

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680000141.7

[43] 公开日 2007年9月26日

[11] 公开号 CN 101044251A

[22] 申请日 2006.4.24

[21] 申请号 200680000141.7

[30] 优先权

[32] 2005.9.15 [33] KR [31] 10-2005-0086284

[86] 国际申请 PCT/KR2006/001535 2006.4.24

[87] 国际公布 WO2007/032587 英 2007.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.9

[71] 申请人 株式会社 LG 生命科学

地址 韩国首尔

[72] 发明人 金在权 李恩政 柳东雕 蒋才英

[74] 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司

代理人 朱梅 徐志明

权利要求书4页 说明书18页 附图8页

### [54] 发明名称

用于固定生物分子的粘合剂珠以及使用该粘合剂珠制造生物芯片的方法

### [57] 摘要

本发明涉及一种用于固定生物分子的粘合剂珠和使用所述粘合剂珠制造生物芯片的方法，更具体而言，涉及一种既起到固定生物分子的固相载体作用又起到生物芯片基质表面的粘合剂作用的粘合剂珠，以及一种制造生物芯片的方法，该方法包括步骤：将生物分子固定于所述粘合剂珠以制备其上固定有生物分子的珠的水悬浮液；以及在基质上固定该水悬浮液。由于具有固定生物分子的固相载体和基质表面的粘合剂的双重功能，本发明的粘合剂珠可不需要额外设备和处理过程直接固定在生物芯片上。



1、一种起固定生物分子的固相载体和粘附于芯片基质表面的粘合剂作用的粘合剂珠，其通过包括在水性介质中乳化亲水性单体、主单体和共聚单体，以及聚合所述水性乳液的方法制备。

2、根据权利要求1所述的粘合剂珠，其中，所述亲水性单体为选自包括甲基丙烯酸、丙烯酸、衣康酸、甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸羟丙酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸缩水甘油酯、聚丙烯酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸乙二醇酯、棕榈油酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、亚麻酸、烯丙醇和乙烯醇的组的一种或多种。

3、根据权利要求1所述的粘合剂珠，其中，所述主单体为选自包括丁二烯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙基己酯和丙烯酸辛酯的组的一种或多种。

4、根据权利要求1所述的粘合剂珠，其中，所述共聚单体为选自包括乙酸乙烯酯、丙烯腈、丙烯酰胺、苯乙烯、甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸酯的组的一种或多种。

5、一种制备粘合剂珠的方法，该方法包括：

(a)通过向乳化剂水溶液中加入单体制得乳液；

(b)搅拌步骤(a)制得的所述乳液与在水性介质中以亲水性单体制备然后在氮气氛中加热至约75℃的溶液的混合物；以及

(c)通过向步骤(b)制得的乳液加入聚合引发剂进行聚合。

6、根据权利要求5所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述水性介质为选自包括水、乙醇、甲醇、DMF、DMSO、丙酮和NMP的组的一种或多种。

7、根据权利要求5所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述亲水性单体为选自包括甲基丙烯酸、丙烯酸、衣康酸、甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸羟丙酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸缩水甘油酯、聚丙烯酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸乙二醇酯、棕榈油酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、亚麻酸、烯丙醇和乙烯醇的组的一种或多种。

8、根据权利要求5所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述单体为选自包括丁二烯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙基己酯和丙烯酸辛酯的组的一种或多种；且所述共聚单体优选为选自包括乙酸乙烯酯、丙烯腈、丙烯酰胺、苯乙烯、甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸酯的组的一种或多种。

9、根据权利要求5所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述乳化剂为选自包括十二烷基硫酸钠、明胶、甲基纤维素、聚乙烯醇、溴化十六烷基三甲基胺和油酸钠的组的一种或多种。

10、根据权利要求5所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述聚合引发剂为选自包括过硫酸钾、过硫酸铵、偶氮二异丁腈(AIBN)和过氧化苯甲酰(BPO)的组的一种或多种。

11、根据权利要求8所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述主单体与共聚单体的结合率优选由粘合剂珠的玻璃化转变温度(Tg)决定，其中，Tg较制造或使用生物芯片时的温度低0~45℃。

12、一种制备生物芯片的方法，该方法包括：

(a) 制备粘合剂珠的水悬浮液，通过连接生物分子和权利要求 1~4 种任一项所述的粘合剂珠而将生物分子固定在该粘合剂珠上；

(b) 附着所述水悬浮液在生物芯片基质上。

13、根据权利要求 12 所述的制备粘合剂珠的方法，其中，步骤(b) 包括：将所述水悬浮液点样在基质上；以及通过干燥附着所述粘合剂珠在基质上。

14、根据权利要求 12 所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述点样通过喷墨进行。

15、根据权利要求 12 所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述将生物分子连接到粘合剂珠的方法通过选自包括疏水吸收、共价连接和静电吸引的组的任一方法进行。

16、根据权利要求 12 所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述生物分子为选自包括核酸、氨基酸、蛋白质、肽、酯类、碳水化合物、配体、辅因子和酶底物的组的任一种。

17、根据权利要求 12 所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述基质为选自包括微孔、载玻片基质和芯片实验室的微通道的组的任一种。

18、根据权利要求 17 所述的制备粘合剂珠的方法，其中，所述芯片基质的材料为选自包括聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、环烯烃共聚物、聚降冰片烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、丙烯腈丁二烯苯乙烯、玻璃、硅、水凝胶、金属、陶瓷和多孔膜的组的任一种。

19、一种通过权利要求 12 的方法制备并具有固定在基质上、其上连接生物分子的粘合剂珠的生物芯片。

20、一种检测样品中靶物质的方法，该方法包括：

(a)将含有靶物质的样品涂布至权利要求 19 的生物芯片；以及

(b)检测特异性结合于所述生物芯片上的生物分子的靶物质。

21、根据权利要求 20 所述的用于检测靶物质的方法，其中，所述样品中靶物质的检测通过选自包括使用如放射性同位素、荧光或着色染料的生物标记的检测方法、使用生物酶的酶联免疫检测(ELISA)、电化学免疫检测、颗粒浊度免疫检测和使用荧光团的检测方法的组的一种或多种方法进行。

22、一种用于测定抗 Lamibudin 的 HBV(B 型肝炎病毒)感染的生物芯片，在所述芯片基质上固定有珠，且所述珠为附有 SEQ ID NO:1 或 2 的 SNP(单核苷酸多态性)的权利要求 1~4 中的任一权利要求的粘合剂珠。

23、一种在基质表面的部分或全部覆有权利要求 1~4 中的任一权利要求所述的粘合剂珠的凸凹结构。

## 用于固定生物分子的粘合剂珠以及 使用该粘合剂珠制造生物芯片的方法

### 技术领域

本发明涉及一种用于固定生物分子的粘合剂珠和使用所述粘合剂珠制造生物芯片的方法，更具体而言，涉及一种起固定生物分子的固相载体和基质表面粘合剂作用的粘合剂珠，以及制造生物芯片的方法，该方法包括步骤：将生物分子固定于所述粘合剂珠以制备水悬浮液和在基质上固定该水悬浮液。

### 背景技术

利用与生物分子间的选择亲和性，能够固定生物分子的固相载体已广泛用于各种生物应用，所述载体包括天然载体，如琼脂糖、纤维素、多孔玻璃、二氧化硅、氧化铝和沸石，以及合成载体，如聚丙烯酰胺珠、聚甲基丙烯酸珠、聚苯乙烯珠和膜(Regnier, F.E., *J. Chromatogr. Sci.*, 14:316, 1976; Hjerten, S., *Anal Biochem.*, 3:109, 1962)。

除了如蛋白质纯化和/或分离以及亲和层析等常规领域，那些固相载体还作为将生物分子固定在生物芯片基质上的载体而广泛应用于用作高通量筛选(high-throughput screening, HTS)和诊断的生物芯片领域(Sato, K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55:379, 2003; Adnerson, H., *Electrophoresis*, 22:249, 2001; Choi, J.W., *Biomed. Microdevices*, 3:191, 2001)。作为一种替代方式设计固相载体，以克服如常规用于相关领域的自组装的二维固定的技术限制，即整合生物分子和保持生物活性的限制。所述固相载体通过在高浓度限制生物分子以及使用固相载体的

宽的三维表面积将其固定在生物芯片上，使生物友好地整合生物分子成为可能。

可用的固相载体包括多种类型。例如，膜型采用具有特征微孔的宽表面区域作为用于固定如纤维素的生物分子的区域，而聚合物基质是一种具有加宽的固定面积和通过形成包括如葡萄糖、聚赖氨酸、几丁聚糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺和聚乙烯醇的生物友好的聚合物的薄聚合物基质而改进的生物分子对基质的位阻的载体(KR 2004-0004725; Yakovleva, J., *Biosens. Bioelectron.*, 19:21, 2003; Gill, I., *Trends in Biotechnology*, 18:282, 2000; US 5,034,428;US 5,482,996)。

珠状载体是一种具有固定在用以收集的各球形珠上，并因此形成具有宽的表面积的三维结构的固定载体，当固定在基质上时，其可用作生物芯片(Sato, K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55:379, 2003; Anderson, H., *Electrophoresis*, 22:249, 2001; Choi J.W., *Biomed. Microdevices*, 3:191, 2001)。所述的膜和聚合物基质具有两个缺点:生物分子固定受限于与外部接触的表面的环境，或者，当为了高的固定率共价结合生物分子时，难于保持对外部环境敏感的酶和其他蛋白质的生物活性。相反，珠状载体具有很大的优点:由于使用生物分子固定其上的各珠形成的三维结构，它们具有高的表面积利用率，且可采用多种保持生物分子活性的固定方法。特别地，由于其易操作，珠状载体可在如芯片实验室的需要在微通道内固定生物分子的生物芯片的制造过程中作为辅助生物芯片制造的合适材料。

另外，由于不具有对基质的粘合性，传统珠具有在微通道中需要其他方式固定珠的缺点。固定珠的常规方式或使用物理分区在微通道内限制珠的方法、使用磁场的固定方法和使用超声或激光镊子(Laser

tweezer)的方法。然而,那些方法的缺点在于,它们对选择珠有限制,并且使生物芯片的制备过程复杂化,在光测量中引起噪音,且在生物芯片内部或外部需要辅助设备。因此,它们用于芯片实验室是没有成本效益的(Sato, K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55:379, 2003; Anderson, H., *Electrophoresis*, 22:249, 2001; Choi, J.W., *Biomed. Microdevices*, 3:191, 2001; Meng, A., *Transducers, Sendai, Japan*, 876, 1999; Dorre, K., *Bioimaging*, 5:139, 1997)。

同时,本发明者已提交了公开一种制备生物芯片的方法的申请(KR 10-2004-104944),该方法包括,使用粘合剂在基质表面固定探针或具有固定的探针的珠。根据所述专利,通过粘合剂而不使用物理分区或磁场,在基质上固定具有探针的珠是可能的,但这仍需要补充一种额外的粘合剂。

因此,已迫切需要开发一种起固定生物分子的载体和不需要额外设备和处理直接固定在生物芯片上的生物芯片基质表面粘合剂作用的粘合剂珠,以及使用该粘合剂珠的生物芯片。

## 发明内容

因此,本发明者已做了大量工作以开发一种起固定生物分子的固相载体和不需要额外的设备和处理粘合于生物芯片基质表面以固定于生物芯片上的粘合剂作用的粘合剂珠,以及一种使用该粘合剂珠的生物芯片,因此完成本发明。

本发明的主要目的为提供一种起固定生物分子的固相载体和粘合于生物芯片基质表面的粘合剂作用的粘合剂珠,及其制备方法。

本发明的另一目的为提供一种制造生物芯片的方法，该方法包括：将生物分子连接到所述粘合剂珠上，以制备生物分子固定其上的珠的水悬浮液；然后将该水悬浮液固定于基质上，以及通过该方法制造的生物芯片。

为了达到上述目的，本发明提供一种起固定生物分子的固相载体和粘合于芯片基质表面的粘合剂作用的粘合剂珠，其通过在水性介质中乳化亲水性单体、主单体和共聚单体以及聚合所述水悬浮液制备。

在本发明中，所述亲水性单体优选为选自包括甲基丙烯酸、丙烯酸、衣康酸、甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸羟丙酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸缩水甘油酯、聚丙烯酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸乙二醇酯、棕榈油酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、亚麻酸、烯丙醇和乙烯醇的组的一种或多种。所述主单体优选为选自包括丁二烯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙基己酯和丙烯酸辛酯的组的一种或多种。所述共聚单体优选为选自包括乙酸乙烯酯、丙烯腈、丙烯酰胺、苯乙烯、甲基丙烯酸甲酯和丙烯酸甲酯的组的一种或多种。

本发明也提供一种制备粘合剂珠的方法，该方法包括：(a)通过向乳化剂水溶液中加入单体制得乳液；(b)搅拌步骤(a)制得的所述乳液与在水性介质中使用亲水性单体制备然后在氮气氛中加热至约 75°C 的溶液的混合物；以及(c)通过向步骤(b)制得的乳液加入聚合引发剂进行聚合。

在所述制备本发明的粘合剂珠的方法中，所述水性介质优选为选自包括水、乙醇、甲醇、DMF、DMSO、丙酮和 NMP 的组的一种或多种。所述亲水性单体优选为选自包括甲基丙烯酸、丙烯酸、衣康酸、

甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸羟丙酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸缩水甘油酯、聚丙烯酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸乙二醇酯、棕榈油酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、亚麻酸、烯丙醇和乙烯醇的组的一种或两种。

在所述制备本发明的粘合剂珠的方法中，所述单体优选包括至少一种选自包括丁二烯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙基己酯和丙烯酸辛酯的组的主单体，和至少一种选自包括乙酸乙烯酯、丙烯腈、丙烯酰胺、苯乙烯、甲基丙烯酸甲酯和丙烯酸甲酯的组的共聚单体。所述主单体与共聚单体的组合率优选由粘合剂珠的玻璃化转变温度(Tg)决定，其中，Tg 优选较制造或使用生物芯片时的温度低0~45℃。

在所述制备本发明的粘合剂珠的方法中，所述乳化剂优选为选自包括十二烷基硫酸钠、明胶、甲基纤维素、聚乙烯醇、溴化十六烷基三甲基胺和油酸钠的组的一种或多种。所述聚合引发剂优选为选自包括过硫酸钾、过硫酸铵、偶氮二异丁腈(AIBN)和过氧化苯甲酰(BPO)的组的至少一种。

本发明也提供一种制造生物芯片的方法，该方法包括：(a) 制备粘合剂珠的水悬浮液，通过连接生物分子和所述粘合剂珠而将生物分子固定在该粘合剂珠上；(b)附着所述水悬浮液在生物芯片基质上。

在所述制造本发明的生物芯片的方法中，步骤(b)优选包括：将所述水悬浮液点样在基质上；以及通过干燥在基板上连接所述粘合剂珠。所述点样优选通过喷墨进行。所述将生物分子连接到粘合剂珠的方法

优选通过选自包括疏水吸收、共价连接和静电吸引的组的任一方法进行。

在所述制造本发明的生物芯片的方法中，所述生物分子为选自包括核酸、氨基酸、蛋白质、肽、酯类、碳水化合物、配体、辅因子和酶底物的组的任一种。所述芯片基质优选为选自包括微孔、载玻片基质和芯片实验室的微通道的组的任一种。所述芯片基质的材料优选为选自包括聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、环烯烃共聚物、聚降冰片烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、丙烯腈丁二烯苯乙烯、玻璃、硅、水凝胶、金属、陶瓷和多孔膜的组的一种或多种。

本发明也提供一种通过上述方法制备并具有固定在基质上、与生物分子连接的粘合剂珠的生物芯片。

本发明也提供一种检测样品中靶物质的方法，该方法包括：(a)将含有靶物质的样品涂布至生物芯片；以及(b)检测特异性结合于所述生物芯片上的生物分子的靶物质。

样品中靶物质的检测优选通过选自包括使用如放射性同位素、荧光或着色染料的生物标记的检测方法、使用生物酶的酶联免疫检测(ELISA)、电化学免疫检测、颗粒浊度免疫检测和使用荧光团的检测方法的组的一种或多种方法进行。

本发明也提供一种用于测定抗 Lamibudin 的 HBV(Hepatitis B virus, B 型肝炎病毒)感染的生物芯片，珠固定在所述芯片基质上，且所述珠为附有 SEQ ID NO:1 或 2 的 SNP(单核苷酸多态性)的权利要求 1~4 中的任一权利要求的粘合剂珠。

本发明也提供一种在生物芯片基质表面的部分或全部覆有所述粘合剂珠的凸凹结构。

在下列描述和权利要求中，更加详细地清楚地描述本发明的其他特征和实施例。

### 附图说明

图 1 为放大 10,000 倍的固定于基质上的本发明粘合剂珠(600nm)的扫描电镜图像。

图 2 为放大 900,000 倍的图 1 中的粘合剂珠的扫描电镜图像。

图 3 为表明根据注入的乳化剂的量粘合珠的粒度变化图。

图 4 为表明根据主单体和共聚单体的共聚合率珠的  $T_g$  变化曲线图。

图 5 为具有彼此不同的玻璃化转变温度( $T_g$ )的粘合剂珠的扫描电镜图像。

图 6 为表明当生物分子的浓度变高时珠上的生物分子的表面覆盖率提高的曲线图。

图 7 为表明聚苯乙烯珠和本发明的粘合剂珠上的生物分子的表面覆盖率随着在珠上固定生物分子的反应时间而提高的曲线图。

图 8 为根据各重量百分比点样在聚甲基丙烯酸甲酯基质上的含有粘合剂珠的水悬浮液的扫描电镜图像。

图 9 为通过在塑料基质上浸涂粘合剂珠的水悬浮液制造的凸凹结构的扫描电镜图像。

图 10 为通过在生物芯片基质上点样固定蛋白质的粘合剂珠的水悬浮液并测量形成的点的自发荧光以定量而得到的曲线图。

图 11 为表明通过在生物芯片上点样固定蛋白质的粘合剂珠的水悬浮液并在形成的点上用非特异性蛋白质处理而定量非特异性结合的曲线图。

图 12 为通过使用本发明的生物芯片竞争免疫检测在不同浓度检测 S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)的荧光扫描照片。

图 13 为表明使用本发明的生物芯片和 Nunc 公司的 Maxisorp, 进行靶物质 SAH 的竞争性免疫检测的结果的曲线图。

图 14 为使用本发明的生物芯片在不同浓度检测具有 HBV 聚合酶的寡核苷酸 SNP(单核苷酸多肽性)的荧光扫描照片。

图 15 为表明通过分析图 14 的照片得到的荧光信号强度的曲线图。

图 16 为表明通过直接免疫检测使用本发明的生物芯片检测一种蛋白质抗体, 免疫球蛋白 G(IgG)的荧光扫描照片的图片。

图 17 为表明通过分析图 16 的照片得到的荧光信号强度的曲线图。

### 具体实施方式

本发明涉及一种起固定生物分子的固相载体和粘合于生物芯片基质表面的粘合剂作用的粘合剂珠, 及制备该粘合剂珠的方法、一种定在基质上、生物分子与所述粘合剂珠连接的具有珠的生物芯片, 及制造该芯片的方法。制造本发明的生物芯片的方法的各步骤描述如下。

#### 步骤 1: 制备含有粘合剂珠的水悬浮液

本发明的粘合剂珠是指一种在水悬浮液中具有粘合剂性质的固体材料，且包括提供粘合性的主单体、提供硬度的共聚单体和用于水分散的亲水性单体。

本发明的粘合剂珠可通过在水性介质中混合主单体、共聚单体和亲水性单体以及使用如悬浮、乳化、分散、微乳化、小乳化、反向乳化等常规方法聚合而制备。聚合条件决定制备的珠的不同直径。为了用作生物分子的固定载体，通常珠需要具有从几十纳米到几微米的直径。

另外，所述珠作为粘合剂和载体的两种功能可通过控制包括珠的主单体和共聚单体的结合率提供，特别地，这两种功能可通过选择使用具有挠性和粘性的主单体的粘合特性和具有坚固性的共聚单体的性质，使生物芯片应用的条件下同时表达两种特性的共聚合的结合率提供。决定主单体和共聚单体的结合率的重要因素为制备珠的内在玻璃化转变温度(Tg)，所述 Tg 优选较制造或使用生物芯片时的温度低 0~45℃。例如，如果在室温(25℃)下制造或使用生物芯片，粘合剂珠的 Tg 优选低于室温 0~45℃的-15~25℃，更优选-15~10℃。

### 步骤 2: 含有固定生物分子的粘合剂珠的水悬浮液的制备

为了提高生物芯片基质上固定的生物分子的固定密度，本发明生物芯片采用具有宽表面积粘合剂珠作为介质。珠上的生物分子的固定方法包括用珠自身的亲水表面直接引发固定的疏水性吸收、使用包括珠的共聚物链的特殊反应基团的共价结合以及静电吸引。用于制备所述珠的水悬浮液的水性介质可包括具有水溶性的任何溶剂。即，所

述水性介质可为水、乙醇、甲醇、DMF、DMSO、丙酮和NMP。然而，不限于此。优选可使用水。

### 步骤 3: 珠的水悬浮液的点样

可通过在基质上点样，使具有固定的生物分子的珠的悬浮液固定在生物芯片表面。对于所述的点样，可使用本领域任何常规点样方法，通常可采用通过喷墨印刷点样。采用喷墨印刷的优点在于其有利于在基质上定量喷涂本发明的水悬浮液。

用在生物芯片领域的多种基质可用作固定粘合剂珠的基质，代表性地可使用微孔、载波片基质、芯片实验室的微通道，但不局限于此。另外，用于基质的材料可选自包括聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)、聚苯乙烯(PS)、环烯烃共聚物、聚降冰片烯、苯乙烯-丁二烯共聚物(SBC)、丙烯腈丁二烯苯乙烯、玻璃、水凝胶、硅、金属、陶瓷和多孔膜的组，但不局限于此。

### 步骤 4: 干燥

可使用通过点样制造生物芯片的常规干燥方法，例如，在室温下干燥。根据材料决定选择的温度，如对于蛋白质为 15~33℃，而对于DNA为 15~90℃。

使用上述方法制备的生物芯片的扫描电镜结果示于图 1 和图 2，证实干燥进行时，珠通过珠和基质之间的表面相互作用结合于基质。因此，生物芯片可使用根据本发明的粘合剂珠制备。

### 根据本发明制备的生物芯片的应用

本发明可应用于样品中存在的靶分子的定量分析和存在测试，且包括步骤：通过点样在生物芯片基质上固定具有固定了生物分子的粘合剂珠、施加含有待检测的靶分子的样品以及检测所述生物分子特异性结合的靶分子。

另外，本发明的粘合剂珠可用于在基质表面全部或部分涂覆粘合剂珠自身而制备由珠组成的凹凸结构(图7)。该空间结构在生物芯片中有很多有用的功能，例如，其应用于检测部分，用作直接点样待固定的生物分子的宽表面基质，或应用于使用毛细流动的芯片实验室的特殊微通道，通过疏水流动延迟用作流体延迟部分。

### 实施例

下文，将通过实施例更加详细地描述本发明。然而，应理解这些实施例仅用于说明用途，不试图限制本发明的范围。

#### 实施例1：制备含有粘合剂珠的水悬浮液

将622.1g去离子水和3.5g衣康酸加入主反应器，在氮气氛围中加热至约75°C。将通过混合35.0g丙烯酸丁酯、31.4g甲基丙烯酸甲酯、0.1g甲基丙烯酸烯丙酯、1.2g 3wt%的十二烷基硫酸钠水溶液制得的乳液加入另一反应器。

当主反应器的温度稳定时，将在所述另一反应器中制备的乳液转移到主反应器并搅拌多于1小时以充分乳化。然后分别加入7.0g和1.0g 3wt%的过硫酸钾水溶液，使反应进行2小时，因此制得含有粘合剂珠的聚合物。

通过透析和离子交换树脂洗涤所述聚合物，然后在去离子水中稀释，以制备含有粘合剂珠的水悬浮液。所述粘合剂珠的直径可通过乳化剂的量调节。图 3 显示以不同量的乳化剂十二烷基硫酸钠制备的珠的直径的分析结果，表明当加入 0.1~0.05wt%的乳化剂时制备平均为亚微米大小的珠。

粘合剂珠、共聚物的 Tg 通常对应于作为主单体的聚丙烯酸丁酯和作为共聚单体的聚甲基丙烯酸甲酯的 Tg 的平均值。因此，具有所需的 Tg 的粘合剂珠可通过调节各单体的结合率制备(图 4)。

图 5 为具有不同的 Tg 的珠的扫描电镜图像，表明 Tg 低的珠具有强粘合性，易于粘附在基质上，但由于膜形成，不能具有空间结构；然而，Tg 高的珠具有强的密实性，以保持明显的珠形，但由于在室温下干燥时其易碎性，不能粘附在基质上。因此，当在室温下干燥时，珠的 Tg 在-15~10°C 范围内是适宜的。

#### 实施例 2: 根据生物分子浓度的固定效率

由于实施例 1 制备的珠的表面既具有与基质粘合的区域，又具有固定生物分子的区域，因此本发明目的粘合剂珠的应用效率可通过控制珠的整个表面积被生物分子占据的面积来调节。

以 0.16、0.31、0.93、1.55 和 3.10 mg/ml 的浓度制备作为待固定的生物分子的牛血清白蛋白的磷酸缓冲液水溶液(pH 7.2)，并按 1: 1 的比例与含有 2wt%所述粘合剂珠的水悬浮液搅拌，然后在室温下振荡 14 小时以反应。终止反应后，通过离心收集上清液，以通过测量没有固定的牛血清白蛋白的量定量固定在珠上的牛血清白蛋白的量(图 6)。结果，如图 6 所示，珠表面的覆盖率可通过控制结合的生物分子的反应量来调节。

#### 比较实施例 1: 根据反应时间测量固定率以及使用聚苯乙烯珠的比

### 较试验

通过反应时间测量固定在珠上的生物分子的量，并与市售聚苯乙烯珠比较。制备 1.6mg/mL 的牛血清白蛋白的磷酸缓冲液水溶液(pH 7.2)、含有 2wt%的实施例 1 中制备的粘合剂珠(直径 510nm)和聚苯乙烯珠(直径 600nm)的水悬浮液，进行如实施例 2 的固定过程。表面覆盖率通过将生物分子固定于珠上的反应时间测量(图 7)。结果，如图 7 所示，证实在实施例 1 中制备的粘合剂珠的情况下，生物分子的表面覆盖率可通过控制反应时间来调节，且它们表现出与市售聚苯乙烯珠同样优异的固定能力。

### 实施例 3: 根据粘合剂珠的浓度的点的形状

在使用粘合剂珠制造生物芯片中，形成于基质上的点的形状受珠的水悬浮液中分散的珠的浓度影响。分别制备含有实施例 1 中制备的粘合剂珠(平均直径 510nm, Tg-8°C)的 0.05、0.1、0.5、1wt%的珠水悬浮液，且将各 0.5mL 水悬浮液点在聚丙烯酸甲酯基质上。然后，该基质在室温下干燥 12 小时，并观察各点的表面形状(图 8)。结果，如图 8 所示，表明当点中的珠的浓度提高时，连接的粘合剂珠的密度提高，且如果珠的浓度超过 0.5wt%，由于聚合链的行为，粘合剂珠的多层固定促进膜形成。

### 实施例 4: 通过涂覆粘合剂珠形成凸凹结构

含有 8.5wt%的实施例 1 中制备的粘合剂珠(直径 510nm, Tg-8°C)的珠水悬浮液在聚甲基丙烯酸甲酯基质的表面部分或全部浸涂(图 9)。结果，如图 9 所示，证实形成包括单层珠的凸凹结构。该凸凹结构可应用于生物芯片中的流体延迟部分或宽表面基质。

### 实施例 5: 自发荧光检测和蛋白质点的非特异性结合

作为将发明的粘合剂珠应用于生物芯片的初步试验，将生物芯片

基质用珠的水悬浮液纳米点样，并测量自发荧光的强度和非特异性结合。

将 200  $\mu$ l 3.1mg/ml 的牛血清白蛋白(BSA)或以 SAH(S-腺苷-L-高半胱氨酸) 标记的 BSA 的磷酸水溶液与 200  $\mu$ l 含有 2wt%的实施例 1 中制备的水悬浮液混合，在室温下振荡 15 小时进行反应。反应后，将其离心并洗涤，然后制备含有 0.2wt%和 0.4wt%的粘合剂珠的水悬浮液。在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)基质上，将所述的含有粘合剂珠的水悬浮液使用喷墨阵列器(inkjet arrayer)以 50nL 的体积点样，且使用荧光图像扫描仪(Axxon)测量基质的固定点的自发荧光 (图 10)。结果，如图 10 所示，粘合剂珠的点自发荧光小于 3 个信噪比(signal to noise ratio, SNR)。

同时，用抗-SAH 抗体水溶液处理以上述方式点样的覆有 BSA 的粘合剂珠，并定量蛋白质的非特异性结合(图 11)。图 11 所示的结果证实在抗-SAH 抗体的非特异性结合反应后测得的点的荧光强度小于 3 个信噪比(SNR)，表明不可避免地发生了蛋白质的非特异性结合。

自发荧光和非特异性结合不显著的结果表明，在本发明的粘合剂分子和靶分子的反应中，所述珠没有干扰检测靶分子的荧光。总而言之，该事实表明，本发明的珠状载体可充分用于生物芯片。

#### 实施例 6: SAH 靶物质上的竞争性免疫检测

为了制造能够检测靶物质 SAH 的生物芯片，使用与实施例 5 相同的方法，分别在粘合剂珠上涂覆 BSA 和以 SAH 标记的 BSA，并使用磷酸缓冲液作为水性介质配制 0.4wt%的珠水悬浮液。将 50nL 体积的制备的珠水悬浮液点在 PMMA 基质上，在 30 $^{\circ}$ C 下干燥 30 分钟并在室温下干燥 20 小时，用含有 3wt%的 BSA 和 0.05vol%的吐温封锁 30 分钟，并洗涤。为了荧光检测，Cy3 标记的二抗和抗-SAH 抗体预培养 30

分钟，并以不同浓度与作为待检测的靶物质的 SAH 混合，然后在生物芯片上进行与点的竞争性免疫反应。

根据 SAH 的浓度，点的荧光扫描照片和检测结果分别示于图 12 和图 13 (-●-)。基于当未加入靶物质 SAH 时设定为 100 的信号值，荧光信号表示为相对值。在通过本实施例制备的生物芯片的竞争性免疫检测的 SAH 检测中，与没有靶物质 SAH 的情况相比，荧光信号下降了 90%多，且最高检测范围约为 2~5 $\mu$ M。

#### 比较实施例 2: 与生物分子的二维固定的比较

为了证明通过本发明的粘合剂珠的三维固定的优越性，免疫检测的效率与作为生物分子固定的市售常规二维固定的效率进行了比较。

选择 Nunc 公司的 MaxiSorp 芯片作为能够二维固定生物分子的典型生物芯片，并检测了对 SAH 靶物质的竞争性免疫检测，以与实施例 6 的结果对比。

将各 0.5 mg/mL 的 BSA 和以 SAH(S-腺苷-L-高半胱氨酸)标记的 BSA 分别加入含有 20vol%的甘油的磷酸缓冲液中，并点在 MaxiSorp 芯片上，在湿度箱中干燥 20 小时。洗涤点样的芯片后，如实施例 6 进行竞争性免疫检测。图 13(-■-)所示的结果表明，通过竞争反应最大降低的荧光值约为 50%，且标准定量范围从 0.01~0.5 $\mu$ M，显示出较实施例 6 中使用粘合剂珠的固定方法低很多的检测水平。

上述结果是由于使用 MaxiSorp 芯片的二维固定的缺点，如生物分子的低整合效率和对生物芯片表面的位阻。因此，证明使用本发明的粘合剂珠的生物芯片相对优于常规芯片。

#### 实施例 7: 特异性 SNP 的检测

通过在粘合剂珠上固定用于检测 B 型肝炎病毒(HBV)感染、具有治疗剂 Lamibudin 的抗性的寡核苷酸序列，检测 DNA 检测应用之一，

单核苷酸多肽性(SNP)。

抗 Lamibudin 的 HBV 是一种病毒聚合酶的 YMDD 基序突变的病毒。半胱氨酸取代 552 位异亮氨酸的 YIDD 突变体是典型的。在表达 YMDD 基序的正常序列和表达 YIDD 基序的突变体序列之间仅有一个碱基的差异。

表 1: 用于 SNP 检测的探针和靶序列

		序列	SEQ ID NO:
探针	正常	5'-NH <sub>2</sub> -TC AGT TAT ATG GAT GAT GTG-3'	1
	突变体	5'-NH <sub>2</sub> -TC AGT TAT ATC GAT GAT GTG-3'	2
靶*		5'-Cy3-CAC ATG ATC CAT ATA ACT GA-3'	3

\*包括 HBV 聚合酶基因序列的寡核苷酸

将各与具有 YMDD 基序的 HBV 聚合酶基因的序列互补的正常探针(SEQ ID NO:1)和与 YIDD 突变体的基因序列互补的突变体探针(SEQ ID NO:2)使用粘合剂珠固定在生物芯片表面,以检验荧光标记的 HBV 聚合酶基因序列(靶)的选择性检测(表 1)。

为了在粘合剂珠上有效地固定各寡核苷酸探针,使用磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-甲基马来酰亚胺)环己烷-1-羧酸酯将寡核苷酸探针与 BSA 连接,并采用与实施例 6 类似的方法涂覆在粘合剂珠上。

通过在塑料基质上纳米点样 50nL 0.4wt%的水悬浮液制备 DNA 芯片。用去离子水洗涤该生物芯片 3 分钟,用 80 $\mu$ l 封闭液 (3ml 20X SSC、1.35ml 甲酰胺、500 $\mu$ l 1wt% 的 BSA、150 $\mu$ l 去离子水)在 40 $^{\circ}$ C 下处理 30 分钟,加入另外 5 $\mu$ l 靶样品(0nM~100nM),然后在 40 $^{\circ}$ C 下水解 1 小

时。为了清除非特异性结合的靶序列，用  $2 \times \text{SSC}$  洗涤该生物芯片 10 分钟，并用  $0.2 \times \text{SSC}$  再洗涤 10 分钟，以用荧光扫描仪分析。图 14 为表明使用本发明的生物芯片在不同浓度检测的具有 HBV 聚合酶的 DNA 序列的寡核苷酸的 SNP 的荧光扫描照片；图 15 为表明通过分析图 14 的照片得到的荧光信号强度的曲线图。

从扫描照片的荧光信号强度分析表明，与靶样品(靶分子)互补的正常探针与具有一个碱基差异的突变体相比，具有高出 4.1 倍的分辨能力。因此，本发明的生物芯片证明可用于如 SNP 的 DNA 检测。

#### 实施例 8: 蛋白质靶物质的直接免疫检测

检测了除如使用粘合剂珠的实施例 6 中的 SAH 的具有低分子量的靶物质之外的蛋白质抗体的免疫检测是否可行。BSA(牛血清白蛋白)用作蛋白质抗原。使用与实施例 6 类似的方法，通过制备涂覆 BSA 的粘合剂珠(Calbiochem 公司，抗原级)，并在 PMMA 基质上点样该粘合剂珠制备检测免疫球蛋白 G(IgG)的简单生物芯片。

为了封闭表面，室温下在芯片上处理  $1 \times \text{PBS}$  缓冲液的水溶液中的 30% 的人血清 30 分钟。选择作为负对照的抗-SAH IgG(多克隆抗体,  $50 \mu\text{g/ml}$ )和作为正对照的抗-BSA IgG(单克隆抗体,  $50 \mu\text{g/ml}$ )，并使其在所述生物芯片基质上在室温下反应 45 分钟，然后使作为二抗的 Cy3 标记的抗-鼠-Cy3(多克隆,  $10 \mu\text{g/ml}$ )荧光染料在室温下反应 20 分钟。使用  $1 \times \text{PBS}$  缓冲液的水溶液洗涤非特异性结合的剩余抗体后，使用荧光扫描仪检测荧光信号。图 16 为表明使用本发明的生物芯片通过直接免疫检测检测到的靶物质免疫球蛋白 G(IgG)的荧光扫描照片；图 17 为表明通过分析图 16 的照片分析的荧光信号强度的曲线图。

由扫描照片的荧光信号强度分析表明，与对 IgG 非特异的负对照相比，对靶物质 IgG 特异的正对照具有 7.7 倍的(正信号强度/负信号强

度)的检测能力。因此,本发明的生物芯片证明可用于蛋白质抗体的检测。

#### 工业应用性

由于具有固定生物分子的固相载体和基质表面的粘合剂的双重功能,本发明的粘合剂珠可不需要额外设备和处理过程直接固定在生物芯片上。另外,本发明的粘合剂珠的优点在于,粘合剂珠的表面覆盖率可通过生物分子的反应量和在珠上固定生物分子的反应时间调节。进而,与常规生物分子的二维固定相比,所述的粘合剂珠具有高的固定密度,而表现出与市售现有珠类似的固定能力,因此使以小粒度制造生物芯片成为可能。因此,其是高度成本有效的。

尽管已参照其特异性特征详细描述本发明,但对于本领域技术人员,本说明书仅作为优选实施方式,且不限本发明的范围是显而易见的。因此,本发明的基本范围将通过所附权利要求和其等同物限定。



图 1

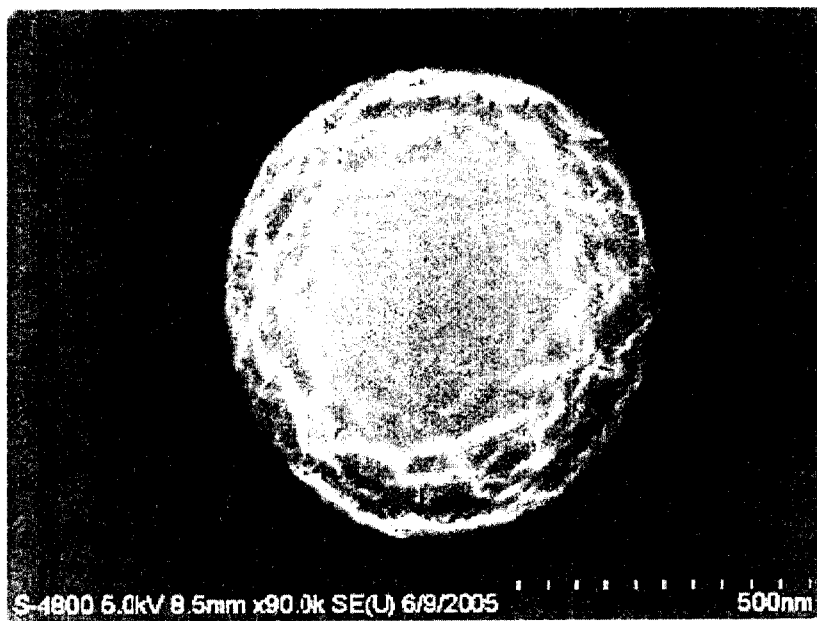


图 2

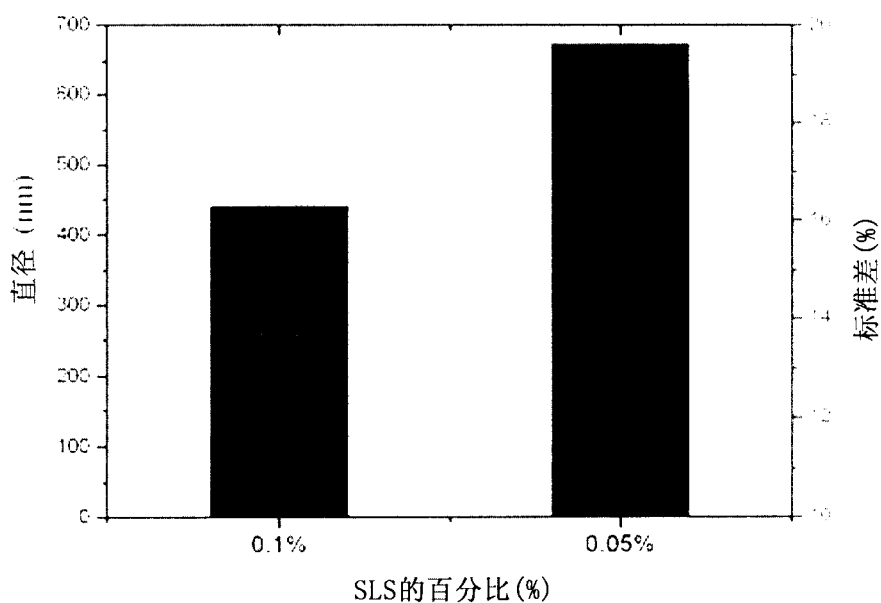


图 3

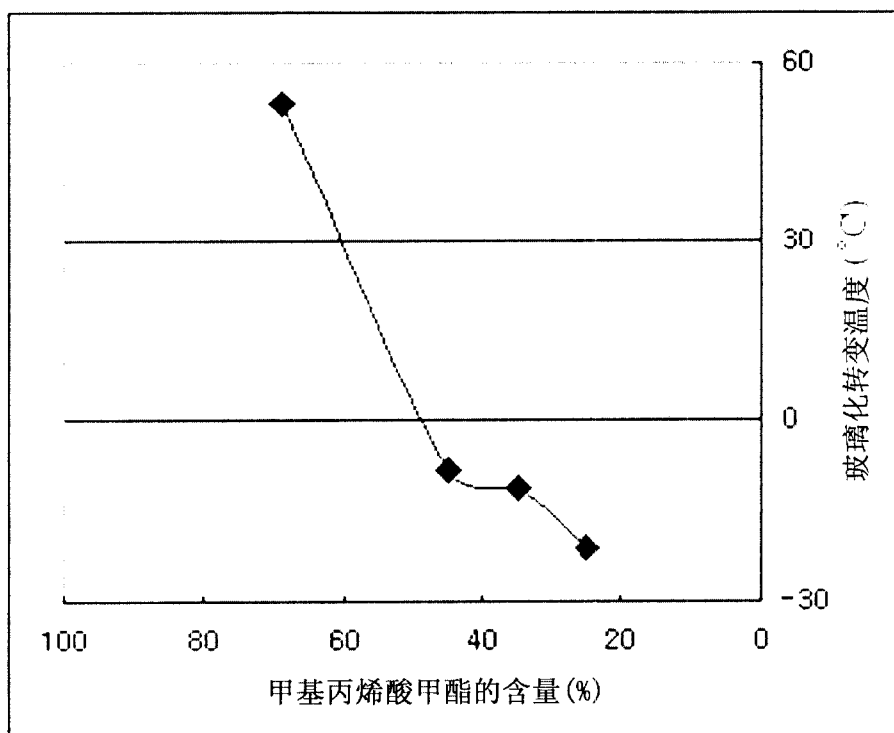


图 4

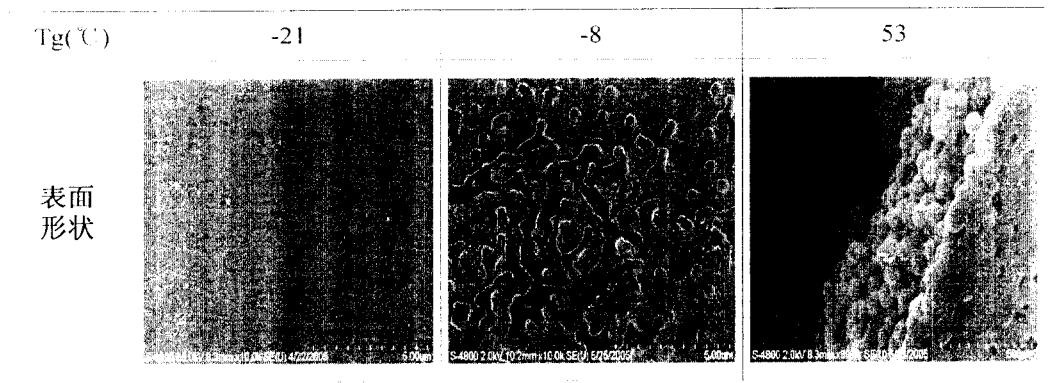


图 5

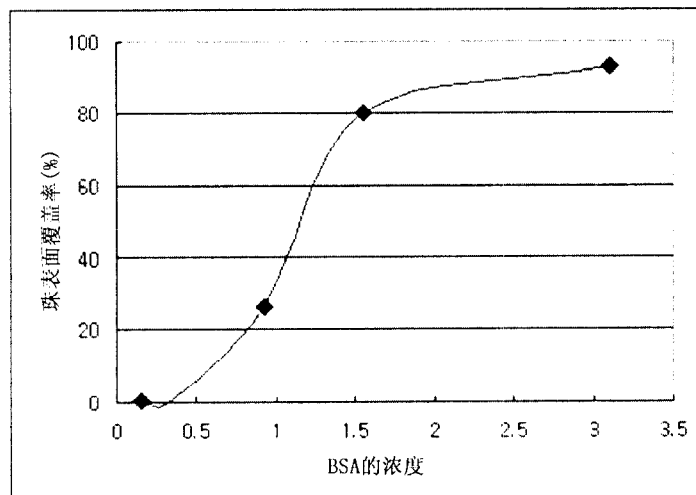


图 6

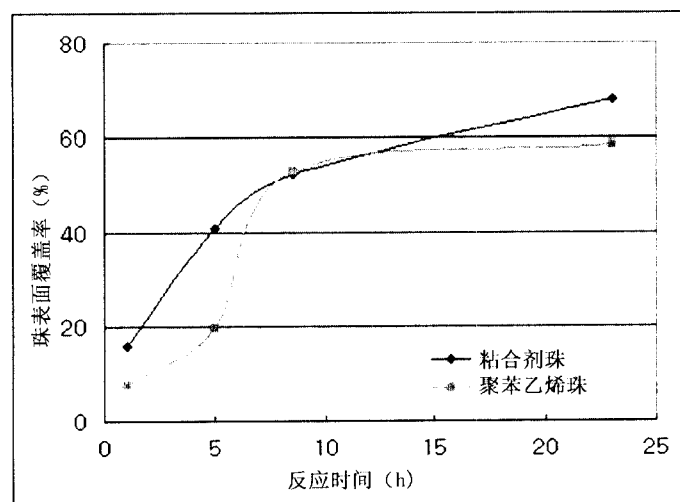


图 7

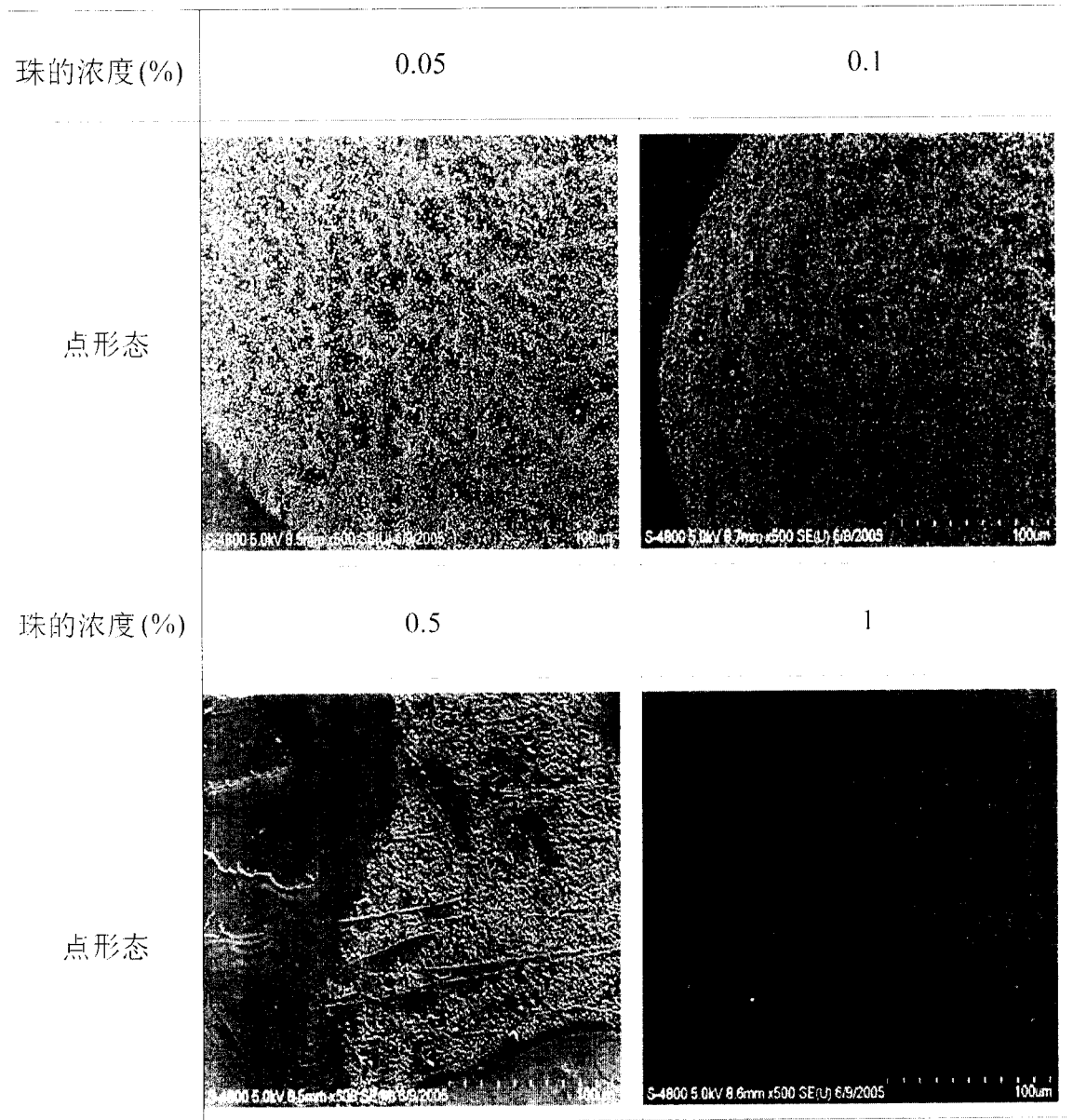


图 8

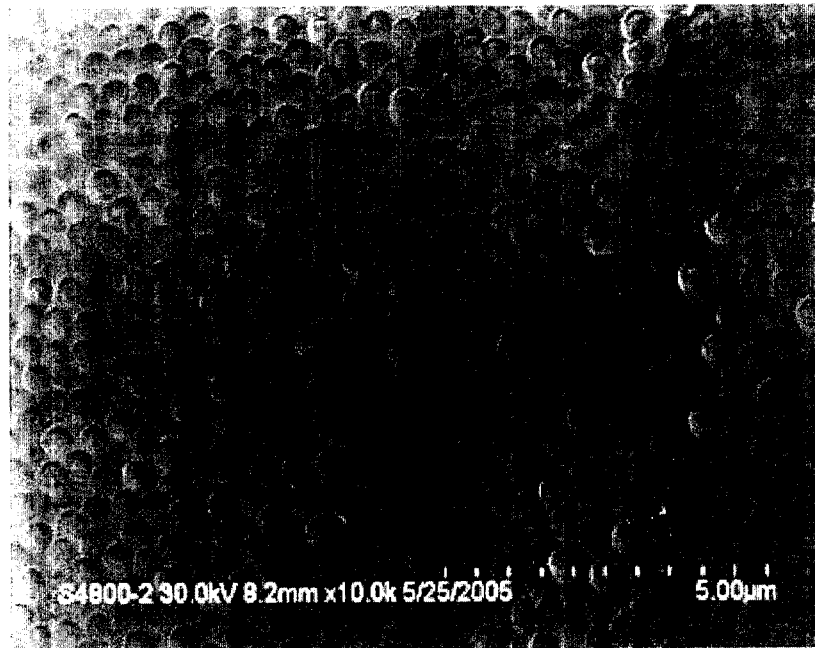


图 9

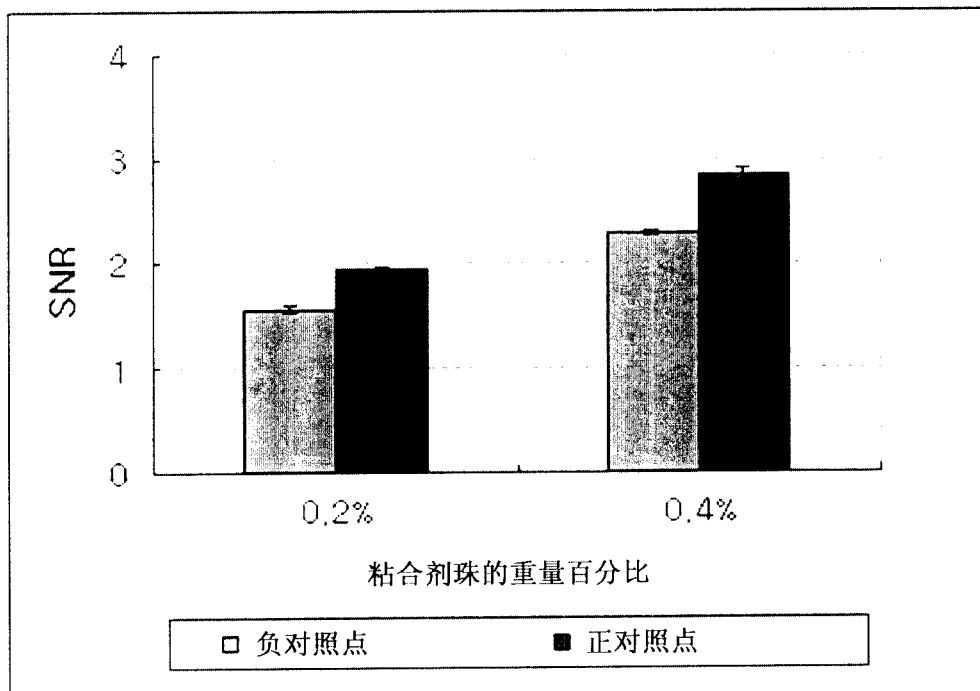


图 10

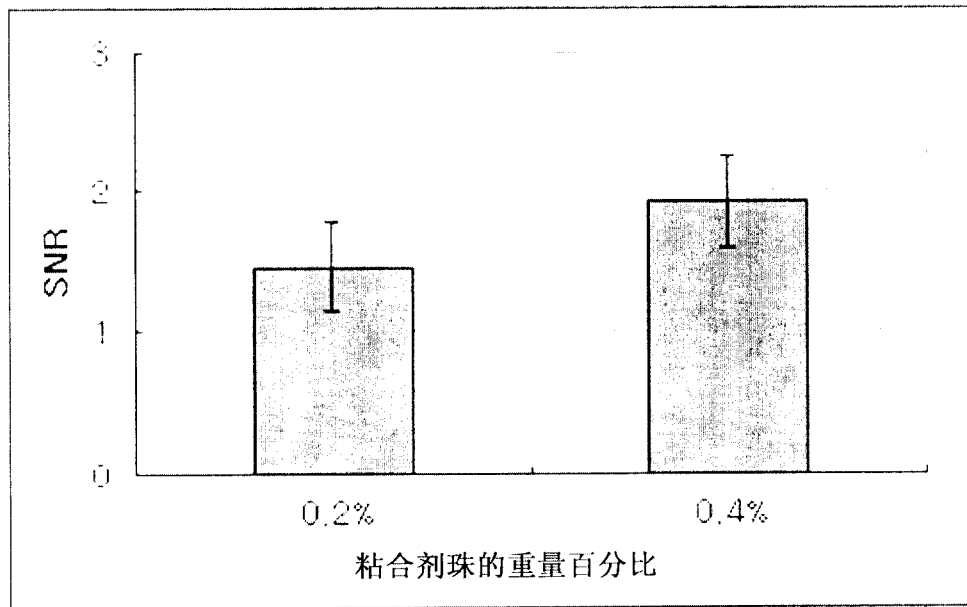


图 11

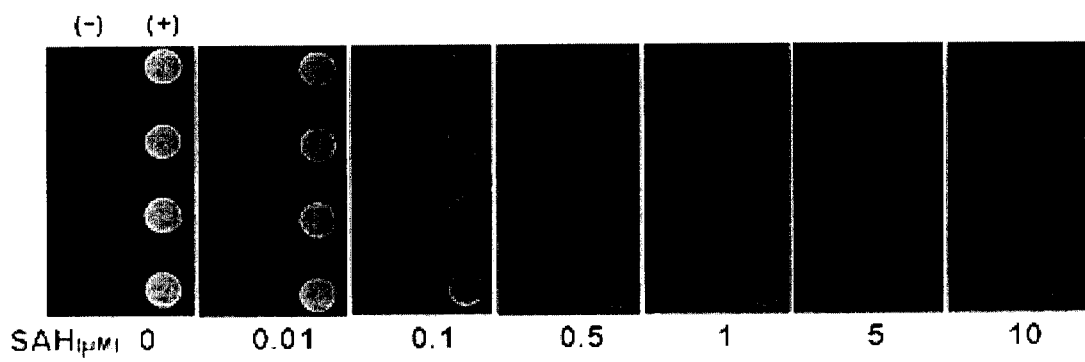


图 12

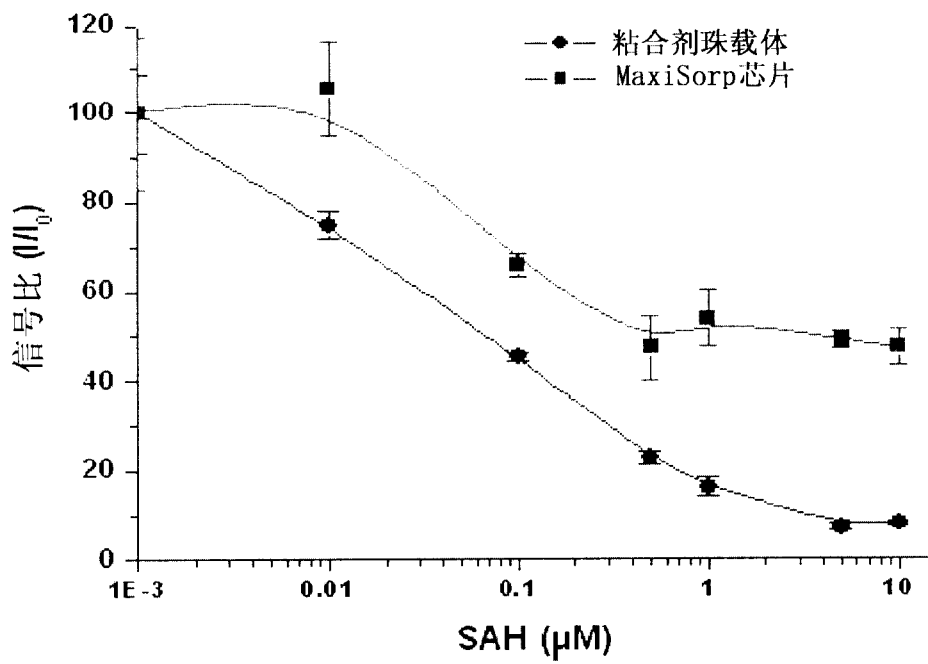


图 13

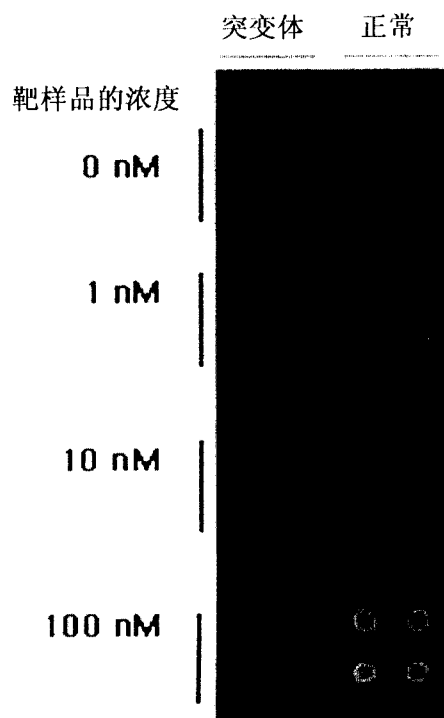


图 14

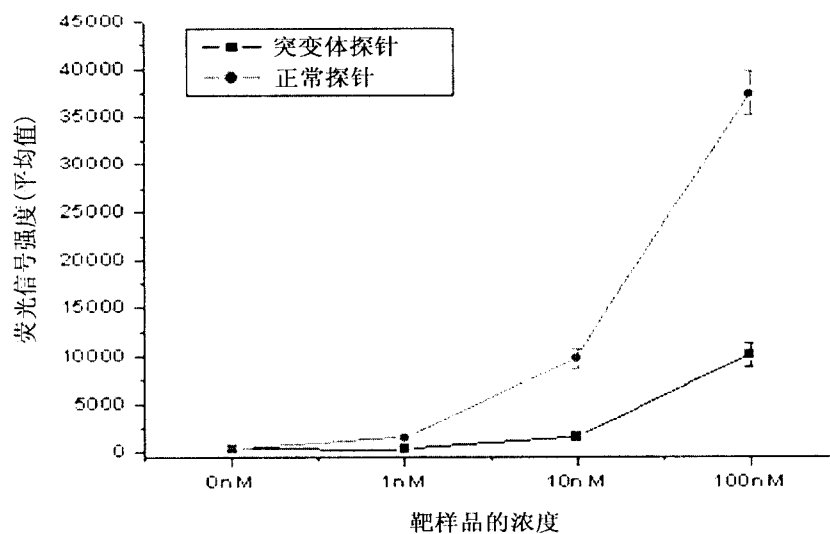


图 15



图 16

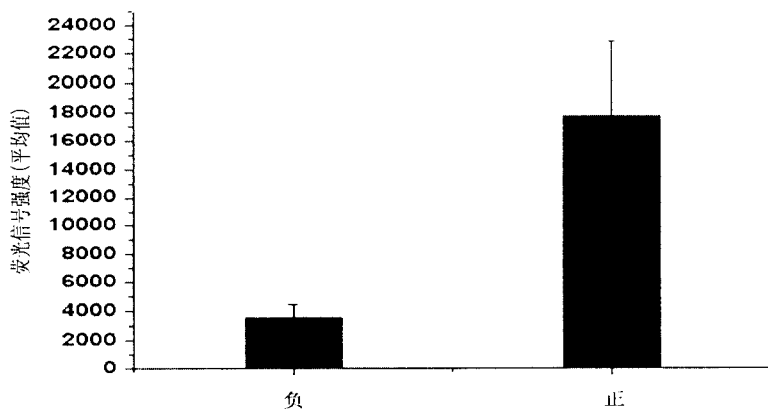


图 17