化学试剂,2005,27(6),349~351

试剂介绍

蛋白质芯片用表面改性剂的合成 ——蛋白质偶联剂与蛋白质非特异吸附抑制剂的合成

曾冬冬*1,张冬海1,陈运法1,靳刚2

(1. 中国科学院 过程工程研究所,北京 100080; 2. 中国科学院 力学研究所,北京 100080)

摘要:以巯丙基三乙氧基硅烷和单取代三聚乙二醇为原料,先把巯基转换成巯钠,把醇羟基转换成对甲苯磺酰基,利用巯钠和对甲苯磺酰基间的亲核取代反应,在温和条件下合成了标题试剂。

关键词:蛋白质芯片;表面改性剂;硅烷偶联剂;合成

中图分类号:O629.73 文献标识码:A 文章编号:0258-3283(2005)06-0349-03

蛋白质芯片作为一种蛋白质分析技术,发展 很快,其中玻片、硅片等硬质片基的蛋白质芯片具 有较大的发展前景[1]。制作这类硬质片基蛋白质 芯片时,必须利用表面改性剂对片基进行处理,使 片基能与蛋白质偶联。目前多使用传统硅烷偶联 剂 X-R-Si-(OR)3,如巯丙基三乙氧基硅烷、 氨丙基三乙氧基硅烷等,但是,经此固定的蛋白质 易于改变空间构象,失去生物活性。为了解决这 个问题,使蛋白质定位于片基表面并保持其生物 活性,我们在硅烷分子中引入以保护醛基为头基 的三聚乙二醇(TEG)链,合成了蛋白质偶联剂。 保护的醛基去保护后能键合蛋白质分子,而聚乙 二醇(PEG)是应用较广泛的蛋白质修饰剂。PEG 毒性小,无抗原性,具有良好的双亲性和生物相容 性,尤其重要的是蛋白质的空间构象不会由于 PEG的修饰而发生改变,经 PEG修饰的蛋白质, 基本不丧失生物活性[3,4]。

除此之外,利用蛋白质芯片分析时,常因蛋白质在片基表面的非特异吸附而出现假阳性结果,影响蛋白质芯片分析的准确性。目前采用的对策是以长链烷基硅烷 R—Si—(OR)3为吸附抑制剂来抑制蛋白质吸附,但是,这个表面的表面自由能(sc=50mN/m)相对还是较高的,能吸附约一个生物分子厚的膜层^[5]。为此我们在硅烷分子中引入三聚乙二醇单甲醚(mTEG)头基,合成了蛋白质吸附抑制剂。聚乙二醇单甲醚(mPEG)的分子链具有亲水性、柔性和电中性,能够有效抑制蛋白质分子在片基表面的非特异吸附,因此在片基表面键合,mPEG是一种有效的抑制蛋白质非特异吸附的手段^[5]。

本文在上述蛋白质偶联剂和蛋白质吸附抑制剂两种硅烷分子的合成中,摒弃了传统的、以HSiR₃为原料的氢硅加成法,而是选择了以碳官能团硅烷——巯丙基三乙氧基硅烷为原料,利用巯丙基的反应活性,通过亲核取代反应来合成。这样不仅避免了 HSiR₃ 的强毒性和难操作性,而且克服了氢硅加成反应的条件苛刻、操作困难等缺点,实现了在温和条件下顺利合成硅烷偶联剂。

为了使巯丙基三乙氧基硅烷和取代 PEG 间的亲核取代反应更容易进行,实验中先把巯基转换成亲核性更强的巯钠,把醇羟基转换成更易离去的对甲苯磺酰基,以此提高亲核取代的反应活性和速率。蛋白质偶联剂和蛋白质吸附抑制剂两种化合物的合成路线分别如下。

蛋白质偶联剂的合成

蛋白质吸附抑制剂的合成

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

收稿日期:2004-09-15

作者简介:曾冬冬(1979),女,江西吉安人,博士生,主要从事硅烷偶联剂的合成和应用研究。

Bruker ARX400MHz 核磁共振谱仪; Bruker-RFS100/ Vector22 红外光谱仪; GF254 薄层层析板。

实验中所用展开剂系统: $V_{=\overline{a}}$ $V_{\overline{p}}$ $V_{\overline{p}}$ $V_{\overline{p}}$ $V_{\overline{p}}$ $V_{\overline{a}}$ $V_{\overline{b}}$ $V_{\overline{b}$

巯丙基三乙氧基硅烷(化学纯),减压蒸馏,收集 78 /1.33kPa 馏分;三聚乙二醇(分析纯),减压蒸馏,收集 137 /0.93kPa 馏分;三聚乙二醇单甲醚(分析纯,Aldrich),减压蒸馏,收集 121 /1.33kPa 馏分;溴代乙醛缩二乙醇(化学纯),减压蒸馏,收集 60 /2.13kPa 馏分;对甲苯磺酰氯(化学纯,进口分装),经四氯化碳重结晶;四氢呋喃(分析纯),经钠-二苯甲酮无水处理;其余试剂、溶剂均为分析纯,经无水处理。

1.2 蛋白质偶联剂(3)的合成与表征。

1.2.1 11-乙氧基-3,6,9,12-四氧杂-1-十四碳醇(1)的合成

参考并改进文献[6]的方法,得到淡黄色油状液体,产率 30%。 $R_f=0.515$ (展开剂 A)。 ¹HNMR (CDCl₃),:1.22(t,6H,CH₃); 2.87(s,1H,OH); $3.74 \sim 3.53$ (m,18H,OCH₂); 4.64(t,1H,CH),与文献[6]相符。

1.2.2 11-乙氧基-3,6,9,12-四氧杂十四碳对甲苯磺酸酯(2)的合成

参考并改进文献[7]的方法,得到淡黄色油状液体,产率60%。 $R_f=0.571$ (展开剂B)。 ¹HNMR(CDCl₃),:1.23(t,6H,CH₃CH₂);2.45(s,3H,ArCH₃);3.70~3.52(m,18H,OCH₂);4.62(t,1H,CH);7.34(d,2H,ArH¹);7.80(d,2H,ArH²)。

1.2.3 - (12-乙氧基-4,7,10,13-四氧杂十四碳-1-硫杂) 丙基三乙氧基硅烷(3) 的合成

氫气保护下,把 253mg(15mmol) 金属钠溶于 4mL 绝对无水甲醇中,之后加入 2.98g(12.5mmol) 巯丙基三乙氧基硅烷,电磁搅拌,回流 1h。冷却至室温。于 50mL THF 中溶解 5.25g(12.5mmol) 化合物 2,把该溶液加入反应液中,电磁搅拌 48h。过滤,滤液经旋转蒸发浓缩,硅胶柱层析纯化分离(展开剂 C),得到 1.82g 淡黄油状液体,产率 30%。 $R_f=0.470(展开剂 C)。 <math>^1HNMR(CDCl_3)$,: $0.85(t,2H,SiCH_2)$; $1.20\sim1.28(m,15H,CH_3)$; $1.73(q,2H,SiCH_2CH_2)$; $2.60(t,2H,CH_2SCH_2)$; $2.75(t,2H,CH_2SCH_2)$; $3.75\sim3.53(m,24H,OCH_2)$;4.62(t,1H,CH)。1R(液膜),, $cm^{-1}:1110(缩醛)$;1125(C-O-C); $1087,1092(SiOCH_2CH_3)$;2856,2932

 $(S - CH_2)_{o}$

- 1.3 蛋白质吸附抑制剂(5)的合成与表征
- **1.3.1** 3,6,9 三氧杂癸碳对甲苯磺酸酯 (4) 的合成

合成方法及步骤同 1.2.2,得到淡黄色油状液体,产率 60%。 $R_f = 0.470$ (展开剂 B)。 ¹HNMR(CDCl₃),: 2.45(s,3H,ArCH₃); 3.33(s,3H,OCH₃); $3.70 \sim 3.52$ (m,18H,OCH₂); 7.34(d,2H,ArH¹); 7.80(d ,2H ,ArH²)。

1.3.2 - (4,7,10-三氧杂癸碳-1-硫杂) 丙基三乙氧基硅烷(5) 的合成

合成方法及步骤同 1.2.3,得到淡黄色油状液体,产率 40%。 $R_f = 0.470$ (展开剂 C)。 ¹HNMR (CDCl₃),: 0.75 (t, 2H, SiCH₂); 1.24 (t, 9H, CH₃CH₂OSi); 1.70 (q, 2H, SiCH₂CH₂); 2.56 (t, 2H, CH₂SCH₂); 2.70 (t, 2H, CH₂SCH₂); 3.38 (s, 3H, OCH₃); $3.75 \sim 3.52$ (m, 20H, OCH₂)。 IR (液膜),,cm⁻¹: 1085,1090 (SiOCH₂CH₃); 1130 (C—O—C); 2827 (OCH₃); 2858, 2930 (S—CH₂)。

2 结果与讨论

2.1 钠用量对巯基转换成巯钠反应的影响

用钠和甲醇反应生成的甲醇钠将巯基转换为 巯钠时,若用和巯基等物质量的钠反应,TLC显示 巯基转换不完全;此时若延长巯基和甲醇钠的反应时间,则有副产物出现,直至巯钠的点完全消失。当用 1.2 倍巯基量的钠时,回流 1h 后,TLC显示原料巯丙基硅烷的点消失,巯钠的点非常清晰明显,此时没有其他化合物的点出现。因此,将 巯基转换为巯钠的反应,以 n_{348} n_{39} = 1.2 1,回流反应 1h 最佳。

2.2 微量水的存在对亲核取代反应的影响

作者在合成过程中发现,微量水的存在对亲核取代反应的影响很大,使反应几乎不能按目标方向进行,难以得到产物。当反应体系中有微量水存在时,TLC显示一条从点样点至溶剂前沿的直线,得不到产物点。这表明,水的存在导致了副反应的发生而抑制了正反应的进行,使亲核取代反应失败。可能发生的副反应是对甲苯磺酸酯的水解以及巯丙基三乙氧基硅烷的水解缩聚。因此投料、转移和反应过程必须严格按照无水无氧条件来操作,以防水气渗入。

2.3 亲核取代反应温度和反应时间的影响

实验发现,反应温度影响正反应的发生,而反应时间影响正反应的反应程度。TLC显示,若在回流温度进行反应,则副反应很快发生,正反应被抑制。若在室温进行反应,则TLC显示清晰的产物点和原料点,随着反应时间从12h延长至48h,原料点逐渐变淡,产物点逐渐变浓;此后反应时间继续延长,原料点和产物点的相对浓度几乎不变。据此,以在室温下反应48h为宜。

3 结论

以巯丙基三乙氧基硅烷为起始原料,利用巯丙基的亲核取代反应合成了两种新型的硅烷偶联剂: -(12-乙氧基-4,7,10,13-四氧杂十四碳-1-硫杂)丙基三乙氧基硅烷及 -(4,7,10-三氧杂癸碳-1-硫杂)丙基三乙氧基硅烷。前者适用于偶联蛋白质和蛋白质芯片片基,后者适用于抑制蛋白质在蛋白质芯片片基上的非特异吸附,两者同时使用,能改善蛋白质芯片的制作。具体应用正在研究中。

参考文献:

- [1]张春秀,梅茵,顾莹.制备蛋白质芯片的玻璃表面修饰方法比较[J].中华检验医学杂志,2003,**26**(4):219-221
- [2]侯伟健,潘忠诚,何群,等. 构建玻片蛋白质芯片的实验研究[J]. 中国医科大学学报,2003,32(2):100-102.
- [3]姜忠义,高蓉,许松伟,等.药物蛋白的聚乙二醇修饰

- [J]. 中国药学杂志,2002,37(6):409-412.
- [4]毛益斌,张蓓蕾.单甲氧聚乙二醇化学修饰药物酶的研究进展[J].中国医药工业杂志,2003,**34**(**5**):250-255.
- [5] Seok-Won L , Paul EL. Protein-resistant coatings for glass and metal oxide surfaces derived from oligo (ethylene glycol)-terminated alkyltrichlorosilanes [J]. *Biomaterials*, 1998, 19 (18):1669-1675.
- [6] Lopez Aparicio F J , Zorrilla Benitez F , Santoyo Gonzalez E. Synthesis and properties of some *O* (2, 2-dialkoxyethyl) glycolaldeydes [J]. *Carbohydr. Res.*, 1983, 114(2):297-302.
- [7] Julian M D, Fang Zhihao, Milton J H. Proton NMR characterization of poly (ethylene glycols) and derivatives [J]. *Macromolecules*, 1990, 23 (16): 3742-3746.

Synthesis of surface modifiers for protein microarray ZENG $Dong dong^{*1}$, $ZHANG Dong hai^{1}$, $CHEN Yurrfa^{1}$, $JIN Gang^{2}$ (1. Institute of Processing Engineering ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China; 2. Institute of Mechanics ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China) , Huaxue Shiji , 2005, 27(6), $349 \sim 351$

Abstract: Two kinds of surface modifiers for protein microarray, protein coupling agent and protein nonspecific absorption inhibitor, were designed and synthesized. Started from mercaptopropyl triethoxy silane (MPTS) and mono-substituted triethylene glycol (R—TEG—OH) , these agents were prepared via S_N reactions, which were carried out under mild conditions.

Key words: protein microarray; surface modifier; silane coupling agent; synthesis

(上接第 335 页)

steroid library using molecularly imprinted polymers [J]. Anal. Commun. ,1998 ,35(1):9-11.

- [22] Zhong Ning, Byun H, Bittman R. Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**(10):1839-1841.
- [23] Kugimiya A, Matsui J, Abe H, et al. Synthesis of castasterone selective polymers prepared by molecular imprinting
 [J]. Anal. Chim. Acta, 1998, 365 (1):75-83.
- [24] Whitcombe M J, Rodriguez M E, Villar P, et al. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol [J]. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117 (27):7105-7111.
- [25] Flores A , Cunliffe D , Whitcombe M J , et al. Imprinted polymers prepared by aqueous suspension polymerization [J]. J. Appl. Polym. Sci. ,2000 ,77 (8) :1841-1850.
- [26] Perez N, Whitcombe MJ, Vulfson EN. Surface imprinting of

cholesterol on submicrometer core-shell emulsion particles [J]. *Macromolecules*, 2001, **34**(4):830-836.

The application of molecular imprinting technique in steroid recognition and analysis $ZHANG\ Jie^1$, $WANG\ Yong\ jian^{+2}$, $YU\ Ao^1(1.\ College\ of\ Chemistry\ ,Nankai\ University\ ,Tianjin\ 300071$, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Materials ,Ministry of Education ,Nankai\ University\ ,Tianjin\ 300071\ ,China) ,Huaxue\ Shiji\ , 2005\ ,27(6)\ ,331\ \sim 335\ ;351

Abstract: Molecular imprinting is a research method developed by combining polymer chemistry, molecular design, molecular recognition and bio-mimic bioengineering. Molecular imprinted polymers (MIPs) prepared by molecular imprinting technique exhibit highly selective recognition properties. Steroids are one of the most important bioactive molecules, which play a crucial role in the process of metabolism in body. In this article, an overview of the application and the progress of molecular imprinting technique in steroid recognition and analysis is described.

Key words:molecular imprinting; steroid; molecular recognition