



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102087292 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 16

(21) 申请号 200910241223. 6

(22) 申请日 2009. 12. 02

(73) 专利权人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11 号

(72) 发明人 潘文颖 张伟 蒋兴宇

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101526520 A, 2009. 09. 09, 说明书第 2 页
第 21-25 行, 第 3 页第 3-4 行.

CN 101413183 A, 2009. 04. 22, 全文.

US 6613581 B1, 2003. 09. 02, 全文.

Mei He

Amy E. Herr. Microfluidic Polyacrylamide
Gel Electrophoresis with in Situ

Immunoblotting for Native Protein Analysis.
《Analytical Chemistry》. 2009, 第 81 卷 (第 19
期), 第 8177-8184 页.

Mei He

Amy E. Herr. Microfluidic Polyacrylamide
Gel Electrophoresis with in Situ

Immunoblotting for Native Protein Analysis.
《Analytical Chemistry》. 2009, 第 81 卷 (第 19
期), 第 8177-8184 页.

审查员 刘彦宁

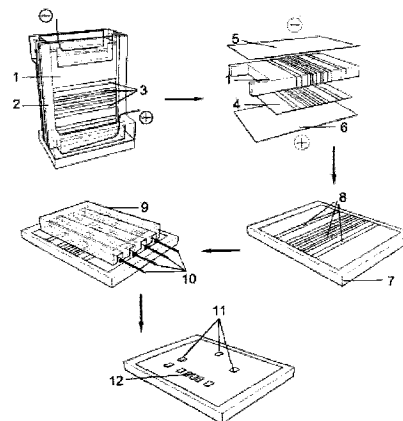
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 3 页

(54) 发明名称

微流控免疫印迹芯片、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明提供一种微流控免疫印迹芯片、其制备方法及应用。本发明所提供的微流控免疫印迹芯片包括: 1) 固定有按分子量分离的蛋白质条带的基底; 和 2) 微流管道。本发明还提供了微流控免疫印迹芯片的方法及其在检测样品中的多种蛋白质、检测蛋白质的分子量标准和优化免疫反应中抗体浓度中的用途。本发明可以实现仅单次免疫印迹实验就能检测生物样品中的多种蛋白, 检测灵敏度高, 且能检测出蛋白分子量, 操作简单, 能够有效的提高免疫检测效率, 降低成本。



1. 一种微流控免疫印迹芯片,其特征在于,所述芯片包括:1)固定有按分子量分离的蛋白质条带的基底;和2)微流管道,所述微流管道彼此平行且与蛋白质条带垂直布置。

2. 根据权利要求1所述的芯片,其特征在于,所述基底选自聚偏氟二乙烯膜、聚偏氟二乙烯电纺丝薄膜、表面经化学修饰的镀金玻璃片、聚苯胺薄膜和聚吡咯薄膜;优选地,所述基底是通过以下方法制备的:

(a) 采用聚丙烯酰胺电泳按分子量分离蛋白质,优选为变性不连续聚丙烯酰胺电泳;

(b) 将步骤(a)所得到的蛋白质条带从聚丙烯酰胺凝胶中转移到基底上;优选地,所述转移方法为电转移法。

3. 根据权利要求2所述的芯片,其特征在于,所述基底为聚偏氟二乙烯膜。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的芯片,其特征在于,所述微流管道为高分子热塑或热固化管道;优选地,所述微流管道是通过软刻蚀方法来制备的,其中微流管道的管径优选为20~200 μm 。

5. 根据权利要求4所述的芯片,其特征在于,所述微流管道为聚二甲基硅氧烷管道或聚甲基丙烯酸甲酯管道。

6. 根据权利要求5所述的芯片,其特征在于,所述微流管道为聚二甲基硅氧烷微流管道。

7. 制备权利要求1-6中任一项所述芯片的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 制备固定有按分子量分离的蛋白质条带的基底;优选地,所述基底为聚偏氟二乙烯膜;

2) 制备微流管道;优选地,所述微流管道为聚二甲基硅氧烷微流管道;

3) 组装步骤1)制备的基底与步骤2)制备的微流管道。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中基底的制备包括以下步骤:

(a) 采用聚丙烯酰胺电泳按分子量分离蛋白质;优选为变性不连续聚丙烯酰胺电泳;

(b) 将步骤(a)所得到的蛋白质条带从聚丙烯酰胺凝胶中转移到聚偏氟二乙烯膜上;优选地,所述转移方法为电转移法。

9. 根据权利要求7或8所述的方法,其特征在于,所述步骤2)中微流管道的制备包括以下步骤:

(a) 将二甲基硅氧烷与固化剂按11:1的质量配比混合并倒入具有微流管道的模板;

(b) 在80 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干30分钟;优选地,所制备的微流管道的管径为20~200 μm 。

10. 根据权利要求7或8所述的方法,其特征在于,所述步骤3)中基底与微流管道的组装包括以下步骤:

(a) 将固定有按分子量分离的蛋白条带的聚偏氟二乙烯膜烘干,优选地,所述烘干条件为37 $^{\circ}\text{C}$,30分钟;

(b) 将聚二甲基硅氧烷微流管道按管道方向与聚偏氟二乙烯膜上的蛋白条带方向垂直的方向盖在步骤(a)得到的聚偏氟二乙烯膜上,轻按压紧。

11. 一种微流控免疫印迹方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 制备权利要求1至6中任一项所述的微流控免疫印迹芯片;

2) 在步骤1)所制备的微流控免疫印迹芯片的不同微流管道中通入针对不同蛋白质的

一抗；

3) 用标记物标记的二抗结合一抗,检测信号。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中一抗所使用的封闭液为含有牛血清蛋白和吐温 -20 的磷酸盐缓冲液,所述牛血清蛋白的含量优选为 5% 体积,所述吐温 -20 的含量优选为 0.2% 体积;优选地,所述步骤 3) 中二抗的标记物选自荧光标记、酶标记、量子点标记、胶体金标记和纳米金标记。

13. 权利要求 1-6 中任一项所述芯片或者权利要求 11 或 12 所述的方法在检测样品中的多种蛋白质、检测蛋白质的分子量标准和优化免疫反应抗体浓度的用途;优选地,所述样品选自细胞、组织、血液和体液。

微流控免疫印迹芯片、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微流控免疫印迹芯片、其制备方法及应用。

背景技术

[0002] 微流控 (Microfluidics) 是一种利用微米级别的小型管道、结构对微升量级的微量流体进行精细控制的分析技术,相应的技术载体即微流控芯片。它以微电子工艺衍生出来的软蚀刻技术为依托,通过在芯片上集成微管道、微反应室等微小元件来构建微流路系统,加载生物样品或化学反应液,以压力泵或电渗流作为动力形成微流路,从而在芯片上进行一种或多种精细的操作或反应,达到生物检测、化学合成或细胞生长等多种目的。

[0003] 免疫印迹 (immunoblotting) 又称蛋白质印迹 (Western blotting),是 Towbin 等人于 1979 年发明的一种借助特异性抗体鉴定抗原的有效方法。该法是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上发展起来的一种免疫生化技术。将含有目标蛋白 (抗原) 的样品首先用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 或非变性电泳 (Native-PAGE) 等分离后,通过转移电泳原位转印至硝酸纤维素膜或其它膜的表面,然后将膜表面的蛋白质再用抗原抗体反应进行特异性检测。例如,将经 SDS-PAGE 分离的蛋白质带转移到膜上后,膜用封闭液处理,然后与第一抗体反应,膜经漂洗后再与酶标记或荧光素标记的二抗,即可显示出目标蛋白的位置。

[0004] 现有的免疫印迹存在的问题是:(1) 一次实验只能检测生物样品中一种蛋白质的表达情况。不能满足现在生物学研究中需要同时对细胞或组织中多种蛋白进行检测的目的。(2):一次免疫印迹实验需要的抗体溶液较多(几百微升至几毫升),而抗体价格昂贵,使免疫印迹实验成本较高。

[0005] 为了让一次实验能够检测多种蛋白,现有的技术有多色荧光素标记二抗法、多色量子点标记二抗法 (Bakalova, R. ;Zhelev, Z. ;Ohba, H. ;Baba, Y. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 9328-9329.),表面增强拉曼免疫印迹法 (Han, X. X. ;Jia, H. Y. ;Wang, Y. F. ;Lu, Z. C. ;Wang, C. X. ;Xu, W. Q. ;Zhao, B. ;Ozaki, Y. Anal. Chem. 2008, 80, 2799-2804.)。但是,多色荧光素标记和多色量子点标记法能检测的蛋白数目受到限制,因为不同标记的物质(荧光素或量子点)的激发光和发射光的波长区间会有重叠,现在报道的蛋白检测数目大多在 5 种以下。表面增强拉曼免疫印迹法的缺陷在于,在检测多种蛋白质的混合物时,光谱谱图复杂而难以辨别。

[0006] 2001 年,瑞士 IBM 实验室发明了一种利用微流管道同时检测多份样品中多种蛋白质的方法 (Bernard, A. ;Michel, B. ;Delamar, E. Anal. Chem. 2001, 73, 8-12.),原理同 ELISA 相似,将平行微流管道铺在 PDMS 的基底上,通过在管道中孵育抗原在基底上固定抗原条带,然后揭开管道,在与抗原条带垂直的方向上铺另一微流管道,在管道中孵育抗体,在两次管道交叉的地方发生免疫反应。此方法可以实现微量,大量的检测生物样品中抗体或抗原含量。另有学者对这项技术进行了改进,如蒋兴宇在微流芯片中引入了自动梯度稀释装置,并应用于检测 HIV (Jiang, X. Y. ;Ng, J. M. K. ;Stroock, A. D. ;Dertinger, S. K. W. ;

Whitesides, G. M. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 5294-5295.)。仰大勇使用电纺丝薄膜作为固定抗原的基底,提高了此免疫检测的灵敏度 (Yang, D. Y. ;Niu, X. ;Liu, Y. Y. ;Wang, Y. ;Gu, X. ;Song, L. S. ;Zhao, R. ;Ma, L. Y. ;Shao, Y. M. ;Jiang, X. Y. Adv. Mater. 2008, 20, 4770-4775.)。但是上述的微流控免疫检测并不能检测出蛋白的分子量大小,而蛋白质的分子量大小作为一种重要信息可以用于排除假阳性信号及鉴定蛋白质的翻译后修饰情况。

发明内容

[0007] 因此,本发明的目的是,提供一种微流控免疫印迹芯片。

[0008] 本发明的另一个目的是,提供上述微流控免疫印迹芯片的制备方法和用途。

[0009] 本发明的又一个目的是,提供一种微流控免疫印迹方法。

[0010] 本发明的目的是采用以下技术方案来实现的。一方面,本发明提供了一种微流控免疫印迹芯片,其包括:1) 固定有按分子量分离的蛋白质条带的基底;和 2) 微流管道。

[0011] 优选地,所述基底选自聚偏氟二乙烯膜、聚偏氟二乙烯电纺丝薄膜、表面经化学修饰的镀金玻璃片、聚苯胺薄膜和聚吡咯薄膜,优选为聚偏氟二乙烯膜。

[0012] 更优选地,所述基底是通过以下方法制备的:(a) 采用聚丙烯酰胺电泳按分子量分离蛋白质,优选为变性不连续聚丙烯酰胺电泳;(b) 将步骤(a)所得到的蛋白质条带从聚丙烯酰胺凝胶中转移到基底上;所述转移方法优选为电转移法。

[0013] 优选地,所述微流管道为高分子热塑或热固化管道,优选选自聚二甲基硅氧烷管道和聚甲基丙烯酸甲酯管道,更优选为聚二甲基硅氧烷微流管道。

[0014] 优选地,所述微流管道是通过软刻蚀方法来制备的,其中微流管道的管径优选为 20 ~ 200 μm 。

[0015] 另一方面,本发明提供了制备上述微流控免疫印迹芯片的方法,其包括以下步骤:1) 制备固定按分子量分离的蛋白质条带的基底;优选地,所述基底为聚偏氟二乙烯膜;2) 制备微流管道;优选地,所述微流管道为聚二甲基硅氧烷微流管道;3) 组装步骤1) 制备的基底与步骤2) 制备的微流管道。

[0016] 优选地,所述步骤1) 中基底的制备包括以下步骤:(a) 采用聚丙烯酰胺电泳按分子量分离蛋白质,优选为变性不连续聚丙烯酰胺电泳;(b) 将步骤(a)所得到的蛋白质条带从聚丙烯酰胺凝胶中转移到聚偏氟二乙烯膜上;优选地,所述转移方法为电转移法。

[0017] 优选地,所述步骤2) 中微流管道的制备包括以下步骤:(a) 将二甲基硅氧烷与固化剂按 11 : 1 的质量配比混合并倒入具有微流管道的模板;(b) 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干 30 分钟;优选地,所制备的微流管道的管径为 20 ~ 200 μm 。

[0018] 优选地,所述步骤3) 中基底与微流管道的组装包括以下步骤:(a) 将固定按分子量分离的蛋白条带的聚偏氟二乙烯膜烘干,所述烘干条件优选为 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 分钟;(b) 将聚二甲基硅氧烷微流管道按管道方向与聚偏氟二乙烯膜上的蛋白条带方向垂直的方向盖在步骤(a)得到的聚偏氟二乙烯膜上,轻按压紧。

[0019] 本发明还提供了上述微流控免疫印迹芯片在检测样品的多种蛋白质、蛋白质的分子量标准和优化免疫反应抗体浓度中的用途;优选地,所述样品选自细胞、组织、血液和体液等。

[0020] 又一方面,本发明提供了一种微流控免疫印迹方法,所述方法包括以下步骤:1)

制备上述的微流控免疫印迹芯片 ;2) 在步骤 1) 制备的微流控免疫印迹芯片的不同微流管道中通入针对不同蛋白质的一抗 ;3) 用标记物标记的二抗结合一抗,检测信号。

[0021] 优选地,所述步骤 2) 中一抗所使用的封闭液为含有牛血清蛋白和吐温-20 的磷酸盐缓冲液 ;优选地,所述牛血清蛋白的含量为 5% 体积,所述吐温-20 的含量为 0.2% 体积。

[0022] 优选地,所述步骤 3) 中的二抗的标记物选自荧光标记、酶标记、量子点标记、胶体金标记和纳米金标记。

[0023] 本发明还提供了上述微流控免疫印迹方法在检测样品中的多种蛋白质、蛋白质的分子量标准和优化免疫反应抗体浓度的用途 ;优选地,所述样品选自细胞、组织、血液和体液等。

[0024] 综上所述,本发明提供了一种结合微流控芯片的免疫印迹方法,其可同时检测到细胞中多种蛋白质的表达,并且只需要几微升的抗体溶液。所述方法的步骤包括 :1) 用聚丙烯酰胺电泳按蛋白质分子量大小分离蛋白质 ;2) 利用电转移技术将蛋白质条带从聚丙烯酰胺凝胶中转移到 PVDF 多孔膜上 ;3) 将 PVDF 膜和 PDMS 微流管道组装成微流控免疫印迹芯片 ;4) 在芯片的不同管道中通入针对不同蛋白质的一抗 ;5) 用荧光标记或者酶标的二抗结合一抗,用激光扫描成像系统检测信号。

[0025] 本发明所提供的微流控免疫印迹芯片的实用范围包括同时检测细胞中的多种蛋白,检测蛋白质的分子量标准以及优化免疫反应中抗体浓度等。

[0026] 由此可见,与现有技术相比,本发明所提供的微流控免疫印迹芯片及相应的检测方法具有以下几方面的有益效果 :

[0027] 首先,本发明在蛋白质印迹膜上,通过平行微流管道检测多种蛋白质的方法,可以实现仅单次免疫印迹实验就能检测生物样品中的多种蛋白,所使用的抗体溶液体积仅为 0.1 ~ 5 微升,抗体的使用量比传统免疫印迹方法大大减少,且其检测灵敏度灵敏度达到了传统免疫印迹方法的水平。

[0028] 其次,本发明所提供的微流控免疫印迹方法可用于分析复杂样品中的蛋白质含量,如细胞和组织样品。此外,本发明通过在芯片的一个管道中通入多种抗体混合液,用于作为蛋白质分子量标准,从而可以获得待测蛋白质的分子量信息,可以用于蛋白质的半定量分析。而现有利用微流管道同时检测多份样品中多种蛋白质的方法只能用于分析血液等体液样品,若将复杂样品(如细胞裂解液)直接通入微流管道中,会造成很强的非特异性吸附,导致背景过强,信号难以辨别,且该方法无法检测出蛋白的分子量大小。

[0029] 第三,与现有的通过微接触印刷在基底上固定蛋白质的方法不同,本发明通过电转移,将电泳分离的蛋白条带固定到高分子膜上,能将细胞中表达的所有蛋白质都固定在芯片基底,且固定在蛋白质上的位置与蛋白质的分子量大小对应,适合用于蛋白质组检测。由此制备的微流控免疫印迹芯片操作简单,不需要借助额外仪器,可有效提高实验效率,降低实验成本。

[0030] 因此,本发明所提供的微流控免疫印迹芯片及检测方法在高通量检测细胞中蛋白质的表达量,蛋白质组学研究,细胞信号通路研究以及检测蛋白质的翻译后修饰情况等方面都具有很强的应用潜力。

[0031] 在制备本发明要求保护的微流控免疫印迹芯片过程中,克服了以下几方面的技术困难 :

[0032] 1) 采用改变 PDMS 的高温成型时间和配比,使其具有一定的柔软性和粘性的方法,使 PDMS 管道和 PVDF 膜密封而不渗漏液体,并且在转膜后将 PVDF 膜做了烘干处理,不同于传统方法。

[0033] 2) 设计管道时,选择了 20 ~ 200 μm 的微流管道的管径,使液体能在毛细作用力下进入管道,而不产生气泡。

[0034] 3) 在微流管道里检测步骤中,优化了表面活性剂 Tween-20 与封闭剂 BSA 的配比,使其有比较好的信噪比。

附图说明

[0035] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0036] 图 1 为本发明所提供的微流控免疫印迹方法的原理图;

[0037] 其中,1:聚丙烯酰胺凝胶,2:电泳槽,3:蛋白质条带,4:PVDF 高分子膜,5:转膜仪负极,6:转膜仪正极,7:载玻片,8:蛋白质印迹条带,9:PDMS 微流管道,10:抗体溶液,11:蛋白质信号,12:蛋白质分子量标准。

[0038] 图 2 为实施例 2 中本发明所提供的微流控免疫印迹方法与传统免疫印迹方法的灵敏度比较结果图。

[0039] 图 3A 和图 3B 分别为实施例 3 中本发明所提供的微流控免疫印迹方法与传统免疫印迹方法的线性分析结果图。

[0040] 图 4 为实施例 4 中利用本发明所提供的微流控免疫印迹方法同时检测 NIH-3T3 七种蛋白的表达量。

[0041] 图 5 为实施例 5 中利用本发明所提供的微流控免疫印迹方法检测蛋白的分子量。

[0042] 图 6 为实施例 6 中利用本发明所提供的微流控免疫印迹方法优化检测条件。

具体实施方式

[0043] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0044] 以下各实施例中所用的 NIH-3T3 细胞购自美国典型菌种收藏所,其全蛋白的提取方法如下:

[0045] 1) 细胞培养至 80% 左右密度时,以含 0.05% 胰蛋白酶消化,细胞经预冷的 PBS 漂洗 3 次,离心收集在离心管中,加入适量裂解液(配方为 150mmol/L NaCl,1.0% NP-40 或 Triton-x-100,0.5% 脱氧胆酸钠,0.1% SDS,50mmol/L Tris(pH8.0)) 反复吹打,冰上放置 30 分钟。

[0046] 2) 于 4°C 下 12000rpm 离心 20 分钟。

[0047] 3) 将离心后的上清液于 -20°C 保存。

[0048] **实施例 1 微流控免疫印迹方法**

[0049] 本实施例为本发明所提供的微流控免疫印迹方法,其原理图见图 1,具体的操作步骤详述如下。

[0050] 1. 微流控芯片模板的制备

[0051] 制备的主要过程为光刻,即利用光刻胶在紫外线照射下可改变性质的特点制作

与设计好的掩膜上的图形完全一致的光刻胶硅片模板。具体的制备方法可参见 Y. Xia, G. Whitesides, Annual Review of Materials Science 1998, 28, 15。

[0052] 2. 微流管道的制备

[0053] 制备方法为软刻蚀技术, 制备材料为聚二甲基硅氧烷 (PDMS, polydimethylsiloxane), 其在普通的状态下是透明而粘稠的液体, 经与固化剂反应 (184silicone elastomer curing agent) 并加热后可固化。利用 PDMS 可以将硅片模板上的突起图形转换为对应的管道图形, 从而得到微流控管道。本发明对制备 PDMS 管道的原料质量配比和高温成型时间进行了优化, 具体条件如表 1 所示。

[0054] 表 1 制备 PDMS 管道的条件优化

[0055]

| 组号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| PDMS 单体与固化剂质量配比 | 9 : 1 | 10 : 1 | 11 : 1 | 12 : 1 | 9 : 1 | 10 : 1 | 11 : 1 | 12 : 1 |
| 烘烤时间 (min) | 30 | 30 | 30 | 30 | 60 | 60 | 60 | 60 |

[0056] 具体的实验步骤如下：

[0057] (1) 根据表 1 中所示的 PDMS 单体 (SYLGARD 184 硅橡胶, 购自美国道康宁公司) 和固化剂 (SYLGARD 184 硅橡胶固化剂, 购自美国道康宁公司) 的质量配比, 分别称取原料并混合, 搅拌约 10 分钟至均匀, 在真空泵中减压抽净气泡。

[0058] (2) 在具有微流管道的硅片模板上倒入 PDMS 和固化剂的混合物, 抽净气泡。

[0059] (3) 放入烘箱中 80℃, 按照表 1 所示的时间进行烘烤, 硅片上突出的光刻胶会将 PDMS 印上凹槽形管道。

[0060] (4) 将固化的 PDMS 从模板上切下, 并在设计好的进样口处用带针头的注射器打孔, 用 Scotch 白胶带清洁 PDMS 管道面。

[0061] (5) 将 PVDF 膜放在载玻片上, 将 PDMS 微流芯片盖在 PVDF 膜上, PDMS 微流芯片尺寸大于 PVDF 膜。用手将轻按将 PVDF 膜与 PDMS 微流芯片压紧。

[0062] (6) 用移液枪在芯片上管道末端的孔口处滴上 3 μL 蓝墨水, 在管道的另一端用注射器抽吸, 记录和观察液体进入管道的难易程度和管道的渗漏情况, 结果表明, 当 PDMS 单体与固化剂按 11 : 1 的质量配比, 在 80℃ 下烘干 30 分钟的条件, 液体容易通入管道, 并且没有渗漏现象。

[0063] 所制备好的微流管道规格为: 宽度 : 50-200 μm, 高度 : 50-200 μm, 长度 : 1cm-5cm。

[0064] 3. 电泳

[0065] 通过电泳仪将蛋白质混合物在聚丙烯酰胺凝胶中按分子量大小分离为条带, 实验步骤同传统的免疫印迹实验中的电泳步骤相同, 具体可参见 H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979, 76, 4350。

[0066] 4. 电转

[0067] 在电场作用下, 将蛋白由聚丙烯酰胺凝胶中转移到聚偏氟二乙烯 (PVDF) 高分子薄膜 (即印迹多孔膜, 由溶剂挥发成孔, 孔径为 0.2-0.45 μm, 购自 milipore 公司), 或者

聚偏氟二乙烯电纺丝薄膜（纳米级纤维形成的无纺布，孔径为纳米级，具体制备方法可参见 Yang, D. Y. ;Niu, X. ;Liu, Y. Y. ;Wang, Y. ;Gu, X. ;Song, L. S. ;Zhao, R. ;Ma, L. Y. ;Shao, Y. M. ;Jiang, X. Y. Adv. Mater. 2008, 20, 4770-4775.）上,实验步骤同传统的免疫印迹实验中的电转步骤相同,具体可参见 H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979, 76, 4350.

[0068] 5. 微流控芯片的组装

[0069] 芯片组装即是将固定了蛋白的 PVDF 膜与 PDMS 管道结合在一起,组成封闭的管道,使液体能在负压下吸入管道,并且管道不会出现渗漏。微流控芯片的组装具体包括以下步骤:

[0070] (1) 将转移上蛋白条带的 PVDF 膜放在烘箱中烘干, 37℃, 30 分钟。

[0071] (2) 将 PVDF 膜放在载玻片上,将 PDMS 微流管道盖在 PVDF 膜上。

[0072] (3) 用手轻按将 PVDF 膜与 PDMS 微流芯片压紧,因为 PDMS 具有弹性和粘性,所以 PDMS 管道和 PVDF 膜能密封良好。

[0073] 6. 微流控芯片免疫荧光检测

[0074] 通过抗原抗体识别,在不同的管道中孵育不同的抗体,检测 PVDF 膜上的多种蛋白。具体包括以下步骤:

[0075] (1) 管道内封闭:用移液枪在芯片上管道末端的孔口处滴上 3 μ L 封闭液(5%体积牛血清蛋白 BSA, 磷酸盐缓冲液 PBS),在管道的另一端用注射器抽吸,使溶液充满管道,孵育 10 分钟后,用注射器抽出溶液。

[0076] (2) 一抗孵育:将一抗用抗体稀释液进行稀释,并优化了该抗体稀释液的配方,即如表 2 所示的不同配方配制的磷酸盐缓冲液。

[0077] 表 2 磷酸盐缓冲液中吐温 Tween-20 和 BSA 的含量配比优化

[0078]

| 组号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Tween-20(%体积) | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.4 |
| BSA(%体积) | 5 | 5 | 5 | 5 | 10 | 10 | 10 | 10 |

[0079] 分别向不同的管道中通入 3 μ L 针对不同蛋白的抗体稀释液,孵育 30 分钟后抽出。揭开 PDMS 管道,用去离子水冲洗 PVDF 膜表面,然后将 PVDF 膜放入异丙醇中浸润,使 PVDF 膜变为亲水。

[0080] (3) 摇洗:用 PBST(0.2%体积 Tween-20) 摇洗 PVDF 膜三次,每次 5 分钟。

[0081] (4) 膜封闭:将膜放在封闭液(其配方同抗体稀释液)中摇荡 20 分钟。

[0082] (5) 二抗孵育:将 PVDF 膜放入荧光标记的二抗稀释液(其配方同抗体稀释液)中避光摇荡 30 分钟。

[0083] (6) 摇洗:用 PBST(0.2%体积 Tween-20) 避光摇洗 PVDF 膜三次,每次 10 分钟。

[0084] (7) 荧光检测:将 PVDF 膜放入 Typhoon Trio™ 多功能影像分析系统(Amersham 公司)中检测信号,参数设置如下:发射滤光片 520nm,激光 488nm, PMT480,敏感度中等。

[0085] (8) 观察并记录每组的荧光信号和背景,结果表明,当一抗稀释液的磷酸盐缓冲液

中含有 0.2% 体积 Tween-20 和 5% 体积 BSA 时,信噪比最强。

[0086] 实施例 2 微流控免疫印迹方法的灵敏度

[0087] 在免疫印迹实验中,有时需检测的蛋白在细胞中的表达量很低,所以检测灵敏度是免疫印迹实验的一个重要指标。本实施例比较了本发明所提供的微流控免疫印迹方法与传统免疫印迹方法的检测灵敏度。

[0088] 在聚丙烯酰胺凝胶的不同上样孔中分别上样以 2 倍梯度稀释的 NIH-3T3 细胞全蛋白。对于两张在相同上样和转膜条件下的 PVDF 膜上的 Annexin II 蛋白分别采用传统免疫印迹方法与微流控免疫印迹方法进行了灵敏度检测比较,结果如图 2 所示。

[0089] 微流控免疫印迹方法的具体步骤参见实施例 1,其中所使用的一抗为 Annexin II 抗体,购自 Santa Cruz 公司(货号:sc-28385)。一抗的稀释比例分别为 1 : 5, 1 : 20, 1 : 80, 1 : 320, 1 : 1280, 稀释后的抗体溶液在每个微流管道中通入 1 μ L。所使用的二抗为 Alexa Fluor[®]488 羊抗鼠 IgG, 购自 Invitrogen 公司。二抗的稀释比例为 1 : 5000, 稀释液用量为 2mL。

[0090] 结果表明,该方法最低能从 1.25 μ g 的 NIH-3T3 细胞全蛋白中检测到 Annexin II。

[0091] 传统免疫印迹方法的具体步骤参见 Millipore 公司的蛋白印迹手册。其中所使用的一抗同上,其抗的稀释比例为 1 : 80, 一抗稀释液的用量为 2mL。所使用的二抗及其稀释比例和用量同上。

[0092] 结果表明,该方法最低能从 1.25 μ g 的 NIH-3T3 细胞全蛋白中检测到 Annexin II。表明本发明所提供的微流控免疫印迹方法的检测灵敏度达到了传统免疫印迹方法的水平。

[0093] 实施例 3 微流控免疫印迹方法的线性分析

[0094] 传统免疫印迹方法可用于蛋白质的半定量分析,检测信号会随着膜上目标蛋白的量的增加而增加。本实施例对本发明所提供的微流控免疫印迹方法与传统免疫印迹方法的分别进行了线性分析,以判别本发明所提供的方法是否适用于蛋白质的半定量分析。

[0095] 在聚丙烯酰胺凝胶的不同上样孔(上样孔宽 5.08mm, 厚 0.75mm) 中分别上样以 2 倍梯度稀释(10 μ g ~ 0.3125 μ g) 的 NIH-3T3 细胞全蛋白,对于两张在相同上样和转膜条件下的 PVDF 膜上的 Annexin II 蛋白分别采用传统免疫印迹方法与微流控免疫印迹方法进行检测,通过荧光信号对蛋白上样量作图,并做线性回归,分析比较两种检测方法的线性。

[0096] 微流控免疫印迹方法的具体步骤参见实施例 1,其中所使用的的一抗为 Annexin II 抗体,购自 Santa Cruz 公司(货号:sc-28385)。一抗的稀释比例为 1 : 20, 稀释后的抗体溶液在每个微流管道中通入 1 μ L。所使用的二抗为 Alexa Fluor[®]488 羊抗鼠 IgG, 购自 Invitrogen 公司。二抗的稀释比例为 1 : 5000, 稀释液用量为 2mL。线性分析结果见图 3A, 其相关系数 $R = 0.993$ 。

[0097] 传统免疫印迹方法的具体步骤参见 Millipore 公司的蛋白印迹手册。其中所使用的一抗同上,其抗的稀释比例为 1 : 80, 一抗稀释液的用量为 2mL。

[0098] 所使用的二抗及其稀释比例和用量同上。线性分析结果见图 3B, 其相关系数 $R = 0.977$ 。

[0099] 以上结果表明,本发明所提供的微流控免疫印迹方法与传统免疫印迹方法一样,可以用于蛋白质的半定量分析。

[0100] 实施例 4 微流控免疫印迹方法检测细胞中多种蛋白的表达

[0101] 采用传统免疫印迹方法,一次只能检测一种蛋白,而利用微流控免疫印迹方法,由于一个微流管道仅有 150-200 μm 宽,一个玻片有约 2cm 宽,可以平行排列多个管道,所以可以同时检测到多个蛋白。本实施例采用本发明所提供的微流控免疫印迹方法同时检测 NIH-3T3 细胞全蛋白中的多种蛋白的检测效果。

[0102] 参照实施例 1 的步骤,通过电泳和转膜将 NIH-3T3 细胞全蛋白固定在 PVDF 膜上,在不同的管道中分别通入了 7 种一抗(均购自 santa cruz 公司,括号内为稀释比例): β -actin 抗体(1 : 20), β -tubulin 抗体(1 : 100), pan-14-3-3 抗体(1 : 20), GAPDH 抗体(1 : 20), F1-ATPase 抗体(1 : 20), Annexin II 抗体(1 : 70), α -tubulin 抗体(1 : 20), 稀释后的抗体溶液在每个微流管道中中通入 1 μL 。所使用的二抗为 Alexa Fluor[®]488 羊抗鼠 IgG, 购自 Invitrogen 公司。二抗的稀释比例为 1 : 5000, 稀释液用量为 2mL。

[0103] 检测效果如图 4 所示。由此可见,微流控免疫印迹方法能够同时检测出 NIH-3T3 细胞全蛋白中有此 7 种蛋白表达。

[0104] 实施例 5 微流控免疫印迹方法检测蛋白质的分子量标准

[0105] 蛋白质分子量标准在分子生物学研究中有着重要作用,它能提供蛋白质翻译后修饰的信息,并能排除假阳性信号。普通的分子量标准一般是几种不同分子量的蛋白质的混合物,在免疫反应中并不显色,但是在本发明所提供的微流控免疫印迹方法中,可以很容易的引入蛋白质分子量标准:在一个微流管道中通入几种分子量不同的大量表达蛋白的抗体的混合物后,在这个管道中的不同位置就会出现信号,根据这些信号就可以判断目标蛋白的大概位置。

[0106] 参照实施例 1 的步骤,将 4 种蛋白的抗体 β -tubulin 抗体、 β -actin 抗体、GAPDH 抗体和 pan-14-3-3 抗体的混合物,通入 1 号管道,已知其分子量分别是 55kD、43kD、36kD 和 30kD。通过 1 号管道中的已知蛋白的分子量标准,可以大致估计出 2、3、4 号管道中检测的蛋白的分子量,结果见图 5。

[0107] 实施例 6 微流控免疫印迹方法优化实验条件

[0108] 在免疫检测中,最佳的抗体浓度是最好的信号和最小的背景/非特异性吸附。抗体的浓度太高和太低都不好,而抗体的最佳浓度会随抗体/抗原的结合性,膜上的抗原量等因素而改变,所以在传统免疫印迹实验中,往往要用不同的抗体浓度做几次平行实验以获得最佳的抗体浓度。在本发明所提供的微流控免疫印迹方法中,这些抗体浓度的优化实验可以在一次实验中完成,只需在不同的微流管道中通入不同的抗体浓度即可。

[0109] 参照实施例 1 的步骤,以检测 NIH-3T3 细胞中的 Annexin II 蛋白为模型,对 Annexin II 抗体做了平行浓度实验,在不同的管道中分别通入不同浓度的抗体溶液(一抗的稀释比例分别是 1 : 5, 1 : 20, 1 : 80, 1 : 320 和 1 : 1280),用于找到抗体的最适稀释比例,结果如图 6 所示。

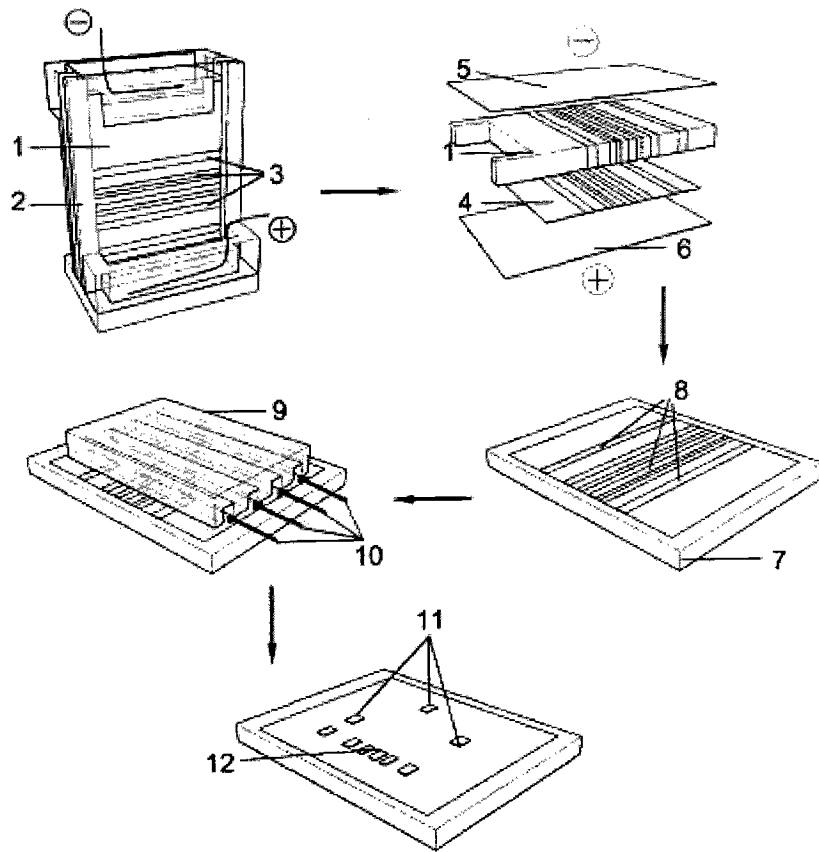


图 1

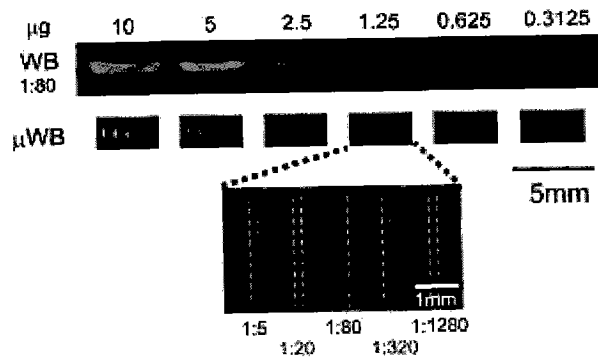


图 2

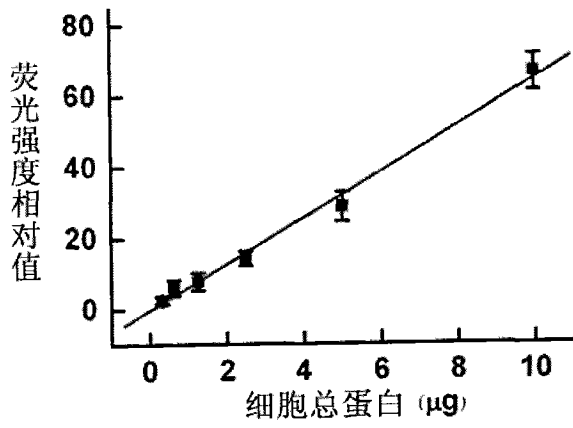


图 3A

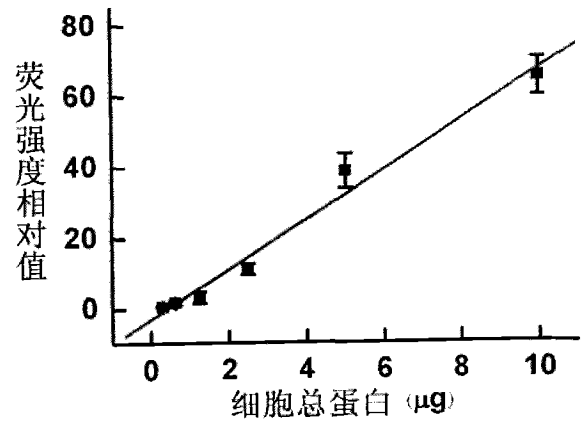


图 3B

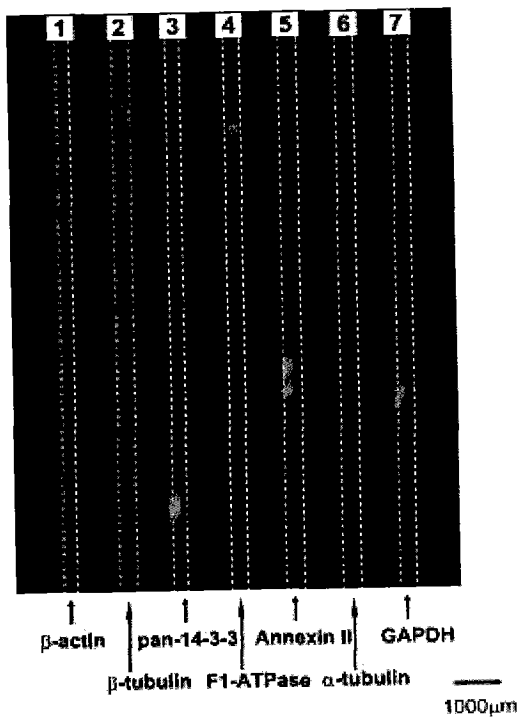


图 4

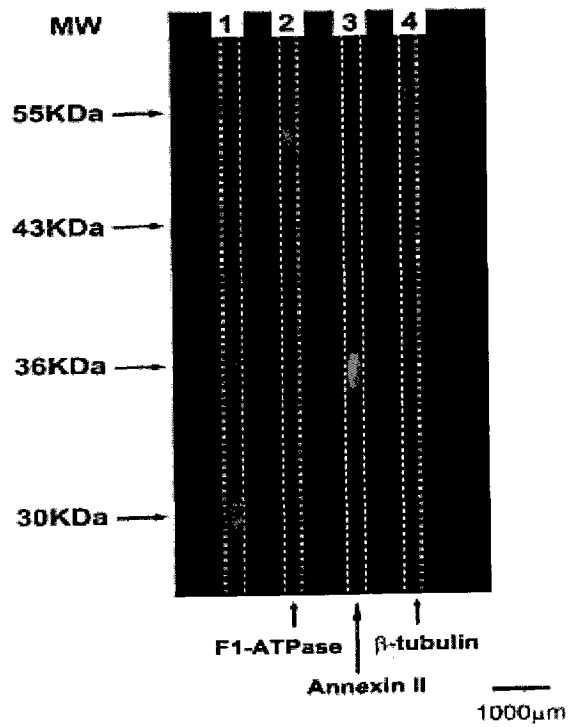


图 5

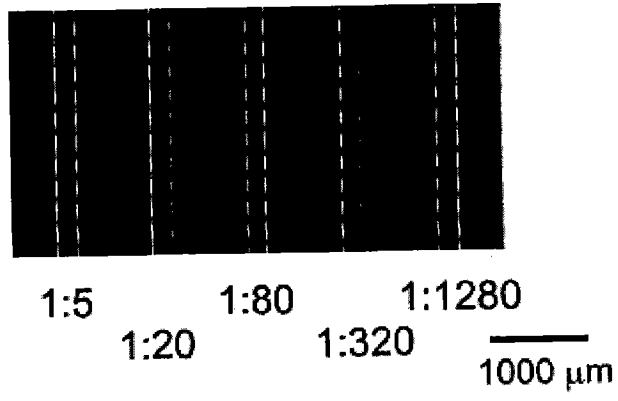


图 6

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 微流控免疫印迹芯片、其制备方法及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN102087292B | 公开(公告)日 | 2013-10-16 |
| 申请号 | CN200910241223.6 | 申请日 | 2009-12-02 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国家纳米科学中心 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 国家纳米科学中心 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 国家纳米科学中心 | | |
| [标]发明人 | 潘文颖 张伟 蒋兴宇 | | |
| 发明人 | 潘文颖 张伟 蒋兴宇 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/535 | | |
| 代理人(译) | 刘丹妮 | | |
| 审查员(译) | 刘彦宁 | | |
| 其他公开文献 | CN102087292A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供一种微流控免疫印迹芯片、其制备方法及其用途。本发明所提供的微流控免疫印迹芯片包括：1)固定有按分子量分离的蛋白质条带的基底；和2)微流管道。本发明还提供了微流控免疫印迹芯片的方法及其在检测样品中的多种蛋白质、检测蛋白质的分子量标准和优化免疫反应中抗体浓度中的用途。本发明可以实现仅单次免疫印迹实验就能检测生物样品中的多种蛋白，检测灵敏度高，且能检测出蛋白分子量，操作简单，能够有效的提高免疫检测效率，降低成本。

