

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 1/28

G01N 23/22 G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01136816.0

[43] 公开日 2003 年 4 月 30 日

[11] 公开号 CN 1414363A

[22] 申请日 2001.10.24 [21] 申请号 01136816.0

[71] 申请人 中国科学院大连化学物理研究所

地址 116023 辽宁省大连市中山路 457 号

[72] 发明人 邹汉法 张清春 郭 忠 郭宝川

张 强 陈小明

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

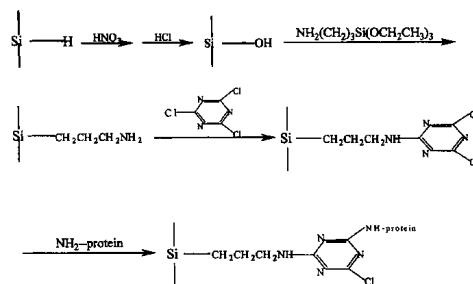
代理人 汪惠民

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 3 页

[54] 发明名称 生物活性靶体及用于药物筛选和蛋白质结构研究的方法

[57] 摘要

一种生物活性靶体的制备方法，用单晶硅在光诱导下进行电解制备多孔硅；用氧化酸进行氧化并用还原酸进行活化；多孔硅放入甲苯中，加入三乙氧基胺丙基硅烷，加热反应；键合蛋白质并用甘氨酸乙酯溶液进行封尾。一种生物活性靶用于药物筛选的方法，将含有目标药物分子的混合溶液点在键合了 BSA 的活性表面，数分钟后，用合适的溶剂冲洗，活性靶送入质谱仪进行分析。一种生物活性靶体用于蛋白质结构研究的方法，将蛋白质细胞色素 C 溶液点在键合有胰蛋白酶的多孔硅活性靶体表面，放置一段时间后将该多孔硅活性靶体送入质谱分析。



ISSN 1008-4274

- 1、一种生物活性靶体的制备方法，先用单晶硅制备多孔硅，然后将
5 多孔硅进行氧化和酸化，再对多孔硅进行胺丙基化，其特征在于，将胺
丙基化的多孔硅放入丙酮中，冰浴温度下加入三聚氯氰进行反应 1-3 小
时，再放入牛血清白蛋白或胰蛋白酶磷酸缓冲液中，水浴 35℃反应 1-3
小时，硅片用甘氨酸乙酯溶液进行封尾，时间 1.5-2.5 小时，温度为 30-40
℃。
- 10 2、如权利要求 1 所述的生物活性靶体的制备，其特征在于：
(1) 单晶硅制备多孔硅：以铂丝为阴极，硅片为阳极，氢氟酸和乙
醇的混合溶液为电解液，光诱导，控制恒定电流 90-95A，电解时间 40-50
分钟；
(2) 多孔硅的氧化和酸化：将步骤（1）制备的多孔硅浸入氧化酸
15 溶液中使其氧化 1-3 小时，再放入还原酸中 90-120℃下活化 4-6 小时，
水洗至中性，真空存放备用；
(3) 多孔硅的胺丙基化：将步骤（2）制备的多孔硅放入甲苯中，
加入三乙氧基胺丙基硅烷，100-130℃下反应 10-16 小时；
- 3、如权利要求 2 所述的生物活性靶体的制备方法，其特征在于，所
20 述电解液为 40-49%氢氟酸和无水乙醇按 3:2 (V/V) 的混合溶液。
- 4、如权利要求 2 所述的生物活性靶体的制备方法，其特征在于，所
述光诱导可用碘钨灯照射。
- 5、如权利要求 2 所述的生物活性靶体的制备方法，其特征在于，所
述氧化酸为硝酸，其浓度为 10-30%，还原酸为盐酸，其浓度为 15-25%。
- 25 6、如权利要求 2 所述的生物活性靶体的制备方法，其特征在于，所
述甲苯经过蒸馏以及钠丝干燥。
- 7、如权利要求 1 所述的生物活性靶体的制备方法，其特征在于，所
述牛血清白蛋白或胰蛋白酶磷酸缓冲液的 pH=6.5，甘氨酸乙酯溶液的
pH=6.7。
- 30 8、一种将权利要求 1 所述的生物活性靶用于药物筛选的方法，其特

征在于，将含有目标药物分子的混合溶液点在键合了牛血清白蛋白的活性靶体表面，数分钟后，用乙醇或甲醇冲洗，活性靶送入质谱仪进行分析。

- 5 9、一种将权利要求 1 所述的生物活性靶体用于蛋白质结构研究的方法，其特征在于，将蛋白质细胞色素 C 溶液点在键合有胰蛋白酶的多孔硅活性靶体表面，放置 2-4 小时后将该多孔硅活性靶体送入质谱分析。

生物活性靶体及用于药物筛选和蛋白质结构研究的方法

5

技术领域

本发明涉及一种生物活性靶的制备方法，具体地涉及一种用多孔硅为基质的活性靶体的制备方法；

本发明还涉及一种该生物活性靶用于药物筛选的方法；

10 本发明还涉及一种该生物活性靶用于蛋白质结构研究的方法。

背景技术

早期的亲和质谱直接将色谱填料置于靶表面，后来将配基直接固栽在基体辅助激光解吸电子化质谱（MALDI）靶上用于质谱分析，许多实
15 验室都对此方法进行了研究。一般是将抗体、受体或凝集素等固定在MALDI靶表面，样品中与亲和靶表面分子有非共价相互作用的成分被束缚在靶表面，并得到一定程度的浓缩。这种技术常见的问题主要有二个，一是容量问题，这个问题直接影响到检测的灵敏度；另一个是非特异性吸附，这将影响到选择性。为了提高相比的减小非特异性吸附，常在靶
20 子上接一层亲水聚合物，如葡聚糖等，然后在聚合物上接配基。常规MALDI亲和质谱技术中使用有机酸类基体，所以pH较低，有机浓度较高，容易使蛋白质等生化样品变性。此外，样品分子被大量的基体分子包围，导致结合位点可能被基体分子占据，从而丧失结合目的分子的能力。由于受基体干扰现象的限制，难以研究生物大分子与药物小分子之
25 间的相互作用。此外，在固定化酶切蛋白肽谱分析中，由于分子量500以下的肽片段与基体相关峰不能区分，因此丢失了很多有用的信息。多孔硅表面的解吸离子化飞行时间质谱（DIOS）
(J.Weil,J.M.Buriak,G.Suizdak,Nature 1999,399,243)，是一种不需要加入任何有机基体的新的解吸离子化方法。由于引入了多孔硅材料，故克服了
30 传统MALDI技术中的基体干扰现象，因而对分子量小的物质也可以很

好的分析,但其却无法研究小分子与蛋白间的相互作用。由于硅材料具有良好的化学反应性质,因而可通过一系列反应结合上生物大分子如蛋白、水解酶(Z.Qiang,Z.Hanfa, W.Hailin, N.Jianyi, J.Chromatogr.A.2000, 866, 173), 制得具有较高生物活性的亲和(蛋白或酶)靶, 而将 DIOS 及亲和作用两者有效结合起来, 达到药物筛选和蛋白一级结构分析的目的。

发明内容

本发明的目的在于提供一种生物活性靶体的制备方法, 该方法制备的靶体不需要加入有机基体, 可以克服传统 MALDI 技术中的基体干扰现象。

本发明的另一目的在于提供一种该生物活性靶体用于药物筛选的方法, 该方法在低分子量(小于 500 Da)药物的筛选中尤其存在优势, 同时, 该方法与微技术结合, 一次可以处理数十个样品, 并且每次的分析速度很快, 可以实现高通量筛选。

本发明的又一目的在于提供一种该生物活性靶体用于以蛋白质结构研究的方法, 该方法可以在活性靶体表面实现固定化酶酶解蛋白技术和分子量测定的一体化。

为实现上述目的, 本发明提供的一种生物活性靶体的制备方法, 主要包括如下步骤:

(1) 用 n 型晶体硅制备多孔硅: 以铂丝为阴极, 硅片为阳极, 电解液为 40-49%氢氟酸和无水乙醇按 3:2 (V/V) 的混合溶液, 进行光诱导, 控制恒定电流 90-95A, 电解时间 40-5-分钟;

(2) 多孔硅的氧化和酸化: 将步骤(1)制备的多孔硅浸入 10-30%的氧化性酸溶液中, 如 20%硝酸溶液, 使其氧化 1-3 小时, 再放入还原性酸溶液, 如 20%盐酸溶液中反应 4-6 小时, 温度控制在 110℃左右。然后用水洗至中性, 真空存放备用;

(3) 多孔硅的胺丙基化: 将步骤(2)制备的多孔硅在氮气保护下放入经过蒸馏、钠丝干燥的甲苯中, 加入三乙氧基胺丙基硅烷, 反应 10-16 小时;

(4) 多孔硅表面键合蛋白质: 将步骤(3)制备的的多孔硅放入丙

酮中，冰浴条件下加入三聚氯氰进行反应，并控制温度低于 5℃，反应时间约 2 小时，再放入 pH=6.5 的牛血清白蛋白（BSA）磷酸缓冲液中室温下反应 1-3 小时，硅片用 pH=6.7 的甘氨酸乙酯溶液进行封尾，时间控制在 2 小时左右，温度为 30-40℃。

- 5 通过上述步骤制备得到的键合了牛血清白蛋白（BSA）的硅片存放于 0.02% 的叠氮钠溶液中。胰蛋白酶的键合方法与牛血清白蛋白（BSA）的键合方法相同，因此对胰蛋白酶的键合方法不作描述。

本发明提供的上述生物活性靶体用于药物筛选的方法，其主要依据和作法是：

- 10 由于许多药物都与蛋白质有非共价相互作用，所以在多孔硅表面键合牛血清白蛋白，制备成活性靶体，用于发现何种物质有潜在成为药物的可能性。将含有目标药物分子的混合溶液点在键合了 BSA 的活性表面。1-5 分钟后，用乙醇、甲醇等溶剂的水溶液冲洗，目标药物分子会在活性靶表面有保留。而其他的与 BSA 没有相互作用的组分被冲走。将保留了目标药物分子的活性靶送入质谱仪进行分析，即可以得到目标分子的分子量信息。

本发明提供的上述生物活性靶体用于蛋白质结构研究的方法，其主要是：

- 20 将蛋白质细胞色素 C 溶液点在键合有胰蛋白酶的多孔硅活性靶体表面，放置 3-5 小时后将该多孔硅活性靶体送入质谱分析，可以得到细胞色素 C 被胰蛋白酶酶切后的肽片段质谱图。

由于该技术综合了固定化酶技术，因此酶的稳定性增加，并可重复使用；肽谱中不出现水解酶的自水解峰。又由于采用了多孔硅质谱技术，具有不需要加入传统的有机基体，无基体干扰峰出现的优点。

- 25 为了更好地理解本发明的实质，下面以实施例并结合附图作具体说明。

附图说明

- 图 1 为本发明制备活性靶体的过程示意图；
30 图 2 为本发明键合蛋白质的活性靶用于药物筛选的质谱图，其中

该图中 a 表示由新制备的多孔硅所得谱图；

该图中 b 表示样品经过与 BSA 亲和靶相互作用，冲洗后所得谱图；

该图中 c 为对照实验；

图 3 为本发明键合有胰蛋白酶的多孔硅活性靶水解马心细胞色素 C 所得到的肽谱图，其中：

该图中 a 表示不加入基体，直接进行质谱分析；

该图中 b 表示加入传统基体后进行质谱分析。

具体实施方式

10 实施例 1：生物活性靶体的制备

1) 本实施例采用的单晶硅面积为 1 平方厘米，放入电解槽内，铂丝为阴极，硅片为阳极，电解液按 40%氢氟酸:无水乙醇=3:2 (V/V) 的比例混合配制，接通电源后，用 300W 的碘钨灯照射加温，通过滑线变阻器控制所需的恒定电流 90-95A，电解时间 40-50 分钟。电解反应结束后
15 分别用水和无水乙醇冲洗多孔硅，氮气吹干，置于真空干燥器中保存。

2) 将制备好多孔硅浸入 5-10 ml 20%的 HNO₃ 溶液中反应 2 小时使其氧化，然后将多孔硅放入 20% 100 ml 的 HCl 中活化 5 小时，反应温度控制在 110℃。将活化后的多孔硅用离子水冲洗至中性，110℃下保存于真空干燥器中备用。

20 3) 取一定体积的甲苯于 150 ml 三口烧瓶内，加入 100 ml 新鲜的钠丝及指示剂二苯甲酮，加热至甲苯回流，保持溶液回流，直至溶液呈明显深蓝色。迅速取下冷凝管，换成蒸馏装置，蒸出的甲苯立即使用，以避免空气的氧化。在氮气保护下，将多孔硅放入蒸馏处理的甲苯中，量取三乙氧基胺丙基硅烷 8ml，在 120℃下反应 14 小时。胺丙基化的硅片
25 用甲苯冲洗三次后置于真空干燥器中干燥。

4) 将胺丙基化的硅片放入 80ml 丙酮中，冰浴温度控制在 0℃，缓慢搅拌下，将 3.7g 三聚氯氰缓慢加入，并控制温度不高于 5℃，反应 2 小时后，硅片放入 20mM 牛血清白蛋白 BSA 磷酸缓冲液，该缓冲液 pH=6.5，温度由水浴控制在 35℃，反应 2 小时，硅片用 1%W/W，pH=6.7
30 的甘氨酸乙酯溶液进行封尾，时间为 2 小时，温度控制在 35℃。

胰蛋白酶的键合方法与牛血清白蛋白 BSA 相同，只要将牛血清白蛋白 BSA 换成胰蛋白酶即可。

实施例 2：生物活性靶体用于药物筛选：

该实施例为比较例

5 (1) 将酮基布洛芬和舒必利的混合溶液点在新制备的多孔硅表面，直接进行质谱分析，谱图见图 1 (a)，质谱峰 255、277 和 293 分别对应 MH、MNa 和 MK。

 (2) 将酮基布洛芬和舒必利的混合溶液点在键合了牛血清白蛋白的活性亲和靶表面，约一分钟后，用 20 μ l 20%的乙醇冲洗，然后送入离子源，进行质谱分析，谱图见图 1 (b)，得到酮基布洛芬的谱峰，但舒必利的谱峰却没有出现。

 (3) 多孔硅经过与亲和靶相同的反应步骤，但没有键合 BSA，经过与实施例 2 相同的处理后，进行质谱分析，谱图见图 1(c)，从谱图中可以看出无样品峰出现。

15 通过上述 3 个例子可以出，酮基布洛芬与 BSA 有相互作用，并非多孔硅本身吸附等引起保留，而舒必利与牛血清白蛋白没有相互作用。

实施例 3：生物活性靶体用于蛋白质结构研究

 依照实施例子所示方法制备键合胰蛋白酶的活性靶，然后将浓度为 1 μ mol/l 的细胞色素 C 点在该活性靶表面。在室温下用该固定化酶水解蛋白质细胞色素 C。约 3 小时后，将反应后的活性靶送入质谱仪进行分析。所得到的水解后肽谱图见图 2 所示。其中 (a) 图加入了传统基体，直接将水解产物进行质谱分析；(b) 图中加入 0.5 μ l 传统基体 HCCA 后进行质谱分析。其中细胞色素 C 的水解肽片段峰均由 ◆ 标记出。利用所得肽谱数据，再结合互联网上的蛋白质数据库，即可验证该蛋白的一级结构。

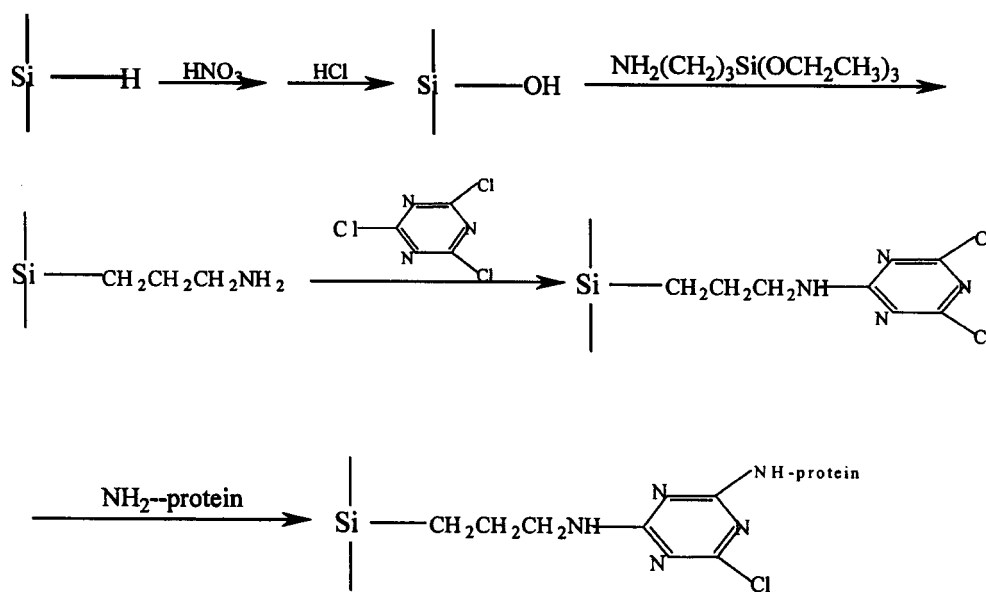


图 1

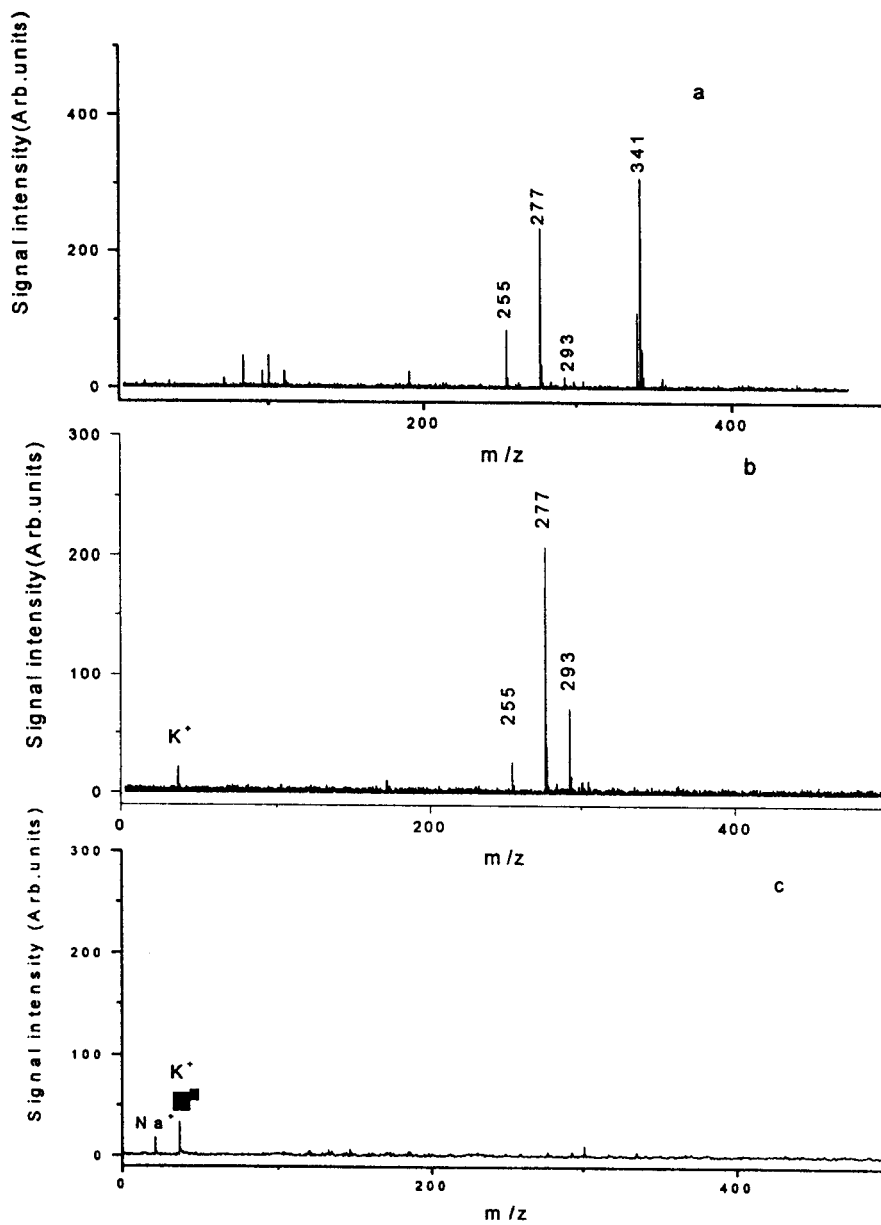


图 2

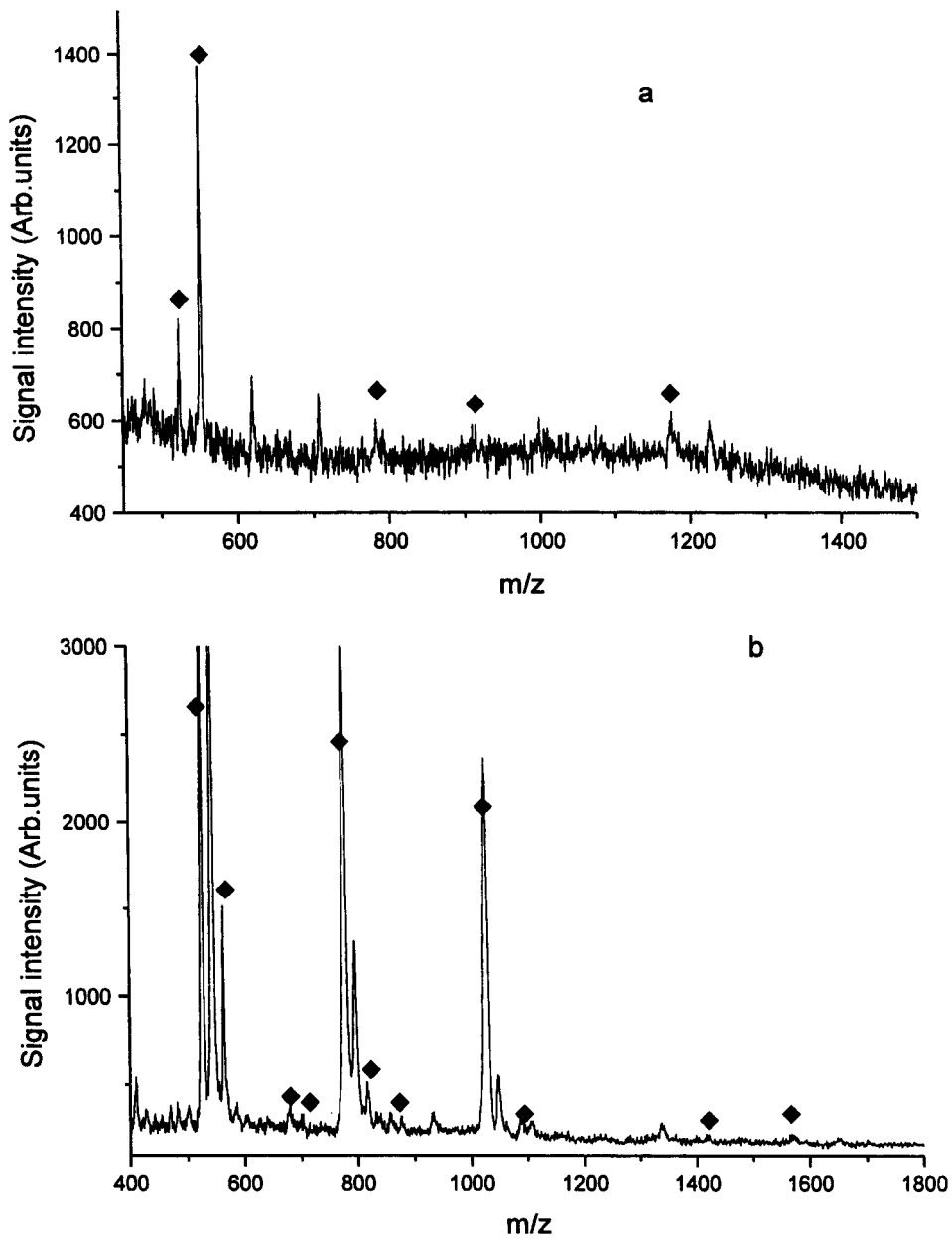


图 3

专利名称(译)	生物活性靶体及用于药物筛选和蛋白质结构研究的方法		
公开(公告)号	CN1414363A	公开(公告)日	2003-04-30
申请号	CN01136816.0	申请日	2001-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
[标]发明人	邹汉法 张青春 郭忠 郭宝川 张强 陈小明		
发明人	邹汉法 张青春 郭忠 郭宝川 张强 陈小明		
IPC分类号	G01N1/28 G01N23/22 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种生物活性靶体的制备方法，用单晶硅在光诱导下进行电解制备多孔硅；用氧化酸进行氧化并用还原酸进行活化；多孔硅放入甲苯中，加入三乙氧基胺丙基硅烷，加热反应；键合蛋白质并用甘氨酸乙酯溶液进行封尾。一种生物活性靶体用于药物筛选的方法，将含有目标药物分子的混合溶液点在键合了BSA的活性表面，数分钟后，用合适的溶剂冲洗，活性靶送入质谱仪进行分析。一种生物活性靶体用于蛋白质结构研究的方法，将蛋白质细胞色素C溶液点在键合有胰蛋白酶的多孔硅活性靶体表面，放置一段时间后将该多孔硅活性靶体送入质谱分析。

