

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53  
G01N 33/68



# [12] 实用新型专利说明书

[21] ZL 专利号 02275950.6

[45] 授权公告日 2003 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 2554631Y

[22] 申请日 2002.07.31 [21] 申请号 02275950.6

[73] 专利权人 中华人民共和国北京出入境检验检疫局

地址 100022 北京市朝阳区建国门外大街 12 号楼

共同专利权人 重庆大学

[72] 设计人 魏传忠 莫志宏 马贵平 靳萍  
李冰玲 田学隆 田海燕 郭钢

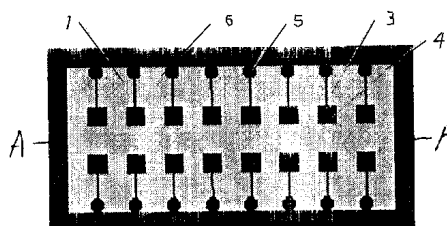
[74] 专利代理机构 重庆大学专利中心  
代理人 张荣清

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称 疯牛病病原检测压电生物芯片

[57] 摘要

疯牛病病原检测压电生物芯片涉及动物检验检疫装置，特别适用于疯牛病病原体的检测。本实用新型包括压电片、固定在压电片下面的共用电极及固定在压电片上面的微型电极阵列、微型电极阵列的各电极上固定有不同的疯牛病朊蛋白抗体形成的朊蛋白抗体阵列，构成疯牛病病原检测压电生物芯片。本芯片与检测仪配套使用，构成疯牛病病原压电生物芯片检测系统，当各抗体与对应朊蛋白进行免疫化学反应时，通过测量谐振频率可实时检测相应各种朊蛋白的信息，对其进行定性和定量分析。适用于疯牛病病原的早期、高效和快速诊断。



ISSN 1000-8-4274

1、疯牛病病原检测压电生物芯片，包括压电片(1)及分别固定在压电片上下两面的共用电极(2)和微型电极阵列(3)，其特征在于在微型电极阵列(3)的各电极上一一对应地固定有不同的疯牛病朊蛋白抗体，构成疯牛病朊蛋白的抗体阵列(4)。

2、根据权利要求1所述的疯牛病病原检测压电生物芯片，其特征在于所述的疯牛病朊蛋白抗体阵列(4)是在微型电极阵列的各电极上固定1—1000纳米厚的朊蛋白抗体组成，抗体阵列是由各种N端氨基酸序列及其正常或变异两种构型的朊蛋白抗体构成。

3、根据权利要求2所述的疯牛病病原检测压电生物芯片，其特征在于疯牛病朊蛋白抗体阵列由N端氨基酸序列分别为异亮氨酸、组氨酸、正常的和变异的4种朊蛋白抗体组成，每一抗体通过固定剂吸附固定于微型电极上，抗体的厚度为100—150纳米。

4、根据权利要求2所述的疯牛病病原检测压电生物芯片，其特征在于疯牛病朊蛋白抗体阵列由N端氨基酸序列I、II、III，正常和变异的6种朊蛋白抗体组成，每一抗体通过固定剂化学键合固定于微型电极上，抗体的厚度为100—150纳米。

5、根据权利要求2所述的疯牛病病原检测压电生物芯片，其特征在于疯牛病朊蛋白抗体阵列由N端氨基酸序列I、II、III、IV，正常和变异的8种朊蛋白抗体组成，每一抗体通过生物素、亲合素自组装固定于微型电极上，抗体的厚度为100—500纳米。

## 疯牛病病原检测压电生物芯片

### 技术领域：

本实用新型涉及动物检验检疫装置，特别适用于疯牛病病原体的检测。

### 背景技术：

疯牛病是由非常规致病因子朊蛋白引起的一种亚急性海绵状脑病。该致病的变异朊蛋白对一些理化因素的抵抗力很强，大大高于已知的各类微生物和寄生虫，其传染性强、危害性大的特性极不利于人类和动物的保健，越来越引起人类的恐慌和关注。因此对疯牛病病原朊蛋白的检测具有重要意义。

对各种蛋白的检测主要有免疫学检测，即用待测蛋白作为抗原制备出对应的抗体，根据抗原抗体进行免疫化学反应形成免疫复合物的性状与活性特点，对该蛋白进行定性、定位或定量的检测。现有对疯牛病病原变异朊蛋白的检测装置，也主要是基于免疫学检测包括免疫电泳、放射免疫分析、荧光免疫分析和酶联免疫分析等的各种设备。如 Schmerr 等在 *Journal of Chromatography A*, 853, 207-14 (1999) 上发表的文章“Use of Capillary Electro-phoresis and Fluorescent Labeled Peptides to Detect the Abnormal Prion Protein in the Blood of Animals that are Infected with a Transmissible Spongiform Encephalopathy”，以及 Bieschke 等在 *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, 97(10), 5468-73A(2000) 发表的文章“Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets”所述，分别

采用荧光标记毛细管免疫电泳和共聚焦双色荧光光谱技术,检测出疯牛病变异朊蛋白。这些检测装置在使用时都需采用同位素、荧光素或酶等标记朊蛋白或朊蛋白的抗体,因此,对检测条件有极其严格的要求,检测设备复杂、成本高,而且操作冗繁,难以实现自动化。

生物芯片是近年来发展十分迅速的一种生化分析装置。压电生物芯片,如重庆大学向国家知识产权局申请的发明专利,其申请号 991174402,发明名称“微型压电谐振式传感器阵列芯片”,和莫志宏等申请的发明专利,其申请号 001131109,发明名称“原位生物芯片及其制备方法”,它们将多个压电生物传感器集成在一个芯片上,当芯片上的各电极与配套使用的振荡电路联接时形成独立的谐振检测单元。测量各检测单元的响应信号如器件的谐振频率、声电阻抗谱、频谱或相位等,可获取有关目标组分或多元组分体系的成分、性状的一维或多维信息,得到目标的全面、动态、实时或在位描述。但已公开的这种压电生物芯片不能提供检测疯牛病病原的信息。目前,国内外还没有关于采用生物芯片检测疯牛病病原的报导。

#### 发明内容:

本实用新型的目的在于提供一种疯牛病病原检测压电生物芯片,该芯片能实时检测疯牛病病原的信息。

为实现上述实用新型的目的,本实用新型包括压电片、固定在压电片下面的共用电极及固定在压电片上面的微型电极阵列、在微型电极阵列的各电极上一一对应地固定有不同的疯牛病朊蛋白抗体构成疯牛病朊蛋白的抗体阵列。

本实用新型是这样实现发明创造目的的:

本实用新型的疯牛病病原检测压电生物芯片(参见附图 1、附图 2),包含压电材料的压电片(1)、共用电极(2)、微型电极阵列(3)、微型电极上的疯牛病朊蛋白抗体阵列(4)。上述压电片的表面为光整表面,电极有分

别在压电片的上下面的共用电极(2)和由至少两个相互隔离的微型电极构成的微型电极阵列(3)，朊蛋白抗体是与各种朊蛋白相对应的抗体，各种朊蛋白抗体一一对应地固定在微型电极阵列的各个电极上，构成有至少一种朊蛋白抗体的朊蛋白抗体阵列(4)。

本实用新型采用朊蛋白抗体阵列与压电谐振阵列结合，是将朊蛋白抗体阵列的各种抗体分子一一对应固定在压电谐振阵列的各个微型电极上，形成各种朊蛋白的检测位点。各种朊蛋白的检测位点组成朊蛋白检测阵列，其整体构成疯牛病病原检测压电生物芯片。

本实用新型的疯牛病病原检测压电生物芯片与检测仪配套使用，配装时将共用微型电极和各微型电极的引脚与检测仪的压电传感器检测电路接口一一对应联接，从而构成压电生物芯片检测系统。进行疯牛病病原检测时，将样品置于芯片上，利用各检测位点的谐振频率与该位点的表面质量成反比，当抗体与朊蛋白进行免疫化学反应时，通过测量各检测位点的谐振频率可实时或在位检测相应各位点免疫反应的动态进程，从而对相应各种朊蛋白进行定性和定量分析。

本实用新型与已有技术比较，具有如下的优点和效果。

首先，本实用新型所采用的朊蛋白抗体阵列可以是根据诊断的对象或需要设计组合而成，即将已知的一类多种或多类多种朊蛋白的朊蛋白抗体组合成一组朊蛋白抗体阵列，使本疯牛病病原检测压电生物芯片可同时对一类或多类朊蛋白进行检测，实现对疯牛病朊蛋白的准确、自动、快速检测，并且无须标记、使用简便、检测效率高。

其次，本实用新型的芯片结构简单，易于大批量制造，成本低廉。

另外，本实用新型与检测仪配套采用频率测量，能对本芯片上各检测位点同时进行高灵敏度、高精度地实时在位检测；且能使检测设备简化、易于小型化。

疯牛病病原检测压电生物芯片与检测仪配套使用,适用于疯牛病的早期、高效和快速诊断。

附图说明:

图 1 是图 2 中的一种疯牛病病原检测压电生物芯片的 A—A 剖面图。

图 2 是图 1 的俯视图。

图 3 是本实用新型的对应一种朊蛋白抗体阵列的四种朊蛋白(I~IV)的 N 端氨基酸序列。

图 4 是本实用新型的一种自组装抗体及其与朊蛋白结合的结构图。

在图 1、2 中,1 为压电片,2 为共用电极,3 为微型电极阵列,4 为疯牛病朊蛋白抗体阵列,5 为通电导线,6 为芯片支撑体。

图 3 中, N 端氨基酸序列根据国际理论与应用化学联合会 IUPAC 标准给出,字母分别代表下列氨基酸:A-丙氨酸、C-半胱氨酸、D-天冬氨酸、E-谷氨酸、F-苯丙氨酸、G-甘氨酸、H-组氨酸、I-异亮氨酸、K-赖氨酸、L-亮氨酸、M-蛋氨酸、N-天冬酰胺、P-脯氨酸、O-谷酰胺、R-精氨酸、S-丝氨酸、T-苏氨酸、V-缬氨酸、W-色氨酸、Y-酪氨酸。

图 4 中,7 为生物素,8 为亲合素,9 为朊蛋白。

具体实施方式:

本实用新型的疯牛病病原检测压电生物芯片,如附图 1、2 所示,由压电片、共用电极、微型电极阵列及其引脚、朊蛋白抗体、支撑体构成。

上述压电片 1 选用石英晶体,也可以选用压电陶瓷、或压电聚偏氟乙烯薄膜等压电材料。采用通常方法制成表面光整的平片形,其片面呈为  $n$  边型,且  $n \geq 3$ ,即可以是三边形、四边形、五边形等多边形。

上述共用电极 2、微型电极 3 阵列分别固连在压电片 1 上、下面。采用通常的金、银、铝等导电材料。用真空蒸镀法将导电材料镀覆在压电片的上下面上形成导电膜,使压电片的下表面上的导电膜成为共用电极 2;

用光刻法、化学腐蚀法按设计的阵列图形，将压电片 1 的上表面上导电膜制成由多个相互隔离呈均匀分布的阵列形的微型电极 3 组成的微型电极阵列。共用电极 2、微型电极 3 及其引脚 5 选用金材料，也可以选银、或铝等导电材料。压电片 1、共用电极 2、微型电极 3 的形状为片状的圆形、或椭圆形、或  $n$  边型，边数  $n \geq 3$ ，即可以是三角形、四边形、五边形等多边形。

疯牛病朊蛋白抗体阵列是在微型电极阵列的各电极上固定 1—1000 纳米厚的不同的疯牛病朊蛋白抗体组成。各种疯牛病朊蛋白有 N 端氨基酸序列、包括正常或变异两种构型。可以采用物理吸附、或化学键合、或交联、或包埋、或自组装方法固定于微型电极(3)上。

上述支撑体 6 选用陶瓷，也可以选用塑料、或玻璃等绝缘材料，制成周边高中部低的凹状的四方形等。压电片 1 的边缘通过热压或用胶粘剂，固定于支撑体的周边的上部。支撑体的作用是支撑压电片，组装时要求微型电极及其上的朊蛋白抗体不与支撑体相接触。从而制成本实用新型的疯牛病病原检测压电生物芯片。

### 实施例 1

本实用新型的一种疯牛病病原检测压电生物芯片。

本实施例的压电片 1 为  $100\mu\text{m}$  厚的石英晶体片，微型电极膜 3 及其引脚 5 为  $200\text{nm}$  厚的金膜，压电片 1 与微型电极 3 形状均为四边形，疯牛病朊蛋白抗体阵列 4 由 N 端氨基酸序列分别为前述 I 和 II、正常和变异的 4 种朊蛋白抗体组成，支撑体 6 为陶瓷。每一抗体 4 通过固定剂吸附固定于微型电极 3 上，抗体的厚度为 100—150 纳米，固定剂为多聚甲醛 4%、戊二醛 25%、pH 为 6~8 的磷酸缓冲液 10%、余量为水。固定温度为  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，固定时间为 8 小时。本实施例可用于 N 端氨基酸序列为 I 和 II 变异朊蛋白疯牛病病原的同时定性检出和定量分析。

## 实施例 2

本实用新型的第二种疯牛病病原检测压电生物芯片。

本实施例的压电片 1 为 80 $\mu$ m 厚的石英晶体片，微型电极膜 3 及其引脚 5 为 150nm 厚的银膜，压电片 1 与微型电极形 3 状均为圆形，疯牛病朊蛋白抗体阵列 4 由 N 端氨基酸序列分别为前述 I、II 和 III、正常和变异 6 种的朊蛋白抗体组成，支撑体 6 为塑料。每一抗体 4 通过固定剂化学键合固定于微型电极 3 上，抗体的厚度为 100—150 纳米，固定剂为乙基-二甲基氨基丙基碳亚胺盐酸盐 2%、戊二醛 25%、pH 为 6~8 的磷酸缓冲液 10%、余量为水。固定温度为 15 $^{\circ}$ C，固定时间为 4 小时。本实施例可用于 N 端氨基酸序列为 I、II 和 III 变异朊蛋白疯牛病病原的同时定性检出和定量分析。

## 实施例 3

本实用新型的第三种疯牛病病原检测压电生物芯片。

本实施例的压电片 1 为 200 $\mu$ m 厚的压电聚偏氟乙烯片，微型电极膜 3 及其引脚 5 为 100nm 厚的金膜，压电片 1 和微型电极 3 形状均为四边形，抗体阵列 4 由 N 端氨基酸序列分别为前述 I、II、III 和 IV、正常和变异的 8 种朊蛋白抗体组成，支撑体 6 为塑料。每一抗体 4 通过生物素、亲合素自组装固定于微型电极 3 上，抗体的厚度为 100—500 纳米，固定温度为 25 $^{\circ}$ C，固定时间为 2 小时。本实施例可用于 N 端氨基酸序列为 I、II、III 和 IV 变异朊蛋白疯牛病病原的同时定性检出和定量分析。

上述实施例疯牛病病原检测压电生物芯片的最低检出量为 1-10 ng/mL，可在 10 分钟内一次完成对多种朊蛋白的同时测定。

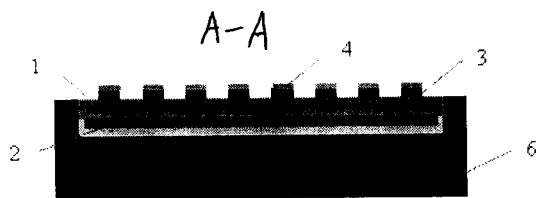


图 1

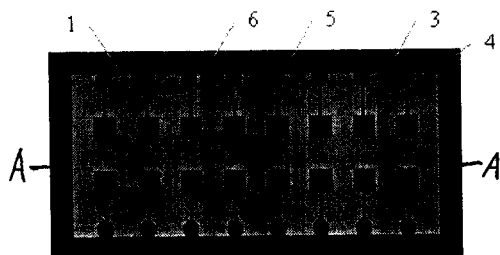


图 2

- I : MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGO-44
- II: GSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGQGP-87
- III: GGGGWGQGGSHSQWNKPSKPPKTNMKHVAGAAAGAWGGLSGY-131
- IV: MLGSAMSSPLIHFGNDYEDRYTRENMYRYPNQVYYRVPDRYSNQNN-177

图 3

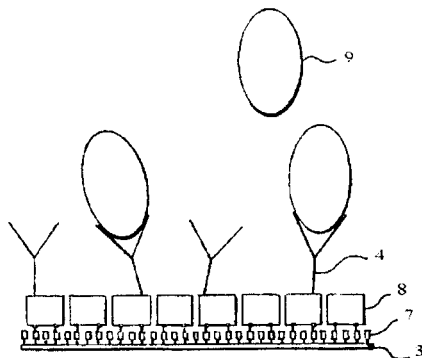


图 4

专利名称(译)	疯牛病病原检测压电生物芯片		
公开(公告)号	<a href="#">CN2554631Y</a>	公开(公告)日	2003-06-04
申请号	CN02275950.6	申请日	2002-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	中华人民共和国北京出入境检验检疫局 重庆大学		
申请(专利权)人(译)	中华人民共和国北京出入境检验检疫局 重庆大学		
当前申请(专利权)人(译)	中华人民共和国北京出入境检验检疫局 重庆大学		
[标]发明人	魏传忠 莫志宏 马贵平 靳萍 李冰玲 田学隆 田海燕 郭钢		
发明人	魏传忠 莫志宏 马贵平 靳萍 李冰玲 田学隆 田海燕 郭钢		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	张荣清		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

疯牛病病原检测压电生物芯片涉及动物检验检疫装置，特别适用于疯牛病病原体的检测。本实用新型包括压电片、固定在压电片下面的共用电极及固定在压电片上面的微型电极阵列、微型电极阵列的各电极上固定有不同的疯牛病朊蛋白抗体形成的朊蛋白抗体阵列，构成疯牛病病原检测压电生物芯片。本芯片与检测仪配套使用，构成疯牛病病原压电生物芯片检测系统，当各抗体与对应朊蛋白进行免疫化学反应时，通过测量谐振频率可实时检测相应各种朊蛋白的信息，对其进行定性和定量分析。适用于疯牛病病原的早期、高效和快速诊断。

