



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310108819.1

[43] 公开日 2004 年 11 月 10 日

[11] 公开号 CN 1544943A

[22] 申请日 2003.11.21

[21] 申请号 200310108819.1

[71] 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区学
源街

[72] 发明人 赵国瑞 叶邦策 王兰州 方志刚
朴美花

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 韩介梅

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称 一种制备抗体芯片的方法

[57] 摘要

本发明的制备抗体芯片的方法，针对在抗体芯片制作中叠氮钠对醛基化玻片表面上的抗体分子中的伯氨基与玻片表面醛基 Schiff 键形成有干扰作用，而增加标记抗体透析，有效去除荧光抗体溶液中所添加的防腐剂叠氮钠，提高抗体芯片检测灵敏度。并设计出一种抗体点样模式，对荧光标记、阳、阴性对照的序列进行了优化。第一列为 FITC 标记的 IgG 对照点样。这种点样模式有利于对扫描图象的分析，根据荧光标记可以很快找到检测信号的位置和抗原类型。最后第二列为阳性标本对照点样，最后一列为阴性对照点样，这样在用激光共聚焦扫描时，阴性对照的点样荧光强度不会受到荧光标志的影响，从而提高抗体芯片检测的特异性。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种制备抗体芯片的方法，其特征在于包括以下操作步骤：

(1) 荧光抗体蛋白的纯化、鉴定

纯化：将荧光抗体蛋白装入透析袋中，并移入 0.01M pH7.2 的磷酸盐缓冲液中透析，直到透析液在 OD_{495nm} 中的吸光值接近零为止；

鉴定：用紫外分光光度计测定荧光标记抗体的 OD_{495nm} ，若其吸光值接近零，表明叠氮钠透析完全；

(2) 载玻片的预处理

将玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗；双蒸水冲洗，晾干；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，晾干；

(3) 点样

抗体芯片的制作采用标准玻片为载体，把待点样的蛋白溶于 40% 的甘油，60% 的 PBS，PBS 的 pH 值为 7.5，终浓度为 100 $\mu g/ml$ ，然后用 Cartesian 机器人点样，将倍比稀释的抗体在醛基化玻片上逐行点样，斑点间距 0.25mm，每点 10nl，其中，第一列为 FITC 标记的 IgG 对照点样，最后第二列为阳性标本对照点样，每个探针点样重复数次，最后一列为阴性对照点样，放置 4℃ 冰箱内 3h，晾干后再用 10% 的小牛血清，溶于 0.01 mol/L，pH 7.2 的 PBS，室温封闭 1.5h，用 0.01mol/L，pH7.2，0.05% Tween20 的 PBST 冲洗数次，10 秒/次，晾干，备用；

(4) 目的蛋白的检测

阳性标本用 5% 的小牛血清，溶于 0.01 mol/L，pH 7.2 的 PBS，稀释液稀释 10 倍，加入玻片中，37℃ 孵育 1h，用 0.01mol/L，pH7.2，0.9% NaCl 的 PBS 冲洗数次，晾干，在玻片上加稀释的荧光抗体，37℃ 孵育 1h，再用 0.01mol/L，pH8.2，0.9% NaCl 0.05% Tween20 的 PBST 冲洗数次，晾干；

(5) 激光共聚焦扫描

上述玻片用 Scan Array Lite 型激光共聚焦扫描成像，图像用专业分析软件定量分析即可。

2. 根据权利要求 1 所述的制备抗体芯片的方法，其特征在于所说的 Scan Array Lite 型激光共聚焦扫描激光强度设定为 60%-95%，光电倍增管强度设定为 70-80%，扫描分辨率为 5-10 μm ，激发及检测波长分别为 500nm，520nm。

一种制备抗体芯片的方法

技术领域

本发明涉及生物医学领域，具体涉及蛋白质芯片，尤其是用于免疫学分析的抗体芯片制备方法。

背景技术

蛋白质芯片 (Protein Microarray) 也叫蛋白质微阵列，其原理是对固相载体进行特殊的化学处理，再将已知的蛋白分子固定其上，(如抗体、抗原、酶、细胞因子等)，利用蛋白质与蛋白质，酶与底物，蛋白质与其他小分子之间的相互作用，检测分析蛋白质，从而获得重要的生命信息。蛋白质检测微阵列能够在同一生物学样本中同时检测多种蛋白质的水平，因此可作为一种分析工具。

目前，制备蛋白质芯片的载体有三种类型，分别为玻片 (glass slide); 多孔凝胶垫 (porous gel pad slides); 微孔 (Microwells)。在载玻片表面构建蛋白质微阵列的优势在于此方法可以制备标准的微阵列，并用基因芯片扫描仪来扫描，获取结果。根据蛋白质的特性，用蛋白质的氨基端 NH_2 固定在经醛基处理的玻片上，这样就可以在玻片上进行抗原抗体反应。为蛋白芯片能象 DNA 芯片简单，准确、快速平行，高通量的操作提供前提条件。

抗体芯片 (Antibody Microarray) 是蛋白质芯片的一种主要类型，最新发展的抗体芯片技术的原理类似于常规的酶联免疫反应，即将特异性抗体或抗原固定在载体上，待测样本按一定的比例稀释后与载体上的抗体或抗原进行反应，再加入荧光标记的抗体或抗原，通过激光共聚焦扫描仪或 CCD 相机读取荧光强度，由计算机软件对荧光信号进行分析，得到准确的定性结果或定量数据。因为在一张蛋白质芯片上可分布上千甚至数万的抗体或抗原，阵列并能标记多种荧光素，通过荧光强度分析蛋白质与蛋白质之间相互作用的关系，由此达到测定各种蛋白质功能的目的。使得这些免疫学指标能同时被快速检测。

(一) 抗体蛋白在玻片上的固定要点

由于生物芯片采用发光检测方法，玻璃芯片具有良好的透射及反射光学性能，所以在制作生物芯片时，玻璃片是最常用的载体材料，其表面活性基团主要为羟基，要固定生物分子，玻片表面必须经过氨基化，醛基化处理，即活化表面的活性基团。氨基硅烷活化玻片载体化学式见图 1，氨基化玻片固定蛋白质的化学式见图 2。

同型双功能交联剂戊二醛的两个醛基可以分别与两个相同或不同分子的伯氨基形成 Schiff 碱，将两分子以五碳链的桥连接起来。戊二醛连接反应是最温和的交联反应之一，可在 4-10℃ 温度范围 pH6.0-8.0 的缓冲水溶液中进行，但是缓冲组份中不得含有氨基化合物。

（二）抗体溶液中所添加的防腐剂叠氮钠对抗体分子在玻片上固定的干扰作用。

无论是纯化的抗体，还是标记抗体，在实验室内的保存条件和方法对维持其效价十分重要。保存方法不当，可使抗体腐败变质、杂菌污染或混入其他杂质而失去应用价值。由于抗体本身是大分子蛋白，因此，在抗体的保存和运输过程中，一定要注意避免蛋白质的变性问题，即杂菌污染，腐败变质，过度的高温，或极端 pH 值的出现。所以，抗体溶液中常加入防腐剂保存。

常用于抗体保存的防腐剂有叠氮钠(0.1%-0.01%浓度)、硫柳汞(0.01%浓度)。抗体及标记抗体加入防腐剂后可放入 4℃ 普通冰箱保存，保存期约 1 年。NaN₃ 是最常用于抗体保存的防腐剂，但 NaN₃ 除了对荧光素(异硫氰酸荧光素)有淬灭作用外，更关键的是：在蛋白质芯片制作中，NaN₃ 还对点样于玻片表面上的抗体分子中的伯氨基与玻片表面的醛基 Schiff 键的形成有干扰作用。对于第一点，已有文献阐明，但对于第二点，未见文献报道，也常为实验人员忽略。

在蛋白质芯片的制作中荧光抗体是必用试剂，无论实验人员向生物技术公司购买现成的，或自行制备，但为了保存抗体的长时间的生物活性，叠氮钠(0.1%-0.01%浓度) 必须添加于抗体溶液中，由于叠氮钠使用浓度甚低(0.1%-0.01%浓度)，实验人员常常没意识到或忽略了叠氮钠对玻片表面上的抗体分子中的伯氨基与玻片表面的醛基 Schiff 键形成的干扰作用，其后果是：用激光共聚焦扫描的各点上的荧光强度会相对减弱，从而减低了检测灵敏度。所以，在蛋白质芯片制作中，用于荧光抗体保存的防腐剂叠氮钠必须去除。

（三）抗体固定模式对检测结果的影响

抗体芯片的制作采用标准玻片为支撑物。该标准玻片长 76.2mm，宽 25.4mm，在玻片的一段可以留有标签的位置。芯片探针区域一般在玻片的中央，其大小视探针数量和探针之间的间距而定。若采取中密度点样技术，其点样区域可在 0.5 至 1cm² 之间。但不同的点样固定的格式对检测结果的判断有明显的影响，为了便于对扫描图象的分析，在各抗体之间加点荧光标志，这样可以根据荧光标记很快找到检测信号的位置和抗原类型。我们在实验中发现，若把 FITC 标记的 IgG 作为荧光标志，按常规点样在最后一例，而把阴性对照点样在最后第二例，阳性对照点样在最后第三例，用激光共聚焦扫描，阴性对照的点样荧光强度会

受最后一例荧光标志的影响，用相应的芯片分析软件分析，荧光强度数值会少量上升，从而提高本底，减低检测灵敏度，严重的会造成检测结果的误判。

发明内容

本发明的目的是提供一种抗体芯片制作方法，以有效去除防腐剂的干扰作用，提高检测结果的灵敏度，特异性。

本发明的制备抗体芯片的方法，包括以下操作步骤：

(1) 荧光抗体蛋白的纯化、鉴定

纯化：将荧光抗体蛋白装入透析袋中，并移入 0.01M pH7.2 的磷酸盐缓冲液中透析，直到透析液在 OD_{495nm} 中的吸光值接近零为止；

鉴定：用紫外分光光度计测定荧光标记抗体的 OD_{495nm} ，若其吸光值接近零，表明叠氮钠透析完全；

(2) 载玻片的预处理

将玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗；双蒸水冲洗，晾干；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，晾干；

(3) 点样

抗体芯片的制作采用标准玻片为载体，把待点样的蛋白溶于 40% 的甘油，60% 的 PBS，PBS 的 pH 值为 7.5，终浓度为 $100\mu g/ml$ ，然后用 Cartesian 机器人点样，将倍比稀释的抗体在醛基化玻片上逐行点样，斑点间距 0.25mm，每点 10nl，其中，第一列为 FITC 标记的 IgG 对照点样，最后第二列为阳性标本对照点样，每个探针点样重复数次，最后一列为阴性对照点样（见图 3 模式），放置 4℃ 冰箱内 3h，晾干后再用 10% 的小牛血清，溶于 0.01 mol/L，pH 7.2 的 PBS，室温封闭 1.5h，用 0.01mol/L，pH7.2，0.05% Tween20 的 PBST 冲洗数次，10 秒/次，晾干，备用；

(4) 目的蛋白的检测

阳性标本用 5% 的小牛血清，溶于 0.01 mol/L，pH 7.2 的 PBS，稀释液稀释 10 倍，加入玻片中，37℃ 孵育 1h，用 0.01mol/L，pH7.2，0.9% NaCl 的 PBS 冲洗数次，晾干，在玻片上加稀释的荧光抗体，37℃ 孵育 1h，再用 0.01mol/L，pH8.2，0.9% NaCl 0.05% Tween20 的 PBST 冲洗数次，晾干；

(5) 激光共聚焦扫描

上述玻片用 Scan Array Lite 型激光共聚焦扫描成像，图像用专业分析软

件定量分析即可。

通常, can Array Lite 型激光共聚焦扫描激光强度设定为 60%-95%, 光电倍增管强度设定为 70-80%, 扫描分辨率为 5-10 μm , 激发及检测波长分别为 500nm, 520nm。

本发明与现有技术相比, 其有益效果有:

本发明在制备抗体芯片的方法中, 由于增加标记抗体的透析这一步, 因此能有效地去除荧光抗体溶液中所添加的防腐剂叠氮钠, 消除叠氮钠对点样于玻片表面上的抗体分子中的伯氨基与玻片表面的醛基 Schiff 键的形成的干扰作用, 提高了抗体芯片检测灵敏度。

设计出一种抗体固定点样模式, 对荧光标记、阳、阴性对照各列的序列进行了优化。第一列为 FITC 标记的 IgG 对照点样, 每个探针重复点样数次, 这样根据荧光标记可以很快找到检测信号的位置和抗原类型, 减少点样的误差; 同时这种模式的固定有利于对扫描图象的分析。对荧光标记、阳、阴性对照点样中, 第一列为 FITC 标记的 IgG 对照点样, 最后第二列为阳性标本对照点样, 最后一列为阴性对照点样, 这样在用激光共聚焦扫描时, 阴性对照点样荧光的分析, 荧光强度不会受最后一列荧光标记的影响, 提高了实验的真实性, 增加抗体芯片检测的灵敏度, 特异性。

附图说明

图 1 是氨基硅烷活化玻片载体化学反应式;

图 2 是氨基化玻片固定蛋白质的化学反应式;

图 3 是抗体芯片的探针固定格式图;

图 4 是用抗体芯片检测血清中 HBsAg 的激光共聚焦扫描 (扫描仪的激光强度设定为 65%, 第一列荧光抗体 (FITC-IgG), 最后第二列阳性对照, 最后一列阴性对照);

图 5 是用抗体芯片检测血清中 HBsAg 的激光共聚焦扫描 (扫描仪的激光强度设定为 90%, 第一列荧光抗体 (FITC-IgG), 最后第二列阳性对照, 最后一列阴性对照)。

具体实施实例

以制备检测血清中乙肝表面抗原抗体芯片为例, 制备方法包括以下步骤:

(1) 荧光抗体蛋白的纯化、鉴定

纯化: 将荧光抗体蛋白装入透析袋移入 0.01MpH7.2 的磷酸盐缓冲液中透析, 每天换液 3 次, 直到透析液在 $OD_{495\text{nm}}$ 中的吸光值接近零为止。一般, 经过透袋

内渗透标记的荧光抗体比较均匀，过量结合的抗体较少，可以不通过离子交换层析法进一步纯化。

鉴定：用紫外分光光度计测定荧光标记抗体的 OD_{495nm} 其吸光值为 0.01。表明叠氮钠透析完全。

(2) 载玻片的预处理

将玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗；双蒸水冲洗，晾干。然后将上述清洗后的玻片浸入 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, PBS (pH7.2) 溶液中，室温作用 2h, PBS 冲洗，晾干。

(3) 点样

把待点样的抗 HBsAg_{S₁} 单抗溶于 40% 的甘油，60% 的 PBS, PBS 的 pH 值为 7.5，终浓度为 100 μ g/ml，用 Cartesian 机器人将倍比稀释的抗 HBsAg_{S₁} 单抗在处理好的载玻片上高速点样，每点 10nl，最后一例为 1mg/ml BSA 对照点样，放置 4℃ 冰箱内 3h，晾干后再用 10% 的小牛血清 PBS (0.01 mol/L 磷酸盐，pH 7.2, 0.9% NaCl) 室温封闭 1.5h。用 PBST (0.01mol/L 磷酸盐，pH7.2, 0.9% NaCl 0.05% Tween20) 冲洗 8 次，10 秒/次，晾干，备用。

(4) 目的蛋白的检测

HBsAg 阳性血清标本用 5% 的小牛血清 PBS (0.01 mol/L 磷酸盐，pH 7.2, 0.9% NaCl) 稀释液稀释，加入载玻片中，37℃ 孵育 1h，用 PBS (0.01mol/L 磷酸盐，pH7.2, 0.9% NaCl) 冲洗 10 次，晾干。在载玻片上加 1:50 稀释的荧光抗体 (FITC- monoclonal anti-HBsAg_{S₂} antibody)，37℃ 孵育 1h，用 PBST (0.01mol/L 磷酸盐，pH8.2, 0.9% NaCl 0.05% Tween20) 冲洗 10 次，晾干。

(5) 激光共聚焦扫描

用 Scan Array Lite 型激光共聚焦扫描成像，扫描仪的激光强度分别设定为 65%，90%，光电倍增管强度设定为 80%。扫描分辨率为 10 μ m，激发及检测波长分别为 500nm, 520nm。

图 4 所显示的是所制得的检测血清中乙肝表面抗原抗体芯片的阳性血清标本的激光共聚焦扫描图，第一例为荧光抗体 (FITC-IgG) 对照，第二例样品中阳性血清 HBsAg 的浓度为 10ng/ml，第三例样品中阳性血清 HBsAg 的浓度为 5ng/ml 最后第二例为阳性对照 HBsAg 的浓度为 1ng/ml 点样，最后一例为 HBsAg 阴性血清标本对照。图 5 所显示的是用抗体芯片检测血清中 HBsAg 的激光共聚焦扫描图。第一例为荧光抗体 (FITC-IgG) 对照，第二例样品中阳性血清 HBsAg 的浓

度为 10ng/ml，第三例样品中阳性血清 HBsAg 的浓度为 5ng/ml 最后第二例为阳性对照 HBsAg 的浓度为 1ng/ml 点样，最后一例为 HBsAg 阴性血清标本对照。

从图 4、图 5 可见，荧光强度与血清 HBsAg 浓度成逐例递减关系。图 4-5 显示：第一行为 FITC 标记的 IgG 对照点样，最后第二例为阳性标本对照点样，每个探针点样重复 5 次，最后一例为阴性对照点样，这种抗体固定点样模式，阴性对照的点样荧光强度不会受最后荧光标志的影响，从而提高了本底的真实性，提高了抗体芯片检测特异性，同时可以根据荧光标记很快找到检测信号的位置和抗原类型。在芯片中加入阳性对照，若在检测时该信号呈阴性，提示检测操作有问题或抗体蛋白发生变性。在芯片中加入阴性对照，在检测时该信号的荧光强度代表实验中本底值的大小。

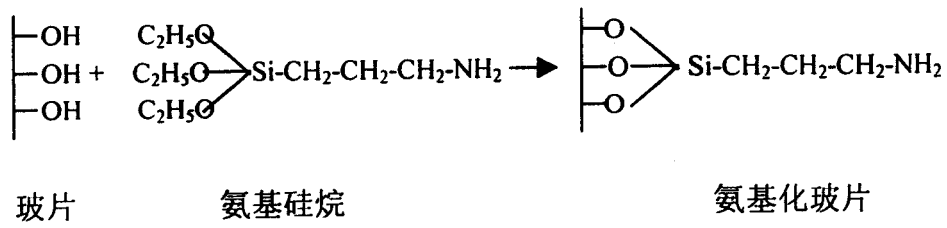


图 1

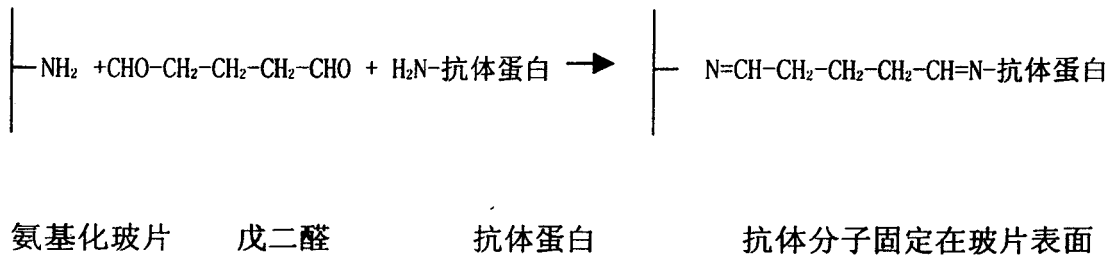


图 2

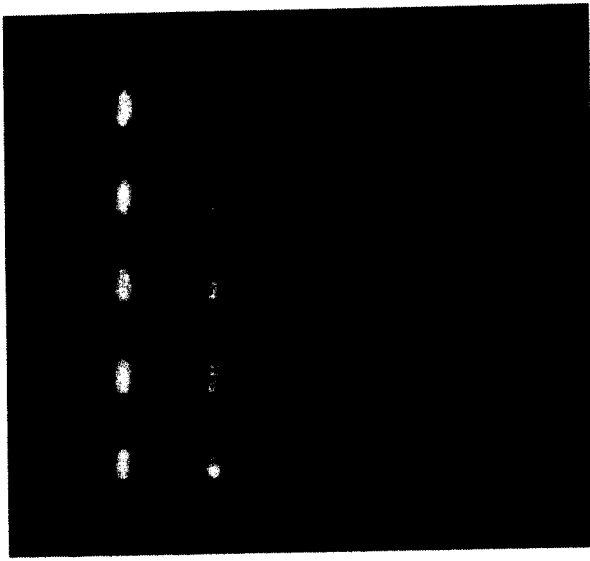


图 4

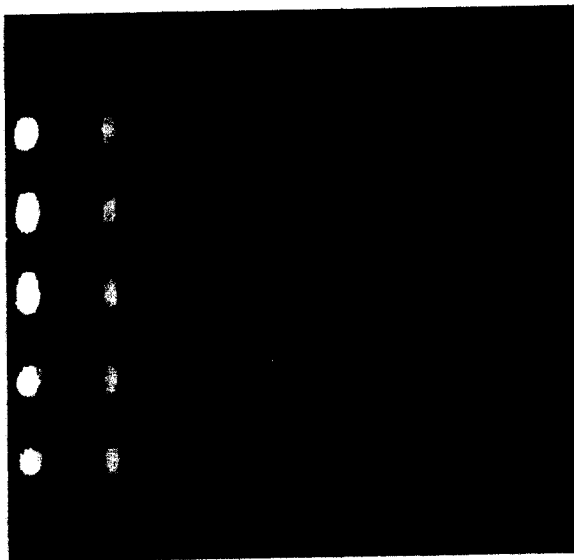


图 5

专利名称(译)	一种制备抗体芯片的方法		
公开(公告)号	CN1544943A	公开(公告)日	2004-11-10
申请号	CN200310108819.1	申请日	2003-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
[标]发明人	赵国瑞 叶邦策 王兰州 方志刚 朴美花		
发明人	赵国瑞 叶邦策 王兰州 方志刚 朴美花		
IPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的制备抗体芯片的方法，针对在抗体芯片制作中叠氮钠对醛基化玻片表面上的抗体分子中的伯氨基与玻片表面醛基Schiff键形成有干扰作用，而增加标记抗体透析，有效去除荧光抗体溶液中所添加的防腐剂叠氮钠，提高抗体芯片检测灵敏度。并设计出一种抗体点样模式，对荧光标记、阳、阴性对照的序列进行了优化。第一列为FITC标记的IgG对照点样。这种点样模式有利于对扫描图象的分析，根据荧光标记可以很快找到检测信号的位置和抗原类型。最后第二列为阳性标本对照点样，最后一列为阴性对照点样，这样在用激光共聚焦扫描时，阴性对照的点样荧光强度不会受到荧光标志的影响，从而提高抗体芯片检测的特异性。

