

生物传感芯片的回收及 CM 芯片的重制

Recovery of Biosensor Chips and Remake of CM Chip

郭爽*, 管祥辰

药物化学生物学全国重点实验室, 南开大学, 天津

*通讯作者邮箱: guoshuang@nankai.edu.cn

摘要

生物传感芯片是基于表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 的生物相互作用分析仪测试的核心部件。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, 然后使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。通常, 供应商开发的传感芯片使用最为广泛, 但是, 固定蛋白或其他受体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, 本文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具有羧甲基葡聚糖表面 (Carboxymethylated dextran matrix surface, CM) 的芯片, 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

材料与试剂

1. 废弃生物传感芯片 (Cytiva, CM5、CM7、SA 等芯片)
2. 裸金芯片 (Cytiva, SIA Kit Au: BR-1004-05)
3. 乙醇 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Aladdin, AR: E111989-500mL)
4. 浓硫酸 (天津市津东天正精细化学试剂厂, 津东天正, AR)
5. 双氧水 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Aladdin, AR, 30 wt% in H₂O: H112515-500mL)
6. 11-巯基十一醇 (西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, Sigma-Aldrich, 97%)
7. 环氧氯丙烷 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Aladdin, AR, 99.5%)
8. 二乙二醇二甲醚 (安徽泽升科技有限公司, 安耐吉化学, 99.5%)
9. 葡聚糖 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Aladdin, Mw = 1,500、25,000、60,000 以及 500,000 g/mol, AR, 99.5%)
10. 溴乙酸 (西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, Sigma-Aldrich, 97%)
11. 透明双面胶 (丰裕工业胶带, 皇冠, PET 透明双面胶带: 7982)
12. 牛血清蛋白 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Aladdin, 96%)
13. 氨基偶联试剂盒 (Cytiva, Amine Coupling Kit: catalog number: BR100050)
14. 醋酸钠缓冲溶液 (Cytiva, Acetate 4.0: catalog number: BR100349)
15. 98% H₂SO₄/30% H₂O₂ (7:3) 溶液 (见溶液配方)
16. 11-巯基十一醇溶液 (见溶液配方)
17. 表氯醇溶液 (见溶液配方)
18. 葡聚糖 (Dextran) 水溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 生物分子相互作用分析仪 (Cytiva, catalog number: Biacore T200)
2. 微孔板恒温振荡器 (杭州米欧仪器有限公司, MIU LAB, catalog number: ST70-2)
3. 氮吹仪 (杭州米欧仪器有限公司, MIU LAB, catalog number: NDK200-1N)
4. 干式金属浴 (杭州米欧仪器有限公司, MIU LAB, catalog number: DHT-100)

实验步骤

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24 h，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2 mL 98% H₂SO₄/30% H₂O₂溶液中，300 rpm 振荡浸洗30 min，中间翻转金膜数次，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，去离子水洗5次，氮气吹干后，得到具有裸金表面的金膜芯片（实验体系参考李雪玲等[1]）。

2. 重构芯片表面基质

将金膜芯片置于5 mL离心管中，加入2 mL 5 mM 11-巯基十一醇溶液，将离心管放置于金属浴中40 °C 孵育30 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0.6 M表氯醇溶液中，在金属浴中25 °C 孵育4 h，依次用去离子水洗2次，80%乙醇洗两次，去离子水洗5次，表氯醇处理生成环氧基用于下一步葡聚糖共价修饰（实验条件参考欧惠超等[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2 mL不同浓度的葡聚糖（Dextran）水溶液中，25 °C下300 rpm振荡孵育20 h，50 °C去离子水洗5次。将上述Dextran修饰后的金膜芯片加入1 M溴乙酸中，25 °C下300 rpm振荡孵育18 h，使Dextran凝胶羧基化，去离子水洗5次，氮气吹干，得到CM芯片。

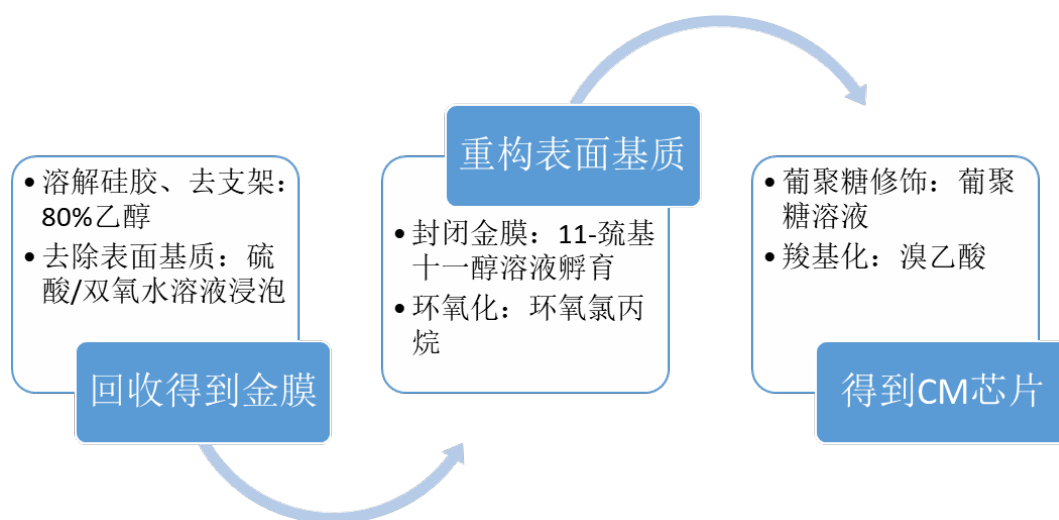


图1 生物传感芯片回收与重制实验流程示意图

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℃储存。

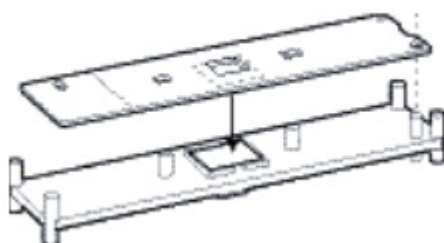


图2 SPR芯片组装示意图

实验注意要点

1. 组装芯片时，注意区分芯片的正反面，即经过化学修饰的金膜面和玻璃基底面。一旦用透明双面胶错误粘贴，则芯片无法再次取下、重新组装。
2. 粘贴、按压芯片不宜用力过大，以免导致玻璃基底断裂，导致芯片无法使用。

结果与数据分析

1. 芯片偶联量测试

采用牛血清蛋白（bovine serum albumin, 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N-羟基丁二酰亚胺（N-Hydroxysuccinimide, EDC）和1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐（1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, NHS）混合液（体积比1:1）预先活化420 s，然后将醋酸钠缓冲盐溶液（pH = 4.0）稀释BSA的100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液进样420 s，随后用乙醇胺盐酸盐进行封闭进样420 s（图3）。对比BSA蛋白偶联前后的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（偶联性能评价参考沈广宇等[3]）。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。

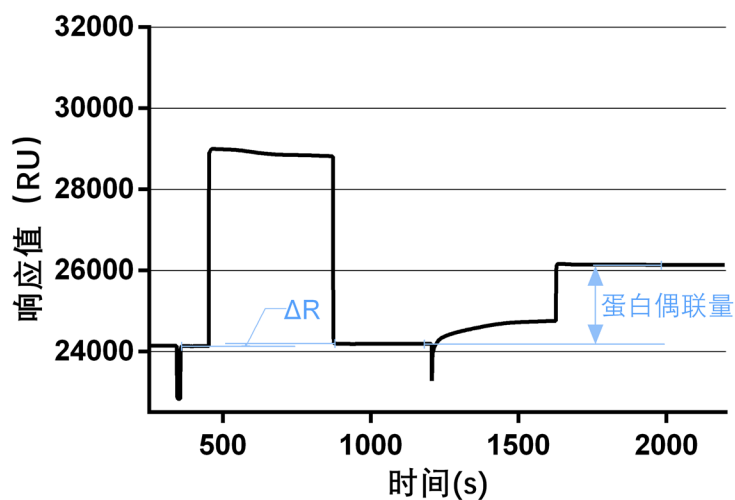


图3 CM芯片偶联性能测试示意图

2. 重构基质阶段 pH 值的影响:

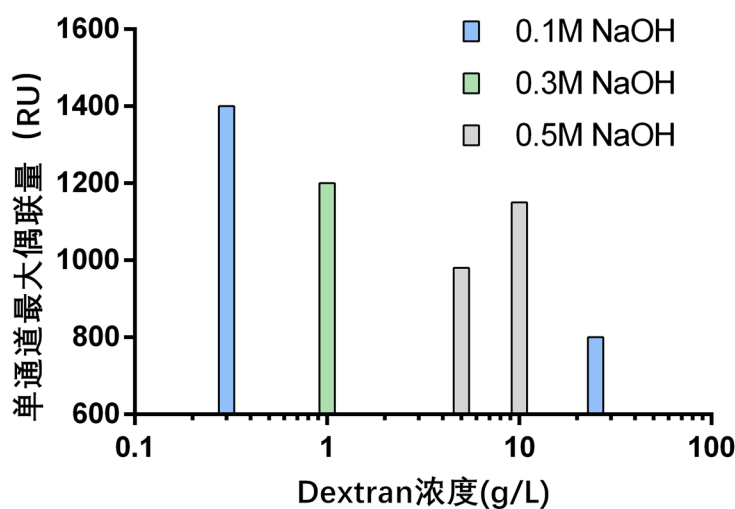


图4 不同pH值下重制CM芯片单通道最大偶联量

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4), 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pH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. 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 ($M_w = 1,500$ 、25,000、60,000 以及 500,000 g/mol) 对重制

CM 芯片单通道最大偶联量的影响 (图 5)，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。

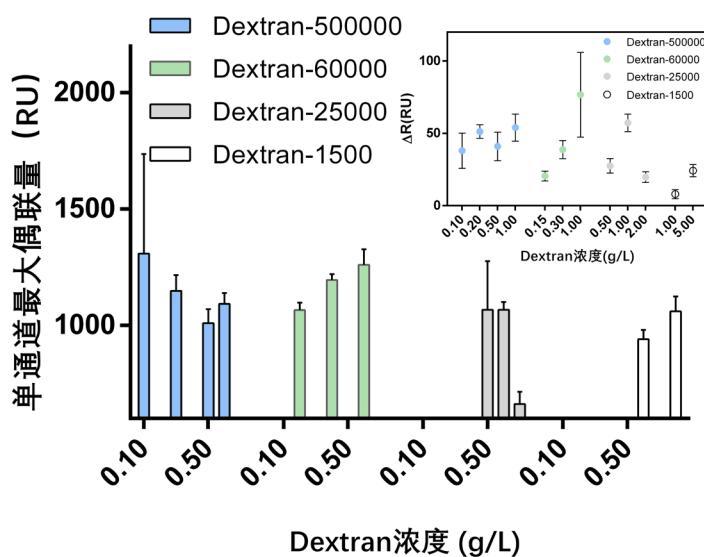


图5 修饰不同分子量葡聚糖下重制CM芯片单通道最大偶联量

溶液配方

1. 98% H_2SO_4 /30% H_2O_2 (7:3) 溶液

即食人鱼洗液，用量筒分别量取体积比为 7:3 的 98% H_2SO_4 及 30% H_2O_2 ，先将浓硫酸倒入烧杯中，再将 30% H_2O_2 缓慢滴入浓硫酸中，同时用玻璃棒不停搅拌。食人鱼洗液每次使用前现用现配，使用后的食人鱼洗液经纯水稀释后倒入酸液废液桶中。

2. 11-巯基十一醇溶液

称量一定质量的 11-巯基十一醇粉末，溶于 80%乙醇中，使得 11-巯基十一醇终浓度为 5 mM，溶液储存于棕色容量瓶中，室温避光存放。

3. 表氯醇溶液

先配制体积比为 1:1 的 0.4 M NaOH 和二乙二醇二甲醚溶液，并将二者混匀，然后量取一定体积的环氧氯丙烷，溶于上述溶剂中，使得环氧氯丙烷的终浓度为 0.6 M，溶液储存于棕色容量瓶中，室温避光存放。

4. 葡聚糖 (Dextran) 水溶液

以 0.3 g/L Dextran-60000 葡聚糖溶液为例：称量 0.025 g 的 Dextran-60000 葡聚糖粉末，溶于 5 mL 去离子水中，使得葡聚糖储液浓度为 5 mg/mL，然后量取 120 μ L 的葡聚糖储液与 100 μ L 的 2 M NaOH 储液混合，再用 1,780 μ L 去离子水稀释，使得溶液中葡聚糖终浓度为 0.3g/L 且 NaOH 终浓度为 0.1 M，葡聚糖溶液应现用现配，葡聚糖储液及 2 M NaOH 储液可 4 $^{\circ}$ C 冷藏存放。

5. 溴乙酸

称量一定质量的溴乙酸粉末，溶于 2 M NaOH 溶液中，使得溴乙酸终浓度为 1 M，溶液储存于玻璃溶剂瓶中，室温存放。

致谢

本研究得到了“南开大学大型仪器实验技术研发项目”的资助，感谢南开大学及设备处对于大型仪器技术、方法开发等工作的大力支持。本实验方法着重参考了欧惠超博士的研究工作“基于 SPR 技术的传感芯片的研制及其应用”，在此致谢欧惠超、罗昭峰和宋存先等老师的研究工作。

参考文献

1. 李雪玲, 方志俊, 黄明辉, 曹慧敏, 赵建龙, 杨梦苏. (2007) [一种葡聚糖芯片的再生方法、表征及其应用](#). *中国生物工程杂志*, 27: 59-62.
2. 欧惠超, 姜浩, 周宏敏, 李磊珂, 白林静, 宋存先, 罗昭峰. (2009) [五种 SPR 传感芯片的再生制备及其应用](#). *中国生物工程杂志*, 29: 44-49.
3. Shen G. Y., Wang S., Wang H., Tan S. Z., Li J. S., Shen G. L. and Yu R. Q. (2005) [Detection of antisperm antibody in human serum using a piezoelectric immunosensor based on mixed self-assembled monolayers](#). *Analytica Chimica Acta*. 540: 279-284.