

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
G01N 33/53
G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03150532.5

[43] 公开日 2005年2月23日

[11] 公开号 CN 1584592A

[22] 申请日 2003.8.22 [21] 申请号 03150532.5

[71] 申请人 中国科学院上海原子核研究所
地址 201800 上海市嘉定区嘉罗公路 2019 号

[72] 发明人 宋世平 李 宾 王惠琼 胡 钧
唐国忠 李民乾

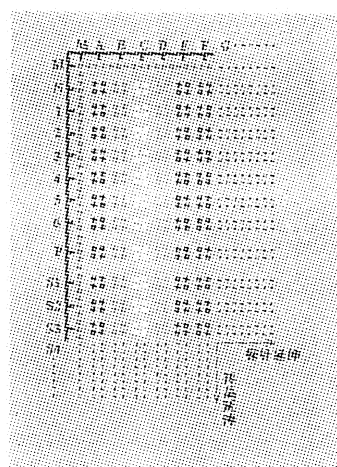
[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
代理人 邓 琪

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 4 页

[54] 发明名称 免疫微阵列蛋白质芯片

[57] 摘要

本发明提供了一种以抗体文库为基础的用于多种蛋白质分析的并可进而用于蛋白质组学研究的免疫微阵列蛋白质芯片、该芯片制备方法及其检测技术。该芯片是利用平板印刷术按照预先设计的方案将取自抗体文库的抗体或进而制备的抗体片断印刷到带有醛基的芯片基片上，将抗体或其抗体片断用平板印刷术固定在活化的芯片基片上。该芯片在检测时，应用通用信号物质，使整个芯片只用一种信号标记物进行蛋白组分析，可在实现微阵列“高通量”检测的同时，也能满足蛋白检测的特异性要求；另外引入亲合素-生物素系统的信号放大体系检测系统可将检测灵敏度提高至超微量测定的水平。利用抗体片断作为捕获探针可进一步提高蛋白质芯片在后续反应中的特异性，改善信噪比。



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

1. 免疫微阵列蛋白质芯片，其特征在于该芯片是利用平板印刷术按照预先设计的方案将取自抗体文库的抗体或进而制备的抗体片断印刷到带有醛基的芯片基片上，使抗体或抗体片断上的游离氨基与基片上的醛基形成酰胺键共价连接，从而将抗体或其抗体片断固定在活化的芯片基片；所述抗体作为捕获探针以点阵的形式在芯片上横向延伸，接受待测样品的所有种类的探针点阵则沿纵向延伸。

2. 如权利要求1所述蛋白质芯片的制备方法，其特征在于：

(1) 从特定蛋白组的抗体文库中选取抗体；

(2) 用酶切的方法制备抗体片断；

(3) 将抗体或抗体片断用平板印刷术按照预先设计的方案印刷到经活化带有醛基的芯片基片上，使抗体或抗体片断上的游离氨基与基片上的醛基形成酰胺键共价连接；

(4) 洗涤；

(5) 封闭芯片基片上剩余的活性基团；

(6) 干燥。

3. 根据权利要求2所述的制备方法，其特征在于所述芯片基片活化的方法为玻片硅烷化方法，免疫微阵列平板印刷是采用通用点样仪进行接触式制样或喷样。

4. 应用如权利要求1或2所述的蛋白质芯片进行蛋白质组学分析的检测方法，其特征在于通过使用配对单克隆抗体对靶蛋白进行夹心分析，其步骤为：

(1) 将特定检测样品加入到免疫微阵列蛋白质芯片上；

(2) 待样品中的靶蛋白与芯片抗体或其片断在反应温度为4~25℃，相对湿度为70~85%的条件下进行免疫反应并至反应平衡；

(3) 洗涤；

(4) 加入作为第一信号物质的可与芯片捕获抗体配对的检测抗体，使两个配对抗体与靶蛋白形成二重夹心复合物；

(5) 洗涤;

(6) 加入与荧光素或其他发光物质连接的第二信号物质, 并使其与所形成的二重夹心复合物实现连接形成三重复合物;

(7) 洗涤;

(8) 干燥后进行成像检测。

5. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于所述第二信号物质为抗种属免疫球蛋白G抗体或Protein A。

6. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于所述成像检测的方法是共聚焦扫描显像法或电荷耦合检测器成像法。

7. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于在上述芯片免疫检测的末端引入亲合素-生物素系统, 通过应用第二信号物质与生物素的连接物和荧光素标记的亲合素实现检测信号的放大, 该亲合素-生物素系统的引入方法是:

(1) 在已形成二重夹心复合物的蛋白质芯片上加入生物素连接的第二信号物质在反应温度: 4~25℃; 相对湿度: 70~85%的条件下反应, 形成三重复合物;

(2) 洗涤;

(3) 加入荧光素或其他发光物质连接的亲合素, 并使之与芯片三重复合物连接形成四重复合物;

(4) 洗涤;

(5) 进行荧光或发光信号检测。

8. 根据权利要求7所述的检测方法, 其特征在于所述第二信号物质为抗种属免疫球蛋白G抗体或Protein A。

9. 根据权利要求7所述的检测方法, 其特征在于前述成像检测的方法是共聚焦扫描显像法或电荷耦合检测器成像法。

免疫微阵列蛋白质芯片

技术领域

本发明涉及蛋白质芯片，特别是一种以抗体文库为基础的用于多种蛋白分析的并可进而用于蛋白质组学研究的芯片、该芯片制备方法及其检测技术。

背景技术

蛋白质芯片是继基因芯片之后又一重大生物技术。基因芯片作为成功的例子，已广泛应用于生物基础研究及临床医学各领域。然而基因芯片只能检测到人体各种遗传信息在 DNA/RNA 水平的变化，而无法检测出在蛋白质水平上的变化。随着人类基因组计划测序工作的完成，即将进入后基因组时代，下一步要对更加复杂的蛋白质功能进行研究，迫切需要蛋白质芯片技术。

蛋白质芯片的初步模型是基于与基因芯片相似的基本原理，即在某一固相载体上按预先设计的微阵列方式固定大量蛋白质。如果所固定的蛋白质为抗体则称免疫微阵列芯片。抗原抗体的结合，即免疫反应，是特异性的，这样将抗原（或抗体）加上各种标记即可实现基于芯片的免疫检测。

任何一种蛋白质都可以作为一种抗原，都可通过免疫应答产生自己的特异性抗体。所以无论是已经存在的临床生物样品还是新的蛋白质表达样品都可以通过免疫芯片实现其检测目的。

现有技术中的蛋白质芯片，如中国专利申请 01105795.5 及 01113323.6，是将蛋白质样品点阵于经化学处理过的载玻片上，蛋白质通过化学键连接于载玻片上而被固定并进一步用于蛋白质检测或特定抗原或抗体的免疫分析。该类蛋白质芯片以蛋白质点阵为基础，仅通过一次系列同步反应就可得到多种指标的反应结果，大大提高了检测速度和效率，适用于任意人份、任意指标的同时检测。但这种技术存在的严重问题有：1. 抗原或抗体与信号物质的连接将有可能严重影响原有的生物活性（很多种蛋白质不适于信号标记甚至无法标记）；2. 在夹心免疫分析中所采用的捕获抗体均采用整分子，这在很多

情况下，如捕获抗体与检测抗体同源时会增加系统非特异性，降低信噪比，并在检测生物样品时增加了非特异性干扰机会，造成检测结果的假阴性或假阳性。

发明内容

本发明基于以上发展需求及蛋白质芯片所存在的缺陷，提出了一种基于抗体文库的免疫微阵列蛋白质芯片技术，该技术包括蛋白质芯片的设计、制备及其检测技术。从而使该蛋白质芯片真正成为高通量、高效率的生物分析系统。

本发明的蛋白质芯片，是利用平板印刷术按照预先设计的方案将取自抗体文库的抗体或抗体片断印刷到带有醛基的芯片基片上，使抗体或抗体片断上的游离氨基与基片上的醛基形成酰胺键共价连接，从而将抗体或其抗体片断固定在活化的芯片基片；所述抗体作为捕获探针以点阵的形式在芯片上横向延伸，接受待测样品的所有种类的探针点阵则沿纵向延伸。

本发明蛋白质芯片的制备方法如下：

- (1) 从特定蛋白组的抗体文库中选取抗体；
- (2) 用酶切的方法制备抗体片断；
- (3) 将抗体或抗体片断用平板印刷术按照预先设计的方案印刷到经活化的芯片基片上，使抗体或抗体片断上的游离氨基与基片上的醛基形成酰胺键共价连接；
- (4) 洗涤；
- (5) 封闭芯片基片上剩余的活性基团；
- (6) 干燥。

上述芯片基片活化的方法为常规的玻片硅烷化方法。用于免疫微阵列平板印刷的方法为使用制作 DNA 芯片的通用点样仪进行接触式制样或喷样。

应用上述制得的蛋白质芯片进行蛋白质组学研究的检测方法可以为免疫微阵列芯片夹心分析方法，即通过使用配对单克隆抗体实现对靶蛋白的夹心分析，其检测步骤如下：

- (1) 将需要检测的样品加入到免疫微阵列蛋白质芯片上。

- (2) 待样品中的靶蛋白与芯片抗体或其片断实现免疫反应并至反应平衡，其中反应温度：4~25℃；相对湿度：70~85%
- (3) 洗涤；
- (4) 加入可与芯片捕获抗体配对的单克隆或多克隆检测抗体，构成可直接携带信号的第一信号物质，使两个配对抗体与靶蛋白形成二重夹心复合物；
- (5) 洗涤；
- (6) 加入第二信号物质
- (7) 洗涤；
- (8) 干燥后进行成像检测。

在上述芯片免疫检测的末端还可引入亲合素—生物素系统，即通过应用第二信号物质与生物素的连接物和荧光素标记的亲合素实现检测信号的放大。该亲合素—生物素系统的引入方法是：

- (1) 在已形成二重夹心复合物的蛋白质芯片上加入生物素连接第二信号物质，在反应温度：4~25℃；相对湿度：70~85%的环境下，反应后形成三重复合物。
- (2) 洗涤；
- (3) 加入荧光素或其他发光物质连接的亲合素，并使之与芯片复合物连接形成四重复合物；
- (4) 洗涤；
- (5) 进行荧光或发光信号检测。

上述第二信号物质可以是抗种属免疫球蛋白 G(IgG)抗体或 Protein A 等；成像检测的方法是共聚焦扫描显像法或电荷耦合检测器 (CCD) 成像法。

上述免疫微阵列芯片中，每个微点的尺度在 100~200 μm，每平方厘米芯片基片面积内可以制备 2500 点以上的免疫微阵列；所以利用本检测体系可望在 2×3 cm 的芯片范围内实现含有上万种组分的蛋白组的分析检测。因而实现了高通量检测。

本发明利用抗体作为蛋白质芯片的靶蛋白捕获探针，对蛋白质芯片的捕获探针进行统筹选择和整体优化，包括必要的分子改造，对于信号系统，则

引入非直接标记的检测探针，同时应用通用信号物质，使整个芯片只用一种信号标记物进行蛋白组分析，可在实现微阵列“高通量”检测的同时，也能满足蛋白检测的特异性要求。利用抗体片断作为捕获探针可进一步提高蛋白质芯片在后续反应中的特异性，改善信噪比，并有利于引入通用标记物和分子放大系统。引入亲合素-生物素系统的信号放大体系的芯片检测系统可将检测灵敏度提高至超微量测定的水平。

附图说明

图 1 为基于抗体文库的免疫微阵列蛋白质芯片结构示意图；

图 2 为本发明特异性鉴定实验成像结果；

图 3 为本发明蛋白质芯片用于肿瘤蛋白夹心分析检测的成像结果；

图 4 为本发明蛋白质芯片用于肿瘤蛋白引入亲合素-生物素系统检测的成像结果。

具体实施方式

下面结合附图及实施例对本发明作进一步详述：

如图 1 所示，为本发明基于抗体文库的免疫微阵列蛋白质芯片结构设计示意图。其中芯片上所有微阵列抗体捕获探针均取自抗体文库，并可进一步以抗体酶解所得到的活性片断作为捕获探针。其设计方案为双向延伸型：作为捕获探针的抗体或其片断在芯片上沿横向逐列增加，直至达到芯片基片容许的容量；待测样品的数量可以沿纵向逐行增加，直至达到芯片基片允许的容量。

图中 M 为微阵列定位探针；A-G 及其后各列为探针种类；1-6 各行为各种被测靶蛋白（与探针捕获匹配）的浓度梯度检测带；N 行为靶蛋白检测阴性质控带；P 行为靶蛋白检测阳性质控带；S1-S4 及其以后各行为样品检测带。每组探针（4 个相同微点）通过捕获靶蛋白，最终给出一个平均的检测信息数据。

如图 2 所示，为本发明特异性鉴定实验成像结果。图中：

M 列为抗体片断微阵列方位标记；A 列为 AFP 抗体片断；B 列为 CEA

抗体片断；C列为 β -HCG抗体片断；D列为CA125抗体片断；E列为CA19-9抗体片断；F列为CA15-3抗体片断。每四个微点得到一个平均光密度数据；

S1、S2和S3为三种肿瘤蛋白混合溶液样品：S1（AFP、CEA、CA19-9）；S2（CEA、 β -HCG、CA125）；S3（CEA、CA125、CA15-3）。

从成像结果可以得出，在被检测样品中，若含有某种肿瘤蛋白，则其即被抗体或抗体片断捕获而最终给出阳性结果，反之给出阴性结果，从而反映出由不同捕获探针所组成的免疫微阵列具有高度特异性，即选择性结合，无交叉反应。

【实施例1】—抗体作为捕获探针，以免疫微阵列蛋白质芯片夹心分析检测体系进行肿瘤蛋白组检测，该芯片制备方法及其检测肿瘤蛋白组的步骤如下：

(1) 从肿瘤蛋白组抗体文库中，选取6种蛋白标志物—甲胎蛋白、癌胚抗原、人绒毛膜促性腺激素、糖类抗原125（CA125）、糖类抗原19-9（CA19-9）和糖类抗原15-3（CA15-3）—的单克隆抗体作为靶蛋白捕获探针；

(2) 将该三种抗体分别溶于固化缓冲液中，用接触式点样仪在醛基化的芯片基片上将其制作成免疫微阵列，固化反应持续时间为4-16小时，4℃，75%相对湿度；

(3) 用洗涤液洗涤芯片3次，每次1分钟；

(4) 将芯片浸入封闭液中30-60分钟，室温，封闭所有剩余的醛基基团及具有非特异性吸附性能的芯片表面部位；

(5) 在芯片上加入含有甲胎蛋白、癌胚抗原、人绒毛膜促性腺激素、糖类抗原125（CA125）、糖类抗原19-9（CA19-9）和糖类抗原15-3（CA15-3）等肿瘤蛋白标志物的反应液，75%相对湿度下，室温反应3小时；

(6) 用洗涤液洗涤芯片3次，每次1分钟；

(7) 加入上述肿瘤蛋白的兔源多克隆抗体混合反应液，75%相对湿度下，室温反应1小时；

(8) 用洗涤液洗涤芯片3次，每次1分钟；

- (9) 加入异硫氢酸荧光素标记的羊抗兔 IgG 抗体溶液, 75%相对湿度下, 室温反应 1 小时;
- (10) 用洗涤液洗涤芯片 3 次, 每次 1 分钟;
- (11) 干燥后进行 CCD 成像检测。

检测成像结果如图 3 所示, 其中:

1. M 行和 M 列为抗体微阵列方位标记; N 行为肿瘤蛋白阴性质控; P 行为肿瘤蛋白阳性质控。

2. A 列为 AFP 抗体; B 列为 CEA 抗体; C 列为 β -HCG 抗体; D 列为 CA125 抗体; E 列为 CA19-9 抗体; F 列为 CA15-3 抗体。每四个微点得到一个平均光密度数据。

3. 行 1 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 20 μ g/L, CEA: 20 μ g/L, β -HCG: 20 μ g/L, CA125: 40kU/L, CA19-9: 40kU/L, CA15-3: 40kU/L; 行 2 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 40 μ g/L, CEA: 40 μ g/L, β -HCG: 40 μ g/L, CA125: 80kU/L, CA19-9: 80kU/L, CA15-3: 80kU/L; 行 3 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 80 μ g/L, CEA: 80 μ g/L, β -HCG: 80 μ g/L, CA125: 160kU/L, CA19-9: 160kU/L, CA15-3: 160kU/L; 行 4 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 160 μ g/L, CEA: 160 μ g/L, β -HCG: 160 μ g/L, CA125: 320kU/L, CA19-9: 320kU/L, CA15-3: 320kU/L; 行 5 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 320 μ g/L, CEA: 320 μ g/L, β -HCG: 320 μ g/L, CA125: 640kU/L, CA19-9: 640kU/L, CA15-3: 640kU/L; 行 6 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 640 μ g/L, CEA: 640 μ g/L, β -HCG: 640 μ g/L, CA125: 1280kU/L, CA19-9: 1280kU/L, CA15-3: 1280kU/L。

4. 从成像结果可以得出, 6 种肿瘤蛋白可被同时检测, 且每种不同浓度的肿瘤蛋白最终给出不同的光密度值 (光密度随浓度梯度变化而成梯度变化)。

【实施例 2】—抗体作为捕获探针, 并引入亲合素-生物素系统的免疫微阵列蛋白质芯片检测体系进行肿瘤蛋白组检测, 该芯片制备方法及其检测肿瘤蛋白组的步骤如下:

其中步骤 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) 同实施例 1;

- (9) 加入生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体溶液, 75%相对湿度下, 室温反应 1 小时;
- (10) 用洗涤液洗涤芯片 3 次, 每次 1 分钟;
- (11) 加入异硫氢酸荧光素标记的亲合素溶液, 75%相对湿度下, 室温反应 1 小时;
- (12) 用洗涤液洗涤芯片 3 次, 每次 1 分钟;
- (13) 干燥后进行 CCD 成像检测。

应用该方法的抗体片段微阵列用于肿瘤蛋白检测的成像结果如图 4 所示, 其中:

1. M 行和 M 列为抗体微阵列方位标记; N 行为肿瘤蛋白阴性质控; P 行为肿瘤蛋白阳性质控。

2. A 列为 AFP 抗体片段; B 列为 CEA 抗体片段; C 列为 β -HCG 抗体片段; D 列为 CA125 抗体片段; E 列为 CA19-9 抗体片段; F 列为 CA15-3 抗体片段。每四个微点得到一个平均光密度数据。

3. 行 1 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 20 μ g/L, CEA: 20 μ g/L, β -HCG: 20 μ g/L, CA125: 40kU/L, CA19-9: 40kU/L, CA15-3: 40kU/L; 行 2 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 40 μ g/L, CEA: 40 μ g/L, β -HCG: 40 μ g/L, CA125: 80kU/L, CA19-9: 80kU/L, CA15-3: 80kU/L; 行 3 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 80 μ g/L, CEA: 80 μ g/L, β -HCG: 80 μ g/L, CA125: 160kU/L, CA19-9: 160kU/L, CA15-3: 160kU/L; 行 4 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 160 μ g/L, CEA: 160 μ g/L, β -HCG: 160 μ g/L, CA125: 320kU/L, CA19-9: 320kU/L, CA15-3: 320kU/L; 行 5 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 320 μ g/L, CEA: 320 μ g/L, β -HCG: 320 μ g/L, CA125: 640kU/L, CA19-9: 640kU/L, CA15-3: 640kU/L; 行 6 中被检测肿瘤蛋白浓度——AFP: 640 μ g/L, CEA: 640 μ g/L, β -HCG: 640 μ g/L, CA125: 1280kU/L, CA19-9: 1280kU/L, CA15-3: 1280kU/L。

4. 从成像结果可以得出, 6 种肿瘤蛋白可被同时检测, 且每种不同浓度的肿瘤蛋白最终给出不同的光密度值, 即光密度随浓度梯度变化而成梯度变化; 检测信号更强, 能给出更优的信号数据。

【实施例 3】—抗体片断作为捕获探针，不引入亲合素-生物素系统的免疫微阵列蛋白质芯片检测体系进行肿瘤蛋白组检测，该芯片制备方法及其检测肿瘤蛋白组的步骤如下：

(1) 从肿瘤蛋白组抗体文库中，选取 6 种标志物—甲胎蛋白、癌胚抗原、人绒毛膜促性腺激素、糖类抗原 125 (CA125)、糖类抗原 19-9 (CA19-9) 和糖类抗原 15-3 (CA15-3) 的单克隆抗体，用胃蛋白酶按照已报道的方法进行酶切并分离纯化得到抗体片断 $F(ab')_2$ ，作为捕获探针；

(2) 将该三种 $F(ab')_2$ 抗体片断分别溶于固化缓冲液中，用接触式点样仪在醛基化的芯片基片上将其制作成免疫微阵列，固化反应持续时间为 4-16 小时，4℃，75%相对湿度；

(3) 洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；

(4) 将芯片浸入封闭液中 30-60 分钟，室温，封闭所有剩余的醛基基团及具有非特异性吸附性能的芯片表面部位；

(5) 在芯片上加入含有甲胎蛋白、癌胚抗原、人绒毛膜促性腺激素、糖类抗原 125 (CA125)、糖类抗原 19-9 (CA19-9) 和糖类抗原 15-3 (CA15-3) 等肿瘤蛋白标志物的反应液，75%相对湿度下，室温反应 3 小时；

(6) 用洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；

(7) 加入含有与捕获探针配对的作为第一信号物质的单克隆抗体混合反应液，70%相对湿度下，室温反应 1 小时；

(8) 用洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；

(9) 加入异硫氢酸荧光素标记的 Fc 区特异的羊抗鼠 IgG 抗体溶液，70%相对湿度下，室温反应 1 小时；

(10) 用洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；

(11) 干燥后进行 CCD 成像检测。

检测结果表明：6 种肿瘤蛋白可被同时检测，且每种不同浓度的肿瘤蛋白最终给出不同的光密度值，即光密度随浓度梯度变化而成梯度变化；结果呈现出更好的信噪比。

【实施例 4】—抗体片断作为捕获探针，并引入亲合素-生物素系统的免疫

微阵列蛋白质芯片检测体系进行肿瘤蛋白组检测，该芯片制备方法及其检测肿瘤蛋白组的步骤如下：

- 步骤 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) 同实施例 3；
- (9) 加入生物素标记的 Fc 区特异的羊抗鼠 IgG 抗体溶液，75%相对湿度下，室温反应 1 小时；
- (10) 洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；
- (11) 加入异硫氢酸荧光素标记的亲合素溶液，75%相对湿度下，室温反应 1 小时；
- (12) 用洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；
- (13) 干燥后进行 CCD 成像检测。

从成像结果可以得出，6 种肿瘤蛋白可被同时检测，且每种不同浓度的肿瘤蛋白最终给出不同的光密度值，即光密度随浓度梯度变化而成梯度变化；结果呈现出更好的信噪比；检测信号更强，能给出更优的信号数据。

【实施例 5】—抗体片断作为捕获探针，以 Protein A 为第二信号物质，并引入亲合素-生物素系统的免疫微阵列蛋白质芯片检测体系进行肿瘤蛋白组检测，该芯片制备方法及其检测肿瘤蛋白组的步骤如下：

- 步骤 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) 同实施例 3；
- (14) 加入生物素标记的 Protein A 溶液，85%相对湿度下，室温反应 1 小时；
- (15) 洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；
- (16) 加入异硫氢酸荧光素标记的亲合素溶液，85%相对湿度下，室温反应 1 小时；
- (17) 用洗涤液洗涤芯片 3 次，每次 1 分钟；
- (18) 干燥后进行 CCD 成像检测。

从成像结果可以得出，6 种肿瘤蛋白可被同时检测，且每种不同浓度的肿瘤蛋白最终给出不同的光密度值，即光密度随浓度梯度变化而成梯度变化；结果呈现出良好的信噪比；检测信号强，能给出优良的信号数据。

上述捕获探针固化液配方：0.5M 碳酸缓冲液及其替代物，pH 9.1，0.15M NaCl，40%丙三醇，0.1%NaN₃。

芯片洗涤液配方：0.05M 磷酸缓冲液及其他替代物，pH 7.4，0.15M NaCl，0.2%Tween，0.1%NaN₃。

芯片封闭液配方：0.5M 碳酸缓冲液及其他替代物，pH 9.1，0.15M NaCl，2%BSA，0.1%NaN₃。

芯片反应液配方：0.05M 磷酸缓冲液及其他替代物，pH 7.4，0.15M NaCl，0.5%BSA，0.1%NaN₃。

本实施例中所述对六种肿瘤蛋白的检测方法可以扩展用于检测抑制所有肿瘤标志蛋白，至少 20 种以上，并进而实现对庞大的肿瘤蛋白组的鉴定。

上述实施例的试验结果均达到了设计结果，实现了高灵敏、高特异和高通量的微型化免疫检测，将该检测系统与自动化仪器连用，可应用于临床检测和实验室研究。同步检测多个疾病标志物，将有利于临床医生对疾病进行全面分析；通过比较健康和疾病细胞的蛋白组图谱，研究人员将能更好的理解和分析细胞信号传递及新陈代谢途径，为医药学和诊疗学提供更多判断依据。

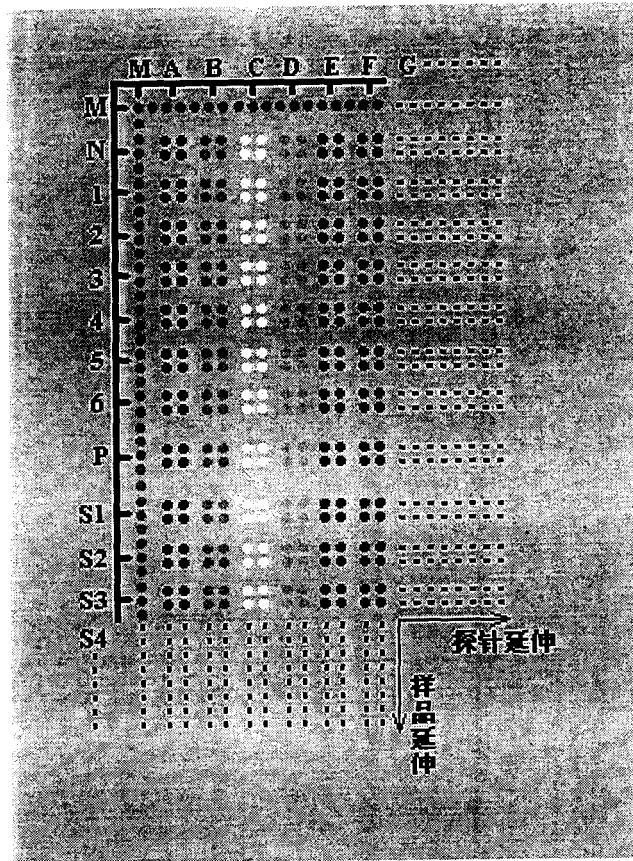


图 1

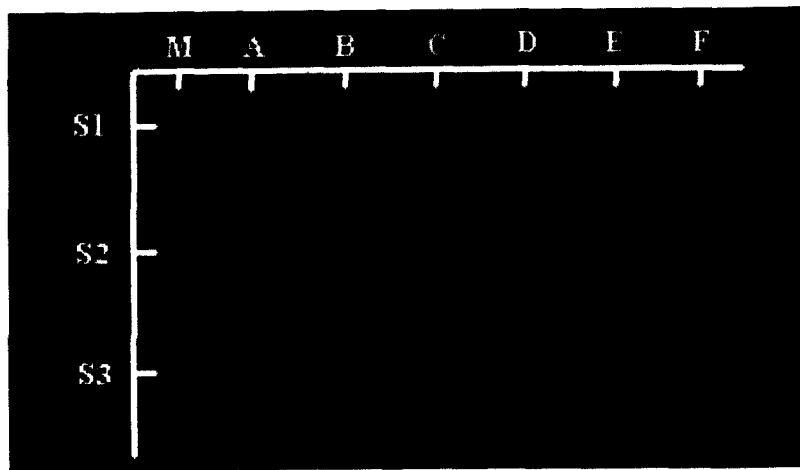


图 2

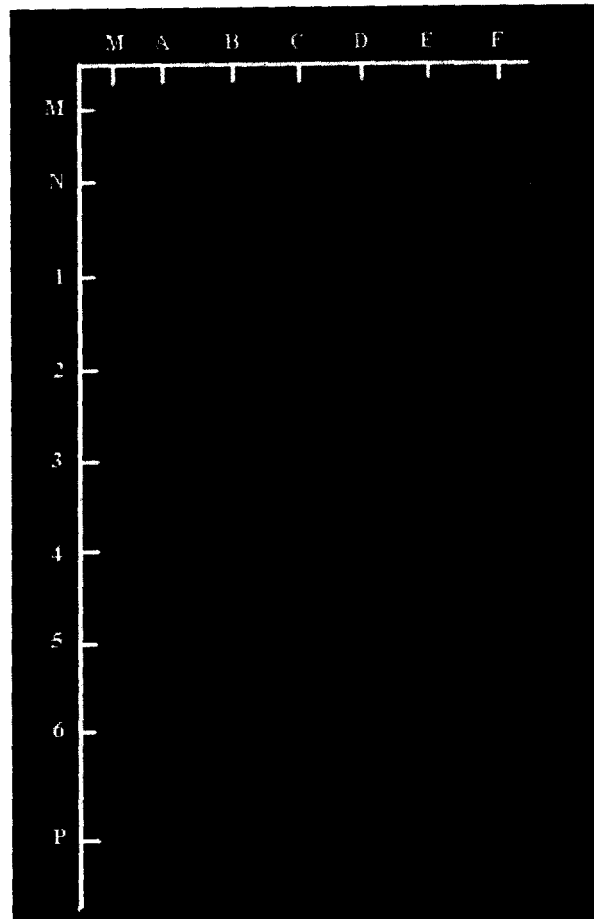


图 3

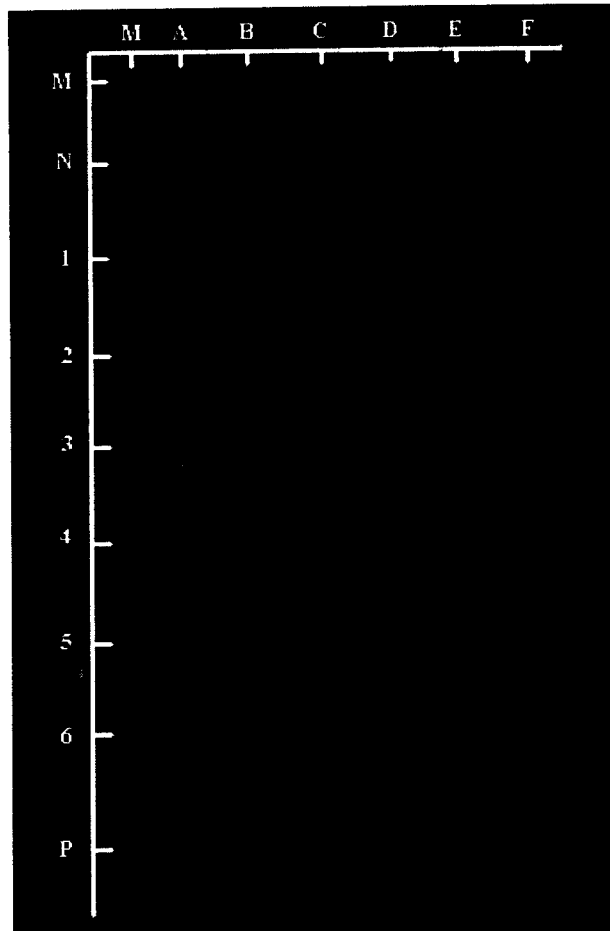


图 4

专利名称(译)	免疫微阵列蛋白质芯片		
公开(公告)号	CN1584592A	公开(公告)日	2005-02-23
申请号	CN03150532.5	申请日	2003-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海原子核研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海原子核研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海原子核研究所		
[标]发明人	宋世平 李宾 王惠琼 胡钧 唐国忠 李民乾		
发明人	宋世平 李宾 王惠琼 胡钧 唐国忠 李民乾		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	邓琪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种以抗体文库为基础的用于多种蛋白质分析的并可进而用于蛋白质组学研究的免疫微阵列蛋白质芯片、该芯片制备方法及其检测技术。该芯片是利用平板印刷术按照预先设计的方案将取自抗体文库的抗体或进而制备的抗体片段印刷到带有醛基的芯片基片上，将抗体或其抗体片段用平板印刷术固定在活化的芯片基片上。该芯片在检测时，应用通用信号物质，使整个芯片只用一种信号标记物进行蛋白组分析，可在实现微阵列“高通量”检测的同时，也能满足蛋白检测的特异性要求；另外引入亲合素-生物素系统的信号放大体系检测系统可将检测灵敏度提高至超微量测定的水平。利用抗体片段作为捕获探针可进一步提高蛋白质芯片在后续反应中的特异性，改善信噪比。

