



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103901217 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201410108570. 2

G01N 33/535 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 21

(71) 申请人 靖江市人民医院

地址 214500 江苏省泰州市靖江市中洲东路
28 号

申请人 东南大学

(72) 发明人 薛艳春 苏娟 车彦军 王建江

毛世琴 朱伟 田亦平 蒋饒

翟丽芬 陶岚 刘松琴 沈丽

吴慧萍

(74) 专利代理机构 南京瑞弘专利商标事务所

(普通合伙) 32249

代理人 冯慧

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006. 01)

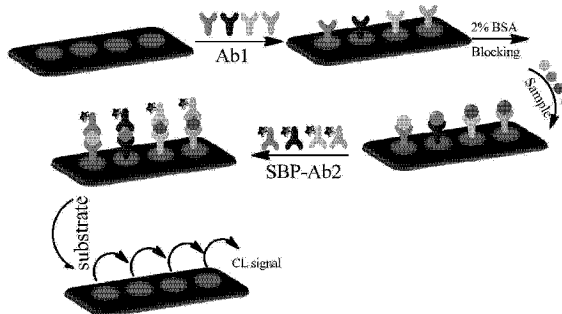
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

大豆过氧化物酶免疫生物芯片及在唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种大豆过氧化物酶免疫生物芯片及在唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测中的应用。第一步,大豆蛋白酶标抗体的制备;第二步,玻片的修饰:玻片表面的羟基化、氨基硅烷化、醛基化;第三步,夹心免疫模型在生物芯片表面的构建:在玻片表面包被抗体;封闭非特异性活性位点;加入待测血清,孵育、洗涤;加入酶标抗体,孵育、洗涤;加入发光底物,CCD 成像采集发光信号。选取了 AFP、HCG、uE3、PAPP-A 四项指标作为唐氏综合症血清学标志物。SBP 具有底物作用范围广,耐热性能高,酸碱稳定性好,pH 适用范围宽。在 Lumino1-H₂O₂ 体系中,当加入增强剂化学发光信号可放大近百倍,检测灵敏度得到增强。



1. 一种大豆过氧化物酶免疫生物芯片,包括酶标抗体、生物芯片底板、发光底物,其特征在于,所述的酶标抗体为大豆蛋白酶标抗体;所述的生物芯片底板是基于夹心免疫模型将与酶标抗体对应的抗体包被在生物芯片底板表面,然后再封闭非特异性活性位点得到;所述的发光底物为优化的鲁米诺-H₂O₂溶液和增强剂 MORPH、SPTZ 组成。

2. 如权利要求 1 所述的大豆过氧化物酶免疫生物芯片,其特征在于,所述的生物芯片底板为经过羟基化、氨基硅烷化和醛基化处理的玻片。

3. 如权利要求 1 所述的大豆过氧化物酶免疫生物芯片,其特征在于,所述的酶标抗体分别偶联 AFP、HCG、uE3 和抑制素 - A 四种抗体。

4. 应用权利要求 1 ~ 3 任一所述的大豆过氧化物酶免疫生物芯片的检测方法,其特征在于,步骤为:

第一步,大豆蛋白酶标抗体的制备:采用改良过碘酸钠法制备;

第二步,玻片的修饰:玻片表面的羟基化、氨基硅烷化、醛基化;

第三步,夹心免疫模型在生物芯片表面的构建:在玻片表面包被抗体,所述的抗体与酶标抗体的一致;封闭非特异性活性位点;加入待测血清,孵育、洗涤;加入酶标抗体,孵育、洗涤;加入发光底物,CCD 成像采集发光信号。

5. 权利要求 1 ~ 3 任一所述的大豆过氧化物酶免疫生物芯片在制备唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测设备中的应用。

大豆过氧化物酶免疫生物芯片及在唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物芯片技术领域,尤其是涉及生物芯片技术在产前唐氏综合症筛查中的应用以及使用了新型的标记酶(SBP)和超高灵敏度的化学发光检测方法。

背景技术

[0002] 现在医学检验技术正朝着标准化、智能化、集约化方向发展。生物芯片技术是这一趋势的引领者,它是一种通过微加工技术和微电子技术将大量生物大分子如核酸片段、多肽分子、抗原、抗体等生物样品有序地固化于玻片、硅片、玻璃片、塑料片、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙膜等固相介质表面,组成密集二维的分子排列,然后与已标记的待测生物样品中靶分子杂交,通过特定仪器对杂交信号的强度进行快速、并行、高效检测分析的技术。它能微型化、高能量、低成本地在短时间内分析大量的生物分子,使人们快速准确地获取样品中的生物信息,效率是传统检测手段的成百上千倍,解决了人们用1份血样检测机体多个系统功能状态的需求。目前蛋白质芯片技术、微电极阵列芯片技术、液相芯片技术是比较成熟的生物芯片技术已逐步应用于临床。

[0003] 出生缺陷是指胚胎或胎儿发育过程中结构或代谢发生异常,出生时即可发现,也可在出生后数月或数年才发现。出生缺陷以及由此带来的残疾,给家庭、社会造成沉重的经济负担和心理负担,成为影响人口素质的重要问题。我国出生缺陷的现状已经不仅仅是一个严重的公共卫生问题,而且成为影响经济发展和人们正常生活的社会问题。据统计我国2009年出生缺陷总发生率为128.38/万,每年仅肉眼可见的出生缺陷就有20万至30多万,加上出生后数月和数年才显现出来的缺陷,每年则高达80万至120万,约占每年大约2000万个新生儿的4%—6%。目前,最常见的遗传性或部分遗传性缺陷主要有:先天性心脏病、神经管缺陷、唐氏综合征、脑积水等等,由此可见,目前的唐氏筛查方法对胎儿先天缺陷的预测,具有一定的局限性,并不完全排除异常的可能性,因此需要开发新的检测技术,提高检测结果的灵敏度和准确性。

[0004] 产前筛查技术通过分析孕期的某些筛查标志物,对宫内的胎儿进行评估,目的是为了在胎儿出生前发现可能导致出生缺陷的疾病。其基本方法就是在准确记录孕妇相关资料的基础上,监测各项标记物水平,然后通过专业分析软件,计算胎儿罹患疾病的风险值。风险值高者即意味着该疾病的发生几率大,需建议孕妇接受进一步的遗传咨询,以决定是否进行产前诊断和相应的处理。所谓标记物是指用于区分正常和非正常情况下的生化指标或其他测量指标,这些筛查标志物可以来源于母体血液,包括一些血清学指标(如糖蛋白、甾体激素、特异性抗体)、胎儿游离DNA、胎儿有核红细胞等;或是超声检查的一些胎儿形态学指标。经过多年的研究与实践,这一技术日趋成熟,在国内外产前筛查临床工作中得到广泛应用,在很多发达国家和发展中国家,均作为必不可少的二级预防措施进行推广。

[0005] 国外对唐氏综合症的产前筛查最早开始于上世纪80年代,英国学者在产前神经管缺陷(NTD)筛查母血甲胎蛋白(AFP)的过程中发现怀有唐氏综合症的胎儿的孕妇血清

AFP 浓度下降,随后相继找到了与唐氏综合征胎儿相关的孕中期标志物,这些标志物基本都由胎儿及胎儿附属物分泌合成。目前唐氏筛查常用的血清学筛查标志物包括甲胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、游离雌三醇(uE3)、妊娠相关蛋白 A(PAPP-A) 抑制素 -A (INH - A) 等。不同的孕周,正常胎儿与唐氏综合征或者 18- 三体胎儿的检测值是不同的,其中以 AFP、HCG 和 uE3 结合的孕中期“三联筛查”最出名,应用最广泛,此后许多方案都是以该方案为基础进行改良或组合的。

[0006] 目前筛查标记物的常用检测方法主要 :时间荧光分辨法、酶联免疫法、化学发光法和胶体金固相免疫层析技术。这些方法已经在临床中得到很好的应用,并收到了预期的效果。但由于方法本身的限制以及生物样品的多样化,导致假阳性和漏检增加。因此寻找新的特异性筛查标志物、开发新的检测技术、实现自动化程度高的多标志物同时检测,以提高检测结果的灵敏度和准确性,将是对产前筛查血清学标志物检测技术的重大创新,有助于产前筛查技术达到方便快捷、成本低廉、准确可靠的目标,对有效预防出生缺陷具有重要的意义。

[0007] 随着科学技术发展突飞猛进,生物芯片技术作为新一代生物技术,以其高通量并行分析的优势引起国内外广泛的关注,生物芯片技术是通过缩微技术,根据分子间特异性地相互作用的原理,将生命科学领域中不连续的分析过程集成于硅芯片或玻璃芯片表面的微型生物化学分析系统,以实现细胞、蛋白质、基因及其它生物组分的准确、快速、大信息量的检测。生物芯片技术目前在药物开发、筛选和监测、基因测序、疾病诊断等多个领域广泛应用。虽然将生物芯片技术应用于产前筛查领域的研究,在国内外尚未见报道,但是诊断类生物芯片在医学领域的应用,已有很多成功经验可供借鉴。例如目前已获得新药证书和试生产批文的“多肿瘤标志物蛋白质芯片诊断系统”,在一张芯片上可同时进行 12 种肿瘤标志物(其中包括 AFP、 β -HCG)的定量检测,其临床应用价值在多项临床研究中得到了肯定。

发明内容

[0008] 为了克服常用筛查标记物的检测方法本身的限制以及生物样品的多样化,导致假阳性和漏检增加等缺点,本发明公开了大豆过氧化物酶免疫生物芯片及在唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测中的应用,对于降低产前筛查检测费用、提高群体的筛查普及率,将具有重要的意义。

[0009] 本发明采用的技术方案是 :一种大豆过氧化物酶免疫生物芯片,包括酶标抗体、生物芯片底板、发光底物,所述的酶标抗体为大豆蛋白酶标抗体 ;所述的生物芯片底板是基于夹心免疫模型将与酶标抗体对应的抗体包被在生物芯片底板表面,然后再封闭非特异性活性位点得到 ;所述的发光底物为优化的鲁米诺 - H_2O_2 溶液和增强剂 MORPH、SPTZ 组成。

[0010] 所述的生物芯片底板为经过羟基化、氨基硅烷化和醛基化处理的玻片。

[0011] 所述的酶标抗体分别偶联 AFP、HCG、uE3 和 PAPP - A 四种抗体。

[0012] 应用所述的大豆过氧化物酶免疫生物芯片的检测方法,步骤为 :

[0013] 第一步,大豆蛋白酶标抗体的制备 :采用改良过碘酸钠法制备 ;

[0014] 第二步,玻片的修饰 :玻片表面的羟基化、氨基硅烷化、醛基化 ;

[0015] 第三步,夹心免疫模型在生物芯片表面的构建 :在玻片表面包被抗体,所述的抗体

与酶标抗体的一致;封闭非特异性活性位点;加入待测血清,孵育、洗涤;加入酶标抗体,孵育、洗涤;加入发光底物,CCD 成像采集发光信号。

[0016] 所述的大豆过氧化物酶免疫生物芯片在制备唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测设备中的应用。

[0017] 本发明的原理:

[0018] 1) 酶标抗体的制备:合成具有高特异性和高酶活力的酶标抗体,利用生物偶联技术将测定抗体(多克隆抗体)与酶的共价连接,优化抗体及酶的偶联条件,获得最佳品质的酶标抗体。

[0019] 2) 唐氏综合征血清学标志物检测新方法:利用纳米材料或聚合物膜技术,在 96 全黑孔板或镀黑玻片表面固载捕捉抗体,通过夹心免疫方法将待测目标物和酶标抗体捕捉到 96 孔板内或玻片表面,利用酶联免疫法或化学发光法检测目标物的浓度,并与相应的 ELISA 方法检测结果相比较,从方法的敏感度、特异性、可靠性、准确性和方便性等多方面评价,确定最佳检测方法,制定目标分子检测标准曲线和检测标准。

[0020] 3) 筛查标志物组合芯片:将上述单一标志物检测组合在同一芯片,依据纳米生物探针不同抗体与酶标记,以及不同的底物,利用 CCD 成像技术,实现多组分酶联免疫化学发光法同时检测的信号分辨,研究其信号交联响应、特异性和敏感度,构建唐氏综合症血清学标志物多组分同时检测芯片。

[0021] 4) 母体血液中唐氏综合症血清学标志物芯片检测及其风险评估:利用上述组合芯片,对血清标本进行检测。通过统计学分析,将芯片检测结果与常规方法的检测结果进行比较,研究其相关性、差异性、一致性等指标,研究评价检测结果用于出生缺陷疾病风险评估的效果。

[0022] 有益效果:

[0023] 1) 基于夹心免疫模型,分别捕获血清中待测抗原和酶(SBP)标抗体于芯片表面,利用增强化学发光反应信号放大效应,CCD 采集发光信号。并将这一化学发光酶免疫诊断技术应用于唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测中。

[0024] 2) 大豆过氧化物酶 SBP 代替辣根过氧化物酶 HRP,而且利用增强化学发光反应,一方面,SBP 底物作用范围广,耐热性能高,酸碱稳定性好,pH 适用范围宽等优点;另一方面,增强剂 SPTZ 和 MORPH 的存在下,在 SBP 存在下,增强剂可使得 Luminol-H₂O₂ 这一发光体系的发光强度可增强近百倍,检测灵敏度大大提高。可以有效克服辣根过氧化物酶标记获得的发光信号弱,即使加入了增强剂对碘苯酚(PIP),化学发光信号能够放大,但是衰减迅速的缺点。

[0025] 3) 通过组合芯片技术,实现产前筛查方案中多个筛查标志物的同时检测,是该领域的一大创新构思。使用酶免疫生物芯片技术,可实现对细胞、蛋白质、基因及其它生物组分的准确、快速、大信息量的检测。

[0026] 4) 通过评价芯片检测结果与常规检测方法的一致性,分析检测结果用于产前筛查风险评估的效果,探索将芯片检测结果直接应用于现有产前筛查风险评估系统的可行性及解决方案。

[0027] 5) 开发的多筛查标志物芯片检测技术,操作简便,检测成本低廉,因此本项目的成果有可能应用于临床检验,具有广阔的应用前景。

[0028] 6) 本发明选定的生物标志物是:选取了甲胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、游离雌三醇(uE3)、妊娠相关蛋白 A(PAPP-A) 等四项指标。对于一个孕妇的血样,在同一块芯片上实现“四联筛查”。这一生物芯片技术的产业化,将会给唐氏综合症的筛查和预防带来新发展,提高产前筛查覆盖率,增加出生缺陷二级干预措施的受益人群,有利于产前筛查和产前诊断技术的发展,有利于降低人口出生缺陷率。

附图说明

[0029] 图 1 为本发明的检测流程图。

具体实施方式

[0030] 本发明所用的大豆蛋白酶采购自美国 Bio-Research Products 公司,本发明所用的 MORPH 和 SPTZ 均采购自 Sigma Aldrich。

[0031] 应用所述的大豆过氧化物酶免疫生物芯片的检测方法,步骤为:

[0032] 第一步,大豆蛋白酶标抗体的制备:采用改良过碘酸钠法制备;

[0033] 第二步,玻片的修饰:玻片表面的羟基化、氨基硅烷化、醛基化;

[0034] 第三步,夹心免疫模型在生物芯片表面的构建:在玻片表面包被抗体,所述的抗体与酶标抗体的一致;封闭非特异性活性位点;加入待测血清,孵育、洗涤;加入酶标抗体,孵育、洗涤;加入发光底物,CCD 成像采集发光信号。

[0035] 1、大豆蛋白酶标抗体制备

[0036] SBP 分别偶联人绒毛膜促性腺激素(HCG)、甲胎蛋白(AFP)、游离雌三醇(uE3)和妊娠相关蛋白 A(PAPP-A) 四种抗体分子,采用目前广泛采用的高碘酸钠氧化法。即采用改良过碘酸钠法分别制备四种酶标抗体。改良过碘酸钠法具体为:

[0037] 步骤一、取 1mg 大豆过氧化物酶溶于 100 μ L PBS 中,加入新配制的 12.8mg/mL NaIO_4 溶液 50 μ L,混匀,置室温 15min;

[0038] 步骤二、取出步骤一得到的溶液,后加入 9 μ L/mL 乙二醇 PBS 溶液 50 μ L,室温放置 30min;

[0039] 步骤三、向步骤二得到的溶液中加入含 2mg 纯化的抗体,混匀,并装入透析袋,于 50mM pH9.6 碳酸盐缓冲液 4 $^{\circ}$ C 透析 18h,使大豆过氧化物酶和抗体结合;

[0040] 步骤四、向步骤三得到的溶液中加入 5mg/ml NaBH_4 溶液 20 μ L,混匀,置 4 $^{\circ}$ C 还原 2h;

[0041] 步骤五、缓慢加入和步骤四得到的溶液等体积的饱和硫酸铵溶液,轻摇盐析 0.5h,转速 132000g 离心 15min,去上清,沉淀以少许 PBS 溶解,装入透析袋,于大量 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜;

[0042] 步骤六、次日取出离心,以除去不溶物,上层清液即得大豆过氧化物酶-抗体结合物,以 PBS 加至 500 μ L;

[0043] 步骤七、效价测定合格后,加入等量甘油,分装小瓶,低温保存。

[0044] 2、玻片的修饰

[0045] 1) 玻片表面的羟基化:取玻片,放入按体积计由 1/3 H_2O_2 和 2/3 浓 H_2SO_4 组成的溶液中,浸泡 1h,然后用二次蒸馏水冲洗 3 遍,再用二次蒸馏水煮沸 10min,在 N_2 流下干燥,于

干燥处保存备用。

[0046] 2) 玻片表面的氨基硅烷化:将上述玻片浸入含有 2%wt 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTEOS) 的 95%wt 乙醇 / 水的溶液 10min,取出后,玻片用乙醇洗 3 遍,每次 1min,再用二次水冲洗 3 遍,每次 1min,最后在 110℃ 条件下烘干,置于干燥处保存。

[0047] 3) 玻片表面的醛基化:将上述硅烷化后的玻片放入含 5%wt 戊二醛的磷酸盐 (0.01M, pH7.4PBS) 中,室温浸泡 4h,取出 PBS 洗涤三次,再用二次水冲洗 3 遍,用 N₂ 吹干,置于 4℃ 保存备用。

[0048] 3、夹心免疫模型在生物芯片表面的构建

[0049] 1、四种抗体 Ab1 (HCG/AFP/uE3/PAPP - A) 在玻片表面的包被:将 5 μ L 10 μ g/mL (10mM pH7.4PBS) 的 Ab1 分别滴加到上述修饰玻片表面(修饰的玻片附刻有圆孔的膜,规定反应区),4℃ 过夜孵育,PBS 充分洗涤,N₂ 吹干,4℃ 保存。

[0050] 2、封闭非特异性活性位点:用 5 μ L 2%BSA (10mM pH7.4PBS) 滴加于固定有 Ab1 的玻片表面,室温封闭 2h。PBS 洗涤三次,N₂ 吹干,4℃ 保存。

[0051] 3、待测血清的检测:将 5 μ L 待测血清加入上述封闭好的玻片上,室温孵育 1h,PBS 彻底洗涤。

[0052] 4、酶标抗体的捕获:加入 5 μ L 一定稀释比的酶标抗体于上述玻片上,室温孵育 1h,PBS 彻底洗涤。

[0053] 5、加入发光底物,CCD 成像采集发光信号:各孔中同时加入条件优化过的新混合的 0.4mM Luminol,0.4mM H₂O₂,0.6mM MORPH,1.2mM SPTZ,立即采集各孔的化学发光信号。因每一孔对应的是血清检验中的四个指标,因而,一步实现产前唐氏综合症的筛选的四联筛查。经优化后化学发光信号强度增强近两个数量级,由原先的 3.5×10^5 提高到 1.4×10^7 。

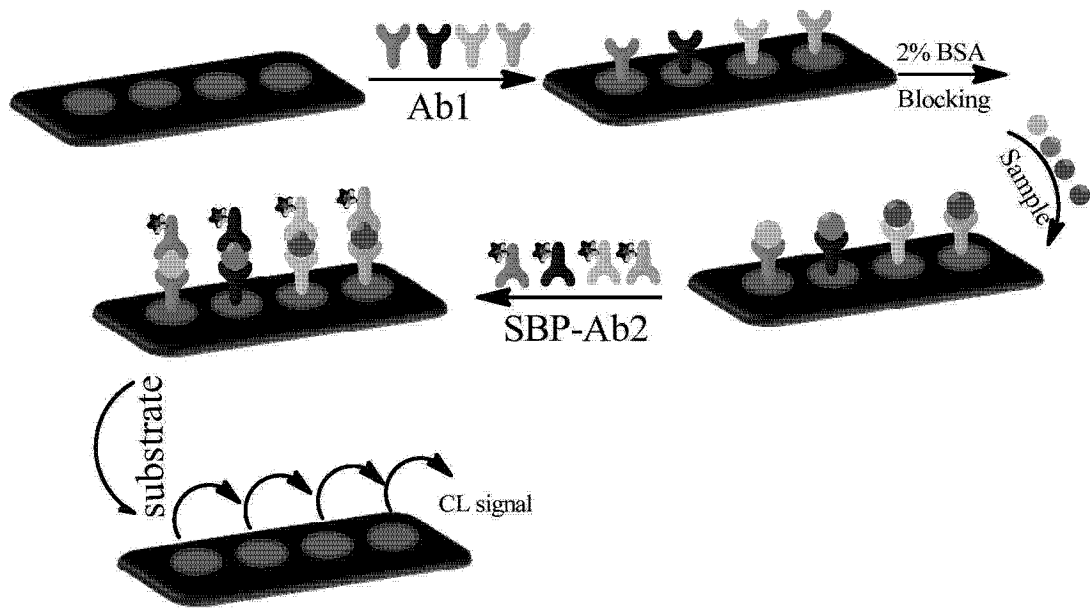


图 1

专利名称(译)	大豆过氧化物酶免疫生物芯片及在唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测中的应用		
公开(公告)号	CN103901217A	公开(公告)日	2014-07-02
申请号	CN201410108570.2	申请日	2014-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	靖江市人民医院 东南大学		
申请(专利权)人(译)	靖江市人民医院 东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	靖江市人民医院 东南大学		
[标]发明人	薛艳春 苏娟 车彦军 王建江 毛世琴 朱伟 田亦平 蒋镛 翟丽芬 陶岚 刘松琴 沈丽 吴慧萍		
发明人	薛艳春 苏娟 车彦军 王建江 毛世琴 朱伟 田亦平 蒋镛 翟丽芬 陶岚 刘松琴 沈丽 吴慧萍		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/689 G01N21/76 G01N33/535 G01N2800/387		
代理人(译)	冯慧		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种大豆过氧化物酶免疫生物芯片及在唐氏综合症产前筛查血清学标志物检测中的应用。第一步，大豆蛋白酶标抗体的制备；第二步，玻片的修饰：玻片表面的羟基化、氨基硅烷化、醛基化；第三步，夹心免疫模型在生物芯片表面的构建：在玻片表面包被抗体；封闭非特异性活性位点；加入待测血清，孵育、洗涤；加入酶标抗体，孵育、洗涤；加入发光底物，CCD成像采集发光信号。选取了AFP、HCG、uE3、PAPP-A四项指标作为唐氏综合症血清学标志物。SBP具有底物作用范围广，耐热性能高，

酸碱稳定性好，pH适用范围宽。在Luminol-H₂O₂体系中，当加入增强剂
化学发光信号可放大近百倍，检测灵敏度得到增强。

