

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.<sup>7</sup>  
G01N 33/50  
C07K 17/14



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01127073. X

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1142433C

[22] 申请日 2001.8.7 [21] 申请号 01127073. X

[71] 专利权人 东南大学

地址 210096 江苏省南京四牌楼 2 号

[72] 发明人 虞伟 顾宁 武建国 廖建辉

张海黔

审查员 刘铭

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 沈廉

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 基于自身抗体谱抗原微阵列的制作方法及其检测方法

[57] 摘要

基于自身抗体谱抗原微阵列的制作方法及其检测方法是一种生物技术中微阵列的制作方法及其检测方法，其制作方法为：①基片的预处理：以适应分子自组装；②基片表面琼脂糖凝胶粘结层的制作与化学修饰；在基片表面形成一层有序的双功能分子薄膜即琼脂糖凝胶分子层；③抗原微阵列设计：每种抗原点制 4 个点，阵列的四角为自身抗体阳性与阴性控制点，中间为点制的已知自身抗原微阵列；④制作抗原微阵列：通过点样设备将不同的生物大分子抗原点至上述修饰后的基片表面，制成所需芯片；⑤对芯片信号进行检测，用显微镜或荧光扫描采集样本信息。检测方法为：将制作好的抗原微阵列芯片与被测样本温育后，再用三种不同荧光素标记的第二抗体探针进行杂交，采用多通道荧光扫描采集样本信息。

知识产权出版社出版

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

1. 一种基于自身抗体谱抗原微阵列的制作方法，其特征在于制作的方法为：

①载玻片的预处理：拟将选择的载玻片进行表面清洁度和平整度的处理，使其表面趋向单一的特性，以适应分子自组装；

②载玻片表面琼脂糖凝胶粘结层的制作与化学修饰：在载玻片表面形成一层有序的双功能分子薄膜即琼脂糖凝胶分子层，用一定浓度的戊二醛制作醛基化表面，自然晾干后备用，使双功能分子一端通过共价键与载玻片表面牢固结合，另一端与待组装的抗原分子偶联；

③抗原微阵列设计：每种抗原点制4个点，点直径为0.1～0.5mm，点间距为0.5mm～1.0mm，阵列的四角为自身抗体阳性与阴性控制点，中间为点制的已知自身抗原微阵列；

④制作抗原微阵列：通过点样设备将不同的自身抗原点至上述修饰的载玻片表面，组装的抗原分子均可与双功能分子层的外延端发生共价键结合，制成所需芯片；

⑤对芯片信号进行检测：用显微镜或荧光扫描采集样本信息。

2. 根据权利要求1制作的基于自身抗体谱抗原微阵列的检测方法，其特征在于检测的方法是将制作好的抗原微阵列芯片与被测样本温育后，再用三种不同荧光素标记的第二抗体探针进行杂交，采用多通道荧光扫描采集样本信息，用以确定自身抗体的不同免疫球蛋白类型，其中三种荧光素分别是用异硫氰酸荧光素、四甲基异硫氰酸罗丹明和氨基香豆素醋酸标记羊抗人免疫球蛋白G、免疫球蛋白A和免疫球蛋白M抗体分子。

## 基于自身抗体谱抗原微阵列的制作方法及其检测方法

### 一、技术领域

本发明是一种生物技术微阵列的制作方法，尤其是一种基于自身抗体谱抗原微阵列的制作方法。

### 二、背景技术

生物芯片是通过平面微细加工与生物分子的自组装技术相结合，在一微小玻片上组装成数目众多的不同生物分子微阵列，以实现目标 DNA 或蛋白质分子信息的大规模检测。这种技术被认为是生命科学研究中的高效工具，因而成为目前国内外科学技术发展的热点。

蛋白质免疫检测型芯片有别于一般的 DNA 芯片检测技术，其原理主要是基于抗原与抗体的特异结合反应来设计的，所测的目的分子仅有结构上的专一性，而无序列特异性。目前有关自身抗体的检测方法有胶体金免疫渗滤技术、酶联免疫吸附试验（ELISA）和放射免疫分析（RIA）等，前者由于方法敏感性欠佳，后者则存在有同位素污染和不稳定等特点，使用中总难令人满意，而目前临床实验室广泛应用的 ELISA 技术，其方法重复性又容易受多种测定因素的干扰，且上述方法仅适用于对单个项目的测定（即一种实验每次只能检测 1 种自身抗体），为此有必要寻找一种敏感、稳定的高通量的检测方法。

德国 Max planck 分子遗传学研究院的 Angelika Lueking 等领导的研究小组于 1999 年报道了用于基因表达与抗体筛选的蛋白质分子微阵列，他们用 92 个人 cDNA 克隆表达所得的细菌溶胞物作为抗原，用机械手臂方法将蛋白点至 PVDF 膜上制成抗原微阵列，用该法可检出 10pg 的蛋白质（阵列点间距为 4.5mm，点直径为 250  $\mu$ m），而后用单克隆抗体来鉴定蛋白表达产物（详见 Analytical Biochemistry. 1999; 270: 103-111），同年美国的 Mendoza LG. 等则在聚苯乙烯反应板上制作了

“基于酶联免疫吸附实验的抗原微阵列(144点/孔),采用标准的ELISA方法进行检测(见Biotechniques. 1999; 27(4).778-788)。这种基于蛋白质微阵列的制作技术,对于实现抗原与抗体乃至配体与受体的高通量检测进行了有益的尝试。但对于一些小分子半抗原(如磷脂)、重组多肽、DNA及蛋白质等同时组装于同一固相载体(如载玻片等),则还有许多需要进一步改进和完善的工作要做。

### 三、发明内容

#### 1、技术问题

本发明的目的就是提供一种用凝胶粘结层与分子组装技术相结合,使固相后的抗原分子仍保持原有的空间构型,从而达到确保后续自身抗体检测结果真实性的基于自身抗体谱抗原微阵列的制作方法。

#### 2、技术方案

本发明制作的方法为:

①载玻片的预处理:拟将选择的载玻片进行表面清洁度和平整度的处理,使其表面趋向单一的特性,以适应分子自组装;

②载玻片表面琼脂糖凝胶粘结层的制作与化学修饰:在载玻片表面形成一层有序的双功能分子薄膜即琼脂糖凝胶分子层,用一定浓度的戊二醛(GA)制作醛基化表面,自然晾干后备用,使双功能分子一端通过共价键与载玻片表面牢固结合,另一端与待组装的抗原分子偶联;

③抗原微阵列设计:每种抗原点制4个点,点直径为0.1~0.5mm,点间距为0.5mm~1.0mm,阵列的四角为自身抗体阳性与阴性控制点,中间为点制的已知自身抗原微阵列;

④制作抗原微阵列:通过点样设备将不同的自身抗原点至上述修饰的载玻片表面,组装的抗原分子均可与双功能分子层的外延端发生共价键结合,制成所需芯片;

⑤对芯片信号进行检测:用显微镜或荧光扫描采集样本信息。

检测的方法是将制作好的抗原微阵列芯片与被测样本温育后,再用三种不同荧光素标记的第二抗体探针进行杂交,采用多通道荧光扫

描采集样本信息，用以确定自身抗体的不同免疫球蛋白类型，其中三种荧光素分别是用异硫氰酸荧光素（FITC）、四甲基异硫氰酸罗丹明（TRITC）和氨甲基香豆素醋酸（AMCA）标记羊抗人免疫球蛋白 G（IgG）、免疫球蛋白 A（IgA）和免疫球蛋白 M（IgM）抗体分子。

### 3、有益效果

本发明的优点在于：

1. 采用凝胶黏结层分子组装技术使固相后的抗原分子仍能保持原有的空间构型，从而达到确保后续检测结果的真实性。

2. 实用性强，具有技术设计合理、实验流程清晰和实施便利等特点，有较强的实用和产业开发价值。应用此种模式还可扩展到其他实验诊断领域，如：传染病、肿瘤标志物与小分子激素等的测定（基于抗原/或抗体的微阵列）。

3. 我们制作的抗原微阵列，包括有不同的生物大分子（如：磷脂、重组多肽、DNA 和蛋白质等），有别于一般的单纯蛋白质/或 DNA 微阵列，抗原固相后（通过共价键结合）仍保持原有的分子构型，而有利于与后续的抗体结合反应。

4. 芯片信号采集：可采用荧光显微镜镜检或通过荧光扫描仪作多通道的荧光扫描（3 色荧光：FITC、TRITC 与 AMCA），可同时测定多种自身抗体的不同免疫球蛋白类型；亦可选用普通的光学显微镜观察（信号显示采用固相酶-底物/或免疫金银染色）。

### 四、具体实施方式

①载玻片的预处理：达到适于分子组装的要求（包括清洁要求，粗糙度要求等）；

②将洁净的羟基化表面处理的载玻片，置于一定浓度的 APTES（2%）丙酮溶液，浸泡适当时间后，取出依次用丙酮和乙醚漂洗，于烘箱中干燥备用；

③基片表面再制作凝胶分子层（琼脂糖）→NaIO<sub>4</sub>氧化 20min →蒸馏水洗涤 30min →干燥后用一定浓度的戊二醛（GA）制作醛基化表面，

自然晾干后备用；

④抗原微阵列设计：每种抗原点制 4 个点，点直径为 0.25 ~ 0.5mm，点间距为 0.5mm~1.0mm，阵列的四角为自身抗体阳性与阴性控制点，中间为点制的已知自身抗原微阵列；

⑤制作抗原微阵列：通过点样设备将不同的自身抗原点至上述修饰的载玻片表面，组装的抗原分子均可与双功能分子层的外延端发生共价键结合，制成所需芯片；即用点样设备将不同的抗原分子（条件预先摸索）点至载玻片，点样浓度 100  $\mu$ g/ml，点样量 0.1  $\mu$ l，同时设抗人  $\gamma$  球蛋白与牛血清白蛋白（BSA）作为阳性与阴性控制点；37 $^{\circ}$ C 温育 4 h 后置 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜；再用 1.0 mg/ml 的 BSA(含 1%的甘氨酸)封闭 37 $^{\circ}$ C 1h，PBS 洗涤后晾干。

分别加一定稀释度的被检样本和标记的第二抗体探针，温育条件均为 37 $^{\circ}$ C 30min。（抗体标记物为 HRP 时，后继反应则需加酶作用底物）。

⑥镜检或荧光扫描：当标记抗体分子选用酶（HRP）或纳米金（10nm）时，则可用普通光学显微镜观察，结果以出现棕黄色或黑色斑点者为阳性；标记抗体为荧光素则采用荧光镜检（带 CCD 摄像头）或荧光扫描进行信号采集，结果以斑点出现荧光者为阳性反应：有绿、红、蓝 3 种不同颜色的荧光，它们分别代表不同免疫球蛋白（IgG、IgA 和 IgM）类别的自身抗体。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 基于自身抗体谱抗原微阵列的制作方法及其检测方法                        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1142433C</a>                     | 公开(公告)日 | 2004-03-17 |
| 申请号            | CN01127073.X                                   | 申请日     | 2001-08-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东南大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 东南大学   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 东南大学   |         |            |
| [标]发明人         | 虞伟<br>顾宁<br>武建国<br>廖建辉<br>张海黔                  |         |            |
| 发明人            | 虞伟<br>顾宁<br>武建国<br>廖建辉<br>张海黔                  |         |            |
| IPC分类号         | C07K17/14 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68        |         |            |
| CPC分类号         | B82Y15/00 B82Y30/00                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN1343887A                                     |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

基于自身抗体谱抗原微阵列的制作及检测方法是一种生物技术中微阵列的制作及检测方法，其制作方法为：①基片的预处理：以适应分子自组装；②基片表面琼脂糖凝胶粘结层的制作与化学修饰；在基片表面形成一层有序的双功能分子薄膜即琼脂糖凝胶分子层；③抗原微阵列设计：每种抗原点制4个点，阵列的四角为自身抗体阳性与阴性控制点，中间为点制的已知自身抗原微阵列；④制作抗原微阵列：通过点样设备将不同的生物大分子抗原点至上述修饰后的基片表面，制成所需芯片；⑤对芯片信号进行检测，用显微镜或荧光扫描采集样本信息。检测方法为：将制作好的抗原微阵列芯片与被测样本温育后，再用三种不同荧光素标记的第二抗体探针进行杂交，采用多通道荧光扫描采集样本信息。