



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109270266 A
(43)申请公布日 2019.01.25

(21)申请号 201811241286.7

(22)申请日 2018.10.24

(71)申请人 安徽大千生物工程有限公司
地址 231200 安徽省合肥市经开区桃花工业园繁华大道工投·立恒工业广场 B12C

(72)发明人 芮双印 符修乐

(74)专利代理机构 合肥兴东知识产权代理有限公司 34148
代理人 王伟

(51)Int.Cl.
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

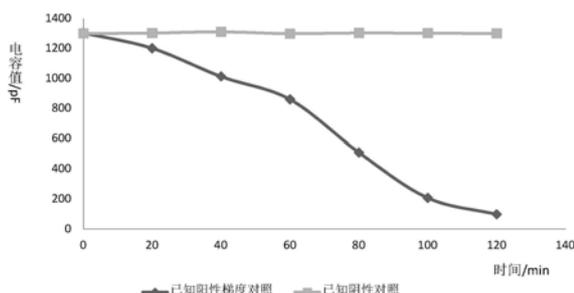
(54)发明名称

检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备使用方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法:A.使用灭活HIV免疫小鼠,制备鼠抗HIV多克隆抗体;B.采用饱和硫酸铵法纯化多克隆抗体;C.在可变电容式微纳米生物检测芯片的检测孔中加入HDT乙醇溶液,于2~8℃下静置,实现芯片改性,再采用超纯水冲洗;D.在芯片的检测孔中加入EDC与NHS的混合溶液进行浸泡,实现芯片活化,再采用超纯水冲洗;E.将纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体固化到改性、活化处理后的芯片极板上,即得。本发明还提供了一种上述检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的使用方法。本发明优点为:检测范围较广,检测时间极短,且检测精密度较高,便于临床检验的开展。

不同浓度HIV阳性血清检测HIV电容值变化



1. 一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

A. 使用灭活HIV免疫小鼠,制备鼠抗HIV多克隆抗体;

B. 采用饱和硫酸铵法纯化鼠抗HIV多克隆抗体;

C. 在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入1~10mmol/L HDT乙醇溶液,再置于2~8℃环境下静置22~26h,实现芯片的改性;静置完成后,再采用超纯水轻柔冲洗3~6次,备用;

D. 在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入0.1~0.5mol/L EDC与0.025~0.25mol/L NHS的混合溶液进行浸泡,实现芯片的活化,再采用超纯水轻柔冲洗3~6次,备用;

E. 将纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体固化到经改性、活化步骤处理后的上述芯片极板一上,即得目标所需的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片;

其中,所述可变电容器式微纳米生物检测芯片的结构具体包括极板一和极板二;所述极板一上设有若干个检测孔,检测孔底部通过一层弹性绝缘薄膜封底,被封底的检测孔内自底部覆有一层导体或半导体镀膜;所述极板二的上表面覆有一层与极板一检测孔面积相匹配的导体或半导体镀膜;上述纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体以烷硫醇法固化到的极板一位置即是极板一上,位于所述检测孔底部的导体或半导体镀膜上表面。

2. 根据权利要求1所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,其特征在于,所述制备鼠抗HIV多克隆抗体的具体方法为:选择6周龄体重25g以上雌性小鼠,取1mL灭活HIV抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠于腹腔注射共0.2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,免疫方案如前;55日取眼眶静脉丛血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;眼眶取血法获得全血,即得目标抗体。

3. 根据权利要求2所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,其特征在于,所述灭活HIV抗原的浓度为2mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,其特征在于,所述纯化鼠抗HIV多克隆抗体的具体方法为:将上述步骤获得的全血于37℃环境下静置0.8~1.2h,4℃收敛0.8~1.2h,于4℃、3000r/min条件下离心12~18min,获得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,向混合液中再缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3~8h;再接着,于4℃、4200r/min条件下离心25~35min,离心后的沉淀继续用20mL的PBS溶解,调整硫酸铵饱和度为33%,4℃下静置3~8h后,再于4℃、4200r/min条件下离心25~35min;将离心后的沉淀再用20mL的PBS溶解,硫酸铵饱和度33%,4℃下静置3~8h后,4℃、4200r/min条件下离心25~35min;最后,将最终获得的离心后沉淀用20mL的PBS溶解,并装入透析袋,4℃条件下透析6~12h除盐,即得纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体。

5. 根据权利要求4所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,其特征在于,所述透析过程中使用的透析袋为10kD透析袋。

6. 根据权利要求4所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,其特征在于,所述透析过程中使用的透析液采用20倍体积的PBS透析液。

7. 根据权利要求1所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法, 其特征在于, 所述将纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体固化到芯片上的具体方法为: 在可变电容式微纳米生物检测芯片完成改性与活化后, 在芯片检测孔中加入2~20mmol纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体-PBS溶液, 室温孵育1~2h后, 超纯水轻柔冲洗3~6次, 即得目标所需的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片。

8. 根据权利要求7所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法, 其特征在于, 所述室温为25~27℃。

9. 一种采用如权利要求1-8任一所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法所制备得到的电容式生物芯片的使用方法, 其特征在于, 方法如下: 先于芯片的检测孔中加入小牛血清平衡芯片, 接着, 再取40μL血清样本置于检测孔中进行检测, 采用电容检测仪检测, 20min后读取电容值, 获得检测结果。

10. 根据权利要求9所述的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的使用方法, 其特征在于, 所述电容检测仪具体为常规的PF级电容检测仪。

检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物芯片领域,尤其涉及一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备使用方法。

背景技术

[0002] 艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus,HIV)感染引起的危害极大的传染病。其中,HIV是一种能攻击人体免疫系统的病毒,其攻击人体免疫系统中最重要CD4T淋巴细胞,大量破坏该细胞从而使人体丧失免疫功能,导致人体易于感染各种疾病,并可发生恶性肿瘤,病死率较高。HIV在人体内的潜伏期平均为8~9年,患艾滋病以前,可以没有任何症状地生活和工作多年。

[0003] 随着大量留学生的进入,经济的快速发展等因素,近年来我国艾滋病发生率逐年上升。目前,我国艾滋病的诊断方法是抗体检测和抗原检测,抗原检测以实验室分子检测为主。然而,目前的分子生物学检测缺乏规范化,且受限于实验室条件。因此,亟需建立一种快速简便的检测方法。

[0004] 目前,国内外关于生物芯片的研究非常多,集中于疾病的诊断、新药开发、生物武器和司法鉴定等领域,生物芯片开发的方法学类型集中于:荧光、电化学发光、电压差。而关于电容式芯片的研究较少,常用于方向校准、温度检测和水分的检测等,生物学检测方向的应用更少。在电容式生物芯片的研究中,有学者使用离子共振技术、荧光波导及微流体技术研究蛋白质的鉴定及分离,也有学者利用荧光技术、电化学技术和力学技术研究疾病的快速诊断。但是,关于电容值检测直观反映疾病或者病原微生物感染的研究却很少,目前也仅只有我司进行了研究。

[0005] 我司专利CN 207198082U中阐述了一种可用于生物类检测的可变电容式芯片,前期研究中的灵敏度和特异度都较高,并且具有很好的精密度。本发明在此基础上开发了一种用于HIV检测的电容式生物芯片,以期达到快速检测HIV感染与否的目的。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种能快速检测出HIV感染的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备使用方法。

[0007] 为解决上述技术问题,经专利CN 207198082U授权,本发明采用如下技术方案:

[0008] 一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0009] A. 使用灭活HIV免疫小鼠,制备鼠抗HIV多克隆抗体;

[0010] B. 采用饱和硫酸铵法纯化鼠抗HIV多克隆抗体;

[0011] C. 在可变电容式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入1~10mmol/L HDT乙醇溶液,再置于2~8℃环境下静置22~26h,实现芯片的改性;静置完成后,再采用超纯水轻柔冲洗3~6次,备用;

[0012] D. 在可变电容式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入0.1~0.5mol/L EDC

与0.025~0.25mol/L NHS的混合溶液进行浸泡,实现芯片的活化,再采用超纯水轻柔冲洗3~6次,备用;

[0013] E.将纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体固化到经改性、活化步骤处理后的上述芯片极板一上,即得目标所需的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片;

[0014] 其中,所述可变电容器微纳米生物检测芯片的结构具体包括极板一和极板二;所述极板一上设有若干个检测孔,检测孔底部通过一层弹性绝缘薄膜封底,被封底的检测孔内自底部覆有一层导体或半导体镀膜;所述极板二的上表面覆有一层与极板一检测孔面积相匹配的导体或半导体镀膜;上述纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体以烷硫醇法固化到的极板一位置即是极板一上,位于所述检测孔底部的导体或半导体镀膜上表面。

[0015] 进一步地,所述极板一的上表面和极板二上的上表面均设有与对应导体或半导体镀膜连接的测量触点。

[0016] 进一步地,所述的检测孔底部弹性绝缘薄膜厚度为10nm~100 μ m。

[0017] 进一步地,所述的检测孔底部的导体或半导体镀膜厚度为10nm~5000nm。

[0018] 进一步地,所述检测孔的个数为1个或2个或2个以上;所述检测孔的直径为50 μ m~2cm。

[0019] 进一步地,所述检测孔底部及内壁均覆有导体或半导体镀膜,所述检测孔底部的导体或半导体镀膜与弹性绝缘薄膜结合为一体式柔性可变形薄膜。

[0020] 作为本发明的优选方式之一,所述制备鼠抗HIV多克隆抗体的具体方法为:选择6周龄体重25g以上雌性小鼠,取1mL灭活HIV抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠于腹腔注射共0.2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,免疫方案如前;55日取眼眶静脉丛血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;眼眶取血法获得全血,即得目标抗体。

[0021] 作为本发明的优选方式之一,所述灭活HIV抗原的浓度为2mg/mL。

[0022] 作为本发明的优选方式之一,所述纯化鼠抗HIV多克隆抗体的具体方法为:将上述步骤获得的全血于37 $^{\circ}$ C环境下静置0.8~1.2h,4 $^{\circ}$ C收敛0.8~1.2h,于4 $^{\circ}$ C、3000r/min条件下离心12~18min,获得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,向混合液中再缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C静置3~8h;再接着,于4 $^{\circ}$ C、4200r/min条件下离心25~35min,离心后的沉淀继续用20mL的PBS溶解,调整硫酸铵饱和度为33%,4 $^{\circ}$ C下静置3~8h后,再于4 $^{\circ}$ C、4200r/min条件下离心25~35min;将沉离心后的沉淀再用20mL的PBS溶解,硫酸铵饱和度33%,4 $^{\circ}$ C下静置3~8h后,4 $^{\circ}$ C、4200r/min条件下离心25~35min;最后,将最终获得的离心后沉淀用20mL的PBS溶解,并装入透析袋,4 $^{\circ}$ C条件下透析6~12h除盐,即得纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体。

[0023] 作为本发明的优选方式之一,所述透析过程中使用的透析袋为10kD透析袋。

[0024] 作为本发明的优选方式之一,所述透析过程中使用的透析液采用20倍体积的PBS透析液。

[0025] 作为本发明的优选方式之一,所述将纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体固化到芯片上的具体方法为:在可变电容器微纳米生物检测芯片完成改性与活化后,在芯片检测孔中加入2~20mmol纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体-PBS溶液,室温孵育1~2h后,超纯水轻柔冲洗3

~6次,即得目标所需的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片。

[0026] 作为本发明的优选方式之一,所述室温为25~27℃。

[0027] 一种采用上述制备方法制备得到的电容式生物芯片的使用方法,方法如下:先于芯片的检测孔中加入小牛血清平衡芯片,接着,再取40μL血清样本置于检测孔中进行检测,采用电容检测仪检测,20min后读取电容值,获得检测结果。

[0028] 作为本发明的优选方式之一,所述电容检测仪具体为常规的PF级电容检测仪。

[0029] 本发明相比现有技术的优点在于:本发明在芯片极板一上固化HIV抗体,当样本中含有HIV抗原时,极板间电容值降低;本发明方法使用芯片直接检测电容,其精密度和检验范围都有很大的提升;另外,将本发明运用于艾滋病的早期筛查中,能极大的提高检验范围,极低的HIV含量也能检出,并且整个检测过程仅需要20min,大大缩短了检测时间,便于临床检测使用。

附图说明

[0030] 图1是可用于生物类检测的可变电容器芯片的极板一结构示意图;

[0031] 图2是可用于生物类检测的可变电容器芯片的极板二结构示意图;

[0032] 图3是可用于生物类检测的可变电容器芯片的极板一分解示意图;

[0033] 图4是实施例3中鼠抗HIV多克隆抗体Western Blot鉴定结果图(图中,泳道M:蛋白Marker26610;泳道1:BSA对照;泳道2:鼠抗HIV多克隆抗体纯化后样本;泳道3:abcam公司HIV tat单抗对照);

[0034] 图5是实施例5中不同浓度HIV阳性血清检测HIV电容值变化图。

[0035] 图1-3中:11为极板一,12为极板一的导体或半导体镀膜,13为检测孔,14为极板一测量触点,15为弹性绝缘薄膜,21为极板二,22为极板二的导体或半导体镀膜,23为极板二测量触点。

具体实施方式

[0036] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0037] 本发明各实施例在授权专利CN 207198082U“一种可用于生物类检测的可变电容器芯片”基础上进行。

[0038] 参见图1-3,所述可变电容器微纳米生物检测芯片的结构具体包括极板一11、极板二21。极板一11上设有若干个检测孔13,检测孔13底部通过一层弹性绝缘薄膜15封底,被封底的检测孔13内自底部覆有一层导体或半导体镀膜;极板二21的上表面覆有一层与极板一11检测孔13面积相匹配的导体或半导体镀膜(即极板二的导体或半导体镀膜22);

[0039] 进一步地,极板一11的上表面和极板二21上的上表面均设有与对应导体或半导体镀膜连接的测量触点,极板一11对应极板一测量触点14,极板二21对应极板二测量触点23。

[0040] 进一步地,检测孔13底部的弹性绝缘薄膜15厚度为10nm~100μm。

[0041] 进一步地,检测孔13底部的导体或半导体镀膜厚度为10nm~5000nm。

[0042] 进一步地,检测孔13的个数为1个或2个或2个以上;所述检测孔13的直径为50μm~

2cm。

[0043] 进一步地,所述检测孔13底部及内壁均覆有导体或半导体镀膜(即极板一的导体或半导体镀膜12),所述检测孔13底部的导体或半导体镀膜与弹性绝缘薄膜15结合为一体式柔性可变形薄膜。

[0044] 实施例1

[0045] 本实施例的一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,包括如下具体步骤:

[0046] (1) 鼠抗HIV多克隆抗体的制备与纯化

[0047] ①BALB/c小鼠的免疫:

[0048] 选择6周龄体重25g以上雌性小鼠,取1mL灭活HIV抗原(2mg/mL)与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠于腹腔注射共0.2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,免疫方案如前;55日取眼眶静脉丛血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;眼眶取血法获得全血,即得目标抗体;

[0049] ②鼠抗HIV多克隆抗体的纯化:

[0050] 将上述步骤获得的全血于37℃环境下静置0.8h,4℃收敛0.8h,于4℃、3000r/min条件下离心12min,获得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,向混合液中再缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3h;再接着,于4℃、4200r/min条件下离心25min,离心后的沉淀继续用20mL的PBS溶解,调整硫酸铵饱和度为33%,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心25min;将沉离心后的沉淀再用20mL的PBS溶解,硫酸铵饱和度33%,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min条件下离心25min;最后,将最终获得的离心后沉淀用20mL的PBS溶解,并装入10kD透析袋,4℃条件下采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体;

[0051] (2) 芯片的改性与活化

[0052] ①芯片的改性:在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入1mmol/L HDT乙醇溶液,再置于2℃环境下静置22h,实现芯片的改性;静置完成后,再采用超纯水轻柔冲洗3次,备用;

[0053] ②芯片的活化:在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入0.1mol/L EDC与0.025mol/L NHS的混合溶液进行浸泡,实现芯片的活化,再采用超纯水轻柔冲洗3次,备用;

[0054] (3) 鼠抗HIV多克隆抗体的固化

[0055] 在可变电容器式微纳米生物检测芯片完成改性与活化后,在芯片检测孔中加入2mmol纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体-PBS溶液,室温25℃孵育1h,使鼠抗HIV多克隆抗体固化到可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一上(位于所述检测孔底部的导体或半导体镀膜上表面),接着使用超纯水轻柔冲洗3次,即得目标所需的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片。

[0056] 实施例2

[0057] 本实施例的一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,包括如下具体步骤:

[0058] (1) 鼠抗HIV多克隆抗体的制备与纯化

[0059] ①BALB/c小鼠的免疫:

[0060] 选择6周龄体重25g以上雌性小鼠,取1mL灭活HIV抗原(2mg/mL)与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠于腹腔注射共0.2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,免疫方案如前;55日取眼眶静脉丛血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;眼眶取血法获得全血,即得目标抗体;

[0061] ②鼠抗HIV多克隆抗体的纯化:

[0062] 将上述步骤获得的全血于37℃环境下静置1.2h,4℃收敛1.2h,于4℃、3000r/min条件下离心18min,获得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,向混合液中再缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置8h;再接着,于4℃、4200r/min条件下离心35min,离心后的沉淀继续用20mL的PBS溶解,调整硫酸铵饱和度为33%,4℃下静置8h后,再于4℃、4200r/min条件下离心35min;将离心后的沉淀再用20mL的PBS溶解,硫酸铵饱和度33%,4℃下静置8h后,4℃、4200r/min条件下离心35min;最后,将最终获得的离心后沉淀用20mL的PBS溶解,并装入10kD透析袋,4℃条件下采用20倍体积的PBS透析液透析12h除盐,即得纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体;

[0063] (2) 芯片的改性与活化

[0064] ①芯片的改性:在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入10mmol/L HDT乙醇溶液,再置于8℃环境下静置26h,实现芯片的改性;静置完成后,再采用超纯水轻柔冲洗6次,备用;

[0065] ②芯片的活化:在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入0.5mol/L EDC与0.25mol/L NHS的混合溶液进行浸泡,实现芯片的活化,再采用超纯水轻柔冲洗6次,备用;

[0066] (3) 鼠抗HIV多克隆抗体的固化

[0067] 在可变电容器式微纳米生物检测芯片完成改性与活化后,在芯片检测孔中加入20mmol纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体-PBS溶液,室温27℃孵育2h,使鼠抗HIV多克隆抗体固化到可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板上(位于所述检测孔底部的导体或半导体镀膜上表面),接着使用超纯水轻柔冲洗6次,即得目标所需的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片。

[0068] 实施例3

[0069] 本实施例的一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法,包括如下具体步骤:

[0070] (1) 鼠抗HIV多克隆抗体的制备与纯化

[0071] ①BALB/c小鼠的免疫:

[0072] 选择6周龄体重25g以上雌性小鼠,取1mL灭活HIV抗原(2mg/mL)与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠于腹腔注射共0.2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,免疫方案如前;55日取眼眶静脉丛血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;眼眶取血法获得全血,即得目标抗体;

[0073] ②鼠抗HIV多克隆抗体的纯化:

[0074] 将上述步骤获得的全血于37℃环境下静置1h,4℃收敛1h,于4℃、3000r/min条件下离心15min,获得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,向混合液中再缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;再接着,于4℃、4200r/min条件下离心30min,离心后的沉淀继续用20mL的PBS溶解,调整硫酸铵饱和度为33%,4℃下静置5h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;将沉离心后的沉淀再用20mL的PBS溶解,硫酸铵饱和度33%,4℃下静置5h后,4℃、4200r/min条件下离心30min;最后,将最终获得的离心后沉淀用20mL的PBS溶解,并装入10kD透析袋,4℃条件下采用20倍体积的PBS透析液透析9h除盐,即得纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体;

[0075] 采用abcam公司兔抗HIV-tat多克隆抗体作为对照抗体,验证本实施例制备鼠抗HIV多克隆抗体为阳性;结果见图4(图4中,泳道M为蛋白Marker26610,泳道1为BSA对照,泳道2为鼠抗HIV多克隆抗体纯化后样本,泳道3为abcam公司HIV tat单抗对照),由图4可知,本实施例的鼠抗HIV多克隆抗体在13kD左右,其与abcam公司产品在相同大小位置出现了阳性条带,表明本实施例制备的抗体可用;

[0076] (2) 芯片的改性与活化

[0077] ①芯片的改性:在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入5mmol/L HDT乙醇溶液,再置于5℃环境下静置24h,实现芯片的改性;静置完成后,再采用超纯水轻柔冲洗5次,备用;

[0078] ②芯片的活化:在可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一检测孔中加入0.3mol/L EDC与0.1mol/L NHS的混合溶液进行浸泡,实现芯片的活化,再采用超纯水轻柔冲洗5次,备用;

[0079] (3) 鼠抗HIV多克隆抗体的固化

[0080] 在可变电容器式微纳米生物检测芯片完成改性与活化后,在芯片检测孔中加入10mmol纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体-PBS溶液,室温26℃孵育1.5h,使鼠抗HIV多克隆抗体固化到可变电容器式微纳米生物检测芯片的极板一上(位于所述检测孔底部的导体或半导体镀膜上表面),接着使用超纯水轻柔冲洗5次,即得目标所需的检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片。

[0081] 实施例4

[0082] 本实施例的一种采用上述实施例方法制备得到的电容式生物芯片的使用方法,方法如下:先于芯片的检测孔中加入小牛血清平衡芯片,接着,再取40μL血清样本置于检测孔中进行检测,采用PF级电容检测仪检测,20min后读取电容值,获得检测结果。

[0083] 检测原理:将HIV抗体固化在极板一检测孔中的导体或半导体镀膜上表面,当样本中含有HIV抗原,便与极板一表面的HIV抗体特异性结合,产生收缩力,极板一和极板二间的电容值降低。

[0084] 实施例5

[0085] 本实施例用以验证上述实施例芯片的检测效果,验证步骤如下:

[0086] (1) 取10名已知健康自愿者全血,分离血清后均匀混合血清,并将血清分为两部分:一部分用于阴性对照;一部分添加20mmol/L灭活病毒颗粒,并做10倍比梯度稀释,稀释5个梯度;

[0087] (2) 打开电容检测仪, 稳定仪器后, 插入芯片, 加入阴性对照血清40 μ L, 20min稳定后, 记录电容值弃去阴性血清;

[0088] (3) 按浓度由低到高顺序, 依次向上述实施例芯片的检测孔中加入人工制备的含病毒血清40 μ L (样本添加间隙, 只需弃去样本, 无需洗涤芯片), 稳定20min, 记录电容变化数据。

[0089] 图5为不同病毒浓度血清检测HIV电容值变化图。图5中, 血清样本按浓度从小到大间隔20min读取数据并弃去样本重新加样, 即横坐标的0-20min表示为一个样本检测过程, 20-40min表示为一个样本检测过程, 依次类推, 并且, 样本浓度从小到大。

[0090] 结果分析: 根据图5的曲线走向, 可试验表明本发明中抗HIV多抗的制备、基因固化于芯片的方法及检测方法均成立, 可用于血清中HIV的检测; 并且, 从图中可以看出, 当电容值下降时所示检测样本为阳性。

[0091] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

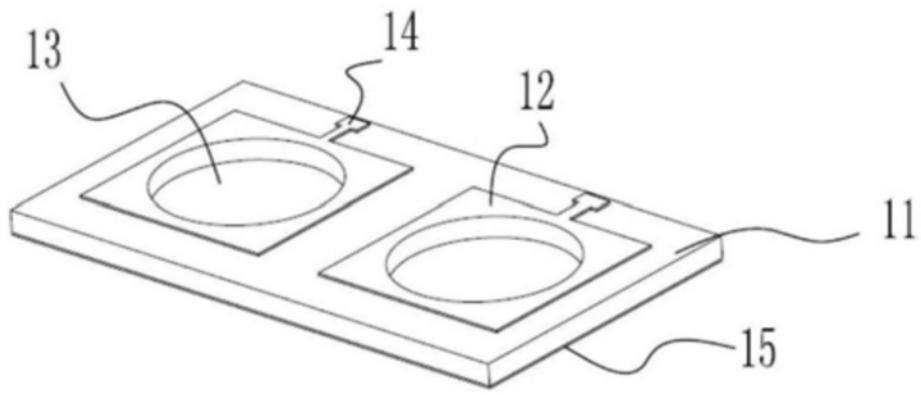


图1

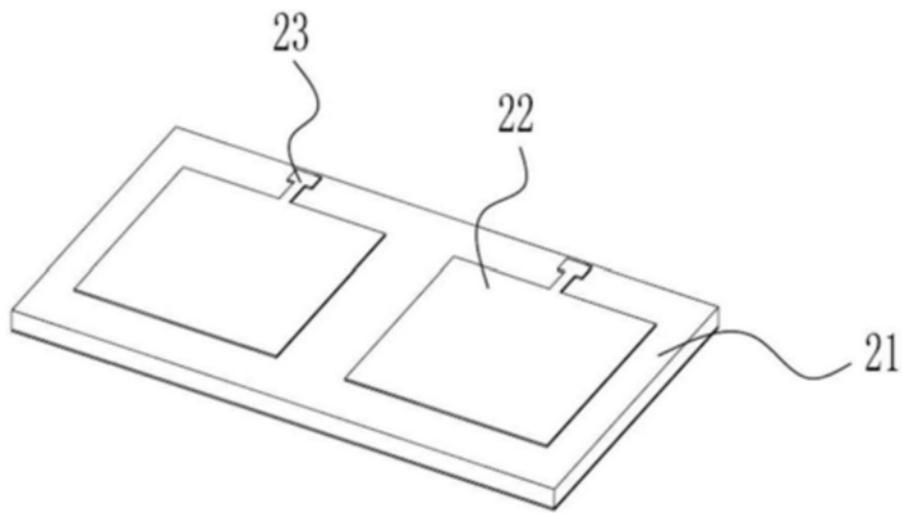


图2

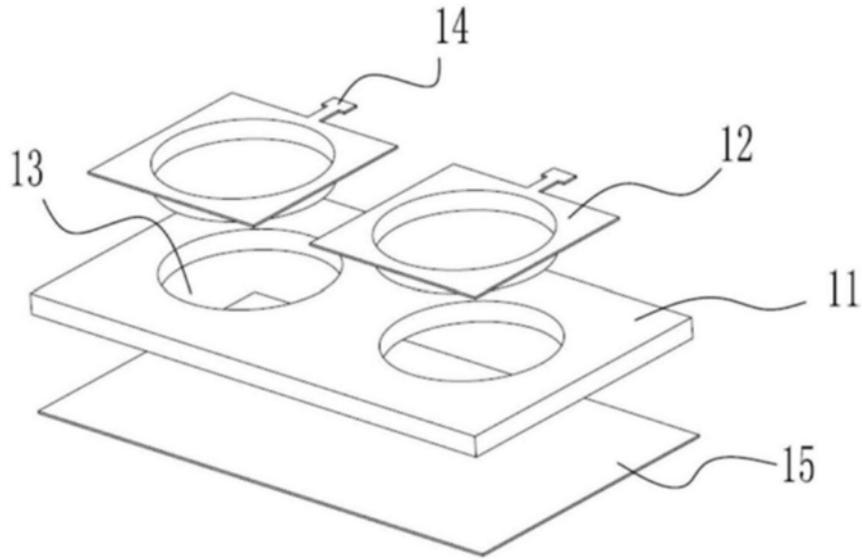


图3

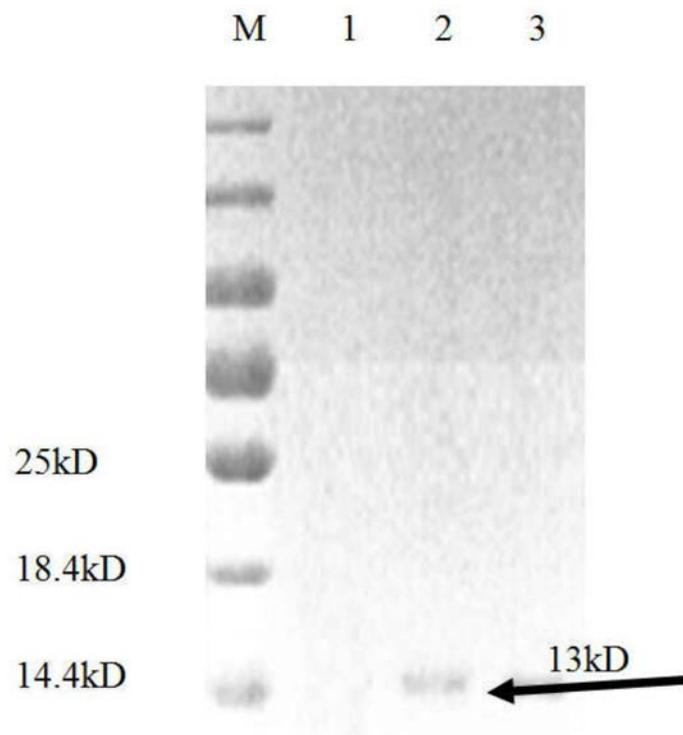


图4

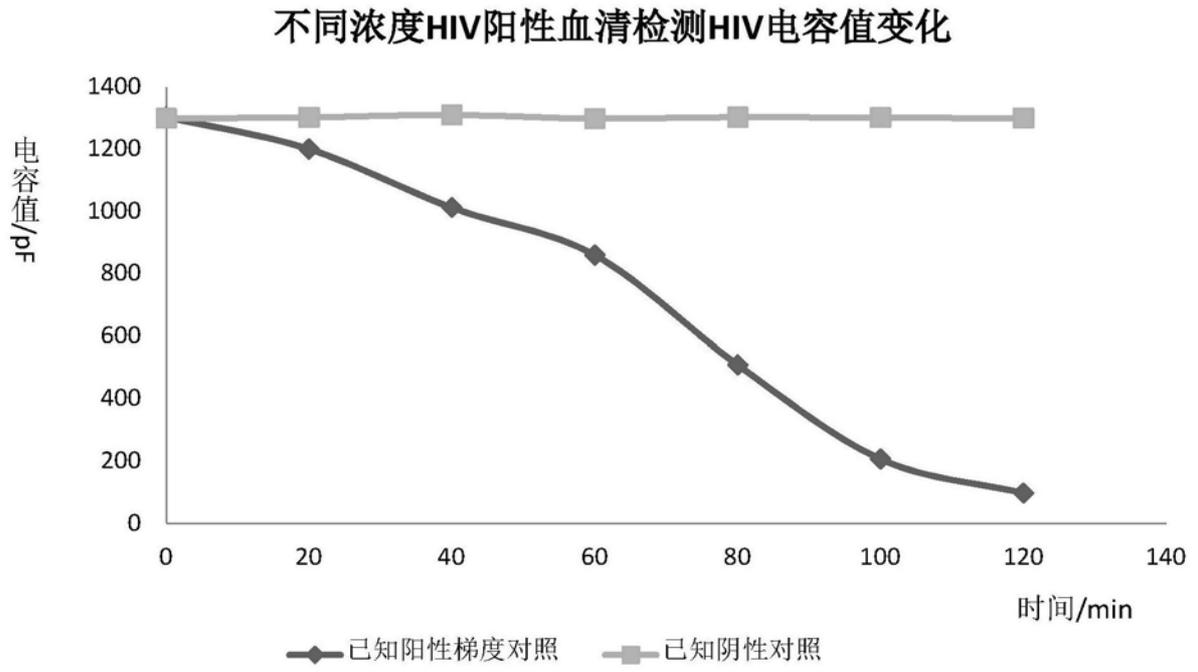


图5

专利名称(译)	检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备使用方法		
公开(公告)号	CN109270266A	公开(公告)日	2019-01-25
申请号	CN201811241286.7	申请日	2018-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
[标]发明人	芮双印 符修乐		
发明人	芮双印 符修乐		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56988 G01N33/531		
代理人(译)	王伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的制备方法：A.使用灭活HIV免疫小鼠，制备鼠抗HIV多克隆抗体；B.采用饱和硫酸铵法纯化多克隆抗体；C.在可变电容式微纳米生物检测芯片的检测孔中加入HDT乙醇溶液，于2~8℃下静置，实现芯片改性，再采用超纯水冲洗；D.在芯片的检测孔中加入EDC与NHS的混合溶液进行浸泡，实现芯片活化，再采用超纯水冲洗；E.将纯化后的鼠抗HIV多克隆抗体固化到改性、活化处理后的芯片极板上，即得。本发明还提供了一种上述检测人类免疫缺陷病毒的电容式生物芯片的使用方法。本发明优点为：检测范围较广，检测时间极短，且检测精密度较高，便于临床检验的开展。

