



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102338801 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201110224063. 1

CN 102095869 A, 2011. 06. 15,

(22) 申请日 2011. 08. 05

CN 101696975 A, 2010. 04. 21,

(73) 专利权人 嘉兴艾锐生物科技有限公司

CN 101629957 A, 2010. 01. 20,

地址 314100 浙江省嘉兴市嘉善县罗星街  
道晋阳东路 568 号综合楼 3 号孵化楼  
3101 室

CN 1414389 A, 2003. 04. 30,

JP 2011122957 A, 2011. 06. 23,

李红梅等. ELISA 测定中 TMB 显色体系的优化  
及其稳定性研究. 《生物技术通报》. 2010, (第 2  
期), 第 126-130 页.

(72) 发明人 张灿

审查员 舒霏霏

(74) 专利代理机构 湖州金卫知识产权代理事务  
所(普通合伙) 33232

代理人 赵卫康

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102095869 A, 2011. 06. 15,

权利要求书3页 说明书15页

(54) 发明名称

一种高灵敏度免疫芯片检测系统及其使用方  
法

(57) 摘要

本发明涉及一种高灵敏度蛋白芯片检测系统  
及其使用方法,属于生物芯片技术领域。它包括  
芯片反应系统和显色系统;芯片反应系统包括载  
体、反应液和洗涤液;显色系统包括检测液和终  
止液;所述载体上包被有能与生物学指标特异性  
结合的探针点阵或质控点;反应液包括两种,一  
种为能与生物学指标结合的生物素标记物,另一  
种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物;或  
者反应液为过氧化物辣根酶标记的能与生物学指  
标相结合的物质;终止液为 0.01 ~ 10.0 (w/v)%  
的叠氮钠溶液。本发明具有检测速度快、灵敏度  
高的优点。

CN 102338801 B

1. 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,其特征在于:它包括芯片反应系统和显色系统;芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液;显色系统包括检测液和终止液;

所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点;

反应液包括两种,一种为能与生物学指标结合的生物素标记物,另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物;或者

反应液为过氧化物辣根酶标记的能与生物学指标相结合的物质;

终止液为 0.01 ~ 10.0 (w/v)% 的叠氮钠溶液;

所述洗涤液的配方如下:

0.1 ~ 10 (v/v)% 的 TWEEN-20、0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH6 ~ 8 的 PB 缓冲液、0.1 ~ 20 (v/v)% 的 proclin300;

所述检测液包括 pH4 ~ 7 的 A 液和 pH2 ~ 7 的 B 液, A 液包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液, B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液;其中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.005 ~ 0.5 (v/v)%、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升;柠檬酸钠浓度为 0.01 ~ 0.1 摩尔每升, B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.01 ~ 1.0 毫克每毫升。

2. 根据权利要求 1 所述的一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,其特征在于:所述载体为孔径在 0.1 ~ 12 微米的多孔性微孔滤膜。

3. 根据权利要求 2 所述的一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,其特征在于:所述多孔性微孔滤膜为纤维素类微孔滤膜、尼龙类微孔滤膜或聚氟乙烯类微孔滤膜。

4. 根据权利要求 2 所述的一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,其特征在于:所述载体为聚乙烯、聚苯乙烯、硅橡胶或玻璃材料制成的各种可用于生物学检测的承载体。

5. 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统的使用方法,包括以下步骤:

1) 蛋白反应芯片的制作

用点样仪将一种或多种能与生物学指标结合的探针溶液或质控点以点阵的形式固化于载体上,室温干燥,2 ~ 8°C 密封保存;

2) 点样稀释液的配制

配制浓度为 0.01 ~ 0.5 摩尔每升的 PB 缓冲液,其中含有浓度为 0.01 ~ 20% 的水溶性色素;

3) 封闭液的配制

封闭液的配方如下:浓度为 1 ~ 10 (w/v)% 的 BSA 溶液、浓度为 1 ~ 10 (w/v)% 的蔗糖溶液、浓度为 0.1 ~ 10 (v/v)% 的 TWEEN-20、0.1 ~ 20 (v/v)% 的 proclin300、浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH 为 6 ~ 8 的 PB 缓冲液;

4) 洗涤液的配制

洗涤液的配方如下:0.1 ~ 10% (v/v) 的 TWEEN-20、0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH6 ~ 8 的 PB 缓冲液、0.1 ~ 20 (v/v)% 的 proclin300;

5) 能与生物学探针结合物质的生物素标记

①用无水 DMSO 配置 1 ~ 20 毫克每毫升的生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;

②用浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH6 ~ 9 的硼酸盐缓冲液为溶剂配制浓度至少为 5 毫克每毫升的能与生物学探针结合的物质溶液;

③按 10 ~ 200 微克每毫克的比率将生物素酯加入上述能与生物学探针结合的物质

溶液中,混合均匀后并在室温下孵育 1 h ~ 6h ;

④按每 100 ~ 500 微克生物素酯内加入 1 ~ 100 微升的浓度为 0.5 ~ 2.0 摩尔每升的氯化铵,室温孵育 5 ~ 60min ;

⑤将经过步骤③的能与生物学探针结合的物质溶液用 0.01 ~ 0.2 摩尔每升的 PBS、CBS、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液透析 2 ~ 48h 进行纯化,或再用蛋白 A 或蛋白 G 层析柱再次纯化能与生物学探针结合物质 ;

6) 链霉亲和素或能与生物学探针结合的物质与过氧化物辣根酶的复合物标记

①新鲜配制 1.0 ~ 10.0 毫克每毫升的 HRP 溶液 ;

②向 HRP 溶液中加入 0.1 ~ 1.0ml 新鲜配制的 0.01 ~ 2.0 摩尔每升的过碘酸钠,室温下避光静置或搅拌 ;

③将步骤②制得的溶液装入透析袋中,用 1 ~ 10 毫摩每升的 pH 为 4 ~ 7 的醋酸钠缓冲液进行透析,2 ~ 6°C 静置或搅拌 ;

④向步骤③制得的溶液中加入 10 ~ 100 微升 0.1 ~ 1.0 摩尔每升的 pH 为 7 ~ 10 碳酸盐缓冲液 ;

⑤向步骤④制得的溶液中加入 0.1 ~ 10 毫克的链霉亲和素或能与生物学探针结合的物质,室温避光轻轻搅拌 1 ~ 6 小时 ;

⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 0.1 ~ 1.0 毫升新鲜配制的浓度为 1 ~ 10 毫克每毫升的 NaBH<sub>4</sub> 溶液混匀,2 ~ 6°C 静置 1 ~ 6 小时 ;

⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中,用 0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH 为 6 ~ 8 的 PBS 溶液进行透析,2 ~ 6°C,过夜 ;

⑧将步骤⑦制得的透析液,在 1000 ~ 10000 rpm 条件下离心去沉淀,上清液为含 HRP- 链霉亲和素或 HRP- 能与生物学探针结合物质的复合物 ;

7) 检测液的配制

检测液包括 pH4 ~ 7 的 A 液和 pH2 ~ 7 的 B 液,A 液包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液,B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液 ;其中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.005 ~ 0.5 (v/v) %、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升 ;柠檬酸钠浓度为 0.01 ~ 0.1 摩尔每升,B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.01 ~ 1.0 毫克每毫升 ;

8) 终止液的配制

配制浓度为 0.01 ~ 10.0 (w/v) % 的叠氮钠溶液 ;

具体操作如下 :

首先将检测样本加到蛋白芯片上,通过摇床温育的方式,使样本溶液中多种生物学指标与芯片载体上包被的对应探针进行特异性的反应结合,然后将反应完成的载体用洗涤液进行洗涤,以减少其它干扰物质的非特性结合 ;接下来加入步骤 5) 制备的生物素标记好的能与生物学探针结合物质和步骤 6) 制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物或 HRP- 能与生物学探针结合物质的复合物,进行摇床温育,这样就形成了载体 - 探针 - 生物学指标 - 步骤 5) 制备的生物素标记的能与生物学探针结合物质 - 链霉亲和素 - 过氧化物辣根酶的复合物或载体 - 探针 - 生物学指标 - 能与生物学探针结合物质 - 过氧化物辣根酶的复合物,再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤,再加入检测液 A 液与 B 液的混合液以及终止液,完成整个芯片的反应过程,最后弃去载体上所有液体 ;如果待测样本中含有目标

检测的生物学功能指标,在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测,或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测;或

首先将封闭液滴加蛋白芯片中,再将检测样本加入蛋白芯片中,使样本溶液中的生物学指标与芯片载体上包被的对应探针进行特异性的反应结合,然后将反应完成的膜面滴加洗涤液进行洗涤,以减少其它干扰物质的非特性结合,接下来加入步骤5)制备的生物素标记好的能与生物学探针结合物质和步骤6)制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物或 HRP-能与生物学探针结合物质的复合物,进行摇床温育,这样就形成了载体-探针-生物学指标-步骤5)制备的生物素标记的能与生物学探针结合物质-链霉亲和素-过氧化物辣根酶的复合物或载体-探针-生物学指标-能与生物学探针结合物质-过氧化物辣根酶的复合物,再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤,再加入检测液 A 液与 B 液的混合液以及终止液,完成整个芯片的反应过程,最后弃去载体上所有液体;如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标,在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测,或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。

## 一种高灵敏度免疫芯片检测系统及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种高灵敏度蛋白芯片检测系统及其使用方法,属于生物芯片技术领域。

### 背景技术

[0002] 在现代血清学检测技术中,除了 ELISA 法之外,还经常采用放免法以及化学发光法等。ELISA 法在临床实验室已得到普遍的应用,特别是用于各型肝炎标志物的检测。但 ELISA 法由于操作程序复杂,时间较长,且需要价格昂贵的酶标仪等实验室非通用设备。ELISA 法需时较长的主要原因,是由于液相中的抗原(或抗体)需经扩散才能与固相上的抗原或抗体反应不适当地缩短反应时间,将使灵敏度降至临床要求以下。一步法快速检测试剂盒,虽可提高检测速度,但有出现假阴性结果的弊端。放免法只能进行单一指标的检测,单个指标检测也需要 2~4h,也需要价格昂贵的 R-计数器等专业设备,且存在着放射性衰减和污染。化学发光检测时间短且灵敏度高,但仍是标记方法的间接判读结果,未引入分子量等更为客观的结果判读体系,检测正确度易受影响,对每种指标的检测需专供设计,如多种抗体的检测存在检测时间长、成本较高的问题,不利于基层临床检验活动的开展。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是为解决现有技术中存在的问题,提供一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,该系统用于检测时具有检测速度快、灵敏度高的优点,它不需要荧光扫描仪等昂贵的设备,不需复杂的操作,不受实验条件的限制,在操作完成后即可直接或间接观察结果,大大缩短检测时间和劳动强度。

[0004] 本发明的上述技术目的是通过以下技术方案得以实现的:

[0005] 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,它包括芯片反应系统和显色系统;芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液;显色系统包括检测液和终止液;

[0006] 所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点;

[0007] 反应液包括两种,一种为能与生物学指标结合的生物素标记物,另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物;或者

[0008] 反应液为过氧化物辣根酶标记的能与生物学指标相结合的物质;

[0009] 终止液为 0.01~10.0(w/v)%的叠氮钠溶液。

[0010] 本发明上述技术方案中,与生物学指标可特异性结合的物质可以是抗原、抗体、SPA 蛋白、羊抗检测样本来源种属 IgG、鼠抗检测样本来源种属 IgG、其他动物免疫的抗检测样本来源种属 IgG、生物学指标的多克隆抗体等。

[0011] 本发明上述技术方案中,所述载体可以是羧基化等修饰后的载体,一般未修饰的载体其连接方式是物理吸附,修饰后的载体其连接方式是共价键结合;但无论是物理吸附和共价键结合均不会对本发明的检测产生本质影响。

[0012] 作为上述技术方案的优选,所述洗涤液的配方如下:0.1~10(v/v)%的 TWEEN-20、

0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH6 ~ 8 的 PB 缓冲液、0.1 ~ 20 (v/v) % 的 proclin300。

[0013] 作为上述技术方案的优选,所述检测液包括 pH4 ~ 7 的 A 液和 pH2 ~ 7 的 B 液, A 液包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液, B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液;其中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.005 ~ 0.5 (v/v) %、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升;柠檬酸钠浓度为 0.01 ~ 0.1 摩尔每升, B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.01 ~ 1.0 毫克每毫升。

[0014] 作为上述技术方案的优选,所述载体为孔径在 0.1 ~ 12 微米的多孔性微孔滤膜。

[0015] 作为上述技术方案的优选,所述多孔性微孔滤膜为纤维素类微孔滤膜、尼龙类微孔滤膜或聚氟乙烯类微孔滤膜。

[0016] 所述纤维素类微孔滤膜是指硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、醋酸纤维素与硝酸纤维素的混合物制成的膜、纤维素膜、玻璃纤维素膜等。

[0017] 所述聚氟乙烯类微孔滤膜是指具偏氟乙烯膜和具四氟乙烯膜等。

[0018] 作为上述技术方案的另一种优选,所述载体还可以是聚乙烯、聚苯乙烯、硅橡胶或玻璃材料制成的各种可用于生物学检测的载体。

[0019] 本发明的另一个目的是提供一种高灵敏度蛋白芯片检测系统的使用方法,它包括以下步骤:

[0020] 1) 蛋白反应芯片的制作

[0021] 用点样仪将一种或多种能与生物学指标结合的探针溶液或质控点以点阵的形式固化于载体上,室温干燥,2 ~ 8℃密封保存;

[0022] 2) 点样稀释液的配制

[0023] 配制浓度为 0.01 ~ 0.5 摩尔每升的 PB 缓冲液,其中含有浓度为 0.01 ~ 20% 的水溶性色素;

[0024] 3) 封闭液的配制

[0025] 封闭液的配方如下:浓度为 1 ~ 10 (w/v) % 的 BSA 溶液、浓度为 1 ~ 10 (w/v) % 的蔗糖溶液、浓度为 0.1 ~ 10 (v/v) % 的 TWEEN-20、0.1 ~ 20 (v/v) 的 proclin300、浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH 为 6 ~ 8 的 PB 缓冲液;

[0026] 4) 洗涤液的配制

[0027] 洗涤液的配方如下:0.1 ~ 10% (v/v) 的 TWEEN-20、0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH6 ~ 8 的 PB 缓冲液、0.1 ~ 20 (v/v) % 的 proclin300;

[0028] 5) 能与生物学探针结合物质的生物素标记

[0029] ①用无水 DMSO 配置 1 ~ 20 毫克每毫升的生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;

[0030] ②用浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH6 ~ 9 的硼酸盐缓冲液为溶剂配制浓度至少为 0.5 ~ 5 毫克每毫升的能与生物学探针结合物质溶液;

[0031] ③按 10 ~ 200 微克每毫升的比率将生物素酯加入上述能与生物学探针结合物质溶液中,混合均匀后并在室温下孵育 1 h ~ 6h;

[0032] ④按每 100 ~ 500 微克生物素酯内加入 1 ~ 100 微升的浓度为 0.5 ~ 2.0 摩尔每升的氯化铵,室温孵育 5 ~ 60min;

[0033] ⑤将经过步骤③的能与生物学探针结合物质溶液用 0.01 ~ 0.2 摩尔每升的 PBS、CBS、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液透析 2 ~ 48h 进行纯化,或再用蛋白 A 或蛋白 G 层析柱再次纯化能与生物学探针结合物质;

[0034] 6) 链霉亲和素能与生物学探针结合物质与过氧化物辣根酶的复合物标记

[0035] ①新鲜配制 1.0 ~ 10.0 毫克每毫升的 HRP 溶液；

[0036] ②向 HRP 溶液中加入 0.1 ~ 1.0ml 新鲜配制的 0.01 ~ 2.0 摩尔每升的过碘酸钠，室温下避光静置或搅拌；

[0037] ③将步骤②制得的溶液装入透析袋中，用 1 ~ 10 毫摩每升的 pH 为 4 ~ 7 的醋酸钠缓冲液进行透析，2 ~ 6℃ 静置或搅拌；

[0038] ④向步骤③制得的溶液中加入 10 ~ 100 微升 0.1 ~ 1.0 摩尔每升的 pH 为 7 ~ 10 碳酸盐缓冲液；

[0039] ⑤向步骤④制得的溶液中加入 0.1 ~ 10 毫克的链霉亲和素或能与生物学探针结合物质，室温避光轻轻搅拌 1 ~ 6 小时；

[0040] ⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 0.1 ~ 1.0 毫升新鲜配制的浓度为 1 ~ 10 毫克每毫升的  $\text{NaBH}_4$  溶液混匀，2 ~ 6℃ 静置 1 ~ 6 小时；

[0041] ⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中，用 0.01 ~ 0.2 摩尔每升 pH 为 6 ~ 8 的 PBS 溶液进行透析，2 ~ 6℃，过夜。

[0042] ⑧将步骤⑦制得的透析液，在 1000 ~ 10000 rpm 条件下离心去沉淀，上清液为含 HRP- 链霉亲和素或 HRP- 能与生物学探针结合物质的复合物；

[0043] 7) 检测液的配制

[0044] 检测液包括 pH4 ~ 7 的 A 液和 pH2 ~ 7 的 B 液，A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液，B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液；其中， $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.005 ~ 0.5 (v/v) %、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.01 ~ 0.2 摩尔每升；柠檬酸钠浓度为 0.01 ~ 0.1 摩尔每升，B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.01 ~ 1.0 毫克每毫升；

[0045] 8) 终止液的配制

[0046] 配制浓度为 0.01 ~ 10.0 (w/v) % 的叠氮钠溶液；

[0047] 具体操作如下：

[0048] 首先将检测样本加到蛋白芯片上，通过摇床温育的方式，使样本溶液中多种生物学指标与芯片载体上包被的对应探针进行特异性的反应结合，然后将反应完成的载体用洗涤液进行洗涤，以减少其它干扰物质的非特性结合；接下来加入步骤 5) 制备的生物素标记好的能与生物学探针结合物质和步骤 6) 制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物或 HRP- 能与生物学探针结合物质的复合物，进行摇床温育，这样就形成了载体 - 探针 - 生物学指标 - 步骤 5) 制备的生物素标记的能与生物学探针结合物质 - 链霉亲和素 - 过氧化物辣根酶的复合物或载体 - 探针 - 生物学指标 - 能与生物学探针结合物质 - 过氧化物辣根酶的复合物，再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤，再加入检测液 A 液与 B 液的混合液以及终止液，完成整个芯片的反应过程，最后弃去载体上所有液体；如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标，在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测，或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测；

[0049] 或

[0050] 首先将封闭液滴加蛋白芯片中，再将检测样本加入蛋白芯片中，使样本溶液中的生物学指标与芯片载体上包被的对应探针进行特异性的反应结合，然后将反应完成的膜面

滴加洗涤液进行洗涤,以减少其它干扰物质的非特性结合,接下来加入步骤5)制备的生物素标记好的能与生物学探针结合物质和步骤6)制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物或 HRP-能与生物学探针结合物质的复合物,进行摇床温育,这样就形成了载体-探针-生物学指标-步骤5)制备的生物素标记的能与生物学探针结合物质-链霉亲和素-过氧化物辣根酶的复合物或载体-探针-生物学指标-能与生物学探针结合物质-过氧化物辣根酶的复合物,再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤,再加入检测液A液与B液的混合液以及终止液,完成整个芯片的反应过程,最后弃去载体上所有液体;如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标,在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测,或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。

[0051] 综上所述,本发明具有以下有益效果:

[0052] 1、本发明参照胶体金免疫渗滤法和生物芯片的主要技术优势和实现方式,最大限度的发挥检测快速、操作简单、检测时间短和劳动强度低等等优势;

[0053] 2、选用合适的载体以及修饰后的载体,载体上可同时包被一种、两种或多种与生物学指标可特异性结合的探针,以实现检测多元化,最大程度发挥此平台并行检测的优势,为临床检测提供更为丰富的数据用于医院、基层卫生服务站等医疗机构的大规模筛查、监测或辅助判断;

[0054] 3、目前蛋白芯片无法在探针包被阶段使每个点阵有颜色显示,因为这样最终的显色会受到点阵颜色的直接的干扰,降低了产品的灵敏度和准确度;而本发明采用水溶性的色素对包被阶段的探针点阵进行着色,而在封闭操作后颜色彻底消失,这样不仅有利于在探针包被和产品装配阶段对产品质量进行方便、有效的控制,而且还不会对最终的检测结果进行任何干扰;

[0055] 4、本发明引入生物素-亲和素信号放大系统,进一步提高免疫芯片检测方法的检测灵敏度,进一步拓宽蛋白芯片系统的检测范围,以适应目前临床检测不断发展的要求;

[0056] 5、本发明将胶体金蛋白芯片检测方法和化学发光检测方法相结合,摒弃了胶体金作为蛋白芯片方法的显色系统,采用了化学发光检测中的HRP-TMB显色系统,同时TMB溶液采用优化后的方法进行自行配制,进一步提高了免疫芯片检测方法的检测灵敏度;

[0057] 6、本发明采用的终止液为自制配方,本法可长时间保存免疫渗滤芯片显色后的点阵,避免了胶体金显色点阵时间久置后颜色消失而导致不利于检测结果的保存、复核和追溯的问题;

[0058] 7、本发明在反应显色后,既可采用肉眼直接比对的方式,也可采用自制的检测仪器,对显色后的各显色点信号进行自动读取,进一步丰富了判读方式,增加了判读方式的选择性和灵活性,提高了检测的准确性。

## 具体实施方式

[0059] 本具体实施例仅仅是对本发明的解释,其并不是对本发明的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本发明的权利要求范围内都受到专利法的保护。

[0060] 实施例一

[0061] 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,它包括芯片反应系统和显色系统;芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液;显色系统包括检测液和终止液;

[0062] 所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点;

[0063] 反应液包括两种,一种为能与生物学指标结合的生物素标记物,另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物;

[0064] 所述检测液包括 pH4 的 A 液和 pH2 的 B 液,A 液包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液,B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠-盐酸溶液;其中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.005 (v/v)%、柠檬酸-磷酸氢二钠溶液浓度为 0.01 摩尔每升;柠檬酸钠浓度为 0.01 摩尔每升,B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.01 毫克每升;

[0065] 所述洗涤液的配方如下:0.1 (v/v)% 的 TWEEN-20、0.01 摩尔每升 pH6 的 PB 缓冲液、0.1 (v/v)% 的 proclin300;

[0066] 终止液为 0.01 (w/v)% 的叠氮钠溶液;

[0067] 所述载体为孔径在 0.1 微米的多孔性硝酸纤维素微孔滤膜。

[0068] 下面通过一种高灵敏度 I 型糖尿病多种抗体试剂盒(免疫渗滤法)的设计来阐述本发明。

[0069] 包括以下步骤:

[0070] 1) 免疫渗滤反应芯片的制作

[0071] 用点样仪将确定浓度的谷氨酸脱羧酶-65、ICA、胰岛素、酪氨酸磷酸酶、ZnT8A、羧基肽酶-H、HSP65、抗胰岛受体共 8 种或其中的几种抗原溶液和质控点以点阵的形式固化于硝酸纤维素膜上,室温干燥 2 小时,2 ~ 8℃ 密封保存;

[0072] 2) 点样稀释液的配制

[0073] 配制浓度为 0.01 摩尔每升的 PB 缓冲液,其中含有浓度为 0.01 的水溶性色素苋菜红;

[0074] 3) 封闭液的配制

[0075] 封闭液的配方如下:浓度为 1 (w/v)% 的 BSA 溶液、浓度为 1% 的蔗糖溶液、浓度为 0.1% 的 TWEEN-20、0.1 的 proclin300、浓度为 0.01 摩尔每升 pH 为 6 的 PB 缓冲液;

[0076] 4) 洗涤液的配制

[0077] 洗涤液的配方如下:0.1 (v/v)的 TWEEN-20、0.01 摩尔每升 pH6 的 PB 缓冲液、0.1 (v/v)% 的 proclin300;

[0078] 5) 抗体标记

[0079] ①用无水 DMSO 配置 1 ~ 20 毫克每毫升的生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;

[0080] ②用浓度为 0.01 摩尔每升 pH6 的硼酸盐缓冲液为溶剂配制浓度至少为 0.5 毫克每升的抗体溶液;

[0081] ③按 10 微克每毫克的比率将生物素酯加入上述抗体溶液中,混合均匀后并在室温下孵育 1 h;

[0082] ④按每 100 微克生物素酯内加入 1 微升的浓度为 0.5 摩尔每升的氯化铵,室温孵育 5min;

[0083] ⑤将经过步骤③的抗体溶液用 0.01 摩尔每升的 PBS、CBS、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液透析 2h 进行纯化,或再用蛋白 A 或蛋白 G 层析柱再次纯化抗体;

- [0084] 6) 过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物标记
- [0085] ①新鲜配制 1.0 毫克每毫升的 HRP 溶液；
- [0086] ②向 HRP 溶液中加入 0.1ml 新鲜配制的 0.01 摩尔每升的过碘酸钠, 室温下避光静置或搅拌；
- [0087] ③将步骤②制得的溶液装入透析袋中, 用 1 毫摩每升的 pH 为 4 的醋酸钠缓冲液进行透析, 2℃ 静置或搅拌；
- [0088] ④向步骤③制得的溶液中加入 10 微升 0.1 摩尔每升的 pH 为 7 碳酸盐缓冲液；
- [0089] ⑤向步骤④制得的溶液中加入 0.1 毫克的链霉亲和素, 室温避光轻轻搅拌 1 小时；
- [0090] ⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 0.1 毫升新鲜配制的浓度为 1 毫克每毫升的  $\text{NaBH}_4$  溶液混匀, 2℃ 静置 1 小时；
- [0091] ⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中, 用 0.01 摩尔每升 pH 为 6 的 PBS 溶液进行透析, 2℃, 过夜。
- [0092] ⑧将步骤⑦制得的透析液, 在 1000 rpm 条件下离心去沉淀, 上清液为含 HRP-链霉亲和素的结合物；
- [0093] 7) 检测液的配制
- [0094] 检测液包括 pH4 的 A 液和 pH2 的 B 液, A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液, B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液；其中,  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.005 (v/v) %、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.01 摩尔每升；柠檬酸钠浓度为 0.01 摩尔每升, B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.01 毫克每毫升；
- [0095] 8) 终止液的配制
- [0096] 配制浓度为 0.01 (w/v) % 的叠氮钠溶液；
- [0097] 首先将封闭液滴加免疫渗滤芯片中, 再将检测样本加入免疫渗滤芯片中, 通过渗滤的方式, 使样本溶液中的抗体与芯片载体上包被的对应抗原进行特异性的反应结合, 然后将反应完成的膜面滴加洗涤液进行洗涤, 以减少其它干扰物质的非特性结合, 接下来加入步骤 5) 制备的生物素标记好的抗体和步骤 6) 制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物, 进行摇床温育, 这样就形成了载体 - 抗原 - 抗体 - 步骤 5) 制备的标记好的抗体 IgG- 链霉亲和素 - 过氧化物辣根酶的复合物, 再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤, 再加入 TMB A 液与 B 液的混合液以及终止液, 完成整个芯片的反应过程, 最后弃去载体上所有液体；如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标, 在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测, 或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。
- [0098] 实施例二
- [0099] 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统, 它包括芯片反应系统和显色系统；芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液；显色系统包括检测液和终止液；
- [0100] 所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点；
- [0101] 反应液包括两种, 一种为能与生物学指标结合的生物素标记物, 另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物；
- [0102] 所述检测液包括 pH5 的 A 液和 pH3 的 B 液, A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶

液, B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液 ; 其中,  $H_2O_2$  浓度为 0.01 (v/v) %、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.04 摩尔每升 ; 柠檬酸钠浓度为 0.02 摩尔每升, B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.02 毫克每毫升 ;

[0103] 所述洗涤液的配方如下 : 0.5 (v/v) % 的 TWEEN-20、0.04 摩尔每升 pH6 的 PB 缓冲液、1 (v/v) % 的 proclin300 ;

[0104] 终止液为 0.05 (w/v) % 的叠氮钠溶液 ;

[0105] 所述载体为孔径在 0.1 ~ 1 微米的多孔性醋酸纤维素膜微孔滤膜。

[0106] 下面通过一种高灵敏度 I 型糖尿病多种抗体检测试剂盒(免疫渗滤法)的设计来阐述本发明。

[0107] 包括以下步骤 :

[0108] 1) 免疫渗滤反应芯片的制作

[0109] 用点样仪将确定浓度的谷氨酸脱羧酶 -65、ICA、胰岛素、酪氨酸磷酸酶、ZnT8A、羧基肽酶 -H、HSP65、抗胰岛受体共 8 种或其中的几种抗原溶液和质控点以点阵的形式固化于载体上, 室温干燥, 2 ~ 8°C 密封保存 ;

[0110] 2) 点样稀释液的配制

[0111] 配制浓度为 0.05 摩尔每升的 PB 缓冲液, 其中含有浓度为 1% 的水溶性色素胭脂红 ;

[0112] 3) 封闭液的配制

[0113] 封闭液的配方如下 : 浓度为 2 (w/v) % 的 BSA 溶液、浓度为 2 (w/v) % 的蔗糖溶液、浓度为 0.5 (v/v) % 的 TWEEN-20、1 (v/v) % 的 proclin300、浓度为 0.04 摩尔每升 pH 为 6 的 PB 缓冲液 ;

[0114] 4) 洗涤液的配制

[0115] 洗涤液的配方如下 : 0.5% (v/v) 的 TWEEN-20、0.04 摩尔每升 pH6 的 PB 缓冲液、1 (v/v) % 的 proclin300 ;

[0116] 5) 抗体标记

[0117] ①用无水 DMSO 配置 2 毫克每毫升的生物素 N - 羟基琥珀酰亚胺酯溶液 ;

[0118] ②用浓度为 0.04 摩尔每升 pH7 的硼酸盐缓冲液为溶剂配制浓度至少为 1 毫克每毫升的抗体溶液 ;

[0119] ③按 40 微克每毫克的比率将生物素酯加入上述抗体溶液中, 混合均匀后并在室温下孵育 2h ;

[0120] ④按每 200 微克生物素酯内加入 10 微升的浓度为 0.8 摩尔每升的氯化铵, 室温孵育 10min ;

[0121] ⑤将经过步骤③的抗体溶液用 0.04 摩尔每升的 PBS、CBS、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液透析 10h 进行纯化, 或再用蛋白 A 或蛋白 G 层析柱再次纯化抗体 ;

[0122] 6) 过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物标记

[0123] ①新鲜配制 2 毫克每毫升的 HRP 溶液 ;

[0124] ②向 HRP 溶液中加入 0.2ml 新鲜配制的 0.05 摩尔每升的过碘酸钠, 室温下避光静置或搅拌 ;

[0125] ③将步骤②制得的溶液装入透析袋中, 用 2 毫摩每升的 pH 为 5 的醋酸钠缓冲液进

行透析,3℃静置或搅拌;

[0126] ④向步骤③制得的溶液中加入 20 微升 0.2 摩尔每升的 pH 为 7 碳酸盐缓冲液;

[0127] ⑤向步骤④制得的溶液中加入 0.5 毫克的链霉亲和素,室温避光轻轻搅拌 2 小时;

[0128] ⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 0.2 毫升新鲜配制的浓度为 2 毫克每毫升的  $\text{NaBH}_4$  溶液混匀,3℃静置 2 小时;

[0129] ⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中,用 0.04 摩尔每升 pH 为 6 的 PBS 溶液进行透析,3℃,过夜。

[0130] ⑧将步骤⑦制得的透析液,在 2000 rpm 条件下离心去沉淀,上清液为含 HRP-链霉亲和素的结合物;

[0131] 7) 检测液的配制

[0132] 检测液包括 pH5 的 A 液和 pH3 的 B 液,A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液,B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠-盐酸溶液;其中, $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.01 (v/v) %、柠檬酸-磷酸氢二钠溶液浓度为 0.04 摩尔每升;柠檬酸钠浓度为 0.02 摩尔每升,B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.02 毫克每毫升;

[0133] 8) 终止液的配制

[0134] 配制浓度为 0.5 (w/v) % 的叠氮钠溶液;

[0135] 首先将封闭液滴加免疫渗滤芯片中,再将检测样本加入免疫渗滤芯片中,通过渗滤的方式,使样本溶液中的抗体与芯片载体上包被的对应抗原进行特异性的反应结合,然后将反应完成的膜面滴加洗涤液进行洗涤,以减少其它干扰物质的非特性结合,接下来加入步骤 5) 制备的标记好的抗体和步骤 6) 制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物,进行摇床温育,这样就形成了载体-抗原-抗体-步骤 5) 制备的标记好的抗体 IgG-链霉亲和素-过氧化物辣根酶的复合物,再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤,再加入 TMB A 液与 B 液的混合液以及终止液,完成整个芯片的反应过程,最后弃去载体上所有液体;如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标,在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测,或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。

[0136] 实施例三

[0137] 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,它包括芯片反应系统和显色系统;芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液;显色系统包括检测液和终止液;

[0138] 所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点;

[0139] 反应液包括两种,一种为能与生物学指标结合的生物素标记物,另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物;

[0140] 所述检测液包括 pH5 的 A 液和 pH4 的 B 液,A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液,B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠-盐酸溶液;其中, $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.05 (v/v) %、柠檬酸-磷酸氢二钠溶液浓度为 0.08 摩尔每升;柠檬酸钠浓度为 0.04 摩尔每升,B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.05 毫克每毫升;

[0141] 所述洗涤液的配方如下:1 (v/v) % 的 TWEEN-20、0.08 摩尔每升 pH7 的 PB 缓冲液、2 (v/v) % 的 proclin300。

- [0142] 终止液为 1 (w/v)% 的叠氮钠溶液。
- [0143] 所述载体为孔径在 0.1 ~ 12 微米的多孔性聚偏氟乙烯微孔滤膜。
- [0144] 下面通过一种高灵敏度 I 型糖尿病多种抗体检测试剂盒(免疫渗滤法)的设计来阐述本发明。
- [0145] 包括以下步骤：
- [0146] 1) 免疫渗滤反应芯片的制作
- [0147] 用点样仪将确定浓度的谷氨酸脱羧酶 -65、ICA、胰岛素、酪氨酸磷酸酶、ZnT8A、羧基肽酶 -H、HSP65、抗胰岛素共 8 种或其中的几种抗原溶液和质控点以点阵的形式固化于多孔性聚偏氟乙烯微孔滤膜上, 室温干燥, 2 ~ 8℃ 密封保存；
- [0148] 2) 点样稀释液的配制
- [0149] 配制浓度为 0.1 摩尔每升的 PB 缓冲液, 其中含有浓度为 2% 的水溶性色素亮蓝；
- [0150] 3) 封闭液的配制
- [0151] 封闭液的配方如下: 浓度为 4 (w/v)% 的 BSA 溶液、浓度为 4 (w/v)% 的蔗糖溶液、浓度为 1 (v/v)% 的 TWEEN-20、2 (v/v) 的 proclin300、浓度为 0.08 摩尔每升 pH 为 7 的 PB 缓冲液；
- [0152] 4) 洗涤液的配制
- [0153] 洗涤液的配方如下: 1% (v/v) 的 TWEEN-20、0.08 摩尔每升 pH7 的 PB 缓冲液、2 (v/v)% 的 proclin300；
- [0154] 5) 抗体标记
- [0155] ①用无水 DMSO 配置 5 毫克每毫升的生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液；
- [0156] ②用浓度为 0.08 摩尔每升 pH7 的硼酸盐缓冲液为溶剂配制浓度至少为 2 毫克每毫升的抗体溶液；
- [0157] ③按 80 微克每毫克的比率将生物素酯加入上述抗体溶液中, 混合均匀后并在室温下孵育 3h；
- [0158] ④按每 300 微克生物素酯内加入 20 微升的浓度为 1.2 摩尔每升的氯化铵, 室温孵育 20min；
- [0159] ⑤将经过步骤③的抗体溶液用 0.08 摩尔每升的 PBS、CBS、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液透析 20h 进行纯化, 或再用蛋白 A 或蛋白 G 层析柱再次纯化抗体；
- [0160] 6) 过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物标记
- [0161] ①新鲜配制 4.0 毫克每毫升的 HRP 溶液；
- [0162] ②向 HRP 溶液中加入 0.4ml 新鲜配制的 0.1 摩尔每升的过碘酸钠, 室温下避光静置或搅拌；
- [0163] ③将步骤②制得的溶液装入透析袋中, 用 4 毫摩每升的 pH 为 5 的醋酸钠缓冲液进行透析, 4℃ 静置或搅拌；
- [0164] ④向步骤③制得的溶液中加入 40 微升 0.4 摩尔每升的 pH 为 8 的碳酸盐缓冲液；
- [0165] ⑤向步骤④制得的溶液中加入 1 毫克的链霉亲和素, 室温避光轻轻搅拌 3 小时；
- [0166] ⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 0.4 毫升新鲜配制的浓度为 4 毫克每毫升的 NaBH<sub>4</sub> 溶液混匀, 4℃ 静置 3 小时；
- [0167] ⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中, 用 0.08 摩尔每升 pH 为 7 的 PBS 溶液进行

透析,4℃,过夜。

[0168] ⑧将步骤⑦制得的透析液,在4000 rpm条件下离心去沉淀,上清液为含HRP-链霉亲和素的结合物;

[0169] 7)检测液的配制

[0170] 检测液包括pH5的A液和pH4的B液,A液包括H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液,B液包括TMB-HCl和柠檬酸钠-盐酸溶液;其中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为0.05(v/v)%、柠檬酸-磷酸氢二钠溶液浓度为0.08摩尔每升;柠檬酸钠浓度为0.04摩尔每升,B液中TMB-HCl的浓度为0.05毫克每毫升;

[0171] 8)终止液的配制

[0172] 配制浓度为1(w/v)%的叠氮钠溶液;

[0173] 首先将封闭液滴加免疫渗滤芯片中,再将检测样本加入免疫渗滤芯片中,通过渗滤的方式,使样本溶液中的抗体与芯片载体上包被的对应抗原进行特异性的反应结合,然后将反应完成的膜面滴加洗涤液进行洗涤,以减少其它干扰物质的非特性结合,接下来加入步骤5)制备的标记好的抗体和步骤6)制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物,进行摇床温育,这样就形成了载体-抗原-抗体-步骤5)制备的标记好的抗体IgG-链霉亲和素-过氧化物辣根酶的复合物,再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤,再加入TMB A液与B液的混合液以及终止液,完成整个芯片的反应过程,最后弃去载体上所有液体;如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标,在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测,或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。

[0174] 实施例四

[0175] 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,它包括芯片反应系统和显色系统;芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液;显色系统包括检测液和终止液;

[0176] 所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点;

[0177] 反应液包括两种,一种为能与生物学指标结合的生物素标记物,另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物;

[0178] 所述检测液包括pH6的A液和pH5的B液,A液包括H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液,B液包括TMB-HCl和柠檬酸钠-盐酸溶液;其中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为0.1(v/v)%、柠檬酸-磷酸氢二钠溶液浓度为0.12摩尔每升;柠檬酸钠浓度为0.06摩尔每升,B液中TMB-HCl的浓度为0.1毫克每毫升;

[0179] 所述洗涤液的配方如下:2(v/v)%的TWEEN-20、0.12摩尔每升pH7的PB缓冲液、5(v/v)%的proclin300。

[0180] 终止液为2(w/v)%的叠氮钠溶液。

[0181] 所述载体为玻片。

[0182] 下面通过一种高灵敏度结核分枝杆菌多种抗体蛋白芯片检测系统的设计来进一步阐述本发明。

[0183] 包括以下步骤:

[0184] 1)免疫反应芯片的制作

[0185] 用点样仪将确定浓度的LAM、ESAT-6、Ag85A、Ag85B、16kDa、38kDa、CFP10、MPT63、

MPT64、MPT70、MPT53、MPT81、MPT84、CFP32、Mtb8、Mtb8. 4、Mtb16. 3、CFP10-ESAT6 融合蛋白、MPT63-MPT70 融合蛋白、16kDa-38kDa 融合蛋白共 20 种或其中的几种抗原溶液和质控点以点阵的形式固化于活化后的羧基化玻片上,进行多人份装配和封闭操作,再室温干燥,2~8℃密封保存;

[0186] 2) 点样稀释液的配制

[0187] 配制浓度为 0.2 摩尔每升的 PB 缓冲液,其中含有浓度为 5% 的水溶性色素果绿;

[0188] 3) 封闭液的配制

[0189] 封闭液的配方如下:浓度为 6 (w/v)% 的 BSA 溶液、浓度为 6 (w/v)% 的蔗糖溶液、浓度为 2 (v/v)% 的 TWEEN-20、5 (v/v) 的 proclin300、浓度为 0.12 摩尔每升 pH 为 7 的 PB 缓冲液;

[0190] 4) 洗涤液的配制

[0191] 洗涤液的配方如下:2%(v/v)的 TWEEN-20、0.12 摩尔每升 pH7 的 PB 缓冲液、5(v/v)% 的 proclin300;

[0192] 5) 抗体标记

[0193] ①用无水 DMSO 配置 10 毫克每毫升的生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;

[0194] ②用浓度为 0.12 摩尔每升 pH8 的硼酸盐缓冲液为溶剂配制浓度至少为 3 毫克每毫升的抗体溶液;

[0195] ③按 120 微克每毫克的比率将生物素酯加入上述抗体溶液中,混合均匀后并在室温下孵育 4h;

[0196] ④按每 300 微克生物素酯内加入 40 微升的浓度为 1.4 摩尔每升的氯化铵,室温孵育 30min;

[0197] ⑤将经过步骤③的抗体溶液用 0.12 摩尔每升的 PBS、CBS、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液透析 28h 进行纯化,或再用蛋白 A 或蛋白 G 层析柱再次纯化抗体;

[0198] 6) 过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物标记

[0199] ①新鲜配制 6.0 毫克每毫升的 HRP 溶液;

[0200] ②向 HRP 溶液中加入 0.6ml 新鲜配制的 0.5 摩尔每升的过碘酸钠,室温下避光静置或搅拌;

[0201] ③将步骤②制得的溶液装入透析袋中,用 6 毫摩每升的 pH 为 6 的醋酸钠缓冲液进行透析,4℃静置或搅拌;

[0202] ④向步骤③制得的溶液中加入 60 微升 0.6 摩尔每升的 pH 为 8 碳酸盐缓冲液;

[0203] ⑤向步骤④制得的溶液中加入 2 毫克的链霉亲和素,室温避光轻轻搅拌 4 小时;

[0204] ⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 0.6 毫升新鲜配制的浓度为 6 毫克每毫升的  $\text{NaBH}_4$  溶液混匀,4℃静置 4 小时;

[0205] ⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中,用 0.12 摩尔每升 pH 为 7 的 PBS 溶液进行透析,4℃,过夜。

[0206] ⑧将步骤⑦制得的透析液,在 6000rpm 条件下离心去沉淀,上清液为含 HRP-链霉亲和素的结合物;

[0207] 7) 检测液的配制

[0208] 检测液包括 pH6 的 A 液和 pH5 的 B 液,A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液,

B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液 ;其中,  $H_2O_2$  浓度为 0.1 (v/v) %、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.12 摩尔每升 ;柠檬酸钠浓度为 0.06 摩尔每升,B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.1 毫克每毫升 ;

[0209] 8) 终止液的配制

[0210] 配制浓度为 2 (w/v) % 的叠氮钠溶液 ;

[0211] 首先将检测样本加到蛋白芯片上,通过摇床温育的方式,使样本溶液中多种抗体与芯片载体上包被的对应抗原探针进行特异性共价的反应结合,然后将反应完成的载体用洗涤液进行洗涤,以减少其它干扰物质的非特性结合 ;接下来加入步骤 5) 制备的标记好的抗体和步骤 6) 制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物,进行摇床温育,这样就形成了载体 - 抗原 - 抗体 - 步骤 5) 制备的标记好的抗体 IgG- 链霉亲和素 - 过氧化物辣根酶的复合物,再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤,再加入 TMB A 液与 B 液的混合液以及终止液,完成整个芯片的反应过程,最后弃去载体上所有液体 ;如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标,在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测,或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。

[0212] 实施例五

[0213] 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,它包括芯片反应系统和显色系统 ;芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液 ;显色系统包括检测液和终止液 ;

[0214] 所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点 ;

[0215] 反应液包括两种,一种为能与生物学指标结合的生物素标记物,另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物 ;

[0216] 所述检测液包括 pH6 的 A 液和 pH6 的 B 液,A 液包括  $H_2O_2$  和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液,B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液 ;其中,  $H_2O_2$  浓度为 0.2 (w/v) %、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.16 摩尔每升 ;柠檬酸钠浓度为 0.08 摩尔每升,B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.5 毫克每毫升 ;

[0217] 所述洗涤液的配方如下 :5 (v/v) % 的 TWEEN-20、0.16 摩尔每升 pH8 的 PB 缓冲液、10 (v/v) % 的 proclin300。

[0218] 终止液为 5 (w/v) % 的叠氮钠溶液。

[0219] 所述载体为硅橡胶片。

[0220] 下面通过一种高灵敏度结核分枝杆菌多种抗体蛋白芯片检测系统的设计来进一步阐述本发明。

[0221] 包括以下步骤 :

[0222] 1) 免疫反应芯片的制作

[0223] 载体上我们选用羧基化的硅橡胶片,用点样仪将确定浓度的 LAM、ESAT-6、Ag85A、Ag85B、16kDa、38kDa、CFP10、MPT63、MPT64、MPT70、MPT53、MPT81、MPT84、CFP32、Mtb8、Mtb8.4、Mtb16.3、CFP10-ESAT6 融合蛋白、MPT63-MPT70 融合蛋白、16kDa-38kDa 融合蛋白共 20 种或其中的几种抗原溶液和质控点以点阵的形式固化于活化后的羧基化硅橡胶片上,进行多人份装配和封闭操作,再室温干燥,2 ~ 8℃ 密封保存 ;

[0224] 2) 点样稀释液的配制

[0225] 配制浓度为 0.3 摩尔每升的 PB 缓冲液,其中含有浓度为 10% 的水溶性色素牛奶巧

克力棕；

[0226] 3) 封闭液的配制

[0227] 封闭液的配方如下：浓度为 8 (w/v)% 的 BSA 溶液、浓度为 8 (w/v)% 的蔗糖溶液、浓度为 5 (v/v)% 的 TWEEN-20、10 (v/v) 的 proclin300、浓度为 0.16 摩尔每升 pH 为 8 的 PB 缓冲液；

[0228] 4) 洗涤液的配制

[0229] 洗涤液的配方如下：5% (v/v) 的 TWEEN-20、0.16 摩尔每升 pH8 的 PB 缓冲液、10 (v/v)% 的 proclin300；

[0230] 5) SPA 抗体标记

[0231] ①用无水 DMSO 配置 15 毫克每毫升的生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液；

[0232] ②用浓度为 0.16 摩尔每升 pH8 的硼酸盐缓冲液为溶剂配制浓度至少为 4 毫克每毫升的 SPA 抗体溶液；

[0233] ③按 160 微克每毫克的比率将生物素酯加入上述 SPA 抗体溶液中，混合均匀后并在室温下孵育 5h；

[0234] ④按每 400 微克生物素酯内加入 60 微升的浓度为 1.6 摩尔每升的氯化铵，室温孵育 40min；

[0235] ⑤将经过步骤③的 SPA 抗体溶液用 0.16 摩尔每升的 PBS、CBS、醋酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液透析 38h 进行纯化，或再用蛋白 A 或蛋白 G 层析柱再次纯化 SPA 抗体；

[0236] 6) 过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物标记

[0237] ①新鲜配制 8 毫克每毫升的 HRP 溶液；

[0238] ②向 HRP 溶液中加入 0.8ml 新鲜配制的 1.0 摩尔每升的过碘酸钠，室温下避光静置或搅拌；

[0239] ③将步骤②制得的溶液装入透析袋中，用 8 毫摩每升的 pH 为 6 的醋酸钠缓冲液进行透析，5℃ 静置或搅拌；

[0240] ④向步骤③制得的溶液中加入 80 微升 0.8 摩尔每升的 pH 为 9 碳酸盐缓冲液；

[0241] ⑤向步骤④制得的溶液中加入 5 毫克的链霉亲和素，室温避光轻轻搅拌 5 小时；

[0242] ⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 0.8 毫升新鲜配制的浓度为 8 毫克每毫升的  $\text{NaBH}_4$  溶液混匀，5℃ 静置 5 小时；

[0243] ⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中，用 0.16 摩尔每升 pH 为 8 的 PBS 溶液进行透析，5℃，过夜。

[0244] ⑧将步骤⑦制得的透析液，在 8000 rpm 条件下离心去沉淀，上清液为含 HRP-链霉亲和素的结合物；

[0245] 7) 检测液的配制

[0246] 检测液包括 pH6 的 A 液和 pH6 的 B 液，A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液，B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠-盐酸溶液；其中， $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.2 (w/v)%、柠檬酸-磷酸氢二钠溶液浓度为 0.16 摩尔每升；柠檬酸钠浓度为 0.08 摩尔每升，B 液中 TMB-HCl 的浓度为 0.5 毫克每毫升；

[0247] 8) 终止液的配制

[0248] 配制浓度为 5 (w/v) % 的叠氮钠溶液；

[0249] 首先将检测样本加到蛋白芯片上,通过摇床温育的方式,使样本溶液中多种抗体与芯片载体上包被的对应抗原探针进行特异性的共价反应结合,然后将反应完成的载体用洗涤液进行洗涤,以减少其它干扰物质的非特性结合;接下来加入步骤 5) 标记好的 SPA 生物素化抗体和步骤 6) 制备好的过氧化物辣根酶和链霉亲和素的复合物,进行摇床温育,这样就形成了载体-抗原-抗体-SPA 生物素化抗体 IgG-链霉亲和素-过氧化物辣根酶的复合物,再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤,再加入 TMB A 液与 B 液的混合液以及终止液,完成整个芯片的反应过程,最后弃去载体上所有液体;如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标,在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测,或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。

[0250] 实施例六

[0251] 一种高灵敏度蛋白芯片检测系统,它包括芯片反应系统和显色系统;芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液;显色系统包括检测液和终止液;

[0252] 所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点;

[0253] 反应液为过氧化物辣根酶标记的能与生物学指标相结合的物质;

[0254] 所述检测液包括 pH7 的 A 液和 pH7 的 B 液,A 液包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和柠檬酸-磷酸氢二钠溶液,B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠-盐酸溶液;其中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.5 (v/v) %、柠檬酸-磷酸氢二钠溶液浓度为 0.2 摩尔每升;柠檬酸钠浓度为 0.1 摩尔每升,B 液中 TMB-HCl 的浓度为 1.0 毫克每毫升;

[0255] 所述洗涤液的配方如下: 10 (v/v) % 的 TWEEN-20、0.2 摩尔每升 pH8 的 PB 缓冲液、20 (v/v) % 的 proclin300。

[0256] 终止液为 10.0 (w/v) % 的叠氮钠溶液。

[0257] 所述载体为尼龙膜。

[0258] 下面通过一种高灵敏度结核分枝杆菌多种抗体蛋白芯片检测系统的设计来进一步阐述本发明。

[0259] 包括以下步骤:

[0260] 1) 免疫反应芯片的制作

[0261] 载体上我们选用尼龙膜,用点样仪将确定浓度的 LAM、ESAT-6、Ag85A、Ag85B、16kDa、38kDa、CFP10、MPT63、MPT64、MPT70、MPT53、MPT81、MPT84、CFP32、Mtb8、Mtb8.4、Mtb16.3、CFP10-ESAT6 融合蛋白、MPT63-MPT70 融合蛋白、16kDa-38kDa 融合蛋白共 20 种或其中的几种抗原溶液和质控点以点阵的形式固化于尼龙膜片上,进行多人份装配和封闭操作,再室温干燥,2~8℃密封保存;

[0262] 2) 点样稀释液的配制

[0263] 配制浓度为 0.5 摩尔每升的 PB 缓冲液,其中含有浓度为 20% 的水溶性色素(葡萄紫);

[0264] 3) 封闭液的配制

[0265] 封闭液的配方如下:浓度为 10 (w/v) % 的 BSA 溶液、浓度为 10 (w/v) % 的蔗糖溶液、浓度为 10 (v/v) % 的 TWEEN-20、20 (v/v) 的 proclin300、浓度为 0.2 摩尔每升 pH 为 8 的 PB 缓冲液;

[0266] 4) 洗涤液的配制

[0267] 洗涤液的配方如下：10% (v/v) 的 TWEEN-20、0.2 摩尔每升 pH8 的 PB 缓冲液、20 (v/v)% 的 proclin300；

[0268] 5) 过氧化物辣根酶标记羊抗人 IgG

[0269] ①新鲜配制 10.0 毫克每毫升的 HRP 溶液；

[0270] ②向 HRP 溶液中加入 1.0ml 新鲜配制的 2.0 摩尔每升的过碘酸钠，室温下避光静置或搅拌；

[0271] ③将步骤②制得的溶液装入透析袋中，用 10 毫摩每升的 pH 为 7 的醋酸钠缓冲液进行透析，6℃静置或搅拌；

[0272] ④向步骤③制得的溶液中加入 100 微升 1.0 摩尔每升的 pH 为 10 碳酸盐缓冲液；

[0273] ⑤向步骤④制得的溶液中加入 10 毫克的羊抗人 IgG，室温避光轻轻搅拌 6 小时；

[0274] ⑥向步骤⑤制得的溶液中加入 1.0 毫升新鲜配制的浓度为 10 毫克每毫升的  $\text{NaBH}_4$  溶液混匀，6℃静置 6 小时；

[0275] ⑦将步骤⑥制得的溶液装入透析袋中，用 0.2 摩尔每升 pH 为 8 的 PBS 溶液进行透析，6℃，过夜。

[0276] ⑧将步骤⑦制得的透析液，在 10000 rpm 条件下离心去沉淀，上清液为含 HRP- 羊抗人 IgG 的结合物；

[0277] 6) 检测液的配制

[0278] 检测液包括 pH7 的 A 液和 pH7 的 B 液，A 液包括  $\text{H}_2\text{O}_2$  和柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液，B 液包括 TMB-HCl 和柠檬酸钠 - 盐酸溶液；其中， $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.5 (v/v)%、柠檬酸 - 磷酸氢二钠溶液浓度为 0.2 摩尔每升；柠檬酸钠浓度为 0.1 摩尔每升，B 液中 TMB-HCl 的浓度为 1.0 毫克每毫升；

[0279] 7) 终止液的配制

[0280] 配制浓度为 10.0 (w/v)% 的叠氮钠溶液；

[0281] 首先将检测样本加到蛋白芯片上，通过摇床温育的方式，使样本溶液中多种抗体与芯片载体上包被的对应抗原探针进行特异性的反应结合，然后将反应完成的载体用洗涤液进行洗涤，以减少其它干扰物质的非特性结合；接下来加入步骤 5) 制备好的 HRP- 羊抗人 IgG 复合物，进行摇床温育，这样就形成了载体 - 抗原 - 抗体 - HRP- 羊抗人 IgG 的复合物，再将反应完成的载体表面用洗涤液进行洗涤，再加入 TMB A 液与 B 液的混合液以及终止液，完成整个芯片的反应过程，最后弃去载体上所有液体；如果待测样本中含有目标检测的生物学功能指标，在显色完成后通过肉眼颜色识别完成样本的检测，或通过检测系统完成对颜色点阵的信号读取后与检测仪中设置的色卡进行自动比对完成样本的检测。

专利名称(译)	一种高灵敏度免疫芯片检测系统及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102338801B</a>	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	CN201110224063.1	申请日	2011-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	张灿		
申请(专利权)人(译)	张灿		
当前申请(专利权)人(译)	嘉兴艾锐生物科技有限公司		
[标]发明人	张灿		
发明人	张灿		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/535 G01N21/76		
其他公开文献	CN102338801A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种高灵敏度蛋白芯片检测系统及其使用方法，属于生物芯片技术领域。它包括芯片反应系统和显色系统；芯片反应系统包括载体、反应液和洗涤液；显色系统包括检测液和终止液；所述载体上包被有能与生物学指标特异性结合的探针点阵或质控点；反应液包括两种，一种为能与生物学指标结合的生物素标记物，另一种为过氧化物辣根酶与链霉亲和素的复合物；或者反应液为过氧化物辣根酶标记的能与生物学指标相结合的物质；终止液为0.01~10.0 (w/v) %的叠氮钠溶液。本发明具有检测速度快、灵敏度高的优点。