

生物传感芯片的回收及 CM 芯片的重制

郭爽¹, 管祥辰¹

(1.南开大学 药物化学生物学全国重点实验室, 天津 300350)

摘要: 生物分子相互作用分析仪基于表面等离子共振 (SPR) 技术, 是一种实时、无需标记的经典分子相互作用技术。其中, 生物传感芯片是 SPR 测试的核心部件。在测试分子相互作用前, 需要先将一种受体分子固定在芯片表面, 然后将与之相互作用的配体分子流过芯片, SPR 检测器就能实时监测配体与受体的结合、解离过程。通常, 供应商开发的传感芯片使用最为广泛, 但是, 固定受体后的芯片经过数次循环测试后, 分子容易失去生物活性或脱落, 而芯片则因不能再生而失去了继续使用的价值。考虑到生物传感芯片价格昂贵, 实验人员尝试对废弃芯片进行回收利用, 并重制用于直接偶联蛋白的 CM 芯片, 可再次用于 SPR 分析测试。

关键词 生物传感芯片; 芯片回收; CM 芯片重制

中图分类号: (O657.91) **文献标识码:** A

Recovery of biosensor chips and remake of CM chip

GUO Shuang¹, GUAN Xiangchen¹

(1.State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300350, China)

Abstract: Based on the Surface Plasmon Resonance (SPR) technology, the biomolecular interaction analyzer is a classical technology for real-time and non-labeled study of dynamic interactions. Biosensor chip is the core component of SPR analysis. Before testing the interactions between biomolecules, the receptor molecular needs to be immobilized to the surface of biosensor chip. When the ligand molecular flows through the biosensor chip, SPR detector can detect the binding and dissociating between ligand and receptor. Biosensor chips developed by suppliers are usually widely used, but immobilized chips can not be used again because of its inability to regenerate after repeatedly cycling-test. Taking the high cost of biosensor chips, the experimenter have tried to recover the discarding chips and remake CM chips which can be used for direct-immobilizing protein, so the recovered and remade chips can be use for SPR analysis again.

Keywords: biosensor chips, recovery of chips, remake of CM chip

1 案例背景

生物分子相互作用分析仪基于表面等离子共振（SPR）技术，是一种实时、无需标记研究生物分子之间动态相互作用的经典技术。其中，生物传感芯片是 SPR 测试的核心部件。传感芯片为玻璃基底上镀金膜，在测试分子相互作用前，先将一种受体分子固定在金膜表面，然后将与之相互作用的配体分子流过芯片表面，SPR 检测器就能实时监测配体分子与受体分子结合、解离过程。

在众多的 SPR 仪器中，Biacore 系列仪器占有最大的市场份额，相应地，其供应商开发的传感芯片的使用也最为广泛。直接偶联蛋白的芯片经过数次测试循环以后，偶联的分子容易失去生物活性或脱落；或者，完成该课题的测试后，芯片因不能再生，而失去了继续使用的价值。

目前 SPR 生物传感芯片只能从供应商采购，价格昂贵，因此，实验人员尝试对废弃芯片进行回收利用，重制可以再次偶联蛋白的具有羧甲基化葡聚糖表面（carboxymethylated dextran matrix surface, CM）的芯片，用于 SPR 分子相互作用分析测试。

2 实验方法

2.1 回收芯片，获得金膜芯片

将废弃的生物传感芯片从芯片外壳中取出，浸泡于 80% 乙醇溶液中 24h，使硅胶溶解，以取下沾在塑料框架上的金膜芯片。室温下，将金膜放置于 24 孔板并浸泡于 98% H₂SO₄ /30% H₂O₂ 溶液中，振荡浸洗 30 min，去掉金膜表面包括失活的配体分子、葡聚糖凝胶和 11-巯基十一醇等有机成分，超纯水洗 5 次，氮气吹干后，得到具有裸金表面的金膜芯片。

2.2 重构芯片表面基质

将金膜芯片置于 5mL 离心管中，加入 2mL 5mM 11-巯基十一醇溶液，40°C 孵育 20 min，然后依次用 80% 乙醇、去离子水各洗 5 次，11-巯基十一醇作为功能结构可进一步修饰，同时阻止生物分子的非特异性吸附。将上面处理过的芯片加入 0.6M 表氯醇溶液中，25°C 孵育 4h，依次用去离子水洗 2 次，乙醇洗两次，去离子超纯水洗 5 次，表氯醇处理生成环氧基用于下一步葡聚糖共价修饰。

2.3 葡聚糖修饰及羧基化，获得 CM 芯片

将重构基质后的金膜芯片置于 24 孔板，浸泡于葡聚糖（Dextran）水溶液中，25°C 振荡孵育 20h，50°C 去离子水洗 5 次。将上述 Dextran 修饰后的金膜芯片加入 1M 溴乙酸中，25°C 振荡孵育 20h，使 Dextran 凝胶羧基化，去离子水洗 5 次，氮气吹干，得到 CM 芯片。

2.4 芯片组装

利用 SIA Kit Au 中的工具包，将重制后的 CM 芯片用裁剪好的透明双面胶粘贴于塑料框架上，并插入芯片外壳。芯片组装完成后，放入自封袋 4°C 储存。

3 结果与数据分析

3.1 芯片偶联量测试

采用牛血清蛋白 (BSA) 作为实验样本，检测重制 CM 芯片的偶联量，同时参考芯片活化的 ΔR 值，依次考察 pH 值、葡聚糖浓度和种类的影响，优化 CM 芯片的重制条件。偶联实验条件如下：

重制 CM 芯片采用 EDC+NHS (体积比 1: 1) 预先活化 420s，然后将醋酸钠缓冲盐溶液 (pH=4.0) 稀释 BSA 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液进样 420s，随后用乙醇胺进行封闭进样 420s (图 1)。对比 BSA 蛋白偶联后的 SPR 曲线差值可以得知蛋白偶联量，由于实验中采用了较大的 BSA 浓度和较长的进样时间，因此该偶联量可以反映出芯片蛋白偶联量的最大能力。对比活化前后的 SPR 曲线差值 ΔR 则可以反应出芯片表面可用于偶联的活性位点的多少，通常与芯片偶联蛋白容量大小是一致的。

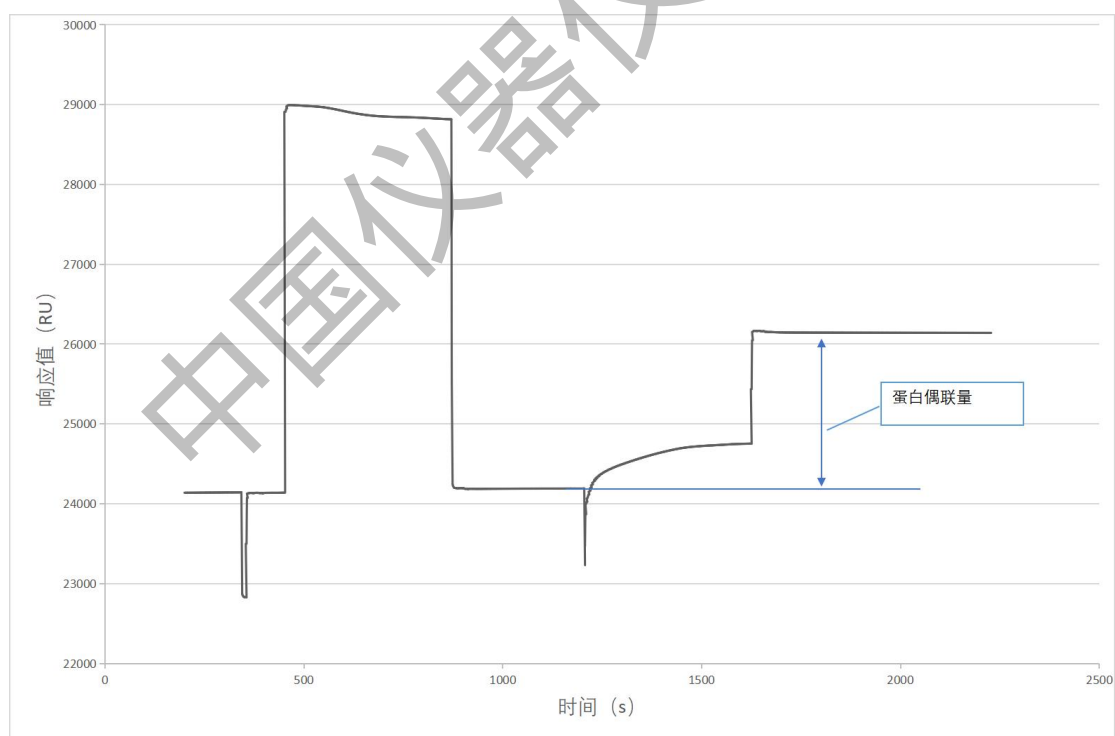


图 1 CM 芯片偶联性能测试示意图

3.2 重构基质阶段 pH 值的影响：

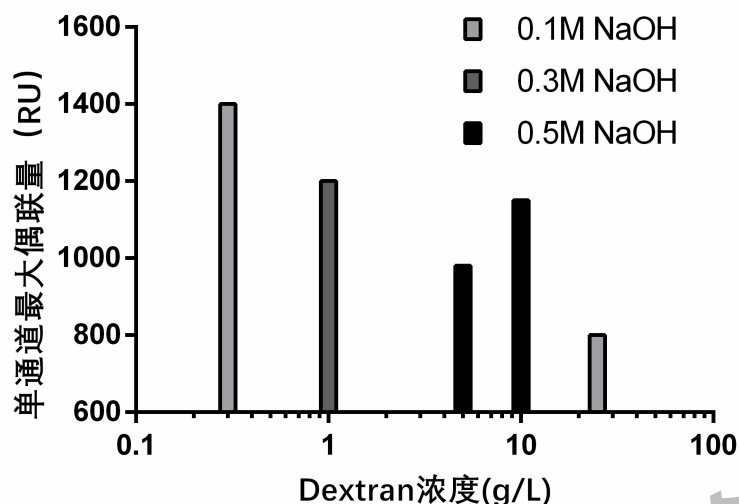


图2 不同 pH 值下重制 CM 芯片单通道最大偶联量

实验初期，采用类似正交实验的方法，初步考察在重构基质阶段 pH 值及葡聚糖浓度对于芯片偶联蛋白量的影响（图 2），可以看到在 0.1 M NaOH 条件下，重制 CM 芯片就能获得一个较高的蛋白偶联量，因此，在后续的实验中，重构基质的条件均采用 0.1 M NaOH。另外，当葡聚糖浓度增大到一定含量后，重制 CM 芯片的蛋白偶联量反而下降。

3.3 用于修饰的葡聚糖种类的影响

本实验中用到的葡聚糖为右旋糖苷（Dextran），是一类种类丰富的多糖。为了优化出合适的 Dextran，实验考察了采用四种不同分子量的 Dextran（Mw=1500、25000、60000 以及 500000 g/mol）对重制 CM 芯片单通道最大偶联量的影响（图 3），可以看出，采用分子量较大的 Dextran 用于修饰芯片，可以获得较高的蛋白偶联量，Dextran-500000 及 Dextran-25000 所修饰的芯片都具备较好的蛋白耦连能力。另外，对于同一 Dextran，葡聚糖浓度提高时，并不总是对应蛋白的偶联量的提高，尤其是对于较大分子量的 Dextran 而言。另外，考察 CM 芯片蛋白偶联能力时，可以参考 ΔR 值的大小（图 5 内插图）， ΔR 值的变化趋势与蛋白最大偶联量基本保持一致。

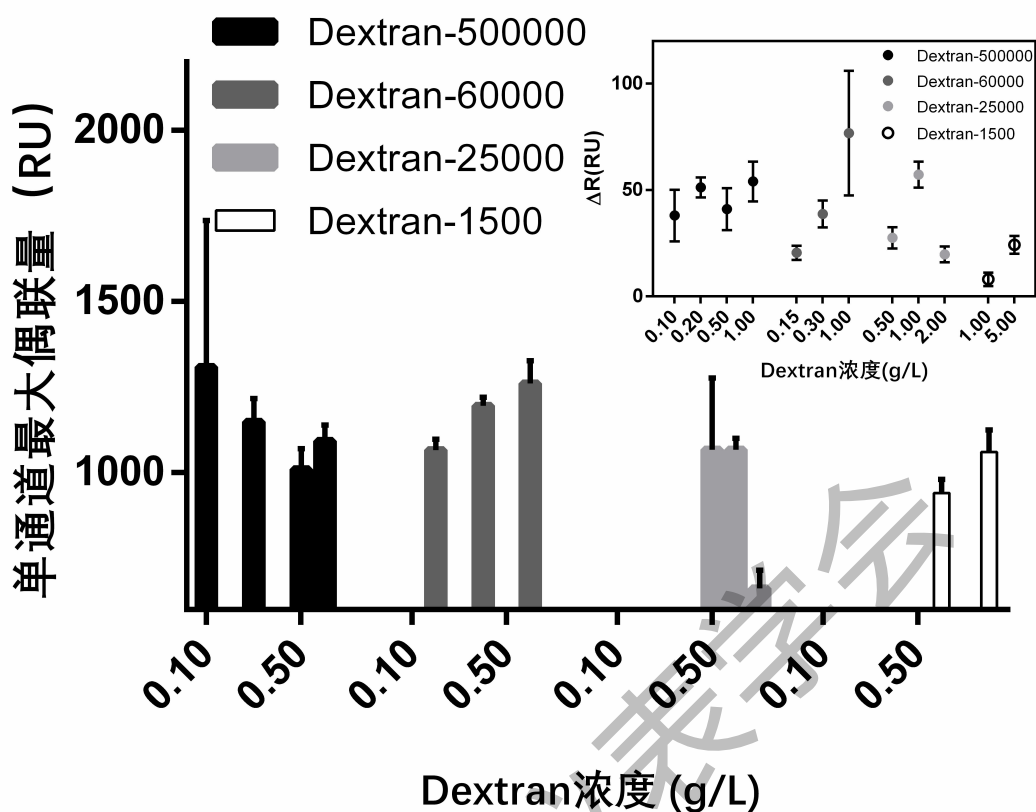


图3 修饰不同分子量葡聚糖下重制CM芯片单通道最大偶联量

4 实际应用效果

本实践所回收的芯片可达到的蛋白偶联量约为 1500 RU，偶联性能相当于商业化 CM3 芯片，可用于蛋白-蛋白、蛋白-多肽、蛋白-核酸等分子相互作用分析测试。目前，我们将该芯片免费提供给校内课题组进行分子互作分析测试，实验表明，重制的 CM 芯片不仅可以获得完整的分子互作数据，并且与商业化 CM5 芯片测试的数据相比，具有较好的一致性。

目前，商业化的 CM5 芯片价格约为 1850 元/张，采用本实践中的方法回收重制的芯片成本可控制在 200-1000 元/张（废弃芯片重制 CM 芯片的成本约为 200 元/张，裸金芯片重制 CM 芯片的成本约为 1000 元/张），可有效地降低课题组的研究成本，节省科研经费，提高生物分子相互作用分析仪的使用率。此外，降低芯片耗材成本，也有利于扩大培训范围，提高学生独立操作贵重大型仪器的可行性，进一步促进大型仪器的开放共享，以及 SPR 技术的推广及应用。

本次实践得到了南开大学实验设备处“南开大学大型仪器实验技术研发项目”的大力支持，特此致谢！

参考文献

- [1] 李雪玲, 方志俊, 黄明辉, 等.一种葡聚糖芯片的再生方法、表征及其应用[J].中国生物工程杂志,2007,27:59-62.
- [2] 欧惠超, 姜浩, 周宏敏, 等.五种 SPR 传感芯片的再生制备及其应用[J].中国生物工程杂志,2009,29: 44-49.
- [3] Shen G Y, Wang S, Wang H, et al. Detection of antisperm antibody in human serum using a piezoelectric immunosensor based on mixed self-assembled monolayers[J]. Analytica Chimica Acta,2005,540:279-284.

中国仪器仪表表学会