



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116678956 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 01

(21) 申请号 202310646145.8

(22) 申请日 2023.05.31

(71) 申请人 东南大学

地址 211189 江苏省南京市江宁区东南大学路2号

(72) 发明人 钱卫平 张宇

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

专利代理师 金诗琦

(51) Int. Cl.

G01N 30/00 (2006.01)

G01J 3/45 (2006.01)

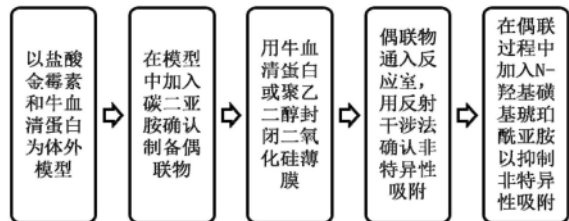
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:将牛血清蛋白和盐酸金霉素溶液混合,加入碳二亚胺搅拌反应,得到偶联产物;将偶联产物置于磷酸缓冲液中,透析浓缩偶联产物,并将偶联产物稀释至1.0~2.0mg/mL;将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上;用牛血清蛋白或聚乙二醇封闭二氧化硅胶体晶体薄膜;偶联产物通入反应室,用反射干涉法确认非特异性吸附;在偶联过程中加入N-羟基琥珀酰亚胺以抑制非特异性吸附。本发明能够解决传统封闭试剂无法解决的强烈非特异性吸附,通过改变反应路径控制偶联物表面的非特异性吸附,保证生物识别的灵敏度较好。



1. 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一,将牛血清蛋白和盐酸金霉素溶液混合,加入碳二亚胺在避光状态下搅拌反应,得到偶联产物;

步骤二,将步骤一所得偶联产物置于磷酸缓冲液中,进行透析,用聚乙二醇浓缩偶联产物,浓缩完成后将产物浓度稀释至1.0~2.0mg/mL,此处产物浓度以牛血清蛋白浓度计;

步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

步骤四,将牛血清蛋白或聚乙二醇注入步骤三制备的反应室,保持2~3h,封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,随后以同样流速注入磷酸缓冲液,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录;

步骤五,将步骤二所得物通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,注入磷酸缓冲液,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信号,确认非特异性吸附;

步骤六,重复一次步骤一~五,并在步骤一中加入N-羟基磺基琥珀酰亚胺,改变反应路径。

2. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤一中,混合后的牛血清蛋白的浓度为4.0~6.0mg/mL,盐酸金霉素溶液的pH为7.0。

3. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤一中,反应时间为10~16h,碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为10~10000。

4. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤二中,磷酸缓冲液的浓度为0.01~0.03M,pH为7.2~7.4。

5. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤二中,透析时间为2~4天,期间总共换12~16次。

6. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤二中,聚乙二醇的分子量为20000~90000。

7. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤四中注入牛血清蛋白、聚乙二醇、磷酸缓冲液的速度与步骤五中注入牛血清蛋白的速度相同。

8. 根据权利要求7所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述注入速度为0.3~0.5mL/min。

9. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤三、步骤四中的反应室温度为20~25℃。

10. 根据权利要求1所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,其特征在于:所述步骤六中,N-羟基磺基琥珀酰亚胺的质量为0.016~160mg,碳二亚胺质量为0.72~720mg。

一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物偶联领域,具体为一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法。

背景技术

[0002] 生物偶联技术对设计与开发新型生物分子和生物材料有重要意义,能够解释复杂的生物学过程,在医学、诊断学、微电子学与材料学领域产生大量新应用。典型的生物偶联物制备可以用共价形式将一个小分子连接到一个大分子上,或将亲和配体固定到纳米颗粒或其它表面上。1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(碳二亚胺)是一种广泛用于生物偶联的偶联剂,然而这种偶联剂的一个重要的特性并未受到重视,简单来说,碳二亚胺会导致偶联物表面产生额外的正电荷,从而导致偶联物在许多应用过程中产生非特异性吸附。传统上虽可通过封闭试剂如牛血清蛋白和聚乙二醇以及表面活性剂控制非特异性吸附,但一方面较强的非特异性吸附难以通过上述传统方案解决,另一方面大量封闭试剂的吸附本身会导致生物识别的灵敏度降低,亟需一种控制非特异性吸附同时不降低生物识别的灵敏度的方法。

发明内容

[0003] 发明目的:为了克服现有技术中存在的不足,本发明的目的是提供一种能够控制偶联物表面非特异性吸附、最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法。

[0004] 技术方案:本发明所述的一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0005] 步骤一,将牛血清蛋白和盐酸金霉素溶液混合,加入碳二亚胺在避光状态下搅拌反应,得到偶联产物;

[0006] 步骤二,将步骤一所得偶联产物置于磷酸缓冲液中,进行透析,用聚乙二醇浓缩偶联产物,浓缩完成后将产物浓度稀释至1.0~2.0mg/mL,此处产物浓度以牛血清蛋白浓度计;

[0007] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

[0008] 步骤四,将牛血清蛋白或聚乙二醇注入步骤三制备的反应室,保持2~3h,封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,随后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的牛血清蛋白或聚乙二醇,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录;

[0009] 步骤五,将步骤二所得物通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的偶联产物,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信号,确认非特异性吸附;

[0010] 步骤六,重复一次步骤一~五,并在步骤一中加入N-羟基磺基琥珀酰亚胺,改变反

应路径,此时N-羟基磺基琥珀酰亚胺会改变原本由碳二亚胺生成的中间体结构,此结构不会引起表面电荷变化,从而最小化非特异性吸附。

[0011] 进一步地,步骤一中,混合后的牛血清蛋白的浓度为4.0~6.0mg/mL,盐酸金霉素溶液的pH为7.0。反应时间为10~16h,碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为10~10000。

[0012] 进一步地,步骤二中,磷酸缓冲液的浓度为0.01~0.03M,pH为7.2~7.4。透析时间为2~4天,期间总共换12~16次。聚乙二醇的分子量为20000~90000,封闭效果较好。

[0013] 进一步地,步骤四中注入牛血清蛋白、聚乙二醇、磷酸缓冲液的速度与步骤五中注入牛血清蛋白的速度相同。注入速度为0.3~0.5mL/min。

[0014] 进一步地,步骤三、步骤四中的反应室温度为20~25℃。

[0015] 进一步地,步骤六中,N-羟基磺基琥珀酰亚胺的质量为0.016~160mg,碳二亚胺质量为0.72~720mg。

[0016] 反应原理:利用反射干涉光谱法,通过碳二亚胺将盐酸金霉素固定到牛血清蛋白上,并将其通入被封闭的基底上,从而实时动态探究碳二亚胺用量与引起非特异性吸附程度的关系。从改变反应路径的角度来说,加入N-羟基磺基琥珀酰亚胺改变原本由碳二亚胺生成的中间体结构,此结构不会引起表面电荷变化,从而最小化非特异性吸附。

[0017] 有益效果:本发明和现有技术相比,具有如下显著性特点:

[0018] 1、能够解决传统封闭试剂无法解决的强烈非特异性吸附,通过改变反应路径控制偶联物表面的非特异性吸附,可避免传统非特异性吸附带来的负面影响,保证生物识别的灵敏度较好;

[0019] 2、通过二氧化硅胶体晶体薄膜,结合其反射干涉光谱,能够将物质结合到薄膜上,体系折射率变化将导致光学厚度变化,从而导致干涉峰迁移,信号最终被光谱仪捕获并显示,为非特异性吸附的监测提供新工具;

[0020] 3、二氧化硅胶体晶体薄膜周期性结构明显,孔隙率高,制备重复性好,能够获得稳定的法布里-珀罗条纹,信号采集可从薄膜背面进行,不受流体性质干扰,可监测复杂流体中的信号。

附图说明

[0021] 图1是本发明的制备流程图;

[0022] 图2是本发明的反应示意图;

[0023] 图3是本发明的反射干涉法的测量原理图;

[0024] 图4是本发明碳二亚胺导致非特异性吸附副反应的化学方程示意图;

[0025] 图5是本发明加入N-羟基磺基琥珀酰亚胺改变反应路径解决非特异性吸附的化学方程示意图;

[0026] 图6是本发明实施例3记录的封闭以及非特异性吸附数据;

[0027] 图7是本发明实施例4中记录的最小化非特异性吸附的数据;

[0028] 图8是本发明对比例1中以含有吐温20的偶联物作为对照的封闭以及非特异性吸附数据;

[0029] 图9是本发明对比例2中证明非特异性吸附并非由盐酸金霉素产生的数据。

具体实施方式

[0030] 实施例1

[0031] 如图1,一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0032] 步骤一,用1M氢氧化钠溶解盐酸金霉素,将pH调节回7.0后配制成5.0mL 5.0mg/mL的盐酸金霉素,在溶液中加入25.0mg牛血清蛋白,使得牛血清蛋白的终浓度达到5.0mg/mL,加入0.72mg碳二亚胺在避光状态下反应12h,得到偶联产物;碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为10;

[0033] 步骤二,将步骤一所得偶联产物用pH 7.2、浓度为0.01M的磷酸缓冲液透析3d,期间总共换12次,用聚乙二醇-20000浓缩偶联产物,并稀释至牛血清蛋白浓度1.0mg/mL。产物是把金霉素结合到牛血清蛋白上的复合物,透析会把没有结合的小分子金霉素透析出去,而产物会留在透析袋里,又经过浓缩,产物上金霉素的浓度难以确定,而牛血清蛋白的浓度好确定,因此,以牛血清蛋白浓度来代表产物浓度。

[0034] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,用自主研发的光学系统与软件进行反射干涉测量,如图2所示。光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱,如图3所示;

[0035] 步骤四,将牛血清蛋白以0.4mL/min的速度泵入步骤三制备的反应室,保持2.5h,封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的牛血清蛋白,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录,实验温度为21℃;

[0036] 步骤五,将步骤二所得物以同样流速通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的偶联产物,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信号,确认非特异性吸附,实验温度为21℃;

[0037] 步骤六,维持步骤一过程中碳二亚胺质量为0.72mg并加入0.16mg的N-羟基磺基琥珀酰亚胺,得到的偶联产物同样经过步骤二~步骤五。

[0038] 实施例2

[0039] 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0040] 步骤一,用1M氢氧化钠溶解盐酸金霉素,将pH调节回7.0后配制成5.0mL 5.0mg/mL的盐酸金霉素,在溶液中加入25.0mg牛血清蛋白,使得牛血清蛋白的终浓度达到5.0mg/mL,加入7.2mg碳二亚胺在避光状态下反应12h,得到偶联产物,反应存在不可避免的副反应,如图4所示;碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为100;

[0041] 步骤二,将步骤一所得偶联产物用pH 7.2、浓度为0.01M的磷酸缓冲液透析3d,期间总共换12次,用聚乙二醇-20000浓缩偶联产物,并稀释至牛血清蛋白浓度1.0mg/mL。

[0042] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,用自主研发的光学系统与软件进行反射干涉测量,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

[0043] 步骤四,将牛血清蛋白以0.4mL/min的速度泵入步骤三制备的反应室,保持2.5h,

封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的牛血清蛋白,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录,实验温度为20℃;

[0044] 步骤五,将步骤二所得物以同样流速通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的偶联产物,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信号,确认非特异性吸附,实验温度为20℃;

[0045] 步骤六,维持步骤一过程中碳二亚胺质量为7.2mg并加入1.6mg的N-羟基磺基琥珀酰亚胺,如图5所示得到的偶联产物同样经过步骤二~步骤五。

[0046] 实施例3

[0047] 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0048] 步骤一,用1M氢氧化钠溶解盐酸金霉素,将pH调节回7.0后配制成5.0mL 5.0mg/mL的盐酸金霉素,在溶液中加入25.0mg牛血清蛋白,使得牛血清蛋白的终浓度达到5.0mg/mL,加入720mg碳二亚胺在避光状态下反应12h,得到偶联产物;碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为10000;

[0049] 步骤二,将步骤一所得偶联产物用pH 7.2、浓度为0.01M的磷酸缓冲液透析3d,期间总共换12次,用聚乙二醇-20000浓缩偶联产物,并稀释至牛血清蛋白浓度1.0mg/mL。

[0050] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,用自主研发的光学系统与软件进行反射干涉测量,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

[0051] 步骤四,将聚乙二醇-20000以0.4mL/min的速度泵入步骤三制备的反应室,保持2.5h,封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的聚乙二醇-20000,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录,实验温度为25℃;

[0052] 步骤五,将步骤二所得物以同样流速通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的偶联产物,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信号,确认非特异性吸附,如图6所示,实验温度为23℃;

[0053] 步骤六,维持步骤一过程中碳二亚胺浓度为720mg并加入16mg的N-羟基磺基琥珀酰亚胺,得到的偶联产物同样经过步骤二~步骤五。

[0054] 实施例4

[0055] 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0056] 步骤一,用1M氢氧化钠溶解盐酸金霉素,将pH调节回7.0后配制成5.0mL 5.0mg/mL的盐酸金霉素,在溶液中加入25.0mg牛血清蛋白,使得牛血清蛋白的终浓度达到5.0mg/mL,加入72mg碳二亚胺在避光状态下反应12h,得到偶联产物;碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为1000;

[0057] 步骤二,将步骤一所得偶联产物用pH 7.2、浓度为0.01M的磷酸缓冲液透析3d,期间总共换12次,用聚乙二醇-20000浓缩偶联产物,并稀释至牛血清蛋白浓度1.0mg/mL。

[0058] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,用自主研发的光学系统

与软件进行反射干涉测量,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

[0059] 步骤四,将牛血清蛋白以0.4mL/min的速度泵入步骤三制备的反应室,保持2.5h,封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的牛血清蛋白,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录,实验温度为23℃;

[0060] 步骤五,将步骤二所得物以同样流速通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的偶联产物,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信号,确认非特异性吸附,实验温度为23℃,信号上涨约33nm,非特异性吸附强烈;

[0061] 步骤六,维持步骤一过程中碳二亚胺浓度为72mg并分别加入160mg、16mg、1.6mg、0.16mg、0.016mg的N-羟基磺基琥珀酰亚胺,得到的偶联产物同样经过步骤二~步骤五,如图7所示,非特异性吸附均显著降低。

[0062] 对比例1

[0063] 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0064] 步骤一,用1M氢氧化钠溶解盐酸金霉素,将pH调节回7.0后配制成5.0mL 5.0mg/mL的盐酸金霉素,在溶液中加入25.0mg牛血清蛋白,使得牛血清蛋白的终浓度达到5.0mg/mL,加入360mg碳二亚胺在避光状态下反应12h,得到偶联产物;

[0065] 步骤二,将偶联产物用pH 7.2浓度为0.01M的磷酸缓冲液透析3d,期间总共换12次,用聚乙二醇-20000浓缩偶联产物,并稀释至牛血清蛋白浓度1.0mg/mL;

[0066] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,用自主研发的光学系统与软件进行反射干涉测量,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

[0067] 步骤四,先将牛血清蛋白以0.4mL/min的速度泵入步骤三制备得到的反应室保持2.5h以封闭薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液去除弱结合或未结合的牛血清蛋白,利用反射干涉测量记录信号,实验温度为23℃;

[0068] 步骤五,在步骤二中得到的偶联产物中加入0.25%吐温-20并用步骤四中相同的速度通入经过步骤四处理后的反应室。偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后以同样流速注入磷酸缓冲液去除弱结合或未结合的偶联产物并达到控制溶液折射率的目的,同样利用反射干涉测量记录信号,如图8所示,信号上涨约12nm,非特异性吸附稍有减弱但依旧强烈,实验温度为23℃。

[0069] 对比例2

[0070] 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0071] 步骤一,将牛血清蛋白以0.4mL/min的速度泵入制备的二氧化硅薄膜反应室保持2.5h以封闭薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液去除弱结合或未结合的牛血清蛋白,利用反射干涉测量记录信号,实验温度为24℃;

[0072] 步骤二,在反应室中用步骤一中相同的速度通入1mg/mL盐酸金霉素,然后用磷酸缓冲液冲洗,可看到光学厚度恢复,如图9所示,说明盐酸金霉素本身不会引起非特异性吸附。

[0073] 实施例5

[0074] 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0075] 步骤一,用1M氢氧化钠溶解盐酸金霉素,将pH调节回7.0后配制成5.0mL 5.0mg/mL的盐酸金霉素,在溶液中加入20.0mg牛血清蛋白,使得牛血清蛋白的终浓度达到4.0mg/mL,加入360.0mg碳二亚胺在避光状态下反应10h,得到偶联产物;碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为6300;

[0076] 步骤二,将步骤一所得偶联产物用pH 7.4、浓度为0.03M的磷酸缓冲液透析2d,期间总共换16次,用聚乙二醇-90000浓缩偶联产物,并稀释至牛血清蛋白浓度2.0mg/mL。

[0077] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,用自主研发的光学系统与软件进行反射干涉测量,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

[0078] 步骤四,将聚乙二醇-90000以0.3mL/min的速度泵入步骤三制备的反应室,保持2h,封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的聚乙二醇-90000,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录,实验温度为25℃;

[0079] 步骤五,将步骤二所得物以同样流速通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的偶联产物,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信号,确认非特异性吸附,实验温度为25℃;

[0080] 步骤六,维持步骤一过程中碳二亚胺浓度为360.0mg并加入80mg的N-羟基磺基琥珀酰亚胺,得到的偶联产物同样经过步骤二~步骤五。

[0081] 实施例6

[0082] 一种最小化碳二亚胺生物偶联引起的非特异性吸附的方法,包括以下步骤:

[0083] 步骤一,用1M氢氧化钠溶解盐酸金霉素,将pH调节回7.0后配制成5.0mL 6.0mg/mL的盐酸金霉素,在溶液中加入30.0mg牛血清蛋白,使得牛血清蛋白的终浓度达到6.0mg/mL,加入720.0mg碳二亚胺在避光状态下反应16h,得到偶联产物;碳二亚胺与牛血清蛋白摩尔之比为10000;

[0084] 步骤二,将步骤一所得偶联产物用pH 7.3、浓度为0.02M的磷酸缓冲液透析4d,期间总共换14次,用聚乙二醇-60000浓缩偶联产物,并稀释至牛血清蛋白浓度1.5mg/mL。

[0085] 步骤三,将二氧化硅胶体晶体薄膜与硅胶和载玻片固定形成反应室,将反应室固定于倒置光学显微镜上,调节光斑聚焦于二氧化硅胶体晶体薄膜,用自主研发的光学系统与软件进行反射干涉测量,光线反射后通过光纤并最终到达光谱仪,光谱仪信号软件上处理后形成二氧化硅胶体晶体薄膜的反射干涉光谱;

[0086] 步骤四,将聚乙二醇-60000以0.5mL/min的速度泵入步骤三制备的反应室,保持3h,封闭二氧化硅胶体晶体薄膜表面,结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的聚乙二醇-60000,通过反射干涉测量实时光学厚度变化并记录,实验温度为24℃;

[0087] 步骤五,将步骤二所得物以同样流速通入经过步骤四处理后的反应室,偶联产物因表面正电荷增加而非特异性地吸附在封闭后的薄膜表面,反应结束后以同样流速注入磷酸缓冲液,去除弱结合或未结合的偶联产物,控制溶液折射率,利用反射干涉测量记录信

号,确认非特异性吸附,实验温度为24℃;

[0088] 步骤六,维持步骤一过程中碳二亚胺浓度为720mg并加入160mg的N-羟基磺基琥珀酰亚胺,得到的偶联产物同样经过步骤二~步骤五。

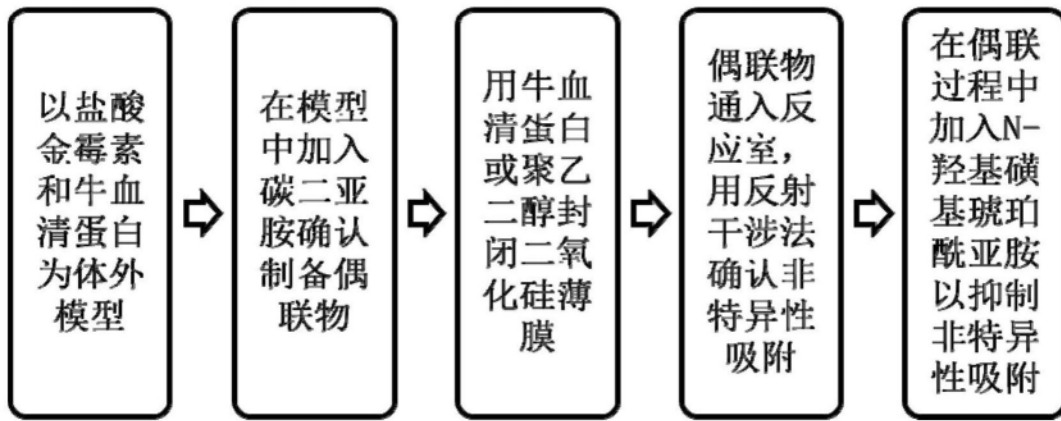


图1

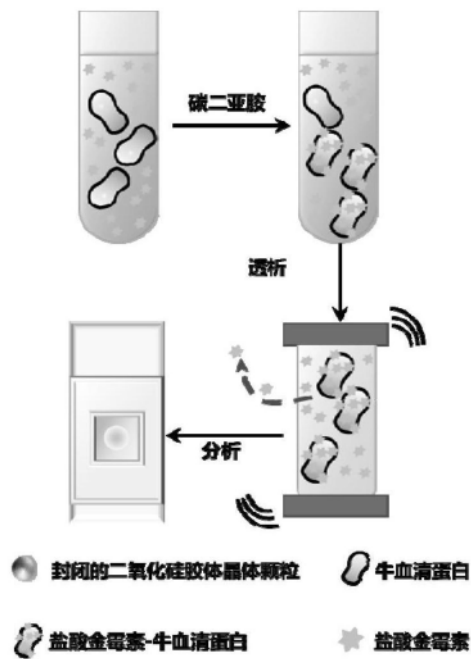


图2

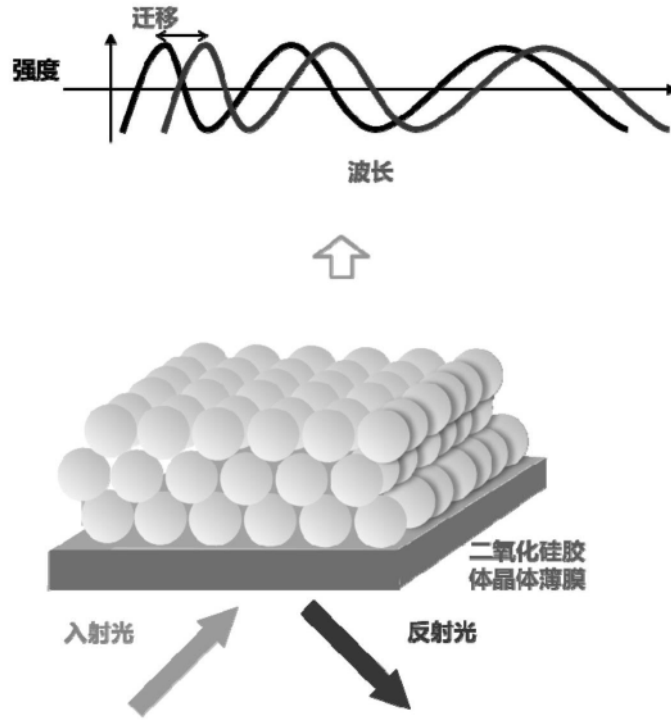


图3

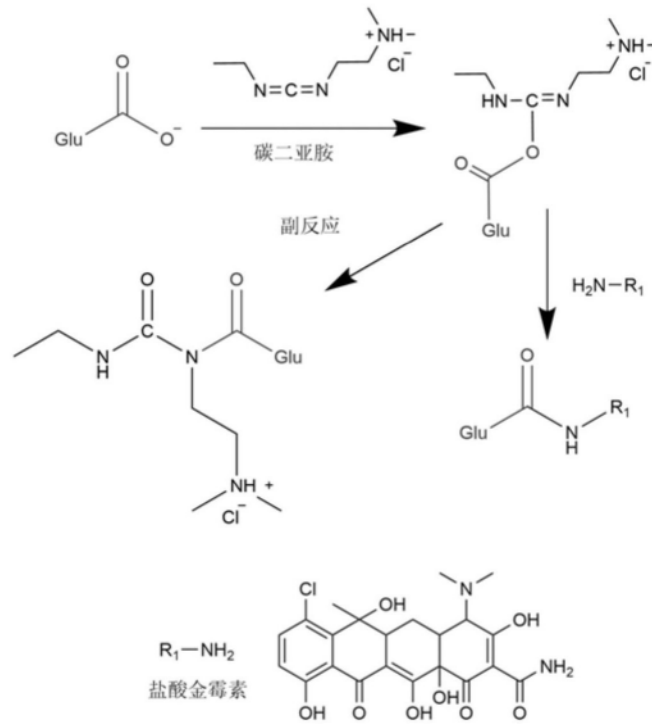


图4

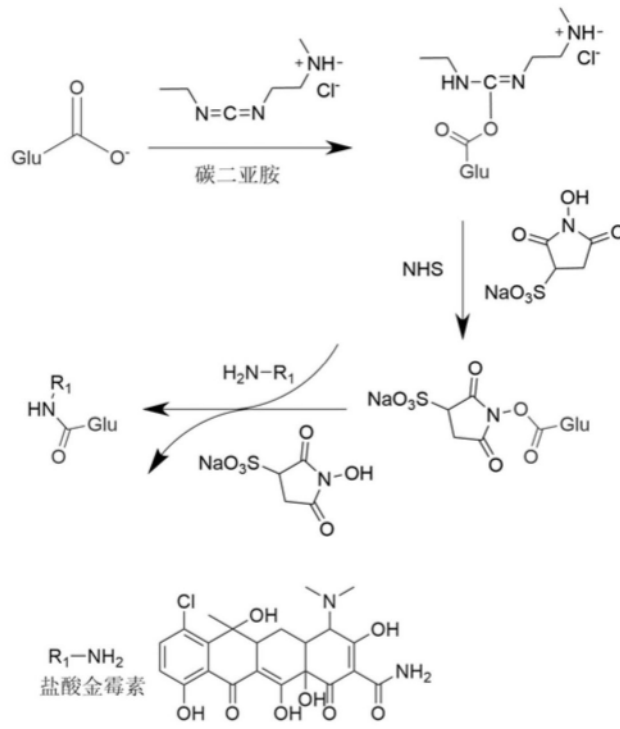


图5

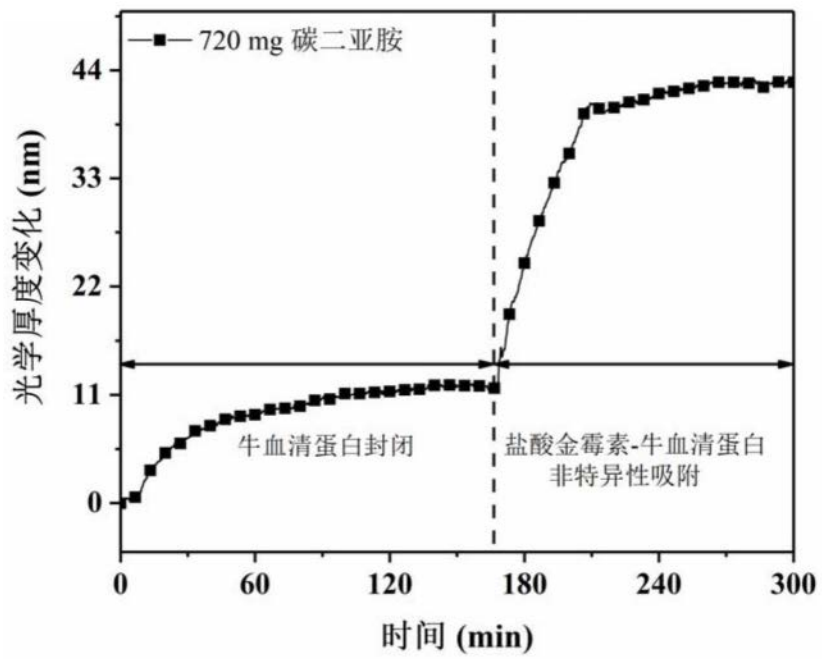


图6

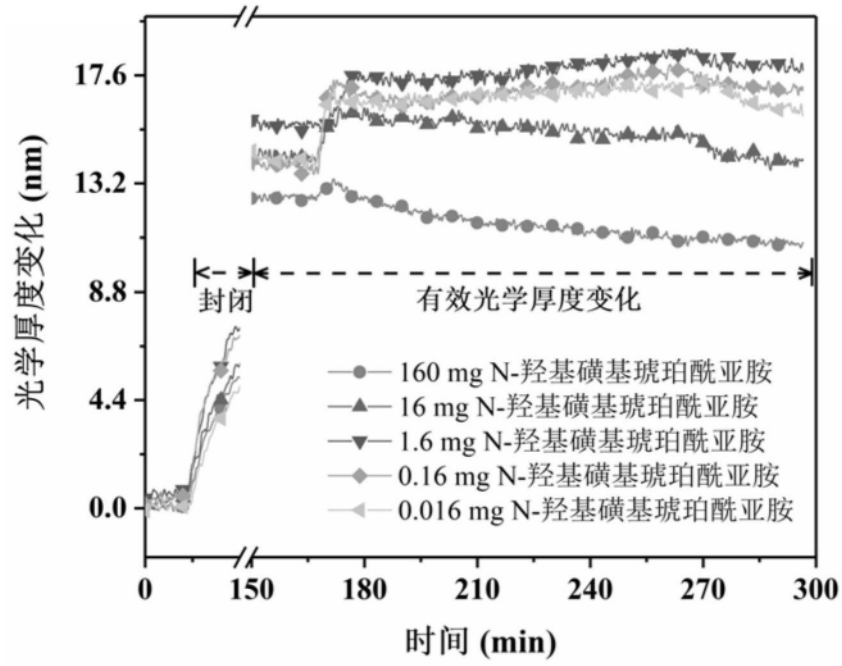


图7

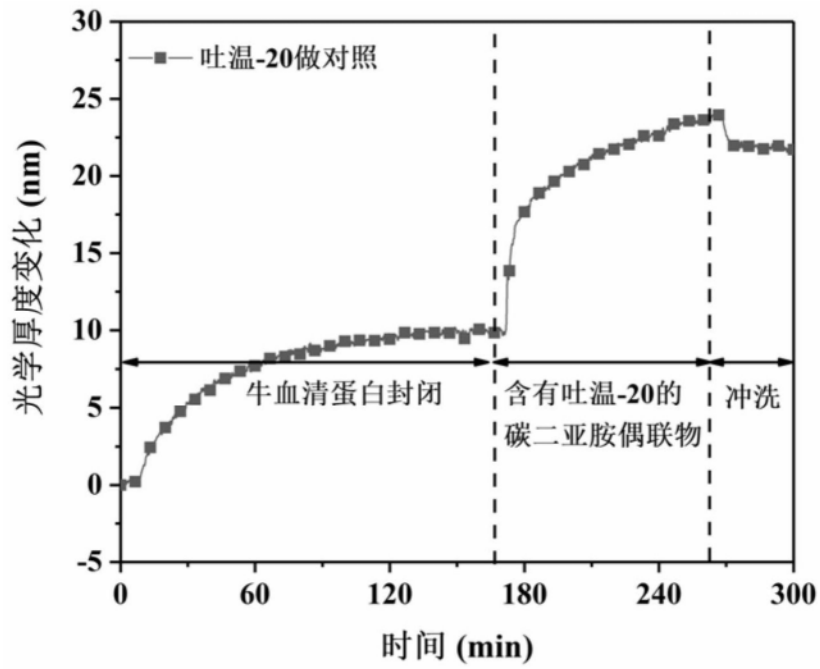


图8

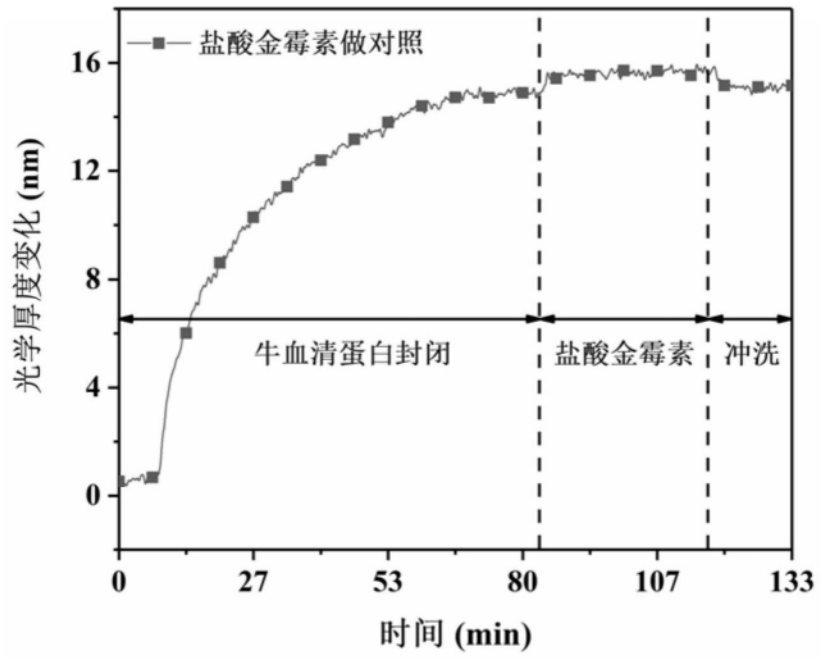


图9