



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103698534 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

---

(21) 申请号 201310674237. 3

(22) 申请日 2013. 12. 11

(71) 申请人 浙江中医药大学

地址 310053 浙江省杭州市滨江区滨文路  
548 号

(72) 发明人 陈民利 蔡月琴

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公  
司 33212

代理人 朱莹莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

---

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片及其制备和  
应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域, 具体涉及兔血清  
免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 液相悬浮芯片及其制备  
和应用。一种兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片, 包  
括分别和 IgG、IgM 和 IgA 捕获抗体偶联的 42 号、  
48 号和 57 号微球。另外, 本发明制备兔 IgG、IgM  
和 IgA 液相芯片, 同步检测 WHBE 兔和 JW 兔血清  
中 IgG、IgM 和 IgA 含量, 建立检测兔血清免疫球蛋  
白 IgG、IgM、IgA 液相悬浮芯片方法。建立检测兔  
血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 液相悬浮芯片的方  
法, 可应用于免疫学和生物诊断试剂盒的研究开  
发, 对生物医药产业的发展, 尤其是为生物诊断试  
剂的研究开发和生产提供实验材料和新的资源。

1. 一种兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片,包括分别和兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM 和 IgA 捕获抗体偶联的 42 号、48 号和 57 号微球。

2. 兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

1) 取 100 μ 142 号、48 号和 57 号羧基微球进行活化;

2) 活化后的 42 号、48 号和 57 号微球分别与不同浓度的亲和纯化的 IgG、IgM 和 IgA 捕获抗体偶联,室温避光旋转偶联 2h;

3) 偶联完毕的微球用 PBST 洗涤,得到兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片。

3. 根据权利要求 2 所述的兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片的制备方法,其特征在于:所述步骤 1) 为取 100 μ 142 号、48 号和 57 号羧基微球,加 80 μ 10.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 μ 150mg/mlS-NHS 和 10 μ 150mg/ml EDC 活化缓冲液,室温避光慢摇 20min 进行活化;所述步骤 3) 为偶联完毕的微球用 0.05%PBST 洗涤两遍后,加 1ml 1%PBSB 室温避光封闭 30min,用 1%PBSB 清洗微球一遍,去除上清,加入 150 μ 11%PBSB 保存微球,得到兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片。

4. 使用兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片检测兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 的应用。

5. 使用兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片检测兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 的方法,包括如下步骤:

(1) 以 100 μ 11%PBSB/ 孔润湿 PVDF 膜反应板,封闭 10min,每孔分别加入偶联兔 IgG、IgM 和 IgA 的微球各 1×10<sup>4</sup> 个,混合,抽滤弃去上清;

(2) 反应孔加入 50 μ 14 倍稀释的兔血清样品,封膜,恒温孵育摇床 500r/m 室温避光反应 60min;

(3) wash buffer 洗 3 次,加入混合的 IgG、IgM 和 IgA 检测抗体,50 μ l/ 孔,500r/m 室温避光反应 60min, wash buffer 洗 3 次,加入 Streptavidin-PE 抗体,50 μ l/ 孔,500r/m 反应 30min, 抽滤弃去上清,用 125 μ 11%PBSB 重悬微球;

(4) 在 Bio-Plex200 液相悬浮芯片系统上检测,液相悬浮芯片系统开机后须通过 calibration kit 和 validation kit 的激光光路校准,方可检测。

6. 根据权利要求 5 所述的使用兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片检测的方法,其特征在于:所述的方法采用荧光微球和悬浮芯片系统流式技术。

7. 根据权利要求 5 所述的使用兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片检测的方法,其特征在于:所述的检测对象为 WHBE 兔血清和 JW 兔血清。

## 兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片及其制备和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，具体涉及兔血清免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 液相悬浮芯片及其制备和应用。

### 背景技术

[0002] 实验兔是目前生物医药产品研发及医学科学研究领域最常用的实验动物之一，尤其在生物抗体制备、眼科手术研究等方面发挥着大小鼠无法比拟的优势。血清免疫球蛋白 Ig 水平是反映动物机体免疫状态的重要指标，Ig 含量的变化与疾病密切相关，其中 IgG、IgM 和 IgA 是介导体液免疫的主要效应分子。

[0003] 液相悬浮芯片技术是可对多指标同时进行定性、定量的新型芯片技术，但是作为生物信息学先进的操作技术平台，液相芯片技术在生命科学基础研究领域的应用仍受限制。目前国外已推出了商品化的可应用于实验动物研究的液相芯片试剂盒，但只局限于大小鼠的检测，实验兔血清指标的检测，无法得到应用。

### 发明内容

[0004] 为克服以上问题，本发明的目的在于提供一种兔血清免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 液相悬浮芯片。

[0005] 一种兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片，包括分别和 IgG、IgM 和 IgA 捕获抗体偶联的 42 号、48 号和 57 号微球。

[0006] 另外，本发明还提供了一种兔血清免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 液相悬浮芯片的制备方法。

[0007] 兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片的制备方法，包括如下步骤：

[0008] 1) 取 100 μ 142 号、48 号和 57 号羧基微球进行活化；

[0009] 2) 活化后的 42 号、48 号和 57 号微球分别与不同浓度的亲和纯化的 IgG、IgM 和 IgA 捕获抗体偶联，室温避光旋转偶联 2h；

[0010] 3) 偶联完毕的微球用 PBST 洗涤，得到兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片。

[0011] 其中，步骤 1) 为取 100 μ 142 号、48 号和 57 号羧基微球，加 80 μ 10.1MNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 μ 150mg/ml S-NHS 和 10 μ 150mg/ml EDC 活化缓冲液，室温避光慢摇 20min 进行活化；所述步骤 3) 为偶联完毕的微球用 0.05%PBST 洗涤两遍后，加 1m11%PBSB 室温避光封闭 30min，用 1%PBSB 清洗微球一遍，去除上清，加入 150 μ 11%PBSB 保存微球，得到兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片。

[0012] 另外，本发明还提供了使用兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片检测兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 的应用及用液相悬浮芯片检测兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 的方法。

[0013] 兔血清免疫球蛋白液相悬浮芯片的使用方法，包括如下步骤：

[0014] (1) 以 100 μ 1/孔 1%PBSB 润湿 PVDF 膜反应板，封闭 10min，每孔分别加入偶联兔 IgG、IgM 和 IgA 的微球各 1×104 个，混合，抽滤弃去上清；

[0015] (2) 反应孔加入 50 μl 14 倍稀释的兔血清样品, 封膜, 恒温孵育摇床 500r/m 室温避光反应 60min;

[0016] (3) wash buffer 洗 3 次, 加入混合的 IgG、IgM 和 IgA 检测抗体, 50 μl / 孔, 500r/m 室温避光反应 60min, wash buffer 洗 3 次, 加入 Streptavidin-PE 抗体, 50 μl / 孔, 500r/m 反应 30min, 抽滤弃去上清, 用 125 μl 11%PBSB 重悬微球;

[0017] (4) 在 Bio-Plex200 液相悬浮芯片系统上检测, 液相悬浮芯片系统开机后须通过 calibration kit 和 validation kit 的激光光路校准, 方可检测。

[0018] 所述的方法采用荧光微球和悬浮芯片系统流式技术。

[0019] 所述的检测对象为 WHBE 兔血清和 JW 兔血清。

[0020] 所述的兔体重为 2-2.5kg。

[0021] 本发明制备兔 IgG、IgM 和 IgA 液相芯片, 同步检测 WHBE 兔和 JW 兔血清中 IgG、IgM 和 IgA 含量, 建立检测兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 液相悬浮芯片方法。建立检测兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 液相悬浮芯片的方法, 可应用于免疫学和生物诊断试剂盒的研究开发, 对生物医药产业的发展, 尤其是为生物诊断试剂的研究开发和生产提供实验材料和新的资源。

[0022] 本发明所用方法如无特别说明, 均为常规方法。以下实施例中所需要的材料或试剂, 如无特殊说明均为市场购得。实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是一种实验获取的途径以达到具体公开的目的, 不应成为对本发明生物材料来源的限制。所述百分比浓度若无特别说明均为质量 / 体积 (W/V) 百分比浓度或体积 / 体积 (V/V) 百分比浓度。

## 具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例进一步阐述本发明, 应理解, 以下实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的保护范围。

[0024] 下列实施例中所用方法如无特别说明, 均为常规方法。以下实施例中所需要的材料或试剂, 如无特殊说明均为市场购得。实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是一种实验获取的途径以达到具体公开的目的, 不应成为对本发明生物材料来源的限制。

[0025] 所述百分比浓度若无特别说明均为质量 / 体积 (W/V) 百分比浓度或体积 / 体积 (V/V) 百分比浓度。

[0026] 实施例

[0027] 1 : 材料与方法

[0028] 1.1 实验动物 : JW 兔 20 只, WHBE 兔 20 只, 雌雄各半, 体重约 2-2.5k, 由浙江中医药大学实验兔生产基地 [SCXK (浙) 2009-0042] 提供。

[0029] 1.2 样品准备 : 分别从 WHBE 兔和 JW 兔耳中动脉取适量血, 置于 10ml 玻璃管中, 4°C, 3000r/m, 离心 10min, 分离血清, 保存于 -20°C。

[0030] 1.3 实验试剂 : 亲和纯化的 IgG 捕获抗体、IgM 捕获抗体、IgA 捕获抗体均购自美国 Bethyl 公司, biotin 标记的 IgG 检测抗体、IgM 检测抗体、IgA 检测抗体均购自美国 Bethyl 公司, Streptavidin-PE 抗体购自美国 Invitrogen 公司, Sulfo-NHS、EDC 购自美国 Thermo 公司, Bio-Plex 羧基微球、Bio-Plex calibration kit 和 validation kit 均购自美国 Bio-Rad 公司。

[0031] 1.4 实验仪器 :Bio-plex200 液相悬浮芯片系统, 台式冷冻高速离心机, 恒温孵育摇床, 真空抽滤装置, 多功能酶标仪。

[0032] 1.5 兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM 和 IgA 液相悬浮芯片制备 :42 号、48 号和 57 号微球分别和 IgG、IgM 和 IgA 捕获抗体偶联, 取  $100 \mu\text{L}$  42 号、48 号和 57 号羧基微球 ( $1.25 \times 10^6$  个 / 种), 加  $80 \mu\text{L}$   $10.1\text{M NaH}_2\text{PO}_4$  (pH6.2)、 $10 \mu\text{L}$   $150\text{mg/mL S-NHS}$  和  $10 \mu\text{L}$   $150\text{mg/mL EDC}$  活化缓冲液, 室温避光慢摇 20min 进行活化。活化后的 42 号、48 号和 57 号微球分别与 5、10、15、20 和  $30 \mu\text{g}$  的亲和纯化的 IgG、IgM 和 IgA 捕获抗体偶联, 室温避光旋转偶联 2h, 偶联完毕的微球用 0.05%PBST (pH7.4) 洗涤两遍后, 加  $1\text{mL} 11\%PBSB$  室温避光封闭 30min。用 1%PBSB 清洗微球一遍, 去除上清, 加入  $150 \mu\text{L}$   $11\%PBSB$  保存微球, 可用血球计数器计算微球的浓度,  $4^\circ\text{C}$  避光保存偶联的微球。即得到兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM 和 IgA 液相悬浮芯片。

[0033] 1.6 检测兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 液相悬浮芯片的方法的建立 :用上述制备的兔 IgG、IgM 和 IgA 液相芯片(兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM 和 IgA 液相悬浮芯片), 对 20 个 WHBE 兔和 20 个 JW 兔血清样品进行检测, 重复检测两次, 取平均值。具体操作如下 :以  $100 \mu\text{L}$   $11\%PBSB$ / 孔润湿 PVDF 膜反应板, 封闭 10min, 每孔分别加入偶联兔 IgG、IgM 和 IgA 的微球各  $1 \times 10^4$  个, 混合, 抽滤弃去上清, 反应孔加入  $50 \mu\text{L}$  14 倍稀释的 WHBE 兔、JW 兔血清样品, 封膜, 恒温孵育摇床  $500\text{r}/\text{m}$  室温避光反应 60min, wash buffer 洗 3 次, 加入混合的 IgG、IgM 和 IgA 检测抗体,  $50 \mu\text{L}$  / 孔,  $500\text{r}/\text{m}$  室温避光反应 60min, wash buffer 洗 3 次, 加入 Streptavidin-PE 抗体,  $50 \mu\text{L}$  / 孔,  $500\text{r}/\text{m}$  反应 30min, 抽滤弃去上清, 用  $125 \mu\text{L}$   $11\%PBSB$  重悬微球, 在 Bio-Plex200 液相悬浮芯片系统上检测。液相悬浮芯片系统开机后须通过 calibration kit 和 validation kit 的激光光路校准, 方可检测。

## [0034] 2 结果

[0035] 对 20 个 WHBE 兔和 20 个 JW 兔血清样品, 用液相悬浮芯片技术进行血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 检测, WHBE 兔 IgG、IgM 和 IgA 蛋白含量分别为  $13836.83 \pm 746.44\text{FI}$ ,  $18044.40 \pm 606.27\text{FI}$ ,  $14816.00 \pm 687.90\text{FI}$ , JW 兔 IgG、IgM 和 IgA 蛋白含量分别为  $14469.85 \pm 858.78\text{FI}$ ,  $18544.80 \pm 600.53\text{FI}$ ,  $14186.68 \pm 674.33\text{FI}$ , 如表 1 所示, 具体见表 1-3。

## [0036] 表 1 兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 含量

### [0037]

实验动物	IgG (FI)	IgM (FI)	IgA (FI)
WHBE 兔	$13836.83 \pm 746.44$	$18044.40 \pm 606.27$	$14816.00 \pm 687.90$
JW 兔	$14469.85 \pm 858.78$	$18544.80 \pm 600.53$	$14186.68 \pm 674.33$

## [0038] 表 2WHBE 兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 含量

样品号码	IgG (FI)	IgM (FI)	IgA (FI)
1	12697.5	18257	15453
2	13861.5	18467.5	15283
3	15306.5	18117.5	15397.5

	4	13847.5	17185.5	15241.5
	5	14422	17244.5	15781.5
	6	14481	17810	15332
	7	13543.5	16687	14649
	8	14291.5	18712	14605.5
	9	14619.5	18491	14297
	10	12929	18598.5	14706
	11	14341	17831	13555.5
[0040]	12	12790	18133.5	15662.5
	13	13516.5	18490	13243
	14	14305.5	19380	14539
	15	13900.5	18342	14990
	16	14648.5	17913.5	15351.5
	17	14104	17751.5	15217
	18	12927	18141.5	14557.5
	19	13506	17721	14549.5
	20	12698	17613.5	13908.5

[0041] 表 3 JW 兔血清免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 含量

样品号码	IgG (FI)	IgM (FI)	IgA (FI)
1	13746.5	17780.5	15062
2	14965.5	18329.5	14102
3	13949.5	18707	13600.5
4	14918	18692.5	15077.5
5	12585	17390	12934.5
6	13723	17589.5	14070.5
7	14952	18941.5	13461
8	15726	19053	14052
9	16262	19676	13266
[0042]	10	14847	18250.5
	11	14408.5	18793.5
	12	13478	19276
	13	14582	18782.5
	14	13710	19452
	15	13938	18963
	16	13950.5	18361.5
	17	15464.5	18210.5
	18	14420	18233
	19	15007.5	18098
	20	14763.5	18316

[0043] 结论

[0044] 建立的悬浮芯片方法可应用于实验兔血清的 IgG、IgM 和 IgA 检测。

专利名称(译)	免血清免疫球蛋白液相悬浮芯片及其制备和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103698534A</a>	公开(公告)日	2014-04-02
申请号	CN201310674237.3	申请日	2013-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	浙江中医药大学		
申请(专利权)人(译)	浙江中医药大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江中医药大学		
[标]发明人	陈民利 蔡月琴		
发明人	陈民利 蔡月琴		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/54313		
代理人(译)	朱莹莹		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，具体涉及免血清免疫球蛋白IgM、IgG、IgA液相悬浮芯片及其制备和应用。一种免血清免疫球蛋白液相悬浮芯片，包括分别和IgG、IgM和IgA捕获抗体偶联的42号、48号和57号微球。另外，本发明制备免IgG、IgM和IgA液相芯片，同步检测WHBE兔和JW兔血清中IgG、IgM和IgA含量，建立检测免血清免疫球蛋白IgG、IgM、IgA液相悬浮芯片方法。建立检测免血清免疫球蛋白IgG、IgM、IgA液相悬浮芯片的方法，可应用于免疫学和生物诊断试剂盒的研究开发，对生物医药产业的发展，尤其是为生物诊断试剂的研究开发和生产提供实验材料和新的资源。

实验动物	IgG (Fl)	IgM (Fl)	IgA (Fl)
WHBE 兔	13836.83±746.44	18044.40±606.27	14816.00±687.90
JW 兔	14469.85±858.78	18544.80±600.53	14186.68±674.33