



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110420671 A

(43)申请公布日 2019.11.08

(21)申请号 201910560659.5

(22)申请日 2019.06.26

(71)申请人 南京科瑞芯生物科技有限公司
地址 210000 江苏省南京市雨花台区板桥
新城新亭大街68号-46号

(72)发明人 张健

(74)专利代理机构 南京业腾知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 32321
代理人 郑婷

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

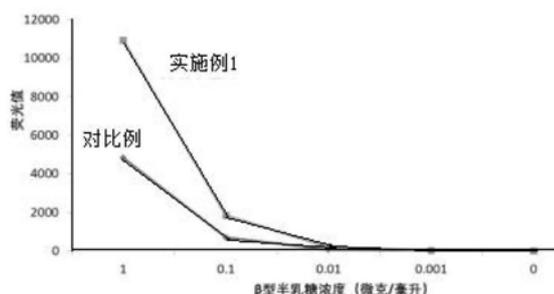
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种凝集素微阵列芯片及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种凝集素微阵列芯片,包括固体基片和凝集素探针,固体基片通过有机硅烷基连接试剂与支化聚合物结合,支化聚合物与凝集素探针通过双官能连接剂键合;所述凝集素选自刀豆凝集素A、雪花莲凝集素等26种凝集素中的一种或多种。该凝集素微阵列芯片可以检测固定在微阵列上的凝集素与靶聚糖缀合物之间的结合相互作用,采用本发明的芯片,操作方便、分析周期短、成本低,并可同时分析N-糖链和O-糖链,分析糖链构型(α/β)和连接方式。可应用于:临床样本中糖基化模式差异或改变的比较;分析蛋白质、抗体、细胞和细胞裂解物的糖基化谱;基于糖类分子的生物标志物的发现和分析;鉴定异常糖基化的细胞,蛋白质或抗体。



1. 一种凝集素微阵列芯片,其特征在於,包括固体基片和凝集素探针,固体基片通过有机硅烷基连接试剂与支化聚合物结合,支化聚合物与凝集素探针通过双官能连接剂键合;

所述凝集素选自刀豆凝集素A、雪花莲凝集素、菜豆白凝集植物血凝素、菜豆红凝集植物血凝素、间质曼陀罗凝集素、水晶体凝集素、紫癜白血球凝集素、紫穗玛卡菌血凝素、黑参凝集素、白血球凝集素、欧几里香凝集素-I、莲藕凝集素、蓖麻凝集素-I、水晶刺桐凝集素、花生凝集素、木菠萝素、银耳凝集素IB4、紫藤凝集素、大豆凝集素、螺旋波马凝集素、砂仁凝集素、双花杜立克凝集素、银耳凝集素II、小麦胚芽凝集素、番茄凝集素和马铃薯凝集素中的一种或多种。

2. 如权利要求1所述的凝集素微阵列芯片,其特征在於,所述凝集素微阵列芯片上,相邻的凝集素探针间的距离为20-50微米。

3. 如权利要求1所述的凝集素微阵列芯片,其特征在於,所述固相基质的材料选自玻璃、陶瓷、氧化钨锡、二氧化硅载玻片、聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯、聚乙烯、高密度聚乙烯、聚氯乙烯、聚酰胺、丙烯腈丁二烯苯乙烯或聚氨酯中的任意一种。

4. 如权利要求1所述的凝集素微阵列芯片,其特征在於,所述有机硅烷基连接试剂选自环氧官能化三烷氧基硅烷、乙烯基官能化三烷氧基硅烷、氨基官能化三烷氧基硅烷、甲基丙烯酸氧基官能化三烷氧基硅烷或异氰酸酯官能化三烷氧基硅烷中的一种或任意几种的混合物。

5. 如权利要求1所述的凝集素微阵列芯片,其特征在於,所述支化聚合物选自多臂聚乙二醇、高度支化的聚乙烯亚胺聚合物、PEG-核心树枝状聚合物、多臂聚乙二醇聚合物、聚丙烯酸酯、多胺、聚酰胺、聚醚、聚酯、聚丙烯酸甲酯、聚亚苯基或聚苯乙烯中的一种或者两种以上任意比例的组合。

6. 如权利要求1至5任一项所述的凝集素微阵列芯片,其特征在於,所述双官能连接剂选自N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、N,N'-二琥珀酰亚胺基酒石酸酯、N,N'-二琥珀酰亚胺基草酸酯、辛二酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)、N,N'-二琥珀酰亚胺基戊二酸酯、N,N'-二琥珀酰亚胺基辛二酸酯或N,N'-二琥珀酰亚胺基同型双官能聚乙二醇中的任意一种。

7. 权利要求1至6任一项所述的凝集素微阵列芯片的制备方法,其特征在於,包括如下步骤:

(1) 制备第一涂层溶液:

将有机硅烷基连接试剂、支化聚合物加入到有机溶剂中混合均匀,得到混合液,将双官能连接剂溶解到有机溶剂中,然后滴加到混合液中,搅拌混合均匀,得到第一涂层溶液;

(2) 制备第二涂层溶液:

将封闭试剂溶于有机溶剂中,得到第二涂层溶液;

(3) 涂层并固化:将第一涂层溶液和第二涂层溶液以1:6的体积比混合后,对固体基片进行旋转涂层,然后进行固化,冷却,得到固化后的基片;

(4) 点样:将凝集素溶解于点样缓冲液中,然后采用微阵列点样设备点样到步骤(3)中固化后的基片上,形成凝集素微阵列芯片。

8. 如权利要求7所述凝集素微阵列芯片的制备方法,其特征在於,步骤(2)中,所述封闭试剂选自6-叠氮磺酰基己基三乙氧基硅烷、聚乙二醇山梨糖醇六油酸酯或聚乙二醇脱水山梨糖醇四油酸酯中的一种或两种以上任意比例的混合物。

9. 如权利要求7所述凝集素微阵列芯片的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述旋转涂层包括两步涂层程序,先以100rpm/s的加速度在500rpm旋转10秒,然后以300rpm/s的加速度在4,000rpm旋转30秒。

10. 如权利要求7或8或9所述凝集素微阵列芯片的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述固化温度为70-150℃,时间为1-4h。

一种凝集素微阵列芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种快速高效检测糖基化变化的凝集素微阵列芯片。

背景技术

[0002] 在基因组学和蛋白质组学时代之后,糖组学成为研究蛋白质碳水化合物修饰(糖基化)的重要领域。糖基化对蛋白质的功能和特性有很大的影响。同时,糖基化一旦发生变化会在很多疾病(例如癌症)病变中体现出来,所以变异性的糖基化可以作为疾病诊断的生物标志物和疾病治疗的生物靶点。

[0003] 目前,糖组学分析主要基于质谱技术。质谱的方法工序繁琐、效率低下,而且价格昂贵,无法满足临床样品分析需求。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于解决现有技术中质谱糖基化分析的低效率和高成本问题,提供一种可以快速高效检测糖基化变化的凝集素微阵列芯片。

[0005] 本发明的另一目的还在于提供上述凝集素微阵列芯片的制备方法。

[0006] 技术方案

[0007] 一种凝集素微阵列芯片,包括固体基片和凝聚素探针,固体基片通过有机硅烷基连接试剂与支化聚合物结合,支化聚合物与凝集素探针通过双官能连接剂键合。所述凝集素选自刀豆凝集素A、雪花莲凝集素、菜豆白凝集植物血凝素、菜豆红凝集植物血凝素、间质曼陀罗凝集素、水晶体凝集素、紫癜白血球凝集素、紫穗玛卡菌血凝素、黑参凝集素、白血球凝集素、欧几里香凝集素-I、莲藕凝集素、蓖麻凝集素-I、水晶刺桐凝集素、花生凝集素、木菠萝素、银耳凝集素I B4、紫藤凝集素、大豆凝集素、螺旋波马凝集素、砂仁凝集素、双花杜立克凝集素、银耳凝集素II、小麦胚芽凝集素、番茄凝集素和马铃薯凝集素中的一种或多种。

[0008] 凝集素是一类从植物或动物中提取纯化到的蛋白,它们可以高度特异性的结合不同糖链的单糖结构单元和连接序列。刀豆凝集素A、雪花莲凝集素、菜豆白凝集植物血凝素等26中凝集素及结合位点详见表1:

[0009] 表1 凝集素微阵列芯片上的26个凝集素

	凝集素	结合位点
	刀豆凝集素 A (Con A)	甘露糖
	雪花莲凝集素 (GNA)	
	菜豆白凝集植物血凝素 (PHA-L)	复合型 N-聚糖
	菜豆红凝集植物血凝素 (PHA-E)	
	间质曼陀罗凝集素 (DSA)	
	水晶体凝集素 (LCA)	
	紫癜白血球凝集素 (MAL-I)	唾液酸
	紫穗玛卡菌血凝素 (MAL-II)	
	黑参凝集素 (SNA)	
	白血球凝集素 (AAL)	岩藻糖
	欧几里香凝集素-I (UEA-I)	
	莲藕凝集素 (LTA)	
	蓖麻凝集素-I (RCA-I)	
[0010]	水晶刺桐凝集素 (ECL)	半乳糖
	花生凝集素 (PNA)	
	木菠萝素	
	银耳凝集素 I B4 (GSI-B4)	
	紫藤凝集素 (WFA)	
	大豆凝集素 (SBA)	
	螺旋波马凝集素 (HPA)	N-乙酰半乳糖胺
	砂仁凝集素 (VVL)	
	双花杜立克凝集素 (DBA)	
	银耳凝集素 II (GSII)	N-乙酰葡萄糖胺
	小麦胚芽凝集素 (WGA)	
	番茄凝集素 (LEL)	聚乙酰氨基乳糖
	马铃薯凝集素 (STL)	

[0011] 进一步,所述凝集素微阵列芯片上,相邻的凝集素探针间的距离为20-50微米。

[0012] 进一步,所述固体基片材料选自玻璃、陶瓷、氧化铟锡 (ITO)、二氧化硅载玻片、

聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯、聚乙烯、高密度聚乙烯 (HDPE)、聚氯乙烯、聚酰胺、丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS) 或聚氨酯中的任意一种。固体基片具有表面羟基,其可用于偶联至有机硅烷连接试剂。

[0013] 进一步,所述有机硅烷基连接试剂为非自交联硅烷基连接试剂,非自交联硅烷基连接试剂是在硅原子上带有两种不同类型反应性基团的有机硅烷,一种活性基团是可水解的-OR基团,如甲氧基,乙氧基或乙酰氧基,第二类反应性基团是有机官能团,例如环氧基,氨基,甲基丙烯酰氧基或硫化物。因此,本发明的非自交联硅烷基连接剂包括官能化烷氧基硅烷。当有机官能团在任何实质程度上不与其它基于硅烷的连接剂试剂反应时,基于硅烷的连接剂试剂被称为“非自交联的”。在本发明的条件下,非自交联硅烷基连接试剂中的硅烷醇基团将主要与羟基缩合。在玻璃,矿物或金属表面形成稳定的Si-OX键(X=Si,Al,Fe等)。本发明的有机硅烷基连接剂试剂具体选自环氧官能化三烷氧基硅烷、乙烯基官能化三烷氧基硅烷、氨基官能化三烷氧基硅烷、甲基丙烯酰氧基官能化三烷氧基硅烷或异氰酸酯官能化三烷氧基硅烷中的一种或任意几种的混合物。烷氧基硅烷上的适当官能团的选择由聚合物上的相应末端基团确定,有机硅烷的有机官能团与聚合物中的末端基团反应。

[0014] 进一步,所述支化聚合物具体选自多臂聚乙二醇(PEG)、高度支化的聚乙烯亚胺(PEI)聚合物、PEG-核心树枝状聚合物、多臂聚乙二醇(PEG)聚合物、聚丙烯酸酯、多胺、聚酰胺、聚醚、聚酯、聚丙烯酸甲酯、聚亚苯基或聚苯乙烯中的一种或者两种以上任意比例的组合。支化聚合物可以通过一个或多个双官能连接基团与凝集素连接,双官能连接基团可以与另一个双官能连接基团或支化聚合物上的末端基团反应,支化聚合物包含至少一个末端基团,可以包括羧酸钠端基,伯胺端基,羟基端基,酰氨基乙醇端基,琥珀酰胺端基,琥珀酰胺基端基,和伯胺和仲胺末端基团的混合物。当支化聚合物包括末端胺基时,可以使用胺反应性交联剂基团,其与伯胺结合。能够与伯胺键合的基团包括异硫氰酸酯,异氰酸酯,酰基叠氮化物,NHS酯,磺酰氯,醛,乙二醛,环氧化物,环氧乙烷,碳酸酯,芳基卤化物,亚氨酸酯,碳二亚胺,酸酐和氟苯酯。其中大多数基团通过酰化或烷基化与胺键合。凝集素通常可以通过例如赖氨酸上的胺基团连接到双官能连接基团一端的官能基团。

[0015] 进一步,所述双官能连接剂选自N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、N,N'-二琥珀酰亚胺基酒石酸酯、N,N'-二琥珀酰亚胺基草酸酯、辛二酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)、N,N'-二琥珀酰亚胺基戊二酸酯、N,N'-二琥珀酰亚胺基辛二酸酯或N,N'-二琥珀酰亚胺基同型双官能聚乙二醇中的任意一种。

[0016] 上述凝集素微阵列芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0017] (1) 制备第一涂层溶液:

[0018] 将有机硅烷基连接试剂、支化聚合物加入到有机溶剂中混合均匀,得到混合液,将双官能连接剂溶解到有机溶剂中,然后滴加到混合液中,搅拌混合均匀,得到第一涂层溶液;

[0019] (2) 制备第二涂层溶液:

[0020] 将封闭试剂溶于有机溶剂中,得到第二涂层溶液;

[0021] (3) 涂层并固化:将第一涂层溶液和第二涂层溶液以1:6的体积比混合后,对固体基片进行旋转涂层,然后进行固化,冷却,得到固化后的基片;

[0022] (4) 点样:将凝集素溶解于点样缓冲液中,然后采用微阵列点样设备点样到步骤

(3) 中固化后的基片上,形成凝集素微阵列芯片。微阵列点样设备是微量递送系统,其可以将皮升到微升量的液体递送到微阵列基质上。它包括但不限于接触式和非接触式点样设备。用于溶解凝集素探针的点样缓冲液是含有添加剂的缓冲液,用于增强点样质量。点样缓冲液的pH值为5-9。添加剂可以是非离子或离子型去污剂,其可以增强点样点的均匀性和在微阵列上的排列的均一性。添加剂也可以或可以是多元醇试剂如甘油或海藻糖,其作用是防止点样溶液蒸发从而增强点的形态。点样过程在60%相对湿度下进行。点样后,可以通过在60-90%湿度下在室温孵育1小时来增强凝集素的固定。

[0023] 进一步,步骤(2)中,所述封闭试剂为叠氮官能化的三烷氧基硅烷交联剂和/或聚乙二醇聚合物,具体选自6-叠氮磺酰基己基三乙氧基硅烷、聚乙二醇山梨糖醇六油酸酯或聚乙二醇脱水山梨糖醇四油酸酯中的一种或两种以上任意比例的混合物。

[0024] 进一步,步骤(3)中,所述旋转涂层包括两步涂层程序,先以100rpm/s的加速度在500rpm旋转10秒,然后以300rpm/s的加速度在4,000rpm旋转30秒。

[0025] 进一步,步骤(3)中,所述固化温度为70-150℃,时间为1-4h。

[0026] 采用本发明的凝集素微阵列芯片进行糖基化检测的方法:

[0027] 将待检测的生物样品标记后(例如荧光标记)与凝集素微阵列芯片作用,定量读出生物样品和凝集素微阵列芯片上的每一个凝集素的结合荧光信号,该荧光信号定量地反应出样品和芯片上凝集素的结合强弱。

[0028] 本发明的有益效果:本发明提供了一种凝集素微阵列芯片,其可以检测固定在微阵列上的凝集素与靶聚糖缀合物之间的结合相互作用,任何具有糖基化的物质都可以通过凝集素微阵列芯片来检测或者定量。与传统的采用质谱对糖基化进行分析的方法相比,采用本发明的芯片,操作方便、分析周期短、成本低,并且可以同时分析N-糖链和O-糖链,分析糖链构型(α/β)和连接方式。可应用于:临床样本中糖基化模式差异或改变的比较;分析蛋白质、抗体、细胞和细胞裂解物的糖基化谱;基于糖类分子的生物标志物的发现和分析;鉴定异常糖基化的细胞,蛋白质或抗体。本发明的凝集素微阵列芯片与质谱对糖基化的分析的优缺点比较见表2。

[0029] 表2. 比较质谱和凝集素芯片对糖基化的分析

[0030]

方法	质谱	本发明的凝集素芯片
分析过程	酶消化释放糖链（例如 PNGase F 释放 N-糖链） 纯化释放后糖链（例如凝胶过滤） 标记纯化的糖链并再次纯化（例如 2-AB 标记加 HPLC 纯化） 用质谱仪分析样品 数据分析	<ul style="list-style-type: none"> • 不需要从生物样品中释放糖链 • 荧光标记和纯化样品（简单透析） • 和凝集素芯片杂交反应 • 芯片扫描仪读出数据 • 数据分析
费用	8.4 万元左右每个样本	1.2 万元左右每个样本
分析周期	一个分析周期 2 天（单样本单分析）	一个分析周期 3 小时（单芯片分析同时分析 8-48 个样本，现有技术可以继续拓展到 64 个）
分析糖链结构	N-糖链分析比较好，O-糖链分析有局限	可以同时分析 N-糖链和 O-糖链
分析糖链构型（ α/β ）和连接方式	不可以	可以（例如 SNA 凝集素可以识别 $\alpha 2, 6$ 连接的唾液酸）

附图说明

[0031] 图1为采用实施例1和对比例的凝集素微阵列芯片识别 β 型的半乳糖的测试结果；

[0032] 图2为采用实施例1和对比例的凝集素微阵列芯片识别 α 型的乙酰氨基半乳糖的测试结果；

[0033] 图3为采用实施例1的凝集素微阵列芯片测定胎球蛋白糖蛋白和去唾液酸胎球蛋白糖蛋白中糖基化的结果；

[0034] 图4为采用实施例1的凝集素微阵列芯片检测乳腺癌和健康人血清中的糖基化变化的结果。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。

[0036] 实施例1

[0037] 一种凝集素微阵列芯片的制备方法，包括如下步骤：

[0038] (1) 制备第一涂层溶液：

[0039] 将10mM有机硅烷基连接试剂（(3-缩水甘油氧基丙基)三甲氧基硅烷）、5mM支化聚合物（聚乙二醇）加入到DMSO中混合均匀，得到混合液，将40mM双官能连接剂（N,N'-二琥珀

酰亚胺基碳酸酯)溶解到DMSO中,然后滴加到混合液中,搅拌混合均匀,得到第一涂层溶液;

[0040] (2) 制备第二涂层溶液:

[0041] 将封闭试剂(4.52mM聚乙二醇山梨糖醇六油酸酯和8.26mM 6-叠氮磺酰基己基三乙氧基硅烷)溶于有机溶剂DMSO中,搅拌混合均匀,得到第二涂层溶液;

[0042] (3) 涂层并固化:采用二氧化硅载玻片作为固体基片,清洗并烘干后备用;将第一涂层溶液和第二涂层溶液以1:6的体积比混合后,对固体基片进行旋转涂层(使用两步涂层程序在旋转涂层机上旋转二氧化硅载玻片:先以100rpm/s的加速度在500rpm旋转10秒,然后以300rpm/s的加速度在4,000rpm旋转30秒),将涂层的载玻片在室温下保持在真空烘箱(200mmHg)中20分钟,然后将烘箱加热至100℃固化2小时,接着在氩气中冷却至50℃,然后将载玻片在空气中冷却至室温,在超声浴中用MilliQ水清洗载玻片两次,每次2分钟,然后将载玻片在红外加热器中干燥15分钟,然后在真空烘箱中在50℃下干燥15分钟,得到固化后的基片;

[0043] (4) 点样:将26种凝集素(刀豆凝集素A、雪花莲凝集素、菜豆白凝集植物血凝素、菜豆红凝集植物血凝素、间质曼陀罗凝集素、水晶体凝集素、紫癜白血球凝集素、紫穗玛卡菌血凝素、黑参凝集素、白血球凝集素、欧几里香凝集素-I、莲藕凝集素、蓖麻凝集素-I、水晶刺桐凝集素、花生凝集素、木菠萝素、银耳凝集素I B4、紫藤凝集素、大豆凝集素、螺旋波马凝集素、砂仁凝集素、双花杜立克凝集素、银耳凝集素II、小麦胚芽凝集素、番茄凝集素和马铃薯凝集素等26种)分别溶解于点样缓冲液(含有浓度为100μM的0.15M磷酸钠,0.1%甘油(pH 8.5))中,然后采用微阵列点样设备点样到步骤(3)中固化后的基片上,每种凝集素做成一系列单独的探针,相邻的凝集素探针间的距离为30微米,点样过程在60%相对湿度下进行,并在60-90%湿度下在室温孵育1小时,得到凝集素微阵列芯片。

[0044] 实施例2

[0045] 一种凝集素微阵列芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0046] (1) 制备第一涂层溶液:

[0047] 通过将10mM(3-缩水甘油氧基丙基)三甲氧基硅烷和4mM聚乙烯亚胺(分子量800Da)在DMSO中混合均匀,得到混合液;在单独的小瓶中,将40mM的N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯溶解在DMSO中,并将溶液滴加到混合液中,搅拌混合均匀,第一涂层溶液。

[0048] (2) 制备第二涂层溶液:

[0049] 将封闭试剂(4.52mM聚乙二醇脱水山梨糖醇四油酸酯和8.26mM 6-叠氮磺酰基己基三乙氧基硅烷)溶于有机溶剂DMSO中,搅拌混合均匀,得到第二涂层溶液;

[0050] (3) 涂层并固化:采用二氧化硅载玻片作为固体基片,清洗并烘干后备用;将第一涂层溶液和第二涂层溶液以1:6的体积比混合后,对固体基片进行旋转涂层(使用两步涂层程序在旋转涂层机上旋转二氧化硅载玻片:先以100rpm/s的加速度在500rpm旋转10秒,然后以300rpm/s的加速度在4,000rpm旋转30秒),将涂层的载玻片在室温下保持在真空烘箱(200mmHg)中20分钟,然后将烘箱加热至100℃固化2小时,接着在氩气中冷却至50℃,然后将载玻片在空气中冷却至室温,在超声浴中用MilliQ水清洗载玻片两次,每次2分钟,然后将载玻片在红外加热器中干燥15分钟,然后在真空烘箱中在50℃下干燥15分钟,得到固化后的基片;

[0051] (4) 点样:将26种凝集素(刀豆凝集素A、雪花莲凝集素、菜豆白凝集植物血凝素、菜

豆红凝集植物血凝素、间质曼陀罗凝集素、水晶体凝集素、紫癜白血球凝集素、紫穗玛卡菌血凝素、黑参凝集素、白血球凝集素、欧几里香凝集素-I、莲藕凝集素、蓖麻凝集素-I、水晶刺桐凝集素、花生凝集素、木菠萝素、银耳凝集素I B4、紫藤凝集素、大豆凝集素、螺旋波马凝集素、砂仁凝集素、双花杜立克凝集素、银耳凝集素II、小麦胚芽凝集素、番茄凝集素和马铃薯凝集素等26种)分别溶解于点样缓冲液(含有浓度为100 μ M的0.15M磷酸钠,0.1%甘油(pH 8.5))中,然后采用微阵列点样设备点样到步骤(3)中固化后的基片上,每种凝集素做成一系列单独的探针,相邻的凝集素探针间的距离为30微米,点样过程在60%相对湿度下进行,并在60-90%湿度下在室温孵育1小时,得到凝集素微阵列芯片。

[0052] 对比例

[0053] 采用市场上的A基片来制作的凝集素芯片,将26种凝集素(刀豆凝集素A、雪花莲凝集素、菜豆白凝集植物血凝素、菜豆红凝集植物血凝素、间质曼陀罗凝集素、水晶体凝集素、紫癜白血球凝集素、紫穗玛卡菌血凝素、黑参凝集素、白血球凝集素、欧几里香凝集素-I、莲藕凝集素、蓖麻凝集素-I、水晶刺桐凝集素、花生凝集素、木菠萝素、银耳凝集素I B4、紫藤凝集素、大豆凝集素、螺旋波马凝集素、砂仁凝集素、双花杜立克凝集素、银耳凝集素II、小麦胚芽凝集素、番茄凝集素和马铃薯凝集素等26种)分别溶解于点样缓冲液(含有浓度为100 μ M的0.15M磷酸钠,0.1%甘油(pH 8.5))中,然后采用微阵列点样设备点样到A基片上,每种凝集素做成一系列单独的探针,相邻的凝集素探针间的距离为30微米,点样过程在60%相对湿度下进行,并在60-90%湿度下在室温孵育1小时,得到凝集素芯片。

[0054] 应用测试:

[0055] 1、采用实施例1和对比例的凝集素微阵列芯片对两种糖链结构(β 型的半乳糖和 α 型的乙酰氨基半乳糖)的识别测试,

[0056] 测试方法:将生物素缀合的 β 型的半乳糖和 α 型的乙酰氨基半乳糖分别溶解在分析缓冲液中,配制成0.001,0.01,0.1和1微克/毫升的分析溶液,然后将分析液和凝集素微阵列芯片孵育1小时,最后,用清洗缓冲液清洗芯片并干燥。芯片用芯片扫描仪读出数据。测试中所用的 β 型的半乳糖和 α 型的乙酰氨基半乳糖是有生物素缀合的。一旦它们结合到凝集素微阵列芯片上的某种凝集素后,该结合信号就可以用荧光(例如Cy3)标记的链霉亲和素检测出来。

[0057] 测试结果见图1和图2,图1为采用实施例1和对比例的凝集素微阵列芯片识别 β 型的半乳糖的测试结果,图2为采用实施例1和对比例的凝集素微阵列芯片识别 α 型的乙酰氨基半乳糖的测试结果,由图1和图2可以看出,本发明实施例1的凝集素微阵列芯片比同种建立在A基片上的凝集素微阵列芯片(对比例)具有更强的检测信号和更低的检出限。

[0058] 2、检测标准糖蛋白中糖基化的变化

[0059] 检测方法:采用实施例1的凝集素微阵列芯片分别来测定AlexaFluor555标记的胎球蛋白糖蛋白(Fetuin)和去唾液酸胎球蛋白糖蛋白(Asialofetuin),两种标准糖蛋白的分析浓度是10 μ g/ml,样品在凝集素微阵列芯片上孵育(杂交)1小时,并用微阵列芯片扫描仪读出分析信号。分析数据用最高的结合荧光信号来归一化,通过比较凝集素微阵列上的凝集素点的信号差异可以判断胎球蛋白糖蛋白和去唾液酸胎球蛋白糖蛋白中糖基化模式的差异。

[0060] 图3为采用实施例1的凝集素微阵列芯片测定胎球蛋白糖蛋白和去唾液酸胎球蛋白

白糖蛋白中糖基化的结果,由图3可以看出,在去唾液酸胎球蛋白的分析数据中,与半乳糖结合凝集素(即RCA-1,ECL,PNA,WFA和SBA)的结合明显增加,这表明去唾液酸胎球蛋白糖中由于缺失了唾液酸末端从而暴露了更多的半乳糖表位,结果说明该凝集素微阵列芯片对糖基化的检测具有高度的特异性。

[0061] 3、检测乳腺癌血清样本中糖基化的变化

[0062] 检测方法:取乳腺癌和健康的人血清各12微升,分别加入3微升250mM的碳酸氢钠溶液,然后各加入1微升10mg/ml的Cy3荧光剂缀合的NHS标记物,标记反应液在冰上孵育1小时,然后将标记反应液加入迷你透析杯中(10000分子量截留),用PBS缓冲液在4℃透析三次,每次一小时,最后一次在4℃透析过夜,接着将标记的两个血清样品分别用Tris分析缓冲液稀释50倍,然后分别与两个实施例1制得的凝集素微阵列芯片在室温中杂交孵育1小时。采用微阵列芯片扫描仪读出分析信号,分析数据用最高的结合荧光信号来归一化。

[0063] 测试结果见图4,图4为采用实施例1的凝集素微阵列芯片检测乳腺癌和健康人血清中的糖基化变化的结果,通过比较健康和癌症血清的信号,我们可以观察到不同的糖基化模式,比如,PNA凝集素(L15)对癌症血清结合信号很低(几乎消失),表明在癌症血清中和PNA凝集素结合的T抗原低表达。相反,在癌症样本中有相对增加的HPA凝集素(L20)的结合信号,表明Tn抗原在癌症血清中的高表达。从凝集素芯片的检测结果推断是Cosmc基因在该癌症患者中的突变。Cosmc是从Tn抗原合成T抗原的酶的表达所需的伴侣蛋白,这一通路的缺陷会导致更多的Tn抗原和较少的T抗原。此外,我们观察到DSA凝集素(L5)和LEL凝集素(L25)在癌症样本中的信号提高,这表明具有N-乙酰聚乳糖胺糖链在癌症样本中的增长。

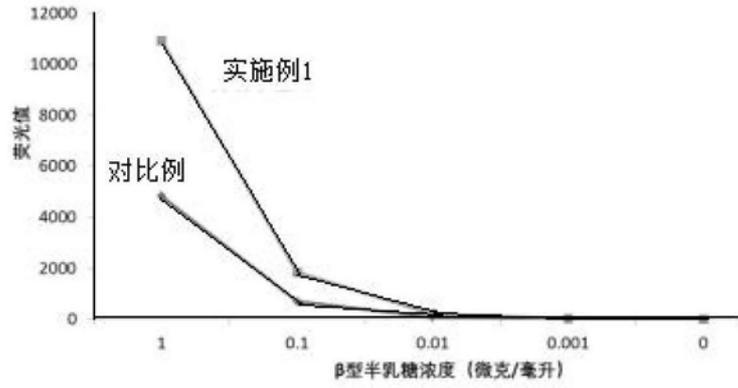


图1

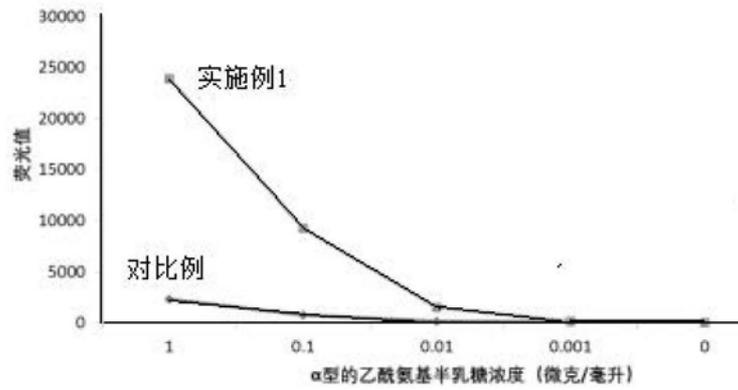


图2

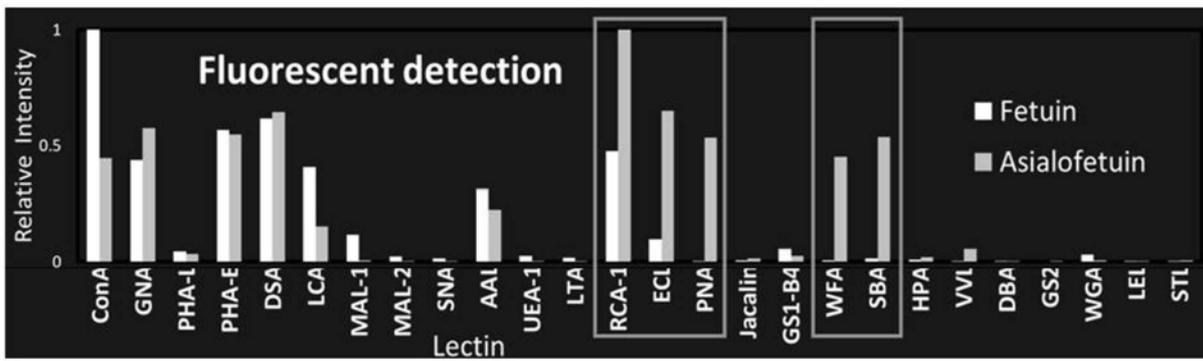


图3

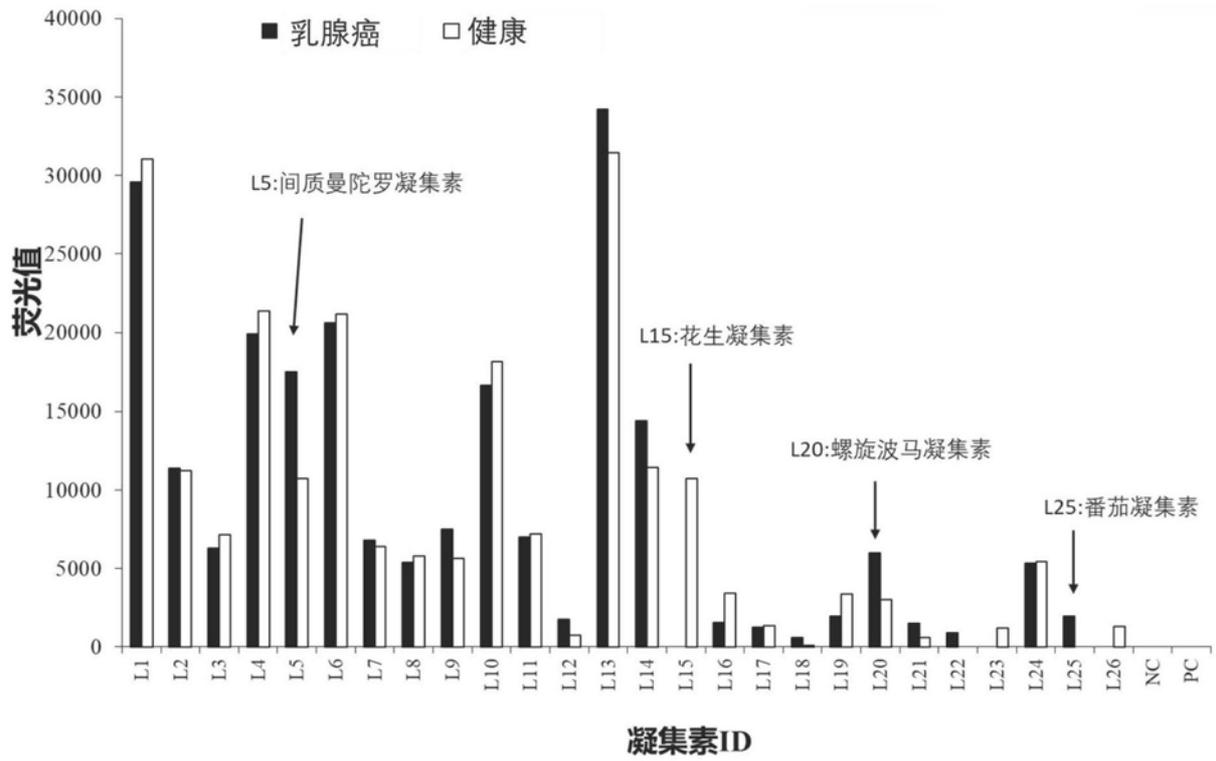


图4

专利名称(译)	一种凝集素微阵列芯片及其制备方法		
公开(公告)号	CN110420671A	公开(公告)日	2019-11-08
申请号	CN201910560659.5	申请日	2019-06-26
[标]发明人	张健		
发明人	张健		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	B01L3/5027 G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/582 G01N33/68		
代理人(译)	郑婷		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种凝集素微阵列芯片，包括固体基片和凝集素探针，固体基片通过有机硅烷基连接试剂与支化聚合物结合，支化聚合物与凝集素探针通过双官能连接剂键合；所述凝集素选自刀豆凝集素A、雪花莲凝集素等26种凝集素中的一种或多种。该凝集素微阵列芯片可以检测固定在微阵列上的凝集素与靶聚糖缀合物之间的结合相互作用，采用本发明的芯片，操作方便、分析周期短、成本低，并可同时分析N-糖链和O-糖链，分析糖链构型(α/β)和连接方式。可应用于：临床样本中糖基化模式差异或改变的比较；分析蛋白质、抗体、细胞和细胞裂解物的糖基化谱；基于糖类分子的生物标志物的发现和分析；鉴定异常糖基化的细胞，蛋白质或抗体。

