



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109694809 A

(43)申请公布日 2019.04.30

(21)申请号 201811375056.X

(22)申请日 2018.11.19

(71)申请人 昆山汇先医药技术有限公司

地址 215301 江苏省苏州市昆山市玉山镇
元丰路168号房中试楼101

(72)发明人 颜菁 方欣

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 孙仿卫 李萍

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

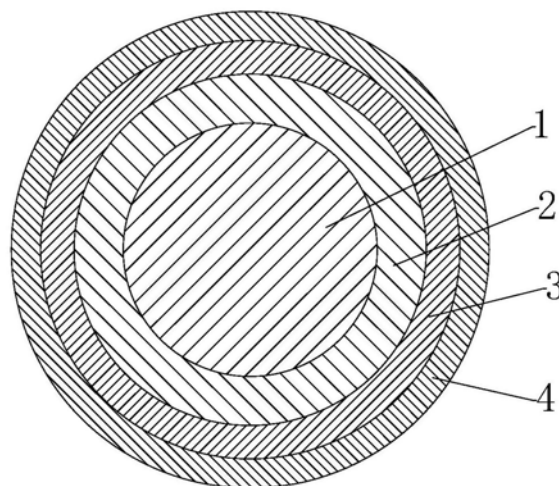
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛及其制备方法。所述捕获筛括高分子层或支化聚合物层,所述高分子层或所述支化聚合物层的原料包括支化聚合物,所述支化聚合物选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合。所述捕获筛具有较高的捕获效率,其能够捕获较多种类的捕获物,如抗体、抗原、适配体、蛋白质。



1. 一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛,其特征在于:包括高分子层或支化聚合物层,所述高分子层或所述支化聚合物层的原料包括支化聚合物,所述支化聚合物选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合。

2. 根据权利要求1所述的捕获筛,其特征在于:所述捕获筛包括由所述支化聚合物形成的所述支化聚合物层。

3. 根据权利要求2所述的捕获筛,其特征在于:所述支化聚合物层形成于高分子层上,所述高分子层形成于保护层上,所述保护层形成于基材层上。

4. 根据权利要求1所述的捕获筛,其特征在于:所述捕获筛包括包含所述支化聚合物的所述高分子层。

5. 根据权利要求4所述的捕获筛,其特征在于:所述高分子层形成于保护层上,所述保护层形成于基材层上。

6. 一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛的制备方法,其特征在于:所述捕获筛包括高分子层及形成在所述高分子的表面的支化聚合物层,所述制备方法包括支化聚合物层制备步骤,所述支化聚合物层的原料选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合;所述支化聚合物层的原料通过物理吸附或化学方法耦合到所述高分子层的表面形成所述支化聚合物层。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述支化聚合物层制备步骤包括:

A、将支化聚合物层的原料溶解于缓冲溶液中制成溶液;

B、采用二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)磷溶液配制生物素PEG溶液;

C、将步骤A和B所制的溶液混合并孵育;

D、向步骤C的混合溶液中加入链霉亲和素并孵育;

E、将具有高分子层的捕获筛半成品放置于步骤D的溶液中进行孵育。

8. 一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛的制备方法,所述捕获筛包括高分子层,其特征在于:所述制备方法包括高分子层制备步骤;所述高分子层的原料包括支化聚合物,所述支化聚合物选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合。

9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述高分子层制备步骤包括:

A、将高分子层的原料溶解于缓冲溶液中制成溶液;

B、采用二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)磷溶液配制生物素PEG溶液;

C、将步骤A和B所制的溶液混合并孵育;

D、向步骤C的混合溶液中加入链霉亲和素并孵育;

E、将捕获筛半成品放置于步骤D的溶液中进行孵育。

用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛及其制备方法。

背景技术

[0002] 微流控芯片技术是把生物学、化学等实验室的基本操作过程集成到一块芯片上,具有集成性、高通量、检测快速、操作便利、所需样本量少、低耗能优点,近年来在药物研究等众多科研与生活领域拥有越来越多的广阔应用前景。用于芯片上细胞分离和捕获的手段涉及光、电、声、磁、流体力学、机械加工以及化学方法等众多领域。微机械加工技术结合流体力学控制用于整体及单个细胞、细菌样本的捕获是目前最有效的固定方式。这种技术往往通过加工尺寸与细胞相匹配的微井、微孔、微坝、微狭缝及微管道等几何陷阱或障碍来捕获细胞,不仅可形成开放阵列体系,还可以在微通道中实现对细胞的控制。

[0003] 随着微加工技术的不断进步,微流控芯片在生物分析中的优势愈显突出,在疾病诊断、药物筛选和细胞分子生物学研究等多个领域里显示出巨大的发展潜力和应用价值。捕获筛是微流控芯片的核心部分,在生物分析领域,捕获筛所采用的高分子聚合物主要有二甲基硅氧烷(PDMS)和聚乙烯(PC)等,其中PDMS因具有良好的生物相容性、光透性和易加工制作等特点,成为最长用的材料之一。然而,现有的捕获筛对生物样本中的蛋白质等生物大分子、细菌和细胞等物质易发生非特异性吸附,影响芯片的生物分析效能。且聚合物表面能量低,缺乏功能化反应所需要的活性基团。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛及其制备方法,该捕获筛具有较高的捕获效率,其能够捕获较多种类的捕获物,如抗体、抗原、适配体、蛋白质。

[0005] 为达到上述目的,本发明采用的一种技术方案为:

一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛,包括高分子层或支化聚合物层,所述高分子层或所述支化聚合物层的原料包括支化聚合物,所述支化聚合物选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合。能够增加捕获物的种类,如抗体、抗原、适配体、蛋白质或其组合。

[0006] 进一步地,所述捕获筛包括由所述支化聚合物形成的所述支化聚合物层。

[0007] 更进一步地,所述支化聚合物层形成于高分子层上,所述高分子层形成于保护层上,所述保护层形成于基材层上。

[0008] 进一步地,所述捕获筛包括包含所述支化聚合物的所述高分子层,支化聚合物与高分子层的其他原料形成交联网络结构,进一步提高了捕获效率。且能够增加捕获物的种类,如抗体、抗原、适配体、蛋白质或其组合。所述高分子层的原料还包括:聚乙烯醇和聚乙二醇和丙烯醇中的一种或两种的混合物、透明质酸、海藻酸钠、羟乙基纤维素、聚乳酸、聚酰

胺、琼脂糖和葡聚糖和壳聚糖中的一种或两种的混合物。通过引入聚乙二醇和/或聚乙烯醇、透明质酸、羟乙基纤维素、聚乳酸、聚酰胺、琼脂糖和/或葡聚糖等进行聚合,活化材料表面,使得高分子材料膜具有很好的亲水性提高了目标分子的捕获效率(可达93%以上)。更进一步地,所述高分子层的原料还包括降解液,所述降解液选自透明质酸酶、纤维素酶中的一种或两种的组合。添加有降解液的高分子层能够进行快速降解,实现捕获物的“无损”脱附及再培养。

[0009] 更进一步地,所述高分子层形成于保护层上,所述保护层形成于基材层上。

[0010] 进一步地,所述基体层的材料为不锈钢;所述保护层的材料为贵金属或其合金。

[0011] 本发明采用的另一种技术方案为:

一种如上所述的用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛的制备方法,所述捕获筛包括高分子层及形成在所述高分子的表面的支化聚合物层,所述制备方法包括支化聚合物层制备步骤,所述支化聚合物层的原料选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合;所述支化聚合物层的原料通过物理吸附或化学方法耦合到所述高分子层的表面形成所述支化聚合物层。

[0012] 进一步地,所述支化聚合物层制备步骤包括:

- A、将支化聚合物层的原料溶解于缓冲溶液中制成溶液;
- B、采用二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)膦溶液配制生物素PEG溶液;
- C、将步骤A和B所制的溶液混合并孵育;
- D、向步骤C的混合溶液中加入链霉亲和素并孵育;
- E、将具有高分子层的捕获筛半成品放置于步骤D的溶液中进行孵育。

[0013] 本发明采用的又一技术方案为:

一种用于捕获生物分子、细胞或细菌的捕获筛的制备方法,所述捕获筛包括高分子层,所述制备方法包括高分子层制备步骤;所述高分子层的原料包括支化聚合物,所述支化聚合物选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合。

[0014] 进一步地,所述高分子层制备步骤包括:

- A、将高分子层的原料溶解于缓冲溶液中制成溶液;
- B、采用二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)膦溶液配制生物素PEG溶液;
- C、将步骤A和B所制的溶液混合并孵育;
- D、向步骤C的混合溶液中加入链霉亲和素并孵育;
- E、将捕获筛半成品放置于步骤D的溶液中进行孵育。

[0015] 本发明的捕获筛包括支化聚合物层,或在高分子层中添加支化聚合物,支化聚合物表面官能团随相对分子质量和分子尺寸递增,提高纳米粒子在聚合物中的分散能力,增加纳米粒子与聚合物的界面结合力,降低了粒子的表面能,消除粒子的表面电荷,提高粒子与有机相的亲合力,减弱粒子的表面极性,并且引入支化聚合物后显示出具有比改性的有机硅酸盐更好的韧性。另外,这种有机无机杂链聚合物的相分离程度由超支化大分子的链端官能团的性质所控制,如使用反应性基团三乙氧基硅作为端基可以得到纳米尺寸的相分离。支化聚合物的“核壳”结构的内核或外壳作为小分子反应的场所,以此来改善捕获筛的性能。通过引入支化聚合物包括聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺等材料,降低了材料的非特

异性吸附和毒性,提高了材料的亲水性和修饰性,同时材料和液体易于分离,无需离心操作,可高效捕获细胞、细菌及目标生物分子,并且捕获后的细胞活性无明显损伤。

[0016] 本发明采用以上方案,相比现有技术具有如下优点:

通过在捕获筛的表层引入支化聚合物(包括聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺等材料),降低了材料的非特异性吸附和毒性,提高了材料的亲水性和修饰性,同时材料和液体易于分离,无需离心操作,可高效捕获细胞、细菌及目标生物分子,捕获效率高达93%以上,能够增加捕获物的种类,如抗体、抗原、适配体、蛋白质或其组合,并且捕获后的细胞活性无明显损伤。

附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1是根据本发明的一种捕获筛的截面示意图;

图2是根据本发明的另一种捕获筛的截面示意图。

具体实施方式

[0019] 下面结合附图对本发明的较佳实施例进行详细阐述,以使本发明的优点和特征能更易于被本领域的技术人员理解。在此需要说明的是,对于这些实施方式的说明用于帮助理解本发明,但并不构成对本发明的限定。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以互相结合。

[0020] 实施例1

本实施例提供一种捕获筛,其能够用于微流控芯片中捕获生物样本中的分子(尤其是生物大分子)、细胞和细菌等物质。图1示出了该捕获筛的局部截面图。参照图1所示,所述捕获筛由基材层1、保护层2、高分子层3、支化聚合物层4及功能材料层(图中未示出)组成。当包含生物分子、细菌或细胞的流体流过捕获筛时,捕获筛将捕获物通过物理作用固定在捕获筛上,达到捕获的目的。

[0021] 基材层1的材料为不锈钢,其上形成有多个微米级的供流体通过的孔道,孔道的孔径为微米级,各孔道相互平行或并列。

[0022] 保护层2形成于基材层1上,如覆盖在基材层1的外表面上,具体为覆盖形成于各孔道的孔壁上。保护层2为金属保护层,其材料为贵金属或其合金,具体为金、镍、铁等贵金属或其合金。

[0023] 高分子层3形成于保护层2上,如覆盖在保护层2的外表面上。高分子层3的原料包括:聚乙烯醇、聚乙二醇、丙烯醇中的一种或多种的混合物,透明质酸,海藻酸钠,羟乙基纤维素,聚乳酸,聚酰胺,琼脂糖、葡聚糖、壳聚糖中的一种或多种的组合等,其由上述材料的一种或多种的混合物。该高分子层的原料还包括降解液,降解液选自透明质酸酶、纤维素酶中的一种或两种的组合。

[0024] 支化聚合物层4形成于高分子层3上,如覆盖在高分子层3的外表面上。支化聚合物层4的原料选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯

醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合。

[0025] 功能材料层形成于支化聚合物层4上,具体包括耦合至支化聚合物层4上的捕获物,如抗体、噬菌体等。

[0026] 上述捕获筛的制备方法如下:

步骤1、基体层制备:提供不锈钢,在不锈钢上形成多个平行的微米级流体孔道,形成筛状结构,得到具有微米级流体孔道的不锈钢基体层;

步骤2、镀层(即所述保护层)制备:采用物理气相沉积(PVD)或化学气相沉积(CVD)方法在基体层的各孔道的壁上镀金属或金属合金,在基体层的各孔道的壁上覆盖形成金属保护层;

步骤3、生物大分子层(即所述高分子层)包裹:将上述高分子层的原料通过采用物理吸附或化学反应方法耦合到孔道中金属保护层的表面;

步骤4、支化聚合物层制备:将上述支化聚合物层的原料通过化学或物理方法耦合到孔道中高分子层的表面。

[0027] 步骤5、功能材料层制备:将捕获物(如抗体、噬菌体等)通过物理或化学方法耦合到支化物层

上述步骤3具体如下:

步骤3-1、将聚乙烯醇和聚乙二醇和丙烯醇中一种或两种的混合物、透明质酸、海藻酸钠、羟乙基纤维素、聚乳酸、聚酰胺、琼脂糖和葡聚糖和壳聚糖中的一种或两种的混合物、降解液(透明质酸酶和/或纤维素酶)溶解于pH为8的PBS-EDTA溶液中,配置成溶液A,各组分的质量百分比分别为3-10%、8-15%、0.1-6%、4-12%、4-18%、0.5-5%、10-20%、0.1-6%。

[0028] 步骤3-2、采用pH为8的PBS-EDTA溶液配制0.8mM的DTT(二硫苏糖醇)或者TECP(三(2-羧乙基)膦)溶液B。

[0029] 步骤3-3、将溶液A和溶液B按照体积比1:1混合得到溶液C。

[0030] 步骤3-4、将清洁后的由步骤2制得的捕获筛放置于溶液C中,在摇床上孵育12h;

步骤3-5、采用PBS-EDTA溶液清洗捕获筛,获得生物大分子层包裹的捕获筛。

[0031] 上述步骤4具体如下:

步骤4-1、支化聚合物制备:将聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺-胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇的混合物溶解于pH为8的PBS-EDTA缓冲溶液中,配置成溶液D,各组分的质量百分比为5-20%、1-16%、0.1-8%、2-16%、2.5-10%、3-15%、0.1-3%、2-12%。

[0032] 步骤4-2、采用pH为8的PBS-EDTA溶液配制0.8mM的DTT(二硫苏糖醇)或者TECP(三(2-羧乙基)膦)溶液E。

[0033] 步骤4-3、采用溶液E配制1mM的生物素PEG溶液F,将溶液D和F按照1:1混合得到溶液G,溶液G室温孵育12h。

[0034] 步骤4-4、向溶液G中加入链霉亲和素,室温孵育1h,得到溶液H;

步骤4-5、将由步骤3-5制得的捕获筛半成品放置于溶液H中,摇床中孵育3h;

步骤4-6、采用PBS-EDTA溶液清洗捕获筛,获得支化聚合物层包裹的捕获筛。

[0035] 实施例2

本实施例提供一种捕获筛,其能够用于微流控芯片中捕获生物样本中的分子(尤其是生物大分子)、细胞和细菌等物质。图2示出了该捕获筛的局部截面图。参照图2所示,该捕获

筛与实施例1的捕获筛的区别在于：该捕获筛由基材层1、保护层2、高分子层3' 及功能材料层(图中未示出)组成，支化聚合物被加入在高分子层3' 的原料中。其中，基材层1和保护层2同实施例1。

[0036] 高分子层3' 的原料包括：聚乙烯醇、聚乙二醇、丙烯醇中的一种或多种的组合，透明质酸，海藻酸钠，羟乙基纤维素，聚乳酸，聚酰胺，琼脂糖、葡聚糖、壳聚糖中的一种或多种的组合等，其由上述材料的一种或多种的组合形成。该高分子层3' 的原料还包括的降解液，降解液选自透明质酸酶、纤维素酶中的一种或两种的组合。该高分子层3' 的原料还包括支化聚合物，支化聚合物选自聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺、聚酰胺、聚酯酰胺、聚(酰胺-酯)、聚苯醚、聚乙二醇中的一种或多种的组合。

[0037] 功能材料层形成于高分子层3' 上，具体包括耦合至高分子层3' 上的捕获物，如抗体、噬菌体等。

[0038] 上述捕获筛的制备方法如下：

步骤1、基体层制备：提供不锈钢，在不锈钢上形成多个平行的微米级流体孔道，形成筛状结构，得到具有微米级流体孔道的不锈钢基体层；

步骤2、镀层(即所述保护层)制备：采用物理气相沉积(PVD)或化学气相沉积(CVD)方法在基体层的各孔道的壁上镀金属或金属合金，在基体层的各孔道的壁上覆盖形成金属保护层；

步骤3、生物大分子层及支化聚合物层(即所述高分子层)制备：将上述高分子层的原料通过物理吸附或化学反应耦合到孔道中金属保护层的表面。

[0039] 步骤4、功能材料层制备：将捕获物(如抗体、噬菌体等)通过物理或化学方法耦合到支化物层

上述步骤3具体如下：

步骤3-1、将聚乙烯醇和聚乙二醇和丙烯醇中的一种或两种的混合物、透明质酸、海藻酸钠、羟乙基纤维素、聚乳酸、聚酰胺、琼脂糖和葡聚糖和壳聚糖中的一种或两种的混合物、降解液(透明质酸酶和/或纤维素酶)、支化聚合物(聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺)在pH为8的PBS-EDTA溶液中搅拌溶解，配置成共聚物溶液A，各组分的质量百分比为3-10%、8-15%、0.1-6%、4-12%、4-18%、0.5-5%、10-20%、0.1-6%、0.1-20%；

步骤3-2、采用pH为8的PBS-EDTA溶液配制0.8mM的DTT(二硫苏糖醇)或者TECP(三(2-羧乙基)膦)溶液B；

步骤3-3、采用溶液B配制1mM的生物素PEG溶液C，将溶液A和溶液C按照1:1混合得到溶液D，溶液D室温孵育12h；

步骤3-4、向溶液D中加入链霉亲和素，室温孵育1h，得到溶液E；

步骤3-5、将清洗后的由步骤2制得的捕获筛半成品放置于溶液E中，摇床孵育3h；

步骤3-6、采用PBS-EDTA溶液清洗捕获筛，获得生物大分子层及支化包裹的捕获筛。

[0040] 本发明在分子层的表面覆着上支化聚合物层，或在分子层中添加支化聚合物，支化聚合物表面官能团随相对分子质量和分子尺寸递增，提高纳米粒子在聚合物中的分散能力，增加纳米粒子与聚合物的界面结合力，降低了粒子的表面能，消除粒子的表面电荷，提高粒子与有机相的亲合力，减弱粒子的表面极性，并且引入支化聚合物后显示出具有比改性的有机硅酸盐更好的韧性。另外，这种有机无机杂链聚合物的相分离程度由超支化

大分子的链端官能团的性质所控制,如使用反应性基团三乙氧基硅作为端基可以得到纳米尺寸的相分离。支化聚合物的“核壳”结构的内核或外壳作为小分子反应的场所,以此来改善捕获筛的性能。通过引入支化聚合物包括聚丙烯酰胺、丙烯酰胺、聚醚胺等材料,降低了材料的非特异性吸附和毒性,提高了材料的亲水性和修饰性,同时材料和液体易于分离,无需离心操作,可高效捕获细胞、细菌及目标生物分子,并且捕获后的细胞活性无明显损伤。

[0041] 此外,本发明提供的捕获筛,通过在金属保护层表面覆着上可降解高分子聚合物涂层,通过各种高分子材料的配比,引入聚乙二醇、聚乙烯醇、透明脂、透明质酸、海藻酸钠、羟乙基纤维素、聚乳酸、聚酰胺、琼脂糖或葡聚糖或壳聚糖等进行聚合,活化材料表面,使得高分子材料膜具有很好的亲水性。本发明在共聚物中加入降解液,在洗脱目标分子阶段能够实现“无损”洗脱或再培养。一方面提高了目标分子的捕获效率,另一方面在聚合物材料中添加降解液,提高了目标捕获物的洗脱效率。

[0042] 本发明的捕获筛具有如下特点:(1)本发明的捕获筛,是将目标分子(生物小分子, DNA, RNA, 抗体蛋白等)通过光交联共价连接在在聚合物捕获筛载体上,与常规的捕获筛相比,其抗非特异性能力有大幅提高,大大提高了药物靶标的捕获成功率,达到93%。(2)本发明采用的高分子共聚物和支化聚合物能够增加捕获物的种类,如抗体、抗原、适配体、蛋白质或其组合。(3)整个杂交过程非特异性吸附小,无明显的相互交叉干扰。(4)高分子材料制成的捕获芯片材料价格低、易加工,适于工业大量生产,样品试剂消耗少,可以根据生化分析的需要进行各种生物化学改性,满足生化分析的需要,成本低、批量化制造,高分子材料的组成配比非单一材料,能够根据配比情况能够满足微流控芯片的工艺需求。(5)本发明捕获筛采用的添加有降解液的高分子层能够进行快速降解,实现捕获物的“无损”脱附及再培养,洗脱效率达85%以上。

[0043] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,是一种优选的实施例,其目的在于熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限定本发明的保护范围。凡根据本发明的原理所作的等效变换或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

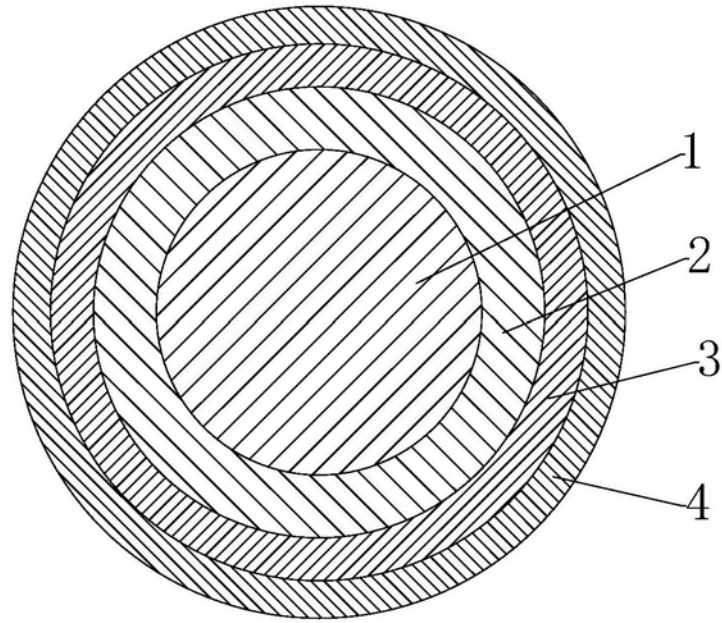


图1

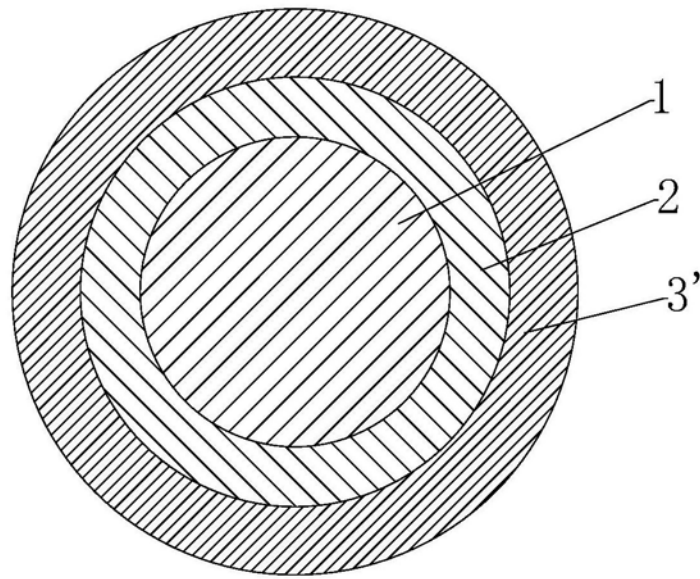


图2