

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12M 1/20

G01N 33/50 G01N 33/53

C12Q 1/70 C12Q 1/68



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02807528.5

[43] 公开日 2004年5月26日

[11] 公开号 CN 1500140A

[22] 申请日 2002.3.28 [21] 申请号 02807528.5

[30] 优先权

[32] 2001. 3.28 [33] CN [31] 01105795.5

[32] 2001. 4.27 [33] CN [31] 01112783.X

[32] 2001. 7.11 [33] CN [31] 01113323.6

[32] 2001. 7.12 [33] CN [31] 01126115.3

[32] 2001. 8.14 [33] CN [31] 01126480.2

[32] 2001. 9.29 [33] CN [31] 01126929.4

[32] 2001. 9.29 [33] CN [31] 01126932.4

[32] 2001. 11.23 [33] CN [31] 01132292.6

[86] 国际申请 PCT/CN2002/000209 2002. 3. 28

[87] 国际公布 WO02/077152 英 2002. 10. 3

[85] 进入国家阶段日期 2003. 9. 28

[71] 申请人 上海晶泰生物技术有限公司

地址 中国上海市桂箐路69号25号楼6层

[72] 发明人 张涛 李宾 彭永济 任一萍  
葛海鹏 邓富桥 丁力 李红梅  
蔡其锋 陈莹

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
代理人 林晓红

权利要求书4页 说明书27页 附图9页

[54] 发明名称 用于测试多种待分析物的装置及方法

接触以进行测试。本发明的另一方面在于提供了在同一样品中分析多种待分析物的方法。

[57] 摘要

本发明提供了用于测试至少一个样品中的多种待分析物的装置。该装置包括有一个测试表面的固相基质。在该测试表面上限定了至少一个反应区域，所述反应区域包括至少一个分离的测试位点的阵列。每一个这样的测试位点上都固定有一种测试分子，而不同的测试位点上则可能固定有不同的测试分子。本发明提供了一种用于附着于该固相基质的分隔物。所述分隔物包括在附着表面上的多个孔。这个附着表面与固相装置的测试表面相吻合并适合与之可逆性地附着，以使得当该两部分附着在一起时，每一个孔都与测试表面的一部分相贴合，从而构成了多个防漏的小室。小室内部的测试表面包括多个暴露在小室内部的测试位点。每一个小室优选地具有一个自外界可进入的开口，这样液体可被引入小室中从而可与暴露的测试位点

1、用于测试多种待分析物的装置，其包括一固相基质及一分隔物，所述基质有一个测试表面，该测试表面上有多个被限定于其上的分离的测试位点，每一个所述测试位点具有一种固定于其上的测试分子；所述分隔物在一附着表面上的预定位置上有多个孔，所述的附着表面与所述的测试表面相吻合并适合与之相附着，所述的分隔物能够可拆开地附着于所述的固相基质，以使得每一个所述的孔与所述的测试表面的一部分相贴合，从而构成多个防漏的小室，所述小室内部的所述测试表面具有多个暴露的测试位点，所述小室还具有一个自外界可进入的开口，这样液体可被引入所述小室中从而可与所述暴露的测试位点接触以进行测试。

2、权利要求1的装置，其中所述的测试分子是抗原或抗体。

3、权利要求1的装置，其中提供了一个遮盖物，所述遮盖物具有一个遮盖面，所述遮盖面适合用于关闭所述小室的开口以防止不同小室的溶液之间的溢出或污染。

4、权利要求3的装置，其中所述遮盖物是聚酯薄片。

5、用于测试多种待分析物的装置，其包括：

(a) 具有一平表面的芯片，所述平表面上有多个被限定于其上的反应区域，每一个所述的反应区域还包含至少一个分离的测试位点的阵列，每一个所述的测试位点具有一种固定于其上的测试分子，和

(b) 具有多个被限定于一个边框中的孔的分隔薄片，每一个所述的孔对应于一个反应区域，所述边框适合与所述平表面可拆开地连接，以使得在两者之间产生多个防漏的池，每一个反应区域形成相应的池的底部，而所述薄片的边框形成相邻的池之间的分隔壁。

6、权利要求5的装置，其中所述的测试分子是抗原或抗体。

7、分析一样品中的多种待分析物的方法，其包含以下步骤：

- (a) 在测试表面上的至少一个测试区域中限定多个分离的且在空间上独立的测试位点；
- (b) 在每一个所述的测试位点上固定一种测试分子，以使得多种测试分子固定于其上；
- (c) 在每一个所述测试区域周围提供一个防水屏障；
- (d) 将每一个所述测试区域与适当的测试试剂及待分析样品相接触；
- (e) 将未反应的样品及试剂移除；
- (f) 移除所述屏障；并
- (g) 分析所述测试表面上的所述样品中的待分析物和所述测试分子间的反应情况。

8、权利要求 7 的分析同一样品中的多种待分析物的方法，其中所述的测试表面是芯片的一面，所述的测试分子是抗体或者配体，而所述的步骤(d)及(e)还包括如下步骤：

将所述样品与每一个测试区域中的固定的测试分子共同温育以使得所述待分析物结合于其上，所述的待分析物是交叉反应配体或抗体；

移除未结合的物质；

将适当的第二分子的混合物加入到所述的反应区域并进行温育，每一种所述的第二分子具有一种偶联于其上的信号分子，所述第二分子还适合与所述的适当的待分析物特异性结合；

移除未结合的第二分子；并

在每一个所述测试位点上测试所述信号分子的存在。

9、权利要求 7 的方法，其中所述测试分子是一种激素、药物、受体、酶、核酸、抗生素或配体。

10、权利要求 7 的方法，其中所述第二分子是与所述适当的分析物发生交叉反应的第二抗体；所述信号分子是一种荧光分子，该荧光分子经激发光子激发后能够发射出发射光子，测试所述信号分子存在与否的所述步骤还包括用所述激发光激发所述信号分子以及用荧光探测器来测试发射光子的发射情况的步骤。

11、权利要求 8 的方法，其中所述的信号分子是一种酶，且所述的测试所述信号分子的存在与否的步骤还包括：为所述的酶提供适当的底物并与之一同温育，所述的酶适合将所述底物转化为一种沉淀在所述测试位点上的有色产物。

12、权利要求 8 的方法，其中所述第二分子是与所述的适当的待分析物发生交叉反应的第二抗体；所述信号分子是生物素，且所述的测试所述信号分子的存在与否的步骤还包括：将信号分子与链霉抗生物素或抗生物素蛋白接触以便两者结合；移除未结合的链霉抗生物素或抗生物素蛋白；将已结合的链霉抗生物素或抗生物素蛋白与含有第二生物素的溶液接触，所述第二生物素缀合了一种荧光分子，所述荧光分子能够发射出发射光子；在所述芯片上投射激发光子，并用探测器测试来自所述荧光分子的发射光子的发射情况。

13、权利要求 6 的方法，其中所述测试分子选自包含如下分子的一组：HAV 抗原、HCV 抗原、HDV 抗原、乙肝表面抗原、乙肝“e”抗原、乙肝核心抗原、HEV 抗原、抗乙肝表面抗原抗体、抗乙肝“e”抗原抗体，抗  $\alpha$  FP 抗原抗体和抗 HDV 抗原抗体。

14、权利要求 6 的方法，其中所述的测试分子选自包含如下分子的一组：弓形体、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 I 型和单纯疱疹病毒 II 型。

15、权利要求 6 的方法，其中所述的测试分子选自包含如下分子的一组：抗  $\alpha$  FP、抗 GGT 同功酶 I 抗体、抗 GGT 同功酶 I' 抗体、抗

GGT 同功酶 II 抗体、抗 GGT 同功酶 II' 抗体、抗  $\gamma$  碳基凝血酶原抗体、抗  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶抗体、抗 5'核苷酸磷酸二酯酶同功酶 V 抗 antitrypsin 体、抗谷胱甘肽-S 转移酶胎盘类型抗体、抗  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶抗体、抗转铁蛋白抗体、抗酸性异铁蛋白抗体及抗乙肝表面抗原抗体。

16、权利要求 6 的方法，其中所述的测试分子选自包含如下分子的一组：单链核酸、双链核酸、SMITH 抗原、乙酰胆碱受体、甲状腺球蛋白、微体抗原、异常人类免疫球蛋白 IgG 以及红细胞蛋白。

## 用于测试多种待分析物的装置及方法

### 技术领域

本发明涉及对一样品中多于一种的待分析物进行测试和/或定量的装置和方法。

### 背景技术

检测各种疾病及人体状态的诊断性测试装置及方法在很多文献及专利文件中已见有述。随着医学治疗及诊断的发展，为了对疾病进行早期诊断，对人们健康状态进行监测就变得越来越重要。在同一样品中对多种不同待分析物同时进行测试的能力一直是许多人多年来所探求的目标。使用单一测试装置分析单一样品的方法可以为多种待分析物提供诊断信息，以便节约所需的试剂及人力资源。

授予 Woudenberg 等人的美国专利 No.6126899 涉及的就是在同一样品中同时测试一种或多种待分析物的方法及仪器。其仪器具体如下：限定样品的基质，即一个样品分布网络，其具有一系列的小室，每一个小室具有一种能有效地与一种待分析物反应的特定的试剂。虽然上述系统可能用于对多种待分析物同时进行分析，但该装置包括很多小室及凹槽，需要专门为此制造特定的固相基质。

Fitzgerald 等人的欧洲专利申请 No.EP0874242 描述了这样一种用于进行多待分析物分析的固相装置，其中基质通过配体与多种分离的反应位点以共价的形式结合。该专利发明了一种包括有各种通道及小室的装置可用于容纳待测样品。该发明还提供了一整体分析系统，可用于同时测试多待分析物形式的不同待分析物。

虽然上述各系统都可以用于分析多待分析物样品，我们仍然需要提供一种改良系统，以降低装置制造的成本和样品测试的成本。另外，另一种需求即是减低样品及试剂的量。本发明的一个目的是提供一个改良的多待分析物诊断系统。

## 发明内容

本发明一方面提供可用于检测至少一个样品中的多种待分析物的装置。该装置包括一具有测试表面的固相基质。在该测试表面上限定了至少一个反应区域，其具有至少一个分离的测试位点的阵列。每一个此类测试位点都有一种测试分子固定于其上，因此，不同测试位点上就有着不同的测试分子固定于其上。提供了可用于附着于固相基质上的分隔物。该一种分隔物在一附着表面上具有很多孔。该附着表面与固相装置的测试表面相吻合，并适合于与之可逆性结合，这样当这两部分组合后，每一个孔则与测试表面的一部分相贴合，以构成多个防漏小室。小室内部的测试表面具有多个暴露的测试位点。每一个小室还具有一个自外界可进入的开口，这样液体可被引入小室中从而可与该暴露的测试位点接触以进行测试。

在一个优选实施方案中，小室是一个池，其由固相基质的测试表面做底部，部分分隔物作为周边的壁，以使得多个测试位点暴露在小室内的池的底部。

本发明的另一方面，测试分子包括至少一种配体以及至少一种抗体。配体被固定于一个测试位点上，而抗体则被固定于同一小室内的不同测试位点上，以使得同一样品中相应的那些有交叉反应的待分析物结合反应可以在同一个反应区域中同时发生。

在本装置的优选实施方案中，固相基质即是一个芯片，有着一个平滑的上表面，其上有多个限定的反应区域。每一个测试区域包括至

少一个分离的测试位点的阵列，其上固定有测试分子。分隔物是具有多个孔的薄片，这些孔由一边框所限定，每一个孔对应于一个反应区域。薄片的边框适合与芯片的平表面可拆开地连接，以使得在这两者之间构成一防漏的池。结合可以通过任何一种常用的方式进行，包括机械的，例如但不限于回形针、螺丝钉，以及化学的如胶水或者粘着剂等等。每一个池内，芯片上表面的一个反应区域形成了池的底部，相应的薄片的边框的一部分就构成了分隔这些池的分隔壁。这个薄片是可以拆除的，因此在样品反应后可以移除该薄片，而芯片可以插入一个标准的芯片读取设备中，用于读取并分析结果。该优选实施方案的优点之一在于，许多标准芯片读取设备都可以用来分析测试结果。与芯片连接后，这个可移除的分隔薄片就成为了一个装配好的装置，其具有一个池的系统，其中可以进行不同样品的反应。池的数量可由使用者依据需要决定，进而决定分隔薄片的数量。本发明提供了一个标准芯片格式的真正的多样化的生物芯片以及测试多种分析物及样品的方法。

另一方面，本发明还提供一种用于分析同一样品中的多种待分析物的方法。该方法包括以下步骤，在测试表面上定义多个分离的并在空间上独立的测试位点，在每一个测试位点上固定一种测试分子，这样便将多种测试分子固定于其上。每一个测试区域周围都设有防水屏障，然后将待测试的样品与适当的测试试剂一起加入到各个测试区域。

#### 附图说明

图 1A 是本发明一个实施方案的固相基质的俯视图。

图 1B 是与图 1A 中的基质相吻合的分隔物的俯视图，二者同属一个实施方案。

图 1C 是本发明的一个装置的俯视图，其显示图 1B 中的顶端分隔薄片附着于图 1A 中的基质上。

图 1D 是图 1C 装置经线 A-A 的侧向剖视图。

图 1E 是与图 1C 相同的实施方案中用于遮盖图 1C 的装置的遮盖物。

图 2A 是本发明第二个实施方案中的基质的俯视图，测试位点的位置已圈出。

图 2B 是与图 2A 中的基质相吻合的分隔薄片的俯视图，二者同属一个实施方案。

图 2C 是本发明的第二个实施方案中的装置的俯视图，其上有分隔薄片及基质，测试位点的位置已圈出。

图 2D 是图 2C 装置经线 B-B 的剖视图。

图 3A 是本发明第三个实施方案中的测试区域。

图 3B 是本发明第四个实施方案中的测试区域。

图 4A 是一个优选实施方案中的肝炎生物芯片的俯视图。

图 4B 是同一实施方案中用于测试不同肝炎抗体的肝炎生物芯片中的测试区域。60: 人类 IgG 阳性对照; 62: 人类血清白蛋白 (HSA) 阴性对照; 64: HAV 抗原; 66: HCV 抗原; 68: HDV 抗原; 70: HBs 抗原; 72: HBe 抗原; 74: HBc 抗原; 76: HEV 抗原。

图 4C 是同一实施方案中用于测试不同肝炎抗体的肝炎生物芯片中的测试区域。60a: HBsAg 阳性对照; 60b: HbeAg 阳性对照; 60c: AFP 阳性对照; 60d: HDVAg 阳性对照; 62: 阴性对照; 78: HBs Ab; 80: HBe 抗体; 82: AFP 抗体; 84: HDV 抗体。

图 4D 的例子是使用图 4A—图 4C 中所示芯片对一个血清抗 HAV-IgG 阳性的 HAV 感染患者进行诊断的预期结果。这里显示了芯片的两个测试区域。

图 4E 所示的一个例子, 是使用图 4A—图 4C 中所示芯片对一个血清 HBsAg, HbeAg 及 HBcAb 阳性的 HBV 感染患者进行诊断的预期结果。这里显示了芯片的两个测试区域。

图 5A 是本发明另一个优选实施方案中 ToRCH 蛋白芯片的一个测试区域。86: 弓形体; 88: 风疹病毒; 90: 巨细胞病毒; 92: 人类单纯疱疹 I; 94: 人类单纯疱疹 2; 96: 阳性对照; 98: 阴性对照。

图 5B 所示的例子是图 5A 的使用 ToRCH 蛋白芯片对一位风疹病毒感染患者进行诊断的预期结果。(为使图示简化, 这里仅显示了一个测试区域或池; 使用含有 RV IgG 的患者血清进行测试)。

图 5C 的例子是图 5B 的对 CMV 感染患者进行诊断的预期结果。(为使图示简化, 这里仅显示了一个测试区域或池; 使用含有 CMV IgM 的患者血清进行测试)。

图 6A 是本发明另一个实施方案中癌症蛋白芯片的测试区域。

图 6B 的例子是图 6A 的使用肝癌患者血清对该患者进行诊断时的预期结果。

图 7A 是自身免疫病蛋白芯片的测试区域。

图 7B 的例子是图 7A 的使用自身免疫病蛋白芯片对系统性红斑狼疮患者进行诊断时的预期结果。(为使插图简化, 这里仅显示了一个测试区域)。

图 7C 的例子是图 7A 的使用自身免疫病蛋白芯片对类风湿关节炎患者进行诊断时的预期结果。(为使插图简化, 这里仅显示了一个测试区域)

## 具体实施方式

如上所述, 样品可以是包含有任何待分析物的任何溶液、混合物或者生物学液体等。样品包含有阳性对照和阴性对照的血清及生物学

液体。防漏小室是指小室能够盛放液体，并只要液体的量不超过小室的尺寸范围，小室在至少一个方向上就不会渗漏或溢出。防漏可以是封闭的或者是具有开口的。配体是指任何能与抗体发生抗原抗体反应的抗原或分子，酶-底物结合反应中的底物、或者可被受体识别并与受体结合的分子，包括但不限于：核酸、染色体片段、蛋白、肽、糖蛋白、脂质、多肽、抗生素、皮质激素以及其他任何有机分子。

在本发明的一个实施方案中，如图 1A—图 1D 中所示，为由玻璃载片 20 组成的生物芯片提供一个分离的顶端分隔薄片 22。分隔薄片 22 如图 1B 中所示，可以由任何惰性材料制成，最好用一些柔软的材料如塑料、膜、乳胶、陶瓷、橡胶、树脂、PVC 或硅胶。在分隔薄片上冲压形成孔 22a，以便在每一个孔周边形成边框 22b。于是边框 22b 就可以作为侧壁，而载片的顶面就作为底部，这样就形成了一个池或说小室 24，如图 1D 所示。顶端分隔薄片的尺寸最好与载片的相同或略小，并在底面应包含有粘合剂，这样才能直接与玻璃载片 20 粘合。在一个优选实施方案中，粘合剂很有力，使得顶层的分隔薄片与玻璃载片粘合在一起，在两者之间形成池 24。池应是防漏的，这样当在每一个池中加入适量的液体时，液体不会流进邻近的池中。粘合剂应该是惰性的，还应该是这样一种材料制成的，它也允许分隔薄片能从载片上分离下来，以方便使用者。每一个阵列中的行与列的数目可以依据使用者的意愿进行调整。分隔薄片的厚度由每一个池所需的反应体积来决定，也可以由一名本领域技术人员来决定，无需过多的实验。一般说来，薄片为 1-3mm 厚。孔和边框可以是任何尺寸或形状，依使用者的需要而定。例如，孔的内尺寸可以是 0.3cm x 0.3cm 至 0.4cm x 0.6cm 甚至 1.2cm x 1.2cm 均可。分隔壁的宽度一般是 22b 或 34a 在 0.15cm 到 0.6 cm 之间。孔的数目可以相对变化，比如说 1x2, 2x3, 3x10, 3x5, 2x5, 3x8 或 4x8 阵列形式。

在最简单的实施方案中，单一的测试分子可以固定于一个玻璃载片的测试区域 20a 中，即与特定的池相对应。例如，在图 1B 中，孔 HI 的位点最好与图 1A 中所示的测试区域 TA1 的位点相对应。一个测试分子固定于测试表面 TA1 上，这样一旦分隔薄片的顶面与载片 20 接触并粘合，就形成了池 WI，池的底面则相应于图 1C 所示的测试区域 TA1。在这个具体的例子中，只有一个测试分子，因此在每一个测试区域中只有一个测试位点。图 1E 中所示的遮盖薄片是可任选的，像个盖子一样，可以放在分隔物的外表面，以便在结合反应进行温育时遮盖溶液防止蒸发、溢出或污染。遮盖薄片也可以根据操作者需要去除掉。遮盖薄片可以由任何惰性材料制成，如用于做分隔物的那些材料，例如聚乙烯薄膜。

在另一个实施方案中，每一个测试区域都有多个测试位点，这样在每一个小室或池中就能发现多个测试分子。如图 2A 所示，本发明中的另一个玻璃载片 29 上显示了两个限定于其上的测试区域 30。每一个测试区域都以虚线方边框勾出。每一个测试区域内都有限定于  $3 \times 3$  阵列内的测试位点 32，图中显示为圈。图 2B 显示的是吻合的分隔薄片 34，上有两个冲压而成的大一些的孔。剩下的薄片构成边框 34a。图 2C 和 2D 显示了本发明该实施方案的组装好的装置，在分隔物 34 与玻璃载片 29 之间是两个大孔 40。从图示上看，可以清楚的知道，在这个具体例子中最多同时可以有 9 个不同的测试分子被固定于同一个测试区域中，用这种方法可以测试多种待分析物。

图 3A 是本发明的另一个实施方案的图示，其中一个测试区域 41（即一个小室的底部）包括有 9 个  $4 \times 4$  的测试位点阵列。为插图简便起见，其他测试区域及固相装置并没有显示。很明显，可以按照使用者的需要安排不同的小室或者同类的测试区域。另外，同一个测试表面上的不同测试区域可以安排不同的测试位点阵列。在这个例子

中，空心圆圈 42 通过测试分子固定于其上来定义测试位点，而实心圆圈 44 则由于有阳性对照分子固定于其上来定义阳性对照位点。虚线圈 46 定义的测试位点有阴性对照固定于其上。阳性对照分子应能与样品中已知的待分析物反应，阴性对照测试分子则不应与样品中的任何待分析物发生反应。测试分子是指与样品中未知浓度的待分析物（为使解释简便，是指那些测试待分析物）有交叉反应的分子。这个测试待分析物就是诊断测试的对象。本例中，仅有的一个测试区域（即一个池）包含有三行  $4 \times 4$  的测试位点阵列（行 A 至 C），和三列  $4 \times 4$  的测试位点阵列（列 1 至 3）。阵列 A1, A2, A3, B1, B2, B3 及 C1 是完全一样的。阳性对照及测试分子被安排在插入的位点。阴性对照则被固定于阵列 C2 和 C3 的测试位点上。整个池 41 可用于进行一个样品的测试，这样所有测试位点的反应可以在同一个反应区域同时进行。因此，在这个例子中，就有三个不同的测试分子被固定于用于分析的同一个测试区域中。而且，每一个测试分子的测试位点上可以进行多次重复，使得测试的准确率明显增高。

虽然上述的实施例中阵列 A1, A2, A3, B1, B2, B3 及 C3 内有相同的三种测试分子，并以相同的方式阵列，但很明显我们也可以在同一个反应区域中的每一个这样的阵列中固定于不同的测试分子。例如，一个测试分子（例如阳性对照分子）可以固定于阵列 A1 的 8 反应位点中，第二个及不同的测试分子（如阴性测试分子）可以固定于阵列 B3 的 8 反应位点中。而且，很明显我们可以在这七个阵列上固定无数不同的测试分子，其数目根据所需的浓度精度而定。

图 3B 显示的是本发明的另一个实施方案，其中测试区域 48 对应于一个孔或小室，包括一个  $9 \times 9$  的阵列，即一个中心行和一个中心列，由周围的四个四分之一围绕。阴性对照 54 被固定于“交叉”形或十字形的行、列上，阳性对照 50 以及测试分子 52 则被安排在四

个四分之一中的插入的位点。使用这个方式，在一个成功的实验中，就可以看到阴性对照不产生信号或产生的信号很低，这四个四分之一就能很清楚地显示。这就是这种方式的一个优点：结果一目了然。

接下来的实施例展示的是本发明的各种特定的实施方案，旨在教授一个普通的本领域人员来使用和操作本发明。这些实施例只是为了说明，并不限制本发明权利要求的范围。在这些实施例中，测试分子还可以是探针或标记物。有时测试区域是些格子，而测试位点是些更次级格子。

## 实施例 1

### 在测试位点固定配体的方法

蛋白芯片由微阵列仪在显微镜固相基质上，按照格子和次级格子的方式通过点样和固定探针的办法制备。探针可以是抗原或抗体，可以是蛋白、多肽或肽，并可以结合测试样品中的靶蛋白。显微镜固相基质可以衍生自显微镜载玻片、硝化纤维素膜或二氧化硅。玻璃基质上每 1cm x 1cm 面积可点 2390 个蛋白点。用于此反应的样本可以是血浆、血清、全血或其它体液。整个的反应过程必须在固相基质上原位进行。

### 生物芯片的制作：

1. 将适当稀释的探针加到微量滴定板（即源板）上的各个孔内，
2. 将源板置于自动化微阵列仪（Prosys4510, from Cartesian Technology, CA, USA）的一个适当的槽内。
3. 软件控制的微阵列针从源板中提取标本。
4. 充满标本的针在载玻片表面上停留，使标本点在经衍生的显微镜载玻片上。

5. 点好的生物芯片在 37°C 下孵育 1 小时，使蛋白探针固定到基质表面上。

6. 用牛血清白蛋白 (BSA) 和吐温 20 在 TBS 缓冲液 [0.02M Tris-HCl, 0.137M NaCl, pH 7.6] 中 37°C 下孵育 1 小时将基质的剩余表面封闭。

7. 蒸馏水两次洗涤，室温下干燥。

8. 在 0.3% 的氢硼化钠 (NaBH<sub>4</sub>) 中 37°C 孵育生物芯片 5~10 分钟，以减少玻璃表面的醛基。

9. 蒸馏水两次洗涤，室温下干燥。

10. 制好的生物芯片在暗处 4°C 密封。

#### 组装方法

1. 制作多个小室塑料装置的塑料物质 (分隔薄片) 的外径要适合固相基质的大小。

2. 每一个装置的小室的数量可从 1 x 2 到 4 x 10。

3. 每两个相邻小室的中心距离为 4.5mm 的倍数，此数值适应了 384 和 96 微量滴定板的几何学、微阵列针头的针间距以及多道移液管。

4. 塑料的厚度决定了每一个小室的深度，应至少 1mm，可 1mm~3mm。

5. 这个多室塑料装置的一侧要有粘性，能牢牢地粘住固相基质，为反应形成一个防漏的池。这种装置要求防水、防漏并且坚硬，在水溶液里是惰性的，能承受水压。

6. 把蛋白探针微点阵到每一个小室内，来制备用于多标记、多样品的生物芯片。

7. 大小适合多室塑料装置外径、单面涂有粘性物质的聚酯薄膜是用于覆盖多室生物芯片的理想物质，为反应形成一个完全绝缘且内封的室。

8. 多室生物芯片的整个安装能经受反应温度在-40~95℃、UV 治疗，且防水。

9. 聚酯薄膜与多孔装置的结合程度要小于装置和固相基质的结合力。每一反应步骤中移走这个薄膜都不会改变多室生物芯片的结构。

10. 反应快要完成时，塑料装置要与固相基质分开，作常规微阵列扫描仪的分析(Scanarray4000, Packard Bioscience (now known as PerkinElmer Life Sciences, CT, USA)。

固定蛋白到固相基质还可通过物理反应获得，如通过电荷（即带负电荷的蛋白与带阳性电荷的薄膜或金属表面结合），通过疏水反应（疏水蛋白与疏水薄膜结合），通过滞留（将一定大小的蛋白隔离在多孔的基质里，如薄膜或基质的凝胶型），还可以通过化学反应（如与环氧载玻片、硅烷化载玻片及甲硅烷化载玻片结合）

## 实施例 2

用交叉反应抗原固定在生物芯片上检测人血清抗体的方法

反应和检测：

1. 从包装中移出生物芯片。
2. 检验样本（患者血清，阳性或阴性血清对照）分别加入生物芯片上的各个小室内，在 37℃ 温度下反应 1 小时。
3. 没有结合的试剂用钠盐如 PBS 或 TBS（PBS: 0.137M NaCl, 0.027M KCl, 0.0043M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0014M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3）[TBS: 0.02M Tris-Cl, 0.137M NaCl, pH7.6]的洗涤缓冲液洗涤。

4. 除去过量的缓冲液，室温下干燥 5 分钟。
5. 生物芯片中加入封闭溶液（含有 1%牛血清白蛋白的 TBS 或 PBS）。
6. 洗涤、干燥生物芯片。
7. 荧光标记的混合物（二抗或抗原）用封闭液稀释，加到生物芯片中，37℃温度下孵育 0.5 小时。
8. 洗涤，从生物芯片中移去分隔薄片并离心干燥。
9. 微阵列扫描仪扫描成像。记录每一个点的荧光强度，用于资料的分析 and 诊断。

在其它方法中以上的第 7 到第 9 步可换成下面的 7a 到 13a:

- 7a. 生物素结合的二抗用封闭溶液稀释，然后加到生物芯片中，37℃温度下孵育 0.5 小时。
- 8a. 洗涤、干燥生物芯片。
- 9a. 加入含有链霉抗生物素分子的封闭溶液，37℃温度下孵育 0.5 小时。
- 10a. 洗涤、干燥。
- 11a. 荧光混合物（生物素或抗链霉抗生物素抗体）用封闭液稀释，加到封闭液中，37℃温度下孵育 0.5 小时。
- 12a. 洗涤，从生物芯片中移去分隔薄片并离心干燥。
- 13a. 微阵列扫描仪扫描成像。记录每一个点的荧光强度，用于资料的分析 and 诊断。

### 实施例 3

用交叉反应的抗体固定后的芯片测试抗原的方法  
反应和测试

1. 从包装中移出生物芯片。

2. 检验样本（患者血清，阳性或阴性血清对照）分别加入生物芯片，在 37°C 温度下反应 1 小时。
3. 没有结合的试剂用钠盐如 PBS 或 TBS（PBS: 0.137M NaCl, 0.027M KCl, 0.0043M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0014M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3）[TBS: 0.02M Tris-Cl, 0.137M NaCl, pH7.6]的洗涤缓冲液洗涤。
4. 除去过量的缓冲液，室温下晾干 5 分钟。
5. 生物芯片中加入封闭溶液（含有 1%牛血清白蛋白的 TBS 或 PBS）。
6. 洗涤、晾干生物芯片。
7. 第二初级抗体用封闭溶液稀释，添加到生物芯片中，37°C 温度下孵育 0.5 小时。
8. 洗涤，离心干燥并再次洗涤。
9. 碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记的人 IgG 抗体（二抗）用封闭缓冲液稀释，37°C 温度下孵育 0.5 小时。
10. 加入适当的化学发光底物（ICN 生物医学公司的用于 HRP 的鲁米诺（CA,USA），或 Pierce 化学公司（IL,USA）用于 AP 的 1,2-dioxetane-based 基质），室温下孵育 1 分钟（按照厂家的说明书）。
11. 微阵列扫描仪扫描成像。记录每一个点的荧光强度，用于资料的分析 and 诊断。

#### 实施例 4A

##### 用人血清诊断肝炎

具体包括蛋白芯片的制备，以及其在急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化和肝炎病毒感染所致肝癌的诊断。

甲型肝炎诊断标志物是甲型肝炎抗体（抗-HAV IgG 或 IgMAb）；乙型肝炎标志物包括乙型肝炎表面抗原（HbsAg），乙型

肝炎表面抗体 (HbsAb), e 抗体 (HbeAb) 以及核心抗体 (HbcAb); 丙型肝炎标志物是丙型肝炎抗体 (抗-HCV IgG 或 IgM); 丁型肝炎的标志物是丁型肝炎抗体 (抗-HDV IgG 或 IgM); 戊型肝炎标志物是戊型肝炎抗体 (抗-HEV IgG 或 IgM)。α-FP (甲胎蛋白) 是生物芯片中用于肝癌诊断的标志物。在制备生物芯片时, 将能与那些标志物特异性反应的探针或检验分子点在固相基质上。

图 4A, 4B, 4C, 4D, 4E 显示了测试区域的例子。这个例子说明了在一个芯片上 56 和 58 两个测试区域使用多次重复的方法进行资料分析。在芯片上要放置一个分隔物, 使两侧的孔一致, 用于加标本, 这两个测试区域要在孔的底部。这种阵列方式对于下面数据的解释非常有利。每次检测分子的重复数高就会增加数据分析的可靠性, 减少数据采集时出现的区域性和与机器有关的误差, 从而提高每一个生物芯片实验的准确性。此外, 下面提到的不同的带型有助于在高密度阵列上识别点。

在这个例子中, 生物芯片上确定了两个测试区域或格子 56 和 58。格子或测试区域 56 包含 7 个次级格子或检测位点阵列 56a。在每一个次级格子 56a 内, 把一个阳性对照和一个测试分子经多次重复固定在一个阵列构型里。点线 56b 代表确定的阴性对照的多次检测位点。

图 4B 更详细地显示了测试区域或格子 56。点圈 62 代表阴性对照, 通过多次重复交叉行和列勾勒出每一个次级格子的边缘。每一个次级格子都固定有一个阳性对照 60 和一个检测分子 (一种肝炎抗原)。固定到每一个次级格子的检测分子是不同的肝炎病毒抗原。

例如, 阵列 A1 有 16 个检测位点阵列成 4 x 4, 人 IgG 作为阳性对照 60, 检测分子甲型肝炎抗原 (HAVA<sub>g</sub>) 64 间插阵列固定。其它 6 个阵列 (A2-A7) 只是固定在上面的检测分子不同 (HAV 抗原 64,

HCV 抗原 66, HDV 抗原 68, HBs 抗原 70, HBeAg 72, HBc 抗原 74 和 HEV 抗原 76 分别固定在次级格子 AI 到 A7 上)。

图 4 所示的测试区域 58 的检测位点的阵列不同于测试区域 56。在测试区域 58, 阴性对照固定于多检测位点, 这些检测位点经过图 4A 上沿线 58 的测试区域中心成十字构型阵列。阴性对照位点的十字构型阵列将测试区域分为 4 个部分。周围是其它阵列或次级格子 (B1~B4)。图 4C 显示阵列 B1, 阳性对照乙型肝炎表面抗原 60a 和检测分子乙型肝炎表面抗体 (HbsAb) 78 用内插关系的方式固定在 16 个独立的检测位点。其它的 3 个部分 (B2~B4) 分别包括阳性对照结合了抗乙型肝炎 e 抗体 80 的肝炎 BeAg 60b, 阳性对照 AFP 60c, 抗-AFP 抗体 82 以及阳性对照丁型肝炎病毒抗原 60D, 抗丁型肝炎病毒抗体 84。

### 结合反应的方法

表 1 显示生物芯片上每一个检测分子点样的情况

柱形 2 显示用于点样的蛋白溶液的浓度, 柱形 3 显示每一个点的估计大小。假设每一个反应位点是半球点, 那么真正固定到每一个检测位点的蛋白量能被估计出来。整个点都可以干燥, 多数蛋白可固定到检测位点表面。

表 1

点样	点样浓度	点样大小	结合反应时间
HBsAG	0.4mg/ml	160 $\mu$ m	60-90 分钟
HBsAb	2mg/ml	160 $\mu$ m	60-90 分钟
HBeAg	0.8mg/ml	160 $\mu$ m	60-90 分钟
HBeAb	2mg/ml	160 $\mu$ m	60-90 分钟
HBcAb	0.15mg/ml	160 $\mu$ m	60-90 分钟
HAV IgG	0.8mg/ml	160 $\mu$ m	60-90 分钟
HCV IgG	0.1mg/ml	180 $\mu$ m	60-90 分钟
HDV IgG	0.125mg/ml	160 $\mu$ m	60-90 分钟
HEV IgG	0.8mg/ml	150 $\mu$ m	60-90 分钟

在结合反应时，将患者的血清加到 56，58 孔内，方法分别与实施例 2、3 方法类似。在这个实施例中，生物芯片上仅显示两个检测位点，一个用于检测血清肝炎抗体，一个用于检测肝炎抗原，因此上面只能检测一个检测血清。其它检测血清如阳性和阴性对照血清要用两个独立的且相同的生物芯片，以获得阴性和阳性结果。反应完成后，扫描芯片并记录每一个点的荧光信号强度。

#### 实施例 4B

##### 应用多池装置测试人类血清中的肝炎病毒

本实施例说明，实施例 4A 中描述的系统可以用于具有多个小池的生物芯片，从而提高在同一个生物芯片上可以检验出的血样数目。在这个实施例中，如图 1 所示，三行八列阵列的小池芯片可以用于检验病人血清中的肝炎病毒。为了方便描述，我们将这三行自上而下分别称之为行 A, B 和 C，而将这八列分别称之为列 1 到 8。在这个实施

例中，生物芯片 1 到 4 列的 12 个测试区域的测试位点与图 4B 中的 56 测试区域是相同的。而 5 到 8 列的测试区域的测试位点的阵列与图 4A 中的 58 测试区域相同。采用这种阵列，可以清晰的看到，检验病人血清中肝炎抗原的测试区域（即小池）共有 12 个。在这个实施例中，从感染肝炎病人的血清获得的样本作为阳性对照放置在 A1 测试区域，从未感染肝炎的健康病人获得的血清样本作为阴性对照放置在 B1 测试区域，以获得诊断反应。余下的 10 个测试区域（A2 到 A4，B2 到 B4，以及 C1 到 C4）被用作检验未知病人血清中是否存在肝炎抗原。同样的，对照用的阳性血清放置在 A5 区，作为肝炎抗体的阳性对照，抗体的阴性对照放置在 B5 区。余下的测试区域（A6 到 A8，B6 到 B8，以及 C5 到 C8）被用作检验病人未知血清中的肝炎抗体。所用的结合反应和检验系统与实施例 4A 中描述的相同。

#### 分析结果的方法

R 值，是在相同的次级格子中，落在被阳性对照探针分割的高斯分布曲线 95%范围内的试验探针的平均密度值。

试验样本的 R 值称之为  $R_s$ 。

阳性对照血清的 R 值称之为  $R_p$ 。

阴性对照血清的 R 值称之为  $R_n$ 。

$R_{co} = 1/2 (R_n + R_p)$ 。

共有三种途径可以解释数据。

方法 1:  $R_s$  大于 0.05 的样本被定义为对试验探针呈阳性反应； $R_s$  在 0.02 到 0.05 之间被认为是边界线，需要重复该实验； $R_s$  小于 0.02 是阴性。方法 2: 试验样本的  $R_s/R_n$  值大于 2.1 被认为是阳性， $R_s/R_n$  值在 1.5 和 2.1 之间被认为是边界线，小于 1.5 是阴性。方法 3:

如果试验样本的  $R_s$  大于  $R_{co}$  被认为是阳性,  $R_s$  小于  $R_{co}$  被认为是阴性。

这项发明实现了组内的比较, 也便于同一芯片内组间的比较。那些可能影响信号强度的地理上的差异也被系统采用的微型阵列和数据处理方法最小化了。

在上述方法中, 肝炎的血清标准是中国国家药品监督管理局 (SDA) 制定的, 并根据现有的出版物进行了方法和仪器设备准确性和敏感性的检查。

为确保诊断试剂盒在中国的准确性和精确性, 国家药品监督管理局制定了准确性和敏感性的标准。敏感性试验确定了诊断试剂的最弱反应范围。我们描述的这种方法以 100% 的准确率通过了目前的敏感性试验。表 2 的第 2 列列出了由中国国家药品监督管理局提供, 所有在中国注册并应用于临床使用的诊断试剂盒验证其敏感性的样本标准。对于 HbsAg 和 HbsAb, 参考标准分别是 1 ng/ml 和 10 mIU/ml 。

表 2: 使用 SDA 敏感性标准进行敏感性试验

肝炎标志物	SDA 敏感性参考	生物芯片诊断结果 (荧光强度)		
		方法 1	方法 2	方法 3
HbsAg <sup>2</sup>	≤1 ng/ml	0.09	2.2	+
HbsAb <sup>3</sup>	≤10mIU/ml	0.12	2.4	+
HbeAg <sup>4</sup>	1# ≥ 1 : 64	0.10	2.4	+
	2# ≥ 1 : 128	0.07	2.2	+
	3# ≥ 1 : 32	0.10	2.3	+
HbeAb <sup>5</sup>	55# ≥ 1 : 32	0.08	2.2	+
	57# ≥ 1 : 32	0.07	2.1	+
	61# ≥ 1 : 32	0.07	2.2	+
HbcAb <sup>6</sup>	2# ≥ 1 : 32	0.08	2.2	+
	3# ≥ 1 : 8	0.11	2.4	+
	4# ≥ 1 : 16	0.09	2.2	+

+为检验阳性, -为检验阴性

1. 国家药品管理局标准序号 9909
2. HbsAg, 乙肝表面抗原
3. HbsAb, 乙肝表面抗体
4. HbeAg, 乙肝 e 抗原
5. HbeAb, 乙肝 e 抗体
6. HbcAb, 乙肝核心抗体

表 3：使用 SDA 标准进行特异性试验

标记物	SDA 特异性参考 (本方法得到的阴性 的样本数目与总体的 阴性标准进行比较)	生物芯片诊断结果		
		方法 1	方法 2	方法 3
HbsAg <sup>2</sup>	20/20	0-0.018	0-1.38	-
HbsAb <sup>3</sup>	20/20	0-0.019	0-1.49	-
HbeAg <sup>4</sup>	15/15	0-0.016	0-1.46	-
HbeAb <sup>5</sup>	15/15	0-0.016	0-1.46	-
HbcAb <sup>6</sup>	15/15	0-0.016	0-1.48	-

角注：+为检验阳性，-为检验阴性

1.国家药品管理局标准序号 9909

2.HbsAg, 乙肝表面抗原

3.HbsAb, 乙肝表面抗体

4.HbeAg, 乙肝 e 抗原

5.HbeAb, 乙肝 e 抗体

6.HbcAb, 乙肝核心抗体

使用上述三种方法进行检验的结果见下三列。

对于 HbeAg, HbeAb 以及 HbcAb, SDA 提供了三种未知样本, 而且不同浓度的稀释液可以用来稀释血清, 见列 2, (样本 1, 2 和 3 是 HbeAg; 样本 55, 57 和 61 是 HbeAb; 样本 2, 3 and 4 是 HbcAb)。结合反应的荧光强度可以在下一列相应的位点上观察到。

表 3 是 SDA 关于特异性试验结果的要求。在这些试验中, SDA 提供阴性样本分别检验那些第 1 列中列出的抗原和抗体。第 2 列中,

分数的分母代表对 SDA 提供的样本进行试验后结果呈阴性的样本数量，分子代表测试样本试验后结果呈阴性的样本数量。根据 SDA 的要求，不允许假阳性结果的存在。所以，使用目前的这种方法，特异性是非常高的，而且在病人血清中，对于不同的非特异性抗原或抗体都只有很低的交叉反应性。

图 4A 是甲肝患者的预期结果。阳性信号只能在检验区域 56 的 64 位点，以及两个阳性对照区域 56 和 58 中被记录到。这样的结果说明，试验血清的抗体是针对 HAV 抗原的，而不是其他的测试分子，所以试验的特异性是好的。

图 4E 是乙型肝炎感染患者的预期试验结果。阳性结果可以在 56 测试区域的 74 位点，58 测试区域的 78 和 80 位点以及 56 和 58 区域的所有阳性对照样本上观察到。

## 实施例 5

### 对怀孕病人进行婴儿出生前的检查

这里讨论一下通过检测孕妇血清从而完成婴儿出生前检查的生物芯片。在孕妇中要常规检测弓形虫、风疹病毒、细胞巨化病毒以及单纯疱疹病毒 I 和 II，统称为 ToRCH，因为这些疾病在孕妇的发生率比较高。这些疾病会在怀孕期间或分娩的时候传染给胎儿，对新生儿造成严重的损伤。由于有这些严重的并发症，所以对孕妇以及孕龄妇女进行免疫状态评价是非常重要的。前面提及过，五种 ToRCH 敏感的特异性抗原探针，以及相应的阳性和阴性对照都放置在同一个多室芯片上。这种生物芯片可以在相邻的小室内同时检测 IgG 和 IgM，只要在相应的小室内加入荧光标记的抗人类 IgG 和 IgM 抗体即可。在 ToRCH 试验中，IgM 的检测有助于疾病的早期诊断，因为 IgM 通常在感染早期即可产生，IgG 则要经过较长一段时间的延迟才产生。

然而 IgG 存在的时间比较长,即使感染已经治愈仍可以在病人血清中检测到。所以如果病人血清同时出现高水平的 IgM 和低水平的 IgG,则说明病人现在处于急性感染期。

方法:

1. 针对不同抗原的探针位于不同的测试区域。如图 5A 所示,在这个 3 x 3 阵列的芯片上,弓形虫位于 86,风疹病毒在 88,细胞巨化病毒在 90,单纯疱疹病毒 I 在 92,单纯疱疹病毒 II 在 94,人类 IgG 的阳性对照在 96,人类血清白蛋白作为阴性对照在 98。只要在一个小池内采用适合的分割物,就可以在同一测试区域内定义这些 100 个不同的小室。首选的生物芯片(见图 5A)包括有 8 个测试区域,也就是这个实施例所描述的芯片。各有两个测试区域用于阳性对照和阴性对照血清的孵化;两个区域可以对病人血清进行检测,最后两个区域对病人血清进行重复试验。

2. 如实施例 2 对血清进行固定、烘干、模块化、反应以及洗涤。

3. 为了检测病人血清中的 ToRCH IgG,荧光标记的抗人类 IgG 抗体被加入到上述已经孵化过的其中一个小池内。

4. 为了检测病人血清中的 ToRCH IgM,荧光标记的抗人类 IgM 抗体被加入到上述血清孵化过的两个小池内。

5. 图 5B 是感染风疹病毒病人血清的试验结果。阳性信号出现在测试分子区域 88 和阳性对照区域 96。

6. 图 5C 是感染细胞巨化病毒病人血清的试验结果。阳性信号出现在测试分子区域 90 和阳性对照区域 96。

实施例 6

### 将链霉抗生物素和生物素应用于通用的扩大方法

这是将荧光/酶标记的链霉抗生物素和生物素（FLSAB/ELSAB）方法用于蛋白芯片分析，作为一种加强的检测系统。在目前的蛋白芯片技术中，用荧光或酶标记抗体是常用的一种检测系统。这里介绍目前检测系统的信号扩大步骤。使用信号扩大系统可以将蛋白芯片的敏感度提高十倍。所以在制作芯片过程中就可以使用较少数量的探针。而且，背景减少了，信/噪比就会提高，假阳性结果的几率也会最小化，同时也简化了对酸性蛋白进行荧光染色这一冗长而艰难的步骤。

### 制作蛋白芯片

1. 在固相底物上阵列探针，如乙醛片、硝化纤维或尼龙膜。
2. 玻片上的蛋白要在室温时放置过夜，或在温度为 37℃ 时烘干 1 小时以进行固定。
3. 底物表面要在 37℃ 时使用含有牛血清白蛋白的封闭缓冲液封闭 1 小时。
4. 使用双蒸水冲洗，室温下干燥保存。

### 方法：

1. 将样本加入到蛋白芯片的每一个小室内，在 37℃ 下孵化 1 小时。
2. 多余的样本用冲洗缓冲液进行冲洗，烘干。
3. 用封闭缓冲液进行封闭，冲洗缓冲液进行冲洗。
4. 洗涤并烘干。
5. 生物素缀合的生物分子与靶标记特异性的结合，用封闭缓冲液稀释，加入到小室内，在 37℃ 时孵化 30 分钟。
6. 洗涤并烘干。

7. 使用封闭缓冲液稀释链霉抗生物素，加在芯片上，在 37°C 时孵化 30 分钟。
8. 洗涤并烘干。
9. 使用封闭缓冲液稀释的碱性磷酸酶（AP）、辣根过氧化物酶（HRP）或荧光缀合的生物素，加在芯片上，在 37°C 时孵化 30 分钟。
10. 如果（9）使用了酶缀合的生物素，就要采用恰当的化学发光底物并在室温下孵化 1 分钟。针对 HRP 的底物有鲁米诺，Pierce 化学公司（美国），或 1, 2-dioxetane 底物，ICN 生物医学公司（美国）（根据制造商的手册）。完成之后，洗涤芯片，去除分割物薄片，烘干芯片，使用微阵列扫描仪进行扫描。

## 实施例 7

### 诊断癌症的方法和设备

这里要讲述的是一种高效率和高敏感的癌症诊断方法和生物芯片。这种芯片不仅可以在癌症早期检测到癌症，还可以确定癌症的类型和亚型。探针是相应组织特异性肿瘤标记的抗体；阳性对照是相应的肿瘤标记物，阴性对照是人类血清白蛋白。

癌症芯片是根据器官/组织类型进行分类。每种类型的癌症芯片都包括一组对组织特异性肿瘤标记物反应的抗体。每一个抗体面板表达的信息允许对癌症进行进一步的分型。例如， $\gamma$ -GT I'、II、II' 只存在于肝癌患者中；对伴刀豆球蛋白 A 反应的  $\alpha$ -FP(R Con A AFP) 主要存在于原发性肝癌病人的血清样本中，而在肝转移癌、性腺和非性腺生殖细胞瘤中 R Con A AFP 的含量显著降低，而非反应型  $\alpha$ -FP 增加。所以，肿瘤标记物面板在生物芯片中的应用促进了癌症的诊断、分型和亚型分型。

图 6A 是癌症芯片的一个测试区域，共有 16 个检测阵列组合 (A1 到 D4)。每一个阵列组合都包括 9 个使用相同检测分子固定的分散的检测位点。区域 A1 内是抗  $\alpha$  甲胎球蛋白抗体的检测分子，A2 是抗  $\gamma$ -GT 同功酶 I 抗体；A3 是抗  $\gamma$ -GT 同功酶 I' 抗体；A4 是抗  $\gamma$ -GT 同功酶 II 抗体；B1 是抗  $\gamma$ -GT 同功酶 II' 抗体；B2 是抗 DPC 抗体；B3 是抗  $\alpha$ -岩藻糖苷酶抗体；B4 是抗 5' 核苷酸二酯酶同功酶 V 抗体；C1 是抗谷胱甘肽 S 转移酶胎盘形式抗体；C2 是抗  $\alpha$ -1-胰岛素抗体；C3 是抗铁蛋白抗体；C4 是抗异铁蛋白抗体 (AIF)；D1 是抗乙肝表面抗原抗体；D2 和 D3 是 13 种肿瘤标记物的阳性对照以及人类 IgG；D4 是阴性对照。

图 6B 是一个肝癌病人的诊断结果，在检验区域 A1、A3、A4、A5、D1，以及阳性对照区域 D2 和 D3 中出现了阳性信号。

## 实施例 9

### 自体免疫疾病的诊断

自体免疫疾病是以病人体液循环中存在高水平的 IgM 和 IgG 为特征的。有两种类型的自体免疫疾病：单器官或细胞性和全身性。前一种类型的疾病包括自体免疫性溶血性贫血 (AIHA)，机体的 IgG 自身抗体和 IgM 抗体水平升高，攻击自身的红细胞；重症肌无力患者肌肉无力，体内含有高水平的乙酰胆碱受体自身抗体；桥本氏甲状腺炎患者体内抗甲状腺素抗体和抗微体抗体水平增加。全身性疾病有系统性红斑狼疮 (SLE)，可以检测到病人的抗核蛋白抗体抗-dsDNA 和抗-SM；风湿性关节炎病人中可以检测到类风湿因子。

方法：

1. 自体免疫蛋白芯片可以检测出病人血清内的自体抗体。制作过程中，与自体免疫疾病标记物相对应的探针被安装在多室芯片上。标记物为抗核蛋白抗体、类风湿因子、抗乙酰胆碱受体抗体、抗红细胞抗体、抗甲状腺球蛋白抗体以及抗微体抗体。

自体免疫疾病的诊断蛋白芯片设计见图 7A。在同一测试区域(组装设备中代表一个小池或小室)，定义了 9 个独立的分区(A1 到 C3)。每一个分区固定用的分子都与其他分区不同。在同一个分区内，16 个(4x4)测试位点内的测试分子是相同的。A1 内是双链 DNA 分子；A2 是 SMITH 抗原；A3 是乙酰胆碱受体；B1 是甲状腺球蛋白；B2 是微体抗原；B3 是不正常的 IgG；C1 是人类 IgG 的阳性对照；C2 是阴性对照；C3 是红细胞。SMITH 是一种 RNA 和非组蛋白核蛋白的混合物，可以保持 DNA 的正常结构；SMITH 在细胞消散时随 DNA 释放到血流中，是 SLE 的一种标记物。

2. 自体免疫蛋白芯片是一种非直接的免疫化验。病人血清被加入到独立的小室内。可以像例 8 中所示，每份血清都被加入到两个小室，以检测 IgG 和 IgM。血清中的自体抗体与静止时相的探针发生反应。洗涤完成之后，荧光标记的抗人类 IgG 抗体被加到小室内以检测发生交叉反应的 IgG。

3. 自体免疫蛋白芯片中，为了检测交叉反应中的二价或多价 IgM，可以采用双抗原三明治方法，即在与血清发生反应之后，将荧光标记的抗原加入到反应室做进一步的检测。

4. 反应结束之后，使用微阵列扫描仪对生物芯片进行扫描。

图 7B 是系统性红斑狼疮病人的诊断结果。阳性信号出现在测试区域 A1 和 A2 以及阳性对照位点 C1。

图 7C 是风湿性关节炎病人的诊断结果。阳性信号出现在试验位点 B3 以及阳性对照位点 C1。

上述详尽的描述是为了更好地说明，而不是有意将本发明限制于彩瓷公开的内容和形式，在本发明的教导基础上，可以做出许多改良和变化。例如，图 4A 和 4C 中的阵列只用于图例，在同一芯片上，可以区分出更小的测试区域。作为一种变动，同一芯片上测试区域 56 和 58 的三个相同的小区可以检验出试验血清、阳性对照和阴性对照。同时，还可以定义出更多的测试区域，只要使用合适的分隔物，并将每一个孔用数字标记好，这样在同一个生物芯片上就可以对多个病人同时进行检测。

另外，这种使用抗人类 IgM 和抗人类 IgG 抗体，如例 5，对病人的抗体谱进行分析，诊断急性感染性疾病的方法，可以应用于其他多种疾病的诊断。

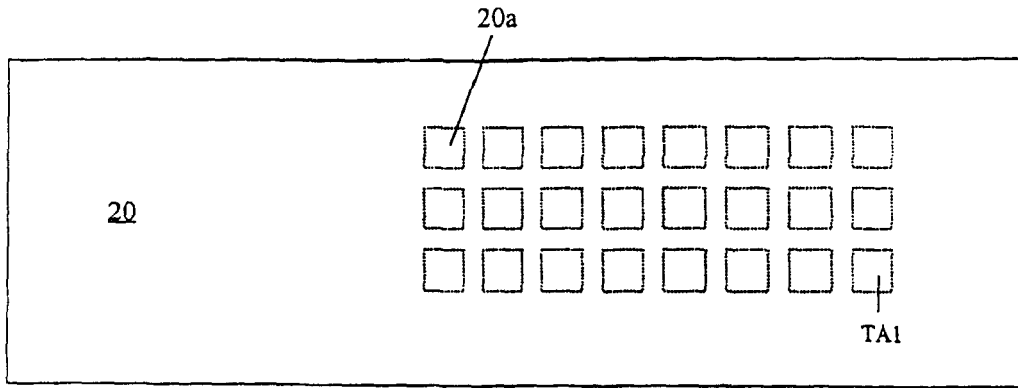


图1A

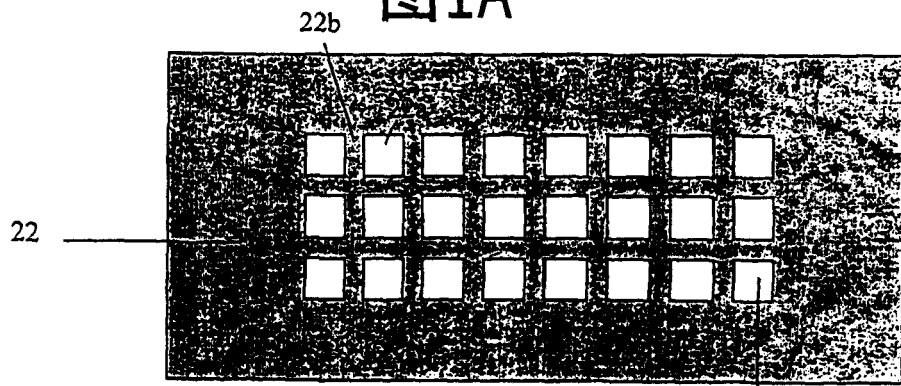


图1B

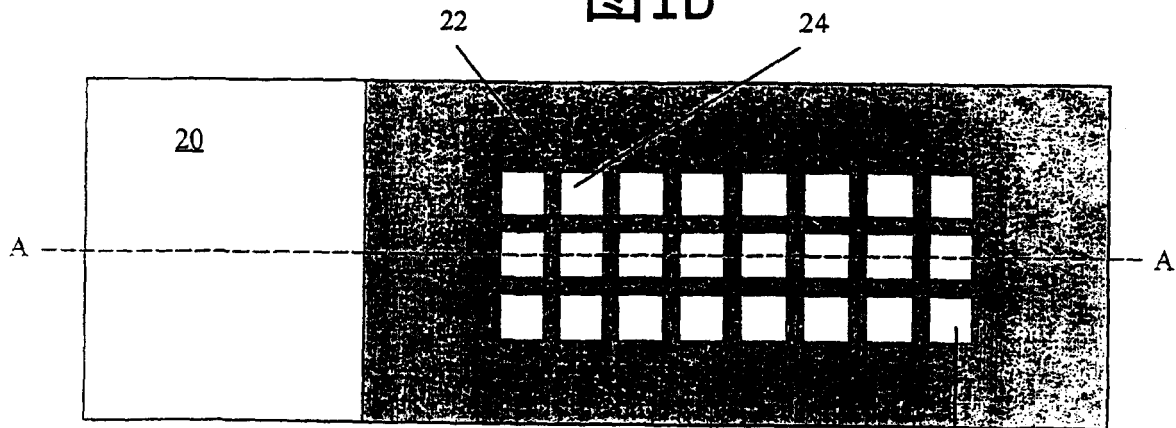


图1C

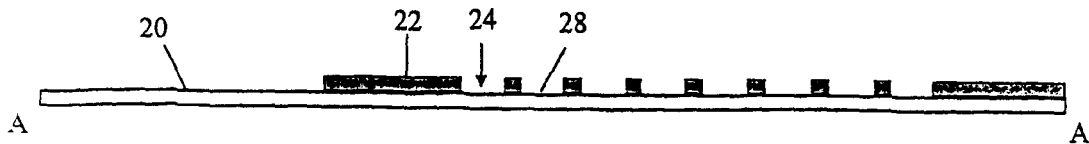


图1D

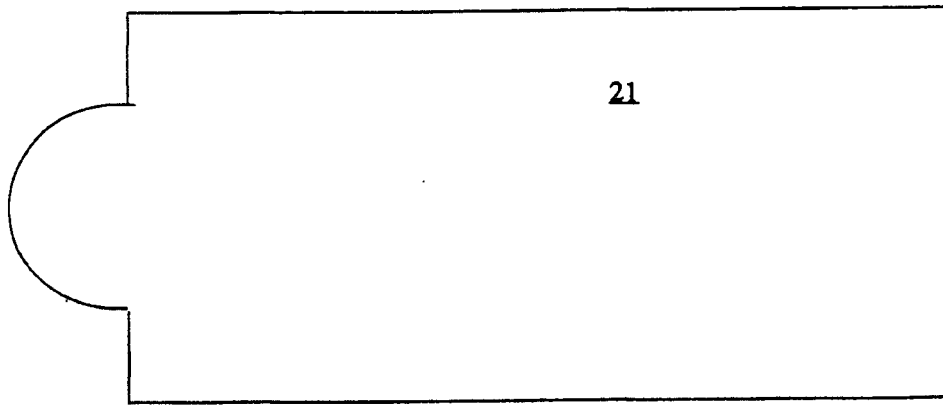


图1E

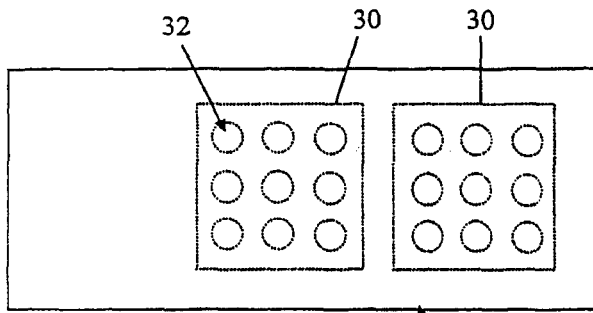


图2A

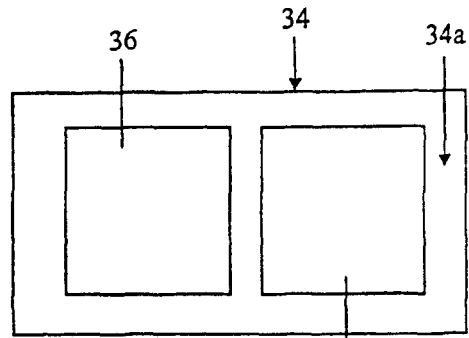


图2B

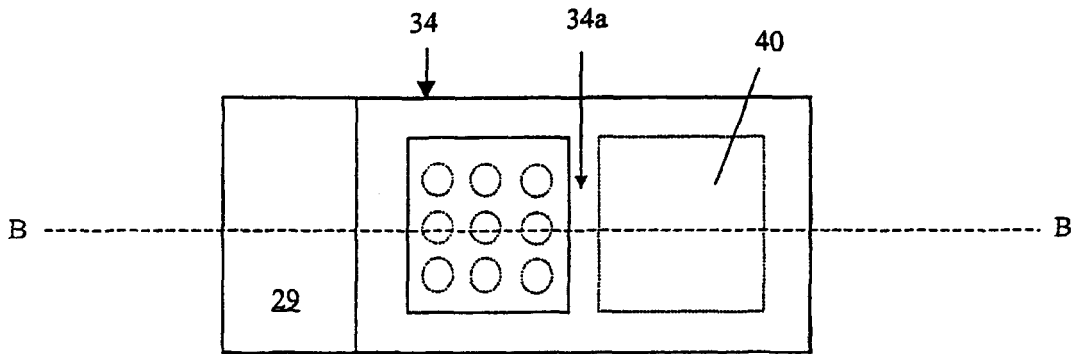


图2C

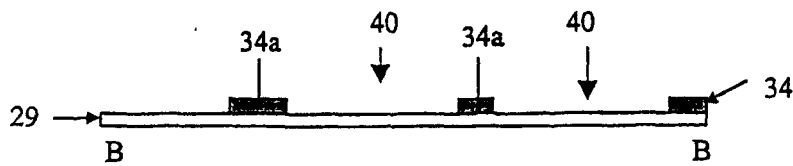


图2D

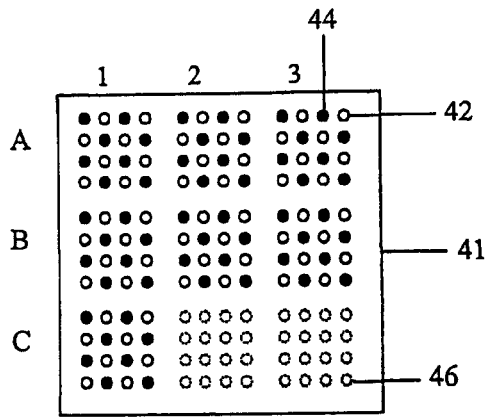


图3A

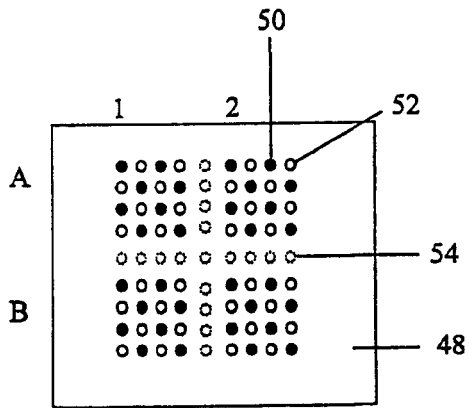


图3B

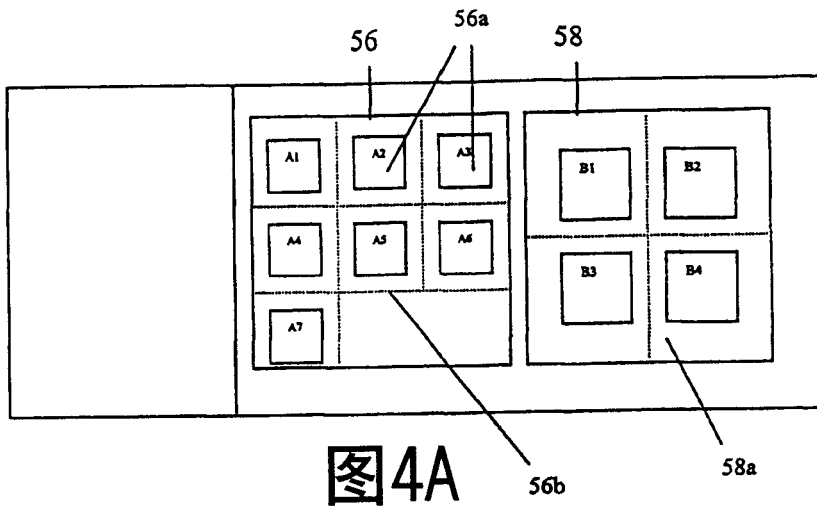


图4A

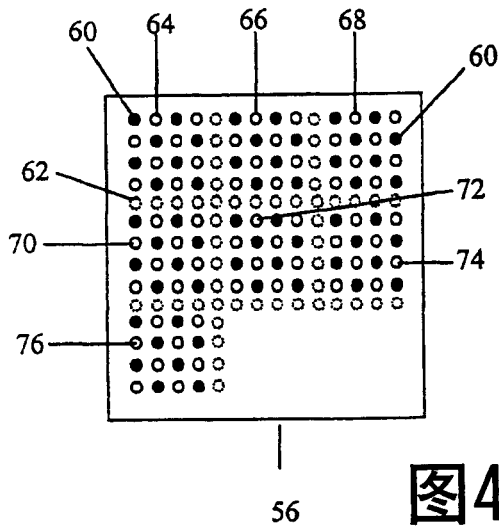


图4B

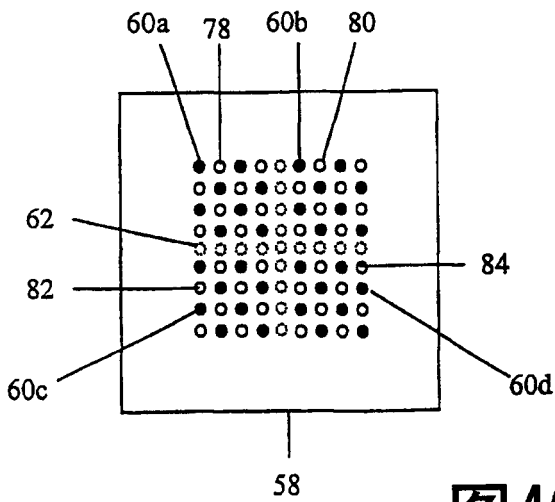


图4C

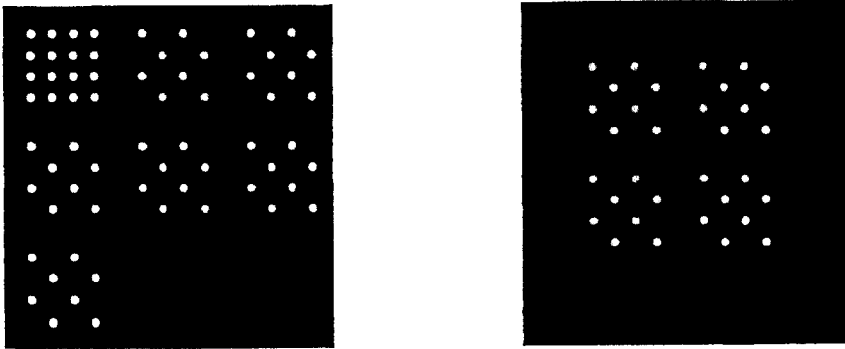


图4D



图4E

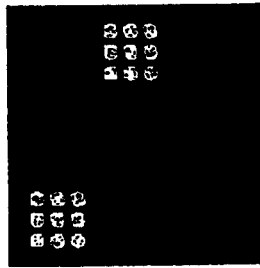
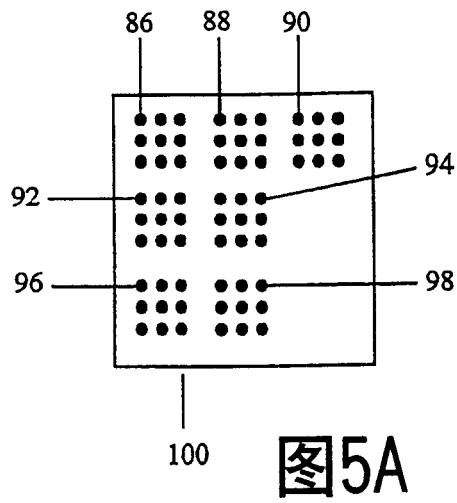


图5B

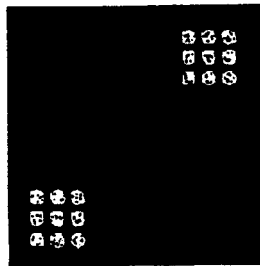


图5C

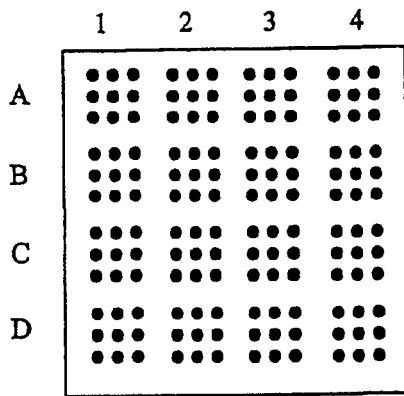


图6A

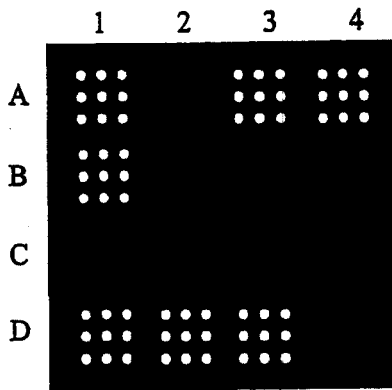


图6B

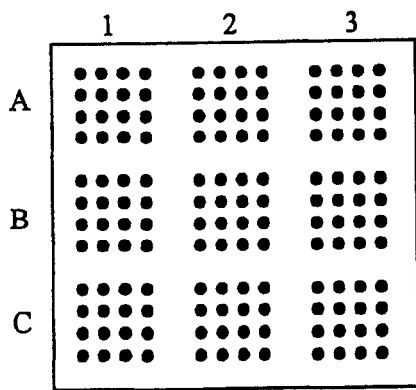


图7A

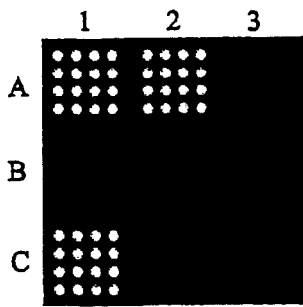


图7B

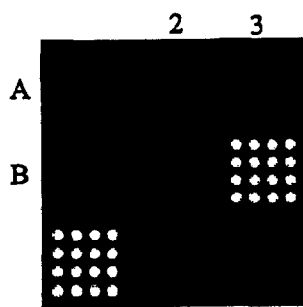


图7C

专利名称(译)	用于测试多种待分析物的装置及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1500140A</a>	公开(公告)日	2004-05-26
申请号	CN02807528.5	申请日	2002-03-28
申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
[标]发明人	张涛 李宾 彭永济 任一萍 葛海鹏 邓富桥 丁力 李红梅 蔡其锋 陈莹		
发明人	张涛 李宾 彭永济 任一萍 葛海鹏 邓富桥 丁力 李红梅 蔡其锋 陈莹		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/20 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N21/78 G01N33/50 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/54313		
代理人(译)	林晓红		
优先权	01126480.2 2001-08-14 CN 01132292.6 2001-11-23 CN 01126115.3 2001-07-12 CN 01112783.X 2001-04-27 CN 01113323.6 2001-07-11 CN 01105795.5 2001-03-28 CN 01126932.4 2001-09-29 CN 01126929.4 2001-09-29 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了用于测试至少一个样品中的多种待分析物的装置。该装置包括有一个测试表面的固相基质。在该测试表面上限定了至少一个反应区域，所述反应区域包括至少一个分离的测试位点的阵列。每一个这样的测试位点上都固定有一种测试分子，而不同的测试位点上则可能固定有不同的测试分子。本发明提供了一种用于附着于该固相基质的分隔物。所述分隔物包括在附着表面上的多个孔。这个附着表面与固相装置的测试表面相吻合并适合与之可逆性地附着，以使得当该两部分附着在一起时，每一个孔都与测试表面的一部分相贴合，从而构成了多个防漏的小室。小室内部的测试表面包括多个暴露在小室内部的测试位点。每一个小室优选地

具有一个自外界可进入的开口，这样液体可被引入小室中从而可与暴露的测试位点接触以进行测试。本发明的另一方面在于提供了在同一样品中分析多种待分析物的方法。

