



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101893618 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 201010209352. X

(22) 申请日 2010. 06. 17

(71) 申请人 中国科学院海洋研究所

地址 266071 山东省青岛市市南区南海路 7
号

(72) 发明人 宋林生 杨嘉龙 邱丽梅 王玲玲
张垠

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

病原相关分子模式免疫检测芯片及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及免疫学免疫检测领域。本发明公开了一种病原相关分子模式免疫检测芯片及其制备方法与应用。该芯片由芯片载体与固定于其上的病原相关分子模式和抗体组成。芯片载体为商品化的晶芯高分子三维基片;本发明的病原相关分子模式免疫检测芯片,包括病原相关分子模式和抗体微阵列的制备,检测用特异性多克隆抗体的制备和荧光素 (Cy3) 标记,及应用该芯片同时检测多个样品与病原相关分子模式相互作用的具体步骤及条件优化。本发明获得的病原相关分子模式免疫检测芯片可用于免疫识别作用机制的研究,以及药物开发中生物大分子相互作用的研究。

1. 一种病原相关分子模式免疫检测芯片,其特征在于它包括晶芯高分子三维基片,晶芯高分子三维基片上固定有多个病原相关分子模式(PAMP)和抗体微阵列,各个微阵列之间用芯片专用围栏或 SuperPAPPen 划线隔开。

2. 根据权利要求1所述的病原相关分子模式免疫检测芯片,其特征在于所述的PAMP为脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)、肽聚糖(peptidoglycan,PGN)、酵母葡聚糖(Yeast glucan)、 β -1,3葡聚糖(β -1,3glucan)、甘露聚糖(mannan)、脂磷壁酸(lipoteichoic acids,LTA)、CpG脱氧寡核苷酸(CpG ODN)、Poly I:C,所述抗体是兔抗大鼠Ig的抗体。

3. 根据权利要求1所述的病原相关分子模式免疫检测芯片的制备方法,其特征是它包括如下步骤:

(1) 抗体的制备及纯化

取健康大鼠血清,亲和层析纯化大鼠Ig,以大鼠Ig为抗原常规方法免疫纯种新西兰白兔,采血制备血清,亲和层析纯化得到兔抗大鼠Ig的抗体。

(2) PAMP及抗体样品的准备

用pH7.4的含40%甘油的磷酸盐缓冲液(PBS)溶解各种PAMP,使脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、酵母葡聚糖(Yeast glucan)、眼虫 β -1,3葡聚糖(β -1,3glucan)、甘露聚糖(mannan)、脂磷壁酸(LTA)、Poly I:C浓度为0.1~2.0mg/mL,CpG ODN浓度为5~25 μ g/mL;稀释兔抗大鼠Ig的抗体,使其浓度为0.05~0.2mg/mL。

(3) 样品的点印与固定

用点样仪将PAMP溶液和抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样,点样量为50~70nL,点直径为500~600 μ m。每张芯片两排五列共10个6 $\times$ 5亚阵列,每个亚阵列所点样品一致,一号为LPS,二号为PGN,三号为Yeast glucan,四号为 β -1,3glucan,五号为mannan,六号为LTA,七号为CpG ODN,八号为Poly I:C,九号为质量控制点,所点样品为兔抗大鼠Ig的抗体作为阳性对照及固定对照,十号为磷酸盐甘油冲液作为阴性对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开,形成独立的反应单元。37 $^{\circ}$ C饱和湿度放置0.5~2.5h,60mJ紫外照射10-40min,洗涤,晾干。

(4) 芯片的封闭

向载玻片上点有样品的区域分别滴加3%牛血清白蛋白进行封闭,37 $^{\circ}$ C饱和湿度放置1h,洗涤,晾干,4 $^{\circ}$ C密封保存,得到病原相关分子模式免疫检测芯片。

4. 根据权利要求3所述的病原相关分子模式免疫检测芯片的制备方法,其特征在于使用兔抗大鼠Ig的抗体作为阳性对照及固定对照。

5. 病原相关分子模式免疫检测芯片在检测免疫识别过程中PAMP与模式识别受体(PRR)相互作用的应用,其特征在于它包括如下步骤:

(1) 诱导并纯化重组栉孔扇贝C型凝集素-3(rCfLec-3)、重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-1(rCfLec-3-CRD-1)、重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-2(rCfLec-3-CRD-2)、重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-3(rCfLec-3-CRD-3)、重组硫氧还蛋白(rTrx);

(2) 以rCfLec-3免疫大鼠制备抗体,亲和层析纯化所得抗体;

(3) 将亲和层析纯化后的大鼠抗rCfLec-3抗体用Cy3标记,并过凝胶柱纯化;

(4) 将待检样品rCfLec-3、rCfLec-3-CRD-1、rCfLec-3-CRD-2、rCfLec-3-CRD-3、rTrx

加到上述芯片的不同亚阵列中,加样量为 20 μ L/ 阵列,注意避免不同亚阵列间的液体混合。室温饱和湿度放置 1 ~ 4h,洗涤,再加稀释的 Cy3 标记的大鼠抗 rCfLec-3 多克隆抗体探针,20 μ L/ 阵列,37℃饱和湿度放置 0.5 ~ 2h,洗涤,晾干。

(5) 上述检测芯片用晶芯® EcoScan™-100CCD 扫描仪扫描成像,图像用专业分析软件分析,根据荧光信号的强弱,得到样品与芯片中 PAMP 相互作用的结果。

6. 根据权利要求 5 所述的病原相关分子模式免疫检测芯片的应用,其特征在于所用待检样品为 PRR,所述 PAMP 芯片与待检样品中 PRR 反应形成的复合体,被高特异性的 Cy3 标记的抗体探针所识别,在 532nm 的激光下呈现绿色荧光。。

7. 根据权利要求 5 所述的病原相关分子模式免疫检测芯片的应用,其特征在于待检样品滴加到芯片上后,室温饱和湿度放置 2h,玻片上加稀释的荧光抗体探针后,37℃饱和湿度放置 1h。

病原相关分子模式免疫检测芯片及其制备方法与应用

技术领域：

[0001] 本发明涉及免疫学检测技术，具体涉及一种用于检测病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 与模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 相互作用的免疫检测芯片或微阵列、制备方法及其应用，其属于免疫学、病原微生物学及生物芯片技术交叉领域。

背景技术：

[0002] 免疫识别是生物机体对外源物质发生免疫应答、实现有效防御的基础，是固有免疫反应中的关键环节。宿主通过模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 介导并完成免疫识别作用，其识别的靶分子是与病原微生物致病或生存相关的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP)。PAMP 主要包括：细菌的脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、肽聚糖 (peptidoglycan, PGN)、脂磷壁酸 (lipoteichoic acids, LTA)、CpG 脱氧寡核苷酸 (CpG ODN)，真菌的葡聚糖 (glucan)、甘露聚糖 (mannan) 和病毒的双链 RNA (dsRNA) 等。探明 PRR 与 PAMP 之间的相互作用是研究免疫识别分子机制的基础与先决条件，而多数 PRR 均具有 PAMP 结合的广谱性，这给研究 PRR 与 PAMP 相互作用制造了难题。

[0003] 鉴于免疫识别过程的重要性和 PRR 与 PAMP 结合的广谱性，快速高通量的结合检测技术已成为各国学者研究的焦点之一。目前，常用检测技术有 SDS-PAGE 法，生物大分子相互作用仪检测法，酶联免疫吸附检测法等。基于 SDS-PAGE 的检测方法直观，但其通量低，且只适用于不溶性的 PAMP；生物大分子相互作用仪检测法灵敏度高，操作简便，但需配备昂贵的生物大分子相互作用仪，不易实现；酶联免疫吸附法是目前常用的检测方法，但存在结果不直观，易产生假阳性的缺点。这些检测技术局限性大，效率低，耗时长，实用性差。因此，建立一种快速、准确、高通量的 PRR 与 PAMP 结合检测技术，已成为免疫识别领域中急需解决的问题。而新发展起来的生物芯片技术为其提供了强有力的技术平台，多样品检验并行处理的病原相关分子模式免疫检测芯片，在 PRR 和 PAMP 相互作用，及药物开发中生物大分子相互作用的检测上具有广阔的应用前景。

发明内容：

[0004] 针对上述现状，本发明的目的是提供一种能同时检测多种 PRR 与多种 PAMP 相互作用的病原相关分子模式免疫检测芯片，用于免疫识别研究中 PRR 与 PAMP 相互作用的快速、准确、高通量的检测。

[0005] 本发明的另一个目的是提供上述病原相关分子模式免疫检测芯片的制备方法。

[0006] 本发明还有一个目的是提供上述病原相关分子模式免疫检测芯片在 PRR 与 PAMP 相互作用检测中的应用。

[0007] 本发明的目的是由以下技术方案实现的：

[0008] 一种病原相关分子模式免疫检测芯片，其结构包括晶芯高分子三维基片、基片上

固定有多个6×5的PAMP和抗体微阵列,各个微阵列之间用芯片专用围栏或Super PAP Pen划线隔开。

[0009] 病原相关分子模式免疫检测芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0010] (1) 抗体的获得及纯化

[0011] 取健康大鼠血清,使用Amersham Pharmacia Biotech公司的亲和层析柱(HiTrap Protein G Sepharose Column)纯化大鼠Ig,以大鼠Ig为抗原,常规方法免疫纯种新西兰白兔,采血制备血清,亲和层析纯化得到兔抗大鼠Ig的抗体。

[0012] (2) PAMP及抗体样品的准备

[0013] 用pH7.4的含40%甘油的磷酸盐缓冲液(PBS)溶解各种PAMP,使脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、酵母葡聚糖(Yeast glucan)、眼虫 β -1,3葡聚糖(β -1,3 glucan)、甘露聚糖(mannan)、脂磷壁酸(LTA)、Poly I:C浓度为0.1~2.0mg/mL,CpG ODN浓度为5~25 μ g/mL;稀释兔抗大鼠Ig的抗体,使其浓度为0.05~0.2mg/mL。

[0014] (3) 样品的点印与固定

[0015] 用点样仪将PAMP溶液和抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样,点样量为50~70nL,点直径为500~600 μ m。每张芯片两排五列共10个6×5亚阵列,每个亚阵列所点样品一致,一号为LPS,二号为PGN,三号为Yeast glucan,四号为 β -1,3 glucan,五号为mannan,六号为LTA,七号为CpG ODN,八号为PolyI:C,九号为质量控制点,所点样品为兔抗大鼠Ig的抗体作为阳性对照及固定对照,十号为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或Super PAP Pen隔开,形成独立的反应单元。37℃饱和湿度放置0.5~2.5h,60mJ紫外照射10~40min,洗涤,晾干。

[0016] (4) 芯片的封闭

[0017] 向载玻片上点有样品的区域分别滴加3%牛血清白蛋白进行封闭,37℃饱和湿度放置1h,洗涤,晾干,4℃密封保存,得到病原相关分子模式免疫检测芯片。

[0018] 本发明的病原相关分子模式免疫检测芯片的应用,所述该应用的步骤如下:

[0019] (1) 用于检测的样品包括:重组栉孔扇贝C型凝集素-3(rCfLec-3)、重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-1(rCfLec-3-CRD-1)、重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-2(rCfLec-3-CRD-2)、重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-3(rCfLec-3-CRD-3)、重组硫氧还蛋白(rTrx),浓度为100 μ g/mL;

[0020] (2) 以rCfLec-3免疫大鼠制备抗体,亲和层析纯化所得抗体;

[0021] (3) 将亲和层析纯化后的大鼠抗rCfLec-3抗体用Cy3标记,过凝胶柱纯化;

[0022] (4) 将待检样品加到上述芯片的5个不同亚阵列中,加样量为20 μ L/阵列,注意避免不同亚阵列间的液体混合。室温饱和湿度放置1~4h,洗涤,再加稀释的Cy3标记的大鼠抗rCfLec-3多克隆抗体探针,20 μ L/阵列,37℃饱和湿度放置0.5~2h,洗涤,晾干。

[0023] (5) 激光扫描

[0024] 上述检测芯片用晶芯®EcoScan™-100CCD扫描仪扫描成像,激发波长为532nm,检测波长为585nm,荧光信号用Lab-chipscanner 2.0软件分析。

[0025] 检测结果分析与判定:扫描得到的图像亚阵列中,十号样品阴性对照的信号强度代表实验的本底值大小;一号至八号样品出现绿色荧光亮点的为阳性,表明所检测PRR可与对应的PAMP结合,无绿色荧光亮点的为阴性,表明所检测PRR不能与对应的PAMP结合;

九号样品质量控制点出现绿色荧光为正常,如果没有绿色荧光,说明检测操作有问题,检测结果为无效。

[0026] 所述的PAMP为LPS、PGN、Yeast glucan、 β -1,3glucan、mannan、LTA、CpG ODN、Poly I:C八种,但不仅仅限于这八种PAMP。

[0027] 所用于点样的LPS、PGN、Yeast glucan、 β -1,3glucan、mannan、LTA、Poly I:C最适浓度为1.0mg/mL,所用于点样的CpG ODN最适浓度为20 μ g/mL。

[0028] 所用于点样的亲和层析纯化后兔抗大鼠Ig抗体最适浓度为0.1mg/mL。

[0029] 所述的用点样仪将抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片表面的不同区域点样,其放置温度为37℃,饱和湿度下放置2h,其60mJ紫外照射时间为20min

[0030] 所述的待检样品加到芯片上后,室温饱和湿度放置2h;芯片上加稀释的抗体探针后,37℃饱和湿度下放置1h。

[0031] 所述芯片单张玻片点有10个亚阵列,可以根据实际需要增加亚阵列数量,能够实现更多样品的同时检测。

[0032] 本发明的优点在于可以同时检测多种PRR与多种PAMP的结合,它结构简单,成本低廉,通量易于扩充,实现多样品的同时平行检测,增加了不同标本数据之间的可比性,可简便、快速、准确地检测PRR与PAMP的结合。对样品要求简单,少量样品即可满足检测需要,并大大简化了现有检测技术不足。同时由于阳性控制及阴性控制的设置及重复点样,增加了实验结果的可靠性。反应相对较快,操作过程便捷,一般人员即可操作,适用于免疫识别机制中PRR与PAMP相互作用的研究。

附图说明：

[0033] 图1:病原相关分子模式免疫检测芯片结构示意图及点样分布图。

[0034] 1-晶芯高分子三维基片,2-点样微阵列,3-芯片专用围栏或Super PAP Pen划线,4-标签区域。点样分布:①LPS;②PGN;③Yeast glucan;④ β -1,3glucan;⑤mannan;⑥LTA;⑦CpG ODN;⑧Poly I:C;⑨兔抗大鼠Ig的抗体,作为阳性对照及固定对照等质量控制;⑩含40%甘油的PBS,作为阴性对照。

[0035] 图2:用病原相关分子模式免疫检测芯片检测重组栉孔扇贝C型凝集素-3(rCfLec-3)等PRR的PAMP结合活性的CCD扫描图(扫描仪的荧光强度设定为88%)。

[0036] a:检测样品为重组栉孔扇贝C型凝集素-3(rCfLec-3),表明rCfLec-3能与LPS、PGN、Yeast glucan、 β -1,3glucan、mannan和CpG ODN结合;

[0037] b:检测样品为重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-1(rCfLec-3-CRD-1),表明rCfLec-3-CRD-1能与LPS、PGN、Yeast glucan、 β -1,3glucan和CpG ODN结合;

[0038] c:检测样品为重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-2(rCfLec-3-CRD-2),表明rCfLec-3-CRD-2能与LPS和PGN结合;

[0039] d:检测样品为重组栉孔扇贝C型凝集素-3-糖识别结构域-3(rCfLec-3-CRD-3),表明rCfLec-3-CRD-3能与LPS和mannan结合;

[0040] e:检测样品为重组硫氧还蛋白(rTrx),表明rTrx不能与任何一种PAMP结合。

具体实施方式：

[0041] 下面通过具体实施例来详细说明本发明。

[0042] 本发明所用仪器及试剂如下：晶芯高分子三维基片（购自北京博奥生物公司）；小型手动芯片点样系统（购自 Whatman 公司）；晶芯® EcoScan™-100CCD 扫描仪（购自北京博奥生物公司）；Cy3 抗体标记试剂盒（购自 GE 公司）；HiTrap Protein G Sepharose Column（购自 GE 公司）；牛血清白蛋白（购自 SIGMA 公司）；Tween-20（购自 SIGMA 公司）；LPS、PGN、Yeast glucan、 β -1,3glucan、mannan、LTA、CpG ODN、Poly I:C（购自 SIGMA 公司）。

[0043] 实施例 1：

[0044] 1. 抗体的获得及纯化

[0045] 取健康大鼠血清，使用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的亲和层析柱（HiTrap Protein G Sepharose Column）纯化大鼠 Ig，以大鼠 Ig 为抗原，常规方法免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，亲和层析纯化得到兔抗大鼠 Ig 的抗体。

[0046] 2. 芯片结构设计

[0047] 该芯片结构如图 1 所示，包括晶芯高分子三维基片（1），晶芯高分子三维基片（1）上固定有两排五列共 10 个 6×5 的 PAMP 微阵列（2），点样量为 50-70nL，点直径为 500 ~ 600 μ m。各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线（3）隔开。在玻片一端具有标签区域（4）。

[0048] 3. PAMP 及抗体样品的准备

[0049] 用 pH7.4 的含 40% 甘油的磷酸盐缓冲液（PBS）溶解各种 PAMP，使脂多糖（LPS）、肽聚糖（PGN）、酵母葡聚糖（Yeast glucan）、眼虫 β -1,3 葡聚糖（ β -1,3glucan）、甘露聚糖（mannan）、脂磷壁酸（LTA）、Poly I:C 浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0mg/mL，CpG ODN 浓度为 5、10、15、20、25 μ g/mL；稀释兔抗大鼠 Ig 的抗体，使其浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20mg/mL。

[0050] 4. 样品的点印与固定

[0051] 用点样仪将 PAMP 溶液和抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样，点样量为 50 ~ 70nL，点直径为 500 ~ 600 μ m。每张芯片两排五列共 10 个 6×5 亚阵列，每个亚阵列所点样品一致，一号为 LPS，二号为 PGN，三号为 Yeast glucan，四号为 β -1,3glucan，五号为 mannan，六号为 LTA，七号为 CpG ODN，八号为 Poly I:C，九号为质量控制点，所点样品为兔抗大鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照，十号为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元。37℃ 饱和湿度放置 2h，60mJ 紫外照射 20min，洗涤，晾干。

[0052] 5. 芯片的封闭

[0053] 向载玻片上点有样品的区域分别滴加 3% 牛血清白蛋白进行封闭，37℃ 饱和湿度放置 1h，洗涤，晾干，4℃ 密封保存，得到病原相关分子模式免疫检测芯片。

[0054] 实施例 2：

[0055] 步骤 1、2 同实施例 1。

[0056] 3. PAMP 及抗体样品的准备

[0057] 用 pH7.4 的含 40% 甘油的磷酸盐缓冲液（PBS）溶解各种 PAMP，使脂多糖（LPS）、肽聚糖（PGN）、酵母葡聚糖（Yeast glucan）、眼虫 β -1,3 葡聚糖（ β -1,3glucan）、甘露聚糖（mannan）、脂磷壁酸（LTA）、Poly I:C 浓度为 1.0mg/mL，CpG ODN 浓度为 20 μ g/mL；稀释兔

抗大鼠 Ig 的抗体,使其浓度为 0.10mg. mL。

[0058] 4. 样品的点印与固定

[0059] 用点样仪将 PAMP 溶液和抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样,点样量为 50 ~ 70nL,点直径为 500 ~ 600 μ m。每张芯片两排五列共 10 个 6 $\times$ 5 亚阵列,每个亚阵列所点样品一致,一号为 LPS,二号为 PGN,三号为 Yeast glucan,四号为 β -1,3 glucan,五号为 mannan,六号为 LTA,七号为 CpG ODN,八号为 Poly I:C,九号为质量控制点,所点样品为兔抗大鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照,十号为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开,形成独立的反应单元。37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5h,60mJ 紫外照射 20min,洗涤,晾干。

[0060] 5. 芯片的封闭

[0061] 向载玻片上点有样品的区域分别滴加 3%牛血清白蛋白进行封闭,37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 1h,洗涤,晾干,4 $^{\circ}$ C 密封保存,得到病原相关分子模式免疫检测芯片。

[0062] 实施例 3:

[0063] 步骤 1、2、3 同实施例 2。

[0064] 4. 样品的点印与固定

[0065] 用点样仪将 PAMP 溶液和抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样,点样量为 50 ~ 70nL,点直径为 500 ~ 600 μ m。每张芯片两排五列共 10 个 6 $\times$ 5 亚阵列,每个亚阵列所点样品一致,一号为 LPS,二号为 PGN,三号为 Yeast glucan,四号为 β -1,3glucan,五号为 mannan,六号为 LTA,七号为 CpG ODN,八号为 Poly I:C,九号为质量控制点,所点样品为兔抗大鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照,十号为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开,形成独立的反应单元。37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 2h,60mJ 紫外照射 10min、20min、30min、40min,洗涤,晾干。

[0066] 5. 芯片的封闭

[0067] 向载玻片上点有样品的区域分别滴加 3%牛血清白蛋白进行封闭,37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 1h,洗涤,晾干,4 $^{\circ}$ C 密封保存,得到病原相关分子模式免疫检测芯片。

[0068] 实施例 4:

[0069] 检测重组栉孔扇贝 C 型凝集素-3(rCfLec-3)、重组栉孔扇贝 C 型凝集素-3-糖识别结构域-1(rCfLec-3-CRD-1)、重组栉孔扇贝 C 型凝集素-3-糖识别结构域-2(rCfLec-3-CRD-2)、重组栉孔扇贝 C 型凝集素-3-糖识别结构域-3(rCfLec-3-CRD-3)与 PAMP 的结合。

[0070] 步骤 1、2、3 同实施例 2。

[0071] 4. 样品的点印与固定

[0072] 用点样仪将 PAMP 溶液和抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样,点样量为 50 ~ 70nL,点直径为 500 ~ 600 μ m。每张芯片两排五列共 10 个 6 $\times$ 5 亚阵列,每个亚阵列所点样品一致,一号为 LPS,二号为 PGN,三号为 Yeast glucan,四号为 β -1,3glucan,五号为 mannan,六号为 LTA,七号为 CpG ODN,八号为 Poly I:C,九号为质量控制点,所点样品为兔抗大鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照,十号为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开,形成独立的反应单元。37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 2.0h,60mJ 紫外照射 20min,洗涤,晾干。

[0073] 5. 芯片的封闭

[0074] 向载玻片上点有样品的区域分别滴加 3% 牛血清白蛋白进行封闭, 37℃ 饱和湿度放置 1h, 洗涤, 晾干, 4℃ 密封保存, 得到病原相关分子模式免疫检测芯片。

[0075] 6. 特异性抗体的获得及纯化

[0076] 以体外重组构建、诱导纯化的 rCfLec-3 为抗原, 常规方法免疫大鼠, 采血制备血清, 得到大鼠抗 rCfLec-3 抗体, 亲和层析纯化所得抗体。

[0077] 7. Cy3 标记的抗体探针的制备

[0078] 按照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的产品说明书, 使用荧光素 Cy3 对亲和层析纯化后的大鼠抗 rCfLec-3 抗体进行标记, 并过凝胶柱纯化。

[0079] 8. 样品检测

[0080] 将待检样品 rCfLec-3、rCfLec-3-CRD-1、rCfLec-3-CRD-2、rCfLec-3-CRD-3 加到上述芯片的 4 个不同亚阵列中, 加样量为 20 μ L/ 阵列, 注意避免不同亚阵列间的液体混合。室温饱和湿度放置 1、2、3、4h, 洗涤, 再加稀释的 Cy3 标记的大鼠抗 rCfLec-3 多克隆抗体探针, 20 μ L/ 阵列, 37℃ 饱和湿度放置 0.5、1.0、1.5、2.0h, 洗涤, 晾干。

[0081] 9. 激光扫描

[0082] 上述检测芯片用晶芯® EcoScan™-100CCD 扫描仪扫描成像, 激发波长为 532nm, 检测波长为 585nm, 荧光信号用 Lab-chipscanner 2.0 软件分析。

[0083] 检测结果分析与判定: 扫描得到的图像亚阵列中 (图 2, a-d), 十号阴性对照的无荧光信号, 表明本实验不受非特异性结合干扰; 九号质量控制点出现绿色荧光, 表明本实验结果有效;

[0084] a: 检测样品为 rCfLec-3, 一、二、三、四、五、七号出现绿色荧光信号, 表明 rCfLec-3 能与 LPS、PGN、Yeast glucan、 β -1,3glucan、mannan 和 CpG ODN 结合;

[0085] b: 检测样品为 rCfLec-3-CRD-1, 一、二、三、四、七号出现绿色荧光信号, 表明 rCfLec-3-CRD-1 能与 LPS、PGN、Yeast glucan、 β -1,3glucan 和 CpG ODN 结合;

[0086] c: 检测样品为 rCfLec-3-CRD-2, 一、二号出现绿色荧光信号, 表明 rCfLec-3-CRD-2 能与 LPS 和 PGN 结合;

[0087] d: 检测样品为 rCfLec-3-CRD-3, 一、五号出现绿色荧光信号, 表明 rCfLec-3-CRD-3 能与 LPS 和 mannan 结合;

[0088] 实施例 5:

[0089] 病原相关分子模式免疫检测芯片的特异性检测:

[0090] 取重组硫氧还蛋白 (rTrx) 与病原相关分子模式免疫检测芯片上微阵列孵育, 经抗体探针检测后扫描, 除九号质量控制点外无绿色荧光信号出现 (图 2, d), 证实所制备的病原相关分子模式免疫检测芯片不与非 PRR 蛋白反应。

[0091] 本领域的普通研究人员都会理解, 在本发明的保护范围内, 对于上述实施例进行修改、添加和替换都是可能的, 其都没有超出本发明的保护范围。

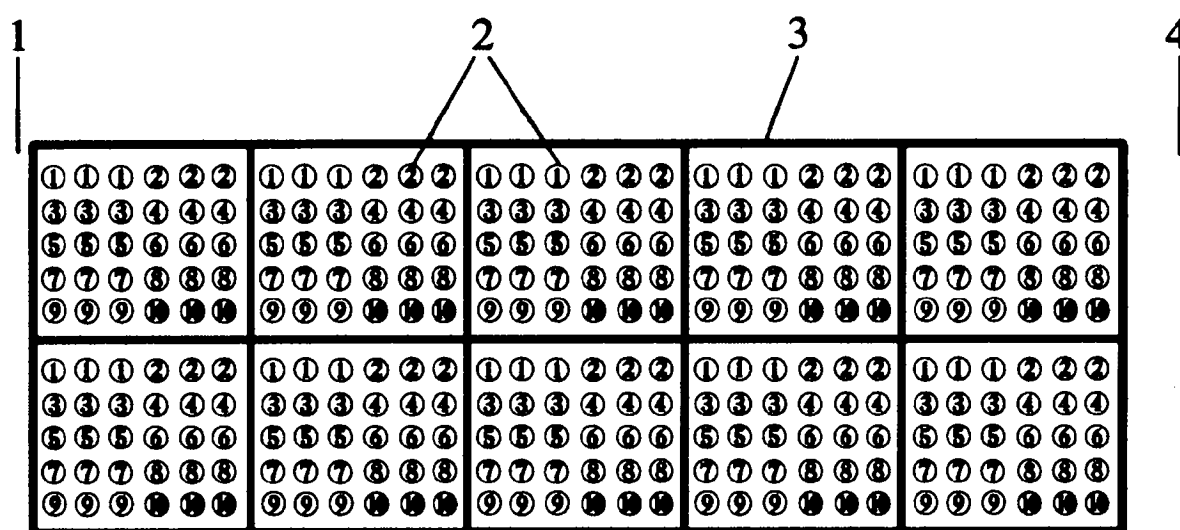


图 1

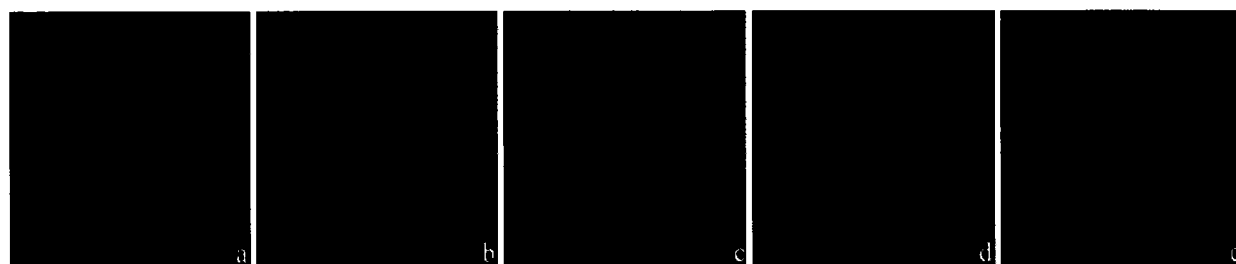


图 2

专利名称(译)	病原相关分子模式免疫检测芯片及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101893618A	公开(公告)日	2010-11-24
申请号	CN201010209352.X	申请日	2010-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院海洋研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院海洋研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院海洋研究所		
[标]发明人	宋林生 杨嘉龙 邱丽梅 王玲玲 张岷		
发明人	宋林生 杨嘉龙 邱丽梅 王玲玲 张岷		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫学免疫检测领域。本发明公开了一种病原相关分子模式免疫检测芯片及其制备方法与应用。该芯片由芯片载体与固定于其上的病原相关分子模式和抗体组成。芯片载体为商品化的晶芯高分子三维基片；本发明的病原相关分子模式免疫检测芯片，包括病原相关分子模式和抗体微阵列的制备，检测用特异性多克隆抗体的制备和荧光素(Cy3)标记，及应用该芯片同时检测多个样品与病原相关分子模式相互作用的具体步骤及条件优化。本发明获得的病原相关分子模式免疫检测芯片可用于免疫识别作用机制的研究，以及药物开发中生物大分子相互作用的研究。

