



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101956000 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 201010233646. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 07. 19

C12Q 1/68 (2006. 01)

(71) 申请人 博奥生物有限公司

G01N 33/535 (2006. 01)

地址 102206 北京市昌平区生命科学园路
18 号

G01N 33/68 (2006. 01)

申请人 清华大学

(72) 发明人 郭素 王国青 张国豪 王璨

韩蓓 刘淼 张锦秀 邓涛

邢婉丽 程京

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅 任风华

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 3 页

(54) 发明名称

可控释放生物分子的方法及可控释放生物分子的生物芯片

(57) 摘要

本发明公开了可控释放生物分子的方法及可控释放生物分子的生物芯片。该方法包括如下步骤：将生物分子与高分子聚合物通过静电吸附或范德华力结合，得到生物分子-高分子聚合物结合物；通过控制外部条件，再将所述结合物中的生物分子与高分子聚合物分开，从而释放所述生物分子；所述高分子聚合物为与所述生物分子发生静电吸附作用或范德华力作用的高分子聚合物。实验证明，通过本方法制备的芯片中，生物分子的释放是可以认为控制的，如通过温度、超声控制，从而使其应用更便捷；包被后的生物分子的活性没有明显改变；包被的生物分子在高分子聚合物的保护下具有抗冲刷能力。本发明的芯片及其制备方法，所需的材料及仪器廉价、易得、简便，且有普适性，因此极具推广潜力，对扩增芯片的设计和制造有着重要意义。

1. 一种可控释放生物分子的方法,包括如下操作步骤:将生物分子与高分子聚合物通过静电吸附或范德华力结合,得到生物分子-高分子聚合物结合物;通过控制外部条件,再将所述结合物中的生物分子与高分子聚合物分开,从而释放所述生物分子;

所述高分子聚合物为与所述生物分子发生静电吸附作用或范德华力作用的高分子聚合物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述将生物分子与高分子聚合物通过静电吸附或范德华力结合的方法包括如下步骤:将所述生物分子和所述高分子聚合物混合或将所述生物分子和所述高分子聚合物分层叠放在一起,孵育。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述孵育的条件包括:温度为 10°C - 95°C 或 25°C - 80°C 和孵育时间为0.1h-2月或0.1h-2h;所述温度具体为 25°C 、 50°C 或 80°C ;所述孵育的时间具体为0.1h、1h或2h。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的方法,其特征在于:所述孵育条件包括真空。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的方法,其特征在于:所述生物分子为DNA、RNA或蛋白质;所述高分子聚合物为壳聚糖、琼脂糖、多聚赖氨酸、聚乙二醇、明胶或聚乙烯醇。

6. 根据权利要求1-5中任一所述的方法,其特征在于:所述高分子聚合物和所述生物分子的配比如下1)或2)或3)所示:

1) 壳聚糖与每种DNA的配比为 $(1.0\mu\text{g}-156\mu\text{g})$ 壳聚糖: $(0.01\text{pmol}-50\text{pmol})$ 每种DNA、 $(1.0\mu\text{g}-156\mu\text{g})$ 壳聚糖: $(1.0\text{pmol}-10\text{pmol})$ 每种DNA、 $(1.0\mu\text{g}-100\mu\text{g})$ 壳聚糖: $(1.0\text{pmol}-10\text{pmol})$ 每种DNA或 $(13.3\mu\text{g}-156\mu\text{g})$: 1.5pmol 每种DNA,具体为 $13.3\mu\text{g} : 1.5\text{pmol}$ 、 $97.5\mu\text{g} : 1.5\text{pmol}$ 、 $50\mu\text{g} : 1.5\text{pmol}$ 、 $20\mu\text{g} : 1.5\text{pmol}$ 或 $156\mu\text{g} : 1.5\text{pmol}$;

2) 琼脂糖与每种DNA的配比为 $(1.0\mu\text{g}-200\mu\text{g})$ 琼脂糖: $(0.01\text{pmol}-50\text{pmol})$ 每种DNA或 $(1.0\mu\text{g}-200\mu\text{g})$ 琼脂糖: $(1.0\text{pmol}-10\text{pmol})$ 每种DNA,具体为 $(75\mu\text{g}-150\mu\text{g})$ 琼脂糖: 1.2pmol ,再具体为 $150\mu\text{g} : 1.2\text{pmol}$ 或 $75\mu\text{g} : 1.2\text{pmol}$;

3) 多聚赖氨酸与每种DNA的配比为 $(0.1\mu\text{g}-10.0\mu\text{g})$ 多聚赖氨酸: $(0.01\text{pmol}-50\text{pmol})$ 每种DNA或 $(0.1\mu\text{g}-10.0\mu\text{g})$ 多聚赖氨酸: $(1.0\text{pmol}-10\text{pmol})$ 每种DNA,具体为 $(3\mu\text{g}-10.0\mu\text{g})$ 多聚赖氨酸: 1.2pmol 每种DNA,再具体为 $3\mu\text{g} : 1.2\text{pmol}$ 或 $10\mu\text{g} : 1.2\text{pmol}$ 。

7. 根据权利要求1-6中任一所述的方法,其特征在于:所述通过控制外部条件,再将所述结合物中的生物分子与高分子聚合物分开是通过向所述结合物中加入溶液和调节所述结合物所处环境的温度实现的,或通过向所述结合物中加入溶液并进行超声实现的;所述溶液为水或扩增反应液。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述调节所述结合物所处环境的温度为如下1)、2)或3)所示:

1) 所述高分子聚合物为壳聚糖,将所述结合物所处环境的温度调节至 50°C - 70°C ,并在此温度下保持5min-60min或10min-60min或15min-60min或10min-15min或5min-15min,具体是如下a)或b)或c)所示:a)将所述结合物所处环境的温度调节至 67°C - 70°C ,并在此温度下保持10min;b)将所述结合物所处环境的温度调节至 50°C ,并在此温度下保持15min;c)将所述结合物所处环境的温度调节至 70°C ,并在此温度下保持

10min ;

2) 所述高分子聚合物为琼脂糖,将所述结合物所处环境的温度调节至 50℃ -70℃,并在此温度下保持 20min-60min ;

3) 所述高分子聚合物为多聚赖氨酸,将所述结合物所处环境的温度调节至 50℃ -70℃,并在此温度下保持 20min-60min。

9. 根据权利要求 2-8 中任一所述的方法,其特征在于:所述方法中,包括如下步骤:将所述结合物通过范德华力吸附在固相载体上,得到包被有所述结合物的固相载体;

所述固相载体为芯片片基、酶联免疫酶标板、试管或离心管;

所述固相载体的材质选自下:金属、玻璃、石英、硅、陶瓷、塑料、橡胶和硅铝酸盐化合物。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述将结合物通过范德华力吸附在固相载体上的方法为如下 1) 或 2) 所示:

1) 将所述生物分子的溶液和所述高分子聚合物的溶液混合,将得到的混合物加到所述固相载体上,再在温度为 10℃ -95℃ 或 25℃ -80℃ 和真空的条件下孵育 0.1h-2month,具体为在 50℃ 和真空的条件下孵育 1h 或在 25℃ 和真空的条件下孵育 0.1h 或在 80℃ 和真空的条件下孵育 2h ;

2) 将所述生物分子的溶液加到所述固相载体上,除去生物分子的溶液中的溶剂,再加入高分子聚合物的溶液,再在温度为 10℃ -95℃ 或 25℃ -80℃ 和真空的条件下孵育 0.1h-2month,具体为在 50℃ 和真空的条件下孵育 1h 或在 25℃ 和真空的条件下孵育 0.1h 或在 80℃ 和真空的条件下孵育 2h。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在于:所述除去生物分子的溶液中的溶剂的方法为在 50℃ 和真空的条件下放置 1 分钟。

12. 由权利要求 10 或 11 所述方法得到的包被有所述结合物的固相载体;

所述固相载体为用于扩增目的生物分子的芯片,所述目的生物分子为 DNA 或 RNA。

可控释放生物分子的方法及可控释放生物分子的生物芯片

技术领域

[0001] 本发明涉及可控释放生物分子的方法及可控释放生物分子的生物芯片。

背景技术

[0002] 生物芯片以其分析速度快、微型化、易于集成的优点,被广泛应用于基因研究领域,其中扩增芯片作为生物芯片的一个重要部分,在疾病检测、药物筛选、法医鉴定等方面已经显出巨大的应用前景。

[0003] 在扩增芯片中,由于装置微型化大大降低了样品量,因此如何实现在微观尺度上的生物分子的有效释放直接决定了生物反应效率的高低。目前的扩增技术中,各种生物样品的释放方式主要有几种方式。一种是直接释放,即在反应前将生物样品混合均匀后加入到芯片中,不在反应过程中额外引入释放步骤。另一种是加入释放,即通过流体控制,在不同时刻单独加入反应样品进行释放。但是直接释放方式不能实现多种样品同时独立扩增,而加入释放方式需要另外加入控制流体的装置,如并行的进样管道等,提高了芯片制作的复杂性。也有研究人员提前将一种反应物固定于芯片中,再加入其它反应物,以实现 PCR 反应。但是这种预先固定一种反应物的做法也有缺陷:若反应物是通过非共价方式固定于芯片中,则在后续进样过程中由于流体冲刷导致反应物损失或污染;若通过共价方式固定于芯片中,则可能会导致生物分子反应效率降低。在这种情况下,急需一种能在扩增芯片中简便、可控、又不影响反应效率的生物分子释放方式,以满足高通量、高效、廉价的扩增芯片发展要求。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种可控释放生物分子的方法。

[0005] 本发明所提供的可控释放生物分子的方法,包括如下操作步骤:将生物分子与高分子聚合物通过静电吸附或范德华力结合,得到生物分子-高分子聚合物结合物;通过控制外部条件,再将所述结合物中的生物分子与高分子聚合物分开,从而释放所述生物分子;

[0006] 所述高分子聚合物为与所述生物分子发生静电吸附作用或范德华力作用的高分子聚合物。

[0007] 上述方法中,所述将生物分子与高分子聚合物通过静电吸附或范德华力结合的方法包括如下步骤:将所述生物分子和所述高分子聚合物混合或将所述生物分子和所述高分子聚合物分层叠放在一起,孵育。

[0008] 上述方法中,所述孵育的条件包括:温度为 10℃-95℃或 25℃-80℃和孵育时间为 0.1h-2 月或 0.1h-2h;所述温度具体为 25℃、50℃或 80℃;所述孵育的时间具体为 0.1h、1h 或 2h。

[0009] 上述方法中,所述孵育的条件包括真空。

[0010] 上述方法中,所述生物分子为 DNA、RNA 或蛋白质;所述高分子聚合物为壳聚糖、琼

脂、多聚赖氨酸、聚二醇、明胶或聚乙烯醇。

[0011] 上述方法中,多聚赖氨酸的数均分子量为 25000-40000g/mol。

[0012] 上述方法中,所述高分子聚合物和所述生物分子的配比如下 1) 或 2) 或 3) 所示:

[0013] 1) 壳聚糖与每种 DNA 的配比为 (1.0 μ g-156g) 壳聚糖 : (0.01pmol-50pmol) 每种 DNA、(1.0 μ g-156 μ g) 壳聚糖 : (1.0pmol-10pmol) 每种 DNA、(1.0 μ g-100 μ g) 壳聚糖 : (1.0pmol-10pmol) 每种 DNA 或 (13.3 μ g-156 μ g) : 1.5pmol 每种 DNA, 具体为 13.3 μ g : 1.5pmol、97.5 μ g : 1.5pmol、50 μ g : 1.5pmol、20 μ g : 1.5pmol 或 156 μ g : 1.5pmol ;

[0014] 2) 琼脂糖与每种 DNA 的配比为 (1.0 μ g-200 μ g) 琼脂糖 : (0.01pmol-50pmol) 每种 DNA 或 (1.0 μ g-200 μ g) 琼脂糖 : (1.0pmol-10pmol) 每种 DNA, 具体为 (75 μ g-150 μ g) 琼脂糖 : 1.2pmol, 再具体为 150 μ g : 1.2pmol 或 75 μ g : 1.2pmol ;

[0015] 3) 多聚赖氨酸与每种 DNA 的配比为 (0.1 μ g-10.0 μ g) 多聚赖氨酸 : (0.01pmol-50pmol) 每种 DNA 或 (0.1 μ g-10.0 μ g) 多聚赖氨酸 : (1.0pmol-10pmol) 每种 DNA, 具体为 (3 μ g-10.0 μ g) 多聚赖氨酸 : 1.2pmol 每种 DNA, 再具体为 3 μ g : 1.2pmol 或 10 μ g : 1.2pmol。

[0016] 上述方法中,所述通过控制外部条件,再将所述结合物中的生物分子与高分子聚合物分开是通过向所述结合物中加入溶液和调节所述结合物所处环境的温度实现的,或通过向所述结合物中加入溶液并进行超声实现的。

[0017] 上述方法中,所述调节所述结合物所处环境的温度为如下 1)、2) 或 3) 所示:

[0018] 1) 所述高分子聚合物为壳聚糖,将所述结合物所处环境的温度调节至 50 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C,并在此温度下保持 5min-60min 或 10min-60min 或 15min-60min 或 10min-15min 或 5min-15min,具体是如下 a) 或 b) 或 c) 所示:a) 将所述结合物所处环境的温度调节至 67 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C,并在此温度下保持 10min;b) 将所述结合物所处环境的温度调节至 50 $^{\circ}$ C,并在此温度下保持 15min;c) 将所述结合物所处环境的温度调节至 70 $^{\circ}$ C,并在此温度下保持 10min ;

[0019] 2) 所述高分子聚合物为琼脂糖,将所述结合物所处环境的温度调节至 50 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C,并在此温度下保持 20min-60min ;

[0020] 3) 所述高分子聚合物为多聚赖氨酸,将所述结合物所处环境的温度调节至 50 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C,并在此温度下保持 20min-60min。

[0021] 上述方法中,包括如下步骤:将所述结合物通过范德华力吸附在固相载体上,得到包被有所述结合物的固相载体;

[0022] 所述固相载体为芯片片基、酶联免疫酶标板、试管或离心管;

[0023] 所述固相载体的材质选自下:金属、玻璃、石英、硅、陶瓷、塑料、橡胶和硅铝酸盐化合物。上述方法中,所述将结合物通过范德华力吸附在固相载体上的方法为如下 1) 或 2) 所示:

[0024] 1) 将所述生物分子的溶液和所述高分子聚合物的溶液混合,将得到的混合物加到所述固相载体上,再在温度为 10 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C 或 25 $^{\circ}$ C-80 $^{\circ}$ C 和真空的条件下孵育 0.1h-2month,具体为在 50 $^{\circ}$ C 和真空的条件下孵育 1h 或在 25 $^{\circ}$ C 和真空的条件下孵育 0.1h 或在 80 $^{\circ}$ C 和真空的条件下孵育 2h ;

[0025] 2) 将所述生物分子的溶液加到所述固相载体上,除去生物分子的溶液中的溶剂,再加入高分子聚合物的溶液,再在温度为 10℃ -95℃ 或 25℃ -80℃ 和真空的条件下孵育 0.1h-2month,具体为在 50℃ 和真空的条件下孵育 1h 或在 25℃ 和真空的条件下孵育 0.1h 或在 80℃ 和真空的条件下孵育 2h。

[0026] 所述除去生物分子的溶液中的溶剂的方法为在 50℃ 和真空的条件下放置 1 分钟。

[0027] 由上述任一所述方法得到的包被有所述结合物的固相载体也属于本发明的保护范围。

[0028] 所述固相载体为用于扩增目的生物分子的芯片,所述目的生物分子为 DNA 或 RNA。

[0029] 本发明提供的在扩增芯片内可控释放生物分子的方法以高分子聚合物为材料,利用了高分子聚合物可以在某种条件下形成较为致密的形态、而在另一种条件下改变为较为疏松形态的性质,来实现生物分子在扩增芯片内的可控释放。首先通过在一定条件使高分子聚合物形成较致密的形态来固定生物分子,然后在另一条件下使高分子聚合物改变为较疏松的形态,在扩增芯片内释放生物分子。同时,整个过程对生物分子活性无影响,对扩增反应无影响。

[0030] 本发明实现过程包括:先将待固定的生物分子与高分子聚合物加入到扩增芯片中(加入方式可以是两种溶液充分混合后加入,或者是呈覆盖关系地依次加入),然后使高分子聚合物形成一定的形态,从而将生物分子固定在扩增芯片中;再向芯片中加入扩增反应液后改变高分子聚合物的形态使生物分子被释放;释放的生物分子参与扩增反应。

[0031] 高分子聚合物在一种形态下固定生物分子时,可以是致密的网状结构,也可以是致密的薄膜结构;在另一种形态下释放生物分子时,其形态由所选择的实验条件决定,可以是疏松的网状结构,也可以是疏松的薄膜结构,或者是无规卷曲结构。高分子聚合物和待固定的生物分子结合形成复合物时,其状态可以是高分子聚合物与生物分子的均匀混合溶液、薄膜或凝胶,也可以是形成覆盖关系的独立组分颗粒、薄膜或凝胶。高分子聚合物在固定生物样品前不需要进行特殊处理或者修饰,只需要制备相应的溶液即可。将待固定的生物分子与高分子聚合物加入到扩增芯片中,可以通过手工加入(如移液器、毛细管等),也可以是借助仪器加入(如接触式或非接触式点样仪等)。通过环境温度和湿度的改变使高分子聚合物的形态发生变化,可以可控地释放生物分子。

[0032] 本发明可控释放生物分子的方法中,高分子聚合物形态改变可以通过外界条件变化来进行控制。通过改变环境条件,高分子聚合物可以形成较致密的状态,也可以形成较疏松的形态。

[0033] 壳聚糖是一种线性高分子聚合物,同时具有丰富的侧链氨基,可以与多种分子(如 DNA、RNA 等)形成静电吸附;另外还能在溶液中与生物分子形成纳米颗粒或纳米颗粒的聚集体(Hai-Quan Mao, et al, 2001),使高分子聚合物与生物分子之间结合更加牢固。利用壳聚糖实现本发明的具体操作步骤如图 1 和图 2 所示。其中图 1,首先将待固定的生物分子 102 与高分子聚合物 103 的溶液充分混合,然后将混合物加入到扩增芯片 101 中,在一定条件下(如加热、抽真空等),使高分子聚合物在芯片表面形成致密的形态,固定生物分子。生物分子被固定后,当加入包含 DNA 模板在内的扩增反应液 104 时,由于高分子聚合物具有一定的抗液体冲刷性,可以避免生物分子在进样过程中因冲刷作用导致的流失或交叉污染。在扩增反应过程中,在一定条件下(如加热、加湿等)高分子聚合物会改变为较疏松

的形态。由于生物分子与高分子为非共价固定,生物分子会在高分子聚合物形态改变后被释放出,不会影响生物分子的活性及扩增反应的正常进行。图 2 为通过呈覆盖关系的高分子聚合物与生物分子薄膜可控释放生物分子原理示意图。与图 1 所示方式不同点在于,待固定的生物分子 102 的溶液先加入到扩增芯片 101 中,然后去除溶剂,使生物分子颗粒吸附于芯片底部,再加入高分子聚合物 103 的溶液,在一定条件下(如加热、抽真空等),可以使高分子聚合物在芯片表面形成与生物分子颗粒呈覆盖关系的致密的形态,从而固定生物分子。

[0034] 实验证明,通过本方法制备的芯片中,生物分子的释放是可以人为控制的,如通过温度、超声控制,从而使其应用更便捷;包被后的生物分子的活性没有明显改变;包被的生物分子在高分子聚合物的保护下具有抗冲刷能力。

[0035] 本发明的芯片可用于目的生物分子(如 DNA、RNA)的扩增,包括但不限于等温扩增反应(如 LAMP, SDA, NASBA 等)和变温扩增反应(如 PCR, LCR 等)。本发明制得的芯片,使包被后的芯片产品化,使用者直接拿来便可用,使操作更加方便快捷,更重要的是,把参与反应的不同试剂分别局限在各自的空间,从而可以同时进行多个不同的检测反应。本发明的芯片及其制备方法,所需的材料及仪器廉价、易得、简便,且有普适性,因此极具推广潜力,对扩增芯片的设计和制造有着重要意义。

附图说明

[0036] 图 1 为先将高分子聚合物与生物分子混合后,再点样制备的芯片的可控释放生物分子原理示意图。其中,101 为扩增芯片,102 为生物分子,103 为高分子聚合物,104 为包含 DNA 模板在内的扩增反应液。

[0037] 图 2 为将高分子聚合物与生物分子依次加入芯片反应池中得到的芯片的可控释放生物分子原理示意图。其中 101 为扩增芯片,102 为生物分子,103 为高分子聚合物,104 为包含 DNA 模板在内的扩增反应液。

[0038] 图 3 为利用壳聚糖可控释放引物与均匀混合溶液的等温扩增反应荧光图比较。

[0039] 图 4 为利用壳聚糖固定引物抗冲刷性实验的等温扩增反应荧光图。

[0040] 图 5 为利用琼脂糖可控释放引物实验的等温扩增反应荧光图。

[0041] 图 6 为利用多聚赖氨酸可控释放引物实验的等温扩增反应荧光图。

具体实施方式

[0042] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0043] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0044] 下述实施例中所使用的芯片的材质均是聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)。本发明中使用的芯片结构只需要具备进行扩增反应的反应池和加入反应液的通道即可,对其他结构没有特殊限定。

[0045] 实施例 1、壳聚糖与 DNA 的结合物包被芯片

[0046] 壳聚糖为日本东京化成工业株式会社生产,产品目录号为 C0831;壳聚糖的黏度(20℃,0.5%质量百分含量下)为 200-500mPa. s。

[0047] 本实施例中的 DNA 引物均生物合成得到。

[0048] 一、包被芯片的制备

[0049] 方法 I :

[0050] 1、高分子聚合物种类 :壳聚糖。

[0051] 2、生物分子的种类 :短链 DNA,具体序列如下 :

[0052] A :TTGTAAAACGACGGCCAGTG,

[0053] B :GACCATGATTACGCCAAGCG,

[0054] C :GCTTATCGATACCGTCGACCTCGTACGACTCACTATAGGGCGAAT,

[0055] D :CAGCCCGGGGATCCACTAGCCTCACTAAAGGGAACAAAAGC ;

[0056] 3、高分子聚合物与生物分子的配比 :

[0057] 将壳聚糖溶于水,得到壳聚糖水溶液(壳聚糖的浓度为 0.65%,质量百分含量);将引物 A、B、C、D 溶于水,得到含有 4 种引物的水溶液(A、B、C、D 在溶液中的浓度均为 0.1 $\mu\text{mol/L}$);将 2.05 μL 壳聚糖水溶液与 15 μL 引物水溶液混合,得到混合溶液,混合溶液中,壳聚糖与 4 种引物的配比均为 13.3 μg : 1.5 pmol ;取 0.7 μL 混合溶液点样于芯片的反应池中。

[0058] 4、包被的条件 :将点样后的芯片置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 真空烘箱中,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 、抽真空的条件下孵育 1h(抽真空目的是为了使得壳聚糖成膜更紧密。具体操作时是将真空烘箱连接真空泵,一直抽真空,面板压力示数为 0 mPa 。)

[0059] 5、将芯片封装,室温保存。

[0060] 方法 II :

[0061] 1、高分子聚合物种类 :壳聚糖

[0062] 2、生物分子的种类 :短链 DNA,具体序列如下 :

[0063] A TTGTAAAACGACGGCCAGTG,

[0064] B GACCATGATTACGCCAAGCG,

[0065] C GCTTATCGATACCGTCGACCTCGTACGACTCACTATAGGGCGAAT,

[0066] D CAGCCCGGGGATCCACTAGCCTCACTAAAGGGAACAAAAGC ;

[0067] 3、高分子聚合物与生物分子的配比 :

[0068] 将壳聚糖溶于水,得到壳聚糖水溶液(壳聚糖的浓度为 0.65%,质量百分含量);将引物 A、B、C、D 溶于水,得到引物水溶液(A、B、C、D 在溶液中的浓度均为 0.1 $\mu\text{mol/L}$);先向反应池中加入引物水溶液,0.7 μL /池,50 $^{\circ}\text{C}$ 抽真空 1min 以去除溶剂(除去溶剂就是通过抽真空和加热使溶剂挥发、引物析出后固定在反应池中)。再向反应池中加入壳聚糖水溶液,1.2 μL /池,50 $^{\circ}\text{C}$ 抽真空 1h,以除去溶剂,使高分子聚合物析出形成薄膜覆盖于前面析出的引物上,即使壳聚糖与 DNA 结合。池中壳聚糖与引物 A(或 B 或 C 或 D)的配均比为 156 μg : 1.5 pmol 。

[0069] 5、将芯片封装,室温保存。

[0070] 方法 III :

[0071] 一、芯片的制备

[0072] 1、高分子聚合物种类 :壳聚糖

[0073] 2、生物分子的种类 :DNA,与方法 I 中所述一致。

[0074] 3、高分子聚合物与生物分子的配比 :将壳聚糖溶于水,得到浓度为 0.65% (w/w)

的壳聚糖水溶液；将引物 A、B、C、D 溶于水，得到引物水溶液（A、B、C、D 在溶液中的浓度均为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ ）；将不同体积的壳聚糖水溶液与 $15 \mu\text{L}$ 引物水溶液混合，得到混合溶液，再根据壳聚糖与引物的配比取不同体积混合溶液点样于芯片的反应池中。

[0075] 混合溶液中，壳聚糖与引物的配比不同；具体如下：

[0076] 实验组 1)：混合溶液中壳聚糖浓度为 0.32%，壳聚糖与 4 种引物的配比为 $97.5 \mu\text{g} : 1.5 \text{pmol}$ ，滴加混合液量为 $1.5 \mu\text{L}/\text{池}$ 。25℃且抽真空条件下孵育 0.1h；

[0077] 实验组 2)：混合溶液中壳聚糖终浓度为 0.20%；壳聚糖与 4 种引物的配比为 $50 \mu\text{g} : 1.5 \text{pmol}$ ，滴加混合液量为 $0.9 \mu\text{L}/\text{池}$ 。80℃且抽真空条件下孵育 2h；

[0078] 实验组 3) 混合溶液中壳聚糖终浓度为 0.08%；壳聚糖与 4 种引物的配比为 $20 \mu\text{g} : 1.5 \text{pmol}$ ，滴加混合液量为 $0.85 \mu\text{L}/\text{池}$ 。50℃且抽真空条件下孵育 1h。

[0079] 4、将芯片封装，室温保存。

[0080] 上述方法制备的芯片中，壳聚糖与 DNA 通过静电吸附作用结合，形成的复合物记作壳聚糖-DNA 复合物；壳聚糖-DNA 复合物通过范德华力吸附在芯片上。

[0081] 二、芯片的效果

[0082] 将方法 I、II、III 制备得到的芯片分别进行如下实验。

[0083] (一) 生物分子的生物活性检测：

[0084] 将所得芯片封装后放置 3 天，再向反应池中加入扩增反应液 $7 \mu\text{L}$ ，进行等温扩增反应。

[0085] 扩增反应液的组成：由体系和模板组成。体系组成如下：

序号	反应物成分	终浓度
1	<i>Bst</i> DNA 聚合酶大片段	0.32 U/ μl
	<i>Bst</i> 酶反应缓冲液	
[0086] 2	(ThermoPol Reaction Buffer)	1 ×
3	脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs)	0.4 mmol/L(各)
4	EvaGreen 染料	0.6 ×
5	牛血清白蛋白(BSA)	0.5 mg/ml
[0087] 6	甜菜碱(betaine)	0.8 mol/L

[0088] 模板是 EZ-T 载体质粒 DNA 购自北京康润诚业生物科技有限公司，货号：T168-10，浓度为 $10^5 \text{copies}/\mu\text{L}$ 。体系：模板 = 23 : 2, v/v。

[0089] 等温扩增反应的条件：67℃进行扩增反应，反应 1h。

[0090] 同时以直接混合的方法进行对照，比较二者之间的扩增时间差异即阳性扩增时间

(T_p 值)。直接混合方法为：配制引物-体系-模板的均匀混合溶液，进行等温扩增反应，引物-体系-模板的均匀混合溶液的组成及浓度与实验组相同，等温扩增反应的条件与实验组相同。

[0091] 生物分子的扩增反应效果通过实时荧光检测来检验。荧光染料可以指示反应进行程度。

[0092] 方法 I 得到的芯片的荧光强度随反应时间变化的扩增曲线如图 3。其中 A 为对照组，B 为实验组结果。结果显示，两条扩增反应荧光图形状、荧光背景及平台区荧光强度均类似，说明实验组和对照组均发生了有效的扩增反应。对照组扩增时间约为 19 分钟，实验组扩增时间约为 20 分钟，此差别在实验误差范围内可以接受，两组扩增时间没有明显实质差别；因此，在利用本方法对生物样品进行固定后再可控释放时，生物分子扩增能力没有减弱，活性没有明显改变，生物样品活性没有受到明显影响。

[0093] 方法 II 得到的芯片的阳性扩增时间 (T_p 值) 为约 22min。

[0094] 方法 III 得到的芯片的结果：实验组 1) 中阳性扩增时间 (T_p 值) 为约 21min，实验组 2) 中阳性扩增时间 (T_p 值) 为约 21min，实验组 3) 中阳性扩增时间 (T_p 值) 为与方法 I 接近，约 20min。实验所得不同壳聚糖浓度下等温扩增时间最大差异约为 1 分钟，壳聚糖浓度越高，扩增时间越长。说明本方法适用于较宽范围的壳聚糖浓度，壳聚糖浓度对扩增时间有一定影响，浓度越高，生物分子释放越慢，扩增时间越长。

[0095] (二) 释放可控检测

[0096] 取保存 3 天后的芯片进行实验。

[0097] 向芯片的反应池中加入纯水，室温放置，观察 DNA 释放情况。再加热到不同温度，观察 DNA 释放情况。比较不同条件下 DNA 释放情况，其中室温条件下观测了 30 分钟，50℃ 条件下观测了 15 分钟，70℃ 条件下观测了 10 分钟。

[0098] 上述三种方法制备的芯片反应池内均具有带有颜色的薄膜，目测观察壳聚糖与引物的结合物的扩散情况。以薄膜边缘变模糊或者反应池内清水明显变色为判断开始释放的标准，以反应池内清水颜色变均匀为判断释放均匀的标准。

[0099] 方法 I 得到的芯片的检测结果如表 1 所示。

[0100] 表 1 壳聚糖释放生物分子条件

[0101]

温度 /℃	开始释放 /min	释放均匀 /min
室温	> 20	> 30
50	5	15
70	3	10

[0102] 结果显示：

[0103] (1) 加入纯水后，室温放置 20 分钟后才观察到有生物分子开始释放，室温放置 30 分钟时也没有释放均匀。这说明室温下，壳聚糖对生物分子的固定牢固，被固定的生物分子具有抗冲刷能力。

[0104] (2) 加入纯水后,在 50℃条件下,放置 5 分钟后,生物分子开始释放;在 50℃条件下,放置 15 分钟后,生物分子均匀释放。

[0105] (3) 加入纯水后,在 70℃条件下,放置 3 分钟后,生物分子开始释放;在 70℃条件下,放置 10 分钟后,生物分子均匀释放。

[0106] (2) 和 (3) 说明,该芯片,70℃和 50℃均可以释放生物分子,但达到均匀释放所需的时间不同,温度越高,达到均匀释放所需时间越短,该释放是可控的,具体可以通过调节温度来控制。

[0107] 方法 II 和方法 III 得到的芯片的检测结果与方法 I 得到的芯片的检测结果无显著差别。

[0108] (三) 抗冲刷:

[0109] 取保存 3 天后的芯片进行实验。

[0110] 向反应池中加入扩增反应液 7 μ L,室温静置 5 分钟后取出溶液,将此溶液进行等温扩增反应。

[0111] 扩增反应液的组成:与实验二(一)中所述一致。

[0112] 等温扩增反应的条件:67℃扩增,1h。

[0113] 同时以直接混合的方法进行对照,比较二者之间的扩增时间差异。直接混合方法为:配制引物-体系-模板的均匀混合溶液,进行等温扩增反应,引物-体系-模板的均匀混合溶液的组成及浓度与实验组相同,等温扩增反应的条件与实验组相同。

[0114] 方法 I 得到的芯片的荧光强度随反应时间变化的扩增曲线如图 4。图 4 中 A 为对照引物-体系-模板混合液等温扩增反应荧光图,B 为加入到芯片后再取出的体系-模板混合液等温扩增反应荧光图。结果显示,加入到芯片后再取出的体系-模板混合液没有发生明显扩增,说明在混合液加入芯片、室温静置、取出的过程中,固定于芯片内部的引物没有因液体冲刷而被溶解出,证明本方法固定的引物有较好的抗冲刷性,引物 DNA 没有因为液体的冲刷而被释放出来,也就不会在芯片内扩散引起反应池间污染。

[0115] 方法 II 和方法 III 得到的芯片的检测结果与方法 I 得到的芯片的检测结果无显著差别。

[0116] 实施例 2、琼脂糖与 DNA 的结合物包被芯片

[0117] 琼脂糖购自 Promega 公司,产品目录号为 V3841

[0118] 一、制备方法

[0119] 1、高分子聚合物种类:琼脂糖;琼脂糖的凝固温度(4%): $\leq 35^{\circ}\text{C}$;熔点(1.5%): $\leq 65^{\circ}\text{C}$;凝胶强度(4%): $\geq 500\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0120] 2、生物分子的种类:DNA,具体序列如下:

[0121] A TTGTAACGACGCGCCAGTG,

[0122] B GACCATGATTACGCCAAGCG,

[0123] C GCTTATCGATACCGTCGACCTCGTACGACTCACTATAGGGCGAAT,

[0124] D CAGCCCGGGGATCCACTAGCCTCACTAAAGGGAACAAAAGC;

[0125] 3、高分子聚合物与生物分子的配比:

[0126] 将琼脂糖溶于水,得到琼脂糖水溶液(琼脂糖的浓度为 5%,质量百分含量);将引物 A、B、C、D 溶于水,得到引物水溶液(A、B、C、D 在溶液中的浓度均为 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$);将不同

体积琼脂糖水溶液与 12 μ L 引物水溶液混合,得到混合溶液。

[0127] 混合溶液中,琼脂糖与 4 种引物的配比不同,具体如下:

[0128] 实验组 1):将 3 μ L 5%的琼脂糖水溶液与 12 μ L 引物水溶液混合,得到混合溶液,琼脂糖与 4 种引物的配比均为 150 μ g : 1.2pmol ;滴加混合液量为 0.77 μ L/ 池 ;

[0129] 实验组 2):将 1.5 μ L 5%的琼脂糖水溶液及 1.5 μ L 水与 12 μ L 引物水溶液混合,得到混合溶液,琼脂糖与 4 种引物的配比均为 75 μ g : 1.2pmol ;滴加混合液量为 0.77 μ L/ 池。

[0130] 4、包被的条件:将点样后的芯片置于 50 $^{\circ}$ C 真空烘箱中,50 $^{\circ}$ C 抽真空 1h。

[0131] 5、将芯片封装,室温保存。

[0132] 琼脂糖与 DNA 通过范德华力结合,形成的复合物记作琼脂糖-DNA 复合物;琼脂糖-DNA 复合物通过范德华力吸附在芯片上。

[0133] 二、芯片效果

[0134] (一) 生物活性检测

[0135] 将所得芯片封装后放置 3 天,再向反应池中加入扩增反应液 7 μ L,进行等温扩增反应。其中实验组 1)、2) 各重复做 3 次,即每个实验组各做 4 条曲线,一共 8 条扩增曲线。

[0136] 扩增反应液的组成:与实施例 1 中实验二(一)中所述一致。

[0137] 等温扩增反应的条件:67 $^{\circ}$ C 扩增,1h。

[0138] 结果:实验得到的芯片的荧光强度随反应时间变化的扩增曲线图如图 5。结果显示,8 条扩增反应荧光图形状、荧光背景及平台区荧光强度均类似,说明实验组 1)、2) 均发生了有效的扩增反应。同时,两个实验组中 8 条曲线扩增时间均约为 20 分钟,曲线间差别在实验误差范围内可以接受,8 条扩增曲线时间没有明显实质差别;因此,在利用本方法对生物样品进行固定后再可控释放时,生物分子扩增能力没有减弱,活性没有明显改变,生物样品活性没有受到明显影响,在一定琼脂糖浓度区间内均适用,且实验重复性很好。

[0139] 实施例 3、多聚赖氨酸与 DNA 的结合物包被芯片

[0140] 多聚赖氨酸购自 Sigma,产品目录号为 P9011。

[0141] 一、制备方法

[0142] 1、高分子聚合物种类:多聚赖氨酸;多聚赖氨酸的数均分子量为 25000-40000g/mol。

[0143] 2、生物分子的种类:DNA 具体序列如下:

[0144] A TTGTAACGACGCGCCAGTG,

[0145] B GACCATGATTACGCCAAGCG,

[0146] C GCTTATCGATACCGTCGACCTCGTACGACTCACTATAGGGCGAAT,

[0147] D CAGCCCGGGGATCCACTAGCCTCACTAAAGGGAACAAAAGC ;

[0148] 3、高分子聚合物与生物分子的配比:将多聚赖氨酸溶于水,得到多聚赖氨酸水溶液(多聚赖氨酸的浓度为 10mg/mL);将引物 A、B、C、D 溶于水,得到引物水溶液(A、B、C、D 在溶液中的浓度均为 0.1 μ mol/L);将不同体积多聚赖氨酸水溶液与 12 μ L 引物水溶液混合,得到混合溶液。

[0149] 混合溶液中,多聚赖氨酸与 4 种引物的配比不同,具体如下:

[0150] 实验组 1):将 0.3 μ L 10mg/mL 的多聚赖氨酸水溶液与 12 μ L 引物水溶液混合,

得到混合溶液,多聚赖氨酸与4种引物的配比均为 $3\mu\text{g} : 1.2\text{pmol}$;滴加混合液量为 $0.77\mu\text{L}$ /池;

[0151] 实验组2):将 $1\mu\text{L}$ 10mg/mL 的多聚赖氨酸水溶液与 $12\mu\text{L}$ 引物水溶液混合,得到混合溶液,多聚赖氨酸与4种引物的配比均为 $10\mu\text{g} : 1.2\text{pmol}$;滴加混合液量为 $0.9\mu\text{L}$ /池。

[0152] 4、包被的条件:将点样后的芯片置于 50°C 真空烘箱中, 50°C 抽真空1h。

[0153] 5、将芯片封装,室温保存。

[0154] 多聚赖氨酸与DNA通过范德华力结合,形成的复合物记作多聚赖氨酸-DNA复合物;多聚赖氨酸-DNA复合物通过范德华力吸附在芯片上。

[0155] 二、芯片效果

[0156] (一)生物活性检测

[0157] 将所得芯片封装后放置3天,再向反应池中加入扩增反应液 $7\mu\text{L}$,进行等温扩增反应。

[0158] 扩增反应液的组成:与实施例1中实验二(一)中所述一致。

[0159] 等温扩增反应的条件: 67°C 扩增,1h。

[0160] 结果:检测结果与壳聚糖及琼脂糖可控释放生物分子的扩增结果类似,实验得到的芯片的荧光强度随反应时间变化的扩增曲线图如图6,其中A为实验组1)结果,B为实验组2)结果。实验组1)扩增时间约为20分钟;实验组2)扩增时间约为21分钟。因此,在利用本方法对生物样品进行固定后再可控释放时,生物分子扩增能力没有减弱,活性没有明显改变,生物样品活性没有受到明显影响。

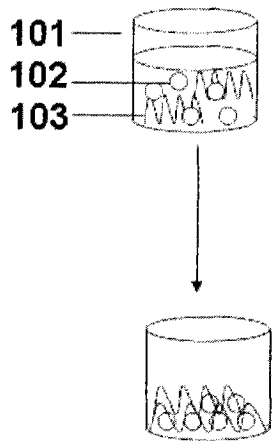


图 1

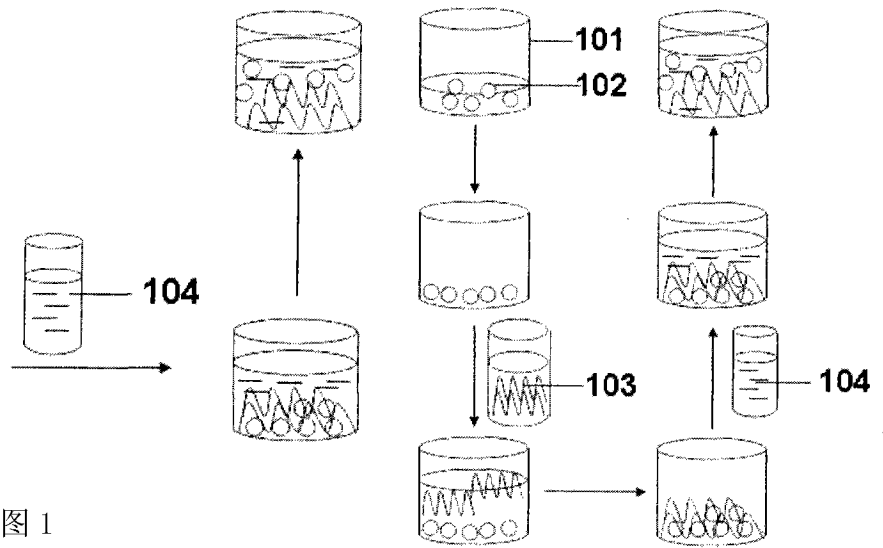


图 2

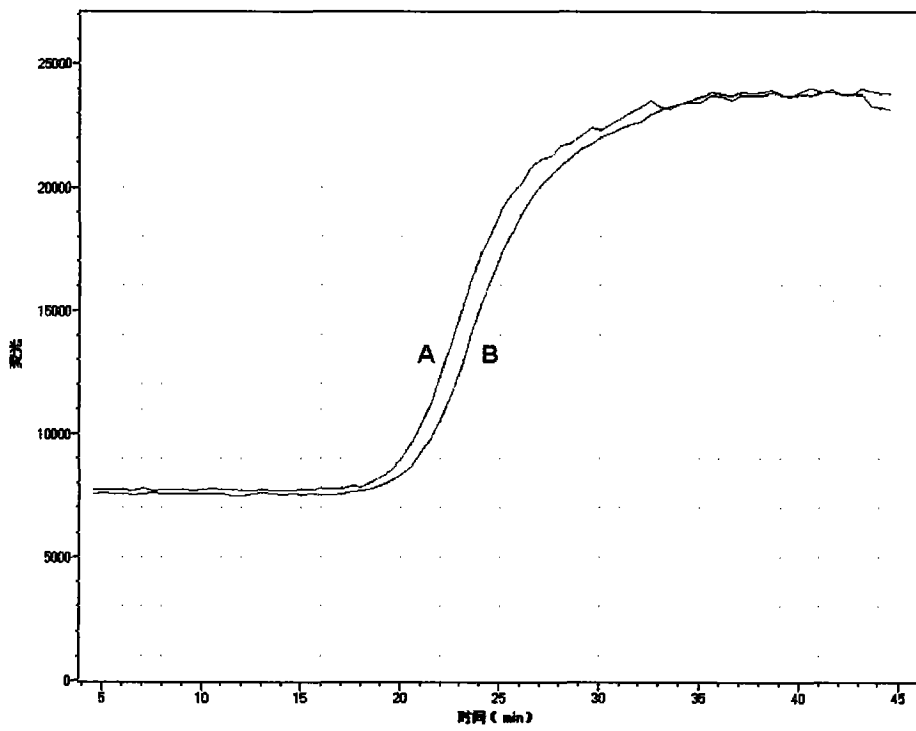


图 3

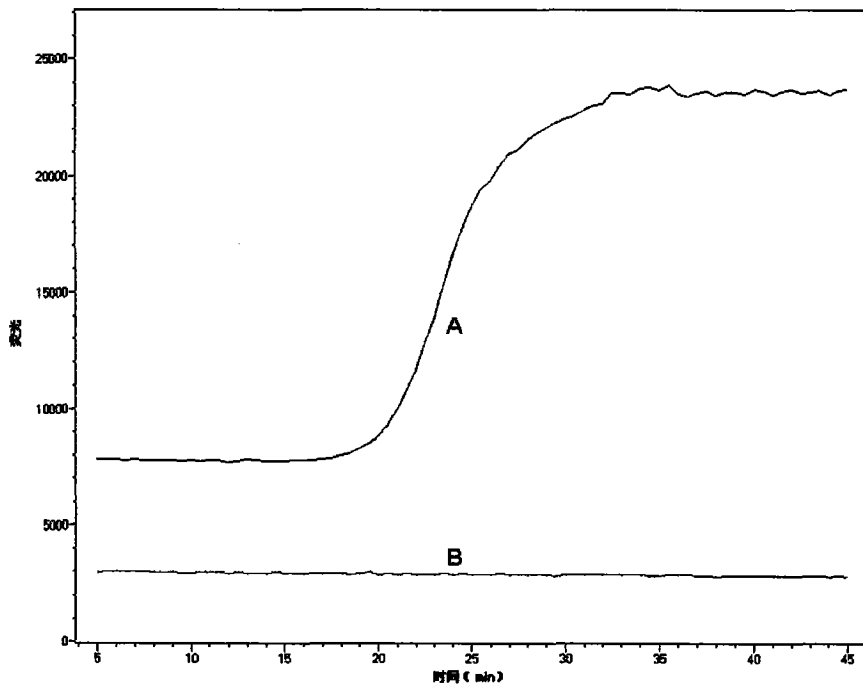


图 4

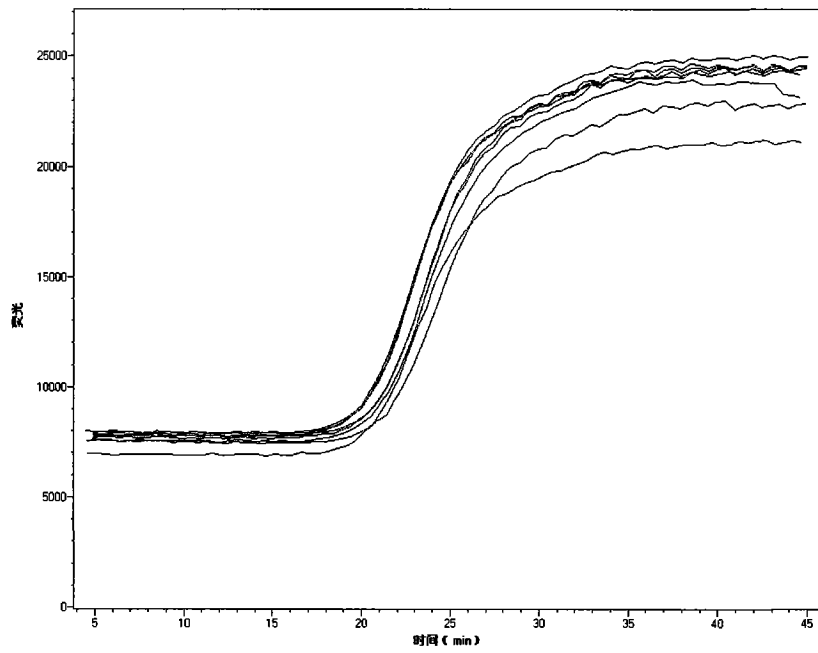


图 5

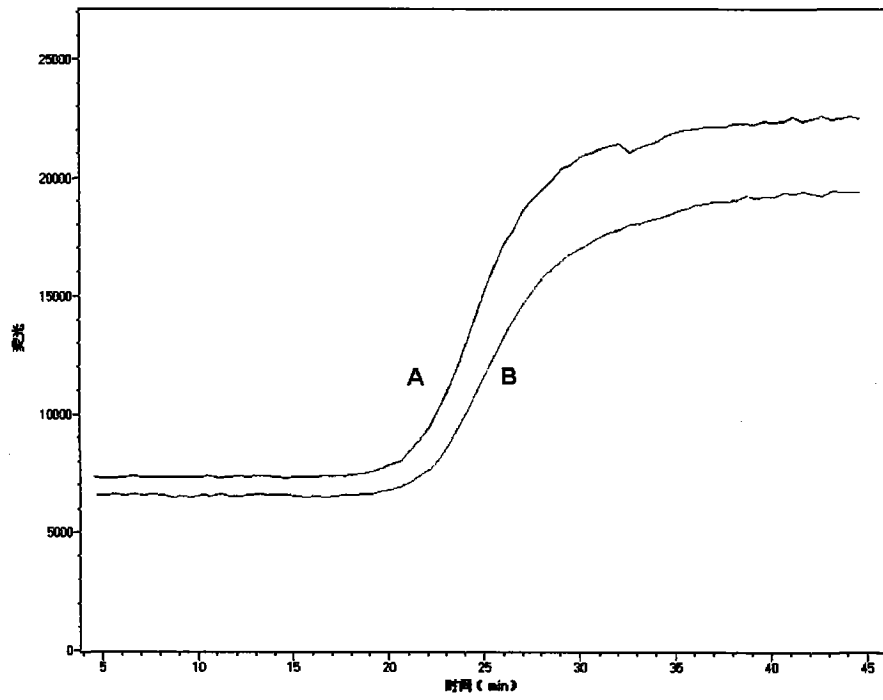


图 6

专利名称(译)	可控释放生物分子的方法及可控释放生物分子的生物芯片		
公开(公告)号	CN101956000A	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN201010233646.6	申请日	2010-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	博奥生物有限公司 清华大学		
申请(专利权)人(译)	博奥生物有限公司 清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	博奥生物有限公司 清华大学		
[标]发明人	郭素 王国青 张国豪 王璨 韩蓓 刘淼 张锦绣 邓涛 邢婉丽 程京		
发明人	郭素 王国青 张国豪 王璨 韩蓓 刘淼 张锦绣 邓涛 邢婉丽 程京		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6853 C07K17/14 C08L2203/02 A61K47/48323 A61K47/48215 C08G69/10 C08L71/02 C07K17/02 A61K47/4823 C08H1/06 C07H21/04 C08B37/003 A61K47/48176 C08H1/00 C08B37/0039 A61K47/58 A61K47/60 A61K47/61 A61K47/6455		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了可控释放生物分子的方法及可控释放生物分子的生物芯片。该方法包括如下步骤：将生物分子与高分子聚合物通过静电吸附或范德华力结合，得到生物分子-高分子聚合物结合物；通过控制外部条件，再将所述结合物中的生物分子与高分子聚合物分开，从而释放所述生物分子；所述高分子聚合物为与所述生物分子发生静电吸附作用或范德华力作用的高分子聚合物。实验证明，通过本方法制备的芯片中，生物分子的释放是可以认为控制的，如通过温度、超声控制，从而使其应用更便捷；包被后的生物分子的活性没有明显改变；包被的生物分子在高分子聚合物的保护下具有抗冲刷能力。本发明的芯片及其制备方法，所需的材料及仪器廉价、易得、简便，且有普适性，因此极具推广潜力，对扩增芯片的设计和制造有着重要意义。

