

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/68 G01N 33/543

G01N 33/532 G01N 33/533

C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03114440.3

[43] 公开日 2003 年 9 月 3 日

[11] 公开号 CN 1439878A

[22] 申请日 2003.1.17 [21] 申请号 03114440.3

[71] 申请人 陕西超英生物医学研究开发有限公司

地址 710061 陕西省西安市长安南路 29 号

[72] 发明人 李 军 李晓华 卫军霞 步 雪

张美萍 李 娟

[74] 专利代理机构 西安新思维专利事务所有限公司

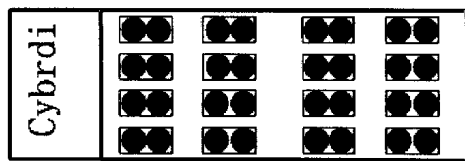
代理人 黄秦芳

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 2 页

[54] 发明名称 自身抗体检测组织芯片

[57] 摘要

本发明涉及一种生物医学检测芯片，进一步涉及一种自身抗体检测组织芯片。本发明要克服现有技术中基材不易保存且成本较高，组织结构不够清晰；培养细胞局限性强，只能用于检测抗核抗体，不能在原位上进行检测分析；两者联合检测也不能很好地检测到所有自身抗体的缺点。为克服现有技术的缺点，本发明提供了一种自身抗体检测组织芯片，包括基材、基材上的基质，其特殊之处在于：所述基质是石蜡包埋组织。所述基质还可包括新鲜冰冻组织或细胞标本，利用间接免疫荧光技术可在该组织芯片上检测、筛选与分析大量相同或不同类型自身免疫性疾病患者血清中的自身抗体，以阐明自身抗体含量的有无、变化、与疾病的相关关系及临床意义。



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

1、自身抗体检测组织芯片，包括基材、基材上的基质，其特征在于：所述基质是石蜡包埋组织。

2、如权利要求1所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：所述芯片上石蜡包埋组织的制备方法是，从供体石蜡组织标本中取出已由病理医生诊断的圆柱状组织核心，将其按设计顺序放置在另一块空白蜡块中，形成组织微阵列蜡块，由此可获得组织微阵列切片，将切片放置在经硅化和胶化的玻片上即形成组织微阵列生物芯片，每一个组织微阵列生物芯片上包含大量有序的各种相同或不同的供体石蜡组织标本。

3、如权利要求2所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：石蜡切片常规包埋、浸蜡、切片处理，载片以 APES 处理。

4、如权利要求1或2或3所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：所述供体石蜡组织标本的供体种属来源包括人、猴、大鼠、小鼠、猪、兔及豚鼠，不同的细胞或组织来源包括 Hep-2 细胞、脐静脉内皮细胞、肺、肝、胃、食道、舌、十二指肠、小肠、结肠、直肠、甲状腺、甲状旁腺、肾、肾上腺、胰腺、前列腺、大脑、小脑、骨骼肌、心肌、平滑肌、血管、垂体、睾丸、卵巢、表皮、视网膜、骨、软骨、眼、胎盘、脾脏、腮腺、颌下腺、舌下腺、胸腺、粒细胞、血小板、脂肪组织、神经组织、结缔组织。

5、如权利要求4所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：所述芯片上的基质还包括新鲜组织冰冻切片和/或培养细胞。

6、如权利要求5所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：所述芯片上新鲜组织冰冻切片基质的制备方法是，新鲜组织以 OCT 复合物包埋后在干冰环境下以空心针头取出圆柱状组织核心，将其按设计顺序放置到受体 OCT 阵列模块中形成组织阵列，全过程中 OCT 包埋组织及受体 OCT 阵列模块均借助干冰保持低温环境。新鲜冰冻组织微阵列制成后在冷冻圆柱头上以 OCT 固定，以低温显微薄片切片机制作切片，贴附于经硅化和胶化的玻片上即获得新鲜冰冻组织芯片，每张芯片上包含大量有序的同或不同的组织标本。

7、如权利要求6所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：所述新鲜组织冰冻切片基质的制备方法中，冰冻切片新鲜组织取材在3小时之内，于恒冷条件中切片，片厚4-6um，载片以APES处理，芯片置于-20℃封存备用。

8、如权利要求5所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：所述芯片上培养细胞基质的制备方法是，①将细胞培养有孔橡胶模具消毒并安装在已消毒灭菌的载玻片上，放入无菌湿盒中，按照设计的排列顺序依次在各孔接种同种或不同种细胞，待细胞贴壁后去除橡胶模具即形成单一细胞芯片，每张芯片上排列有大量有序的培养细胞；②将消毒灭菌的聚苯乙烯盖片放入细胞培养皿内，待细胞铺满盖片后取出，采用机械化制备仪器将盖片按预先设计的大小切割，并按设计的排列组合方式将其贴附至含石蜡包埋组织或冰冻新鲜组织的芯片上，即形成了由石蜡组织、冰冻新鲜组织及培养细胞组成的组合芯片；③细胞常规培养，使其单层生长铺满瓶底至90%的区域，弃去培养液，4%中性甲醛固定，用细胞刮子刮下贴壁细胞离心，以优质琼脂悬浮细胞，待冷却凝固后，以低熔点石蜡常规包埋，切片。

9、如权利要求8所述的自身抗体检测组织芯片，其特征在于：所述培养细胞基质的制备方法中，细胞常规培养48~72h，细胞数为 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 个/ mm^2 。

自身抗体检测组织芯片

所属技术领域:

本专利发明涉及一种生物学检测芯片,进一步涉及一种自身抗体检测组织芯片。

背景技术:

自身免疫性疾病是指自身免疫反应引起组织损伤的疾病,包括11大类30余种各种不同的疾病,其中系统性红斑狼疮、自身免疫性肝炎、风湿和类风湿性疾病、溃疡性结肠炎、萎缩性胃炎、I型糖尿病、心肌炎、心肌病以及恶性肿瘤均是十分常见的疾病,而且诊断较为困难。自身免疫性疾病患者中,有相当一部分病人的血清或其他体液中可检测到一种或多种自身抗体,能为自身免疫疾病的诊断提供非常有价值的依据,不论从临床诊断,治疗和预后随访,或是对自身免疫疾病的机理研究,自身抗体检查方法与方式的研究是一个重要的问题。

在检查自身抗体的方法中,目前较常见的标准技术是间接免疫荧光法(IIF),该方法敏感,简单且重复性好,如果有一台质量较好的荧光显微镜,几乎所有的实验室都可开展,通过一次实验即可得到自身抗体谱的信息,快速、标准化,其特点是:1)特异性强,阳性与阴性样品的信号强度对比明显,通过显微镜观测能够精确地判断组织或细胞内荧光的分布,自身抗原的位置决定了其相应抗体的典型的荧光模式,所有与此典型模式不相关区域的染色被认为是非特异性染色。2)直接以血清稀释即可检测,不需要复杂、费时的化学制备及纯化程序。3)保留了原检测基质的完整抗原谱,因而可同时检测大量抗体,具有很高的检测效率。4)可检测到一些至今未知的抗体。四十多年这一技术并未有很大的改变,表明了其简捷有效性,但随着自身抗体检测数目的增加、检测基质种属提供更多的选择后,更高的检测特异性和更快的检测效率已成为目前需要解决的问题。而要解决这一问题,就需要从检测基质的选择上入手,传统上的检测基质是采用新鲜组织冰冻切片及培养细胞,目前商品化的是以欧蒙免疫实验室为代表的生物薄片技术,其核心技术是在载玻片同一血清反应区粘上贴附有针对不同抗原的不同基质的生物薄片。现有基质中的新鲜组织冰冻切片不易保存且成本较高,组织结构不够清晰限制了其进一步发展和使用;

而培养细胞局限性强，只能用于检测抗核抗体（如 Hep2 细胞），而且不能在原位上进行检测分析是其最大局限；两者一起应用于芯片上，联合检测也不能很好地检测到所有自身抗体。据了解，目前石蜡切片已开始用于检测自身抗体，但它目前仅限于单个组织、单个点的检测，且还处于实验室阶段。

发明内容：

本发明要克服现有技术中新鲜组织冰冻切片基材不易保存且成本较高，组织结构不够清晰；培养细胞局限性强，只能用于检测抗核抗体（如 Hep2 细胞），且不能在原位上进行检测分析；两者联合检测也不能很好地检测到所有自身抗体的缺点。

为克服现有技术的缺点，本发明提供了一种自身抗体检测组织芯片，包括基材、基材上的基质，其特殊之处在于：所述基质是石蜡包埋组织。

所述芯片上的石蜡包埋组织的制备方法是：从供体石蜡组织标本中取出已由病理医生诊断的圆柱状组织核心，将其按设计顺序放置在另一块空白蜡块中，形成组织微阵列蜡块，由此可获得组织微阵列切片，将切片放置在经硅化和胶化的玻片上即形成组织微阵列生物芯片，每一个组织微阵列生物芯片上包含大量有序的各种相同或不同的供体石蜡组织标本。

石蜡切片常规包埋、浸蜡、切片处理，载片以 APES 处理。

所述供体石蜡组织标本的供体种属来源包括人、猴、大鼠、小鼠、猪、兔及豚鼠，不同的细胞或组织来源包括 Hep-2 细胞、脐静脉内皮细胞、肺、肝、胃、食道、舌、十二指肠、小肠、结肠、直肠、甲状腺、甲状旁腺、肾、肾上腺、胰腺、前列腺、大脑、小脑、骨骼肌、心肌、平滑肌、血管、垂体、睾丸、卵巢、表皮、视网膜、骨、软骨、眼、胎盘、脾脏、腮腺、颌下腺、舌下腺、胸腺、粒细胞、血小板、脂肪组织、神经组织、结缔组织等。

所述芯片上的基质还包括新鲜组织冰冻切片和/或培养细胞。针对特定的疾病选取最能检测出特异性的组合。

所述芯片上新鲜组织冰冻切片基质的制备方法是：新鲜组织以 OCT 复合物包埋后在干冰环境下以空心针头取出圆柱状组织核心，将其按设计顺序放置到受体 OCT 阵列模块中形成组织阵列，全过程中 OCT 包埋组织及受体 OCT 阵列模块均借助干冰保持低温环境。新鲜冰冻组织微阵列制成后在冷冻圆柱头上以 OCT 固定，以低温显微薄片切片机制作切片，贴附于经硅化和胶化的玻片上即获得新鲜冰冻组织芯片，

每张芯片上包含大量有序的不同或相同的组织标本。

所述芯片上新鲜组织冰冻切片基质的制备方法中，冰冻切片新鲜组织取材在 3 小时之内，于恒冷条件中切片，片厚 4-6 μm ，载片以 APES 处理，芯片置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 封存备用。

所述培养细胞基质的制备方法是：①将细胞培养有孔橡胶模具消毒并安装在已消毒灭菌的载玻片上，放入无菌湿盒中，按照设计的排列顺序依次在各孔接种同种或不同种细胞，待细胞贴壁后去除橡胶模具即形成单一细胞芯片，每张芯片上排列有大量有序的培养细胞；②将消毒灭菌的聚苯乙烯盖片放入细胞培养皿内，待细胞铺满盖片后取出，采用机械化制备仪器将盖片按预先设计的大小切割，并按设计的排列组合方式将其贴附至含石蜡包埋组织或冰冻新鲜组织的芯片上，即形成了由石蜡组织、冰冻新鲜组织及培养细胞组成的组合芯片。③细胞常规培养，使其单层生长铺满瓶底至 90% 的区域，弃去培养液，4% 中性甲醛固定，用细胞刮子刮下贴壁细胞离心，以优质琼脂悬浮细胞，待冷却凝固后，以低熔点石蜡常规包埋，切片。

所述培养细胞基质的制备方法中，细胞常规培养 48~72h，细胞数为 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 个/ mm^2 。

与现有技术相比，本发明的优点是：

- 1、免疫荧光技术可在该组织芯片上检测与筛选一种或多种自身免疫性疾病患者血清中的自身抗体，通过检测自身抗体含量的有无、多少及其特定的荧光模式、部位等信息，为判定自身免疫性疾病发生、发展、预测和转归提供依据；
- 2、石蜡切片已开始用于检测自身抗体，如检测抗心肌抗体、抗骨骼肌抗体、抗血管内皮基底膜抗体等，在经过抗原修复后石蜡切片也能获得较好的检测效果，其保存方便，成本低廉及组织结构清晰，定位准确，是继冰冻切片和培养细胞之后的又一良好基质；
- 3、可以与传统上的检测基质，新鲜组织冰冻切片及培养细胞一起应用于芯片上，联合检测几乎所有自身抗体；
- 4、可实现快速筛查和检测自身抗体，一次实验，一份血清，不同检测基质获得的结果相互补充，可很快地得到一份关于患者自身抗体谱的详细信息；
- 5、本发明提供的是一种不随时间而变质失效的组织切片。
- 6、可机械化制备，成本低，为产业化生产提供了简单可行的制备方法。

7、易于商品化，产品可包括非器官/组织特异性抗体检测芯片、器官/组织特异性抗体检测芯片与自身免疫性疾病抗体检测芯片三类，该芯片利用间接免疫荧光法检测自身免疫性疾病患者血清中的自身抗体，通过一次检测可以获得一位或多位患者的一种或多种血清自身抗体资料（自身抗体谱）。这种组织微阵列生物芯片的组织/细胞点阵的排列顺序是针对各种自身免疫性疾病预先设计的，并可进行多种组合排列，可进行各种不同的血清自身抗体分析，可同时比较和分析数十个乃至数百个同一类型疾病的不同患者及不同类型疾病患者血清中自身抗体样本的异同、变化及其相互关系和临床意义。该检测芯片可用于一位患者的一种自身抗体检测或多种自身抗体检测与筛选；可用于多位患者的一种自身抗体检测或多种自身抗体检测与筛选；可用于寻找新的自身抗体。

附图说明：

图 1~图 2 是非器官/组织特异性抗体检测芯片两个实施例的示意图；

图 3~图 4 是 特异性自身抗体检测芯片两个实施例的示意图；

图 5 是自身免疫性甲状腺病（AITD）自身抗体检测芯片的实施例示意图；

图 6 是原发性胆汁性肝硬化检测芯片实施例的示意图；

图 7 是自身免疫性甲状腺病（AITD）自身抗体检测芯片实施例的示意图。

具体实施方式：

下面将参照附图通过具体实施方式对本发明加以说明，本发明的保护范围并不仅限于下述实施例。

根据检测指标的不同，所说的芯片分为非器官/组织特异性抗体检测芯片、器官/组织特异性抗体检测芯片自身免疫性疾病抗体检测芯片。

（一）非器官/组织特异性抗体检测芯片上的检测基质是 Hep-2 细胞与猴（或人、大鼠、小鼠）肝组织石蜡包埋组织切片或新鲜组织冰冻切片的组合，用于 30 多种非器官/组织特异性抗体的检测。肝组织种属来源为大鼠、小鼠、人或猴，可对 30 多种非器官/组织特异性自身抗体进行检测与筛选。

这类检测芯片设计与特征为：芯片上排列的基本单元为 Hep-2 细胞与肝组织的组合，单元面积（或直径，下略）大小为 $0.12\text{cm} \times 0.12\text{cm} \sim 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.2\text{cm} \times 0.2\text{cm} \sim 0.8\text{cm} \times 0.8\text{cm}$ ，组合方式如下：M 个 Hep-2 细胞区域与 N 个肝组织区域组

合在同一个血清反应区域，M 的范围为 1~10 个，N 的范围为 1~10 个，共 100 种组合。其基本组合方式为 1 个 Hep-2 细胞区域与 1 个肝组织区域，其他组合方式例如：3 个 Hep-2 细胞区域与 2 个肝组织区域；5 个 Hep-2 细胞区域与 5 个肝组织区域；6 个 Hep-2 细胞区域与 4 个肝组织区域；7 个 Hep-2 细胞区域与 3 个肝组织区域；8 个 Hep-2 细胞区域与 8 个肝组织区域等亦可组成一个基本单元。

每张检测芯片上容纳有 4~400 个基本单元而形成组织微阵列，最佳为 4~200 个基本单元，常用的为 4~80 个基本单元。每个基本单元均可以用于血清抗体检测、阳性对照（加已知阳性血清）、荧光抗体对照（不加检测血清，以荧光抗体替代）及自发荧光对照（以 PBS 替代检测血清），即检测一份血清至少需由血清抗体检测、阳性对照、荧光抗体对照、自发荧光对照共四个基本单元组织组成。根据检测的需要可设置多个相同的基本单元，用于同一血清或不同血清多个稀释度的检测。

下面以“双链 DNA 抗体（抗 dsDNA）特异性抗体检测芯片”为例，说明非器官/组织特异性抗体检测芯片的具体实施方式。

实施例 1，参见图 1，

1、抗双链 DNA 抗体检测芯片：

检测基质选择培养的 Hep-2 细胞与肝组织的基质组合，Hep-2 细胞与肝组织组合系检测双链 DNA 抗体的标准基质，其基本单元的组合方式为 1 个 Hep-2 细胞区域与 1 个肝组织区域组合为一个检测区域，基本单元面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.6\text{cm}$ ，其中 Hep-2 细胞区域面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ ，Hep-2 细胞数为 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ 个/ mm^2 ，肝组织区域面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ 。

本检测芯片上排列有 16 个基本单元，排列成 4 个基本单元组合而形成组织/细胞微阵列，一次可检测至少 4 份不同的血清标本或者同一种血清设置至少 4 种不同的血清稀释度进行检测。所说的肝组织基质是石蜡切片或新鲜肝组织冰冻切片。

2、抗双链 DNA 抗体检测芯片的制作过程：

由病理医生对供体肝组织 HE 切片作形态学观察并在供体蜡块上准确标记所需要的靶点；根据设计将受体蜡块进行打孔，孔径大小为 0.3cm ，与供体蜡块组织钻取孔径大小一致；利用打孔仪钻取圆柱状肝组织，每个点直径为 0.3cm ，并转移至受体蜡块相应的孔位上，即制成所需的 16 点肝组织阵列蜡块，肝石蜡组织切片的排列方式为 16 个点，每个点直径为 0.3cm ，纵向为 4 个点，每点间距为 0.4cm ，横向为 4 个

点,每个点间距为0.8cm,其中0.3cm的区间预留放置面积大小为0.3cm×0.3cm Hep-2 细胞盖片。Hep-2 细胞基质的制备: Hep-2 细胞常规培养,将消毒灭菌的聚苯乙烯盖片或硅胶盖片放入细胞培养皿内,待细胞单层长至盖片面积约90%时后取出,采用机械化制备仪器将盖片切割为0.3cm×0.3cm大小,将切割后盖片贴附至前述肝石蜡组织切片上预留的区间,共贴附16张Hep-2细胞盖片,形成Hep-2细胞与肝组织石蜡切片组合检测芯片。

3、抗双链DNA抗体检测芯片的检测:

所说的检测芯片均可用于初筛双链DNA抗体,检测方法为公知的间接免疫荧光法(IIF),血清起始稀释度为1:100,荧光抗体为异硫氰酸荧光素标记抗人IgG抗体(IgG-FIHC)。

检测操作流程如下:

①需要时进行区域标记:从试剂盒中取出检测芯片,不要触摸生物薄片,用笔编号或标记每份血清各自的检测区,同时标明每份血清的抗体检测区、阳性对照区(加已知阳性血清)、荧光抗体对照(不加检测血清,以荧光抗体替代)、自发荧光对照(以PBS替代检测血清)。

②稀释血清:建议根据使用说明稀释血清,用PBS-Tween(0.01PBS,20% Tween, PH7.4)缓冲液稀释血清,本次检测稀释度为1:100或者可以根据需要设置至少4种不同的稀释度对同种血清进行检测。

③第一次孵育:每孔分别滴加25ul未免疫正常山羊血清封闭,室温10分钟,甩去封闭血清,然后按顺序分别滴加25ul稀释后血清、已知阳性血清、荧光抗体、PBS至血清抗体检测区、阳性对照区、荧光抗体对照区,自发荧光对照区。避免产生气泡。滴加完所有待测标本后再开始孵育,室温温育30分钟,一次至少检测4份血清,最多可检测13种血清。

或者根据需要设置不同的稀释度进行检测,如1:5、1:25、1:50、1:100等,本芯片含16个基本单元,除去阳性对照区、荧光抗体对照区,自发荧光对照区外,至少可对一种血清设置4种不同的稀释度,最多可对一种或多种血清设置13种不同的稀释度。

④冲洗:用烧杯盛PBS-Tween缓冲液流水冲洗载片,然后立即以PBS-Tween缓冲液的浸洗3分钟。

⑤第二次孵育：滴加 25ul 的抗人 IgG-FITC 至加样板的各反应区，全部加完后继续孵育，室温温育 30 分钟，抗人 IgG-FITC 使用前需以 PBS-Tween 缓冲液稀释、混匀。

⑥冲洗：用烧杯盛 PBS-Tween 缓冲液流水冲洗载片，然后立即以 PBS-Tween 缓冲液的浸洗 3 分钟。

⑦封片：以甘油/PBS（缓冲甘油）封片，每一反应区约 20ul。

⑧结果判断：在荧光显微镜下观察荧光，抗双链 DNA 抗体荧光模式为，Hep-2 细胞（细胞核均质型荧光，在分裂期荧光增强，染色体周边荧光则减弱），肝组织（细胞核均质型荧光，偶尔有较粗或较细的荧光）。如阳性对照、待检血清出现明亮荧光而荧光抗体对照、自发荧光对照没有特异性荧光或阴性荧光，则判断为阳性。

⑨临床意义：双链 DNA 抗体是系统性红斑狼疮的标志性抗体，阳性率在 70%以上，活动期则更高，故此抗体滴度的测定可为系统性红斑狼疮的病情监测及治疗方案的选择提供有效的依据。必要时可设置不同的稀释度如 1: 5, 1: 25; 1: 50 至 1: 800 在高密度的检测芯片上进行检测，滴度越高越具有临床意义。如在正常人血清中检测到此抗体，则提示其中有 85%的人五年内会发展为系统性红斑狼疮。间接荧光法检测双链 DNA 抗体特异性较高，但敏感性不如酶联免疫吸附测定法，建议对怀疑系统性红斑狼疮患者联合应用上述方法诊断。

实施例 2，参见图 2：该检测芯片上排列有 5 个基本单元，每个基本单元由上向下排列依次为 Hep-2 细胞、猴肝、大鼠肝、人胚肝石蜡切片组合，每点大小均为 0.3cm，纵向每点间距为 0.3cm，横向每点间距为 0.8cm，Hep-2 细胞数为 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ 个/ mm^2 ，一次可检测 1~3 份血清。

（二）器官/组织特异性抗体检测芯片上排列的基本单元为针对各种自身免疫性抗体进行检测的同种或不同种单一组织或组织组合，上述每种自身抗体的出现与一种或多种自身免疫性疾病有关，或是某类自身免疫性疾病的特异性/标志性抗体，本组芯片可用于临床协助诊断自身免疫性疾病：可用于科研中筛选，鉴别自身抗体。

它包括抗中性粒细胞胞浆抗体（ANCA）检测芯片，人中性粒细胞与人或猴肝组织组合；抗线粒体抗体（AMA）检测芯片，人肾皮质、大鼠或小鼠肾脏组合；抗肝肾微粒体抗体（LKM）检测芯片，大鼠、小鼠、猴或人的肝脏与肾脏组织组合；抗肌内膜抗体（EMA）检测芯片，人或猴的消化道组织（食道、胃肠道）组合；抗神经原核抗体

检测芯片 (ANNA-1、ANNA-2), 人或猴的小脑与小肠; 抗普肯耶细胞抗体 (PCA-1) 检测芯片, 人或猴的小脑; 抗内皮细胞抗体 (AECA) 检测芯片, 人或猴的肺组织和人脐静脉培养内皮细胞; 抗角蛋白抗体 (AKA) 检测芯片, 大鼠、小鼠、人或猴的食管组织; 抗涎腺导管抗体 (抗唾液腺排除道抗体) 检测芯片, 人或猴的腮腺组织; 抗心肌抗体 (ASA、AFA) 检测芯片, 人或猴的心肌组织; 抗骨骼肌抗体/抗横纹肌抗体 (StrAb) 检测芯片, 人或猴的骨骼肌组织; 抗皮肤成分自身抗体/抗表皮基底膜抗体 (BMZ) /类天疱疮抗体/抗基底膜带抗体检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的皮肤、食管和舌组织; 抗桥粒抗体/天疱疮抗体检测芯片, 人、猴、大鼠的食管和舌组织; 抗胃壁细胞抗体和抗内因子抗体 (PCA) 检测芯片, 大鼠或小鼠的胃组织; 抗胃泌素细胞 (GCA) 抗体检测芯片, 大鼠或小鼠的胃窦组织; 抗肾小球基底膜抗体/GP 抗体/GBM 抗体检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的肾组织; 抗肾上腺皮质抗体/肾上腺抗体检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的肾上腺组织; 抗小肠杯状细胞抗体 (GCA) 检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的小肠组织; 抗胰腺腺泡抗体 (PAA) 检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的胰腺组织; 抗胰岛细胞抗体 (ICA) 检测芯片, 人、兔、大鼠或小鼠的胰腺组织; 抗结肠抗体检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的结肠组织; 抗胆管抗体检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的肝组织; 抗甲状腺球蛋白抗体 (TGA、ATGA) 检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的甲状腺组织; 抗甲状腺微粒体抗体 (TMA、TPO) 检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的甲状腺组织; 抗平滑肌抗体 (SMA、ASMA) 检测芯片, 大鼠或小鼠的胃、肝、肾组织; 抗肝特异性蛋白抗体/肝特异性膜脂蛋白抗体 (LSP) 检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的肝和肾组织; 抗精子抗体 (ASAB) 检测芯片, 人、猴睾丸组织; 抗卵子抗体 (EMAB) 检测芯片, 人、猴、猪卵巢组织; 抗心肌磷脂抗体 (APA, ACA) 检测芯片, 人、猴或大鼠心肌组织; 抗可溶性肝抗原抗体 (SLA) 检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的肝和肾组织; 抗肝细胞膜抗原抗体 (LMA) 检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的肝组织; 抗枯否氏细胞抗体检测芯片, 人、猴、大鼠或小鼠的肝组织或肺组织; 抗肝细胞膜 (AHM) 抗体检测芯片, 大鼠肝、胃窦、肾皮质及髓质组合; 抗神经原抗体检测芯片, 人或猴的小脑, 神经与小肠组合。

本组检测芯片的设计与特征为: 由单一点组织构成的基本单元面积 (或直径大小, 下略) 大小为 $0.06\text{cm} \times 0.06\text{cm} \sim 0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$, 最佳面积为 $0.1\text{cm} \times 0.1\text{cm} \sim 0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$; 由两点组织构成的基本单元面积大小为 $0.12\text{cm} \times 0.12\text{cm} \sim 1.0\text{cm} \times 1.0\text{cm}$,

最佳面积为 $0.2\text{cm} \times 0.2\text{cm} \sim 0.8\text{cm} \times 0.8\text{cm}$ ；由三点组织构成的基本单元面积大小为 $0.18\text{cm} \times 0.18\text{cm} \sim 1.2\text{cm} \times 1.2\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm} \sim 0.9\text{cm} \times 0.9\text{cm}$ ；由四点组织构成的基本单元面积大小为 $0.24\text{cm} \times 0.24\text{cm} \sim 1.6\text{cm} \times 1.6\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.4\text{cm} \times 0.4\text{cm} \sim 1.2\text{cm} \times 1.2\text{cm}$ ；由五点组织构成的基本单元面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm} \sim 2.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm} \sim 1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ ；由六点组织构成的基本单元面积大小为 $0.36\text{cm} \times 0.36\text{cm} \sim 2.4\text{cm} \times 2.4\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.6\text{cm} \times 0.6\text{cm} \sim 1.8\text{cm} \times 1.8\text{cm}$ ，最多可由 30 种不同组织组合形成一个基本单元。

每张检测芯片上容纳有 4~800 个基本单元而形成组织微阵列，最佳为 4~400 个基本单元，常用的为 4~100 个基本单元。每个基本单元均可以用于血清抗体检测、阳性对照（加已知阳性血清）、荧光抗体对照（不加检测血清，以荧光抗体替代）及自发荧光对照（以 PBS 替代检测血清），即检测一份血清至少由血清抗体检测、阳性对照、荧光抗体对照、自发荧光对照四个基本单元组成。根据检测的需要可设置多个相同的基本单元，用于同一血清或不同血清多个稀释度的检测。

下面以“抗桥粒抗体/天疱疮抗体检测芯片”为例，说明器官/组织特异性抗体检测芯片的具体实施方式。

实施例 3，参见图 3：

1、抗桥粒抗体/天疱疮抗体检测芯片的制作过程

检测基质选择人（或大鼠）的食管及舌组织石蜡切片组合，系检测双链 DNA 抗体的标准基质，其基本单元的组合方式为 1 个食管组织区域与 1 个舌组织区域组合为一个检测区域（基本单元），基本单元面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.6\text{cm}$ ，其食管组织区域面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ ，舌组织组织区域面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ 。

该检测芯片中石蜡组织切片的排列方式为 4×12 个点，每个点直径为 0.3cm ，纵向为四个点，依次为食管组织、舌组织、食管组织和舌组织，第 1、2 点相连组成一个基本单元，第 3、4 点相连组成一个基本单元，第 2 与第 3 点间距为 0.6cm ，横向为 12 列，组织排列与纵向保持一致，每个点间距为 0.2cm 。对供体食管组织、舌组织 HE 切片作形态学观察并在供体蜡块上准确标记所需要的靶点；本实施例检测芯片上排列有 24 个基本单元形成组织/细胞微阵列，一次至少可检测 6~21 份血清或根据需要为一种或多种血清设置 6~21 种稀释度。

2、抗桥粒抗体/天疱疮抗体检测芯片的制作过程

根据设计将受体蜡块进行打孔，孔径大小为 0.3cm，与供体蜡块组织钻取孔径大小一致；利用打孔仪钻取圆柱状食管及舌组织，每个点直径为 0.3cm，并转移至受体蜡块相应的孔位上，即制成所需的 40 点阵列蜡块；常规方法制作石蜡切片，每一个组织微阵列生物芯片上含 24 点的食管组织石蜡切片标本与 24 点的舌组织石蜡切片标本。

新鲜组织冰冻切片的排列方式为 4×12 个点，每个点直径为 0.3cm，纵向为四个点，依次为食管组织、舌组织、食管组织和舌组织，第 1、2 点相连组成一个基本单元，第 3、4 点相连组成一个基本单元，第 2 与第 3 点间距为 0.6cm，横向为 12 个点，组织排列与纵向保持一致，每个点间距为 0.2cm。采用机械化制备仪器制备芯片，新鲜食管组织、舌组织以 OCT 复合物包埋后在干冰环境下以 0.3cm 空心针头取出圆柱状组织核心，放置到受体 OCT 阵列模块中形成 48 点组织阵列共 24 个单元，全过程中 OCT 包埋组织及受体 OCT 阵列模块均借助干冰保持低温环境。以低温显微薄片切片机制作切片，贴附于经硅化和胶化的玻片上即获得新鲜冰冻组织芯片。

3、抗桥粒抗体/天疱疮抗体检测芯片的检测过程

本检测芯片可以检测抗桥粒抗体/天疱疮抗体，检测方法为公知的间接免疫荧光技术（IIF），血清起始稀释度为 1:5，荧光抗体为异硫氰酸荧光素标记抗人 IgG 抗体（IgG-FIHC），一次至少可检测 6 份血清标本，最多可检测 21 份血清标本。

检测操作流程如下：

①需要时进行标记；

②稀释血清；

③抗原修复：将芯片放入盛有抗原修复液（0.01M 柠檬酸钠，PH7.4）的容器内，置医用微波炉内加热并持续 10 分钟，取出，自然冷却，以 0.01MPBS（PH7.4）洗涤 5 分钟；

④第一次孵育；

⑤冲洗；

⑥第二次孵育；

⑦冲洗；

⑧封片；

⑨结果判断：立即在荧光显微镜下观察荧光，抗桥粒抗体/天疱疮抗体荧光模式为上皮区棘细胞层间质区域颗粒型和网状黄绿色荧光。如阳性对照、待检血清出现明亮荧光而荧光抗体对照、自发荧光对照没有特异性荧光或阴性荧光，则判断为阳性；

⑩临床意义：抗桥粒抗体/天疱疮抗体是天疱疮特异性标志抗体，抗体滴度与疾病活动性有关，检测此抗体可监测病情、协助制定治疗方案。在系统性红斑狼疮、重症肌无力、青霉素过敏患者可出现类似荧光，但滴度一般很低。如需要区分叶状天疱疮抗体与寻常天疱疮抗体，应采用免疫印迹法区分。有时接免疫荧光检测可能为阴性，应做皮肤活检。必要时设置梯度，如 1: 5, 1: 25, 1: 50, 1: 100, 1: 200 等，据此判断疾病活动性，监测病情。

实施例 4，参见图 4：该检测芯片含 20 个基本单元，共 60 点检测芯片，选择大鼠（或小鼠、人）的胃、肝、肾组织石蜡切片或冰冻切片组合，每点大小均为 0.3cm，纵向每点间距为 0.3cm，横向每点间距为 0.8cm，用于抗平滑肌抗体（ASMA）检测，一次可检测 5~17 份血清，或者设置同种或不同血清多种稀释度进行检测。

（三）自身免疫性疾病抗体检测芯片上排列的基本单元为针对各种自身免疫性疾病进行检测的同种或不同种单一组织或组织组合，其目的为检测该种疾病的具有诊断、参考意义的一种或多种自身抗体，包括特征性/标志性自身抗体、常见的自身抗体以及需要鉴别的其它自身抗体等。

包括自身免疫性甲状腺病（AITD）检测芯片，人、猴或大鼠甲状腺组织/胰腺组织组合；甲状旁腺功能低下检测芯片，人、猴或大鼠甲状旁腺组织组合；系统性红斑狼疮（SLE）检测芯片，Hep-2 细胞/肝/食管/气管/肾脏/心脏/骨骼肌组合；类风湿性关节炎检测芯片，Hep-2 细胞/肝/食管/气管/心脏组织组合；干燥综合征（SS）与硬皮病检测芯片，Hep-2 细胞/肝/食管/唾液腺/泪腺组织组合；多发性肌炎（PM）及皮肌炎（DM）检测芯片，Hep-2 细胞/肝组合；混合性结缔组织病（MCTD）检测芯片，Hep-2 细胞/肝/食管/气管/肾脏/心脏/骨骼肌组合；萎缩性胃炎及恶性贫血（PA）检测芯片，人猴、大鼠或小鼠胃组织（胃体及胃底部）组合，胰岛素依赖型糖尿病（I 型）检测芯片，胰腺组织/大脑组合；原发性免疫性系统性血管炎检测芯片，人、猴肺组织/脐静脉内皮细胞组合；重症肌无力（MG）检测芯片，人、大鼠、小鼠骨骼肌/Hep-2 细胞/肝/甲状腺组合；多发性硬化症（MS）检测芯片，大脑/小脑/脑干组

合；特异性肠炎（溃疡性结肠炎、克隆病）检测诊断芯片，肠组织/胰腺组织组合；原发性肾上腺皮质功能不全（Addison's 病）检测芯片，人、猴肾上腺组织/睾丸/卵巢组合；Goodpasture 综合症（肺肾综合征/肾小球基底膜肾炎）检测芯片，人、猴肾组织/肺组织组合；自身免疫性皮肤病检测芯片，人、大鼠、猴食道组织/小肠组织组合；心脏疾病检测芯片，人或猴心肌组织；不孕症检测芯片，人、猴睾丸/卵巢组合；自身免疫性肝炎检测芯片，人、猴、大鼠肝脏/肾脏/睾丸组合；原发性胆汁性肝硬化检测芯片，大鼠、小鼠肾脏/胃/肝脏/Hep-2 细胞组合。

由单一点组织构成的基本单元面积（或直径大小，下略）大小为 $0.06\text{cm} \times 0.06\text{cm} \sim 0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.1\text{cm} \times 0.1\text{cm} \sim 0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ ；由两点组织构成的基本单元面积大小为 $0.12\text{cm} \times 0.12\text{cm} \sim 1.0\text{cm} \times 1.0\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.2\text{cm} \times 0.2\text{cm} \sim 0.8\text{cm} \times 0.8\text{cm}$ ；由三点组织构成的基本单元面积大小为 $0.18\text{cm} \times 0.18\text{cm} \sim 1.2\text{cm} \times 1.2\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm} \sim 0.9\text{cm} \times 0.9\text{cm}$ ；由四点组织构成的基本单元面积大小为 $0.24\text{cm} \times 0.24\text{cm} \sim 1.6\text{cm} \times 1.6\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.4\text{cm} \times 0.4\text{cm} \sim 1.2\text{cm} \times 1.2\text{cm}$ ；由五点组织构成的基本单元面积大小为 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm} \sim 2.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm} \sim 1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ ；由六点组织构成的基本单元面积大小为 $0.36\text{cm} \times 0.36\text{cm} \sim 2.4\text{cm} \times 2.4\text{cm}$ ，最佳面积为 $0.6\text{cm} \times 0.6\text{cm} \sim 1.8\text{cm} \times 1.8\text{cm}$ ，最多可由 30 种不同组织组合形成一个基本单元。

每张检测芯片上容纳有 4~800 个基本单元而形成组织微阵列，最佳为 4~200 个基本单元，常用的为 4~100 个基本单元。每个基本单元均可以用于血清抗体检测、阳性对照（加已知阳性血清）、荧光抗体对照（不加检测血清，以荧光抗体替代）及自发荧光对照（以 PBS 替代检测血清），即检测一份血清至少由血清抗体检测、阳性对照、荧光抗体对照、自发荧光对照。根据检测的需要可设置多个相同的基本单元，用于同一血清或不同血清多个稀释度的检测。

实施例 5，参见图 5：以“自身免疫性甲状腺病（AITD）自身抗体检测芯片”为例。

1、自身免疫性甲状腺病（AITD）自身抗体检测芯片

检测基质选择 Hep-2 细胞/大鼠甲状腺组织/肝/胃组织石蜡包埋组织组合或与新鲜冰冻组织组合，其中应用 Hep-2 细胞/肝/胃可将甲状腺微粒体抗体与抗核抗体，抗线粒体抗体区分。其基本单元的组合方式为 1 个 Hep-2 细胞区域、1 个甲状腺组织

区域、1个肝组织区域与1个胃组织区域组合，基本单元面积大小为 $0.4\text{cm} \times 1.6\text{cm}$ ，其中Hep-2细胞盖片大小为 $0.4\text{cm} \times 0.4\text{cm}$ ，甲状腺组织、肝、胃组织区域直径大小均为 0.4cm 。本实施例检测芯片上排列有4个基本单元，其排列方式为 4×4 个点，其中石蜡切片为 3×4 个点，Hep-2细胞盖片为 1×4 个点，石蜡切片每个点直径为 0.4cm ，纵向为三个点，依次为甲状腺组织、肝组织、胃组织，每个点间距为 0.2cm ，横向为四个点，组织排列与纵向保持一致，每个点间距为 0.8cm 。分别用于血清抗体检测、阳性对照、荧光抗体对照和自发荧光对照用，一次可检测1份血清标本。

2、自身免疫性甲状腺病（AITD）自身抗体检测芯片的制作过程

由病理医生对供体组织、组织HE切片作形态学观察并在供体蜡块上准确标记所需要的靶点；根据设计将受体蜡块进行打孔，孔径大小为 0.4cm ，与供体蜡块组织钻取孔径大小一致；利用打孔仪钻取圆柱状甲状腺组织、胃、肝组织，每个点直径为 0.4cm ，并转移至受体蜡块相应的孔位上，即制成所需的 3×4 点阵列蜡块；常规方法制作石蜡切片，每一个组织微阵列生物芯片上含4点甲状腺组织石蜡切片标本、4点肝组织石蜡切片标本、4点胃组织石蜡切片标本。Hep-2细胞常规培养，将消毒灭菌的硅胶盖片放入细胞培养皿内，待细胞单层长至盖片面积约90%时后取出，此时Hep-2细胞数为 $2.5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个/ mm^2 ，采用机械化切割仪器将盖片切割为 $0.4\text{cm} \times 0.4\text{cm}$ 大小，将切割后盖片贴附至石蜡组织切片上预留的区间，共贴附 1×4 张Hep-2细胞盖片，形成Hep-2细胞与甲状腺组织、肝组织、胃组织石蜡切片组合检测芯片。

3、自身免疫性甲状腺病（AITD）自身抗体检测过程

本检测芯片可检测自身免疫性甲状腺病（AITD）患者血清中的自身抗体，检测方法为公知的间接免疫荧光技术（IIF），血清起始稀释度为1:50，荧光抗体为异硫氰酸荧光素标记抗人IgG抗体及IgGAM抗体，检测抗体为抗甲状腺微粒体抗体（TPO）、抗甲状腺球蛋白抗体（TGA）、抗核抗体及抗线粒体抗体，一次可检测1份血清标本。

检测操作流程如下：

①根据需要进行标记；

②稀释血清；

③抗原修复：每孔分别滴加 $25\mu\text{l}$ 0.1%胰蛋白酶， 37°C 消化20分钟；或0.5%胃蛋白 37°C 消化20分钟，以0.01PBS洗5分钟。

④第一次孵育；

⑤冲洗；

⑥第二次孵育；

⑦冲洗；

⑧封片；

⑨结果判断：立即在荧光显微镜下观察荧光，荧光模式为①抗甲状腺微粒体抗体，甲状腺滤泡上皮胞浆颗粒性荧光，应用 Hep-2 细胞/肝/胃可将该抗体与抗核抗体，抗线粒体抗体区分；②抗甲状腺球蛋白抗体为大部分滤泡腔内网状荧光。如阳性对照、待检血清出现明亮荧光而荧光抗体对照、自发荧光对照没有特异性荧光或阴性荧光，则判断为阳性。

⑩临床意义：TPO 及 TGA 见于 Grave's 病、原发性黏液性水肿、I 型糖尿病、Addison's 病、淋巴滤泡性甲状腺炎、恶性贫血。TPO 抗体为人类自身免疫性甲状腺炎理想的标记抗体，阳性荧光支持自身免疫性甲状腺肿的诊断，但该抗体也出现于其他类型自身免疫性甲状腺病，故该抗体不能进一步进行分类。TPO 与 TGA 联合检测时，几乎 100%的甲状腺炎患者至少出现上述一种抗体，阴性结果可以排除甲状腺炎的诊断。如果在正常人群中检测甲状腺自身抗体阳性则提示为易患自身免疫性甲状腺病的危险因子。

实施例 6，参见图 6：一种原发性胆汁性肝硬化检测芯片上含 18 个基本单元，每个单元 7 个点，依次为 Hep-2 细胞、大鼠肾、胃、肝脏、小鼠肾、胃、肝冰冻切片或石蜡切片组合。每点大小均为 0.2cm，纵向每点间距为 0.15cm，横向每点间距为 0.12cm，可用于初筛原发性胆汁性肝硬化患者，一次可检测 1~15 份血清，或者设置同一种或不同血清多种的稀释度进行检测。

实施例 7，参见图 7：自身免疫性甲状腺病（AITD）自身抗体检测芯片上含 4 个基本单元，每个单元 4 个点，依次为 Hep-2 细胞、大鼠甲状腺、肝、胃组织石蜡切片或新鲜组织冰冻切片组合。

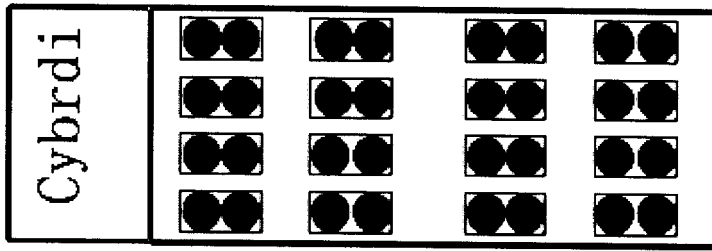


图 1

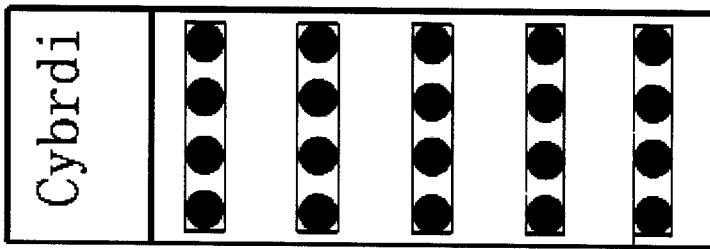


图 2

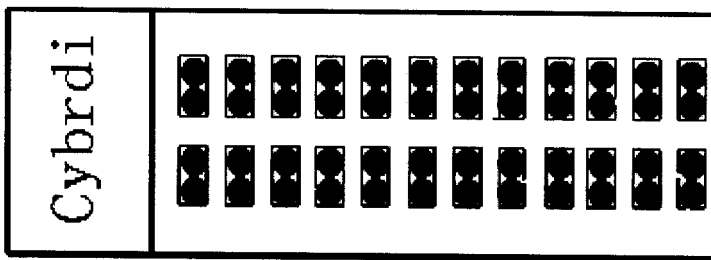


图 3

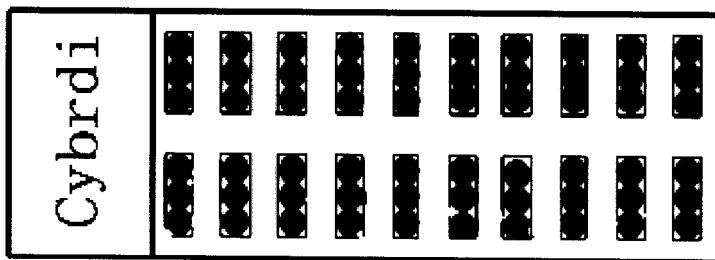


图 4

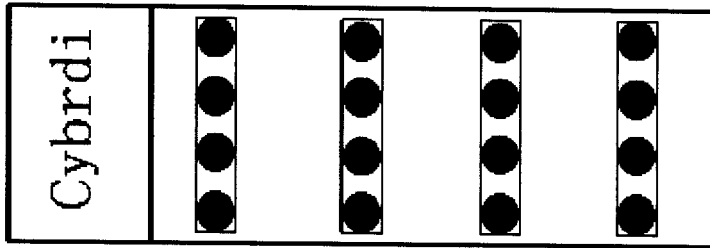


图 5

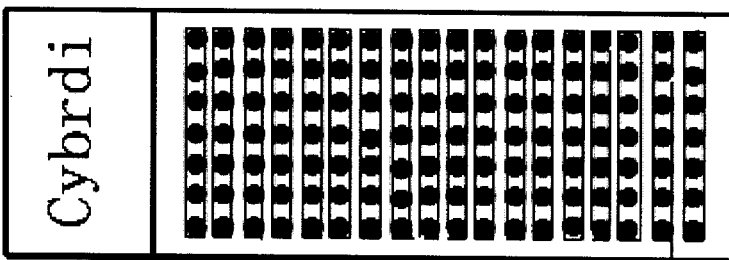


图 6

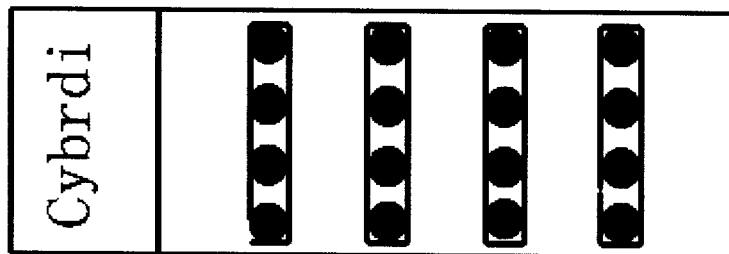


图 7

专利名称(译)	自身抗体检测组织芯片		
公开(公告)号	CN1439878A	公开(公告)日	2003-09-03
申请号	CN03114440.3	申请日	2003-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	陕西超英生物医学研究开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西超英生物医学研究开发有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	陕西超英生物医学研究开发有限公司		
[标]发明人	李军 李晓华 卫军霞 步雪 张美萍 李娟		
发明人	李军 李晓华 卫军霞 步雪 张美萍 李娟		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种生物医学检测芯片，进一步涉及一种自身抗体检测组织芯片。本发明要克服现有技术中基材不易保存且成本较高，组织结构不够清晰；培养细胞局限性强，只能用于检测抗核抗体，不能原位上进行检测分析；两者联合检测也不能很好地检测到所有自身抗体的缺点。为克服现有技术的缺点，本发明提供了一种自身抗体检测组织芯片，包括基材、基材上的基质，其特殊之处在于：所述基质是石蜡包埋组织。所述基质还可包括新鲜冰冻组织或细胞标本，利用间接免疫荧光技术可在该组织芯片上检测、筛选与分析大量相同或不同类型自身免疫性疾病患者血清中的自身抗体，以阐明自身抗体含量的有无、变化、与疾病的相关关系及临床意义。

