

[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 200910017832.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 20 日

[11] 公开号 CN 101629953A

[22] 申请日 2009.8.7

[21] 申请号 200910017832.3

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路 238 号

[72] 发明人 绳秀珍 徐晓丽 战文斌

[74] 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务有限公司

代理人 王 铎

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种现场检测免疫芯片及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种现场检测免疫芯片，其结构包括芯片载体，铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层，琼脂糖凝胶层上固定有多个 4×4 的抗体微阵列，各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线隔开；采用双抗体夹心原理检测抗原，将水产动物病原的相应捕获抗体、阳性对照、阴性对照同时点阵于固相载体上，抗体蛋白通过共价键及物理吸附连接于固相载体上；直接将待检样品液与芯片孵育，样品中的待测抗原与固定在芯片上的相应的抗体结合，再加入辣根过氧化物酶标记的特异性单克隆抗体探针，经底物显色后得到肉眼可见的检测结果。能同时检测多种水产动物样品中的病毒，结果肉眼可见，适用于养殖生产中水产动物病毒的快速、准确检测。

1、一种现场检测免疫芯片，其特征在于包括芯片载体、铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层，琼脂糖凝胶层上固定多个抗体微阵列，各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线隔开；所述的芯片载体为标准载玻片，芯片载体具有经过亲和硅烷处理后，并用琼脂糖凝胶修饰的玻璃表面，该表面经 NaIO_4 活化后，使抗体以物理吸附和共价连接两种方式固定在其上。

2、根据权利要求 1 所述的现场检测免疫芯片，其特征在于所述的抗体是兔抗白斑症病毒（WSSV）抗体或兔抗淋巴囊肿病毒（LCDV）抗体及兔抗鼠 Ig 的抗体。

3、根据权利要求 1 所述的现场检测免疫芯片的制备方法，其特征是它包括如下步骤：

（1）抗体的制备及纯化

制备兔抗 WSSV 抗体、兔抗 LCDV 抗体、鼠抗 WSSV 单克隆抗体（单抗）、鼠抗 LCDV 单抗及兔抗鼠 Ig 的抗体，亲和层析法纯化所得抗体；

（2）HRP 标记单克隆抗体探针的制备

将亲和层析纯化后的单抗（鼠抗 WSSV 单抗、鼠抗 LCDV 单抗）用 HRP 标记，并过凝胶柱纯化；

（3）琼脂糖凝胶基片的制备

将清洗后的载玻片浸入 0.4% 的亲和硅烷的乙酸溶液中，调 pH 至 4.5，室温下作用 1h，双蒸水冲洗，晾干；配制 1.2% 的琼脂糖溶液，微波炉煮沸 3min，使其完全溶解，将 2ml 琼脂糖溶液铺覆在经 60℃ 预热的亲和硅烷处理过的清洁载玻片上；待琼脂糖凝固后，将玻片在 37℃ 下过夜干燥；使用前在室温下用 0.02mol/L NaIO_4 溶液活化 30min，超纯水冲洗 3 遍，用氮气流吹干，室温干燥处保存；

（4）抗体的固定

将捕获抗体（兔抗 WSSV 抗体或兔抗 LCDV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体）用含 50% 甘油的 PBS 稀释至合适浓度，用点样仪在上述琼脂糖修饰的玻片表面点样，每张芯片两排四列共 8 个 4×4 矩阵，每个亚阵列所点样品一致，第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照，第二、三列所点样品为捕获抗体，为病原检测点，第四列为质量控制点，所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元；37℃ 饱和湿度放置 2h，洗涤，晾干；

向载玻片上点有抗体的区域滴加 3% 牛血清白蛋白封闭，37℃ 饱和湿度放置 1h，洗涤，晾

干, 4℃密封保存, 得到所述现场检测免疫芯片。

4、根据权利要求3所述的现场检测免疫芯片的制备方法, 其特征在于用 HRP 标记亲和层析纯化后的高特异性的单抗(鼠抗 WSSV 单抗、鼠抗 LCDV 单抗)作为抗体探针, 并使用兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。

5、根据权利要求3所述的现场检测免疫芯片的制备方法, 其特征在于所述鼠抗 WSSV 单抗为保藏号分别为 CCTCC-C200422 和 CCTCC-C200421 的杂交瘤细胞分泌的鼠抗 WSSV 核衣壳单抗 D 和抗 WSSV 囊膜单抗 E; 鼠抗 LCDV 单抗为保藏号分别为 CCTCC-C200419 和 CCTCC-C200420 的杂交瘤细胞分泌的 LCDV 单抗 B 和单抗 C。

6、根据权利要求1所述的现场检测免疫芯片在水产动物病毒检测中的应用。

7、根据权利要求6所述现场检测免疫芯片的应用, 其特征在于包括如下步骤:

(1) 用于检测的样品包括: 虾/蟹等的鳃、血淋巴等, 或养殖环境中的桡足类等, 或鱼类体表瘤状物、表皮、胃、肠等, 取上述样品, 与 A 液按 1: 10 (W/V) 的比例混合, 匀浆, 再沉降 5~10min, 低温离心, 5000rpm×15min, 取上清作为检测样品, 待检;

(2) 将待检样品加到上述芯片不同亚阵列上, 加样量为 10μl/阵列, 一张芯片可同时检测八个样品, 注意避免不同阵列间的液体混和。37℃饱和湿度放置 15~30 min, 洗涤后再加稀释的 HRP 标记抗体探针, 10μl/阵列, 37℃饱和湿度放置 15~30 min, 洗涤后, 在芯片表面滴加 TMB 显色液室温避光显色, 并用 2mol/L 硫酸终止显色, 阳性点呈现肉眼可见的紫红色;

(3) 结果判读: 显色后得到的图像亚阵列中, 第一列阴性对照的信号强度代表实验的本底值大小; 第二、三列出现肉眼可见的紫红色点为阳性, 表明所检测样品中有病毒; 无紫红色的为阴性, 表明所检测样品中无病毒。信号强弱与样品中病毒浓度有关; 第四列质量控制点出现紫红色的为正常, 如果没有紫红色点, 说明检测操作有问题或者抗体蛋白发生变性, 检测结果为无效。

8、根据权利要求7所述的现场检测免疫芯片的应用, 其特征在于所用待检样品为水产动物病毒感染靶器官的匀浆液上清。

9、根据权利要求7所述的现场检测免疫芯片的应用, 其特征在于, 进行杂交反应, 待检样品滴加到芯片上后, 37℃饱和湿度放置 15~30min, 玻片上加稀释的 HRP 标记抗体探针后, 37℃饱和湿度放置 15~30min。

一种现场检测免疫芯片及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种现场检测免疫芯片或微阵列及其制备方法,为病原检测技术的改进,具体涉及一种采用标记辣根过氧化物酶技术制备用于水产养殖中现场检测一种或几种水产动物病毒的免疫芯片的方法与应用,其属于免疫学、生物芯片及诊断试剂交叉技术领域。

背景技术

病毒性疾病是水产养殖动物病害中最难以预防和治疗的一类疾病,由于水产动物所处的特定水生环境以及病毒独特的生物学特性,使得病毒病的预防及治疗较其他陆生动物更加困难。目前尚无有效的治疗病毒病的方法,因此预防病毒感染显得尤为重要,而对病毒携带者的准确检测和诊断是有效预防的基础。国内外对水产动物病毒病的诊断主要依靠实验室内对病原的检测来实现,方法主要包括电镜技术;PCR法;DNA探针原位杂交法;免疫荧光抗体技术;免疫组织化学技术;胶体金免疫层析技术;酶联免疫吸附检测法以及斑点免疫印迹检测法等。这些检测技术在灵敏度、准确性、特异性、实用性、检测成本等方面各有其优势,但在实际应用中大多需要较长的时间和专用实验设备,不适于养殖生产过程中病原的现场检测,养殖生产中急需一种凭借肉眼观察就可以判读检测结果的快速检测诊断技术。胶体金免疫层析技术检测结果肉眼可见,适用于实际生产中病原的快速、准确、现场检测,但其不能实现多样品的同时检测。因此研制一种适用于水产养殖动物病毒性病原的快速、准确、现场、简便、多样品并行处理的检测技术势在必行,以期达到早发现、早预防的目的。

蛋白质芯片技术提供了一种多样品多指标检验并行处理的方法,有效地克服了以上检测技术的缺点。常规免疫标记的蛋白质芯片,多将荧光探针标记在可与待测物质结合的蛋白质上,凭借专用设备来读取检测信号,使用范围受到一定的限制。而免疫酶技术由来已久,用途广泛,目前常用于标记的辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)性质稳定,分子量小,纯酶容易制备,经底物催化后,结果肉眼可见。将免疫酶技术与蛋白芯片技术结合,制备出一种可用于多个样品同时并行检测,检测结果肉眼可见,使用简便、快速的现场检测免疫芯片,可以很好地解决常规蛋白质芯片难以在养殖生产现场普及应用的缺点。

蛋白芯片的制备过程中,片基的选择和处理是很关键的,它不但要对蛋白质有较强

的固定能力，还要保持所固定蛋白质的活性。目前大部分芯片都采用玻片作为基片，基片的修饰方式大体分为两种，一种为二维修饰，常用的有氨基、醛基、巯基、多聚赖氨酸等，利用它们的活性基团与蛋白质的活性基团以共价方式连接在一起从而达到固定蛋白质的目的，另一种为三维修饰，常用的即为琼脂糖、丙烯酰胺、硝化纤维等，与二维表面相比，其表面不仅有多孔结构，还有一定厚度，其三维多孔结构可以使蛋白质以物理吸附的方式固定在其上面，而琼脂糖是一种常用的分子生物学试剂，价格比较便宜，且具有较好的生物相容性，同时，其亲水环境还有利于保持固定在上面的蛋白质的活性，目前琼脂糖修饰片基在蛋白芯片的制备中已有应用。

发明内容

本发明的目的是提供一种能同时检测多种水产动物样品中的病毒的现场检测免疫芯片，检测结果肉眼可见，适用于养殖生产中一种或几种水产动物病毒的快速、准确检测，及进出口水产品中病毒的检疫。

本发明的另一个目的是提供上述现场检测免疫芯片的具体制备方法及其在水产动物病毒检测中的应用。

本发明的原理是：采用双抗体夹心原理检测抗原，将水产动物病原的相应捕获抗体、阳性对照、阴性对照同时点阵于固相载体上，抗体蛋白通过共价键及物理吸附连接于固相载体上。直接将待检样品液与芯片孵育，样品中的待测抗原与固定在芯片上的相应的抗体结合，再加入辣根过氧化物酶标记的特异性单克隆抗体（单抗）探针，经底物显色后得到肉眼可见的检测结果。所述固相载体为琼脂糖修饰的载玻片。所述的待检样品液为水产动物病毒感染靶器官的组织匀浆液。

本发明的具体技术方案如下：现场检测免疫芯片，其结构包括芯片载体，铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层，琼脂糖凝胶层上固定有多个 4×4 的抗体微阵列，各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线隔开；A 液：渗透压小于 360 mOsm/kg 的低渗液；B 液：吐温-磷酸盐缓冲液（PBST）；C 液：HRP 标记的单抗（鼠抗白斑症病毒单抗或鼠抗淋巴囊肿病毒单抗等）探针。所述单抗探针所用单抗是由保藏号分别为 CCTCC-C200421 和 CCTCC-C200422（保藏日期：2004/12/14）的杂交瘤细胞分泌的鼠抗白斑症病毒（White spot syndrome virus, WSSV）囊膜单抗 E、鼠抗 WSSV 核衣壳单抗 D（简称为：单抗 E 和 D），以及保藏号分别为 CCTCC-C200419 和 CCTCC-C200420（保藏日期：2004/12/14）的杂交瘤细胞分泌的鼠抗淋巴囊肿病毒（Lymphocystis disease virus, LCDV）单抗 B 和单抗 C。

以现场检测对虾 WSSV 和鱼类 LCDV 的免疫芯片为例，一种现场检测免疫芯片的制

备方法，包括如下步骤：

1. 抗体的获得及纯化

从患白斑症病毒病对虾的鳃等靶器官中提取 WSSV，从患淋巴囊肿病毒病的牙鲆体表瘤状物中提取 LCDV，常规方法免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗 WSSV 抗体、兔抗 LCDV 抗体。

复苏并培养小鼠杂交瘤细胞株，注射小鼠腹腔生产腹水，得到鼠抗 WSSV 单抗（单抗 E、单抗 D）和鼠抗 LCDV 单抗（单抗 B、单抗 C）。

取亲和层析纯化后的鼠抗 WSSV 单抗（单抗 E 与单抗 D 混合）、鼠抗 LCDV 单抗（单抗 B 与单抗 C 混合），常规方法分别免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗鼠抗 WSSV 单抗的抗体及兔抗鼠抗 LCDV 单抗的抗体（兔抗鼠 Ig 的抗体）。

使用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的亲和层析柱（HiTrap Protein G Sepharose Column）纯化所得抗体。

2. HRP 标记的抗体探针的制备

按照 Thermofisher 公司的 HRP 抗体标记试剂盒产品说明书，使用 HRP 对亲和层析纯化后的鼠抗 LCDV 单抗、鼠抗 WSSV 单抗进行标记，并过凝胶柱纯化，得到 HRP 标记的抗体探针。

3. 不同修饰方法的芯片片基效果比较

将七种不同修饰方法的芯片片基与未经任何修饰的玻片在固定蛋白效率、信噪比等方面进行比较，选择最适固相载体。

（1）七种不同修饰方法的玻片的制备

将载玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗，双蒸水冲洗，晾干，分别用 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷（ γ -Aminopropyltriethoxysilane, APES）、多聚赖氨酸、巯基硅烷、醛基-PBS、琼脂糖、聚丙烯酰胺修饰玻片。另有氨基玻片购自 Cel associate 公司。

（2）不同方法修饰的载玻片的原子力显微镜表征

将上述七种方法修饰的玻片用超纯水清洗后晾干，截取适当大小，采用接触模式于室温和大气环境条件下对修饰后的玻片表面作原子力显微镜（atomic force microscope, AFM）观察。对每个样品的不同位置进行扫描观察，以保证获取的图像是样品表面的典型形貌。

（3）蛋白固定效率的比较

纯化的抗原（WSSV 或 LCDV 等）用含 50%甘油的 PBS 将其浓度分别稀释为 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005mg/mL，在上述不同修饰的玻片片基上点样，每张芯片两排四列共 8 个 3×3 亚阵列，每个亚阵列为不同浓度抗原，封闭后，加

HRP 标记的抗体探针, TMB 显色, 2mol/L 硫酸终止显色, 观察结果, 阳性点呈现紫红色。

(4) 实验结果分析

琼脂糖修饰玻片和丙烯酰胺修饰玻片为三维修饰的表面, 和酸碱处理后的玻片及其它二维修饰的玻片表面相比, 其表面不仅有多孔结构, 还有一定的厚度, 形成三维多孔结构。

七种修饰玻片对蛋白质的固定效果不同, 二维修饰的玻片表面的蛋白点有扩散, 固定蛋白的效率较低, 而且有不同程度的拖尾现象, 未修饰的玻片蛋白点拖尾且周面弥散。而琼脂糖和丙烯酰胺修饰的三维表面上的蛋白点圆润均匀, 没有拖尾及扩散现象, 对蛋白的固定效果较好。

玻片上固定蛋白的效率越高, 则参与反应的 HRP 标记抗体探针越多, 显色后信号点颜色越深。丙烯酰胺修饰玻片因非特异吸附使背景色过深, 从而造成信号值偏低; 琼脂糖修饰玻片所得到的平均信号值最高, 具有较高的信噪比。

在蛋白质微阵列的制备和检测过程中, 蛋白点样液、封闭液种类、封闭时间、与样品或抗体探针的反应时间等因素对信号值的强弱都有影响, 本实验将上述条件都尽量保持一致。通过比较发现, 琼脂糖修饰的玻片对蛋白固定效果最好, 具有较好的生物相容性, 三维结构具有一定的保水性, 可以很好的保持所固定蛋白的活性, 而且价格较便宜, 制备方法简便, 因此采用琼脂糖修饰玻片作为芯片载体。

4. 抗体的固定

(1) 将捕获抗体(兔抗 WSSV 抗体或兔抗 LCDV 抗体等)用含 50%甘油的 PBS 稀释至合适浓度, 用点样仪在上述琼脂糖修饰玻片的表面点样, 每张芯片两排四列共 8 个 4×4 矩阵, 每个亚阵列所点样品一致, 第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照, 第二、三列所点样品为捕获抗体, 为病原检测点, 第四列为质量控制点, 所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开, 形成独立的反应单元。37℃饱和湿度放置 2h, 洗涤, 晾干。

(2)向载玻片上点有抗体的区域滴加 3%牛血清白蛋白封闭, 37℃饱和湿度放置 1h, 洗涤, 晾干, 4℃密封保存, 得到一种现场检测免疫芯片。

本发明的现场检测免疫芯片的应用, 所述该应用的步骤如下:

1. 用于检测的样品, 如: 虾/蟹等的鳃、血淋巴或挠足类等, 或鱼类体表瘤状物、表皮、脾、胃、肠等, 取上述样品, 与 A 液约按 1: 10 (W/V) 的比例混合, 匀浆, 再沉降 5~10min, 低温离心, 5000rpm×15min, 取上清作为检测样品, 待检。

2. 将待检样品滴加到上述相应芯片不同亚阵列上, 加样量为 10μL/阵列, 一张芯片

可同时检测八个样品, 注意避免不同阵列间的液体混和。37℃饱和湿度放置 15~30 min, 洗涤后再加稀释的 C 液(HRP 标记抗体探针), 10μL/阵列, 37℃饱和湿度放置 15~30 min, 洗涤后, 在芯片表面滴加 TMB 显色液室温避光显色, 并用 2mol/L 硫酸终止显色, 阳性点呈现肉眼可见的紫红色。

3. 结果判读

显色后得到的图像亚阵列中, 第一列阴性对照的信号强度代表实验的本底值大小; 第二、三列出现紫红色点的为阳性, 表明所检测样品中有病毒(WSSV 或 LCDV 等), 无紫红色点的为阴性, 表明所检测样品中无病毒。信号强弱与样品中病毒浓度有关; 第四列质量控制点出现紫红色点的为正常, 如果没有紫红色点, 说明检测操作有问题或者抗体蛋白发生变性, 检测结果为无效。

4. 现场检测免疫芯片的最低检测限

提纯的 WSSV12.8μg/mL 或 LCDV12.8μg/mL 二倍比稀释所得 6 个抗原浓度分别与相应检测芯片的 6 个阵列孵育, 经抗体探针检测后, 扫描结果如图 6 所示, 随抗原浓度变化, 矩阵中紫红色圆点颜色深浅也随之变化。由此制备标准比色卡, 通过信号点颜色比较可大致判断样品中病毒的浓度。

所述琼脂糖修饰的玻璃表面, 为三维多孔结构, 经 NaIO₄ 活化后, 可以使抗体以物理吸附和共价连接两种方式固定在其上。所述的抗体是兔抗 WSSV 抗体、兔抗 LCDV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体等, 不仅仅限于这三种抗体。

所述的用于点样的亲和层析纯化后兔抗 LCDV 抗体最适浓度为 0.5mg/mL, 兔抗 WSSV 抗体最适浓度为 0.1mg/mL, 兔抗鼠 Ig 的抗体最适浓度为 0.1mg/mL。

所述芯片单张玻片点有 8 个亚阵列, 可以根据实际需要增加亚阵列数量, 能够实现更多样品的同时检测。

所制备的免疫芯片所能检测到的病毒最低浓度为 0.8~1.6μg/mL。

与现有技术相比, 本发明具有下述优越性:

①利用当前最新的蛋白芯片技术, 与免疫酶技术相结合, 采用 HRP 标记单抗制备检测探针, 通过 TMB 显色, 达到检测结果肉眼可见的目的, 无需专业的实验室设备读取检测结果, 适用于缺乏专业设备的养殖现场的水产动物病毒的快速、现场、准确的检测, 具有重要的实用价值。

②采用琼脂糖修饰玻片作为芯片载体, 固定蛋白的效率, 背景低, 具较高的信噪比, 且信号点圆润均匀无扩散, 对蛋白的固定效果最好。

③高通量, 一张检测芯片可同时检测多种不同样品或指标, 可根据实际需要增加抗体及矩阵数量, 多种样品或指标同时并行处理增加了不同标本数据之间的可比性, 实现

抗体芯片多样品、多指标的高通量检测，从而可在实际生产中简便、快速、现场、准确地检测水产动物如：虾类、蟹类及桡足类中的 WSSV，鱼类中的 LCDV 等。

④检测成本低廉，操作简单便利，少量样品即可满足检测需要，甚至可以在不杀死养殖动物的情况下进行取材检测，并大大简化了现有检测技术样品处理的步骤。

⑤特异性强，灵敏度高及稳定的质量控制。采用高特异性的单抗制备探针，保证了检测的特异性。阳性控制及阴性控制的设置及捕获抗体的重复点样，增加了实验结果的可靠性，在病原检测中，与目前的检测方法相比，符合率较高。

另外，本发明可以为水产动物细菌等病原的检测提供技术平台，用于养殖过程中的疾病监控及水产动物的出入境检疫等，有效避免水产养殖动物疾病的传播与流行。

附图说明

图 1 琼脂糖修饰玻片的原子力显微镜（AFM）表征。

图 2 六种不同处理玻片制备的芯片的固定杂交效果扫描图像。

其中，a-g 分别为不同方法修饰的片基。a 为琼脂糖修饰片基；b 为 APES 修饰片基；c 为戊二醛修饰片基；d 为商品化氨基修饰片基；e 为巯基修饰片基；f 为多聚赖氨酸修饰片基；g 为未修饰片基。

图 3 信号强度与固定抗体浓度的关系比较。从 a-h，所固定的抗体浓度递减。

图 4 利用琼脂糖修饰玻片制备抗原抗体微阵列的结构图及点样分布图。

其中，1-芯片载体，2-琼脂糖凝胶层，3-抗体微阵列，4-芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线，5-标签区域。点样分布：①含 50%甘油的 PBS，作为阴性对照；②、③为捕获抗体（以兔抗 WSSV 抗体或兔抗 LCDV 抗体为例）；④兔抗鼠 Ig 的抗体，作为阳性对照及固定对照等质量控制。

图 5 使用本发明的现场检测免疫芯片检测不同来源对虾样品中 WSSV 的结果图。其中，a、c、d 显色较深，说明样品中含有 WSSV 且浓度较高；b、f、g 显色较浅，说明样品中含一定量的 WSSV 但浓度较低；e、h 检测点未显出颜色说明此样品未感染 WSSV 或者 WSSV 含量低于 $0.8\mu\text{g/mL}$ 。

图 6 使用该现场检测免疫芯片检测不同来源鱼类样品中 LCDV 的结果图。其中，c 显色较深，说明样品中含有 LCDV 且浓度较高；d、f 显色较浅，说明样品中含一定量的 LCDV 但浓度较低；h 显色很浅，说明样品中 LCDV 含量很低；a、b、e、g 检测点未显出颜色说明在样品未检测到 LCDV 或者 LCDV 含量低于 $0.8\mu\text{g/mL}$ 。

具体实施方式

下面结合附图并通过具体实施例来详细说明本发明。

本发明所用仪器及试剂如下：

小型手动芯片点样系统（购自 Whatman 公司）；HRP 抗体标记试剂盒（购自 Thermofisher 公司）；TMB 显色液（购自 SIGMA 公司）；HiTrap Protein G Sepharose Column（购自 GE 公司）；1640（购自 GIBCO 公司）；胎牛血清（购自 HYCLONE 公司）；牛血清白蛋白（购自 SIGMA 公司）；Tween-20（购自 SIGMA 公司）；二甲基亚砜（购自 SIGMA 公司）。

实施例 1：

1. 抗体的获得及纯化

从患白斑症病毒病的对虾的鳃等靶器官中提取 WSSV，从患淋巴囊肿病毒病的牙鲆体表肿瘤中提取 LCDV，常规方法免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗 WSSV、兔抗 LCDV 抗体。

复苏并培养小鼠杂交瘤细胞株（WSSV 单抗 D、E，LCDV 单抗 B、C），注射小鼠腹腔生产腹水，得到鼠抗 WSSV 单抗和鼠抗 LCDV 单抗。

取亲和层析纯化后的鼠抗 WSSV 单抗（单抗 E 与单抗 D 混合）、鼠抗 LCDV 单抗（单抗 B 与单抗 C 混合），常规方法分别免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗鼠抗 WSSV 单抗的抗体及兔抗鼠抗 LCDV 单抗的抗体（兔抗鼠 Ig 的抗体）。

使用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的亲和层析柱（HiTrap Protein G Sepharose Column）纯化所得抗体。

2. HRP 标记的抗体探针的制备

按照 Thermofisher 公司的 HRP 抗体标记试剂盒产品说明书，使用 HRP 对亲和层析纯化后的鼠抗 LCDV 单抗、鼠抗 WSSV 单抗进行标记，并过凝胶柱纯化，得到 HRP 标记的抗体探针。

实施例 2：

七种不同修饰方法的玻片的制备及固定效果比较。

1. 市售载玻片分别用强碱和浓硫酸清洗，超纯水浸泡过夜，分别用以下方法进行修饰。

（1）APES 修饰玻片的制备：APES 现用现配。将洗净的玻片放入以 1：50 丙酮稀释的 APES 中，停留 20~30s，取出稍停片刻，再放入纯丙酮溶液中除去未结合的 APES，

立即浸入纯水中浸泡 2~5min 漂洗，无尘处避光保存，置玻片架于 80℃ 烤箱烘干。

(2) 多聚赖氨酸修饰玻片的制备：将洗净、干燥的载玻片放入以 1:10 比例去离子水稀释的多聚赖氨酸溶液中，置摇床平摇，双蒸水清洗，浸泡 5min，60℃ 烤箱烘烤 1h 或室温过夜干燥，装盒备用。试验中使用的器具均为非玻璃制品。

(3) 巯基修饰玻片的制备：将要修饰的玻片放入含巯基硅烷 1% 的甲苯溶液中，室温下过夜，用三氯甲烷或丙酮等有机溶剂清洗，吹干。

(4) 醛基修饰玻片的制备：将清洗后的玻片浸入 2% 的氨基硅烷的 95% 乙醇溶液中，冰醋酸调节 pH 至 4.5，室温作用 30min，用 95% 乙醇冲洗，晾干；再将氨基化玻片浸入 2.5% 戊二醛的 0.1mol/L，pH7.2 的 PBS 溶液中，室温作用 2h，PBS 冲洗，室温晾干。

(5) 琼脂糖修饰玻片的制备：将洁净的载玻片浸入 0.4% 的 Bind-Silane 乙酸溶液中 1h，蒸馏水冲洗，晾干。配制 1.2% 的琼脂糖溶液，微波炉煮沸 3 min 完全溶解；将 2mL 琼脂糖溶液覆盖在 60℃ 预热的清洁玻片上；琼脂糖凝固后，玻片在 37℃ 下过夜干燥；使用前用 0.02mol/L NaIO₄ 溶液室温下活化 30 min，超纯水彻底冲洗 3 遍，并用氮气流吹干，室温干燥处保存。

(6) 将酸碱洗净后的玻片在 0.4 % Bind-Silane 乙酸溶液(pH 3.5)中浸泡 1h ,然后用蒸馏水淋洗,离心干燥。根据需要在玻片四周围上陶泥做成框架，在框架中加入新鲜的凝胶溶液(1mol/L 丙烯酰胺，0.02mol/L N,N' 2 亚甲基双丙烯酰胺， 5×10^{-3} mol/L 过硫酸铵， 8.6×10^{-4} mol/L N,N,N',N' 2 四甲基乙二胺(TEMED))。然后盖上一片普通玻片，室温下聚合 3h。撤除模具后,用双蒸水淋洗凝胶基片数次，直到没有成胶的单体洗净为止。晾干，于 12.5 %戊二醛，50mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7.5 ,室温下浸泡 12h。然后用蒸馏水浸泡数次，并用蒸馏水淋洗直至无戊二醛的味道，4℃ 保存。

(7) 氨基修饰玻片购自美国 CEL 公司。

2. 将上述不同方法修饰的玻片，截取适当大小，采用接触模式于室温和大气环境条件下对玻片表面作原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 观察。对每个样品的不同位置进行扫描观察，以保证获取的图像是样品表面的典型形貌。

3. 不同片基用于免疫芯片制备的效果比较

将抗原 (WSSV 或 LCDV) 从 0.5mg/mL 开始，用含 50%甘油的 PBS 做系列稀释，浓度依次为 0.5、0.25、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005mg/mL，共八个梯度，用点样仪分别在前述七种玻片上点样，形成两排四列共 8 个 3×3 阵列，每一阵列为同一浓度的抗原，置于 37℃ 湿盒中温孵 2h，洗涤后用 3%BSA 封闭 1h，在芯片上滴加 HRP 标记的抗体探针，37℃ 温孵 15~30min，洗涤后滴加 TMB 显色液，室温避光发色，2mol/L 硫酸终止发色后阳性点呈现紫红色。所有实验重复 3 次以上。

实施例 3:

以上述琼脂糖修饰的载玻片作为基片，制备抗体微阵列。

1. 芯片结构设计

该芯片结构如图 4 所示，包括芯片载体（1）、铺覆于芯片载体（1）上的琼脂糖凝胶层（2），琼脂糖凝胶层（2）上固定有两排四列共 8 个 4×4 的抗体微阵列（3），点样量为 50-70nl，点直径为 500~600μm。各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线（4）隔开。所述的芯片载体为标准载玻片，在玻片一端可以留出标签区域（5）。

2. 捕获抗体最适浓度的选择

（1）用 pH 7.4 的含 50%甘油的 PBS 缓冲液稀释捕获抗体（兔抗 LCDV 抗体或兔抗 WSSV 抗体），使其浓度依次为 1，0.5，0.1，0.05，0.01，0.005，0.001，0.0005mg/mL。

（2）用点样仪将抗体不同浓度稀释液在上述琼脂糖修饰的载玻片表面的不同区域点样，每张芯片两排四列共 8 个 3×3 矩阵，每个矩阵所点样品一致，为不同浓度的捕获抗体。37℃饱和湿度放置 2h，洗涤，晾干。

（3）向载玻片上点有抗体的区域滴加 3%牛血清白蛋白进行封闭，37℃饱和湿度放置 1h，洗涤，晾干，4℃密封保存，得到现场检测免疫芯片。

（4）将相应抗原稀释液滴加到芯片表面，37℃饱和湿度孵育 30min，洗涤，在玻片上加稀释的 C 液，37℃饱和湿度孵育 30min，洗涤，TMB 显色液显色，2mol/L 硫酸终止，肉眼观察结果，选择用于点样的捕获抗体的最适浓度。

实施例 4:

以上述琼脂糖修饰的载玻片作为基片，制备抗体微阵列。

1. 芯片结构设计同实施例 3。**2.现场检测免疫芯片的制备**

（1）用 pH 7.4 的含 50%甘油的 PBS 缓冲液稀释捕获抗体（兔抗 LCDV 抗体或兔抗 WSSV 抗体）至其最适浓度；稀释兔抗鼠 Ig 的抗体至 0.1mg/mL。

（2）将此抗体稀释液用八针小型手动芯片点样仪在上述琼脂糖修饰的玻片表面点样，点样分布如图 4 所示，各个矩阵之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线隔开，形成独立的反应单元。37℃饱和湿度放置 2h，洗涤，晾干。

（3）向载玻片上点有抗体的区域滴加 3%牛血清白蛋白进行封闭，37℃饱和湿度放置 1h，洗涤，晾干，4℃密封保存，得到现场检测免疫芯片。

实施例 5:

现场检测免疫芯片的应用：

1. 取待检样品如虾/蟹等的鳃、血淋巴等或养殖环境中的桡足类等（检测环境生物是否携带病毒）或鱼类体表瘤状物、鳃、胃、肠、表皮等，与 A 液约按 1: 10 (W/V) 的比例混合，匀浆，再沉降 5-10min，低温离心，5000rpm×15min，取上清液作为检测样品，待检。

2. 将不同待检样品滴加到相应检测芯片的不同亚阵列上，加样量为 10μl/阵列，一张芯片可同时检测八个样品，注意避免不同亚阵列间的液体混合。37℃饱和湿度孵育 30min，洗涤，在玻片上加稀释的 C 液，37℃饱和湿度孵育 30min，洗涤，TMB 显色液显色，2mol/L 硫酸终止，肉眼观察结果。

结果判读：显色后得到的图像亚阵列中，第一列阴性对照的信号强度代表实验的本底值大小；第二、三列出现肉眼可见的紫红色点的为阳性，表明所检测样品中有病毒，无紫红色点的为阴性，表明所检测样品中无病毒。信号强弱与样品中病毒浓度有关；第四列质量控制点出现紫红色点的为正常，如果没有紫红色点，说明检测操作有问题或者抗体蛋白发生变性，检测结果为无效。

实施例 6：

该现场检测免疫芯片的最低检测限：

取制备好的现场检测免疫芯片（WSSV 或 LCDV 现场检测免疫芯片），将纯化的相应抗原稀释至 12.8μg/mL、再按二倍比稀释所得 6 个抗原浓度分别与芯片的 6 个阵列孵育，经抗体探针检测，TMB 显色液显色，2mol/L 硫酸终止，阳性点呈现肉眼可见的紫红色，经普通扫描仪扫描记录结果。

结果显示，随抗原浓度变化，矩阵中紫红色圆点颜色深浅也随之变化。由此制备标准比色卡，通过信号点颜色比较可大致判断样品中病毒的浓度。

此现场检测免疫芯片所能检测的病原最低浓度为 0.8~1.6μg/mL。

本领域的普通技术人员都会理解，在本发明的保护范围内，对于上述实施例进行修改，添加和替换都是可能的，其都没有超出本发明的保护范围。

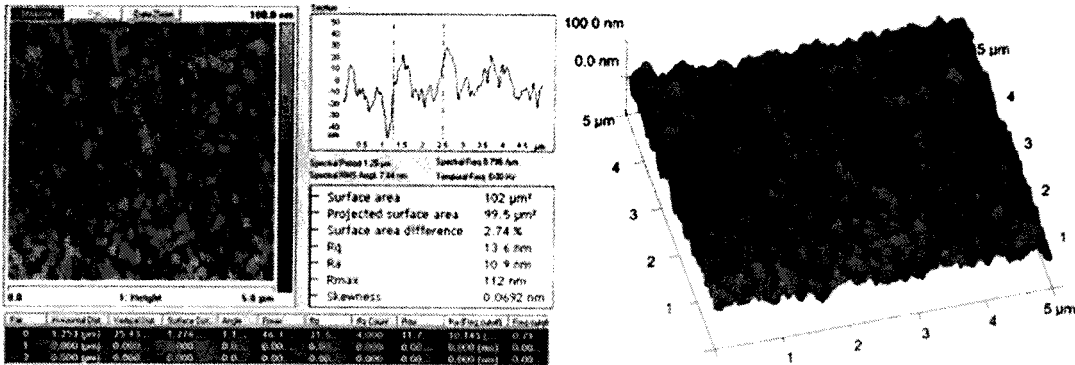


图 1

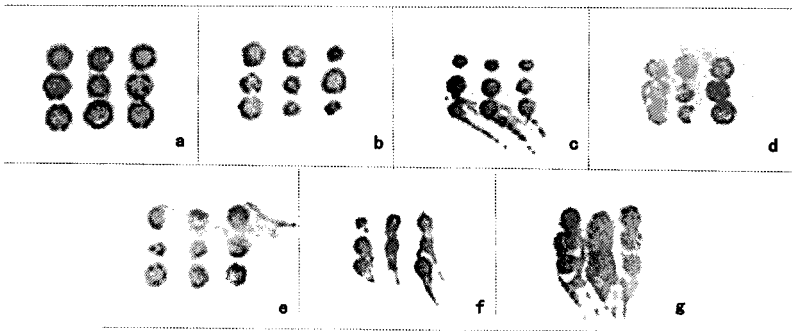


图 2

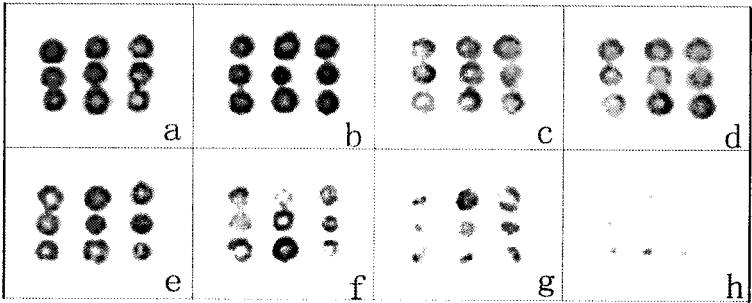


图 3

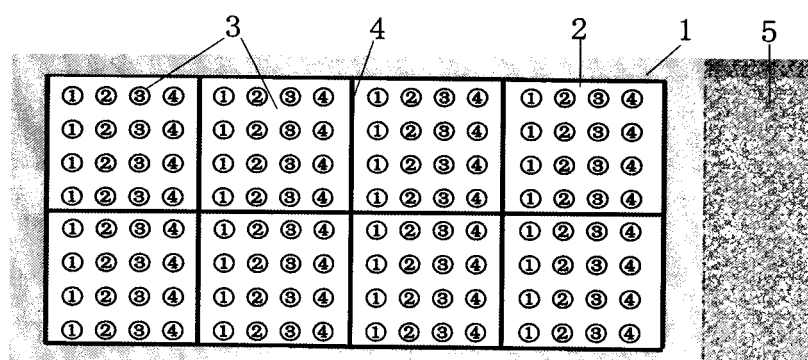


图 4

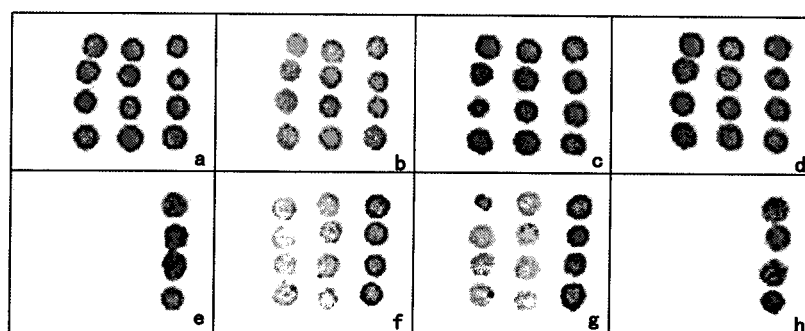


图 5

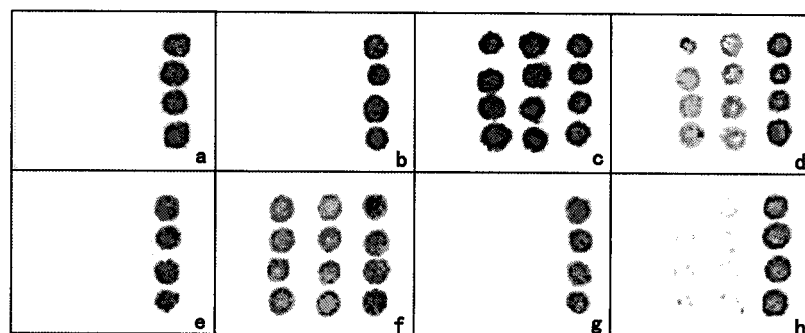


图 6

专利名称(译)	一种现场检测免疫芯片及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101629953A	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200910017832.3	申请日	2009-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	绳秀珍 徐晓丽 战文斌		
发明人	绳秀珍 徐晓丽 战文斌		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/532 G01N33/52		
代理人(译)	王铎		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种现场检测免疫芯片，其结构包括芯片载体，铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层，琼脂糖凝胶层上固定有多个4×4的抗体微阵列，各个微阵列之间用芯片专用围栏或Super PAP Pen划线隔开；采用双抗体夹心原理检测抗原，将水产动物病原的相应捕获抗体、阳性对照、阴性对照同时点阵于固相载体上，抗体蛋白通过共价键及物理吸附连接于固相载体上；直接对待检样品液与芯片孵育，样品中的待测抗原与固定在芯片上的相应的抗体结合，再加入辣根过氧化物酶标记的特异性单克隆抗体探针，经底物显色后得到肉眼可见的检测结果。能同时检测多种水产动物样品中的病毒，结果肉眼可见，适用于养殖生产中水产动物病毒的快速、准确检测。

