



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111295582 A

(43)申请公布日 2020.06.16

(21)申请号 201880057668.6

(22)申请日 2018.07.05

(30)优先权数据

62/529,986 2017.07.07 US

62/530,735 2017.07.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/040887 2018.07.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/010285 EN 2019.01.10

(71)申请人 艾维亚纳分子技术有限公司

地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 S·达斯 J·M·哈姆林

A·古普塔

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 王锦阳

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/566(2006.01)

G01R 19/22(2006.01)

权利要求书5页 说明书20页 附图9页

(54)发明名称

表面声波传感器生物活性涂层

(57)摘要

提供一种声波传感器元件。所述声波传感器包括：具有或不具有3D基质微结构的压电基板以增加有效传感区域的表面，以及共价键合到压电基板表面的锚定物质；并且所述锚定物质可结合至捕捉试剂。还提供制造使用包含锚定物质的生物活性膜涂覆压电材料表面的所述3D生物传感器表面和元件的方法。



1. 一种生物传感器元件,包括:涂覆有金属的基板;以及锚定物质,所述锚定物质包含结合蛋白和具有至少一个硫原子的官能团,其中所述锚定物质通过所述官能团直接结合到所述金属并在所述涂覆有金属的基板上形成单层;并且其中所述锚定物质配置为与捕捉试剂连接。

2. 根据权利要求1所述的生物传感器元件,其中所述金属选自由铝、金、铝合金、以及其任意组合所组成的组。

3. 根据权利要求1或2所述的生物传感器元件,其中所述金属是铝。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的生物传感器元件,其中所述官能团是硫醇基。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的生物传感器元件,其中所述结合蛋白是亲和素、寡核苷酸、抗体、亲和体、适配体或多核苷酸。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的生物传感器元件,其中所述结合蛋白是选自由下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素、链霉亲和素、以及其任意组合。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的生物传感器元件,其中所述捕捉试剂包含用于结合到所述锚定物质的所述结合蛋白的生物素部分。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的生物传感器元件,其中所述捕捉试剂包含用于结合到全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、小分子或蛋白质的部分。

9. 根据权利要求8所述的生物传感器元件,其中所述部分选自由抗体、亲和体或适配体所组成的组。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的生物传感器元件,还包括声波换能器。

11. 根据权利要求10所述的生物传感器元件,其中所述声波换能器生成体声波。

12. 根据权利要求11所述的生物传感器元件,其中所述体声波选自由厚度剪切模式、声板模式和水平板模式所组成的组。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的生物传感器元件,其中所述生物传感器元件是基于膜体声波谐振器(基于FBAR)的装置。

14. 根据权利要求10所述的生物传感器元件,其中所述声波换能器生成表面声波。

15. 根据权利要求14所述的生物传感器元件,其中所述表面声波选自由剪切水平表面声波、表面横波、瑞雷波和拉夫波所组成的组。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的生物传感器元件,其中所述基板包括压电材料。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的生物传感器元件,其中所述金属直接涂覆在所述基板上。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的生物传感器元件,其中所述基板还包括介电层,并且所述金属涂覆在所述介电层上。

19. 一种体声波谐振器,包括根据权利要求1至18中任一项所述的生物传感器元件。

20. 一种使用生物活性膜涂覆金属材料表面的方法,包括:

将包含锚定物质的第一组合物施加到所述金属材料表面以在所述表面上形成单层,其中所述锚定物质包含结合蛋白和具有至少一个硫原子的官能团;

将包含生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上,其中所述生物素

化捕捉试剂通过所述结合蛋白结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

21. 根据权利要求17所述的方法,还包括对所述锚定物质的表面进行等离子体清洁。

22. 一种生物传感器元件,包括:

压电基板;

键合到所述压电基板表面的锚定物质,其中所述锚定物质包括间隔物和结合成分,以及捕捉试剂,其中所述锚定物质与所述捕捉试剂通过所述结合成分连接。

23. 根据权利要求22所述的生物传感器元件,其中所述结合成分是结合蛋白。

24. 根据权利要求23所述的生物传感器元件,其中所述结合蛋白是亲和素、寡核苷酸、抗体、亲和体、适配体或多核苷酸。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的生物传感器元件,其中所述结合蛋白是选自下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素、链霉亲和素、以及其任意组合。

26. 根据权利要求22所述的生物传感器元件,其中所述结合成分是具有一个或多个官能团的结合化合物。

27. 根据权利要求26所述的生物传感器元件,其中所述结合化合物具有一个或多个选自N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、磺基-NHS、环氧基、羧酸、羰基、马来酰亚胺和胺所组成组的官能团。

28. 根据权利要求22至27中任一项所述的生物传感器元件,其中所述官能团是间隔物是聚合物链接子。

29. 根据权利要求28所述的生物类似器元件,其中所述聚合物链接子是聚乙二醇、聚乙烯醇或聚丙烯酸酯。

30. 根据权利要求23所述的生物传感器元件,其中所述聚合物链接子是聚乙二醇。

31. 根据权利要求22至30中任一项所述的生物传感器元件,其中所述锚定物质在所述压电基板表面上形成一层。

32. 根据权利要求31所述的生物传感器元件,其中所述锚定物质在所述压电基板表面上形成自组装单层。

33. 根据权利要求22至32中任一项所述的生物传感器元件,其中所述锚定物质的所述结合蛋白通过所述间隔物从所述压电物质表面远离所述表面延伸。

34. 根据权利要求22至32中任一项所述的生物传感器元件,其中所述压电基板选自由石英铌酸锂和钽酸锂、36°Y石英、36°YX钽酸锂、硅酸镧镓、钽酸镓镧、铌酸镓镧、锆钛酸铅、硫化镉、块磷铝矿、碘酸锂、四硼酸锂、氧化铋锗、氧化锌、氮化铝和氮化镓所组成的组。

35. 根据权利要求22至34中任一项所述的生物传感器元件,还包括壳体和射流室,其中承载所述锚定材料的所述压电材料表面形成所述室的壁。

36. 根据权利要求22至35中任一项所述的生物传感器元件,其中所述锚定物质通过硅烷基团结合到所述压电基板表面。

37. 根据权利要求22至36中任一项所述的生物传感器元件,其中所述结合蛋白是亲和素、寡核苷酸、抗体、亲和体、适配体或多核苷酸。

38. 根据权利要求22至37中任一项所述的生物传感器元件,其中所述结合蛋白是选自下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素、链霉亲和素、以及其任意组合。

39. 根据权利要求22至38中任一项所述的生物传感器元件,还包括捕捉试剂,其中所述

捕捉试剂包含用于结合到所述锚定物质的所述结合蛋白的生物素部分。

40. 根据权利要求22至39中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述捕捉试剂包含用于结合到全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、蛋白质或小分子的第三部分。

41. 根据权利要求22至40中任一项所述的生物传感器元件, 还包括声波换能器。

42. 根据权利要求41所述的生物传感器元件, 其中所述声波换能器生成体声波。

43. 根据权利要求42所述的生物传感器元件, 其中所述体声波选自厚度剪切模式、声板模式和水平板模式所组成的组。

44. 根据权利要求22至43中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述生物传感器元件是基于膜体声波谐振器(基于FBAR)的装置。

45. 根据权利要求41所述的生物传感器元件, 其中所述声波换能器生成表面声波。

46. 根据权利要求45所述的生物传感器元件, 其中所述表面声波选自剪切水平表面声波、表面横波、瑞雷波和拉夫波所组成的组。

47. 一种体声波谐振器, 包括根据权利要求22至46中任一项所述的生物传感器元件。

48. 一种使用生物膜涂覆压电材料表面的方法, 包括:

将包括锚定物质的第一组合物施加到涂覆有金属的基板的表面以在所述表面上形成单层, 其中所述锚定物质包含连接到结合成分的间隔物; 将包括生物素化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上, 其中所述生物素化捕捉试剂通过所述锚定物质的所述结合成分结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

49. 一种确定样品中被分析物的存在或量的方法, 所述方法包括:

令根据权利要求1至15和22至46中任一项所述的生物传感器元件与样品接触;

生成跨越所述经涂覆的基板的声波; 以及测量所述声波的振幅、相或频率的任何变化, 作为被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

50. 一种生物传感器元件, 包括:

压电基板; 以及

固定在所述压电基板上的捕捉试剂, 其中所述压电基板包括配置为增加固定在所述压电基板上的捕捉试剂数量的三维(3D)基质微结构, 以及其中所述捕捉试剂通过结合到所述3D基质微结构而被固定在所述压电基板上。

51. 根据权利要求50所述的生物传感器元件, 其中所述3D基质微结构包括多个孔。

52. 根据权利要求50或52所述的生物传感器元件, 其中所述3D基质微结构包括捕捉剂的微阵列。

53. 根据权利要求50至52中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述3D基质微结构包括水凝胶基质。

54. 根据权利要求50所述的生物传感器元件, 其中所述水凝胶基质包括多个孔。

55. 根据权利要求53所述的生物传感器元件, 其中所述水凝胶基质包括交联聚合物。

56. 根据权利要求53所述的生物传感器元件, 其中所述交联聚合物是亲水的。

57. 根据权利要求50至52中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述3D基质微结构包括树枝状聚合物。

58. 根据权利要求50至57中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述3D基质微结构包

括氢基质的微阵列。

59. 根据权利要求50至57中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述3D基质微结构包括氢基质的层。

60. 根据权利要求56至61中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述水凝胶基质对于全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、有机小分子、多肽或蛋白质是不可渗透的。

61. 根据权利要求50至61中任一项所述的生物传感器元件, 还包括将所述捕捉试剂附接到所述3D基质微结构或所述压电物质的锚定物质。

62. 根据权利要求50至61中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述捕捉试剂包含用于结合到所述锚定物质的结合蛋白的生物素部分。

63. 根据权利要求50至62中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述捕捉试剂包含用于结合到全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、有机小分子、多肽或蛋白质的部分。

64. 根据权利要求63所述的生物传感器元件, 其中所述部分选自由抗体、亲和体或适配体所组成的组。

65. 根据权利要求60至64中任一项所述的生物传感器元件, 还包括锚定物质。

66. 根据权利要求65所述的生物传感器元件, 其中所述声波换能器生成体声波。

67. 根据权利要求66所述的生物传感器元件, 其中所述体声波选自由厚度剪切模式、声板模式和水平板模式所组成的组。

68. 根据权利要求50至67中任一项所述的生物传感器元件, 其中所述生物传感器元件是基于膜体声波谐振器(基于FBAR)的装置。

69. 根据权利要求68所述的生物传感器元件, 其中所述声波换能器生成表面声波。

70. 根据权利要求69所述的生物传感器元件, 其中所述表面声波选自由剪切水平表面声波、表面横波、瑞雷波和拉夫波所组成的组。

71. 一种体声波谐振器, 包括根据权利要求50至70中任一项所述的生物传感器元件。

72. 一种制造生物传感器元件的方法, 包括: 在压电基板上形成3D基质微结构以增加所述压电基板的表面积; 以及将一种或多种捕捉试剂固定在所述压电基板上。

73. 根据权利要求72所述的方法, 包括在所述压电基板上形成孔。

74. 根据权利要求72或73所述的方法, 包括在所述压电基板上形成水凝胶基质。

75. 根据权利要求72至74中任一项所述的方法, 包括在所述压电基板上形成水凝胶基质的微阵列。

76. 根据权利要求72或75中任一项所述的方法, 包括在所述压电基板上形成水凝胶基质的层。

77. 根据权利要求72至76中任一项所述的方法, 其中所述水凝胶基质包括多个孔。

78. 根据权利要求72所述的方法, 包括使用光刻打印在所述压电基板上形成所述捕捉试剂的微阵列。

79. 根据权利要求72所述的方法, 包括在所述压电基板上形成树枝状聚合物的层。

80. 一种确定样品中被分析物的存在或量的方法, 所述方法包括:

令根据权利要求50至70中任一项所述的生物传感器元件与样品接触;

生成跨越所述金属基板的声波;以及测量所述声波的振幅、相或频率的任何变化,作为样品中被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

81. 根据权利要求59和80所述的方法,其中所述样品是环境样品或生物样品。

82. 根据权利要求81所述的方法,其中所述生物样品是血液、血清、血浆、尿液、痰或粪便。

83. 根据权利要求49、81和82中任一项所述的方法,其中所述声波具有大约100至300MHz的输入频率。

表面声波传感器生物活性涂层

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请主张2017年7月7日提交的美国临时专利申请62/529,986和2017年7月10日提交的美国临时专利申请62/530,735的权益和优先权,其各自通过引用而整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请一般涉及对使用压电表面的表面声波技术的具有微射流的单一或复用生物传感器装置进行生物活性涂覆和3D修饰的方法。更特别地,本申请涉及下述方法:对压电晶体或进食的表面进行生物涂覆以创建三维(3D)表面,从而增加捕捉剂结合密度并改善对缓冲液和可能被感染的患者或动物的生物样品中的小分子、核酸序列、蛋白质、抗体和细胞实施夹心分析的灵敏度;以及创建适用于研发基于表面声学的生物传感器的平台技术。

背景技术

[0004] 不执行诊断医学是盲目的,因此快速准确地识别疾病和威胁是诊断领域的关键。传统上,用来诊断生物现象的检测技术采用光传感器和化学传感器,近年来声学技术的发展导致了声学方法在生物传感中的潜在应用。声学方法使用响应性压电材料的功能,该材料对电信号作出响应,并产生声波(即,甚高频声音)作为基本传感特性。随着声波通过声波传感器材料的表面或在其上传播,被分析的结合引入质量负载和/或波径上的粘度变化,可能影响表面声波或体声波的速度和/或振幅。可将这些变化关联至键合到它们的表面上的相应数量,并测量这些变化以提供对所述被分析物的传感/检测。不幸的是,目标分子与传感器表面间的结合可能较弱,因此声波传感器往往缺乏敏感性,并且当它们与目标一起存在时不能有效地操作。因此,需要稳定、高强度的受体分子固定化,使得感兴趣的生物分子/被分析物能有效地结合在所述表面上,以增强检测灵敏度。

发明内容

[0005] 一方面,本申请提供一种生物传感器元件,包括:涂覆有金属的基板;以及锚定物质,所述锚定物质包含结合蛋白和具有至少一个硫原子的官能团,其中所述锚定物质通过所述官能团直接结合到所述金属并在所述涂覆有金属的基板上形成单层;并且其中所述锚定物质配置为与捕捉试剂连接。

[0006] 一个具体实施例中,金属选自由铝、金、铝合金、以及其任意组合所组成的组。

[0007] 一个具体实施例中,金属是铝。

[0008] 一个具体实施例中,官能团是硫醇基。

[0009] 一个具体实施例中,结合蛋白是亲和素、寡核苷酸、抗体、亲和体(affimer)、适配体或多核苷酸。

[0010] 一个具体实施例中,结合蛋白是选自由下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素、链霉亲和素以及其任意组合。

- [0011] 一个具体实施例中,捕捉试剂包含用于结合到锚定物质的结合蛋白的生物素部分。
- [0012] 一个具体实施例中,捕捉试剂包含用于结合到全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、小分子或蛋白质的部分。
- [0013] 一个具体实施例中,所述部分选自由抗体、亲和体或适配体所组成的组。
- [0014] 一个具体实施例中,生物传感器还包括声波换能器。
- [0015] 一个具体实施例中,声波换能器生成体声波。
- [0016] 一个具体实施例中,体声波选自由厚度剪切模式、声板模式和水平板模式所组成的组。
- [0017] 一个具体实施例中,生物传感器元件是基于膜体声波谐振器(基于FBAR)的装置。
- [0018] 一个具体实施例中,声波换能器生成表面声波。
- [0019] 一个具体实施例中,表面声波选自由剪切水平表面声波、表面横波、瑞雷波(Rayleigh wave)和拉夫波(love wave)所组成的组。
- [0020] 一个具体实施例中,基板包括压电材料。
- [0021] 一个具体实施例中,金属被直接涂覆在基板上。
- [0022] 一个具体实施例中,基板还包括介电层,并且金属被涂覆在所述介电层上。
- [0023] 一方面,本申请提供包括前述任一项所述的生物传感器元件的体波谐振器。
- [0024] 一方面,本申请提供使用生物活性膜涂覆金属材料表面的方法,包括以下步骤:将包括锚定物质的第一组合物施加到金属材料的表面上以在所述表面上形成单层,其中所述锚定物质包含结合蛋白和具有至少一个硫的官能团;以及将包含生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上,其中所述生物素化捕捉试剂通过所述结合蛋白结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。
- [0025] 一个具体实施例中,锚定物质的表面进行等离子体清洁。
- [0026] 一方面,本申请提供一种生物传感器元件,包括:压电基板;键合到所述压电基板表面的锚定物质,其中所述锚定物质包括间隔物和结合成分,以及捕捉试剂,其中所述锚定物质与所述捕捉试剂通过所述结合成分连接。
- [0027] 一个具体实施例中,结合成分是结合蛋白。
- [0028] 一个具体实施例中,结合蛋白是亲和素、寡核苷酸、抗体、亲和体、适配体或多核苷酸。
- [0029] 一个具体实施例中,结合蛋白是选自由下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素、链霉亲和素以及其任意组合。
- [0030] 一个具体实施例中,结合成分是具有一个或多个官能团的结合化合物。
- [0031] 一个具体实施例中,结合化合物具有一个或多个选自由N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、磺基-NHS、环氧基、羧酸、羰基、马来酰亚胺和胺所组成组的官能团。
- [0032] 一个具体实施例中,间隔物是聚合物链接子。
- [0033] 一个具体实施例中,聚合物链接子是聚乙二醇、聚乙烯醇或聚丙烯酸酯。
- [0034] 一个具体实施例中,聚合物链接子是聚乙二醇。
- [0035] 一个具体实施例中,锚定物质在压电基板的表面上形成一层。
- [0036] 一个具体实施例中,锚定物质在压电基板表面上形成自组装单层。

[0037] 一个具体实施例中,锚定物质的结合蛋白通过间隔物从压电物质表面远离所述表面延伸。

[0038] 一个具体实施例中,压电基板选自由石英铌酸锂和钽酸锂、 36°Y 石英、 36°YX 钽酸锂、硅酸镓、钽酸镓、铌酸镓、锆钛酸铅、硫化镉、块磷铝矿、碘酸锂、四硼酸锂、氧化铋、氧化锌、氮化铝和氮化镓所组成的组。

[0039] 一个具体实施例中,生物传感器元件还包括壳体和射流室,其中承载所述锚定材料的所述压电材料表面形成所述室的壁。

[0040] 一个具体实施例中,锚定物质通过硅烷基团结合到压电基板的表面。

[0041] 一个具体实施例中,结合蛋白是亲和素、寡核苷酸、抗体、亲和体、适配体或多核苷酸。

[0042] 一个具体实施例中,结合蛋白是选自由下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素、链霉亲和素以及其任意组合。

[0043] 一个具体实施例中,生物传感器元件还包括捕捉试剂,其中所述捕捉试剂包含用于结合到锚定物质的结合蛋白的生物素部分。

[0044] 一个具体实施例中,捕捉试剂包含用于结合到全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、蛋白质或小分子的第三部分。

[0045] 一个具体实施例中,生物传感器元件还包括声波换能器。

[0046] 一个具体实施例中,声波换能器生成体声波。

[0047] 一个具体实施例中,体声波选自由厚度剪切模式、声板模式和水平板模式所组成的组。

[0048] 一个具体实施例中,生物传感器元件是基于膜体声波谐振器(基于FBAR)的装置。

[0049] 一个具体实施例中,声波换能器生成表面声波。

[0050] 一个具体实施例中,表面声波选自由剪切水平表面声波、表面横波、瑞雷波和拉夫波所组成的组。

[0051] 一方面,本申请提供包括前述任一项所述的生物传感器元件的体波谐振器。

[0052] 一方面,本申请提供使用生物膜涂覆压电材料表面的方法,包括以下步骤:将包括锚定物质的第一组合物施加到涂覆有金属的基板表面以在所述表面上形成单层,其中所述锚定物质包含连接到结合成分的间隔物;将包括生物素化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上,其中所述生物素化捕捉试剂通过所述锚定物质的所述结合成分结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

[0053] 一方面,本申请提供用于测定样品中被分析物的存在或量的方法,所述方法包括以下步骤:令前述任一项所述的生物传感器元件与样品接触;生成跨越所述经涂覆的基板的声波;以及测量所述声波的振幅、相或频率的任何变化,作为被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

[0054] 一方面,本申请提供生物传感器元件,包括:固定在所述压电基板上的捕捉试剂,其中所述压电基板包括配置为增加固定在所述压电基板上的捕捉试剂数量的三维(3D)基质微结构,以及其中所述捕捉试剂通过结合到所述3D基质微结构而被固定在所述压电基板上。

[0055] 一个具体实施例中,3D基质微结构包括多个孔。

- [0056] 一个具体实施例中,3D基质微结构包括捕捉剂的微阵列。
- [0057] 一个具体实施例中,3D基质微结构包括水凝胶基质。
- [0058] 一个具体实施例中,水凝胶基质包括多个孔。
- [0059] 一个具体实施例中,水凝胶基质包括交联聚合物。
- [0060] 一个具体实施例中,交联聚合物是亲水的。
- [0061] 一个具体实施例中,3D基质微结构包括树枝状聚合物。
- [0062] 一个具体实施例中,3D基质微结构包括水凝胶基质的微阵列。
- [0063] 一个具体实施例中,3D基质微结构包括水凝胶基质的层。
- [0064] 一个具体实施例中,水凝胶基质对于全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、有机小分子、多肽或蛋白质是不可渗透的。
- [0065] 一个具体实施例中,生物传感器元件还包括将捕捉试剂附接到3D基质微结构或压电物质的锚定物质。
- [0066] 一个具体实施例中,捕捉试剂包含用于结合到锚定物质的结合蛋白的生物素部分。
- [0067] 一个具体实施例中,捕捉试剂包含用于结合到全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、有机小分子、多肽或蛋白质的部分。
- [0068] 一个具体实施例中,所述部分选自抗体、亲和体或适配体所组成的组。
- [0069] 一个具体实施例中,生物传感器元件还包括锚定物质。
- [0070] 一个具体实施例中,声波换能器生成体声波。
- [0071] 一个具体实施例中,体声波选自厚度剪切模式、声板模式和水平板模式所组成的组。
- [0072] 一个具体实施例中,生物传感器元件是基于膜体声波谐振器(基于FBAR)的装置。
- [0073] 一个具体实施例中,声波换能器生成表面声波。
- [0074] 一个具体实施例中,表面声波选自剪切水平表面声波、表面横波、瑞雷波和拉夫波所组成的组。
- [0075] 一方面,本申请提供包括前述任一项所述的生物传感器元件的体波谐振器。
- [0076] 一方面,本申请提供制造生物传感器元件的方法,包括:在压电基板上形成3D基质微结构以增加所述压电基板的表面积;以及将一种或多种捕捉试剂固定在所述压电基板上。
- [0077] 一个具体实施例中,本申请包括在压电基板上形成孔。
- [0078] 一个具体实施例中,所述方法包括在压电基板上形成水凝胶基质。
- [0079] 一个具体实施例中,所述方法包括在压电基板上形成水凝胶基质的微阵列。
- [0080] 一个具体实施例中,所述方法包括在压电基板上形成水凝胶基质的层。
- [0081] 一个具体实施例中,水凝胶基质包括多个孔。
- [0082] 一个具体实施例中,所述方法包括使用光刻打印在所述压电基板上形成所述捕捉试剂的微阵列。
- [0083] 一个具体实施例中,所述方法包括在压电基板上形成树枝状聚合物的层。
- [0084] 一方面,本申请提供用于测定样品中被分析物的存在或量的方法,包括以下步骤:令前述任一项所述的生物传感器元件与样品接触;生成跨越金属基板的声波;以及测量所

述声波的振幅、相或频率的任何变化,作为样品中被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

[0085] 一个具体实施例中,样品是环境样品或生物样品。

[0086] 一个具体实施例中,生物样品是血液、血清、血浆、尿液、痰或粪便。

[0087] 一个具体实施例中,声波具有100至300MHz的输入频率。

[0088] 此外,一些具体实施例涉及生物传感器元件,包括涂覆有金属的基板、包含结合蛋白或核苷酸以及具有至少一个硫原子的官能团的锚定物质,其中所述锚定物质配置为与捕捉试剂连接并通过所述官能团直接接合到所述金属,并且在所述金属基板上形成单层。

[0089] 一些具体实施例涉及通过下述使用生物活性膜涂覆金属材料和/或平晶体表面的方法:将包含锚定物质的第一组合物施加到所述金属/晶体材料的表面以在所述表面上形成单层,其中所述锚定物质包含结合蛋白和具有至少一个硫原子的官能团。将包括生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上,其中所述生物素化捕捉试剂通过所述结合蛋白结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

[0090] 一些具体实施例涉及生物传感器元件、压电基板、键合到所述压电基板表面的锚定物质,其中所述锚定物质包括间隔物和结合成分,以及捕捉试剂,其中所述锚定物质与所述捕捉试剂通过所述结合成分连接。

[0091] 一些具体实施例涉及通过下述使用生物膜涂覆压电材料表面的方法:将包含锚定物质的第一组合物施加到所述金属/晶体材料的表面以在所述表面上形成单层,其中所述锚定物质包含与结合成分连接的间隔物。将包括生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上,其中所述生物素化捕捉试剂通过所述锚定物质的结合成分结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

[0092] 一些具体实施例涉及用于测定样品中被分析物的存在或量的方法,所述方法包括:令本文所述的生物传感器元件与样品接触;生成跨越所述经涂覆的基板的声波或体波;以及测量所述声波或体波的振幅、相或频率的任何变化,作为被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

[0093] 一些具体实施例涉及包括本文所述生物传感器元件的体波谐振器。一种压电基板,具有键合到所述压电基板表面的锚定物质,其中所述锚定物质包括间隔物、结合成分和捕捉试剂,其中所述锚定物质与所述捕捉试剂通过所述结合成分连接。

[0094] 一些具体实施例涉及通过下述使用生物活性涂层涂覆压电材料表面的方法:将包含锚定物质的第一组合物施加到所述金属/晶体材料的表面以在所述表面上形成单层,其中所述锚定物质包含与结合成分连接的间隔物。将包括生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上,其中所述生物素化捕捉试剂通过所述锚定物质的结合成分结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

[0095] 一些具体实施例涉及用于测定样品中被分析物的存在或量的方法。这一方法包括与生物传感器元件接触,生成跨越所述经涂覆的基板的声波或体波,以及测量所述声波或体波的振幅、相或频率的任何变化,作为被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

[0096] 一些具体实施例涉及生物传感器元件,其包括:固定在所述压电基板上的捕捉试剂,其中所述压电基板包括配置为增加固定在所述压电基板上的捕捉试剂数量的三维(3D)基质微结构,以及其中所述捕捉试剂通过结合到所述3D基质微结构而被固定在所述压电基板上。

[0097] 一些具体实施例涉及通过下述制造生物传感器元件的方法：在压电基板上形成3D基质微结构以增加所述压电基板的表面积；以及将一种或多种捕捉试剂固定在所述压电基板上。

[0098] 一些具体实施例涉及通过下述测定样品中被分析物的存在或量的方法：与上述具体实施例中任一项所述的生物传感器元件接触；生成跨越金属基板的体声波；以及测量所述声波或体波的振幅、相或频率的任何变化，作为被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

[0099] 一些具体实施例涉及包括本文所述生物传感器元件的体波谐振器。

[0100] 一些具体实施例使用聚合物聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 作为拉夫波，并且进行等离子体蚀刻以在传感器表面上创建3D结构，从而增加表面积。

[0101] 下列术语应具有归于其下的意义。

[0102] “锚定物质”表示一种涂层材料，其结合到传感器表面的压电基板（用于“直接”结合）金属部分或其上的中间涂层上，还结合到“捕捉试剂”（如下文定义）。该术语包括亲和素，通过其结合生物素（用作其特异性结合配偶体）的能力而功能性定义的蛋白质家族成员，例如，亲和素、链霉亲和素、天然亲和素，以及具有特异性结合配偶体的寡核苷酸、多核苷酸和蛋白质，它们可用来修饰捕捉试剂并因此造成所述捕捉试剂结合到涂覆有锚定物质的压电传感器材料。还包括天然出现的碳水化合物结合凝集素，其结合到碳水化合物基团（例如，结合到抗体和抗体片段（即，Fe片段）和核苷酸片段例如适配体上）。通常，使用捕捉试剂作为锚定物质不是优选，这是因为捕捉试剂构型变化或甚至部分失活的风险，而这将会影响测试的准确性。寡核苷酸和多核苷酸可通过离子或双极位点或直接地或通过所时间的中间银涂层（例如，通过离子交换方法）结合到压电材料。它们的特异性结合配偶体是互补核苷酸分子和可用于修饰捕捉试剂的那些。

[0103] “捕捉试剂”以为特异性地结合到生物样品中被分析物的物质，使得其可用来通过将被分析物从生物样品中捕捉出来而鉴定和/或量化所述被分析物。该术语包括抗体、适配体和抗体片段，但不限于此。捕捉试剂将结合到具有或不具有链接基修饰的锚定物质，它是所述锚定物质的特异性结合配偶体（例如，生物素化或互补核酸）。换言之，捕捉试剂是或包含锚定物质的特异性结合配偶体，并且同步识别被分析物。

[0104] “有机小分子”是指天然出现的或合成的或重组的有机分子，其分子量大于约10道尔顿但小于约2500道尔顿，优选小于约2000道尔顿，优选介于约10至约1000道尔顿之间，更优选介于约10至约500道尔顿之间。

[0105] “亲和素”是源自例如鸟类、爬行动物和两栖动物蛋清的蛋白质，并且已经用于多种生化反应中。亲和素家族包括中性亲和素、链霉亲和素和亲和素，全部蛋白质均通过它们以高亲和性和特异性结合生物素的能力而功能地定义。亲和素也可包括细菌亲和素，例如联袂亲和素和改性亲和素如中性亲和素（来自Thermo Scientific：www.thermoscientific.com的去糖基化亲和素）。它们是小的寡聚蛋白质，各自包含四个（或两个）相同的亚基，每个亚基承载一个用于生物素的结合位点。当键合到本发明的生物传感器表面时，一些位点可能面对涂覆有金属的压电材料表面，并且因此不能用于生物素结合。一些其它位点背向压电材料，并且可用于生物素结合。亲和素结合到生物素但非共价结合的亲和性是如此之高，使得它可被视为不可逆。亲和素的解离常数(KD)为大约 10^{-15} M，令其称为已知非共价键中最强者之一。四聚体形式的亲和素的大小评估为介于66kDa至

69kDa之间。分子量的10%归因于由四至五个甘露糖和三个N-乙酰化葡萄糖胺残基构成的碳水化合物成分。亲和素的碳水化合物部分含有至少三个在结构和组成上类似的特有寡糖结构类型。

[0106] “生物素”，也成为了d-生物素或维生素H、维生素B7和辅酶R，是亲和素的特异性结合配偶体。它可从包括Sigma-Aldrich在内的多个供应商处商购。

[0107] 本文提供的范围理解为该范围内所有值的简写。例如，1至50的范围理解为包括来自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50所组成组的任何数字、数字组合或子范围以及介于前述整数之间的全部十进制的中间值，例如1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8和1.9。关于子范围，特别考虑从该范围的一个端点延伸的“嵌套子范围”。例如，示例性范围1至50的嵌套子范围可包括一个方向上的1至10、1至20、1至30、和1至40，或另一个方向上的50至40、50至30、50至20、和50至10。

附图说明

[0108] 图1示例性说明使用硫醇化的生物捕捉试剂的位于天然铝表面上的生物涂层的一个具体实施例。

[0109] 图2A至图2C显示中性亲和素 (NAv) 优先结合到铝 (Al) 表面。图2A显示采用生物素化的HRP/二盐酸邻苯二胺 (OPD) 对的酶学测定结果。在417nm的吸收强度与键合到传感器表面的NAv的量成正比。当使用硫醇化NAv时，键合到Al涂覆的晶体表面上的NAv的量明显更高。图2B示例性说明基于显微镜的键合到表面NAv的生物素化荧光素分子的图像 (500倍放大)。图2C显示示例性说明0.2 μ m聚苯乙烯生物素化荧光微珠的结合的图像 (500倍放大)。

[0110] 图3示例性说明使用中性亲和素进行选择捕捉目标被分析物的生物涂层发展的示意图。

[0111] 图4A和图4B示例性说明水在传感器上的接触角测量。图4A显示等离子体清洁导致接触角的显著减小。图4B显示具有PEG-硅烷的涂层显著增加了传感器的疏水性。

[0112] 图5A和图5B示例性说明了生物素化荧光素 (图2C, 50倍放大) 和荧光聚苯乙烯微珠 (图2B, 500倍放大) 的荧光图像，其显示结合到表面生物涂层的均质结合。

[0113] 图6示例性说明用于选择性捕捉目标被分析物的生物涂层的发展 (没有中性亲和素)。

[0114] 图7A和图7B显示键合到经由过氧间隔物固定化的表面生物涂层的荧光被分析物。图7A是对照物 (500x)，而图7B是过氧涂覆的传感器 (500x)。

[0115] 图8A和图8B显示在通过皮秒激光系统钻孔的水凝胶基质中正弦结构的SEM图像和接触角。图8A显示具有25 μ m周期性和12 μ m高度的正弦结构。图8B显示具有35 μ m周期性和45 μ m高度的正弦结构。

[0116] 图9示例性说明用于制造微米/纳米图案的软光刻工艺。

具体实施方式

[0117] 本申请至少部分地基于以下发现：可在涂覆之前用金属和锚定物质修饰生物传感器基板，或用金属和锚定物质涂覆生物传感器基板，所述锚定物质具有包括具有至少一个

硫原子的官能团的结合蛋白(例如,多肽、蛋白质、蛋白复合体等),所述锚定物质可键合到金属涂覆的基板上以形成生物涂层,所述生物涂层可结合和/或接合到生物传感器装置(例如,表面声波(SAW)传感器、体声波(BAW)传感器等)以增加待通过所述传感器装置检测的信号强度和灵敏度。

[0118] 一些具体实施例中,可在本文中讨论的条件下获得锚定物质例如亲和素与金属涂覆的压电材料的直接结合。使用这一工艺,锚定物质被通过强且稳定的共价键或化学吸附键成功地直接附接到金属涂覆的压电基板表面上,并且在所述金属涂覆的压电表面上形成单层。该单层可能有助于优化并构建生物传感器的功能,因为多层的锚定物质可能干扰声学信号。

[0119] 本文所述的声学技术允许使用声学方法进行高转确定和灵敏度的生物传感。可使用本文所述的技术将生物敏感剂容纳并结合到声音传递材料的表面上,这有助于进一步拓展声学方法在检测应用中的使用。一些具体实施例涉及使用化学剂例如硅烷、具有反应性胺、羧基和环氧残基的化合物以及基于碳水化合物的材料,以提供生物材料与金属涂覆的晶体表面之间的强吸附。一些具体实施例中,晶体表面可以是石英和类似材料,例如铌酸锂和钽酸锂、36°Y石英、36°YX钽酸锂、硅酸镧镓、钽酸镓镧、铌酸镓镧、锆钛酸铅、硫化镉、块磷铝矿、碘酸锂、四硼酸锂、氧化铋锗、氧化锌、氮化铝和氮化镓所组成的组。

[0120] 一些具体实施例涉及使用适合附接生物材料或化学化合物的金属涂覆晶体表面的方法。一些具体实施例中,金属可以是铝、铝合金、金、银、钛、铬、铂、钨等。一些具体实施例中,金属可以是铝或铝合金。本文所述的方法可允许使用一些金属表面,所述金属表面可能在传统上与生物材料的结合性很差。例如,铝本身可与生物材料形成弱结合,但本文所述的方法和材料令铝表面可广泛应用于表面声波(SAW)传感器中。使用铝作为表面来结合生物材料可能具备优势,例如,当与声学传感器联用时,不造成信号损失、不损毁结合材料、并且不形成黑色或紫色斑块。此外,铝表面可更有效地传播声波。本文所述的方法可帮助实现生物分子或化学分子与金属(铝或铝合金)涂覆的表面之间的强结合,并且令金属涂覆的表面可用于SAW传感器中。

[0121] 本文所述的方法和材料可在金属(铝或铝合金)涂覆的晶体表面上和未涂覆的晶体上提供稳定的共价键合生物涂层,这些表面键合生物活性涂层可保留功能性生物学活性。此外,当与敏感的电学系统和各种修饰联用时,本文所述的方法和材料可帮助提供具有高灵敏度的生物传感器。

[0122] 本文所述的方法可实现共价键合的亲性和性捕捉试剂。捕捉试剂的一些示例可包括但不限于适用于选择性捕捉目标被分析物的小分子、抗体、蛋白抗原、适配体或其它此类分子。一些具体实施例中,表面粘附导致所述亲和剂在铝表面上的适宜取向,以选择性地和特异性地捕捉目标被分析物。一些具体实施例中,本文所述的材料可包括使用硫醇官能团活化的用来锚定亲和剂的硅烷与共价键合到被活化部分的多种亲和剂的组合,并且所述被活化的部分可包括环氧和其它适合的粘附化学官能团。一些具体实施例中,被活化的部分可与间隔物例如peg化的碳水化合物合用,以便最小化空间维族并增加信号应答。一些具体实施例中,被活化的部分可不与间隔物合用。

[0123] 本文所述的生物锚定物质一般已知是生物活性的,并且包括但不限于例如亲和素。亲和素在增加结合稳定性的同时,可结合多种生物素化的材料,包括经修饰的蛋白质、

聚合物或碳水化合物整体。本文所述的方法可用来活化SAW传感器的表面,包括大不限于热、等离子体、辐射和气体例如氧或氮。这些不同的工艺提供了在多种条件下的一系列处理。可在这些条件下活化SAW传感器的铝涂覆晶体表面,导致生物活性步骤试剂的共价结合有所增强。这些表面修饰和材料的组合作用通用平台,从而以用于特异性捕捉所希望的目标被分析物分子的任何抗体或其它亲和性捕捉剂装饰传感器的表面。

[0124] 生物传感器元件

[0125] 传感器的表面可以是沉积在压电晶体材料上的金属层(铝或铝合金),或者传感器可以是不具有金属层的未涂覆压电材料。一些具体实施例中,SAW传感器的表面可以是沉积在压电晶体材料上的金属层(铝或铝合金)。一些具体实施例中,SAW传感器的区段可含有与晶体交替的金属涂层,或可覆盖有介电材料层。一些具体实施例中,介电层可以是聚合物或陶瓷层。一些具体实施例中,介电层可包含SiO₂、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、氧化锌或氮化铝。一些具体实施例中,适合的晶体可以经各种晶体切割而使用。一些具体实施例中,传感器的区段可包括沉积在压电基板上的介电层。一些具体实施例中,传感器的区段可包括沉积在金属层上的介电层,所述金属层转而沉积在压电基板上。一些具体实施例中,传感器的区段可包括沉积在介电层上的金属层,所述介电层转而沉积在压电基板上。一些具体实施例中,传感器的区段可包括沉积在介电层上的第一金属层,所述介电层转而沉积在第二金属层上,所述第二金属层随后沉积在压电基板上。所有适合的关于将传感器用于检测目标分析物的途径都可能基于使用本文所述的适合涂层装饰传感器的能力。对于生物分子的检测,传感器表面可固定有或修饰有适合的材料,所述材料可选择性地捕捉所希望的目标分析物。一些具体实施例中,本文所述的传感器是SAW传感器。一些具体实施例中,本文所述的传感器是BAW传感器。

[0126] 一些具体实施例涉及生物传感器元件,包括:涂覆有金属层的基板、包含结合蛋白和具有至少一个硫醇基的官能团的锚定物质,其中所述锚定物质通过所述官能团直接结合到所述金属层,并且其中所述锚定物质配置为与捕捉试剂连接。一些具体实施例中,锚定物质在结合到金属层后在所述金属层上形成单层。

[0127] 一些具体实施例中,金属选自由铝、金、铝合金、银、钛、铬、铂、钨和/或其任意组合所组成的组。一些具体实施例中,金属被沉积在压电或介电基板上。一些具体实施例中,金属被沉积在介电基板上,所述介电基板随后被沉积在另一金属层上。

[0128] 一些具体实施例中,基板包括压电材料。一些具体实施例中,基板还包括直接设置在压电材料上的介电层。

[0129] 一些具体实施例中,结合蛋白上的官能团是硫醇基。

[0130] 一些具体实施例中,结合蛋白是亲和素、寡核苷酸或多核苷酸。一些具体实施例中,结合蛋白可以是亲和剂如抗体。一些具体实施例中,结合蛋白是选自由下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素、链霉亲和素以及其任意组合。一些具体实施例中,结合蛋白可包括抗体、亲和体和适配体。

[0131] 捕捉试剂可以是生物素化寡核苷酸、核苷酸、核酸、蛋白质、肽和抗体形成的抗体、适配体或其它特异性配体或受体,包括IgA、IgG、IgM、IgE、酶、酶辅因子、酶抑制剂、膜受体、激酶、蛋白A、Poly U、Poly A、聚赖氨酸受体、多糖、螯合剂、碳水化合物或糖。

[0132] 一些具体实施例中,捕捉试剂可包含用于结合到全细胞、细菌、真核细胞、肿瘤细

胞、病毒、真菌、寄生虫、孢子、核酸、蛋白质或小分子的部分。一些具体实施例中,所述部分选自抗体、蛋白质片段、肽、多肽、亲和体、抗体片段、适配体或核苷酸所组成的组。一些具体实施例中,所述部分选自抗体、亲和体或适配体所组成的组。

[0133] 捕捉试剂可使用对于结合蛋白为特异性的结合配偶体修饰。一些具体实施例中,捕捉试剂还包含用于结合到锚定物质的结合蛋白的生物素部分。

[0134] 一些示例性的生物传感器和检测方法示例性地说明为具有作为捕捉试剂而被附接的抗体的表面。但是,生物传感器并不限于具有作为捕捉试剂的抗体,也可经调整以将捕捉试剂(包括但不限于,蛋白质片段、亲和体、抗体片段、适配体或核苷酸)固定在传感器表面上。

[0135] 本文所述的生物传感器元件还包括声波或体波换能器。一些具体实施例中,声波换能器生成体声波。一些具体实施例中,体声波选自厚度剪切模式、声板模式和水平板模式所组成的组。一些具体实施例中,生物传感器元件是基于膜体声波谐振器(基于FBAR)的装置。

[0136] 一些具体实施例中,声波换能器生成表面声波。一些具体实施例中,表面声波选自由剪切水平表面声波、表面横波、瑞雷波和拉夫波所组成的组。

[0137] 一些具体实施例涉及生物传感器元件,包括:晶体层、包含结合蛋白和具有至少一个硫醇基的官能团的锚定物质,其中所述锚定物质通过所述官能团直接结合到所述晶体层,并且其中所述锚定物质配置为与捕捉试剂连接。

[0138] 至于对金属表面/材料与官能团(例如,硫醇基)间的结合有所描述的具体实施例,可将金属表面/材料替换为晶体材料或其它压电材料。

[0139] 含有间隔物的锚定物质

[0140] 一些具体实施例涉及生物传感器元件,其包括涂覆有金属的基板、键合到所述金属的锚定物质,其中所述锚定物质包括间隔物和结合成分,以及捕捉试剂,其中所述锚定物质与所述捕捉试剂通过所述结合成分连接。一些具体实施例中,基板可包括压电材料。一些具体实施例中,间隔物包含硅烷基团,其可在所述金属涂层上形成共价键。因此,一些具体实施例中,锚定物质通过硅烷基团结合到涂覆有金属的压电基板的表面。

[0141] 一些具体实施例涉及生物传感器元件,其包括晶体材料和键合到所述晶体材料的锚定物质,其中所述锚定物质包含间隔物和结合成分以及捕捉试剂。锚定物质与捕捉试剂通过所述结合成分连接。一些具体实施例中,间隔物包含硅烷基团。硅烷基团可在所述晶体材料上形成共价键。因此,一些具体实施例中,锚定物质通过硅烷基团结合到所述晶体材料的表面。

[0142] 一些具体实施例中,结合成分是结合蛋白,例如,亲和素、寡核苷酸或多核苷酸。一些具体实施例中,结合蛋白是选自由下列所组成组的亲和素:中性亲和素、天然亲和素和链霉亲和素以及其任意组合。

[0143] 一些具体实施例中,结合成分是具有一个或多个选自由N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、磺基-NHS、环氧基、羧酸、羰基、马来酰亚胺和/或胺所组成组的官能团的结合化合物。

[0144] 一些具体实施例中,间隔物是聚合物链接子,其中所述聚合物链接子是聚乙二醇、聚乙烯醇或聚丙烯酸酯。在一些具体实施例中,聚合物链接子是分子量在约50至约10,000、约100至约10,000、约200至约8000、约300至约8000、约400至约8000、约500至约6000、约600

至约6000、约700至约6000、约800至约5000、至约900至约5000、约1000至约5000、约500至约4000、约600至约4000、约700至约4000、约800至约4000、约900至约4000、约1000至约4000、约500至约3000、约600至约3000、约700至约3000、约800至约3000、约900至约3000、约1000至约3000、约500至约2000、约600至约2000、约700至约2000、约800至约2000、约900至约5000、或约1000至约2000范围内的线性聚乙烯。

[0145] 一些具体实施例中,聚合物链接子是分子量大于约10、大于约50、大于约100、大于约200、大于约300、大于约400、大于约500、大于约600、大于约700、大于约800、大于约900、大于约1000、大于约1200、大于约1400、大于约1600、大于约1800、或大于约2000的线性聚乙烯。一些具体实施例中,聚合物链接子是分子量小于约500、小于约600、小于约700、小于约800、小于约900、小于约1000、小于约1200、小于约1400、小于约1600、小于约1800、小于约2000、小于约2200、小于约2400、小于约2600、小于约2800、小于约3000、小于约3500、小于约4000、小于约4500、小于约5000、小于约5500、小于约6000、小于约6500、小于约7000、小于约7500、小于约8000、小于约8500、小于约9000、小于约9500、或小于约10,000的线性聚乙烯。

[0146] 对于当结合化合物具有一个或多个官能团(例如,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、磺基-NHS、环氧基、羧酸、羰基、马来酰亚胺和/或胺)时的具体实施例,间隔物的长度可在约0.1nm至50nm、0.5nm至50nm、1nm至50nm、1.5nm至50nm、2nm至50nm、2.5nm至50nm、3nm至50nm、4nm至50nm、5nm至50nm、0.1nm至40nm、0.5nm至40nm、1nm至40nm、1.5nm至40nm、2nm至40nm、2.5nm至40nm、3nm至40nm、4nm至40nm、5nm至40nm、0.1nm至30nm、0.5nm至30nm、1nm至30nm、1.5nm至30nm、2nm至30nm、2.5nm至30nm、3nm至30nm、4nm至30nm、5nm至30nm、0.1nm至20nm、0.5nm至20nm、1nm至20nm、1.5nm至20nm、2nm至20nm、2.5nm至20nm、3nm至20nm、4nm至20nm、5nm至20nm、0.1nm至10nm、0.5nm至10nm、1nm至10nm、1.5nm至10nm、2nm至10nm、2.5nm至10nm、3nm至10nm、4nm至10nm、5nm至10nm、0.1nm至8nm、0.5nm至8nm、1nm至8nm、1.5nm至8nm、2nm至8nm、2.5nm至8nm、3nm至8nm、4nm至8nm、5nm至8nm、0.1nm至5nm、0.5nm至5nm、1nm至5nm、1.5nm至5nm、2nm至5nm、2.5nm至5nm、3nm至5nm、4nm至5nm、0.1nm至3nm、0.5nm至3nm、1nm至3nm、1.5nm至3nm、2nm至3nm、2.5nm至3nm、0.1nm至2.5nm、0.5nm至2.5nm、1nm至2.5nm、1.5nm至2.5nm、或2nm至2.5nm的范围内。一些具体实施例中,间隔物的长度在大于0.05nm、0.1nm、0.2nm、0.3nm、0.4nm、0.5nm、0.6nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1nm、1.2nm、1.4nm、1.6nm、1.8nm、2nm、2.5nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、或100nm的范围内。一些具体实施例中,间隔物的长度在小于1nm、1.5nm、2nm、2.5nm、3nm、4nm、5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、100nm、150nm、200nm、250nm、或500nm的范围内。

[0147] 一些具体实施例中,锚定物质在涂覆有金属的压电材料的表面上形成单层。一些具体实施例中,锚定物质在涂覆有金属的压电材料的表面上形成自组装单层。一些具体实施例中,锚定物质的结合蛋白通过间隔物从金属表面远离所述表面延伸。

[0148] 一些具体实施例中,压电基板选自铌酸锂(LiNbO₃)、钽酸锂(LiTaO₃)、二氧化硅(SiO₂)和硼硅酸盐组成的组。一些具体实施例中,金属涂层可以是铝或铝合金。

[0149] 一些具体实施例中,本文所述的生物传感器元件还包括外壳和射流室,其中所述室壁形成在承载锚定物质和捕捉试剂的经涂覆压电基板的表面上。

[0150] 体声波谐振器

[0151] 体声波 (BAW) 谐振器是由夹在两个电极之间的至少一种压电材料构成的装置。电极将交流电场施加到压电材料商, 创建生成一些BAW波的一定程度的应力。一些设计添加一些具有高和低的声阻抗的层, 以构建一些布拉格反射器和/或使这些层悬浮。BAW谐振器可包括若干层、压电基板 (AlN、PZT、石英、LiNbO₃、硅酸镓镧等)、电极 (金、铝、铜等)、布拉格反射器 (声阻抗高或低的材料) 层, 以捕获被分析物 (生物活性层、抗体、抗原、气体敏感层、钯等) 或任何可传播声波的材料。BAW传感器可以使多种本文所述层的混合。敏感层 (用于捕获被分析物的层) 可与电极 (A) 直接接触, 或可位于布拉格反射器上, 或可位于任何可传播声波的材料上。

[0152] 一些具体实施例涉及包括本文所述生物传感器元件的BAW谐振器。构建用于液体或气体传感的BAW传感器是基于下述原则: 在BAW传感器表面上行进的任何事物都将改变其共振频率。通过跟踪并解码共振频率 (测量或相位频率), 可测量附着在传感器表面的颗粒的质量负荷和粘度。

[0153] 生物涂覆方法

[0154] 一些具体实施例涉及使用生物活性膜涂覆金属材料表面的方法, 包括: 将包括锚定物质的第一组合物施加到金属材料的表面上以在所述表面上形成单层, 其中所述锚定物质包含结合蛋白和具有至少一个硫醇基的官能团; 以及将包含生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上, 其中所述生物素化捕捉试剂通过所述结合蛋白结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

[0155] 一些具体实施例涉及通过下述使用生物活性膜涂覆晶体材料的方法, 包括: 将包含锚定物质的第一组合物施加到所述晶体材料的表面以在所述表面上形成单层, 其中所述锚定物质包含结合蛋白和具有至少一个硫醇基的官能团。将包含生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上, 其中所述生物素化捕捉试剂通过所述结合蛋白结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

[0156] 一些具体实施例涉及使用生物活性膜涂覆铝表面的方法, 包括: 将包括锚定物质的第一组合物施加到铝表面上以在所述铝表面上形成单层, 其中所述锚定物质包含结合蛋白和至少一个硫醇官能团; 以及将包含生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上, 其中所述生物素化捕捉试剂通过所述结合蛋白结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。该方法也可用于涂覆晶体表面或介电材料的表面。

[0157] 一些具体实施例涉及使用生物活性膜涂覆金属涂覆的压电材料表面的方法, 包括: 处理所述金属涂覆的压电材料表以活化金属表面, 以及将一层锚定物质直接施加到所述金属涂覆的压电基板的活化表面上。锚定物质具备结合捕捉试剂的特性, 所述捕捉试剂包含用于锚定物质的特异性结合配偶体或由所述配偶体构成。一些具体实施例中, 锚定物质包含硅烷官能团。硅烷官能团能与金属涂覆的压电表面反应。一些具体实施例中, 所述方法还包括将金属层沉积在压电基板上。一些具体实施例中, 金属是铝。该方法也可用于涂覆晶体表面或介电材料的表面。

[0158] 一些具体实施例中, 所述方法包括使用共价键合将化学吸收锚定层形成在金属表面上。

[0159] 一些具体实施例提供用于测定生物流体样品中被分析物的存在或量的方法, 所述方法包括: 令生物传感器元件与包含捕捉试剂的组合物接触, 其中所述捕捉试剂包含用于

锚定物质的特异性结合配偶体或有所述配偶体构成并且特异性地识别被分析物,造成捕捉试剂结合锚定物质,形成捕捉试剂层,同时令所结合的捕捉试剂层与生物流体样品接触并生成跨越/通过压电表面的声波,以及测量所述波的振幅、相位、时间延迟或频率中的任何变化作为被分析物结合到所述捕捉试剂层的结果。

[0160] 一些具体实施例涉及使用生物活性膜涂覆金属材料表面的方法,包括:将包括锚定物质的第一组合物施加到金属材料的表面上以在所述表面上形成单层,其中所述锚定物质包含连接到结合成分的间隔物;以及将包含生物化捕捉试剂的第二组合物施加到所述锚定物质的单层上,其中生物素化捕捉试剂通过所述锚定物质的结合成分结合到所述锚定物质以形成所述生物素化捕捉试剂的层。

[0161] 一些具体实施例中,本文所述的方法还包括活化锚定物质的表面。一些具体实施例中,活化锚定物质的表面包括等离子体清洁。一些具体实施例中,等离子体清洁包括使用氧或氧/氩混合物来处理表面。一些具体实施例中,等离子体清洁持续1至10分钟,1至20分钟,1至30分钟、或1至60分钟。一些具体实施例中,等离子体清洁持续超过1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、60分钟、1.5h、2h、3h或4h。一些具体实施例中,等离子体清洁持续低于5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、60分钟、1.5小时、2小时、3小时或4小时。一些具体实施例中,等离子体清洁包括在50至200瓦和50至150KHz下的处理。

[0162] 一些具体实施例中,本文所述的方法是直接涂覆。一些具体实施例中,直接涂覆牵涉简单快速的涂覆化学品,这在几秒或几分钟内而非几小时内完成,并且使用可扩容的、连续的在线方法制造,例如具备所需精度和设置物质单层的能力的喷墨印刷,其可在最小操作者干预下容易地自动化。这一涂覆方法产生的次品量低,并且生成较少量的危险废弃物。这一涂覆方法将锚定物质直接沉积在压电表面上而无需材料中间层。

[0163] 一些具体实施例中,本文所述的制备方法包括清洁压电基板表面。清洁步骤可通过大量方法实施,所述方法包括但不限于,酸处理、紫外线暴露和各种可经由生成高反应性物质而移除压电基板表面上的几乎全部有机污染物的等离子体处理方法。一些具体实施例中,制备方法包括等离子体清洁。

[0164] 被分析物与经涂覆的生物传感器的结合

[0165] 一些具体实施例中,需要活化亲和素与压电基板表面的键合以结合感兴趣的被分析物。所述活化包括生物素化的粘合剂如抗体,所述抗体对于感兴趣的被分析物抗原是特异性的。在固定到亲和素涂覆的芯片上之前,将抗体或其它剂生物素化。抗体可在其被固定在亲和素基板上之前与其被分析物抗原结合。被分析物生物素化的抗体复合体可在传感器外部形成,并且所述复合体可与传感器接触,抗体上的生物素借此将结合到所述亲和素涂覆的芯片。两种方法中哪一种是优选的取决于被分析物和样品处理。两种方法均在本申请的范畴内。再次使用AFM分析具有与芯片表面上的亲和素结合的特定抗体的表面涂层,测得深度为6至9nm,表明抗体确实结合到了亲和素层。

[0166] 施加抗原特异性的生物素化捕捉试剂以形成第二层,所述第二层由在非干燥介质中的结合且过量的游离生物化试剂构成,还含有该领域中已知的蛋白稳定剂例如蔗糖、海藻糖、甘油等。很多试剂可被生物素化,其中最常用的是生物素化的抗体,器特异性地识别感兴趣的被分析物。蛋白捕捉试剂可被化学地或酶学地生物素化。化学生物素化使用各种

已知的接合化学反应来获得胺、碳水化合物、含硫氢化合物和烃的非特异性生物素化。也应理解,N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)偶联给出了对蛋白质中任何伯胺的生物素化。酶促生物素化通过细菌生物素连接酶导致某些序列内特异性赖氨酸的生物素化。大多数化学生物素化试剂由经由链接基附接到生物素的缬氨酸侧链的反应性基团组成。酶促生物素化最常通过将感兴趣的蛋白在其N端、C端或在内部环处链接到名为Avi标签或接纳体肽(AP)的由15个氨基酸组成的肽而实现。这些生物素化技术是该领域中已知的。

[0167] 一旦被结合,捕捉试剂就被短暂地暴露于加热的空气中,使得水被从所施加的流体中部分地移除,形成保护性的稳定化凝胶,所述凝胶将确保所结合的蛋白质样结合剂如抗体在分干燥凝胶层中的长期稳定性,这使得第二抗原特异性结合剂层的形成具有基本上完全的事件依赖性。任选地,将这些类似玻璃的层脱水,在氧化硅或分子筛干燥剂颗粒的存在下储存在药囊内。将药囊的上部腔室密封以形成射流室。随后,将具有上部腔室的药囊密封在塑料储存袋中,优选在N₂气氛下。

[0168] 锚定物质(例如,亲和素)与生物素化捕捉试剂之间的结合造成在芯片上形成第二个捕捉试剂层。在使用前,通使用试验缓冲液或甚至使用分析过程中的试样流体简单冲洗,可轻易地移除任何残留的未结合生物素化捕捉试剂和保护性凝胶层中的其它成分。这些传感器已经被证明可以检测抗原、被分析物的结合以及使用生物传感器检测疾病。

[0169] 当配备含有与感兴趣的被分析物特异性结合的捕捉试剂的适当的生物膜涂层时,本文所述的生物传感器可用来检测多种试剂和生化标记物。可应用这一集成传感器的实例包括人类和兽医诊断。被分析物被定义为传染剂或见于传染剂中或由传染剂生成并且可用于检测中的任何物质,包括而不限于,小分子、寡核苷酸、核酸、蛋白质、肽、病原体片段、裂解的病原体、抗体(包括IgA、IgG、IgM、IgE)、酶、酶辅因子、酶抑制剂、毒素、膜受体、激酶、蛋白A、Poly U、Poly A、聚赖氨酸、多糖、适配体和螯合剂。先前已经描述了对抗原-抗体相互作用的检测(美国专利4,236,893、4,242,096和4,314,821,全部通过引用而明确并入本文)。再者,在全细胞(包括原核生物例如致病菌细胞、真核生物细胞和哺乳动物肿瘤细胞)、病毒(包括逆转录病毒、疱疹病毒、腺病毒、慢病毒等)、真菌、寄生虫和孢子(包括传染剂的表型变异,例如血清变型(serovar)或血清型(serotype))检测中的应用处于本申请的范畴内。

[0170] 一些具体实施例涉及用于测定样品中被分析物的存在或量的方法,包括:令生物传感器元件与样品接触;生成声波;以及测量所述声波的振幅、相或频率的变化,作为被分析物结合到所述捕捉试剂的结果。

[0171] 一些具体实施例中,样品是环境样品或生物样品。一些具体实施例中,生物样品是血液、血清、血浆、尿液、痰或粪便。

[0172] 一些具体实施例中,涂覆有金属的基板是压电基板。一些具体实施例中,声波具有10至300MHz的输入频率。一些具体实施例中,声波具有在约1至10000MHz、1至8000MHz、1至6000MHz、1至5000MHz、1至4000MHz、1至3000MHz、1至2000MHz、1至1000MHz、10至8000MHz、10至6000MHz、10至5000MHz、10至3000MHz、10至2000MHz、10至1000MHz、50至8000MHz、50至6000MHz、50至5000MHz、50至3000MHz、50至2000MHz、50至1000MHz、100至8000MHz、100至6000MHz、100至5000MHz、100至3000MHz、100至2000MHz、100至1000MHz、200至8000MHz、200至6000MHz、200至5000MHz、200至3000MHz、200至2000MHz、200至1000MHz范围内的输入频

率。一些具体实施例中,声波具有大于约1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、30MHz、40MHz、50MHz、60MHz、70MHz、80MHz、90MHz、100MHz的输入频率。一些具体实施例中,声波具有小于约500MHz、1000MHz、2000MHz、3000MHz、4000MHz、5000MHz、6000MHz、7000MHz、8000MHz、9000MHz、10000MHz的输入频率。

[0173] 本文所述的具体实施例提供独立的元件和传感器,它们表现出在上述两类传感器中每一种中可见的独立优点的组合。例如,使用具有用来与压电基板结合的硫醇官能团的锚定物质的第一具体实施例可与具有间隔物的锚定物质的具体实施例组合。

[0174] 用来改善锚定剂涂覆密度的3D表面

[0175] 很多传感器设计采用基质(或多种基质)例如酶水凝胶基质来发挥功能。术语“基质”根据其领域接受的意义用于本文中,意为其它事物在其中或自其起源、发展、取得和/或发现的事物。示例性的酶水凝胶基质典型包含已经使用交联剂如戊二醛交联在一起以形成聚合物网的生物传感酶(例如,葡萄糖氧化酶或乳酸氧化酶)和人血清白蛋白。这一网状结构随后在水溶液中溶胀以形成酶水凝胶基质。这一水凝胶的溶胀程度在数周的时间段内经常增加,这可能是由于网状结构交联的降解。无论其肇因如何,所观察到的这一溶胀的结果是水凝胶突出到孔或“窗”外,切入外部的传感器管内。这造成传感器尺寸超过设计说明,并且对其分析性能造成负面影响。

[0176] 一些具体实施例涉及采用多种不同的微图案来增加被固定的捕捉试剂的有效表面积,而不破坏在与目标被分析物(例如,游离抗原或被表达在细胞或病毒颗粒表面上的抗原)接合中有效的结合部分(例如,抗体)的空间构型。由于被结合的被分析物(例如,抗原)的密度在测定传感器性能中至关重要,必须确保相对开发的三维基质微结构,所述微结构允许目标被分析物的扩散性传输并且容纳结合捕捉试剂(例如,抗体接合的生物素)的锚定物质(例如,亲和素分子)的结合部分的大小。一些具体实施例涉及检测包括病毒和细菌在内的完整病原体物种,将需要通过所述三维(3D)基质的宽度为约0.05微米至约10微米的通道,以便允许将这些物种传输通过包含捕捉试剂(例如,活化的生物素分子)的基质。

[0177] 一些具体实施例涉及具有增强的材料特性的生物传感器元件以及由此类元件构造的生物传感器。本申请还提供制作和使用此类传感器的方法。尽管一些具体实施例归属于声波传感器,但本文公开的多种元件(例如,压电基板和3D基质微结构设计)可适合与该领域已知的多种传感器中的任一种合用。本文所公开的被分析物传感器元件、架构以及制作和使用这些元件的方法可用来建立多种分层传感器结构。此类传感器表现出的灵敏和精确程度令人震惊。所述传感器也具有高度挠性、多功能性和允许待检查大量被分析物种的多种传感器配置的特征。

[0178] 与传统SAW传感器相比,本文所述的生物传感器的灵敏度足以检测低浓度的生物学被分析物,也足以检测生物流体中传染性颗粒数量可能较小的细菌或病毒感染。再者,本文所述的传感器在生物流体的体积也有限的情况下也具有足够的灵敏度。

[0179] 本文所述的检测和量化方法可具有足以检测皮摩尔范围内的生物学被分析物,也用于检测生物流体中传染性颗粒数量可能较小(即,<10颗粒/ml)的细菌和病毒感染。此外,由于其灵敏度有所增强,本文所述的检测方法也可用于生物流体的体积也有限(例如,10至250微升)时。

[0180] 3D基质微结构可包括3D凝胶或纳米结构化的表面,采用3D超分子架构,它可被集

成到生物传感器中以增加被固定在生物传感器表面上的捕捉试剂的有效表面积和数量。可使用各种树枝状聚合物来创建3D基质微结构,因为树枝状聚合物以分支状配置在3D空间内提供高密度的官能团。周边官能团促进抗原/抗体在传感器表面上的接合。由于它们的分支结构,树枝状聚合物还降低抗原与抗体结合的空间位阻,因此促进对目标分子的捕捉。可使用聚酰胺胺(PAMAM)和/或聚丙烯亚胺(PPI)树枝状聚合物涂覆压电基板的表面。可共价或非共价地将树枝状聚合物涂覆在压电基板的表面上。可使用盐化方法,使用胺基硅烷、氰基硅烷、过氧硅烷等将压电表面功能化。树枝状聚合物可与所述功能化的表面声学表面共价接合。树枝状聚合物层的高度可为介于5nm至20nm之间。之后,可将抗体、抗体片段、单域抗体、小分子、DNA或抗原固定在树枝状聚合物表面的周边上,以捕捉目标分子。

[0181] 制造三维基质微结构的方法

[0182] 可使用光刻技术在压电基板上形成3D基质微结构。在光聚合过程中,可使用光掩模和模具形成微图案。在光刻过程后,可将锚定物质附接到微结构上。将锚定物质附接到3D基质微结构上之后,随后可通过与锚定物质连接而将捕捉试剂固定在所述微结构上。

[0183] 一些具体实施例涉及在压电基板上形成3D基质微结构的方法,所述方法包括:将悬浮液施加到所述压电基板上以形成悬浮层,将光掩模施加到所述悬浮层上,将所述光掩模暴露于紫外光源而令所述悬浮层的未被所述光掩模覆盖的部分借以反应,以及从所述基板移除任何未反应的悬浮层,其中所述3D基质微结构被形成在所述基板上。

[0184] 一些具体实施例涉及在压电基板上形成3D基质微结构的方法,所述方法包括:在所述压电基板昂形成包含至少一个微通道的微流体网,用水凝胶前体溶液填充所述微通道,将所述水凝胶前体暴露于紫外光源,以及从所述压电基板移除所述微流体网,留下设置在所述基板上的所述三维水凝胶微结构。

[0185] 一些具体实施例中,所述悬浮层的一部分没有被所述光掩模覆盖。

[0186] 一些具体实施例中,通过旋涂将所述悬浮液施加到所述基板。

[0187] 一些具体实施例中,通过在微流体通道中流动而将所述悬浮液施加到所述基板。

[0188] 一些具体实施例中,通过将所述悬浮层溶解在溶剂中二将所述未反应的悬浮层从所述基板移除,其中所述溶剂可以是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水或有机溶剂。一些具体实施例中,通过洗涤将所述未反应的悬浮层从所述压电基板移除。

[0189] 一些具体实施例中,本文所述的方法还包括将3D基质微结构暴露于含有结合试剂的溶液中。一些具体实施例中,结合试剂是生物素。

[0190] 一些具体实施例中,本文所述的方法还包括将3D基质微结构暴露于锚定物质的溶液中,其中所述3D基质微结构包括接合试剂,以及其中所述3D基质微结构通过所述结合试剂附接到所述锚定物质。

[0191] 一些具体实施例中,本文所述的方法还包括,在将锚定物质附接到3D基质微结构之后,将3D基质微结构暴露于捕捉试剂的溶液中。

[0192] 一些具体实施例涉及通过下述制造生物传感器元件的方法,包括:在压电基板上形成3D基质微结构以增加所述压电基板的表面积;以及将一种或多种捕捉试剂固定在所述压电基板上。

[0193] 一些具体实施例中,本文所述的制造方法还包括在压电基板上形成孔。

[0194] 一些具体实施例中,本文所述的制造方法还包括在压电基板上形成水凝胶基质。

[0195] 一些具体实施例中,本文所述的制造方法还包括在压电基板上形成水凝胶基质的微阵列。

[0196] 一些具体实施例中,本文所述的制造方法还包括在压电基板上形成水凝胶基质的层。

[0197] 一些具体实施例中,本文所述的制造方法还包括,所述水凝胶基质包含多个孔。

[0198] 一些具体实施例中,本文所述的制造方法还包括使用光刻打印在所述压电基板上形成所述捕捉试剂的微阵列。

[0199] 一些具体实施例中,本文所述的制造方法包括使用激光形成孔。一些具体实施例中,激光是皮秒或飞秒脉冲激光。

[0200] [实施例]

[0201] 实施例1

[0202] 使用硫醇化的中性亲和素作为直接附接到传感器表面的第一层。图1示例性说明使用硫醇化的生物捕捉试剂的天然铝表面的生物涂层。铝被作为示例提供,但也可在晶体上使用。附接是基于硫醇化学。硫醇具有对于金表面的高亲和性,形成稳定的共价键。图2A显示,硫醇化的中性亲和素也表现出对于铝的高亲和性,并且出乎意料地相对于结合晶体更优先结合铝。硫醇化的中性亲和素对于铝金属的优先结合可用来选择性地在传感器上制造感兴趣的任何区域。捕捉剂可以是硫醇化的中性亲和素,并且它也可作为任何硫醇化的捕捉剂(包括适配体、核苷酸和抗体)替代。本文所述的方法可用于其它用于传送声波的材料如钛等。

[0203] 将在ddH₂O中含有10至0.01mg/ml中性亲和素的低微摩尔范围内的小体积液体施加到传感器的目标表面区域,风干一段时间,该时间从几分钟到几小时之间可变,取决于晶体或铝表面的状况。然后彻底洗除过量的未吸附中性亲和素。图2A使用光学试验方法比较生物素化的酶探针分别与表面涂覆的中性亲和素和硫醇化的中性亲和素的结合。数据显示,铝对硫醇化的中性亲和素的吸附大约六倍于晶体表面,并且也高于对(未经硫醇化的)中性亲和素的吸附。

[0204] 图2A至2C显示中性亲和素(NA_v)优先结合到铝表面。图2A显示采用生物素化的HRP/二盐酸邻苯二胺(OPD)对的酶学测定结果。B1k LT表示钽酸锂晶体表面。在417nm的吸收强度与键合到传感器表面的中性亲和素的量成正比。当使用硫醇化的中性亲和素时,键合到铝或晶体表面上的中性亲和素的量明显更高。图2B示例性说明与表面中性亲和素结合的生物素化荧光素分子的基于显微镜的图像(500倍放大),而图2C示例性说明0.2μm聚苯乙烯生物素化荧光微珠的结合(500倍放大)。使用生物素化荧光素和聚苯乙烯荧光微珠确定SAW传感器上表面结合荧光的存在,证实表面中性亲和素生物涂层是功能活跃的。

[0205] 实施例2

[0206] 首先,通过等离子体清洁(几分钟到几小时)活化铝或晶体表面。将传感器表面暴露于等离子体清洁,创建了可通过评估水接触角而轻易测量的官能团。对于后续的试剂与活化表面的附接来说,显著小于90°的接触角是最优的。晚些时候,将活化的表面暴露于硫醇化的中性亲和素以在表面上形成层。涂覆之后,洗涤传感器以从活化的铝或晶体表面移除过量的硫醇化中性亲和素。随后干燥经涂覆的装置。

[0207] 实施例3

[0208] 图3示例性说明使用中性亲和素进行选择捕捉目标被分析物的生物涂层发展的示意图。首先,通过等离子体清洁(几分钟到几小时)活化铝或晶体表面。将传感器暴露于等离子体清洁,创建了可通过评估水接触角而轻易测量的官能团。对于后续的试剂与活化表面的附接来说,显著小于 90° 的接触角是最优的。图4A和图4B示例性说明水在传感器上的接触角测量。图4A显示等离子体清洁导致接触角的显著减小,而图4图4B显示具有PEG-硅烷的涂层显著增加了传感器的疏水性。

[0209] 接着,使用附接到各种长度的PEG化的化合物(间隔物)的硅烷涂覆活化的表面,其中生物素共价附接到间隔物的顶部。PEG的浓度对于确保单层来说是重要的,并且取决于所使用的反应条件。涂覆之后,洗涤传感器以从活化的铝表面移除过量的未吸附PEG-亲和素。随后干燥经涂覆的装置。随后,使用水接触角测量证实PEG-生物素的完整性。PEG间隔物的长度可介于100至2000分子量之间,并且可根据感兴趣的特定结合剂调整。

[0210] 图5A和图5B示例性说明生物素化荧光素和荧光聚苯乙烯微珠的荧光图像。图5A是生物素化荧光素(50倍放大),图5B是荧光聚苯乙烯微珠(500倍放大),显示了与表面生物涂层的均质结合。图5A和图5B显示生物素化的聚苯乙烯微珠附着到传感器的活化表面,并且证明所获得的表面中性亲和素是完全功能性的。同样,可在生物涂层上制造任何生物素化的物质,包括生物素化的抗体或其片段、适配体等。实施例显示,使用生物素化的荧光素作为用于表面结合中性亲和素的探针。在例如通过生物素化抗体占据表面上所有中性亲和素结合位点的条件下,在生物涂层上可能观察不到生物素化荧光素的后续加成(数据未显示)。数据指示,所述涂层适用于对目标被分析物的捕捉。据此,被分析物与传感器表面结合将会导致传感器表面上微粘度和质量负荷的改变,而这些改变可使用SAW技术定量检测。

[0211] 实施例4

[0212] 本实施例牵涉在表面活化和衍生后用于铝和/或晶体的生物涂层的过程。经由短NHS或过氧间隔物将生物捕捉剂(例如,抗体)直接附接到表面上。

[0213] 图6示例性说明用于选择性捕捉目标被分析物的生物涂层的发展(没有中性亲和素)。使用附接到间隔物(例如,PEG或碳水化合物链)的官能团,所述官能团可将抗体或其它被分析物捕捉分子直接附接到传感器表面。这一直接方法避免了中性亲和素的使用,并因此降低了双分子层的总体厚度和所牵涉的处理步骤数量。可选择N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、磺基-NHS、马来酰亚胺、-COOH或-NH₂或者具有短间隔物(2至20nm长的PEG或碳水化合物链)的3-缩水甘油基氧丙基(环氧)官能团。在每种情况下,使用硅烷作为锚定分子以附接通过间隔物分离的官能团。官能化的间隔物与捕捉分子(例如,抗体)反应,导致高密度和降低的空间位阻。通过等离子体清洁活化传感器的铝或晶体表面。之后,将硅烷分子(5%至10%浓度,重量/体积)施加到传感器表面并孵化(几分钟到几小时)。使用溶剂洗掉过量的硅烷。对于NHS官能化,将抗体/蛋白质(1至10 μ m)直接施加到传感器并在室温下孵化。在NHS或过氧官能化之后,可加入荧光-被分析物以证实表面生物涂层的功能性。

[0214] 图7A和图7B显示键合到经由过氧间隔物固定化的表面生物涂层的荧光被分析物。图7A是对照物(500x),而图7B是过氧涂覆的传感器(500x)。

[0215] 实施例5

[0216] 可通过在表面中钻孔而在压电基板中形成三维基质,从而暴露更大的用于捕捉剂的面积,并且这一结构可帮助增加压电基板的活化面积。孔优选尽可能深,因为增加每个孔

的深度增加了每孔中亲和素暴露于被分析物的面积。但是,增加孔的深度也可能增加孔的径深比,并且可使得被分析物更难以向下扩散到孔的底部。大于 $I0(h/R)$ 的径深比是不可取的,因为这将过度增加本分希望覆盖整个孔面积所需的时间,造成仪器的响应时间。优选 $I0(h/R)$ 或更小的径深比。如果涂覆有捕捉剂的压电基板面积为 100mm^2 ,并将直径20微米深度100微米的孔加入其中,则接触面积增加4280平方微米每孔。因此,将总接触面积翻倍需要 1.6×10^4 个孔,而将接触面积增加 10^3 倍所需的孔数为 1.6×10^7 个。 1.6×10^7 个孔占据的表面积为50平方毫米。因此,孔的面积密度为50%,完全可使用扫描脉冲皮秒激光实现。对于将表面积增加大于 10^3 倍,优选直径更大的孔。例如,将接触面积翻倍需要的直径为100微米深为500微米的孔的数量是 1.3×10^2 个,覆盖 1.04mm^2 的总表面积。

[0217] 图8A和图8B显示在通过在 1.04μ 操作的皮秒激光系统钻孔的水凝胶基质中正弦结构的SEM图像和接触角。图8A显示具有 $25\mu\text{m}$ 周期性和 $12\mu\text{m}$ 高度的正弦结构,图8B显示具有 $35\mu\text{m}$ 周期性和 $45\mu\text{m}$ 高度的正弦结构。优选使用皮秒或飞秒脉冲激光器在亲水性交联基质内钻出这些孔。

[0218] 实施例6

[0219] 将生物素链霉亲和素复合体的微阵列固定在压电基板上。优选地,每个点可具有10至25微米的直径,并且可具有5至20微米的高度。优选地,可使用传统蛋白质微阵列技术实现20%至50%的表面封装密度。使用聚乙二醇(PEG)作为涂覆材料,方便地制造了蛋白质微阵列,PEG对于包括链霉亲和素和生物素在内的蛋白质的吸附高度惰性的。在附接生物素之前,使用光刻技术来图案化PEG涂层,然后,在结合与抗体复合的生物素之前,将该涂层与链霉亲和素复合。

[0220] 实施例7

[0221] 通过合并有水溶性惰性稀释剂如PEG的亲水性单体制剂的聚合和交联,形成水凝胶基质。可通过下述形成水凝胶基质:将单体制剂层添加到压电基板上,随后将所述单体层暴露于紫外辐射以活化其内部的光引发剂实施聚合和交联。随后将水凝胶基质在去离子水或PBS中浸泡几分钟到几小时,取决于基质的厚度、其亲水性(平衡水含量)和处理温度。这一处理移除稀释剂,代之以将水引入微腔,以及增强允许待附接到基质的蛋白分子节段进行局部迁移的自由体积。随后用溶解在磷酸盐缓冲盐水中的生物素(即,NHS-LC-生物素)溶液洗提所述基质,以便将生物素结合到水凝胶基质上。随后用链霉亲和素的溶液进一步洗提所述水凝胶基质,以将链霉亲和素结合在所结合的生物素上。随后,功能化的水凝胶基质准备好使用与抗体接合的生物素进行活化,其中所述抗体是以特异性的病原体或其它生物剂为靶向的。

[0222] 实施例8

[0223] 实施例5至7中所述的微图案和3D基质全部可使用软光刻过程在压电基板上制备。这一途径尤其适合自动化,如图9所示。图9所示的用于制造微米/纳米图案的软光刻过程可采用由聚二甲基硅氧烷(PDMS)做成的模具。

[0224] 实施例9

[0225] 也可根据实施例7中描述的聚合和交联步骤之别水凝胶基质的微阵列。也可使用上述实施例中描述的步骤将这一水凝胶基质的微阵列功能化。

[0226] 实施例10

[0227] 可制备水凝胶基质以形成层。从包括小颗粒的水溶性聚合物例如聚乙烯醇或聚醋酸乙烯酯的制剂形成水凝胶基质。一旦已经形成基质,就将其在水中或生理盐水中洗涤,以便移除稀释剂(若存在)并且也溶解颗粒。颗粒留下随机且均匀分布在基质内的具体体积在 10^2 至 10^6 立方微米范围内的空间。多达 10^6 个颗粒可加载到1mL的单体制剂中。所形成的每个微腔因此可抵达停留在与亲和素分子结合的生物素上的抗体位点。

[0228] 实施例11

[0229] 可制备树枝状聚合物(例如,PMMA、PPI、或它们的组合)以形成层。可形成包括官能团的树枝状聚合物。一旦已经形成基质,就将其在水中或生理盐水中洗涤,以便移除稀释剂(若存在)并且也溶解颗粒。颗粒留下随机且均匀分布在基质内的具体体积在 10^2 至 10^6 立方微米范围内的空间。多达 10^6 个颗粒可加载到1mL的单体制剂中。所形成的每个微腔因此可抵达停留在与亲和素分子结合的生物素上的抗体位点。

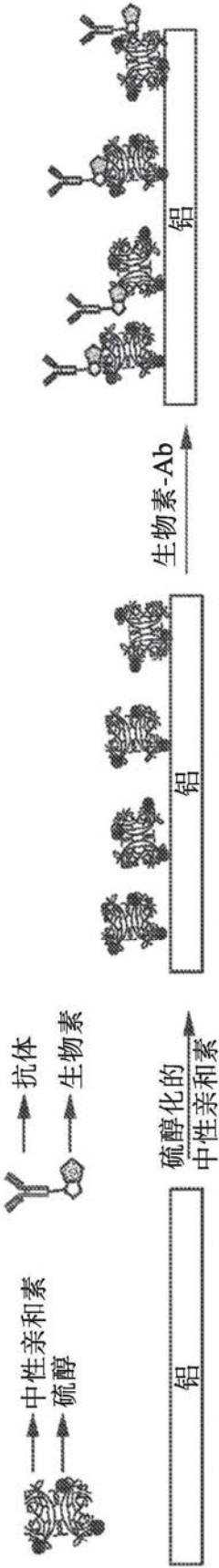


图1

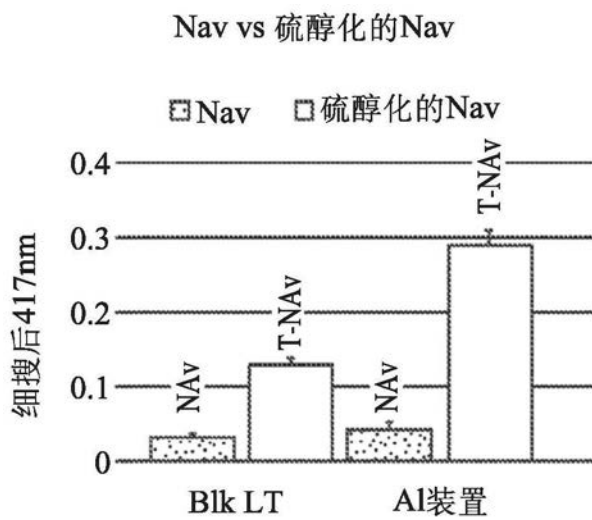


图2A

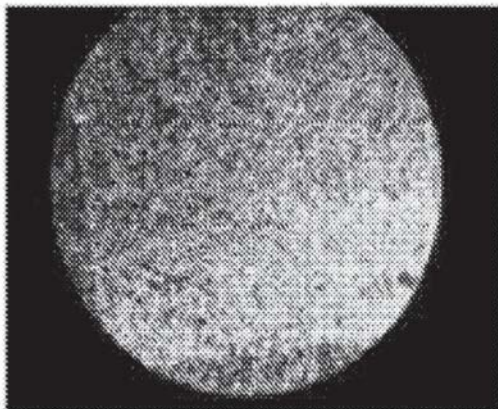


图2B

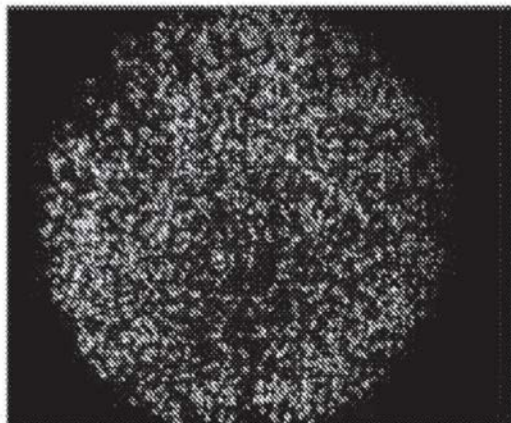


图2C

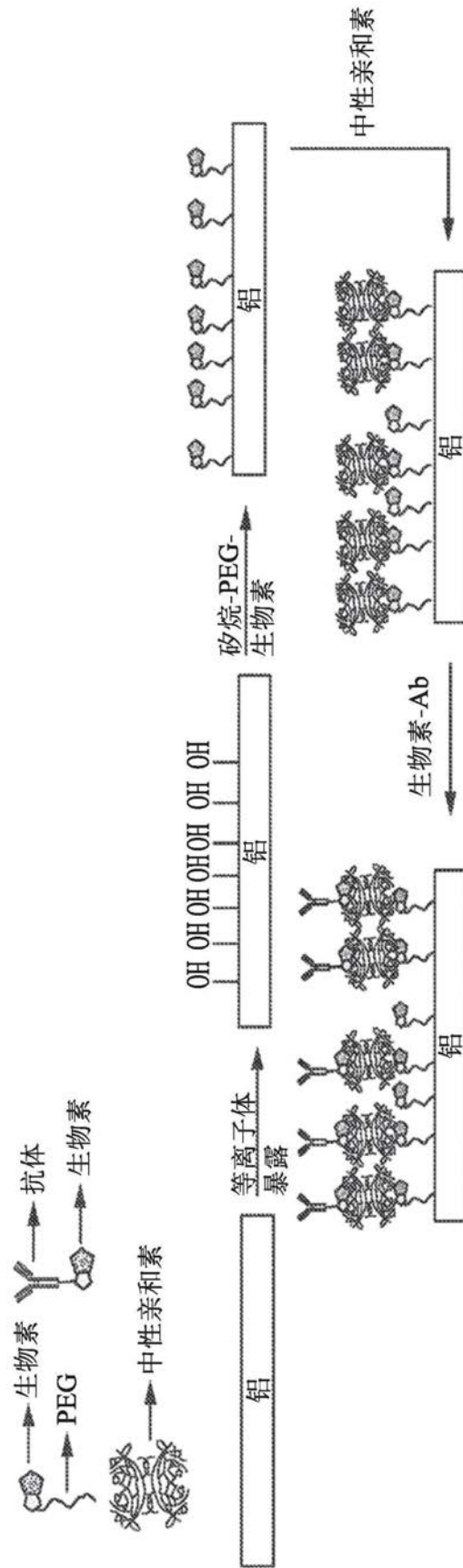


图3

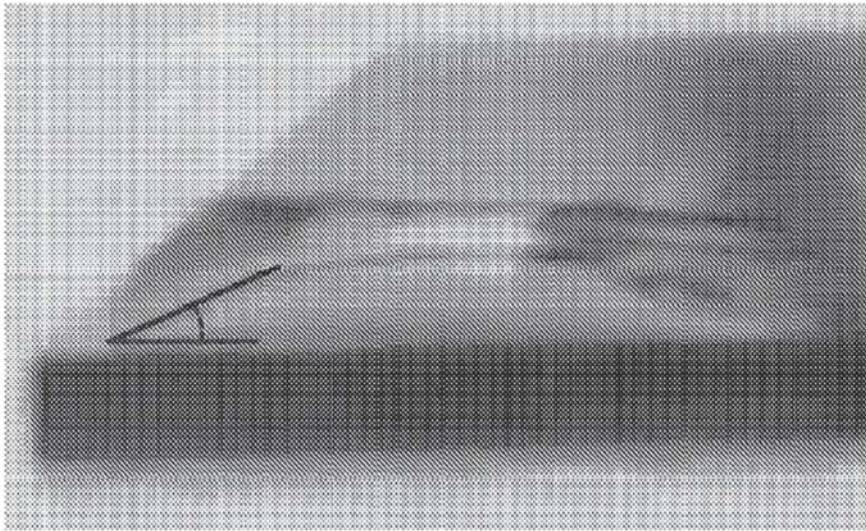


图4A

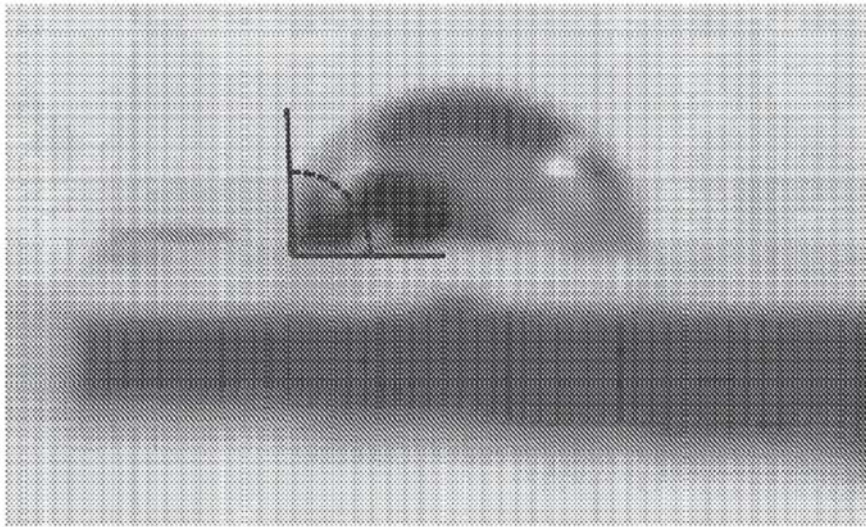


图4B

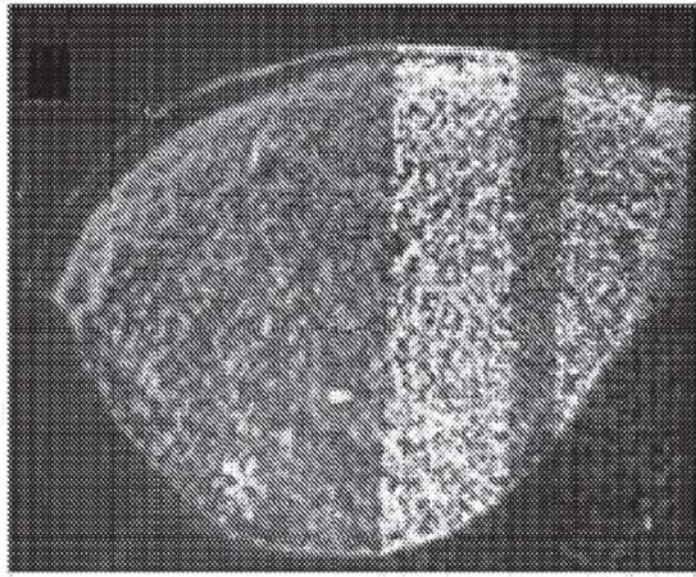


图5A

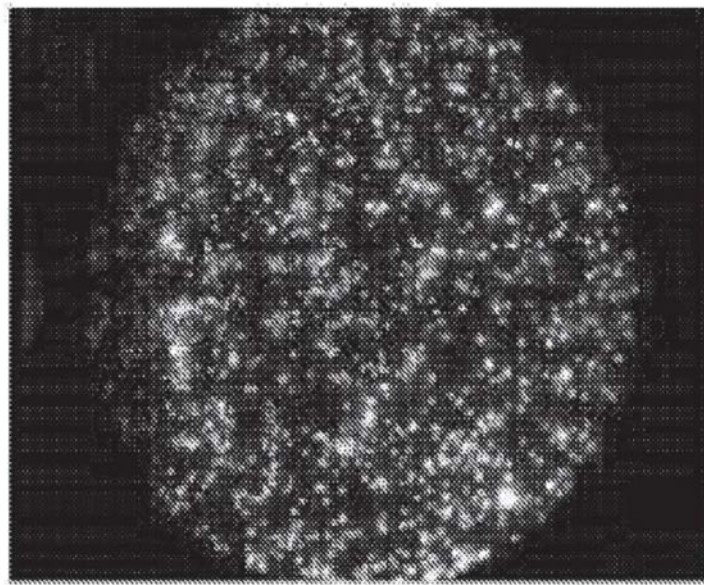


图5B

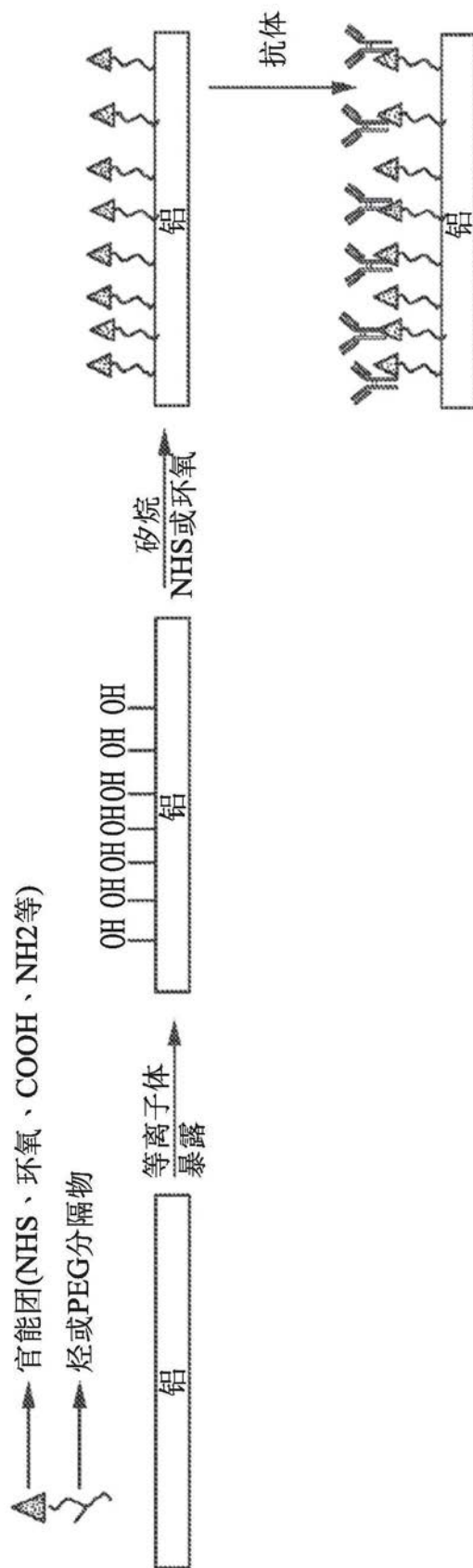


图6

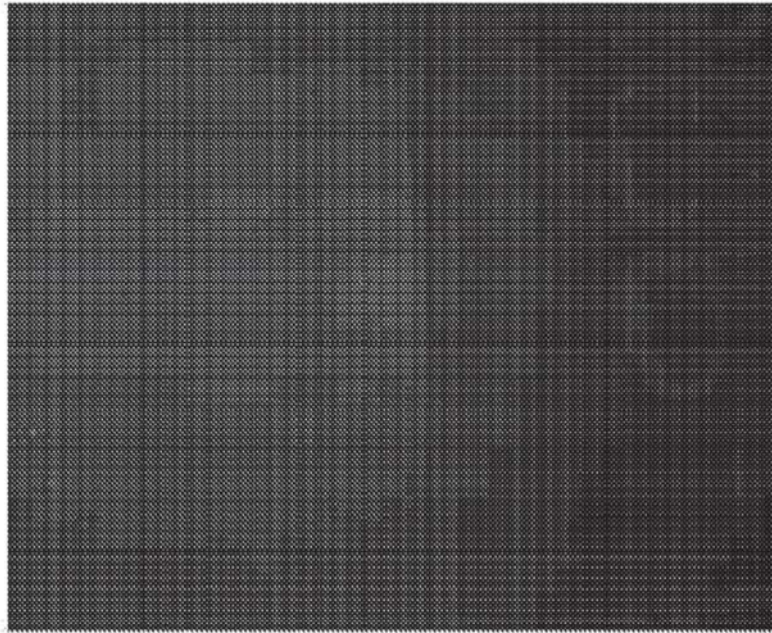


图7A

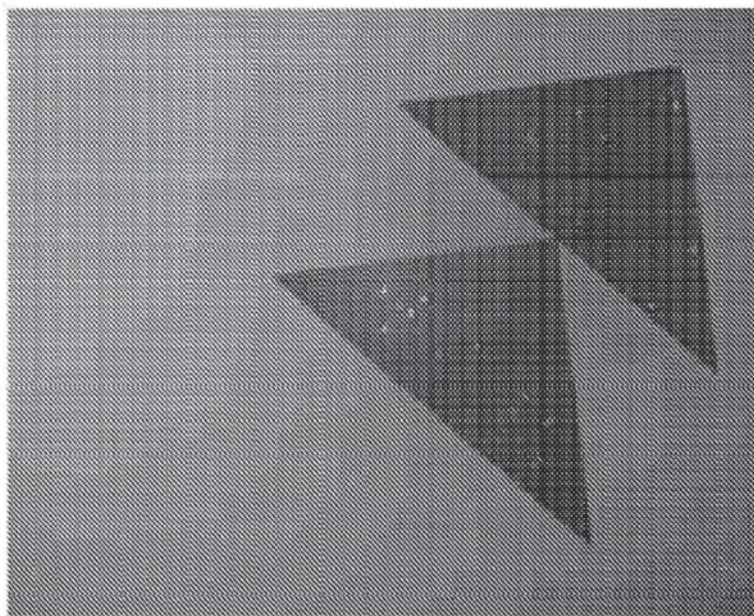


图7B

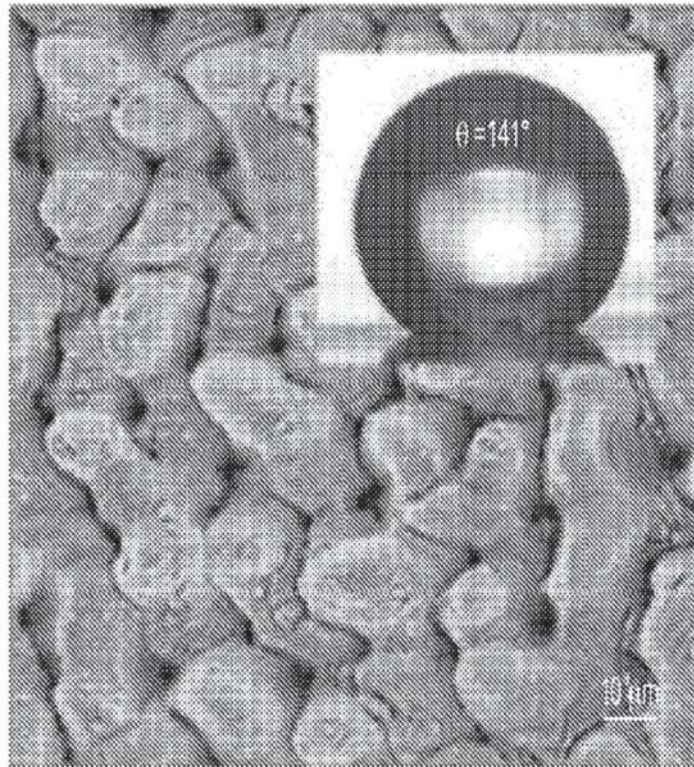


图8A

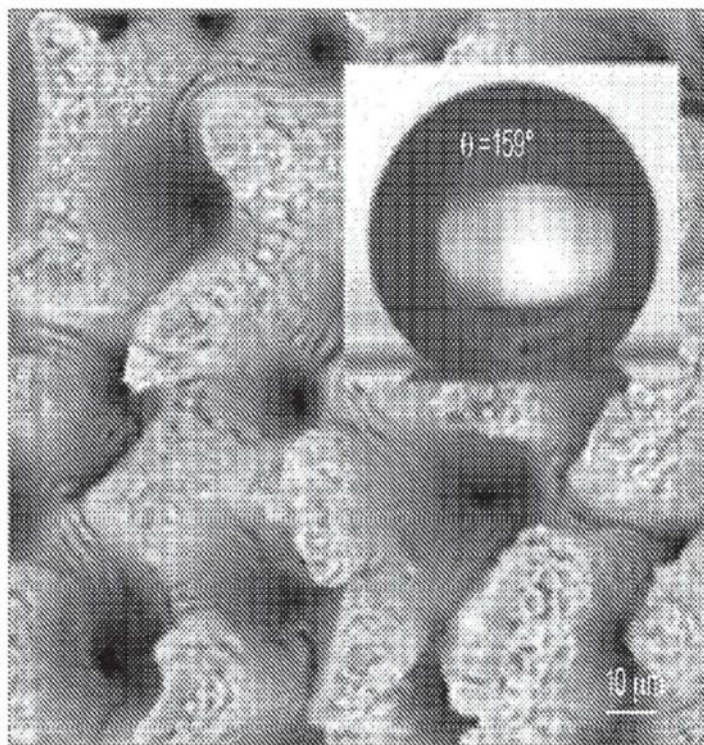


图8B

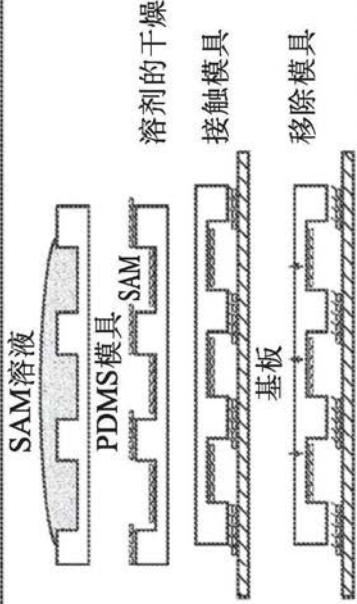
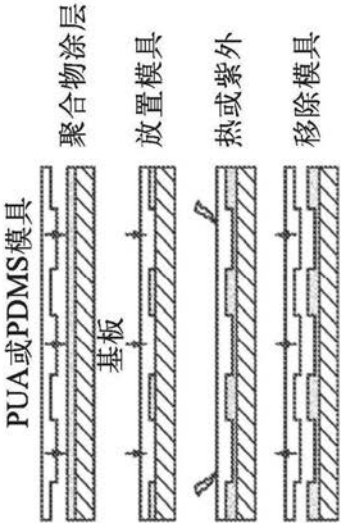
	接触晒印(参考文献38、39)	毛细管模制(参考文献40至43)
模具	软模具 聚二甲基硅氧烷(PDMS) 硬PDMS(h-PDMS)	聚二甲基硅氧烷(PDMS) 刚性可挠模具(PUA)
分辨率	~500 nm ~50 nm，使用h-PDMS	~50 nm，使用PUA模具
应用	1.通道制造 2.生物分子的直接打印 (1D化学修饰)	1.通道制造 2.微米/纳米结构的制造 (2D结构)
工艺	 SAM溶液 PDMS模具 溶剂的干燥 接触模具 移除模具 基板	 PUA或PDMS模具 聚合物涂层 基板 放置模具 热或紫外 移除模具

图9

专利名称(译)	表面声波传感器生物活性涂层		
公开(公告)号	CN111295582A	公开(公告)日	2020-06-16
申请号	CN201880057668.6	申请日	2018-07-05
[标]发明人	S·达斯 A·古普塔		
发明人	S·达斯 J·M·哈姆林 A·古普塔		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01R19/22		
CPC分类号	G01N29/022 G01N29/036 G01N33/553 G01N2291/0255 G01N2291/0256 G01N2291/0422 G01N2291/0423 G01N2291/0426 G01N2291/0427		
代理人(译)	程伟 王锦阳		
优先权	62/529986 2017-07-07 US 62/530735 2017-07-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供一种声波传感器元件。所述声波传感器包括：具有或不具有3D基质微结构的压电基板以增加有效传感区域的表面，以及共价键合到压电基板表面的锚定物质；并且所述锚定物质可结合至捕捉试剂。还提供制造使用包含锚定物质的生物活性膜涂覆压电材料表面的所述3D生物传感器表面和元件的方法。

