

聚合物表面可控修饰构筑蛋白质检测芯片

王梦婷, 吴仲崧, 代思雨

(武汉理工大学 材料科学与工程学院, 武汉 430070)

摘 要: 概述了基于聚合物表面可控修饰构筑蛋白质检测芯片的相关技术。对于探针分子筛选技术, 探针分子的筛选对蛋白质芯片的灵敏度十分重要, 介绍了目前常用的技术 (噬菌体抗体库技术和 SELEX 技术) 以及近年来发展的新技术 (PFSC 技术) 的特点。聚合物表面蛋白质微图案构筑技术, 可分为使用模具的模板法和基于聚合物自组装的非模板法。模板法介绍了软光刻技术和粒子束刻印技术, 其特点是微图案的构筑重复精确。非模板法介绍了聚合物薄膜去湿法和呼吸图法, 其特点是不依赖于刻蚀技术, 表面图案形状尺寸可动态调控。对已经发表的一些该技术制备的蛋白质检测芯片及其应用方向进行了相关介绍。最后总结了该技术仍存在的不足, 并针对此展望了未来研究的关注点。

关键词: 蛋白质检测芯片; 探针分子; 聚合物可控修饰; 微图案化; 蛋白质微图案

中图分类号: O629.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2020)07-0009-08

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2020.07.002

The Protein Detection Microarray Technology Based on Controllable Modification of Polymer Surface

WANG Meng-ting, WU Zhong-kui, DAI Si-yu

(School of Materials Science and Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: This article briefly introduces the related technologies for constructing protein microarrays based on polymer controllable modification. Probe molecular screening technology, including common technologies (such as phage antibody library technology and SELEX technology) and new technologies (PFSC technology). Construction technology of protein micropattern on polymer surface, it can be generally divided into template method using mold (such as soft lithography technology and particle beam marking technology) and non-template method based on polymer self-assembly (such as polymer film dewetting method and breath-figure method). This paper introduces some published protein detection microarrays prepared by this technology and their application directions. Finally, it summarizes the shortcomings of this technology and looks forward to the future research concerns.

KEY WORDS: protein detection microarray; probe molecules; polymer controlled modification; micropatterning; protein micropattern

收稿日期: 2020-06-13; 修订日期: 2020-07-07

Received: 2020-06-13; Revised: 2020-07-07

基金项目: 国家自然科学基金 (50973087/E0310)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (50973087/E0310)

作者简介: 王梦婷 (1996—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水凝胶。

Biography: WANG Meng-ting (1996—), Female, Master, Research focus: self-healing hydrogel.

通讯作者: 吴仲崧 (1964—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为聚合物材料的表面与界面、功能高分子材料。邮箱: zhongkuiwu@163.com

Corresponding author: WU Zhong-kui (1964—), Male, Doctor, Professor, Research focus: Surface and interface of polymer materials, functional polymer materials. E-mail: zhongkuiwu@163.com

引文格式: 王梦婷, 吴仲崧, 代思雨. 聚合物表面可控修饰构筑蛋白质检测芯片[J]. 表面技术, 2020, 49(7): 9-16.

WANG Meng-ting, WU Zhong-kui, DAI Si-yu. The protein detection microarray technology based on controllable modification of polymer surface[J]. Surface technology, 2020, 49(7): 9-16.

生物芯片技术可以将多种探针分子集成于一体,并按设定的阵列进行排列,能在同一时间对多个生物标志物分子进行检测。蛋白质芯片是近年来蛋白质组学研究中兴起的一种新的生物芯片技术,可分为三类:功能性芯片、检测性芯片和反相芯片。蛋白质功能芯片在基础研究中用于蛋白质功能性的研究。纯化的蛋白质或肽被固定在基质上,以进行生化相互作用的平行筛选^[1]。蛋白质检测芯片用于确定复杂物质中某些蛋白质的丰度。与功能芯片不同,检测阵列中固定的分子通常是抗体或抗原,而不是分析物^[2-3]。在蛋白质反相芯片中,样品(例如组织或血清)被固定在表面上,并针对每种分析物用一种抗体进行探测^[4]。本文主要关注检测芯片的构筑。

蛋白质是生物体内执行生物功能的单位,蛋白质检测芯片在药物筛选、抗原抗体检测、疾病诊断、临床分析等生物医学领域有广阔的应用前景^[5-7]。尤其是疾病诊断方面,生物体内蛋白质组水平的变化与疾病的发展阶段息息相关,在疾病潜伏期和早期就会有所变化,利用蛋白质检测芯片能全面检测生物样品中与某种疾病相关的多种标志物的含量情况,能够更好筛查和监测疾病状态,为正确给出诊疗方案及使用药物提供依据^[5-6]。

蛋白质检测芯片技术也存在着诸多挑战:需稳定地结合足量的探针分子;必须在保持生物活性的情况下固定合适的配体;生物分子表面构型需有利于结合待测液中的生物标志物;背景信号要低,非特异性蛋白吸附必须被抑制。因此,要解决上述难题应从两个方面进行研究:筛选合适的探针分子,使其与生物标志物间作用的特异性和灵敏度不受固定方式的影响;载体材料表面性质易调控,以控制探针分子的取向和足量吸附。为此,基于分子生物信息学的探针分子筛选技术不断发展,聚合物表面可控修饰构筑蛋白质微图案技术的发展也为高通量高灵敏度的蛋白质检测芯片的制备提供了新的方向。

1 探针分子的筛选技术

为了得到高特异性和灵敏度的蛋白质芯片,探针分子的筛选至关重要。根据研究情况的不同,探针分子可以从配体、药物、抗体、DNA 等分子中筛选。分子生物信息学为研究生物分子间、生物分子与环境分子间的特异性和相互作用提供了一条高通量途径。下面介绍常用的两种探针分子筛选技术——噬菌体抗体库技术和 SELEX 技术,以及近年来兴起的 PFSC 技术(蛋白质折叠形状码技术)^[7-11]。

噬菌体抗体库技术在 1989 年首次提出,该技术通过噬菌体的扩增能力以及抗体-抗原的特异性结合,多次吸附-洗脱-扩增,筛选并富集特异性抗体作为探针分子。随着该技术的不断发展,筛选能力不断增强,目前已可以对高库容量(10^8 以上)的抗体进行高效筛选。该方法操作简单,可同时有效处理大量的不同抗体分子,目前已广泛地应用于蛋白质芯片的制备^[8]。

SELEX 技术为指数富集的配体进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)。1990 年,SELEX 技术首次出现。该技术通过在体外建立适配体(即寡核苷酸)库与靶物质混和,筛选出结合的适配体再扩增。根据所需适配体的类型,多次的筛选扩增得到高亲和力和特异性的适配体作为探针分子连接蛋白质^[9]。自问世以来,该技术一直受到广泛关注,并得到不断的改善,适配体库容量不断增大(目前一般为 $10^{14} \sim 10^{15}$),出现了多种衍生技术,如硝酸纤维素膜过滤法 SELEX、细胞 SELEX、体内 SELEX 和微流体 SELEX 等。与传统 SELEX 技术相比,各类衍生技术可针对不同类型的靶标(如细胞、组织等)高效筛选适配体^[10]。

PFSC 技术是一种新型的技术,它从封闭的空间中数学推导出 27 个向量,每个向量代表蛋白质骨架中 5 个连续的 C_{α} 原子的三维折叠形状,如图 1 所示。该技术可提供沿着蛋白质骨架折叠形状的数据描述,如图 2 所示,这有助于蛋白质结构分析^[11]。与传统方

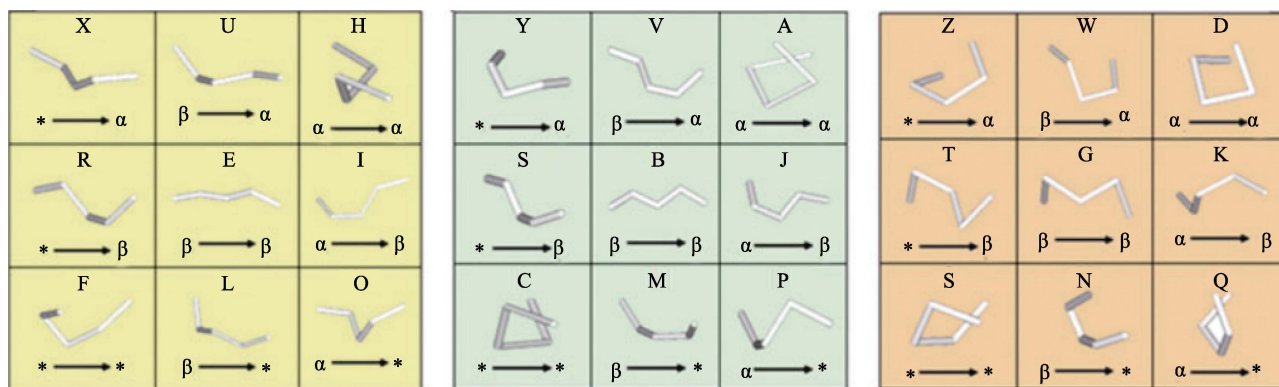


图 1 27 个 PFSC 向量^[11]

Fig.1 The diagram of 27 PFSC vectors^[11]

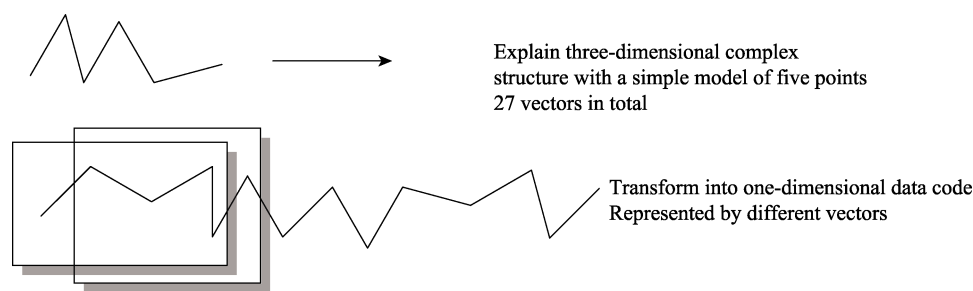


图 2 利用 PFSC 技术提供一维数据描述

Fig.2 Schematic diagram of using PFSC technology to provide one-dimensional data description

法相比,由于该方法将三维结构的蛋白质转化为一维的数据编码,利用蛋白质的一维描绘进行检索,能够大大地减小工作量。一般可将与各种疾病标志物有关的全部蛋白质数据库(PDB)的结构转化为一维指纹编码,再利用蛋白靶点检索辅助预测,从生物分子的角度高通量地筛选出与各种生物标志物靶点区结合的高特异性和敏感度的探针分子^[11]。吴仲岩等与麦克罗医药科技有限公司合作,已找到了 40 多种类风湿性关节炎(RA)生物标志物,并利用 PFSC 技术从配体、药物、抗体、DNA 等分子中筛选探针分子。

总之,在科学家的努力下,包括上述两种常用技术在内,还有 mRNA 展示技术、核糖体展示技术、亲和体技术等体外蛋白质筛选技术已趋于成熟,得到了广泛的推广,已有效地运用于抗体或类抗体分子的筛选和富集。PFSC 等新技术的发展,能够大大地减小工作量,高通量地筛选蛋白质分子。这些技术的发展确保了高亲和力和特异性探针分子的筛选以及不同种类探针分子的发现,这是构筑高灵敏度蛋白质检测芯片的关键。

2 聚合物表面可控修饰构筑蛋白质微图案

聚合物材料具有组成多样化、结构简单、加工成形性好、柔韧性好、生物相容性好等特点。聚合物表面微图案技术的发展为构筑理想蛋白质检测芯片提供了契机,大量研究者对聚合物进行不同的修饰,在其表面构筑了可特异性结合蛋白质的微图案,从而获得理想的载体材料。常用的实现聚合物表面图案化的技术可分为模板法和非模板法^[12]。

2.1 模板法

模板法使用模具在聚合物表面构筑微图案,如微接触印刷中的聚二甲基硅氧烷(PDMS)压模和粒子束刻印技术中的掩模。其优点是表面的微图案尺寸形状等可控,且模具可重复使用。常用的有软光刻技术及粒子束刻印技术等^[12-15]。

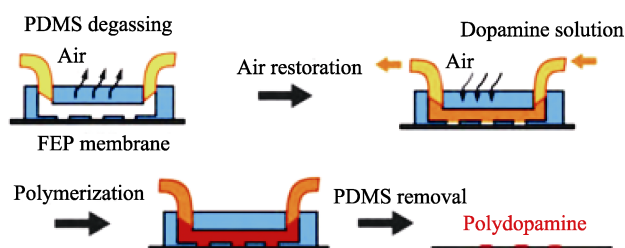
2.1.1 软光刻技术

软光刻技术基于自组装和复制模制,通常使用弹

性体压模、模具和光掩等来模制结构,通过软光刻技术可高效重复且低成本地制造微结构和纳米结构。诸如 PDMS 之类的弹性体材料常被用于软光刻中,使用 PDMS 压模或模版作为模具在基质上创建蛋白质或细胞图案。已开发的软光刻技术包括微接触印刷(μ CP)、复制成形(REM)、微传递成形(μ TM)、毛细管微成形(MIMIC)和溶剂辅助微成形(SAMIM)等^[13]。

微接触印刷利用 PDMS 弹性体压模将蛋白质分子盖印到载体表面,实现蛋白质图案从模具到聚合物基质表面的转移^[14]。通常蛋白质分子通过疏水作用与 PDMS 压模结合,因此将蛋白质分子压印到同样疏水性强的载体上十分困难。杨海军等^[16]通过添加乙二胺四乙酸(EDTA)螯合物,实现了利用该法在同样疏水的 PDMS 基体上构筑蛋白质微图案。令 PDMS 基体上吸附 EDTA 分子,通过 EDTA 与蛋白质分子间的强静电相互作用实现蛋白质分子从 PDMS 压模到 PDMS 载体的转移,并且 EDTA 可高度抑制蛋白质的水解,也保证了固定在表面的生物分子的活性。

Feng^[13]利用软光刻技术开发了一种超低背景信号的聚合物底物,用于蛋白质微阵列的制备。首先制备了 PDMS 模具,模具分两层,上层是通道层,而下层是具有微孔阵列的膜^[17]。基于聚氟化乙烯丙烯(FEP)膜,将 PDMS 模具固定在 FEP 膜上,将多巴胺溶液(pH=8.5)连续注入模具中。在此期间,形成聚多巴胺,撤去模具后,聚多巴胺微点阵列形成在 FEP 膜上,可用作蛋白质或肽结合的中间体,如图 3 所示。后续实验证明,无需再进行特殊的表面处理或印刷溶液即可获得均匀的微点形态,修饰后的 FEP 膜显示出极小的非特异性蛋白质吸附,并在蛋白质和肽微阵列技术中显示出极大的优势^[13]。

图 3 在 FEP 基板上制备聚多巴胺微点阵列示意^[13]Fig.3 Scheme showing the fabrication method of polydopamine microspots array on the FEP substrate^[13]

2.1.2 粒子束刻印技术

粒子束刻印技术是利用高能量的粒子束对聚合物表面特定区域进行辐射改性,配有相应图案的掩模,可以在聚合物表面制备高精度且特征尺寸任意的微纳米图案。根据粒子束的不同,可分为聚焦粒子刻印技术、电子束刻印技术及激光束刻蚀技术^[14-15]。

Hwang I. T.等^[18]利用离子束对聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜表面进行选择性微加工,成功地在特定区域生成了羧酸基团。进一步将炭疽病毒探针DNA和肝癌特异性靶R甲胎蛋白(AFP)抗原共价固定于官能化的区域,在PET表面成功构筑了蛋白质分子微图案。后续制作成生物传感器,靶DNA和靶AFP抗原的最低可检测质量浓度分别为4、16 ng/mL。

吴仲岩等^[19-23]致力于聚合物表面性质的微调控和表面结构的微加工,并在聚合物表面制作了相应的蛋白图案。他们对对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜表面用紫外光引发聚乙二醇(PEG)接枝,利用真空紫外光刻蚀技术,采用铜网掩模,在透光区生成了羧基等官能团用于固定蛋白质分子,而避光区的PEG能够抑制蛋白质吸附,达到构建阵列图案的目的。进一步对聚合物表面金属银图案化(如图4所示),可阻止聚合物表面性质的反转,有利于控制蛋白质区域吸

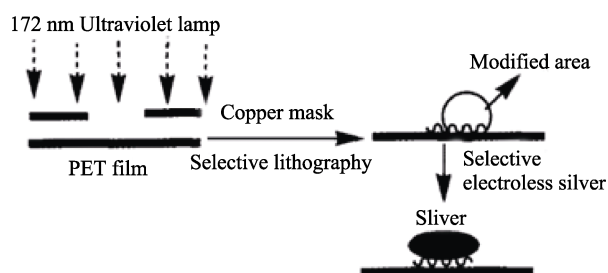


图4 在PET表面选择性无电解镀银的主要步骤^[21]
Fig.4 Schematic illustration of selective electroless silver plating on PET films^[21]

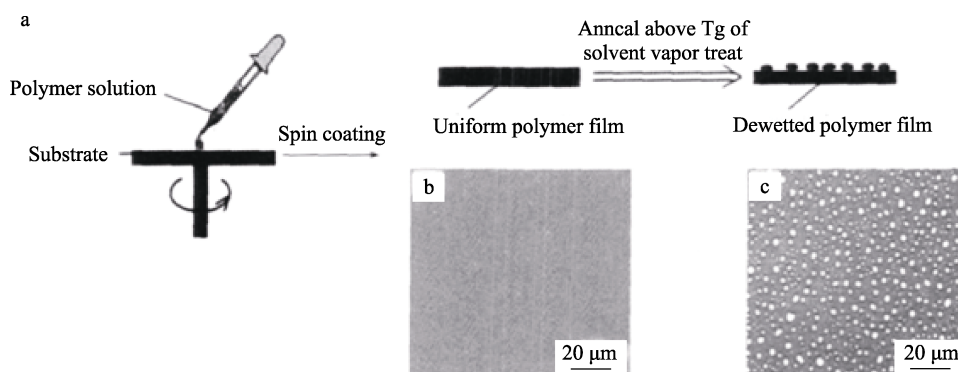


图5 聚合物薄膜去湿行为示意图^[25]
Fig.5 Schematic diagram of polymer film dehumidification behavior^[25]

Neto等^[26]利用去湿效应开发了一种新的蛋白质微图案构筑方法。方法选用对蛋白质亲和力不同的聚合物膜——PS和PMMA膜,将亚稳态的PS薄膜在PMMA薄膜上脱湿制得。PMMA整体具有蛋白抗性,

附的选择性,从而有望提高制备的蛋白质芯片检测的信噪比^[22-23]。

Ekblad等^[24]使用可见光作引发剂引发了聚(PEG₁₀MA-co-HEMA)在PS基体上接枝聚合,在其表面形成了薄水凝胶膜。用紫外光照射,采用带有孔(直径200~300 nm)或线(间距200~300 nm)阵列的石英圆盘镀铬后,作为光掩模,在透光区可特异性地固定蛋白质,而避光区保留了高蛋白抗性,实现了蛋白质图案化。

大体上,模板法借助现代微细加工技术对聚合物表面性质和结构进行微调控,进而在空间和时间上控制生物分子在界面上的排列。这类方法的优势是可以构筑任意形状尺寸的微图案,并且由于模具的可重复利用,聚合物表面微图案重复性好,适用于蛋白质芯片技术中。在实际应用中,软光刻技术在转移中会受到重力、粘附力等影响,导致图案产生微小变形,而粒子束刻印技术设备昂贵,且刻蚀速度慢,这些限制了其推广应用。

2.2 非模板法

非模板法往往是基于聚合物本身的性质自发构筑特有的表面结构,又或者是借助一些外力作用(如电场力、磁场力)在聚合物表面构筑微图案。基于分子自组装,下面介绍两种常见的非模板法:聚合物薄膜去湿法和呼吸图法。

2.2.1 聚合物薄膜去湿法

聚合物薄膜去湿法利用了聚合物薄膜的去湿效应。在不浸润的基体上,较薄的聚合物膜不稳定,在一定条件下,由于与基底之间的相互作用力,薄膜会发生损坏,变得不连续,最后以“小岛”的形式存在(如图5所示),而较厚的聚合物薄膜由于重力,能够稳定存在。通过控制薄膜厚度、退火时间以及基底种类等因素,可以控制不稳定薄膜形成的“岛”的大小^[25]。

而其上分布的PS“岛”具有蛋白吸附性,从而能够实现蛋白质在聚合物表面的微图案化。通过控制薄膜厚度和退火时间等因素可以控制PS区在PMMA基质上的分布和大小,实现对蛋白质的抗性和亲和力的比

例不同,得到的聚合物基体可潜在地用于蛋白质芯片的载体。

Peng 等^[27-28]将聚合物薄膜的去湿效应和光刻技术、微接触印刷相结合,构筑了更为复杂的图案。他们对基体分别用光刻技术和微接触印刷构筑了规则图案,再将亚稳态的 PS 薄膜在其上脱湿,分别形成了不同于“岛”的规整条纹图案和方块图案^[27]。另一方面,他们将 PDMS “印章”置于亚稳态聚合物 PS 薄膜表面,受到上方 PDMS “印章”的限制,脱湿后得到了与 PDMS 模具相关的微图案^[28]。

2.2.2 呼吸图法

呼吸图法 (BF) 依赖于“呼吸图形”的形成以及围绕它们的聚合物的组装,从而制备具有排列六边形孔的聚合物膜。该方法受到生活现象启发,当对着较冷基底呼吸时,水汽便会在基底凝结,形成小液滴图案,自然界的雾和露也是这种现象表现^[29]。该方法是在潮湿环境里从聚合物溶液中快速蒸发溶剂而制备蜂窝状多孔膜,溶剂蒸发使表面温度降低,捕获“呼吸图形”(即获得的水滴的规则阵列),水滴在冷溶剂表面形成,随后嵌入聚合物中,溶剂和水分蒸发后即得到聚合物蜂窝状多孔膜^[30]。已报道的孔的大小范围为 200 nm~7 mm,影响孔径的参数包括聚合物溶液的浓度、聚合物的结构、分子量和浇铸条件^[31-32]。利用该方法实现聚合物膜表面的蛋白质微图案是有前景的,关键在于如何将蛋白质连接到聚合物膜的指定区域。

Zhang 等^[33]将聚苯乙烯 (PS) 和带少量氨基末端的 PS (PS-mNH₂) 溶解在氯仿中,通过 BF 法制备具有氨基末端表面的多孔 PS 膜 (PS-mNH₂)。在 PS 溶液中形成水滴阵列时,两亲性聚合物 PS-mNH₂ 在水/PS 界面处自组装,且氨基朝向水滴,水蒸发后形成多孔薄膜 (如图 6 所示)。随后采用 PEG-硅烷覆盖的 PDMS 薄膜直接接触印刷,将 PEG 印至 PS 薄膜表面 (空隙外) 来充当蛋白质吸收的抗蚀剂,而蛋白质可通过戊二醛的交联而缀合至氨基末端的孔表面。

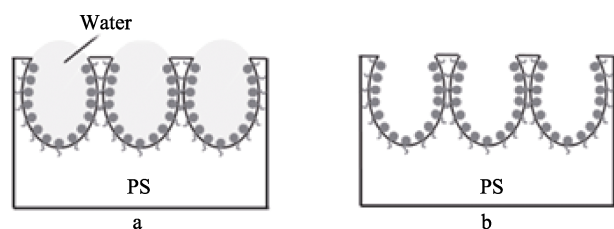


图 6 BF 法制备 PS 多孔膜示意^[33]

Fig.6 Schematic diagram of PS porous membrane prepared by BF method^[33]

Stenzel 等^[34]利用呼吸图法,使用一步自组装获得了蛋白质图案。两性嵌段共聚物在膜形成过程中围绕呼吸图排列,能够形成具有亲水孔的蜂窝结构多孔膜。他们采用聚苯乙烯-b-聚丙烯酸两亲性嵌段共聚

物,通过呼吸图法形成 PS-PAA 蜂窝结构的多孔膜后,将生物素结合到膜的孔中,将膜浸入链霉亲和素的碱性缓冲溶液中,然后用水和白蛋白充分洗涤,以除去任何非特异性蛋白结合。

Zhou 等^[35]提出了一种针对生物功能表面的最新方法。他们结合 PS 珠/聚乙二醇 PEG 用呼吸图法制备了带有微珠的蜂窝膜 (PS 微珠可固定蛋白质,而 PEG 具有蛋白抗性),并研究了牛血清白蛋白的吸附。激光扫描共聚焦显微镜的结果表明,这些孔被选择性富集了抗蛋白质的 PEG。

鞠远来等^[36]利用反相乳液体系和呼吸图法,实现了蛋白质组分在 PS 膜上的蜂窝状分布。他们首先制备溶有水溶性蛋白质的反相乳液体系,蛋白组分被包裹于油相中,再以该体系溶解 PS 后,使用呼吸图法制备了结构规整的蜂窝状薄膜。测试表明,蛋白质有效地富集在孔洞区域,可通过控制 PS 浓度,控制薄膜表面孔径大小。该方法区别于传统的呼吸图法的单相溶液,反相乳液体系的引入使其能够对亲水的蛋白质实施,从而在聚合物膜上制备蛋白质微图案。

此外,人们也常常利用嵌段共聚物的微观相分离、聚合物共混物的相分离在聚合物表面构筑有序微结构,在聚合物表面形成一定具有蛋白吸附性和蛋白抗性的区域,可用作蛋白质检测芯片载体材料。如 Cuellar 等^[37]采用点击化学反应制备了聚乙二醇 (PEG) 和树状聚甘油 (dPG) 嵌段共聚物,构筑了三维水凝胶阵列。点击化学反应可调节链段长度,影响水凝胶性能。这种水凝胶基质可以共价连接任何肽,并识别其相应的抗体,表面可能适用于蛋白质芯片的平台。这类方法不依赖于刻蚀技术,对表面图案的形状尺寸,甚至性质,都可以进行动态调控。

在实际使用中,聚合物表面蛋白质微图案的构筑常常是多种方法结合使用,赋予聚合物具有功能性和有序微纳米结构的表面,后续可用作开发一系列蛋白质检测芯片的平台。

3 聚合物可控修饰构筑蛋白质检测芯片

聚合物表面可控修饰构筑蛋白质微图案技术的发展,对蛋白质检测芯片的发展起到重要的作用。研究者们基于聚合物材料的生物相容性优异、结构尺寸可调控以及外场的响应特性等优势,对聚合物表面进行可控修饰,构筑不同功能的聚合物基底蛋白质检测芯片。目前已报道了各种不同用途的蛋白质检测芯片。

Wu 等^[38-39]加入带末端烯烃的引发剂对 PDMS 进行改性,使其表面带有活性引发位点,再在聚合物表面通过 ATRP 反应,修饰上带有 PEG (抑制蛋白吸附) 侧链的高分子刷层。该基体对蛋白质的抗非特异性

吸附能力优异^[40],是理想的蛋白质芯片载体材料。王伟^[9]使用上述改性后的 PDMS 基体作为蛋白质芯片载体材料,筛选了恶性肿瘤相关的探针分子,采用非接触式点样法将探针蛋白分子转移到改性 PDMS 膜上,构筑了 PDMS 蛋白质芯片,用于肿瘤的预防诊断和药物筛选。他还收集了 2017—2018 年三家深圳医院的 1152 例患者的静脉血进行研究,设计了 79 种 PDMS 基质蛋白质微阵列,筛选出了多种有诊断价值的蛋白。

Liu 等^[41]开发了一种基于聚合物的新型高性能蛋白质微阵列,用于检测乙型肝炎病毒表面抗原。首先在紫外光下通过光引发剂作用对 PMMA 进行活化,作为高性能蛋白质微阵列的底物。再采用丙烯酸酯和环氧基的甲基丙烯酸缩水甘油酯单体(GMA)用作光聚合的单体,在 PMMA 上进行光接枝,在 PMMA 表面产生了一层 GMA 聚合物“刷子”(均匀且为纳米结构的 3-D 样功能层),从而产生了丰富的环氧官能团,可以有效地对蛋白质进行固定。之后采用了相应的抗体分子作为探针分子固定在载体上,得到了基于 PGMA-PMMA 的蛋白质检测芯片,对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)进行检测分析(一般蛋白病毒的产物(抗原)是筛查潜在患者血液的主要诊断生物标志物^[42]),实验证明,该蛋白检测芯片在检测范围上比现有技术高 1~2 个数量级。

Zhen 等^[43]制备了一种凝集素-水凝胶芯片,可以有效地捕获大肠杆菌,并同时筛选细菌粘附抑制剂。通过将凝胶前体水溶液(丙烯酰胺、丙烯酸、双丙烯酰胺和甘油按比例混合的水溶液)点在经过处理的载玻片上,以标准的非接触印刷程序及紫外线照射制备了水凝胶微阵列,再用适量 EDC 和磺基-NHS 溶液活化。之后仍通过标准的非接触印刷程序将凝集素缓冲液喷在活化的水凝胶斑点,通过细菌与凝集素的特异性作用,制备了载有细菌的凝集素-水凝胶芯片。在此基础上,进一步开发了一种夹心水凝胶芯片平台用于研究细菌与抗生素的相互作用^[44]。用同样的方法制备了载有药物的聚丙烯酰胺水凝胶芯片,用 PTFE 掩膜剂粘贴工具将两者面对面对齐,通过在微阵列上两个对齐的水凝胶点之间形成大量的微型培养室来筛选抗生素。该实验研究了金黄色葡萄球菌与四种抗生素(阿莫西林、万古霉素、链霉素和氯霉素)的相互作用。结果表明,该测定法具有高通量筛选抗菌药物的潜力。

Zeneida 等^[45]开发了一种基于葡聚糖水凝胶(CDHs)的高性能蛋白质微阵列。该方法使用了一种生物相容性的光聚合单体甲基丙烯酸右旋糖酐(Dx-MA)的水溶液,在光催化下,形成葡聚糖聚合物的同时,通过光诱导的巯基丙烯酸酯偶联反应,将探针分子寡核苷酸固定在水凝胶内部。基于该技术的凝胶微阵列可在聚碳酸酯表面制备,系统显示出高

的探针装载能力和良好的生物识别产率。

Mariia 等^[46]研究了一种用于丙型肝炎病毒(HCV)检测的大孔整体材料基体的芯片。在该工作中,提出了大孔聚甲基丙烯酸缩水甘油酯-二甲基丙烯酸乙二醇酯作为构建用于 HCV 检测的 3-D 微阵列的基质。相比水凝胶,该材料具有永久的多孔结构,并且由于高度交联的聚合物网络,在各环境中均稳定。根据聚合混合物的组成,此类材料的孔径可以在 100 nm~3 μm 之间变化。包膜蛋白 E2 是关键的病毒抗原之一,选择抗 E2 抗体作为探针。使用该芯片对 E2 蛋白进行检测,通过改变探针数量、亲和力结合时间、分析物浓度等来选择该种蛋白质芯片的最佳操作条件,研究结果为进一步研究丙型肝炎病毒检测的实际应用奠定了基础。

Qi 等^[47]开发了具有高固定密度的基于环状烯烃共聚物(COC)的蛋白质微阵列。他们通过紫外线诱导的接枝共聚作用,将聚马来酸酐-乙酸乙烯酯共聚物刷子附着在 COC 表面上。刷子的引入使改性 COC 上酸酐基团的接枝密度可以从 0.46 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 调节至 3.2 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$,之后固定免疫球蛋白 G(IgG),而 IgG 在功能化 COC 上的固定效率达到 88%。随后的免疫测定实验表明,微阵列对目标分析物显示出高灵敏度。

上述基于聚合物表面可控修饰技术构筑的蛋白质检测芯片,显示了在疾病标志物检测、药物筛选、病原体检测等方面的应用。当前,聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚苯乙烯(PS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)及尼龙膜等是蛋白质检测芯片中常用的基底,相比玻片载体,它们可用于制备具有复杂几何形状和功能的蛋白质检测芯片,但与这些底物相关的一些问题限制了微阵列的性能^[48-49]。首先,聚合物载体表面固定探针分子的结合位点较少;其次,这些基底通常会遭受非特异性蛋白质吸附,导致背景信号增加,蛋白质微阵列的灵敏度和稳定性降低^[50]。基于此,目前研究人员结合聚合物表面可控修饰技术,发表了各种方法来增加结合位点或使背景区域失活。如对聚合物表面使用酯、醛、环氧基、马来酰亚胺、胍等基团或聚合物涂层(如聚-L-赖氨酸)活化和官能化,增加结合位点^[51];接枝聚乙二醇(PEG)^[52],并将牛血清白蛋白(BSA)沉积到基体上^[53-54],达到抑制蛋白质非特异性吸附的目的。

4 结语

蛋白质芯片技术是在基因芯片的基础上发展起来的,相比于核酸,蛋白质作为生物体内功能的执行者,其水平变化反映的信息更为完整,蛋白质检测芯片在生物医学领域展现了极大的价值,有潜力成为体外检测的重要方法之一。蛋白质结构更为多样,种类繁多,许多性质很不稳定,蛋白质折叠结构的变化会

导致功能的改变,甚至失效,因此蛋白质芯片技术面临更多的挑战。

聚合物表面有序图案的构筑是当前的研究热点之一,在生物芯片技术领域有潜在的应用前景。研究者基于该技术构筑了一些具有特定功能的蛋白质检测芯片,有些甚至已得到临床应用,展示了聚合物蛋白质检测芯片特有的优势。但也有不足,目前报道的基于聚合物可控修饰构筑的蛋白质检测芯片常常仍存在少量的蛋白质非特异性吸附,其上探针分子的密度较小,多仅限于实验室,制备方法复杂,制备条件严格,制备成本较高,难以大量制作,使得聚合物蛋白质检测芯片难以得到普及,无法大量投入临床应用。

为此,可关注于以下方向,使聚合物蛋白质芯片得到推广:继续改进聚合物载体表面处理技术来减少蛋白质非特异性结合;构筑三维结构的蛋白质芯片聚合物载体,增加单位面积的探针分子结合位点,提升检测灵敏度;开展更多实验室与医院临床诊断的合作,得到相应临床样本,结合医院现行的诊断方法,通过不断改进,平衡制备成本与检测灵敏度的关系,制得合适的聚合物蛋白质检测芯片。

参考文献:

- [1] CROMPTON P D, KAYALA M A, TRAORE B, et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2010, 107(15): 6958-6963.
- [2] BERTOK T, SEDIVA A, KATRLIK J, et al. Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles[J]. *Talanta*, 2013, 108: 11-18.
- [3] PARK S, GILDERSLEEVE J C, BLIXT O, et al. Carbohydrate microarrays[J]. *Chemical SOCIETY Reviews*, 2013, 42(10): 4310-4326.
- [4] SPEER R, WULFKUHLE J D, LIOTTA L A, et al. Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis[J]. *Current opinion in molecular therapeutics*, 2005, 7(3): 240-245.
- [5] ADEOLA H A, VAN WYK J C, AROWOLO A, et al. Emerging diagnostic and therapeutic potentials of human hair proteomics[J]. *Proteomics clinical applications*, 2018, 12(2): 1862-1876.
- [6] CHEN Z Q, DODIG-CRNKOVIC T, SCHWENK J M, et al. Current applications of antibody microarrays[J]. *Clinical proteomics*, 2018, 15(1): 7-21.
- [7] 庞建达, 宋伊宁, 王昕蕊, 等. 抗体芯片技术及其在寄生虫研究中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(7): 85-90.
PANG J D, SONG Y N, WANG X R, et al. Research progress of antibody chip technology and its application in parasite research[J]. *China biotechnology*, 2019, 39(7): 85-90.
- [8] 蔡尽忠. 噬菌体抗体库技术概述[J]. *生物学教学*, 2017, 42(5): 4-7.
- CAI J Z. An overview of phage antibody display libraries technique[J]. *Biology teaching*, 2017, 42(5): 4-7.
- [9] 王伟. 蛋白质芯片在肿瘤标志物筛查中的应用以及利用 SELEX 技术筛选 CD20/486 的 ssDNA 适配体的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
WANG W. CD20/486 ssDNA aptamers screening by SELEX and its application in tumor markers protein microarray construction[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.
- [10] WANG T, CHEN C Y, LEON M, et al. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on development[J]. *Biotechnology advances*, 2019, 37(1): 28-50.
- [11] YANG J. Comprehensive description of protein structures using protein folding shape code[J]. *Proteins*, 2008, 71(3): 1497-1518.
- [12] 曹新宇, 江雷. 高分子表面微纳米结构的构筑及应用[J]. *高分子通报*, 2008(8): 123-133.
CAO X Y, JIANG L. Construction and application of micro-nano structure on polymer surface[J]. *Polymer bulletin*, 2008(8): 123-133.
- [13] FENG Hui. Ultralow background substrate for protein microarray technology and on-chip study of macromolecular crowding effect on FRET[D]. Hong Kong: The Chinese University of Hong Kong, 2015.
- [14] 李少英. 聚合物表面微调控诱导蛋白质区域选择性吸附[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2012.
LI S Y. Micro-regulation of polymer surface induces regioselective protein adsorption[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2012.
- [15] 杨军. 聚合物表面微图案的构筑及金属铜的选择性沉积[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2012.
YANG J. Polymer surface micropatterning and selectively deposition of copper on patterned surface[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2012.
- [16] 杨海军, 李海, 王鹏, 等. EDTA 应用于微接触印刷法制备高密度蛋白微阵列的研究[J]. *核技术*, 2008, 31(12): 946-950.
YANG H J, LI H, WANG P, et al. Fabrication of high-density protein microarray on an EDTA-PDMS substrate by microcontact printing[J]. *Nuclear science and techniques*, 2008, 31(12): 946-950.
- [17] UNGER M A, CHOU H P, THORSEN T, et al. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography[J]. *Science*, 2000, 288: 4-7.
- [18] HWANG I T, KUK I S, JUNG C H, et al. Efficient immobilization and patterning of biomolecules on poly (ethylene terephthalate) films functionalized by ion irradiation for biosensor applications[J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2011, 3: 2235-2239.
- [19] LI S Y, WU Z K, TANG H X, et al. Selective adsorption of protein on micropatterned flexible poly (ethylene terephthalate) surfaces modified by vacuum ultraviolet lithography[J]. *Applied surface science*, 2012, 258: 4222-4227.
- [20] WU Z K, YAN H Y, CHEN H, et al. One-stage fabrication of sub-micron hydrophilic microchannels on PDMS[J]. *Applied Surface Science*, 2009, 255: 4702-4704.
- [21] CAO J L, WU Z K, YANG J, et al. Site-selective electroless plating of copper on a poly (ethylene terephthalate) surface modified with a self-assembled monolayer[J]. *Colloids and surfaces A*, 2012, 415: 374-379.
- [22] 唐红肖, 吴仲岩, 杨军, 等. 通过紫外光对聚合物表面性质的微区域修饰诱导金属银在其表面的选择性沉积

- 制备微米级的金属图案[J]. 中国表面工程, 2012, 25(1): 49-53.
- TANG H X, WU Z K, YANG J, et al. Fabrication of micron silver patterns on polymers selectively modified by UV-light[J]. China surface engineering, 2012, 25(1): 49-53.
- [23] CAO J L, WU Z K, LI S Y, et al. Site-selective adsorption of protein induced by a metal pattern on apoly (ethylene terephthalate) surface[J]. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2013, 111: 418-422.
- [24] TOBIAS E, LARS F L, OLOF A, et al. Patterned hydrogels for controlled platelet adhesion from whole blood and plasma[J]. Advanced functional materials, 2010, 20(15): 2396-2403.
- [25] 彭娟, 崔亮, 罗春霞, 等. 高分子表面有序微结构的构筑与调控[J]. 科学通报, 2009(6): 679-695.
- PENG J, CUI L, LUO C X, et al. Constructing and tuning polymer surface microstructures[J]. Chinese Science Bulletin, 2009(6): 679-695.
- [26] NETO C. A novel approach to the micropatterning of proteins using dewetting of polymers bilayers[J]. Physical chemistry chemical physics, 2007, 9(1): 149-155.
- [27] ZHANG Z, WANG Z, XING R, et al. Patterning thin polymer films by surface-directed dewetting and pattern transfer[J]. Polymer, 2013, 54(13): 3737-3743.
- [28] PENG J, XUAN Y, WANG H F, et al. Solvent vapor induced dewetting in diblock copolymer thin films[J]. Polymer, 2005, 46(15): 5767-5772.
- [29] HERNÁNDEZ-GUERRERO M, STENZEL M H. Honeycomb structured polymer films via breath figures[J]. Polymer chemistry, 2012, 3(3): 563-577.
- [30] SONG L, BLY R K, WILSON J N, et al. Direct synthesis of a macroscale single-walled carbon nanotube non-woven material[J]. Advanced materials, 2004, 16(17): 1529-1534.
- [31] CHRISTOPHER B K, HELEN D, THOMAS P D, et al. Nano- and micro-engineering of ordered porous blue-light-emitting films by templating well-defined organic polymers around condensing water droplets[J]. Angewandte chemie international edition, 2003, 42: 1433-7851.
- [32] YABU H, TANAKA M, IJIRO K, et al. Preparation of honeycomb-patterned polyimide films by self-organization [J]. Langmuir, 2003, 19(15): 6297-6300.
- [33] ZHANG Y, WANG C. Micropatterning of proteins on 3D porous polymer films fabricated by using the breath-figure method[J]. Advanced materials, 2007, 19(7): 913-916.
- [34] MIN E, WONG K H, STENZEL M H, et al. Microwells with patterned proteins by a self-assembly process using honeycomb-structured porous films[J]. Advanced materials (FRG), 2008, 20(18): 3550-3556.
- [35] JIANG X L, ZHOU X F, ZHANG Y, et al. Interfacial effects of in situ-synthesized Ag nanoparticles on breath figures[J]. Langmuir, 2010, 26(4): 2477-2483.
- [36] 鞠远来, 张震震, 刘玉, 等. 通过一步法制备蛋白质图案化阵列结构[J]. 化工新型材料, 2015, 43(5): 89-92.
- JU Y L, ZHANG Z Z, LIU Y, et al. Fabrication of honeycomb patterned proteins structure films via one-step method[J]. New chemical materials, 2015, 43(5): 89-92.
- [37] RANDRIANTSILEFISOA R, CUELLAR-CAMACHO J L, CHOWDHURY M S, et al. Highly sensitive detection of antibodies in a soft bioactive three-dimensional bio-orthogonal hydrogel[J]. Journal of materials chemistry B, 2019, 7(20): 3220-3231.
- [38] MA H, WU Y, YANG X, et al. Integrated poly (dimethylsiloxane) with an intrinsic nonfouling property approaching "absolute" zero background in immunoassays[J]. Analytical chemistry, 2010, 82(15): 6338-6342.
- [39] WU Y, HUANG Y, MA H. A facile method for permanent and functional surface modification of poly (dimethylsiloxane)[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(23): 7226-7227.
- [40] BLUMMEL J, PERSCHMANN N, AYDIN D, et al. Protein repellent properties of covalently attached PEG coatings on nanostructured SiO₂-based interfaces[J]. Biomaterials, 2007, 28(32): 4739-4747.
- [41] LIU Y S, HU W H, LU Z S, et al. Photografted poly (methyl methacrylate)-based high performance protein microarray for hepatitis B virus biomarker detection in human serum[J]. Med chem comm, 2010, 1(2): 132-135.
- [42] MARQUETTE C A, CRETICH M, BLUM L J, et al. Nanobeads arraying and polymer coating: mixed technology for protein microarrays improvement[J]. Talanta, 2007, 71(3): 1312-1318.
- [43] LIU X, ZHEN L, LIU F, et al. Fabricating three-dimensional carbohydrate hydrogel microarray for lectin-mediated bacterium capturing, Biosens[J]. Bioelectron, 2014, 58: 92-100.
- [44] LIU X, ZHEN L, LIU D J, et al. Development of a sandwiched microarray platform for studying the interactions of antibiotics with Staphylococcus aureus[J]. Analytica chimica acta, 2016, 917: 93-100.
- [45] DÍAZ-BETANCOR Z, MARÍA-JOSÉ B, ÁNGEL M. Photoclick chemistry to create dextran-based nucleic acid microarrays[J]. Analytical & bioanalytical chemistry, 2019, 411(25): 6745-6754.
- [46] MARIIA A, DMITRY P, EKATERINA S. Towards the development of a 3-D biochip for the detection of hepatitis C virus[J]. Sensors, 2020, 20(9): 2719-2735.
- [47] QI Y, WANG Y D, CHEN C X, et al. Facile surface functionalization of cyclic olefin copolymer film with anhydride groups for protein microarray fabrication[J]. ACS applied bio materials, 2020, 3(5): 3203-3209.
- [48] EISENSTEIN M. Protein arrays: Growing pains[J]. Nature, 2006, 444(7121): 959-962.
- [49] RUSMINI F, ZHONG Z, FEIJEN J. Protein immobilization strategies for protein biochips[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(6): 1775-1789.
- [50] SRIVASTAVA S, LABAER J. Nanotubes light up protein arrays[J]. Nature biotechnology, 2008, 26(11): 1244-1246.
- [51] KUSNEZOW W, HOHEISEL J D. Solid supports for microarray immunoassays[J]. Journal of molecular recognition, 2003, 16(4): 165-176.
- [52] OWENS D E, PEPPAS N A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles[J]. International journal of pharmaceutics, 2006, 307(1): 93-102.
- [53] HSIEH H Y, WANG P C, WU C L, et al. Effective enhancement of fluorescence detection efficiency in protein microarray assays: Application of a highly fluorinated organosilane as the blocking agent on the background surface by a facile vapor-phase deposition process[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(19): 7908-7916.
- [54] SHULTZ M A, OHDERA A, MACMANIMAN J, et al. Optimized blocking of porous nitrocellulose films for sensitive protein microarrays[J]. Biotechniques, 2013, 54(4): 223-225.