



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101048663 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 01

(21) 申请号 200580036907. 2

(22) 申请日 2005. 09. 22

(30) 优先权数据

60/612, 391 2004. 09. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007. 04. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2005/033938 2005. 09. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/034385 EN 2006. 03. 30

(73) 专利权人 三路影像公司

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 W·A·福克斯 W·C·雷三世

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

J. Shaikh Mohammed 等. Micropatterning of Nanoengineered Surfaces to Study Neuronal Cell Attachment in Vitro. 《Biomacromolecules》. 2004 American Chemical

Society, 2004, 第 5 卷摘要和第 1747 页左栏最后 1 段—右栏第 2 段, 第 1747 页左栏第 4 段, 第 1746 页右栏第 2 段, 第 1748 页左栏第 1 段.

Renjun Pei 等. Assembly of Alternating Polycation and DNA Multilayer Films by Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. 《Biomacromolecules》. 2001 American Chemical Society, 2001, 第 2 卷 463 — 468.

J. Shaikh Mohammed 等. Micropatterning of Nanoengineered Surfaces to Study Neuronal Cell Attachment in Vitro. 《Biomacromolecules》. 2004 American Chemical Society, 2004, 第 5 卷摘要和第 1747 页左栏最后 1 段—右栏第 2 段, 第 1746 页右栏第 2 段, 第 1748 页左栏第 1 段.

Mengyan Li 等. Fabrication of 3-D Gelatin-Patterned Glass Substrates With Layer-by-Layer and Lift-Off (LbL - LO) Technology. 《IEEE TRANSACTIONS ON NANOTECHNOLOGY》. 2004 IEEE, 2004, 第 3 卷 (第 1 期), 第 117 页右栏最后 1 段到第 118 页左栏第 1 段, 第 116 页右栏倒数第 3 段.

审查员 朱晓乐

权利要求书3页 说明书17页

(54) 发明名称

用于固定生物样品的聚阳离子聚合物涂层

(57) 摘要

本发明涉及一种适于固定样品的预涂基材, 如载玻片。本发明还提供制备这类预涂基材的方法和分析被固定在这类预涂基材上的生物样品的方法。该基材上涂了聚阳离子聚合涂料, 特定选择该聚阳离子聚合涂料, 使得有涂层的基材表现出增加的稳定性和延长的贮存期。优选的聚合涂料包括其上具有阳离子基团且具有仅小百分比的肽单体键的烯丙基型或乙烯基型聚合物, 特别是聚二烯丙基二甲铵 (PDMA)。

1. 一种制备适于固定生物样品的有涂层的基材的方法,该方法包括:
提供一种具有表面的基材,该表面含有许多阴离子基团;
使所述基材与含有非肽聚合材料溶液的组合物接触,所述非肽聚合材料包含许多阳离子基团,该溶液具有 8 至 14 的 pH,以在所述基材的至少一部分表面上形成所述非肽聚合材料的涂层;
在冲洗前干燥所述非肽聚合材料的涂层;
冲洗其上具有所述非肽聚合材料的干燥涂层的基材;以及
让所述经冲洗的其上具有所述非肽聚合材料的干燥涂层的基材在使用前干燥;
其中定位所述非肽聚合材料的涂层,以固定生物样品。
2. 根据权利要求 1 的方法,其中该方法包括形成单层的所述非肽聚合材料的涂层。
3. 根据权利要求 1 的方法,其中在环境温度下进行所述干燥有涂层的基材的步骤。
4. 根据权利要求 3 的方法,其中所述干燥有涂层的基材的步骤进行 5 分钟至 1 小时的一段时间。
5. 根据权利要求 1 的方法,其中在 35℃ 至 120℃ 的温度下进行所述干燥有涂层的基材的步骤。
6. 根据权利要求 5 的方法,其中所述干燥有涂层的基材的步骤进行 1 分钟至 20 分钟的一段时间。
7. 根据权利要求 1 的方法,其中所述基材选自载玻片、平板、珠、试管、比色皿、浸渍片、拭子和纱布。
8. 根据权利要求 1 的方法,其中所述基材是显微镜载玻片。
9. 根据权利要求 8 的方法,其中所述载玻片包含选自玻璃、陶瓷和聚合物材料材料。
10. 根据权利要求 9 的方法,其中所述载玻片包含聚合物,该聚合物选自聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸羟酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚四氟乙烯、氟化乙烯、聚二甲基硅氧烷、它们的共聚物及它们的组合。
11. 根据权利要求 10 的方法,其中所述共聚物为三元共聚物。
12. 根据权利要求 1 的方法,其中所述非肽聚合材料包含至少一种单体,该单体选自二烯丙基二甲胺、烯丙胺、甲基丙烯酰氨基丙基三甲胺、丙烯酰胺、丙烯酸、异丁烯酰氧基乙基三甲胺、4-乙烯基-苄基三甲胺、甲基丙烯酸、丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸羟乙酯、4-乙烯基吡啶 **𪛶**、4-乙烯基-1-甲基吡啶 **𪛶**、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸 2-乙基己酯、丙烯酸二甲氨基乙酯、氯化丙烯酸二甲氨基乙酯甲基季铵盐、二甲氨基丙基丙烯酰胺、氯化二甲氨基丙基丙烯酰胺甲基季铵盐、丙烯酰氧乙基二甲苄基胺、丙烯酰氧乙基三甲苄基胺、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯、甲基丙烯酰氧乙基二甲胺、甲基丙烯酰氧乙基三甲苄基胺、乙烯、乙烯亚胺、丙烯、苯乙烯、氯乙烯、异丁烯、三甲基-2-甲基丙烯酰乙胺、三甲基-2-甲基丙烯酰基氨基丙胺和它们的混合物。
13. 根据权利要求 1 的方法,其中所述非肽聚合材料包含聚合物,该聚合物选自烯丙基型聚合物、乙烯基型聚合物和它们的混合物。
14. 根据权利要求 1 的方法,其中所述非肽聚合材料包含聚二烯丙基二甲胺。
15. 根据权利要求 1 的方法,其中所述非肽聚合材料包含聚烯丙胺。

16. 根据权利要求 1 的方法,其中所述非肽聚合材料包含二烯丙基二甲铵与至少一种其它单体的共聚物。

17. 根据权利要求 1 的方法,其中所述非肽聚合涂料以浓度为 0.01% (w/v) 至 10% (w/v) 的溶液形式存在。

18. 根据权利要求 17 的方法,其中所述非肽聚合涂料以浓度为 0.15% (w/v) 至 0.75% (w/v) 的溶液形式存在。

19. 根据权利要求 1 的方法,其中所述非肽聚合涂料具有至少 75,000 道尔顿的平均分子量。

20. 根据权利要求 19 的方法,其中所述非肽聚合涂料具有 400,000 道尔顿至 500,000 道尔顿的平均分子量。

21. 根据权利要求 1 的方法,其中在使所述基材与非肽聚合材料的溶液接触之前,该基材表面没有经受清洗过程。

22. 根据权利要求 21 的方法,其中在使所述基材与非肽聚合材料的溶液接触之前,该基材表面没有经受掺入酸、碱或有机溶剂的清洗过程。

23. 根据权利要求 1 的方法,在使所述基材与非肽聚合材料的溶液接触之前,该基材表面没有经受硅烷化过程。

24. 一种根据权利要求 1 的方法制备的预涂基材。

25. 根据权利要求 24 的预涂基材,其适于固定生物样品以便分析,该基材包含表面,该表面具有许多阴离子基团,其中该基材上涂了单层含有许多阳离子基团的非肽聚合材料,并且其中当预涂基材与 1 毫升来自 SiHa 细胞系的细胞悬浮液接触时,该预涂基材表面每表面面积能够固定的平均细胞数为至少 20,000 个细胞 / 平方厘米。

26. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中当预涂基材与 1 毫升来自 SiHa 细胞系的细胞悬浮液接触时,该预涂基材表面每表面面积能够固定的平均细胞数为至少 22,000 个细胞 / 平方厘米。

27. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中当预涂基材与 1 毫升来自 SiHa 细胞系的细胞悬浮液接触时,该预涂基材表面每表面面积能够固定的平均细胞数为至少 23,000 个细胞 / 平方厘米。

28. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中该基材选自载玻片、平板、珠、试管、比色皿、浸渍片、拭子和纱布。

29. 根据权利要求 28 的预涂基材,其中该基材是显微镜载玻片。

30. 根据权利要求 29 的预涂基材,其中所述载玻片包含选自玻璃、陶瓷和聚合物材料的材料。

31. 根据权利要求 29 的预涂基材,其中所述载玻片包含聚合物,该聚合物选自聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸羟酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚四氟乙烯、氟化乙烯、聚二甲基硅氧烷、它们的共聚物和它们的组合。

32. 根据权利要求 29 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料包含至少一种单体,该单体选自二烯丙基二甲铵、烯丙胺、甲基丙烯酸酞氨基丙基三甲铵、丙烯酰胺、丙烯酸、异丁烯酞氨基乙基三甲铵、4- 乙烯基 - 苄基三甲铵、甲基丙烯酸、丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸羟乙酯、4- 乙烯基吡啶、4- 乙烯基 -1- 甲基吡啶、丙烯酸甲酯、

丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸 2-乙基己酯、丙烯酸二甲氨基乙酯、氯化丙烯酸二甲氨基乙酯甲基季铵盐、二甲氨基丙基丙烯酰胺、氯化二甲氨基丙基丙烯酰胺甲基季铵盐、丙烯酰氧乙基二甲基苄铵、丙烯酰氧乙基三甲铵、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯、甲基丙烯酰氧乙基二甲铵、甲基丙烯酰氧乙基三甲基苄铵、乙烯、乙烯亚胺、丙烯、苯乙烯、氯乙烯、异丁烯、三甲基-2-甲基丙烯酰乙铵、三甲基-2-甲基丙烯酰基氨基丙铵和它们的混合物。

33. 根据权利要求 29 的预涂基材,其中所述在载玻片上涂覆的非肽聚合涂料具有 0.005 微米至 500 微米的层厚度。

34. 根据权利要求 33 的预涂基材,其中所述在载玻片上涂覆的非肽聚合涂料具有 1 微米至 50 微米的层厚度。

35. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料包含选自烯丙基型聚合物、乙烯基型聚合物和它们的混合物的聚合物。

36. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料包含聚二烯丙基二甲铵。

37. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料包含聚烯丙胺。

38. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料包含二烯丙基二甲铵与至少一种其它单体的共聚物。

39. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料具有至少 75,000 道尔顿的平均分子量。

40. 根据权利要求 39 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料具有 400,000 道尔顿至 500,000 道尔顿的平均分子量。

41. 根据权利要求 29 的预涂基材,其中所述载玻片特别适于固定用于在组织微阵列、细胞微阵列或核酸微阵列中分析生物样品,该生物样品选自多肽样品、流体样品、细胞样品或核苷酸样品。

42. 根据权利要求 41 的预涂基材,其中所述核苷酸样品是 DNA 样品。

43. 根据权利要求 25 的预涂基材,其中将在基材上涂覆的非肽聚合材料以溶液形式应用到该基材上,其中该非肽聚合材料以 0.01% (w/v) 至 10% (w/v) 的浓度存在。

44. 根据权利要求 43 的预涂基材,其中所述非肽聚合材料以 0.15% (w/v) 至 0.75% (w/v) 的浓度存在。

用于固定生物样品的聚阳离子聚合物涂层

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备有涂层的基材的方法,该有涂层的基材用于在其上固定生物样品,优先用于该生物样品的分析。本发明还涉及按照上述方法制备的预涂基材。该基材上涂了聚阳离子聚合物,该聚阳离子聚合物提供稳定的聚合物层,该聚合物层能够与阴离子生物组分进行离子相互作用。

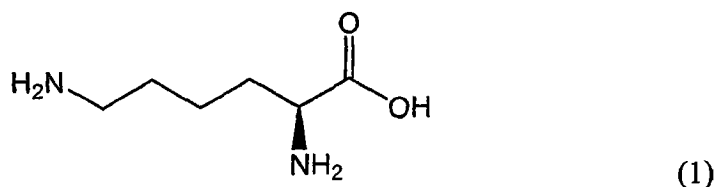
背景技术

[0002] 各种生物制备技术要求在后续处理之前,将样品材料,如细胞、组织、蛋白质或核酸固定在基材上。这些目标生物材料中有许多是阴离子性质的,表现出净负电荷位点。一种固定这些材料的方法是使用含活性成分的化学溶液涂靶基材,所述活性成分是阳离子性质的,表现出净正电荷。因为所固定的目标生物材料表现出净负电荷位点,因此生物材料通过与涂料溶液的净正电荷位点相互作用而与基材的表面结合。涂料溶液的这种粘附性质允许固定生物材料以便后续处理。

[0003] 可通过使用含有本领域中目前已知的各种活性成分的涂层而产生上述固定作用。例如,目前使用涂层剂,如聚-L-赖氨酸、3-氨基丙基三乙氧基硅烷、钾铬矾明胶和卵白蛋白是已知的。这些已知固定剂中最被广泛使用的一种是聚-L-赖氨酸 (PLL)。

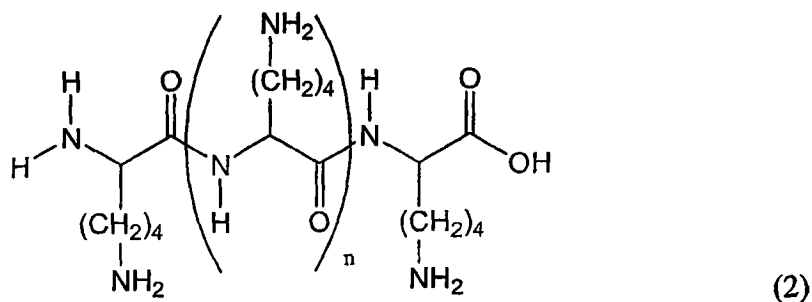
[0004] PLL 是一种大的聚阳离子均聚物,其表现出强的正电荷,该正电荷是由沿着聚合物上的所有赖氨酸残基侧链的末端氨基产生的。L-赖氨酸 [(S)-2,6-二氨基己酸] 是下面式 (1) 所示化学结构的氨基酸。

[0005]



[0006] 聚合物 PLL 是通过肽键相连的一连串 L-赖氨酸单体单元。下面式 (2) 中提供了 PLL 的化学结构,其中 n 是代表聚合物链中单体单元数的整数。

[0007]



[0008] 虽然 PLL 被广泛用作聚阳离子聚合物涂料,但使用 PLL 涂覆的基材趋向在相对短的时间段内失去它们的固定有效性。通常认为这种有效性随时间的下降是由于 PLL 侧链胺基团的氧化所致。氧化的基团不表现出与所要固定的生物材料适当粘附所需的净正电荷。

[0009] PLL 作为固定剂的有效性还受到上面式 (2) 所示的其固有化学结构的限制。正如先前注释的,聚合物的氨基酸残基是通过肽键(-CO-NH-键)连接的。这些肽键非常易被蛋白水解酶,如胰蛋白酶裂解,并且易被一般的水解裂解,如通过亲核性物质的攻击而裂解。肽键的裂解产生链长短得多的 PLL 分子,如通过聚合物的平均分子量所测量的。因为通过蛋白水解裂解,PLL 分子的分子量减小,因此分子的固定能力(即,它的粘附性质)大大降低。

[0010] 已知的固定剂,如 PLL,因为上述化学不稳定性而表现出有限的有用性。因此,使用已知试剂涂覆的基材也表现出有限的有用性,特别是对于长期使用或者在有意义的储存时间之后使用而言。由于使用已知固定剂涂覆的基材的有限稳定性,具有预涂基材将非常有用,该基材上涂了表现出稳定性增加的固定剂,特别适用于固定生物样品以便观测。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供一种优选适于固定生物样品的有涂层的基材。该基材上涂了聚阳离子聚合物,该聚阳离子聚合物与本领域先前已知的固定剂相比表现出稳定性增加。因此,用稳定的聚阳离子聚合物涂覆的基材适用于固定具有净负电荷的生物样品,并且有涂层的基材长时间保持这种有用性。

[0013] 在本发明的一个实施方案中,提供一种制备有涂层的基材的方法。优先地,该有涂层的基材适于固定生物样品。按照一个实施方案,该方法包括提供具有表面的基材(该表面包含许多阴离子基团),并且使该基材与含有非-肽聚合材料溶液的组合物接触,以在该基材的至少一部分表面上形成非-肽聚合材料涂层。含有非-肽聚合材料的溶液可以是水溶液或有机溶液,优选具有至少约 6 的 pH。

[0014] 在本发明的一个优选实施方案中,该方法进一步包括干燥涂了非-肽聚合材料的基材的步骤。优先地,冲洗其上具有干燥的非-肽聚合材料的有涂层的基材。

[0015] 在本发明的另一个优选实施方案中,该方法的特征在于没有进行基材清洗。具体而言,该方法不包括在使基材与非-肽聚合材料接触之前,使基材经受清洗过程。

[0016] 根据本发明的另一方面,提供一种预涂基材,如显微镜载玻片,其优先适于固定生物样品以便分析。按照一个实施方案,该基材包含具有许多用于提供净负电荷的阴离子基团的表面,并该基材上涂了包含许多阳离子基团的非-肽聚合材料。

[0017] 根据本发明这一方面,预涂基材特征在于其每基材的表面面积固定平均细胞数的能力。在一个具体的实施方案中,当预涂基材与 1 毫升来自 SiHa 细胞系的细胞悬浮液接触时,该预涂基材每表面面积能够固定的平均细胞数为至少约 20,000 个细胞/平方厘米。

[0018] 根据本发明的另一个实施方案,用于涂覆预涂基材的非-肽聚合材料包含烯丙基型聚合物、乙烯基型聚合物或其组合,优先地包含选自伯胺、仲胺、叔胺、季铵的阳离子基团。在一个优选的实施方案中,非-肽聚合材料包含聚二烯丙基二甲铵(PDDA)。在本发明的另一个优选实施方案中,非-肽聚合材料包含聚烯丙胺(PAH)。

[0019] 根据本发明的基材可以是适用于观测或分析生物材料或观测或分析生物材料所必需的任何物品或仪器。在一个优选的实施方案中,该基材选自载玻片、平板、珠、试管、比色皿、浸渍片、拭子和纱布。在另一个实施方案中,该基材可以是适用作污染物聚集器具的器具。例如,该基材可以是手套、毛巾或医用布单。

[0020] 根据本发明的有涂层的基材适于固定本质上至少是部分阴离子的材料。优选的

是,用于固定的材料具有净负电荷。因此,该有涂层的基材适用于固定不同的材料,特别适于固定生物材料,如细胞、组织、流体、DNA、RNA、蛋白质和具有阴离子基团的类似生物材料,该阴离子基团可被用于与制备本发明有涂层的基材的非-肽聚合材料的阳离子基团相互作用。

[0021] 根据本发明的另一方面,提供一种分析生物样品的方法。在根据本发明这一方面的一个实施方案中,该方法包括下列步骤:提供适于固定生物样品的预涂基材,该基材包含具有许多阴离子基团的表面,其中该基材上涂了含有许多阳离子基团的非-肽聚合涂料;将生物样品应用到预涂基材上,以将该生物样品固定在该基材上;并且分析固定在预涂基材上的生物样品。在特定的实施方案中,当预涂基材与1毫升来自SiHa细胞系的细胞悬浮液接触时,该预涂基材每表面面积能够固定的平均细胞数为至少约20,000个细胞/平方厘米。

[0022] 发明详述

[0023] 现在将在下文中更充分地描述本发明。然而,本发明可具体表现为许多不同的形式且不应被解释为限于本文所提出的实施方案;相反,提供这些实施方案,以使这种公开将满足可应用的法律要求。除非上下文中另外清楚地描述,如本说明书和权利要求中所用的,单数形式“一个”、“一个”和“该”包括复数的所指对象。

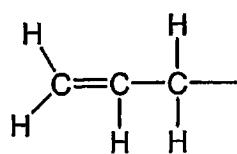
[0024] 本发明预涂基材的特征在于使用聚合涂料,该聚合涂料优选证实至少与目前已知的涂层剂相等的固定能力,但还证实在涂覆基材之后该固定作用的延长的稳定性。此外,在优选的实施方案中,与常规涂层剂,如PLL相比,所述聚合涂料具有较不易或不易被蛋白分解或水解降解的化学结构。

[0025] 根据本发明的聚合涂料包含许多阳离子基团,它们可用于与阴离子基团(例如在所涂覆的基材上和所要固定的生物样品内的阴离子基团)相互作用。阳离子基团可以是聚合涂料的聚合主链的组成组分或以侧链基团的形式存在。阳离子基团可以是具有净正电荷且能够与带相反电荷的粒子或基团进行离子相互作用的任何基团。特别优选的阳离子基团包括胺基团和铵基团,其可以是伯、仲、叔或季铵基团或铵基团。阳离子基团,特别是铵基团,常常带有与基团,如氯化物缔合的带负电荷的抗衡离子。

[0026] 特别优选显示较大程度取代的阳离子基团。正如先前注释的,简单的胺基团,如伯胺,非常容易被氧化。取代胺类较不易受到这种氧化攻击且因此表现出稳定性增加。现认为,用更复杂的基团,如甲基取代胺上的氢基团提供抗氧化的保护作用,更复杂的基团较不易被取代。因此,现认为更高程度的取代产生稳定性增加的胺。由于它们增加的稳定性,所以季铵基团是特别优选的。

[0027] 优选通过聚合一个或多个烯丙基型或乙烯基型单体形成本发明的聚合涂料。烯丙基型聚合物被理解为由含有至少一个烯丙基型基团的单体产生的聚合物,其在下面的式(3)中举例说明。

[0028]

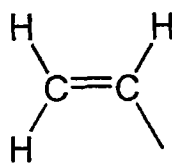


(3)

[0029] 乙烯基型聚合物被理解为由含有至少一个乙烯基型基团的单体产生的聚合物,其

在下面的式 (4) 中举例说明。

[0030]

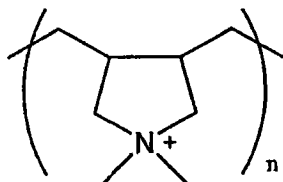


(4)

[0031] 丙烯酸、甲基丙烯酸和它们的各种酯是适用于本发明中的乙烯基型单体的例子。烯丙基型和乙烯基型单体二者都导致形成非-肽聚合物主链并且,结果,比 PLL 表现出对蛋白分解降解更大的抗性。

[0032] 在本发明的一个实施方案中,用作聚合涂料、由烯丙基型单体产生的特别优选的聚合物是聚二烯丙基二甲铵 (PDDA),其通常可以聚合物氯化物盐的形式得到。像 PLL 一样,PDDA 是一种大的聚阳离子均聚物,其表现出强的净正电荷。PDDA 分子上的强净正电荷是由沿着聚合物上的所有残基上的侧链二甲基化铵基团产生的。下面式 (5) 中提供了聚合物 PDDA 的化学结构,其中 n 是代表聚合物链中单体单元数的整数。

[0033]



(5)

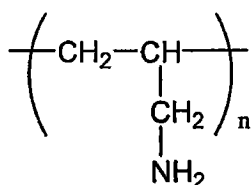
[0034] PDDA 是用作本发明聚合涂料的特别稳定的固定剂。PDDA 上的阳离子基团为季铵类,如上所述,这意味着它们很不易被氧化。PDDA 的聚合物主链由烯丙基型基团产生且不含肽键,如在 PLL 分子中发现的那些。这种肽键的缺失使得 PDDA 对蛋白分解剂,如胰蛋白酶的 attack 具有抗性,现已证明该蛋白分解剂分解 PLL 聚合物链并降低固定能力。

[0035] 通过实验室测试已经证实了用含 PDDA 的聚合涂料涂覆的基材的稳定性增加。在一个试验中,使用含 PDDA 的聚合涂料涂覆基材,让其干燥,并用去离子水冲洗。在 45°C 下比较涂了 PLL 的基材与涂了 PDDA 的基材的加速稳定性研究预测超过 15 个月的特别的性能稳定性。在实施例 2 中进一步举例说明了这一比较。

[0036] 此外,因为其内在的亲水性,PDDA 用于本发明的聚合涂料中是有利的。令人意外的是,使用 PDDA 涂覆的基材与使用已知涂层剂,如 PLL 涂覆的基材相比,表现出亲水性增加。这是一种有利的作用,因为小的含水分析样品将更均匀地散布在用 PDDA 涂覆的基材上。这使得固定样品更均匀分布,其有利于更好地观测固定的样品。

[0037] 在本发明的另一个实施方案中,聚合涂料中所用的聚合物是聚烯丙胺 (PAH),其通常可以盐酸盐(盐酸聚烯丙胺)的形式得到。与 PDDA 一样,PAH 是没有肽键的烯丙基型聚合物。PAH 的胺基团没有被高度取代,如 PDDA;然而,PAH 仍然适用作本发明的聚合涂料。下面式 (6) 中提供了聚合物 PAH 的化学结构,其中 n 是代表聚合物链中单体单元数的整数。

[0038]



(6)

[0039] 除了 PDDA 和 PAH 之外,聚合涂料还可以是由一个或多个各种单体,特别是烯丙基型或乙烯基型单体聚合而产生的聚合物。因此,聚合涂料可以是均聚物、共聚物或三元共聚物。此外,聚合涂料可以是一种或多种均聚物、共聚物或三元共聚物的物理混合物。当聚合涂料包含均聚物时,单体优选全部是阳离子单体;然而,当聚合物是共聚物、三元共聚物或物理聚合物混合物时,无需所有单体都是阳离子的。在一个优选的实施方案中,聚合涂料包含约 5% 至约 100% 摩尔百分比的阳离子聚合物或单体。更优选,聚合涂料包含约 30% 至约 100% 摩尔百分比的阳离子聚合物或单体,最优选约 50% 至约 100% 的阳离子聚合物或单体。

[0040] 聚合涂料中所用的阳离子单体可以是其常态阳离子型或可从非-阳离子状态衍生成阳离子状态。这种衍生可通过本领域中通常已知的任何方法进行,如通过加入离子官能度,如胺或铵基团进行。换句话说,用于形成聚合涂料的单体可含有天然阳离子基团,如在用于形成 PDDA 和 PAH 的单体的情况下,或可含有侧基,其可被衍生形成阳离子侧基。

[0041] 优选,聚合涂料由至少一种单体产生,该单体选自二烯丙基二甲铵、烯丙胺、甲基丙烯酰氨基丙基三甲铵、丙烯酰胺、丙烯酸、异丁烯酰氧基乙基三甲铵、4-乙烯基-苄基三甲铵、甲基丙烯酸、丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸羟乙酯、4-乙烯基吡啶鎓、4-乙烯基-1-甲基吡啶鎓、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸 2-乙基己酯、丙烯酸二甲氨基乙酯、氯化丙烯酸二甲氨基乙酯甲基季铵盐、二甲氨基丙基丙烯酰胺、氯化二甲氨基丙基丙烯酰胺甲基季铵盐、丙烯酰氧乙基二甲基苄铵、丙烯酰氧乙基三甲铵、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯、甲基丙烯酰氧乙基二甲铵、甲基丙烯酰氧乙基三甲基苄铵、乙烯、乙烯亚胺、丙烯、苯乙烯、氯乙烯、异丁烯、三甲基-2-甲基丙烯酰乙铵、三甲基-2-甲基丙烯酰基氨基丙铵和它们的混合物。

[0042] 在本发明的另一个优选实施方案中,聚合涂料包含阳离子单体与至少一种其它单体的共聚物。优先地,聚合涂料包含二烯丙基二甲铵与至少一种其它单体的共聚物。最优选,该至少一种其它单体包含乙烯基型单体。在一个实施方案中,聚合涂料所含的共聚物含有二烯丙基二甲铵和丙烯酸单体单元。在另一个实施方案中,聚合涂料所含的共聚物含有二烯丙基二甲铵和丙烯酰胺单体单元。在本发明的另一个实施方案中,聚合涂料所含三元共聚物含有二烯丙基二甲铵、丙烯酸和甲基丙烯酸羟乙酯单体单元。

[0043] 优选,根据本发明的聚合涂料是“非-肽的”,即单体单元之间的键主要是并且,优选基本上是非-肽性质的。优选,聚合涂料包含不多于约 25% 的肽单体键,即单体单元之间至多约 25% 的键含有肽键。更优选,不多于约 10% 的单体键是肽键,并且最优选不多于约 5% 的单体键是肽键。在某些优选的实施方案中,聚合涂料完全没有肽键。

[0044] 本发明聚合涂料中所用的聚合物优选具有相对高的分子量。优选高分子量聚合物是因为与这种高分子量有关的高电荷密度。因此,虽然优选高分子量,但根据本发明,如果较低分子量的聚合物表现出被认为与本文所述高分子量聚合物的电荷密度相等的足够高的电荷密度,则具有比本文所述分子量更低的分子量的聚合物也是有用的。

[0045] 聚合涂料中所用的聚合物优选具有大于约 75,000 道尔顿,更优选大于约 100,000 道尔顿的分子量。在特定的实施方案中,聚合物具有约 250,000 至约 750,000 道尔顿,最优选约 400,000 道尔顿至约 500,000 道尔顿范围内的分子量。除非另有注释,分子量在本文表示为重均分子量 (M_w),其由下式 (7) 定义

$$[0046] \quad \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}, \quad (7)$$

[0047] 其中 N_i 是具有分子量 M_i 的聚合物分子数 (或那些分子的摩尔数)。

[0048] 在一个优选的实施方案中,聚合涂料包含 PDDA,如上面式 (5) 中所示,其中 n 是约 500 至 6,000,优选约 2,000 至约 5,000,更优选约 3,000 至约 4,000 之间的整数。在另一个优选的实施方案中,聚合涂料包含 PAH,如上面式 (6) 所示,其中 n 是约 1,000 至约 15,000,优选约 5,000 至约 12,000,更优选约 8,000 至约 10,000 之间的整数。

[0049] 在本发明的一个方面,提供一种制备优先适于固定生物样品的有涂层的基材的方法。通常,该方法包括提供具有表面的基材,该表面包含许多阴离子基团,如上所述,使基材与含有非-肽聚合涂料溶液的组合物接触,以在该基材的至少一部分表面上形成聚合涂料的涂层,并干燥涂覆在基材表面上的聚合涂料。

[0050] 根据本发明方法所用的基材可以是含有表面的任何基材,该表面具有许多阴离子基团且显示净负电荷并且适用于在其上固定样品。优选,基材是适用作诊断工具、观测工具、抗-污染工具和其它类似工具的物品,其使用对于本领域技术人员而言是显而易见的。优选,本发明方法中所用的基材包含玻璃、金属、陶瓷、天然或合成聚合物、天然或合成纤维材料,及其混合物。适用于所述方法中的基材的具体、非限制性例子包括载玻片、珠、试管、比色皿、浸渍片、拭子、纱布等。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,使用聚合涂料涂覆的基材是平板或载玻片,如显微镜载玻片。载玻片可包含本领域通常接受的、本身有用的任何材料。例如,载玻片可由玻璃、陶瓷或聚合材料构成。当使用玻璃时,玻璃可以是主要包含二氧化硅的任何种类的标准玻璃,如标准钠钙玻璃。可选择性地,玻璃可以是特种玻璃,如硼硅玻璃。

[0052] 当载玻片由聚合物构成时,优选聚合物,以其常态,包含能够与聚合涂料的阳离子基团相互作用的阴离子基团。然而,在缺少这种基团的情况下,聚合物可被衍生以增强细胞粘附。根据本发明的这种实施方案适用作载玻片的聚合物例子包括,但不限于,聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸羟酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚四氟乙烯、氟化乙烯和聚二甲基硅氧烷。该聚合物可以是均聚物、共聚物、三元共聚物或物理聚合物混合物。

[0053] 在本发明方法的优选实施方案中,聚合涂料为溶液形式,其可以是水溶液或有机溶液形式。本领域已知的任何适宜溶剂均可用于溶解聚合涂料,如去离子水用于制备水溶液或醇用于制备有机溶液。该溶液可具有约 0.001% (w/v) 至约 50% (w/v) 的聚合涂料浓度。优选,溶液中聚合涂料的浓度为约 0.01% 至约 10%,还更优选约 0.05% 至约 2%,更优选约 0.1% 至约 1%,并且最优选约 0.15% 至约 0.75%。

[0054] 根据本发明特别令人意外的是,在某些实施方案中,较低浓度的溶液可用于制备有涂层的基材,其固定能力优于使用较高浓度溶液制备的有涂层的基材。例如,在特定的实施方案中,显示具有约 0.25% 聚合涂料浓度的溶液特别有利于制备根据本发明的预涂基

材。

[0055] 如上所述,适用于本发明的聚阳离子聚合物可以以与抗衡离子(例如,在 PDDA 情况下的氯化物和 PAH 情况下的氢氯化物)偶合的中性状态存在。当为溶液形式时,离子倾向解离。因此,聚合物以其阳离子状态存在,现成可用作根据本发明的固定剂。

[0056] 本发明还包括促进基材上结合位点的活化,由此增加可被用于与聚合涂料上阳离子基团相互作用的阴离子位点数。根据本发明,用于活化基材上阴离子结合位点的本领域中已知的任何方法都是有用的。

[0057] 根据本发明的一个实施方案,可调节聚合涂料的 pH。聚合涂料 pH 的这种调节可以是升高或降低 pH 且可在使用聚合涂料涂覆基材之前或之后进行。调节聚合涂料 pH 的这种能力对于通过与聚合涂料接触时基材的脱质子化而增加基材上阴离子结合位点数特别有利。通常,增加基材表面的 pH 将促进脱质子化并增加可利用的阴离子结合位点数。

[0058] 优先地,将包含聚合涂料的溶液的 pH 调节至优选的 pH。在一个实施方案中,溶液的 pH 为至少约 6。换句话说,溶液 pH 为约 8、约 9、约 10、约 11、约 12、约 13 或约 14。在一个优选的实施方案中,包含聚合涂料的溶液的 pH 为约 8 至约 14,优选约 8 至约 10。

[0059] 在使基材与聚合涂料接触后,优选在进一步处理或使用前,干燥涂覆在基材上的聚合涂料。可通过本领域中通常已知的任何方法评价聚合涂料的干燥。在本发明的一个实施方案中,聚合涂层至少被干燥至视觉干燥点。湿润聚合材料与干燥聚合材料之间的视觉差异很容易被本领域技术人员识别。

[0060] 聚合涂料的干燥可通过本领域中通常接受的任何方法实现且可包括被动干燥或主动干燥(例如,迫风,如风扇)。涂覆在基材上的聚合涂料可在环境温度或升高的温度下干燥。将本文所用的环境温度理解为指周围环境的温度。在一个实施方案中,环境温度为平均室温,通常被认为是在约 20°C 至约 25°C (约 68 °F 至约 77 °F) 的范围内。当然,本发明不排除低于约 20°C 的温度,事实上,干燥可在低至约聚合涂料冻结温度的温度下进行。

[0061] 涂覆在基材上的聚合涂料的干燥也可在升高的温度下进行。温度可升高直到大约其中进一步增加将引起聚合涂料降解的温度。因此,涂覆在基材上的聚合涂料可至少部分在升高至约 35°C 至约 120°C (约 95 °F 至约 248 °F),更优选约 45°C 至约 80°C (约 113 °F 至约 176 °F),最优选约 50°C 至约 60°C (122 °F 至约 140 °F) 的温度下干燥。

[0062] 干燥涂覆在基材上的聚合涂料的时间段可根据干燥的温度和方法而变化。通常,干燥时间可从约 1 分钟至约 1 小时而变化,或更长时间。例如,当在环境温度下干燥涂覆在基材上的聚合涂料时,这种干燥优选进行至多约 1 小时的一段时间,更优选约 5 分钟至约 1 小时的一段时间,并且最优选约 10 分钟至约 30 分钟的一段时间。在环境温度下干燥可持续超过 1 小时而对聚合涂料不会有害。

[0063] 当在升高的温度下干燥涂覆在基材上的聚合涂料时,这种干燥优选进行约 1 分钟至约 20 分钟的一段时间,更优选约 2 分钟至约 10 分钟的一段时间。在升高的温度下干燥可花费超过约 20 分钟的一段时间,只要时间与温度的组合不会导致聚合物降解。

[0064] 在用于固定样品之前,优先冲洗,如使用去离子水冲洗其上涂有干燥聚合涂料的基材。这种冲洗适用于除去解离的抗衡离子以及未与基材进行离子相互作用的过量聚合涂料。优选在冲洗之前干燥涂覆在基材上的聚合材料,因为在冲洗步骤之前不进行干燥步骤可导致其中涂层不完全的(即,“斑驳的”)有涂层的基材。涂覆之后立即冲洗导致洗掉过

量的聚合涂料,使有涂层的基材随后固定样品的能力有限。然而,在冲洗之前干燥涂覆在基材上的聚合涂料(如上所述),促进聚合涂料与基材之前的最大离子相互作用,其提供其上涂有最大量聚合涂料(即最大电荷密度)且因此具有随后固定样品的最大能力的有涂层的基材。

[0065] 根据本发明,固定能力的最大化也是可能的,因为提供一种以可控方式将聚合涂料应用到基材上的方法,该方式使得完全消除了冲洗步骤。在涂覆方法中通常包括冲洗,以除去没有通过离子相互作用而被固定在基材上的过量聚合材料。从经济学上说这是不合乎需要的。首先,冲洗步骤增加了制备有涂层的基材所需的时间,特别是在大量生产中,如显微镜载玻片。其次,冲洗代表材料的损耗。应用在基材上的过量聚合材料(即,未与基材粘附的聚合材料)在冲洗中损失。再有,在大量生产中,冲洗中损失的聚合材料的量可总计达很大的成本。

[0066] 然而,本发明解决了这些问题。在一个实施方案中,本发明提供一种将聚合材料控制应用到基材上的方法。在该方法中,计算与基材表面上的离子基团进行最大离子相互作用所需的聚合材料的量,并仅把所需量的聚合材料应用到基材上。因此,使用聚合材料涂覆基材,并且不存在过量的量而需要冲洗步骤。优选,在使用有涂层的基材固定样品之前,仍然干燥聚合材料。

[0067] 本领域中此前还未认识到的本发明另一个令人意外的方面在于,当本发明方法特定地不包括在使基材与聚合涂料接触前,使基材表面经历清洗过程时,所得到的有涂层的基材表现出改进的固定性质。本领域中通常认可在固定步骤之前,使用于在其上固定样品的基材经历剧烈清洗。例如,当基材是显微镜载玻片时,普遍的实践是获得载玻片,如从制造商处收到,并在继续进行任意固定步骤之前洗涤载玻片。Cras, J. J. 等人 *Biosensors&Bioelectronics*, 14(1999)683-688 提供了清洗或洗涤过程的多个实例。

[0068] 根据本发明要避免的清洗过程是包括使用被认为可从基材表面有效除去有机化合物的化学品的过程。要避免的清洗过程的举例是包括使用酸(例如,盐酸、硫酸、硝酸、铬酸和铬硫酸)、碱(例如,氢氧化铵、氢氧化钠和氢氧化钾)和有机溶剂(例如,甲醇、乙醇、丙醇、甲苯、丙酮、二氯甲烷和松香水)的过程。要避免的其它清洗过程包括被设计用于使基材,如玻璃上的硅烷基团暴露的硅烷化过程。例如上述(且由 Cras, J. J. 等人进一步描述)等过程包括除基材表面的简单冲洗或擦拭之外的作用机理。因此,根据本发明处理步骤,如使用去离子水冲洗基材或使用布擦拭基材表面不被排除在外。换句话说,本发明包括其中在用非-肽聚合材料涂覆之前,擦拭基材至没有灰尘或用水冲洗的过程。

[0069] 清洗过程,如上所述,要耗费时间且包括有毒化学品的使用。因此,本发明的方法特别有用,因为这类清洗步骤在优选的实施方案中被完全排除。因此,显微镜载玻片,例如,可在从制造商处收到时使用,而不包括任何清洗步骤。换句话说,在本发明的方法中,该方法不包括在使基材与非-肽聚合涂料接触之前,使基材经历清洗过程。

[0070] 在本发明的另一方面,提供一种特别适用于在其上固定生物样品的预涂基材。在一个实施方案中,该预涂基材是按照上述方法制备的。

[0071] 利用本文所述聚合涂料的根据本发明的预涂基材是有利的,因为即使非-肽聚合涂料的涂层相对薄,该预涂基材仍然有用和有效用于固定生物样品。当然,该涂层的有效性不限于这类相对薄的涂层,具有相对厚涂层的聚合涂料也是有效的。然而,制备根据本发明

的预涂基材的能力在制备这类载玻片的成本方面是特别有利的。换句话说,仅使用聚合涂层的薄涂层制备用于在其上固定样品的基材的能力是经济的,因为可使用减少量的聚合材料。

[0072] 聚合涂料,当涂覆在基材上时,可具有约 0.005 微米至约 500 微米的厚度。优选,聚合涂料具有约 0.5 微米至约 100 微米,更优选约 1 微米至约 50 微米的涂层厚度。优选,将聚合涂料以单层形式涂覆在基材上,即在本发明聚合涂料的两层或更多层之间没有夹入不同材料的居间层。然而,本发明还预想到了多层涂层。

[0073] 本发明的预涂基材不仅在增加贮存期限方面,而且在固定增加量的生物样品的能力方面特别有用。例如,在一个实施方案中,本发明的预涂基材可以表征为相对于其它先前已知的预涂基材,每表面面积能够固定的平均细胞数增加。

[0074] 在一个特定的实施方案中,在本发明预涂基材上每表面面积固定的平均细胞数相对于没有根据本发明的方法涂覆的相同面积基材(该基材与相同的细胞样品接触),每表面面积固定的平均细胞数多至少约 10%。优选,在本发明预涂基材上每表面面积固定的平均细胞数相对于没有根据本发明的方法涂覆的相同面积基材上每表面面积固定的平均细胞数多至少约 15%,最优选多至少约 20%。

[0075] 可使用本领域技术人员将认识到的各种设备和方法,测定与根据本发明预涂基材缔合的生物材料的增加细胞计数。例如,血细胞计数器可用于人工计算有代表性的多个视野内的细胞数且之后推断出每面积的总细胞数是本领域公知的。

[0076] 细胞计数还可通过使用计算机-控制的、自动化设备,如 FOCALPOINT™ Cell Profiler 自动化载玻片阅读系统(可从 TriPath Imaging, Inc. 获得)获得。FOCALPOINT™ Cell Profiler 使用特定的算法,将细胞计数中所包括的细胞数限制到诊断上有意义的值的总数(即,仅计算实际细胞数且忽略不计人为现象)。该细胞数从约 950 累积到 1,000 个图像,其是按最大可能评价的在细胞视野中以高分辨率获取的。

[0077] 优选,用于获得细胞计数的方法,如上所述,能够提供可再现的结果且能够提供以统计学显著性的方式评价的结果。因此,可以将应用在基材上的生物样品使用标准化设备处理,这样可比较性地评价使用该设备处理的样品。这种处理设备的一个例子是 PrepStain Slide Processor(可从 TriPath Imaging, Inc. 获得)。PrepStain Slide Processor 允许制备具有一致涂布量的生物样品的载玻片,这样涂了样品的载玻片的面积是一致的且可再现。这种处理特别适用于基于每基材的表面面积的平均细胞计数,评价应用在基材上的生物样品。

[0078] 本发明的一个具体实施方案提供一种适于固定生物样品以便分析的预涂基材。该基材可以是本文所述的任何基材,其上涂了例如上面所述的非-肽聚合涂料。本发明该实施方案中的预涂基材的特征在于它每表面面积能够固定的平均细胞数。可基于标准细胞系的固定,评价这种固定能力。例如,可使用人子宫颈癌细胞(通常称作 SiHa 细胞系)评价预涂基材固定细胞的能力。SiHa 细胞很容易得到,如从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection(ATCC)),通过 ATCC 号 HTB-35 鉴别。

[0079] 根据本发明的一个实施方案,提供一种预涂基材,其中当预涂基材与 1 毫升来自 SiHa 细胞系的细胞悬浮液接触时,该预涂基材表面每表面面积能够固定的平均细胞数为至少约 20,000 个细胞/平方厘米。优选,当预涂基材与 1 毫升来自 SiHa 细胞系的细胞悬浮

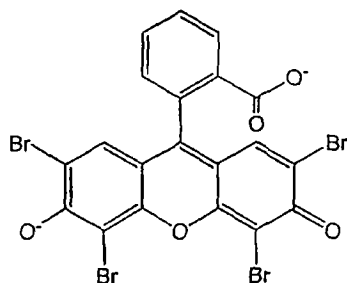
液接触时,该预涂基材表面能够固定平均至少约 21,000 个细胞 / 平方厘米,更优选至少约 22,000 个细胞 / 平方厘米,最优选至少约 23,000 个细胞 / 平方厘米。

[0080] 通过其它分析方法也可观测到根据本发明的预涂基材的固定能力提高。适用于量化有涂层的基材电荷密度的一种方法将根据每面积有涂层基材的电荷密度,直接测量电荷密度。另一种方法将通过与另一种可测量的性质相关联而间接测量电荷密度。例如,可通过光谱测量与有涂层的基材缔合(例如,吸附在其上)的染料,量化涂覆在基材上的聚合涂料的电荷密度。

[0081] 如前所注释的,有涂层的基材粘附生物样品(通常带负电荷)的能力与载玻片表面上过量正电荷的量直接相关。当带负电荷的染料与载玻片表面缔合时,载玻片表面上的过量正电荷可通过染料的光谱分析而量化。染料对特定波长电磁辐射的吸收与染料的浓度成正比是本领域中熟知的。因此,已知阴离子染料与阳离子染料之间的比例关系,则与染料缔合的染料吸收度的测量是有涂层的基材表面上过量正电荷量的可靠指示剂。换句话说,电荷密度越大,有涂层的基材上吸附的染料浓度越大,并且染料对特定波长电磁辐射的吸收越大。这种测量技术由 Tadao Sakai 和 Akihiko Hirose(Talanta59(2003)167-175)描述,其引入本文作为参考。

[0082] 本领域已知的多种染料均可用于量化涂覆在根据本发明的基材上的聚合涂料电荷密度的分析技术中。特别适用于量化本发明中有涂层的基材电荷密度的一类染料是咕吨染料,如曙红和四碘荧光素。根据本发明特别有用的染料是曙红 Y(下面式 8 中所示),其在中性水溶液中是二-阴离子的。作为二-阴离子类,该染料以 1:2 的关系结合单-阳离子类。

[0083]



(8)

[0084] 吸附在阳离子聚合物,如 PDDA 上的曙红 Y 具有约 542 纳米的最大吸收波长($\lambda_{\max}$)。因此,该波长下的吸收测量可有效量化有涂层的基材表面上的过量正电荷。这种测量可在本领域已知适用于这种测量的任何分析装置,如 UV-Vis 分光光度计上进行。下面的实施例 4 中提供涂了根据本发明的聚合涂料的基材的电荷密度测量的实施例。

[0085] 使用聚合涂料涂覆的根据本发明的有涂层的基材具有过量正电荷位点,这种过量具有有效结合生物样品的量。当聚合涂料显示至少最低可接受的电荷密度时,根据本发明有涂层的基材上的聚合涂料有效结合生物样品。根据本发明制备的预涂基材的电荷密度,通过定量测量,可很容易看出比不是根据本发明制备的预涂基材的电荷密度大得多。当曙红 Y 染料用于上述定量方法中时,根据本发明的预涂基材表现出的吸收度至少高达不是根据本发明制备的基材上吸收度的两倍。更优选,根据本发明的基材表现出的吸收度比不是根据本发明制备的基材上吸收度大至少约 3 倍。甚至更优选,根据本发明的基材表现出的

吸收度比不是根据本发明制备的基材上吸收度大至少约 4 倍。

[0086] 根据本发明的一个实施方案,提供一种适于固定生物样品以便分析的预涂玻璃载玻片。该玻璃载玻片具有许多阴离子基团,并且载玻片上涂了含许多阳离子基团的非-肽聚合涂料。预涂玻璃载玻片具有电荷密度,这样当曙红 Y 染料吸附在有涂层的载玻片上且之后经历 542 纳米波长的电磁辐射时,染料显示至少约 0.05 的吸收度,其表示涂覆玻璃载玻片的聚合涂料上的最低可接受的电荷密度(即,过量正电荷)。优选,吸收度为至少约 0.1。最优选,吸收度为至少约 0.15。

[0087] 正如本领域技术人员已知的,基材的选择可影响吸附在用于涂覆基材的涂料上的染料的测量吸收度。因此,如果根据本发明使用玻璃载玻片之外的基材,则吸收度值可在上面提供的范围内变化。虽然如此,正如先前注释的,根据本发明涂覆的基材表现出的吸收度比不是根据本发明方法涂覆的相同基材表现出的吸收度大至少约 2 倍,优选大至少约 3 倍,最优选大至少约 4 倍。

[0088] 固定在用聚合涂料涂覆的基材上的样品可以是具有能够与聚合涂料的阳离子基团相互作用的阴离子基团且由此被固定其上的任何样品。优选,该样品包含生物组分。用于固定在根据本发明的有涂层的基材上的生物样品的例子包括,但不限于,细胞、组织、流体、核酸,包括多核苷酸及寡核苷酸(例如,DNA、RNA 及其片段)、多肽和蛋白质。

[0089] 在根据本发明的一个实施方案中,将单层的生物样品固定在用聚合涂料涂覆的基材上。短语“单层”是指在有涂层的基材上仅沉积并固定一层物质。因此,除了生物样品外(特别是在生物样品上),没有其它层被固定在上面,如其它层将阻碍观察并妨碍分析直接固定在基材上的聚合涂料上的生物样品。

[0090] 生物样品可被固定在有涂层的基材上用于多种用途。优先地,该用途为诊断用途。例如,生物样品可被固定用于从较大样品中提取目的,用于另外处理或测试,并用于各种分析方法。有涂层的基材用途的具体的、非限制性例子包括,组织微阵列(TMA),细胞微阵列(CMA)、核酸微阵列及其它细胞学或组织学诊断工具。除了这类具体用途外,本发明的预涂基材还可用于固定人工或自动化诊断测定试剂盒的各种生物样品。

[0091] 本发明的预涂基材可用于多种诊断方法中。例如,预涂基材可用于固定对特定蛋白是选择性的抗体。在另一个例子中,预涂基材可用于固定反应性底物,其特别适用于分离特定蛋白,该特定蛋白是能够作用于反应性底物的酶。其它类似的诊断用途也包括在本发明内。

[0092] 在本发明的一个实施方案中,提供一种预涂珠。优选,该预涂珠适于从样品中提取生物组分。本实施方案中珠具有表面,该表面包含许多能够与非-肽聚合涂料的阳离子基团相互作用的阴离子基团,如上所述。因此,珠具有覆盖在珠表面上并与珠表面离子性连接的非-肽聚合涂料。因此有涂层的珠具有许多暴露的阳离子基团,用于与样品中目标生物组分的阴离子基团相互作用。然后,生物样品可被固定在珠表面并从样品中提取。

[0093] 预涂珠优先包含选自玻璃、聚合物、二氧化硅、金属、金属氧化物和陶瓷的材料。在一个特别优选的实施方案中,珠含有聚合物,该聚合物选自聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、聚氨酯、聚酰胺、聚碳酸酯、聚二甲基硅氧烷、聚二烷基硅氧烷、纤维素、它们的衍生物、它们的共聚物和它们的组合。

[0094] 根据本发明的预涂珠可用于多种提取和分离方法中,如先前所述和本领域技术人

员很容易预想到的。例如,预涂珠可用于各种色谱分离方法中。此外,可将预涂珠掺入到样品中并选择性除去以从其中提取生物组分。

[0095] 当然,本发明还包括多个其它实施方案,其中本文所述预涂基材可用于诊断方法中,并且发明不受目前公开内容的限制。例如,前文已经描述了其中的预涂基材是显微镜载玻片的实施方案。

[0096] 根据本发明的另一方面,提供一种分析生物样品的方法。该方法通常包括提供适于固定生物样品的预涂基材,其中该基材上涂了本文所述的聚合涂料涂覆,将生物样品固定在该预涂基材上,并分析固定在预涂基材上的生物样品。

[0097] 在一个具体的实施方案中,分析固定在预涂载玻片上的生物样品的步骤是通过使用诊断仪器进行的,然而,本发明还预期了由个体在不借助于其它仪器操作(即,仅通过利用感觉)的情况下,分析固定的样品。适用于分析根据本发明方法的固定样品的诊断仪器的例子包括,但不限于,显微镜(如光学显微镜或电子显微镜)、色谱仪、分光计和成像装置(如数字照相机、摄像机和电荷耦合装置(CCD)照相机)。

[0098] 本发明还包括各种实施方案,其中本发明的预涂基材具有诊断用途以外的用途,如先前所述。例如,在一个实施方案中,提供一种适用于采集一种或多种生物污染物的器具。在该实施方案中,如前,基材包含具有许多阴离子基团的材料,并涂了非-肽聚合涂料。该实施方案中特别优选的实施方案是,基材包含纤维材料。该纤维材料可以是天然或合成的且可以是纺织或无纺的。适用作生物污染物采集器具的纤维材料的非-限制性例子包括棉、纤维素和聚乙烯。

[0099] 在一个优选的实施方案中,生物污染物采集器具选自纱布、毛巾和医用布单。因此,该生物污染物采集器具可用于转移样品、用于医学程序中,并且用于在其中它适用于收集或采集可能或已知的生物物质以防止该生物物质污染材料或区域的其它情形中。例如,生物污染物采集器具可用于支持其上具有DNA样品的载玻片。因此,防止外来的DNA,如来自操作载玻片的个体,污染载玻片上的DNA样品。相似地,污染物采集器具可在手术部位周围使用,从而采集生物物质以防止该物质污染手术部位。

[0100] 在本发明特别优选的实施方案中,生物污染物采集器具是手套,如手术用手套。该手套可由涂了上述聚合涂料的纤维材料构成。可选择性地,该手套可由天然或合成聚合物构成(例如,“橡胶”手套)。

[0101] 根据下面的实验实施例,更清楚地描述本发明的其它实施方案。

[0102] 实验

[0103] 通过下列实施例更充分地举例说明本发明,提出实施例是为了举例说明本发明,而不应将其解释为限制本发明。

[0104] 实施例 1

[0105] 使用 PDPA 预涂玻璃显微镜载玻片

[0106] 在制备预涂玻璃显微镜载玻片中,制备 PDPA 的去离子水溶液,使溶液终浓度为 1% PDPA (+/-0.05%) w/v。然后通过加入 1N NaOH 调节溶液 pH 至 9.0 (+/-0.2)。

[0107] 将调节过 pH 的 PDPA 溶液放在人工载玻片染色浴中。将玻璃显微镜载玻片装在人工载玻片染色架上,并将具有玻璃显微镜载玻片的架加到浴中的 PDPA 溶液中,溶液覆盖载玻片直到载玻片的磨砂边缘。让载玻片在 PDPA 溶液中放置约 10 秒钟。将架从浴中取出,将

载玻片从架上取下,并将载玻片以垂直、稍成角度的位置放置,并让其在环境温度下干燥。让其上涂有 PDDA 溶液的载玻片干燥至目视干燥,然后用去离子水冲洗。再次让冲洗过的载玻片干燥,提供现成用于分析阴离子样品的有 PDDA 涂层的载玻片。

[0108] 实施例 2

[0109] 有 PDDA 涂层的显微镜载玻片与有 PLL 涂层的

[0110] 显微镜载玻片的比较

[0111] 制备 PDDA 溶液,并按照实施例 1,使用该溶液涂覆多个玻璃显微镜载玻片。使用 PREPSTAIN™ 载玻片涂层试剂 (PLL) (得自 TriPath Imaging, Inc.) 相似地涂覆多个另外的显微镜载玻片。

[0112] 将有 PDDA 涂层的载玻片和有 PLL 涂层的载玻片各自分成两组。一组有 PDDA 涂层的载玻片在环境温度下贮存 16 周。同样,一组有 PLL 涂层的载玻片在环境温度下贮存 16 周。将第二组有 PDDA 涂层的载玻片和第二组有 PLL-涂层的载玻片在环境温度下贮存 5 周,并在 45℃ 下再贮存 9 周,共贮存 16 周。在 16 周结束时,将所有四组载玻片从贮存处取出用于进一步测试,如下所述。按照与先前所述相同的方法制备一组新制的有 PLL 涂层的载玻片,作为实验中的比较,用于与稳定性组进行比较。

[0113] 使来自上述五组的各组载玻片经历单一池的细胞材料,随后使用 PREPSTAIN™ 方法染色。然后以与涂覆的表面粘附的细胞材料的量为基础比较所有五组的载玻片。

[0114] 注意到有 PLL 涂层的载玻片具有降低的稳定性,该稳定性随时间和温度而降低。这种稳定性的降低可从存在于有 PLL 涂层的载玻片上的粘附和染色的细胞材料量的降低而明显识别。在评价开始的时候,使用 PLL 新鲜涂覆载玻片 1 (对照载玻片) 并且它没有经受 16 周的测试。让使用 PLL 涂覆的载玻片 2 在环境温度下保持 16 周。载玻片 2 与载玻片 1 的比较显示与载玻片 2 粘附的细胞材料染色较差,这表明聚合物涂层在 16- 周的时间内降解。也涂了 PLL 的载玻片 4 在环境温度下放置 5 周并在 45℃ 下放置 9 周。该载玻片中的聚合物降解甚至更明显。载玻片 4 的肉眼观察显示仅有少量细胞材料与载玻片表面粘附 (即,几乎没有肉眼可见的染色细胞材料)。

[0115] 使用 PDDA 涂覆载玻片 3 并在环境温度下贮存 16 周。使用 PDDA 涂覆载玻片 5,在环境温度下贮存 5 周,然后在 45℃ 下贮存 9 周。载玻片 3 和 5 二者都显示很少至没有涂层降解。通过与有涂层的载玻片粘附的染色细胞材料的完全和均匀的分布,可很明显看到这一点。此外,与新近涂覆的 PLL 对照载玻片 (载玻片 1) 相比, PDDA 载玻片,甚至在放置 16 周后,显示涂层更深的染色,这表明与有 PLL 涂层的载玻片相比,有 PDDA 涂层的载玻片上聚合物 (且因此阳离子结合位点) 的浓度增加。

[0116] 实施例 3

[0117] 使用不同涂覆方法涂覆的显微镜载玻片的比较

[0118] 根据本发明的方法和先前描述的方法,使用 PDDA 涂覆两组显微镜载玻片。下面提供该载玻片固定能力的比较。

[0119] 根据本发明,使用 PDDA 涂覆 12 个玻璃显微镜载玻片。具体而言,制备 PDDA 在去离子水中的 0.25% (w/v) 溶液,并使用 NaOH 调节 pH 至 9.2 的终 pH。从购自制造商的包装中取出 12 个显微镜载玻片,并特别在使用 PDDA 溶液涂覆之前,不经过任何清洗过程。接下来,将没有清洗过的载玻片人工浸在 PDDA 溶液中,取出,让其在环境温度下干燥至目视干

燥,然后用去离子水冲洗以除去任何残留的 PDDA。在使用前,让冲洗过的载玻片干燥。

[0120] 按照已知的制备方法制备另外 12 个显微镜载玻片,用于与本发明的有 PDDA 涂层的载玻片比较。首先,将新取自相同包装和制造商的 12 个载玻片,按照 Cras, J. J. 等人 *Biosensors&Bioelectronics*, 14(1999)683-688 公开的方法 2 清洗。然后按照 Seyfert, S. 等人 *Biomaterials*, 16(1995)201-207 提供的方法,使用 1.0% PDDA 水溶液涂覆清洗过的载玻片。具体而言,将清洗过的载玻片人工浸在 1% PDDA 溶液中,从溶液中取出,并立即冲洗以除去任何残留的 PDDA 溶液(即,在冲洗之前没有干燥涂层)。在使用之前,让冲洗过的载玻片干燥。

[0121] 为了制备用于显微镜载玻片固定的细胞样品,获得 3 瓶 SiHa 对照细胞(来自 TriPath Imaging, Inc.)。实验中所用的 SiHa 细胞来自 Friedl, F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 135(1970)543-545 中首先描述的单一细胞系。将 3 个瓶子的内容物离心(800g, 10 分钟),以使细胞压缩成颗粒状物。弃去上清液,并将细胞重悬浮于去离子水中。然后通过离心(800g, 10 分钟)将细胞再次压缩成颗粒状物。弃去上清液,并将细胞重悬浮于约 30 毫升去离子水中。将 1 毫升细胞悬浮液转移到 24 个圆锥形试管的每一管中,并按照标准方案,使用 TriPath Imaging PREPSTAIN™ Slide Processor 仪器处理样品(将样品涂在载玻片上并染色)。

[0122] 将载玻片染色并盖上盖玻片后,使用 TriPath Imaging FOCALPOINT™ Slide Profiler 评价载玻片。通过仪器计算各载玻片上的细胞数,并从仪器的数据库中提取各显微镜载玻片的细胞计数(细胞数与通过 Slide Profiler 记录的目标数成正比)。

[0123] 将各显微镜载玻片上的细胞样品制备成具有 1.3 厘米(13 毫米)已知直径的均匀圆圈。因此,各载玻片上的样品面积为 1.33 平方厘米(132.7 平方毫米)。下面显示了各载玻片上固定的细胞数。表 1 提供了根据本发明方法制备的载玻片上固定的细胞数,表 2 提供按照先前所述方法制备的载玻片上固定的细胞数。

[0124]

表 1

载玻片编号	细胞计数
1	28,997
2	27,914
3	25,992
4	24,398
5	22,525
6	39,738
7	41,413
8	36,446
9	38,968
10	26,200
11	27,023
12	35,053
平均值	31,222

[0125]

表 2

载玻片编号	细胞计数
13	25,521
14	24,361
15	24,712
16	25,086
17	26,011
18	25,419
19	23,528
20	29,788
21	28,230
22	22,035
23	25,843
24	24,146
平均值	25,390

[0126] 使用 Student's t-分布对上面表 1 和表 2 中提供的细胞计数进行比较,揭示小于 0.005 的显著性水平。因此,细胞计数说明根据本发明制备的有 PDDA 涂层的载玻片固定的平均细胞数大于按照先前已知方法制备的有 PDDA 涂层的载玻片,具有统计学显著性。具体而言,本发明的有 PDDA 涂层的载玻片固定的平均细胞数较之按照先前已知方法制备的有 PDDA 涂层的载玻片上固定的平均细胞数多 22.97%。

[0127] 如上所注释的,各载玻片上的细胞样品面积为 1.33 平方厘米 (132.7 平方毫米)。因此,可计算已知表面面积上固定的平均细胞数。使用根据本发明制备的载玻片,每表面面积固定的平均细胞数为 23,475 个细胞 / 平方厘米 (235.2 个细胞 / 平方毫米)。相比之下,按照先前已知方法制备的载玻片每表面面积固定的平均细胞数仅为 19,090 个细胞 / 平方厘米 (191.3 个细胞 / 平方毫米)。

[0128] 实施例 4

[0129] 通过所吸附曙红 Y 染料的 UV 吸收分析用 PDDA 涂覆的载玻片

[0130] 获得 15 个 ESCO 显微镜载玻片 (目录号 2951)。留出 3 个载玻片用作对照载玻片。将剩余的 12 个载玻片分为 4 组,每组 3 个载玻片。第 1 组载玻片使用 pH 约 9.2 的 1% PDDA 溶液涂覆。让有涂层的载玻片干燥 1 小时,用去离子水冲洗,并让其再干燥 1 小时。第 2 组载玻片使用 pH 约 9.2 的 1% PDDA 溶液涂覆。立即用去离子水冲洗有涂层的载玻片 (没有干燥 PDDA 涂层),并让冲洗过的载玻片干燥 1 小时。第 3 组载玻片使用 pH 约 5.3 的 1% PDDA 溶液涂覆。让有涂层的载玻片干燥 1 小时,用去离子水冲洗,并让其再干燥 1 小时。第 4 组载玻片用 pH 约 5.3 的 1% PDDA 溶液涂覆。立即用去离子水冲洗有涂层的载玻片 (没有干燥 PDDA 涂层),并让冲洗过的载玻片干燥 1 小时。没有涂覆第 5 组载玻片 (对照载玻片)。

[0131] 制备上面 5 组中的所有载玻片以便下列处理,即将各载玻片放在 Hettich 显微镜载玻片-支架底部中,并把 Hettich 固定室放在载玻片上,以隔离一部分载玻片。使用去离子水中 200 微升 5% w/v 曙红 Y 溶液处理各载玻片表面的隔离部分达 1 分钟。真空抽吸除去染料溶液,并让用 2.5 毫升去离子水处理各载玻片两次,在真空抽吸除去之前,让每次冲洗维持 1 分钟。然后使用 2.5 毫升异丙醇处理各载玻片两次,在真空抽吸除去之前,让每次冲洗维持 1 分钟。然后从载玻片支架中取出各载玻片,并让其干燥至少 10 分钟。使用染料处理的各载玻片具有约 240 平方毫米面积的圆形染色部分,圆形染色部分的中心距离载玻片的未经磨砂的短端约 17.5 毫米。

[0132] 使用 UV-Vis 分光光度计在 542 纳米处进行光谱分析。使用普通的、未处理的、没有涂层的玻璃载玻片将仪器调零。测量的各载玻片的吸收度 (在下面表 6 中提供) 显示了在冲洗之前没有干燥聚合涂层的情况下涂覆的载玻片与通过本发明方法涂覆的那些之间的显著性差异。有 PDDA 涂层的载玻片带正电荷表面上吸附的曙红 Y 比在使用去离子水冲洗之前,让其在环境温度下干燥约 1 小时的载玻片多得多。

[0133] 表 3

[0134]

载玻片处理的方法	平均吸收度
第 1 组 - PDDA 涂覆的 (1%), pH 9.2, 冲洗之前干燥	0.158
第 2 组 - PDDA 涂覆的 (1%), pH 9.2, 冲洗之前没有干燥	0.037
第 3 组 - PDDA 涂覆的 (1%), pH 5.3, 冲洗之前干燥	0.109
第 4 组 - PDDA 涂覆的 (1%), pH 5.3, 冲洗之前没有干燥	0.023
第 5 组 - 没有被涂覆	0.002

[0135] 在没有干燥的情况下涂覆的载玻片 (第 2 组) 与根据本发明方法涂覆的载玻片 (第 1 组) (都在 pH9.2 下) 的直接比较表明, 根据本发明制备的载玻片上的过量正电荷多约 4.3 (+/-0.8) 倍。相似地, 在没有干燥的情况下涂覆的载玻片 (第 4 组) 与根据本发明方法涂覆的载玻片 (第 3 组) (都在 pH5.3 下) 的直接比较表明, 根据本发明制备的载玻片上的过量正电荷多约 4.7 (+/-3.0) 倍。玻璃本身对曙红 Y 染料吸附的贡献忽略不计, 正如没有涂层的载玻片 (对照载玻片) 的接近 - 零的吸收值所显示的那样。因此可以将曙红 Y 染料的吸附仅仅归于载玻片上涂覆的 PDDA 所携带的正电荷。

[0136] 本文提出的发明所涉及的领域中的技术人员将会想到这些发明的许多改进及其它实施方案, 其具有先前描述中提供的教导的益处。因此, 应理解本发明不限于所公开的具体实施方案, 改进及其它实施方案也被包括在所附权利要求的范围内。虽然本文中使用了特定的术语, 但仅在一般且描述性意义上, 而不是为限制的目的使用它们。