

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/66

G01N 33/53 G01N 33/543



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03116884.1

[43] 公开日 2003 年 10 月 15 日

[11] 公开号 CN 1448724A

[22] 申请日 2003.5.13 [21] 申请号 03116884.1
[71] 申请人 上海晶泰生物技术有限公司
地址 200233 上海市桂箐路 69 号 25 号楼 6 楼
[72] 发明人 张 涛 李 宾 彭永济 邓富桥
葛海鹏 孙 露

[74] 专利代理机构 上海东亚专利代理有限公司
代理人 董 梅

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片

[57] 摘要

本发明 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片，涉及生命科学免疫组化蛋白芯片领域。1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片，是将多种不同的抗原和抗体点阵于固相载体上不同位置，抗原和抗体化学键连接于固相载体上，固相载体表面经封闭后，加入待测样品，与固相载体上固定的生物分子进行杂交反应，洗去未结合的物质后，加入标记的二抗及标记的特异性抗体混合物，再进行杂交，洗去未结合的物质后检测标记信号，所述不同的抗原是腮腺炎病毒抗原、肾小球基底膜抗体等。可多指标同时检测，节省了人力物力，也缩短了诊断的时间；准确快速鉴别 I 型糖尿病，利于医生制定正确的治疗方案；可以灵活地检测样品；更节省待测样品的量和大量的资金。

1, 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片, 是将多种不同的抗原和抗体点阵于固相载体上不同位置, 抗原和抗体通过化学键连接于固相载体上, 固相载体表面经过封闭后, 加入待测样品, 与固相载体上固定的生物分子进行杂交反应, 洗去未结合的物质后, 加入标记的二抗及标记的特异性抗体混合物, 再进行杂交, 洗去未结合的物质后检测标记信号, 其特征在于: 所述不同的抗原是腮腺炎病毒抗原 (Mumps virus)、柯萨奇病毒 B4 抗原 (Coxsackievirus)、风疹病毒抗原 (Rubella virus)、人肠道孤病毒抗原、甲状腺球蛋白抗原 (thyroglobulin)、甲状腺过氧化物酶抗原 (thyroid peroxidase)、甲状腺素受体抗原 (Thyroxin Receptor)、甲状腺微粒体抗原 (Thyroid Microsomal), 也可以是 ICAs、IAAs、GADAs 和 IA-2As (IA-2As 包括 ICA512 和 IA-2c 自身抗体) 抗原, 胰岛细胞表面抗原 (islet cell surface Antigens, ICSAs)、胰岛素受体抗原 (Insulin Receptor)、carboxypeptidase-H, IA-2 β 、肾小球基底膜抗体 (Glomerular Basement Membrane antibody, GBM Ab) 抗原中的一种或一种以上。

2, 据权利要求 1 所述的 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片, 其特征在于所述固定在固相上的抗体为抗胰岛素或抗 C 肽抗体;

3, 根据权利要求 1 所述的 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片, 其特征在于所述固相载体可以是表面带有活化基团的玻璃片、醋

酸纤维薄膜、硝酸纤维薄膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片中的一种或一种以上的结合物。

4, 根据权利要求 1 所述的 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片, 其特征在于所述的待测样品可以是血清、体液、组织液、组织的细胞裂解液中的一种或一种以上。

5, 根据权利要求 1 所述的 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片, 其特征在于所述二抗的标记物可以是荧光染料、也可以通过结合的显色或化学发光酶催化底物中的一种或一种以上。

6, 根据权利要求 1 所述的 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片, 其特征在于所述标记过的特异性抗体是另一抗胰岛素抗体以及另一抗 C 肽的特异性抗体。

7, 根据权利要求 1 所述的 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片的制备方法, 其特征在于: 第一步, 样品的制备: 第一, 采血清、取组织液, 或将组织捣碎、裂解后, 取组织裂解液; 第二, 用高速点样机器人, 根据抗原的种类确定点阵的排列方式和点样位置; 第三, 点样针从多孔板取出样品后直接点阵于固相载体表面; 第四, 室温过夜或 37°C 温育 1 小时; 在载体表面加上封闭液, 37°C 温育 1 小时; 第五用缓冲液充分洗涤并室温干燥; 第二步, 抗体的标记: 用荧光染料或酶标记抗体, 除去未结合成分后, 4 °C 保存备用; 第三步, 杂交反应: 在点好样的固相载体上滴加标记二抗 (或特异性抗体), 37°C 避光温育 30 分钟, 洗净并室温晾干; 用专业的 CCD 分析系统或扫描系统进行结果的判读。

1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片

技术领域

本发明 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片，涉及一种蛋白芯片、用途及制备方法，属于生命科学免疫组化蛋白芯片领域。

背景技术

糖尿病 (Diabetes Mellitus) 是一个复合病因的综合病症，是由于体内胰岛素缺乏或拮抗胰岛素的激素增加，或胰岛素在靶细胞内不能发挥正常生理作用而引起的葡萄糖、蛋白质及脂质代谢紊乱的一种综合征。其基本特征是长期高血糖。1997 年 7 月世界卫生组织根据美国糖尿病协会提出的修改意见对糖尿病的诊断标准与分型进行了修改，修改后的糖尿病分型为：1. 1 型糖尿病：胰岛 β 细胞破坏，胰岛素绝对缺乏，包括免疫介导和特发性两类；2. 2 型糖尿病：胰岛素抵抗为主伴胰岛素相对缺乏，或胰岛素分泌缺陷为主伴胰岛素抵抗；3. 其它特异性糖尿病：多种特殊原因造成的低血糖；4. 妊娠期糖尿病。I 型糖尿病，以往称为胰岛素依赖型糖尿病，常发生于儿童和青少年，但也可发生于任何年龄，甚至 80~90 岁时也可患病。1 型糖尿病的病因与发病机制主要由于遗传与环境因素中病毒感染、化学物质所致的胰岛 β 细胞自身免疫性炎症，导致 β 细胞破坏，功能损害，胰岛素分泌缺乏所致。起病时血清中可存在多种自身抗体。2 型糖尿

病具有明显的遗传异质性，并受到肥胖、饮食成分结构不合理，体力活动减少、吸烟、年龄、应激等诸多因素的影响。其发病机理与胰岛素抵抗和胰岛素分泌的相对性缺乏有关。与 HLA 抗原频率无关联。与自身免疫反应无关联，血清中不存在胰岛细胞抗体及胰岛素自身抗体。特异型糖尿病共有 8 大类。其病因大概与基因突变有关。妊娠糖尿病的确切原因不太清楚。但可能与激素异常、遗传基础、肥胖症有关。

随着经济的发展和人们生活方式的改变，以及人口老龄化，糖尿病患者数量迅速增加，其发病率在全球范围内呈逐渐增高趋势，尤其在发展中国家增加速度更快，呈现流行态势。糖尿病已成为全世界许多国家的常见病和多发病，其死亡率已居肿瘤、心血管之后的第三位。据估计目前世界糖尿病患者约 1.6 亿，预测到 2025 年，全球糖尿病患者的数量将达到 2.99 亿。1 型糖尿病约占糖尿病病人总数的 10%，90% 以上是由于生活方式和饮食结构不当引起的 2 型糖尿病，60% 的患者不能早期识别，血糖控制合格的糖尿病患者人数更低。1 型糖尿病发病时糖尿病症状较明显，容易发生酮症，即有酮症倾向，需依靠外源胰岛素存活，一旦中止胰岛素治疗则威胁生命。2 型糖尿病病人多数在饮食控制及口服降糖药治疗后可稳定控制血糖；但仍有一些病人，尤其是非常胖的病人需要外源胰岛素控制血糖。因而，外源胰岛素治疗不能作为 1 型与 2 型糖尿病的鉴别指标。因此，早期诊断早期识别糖尿病及区分糖尿病型别（主要是 1 型糖尿病和 2 型糖尿病）对医生制定正确的治疗方案尤为重要。

通过糖尿病免疫指标的检验测定,可对糖尿病进行正确的分型和预测。1型糖尿病可检测胰岛素、C肽和很多种自身抗体,如胰岛细胞抗体测定(Islet cell(cytoplasmic) autoantibodies, ICAs)、胰岛素自身抗体测定(insulin autoantibodies , IAAs)、谷氨酸脱羧酶抗体测定(glutamic acid decarboxylase autoantibodies, GADAs)、胰岛细胞表面抗体(islet cell surface autoantibodies, ICsAs)、肾小球基底膜抗体(Glomerular Basement Membrane antibody, GBM Ab)、胰岛素受体自身抗体(Insulin Receptor autoantibodies)、carboxypeptidase-H autoantibodies,热震动蛋白抗体(heat shock protein autoantibodies)等。ICAs、IAAs、GADAs和IA-2As(IA-2As包括ICA512和IA-2c自身抗体)是目前诊断和预测1型糖尿病的最科学的依据。ICAs、IAAs、GADAs的出现是1型糖尿病的典型表现,在糖尿病患者发病前几年甚至是前十几年即可监测到,这三项指标的发现对解除或延缓糖尿病的发生起到了关键性的作用,是目前诊断和预测1型糖尿病的最科学的依据。IA-2和IA-2 β 是近年来发现的两种重要胰岛细胞自身抗原,是引发1型糖尿病胰岛自身免疫反应的重要因素。针对两者的自身抗体存在于半数以上的新诊1型糖尿病患者血清中。IA-2、IA-2 β 及其抗体检测在1型糖尿病的发病机制研究、诊断、预测和早期防治中具有重要作用。1型糖尿病患者常伴有自身免疫性疾病,如甲状腺机能亢进症、桥本氏甲状腺炎、重症肌无力、恶性贫血等。有很多报道甲状腺球蛋白自身抗体(Autoantibodies to thyroglobulin, TgAb)甲状腺过氧化物酶

抗体 (thyroid peroxidase autoantibodies, TPOAb), 甲状腺素受体抗体 Thyroxin Receptor autoantibodies, TRAb) 甲状腺微粒体抗体 (Thyroid Microsomal autoantibodies, TMAb) 在 1 型糖尿病患者中出现阳性的频率很高, 提示 1 型糖尿病患者大部分会患有与甲状腺相关自身免疫性疾病。病毒感染是 1 型糖尿病的重要因素。当具有糖尿病易感性的人感染了腮腺炎病毒 (Mumps virus)、柯萨奇病毒 B4 (Coxsackievirus)、风疹病毒 (Rubella virus)、人肠道孤病毒 (Echo virus) 后, 病毒可直接侵犯胰岛 B 细胞, 使之发生急性炎症、坏死而丧失功能; 或病毒长期滞留在 B 细胞内, 激发自身免疫系统, 引起体内 B 淋巴细胞产生抗胰岛素细胞抗体, 这种抗体使胰岛 B 细胞损伤破坏, 造成胰岛素合成减少, 引起糖尿病。因此, 检测上述病毒产生的抗体, 对 1 型糖尿病的诊断具有重要的参考作用。

由于诊断 1 型糖尿病涉及的抗体多, 给糖尿病的分型带来了许多不便。

发明内容

本发明的目的在于提供一种将上述抗体对应的抗原或抗体点阵于芯片上的 1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片, 以结合血清中的抗体, 达到一次检测多种抗体的目的。

本发明目的可通过下述技术方案实现: 将多种不同的抗原和抗体点阵于固相载体上不同位置, 抗原和抗体通过化学键连接于固相载体上而被固定。固相载体表面经过封闭后, 加入待测样品, 与固相载体

上固定的生物分子进行杂交反应，洗去未结合的物质后，加入标记的二抗及标记的特异性抗体混合物，再进行杂交，洗去未结合的物质后检测标记信号，其中，所述不同的抗原可以是腮腺炎病毒抗原(Mumps virus)、柯萨奇病毒 B4 抗原 (Coxsackievirus)、风疹病毒抗原 (Rubella virus)、人肠道孤病毒抗原，甲状腺球蛋白抗原 (thyroglobulin) 甲状腺过氧化物酶抗原 (thyroid peroxidase)，甲状腺素受体抗原 (Thyroxin Receptor) 甲状腺微粒体抗原 (Thyroid Microsomal)，也可以是 ICAs、IAAs、GADAs 和 IA-2As (IA-2As 包括 ICA512 和 IA-2c 自身抗体) 抗原，胰岛细胞表面抗原 (islet cell surface Antigens, ICSAs)、胰岛素受体抗原 (Insulin Receptor)、carboxypeptidase-H，IA-2 β 、肾小球基底膜抗体 (Glomerular Basement Membrane antibody, GBM Ab) 抗原的一种或一种以上。

在上技术方案基础上，所述固定在固相上的抗体为抗胰岛素或抗 C 肽抗体。

所述固相载体可以是表面带有活化基团的玻璃片，也可以是醋酸纤维薄膜、硝酸纤维薄膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片中的一种或它们的相互结合物。

所述的待测样品，可以是血清、体液、组织液、组织的细胞裂解液等。

所述的二抗的标记物可以是荧光染料，也可以通过结合的酶催化底物而显色或化学发光。

所述标记过的特异性抗体是另一抗胰岛素抗体以及另一抗 C 肽

的特异性抗体。

本发明的优越性在于：第一，可多指标同时检测。此芯片由于将几种不同的抗原点阵于固相载体上，因而可以同时检测几种不同的指标。摒弃了以往 ELISA 检测几种不同指标时重复操作的烦琐，节省了人力物力，也缩短了诊断的时间；第二，准确快速鉴别 I 型糖尿病，利于医生制定正确的治疗方案；第三，可以灵活地检测样品。可以随意的按需随时进行检测与诊断，以最快的速度得到结果，为病人和医生争取宝贵的治疗时间；第四，更节省待测样品的量。由于能同时进行多种不同指标的检测，不需用多种不同的试剂盒几次检测，因而大大节省了待测样品的量。第五，可以节省大量的资金。由于将多种不同的抗原(或抗体)点阵于固相载体上，可以同时检测多种不同的指标。摒弃了以往 ELISA 检测几种不同指标时重复操作的烦琐，从而节省了大量的试剂，节省了人力物力，因而节省了大量的资金。

附图说明

图 1：检测抗体原理图

图 2：检测抗原原理图

图 3：同时进行多种抗体（或抗原）的检测。

具体实施方式

如图 1 本发明检测抗体原理图和图 2 本发明检测抗原原理图所示，1 型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片，是将多种不同的抗

原和抗体点阵于固相载体上不同位置，抗原和抗体通过化学键连接于固相载体上，固相载体表面经过封闭后，加入待测样品，与固相载体上固定的生物分子进行杂交反应，洗去未结合的物质后，加入标记的二抗及标记的特异性抗体混合物，再进行杂交，洗去未结合的物质后检测标记信号，其特征在于：所述不同的抗原是腮腺炎病毒抗原 (Mumps virus)、柯萨奇病毒 B4 抗原 (Coxsackievirus)、风疹病毒抗原 (Rubella virus)、人肠道孤病毒抗原、甲状腺球蛋白抗原 (thyroglobulin)、甲状腺过氧化物酶抗原 (thyroid peroxidase)、甲状腺素受体抗原 (Thyroxin Receptor)、甲状腺微粒体抗原 (Thyroid Microsomal)，也可以是 ICAs、IAAs、GADAs 和 IA-2As (IA-2As 包括 ICA512 和 IA-2c 自身抗体) 抗原，胰岛细胞表面抗原 (islet cell surface Antigens, ICsAs)、胰岛素受体抗原 (Insulin Receptor)、carboxypeptidase-H, IA-2 β 、肾小球基底膜抗体 (Glomerular Basement Membrane antibody, GBM Ab) 抗原中的一种或一种以上。本发明的制作方法为：第一，进行载体材料的选择，固相载体可以是表面带有活化基团的玻璃片，也可以是醋酸纤维素薄膜、硝酸纤维素薄膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片或它们的相互结合物等。

其中，芯片的点样、制作技术：(1) 样品的制备：采血清、取组织液，或将组织捣碎、裂解后，取组织裂解液。(2) 用高速点样机器人，根据抗原的种类确定点阵的排列方式和点样位置。(3) 点样针从多孔板取出样品后直接点阵于固相载体表面。(4) 室温过夜或 37

℃温育 1 小时，以固定样品。(5) 在载体表面加上封闭液，37℃温育 1 小时。(6) 用缓冲液充分洗涤并室温干燥。

抗体的标记：用荧光染料或酶标记抗体，除去未结合成分后，4℃保存备用。

杂交反应：在点好样的固相载体上滴加标记二抗（或特异性抗体），37℃避光温育 30 分钟。洗净并室温晾干。

结果的检测：反应结束后，利用专业的 CCD 分析系统或扫描系统进行结果的判读。

如图 3 同时进行多种抗体（或抗原）的检测图片所示，用荧光标记的抗体检测血清中的相关 1 型糖尿病抗体。点样阵列为 4×5。左图为抗原点阵方式 A1-A4 为 ICAs、IAAs、GADAs 和 IA-2As (IA-2As 包括 ICA512 和 IA-2c 自身抗体) 抗原 B1-B4 为甲状腺球蛋白自身抗体 (Autoantibodies to thyroglobulin, TgAb) 甲状腺过氧化物酶抗体 (thyroid peroxidase autoantibodies, TPOAb), 甲状腺素受体抗体 Thyroxin Receptor autoantibodies, TRAb) 甲状腺微粒体抗体 (Thyroid Microsomal autoantibodies, TMAb) 抗原、C1-C4 为腮腺炎病毒 (Mumps virus)、柯萨奇病毒 B4 (Coxsackievirus)、风疹病毒 (Rubella virus)、人肠道孤病毒抗原，D1-D4 为胰岛细胞表面抗体 (islet cell surface autoantibodies, ICSAs)、胰岛素受体自身抗体 (Insulin Receptor autoantibodies)、carboxypeptidase-H autoantibodies, IA-2 β 自身抗体 (heat shock protein autoantibodies)、肾小球基底膜抗体 (Glomerular Basement

Membrane antibody, GBM Ab) 抗原, E1-E4 为 carboxypeptidase-H autoantibodies , 热震动蛋白抗体 (heat shock protein autoantibodies), 抗胰岛素或抗 C 肽抗体; 右图为检测抗体 (或抗原) 结果, 结果显示为 TgAb, TPOAb, TRAb, TMAb 阳性; 腮腺炎病毒 (Mumps virus)、柯萨奇病毒 B4 (Coxsackievirus)、风疹病毒 (Rubella virus)、人肠道病毒抗体阳性, 其他指标为阴性, 荧光的强弱代表抗体 (或抗原) 含量的高低。

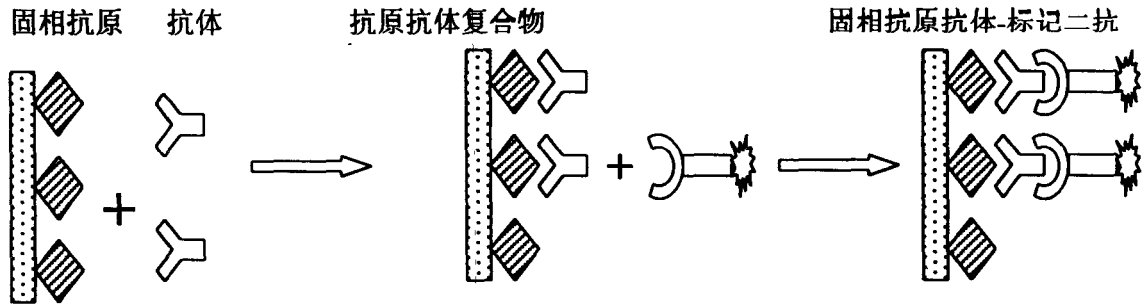


图 1

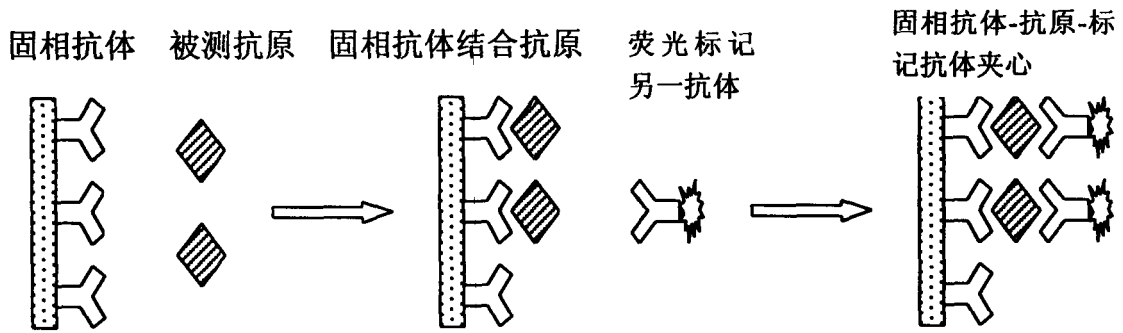


图 2



图 3

专利名称(译)	1型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片		
公开(公告)号	CN1448724A	公开(公告)日	2003-10-15
申请号	CN03116884.1	申请日	2003-05-13
申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海晶泰生物技术有限公司		
[标]发明人	张涛 李宾 彭永济 邓富桥 葛海鹏 孙露		
发明人	张涛 李宾 彭永济 邓富桥 葛海鹏 孙露		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/66		
代理人(译)	董梅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明1型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片，涉及生命科学免疫组化蛋白芯片领域。1型糖尿病相关抗原抗体同时检测蛋白芯片，是将多种不同的抗原和抗体点阵于固相载体上不同位置，抗原和抗体化学键连接于固相载体上，固相载体表面经封闭后，加入待测样品，与固相载体上固定的生物分子进行杂交反应，洗去未结合的物质后，加入标记的二抗及标记的特异性抗体混合物，再进行杂交，洗去未结合的物质后检测标记信号，所述不同的抗原是腮腺炎病毒抗原、肾小球基底膜抗体等。可多指标同时检测，节省了人力物力，也缩短了诊断的时间；准确快速鉴别1型糖尿病，利于医生制定正确的治疗方案；可以灵活地检测样品；更节省待测样品的量和大量的资金。

