



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109765357 A

(43)申请公布日 2019.05.17

(21)申请号 201910046422.5

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2019.01.18

(71)申请人 江苏医联生物科技有限公司
地址 225000 江苏省扬州市高新技术产业
开发区开发西路217号

(72)发明人 杨文婷 曹臻 陈亮

(74)专利代理机构 北京文苑专利代理有限公司
11516

代理人 朱青

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

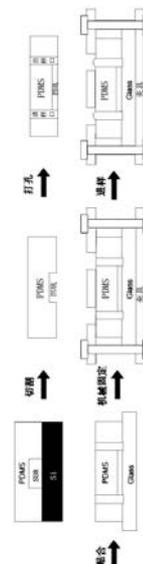
权利要求书2页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法

(57)摘要

本发明涉及一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法,包括:步骤一:在硅衬底上光刻SU-8模具;将PDMS溶液混合均匀,抽真空除干净气泡;将PDMS混合液倒在SU-8模具上,加热固化,形成PDMS固化块,该PDMS固化块中心位置形成有凹坑;在凹坑的左右两端分别打一个进样口与出气口;进样口和出气口均与凹坑相连通;清洗玻璃片和该PDMS模具后,使玻璃载体与该PDMS模具贴合,用夹具将两者固定;在进样口、出气口加入PL溶液,清洗后得到表面附着有PL的玻璃载体;步骤二:对玻璃片进行ELISA实验。本发明操作简单且成本低廉,通过PDMS模具实现了固相载体特定区域的化学处理,实现荧光增强,大大提高了蛋白质芯片的检测灵敏度,对疾病的早期检测与诊断具有重要意义。



1. 一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,包括:
步骤一:用PDMS模具在玻璃片表面用PL处理;
步骤二:对玻璃片进行ELISA实验。
2. 根据权利要求1所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,步骤一包括:
步骤1) 在硅衬底上光刻SU-8模具;
步骤2) 通过脱模剂浸没SU-8模具室温下反应10min,流水清洗并用氮气吹干;
步骤3) 使用热板120℃加热5min,105℃加热2h,60℃加热3h,实现SU-8模具表面键合单分子疏水层;
步骤4) 使用玻璃棒将10:1比例配置的PDMS溶液混合均匀,再抽真空除干净气泡;
步骤5) 将PDMS混合液倒在SU-8模具上,加热实现固化,形成PDMS固化块,该PDMS固化块中心位置形成有一个长方体形状的凹坑;
步骤6) 将PDMS固化块切割所需要的尺寸,然后在其长方体凹坑的左右两端分别打一个进样口与出气口;进样口和出气口均与该长方体凹坑相连通,形成沟道,得到PDMS模具;
步骤7) 使用丙酮、异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片和该PDMS模具;
步骤8) 使用氮气吹干玻璃片及该PDMS模具后,使玻璃载体与该PDMS模具贴合,再用夹具将两者机械固定;
步骤9) 在进样口加入10 μ L 0.1%的PL溶液,使之流满所述沟道后在出气口加入10 μ L 0.1%的PL溶液,室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。
3. 根据权利要求1-2所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,所述SU-8模具为一长度为12mm,宽度为300 μ m,厚度为150 μ m的矩形板。
4. 根据权利要求1-2所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,所述夹具包括矩形的上层板和下层板,上层板和下层板的形状和尺寸均相同,上层板和下层板上靠近外周边缘处均对应开设有四个螺栓孔,上层板的中心位置开设有多个圆孔,其中有两个圆孔分别与PDMS模具的进样口和出气口对准的圆孔。
5. 根据权利要求1-4所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,圆孔的直径为4mm。
6. 根据权利要求1-4所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,所述夹具为玻璃、聚四氟乙烯或亚克力材料制成。
7. 根据权利要求1所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,步骤二包括:
步骤(1) 在该载体表面加入20 μ g/ml的cTnI单克隆抗体溶液室温下反应2h,实现cTnI捕获;
步骤(2) 清洗后再加入5%牛血清蛋白溶液室温下反应1h;
步骤(3) 清洗后再加入不同浓度cTnI溶液室温下反应2h;
步骤(4) 清洗后加入20 μ g/ml cTnI多克隆抗体溶液室温下反应2h;
步骤(5) 清洗后加入2 μ g/ml 荧光标记的兔抗山羊IgG溶液室温下反应1h;
步骤(6) 清洗干净后,在荧光显微镜下测得各浓度cTnI对应的荧光强度,得到荧光免疫曲线,并与未经过化学处理的干净玻璃片进行对比。

8. 根据权利要求1-7所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,在步骤(3)中,cTnI溶液的浓度范围为1pg/ml-1μg/ml。

9. 根据权利要求1-8所述的在固相载体区域选择性固定蛋白质的方法,其特征在于,所述室温的温度范围为22℃~26℃。

一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法。

背景技术

[0002] 蛋白质芯片是一种高通量的蛋白功能分析技术,可用于蛋白质表达谱分析,研究蛋白质与蛋白质的相互作用,以及DNA-蛋白质、RNA-蛋白质的相互作用、筛选药物作用的蛋白靶点等。传统的蛋白质芯片检测分析操作一般是对固相载体整体进行特殊的化学处理,再将已知的蛋白分子固定其上捕获能与之特异性结合的待测蛋白从而实现生物分子检测与分析,为抗原抗体检测和药物筛选等领域提供有力的技术支持。然而,传统蛋白质芯片固相载体检测区域大,捕获不均匀且蛋白质浓度较低时荧光检测信号很弱,蛋白质芯片的检测灵敏度低。

发明内容

[0003] 针对上述现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种可避免出现上述技术缺陷的在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供的技术方案如下:

[0005] 一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法,包括:

[0006] 步骤一:用PDMS模具在玻璃片表面用PL处理;

[0007] 步骤二:对玻璃片进行ELISA实验。

[0008] 进一步地,步骤一包括:

[0009] 步骤1) 使用光刻技术在硅衬底上光刻SU-8模具;

[0010] 步骤2) 通过脱模剂浸没SU-8模具室温下反应10min,流水清洗并用氮气吹干;

[0011] 步骤3) 使用热板120℃加热5min,105℃加热2h,60℃加热3h,实现SU-8模具表面键合单分子疏水层;

[0012] 步骤4) 使用玻璃棒将10:1比例配置的PDMS溶液混合均匀,再抽真空1h除干净气泡;

[0013] 步骤5) 将PDMS混合液倒在SU-8模具上,80℃加热1h实现固化,形成PDMS固化块,该PDMS固化块中心位置形成有一个长方体形状的凹坑;

[0014] 步骤6) 将PDMS固化块切割所需要的尺寸,然后在其长方体凹坑的左右两端分别打一个3mm直径的进样口与出气口;进样口和出气口均与该长方体凹坑相连通,形成沟道,得到PDMS模具;

[0015] 步骤7) 使用丙酮、异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片和该PDMS模具5min;

[0016] 步骤8) 使用氮气吹干玻璃片及该PDMS模具后,使玻璃载体与该PDMS模具贴合,再用夹具将两者机械固定;

[0017] 步骤9) 在进样口加入10 μ L 0.1%的PL溶液,使之流满所述沟道后在出气口加入10

$\mu\text{L}0.1\%$ 的PL溶液,室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。

[0018] 进一步地,所述SU-8模具为一长度为12mm,宽度为300 μm ,厚度为150 μm 的矩形板。

[0019] 进一步地,所述夹具包括矩形的上层板和下层板,上层板和下层板的形状和尺寸均相同,上层板和下层板上靠近外周边缘处均对应开设有四个螺栓孔,上层板的中心位置开设有多个圆孔,其中有两个圆孔分别与PDMS模具的进样口和出气口对准的圆孔。

[0020] 进一步地,圆孔的直径为4mm。

[0021] 进一步地,所述夹具为玻璃、聚四氟乙烯或亚克力材料制成。

[0022] 进一步地,步骤二包括:

[0023] 步骤(1)在该载体表面加入20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的cTnI单克隆抗体溶液室温下反应2h,实现cTnI捕获;

[0024] 步骤(2)清洗后再加入5%牛血清蛋白溶液室温下反应1h;

[0025] 步骤(3)清洗后再加入不同浓度cTnI溶液室温下反应2h;

[0026] 步骤(4)清洗后加入20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cTnI多克隆抗体溶液室温下反应2h;

[0027] 步骤(5)清洗后加入2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 荧光标记的兔抗山羊IgG溶液室温下反应1h;

[0028] 步骤(6)清洗干净后,在荧光显微镜下测得各浓度cTnI对应的荧光强度,得到荧光免疫曲线,并与未经过化学处理的干净玻璃片进行对比。

[0029] 进一步地,在步骤(3)中,cTnI溶液的浓度范围为1pg/ml-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0030] 进一步地,所述室温的温度范围为22 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0031] 本发明提供的在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法,操作简易且成本低廉,通过聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS)模具实现了固相载体特定区域的化学处理,大大提高了蛋白质芯片的检测灵敏度,对疾病的早期检测与诊断具有重要意义,可以很好地满足实际应用的需要。

附图说明

[0032] 图1为本发明的方法流程示意图;

[0033] 图2为夹具上层板的结构示意图;

[0034] 图3为夹具下层板的结构示意图;

[0035] 图4为本发明测试得到的荧光剂浓度(FITC-Ab2Concentration)与强度(Intensity(a.u.))的关系图。

具体实施方式

[0036] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0037] 一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法,包括:

[0038] 步骤一:使用带有特定结构的PDMS模具在玻璃片表面特定区域用PL处理;具体包括以下步骤:

[0039] 步骤1) 使用光刻技术在硅衬底上光刻SU-8光刻胶模具;所述SU-8模具为一长度为12mm,宽度为300 μ m,厚度为150 μ m的矩形板;

[0040] 步骤2) 通过脱模剂浸没SU-8模具室温下反应10min,流水清洗并用氮气吹干;

[0041] 步骤3) 使用热板120 $^{\circ}$ C加热5min,105 $^{\circ}$ C加热2h,60 $^{\circ}$ C加热3h,实现SU-8模具表面键合单分子疏水层;

[0042] 步骤4) 使用玻璃棒将10:1比例配置的PDMS溶液混合均匀,再抽真空1h除干净气泡;PDMS即聚二甲基硅氧烷,polydimethylsiloxane的缩写;

[0043] 步骤5) 将该PDMS混合液缓缓倒在SU-8模具上,80 $^{\circ}$ C加热1h实现固化,形成PDMS固化块,该PDMS固化块中心位置形成有一个长方体形状的凹坑,该凹坑为PDMS混合液在SU-8模具上固化后形成的SU-8模具坑;如图1所示;

[0044] 步骤6) 将该PDMS固化块进行切割,切割到所需要的合适尺寸,然后在其长方体凹坑的左右两端分别打一个3mm直径的进样口与出气口,进样口和出气口均与该长方体凹坑相连通,形成沟道,从而得到带有特定结构的PDMS模具;此处所述特定结构即指PDMS模具上的沟道,即由长方体凹坑以及分别位于凹坑左右两侧且均与凹坑相连通的进样口和出气口所构成的沟道;

[0045] 步骤7) 使用丙酮,异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片和该PDMS模具5min;

[0046] 步骤8) 使用氮气吹干玻璃片及该PDMS模具后,使玻璃载体与该PDMS模具贴合,再用夹具将两者机械固定;

[0047] 如图2和图3所示,所述夹具包括矩形的上层板和下层板,上层板和下层板的形状和尺寸均相同,上层板和下层板上靠近外周边缘处均对应开设有四个螺栓孔,上层板的中心位置开设有多个圆孔,圆孔的数量和直径根据实际需要来进行设定,本实施例为9个圆孔。夹具上层板和下层板以及圆孔、螺栓孔等的各种尺寸可以根据实际应用的需要设置为合适的数值,例如圆孔的直径可以为4mm等。

[0048] 所述夹具可以采用以下几种材料:第一种为玻璃夹具,优点是清洗透明,可随时进行光学检测;第二种为聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene,PTFE),优点是耐高温高压,且生物相容性优良,几乎不与任何试剂反应;第三种为亚克力,优点是成本低廉,加工简易。

[0049] 其中夹具板上层板上的圆孔中有两个圆孔分别与PDMS模具的进样口和出气口对准,这样就使得玻璃载体上有一微米尺寸的矩形区域可进行化学处理。

[0050] 步骤9) 通过与进样口对准的圆孔在进样口加入10 μ L 0.1%PL溶液,使之自然流满沟道后,再通过与出气口对准的圆孔在出气口加入10 μ L 0.1%PL溶液,室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面特定位置有一微米尺寸的矩形区域附着有PL的玻璃载体。

[0051] 步骤二:对该表面进行过PL处理的玻璃载体进行ELISA实验;该过程包括以下步骤:

[0052] 步骤(1) 在该载体表面加入20 μ g/ml的心肌钙蛋白I(cTnI)单克隆抗体溶液室温下反应2h,实现cTnI捕获;

[0053] 步骤(2) 清洗后再加入5%牛血清蛋白(BSA)溶液室温下反应1h;

[0054] 步骤(3) 清洗后再加入不同浓度(浓度范围为1pg/ml-1 μ g/ml)cTnI溶液室温下反应2h;

[0055] 步骤(4) 清洗后加入20 μ g/ml cTnI多克隆抗体(山羊属)溶液室温下反应2h;

[0056] 步骤(5)清洗后加入2 μ g/ml荧光标记的兔抗山羊IgG溶液室温下反应1h;

[0057] 步骤(6)清洗干净后,在荧光显微镜下测得各浓度cTnI对应的荧光强度,得到荧光免疫曲线,并与未经过化学处理的干净玻璃片进行对比。

[0058] 本实施例中提到的室温指的是22 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C的温度范围。

[0059] 如图4所示为本实施例得到的荧光剂浓度(FITC-Ab2Concentration)与强度(Intensity(a.u.))的关系图。

[0060] 本发明提供的在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法,操作简易且成本低廉,通过聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS)模具实现了固相载体特定区域的化学处理,大大提高了蛋白质芯片的检测灵敏度,对疾病的早期检测与诊断具有重要意义,可以很好地满足实际应用的需要。

[0061] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

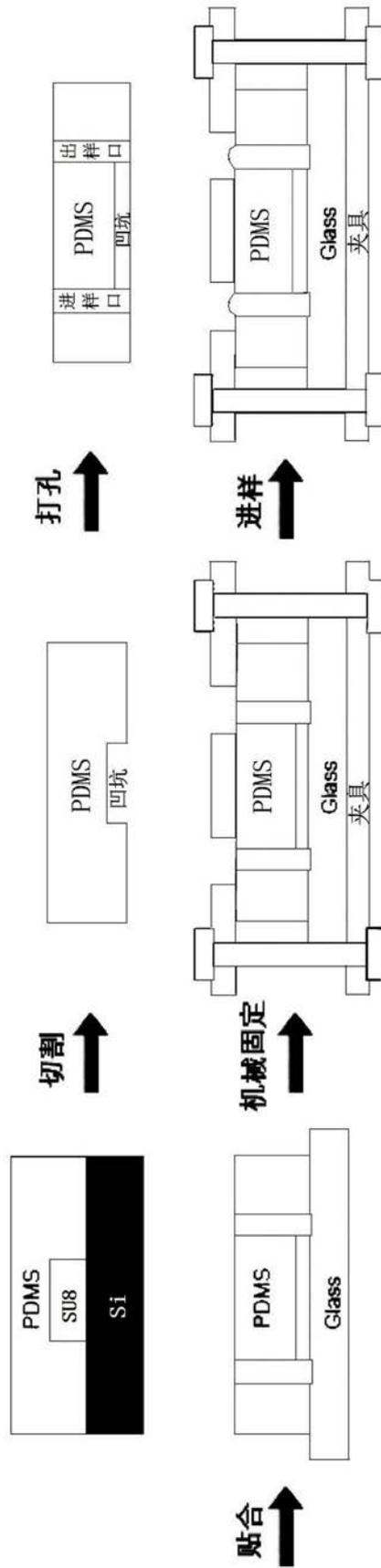


图1

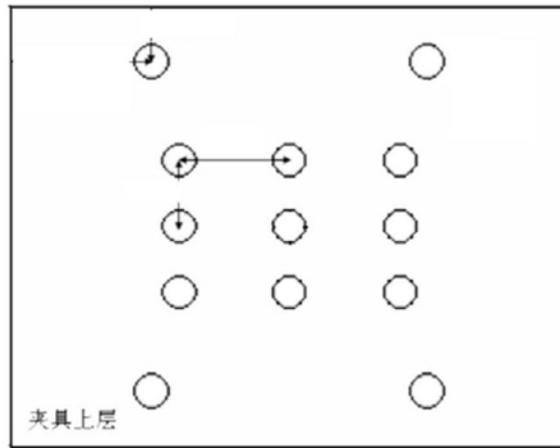


图2

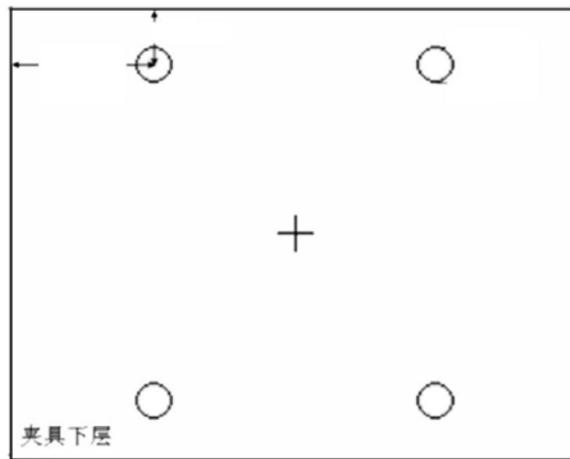


图3

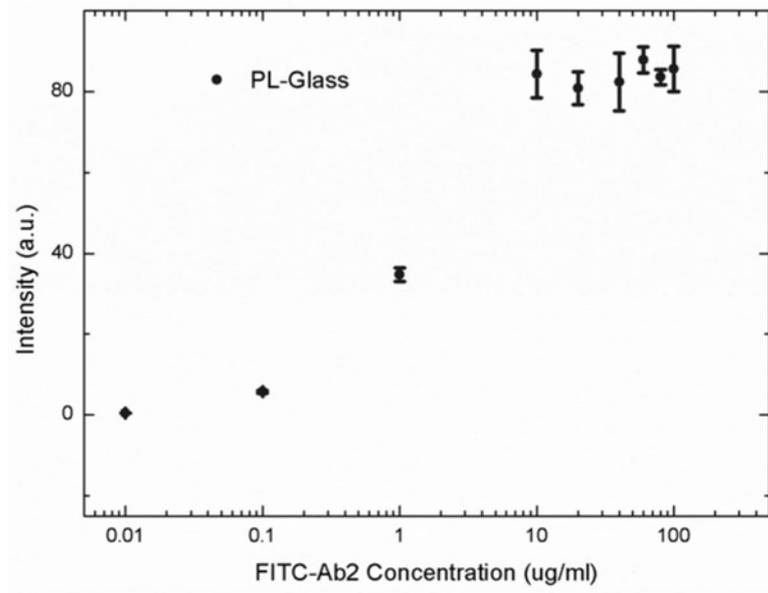


图4

专利名称(译)	一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法		
公开(公告)号	CN109765357A	公开(公告)日	2019-05-17
申请号	CN201910046422.5	申请日	2019-01-18
[标]发明人	杨文婷 曹臻 陈亮		
发明人	杨文婷 曹臻 陈亮		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	朱青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种在固相载体特定区域选择性固定蛋白质的方法，包括：
 步骤一：在硅衬底上光刻SU-8模具；将PDMS溶液混合均匀，抽真空除干净气泡；将PDMS混合液倒在SU-8模具上，加热固化，形成PDMS固化块，该PDMS固化块中心位置形成有凹坑；在凹坑的左右两端分别打一个进样口与出气口；进样口和出气口均与凹坑相连通；清洗玻璃片和该PDMS模具后，使玻璃载体与该PDMS模具贴合，用夹具将两者固定；在进样口、出气口加入PL溶液，清洗后得到表面附着有PL的玻璃载体；
 步骤二：对玻璃片进行ELISA实验。本发明操作简易且成本低廉，通过PDMS模具实现了固相载体特定区域的化学处理，实现荧光增强，大大提高了蛋白质芯片的检测灵敏度，对疾病的早期检测与诊断具有重要意义。

