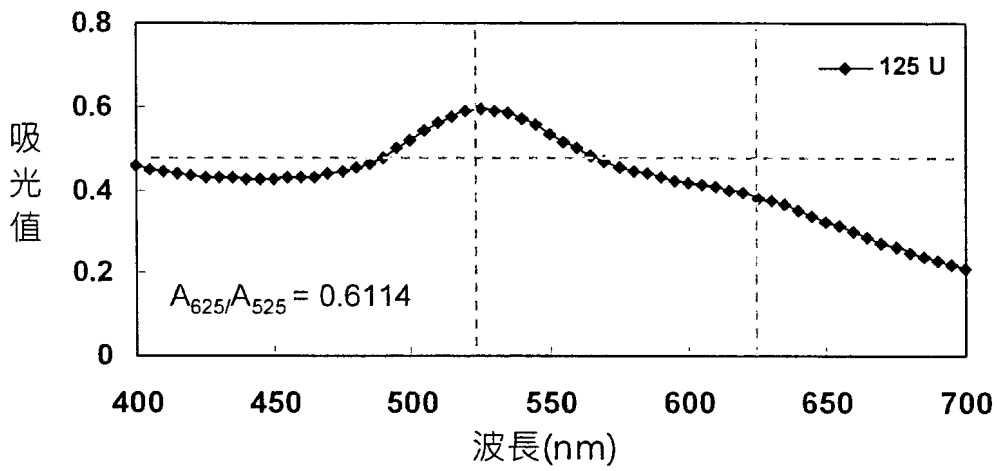
第 3D 圖



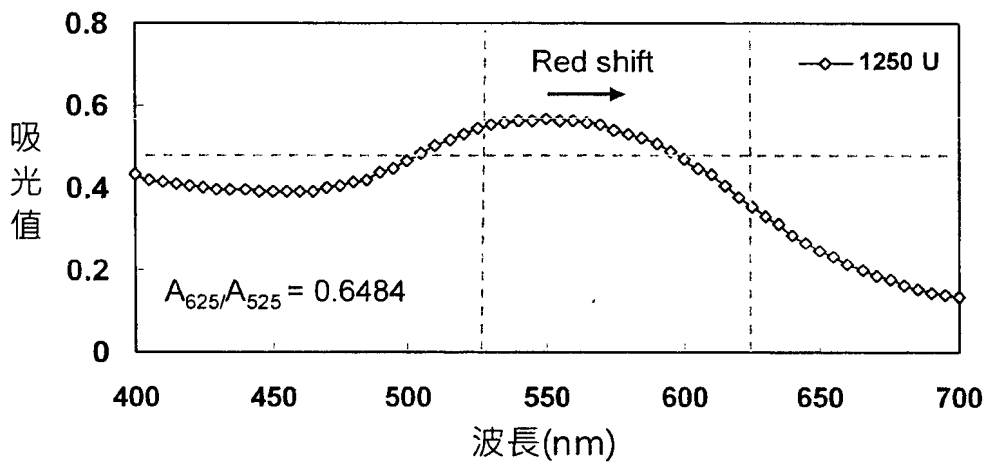
第 3E 圖



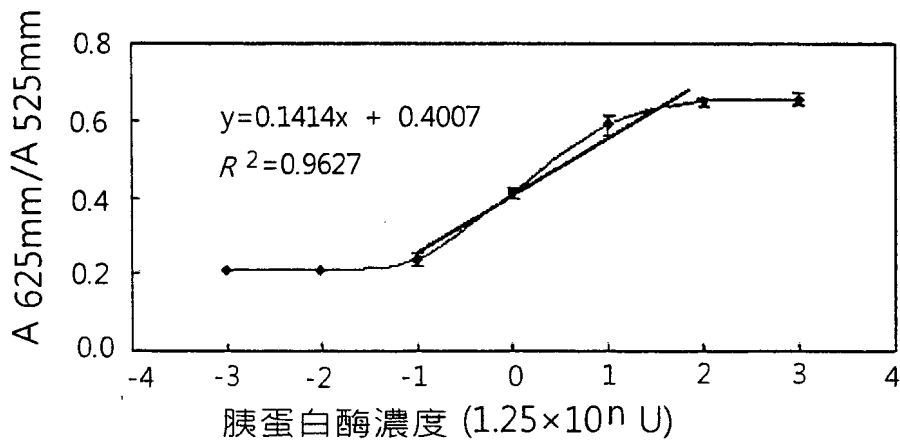
第 3F 圖



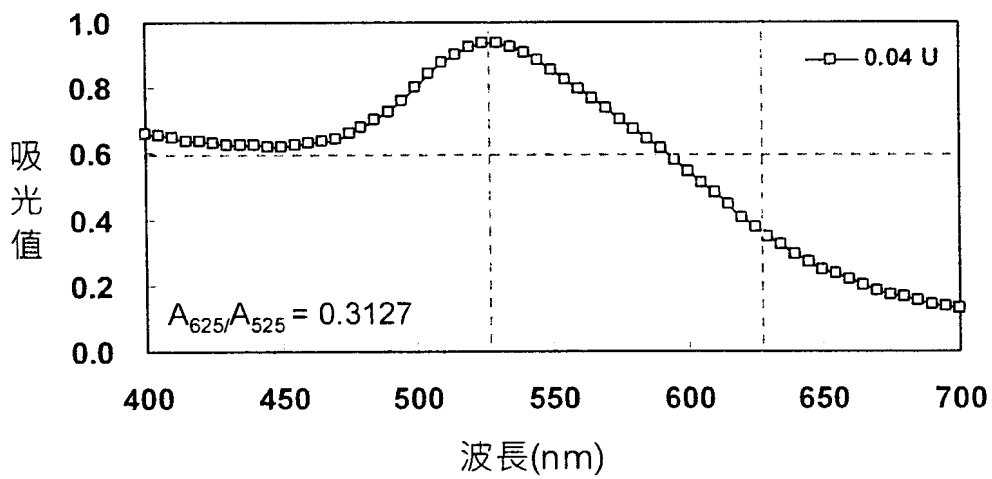
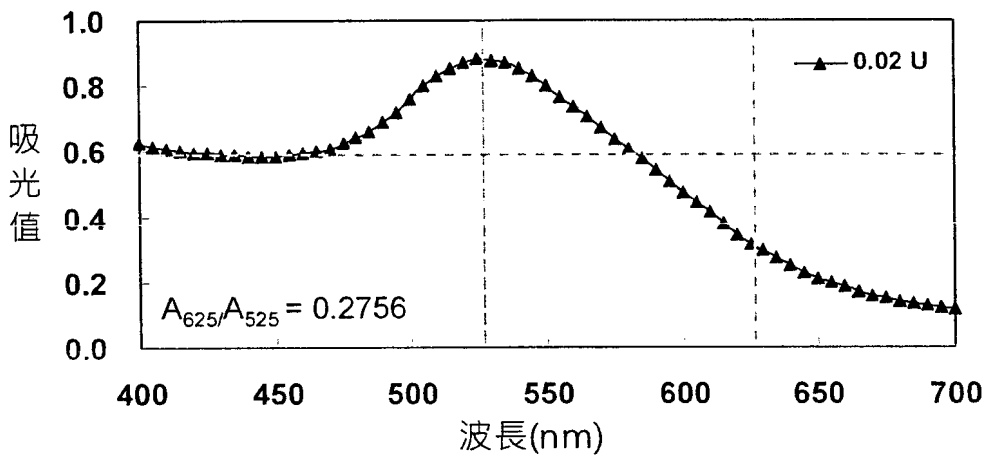
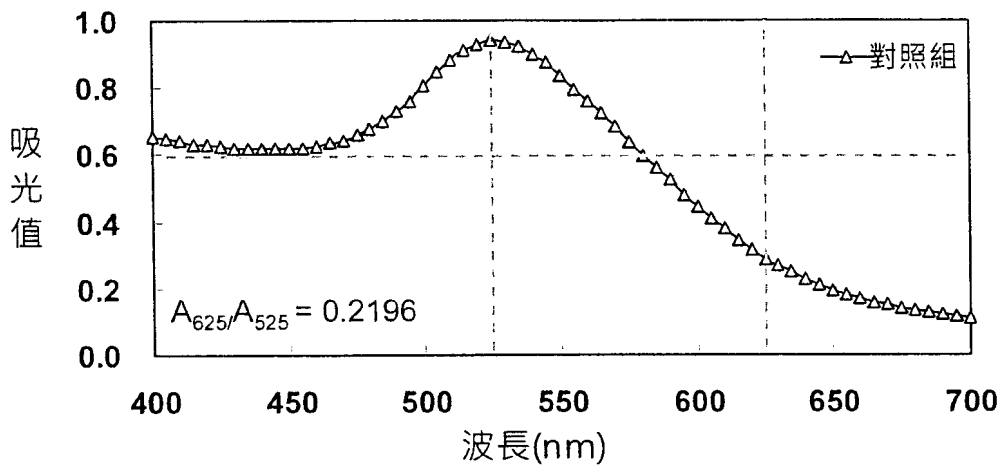
第 3G 圖

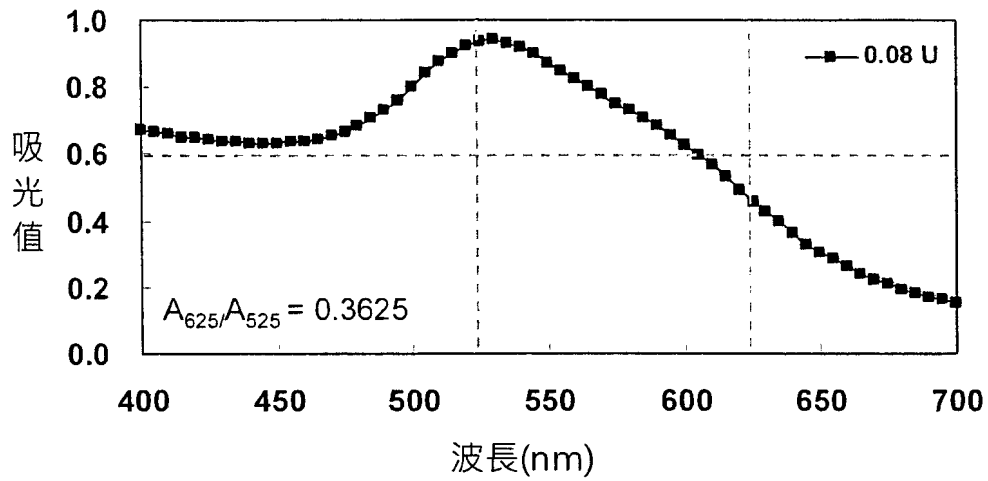


第 3H 圖

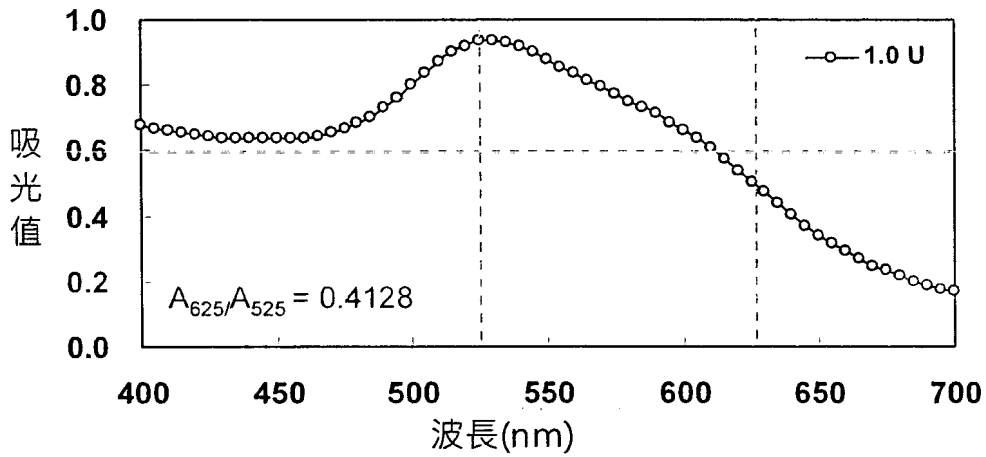


第 3I 圖

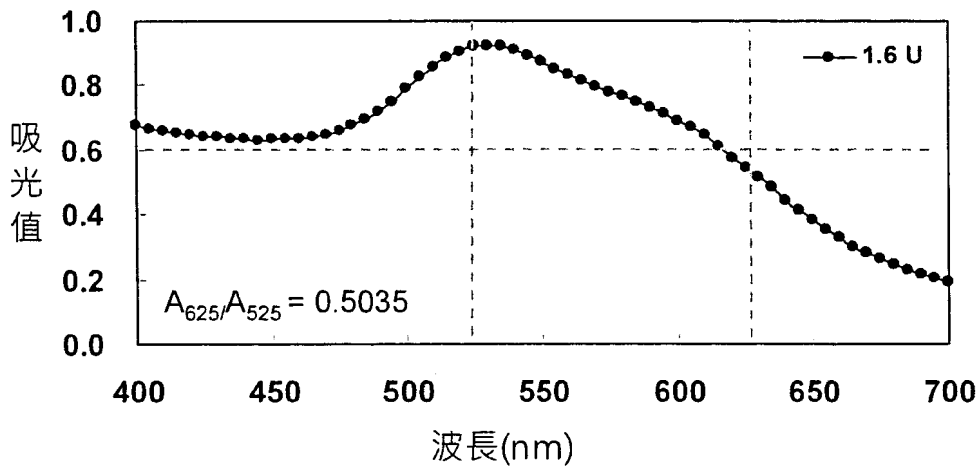




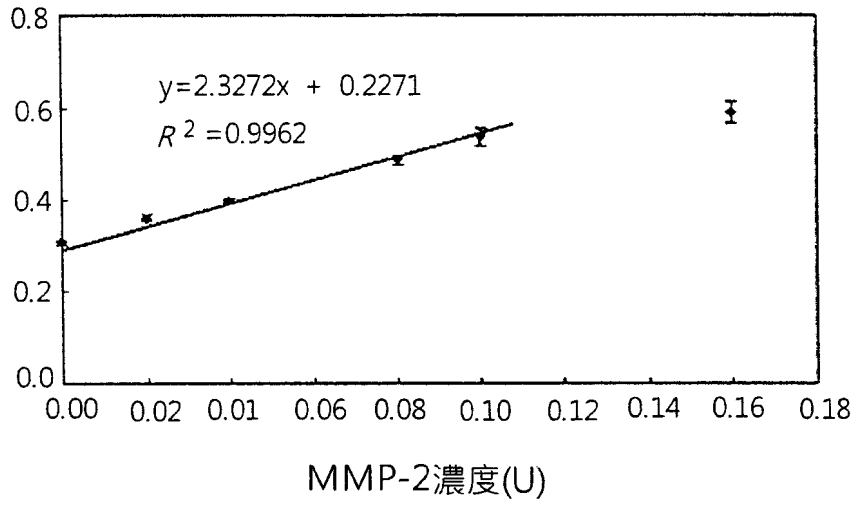
第 4D 圖



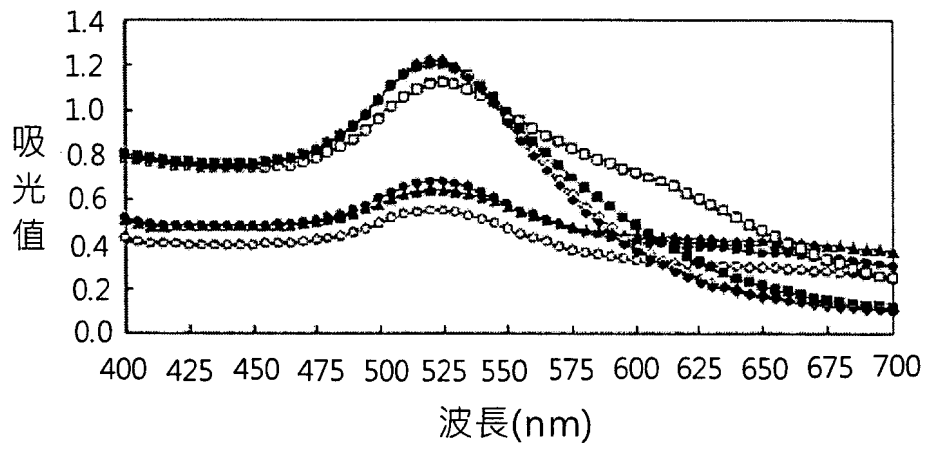
第 4E 圖



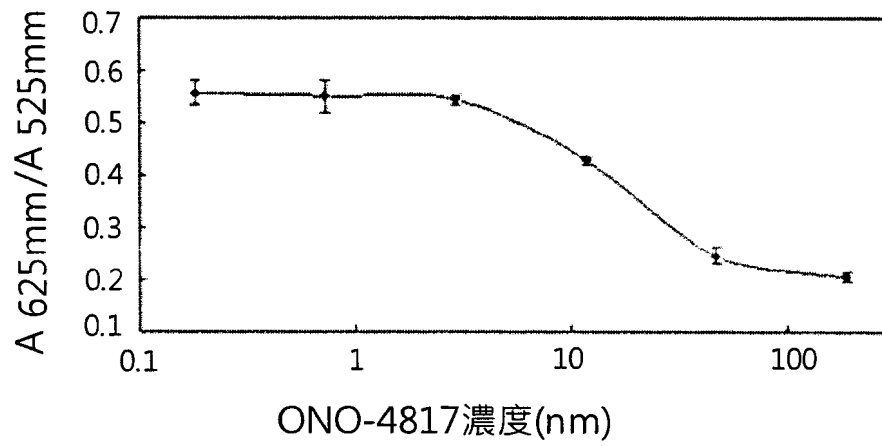
第 4F 圖



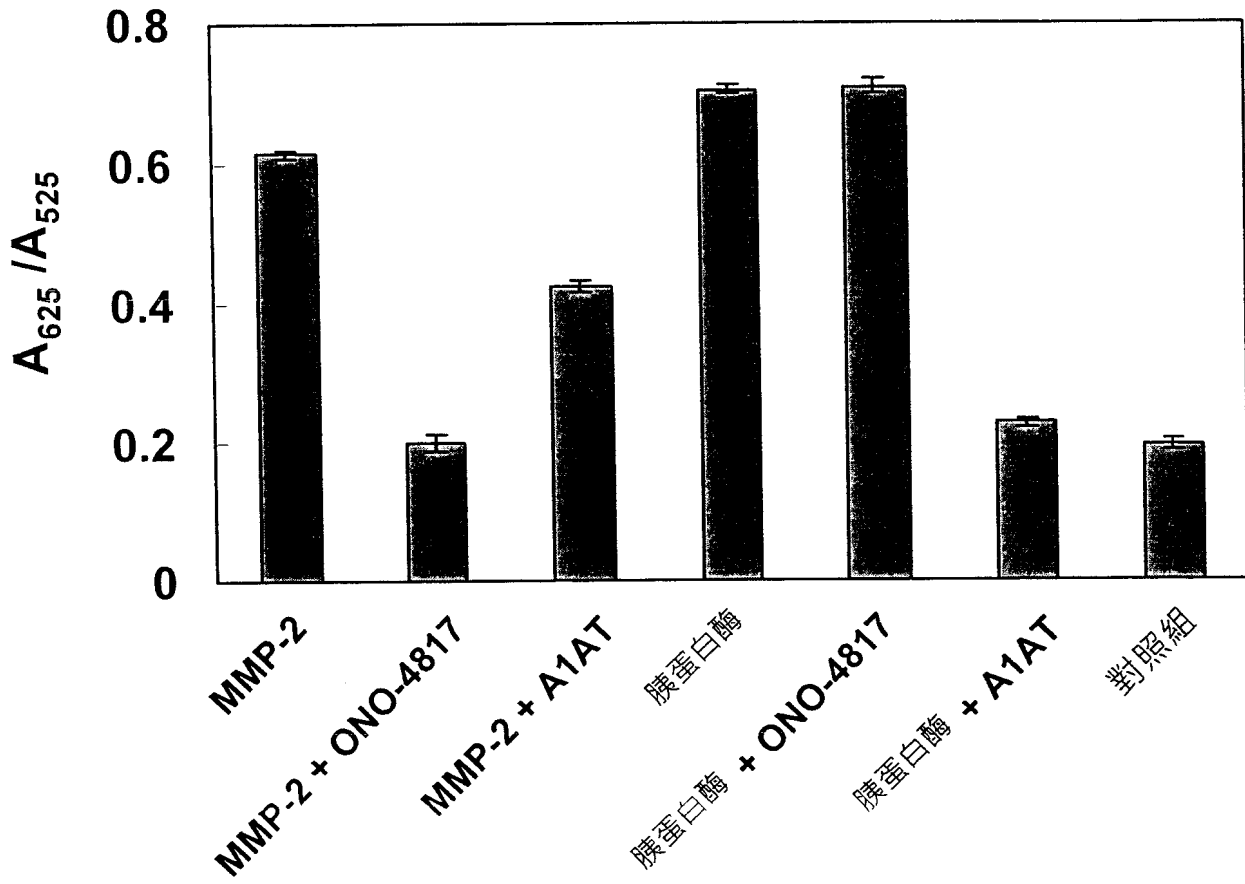
第 4G 圖



第 5A 圖



第 5B 圖



第 6 圖