



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104122398 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201310157055. 9

(22) 申请日 2013. 04. 28

(71) 申请人 上海铭源数康生物芯片有限公司
地址 201403 上海市奉贤区现代农业园区汇
丰北路 699 号

(72) 发明人 朱跃为 柳飞舟 季海鹏 喻长杰

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限
公司 31224

代理人 吕伴

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

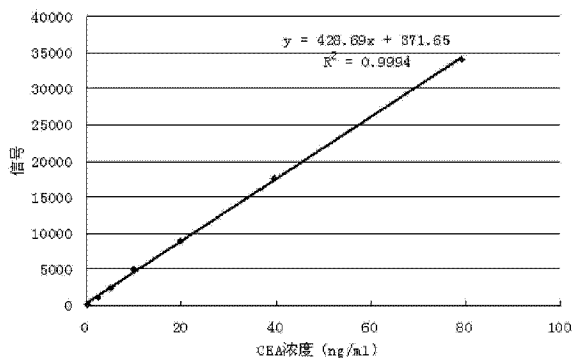
(54) 发明名称

一种多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒、
制备方法及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于硝酸纤维素膜和近红外
荧光分子标记的多指标并行检测的蛋白芯片检测
试剂盒,其包括:一微阵列蛋白芯片,所述微阵列
蛋白芯片是以硝酸纤维素膜为固相基片,在该固
相基片上的不同区域固定有不同的第一蛋白质而
形成,每一第一蛋白质均能与体内的疾病标志物
特异性结合,形成免疫复合物;以近红外荧光素
分子标记第二种能与所述免疫复合物特异性结合
的第二蛋白质,该第二蛋白质与所述免疫复合物
形成标记免疫复合物。本发明红外荧光信号是静
态信号,信号不随时间变化,信号和目标蛋白浓
度成比例关系,因此可以用于精确定量,并且操作
简单,便于实现系统的自动化。本发明还公开了该
蛋白芯片检测试剂盒的制备方法和检测方法。

标准曲线图



1. 一种多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒,其特征在于:包括:

一微阵列蛋白芯片,所述微阵列蛋白芯片是以硝酸纤维素膜为固相基片,在该固相基片上的不同区域固定有不同的第一蛋白质而形成,每一第一蛋白质均能与体内的疾病标志物特异性结合,形成免疫复合物;

以近红外荧光素分子标记第二种能与所述免疫复合物特异性结合的第二蛋白质,该第二蛋白质与所述免疫复合物形成标记免疫复合物。

2. 如权利要求1所述的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒,其特征在于:所述第一蛋白质为特异性抗原,所述体内的疾病标志物为与第一蛋白质对应的疾病标志性免疫球蛋白抗体,所述第二蛋白质为抗人免疫球蛋白抗体的动物源性抗体。

3. 如权利要求1所述的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒,其特征在于:所述第一蛋白质为特异性抗原或抗体,所述体内的疾病标志物为与第一蛋白质对应的疾病标志性免疫球蛋白抗体或抗原,,所述第二蛋白质为特异性抗原或者抗体。

4. 如权利要求1或2或3所述的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒,其特征在于:所述近红外荧光素分子为发射波长为650-1000nm的近红外荧光染料。

5. 如权利要求4所述的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒,其特征在于:所述近红外荧光染料为琥珀酰亚胺酯或琥珀酰亚胺酯IRDye800。

6. 权利要求1至5任一项权利要求所述的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒的制备方法,具体包括如下步骤:

(1) 微阵列蛋白芯片制备步骤

裁取硝酸纤维素膜作为蛋白芯片的固相基片,然后在固相基片上划格形成若干区域,使用自动芯片点样仪,将若干不同的能与体内的疾病标志物特异性结合而形成免疫复合物的第一蛋白质固定在固相基片的不同区域内;

(2) 以近红外荧光分子标记第二种能与所述免疫复合物特异性结合的第二蛋白质制备步骤。

7. 权利要求1至5任一项权利要求所述的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒的检测方法,其特征在于,具体步骤如下:

(1) 将含体内的疾病标志物样本与所述微阵列蛋白芯片不同区域内的不同的第一蛋白质反应,形成抗原/抗体免疫复合物;

(2) 将近红外荧光素分子标记的第二蛋白质与上述抗原/抗体免疫标记物反应,形成标记免疫复合物;

(3) 信号检测;

(4) 计算待测物浓度或量。

一种多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒、制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及近红外荧光素分子标记在蛋白芯片检测中的应用。尤其涉及一种基于硝酸纤维素膜和近红外荧光分子标记应用于多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒、制备方法及检测方法。

背景技术

[0002] 蛋白芯片技术作为近年来发展起来的一种多指标并行检测的新兴技术,具有高通量,高信息量的特点,在科研和临床诊断领域具有广泛的应用前景。但是,由于技术上的一些因素,限制了其实际应用,尤其是在临床诊断领域还没有得到应有的推广。例如,芯片片基的选择包括有硅片和玻璃片等无机材料和硝酸纤维素膜,尼龙膜,琼脂糖凝胶,以及塑料片等有机材料片基,其中又以玻璃片和硝酸纤维素膜的应用比较广泛,但是都存在各自的缺点。硝酸纤维素膜具有蛋白吸附量大和使用方便等优点,而且来源稳定,价格低廉,是蛋白质分析中最为常用的一种材料。但是在蛋白芯片检测中,往往采用荧光标记技术,而一般的荧光染料因为它们的激发光和检测光的波长位于可见光区,容易形成高背景的荧光干扰,不能有效地用于检测硝酸纤维素膜上的蛋白。因此,目前基于硝酸纤维素膜等具有高荧光背景的作为芯片片基的蛋白芯片技术难以做到精确定量,从而限制了这类产品的实际应用。

[0003] 目前一些蛋白芯片技术采用化学发光方式进行标记和信号检测。但是化学发光是动态信号,信号随时间变化,造成定量不精确。近红外荧光材料的发射波长范围在650-1000nm,在这个范围内,生物体自发荧光较弱,因此,使用近红外荧光材料作为检测荧光标记物,具有低背景荧光、检测信噪比高,检测灵敏度高的特点。更为重要的是,在红外波长区硝酸纤维素膜几乎不发荧光,因此在红外波长区检测硝酸纤维素膜上结合的蛋白具有低背景的优势,而且具有很高的信噪比,从而获得很高的检测灵敏度。结合硝酸纤维素膜和红外荧光染料的优势,可以有效地提高蛋白芯片检测性能,使蛋白芯片产品获得更为广泛的应用。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题之一在于针对现有技术所存在的不足而提供一种基于硝酸纤维素膜和近红外荧光分子标记应用于多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒。

[0005] 本发明所要解决的技术问题之二在于利用上述检测试剂盒的制备方法。

[0006] 本发明所要解决的技术问题之三在于提供上述检测试剂盒的检测方法。

[0007] 作为本发明第一方面的一种多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒,其特征在于:包括:

[0008] 一微阵列蛋白芯片,所述微阵列蛋白芯片是以硝酸纤维素膜为固相基片,在该固相基片上的不同区域固定有不同的第一蛋白质而形成,每一第一蛋白质均能与体内的疾病

标志物特异性结合,形成免疫复合物;

[0009] 以近红外荧光素分子标记第二种能与所述免疫复合物特异性结合的第二蛋白质,该第二蛋白质与所述免疫复合物形成标记免疫复合物。

[0010] 在本发明的一个优选实施例中,所述第一蛋白质为特异性抗原,所述体内的疾病标志物为与第一蛋白质对应的疾病标志性免疫球蛋白抗体,所述第二蛋白质为抗人免疫球蛋白抗体的动物源性抗体。

[0011] 在本发明的一个优选实施例中,所述第一蛋白质为特异性抗原或抗体,所述体内的疾病标志物为与第一蛋白质对应的疾病标志性免疫球蛋白抗体或抗原,,所述第二蛋白质为特异性抗原或者抗体。

[0012] 在本发明的一个优选实施例中,所述近红外荧光素分子为发射波长为 650-1000nm 的近红外荧光染料。

[0013] 在本发明的一个优选实施例中,所述近红外荧光染料为琥珀酰亚胺酯或琥珀酰亚胺酯 IRDye800。

[0014] 作为本发明第二方面的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒的制备方法,具体包括如下步骤:

[0015] (1) 微阵列蛋白芯片制备步骤

[0016] 截取硝酸纤维素膜作为蛋白芯片的固相基片,然后在固相基片上划格形成若干区域,使用自动芯片点样仪,将若干不同的能与体内的疾病标志物特异性结合而形成免疫复合物的第一蛋白质固定在固相基片的不同区域内;

[0017] (2) 以近红外荧光分子标记第二种能与所述免疫复合物特异性结合的第二蛋白质制备步骤。

[0018] 作为本发明第三方面的多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒的检测方法,其具体步骤如下:

[0019] (1) 将含体内的疾病标志物样本与所述微阵列蛋白芯片不同区域内的不同的第一蛋白质反应,形成抗原/抗体免疫复合物;

[0020] (2) 将近红外荧光素分子标记的第二蛋白质与上述抗原/抗体免疫标记物反应,形成标记免疫复合物;

[0021] (3) 信号检测;

[0022] (4) 计算待测物浓度或量。

[0023] 由于采用了如上的技术方案,本发明结合硝酸纤维素膜和红外荧光染料的优势,克服了以硝酸纤维素膜为片基和以一般荧光染料为标记物的蛋白芯片技术所拥有的背景荧光干扰大所造成的灵敏度低,定量不精确的缺点,建立了一种基于硝酸纤维素膜为片基和以近红外荧光染料为标记物的蛋白芯片检测技术和试剂准备方法。

[0024] 本发明的工作原理为:使用自动芯片点样仪,将多种能与含体内的疾病标志物特异性结合的蛋白质固定在硝酸纤维素膜上,形成特定的蛋白芯片微阵列,当检测样本与蛋白芯片接触时,样本中的待测物与蛋白芯片上的捕获蛋白形成特异性免疫复合物,再将近红外荧光染料标记的第二蛋白质与蛋白芯片接触,与蛋白芯片上形成的特异性免疫复合物形成近红外标记特异性免疫复合物。使用荧光扫描仪读取反应完毕后蛋白芯片荧光强度,以定标物质的荧光强度作为参照,计算待测物的浓度或量。

[0025] 本发明所采用的方法包括夹心法和间接法免疫检测。

[0026] 当使用夹心法检测待测物时,其第一蛋白质为特定的抗体或抗原,第二蛋白质为抗原或抗体,将特定的抗体(捕获抗体,当待测物为抗原时)或者抗原(捕获抗原,当待测物为抗体时)固定于蛋白芯片片基上形成蛋白微阵列,制备成适合免疫反应的蛋白芯片集成块,每个集成块包括多个蛋白微阵列(每个微阵列即是一个蛋白芯片),用于同时并行检测待测样本,标准物质和质控物质。标准物质和质控物质含有已知浓度或量的待测抗原或者抗体。以近红外荧光染料标记另外一种特异识别待测抗原或者抗体的抗体或者抗原,制备成检测抗体或者检测抗原。将检测样本,标准物质和质控物质与蛋白芯片反应时,待测物与捕获抗原或抗体形成免疫复合物,再将近红外荧光染料标记的多个抗体或抗原混合与蛋白芯片反应,即形成近红外荧光染料标记的捕获抗体-待测抗原-检测抗体形式的双抗体夹心复合物(当待测物为抗原时)或者近红外荧光染料标记的捕获抗原-待测抗体-检测抗原形式的双抗原夹心复合物(当待测物为抗体时)。反应结束后,用红外荧光扫描仪读取蛋白芯片荧光强度,以与标准物质反应的蛋白芯片获得的数据为计算依据,制备标准曲线,计算样本中待测物的浓度或量以及质控品中质控物质的浓度或量,质控品中质控物质的浓度或量作为实验有效性的判断依据。

[0027] 当使用间接法检测待测物时,第一蛋白质为特定的抗原,第二蛋白质为抗体,待测物是样本中的抗体。将特定的抗原(检测抗原)固定于蛋白芯片片基上形成蛋白微阵列,制备成适合免疫反应的蛋白芯片集成块,每个集成块包括多个蛋白微阵列(每个微阵列即是一个蛋白芯片),用于同时并行检测待测样本,标准物质和质控物质。标准物质和质控物质含有已知浓度或量的待测抗体。以近红外荧光染料标记一种特异结合待测抗体的外源性抗体,制备成检测抗体。将检测样本,标准物质和质控物质与蛋白芯片反应时,待测抗体与检测抗原形成免疫复合物,再将近红外荧光染料标记的多个检测抗体混合与蛋白芯片反应,即形成近红外荧光染料标记的检测抗原-待测抗体-检测抗体形式的免疫复合物。反应结束后,用红外荧光扫描仪读取蛋白芯片荧光强度,以与标准物质反应的蛋白芯片获得的数据为计算依据,计算样本中待测物的浓度或量以及质控品中质控物质的浓度或量,质控品中质控物质的浓度或量作为实验有效性的判断依据。

[0028] 本发明中使用的荧光扫描仪为常用的实验扫描仪器,例如美国 LI-COR 公司的 Odyssey 近红外成像系统。

[0029] 本发明与其他蛋白芯片检测方法比较,具有以下优点:

[0030] 材料背景信号和生物背景信号低,信噪比高,检测灵敏度高。目前的蛋白芯片一般的荧光染料进行标记。但是,在一般的荧光染料的波长范围内,生物物质会产生干扰背景荧光,同时硝酸纤维素膜也会产生很强的干扰背景荧光,因此,使用基于硝酸纤维素膜芯片片基和一般荧光染料标记的蛋白芯片检测灵敏度低,检测结果不够稳定。而结合近红外标记和硝酸纤维素膜,则具有低背景的优势,而且具有很高的信噪比,从而获得很高的检测灵敏度,大大提高检测灵敏度。

[0031] 本发明红外荧光信号是静态信号,信号不随时间变化,信号和目标蛋白浓度成比例关系,因此可以用于精确定量,并且操作简单,便于实现系统的自动化。另外由于红外荧光信号是静态信号,信号不随时间变化,反应完成后并不需要立即进行检测,因此检测过程容易把握,检测设备设计更简单,易于实现系统的自动化检测。而化学发光标记检测则对设

备的设计和制造要求更高。

附图说明

[0032] 图 1 为本发明实施例 1 所述的抗体阵列图示意图。

[0033] 图 2 为本发明实施例 1 所述的标准曲线图。

[0034] 图 3 为本发明实施例 2 所述的用红外荧光扫描仪读取蛋白芯片荧光强度示意图。

具体实施方式

[0035] 实施例 1：

[0036] 双抗体夹心法检测多种肿瘤标志物

[0037] 检测多种肿瘤标志物(包括 CA72-4、SCC、c-PSA、NSE、CA125、CK19、CA19-9、AFP、CEA、CA242、 β -HCG、CA15-3 等 12 种肿瘤标志物)

[0038] 1、红外荧光标记 12 种单克隆抗体

[0039] 12 种单克隆抗体(包括 CA72-4、SCC、c-PSA、NSE、CA125、CK19、CA19-9、AFP、CEA、CA242、 β -HCG、CA15-3) 分别用 PBS 透析,按照 7 μ LNHS 活化的琥珀酰亚胺酯 IRDye800 近红外荧光染料(美国 LI-COR 公司)标记 1mg 单克隆抗体的比例将抗体与荧光染料混合,再加入 1/10 体积的 1M NaHCO₃,混合均匀后室温避光反应 1 小时。反应结束后,将标记物置入孔径为 10K 透析袋中,用 PBS 4℃透析过夜,以去除游离的荧光染料。溶液中添加终浓度为 1M BSA 和 2mM 叠氮钠,2-8℃避光保存。

[0040] 2、蛋白芯片的制作

[0041] 固相载体:硝酸纤维素膜。

[0042] 固相载体上所用蛋白质:12 种具备检测活性的单克隆抗体(CA72-4、SCC、c-PSA、NSE、CA125、CK19、CA19-9、AFP、CEA、CA242、 β -HCG、CA15-3)。

[0043] 点样物为 A1,A2—CEA 抗体;B1,B2— β -HCG 抗体;C1,C2—CA72-4 抗体;D1,D2—CA15-3 抗体;E1,E2—c-PSA 抗体;F1,F2—CK19 抗体;A3,A4—AFP 抗体;B3,B4—CA19-9 抗体;C3,C4—CA242 抗体;D3,D4—CA125 抗体;E3,E4—NSE 抗体;F3,F4—SCC 抗体;具体点样方阵见表 1 所示。

[0044] 表 1

[0045] 抗体点阵分布表

[0046]

	A	B	C	D	E	F
1	CEA	β -HCG	CA72-4	CA15-3	c-PSA	CK19
2	CEA	β -HCG	CA72-4	CA15-3	c-PSA	CK19
3	AFP	CA19-9	CA242	CA125	NSE	SCC
4	AFP	CA19-9	CA242	CA125	NSE	SCC

[0047] 包被液:PH9.6 的 CBS (NaHCO₃-Na₂CO₃)。

[0048] 封闭液终浓度 :NaCl0.9%, Tris1.21%, Tween20 0.2%, 酪氨酸 0.1%, BSA5%, 蔗糖 4%, Proclin0.5%。制备步骤如下 :

[0049] (1) 将蛋白芯片上所要点制的蛋白质溶于包被液中, 然后用蛋白芯片自动点样系统(BioGrid Total Array System, BioRobotics 公司) 将这些蛋白质点制在固相载体的相应位置。

[0050] (2) 放置过夜。

[0051] (3) 用封闭液将蛋白芯片封闭冻干处理, 存储于 4 度

[0052] 3、蛋白芯片检测试剂盒操作步骤 (如下表 2 所示)

[0053] 表 2 蛋白芯片检测试剂盒的标准检测步骤

[0054]

步骤	操作
1. 试验前准备	A:标准品稀释: 1)、将标准品用 240 μ l 复溶剂复溶; 2)、其余一次从最高浓度标准品用标准品 0 往下对倍稀释, 共稀释成 6 个梯度。 3)、将定量质控品用 120 μ l 复溶剂复溶。 B:浓缩洗涤液用纯化水稀释 15 倍。
2. 加待测样本、标准品复溶液、定量质控品复溶液	各吸取 100 μ l, 加入不同的芯片表面。
3. 温育, 振荡	37 $^{\circ}$ C、100rpm 温育振荡 30 分钟。然后弃去芯片表面的液体。
4. 洗涤	将芯片放入洗盆中加入洗涤液, 37 $^{\circ}$ C、250rpm 温育振荡 8 分钟, 弃去洗涤液。共洗涤四次。
5. 加反应液	每个芯片表面各加入 100 μ l 反应液。
6. 温育, 振荡	同步骤 3。
7. 洗涤	剥离蛋白芯片集成块的上部, 后同步骤 4。
8. 阅读, 分析	将蛋白芯片集成块放入生物芯片阅读仪, 软件读取图象、作标准曲线、分析各被测样本的测试结果并打印数据报表。

[0055] 3.1 试验的质量控制

[0056] 3.1.1 读出与各标准品反应的芯片上对应于各肿瘤标志物的信号强度值(由美国 LI-COR 公司的 Odyssey 近红外成像系统读取)。

[0057] 3.1.2 对每个肿瘤标志物作校准曲线 :以标准品的肿瘤标志物浓度为横坐标(X), 以肿瘤标志物的信号强度(Sd)为纵坐标(Y), 在直角坐标上绘制校准曲线, 并求出回归方

程。

[0058] 3.1.3 根据与定量质控品反应的芯片上对应该肿瘤标志物的信号强度(Sd),在校准曲线上计算出质控品中该肿瘤标志物的含量。

[0059] 3.1.4 质控标准:当所计算的肿瘤标志物含量值处于定量质控品的标示浓度范围内,标准曲线 $r \geq 0.98$ 说明本品符合质量控制要求,所测数据可作为辅助诊断的依据。

[0060] 3.1.5 试验结果计算方法

[0061] 3.1.5.1 由美国 LI-COR 公司的 Odyssey 近红外成像系统读出与各被测样本反应的芯片上对应于各肿瘤标志物的信号强度值。

[0062] 3.1.5.2 在各校准曲线上根据被测样本的信号强度计算出被测样本中各抗原的含量。

[0063] 结果如下图,阳性样本与正常血样相比有强烈的信号,参照图 1,为 CEA 指标。

[0064] 加样表如下表 3

[0065] 表 3

[0066]

1 空白	2 阴性 对照	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8
标准品 0	1/32 标 准品	1/16 标 准品	1/8 标准 品	1/4 标准 品	1/2 标准 品	标准品	质控品

[0067] 制定图 2 所示的标准曲线

[0068] 按照蛋白芯片检测试剂盒的标准检测步骤,其中标准品中 CEA 浓度为 79.2ng/ml,标准品 0 中 CEA 浓度为 0.02ng/ml,定量质控品的标示浓度范围是(9.83-16.38ng/ml)。

[0069] 标准品对应检测结果如下表 4

[0070] 表 4

[0071]

浓度(ng/ml)	0.2	2.475	4.95	9.9	19.8	39.6	79.2
第一点信号	110	1010	2490	5010	8900	17500	34010
第二点信号	130	1230	2530	5090	9120	17720	34210
平均值	120	1120	2510	5050	9010	17610	34110

[0072] 质控标准:定量质控品检测信号为 6150,按照标准曲线计算浓度为 13.29ng/ml,而定量质控品的标示浓度范围是(9.83-16.38),标准曲线 $r \geq 0.98$ 说明本品符合质量控制要求,所测数据可作为辅助诊断的依据。

[0073] 检测临床样本

[0074] 取临床样本,检测信号。根据标准曲线计算样本中 CEA 的浓度。结果见表 5

[0075] 表 5

[0076]

样本编号	检测信号	浓度 (ng/ml)
1 空白	820	1.03
2 阴性对照	1550	2.71
3	3760	7.79
4	9460	20.90
5	28960	65.75
6	26860	60.92
7	49060	111.98
8	65660	150.16

[0077] 实施例 2 :间接法检测多种自身抗体

[0078] 一、红外荧光标记羊抗人 IgG 抗体

[0079] 羊抗人 IgG 抗体用 PBS 透析,按照 7 μ LNHS 活化的琥珀酰亚胺酯 IRDye800 近红外荧光染料(美国 LI-COR 公司)标记 1mg 抗体的比例将抗体与荧光染料混合,再加入 1/10 体积的 1M NaHCO₃,混合均匀后室温避光反应 1 小时。反应结束后,将标记物置入孔径为 10K 透析袋中,用 PBS4℃透析过夜,以去除游离的荧光染料。溶液中添加终浓度为 1M BSA 和 2mM 叠氮钠,2-8℃避光保存。

[0080] 二、蛋白芯片的制备

[0081] 固相载体:硝酸纤维素膜。固相载体上所用蛋白质:6 种具备检测活性的自身抗原(SSA、SSB、Sc1-70、Jo-1、Sm、RNP)。

[0082] 点样物为 A1, A2—SSA 抗原;A3, A4—SSB 抗原;B1, B2—Sc1-70 抗原;B3, B4—Jo-1 抗原;C1, C2—Sm 抗原;C3, C4—RNP 抗原;D1, D2—阳性对照;D3, D4—阴性对照。具体点样方阵见下表 6:

[0083] 表 6

[0084]

	A	B	C	D
1	SSA	Sc1-70	Sm	阳性对照
2	SSA	Sc1-70	Sm	阳性对照
3	SSB	Jo-1	RNP	阴性对照
4	SSB	Jo-1	RNP	阴性对照

[0085] 包被液 :PH9.6 的 CBS ($\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$).

[0086] 封闭液终浓度 :NaCl0.9%, Tris1.21%, Tween200.2%, 酪氨酸 0.1%, BSA5%, 蔗糖 4%, Proclin0.5%。具体步骤如下 :

[0087] (1) 将蛋白芯片上所要点制的蛋白质溶于包被液中, 然后用蛋白芯片自动点样系统(BioGrid Total Array System, BioRobotics 公司) 将这些蛋白质点制在固相载体的相应位置。

[0088] (2) 放置过夜。

[0089] (3) 用封闭液将蛋白芯片封闭冻干处理, 存储于 4 度

[0090] 三、蛋白芯片的检测

[0091] (1) 样本稀释液 :同封闭液 ;

[0092] (2) 用样本稀释液将待测样本稀释 100 倍 ;

[0093] (3) 吸取稀释后的样本, 取 $100\ \mu\text{l}$ 的体积滴加到蛋白芯片表面, 在 100 转 / 分钟的频率和 37 摄氏度下振摇 30 分钟, 使样本中的自身抗体与固定于蛋白芯片上的抗原起反应, 形成抗原 - 抗体复合物 ;

[0094] (4) 吸干反应液, 将蛋白芯片放在洗涤液中振摇洗涤 8 分钟, 重复四次。

[0095] (5) 吸取一标记荧光染料的羊抗人 IgG, 取 $100\ \mu\text{l}$ 的体积滴加到蛋白芯片表面, 在 100 转 / 分钟的频率和 37 摄氏度下振摇 30 分钟, 形成稳定的三聚物抗原 - 抗体 - 抗抗体 (荧光染料) 复合物。

[0096] (6) 吸干反应液, 将蛋白芯片放在洗涤液中振摇洗涤 8 分钟, 重复四次。

[0097] (7) 晾干芯片, 用红外荧光扫描仪读取蛋白芯片荧光强度。

[0098] 结果如图 3, 阳性样本在 A3、A4 处与正常血样相比有强烈的信号, 为 SSB 指标。

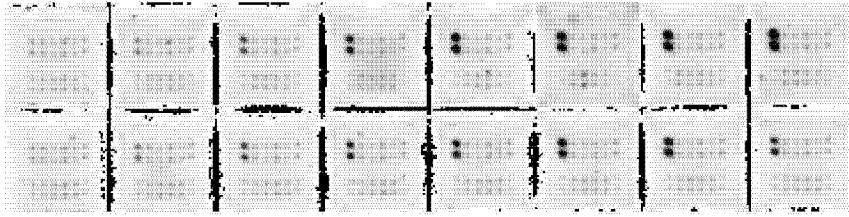


图 1

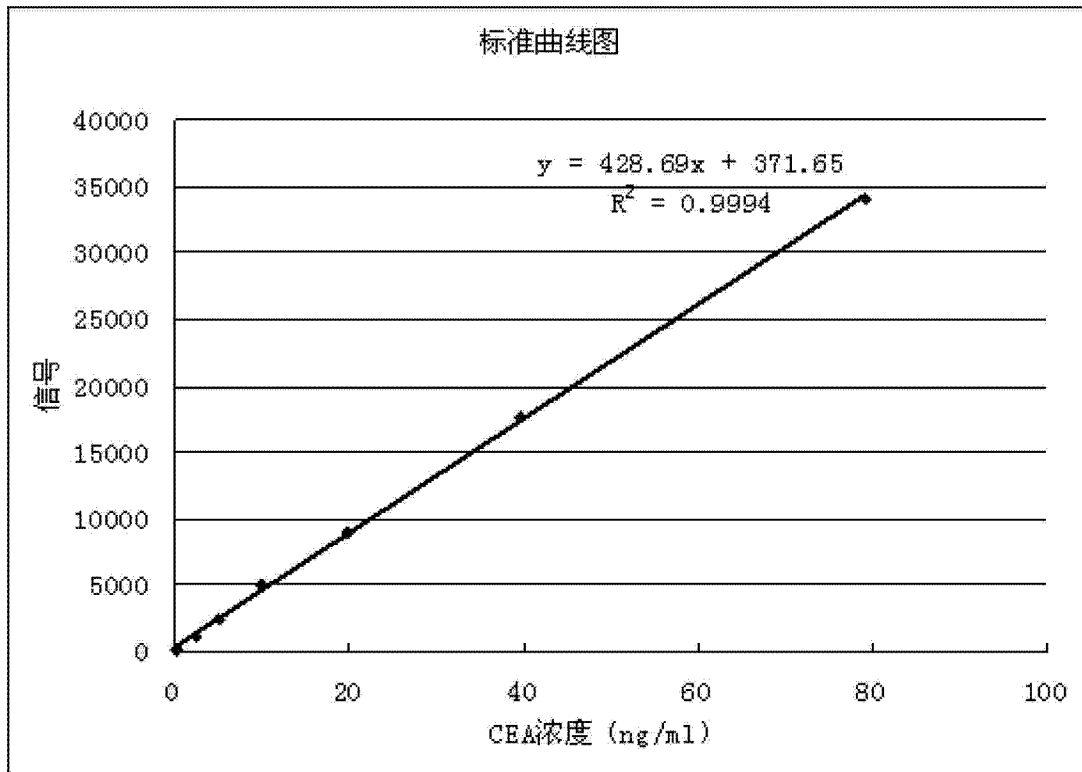


图 2

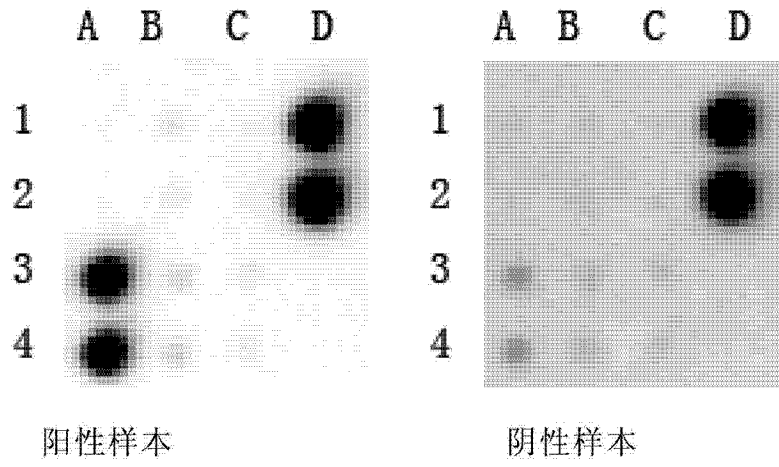


图 3

专利名称(译)	一种多指标并行检测蛋白芯片检测试剂盒、制备方法及检测方法		
公开(公告)号	CN104122398A	公开(公告)日	2014-10-29
申请号	CN201310157055.9	申请日	2013-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海铭源数康生物芯片有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海铭源数康生物芯片有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海铭源数康生物芯片有限公司		
[标]发明人	朱跃为 柳飞舟 季海鹏 喻长杰		
发明人	朱跃为 柳飞舟 季海鹏 喻长杰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N21/6402 G01N33/533 G01N33/57484 G01N2800/7028		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于硝酸纤维素膜和近红外荧光分子标记的多指标并行检测的蛋白芯片检测试剂盒，其包括：一微阵列蛋白芯片，所述微阵列蛋白芯片是以硝酸纤维素膜为固相基片，在该固相基片上的不同区域固定有不同的第一蛋白质而形成，每一第一蛋白质均能与体内的疾病标志物特异性结合，形成免疫复合物；以近红外荧光素分子标记第二种能与所述免疫复合物特异性结合的第二蛋白质，该第二蛋白质与所述免疫复合物形成标记免疫复合物。本发明近红外荧光信号是静态信号，信号不随时间变化，信号和目标蛋白浓度成比例关系，因此可以用于精确定量，并且操作简单，便于实现系统的自动化。本发明还公开了该蛋白芯片检测试剂盒的制备方法和检测方法。

标准曲线图

