



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103360459 B

(45)授权公告日 2017.12.26

(21)申请号 201210090217.7

(22)申请日 2012.03.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103360459 A

(43)申请公布日 2013.10.23

(73)专利权人 武汉介观生物科技有限责任公司

地址 430075 湖北省武汉市东湖开发区高新大道666号

(72)发明人 陈勇 丁一 李俊君 石剑

(51)Int.Cl.

C07K 1/14(2006.01)

(56)对比文件

CN 101850231 A,2010.10.06,

EP 1386087 B1,2001.11.30,

邸月芹等.微流控浓度梯度液滴形成芯片及

其在蛋白结晶中的应用.《2010年微纳尺度分离和分析技术学术会议暨第六届全国微全分析学术会议》.2010,摘要,第1-2小节,图1-5.

李俊君等.微流控技术应用于蛋白质结晶的研究.《化学进展》.2009,第21卷(第5期),第1036页左栏第2段至第1038页左栏第2段.

审查员 皇甫洁琼

权利要求书2页 说明书6页 附图3页

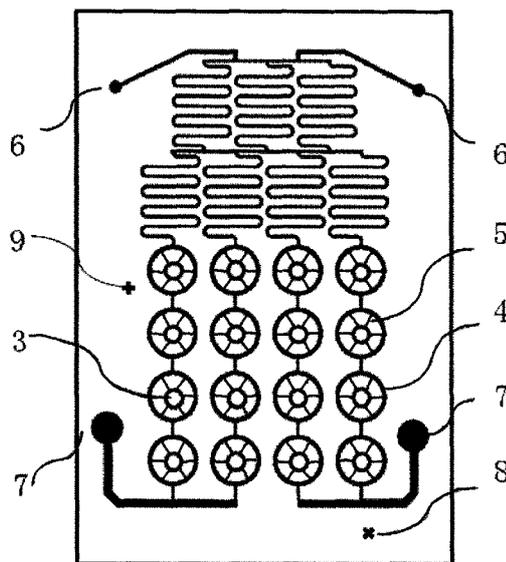
(54)发明名称

恒流扩散的蛋白质结晶方法和开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片及其制作方法和应用

(57)摘要

本发明涉及基于恒流扩散的蛋白质结晶方法和开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片及其制作方法和应用。所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,包括一个基底和固定在基底上的基片;基片上分布有若干个与外界环境相通的孔形蛋白质结晶单元,形成结晶单元阵列;基片上也分布有若干个微流主通道;每个结晶单元通过辐射状的微流扩散通道与相应的微流主通道相联通。蛋白质溶液以恒流的方式注入到微流主通道中,而在开放式结晶单元中的沉淀剂溶液是不流动的。本发明的优点是:1.在微流主通道与结晶单元间保持高的蛋白质浓度梯度,使蛋白质分子源源不断地扩散到结晶单元中,因而蛋白质结晶速度快,晶体簇群密度高;2.在结晶单元中形成的蛋白晶体不受到剪切力作用,并能方便地被提取和分析;3.蛋白质耗量少、操作灵活、适用于结晶条件的高通筛选;4.芯片的制作简单,结构

紧凑,成本低,并可大批量生产。



1. 一种开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,它包括一个基底(2)和固定在基底(2)上的基片(1);所述基片(1)上分布有若干个孔形的蛋白质结晶单元(3);每个蛋白质结晶单元(3)一端有朝上开放的上口(3.1),另一端下口朝向基底(2)表面;若干个蛋白质结晶单元(3)组成开放式结晶单元阵列;基片(1)与基底(2)相结合的平面上有环状微流主通道(4)和辐射状微流扩散通道(5);所述辐射状微流扩散通道(5)使每个蛋白质结晶单元与相对应的环状微流主通道(4)相联通;蛋白质溶液由入口(6)注入,流经环状微流主通道(4)后由出口(7)流出;环状微流主通道(4)中的蛋白质分子通过辐射状微流扩散通道(5)进入蛋白质结晶单元(3),并与其中沉淀溶液作用产生蛋白质晶核并使之生长;所述沉淀溶液由蛋白质结晶单元(3)的上口(3.1)注入,并与外界环境相通,用于调控结晶时所需的湿度。

2. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,每个蛋白质结晶单元(3)由一个环状微流主通道(4)包围,并由辐射状微流扩散通道(5)联通蛋白质结晶单元(3)和环状微流主通道(4),通过调控环状微流主通道(4)中蛋白质液体的浓度、流速及进样频率来改变结晶条件,用于实现多通道的蛋白分子浓度梯度,使蛋白分子定时、定量释放,实现高通量的结晶条件筛选。

3. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,蛋白质结晶单元(3)是开放式的,通过其上口(3.1)以加入不同浓度或不同体积或不同种类的沉淀剂的溶液,用于实现高通量的结晶条件筛选。

4. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,蛋白质结晶单元(3)是开放式的,而蛋白质溶液被连续注入到微流主通道(4)中,使蛋白质分子通过辐射状微流扩散通道(5)源源不断地进入蛋白质结晶单元(3),形成在微流主通道和结晶单元间稳定的蛋白质浓度梯度,提高了蛋白质结晶速率和产量。

5. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,在整个结晶过程中,蛋白质结晶单元(3)内的液体是不流动的,已形成的蛋白质晶体始终处于零剪切力的状态,保持了其稳定性并能产生高密度簇群的蛋白质晶体。

6. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,辐射状微流扩散通道(5)在基片(1)与基底(2)相结合的平面上,也可以在基片(1)中间。

7. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,所述环状微流主通道(4)、辐射状微流扩散通道(5)和蛋白质结晶单元(3)阵列均用标准的微纳加工方法制作。

8. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,构成蛋白质结晶单元阵列的基片(1)材料选自于聚合物聚二甲基硅氧烷PDMS,或热塑性材料聚甲基丙烯酸甲酯PMMA,或聚碳酸西言PC,或聚苯乙烯PS、石英或玻璃或硅片,或两种以上材料的组合;基底(2)材料为玻璃或石英或硅片。

9. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,辐射状微流扩散通道(5)的高度小于等于5微米,宽度小于等于5微米;环状微流主通道(4)的高度小于等于200微米,宽度小于等于500微米;蛋白质结晶单元(3)的直径大于等于0.1毫米,小于等于10毫米,高度小于等于8毫米。

10. 如权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,辐射状微

流主通道(5)和蛋白质结晶单元(3)的表面可作选择性的亲水或疏水处理。

11.一种开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,它包括一个基底(2)和固定在基底(2)上的基片(1);所述基片(1)上分布有若干个孔形的蛋白质结晶单元(3);每个蛋白质结晶单元(3)一端有朝上开放的上口(3.1),另一端下口朝向基底(2)表面;若干个蛋白质结晶单元(3)组成开放式蛋白质结晶单元阵列;基片(1)与基底(2)相结合的平面上有平行的环状微流主通道(4)和辐射状微流扩散通道阵列(5);所述辐射状微流扩散通道(5)使每个蛋白质结晶单元与相应的环状微流主通道(4)相联通;每个蛋白质结晶单元(3)的上口(3.1)与外界环境相通,用于调控结晶时所需的湿度。

12.一种权利要求1所述开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片的制作方法,其特征在于,包括以下步骤:

A、制作基片(1):

1)制作阳模:

先绘图并制作光学模板,包括环状微流主通道(4)和辐射状微流扩散通道(5)及蛋白质结晶单元(3),并附加不同对准图标(8、9);然后用光学曝光和/或离子刻蚀的方法制作包括环状微流主通道(4)和辐射状微流扩散通道(5)的阳模;

2)模制成型基片:

通过软光刻和热压印的方法复制阳模,制成具有环状微流主通道(4)和辐射状微流扩散通道(5)及有对准图标(8、9)结构的PDMS,或PMMA,或PC,或PS基片;

3)加工蛋白质结晶单元(3)和流体进出口(6、7):

通过微细加工机床定位打通基片(1)上的各蛋白质结晶单元(3)和相应流体进出口(6、7);

B、键合基片(1)和基底(2):

将具有环状微流主通道(4)和辐射状微流扩散通道(5)及蛋白质结晶单元(3)阵列的基片(1)键合到基底(2)表面上。

13.一种权利要求1所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片用于蛋白质结晶条件高通筛选的应用方法,其特征在于,包括如下步骤:

1)将制作好的蛋白质结晶阵列芯片用超净去离子水清洗;

2)配置两种浓度不同的蛋白溶液;

3)用注射泵在两个流体进口(6)分别注入这两种蛋白质溶液;

4)当微流扩散通道内充满蛋白质溶液后,通过各个蛋白质结晶单元(3)的上口(3.1)分别注入相同体积但沉淀剂浓度不同的溶液;

5)在上述步骤完成后,通过注射泵向流体进口(6)持续注入蛋白质溶液。

恒流扩散的蛋白质结晶方法和开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片及其制作方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高效地获得蛋白质结晶的方法及结晶条件筛选,蛋白质结晶是全面了解蛋白质高级结构和功能最直接和有效的方法,对研究生物学过程和新药设计有着重要意义,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 蛋白质结构与功能的研究对了解分子水平上的生命过程和新药设计有着十分重要的意义。而蛋白质的晶体解析是全面了解蛋白质三维结构最直接和有效的方法,因而受到人们的广泛关注。

[0003] 为高效获得可用于晶体解析的蛋白质结晶体,需要利用少量的蛋白质溶液进行合理的条件筛选(如蛋白质溶液浓度、沉淀剂浓度、溶液的pH、温度、缓冲溶液的类型等)。传统的方法是通过大量试验去筛选合适的结晶条件,但由于蛋白质的结晶条件相当苛刻,而晶体形成的过程十分耗时的,需要对多个变量进行调节,所以蛋白质溶液的用量一般较大,代价昂贵。事实上,目前能够结晶并了解其三维结构的蛋白质只占已知有功能的蛋白质中极少的一部分。因而,如何迅速、高效地的筛选出蛋白质结晶的条件,是当前生命科学的重大课题之一。

[0004] 微流控芯片技术用于蛋白质的结晶条件的筛选具有一定的优势,如:

[0005] (1) 减少单个试验所需的样品量;

[0006] (2) 增加条件试验的总数;

[0007] (3) 对影响蛋白质结晶的变量进行较系统的研究;

[0008] (4) 加快试验速度等。目前,国内外研究用微流控芯片实现蛋白质结晶 有以下几类主要思路:

[0009] (1) 利用阀门控制的微流芯片中实现条件筛选(S.R.Quake等,Proc.Natl.Acad.Sci,USA2002,99,16531;Proc.Natl.Acad.Sci,USA2004,101,14431);

[0010] (2) 利用液滴法引入沉淀剂、缓冲溶液和待结晶蛋白质的溶液,从而实现条件筛选(R.F.Ismagilov等,J.Am.Chem.Soc.2003,125,11170;Proc.Natl.Acad.Sci,USA2006,103,19243);

[0011] (3) 利用微流芯片中的透析过程实现蛋白质的结晶过程(S.Fraden等,Cryst.GrowthDes.2007,7,2192);

[0012] (4) 利用滑动微流芯片(SlipChip)的方式实现不同溶液的混合(R.F.Ismagilov等,Lab Chip2009,9,2286)。

[0013] 以上试验中一个普遍的问题在于,在液体体积不变的情况下,所含蛋白质分子的总量是十分有限的,难以促使蛋白质分子结晶。如果增加蛋白质的浓度,可以增加其结晶的效率,但所得的蛋白质晶体体积小,簇群密度低,因而较难直接用于衍射分析。基于此,本发明提供一种基于恒流扩散的蛋白质结晶方法和一种开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,

它不仅能用于迅速和高效地获得蛋白质结晶体,而且可用于蛋白质结晶条件的高通筛选。

发明内容

[0014] 本发明的目的在于,克服现有技术的缺点,提供基于恒流扩散的蛋白质结晶方法和开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片及其制作方法和高通筛选的应用。所述恒流扩散蛋白质结晶方法,其特征在于,利用微流控的方法,产生稳定和高的蛋白质溶液浓度梯度,进而调控蛋白质结晶的动力学过程。所述蛋白质结晶阵列芯片由多个重复的开放式蛋白质结晶单元阵列构成,每个蛋白质结晶单元均由微流扩散通道与微流主通道联通,结晶单元为开放式的,形成的蛋白结晶体不会受到剪切力,并能方便地被提取和分析;蛋白质溶液被连续注入到微流主通道中,使蛋白质分子通过扩散通道源源不断地进入结晶单元,并保持在微流主通道和结晶单元间高的蛋白质分子浓度梯度,蛋白质分子进入结晶单元后与沉淀溶液作用而结晶形成蛋白质结晶的簇群;而在同一芯片上设计的微流主通道可以是平行多路,以产生不同浓度或不同种类的蛋白质液体,实现蛋白质结晶条件的高通筛选,同时,芯片结构紧凑,且成本低,并可大批量生产;制作方法简单,易于操作;因此,本发明提供的蛋白质结晶方法是高效的,具有一定的普适性。

[0015] 本发明的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片一种技术方案是:

[0016] 开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片包括一个基底和固定在基底上的基片;所述基片上分布有若干个开放式孔形蛋白质结晶单元;每个单元一端有朝上开放的上口,另一端下口朝向基底表面;若干个结晶单元组成蛋白质结晶单元阵列;基片与基底相结合的平面上设有包埋式微流主通道和辐射状微流扩散通道阵列;所述微流扩散通道使每个蛋白质结晶单元与相对应的微流主通道联通;每个蛋白质结晶单元上口与外界环境相通,用于调控结晶时所需的湿度。

[0017] 在上述技术方案基础上更进一步的技术方案是:

[0018] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其蛋白质结晶单元由圆形或多边形微流主通道包围,辐射状微流扩散通道使每个蛋白质结晶单元与相应的微流主通道联通,实现蛋白质分子在微流主通道与结晶单元间的扩散。

[0019] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其微流主通道中蛋白质液体的浓度、流速及进样频率是可调控的,用于实现多通道的蛋白分子浓度梯度,使蛋白分子定时、定量释放,实现高通量的结晶条件筛选。

[0020] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,结晶单元是开放式的,通过其上口可以加入不同浓度或不同体积或不同种类的沉淀剂的溶液,用于实现高通量的结晶条件筛选;而其蛋白质溶液被连续注入到微流主通道中,形成在微流主通道和结晶单元间稳定而高的蛋白质分子浓度梯度,使蛋白质分子通过扩散通道源源不断地进入结晶单元,以保持高的蛋白质结晶速率和产量。

[0021] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,整个结晶过程中,其结晶单元内的液体是不流动的,已形成的蛋白质结晶体始终处于零剪切力的状态,保持了其稳定性并能产生高密度簇群的蛋白质结晶体。

[0022] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其微流主通道的设计是灵活多样的,可以在同一芯片进行不同种蛋白质分子或同一种蛋白质分子不同浓度的蛋白质结晶实

验。

[0023] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其微流主通道、扩散通道和结晶单元阵列均可用标准的微纳加工方法制作。

[0024] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其构成蛋白质结晶单元阵列的基片材料选自于聚合物聚二甲基硅氧烷PDMS,或热塑性材料聚甲基丙烯酸甲酯PMMA,或聚碳酸酯PC,或聚苯乙烯PS,或石英,或玻璃,或其它固体材料,或两种或两种以上材料的组合。基底材料为玻璃,也可为其它固体材料,如石英、硅片等。

[0025] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其扩散通道的高度小于等于5微米,宽度小于等于5微米;微流主通道的高度小于等于200微米,宽度小于等于500微米;结晶单元的直径大于等于0.1毫米,小于等于10毫米,高度小于等于8毫米。

[0026] 所述的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片,其特征在于,微流主通道和蛋白质结晶单元的表面可作选择性的亲水或疏水处理。

[0027] 本发明的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片另一种技术方案是:

[0028] 它包括一个基底和固定在基底上的基片;所述基片上分布有若干个孔形的蛋白质结晶单元;每个蛋白质结晶单元一端有朝上开放的上口,另一端下口朝向基底表面;若干个蛋白质结晶单元组成开放式蛋白质结晶单元阵列;基片与基底相结合的平面上有平行的微流主通道和辐射状微流扩散通道阵列;所述微流扩散通道使每个蛋白质结晶单元与相对应的微流主通道相联通;每个蛋白质结晶单元上口与外界环境相通,用于调控所需的结晶湿度。

[0029] 本发明的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片制作方法的技术方案是:包括以下步骤:

[0030] A、制作基片:

[0031] 1) 制作阳模:

[0032] 先绘图并制作光学模板,包括微流主通道和微流扩散通道及蛋白质结晶单元,并附加不同对准图标;然后用光学曝光和/或离子刻蚀的方法制作包括微流主通道和微流扩散通道的阳模;

[0033] 2) 基片成型:

[0034] 通过软光刻和热压印的方法复制阳模,制成具有微流主通道和微流扩散通道及具有蛋白质结晶单元相对位置对准图标标记的PDMS,或PMMA,或PC,或PS基片;

[0035] 3) 加工蛋白质结晶单元和流体进出口:通过微细加工机床定位打通基片上的各蛋白质结晶单元和相应流体进出口;B、基片与基底粘合:将具有微流主通道和微流扩散通道及蛋白质结晶单元的阵列基片粘合到基底表面上。

[0036] 本发明的开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片进行溶菌酶蛋白结晶条件的筛选试验,包括如下步骤:

[0037] 1) 利用蠕动泵或注射泵在进液口分别通入两种不同浓度的溶菌酶蛋白质水溶液(25毫克/毫升和150毫克/毫升),使主通道中蛋白质浓度控制在25-150毫克/毫升,注射速度控制在0.5-8微升/分;

[0038] 2) 在蛋白质结晶单元中加入沉淀溶液(沉淀剂和缓冲溶液的混合液),控制沉淀剂浓度在0.5-5摩尔/升,溶液pH在4-7之间;

[0039] 3) 继续通入蛋白质水溶液,保持注射速度(或蠕动进样速度),在出液口将蛋白质水溶液进行收集并重新注入进液口,保持进样1-24小时。

[0040] 所述的沉淀剂选自氯化钠,磷酸钠,氯化钙。缓冲溶液选自醋酸钠/醋酸,磷酸/磷酸二氢钠。

[0041] 本发明的技术效果显著:基于扩散控制的蛋白质结晶方法和开放式恒流扩散制作的蛋白质结晶阵列芯片可用于高效蛋白质结晶实验或蛋白质结晶条件的高通量筛选。在整个结晶过程中,蛋白质溶液在微流主通道中连续流动,通过扩散进入开放式的蛋白质结晶单元,并保持动态的高浓度梯度,从而显著提高了结晶效率;由于进入结晶单元的蛋白质分子量不再受结晶单元大小的限制,所得到的蛋白质结晶具有晶体尺寸大、结晶速率高和簇群密度大等优点;结晶单元中的液体是不流动的,故作用于蛋白质结晶体的剪切力为零;每个结晶单元上口与外界是相通的,以保证蛋白质结晶所需的湿度环境和结晶产物的方便提取或分析;通过调控微流主通道中蛋白质溶液的浓度、流速及进样频率,可改变结晶条件,实现高通筛。相对于传统的蛋白质结晶体系而言,基于微流扩散的结晶阵列芯片可更好地用于结晶条件的筛选,且结晶速率高,晶体簇群密度大;相对于现行的微流芯片而言,开放式恒流扩散阵列芯片避免了蛋白质液体体积的限制,可在正常浓度条件下完成优质的结晶工作和分析;根据具体实验的需要,可改变微流主通道的设计方案,通过微流控在同一芯片上实现不同浓度或不同蛋白质结晶的实验;本发明特别适用于蛋白质三维结构的发现和相应药物靶点的筛选;最后,该类芯片的制作简单,结构紧凑,成本低,适用性强,并能大批量生产。

附图说明:

[0042] 图1为本发明开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片仰视示意图;是从下向上仰视结晶阵列基片1粘合到基底2平面上的蛋白质结晶芯片全图,该图还展示了包埋式微流主通道4、扩散通道5、开放式结晶单元3、蛋白质溶液的进口6和出口7及对位图案8,9的位置;

[0043] 图2为图1单个结晶单元俯视示意图,展示了结晶单元3、微流主通道4和扩散通道5在芯片基底2上的相对位置;

[0044] 图3为图2的A-A剖视示意图,显示了结晶单元3、结晶单元上口3.1、微流主通道4、扩散通道5在芯片基底2上的相对位置;

[0045] 图4为本发明开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片功能结构的俯视示意图;展示了结晶单元3、微流主通道4和扩散通道5的相对位置;还展示了蛋白质液体进口6和出口7以及对位图案8和对位图案9的相对位置;

[0046] 图5为本发明开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片中的微流主通道俯视图;两种不同浓度的蛋白质溶液分别注入到芯片上端的两个入口处6,通过两级分流结构10和微流混合结构11,得到四种不同浓度的蛋白质溶液,分别送入四个平行的微流主通道中,最后经出口7流出。所示微流主通道分别由四个环形通道串联而成;

[0047] 图6为本发明开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片中的扩散通道阵列俯视图,展示了对位图案8和对位图案9的相对位置,每个单元六条辐射型扩散通道5形成,以保证相对应的蛋白质结晶单元和环形微流主通道的联通。

[0048] 图中各附图标记的名称为:1-蛋白质结晶芯片基片;2-芯片基底;3-蛋白质结晶单

元;4-微流主通道;5-扩散通道;6-蛋白质液体进口;7-蛋白质液体出口;8-X字型对位图案;9-十字型对位图案;10-微型分流结构;11-微流混合结构。

[0049] 实施方案:

[0050] 下边结合实施例对本发明的1) 芯片制备步骤和2) 蛋白质结晶条件筛选步骤作进一步描述。

[0051] 实施例1:

[0052] 图1-6所示,是本发明恒流扩散的蛋白质结晶方法和开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片第一个较优的实施例。

[0053] 所述开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片含有4x4蛋白质结晶单元,基本材料使用孔聚二甲基硅氧烷(PDMS),其制备采用如下步骤:

[0054] 1) 用L-Edit绘图并制作如图4和图5的光学模板:主要包括两部分:图5为主通道设计图,图6为扩散通道设计图。其中,主通道宽度为100微米,扩散通道宽度为5微米。

[0055] 2) 设计图案的模具的制作:将硅片分别用异丙醇和丙酮各超声清洗5分钟,以浓硫酸和双氧水混合液(1:10体积比)煮沸20分钟。冷却后取出,再用去离子水冲洗干净,氮气吹干。置于200℃烘箱中1小时。将SU8-2005涂满与清洗过的硅片上,并将硅片置于水平台面上静置20分钟,去除光刻胶里的微小气泡,然后将其置于旋涂机的旋转台上,以500转/分甩涂5秒,再以3000转/分的速率甩涂30秒。取出旋涂好的硅片,置于95℃热板10分钟烘干。按照图4掩版进行曝光,之后继续在95℃热板上烘10分钟。以SU8-2030光刻胶重复这一过程并以图3掩版进行曝光。将完成曝光的硅片浸入显影液8分钟,从而在硅片上得到设计图案的模具,异丙醇清洗后用丙酮漂洗,去离子水冲洗,氮气吹干,并放入85℃烘箱进行热烘10分钟。最后用三甲基氯硅烷(TMCS)对模具进行表面改性处理。

[0056] 3) 主通道和扩散通道的制造:将PDMS预聚体和固化剂以10:1的比例充分混合,抽真空除气15分钟后浇注于模具上并置于85℃热板上加热60分钟以上,将固化的PDMS从模具上剥离。

[0057] 4) 通过微细加工铣床用1毫米针头对位打孔。

[0058] 5) 按照图4所示用直径为2毫米的打孔器依次打孔,制作蛋白质结晶单元阵列,并用直径为1毫米的打孔器制作相应流体进出口。

[0059] 6) 芯片组装:将PDMS待键合面向上放入等离子清洗机中,同时将用于芯片载物层的玻璃片放入等离子清洗机中,抽真空至400Pa,进行等离子处理2.5分钟。取出PDMS和玻璃片,将PDMS与玻璃的待键合面贴合并轻轻挤压,再将芯片放入80℃烘箱半小时以确保键合良好。由此得到可用于蛋白质结晶条件筛选试验的微流控芯片,如图1。

[0060] 实施例2:

[0061] 图1-6所示,是本发明恒流扩散的蛋白质结晶方法和开放式恒流扩散蛋白质结晶阵列芯片用于溶菌酶蛋白结晶条件的筛选试验,采用如下步骤:

[0062] 1) 配置20毫克/毫升与120毫克/毫升的溶菌酶蛋白溶液,利用循环注射泵在进液口同时通入这两种蛋白质水溶液,注射速度设为8微升/分。

[0063] 2) 待芯片的扩散管里充满蛋白质溶液后将16个结晶单元中按照不同浓度条件加入NaCl溶液及CH₃COONa/CH₃COOH混合溶液(NaCl的典型浓度范围0.5摩尔/升-4摩尔/升,CH₃COONa/CH₃COOH混合溶液的比例范围1:1-10:1)。

[0064] 3)以注射速度1微升/分继续通入蛋白质水溶液,并保持进样,10小时后,用光学显微镜观察,发现在结晶单元中形成了蛋白质的结晶体,晶体呈六方对称性,直径约为50微米。

[0065] 本发明权利要求保护范围不限于上述实施例。

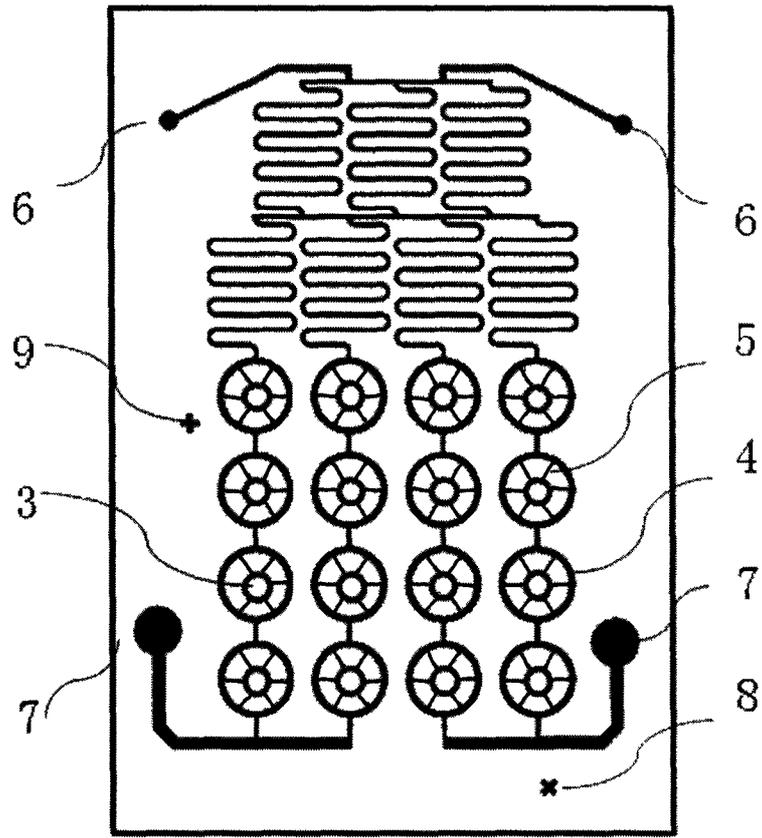


图1

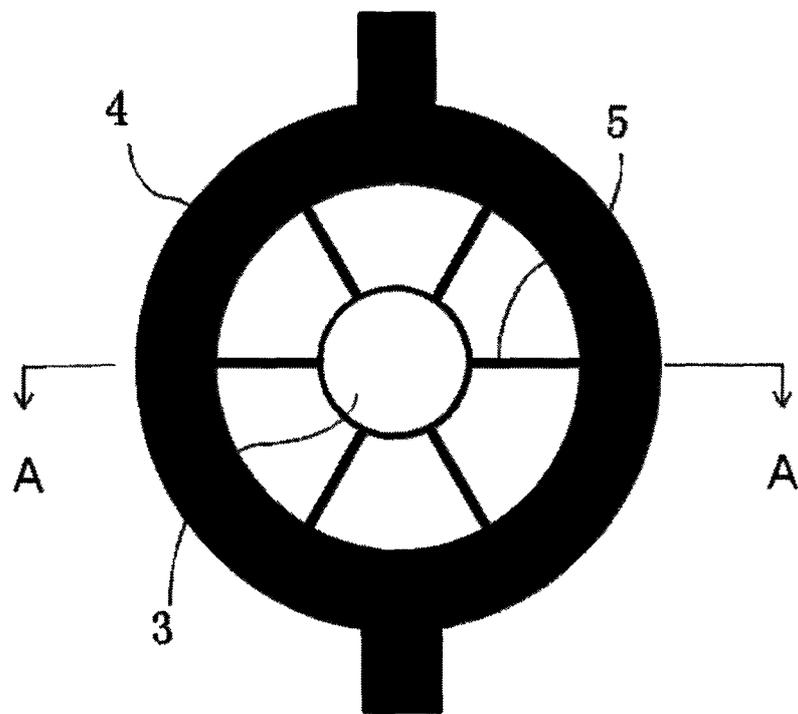


图2

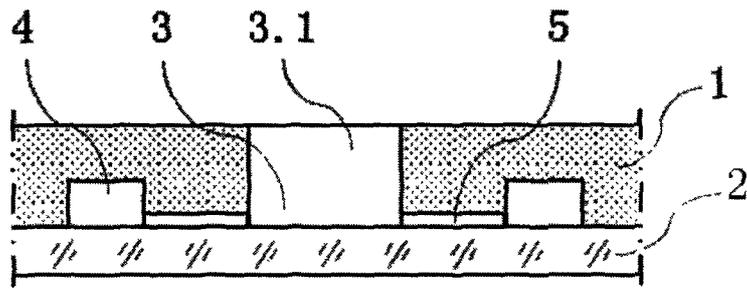


图3

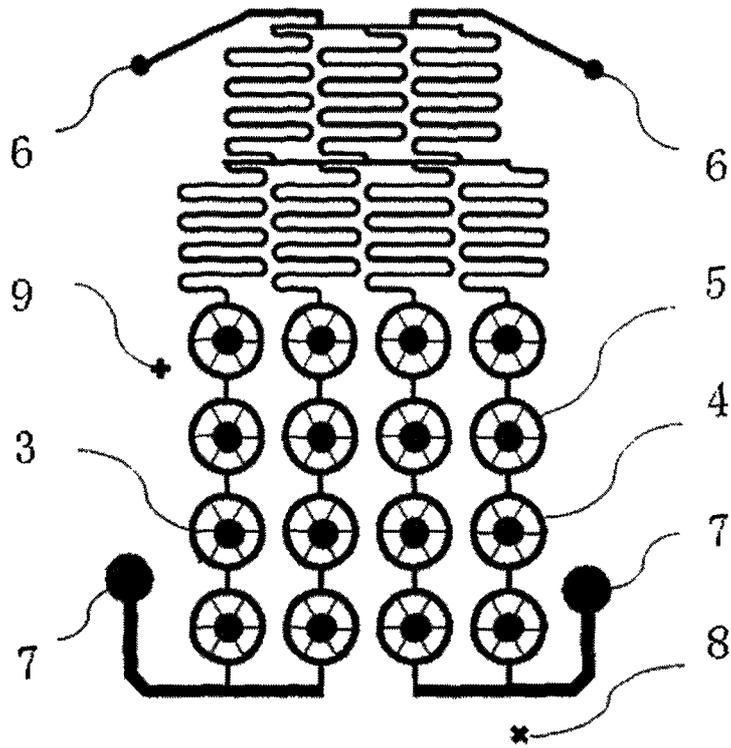


图4

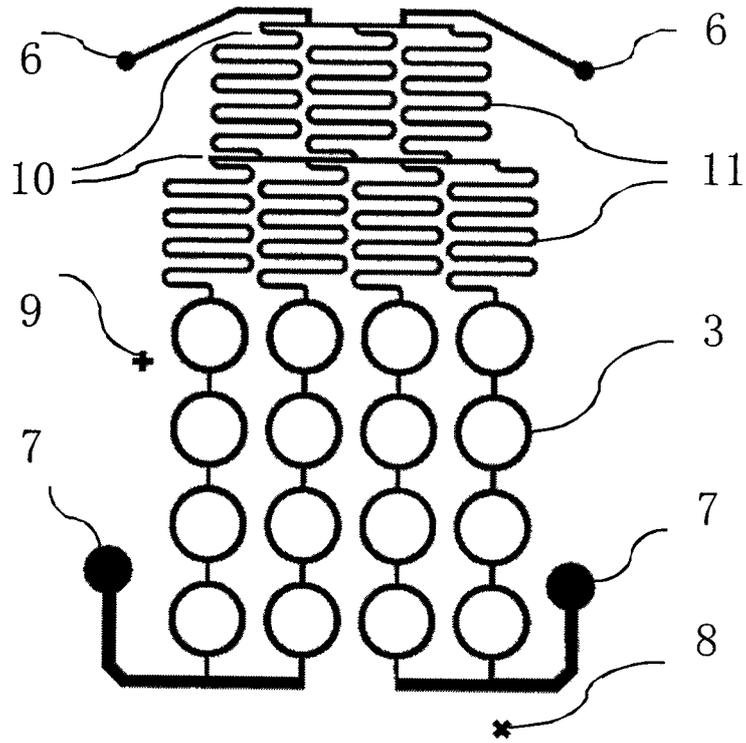


图5

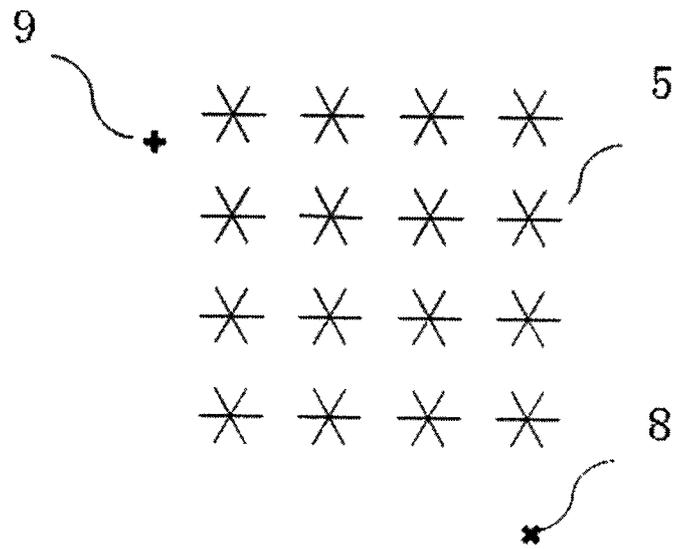


图6