

【11】證書號數：I510779

【45】公告日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 01 日

【51】Int. Cl. : G01N27/327 (2006.01) C12Q1/37 (2006.01)
C07H19/20 (2006.01)

發明

全 12 頁

【54】名稱：具有 26S 蛋白酶體酵素電極之對三磷酸腺苷的偵測系統及其形成方法
THE SYSTEM FOR DETECTING ATP WITH ENZYME ELECTRODE OF
26S PROTEASOME AND FORMING THE SAME

【21】申請案號：101110892

【22】申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 28 日

【11】公開編號：201339574

【43】公開日期：中華民國 102 (2013) 年 10 月 01 日

【72】發明人：張家欽 (TW) CHANG, CHIA CHIN；張翠玲 (TW) CHANG, TSUI LING；林晏竹 (TW) LIN, YEN ZHU

【71】申請人：張家欽

CHANG, CHIA CHIN

臺南市南區健康路 1 段 133 巷 92 號

張翠玲

CHANG, TSUI LING

臺南市中西區尊王路 28 號

林晏竹

LIN, YEN ZHU

臺中市沙鹿區光華路 372 巷 47 弄 20 號

【74】代理人：陳福龍

【56】參考文獻：

Lin TY et al., "The electrochemical method for detecting 26S proteasome", Sensors and Actuators B, vol.160, p.412-417, 2011/08/09

Liu CW et al., "ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome", Molecular Cell, vol. 24, no.1, p.39-50, 2006/10/06

審查人員：張榮興

[57]申請專利範圍

1. 一種偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置，該偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置包含一 26S 蛋白酶體酵素工作電極，該 26S 蛋白酶體酵素工作電極具有一導電基材，且該導電基材上具有一 26S 蛋白酶體酵素，且該 26S 蛋白酶體酵素工作電極設置於一緩衝液 A(-)中，其中該緩衝液 A(-)係為 20mM 三羥甲基胺基甲烷 pH=7.1, 5mM 氯化鎂(MgCl₂)。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置，其中上述之偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置係為一三電極系統，該三電極系統更包括一參考電極與一輔助電極，該輔助電極為可導電載體，且該參考電極為一銀/氯化銀電極。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置，其中上述之 26S 蛋白酶體酵素工作電極之修飾方法係為一酵素固定化技術之吸附法，該酵素固定化技術之吸附法係藉由置入該 26S 蛋白酶體酵素工作電極之該導電基材表面於含 26S 蛋白酶體酵素之一第一特定溶液中，於一特定溫度範圍中放置一特定時間範圍後，經過該吸附程序後吸附 26S 蛋白酶體酵素固定於該導電基材之該電極，其中，該第一特定溶液包含：0.5~2mM 三磷酸腺苷；5-30%(v/v)甘油；10~50mM 三羥甲基胺基甲烷；與 1~10mM 氯化鎂。

(2)

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置，其中上述之第一特定溶液更包含 1-1.2mM 三磷酸腺苷；10-11%(v/v)甘油；20mM 三羥甲基胺基甲烷；與 5mM 氯化鎂。
5. 如申請專利範圍第 3 項所述之偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置，其中上述之特定溫度範圍 0~10 ，且該特定時間範圍 1~4hr。
6. 一種偵測三磷酸腺苷之方法，該偵測三磷酸腺苷之方法包含：提供如申請專利範圍第 1 項所述之偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置，該偵測三磷酸腺苷之電化學感測裝置具有該 26S 蛋白酶體酵素工作電極；利用電化學電位電流法，將該 26S 蛋白酶體酵素工作電極放置於含三磷酸腺苷之一第二特定溶液系統中；與在一特定溫度範圍與一特定電壓範圍中進行偵測。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之偵測三磷酸腺苷之方法，其中上述之第二特定溶液系統包含 10~50mM 三羥甲基胺基甲烷與 1~10mM 氯化鎂。
8. 如申請專利範圍第 6 項所述之偵測三磷酸腺苷之方法，其中上述之第二特定溶液系統之成分更包含 20mM 三羥甲基胺基甲烷與 5mM 氯化鎂。
9. 如申請專利範圍第 6 項所述之偵測三磷酸腺苷之方法，其中上述之第二特定溶液系統可添加一鹽類以增加中離子濃度，該鹽類係為下列族群之一或其組合者：0-50mM 過氯酸鋰、10-50mM 硫酸鈉、10-50mM 過氯酸鈉、10-50mM 硝酸鉀。
10. 如申請專利範圍第 6 項所述之偵測三磷酸腺苷之方法，其中上述之特定溫度範圍為 25~42 ，且該特定電壓範圍相對於參考電極為 3M 銀/氯化銀時為-0.5 至 0.8V。

圖式簡單說明

第一圖係為本發明之一線性掃描伏安法(LSV)圖，以 26S 蛋白酶體酵素電極進行循環伏安法偵測(1)具有緩衝液 A(-)之 10mM 過氯酸鋰(LiClO₄)及(2)具有內含 1mM 三磷酸腺苷(ATP)之緩衝液 A(-)之 10mM 過氯酸鋰(LiClO₄)，其說明三磷酸腺苷(ATP)與 26S 蛋白酶體酵素反應於電化學圖譜上之特徵，此為設定線性掃描伏安法(LSV)掃描範圍於-0.3V 到 0.2V 之間以及掃描速度 0.1V；

第二圖係為本發明之一線性掃描伏安法(LSV)圖，26S 蛋白酶體酵素電極在具有緩衝液 A(-)之 10mM 過氯酸鋰(LiClO₄)之電解液環境下，偵測不同濃度三磷酸腺苷(ATP)：(1) blank；(2) 1mM；(3) 1.24mM；(4) 1.49mM；(5) 1.74mM；(6) 1.98mM，其說明在不同濃度三磷酸腺苷(ATP)中，還原電流值會隨三磷酸腺苷(ATP)的濃度上升而增加，此為設定線性掃描伏安法掃描範圍於-0.5V 到 0.8V 之間以及掃描速度 0.1V；

第三圖係以第二圖中電位-0.3V 之電流值對三磷酸腺苷(ATP)濃度作線性回歸分析，據以說明三磷酸腺苷(ATP)濃度與產生之還原電流值具高度線性相關性，其線性相關式為 $y=0.3338x-0.1316$ ，線性相關係數為 0.9848；

第四圖係一線性掃描伏安法(LSV)圖，以 26S 蛋白酶體酵素電極在具有緩衝液 A(-)之電解液環境下，偵測不同濃度三磷酸腺苷(ATP)：(1)blank；(2)1mM；(3)1.24mM；(4)1.49mM；(5)1.74mM；(6)1.98mM，此為設定線性掃描伏安法(LSV)掃描範圍於-0.3V 到 0.2V 之間以及掃描速度 0.1V；

第五圖係取第四圖中，電位-0.3V 之電流值對三磷酸腺苷(ATP)濃度作線性回歸分析，其中線性相關式為 $y=0.1603x-0.0805$ ，線性相關係數為 0.9911；

第六圖係一線性掃描伏安法(LSV)圖，說明白蛋白的濃度對此三磷酸腺苷(ATP)偵測系統，在固定三磷酸腺苷(ATP)濃度下不會產生明顯的電化學反應，其中白蛋白濃度分別為：(1) blank；(2)2.6nM；(3)5.2nM；(4)10.4nM；(5)20.8nM，此為設置具緩衝液 A(-)之電解液環境，設定線性掃描伏安法掃描範圍於-0.3V 到 0.2V 之間以及掃描速度 0.1V；

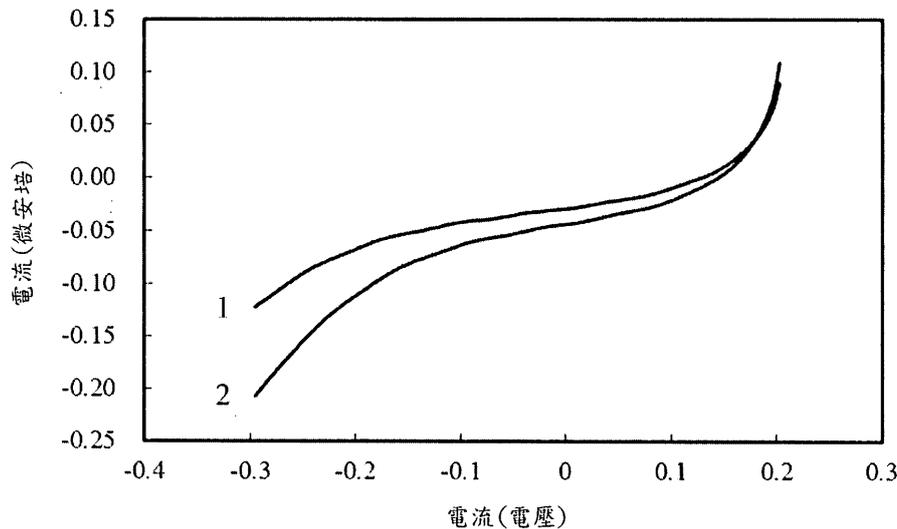
(3)

第七圖係一線性掃描伏安法(LSV)圖，說明添加白蛋白於具緩衝液 A(-)之電解液中，並不會影響 26S 蛋白酶體酵素電極對三磷酸腺苷(ATP)之偵測。其中白蛋白濃度為 20.8nM；三磷酸腺苷(ATP)濃度分別為：(1)blank；(2)0.503mM；(3)0.752mM；(4)1.00mM；(5)1.24mM；(6)1.49mM；(7)1.74mM；(8)1.98mM。設定線性掃描伏安法(LSV)掃描範圍於-0.3V 到 0.2V 之間以及掃描速度 0.1V；

第八圖係取第七圖中，電位-0.3V 之電流值對三磷酸腺苷(ATP)濃度作線性回歸分析，其中線性相關式為 $y=0.1396x+1.477$ ，線性相關係數為 0.9593；

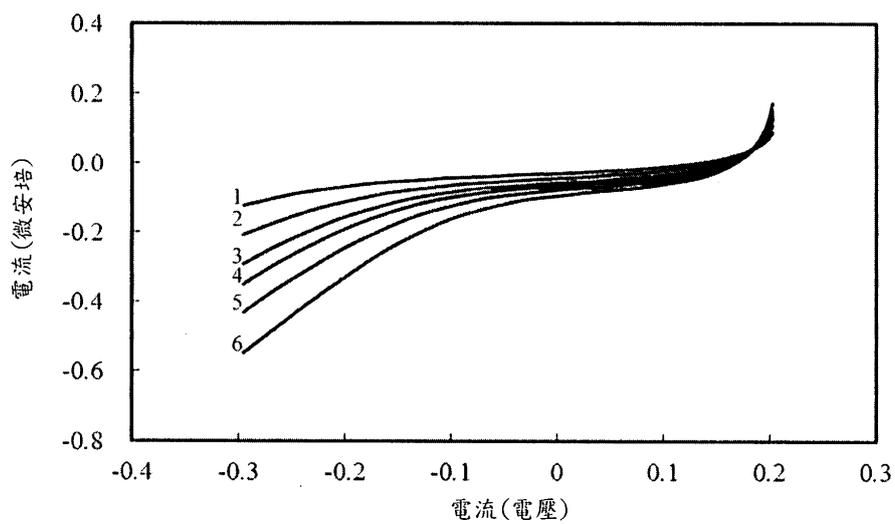
第九圖係一線性掃描伏安法(LSV)圖，為 26S 蛋白酶體酵素電極於 10.4nM 26S 蛋白酶體及 10.4nM 白蛋白(Albumin)在緩衝液 A(-)之電解液環境中對不同三磷酸腺苷(ATP)濃度進行偵測，其中三磷酸腺苷(ATP)濃度為：(1)blank；(2)0.503mM；(3)0.752mM；(4)1.00mM；(5)1.24mM；(6)1.49mM；(7)1.74mM；(8)1.98mM，設定線性掃描伏安法(LSV)掃描範圍於-0.3V 到 0.2V 之間以及掃描速度 0.1V；與

第十圖係取第九圖中，電位-0.3V 之電流值對三磷酸腺苷(ATP)濃度作線性回歸分析，其中線性相關式為 $y=0.09x+0.0915$ ，線性相關係數為 0.9202。



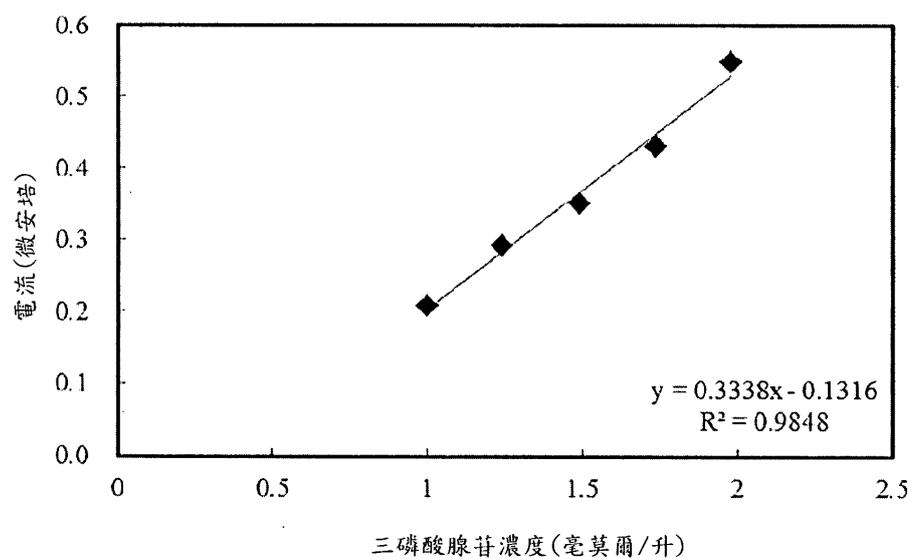
第一圖

(4)



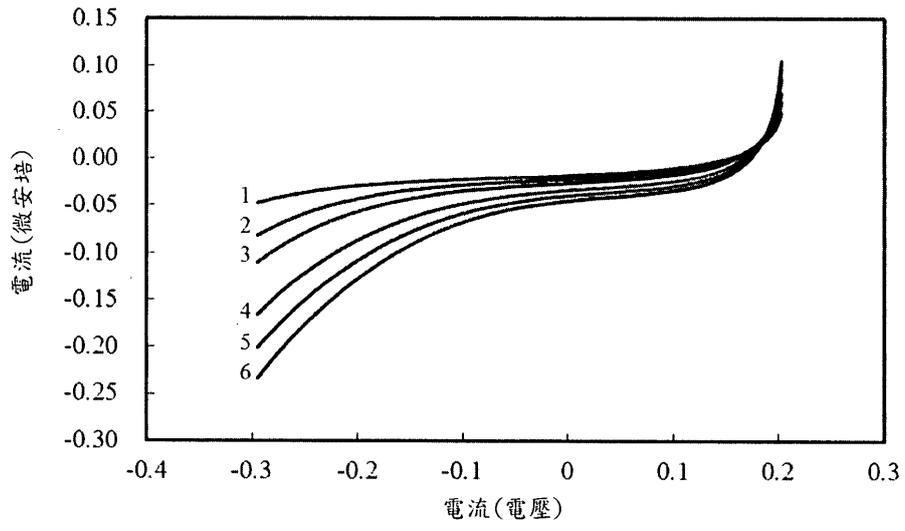
第二圖

(5)



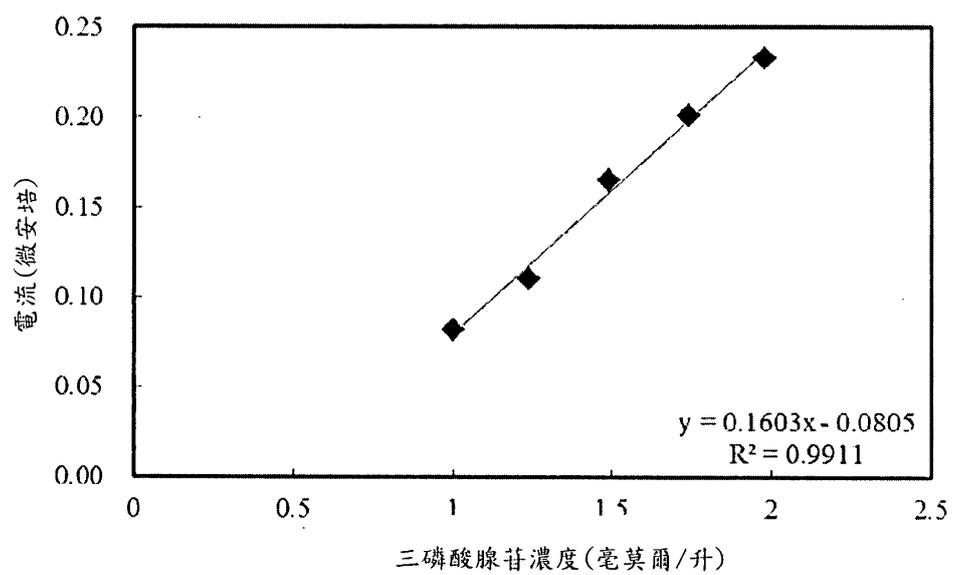
第三圖

(6)



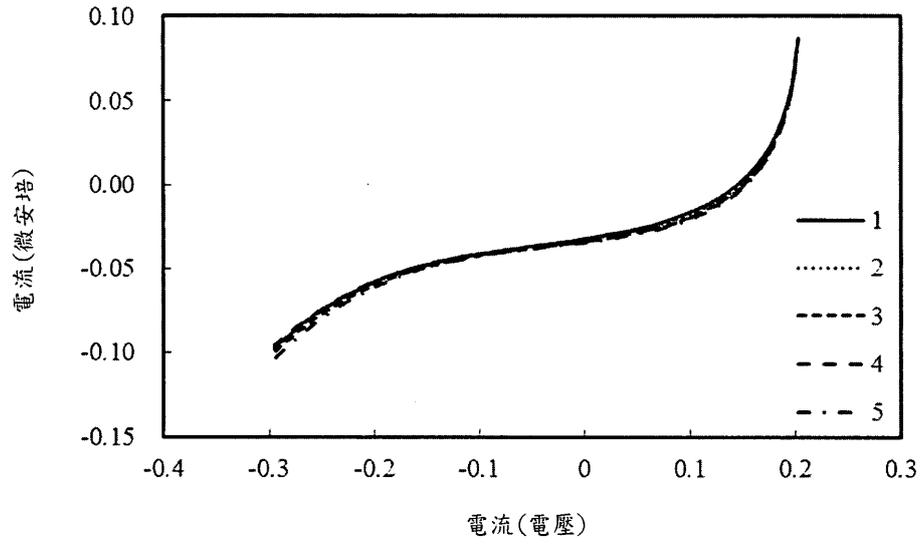
第四圖

(7)



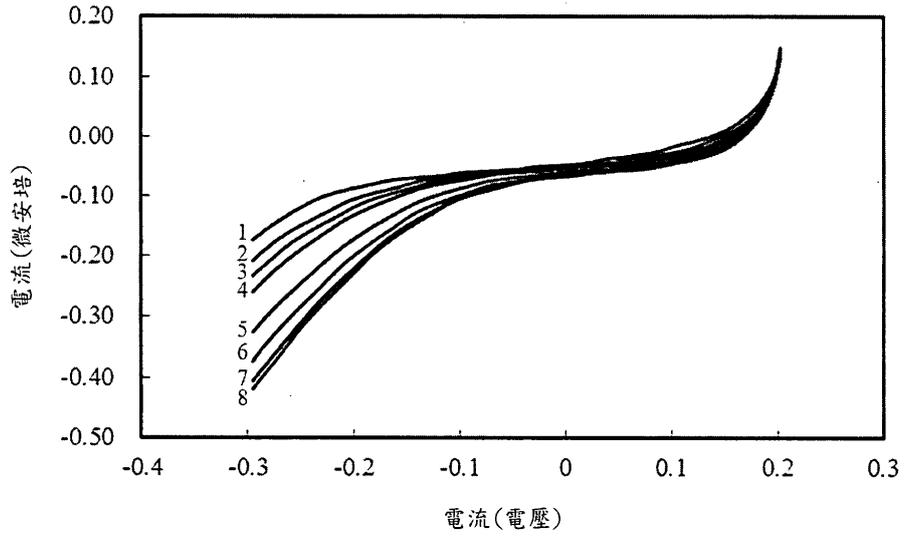
第五圖

(8)



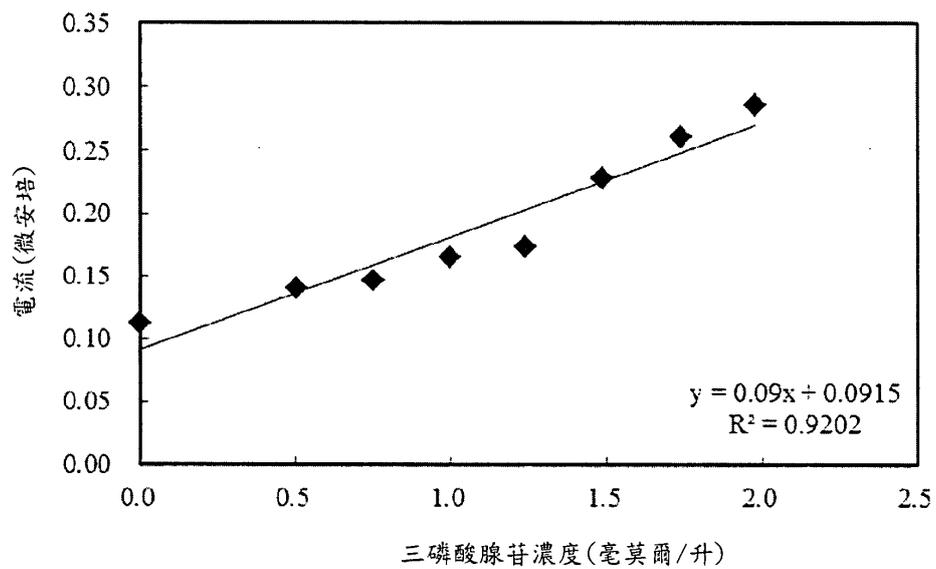
第六圖

(9)



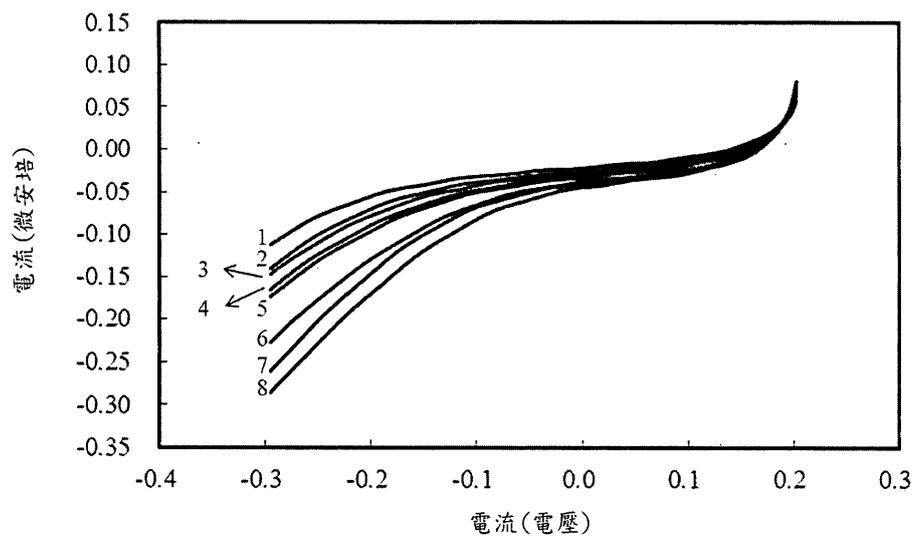
第七圖

(10)



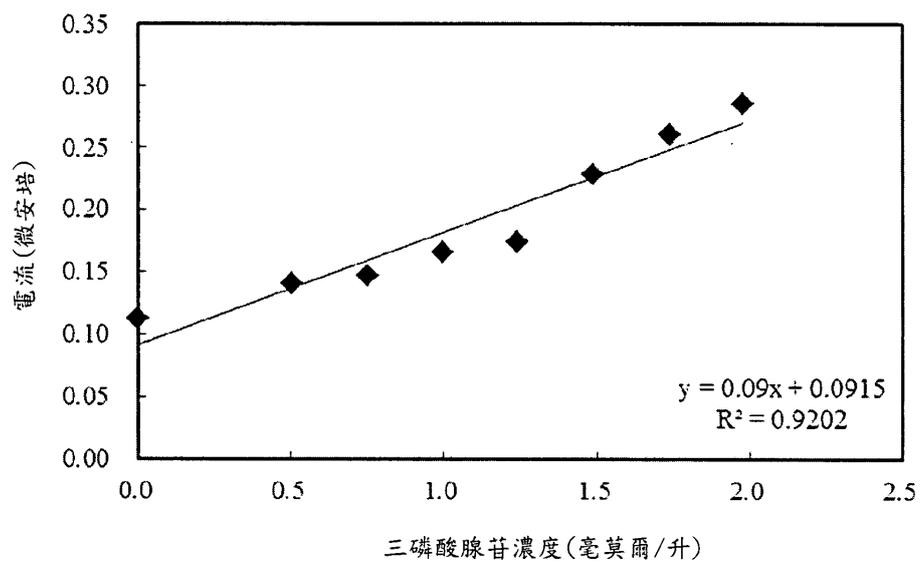
第八圖

(11)



第九圖

(12)



第十圖