

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910040094.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月4日

[11] 公开号 CN 101571545A

[22] 申请日 2009.6.9

[21] 申请号 200910040094.4

[71] 申请人 广州益善生物技术有限公司

地址 510663 广东省广州市广州科学城揽月
路80号广州科技创新基地B、C区五
层

[72] 发明人 许嘉森 廖新梅

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有
限公司

代理人 万志香 曾旻辉

权利要求书3页 说明书27页

[54] 发明名称

用于多项肿瘤骨转移标志物并行检测的液相
芯片及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种多项肿瘤骨转移血清标志物
并行检测液相芯片，主要包括有：包被微球；含有
分别用生物素标记的 ET-1、SDF-1/CXCL12、
PDGF-BB、PDGF-AA、FGF、IGFBP-3、IGF-
I、TGF- β 1、BMP-2、BMP-7/OP-1、BMP-
6、activin A、IL-11、OCIF/OPG、RANKL、
PTHrP、BALP、BSP、OC、IL-8、IL-6、IL-1a、
IL-1 β 、TNF-a、OPN、VEGF 的检测抗体；和链
亲和素藻红蛋白。本发明所提供的多项肿瘤骨转移
标志物并行检测液相芯片具有检测效率高，所需样
本量少，特异性强，灵敏度高等优点。同时，各项
标志物可自由组合，使用方便。

1、一种多项肿瘤骨转移血清标志物并行检测液相芯片，其特征是，主要包括有：

(1) 包被微球：含有分别包被了 ET-1 的捕获抗体的微球、包被了 SDF-1/CXCL12 捕获抗体的微球、包被了 PDGF-BB 捕获抗体的微球、包被了 PDGF-AA 捕获抗体的微球，包被了 FGF 捕获抗体的微球、包被了 IGFBP-3 捕获抗体的微球、包被了 IGF- I 捕获抗体的微球、包被 TGF- β 1 捕获抗体的微球、包被了 BMP-2 捕获抗体的微球、包被了 BMP-7/OP-1 捕获抗体的微球、包被了 BMP-6 捕获抗体的微球、包被了 activin A 捕获抗体的微球、包被了 IL-11 捕获抗体的微球、包被了 OCIF/OPG 捕获抗体的微球、包被了 RANKL 捕获抗体的微球、包被了 PTHrP 捕获抗体的微球、包被了 BALP 捕获抗体的微球、包被了 BSP 捕获抗体的微球、包被了 OC 捕获抗体的微球、包被了 IL-8 捕获抗体的微球、包被了 IL-6 捕获抗体的微球、包被了 IL-1a 捕获抗体的微球、包被了 IL-1 β 捕获抗体的微球、包被了 TNF-a 捕获抗体的微球、包被了 OPN 捕获抗体的微球、和包被了 VEGF 捕获抗体的微球中的 3 种以上，上述微球分别具有不同颜色编码；

(2) 生物素标记的检测抗体：含有分别用生物素标记的 ET-1、SDF-1/CXCL12、PDGF-BB、PDGF-AA、FGF、IGFBP-3、IGF- I 、TGF- β 1、BMP-2、BMP-7/OP-1、BMP-6、activin A、IL-11、OCIF/OPG、RANKL、PTHrP、BALP、BSP、OC、IL-8、IL-6、IL-1a、IL-1 β 、TNF-a、OPN、VEGF 的检测抗体中的 3 种以上，该 3 种以上的检测抗体与 (1) 中的捕获抗体相对应；

和 3) 链亲和素藻红蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的多项肿瘤骨转移血清标志物并行检测液相芯片，其特征是，它由以下组成：(1) 包被微球：含有分别包被了 ET-1 的捕获抗体的微球、包被了 SDF-1/CXCL12 捕获抗体的微球、包被了 PDGF-BB 捕获抗体的微球、包被了 PDGF-AA 捕获抗体的微球，包被了

FGF 捕获抗体的微球、包被了 IGFBP-3 捕获抗体的微球、包被了 IGF- I 捕获抗体的微球、包被 TGF- β 1 捕获抗体的微球、包被了 BMP-2 捕获抗体的微球、包被了 BMP-7/OP-1 捕获抗体的微球、包被了 BMP-6 捕获抗体的微球、包被了 activin A 捕获抗体的微球、包被了 IL-11 捕获抗体的微球、包被了 OCIF/OPG 捕获抗体的微球、包被了 RANKL 捕获抗体的微球、包被了 PTHrP 捕获抗体的微球、包被了 BALP 捕获抗体的微球、包被了 BSP 捕获抗体的微球、包被了 OC 捕获抗体的微球、包被了 IL-8 捕获抗体的微球、包被了 IL-6 捕获抗体的微球、包被了 IL-1a 捕获抗体的微球、包被了 IL-1 β 捕获抗体的微球、包被了 TNF-a 捕获抗体的微球、包被了 OPN 捕获抗体的微球、和包被了 VEGF 捕获抗体的微球，上述微球分别具有不同颜色编码；

(2) 生物素标记检测抗体：分别用生物素标记的 ET-1、SDF-1/CXCL12、PDGF-BB、PDGF-AA、FGF、IGFBP-3、IGF- I 、TGF- β 1、BMP-2、BMP-7/OP-1、BMP-6、activin A、IL-11、OCIF/OPG、RANKL、PTHrP、BALP、BSP、OC、IL-8、IL-6、IL-1a、IL-1 β 、TNF-a、OPN、和 VEGF 的检测抗体；

和 (3) 链亲和素藻红蛋白。

3.一种制备权利要求 1 所述的肿瘤骨转移标志物检测液相芯片的方法，其特征是，主要步骤包括：

(A)每种捕获抗体包被微球：一取 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个微球活化；

一活化后的微球去除上清，加入 300~400ul 偶联缓冲液清洗一次；

一往微球中加入 1.08~8.64 μ g 权利要求 1 中所述捕获抗体中的一种，加偶联缓冲液将总体积补至 400~450 μ L，涡旋混匀，室温涡旋孵育 2hr；

一偶联抗体后的微球去除上清，加入 400ul 分析缓冲液，室温涡旋孵育 25~30min；

—去除上清液，加入 400~800ul 的分析缓冲液清洗两次；

—包被好的微球加入约 100~200ul 分析缓冲液；

按上述方法分别得到所选的捕获抗体包被的微球，所述微球分别具有不同颜色编码；

(B)生物素标记检测每种抗体：

—分别用 pH7.4 的 PBS 稀释每种检测抗体至 1 mg/ml ~2mg/ml，为检测抗体溶液；

—按摩尔比 1：80~1：120 加入一种与(A)中所述捕获抗体对应的检测抗体溶液与 10mg/ml

NHS-Biotin 反应液；

—加入 NaHCO_3 溶液使反应体系 pH 值为 8~9；

—室温涡旋孵育 2hr~4hr；

—脱盐；分别得到与(A)中所述捕获抗体包被微球相对应的生物素标记后的检测抗体。

用于多项肿瘤骨转移标志物并行检测的液相芯片及其制备方法

技术领域

本发明属于医药生物类，具体的是涉及用于多项肿瘤骨转移标志物检测的液相芯片及其制备。

背景技术

肿瘤转移是恶性肿瘤最严重的危害之一，是肿瘤病人临床死亡的主要原因。骨转移是晚期肿瘤的常见疾病，许多类型的恶性肿瘤都可以发生骨转移，约80%的乳腺癌和前列腺癌、约70%的晚期乳腺癌及前列腺癌病人，以及15—30%的结直肠癌、甲状腺癌、肾癌病人会发生骨转移。一旦发生骨转移，多数病人无法医治。例如乳腺癌病人发生骨转移后，仅有20%在五年后仍然存活。美国每年约有35万病人死于肿瘤骨转移。

骨转移过程：骨组织由于其血供丰富及特殊的生长微环境，构成体内第三个最容易发生肿瘤血行转移的器官，仅次于肺脏和肝脏。肿瘤要扩大生长，必须形成新血管提供必需的营养和溶解氧。血管的新生为癌细胞通过血道的转移提供了便利的条件。肿瘤细胞最初通过产生溶解性的蛋白酶侵袭周围的正常组织，穿过正常或肿瘤诱生性小血管壁，进入血液循环，接着传播到远处器官。逃脱了宿主免疫监督机制幸存的癌细胞进入骨髓腔的窦状小管，而后穿过窦状小管的壁，侵袭骨髓基质，形成骨转移。

而在肿瘤骨转移的过程中，包括肿瘤细胞的迁移，黏附以及与骨细胞相互作用的过程中，有多种标志物参与其中，检测通路标志物对肿瘤骨转移潜在的预测 / 诊断 / 预后等有重要的

指导作用。

目前国内诊断肿瘤骨转移主要手段是：(1) 血液检查：部分溶骨性肿瘤骨转移患者的血清钙、磷增高，成骨性肿瘤骨转移患者的血清碱性磷酸酶增高，本法阳性检出率低，只有骨显像的50~70%。(2) 影像诊断：主要包括X线片、CT、核磁共振(MRI)，ECT(放射性核素扫描)全身骨显像等。① X线摄片法：溶骨性肿瘤骨转移，可显示不规则溶骨破坏，边界模糊不清，常发生病理性骨折。成骨性肿瘤骨转移，X线表现为类圆形，不规则形致密阴影，边界不清，骨小梁紊乱，增厚、粗糙、无骨膜反应。X线摄片法反映出的是骨代谢不平衡所造成的结果，即骨密度的变化。骨密度变化大于30%左右才能确诊，其阳性率仅15%左右，因此只能作为癌骨转移晚期(IV期)诊断。总体来说由于X线片检查价格低，CT和MRI检查对脊柱等复杂部位的解剖结构显示清晰等优点，经常被用来对各种骨骼疾病进行检查。但这些检查对恶性肿瘤骨转移来说，其最大缺点是只能进行局部检查并且灵敏度不很高，仅适用于对局部剧烈疼痛的部位进行检查；对无症状的骨转移患者无法进行检查。因此，均不宜作为癌症患者常规筛查时应用。② 放射性核素骨显像法：常用 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ 或 $^{99m}\text{Tc-EDTMP}$ 骨显像剂。由于 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ 和 $^{99m}\text{Tc-EDTMP}$ 不是亲肿瘤的特异显像剂，而是骨代谢显像剂，反映的是病灶处成骨与破骨的动态平衡状态和血管通透情况，灵敏度比X线摄片法高，早期阳性检出率高，其阳性检出率由肿瘤骨转移的I期到IV期，由10%增加至60%，此法适合于肿瘤骨转移的早、中、晚期诊断。由于该法特异性差，注意排除其它良性骨代谢疾病。

从上述肿瘤骨转移的诊断方法可知，影像学方法是目前常用的临床诊断方法，但因其特异性差，通常都需要先对患者进行ECT扫描，ECT全身骨显像出现异常者，再针对骨转移灶的可疑部位进行X线、CT或MRI检查，以确诊骨转移。从血液检查方面来说，通常需要

各个指标进行单独检测，未出现多个指标可同时进行联合检测的情况。上述诊断方法对于癌症患者的常规筛查来说费钱费力。特别对于早期无骨痛的肿瘤骨转移患者，不易进行检测。因此，如果能找出与骨转移过程相关的标志物，然后再使用简便高效的检测方法对血清标志物进行检测，做到对肿瘤患者进行常规筛查，能起到及早预测的作用。

肿瘤骨转移标志物简介及作用：

血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）：肿瘤要扩大生长，必须形成新血管提供必需的营养和溶解氧，而 VEGF 是一种能促进新生血管生成的物质，是血管内皮细胞有丝分裂的促进剂。

趋化因子：是一类小的类似细胞因子的短肽，可以诱导细胞骨架的改变、内皮细胞的吸附和细胞的迁移。Muller等人对所有已知的趋化因子受体进行了系统的分析发现乳腺癌细胞大量表达CXCR4和CXCR7，发生乳腺癌转移的组织中富含其可溶性配基CXCL12/SDF-1和CXCLZ1/6Ckine，而在非转移的相关组织中配基水平较低。骨基质中趋化因子与乳腺癌细胞上的受体相互作用促进了乳腺癌的专一性骨转移。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)：也称为Bone Sialoprotein I，属SIBLING蛋白家族。作为一种细胞因子，在巨噬细胞、淋巴细胞归巢中起着重要作用。目前一般认为，肿瘤细胞发生转移时充分利用了OPN的相关功能。OPN的低表达可明显降低肿瘤生成和转移潜能，血浆OPN正常参考值为14~64 ng/ml，若血浆OPN的浓度显著大于此值，则提示乳腺癌已转移。

骨转移的类型主要有两种，溶骨性骨转移和成骨性骨转移。在乳腺癌患者中，溶骨性骨转移占主要地位，而前列腺癌骨转移主要属于成骨性骨转移，而肺癌则是两者兼有。

溶骨性骨转移：肿瘤细胞通过分泌甲状旁腺激素(PTH)、甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)、

IL-1、IL-6和IL-11刺激成骨细胞或基质细胞合成核转录因子KB配基受体激活剂(RANKL)，通过未成熟破骨细胞表面的RANK信号系统，RANKL刺激转录因子起始转录，导致未成熟破骨细胞分化为成熟的破骨细胞；并且同时抑制骨保护素——osteoprotegerin(OPG)的合成。OPG能够与RANKL结合，阻止RANKL与破骨细胞前体表面的RANK受体结合，从而抑制破骨细胞的活化。

骨吸收导致骨基质中的胰岛素样生长因子(IGF- I)、转化生长因子- β (TGF- β)、骨形态发生蛋白(BMP)和成纤维细胞生长因子(FGF)等生长因子等释放进入骨微环境中。骨微环境使癌细胞PTHrP表达上调，引起转移癌细胞的生长，进一步促进局部骨吸收和溶骨性骨转移，形成恶性循环。

骨唾液酸蛋白(Bone Sialoprotein II，简称BSP)：是1972年首次从牛骨中提取的是一种主要由成骨细胞和破骨细胞分泌的糖基化、磷酸化和硫酸化的非胶原蛋白，属SIBLING(small integrin-binding ligand, *N*-linked glycoproteins)蛋白家族。临床研究显示，原发性乳腺癌病人的血清BSP升高可提示早期骨转移，检测血清BSP的水平可作为预后评价指标。另外发现骨转移处的乳腺癌细胞BSP的表达量要高于原发部位的乳腺癌细胞，因此BSP可能与肿瘤特异性骨转移密切相关。

成骨性骨转移：骨形成包括成骨细胞的增殖和分化，同时也包括破骨细胞的凋亡。

以前列腺癌成骨骨转移模型为例，由肿瘤细胞分泌的FGFs,BMPs,PDGF,TGF- β 能直接促进成骨细胞的活性和后续骨形成；蛋白酶如ALP/AKP (alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶)在uPA的诱导下激活发挥作用，蛋白酶不仅能激活潜在TGF- β 为活性TGF- β ，还能释放IGF抑制结合蛋白IGFBPs，同时能使PTHrP失活以促进骨形成。成骨细胞分化包括骨基质结构蛋白的

表达如I型胶原蛋白，ALP/AKP（碱性磷酸酶）和OC（骨钙素）。破骨细胞凋亡也由TGF- β 来诱导，变相促进骨形成。

血小板分泌的生长因子（platelet-derived growth factor, PDGF）：因首先发现于血小板而得名，后来发现多种细胞能够合成和分泌PDGF，PDGF由A、B两条链组成，有AA、AB、BB三种存在形式和两种类型的受体（ α 和 β 受体）。由内皮细胞分泌的三种PDGF能促进平滑肌细胞的增殖，其活性依次是BB>AB>AA。AB、BB还能促进平滑肌游走，而AA则不具有这一功能，相反还有抑制作用。所以一般认为PDGF-AB、BB是促进病灶形成因子，PDGF-AA是抑制因子。

TGF β ：是一个超级家族，包括转化生长因子 β 、骨形成蛋白（BMP）、活化素（Activitin）。TGF β 自身以及TGF β 超家族BMPs 亚群在调节骨的再吸收和形成方面具有重要的作用。

转化生长因子 β (TGF- β)是一组多功能的多肽蛋白。研究表明，TGF- β 已具有促进细胞增殖、调节细胞分化、促进细胞外基质合成和调节机体免疫作用。体外实验表明，TGF- β 已可促进骨膜间充质细胞的增殖升分化，促进成骨(软骨)细胞的增殖，刺激I型胶原和骨桥蛋白(osteopontin)的合成。同时，TGF- β 可抑制破骨细胞的生成以及成熟破骨细胞的活性，从而抑制骨吸收作用。目前以研究TGF- β 1在肿瘤骨转移的作用最为多见。

骨形态发生蛋白(BMP):由一个结构和功能相似的多肽因子家族(BMP-1除外)组成，具有诱导新骨形成的功能。BMPs家族包括20多种蛋白，根据结构的相似性，BMPs家族可分为以下4个亚族:①BMP-2/BMP4，②BMP-3，③BMP-7(OP-1)，④GDF-5/6/7（生长分化因子）。

活化素A(activin A):可增强骨肌细胞向成骨样细胞转化，与其他因子协同诱导成骨细胞分化。活化素A 还可刺激成骨细胞增殖和胶原合成。

胰岛素样生长因子(IGF): 胰岛素样生长因子 IGF 具有胰岛素样促代谢作用, 有极强的促有丝分裂作用, 是许多正常和肿瘤细胞凋亡的抑制物。IGF 系统在正常和肿瘤细胞生物学中起重要作用。IGF 系统包括 2 个多肽类生长因子 (IGF- I, IGF- II)。

内皮素-1 (Endothelin-1, ET-1): 内皮素-1 是一个强效的血管收缩剂。在前列腺癌转移患者的血浆中内皮素-1 水平显著增高。体外检测表明许多前列腺癌细胞株表达并分泌内皮素。在新骨形成的过程中, 内皮素通过激活碱性磷酸酶而介导前列腺癌细胞的成骨反应。

骨代谢相关的生化指标, 又称为骨转换标志物, 是一类源于骨基质或骨细胞的代谢指标。

骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP): Coleman等检测2000多例恶性肿瘤, 包括乳腺癌, 肺癌, 多发性骨髓瘤和前列腺癌等血清中BALP的水平, 发现BALP水平高者亦易发生骨转移的并发症。BALP与骨矿化密切相关, 因为在碱性环境中骨钙化最活跃, 成骨细胞释放的BALP能使无机磷酸盐水解, 从而降低焦磷酸盐浓度, 有利于骨的矿化。血清的总碱性磷酸酶最主要的来源是骨和肝脏, 检测骨BALP的关键是将肝和BALP分开, 其方法较多, 如热失活法、化学抑制法、凝胶电泳法、麦胚凝结素沉淀法等, 这些方法大多属于间接法, 对于提高指标的特异性效果并不理想, 而使用双抗体夹心反应, 则可直接检测血中的BALP, 且特异性高。

骨钙素(Osteocalcin, OC): OC 是一种维生素 K 依赖性的非胶原蛋白。目前已知 OC 与骨基质合成及矿化速率有关。另一些体内外实验示 OC 还参与骨吸收的调节, 它可以募集并激活骨重吸收细胞, 当 OC 减少时, 破骨细胞样细胞聚集减少。OC 作为直接反映骨形成的特异性指标, 可用来监测肿瘤骨转移和判断其它代谢性骨病治疗效果。

总之, 根据肿瘤骨转移过程和步骤, 将与肿瘤骨转移相关的标志物大致分为以下两类:

一是与细胞迁徙,活化有关的趋化、生长因子,如IGFs、PDGF-AA、PDGF-BB、CXCL-12/SDF-1、TNF- α 、ET-1、VEGF、TGF- β 、FGF、IL-1、IL-6、IL-8、IL-11等;二是与骨代谢相关的因子,骨代谢包括骨形成和骨吸收,与骨形成有关的指标主要包括BALP、OC等,与骨吸收有关的指标主要包括BSP、OPG、RANKL等。

国内尚未有系统地针对肿瘤骨转移调控通路的相关标志物进行联合检测的早期诊断,本发明所公开的多项肿瘤骨转移标志物并行检测液相芯片可一次反应同时完成多种标志物的定量检测,对于肿瘤患者潜在骨转移的预测以及肿瘤骨转移患者的诊断/预后等有着重要的指导意义。

发明内容

针对现有肿瘤骨转移血清标志物检测指标少且诊断方法一次只能检测一个标志物的技术的不便和常规筛查的需要,本发明要解决的问题是提供一种多项肿瘤骨转移血清标志物并行检测液相芯片及其制备方法,为肿瘤骨转移的早期诊断提供一种无创伤的,准确方便的临床检测方法及检测试剂盒。

一种多项肿瘤骨转移血清标志物并行检测液相芯片,主要包括有:

(1) 包被微球:含有分别包被了 ET-1 的捕获抗体的微球、包被了 SDF-1/CXCL12 捕获抗体的微球、包被了 PDGF-BB 捕获抗体的微球、包被了 PDGF-AA 捕获抗体的微球,包被了 FGF 捕获抗体的微球、包被了 IGFBP-3 捕获抗体的微球、包被了 IGF- I 捕获抗体的微球、包被 TGF- β 1 捕获抗体的微球、包被了 BMP-2 捕获抗体的微球、包被了 BMP-7/OP-1 捕获抗体的微球、包被了 BMP-6 捕获抗体的微球、包被了 activin A 捕获抗体的微球、包被了 IL-11 捕获抗体的

微球、包被了 OCIF/OPG 捕获抗体的微球、包被了 RANKL 捕获抗体的微球、包被了 PTHrP 捕获抗体的微球、包被了 BALP 捕获抗体的微球、包被了 BSP 捕获抗体的微球、包被了 OC 捕获抗体的微球、包被了 IL-8 捕获抗体的微球、包被了 IL-6 捕获抗体的微球、包被了 IL-1a 捕获抗体的微球、包被了 IL-1 β 捕获抗体的微球、包被了 TNF- α 捕获抗体的微球、包被了 OPN 捕获抗体的微球、和包被了 VEGF 捕获抗体的微球中的 3 种以上，上述微球分别具有不同颜色编码；

(2)生物素标记检测抗体：含有分别用生物素标记的 ET-1、SDF-1/CXCL12、PDGF-BB、PDGF-AA、FGF、IGFBP-3、IGF-I、TGF- β 1、BMP-2、BMP-7/OP-1、BMP-6、activin A、IL-11、OCIF/OPG、RANKL、PTHrP、BALP、BSP、OC、IL-8、IL-6、IL-1a、IL-1 β 、TNF- α 、OPN、和 VEGF 的检测抗体中的 3 种以上，该 3 种以上的检测抗体与 (1) 中的捕获抗体相对应；

和 (3) 链亲和素藻红蛋白。

所述的肿瘤骨转移标志物检测液相芯片的制备方法，其主要步骤包括：(A)每种捕获抗体包被微球：一取 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个微球活化；

一活化后的微球去除上清，加入 300~400ul 偶联缓冲液清洗一次；

一往微球中加入 1.08~8.64 μ g 上述捕获抗体中一种，加偶联缓冲液将总体积补至 400~450 μ L，涡旋混匀，室温涡旋孵育 2hr；

一偶联抗体后的微球去除上清，加入 400ul 分析缓冲液，室温涡旋孵育 25~30min；

一去除上清液，加入 400~800ul 的分析缓冲液清洗两次；

一包被好的微球加入约 100~200ul 分析缓冲液；

按上述包被方法分别得到所选的捕获抗体包被的微球，所述微球分别具有不同颜色编码；

(B)生物素标记检测每种抗体:

- PBS (pH7.4) 稀释每种检测抗体至 1 mg/ml ~2mg/ml, 分别为检测抗体溶液;
 - 按摩尔比 1: 80~1: 120 于反应管中分别加入与(A)中所述捕获抗体相对应的检测抗体溶液与 NHS-Biotin (10mg/ml) 反应液;
 - 加入 NaHCO_3 (pH8.9) 溶液使反应体系 pH 值为 8~9;
 - 室温涡旋孵育 2hr~4hr;
 - 将反应液转入脱盐柱或透析袋中脱盐; 生物素标记后的检测抗体于-20℃保存;
- 分别得到与(A)中所述捕获抗体包被微球相对应的生物素标记后的检测抗体。

本发明所提供的多项肿瘤骨转移标志物并行检测液相芯片具有检测效率高, 所需样本量少, 特异性强, 灵敏度高等优点。同时, 各项标志物可自由组合, 使用方便。本发明所述的多项肿瘤骨转移标志物并行检测液相芯片的制备方法, 比现有技术中的液相芯片的制备方法更加简单易行, 可批量生产, 且稳定性好。

具体实施方式

液相芯片技术也叫流式荧光技术, 该技术由一种微球作为反应载体, 微球用聚苯乙烯材料制成, 直径 5.6um, 表面有活性羧基可供化学偶连用, 抗原、抗体等生物大分子可通过氨基与微球表面的羧基通过化学反应共价结合(即包被过程)。在微球制造过程中加入红外和远红外两种荧光染料, 根据两种染料混合比例的不同将微球进行编码, 可区分出上百种不同编码的微球。使用时, 先将各标志物的捕获抗体分别包被于不同颜色编码的微球上, 同时分别用生物素标记各指标的检测抗体。将包被好的二十六种捕获抗体微球混合, 悬浮于液相, 再加入标本, 在悬液中微球上包被的捕获抗体与标本中相应的检测物的某一个表位异性地结合,

之后加入二十六种生物素标记的检测抗体与标本中相应检测物的另一表位特异性结合，反应完全后加入荧光物质-藻红蛋白标记的链亲和素，由于链亲和素藻红蛋白（SA-PE）可以与生物素高度特异性结合，因此反应体系中最后形成“微球-捕获抗体 + 待检测物 + 生物素标记的检测抗体 + SA-PE”的二十六种复合物，以微球为载体，通过 Luminex 系列液相芯片分析仪器检测，读取微球的色彩编号及 SA-PE 的荧光值。微球色彩编号可辨别检测项目，SA-PE 荧光值与各检测物浓度呈正相关，通过测定各标志物标准品在不同浓度下的荧光值，可以获得各个检测指标标准品浓度-荧光值标准曲线以及标准曲线方程。将待测血清样本检测所得荧光值代入标准曲线方程即可分别求得样本中各标志物的含量。

由于所有反应均处在液相环境，更有利于保持蛋白质的天然构象，使探针和被检测物的反应更快更完全，因此检测灵敏度和线性范围均得到极大的提高。

序号	指标 英文缩写	中文名	序号	指标 英文缩写	中文名
1	ET-1	内皮素-1	14	OCIF/OPG	骨保护素
2	SDF-1/CXCL12	基质细胞衍生因子-1	15	RANKL	细胞核因子 κ B 受体活化因子配基
3	PDGF-BB	血小板分泌的生长因子 -BB	16	PTHrP	甲状旁腺激素相关蛋白
4	PDGF-AA	血小板分泌的生长因子 -AA	17	BALP	骨碱性磷酸酶

5	FGF	成纤维细胞生长因子	18	BSP	骨唾液酸蛋白
6	IGFBP-3	胰岛素样生长因子结合蛋白-3	19	OC	骨钙素
7	IGF-1	胰岛素样生长因子-I	20	IL-8	白介素-8
8	TGF- β 1	转化生长因子- β 1	21	IL-6	白介素-6
9	BMP-2	骨形态蛋白-2	22	IL-1a	白介素-1a
10	BMP-7/OP-1	骨形态蛋白-7	23	IL-1 β	白介素-1 β
11	BMP-6	骨形态蛋白-6	24	TNF-a	肿瘤坏死因子
12	activin A	激活素 A	25	OPN	骨桥蛋白
13	IL-11	白介素-11	26	VEGF	血管内皮生长因子

实施例1 肿瘤骨转移液相芯片检测试剂盒的制备，主要包括有：

(一) 捕获抗体与微球偶联（微球包被）

1、微球包被各种溶液配方如下：

激活缓冲液（pH6.2）		
试剂名称	来源	1L 理论用量
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	天津市大茂化学试剂厂	15.6g
ddH ₂ O		定容至 1L
NaOH	天津市大茂化学试剂厂	调 pH 至 6.2

偶联缓冲液（pH5.0）		
试剂名称	来源	1L 理论用量
MES	Sigma	9.76g

ddH ₂ O		定容至 1L
NaOH	天津市大茂化学试剂厂	调 pH 至 5.0

S-NHS 溶液		
试剂名称	来源	1mL 理论用量
S-NHS	上海延长生化科技发展有限公司	50mg
ddH ₂ O		定容至 1mL

EDC 溶液		
试剂名称	来源	1mL 理论用量
EDC	上海延长生化科技发展有限公司	50mg
ddH ₂ O		定容至 1mL

PBS (0.01M, pH7.4)		
试剂名称	来源	1L 理论用量
NaCl	国药集团化学试剂有限公司	8.064g
KCl		0.201g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		0.2964g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O		2.901g
NaOH	天津市大茂化学试剂厂	调 pH 到 7.4

分析缓冲液配制 (PH7.4)		
试剂名称	来源	1L 理论用量
BSA	北京鼎国生物技术有限责任公司	1g
NaN ₃	天津市河东区红岩试剂厂	0.5g
PBS		定容至 1L

2、捕获抗体的来源:

序号	指标	捕获抗体来源	供应商
1	ET-1	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
2	SDF-1/CXCL12	小鼠单抗	广州雅怡生物科技有限公司
3	PDGF-BB	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
4	PDGF-AA	小鼠单抗	上海吉泰生物科技有限公司
5	FGF	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
6	IGFBP-3	小鼠单抗	上海吉泰生物科技有限公司
7	IGF- I	小鼠单抗	上海吉泰生物科技有限公司
8	TGF- β 1	小鼠单抗	基因有限公司
9	BMP-2	小鼠单抗	武汉博士德生物工程有限公司
10	BMP-7/OP-1	小鼠单抗	武汉博士德生物工程有限公司
11	BMP-6	小鼠单抗	上海吉泰生物科技有限公司
12	activin A	小鼠单抗	上海优宁维生物科技有限公司
13	IL-11	小鼠单抗	上海优宁维生物科技有限公司
14	OCIF/OPG	小鼠单抗	上海优宁维生物科技有限公司
15	RANKL	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
16	PTHrP	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
17	BALP	小鼠单抗	上海优宁维生物科技有限公司
18	BSP	小鼠单抗	上海优宁维生物科技有限公司
19	OC	小鼠单抗	上海吉泰生物科技有限公司
20	IL-8	小鼠单抗	基因有限公司
21	IL-6	小鼠单抗	上海吉泰生物科技有限公司
22	IL-1a	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
23	IL-1 β	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
24	TNF-a	小鼠单抗	广州雅怡生物科技有限公司
25	OPN	小鼠单抗	上海优宁维生物科技有限公司
26	VEGF	小鼠单抗	上海优宁维生物科技有限公司

3、包被流程如下：

- 1) 取出上述微球管 (购自 Luminex 公司), 涡旋混匀后取 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个微球, 加入 8ul 50 mg/mL S-NHS, 8ul 50 mg/mL EDC, 加入激活缓冲液至 100ul, 混匀后室温涡旋孵育 25~30min;
- 2) 活化后的微球去除上清, 加入 300~400ul 偶联缓冲液清洗一次;
- 3) 往微球中加入 1.08~8.64 μ g 上述捕获抗体 (例如, 其中 PDGF-BB、RANKL 加入量可为 1.08 μ g, IGF- I、TGF- β 1、BMP-2 加入量可为 2.16 μ g, PTHrP 加入量可为 4.32 μ g, activin A 加入量为 8.64 μ g, 上述捕获抗体和其余指标抗体用量均可在 1.08~8.64 μ g 之间), 加偶联缓冲液将总体积补至 400~450 μ L, 涡旋混匀, 室温涡旋孵育 2hr;
- 4) 偶联抗体后的微球去除上清, 加入 400ul 分析缓冲液, 室温涡旋孵育 25~30min;
- 5) 去除上清液, 加入 400~800ul 的分析缓冲液清洗两次;
- 6) 包被好的微球加入约 100~200ul 分析缓冲液置于 2-8 $^{\circ}$ C 避光保存。

本发明中各检测指标与微球号对应列表如下:

序号	指标 英文缩写	微球号 (#)	序号	指标 英文缩写	微球号 (#)
1	ET-1	19	14	OCIF/OPG	43
2	SDF-1/CXCL12	79	15	RANKL	28
3	PDGF-BB	46	16	PTHrP	23
4	PDGF-AA	50	17	BALP	57
5	FGF	29	18	BSP	61

6	IGFBP-3	60	19	OC	62
7	IGF- I	88	20	IL-8	38
8	TGF- β 1	31	21	IL-6	51
9	BMP-2	33	22	IL-1a	18
10	BMP-7/OP-1	35	23	IL-1 β	36
11	BMP-6	37	24	TNF-a	55
12	activin A	21	25	OPN	18
13	IL-11	42	26	VEGF	32

(二) 检测抗体的生物素标记

1、 溶液配方：

NHS-Biotin 溶液		
试剂名称	来源	1mL 理论用量
NHS-Biotin	Sigma 公司	10mg
DMSO	国药集团化学试剂有限公司	定容至 1mL

NaHCO ₃ 溶液		
试剂名称	来源	1L 理论用量
NaHCO ₃	上海虹光化学厂	84.01g
ddH ₂ O		定容至 1L

2、 检测抗体来源：

序号	指标	检测抗体来源	供应商
1	ET-1	大鼠多抗	北京国科昌盛科技有限公司
2	SDF-1/CXCL12	大鼠多抗	广州雅怡生物科技有限公司

3	PDGF-BB	大鼠多抗	北京国科昌盛科技有限公司
4	PDGF-AA	大鼠多抗	上海吉泰生物科技有限公司
5	FGF	大鼠多抗	北京国科昌盛科技有限公司
6	IGFBP-3	山羊多抗	上海吉泰生物科技有限公司
7	IGF- I	山羊多抗	上海吉泰生物科技有限公司
8	TGF- β 1	兔子多抗	基因有限公司
9	BMP-2	兔子多抗	武汉博士德生物工程有限公司
10	BMP-7/OP-1	兔子多抗	武汉博士德生物工程有限公司
11	BMP-6	大鼠多抗	上海吉泰生物科技有限公司
12	activin A	大鼠多抗	上海优宁维生物科技有限公司
13	IL-11	兔子多抗	上海优宁维生物科技有限公司
14	OCIF/OPG	兔子多抗	上海优宁维生物科技有限公司
15	RANKL	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
16	PTHrP	兔子多抗	北京国科昌盛科技有限公司
17	BALP	兔子多抗	上海优宁维生物科技有限公司
18	BSP	兔子多抗	上海优宁维生物科技有限公司
19	OC	大鼠多抗	上海吉泰生物科技有限公司
20	IL-8	山羊多抗	基因有限公司
21	IL-6	大鼠多抗	上海吉泰生物科技有限公司
22	IL-1a	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
23	IL-1 β	小鼠单抗	北京国科昌盛科技有限公司
24	TNF-a	小鼠单抗	广州雅怡生物科技有限公司
25	OPN	兔子多抗	上海优宁维生物科技有限公司
26	VEGF	兔子多抗	上海优宁维生物科技有限公司

3、 标记流程：

- 1) PBS (pH7.4) 稀释抗体至 1 mg/ml~2mg/ml, 为抗体溶液；
- 2) 按摩尔比 1: 80~1: 120 于反应管中分别加入抗体溶液与 NHS-Biotin (10mg/ml) 反

应液（NHS-Biotin 用量为过量，1：80~1：120 比例均为合适的范围）；

- 3) 加入 NaHCO_3 (pH8.9) 溶液使反应体系 pH 值为 8~9；
- 4) 室温涡旋孵育 2hr~4hr；
- 5) 将反应液转入脱盐柱或透析袋中脱盐；
- 6) 生物素标记后的检测抗体于-20℃保存。共得到 26 种与所述捕获抗体包被微球相对应的生物素标记后的检测抗体。

使用时，可依据检测项目选择混合。

实施例2：使用实施例1中制备的液相芯片进行样品检测

（一）液相芯片检测肿瘤骨转移标志物的流程如下：

- 1) 使用前先取出所有试剂，放置平衡至室温。
- 2) 标准品的稀释：分别根据二十六种肿瘤骨转移标志物的血清学浓度的范围，配制各种标志物的标准品，每个标准品设 6 个稀释度（std1、std2.....std6），然后等比例混合，使各自的终浓度为所需的浓度（理论浓度）。
- 3) 设置 96 孔滤板布局：确定 96 孔板上标准品、待测样品及空白孔（Background）的位置。考虑到仪器读数的顺序是按照从第 1 列到第 12 列、从第 A 行到第 H 行的顺序纵向读数，在设置 96 孔板布局时应遵循从第 1 列到第 12 列、从第 A 行到第 H 行的顺序排列。
- 4) 加入待检样品：按照设置好的 96 孔板布局，往空白孔、标准品孔、样品孔每孔加入 25 μl 分析缓冲液。往标准品孔中加入相应浓度的 25 μl 标准品溶液，往样品孔中加入 25 μl 样品溶液。

- 5) 加入包被有捕获抗体的微球孵育：分别取出上述制备的 26 种包被有捕获抗体的微球制成混合液（混合液中每种微球浓度均为 40 个/ μl ），每孔加入微球混合液 25 μl ；将 96 孔板于 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 分钟。
- 6) 加入生物素标记的检测抗体孵育：孵育完成后每孔加入 25 μl 检测抗体（每种生物素标记的检测抗体浓度都为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60min。
- 7) 加入链亲和素藻红蛋白孵育：每孔加入 25 μl (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 链亲和素藻红蛋白，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min。
- 8) 检测分析：于 Luminex 系列液相芯片分析仪上读取结果。仪器可自动绘制标准曲线，并计算出待测样品的测值。

(二) 结果检测与数据分析

从下述表中可以看出，各指标标准曲线的线性在检测的浓度范围内 $R^2 \geq 0.90$ ，通过 26 个指标的联合检测，可更方便，快捷，监控肿瘤患者骨转移情况。检测所需的样本量极少（25 微升），并且可在三个小时的时间内完成 26 种标志物的检测。

实验结果：

表 1：检测的荧光值（MFI）

指标序号	1	2	3	4	5	6	7	
指标名称	SDF1	PDGF-a	FGF	IL-6	VEGF	IL-11	OPG	
样品名称	Background	16	6	12	81	17	115	58
	std1	18	15	14	93	45	132	67
	std2	18	31	16	166	72	143	77
	std3	29	91	60	424	210	157	98

std4	116	284	312	1423	670	335	281
std5	1132	1236	2482	4627	3470	1110	991
std6	6616	8647	6930	13111	11955	10492	10127
LK7	16	1508	4	80	44	13	46
LK8	16	932	4	152	84	29	151
LK10	14	6473	4	134	148	75	205
LK12	8	12405	4	52	368	43	133
LK13	15	12224	5	108	849	24	81
LK15	11	4115	4	77	53	40	116
LK17	23	2581	4	109	16	36	198
LK19	12	16548	3	102	52	49	108
LK21	14	1262	4	52	24	14	94
LK22	15	14440	3	150	77	46	173
391	17	3014	6	104	40	41	171
424	11	1139	5	38	7	20	50
430	6	8677	3	109	97	36	82
448	6	763	3	32	21	22	59
504	13	885	4	99	28	24	158
522	7	6877	3	19	50	17	83
547	7	8661	3	30	106	24	76
597	6	10092	3	44	298	27	103
650	8	13929	3	63	193	20	121
657	10	17440	3	102	1316	18	106

表 1: 检测的荧光值 (MFI) 续 1:

指标序号	8	9	10	11	12	13	14
指标名称	Activin A	BMP-6	IGF-1	IGF-BP 3	RANKL	IL-8	TNF-a
样	Backgrou	67	134	136	112	41	704
							11

品 名 称	nd							
	std1	83	138	138	196	95	1005	21
	std2	86	156	144	329	155	1249	42
	std3	129	156	161	1296	304	2169	121
	std4	545	267	339	5699	1133	4838	557
	std5	2146	730	834	12572	5362	11069	3461
	std6	10723	9625	9090	20897	17965	21737	13305
	LK7	20	16	52	3422	25	153	12
	LK8	67	45	85	1802	64	288	19
	LK10	137	88	185	3431	132	249	11
	LK12	50	38	72	1656	64	186	19
	LK13	33	26	60	5378	38	528	12
	LK15	53	42	73	2169	53	74	11
	LK17	76	38	95	2131	66	102	12
	LK19	92	45	116	2170	78	212	8
	LK21	34	16	59	1660	31	69	10
	LK22	137	69	143	3019	112	67	14
	391	76	55	92	2514	78	139	8
	424	26	23	32	1179	29	54	8
	430	43	39	77	2194	79	331	14
	448	25	21	47	1637	39	333	10
	504	45	28	73	2414	43	230	12
	522	20	15	51	2185	42	141	8
	547	33	23	60	2251	38	177	13
	597	32	26	61	1458	43	226	18
	650	38	22	57	718	35	85	19
	657	26	18	59	1644	35	112	64

表1: 检测的荧光值 (MFI) 续 2:

指标序号	15	16	17	18	19	20	21	
指标名称	IL-1a	IL-1 β	ET-1	OC	OPN	TGF- β 1	BSP	
样品名称	Backgrou nd	75	14	33	73	28	26	54
	std1	174	34	35	76	113	29.5	50
	std2	296	124	51	106	253	54	68
	std3	654	394	108	169	484	139	107
	std4	2143	1431	350	501	710	280	327
	std5	6397	4344	1800	1217	1481	890	1444
	std6	12205	9339	7581	4895	4758	3408	6085
	LK7	8	13	1220	52	40	541	43
	LK8	12	20	1423	68	74	142	63
	LK10	9	14	1635	95	274	1904	101
	LK12	12	17	657	59	70	2623	44
	LK13	14	17	393	66	132	1616	62
	LK15	9	9	1996	62	120	1255	69
	LK17	10	11	233	87	76	271	89
	LK19	7	9	2092	91	22	107	110
	LK21	5	10	380	36	32	324	34
	LK22	5	11	1454	133	65	1021	146
	391	6	7	456	64	83	135	57
	424	8	9	296	35	67	250	28
	430	19	14	1294	91	257	215	68
	448	10	7	1152	16	53	81	12
	504	9	117	575	77	38	311	250
	522	7	8	366	20	27	63	15
547	10	13	2401	32	55	395	32	
597	12	19	624	50	39	51	42	
650	10	102	381	58	42	860	132	

	657	36	68	618	101	31	231	88
--	-----	----	----	-----	-----	----	-----	----

表 1: 检测的荧光值 (MFI) 续 3:

指标序号		22	23	24	25	26
指标名称		BMP-2	BMP-7	PDGF-bb	PTHrP	BALP
样品名称	Background	53	46	35	43	28
	std1	220	100	50	94	30
	std2	324	380	87	153	38
	std3	931	714	204	305	72
	std4	3561	2621	798	967	212
	std5	12051	9238	3126	7984	1043
	std6	22946	19632	12324	18813	4323
	LK7	527	35	8904	15	186
	LK8	676	34	4652	13	90
	LK10	832	222	4057	61	260
	LK12	516	56	8535	25	108
	LK13	932	55	6385	20	351
	LK15	735	92	8156	25	168
	LK17	583	68	4040	17	59
	LK19	129	33	2448	6	210
	LK21	388	57	2366	10	28
	LK22	458	152	3649	18	108
	391	607	65	2109	22	134
	424	278	37	588	12	33
	430	836	206	1755	68	149
448	310	26	1343	12	33	
504	530	38	2710	16	903	
522	359	19	2866	11	50	
547	377	39	2433	15	93	

	597	427	38	2992	15	84
	650	517	40	2054	16	506
	657	539	30	3303	11	112

理论浓度值 (pg/ml) :

指标 1-7, 13-26 标准曲线 std1~std6 的理论浓度为: 9.77pg/ml, 39.06 pg/ml, 156.25 pg/ml,

625 pg/ml, 2500 pg/ml, 10000 pg/ml;

指标 8-12 标准曲线 std1~std6 的理论浓度为: 97.7 pg/ml, 390.6 pg/ml, 1562.5 pg/ml, 6250 pg/ml,

25000 pg/ml, 100000 pg/ml。

表 2 测定浓度值 (pg/ml)

指标序号	1	2	3	4	5	6	7	
Sample	SDF1	PDGF-a a	FGF	IL-6	VEGF	IL-11	OPG	
样品 名称	Background	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
	std1	28.02	8.39	13.48	9.77	9.53	7.00	8.85
	std2	28.02	47.37	36.92	39.47	39.04	54.00	45.50
	std3	174.89	176.24	176.26	152.62	170.74	115.00	130.00
	std4	578.27	548.26	552.64	637.65	563.83	737.00	741.00
	std5	2683.95	2185.93	3075.16	2483.73	2659.53	2350.00	2260.00
	std6	9861.67	13154.5 0	9543.72	10011.46	9999.98	10100.0 0	10200.00
	LK7	<9.77	5258.68	<9.77	<9.77	<9.77	<9.77	<9.77
	LK8	<9.77	3362.94	<9.77	33.66	51.37	<9.77	331.00
	LK10	<9.77	20156.1 7	<9.77	26.07	113.76	<9.77	512.00
LK12	<9.77	>10000	<9.77	<9.77	310.87	<9.77	265.00	

LK13	<9.77	>10000	<9.77	15.82	708.61	<9.77	61.40
LK15	<9.77	13283.84	<9.77	<9.77	18.12	<9.77	201.00
LK17	225.26	8639.51	<9.77	16.22	<9.77	<9.77	490.00
LK19	<9.77	>10000	<9.77	13.46	17.56	<9.77	170.00
LK21	<9.77	4457.11	<9.77	<9.77	<9.77	<9.77	114.00
LK22	<9.77	>10000	<9.77	32.83	44.21	<9.77	407.00
391	<9.77	9968.53	<9.77	14.05	<9.77	<9.77	400.00
424	<9.77	4052.43	<9.77	<9.77	<9.77	<9.77	<9.77
430	<9.77	>10000	<9.77	16.22	128.86	<9.77	65.50
448	<9.77	2792.32	<9.77	<9.77	<9.77	<9.77	<9.77
504	<9.77	3206.39	<9.77	12.28	<9.77	<9.77	355.00
522	<9.77	21312.35	<9.77	<9.77	15.30	<9.77	69.50
547	<9.77	>10000	<9.77	<9.77	73.33	<9.77	41.60
597	<9.77	>10000	<9.77	<9.77	249.89	<9.77	150.00
650	<9.77	>10000	<9.77	<9.77	155.19	<9.77	220.00
657	<9.77	>10000	<9.77	13.46	1075.13	<9.77	162.00

表2 测定浓度值 (pg/ml) 续1

指标序号	8	9	10	11	12	13	14
指标名称	Activin A	BMP-6	IGF-1	IGF-BP3	RANKL	IL-8	TNF-a
样品名称	Background	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	std1	181.00	21.00	89.00	96.71	89.70	9.79
	std2	362.00	1090.00	450.00	394.41	444.00	38.91
	std3	1500.00	1090.00	1360.00	1528.91	1440.00	157.22
	std4	6950.00	6920.00	7860.00	6653.57	6390.00	619.93
	std5	21800.00	21300.00	19600.00	22770.95	25000.00	2516.97

std6	107000.0	106000.0	109000.0	109721.3	100000.0	9975.72	9999.96
LK7	<97.7	<97.7	<97.7	3775.25	<97.7	<9.77	<9.77
LK8	<97.7	<97.7	<97.7	2049.48	<97.7	<9.77	<9.77
LK10	1660.00	<97.7	2480.00	3785.96	299.00	<9.77	<9.77
LK12	<97.7	<97.7	<97.7	1899.20	<97.7	<9.77	<9.77
LK13	<97.7	<97.7	<97.7	6204.17	<97.7	<9.77	<9.77
LK15	<97.7	<97.7	<97.7	2427.58	<97.7	<9.77	<9.77
LK17	<97.7	<97.7	<97.7	2388.23	<97.7	<9.77	<9.77
LK19	590.00	<97.7	<97.7	2428.61	<97.7	<9.77	<9.77
LK21	<97.7	<97.7	<97.7	1903.82	<97.7	<9.77	<9.77
LK22	1660.00	<97.7	391.00	3328.53	181.00	<9.77	<9.77
391	<97.7	<97.7	<97.7	2787.42	<97.7	<9.77	<9.77
424	<97.7	<97.7	<97.7	1406.38	<97.7	<9.77	<9.77
430	<97.7	<97.7	<97.7	4906.99	<97.7	<9.77	<9.77
448	<97.7	<97.7	<97.7	3760.45	<97.7	<9.77	<9.77
504	<97.7	<97.7	<97.7	2682.84	<97.7	<9.77	<9.77
522	<97.7	<97.7	<97.7	2444.16	<97.7	<9.77	<9.77
547	<97.7	<97.7	<97.7	2512.69	<97.7	<9.77	<9.77
597	<97.7	<97.7	<97.7	1696.32	<97.7	<9.77	<9.77
650	<97.7	<97.7	<97.7	905.21	<97.7	<9.77	<9.77
657	<97.7	<97.7	<97.7	1887.41	<97.7	<9.77	77.26

表2 测定浓度值 (pg/ml) 续2

指标序号	15	16	17	18	19	20	21
指标名称	IL-1a	IL-1 β	ET-1	OC	OPN	TGF- β 1	BSP
样品名称	Background	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	std1	9.48	9.75	9.00	9.00	7.00	9.07
	std2	41.72	40.25	47.00	51.00	55.00	46.80
	std3	147.13	148.31	151.00	132.00	212.00	183.00

std4	646.36	647.96	531.00	612.00	447.00	451.00	638.00
std5	2484.31	2482.68	2580.00	1940.00	1740.00	2020.00	2490.00
std6	10032.3	10019.5	10500.0	13000.0	13500.0	13300.0	10000.0
LK7	<9.77	<9.77	1780.00	<9.77	<9.77	1050.00	<9.77
LK8	<9.77	<9.77	2060.00	<9.77	2.00	189.00	36.00
LK10	<9.77	<9.77	2350.00	37.00	66.00	5740.00	129.00
LK12	<9.77	<9.77	980.00	<9.77	1.00	9070.00	<9.77
LK13	<9.77	<9.77	595.00	<9.77	12.00	4560.00	34.00
LK15	<9.77	<9.77	2850.00	<9.77	9.00	3220.00	50.00
LK17	<9.77	<9.77	353.00	26.00	2.00	433.00	99.00
LK19	<9.77	<9.77	2990.00	31.00	<9.77	130.00	151.00
LK21	<9.77	<9.77	575.00	<9.77	<9.77	543.00	<9.77
LK22	<9.77	<9.77	2100.00	85.00	<9.77	2430.00	239.00
391	<9.77	<9.77	688.00	<9.77	3.00	177.00	23.00
424	<9.77	<9.77	449.00	<9.77	1.00	391.00	<9.77
430	<9.77	<9.77	1880.00	31.00	57.00	322.00	48.00
448	<9.77	<9.77	1680.00	<9.77	<9.77	88.30	<9.77
504	<9.77	37.72	861.00	11.00	<9.77	516.00	476.00
522	<9.77	<9.77	555.00	<9.77	<9.77	60.40	<9.77
547	<9.77	<9.77	3410.00	<9.77	<9.77	700.00	<9.77
597	<9.77	<9.77	932.00	<9.77	<9.77	42.30	<9.77
650	<9.77	32.37	577.00	<9.77	<9.77	1930.00	205.00
657	<9.77	20.66	924.00	45.00	<9.77	353.00	97.00

表 2 测定浓度值 (pg/ml) 续 3

指标序号	22	23	24	25	26
指标名称	BMP-2	BMP-7/OP-1	PDGF-bb	PTHrP	BALP
样品	Background	N/A	N/A	N/A	N/A
	std1	9.00	9.00	10.00	7.00

名称	std2	36.00	53.00	42.00	49.00	41.00
	std3	161.00	114.00	145.00	164.00	157.00
	std4	623.00	583.00	646.00	560.00	573.00
	std5	2500.00	3160.00	2520.00	2580.00	2680.00
	std6	10000.00	9250.00	9930.00	6810.00	9840.00
	LK7	81.00	<9.77	7140.00	<9.77	499.00
	LK8	112.00	<9.77	3730.00	<9.77	214.00
	LK10	142.00	27.00	3260.00	<9.77	706.00
	LK12	79.00	3.00	6840.00	<9.77	270.00
	LK13	161.00	2.00	5110.00	<9.77	952.00
	LK15	123.00	8.00	6540.00	<9.77	448.00
	LK17	93.00	4.00	3250.00	<9.77	115.00
	LK19	<9.77	<9.77	1980.00	<9.77	567.00
	LK21	51.00	3.00	1910.00	<9.77	5.00
	LK22	67.00	17.00	2930.00	<9.77	270.00
	391	98.00	4.00	1710.00	<9.77	348.00
	424	25.00	<9.77	471.00	<9.77	22.00
	430	143.00	25.00	1420.00	<9.77	392.00
	448	33.00	<9.77	1090.00	<9.77	22.00
	504	82.00	<9.77	2190.00	<9.77	2340.00
	522	45.00	<9.77	2310.00	<9.77	84.00
	547	49.00	<9.77	1970.00	<9.77	224.00
	597	60.00	<9.77	2410.00	<9.77	196.00
650	79.00	<9.77	1660.00	<9.77	1360.00	
657	84.00	<9.77	2660.00	<9.77	282.00	

专利名称(译)	用于多项肿瘤骨转移标志物并行检测的液相芯片及其制备方法		
公开(公告)号	CN101571545A	公开(公告)日	2009-11-04
申请号	CN200910040094.4	申请日	2009-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	广州益善生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州益善生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	益善生物技术股份有限公司		
[标]发明人	许嘉森 廖新梅		
发明人	许嘉森 廖新梅		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/546 G01N33/531 G01N21/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多项肿瘤骨转移血清标志物并行检测液相芯片，主要包括有：包被微球；含有分别用生物素标记的ET - 1、SDF - 1 /CXCL12、PDGF - BB、PDGF - AA、FGF、IGFBP - 3、IGF - I、TGF - β 1、BMP - 2、BMP - 7/OP - 1、BMP - 6、activin A、IL - 11、OCIF/OPG、RANKL、PTHrP、BALP、BSP、OC、IL - 8、IL - 6、IL - 1a、IL - 1 β 、TNF - a、OPN、VEGF的检测抗体；和链亲和素藻红蛋白。本发明所提供的多项肿瘤骨转移标志物并行检测液相芯片具有检测效率高，所需样本量少，特异性强，灵敏度高等优点。同时，各项标志物可自由组合，使用方便。

激活缓冲液 (pH6.2)		
试剂名称	来源	1L理论用量
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	天津市大茂化学试剂厂	15.6g
ddH ₂ O		定容至 1L
NaOH	天津市大茂化学试剂厂	调 pH 至 6.2