[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
B01D 15/00
G01N 33/53 B01J 20/32

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96193700.9

[43] 授权公告日 2003 年 2 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1100582C

[22] 申请日 1996.4.1 [21] 申请号 96193700.9
[30] 优先权
[32] 1995. 5. 4 [33] US [31] 08/434,930
[86] 国际申请 PCT/US96/04485 1996.4.1
[87] 国际公布 WO96/34670 英 1996.11.7
[85] 进入国家阶段日期 1997.11.3
[71] 专利权人 美国 3M 公司
地址 美国明尼苏达州
[72] 发明人 P·L·科尔曼 M·K·迪布
J·B·斯托尔
[56] 参考文献
JP－56144085 1981.11.10 C12M1/40
US－4812352 1989.03.14 B32B5/00
US－5338403 1994.08.16 G01N27/26
审查员 刘天佐

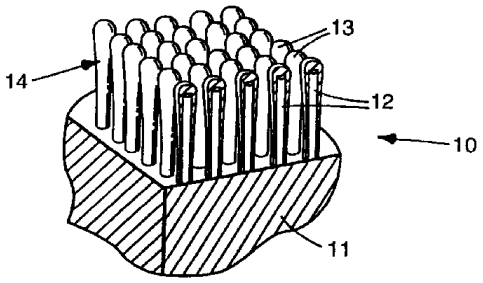
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 7 页

[54] 发明名称 生物吸附载体

[57] 摘要

本发明提供生物测定方法和生物吸附载体，生物吸附载体包含一个支持有毫微结构表面的惰性底物，该表面包含涂布金属的，定向排列的，不连续的亚微米大小的须晶。 或者，敷形涂布金属的须晶可被部分包埋或被第二种材料敷形涂布。 毫微结构表面不需搅拌或振荡即可快速且高度牢固地吸附结合生物分子。 有利的是，结合的生物分子仍保留其生物活性。



ISSN1008-4274

1. 一种生物吸附载体作为分离手段的应用，其中生物吸附载体包含一个支持毫微结构表面的惰性底物，毫微结构表面包含涂布金属的，定向排列的，不连续的亚微米大小的单元，该单元的表面数密度在 1-200/μm^2。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其中每个毫微结构单元是含有两个组分的单元，其中第一组分是定向排列的须晶，第二组分是生物分子吸附剂敷形涂层，敷形涂层涂布在第一组分上。

3. 根据权利要求 1 所述的应用，其中有生物活性的物质被吸附在生物吸附载体上。

4. 根据权利要求 1 所述的应用，其中毫微结构单元的高径比大于 3。

5. 一种组合体，包含

(a) 一种生物吸附载体，其包含一个支持毫微结构表面的惰性底物，毫微结构表面包含敷形涂布生物分子吸附剂的，定向排列的，不连续的亚微米大小的单元，其中所述生物分子吸附剂是金属，该单元的表面数密度在 1-200/μm^2 和

(b) 一个吸附在敷形涂布生物分子吸附剂的单元上的生物活性物质的单层，其中被吸附层保持生物活性。

6. 根据权利要求 5 所述的组合体，其中生物分子吸附剂敷形涂层是贵金属。

7. 一种用权利要求 5 所述的组合体作为分离手段，用作免疫测定的生物传感器，抽提手段或过滤器中的至少一种的应用。

8. 根据权利要求 5 所述的组合体，还包含

(c) 一个吸附在第一生物活性物质单层上的第二生物活性物质单层。

9. 一种用权利要求 8 所述的组合体作为分离手段，用作免疫测定的传感器，抽提手段或过滤器中的至少一种的应用。

10. 一种用权利要求 8 所述的组合体作为催化反应器的应用。

生物吸附载体

发明领域

本发明涉及一种生物吸附载体，特别涉及一种以毫微结构(nanostructured)的表面形态为基础的生物吸附载体.

发明背景

常用生物吸附载体包括聚合物，共聚物或有化学官能团的没有明显物理显微结构的聚合物表面(即，其表面积由载体的平均几何形状来确定)．从微观角度来说，聚合物表面提供了亲水和疏水位点是不均一的，从而使生物分子有不同水平的对吸附剂底物亲和能力．在一个平的表面上，生物分子经扩散而脱离和吸附到底物上的可能性是相同的．通常吸附速度可通过摇动或振荡溶液来提高.

发明概要

简单的说，本发明一方面提供一种生物吸附载体，其含有一个惰性的底物来支持一个毫微结构表面，表面包含涂布金属的，定向排列的，不连续的亚微米大小的单元，单元有很高的高径比，例如大于 3 且表面数密度(areal number densiy) 在 1-200/μm^2 范围内.

有利的是，毫微结构表面的物理形态(在这里描述为毫微结构是因为表面的体积以纳米表征)为溶液内与表面接触的生物分子在短的扩散路程长度内提供了高的比表面积．其上吸附生物分子的毫微结构须晶上的涂布材料可以不同，但最好用简单金属如贵金属．有毫微结构表面的底物通常是柔性的，惰性的，并易被切开或成形的．生物分子可快速吸附到载体上，并形成高水平(85-90 %)的牢固结合和高的绝对结合数量(~ 10$\mu g/cm^2$)，且不需要摇动或振荡．而且，牢固结合的生物分子表现出仍保持生物活性．鉴于生物活性物质的高度不均一性，即三聚物(通常只含有三个不同的单体)与生物活性物质(通常有 11 个或更多的不同的单体)相比是简单的，因此其结合紧密度和生物活性的保留是特别惊人的.

本发明毫微结构有高的高径比，其表面数密度在 40-50/μm^2，与其它该领

域已知的吸附载体相比可为吸附生物分子提供 10-15 倍的平面表面积．毫微结构须晶上的纯金属涂层如 Pt 可形成一个均一的吸附表面．而且，定向排列单元的很高的高径比和它们的高填充密度(即表面数密度)可使生物分子在扩散入毫微结构层时被暂时截留，从而不需摇动或振荡即可获得更多的生物分子/吸附表面的碰撞机会．

本发明另一方面是生物吸附载体可有利地用作分离装置如过滤器，传感器及其他．例如，含有生物活性物质的流体可在生物吸附载体上方流过或通过生物吸附载体，以使流体内的一个或多个生物活性物质从流体被抽提出或被分离．抽提出的或分离出的生物活性物质单层粘附在毫微结构单元上．生物活性物质可以某种方式在任意的终点时被取出，这些方式如直至吸附了预定水平的物质，吸附了预定的时间，或直至载体被生物活性物质所饱和．

本发明还有一个方面是生物吸附载体可用于稳态的从一种物质转变为另一种物质的生物转变过程，如作为一种催化剂．这些特征为本发明提供了几个方面，这些是该领域技术人员所不能预见的．与吸附载体技术领域的已知技术相比，生物分子结合到这种物质表面的速度比生物分子结合到常规平面表面上的速度更快．令人惊奇的是，生物分子的结合不仅快速而且有高的表面覆盖率。

本发明另一个有利的特征是生物分子的结合紧密度，其可用十二烷基硫酸钠(SDS)处理时耐受解吸的能力来描述．如此高的残留结合通常只有当这种生物分子以共价键结合到表面上时才会有．同样令人惊奇的是在如此牢固结合的同时，生物分子还可保留其生物活性．

利用毫微结构单元特别的优点可制成一种组合体，其含有(a)一个生物吸附载体，其含有一个支持一个毫微结构表面的惰性底物载体，表面包含涂布金属的，定向排列的，不连续的亚微米大小的单元，单元有高的高径比且表面数密度在 1-200/μm^2 范围内和(b)吸附在涂布金属的单元上的单层生物活性物质，其中被吸附的一层具有生物活性．

有利的是，组合体也可用作一个分离装置，其中吸附在涂布金属的单元上的生物活性物质对特定的生物活性物质具有特异性．

或者，本发明还有一个方面是提供一个组合体，其包含:

(a)一个生物吸附载体，其含有一个支持毫微结构表面的惰性底物，表面包含敷形涂布生物吸附剂的，定向排列的，不连续的亚微米大小的单元，单元有高的高径比且表面数密度在 1-200/μm^2 范围内

(b)一个吸附在敷形涂布生物吸附剂的单元上的第一生物活性物质单层，其中被吸附层具有生物活性，和

(c)吸附在第一生物活性物质单层上的第二生物活性物质单层.

例如，第一个组合体可用第一生物活性物质单层涂布，该单层可暂时或永久地与药物(第二生物活性物质单层)结合，从而使药物以饱和或预定剂量涂布在组合体上．然后涂布有药物的组合体可用于使药物在特定部位定时解吸或仍保留药物，其通常可吸附到或离开所给定的区域.

在本申请中:

“生物活性物质”也称”生物分子“，是指分子如有生化，免疫化学，生理和/或药物活性的分子，即能以一种影响生物过程的方式进行反应的分子，这类物质包括蛋白质，抗体，抗原，酶，辅因子，卵磷脂，激素，脂质，介质，受体，凝集因子，组蛋白，细胞受体和细胞表面抗原，以及还包括分子量(用SDS 凝胶电泳测定)至少为 1000 以上，最好至少为 5000 以上的物质或生物分子.

附图简述

图 1A 是未涂布的不连续的亚微米大小的须晶的立体图，该须晶由底物支持.

图 1B 是图 1A 不连续的亚微米大小须晶被敷形涂布后的立体图.

图 2 是放大倍数为 10,000 倍的扫描电子显微照片(SEM)，其表明用胶乳部分包埋的涂布 Pt 的须晶，须晶形成用于吸附蛋白质 A 的毫微结构单元.

图 3 是放大倍数为 150,000 倍的扫描电子显微照片(SEM)，其表明未包埋的在涂布铜的聚酰亚胺底物上的涂布 Pt 的须晶.

图 4 表示最初结合和牢固结合的蛋白质 A 吸附量对应于时间的曲线图.

图 5 表示最初结合和牢固结合的牛血清白蛋白(BSA)吸附量对应于时间的曲线图.

图 6 表示最初结合和牢固结合的人免疫球蛋白 G (IgG)吸附量对应于时间的曲线图.

图 7 是放大倍数为 150,000 倍的扫描电子显微照片(SEM)，其表明在吸附蛋白质 A 后的涂布 Pt 的须晶.

较佳实施例描述

本发明提供一种生物吸附载体，其含有一个惰性的底物来支持一个毫微结构表面，表面包含金属涂布的，定向排列的，有不连续亚微米大小的须晶．或

者，敷形涂布金属的须晶可部分包埋或用第二种材料敷形涂布．毫微结构表面不需摇动或振荡即可快速且高度牢固地结合吸附生物分子．有利的是，结合的生物分子仍保持其生物活性．

本申请所用的“毫微结构”指在至少一个方向上空间大小大约为几十纳米数量级的组成不均匀的表面区域．这种在两个方向上有空间不均匀性的毫微结构表面区域的例子是，底物表面上均匀地排列有伸展的涂布金属的单元(纳结构单元)，单元间互不接触，每单位面积内有足够的数目以获得所需的性质，如快速牢固结合．两个方向上空间不均匀的毫微结构表面区域可以是一种沿任何两个或三个正交方向至少有两种不同的物质如毫微结构单元和空隙的区域．这种毫微结构材料在如美国专利 No. 4,812,352 中有所描述，它被引证包括在这里．

简单的说，将一种有机材料在接近室温时真空气相沉积在一个柔性的底物如聚酰亚胺织物上，形成约 0.15 微米数量级的厚度，这种有机材料基本上有平面形状的分子和非定域的π-电子密度，如颜料 N,N'-二(3,5-二甲苯基)苝-3,4:9,10 二(二羧酰亚胺)，以下称为 PR149．此后，底物和 PR149 涂层在足够的真空中退火以使最初均匀的颜料膜变为具高度毫微结构的须晶．参照图 1(a)和 1(b)，毫微结构表面(10)包括不连续的均匀排列的结晶须晶(12)，其高为 1 至 2 微米，有高的高径比(长度对宽度)和高的表面数密度(1-200/μm^2)，直径约为 0.05 微米．由底物(11)支持的须晶间的距离约为 0.05 微米或更小．因此得到的结晶须晶(12)的几何表面积可比平面表面积(10)增加 10 到 15 倍．然后附着在最初底物(11)上的结晶须晶(12)可用金属，半金属，半导体，电介质或有机物质敷形涂布．在本申请中，喷镀或气相沉积金属涂层，特别是铂层，是直接吸附生物分子所需的表面．金属涂层(13)也有助于加固涂布过的须晶(14)和维持须晶粘结在底物(11)上以防止其进入溶液．

或者，上述的涂布过的毫微结构单元还可任用一种有机物质进一步敷形涂布以围绕每个毫微结构单元施加一层有生物官能团的薄的敷形涂层．这种涂层的涂敷方法包括，例如自组装单层．

而且，上述的毫微结构表面可通过用可流动的物质，如预聚合物，覆盖须晶(14)结构来部分包埋，预聚合物只部分填充须晶间的空隙，当其固化成固态时，其可从原来的底物上剥落．在剥落时，固化聚合物的部分包埋剂将须晶拉出原来的底物，由于使须晶末端突出而形成起纹理的表面．该表面现在可作为生物分子吸附表面．许多聚合物可作为包埋剂，并可被选用来进一步增加生物

分子的结合性.

较佳的底物材料包括有机或无机材料，如聚合物，金属，陶瓷，玻璃和半导体．较佳的有机材料是涂布金属的聚酰亚胺薄层(工业上可从 DuPont Corp. 以商品名 KAPTON™ 获得)．本发明适用的其它底物材料的例子在美国专利 No. 4,812,352 中有描述，并且引证包括在这里.

在美国专利 No. 5,238,729 中描述了一种用于证实本发明的特别有用的制造方法来制备生物吸附载体的毫微结构表面区域，且该描述被引证包括在这里．在美国专利 No. 5,039,561 和 4,812,352 中描述了含有毫微结构表面区域的毫微结构单元，该描述被引证包括在这里.

其它产生毫微结构表面的方法包括(1)有机颜料真空沉积在加热的底物上，(2)用物理蒸气迁移生长而不用真空蒸气沉积，(3)无机材料以高入射角真空沉积，(4)有不同喷涂速率的聚合物，半导体或合金的离子喷涂浸蚀或 RF 喷涂浸蚀，(5)采用微岛(microisland)掩蔽的聚合物喷涂浸蚀，(6)光刻法(UV 和 X-射线)，和电子束石印术，(7)铝水解而形成一水软铝石，(8)金属的电化学腐蚀和粗糙金属的电镀，(9)光聚合物表面的光刻法，(10)低共熔混合物直接固化和浸蚀法，和(11)气液固(VLS)晶体生长．这些方法的任一个都可用于形成毫微结构表面．一些技术或方法有利于制备如须晶状结构．在 J. Vac. Sci. Tech. (1983, 1(3),1398-1402)和美国专利 No. 4,812,352, 5,039,561 和 5,238,729 中描述了无机物，金属或半导体为基础的微结构层或微结构的制备方法.

可用于制备须晶的原材料包括有机和无机化合物．须晶对于后续的薄层金属涂布，以及任选的和敷形涂布和任选的包埋必须是无反应性的或不活泼的骨架．较佳的有机材料可大致分为多环芳香烃和杂环芳香烃化合物．特别有用的多环芳香烃包括，例如萘，菲，芘，蒽，晕苯和苝这些类别．较佳的多环芳香烃是 N,N'-二(3,5-二甲苯基)苝-3,4:9,10 二(二羧酰亚胺)(工业上可从 Hoechst-Celanese Corp.以商品名“C.I. Pigment Red 149”获得，也称为“PR149”).

用于制备须晶的有机材料可用该领域已知涂布技术来将有机材料层涂布在底物上，其包括(但不局限于)真空蒸发，喷镀，化学蒸气沉积，喷涂，溶液吸附，LangmuirBlodgett，或刮涂．有机层的涂布最好用物理真空蒸气沉积(即，有机材料在所施加的真空下升华)．在沉积时底物较佳的温度取决于所选择的有机材料．对于 PR149，底物的温度近室温(即，约 25 ℃)是理想的.

在制备有机须晶的较佳方法中，沉积的有机层的厚度将决定在退火过程中形成的微结构的主要方向．这一较佳的方法包括在或接近室温时使形成须晶的

材料沉积，然后升高底物的温度，在低于约 130 帕斯卡的真空下，最好低于 10^{-2} 帕斯卡的真空下对形成须晶的材料退火．须晶在底物上生长，其特征和方法在美国专利 No. 5,039,561 中有所描述，它被引证并包括在这里．这种获得须晶的方法在下面的实施例 1 中也有描述．

另一种形成须晶的方法包括将形成须晶的材料沉积在底物上，其中对形成须晶的材料和底物升温．材料被在低于约 130 帕斯卡的真空下沉积，直至获得有高的高径比的随机取向的须晶．这种可供选择的方法在美国专利 No. 5,352,651 中有所描述，被引证并包括在这里．

在两种情况下，PR149 都是较佳的有机材料．PR149 层在退火前的厚度通常为约 0.05 至 0.3μm，更佳在 0.05 至 0.15μm，最佳在 0.1 至 0.15μm．当有机材料退火时，如在 1.0×10^{-2} 帕斯卡和约 250 ℃退火 30 分钟，就形成了须晶．最好，须晶是单晶的或多晶的而不是无定形的．由于晶体的特征和微结构的一致取向，须晶层的物理和化学性质是各向异性的．通常须晶的取向是一致的，是垂直于底物表面的．每个须晶的较佳长度在 0.1 至 3μm，更佳为 0.5 至 2.5μm．每个须晶的横截面宽度最好小于 0.1μm．须晶最好有高的高径比(即须晶的长度和须晶的直径之比约在 3:1 至 100:1 之间)．敷形涂布的毫微结构单元的表面数密度较佳是在 1-200/μm^2，最好在 5-50/μm^2 范围内．

而且，无论毫微结构单元是同轴取向还是随机取向，最好每个毫微结构单元的至少一端与所有毫微结构单元共有的二维平面接触．

参照图 1B，亚微米宽度和几微米长度的毫微结构单元(14)，是一个包含有机须晶核心(12)和至少一个敷形涂层(13)的复合物．敷形涂层材料从生物材料，有机材料如自组装单层、有机颜料如酞菁或杂环芳香族化合物，或无机材料中选出．通常敷形涂层材料被选择用于优化生物分子的吸附和结合．无机涂层材料最好从导电金属，半金属，电介质和半导体中选出．较佳的金属敷形涂层材料包括 Pt, Pd, Ag, Cu, Au,和合金，如 CrCo, NiCr 和 PtIr．围绕须晶的敷形涂层材料其壁厚在约 0.5nm 至约 50nm 范围内．

敷形涂层可用常规技术沉积在须晶上，其包括，例如在美国专利 No. 5,039,561 中描述的方法．敷形涂层沉积的方法应避免机械的或类似机械的力扰乱毫微结构表面区域．更佳的是无机敷形涂层采用真空沉积的方法沉积，例如真空升华，喷涂，蒸气迁移和化学蒸气沉积的方法．

此外，可在毫微结构单元外涂敷第二，第三或更多层敷形涂层．一种特别有用的涂敷附加的敷形涂层的方法是从溶液中吸附有机材料，例如末端硫代的

低聚物.

尽管最好用多组分的毫微结构单元(如上所述)，但是本发明也考虑了含有一个组分的毫微结构单元．单一组分的单元有和多组分单元类似的尺寸，然而，单一组分的单元只含有一种材料，如金属，参照如上所述的金属敷形涂层.

或者，尽管不是最佳的，但可任意在毫微结构表面区域的暴露表面涂敷一种有机或无机的包埋剂，其中包埋剂全部或部分地包埋毫微结构单元．包埋剂可用适于特定包埋剂的方法以液态，气态或固态涂敷到毫微结构表面区域上．涂敷的包埋剂可用适于所用特定材料的方法固化，缩合或聚合.

在毫微结构单元被包埋后，得到的复合体即被包埋的本发明的生物吸附载体，用机械的方法，如将包埋的生物吸附载体从底物中拉出，将底物从包埋的生物吸附载体中拉出或两者共同作用的方法，使载体从底物-毫微结构层界面剥落．在一些例子中，包埋的生物吸附载体在包埋剂固化时会自动脱落.

另一种较佳的方法是制造包埋的生物吸附载体的无溶剂方法，该方法可用于任何有毫微结构表面的组分，即，一个包含各种材料组分，形状，取向和堆积密度的毫微结构单元的组合．如美国专利 No. 5,352,651 中所述，毫微结构单元可用热辊压延入聚合物织物的任何预定的深度.

生物吸附载体通常在 25-50μm 厚的底物上形成大面积的片材，适于切割或冲出许多小的样品片．例如，可冲出小直径的片(～ 6mm)并将其置于微量滴定孔的底部以使毫微结构表面面对孔的内部.

有利的是，毫微结构表面的高表面积和小的体积不会受到由于化学和生物官能团包括在须晶的敷形涂层中的影响，因此增加了毫微结构表面的用途和对生物活性的特异性．我们相信本发明的生物吸附载体上结合的蛋白质数量的增加是由于实施例中所示的毫微结构表面的表面积增加了 10 至 15 倍.

用对 SDS 的耐受性测定的牢固结合的生物分子的比率始终是高的，特别是对 Pt ，并且它代表了比常规载体性能的提高．不想受理论约束，但与常规的生物吸附载体相比，在天然氧化的纯金属底物上可以预期小的亲水和疏水区域的均一性更好，这部分地解释了更高的对 SDS 的耐受性和更高水平的结合数量.

不想受理论约束，但据认为与绝缘(聚合物)材料相比，金属底物(吸附剂)上的电荷容易重新分配，这也使溶解的生物分子易接近吸附剂-水界面而发生结合(在此处会产生色散力和静电镜像力)．当生物分子扩散进入或离开吸附剂时，与在均匀的平的吸附剂表面上发生的碰撞机会相比，在相对高的柱状须晶

间生物分子的有效截留将引起每单位随机移动距离内有更多的生物分子/吸附剂间的碰撞机会．即，如果当生物分子接近须晶表面但不吸附而是扩散离开时，它将主要向另一个只有几步“费克扩散”距离的须晶表面扩散，因为大多数须晶的表面是须晶的侧面．在一个无此类结构的平的底物上，生物分子的一半时间是静态扩散离开．碰撞率的增加可解释吸附过程的动力学的改善．

本发明的生物吸附载体可用于任何需要生物分子结合的场合．载体特别适于需要更牢固结合的生物分子，或更高密度或更高吸附速率的情况；例如，结合的生物分子数量限制了反应速度的场合．这类情况通常发生在酶反应器中，在这里通常反应速率与酶浓度是表现出一级动力学．另一个例子是纯化系统，其中系统的性能通常与某些官能团的数量成比例，如亲和纯化系统中的结合生物分子．另一个例子是分析测试，其中测试的灵敏度与检测器分子(配体)的敏感性量成比例，且通常受检测器分子的数量限制．如果结合的检测器分子(通常是生物分子)的密度增加，结合的被分析物数量就增加，信号就增加．还有一个例子是结合的生物分子用作生物传感器，其中检测灵敏度随结合的生物分子的数量而变．

本发明的目的和优点还在下列实施例中进一步描述，但这些实施例中列举的特定的材料和数量以及条件和细节不应被理解为本发明的限制范围．所有的材料是工业上可获得的或是该领域已知的，但加以描述或显而易见的其他情况除外．所有的样品除另有描述，均制备和分析三份，其平均值和标准偏差归纳列在下列表中．

实施例

对 SDS 的耐受性

下面报告中的对 SDS 的耐受性百分比按下列公式计算:

[(牢固结合的蛋白质)÷(最初结合的蛋白质)]× 100 = % 对 SDS 的耐受性．它是耐受 SDS 增溶处理的蛋白质的百分数．

实施例 1-2 .

一片 3cm × 10cm 的玻璃微载物片，用铜进行 RF 喷镀至厚度约为 100nm．将有机颜料 N,N'-二(3,5-二甲苯基)芘-3,4:9,10 二(二羧酰亚胺)(PR149)以 20nm/min 的平均沉积速度真空(基础压力为约 2.0×10^{-4} 帕斯卡)蒸气相沉积在涂布铜的载物片上，至厚度为 146nm．如美国专利 No. 4,812,352 所述的那样，

将涂有有机颜料层的载物片在真空下退火至最高温度为 200 ℃，以使有机颜料层变成有不连续的垂直取向的结晶须晶的毫微结构层.

然后大约一半的须晶状有机颜料层用铜进行 RF 喷镀，以在须晶上形成相当平面厚度约 100nm 的敷形涂层. 由于须晶表面积比平面表面积大得多，因此铜涂层的有效厚度应远远小于 100nm . 大约三分之一的须晶用铂喷镀以形成相当于平面厚度为约 100nm 的敷形涂层. 载物片剩下的约六分之一的面积不涂布，其上只有加上制备的裸 PR149 须晶.

一个常用的空气加压涂料喷雾器可用于在敷形涂布的毫微结构层上喷涂一层包埋的胶乳前体(工业上可从 3M Co.以商品名 " STRIPPABLE MASKANT YR-43 " 获得)，其形成的湿厚度为约 0.157 至 0.165mm . 然后包埋层在常规的空气烘箱中在约 66 ℃干燥约 20 分钟.

从涂布的组合体的三个区域上分别切下一组(每组含有三个)边长为 5mm 的正方形样品，并用镊子从载玻片上剥下. 原先涂布在载玻片上的铜涂层仍在玻片上. 第一组样品含有以铜敷形涂布并包埋在可剥落的保护层中的须晶(实施例 1). 三组样品中的第二组样品含有铂敷形涂布并包埋在可剥落的保护层中的须晶(实施例 2). 第一对照组是含有裸须晶(没有敷形涂布)且包埋在可剥落的保护层中的 5mm 正方形的一组样品. 第二对照组是从干燥的可剥落保护层上切下的一组三个 5mm 的正方形样品，该保护层喷涂在钢板上形成了一个无包埋的毫微结构的表面.

由于有涂布金属的须晶的样品片其毫微结构表面有高度的光吸收效应，因此其看上去非常黑. 部分包埋在可剥落保护层中的以铂敷形涂布的须晶其表面比以铜敷形涂布的须晶表面更有纹理，图 2 的 SEM 照片表示了以铂敷形涂布的须晶表面.

为测定蛋白质结合，每个正方形样品在 250μg/ml， ^{125}I 放射标记的蛋白质 A(Genzyme Corp., Boston, MA)的磷酸盐缓冲液中(0.15M NaCl 在 25mM 磷酸钠中)(这里称为 PBS， pH7.5)振荡恒温反应 18 小时. 色层分析杂志，第 512 卷，345-363 页(1990)(**J. Chromatog., vol. 512, p.345-363(1990)**). 然后表面用 3.0M， pH9.0 的乙醇胺处理 1 小时，再用 PBS 冲洗四次. 用 Packard 自动γ辐射计数仪(5230 型， Canberra Industries Inc./Packard Instrument Co., Meriden, CT)测定残余的放射性来得出蛋白质的最初结合水平. 每一组样品，即涂布铂，涂布铜和未涂布的样品均一式三份地进行制备和分析. 胶乳对照品也一式三份地制备和分析. 三个未涂布的，以铂敷形涂布的和以铜敷形涂布的须晶样品，

以及胶乳对照品每单位面积吸附的蛋白质量的平均值和平均偏差归纳在表 1 中.

然后样品进一步在 1 % 的 SDS 水溶液中于 37 ℃ 下恒温反应 4 小时，然后用 SDS 淋洗三次，以除去结合不牢固的蛋白质．再通过测定剩下的放射性以测定残余的牢固结合的蛋白质的量．三个样品对 SDS 的耐受性和牢固结合的蛋白质密度的平均值和平均偏差归纳在表 1 中.

值得注意的是，铂敷形涂布的须晶样品与其它样品相比有显著的较高的结合性和对 SDS 的耐受性.

尽管，在 SDS 处理后，胶乳对照样品和涂布铜的须晶样品被损坏，未涂布样品发生断裂，但是样品还可进行分析处理，结果列在表 1．敷形涂布铂的须晶仍保持完整.

表 1

样品	最初结合($\mu g/cm^2$)	牢固结合($\mu g/cm^2$)	对 SDS 的耐受性(%)
胶乳(对照)	0.63±0.06	0.06±0.01	9.0±1.7
裸须晶(对照)	0.65±0.10	0.15±0.06	22.8±6.5
铜/须晶(实施例 1)	0.79±0.11	0.29±0.02	37.8±6.8
铂/须晶(实施例 2)	3.46±0.52	2.69±0.37	77.6±2.3

实施例 3-4

这些实施例采用相同类型的如实施例 1 和 2 制备的部分包埋的毫微结构样品，但是恒温反应的时间更短，所用的缓冲液也不同.

将边长为 5mm 样品方片从如实施例 1 和 2 所述制备的的胶乳包埋的有须晶的样品上切下，并将其与涂布铜的载玻片分离．从涂布铜和涂布铂的区域和平面胶乳对照区上各切下 6 个方片．从裸须晶对照区域只切下三个方片．采用与实施例 1 和 2 所述相同的蛋白质 A 结合过程和测定方法，只是最初蛋白质恒温反应时间为 2 小时而不是 18 小时，并用两个不同的缓冲液．每种类型的三个方片用 pH7.5 的含蛋白质 A 的 PBS 涂布，其它三个方片用 pH7.5，含蛋白质 A 的 1.5M 硫酸钠的磷酸钠缓冲液(下面称为“硫酸盐缓冲液”)涂布．三个从包埋的裸须晶样品区域获得的 5mm 的方片只用含蛋白质 A 的 PBS 缓冲液涂布．所有的样品在乙醇胺钝化后均用 PBS 淋洗三次.

表 2 归纳了对于每种样品类型和缓冲液条件的三份样品的最初结合，对 SDS 的耐受性和牢固结合的蛋白质密度及标准偏差．表 2 证实了实施例 1 和 2

的结果，即涂布铂的样品比涂布铜或裸须晶能更好地吸附蛋白质，并继续有很高的对 SDS 的耐受性的趋势．对于铂，硫酸盐缓冲液可吸附更多的蛋白质．

表 2a

(PBS)

实施例	支持物	最初结合($\mu g/cm^2$)	牢固结合($\mu g/cm^2$)	对 SDS 的耐受性(%)
对照	胶乳	0.113±0.005	0.023±0.003	20.3±1.9
对照	裸须晶	0.111±0.007	0.022±0.002	20.2±0.2
实施例 3	铜/须晶	0.172±0.014	0.078±0.006	45.6±0.6
实施例 4	铂/须晶	0.303±0.010	0.214±0.018	70.5±3.7

表 2b

(硫酸钠)

实施例	支持物	最初结合($\mu g/cm^2$)	牢固结合($\mu g/cm^2$)	对 SDS 的耐受性(%)
对照	胶乳	0.145±0.005	0.036±0.003	25.1±1.0
对照	裸须晶	N.A.	N.A.	N.A.
实施例 3	铜/须晶	0.148±0.017	0.06±0.012	40.2±3.1
实施例 4	铂/须晶	0.456±0.005	0.368±0.009	80.8±2.3

实施例 5-8

实施例 5-8 证明无包埋的须晶的毫微结构表面可在更短的暴露时间内吸附更多的蛋白质，并揭示不同金属的相应效果，其与表面形态无关．

这些实施例特别比较了四种金属，它们均涂布在同一样品的不同象限内，因此保证了每个须晶微结构是相同的，尽管在实施例 9-12 中有特别，但图 3 显示了以铂敷形涂布的须晶，特别是用于本实施例的须晶的 SEM 显微照片．

在两个不锈钢钢圈之间拉伸安装 0.050mm(2mil)厚的聚酰亚胺薄层(ICI Films)以形成一个直径为 8.3cm 的片．在该聚酰亚胺底物片上 rf 喷镀铜，形成的厚度约 180nm．PR149 红颜料如实施例 1-2 所述用真空蒸气沉积在涂布铜的聚酰亚胺上，形成大约 150nm 厚的涂层，然后在真空(基础压力为 2.5×10^{-5} 帕斯卡)中于 280 ℃退火 40 分钟．涂布有红色颜料的聚酰亚胺转变成 1-2μm 高的取向的结晶须晶．

在一个单独的常规(13.47MHz)rf 喷镀真空器中，须晶连续地用 Cu(实施例 5)，CoCr(86： 14)(实施例 6)和 Fe(实施例 7) 沉积喷镀分别敷形涂布在三个象

限上，通过一个金属网罩每次只暴露底物片的一个象限. 20cm 的靶在样品上方 10cm，底物用水冷却，并使其在 3.2 帕斯卡 Ar 下用 500 瓦正向功率和 1200-1600 伏电压靶偏压喷镀 10 分钟. Cu, CoCr 和 Fe 的等质量厚度分别为约 350nm， 250nm 和 250nm. 在单独的类似喷镀容器中，铂被喷镀在底物片的第四象限，其等质量厚度为 120nm (实施例 8).

将第二个涂布铜的聚酰亚胺片用 PR149 蒸汽涂布，但不退火(即没有须晶)来作为对照. Fe, Cu, Co Cr 和 Pt 涂层如实施例 5-8 所述同样方式喷镀沉积在未转化的颜料层上.

从毫微结构样品片和对照样品片的每个象限中切下边长为 5mm 的六个方片(共有 48 片). 方片一式三份在含 250μg/ml， ^{125}I 标记的蛋白质 A 的 PBS 或硫酸盐缓冲液中保温两个小时而不摇动或振荡. 所有的样品均用适当的缓冲液淋洗. 剩余的未结合的表面用无放射性标记的 BSA(牛血清白蛋白)溶液(2.5mg/ml，在 PBS 缓冲液中)在不摇动或振荡下保温或反应 1 小时来钝化.

如实施例 1 和 2 所述，在用 PBS 缓冲液冲洗三次后，通过测定剩余的放射性来测定总的蛋白质 A 的结合量，如实施例 1 所述. 然后用 SDS 处理，在不振荡下除去未牢固结合的蛋白质. 再测定放射性以测定牢固结合的蛋白质的密度.

表 3 归纳了对于每种缓冲液，四种涂布金属的须晶样品类型的最初结合，对 SDS 的耐受性和牢固结合的蛋白质量. 由于所有涂布金属的 PR149 对照样品没有须晶结构，其在冲洗或用 SDS 处理后发生崩解，即覆盖金属层的苴涂层从聚酰亚胺底物上剥落，所以对照样品没有数据. 所有的涂布金属的须晶样品在整个实验中保持完整.

表 3a

(PBS)

实施例	支持物	最初结合(μg/cm²)	牢固结合(μg/cm²)	对 SDS 的耐受性(%)
5	Fe/须晶	2.86±0.10	2.30±0.05	80±2
6	CoCr/须晶	3.35±0.68	2.55±0.42	77±3
7	Cu/须晶	6.43±0.29	4.36±0.40	68±9
8	Pt/须晶	7.52±0.26	6.94±0.18	92±2

表 3b

(硫酸盐缓冲液)

实施例	支持物	最初结合($\mu g/cm^2$)	牢固结合($\mu g/cm^2$)	对SDS的耐受性(%)
5	Fe/须晶	5.19±0.99	3.79±0.40	74±8
6	CoCr/须晶	4.62±0.34	3.64±0.14	79±4
7	Cu/须晶	10.91±0.68	6.84±0.95	62±7
8	Pt/须晶	10.24±0.41	9.64±0.50	94±2

表 3a 和表 3b 的结果显示，在仅仅两个小时内，在所有步骤均不摇动或振荡样品的情况下，在未包埋的涂布金属的须晶上牢固结合的蛋白质 A 的质量密度出乎意料地高．这些数量在数量级上大于实施例 3-4 的从被包埋的须晶获得的数量．

实施例 9-14

这些实施例研究了非包埋的，敷形涂布铂的须晶的吸附动力学过程，其表明短达 7.5 分钟的保温时间足以实现显著的结合，且也包括了另外两个蛋白质， BSA 和人 IgG 抗体．

如实施例 3-8 所述，将片状的直径为 8.3cm 的涂布铜的聚酰亚胺用 PR149 蒸气涂布，然后退火．如实施例 5-8 所述，将得到的毫微结构须晶用 rf 喷镀压力为 1.3 帕斯卡的 Ar 和 200 瓦正向功率进行 Pt 的敷形涂布以形成 120nm 的等质量厚度．图 3 显示了涂布铂的须晶的放大倍数为 150,000 倍的高分辨率 SEM 显微照片．在须晶的铂涂层上明显有高度精细的结状结构．

从片上一式三份切下足够数量的 5mm 样品方片以对三个蛋白质(蛋白质 A，人 IgG 抗体和 BSA)，在 PBS 和硫酸钠缓冲液系统中，采用五个保温时间即 7.5， 15, 30, 60 和 120 分钟进行结合研究． ^{125}I 标记的蛋白质 A 溶液与实施例 1-8 中的相同．三个蛋白质的浓度均为 250μg/ml(BSA 和人 IgG 在工业上均可从 Sigma Chemical Co.获得其无放射性的形式)．

三个蛋白质溶液的氯化物浓度均为 0.15M， pH 为 7.5．蛋白质 A 和 BSA 的硫酸盐浓度为 1.5M， pH 为 7.5，人 IgG 中硫酸盐浓度为 0.75M, pH 为 7.5．

所有未反应的结合位点用无放射性标记的 BSA 溶液(2.5mg/ml)钝化一小时，然后用 PBS 冲洗三次，一次 30 分钟，另两次洗 10 分钟．实施例 1 所述的 SDS 处理过程用于使蛋白质变性，并除去未牢固结合的蛋白质．最后，用平面

的未敷形涂布的聚酰亚胺膜的同样的一组对照样品进行操作.

表4和6归纳了两种缓冲液中不同的蛋白质类型和反应时间的最初结合质量密度，对 SDS 的耐受性和牢固结合的质量密度的三个测定值的平均值及其标准偏差. 表5和7归纳了从未涂布的聚酰亚胺对照膜上取下的样品对于三种蛋白质和两种缓冲液在不同时间的最初结合质量密度，对 SDS 的耐受性和牢固结合的质量密度. 图4-6(曲线 A-D)各自表示两种缓冲液中最初结合和牢固结合的蛋白质对应于吸附时间的曲线.

A PBS

B PBS(在 SDS 处理之后)

C 硫酸盐缓冲液

D 硫酸盐缓冲液(在 SDS 处理之后)

E 硫酸盐缓冲液中的对照样品

F PBS 中的对照样品

G PBS 中的对照样品(在 SDS 处理之后)

H 硫酸盐缓冲液中的对照样品(在 SDS 处理之后)

首先，与实施例 5-8 一致，结合水平很高，且与人 IgG 和 BSA 的结合水平比与蛋白质 A 的结合水平更高. 其次，结合水平在 15 分钟后变为平稳，且在小于最小观测时间 7.5 分钟时就有显著高的结合水平. 第三，与实施例 5-8 不同，对于人 IgG(hIgG)和蛋白质 A 来说，在 PBS 中的结合水平比在硫酸盐缓冲液中要高. 第四，对 SDS 的耐受性很高，且非常平均.

表 4

下面归纳了在 PBS 中，涂布铂的须晶对于三种蛋白质的蛋白质结合和对 SDS 的耐受性在不同暴露时间的平均值和标准偏差.

蛋白质(实施例9-11) PBS	时间 (分钟)	最初结合 ($\mu g/cm^2$)	牢固结合 ($\mu g/cm^2$)	对 SDS 的耐受性
蛋白质 A	7.5	3.77±0.29	3.44±0.20	91±2
蛋白质 A	15.0	3.78±0.32	3.43±0.22	92±3
蛋白质 A	30.0	4.26±0.33	3.98±0.27	93±2
蛋白质 A	60.0	4.57±0.06	4.23±0.10	92±2
蛋白质 A	120.0	4.50±0.34	4.15±0.35	92±1
人 IgG	8.0	3.84±0.4	3.07±0.20	80±5
人 IgG	15.0	4.86±0.22	3.88±0.26	80±4
人 IgG	30.0	5.69±0.66	4.81±0.60	84±1
人 IgG	60.0	6.80±0.51	5.52±0.53	81±3
人 IgG	120.0	9.67±1.16	8.15±0.57	85±6
BSA	7.5	2.75±0.07	2.55±0.09	93±1
BSA	15.0	3.87±0.42	3.54±0.40	92±1
BSA	30.0	6.37±0.46	5.98±0.40	94±1
BSA	60.0	7.34±0.34	6.94±0.24	95±1
BSA	120.0	10.03±0.31	9.48±0.26	94±1

表 5

下面归纳了聚酰亚胺膜对照样品，在 PBS 中对于三种蛋白质的蛋白质结合和对 SDS 的耐受性在不同暴露时间的平均值和标准偏差.

蛋白质(实施例9-11)对照/ PBS	时间(分钟)	最初结合($\mu g/cm^2$)	牢固结合($\mu g/cm^2$)	对 SDS 的耐受性
蛋白质 A	7.5	0.44±0.02	0.16±0.01	34±2
蛋白质 A	30.0	0.48±0.02	0.18±0.02	35±3
蛋白质 A	120.0	0.64±0.04	0.24±0.01	37±1
人 IgG	7.5	0.78±0.04	0.28±0.01	36±3
人 IgG	15.0	0.78±0.04	0.30±0.01	38±2
人 IgG	30.0	0.94±0.08	0.36±0.03	37±2
人 IgG	60.0	1.02±0.06	0.38±0.01	37±2
人 IgG	120.0	1.04±0.03	0.42±0.02	36±1
BSA	7.5	0.50±0.07	0.26±0.03	50±3
BSA	30.0	0.42±0.03	0.22±0.02	50±1
BSA	120.0	0.48±0.03	0.26±0.02	51±3

平面的未经涂布的聚酰亚胺对照样品的结果进一步证明了平面的聚合物表面蛋白质吸附值相当低. 在图 4-6 中也绘出了对照样品牢固结合的蛋白质量的平均值(曲线 E-H), 其表明有毫微结构的膜在两小时内比未涂布的聚酰亚胺可多吸附 70 倍的蛋白质.

表 6

下面归纳了在硫酸盐缓冲液中，涂布铂的须晶对于三种蛋白质的蛋白质结合和对 SDS 的耐受性在不同暴露时间的平均值和标准偏差.

蛋白质(实施例 12-14) 硫酸盐缓冲液	时间 (分钟)	最初结合 ($\mu g/cm^2$)	牢固结合 ($\mu g/cm^2$)	对 SDS 的 耐受性(%)
蛋白质 A	7.5	1.96±0.05	1.71±0.10	87±3
蛋白质 A	15.0	2.51±0.25	2.23±0.21	89±2
蛋白质 A	30.0	2.58±0.11	2.27±0.06	88±2
蛋白质 A	60.0	3.16±0.32	2.84±0.19	90±4
蛋白质 A	120.0	4.06±0.04	3.60±0.04	89±2
人 IgG	8.0	3.48±0.14	2.99±0.14	86±3
人 IgG	15.0	4.30±0.64	3.45±0.40	81±2
人 IgG	30.0	4.83±0.69	4.14±0.60	86±4
人 IgG	60.0	5.85±0.96	4.84±0.90	82±2
人 IgG	120.0	7.02±0.74	6.09±0.95	86±5
BSA	7.5	3.77±0.38	3.43±0.29	91±2
BSA	15.0	6.01±0.12	5.66±0.06	95±1
BSA	30.0	6.21±0.37	5.91±0.30	95±1
BSA	60.0	7.36±0.11	6.94±0.01	94±2
BSA	120.0	9.08±1.84	8.47±2.05	92±4

表 7

下面归纳了聚酰亚胺膜对照样品，在硫酸盐缓冲液中对于三种蛋白质的蛋白质结合和对 SDS 的耐受性在不同暴露时间的平均值和标准偏差.

蛋白质(实施例 12-14)对照/ 硫酸盐缓冲液	时间(分钟)	最初结合($\mu g/cm^2$)	牢固结合($\mu g/cm^2$)	对 SDS 的耐受性(%)
蛋白质 A	7.5	0.28±0.09	0.06±0.02	19±1
蛋白质 A	30.0	0.30±0.04	0.06±0.01	21±2
蛋白质 A	120.0	0.24±0.09	0.07±0.01	27±2
人 IgG	7.5	0.35±0.04	0.14±0.02	40±2
人 IgG	15.0	0.35±0.04	0.14±0.02	39±1
人 IgG	30.0	0.42±0.02	0.16±0.02	38±2
人 IgG	60.0	0.51±0.05	0.18±0.02	35±2
人 IgG	120.0	0.52±0.07	0.17±0.02	32±2
BSA	7.5	0.22±0.04	0.11±0.02	47±1
BSA	30.0	0.24±0.05	0.11±0.02	46±1
BSA	120.0	0.28±0.02	0.13±0.01	46±3

实施例 15

与图 3 在吸附任何蛋白质之前的照片相比，图 7 是放大倍数为 150,000 倍的高分辨率扫描电子显微照片，其表明了在不加振摇地吸附 PBS 中的蛋白质 A(250μg/ml)一小时后再用水洗三次(每次 10 分钟)后的同一涂布铂的须晶样品.

在敷形涂布伯的须晶上可看见与图 3 相同的超细纹理，只是纹理看上去并不明显、清楚，好象分辨率下降. 在图 7 中从蛋白质包覆的铂须晶发出的次级电子发射并不象未暴露的须晶那样高，即通常它们并不象未暴露的须晶那样亮. 这些观察结果与在铂上的第二层不导电的包覆层如蛋白质分子相符合，蛋白质分子位于喷镀铂的表面明显高低不平的纹理的角落和缝隙内. 未暴露的和暴露于蛋白质的须晶上的铂涂层的粗糙度之间的区别可从所有的须晶上看出，即图 3 和图 7 的显微照片是不同的.

实施例 16

该实施例证明了结合到毫微结构膜上的蛋白质仍保持其生物活性，及毫微

结构膜可用作蛋白质吸附载体.

将铜涂布厚度为0.050mm直径为8.3cm的聚酰亚胺片用PR149蒸气涂布，并如实施例9-14一样退火．得到的毫微结构须晶再如实施例9-14所述的用rf喷镀(压力为1.3帕斯卡的Ar)和200瓦正向功率进行铂的敷形涂布至等质量厚度为120nm．图3表示涂布Pt的须晶的高分辨SEM显微照片．从毫微结构样品片和未涂布的聚酰亚胺的对照层上各自切下两组相同的每组为三个的5mm的方形片．第一组(组I)与300μL含浓度为250μg/ml的^{125}I标记的蛋白质A的PBS(pH7.5)在室温反应60分钟．同时第二组(组II)同样但与未标记的蛋白质A溶液在相同条件下反应．然后两组均用500μL的含2.5mg/ml的BSA的PBS(pH7.5)在室温下处理19小时．必须处理长时间以保证表面被完全封闭．如前述实施例一样不进行摇动或振荡，只是用轻微地回荡直至样品被浸没．这两组均用500μL的纯化水(从Millipore以商品名Milli-Q水获得)洗4次，每次洗15分钟．测定组I的放射性，而将组II在室温真空干燥箱内干燥5小时．组II在室温下与300μL含250μg/mld ^{125}I标记的人IgG的PBS(pH7.5)溶液保温反应18小时．然后在测定放射性前将该组用500μL PBS清洗四次，每次洗15分钟.

表8归纳了结合到表面上的蛋白质A的量，结合的抗体和结合的蛋白质A之比，以及每单位表面积的抗体结合的量.

表 8

下面归纳了蛋白质A上结合的人IgG抗体，蛋白质A固定在涂布铂的有毫微结构的须晶上.

样品类型	结合的蛋白质A ($\mu g/cm^2$)	结合的hIgG ($\mu g/cm^2$)	hIgG与蛋白质A之比	hIgG ($\mu mol/cm^2$)
毫微结构样品	5.75±0.38	25.9±11.5	1.34	1.72×10^{-4}
对照样品	0.12±0.01	0.79±0.17	1.95	0.05×10^{-4}

表8显示，样品每单位面积上蛋白质S结合到毫微结构表面的量比聚酰亚胺对照膜50倍．结合的人IgG的量增加33倍，表明其生物活性大部分被保留．结果证明毫微结构的表面可用于从溶液中纯化IgG并在固体载体上将其浓缩.

对于该领域技术人员来说，不脱离本发明的范围和精神的前提的许多改进和变化是显而易见的，应当理解本发明并不能不适当地限于上面所述的描述性

实施例.

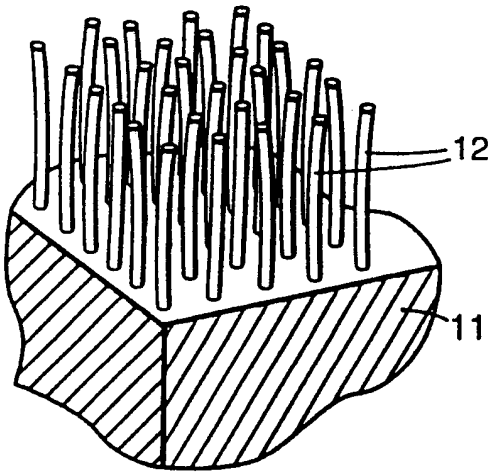


图 1A

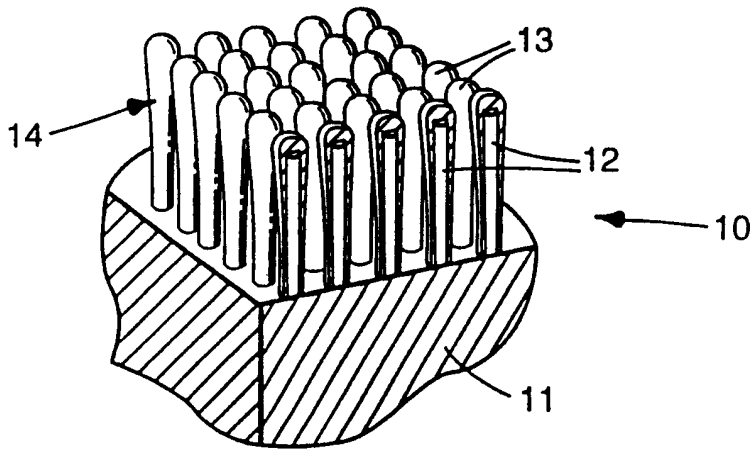


图 1B

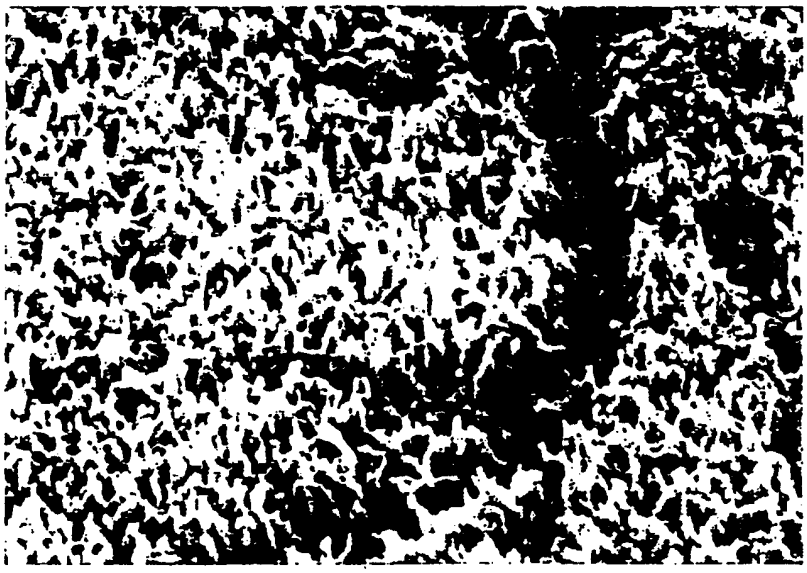


图 2

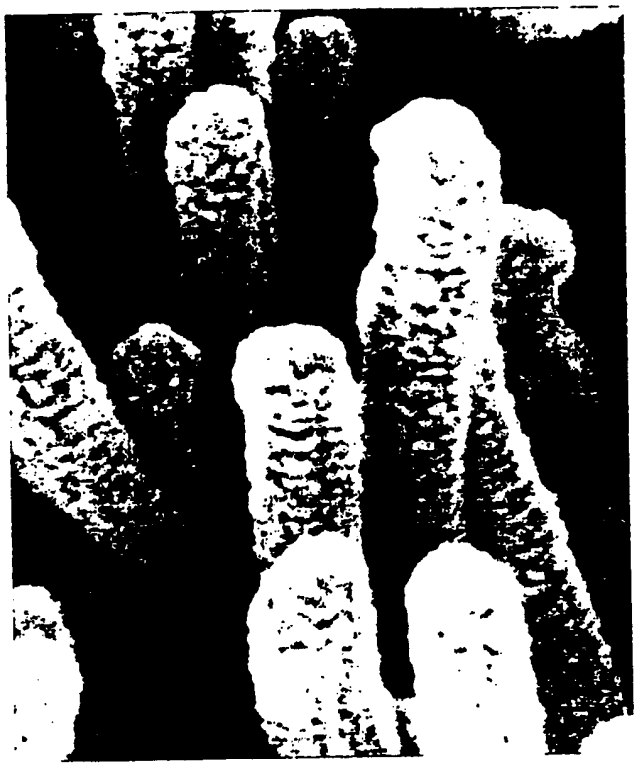


图 3

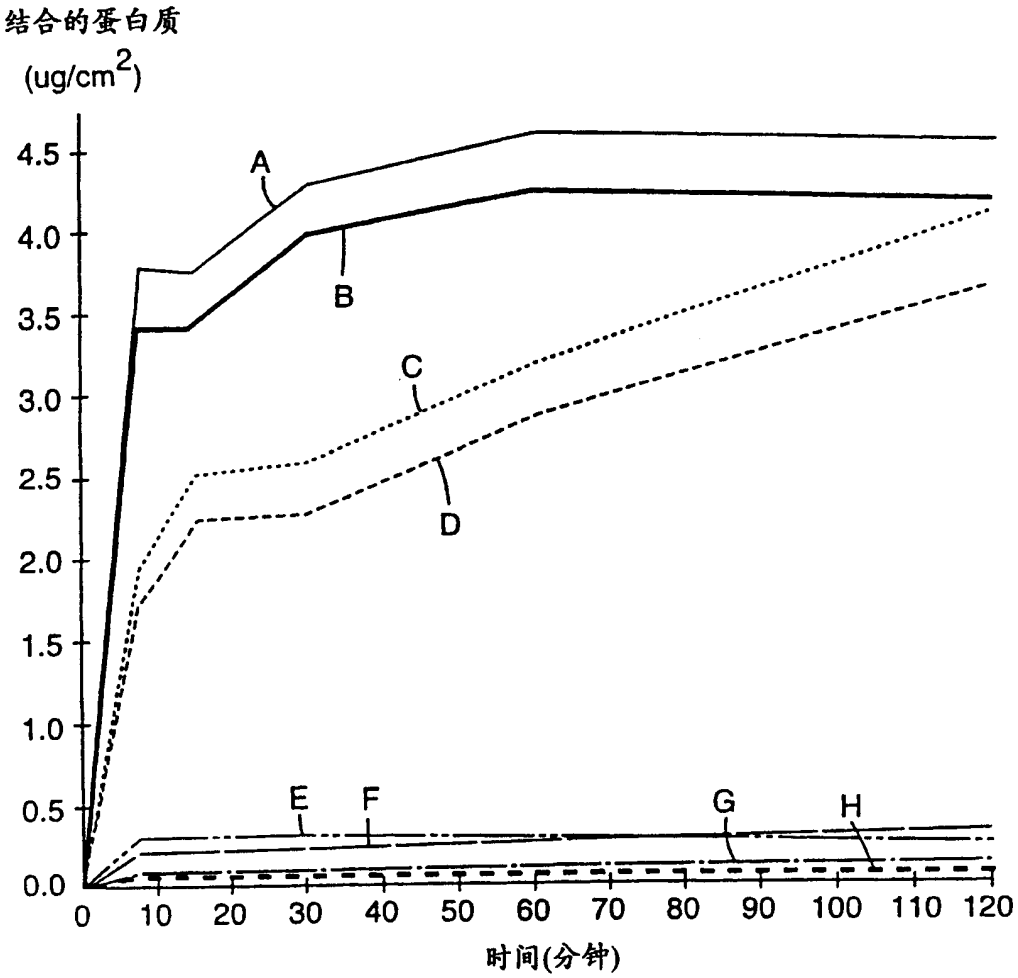

结合的蛋白质
(ug/cm2)
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
A
B
C
D
E
F
G
H
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
时间(分钟)

图 4

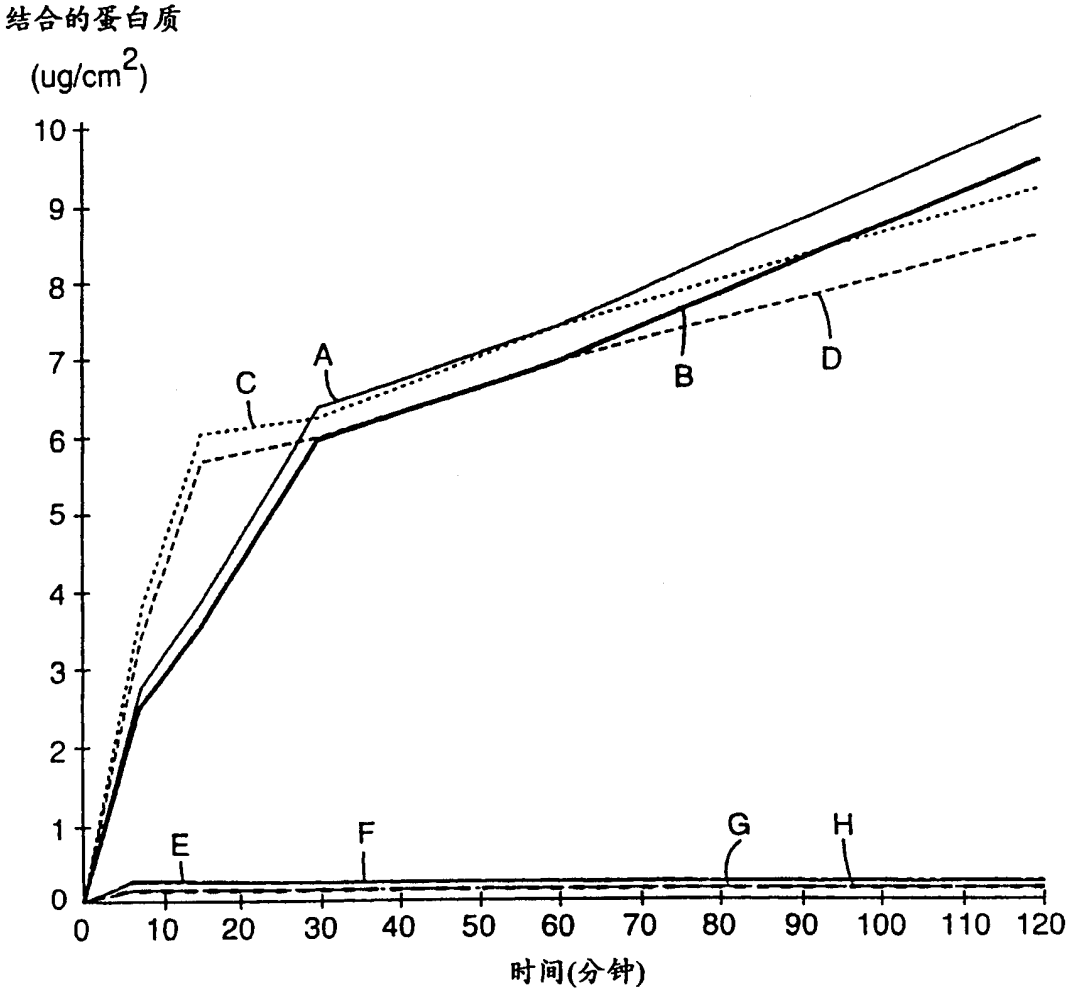

结合的蛋白质
(ug/cm2)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
A
B
C
D
E
F
G
H
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
时间(分钟)

图 5

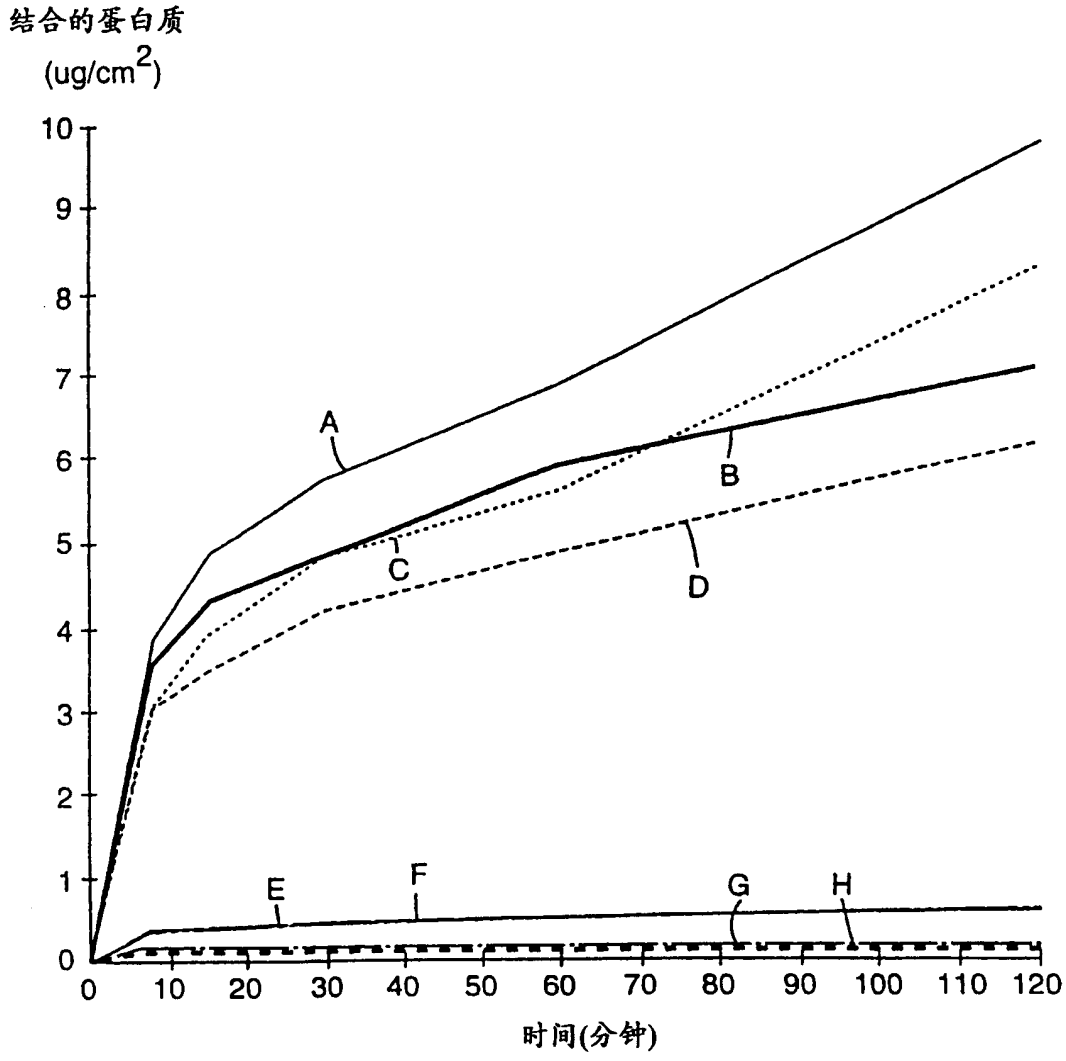

结合的蛋白质
(ug/cm2)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
A
B
C
D
E
F
G
H
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
时间(分钟)

图 6



图 7