



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106383224 A

(43)申请公布日 2017.02.08

(21)申请号 201610789401.9

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街5625号

(72)发明人 栾世方 马姣 殷敬华 石恒冲
宋凌杰

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

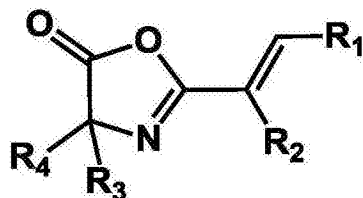
(54)发明名称

一种生物检测元件及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种生物检测元件,基底修饰有恶唑酮聚合物。本发明提供的生物检测元件,通过恶唑酮官能团的类点击化学特性,可以负载各种生物探针,反应简单,快速,高效,无需活化或催化剂,同时能够减少非特异性吸附。并且经恶唑酮聚合物修饰的基底表面,具有良好的亲水性以及抗生物污染性能,从而实现对复杂样品如全血,血浆,血清,尿液,唾液,以及泪液等既准确又灵敏的分析检测。从而在即时检测设备,微流控芯片以及基因芯片等分析检测前沿领域具有广阔的应用前景。

1. 一种生物检测元件,其特征在于,基底修饰有恶唑酮聚合物。
2. 根据权利要求1所述的生物检测元件,其特征在于,所述基底包括孔板,玻璃,纤维,石英,硅,金,氧化铟锡和塑料中的一种或几种。
3. 根据权利要求1所述的生物检测元件,其特征在于,所述恶唑酮聚合物由恶唑酮单体聚合得到,所述恶唑酮单体具有式1所示结构:



式 1;

其中, R_1 和 R_2 独立的选自H或具有1~4个碳原子的烷基; R_3 和 R_4 独立的选自具有1~6个碳原子的烷基或具有5~6个碳原子的环烷基。

4. 根据权利要求3所述的生物检测元件,其特征在于,所述恶唑酮单体选自2-乙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-乙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-乙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二环己烷基-1,3-恶唑啉-5-酮和2-异丙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮中的一种或几种。

5. 一种生物检测元件的制备方法,包括以下步骤:

- a) 将光引发剂,交联剂和恶唑酮单体的混合溶液,滴加到基底表面,干燥挥发;
- b) 采用紫外光对上述步骤a)得到的基底表面进行照射,进行聚合反应,得到表面修饰有恶唑酮聚合物的基底;
- c) 将步骤b)得到的基底与生物探针反应,得到表面修饰有恶唑酮聚合物的具有生物检测功能的基底;
- d) 封闭未反应活性位点,得到生物检测元件。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述步骤d)具体为:

将步骤c)得到的基底与亲水性聚合物反应,封闭未反应活性位点,得到生物检测元件。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述亲水性聚合物包括端氨基聚乙二醇,端巯基聚乙二醇,端氨基聚乙烯吡咯烷酮和端巯基聚乙烯吡咯烷酮中的一种或几种。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述光引发剂包括二苯甲酮,1-羟基环己基苯基酮,2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮,2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮,2-甲基-1-(4-甲硫基苯基)-2-吗啉基-1-丙酮和2,2-二甲氧基-苯基苯乙酮中的一种或几种。

9. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述交联剂包括聚乙二醇二甲基丙烯酸酯,N,N-亚甲基双丙烯酰胺,N,N-乙烯基双丙烯酰胺,烯丙基醚,1,4-戊二烯-3-醇,碳酸二烯丙酯,1,5-己二烯-3-醇,1,3-二烯丙基脒中的一种或几种。

10. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述光引发剂,交联剂,恶唑酮单体的摩尔比为(0.1~5):(0.5~10):100。

一种生物检测元件及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及一种生物检测元件及其制备方法。

背景技术

[0002] 生物检测,包括免疫检测以及基因检测,通常是利用生物分子之间特异性识别作用,从而对目标物实现快速,准确且灵敏的检测,因此在疾病诊断与治疗,环境监测及食品检验中均有很好的应用前景,近些年来也得到研究者的广泛注意。然而,由于实际检测样品,如全血,血浆,血清,尿液,唾液,以及泪液等组成十分复杂,生物检测的临床应用仍面临着很大挑战,主要包括由于非特异性吸附引起的假阳性以及探针负载量小引起的低灵敏度。

[0003] 表面结构和组成决定了生物材料的许多物理性质和最终用途。改变表面性质在包括生物检测在内的生物技术领域具有特殊的重要性,其中生物相容性特别受到关注。为此,研究者们通常在检测基底表面修饰一层亲水性的聚合物,从而降低非特异性蛋白吸附以及保持负载探针活性。通常,所修饰的聚合物由两种单体共聚得到,即一种抗生物污染单体,一种带有探针结合位点的单体,从而同时实现检测表面的抗生物污染以及探针固定功能。但是这样的共聚必然会导致两种组分的含量相对减少,从而使各自的功能被削弱。此外,目前最常用的两类探针固定单体,包括丙烯酸类以及如甲基丙烯酸缩水甘油醚类含有末端环氧官能团的单体。然而对于丙烯酸类单体,在与探针反应时,通常需先进行活化反应,且该活化反应对PH敏感,因此反应效率较低。而对于末端具有环氧官能团的单体,虽可以直接与探针反应,然而该反应活性低,反应速率慢,此外受到生物大分子反应所要求的反应温度与时间的限制,使最终探针固定效率不理想。因此,探索一种既可以高效负载探针,同时又可以减少非特异性吸附的双功能单体显得尤为重要。

[0004] 中国发明专利101824477B提供了一种由聚酰胺-胺型树枝状大分子修饰基底构成的基因芯片,其中树枝状分子上氨基经戊二醛活化,可负载DNA探针。然而通过戊二醛活化氨基时,很容易使戊二醛两端均与表面氨基反应,从而失去与DNA探针结合能力。中国发明专利104820093A提供了一种聚多巴胺生物检测表面进行抗原检测的方法,通过多巴胺自聚合在基底表面修饰一层聚多巴胺层,随后利用聚多巴胺的化学反应性可直接与抗体反应,将抗体修饰在表面。然而,该聚多巴胺层修饰表面也可以与其他蛋白反应,因此会引起非特异性吸附。

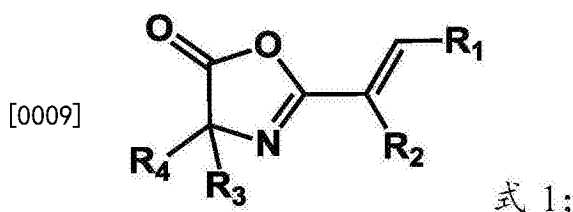
发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种生物检测元件及其制备方法,所述生物检测元件可以高效负载探针,同时具有较低的非特异性吸附。

[0006] 本发明提供了一种生物检测元件,基底修饰有恶唑酮聚合物。

[0007] 优选的,所述基底包括孔板,玻璃,纤维,石英,硅,金,氧化铟锡和塑料中的一种或几种。

[0008] 优选的,所述恶唑酮聚合物由恶唑酮单体聚合得到,所述恶唑酮单体具有式1所示结构:



[0010] 其中,R₁和R₂独立的选自H或具有1~4个碳原子的烷基;R₃和R₄独立的选自具有1~6个碳原子的烷基或具有5~6个碳原子的环烷基。

[0011] 优选的,所述恶唑酮单体选自2-乙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-乙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-乙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二环己烷基-1,3-恶唑啉-5-酮和2-异丙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮中的一种或几种。

[0012] 本发明还提供了一种生物检测元件的制备方法,包括以下步骤:

[0013] a) 将光引发剂,交联剂和恶唑酮单体的混合溶液,滴加到基底表面,干燥挥发;

[0014] b) 采用紫外光对上述步骤a)得到的基底表面进行照射,进行聚合反应,得到表面修饰有恶唑酮聚合物的基底;

[0015] c) 将步骤b)得到的基底与生物探针反应,得到表面修饰有恶唑酮聚合物的具有生物检测功能的基底;

[0016] d) 封闭未反应活性位点,得到生物检测元件。

[0017] 优选的,所述步骤d)具体为:

[0018] 将步骤c)得到的基底与亲水性聚合物反应,封闭未反应活性位点,得到生物检测元件。

[0019] 优选的,所述亲水性聚合物包括端氨基聚乙二醇,端巯基聚乙二醇,端氨基聚乙烯吡咯烷酮和端巯基聚乙烯吡咯烷酮中的一种或几种。

[0020] 优选的,所述光引发剂包括二苯甲酮,1-羟基环己基苯基酮,2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮,2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮,2-甲基-1-(4-甲硫基苯基)-2-吗啉基-1-丙酮和2,2-二甲氧基-苯基苯乙酮中的一种或几种。

[0021] 优选的,所述交联剂包括聚乙二醇二甲基丙烯酸酯,N,N-亚甲基双丙烯酰胺,N,N-乙烯基双丙烯酰胺,烯丙基醚,1,4-戊二烯-3-醇,碳酸二烯丙酯,1,5-己二烯-3-醇,1,3-二烯丙基脒中的一种或几种。

[0022] 优选的,所述光引发剂,交联剂,恶唑酮单体的摩尔比为(0.1~5):(0.5~10):100。

[0023] 与现有技术相比,本发明提供了一种生物检测元件,基底修饰有恶唑酮聚合物。本发明提供的生物检测元件,通过恶唑酮官能团的类点击化学特性,可以负载各种生物探针,反应简单,快速,高效,无需活化或催化剂,同时能够减少非特异性吸附。并且经恶唑酮聚合物修饰的基底表面,具有良好的亲水性以及抗生物污染性能,从而实现对复杂样品如全血,血浆,血清,尿液,唾液,以及泪液等既准确又灵敏的分析检测。从而在即时检测设备,微流

控芯片以及基因芯片等分析检测前沿领域具有广阔的应用前景。

[0024] 实验结果表明,本发明提供的生物检测元件探针负载反应速度更快,效率更高,负载量更大,同时非特异性吸附量小,最终可以对复杂样品进行灵敏检测。

附图说明

[0025] 图1是实施例1、比较例1不同反应时间下各样品上固定抗体的荧光图;

[0026] 图2是实施例2、比较例2的相对吸附量柱状图;

[0027] 图3是实施例3的吸光度曲线图;

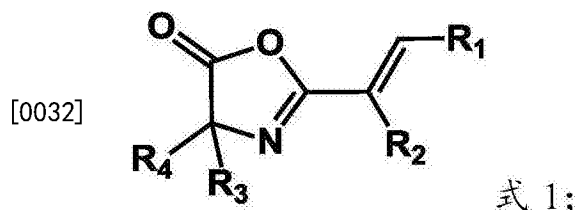
[0028] 图4是实施例4的荧光强度曲线图。

具体实施方式

[0029] 本发明提供了一种生物检测元件,基底修饰有恶唑酮聚合物。

[0030] 本发明对所述基底并无特殊限定,可以为本领域技术人员熟知的适用于生物检测元件的基底,本发明优选包括玻璃,纤维,石英,硅,金,氧化铟锡等电极材料和塑料中的一种或几种。在本发明的某些具体实施例中,所述基底为硝酸纤维素膜,环状聚烯烃(COP)膜,滤纸,玻璃。所述基底可以为孔板。

[0031] 所述恶唑酮聚合物由恶唑酮单体聚合得到,所述恶唑酮单体具有式1所示结构:



[0033] 其中,R₁和R₂优选为H或具有1~4个碳原子的烷基;R₃和R₄优选为具有1~6个碳原子的烷基或具有5~6个碳原子的环烷基。

[0034] 所述恶唑酮单体更优选为2-乙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-乙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-乙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮、2-异丙烯基-4,4-二环己烷基-1,3-恶唑啉-5-酮和2-异丙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮中的一种或几种。

[0035] 在本发明的某些具体实施例中,所述恶唑酮单体为2-乙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮,2-乙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮,2-异丙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮和2-乙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮中的任意一种或多种。

[0036] 基底表面修饰有恶唑酮聚合物的生物检测元件,通过恶唑酮官能团的类点击化学特性,可以负载各种生物探针,反应简单,快速,高效,无需活化或催化剂,同时能够减少非特异性吸附。并且经恶唑酮聚合物修饰的基底表面,具有良好的亲水性以及抗生物污染性能,从而实现对复杂样品如全血,血浆,血清,尿液,唾液,以及泪液等既准确又灵敏的分析检测。从而在即时检测设备,微流控芯片以及基因芯片等分析检测前沿领域具有广阔的应用前景。

[0037] 实验结果表明,本发明提供的生物检测元件探针负载反应速度更快,效率更高,负

载量更大,同时非特异性吸附量小,最终可以对复杂样品进行灵敏检测。

[0038] 本发明还提供了上述生物检测元件的制备方法,包括以下步骤:

[0039] a) 将光引发剂,交联剂和恶唑酮单体的混合溶液,滴加到基底表面,干燥挥发;

[0040] b) 采用紫外光对上述步骤a)得到的基底表面进行照射,进行聚合反应,得到表面修饰有恶唑酮聚合物的基底;

[0041] c) 将步骤b)得到的基底与生物探针反应,得到表面修饰有恶唑酮聚合物的具有生物检测功能的基底;

[0042] d) 封闭未反应活性位点,得到生物检测元件。

[0043] 所述光引发剂优选为二苯甲酮,1-羟基环己基苯基酮,2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮,2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮,2-甲基-1-(4-甲硫基苯基)-2-吗啉基-1-丙酮和2,2-二甲氧基-苯基苯乙酮中的一种或几种。

[0044] 本发明通过光引发剂在紫外光照射下产生自由基,从而引发恶唑酮类单体进行聚合反应。

[0045] 所述交联剂优选为聚乙二醇二甲基丙烯酸酯,N,N-亚甲基双丙烯酰胺,N,N-乙烯基双丙烯酰胺,烯丙基醚,1,4-戊二烯-3-醇,碳酸二烯丙酯,1,5-己二烯-3-醇,1,3-二烯丙基脲中的一种或几种。

[0046] 本发明通过交联剂使所述恶唑酮类聚合物涂层更加稳定,不易脱落。

[0047] 所述恶唑酮单体同上,在此不再赘述。

[0048] 本发明中,所述光引发剂,交联剂,恶唑酮单体的摩尔比优选为(0.1~5):(0.5~10):100,更优选为(0.1~3):(0.5~8):100,最优选为(0.5~3):(1~8):100。

[0049] 本发明首先将所述光引发剂,交联剂,恶唑酮单体混合得到混合溶液,所述混合溶液的溶剂优选为甲醇,乙醇,丙酮,四氢呋喃,二氯甲烷和氯仿中的一种或多种;更优选为甲醇,丙酮,四氢呋喃,二氯甲烷或氯仿;最优选为甲醇,丙酮,二氯甲烷或四氢呋喃。

[0050] 然后将所述混合溶液滴加到基底表面,干燥挥发,制得涂层。本发明优选,在室温下挥发干燥即可。

[0051] 然后采用紫外光对上述得到的基底表面进行照射,进行聚合反应。

[0052] 本发明优选的,将上述基底表面置于紫外灯下照射,进行交联聚合。在本发明中,所述紫外灯的光源优选为低压汞灯、中压汞灯、高压汞灯、碘钨灯和加滤光片中的一种或几种,所述紫外光照射时间优选为2~30min,更优选为5~30min,最优选为10~30min。本发明优选的,完成所述紫外光照射后,将所得样品置于丙酮中清洗,最终得到表面修饰有恶唑酮聚合物的基底。

[0053] 完成上述紫外照射聚合反应后,将所得表面修饰有恶唑酮聚合物的具有生物检测功能的基底与生物探针反应。

[0054] 具体的,将其置于生物探针溶液中进行反应,固定生物探针。

[0055] 在本发明中,所述反应的时间优选为5~120min,更优选为5~80min,最优选为8~60min。所述反应的温度优选为25~45℃,更优选为37℃。

[0056] 在本发明中,所述生物探针溶液的浓度优选为1pg/mL~100μg/mL,更优选为1pg/mL~80μg/mL,最优选为0.1ng/mL~100μg/mL。所述生物探针包括各种抗体,抗原,DNA,RNA,多肽,蛋白以及激素等,具体包括Mouse IgG,Rabbit IgG,Goat IgG等种属抗体,以及抗甲

种胎儿球蛋白,癌胚抗原,前列腺特异性抗原,甲状腺激素等其他疾病标志物抗体,识别细菌,细胞的DNA,RNA探测序列以及多肽链等。

[0057] 本发明优选的,将上述制备得到的表面修饰有恶唑酮聚合物的具有生物检测功能的基底表面进行清洗,本发明优选在水浴振荡的条件下,用含有0.05%Tween的磷酸盐缓冲液进行清洗,后干燥保存。

[0058] 完成上述生物探针的固定后,封闭其未反应活性位点。

[0059] 具体的,将上述生物检测基底与亲水性聚合物反应。将其置于含有亲水性聚合物的水溶液中进行反应,封闭未反应的恶唑酮官能团。在本发明中,所述亲水性聚合物可以为本领域技术人员熟知的能够封闭反应活性位点的亲水性聚合物,本发明优选为端氨基聚乙二醇,端巯基聚乙二醇,端氨基聚乙烯吡咯烷酮和端巯基聚乙烯吡咯烷酮中的一种或多种。所述亲水性聚合物的数均分子量优选为300~30000,更优选为1000~20000,最优选为3000~10000。在本发明中,所述亲水性聚合物的反应浓度优选为0.1~100mg/mL,更优选为1~50mg/mL,最优选为1~10mg/mL;所述反应时间优选为5~30min,更优选为5~15min;所述反应温度优选为25~45℃,最优选为37℃。

[0060] 本发明优选的,反应结束后,将上述制得的生物检测表面在磷酸盐缓冲液中进行清洗,清洗后干燥保存备用,最终得到生物检测元件。

[0061] 本发明提供的上述制备方法,反应条件温和,反应速率快,无其他副反应,且所需设备简单,方法易操作。

[0062] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的生物检测元件及其制备方法进行详细描述。

[0063] 实施例1

[0064] 取0.5mmol二苯甲酮,1mmol N,N-亚甲基双丙烯酰胺,100mmol 2-乙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮,加入10mL四氢呋喃中,充分搅拌溶解,配成混合溶液。取1mL上述混合溶液,滴加到10×10cm²硝酸纤维素膜上,室温挥发干燥。

[0065] 将上述干燥后的硝酸纤维素膜置于紫外灯下照射2min,随后置于丙酮中,摇床清洗30min后,干燥备用。

[0066] 将上述清洗后的硝酸纤维素膜置于含100μg/mL罗丹明标记鼠抗(RBITC-Mouse IgG)的磷酸盐缓冲液中。37℃下分别反应5min,20min,40min,60min,80min,100min,120min。反应完毕后,将上述样品用0.05%Tween的磷酸盐缓冲液进行清洗,后干燥保存。

[0067] 将上述固定了荧光抗体的样品进行荧光强度扫描,研究抗体固定量随着时间变化关系。样品荧光强度扫描采用激光共聚焦显微镜(ZEISS,LSM700)。不同反应时间下各样品上固定抗体的荧光图片如图1所示,图1是实施例1、比较例1不同反应时间下各样品上固定抗体的荧光图。

[0068] 实验结果表明,随着反应时间的增加,样品上荧光强度逐渐增强,表明抗体固定量逐渐增多。仅反应5min后,就有抗体结合在基底上,在达到40~60min后,反应趋于平衡。以上实验结果表明恶唑酮官能团与抗体上氨基之间的反应具有非常高的反应活性,反应速率快,固定量大。

[0069] 比较例1

[0070] 取0.5mmol二苯甲酮,1mmol N,N-亚甲基双丙烯酰胺,100mmol 甲基丙烯酸缩水甘

油醚,加入10mL四氢呋喃中,充分搅拌溶解,配成混合溶液。取1mL上述混合溶液,滴加到 $10 \times 10\text{cm}^2$ 硝酸纤维素膜上,室温挥发干燥。

[0071] 将上述干燥后的硝酸纤维素膜置于紫外灯下照射2min,随后置于丙酮中,摇床清洗30min后,干燥备用。

[0072] 将上述清洗后的硝酸纤维素膜置于含 $100\mu\text{g/mL}$ RBITC-Mouse IgG的磷酸盐缓冲液中。 37°C 下依次反应5min,20min,40min,60min,80min,100min,120min。反应完毕后,将上述样品用 0.05% Tween20的磷酸盐缓冲液进行清洗,后干燥保存。

[0073] 将上述固定了荧光抗体的样品进行荧光强度扫描,研究抗体固定量随着时间变化关系。具体方法与实施例1相同,在此不再赘述。结果如图1,图1是实施例1、比较例1不同反应时间下各样品上固定抗体的荧光图。

[0074] 从图1中可以看到,对于比较例1,环氧官能团与抗体反应慢,随着反应时间增加,荧光强度缓慢增强,且达到120min时,荧光强度相比实施例1明显弱。

[0075] 以上实验结果表明,实施例1的抗体固定速率明显更快,固定量也更大,恶唑酮类官能团与抗体上氨基之间的反应具有非常高的反应活性,反应速率快,固定量大。

[0076] 实施例2

[0077] 取 1.0mmol 2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮, 2mmol N,N-乙烯基双丙烯酰胺, 100mmol 2-乙烯基-4,4-二乙基-1,3-恶唑啉-5-酮,加入10mL丙酮中,充分搅拌溶解,配成混合溶液。取1mL上述混合溶液,滴加到 $10 \times 10\text{cm}^2$ 环状聚烯烃(COP)膜上,室温挥发干燥。

[0078] 将上述干燥后的环状聚烯烃(COP)膜置于紫外灯下照射10min,随后置于丙酮中,摇床清洗30min后,干燥备用。

[0079] 将上述清洗后的环状聚烯烃(COP)膜置于含 $100\mu\text{g/mL}$ Rabbit IgG的磷酸盐缓冲液中。 37°C 下依次反应5min,20min,40min,60min,80min,100min,120min。反应完毕后,将上述样品用 0.05% Tween20的磷酸盐缓冲液进行清洗,后干燥保存。

[0080] 将上述固定了抗体的环状聚烯烃膜,以及纯聚烯烃膜放入 1mg/mL 的异硫氰酸荧光素标记牛血清白蛋白(FITC-BSA)溶液中, 37°C 下吸附2h,用磷酸盐缓冲液清洗三次,随后用激光共聚焦显微镜扫描,计算各样品的荧光强度,每种样品重复5次。以纯COP膜上非特异性蛋白吸附结果为 100% ,得到实施例2的相对吸附量,结果如图2,图2是实施例2、比较例2的相对吸附量柱状图。

[0081] 从图2可以看到,相对于纯COP膜,实施例2,即恶唑酮聚合物修饰的基底,表现出优异的抗非特异性吸附性能,降低 85% 。

[0082] 比较例2

[0083] 取 1.0mmol 2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮, 2mmol N,N-乙烯基双丙烯酰胺, 100mmol N-乙烯基吡咯烷酮,加入10mL丙酮中,充分搅拌溶解,配成混合溶液。取1mL上述混合溶液,滴加到 $10 \times 10\text{cm}^2$ 环状聚烯烃膜上,室温挥发干燥。

[0084] 将上述干燥后的环状聚烯烃膜置于紫外灯下照射10min,随后置于丙酮中,摇床清洗30min后,干燥备用。

[0085] 与实施例2步骤相同,将上述修饰了N-乙烯基吡咯烷酮合物的环状聚烯烃膜,放入 1mg/mL 的FITC-BSA溶液中, 37°C 下吸附2h,用磷酸盐缓冲液清洗三次,随后用激光共聚焦显微镜扫描,计算各样品的荧光强度,每种样品重复5次。结果如图2,图2是实施例2、比较例2

的相对吸附量柱状图。

[0086] 从图2可以看出,相对于纯COP膜,比较例2的非特异性蛋白吸附降低,这主要是由于N-乙烯基吡咯烷酮已经被证实,由于其具有优异的亲水性,可赋予改性表面良好的抗非特异性吸附性能。

[0087] 实施例2与比较例2的抗非特异性吸附效果接近。因此,以上结果表明,恶唑酮类聚合物修饰的生物检测元件基底表面不仅可以高效负载生物探针,同时可以有效抑制非特异性吸附,赋予检测表面良好的抗生物污染性能。

[0088] 实施例3

[0089] 取2.0mmol 2,2-二甲氧基-苯基苯乙酮,3mmol聚乙二醇二甲基丙烯酸酯,100mmol 2-异丙烯基-4,4-二甲基-1,3-恶唑啉-5-酮,加入10mL丙酮中,充分搅拌溶解,配成混合溶液。取1mL上述混合溶液,滴加到 $10 \times 10 \text{ cm}^2$ Whatman4#滤纸上,室温挥发干燥。

[0090] 将上述滤纸干燥后置于紫外灯下照射20min,随后置于丙酮中,摇床清洗30min后,干燥备用。

[0091] 将5 μ L的含100 μ g/mL抗甲种胎儿球蛋白抗体的磷酸盐缓冲液滴加在聚合物修饰后的Whatman 4#滤纸上。37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应5min,反应完毕后,将上述样品用0.05%Tween20的磷酸盐缓冲液进行清洗,干燥备用。

[0092] 将上述固定抗体后的样品与氨基聚乙二醇($M_n=5000$)反应,37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应10min,封闭未反应活性位点。反应后,将样品用磷酸盐缓冲液清洗,后干燥备用。

[0093] 分别取5 μ L含有0ng/mL,1ng/mL,2ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,15ng/mL,20ng/mL甲种胎儿球蛋白(AFP)的人血浆和磷酸盐缓冲液滴加到上述负载抗体滤纸上。37 $^{\circ}\text{C}$ 下识别5min,后加入10ng/mL的辣根过氧化物酶标记的抗甲种胎儿球蛋白抗体,磷酸盐缓冲液清洗3次,后加入3 μ L TMB底物显色10min,测试每个浓度下各样品的吸光度值,检测结果如图3所示,图3是实施例3的吸光度曲线图。

[0094] 从图3可以看出,对于磷酸盐缓冲液中,通过酶联免疫吸附试验,对AFP的检测限为1.69ng/mL;而在组成非常复杂的人血浆中检测时,对AFP的检测限为1.62ng/mL,这一结果与在磷酸盐缓冲液中的检测限无明显差别。因此,以上实验结果表明本发明提供的恶唑酮类聚合物修饰的生物检测元件由于所负载抗体量大,活性高,且可以抑制非特异性吸附,最终在复杂组分,血浆中仍能够对待测物进行灵敏且准确的检测。

[0095] 实施例4

[0096] 取3.0mmol 2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮,5mmol碳酸二烯丙酯,100mmol 2-乙烯基-4,4-二丁基-1,3-恶唑啉-5-酮,加入10mL丙酮中,充分搅拌溶解,配成混合溶液。取1mL上述混合溶液,滴加到 $10 \times 10 \text{ cm}^2$ 玻璃上,室温挥发干燥。

[0097] 将上述干燥后的玻璃置于紫外灯下照射15min,随后置于丙酮中,摇床清洗30min后,干燥备用。

[0098] 将上述清洗后的玻璃置于含100 μ g/mL的-NH₂DNA(5'-GGATTATTGTTAAATAATGATAAGGAT-NH₂-3')的磷酸盐缓冲液中。37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应20min。反应完毕后,将上述样品用0.05%Tween20的磷酸盐缓冲液进行清洗,后干燥保存。

[0099] 将上述固定捕获DNA探针的玻璃样品与巯基聚乙二醇($M_n=10000$)反应,37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应5min,封闭未反应活性位点。反应后,将样品用磷酸盐缓冲液清洗,后干燥备用。

[0100] 将上述固定捕获DNA探针的玻璃样品放入含有不同浓度的待测DNA (5'-FITC-ATCCTTATCATTATTTAACAATAATCC-3') 的磷酸盐缓冲液中, 浓度分别为0ng/mL, 10ng/mL, 20ng/mL, 40ng/mL, 60ng/mL, 80ng/mL, 100ng/mL, 37℃下识别30min, 用磷酸盐缓冲液清洗三次, 随后用激光共聚焦显微镜扫描, 计算各样品的荧光强度, 每种样品重复5次。结果如图4所示, 图4是实施例4的荧光强度曲线图。

[0101] 从图4可以看到, 随着目标DNA浓度从10ng/mL增加到100ng/mL, 上述样品表面捕获探针量也随之增大, 绿色荧光强度增强, 表明上述所构建的DNA检测表面可以有效捕获目标DNA。因此, 本发明提供的恶唑酮类聚合物修饰的生物检测元件检测范围广, 可以对各种抗体, 抗原包括DNA进行灵敏识别。

[0102] 由以上实施例以及比较例结果可知, 本发明提供的生物检测元件通过恶唑酮官能团与生物探针上的氨基, 巯基以及羟基的反应具有类点击化学特性, 因此反应简单, 快速, 高效, 无需活化或催化剂。同时本发明提供的恶唑酮类聚合物修饰的生物检测元件可以赋予检测表面良好的亲水性以及抗生物污染性能, 从而实现复杂样品既准确又灵敏的分析检测。本发明提供的恶唑酮类聚合物修饰的生物检测表面仅需5min即可负载上生物探针, 同时所构建的生物检测表面上非特异性吸附可降低85%, 且在未稀释的人血浆中仍可保持对抗原的灵敏准确检测。

[0103] 本发明提供的构建方法简单快速, 条件温和, 成本低, 适合大规模生产。

[0104] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以对本发明进行若干改进和修饰, 这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

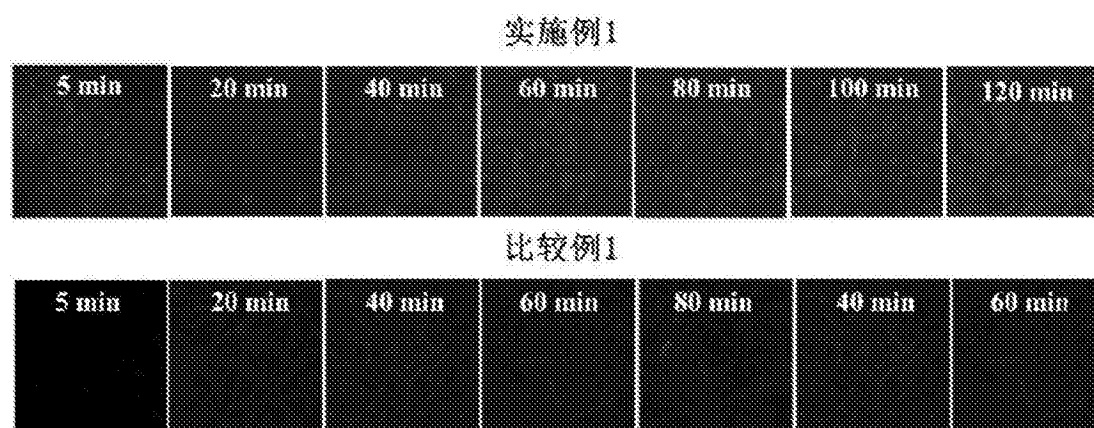


图1

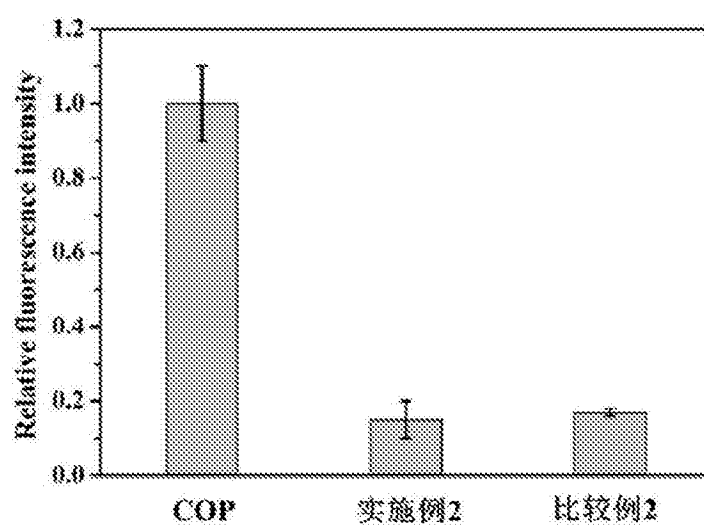


图2

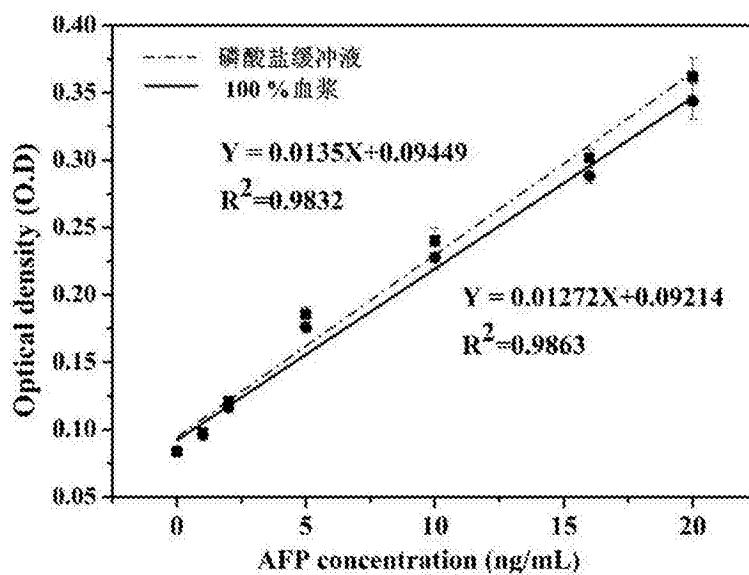


图3

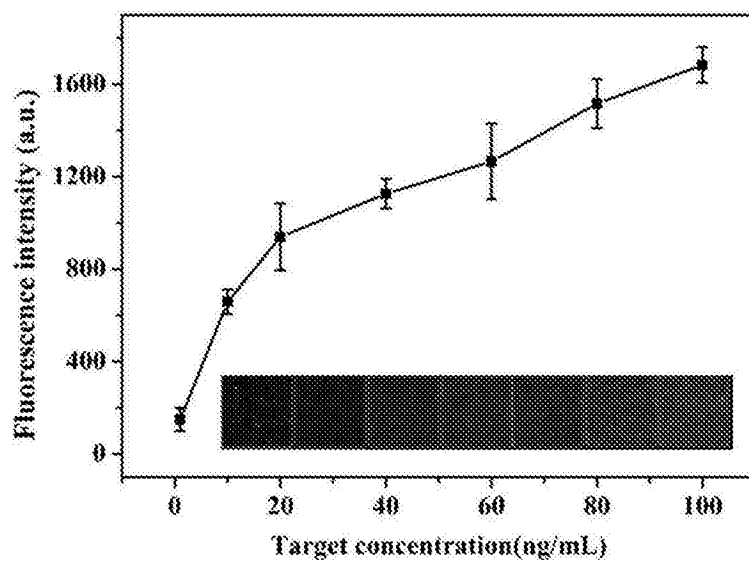
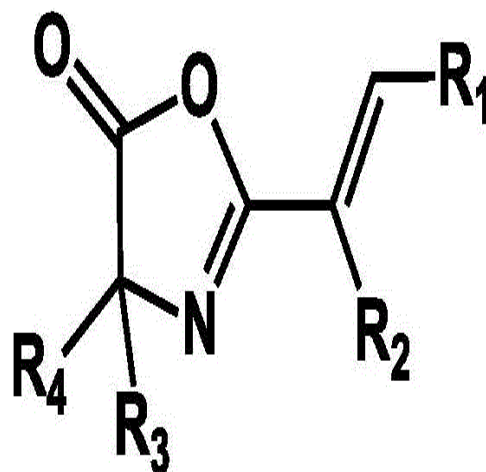


图4

本发明提供了一种生物检测元件，基底修饰有恶唑酮聚合物。本发明提供的生物检测元件，通过恶唑酮官能团的类点击化学特性，可以负载各种生物探针，反应简单，快速，高效，无需活化或催化剂，同时能够减少非特异性吸附。并且经恶唑酮聚合物修饰的基底表面，具有良好的亲水性以及抗生物污染性能，从而实现对复杂样品如全血，血浆，血清，尿液，唾液，以及泪液等既准确又灵敏的分析检测。从而在即时检测设备，微流控芯片以及基因芯片等分析检测前沿领域具有广阔的应用前景。



式 1: