



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110343182 A

(43)申请公布日 2019.10.18

---

(21)申请号 201910599807.4

(22)申请日 2019.07.04

(71)申请人 苏州贝蒂克生物技术有限公司

地址 215300 江苏省苏州市苏州相城经济  
技术开发区漕湖街道观塘路1号

(72)发明人 李子洋 钟留彪 王增 高恒兰

(74)专利代理机构 苏州根号专利代理事务所

(普通合伙) 32276

代理人 项丽

(51)Int.Cl.

C07K 17/14(2006.01)

C07K 17/08(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

---

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种基于基底表面的醛基修饰方法及验证  
其蛋白固定效果的方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于基底表面的醛基修饰方法,先将基底进行等离子体处理后,转移至氨基硅烷及乙醇的气化的真空腔室,修饰得第一修饰基底,抽掉真空腔室的气体并且接入戊二醛的乙醇稀释气体,修饰得第二修饰基底;随后通过固相表面醛基基团与蛋白抗体分子终端氨基结合形成化学结合,再将经过孵育的蛋白抗体封闭后,与蛋白抗原的PBS溶液进行免疫反应,从荧光强度得知,采用上述方法既可以稳定的固定蛋白且可实现低荧光信噪比且量产化的功能。

1.一种基于基底表面的醛基修饰方法,其特征在于,它包括以下步骤:

(a) 将干净的基底进行等离子体处理后,转移至氨基硅烷及乙醇的气化的真空腔室,保压维持,修饰得第一修饰基底,所述的氨基硅烷与乙醇的体积比为1:50-1:400;

(b) 抽掉所述的真空腔室的气体并且接入戊二醛的乙醇稀释气体,保压维持,修饰得第二修饰基底,所述的戊二醛与所述的乙醇的体积比为1:50-1:200:。

2.根据权利要求1所述的基于基底表面的醛基修饰方法,其特征在于:步骤(a)中,将干净的基底进行等离子体处理5min-10min,并在氧气的氛围下保持压强在30-50Pa以下。

3.根据权利要求1所述的基于基底表面的醛基修饰方法,其特征在于:步骤(a)中,所述的保压维持为保持压强在30Pa-50Pa下维持5-15min。

4.根据权利要求1所述的基于基底表面的醛基修饰方法,其特征在于:步骤(b)中,所述的保压维持为保持压强在30Pa-100Pa下维持10-20min。

5.一种验证如权利要求1-4所述的经醛基修饰基底的蛋白固定效果的方法,其特征在于,它包括以下步骤:

S1、在所述的经醛基修饰基底的点样区孵育单抗蛋白,移取点样至孵育区,再进行恒温孵育完成基底的醛基与单抗蛋白的固定结合;

S2、将孵育好的经单抗蛋白包被的基底浸入BSA的PBS溶液中,置于恒温振荡器温育以达到对基底表面的封闭,再取出反复冲洗,备用;

S3、将经S2封闭的基底贴亲水薄膜,再在基底的加样区加入单抗蛋白抗原的PBS溶液进行免疫反应;

S4、将经免疫反应的基底通过荧光测试仪,测定其荧光强度。

6.根据权利要求5所述的经醛基修饰基底的蛋白固定效果的方法,其特征在于:S1中,所述的单抗蛋白为甲胎蛋白抗体,所述的甲胎蛋白抗体的浓度为100-200ng/ml。

7.根据权利要求5所述的经醛基修饰基底的蛋白固定效果的方法,其特征在于:S1中,恒温孵育的温度为37℃,时间为4-12h。

8.根据权利要求5所述的经醛基修饰基底的蛋白固定效果的方法,其特征在于:S2中,BSA的PBS溶液的浓度为1mg/ml,置于恒温振荡器37℃温育1小时以达到对基底表面的封闭。

9.根据权利要求5所述的经醛基修饰基底的蛋白固定效果的方法,其特征在于:S3中,单抗蛋白抗原的PBS溶液的浓度为2ug/ml。

10.根据权利要求5所述的经醛基修饰基底的蛋白固定效果的方法,其特征在于:S4中,将经免疫反应的基底在10-15min内通过荧光测试仪进行荧光强度的测试。

# 一种基于基底表面的醛基修饰方法及验证其蛋白固定效果的方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于基底表面的醛基修饰方法及验证其蛋白固定效果的方法。

## 背景技术

[0002] 随着临床检测的日益发展,人们对于即时快速检测且准确预测疾病的需求日益重要。以塑料芯片作为基材检测疾病以及农药残留等快检产品不断受到广泛关注,但是在IVD(体外诊断)微流控领域能否做到准确的定量还存在着挑战。

[0003] 快检以及临床检测芯片以及测试卡最重要的程序就是在固相表面固定嫁接蛋白质。目前固相表面有硅片、载玻片、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、硝酸纤维膜等材料。常见的蛋白组装固定方式有疏水吸附,基质表面单体改性以及固相表面修饰聚合物等方法。如何在不同的固相表面固定足够多的保持生物活性的蛋白质分子是具有挑战性的工作,也是众多蛋白质组学研究者孜孜追求的目标。

[0004] 常规芯片修饰大部分采用溶液法,在浓硫酸和双氧水中浸泡达到表面活化,在转移至氨基溶液和含醛基分子的溶液达到表面带有醛基官能团,但是这样耗时且产量低并且对塑料芯片会产生直接的破坏结构。

[0005] 此外对于传统的通过蛋白质疏水吸附固相表面的方式,蛋白质在疏水材料表面吸附引起构象改变大小比蛋白质在亲水材料吸附后的构象改变大并且蛋白质很容易失活,这对于临床检测的定量以及灵敏度产生很大的挑战。由于蛋白质是具有空间构象的生物大分子,所以蛋白质分子的吸附大部分采用表面修饰以及嫁接配基分子的方法,通过共价连接实现蛋白质的定量固定。首先需要在固相基底表面(硅片、塑料等)衍生出化学的基团,然后通过化学反应将蛋白质分子偶联固定到化学活化的固相表面。这种固定蛋白质过程中,如何提高偶联的效率已经保证背景信号干扰是主要挑战之一。目前的表面处理方法以及共价偶联的方法有氨基、醛基、生物亲和聚合物(多巴胺、聚赖氨酸等),其中普遍使用氨基修饰的基片,这类的芯片多数应用在基因检测由于其通过物理吸附作用把蛋白固定在固相表面,这种方法便于制备且成本低,但经常出现蛋白固定率低,表面修饰不好产生均一性差,会有背景较高的杂质点出现影响芯片的定量测试等问题。而对于聚合物修饰的芯片可以很好的解决蛋白质芯片在固相表面固定的结合量且蛋白质结合更稳定生物亲和性好,但是由于聚合物分子本身链长、空间分布复杂且分子量大,很容易在探针分子结合到蛋白质芯片表面时产生很高的非特异性吸附导致较高的信噪比。

## 发明内容

[0006] 本发明目的是为了克服现有技术的不足而提供一种基于基底表面的醛基修饰方法及验证其蛋白固定效果的方法。

[0007] 本发明的第一个目的在于提供一种基于基底表面的醛基修饰方法,它包括以下步骤:

[0008] (a) 将干净的基底进行等离子体处理后,转移至氨基硅烷及乙醇的气化的真空腔室,保压维持,修饰得第一修饰基底,所述的氨基硅烷与乙醇的体积比为1:50-1:400;

[0009] (b) 抽掉所述的真空腔室的气体并且接入戊二醛的乙醇稀释气体,保压维持,修饰得第二修饰基底,所述的戊二醛与所述的乙醇的体积比为1:50-1:200。

[0010] 具体地,步骤(a)中,将干净的基底进行等离子体处理5min-10min,并在氧气的氛围下保持压强在30-50Pa以下。

[0011] 具体地,步骤(a)中,所述的保压维持为保持压强在30Pa下维持5min。

[0012] 具体地,步骤(b)中,所述的保压维持为保持压强在100Pa下维持10min。

[0013] 具体地,所述的基底为选自塑料芯片、玻璃或硅模板中的一种。

[0014] 优选地,所述的塑料芯片为选自聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯中的一种。

[0015] 优选地,所述的玻璃选取较低荧光干扰且干净的含硼化物的玻璃。

[0016] 优选地,所述的基底在使用前会用超声机清洗,再用去离子水冲洗后烘干备用。

[0017] 优选地,所述的氨基硅烷与乙醇的体积比为1:200-1:400。

[0018] 优选地,所述的戊二醛与所述的乙醇的体积比为1:50-1:100。

[0019] 本发明中,步骤(a)干净的基底进行等离子体处理以后,处理完的基底表面会产生大量的自由基以及羟基,再转移到氨基硅烷气化的真空腔室得到第一修饰基底,基底表面嫁接了氨基基团。氨基硅烷由于挥发温度在135℃,在真空条件下氨基硅烷气化温度会降低、同时氨基硅烷和乙醇稀释剂的配比也起着重要作用。

[0020] 步骤(b)抽掉所述的真空腔室的气体并且接入戊二醛的乙醇稀释气体,保压维持,修饰得第二修饰基底,此时基底表面嫁接了醛基基团。

[0021] 本发明的第二个目的在于提供一种验证如上所述的经醛基修饰基底的蛋白固定效果的方法,它包括以下步骤:

[0022] S1、在所述的经醛基修饰基底的点样区孵育单抗蛋白,移取点样至孵育区,再进行恒温孵育完成基底的醛基与单抗蛋白的固定结合;

[0023] S2、将孵育好的经单抗蛋白包被的基底浸入BSA的PBS溶液中,置于恒温振荡器温育以达到对基底表面的封闭,再取出反复冲洗,备用;

[0024] S3、将经S2封闭的基底贴亲水薄膜,再在基底的加样区加入单抗蛋白抗原的PBS溶液进行免疫反应;

[0025] S4、将经免疫反应的基底通过荧光测试仪,测定其荧光强度。

[0026] 本发明S1中,醛基与单抗蛋白的固定结合是通过单抗蛋白终端携带的氨基与基底上嫁接的醛基终端经过脱水形成schiff碱的化学稳定的结合:DNA-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>+R-CHO→DNA-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N=OHC-R;这种牢固的化学结合方式相比于普通的基底单纯的物理吸附作用,大大提高了抗体的固定率。

[0027] 本发明S3中,在基底的加样区加入单抗蛋白抗原的PBS溶液进行免疫反应,即抗原通过微孔道进入一抗反应区实现抗原抗体的特异性结合。

[0028] 具体地,S1中,所述的单抗蛋白为甲胎蛋白抗体,所述的甲胎蛋白抗体的浓度为100-200ng/ml。

[0029] 优选地,所述的甲胎蛋白抗体的浓度为100ng/ml。

[0030] 具体地,S1中,恒温孵育的温度为37℃,时间为4-12h。

- [0031] 优选地，所述的恒温孵育的温度为37℃，时间为4h。
- [0032] 具体地，S2中，BSA的PBS溶液的浓度为5-10mg/ml，置于恒温振荡器37℃温育1-2小时以达到对基底表面的封闭。
- [0033] 优选地，所述的BSA的PBS溶液的浓度为8-10mg/ml。
- [0034] 具体地，S3中，单抗蛋白抗原的PBS溶液的浓度为1-3ug/ml。
- [0035] 优选地，所述的单抗蛋白抗原的PBS溶液的浓度为2-3ug/ml。
- [0036] 具体地，S4中，将经免疫反应的基底在15min内通过荧光测试仪进行荧光强度的测试。
- [0037] 由于上述技术方案运用，本发明与现有技术相比具有下列优点：先将基底表面修饰醛基，再利用固相基底修饰的醛基分子来固定蛋白，通过固相表面醛基基团与蛋白分子终端氨基结合形成化学结合，既可以稳定的固定蛋白质且可实现低信噪比且量产化的功能。

## 附图说明

- [0038] 图1为本发明基底表面醛基化的流程图；
- [0039] 图2为基底的结构示意图；
- [0040] 图3为蛋白在已经醛基化的基底上结合的示意图。

## 具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明，但本发明并不限于以下实施例。实施例中采用的实施条件可以根据具体使用的不同要求做进一步调整，未注明的实施条件为本行业中的常规条件。

[0042] 本发明的基底选择塑料芯片，下面直接称为“芯片”。

[0043] 实施例1

[0044] 本实施例提供一种基于芯片表面的醛基修饰方法及验证其蛋白固定效果的方法，它包括以下步骤：

[0045] (a) 取芯片置于烧杯中，超声15分钟，再用去离子水冲洗后放入烘箱备用；然后将干净的芯片进行等离子体处理5min，并且在氧气的氛围下压强保持在50Pa以下；将处理过的芯片转移至氨基硅烷及乙醇的气化的真空腔室(氨基硅烷与乙醇的体积比为1:200)，芯片在气化氨基硅烷的真空腔室内压强保持50Pa下维持5min，从而芯片的表面直接嫁接了氨基基团得到第一修饰芯片；

[0046] (b) 抽掉气化氨基硅烷的真空腔室的气体，同时往腔室中接入戊二醛的乙醇稀释气体(戊二醛与乙醇的体积比为1:100)，芯片在腔室内压强50Pa下维持15min；从而芯片的表面直接嫁接了醛基基团得到第二修饰芯片。

[0047] 测试：芯片修饰完成后，我们采用如下方法验证其蛋白固定的效果：

[0048] S1：在经修饰的芯片的点样区孵育甲胎蛋白100ng/ml，随后用移液枪移取1uL点样至孵育区，放入恒温38℃的烘箱中孵育4h；

[0049] S2：将孵育好的甲胎蛋白包被的芯片浸入含有10mg/ml BSA的PBS溶液中，置于恒温振荡器37℃温育1h以达到对芯片表面的封闭；封闭好的芯片取出PBS缓冲液反复冲洗3遍

放入37℃烘箱备用；

[0050] S3：将封闭完成的芯片贴亲水薄膜，然后在芯片的点样区加入2ug/ml的甲胎蛋白抗原（抗原表面带有荧光微球）的PBS溶液，实现抗原抗体的特异性结合；

[0051] S4：将免疫反应后的芯片在15min内通过荧光测试仪，测定其荧光强度。

[0052] 测试同批相同处理工艺芯片10组得出的荧光信号的变异系数CV值为8.45%。

[0053] 实施例2

[0054] 本实施例提供一种基于芯片表面的醛基修饰方法，它与实施例1中的基本一致，不同的是：步骤(a)中，氨基硅烷与乙醇的体积比为1:50。测试同批相同处理工艺芯片10组得出的荧光信号的变异系数CV值为14.3%。

[0055] 实施例3

[0056] 本实施例提供一种基于芯片表面的醛基修饰方法，它与实施例1中的基本一致，不同的是：步骤(a)中，氨基硅烷与乙醇的体积比为1:400。测试同批相同处理工艺芯片10组得出的荧光信号的变异系数CV值为13.6%。

[0057] 实施例4

[0058] 本实施例提供一种基于芯片表面的醛基修饰方法，它与实施例1中的基本一致，不同的是：步骤(b)中，戊二醛与乙醇的体积比为1:200。测试同批相同处理工艺芯片10组得出的荧光信号的变异系数CV值为14.1%。

[0059] 实施例5

[0060] 本实施例提供一种基于芯片表面的醛基修饰方法，它与实施例1中的基本一致，不同的是：步骤(b)中，戊二醛与乙醇的体积比为1:50。测试同批相同处理工艺芯片10组得出的荧光信号的变异系数CV值为13.2%。

[0061] 对比例1

[0062] 本实施例采用溶液法，将芯片在浓硫酸与双氧水中浸泡达到表面活化，再转移到氨基溶液和含醛基分子的溶液中，使得芯片表面嫁接醛基团。

[0063] 验证蛋白固定效果的步骤与实施例1一致。

[0064] 对比例1中的浓硫酸对芯片产生直接的破坏作用，无法进行后续的嫁接与效果验证。

[0065] 对比例2

[0066] 芯片未做醛基修饰，验证蛋白固定效果的步骤与实施例1一致。

[0067] 测试同批相同处理工艺芯片10组得出的荧光信号的变异系数CV值为20%。

[0068] 将实施例1的十组平行实验与对比例2的十组平行实验测算的荧光强度的稳定性数据，列于表1。

[0069]

芯片编号	荧光强度--醛基修饰	荧光强度--未做修饰
1	347571	52359
2	361810	64976
3	372677	197709
4	374680	203521
5	378886	207049

6	395992	235372
7	405594	262913
8	423945	286883
9	432541	303807
10	450977	333005
Mean	394467.3	253782.4
STD	33354.84	50921.63
CV	8.45%	20%

[0070] 表1

[0071] 如表1所示,醛基修饰芯片与未做修饰芯片的CV值分别为8.45%和20%,可见醛基修饰后芯片在蛋白固定的效果明显优于未作修饰的芯片。变异系数CV值作为评判芯片荧光信号强度的标准,市面上普遍认为其同批相同处理工艺的芯片CV低于15%才得到市场认可。

[0072] 对比例中的芯片未做修饰或者做了常规的修饰,耗费时间长且产量低,对芯片会产生直接的破坏结构。因此芯片的合格率低,在基材检测疾病以及农药残留等快检产品中使用不佳。而采用本发明的方法进行醛基修饰,验证蛋白固定效果佳。通过表1我们可以发现做完醛基处理的芯片批内差异明显小于未作处理的芯片。

[0073] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

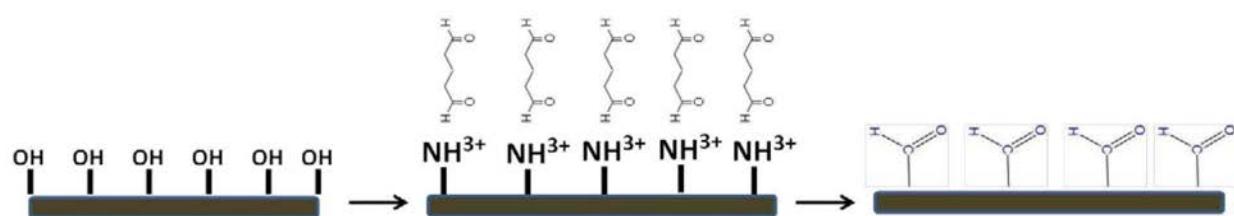


图1

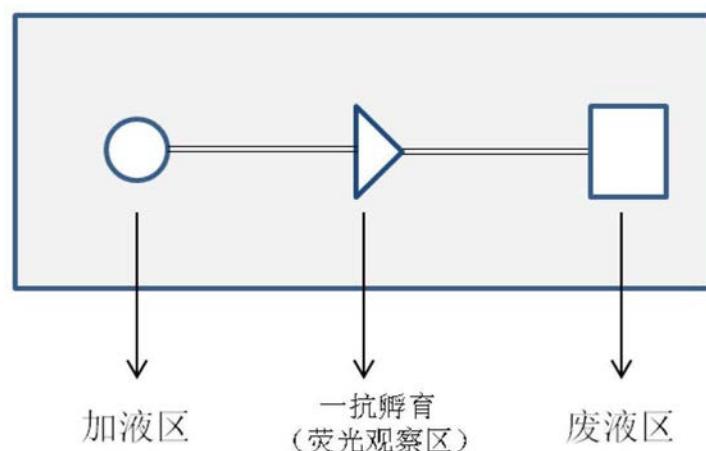


图2

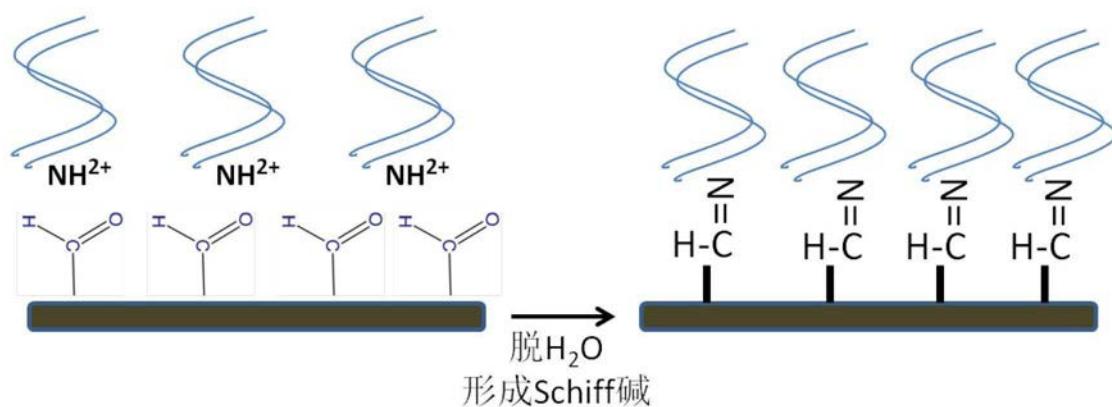


图3

专利名称(译)	一种基于基底表面的醛基修饰方法及验证其蛋白固定效果的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110343182A</a>	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201910599807.4	申请日	2019-07-04
[标]发明人	李子洋 钟留彪 王增		
发明人	李子洋 钟留彪 王增 高恒兰		
IPC分类号	C07K17/14 C07K17/08 G01N21/64 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	项丽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明涉及一种基于基底表面的醛基修饰方法，先将基底进行等离子体处理后，转移至氨基硅烷及乙醇的气化的真空腔室，修饰得第一修饰基底，抽掉真空腔室的气体并且接入戊二醛的乙醇稀释气体，修饰得第二修饰基底；随后通过固相表面醛基基团与蛋白抗体分子终端氨基结合形成化学结合，再将经过孵育的蛋白抗体封闭后，与蛋白抗原的PBS溶液进行免疫反应，从荧光强度得知，采用上述方法既可以稳定的固定蛋白且可实现低荧光信噪比且量产化的功能。

