

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02132698.3

[43] 公开日 2004 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 1472534A

[22] 申请日 2002.7.30 [21] 申请号 02132698.3

[71] 申请人 王颖剑

地址 110002 辽宁省沈阳市和平区中兴街 71 栋 1-11-2 号

[72] 发明人 王颖剑

[74] 专利代理机构 沈阳利泰专利代理有限公司

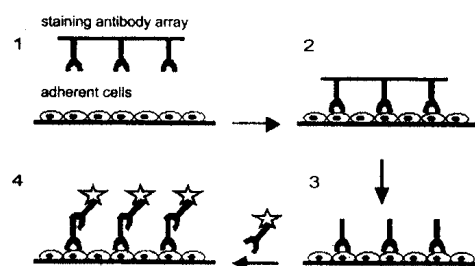
代理人 刘忠达

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 4 页

[54] 发明名称 检测多个生物分子的点阵及其使用方法

[57] 摘要

检测多个生物分子的点阵及其使用方法，其特点包括此点阵至少有一个生物试剂被固定在第一个支持体上，当此点阵用来检测固定在第二个支持体上的生物分子时，固定在第一个支持体上的生物试剂与固定在第二个支持体上的生物分子相接触，至少一个生物试剂与所说的第二个支持体上的生物分子相结合，然后第一个支持体与第二个支持体分离，至少一个生物试剂离开所说的第一个支持体而结合在所说的第二个支持体上。本发明提供了一种方便、快速、简捷地检测多个生物分子的点阵、多个蛋白的表述、活化和功能的有力方法，有利于推动生命科学研究、生物技术研究、药物开发和研究等领域的发展。



ISSN 1008-4274

1、一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是此点阵至少有一个生物试剂被固定在第一个支持体上，当此点阵用来检测固定在第二个支持体上的生物分子时，固定在第一个支持体上的生物试剂与固定在第二个支持体上的生物分子相接触，至少一个生物试剂与所说的第二个支持体上的生物分子相结合，然后第一个支持体与第二个支持体分离，至少一个生物试剂离开所说的第一个支持体而结合在所说的第二个支持体上。

2、根据权利要求 1 所述的生物试剂点阵，其特征是所说的生物试剂为抗体。

3、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是所说的生物试剂为重组蛋白。

4、根据权利要求 1 所述的生物试剂点阵，其特征是所说的生物试剂为核酸。

5、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是所说的生物试剂为寡核苷酸。

6、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是所说的第一个支持体的材料为尼龙，或玻璃，或塑料，或硝酸纤维，或聚丙烯酰胺，或它们的衍生物。

7、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是所说的第一个支持体为一个或多个毛细管。

8、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是生物试剂以长方形，或多边形的形状固定在所说的第一个支持体上。

9、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是首先将中间物固定在所说的第一个支持体上，然后通过与中间物的作用将生物试剂固定在所说的第一个支持体上。

10、根据权利要求 9 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是所述的中间物为蛋白 A 或蛋白 G，或它们的突变体。

11、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是至少有 5 个不同的生物试剂，每一个生物试剂被固定在第一个支持体上至少一个预先确定的位置上。

12、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其

特征是至少有 10 个不同的生物试剂，每一个生物试剂被固定在第一个支持体上至少一个预先确定的位置上。

13、根据权利要求 1 所述的一个用于检测生物分子的生物试剂点阵，其特征是至少有 100 个不同的生物试剂，每一个生物试剂被固定在第一个支持体上至少一个预先确定的位置上。

14、检测多个生物分子的方法，其特征是将至少一个生物试剂固定在第一个支持体上，每一个生物试剂被固定在预先确定的位置上，以便可以通过这个位置来确定这一生物试剂；把生物分子固定在第二个支持体上；将固定在第一个支持体上的生物试剂与固定在第二个支持体上的生物分子相接触，至少一个生物试剂与所说的生物分子相结合；然后第一个支持体与第二个支持体上的生物分子分离，至少一个与所说生物分子结合的生物试剂从第一个支持体分离而结合在所说的第二个支持体上；检测结合在所说的第二个支持体上的生物试剂。

15、根据权利要求 14 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物试剂包括抗体。

16、根据权利要求 14 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物试剂包括重组蛋白。

17、根据权利要求 14 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物试剂包括核酸。

18、根据权利要求 14 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物试剂包括寡核苷酸。

19、根据权利要求 14 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物分子在固定在第二个支持体上之前被分离。

20、根据权利要求 19 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物分子在固定在第二个支持体上之前先通过凝胶电泳进行分离。

21、根据权利要求 19 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物分子在固定在第二个支持体上之前先根据分子量进行分离。

22、根据权利要求 19 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所述的生物分子在固定在第二个支持体上之前先通过免疫方法被进行分离。

23、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于所述的生物分子在固定在第二个支持体上之前先通过抗体点阵进行分离。

24、根据权利要求 14 所述的检测多个生物分子的方法，其特征是在第

一个支持体与第二个支持体分离之前先用交联剂将所说的相结合的生物试剂与生物分子共价联接。

25、根据权利要求 24 所述的检测多个生物分子的方法，其特征在于所说的交联剂为醛类，包括甲醛和戊二醛。

26、根据权利要求 14 所述的检测多个生物分子的方法，其特征是生物试剂以长方形，或多边形的形状固定在支持体上。

27、检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征是将至少一个抗体固定在第一个支持体上，每一个抗体被固定在预先确定的位置上，以便可以通过这个位置来确定这一抗体；把细胞放在第二个支持体上；将固定在第一个支持体上的抗体与固定在第二个支持体上的细胞相接触，至少一个抗体与所说的细胞中的抗原相结合；然后第一个支持体与第二个支持体上的细胞分离，至少一个与所说抗原结合的抗体从第一个支持体分离而结合在所说的第二个支持体上；检测结合在所说的第二个支持体上的抗体。

28、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征在于所述的细胞在第二个支持体上被固定和渗透。

29、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征在于所述的细胞为组织切片。

30、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征在于所述的抗体是抗磷酸化蛋白的抗体。

31、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征是至少有 5 个不同的抗体，每一个抗体被固定在第一个支持体上至少一个预先确定的位置上。

32、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征是至少有 10 个不同的抗体，每一个抗体被固定在第一个支持体上至少一个预先确定的位置上。

33、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征是至少有 100 个不同的抗体，每一个抗体被固定在第一个支持体上至少一个预先确定的位置上。

34、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征是第一个支持体材料为尼龙，或玻璃，或塑料，或硝酸纤维，或聚丙烯酰胺，或它们的衍生物。

35、根据权利要求 27 所述的检测多个蛋白的细胞染色方法，其特征是第一个支持体材料为尼龙，或其衍生物。

检测多个生物分子的点阵及其使用方法

(一) 技术领域:

本发明涉及一种检测生物分子的方法，特别是一种通过固定在第一个支持体上的抗体点阵与固定在第二个支持体上的蛋白样品相接触，抗体将离开第一个支持体而与第二个支持体上的蛋白样品相结合，从而对多个蛋白进行检测的方法。这个方法可广泛用于检测多个蛋白的表达，活化和功能。

(二) 背景技术:

科学技术的飞速发展，推动了生命科学研究、生物技术研究、药物开发和研究等领域的进展。因此，提供一个能够检测作为生命基础的蛋白质的有效方法就变得越来越重要。

目前大量生物试剂的出现，例如成千上万个 DNA 克隆序列，众多抗体和重组蛋白，数百万个通过化学合成的分子，推动了在生物研究，临床诊断和药物开发方面利用这些试剂的技术的发展。特殊生物试剂点阵已经出现，在这些点阵中，每个试剂被放在预先指定的位置上以便以后能通过这个位置来识别它。例如，在一个 DNA 点阵中(也被称为基因芯片)，大量 cDNA 或寡核苷酸被固定，每一个被放在各自预先指定的位置，以便通过那个位置来识别每一个 cDNA 或寡核苷酸。DNA 点阵被用在杂交试验中，来监测大量基因的表达 (Schena et al., 1995; Science 270: 467-470; DeRisi et al., 1996, Nature Genetics 14: 457-460)。编码蛋白的 DNA 可放在表达载体中，由这些 DNA 克隆制成的点阵可被用来在哺乳细胞中表达它们编码的蛋白 (Ziauddin and Sabatini, 2001, Nature 411, 107-110)。

在一个蛋白点阵(或蛋白芯片)中，许多蛋白被固定在一个支持体上。每一个蛋白被放在一个预先指定的位置上以便能通过这个特定的位置将其识别。有两种类型的蛋白点阵特别有用：抗体点阵和重组蛋白点阵，它们分别包括大量不同的抗体和重组蛋白。因为抗体点阵能够与细胞中表达的蛋白结合，它们在监视蛋白的体内活性方面极有好处。利用抗体点阵技术，可以在一次实验中研究细胞中多种蛋白的性质。具体来讲，抗体点阵已被应用在研究体内蛋白与蛋白相互作用，蛋白翻译后修饰，以及蛋白表达中 (美国专利：6197599)。

另外，细胞，组织，脂类分子，多肽，药物或其他化学物质组成的点阵能够用在医疗诊断，药物开发，分子生物学，免疫和毒理学等方面进行大规模的筛选检测实验中 (Kononen, et al., *Nature medicine*, 4: 844-7, 1998)。

蛋白是细胞的重要组成部分，在多种细胞活动过程中发挥作用；它们还是许多药物的作用靶点。整个人类基因组大约编码 4 万个蛋白。尽管一个细胞可能含有编码所有蛋白的 DNA，但它一般仅表达其中的一部分。一个细胞株大约表达 1 万个蛋白，一个组织可表达更高数目的蛋白。细胞中的蛋白表达种类及数量决定它的形状和功能，异常的蛋白表达会引起疾病。因此蛋白组学研究的一个主要任务就是检测一个特定生物样品中蛋白的表达模式。

由于翻译后修饰，一种蛋白（有特定的氨基酸一级序列）在细胞中可能以不同的形式出现，从而产生更大数量的不同蛋白。由于在许多情况下，某些特殊形式的蛋白直接参与细胞的某种特定活动，所以，通过检测在细胞中出现的这些特殊形式的蛋白，可以了解细胞的活性和功能提供有价值的信息。

蛋白有很多种不同的翻译后修饰，如磷酸化，糖基化和泛素化。丝氨酸，蛋氨酸或酪氨酸残基的磷酸化在信号传导上是一个重要的机制。异常的蛋白磷酸化会导致许多人类疾病。

在检测蛋白磷酸化的方法中，放射性同位素代谢标记和用特异抗体去免疫检测磷酸化蛋白是最常用的方法。然而这些方法每次只适合于检测一种或几种蛋白。尽管抗磷酸化残基的特异性抗体，例如 PY20，4G10，能够用来展示多个磷酸化蛋白，但是，这些抗体单独却不能告诉是哪一个蛋白被磷酸化。所以在信号传导研究和临床诊断方面，急需一种新的、能够同时检测多个被磷酸化或被其他修饰的蛋白的方法。

定量蛋白表达在多个领域都有应用，包括生物医学的研究，疾病诊断，寻找治疗指标和药物靶点，以及在毒理和药效反映分析方面。在基础生物医学研究方面，经常希望知道哪些蛋白在特殊的细胞或特殊条件下表达。通过比较不同类型细胞的蛋白表达，就可能鉴别那些蛋白，它们的表达和活性决定一个细胞的特殊类型。在许多信号传导通道中，一些蛋白被特异性地激活；检测这些被激活蛋白，例如磷酸化蛋白，可为了解信号传导通道的原理提供关键的信息。

许多疾病会改变蛋白的表达模式，反过来，在许多情况下，异常的蛋白表达可以引发疾病。因此，确定蛋白的表达模式以及对比正常和异常细胞的

蛋白表达模式，对于了解疾病的机理具有极其重要的意义。

检测蛋白的表达也能在临床诊断上发挥作用。例如，在一个血样中，同时对几个病毒蛋白进行检查，能够更加有效准确地诊断病毒感染。剖析蛋白表达对于区分正常细胞，早期癌细胞，恶性癌细胞，转移癌细胞（真正的致命癌细胞）具有非常重要的价值。

另外，检测蛋白表达在药物开发领域，例如药物作用靶点的选择，毒理学及寻找药物反应的指标方面也是非常有用的。

寻找一个可以准确定量生物样品中每一个蛋白的表达水平、以及每一个蛋白的不同存在形式的方法，一直是分子生物学者重要研究目标。事实证明，要找到这样的方法是极其困难的。传统上，一个或小数量蛋白的表达可以通过 Western 印迹法和酶联免疫反应（ELISA）等免疫方法来检测。

尽管二维凝胶电泳可以用来分析一个样品中蛋白的表达，但其程序复杂。而且必须要去确认展示在二维凝胶电泳上的蛋白，这对许多蛋白来说是很难做到的。最近，蛋白点阵技术也被用于研究蛋白的表达。在这种方法中(美国专利 6197599, Haab et al., Genome Biol. 2, research0004-0004.13, 2001年)，一个抗体点阵与一个蛋白样品结合，然后与点阵上抗体特异结合的蛋白随之被检测出来。

免疫化学染色是一种常用的生物学技术，可以用来确定一个抗原在细胞中的表达和定位(Harlow and Lane, Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring harbor Press, 1988)，这些信息对于生物医学研究和临床医学具有极高的价值。现有的许多方法，都是用一个抗体溶液去对细胞进行染色，并一次仅允许用一个或几个抗体进行细胞染色。这些方法无法满足大规模测定不同蛋白的表达和细胞内定位的需要。因此，需要一个能够用大量不同抗体同时进行细胞染色的新方法。

（三）发明内容：

本发明要解决的技术问题之一，是要描述一种新型生物试剂点阵，一方面可维持试剂在点阵支持体上的位置；另一方面，当试剂与固定在另一个支持体上的分子结合后，可离开点阵支持体。

本发明要解决的技术问题之二，是要描述制作生物试剂点阵的方法。特别要介绍如何使用不同的支持体材料和固定方法来制作点阵。

本发明要解决的技术问题之三，就是要介绍如何使用改进的生物试剂点阵来检测生物分子及其性质，尤其是检测和对比细胞中蛋白质的表达及其在

细胞内的位置。

本发明提供了在检测蛋白及其它生物分子领域中使用生物点阵技术的方法。一种方法的一个重要特征是，当固定在第一个固相支持体上的抗体点阵与固定在第二个支持体上的蛋白样品相接触时，抗体能够与抗原特异性相结合，结合之后，当第一个支持体与固定在第二个支持体上的蛋白样品分开时，抗体能够保持与第二个支持体上的抗原的结合而与第一个支持体分开。

在一个具体应用中，蛋白样品可以是固定的细胞。因此，这个发明提供了一种使用具有大量不同抗体的点阵去染色细胞的方法，每一个抗体在一个预先确定的位置上可以对一部分细胞进行染色。在此方法中，首先按特定顺序将抗体固定在一个支持体上形成抗体点阵；然后这个抗体点阵与细胞相接触，从而允许抗体与它们相应的抗原结合。因此在细胞中多个蛋白的表达和位置能被检测出来。

在另一种情况下，在把蛋白样品固定在支持体之前，可根据分子量和（或）等电点首先将生物样品中的蛋白质分离，然后把分离好的蛋白质转移到一个固相支持体上，再与抗体点阵接触，从而使抗体与其对应的抗原相结合。将点阵支持体同蛋白样品分离后，抗体仍保持与抗原的结合。之后，与抗原结合的抗体被检测出来。

这个发明提供了在固相支持体上固定生物试剂的方法，这个方法特别适合于检测蛋白。这个方法的主要特征是，每个试剂都被固定在支持体上，但是在某种条件下试剂可从支持体上脱离。在一个具体实例中，充填有生物试剂的毛细管被按着指定的顺序捆绑在一起，以便每一个具有特殊试剂的毛细管都能够通过指定的位置而识别。在某些应用中，可将毛细管束进一步切割以制成合适高度的生物试剂点阵。

检测多个蛋白的方法，其特征是允许固定的抗体与抗原结合，尤其是所用的抗体点阵能够使多个抗体与固定在另一支持体上的对应的抗原相结合；每一个抗体与抗原的结合发生在预先指定的位置。

具体做法是使固定在第一个支持体上的抗体点阵与固定在第二个支持体上的蛋白样品相接触，使一些或所有的抗体离开第一个支持体点阵而与第二个支持体上的蛋白样品相结合。

“点阵”这个术语在这里指的是由一个固相支持体和至少一个生物试剂组成的一个装置，每个生物试剂被固定在支持体上特定的位置以便能通过这一特定位置来识别它。例如，“抗体点阵”在这里指的是由一个固相支持体

和至少一个抗体组成的一个装置，抗体被固定在支持体上特定的位置以便每一个抗体能通过其特定位置来识别。

“生物试剂”这个术语用在这里指任何感兴趣的分子，可以是抗体，重组蛋白，纯化的蛋白，合成的肽链，其它蛋白质，核酸，脱氧核酸，寡核苷酸，糖类，脂类，小分子化合物，以及它们的溶液或混合物。“试剂”具有相同的含意。

“固定”这个术语用在这里出于便于描述本发明和专利权利要求的需要，指的是限制试剂或其它分子在一个支持体上的运动。例如，当一个抗体被固定在一个支持体上时，它就被粘接在支持体上而在一般情况下不会与支持体分离，同时，抗体在支持体上的活动也受到限制。然而，在某些条件下，象发明中所描述的，一个被固定的试剂能够与支持体分离。固定方法的物理和化学性质决定一个被固定的试剂是否能够从支持体上分离及这种分离的效率如何。

“支持体”这个术语用在这里出于便于描述和专利权利要求的需要指的是将生物试剂或分子放置和固定在上面的结构。具体而言，这个支持体可能是硬质材料如硬玻璃或塑料制成的硬片，也可能是由硝酸纤维，尼龙或聚丙烯酰胺等材料制成的膜。膜使用起来方便操作，并且易于将试剂固定在上面。玻璃或塑料制成的硬片能提供坚固的支持，因此在某些特殊的应用中也是不可缺少的。

支持体最好被预先处理，以便能够将生物试剂以适当的强度固定在上面。一种处理方法是在固体支持体上涂上一层多聚体化合物，这些多聚体化合物可通过非特异的非共价键与生物试剂发生相互作用。例如，可以用在载玻片或盖玻片上涂抹多聚体化合物如 polylysine 或 polyethyleneimine 的方法固定生物分子。

将多种试剂放置和固定在固相支持体上的几个技术，如 Lehrach 等 (Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing, genome analysis, Voll, Davies and Tilgham, Eds, Cold Spring Harbor Press, pp. 39-81, 1990) 及 Brown 等 (美国专利: 5807522) 所描述过的一些方法，使用机械点样机每次可将一种或几种试剂放在一个玻璃载玻片上。采用这些方法，可在一个平的固相支持体上，放置大量不同试剂而形成生物试剂点阵，每一个试剂放置在一个预先确定的位置。

可将至少 1 个不同的生物试剂固定在一个支持体上，每一个生物试剂都

被固定在一个或多个预先确定的位置上。也可将 5 到 100000 个不同的生物试剂固定在一个支持体上，每一个生物试剂都被固定在一个或多个预先确定的位置上。或者将 10 到 100000 个不同的生物试剂固定在一个支持体上，每一个生物试剂都被固定在一个或多个预先确定的位置上。或者将至少 100 个不同的生物试剂固定在一个支持体上，每一个生物试剂都被固定在一个或多个预先确定的位置上。

抗体和其它生物试剂能通过吸附作用而固定 (Trevan, 1980, *Immobilized Enzymes: an introduction and their application in biotechnology*. Wiley, Chichester)。吸附力可以是非特异的，疏水或离子间相互作用。典型的吸附材料包括粘土，木炭，羟磷灰石，以及许多离子交换材料例如 DEAE-交联葡萄糖。

包埋(entrapment) 是另一种固定抗体和其它生物试剂的方法 (Trevan, 1980, *Immobilized Enzymes: an introduction and their application in biotechnology*. Wiley, Chichester)。理论上，被包埋的抗体并没有与介质结合；仅仅是它们的自由扩散受到限制。一个经常使用的介质是多聚酰胺凝胶。在一个具体例子中，毛细管可用来固定生物试剂和制作点阵。“毛细管”这个术语指密封的细长结构，能够用来支持和固定生物试剂。毛细管由塑料或玻璃等材料制成，这些材料不影响生物试剂的性质。毛细管的高度是可以变化的，理论上可从几微米到几米。生物试剂通常以液体状态充填在毛细管里。填充后，液体凝固从而使生物试剂固定。固定的强度可随不同应用而变化。

生物试剂可被直接或者间接地固定在固相支持体上。试剂可以高密度地被直接固定和支持体上，如显微镜载玻片上。相类似的技术已被用来制备高密度的 DNA 芯片(Shalon et al., *Genome Reserch*, 1996 Jul; 6(7): 639—645)。试剂也能被间接地固定和支持体上。例如，可以首先将一个中间物，如蛋白 A 或蛋白 G 以及它们的突变体固定和支持体上，然后抗体可通过与蛋白 A 或蛋白 G 的相互作用而被固定和支持体上。这一方法的优点是抗体仅通过恒定区同蛋白 A 或 G 相作用，抗体的可变区（抗原结合区）则可完全用来与抗原作用。另外一个优点是，由于蛋白 A 或蛋白 G 与抗体的结合位点可以改变，当使用改变的蛋白 A 或 G 时，抗体能以适当的强度固定和支持体上。这样，一方面抗体能够固定和支持体上从而保持各自位点，另一方面，抗体能够离开支持体并与具有更高亲和力的抗原结合。重组蛋白能通过其特异序列和固定和支持体上的与此特异序列相作用的中间物相结合而被固定。例如，中间物

(如谷胱甘肽或镍)能首先被共价键或非共价键固定和支持体上,然后带有特异序列(如GST或6xHis)的重组蛋白通过与中间物的相互作用而被固定在相同的支持体上。通过修饰特异序列和中间物,改变它们之间的亲和力,从而以适当的强度将重组蛋白固定。

虽然抗体经常以圆点的形状放在支持体上,它们也能以其他形状被放在支持体上。例如,抗体能以长方形的形状被点在支持体上,(如0.1到10厘米宽,1到50厘米长)。这样固定而制成的抗体点阵可用来与按分子量分离后的抗原相结合。

一个抗体一般要被固定和支持体上一个特殊位置上。一般来说,要保证当抗体点阵与蛋白样品相接触时,每个抗体都能与其抗原相结合。因此,每一个抗体被固定的位置是由抗原的位置来决定的。例如,如果抗原被通过二维凝胶电泳首先分离然后转移和固定在一个支持体上,那么每一个抗原就被固定在一个由它的分子量和等电点所决定的特殊位置。为了使每一个抗体能与其抗原接触,抗体需按照抗原在支持体上的位置而被固定在另一个支持体上。

在本发明中,生物试剂点阵用来检测生物样品中的生物分子,如蛋白样品中的蛋白质等。“蛋白样品”这个术语指的是来自某些来源的蛋白混合物。例如,它既可以是细胞系或组织的裂解液,也可以是完整的细胞或固定和支持体上的细胞。蛋白样品可以有不同的来源:可来自培养的细胞系,也可来自于人或动物组织,或来自于血样。

在一种情况下,培养的细胞或动物组织样品被放在载玻片上。用之前,细胞被处理以固定并且暴露蛋白。被固定的细胞能维持一定的细胞形态,同时蛋白停留在它们原来的细胞位置。有多种固定和渗透细胞组织的方法(Harlow and Lane, *Antibodies, a laboratory manual*, Cold Spring harbor Press, 1988)。通常使用的固定溶液是福尔马林或戊二醛溶液,此外还有一种常用的固定溶液含有甲醇。悬浮细胞,如淋巴细胞可通过离心沉降并固定和支持体上。细胞也可包埋在介质(如石蜡,胶原,明胶)中,然后用组织切片机做成切片放在支持体上。用来制备细胞样品的技术有很多(Jones, T.C, Ward, J.M., Mohr, U. and Hunt, R.D. (editors), 1990, *Hemopoietic System*. Berlin, Springer-Verlag; Polak, J.M. and Van Noorden, S., 1997, *Introduction to Immunocytochemistry*. New York, Springer)。

在另一情况下,蛋白样品可通过裂解细胞或组织来制备。一种典型的裂

解缓冲液包括去污剂如十二烷基硫酸钠 (SDS), Triton X-100, 等。然后蛋白可均匀地放在支持体上并且固定。有很多已知的固定方法可以利用, 如通过共价或非共价键来固定。固定在支持体上的蛋白样品的面积大小, 可以根据应用和被固定蛋白样品的体积和数量而决定。例如, 当用一个膜做支持体时, 如果每平方厘米膜可结合 10 毫克蛋白质, 那么, 10 毫克蛋白就能被固定在 1 平方厘米大小的膜上。

在许多应用中, 可先将生物分子, 如蛋白等分离然后再固定在支持体上。有许多已知的蛋白分离方法可以利用。例如, 蛋白能根据分子量通过 SDS/PAGE 被分离; 或根据分子量和等电点通过二维凝胶电泳来分离。经过电泳分离之后, 蛋白能被转移和固定在支持体上。

在另一些情况下, 蛋白可通过免疫学方法而被分离, 例如通过抗体点阵将蛋白样品中的各种蛋白分离。做法是, 首先将蛋白样品同第一个固相支持体上的抗体点阵混合, 从而可使抗体捕捉并分离蛋白样品中的抗原。清洗掉非结合的蛋白后, 在每一个位点捕捉到的蛋白能够同抗体分离并被转移到另一个支持体上并固定。因为抗体和固相支持体之间的相互作用可比抗体和抗原之间的相互作用强得多, 所以能够找到一些条件去打断抗体和抗原相互作用, 同时不影响抗体与第一个支持体的作用。在这种条件下, 抗原而不是抗体能被转移到另一个支持体上并且固定在上面。为了避免抗体同第一个固相支持体分离, 可将抗体共价键地固定在支持体上。

在一个典型的转移过程中, 带有抗体和与之相互作用的蛋白的支持体与另一个支持体相接触, 然后它们被放在一个缓冲溶液中以打断抗体和抗原的相互作用。同时, 可以施加电流或其它条件以便分离的蛋白能够从第一个支持体上转移到第二个支持体上。完成之后这两个支持体被分离。蛋白的转移和固定可以同时进行或分开进行。即蛋白质首先被转移, 然后被固定。蛋白质也可被同时转移和固定。如果固定并不是象所希望的那样牢固, 可将蛋白质进一步固定, 例如通过共价键。将蛋白质共价固定在固相支持体上的方法有很多。

然后可以用这样准备的蛋白样品与另外一个抗体点阵相结合。这种结合可以这样进行: 每个抗体能与它对应的抗原相接触而特异地结合。在这一点阵上的抗体能与支持体相分离。因此, 当将新的抗体点阵支持体与蛋白样品支持体分离之后, 与抗原结合的抗体将转移到样品支持体上。通过检测样品支持体上的抗体, 样品中的抗原及其数量能被检测出来。

在某些条件下，蛋白样品被牢固地固定，例如，经过共价键固定在支持体，如载玻片上。将蛋白共价固定在支持体上的方法有很多。

本发明提供的方法可使被固定在一个支持体上的抗体能够与固定在另一个支持体上的抗原相结合。具体来说，当将两个支持体放在一起时，固定在第一个支持体上的抗体与固定在第二个支持体上的抗原发生作用相结合。结合一定的时间后，两个支持体被分开。一些抗体由于与抗原的相互作用，将从第一个支持体上分离而结合到固定有抗原的第二个支持体上。第一个支持体上抗体的固定强度需要比抗体和抗原之间的相互作用更弱，也要比抗原在另一个支持体上的固定要弱。特定条件，如电场，特殊溶液，能促进抗体与其支持体的分离。

在这种方法中，当抗原和抗体结合之后，可通过共价交联方法使抗原抗体复合物更稳定。较好的共价交联的方法是使抗体与抗原被交联但支持物与抗体不进行交联。这可以通过选择特异的交联化合物和特殊的支持体材料来实现。多种带有不同功能团的化合物可用来交联抗体和抗原 (Wong, Shan S., *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*. Boca Raton: CRC Press, 1993)。很常用的交联剂有醛类，如甲醛和戊二醛等。

之后，与抗原结合的抗体能被检测出来。用来检测抗体的方法有很多。一个通常使用的方法就是使用酶联二抗，例如辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase) 偶联的羊抗兔和羊抗鼠的抗体。也可使用荧光标记的二抗。其他技术包括免疫 PCR (Sano et al., 1992, *Science* 258, 120—122), 循环 DNA 扩增技术 (Schweitzer et al., 2000, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 97, 10113-10119), 经 T7 RNA 聚合酶扩增的免疫检测技术 (Zhang et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 98, 5497—5502) 等。

本发明一个主要的应用是利用抗体点阵来染色细胞。在这一应用中，抗体被固定在第一个支持体上，需要染色的细胞被固定在第二个支持体上。细胞放在盖玻片上，培养直到长到合适状态。下一步就是固定和渗透细胞以暴露抗原。细胞可在-20 度甲醇 / 丙酮溶液中放置 10 分钟而被固定和渗透。这样处理的细胞与一个抗体点阵接触使得抗体与它们对应的抗原相结合。随后，抗体点阵支持体和细胞支持体被分开。由于与抗原的相互作用一些抗体将被转移到细胞支持体上。

通过检测细胞支持体上所结合的抗体种类和数量，可以检测细胞中表达的抗原的种类和数量。如果抗体是与酶分子共价连接的，它们可以通过酶反

应而被检测出来。例如，碱性磷酸酶是一个经常被使用的酶。它的催化反应可产生不溶的彩色物质。如果用的是荧光分子标记的抗体，那么它们能够通过荧光显微镜直接观察到。在更多情况下，可以利用荧光或者酶联二抗来揭示一抗。为了揭示抗原的表达和定量，可以在低倍显微镜下对染色进行观察。然而，为了揭示抗原的其他性质，例如它们在细胞内的位点，则通常需在高倍镜下观察。采用这种方法时，在一个细胞染色实验中，可以应用 1 到 100000 个不同的抗体，也可以是至少 5 个不同的抗体，还可以是 10 到 100000 个不同的抗体，或者是至少 100 个不同的抗体。

在研究两个相关蛋白的功能方面，双染色方法非常有效。比如，两个蛋白相作用的证据之一就是两个蛋白在细胞中表达在同一位置上。在本发明中，可将两个或更多的抗体固定在一个支持体上的同一位置，从而在同一位置上同时检测出两个或更多个抗原。

在本发明中，如果用来做点阵的是 DNA 探针而不是抗体，那么就可以用这种方法来检测细胞中表达的特异的 DNA 或 RNA 靶序列。可以将 DNA 探针以特殊的方式固定在一个支持体上，使得每一个探针在支持体上保持特定位置。但是探针的固定最好比探针与靶序列之间的作用要弱。这样，当探针与靶序列结合后，就可以从支持体上脱离。用这种方法制成的 DNA 探针点阵可用来同时检测大量不同的 DNA 或 RNA 靶序列。这要比当前原位杂交方法有许多优点。准备 DNA 或 RNA 探针并把它们点到支持体并固定其上的方法有很多，如在下列文献中所描述的方法，(Ian A. Darby (Editor), *In Situ Hybridization Protocols (Methods in Molecular Biology, 123)*, by Humana Press; ISBN: 0896036863; 2nd edition, 2000)。

在本发明中，抗体点阵可用来检测蛋白裂解液中的蛋白。具体方法是，固定在第一个支持体上的抗体点阵与固定在第二支持体上的蛋白裂解液接触。一段时间之后，抗体将与固定在第二个支持体上的蛋白裂解液中的对应抗原相结合，然后第一个支持体与第二个支持体分离。在适当条件下，与抗原连接的抗体将从第一个支持体上分离而转移到第二个支持体上。被转移到第二个支持体上的抗体的数量与蛋白样品中抗原的数量是成比例的。因此可以通过检测第二个支持体上抗体的数量而得知蛋白样品中抗原的数量。

在许多应用中，蛋白需首先被分离和 / 或浓缩，这对于检测表达量低的蛋白尤为重要。具体来说，蛋白首先通过一维 SDS / PAGE 分离并转移到硝化纤维膜上以便每一个蛋白都根据分子量不同而被固定在支持体上的不同位

置。然后这一支持体同一个抗体点阵相接触。在点阵中，抗体被固定的形状可为长方形，而且每一个抗体都处在一个特殊的位置以便都能同抗原相结合。这个特殊的位置是由抗原的分子量决定的。

蛋白也可通过二维凝胶电泳分离。之后转移到一个 PVDF 膜上。在这里利用的抗体点阵上，每个抗体都被固定在一个预先确定的位置以便每一个抗体都将与它的抗原相作用。这一位置与抗原的分子量和等电点有关。

在本发明中，蛋白可通过免疫方法分离和浓缩。其中一种方法是使用抗体点阵。第一个抗体点阵同一个蛋白样品接触以便蛋白能被固定在点阵上的抗体结合并分离。点阵上的抗体最好被牢固地固定，例如通过共价键。抗原，抗体结合后，抗原再同抗体分离，转移和固定在另一个支持体上。这个过程可以通过几个已知的方法来进行。之后第二个抗体点阵用来检测抗原。在第二个点阵上的抗体与它们对应的抗原结合之后能够从点阵支持体上分离。在第一个和第二个点阵上，抗相同抗原的抗体处在对应的位置上；它们可以是相同也可以是不同的抗体。

本发明提供了一种方便、快速、简捷地检测多个生物分子的点阵、多个蛋白的表述、活化和功能的有力方法，有利于推动生命科学研究、生物技术研究、药物开发和研究等领域的发展。

(四) 附图说明：

图 1 是利用本发明检测多个蛋白质方法的图示。此方法包括以下几个步骤：第一步，制备抗体点阵和培养贴壁细胞；第二步，点阵和细胞相接触；第三步，让点阵支持体与细胞分开；第四步，检测与细胞结合的抗体。

图 2 是利用本发明方法检测多个蛋白质的例子。MDCK 细胞被用一个有 200 个抗体的点阵染色。染色以 BCIP/NBT 为底物通过碱性磷酸酶催化的显色反应来观察。

图 3a 显示了用抗体点阵进行荧光染色的结果。所使用的是一个具有 200 个兔多克隆抗体的点阵。图中显示了 IRF1 蛋白在一处的染色结果。图中标尺代表 300 微米。

图 3b 是图 3a 放大图像的一部分。显示细胞中 IRF1 蛋白的表达和分布情况。图中标尺代表 30 微米。

图 3c 显示了用抗体点阵进行荧光染色的结果。所使用的是一个具有 200 个兔多克隆抗体的点阵。图中显示了 14-3-3 β 信号分子在一处的染色结果。

图 3d 是图 3c 放大图像的一部分。显示细胞中 14-3-3 β 蛋白的表达和分布

情况。

图 3 e 显示了用抗体点阵进行荧光染色的结果。所使用的是一个具有 200 个兔多克隆抗体的点阵。图中显示了 β -catenin 蛋白在一处的染色结果。

图 3 f 是图 3 e 放大图像的一部分。显示细胞中 β -catenin 蛋白的表达和分布情况。

图 3 g 显示了用抗体点阵进行荧光染色的结果。所使用的是一个具有 200 个兔多克隆抗体的点阵。图中显示了 Ets-1 转录因子在一处的染色结果。

图 3 h 是图 3 g 放大图像的一部分。显示细胞中 Ets-1 蛋白的表达和分布情况。

图 4a 显示了使用一个抗体点阵对 A431 细胞进行荧光染色的结果，在这个抗体点阵中兔抗 YY1 抗体（左图），鼠抗 p130^{cas} 抗体（中图），以及 YY1 抗体和 p130^{cas} 抗体（右图）被放在 3 个相邻的位置上，这一实验使用了 Cy2 标记的羊抗兔二抗和 Cy3 标记的羊抗鼠二抗。

图 4b 是图 4a 双染色（YY1 和 p130^{cas}）的放大图像。

图 5 是检测和比较两个生物样品中蛋白表达的例子。左侧显示的是在 ME180 细胞中蛋白质的表达，右侧显示的是在 A431 细胞中蛋白质的表达。这里所使用的是一个有 240 个抗体的点阵。染色是通过碱性磷酸酶催化的显色反映来观察的。

图 6 显示用 Western 印迹法验证图 5 例子中蛋白质表达的结果。图中显示了通过 Western 印迹法在测定 ME180 细胞中（左带）和在 A431 细胞中（右带）19 种蛋白质的表达。它们分别是：A, Cb1 (120 kD); B, Cdc2 (34 kD); C, Cortactin (80 kD); D, Neu (185 kD); E, ERK1 (44 kD); F, Ets-1 (51 kD); G, GSK-3 α (51 kD); H, HSP 70 (70 kD); I, JNK1 (46 kD); J, Lyn (56 kD); K, NF κ B p50 (50 kD); L, Skp2 p45 (45 kD); M, p53 (53 kD); N, Plk3 (70 kD); O, SH-PTP2 (60 kD); P, Raf-1 (74 kD); Q, Rb p107 (107 kD); R, Stat1 (84 kD); S, Stat5a (95 kD)。每个抗体在图 5 中的对应位置标在上面。

图 7 是将 A431 细胞的蛋白裂解液通过 SDS/PAGE 分离后用抗体点阵来检测蛋白质表达的一个例子。12 种蛋白质的抗体被固定在相应的位置上。被检测出的蛋白质是：1, IKK beta; 2, E2F1; 3, ERK2; 4, 14-3-3; 5, Rb p107; 6, ERK1 (control, 抗体被固定在没有其抗原的位置); 7, Ets-1; 8, ERK1; 9, Stat1; 10, 14-3-3 (control, 抗体被固定在没有其抗原的位置); 11, JNK1; 12, Stat2; 13, Lyn; 14, p38。每个抗体的对应位置被标示在相应印迹点

的右边。

(五) 具体实施方式:

本发明有很多不同用途, 而且依不同用途而有所变化。下面的例子只是发明技术的部分应用和部分具体实施方法, 本发明的应用不止于此。比如, 尽管本发明主要描述的是使用抗体点阵的例子, 但是也可同理使用其它生物试剂点阵。这些生物分子包括但并不局限于重组蛋白, 重组抗体, 单链重组抗体, 核苷酸, 寡核苷酸, cDNA 探针, 糖类, 脂类, 小分子化合物等。例如, 应用本发明中的方法, 一个 cDNA 探针点阵能被用在原位杂交中揭示多个信使 RNA (mRNA) 在细胞中的表达。

例 1: 制作抗体点阵。

首先用一个机械点样机把抗体(大约 0.5 微克/每微升)点到尼龙膜上。点样机用 0.6 毫米的点样头把大约 80 纳升抗体溶液(大约 40 纳克)滴到每一个点上。点与点之间的距离大约 0.6 毫米。抗体非共价键地与尼龙膜结合。用此法制做的抗体点阵可立刻使用或保持在 4°C 的环境下在 48 小时之内使用。

例 2: 在免疫化学染色中使用抗体点阵。

这个例子是应用例 1 描述的方法制备的抗体点阵进行免疫化学染色。这个点阵含有 200 个抗体。

将 MDCK 细胞在盖玻片上培养 2 天直到长满。然后将细胞放在零下 20 度的甲醇 / 丙酮 (1: 1 比例)混合溶液中固定和渗透 10 分钟。用生理盐水清洗之后, MDCK 细胞与抗体点阵接触大约 1 小时。然后抗体点阵支持体和细胞及其支持体分开。用生理盐水再一次清洗细胞后, 加上碱性磷酸酶标记的二抗反应半小时。清洗后, 通过以 5-bromo-4 chloro-indolyl-phosphatase(BCIP) and nitroblue tetrazolium(NBT)为底物的显色反映来观察染色。通过用生理盐水清洗终止显色反映。显色的图像被数字扫描仪扫描(见图二)。在很多地方的细胞被抗体染色, 而且抗体并没有扩散, 这一点可以从固定抗体位置间无染色可以看出。染色的位置与抗体被固定的位置相吻合。

例 3: 在荧光免疫化学染色中使用抗体点阵。

在这个例子中, 点样机用 0.3 毫米的点样头把大约 10 纳升抗体溶液(大约 5 纳克)滴到每一个点上。点与点之间的距离大约 0.3 毫米。然后应用图一中所示方法, 使用抗体点阵对 A431 细胞进行染色。与例 2 类似, 只不过用了荧光标记的二抗, 而且在荧光显微镜下观察染色(见图三)。细胞与荧光标记的二抗结合半个小时。清洗之后, 在荧光显微镜下观察细胞。细胞在几个不

同的位置被抗体染色，同时看不见抗体的扩散，这从不同的抗原具有不同的亚细胞位点以及被固定的抗体之间的区域没被染色的事实就可以得到这一结论。在低倍镜下可以观察到有规则的荧光点，与抗体被固定在支持体上的模式相符。高倍镜下可观察到细微的染色结构，例如 IRF1 在细胞核中的染色，14-3-3 β 和 ETS-1 蛋白在细胞质中的染色， β -catatin 蛋白在细胞连接间的染色。本方法的染色结果与一般染色方法所得到的结果一致。

例 4：用毛细管做成的抗体点阵。

这个例子是用毛细管做成的抗体点阵去染色细胞。每个抗体都与低凝固点琼脂糖溶液混合，注射到一个高 1 厘米，外径 2 毫米，壁厚 0.2 毫米的塑料毛细管中。当琼脂固定后，按特定顺序将毛细管固定在一起并横切，制成大约 1 毫米高的点阵。然后抗体点阵被放在一个玻璃支持体上与固定在另一个玻璃支持体上的细胞相接触。抗体与抗原因此有机会相结合。之后，如例 3 一样通过荧光标记的二抗来检测并且在显微镜下观察与抗原相结合的抗体。

例 5：用毛细管做成的抗体点阵进行荧光染色。

首先将荧光标记的抗体与低熔点琼脂糖凝胶在高温下混合。然后将抗体溶液注射到毛细管中并降低温度以使毛细管中的溶液凝固。20 个固定有抗体的毛细管按一定顺序排列做成毛细管点阵。之后，毛细管被切成薄的点阵，不高于 1 毫米，然后放在一个塑料支持体上并且粘固在上面。将点阵与放在盖玻片上固定的细胞相接触以使抗体和抗原相连接。然后细胞和抗体点阵在 37 度结合 2 小时。降低温度后，点阵和细胞被分离。将盖玻片上的细胞用生理盐水清洗之后在荧光显微镜下观察。

例 6：使用抗体点阵进行双染色。

首先制备一个含有 100 个位点的抗体点阵，每个位点阵有 1 个或 2 个抗体。当两个不同的抗体被固定在同一位点上时，一个是鼠的单克隆抗体，另一个是兔的多克隆抗体。之后这个点阵用来染色 A431 细胞。染色之后，cy3 荧光标记的羊抗鼠二抗和 cy2 荧光标记的羊抗兔二抗与一抗结合。抗原的位点可通过荧光显微镜来观察（图 4a 和 4b）。在有两个抗体的位置上，能够观察并区别两个相应的抗原，每个都有它特殊的细胞位点。比如在图 4 中，YY1 蛋白的细胞核染色和 p130^{cas} 蛋白的细胞膜染色可被分别观察到（图 4a 左和右）或同时观察到（图 4b）。

例 7：使用抗体点阵染色比较两种不同细胞的蛋白表达。

同样，可利用通过上述方法制成的含有 240 个鼠单克隆抗体和兔多克隆

抗体的点阵来检测和对比两个不同细胞样品中 240 种蛋白的表达情况。在此采用的是研究中常用的两种细胞，A431 细胞和 ME180 细胞。结果表明，两种细胞样品具有明显不同的蛋白表达模式（图五）。例如，与 ME180 细胞比较，A431 细胞表达更多的 Cbl, cortactin, Neu, HSP70, JNK1, p53, Raf-1, 和 Stat1；但表达较少的 GSK-3alpha, Skp2 p45, Plk3, 和 Stat5a。这些蛋白的表达也可以通过西杂交的方法来测定（图六）。两种实验结果相似，证明抗体点阵是一种检测蛋白表达的有效方法。

例 8：用抗体点阵检测激活路径。

可将抗激活蛋白(磷酸化蛋白)的特异性抗体做成抗体点阵，用这个点阵来检测生物样品中表达的激活蛋白。有激活蛋白的出现就说明某些信号传递途径被激活。

例 9：在蛋白裂解液中检测特异的蛋白。

将 50 微克含有 Stat1 重组蛋白的细菌裂解液固定在 1 平方厘米的硝化纤维素膜上，然后将这个膜同一个固定在尼龙膜上包括多个抗体（含有 Stat1 抗体）的抗体点阵相接触，1—2 小时之后，抗体与裂解液中对应的抗原相结合。当裂解液支持体与抗体点阵分开之后，一些抗体由于与抗原的相互作用而与抗体点阵支持体分离并结合在裂解液支持体上。结合到裂解液支持体上的抗体的数量与裂解液中的抗原的数量有关。可应用辣根过氧化酶联接的二抗来检测抗体，利用 ECL 反应来进行显示。

例 10：用辣根过氧化酶联接的一抗来检测 Stat1 蛋白。

这个例子与例 6 很相似，只不过使用了辣根过氧化酶联接的 Stat1 一抗。因此不需要使用酶联二抗来检测。

例 11：用通过蛋白 A 突变体固定的抗体点阵进行染色。

在这个例子中，带有一个抗体结合区的重组蛋白 A 突变体被首先固定在一个支持体上，然后抗体通过与蛋白 A 突变体的相互作用而被固定制成一个抗体点阵。这样制成的抗体点阵与固定在另外一个支持体上的蛋白裂解液相接触。1 小时之后，除去抗体点阵，通过 HRP 联接的二抗来检测与蛋白样品支持体相结合的抗体。

例 12：检测通过 SDS / PAGE 分离蛋白样品。

在这个例子中，使用帘状凝胶将 A431 细胞的裂解液中的蛋白通过 SDS / PAGE 首先分离然后转移到一个 PVDF 膜上。12 个重要蛋白的抗体被以长方形形状固定在尼龙膜上而制成点阵。每一个抗体都放在一个特殊位置，该

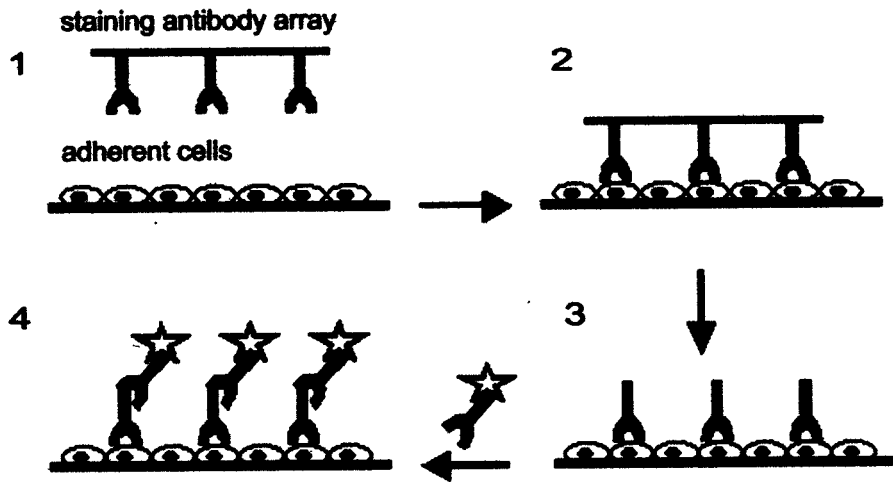
位置取决于抗原在 PVDF 膜上的位置（取决于抗原的分子量）。因此当点阵与蛋白样品接触时，每个抗体都能与它的抗原相接触并结合。抗体与它们的抗原结合后，点阵的尼龙膜与 PVDF 膜分开。那些由于同抗原作用而转移到 PVDF 膜上的抗体可通过用辣根过氧化酶联接的二抗来检测。如图七所示，一些蛋白被检测到并且每一个蛋白都是在正确的分子量的位置上被检测到的。而那些被有意放在错误位置上的抗体没有检测到真正的强信号，证明这个方法能够有效准确的检测蛋白表达。

例 13：检测经二维凝胶电泳分离之后的蛋白样品。

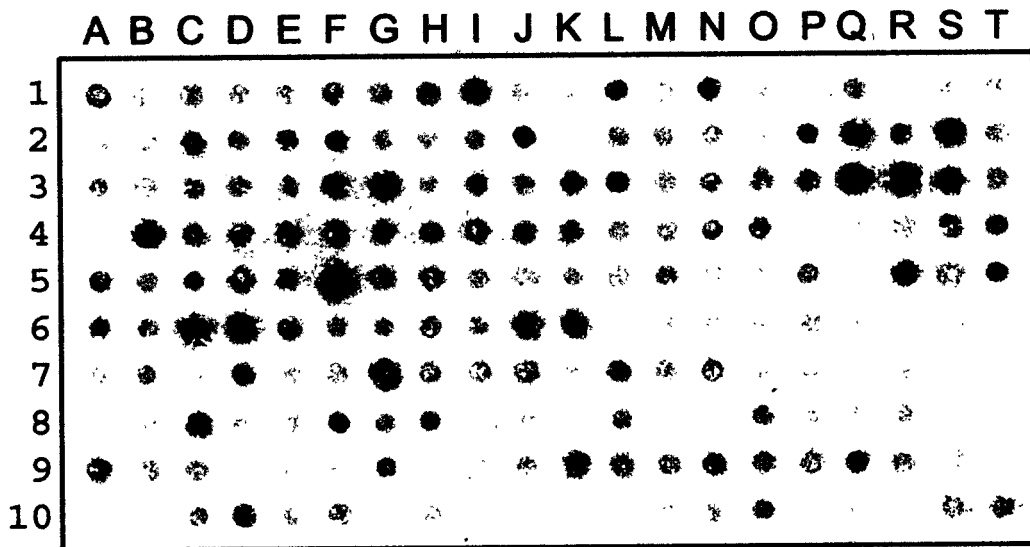
这个例子类似例 12，只不过蛋白样品经二维凝胶电泳分离之后被转移到一个 PVDF 膜上，然后蛋白样品同一个抗体点阵相接触。抗体点阵包括多个抗体，每个抗体都被固定在一个预先确定的位置上以便每一个抗体都能与它的抗原相接触。抗原在 PVDF 膜上的位置（也就是抗体在点阵上的位置）取决于抗原的分子量和等电点。

例 14：检测通过抗体点阵分离的蛋白样品。

在这个例子中，蛋白经抗体点阵首先分离并浓缩。通过在一个支持体上共价固定抗体制成第一个点阵；然后将这个点阵同一个蛋白样品放在一起以便蛋白能够与被固定在点阵上的每一个抗体所结合。这样，样品中的蛋白质就被分离并浓缩。然后抗原与抗体分开，转移并固定在一个样品支持体上。因为抗体被共价固定，很少抗体被转移到样品支持体上。在第二个抗体点阵上，抗体可以离开支持体。抗相同抗原的抗体在第一个抗体点阵和第二抗体点阵上的相对位置一致。这样当第二个抗体点阵与样品支持体相接触时，每个抗体都将与相应的抗原接触并结合。结合之后，点阵与样品支持体分离。因为一些抗体与它们的抗原相结合，所以这些抗体将与点阵支持体分开而结合到样品支持体上。



图一



图二

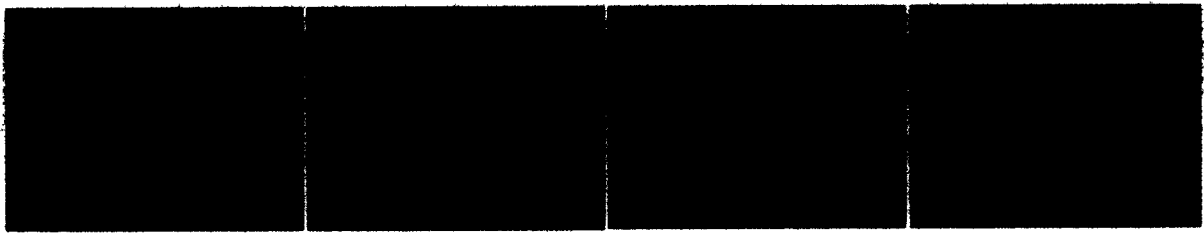


图 3a

图 3c

图 3e

图 3g

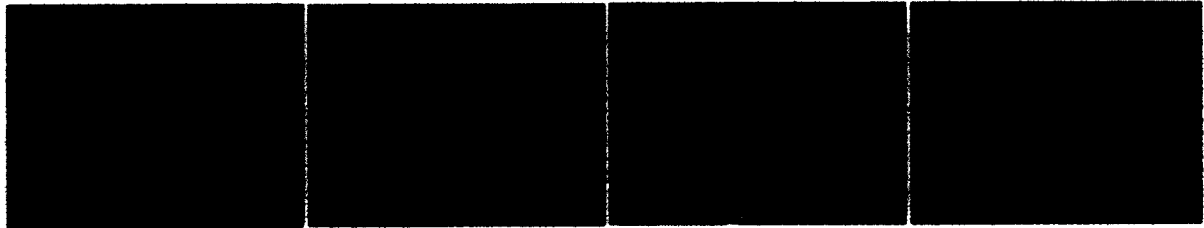


图 3b

图 3d

图 3f

图 3h

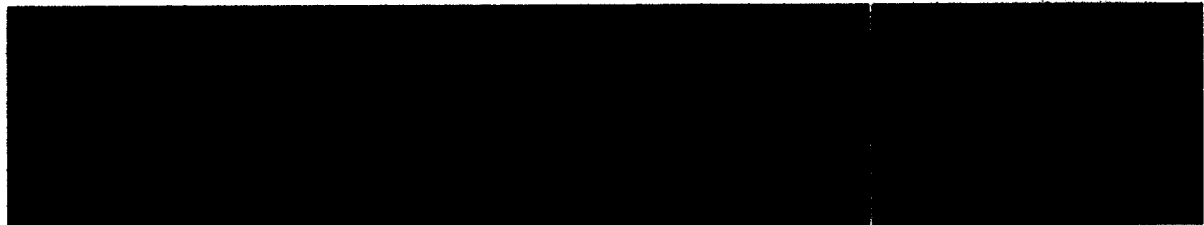


图 4a

图 4b

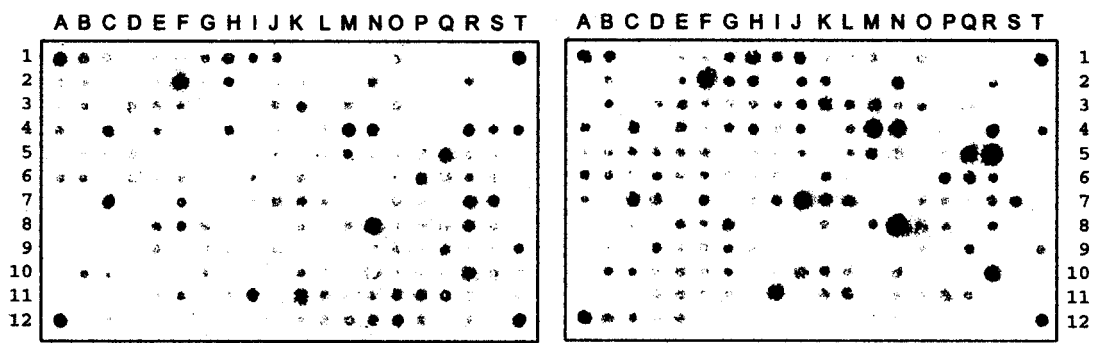


图 5

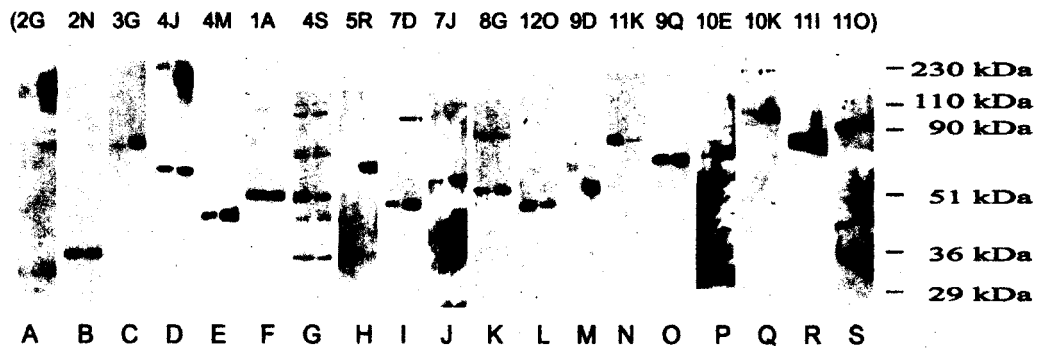


图 6

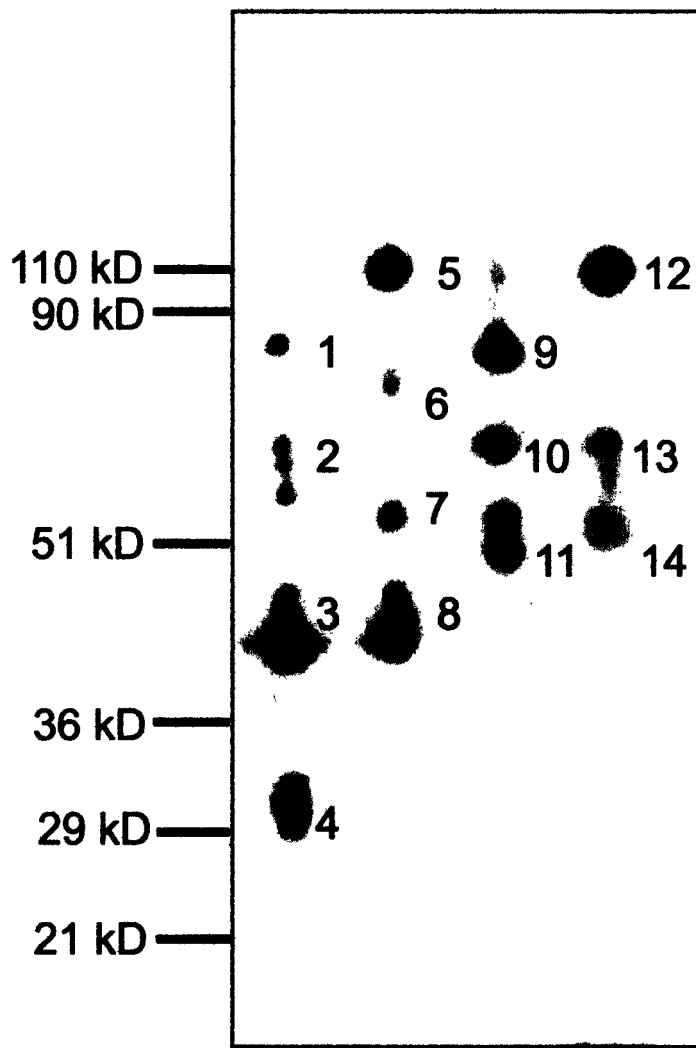


图7

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测多个生物分子的点阵及其使用方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1472534A | 公开(公告)日 | 2004-02-04 |
| 申请号 | CN02132698.3 | 申请日 | 2002-07-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 王颖剑 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 王颖剑 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 王颖剑 | | |
| [标]发明人 | 王颖剑 | | |
| 发明人 | 王颖剑 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68 | | |
| 代理人(译) | 刘忠达 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

检测多个生物分子的点阵及其使用方法，其特点包括此点阵至少有一个生物试剂被固定在第一个支持体上，当此点阵用来检测固定在第二个支持体上的生物分子时，固定在第一个支持体上的生物试剂与固定在第二个支持体上的生物分子相接触，至少一个生物试剂与所说的第二个支持体上的生物分子相结合，然后第一个支持体与第二个支持体分离，至少一个生物试剂离开所说的第一个支持体而结合在所说的第二个支持体上。本发明提供了一种方便、快速、简捷地检测多个生物分子的点阵、多个蛋白的表述、活化和功能的有力方法，有利于推动生命科学研究、生物技术研究、药物开发和研究等领域的发展。

