



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I500769 B

(45) 公告日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 21 日

(21) 申請案號：102149086

(22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 30 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/37 (2006.01)

G01N33/68 (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, CHIHSHENG (TW) ; 葉芳沅 YEH, FANGYUAN (TW) ; 曾一華

TSENG, IHUA (TW)

(74) 代理人：蔡坤財；李世章

(56) 參考文獻：

US 20110014125A1

US 20110213121A1

US 20110293529A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：6 共 31 頁

(54) 名稱

用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針及其應用

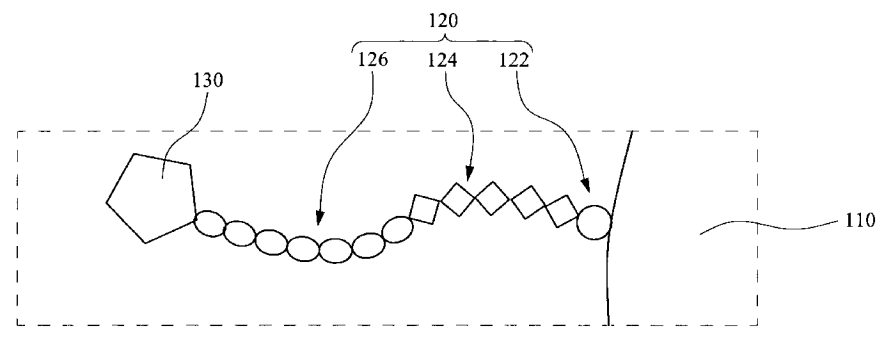
NANOPARTICLE FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING PROTEASE ACTIVITY AND USE THEREOF

(57) 摘要

一種用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，包含一奈米粒子；複數個功能性短鏈；以及複數個螢光基團。每一功能性短鏈包含：一定位段，與奈米粒子鍵結，以將功能性短鏈固定於奈米粒子上；一負電段，與定位段鍵結；以及一受質段，與負電段鍵結，且受質段可被蛋白酶辨識水解。其中，螢光基團與受質段鍵結，且奈米粒子對螢光基團具有螢光淬熄效應。

A nanoparticle fluorescent probe for detecting protease activity is provided, and the nanoparticle fluorescent probe includes a nanoparticle, a plurality of functional chains, and a plurality of fluorescent groups. Each functional chain includes a positioning segment binding to the nanoparticle to anchor the functional chain to the nanoparticle, a negatively charged segment binding to the positioning segment, and a substrate segment binding to the negatively charged segment, wherein the substrate segment can be identified and hydrolyzed by the protease. The fluorescent group binds to the substrate segment, and the nanoparticle has a fluorescence quenching effect on the fluorescent group.

102



- 102 . . . 奈米粒子螢光探針局部放大圖
- 110 . . . 奈米粒子
- 120 . . . 功能性短鏈
- 122 . . . 定位段
- 124 . . . 負電段
- 126 . . . 受質段
- 130 . . . 螢光基團

第 1B 圖

發明摘要

※申請案號：102149086

※申請日：107 12 30

※IPC 分類：

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針及其應用

NANOPARTICLE FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING
PROTEASE ACTIVITY AND USE THEREOF

【中文】

一種用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，包含一奈米粒子；複數個功能性短鏈；以及複數個螢光基團。每一功能性短鏈包含：一定位段，與奈米粒子鍵結，以將功能性短鏈固定於奈米粒子上；一負電段，與定位段鍵結；以及一受質段，與負電段鍵結，且受質段可被蛋白酶辨識水解。其中，螢光基團與受質段鍵結，且奈米粒子對螢光基團具有螢光淬熄效應。

【英文】

A nanoparticle fluorescent probe for detecting protease activity is provided, and the nanoparticle fluorescent probe includes a nanoparticle, a plurality of functional chains, and a plurality of fluorescent groups. Each functional chain includes a positioning segment

binding to the nanoparticle to anchor the functional chain to the nanoparticle, a negatively charged segment binding to the positioning segment, and a substrate segment binding to the negatively charged segment, wherein the substrate segment can be identified and hydrolyzed by the protease. The fluorescent group binds to the substrate segment, and the nanoparticle has a fluorescence quenching effect on the fluorescent group.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1B ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

102：奈米粒子螢光探針局部放大圖

110：奈米粒子

120：功能性短鏈

122：定位段

124：負電段

126：受質段

130：螢光基團

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

【發明名稱】(中文/英文)

用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針及其應用

NANOPARTICLE FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING
PROTEASE ACTIVITY AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種奈米粒子螢光探針，特別是有關於一種用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針。

【先前技術】

【0002】 生物檢測技術是以測定生物或生物性材料對外來物的刺激之反應，其應用範圍廣泛，可促進醫藥、生醫檢測、環境工程、食品分析與生物技術等領域的發展。習知常用的生物檢測技術，例如呈色法或酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunoassay, ELISA)，不是靈敏度不佳，就是檢測時間過久。

【0003】 目前已有許多將奈米粒子用於生物分子檢測之技術，其中多為微生物體、核酸、抗體或抗原等，以奈米粒子物理特性用於蛋白酶活性檢測的研究，則為較新發展之技術。奈米粒子可依欲檢測之蛋白酶與不同受質鍵結蛋白質或胜肽鏈，用以檢測蛋白酶的活性。奈米粒子具有表面電漿共振(Surface plasmon resonance, SPR)的特性，不同大小形狀或聚集狀況的奈米粒子會有不同的吸收光譜，可作

為檢測上的依據。此外，某些奈米粒子具有特殊的光學性質，使其可以抑制或增加特定螢光分子之螢光強度，因而應用於螢光的檢測方法中。然而，不論是利用奈米粒子的 SPR 特性或是特殊光學性質，這兩種方法所要共同克服的問題是如何有效避免奈米粒子受檢測反應溶液的離子或 pH 值影響，而於溶液中產生聚集，進而影響檢測的結果。此外，奈米粒子通常需被固定於檢測基台上，其製備過程繁複，生產成本高，且未必可以得到高靈敏度的檢測結果或減少檢測時間。

【0004】因此，目前需要一種檢測蛋白酶活性的工具，其可解決上述問題，並可利用於醫療診斷領域。

【發明內容】

【0005】本發明之主要目的係提供一種用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，包含一奈米粒子；複數個功能性短鏈；以及複數個螢光基團。每一功能性短鏈包含：一定位段，與奈米粒子鍵結，以將功能性短鏈固定於奈米粒子上；一負電段，與定位段鍵結；以及一受質段，與負電段鍵結，且受質段可被蛋白酶辨識水解。其中，螢光基團與受質段鍵結，且奈米粒子對螢光基團具有螢光淬熄效應。

【0006】根據本發明一實施例，奈米粒子之粒徑大小約為 5~50nm。

【0007】根據本發明一實施例，奈米粒子為奈米金粒子、奈米銀粒子、奈米氧化鐵粒子或上述任一組合。

【0008】 根據本發明一實施例，奈米粒子為奈米金粒子。

【0009】 奈米粒子與定位段間的鍵結關係可依據奈米粒子的種類選擇不同的定位段而改變。根據本發明一實施例，奈米金粒子與定位段以金硫鍵鍵結，且定位段為一半胱胺酸(Cysteine, Cys)。

【0010】 根據本發明一實施例，負電段包含至少一次負電段，且次負電段為帶有負電荷的物質，其中次負電段可視實際情況調整為帶有不同負電量之不同物質。

【0011】 根據本發明一實施例，負電段包含 4~7 個次負電段，較佳為 5~6 個次負電段，且此些次負電段可為天門冬胺酸(Aspartic acid, Asp)、麩胺酸(Glutamic acid, Glu)或其組合。

【0012】 根據本發明另一實施例，負電段包含 12~21 個次負電段，較佳為 15~18 個次負電段，且此些次負電段為去氧核糖核酸，由去氧核糖核酸提供負電性。

【0013】 根據本發明一實施例，蛋白酶為胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)，受質段包含 SEQ ID NO: 1 中至少三個連續胺基酸，且至少一個胺基酸為白胺酸(Leucine, Leu)。

【0014】 根據本發明一實施例，螢光基團為異硫氰酸螢光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、Cyanine 3 (Cy3)、Cyanine 5 (Cy5)或 Texas red。

【0015】 本發明之另一態樣係提供一種檢測疾病的套組，包含上述之奈米粒子螢光探針，藉由檢測蛋白酶的活性，以診斷與蛋白酶相關之疾病。

【0016】 根據本發明一實施例，當檢測的蛋白酶為胰凝乳蛋白酶時，可用於診斷的疾病為急性胰臟炎、慢性胰臟炎、胰外分泌不全症或胰臟癌。根據本發明另一實施例，套組所使用之樣品係來自糞便檢體。

【0017】 本發明之又一態樣係提供一種監控平台，包含上述之奈米粒子螢光探針，用以檢測胰凝乳蛋白酶活性，進行膽胰腸相關手術時，經常會發生胰、腸液滲漏，而滲漏液中蛋白酶可辨識水解奈米粒子螢光探針，並產生螢光，如此可以即時監控胰、腸液滲漏的情形。

【0018】 本發明之又一態樣係提供一種藥物篩選平台，包含上述之奈米粒子螢光探針，藉由檢測蛋白酶活性，以篩選出可抑制或促進蛋白酶活性的藥物。

【0019】 本發明之奈米粒子螢光探針利用特殊設計之功能性短鏈做為生物辨識元件用以修飾奈米粒子，可提升生物檢測之靈敏度及穩定性。

【圖式簡單說明】

【0020】 為使本發明之特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第 1A 及 1B 圖分別為本發明一實施例之奈米粒子螢光探針的示意圖及其局部放大圖。

第 2A 及 2B 圖分別為本發明一實施例之奈米粒子螢光探針的製程示意圖及其用於蛋白酶活性檢測原理示意圖。

第 3 圖為本發明一實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測

不同濃度之胰凝乳蛋白酶的螢光強度變化與時間關係圖。

第 4 圖為本發明一實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測胰凝乳蛋白酶的螢光強度變化與蛋白酶濃度關係圖。

第 5 圖為本發明一實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測不同酵素的螢光強度變化與蛋白酶濃度關係圖。

第 6 圖為本發明一實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測小鼠糞便檢體中之胰凝乳蛋白酶的含量變化與時間關係圖。

【實施方式】

【0021】為了使本揭示內容的敘述更加詳盡與完備，下文將參照附隨圖式來描述本發明之實施態樣與具體實施例；但這並非實施或運用本發明具體實施例的唯一形式。以下所揭露的各實施例，在有益的情形下可相互組合或取代，也可在一實施例中附加其他的實施例，而無須進一步的記載或說明。

【0022】習知的奈米探針並未採用間隔物或使用中性物質作為間隔物，容易造成受質於奈米粒子表面的鍵結不平均，而受質高負載的部分會形成立體障礙，使蛋白酶不易與受質反應，進而降低奈米探針的靈敏度。此外，進行檢測時，習知的奈米探針易受反應溶液中離子的誘發或 pH 值的影響而產生聚集，進而影響檢測的結果。為避免奈米粒子聚集影響檢測結果，需另加穩定劑。

【0023】本發明之奈米粒子螢光探針採用具有特殊設計的

功能性短鏈，利用功能性短鏈中之負電段作為間隔物，可提升奈米粒子螢光探針的靈敏度及穩定性。

【0024】請同時參照第 1A 及 1B 圖，其分別為本發明一實施例之奈米粒子螢光探針 100 的示意圖及其局部放大圖 102。奈米粒子螢光探針 100 包含一奈米粒子 110；複數個功能性短鏈 120；以及複數個螢光基團 130。每一功能性短鏈 120 包含：一定位段 122，與奈米粒子 110 鍵結，以將功能性短鏈 120 固定於奈米粒子 110 上；一負電段 124，與定位段 122 鍵結；以及一受質段 126，與負電段 124 鍵結，且受質段 126 可被蛋白酶(未繪示)辨識並水解。其中，螢光基團 130 與受質段 126 鍵結，且奈米粒子 110 對螢光基團 130 具有螢光淬熄效應。

【0025】在一實施方式中，奈米粒子 110 為奈米金粒子，與定位段 122 以金硫鍵鍵結，且定位段 122 為一半胱胺酸(Cysteine, Cys)。半胱胺酸具有硫醇基(-SH)，以金硫鍵自組裝(Self-assembly)的方式將功能性短鏈 120 固定於奈米金粒子表面。由於半胱胺酸位於功能性短鏈 120 之端點，可確保功能性短鏈修飾的單一方向性。

【0026】值得注意的是，負電段中之次負電段可視實際情況調整為帶有不同負電量之不同物質，並藉由調整次負電段的數目以調控負電段的總負電量，進而調控功能性短鏈於奈米粒子表面的分散性。

【0027】在一實施方式中，負電段 124 具有 5 個次負電段，且為天門冬胺酸(Aspartic acid, Asp)、麩胺酸(Glutamic acid,

Glu)或其組合。舉例來說，當負電段 124 包含一種胺基酸，其組成可為 5 個天門冬胺酸或 5 個麩胺酸；當負電段 124 包含兩種胺基酸，其組成可為任意排列之 4 個天門冬胺酸和 1 個麩胺酸、3 個天門冬胺酸和 2 個麩胺酸、2 個天門冬胺酸和 3 個麩胺酸或 1 個天門冬胺酸和 4 個麩胺酸。利用負電段 124 作為間隔物，將受質段 126 延伸出奈米粒子 110 表面。此外，負電段 124 間的負電性互斥力，使功能性短鏈 120 可平均分散於奈米粒子 110 表面，降低奈米粒子 110 表面的立體障礙。另，負電段 124 的負電性亦可提高奈米粒子 110 間的靜電互斥力，以避免奈米粒子 110 產生聚集。奈米粒子螢光探針 100 用於生物檢測可提升其靈敏度及穩定性。

【0028】本發明之用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，其中受質段之序列可依欲檢測之蛋白酶變化。根據本發明一實施例，蛋白酶為胰凝乳蛋白酶，其可辨識之切位為白胺酸(Leucine, Leu)。在一實施方式中，受質段包含 SEQ ID NO: 1 中至少三個連續胺基酸。舉例來說，當受質段具有三個胺基酸時，其序列可為 Gly-Pro-Leu、Pro-Leu-Gly、Leu-Gly-Leu、Gly-Leu-Ala 或 Leu-Ala-Arg；當受質段具有四個胺基酸時，其序列為 Gly-Pro-Leu-Gly、Pro-Leu-Gly-Leu、Leu-Gly-Leu-Ala 或 Gly-Leu-Ala-Arg；當受質段具有五個胺基酸時，其序列為 Gly-Pro-Leu-Gly-Leu、Pro-Leu-Gly-Leu-Ala 或 Leu-Gly-Leu-Ala-Arg；當受質段具有六個胺基酸時，其序

列 為 Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala 或 Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg；當受質段具有七個胺基酸時，其序列為 Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg。

【0029】奈米粒子 110 對螢光基團 130 具有螢光淬熄效應，當具有螢光基團 130 的功能性短鏈 120 與奈米粒子 110 鍵結時，由於螢光基團 130 與奈米粒子 110 距離近，並位於奈米粒子 110 的抑制範圍內，因而偵測不到螢光基團 130 的螢光強度，故此時奈米粒子螢光探針 100 不帶有螢光反應。

【0030】請同時參照第 2A 及 2B 圖，其分別為本發明一實施例之奈米粒子螢光探針 200 的製程示意圖及其用於蛋白酶 240 活性檢測原理示意圖。奈米粒子螢光探針 200 係由一奈米粒子 210 與複數個具有螢光基團(活化)230 的功能性短鏈 220 鍵結而得，不需額外步驟且在室溫下即可完成。由於奈米粒子 210 對螢光基團(活化)230 具有淬熄效應，當功能性短鏈 220 鍵結於奈米粒子 210 表面後，螢光基團(活化)230 會位於奈米粒子 210 的抑制範圍內，並受奈米粒子 210 的抑制而變為螢光基團(淬熄)230a，故此時奈米粒子螢光探針 200 不帶有螢光反應。請參照第 2B 圖，當將蛋白酶 240 加入與奈米粒子螢光探針 200 反應，蛋白酶 240 會辨識出功能性短鏈 220 中之受質段，並將受質段水解，功能性短鏈 220 也隨之斷裂，進而釋出螢光基團(淬熄)230a。當螢光基團(淬熄)230a 脫離奈米粒子 210 表面，並遠離其抑制範圍，螢光基團(淬熄)230a 會再次變回螢光基團(活

化)230，使螢光強度得以被偵測，並藉由螢光強度的變化作為蛋白酶活性的判定。螢光強度的變化越高，代表蛋白酶活性濃度越高。

【0031】本發明之奈米粒子螢光探針利用奈米粒子對螢光基團具有螢光淬熄效應的特性，作為檢測蛋白酶活性的方法，並採用特殊設計的功能性短鏈，利用功能性短鏈中之負電段作為間隔物。負電段作為間隔物會將受質段延伸出奈米粒子表面，而利於蛋白酶辨識。此外，由於負電段帶有負電荷，負電段與負電段間的負電性互斥力，使功能性短鏈平均分散於奈米粒子表面，以降低奈米粒子表面的立體障礙，而利於蛋白酶對受質段的辨識效果。另，負電段的負電性亦可提高奈米粒子間的靜電互斥力，不需另加穩定劑即可避免奈米粒子產生聚集。因此，本發明之奈米粒子螢光探針用於生物檢測可提升其靈敏度及穩定性。

【0032】上述之奈米粒子螢光探針可應用於檢測疾病的套組，藉由檢測蛋白酶的活性，以診斷與蛋白酶相關之疾病。相較於習知的檢測方式，由於本套組係使用上述之奈米粒子螢光探針檢測蛋白酶活性，具有高靈敏度及高穩定性等優點，且僅需少量檢體即可用於疾病診斷。

【0033】根據本發明一實施例，蛋白酶為胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)。胰凝乳蛋白酶為一種能分解蛋白質的消化性酶，於胰臟合成，並可於糞便中測得。相較於彈性蛋白酶(Elastase)，胰凝乳蛋白酶為更穩定的胰臟相關酵素，可做為胰臟相關疾病的診斷指標，例如：急性胰臟炎、慢性

胰臟炎、胰外分泌不全症及胰臟癌。若受試者胰臟出現障礙，胰凝乳蛋白酶於糞便中的含量則會減少。在一實施方式中，套組所使用之樣品係來自糞便檢體，糞便檢體經採樣溶液處理後即可進行檢測。習知常用於診斷胰臟相關疾病的方法為檢測血液中澱粉酶(Amylase)或脂肪酶(Lipase)的含量，並以呈色法分析。此方法為侵入性採樣，且胰臟炎患者血樣中的澱粉酶或脂肪酶並不一定會升高，又或是其他病因也同樣會造成此兩種酵素急性升高，造成臨床上的誤診。目前市面上有針對糞便中胰凝乳蛋白以呈色法或酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunoassay, ELISA)檢測的套組，然而以呈色法進行檢測之套組其靈敏度不高，檢測範圍約為 200~600ng/mL，且檢測前糞便檢體需要另外進行處理；以 ELISA 進行檢測之套組雖可偵測較低濃度(檢測範圍約為 20~1000ng/mL)，但檢測耗時，需數小時才可完成檢測。本發明之檢測疾病的套組可應用於檢測糞便檢體中胰凝乳蛋白酶的活性，其優點為採用非侵入式的方法監控胰臟相關疾病，可做為日常例行性檢測，且具有高靈敏度及高穩定性。

【0034】 本發明之檢測疾病的套組除了可用於人類疾病的檢測外，亦可用於非人類之動物疾病的檢測。舉例來說，貓狗胰臟炎的症狀通常不明顯，且不易察覺，然而，目前市面上販售之貓狗胰臟炎檢測套組係採用血樣，且靈敏度不高。因此，本發明之檢測疾病的套組亦可用於寵物醫療。

【0035】 上述之奈米粒子螢光探針可做為一種監控平台，用

以檢測胰凝乳蛋白酶活性。由於進行膽胰腸相關手術時，經常會發生胰、腸液滲漏，而滲漏液中蛋白酶可辨識水解奈米粒子螢光探針，並產生螢光，如此可以即時監控胰、腸液滲漏的情形。

【0036】 上述之奈米粒子螢光探針可做為藥物篩選平台，藉由檢測蛋白酶活性，以篩選出可抑制或促進蛋白酶活性的藥物。許多蛋白酶與身體疾病相關，然而還有疾病尚未有可阻止其病情發展的有效藥物。舉例來說，目前胰臟炎患者所使用之藥物主要是以減緩症狀為目的，尚無兼具安全性與有效性的新藥可以阻止病情發展。因此，可將本發明之奈米粒子螢光探針應用於篩選治療胰臟炎的藥物。

【0037】 以下列舉數個實施例以更詳盡闡述本發明之方法，然其僅為例示說明之用，並非用以限定本發明，本發明之保護範圍當以後附之申請專利範圍所界定者為準。

實施例：奈米粒子螢光探針的製備

【0038】 本實施例所使用之奈米粒子螢光探針包含 15nm 奈米金粒子；複數個功能性短鏈；以及複數個螢光基團，其中每一功能性短鏈具有 SEQ ID NO: 2 所示序列，即定位段為 1 個半胱氨酸 (Cysteine, Cys)；負電段為 5 個天門冬氨酸 (Aspartic acid, Asp)；以及受質段為 SEQ ID NO: 1 中的 7 個胺基酸，此受質段可被胰凝乳蛋白酶辨識。螢光基團為異硫氰酸螢光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC)，且奈米

金粒子對 FITC 具有螢光淬熄效應。

【0039】 奈米金粒子螢光探針的製備包含下列步驟：

1. 製備大小為 15nm 的奈米金粒子。
2. 合成具有 SEQ ID NO: 2 所示序列之功能性短鏈。
3. 將上述之功能性短鏈與 FITC 鍵結。
4. 將上述具有 FITC 之功能性短鏈與奈米金粒子鍵結，即為本實施例所使用之奈米金粒子螢光探針。

【0040】 以下對本實施例之奈米金粒子進行多個實驗，用於檢測胰凝乳蛋白酶的活性。

【0041】 請參照第 3 圖，其為本實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測不同濃度之胰凝乳蛋白酶的螢光強度變化與時間關係圖。將本實施例之奈米金粒子螢光探針分別與濃度為 1ng/mL 及 5ng/mL 的胰凝乳蛋白酶反應，並觀察反應時間與螢光強度變化的關係。結果顯示，本實施例之奈米金粒子螢光探針確實可偵測胰凝乳蛋白酶的活性，且螢光強度變化隨反應時間增長而提高，尤其在反應時間為 15 分鐘內的螢光強度變化最為明顯。因此，此檢測可於 15 分鐘內完成，其可有效地縮短檢測時間。

【0042】 請參照第 4 圖，其為本實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測胰凝乳蛋白酶的螢光強度變化與蛋白酶濃度關係圖。將本實施例之奈米金粒子螢光探針與不同濃度之胰凝乳蛋白酶反應 15 分鐘並測量其螢光強度。結果顯示，本實施例之奈米金粒子螢光探針偵測到之螢光強度變化確實

與胰凝乳蛋白酶的濃度成正相關，且具有良好的線性關係。尤其在胰凝乳蛋白酶的濃度為 0.25~10ng/mL 時，螢光強度變化最為明顯，並具有關係式 $y = 506.69 x - 90.82$ ，其中 x 為胰凝乳蛋白酶濃度 (ng/mL)， y 為螢光強度變化 (a.u.)，故此檢測的偵測範圍為 0.25~10ng/mL。相較於習知採用呈色法分析之檢測範圍或 ELISA 套組之檢測範圍，本實施例之奈米金粒子螢光探針可有效地將檢測極限提升至 pg/mL 等級，具有高靈敏度，故只需要微量的樣品即可檢測到樣品中之待測蛋白酶的含量。

【0043】請參照第 5 圖，其為本實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測不同蛋白酶的螢光強度變化與酵素濃度關係圖。將本實施例之奈米金粒子螢光探針與不同濃度之胰凝乳蛋白酶及胰蛋白酶 (Trypsin) 反應，結果顯示，雖同為胰腺所分泌之絲氨酸蛋白酶，本實施例之奈米金粒子螢光探針僅可偵測偵測胰凝乳蛋白酶的活性，而無法偵測胰蛋白酶的活性。因此，此奈米金粒子螢光探針對胰凝乳蛋白酶具有高度的專一性。

【0044】本實施例已應用於小鼠誘發急性胰臟炎之檢測，樣品可來自於腸液或糞便檢體。請參照第 6 圖，其為本實施例之奈米金粒子螢光探針用於檢測小鼠糞便檢體中之胰凝乳蛋白酶的含量變化與時間關係圖。利用濃度為 200 μ g/kg 的蛙皮素 (Cerulein) 每兩小時一次以腹腔注射，共 4 劑，誘發小鼠急性胰臟炎後，連續 24 小時監測其糞便檢體中胰蛋白酶的活性，並腹腔注射食鹽水至另一組小鼠作為對照

組。注射後給予飲食，整體而言，胰凝乳蛋白酶的含量隨飲食而變化。結果顯示，經誘發急性胰臟炎之小鼠糞便檢體中的胰凝乳蛋白酶含量整體而言遠少於對照組之健康小鼠，尤其是在注射 0~4、5~9 及 20~24 小時後，兩者的胰凝乳蛋白酶含量具有顯著的差異。由此可知，本實施例之奈米金粒子螢光探針用於偵測糞便檢體中胰凝乳蛋白酶的活性，確實可以做為臨床上胰臟相關疾病的診斷指標之一，具有醫療診斷的價值。

【0045】綜上所述，本發明之奈米粒子螢光探針利用奈米粒子對螢光基團具有螢光淬熄效應的特性，作為檢測蛋白酶活性的方法，並採用特殊設計之功能性短鏈做為生物辨識元件用以修飾奈米粒子。此功能性短鏈中之受質段可被欲檢測之蛋白酶辨識，使探針對特定蛋白酶具有專一性；負電段做為間隔物，將受質段延伸出奈米粒子表面，且由於負電性互斥力，使功能性短鏈分散於奈米粒子表面，降低立體障礙，利於蛋白酶對受質段的辨識效果，因而提升探針的靈敏度。負電段之負電性亦可提高奈米粒子間的靜電互斥力，可避免奈米粒子產生聚集，因而提升探針的穩定性。另，本發明之奈米粒子螢光探針可有效地縮短檢測時間，且製備方法簡單，可降低成本，具有經濟效益。本發明之奈米粒子螢光探針亦可應用於檢測疾病，監控手術併發症平台，或做為藥物篩選的平台。

【0046】雖然本發明已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神

和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0047】

100、200：奈米粒子螢光探針

102：奈米粒子螢光探針局部放大圖

110、210：奈米粒子

120、220：功能性短鏈

122：定位段

124：負電段

126：受質段

130：螢光基團

230：螢光基團(活化)

230a：螢光基團(淬熄)

240：蛋白酶

【序列表】

<110> 國立交通大學

<120> 用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針及其應用

<160> 2

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可檢測胰凝乳蛋白酶活性的受質段

<400> 1

Gly Pro Leu Gly Leu Ala Arg

1 5

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可檢測胰凝乳蛋白酶活性的功能性短鏈

<400> 2

Gly Pro Leu Gly Leu Ala Arg Asp Asp Asp Asp Asp Cys

1 5 10

申請專利範圍

1. 一種用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，包含：

一奈米粒子；

複數個功能性短鏈，其中每一該功能性短鏈包含：

一定位段，與該奈米粒子鍵結，以將該功能性短鏈固定於該奈米粒子上；

一負電段，與該定位段鍵結，且包含至少一次負電段，其中該次負電段為帶負電之胺基酸或去氧核醣核酸；以及

一受質段，與該負電段鍵結，其中該受質段係被該蛋白酶辨識之胺基酸序列；以及

複數個螢光基團，與該受質段鍵結，其中該奈米粒子對該螢光基團具有螢光淬熄效應。

2. 如請求項 1 所述之奈米粒子螢光探針，其中該奈米粒子之粒徑大小約為 5~50nm。

3. 如請求項 1 所述之奈米粒子螢光探針，其中該奈米粒子為奈米金粒子、奈米銀粒子、奈米氧化鐵粒子或上述任一組合。

4. 如請求項 3 所述之奈米粒子螢光探針，其中該奈米粒子為奈米金粒子。

5. 如請求項 4 所述之奈米粒子螢光探針，其中該奈米金粒子與該定位段係以金硫鍵鍵結，且該定位段為一半胱胺酸(Cysteine, Cys)。

6. 如請求項 1 所述之奈米粒子螢光探針，其中該負電段包含 4~7 個次負電段，且該些次負電段為天門冬胺酸(Aspartic acid, Asp)、麩胺酸(Glutamic acid, Glu)或其組合。

7. 如請求項 1 所述之奈米粒子螢光探針，其中該負電段包含 12~21 個次負電段，且該些次負電段為去氧核醣核酸。

8. 如請求項 1 所述之奈米粒子螢光探針，其中該蛋白酶為胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)。

9. 如請求項 8 所述之奈米粒子螢光探針，其中該受質段包含 SEQ ID NO: 1 中至少三個連續胺基酸。

10. 如請求項 9 所述之奈米粒子螢光探針，其中該些連續胺基酸至少一個為白胺酸(Leucine, Leu)。

11. 如請求項 1 所述之奈米粒子螢光探針，其中該螢光基團為異硫氰酸螢光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、Cyanine 3 (Cy3)、Cyanine 5 (Cy5)或 Texas red。

12. 一種檢測疾病的套組，包含如請求項 1~11 任一項所述之用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，其中該疾病與該蛋白酶相關。

13. 如請求項 12 所述之套組，其中該蛋白酶為胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)。

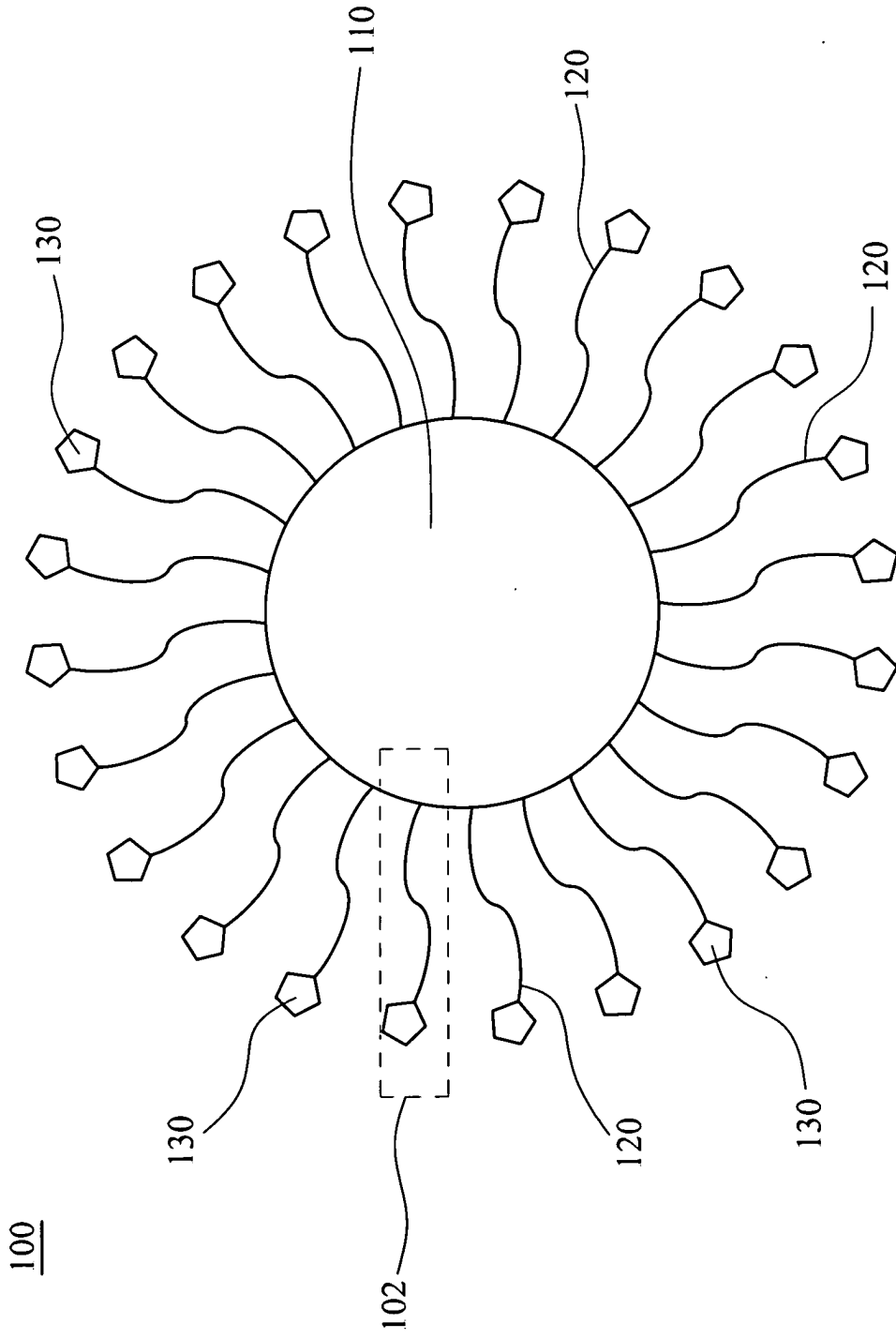
14. 如請求項 13 所述之套組，其中該疾病為急性胰臟炎、慢性胰臟炎、胰外分泌不全症或胰臟癌。

15. 如請求項 13 所述之套組，其中該套組所使用之樣品係來自糞便檢體。

16. 一種監控平台，包含如請求項 1~11 任一項所述之用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，其中該蛋白酶為胰凝乳蛋白酶，以用於監控因進行膽胰腸手術而可能發生之胰、腸液滲漏。

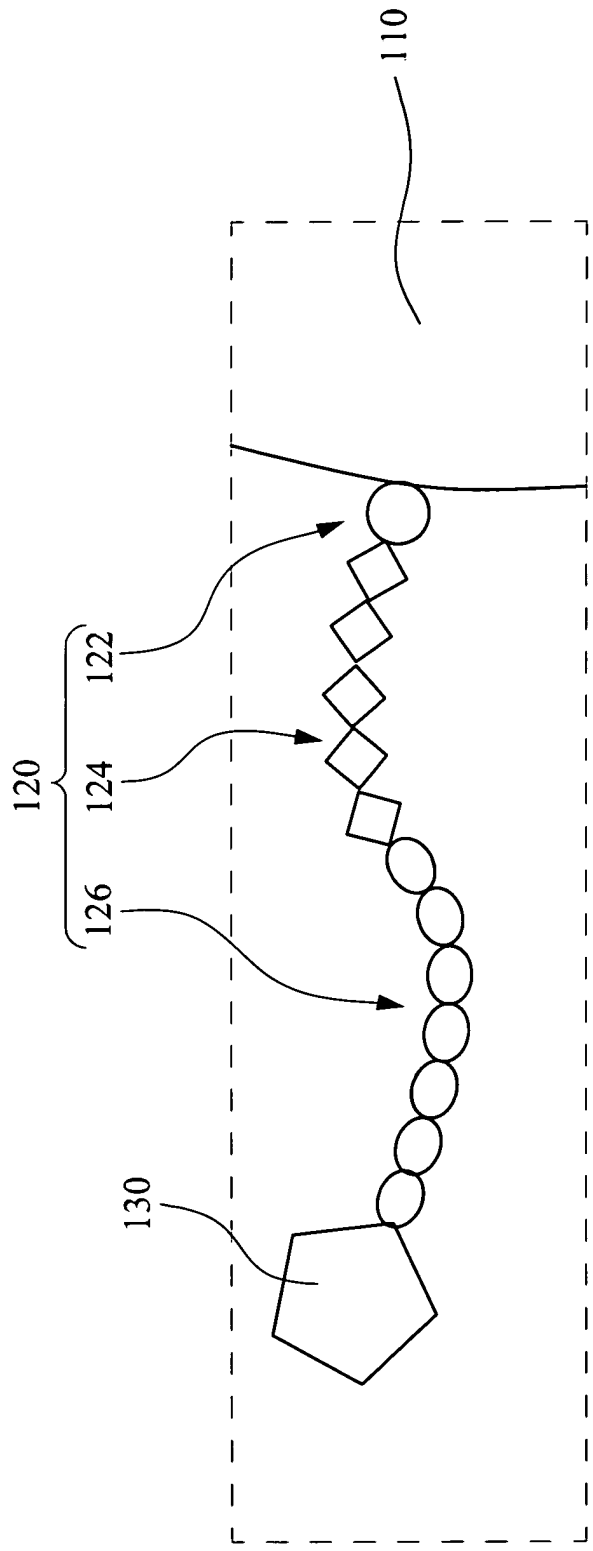
17. 一種藥物篩選平台，包含如請求項 1~11 任一項所述之用於檢測蛋白酶活性的奈米粒子螢光探針，以篩選出可抑制或促進該蛋白酶活性的藥物。

圖式

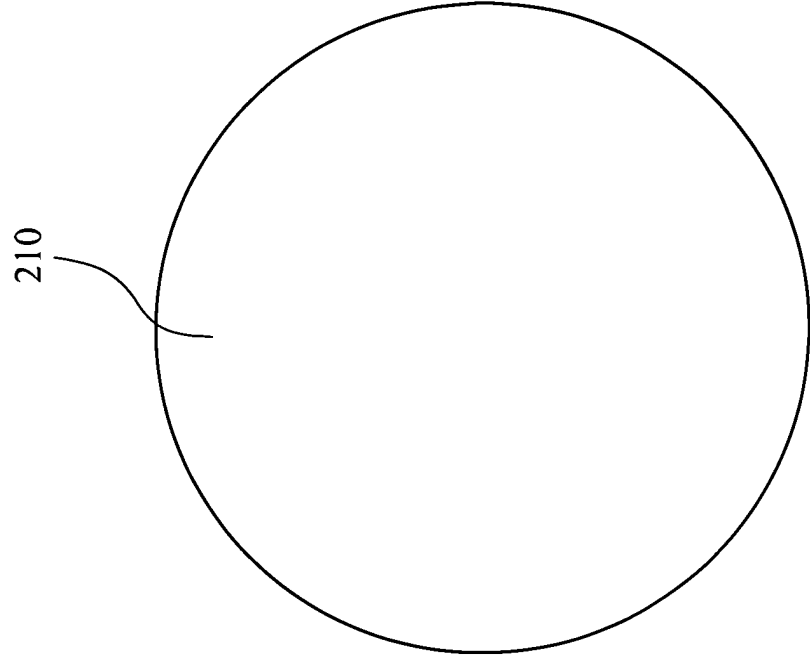


第 1A 圖

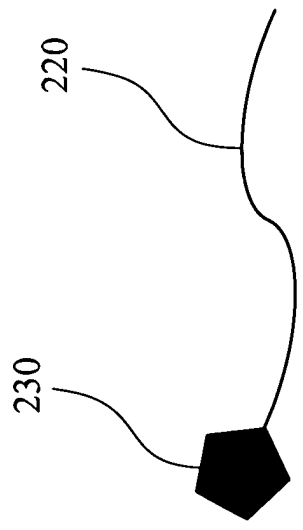
102



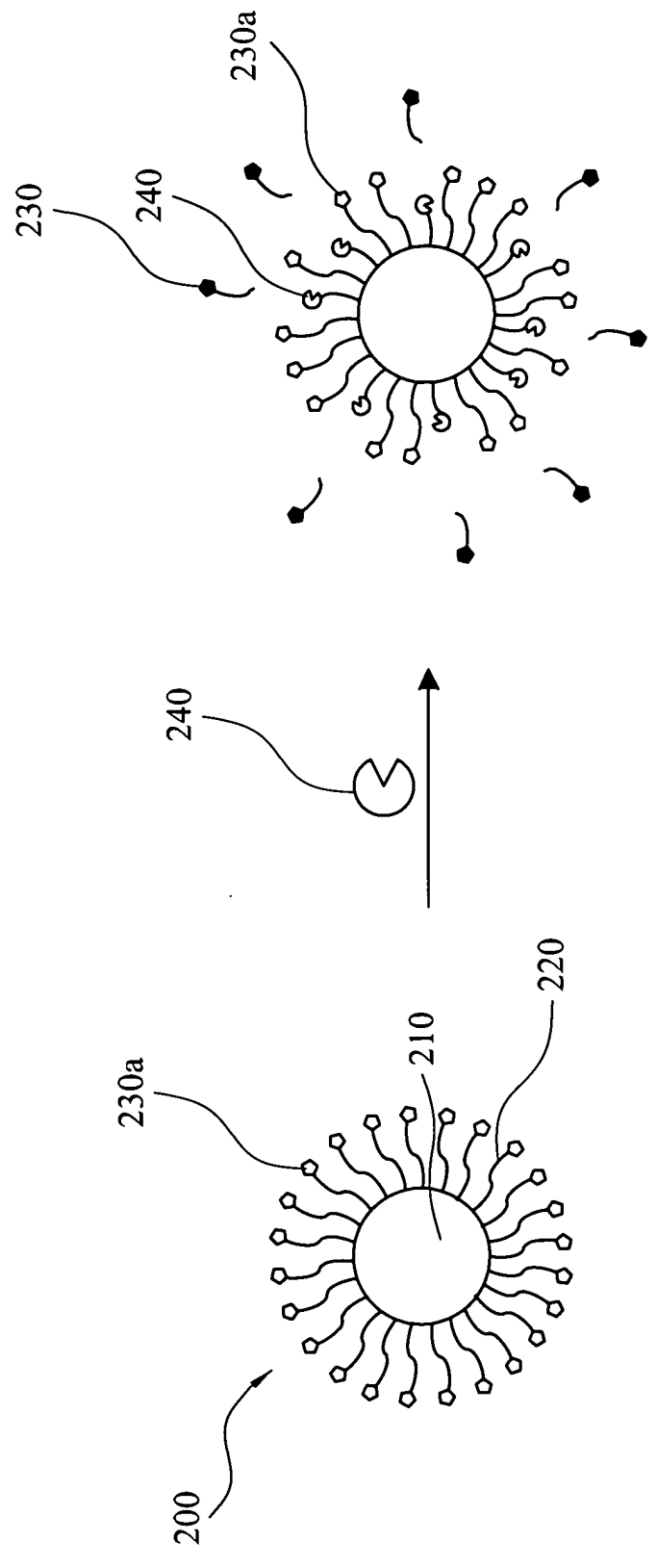
第 1B 圖



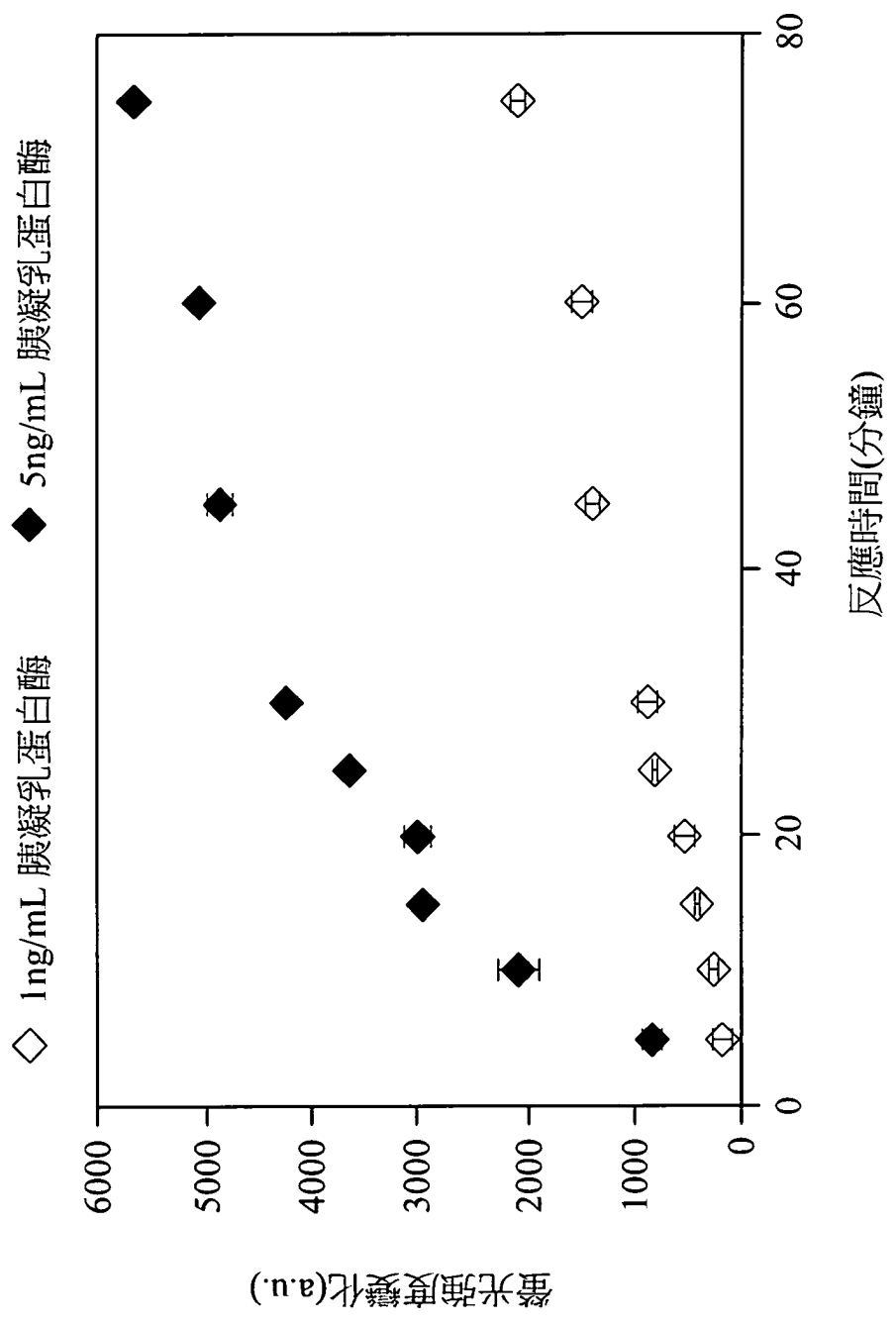
+



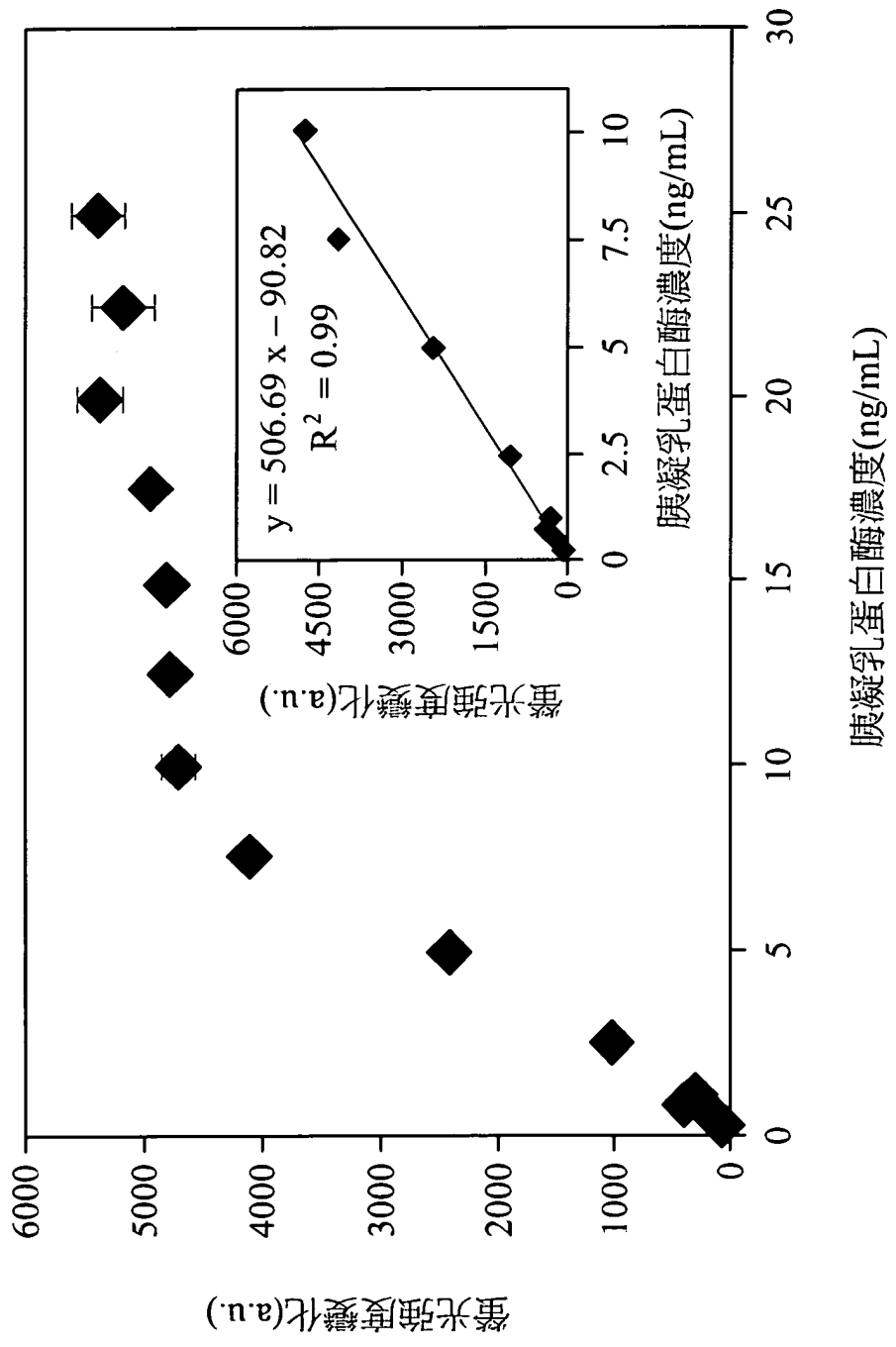
第 2A 圖



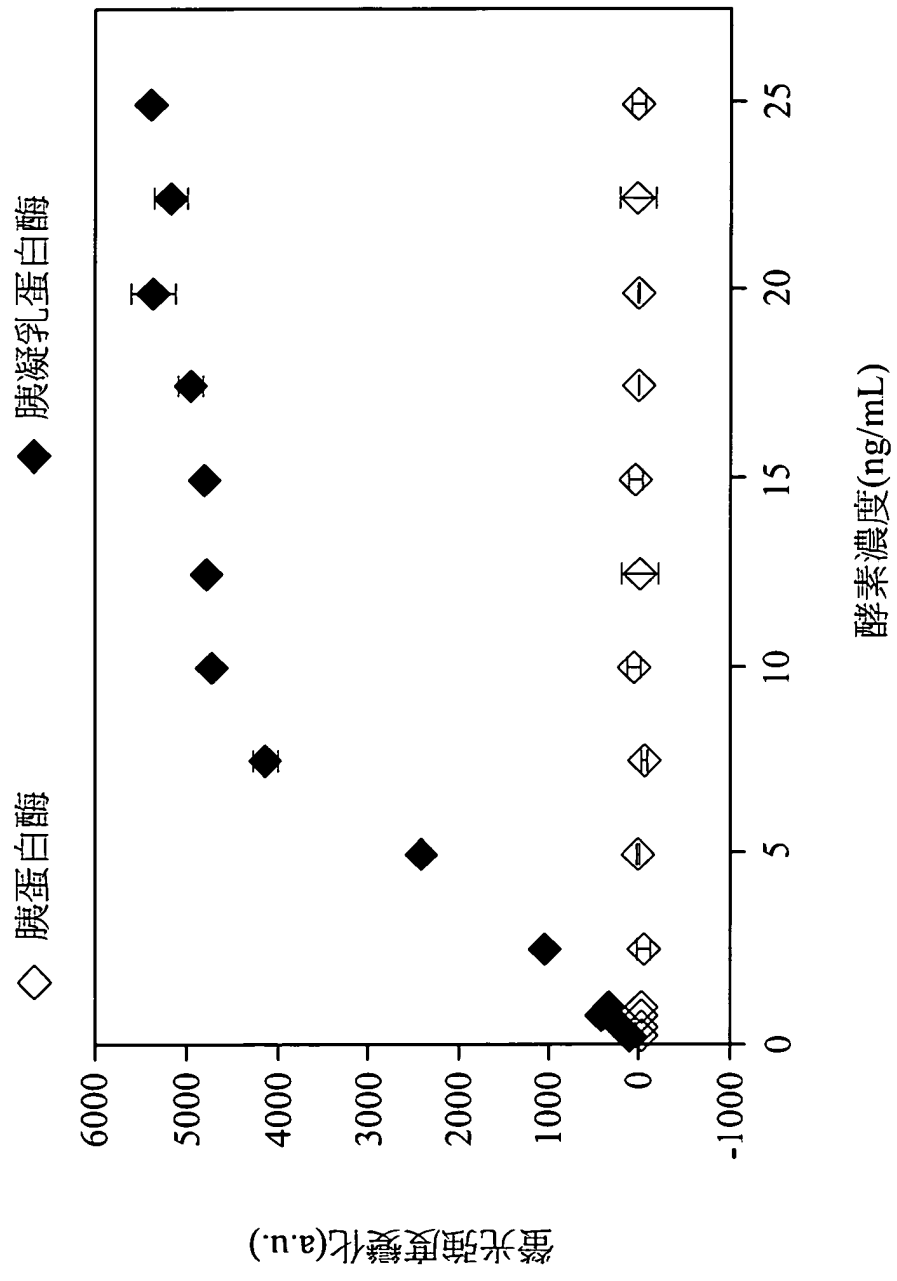
第 2B 圖



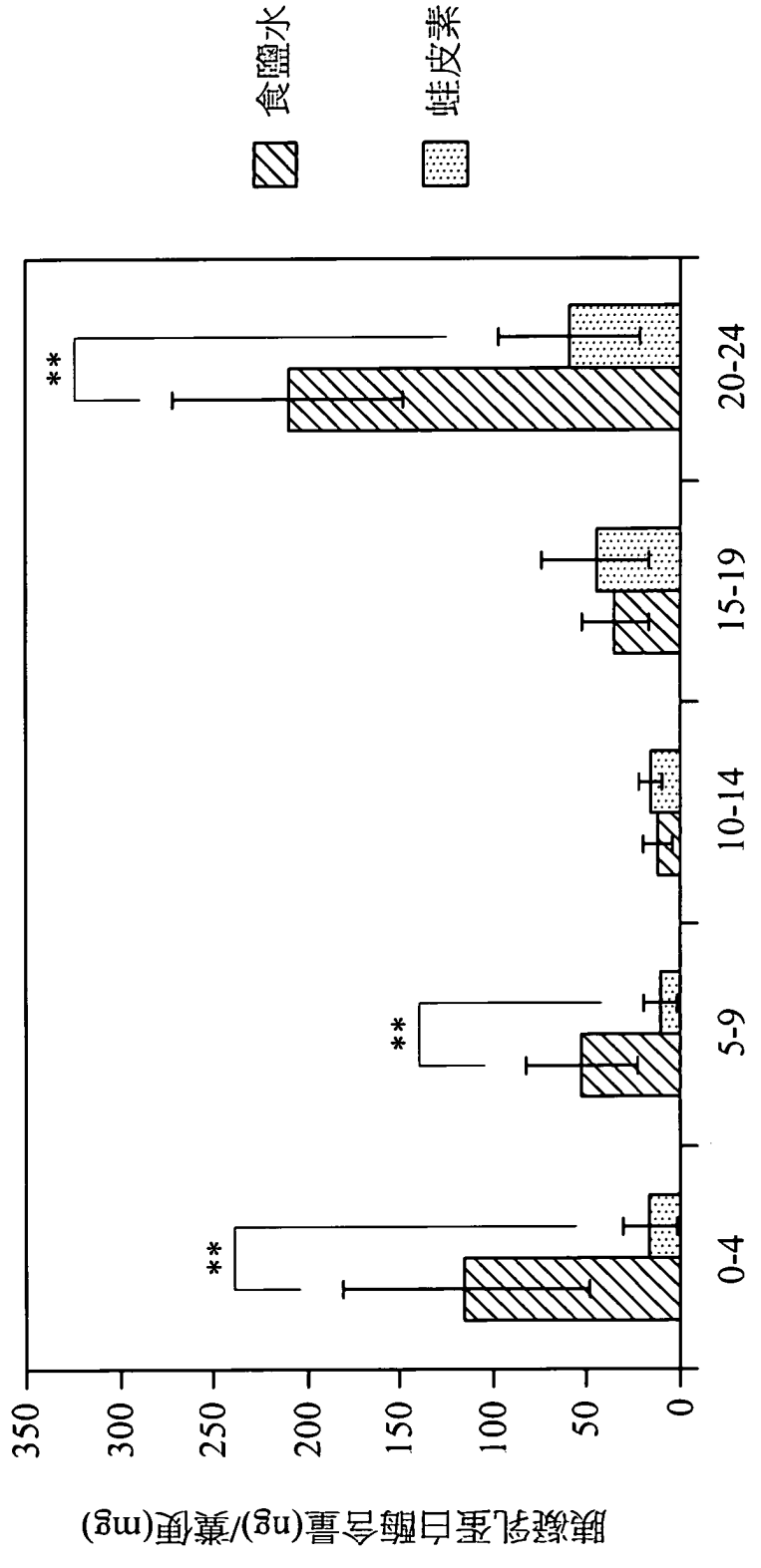
第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖



時間過程(小時)

第 6 圖