

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/551

G01N 33/533

G01N 33/53

G01N 21/64



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510013108.5

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1645147A

[22] 申请日 2005. 1. 18

[21] 申请号 200510013108.5

[71] 申请人 南开大学

地址 300071 天津市卫津路 94 号南开大学生命科学学院

[72] 发明人 王立凯 冯喜增 秦 明 张福海  
贾云芳 牛文成

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理事务所

代理人 赵尊生

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用于免疫学分析的蛋白质芯片

[57] 摘要

本发明涉及一种用于免疫学分析的新型蛋白质芯片。在洁净的玻璃基片上镀一层金属膜后用甩胶机在上面涂一层光敏胶。将具有图案的光刻掩模盖在基片上，在紫外光刻机下光刻，显影定影后得到微图案。再将露出的金属图案腐蚀掉，露出玻璃图案。去胶后，修饰露出的玻璃图案，使其具有活性功能基团——氨基。去掉剩余的金属膜并清洗晾干后，将抗原蛋白溶液覆盖于基片表面，蛋白质与氨基作用后通过化学键连接于载玻片上而被固定。利用荧光标记物对蛋白质样品分子进行标记，最后利用芯片荧光显微分析系统对蛋白质样品进行检测分析。本发明是灵敏度和特异性都较高的生物化学型蛋白质芯片，制作方法简便、适合于批量生产，并且可以对多种蛋白质样品进行检测分析。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种用于免疫学分析的蛋白质芯片，其特征在于：

1) 在洁净的玻璃基片上镀一层金属膜后用高速旋转的甩胶机在上面涂一层光敏胶；

2) 将具有的光刻掩模盖在基片上，在紫外光刻机下光刻，显影定影后得到金属基底图案；

3) 再将露出的金属膜腐蚀掉，露出玻璃基底图案，去胶后，修饰露出的玻璃基底图案，使其具有活性功能基团——氨基；

4) 去掉剩余的金属膜并清洗晾干后，将抗原蛋白溶液覆盖于基片表面，蛋白质与氨基作用后通过化学键连接于载玻片上而被固定；所述的蛋白质样品成微阵列；

5) 利用荧光标记物对蛋白质样品分子进行标记，最后利用芯片荧光显微镜对蛋白质样品进行检测分析。

2、根据权利要求1所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片，其特征在于所述的蛋白质样品微阵列为方块状点阵或长条状阵列。

3、根据权利要求2所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片，其特征在于所述的方块状微阵列每个方块状微阵列中点的数目为  $40 \times 40$ - $400 \times 400$  个。

4、根据权利要求3所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片，其特征在于所述的方块状微阵列中蛋白质样品点的直径为  $50\mu\text{m}$ ，点之间的间隙距离为  $50\mu\text{m}$ 。

5、根据权利要求2所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片，其特征在于所述的长条状微阵列中为 10-100 组，每组 4 个条。

6、根据权利要求5所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片，其特征在于所述的长条状微阵列中条的宽度依次为  $30\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$  和  $120\mu\text{m}$ ，条之间的间隙距离为  $50\mu\text{m}$ 。

7、根据权利要求1所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片的制作工艺，其特征在于采取如下步骤：

1) 在洁净的载玻片表面镀一层厚约 150-250nm 的金属铬膜或铝膜，然后在上面用高速旋转的甩胶机涂一层 500-700nm 厚的紫外正型光刻胶；

2) 在  $60-80^\circ\text{C}$  下烘干坚膜 30-60min，使光胶与金属膜紧密结合；

3) 通过微电子学中制作电路版的技术制作的具有微阵列图案的光刻掩模；或者事先设计并打印出微阵列图案，通过翻拍技术制得照相底片，以其作为光刻掩模；

4) 将光刻掩模盖在涂胶的玻片上面，在紫外光刻机下光刻；

5) 用 0.5-1% 的 NaOH 溶液显影，去掉曝光图案部分的光刻胶，露出金属基底图案；

6) 用硝酸铈铵溶液腐蚀掉露出的铬层或对铝膜用 1.6mol/L 的磷酸溶液腐蚀，得到玻璃图案；用 1-10% 的 NaOH 溶液去掉剩余的光刻胶。

8、根据权利要求1所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片的制作工艺，其特征在于采取如下方法修饰玻璃表面：

1) 将玻璃片用体积比 1:1:5 的 25%  $\text{NH}_3$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  溶液清洗; 然后用体积比 1:1:5 为 37%  $\text{HCl}$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  溶液处理 5-10 分钟; 对镀铝的玻璃片则改用 30% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理; 再将其分别用水, 酒精和丙酮清洗, 使其在空气下干燥后再置于 100-120°C 的烘箱内干燥 0.5-1 小时;

2) 将玻璃片用 1-5% 的 3-氨基-丙基-三乙氧基硅烷 (APTES) 的甲苯溶液修饰 3-10 分钟, 再用甲苯及丙酮清洗之, 然后在 100-120 °C 下干燥 0.5-1 小时, 使玻璃片表面带上氨基;

3) 用硝酸铈铵腐蚀液腐蚀掉剩余的铬层; 或用磷酸溶液腐蚀铝膜; 并用双蒸水进行充分的清洗后晾干。

9、根据权利要求 8 所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片的制作工艺, 其特征在于所述的硝酸铈铵腐蚀液配方: 硝酸铈铵 100 克, 醋酸 17.5mL, 加双蒸水稀释至 500 mL; 所述的磷酸溶液为 1.6mol/L 的磷酸溶液。

10、权利要求 1 所述的用于免疫学分析的蛋白质芯片的使用方法, 其特征在于它是经过下述步骤:

1) 将配好的抗原加到经过修饰的玻璃基片表面, 使蛋白质与表面的氨基作用约 10-30min, 通过化学键连接于载玻片上而被固定; 然后用 pH 值在 7.2-7.4 之间磷酸盐缓冲液: 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  81.0 mL, 0.2 mol/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  19.0 mL 混合和双蒸水分别冲洗基片表面, 洗掉多余的抗原后晾干;

2) 将用荧光标记的待测样品溶液加到固定有抗原的玻璃片表面上, 在常温下保持 5-10min, 使抗原和抗体充分反应;

3) 用 pH 值在 7.2-7.4 之间的磷酸盐缓冲液和双蒸水依次冲洗玻璃片, 洗去残余的样品, 并在常温下晾干;

4) 在荧光显微镜下对芯片进行检测分析, 或利用 CCD 系统拍照后对其荧光强度进行分析。

## 用于免疫学分析的蛋白质芯片

### 技术领域

本发明属于生命科学领域，特别涉及一种免疫学检测、分析和诊断的蛋白质芯片。

### 背景技术

蛋白质芯片是一种在固体基片表面固定蛋白质或多肽微阵列，通过免疫学原理对蛋白质样品进行检测、识别、分析和诊断，可应用于生命科学、医药学、及生物传感器的研制等相关领域。

传统的免疫分析方法目前主要有免疫荧光方法(Fluorescent Immunoassay, FIA),酶联免疫分析法(Enzyme-linked Immunoassay, EIA)和放射免疫分析技术(Radioactive Immunoassay, RIA)。这些技术具有较高的灵敏度和特异性，在临床医学和生物学的研究中发挥了重要作用。然而，传统方法检测速度慢，效率低，已不能满足医学尤其是生命科学飞速发展的要求。例如，FIA 和 EIA 法灵敏度较低，而 RIA 虽然灵敏度较高，但其放射性又会对操作人员身体造成伤害。

生物芯片的出现给免疫分析技术带来了新的发展契机。现代生物芯片是指包括在固相载体表面固定排列高密度的 DNA、抗原、抗体或细胞的为阵列，利用生物大分子之间具有的特异识别的能力，与检测样品或生物大分子进行反应或杂交，通过自动检测设备可获得大量有用的生物信息。

蛋白质芯片是在一种固相载体基片上，将蛋白质或多肽直接点样于其上，使之与基片表面牢固结合，形成蛋白质微阵列。抗原抗体大都是蛋白质，并且它们之间的结合又是特异性的。因此，固定在基片表面的蛋白质可与带有特殊标记的蛋白质分子(抗体或抗原)进行特异性免疫反应，两者结合后，通过对标记的抗原-抗体复合物的检测来实现抗原抗体的互检，用于检测相应的抗体或抗原。该技术的特点是高通量、微型化和自动化。可广泛应用于临床诊断、药物筛选以及蛋白质组学等领域的研究。

蛋白质芯片可分为化学型和生物化学型两种类型。化学型蛋白质芯片是基于经典的色谱介质，其基本原理是：在蛋白质芯片表面铺上特定的介质，通过介质的疏水力、静电力以及共价键等结合样品中的蛋白质。然后用特定的洗脱液洗去杂质蛋白，而保留特定的蛋白质进行分析。生物化学型蛋白质芯片是把生物活性分子(如抗原、抗体或受体、配体等)固定到芯片表面，用于结合样品中的互补靶蛋白。由于生物化学型蛋白质芯片具有较高的特异性和生物活性分子的多样性，因此其应用范围和前景都远远超过了化学型蛋白质芯片。蛋白质芯片的制备必须保证蛋白质的正确定位和其生物活性的保持。但是，传统的蛋白质芯片对实验操作要求高，反应体系严格，由于人为因素产生的误差较大，结果不稳定，并且其检测仪器设备价格昂贵，检测成本高，因此无

法大批量生产和使用。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种用于免疫学分析的蛋白质芯片，本发明是灵敏度和特异性都较高的生物化学型蛋白质芯片，制作方法简便、适合于批量生产，并且可以对多种蛋白质样品进行检测分析。

本发明用于免疫学分析的蛋白质芯片的具体技术方案是：

1) 在洁净的玻璃基片上镀一层金属膜(如金属铬膜或铝膜)后用高速旋转的甩胶机在上面涂一层光敏胶；

2) 将具有的光刻掩模盖在基片上，在紫外光刻机下光刻，显影定影后得到金属基底图案；

3) 再将露出的金属膜腐蚀掉，露出玻璃基底图案，去胶后，修饰露出的玻璃基底图案，使其具有活性功能基团——氨基；

4) 去掉剩余的金属膜并清洗晾干后，将抗原蛋白溶液覆盖于基片表面，蛋白质与氨基作用后通过化学键连接于载玻片上而被固定；所述的蛋白质样品成微阵列；

5) 利用荧光标记物对蛋白质样品分子进行标记，最后利用芯片荧光显微镜对蛋白质样品进行检测分析。

所述的蛋白质样品微阵列为方块状点阵或长条状阵列。

所述的方块状微阵列每个方块状微阵列中点的数目为  $40 \times 40$ - $400 \times 400$  个。所述的方块状微阵列中蛋白质样品点的直径为  $50\mu\text{m}$ ，点之间的间隙距离为  $50\mu\text{m}$ 。

所述的长条状微阵列中为 10-100 组，每组 4 个条。所述的长条状微阵列中条的宽度依次为  $30\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$  和  $120\mu\text{m}$ ，条之间的间隙距离为  $50\mu\text{m}$ 。条的长度为 0.2-2.0cm。

用于免疫学分析的蛋白质芯片的制作工艺采取如下步骤：

1) 在洁净的载玻片表面镀一层厚约 150-250nm 的金属铬膜或铝膜，然后在上面用高速旋转的甩胶机涂一层 500-700nm 厚的紫外正型光刻胶；

2) 在  $60-80^\circ\text{C}$  下烘干坚膜 30-60min，使光胶与金属膜紧密结合；

3) 通过微电子学中制作电路版的技术制作的具有微阵列图案的光刻掩模；或者事先设计并打印出微阵列图案，通过翻拍技术制得照相底片，以其作为光刻掩模；

4) 将光刻掩模盖在涂胶的玻片上面，在紫外光刻机下光刻；

5) 用 0.5-1% 的 NaOH 溶液显影，去掉曝光图案部分的光刻胶，露出金属基底图案；

6) 用硝酸铈铵溶液腐蚀掉露出的铬层或对铝膜用 1.6mol/L 的磷酸溶液腐蚀，得到玻璃图案；用 1-10% 的 NaOH 溶液去掉剩余的光刻胶。

采取如下方法修饰玻璃表面：

1) 将玻璃片用体积比 1:1:5 的 25%  $\text{NH}_3$ 、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  溶液清洗；然后用体积

比 1:1:5 为 37% HCl, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O 溶液处理 5-10 分钟; 对镀铝的玻璃片则改用 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理; 再将其分别用水, 酒精和丙酮清洗, 使其在空气下干燥后再置于 100-120°C 的烘箱内干燥 0.5-1 小时;

2) 将玻璃片用 1-5% 的 3-氨基-丙基-三乙氧基硅烷 (APTES) 的甲苯溶液修饰 3-10 分钟, 再用甲苯及丙酮清洗之, 然后在 100-120 °C 下干燥 0.5-1 小时, 使玻璃片表面带上氨基;

3) 用硝酸铈铵腐蚀液腐蚀掉剩余的铬层; 或用磷酸溶液腐蚀铝膜; 并用双蒸水进行充分的清洗后晾干。

所述的硝酸铈铵腐蚀液配方: 硝酸铈铵 100 克, 醋酸 17.5mL, 加双蒸水稀释至 500 mL; 所述的磷酸溶液为 1.6mol/L 的磷酸溶液。

用于免疫学分析的蛋白质芯片的使用方法是经过下述步骤:

1) 将配好的抗原(鸡 IgG) 加到经过修饰的玻璃基片表面, 使蛋白质与表面的氨基作用约 10-30min, 通过化学键连接于载玻片上而被固定; 然后用 pH 值在 7.2-7.4 之间磷酸盐缓冲液: 0.2 mol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81.0 mL, 0.2 mol/L 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19.0 mL 混合和双蒸水分别冲洗基片表面, 洗掉多余的抗原后晾干;

2) 将用荧光标记的待测样品(如 FITC 标记的鸡 Anti-IgG) 溶液加到固定有抗原(鸡 IgG) 的玻璃片表面上, 在常温下保持 5-10min, 使抗原和抗体充分反应;

3) 用 pH 值在 7.2-7.4 之间的磷酸盐缓冲液和双蒸水依次冲洗玻璃片, 洗去残余的样品, 并在常温下晾干;

4) 在荧光显微镜下对芯片进行检测分析, 或利用 CCD 系统拍照后对其荧光强度进行分析。

本发明用于免疫学分析的蛋白质芯片, 首次将半导体制作工艺及微电子技术引入免疫分析的研究中来, 使蛋白质芯片微阵列实现集成化。本发明是灵敏度和特异性都较高的生物化学型蛋白质芯片, 制作方法简便, 并且检测方法更加快捷灵敏, 检测效率更高。适合于批量生产, 并且可以对多种蛋白质样品进行检测分析。

#### 附图说明

图 1 是通过翻拍技术制得的光刻掩模照片。

图 2 是免疫反应后所拍的蛋白质微图案荧光显微照片。

图 3 是蛋白质芯片的方块状微阵列图形的光学显微照片。

图 4 是蛋白质芯片的方块状微阵列图形的扫描电镜照片。

图 5 是蛋白质芯片进行免疫反应后所拍的方块状蛋白质微阵列荧光显微照片。

图 6 是蛋白质芯片的长条状微阵列图形的光学显微照片。

图 7 是蛋白质芯片的长条状微阵列图形的扫描电镜照片。

图 8 是蛋白质芯片进行免疫反应后所拍的长条状蛋白质微阵列荧光显微照片。

## 具体实施方式

### 实例 1: 蛋白质微阵列芯片(镀铬膜)的制作方法:

1) 使用镀膜机(镀膜机, DM-450C 型, 北京仪器厂), 真空下加热铬丝在洁净的载玻片表面蒸镀一层厚约 154nm 的金属铬膜, 然后在上面用高速旋转的甩胶机涂一层 600nm 厚的正型光刻(胶匀胶净化工作台, 型号: SW-CJ-9B, 苏州净化设备厂; 紫外正型光刻胶, 型号: BP212, 北京化学试剂研究所);

2) 在 80℃ 下烘干坚膜 30min, 使光胶与金属膜紧密结合;

3) 设计并打印出微阵列图案, 如图 1 所示; 图 1 是通过翻拍技术制得的光刻掩模照片, 图 1 中圆形及五角星的直径分别为 150-250 不等。间距为 150 $\mu$ m, 微阵列中点的数目为 48  $\times$  60 个, 并通过翻拍技术制得照相底片, 以其作为光刻掩模。

4) 将光刻掩模盖在涂胶的玻片上面, 在紫外光刻机下光刻(半自动光刻机, JKG-1 型, 上海光学机械厂);

5) 用 0.5% 的 NaOH 溶液显影, 去掉曝光图案部分的光刻胶, 露出铬的图案;

6) 用硝酸铈铵溶液腐蚀掉露出的铬层, 得到玻璃基底图案, 然后用 5% 的 NaOH 溶液去掉剩余的光刻胶;

7) 将玻璃片用 25% NH<sub>3</sub>, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 和 H<sub>2</sub>O 溶液(体积比 1:1:5)清洗片刻; 然后用 37% HCl, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O 溶液(体积比 1:1:5)处理 5-10 分钟; 再将其分别用水, 酒精和丙酮清洗, 使其在空气下干燥后再置于 100℃ 的烘箱内干燥 0.5 小时;

8) 将玻璃片用 1-5% 的 APTES(3-氨基-丙基-三乙氧基硅烷)(3-aminopropyltriethoxysilane)的甲苯溶液修饰 3-10 分钟, 再用甲苯及丙酮清洗之, 然后在 100℃ 下干燥 1 小时, 使玻璃片表面带上氨基;

9) 用硝酸铈铵溶液(配方: 硝酸铈铵 100 克, 醋酸 17.5mL, 加双蒸水稀释至 500 mL)腐蚀掉剩余的铬层, 并用双蒸水进行充分的清洗后晾干。

10) 将配好的抗原(鸡 IgG)加到经过修饰的玻璃基片表面, 使蛋白质与表面的氨基作用约 10-30min, 通过化学键连接于载玻片上而被固定; 然后用 pH 值在 7.2-7.4 之间磷酸盐缓冲液(PBS, 0.2 mol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81.0 mL, 0.2 mol/L 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19.0 mL 混合)和双蒸水分别冲洗基片表面, 洗掉多余的抗原后晾干;

11) 将用荧光标记的待测样品 FITC 标记的鸡 Anti-IgG 溶液加到固定有鸡 IgG 的玻璃片表面上, 在常温下保持 5-10min, 使抗原和抗体充分反应;

12) 用 pH 值在 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)和双蒸水依次冲洗玻璃片, 洗去残余的样品, 并在常温下晾干;

13) 在荧光显微镜下对芯片进行检测分析, 或利用 CCD 系统拍照后对其荧光强度进行分析, 如图 2 所示, 图 2 是免疫反应后所拍的蛋白质微图案荧光显微照片。通过抗原与荧光标记的抗体之间的免疫反应, 可以得到清晰的绿色荧光图案, 图中圆形及五角星的直径分别为 150-250 不等。间距为 150 $\mu\text{m}$ , 微阵列中点的数目为 48 x 60 个。这说明只有经过化学修饰而具有功能基团(氨基)的区域才可结合抗原, 而未经修饰的区域基本上不结合蛋白, 进而通过免疫反应特异性地结合荧光蛋白, 形成绿色微图案。可以看出所得图案十分清晰, 这说明本生物化学型蛋白质芯片具有较高的灵敏度和特异性。并且制作方法简便, 检测方法更加快捷灵敏, 检测效率更高。

#### 实例 2: 方块状蛋白质微阵列芯片(镀铝膜)的制作方法:

1) 使用镀膜机, 真空下加热铝丝在洁净的载玻片表面蒸镀一层厚约 200nm 的金属铝膜, 然后在上用高速旋转的甩胶机涂一层 600nm 厚的正型光刻胶(胶匀胶净化工作台, 型号: SW-CJ-9B, 苏州净化设备厂; 紫外正型光刻胶, 型号: BP212, 北京化学试剂研究所);

2) 在 80 $^{\circ}\text{C}$  下烘干坚膜 30min, 使光刻胶与金属膜紧密结合;

3) 通过微电子学中制作电路的制版技术制作方块微阵列光刻掩模;

4) 将光刻掩模盖在涂胶的玻片上面, 在紫外光刻机下光刻(半自动光刻机, JKG-1 型, 上海光学机械厂);

5) 用 0.5% 的 NaOH 溶液显影, 去掉曝光图案部分的光刻胶, 露出铬的图案;

6) 用磷酸溶液(1.6mol/L)腐蚀掉露出的铝层, 得到玻璃基底图案, 如图 3 所示, 图 3 是蛋白质芯片的方块状微阵列图形的光学显微照片。然后用 5% 的 NaOH 溶液去掉剩余的光刻胶, 并在扫描电镜下观测图案形貌, 如图 4 所示, 图 4 是蛋白质芯片的方块状微阵列图形的扫描电镜照片。

7) 将玻璃片用 25%  $\text{NH}_3$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 和  $\text{H}_2\text{O}$  溶液(体积比 1:1:5)清洗片刻; 然后用 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 10 分钟; 再将其分别用水, 酒精和丙酮清洗, 使其在空气下干燥后再置于 100 $^{\circ}\text{C}$  的烘箱内干燥 0.5 小时;

8) 将玻璃片用 5% 的 APTES(3-氨基-丙基-三乙氧基硅烷)(3-aminopropyltriethoxysilane)的甲苯溶液修饰 5 分钟, 再用甲苯及丙酮清洗之, 然后在 100 $^{\circ}\text{C}$  下干燥 1 小时, 使玻璃片表面带上氨基;

9) 用磷酸溶液(1.6mol/L)腐蚀掉剩余的铝层, 并用双蒸水进行充分的清洗后晾干。

10) 将配好的抗原(鸡 IgG)加到经过修饰的玻璃基片表面, 使蛋白质与表面的氨基作用约 10min, 通过化学键连接于载玻片上而被固定; 然后用 pH 值在 7.2-7.4 之间磷酸盐缓冲液(PBS, 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  81.0 mL, 0.2 mol/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  19.0 mL 混合)和双蒸水分别冲洗基片表面, 洗掉多余的抗原后晾干;

11) 将用荧光标记的待测样品 FITC 标记的鸡 Anti-IgG 溶液加到固定有鸡 IgG 的玻璃片表面上, 在常温下保持 5min, 使抗原和抗体充分反应;

12) 用 pH 值在 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)和双蒸水依次冲洗玻璃片, 洗去残余的样品, 并在常温下晾干;

13) 在荧光显微镜下对芯片进行检测分析, 或利用 CCD 系统拍照后对其荧光强度进行分析, 如图 5 所示, 图 5 是蛋白质芯片进行免疫反应后所拍的方块状蛋白质微阵列荧光显微照片。通过抗原与荧光标记的抗体之间的免疫反应, 可以得到清晰的绿色荧光图案, 方块状微阵列每个方块状微阵列中点的数目为  $200 \times 200$  个, 蛋白质样品点的直径为  $50\mu\text{m}$ , 点之间的间隙距离为  $50\mu\text{m}$ 。这说明只有经过化学修饰而具有功能基团(氨基)的区域才可结合抗原, 而未经修饰的区域基本上不结合蛋白, 进而通过免疫反应特异性地结合荧光蛋白, 形成方块状绿色微图案。可以看出所得图案十分清晰, 这说明本生物化学型蛋白质芯片具有较高的灵敏度和特异性。并且制作方法简便, 检测方法更加快捷灵敏, 检测效率更高。

### 实例 3: 长条状蛋白质微阵列芯片(镀铝膜)的制作方法:

1) 使用镀膜机(镀膜机, DM-450C 型, 北京仪器厂), 真空下加热铝丝在洁净的载玻片表面蒸镀一层厚约 200nm 的金属铝膜, 然后在上面用高速旋转的甩胶机涂一层 600nm 厚的正型光刻胶(胶匀胶净化工作台, 型号: SW-CJ-9B, 苏州净化设备厂; 紫外正型光刻胶, 型号: BP212, 北京化学试剂研究所);

2) 在  $80^\circ\text{C}$  下烘干坚膜 30min, 使光刻胶与金属膜紧密结合;

3) 通过微电子学中制作电路的制版技术制作方块微阵列光刻掩模;

4) 将光刻掩模盖在涂胶的玻片上面, 在紫外光刻机下光刻(半自动光刻机, JKG-1 型, 上海光学机械厂);

5) 用 0.5% 的 NaOH 溶液显影, 去掉曝光图案部分的光刻胶, 露出铝的图案;

6) 用磷酸溶液(1.6mol/L)腐蚀掉露出的铝层, 得到玻璃基底图案, 如图 6 所示, 图 6 是蛋白质芯片的长条状微阵列图形的光学显微照片。然后用 5% 的 NaOH 溶液去掉剩余的光刻胶, 并在扫描电镜下观测图案形貌, 如图 7 所示, 图 7 是蛋白质芯片的长条状微阵列图形的扫描电镜照片。。

7) 将玻璃片用 25%  $\text{NH}_3$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 和  $\text{H}_2\text{O}$  溶液(体积比 1:1:5)清洗片刻; 然后用 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 10 分钟; 再将其分别用水, 酒精和丙酮清洗, 使其在空气下干燥后再置于  $100^\circ\text{C}$  的烘箱内干燥 0.5 小时;

8) 将玻璃片用 5% 的 APTES(3-氨基-丙基-三乙氧基硅烷)(3-aminopropyltriethoxysilane)的甲苯溶液修饰 5 分钟, 再用甲苯及丙酮清洗之, 然后在  $100^\circ\text{C}$  下干燥 1 小时, 使玻璃片表面带上氨基;

9) 用磷酸溶液(1.6mol/L)腐蚀掉剩余的铝层, 并用双蒸水进行充分的清洗后晾

干。

10) 将配好的鸡 IgG 溶液加到经过修饰的玻璃基片表面, 使蛋白质与表面的氨基作用约 10min, 通过化学键连接于载玻片上而被固定; 然后用 pH 值在 7.2-7.4 之间磷酸盐缓冲液(PBS, 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  81.0 mL, 0.2 mol/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  19.0 mL 混合)和双蒸水分别冲洗基片表面, 洗掉多余的抗原后晾干;

11) 将用荧光标记的待测样品 FITC 标记的鸡 Anti-IgG 溶液加到固定有抗原鸡 IgG 的玻璃片表面上, 在常温下保持 5min, 使抗原和抗体充分反应;

12) 用 pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)和双蒸水依次冲洗玻璃片, 洗去残余的样品, 并在常温下晾干;

13) 在荧光显微镜下对芯片进行检测分析, 或利用 CCD 系统拍照后对其荧光强度进行分析, 如图 8 所示, 图 8 是蛋白质芯片进行免疫反应后所拍的长条状蛋白质微阵列荧光显微照片。通过抗原与荧光标记的抗体之间的免疫反应, 可以得到清晰的绿色荧光图案, 长条状微阵列中共有 60 组, 每组 4 个条, 长条状微阵列中条的宽度依次为  $30\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$  和  $120\mu\text{m}$ , 条的长度为 2cm, 条之间的间隙距离为  $50\mu\text{m}$ 。这说明只有经过化学修饰而具有功能基团(氨基)的区域才可结合抗原, 而未经修饰的区域基本上不结合蛋白, 进而通过免疫反应特异性地结合荧光蛋白, 形成长条状绿色微图案。可以看出所得图案十分清晰, 这说明本生物化学型蛋白质芯片具有较高的灵敏度和特异性。并且制作方法简便, 检测方法更加快捷灵敏, 检测效率更高。

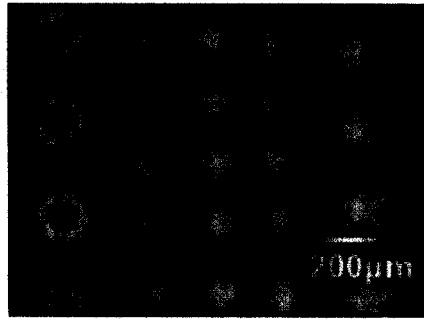


图 1

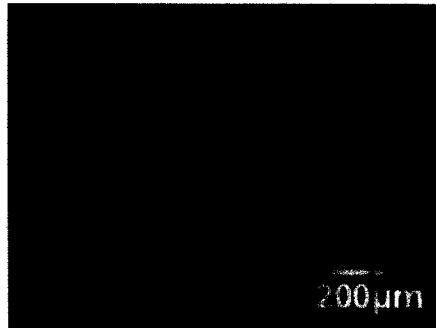


图 2



图 3



图 4



图 5



图 6



图 7

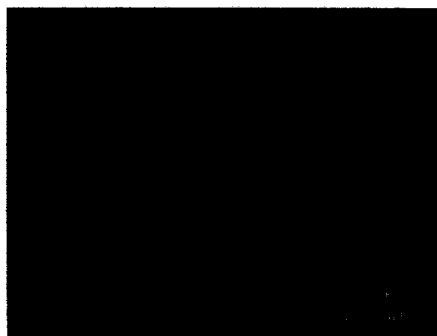


图 8

专利名称(译)	用于免疫学分析的蛋白质芯片		
公开(公告)号	<a href="#">CN1645147A</a>	公开(公告)日	2005-07-27
申请号	CN200510013108.5	申请日	2005-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	王立凯 冯喜增 秦明 张福海 贾云芳 牛文成		
发明人	王立凯 冯喜增 秦明 张福海 贾云芳 牛文成		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/551		
其他公开文献	CN1327225C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于免疫学分析的新型蛋白质芯片。在洁净的玻璃基片上镀一层金属膜后用甩胶机在上面涂一层光敏胶。将具有图案的光刻掩模盖在基片上，在紫外光刻机下光刻，显影定影后得到微图案。再将露出的金属图案腐蚀掉，露出玻璃图案。去胶后，修饰露出的玻璃图案，使其具有活性功能基团——氨基。去掉剩余的金属膜并清洗晾干后，将抗原蛋白溶液覆盖于基片表面，蛋白质与氨基作用后通过化学键连接于载玻片上而被固定。利用荧光标记物对蛋白质样品分子进行标记，最后利用芯片荧光显微分析系统对蛋白质样品进行检测分析。本发明是灵敏度和特异性都较高的生物化学型蛋白质芯片，制作方法简便、适合于批量生产，并且可以对多种蛋白质样品进行检测分析。

