



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101226192 B

(45) 授权公告日 2011.08.31

(21) 申请号 200810014143.2

(56) 对比文件

(22) 申请日 2008.02.03

WO 2006003022 A2, 2006.01.12, 全文.

CN 1384210 A, 2002.12.11, 全文.

(73) 专利权人 山东省医药生物技术研究中心
地址 250062 山东省济南市历下区经十路
89号

审查员 杨冀川

(72) 发明人 高雪芹 王国强 韩金祥

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

代理人 李健康

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

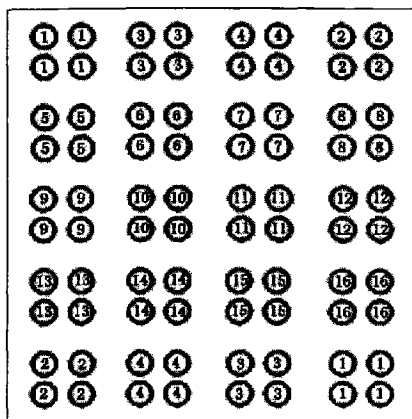
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

(54) 发明名称

以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片及其在自身抗体检测中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片,由基片和阵列涂布于其上的 12 种抗原以及阴性对照、阳性对照、空白对照制成,其中:所述基片是 APES 修饰的玻片;所述 12 种抗原的种类及其点样浓度为 ANA :520 μg/ml, Ro-60/SSa :465 μg/ml, La/SSb :530 μg/ml, Jo-1 :530 μg/ml, Scl-70 :525 μg/ml, Sm :520 μg/ml, Ro-52/SSa :615 μg/ml, RF :340 μg/ml, CCP :465 μg/ml, u1RNP :410 μg/ml, CENP-B :490 μg/ml, dsDNA :580 μg/ml。本发明用 BCIP/NBT 为底物的碱性磷酸酶显色法作为蛋白芯片的终点检测信号能广泛应用于自身抗体检测,检测灵敏度与目前的检测方法相比有较高的符合率,但检测成本和时间明显缩短。本发明的技术体系还能适用于临床检测,卫生监督,海关检疫及科研等领域。



1. 一种以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片,由基片和阵列涂布于其上的 12 种抗原以及阴性对照、阳性对照、空白对照制成,其特征在于:所述基片是 APES 修饰的玻片;所述 12 种抗原的种类及其点样浓度为 ANA :520 μ g/ml, Ro-60/SSa :465 μ g/ml, La/SSb :530 μ g/ml, Jo-1 :530 μ g/ml, Scl-70 :525 μ g/ml, Sm :520 μ g/ml, Ro-52/SSa :615 μ g/ml, RF :340 μ g/ml, CCP :465 μ g/ml, u1RNP :410 μ g/ml, CENP-B :490 μ g/ml, dsDNA :580 μ g/ml ;所述阴性对照为 5 μ g/ml Human IgG ;所述阳性对照为 250 μ g/ml Human IgG ;所述空白对照为含 0.1% Tween20 的 TBST。

2. 权利要求 1 所述以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片在自身抗体检测中的应用。

3. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在于:所述芯片应用方法是以 BCIP/NBT 为底物的碱性磷酸酶显色法作为蛋白芯片的终点检测信号。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的应用,其特征在于:所述芯片应用方法是将制备好的蛋白芯片经 37 $^{\circ}$ C 温育 1h、37 $^{\circ}$ C 封闭 30min、37 $^{\circ}$ C 与血清反应 30min、37 $^{\circ}$ C 与碱性磷酸酶标记的二抗反应 30min、BCIP/NBT 显色 20 ~ 30min,用扫描仪扫描图像,TotalLab 软件进行灰度分析、以同一芯片相应区域的阴性、阳性对照的灰度值作为阴性和阳性的 Cutoff 值对结果判读。

5. 如权利要求 4 所述的应用,其特征在于:所述扫描仪采用 UMAX PowerLook III 扫描仪。

以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片及其在自身抗体检测中的应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白芯片及其应用,尤其是及一种以 BCIP/NBT 为底物的碱性磷酸酶显色蛋白芯片及其在自身抗体检测中的应用;属生物芯片和诊断试剂等技术领域。

(二) 背景技术

[0002] 自身免疫性疾病(AID)可累及多器官、多系统,对患者造成的危害极大。近年来,AID的发病率呈明显上升,约占世界总人口的3%~5%,我国患者约超过12000万。自身抗体的出现是AID最重要的特征,自身抗体的检测不仅对AID的早期诊断具有重要作用,而且在疾病分型、判断预后和治疗效果监测等多方面具有重要的意义。

[0003] 目前临床上开展的自身抗体检测方法主要有间接免疫荧光法、酶联免疫吸附法、免疫印迹法、免疫斑点法、免疫沉淀法等,其中多数检测方法仍以手工操作为主,检测程序较复杂,且多数检测方法不能同时检测多种自身抗体,检测结果受到检测方法、试剂、仪器及实验人员的经验等诸多因素的影响;因此,临床迫切需要一种操作简便,快速可靠,能同时检测多种自身抗体的新方法。

[0004] 蛋白芯片具有的高通量、平行检测、自动化等优点,为简便、快速、同时检测多种自身抗体的解决带来了希望。目前国外Zeus公司等已经构建了包括10种自身抗原的蛋白芯片,且在自身免疫疾病中的检测中结果与传统方法的结果相似,国内也有相关方面的研究,但是蛋白芯片的检测均是采用荧光检测的方法。该方法虽然灵敏度好,但需要专用的扫描仪,对于基层的检验单位却难以全面实现,使应用受到了限制。

[0005] NBT/BCIP显色方法是一种常用的、稳定的检测系统,底物反应产物呈蓝色或紫色,既可定性又可定量,作为终点检测系统广泛的应用在免疫组织化学、原位杂交、Western

[0006] blot等检测中,在实验室和临床上应用广泛。然而,经检索NBT/BCIP显色方法在蛋白芯片中的应用至今国内外还没有相关的报道,因此,有必要将这种常用的检测方法和新的蛋白芯片技术体系结合,开发更适用于不同级别临床检测需要的简便、快速、同时检测多种抗体或抗原的蛋白芯片。

(三) 发明内容:

[0007] 针对现有技术的不足和临床诊断的实际需要,本发明要解决的问题是提供一种以BCIP/NBT为底物的显色蛋白芯片及其在自身抗体检测中的应用。

[0008] 本发明所述以BCIP/NBT为底物的显色蛋白芯片,由基片和阵列涂布于其上的12种抗原以及阴性对照、阳性对照、空白对照制成,其特征在于:所述基片是APES修饰的玻璃片;所述12种抗原的种类及其点样浓度为ANA:520 μ g/ml, Ro-60/SSa:465 μ g/ml, La/SSb:530 μ g/ml, Jo-1:530 μ g/ml, Scl-70:525 μ g/ml, Sm:520 μ g/ml, Ro-52/SSa:615 μ g/ml, RF:340 μ g/ml, CCP:465 μ g/ml, u1RNP:410 μ g/ml, CENP-B:490 μ g/ml, dsDNA:580 μ g/ml;所述阴性对照为5 μ g/ml Human IgG;所述阳性对照为250 μ g/ml Human IgG;所述空白

对照为含 0.1% Tween20 的 TBST ;所述阵列布局如图 1 所示。

[0009] 本发明所述以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片在自身抗体检测中的应用。

[0010] 其中 :所述芯片应用方法是以 BCIP/NBT 为底物的碱性磷酸酶显色法作为蛋白芯片的终点检测信号。

[0011] 进一步的 :所述芯片应用方法是将制备好的蛋白芯片经 37℃ 温育 1h、37℃ 封闭 30min、37℃ 与血清反应 30min、37℃ 与碱性磷酸酶标记的二抗反应 30min、BCIP/NBT 显色 20 ~ 30min,用扫描仪扫描图像,TotalLab 软件进行灰度分析、以同一芯片相应区域的阴性、阳性对照的灰度值作为阴性和阳性的 Cutoff 值对结果判读。

[0012] 其中 :所述扫描仪优选采用 UMAX PowerLookIII 扫描仪。

[0013] 本发明的显色反应蛋白芯片能同时检测多种自身免疫性抗体,包括定性和定量检测,极适用于基层的临床检测应用。应用本发明所述的显色反应蛋白芯片技术体系能进一步研究开发包括检测其他抗体、抗原及其他蛋白的蛋白芯片及相应的应用。

[0014] 试验结果显示 :本发明的显色蛋白芯片检测结果与临床检测结果无显著性差异,两者具有较高的符合率。说明采用以 BCIP/NBT 为底物的碱性磷酸酶显色法作为终点信号的检测是可行的。建立的显色反应蛋白芯片技术体系与现有的蛋白芯片技术相比,具有检测成本低、易于向基层推广等优点,且该显色蛋白芯片具有较高的敏感性和特异性,是一种具有广泛应用前景的技术体系。适用于临床检测,卫生监督,海关检疫及科研等广泛的领域。

(四) 附图说明

[0015] 图 1 为本发明的蛋白芯片阵列分布图,

[0016] 其中 1 为阳性对照 1 ;2 为阳性对照 2 ;3 为阴性对照 ;4 为空白对照 ;5 ~ 16 依次为抗原 ANA、Ro-60/SSa、La/SSb、Jo-1、Scl-70、Sm、Ro-52/SSa、RF、CCP、u1RNP、CENP-B 和 dsDNA。

[0017] 图 2 为点样液优化阵列分布图,

[0018] 从左到右 :A ~ F 依次为含 0.1%、0.02%、0.04%、0.1%、0.2%、0.4% Tween20 的 TBST ;

[0019] 从上到下 :① PC ;② NC ;③ BC ;④ ~ ⑩ 为抗原的浓度梯度,依次为 50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml、300 μ g/ml、500 μ g/ml、750 μ g/ml、1000 μ g/ml ; 其中, I 为 HumanIgG, II ~ VI 为单种抗原。

[0020] 图 3 为芯片抗原浓度、阳性对照优化阵列分布图,

[0021] 其中 A1 ~ A9 为 Human IgG,浓度依次为 5、20、50、100、200、300、500、750、1000 μ g/ml ;B1 ~ B9 :为分别优化的 12 种抗原,浓度依次为 5、20、50、100、200、300、500、750、1000 μ g/ml。

[0022] 图 4 为芯片阴性对照优化阵列分布图,

[0023] 其中 A1 ~ A6 为 Human IgG,浓度依次为 5、10、20、50、100、200 μ g/ml ;B1 ~ B6 : ANA、Ro-60/SSa、La/SSb、Jo-1、Scl-70、Sm ;C1 ~ C6 :Ro-52/SSa、RF、CCP、u1RNP、CENP-B、dsDNA。

[0024] 图 5 为 12 种抗原的点样液优化结果 (血清稀释度 1 : 4) 扫描图像。

[0025] 图 6 为 Human IgG 和 12 种抗原浓度 - 灰度线性关系拟合结果。

[0026] 图 7 为抗原浓度和阳性 Cutoff 值确定法示意图。

[0027] 图 8 为芯片对 SLE(A)、RA(B) 和 MCTD(C) 各一例患者血清样本检测结果，

[0028] 其中 A :ANA、抗 Ro-60/SSa 抗体、抗 Ro-52/SSa 抗体、抗 u1RNP 抗体阳性，抗 Sm 抗体、抗 dsDNA 抗体弱阳性；B :RF、抗 CCP 抗体阳性，ANA 弱阳性；C :ANA、抗 u1RNP 抗体阳性，抗 Ro-60/SSa 抗体、抗 Ro-52/SSa 抗体弱阳性。

(五) 具体实施方式

[0029] 实施例 1 以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片

[0030] 1. APES 修饰基片的制备①将玻片清洗甩干后，强碱 (10M NaOH) 浸泡 24 小时；②用去离子水冲洗 3 次，每次 10 分钟，再入强酸 (浓盐酸) 中浸泡 24 小时；③用去离子水冲洗 3 次，每次 10 分钟，离心机甩干，入 2% APES 丙酮溶液中停留 30 ~ 40 秒，拿出稍停片刻，再入纯丙酮溶液中涮去未结合的 APES，在入去离子水中涮去多余的丙酮；④离心机甩干备用，注意防尘。

[0031] 2. 抗原的选择本发明选择了临床上常用的用于自身抗体检测的 12 种抗原，其中 Ro-52/SSa、La/SSb、Jo-1 和 Goat IgG 购自 sigma；Ro-60/SSa、Scl-70、CENP-B 和 u1RNP 购自 Diarect；Sm 购自 Immunovision；抗环呱氨酸多肽 (CCP) 采用商业合成；ANA 和 dsDNA 以如下方法制备：

[0032] ANA 制备方法：培养 Hep-2 细胞，待细胞长到一定数量时，用 PBS 洗一次，用 EDTA 溶液处理细胞 (尽量避免用胰酶消化细胞，以免造成目的蛋白的降解)，吹打后收集细胞；800rpm 离心 5min，弃上清，加入 200 μ l 添加了 PMSF 的细胞浆蛋白裂解液 A (细胞核蛋白 / 浆蛋白抽提试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司)，Vortex 5 秒，把细胞沉淀完全悬浮并分散开；离心去上清 (洗细胞)，加入 60 μ l 细胞浆蛋白裂解液 A，最高速 Vortex 5 秒，冰浴 10 分钟，最高速 Vortex 5 秒，4 $^{\circ}$ C 14000rpm 离心 10 分钟；弃上清 (完全吸干净)，加入 50 μ l 添加了 PMSF 的细胞核蛋白裂解液 B，最高速 Vortex 5 秒，放入冰浴中，每隔 5 分钟再高速剧烈 Vortex 15-30 秒，共 40 分钟；4 $^{\circ}$ C 14000rpm 离心 10 分钟，立即吸取上清至一预冷的 EP 管中，即为抽提得到的核蛋白，浓缩后 (终浓度为 1000 μ g/ml) 备用。

[0033] dsDNA 制备方法：采用 Blood DNA Kit(OMGEA) 提取人全血 DNA，取 250 μ l 全血至 EP 管中，加入 BL Buffer 250 μ l 和 25 μ l (20mg/ml) 蛋白酶 K，Vortex 5 秒，70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟，中间取出涡旋一次；加 250 μ l 异丙醇，颠倒混匀；上柱，8000g 离心 1 分钟；弃去接受管，将柱子置于新的接收管上，加入 500 μ l HB Buffer，8000g 离心 1 分钟；倒掉液体，加入 750 μ l Wash Buffer (已加异丙醇)，8000g 离心 1 分钟，重复一次；倒掉液体，10000g 空柱离心 2 分钟；加 50 μ l Elution Buffer，置柱中间，室温放置两分钟；将柱放入 1.5 μ l EP 管中，8000g 离心 1 分钟；将 EP 管中的液体再吸入柱中间，室温放置 2 分钟 8000g 离心 1 分钟，所得到的液体即为 dsDNA，浓缩后 (终浓度为 1000 μ g/ml) 备用。

[0034] 3. 点样本发明的点样液为含 0.1% Tween20 的 TBST，12 种抗原的点样浓度如表 1 所示，用 Cartisian5500 点样仪按照图 1 所示阵列布局图点样。

[0035] 表 1 :12 种抗原的点样浓度

[0036]

抗原种类	ANA	Ro-60/SSa	La/SSb	Jo-1	Sc1-70	Sm
浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	520	465	530	530	525	520
抗原种类	Ro-52/SSa	RF	CCP	uIRNP	CENP-B	dsDNA
浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	615	340	465	410	490	580

[0037] 4. 样品检测本发明将点制好的蛋白质微阵列在 37°C 杂交盒中温孵 1h, 用封闭液 (0.01mol/L PBS, 含 0.1% Tween-20, 2.5% 蔗糖) 封闭 30min, PBST 洗三次, 每次 15s, 离心机甩干, 每个阵列中加入 1 : 4 稀释的待测血清, 37°C 温孵 30min, PBST 洗三次, 方法同前, 每个阵列中加入碱性磷酸酶标记的二抗, 37°C 温孵 30min, PBST 洗三次, 方法同前, BCIP/NBT 显色 20 ~ 30min, UMAX PowerLookHI 扫描仪扫描图像, Totallab 软件进行结果判读。

[0038] 实施例 2 优化方案选择试验

[0039] 1. 点样液的优化

[0040] 选择含不同浓度 Tween20 的 TBST 为点样液, 以 APES 修饰玻片作为基片, 以 Cartisian5500 点样仪点样, 阵列布局如图 2 所示。每个样品点重复 4 次, 选择既可以很好的固定抗原, 又可以提高检测灵敏性的点样液作为芯片的点样液。

[0041] 2. 血清稀释度的优化

[0042] 将标准抗体血清用 PBS 稀释, 稀释度分别为 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 在同一张基片上, 每一阵列与一种稀释度的血清反应; 选择信噪比最高的血清稀释度作为芯片的血清反应稀释度。

[0043] 3. 12 种抗原的点样浓度和阳性 Cutoff 值、阴性 Cutoff 值的确定

[0044] 本发明用优化好的点样液按照图 3 所示点制芯片 (每个样品点重复 4 次), 在优化好的血清稀释度 (其余条件相同) 下检测 AID 阳性血清 240 份 (每种自身抗体检测 20 份), 每个反应重复 3 次。在抗原的浓度 - 灰度值线性范围之内选取连续的 3 ~ 4 个信噪比高、均一稳定的浓度点, 以单侧 99.5% 的可信限分别确定每个浓度点的 Cutoff 值 (灰度值), 通过 Human IgG 的浓度 - 灰度标准曲线 (相同检测条件下), 选取 12 种抗原的线性 Cutoff 值范围内所共有的最低灰度值作为芯片的 Cutoff 值, 该灰度值对应的每个抗原的浓度即为芯片中该抗原的点样浓度, 对应的 Human IgG 的浓度为芯片的阳性对照 II 中 Human IgG 的浓度, 即为芯片的阳性 Cutoff 值; 阳性对照 I 中 Human IgG 的浓度是根据“灰区” (阳性 Cutoff 值和阴性 Cutoff 值之间的区域) 的大小, 综合考虑假阳性和假阴性率的情况下确定, 既为强阳性的判定标准, 又为芯片的质控区。

[0045] 阴性对照的确定: 用优化好的点样液和抗原浓度按照图 4 所示阵列点制芯片 (每个样品点重复 4 次), 在优化好的血清稀释度 (其余条件相同) 下检测 AID 阴性血清 (来自健康献血员, 经过相同的检测方法, 不含有该 12 种自身抗体的阴性血清标本) 100 份, 每个反应重复 3 次。以单侧 99.5% 的可信限确定每个抗原的阴性 Cutoff 值, 计算它们的均值, 在综合考虑标准差和变异系数的情况下得出一个共同的阴性 Cutoff 值, 通过 Human IgG 的浓度 - 灰度标准曲线 (相同检测条件下), 以相同灰度值所对应的 Human IgG 浓度作为芯片阴性对照中 Human IgG 的浓度, 即为芯片的阴性 Cutoff 值。

[0046] 优化结果确定：

[0047] 1. 芯片制备条件的优化结果

[0048] 通过对 5 种点样液和 6 种血清稀释度的比较,筛选出信噪比最高的血清稀释度为 1 : 4,最佳的点样液为含 0.1% Tween20 的 TBST,如图 5 所示。芯片的 Human IgG 和 12 种抗原(点样液为含 0.1% Tween20 的 TBST,血清稀释度为 1 : 4 时)的浓度 - 灰度值线性关系如图 6 所示, R^2 均大于 0.97,线性关系较好,说明该芯片在我们所选择范围的抗原浓度下可以进行血清中相应抗体的定性和半定量检测。

[0049] 1.2 抗原浓度及阳性对照和阴性对照的优化结果

[0050] 通过对 12 种抗原的线性 Cutoff 值的综合分析,如图 7 所示,分别确定了每种抗原的点样浓度及阳性 Cutoff 值和阴性 Cutoff 值。

[0051] 2. 芯片对血清标本的检测应用结果

[0052] 采用本发明的显色蛋白芯片共检测了 678 份 AID 阳性血清和 120 份阴性血清,检测结果见表 2。

[0053] 表 2 :自身免疫性疾病抗体检测芯片检测临床标本结果

[0054]

检测指标	阳性标本		阴性标本		敏感度 (%)	特异度 (%)	假阳性率 (%)	假阴性率 (%)	χ^2 值 *	p 值 *
	总数	阳性数	总数	阳性数						
ANA	72	67	120	8	93.1	93.3	6.7	6.9	0.31	> 0.1
Ro-60/SSa	43	35	120	2	81.4	98.3	1.7	18.6	2.50	> 0.1
La/SSb	56	51	120	0	91.1	100.0	0.0	8.9	3.20	> 0.05
Jo-1	42	34	120	5	81.0	95.8	4.2	19.0	0.31	> 0.1
Sc1-70	58	49	120	3	84.5	97.5	2.5	15.5	2.08	> 0.1
Sm	62	58	120	13	93.5	89.2	10.8	6.5	3.76	> 0.05
Ro-52/SSa	65	59	120	6	90.8	95.0	5.0	9.2	0.08	> 0.1
RF	81	73	120	16	90.1	86.7	13.3	9.9	2.04	> 0.1
CCP	68	62	120	11	91.2	90.8	9.2	8.8	0.94	> 0.1
u1RNP	54	52	120	4	96.3	96.7	3.3	3.7	0.13	> 0.1
CENP-B	47	38	120	6	80.9	95.0	5.0	19.1	0.27	> 0.1
dsDNA	30	24	120	2	80.0	98.3	1.7	20.0	1.13	> 0.1

[0055] * 针对 12 个指标采用 SPSS 10.0 for Windows 软件分别进行配对 χ^2 检验的结果。

[0056] 结果显示:本发明的显色蛋白芯片检测结果与临床检测结果无显著性差异,两者具有较高的符合率。如图 8 显示 1 例 SLE、1 例 RA 和 1 例 MCTD 患者血清样本检测结果。

[0057] 综上,本发明的以 BCIP/NBT 为底物的显色蛋白芯片与临床常规检测方法相比符合率较高,说明采用以 BCIP/NBT 为底物的碱性磷酸酶显色法作为终点信号的检测是可行的。建立的显色反应蛋白芯片技术体系与现有的蛋白芯片技术相比,具有检测成本低、易于向基层推广等优点,且该显色蛋白芯片具有较高的敏感性和特异性,是一种具有广泛应用前景的技术体系。

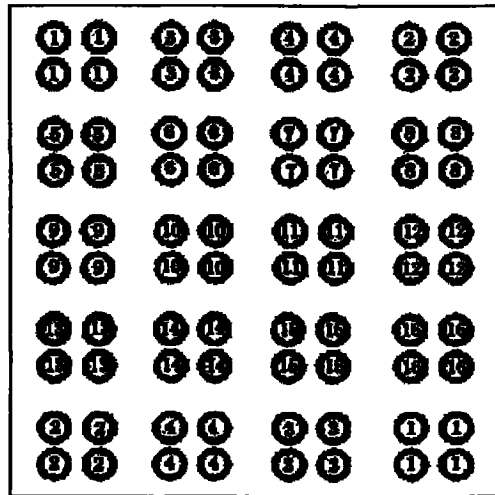


图1

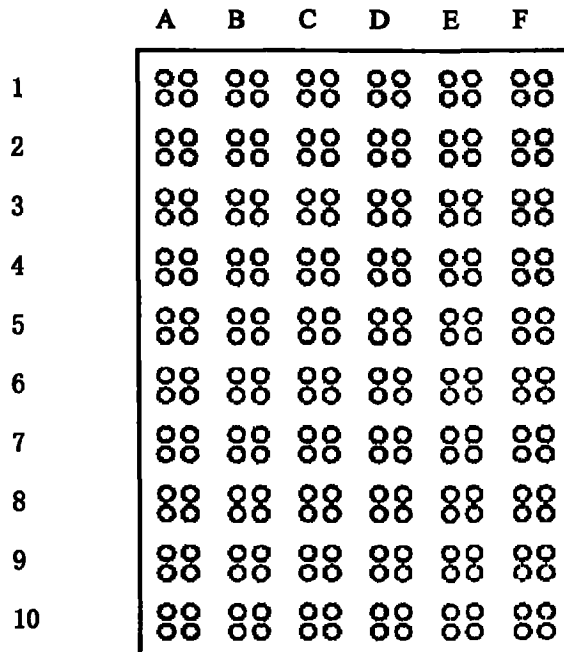


图2

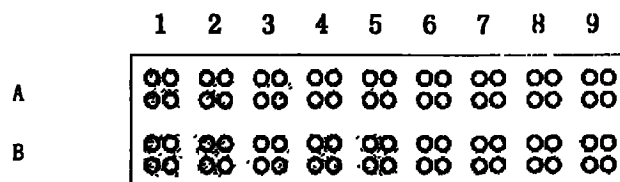


图3

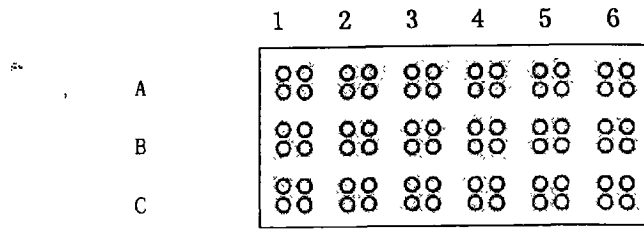


图4

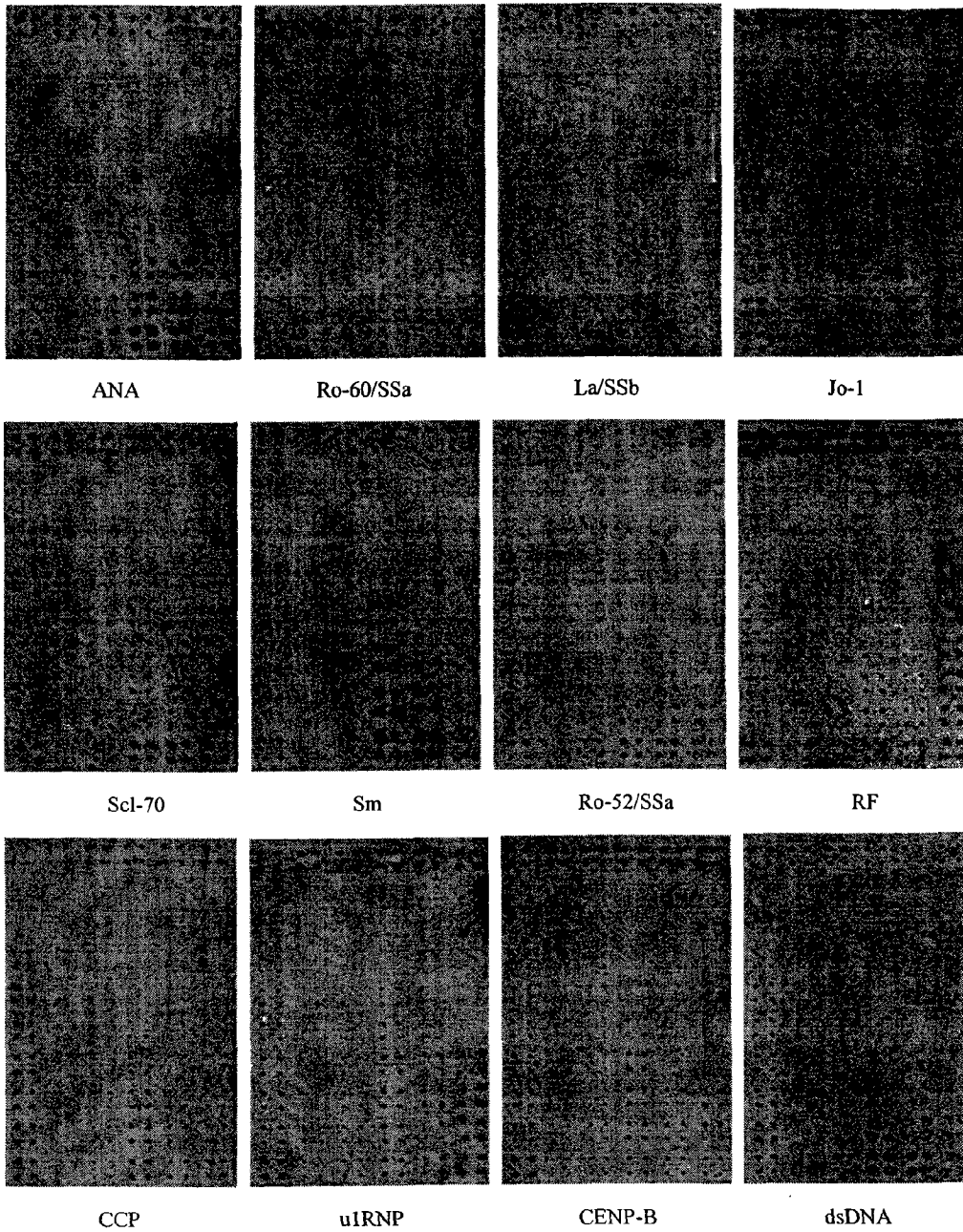
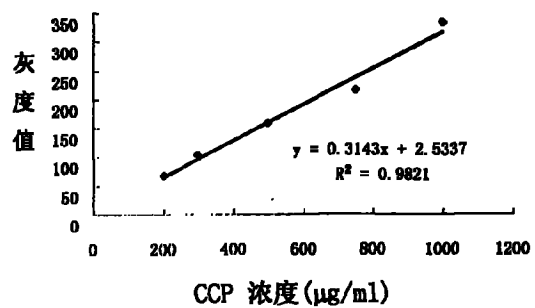
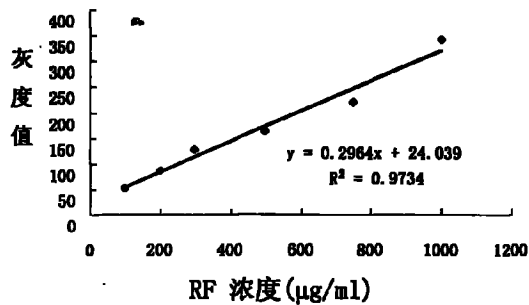
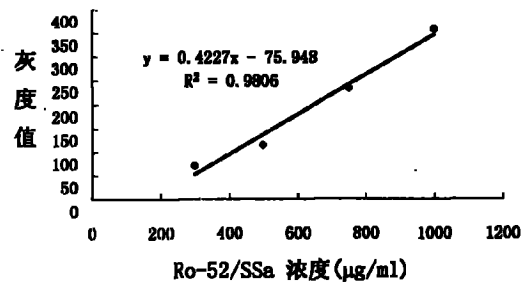
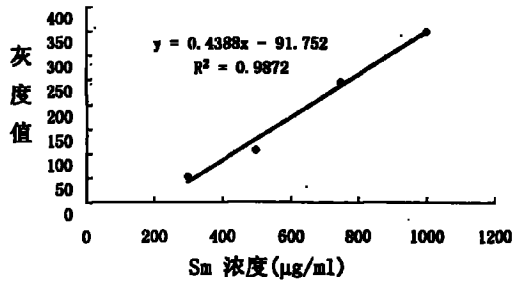
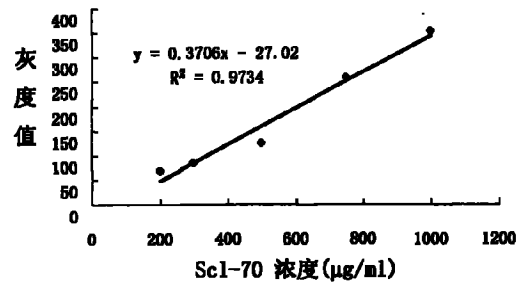
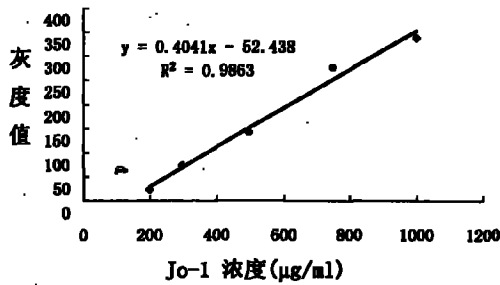
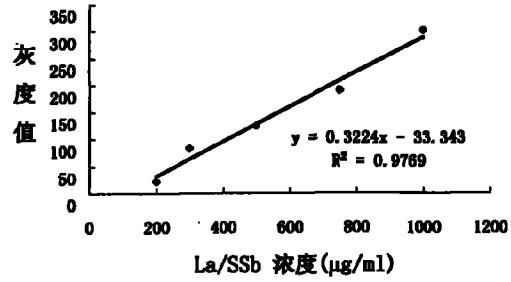
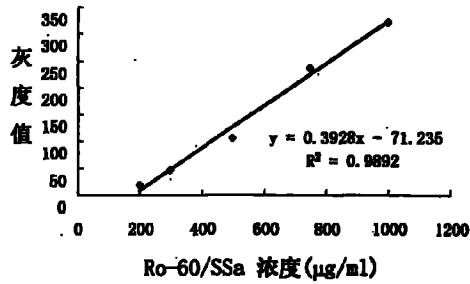
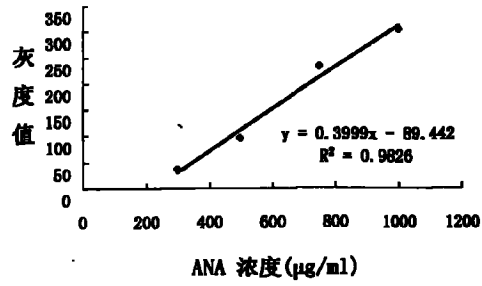
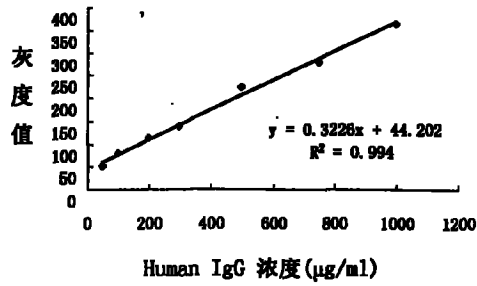


图5



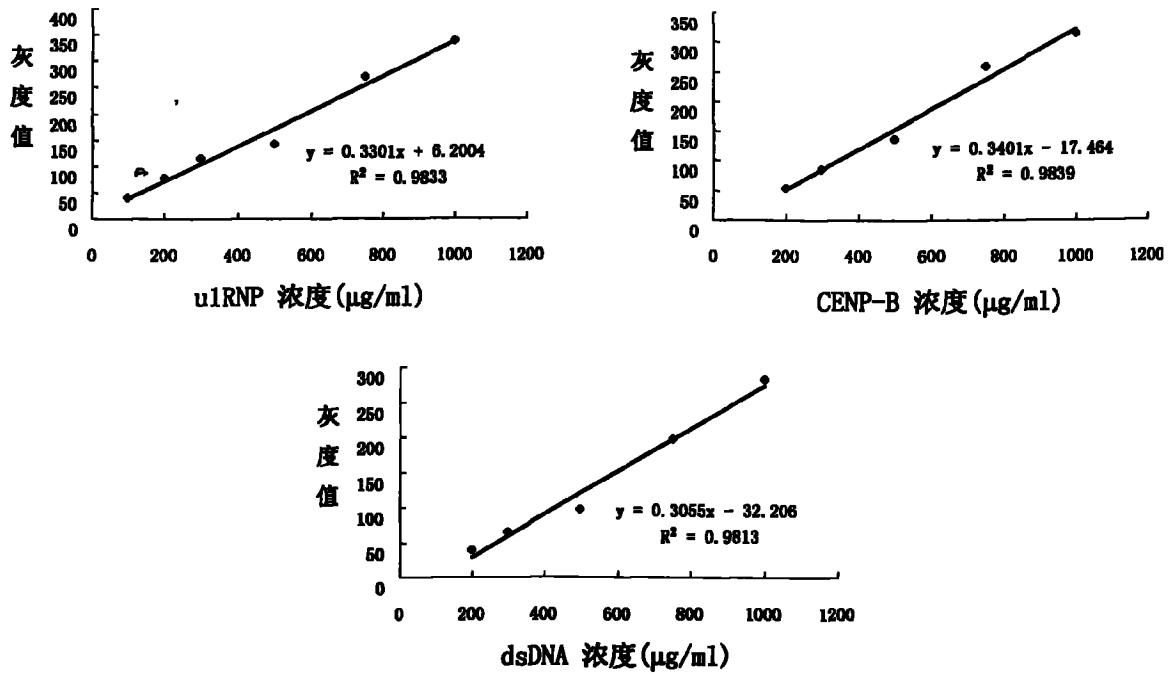


图6

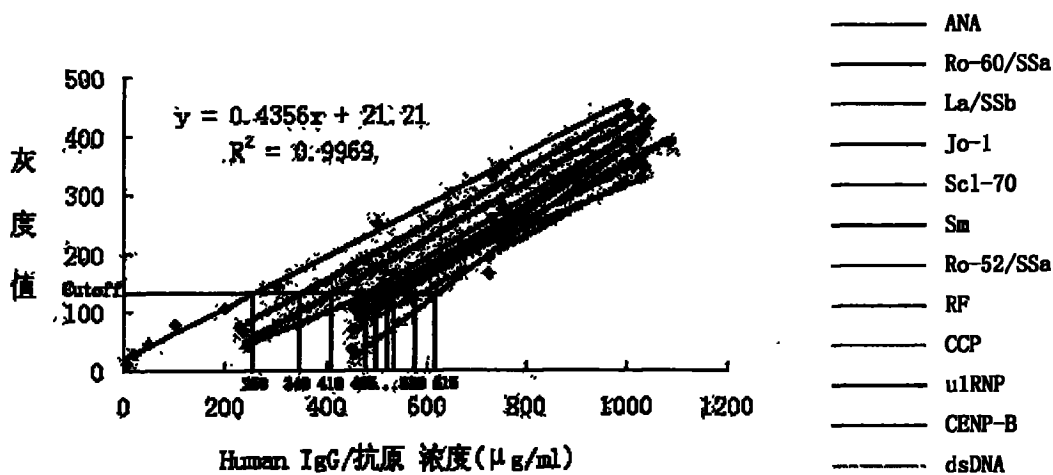
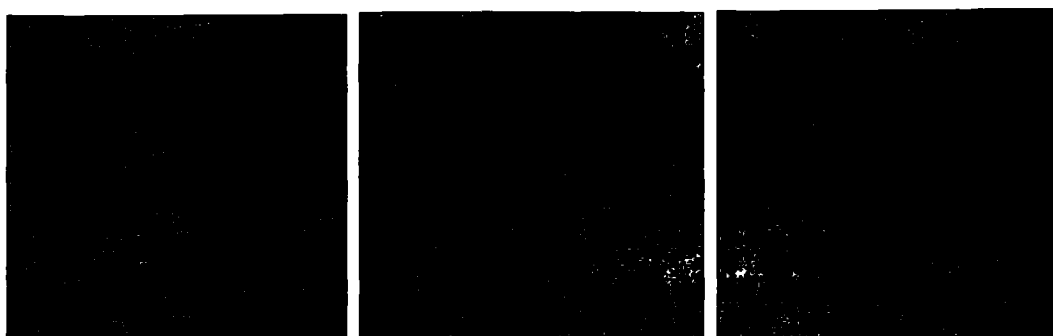


图7



A

B

C

图8

专利名称(译)	以BCIP/NBT为底物的显色蛋白芯片及其在自身抗体检测中的应用		
公开(公告)号	CN101226192B	公开(公告)日	2011-08-31
申请号	CN200810014143.2	申请日	2008-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东省医药生物技术研究中心		
[标]发明人	高雪芹 王国强 韩金祥		
发明人	高雪芹 王国强 韩金祥		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78		
代理人(译)	李健康		
其他公开文献	CN101226192A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种以BCIP/NBT为底物的显色蛋白芯片，由基片和阵列涂布于其上的12种抗原以及阴性对照、阳性对照、空白对照制成，其中：所述基片是APES修饰的玻片；所述12种抗原的种类及其点样浓度为ANA：520μg/ml，Ro-60/SSa：465μg/ml，La/SSb：530μg/ml，Jo-1：530μg/ml，Scl-70：525μg/ml，Sm：520μg/ml，Ro-52/SSa：615μg/ml，RF：340μg/ml，CCP：465μg/ml，u1RNP：410μg/ml，CENP-B：490μg/ml，dsDNA：580μg/ml。本发明用BCIP/NBT为底物的碱性磷酸酶显色法作为蛋白芯片的终点检测信号能广泛应用于自身抗体检测，检测灵敏度与目前的检测方法相比有较高的符合率，但检测成本和时间明显缩短。本发明的技术体系还能适用于临床检测，卫生监督，海关检疫及科研等领域。

