



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113686824 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 19

(21) 申请号 202110542583.0

(22) 申请日 2021.05.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113686824 A

(43) 申请公布日 2021.11.23

(30) 优先权数据
20175412.4 2020.05.19 EP

(73) 专利权人 游长江
地址 102206 北京市昌平区林湖家园二区
18号楼4层一单元402

专利权人 雅可布·佩勒

(72) 发明人 游长江 雅可布·佩勒

(74) 专利代理机构 北京知元同创知识产权代理
事务所(普通合伙) 11535
专利代理师 张炳楠

(51) Int. Cl.
G01N 21/64 (2006.01)
C01B 32/194 (2017.01)

(56) 对比文件

US 2019169463 A1, 2019.06.06
Yuko Ueno等.On-Chip FRET Graphene
Aptasensor.《Int. J. of Automation
Technology等》.2018,第12卷(第1期),第38页左
栏第1-2段,第39页右栏第2段,第43页左栏第1
段.

Ricardo Miguel Ribeiro Adã
o.Development of a Nanoscale-Sensitive
DNA Sensor using Functionalized Graphene
Substrates and Fluorescence Lifetime
Characterization.《Dissertation submitted
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in
Physics Engineering》.2017,第4页图1.2,第21
页第2段,第30页第4-6段,第31页第1段,第43页
第2段,图3.4、4.16、4.23.

审查员 翟千里

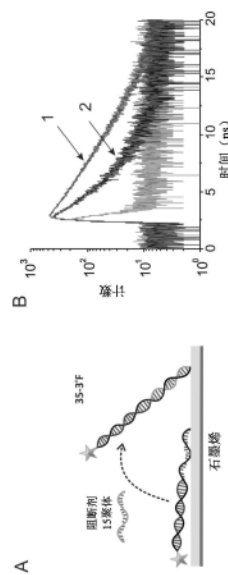
权利要求书2页 说明书23页 附图7页

(54) 发明名称

一种石墨烯诱导的能量转移量化生物分子
的结构和动力学的方法和装置

(57) 摘要

本发明涉及生物分子的结构和活性测定,属
于生物传感器应用领域。具体地,本发明通过开
发双亲性涂层获得生物功能化的石墨烯层,由此
制得作为对生物分子敏感的传感器,可以对蛋白
质结构进行亚纳米精度的分析以及对核酸分子
杂交进行灵敏检测。本发明用双亲性涂层获得的
生物功能化石墨烯层、对生物分子的结构和活性
的分析方法以及获得的传感装置在科学研究、医
学诊断和药物筛选中具有广泛的应用。



1. 一种确定目标分析物的结构和/或动力学的方法,包括将目标分析物固定到石墨烯诱导的能量转移(GIET)装置,并测定其与距离相关的GIET效率,

所述装置具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层,所述装置通过如下方法制备得到,包括:

(a) 将石墨烯层转移到所述支撑层,以形成在顶部具有石墨烯层的支撑层;

(b) 将两亲性涂层施加到步骤(a)的石墨烯层上,以在该石墨烯层上形成非共价表面涂层;和

(c) 获得具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置;

其中,所述两亲性涂层包含具有疏水基团和亲水基团的两亲性分子,所述疏水基团和亲水基团通过连接基团连接,其中该连接基团为聚合物,其中,所述两亲性涂层的分子之间不发生交联。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中:

(i) 所述亲水基团包含亲和力捕获部分,和/或

(ii) 所述疏水基团包括以下中的任一种:多环芳烃衍生物、环炔烃、表面粘附蛋白、和/或脂族胺。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述疏水基团包括以下中的任一种:芘、环辛炔衍生物、牛血清白蛋白、和/或脂肪胺衍生物。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述环辛炔衍生物为苯并稠合的环辛炔衍生物,所述脂肪胺衍生物为十八烷基胺衍生物。

5. 根据权利要求2的方法,其中所述亲和力捕获部分为目标分析物捕获部分,并且其中该目标分析物为生物分子,该生物分子包括肽或蛋白质、适体、核酸、脂质和碳水化合物中的任一种。

6. 根据权利要求5的方法,其中该目标分析物为蛋白原性分子或核酸分子。

7. 根据权利要求5的方法,其中该目标分析物为蛋白质、DNA或RNA。

8. 根据权利要求2的方法,所述亲和力捕获部分为:

(a) 蛋白质捕获配体;或

(b) 核酸捕获配体;或

(c) 螯合剂。

9. 根据权利要求8的方法,其中,所述蛋白质捕获配体为卤代烷衍生物;所述核酸捕获配体为互补核酸序列、亲和素或链霉亲和素或结合蛋白;所述螯合剂为基于羧酸的螯合剂。

10. 根据权利要求8的方法,其中所述蛋白质捕获配体为氯代烷衍生物;所述螯合剂为基于二乙酸或三乙酸的螯合剂。

11. 根据权利要求8的方法,其中所述螯合剂为多价螯合剂。

12. 根据权利要求1的方法,其中所述连接基团为聚(乙二醇)(PEG)。

13. 根据权利要求1的方法,所述两亲性涂层包含不具有亲和力捕获部分的两亲性分子。

14. 根据权利要求1所述的方法,还包括以下步骤:将目标分析物固定到步骤(c)的所述石墨烯层的非共价修饰的表面的步骤。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述目标分析物通过靶向或连接到所述一种或

多种两亲性分子的功能性部分固定到所述石墨烯层的非共价表面。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述功能性部分靶向或连接至所述一种或多种两亲性分子的亲水基团。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法, 其中, 所述支撑层包括二氧化硅类材料、UV可固化塑性材料、玻璃、硅和/或热塑性材料中的任一种。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述支撑层包括二氧化硅类基底。

19. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述支撑层包括二氧化硅玻璃。

20. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法, 通过荧光猝灭测定。

21. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法, 所述方法用于测定目标分析物的轴向尺寸和/或轴向构象变化。

22. 权利要求1至16中任一项所述的方法, 其中, 可检测GIET区域的下限为0.3nm、0.5nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1nm、1.5nm、2nm、2.5nm、3nm、3.5nm、4nm、4.5nm或5nm。

23. 根据权利要求22所述的方法, 所述可检测GIET区域为1-50nm。

24. 根据权利要求22所述的方法, 所述可检测GIET区域为3-40nm。

25. 根据权利要求24所述的方法, 所述可检测GIET区域为5-30nm。

26. 根据权利要求1所述的方法, 其中两亲性分子为: trisNTA-PEG-DBCO、trisNTA-PEG-苾。

一种石墨烯诱导的能量转移量化生物分子的结构和动力学的 方法和装置

技术领域

[0001] 本发明整体涉及生物分子的结构和活性测定。更具体地,本发明涉及制造具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置的方法,以及此类装置用于测定生物分子尤其是核苷酸杂交、蛋白质和蛋白质复合物的结构和结构动力学的用途。本发明还涉及用于石墨烯生物功能化的新型化合物,尤其是用于石墨烯层的非共价表面涂覆的新型两性分子,以及它们在本发明的制造方法和装置中的用途。

背景技术

[0002] 关于蛋白质和蛋白质复合物结构的知识对于了解它们的功能(尤其是在制药应用的背景下)至关重要。基于Foerster(荧光)共振能量转移(FRET)的荧光方法已经广泛用于蛋白质结构的探索。在不需要复杂仪器的情况下,FRET及其衍生的发光(或基于镧系元素)共振能量转移(LRET)方法报告了蛋白质在活细胞复杂生物环境中的结构动力学。

[0003] FRET的速率随着分子间距离 r 和Foerster半径 R_0 的 $(r/R_0)^{-6}$ 相关性而急剧衰减。由于 R_0 通常为几纳米,因此FRET的有效范围在10nm内。然而,许多蛋白质都具有扩展超过该距离的流体动力学半径。由多个亚基组成的蛋白质复合物具有数十纳米的大尺寸也是相当常见的。因此,本领域亟需开发空间精度类似于FRET但灵敏度距离延长的方法。

[0004] 石墨烯附近荧光发色团的荧光猝灭已经在生物传感中得到广泛应用。在靠近但未接触石墨烯的情况下,受激荧光发色团与石墨烯等离激元发生远距离无辐射电磁耦合。这种现象类似于金属诱导的能量转移(MIET)(Chizhik等人,2014年,Nature Photonics,第8卷,第124页),并且在下文中称为石墨烯诱导的能量转移(GIET)。

[0005] 石墨烯的原子厚度确保了高光学透明度和极高的等离激元约束。理论计算已经预测,GIET的能量转移速率与到石墨烯的垂直距离 d 的关系为 d^{-4} (Swathi等人,2009年,The Journal of Chemical Physics,第130卷第8期,第086-101页)。预测GIET的灵敏区域高达30nm,这对于结构生物学来说非常有吸引力。然而,对于GIET在蛋白质结构分析中的应用,石墨烯的表面生物功能化为关键的先决条件。必须避免石墨烯电子性质的恶化,同时应保持蛋白质和蛋白质复合物的结构完整性。常用的石墨烯氧化引入了对碳键的修饰。这些修饰可影响石墨烯等离激元(Dreyer等人,2010年,Chemical Society Reviews,第39卷第1期,第228页),从而改变了GIET的距离相关性方式。由于这些原因,石墨烯的非共价生物功能化成为基本要求。此外,蛋白质在非共价修饰的石墨烯上的位点特异性固定有利于确保完整的蛋白质功能性和受控的蛋白质取向。

[0006] 本领域需要使用GIET来定量检测大量生物分子的结构和动力学的新型方法以及开发用于石墨烯的非共价生物功能化的新型化合物。此类基于GIET的方法及其产品可以减少样品消耗并节省分析时间,同时可以通过将GIET装置与微流控系统、采样系统等集成来实现候选药物的自动大规模筛选。本发明通过本文所公开和要求保护的主题来解决本领域的需求。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种制造具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置的新型方法,以及此类装置用于杂交、测定生物分子尤其是核苷酸、蛋白质和蛋白质复合物的结构和动力学的用途。此外,本发明提供了用于石墨烯生物功能化的新型化合物,尤其是用于石墨烯层的非共价表面涂覆的新型两亲性分子,以及它们在本发明的制造方法和装置中的用途。

[0008] 令人惊讶地是,已经发现石墨烯诱导的能量转移(graphene induced energy transfer, GIET)的距离相关性可以被校准,从而用于结构上定义的生物分子的尺寸和动力学的高精度定量分析,这些结构上定义的生物分子包括例如核苷酸、蛋白质、蛋白质复合物、具有内在无序结构域的蛋白质或具有至多50nm的尺寸的蛋白质复合物。本发明提供了石墨烯层的生物功能化,以用于生物分子的位点特异性固定,从而测定结构或构象变化。令人惊讶地是,已经发现在基于GIET的方法中使用本发明的石墨烯的非共价生物功能化,可以保持生物分子的结构完整并且可以控制它们的取向。因此,生物分子在与其他分子相互作用方面的功能得以保留。

[0009] 本发明的基于GIET的方法的特征在于包括三个主要步骤:

[0010] (i) 将(市售)石墨烯(单)层转移到支撑层(例如玻璃基底)上;

[0011] (ii) 对石墨烯层的表面进行生物功能化以用于生物分子的位点特异性固定;以及

[0012] (iii) 测定荧光猝灭以获得荧光发色团到石墨烯的垂直距离。

[0013] 在一个方面,本发明提供了一种制造包括在支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置的方法。在第二方面,本发明提供了用于石墨烯层的非共价表面涂覆的新型两亲性分子。疏水末端可利用通过脂质类似物的范德华相互作用,或利用通过芘或二苯并环辛炔(DBCO)的 π - π 相互作用。可将亲和力捕获部分,诸如三-次氨基三乙酸(tris-NTA),引入另一末端,以用于生物分子的位点特异性的、可逆的固定。末端可通过聚乙二醇(PEG)连接。在第三方面,本发明提供了通过本文公开的方法制造的装置。在第四方面,本发明提供了本文公开的制造装置用于通过荧光强度和/或荧光寿命验证距离相关性GIET的用途。石墨烯的透明度使得寿命测定非常快速地完成。DNA可用作几何上定义的纳米尺。在本发明的第五方面,本文公开的用于支撑层上的生物功能化石墨烯的手段和方法可用作尤其用于DNA杂交测定的装置,这些DNA杂交测定包括目标基因组序列的临床PCR(聚合酶链反应)测试。在第六方面,本发明提供了使用本文公开的制造装置来测定尺寸、结构或动力学的方法,该尺寸、结构或动力学包括生物分子的构象变化,尤其是核苷酸、结构上定义的蛋白质、蛋白质复合物、具有内在无序结构域的蛋白质或具有至多50nm尺寸的蛋白质复合物的构象变化。在本发明的第七方面,本文提供的方法、装置和组合物可用于分析或诊断应用中。

[0014] 本发明尤其提供:

[0015] [1]一种制造具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

[0016] (a) 将石墨烯层转移到支撑层,以形成在其上具有石墨烯层的支撑层;

[0017] (b) 将两亲性涂层施加到步骤(a)的石墨烯层上,以在该石墨烯层上形成非共价表面涂层;以及

[0018] (c) 获得具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置。

[0019] [2]根据[1]所述的方法,其中该两亲性涂层包含具有疏水基团和亲水基团的两亲性分子,该疏水基团和亲水基团可通过或不通过连接基团连接。

[0020] [3]根据[1]或[2]所述的方法,其中:

[0021] (i) 该亲水基团包含亲和力捕获部分,和/或

[0022] (ii) 该疏水基团包括以下中的任一种:多环芳烃衍生物,优选为芘;环炔烃,优选为环辛炔衍生物,更优选为苯并稠合的环辛炔衍生物;表面粘附蛋白,优选为牛血清白蛋白;和/或脂族胺,优选为脂肪胺衍生物,更优选为十八烷基胺衍生物。

[0023] [4]根据[3]所述的方法,其中该亲和力捕获部分为目标分析物捕获部分,并且其中该目标分析物为生物分子,该生物分子包括肽或蛋白质、适体、核酸、脂质和碳水化合物中的任一种,其中该目标分析物优选为蛋白原性分子或核酸分子,更优选为蛋白质、DNA或RNA。

[0024] [5]根据[4]所述的方法,其中该亲和力捕获部分为

[0025] (a) 蛋白质捕获配体,其中该蛋白质捕获配体优选为卤代烷衍生物,更优选为氯代烷衍生物;或

[0026] (b) 核酸捕获配体,其中该核酸捕获配体优选为互补核酸序列、亲和素或链霉亲和素或结合蛋白;或

[0027] (c) 螯合剂,优选为基于羧酸的螯合剂,更优选为基于二乙酸或三乙酸的螯合剂,其中该螯合剂优选为多价螯合剂。

[0028] [6]根据[2]至[5]中任一项所述的方法,其中该疏水基团和该亲水基团通过连接基团连接,其中该连接基团优选为聚合物,其中该连接基团更优选为聚(乙二醇)(PEG)。

[0029] [7]根据[1]或[2]所述的方法,其中该两亲性涂层包含不具有亲和力捕获部分的两亲性分子。

[0030] [8]根据[1]至[7]中任一项所述的方法,该方法还包括将目标分析物固定到步骤(c)的该石墨烯层的非共价修饰的表面的步骤。

[0031] [9]根据[8]所述的方法,其中该目标分析物通过靶向或连接到该一种或多种两亲性分子的功能性部分固定到该石墨烯层的该非共价表面,其中该功能性部分优选靶向或连接到该一种或多种两亲性分子的亲水基团。

[0032] [10]根据[1]至[9]中任一项所述的方法,其中该支撑层包括二氧化硅类材料、UV可固化塑性材料、玻璃、硅和/或热塑性材料中的任一种,其中该支撑层优选包括二氧化硅类基底,更优选包括二氧化硅玻璃。

[0033] [11]一种石墨烯诱导的能量转移(GIET)装置,该装置具有支撑层和在该支撑层上的[生物]功能化石墨烯层,该装置可通过[1]至[10]中任一项所述的方法获得。

[0034] [12]一种测定目标分析物的结构和/或动力学的方法,该方法包括将所述目标分析物固定到根据权利要求[11]所述的装置并测定距离相关的GIET效率,优选通过荧光猝灭。

[0035] [13]根据[12]所述的方法,该方法用于测定目标分析物的轴向尺寸和/或轴向构象变化。

[0036] [14]根据[11]所述的GIET装置或根据[12]或[13]所述的方法,其中可检测GIET区域为约1nm至50nm,优选为3nm至40nm,更优选为5nm至30nm。

[0037] [15]根据[11]所述的装置在筛选、分析和/或诊断应用中的用途。

附图说明

[0038] 图1:距离相关的GIET的校准。(A) DNA纳米尺的示意图。探针链分别在3'或5'末端与荧光素(显示为星号)缀合。(B)通过强度比(正方形,左轴)和寿命比(圆点,右轴)测量的未猝灭荧光随荧光发色团到石墨烯表面的垂直距离 d 变化的图。数值为来自3次独立测量的平均值 \pm SD。曲线表示理论预测。插图显示计算 d 的方案。石墨烯上的灰色区域表示石墨烯上的非共价涂层。

[0039] 图2:通过表面灵敏RIfs-TIRFs检测的六聚组氨酸标签化抗GFP纳米抗体和GFP的结合。(A)通过反射干涉光谱(RIfs)检测针对脂质涂覆(I)、His标签化NB固定(III)和无标签的mEGFP结合(IV)的质量信号,用灰色条标记。(B)同步延时荧光强度示踪。虚线:二氧化硅传感器。实线:石墨烯涂覆的二氧化硅传感器。

[0040] 图3:通过GIET测定的NB::GFP复合物和GFP的轴向距离。(A)通过表面灵敏RIfs-TIRFs测量获得的NB::GFP复合物和GFP的 I_{GIET}/I_0 比。(B)示出定量的轴向距离的卡通。

[0041] 图4:通过GIET对DNA的构象变化进行的定量。(A)石墨烯上35聚体ssDNA锚链的构象变化的示意图。(B)在不同条件下与35聚体锚DNA链杂交的探针链的时间相关单光子计数。灰色曲线:石墨烯上不存在15聚体阻断剂。黑色曲线2:石墨烯上存在15聚体阻断剂。黑色曲线1:玻璃上存在15聚体阻断剂。

[0042] 图5:TrisNTA-PEG-DBCO和trisNTA-PEG-苣的分子结构。

[0043] 图6:TrisNTA-PEG-苣/PEG-苣涂层的无标记固相检测(I),处理和 Ni^{2+} 加载(II),以及六聚组氨酸-GFP的固定(III)。(IV)是咪唑洗涤步骤。

[0044] 图7:GFP结合HaloTag-DARPin::BSA-HTL功能化石墨烯的无标记固相检测(黑线)。灰线表示阴性对照,其中结合在BSA功能化的石墨烯上的GFP可忽略不计。

具体实施方案

[0045] 本发明提供一种制造具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

[0046] (a) 将石墨烯层转移到支撑层,以形成在其上具有石墨烯层的支撑层;

[0047] (b) 将两亲性涂层施加到步骤(a)的石墨烯层上,以在该石墨烯层上形成非共价表面涂层;以及

[0048] (c) 获得具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置。

[0049] 如本文所用,术语“装置”表示适于通过该方法测定样品的任何仪器,并且可与术语“芯片”互换使用。本发明的典型装置是根据本文所述的方法制造的。根据本发明,术语“装置”是指用于定量测量和/或检测生物分子的结构和动力学的物体。在本发明中,装置包括在支撑层上的生物功能化石墨烯层。装置可包括在支撑层上的固体表面。术语“固体表面”是指具有刚性或半刚性表面的材料。如本文所用,装置被设计为与具有一种或多种生物分子的样品接触,该一种或多种生物分子可具有或不具有与该装置(的支撑层或固体表面)结合的能力。固体表面可根据其吸引和固定生物分子的内在能力来选择。另选地,固体表面可保留具有吸引和固定生物分子的能力的连接分子。如本文所述,生物功能化的石墨烯层

可以在支撑层的固体表面上。

[0050] 如本文所用,术语“石墨烯”包含了该术语的普通含义,并且描述了单原子厚层中的纯碳或近纯碳,其中碳原子以规则的sp²键合的原子级六边形图案密集堆积。如本文所用,“石墨烯层”不仅包括石墨烯单层,还可包括多个石墨烯层。为了方便起见,在整个公开中使用单个“石墨烯层”,其可指类似于石墨烯单层或多个石墨烯层的单个层。在各种实施方案中,石墨烯层可包括多个石墨烯层,包括两个、三个、四个、五个等石墨烯层。在优选的实施方案中,石墨烯层为石墨烯单层。此外,如本文所用,“石墨烯层”不仅包括连续的石墨烯层,还包括非连续的石墨烯层。在一个优选的实施方案中,石墨烯层为连续的。如本文所用,术语“连续的”意指石墨烯层的涂层具有沿表面的不间断延伸。其他描述连续的方式包括但不限于“恒定地”或“快速连续地重复出现”。因此,如本文所用,术语“连续的”是指覆盖整个表面而不具有使层(即支撑层)下方的材料漏出的缺口或裸露点的层。如本文所用,术语“连续的”意在包括具有来自非连续沉积物(例如,来自制造缺陷)的无意的、间歇的、孤立的中断或缺口的石墨烯层。表面上的这些缺口或裸露点可小于总表面积约1%。而在其中石墨烯层为非连续的实施方案中,对于非连续石墨烯层的空间布置不存在特别的要求。它们可周期性地或非周期性地布置在支撑层上。在所有上述实施方案中,不存在石墨烯层的优选形状,这些优选形状包括但不限于正方形、条纹、球形、三角形、椭圆形或其他不规则形状。在各种实施方案中,石墨烯层的长度为至少100nm。在一个优选的实施方案中,石墨烯层的长度大于100nm。石墨烯层的其他优选长度尺度为至少200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、1 μ m。甚至更优选大于1 μ m、10 μ m、100 μ m和1mm、5mm。在各种实施方案中,根据本发明使用的石墨烯单层的厚度为约0.34nm。在其他实施方案中,根据石墨烯层的数量,厚度为至多0.5nm,优选为至多几纳米。

[0051] 如本文所用,术语“支撑层”是指为生物功能化石墨烯层提供机械支撑的层。如本文所用,支撑层为具有刚性或半刚性表面的材料。在各种实施方案中,诸如在其上形成生物功能化石墨烯层的支撑层的情况下,支撑层的至少一个表面将为基本上平坦的。在化合物或材料库的情况下,可期望在用于不同材料的支撑层中用,例如,凹陷部分、孔、凸起区域、蚀刻沟槽等物理地分离合成区域。在一些实施方案中,用于化合物或材料库的支撑层本身将包含形成合成区域的全部或部分的孔、凸起区域、蚀刻沟槽等。在本发明的一个实施方案中,支撑层提供生物功能化石墨烯层所转移到的适当坚固的基础。在一个优选的实施方案中,本发明的支撑层为基于二氧化硅的支撑层。如本文所用,“二氧化硅”为具有硅(Si)和氧(O)原子,以及可能的附加取代基的材料,可能的附加取代基诸如但不限于其他元素,诸如H、C、B、P或卤原子;烷基;或芳基。在某些情况下,材料可进一步包括硅-碳键,该硅-碳键相对于Si原子总数的Si-C键总数的范围在介于约20摩尔%至约80摩尔%之间,或在介于约40摩尔%至约60摩尔%之间。二氧化硅支撑层优选包括二氧化硅类材料、UV可固化塑性材料、玻璃、硅和/或热塑性材料中的任一种,该支撑层优选包括二氧化硅类基底,更优选包括二氧化硅玻璃,该二氧化硅玻璃可选自1 \times 1cm²二氧化硅涂覆的传感器或玻璃显微镜盖玻片。

[0052] 在优选的实施方案中,本文所用的二氧化硅为二氧化硅涂覆的传感器的形式。如本文所用,术语“传感器”是指被配置为将能量从一种形式转换为另一种形式和/或被配置为转换输入信号的任何种类的功能部件或功能部件的布置。在一个进一步优选的实施方案中,二氧化硅涂覆的传感器用于反射干涉光谱和全内反射荧光光谱检测(RIfs-TIRFs)。在

另一个优选的实施方案中,本文所用的二氧化硅基底为玻璃显微镜盖玻片。如本文所用,“盖玻片”是指用于支撑将在显微镜下观察的生物样本的玻璃薄条。盖玻片应该具有足够的长度和宽度以支撑整个生物样本。

[0053] 在本发明的各种实施方案中,本文公开的制造方法包括使石墨烯层与支撑层接触。在一个实施方案中,石墨烯层包括保护性聚合物层。如本文所述,“转移”或“接触”是指面对面接触以使用石墨烯层涂覆支撑层。在其他实施方案中,制造方法包括(例如在室温下)干燥具有石墨烯层的支撑层。将所获得的具有石墨烯层的支撑层优选在室温下以时间控制的方式干燥,优选干燥介于15分钟至45分钟之间,更优选干燥约20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟或45分钟中的任一段时间。在各种优选的实施方案中,具有石墨烯层的支撑层在室温下干燥30分钟。如本文所用,室温可包括20°C至25°C之间的任何温度,室温优选意指约25°C。在室温干燥步骤之后,具有石墨烯层的支撑层可在介于100°C至200°C之间的温度下加热,包括例如在约100°C、120°C、150°C、170°C、180°C和200°C中的任一温度下加热。在一个优选的实施方案中,将石墨烯层的支撑层加热至约150°C的温度。加热步骤可进行介于1小时至2小时之间,1小时、1.5小时,并且最优选为2小时的间隔时间。加热的产物可在真空条件下储存以冷却,优选储存24小时。在各种实施方案中,然后将冷却的产物在两种至三种有机溶剂中温育。在优选的实施方案中,冷却的产物可在两种有机溶剂中温育,以便从石墨烯层去除保护性聚合物层。在进一步优选的实施方案中,温育可以在两种有机溶剂中依次进行。在其他优选的实施方案中,冷却的产物可首先在丙酮中温育,优选温育1小时,然后再在异丙醇中温育1小时。在进一步的实施方案中,所获得的具有石墨烯单层的支撑层可用氮气(N₂)吹干。在所有上述实施方案中,支撑层优选为基于二氧化硅的支撑层。基于二氧化硅的支撑层优选包括二氧化硅类材料、UV可固化塑性材料、玻璃、硅和/或热塑性材料中的任一种,该支撑层优选包括二氧化硅类基底,更优选包括二氧化硅玻璃,该二氧化硅玻璃可选自1×1cm²二氧化硅涂覆的传感器或玻璃显微镜盖玻片。

[0054] 本领域的技术人员应了解,可通过其他方法将石墨烯转移到支撑层。在一个实施方案中,用于转移的石墨烯可以铜箔作为基底,该铜箔可在转移过程中通过蚀刻溶液去除。蚀刻溶液包含过硫酸铵、氯化铝、氯化铁、硝酸铁中的任一种或它们的组合。在进一步的实施方案中,直接合成方法可用于将石墨烯层“转移”到支撑层上。使用气体或固体碳源通过磁控溅射、电子束蒸发或化学气相沉积将石墨烯层形成在支撑层上。优选的气体碳源为甲烷/氢气、乙烯/氢气或乙炔/氢气中的任一种。优选的固体碳源为无定形碳、石墨、富勒烯、碳纳米管中的任一种或它们的组合。在各种实施方案中,石墨烯在制造过程期间可能并非完美无缺。所获得的石墨烯层可包含氧、氢、胺基基团、羧基基团或金属离子。在这些实施方案中,除非非碳元素的含量使得石墨烯不能用两亲性分子来修饰,否则那些石墨烯层可视为无瑕疵的石墨烯层。

[0055] 根据本发明的第一方面,制造如本文所述的包括在支撑层上的生物功能化石墨烯层的装置的方法还包括用本文公开的本发明的合成化合物进行的石墨烯层的功能化。如本文所用,石墨烯的功能化是指使石墨烯与官能团前体反应以形成功能化的石墨烯层。如本文所用,术语石墨烯的“生物功能化”是指形成石墨烯层以调节生物分子与石墨烯单层的相互作用和/或固定。因此,在一些实施方案中,本文提供了通过(生物)功能化生产具有定制表面性质的石墨烯层的方法。本文所述的方法可以有利地进行,而无需为了连接官能团而

对石墨烯进行剧烈的氧化和/或还原,这种剧烈的氧化和/或还原可在石墨烯片上引入许多空穴缺陷或破坏石墨烯上的 π 电子云的其他缺陷,从而降低其电导率并因此降低其性能。另外,用于合成功能化石墨烯层的方法可为简化的、可扩展的及经济有效的,而无需长时间的反应、强功率超声处理、表面活性剂、反应性石墨插层化合物和/或非理想的电化学方法。使用本文所述的实施方案,可高产率地合成包含多种官能团的石墨烯层。此类分子可单独利用或与纳米颗粒或聚合物一起利用。在优选的实施方案中,功能化石墨烯层可为单层(生物)功能化石墨烯。在一些情况下,(生物)功能化石墨烯层可为多层(生物)功能化石墨烯。官能团前体可为能够与石墨烯成键的任何物质。官能团与石墨烯的成键可为共价的或非共价的,即是指共价和/或非共价表面涂层。在本发明的制造方法中,(生物)功能化为非共价表面涂层。如本文所用,石墨烯的“非共价”(生物)功能化可基于与本文公开的用于石墨烯层的(生物)功能化的任何化合物的范德华力或 π - π 相互作用。非共价相互作用特别适于本发明的应用,因为石墨烯纳米结构的扩展 π 体系已被证明不被中断,这意味着性质(诸如石墨烯等离激元、导电性或机械强度)不受影响。用本文公开的两亲性生物功能化化合物对石墨烯进行非共价(生物)功能化不会中断石墨烯层的电性能或机械性能。此外,通过两亲性生物功能化化合物与石墨烯层的直接接触来获得石墨烯的非共价(生物)功能化。根据本发明的在石墨烯上的(生物)功能化层的厚度为约至少0.3nm、介于0.3nm至0.5nm之间、介于0.5nm至0.7nm之间、介于0.7nm至0.8nm之间、介于0.8nm至0.9nm之间、介于0.9nm至1.0nm之间或为至少1.0nm。在一些实施方案中,根据本发明的在石墨烯上的(生物)功能化层的厚度为约至多0.3nm、0.5nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1.0nm、1.5nm、2.0nm、2.5nm、3.0nm、3.5nm、4.0nm、4.5nm或至多5.0nm。在石墨烯上的(生物)功能化层的厚度作为本发明的GIET装置的检测下限。

[0056] 因此,可利用石墨烯上方的有利的最小距离来调节生物分子在石墨烯层上的相互作用和/或固定。如上所述,所述最小距离取决于(生物)功能化层的厚度,并且为0.3nm、0.5nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1nm、1.5nm、2nm、2.5nm、3nm、3.5nm、4nm、4.5nm或5nm。因此,本发明的可检测GIET区域(灵敏GIET区域)可具有作为最小距离的下限。

[0057] 在示例性实施方案中,用本发明的两亲性生物功能化化合物对石墨烯层进行(生物)功能化的方法包括使用trisNTA-PEG-苧和BSA-HaloTag配体缀合物,它们也由本发明提供。可通过如图6中所示的针对trisNTA-PEG-苧的无标记固相检测以及如图7中所示的针对BSA-HaloTag配体缀合物的无标记固相检测表征在石墨烯层上的所述两亲性化合物的(生物)功能化层的形成。在优选的实施方案中,两亲性化合物和石墨烯层之间的非共价相互作用为通过化合物的疏水末端进行的。在各种实施方案中,通过在介于0.2ng/mm²至10.0ng/mm²之间、介于0.2ng/mm²至1.0ng/mm²之间、介于1.0ng/mm²至2.0ng/mm²之间、介于2.0ng/mm²至2.5ng/mm²之间、介于2.5ng/mm²至3.0ng/mm²之间、介于3.0ng/mm²至3.5ng/mm²之间、介于3.5ng/mm²至4.0ng/mm²之间、介于4.0ng/mm²至4.5ng/mm²之间、介于4.5ng/mm²至5.0ng/mm²之间、介于5.0ng/mm²至6.0ng/mm²之间、介于6.0ng/mm²至8.0ng/mm²之间和介于8.0ng/mm²至10.0ng/mm²之间的任一者的质量信号来表征在石墨烯上的功能化层的形成。已通过校准实验测定,质量信号变化1.0ng/mm²相应于干涉最小值(1.5阶)偏移了1.2nm的厚度。质量信号证实两亲性生物功能化化合物和石墨烯层之间稳定的 π - π 相互作用,并确定覆盖层的厚度。本发明的所有上述实施方案获得了具有支撑层和在该支撑层上的生物功能化石墨烯层的

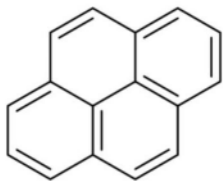
装置。

[0058] 本发明的制造方法包括将两亲性涂层施加到石墨烯层以在石墨烯层上形成非共价表面涂层的步骤。此外,根据第二方面,本发明还提供了用于在支撑层上的石墨烯的生物功能化的新合成(两亲性)化合物。如本文所述,两亲性涂层包含具有疏水基团和亲水基团的两亲性分子,该疏水基团和亲水基团可通过或不通过连接基团连接。

[0059] 如本文所用,术语“两亲性分子”通常是指具有亲水部分和疏水部分的分子,该亲水部分和疏水部分可在水或另一种溶剂中自组装形成结构(诸如囊泡或胶束)。如本文所用,术语“亲水基团”意指对水具有强亲和力的极性基团,术语“疏水基团”意指对水具有低亲和力且对油具有高亲和力的非极性基团。本发明中亲水基团和疏水基团的定义可包括本领域的技术人员知晓的所有亲水基团和疏水基团。根据本发明,两亲性分子用于涂覆在支撑层上的石墨烯层,该步骤称为(生物)功能化,如本文其他处所述。在此类实施方案中,两亲性分子也称为基质分子。

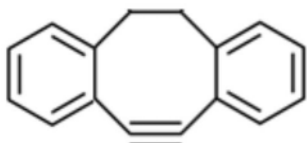
[0060] 在各种实施方案中,疏水末端与石墨烯层结合。在一些实施方案中,与石墨烯层结合的疏水基团为多环芳烃衍生物。本文中所提及的多环芳烃包括由稠合的,即共享一个或多个边的多个芳环组成的烃。多环芳烃也称为多核芳烃(“PNA”)。因此,术语“多环芳烃”、“PCA烃”、“PCA”、“多核芳烃化合物”或“PNA”在本文中可互换使用,是指具有多个稠合芳环的芳烃。在优选的实施方案中,本文所用的多环芳烃为芘。术语“芘”是本领域的技术人员已知的。它是指由四个稠合苯环组成从而形成平面芳族体系的多环芳烃(PAH)。化学式为 $C_{16}H_{10}$ 。芘的一般结构为:

[0061]



[0062] 在各种实施方案中,与石墨烯层结合的疏水基团为环炔烃。如本文所用,术语“环炔烃”是指具有至少一个内环三键的不饱和单环烃基。环炔烃的示例包括但不限于环辛炔和环壬炔。在一个优选的实施方案中,本文所用的环炔烃为环辛炔衍生物。如本文所用,“环辛炔”是指包含碳-碳三键的8元环。在一个进一步优选的实施方案中,本文所用的环辛炔衍生物为苯并稠合的环辛炔衍生物。在更优选的实施方案中,苯并稠合的环辛炔衍生物为二苯并环辛炔(DBCO)。术语“DBCO”为本领域的技术人员已知的。它是指由8元环组成的二苯并稠合环炔烃化合物。化学式为 $C_{16}H_{12}$ 。DBCO的一般结构为:

[0063]



[0064] 在一些实施方案中,与石墨烯层结合的疏水基团为脂族胺。如本文所用,术语“脂族胺”是指其中氨基基团的氮原子与脂族基团而非芳环连接的胺化合物,例如丁胺、环己胺、环己烷二胺等。如本文所用,术语“脂族二胺”是指含有两个氨基基团的脂族胺化合物的集合。在一个优选的实施方案中,本文所用的脂族胺为脂肪胺衍生物。如在整个说明书中所用,术语“脂肪胺”意指具有至少一个脂肪烷基链的脂族胺,其中脂肪烷基链为饱和或不饱

和碳。脂肪胺可包含多于一个胺部分。合适的脂肪胺为伯、仲或叔脂肪胺,诸如正癸胺、正十二烷基胺、正十四烷基胺、正十六烷基胺、正十八烷基胺、油基胺、(牛油烷基)胺、(油菜籽烷基)胺、(大豆烷基)胺、芥酸胺、(可可烷基)胺、N-(正癸基)-三亚甲基二胺、N-(正十二烷基)-三亚甲基二胺、N-(可可烷基)-三亚甲基二胺、N-(油基烷基)-三亚甲基二胺、N-(油菜籽烷基)-三亚甲基二胺、N-(大豆烷基)-三亚甲基二胺、N-(牛油烷基)-三亚甲基二胺、N-芥酸基三亚甲基二胺、N-(正癸基)-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N-(正十二烷基)-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、油基-1,3-二氨基丙烷、N-(可可烷基)-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N-(油菜籽烷基)-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N-(大豆烷基)-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N-油基-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N-(牛油烷基)-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N-芥酸基-N'-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-癸基氨基)丙基]-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-十二烷基氨基)丙基]-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-(可可烷基)氨基)丙基]-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-(油菜籽烷基)氨基)丙基]-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-(大豆烷基)氨基)丙基]-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-(十八烯基氨基)丙基)-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-(牛油烷基)氨基)丙基]-1,3-丙二胺和N-(3-氨基丙基)-N'-[3-(9-芥酸基氨基)丙基]-1,3-丙二胺。在进一步优选的实施方案中,脂肪胺衍生物为十八烷基胺衍生物。在特别优选的实施方案中,十八烷基胺衍生物为双十八烷基胺(DODA)。术语“DODA”为本领域的技术人员已知的。它是指仲胺和脂肪胺衍生物。化学式为 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}]_2\text{NH}$ 。DODA的一般结构为:



[0066] 在各种实施方案中,与石墨烯层结合的疏水基团为表面粘附蛋白。如本文所用,术语“表面粘附蛋白”是指防止目标分析物的非特异性结合的阻断剂。为了消除反应进行的表面的残余结合能力,通常使用基于蛋白质的阻断剂。阻断剂还可使与表面结合的生物分子稳定并减少非特异性相互作用。表面粘附蛋白可为链霉亲和素、中性亲和素、亲和素、细胞外基质蛋白或血清蛋白中的任一种。在一个实施方案中,细胞外基质蛋白为纤连蛋白、层粘连蛋白和胶原。血清蛋白为白蛋白、巨球蛋白和触珠蛋白中的一种。在另一个实施方案中,抗体可用作在石墨烯上的蛋白质粘附蛋白。抗体为常用的包含重链和轻链的免疫球蛋白。抗体还可为本领域的技术人员已知的单链抗体和纳米抗体。在优选的实施方案中,本文所用的表面粘附蛋白为牛血清白蛋白(BSA)。如本文所用,术语“BSA”为本领域的技术人员已知的。BSA为来源于牛的血清白蛋白蛋白质。全长BSA前体蛋白的长度为607个氨基酸(AA)。分泌时,N-末端18-残基信号肽从前体蛋白质上切除,因此起始蛋白质产物含有589个氨基酸残基。另外有六个氨基酸被切割,产生含有583个氨基酸的成熟BSA蛋白。

[0067] 因此,在特别优选的实施方案中,与石墨烯层结合的本发明两亲性化合物的疏水基团为苝、二苯并环辛炔(DBCO)或双十八烷基胺(DODA)或牛血清白蛋白(BSA)。

[0068] 在各种实施方案中,本发明两亲性化合物的亲水基团可包含亲和力捕获部分。如本文所用,术语“亲和力”是指两种试剂可逆结合的平衡常数,并表示为 K_D 。结合蛋白与配体的亲和力(诸如抗体与表位的亲和力)可为例如约1000纳摩尔(nM)至约0.1nM、约100nM至约1皮摩尔(pM)或约100nM至约1飞摩尔(fM)。如本文所用,“亲和力捕获”是指使用特异于目标分析物的部分来捕获目标分析物。如本文所用,术语“亲和力捕获部分”是指与亲和力部分

结合配偶体(例如表位、受体、配体等)结合以形成亲和力结合对的分子。同样,术语“亲和力部分结合配偶体”是指与亲和力部分结合的部分或分子,并且与术语“功能性部分”可互换使用。亲和力部分可为合成的、半合成的或天然存在的。结合可通过非共价相互作用发生,这些非共价相互作用诸如静电相互作用、偶极-偶极相互作用(例如基桑相互作用(Keesom interaction)、伦敦分散作用(London dispersion)和德拜相互作用(Debye interaction))、偶极- π 相互作用、氢键、范德华接触、范德华/伦敦分散作用、 π - π 堆积和离子键(例如盐桥)。结合可通过共价相互作用发生,从而形成例如醚键、酯键、酰胺键、磷酸酯键、希夫碱、二硫键和硫醇酯键。与目标分析物无关的示例性亲和力结合对包括例如亲和素或链霉亲和素和生物素;配体和受体;免疫球蛋白的A或G蛋白结合区和Fc区;寡核苷酸和互补序列,例如聚脱氧腺苷酸和聚脱氧胸苷酸,或聚脱氧鸟苷酸和聚脱氧胞苷酸;Ni-NTA(次氨基三乙酸,镍盐)和聚组氨酸标签化配体等。在一些实施方案中,“亲和力捕获部分”和“亲和力部分结合配偶体”为特异性结合对的成员。特异性结合对包括通过化学或物理手段彼此特异性结合的两种不同部分/分子。特异性结合配偶体包括抗原/表位及其抗原结合分子(例如抗体)、酶及其结合配偶体(包括辅因子、抑制剂和酶促进反应的化学部分)、配体(例如激素、细胞因子、生长因子、维生素等)及其受体、互补肽、特异性碳水化合物基团和凝集素、抗生素及其抗体和天然存在的结合蛋白、互补核苷酸序列、适体及其靶点、生物素和亲和素(或链霉亲和素)等。此外,特异性结合对可包括作为原始特异性结合成员的类似物的成员,例如分析物类似物。免疫相互作用特异性结合成员包括抗原、抗原片段及其表位和抗原结合分子,诸如但不限于抗体、抗体片段及其变体(包括变体的片段),无论是分离的还是重组产生的。

[0069] 在本发明中,术语“目标分析物捕获部分”是指本文所述的与特异性目标分析物有关的亲和力捕获部分中的任一种,例如蛋白质捕获部分、核苷酸捕获部分、螯合剂等。

[0070] 根据本发明,术语“核酸亲和力捕获部分”包括本文所述的亲和力捕获部分中的任一种,例如包括但不限于结合蛋白、互补核苷酸序列、适体及其靶点、生物素和亲和素(或链霉亲和素)等。每个另选方案代表本发明的一个单独的实施方案。在本发明中,蛋白质亲和力捕获部分可为酶促蛋白质捕获配体,诸如 O^6 -苄基鸟嘌呤衍生物或 O^2 -苄基胞嘧啶衍生物的酶促蛋白质捕获配体;该酶促蛋白质捕获配体可优选为卤代烷衍生物,更优选为氯代烷衍生物;或螯合剂,优选为基于羧酸的螯合剂,更优选为基于二乙酸或三乙酸的螯合剂。

[0071] 在一个实施方案中,亲和力捕获部分为 O^6 -苄基鸟嘌呤衍生物,即SNAP标签配体。SNAP-tag为182个残基的多肽(19.4kDa),该多肽可用SNAP标签配体进行特异性地且共价地标签化。在特别优选的实施方案中,亲和力捕获部分为HaloTag配体。在进一步优选的实施方案中,酶促蛋白质捕获配体可为6-氯己醇衍生物,优选为氯己烷-OEG2-胺。本文所用的HaloTag为自标记蛋白质标签,该自标记蛋白质标签可与目标蛋白质融合,从而充当功能性部分。HaloTag可为源自细菌酶的297个残基的肽(33kDa),该肽被设计为与合成配体(可通过功能性部分与目标蛋白质融合的HaloTag配体)共价结合。

[0072] 在各种实施方案中,“亲和力捕获部分”可为螯合剂。如本文所用,术语“螯合剂”为与金属配位形成螯合物的化合物。螯合剂包括含有可与单个金属离子形成配位键的两个或多个电子供体原子的分子。术语“螯合剂”应理解为包括螯合剂及其盐。在一个优选的实施方案中,本文所用的螯合剂为基于羧酸的螯合剂,更优选为基于二乙酸或三乙酸的螯合剂。

在一个实施方案中,基于二乙酸的螯合剂为亚氨基二乙酸 (IDA),该IDA可预载或不预载锌离子。在优选的实施方案中,本文所用的螯合剂为基于次氨基三乙酸 (NTA) 的试剂,该试剂可预载或不预载金属离子。这些金属离子为镍离子、锌离子、钴离子、铜离子中的任一种。根据本发明,NTA的示例性亲和力结合对(即功能性部分)为聚组氨酸标签。如本文所用,术语“聚组氨酸标签”是指允许基于亲和力固定肽和/或蛋白质的组氨酸残基的线性序列。聚组氨酸标签可包含6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个连续组氨酸残基中的任一种。在各种实施方案中,螯合剂为多价螯合剂。

[0073] 如本文进一步所述,疏水基团和亲水基团可通过连接基团连接,该连接基团优选为聚合物,更优选为聚(乙二醇) (PEG)。

[0074] 如本文所用,术语“连接基团”意指将至少两个其他部分(诸如两亲性分子中的疏水基团和亲水基团)连接在一起的部分。可使用多种连接基团,包括可生物降解的连接基团和生物聚合物。本文所述的连接基团具体包括聚合物,诸如大分子结构,优选为聚(乙二醇)(称为PEG)。本文所用的连接基团优选包含PEG的重复单元。重复单元数为1-500的整数,优选在50至500的范围内,至少为400,优选至少为200,更优选至少为100,并且甚至更优选至少为50。PEG可为支链PEG。支链的数量可为3、4、5、6、7和8。支链PEG的末端中的至少两个末端可分别与亲水基团和疏水基团共价缀合。在优选的实施方案中,其中亲水基团和疏水基团通过连接基团连接的本发明的两亲性分子包括疏水基团为多环芳烃衍生物、优选为芘的两亲性分子。在其他优选的实施方案中,其中亲水基团和疏水基团通过连接基团连接的本发明的两亲性分子包括疏水基团为环炔烃、优选为环辛炔衍生物、甚至更优选为苯并稠合的环辛炔衍生物并且甚至更优选为二苯并环辛炔 (DBCO) 的两亲性分子。

[0075] 根据上述实施方案中的任一个实施方案,两亲性分子可被认为是具有疏水基团和亲水基团的基质分子。所述疏水基团可包括以下化合物中的任一种:多环芳烃衍生物,优选为芘;环炔烃,优选为环辛炔衍生物,更优选为苯并稠合的环辛炔衍生物;表面粘附蛋白,优选为牛血清白蛋白。疏水基团和亲水基团可通过或不通过连接基团连接,其中所述连接基团优选为聚合物,更优选为其中所述连接基团为聚(乙二醇) (PEG)。

[0076] 在各种实施方案中,两亲性分子可被认为是基质分子,其中用于本发明的石墨烯层的(生物)功能化的两亲性化合物的亲水基团不包含蛋白质亲和力捕获部分。所述基质分子能够形成自组装单层。所述两亲性分子包括脂质,优选为1,2-二酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱,更优选为1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DMPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DPPC)、2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DLPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DOPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DSPC) 和1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (MPPC)、1-肉豆蔻酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (MSPC)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (PMPC)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (PSPC)、1-硬脂酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (SMPC)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (SPPC)、1-肉豆蔻酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (MOPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (POPC)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (SOPC) 中的任一种;和/或1,2-二酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺,更优选1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (DMPS)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (DPPS)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-

磷酸丝氨酸 (DOPS)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (DSPS)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (POPS) 和1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (SOPS)。基质脂质分子在实施例2、3和4中举例说明。这些基质脂质分子可以带中性电荷或带负电荷或它们的混合物。在各种实施方案中,带负电荷的脂质和中性脂质的混合物中带负电荷的脂质的摩尔比在0%至20%的范围内,1%、2%、3%、4%,优选为5%。在各种实施方案中,带负电荷的脂质和中性脂质的混合物中带负电荷的脂质的摩尔比为10%、15%或20%。在优选的实施方案中,所述分子为1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DOPC) 或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (DOPS) 或它们的二元混合物。在此类实施方案中,DOPC/DOPS的摩尔比为95:5。

[0077] 在各种实施方案中,用包含根据本文所述实施方案中的任一个实施方案的亲合力捕获部分的基质分子和不具有根据本文所述实施方案中的任一个实施方案的亲合力捕获部分的基质分子的混合物对石墨烯层进行功能化。在各种实施方案中,用于石墨烯的(生物)功能化的具有亲合力捕获部分和不具有亲合力捕获部分的基质分子的摩尔比可在介于0.001至0.999之间、优选为介于0.01至0.99之间的范围内。在其他优选的实施方案中,摩尔比可为50:50,如实施例12中trisNTA-PEG-苾/mPEG-苾所示。在其他优选实施方案中,摩尔比可为95:5,如实施例5中DOPC/trisNTA DODA所示。

[0078] 在各种实施方案中,本发明提供了合成用于石墨烯生物功能化的两亲性化合物的方法,如实施例10、11、13和14所示。在各种实施方案中,在亲水基团中包含亲合力捕获部分的两亲性化合物为trisNTA-PEG-DBCO、trisNTA-PEG-苾、trisNTA-DODA、BSA-HaloTag配体缀合物和BSA-生物素缀合物。在优选的实施方案中,在亲水基团中不包含亲合力捕获部分的两亲性化合物可为1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DOPC) 或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (DOPS) 或它们的二元混合物。在各种实施方案中,根据本文所述实施方案中的任一个实施方案的两亲性分子可合成为单层或双层。可通过质量变化检测单层和/或双层的合成。优选地,检测到的双层的质量变化为检测到的单层的质量变化的两倍。在一个示例性实施方案中,5.0ng/mm²的双层形成的特征质量变化和2.5ng/mm²的表征单层形成的精确半质量变化示出于图2A。在各种示例性实施方案中,本发明提供了合成用于石墨烯的生物功能化的DOPC脂质体或DOPS和DOPC脂质体的二元混合物的方法。阴离子DOPS优选以5摩尔%包含在混合物中。优选地,用DOPS进行生物功能化确保了带负电荷的生物分子在石墨烯层上的垂直沉积。

[0079] 在第三方面,本发明提供了一种具有支撑层和在该支撑层上的[生物]功能化石墨烯层的装置,该装置可根据本发明第一方面的实施方案中的任一个实施方案获得,并且包括本发明第二方面的实施方案中的任一个实施方案。

[0080] 如本文所公开的,装置包括涂覆在支撑层上的石墨烯层。在本发明的各种实施方案中,装置的支撑层为生物功能化石墨烯层提供适当坚固的基础。在优选的实施方案中,本发明的支撑层为二氧化硅支撑层。二氧化硅支撑层优选包括二氧化硅类材料、UV可固化塑性材料、玻璃、硅和/或热塑性材料中的任一种,其中该支撑层优选包括二氧化硅类基底,更优选包括二氧化硅玻璃,该二氧化硅玻璃可为例如1×1cm²二氧化硅涂覆的传感器或玻璃显微镜盖玻片。在优选的实施方案中,本文所用的二氧化硅为二氧化硅涂覆的传感器的形式。在一个进一步优选的实施方案中,二氧化硅涂覆的传感器用于反射干涉光谱和全内反

射荧光光谱检测 (RIfs-TIRFs)。在其他优选的实施方案中,本文所用的二氧化硅基底为玻璃显微镜盖玻片。

[0081] 在各种实施方案中,本发明的方法和GIET装置具有用本文公开的本发明的两亲性化合物进行功能化的石墨烯层。优选地,本发明的方法和GIET装置具有在二氧化硅支撑层上的石墨烯层,该石墨烯层用在本发明第二方面的背景下根据上文所述实施方案中的任一个实施方案的两亲性分子中的任一种进行功能化,这些两亲性分子尤其包括DOPC脂质体或DOPC和DOPC脂质体的二元混合物、或trisNTA-PEG-DBCO、trisNTA-PEG-苾、trisNTA-DODA、BSA-HaloTag配体缀合物和/或BSA-生物素缀合物。每个另选方案代表本发明的一个单独的实施方案。

[0082] 在其他实施方案中,本发明提供了包括根据上述实施方案制造的装置的试剂盒。该装置可用作石墨烯诱导的能量转移装置。

[0083] 在第四方面,本发明提供了利用本文公开的装置来校准石墨烯诱导的能量转移 (GIET) 相对于距离的方法。石墨烯的无间隙能带结构和布里渊区的角附近的线性色散关系导致了与频率无关、仅受精细结构常数 ($\alpha \approx 1/137$) 制约的光吸收。因此,在可见光和近红外光谱区内,这种仅一个原子厚的材料吸收了 $\pi\alpha \approx 2.3\%$ 的光。因此,石墨烯表现为非凡的能量吸收器和独特的受体系统。靠近石墨烯放置的荧光染料被强烈猝灭,并且它们从石墨烯旁移开可恢复荧光。实验已经证明,从分子(单个偶极)到石墨烯(“偶极的2D阵列”)的能量转移很大程度上取决于两者之间的距离 d 并且与 d^{-4} 成正比。虽然距离相关性已广为人知,但关于 d_0 值的报告却各不相同,该值表示猝灭效率为50%的距离。本文提供的校准方法使用荧光强度测量(例如全内反射模式)和荧光寿命测量两者来测定灵敏的石墨烯诱导的能量转移区。在优选的实施方案中,该方法利用如本文他处所述的制造装置,其中石墨烯层涂覆在支撑层上。在优选的实施方案中,本发明的支撑层为二氧化硅支撑层。二氧化硅支撑层优选包括二氧化硅类材料、UV可固化塑性材料、玻璃、硅和/或热塑性材料中的任一种,其中该支撑层优选包括二氧化硅类基底,更优选包括二氧化硅玻璃,该二氧化硅玻璃可为 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 二氧化硅涂覆的传感器或玻璃显微镜盖玻片。在优选的实施方案中,本文所用的二氧化硅为二氧化硅涂覆的传感器的形式。在进一步优选的实施方案中,二氧化硅涂覆的传感器用于反射干涉光谱和全内反射荧光光谱检测 (RIfs-TIRFs)。在其他优选的实施方案中,本文所用的二氧化硅基底为玻璃显微镜盖玻片。在其他实施方案中,本发明提供了一种装置,其中石墨烯层用根据本发明合成的两亲性化合物进行(生物)功能化。优选地,本发明提供的装置包括在二氧化硅支撑层上的石墨烯层,该石墨烯层在本发明第二方面的背景下根据上文所述实施方案中的任一个实施方案的两亲性分子中的任一种进行(生物)功能化,这些两亲性分子包括DOPC脂质体或DOPS和DOPC脂质体的二元混合物、或trisNTA-PEG-DBCO、trisNTA-PEG-苾、trisNTA-DODA、BSA-HaloTag配体缀合物和/或BSA-生物素缀合物中的任一种。每个另选方案代表本发明的一个单独的实施方案。

[0084] 在本发明的各种实施方案中,生物分子用作纳米尺,用于石墨烯诱导的能量转移 (GIET) 相对于距离的校准方法。在优选的实施方案中,单链DNA (ssDNA) 用作纳米尺的支架。优选地,ssDNA的纳米尺包含“锚”链和“探针”链,其中这两条链杂交。在优选的实施方案中,“锚”链在5'末端包含至少共同的20聚体序列,并且在3'末端包含胆固醇修饰,优选地,胆固醇修饰含有连接基团,优选的连接基团为聚乙二醇。优选地,锚链通过在3'端的胆固醇修饰

与涂覆在二氧化硅支撑层上的非共价修饰的石墨烯层连接。在其他优选的实施方案中,“探针”链包含与“锚链”互补的至少共同的20聚体序列。优选地,用作纳米尺的ssDNA包含荧光标记。在优选的实施方案中,荧光标记位于“探针”链上。如本文所用,术语“荧光标记”通常是指在用激发波长的光激发标记后以发射波长发射光的分子。荧光标记的发射覆盖可检测的紫外光、整个可见光光谱和可检测的近红外范围。优选地,发射的光谱范围在300nm至2500nm的范围内。更优选地,发射的光谱范围在350nm至2000nm的范围内。最优选地,发射的光谱范围在400nm至800nm的范围内。可用作荧光标记的具体材料的示例包括有机染料,诸如花青染料、咕吨染料、罗丹明染料、荧光素和荧光素衍生物以及稀土金属离子的螯合物。如本文所用,“荧光标记”还意指具有荧光部分和连接部分的有机分子,使得该连接部分允许该荧光部分与目标官能团共价连接。与荧光标记的构建和使用相关联的一些考虑因素包括荧光部分和连接部分之间键的稳定性、连接部分在与目标官能团连接之前和之后对荧光特性的影响、荧光部分和目标官能团之间键的稳定性(即连接之后连接部分的强度)、连接官能团与目标官能团的反应性等。当需要多种荧光标记时,每种荧光标记具有不同的荧光特性(诸如非重叠发射峰),选择用于特定应用的标记会变得非常困难,通常需要在可用荧光标记的所需特性之间进行权衡。

[0085] 对于GIET测量,分析物或分析物的相互作用配偶体可进行荧光标记。用于标记核苷酸的荧光发色团可为如本文所述的有机染料。用于标记蛋白质的荧光发色团可为有机染料分子和荧光蛋白(FP)。FP包括绿色荧光蛋白(例如GFP、mNeon)、蓝色荧光蛋白(例如BFP、CFP)、红色荧光蛋白(例如mCherry、TagRFP)、红外荧光蛋白(URFP)。

[0086] 在优选的实施方案中,荧光标记为6-羧基荧光素(FAM)。在优选的实施方案中,可使用大小在介于20聚体至50聚体核苷酸之间的任何数量的ssDNA。例如,使用了包括20聚体、25聚体、35聚体和50聚体核苷酸的四种ssDNA,如图1A所示。GIET相对于距离的校准方法可包括获得生物分子的荧光强度。在一个示例性实施方案中,在(I_{GIET})所示的石墨烯层上和(I_0)所示的单独二氧化硅上均有一条ssDNA探针链。石墨烯和二氧化硅上的荧光强度比允许对距离(d)相关的GIET效率进行定量。根据本发明的各种实施方案,可检测GIET区域(灵敏GIET区域)为介于1nm至50nm之间,优选为介于1nm至40nm之间,更优选为介于1nm至30nm之间,并且甚至更优选为介于1nm至25nm之间。在其他优选的实施方案中,在可检测GIET区域内的GIET灵敏度可在介于1.0nm至3.0nm之间、介于1.5nm至3.0nm之间、介于2.0nm至3.0nm之间或介于2.5nm至3.0nm之间。在可检测GIET区域内的GIET灵敏度可尤其小于约1.7nm、1.6nm、1.5nm、1.4nm、1.3nm或1.2nm。这些结果示于图1B所示的图中。根据验证的基于强度的GIET曲线,30nm处的 I_{GIET}/I_0 比为1nm处的140倍,为5nm处的9.2倍,为10nm处的2.2倍,并且为20nm处的1.1倍。使用强度比,1nm处的检测灵敏度比5nm处高15倍,比10nm处高64倍,比20nm处高127倍。

[0087] 根据本发明的第五方面,本文公开的用于支撑层上的生物功能化石墨烯的手段和方法可用作尤其用于DNA杂交测定的装置,这些DNA杂交测定包括目标基因组序列的临床PCR(聚合酶链反应)测试。在如实施例7、8和9中所示的本发明的各种实施方案中,通过DNA杂交进行的荧光猝灭和/或去猝灭允许使用GIET进行DNA或RNA杂交测定。可通过荧光强度测量(例如全内反射模式)或荧光寿命测量来进行DNA或RNA杂交测定。该方法利用如本文他处所述的制造装置,其中石墨烯层涂覆在支撑层上。在优选的实施方案中,本发明的支撑层

为二氧化硅支撑层。二氧化硅支撑层优选包括二氧化硅类材料、UV可固化塑性材料、玻璃、硅和/或热塑性材料中的任一种,其中该支撑层优选包括二氧化硅类基底,更优选包括二氧化硅玻璃,该二氧化硅玻璃可为 $1 \times 1\text{cm}^2$ 二氧化硅涂覆的传感器或玻璃显微镜盖玻片。在其他优选的实施方案中,本文所用的二氧化硅基底为玻璃显微镜盖玻片。在其他实施方案中,本发明提供了一种装置,其中石墨烯层用根据本发明合成的两亲性化合物进行(生物)功能化。通过GIET进行荧光猝灭和去猝灭的方法尤其适用于替代在聚合酶链式反应(PCR)检测中使用的分子信标探针或其他基于猝灭的探针。例如,该方法可用于实时PCR定量或多重PCR测定以检测目标基因组序列。

[0088] 根据本发明的第六方面,本文提供了测定生物分子的结构和/或动力学的方法。如本文所用,术语“生物分子”包括可能需要测定(定量)结构、功能和/或活性的任何类型的生物分子,包括但不限于肽、蛋白质、核酸、糖、单糖和多糖、脂质、脂蛋白、全细胞等,或多种酶、有机和无机化学品、包括DNA和RNA的其他敏感的生物聚合物以及包括植物、动物和微生物细胞的整体或片段的复杂系统。

[0089] 如本文所用,术语“蛋白质”表示具有特定二级和三级结构的多肽,该多肽可与另一分子相互作用,并且特别是与包括其他蛋白质、DNA、RNA、脂质、代谢物、激素、趋化因子和/或小分子的其他生物分子相互作用。如本文所用,术语“多肽”表示由两个或更多个氨基酸单体和/或其类似物组成的有机线性、环状或支链聚合物。术语“多肽”包括任何长度的氨基酸聚合物,该氨基酸聚合物包括全长蛋白质和肽,以及其类似物和片段。三个或更多个氨基酸的多肽也称为蛋白质寡聚物、肽或寡肽。特别地,术语“肽”和“寡肽”通常表示具有少于100个氨基酸单体的多肽。特别地,在蛋白质中,多肽提供了蛋白质的一级结构,其中术语蛋白质的“一级结构”是指在多肽链中共价连接以形成多肽聚合物的氨基酸的序列。蛋白质“序列”表示形成一级结构的氨基酸的顺序。一级结构内的氨基酸之间的共价键可包括肽键或二硫键,以及可由技术人员识别的其他键。本公开意义上的多肽通常由通过肽键或合成共价键共价连接的 α -氨基酸残基的线性链组成。基于每个末端上的自由基的性质,将包含末端残基和相邻区段的线性多肽链的两端称为羧基末端(C-末端)和氨基末端(N-末端)。除非另有说明,否则多肽中残基的计数以从N-末端(NH_2 -基团)(该末端为其中氨基基团不包含在肽键中的末端)至C-末端($-\text{COOH}$ 基团)(该末端为其中 COOH 基团包含在肽键中的末端)的顺序进行。在其中蛋白质为聚合物的至少一部分中的合成蛋白质的一些情况下,两个或多个氨基酸单体和/或其类似物通过有机酸($-\text{COOH}$)和胺($-\text{NH}_2$)的化学介导缩合而连接,以形成酰胺键或“肽”键。

[0090] 如本文所用,术语“氨基酸”是指由胺和羧酸官能团以及特异于各个氨基酸的侧链组成的有机化合物。特别地,氨基酸是指由胺($-\text{NH}_2$)和羧酸($-\text{COOH}$)以及与 α 碳连接的特异于各个氨基酸的侧链组成的有机化合物。不同的氨基酸具有不同的侧链,并且具有独特的特性,诸如电荷、极性、芳香性、还原电位、疏水性和 pK_a 。氨基酸可通过第一氨基酸的胺基基团和第二氨基酸的羧酸基团之间的反应通过肽键共价连接以形成聚合物。在本发明的意义上,氨基酸是指二十种天然存在的氨基酸、非天然氨基酸中的任一种,并且包括D和L两种光学异构体。

[0091] 如本文所用,术语“配体”是指能够共价或以其他方式化学结合目标化合物的部分。

[0092] 如本文所用,术语“脂质”包括脂肪酸的单甘油酯、二甘油酯和三甘油酯、脂肪酸蔗糖酯和丙二醇酯等,以及蜡、磷脂和糖脂,以及上述物质的混合物。

[0093] 如本文所用,术语“碳水化合物”包括水解时代谢为能量的多糖(例如淀粉和糊精)和糖(例如蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖)。

[0094] 如本文所用,术语“核酸”可包括嘧啶和嘌呤碱基的任何聚合物或寡聚物,嘧啶和嘌呤碱基优选分别为胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及腺嘌呤和鸟嘌呤。参见Albert L. Lehninger, PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY, 第793-800页(Worth Pub, 1982年)。实际上,本发明考虑了任何脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或肽核酸组分及其任何化学变体,诸如这些碱基的甲基化、羟甲基化或糖基化形式等。聚合物或寡聚物在组成上可为异质的或为均质的,并且可从天然存在的来源分离或可人工或合成产生。此外,核酸可为DNA或RNA或它们的混合物,并且可以单链或双链形式(包括同源双链体、异源双链体和杂交体状态)永久或暂时存在。

[0095] 如本文所用,“适体”是指对目标分子具有特异性结合亲和力的核酸。人们认识到亲和力相互作用为程度问题;然而,在这种情况下,适体对其靶点的“特异性结合亲和力”意指该适体结合其靶点的亲和力程度通常比其结合测试样品中的其他组分的亲和力程度高得多。“适体”为具有特定核苷酸序列的一种或多种核酸分子的一组复制。适体可包括任何合适数量的核苷酸,包括任何数量的化学修饰的核苷酸。“适体”是指多于一组的此类分子组。不同的适体可具有相同或不同数量的核苷酸。适体可为DNA或RNA或化学修饰的核酸,并且可为单链、双链或含有双链区,并且可包括更高阶的结构。适体也可为光适体,其中光反应性或化学反应性官能团包括在该适体中以允许其与其对应的靶点共价连接。本文公开的适体方法中的任一种方法可包括使用特异性结合相同目标分子的两种或更多种适体。如下文进一步描述的,适体可包括标签。如果适体包括标签,则适体的所有拷贝不需要具有相同的标签。此外,如果不同的适体各自包含标签,则这些不同的适体可具有相同标签或不同标签。

[0096] 生物分子的固定和捕获为测定生物分子的结构和/或动力学的方法的特性。在各种实施方案中,将生物分子固定到石墨烯层的方法需要与本文公开的本发明的两亲性分子中的任一种的亲水基团连接的亲和力捕获部分。在各种实施方案中,将生物分子固定到石墨烯层的方法需要与生物分子连接的功能性部分。在各种实施方案中,将生物分子固定到石墨烯层的方法需要与本发明的两亲性分子中的任一种的亲水基团连接的亲和力捕获部分和与生物分子连接的功能性部分。如本文所用,术语“功能性部分”是指在体外或体内具有某种生物学、化学、治疗和/或诊断功能的化学基团或分子。用于本发明的功能性部分描述于本文他处。在本发明中,测定生物分子的结构和/或动力学的方法需要本发明的两亲性化合物的亲水基团,该亲水基团包含与生物分子的功能性部分连接的亲和力捕获部分,以用于将生物分子固定在装置的功能化石墨烯层的表面上。

[0097] 在各种实施方案中,“亲和力捕获部分”为酶促蛋白质捕获配体,优选为卤代烷衍生物,更优选为氯代烷衍生物。在更优选的实施方案中,亲和力捕获部分为HaloTag配体,并且功能性部分为HaloTag。本文所用的HaloTag为自标记蛋白质标签。HaloTag为源自细菌酶的297个残基的肽(33kDa),该肽被设计为与合成配体(即可与目标蛋白质融合的HaloTag配体)共价结合。HaloTag可选自本领域的技术人员已知的许多可用配体。在进一步优选的实

实施方案中,酶促蛋白质捕获配体为6-氯己醇衍生物,优选为氯己烷-OEG2-胺。

[0098] 如本文他处所述,“亲和力捕获部分”可为螯合剂。如本文所用,术语“螯合剂”为与金属配位形成螯合物的化合物。螯合剂包括含有可与单个金属离子形成配位键的两个或多个电子供体原子的分子。术语“螯合剂”应理解为包括螯合剂及其盐。在优选的实施方案中,本文所用的螯合剂为基于羧酸的螯合剂,更优选为基于二乙酸或三乙酸的螯合剂。在优选的实施方案中,本文所用的螯合剂可为基于次氨基三乙酸(NTA)的试剂。因此,生物分子上的功能性部分为聚组氨酸标签。如本文所用,术语“聚组氨酸标签”是指允许基于亲和力固定肽和/或蛋白质的组氨酸残基的线性序列。聚组氨酸标签可包含6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个连续组氨酸残基中的任一种。

[0099] 在一个示例性实施方案中,使用生物分子上的六聚组氨酸标签化功能性部分,通过在功能化石墨烯层上的两亲性分子的亲水基团上的亲和力捕获部分tris-NTA,将该生物分子固定在本发明的装置上。在此类示例性实施方案中,生物分子为如实施例12和图6(阶段III和IV)所示的单体增强型绿色荧光蛋白(H6GFP)。

[0100] 在另一个示例性实施方案中,使用生物分子上的HaloTag功能性部分,通过在功能化石墨烯层上的两亲性分子的亲水基团上的亲和力捕获部分HaloTag配体,将该生物分子固定在本发明的装置上。在此类示例性实施方案中,生物分子为如实施例15所示的抗GFP DARPin。

[0101] 为了测定生物分子的结构和/或动力学,在将生物分子固定到装置的功能化石墨烯层之后,下一个步骤为通过荧光猝灭来测定生物分子的轴向尺寸。如本文所用,术语“荧光猝灭”意指由于通过用激发光照射荧光物质的光化学破坏而导致的荧光减少。如本文所用,术语“荧光标记”通常是指在用激发波长的光激发标记后以发射波长发射光的分子。荧光标记的发射覆盖可检测的紫外光、整个可见光光谱和可检测的近红外范围。优选地,发射的光谱范围在300nm至2500nm的范围内。更优选地,发射的光谱范围在350nm至2000nm的范围内。最优选地,发射的光谱范围在400nm至800nm的范围内。可用作荧光标记的具体材料的示例包括有机染料,诸如花青染料、咕吨染料、罗丹明染料、荧光素和荧光素衍生物以及稀土金属离子的螯合物。如本文所用,“荧光标记”还意指具有荧光部分和连接部分的有机分子,使得该连接部分允许该荧光部分与目标官能团共价连接。与荧光标记的构建和使用相关联的一些考虑因素包括荧光部分和连接部分之间键的稳定性、连接部分在与目标官能团连接之前和之后对荧光特性的影响、荧光部分和目标官能团之间键的稳定性(即连接之后连接部分的强度)、连接官能团与目标官能团的反应性等。当需要多种荧光标记时,每种荧光标记具有不同的荧光特性(诸如非重叠发射带),选择用于特定应用的标记会变得非常困难,通常需要在可用荧光标记的所需特性之间进行权衡。

[0102] 对于GIET测量,分析物或分析物的相互作用配偶体可进行荧光标记。用于标记核苷酸的荧光发色团可为如本文所述的有机染料。用于标记蛋白质的荧光发色团可为有机染料分子和荧光蛋白(FP)。FP包括绿色荧光蛋白(例如GFP、mNeon)、蓝色荧光蛋白(例如BFP、CFP)、红色荧光蛋白(例如mCherry、TagRFP)、红外荧光蛋白(URFP)。

[0103] 如本文所用,术语“轴向尺寸”定义为生物分子的标称纵向尺寸(nm)。在一个示例性实施方案中,如实施例5以及图2A、图2B和图3所示测定H6-NB::GFP复合物的轴向尺寸。

[0104] 在其他实施方案中,可测定生物分子的轴向构象变化。如本文所用,术语“构象变

化”是指物质分子结构的改变。该术语旨在包括改变单个分子或分子聚集体的结构。如本文所用,当术语“构象变化”用于蛋白质时,意指蛋白质结构的至少一种变化、蛋白质形状的变化或蛋白质的部分排列的变化。蛋白质的部分可为例如由于围绕分子结构中原子之间发生的一个或多个化学键旋转而改变相对位置的原子。这些部分也可为二级、三级或四级结构的区域。蛋白质的部分还可为大分子的结构域,诸如相关领域中通常已知的那些结构域。

[0105] 在一个示例性实施方案中,如实施例6以及图4A和图4B所示测定ssDNA的构象变化。在优选的实施方案中,对大于10nm的轴向构象变化进行定量。

[0106] 根据本发明的方法和组合物,已经发现与FRET的10nm相比,GIET具有高达50nm纳米级灵敏度的延长灵敏距离。根据本发明,GIET只需要对目标生物分子进行单一的荧光标记,而不像FRET测量那样需要对蛋白质上的供体和受体进行双重标记。因此避免了FRET测量所必需的标记度和光谱渗漏的校正。根据本发明的方法,石墨烯的高透明度使得通过GIET的寿命测定在几秒钟之内非常快速地完成,而MIET通常需要10分钟来收集足够用于精确测定荧光寿命的光子。

[0107] 本发明还表明,由于石墨烯对可见光的高透明度,因此可以全内反射荧光检测的形式进行基于荧光强度的GIET。因此,根据本发明,可实现高灵敏度的单分子GIET,以获得通过组装测量隐藏的单个生物分子的结构波动。根据本发明的方面,通过trisNTA-PEG-苾或trisNTA-PEG-DBCO对石墨烯的生物功能化在醇洗涤后为可逆的。此外,His标签化蛋白质通过trisNTA与石墨烯可逆地结合。

[0108] 在本发明的第七方面,本文公开的方法、化合物和装置可用于筛选、分析和/或诊断应用。本发明的手段和方法,包括用于石墨烯的生物功能化的新型两亲性化合物trisNTA-PEG-DBCO、trisNTA-PEG-苾和BSA-HaloTag配体缀合物,可用于检测大量生物分子(本文以DNA和蛋白质为例)的结构和活性。本文公开的用于支撑层上的生物功能化石墨烯的手段和方法可用作尤其用于DNA杂交测定的装置,这些DNA杂交测定包括目标基因组序列的临床PCR(聚合酶链反应)测试。此外,这些手段和方法可作用于药理学上重要的跨膜受体、细胞因子受体、GPCR或可溶性His标签化蛋白的结构动力学测定的装置。这些GIET装置将成为诊断试剂盒的核心组成部件,广泛用于科学研究和药物筛选(参见定量PCR仪器和商业化的Biacore®芯片)。该试剂盒可报告药物诱导的蛋白质受体结构变化,作为其有效性的指标。通过在流体系统、取样系统等中集成GIET装置,可以实现目标基因和候选药物的自动化大规模筛选。

[0109] 实施例

[0110] 本发明的手段和方法的实施方案在以下实施例中说明。这些实施例仅用于说明性目的,并且不应认为是在任何程度上限制本发明的范围。

[0111] 实施例1在二氧化硅基底上的石墨烯单层的形成

[0112] 二氧化硅类基底用于在其上形成石墨烯单层。二氧化硅类基底包括用于反射干涉光谱和全内反射荧光光谱检测(RIfs-TIRFs)的 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 二氧化硅涂覆的传感器,以及玻璃显微镜盖玻片。将RIfs-TIRFs传感器在新鲜的食人鱼溶液(一份30% H_2O_2 和两份浓 H_2SO_4 —注意,具有高度腐蚀性)中清洗。将玻璃显微镜盖玻片在从环境空气获得的真空下用等离子清洗机(Femto等离子系统,Diener Electronic GmbH/德国)清洗。为了用石墨烯单层涂覆基底,将石墨烯单层与保护聚合物薄膜(Easy Transfer Monolilayer®, Graphenea公司,西班牙

牙)一起切成 $5 \times 5\text{mm}^2$ 的小块。将这些小块缓慢浸入MiliQ水中,以漂浮在水面上。通过清洁的玻璃盖玻片或二氧化硅Rifs-TIRFs传感器从下方将聚合物保护的石墨烯单层捞出来。这使得石墨烯与基底面对面接触。将所获得的基底在室温下干燥30分钟,然后在 150°C 烘箱中加热2小时。然后将热的基底从烘箱中取出,并立即在真空下储存24小时以冷却。然后将基底在丙酮中浸泡1h,随后再在异丙醇中浸泡另外1h,以去除石墨烯上的保护性聚合物膜。用 N_2 吹干石墨烯单层涂覆的基底以备后用。

[0113] 实施例2用于石墨烯非共价功能化的脂质体的制备

[0114] 为了制备DOPC脂质体,将 $2.5\mu\text{mol}$ DOPC溶于氯仿,在50mL圆底烧瓶中混合。为了制备含有DOPC:DOPS (95:5摩尔比)的脂质体,将 $2.4\mu\text{mol}$ DOPC和 $0.12\mu\text{mol}$ DOPS溶于氯仿中,在50ml圆底烧瓶中混合。类似地,以与获得含有DOPC:trisNTA-DODA (95:5摩尔比)的脂质体相同的方式制备含有 $2.4\mu\text{mol}$ DOPC和 $0.125\mu\text{mol}$ 三-次氨基三乙酸-双十八烷基胺(trisNTA-DODA)的脂质混合物。分别通过旋转蒸发仪蒸发所有上述脂质溶液中的氯仿。通过涡旋30分钟将干燥的脂质分散于10mL HBS缓冲液(20mM HEPES、150mM NaCl, pH 7.5)中。然后将脂质溶液在冰水浴中探针超声处理3次,处理5分钟。超声后,将溶液以20000rpm离心15分钟。上清液为含有 $250\mu\text{M}$ 脂质或脂质混合物的脂质体溶液。

[0115] 实施例3通过强度测量校准距离相关的石墨烯诱导的能量转移(GIET)

[0116] 在通过脂质单层非共价修饰的石墨烯单层涂覆的二氧化硅基底上校准GIET的距离相关性。设计了具有20聚体、25聚体、35聚体和50聚体核苷酸的四条单链DNA(ssDNA)作为纳米尺的支架(图1A)。这些ssDNA作为“锚”链在5'末端共享共同的20聚体序列,并且在3'末端共享胆固醇修饰。为了确保寡核苷酸垂直沉积到脂质层上,将5%带负电荷的DOPS加入基质脂质DOPC中,即DOPC:DOPS (95:5摩尔比)。“探针”链具有与锚链互补的共同的20聚体ssDNA序列。探针链分别在3'末端或5'末端与6-羧基荧光素(FAM)缀合,用于荧光读出。探针链和锚链的杂交表示为“锚链-3'F或5'F”。对于35聚体和50聚体锚链,分别将另外的互补15聚体和30聚体ssDNA用作阻断剂来获得全长双链DNA纳米尺。表1列出了所有DNA序列。

[0117] 表1用于校准的DNA链*

DNA 链	序列和修饰 (5'-3')
SEQ ID NO: 1-20 聚体锚:	GATGAATGGTGGGTGAGAGG-TEG-胆固醇
SEQ ID NO: 2-25 聚体锚:	GATGAATGGTGGGTGAGAGGTGAGG-胆固醇
SEQ ID NO: 3-35 聚体锚:	GATGAATGGTGGGTGAGAGGTGAGGAGTA AGAGGA-胆固醇
SEQ ID NO: 4-50 聚体锚:	GATGAATGGTGGGTGAGAGGTGAGGAGTAAGA GGATGTGTTAGAGGGATG-胆固醇
SEQ ID NO: 5-3'-FAM 探针:	CCTCTCACCCACCATTCATC-FAM
SEQ ID NO: 6-5'-FAM 探针:	FAM-CCTCTCACCCACCATTCATC
SEQ ID NO: 7-15 聚体阻断剂:	TCCTCTTACTCCTCA
SEQ ID NO: 8-30 聚体阻断剂:	CATCCCTCTAACACATCCTCTTACTCCTCA

*通过 IDT DNA 公司定制合成

[0119] 使用具有同步反射干涉光谱和全内反射荧光光谱 (RIfs-TIRFs) 检测的自制流通系统进行表面灵敏检测(参见Gavutis等人,2006年,Nature Protocols,第1卷,第2091页)。为了制备固体支撑的脂质层,将实施例2中制备的含有250 μ M DOPC/DOPS (95:5摩尔比)的脂质体注入安装在固体基底上的流动腔室。另选地,使用溶液辅助的脂质沉积在石墨烯上形成脂质单层。在该方法中,将HBS的含有250 μ M DOPC/DOPS (95:5摩尔比)的脂质体溶于HBS:EtOH (90:10v/v)的混合溶液中。将混合物注入RIfs-TIRFs装置的流动腔室。在固体支撑物上形成脂质层后,注入胆固醇修饰的ssDNA以将锚链固定在表面上(在IDT DNA公司定制的锚链中,胆固醇均通过三缩乙二醇TEG连接基团与ssDNA连接)。随后注入FAM标记的ssDNA作为探针链与锚链杂交。所有DNA浓度均为1 μ M。用于DNA杂交的电泳缓冲液为含有Mg离子的HBS缓冲液(HBS-Mg,20mM HEPES、150mM NaCl和5mM MgCl₂,pH 7.5)。分别实时监测在石墨烯上形成脂质单层、固定ssDNA锚链和与脂质层上的探针链杂交的RIfs-TIRFs信号。将所获得的石墨烯上探针链的荧光强度(I_{GIET})分别与二氧化硅上探针链的荧光强度(I_0)就固定化DNA链的质量信号方面进行比较。通过假定DNA和石墨烯之间的倾斜角 α ,我们计算了垂直距离 d 。总而言之,将七个测量的 I_{GIET}/I_0 比相对于 d 作图(图1)。所获得的 I_{GIET}/I_0 相对于 d 的相关性与理论GIET曲线匹配,其中全局拟合的倾斜角为 $43 \pm 1^\circ$ 。根据验证的基于强度的GIET曲线,30nm处的 I_{GIET}/I_0 比为1nm处的140倍,为5nm处的9.2倍,为10nm处的2.2倍,并且为20nm处的1.1倍。使用强度比,1nm处的检测灵敏度比5nm处高15倍,比10nm处高64倍,比20nm处高127倍。

[0120] 实施例4通过寿命测量校准距离相关的GIET

[0121] 另选地,石墨烯上脂质单层的形成、ssDNA锚链的固定以及与脂质层上探针链的杂交都在体外的石墨烯涂层玻璃显微镜盖玻片上进行。将盖玻片安装在具有1mL缓冲液体积的显微镜腔室中。将800 μ L实施例2中制备的DOPC/DOPS (95:5摩尔比)脂质体溶液加入盖玻片上,并在室温下温育30分钟。用过量HBS洗涤盖玻片以去除溶液中的游离脂质体。然后将盖玻片分别与1 μ M不同的ssDNA锚链温育15分钟,然后用HBS-Mg缓冲液洗涤10次。将100nM探针链加入溶液中,并且温育15分钟,然后用HBS洗涤10次。使用配备有PicoQuant系统(PicoHarp 300)的共焦激光扫描显微镜(Olympus Fluoview 1000),通过时间相关单光子计数(TCSPC)来对石墨烯的荧光猝灭进行定量。所有TCSPC迹线用单指数衰减函数拟合。石墨烯的寿命与玻璃的寿命比($\tau_{\text{GIET}}/\tau_0$)分别根据探针链的3'或5'标记来分组。以与实施例3中所述相同的方式,将从七个DNA纳米尺获得的 $\tau_{\text{GIET}}/\tau_0$ 图相对于垂直距离 d 作图(图1B)。强度和寿命测量结果均显示在1nm至30nm内有一个灵敏GIET区域。检测到纳米尺在介于35-5'F和35-3'F之间的显著差异。结果证实GIET对1.2nm的距离变化高度敏感。

[0122] 实施例5使用基于强度的GIET测定蛋白质轴向尺寸

[0123] 在自制RIfs-TIRFs装置中对石墨烯单层涂覆的二氧化硅传感器上的His标签化蛋白质进行位点特异性捕获。将含有250 μ M DOPC/trisNTA-DODA (95:5摩尔比)的脂质体注入安装在固体基底上的流动腔室中。另选地,使用溶液辅助的脂质沉积在石墨烯上形成脂质单层。在该方法中,将乙醇加入HBS的DOPC/trisNTA-DODA中,以得到HBS:EtOH的最终混合物(90:10体积比)。DOPC/tris-NTA DODA (95:5摩尔比)脂质双层在二氧化硅传感器上的形成显示了5.0ng/mm²的特征质量变化。令人惊讶的是,石墨烯上脂质沉积的质量信号为2.5ng/mm²。精确半质量信号表示在石墨烯上形成了密集堆积的trisNTA-DODA/DOPC脂质单层(图

2A)。在通过加载 Ni^{2+} 离子处理石墨烯上的trisNTA-DODA/DOPC脂质单层后,注入 $1\mu\text{M}$ 六聚组氨酸标签化抗GFP纳米抗体(H6-NB),然后注入 100nM 单体增强型绿色荧光蛋白(GFP)(图2B)。 $m\text{EGFP}$ 和NB相互作用的结合常数,以及通过咪唑对H6-NB::GFP复合物的定量去除验证了石墨烯上具有完整功能的His标签化蛋白的高亲和力捕获。通过将用固定化蛋白质质量归一化的荧光信号(I_{GIET})与二氧化硅基底上的荧光信号(I_0)进行比较,通过归一化至固定化蛋白质质量获得 16.4% 的 I_{GIET}/I_0 比。 H6 标签化GFP在石墨烯上的直接固定使得 I_{GIET}/I_0 比为 7.6% 。使用校准的GIET与距离曲线,固定化 H6 标签化GFP的 7.6% 的 I_{GIET}/I_0 比对应于在石墨烯上方GFP荧光发色团的 3.8nm 。所获得的NB::GFP复合物的 I_{GIET}/I_0 比为 16.4% ,表示复合物中的GFP荧光发色团比石墨烯高 5.5nm (图3)。

[0124] 实施例6使用基于寿命的GIET对DNA的轴向构象变化进行定量

[0125] 将石墨烯单层涂覆的盖玻片安装在具有 1mL 缓冲液体积的显微镜腔室中。将 $800\mu\text{L}$ 实施例2中制备的DOPC/DOPS(95:5摩尔比)脂质体溶液加入盖玻片上,并在室温下温育30分钟。用过量HBS淋洗盖玻片以从表面去除游离脂质体。然后将 $1\mu\text{M}$ 35聚体ssDNA锚链锚定在脂质单层涂覆的石墨烯上(DNA序列列于表1中)。通过与溶液中的 100nM 20聚体3'FAM探针链杂交,使用共焦激光扫描显微镜通过TCSPC检测到寿命 τ_{GIET} 为 0.24ns 。与玻璃上 3.0ns 的 τ_0 进行比较,所获得的 $\tau_{\text{GIET}}/\tau_0$ 比为 8% ,表示到石墨烯的距离为 4.4nm 。这表明由于柔性的、未配对的15聚体缺口,杂交的探针-锚DNA链位于脂质单层上。在溶液中加入 200nM 15聚体ssDNA阻断剂链后,观察到寿命为 1.5ns (图4B)。根据校准曲线, $49\pm 3\%$ 的 $\tau_{\text{GIET}}/\tau_0$ 比对应于在石墨烯上方 10.9 ± 0.2 的距离。结果表明,与探针杂交的35聚体ssDNA锚链在静止状态下粘附于脂质单层。15聚体阻断剂的结合通过与dsDNA的附加杂交并伸展至其全长而使柔性缺口变得具有刚性(图4)。该结果证实GIET可测量大于 10nm 的分子距离变化。

[0126] 实施例7通过基于强度的GIET进行的DNA杂交测定

[0127] 使用具有同步反射干涉光谱和全内反射荧光光谱(RIfs-TIRFs)检测的自制流通系统进行表面灵敏检测(参见Gavutis等人,2006年,Nature Protocols,第1卷,第2091页)。为了制备固体支撑的脂质层,将实施例2中制备的含有 $250\mu\text{M}$ DOPC/DOPS(95:5摩尔比)的脂质体注入安装在固体基底上的流动腔室。另选地,使用溶液辅助的脂质沉积在石墨烯上形成脂质单层。在固体支撑物上形成脂质层后,注入 $1\mu\text{M}$ 胆固醇修饰的ssDNA以将锚链固定在表面上:SEQ ID NO:2所示的GATGAATGGTGGGTGAGAGGTGAGG-胆固醇(25聚体锚)。随后注入 $1\mu\text{M}$ FAM标记的ssDNA(SEQ ID NO:5所示的CCTCTCACCCACCATTCATC-FAM)作为用于与锚链杂交的探针链。用于DNA杂交的电泳缓冲液为含有Mg离子的HBS缓冲液(HBS-Mg, 20mM HEPES、 150mM NaCl和 5mM MgCl_2 , pH 7.5)。分别实时监测在石墨烯上形成脂质单层、固定ssDNA锚链和与脂质层上的探针链杂交的RIfs-TIRFs信号。将所获得的石墨烯上探针链的荧光强度(I_{GIET})与二氧化硅上探针链的荧光强度(I_0)就固定化DNA链的质量信号方面进行比较。 $23.2\pm 1.4\%$ 的 I_{GIET}/I_0 比例报告了探针ssDNA荧光强度的显著猝灭。该结果证实,荧光标记的探针DNA链在与固定在石墨烯支撑的脂质单层上的DNA链杂交时显著猝灭。

[0128] 实施例8通过基于强度的GIET进行的与未标记的DNA链的DNA杂交测定

[0129] 在固体支撑物上进行与实施例7相同的脂质层形成过程。然后注入 $1\mu\text{M}$ 胆固醇修饰的ssDNA以进行表面上的固定:SEQ ID NO:4所示的GATGAATGGTGGGTGAGAGGTGAGGAGTAAGAGGATGTGTTAGAGGGATG-胆固醇(50聚体锚)。随后将 $1\mu\text{M}$ 探针链FAM标记的ssDNA(SEQ

ID NO:5所示的CCTCTCACCCACCATTCATC-FAM或SEQ ID NO:6所示的FAM-CCTCTCACCCACCATTCATC)与 $1\mu\text{M}$ 未标记的ssDNA链(SEQ ID NO:8所示的CATCCCTCTAACACATCCTCTTACTCCTCA)一起注入固体支撑物上,以与锚链杂交。用于DNA杂交的电泳缓冲液为含有Mg离子的HBS缓冲液(HBS-Mg, 20mM HEPES、150mM NaCl和5mM MgCl_2 , pH 7.5)。分别实时监测在石墨烯上形成脂质单层、固定ssDNA锚链和与脂质层上的探针链杂交的RIfs-TIRFs信号。将所获得的石墨烯上探针链的荧光强度(I_{GIET})与二氧化硅上探针链的荧光强度(I_0)就固定化DNA链的质量信号方面进行校正。所得到的 $63.8\pm 1.9\%$ 和 $41.9\pm 0.3\%$ 的 I_{GIET}/I_0 比分别报告了两种探针ssDNA荧光强度的显著猝灭。结果证实,石墨烯支撑的脂质单层上的DNA杂交对于使用荧光标记的DNA链结合未标记的DNA链检测具有灵敏性。

[0130] 实施例9通过基于寿命的GIET进行的DNA杂交测定

[0131] 将石墨烯单层涂覆的盖玻片安装在具有1mL缓冲液体积的显微镜腔室中。将800 μL 实施例2中制备的DOPC/DOPS(95:5摩尔比)脂质体溶液加入盖玻片上,并在室温下温育30分钟。用过量HBS淋洗盖玻片以从表面去除游离脂质体。然后将SEQ ID NO:3所示的 $1\mu\text{M}$ GATGATGGTGGGTGAGAGGTGAGGAGTAAGAGGA-胆固醇(35聚体ssDNA锚链)锚定在用脂质单层涂覆的石墨烯上。通过与溶液中SEQ ID NO:5所示的100nM CCTCTCACCCACCATTCATC-FAM(20聚体3' FAM探针链)杂交,使用共焦激光扫描显微镜通过TCSPC检测到寿命 τ_{GIET} 为0.24ns。在溶液中加入SEQ ID NO:7所示的200nM TCCTCTTACTCCTCA(15聚体ssDNA阻断剂链)后,观察到 τ_{GIET} 寿命为1.5ns(图4B)。通过两步DNA杂交,获得的荧光寿命总共增加约6倍。结果表明,基于寿命的GIET可在溶液中存在未标记的DNA链的情况下检测荧光标记的DNA链在石墨烯支撑的脂质单层上的杂交。

[0132] 实施例10 TrisNTA-PEG-DBCO的合成

[0133] 将11mg trisNTA-OEG7-二硫化物(分子量2978Da,自制)溶于200 μL HBS缓冲液。将在100 μL HBS中的2.2mg三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP,分子量286.6Da, Sigma Aldrich, C4706)加入trisNTA-OEG7-二硫化物溶液中。混合物在pH 7.5反应15分钟,以获得还原的硫醇化合物trisnTA-OEG7-SH。将混合物加入含有5mg二苯并环辛炔-PEG4-马来酰亚胺(DBCO-PEG4-Mal,分子量674.7Da, Sigma Aldrich, 760676)的300 μL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液的10mL玻璃圆底烧瓶中。将反应混合物用磁棒搅拌1小时。将粗产物用10mL含有0.2% (v/v) 三氟乙酸(TFA)的MiliQ水稀释。将粗产物通过C18 RP-HPLC以0%-100% 0.2% TFA/水中的乙腈的梯度进一步纯化。将纯化的化合物冻干为白色粉末。产率:7.6mg。MS (MALDI-TOF): 2187 [M+Na]⁺。将所获得的化合物命名为trisNTA-PEG-DBCO(图5),以1mg等分试样储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 的玻璃瓶中。

[0134] 实施例11 TrisNTA-PEG-苾的合成

[0135] 将5mg trisNTA-OEG7-二硫化物(分子量2978Da,自制)溶于200 μL HBS缓冲液。将在100 μL HBS中的1.0mg三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP,分子量286.6Da, Sigma Aldrich, C4706)加入trisNTA-OEG7-二硫化物溶液中。混合物在pH 7.5反应15分钟,以获得还原的硫醇化合物trisnTA-OEG7-SH。将混合物加入含有5mg苾-PEG2000-马来酰亚胺(苾-PEG2k-Mal,平均分子量2000Da, Creative PEGworks公司, PBL-9062)的300 μL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液的10mL玻璃圆底烧瓶中。将反应混合物用磁棒搅拌1小时。将粗产物用10mL含有

0.2% (v/v) 三氟乙酸 (TFA) 的MiliQ水稀释,并通过C18 RP-HPLC以0%-100%0.2%TFA/水中的乙腈的梯度纯化。将纯化的化合物冻干。产率:5.8mg白色粉末。MS (MALDI-TOF):3512[M+Na]⁺,多重±44m/z峰。将所得的化合物命名为trisNTA-PEG-苾(图5),以1mg等分试样储存在-20°C的玻璃瓶中。

[0136] 实施例12通过与trisNTA-PEG-苾的 π - π 相互作用进行的石墨烯功能化

[0137] 将1mg trisNTA-PEG-苾和1mg mPEG-苾(苾-PEG2k-OMe,平均分子量2000Da, Creative PEGworks公司,PCN-102)溶于水:乙醇(90:10v/v)中。将50 μ M水:乙醇(90:10v/v)中的trisNTA-PEG-苾/mPEG-苾(50:50摩尔比)注入自制RIfs-TIRFs装置的流动腔室中。石墨烯上的trisNTA-PEG-苾/mPEG-苾层的形成通过2.0ng/mm²的质量信号表征(图6,阶段I)。TrisNTA-PEG-苾/mPEG-苾单层的稳定固定证实了苾在石墨烯上的强 π - π 相互作用。在通过Ni²⁺加载处理石墨烯上的trisNTA-PEG-苾/mPEG-苾层后,注入1 μ M六聚组氨酸标签化单体增强型绿色荧光蛋白(H6-GFP)(图6,阶段III和IV)。H6-GFP的稳定固定以及通过咪唑对H6-NB::GFP复合物的定量去除验证了trisNTA-PEG-苾/mPEG-苾-修饰的石墨烯上His标签化蛋白的特异性捕获。

[0138] 实施例13 BSA-HaloTag配体缀合物的合成

[0139] 将75mg牛血清白蛋白(BSA级分V,Carl-Roth)溶于4mL HBS。将96mg N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC,Sigma Aldrich 03449)溶于1mL HBS。将3.9mg氯代己烷-OEG2-胺(HaloTag配体,HTL,自合成)溶于200 μ L乙醇。将三种溶液在10mL圆底烧瓶中混合,并在4°C下磁力搅拌4小时。使用截留尺寸为14kDa的膜,将反应混合物在HBS缓冲液中在4°C透析48小时。280nm处的UV-vis吸收表示,所获得的溶液含有1.5mM BSA-HTL缀合物。将溶液用液氮冷冻并在-80°C储存。

[0140] 实施例14 BSA-生物素缀合物的合成

[0141] BSA-生物素以与实施例13所述相同的方式合成,但使用的为4.1mg生物素(Sigma Aldrich B4501)而非3.9mg HaloTag配体。获得1.8mM BSA-生物素的终溶液并在-80°C储存。

[0142] 实施例15通过包含表面粘附蛋白的两亲性分子进行的石墨烯功能化

[0143] 将20 μ L实施例9的BSA-HTL溶液施加到石墨烯单层涂覆的二氧化硅传感器上,然后使其与另一个石墨烯涂覆的传感器面对面接触。然后分离传感器并用HBS洗涤3次。将传感器与10 μ M HaloTag融合的抗GFP DARPin温育,后者为GFP的特异性结合物。将所获得的传感器用HBS缓冲液洗涤3次,并在使用前储存在4°C下的HBS缓冲液中。GFP结合测定在自制RIfs-TIRFs装置中进行。将500nM单体增强型绿色荧光蛋白(GFP)注入RIfs-TIRFs装置的流动腔室。通过1.5ng/mm²的质量信号表征在石墨烯上的GFP的固定(图7,灰色条)。相反,在传感器上涂覆的BSA处理的石墨烯单层上的GFP的固定可忽略不计。结果证实,两亲性BSA-HTL在石墨烯上形成了稳定的功能化层。因此,HaloTag融合的抗GFP DARPin通过HTL和HaloTag的共价偶联固定在石墨烯上。然后将GFP从溶液中特异性地捕获至两亲性分子功能化的石墨烯表面。

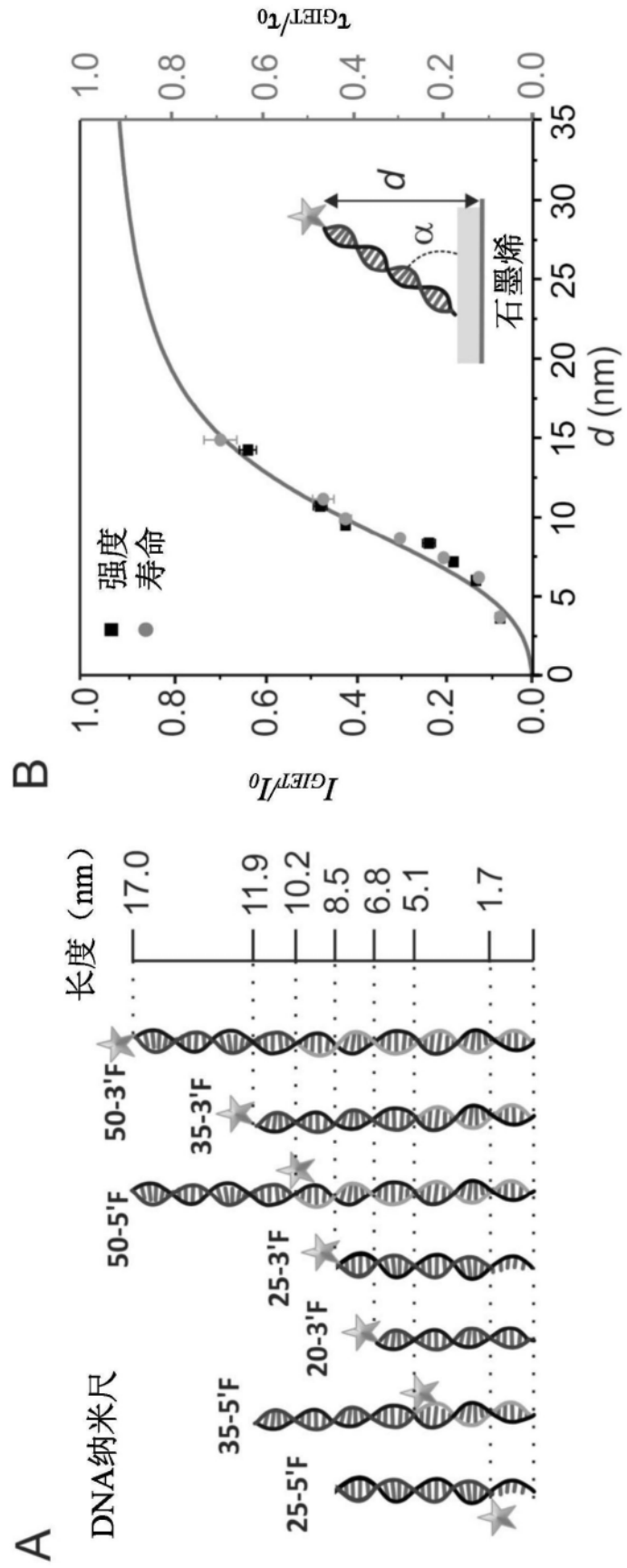


图1

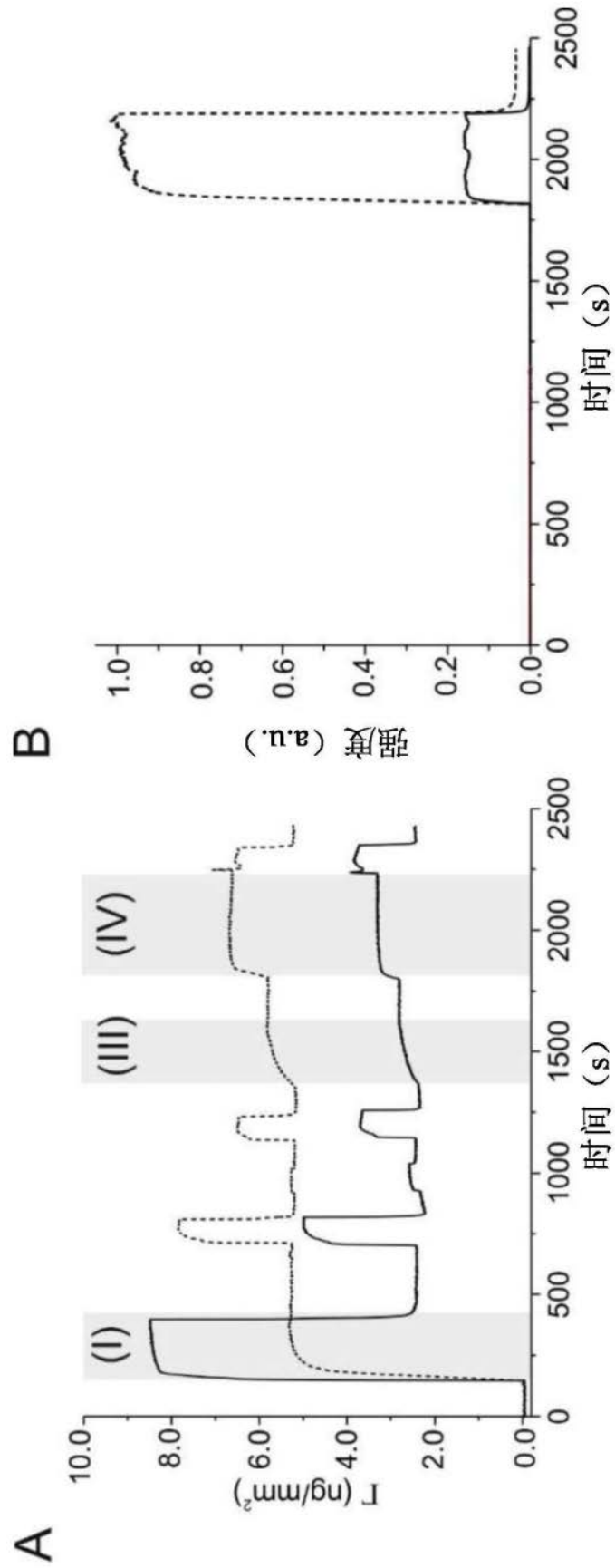


图2

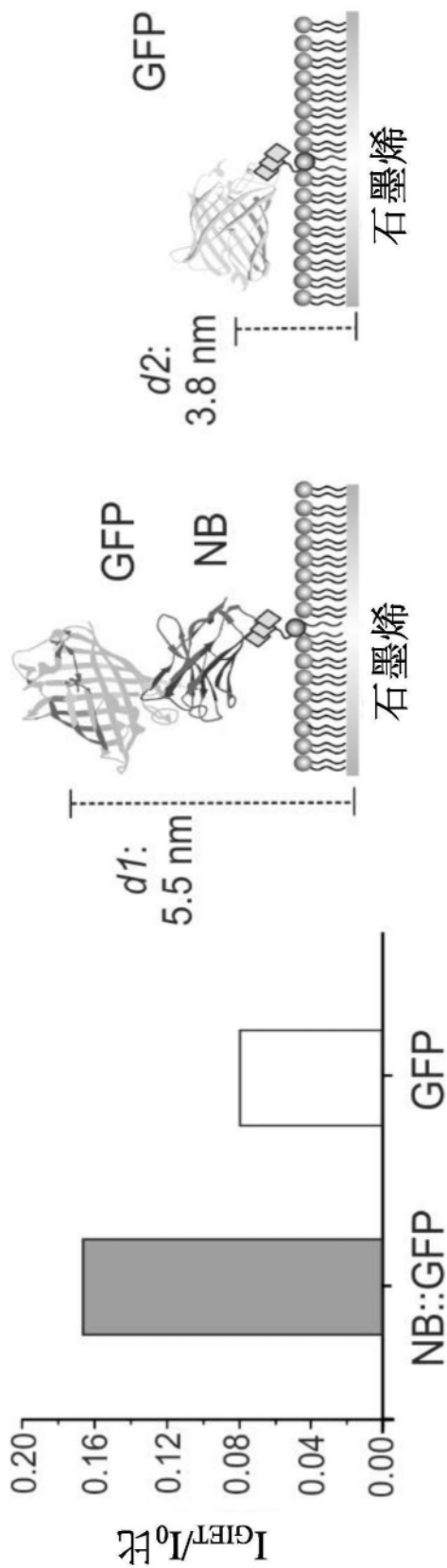


图3

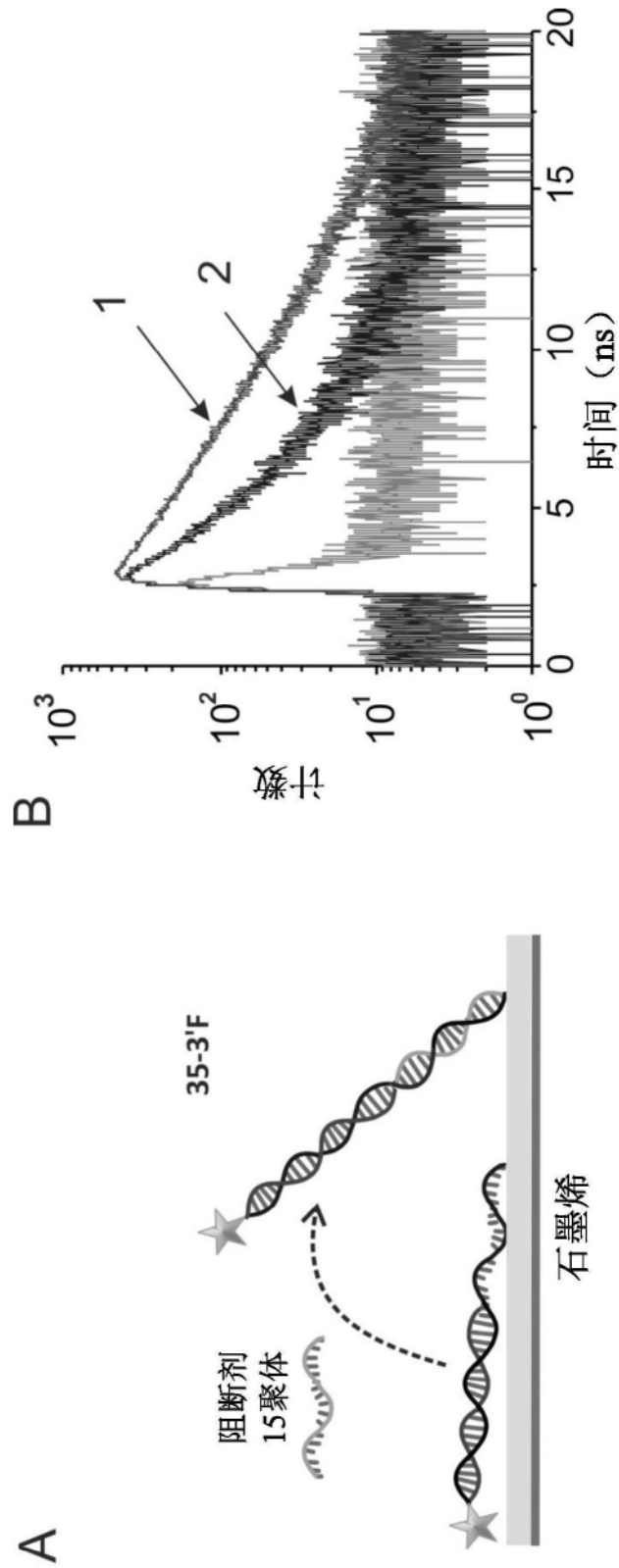


图4

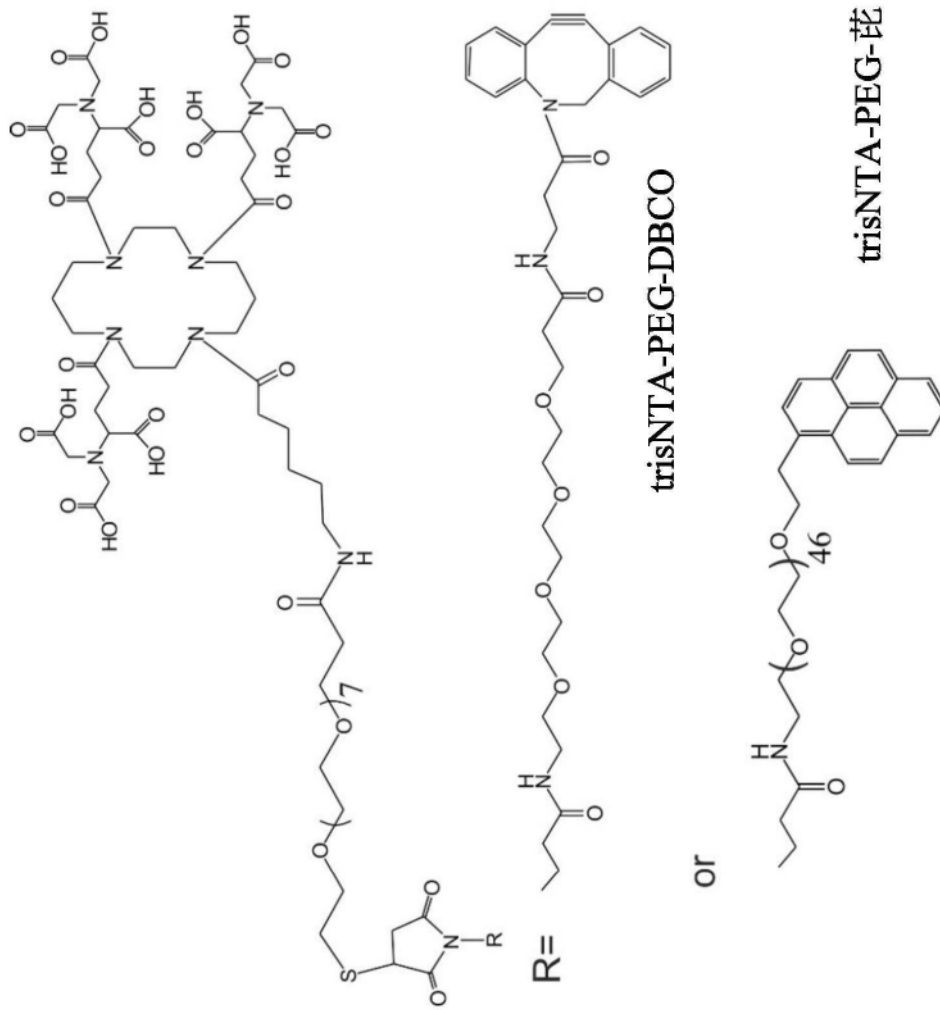


图5

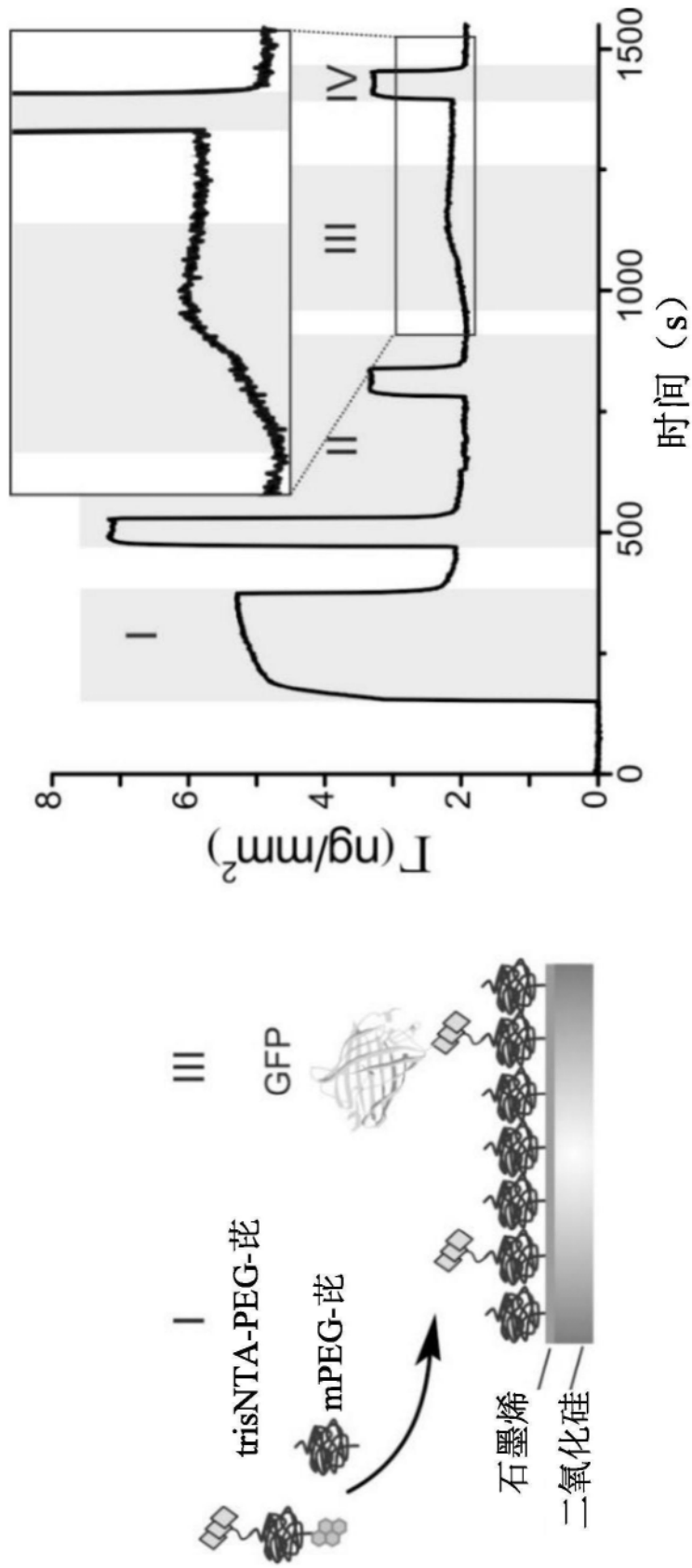


图6

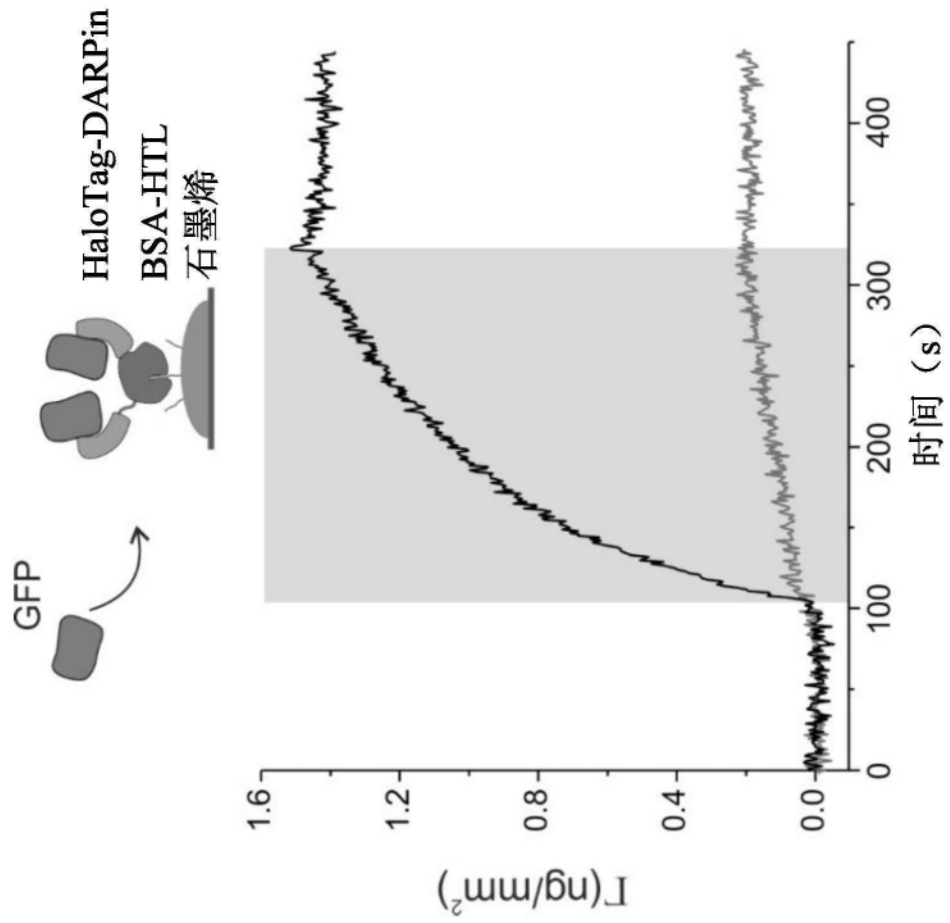


图7