

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/569

G01N 33/552

G01N 33/533



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410075545.5

[43] 公开日 2005 年 7 月 20 日

[11] 公开号 CN 1641355A

[22] 申请日 2004. 12. 20

[21] 申请号 200410075545.5

[71] 申请人 山东省医药生物技术研究中心

地址 250062 山东省济南市经十路 89 号

[72] 发明人 刘毅 韩金祥 朱波 高雪芹
潘继红 黄海南 黄海燕 鲁艳芹

[74] 专利代理机构 济南三达专利事务所

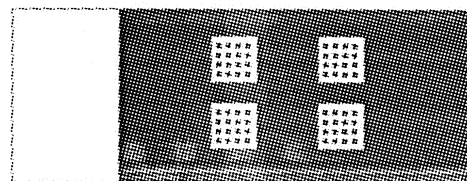
代理人 李健康

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片及其制备方法与应用,该芯片包括基片和阵列式分布的病原体种或型特异性蛋白或多肽抗原与对照的点涂层,所述的基片是玻璃基片;所述的抗原与对照的点涂层是指在基片上均匀分布的、点阵于玻片上的单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)、单纯疱疹病毒 II 型(HSV-II)、水痘-带状疱疹病毒(VZV)、巨细胞病毒(CMV)、EB 病毒(EBV)、风疹病毒(RV)、乙脑病毒(JEV)、腮腺炎病毒(MV)、结核分枝杆菌(MT)、钩端螺旋体(LP)十项指标的 13 种抗原及阳性对照、阴性对照、空白对照。利用本发明的芯片仅通过一次反应就可得到多种指标的反应结果,判断出不同病原体的感染,具有快速、高效、准确、平行诊断的特点。



1. 一种用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片，包括基片和阵列式分布的病原体种或型特异性蛋白或多肽抗原与对照的点涂层，其特征在于，所述的基片是玻璃基片；所述的抗原与对照的点涂层是指在基片上均匀分布的、点阵于玻片上的单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-I)、单纯疱疹病毒 II 型 (HSV-II)、水痘一带状疱疹病毒 (VZV)、巨细胞病毒 (CMV)、EB 病毒 (EBV)、风疹病毒 (RV)、乙脑病毒 (JEV)、腮腺炎病毒 (MV)、结核分枝杆菌 (MT)、钩端螺旋体(LP)十项指标的 13 种抗原及阳性对照、阴性对照、空白对照。
2. 如权利要求 1 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片，其特征在于，所述的基片是多聚赖氨酸处理的玻片。
3. 如权利要求 1 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片，其特征在于，所述的抗原与对照的点涂层的大小，可以根据点的大小，点间距的变化而变化；阵列的排列和分布数量可以根据待检样品的数目而变化。
4. 如权利要求 3 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片，其特征在于，所述的抗原与对照的点涂层的大小是：当点直径为 $100\mu\text{m}$ ，点间距为 $300\mu\text{m}$ 时，抗原阵列的大小为 $3.5\text{mm}\times 3.5\text{mm}$ ，且可同时在一张玻璃基片上设置 4~16 个。
5. 如权利要求 1 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片，其特征在于，所述点阵于玻璃基片上的抗原是纯化的所述病原体的种或型特异性抗原，包括单纯疱疹病毒 I、II 型共同抗原包膜糖蛋白 D (HSV-gD)，HSV I、II 型特异性抗原包膜糖蛋白 G (HSV1-gG、HSV2-gG)；水痘一带状疱疹病毒抗原 (VZV)；巨细胞病毒抗原 pp150、pp65 (CMV-pp150、pp65)；EB 病毒抗原 (EBV)；风疹病毒抗原 (RV)；乙脑病毒抗原 (JEV)；腮腺炎病毒抗原 (MV)；结核分枝杆菌结核菌素纯蛋白衍化物 (purified protein derivative, PPD)、脂阿拉伯甘露糖 (lipoarabinomannan, LAM)；钩端螺旋体抗原 (LP)。
6. 如权利要求 1 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片，其特征在于，所述的空白对照采用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 PBS，配方是 0.2g/L KCl， 1.44g/L Na_2HPO_4 ， 0.24g/L KH_2PO_4 ， 8g/L NaCl；阴性对照采用牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)；阳性对照采用人类免疫球蛋白 G 或 M (IgG/IgM)，其中在检测 IgG 的阵列里采用 IgG，在检测 IgM 的阵列里采用 IgM 作为阳性对照。
7. 如权利要求 1 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片的制备方法，其特征在于，(1) 多聚赖氨酸包被载玻片；(2) 根据样品数目设计芯片，确定每个样品对应的检测 IgG 和 IgM 的阵列，做好标记，并确定点阵的排列方式和点样位置；(3) 点样针从 384 孔板吸出病原体抗原及对照后直接点印于多聚赖氨酸玻片上；(4) 室温放置 24 小时，使蛋白质的氨基与玻片上的赖氨酸发生反应，以固定样品；(5) 利用制作蛋白芯片的常规方法封闭、洗涤、干燥、包装、保存。
8. 权利要求 1 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片的应用，其特征在于，采用抗原-抗体-荧光二抗方法检测病人血液或脑脊液中的特异性病原体抗体，方法是将病人血清或脑脊液加于芯片表面，样本中的抗体分别与固定在芯片上的相对应的抗原结合，洗去未结合的其他物质后，加入荧光标记的二抗，抗体检测指标分为 IgG 抗体和 IgM 抗体两部分，在测 IgG 的阵列里，二抗采用抗人 IgG 二抗；在测 IgM 的阵列里，二

抗采用抗人 IgM 二抗，洗去未结合的二抗，扫描并收集信号，样品点的荧光强度与其抗体的浓度成正比。

9. 如权利要求 8 所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片的应用，其特征在于，使用方法如下：

(1) 用 1%BSA, 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl, 0.1% Tween-20 的封闭液，封闭于点好抗原的芯片上，37℃1~1.5 小时，封闭基片表面非特异性位点；

(2) 用 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl, 0.1% Tween-20 的 PBST 液洗涤 3~4 次，每次 10 秒钟，再用 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl 的 PBS 液冲洗，置于离心机，以 800 转/分离心 3 分钟，去除多余封闭液；

(3) 滴加病人血清或脑脊液样品于芯片上，置于杂交盒内 37℃30 分钟，使抗原与抗体充分反应；

(4) 用 PBST 洗涤 3~4 次，每次 10 秒钟，用 PBS 冲洗，于离心机以 800 转/分离心 3 分钟，去除多余样品；

(5) 滴加封闭液稀释过的荧光标记的二抗 (Cy3-Anti-Human-IgG, Cy3-Anti-Human-IgM)，在测 IgG 的阵列中，二抗采用抗人 IgG (Cy3-Anti-Human-IgG,)；在测 IgM 的阵列中，采用抗人 IgM 二抗 (Cy3-Anti-Human-IgM,)，37℃避光温育 15 分钟；

(6) 用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 秒钟，用 PBS 冲洗，于离心机以 800 转/分离心 3 分钟；

(7) 用激光共聚焦扫描仪扫描并收集信号，依据扫描显示：阳性对照有荧光信号，阴性对照和空白对照无荧光信号，分析检测结果。

检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及生物芯片及其制备方法与应用，具体地说，涉及低密度蛋白芯片及其制备方法与应用，尤其是涉及血液脑脊液病原体抗体检测芯片及其制备方法与应用。

背景技术

近年来，中枢神经系统（Central nervous system, CNS）感染性疾病发病率有所上升，其病原体有各种细菌、真菌、病毒、螺旋体等多种，病原学诊断是确诊的金标准。病原学诊断一俟确定，鉴别诊断则毋庸再提。目前，病原体诊断仍然靠形态学检查、病原体分离培养以及酶联免疫吸附实验（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）检测抗体；而对于结核杆菌、螺旋体及各种病毒感染，包括单纯疱疹病毒 I 型（HSV-I）、单纯疱疹病毒 II 型（HSV-II）、水痘一带状疱疹病毒（VZV）、巨细胞病毒（CMV）、EB 病毒（EBV）、风疹病毒（RV）、乙脑病毒（JEV）、腮腺炎病毒（MV）等，其形态学检查和病原体分离培养常受到限制，临床上通称为无菌性脑炎、脑膜炎。由于不同病原体感染的治疗原则大相径庭，如果病原体不明，临床就难以用药；而抗病毒药物的不断研发和对不同病毒具有的不同的敏感性、耐药性，也使得对病毒种类的鉴定更为迫切，但迄今为止病原学确诊远远不能满足临床的要求，由此延误治疗使该类疾病死亡率一直居高不下。由于早期治疗能降低死亡率，因此，建立一种早期平行快速诊断方法至关重要。

机体受病原体感染后，体液中产生特异性抗体，感染后 2-3 天内血清中最先出现 IgM，然后产生 IgG，许多国内外学者将测定脑脊液中的病原体特异性 IgM 作为早期诊断中枢神经系统感染的实验依据，认为 CSF 中病毒特异性抗体检测比血清检测特异性高、干扰小，能特异性地诊断中枢神经系统的病毒性感染，由于血中免疫球蛋白难以通过血脑屏障，尤其是大分子的 IgM 抗体，因此脑脊液中的 IgM 被视为局部炎症所产生的免疫反应。但用 ELISA 技术每次只能检测一种病原体的 IgM，如要对可疑所有病原体进行检测，则费用昂贵，而且需要脑脊液的量大，实际上无法进行。

生物芯片（Biochip）技术是随着人类基因组计划（HGP）的研究发展应运而生，主要指通过平面微细加工技术构建的微流体分析单元和系统，以实现细胞、蛋白质、核酸以及其它生物组分的准确、快速、大信息量的检测，具有高度平行性、多样性、微型化和自动化的特点，生物芯片主要包括基因芯片和蛋白芯片两大类。蛋白芯片（proteinchip）是集微电子、微机械、化学物理技术、计算机技术为一体的一门高新技术，被认为是生命科学研究中的高效工具，是将各种蛋白质有序地固定于载体上成为检测用的芯片，然后，用标记了特定荧光抗体的蛋白质或其他成分与芯片作用，经漂洗将未能与芯片上的蛋白质互补结合的成分洗去，再利用荧光扫描仪或激光共聚焦扫描技术，测定芯片上各点的荧光强度，通过荧光强度分析蛋白质与蛋白质之间相互作用的关系，由此达到测定各种蛋白质功能的目的。利用这项技术可同时对多种蛋白质进行平行检测分析，使得用常规 ELISA 技术需上千次才能完成的分析在蛋白质芯片上仅需一次就可以完成，并且检测到的平行数据误差更小，更准确。

临床上进行血液脑脊液抗体的检测主要是通过 ELISA 技术, 具体地说, 当检测 IgG 时, 酶标板上包被该项目相应的抗原, 与血清中相应的 IgG 孵育结合, 然后加入酶标二抗, 最后加入酶作用的底物显色, 用酶标仪检测判断结果; 当检测 IgM 时, 酶标板上包被该项目相应的二抗, 与血清中相应的 IgM 孵育结合, 然后依次加入抗原、酶标抗体, 最后加入酶作用的底物显色, 用酶标仪检测判断结果。

如要对单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-I)、单纯疱疹病毒 II 型 (HSV-II)、水痘一带状疱疹病毒 (VZV)、巨细胞病毒 (CMV)、EB 病毒 (EBV)、风疹病毒 (RV)、乙脑病毒 (JEV)、腮腺炎病毒 (MV)、结核分枝杆菌、钩端螺旋体十种病原体进行检测, 就需要是二十个试剂盒才能将所有的 IgG 和 IgM 检测完毕, 每次反应只能检测一个指标, 速度慢、效率低、费用昂贵、需要样本的量, 实际上无法进行; 而且目前所用的检测试剂盒中的抗原均为病原体培养物的粗提抗原, 其病毒含量低, 成分复杂, 本底较高, 各病原体之间的交叉反应严重, 且特异性、敏感性、稳定性相差很大; 另外, 实验中所用的底物也是剧毒化学品, 对实验人员的健康也有潜在的威胁。

发明内容

针对上述不足, 本发明要解决的问题是, 提供一种检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片及其制备方法与应用, 目的在于把十种病原体的十三种纯化的种或型特异性抗原同时点阵于一张玻片上, 用荧光标记二抗, 仅通过一次反应就可得到多种指标的反应结果, 力求快速、准确的判断出不同病原体的感染。本发明涉及的应用方法反应条件一致, 避免了交叉反应和酶反应底物的潜在危害和污染, 大大提高了检测的速度和效率, 具有快速、高效、准确、平行诊断的特点, 为临床用药、治疗提供重要依据。

本发明涉及的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片, 包括基片和阵列式分布的病原体种或型特异性蛋白或多肽抗原与对照的点涂层, 其中, 所述的基片是玻璃基片; 所述的抗原与对照的点涂层是指在基片上均匀分布的、点阵于玻片上的单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-I)、单纯疱疹病毒 II 型 (HSV-II)、水痘一带状疱疹病毒 (VZV)、巨细胞病毒 (CMV)、EB 病毒 (EBV)、风疹病毒 (RV)、乙脑病毒 (JEV)、腮腺炎病毒 (MV)、结核分枝杆菌 (MT)、钩端螺旋体 (LP) 十项指标的 13 种抗原及阳性对照、阴性对照、空白对照。

上述的基片优选多聚赖氨酸处理的玻片; 抗原与对照的点涂层的大小, 可以根据点的大小, 点间距的变化而变化; 阵列的排列和分布数量可以根据待检样品的数目而变化。其中, 上述抗原与对照的点涂层的大小优选是: 当点直径为 $100\mu\text{m}$, 点间距为 $300\mu\text{m}$ 时, 抗原阵列的大小为 $3.5\text{mm}\times 3.5\text{mm}$, 且可同时在一张玻璃基片上设置 4~16 个。

本发明利用高速全自动点样机器人把十种病原体的十三种抗原以及阳性对照、阴性对照和空白对照点阵于玻片上, 蛋白质通过化学键连接于赖氨酸处理的基片上而被固定。玻片上每个阵列均点阵了上述十三种抗原, 均为纯化的病原体的种或型特异性抗原, 包括单纯疱疹病毒共同抗原包膜糖蛋白 D (HSV-gD), HSVI、II 型特异性抗原包膜糖蛋白 G (HSV1-gG、HSV2-gG); 水痘一带状疱疹病毒抗原 (VZV); 巨细胞病毒抗原 pp150、pp65 (CMV-pp150、pp65); EB 病毒抗原 (EBV); 风疹病毒抗原 (RV); 乙脑病毒抗原 (JEV); 腮腺炎病毒抗原 (MV); 结核分枝杆菌结核菌素纯蛋白衍化物 (purified protein derivative, PPD)、脂阿拉伯甘露糖 (lipoarabinomannan, LAM); 钩端螺旋体抗原 (LP)。

在本发明涉及的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片中, 所述的空白对照采

用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 PBS, 配方是 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl; 阴性对照采用牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA); 阳性对照采用人类免疫球蛋白 G 或 M (IgG/IgM), 其中在检测 IgG 的阵列里采用 IgG, 在检测 IgM 的阵列里采用 IgM 作为阳性对照。

本发明所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片的制备方法, 其步骤主要是: (1) 多聚赖氨酸包被载玻片; (2) 根据样品数目设计芯片, 确定每个样品对应的检测 IgG 和 IgM 的阵列, 做好标记, 并确定点阵的排列方式和点样位置; (3) 点样针从 384 孔板吸出病原体抗原及对照后直接点印于多聚赖氨酸玻片上; (4) 室温放置 24 小时, 使蛋白质的氨基与玻片上的赖氨酸发生反应, 以固定样品; (5) 利用制作蛋白芯片的常规方法封闭、洗涤、干燥、包装、保存。

上述用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片的制备方法具体包括以下步骤:

1. 病原体抗原的确定

抗原的谨慎选择是改善血清学诊断的首要条件。应用具有较强免疫原性且与其它病原体没有同源性的抗原, 将会有效地提高病原体感染诊断的敏感性和特异性。因此, 在确定单纯疱疹病毒抗原时, 选择 I、II 型共同的具有强抗原决定簇的基因工程表达纯化的包膜糖蛋白 D (HSV-gD); 又选择了 HSVI、II 型特异性抗原基因工程表达纯化的包膜糖蛋白 G (HSV1-gG、HSV2-gG) 以能区分两型病毒; 由于巨细胞病毒抗原成份与其它疱疹病毒中的相应成份具有很强的同源性, 选择了其优势表位抗原 pp150 和 pp65 基因工程表达纯化的蛋白作为特异性抗原; 对于结核分枝杆菌, PPD 包含的抗原范围广泛, 有致病性分枝杆菌、环境分枝杆菌等, 特异性不高, 脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 是近年来国外研究成功的较为优化的抗原, 两者联用可极大的提高结核性脑膜炎的检出率; 其余均为纯化的病原体抗原。

2. 多聚赖氨酸包被载玻片

将玻片置玻片架上, 放入盛有 350ml 清洁液 (NaOH 100g, 乙醇 600ml, 水 400ml) 的玻璃缸内, 置摇床上 60 转/分, 平摇 2 小时; 倒掉清洁液, 充分水洗 4 次, 每次 3 分钟; 将玻片浸泡于盛有 350ml 多聚赖氨酸 PBS 溶液 (多聚赖氨酸 35ml, PBS 35ml, 水 280ml) 的玻璃缸内, 置摇床 60 转/分, 平摇 1 小时; 将玻片浸于水中, 上下洗 5 次; 放离心机中, 800 转/分离心 5 分钟后, 置一干净塑料盒中, 垂直放置 2 周或烘箱烤片后点样用。

3. 点样制备蛋白芯片

根据样品数目选择合适的微阵列芯片, 确定每个样品对应的检测 IgG 和 IgM 的阵列, 做好标记, 并确定点阵的排列方式和点样位置; 用 Pixsys 5500 芯片自动点样仪, 接触式点样, 点样针从 384 孔板吸出病原体抗原及对照后直接点印于多聚赖氨酸玻片上, 点阵形式为四点矩形阵列, 当点直径为 100 μ m, 点间距为 300 μ m, 抗原阵列的大小为 3.5mm $\times$ 3.5mm; 点样后室温放置 24 小时或 37 $^{\circ}$ C 2 小时, 使蛋白质的氨基与玻片上的赖氨酸发生反应, 以固定抗原; 最后将芯片室温自然干燥、包装后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

本发明所述的用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片的应用, 主要采用抗原-抗体-荧光二抗方法检测病人血液或脑脊液中的特异性病原体抗体, 方法是将病人血清或脑脊液加于芯片表面, 样本中的抗体分别与固定在芯片上的相对应的抗原结合, 洗去

未结合的其他物质后,加入荧光标记的二抗,抗体检测指标分为 IgG 抗体和 IgM 抗体两部分,在测 IgG 的阵列里,二抗采用抗人 IgG 二抗;在测 IgM 的阵列里,二抗采用抗人 IgM 二抗,洗去未结合的二抗,扫描并收集信号,样品点的荧光强度与其抗体的浓度成正比。

上述的检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片,其抗体检测指标包括 IgG 抗体和 IgM 抗体两部分,在测 IgG 的阵列里,二抗采用抗人 IgG 二抗;在测 IgM 的阵列里,二抗采用抗人 IgM 二抗。

用这种蛋白芯片可分别检测到样本中针对上述十种病原体的 IgG 和 IgM。

在上述用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片的应用中,其抗原抗体反应及检测的具体使用方法如下:

(1) 用 1%BSA, 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl, 0.1% Tween-20 的封闭液,封闭于点好抗原的芯片上,37℃1~1.5 小时,封闭基片表面非特异性位点;

(2) 用 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl, 0.1% Tween-20 的 PBST 液洗涤 3~4 次,每次 10 秒钟,再用 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl 的 PBS 液冲洗,置于离心机,以 800 转/分离心 3 分钟,去除多余封闭液;

(3) 滴加病人血清或脑脊液样品于芯片上,置于杂交盒内 37℃30 分钟,使抗原与抗体充分反应;

(4) 用 PBST 洗涤 3~4 次,每次 10 秒钟,用 PBS 冲洗,于离心机以 800 转/分离心 3 分钟,去除多余样品;

(5) 滴加封闭液稀释过的荧光标记的二抗 (Cy3-Anti-Human-IgG, Cy3-Anti-Human-IgM),在测 IgG 的阵列中,二抗采用抗人 IgG (Cy3-Anti-Human-IgG,);在测 IgM 的阵列中,采用抗人 IgM 二抗 (Cy3-Anti-Human-IgM,), 37℃避光温育 15 分钟;

(6) 用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 秒钟,用 PBS 冲洗,于离心机以 800 转/分离心 3 分钟;

(7) 用激光共聚焦扫描仪扫描并收集信号,依据扫描显示:阳性对照有荧光信号,阴性对照和空白对照无荧光信号,分析检测结果。

利用本发明的检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片具有以下优越性:

1) 本发明实现了把不同的病原体抗原同时点阵于一张玻片上,进行细菌病毒螺旋体多项指标同时检测,所需样本量少 (3 μ L),仅通过一次反应就可得到多指标的反应结果,大大提高了检测速度和效率,可为临床提供更多的指标。

2) 可同时在一张玻片上检测多人份样品的 IgG 和 IgM,简便快速,又降低了检测费用。

3) 保留了 ELISA 技术的高度特异性,检测结果稳定,可靠性高,有利于临床早期的诊断治疗。

4) 制作工艺简单,操作安全,实用性强。

总之,使用本发明进行血液脑脊液病原体抗体的检测,具有样品用量少、省时、省

力、准确度高的特点。

附图说明

图 1 检测血液脑脊液病原体抗体蛋白芯片的外观图。

图 2 点样阵列图，

第一排为：单纯疱疹病毒 gD、单纯疱疹病毒 I-gG、单纯疱疹病毒 II-gG，水痘一带状疱疹病毒抗原；

第二排为：巨细胞病毒 pp150、巨细胞病毒 pp65，EB 病毒，风疹病毒；

第三排为：乙脑病毒抗原；腮腺炎病毒抗原；结核菌素纯蛋白衍化物 PPD、脂阿拉伯甘露糖；

第四排为：钩端螺旋体、PBS、BSA、IgG/IgM。

图 3 单纯疱疹病毒 II-IgM 检测阳性图示。

图 4 结核分枝杆菌 IgG 检测阳性图示。

具体实施方式

实施例 1：玻片的修饰与抗原的固定，如图 1 为检测血清脑脊液病原体抗体蛋白芯片的外观图，如图 2 点样阵列图。

将玻片置玻片架上，放入盛有 350ml 清洁液（NaOH 100g，乙醇 600ml，水 400ml）的玻璃缸内，置摇床上 60 转/分，平摇 2 小时；倒掉清洁液，充分水洗 4 次，每次 3 分钟；将玻片浸泡于盛有 350ml 多聚赖氨酸 PBS 溶液（多聚赖氨酸 35ml，PBS 35ml，水 280ml）的玻璃缸内，置摇床 60 转/分，平摇 1 小时；将玻片浸于水中，上下洗 5 次；放离心机中，800 转/分离心 5 分钟后，置一干净塑料盒中，垂直放置 2 周或烘箱烤片后点样用。

做 2 份血清样品检测，选择 2×2 的微阵列芯片，（如图 1）其中上排 2 个阵列为 IgG，下排 2 个阵列为 IgM，左数第一列为第一份样品（单纯疱疹病毒-II IgM 阳性）、第二列为第二份样品（结核分枝杆菌 IgG 阳性）；用 Pixsys 5500 芯片自动点样仪，接触式点样，以 PBS 甘油为点样液（80%PBS, 20%甘油），点样针从 384 孔板吸出病原体抗原及对照后直接点印于多聚赖氨酸玻片上，点阵形式为四点矩形阵列，点直径为 100 μm，点间距为 300 μm，抗原阵列的大小为 3.5mm×3.5mm；点样后室温放置 24 小时或 37℃2 小时，使蛋白质的氨基与玻片上的赖氨酸发生反应，以固定抗原；最后将芯片室温自然干燥、包装后于 4℃保存。

用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片，是将纯化的十三种抗原以及空白对照、阴性对照、阳性对照点阵于玻片上，蛋白质通过化学键连接于固相载体上而被固定，玻片上每一个阵列均点阵了上述十三种抗原，其中空白对照用 PBS，阴性对照采用牛血清白蛋白 BSA，阳性对照采用人类免疫球蛋白 G 或 M（IgG 或 IgM），如图 2 所示。

实施例 2：抗原抗体反应及检测

加封闭液（1%BSA，0.2g/L KCl，1.44g/L Na₂HPO₄，0.24g/L KH₂PO₄，8g/L NaCl，0.1% Tween-20，）封闭于点好抗原的芯片上，37℃1 小时，封闭基片表面非特异性位点；用 PBST（0.2g/L KCl，1.44g/L Na₂HPO₄，0.24g/L KH₂PO₄，8g/L NaCl，0.1% Tween-20）洗涤 3 次，每次 10 秒种后，用 PBS（0.2g/L KCl，1.44g/L Na₂HPO₄，0.24g/L KH₂PO₄，8g/L NaCl）冲洗，于离心机以 800 转/分离心 3 分钟，去除多余封闭液；将血清用 PBS 稀释

10 倍后取 3 μ L 加于阵列上，第一份样本加在第一列上下两个阵列中；第二份样本加在第二列上下两个阵列中，置于杂交盒内 37℃ 30 分钟，使抗原与抗体充分反应；用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 秒种后，用 PBS 冲洗，于离心机以 800 转/分离心 3 分钟，去除多余样品；将荧光标记的二抗用封闭液稀释至应用浓度，每个阵列加 3 μ L，只是上排阵列中，二抗采用抗人 IgG，下排阵列中，采用抗人 IgM 二抗，37℃ 避光温育 15 分钟；用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 秒种后，用 PBS 冲洗，于离心机以 800 转/分离心 3 分钟；用激光共聚焦扫描仪扫描并收集信号，依据扫描显示：阳性对照有荧光信号，阴性对照和空白对照无荧光信号，分析检测结果。

如图 3 单纯疱疹病毒 II-IgM 检测阳性图示，图 4 结核分枝杆菌 IgG 检测阳性图示。

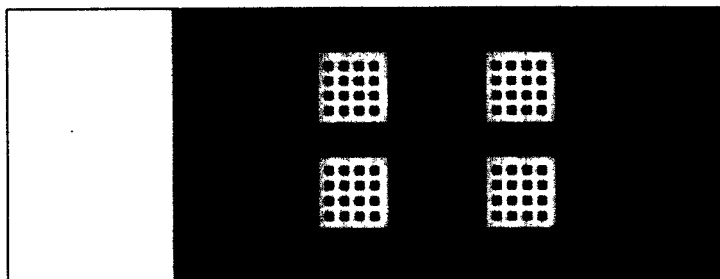


图 1

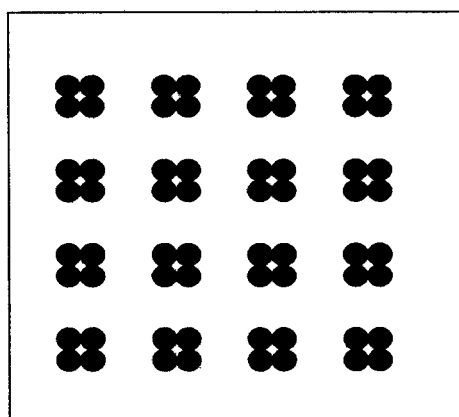


图 2



图 3



图 4

专利名称(译)	检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN1641355A	公开(公告)日	2005-07-20
申请号	CN200410075545.5	申请日	2004-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
[标]发明人	刘毅 韩金祥 朱波 高雪芹 潘继红 黄海南 黄海燕 鲁艳芹		
发明人	刘毅 韩金祥 朱波 高雪芹 潘继红 黄海南 黄海燕 鲁艳芹		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/552 G01N33/569		
代理人(译)	李健康		
其他公开文献	CN1300587C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测血液脑脊液病原体抗体的蛋白芯片及其制备方法与应用，该芯片包括基片和阵列式分布的病原体种或型特异性蛋白或多肽抗原与对照的点涂层，所述的基片是玻璃基片；所述的抗原与对照的点涂层是指在基片上均匀分布的、点阵于玻片上的单纯疱疹病毒I型(HSV - I)、单纯疱疹病毒II型(HSV - II)、水痘 - 带状疱疹病毒(VZV)、巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、风疹病毒(RV)、乙脑病毒(JEV)、腮腺炎病毒(MV)、结核分枝杆菌(MT)、钩端螺旋体(LP)十项指标的13种抗原及阳性对照、阴性对照、空白对照。利用本发明的芯片仅通过一次反应就可得到多种指标的反应结果，判断出不同病原体的感染，具有快速、高效、准确、平行诊断的特点。

