



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102352053 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 15

(21) 申请号 201110310166. X

C12N 15/10(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 10. 13

C12Q 1/68(2006. 01)

(71) 申请人 吉林大学

G01N 21/64(2006. 01)

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699
号

G01N 33/68(2006. 01)

(72) 发明人 吴立新 马英一 梁静 孙航

(74) 专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任
公司 22201

代理人 张景林 刘喜生

(51) Int. Cl.

C08J 9/28(2006. 01)

C08L 89/00(2006. 01)

C08L 25/06(2006. 01)

C08L 33/12(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

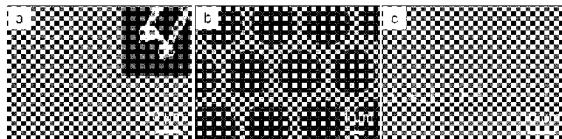
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

构筑基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构的方
法

(57) 摘要

本发明属于蛋白定位组装及图案化技术领
域,涉及一种通过微乳液制备蛋白图案化结构
的方法。包括蛋白水溶液和聚合物有机溶液的制
备、蛋白水溶液和聚合物有机溶液混合、微乳化后
浇铸成膜等步骤。本发明所述方法采用的设备简
单、条件温和、周期短,有序的多孔薄膜和蛋白图
案化结构同时形成,从而不需要复杂的实验步骤
来实现蛋白的引入;被图案化的蛋白的活性依然
存在,可以与特定的抗体进行反应,因此可以应
用于不同蛋白间的识别;此外这种方法还可应用于
水溶性的无机簇、纳米粒子等其他体系,该蛋白图
案化结构能够作为筛选不同蛋白的媒介,在细胞
的可控生长、生物传感器制备和组织工程材料等
领域具有重要的应用价值。



1. 一种构筑基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构的方法,其步骤如下:
 - 1) 将蛋白溶于二次水中,得到浓度为 5mg/mL 的蛋白水溶液;
 - 2) 将聚合物和表面活性剂以 20 : 1 ~ 120 : 1 的质量比混合后溶于有机溶剂中,制备浓度为 6mg/mL 的聚合物溶液;
 - 3) 将蛋白水溶液与聚合物溶液以 1 : 20 的体积比混合,震荡至溶液呈微乳白色,得到微乳液;
 - 4) 将步骤 3) 得到的微乳液在湿度为 30%~40%、温度为 25~30℃的环境中浇铸在清洗过的平滑基底上成膜,得到孔径为 3~10 μm 的有序多孔膜,蛋白富集在有序多孔膜中孔的底部,从而得到有序的蛋白图案化结构。
2. 如权利要求 1 所述的一种构筑基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构的方法,其特征在于:蛋白为牛血清白蛋白、牛血清白蛋白的一级抗体或荧光基团异硫氰酸荧光素共轭的牛血清白蛋白。
3. 如权利要求 1 所述的一种构筑基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构的方法,其特征在于:聚合物为聚苯乙烯或聚甲基丙烯酸甲酯,其分子量为 32~36 万。
4. 如权利要求 1 所述的一种构筑基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构的方法,其特征在于:有机溶剂为二氯甲烷。
5. 如权利要求 1 所述的一种构筑基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构的方法,其特征在于:表面活性剂为双十二烷基二甲基溴化铵。
6. 权利要求 1~5 所述方法构筑的基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构。
7. 权利要求 6 所述的基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构在蛋白筛分中的应用。

构筑基于聚合物薄膜的蛋白图案化结构的方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白定位组装及图案化技术领域,具体涉及一种通过微乳液制备蛋白图案化结构的简单而又快速的方法。此蛋白图案化结构能够作为筛分不同蛋白的媒介,在细胞的可控生长、生物传感器制备和组织工程材料等领域具有重要的应用价值。

背景技术

[0002] 有序图案化的蛋白,由于可以作为一种在特定微区域内研究蛋白与抗体以及其他生物分子相互作用的有效途径 (BLAWAS A S, REICHERT W M. Protein patterning, Biomaterials 1998, 19 :595–609), 近年来在生物传感器、医药器械、细胞的粘附与生长和组织工程等领域得到了广泛的关注 (MIN E, WONG K H, STENZEL M H. Microwells with patterned proteins by a self-assembly process using honeycomb-structured porous films, Adv. Mater. 2008, 20 :3550–3556)。目前被广泛应用的蛋白图案化制备技术主要包括光刻 (SORRIBAS H, PADESTEC, TIEFENAVER L. Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications, Biomaterials 2002, 23 :893–900)、软刻蚀 (WHITESIDES G M, XIA Y N. Soft lithography, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37 :550–575)、化学选择性吸附或沉积 (VEISEH M, ZAREIE M H, ZHANG M Q. Highly selective protein patterning on gold-silicon substrates for biosensor applications, Langmuir 2002, 18 :6671–6678) 以及等离子体刻蚀 (MUGURUMA H, TAKAHASHI H. Protein patterning on functionalized surface prepared by selective plasma polymerization, Surf. Coat. Technol. 2010, 205 :2490–2494) 等方法。利用这些方法可以制备出规整有序的蛋白图案化结构,但是这些方法大多要求较为严苛的实验条件和复杂的实验步骤,在一定程度上限制了其应用。因此需要发展新的制备有序蛋白图案化的简便方法。

[0003] 自 Francois 等首次以星形聚苯乙烯为膜材质,在高湿度环境中获得蜂窝状图案化结构以来,以水滴为模板的呼吸图案化 (Breath Figure) 方法因其操作步骤简单、实验条件温和快速等优点受到了国内外学者的广泛关注 (WIDAWSKI G, RAWISO M, FRANCOIS B. Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films, Nature 1994, 369 :387–389), 并发展出各种各样的成膜材料。此方法是在潮湿的环境中,利用水蒸气在铺展在固体或者水表面的聚合物溶液的表面冷凝形成水珠并在表面张力作用下产生规则排列。当水珠和溶剂完全挥发后,在固化的聚合物膜上就形成了有序蜂窝状微孔结构。改变实验条件可以调节孔洞的尺寸以及有序性。采用不同的成膜材料、掺杂材料以及实验参数实现了多孔结构的各种应用 (孙航, 吴立新. 水滴模板法构筑蜂窝状有序多孔膜, 化学进展 2010, 22 :1784–1798)。金属纳米粒子、二氧化硅和聚合物小球以及多金属氧簇等也通过这种方法被引入到多孔结构中。最近这种方法经过改进也可以应用到蛋白图案化结构的制备中来。但是在此过程中,蛋白的引入需要在制得有序多孔结构的基础上,通过多步化学反应修饰的手段实现 (ZHANG Y, WANG C. Micropatterning of proteins on 3D porous

polymer films fabricated by using the breath-figure method, *Adv. Mater.* 2007, 19 : 913-916)。这种孔洞内定位修饰涉及到较为复杂的实验步骤,而且蛋白在孔洞外的分布也不可避免。因此,发展更为简便的蛋白图案化方法,使其能够在保持水滴模板制备有序多孔结构的简单方便特性的同时,实现蛋白的图案化。这对于实现图案化蛋白的应用是非常重要的。

[0004] 人们曾经试图改进呼吸图案化方法,即通过将水引入到有机溶液中(或者相反的过程)形成乳状液,然后浇铸成膜(NISHIKAWA T, NISHIDA J, OOKURA R, NISHIMURA S I, SCHEUMANN V, ZIZLSPERGER M, LAWALL R, KNOLL, W, SHIMOMURA M. Web-structured films of an amphiphilic polymer from water in oil emulsion :fabrication and characterization, *Langmuir* 2000, 16 :1337-1342)。也有报道通过乳液的方法将蛋白定位到孔结构内(ZHANG WX, MENG X L, LI JW, KE B B, CHEN P C, XU Z K, WAN L S. Macroporous, protein-containing films casting from water-in-oil emulsions featuring a block-copolymer, *Soft Matter* 2011, 7 :4221-4227)。但是到目前为止,得到的多孔膜一方面有序性较差,孔结构分布不均匀,另一方面蛋白的分布不理想,不能很好的将蛋白定位在孔结构内。尽管改变不同的实验条件如溶剂、湿度、含水量等,多孔结构的有序性依然不好(WANG M T, LEI Y, ZHANG L D, WANG S X. Mesoscopic self-assembling morphology of polymer based on emulsification, *Mater. Res. Bull.* 2000, 35 :1625-1630),使得这些改进难以实用化。其中的原因主要是聚合物两亲性、水滴稳定剂、溶剂等成膜条件的优化等没有达到合适的控制条件。

[0005] 考虑到表面孔结构的尺度范围、应用条件和水滴模板的生长平衡,如果能够选择更常用的聚合物溶液体系,将预先结合了蛋白的乳液滴保持在更小的尺度上,然后将得到的乳液浇铸成膜,那么表面结构会由于水滴的生长平衡而更有序,而且水滴中的蛋白会随着水滴的挥发保留在形成的多孔结构底部。这样就既可以避免水滴的扩散,实现简捷而又快速的表面蛋白图案化结构聚合物膜的制备,又能获得尺度均一的有序结构。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种简便易行的制备尺度均一和有序的蛋白图案化结构的方法及其在识别不同蛋白方面的应用。

[0007] 作为一种制备多孔结构的方法,乳液法由于其制得的多孔结构中孔洞的规则度和有序性不好,所以以其为基础制备多孔结构的报道并不多见。本发明通过选择合适的聚合物和水溶液体系,应用微乳液法制备出有序的多孔结构聚合物膜以及在此聚合物膜基础上得到蛋白图案化结构,并且应用所得蛋白图案化结构对不同的蛋白进行识别。

[0008] 本发明点在于蛋白被预先溶解在水中,然后与聚合物的有机溶液混合,混合溶液经微乳化后滴在干净的固体基底上,随着有机溶剂的挥发,溶液表面的温度下降,所以在溶液内部与表面形成温度梯度,进而导致溶液内部对流作用的形成,相邻的水滴间会在这种对流的作用下碰撞、融合并长大,长大后的水滴在对流以及热毛细的作用下以能量最低的原理形成六方密堆积排列,待有机溶剂和水全部挥发后,蛋白留在水滴形成的模板位置,也就是孔洞底部。这样,有序的多孔结构膜和蛋白图案化结构同时形成,从而实现了一步直接制备蛋白图案化结构。

[0009] 本发明包括以下步骤：

[0010] 1) 将蛋白溶于二次水中,得到浓度为 5mg/mL 的蛋白水溶液；

[0011] 2) 将聚合物和表面活性剂以 20 : 1 ~ 120 : 1 的质量比混合后溶于有机溶剂中,制备浓度为 6mg/mL 的聚合物溶液；

[0012] 3) 将蛋白水溶液与聚合物溶液以 1 : 20 的体积比混合,震荡至溶液呈微乳白色,得到微乳液；

[0013] 4) 将步骤 3) 得到的微乳液在湿度为 30% ~ 40%、温度为 25 ~ 30℃的环境中浇铸在清洗过的平滑基底（包括玻璃、石英或硅等）上成膜,得到孔径为 3 ~ 10 μm 的有序多孔膜,与此同时,蛋白富集在有序多孔膜中孔的底部,从而得到有序的蛋白图案化结构。

[0014] 所述蛋白为牛血清白蛋白（简称为 BSA）,聚合物为聚苯乙烯（简称为 PS）或聚甲基丙烯酸甲酯（简称为 PMMA）,分子量为 32 ~ 36 万;有机溶剂为二氯甲烷;表面活性剂为双十二烷基二甲基溴化铵（简称为 DDAB）。

[0015] 有序的蛋白图案化可用于不同蛋白的识别。

[0016] 本发明采用的设备简单,方法操作便利,制备条件温和,快捷,得到的多孔结构以及蛋白图案规整有序。将蛋白预先溶解在水中的方法省去了通常引入蛋白所涉及的复杂步骤,同时,所引入的蛋白的活性依然保持,可对特定的抗体进行识别。得到的蛋白图案化结构也可用来识别不同的蛋白质。Bernard 等通过蛋白与抗体间的识别作用实现了对特定蛋白的分离 (BERNARD A, FITZLI D, SONDEREGER P, DELAMARCHE E, MICHEL B, BOSSHARD H R, BIEBUYCKH. Affinity capture of proteins from solution and their dissociation by contact printing, Nat. Biotechnol. 2001, 19 ;866-869)。通过利用本发明所制得的蛋白图案化结构,可以用极少量的抗体实现对特定蛋白的分离或检测。此外,本发明也可应用于其他水溶性的生物分子如其他蛋白（血红蛋白、溶菌酶等）或者其抗体、组成 DNA 序列中的某一段寡核苷酸等的图案化及其所识别的特定物质的检测与分离,而且制得的寡核苷酸有序排列还可通过与互补序列进行识别实现有序孔洞中 DNA 的合成与检测。

附图说明

[0017] 图 1 :实施例 1 制备得到的多孔结构的扫描电镜照片；

[0018] 图 2 :用荧光基团标记的蛋白得到的图案化结构的激光共聚焦显微镜照片；

[0019] 图 3 :用普通蛋白制得的蛋白的图案化结构浸入不同蛋白的混合溶液后的激光共聚焦显微镜照片。

具体实施方式

[0020] 本发明所述聚合物为 PS 和 PMMA。

[0021] 有序的蛋白图案化结构用于识别不同蛋白的过程 :将制得的有序多孔结构膜浸入不同荧光基团标记的两种蛋白的混合溶液中,4℃冰箱中放置 12 小时后,用磷酸盐缓冲溶液（简称为 PBS）清洗数次,用激光共聚焦显微镜观察。

[0022] 以下实施实例对本发明做更详细的描述,但所述实例不构成对本发明的限制。

[0023] 实施例 1

[0024] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中,30mg PS(分子量为 35 万) 和 0.33mgDDAB 溶解

在 5mL 二氯甲烷中, 取 50 μL 蛋白水溶液与 1mL 聚合物溶液混合, 振荡至溶液呈微乳白色, 得到微乳液, 在湿度为 35%, 温度为 25℃ 条件下将 20 μL 得到的微乳液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后, 在留下的聚合物膜表面得到孔径约为 5 μm 的有序多孔结构。

[0025] 附图 1 是得到的多孔结构的扫描电镜照片。图 1a 是大面积的扫描电镜照片, 说明得到的多孔结构大面积有序, 插图表明所得到的膜可以从基底上揭掉。

[0026] 图 1b 是选定区域放大后的扫描电镜照片, 说明得到的多孔结构中, 孔洞呈六方密堆积排列, 大小均一, 排列有序。

[0027] 图 1c 是得到的多孔结构截面的扫描电镜照片, 说明得到的多孔结构中孔洞是呈单层排布的。

[0028] 将上述 BSA 替换为荧光基团异硫氰酸荧光素 (简称为 FITC) 共轭的 BSA (购自北京博奥森生物技术有限公司), 重复以上步骤, 制备得到有序的多孔结构薄膜; 用激光共聚焦显微镜观察, 附图 2 是用该荧光蛋白得到的多孔结构在不同切面的激光共聚焦显微镜照片, 图 2a 是标记出不同切面的单个孔洞示意图。S1 ~ S5 对应于图 2a 中不同切面的激光共聚焦显微镜照片。此图表明荧光蛋白强度从孔顶到孔底部依次增加, 即荧光蛋白主要分布在孔洞底部。而且这些蛋白的小圆点呈有序的六方密堆积排列。

[0029] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体 (购自美国英杰生命技术有限公司) 后, 重复以上步骤, 制得该蛋白抗体的图案化结构膜, 将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和荧光染料 CY3 标记的血红蛋白 (按 MUJUMDAR R B, ERNST L A, MUJUMDAR S R, LEWIS C J, WAGGONER A S. Cyanine dye labeling reagents : sulfoindocyanine succinimidyl esters, Bioconjugate Chem. 1993, 4 :105 ~ 111 中所述方法合成) 混合溶液中, 4℃ 冰箱中放置 12 小时后, 用 PBS 缓冲溶液 (购自美国英杰生命技术有限公司) 清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察, 由于特异性抗体识别作用, FITC 共轭的 BSA 选择性的分布在孔洞内, 而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0030] 附图 3 是将由 BSA 抗体制得的蛋白图案化结构浸入 FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白的混合溶液后的共聚焦显微镜照片。图 3a 是只显示 FITC 的荧光时的显微镜照片, 绿色的 FITC 主要分布在孔洞内; 图 3b 是只显示 CY3 时的显微镜照片, 红色的 CY3 的分布几乎没有选择性; 图 3c 是同时显示两种荧光时的显微镜照片, 同样, 绿色分布于孔洞内, 红色无选择性分布。这就表明图案化的蛋白的活性依然保持, 还可与特定的识别它的物质进行反应, 此蛋白的图案化结构可用来识别不同的蛋白。

[0031] 实施例 2

[0032] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中, 30mg PMMA (分子量为 35 万) 和 0.33mg DDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中, 取 50 μL 蛋白水溶液与 1mL 聚合物溶液混合, 振荡至溶液呈微乳白色, 得到微乳状液, 在湿度为 35%, 温度为 30℃ 条件下将 20 μL 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后, 在留下的聚合物膜表面得到孔径约为 5 μm 的有序多孔结构。此多孔结构中孔洞也呈有序的六方密堆积排列。而且孔洞的排列是单层的。

[0033] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后, 重复以上步骤, 制备得到有序的多孔结构薄膜; 用激光共聚焦显微镜观察, 蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部, 因而也呈有序

的六方密堆积排列。

[0034] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后,重复以上步骤,制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜,将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中,于 4℃冰箱中放置 12 小时后,用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察,由于特异性抗体识别作用,BSA 选择性的分布在孔洞内,而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0035] 实施例 3

[0036] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中,30mg PS(分子量为 35 万)和 1.0mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中,取 50 μ L 蛋白水溶液与 1mL 聚合物溶液混合,振荡至溶液呈微乳白色,得到微乳状液,在湿度为 35%,温度为 30℃ 条件下将 20 μ L 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后,在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 4 μ m 的有序多孔结构。在此多孔结构中,孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低,但是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0037] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后,重复以上步骤,制备得到有序的多孔结构薄膜;用激光共聚焦显微镜观察,蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部,因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0038] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后,重复以上步骤,制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜,将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中,于 4℃冰箱中放置 12 小时后,用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察,由于特异性抗体识别作用,BSA 选择性的分布在孔洞内,而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0039] 实施例 4

[0040] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中,30mg PS(分子量为 35 万)和 1.5mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中,取 50 μ L 蛋白水溶液与 1mL PS 溶液混合,振荡至溶液呈微乳白色,得到微乳状液,在湿度为 35%,温度为 30℃ 条件下将 20 μ L 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后,在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 3 μ m 的有序多孔结构。在此多孔结构中,孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低,但是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0041] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后,重复以上步骤,制备得到有序的多孔结构薄膜;用激光共聚焦显微镜观察,蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部,因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0042] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后,重复以上步骤,制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜,将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中,于 4℃冰箱中放置 12 小时后,用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察,由于特异性抗体识别作用,BSA 选择性的分布在孔洞内,而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0043] 实施例 5

[0044] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中,20mg PS(分子量为 35 万)和 0.33mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中,取 50 μ L 蛋白水溶液与 1mL PS 溶液混合,振荡至溶液呈微乳白色,得到

微乳状液，在湿度为 35%，温度为 30℃ 条件下将 20 μL 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后，在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 7 μm 的有序多孔结构。在此多孔结构中，孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低，但是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0045] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后，重复以上步骤，制备得到有序的多孔结构薄膜；用激光共聚焦显微镜观察，蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部，因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0046] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后，重复以上步骤，制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜，将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中，于 4℃ 冰箱中放置 12 小时后，用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察，由于特异性抗体识别作用，BSA 选择性的分布在孔洞内，而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0047] 实施例 6

[0048] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中，25mg PS（分子量为 35 万）和 0.33mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中，取 50 μL 蛋白水溶液与 1mL PS 溶液混合，振荡至溶液呈微乳白色，得到微乳状液，在湿度为 35%，温度为 30℃ 条件下将 20 μL 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后，在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 6 μm 的有序多孔结构。在此多孔结构中，孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低，但是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0049] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后，重复以上步骤，制备得到有序的多孔结构薄膜；用激光共聚焦显微镜观察，蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部，因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0050] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后，重复以上步骤，制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜，将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中，于 4℃ 冰箱中放置 12 小时后，用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察，由于特异性抗体识别作用，BSA 选择性的分布在孔洞内，而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0051] 实施例 7

[0052] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中，35mg PS（分子量为 35 万）和 0.33mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中，取 50 μL 蛋白水溶液与 1mL PS 溶液混合，振荡至溶液呈微乳白色，得到微乳状液，在湿度为 35%，温度为 30℃ 条件下将 20 μL 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后，在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 4 μm 的有序多孔结构。在此多孔结构中，孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低，但是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0053] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后，重复以上步骤，制备得到有序的多孔结构薄膜；用激光共聚焦显微镜观察，蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部，因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0054] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后，重复以上步骤，制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜，将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中，于 4℃ 冰箱

中放置 12 小时后,用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察,由于特异性抗体识别作用,BSA 选择性的分布在孔洞内,而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0055] 实施例 8

[0056] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中,30mg PS(分子量为 35 万) 和 0.33mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中,取 50 μ L 蛋白水溶液与 1mL PS 溶液混合,振荡至溶液呈微乳白色,得到微乳状液,在湿度为 35%,温度为 30℃ 条件下将 10 μ L 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后,在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 4 μ m 的有序多孔结构。在此多孔结构中,孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低,但是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0057] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后,重复以上步骤,制备得到有序的多孔结构薄膜;用激光共聚焦显微镜观察,蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部,因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0058] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后,重复以上步骤,制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜,将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中,于 4℃ 冰箱中放置 12 小时后,用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察,由于特异性抗体识别作用,BSA 选择性的分布在孔洞内,而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0059] 实施例 9

[0060] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中,30mg PS(分子量为 35 万) 和 0.33mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中,取 50 μ L 蛋白水溶液与 1mL PS 溶液混合,振荡至溶液呈微乳白色,得到微乳状液,在湿度为 35%,温度为 30℃ 条件下将 30 μ L 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后,在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 6 μ m 的有序多孔结构。在此多孔结构中,孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低,但是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0061] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后,重复以上步骤,制备得到有序的多孔结构薄膜;用激光共聚焦显微镜观察,蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部,因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0062] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后,重复以上步骤,制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜,将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中,于 4℃ 冰箱中放置 12 小时后,用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察,由于特异性抗体识别作用,BSA 选择性的分布在孔洞内,而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

[0063] 实施例 10

[0064] 将 5mg BSA 溶解在 1mL 二次水中,30mg PS(分子量为 35 万) 和 0.33mgDDAB 溶解在 5mL 二氯甲烷中,取 50 μ L 蛋白水溶液与 1mL PS 溶液混合,振荡至溶液呈微乳白色,得到微乳状液,在湿度为 35%,温度为 30℃ 条件下将 40 μ L 得到的微乳状液滴在用二次水、乙醇、二次水依次清洗过的平滑玻璃基底上。待溶剂挥发后,在留下的聚合物膜表面得到孔径为约 7 μ m 的有序多孔结构。在此多孔结构中,孔洞的有序性与实施例 1 相比略有降低,但

是孔洞还是呈单层的六方密堆积排列。

[0065] 将上述 BSA 换为荧光基团 FITC 共轭的 BSA 后, 重复以上步骤, 制备得到有序的多孔结构薄膜; 用激光共聚焦显微镜观察, 蛋白分布在多孔结构中孔洞的底部, 因而也呈有序的六方密堆积排列。

[0066] 将上述 BSA 换为 BSA 的一级抗体后, 重复以上步骤, 制得具有此蛋白抗体的图案化结构膜, 将此膜浸入 10mL FITC 共轭的 BSA 和 CY3 标记的血红蛋白混合溶液中, 于 4℃冰箱中放置 12 小时后, 用 PBS 缓冲溶液清洗数次。用激光共聚焦显微镜观察, 由于特异性抗体识别作用, BSA 选择性的分布在孔洞内, 而没有特异性识别作用的血红蛋白的分布则没有选择性。

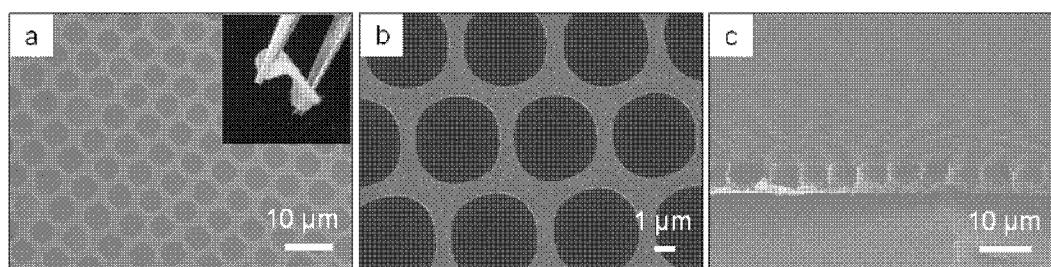


图 1

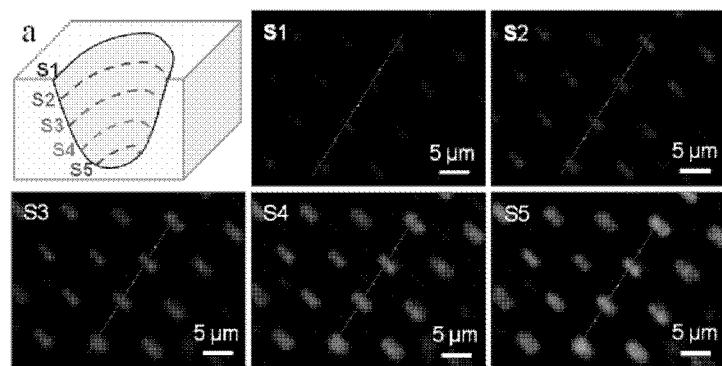


图 2

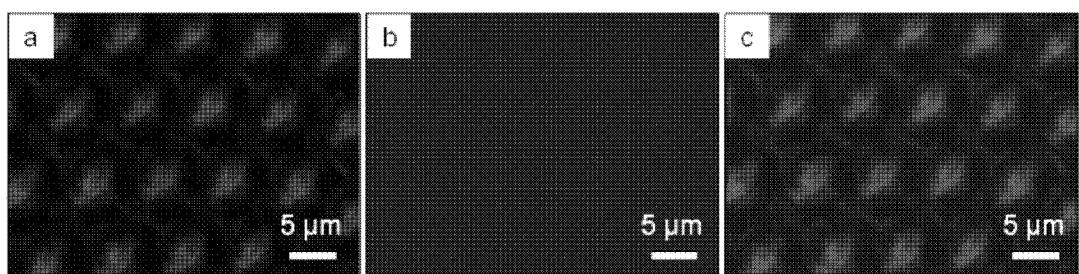


图 3