



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111511926 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 26

(21) 申请号 201880081424.1

金贤雄 文硕骏

(22) 申请日 2018.12.14

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111511926 A

专利代理师 杨贝贝 臧建明

(43) 申请公布日 2020.08.07

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/6834 (2006.01)

10-2017-0173911 2017.12.18 KR

G01N 33/543 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.17

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2016333398 A1, 2016.11.17

PCT/KR2018/015898 2018.12.14

US 2016333398 A1, 2016.11.17

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 101245387 A, 2008.08.20

W02019/124878 KO 2019.06.27

CN 101315369 A, 2008.12.03

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市城北区安岩路145 (邮递区号:02841)

CN 105784664 A, 2016.07.20

US 2014134601 A1, 2014.05.15

Gaelle C. Le Goff, 等. Hydrogel

microparticles for biosensing.《European Polymer Journal》.2015,第72卷386-412.

审查员 徐丹

(72) 发明人 奉纪完 卢允镐 文炫准 李贤智

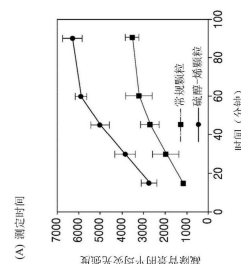
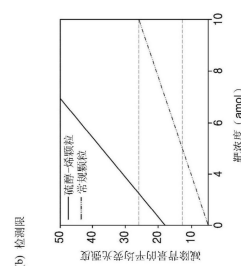
权利要求书1页 说明书8页 附图10页

(54) 发明名称

用于制备编码的水凝胶颗粒的方法以及由此制备的编码的水凝胶颗粒

(57) 摘要

本发明涉及一种用于制备用于以高准确度对靶生物分子进行高灵敏度检测的编码的水凝胶颗粒的方法以及由此制备的编码的水凝胶颗粒,且具体来说,涉及一种用于制备编码的水凝胶颗粒的方法以及由此制备的编码的水凝胶颗粒,方法包括合成水凝胶颗粒的步骤以及接着使探针与水凝胶颗粒结合。根据本发明,可以显著提高的高效率装载探针,装载的探针可均匀地分布,且可解决由未反应末端所导致的生物分子检测抑制的潜在问题。此外,本发明可提高检测灵敏度,可通过以高灵敏度对例如核酸和蛋白质的靶生物分子进行多重检测来应用于疾病的诊断或药物的筛选,且可普遍地用于例如分子诊断的医学诊断领域中。



1. 一种用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,包括合成水凝胶颗粒和将探针缀合到所述水凝胶颗粒,

其中所述水凝胶颗粒包括用以鉴定所述探针的代码区,

所述探针通过保留在所述水凝胶颗粒中的未反应末端的碳-碳双键与所述探针的官能团之间的共价键缀合到合成的所述水凝胶颗粒。

2. 根据权利要求1所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中所述探针经由溶液中的自由基反应和自发电子转移与合成的所述水凝胶颗粒交联。

3. 根据权利要求2所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中用于使所述探针与合成的所述水凝胶颗粒交联的所述自由基反应是通过在存在光引发剂的情况下用紫外线照射或通过存在热引发剂的情况下施加热能来引发。

4. 根据权利要求2所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中当所述探针经由所述溶液中的电子转移而与合成的所述水凝胶颗粒交联时,水溶液或极性溶剂中的电子充当亲核试剂以形成共价键。

5. 根据权利要求2所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中所述探针在0℃到90℃下交联。

6. 根据权利要求1所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中所述探针是脱氧核糖核酸、核糖核酸或蛋白质。

7. 根据权利要求1所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中所述编码的水凝胶颗粒被设计成使得所述代码区与探针区整合。

8. 根据权利要求7所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中代码包括几何代码。

9. 根据权利要求8所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中所述几何代码由不同类型的图形的组合组成。

10. 根据权利要求1所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,其中所述水凝胶颗粒进一步包括官能纳米颗粒。

11. 一种编码的水凝胶颗粒,通过如权利要求1所述的用于制备编码的水凝胶颗粒的方法来制备。

用于制备编码的水凝胶颗粒的方法以及由此制备的编码的水凝胶颗粒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于制备编码的水凝胶颗粒的方法以及由此制备的编码的水凝胶颗粒,所述编码的水凝胶颗粒能够以高准确度和高灵敏度检测靶生物分子。更具体来说,本发明涉及一种用于制备编码的水凝胶颗粒的方法以及通过所述方法来制备的编码的水凝胶颗粒,所述方法包含合成水凝胶颗粒和将探针缀合到所述水凝胶颗粒。

背景技术

[0002] 产生对研发用于在诊断、药物筛选以及分子生物化学领域中以高准确度和高灵敏度检测例如核酸和蛋白质的生物分子的技术的需要。

[0003] 编码的水凝胶颗粒(encoded hydrogel particle)已吸引大量关注,因为这些颗粒可用于生物分子的高度灵敏的多重检测。编码的水凝胶颗粒包含装载以检测生物分子的探针和用以鉴定装载的探针的代码。编码的颗粒的使用使得能够在单个检测过程中同时捕获(也就是多重检测)多个生物分子,以及在三维颗粒空间中对与探针相互作用的靶生物分子进行高度灵敏的检测。

[0004] 流动光刻作为用于合成具有各种功能和形状的编码的水凝胶颗粒的工艺已受到大量关注。流动光刻允许基于使微流体流图案化和使用穿过光掩模的UV光来合成多官能不对称颗粒。根据流动光刻,微通道中的流体由于其低雷诺数(Reynolds number) (Re) 而在不与不同相邻流混合的情况下流动,且可构造多个平行流。此外,根据流动光刻,图案化UV通过光掩模照射到前驱体流体上以诱导前驱体流体的选择性聚合,使得可合成具有与光掩模相同形状的颗粒。能够在聚合之前与前驱体流体中的生物分子结合的例如抗体和核酸的材料的存在使得能够合成适合用于生物分子的检测中的颗粒。

[0005] 用于合成编码的水凝胶颗粒的常规方法包含直接混合前驱体流体与用于生物分子检测的探针,以及在合成期间使探针与颗粒交联。然而,这一方法有以下问题。由于通过流动光刻在非常短的时间内合成颗粒,所以在前驱体中仅约10%的单体聚合,结果是仅约10%的探针与颗粒交联。探针的低装载产率导致有限的检测性能。另一问题是大部分的探针不容易在前驱体中分散。特定来说,当探针(例如,抗体)具有与前驱体的低相容性时,前驱体应与探针混合较长时间,且即使在混合之后也呈聚集体形式保留的探针可与颗粒交联。在探针呈(异质)聚集体形式存在的情况下,生物分子的捕获位点未暴露,从而导致探针的较差检测能力。高度灵敏的检测需要均匀装载最大可能数目的探针,这因上文提及的问题而不可避免地使检测性能劣化。

[0006] 根据另一常规方法,通过液体聚合物的交联以形成网络来合成颗粒。如上文所提及,液体聚合物的交联产率低到约10%,这导致网络上的缺陷的存在。举例来说,缺陷可能在单体的一个或多个反应性基团在网络中保持未反应时形成。保留在最终颗粒中的大量数目的未反应反应性基团(未反应末端)是劣化检测生物分子的能力的因素。未反应末端可能非特异性地与靶生物分子结合,从而因其高反应性而产生假阳性信号(false-positive

signal)。另外,将要在检测期间使用的必需材料(例如,靶生物分子、荧光材料、报告物以及细胞)与未反应末端反应且固定在颗粒上。也就是说,未反应末端的存在可能是劣化检测生物分子的能力的因素。

[0007] 因此,本发明人已认真地进行研究以解决现有技术的问题,且因此发现,当将探针装载在设计成使得代码区与探针区整合的编码的水凝胶颗粒上时,可以高准确度和高灵敏度检测靶生物分子。已基于这一发现实现了本发明。

发明内容

[0008] 技术挑战

[0009] 本发明的一个目标是提供一种用于制备编码的水凝胶颗粒的方法以及通过所述方法来制备的编码的水凝胶颗粒,所述方法包含合成水凝胶颗粒和将探针缀合到所述水凝胶颗粒。

[0010] 解决问题的手段

[0011] 本发明提供一种用于制备编码的水凝胶颗粒的方法以及通过所述方法来制备的编码的水凝胶颗粒,所述方法包含合成水凝胶颗粒和将探针缀合到所述水凝胶颗粒。

[0012] 本发明还提供设计成使得代码区与探针区整合的编码的水凝胶颗粒。

[0013] 发明效果

[0014] 本发明的方法确保以显著提高效率装载探针以及装载的探针的均匀分布,同时避免未反应末端可能抑制生物分子的检测的潜在问题。此外,本发明的编码的水凝胶颗粒可用于例如核酸和蛋白质的靶生物分子的高度灵敏的多重检测。因此,编码的水凝胶颗粒可应用于疾病诊断和药物筛选中,且因此可普遍地用于例如分子诊断的医学诊断领域中。

[0015] 具体来说,本发明的方法使得能够将至少8.2倍于常规方法的数目的探针缀合到水凝胶颗粒。此外,本发明的编码的水凝胶颗粒防止有可能由未反应末端的存在所导致的与靶生物分子的非特异性结合(假阳性信号(false-positive signal)),避免由将要用于检测的必需材料的固定所导致的较差检测性能的问题,对靶生物分子具有提高的检测灵敏度,在较短时间内检测靶生物分子,对靶生物分子具有改进的特异性,且具有提高的捕获靶生物分子的能力。

附图说明

[0016] 图1以图解方式示出根据本发明的用于合成水凝胶颗粒的工艺和在合成之后保留在颗粒中的未反应末端。

[0017] 图2是示出用于通过复制模塑(replica molding)来合成水凝胶颗粒的方法的示意图。

[0018] 图3示意性地示出根据本发明的用于将探针与在合成水凝胶颗粒之后保留的未反应末端缀合的工艺。

[0019] 图4是根据本发明的示出水凝胶颗粒的尺寸和代码区的概念图。

[0020] 图5示出经由硫醇-烯反应连接探针的时间依赖性动力学(kinetics) a且比较来自常规颗粒和硫醇-烯颗粒的荧光信号b。

[0021] 图6比较作为盐(NaCl)浓度的函数的来自常规颗粒和硫醇-烯颗粒的荧光信号(A)

且示出特异性测试结果(B)。

[0022] 图7比较作为孵育时间的函数的来自常规颗粒和硫醇-烯颗粒的荧光信号(A)且示出检测灵敏度测试结果(b)。在(b)中,平行于X轴的虚线中的每一个对应于来自对照颗粒的信号的标准差的3倍。

[0023] 图8比较常规颗粒和硫醇-烯颗粒上的抗体聚合的程度。

[0024] 图9比较作为VEGF浓度的函数的来自硫醇-烯颗粒的荧光信号和ELISA的光学密度a)且示出作为孵育时间的函数的来自ELISA和硫醇-烯颗粒的归一化检测信号b)。

[0025] 图10示出针对VEGF、PIGF以及CG贝塔的检测灵敏度测试的结果。平行于X轴的线对应于来自对照颗粒的信号的标准差的3倍。

[0026] 图11示出针对三种不同蛋白质的多重检测测试的结果且在蛋白质的总共8种情况下比较来自硫醇-烯颗粒的荧光信号。

具体实施方式

[0027] 除非另外定义,否则本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。一般来说,本文中所使用的术语是众所周知的且常在本领域中采用。

[0028] 在一个方面中,本发明涉及一种用于制备编码的水凝胶颗粒的方法,包含合成水凝胶颗粒和将探针缀合到所述水凝胶颗粒。水凝胶颗粒具有可用的孔,所述孔的大小确定成使得便于装载探针且确保靶生物分子的自由质量转移。

[0029] 探针通过保留在水凝胶颗粒中的未反应末端缀合到合成的水凝胶颗粒。具体来说,探针通过未反应末端的碳-碳双键($C=C$)与探针的官能团之间的共价键缀合到合成的水凝胶颗粒(图1到图3)。

[0030] 探针经由溶液中的自由基反应和自发电子转移与合成的水凝胶颗粒交联。通过在存在光引发剂的情况下用UV照射或通过存在热引发剂的情况下施加热能来引发用于使探针与合成的水凝胶颗粒交联的自由基反应。自由基反应引起共价键的形成。或者,探针可经由溶液中的电子转移与合成的水凝胶颗粒交联。在这一情况下,水溶液或极性溶剂中的电子充当亲核试剂以形成共价键。优选的是,探针在0℃到90℃的温度下交联,在所述温度的情况下探针可保持最稳定。

[0031] 如本文中所使用的术语“探针”是指能够与样品中的靶材料特异性结合以特异性地鉴定样品中的靶材料的存在的试剂。

[0032] 探针可包含与DNA、RNA、蛋白质或稍后的探针结合的化学反应性基团。

[0033] 可通过例如停止流动光刻(stop flow lithography;SFL)(图1)和复制模塑(图2)的各种工艺来合成水凝胶颗粒。根据本发明的一个实施例,通过停止流动光刻(SFL)来合成水凝胶颗粒。在这一实施例中,允许前驱体流体流动到通道中或在通道中用UV照射。此后,将探针缀合到水凝胶颗粒以制备编码的水凝胶颗粒。

[0034] 前驱体流体可包含含有甲基丙烯酸酯或丙烯酸酯基团的光固化单体和光引发剂。光固化单体可以是例如聚乙二醇单体、2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(methacryloyloxyethyl phosphoryl choline;MPC)单体,或其混合物。前驱体流体包含致孔剂,例如聚乙二醇和/或去离子(deionized;DI)水。或者,前驱体流体可包含多种不同的

光固化单体。

[0035] 编码的水凝胶颗粒设计成使得代码区与探针区整合。代码包含几何代码。几何代码可由不同类型的图形的组合组成。在设计成使得代码区与探针区分离的常规编码的水凝胶颗粒中,来自代码区的信号可能因未反应末端分布在水凝胶颗粒之上而与检测信号重叠。这一问题可通过根据本发明的编码的水凝胶颗粒的设计(其中代码区与探针区整合)来避免。

[0036] 水凝胶颗粒可进一步包含官能纳米颗粒。

[0037] 在另一方面中,本发明涉及通过所述方法来制备的编码的水凝胶颗粒。

[0038] 在又一方面中,本发明涉及设计成使得代码区与探针区整合的编码的水凝胶颗粒。

[0039] 用于实行本发明的模式

[0040] [实例]

[0041] 将参考以下实例更详细地解释本发明。本领域的技术人员应了解,这些实例仅为示出性的且本发明的范围不理解为限于所述实例。因此,应通过所附权利要求和其等效物来限定本发明的实质性范围。

[0042] 实例1:合成编码的水凝胶颗粒、装载DNA探针以及检测靶微RNA

[0043] 1-1:制造微流体装置

[0044] 使用AutoCAD(欧特克(Autodesk),美国)设计微流体装置且印刷在光掩模膜上(Han&All技术(Han&All Technology),韩国)。颗粒设计成具有50微米(宽度)×50微米(长度)×20微米(高度)的尺寸,所述尺寸可划分成9个区以产生用于编码的明亮检测信号(图4)。使用涂布有SU-8 25(微凯(Microchem),美国)的硅晶片通过光刻产生SU-8母模,其充当负性光致抗蚀剂。将包含微流体装置的图案的SU-8母版的厚度调整为24微米。将以10:1(w/w)比混合固化剂的聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane;PDMS)(希尔加德(Sylgard) 184,康宁(Corning),美国)倾倒在SU-8母模上且在70℃下固化8小时。接着,用活检打孔器(直径1毫米)对面板进行打孔以创造孔洞,且从SU-8母版和孔洞剥离PDMS厚板以将流体引入到面板中。此后,用PDMS涂布载玻片且在70℃下部分地固化20分钟。将PDMS厚板附着到经PDMS涂布的载玻片。最后,将PDMS装置烘烤过夜以完成固化。

[0045] 1-2:合成水凝胶颗粒

[0046] 经由停止流动光刻(SFL)合成水凝胶颗粒(K.W.邦(Bong)等人,实验室芯片(Lab Chip),2011年,第11卷,743页到747页)。简单来说,为了进行SFL,将UV光发光二极管(索雷博(Thorlabs),英国)用作光源且使用压力调节器(ITV0031-3BL,SMC气动(SMC pneumatics),日本)来控制流体在微流体装置中的流动。通过定制电路板和LabView(国家仪器(National Instrument),美国)代码以同步方式控制UV LED和压力调节器。由UV LED通过安装在倒置显微镜(Axiovert 200,蔡司(Zeiss),德国)上的膜光掩模(Hanall技术,韩国)合成水凝胶颗粒。当在SFL期间前驱体溶液在通道中停止时,通过UV(4毫瓦/平方厘米)的周期性爆发(50毫秒)来合成颗粒。

[0047] 前驱体溶液由20%(v/v)聚乙二醇二丙烯酸酯700(PEG700DA,西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich),美国)、40%(v/v)作为致孔剂的聚乙二醇600(PEG200,西格玛奥德里奇)、5%作为光引发剂的德牢固(Darocur) 1173(西格玛奥德里奇)以及35%去离子(DI)水

构成。在合成之后,在预填充有200微升的由5×PBS缓冲液(西格玛奥德里奇)与0.05% (v/v) 吐温(Tween)-20(西格玛奥德里奇)组成的混合物(5×PBST缓冲液)的微管中收集水凝胶颗粒。将收集的颗粒涡旋和离心约1分钟。接着,通过去除150微升的上清液缓冲液且重新悬浮在相同体积的新鲜5×PBST中来冲洗这些微粒。这一冲洗步骤重复5次。最后,在使用前将水凝胶颗粒存储在140微升的5×PBST中。

[0048] 通过常规方法来合成用于miRNA检测的水凝胶颗粒(Y.H.洛(Roh)等人,分析师(Analyst),2016年,第141卷,4578页到4586页)。将由20% (v/v) PEG700DA、40% (v/v) PEG200、5% (v/v) 光引发剂以及35% (v/v) 3×三羟甲基氨基甲烷EDTA(Tris EDTA;TE)缓冲液(西格玛奥德里奇)构成的前驱体溶液与丙烯酰胺(acrydite)修饰的ssDNA寡聚物(集成DNA技术(Integrated DNAtechnologies))以9:1的体积比混合。此后,在与上文相同的UV强度和曝光时间条件下制备水凝胶颗粒。

[0049] 1-3:DNA探针装载

[0050] 使用硫醇-烯迈克尔加成(Michael addition)反应将ssDNA探针固定在水凝胶颗粒上。将硫醇修饰的ssDNA寡聚物(集成DNA技术,美国)在0.5摩尔每升三羟甲基氨基甲烷[2-羧乙基]膦(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific),美国)中还原以形成活性巯基。此后,将还原的寡聚物以约7颗粒/微升的浓度与悬浮在140微升的缓冲液中的水凝胶颗粒混合。在37℃的恒定温度下在热振荡器(恒温振荡器,杭州奥盛仪器有限公司(Hangzhou Allsheng Instruments Co.Ltd),中国)中孵育最终混合溶液,同时以1,500转/分钟搅拌。使用无核酸酶水、高压灭菌的移液管尖端以及微管来防止潜在污染。

[0051] 1-4:miRNA检测测定

[0052] 在50微升的总体积中实行miRNA检测测定。首先,将由1×TE缓冲液(西格玛奥德里奇)和0.05% (v/v) 吐温-20构成的40微升1×TET缓冲液施加于每一微管,随后添加5微升的靶miRNA。通过改变miRNA和NaCl浓度和杂交时间来评估miRNA测定的检测灵敏度。在热振荡器中将混合物加热到95℃持续5分钟。在冷却到室温之后,将装载探针的水凝胶颗粒和常规水凝胶颗粒(每靶约50个颗粒)添加到微管。在55℃下在热振荡器中孵育测定微管15分钟到90分钟,同时以1500转/分钟搅拌,以便允许靶miRNA与水凝胶颗粒中的探针杂交。

[0053] 为了观察NaCl浓度的影响,将杂交缓冲液中的NaCl的最终浓度调整为50毫摩尔每升到350毫摩尔每升。在55℃下进行测定,持续90分钟。在杂交之后,用350微升的含有50毫摩尔每升NaCl的1×TET冲洗水凝胶颗粒三次,且接着添加245微升的连接反应混合物。这一连接反应混合物由1350微升1×TET、150微升10×NE缓冲液2(新英格兰生物实验室(New England Biolabs),美国)、250纳摩尔每升ATP(新英格兰生物实验室)、40纳摩尔每升通用接头(集成DNA技术)以及800单位/毫升T4 DNA连接酶(赛默飞世尔科技)构成。接着,在21.5℃下在热振荡器中使混合物杂交45分钟。在另一冲洗步骤之后,添加在1×TET中稀释10倍的链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE;生命技术(Life Technologies),美国)。允许在21.5℃下进行最终孵育步骤45分钟。在冲洗步骤之后,将50微升的在1×TET中的水凝胶颗粒悬浮液用于图像分析。

[0054] 1-5:图像分析

[0055] 使用数字单透镜反射(digital single-lens reflex;DSLR)相机(EOS 6D,佳能(Canon),日本))获取水凝胶颗粒的RGB荧光图像。对于用以分析来自探针区的靶信号的强

度的单色荧光图像,使用科学互补金属氧化物半导体(scientific complementary metal-oxide-semiconductor;sCMOS)相机(Prime,光学性质(Photometrics),美国)。两个相机都连接到倒置显微镜(Axiovert 200,蔡司)。通过用以对颗粒进行成像的立方体组过滤LED灯(HXP 120V,蔡司)。为了在各种分析时间和NaCl浓度下获得信号,使用具有1000毫秒曝光时间的4.5毫瓦/平方厘米LED强度。对于分析灵敏度测量,使用具有300毫秒曝光时间的11毫瓦/平方厘米LED强度。通过图像J(Image J)软件(美国国立卫生研究院(National Institute of Health),美国)来分析单色荧光图像。

[0056] 1-6:测定结果

[0057] 相较于在根据常规方法由含有探针的前驱体制备的编码的水凝胶颗粒(下文称为“常规颗粒”)中,在通过合成水凝胶颗粒和将探针装载在水凝胶颗粒上来制备的编码的水凝胶颗粒(下文称为“硫醇-烯颗粒”)中缀合了至少8.2倍更大数目的探针(单链DNA)(图5)。

[0058] 通过将NaCl的浓度从50毫摩尔每升改变到350毫摩尔每升来检测核酸。分析显示,检测灵敏度提高,但检测特异性随NaCl浓度增大而降低。不同于常规颗粒,硫醇-烯颗粒在低NaCl浓度(200毫摩尔每升)下产生最佳信号(图6的(A))。

[0059] 除了1×TET的初始量是25微升,以1000amol的量添加四种微RNA(let-7a、let-7b、let-7c以及let-7d),且NaCl浓度是200毫摩尔每升之外,使用miRNA检测的相同过程进行特异性测试。因此,最大交叉反应性从25%降低到15%(图6的(B))。

[0060] 通过改变核酸检测的测定时间来进行测定。分析显示,硫醇-烯颗粒以比常规颗粒高至少3倍的速率产生相同荧光信号(图7的(A))。

[0061] 将1×TET的初始量调整为40微升,通过加入50amol、100amol、500amol、1000amol以及5000amol的分别具有350毫摩尔每升和200毫摩尔每升的NaCl浓度的常规颗粒和硫醇-烯颗粒来检测信号,且其后,通过外推荧光信号相对于靶浓度的曲线来获得检测限。因此,硫醇-烯颗粒的检测限(3.4amol)低于常规颗粒的检测限(4.9amol)(图7的(b))。

[0062] 对于蛋白质检测,抗体因与前驱体的较差相容性而容易在常规颗粒中聚集,而未在硫醇-烯颗粒中观察到抗体聚合,使得检测灵敏度提高(图8)。

[0063] 实例2:合成编码的水凝胶颗粒、装载抗体探针以及检测靶蛋白

[0064] 2-1:制造微流体装置

[0065] 通过实例1中所描述的相同方法来制造用于合成水凝胶颗粒的微流体装置。

[0066] 2-2:合成水凝胶颗粒和装载抗体探针

[0067] 在两个不相连(discrete)步骤中实行颗粒合成和探针装载。前驱体溶液由20%(v/v)聚乙二醇二丙烯酸酯700(PEG700DA,西格玛奥德里奇,美国)、40%(v/v)作为致孔剂的聚乙二醇600(PEG200,西格玛奥德里奇)、5%作为光引发剂的德牢固1173(西格玛奥德里奇)以及35%去离子(DI)水组成。经由停止流动光刻的颗粒合成的一个循环由400毫秒的流动、200毫秒的停止、75毫秒的UV曝光以及200毫秒的保持时间组成。对于每一蛋白质测定,1小时合成使用1-D光掩模产生大约4000个颗粒。使用不同光掩模来合成用于检测不同蛋白质的颗粒。在合成之后,在1×PBST中洗涤颗粒三次。对于抗体与颗粒的连接,在25℃下以1500转/分钟将16.5微升的颗粒(55个颗粒/微升)与12微升的重构捕获抗体(对IL-6是6微克/微升,对VEGF是3微克/微升,对PIGF是12微克/微升,且对CG贝塔是3微克/微升)和1.5微升的异双官能PEG连接子(硫醇-PEG2000-NHS,安诺伦(Nanocs))一起孵育48小时。基于步骤

的分离并不产生任何可辨别的优点的发现,在单个步骤中进行抗体的官能化和其在颗粒上的固定以减少步骤数以及制备时间。在抗体连接之后,在1×PBST中洗涤颗粒三次。

[0068] 2-3:蛋白质检测

[0069] 对于蛋白质检测,将25微升1×PBST中的50个颗粒和1×PBS中的2%BSA中的25微升2×靶蛋白置于微管中。在25℃下以1500转/分钟孵育颗粒2小时。在1×PBST中冲洗三次之后,将10微升的重构二次抗体(对IL-6是12.5微克/微升,对VEGF是25微克/微升,对PIGF是15微克/微升,且对CG贝塔是125微克/微升)添加到40微升1×PBST中的蛋白结合颗粒中。在25℃下以1500转/分钟孵育混合物1小时。在1×PBST中洗涤三次之后,将在1×PBST中的5%BSA中稀释50倍的10微升的链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE,生命技术)添加到40微升1×PBST中的颗粒中。孵育混合物以荧光标记抗体。在成像之前用1×PBST冲洗颗粒五次。

[0070] 2-4:图像分析

[0071] 将实例1中所描述的相同系统用于图像分析。以50毫秒的曝光时间取得图像。光源的强度固定在1100毫瓦/平方厘米下。使用图像J程序测量以TIFF格式检索到的图像的荧光强度。

[0072] 2-5:ELISA

[0073] 过程遵循由制造商提供的一般ELISA方案。在25℃下用100微升每孔的稀释VEGF捕获抗体(1微克/微升)涂布96孔微孔板(安迪生物公司(R&D Systems))且孵育过夜。用400微升的1×PBST冲洗孔三次。为了阻断游离位点,用1×PBS中的300微升的1%BSA孵育板1小时。在两次洗涤之后,用在1×PBS中的1%BSA中稀释的100微升的靶蛋白孵育板2小时。在添加100微升的稀释检测抗体(100纳克/毫升)之前洗涤孔三次。在25℃下孵育板2小时。在三次洗涤之后,将100微升的40倍稀释链霉亲和素-HRP(安迪生物公司)添加到每一孔中且孵育20分钟。洗涤板三次,且添加100微升的底物溶液(安迪生物公司,目录号DY999)并在25℃下孵育20分钟。在添加50微升的停止溶液(安迪生物公司,目录号DY994)之后,使用设定成450纳米和570纳米的微板读数仪(SpectraMax iD5,分子仪器公司(Molecular Devices))确定光学密度。从570纳米处的读数中减去450纳米处的读数以校正板中的光学缺陷。

[0074] 2-6:多重检测

[0075] 针对总共8种情况进行多重检测。在每一情况下,将100微升1×PBST中的150个颗粒(每蛋白质50个)与1×PBS中的2%BSA中的100微升的2×靶蛋白混合。通过将1×PBS中的25微升的2%BSA与1×PBS中的2%BSA中的25微升8×靶蛋白(靶存在的情况下)和1×PBS中的25微升的2%BSA(靶不存在的情况下)混合来制备预混合物。在25℃下以1500转/分钟孵育8种不同的靶组合中的颗粒持续2小时。在1×PBST中洗涤颗粒三次,且将10微升的三种二级抗体(对VEGF是25微克/微升,对PIGF是15微克/微升,且对CG贝塔是125微克/微升)中的每一种添加到20微升1×PBST中的颗粒。在25℃下以1500转/分钟孵育混合物1小时。在1×PBST中洗涤三次之后,通过将在1×PBST中的5%BSA中稀释50倍的30微升的链霉亲和素-藻红蛋白添加到120微升1×PBST中的颗粒中来荧光标记二级抗体。在成像之前用1×PBST洗涤颗粒五次。

[0076] 2-7:测定结果

[0077] 根据用于由含有探针的前驱体制备编码的水凝胶颗粒的常规方法,疏水性引发剂的存在引起抗体聚集。相对而言,用于通过合成水凝胶颗粒和将探针装载在水凝胶颗粒上

来制备编码的水凝胶颗粒的本发明的方法阻止抗体聚集且确保探针与颗粒的均匀缀合(图8)。

[0078] 在使用ELISA(其为通常用于蛋白质检测的过程)的比较实验中,相较于产生1.8记录(log)范围的具有31.2皮克/毫升到2000皮克/毫升的检测范围的ELISA,硫醇-烯颗粒测定具有17.7皮克/毫升到60000皮克/毫升的检测范围,产生3.5记录范围。相较于ELISA,检测下限(17.7皮克/毫升)展现硫醇-烯颗粒测定的大大提高的效能(图9的a))。

[0079] 观察到ELISA和硫醇-烯颗粒测定的归一化荧光信号作为孵育时间的函数。因此,硫醇-烯颗粒测定的略小于1小时的孵育产生与ELISA中的2小时孵育相当的信号(图9的b))。

[0080] 为了获得三种蛋白质(VEGF、PIGF以及CG贝塔)的校准曲线,以不同浓度加入蛋白质以检测信号,且接着外推荧光信号相对于蛋白质浓度的曲线以确定检测限。因此,检测限(limits of detection;LOD)对于VEGF、PIGF以及CG贝塔分别是17.7皮克/毫升、17.5皮克/毫升以及4.2皮克/毫升(图10)。

[0081] 为了确认对三种蛋白质的多重检测是否可行,使用取决于蛋白质的存在或不存在的总共八种情况。在所有情况下多重检测都成功地进行(图11)。

[0082] 虽然已详细地描述本公开的细节,但将对本领域的技术人员显而易见的是这种细节仅仅是优选实施例且并不意图限制本发明的范围。因此,通过所附权利要求和其等效物来限定本发明的真实范围。

[0083] 工业实用性

[0084] 本发明的方法确保以显著提高效率装载探针以及装载的探针的均匀分布,同时避免未反应末端可能抑制生物分子的检测的潜在问题。此外,本发明的编码的水凝胶颗粒可用于例如核酸和蛋白质的靶生物分子的高度灵敏的多重检测。因此,编码的水凝胶颗粒可应用于疾病诊断和药物筛选中,且因此可普遍地用于例如分子诊断的医学诊断领域中。

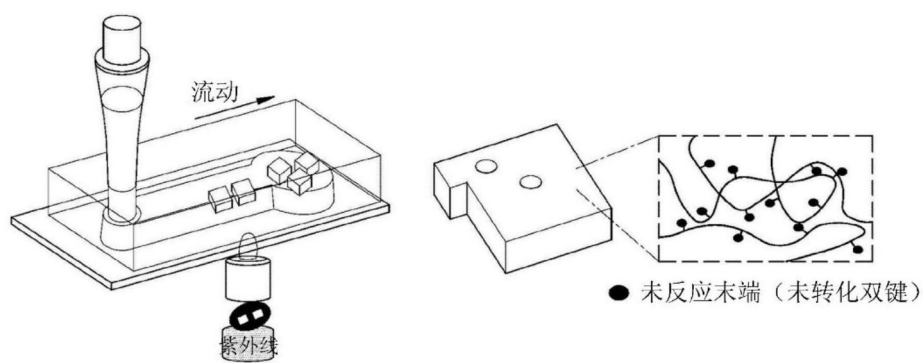


图1

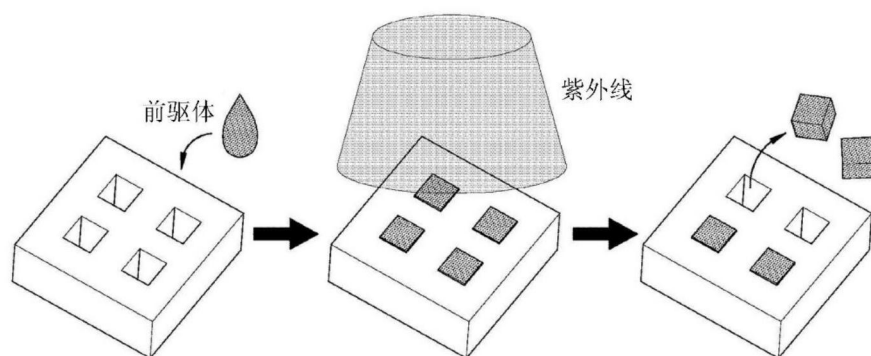


图2

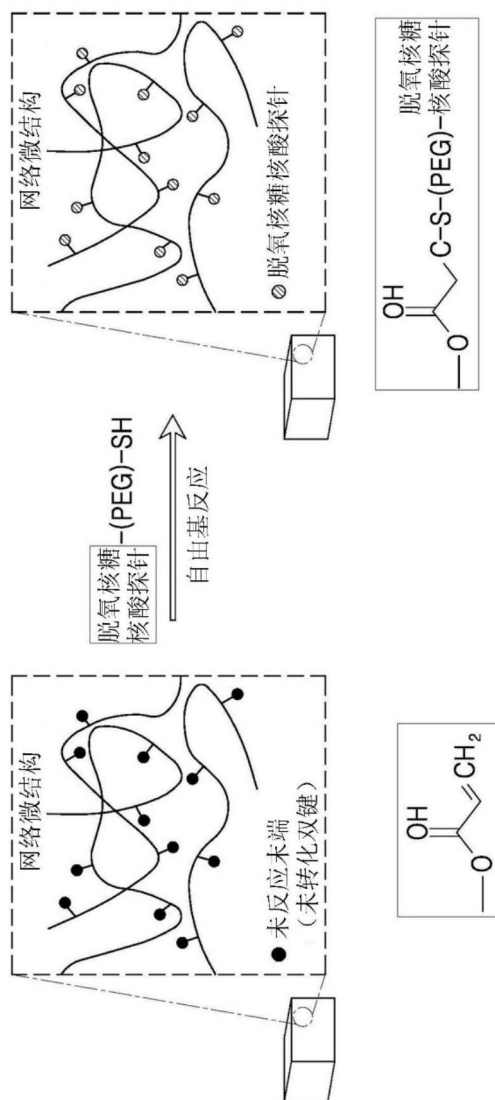


图3

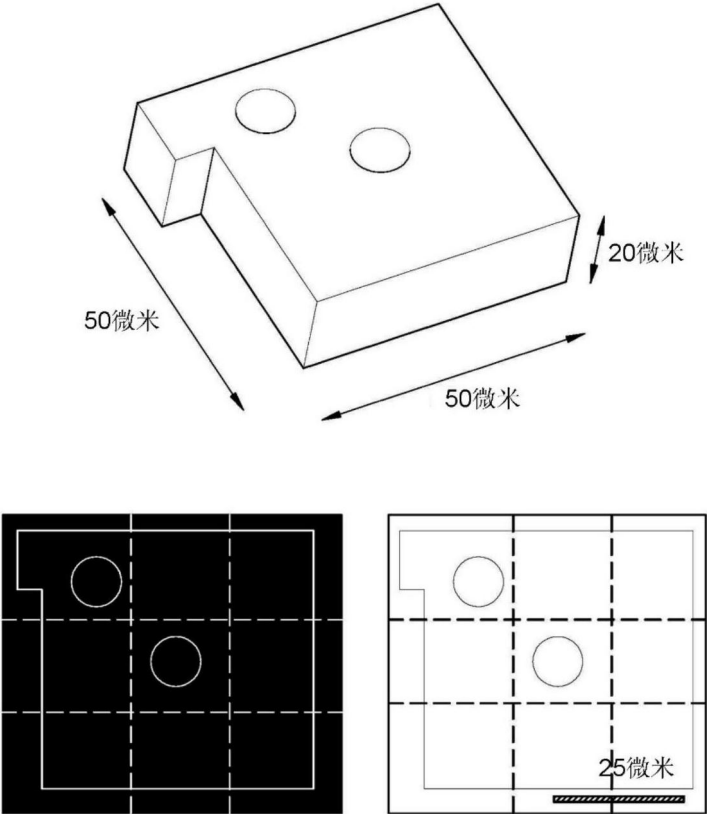


图4

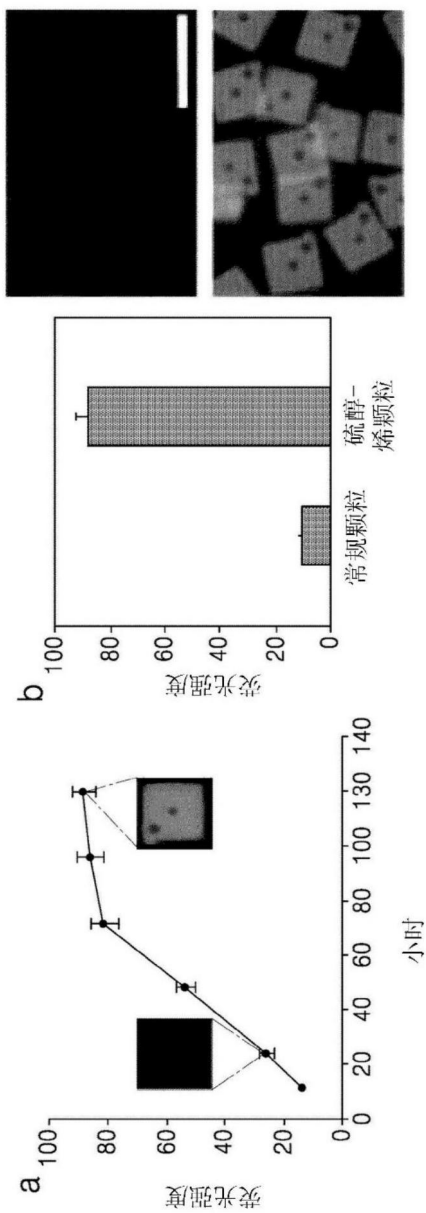


图5

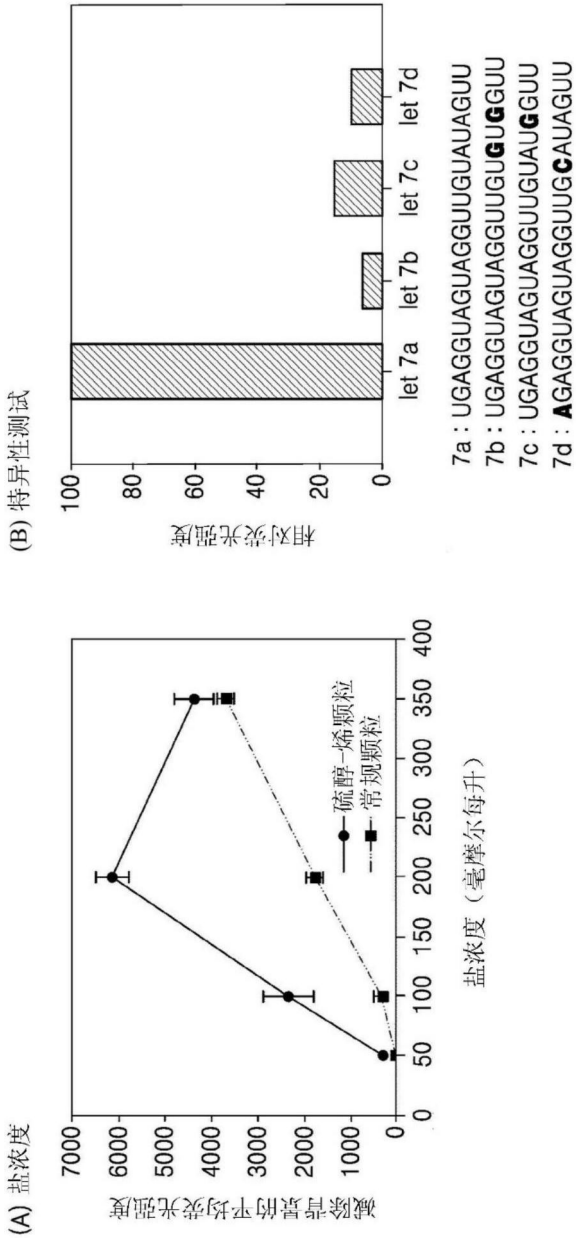


图6

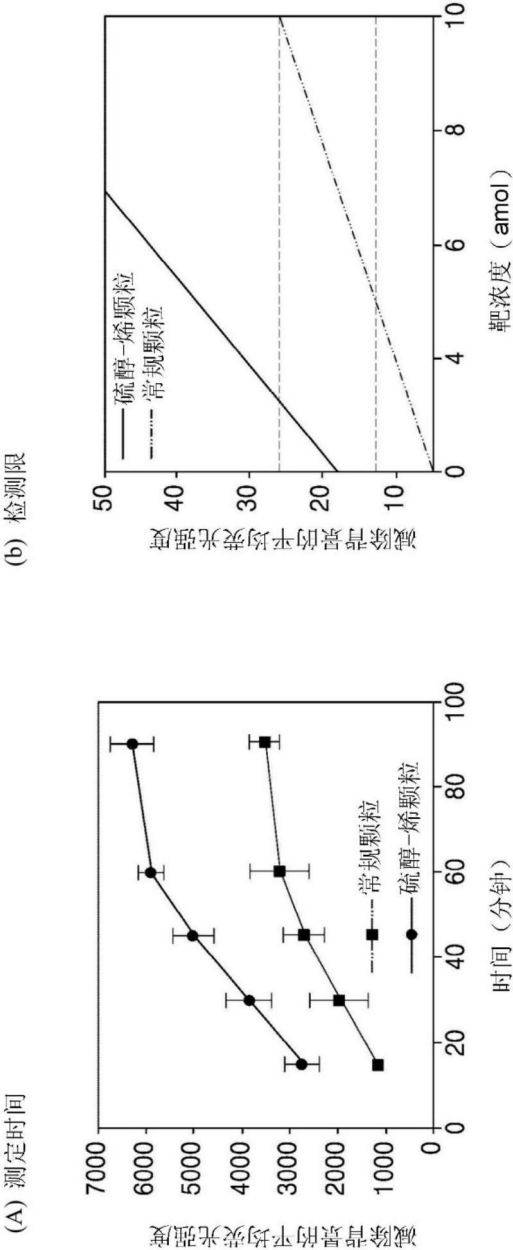


图7

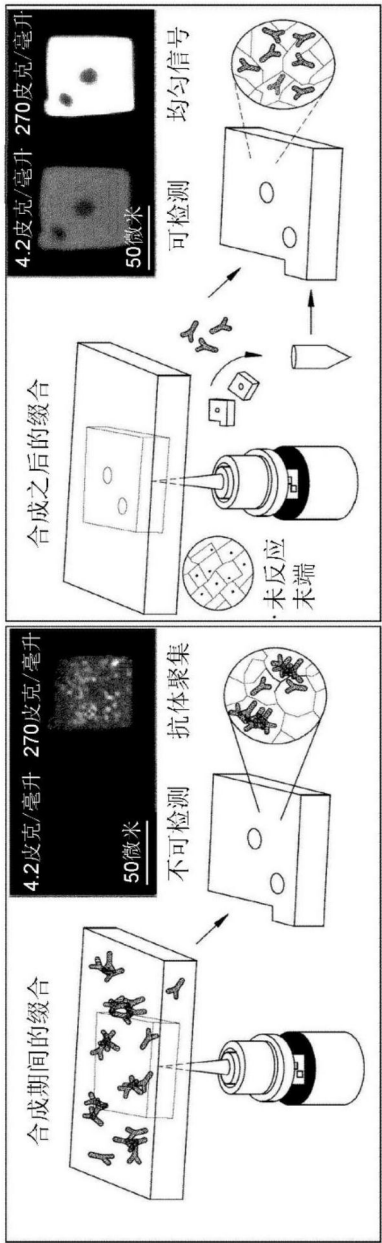


图8

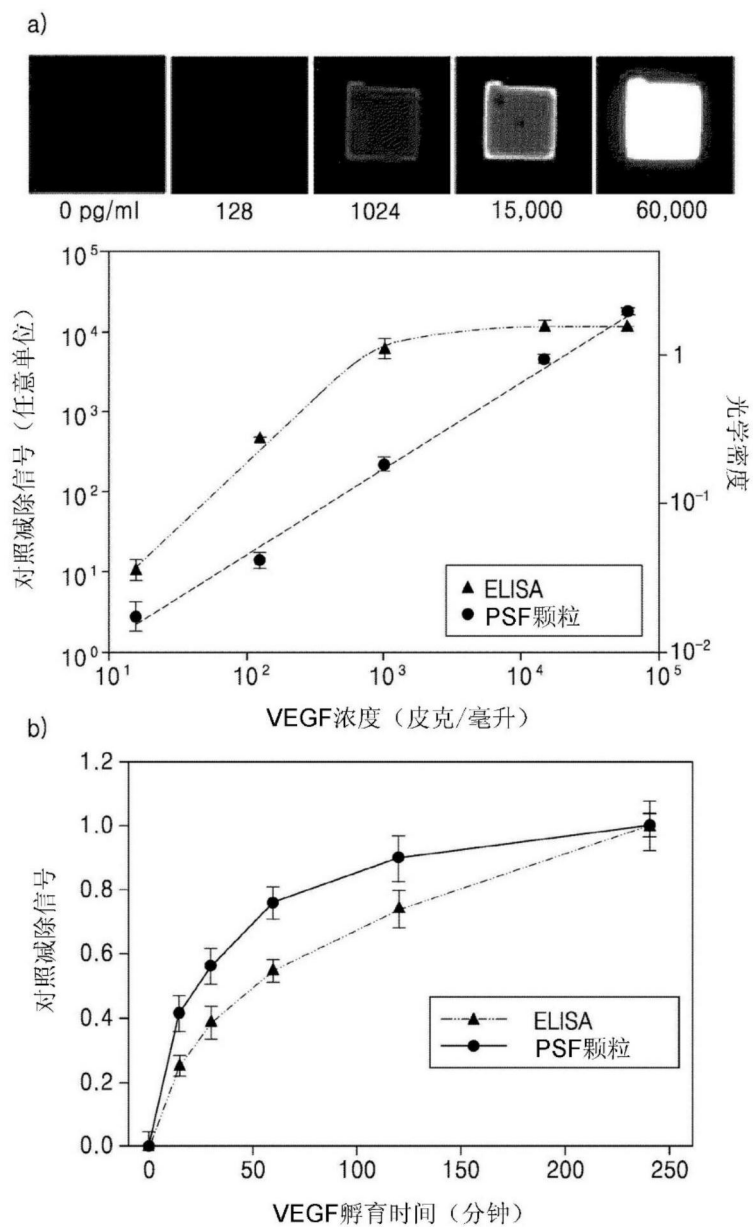


图9

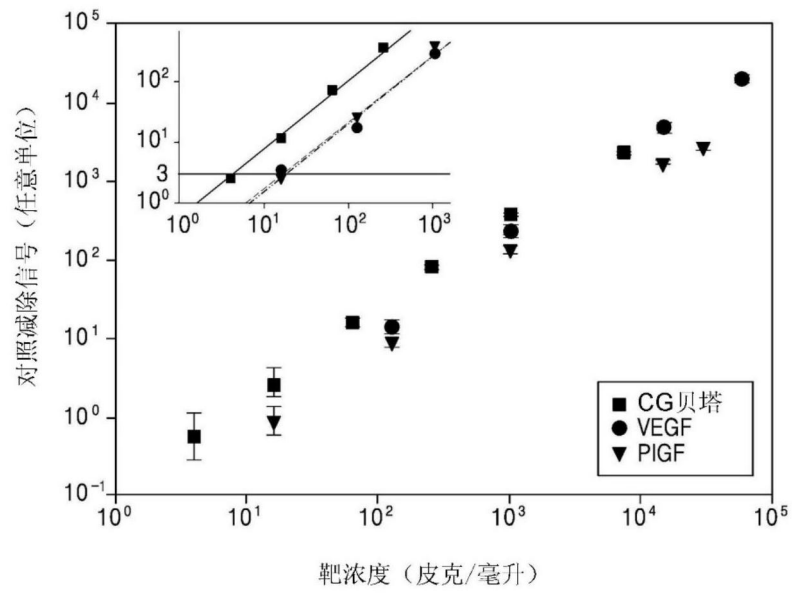


图10

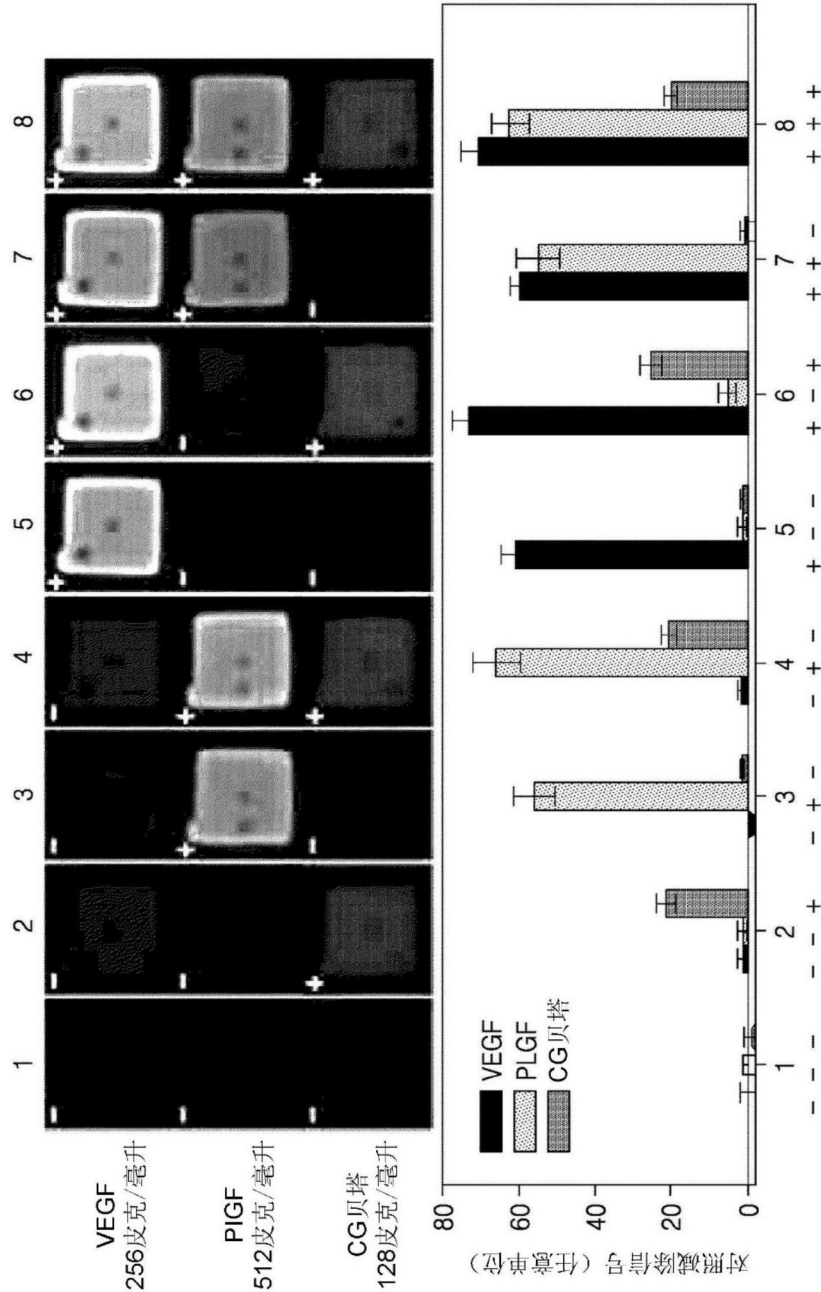


图11