



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109765356 A

(43)申请公布日 2019.05.17

(21)申请号 201910046417.4

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2019.01.18

(71)申请人 江苏医联生物科技有限公司

地址 225000 江苏省扬州市高新技术产业
开发区开发西路217号

(72)发明人 杨文婷 曹臻 陈亮

(74)专利代理机构 北京文苑专利代理有限公司
11516

代理人 朱青

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

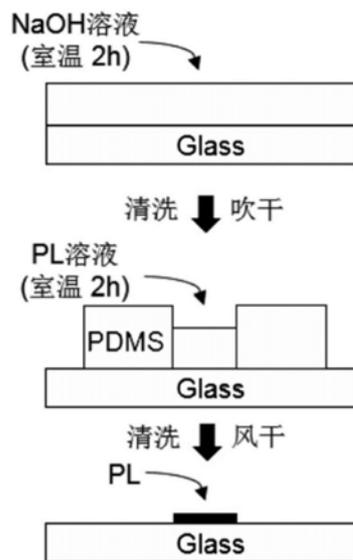
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种蛋白质芯片荧光检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种蛋白质芯片荧光检测方法,包括:步骤一:在玻璃片表面进行PL处理;步骤二:对进行过PL处理的玻璃片进行ELISA实验;所述步骤一包括:步骤(1)分别使用丙酮、异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片;步骤(2)将玻璃片用氮气吹干后,将玻璃片浸没在溶于水浓度为2.5M的NaOH溶液中室温下反应2h;步骤(3)使用流水冲洗干净玻璃片并氮气吹干,再用0.1%PL溶液室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。本发明提供的方法,操作简单,成本低,检测尺寸大小可调节和低浓度蛋白质的荧光检测性能,操作者只需首先制备所需PDMS模具,再在特定区域化学处理玻璃载体表面,就可得到所需大小的检测区域,捕获均匀。



1. 一种蛋白质芯片荧光检测方法,其特征在于,包括:

步骤一:在玻璃片表面进行PL处理;

步骤二:对进行过PL处理的玻璃片进行ELISA实验。

2. 根据权利要求1所述的蛋白质荧光检测方法,其特征在于,所述步骤一包括:

步骤(1) 分别使用丙酮、异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片;

步骤(2) 将玻璃片用氮气吹干后,将玻璃片浸没在溶于水浓度为2.5M的NaOH溶液中室温下反应2h;

步骤(3) 使用流水冲洗干净玻璃片并氮气吹干,再用0.1%PL溶液室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。

3. 根据权利要求1所述的蛋白质荧光检测方法,其特征在于,所述步骤一包括:

步骤(1) 使用玻璃棒将10:1比例配置的PDMS溶液混合均匀,再抽真空1h除干净气泡;

步骤(2) 将该PDMS混合液缓缓倒在干净Si片上,80°C加热1h实现固化;

步骤(3) 用刀将PDMS固化块切成多个小块,在小块上用打孔器在其中心打上贯穿的圆形进样口,得到PDMS模具;

步骤(4) 使用丙酮,异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片和PDMS模具各5min;

步骤(5) 氮气吹干后使玻璃载体特定区域与PDMS模具进样口对准贴合,再用夹具将两者机械固定;

步骤(6) 将PDMS模具用夹具上层板和下层板夹起来,PDMS模具上的进样口与上层板上的一个圆孔对齐,用螺栓螺母固定住夹具;

步骤(7) 通过上层板上的圆孔向进样口加入10 μ L 0.1%PL溶液,在室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的蛋白质荧光检测方法,其特征在于,所述步骤二包括:

步骤1) 在该载体表面加入20 μ g/ml的cTnI单克隆抗体溶液室温下反应2h,实现cTnI捕获;

步骤2) 清洗后再加入5%牛血清蛋白溶液室温下反应1h;

步骤3) 清洗后再加入不同浓度cTnI溶液室温下反应2h;

步骤4) 清洗后加入20 μ g/ml cTnI多克隆抗体溶液室温下反应2h;

步骤5) 清洗后加入2 μ g/ml 荧光标记的兔抗山羊IgG溶液室温下反应1h;

步骤6) 清洗干净后,在荧光显微镜下测得各浓度cTnI对应的荧光强度,得到荧光免疫曲线,并与未经过化学处理的干净玻璃片进行对比。

5. 根据权利要求1-3所述的蛋白质荧光检测方法,其特征在于,所述夹具包括矩形的上层板和下层板,上层板和下层板的形状和尺寸均相同,上层板和下层板上靠近外周边缘处均对应开设有四个螺栓孔,上层板的中心位置开设有多个圆孔。

6. 根据权利要求1-5所述的蛋白质荧光检测方法,其特征在于,夹具上层板的长为50mm,宽为40mm,中间开设有9个圆孔,排列成3行3列,行与行之间的距离为6mm,列与列之间的距离为10mm,螺栓孔距离板的长边的距离为5mm,距离板的短边的距离为12.5mm。

7. 根据权利要求1-3所述的蛋白质荧光检测方法,其特征在于,所述夹具为玻璃材料、聚四氟乙烯材料或亚克力材料制成。

8. 根据权利要求1-3所述的蛋白质荧光检测方法,其特征在於,在步骤3)中,cTnI溶液浓度范围为1pg/ml-1µg/ml。

一种蛋白质芯片荧光检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种蛋白质芯片荧光检测方法。

背景技术

[0002] 蛋白质芯片技术在生物医学领域中有着潜在的广阔应用前景。蛋白质芯片能够同时检测生物样品中与某种疾病或者环境因素损伤可能相关的全部蛋白质的含量情况,即表型指纹。表型指纹对监测疾病的过程或预测,判断治疗的效果也具有重要意义。传统蛋白质芯片一般是对固相载体整体进行特殊的化学处理,再将已知的蛋白分子固定其上捕获能与之特异性结合的待测蛋白从而实现生物分子检测与分析,为抗原抗体检测和药物筛选等领域提供有力的技术支持。然而,传统蛋白质芯片固相载体检测区域大,加工工艺复杂,捕获不均匀。

发明内容

[0003] 针对上述现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种可避免出现上述技术缺陷的蛋白质芯片荧光检测方法。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供的技术方案如下:

[0005] 一种蛋白质芯片荧光检测方法,包括:

[0006] 步骤一:在玻璃片表面进行PL处理;

[0007] 步骤二:对进行过PL处理的玻璃片进行ELISA实验。

[0008] 进一步地,所述步骤一包括:

[0009] 步骤(1)分别使用丙酮、异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片;

[0010] 步骤(2)将玻璃片用氮气吹干后,将玻璃片浸没在溶于水浓度为2.5M的NaOH溶液中室温下反应2h;

[0011] 步骤(3)使用流水冲洗干净玻璃片并氮气吹干,再用0.1%PL溶液室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。

[0012] 进一步地,所述步骤一包括:

[0013] 步骤(1)使用玻璃棒将10:1比例配置的PDMS溶液混合均匀,再抽真空1h除干净气泡;

[0014] 步骤(2)将该PDMS混合液缓缓倒在干净Si片上,80℃加热1h实现固化;

[0015] 步骤(3)用刀将PDMS固化块切成多个小块,在小块上用打孔器在其中心打上贯穿的圆形进样口,得到PDMS模具;

[0016] 步骤(4)使用丙酮,异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片和PDMS模具各5min;

[0017] 步骤(5)氮气吹干后使玻璃载体特定区域与PDMS模具进样口对准贴合,再用夹具将两者机械固定;

[0018] 步骤(6)将PDMS模具用夹具上层板和下层板夹起来,PDMS模具上的进样口与上层板上的一个圆孔对齐,用螺栓螺母固定住夹具;

[0019] 步骤(7)通过上层板上的圆孔向进样口加入10 μ L 0.1%PL溶液,在室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。

[0020] 进一步地,所述步骤二包括:

[0021] 步骤1)在该载体表面加入20 μ g/ml的cTnI单克隆抗体溶液室温下反应2h,实现cTnI捕获;

[0022] 步骤2)清洗后再加入5%牛血清蛋白溶液室温下反应1h;

[0023] 步骤3)清洗后再加入不同浓度cTnI溶液室温下反应2h;

[0024] 步骤4)清洗后加入20 μ g/ml cTnI多克隆抗体溶液室温下反应2h;

[0025] 步骤5)清洗后加入2 μ g/ml荧光标记的兔抗山羊IgG溶液室温下反应1h;

[0026] 步骤6)清洗干净后,在荧光显微镜下测得各浓度cTnI对应的荧光强度,得到荧光免疫曲线,并与未经过化学处理的干净玻璃片进行对比。

[0027] 进一步地,所述夹具包括矩形的上层板和下层板,上层板和下层板的形状和尺寸均相同,上层板和下层板上靠近外周边缘处均对应开设有四个螺栓孔,上层板的中心位置开设有多圆孔。

[0028] 进一步地,夹具上层板的长为50mm,宽为40mm,中间开设有9个圆孔,排列成3行3列,行与行之间的距离为6mm,列与列之间的距离为10mm,螺栓孔距离板的长边的距离为5mm,距离板的短边的距离为12.5mm。

[0029] 进一步地,所述夹具为玻璃材料、聚四氟乙烯材料或亚克力材料制成。

[0030] 进一步地,在步骤3)中,所述cTnI溶液浓度范围为1pg/ml-1 μ g/ml。

[0031] 本发明提供的蛋白质芯片荧光检测方法,操作简单,成本低,检测尺寸大小可调节和低浓度蛋白质的荧光检测性能,操作者只需首先制备所需PDMS模具,再在特定区域化学处理玻璃载体表面,就可得到所需大小的检测区域,cTnI捕获均匀,可以很好地满足实际应用的需要。

附图说明

[0032] 图1为实施例1的在玻璃片表面进行PL处理实现cTnI捕获的过程示意图;

[0033] 图2为实施例2中使用中心有孔的PDMS模具对玻璃片表面特定区域用PL处理的过程示意图;

[0034] 图3为夹具上层板的结构示意图;

[0035] 图4为夹具下层板的结构示意图。

具体实施方式

[0036] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0037] 实施例1

[0038] 一种蛋白质芯片荧光检测方法,包括:

[0039] 步骤一:在玻璃片表面进行PL处理;具体包括以下步骤:

- [0040] 步骤(1)分别使用丙酮、异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片5min;
- [0041] 步骤(2)将玻璃片用氮气吹干后,如图1所示,将玻璃片浸没在溶于水浓度为2.5M的NaOH溶液中室温下反应2h;
- [0042] 步骤(3)使用流水冲洗干净玻璃片并氮气吹干,再用0.1%PL溶液室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体;
- [0043] 步骤二:对该表面进行过PL处理的玻璃片进行ELISA实验;该过程包括以下步骤:
- [0044] 步骤(1)在该载体表面加入20 μ g/ml的心肌钙蛋白I(cTnI)单克隆抗体溶液室温下反应2h,实现cTnI捕获;
- [0045] 步骤(2)清洗后再加入5%牛血清蛋白(BSA)溶液室温下反应1h;
- [0046] 步骤(3)清洗后再加入不同浓度(1pg/ml-1 μ g/ml)cTnI溶液室温下反应2h;
- [0047] 步骤(4)清洗后加入20 μ g/ml cTnI多克隆抗体(山羊属)溶液室温下反应2h;
- [0048] 步骤(5)清洗后加入2 μ g/ml荧光标记的兔抗山羊IgG溶液室温下反应1h;
- [0049] 步骤(6)清洗干净后,在荧光显微镜下测得各浓度cTnI对应的荧光强度,得到荧光免疫曲线,并与未经过化学处理的干净玻璃片进行对比。
- [0050] 本实施例中提到的室温指的是22 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C的温度范围。
- [0051] 实施例2
- [0052] 一种蛋白质芯片荧光检测方法,包括:
- [0053] 步骤一:使用中心有孔的PDMS模具对玻璃片表面特定区域用PL处理;PL即聚L-赖氨酸,poly-l-lysine的缩写;具体包括以下步骤:
- [0054] 步骤(1)使用玻璃棒将10:1比例配置的PDMS溶液(PDMS即聚二甲基硅氧烷)混合均匀,再抽真空1h除干净气泡;
- [0055] 步骤(2)将该PDMS混合液缓缓倒在干净Si片上,80 $^{\circ}$ C加热1h实现固化;
- [0056] 步骤(3)使用小刀将该PDMS固化块切成一个个2cm*2cm的小固化块,取其中3块小固化块通过打孔器在其中心分别打1mm、2mm和3mm直径的圆形贯穿小固化块的进样口,得到三个PDMS模具;如图2所示;
- [0057] 步骤(4)使用丙酮,异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片和PDMS模具各5min;
- [0058] 步骤(5)氮气吹干后使玻璃载体特定区域与PDMS模具进样口对准贴合,再用夹具将两者机械固定;
- [0059] 如图3和图4所示,所述夹具包括矩形的上层板和下层板,上层板和下层板的形状和尺寸均相同,上层板和下层板上靠近外周边缘处均对应开设有四个螺栓孔,上层板的中心位置开设有多个圆孔,圆孔的数量和直径根据实际需要来进行设定,本实施例为9个圆孔。在本实施例中,夹具上层板的长为50mm,宽为40mm,中间9个圆孔排列成3行3列,行与行之间的距离为6mm,列与列之间的距离为10mm,螺栓孔距离板的长边的距离为5mm,距离板的短边的距离为12.5mm,这些尺寸可以根据实际应用的需要设置为其他数值,例如圆孔的直径可以为1mm、2mm或3mm等。
- [0060] 所述夹具可以采用以下几种材料:第一种为玻璃夹具,优点是清洗透明,可随时进行光学检测;第二种为聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene,PTFE),优点是耐高温高压,且生物相容性优良,几乎不与任何试剂反应;第三种为亚克力,优点是成本低廉,加工简易。
- [0061] 步骤(6)将PDMS模具用夹具上层板和下层板夹起来,PDMS模具上的进样口与上层

板上的一个圆孔对齐,用螺栓螺母固定住夹具;

[0062] 步骤(7)通过上层板上的圆孔向进样口加入10 μ L 0.1%PL溶液,在室温下与玻璃片表面反应2h,清洗干净后得到表面特定位置有一圆形区域(直径1mm、2mm或3mm)附着有PL的玻璃载体,该圆形区域位于该玻璃载体的中心位置。

[0063] 步骤二:对该表面进行过PL处理的玻璃片进行ELISA实验;该过程包括以下步骤:

[0064] 步骤(1)在该玻璃片载体表面加入20 μ g/ml的心肌钙蛋白I(cTnI)单克隆抗体溶液室温下反应2h,实现cTnI捕获;

[0065] 步骤(2)清洗后再加入5%牛血清蛋白(BSA)溶液室温下反应1h;

[0066] 步骤(3)清洗后再加入不同浓度(1pg/ml-1 μ g/ml)cTnI溶液室温下反应2h;

[0067] 步骤(4)清洗后加入20 μ g/ml cTnI多克隆抗体(山羊属)溶液室温下反应2h;

[0068] 步骤(5)清洗后加入2 μ g/ml荧光标记的兔抗山羊IgG溶液室温下反应1h;

[0069] 步骤(6)清洗干净后在荧光显微镜下测得各浓度cTnI对应的荧光强度,得到荧光免疫曲线,并与未经过化学处理的干净玻璃片进行对比。

[0070] 本实施例中提到的室温指的是22 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C的温度范围。

[0071] 实施例2通过夹具固定PDMS模具在载体待处理表面上可以简单且低成本地实现固相载体特定区域(100微米-1厘米尺寸大小,特定形状)的化学处理。

[0072] 本发明提供的蛋白质芯片荧光检测方法,操作简单,成本低,检测尺寸大小可调节和低浓度蛋白质的荧光检测性能,操作者只需首先制备所需PDMS模具,再在特定区域化学处理玻璃载体表面,就可得到所需大小的检测区域,cTnI捕获均匀,可以很好地满足实际应用的需要。

[0073] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

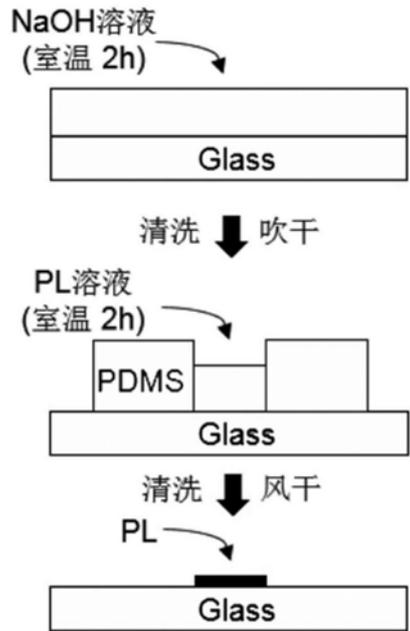


图1

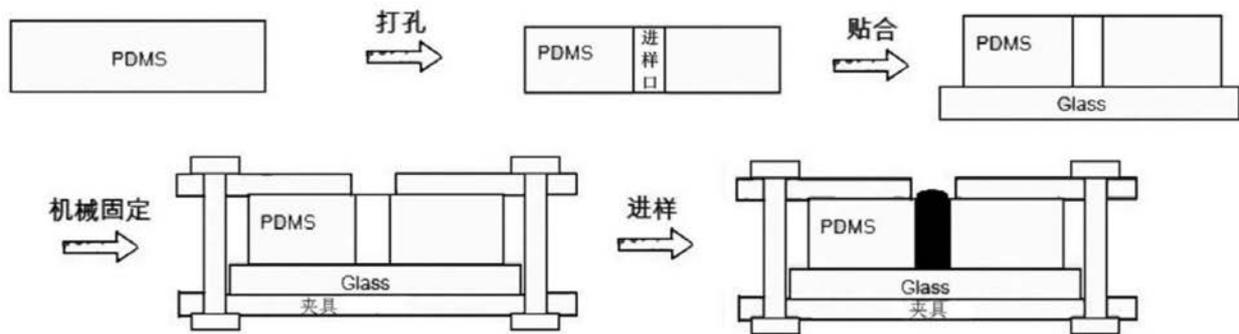


图2

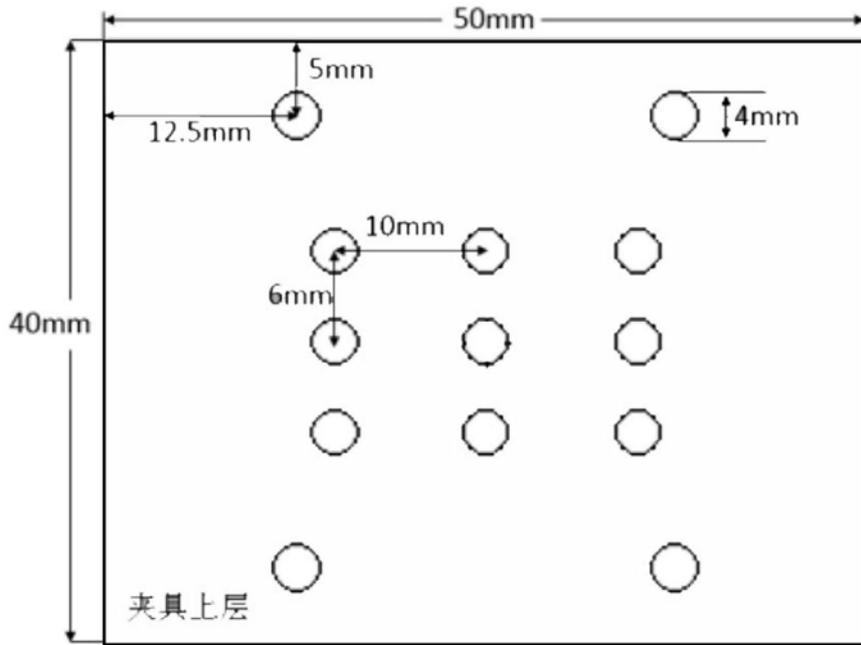


图3

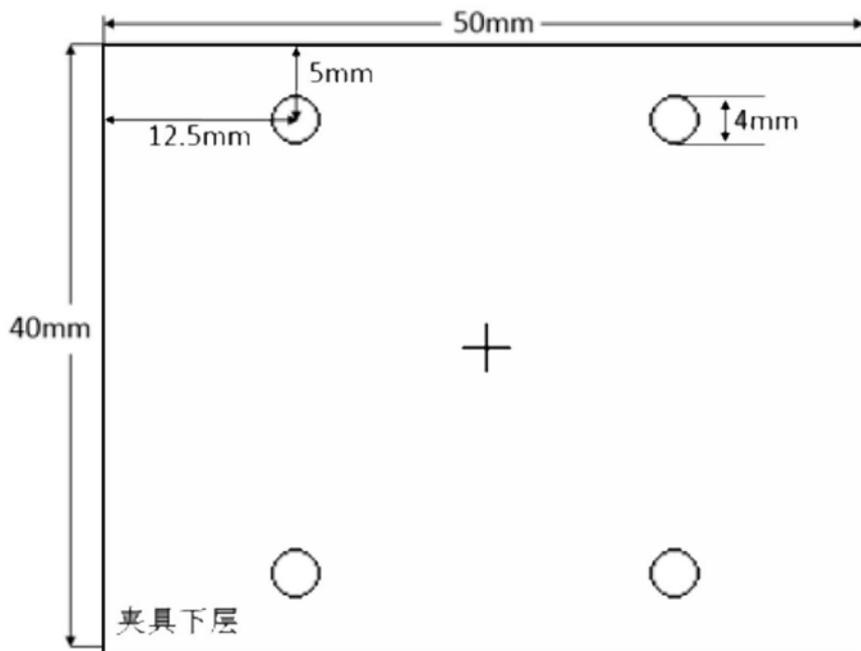


图4

专利名称(译)	一种蛋白质芯片荧光检测方法		
公开(公告)号	CN109765356A	公开(公告)日	2019-05-17
申请号	CN201910046417.4	申请日	2019-01-18
[标]发明人	杨文婷 曹臻 陈亮		
发明人	杨文婷 曹臻 陈亮		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	朱青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种蛋白质芯片荧光检测方法，包括：步骤一：在玻璃片表面进行PL处理；步骤二：对进行过PL处理的玻璃片进行ELISA实验；所述步骤一包括：步骤(1)分别使用丙酮、异丙醇和去离子水依次超声清洗玻璃片；步骤(2)将玻璃片用氮气吹干后，将玻璃片浸没在溶于水浓度为2.5M的NaOH溶液中室温下反应2h；步骤(3)使用流水冲洗干净玻璃片并氮气吹干，再用0.1%PL溶液室温下与玻璃片表面反应2h，清洗干净后得到表面附着有PL的玻璃载体。本发明提供的方法，操作简单，成本低，检测尺寸大小可调节和低浓度蛋白质的荧光检测性能，操作者只需首先制备所需PDMS模具，再在特定区域化学处理玻璃载体表面，就可得到所需大小的检测区域，捕获均匀。

