[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780027546.4

[43] 公开日 2009 年 7 月 22 日

[11] 公开号 CN 101490552A

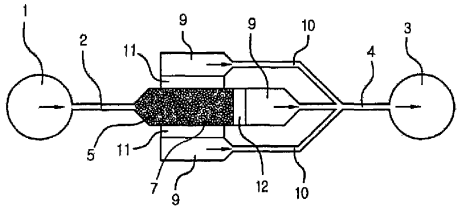
[22] 申请日 2007.7.19
[21] 申请号 200780027546.4
[30] 优先权
[32] 2006.7.20 [33] KR [31] 10-2006-0067708
[86] 国际申请 PCT/KR2007/003499 2007.7.19
[87] 国际公布 WO2008/010677 英 2008.1.24
[85] 进入国家阶段日期 2009.1.20
[71] 申请人 首临生物科学株式会社
地址 韩国首尔市
[72] 发明人 吴炫直 尹泰重 李尚勋
[74] 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司
代理人 梁兴龙 陈桂香
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称

蛋白固定用微芯片

[57] 摘要

本发明公开了一种蛋白固定用微芯片，其将诸如白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白或角蛋白等特定蛋白固定到珠子上，以在诸如液相色谱/质谱(LC/MS)或基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)等微量分析过程中检测微量蛋白。这种蛋白固定用微芯片减少了样品量、缩短了反应时间、提高了结果的可靠性并简化了工作过程。为此，将其上附着抗体的珠子容纳于微芯片的腔室中，该微芯片具有利用有机聚合物(即，聚二甲基硅氧烷(PDMS))产生的层状结构，通过腔室的微量样品的压力均匀分布于全部珠子上，微量样品通过表面积很大的珠子并以最佳速度平稳地排放到外面，从而有效地固定特定蛋白。因此，蛋白固定用微芯片优化了样品通过微芯片的速度，并且由于小尺寸珠子足够大的表面积的原因，提高了将特定蛋白固定到抗体上的效率，这样得到了快速的反应结果。



1. 一种蛋白固定用微芯片，其中在入口一侧形成的入口通道与出口一侧形成的出口通道之间形成腔室，盖玻片盖住所述入口、所述入口通道、所述出口、所述出口通道，从而在所述腔室除所述入口之外的前面部分和两侧部分处的所述腔室周围的隔壁的上端与所述盖玻片之间形成高度小于所述珠子直径的排放空间，并且所述腔室通过运送通道与所述出口通道连接。

2. 根据权利要求 1 所述的蛋白固定用微芯片，其中贮存器安装在所述隔壁与所述运送通道之间，并且通过运送通道与所述出口通道连接。

3. 根据权利要求 1 所述的蛋白固定用微芯片，其中附着到所述珠子上的抗体是抗白蛋白抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的蛋白固定用微芯片，其中附着到所述珠子上的抗体是抗转铁蛋白抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的蛋白固定用微芯片，其中附着到所述珠子上的抗体是抗 Ig G 抗体。

6. 根据权利要求 1 所述的蛋白固定用微芯片，其中附着到所述珠子上的抗体是抗角蛋白抗体。

蛋白固定用微芯片

技术领域

[1] 本发明涉及一种蛋白固定用微芯片，尤其涉及一种用于选择性地固定白蛋白、免疫球蛋白等的蛋白固定用微芯片。

背景技术

[2] 众所周知，目前已经研究出了分析微量样品的设备，例如液相色谱/质谱(LC/MS)或基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)。然而，在分析微量蛋白过程中，由于诸如白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白、角蛋白等特定蛋白的原因，很难检测出微量蛋白。

[3] 为解决上述问题，在进行 LC/MS 或 MALDI-TOF/MS 之前进行染料层析以固定上述特定蛋白。然而，此方法的缺点在于待分析的蛋白可能也被固定。

[4] 为克服上述缺点，实施免疫层析法。此方法利用结合这些蛋白的抗体免疫性地固定特定蛋白，从而可以分析微量靶蛋白。

[5] 然而，在这种免疫层析法中，用柱对样品进行精制，所以在一次试验后必须对柱进行洗涤，然后重复使用。因此，该方法很麻烦并且需要很长时间来分析蛋白。此外，实施该方法后，蛋白可能附着到抗体树脂上，并且在反复使用柱的情况下，由其后分析过程(例如 LC/MS 或 MALDI-TOF/MS)测量的结果的可靠性可能降低。

[6] 此外，免疫层析法需要至少 250μl 的样品，所以在样品量非常少的情况下不能使用这种方法，并且需要 20-30 分钟的反应时间，所以不能迅速得到结果。此外，免疫层析法使用其量为样品 1.8 倍的树脂。

发明内容

技术问题

[7] 因此，考虑到上述问题完成了本发明，本发明的目的是提供一种蛋白固定用微芯片，所述微芯片缩短了反应时间、提高了结果的可靠性并简化了工作过程。

技术方案

[8] 根据本发明的一个方面，通过提供蛋白固定用微芯片可以实现上述和其它目的，其中，将其上附着抗体的珠子容纳于微芯片的腔室中，该微芯片具有利用有机聚合物(即，聚二甲基硅氧烷(PDMS))产生的层状结构，通过腔室的微量样品的压力均匀分布于全部珠子上，微量样品通过表面积很大的珠子并以最佳速度平稳地排放到外面，从而有效地固定特定蛋白。

有益效果

[9] 因此，本发明蛋白固定用微芯片优化了样品通过微芯片的速度，并且由于小尺寸珠子足够大的表面积的原因，提高了特定蛋白固定到附着于珠子的抗体上的效率，这样得到了快速的反应结果。

附图说明

[10] 从以下结合附图的详细说明可以更清楚地理解本发明的上述和其它目的、特征以及其它优点，在附图中：

[11] 图 1 是根据本发明的蛋白固定用微芯片的立体图；

[12] 图 2 是根据本发明的微芯片的平面图，从其上剥离了盖玻片；

[13] 图 3 是根据本发明的微芯片的立体图，从其上剥离了盖玻片；

[14] 图 4 是显示根据本发明的微芯片的操作状态的示意图；和

[15] 图 5 是显示样品状态的示意图，其中样品经过根据本发明的微芯片的珠子。

具体实施方式

[16] 下面，参照附图详细描述本发明。

[17] 通过软刻蚀来制造根据本发明的蛋白固定用微芯片，将聚二甲

基硅氧烷(PDMS)浇注到利用半导体加工技术(例如蚀刻)在硅晶片上形成的框架上，以形成具有所需结构的通道、腔室、隔壁等。

[18] 对本发明的蛋白固定用微芯片进行加工，使得在入口 1 和入口通道 2 与出口 3 和出口通道 4 之间形成腔室 5，盖玻片 6 盖住上述部件，从而在腔室 5 除入口 1 之外的前面部分和两侧部分处的腔室 5 周围的隔壁 11 和 12 的上端与盖玻片 6 之间形成高度小于珠子 7 直径的排放空间 8。在上述三部分的排放空间 8 内选择性地形成贮存器 9，并且通过运送通道 10 与出口通道 4 连接。

[19] 在本发明的蛋白固定用微芯片中，微量样品进入入口 1，通过入口通道 2，到达腔室 5。如图 4 所示，因为腔室 5 填充有多个珠子 7，所以样品沿珠子 7 的表面流过。此时，样品的流体压力被施加到珠子 7 的表面上。因为腔室 5 填充有珠子 7，所以高压沿样品可流出的方向被施加到珠子 7 上。此时，在本发明中，珠子 7 沿样品可流出的方向(即，前进的方向和两侧的方向)被推动。然而，如图 5 所示，隔壁 11 和 12 与盖玻片 6 之间的排放空间 8 的高度(d1)小于珠子 7 的直径(d2)，所以可以防止珠子 7 从腔室 5 被释放出去。因此，可使样品通过圆形珠子 7 之间的间隙，并经由隔壁 11 和 12 供应到贮存器 9。贮存器 9 中聚集的样品经由运送通道 10 供应到出口通道 4，并排放到出口 3。因为珠子 7 在上述过程中沿行进方向分散到侧面隔壁 11 和隔壁 12，所以可以防止珠子 7 被挤到一侧，并因而防止由于过高压力而变形或损坏，或者可以防止样品由于珠子 7 聚集而被局限于一定范围内，这样能够引起稳定和有效的反应。在本发明中，珠子 7 的直径很小，为 100μm 或更小，所以表面积很大。因此，抗体附着到珠子 7 的足够大的表面区域上。

[20] 因此，与珠子 7 的表面接触、然后通过上述过程排放的样品的特定蛋白，可与附着到珠子 7 的表面上的抗体结合。所以，样品的特定蛋白与抗体有效地反应，快速聚集，然后排放到外面。本发明的蛋白固定用微芯片包括安装于其中的小尺寸内部结构，以使微量样品可持续通过该结构。所以，即使当微量样品通过微芯片的该结构时，也可获得有效充分的反应。在本发明中，根据珠子 7 的直径和腔室 5 内珠子 7 的数量，需要调整通道的隔壁 11 和 12 的高度。此外，在本发明中，将多个

结构蚀刻进硅晶片中，所以，可重复地大量生产多个蛋白固定用微芯片。

[21] 可以选择性地安装贮存器 9。贮存器 9 安装于隔壁 11 和 12 与运送通道 10 之间，用于稳定地精制和排放由微型泵和微量移液管转移的样品。

[22] 在本发明中，附着到珠子 7 上的抗体可以是不同的。

[23] 即，附着到珠子 7 上的抗体可以是抗白蛋白抗体、抗转铁蛋白抗体、抗 Ig G 抗体或抗角蛋白抗体。

[24] 尽管在本发明中没有描述，但是因为可根据不同目的任意选择固定到珠子 7 上的特定蛋白，所以可改变附着到珠子 7 上的抗体使其适于具体目的。

工业实用性

[25] 如上所述，常规的免疫层析法需要约 250μl 的样品，本发明的蛋白固定用微芯片使用不超过 10μl 的样品，并因此得到精制的产品，其中特定蛋白已被除去，而且所述微芯片根据附着到具有充分大表面积的珠子上的抗体种类选择性地捕获目标特定蛋白，并因此可以选择性地用于各种目的。此外，本发明的蛋白固定用微芯片将反应时间极大地缩短到常规免疫层析法的 30-50%，从而得到快速的反应结果，并使样品和珠子的比率减少到 10：1，为常规柱方法的 1/18。此外，通过软刻蚀可大量生产本发明的蛋白固定用微芯片，而且生产成本很低，所以尽管微芯片使用一次后要扔掉，但仍很经济。

[26] 尽管为了说明而公开了本发明的优选实施方案，但是本领域技术人员将会理解，在不脱离所附权利要求书公开的本发明范围和精神的情况下，可以做出各种修改、添加和替代。

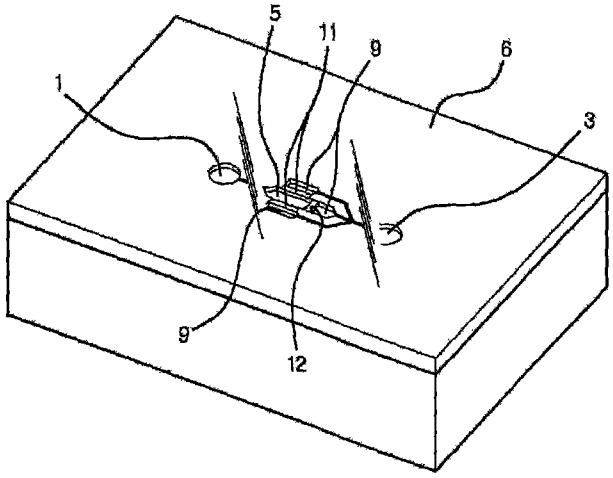


图 1

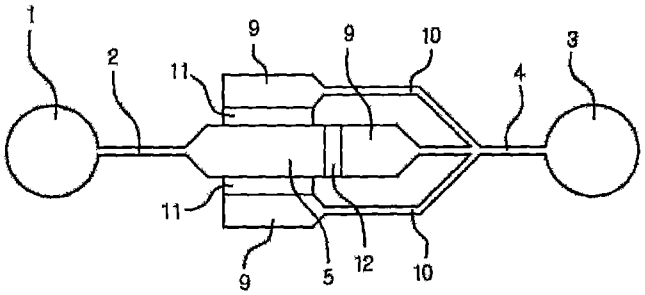


图 2

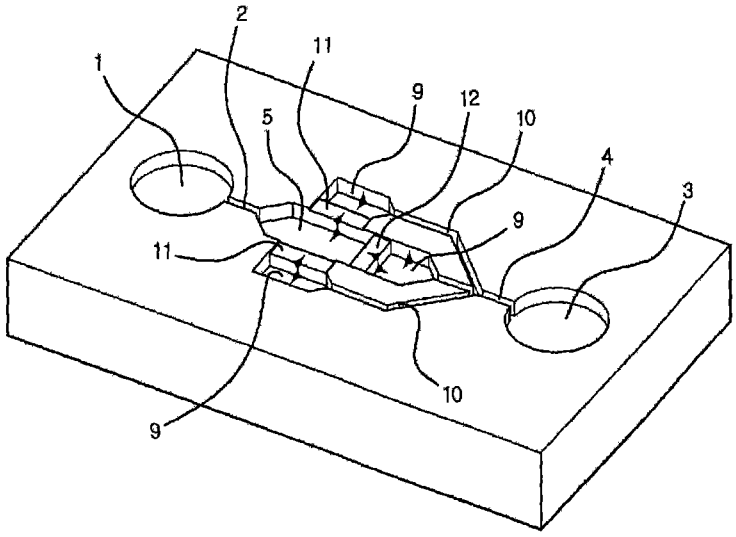


图 3

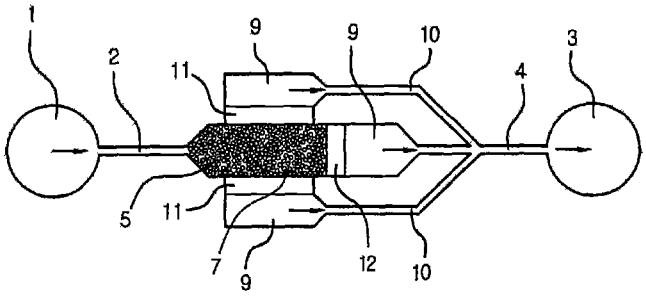


图 4

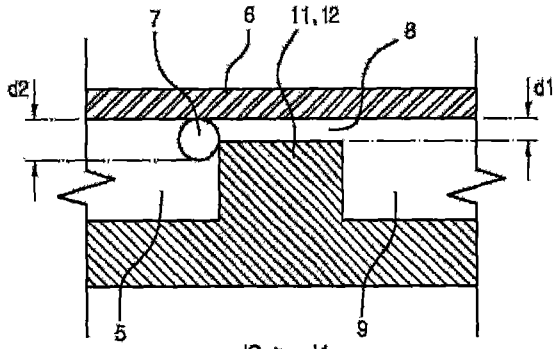


图 5