

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02121325.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 100414296C

[22] 申请日 2002.6.14 [21] 申请号 02121325.9

[73] 专利权人 赵 翀

地址 100083 北京市海淀区学院路丁 11
号西二楼 408 室

[72] 发明人 赵 翀

[56] 参考文献

WO 9967641 A2 1999.12.29

CN 1320820 A 2001.11.7

CN 2478109 Y 2002.2.20

WO 0221128 A2 2002.3.14

US 6327410 B1 2001.12.4

审查员 马秋娟

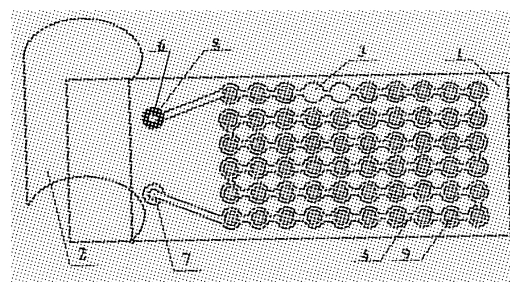
权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图 6 页

[54] 发明名称

镶嵌式高通量三维立体生物检测方法
及试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种镶嵌式高通量三维立体生物检测技术及试剂盒的制备方法，该技术灵敏快速、信息量大，制造简便、成本低，可对样品中多种不同的生物/化学成分、细胞或微生物等同时进行检测分析。主要特征在于将包被不同化学或生物分子的微珠，分别镶嵌在检测板的不同微孔中，微孔间有微管相连，并同进/出液口形成微流路与外界相通，样品经微流路与微珠表面的包被分子反应，其结果用目测或仪器记录分析。可广泛地用于环境检测、医药研究、疾病诊断和蛋白质组学等领域的研究与开发。



1. 一种检测样品中的化学分子或生物分子、细胞、细菌和病毒或其它微生物体的镶嵌式高通量三维立体生物检测方法，该方法至少包括下述成分或步骤：

①检测板由微孔板、微流路和微珠组成；微孔板由板体（1）和板盖（2）组成；微流路由微孔（3）、微槽（4）和/或微管（5）、进液孔（6）、出液孔（7）、密封圈（8）组成，分别或共同位于板体（1）或板盖（2）上；微珠（9）通过表面带有不同活性基团的手臂分子或涂层（10）包被不同的化学分子（11）或生物分子（12），并按一定的顺序分别镶嵌在不同的微孔（3）中；

②被检样品直接或经过处理后由进液孔(6)进入微孔板、沿微流路，经微槽（4）和/或微管(5)流经微孔(3)与微珠（9）表面包被的化学分子(11)、生物分子（12）相互作用或特异性结合；未结合的样品成分沿微流路经出液孔（7）流出；

③用标记分子（13）或其不同标记物（14）标记被检样品；

④洗液漂洗去除检测板中非特异性结合的和残留的样品、标记物(14)或样品标记物；

⑤用目测、扫描仪或其它已知方法检测各微孔中标记分子(13)的有无与含量，分析被检样品中被检物的有无、含量、组成、来源、组织/细胞学定位或排列顺序；

⑥或加入酶（15）的底物（16）显色，观察结果。

2. 根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于微孔板由板体(1)和板盖(2)组成，板体和板盖上分别具有微孔(3)、微槽(4)或微管(5)、进液孔(6)、出液孔(7)、密封圈(8)、驱动孔(19)、定位孔(20)和视窗(21)结构或部分结构；微孔按一定的格式排列，其间有微槽(4)或微管（5）直接或间接两两相连；板体（1）和板盖（2）为方形、长方形、园盘型或其它外观形状透光的、不透光的或反光的硬质或软质材料；板体（1）和板盖（2）分别或共同经不同的化学修饰或表面处理获得具有惰性或活性基团的分子表面或涂层（10），活性基团的涂层或分子表面经进一步处理，包被不同的化学分子（11）或生物分子（12）。

3. 根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于微流路由微孔（3）、微槽（4）或微管（5）、与外界相通的进液孔（6）、出液孔（7）和密封圈（8）结构组成；上述结构分别位于板体或板盖上，或全部位于板体（1）或板盖（2）上。

4. 根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于微珠（9）是经加工而成的，大小均一、具有不同外观形状的多孔或实体；经射线照射、化学修饰或表面处理，表面获得带有不同化学活性基团的手臂分子或涂层（10）；手臂分子上的活性化学基团进一步与不同的化学分子（11）或生物分子（12）连接，将其包被在微珠表面，生成具有不同结合特性的药物微珠（17）和生物微珠(18)。

5. 根据权利要求1、权利要求2或权利要求4所述的检测方法，其特征在于包被是指在微珠(9)和微孔（3）的涂层或手臂分子（10）上，分别连接不同的化学分子（11）或生物分子（12），获得具有不同结合特性的微珠或微孔。

6. 根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于微珠用下述方法制备，其步骤至少包括：

①将包被有抗原的特异性抗体（22）的抗体微珠（23）与含有过量特异性抗原（24）的缓冲液共育，通过抗原抗体反应将特异性抗原（24）吸附在微珠表面，待充分反应后，

用缓冲液充分漂洗；

②加入戊二醛、炭二亚胺或其它双功能交联剂；

③缓冲液充分漂洗，获得带有特异性抗原的生物微珠-抗原免疫微珠（25）。

7. 根据权利要求4所述的检测方法，其特征在于微珠用下述方法制备，其步骤至少包括：

①将包被有抗小鼠免疫球蛋白Fc段抗体(26)的抗抗体微珠（27）与含有小鼠单克隆抗体（28）的杂交瘤细胞培养液或腹水共育，通过抗原抗体反应将单克隆抗体吸附在微珠表面，待充分反应后，用缓冲液漂洗；

②加入戊二醛或炭二亚胺或其它双功能交联剂；

③充分漂洗，获得包被有小鼠抗特异性抗原单克隆抗体的生物微珠-抗体免疫微珠（29）。

8. 根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于采用下述方法进行定量分析：在同一块微孔板上包被同一种化学或生物分子的微孔（2）和镶嵌微珠（4）的数量有1个或1个以上，当样品沿微流路逐孔流经各微孔及其复孔时，对应的被检测物被不断结合，并不断地从标本液中去掉，因此，各微孔及其复孔的结合量，因前后排列顺序的不同逐渐减少，根据各微孔与复孔反应的有无与强弱变化，进行定量分析；在进行定量分析时，按此方法设定标准对照物或参照物，借助计算机分析绘出被检物浓度-反应孔数量及其强弱变化曲线，结合标本体积，获得定量分析结果。

9. 一种检测样品中的化学分子或生物分子、细胞、细菌和病毒和其它微生物体的镶嵌式高通量三维立体生物检测试剂盒，其特征在于试剂盒装有权利要求1所述的检测板1块或1块以上，其每个微孔中至少镶嵌一粒微珠，微珠表面分别包被某种化学或生物分子，并与下述成分分别或共同组成不同的试剂盒：

①至少有一管组织或细胞或微生物样品处理液；

②至少有一管为蛋白质浓度检测分析试剂；

③至少有一种含标记分子或标记物的样品标记试剂；

④至少有一管洗涤液或其浓缩液；

⑤至少有一种为酶类的显色底物或发光底物；

⑥至少有一管装有表面具有某种化学活性基团或包被了某种生物分子的微珠；

⑦至少有一管蛋白质磷酸化分析试剂；

⑧至少有一管为蛋白水解酶；

⑨至少有一管为电泳样品缓冲液；

⑩至少有一管为蛋白质糖基化分析试剂。

10. 根据权利要求9所述的检测试剂盒，其特征在于，在完成检测分析后通过下述不同的方法，用试剂盒所提供的试剂，对微孔板各不同孔中所结合的样品成分分别做质谱分析、氨基酸序列测定、蛋白质磷酸化以及糖基化或其它进一步分析前的处理：

(1) 直接在感兴趣的微孔中加入蛋白水解酶或磷酸酶或电泳样品缓冲液或蛋白质糖基化分析试剂，对微孔和微珠的结合物在原位做进一步分析前的样品处理；

(2) 将微孔中的生物微珠取出，在微量反应容器中分别加入蛋白水解酶或磷酸酶或电泳样品缓冲液或蛋白质糖基化分析试剂做进一步分析前的样品处理；

(3) 将新鲜样品分别与感兴趣微孔的复本微珠共育，以同样的条件重复微孔板的操作步骤，将样品中感兴趣的物质成分吸附在微珠上，充分漂洗去除未结合的样品混合物，加入蛋白水解酶或磷酸酶或电泳样品缓冲液或蛋白质糖基化分析试剂，对结合物做进一步分析前的样品处理。

镶嵌式高通量三维立体生物检测方法及试剂盒

技术领域

本发明涉及一种新型的镶嵌式高通量三维立体生物检测技术及试剂盒的制备方法。该技术灵敏快速、信息量大，制备方法简便、成本低，能同时检测样品中多种不同的化学物质、生物分子、微生物或细胞等成分，可广泛地用于生物学、医药学、预防医学、动植物学、农牧业、食品与卫生、能源与化工、环境监测以及医学诊断与检测等领域。

背景技术

固相吸附试验常被用于检测或分析被检样品或样品溶液、生物体液（如血液、血清、血浆、脑脊液、尿液等，泪液、汗液、消化液和精液等分泌液，组织液、渗出液、呕吐物、粪便、组织/细胞匀浆液等）中的化学物质、生物分子以及微生物或细胞等生物体。

固相吸附试验中的微孔板、微颗粒或微珠作为固相常被用于通过吸附或结合捕获被分析物，以便将目的物从复杂的样品混合物或悬液中分离出来。根据实验的不同，固相微颗粒和微孔板可用多种不同的材料，如玻璃、塑料、乳胶、葡聚糖、琼脂糖、磁性材料、陶瓷、金属等制成。在传统的固相吸附试验中，微孔板、微颗粒作为固相主要是通过其吸附或结合能力，辅助捕获液相中的对应分子，借助重力、压力、离心、过滤、磁力等，经过一步或多步操作很方便的将未结合的分子（液相或称游离相）与结合分子（固相）分离。

在样品的检测分析试验中，大部分情况下需要在同一个容器里、同时进行两项或多项实验，以便对样品中多种不同成分的有无、含量和来源等做出平行的定性、定量、定位等检测分析；或对单一种分子的多种不同特性（如单一蛋白分子具有多个不同的表位或抗原决定簇）进行平行检测与分析。在此情况下，传统的固相吸附试验所存在的问题是：对超过3种以上的不同被检测物，由于难以区分，很难同时进行。也就是说，用传统的固相吸附试验方法，在一个试验中所要检测或分析被检测物的数量受固相系统的限制或制约。

在现代免疫检测和蛋白质组学分析和研究中，需要对同一样品中大量的、多种不同化学物质、抗原、抗体或蛋白质等成分进行快速、灵敏的高通量检测，以分析化学物资、抗原、抗体或蛋白的种类、数量、组成、变异以及多态性、翻译后修饰、个体的感染状态或个体免疫系统的功能状态等。传统解决办法是首先通过分离纯化等技术和工艺，分别纯化大量的各种不同的生物探针，如药物分子、蛋白酶分子、生长因子与受体、抗原和各种不同特异性的抗体等，再分别将生物探针固相化在不同的微孔板或微珠等固相基质的表面，分别与样品中对应的化学物质、抗体或/和抗原分别反应，再分别进行检测分析，因此如要检测十几种成分就需进行十几次不同的实验，异常繁琐复杂。现有的生物芯片技术（如Affymatrix公司等提供的技术方案）虽将检测分析集成为一体，使样品的高通量检测被简化，但其生物探针的制备和固相化技术与工艺依然十分复杂。Illumina公司通过一种带有电磁波发射装置微珠所建立的检测技术，虽进一步简化了生物探针的制备和固相化技术，但是由于电磁波发射装置的存在，不仅制造成本较高，同时也使得微珠的大小和固相中生物探针的容量和检测灵敏度等受到限制，同时还需解决电磁屏蔽等问题。本发明的目的就是要提供一种技术和工艺更为简单，能克服上述种种困惑，即简便灵敏、快速及时，又可同时检测样品中多种不同物质成分的技术。

发明内容

本发明的主要技术特征是，将表面分别包被有不同生物分子或带有不同化学物质的微珠，分别镶嵌在检测板的不同微孔中，微孔间有微管相连，并与进/出液口形成微流路与外界相通，样品通过微流路与微珠表面的包被分子反应，各孔的反应结果可用目测或用仪器记录分析，根据微珠或微孔在检测板中的排列位置和顺序，对样品中的化学物质、生物靶分子、细胞和微生物等多种不同成分的有无、性质、含量、来源、组织和细胞学定位等同时进行鉴定分析。

本项发明同时还提供了一种基于镶嵌式高通量三维立体生物检测技术制备试剂盒的方法，其主要技术特征在于：试剂盒由镶嵌有微珠，带有微流路的多孔检测板及各种相关的配套试剂分别组成。根据检测板各微孔反应的有无与强弱，以及各微孔在检测板中的排列位置和顺序，可对不同样品中多种不同成分同时进行比对分析，利用试剂盒中所提供的试剂和方法还可对检测板中各孔所捕获的样品成分，做分子量、等电点、糖基化、磷酸化和氨基酸序列等进一步分析。该试剂盒不仅大大简化了同一样品进行多因素检测分析的操作步骤，缩短了操作时间，降低了工作强度，更增加了检测结果的精确性、灵敏度、重现性和可比性，而且还可同时对检测样品中多种不同的物质成分做进一步的不同分析，使用更方便，操作更快捷，并且可广泛地应用于环境检测、疾病诊断、新药开发、疫苗研究和蛋白质组学等技术、研究领域。

为了达到上述目的本发明所采用的技术方案，其基本特征在于镶嵌式高通量三维立体生物检测技术及试剂盒的制备至少包括下述步骤和成分：

①检测板由微孔板、微流路和微珠等组成；微孔板由板体(1)和板盖(2)组成；微流路由微孔(3)、微槽(4)和/或微管(5)、进液孔(6)、出液孔(7)、密封圈(8)等结构组成，可分别或共同位于板体(1)和/或板盖(2)上；微珠(9)可通过表面带有不同活性基团的手臂分子或涂层(10)等包被不同的化学分子(11)或生物分子(12)，按一定的顺序分别镶嵌在检测板不同的微孔中（见图 1-5）。微珠表面包被的化学或生物分子与样品中被检测的目的物分别具有结合特异性（如抗原/半抗原与抗体、激素/细胞因子与受体、配基与配体等）或生物专一性（如酶与底物、药物与靶分子）等；

②被检样品，如水源、生物体液等各种液体，直接或经过处理，如组织/细胞经裂解液的裂解，由进液孔（6）进入检测板、沿微流路，经微槽（4）和/或微管（5）流经各微孔(3)与微珠(9)表面包被的化学物质(11)或生物分子(12)等混合，并相互作用或特异性结合；样品中未结合的游离物沿微流路经出液孔(7)流出；

③用标记分子(13)，如荧光素(FITC,Cy3,Cy5,Texas Red 等)、同位素(^{125}I , ^{32}P , ^{35}S 等)、生物素和半抗原，酶(HRP,AP,半乳糖苷酶,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,尿素酶和荧光素酶等)、胶体金、稀土离子(如 Eu,Sm,Tb 和 Dy 等)及其螯合物(如 Eu^{3+} -DTPA)等物质直接标记被检样品；或用标记分子的不同标记产物-标记物(14)，如荧光抗体、酶标抗体、生物素化抗体、生物素化酶、 Eu^{3+} -DTPA-抗体等标记物，标记被检样品(间接标记)；

④洗液流洗去除检测板中残留的和非特异性结合的标记物(14)、样品或样品标记物等；

⑤目测观察或用检测仪分析检测板微孔中标记分子（13）如荧光、显色产物或发光产物、放射性的有无、强弱或深浅，并据此分析被检样品中被检物的有无、含量、组成、来源、组织/细胞学定位或排列顺序等。

⑥标记物为酶(15)时，如HRP(辣根过氧化物酶)，AP(碱性磷酸酶)、荧光素酶(Luciferase)

等,观察结果前需先加入显色剂或发光试剂等底物试剂(16),如OPD(邻苯二胺)、DAB(二氨基联苯胺)或发光试剂(如鲁米诺、甲基伞形酮磷酸酯、对羟基苯乙酸)等。

本发明的特征还在于:微孔板由板体(1)和板盖(2)组成,板体和板盖上可分别具有微孔(3)、微槽(4)和/或微管(5)、进液孔(6)、出液孔(7)、密封圈(8)、驱动孔(19)、定位孔(20)和视窗(21)等部分或全部结构;微孔(3)按一定的格式排列,其间有微槽(4)或微管(5)直接或间接两两相连;板体(1)和板盖(2)为任何可加工成型的、透光的、不透光的或反光的硬质或软质材料,如玻璃、塑料、高分子合成材料、陶瓷、金属、非金属等多种不同材料或复合材料等,经精加工而成的具有方形、长方形、圆盘型或其它外观形状的实体结构(见图1-4)。板体(1)和板盖(2)分别或共同经不同的化学修饰或表面处理,①产生反光层,反射光信号;②获得惰性化学涂层,如辛胺、泰富隆(Teflon)涂层、硅化等处理以减少样品和/或标记物(14)等对板体和板盖的非特异性吸附;③获得具有不同反应活性基团的分子表面或涂层,如氨基、羧基、醛基、羟基、巯基、溴乙酰基、酰肼基、环化亚胺碳酸盐基团等(见图6,图7),以便于不同的化学分子(11),如药物、激素等半抗原分子,或蛋白酶、生长因子、抗体等不同生物分子(12)的包被(见图8),与微珠配合,增加比表面积,以提高检测灵敏度。

本发明的特征还在于:微流路由微孔(3)、微槽(4)和/或微管(5)、与外界相通的进液孔(6)、出液孔(7)、密封圈(8)等结构共同组成;上述结构可分别位于板体或板盖上,也可全部位于板体或板盖上,其在板体或板盖上的不同位置与组合,可形成具有不同几何特征,满足不同实验需求的微流路,见图3-5。

本发明的特征还在于:微珠(9)是由任何可加工成型的材质,如玻璃、塑料、葡聚糖、聚蔗糖、琼脂糖、高分子合成材料、纤维素、乳胶、硅胶、层析基质、陶瓷、金属、非金属、磁性材料或复合材料等,经精加工而成的,大小均一、具有不同外观形状的多孔或实心体;可直接吸附化学和生物分子;或经射线照射、化学修饰或表面处理,获得带有不同化学活性基团的手臂分子表面或涂层(10),通过手臂分子上的活性化学基团微珠可进一步与不同的生物分子(12),如抗原、抗体、激素、细胞因子、受体、配基与配体等,或化学分子(11)等连接将其包被在微珠表面,生成具有不同结合特性的药物微珠(17)和生物微珠(18),如免疫微珠、蛋白微珠、核酸微珠等(见图6-8)。

本发明的特征还在于:微珠(9)和微孔(3)均可或分别通过其手臂分子涂层或表面所带有的化学活性基团,如溴乙酰基、酰肼基、环化亚胺碳酸盐基团、氨基、醛基、巯基等与化学/药物分子、蛋白分子上的活性基团如羧基、氨基、醛基、巯基等分别形成酰胺键、肽键、醚键、二硫键;或通过疏水表面与蛋白质分子的疏水基团相互作用,分别连接或包被不同的化学分子或生物分子,以分别获得对不同化学或生物分子具有不同结合能力的微珠或微孔(见图7,图8);当微孔(3)也进行包被处理时,其表面所包被的化学(11)或生物分子(12)与嵌入该孔的微珠(9)所包被的化学(11)或生物分子(12)一致,即同一孔中,微孔和微珠表面的包被分子完全相同。

本发明的特征还在于生物微珠(18)还可以用下述方法制备,其基本步骤至少包括:

①将包被有抗原特异性抗体(22)的抗体微珠(23)与含有过量特异性抗原(24)的化合物共育,通过抗原抗体反应将抗原(24)吸附在微珠表面,待充分反应后,用缓冲液充分漂洗以去除杂质和未结合的抗原;

②加入戊二醛或炭二亚胺等双功能交联剂,使抗原与抗体交联,以避免或减少抗体结

合的特异性抗原分子的解吸附或脱落(见图 9A);

③反应完成后缓冲液充分漂洗, 去除交联剂并封闭残留的交联位点, 获得带有特异性抗原的生物微珠-抗原免疫微珠 (25)。

本发明的特征还在于生物微珠(18)也可以用下述方法制备, 其基本步骤至少包括:

①将包被有抗小鼠免疫球蛋白 Fc 段抗体(26)或的生物微珠 (27) 与含有小鼠单克隆抗体 (28) 的杂交瘤细胞培养液或腹水共育, 通过抗原抗体反应将单克隆抗体吸附在微珠表面, 待充分反应后, 用缓冲液漂洗;

②加入戊二醛或炭二亚胺等双功能交联剂(见图 9B);

③缓冲液充分漂洗以去除交联剂并封闭残留的交联位点, 即获得包被有小鼠抗特异性抗原单克隆抗体的生物微珠-抗体免疫微珠 (29)。

本发明的特征还在于: 可采用下述方法进行定量分析: ①在同一块微孔板上包被同一种化学或生物分子的微孔和镶嵌微珠的数量可有 1 个或 1 个以上的复孔, 当样品沿微流路逐孔流经各微孔及其复孔时, 对应的被检测物被不断结合, 并不断地从标本液中去除, 因此, 各微孔及其复孔的结合量, 因前后排列顺序的不同逐渐减少, 根据各微孔与复孔反应的有无与强弱变化, 即可进行定量分析; ②在进行定量分析时, 可按此方法设定标准对照物或参照物, 借助计算机分析可绘出被检物浓度-反应孔数量及其强弱变化曲线, 结合标本体积, 获得定量分析结果。

本发明的特征还在于: 本发明所述的试剂盒至少装有一块检测板, 每个微孔中至少镶嵌一粒微珠, 微珠表面分别包被某种化学分子或生物分子, 并可与下述成分分别或共同组成不同的试剂盒:

①至少有一管组织/细胞或微生物样品处理液, 处理液中主要含有适量的去垢剂, 如 Triton X-100, NP40, Chaps 等和蛋白酶抑制剂, 如 PMSF, EDTA, TPCK, TLCK, aprotinin, leupeptin, antipain 等, 以保证样品充分裂解和溶解, 同时保证蛋白分子不被降解;

②至少有一管为蛋白质浓度检测分析试剂, 如 Folin-酚试剂, Bradford 试剂等;

③至少有一种含标记分子或标记物的试剂, 如 FITC, Cy3, Cy5, Texas Red, ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S , 地高辛, 生物素-亲和素系统, 荧光抗体、酶标抗体等, 可用于样品的直接或间接标记;

④至少有一管洗涤液或其浓缩液, 如含有适量 BSA 或小牛血清、脱脂牛奶、Tween 20 等的 PBST, 或 TBST 缓冲液, 可用于检测板的漂洗或流洗, 以去除各种非特异性吸附物;

⑤在标记物为酶类时, 至少有一种显色底物或发光底物, 如 OPD 或 DAB 与过氧化氢/脲、鲁米诺, 甲基伞形酮磷酸酯, ATP 等;

⑥至少有一管装有表面具有某种化学活性基团或包被了某种生物分子的微珠, 如包被抗 CEA, 抗 AFP, 抗 P53, 抗 Erb-2 等的单克隆抗体或多克隆抗体的玻璃微珠、Sephrose CL-4B 或聚苯乙烯微珠等;

⑦至少有一管蛋白质磷酸化分析试剂, 如细菌碱性磷酸酶, 马铃薯磷酸酶等;

⑧至少有一管为蛋白水解酶, 如胰蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶, 羧肽酶等, 用于微珠捕获蛋白的消解, 以便进行蛋白质的质谱分析或氨基酸序列分析;

⑨至少有一管为电泳样品缓冲液, 如含适量 SDS 或尿素、盐酸胍等不同蛋白质变性剂的 SDS-PAGE 电泳样品缓冲液或含有尿素或 Chaps 等的 IEF 电泳样品缓冲液;

⑩至少有一管为蛋白质糖基化分析试剂, 如 PNGase F 等;

本发明的特征还在于：在完成基本检测分析后，还可用试剂盒中的试剂通过下述不同的方法对检测板各不同孔所结合的样品成分分别做质谱分析、氨基酸序列测定、蛋白质磷酸化以及糖基化等进一步分析前的处理：

①直接在感兴趣的各微孔中加入蛋白水解酶或磷酸酶或电泳样品缓冲液或蛋白质糖基化分析等试剂，对微孔和微珠的结合物在原位做进一步分析前的样品处理；

②将微孔中的生物微珠取出，在微量反应容器中分别加入蛋白水解酶或磷酸酶或电泳样品缓冲液或蛋白质糖基化分析等试剂做进一步分析前的样品处理；

③将新鲜样品分别与感兴趣微孔的复本微珠共育，以同样的条件重复微孔板的操作步骤，将样品中感兴趣的物质成分与样品液分离，加入蛋白水解酶或磷酸酶或电泳样品缓冲液或蛋白质糖基化分析等试剂，对结合物做进一步分析前的样品处理。

本发明具有以下优点：1. 信息量大。样品经一次检测分析，可同时获得成千上万种不同成分的平行分析结果与数据资料，解决了传统实验技术信息量小的问题。2. 易于制备、成本低。本发明所述的微珠可选用各种商售产品为原材料，如如多肽固相合成用的基质材料多孔玻璃珠、聚苯乙烯珠等，溴化氰活化的 Sepharose-4B 等各种层析基质、硅胶珠等，将生物分子的分离纯化及固相合成等与生物微珠的制备融为一体，省略了繁杂的生物分离纯化过程；3. 自由组合，灵活易变。可完全依照使用目的的不同，自由组合，或灵活地改变微孔板中任何一孔镶嵌微珠的种类和结合特性以改变检测的内容，而无需变动全部排列顺序和格式；4. 灵敏度高。本技术方法所用的固相基质采用了三维立体结构，即微珠与微孔均可或分别作固相。每个微珠相当于固化了抗原/抗体或配基/配体的亲和层析基质，与传统方法相比，有更大的比表面积和比结合容量。同时由于通过手臂分子上的化学活性基团连接药物或生物蛋白分子，消除了空间位阻对分子结合的影响，进一步提高了比结合容量。为提高反应灵敏度，还可采用多孔微珠和微孔作固相，使比表面积远远超过现有技术和方法。当样品逐孔流过串珠样排列的微孔时，可与固相中的生物探针特异结合（具有过滤、亲和层析、分离与浓缩效用）；同时被固相吸附后的样品液不再与样品原液混合，减少了被检测物（如抗原/抗体等）因反复扩散、平衡而被稀释的影响，故更加灵敏。此外，由于省略了复杂的分离纯化和苛刻的解吸附过程，故所获得的固相化的被包被物的生物活性将会更高，同时纯度也将进一步提高，这一因素也将进一步提高检测分析的灵敏性；5. 操作简便，节省样品与试剂。采用本发明所述的高密度微孔板进行检测分析，样品、标本、标记物、洗液和底物沿微流路逐一流经各孔，改变了传统和现有技术分别反应、清洗或在较大的容器中反应和浸洗的操作方式，因此可解决因样品不易获得和标记物价格昂贵所带来的困扰，可大量节约试剂，并且易于实现全自动化操作；6. 定量分析更准确。本方法将数十种甚至数千种化学物质和生物分子的检测分析集中在一块检测板上同时进行，根据检测板中各微孔中荧光、胶体金沉积、发光的有无，或成色产物的生成与否，对照其排列位置，不仅可以确定样品的组成及各组分的来源、含量，组织/细胞定位，同时又便于不同样品间和同一样品不同成分间的平行比对。微珠的包被可在同一试管中一次性大量制备，从而可保证各复孔和各检测板之间的检测结果的平行一致。在需要对某一成分进行定量分析时，通过增加相同包被物平行包被的复孔数量，配合微流路解决了定量分析的问题；7. 保留了传统和现有检测方法重复性好，准确性高、可靠性强等优点。8. 用途更广泛。本发明不仅可直接用于疾病的诊断、新药的开发和蛋白质组学等现代生命科学的研究与开发；

而且还可以对感兴趣的微孔还可直接在检测板中进行氨基酸序列与变异、蛋白质的糖基化、磷酸化、以及分子功能与组织/细胞及亚微或超微结构定位等进一步分析。

附图说明

图 1 为检测板基本结构示意图。

图中所示为板体 1、板盖 2、微孔 3、微槽 4，镶嵌在微孔 3 中的微珠 9 以及经微槽 4 与微孔 3 相通的进液孔 6、出液孔 7，和密封垫 8 等结构；板盖 2 可与微槽 4 形成微管 5，图中微孔 3 与微槽 4、进液孔 6、出液孔 7 和密封垫 8 形成微流路。

图 2 为 3 种典型检测板的外观结构示意图

图中 2A, 2B, 2C 分别为 3 种典型检测板的外观结构示意图，图中所示为进液孔 6、出液孔 7，驱动孔 19，定位孔 20 和视窗 21 等结构。

图 3 是图 2A 中虚线框 A 部分的放大图。

图 3A 为平面示意图，图中所示为板体 1、微孔 3、不连续的微槽 4，镶嵌在微孔 3 中的微珠 9，以及与微槽 4 相通的出液孔 7、密封垫 8；

图 3B 为图 3A 的 A-A 剖面图，图中所示为板体 1、板盖 2、微孔 3、微槽 4，微管 5，镶嵌在微孔 3 中的微珠 9，出液孔 7、密封垫 8 等；图中微孔 3 上端的微槽 4 与板盖 2 形成微管 5，并与下端的微管 5 将微孔 3 两两相连，与进液孔 6、出液孔 7 等形成完整的微流路。

图 4 是图 2A 中虚线框 B 部分的放大图。

图 4A 为平面示意图，图中所示为微孔 3、微槽 4，镶嵌在微孔 3 中的微珠 9；

图 4B 为图 4A 的 A-A 剖面图，图中所示为板体 1、板盖 2、微孔 3、镶嵌在微孔 3 中的微珠 9；图中微孔 3 两端的微槽 4 与板盖形成微管 5 将微孔 3 两两相连，与进液孔 6，出液孔 7 等形成完整的微流路。

图 5 是具有不同微流路的检测板的局部放大图。

图中所示为微孔 3、微槽 4，镶嵌在微孔 3 中的微珠 9；图中两个相邻微孔的侧壁上有微管 5，其上端的开口与微槽 4 相通，微槽 4 与板盖 2 形成微管 5，微管 5 上下两端的开口将微孔 3 两两相连，并与进/出液孔等形成完整的微流路。

图 6 是微珠 9 的结构示意图。

图 6A 显示呈多面体的微珠 9，表面连有带活性基团 R 的手臂分子 10；

图 6B 是多面体微珠 9 的剖面图，显示多孔结构，微珠 9 的表面通过带活性基团的手臂分子 10 连接化学/药物分子 11，生成药物微珠 17；

图 6C 是球体微珠 9 的外观结构示意图，表面通过带活性基团的手臂分子 10 连接生物分子 12，获得生物微珠 18。

图 6D 是用纤维膜制成的片状微珠 9，表面吸附生物分子 12，产生生物微珠 18。

图 7 是部分手臂分子的结构示意图。

图中以微珠为例，显示微珠 9 的表面分子或涂层 10 所带各种不同化学基团的分子结构。图中 10 为带有化学活性基团的手臂分子；图中各微珠手臂分子 10 所带的活性基团分别为：图 7.1 为醛基；图 7.2 为羧基；图 7.3 为环氧乙基；图 7.4 为乙二醇；图 7.5 为氨基；图 7.6 为巯基；图 7.7 为吡内酯基团；图 7.8 为氰酸酯基团；图 7.9 为环化亚胺碳酸盐基团；图 7.10 为酰基咪唑基团；图 7.11 为咪唑碳酸盐基团；图 7.12 为碘乙酰基团；图 7.13 为溴乙酰基团；图 7.14 二硫吡啶基团；图 7.15 为二硫硝基苯甲酸基团；图 7.16 为亚氨基二

乙酸基团；图 7.17 为偶氮盐基团；图 7.18 为辛胺基团；图 7.19 为 NHS 基团；图 7.20 为三氟乙酰磺酰氯基团；图 7.21 为对甲基苯基磺酰氯基团；图 7.22 为胍基基团；图 7.23 为酰胍基基团；图 7.24 为氰尿酸基基团；

图 8. 为蛋白或抗体包被反应示意图

图 8A 中显示微珠 9 表面的手臂分子 10 的化学活性基团—溴乙酰基团与蛋白分子 12 上的巯基反应，将蛋白分子连接在微珠表面，生成生物微珠(18)；

图 8B 中显示微珠 9 表面手臂分子 10 的化学活性基团—酰胍基团与半抗原药物分子(11)上的醛基反应，将药物分子连接在微珠表面，生成药物微珠 (17)；

图 8C 中显示微珠 9 表面手臂分子 10 的化学活性基团—吡内酯基团与抗体分子 (22) 上的氨基反应，将抗体蛋白分子连接在微珠表面；

图 8D 中显示微珠 9 表面手臂分子 10 的化学活性基团—环化亚胺碳酸盐基团与抗体分子 (22) 上的氨基反应，将蛋白分子连接在微珠表面；图 9 抗原免疫微珠和抗体免疫微珠的分子结构示意图

图 9A 为抗原免疫微珠 25 的分子结构示意图，图中微珠 9 借助手臂分子 10 将抗原特异性抗体 22 包被在其表面；抗原 24 通过抗原抗体反应，被抗体 22 吸附在微珠 9 的表面，再经蛋白质偶联反应将抗原 24 与抗体 22 通过化学键连接生成抗原免疫微珠 25；

图 9B 为抗体免疫微珠 29 的分子结构示意图，图中微珠 9 借助手臂分子 10 将抗小鼠免疫球蛋白 Fc 段抗体 26 (抗抗体) 包被在其表面，小鼠单克隆抗体 28 (在此为抗原) 通过抗原抗体反应被抗抗体 26 吸附在微珠 9 的表面，再经蛋白质偶联反应，小鼠单克隆抗体 28 与抗抗体 26 通过化学键连接生成抗体免疫微珠 29。

图 10. 为几种具有代表性的实验方法基本原理示意图

图 10.1 为直接法。图 10.2 为间接法。图 10.3 为夹心法。图 10.4 和图 10.5 为竞争法，后者为双标记法。图 10.6 为桥联法 (直接标记)。图中显示微珠 9，带活性基团的手臂分子 10，半抗原药物分子 11，不同标记分子 13 和 13'，不同特异性标记物 14 和 14'，HRP 酶 15，底物 16，已知特异性抗体 22，已知特异性抗原 24，未知被检抗原 30，未知被检抗体 31，半抗原药物分子的靶蛋白 32，亲合素或链亲合素 33，生物素 34，生色产物或发光产物 35。

具体实施方式

本发明在实施中的基本操作步骤和方法如下：

一. 检测板的制备：检测板的制备方法包括以下基本方法和步骤：

1. 表面处理：微孔板和微珠的表面处理因所选材料的不同而略有不同，每种材料其具体处理方法和条件都有多种，本发明在此将《生物分子固定化技术及应用》(蒋中华等，1998 年，化学出版社) 及中国专利号为 01207812.3 和申请号为 00120798.9 的专利为主要参考文献。运用公知的各种生物大分子固相化技术，处理各种材料的微珠和微孔板，使其表面带有特定的活性基团 (如羟基、羧基、巯基、醛基、氨基、巯基、亲水/疏水基团，阳离子/阴离子和金属基团等，见图 7)，可与化学分子、药物分子和生物分子上的活性基团反应，而具有特定的吸附能力。如多孔玻璃微珠经严格清洗后用二甲苯浸洗，再经 70% 的乙醇漂洗、烘干；然后在 2% 丙氨基-三乙基硅烷无水丙酮溶液 (APES, 3-Aminopropyltriethoxysilane, Sigma 公司, 目录号 A3648) 中浸泡 30 秒, 用无水丙酮和蒸馏水顺序漂洗, 干燥 (Weetall, H. H., Biochem. Biophys. Acta, 1970;212:1)。或以商售的经表面处理的各种层析基质 (如溴化

氰活化的 Sepharose-4B), 多肽与寡核苷酸固相合成用的基质, 带各种活性基团的玻璃珠 (Sigma 公司) 等作为微珠的固相基质材料。

微孔板也可依据实验要求做不同的表面处理。如进行硅化处理或泰富隆 (Teflon) 涂层处理, 仅作为反应容器或微流路, 以减少实验中的非特异性吸附。

2. 包被: 微珠和微孔板的包被方法主要是①生物分子, 如抗原、抗体、细胞因子和酶等蛋白分子分别溶解在磷酸盐、碳酸盐等不同缓冲液中, 直接与经表面处理的聚苯乙烯微珠、玻璃珠、溴化氰活化的 Sepharose-4B 等共育, 使待包被的生物分子与微珠表面的活性基团充分反应, 并被固相化在微珠和微孔板的表面, 用水或缓冲液充分流洗, 以去除未固相化的游离生物分子; ②对生物小分子, 如半抗原、药物分子、皮质激素、甾体类激素等化学分子可直接通过活性基团连接在微珠上; ③先连接在蛋白分子载体上, 再将载体分子连接在微珠上; ④原位合成。运用固相化学合成技术, 将小肽、药物分子、先导化合物等直接在微珠表面合成。

3. 镶嵌微珠: 人工或用全自动机械手系统, 将不同包被处理的微珠 (具有不同的结合特性), 按一定顺序分别嵌入微孔板的各个微孔中。

4. 封盖: 使微孔、微槽与进/出液孔形成微流路, 并只能通过进/出液孔与外界相通。

5. 封闭: 经进/出液孔用封闭缓冲液以封闭去除微珠、微孔板或盖板 (或盖膜) 等表面可能残留的活性基团或非特异性结合位点, 以减少检测中可能出现的非特异性结合。由此即获得能与化学分子、生物分子、抗体和/或抗原, 酶/底物或拮抗剂、配基/配体、核酸探针、核酸/蛋白等特异性结合, 并可用于对结合物进行检测的三维立体镶嵌式高通量生物检测板。常用的封闭液添加剂有: 牛血清白蛋白 (0.5-5%)、脱脂牛奶 (1-6%)、酪蛋白 (0.5-2%)、白明胶 (0.1-0.5%), 正常动物血清 (0.5-5%) 和去垢剂等 (如 Tween 20, NP40, Triton X-100) 等。但蜂巢式检测板无微管、微槽或也无进/出液孔, 需封盖前封闭, 使用时揭掉粘封的盖膜即可使用, 漂洗方式采用浸洗。

二. 样品的检测分析

样品的检测分析一般包括以下基本步骤和方法:

1. 样品的制备: 根据检测目的的不同, 生物样品在检测前将分别进行不同的处理。常见样品处理方法包括: ①加入适量缓冲液以调节样品浓度或蛋白浓度, 离子强度和酸碱度等; ②细胞、微生物等颗粒抗原用裂解缓冲液配合匀浆或超声粉碎等处理使之成为真性溶液; ③离心或过滤去除悬浮物或颗粒物, 如血细胞等。

2. 样品的标记: ①直接标记。运用公知的生物分子标记技术, 分别用生物素、酶、荧光素、胶体金、同位素或稀土离子及其螯合剂等物质或其衍生物等标记分子作为指示剂直接标记样品或待检标本。②采用间接标记。用上述标记分子的标记物标记样品, 但标记反应是在完成加待检样品和流洗等步骤后进行。

3. 加待检样品: 将样品或处理样品经进液孔加入检测板中, 使之与各孔中的微珠表面已固相化的不同化学分子、生物分子等进行反应。被检样品中与固相对应生物分子被捕获并特异结合或吸附, 剩余的和未结合的部分经出液孔流出检测板。

4. 流洗或浸洗: 借助检测板的微流路, 用洗液流洗, 蜂巢式检测板可通过进/出液孔流洗或经视窗 (21) 浸洗, 以去除板中残留的被检样品 (未结合物或称游离物) 或标记物等。

5. 结果分析: 根据标记分子的不同, 目测或用扫描仪等仪器观察并记录各孔反应的有无以

及强弱（如生成产物颜色的深浅、胶体金沉积、荧光强度、放射强度等的强弱变化）。对照微珠的排列位置，借助计算机分析即可以确定该样品中，被检测物的组成以及各组分的含量。但是在标记物为蛋白酶时，操作中必须增加添加底物等操作步骤才能观察检测结果，其检测结果为呈色反应或发光反应。

本发明在实施中，上述操作步骤依据其包被物、被检测物、标记物和显示结果等的不同，可有多种组合方式。以抗原抗体的检测为例，下面结合附图详细说明：

1. 直接法：将包被了不同特异性抗体(22, 22', 22'')的生物微珠—抗体微珠(23, 23', 23'')分别镶嵌在不同的微孔(3)中，封盖，加封闭液封闭非特异性结合位点。将样品用标记分子(荧光素 13)标记后，直接经进液孔(6)加入检测板中。样品流经微孔时，其中的未知抗原(30, 30', 30'')与各微孔中抗体微珠(23, 23', 23'')表面包被的对应抗体分子(22, 22', 22'')分别结合，未结合的部分随样品液经出液孔(7)流出。用洗液(如 PBST, 50mM PB, pH7.0-7.6, 100mM NaCl, 0.05% Tween 20)流洗，去除残留的样品和非特异结合的样品，荧光显微镜或扫描仪观察并记录检测结果。微孔中有荧光，表示被检样品中有与抗体(22, 22', 22'')对应的未知抗原(30, 30', 30'')，反之则为阴性。分析阳性孔反应的强弱，即可知道样品中被检样品成分含量的变化。见图 10.1。

2. 间接法：将乙肝 24^A、丙肝 24^B、艾滋病 24^C、梅毒 24^D、疟原虫 24^E等不同特异性抗原多肽(24)通过固相多肽合成仪原位合成获得抗原包被的生物微珠(18^A, 18^B, 18^C, 18^D, 18^E等)，分别镶嵌在不同的微孔(3)中，封盖，加封闭液封闭非特异性结合位点。将处理好的样品(如患者血清，含未知抗体 31)，不标记直接经进液孔(6)加入检测板中反应，样品流经各微孔时，其中的未知抗体(31^A, 31^B, 31^C, 31^D, 31^E)与各微孔(3)中抗原微珠(18)表面包被的抗原分子(24)结合，未结合的部分随样品液经出液孔(7)流出。流洗以去除残留的和未反应的样品，加入标记分子(荧光素 13)标记的抗人免疫球蛋白抗体(抗抗体)的标记物(14)反应，流洗去除未结合的游离标记物，观察并记录检测结果。如只有镶嵌包被乙肝抗原 24^A的抗原微珠所在的孔反应阳性，就表示被检者血清中有与乙肝抗原对应的未知抗体 31^A，由此可推断，患者可能有或有过乙肝的感染，无其它相应病原体的感染。见图 10.2。

3. 夹心法：将包被了不同特异性抗体(22, 22', 22'')，如大鼠抗小鼠不同类、亚类、型和亚型抗体的单克隆抗体的纤维素膜片(抗体微珠 23, 23', 23'')，分别镶嵌在不同的微孔(3)中，封盖，加封闭液封闭非特异性结合位点。经进液孔(6)将待检样品(含小鼠单克隆抗体的杂交瘤细胞培养液)加入检测板(可用蜂巢式微孔板)中反应，样品流经微孔时，其中的未知抗体(30, 30', 30'')(在此作为抗原)与各微孔(3)中纤维素膜片上包被的抗体分子(22)分别结合，未结合的部分随样品液经出液孔(7)流出。流洗或浸洗以去除未反应的游离抗原—小鼠单克隆抗体(30)，再加入胶体金(13')标记的兔(或羊等)抗小鼠免疫球蛋白的抗体(种特异性抗抗体 14')进行反应，流洗去除未结合的游离标记物，目测各孔的反应，阳性孔既表示被检培养液中的单克隆抗体为该型和该亚型的抗体。见图 10.3。

4. 竞争法：将包被了不同特异性抗体(22)的抗体微珠(23)分别镶嵌在不同的微孔(3)中，封盖，加封闭液封闭非特异性结合位点。将荧光素 Cy3(标记分子 13)标记的已知样品(抗原标记物 24)与未标记的待检样品(抗原 30)混合，然后加入检测板，待检样品(抗原 30)与标记的已知抗原(31)竞争结合检测板中包被的固相化抗体(22)，流洗或浸洗去除游离的已知样品(抗原标记物 31)和待检样品(抗原 30)，用荧光显微镜或扫描仪等仪器观察

记录各孔荧光反应的有无与强弱变化, 见图 10.4。荧光强的表示待检样品中该抗原无或含量较低, 反之则表明含量较高。对照标准曲线, 可做出较为精确的定量分析。实施中也可以分别用不同颜色的荧光素(13'), 如用 Cy5 标记待检样品(抗原 30) 既双标记, 或多标记实验进行, 见图 10.5。

5. 桥联法: 将包被了不同化学药物分子(半抗原 11) 的药物微珠(17) 分别镶嵌在不同的微孔(3) 中, 封盖, 加封闭液封闭非特异性结合位点。加入亲合素或链亲合素(33) 标记的待检样品(药物 11 的靶蛋白分子 32), 缓冲液流洗或浸洗去除样品中未结合的游离药物靶蛋白分子, 再加入生物素(34) 标记的 HRP(酶 15); 缓冲液流洗或浸洗去除未结合的游离酶标记物, 加入底物(16), 阳性孔生成有色产物或发光产物(35), 观察各孔的颜色变化或发光强弱, 判断分析结果。在前述的操作方法 1-4 中, 均可采用桥联法进行, 以运用其放大作用提高检测的灵敏度。

实施中, 在同一检测系统中, 常需同时进行对应抗原和抗体的检测, 以判断患者的免疫力、感染状态及传染性。最简捷的解决方案是直接法和直接桥联法, 但直接法因灵敏度低, 而较少采用; 其次是双标记或多标记法, 再其次是采用分区板法(申请号为 00120798.9)。本发明在实施中也可选用中国专利号为 01207812.3 和申请号为 00120798.9 所述的微孔板和专用检测板及技术方案。在以酶为标记物和需要对感兴趣的反应孔做进一步分析时, 优选本发明所述的检测板, 特别是具有图 5 所示微流路特征的检测板。

检测板中的镶嵌微珠在进行免疫学检测时将优选多孔和实心的聚苯乙烯珠和玻璃珠。聚苯乙烯微珠将采用同位素照射、浓硫酸/重铬酸钾或硝酸浸泡等处理; 并根据灵敏度和后续分析处理等需要的不同分别采用多聚赖氨酸或戊二醛处理, 也可以选用商售聚苯乙烯珠、玻璃珠和多肽固相合成用的固相基质。

下面结合实施例对本发明做进一步的说明。

实施例 I: 三维立体镶嵌式高通量生物检测技术在预防先天畸形和宫内感染中的应用。

风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、柯萨基病毒、弓形体是引起宫内感染并导致胎儿畸形的主要病原体; 乙肝、梅毒和艾滋病等是可以垂直传播引起新生儿感染的传染性疾病的病原体。对育龄和妊娠妇女开展上述病原体感染的检测诊断是预防先天性畸形和新生儿感染的重要手段, 在实施中的具体操作步骤如下:

1. 包被微珠的制备:

①微珠的制备可因所选固相基质材料的不同而有所不同, 在此仅以聚苯乙烯微珠为例。经同位素照射的聚苯乙烯塑料微珠用洗液(浓硫酸和重铬酸钾溶液)浸泡过夜, 蒸馏水漂洗、烘干。用 0.1—5% 的戊二醛溶液浸泡处理, 漂洗, 分装于不同的试管中; 或用 0.05—0.5mg/ml 的多聚赖氨酸浸泡处理, 分别加入含上述病原微生物不同抗原(0.5—100ug/ml) 的碳酸缓冲液(CB, 50mM, pH8.6—10.0), 常温孵育 6 小时或 4℃ 过夜。CB 充分漂洗后, 加入封闭液(PBS, 50mM pH6.8—7.8, NaCl 100mM, 含 1—5% 正常血清和其它封闭液添加剂) 封闭非特异性结合位点。

②以氨基酸合成仪通过固相合成的上述病原微生物的特异性半抗原小肽为抗原, 直接以其固相载体微珠与合成产物为包被微珠(不经裂解或断链处理), 分装于微量反应管中加入封闭液(PBS, 50mM pH6.8—7.8, NaCl 100mM, 含 1—5% 正常血清和其它封闭液添加剂) 封闭非特异性结合位点。

2. 检测板的制备:

从进液孔(6)端开始,将上述封闭处理的微珠依序嵌入微孔板的微孔中,加盖封板。经进液孔加入封闭液,常温孵育6小时或4℃过夜。

3. 检测样品:

待检者血清20ul, PBS 适量稀释,取100ul经进液孔加入检测板中,室温孵育20分钟; PBST(PBS含0.01-0.2% Tween 20)流洗5-10分钟;加入含Cy3标记的羊抗人IgG和Cy5标记的羊抗人IgM混合液100ul,室温孵育20分钟; PBSA(PBST含2%BSA)流洗5-10分钟。

4. 观察结果:

检测板置荧光显微镜或扫描仪分析结果。Cy3 阳性表示有感染史,超过标准值提示有近期感染; Cy5 阳性表明近期感染,可能处于带毒状态,有传染性,不宜妊娠。

实施例 II: 三维立体镶嵌式高通量生物检测技术在细胞蛋白质组表达谱研究中的应用。

对个体而言,尽管全身各组织器官的细胞所携带的基因都相同,但表达的蛋白种类和数量则千差万别。研究细胞蛋白质组表达谱不仅有助于了解细胞的正常功能和调控机制,而且还可以帮助人类了解病理或异常状态下的功能状态和调控机制,为疾病的诊断、治疗提供标志分子或靶分子。

1. 微珠的制备:

①微珠的制备在此以经过进一步颗粒筛分的商售多孔玻璃珠为固相基质,按厂商产品说明书要求将纯化的抗不同蛋白质抗原的单克隆抗体与之共育,反应完成后,充分漂洗并封闭残留的活化基团,将封闭处理的包被微珠分装于不同的试管中。

②将包被有抗小鼠免疫球蛋白Fc段抗体(26)的抗抗体微珠(27)与含有小鼠单克隆抗体(28)的杂交瘤细胞培养液或腹水共育,通过抗原抗体反应将单克隆抗体吸附在微珠表面,待充分反应后,用缓冲液漂洗;加入戊二醛处理30-60分钟,Tris缓冲液充分漂洗,获得包被有小鼠抗特异性抗原单克隆抗体的生物微珠-抗体免疫微珠(29)。

2. 检测板的制备:

从进液孔端开始,将包被有不同特异性单克隆抗体的微珠依序嵌入微孔板的微孔中,加盖封板,经进液孔加入封闭液,常温孵育6小时或4℃过夜。

3. 检测样品:

裂解处理的组织或细胞液,取适量测定蛋白浓度,经荧光标记后,取适量调整体积至300-500ul,经进液孔缓慢加入检测板中,室温孵育30-60分钟;流洗5-10分钟。

4. 观察结果:

荧光显微镜或扫描仪分析结果。比较不同来源或经不同处理的组织细胞的蛋白质组表达谱,分析差异谱带与功能或疾病的关系,确定感兴趣的蛋白谱带。

5. 质谱分析:

对分析中感兴趣的蛋白谱带,对照检测板中微珠的排列,取出相应的微珠置微量反应试管中,加入解吸附液,然后取适量进行质谱分析以测定蛋白质的分子量;或在原反应孔中加入胰蛋白酶(蛋白质水解酶),室温或37℃反应2-6小时或消化过夜,取适量点样进行质谱分析,获得蛋白指纹图谱,通过计算机检索以分析蛋白质的氨基酸顺序。

6. 蛋白质磷酸化分析:

取适量酶水解液,加入适量体积的细菌碱性磷酸酶(溶于HEPES 20mmol/L, pH7.0,含

NaCl 150mmol/L, 0.1% Triton X-100, 10% 甘油), 30°C 反应 60 分钟, 取适量进行质谱分析; 或将复孔中的微珠取出置微量反应试管中, 加入磷酸酶, 待反应彻底后加入解吸附液, 然后取适量进行质谱分析, 对照未经磷酸酶处理的微珠分析结果, 以测定和分析蛋白质有无磷酸化以及磷酸化的可能部位。

7. 蛋白质糖基化分析:

将微珠取出置微量反应试管中或在原孔中, 加入 PNGase 试剂 (溶于 Tris-HCl 缓冲液中, 20 mmol/L, pH7.2, 含 50mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA) 适量, 37°C 反应 60-120 分钟, 取适量进行质谱或色谱分析, 以测定和分析蛋白质有无糖基化及糖基化的程度。

8. 蛋白质等电点和分子量测定

取适量细胞裂解液, 根据步骤 4 的分析结果, 与对应微珠反应, 充分漂洗后, 分装于不同的微量试管中, 分别加入专用等电聚焦和 SDS-PAGE 电泳样品缓冲液, 取出适量分别电泳, 以测定等电点和分子量。

实施例 III: 三维立体镶嵌式高通量生物检测技术在新药开发研究中的应用。

在新药的研究开发中, 通常是根据靶蛋白分子的三维晶像结构或已知的药物分子结构, 合成大量具有不同细微结构差异的新的化合物-先导化合物。对新合成的先导化合物需进行结合力, 结合特异性, 代谢途径和代谢速度等的高通量分析, 以分析新合成的先导化合物的化学结构与药效和药性及其与毒性的关系。

1. 微珠的制备:

微珠的制备以商售的活化或修饰的玻璃微珠 (Sigma 公司), 聚苯乙烯等树脂为载体基质, 运用不同的药物合成途径和技术路线进行固相合成, 可获得具有不同化学基团和分子结构的各种先导化合物。新获得的先导化合物连同固相合成载体, 不经解链处理, 作为包被微珠直接使用。

2. 检测板的制备:

从进液孔端开始, 将带有先导化合物的树脂颗粒或微珠依序分别嵌入微孔板的不同微孔中, 加盖膜或盖板封板, 经进液孔加入封闭液, 封闭非特异性结合位点。

3. 检测样品:

荧光标记的靶蛋白分子溶于 PBS 或 TBS(Tris-HCl)等适宜缓冲液中, 取适量体积 (50-500ul)经进液孔加入检测板中, 室温孵育 30-60 分钟, 用 PBS 或 TBS 流洗 5-10 分钟。

4. 观察结果:

用激光共焦显微镜、扫描仪或荧光显微镜记录结果。

5. 流洗: 分别用不同酸碱度的缓冲液系统 (如醋酸缓冲液、PBS 或 TBS 等) 和不同离子强度的缓冲液流洗 5-10 分钟。

6. 每次流洗后用激光共焦显微镜、扫描仪或荧光显微镜记录结果。分析检测板各孔在不同流洗条件下, 荧光强度的变化, 以获得各不同先导化合物与靶蛋白分子的亲合力, 结合稳定性, 细微结构变化对先导化合物与靶分子结合稳定性的影响。

本发明把固相合成技术和吸附层析、毛细管电泳等分离技术与生物芯片等分析技术相结合, 是一种全新概念的生物学分析检测技术, 集数种技术的优点于一身, 具有信息量大、定量准确、灵敏度高、制造成本低等突出优点, 可广泛用于生物学、医学、药物学, 环境科学等领域。

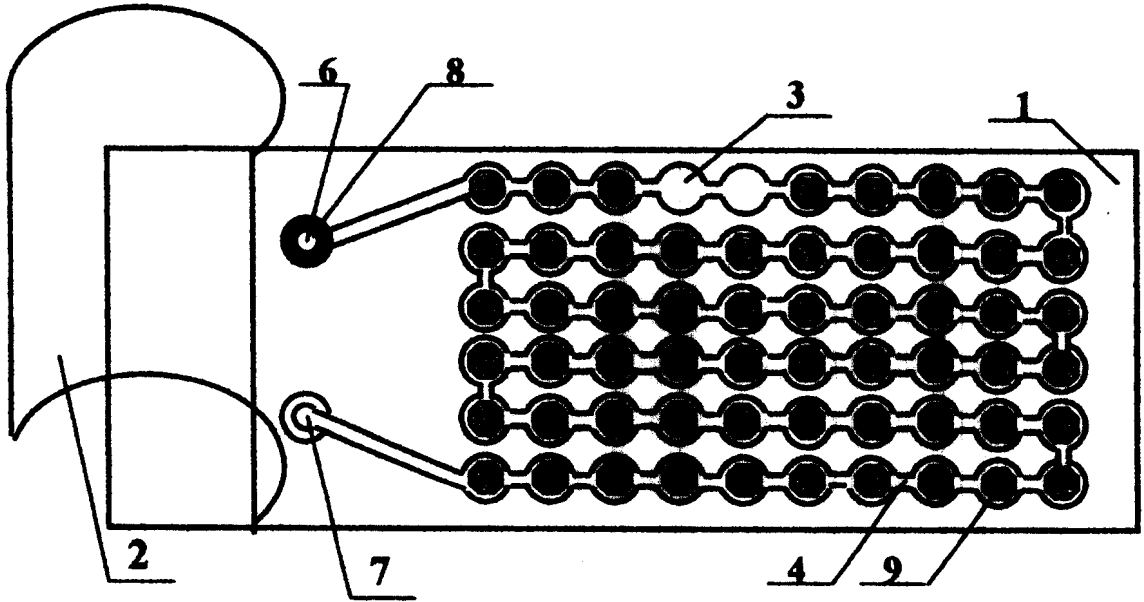


图1

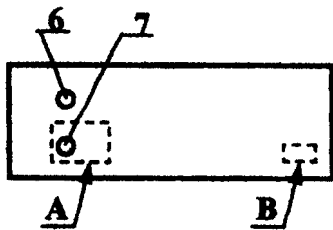


图2A

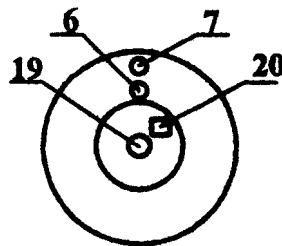


图2B

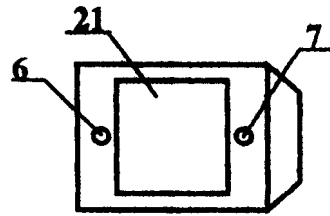


图2C

图2

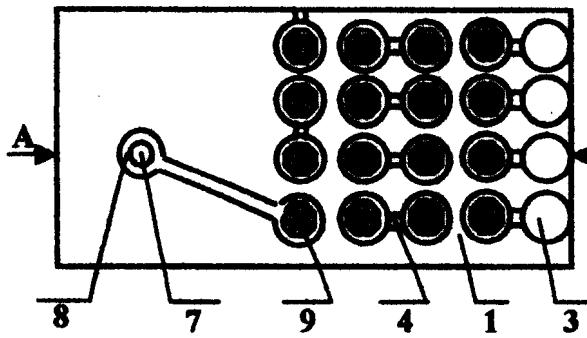


图3A

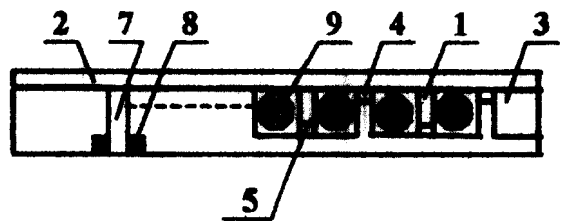


图3B

图3

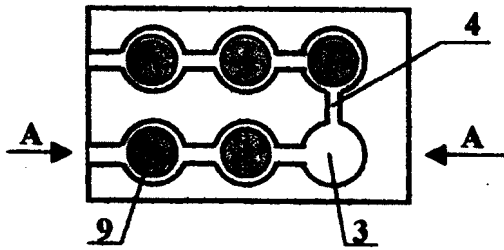


图4A

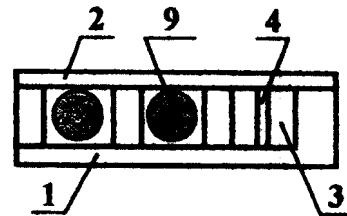


图4B

图4

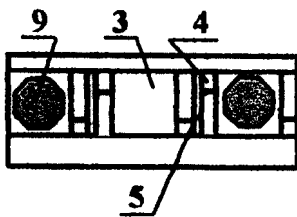


图5

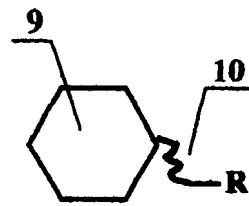


图6A

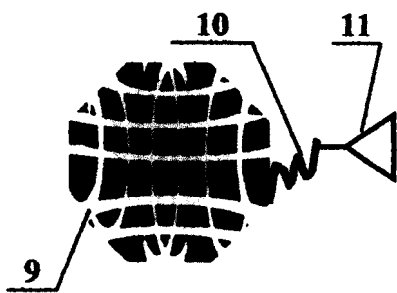


图6B

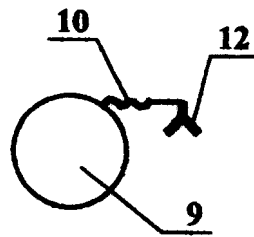


图6C

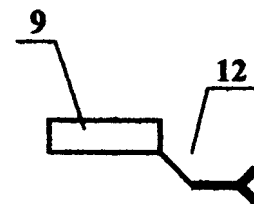


图6D

图6

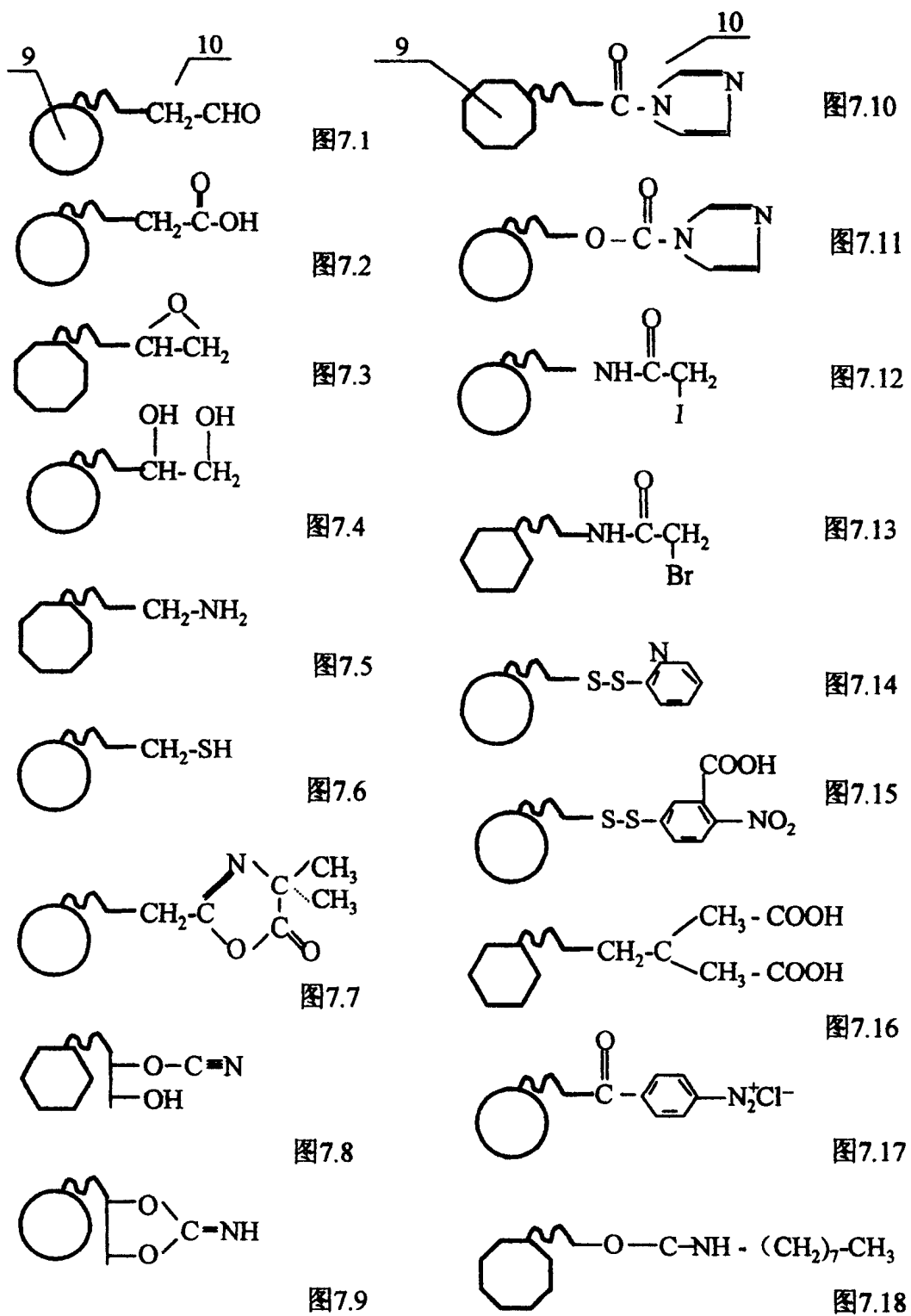


图7

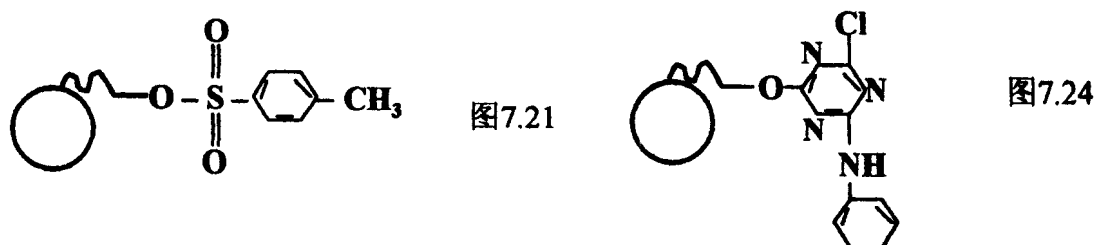
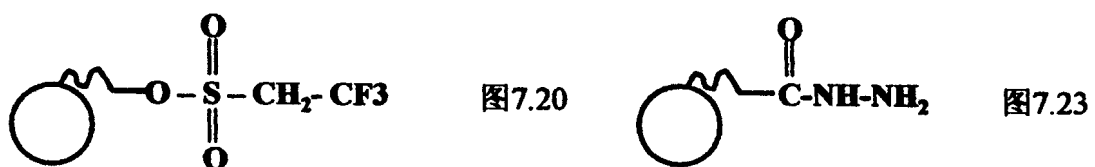
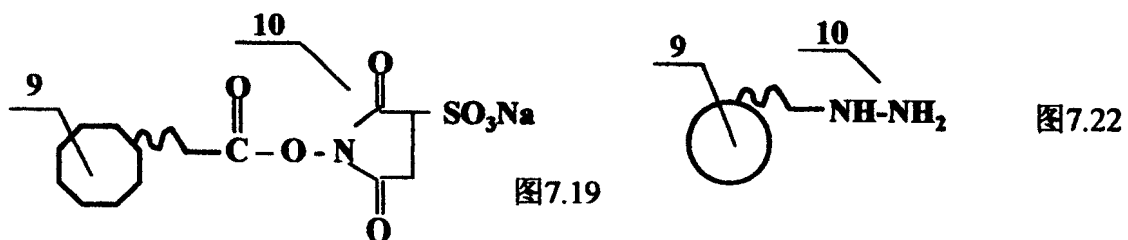


图7

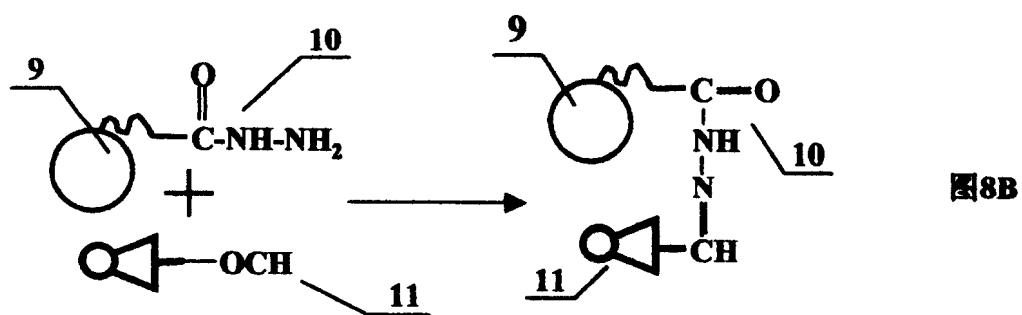
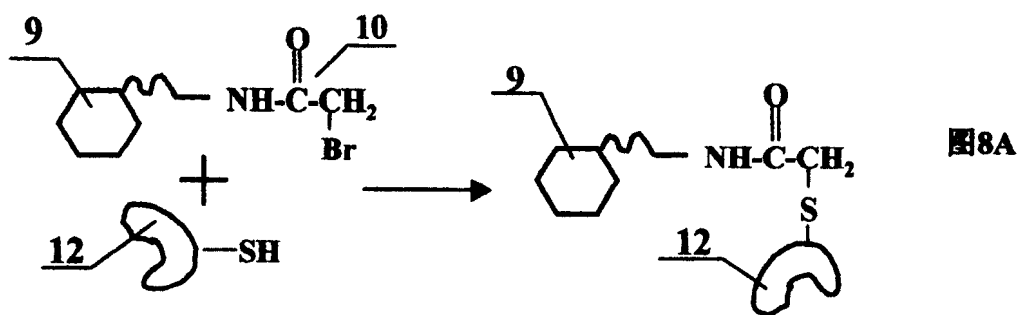


图8

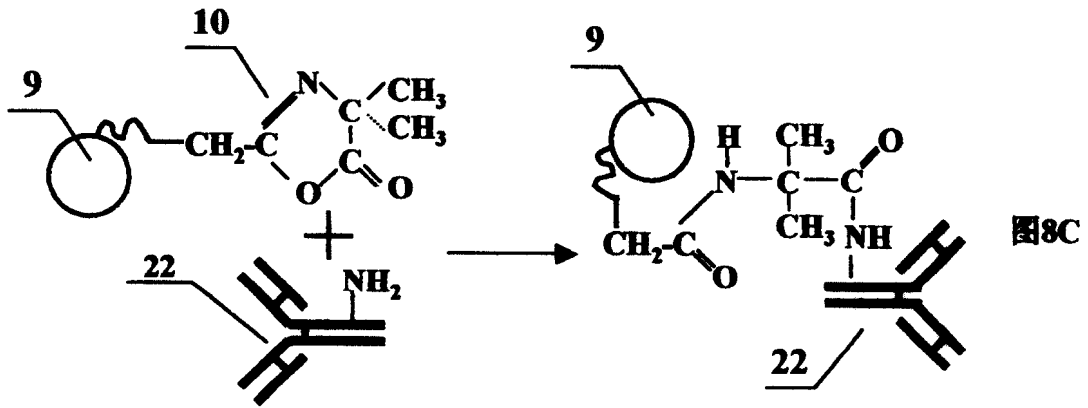


图8C

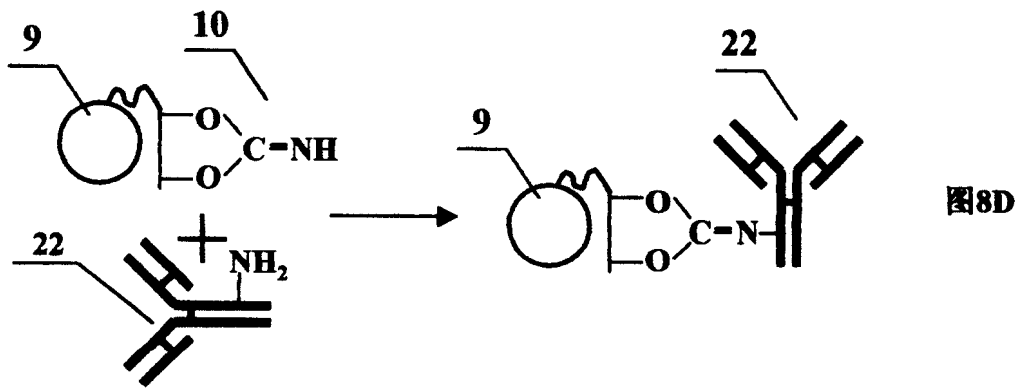


图8D

图8

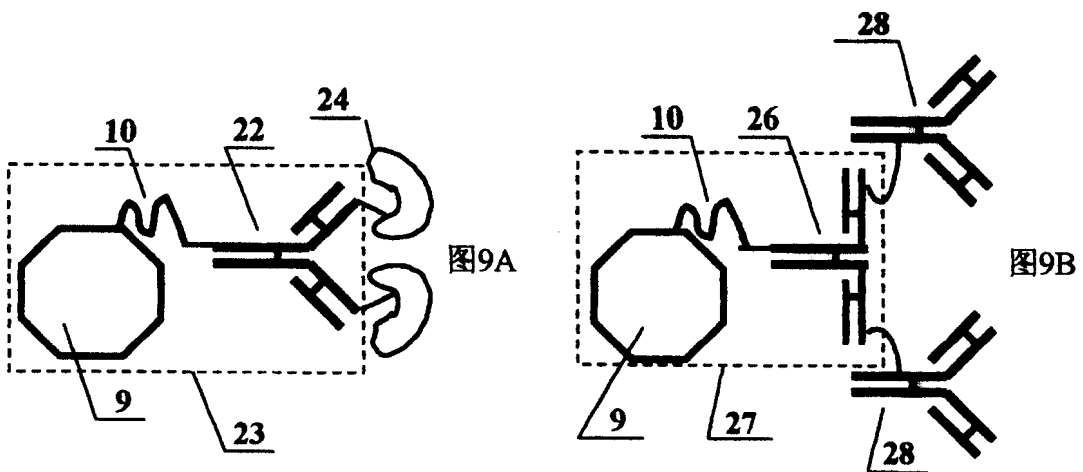


图9A

图9B

图9

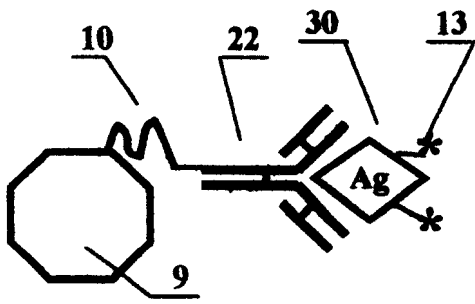


图10.1

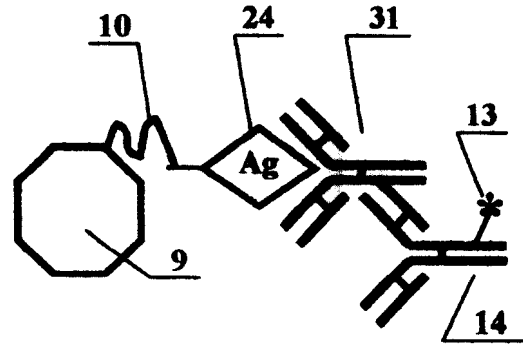


图10.2

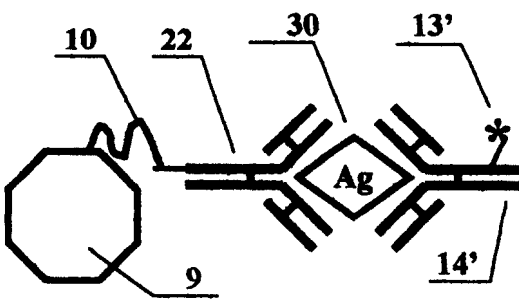


图10.3

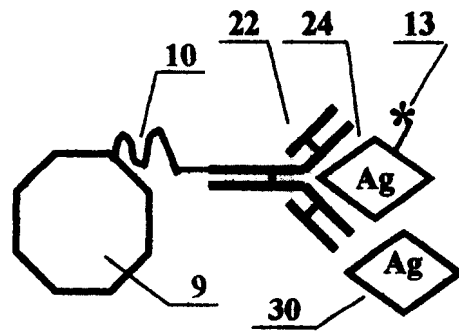


图10.4

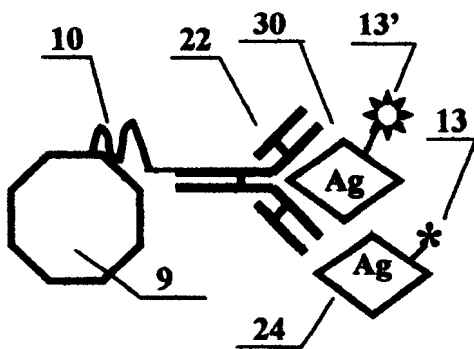


图10.5

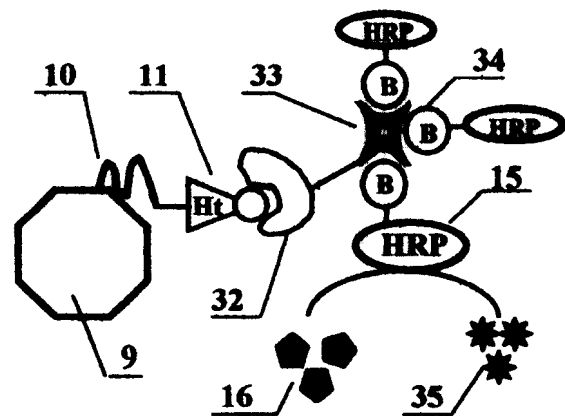


图10.6

图10

专利名称(译)	镶嵌式高通量三维立体生物检测方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN100414296C	公开(公告)日	2008-08-27
申请号	CN02121325.9	申请日	2002-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	赵翀		
申请(专利权)人(译)	赵翀		
当前申请(专利权)人(译)	赵翀		
[标]发明人	赵翀		
发明人	赵翀		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/68 C12Q1/68		
审查员(译)	马秋娟		
其他公开文献	CN1464307A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种镶嵌式高通量三维立体生物检测技术及试剂盒的制备方法，该技术灵敏快速、信息量大，制造简便、成本低，可对样品中多种不同的生物/化学成分、细胞或微生物等同时进行检测分析。主要特征在于将包被不同化学或生物分子的微珠，分别镶嵌在检测板的不同微孔中，微孔间有微管相连，并同进/出液口形成微流路与外界相通，样品经微流路与微珠表面的包被分子反应，其结果用目测或仪器记录分析。可广泛地用于环境检测、医药研究、疾病诊断和蛋白质组学等领域的研究与开发。

