

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03157199.9

[51] Int. Cl.

C01N 33/68 (2006.01)

C01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1281961C

[22] 申请日 2003.9.18 [21] 申请号 03157199.9

[71] 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 王战会 靳 刚

审查员 边 听

[74] 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司

代理人 王凤华

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

一种在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法。该方法使用组分 A 和组分 B 的无水乙醇溶液浸泡蛋白质芯片，所述组分 A 为能够使蛋白质芯片表面呈疏水性的有机化合物；所述组分 B 为一端含有能够与所需固定的蛋白质分子以共价连接的活性基团、一端含有极性基团的有机化合物；然后使用常规方法活化组分 B 的极性基团；最后将此蛋白质芯片放入所需固定的蛋白质溶液中浸泡。该方法固定的蛋白质比较稳定；而且能够有效降低蛋白质芯片表面与蛋白质分子间的相互作用，减少蛋白质芯片表面对蛋白质分子的空间构像的影响；通过这种方法固定的蛋白质的生物活性比通过物理吸附或单纯组分 B 固定的蛋白质生物活性提高 1 倍以上。

1、一种在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法，包括如下的步骤：

- 1) 配制组分 A 和组分 B 的无水乙醇溶液，其中组分 A 的浓度为 1 毫摩尔~1 摩尔，组分 A 和组分 B 的摩尔比为 20~100: 1；所述组分 A 为甲基三乙氧基硅烷、十一烷硫醇或甲基三甲氧基硅烷；所述组分 B 为氨丙基三乙氧基硅烷、羧基十一烷硫醇或巯基三甲氧基硅烷；
- 2) 将蛋白质芯片的基片放置于步骤 1) 的溶液中浸泡 30 分钟~5 小时进行改性；用无水乙醇清洗固体基片 3 次；再使用常规方法活化组分 B 的极性基团；
- 3) 将所需固定的蛋白质溶液中加入 0.05~1wt% 非离子型表面活性剂；
- 4) 将步骤 2) 改性的蛋白质芯片的基片放入步骤 3) 的蛋白质溶液中浸泡 30 分钟。

2、如权利要求 1 所述的在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法，其特征在于：所述蛋白质芯片的基片为玻璃、硅片、金属或塑料。

3、如权利要求 1 所述的在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法，其特征在于：所述蛋白质包括人免疫球蛋白 G、人血清蛋白。

4、如权利要求 1 所述的在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法，其特征在于：所述非离子型表面活性剂为 Tween 20。

一种在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法

技术领域

本发明涉及一种在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法。

背景技术

蛋白质是一种组成、结构复杂的有机大分子，几乎能与所有固体表面发生相互作用并吸附在表面上。在蛋白质芯片表面上固定目标蛋白质分子已经广泛用于蛋白质纯化、固相免疫检测和生物材料制备等生物医学领域。

目前在蛋白质芯片表面上固定蛋白质的主要方法是通过物理吸附作用，也就是通过两者之间的静电、疏水和氢键等相互作用将蛋白质固定到固体表面上。如 Jonsson, U.; Ivarsson, B.; Lundstrom, I.; Berghem, L. J. Colloid. Interface Sci. 1982, 90, 148. 中所述，通过物理吸附在蛋白质芯片表面固定蛋白质，是使用了二氯二甲基硅烷改性硅表面。但是，使用物理吸附的方法，固定在蛋白质芯片表面上的蛋白质分子的生物活性通常都低于溶液状态下的蛋白质活性，其主要原因是蛋白质分子在吸附到固体表面的同时，其空间构像也会随之发生变化，而蛋白质分子的生物活性是依赖于其空间构像的稳定的。此外，通过这种方法固定的蛋白质很不稳定，一方面，在有流动液体的环境下，固定在蛋白质芯片表面上的蛋白质容易发生脱落；另一方面，由于竞争吸附，其它蛋白质也会替代原有固定在表面上的蛋白质，造成其流失。

另一种较为常用的在蛋白质芯片表面上固定蛋白质的方法是通过共价连接的方式。如 Haodan Yuan, Wayne M. Mullett and Janusz Pawliszyn, Biological sample analysis with immunoaffinity solid-phase microextraction, The Analyst, 2001, 126, 1456-1461. 中所述的通过共价方法在蛋白质芯片表面固定蛋白质，是使用氨丙基三乙氧基硅烷改性硅表面。此方法形成的共价键比物理吸附作用牢固，使得蛋白质相对比较稳定，可以部分解决物理吸附方法存在的蛋白质不稳定问题。但是，在蛋白质芯片表面上用于共价固定蛋白质的基团多为极性的基团，这会进一步增强蛋白质与蛋白质芯片表面间的静电相互作用，从而使得蛋白质的空间构像发生更大的改变，引起生物活

性的降低。

发明内容

本发明的目的在于克服已有固定蛋白质的方法使得蛋白质空间构像发生较大的改变、蛋白质生物活性低、固定的蛋白质不稳定的缺陷，从而提供一种所固定的蛋白质稳定、空间构像所受影响小、生物活性高的、在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法。

本发明的目的是通过如下的技术方案实现的：

本发明提供一种在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法，包括如下的步骤：

- 1) 配制组分 A 和组分 B 的无水乙醇溶液，其中组分 A 的浓度为 1 毫摩尔～1 摩尔，组分 A 和组分 B 的摩尔比为 20～100: 1；所述组分 A 为能够使蛋白质芯片表面呈疏水性的有机化合物；所述组分 B 为一端含有能够与所需固定的蛋白质分子以共价连接的活性基团、一端含有极性基团的有机化合物；
- 2) 将蛋白质芯片的基片放置于步骤 1) 的溶液中浸泡 30 分钟～5 小时进行改性；用无水乙醇清洗固体基片 3 次；再使用常规方法活化组分 B 的极性基团；
- 3) 将所需固定的蛋白质溶液中加入 0.05～1wt% 非离子型表面活性剂；
- 4) 将步骤 2) 改性的蛋白质芯片的基片放入步骤 3) 的蛋白质溶液中浸泡 30 分钟。

所述组分 A 为甲基三乙氧基硅烷、十一烷硫醇或甲基三甲氧基硅烷。

所述组分 B 为氨丙基三乙氧基硅烷、羧基十一烷硫醇或巯基三甲氧基硅烷。

所述蛋白质芯片的基片为玻璃、硅片、金属或塑料。

所述蛋白质包括人免疫球蛋白 G、人血清蛋白。

所述非离子型表面活性剂为 Tween 20 (吐温)。

该方法的原理是通过两种有机化合物——组分 A 和组分 B 同时使用，在蛋白质芯片表面固定蛋白质。其中，组分 A 用来封闭蛋白质芯片表面，使蛋白质芯片表面呈强疏水性、电中性，不与蛋白质分子形成氢键，如甲基三乙氧基硅烷、烷硫醇等；而组分 B 为一端含有能够与所需固定的蛋白质分子以共价连接的活性基团、一端含

有极性基团的有机化合物，如氨基三乙氧基硅烷、羧基烷硫醇等。

本发明提供的在蛋白质芯片表面固定蛋白质的方法与已有技术相比，其优点在于：

- 1、一方面，该方法使用组分 B 的活性基团，在蛋白质分子和固体表面间形成共价键，固定的蛋白质比较稳定；
- 2、同时，由于蛋白质分子与固体表面之间形成的共价键数量越少，就越有利于蛋白质分子保持其空间构像，所以通过控制组分 A 和组分 B 的量，使得在一个蛋白质分子覆盖的面积上，仅以一个共价键连接，就足以使其固定在蛋白质芯片表面上，并能够有效降低蛋白质芯片表面与蛋白质分子间的相互作用，减少蛋白质芯片表面对蛋白质分子的空间构像的影响；
- 3、可以选择与蛋白质分子的分子量和体积差距大的表面改性的有机分子，这样用于共价固定蛋白质的有机分子仅需稀疏地散布于蛋白质芯片表面上，就足以形成饱和蛋白质分子膜层，能够有效降低蛋白质芯片表面与蛋白质分子间的相互作用，减少蛋白质芯片表面对蛋白质分子的空间构像的影响；
- 4、通过加入少量的非离子型表面活性剂，能够有效抑制蛋白质分子在蛋白质芯片表面上的物理吸附，保持蛋白质分子的空间构像；
- 5、通过调控两种有机分子的比例，可以定量地控制蛋白质在蛋白质芯片表面上的固定量
- 6、通过这种方法固定的蛋白质的生物活性比通过物理吸附或单纯组分 B 固定的蛋白质生物活性提高 1 倍以上。

具体实施方式

实施例 1

配制甲基三乙氧基硅烷和氨丙基三乙氧基硅烷（二者的摩尔比为 20: 1）的混合乙醇溶液，甲基三乙氧基硅烷的浓度为 1 毫摩尔；

将以硅片为基片的蛋白质芯片放置于上述溶液中浸泡 5 小时进行改性；用无水乙醇清洗固体基片 3 次；再使用戊二醛活化氨丙基三乙氧基硅烷上的氨基；

配制 1mg/ml 人免疫球蛋白 G PBS(磷酸缓冲液)溶液，其中含有 0.05wt% Tween 20；

将改性的蛋白质芯片放入此人免疫球蛋白 G 溶液中浸泡 30 分钟。

实施例 2

配制十一烷硫醇和羧基十一烷硫醇（二者的摩尔比为 100: 1）的混合乙醇溶液，十一烷硫醇的浓度为 1 摩尔；

将以金为基片的蛋白质芯片放置于上述溶液中浸泡 30 分钟进行改性；用无水乙醇清洗固体基片 3 次；再使用乙基碳二亚胺（EDC）活化羧基十一烷硫醇的羧基；

配制 1mg/ml 人血清蛋白 PBS 溶液，其中含有 1wt% Tween 20；

将改性的蛋白质芯片放入此人血清蛋白溶液中浸泡 30 分钟。