

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910148151.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

C08L 83/06 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月2日

[11] 公开号 CN 101592655A

[51] Int. Cl. (续)

C08L 67/04 (2006.01)

C08L 27/16 (2006.01)

C08L 29/04 (2006.01)

[22] 申请日 2009.6.23

[21] 申请号 200910148151.0

[71] 申请人 毅新兴业(北京)科技有限公司

地址 100080 北京市海淀区苏州街18号长远
天地大厦A2座1209室

[72] 发明人 马庆伟 于中连 吕萍萍 任晶

胡晓慧 张燕

权利要求书2页 说明书15页 附图1页

[54] 发明名称

液体生物芯片系统

[57] 摘要

本发明公开了一种用于结合、分离、纯化靶生物大分子的液体芯片系统,包括由微米或纳米级芯片粒子和芯片粒子保存缓冲液组成的液体芯片,和液体芯片工作缓冲液:样品修饰缓冲液、结合缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、和/或芯片钝化缓冲液、和/或芯片激活缓冲液。该系统具有重复性好、样品处理通量高、操作简便、成本低等优点,并且具有极广泛的应用领域,适用于各种生物大分子的分离和纯化。

1. 一种用于吸附、分离、纯化、检测超微量生物大分子的液体芯片系统，包括：

a) 液体芯片：由微米或纳米级芯片粒子和芯片粒子保存缓冲液组成的，其中所述芯片粒子由无毒、生物相容性好的高分子材料内层和可逆结合或释放靶生物大分子的官能团外层组成；

b) 液体芯片工作缓冲液：用于修饰待测样品和芯片的修饰缓冲液、用于吸附靶蛋白的结合缓冲液、用于洗去微珠中杂质的洗涤缓冲液、用于洗脱微珠上靶蛋白的洗脱缓冲液、和/或用于使芯片表面活性钝化的缓冲液、和/或用于活化芯片表面的激活缓冲液；

其中芯片粒子表面的功能基团外层是根据所分离的靶生物大分子所进行修饰的官能团外层，这些饰选自疏水性修饰、亲水性修饰、金属螯合/配位修饰、阴离子修饰、阳离子修饰、生物素亲和修饰、免疫修饰、糖基化修饰、dextran 修饰、脂肪酸修饰、配体或受体修饰，或者官能团选自-COOH、-CHO、-NH₂、-SH、-S-S、环氧基、羰基。

2. 权利要求 1 中所述的液体芯片系统，其中芯片粒子内层的高分子材料选自聚多糖、聚酯、烯烃聚合物、聚氮化合物、聚酸化合物、蛋白质、胶体物、二氧化硅、环氧化合物或以上组成的共聚物，所述的生物大分子是待检的氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、低聚糖、多糖、脂质中的一种或多种或其混合物。

3. 权利要求 2 所述的液体芯片系统，其中聚多糖选自琼脂糖、壳聚糖、纤维素、琼脂糖、淀粉、环糊精，聚酯选自聚（丙交酯-共-乙交酯）、聚（丙交酯-共-碳酸酯）、树脂、聚氨酯、聚己内酯、纤维素酯、聚乙二醇、聚乙烯醇，烯烃聚合物选自聚砜、聚醚砜、聚偏乙烯、聚四氟乙烯、聚丙烯腈，聚酸化合物选自聚乳酸、乳酸与乙醇酸共聚物、聚羟基酸、3-羟基丁酸和 3-羟基己酸聚合物，蛋白质选自胶原、纤维蛋白、纤维粘连蛋白、白蛋白，胶体物选自硅胶、明胶、罗望子胶、沙蒿胶、黄原胶、瓜尔豆胶或共聚物；或以上任意组合的共聚物。

4. 权利要求 1 至 3 任一项所述的液体芯片系统，其中芯片粒子还可包含具有磁性的核心，该磁性核心选自铁的氧化物、镍的氧化物、钴的氧化物、镍-铁合金，或其组合。

5. 权利要求 4 所述的液体芯片系统，其中铁的氧化物是 Fe₃O₄ 或 γ-Fe₂O₃。

6. 权利要求 1 至 5 任一项所述的液体芯片系统，其中芯片粒子的高分子材料内层中还掺入了一种荧光染料或量子点荧光材料组成的荧光颗粒，并且通过计算机控制的相应波长激光使该芯片粒子中的荧光颗粒被激发出荧光，从而计算机根据荧光颜色和强度以

及芯片粒子表面的官能团鉴别出官能团所结合的靶生物大分子的种类和数量。

7. 权利要求 6 所述的液体芯片系统，其中芯片粒子还可以是多种不同的荧光粒子混合物，每种荧光粒子的高分子材料内层掺入了不同的荧光染料或量子点荧光材料，因此通过计算机控制的相应的不同波长的激光使该荧光芯片粒子混合物中不同荧光颗粒被激发出不同颜色的荧光和不同强度的荧光，从而计算机根据荧光颜色和强度以及芯片粒子表面的官能团鉴别出官能团所结合的靶生物大分子的种类和数量。
8. 权利要求 4 至 7 任一项中所述的液体芯片系统，其还包括用于分离磁性芯片粒子与液相的相关配套附件，该附件是对应于填充了磁性的珠子的，这些磁珠需要相应的磁石相配合以达到分离磁珠与液相的目的。配套附件又叫磁架，可以设计成两孔的，两孔相邻部分镶嵌着磁石，适合于单个生物芯片系统；也可以设计成两套八连管形式，两套八连管之间镶嵌磁石，适合八个样品的分离；同样也可以设计成七个两套八连管的集合体，适合 96 孔板进行的高通亮芯片修饰。
9. 权利要求 8 中所述的液体芯片系统，其中所述磁架主体材料不限，可以是透明橡胶、塑料等。

液体生物芯片系统

技术领域

本发明涉及到蛋白质组学和分子生物学中生物大分子的诊断和生物芯片技术，具体是提供一种液体生物芯片系统以吸附、分离、纯化、检测生物样品中目的生物大分子。

技术背景

生物芯片是八十年代末在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技术，主要是指通过微加工技术和微电子技术在固体芯片表面构建的微型生物化学分析系统，以实现生命机体的组织、细胞、蛋白质、核酸、糖类及其他生物组分进行准确、快速、大信息量的检测。生物芯片技术具有高通量、微型化和自动化的特点。利用生物芯片技术，可以一次对被检测对象进行多个指标的检验。生物芯片上高度集成的成千上万密集排列的分子微阵列，能够在很短的时间内分析大量的生物分子，使人们能够快速准确地获取样品中的生物信息，检测效率是传统检测手段的成百上千倍。生物芯片的出现是近年来高新技术领域中极具时代特征的重大进展，它是物理学、微电子学与分子生物学综合交叉形成的新技术，目前已经成为人们高效、准确、大规模地获取相关信息的重要手段之一。

常规的生物芯片是将生物分子有序地固化于支持物(如硅片、玻片、聚丙烯酰胺凝胶、塑料、尼龙膜等)的表面，形成高密度的点阵，与样品中的靶分子作用后，对杂交或反应信号进行检测，从而对样品中的靶分子进行定性或/和定量。这类芯片有其固有的缺点：1、芯片特异性问题，这与芯片表面修饰和修饰物都有关系，芯片表面修饰工艺不好或者修饰物间隔不合适都可能造成芯片表面的非特异性吸附，修饰物的特异性更是直接决定着芯片的特异性。2、芯片容量，芯片的表面积有限，因此所修饰的修饰物数量是一定的，因此，芯片容量也一直是芯片的一个重要问题。3、是芯片同样品的结合不充分，芯片对待检分子的结合属于平面结合，并且芯片所需样品量很小，因此不能保证芯片同样品充分结合，这不像液体中两项能充分混合；4、芯片洗脱不充分，芯片是一个固体表面，洗脱不能完全洗涤，可能造成干扰物质洗涤不完全从而影响芯片的特异性；5、修饰样品量小，对低丰度目标物质的检测能力有限。

这些问题主要局限于修饰表面不能同样品的充分混合上。为了解决这些问题，我们开发出了液体芯片缓冲液，这些系统即具有固体芯片的优势又很好的解决了修饰表面同液体样品的充分结合问题。

发明内容

本发明针对生物材料修饰过程中生物大分子的分离纯化过程中所存在的问题采用现代的微加工工艺和生物分子分离基本原理提出的解决方案和系统。

本发明的原理在于：发明者综合了层析洗脱分离法和普通微珠芯片分离法的优点，创造性地提出对待测样品的表面也进行相应修饰，即根据芯片表面的修饰类型，选择相应的样品修饰缓冲液对待测样品进行修饰，以便进行样品与芯片的结合，然后芯片与样品中生物大分子在样品结合缓冲液中结合，芯片洗涤缓冲液对结合后的芯片进行漂洗以去除相应的杂质组分，最后通过洗脱缓冲液将同芯片表面相结合的生物大分子洗脱下来。另外，本发明还提出了将液体芯片制成无缓冲液，或保存在钝化缓冲液中的产品，在使用前只需使用激活缓冲液进行活化液体芯片，这大大便于液体芯片在运输和保藏中，以实现产品的长期保藏。因此，本发明中所使用的各种材料和修饰、加工过程，如微珠、缓冲液、对微珠的修饰方法，均可使用现有技术。

本发明第一个目的是提供一种用于结合、分离、纯化靶生物大分子的液体芯片系统，包括：

a) 液体芯片：由微米或纳米级芯片粒子和芯片粒子保存缓冲液组成的，其中所述芯片粒子由无毒、生物相容性好的高分子材料内层和可逆结合或释放靶生物大分子的官能团外层组成；

b) 液体芯片工作缓冲液：样品修饰缓冲液、结合缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、和/或芯片钝化缓冲液、和/或芯片激活缓冲液；

其中粒子表面的功能基团外层是根据所分离的靶生物大分子进行特殊修饰的官能团外层，该特殊修饰选自疏水性修饰、亲水性修饰、金属螯合/配位修饰、阴离子修饰、阳离子修饰、生物素亲和修饰、免疫修饰、糖基化修饰、dextran 修饰、脂肪酸修饰、配体或受体修饰，或者官能团选自-COOH、-CHO、-NH₂、-SH、-S-S、环氧基、羰基。

本发明第二个目的是在第一个目的基础上，提供具有磁性核心的液体芯片系统，包括：

a) 液体芯片：由微米或纳米级芯片粒子和芯片粒子保存缓冲液组成的，其中所述芯片粒子由无毒、生物相容性好的高分子材料内层和可逆结合或释放靶生物大分子的官能

团外层组成，该磁性核心选自铁的氧化物、镍的氧化物、钴的氧化物、镍-铁合金或其组合，其中铁的氧化物优选是 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 。；

b) 液体芯片工作缓冲液：样品修饰缓冲液、结合缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、和/或芯片钝化缓冲液、和/或芯片激活缓冲液。

带有磁性的液体芯片系统的工作原理是带有磁性的芯片与样品中生物大分子在样品结合缓冲液中结合，磁性分离，弃上清；芯片洗涤缓冲液对结合后的磁性芯片进行漂洗以去除相应的杂质组分，磁性分离，弃上清；最后通过洗脱缓冲液将同芯片表面相结合的生物大分子洗脱下来，磁性分离上清液和磁性芯片，留取上清液。

本发明第三个目的是在第二个目的基础上，提供高分子材料内层掺入了一种荧光染料或量子点荧光材料组成的荧光颗粒的液体芯片系统，包括：

a) 液体芯片：由微米或纳米级芯片粒子和芯片粒子保存缓冲液组成的，其中所述芯片粒子由无毒、生物相容性好的高分子材料内层和可逆结合或释放靶生物大分子的官能团外层组成，该磁性核心选自铁的氧化物、镍的氧化物、钴的氧化物、镍-铁合金或其组合，其中铁的氧化物优选是 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ，其中芯片粒子的高分子材料内层中还掺入了一种荧光染料或量子点荧光材料组成的荧光颗粒，并且通过计算机控制的相应波长激光使该芯片粒子中的荧光颗粒被激发出荧光，从而计算机根据荧光颜色和强度以及芯片粒子表面的官能团鉴别出官能团所结合的靶生物大分子的种类和数量；

b) 液体芯片工作缓冲液：样品修饰缓冲液、结合缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、和/或芯片钝化缓冲液、和/或芯片激活缓冲液。

在一个具体实施方案中，芯片粒子还可以是多种不同的荧光粒子混合物的液体芯片系统，每种荧光粒子的高分子材料内层掺入了不同的荧光染料或量子点荧光材料，因此通过计算机控制的相应的不同波长的激光使该荧光芯片粒子混合物中不同荧光颗粒被激发出不同颜色的荧光和不同强度的荧光，从而计算机根据荧光颜色和强度以及芯片粒子表面的官能团鉴别出官能团所结合的靶生物大分子的种类和数量。

本发明的第四个目的是在前述三个目的的基础上，提供其还包括用于分离磁性芯片粒子与液相的相关配套附件，该附件是对应于填充了磁性的珠子的，这些磁珠需要相应的磁石相配合以达到分离磁珠与液相的目的。配套附件又叫磁架，可以设计成两孔的，两孔相邻部分镶嵌着磁石，适合于单个生物芯片系统；也可以设计成两套八连管形式，

两套八连管之间镶嵌磁石，适合八个样品的分离；同样也可以设计成七个两套八连管的集合体，适合 96 孔板进行的高通亮芯片修饰。其中所述磁架主体材料不限，可以是透明橡胶、塑料等。其工作原理是带有磁性的芯片与样品中生物大分子在样品结合缓冲液中结合，磁性分离，弃上清；芯片洗涤缓冲液对结合后的磁性芯片进行漂洗以去除相应的杂质组分，磁性分离，弃上清；最后通过洗脱缓冲液将同芯片表面相结合的生物大分子洗脱下来，磁性分离上清液和磁性芯片，留取上清液。

另外，对于保存过程中采取保护措施的芯片，设计了芯片恢复液，使得在使用前芯片表面能够获得最佳的状态；为各类表面修饰的芯片提供了针对不同来源样品的结合液，为芯片与目标分离大分子的结合提供最佳的环境；为各类表面修饰的芯片提供了漂洗液，以洗却样品中其他杂质而不影响目标分子与芯片的结合；为各类表面修饰的芯片提供了洗脱液，使得所分离的目标分子成功的从芯片上洗脱以供进一步检测、鉴定和定量。

定义

术语“靶生物大分子”指待检的氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、低聚糖、多糖、脂质中的一种或多种或其混合物。

术语“微米级微珠”或“纳米级微珠”指直径约在 $10\text{-}10^3\mu\text{m}$ 级或 $10\text{-}10^3\text{nm}$ 级的微珠，该微珠具有生理性无毒、生物高相容性的高分子材料内层和可逆结合或释放靶蛋白的官能团外层。

本发明的核心是经表面修饰的固体粒子。这些粒子的材质很特别，是象琼脂糖、聚丙烯酰胺、纤维素等物质形成的聚合物粒子，主要特点是具有化学惰性；如果需要，粒子中可以填充含有磁性的物质从而使粒子可以被磁性物质如磁石所吸附。这些粒子很微小，可以是微米级的粒子也可以是纳米级的粒子；而且粒子形状可以制造成球形的，也可以制造成其他形状如立方体等。

所制备的粒子表面需要经过特殊的修饰，修饰有很多种，如疏水性修饰、亲水性修饰、亲和修饰（如金属亲和等）、弱阴（阳）离子修饰、生物素亲和修饰、蛋白质（抗原、抗体、受体等特殊作用功能的蛋白质）结合修饰、dextran 修饰、脂肪酸修饰等。下面主要介绍几种修饰的特征。

术语“疏水性修饰”，指将微珠表面处理成具有疏水特征的表面，如表面特征修饰 C

骨架等。由于 C 骨架的长短决定着疏水性作用的大小和所分离的多肽的特征，因此不同的疏水能力、不同 C 骨架可结合具有疏水性基团的不同大小的靶蛋白。然后利用多肽中含有疏水基团，可与固定相之间产生疏水作用而达到分离、分析微量靶蛋白的目的。例如，C18 疏水性修饰一般只用来纯化分离 10 个氨基酸以下的多肽和肽的酶消化产物，C8 修饰的微珠可用来分离一般大小的多肽，较大的多肽的分离和纯化需要用到 C3 乃至 C1 修饰的微珠表面。

术语“亲水性修饰”，指将微珠表面处理成具有疏水特征的表面，然后利用多肽中含有亲水性基团（如-OH 基团等等），可与固定相之间产生亲水作用而达到分离、分析微量生物大分子的目的。其中亲水能力同基团数量相关，这些基团可以同具有亲水基团的蛋白相结合。例如，参见文献：Advanced Materials, 2001, 13, 11-22; Chemistry of Materials, 1999, 11, 2389-2399; Chemical Communications, 2002, 350-351; Chemistry of Materials, 2003, 15, 1944-1949。

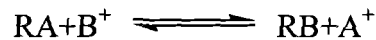
术语“糖基化修饰”，是指将微珠表面暴露于进行糖基化的酶（例如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶），通过将蛋白质通过糖基化酶或去糖基化酶的作用完成糖基化或去糖基化，通过这些物质同生物大分子相结合，从而具有作为配体或受体的靶蛋白相结合的能力。

术语“dextran 修饰”是将粒子表面亲和上 dextran，dextran 上可以通过修饰亲和特异基团，通过这些基团同生物大分子相结合。

术语“脂肪酸修饰”，指将微珠表面亲和上脂肪酸，通过形成疏水的脂肪酸支链形成类似细胞膜的疏水环境，使得细胞膜上的靶膜蛋白通过疏水作用插入并结合到微珠，这样膜蛋白等具有相应可以通过疏水作用插入到细胞膜上的生物大分子结合到珠子上。

术语“离子交换修饰”，指，是将微珠表面处理成具有吸附（弱）阳/阴离子特征的表面，如表面特征的修饰（弱）阴/阳离子，从而特征吸附含有（弱）阳/阴离子的蛋白。离子交换修饰包括（弱）阴/阳离子修饰。由于微珠表面带有许多可电离基团，根据这些基团所带电荷不同，可分为阴离子交换微珠和阳离子交换微珠。含有欲被分离的离子的溶液同微珠混合后，各种离子即与微珠上的荷电部位竞争性结合。微珠表面荷电部位由基团、荷电基团和反离子构成，在水中呈不溶解状态，能释放出反离子。同时它与溶液中的其他离子或离子化合物相互结合，结合后不改变本身和被结合离子或离子化合物的理化性质。微珠表面与水溶液中离子或离子化合物所进行的离子交换反应是可逆的。假定

以 RA 代表阳离子交换剂，在溶液中解离出来的阳离子 A⁺与溶液中的阳离子 B⁺可发生可逆的交换反应，反应式如下：



微珠表面利用其荷电基团，吸附溶液中相反电荷的离子或离子化合物，被吸附的物质随后为带同类型电荷的其他离子所置换而被洗脱。

术语“亲和性修饰”，利用了亲和层析(Affinity Chromatography, AC)的基本原理。亲和层析法是利用生物大分子与某些对应的专一分子特异识别和可逆结合的特性而建立起来的一种分离生物大分子的色谱方法，也叫做生物亲和或生物特异性亲和色谱。这种特异可逆结合的物质很多，如抗原与抗体、底物与酶、激素与受体等，他们间的这种特异亲和能力又叫亲和力。亲和色谱中，一对互相识别的分子互称对方为配体，如激素可认为是受体的配体，受体也可以认为是激素的配体。琼脂糖凝胶上的羟基在碱性条件下极易被溴化氰活化成亚氨基碳酸盐，并能在温和的条件下与氨基等基团作用而引入配体。而固定金属亲和层析(Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)是近年来发展起来的一种亲和方法。其固定相基质上螯合了一些金属离子，如 Cu²⁺、Ni²⁺、Fe³⁺等，可通过配位键螯合侧链含有 Lys、Met、Asp、Arg、Tyr、Glu 和 His 的多肽，特别是肽序列中含有 His-X-X-X-His 的结构最易结合到金属离子亲和柱上，纯化效果较好。

亲和层析法特异可逆结合的物质很多，如抗原与抗体、底物与酶、激素与受体等。因此，术语“亲和性修饰”指根据所分离的生物大分子的类型，将其对应配体的官能团引入微珠表面，以使得微珠作为生物大分子的配体能特异吸附、释放生物大分子。因此，根据生物大分子与其配体的关系，亲和性修饰可包括生物素亲和作用修饰、免疫亲和修饰、凝集素亲和修饰、金属螯合/配位亲和修饰、染料配体亲和修饰、核酸亲和修饰。

例如，术语“生物素亲和修饰”，指将微珠表面亲和结合生物素、亲和素等亲和物质，通过它们同生物大分子相结合。

例如，术语“免疫亲和修饰”，是利用抗体与其相应抗原的作用具有高度的特异性和高度结合力的特点，将靶蛋白的抗原、抗体偶联在微珠表面，以通过这些物质使得微珠与各自互补的靶蛋白相结合。常见的免疫亲和修饰包括单抗亲和修饰、细菌胞壁蛋白 A 和蛋白 G 亲和修饰（它们能够特异结合到免疫球蛋白的 Fc 部分，对不同的免疫球蛋白有不同的结合力）。

例如，术语“凝集素亲和修饰”，指将凝集素引入微珠表面，由于凝集素可特异结合

靶蛋白的寡糖，从而使得微珠特异结合、洗脱纯化靶蛋白。不同的凝集素能够特异地结合某种寡糖或者糖肽，因而借助于凝集素表面修饰可特异、敏感、快速分析具有糖链结构的靶蛋白，例如几乎所有的膜蛋白。

例如，术语“金属螯合/配位亲和修饰”，是利用靶蛋白质表面暴露的一些氨基酸残基和微珠之上的金属离子之间的相互作用，将所述金属离子引入微珠表面，从而特异吸附、洗脱纯化靶蛋白。这些氨基酸残基包括组氨酸、色氨酸、赖氨酸等。目前采用的固定金属离子螯合剂主要有亚氨基二乙酸(IDA)和次氨基三乙酸(NTA)两种。它们都可以有效地与 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 等二价金属离子发生螯合作用，从而将这些金属离子固定在微珠表面上。固定金属亲和层析(Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)是近年来发展起来的一种亲和方法，其固定相基质上螯合了一些金属离子，如 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{3+} 等。因此在微珠表面进行金属螯合/配位亲和修饰时，可通过配位键螯合侧链含有 Lys、Met、Asp、Arg、Tyr、Glu 和 His 的多肽，特别是肽序列中含有 His-X-X-X-His 的结构，使得靶蛋白最易结合到修饰过的微珠表面上，以达到很好的纯化效果。

例如，术语“染料配体亲和修饰”，指将染料三嗪环与羟基反应偶联到微珠表面，在它们之间形成醚键，以作为纯化脱氢酶、激酶、血清蛋白、干扰素、多种血浆蛋白等极好的配体，从而使得微珠吸附、洗脱纯化靶蛋白。常用的染料主要有两类，一类是 Cibacron，另一类是 Procion。这些染料结构中都有三嗪环，环上有 1~2 个可被取代的氯原子。染料的结构类似于某些酶类的底物，如 Cibacron Blue F3GA 与 NAD 的分子结构类似，是许多酶和蛋白质的极有效的吸附剂。

例如，术语“核酸亲和修饰”指将特异核酸片段偶联在微珠上，通过核酸片段可吸附、洗脱对应的核酸结合蛋白以及调节蛋白。通过所述的核酸亲和修饰过的微珠或载体，已经纯化了许多 DNA 结合蛋白，包括转录因子和与 DNA 修复、重组和转座有关的靶蛋白。例如倪菊华等采用偶联 CATTGCT 寡核苷酸的 DNA 亲和层析载体上从发育 13 天鸡胚骨骼肌核抽提物中分离到两种核蛋白。

应当指出的是，由于本发明综合了层析洗脱分离法和蛋白微珠芯片分离法的优点，创造性发明了用于结合、分离、纯化生物大分子的系统及其使用方法。也就是说，本发明的关键是将蛋白微珠芯片分离法的微珠系统，转用到层析洗脱分离领域，从而发明快速、简便的分离微量生物大分子的系统。因此，本发明中所使用的各种材料和修饰、加工过程，如微珠、缓冲液、对微珠的修饰方法，均可使用现有技术。

例如，各种类型的微珠（包括修饰类型）可使用现有的微珠（例如琼脂糖微珠可购自 Sigma Chemicals, St.Louis, MO）。

例如，对于应用现有的天然高分子，再将它们加工成形为微珠，已有一些专利报道，如 JP11181147A (1999)、EP075000A1(1996)、US5064949A(1991)和 JP3028241A(1991)报道了应用纤维素及衍生物制造微珠的方法。WO9119746A(1991)和 EP0087786A(1983)则报道了琼脂和琼脂糖微珠的成形技术。CN1105369A(1995)和 JP62100534A(1987)报道了制造甲壳素微珠的方法。合成高分子微珠一般都是在高分子合成过程中用单体通过如悬浮聚合、乳液聚合或分散聚合的方法来制造的。此外，W.-H. Hou 等报道了单分散的聚酰胺微珠的报道(J.Appl.Polym.Sci.45(1992)1783)。

此外，中国公开专利 CN1353130 公开了一种新型制备颗粒度均匀的高分子微珠方法，其发明原理是首先配制高分子溶液，然后往溶液中滴加沉淀剂，促使高分子溶液相分离，产生富含高分子且尺寸均匀的液珠。在另一种不会沉淀的高分子保护下，控制搅拌速度和温度，使液珠彼此不碰撞以保持尺寸的稳定性，最后液珠转化为高分子均匀微珠或针状微珠。起保护作用的高分子在配制高分子溶液和沉淀剂时加入。

在一个实例中，将欲加工成微珠或针状微珠的高分子称之为高分子甲；将起保护作用的高分子称之为高分子乙；将高分子甲的溶剂称之为溶剂甲，高分子乙也溶解于溶剂甲；将高分子甲的沉淀剂但同时又是高分子乙的溶剂称之为溶剂乙。因此，成形高分子均匀微珠的过程是：

(1)配制高分子甲和乙在溶剂甲中的混合高分子溶液。高分子甲的浓度范围为 0.001-0.1 克/毫升，高分子乙的浓度是高分子甲 0.1-10 倍。此溶液命名为溶液甲。

(2)配制高分子乙在溶剂乙中的高分子溶液。高分子乙的浓度范围为 0.001-0.2 克/毫升，溶剂乙与溶剂甲完全混溶。此溶液命名为溶液乙。

(3)将溶液乙在搅拌下滴入溶液甲中，促使溶液甲相分离。首先产生富含高分子甲的液珠，并逐渐转化为高分子甲的溶胀微珠。溶液乙的用量是溶液甲的 1-10 倍，以保证高分子甲充分沉淀出来。滴加溶液乙时，搅拌速度为 5-500 转/分。温度低于溶剂甲和乙的沸点。

4)用过滤，离心或沉淀的方法分出高分子甲的溶胀微珠。用溶剂乙反复浸泡和洗涤，

不断更换溶剂乙以洗去溶剂甲及少量共沉淀的高分子乙。这时溶胀微珠逐渐收缩，最后得到颗粒度均匀的高分子(甲)微珠。

在该公开专利中，还进一步描述了成形高分子均匀针状微珠的过程是：

(1)配制高分子甲和乙在溶剂甲中的混合高分子溶液。高分子甲的浓度范围为0.001-0.1克/毫升。高分子乙的浓度是高分子甲的0.1-10倍。此溶液命名为溶液甲。

(2)配制高分子乙在溶剂乙中的高分子溶液。高分子乙的浓度范围为0.001-0.2克/毫升。溶剂乙与溶剂甲完全混溶。此溶液命名为溶液乙。

(3)将溶液乙在搅拌下滴入溶液甲中，促使溶液甲相分离。首先产生富含高分子甲的液珠，并逐渐转化为高分子甲的溶胀针状微珠。溶液乙的用量是溶液甲的1-10倍，以保证高分子甲充分沉淀出来。滴加溶液乙时，搅拌速度为100-10000转/分。温度可接近溶剂甲和乙的沸点。

(4)用过滤，离心或沉淀的方法分离高分子甲的溶胀针状微珠。用溶剂乙反复浸泡和洗涤，不断更换溶剂乙，以洗去溶剂甲及少量共沉淀的高分子乙。这时溶胀针状微珠逐渐收缩，最后得到颗粒度均匀的高分子(甲)针状微珠。

术语“芯片粒子保存缓冲液”是存储保藏芯片粒子的系统，主要是保持粒子液体芯片的特殊修饰的稳定性，不同修饰的粒子的液缓冲液不同，组分也不同。

术语“样品修饰缓冲液”是对要修饰样品进行简单修饰以便进行样品与芯片的结合，芯片与样品结合缓冲液为芯片与样品中生物大分子的结合提供了最佳的环境。

术语“芯片洗涤缓冲液”是对结合后的芯片进行漂洗以去除相应的杂质组分，洗脱缓冲液是将同芯片表面相结合的生物大分子洗脱下来。

术语“钝化缓冲液”是可以可逆钝化敏感的芯片表面从而保护芯片。

术语“芯片激活缓冲液”选自将储存状态的芯片上的表面激活到最适状态的液缓冲液系统。

基于本发明工作原理，本发明中所使用的各种缓冲液（包括激活/钝化缓冲液、结合缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱缓冲液）也可使用现有的缓冲液。

例如，在用于选择吸附层析纯化人粒细胞集落刺激因子的微珠体系中，由于微珠表面进行了聚乙二醇的疏水性修饰处理，因此该微珠体系可使用常规的缓冲液，如结合和

洗涤缓冲液为的 50mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH4.5)，而洗脱缓冲液为含 1mol / L NaCl 的 50mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH4.5)。

例如，在用于亲和层析纯化 IgG 单抗的微珠体系中，由于微珠表面进行了蛋白 G 的免疫亲和修饰处理，因此该微珠体系可使用常规的缓冲液，如结合和洗涤缓冲液为 pH7.0、20mmol / L 磷酸缓冲液，而洗脱缓冲液为 pH2.7、0.1mmol / L 甘氨酸盐酸。

例如，在用于亲和层析纯化血小板膜糖蛋白 I、III 受体复合物的微珠体系中，由于微珠（琼脂糖胶珠）表面进行了刀豆素 A（凝集素）的亲和修饰处理，因此该微珠体系可使用常规的缓冲液，如结合和洗涤缓冲液为 20 mmol/ L Tris. HCl、100 mmol/ L Na₂Cl、0.1 %Triton X2-100、1 mmol/ L CaCl₂ (pH 7.4)的缓冲液，而洗脱缓冲液为结合缓冲液中加入 100 mmol/ L α 2 甲基 2D2 甘露糖苷。

例如，在用于亲和层析纯化超氧化物歧化酶的微珠体系中，由于微珠表面进行了二价铜离子的金属螯合修饰处理，因此该微珠体系可使用常规的缓冲液，如结合和洗涤缓冲液为 20mmol / L 磷酸缓冲液(含 0.5mol/L NaCl, pH7.2)，而洗脱缓冲液依次为 20mmol / L 磷酸缓冲液(含 0.5mol/L NaCl, pH7.2)、20mmol / L 磷酸缓冲液(含 0.8mol/L NaCl, pH 6.0)、20mmol / L 磷酸缓冲液(含 0.5mol/L (NH₄)₂SO₄, pH7.8)。

从以上实例可知，由于离子交换层析、选择吸附层析（如疏水作用层析、亲水作用层析、糖基化作用层析、脂肪酸作用层析）、亲和作用层析（如生物素亲和作用层析、免疫亲和层析、凝集素亲和层析、金属螯合/配位亲和层析、核酸亲和层析）都已经广泛用于分离纯化各种生物大分子，因此对于上述层析法所对应的微珠修饰，所涉及的各种缓冲液（活化、结合、吸附、洗涤、洗脱缓冲液等）均是上述层析法中已知的。因此，在使用本发明的系统进行分离、纯化、鉴定微量生物靶分子中，根据所述生物靶分子的现有技术中的提示，本领域技术人员可毫不费力地选择适当的缓冲液。

由于液体芯片表面经过了修饰，很多修饰很敏感，可能会受到外界影响从而影响芯片的存储寿命，因此本发明针对不同的表面修饰设计了相应的保存容易以预防环境对芯片表面的影响。仅以亲和表面修饰蛋白质为例，保存缓冲液中加入了防止蛋白质氧化、酶解等相关的抑制剂。甚至一些芯片的保存缓冲液中所含物质可以可逆钝化敏感的芯片表面从而保护芯片。

附图说明

图 1: 放大的微珠剖面图, 其中 4 为微珠的高分子内层, 5 为高分子外层, 6 为官能团。

图 2: 分离、纯化的微量生物大分子(靶蛋白)的质谱检测图。其中, 图 A 是分离后的酸性靶蛋白的质谱检测图; 图 B 是分离后的金属结合靶蛋白的质谱检测图。

有益效果

该系统具有重复性好、样品处理通量高、操作简便、成本低等优点, 并且具有极广泛的应用领域, 适用于各种生物大分子的分离和纯化。

具体实施方式:

现在仅用参考下面非限制性的实施例的方式进一步描述本发明。但是应当理解, 下面的实施例仅仅是作为例证的, 不应以任何方式当作对上述本发明总体的限制。

实施例一: 微珠的制备

1.壳聚糖微珠

壳聚糖(chitosan), 化学名称(1,4)-A-氨基-A-脱氧-B-D-葡聚糖, 是 N-脱乙酰基氨基葡萄糖的共聚物, 由于壳聚糖及其衍生物无毒, 具有生物降解性及良好的生物相容性, 被广泛用于酶和细胞的固定化载体。

以下是壳聚糖微珠的制备过程: 称取壳聚糖 9, 溶于 300mL 2% 的醋酸溶液中, 连续搅拌 2h 使其充分溶解, 抽滤去除不溶物, 滤液分别加入 Tween-80 10mL、油相分散介质、致孔剂乙酸乙酯、乳化剂及高分子表面改性剂, 50°C 下充分搅拌充分反应 30min, 升温至 60°C, 加入甲醛溶液, 反应 30min, 再加入戊二醛 2.0ml, 调 pH9.0, 升温至 80°C, 反应 60min. 抽滤, 用煤油充分洗涤, 再用无水乙醇洗涤去除残留有机物. 80°C 干燥, 得 20~100 μ m 的壳聚糖微珠。

2.硅胶微珠的制备

(1)将正硅酸乙酯、乙醇和去离子水混合进行水解, 正硅酸乙酯与乙醇的体积比为

1 : 0.25~1, 正硅酸乙酯与水的摩尔比控制在 1 : 2~10 之间; 加入氨水调节 pH 值, pH 值控制在 8~12 之间, 搅拌 6~12 小时, 得到均匀半透明的聚四乙氧基硅烷溶液;

(2)将上述聚四乙氧基硅烷溶液加入水中进行分散, 水与聚四乙氧基硅烷溶液的体积比为 1~4; 再加热溶液, 保持在 80~100℃, 蒸发除去乙醇;

(3)将上述溶液冷却至室温, 用浓盐酸调节 pH 在 2.5~5.0 之间; 边搅拌边加入尿素的甲醛混合溶液聚合, 尿素与甲醛的摩尔比为 1 : 0.5~1.5, 混合溶液的加入量为正硅酸乙酯 : 混合溶液 = 10 : 2~6 体积; 重新调节 pH 值为 2.5~5.0, 5~40 分钟后加入水终止反应, 得到 3~10 μm 的粒径均匀分布有机无机复合微珠, 停止搅拌, 放置过夜陈化; 将有机-无机复合物微珠在 650~750℃灼烧除去有机物, 得 3~10 μm 球形硅胶, 粒径分布范围 $\pm 0.5\mu\text{m}$ 。

3. 共聚物微珠的制备:

(1) 聚乳酸共聚物微珠

材料: 单甲氧基聚乙二醇聚乳酸共聚物 [Monomethoxy-poly(ethylene glycol)-b-poly-dl-lactide, PELA40000 (2000)], 其中 2000 为 MPEG 链段分子量, 40000 为 PELA 分子量], 聚乳酸 [Poly(lactic acid), D,L-PLA, 分子量 40000, 山东医疗器械公司], 聚(乳酸-羟基乙酸) [Poly(lactide-co-glycolide), PLGA, 乳酸和羟基乙酸的摩尔比为 50:50, 分子量 40000, 山东医疗器械公司], 其他试剂均为国产分析纯试剂。

乳化均质机 (T18 Basic, IKA Co., China), 离心机 (CS-6KR, Beckman Co., USA), 激光粒度仪 (Hydro2000MU, Malvern Instruments Co., UK), 场发射扫描电子显微镜 (JSM-6700F, JEOL, Japan)。

微珠制备过程如下: 采用复乳法制备微珠. 先将 0.5 mL 去离子水(内水相 W1)倒入溶有 55 mg 共聚物膜材的 2 mL 乙酸乙酯(Ethyl Acetate, EA, 油相 O)中, 用均质机乳化 15 s. 将该初乳液倒入 15 mL 去离子水(外水相 W2)中, 再复乳化 60 s, 形成 W1/O/W2 型复乳液. 将复乳液倒入 10 mL 去离子水中, 室温下 200 r/min 搅拌 3 min, 使部分乙酸乙酯扩散到外水相中, 进行预固化. 再将其倒入 400 mL 去离子水中, 室温下 500 r/min 搅拌 4 min 进行固化, 使乙酸乙酯完全除去. 用去离子水离心洗涤 3 次, 从而得到大孔

微珠。

(2) 聚偏氟乙烯和聚乙烯醇二甲基乙酰胺的共聚微珠

在 5000 毫升的三口瓶中置入浓度为 0.04 克/毫升的聚偏氟乙烯和 0.02 克/毫升的聚乙烯醇二甲基乙酰胺溶液 1000 毫升。在搅拌下滴加浓度为 0.04 克/毫升的聚乙烯醇水溶液，滴加时注意要等到前一滴所引起的沉淀基本消失方可滴入下一滴。当滴加液达 2000 毫升时溶液出现混浊。继续滴加，直至滴加液总量达 3000 毫升。滴加时搅拌速度为 500 转/分，温度为 95℃。搅拌过夜。第 2 天用离心机在 3000 转/分下收集微珠沉淀物，并不断用水洗，烘干，收率 82%。微珠直径 $d=2.97$ 微米，分散系数 $\varepsilon=0.23$ 。

(3) 二乙酸纤维素和聚乙烯醇二甲基乙酰胺的共聚微珠

在 5000 毫升的三口瓶中置入浓度为 0.02 克/毫升的二乙酸纤维素和 0.04 克/毫升的聚乙烯醇二甲基乙酰胺溶液 1000 毫升。在搅拌下滴加浓度为 0.04 克/毫升的聚乙烯醇水溶液，滴加时注意要等到前一滴所引起的沉淀基本消失方可滴入下一滴。当滴加液达 230 毫升时溶液出现混浊，达 400 毫升时完全混浊。继续滴加，直至滴加液总量达 2000 毫升。滴加时搅拌速度为 250 转/分，温度为 40℃。搅拌过夜。第 2 天滤出微珠，用水反复洗涤，烘干，收率 53%。微珠直径 $d=8.65$ 微米，分散系数 $\varepsilon=0.25$ 。

4. 荧光纳米微珠的制备

将异丙醇和水按照 5: 1 的比例混合，超声 5 分钟。

称取 0.1-0.8mg 的荧光物质异硫氰酸荧光素 FITC，配制成水溶液，超声处理 10 分钟。

取上清层清液倒入三颈烧瓶中，不断搅拌 使其保持分散状态。

取 1mL 的浓氨水，将其缓慢加入到不断搅拌的溶液缓冲液中。

取 1-3mL 的正硅酸乙酯，同样将其缓慢加入到不断搅拌的溶液缓冲液中。

缓冲液在室温的条件下反应 3-5 个小时。

将反应产物倒出，用二次蒸馏水洗涤粒子 3-5 次。清洗后的粒子在 20-50℃ 的温度下真空干燥 5 小时，收集粒子备用。

5.磁性微珠的制备

在剧烈搅拌的条件下，向 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的溶液 ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=2:3$) 中加入 NaOH 溶液。反应过程中保持 pH 值大于 10，80℃ 应 1h。

反应结束后，将盛有反应物的烧杯置于块状磁铁上，静置几分钟，将上清液倾去。用去离子水洗涤反应生成的黑色沉淀物，直到上清液的 pH 值为中性，之后将产物用超声仪分散处理。

然后称取所制备的 Fe_3O_4 磁液(固含量约 10%)，加入到 100 ml 10% (v/v) 的 KH550 的乙醇溶液中，用冰醋酸调节 pH 值至 4.5 左右。在 N_2 保护下升温至 75℃ 反应 2 h，停止反应，冷却至室温，然后用无水乙醇洗两次，再用水洗三次。即可得到磁性微珠。

实施例二：微珠的表面官能团修饰

1.壳聚糖微珠的表面亲和修饰过程

将壳聚糖微珠加适量无离子水,用环氧氯丙烷活化,加入 EDC 和肝素,4℃ 搅拌 24h,得表面亲和修饰的微珠。

将壳聚糖微珠的长链烷基作疏水部分，硫酸基团为亲水部分，合成 N-辛基-O-硫酸壳聚糖(OCS1)，可得到表面亲水性修饰的微珠。

2.纤维素微珠的表面离子交换修饰过程

将洗涤干净的纤维素微珠，加至含 0.1mol/L DEAE 盐酸盐、0.5mol/L NaOH 的溶液中，置 60℃ 下不断搅拌 10h，使其交联-DEAE 弱碱性阴离子交换基团。

3.微珠的金属螯合亲和修饰

将微珠加入 5mol/L 的氢氧化钠溶液中 80℃ 反应 30min；再加入 2: 4: 5 (V:V:V) 的 5mol 氢氧化钠/二甲基亚砷/环氧氯丙烷，40℃ 继续反应 4h；然后再加入 1 mol/L 络合试剂亚氨基乙酸并于 60℃ 水浴反应 4h，最后将微球置于 0.01mol/L 硫酸铜溶液中进行反

应，得到表面螯合金属铜的微球。

4. 荧光微珠的表面氨基修饰

取 20mg 荧光纳米粒子加入 30-50mL 甲醇和丙三醇按 5: 3 比例组成的混合液中，用超声波处理 20-60 分钟。

称取 1-3mLAEAPS[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷，用超声波处理 10-60 分钟。

将上述两种溶液混合均匀，在 60℃ 的条件下反应 5 小时。

取出粒子并用甲醇清洗 3 次，接着在 40-80℃ 真空干燥 2 小时，收集粒子得到表面修饰有氨基的生物功能化的荧光纳米微珠。

实施例三：酸性蛋白、金属结合蛋白的结合、纯化、鉴定

(1) 取 98ul 结合缓冲液于 0.5ml 的 eppendorf 管中，加入 2ul 血清。选取弱阳离子结合分离装置，20—200ul 移液器前端固定分离装置，吸取 EP 管中样品，轻柔来回吸打 5 次，静置 1min。吹弃样品。0.6ml 漂洗缓冲液加入 1.5mlEP 管中，把移液器调节到 120ul 吸取洗涤缓冲液，在另一个 EP 管中中反复吸打三次，弃去洗涤缓冲液，如此重复三次。吸取 20ul 洗脱缓冲液，静置 2mins。把洗脱液吸入一新的 0.2ulEP 管。洗脱液可以进行蛋白质谱检测和鉴定，结果如图 2-A 所示，其中横坐标代表所检测蛋白的质荷比（其中电荷为 1），纵坐标为峰强度，每个质谱峰的峰高对应着蛋白质的相对含量。

(2) 取 98ul 结合缓冲液于 0.5ml 的 eppendorf 管中，加入 2ul 血清。选取 Cu^{2+} 离子结合分离装置，20—200ul 移液器前端固定分离装置，吸取 EP 管中样品，轻柔来回吸打 5 次，静置 5min。吹弃样品。0.6ml 漂洗缓冲液加入 1.5mlEP 管中，把移液器调节到 120ul 吸取漂洗缓冲液，在另一个 EP 管中中反复吸打三次，弃去漂洗缓冲液，如此重复三次。吸取 20ul 洗脱缓冲液，静置 5mins。把洗脱液吸入一新的 0.2ulEP 管。洗脱液可以进行蛋白质谱检测和鉴定，结果如图 2-B 所示，其中横坐标代表所检测蛋白的质荷比（其中电荷为 1），纵坐标为峰强度，每个质谱峰的峰高对应着蛋白质的相对含量。

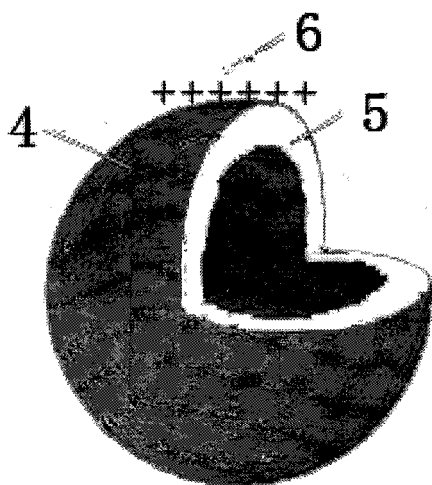


图 1

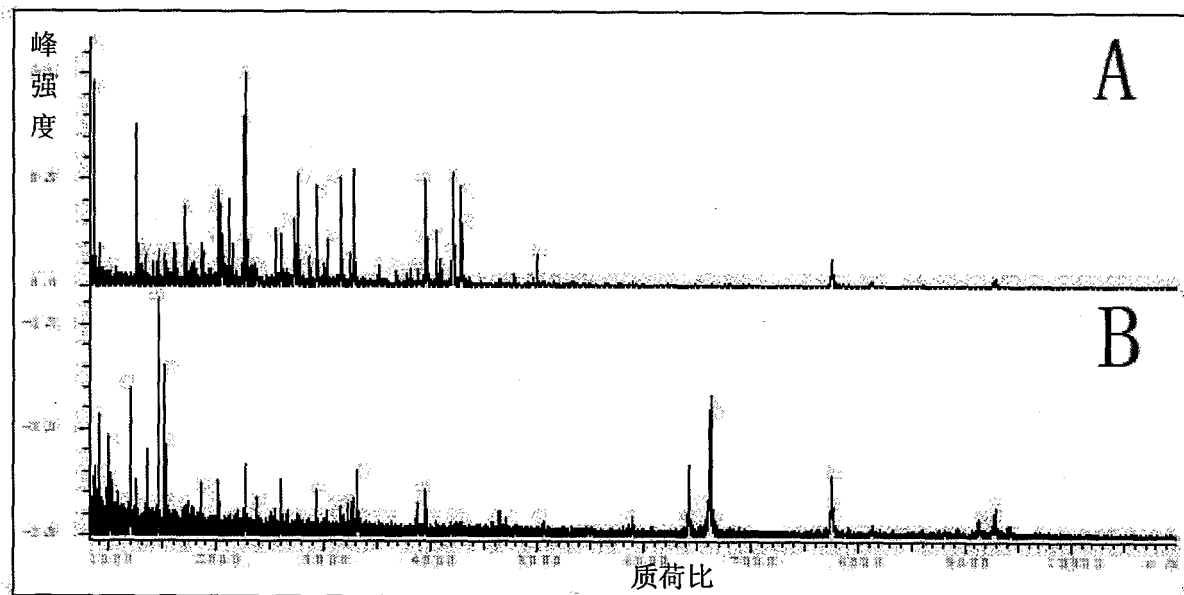


图 2

专利名称(译)	液体生物芯片系统		
公开(公告)号	CN101592655A	公开(公告)日	2009-12-02
申请号	CN200910148151.0	申请日	2009-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	毅新兴业(北京)科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	毅新兴业(北京)科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	毅新兴业(北京)科技有限公司		
[标]发明人	马庆伟 于中连 吕萍萍 任晶 胡晓慧 张燕		
发明人	马庆伟 于中连 吕萍萍 任晶 胡晓慧 张燕		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/547 G01N21/64 C08L5/08 C08L83/06 C08L67/04 C08L27/16 C08L29/04		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于结合、分离、纯化靶生物大分子的液体芯片系统，包括由微米或纳米级芯片粒子和芯片粒子保存缓冲液组成的液体芯片，和液体芯片工作缓冲液：样品修饰缓冲液、结合缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、和/或芯片钝化缓冲液、和/或芯片激活缓冲液。该系统具有重复性好、样品处理通量高、操作简便、成本低等优点，并且具有极广泛的应用领域，适用于各种生物大分子的分离和纯化。

