

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/50

G01N 33/543

G01N 21/55



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01132289.6

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1218180C

[22] 申请日 2001. 11. 23 [21] 申请号 01132289. 6

[71] 专利权人 上海数康生物科技有限公司

地址 200233 上海市钦州北路 1089 号 51 号
楼 4 楼

[72] 发明人 胡赟熙

审查员 刘 铭

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

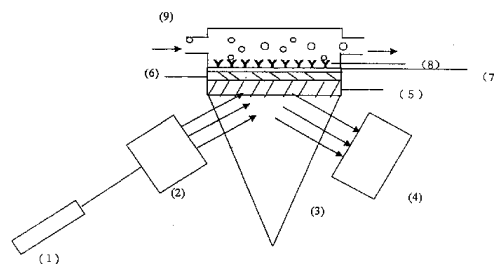
代理人 衷诚宣

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 6 页

[54] 发明名称 并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种基于表面等离子体共振 (SPR) 原理、可以并行检测多个生物学信号的生物传感器。该生物传感器依次由基质, 金属膜, 化学修饰层, 交联剂层和生物单分子层构成, 其特征在于: 在生物单分子层的不同位置结合了多种生物分子, 可并行定量检测生物样品中特定目标分子的浓度, 并可以应用于疾病指标的检测, 具有临床诊断应用的价值。本发明还提供了该生物传感器的制备方法和使用方法。本发明所述生物传感器使用方便, 检测灵敏。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器，该生物传感器依次由基质，金属膜，化学修饰物层，交联剂层和生物单分子层构成，其特征在于此生物单分子层的不同位置含有不同的生物分子，点与点之间的距离大于 1mm，所用的生物分子的浓度为 0.05mg/ml—20.0mg/ml。

2、如权利要求 1 所述的并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器，其特征在于其中所述的生物单分子层点有抗原、抗体，激素、受体，生物素、抗生物素蛋白，底物、酶或辅酶和核酸分子。

3、如权利要求 1 所述的并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器，其特征在于其中所述的基质选用玻璃、硅片或其他硬质固体材料。

4、如权利要求 1 所述的并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器，其特征在于其中所述的基质为连续或不连续的基质。

5、如权利要求 1 所述的并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器，其特征在于其中所述的金属膜为厚度在 20-90nm 的 Au 膜或 Ag 膜。

6、如权利要求 1 所述的并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器，其特征在于其中所述的化学修饰物层所用的化学修饰剂为 11-巯基烷二酸、氨基硫酚、氨基硫醇、巯基乙二胺、十六烷巯基醇或其他含硫试剂。

7、如权利要求 1 所述的并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器，其特征在于其中所述的交联剂层选用的交联剂为 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺或戊二醛。

8、权利要求 1 所述的并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器的制备方法，其特征在于该生物传感器是通过下述技术方案获得的：

- 1) 在基质的表面镀上金膜，使金属膜的厚度为 20-90nm；
- 2) 此基质依次在浓硫酸：过氧化氢=1.5—4:1 的溶液、丙酮溶液或酒精溶液、二次水溶液中超声清洗，干燥；
- 3) 此基质浸于含有巯基的化学修饰物溶液中组装 3—24 小时；

- 4) 依次在酒精溶液和二次水溶液中清洗，干燥；
- 5) 在交联剂中，组装 3-24 小时；
- 6) 用加样器将多种生物分子按一定顺序定量点制在上述基质表面的不同位置；点与点之间的距离大于 1mm，所用的生物分子的浓度为 0.05mg/ml—20.0mg/ml；
- 7) 浸于 0.01—0.5%w/vBSA 封闭液中封闭过夜，2-8℃保存。

并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器及其制备方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种基于表面等离子体共振原理的、可以并行检测多个生物学信号的生物传感器。

背景技术

21 世纪是生物学发展的时代，特别是生物科学与计算机科学经融合产生的生物信息学将得到蓬勃的发展。传感技术是信息科学的主要技术之一，是信息获取的手段。利用传感技术获取生物样品的信息是生物检测技术发展的重要内容。

其中，光学方法由于其具有非破坏性和高灵敏度的特点被视为是最成熟和最好的生物传感技术。自 1902 年,Wood 在光学实验中首次发现了表面等离子体共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 现象以来，SPR 仪器和 SPR 生物传感器的研究一直受到关注。

表面等离子体共振 SPR 是一种物理光学现象。形成 SPR 现象的必要条件之一是金属和电介质间的界面存在。当入射光以某一特定的角度入射时，其反射率会显著减少，此入射角度即为 SPR 角。附着在金属表面的物质不同，其 SPR 角不同，而同一种物质，附着在金属表面的量不同，其 SPR 角也不相同。根据上述原理，SPR 生物传感器可以将已知的生物分子固定在几十纳米厚的金属膜表面，当它与互补的目标生物分子结合时，由于表面结构的改变将导致 SPR 角改变，并且根据 SPR 角的改变值，可以得知结合的目标生物分子的种类及浓度。目前，SPR 传感器已用于生物分析领域。

世界上已有一些基于 SPR 原理的生物传感器产品，以瑞典的 Biacore AB 的 Biacore 系列生物传感器为例，它的制备方法是 100nm 厚的金膜固定在玻璃基质上，将此玻璃片嵌在一个塑料平板夹里，用一种折射率与棱镜匹配的聚合物将芯片耦合到玻璃棱镜上。在芯片表面固定一层葡聚糖分子层，使它较容易与其它生物大分子偶联。它以发光二极管为光源，用线性阵列发光二极管作为检测器，检测不同入射角处的反射光强度。但这只完成了单点 SPR 的检测，一次只能对一种物质进行检测，这在一定程度限制了它的应用。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是在现有 SPR 技术基础上提供一种可以进行多点并行检测的 SPR 生物传感器。

本发明 SPR 生物传感器依次由基质、金属膜、化学修饰物层、交联剂层和生物单分子层构成，此生物单分子层在不同位置含有不同的生物分子。

本发明的基质可以是连续基质，也可为不连续的基质，材料可选用玻璃、硅片或其他硬质固体材料。在基质的外部镀上厚度为 20-90nm 的金属膜，金属膜优选 Au 膜或 Ag 膜。在金属膜表面涂有化学修饰物层以产生一层多聚阴离子表面，此化学修饰物可以是 11-巯基烷二酸 (MUA)、氨基硫酚、氨基硫醇、巯基乙二胺、十六烷巯基醇或其他含硫试剂。在化学修饰物的表面联有交联剂，交联剂可选用 EDAC (1-Ethyl-3(3-Dimethylamino-propyl)carbodiimide, 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺)、戊二醛等，在交联剂层上按一定顺序点有多种生物分子，如抗原、抗体，激素、受体，生物素、抗生物素蛋白，底物、酶或辅酶，核酸分子等，形成生物单分子层。

上述生物传感器与 SPR 检测仪配套使用，可实现对生物样品中多个生物学信号并行检测。

本发明所要解决的另一个技术问题是提供上述生物传感器的制备方法。

本发明生物传感器是通过下述技术方案获得的：

1. 在基质的表面镀上金膜，使金属膜的厚度为 20-90nm；
2. 此基质依次在浓硫酸：过氧化氢=1.5—4:1 的溶液、丙酮溶液或酒精溶液、二次水溶液中超声清洗，干燥；
3. 此基质浸于含有巯基的化学修饰物溶液中组装 3—24 小时；
4. 依次在酒精溶液和二次水溶液中清洗，干燥；
5. 在交联剂中，组装 3-24 小时；
6. 用加样器将多种生物分子按一定顺序定量点制在经过上述步骤处理过的基质表面的不同位置；点与点之间的距离大于 1mm，各生物分子的浓度从 0.05mg/ml—20.0mg/ml 不等。
7. 浸于 0.01—0.5% (w/v) BSA 封闭液中封闭过夜，2-8℃ 保存。

本发明的再一目的是提供上述生物传感器在多个生物学信号并行检测中的应用。

本发明生物传感器可用于并行检测待测样品中的多种抗原、抗体、激素、受体、生物素、抗生物素蛋白、底物、酶或辅酶和核酸分子等。

检测时，可用激光光源发出的单束激光对传感器进行扫描，也可

用空间滤波器 (Spatial Filter) 对单束激光进行扩束, 使其可以同时照射传感器的整个表面。当待测溶液接触 SPR 生物传感器时, 其生物单分子层的各生物分子与待测样品溶液中的目标分子特异性结合, 形成复合物, 使生物单分子层的表面结构发生变化。这一变化可导致该单分子层上各生物分子处的 SPR 现象的改变, 通过 SPR 检测仪可检测 SPR 角的变化。

本发明所述 SPR 生物传感器通过下述方式实现多个生物学信号并行检测:

- 1) 用完全相同的上述 SPR 生物传感器分别检测几份含有多种可与生物传感器上的生物分子特异性结合的目标分子, 且各目标分子浓度已知并依次递增的样品, 通过 SPR 检测仪记录不同时刻 t 、生物传感器上各生物分子处的 SPR 角 ω 的变化, 根据 ω 与 t 的关系作动力学曲线。
- 2) 由动力学曲线可以得到反应达到平衡后, 生物传感器上各生物分子的 SPR 平衡角 ω_0 值, 作此角度值与该点对应的目标分子浓度 C 的相关曲线, 即得到对应于各目标分子的 ω_0/C 曲线 (称为标准曲线), 上述标准曲线置于检测仪数据库中备用。
- 3) 当检测未知浓度的溶液时, 同 1) 仍根据生物传感器上各点的 SPR 角 ω 与时间 t 的关系作动力学曲线。
- 4) 同 2), 由动力学曲线找出各 SPR 平衡角 ω_0 值, 将 ω_0 值与对应的目标分子的标准曲线对照, 可得出该目标分子的浓度。从而达到对多种目标分子进行定量检测的目的。

目前的单点 SPR 检测主要应用在研究领域, 本发明的多点 SPR 检测, 它的意义在于临床上的应用。如: 目前对于肿瘤的早期检测, 大多采用生化检测, 但是, 单指标 (单一的肿瘤标志物) 的检测并不足以帮助医生作出正确的判断, 因为单指标检测的假阳性和假阴性都相当高, 因此对多个肿瘤标志物进行并行检测, 可以大大提高诊断的准确度。

本发明所述并行检测多个生物学信号的表面等离子体共振生物传感器, 使用方便, 检测灵敏, 有助于准确检测各种疾病, 具有广泛的临床应用价值。

附图说明

图 1 SPR 生物传感器结构及检测示意图

(1) 为激光光源, (2) 为空间滤波器 (Spatial Filter), (3) 为

光学耦合器件，(4)为光电探测器，(5)(6)(7)(8)构成生物传感器，(5)为镀有金属膜的基质，(6)为化学修饰物层，(7)为交联剂(8)为单分子生物膜，(9)为待测样品。

图2 传感器上生物分子点样示意图

图3 ω/k 动力学曲线示意图

图4 标准曲线示意图

图5 A1、A2、B1、B2 分别表示实施例1点样点，5.1、5.2、5.3、5.4 是对应于点 A1、A2、B1、B2 的反射率 I/入射角 A 的曲线

图6 6.1、6.2、6.3、6.4 分别是图5中 A1、A2、B1、B2 点对应的 ω/k 动力学曲线

图7 7.1、7.2、7.3、7.4 分别是实施例1AFP、CEA、PSA、Ferritin 的 ω/c 标准曲线

具体实施方式

实施例1

选用材料：

- 1) 镀有 Au 膜的玻璃片
- 2) 化学修饰物：11-巯基烷二酸 (MUA)
- 3) 交联剂：0.1%EDAC
- 4) 生物分子：0.6mg/ml 的抗 AFP (甲胎蛋白) 单抗、1.0mg/ml 的抗 CEA (癌胚抗原) 单抗，0.5mg/ml 的抗 PSA (前列腺特异抗原) 单抗、0.5mg/ml 的抗 Ferritin (铁蛋白) 单抗。
上述单抗均来源于美国 Biodesign 公司
- 5) 血清样品：来源于上海市第六人民医院。

制备方法：

- 1) 将镀有 Au 膜的玻璃片在浓硫酸：过氧化氢=7：3 的溶液、酒精溶液、二次水溶液中各超声清洗 5 分钟，室温吹干；
- 2) 将上述玻片浸于 11-巯基烷二酸 (MUA) 中室温组装 24 小时；
- 3) 依次在酒精溶液和二次水溶液中各清洗 5 分钟，室温吹干；
- 4) 浸于交联剂 0.1%EDAC 溶液中，室温组装 24 小时
- 5) 用微量加样器将 0.6mg/ml 的抗 AFP 单抗、1.0mg/ml 的抗 CEA 单抗 0.5mg/ml 的抗 PSA 单抗、0.5mg/ml 的抗 free-PSA 单抗如图 5 所示定量点制在上述基质表面的不同位置；点与点之间的距离为 2.5mm，点样量为 1 μ l。

如图 5，点 A1：抗 AFP 单抗，点 A2：抗 CEA 单抗，点 B1：抗

PSA 单抗, 点 B2: 抗 Ferritin 单抗

6)、浸于 0.1% (W/V)BSA 封闭液中封闭过夜。

用上述生物传感器来检测血清。将上述生物传感器置于光学耦合器件如图 1 (3) 上, 使待测血清接触其表面, 光电检测器 (4) 可记录生物传感器上各单抗处的 SPR 现象的变化, 如图 5 中 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 所示, 经过计算机处理可得出各点的 ω/k 动力学曲线, 各点的动力学曲线如图 6 所示。从图 6.1 至 6.4, 可分别以得出抗 AFP、CEA、PSA、Ferritin 的 SPR 平衡角 ω_0 , 将平衡角 ω_0 与各目标分子的标准曲线对应, 如图 7, 从图 7.1 至 7.4, 可得出此血清中 AFP、CEA、PSA、Ferritin 的浓度: CEA 浓度为 24ng/ml; AFP 浓度为 17ng/ml; PSA 浓度为 3ng/ml; Ferritin 浓度为 205ng/ml。

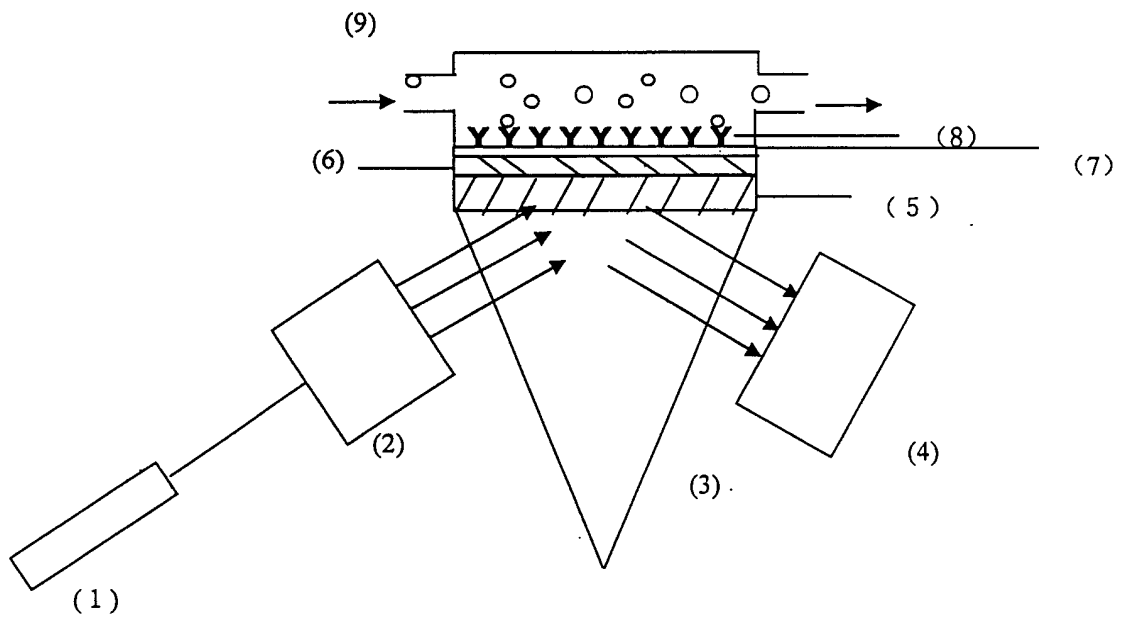


图 1

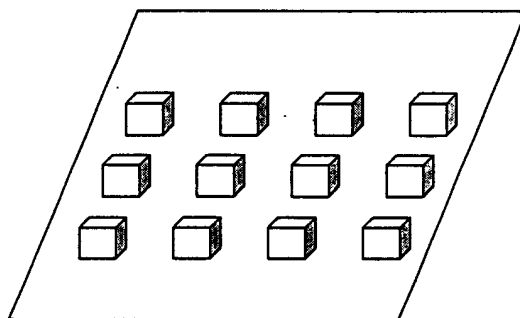


图 2

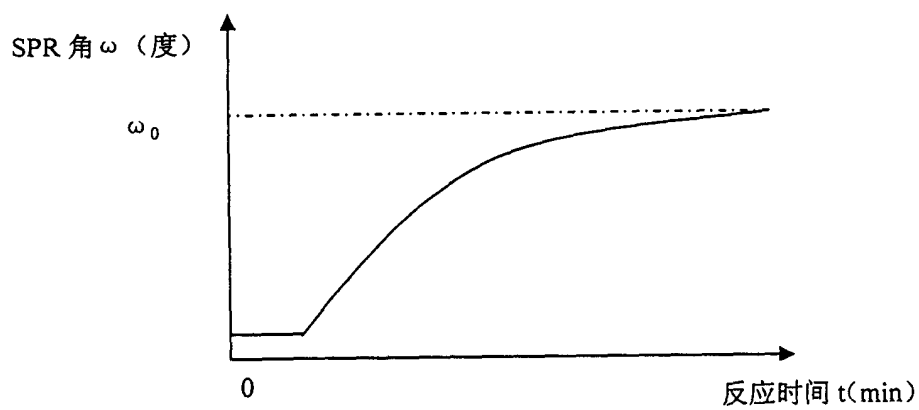


图 3

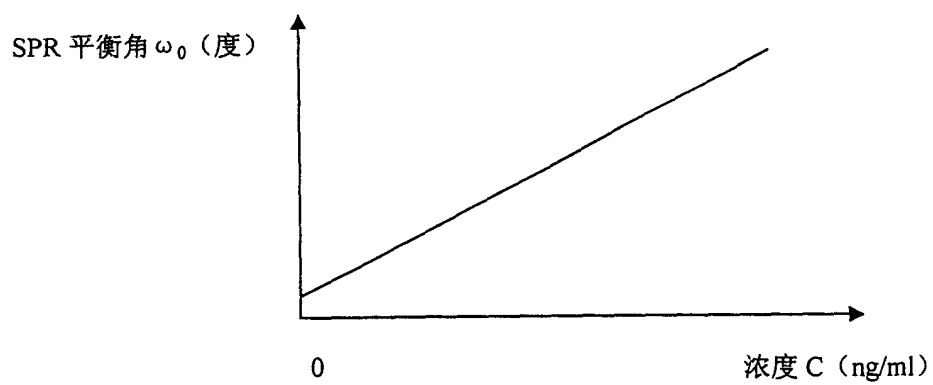


图 4

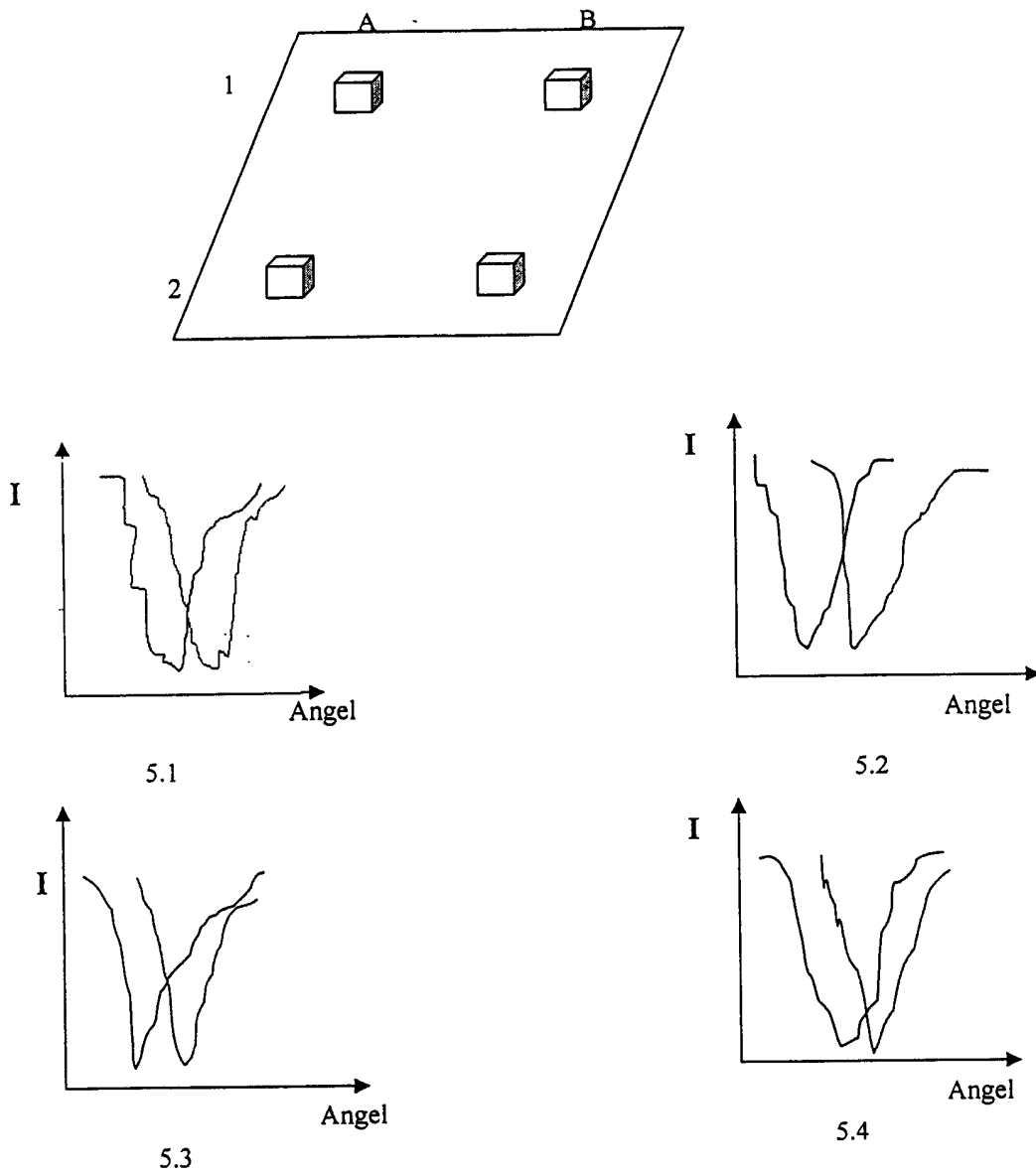


图 5

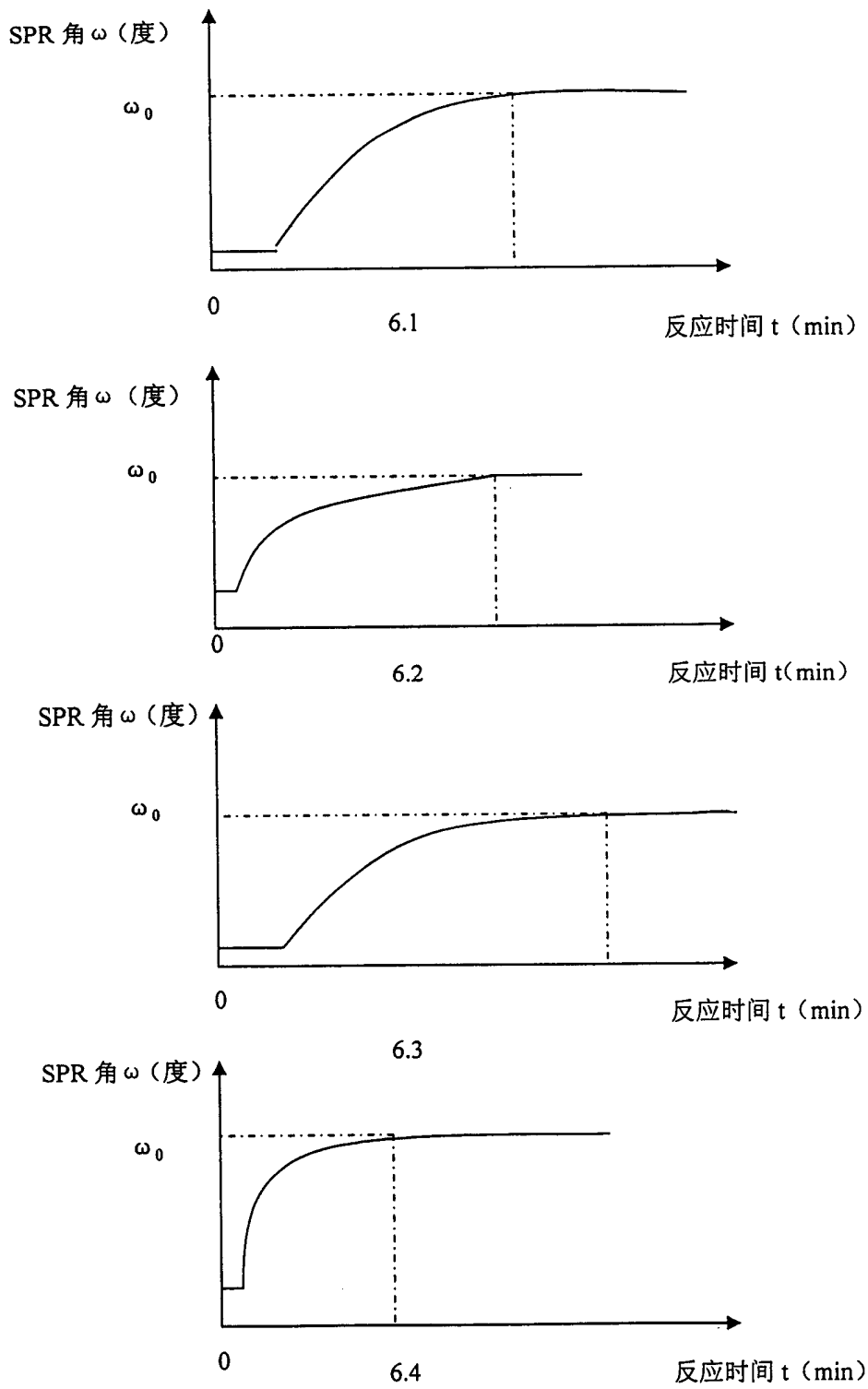
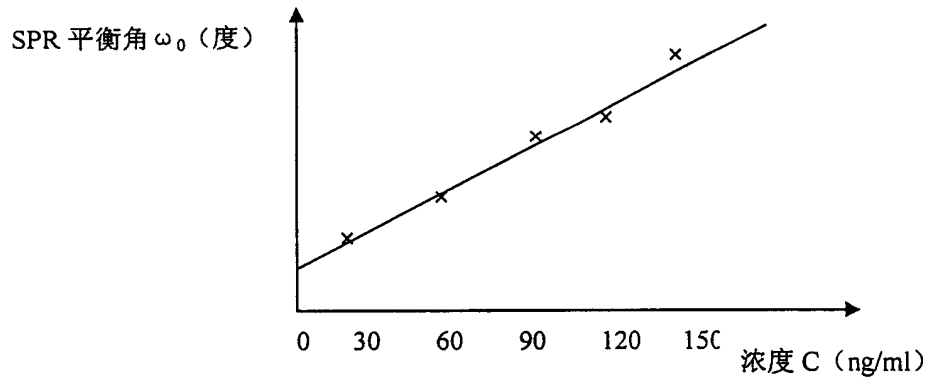
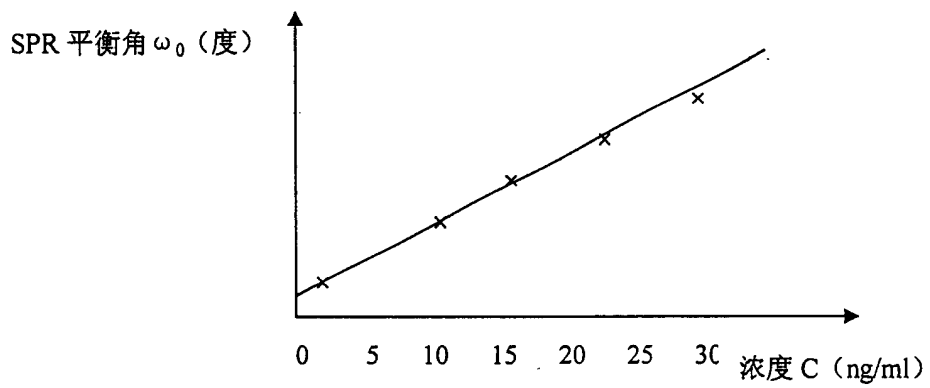


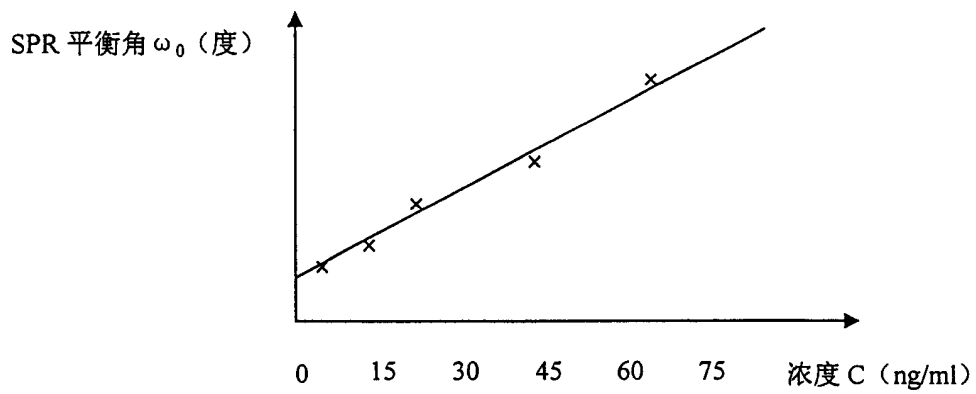
图 6



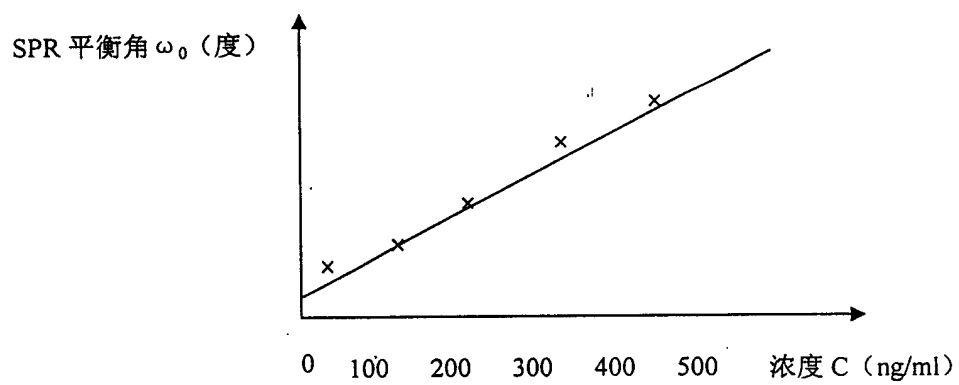
7.1



7.2



7.3



7.4

图 7