



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101038290 B

(45) 授权公告日 2011.05.11

(21) 申请号 200610065106.5

(22) 申请日 2006.03.17

(73) 专利权人 中国科学院力学研究所  
地址 100080 北京市海淀区北四环西路 15 号

(72) 发明人 靳刚 王战会 梁伟 刘妍

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 高存秀

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1523354 A, 2004.08.25, 全文.

CN 1462885 A, 2003.12.24, 全文.

Michael F. Brown et al. Influence of Cholesterol on the Polar Region of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Bilayers. 《Cholesterol influence on bilayers》.1978, 第 17 卷 (第 2 期), 全文.

V.P. Torchilin et al. p-Nitrophenylcarboxyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific

ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups.

《Biochimica et Biophysica Acta》.2001, 第 1511 卷全文.

审查员 黎舒婷

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种双脂膜表面改性的蛋白质芯片及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及一种双脂膜表面改性的蛋白质芯片,其以硅基片为固体基片,其上依次为与硅基片共价键结合的 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺单分子层,和与该磷脂酰乙醇胺单分子层通过疏水作用结合的对硝基苯酯基-聚乙二醇-(1,2-双油酰基-3-甘油磷脂乙醇胺)层。该蛋白质芯片是在微流道系统中将 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺单分子层共价固定到硅基片表面,然后吸附对硝基苯酯基-聚乙二醇-(1,2-双油酰基-3-甘油磷脂乙醇胺)得到的。该蛋白质芯片可以用于椭圆成像生物传感器,通过在该蛋白质芯片表面 PEG 的末端官能基来共价固定配基分子,探测能与其特异性结合的靶分子,二者结合后,在椭圆成像系统中可以观察到蛋白质芯片表面形貌变化。本发明的双脂膜表面改性的蛋白质芯片可以有效阻止非特异性吸附,其配基分子层具有很好的稳定性,且保持高生物活性。

CN 101038290 B

1. 一种双脂膜表面改性的蛋白质芯片,其以硅基片为固体基片,其上依次为与硅基片共价键结合的磷脂酰乙醇胺单分子层,和与该磷脂酰乙醇胺单分子层通过疏水作用结合的硝基苯酯基-聚乙二醇-(1,2-双油酰基-3-甘油磷脂乙醇胺)层。

2. 一种权利要求1所述的双脂膜表面改性的蛋白质芯片的制备方法,其为在微流道系统中将磷脂酰乙醇胺单分子层共价固定到硅基片表面,然后吸附PEG化的磷脂得到双脂膜层;具体包括如下的步骤:

1) 将硅基片裁成 $10 \times 20 \text{mm}^2$ 小片,放入体积比1:3的30wt%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 和浓硫酸混合溶液中浸泡30分钟,使基片羟基化,依次用水和乙醇清洗;将羟基化基片吹干后,放入5wt% 3-氨丙基-3-乙氧基硅烷和95wt%无水乙醇混合溶液中,室温反应2小时,形成一层末端为氨基的单分子自组装膜,依次用乙醇和水清洗3次;最后,用含有2.5wt%戊二醛的PBS溶液浸泡1小时,用PBS缓冲液清洗,得到表面形成活性醛基的基片;

2) 在用于制备生物芯片的微流道体系中,将步骤1)表面形成活性醛基的基片与微阵列模板紧密接触,并通过外力压紧;把L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺溶液通过微流道微细管子输送到基片上选定区域,30分钟后,磷脂酰乙醇胺的胺基与基片上的醛基形成亚胺,在基片表面形成磷脂酰乙醇胺单分子层;然后通过微流道将PBS缓冲液输送到基片不同区域,将没有被固定在基片上的磷脂酰乙醇胺分子清洗掉;

所述的L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺溶液按照每毫升PBS缓冲液加入10mgL- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺和1wt% Tween 20的比例配制而成;

3) 把PEG化磷脂溶液通过微流道微细管子输送到固定了磷脂酰乙醇胺的基片上,30分钟后,由于疏水作用PEG化磷脂与基片上磷脂酰乙醇胺单分子层形成双脂膜层;然后通过微流道将水输送到基片上,冲去缓冲液,将微阵列模板从基片上取下,得到双脂膜表面改性蛋白质芯片;所述的PEG化磷脂溶液是按每毫升乙酸钠缓冲液加入5mg对硝基苯酯基-聚乙二醇-(1,2-双油酰基-3-甘油磷脂乙醇胺)配制而成。

3. 权利要求1所述的双脂膜表面改性的蛋白质芯片作为椭偏成像生物传感器中的应用,通过在该蛋白质芯片表面PEG末端官能基来共价固定配基分子,探测能与其特异性结合的靶分子,二者结合后,在椭偏成像系统中可以观察到蛋白质芯片表面形貌变化。

## 一种双脂膜表面改性的蛋白质芯片及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种双脂膜表面改性的蛋白质芯片,其制备方法,以及该蛋白质芯片在椭圆成像生物传感器中应用。

### 背景技术

[0002] 随着蛋白质芯片传感技术被广泛应用到越来越多的领域,一些亟需解决的问题也暴露出来。常用的蛋白质芯片是将蛋白质分子固定到固体基片表面上作为配基,用以识别与之发生特异性结合的生物分子。蛋白质分子作为配基固定在芯片的表面上是有一定的密度的,并且分子间有间隙,这样的蛋白质芯片的表面接触到待测分子溶液时,待测分子与配基分子发生特异性结合产生特异信号的同时,也可以结合到配基分子间隙的芯片基底上而产生非特异信号。为了避免非特异信号,往往在配基分子装配后,用封闭液对芯片表面进行封闭。由于封闭液很难完全封闭配基分子间的全部芯片表面,因此很难避免非特异性吸附。

[0003] 在固体基片表面上固定配基分子的方法主要有物理吸附和共价连接,这两种方式均有缺陷。物理吸附方式是通过静电、疏水和氢键等相互作用将配基分子固定到固体基片表面上,不仅使蛋白质分子空间构像容易发生变化,导致生物活性降低;还容易使其在流动液体的环境下发生脱落,或是被其它蛋白质分子竞争吸附而替换下来。共价连接方式固定的配基分子相对比较稳定,可以部分解决物理吸附方法存在的蛋白质分子不稳定问题。但是,在蛋白质芯片表面上用于共价固定蛋白质分子的基团多为极性基团,这会增强蛋白质分子与固体基片表面间静电相互作用,从而使蛋白质分子空间构像发生改变,蛋白质分子生物活性降低的问题仍然存在。

[0004] 基于上述的现有技术很难避免非特异性吸附,而且在芯片基底上固定配基分子后其稳定性和生物活性降低的问题,需要研究一种新的蛋白质芯片,使得其在进行蛋白质检测时能够提高精确度。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有蛋白质芯片技术中固定配基分子方法所存在的非特异性吸附、稳定性差和生物活性降低等缺陷,从而提供一种可以在保持配基分子生物活性情况下,将其稳定地固定在基片表面,同时还能够有效地抑制非特异性吸附的双脂膜表面改性的蛋白质芯片。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述双脂膜表面改性的蛋白质芯片的制备方法。

[0007] 本发明的再一目的在于提供上述双脂膜表面改性的蛋白质芯片在用椭圆光学成像系统检测的生物传感器中的应用。

[0008] 本发明的目的是通过如下的技术方案实现的:

[0009] 本发明提供一种双脂膜表面改性的蛋白质芯片,其以硅基片为固体基片,其上依次为与硅基片共价键结合的 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺(L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine,以下简称 PE) 单分子层,和与该磷脂酰乙醇胺单分子层通过疏水作用结合的对硝基苯酯基—

聚乙二醇—(1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺) (p-nitrophenoxycarbonyl-PEG-1,2-di-*ioleoyl*-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 以下简称 pNP-PEG-DOPE) 的分子膜层。

[0010] 本发明提供一种上述双脂膜表面改性的蛋白质芯片的制备方法, 如图 1 所示, 其在微流道系统中将 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺单分子层共价固定到硅基片表面, 然后吸附 PEG 化的磷脂分子(对硝基苯酯基—聚乙二醇—(1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺)) 得到双脂膜层, 具体步骤包括:

[0011] 1) 将硅基片裁成  $10 \times 20 \text{mm}^2$  小片, 放入 30wt%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和浓硫酸(体积比 1:3) 混合溶液中浸泡 30 分钟, 使基片羟基化, 依次用水和乙醇清洗; 将羟基化基片吹干后, 放入 5wt% 3-氨基丙基—3 乙氧基硅烷和 95wt% 无水乙醇的混合溶液中, 室温反应 2 小时, 形成一层末端为氨基的单分子自组装膜, 依次用乙醇和水清洗 3 次; 最后, 用含有 2.5wt% 戊二醛的 PBS 溶液浸泡 1 小时, 用 PBS 缓冲液清洗, 得到表面形成活性醛基的基片;

[0012] 2) 在中国专利 03102659.1 中公开的用于制备生物芯片的微流道体系中, 将步骤 1) 表面形成活性醛基的基片与微列阵模板紧密接触, 并通过外力压紧; 把 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺溶液通过微流道微细管子输送到基片上选定区域, 30 分钟后, L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺的胺基与基片上的醛基形成亚胺, 在基片表面形成磷脂酰乙醇胺单分子层; 然后通过微流道将 PBS 缓冲液输送到基片不同区域, 将没有被固定在基片上的 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺分子清洗掉;

[0013] 所述的 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺溶液是按照每毫升 PBS 缓冲液 (pH7.2) 加入 10mg L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺和 1wt% Tween20 的比例配制而成的;

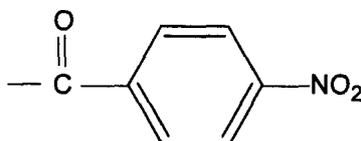
[0014] 3) 把 PEG 化的磷脂分子溶液通过微流道微细管子输送到固定了 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺的基片上, 30 分钟后, 由于疏水作用 PEG 化的磷脂分子与基片上 L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺单分子层形成双脂膜层; 然后通过微流道微细管子将水输送到基片上, 冲去缓冲液, 将微列阵模板从基片上取下, 即得到本发明的双脂膜表面改性蛋白质芯片;

[0015] 所述的 PEG 化的磷脂分子溶液是按每毫升乙酸钠缓冲液 (pH4.0) 加入 5mg 对硝基苯酯基—聚乙二醇—(1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺) 比例配制而成的。

[0016] 本发明提供的上述双脂膜表面改性的蛋白质芯片可以用于椭圆成像生物传感器。

[0017] 通过在该蛋白质芯片表面 PEG 末端官能基团

[0018]



[0019] 来共价固定配基分子, 探测能与其特异性结合的靶分子, 二者结合后, 在椭圆光学成像系统中可以观察到蛋白质芯片表面形貌变化。

[0020] 对本发明的双脂膜表面改性的蛋白质芯片的稳定性进行考察。分别使用 2M 氯化钠溶液, 1wt% Tween20 的 PBS 缓冲液 (pH7.2), 10mM 碳酸钠溶液和 100mM 盐酸溶液以  $20 \mu\text{l}/\text{min}$  流速冲洗该双脂膜表面改性蛋白质芯片 5 分钟, 在椭圆成像系统下观察, 蛋白质芯片形貌没有发生改变, 厚度没有变化。使用 PBS 缓冲液以  $20 \mu\text{l}/\text{min}$  流速冲洗 2 小时, 在椭圆成像系统下观察, 蛋白质芯片形貌仍保持完整。将蛋白质芯片在氮气流中干燥, 无尘储存 1 个月, 用水重新水化, 在椭圆成像系统下观察, 蛋白质芯片仍然是均匀的, 厚度没有发生改

变。将蛋白质芯片进行多次干燥—水化循环处理,在椭偏成像系统下观察,双脂膜仍能保持形貌完整,这些结果说明,本发明中的蛋白质芯片上的双脂膜是稳定的。

[0021] 综上所述,与现有技术相比,本发明提供的双脂膜表面改性蛋白质芯片优点在于:

[0022] 1、该双脂膜表面改性蛋白质芯片上固定的磷脂双分子层具有很高的蛋白质选择性,有效地阻止了蛋白质的非特异性吸附,此外该双脂膜改性装配的配基分子层具有很好的稳定性。

[0023] 2、由于本发明使用的 PEG 是一类惰性水溶性高分子,可以有效地抑制非特异性吸附;另一方面,PEG 长链作为连接臂,可以增加配基在溶液中的灵活性,减少空间阻碍,固定后的配基分子保持高生物活性。

### 附图说明

[0024] 图 1 是本发明的双脂膜表面改性蛋白质芯片的制备方法的示意图;

[0025] 图 2 是实施例 2 中经双脂膜表面改性后的蛋白质芯片表面在椭偏光学显微成像系统中观察到下述单元的灰度图 (A) 和相应的厚度分布图 (B);

[0026] 图 3 是实施例 3 中在椭偏光学显微成像系统中观察到下述单元的灰度图 (A) 和相应的厚度分布图 (B);其中,单元 1:双脂膜层;单元 2:结合 IgG 分子的双脂膜层;单元 3:结合 IgG、anti-IgG 分子的双脂膜层;单元 4:直接结合在醛基基片表面上的 IgG 膜层;单元 5:直接结合在醛基表面上的 IgG 结合的 anti-IgG 膜层。

### 具体实施方式

[0027] 实施例 1、制备 PEG 化的磷脂——对硝基苯酯基—聚乙二醇—(1,2—双油酰基—3—甘油磷脂酰乙醇胺)

[0028] 根据参考文献:p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes:fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups 中的方法,合成 pNP-PEG-DOPE

[0029] 1) 在 480  $\mu$ l 1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺溶液中加入 80  $\mu$ l 三乙胺和 5ml 聚乙二醇—双对硝基苯酯基溶液,将此混合溶液用氩气保护后在室温下静置过夜;

[0030] 所述的 1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺溶液为每 1ml 氯仿加入 50mg 1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺比例配置而成;

[0031] 所述的聚乙二醇—双对硝基苯酯基溶液为每 5ml 氯仿加入 1g 聚乙二醇—双对硝基苯酯基比例配置而成;

[0032] 2) 将混合液离心,弃去上层清液,将对硝基苯羰基—聚乙二醇—(1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺)胶束溶液用过量的 0.01M HCl 和 0.15M NaCl 进行水浴超声后冻干,经从氯仿中反复提取三次并冻干后于氯仿中保存在—80℃中。

[0033] 实施例 2、制备本发明的双脂膜表面改性蛋白质芯片

[0034] 1) 将硅基片裁成 10×20mm<sup>2</sup> 小片,放入 30wt% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和浓硫酸(体积比 1:3)混合溶液中浸泡 30 分钟,使基片羟基化,依次用水和乙醇清洗;将羟基化基片吹干后,放入 5wt% 3—氨基丙基—3 乙氧基硅烷和 95wt% 无水乙醇的混合溶液中,室温反应 2 小时,形成一层末

端为氨基的单分子自组装膜,依次用乙醇和水清洗3次;最后,用含有2.5wt%戊二醛的PBS溶液浸泡1小时,用PBS缓冲液清洗,得到表面形成活性醛基的基片;

[0035] 2) 在中国专利03102659.1中公开的用于制备生物芯片的微流道体系中,将步骤1)表面形成活性醛基的基片与微阵列模板紧密接触,并通过外力压紧;把L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺溶液通过微流道微细管子输送到基片上选定区域,30分钟后,L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺的胺基与基片上的醛基形成亚胺,在基片表面形成磷脂酰乙醇胺单分子层;然后通过微流道将PBS缓冲液输送到基片不同区域,将没有被固定在基片上的L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺分子清洗掉;

[0036] 所述的L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺溶液是按照每毫升PBS缓冲液(pH7.2)加入10mgL- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺和1wt% Tween20的比例配制而成的;

[0037] 3) 把实施例1中制备的PEG化磷脂溶液通过微流道微细管子输送到固定了L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺的基片上,30分钟后,由于疏水作用PEG化磷脂与基片上L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺单分子层形成双脂膜层;然后通过微流道将水输送到基片上,冲去缓冲液,将微阵列模板从基片上取下,即得到本发明的双脂膜表面改性蛋白质芯片;

[0038] 所述的PEG化磷脂溶液是按每毫升乙酸钠缓冲液(pH4.0)加入5mg对硝基苯酯基—聚乙二醇—(1,2—双油酰基—3—甘油磷脂乙醇胺)比例配制而成的。

[0039] 在椭偏光学显微成像系统中观察,经双脂膜表面改性后的蛋白质芯片的表面双脂膜层的灰度图(A)和相应的厚度分布图(B)如图2所示(每个芯片上有6个重复的单元),可以看出,由于磷脂分子的相对分子量较小,且结构比较简单,因此双脂膜的厚度相当薄(约1-1.2nm),在椭偏光学成像系统中观测,其灰度值较低。

[0040] 实施例3、本发明的双脂膜表面改性蛋白质芯片在作为椭偏成像生物传感器中的应用,

[0041] 在中国专利03102659.1中公开的用于制备生物芯片的微流道体系中,将实施例2中制得的磷脂双膜层上按下述方法固定人血免疫球蛋白G(IgG)再与人血免疫球蛋白抗体(anti-IgG)反应:

[0042] 所用的IgG(0.1mg/ml),anti-IgG(10wt%),牛血清白蛋白(BSA,10mg/ml)溶液均由PBS缓冲液配制。

[0043] 1) 通过微流道微细管子将IgG溶液输送到在实施例2中经磷脂双膜层成功改性的蛋白质芯片表面上,30分钟后,IgG分子的氨基基团与双脂膜上的pNP-PEG-DOPE分子末端的活性基团以氨基甲酸键共价稳定结合。之后,通过微流道微细管子将BSA溶液输送到上述反应单元中,反应30分钟,以封闭双脂膜表面未结合IgG分子的对硝基苯羰基活性基团。

[0044] 2) 与此同时,在另一单元中,用微流道微细管子将IgG溶液输送到未经双脂膜改性的醛基基片表面,30分钟后,IgG分子与醛基直接接合。同样用BSA溶液反应30分钟,封闭醛基基片表面未结合IgG分子的醛基活性基团。

[0045] 3) 分别用PBS缓冲液冲洗反应单元。

[0046] 4) 用微流道微细管子将anti-IgG溶液分别输送到上述单元的IgG膜层,反应30分钟后,用PBS缓冲液和去离子水冲洗。

[0047] 5) 用氮气吹干后在椭偏光学显微成像系统中观察,双脂膜层、结合IgG分子的双脂膜层、结合IgG和anti-IgG分子的双脂膜层、直接结合在醛基基片表面上的IgG膜层和

直接结合在醛基表面上的 IgG 结合的 anti-IgG 膜层在椭偏光学显微成像系统中观察到的灰度图 (A) 和相应的厚度分布图 (B) 如图 3 所示。由此结果可以看出,经磷脂双层膜改性后的基片表面结合的 IgG 分子特异性结合的 anti-IgG 分子比未经双脂膜改性的结合量多。双脂膜表面不仅可以组装配基分子,并能高度保持配基分子的生物活性。

[0048] 通过在该蛋白质芯片表面 PEG 末端官能基来共价固定配基分子人血免疫球蛋白 G(IgG),探测能与其特异性结合的靶分子人血免疫球蛋白 G 抗体 (anti-IgG),二者结合后,在椭偏成像系统中可以观察到蛋白质芯片表面上,经灰度图与厚度分布图比较,同样多的 IgG 配基分子,装配在双脂膜上比直接装配在醛基基片表面能结合更多的靶分子—anti-IgG 分子。说明与直接装配在醛基基片表面相比,IgG 分子的空间构象在装配到双脂膜上后改变得较小,较少地损失其与靶分子特异性结合的位点。IgG 分子的生物活性得以更好地保持。

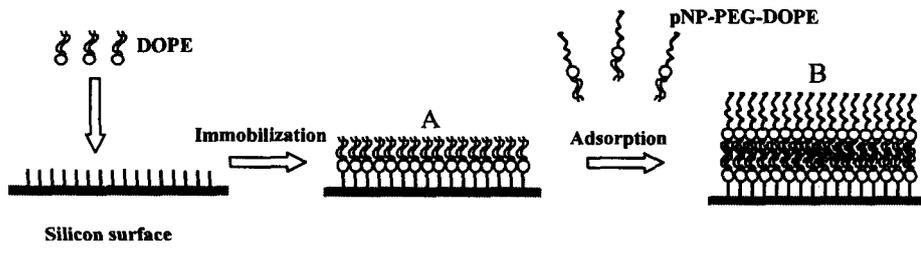


图 1

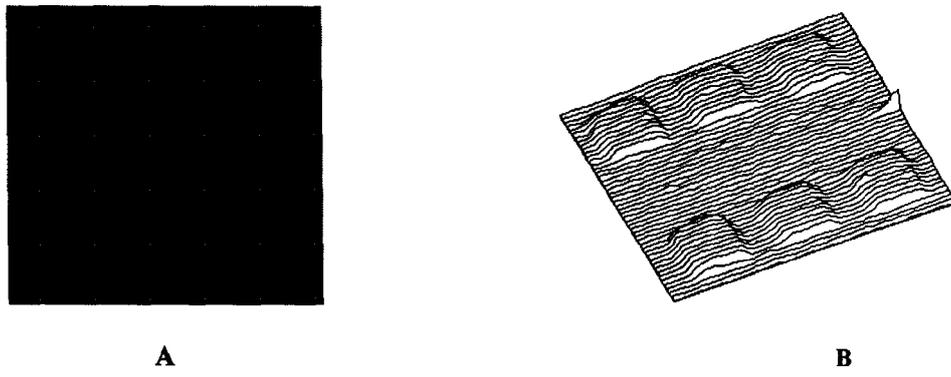


图 2

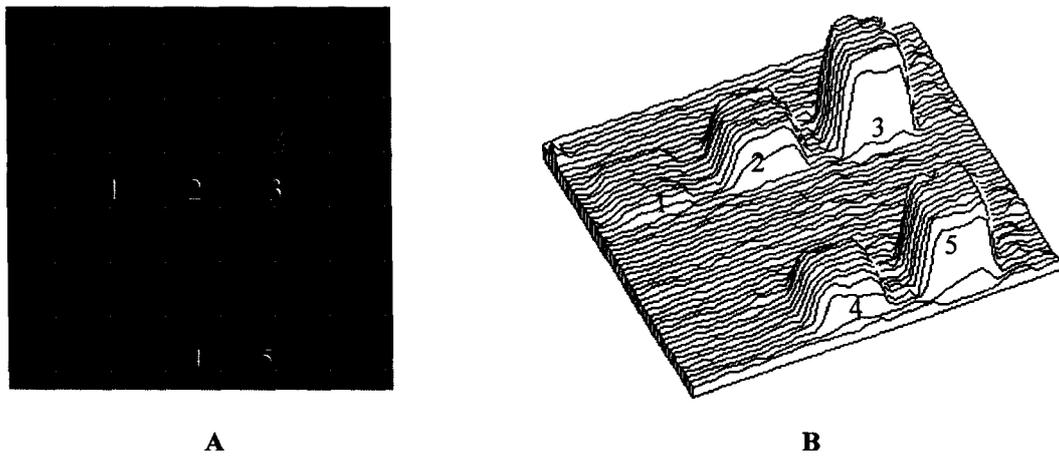


图 3