

[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 03157200.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1320361C

[22] 申请日 2003.9.18 [21] 申请号 03157200.6

[73] 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

[56] 参考文献

CN1381723A 2002.11.27

CN1402007A 2003.3.12

US6485984B1 2021.12.6

蛋白 A 高效亲和膜色谱法测定人血浆中免
疫球蛋白 G 的含量 周冬梅等, 色谱, 第 16 卷
第 3 期 1998

审查员 边 昕

[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 3 页

[54] 发明名称

一种改性蛋白芯片表面的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种改性蛋白芯片表面的方法，其特征在于用常规方法在蛋白质芯片的基片上先固定一层小分子量的蛋白质分子，再固定待固定的蛋白质分子。所述的小分子量的蛋白质分子的分子量为 $1 \times 10^3 \sim 9 \times 10^5$ 道尔顿。该方法可以改善蛋白质芯片表面的特性：一方面，小分子量的蛋白质分子覆盖在蛋白质芯片的表面，保证了待固定的蛋白质分子的生物活性，同时也抑制了待固定的蛋白质分子在固体表面上的非特异性吸附；另一方面，小分子量的蛋白质分子的带有氨基、羧基、羟基、巯基等活性基团的极性氨基酸残基多位于蛋白质分子表面，这些基团活化后可以直接用于固定待固定的蛋白质分子，形成稳定的共价键。

1、一种改性蛋白芯片表面的方法，其特征在于：在经醛基改性的蛋白质芯片的基片上先以共价键固定一层分子量为 5000—50000 道尔顿的小分子量的蛋白质分子，再固定待固定的蛋白质分子。

2、如权利要求 1 所述的改性蛋白芯片表面的方法，其特征在于：所述的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 所述的改性蛋白芯片表面的方法，其特征在于：所述的小分子量的蛋白质分子为胰岛素分子，分子量 5000 道尔顿。

4、如权利要求 1 所述的改性蛋白芯片表面的方法，其特征在于：所述的小分子量的蛋白质分子为牛血清白蛋白分子，分子量 50000 道尔顿。

5、如权利要求 1 所述的改性蛋白芯片表面的方法，其特征在于：所述的小分子量的蛋白质分子为溶菌酶分子，分子量 30000 道尔顿。

一种改性蛋白芯片表面的方法

技术领域

本发明涉及一种改性蛋白芯片表面的方法。

背景技术

随着科学技术的发展，蛋白质芯片已被广泛地应用于许多生物医学领域。常用的蛋白质芯片都是将目标蛋白质分子固定到固体基片的表面。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。在蛋白质芯片制作中，不但需要把蛋白质分子稳定地固定在表面上，保持其生物活性，而且还需要能够有效地在表面上抑制非特异性吸附。

目前，在固体表面上固定蛋白质主要是通过物理吸附或共价连接的方法。如 Jonsson, U.; Ivarsson, B.; Lundstrom, I.; Bergem, L. J. Colloid. Interface Sci. 1982, 90, 148. 中所述，物理吸附的方式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。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。

但是这两种方法制作的蛋白质芯片并不是很理想。通过物理吸附在蛋白质芯片表面固定蛋白质分子，蛋白质分子的空间构像会发生变化，使得其生物活性降低；而且通过这种方法固定的蛋白质很不稳定，容易发生脱落以及由于其它蛋白质分子的竞争吸附而造成的流失。通过共价连接在蛋白质芯片表面固定蛋白质分子，使得蛋白质分子相对比较稳定；但是，在蛋白质分子与蛋白质芯片表面间的静电相互作用大，从而使得蛋白质的空间构像发生更大的改变，引起生物活性的进一步降低。

另外，在将蛋白质芯片用于体内生物材料移植、固相免疫检测和蛋白质纯化时，不但需要把蛋白质分子稳定地固定在表面上，保持其生物活性，往往还需要抑制蛋白质分子在固体表面上的非特异性吸附。

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，为了把蛋白质分子稳定地固定在表面上，保持其生物活性，而且可以抑制蛋白质分子在固体表面上的非特异性吸附，从而提供一种改性蛋白芯片表面的方法。

本发明的目的是通过如下的技术方案实现的：

本发明提供一种改性蛋白芯片表面的方法，其特征在于：用常规方法在蛋白质芯片的基片上先固定一层小分子量的蛋白质分子，再固定待固定的蛋白质分子。

所述的蛋白质芯片的基片为玻璃、硅片、金属或塑料。

所述的小分子量的蛋白质分子的分子量为 $1\times 10^3\sim 9\times 10^5$ 道尔顿。

所述的小分子量的蛋白质分子为胰岛素分子，分子量5000道尔顿。

所述的小分子量的蛋白质分子为牛血清白蛋白分子，分子量50000道尔顿。

所述的小分子量的蛋白质分子为溶菌酶分子，分子量30000道尔顿。

本发明提供的改性蛋白质芯片表面的方法，可以改善蛋白质芯片表面的特性，其优点在于：一方面，小分子量的蛋白质分子覆盖在蛋白质芯片的表面，由于蛋白质分子之间相互排斥的作用，从而抑制了待固定的蛋白质分子与蛋白质芯片表面的直接接触，降低了待固定的蛋白质分子与蛋白质芯片表面间的静电相互作用，保证了蛋白质分子的生物活性，同时也抑制了蛋白质分子在固体表面上的非特异性吸附；另一方面，小分子量的蛋白质分子的带有氨基、羧基、羟基、巯基等活性基团的极性氨基酸残基多位于蛋白质分子表面，这些基团活化后可以直接用于固定待固定的蛋白质分子，形成稳定的共价键。

具体实施方式

实施例 1

把小分子量的蛋白质分子——分子量5000道尔顿的胰岛素分子以共价键固定到经醛基改性的蛋白质芯片的硅基片表面上，达到饱和，得到固定了小分子量蛋白质

分子的蛋白质芯片；

把上述已固定胰岛素分子的蛋白质芯片浸泡到戊二醛溶液中活化 30 分钟，胰岛素分子的部分氨基同戊二醛反应，使胰岛素分子表面带有醛基；

配制 1mg/ml 待固定的蛋白质分子——人免疫球蛋白 G 的 PBS（磷酸缓冲液）溶液，其中含有 0.05wt% Tween 20；将上述已活化的固定了胰岛素分子的蛋白质芯片放入此人免疫球蛋白 G 溶液中浸泡 30 分钟，以将人免疫球蛋白 G 固定到蛋白质芯片的表面。

实施例 2

把小分子量的蛋白质分子——分子量 50000 道尔顿的牛血清白蛋白分子以共价键固定到经醛基改性的蛋白质芯片的金基片表面上，达到饱和，得到固定了小分子量蛋白质分子的蛋白质芯片；

把上述已固定牛血清白蛋白分子的蛋白质芯片浸泡到乙基碳二亚胺（EDC）溶液中活化 10 分钟，胰岛素分子的部分羧基与乙基碳二亚胺反应生成活泼酯；

配制 1mg/ml 待固定的蛋白质分子——人血清蛋白的 PBS（磷酸缓冲液）溶液，其中含有 0.05wt% Tween 20；将上述已活化的固定了牛血清白蛋白分子的蛋白质芯片放入此人血清蛋白溶液中浸泡 30 分钟，以将人血清蛋白固定到蛋白质芯片的表面。

实施例 3

把小分子量的蛋白质分子——分子量 30000 道尔顿的溶菌酶分子以共价键固定到经醛基改性的蛋白质芯片的塑料基片表面上，达到饱和，得到固定了小分子量蛋白质分子的蛋白质芯片；

把上述已固定溶菌酶分子的蛋白质芯片浸泡到乙基碳二亚胺（EDC）溶液中活化 10 分钟，溶菌酶分子的部分羧基与乙基碳二亚胺反应生成活泼酯；

配制 1mg/ml 待固定的蛋白质分子——单克隆抗体的 PBS（磷酸缓冲液）溶液，其中含有 0.05wt% Tween 20；将上述已活化的固定了溶菌酶分子的蛋白质芯片放入此单克隆抗体溶液中浸泡 30 分钟，以将单克隆抗体固定到蛋白质芯片的表面。