



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102236015 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201110090918. 6

(22) 申请日 2011. 04. 12

(73) 专利权人 广州瑞博奥生物科技有限公司
地址 510663 广东省广州科学城掬泉路 3 号
广州国际企业孵化器 D 区

(72) 发明人 黄若磐 蒋卫东

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 任重

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006. 01)

G01N 33/545 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101833001 A, 2010. 09. 15,
CN 101858909 A, 2010. 10. 13,
WO 2005094200 A2, 2005. 10. 13,

审查员 王子晔

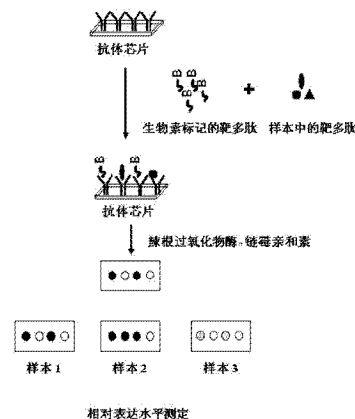
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒,包括:(1)同时固定有若干种特异性抗体的底膜,特异性抗体与肥胖因子能够发生抗体-抗原反应,每种特异性抗体分别固定于底膜形成若干个独立识别位点;和(2)反应剂和检测剂,用于通过竞争抑制性酶联免疫芯片方法检测待测样品中是否存在能够与特异性抗体发生抗体-抗原反应的物质。本发明还公开了该试剂盒的制备方法,该方法包括将特异性抗体固定于底膜的步骤。本发明的试剂盒采用竞争抑制性酶联免疫芯片技术,能同时检测多项肥胖因子,克服现有技术的诸多缺陷,具有廉价、便利、灵敏、准确、高通量、标本用量少、能在普通实验室推广和规模化等优点。



1. 一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒,包括:(1)同时固定有若干种特异性抗体的底膜,所述特异性抗体与肥胖因子能够发生抗体-抗原反应,每种特异性抗体分别固定于所述底膜形成若干个独立识别位点;和(2)反应剂和检测剂,用于通过竞争抑制性酶联免疫芯片方法检测待测样品中是否存在能够与所述特异性抗体发生抗体-抗原反应的物质;

所述特异性抗体为针对如下肥胖因子之抗体:内脂素、神经肽 Y、血管紧张素 II、抵抗素、脂联素、视黄醇结合蛋白 4、血管粘附蛋白、转录调节肽、抗原呈递细胞、生长激素受体和神经元特异性烯醇酶;上述各种特异性抗体分别固定于所述底膜形成若干个独立识别位点;

针对内脂素的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 75043M9;针对神经肽 Y 的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 050700811;针对血管紧张素 II 的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 07080082;针对抵抗素的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 0721009RESC0309;针对脂联素的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 0826009ADPNC0309;针对视黄醇结合蛋白 4 的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 0805009RBPC0309;针对血管粘附蛋白的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 0114009;针对转录调节肽的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 91700840;针对抗原呈递细胞的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 05260093;针对生长激素受体的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 021200841;针对神经元特异性烯醇酶的抗体由 RayBiotech 提供,批号为 1205007;

所述反应剂包括用生物素标记的竞争抑制剂和识别生物素标记的链霉亲和素,所述链霉亲和素标记有辣根过氧化物酶。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述独立识别位点上固定有单一浓度的一种抗体,一种抗体以一种以上的浓度分别固定于底膜形成一个以上独立识别位点。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于:所述特异性抗体中的任意一种以 0.2ng ~ 20ng 的含量点样固定于所述独立识别位点。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述底膜为硝酸纤维素膜、聚偏氟乙烯膜或者尼龙膜。

5. 一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒的制备方法,该方法包括一将权利要求 1 中的特异性抗体固定于底膜的步骤,该步骤包括:

(1) 将 50-500nl 的含 0.5-100ng 特异性抗体蛋白质的三羟甲基氨基甲烷缓冲液点样于底膜上,所述三羟甲基氨基甲烷缓冲液含有质量比为 0.01% -10% 牛白蛋白;

(2) 于室温下,用含 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液包被 5 分钟到 8 小时,于 2°C 到 80°C 保存备用。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:步骤 (1) 中采用全自动点样仪完成点样操作,各特异性抗体按蛋白质芯片点阵排布于所述底膜。

7. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:所述底膜为硝酸纤维素膜、聚偏氟乙烯膜或者尼龙膜。

一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,尤其涉及一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒。

技术背景

[0002] 传统观点认为脂肪组织的作用是单一的、被动的。但随着 1987 年第一个脂肪细胞分泌的蛋白质补体 D 被发现;尤其是 1994 年脂肪细胞特异分泌蛋白瘦素的基因被成功克隆,并发现瘦素与肥胖密切相关之后,其重要的分泌功能引起越来越多的关注。迄今为止,已从脂肪组织分离出补体 D、瘦素、抵抗素等 20 余种生物活性物质,包括细胞因子、生长因子、酶、激素、补体因子、基质蛋白等多种类型,统称为肥胖因子或脂肪细胞因子。实验表明,肥胖因子通过不同的分泌途径作用于多个器官,在一些重要的生理过程中发挥关键的调控作用,包括糖脂代谢、造血、炎症、补体激活、血栓形成等,因此与许多疾病如肥胖及胰岛素抵抗等相关疾病的发生有着密不可分的关系。检测这些肥胖因子的表达水平不仅能帮助我们了解疾病的发生、发展机制,也能帮助我们找到疾病的特殊靶标记和个体医疗生物标志。

[0003] 目前常用的肥胖因子检测方法主要包括:酶联免疫吸附法、放射免疫分析、免疫印迹法、流式细胞仪、蛋白芯片技术等。其中,酶联免疫吸附法的优点是敏感性和特异性高、简便易行、重复性好、可定量、样品用量小等。其缺点是低通量,每次只能检测一个指标,不能检测大分子或多肽,要求有抗体对;放射免疫分析法是一种利用同位素标记的与未标记的抗原同抗体发生竞争抑制性抑制反应的放射性同位素体外微量分析方法。放射免疫分析法的优点是灵敏、特异、简便易行、用样量小,常可测至皮摩尔量,适用于小分子和多肽的检测。本法的最大缺点是放射性标记物的使用,其缺点包括有时会出现交叉反应、假阳性反应、组织样品处理不够迅速,不能灭活降解酶和盐,有时会影响结果等。免疫印迹法能测定分子的大小,且无非特异的反应,但操作繁琐,灵敏度低,且只能检测单一指标,不适合运用于肥胖因子的检测;流式细胞仪能在细胞水平上检测脂肪分子的水平,但却存在低灵敏、低通量、高成本等缺点。

[0004] 抗体芯片技术克服了现有检测试剂盒操作繁琐、检测指标单一、需有费仪器、灵敏度低等缺陷,具有廉价、便利、灵敏、准确、高通量、标本用量少、能在普通实验室推广和规模化等优点。但是由于小分子和多肽大多只有一个抗原决定簇,因此不适合双抗夹心酶联免疫法和常规蛋白芯片。

[0005] 竞争抑制法是一种基于竞争抑制性酶联免疫技术的检测方法,其对于检测只有一个抗原决定簇的多肽和其他各种小分物质具有明显的优势,然而现有技术中公开的竞争抑制性酶联免疫试剂盒一般无法对同一标本中的多项浓度指标进行高通量、快速、便捷的检测,而对于将此技术运用到肥胖因子的检测中,实现多个肥胖因子的同时检测,并使之具备高通量、快速、便捷的效果则更是无从谈起。

[0006] 有鉴于此,开发出一种新型的肥胖因子检测试剂盒,克服现有技术中存在的不足,

实现肥胖因子检测的高通量、高灵敏度、高特异性和低成本是本领域技术人员亟待解决的问题。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明所要解决的技术问题在于提供一种高通量、高灵敏度、高特异性和低成本的肥胖因子检测试剂盒,采用竞争抑制性酶联免疫芯片技术,能够同时检测十一项肥胖因子,克服了现有技术操作繁琐、检测指标单一、需有费仪器、灵敏度低等缺陷,具有廉价、便利、灵敏、准确、高通量、标本用量少、能在普通实验室推广和规模化等优点。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供的一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒,包括:(1)同时固定有若干种特异性抗体的底膜,所述特异性抗体与肥胖因子能够发生抗体-抗原反应,每种特异性抗体分别固定于所述底膜形成若干个独立识别位点;和(2)反应剂和检测剂,用于通过竞争抑制性酶联免疫芯片方法检测待测样品中是否存在能够与所述特异性抗体发生抗体-抗原反应的物质。

[0009] 其中所述特异性抗体为针对选自如下肥胖因子之抗体:内脂素、神经肽 Y、血管紧张素 II、抵抗素、脂联素、视黄醇结合蛋白 4、血管粘附蛋白、转录调节肽、抗原呈递细胞、生长激素受体和神经元特异性烯醇酶;上述各种特异性抗体分别固定于所述底膜形成若干个独立识别位点。

[0010] 优选地,所述独立识别位点上固定有单一浓度的一种抗体,一种抗体以一种或者一种以上的浓度分别固定于底膜形成一个或者一个以上独立识别位点。

[0011] 优选地,所述特异性抗体中的任意一种以 0.2ng~20ng 的含量点样固定于所述独立识别位点。

[0012] 在本发明的一个优选实施方案中,底膜采用所述底膜为硝酸纤维素膜、聚偏氟乙烯膜或者尼龙膜。反应剂包括抗体混合液,所述抗体混合液为所述若干种特异性抗体的混合溶液;另外,所述反应剂还包括用于生物素标记的竞争抑制剂和识别生物素标记的链霉亲和素,所述抗生物素蛋白链菌素标记有辣根过氧化物酶。

[0013] 另一方面,本发明的所要解决的技术问题还在于提供一种测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒的制备方法,该方法包括一将特异性抗体固定于底膜的步骤,该步骤包括:

[0014] (1)将 50-500nl 的含 0.5-100ng 特异性抗体蛋白质的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(含有质量比为 0.01%-10% 牛白蛋白)点样于底膜上,

[0015] (2)于室温下,用含 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液包被 5 分钟到 8 小时,于 2℃ 到 80℃ 保存备用。

[0016] 其中,步骤(1)中采用全自动点样仪完成点样操作,各特异性抗体点阵排布于所述底膜。

[0017] 优选地,所述底膜为硝酸纤维素膜、聚偏氟乙烯膜或者尼龙膜。

[0018] 由于本发明的方法中,采用的底膜材料和点样液的优良特性,再结合本发明的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒在检测肥胖因子时的使用方法与现有技术的区别性,使本发明的方法中,将特异性抗体固定于底膜的步骤得到了极大的简化,无须现有技术中普遍采

用的点样后封闭底膜上的有效成分的操作步骤。

[0019] 如图 1a 和图 1b 所揭示的是竞争抑制性酶联免疫试剂盒检测样品表达水平的原理图,通过如图 1a 中流程图所示的方式能够测定待测样品中抗原的相对浓度或者相对表达水平,而通过如图 1b 中流程图所示的方式能够测定待测样品中抗原的绝对浓度或者定量测定相关因子的表达水平。

[0020] 在本发明的一个实施例中,步骤(1)的点样操作中,采用美国伯乐公司或铂金艾默公司生产的全自动点样仪器,而用于固定特异性抗体的底膜则采用硝酸纤维素膜,该硝酸纤维素膜由通用电气公司提供,各特异性抗体点阵排布于硝酸纤维素底膜。而在具体的操作过程中,各特异性抗体蛋白质的排布可以按照实验设计需要进行调整,根据不同的蛋白质芯片排布阵列,控制全自动点样仪,制备出所需要的中间产品。

[0021] 采用本发明的检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒,能够同时检测出十一项肥胖因子,并且能够实现多样本多指标的并行检测,克服了现有技术操作繁琐、检测指标单一、需有费仪器、灵敏度低等缺陷,具有廉价、便利、灵敏、准确、高通量、标本用量少、能在普通实验室推广和规模化等优点。

[0022] 另外本发明的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒所用到的将特异性抗体蛋白质固定于底膜的方法,由于其采用了全自动点样仪,为实现肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒的高通量、多位点检测提供了一种可能;另外,通过对在点样和包被过程中用到的底膜进行优选,也优化了竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒在灵敏度、准确性、高通量等方面的性能。

[0023] 附图说明:

[0024] 图 1a 为本发明竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒工作原理图一;

[0025] 图 1b 为本发明竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒工作原理图二;

[0026] 图 2 为本发明抗体芯片的点样示意图;

[0027] 图 3 为用本发明的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒检测人血清样品中的肥胖因子的实验结果图;

[0028] 图 4 为本发明试剂盒检测胚胎成纤维细胞 L1 细胞系条件培养基中的肥胖因子的实验结果图;

[0029] 图 5 为本发明竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒的标准曲线。

[0030] 具体实施方式:

[0031] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0032] 实施例 1:一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒的制备。

[0033] 为了检测样品中是否存在相应的肥胖因子,制备固定有针对于如下肥胖因子的抗体特异性抗体的底膜:内脂素、神经肽 Y、血管紧张素 II、抵抗素、脂联素、视黄醇结合蛋白 4、血管粘附蛋白、转录调节肽、抗原呈递细胞、生长激素受体和神经元特异性烯醇酶。

[0034] 1、抗体的制备:

[0035] 采用针对表 1 中所列肥胖因子的特异性抗体,抗体的来源、浓度、及其针对的蛋白质名称均在表 1 详细说明:

[0036] 表 1 特异性抗体所针对的肥胖因子名称,抗体的来源、浓度信息。

[0037]

	原料 /英文缩写	中文名	批号(1) Cat#	批号(1) Lot#	浓度	厂商
1	VIS	内脂素	RB-08-00 03	75043M9	1mg/ml	RayBiotech Inc
2	NPY	神经肽 Y	RB-08-00 16	050700811	2mg/ml	RayBiotech Inc
3	ANG II	血管紧张素 II	RB-08-00 18	07080082	4mg/ml	RayBiotech Inc
4	RES	抵抗素	RB-08-00 30	0721009RE SC0309	10mg/m l	RayBiotech Inc
5	ADPN	脂联素	RB-08-00 33	0826009AD PNC0309	1mg/ml	RayBiotech Inc
6	RBP4	视黄醇结合蛋白 4	RB-08-00 32	0805009RB PC0309	1mg/ml	RayBiotech Inc
7	VAP	血管粘附蛋白	RB-08-00 24	0114009	1mg/ml	RayBiotech Inc
8	CART	转录调节肽	RB-08-00 12	91700840	20mg/m l	RayBiotech Inc
9	APC	抗原呈递细胞	RB-08-00 29	05260093	4mg/ml	RayBiotech Inc
10	GHR	生长激素受体	RB-08-00 10	021200841	10mg/m l	RayBiotech Inc
11	NES	神经元特异性烯醇酶	RB-08-00 08	1205007	2mg/ml	RayBiotech Inc

[0038] 2、点样及封闭

[0039] 将 50-500nl 的含 0.5-100ng 的特异性的抗体的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(含有 0.01-10g/100ml 牛白蛋白)用全自动了点样仪点样于硝酸纤维膜上,具体的竞争抑制酶联免疫点阵示意图如图 2 所示,牛免疫球蛋白 G 作为阳性对照。在本实施例中芯片点阵采用如图 2 所示的排布方式,但事实上,在其他实施例中,用于点样的芯片点阵还可以以其他方式的排布方式进行组合,并不局限于如图所表示的形式。于室温下,用含 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液包被 5 分钟到 8 小时,于 2℃ 到 80℃ 保存备用。

[0040] 其中,本实施例中,全自动点样仪为美国伯乐公司或铂金艾尔默公司生产的产品;硝酸纤维膜购自通用电气公司。当然,在发明技术方案的上述步骤中,仪器和材料的采用并不局限于本实施例的列举,而是以能够解决本发明的技术问题,并实现相应的技术效果为依据。

[0041] 实施例 2:用本发明的试剂盒检测肥胖因子的实验。

[0042] 将底膜放于配套方盒内,由于本实施例的底膜上分布有多个芯片点阵,故而在本实施例中方盒设置有 8 个方格,通过方盒之间的方格将每个芯片点阵划分为相互独立的反

应区,本实施例中采用的设置有 8 个方格方盒由美国瑞博奥生物科技有限公司生产,向每个方格内加 2 毫升封闭液后放置于室温下培养 30 分钟,而后依次进行如下各步骤的操作:

[0043] 1、加样

[0044] 实验 1:用本发明的试剂盒检测人血清样品中的肥胖因子。

[0045] 吸出每个方格中的封闭液,将 100 μ l ~ 5ml 经封闭液稀释过的样品放入有膜的方格内,然后放在摇床上室温下摇动 1 至 2 小时,或者亦可在 4 $^{\circ}$ C 下反应 12-18 小时。在本实施例中加入的样品包括五个梯级浓度的标准肽,人血清样品、阴性对照样品和阳性对照样品。加样是将生物素标记的竞争抑制剂和样品的混合物同时加入有膜的方格内,阴性对照样品为不加生物素标记的竞争抑制剂或者直接计入空白样品,而阳性对照样品则为只加生物素标记的竞争抑制剂。这五个标准肽样品中含有的肥胖因子的浓度依次为 0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、1000ng/mL。实验过程设置至少三组以上的平行实验,以便于计算出符合统计规律的实验数值。

[0046] 实验 2:用本发明的试剂盒检测胚胎成纤维细胞 L1 细胞系条件培养基中的肥胖因子。

[0047] 采用与实验 1 中相同的方法,加入与实验 1 中相同的五个梯级浓度的标准肽、阴性对照和阳性对照,另外加入胚胎成纤维细胞 L1 细胞系条件培养基样品作为待检测样品,测定胚胎成纤维细胞 L1 细胞系条件培养基中的肥胖因子。

[0048] 2、洗膜

[0049] 洗涤液 I 清洗:从方格内吸出样品,用 1 ~ 5ml 1 倍的洗涤液 I 清洗,之后放在摇床上室温摇动 5 分钟,再重复此清洗步骤两次。

[0050] 洗涤液 II 清洗:从方格内吸出残液,用 1 ~ 5ml 1 倍的洗涤液 II 清洗,之后放在摇床上室温摇动 5 分钟,再重复此清洗步骤一次。

[0051] 3、加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素

[0052] 向每个方格加入 500 μ l ~ 2 ml 稀释过的辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白链霉菌素,然后放在摇床上室温条件下摇动 1 至 2 小时,亦可在 4 $^{\circ}$ C 下反应 12-18 小时。而后从方格内吸出辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,重复步骤 2 的洗膜步骤。

[0053] 其中,辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素商购自美国宝德公司(产品号 554066),实验前,需要用封闭液进行 20,000 倍稀释。

[0054] 另外,需要说的是,在本实施的步骤 1 至步骤 4 中,用到如下溶液,其成分和配制方法如下:

[0055] 2M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH7.5):三羟甲基氨基甲烷 484g,纯化水 1.3L,调节 pH 至 7.5,纯化水加至 2L。

[0056] 封闭液的配制方法如下:先将 20 \times PBS (氯化钾 16g,氯化钠 640g,磷酸二氢钾 16g,磷酸氢二钠 92g,溶解于 2.6L 纯化水后,再加纯化水至 4 升)稀释成 1 \times PBS (20 \times PBS 200ml,纯化水 3800ml),然后配制 10% 牛血清白蛋白 (牛血清白蛋白 400g,1 \times PBS 加至 4 升),最后配制封闭液 (10% 牛血清白蛋白 4 升,酪蛋白 4 升,混匀)。

[0057] 20 \times 洗涤液 II (20 \times TBS) 配分如下:2M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH7.5) 800ml,5M 氯化钠 4800ml (氯化钠 1461g,纯化水 3.3 升,溶解后纯化水加至 5 升),混匀后,纯化水加至 8 升。使用时,将 20 \times 洗涤液 II 倍比稀释即可。

[0058] 20× 洗涤液 I (2% 吐温 /20×TBS) 配分如下 :20× 洗涤液 II 1L,吐温 20ml, 混匀。使用时,将 20× 洗涤液 II 倍比稀释即可。

[0059] 4、检测

[0060] 用镊子夹出膜并置于垂直状态使多余的液体滴干。将膜放在清洁的塑料片上(包装内提供),使膜的抗体面朝上。加入 500 μ l 配制好发光液 (A:B=1:1) 到每张膜上并在室温下放置 2 分钟。确保测试混合液完全覆盖每张膜并没有任何气泡。用镊子将膜夹出并置于垂直状态使多余的液体滴干 ;小心地将膜放在干净的塑料片上 ;用另一张干净的塑料片覆盖。小心地将塑料片中的气泡挤压出去,避免在膜上用力。室温下 5 到 10 秒成像拍摄时采用低温电荷耦合元件,采用相配套的扫描仪读取数据。也可用传统胶卷,建议用柯达 X-Omat AR 胶卷(一种双层涂布的感蓝 X 光片,采用透明片基,速度非常高,适用于自动射线摄影。),可以用胶卷冲洗而得到图像系统检测信号。信号的强弱和样品中肥胖因子多肽的浓度成反比,和生物素标记的多肽 - 亲和素 - 辣根过氧化物酶混合体的浓度呈正比。通过标准曲线就可以很容易地来确定样品中肥胖因子的浓度。在室温条件下,采用 UVP 扫描仪,膜被暴光 1 分钟。生物素标记的免疫球蛋白 G 作为阳性对照,其作用是识别膜的方向和比较不同膜的相对表达程度。通过比较信号的强弱,可以得到肥胖因子的相对表达程度高低。并且通过测光密度技术可将信号的强弱数字化。在比较几张膜时,其结果可用阳性对照的数据标准化。其结果可用为本发明所述抗体芯片试剂盒而制作的分析软件进一步分析。其功能不但可以编译和组织实验数据,而且减少繁琐的计算和避免反复使用计算机的复制、粘贴功能。

[0061] 图 3 和图 4 上述实验 1 和实验 2 的结果示意图,从标准肽的肥胖因子竞争矩形图可以看出,信号强度与生物素标记多肽 - 辣根过氧化物酶 - 链酶亲和素的量成正比,而与单个肥胖因子的量成反比。

[0062] 根据上述检测步骤中的方法,得出实验 1 和实验 2 中样品的肥胖因子表达水平,另外,如图 5 所示,为竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒的标准曲线。通过参考标准的表达率结合依据标准品的结合律做出的标准曲线,既可以对样品中的肥胖因子的含量或表达水平进行定量。

[0063] 表二、实验 1 和实验 2 中样品的肥胖因子表达水平

[0064]

	肥胖因子 /英文缩写	中文名	表达水平 (B/B0%)	
			实验 I	实验二
1	VIS	内脂素	83	60
2	NPY	神经肽 Y	58	30
3	ANG II	血管紧张素 II	59	65
4	RES	抵抗素	49	75
5	ADPN	脂联素	47	54
6	RBP4	视黄醇结合蛋白 4	48	76
7	VAP	血管粘附蛋白	60	ND
8	CART	转录调节肽	64	16
9	APC	抗原呈递细胞	62	7
10	GHR	生长激素受体	62	42
11	NES	神经元特异性烯醇酶	58	ND

[0065] 上表中, ND 表示为阴性。

[0066] 应当说明的是, 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制, 尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明, 本领域的普通技术人员应当理解, 可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换, 而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

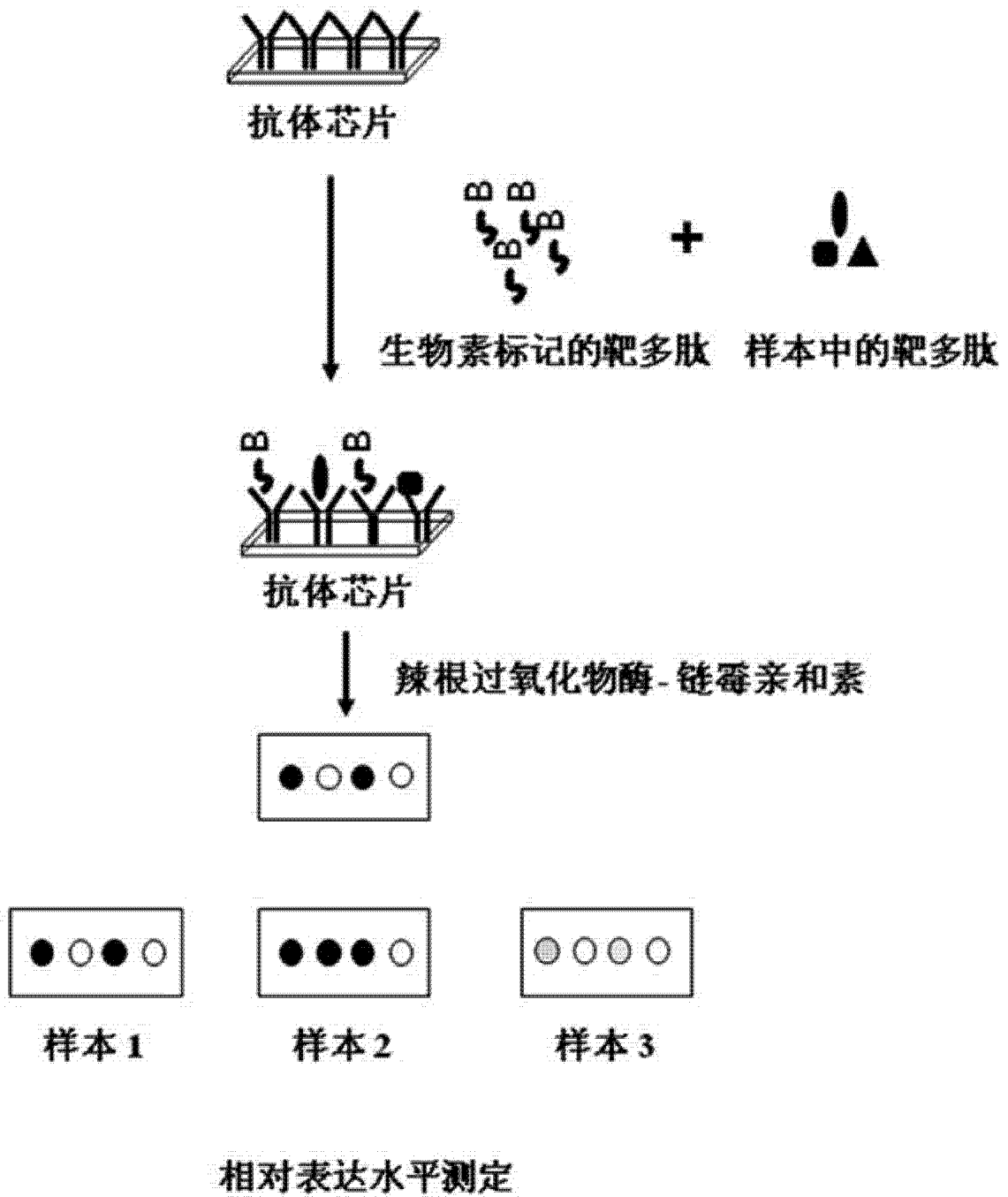


图 1a

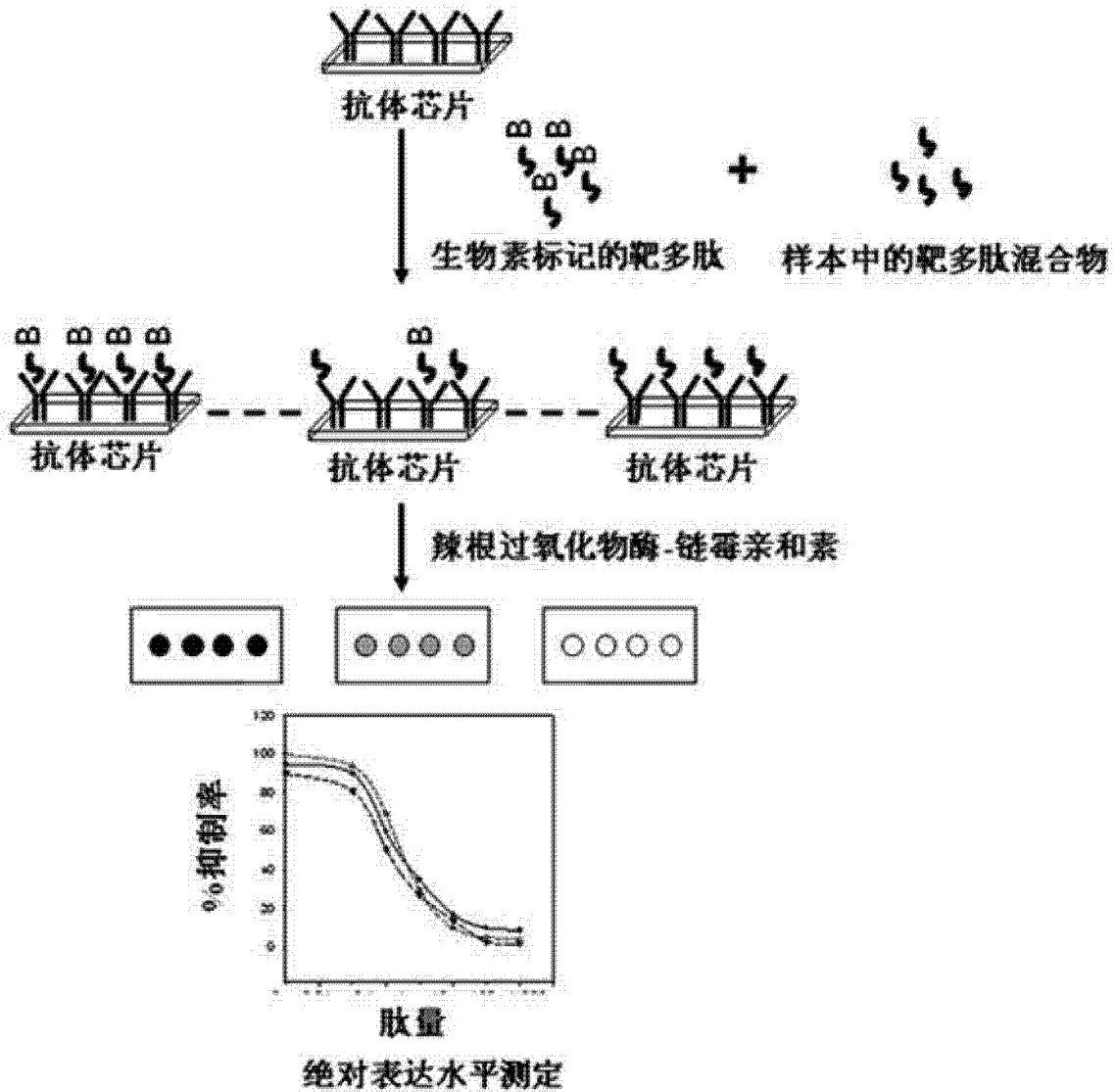


图 1b

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	阳性对照	阳性对照	阴性对照	阴性对照	内脂素	神经元特异性烯醇酶	生长激素受体	抗原呈递细胞
2	阳性对照	阳性对照	阴性对照	阴性对照	内脂素	神经元特异性烯醇酶	生长激素受体	抗原呈递细胞
3	神经肽Y	血管紧张素II	转录调节肽	血管粘附蛋白	视黄醇结合蛋白4	脂联素	抵抗素	阳性对照
4	神经肽Y	血管紧张素II	转录调节肽	血管粘附蛋白	视黄醇结合蛋白4	脂联素	抵抗素	阳性对照

图 2

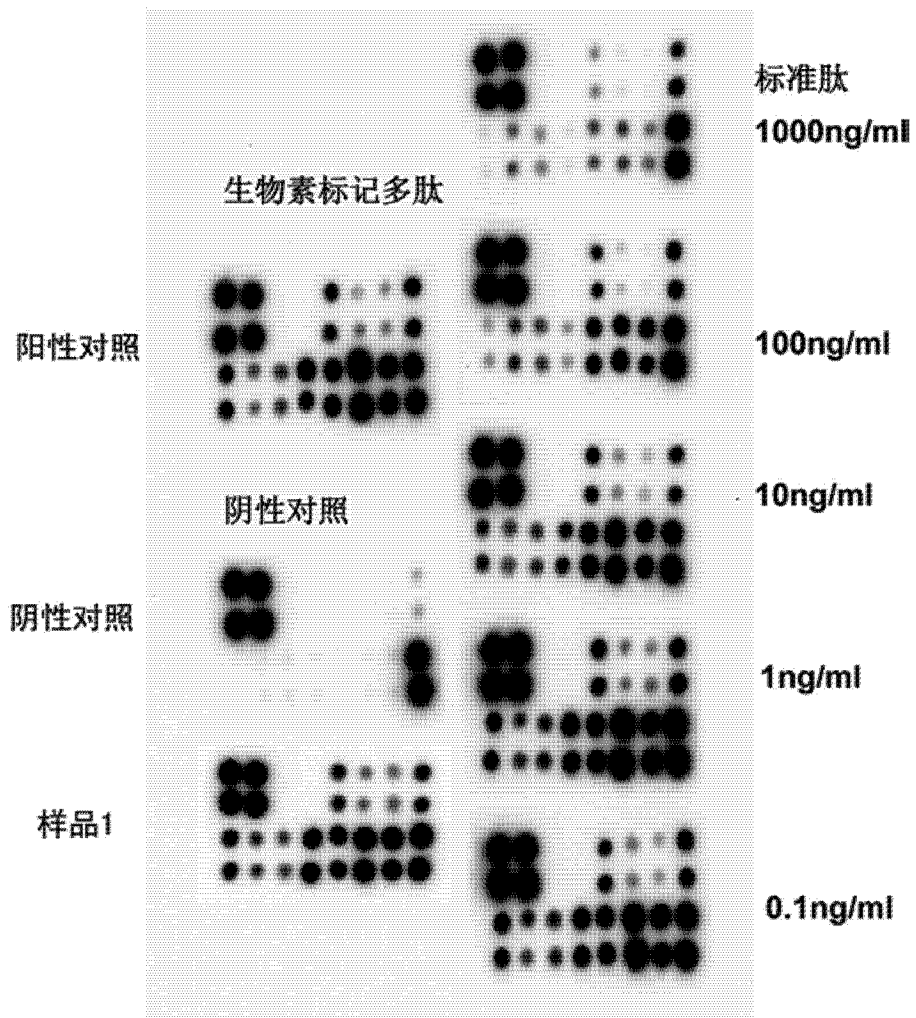


图 3

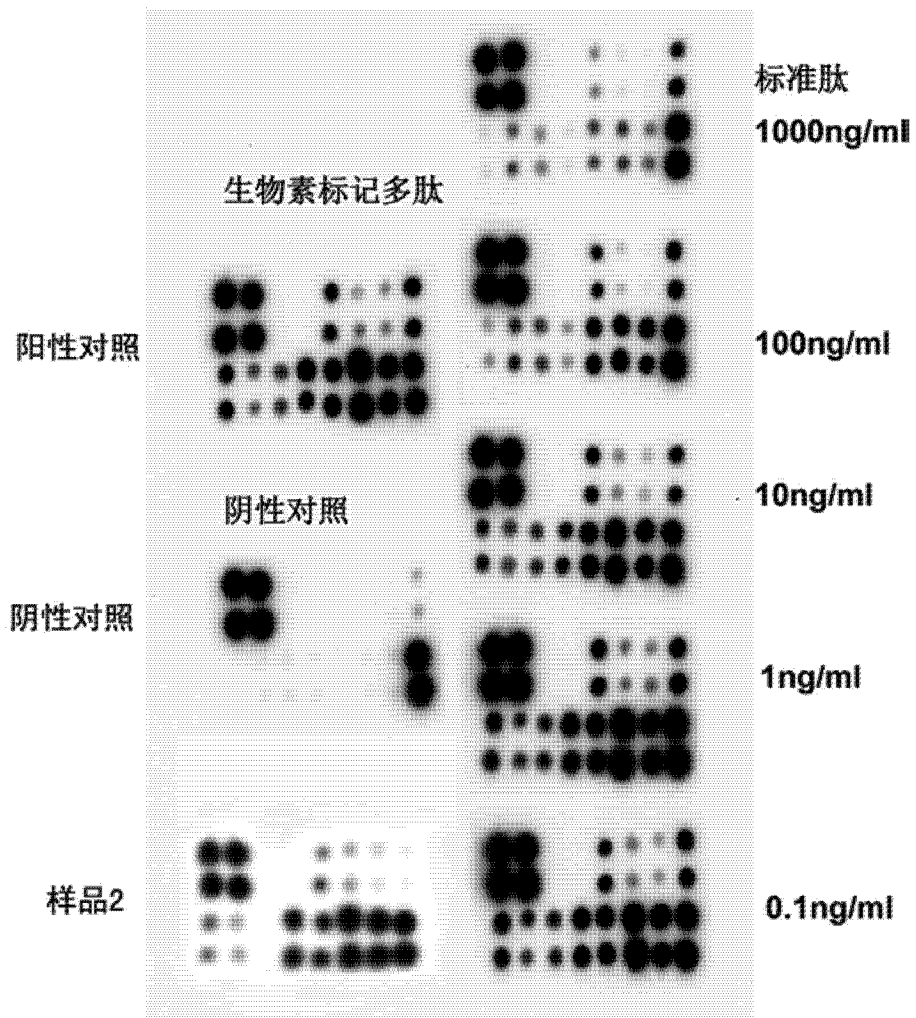


图 4

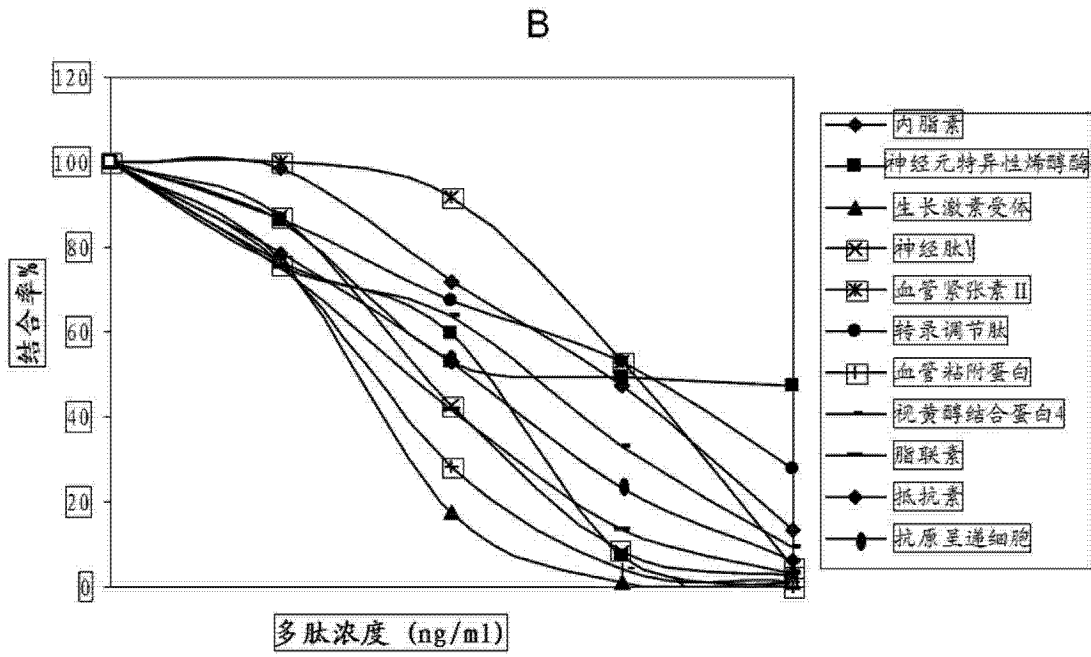


图 5

专利名称(译)	一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102236015B	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201110090918.6	申请日	2011-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	黄若馨 广州瑞博奥生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	黄若馨 广州瑞博奥生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
[标]发明人	黄若馨 蒋卫东		
发明人	黄若馨 蒋卫东		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/545 G01N33/531		
代理人(译)	任重		
其他公开文献	CN102236015A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测肥胖因子的竞争抑制性酶联免疫芯片试剂盒，包括：(1)同时固定有若干种特异性抗体的底膜，特异性抗体与肥胖因子能够发生抗体-抗原反应，每种特异性抗体分别固定于底膜形成若干个独立识别位点；和(2)反应剂和检测剂，用于通过竞争抑制性酶联免疫芯片方法检测待测样品中是否存在能够与特异性抗体发生抗体-抗原反应的物质。本发明还公开了该试剂盒的制备方法，该方法包括将特异性抗体固定于底膜的步骤。本发明的试剂盒采用竞争抑制性酶联免疫芯片技术，能同时检测多项肥胖因子，克服现有技术的诸多缺陷，具有廉价、便利、灵敏、准确、高通量、标本用量少、能在普通实验室推广和规模化等优点。

