

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02136668.3

[43] 公开日 2004 年 3 月 3 日

[11] 公开号 CN 1479098A

[22] 申请日 2002.8.27 [21] 申请号 02136668.3

[71] 申请人 缪金明

地址 201204 上海市浦东新区白杨路 360 弄 5
号 1101 室

[72] 发明人 缪金明

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 4 页

[54] 发明名称 高通量 IgY 抗体芯片构建技术

[57] 摘要

本发明是涉及一种 IgY (Yolk Immunoglobulin) 高通量蛋白芯片的制作技术, 以及采用这种技术开发的四种蛋白质芯片产品。 本发明采用候选抗原蛋白直接免疫母鸡; 或将候选抗原 cDNA 构建 cDNA 真核表达质粒, 再将 DNA 真核表达质粒免疫母鸡; 收集鸡蛋, 从蛋黄中分离纯化抗原特异的 IgY 抗体; 利用玻片或多孔滤膜构建 IgY 蛋白芯片。 由于 IgY 具有亲和力高 (100 倍以上)、 与之结合的二抗多 (3~5 倍)、 交叉反应小、 不与蛋白 A、 G、 哺乳动物抗体 Fc 段、 补体等结合、 耐酸耐热等优点, 是构建蛋白芯片的最佳材料。 本发明还应用该技术开发了白细胞分化抗原检测芯片、 血清细胞因子检测芯片、 血清肿瘤标志物检测芯片和心肌疾病早期预警芯片等产品。

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

1. 一种 IgY 高通量蛋白芯片的构建方法，是一种采用抗原或直接采用 cDNA 制作鸟类特异性抗体并构建蛋白（抗体）芯片的技术，以及用此技术构建的蛋白芯片产品，可用于蛋白质组学的研究以及临床诊断试剂的开发。具体包括下述步骤：
 - a) 候选抗原蛋白的选择；
 - b) 或候选抗原基因 cDNA 或基因组 DNA 序列的选择；
 - c) 构建 cDNA 或基因组 DNA 真核表达质粒；
 - d) DNA 表达质粒转化、筛选、鉴定、扩增、提纯；
 - e) 将抗原蛋白或 DNA 真核表达质粒免疫母鸡等鸟类动物；
 - f) 收集鸡蛋或其他蛋，制备和纯化抗原蛋白特异的 IgY 抗体；
 - g) 利用玻片或多孔滤膜构建 IgY 蛋白芯片；
 - h) IgY 夹心法检测或直接标记法检测。
2. 根据权利要求 1 所描述的 IgY 高通量蛋白芯片构建方法，其特征在于构建蛋白芯片所用的抗体是来源于鸡、鸭、鹅或鸟类动物蛋黄的抗体，也称为 IgY 抗体，包括 IgY 抗体的其他命名，如鸡 IgG，7SIgG, 卵黄 IgG 等。
3. 根据权利要求 1 所描述的 IgY 高通量蛋白芯片构建方法，其特征在于将这些 IgY 抗体作为蛋白芯片的探针阵列于固体支撑物表面，如玻片和滤膜类。
4. 根据权利要求 1 和 2 所描述的 IgY，其特征在于这些 IgY 是通过特定 cDNA、DNA 构建真核表达质粒后直接免疫鸟类动物所获得的对特定 cDNA 表达产物具有特异性的 IgY 抗体。
5. 根据权利要求 1 和 2 所描述的 IgY，其特征在于这些 IgY 是通过特定蛋白质抗原直接免疫鸡等鸟类动物所获得的对抗原具有特异性 IgY 抗体。
6. 根据权利要求 1 和 3 所描述的玻片，其特征在于玻片表面经过化学修饰，具有共价或非共价结合蛋白质的能力，这些玻片包括实验室标准玻片、硅烷修饰过的玻片、硅片和表面贴有其他高分子物质的玻片。
7. 根据权利要求 1 和 3 所描述的多孔滤膜，其特征在于这些滤膜是多孔性的，孔的直径在 0.1~20 μm 之间，对蛋白质具有高度的亲和固定作用和层析扩散作用，这些滤膜包括各种硝酸纤维膜、PVDF 膜、尼龙膜。
8. 根据权利要求 1 所描述的 IgY 夹心法检测，其特征在于所使用的 IgY 抗体为多克隆抗体；固定抗体和检测抗体为同一个抗体，检测抗体的标记可以是荧光物质如 FITC、Cy3、Cy5 等，也可以是酶标、胶体金标记等方法。
9. 根据权利要求 1 所描述的直接标记法检测，其特征在于将荧光物质、酶或胶体金直接标记在被检测的蛋白质分子上。
10. 根据权利要求 1 所描述的蛋白芯片产品，是指白细胞分化抗原蛋白芯片，其特征在于该产品由 IgY 抗体所构建，包括部分或全部白细胞分化抗原（CD），

芯片基片为修饰玻片，检测方法为直接标记法，包括荧光标记、酶标记和胶体金标记。

11. 根据权利要求1所描述的蛋白芯片产品，是指血清细胞因子检测蛋白芯片，其特征在于该芯片由IgY抗体所构建，包括所有或部分白细胞介素、干扰素、造血细胞因子、可溶性受体蛋白，芯片片基为修饰玻片，检测方法为直接标记法，标记物质包括荧光物质、酶和胶体金。
12. 根据权利要求1所描述的蛋白芯片产品，是指血清肿瘤标志物检测蛋白芯片，其特征在于该芯片由IgY抗体构建，包含TSGF、PSA、PAP、CA125、CEA、AFP、HCG、CA19-9、CA15-3、CA27-29、LDH、NSE以及一些肿瘤基因产物、肿瘤相关酶类和肿瘤耐药基因产物等，采用多孔滤膜为支撑材料，IgY夹心法检测，标记物为胶体金。
13. 根据权利要求1所描述的蛋白芯片产品，是指心血管疾病早期预警芯片，其特征在于该芯片由IgY抗体构建，包括心肌肌钙蛋白I/T、肌红蛋白(Mb)、肌酸激酶(CK-MB)、脂肪酸结合蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、C反应蛋白、淀粉样蛋白A、细胞色素C、纤维原、TPP、E-6、TNF- α 、P-Selectin、补体C9等，采用多孔滤膜为支撑材料，IgY夹心法检测，标记物为胶体金。

高通量 IgY 抗体芯片构建技术

发明所属技术领域：生物领域

发明目的： 本发明涉及一种高通量蛋白（抗体）芯片构建技术，具体地说指将抗原蛋白免疫母鸡，或将已知蛋白或未知蛋白的 cDNA 或基因组 DNA 构建真核表达质粒；DNA 质粒免疫母鸡；免疫结束后收集鸡蛋，从蛋黄中分离基因特异的 IgY 抗体；构建 IgY 抗体蛋白芯片。该技术克服了鼠源性抗体的制备周期长、抗体质量低的缺陷，可以快速构建高通量的未知蛋白的抗体芯片，用于蛋白质组学的实验室研究和疾病的临床诊断。

经过 10 多年的研究，科学家已经拥有一张接近完整的人类基因组图谱，但人类基因组图谱只是一份周密的“设计图纸”，并没有告诉我们所有基因的“身份”以及它们所编码的蛋白质。人体内真正发挥作用的是蛋白质，蛋白质扮演着构筑生命大厦的“砖块”角色，其中可能藏着开发疾病诊断方法和新药的线索。

虽然以检测样品中的 mRNA 为基础的 cDNA 芯片是当今研究中倍受关注的研究手段，然而，由于存在着转录后加工、翻译调控以及翻译后加工等多种调节机制，基因的表达，或者说 mRNA 的水平并不必然代表蛋白质产物的水平和功能状态。因此要研究生命活动，必须研究蛋白质之间的相互关系，由此，蛋白质组学(Proteomics)诞生了。蛋白质组学是一门新的学科，它是在分子水平研究细胞内的所有蛋白质，是研究整体或一组相关的蛋白质的学科。目前各种生物的蛋白质组数据库正在建立之中，然而，就目前工作来看，则更多着眼于蛋白质组的变化或差异上，也就是通过对蛋白质组的比较分析。首先发现并去鉴定在不同生理条件下或不同外界条件下蛋白质组中有差异的蛋白质组分。

目前在蛋白质组研究中所使用的技术平台主要是蛋白空间位置的分析二维电泳技术以及以蛋白质-蛋白质相互作用为基础的蛋白芯片技术。

蛋白质 2D 电泳：这种 70 年代发展起来的蛋白质双相凝胶电泳技术的复兴、结合最近电喷雾质谱（ESI-MS）和基质辅助激光解吸飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）技术的发明，为蛋白质组分析技术和蛋白质组信息数据库的建立提供了重要的技术平台。不仅如此，这种技术还可以应用于医学蛋白质组诊断应用。美国 FDA/NCI 临床蛋白质组课题研究组和 Correlogic System 公司协作完成的产品----血清蛋白质谱，通过指血采样，可在 30 分钟内确定病人有没有卵巢癌。他们把蛋白质组学和人工智能计算机程序结合在一起，“训练”计算机鉴别癌症病人和对照者血液的蛋白质谱。在数千个蛋白质中，人工智能计算机程序，仅识别那些能鉴别卵巢癌和非卵巢癌妇女的少数蛋白质。

蛋白 2D 电泳技术是通过固定的操作流程以及蛋白质在二维空间上的定位，比较（差异显示）特定位置上的蛋白质的量的变化和位置的改变。缺点是大多数蛋白质都是未知的，以及双向凝胶电泳的重复性是研究蛋白质组首先要解决的问题。只有获得可信的电泳图谱，才能对蛋白的表达进行下一步的分析。

蛋白芯片技术：蛋白芯片的检测原理是通过：（1）蛋白质—蛋白质相互作用；（2）配体—药物相互作用；（3）酶—底物相互作用等特异性识别而设计的。阳性的相互作用随之能够通过例如一个标记药物或配体的存在，通过使用一个特异的抗体或者使用配体而被检测出来。由于蛋白质芯片是将抗体或配体制成高密度点阵阵列，可以同时检测数百数千的待检物质。通过蛋白质芯片，可以绘制体液中 DNA、蛋白质、肽和抗体的图谱，促进人们对健康和疾病的理解。比如，通过筛选血清、脑脊液和其它健康和疾病的体液可能识别与疾病相关的蛋白质。描绘和监测一个疾病的状态，诸如自身免疫性疾病，通过监测特殊治疗的效应或者抗体对疫苗的反应，能够产生诊断或预后的信息。

蛋白芯片技术是蛋白质—蛋白质之间的相互作用制作的高通量蛋白表达技术平台。固定在支撑物表面的蛋白质可以是抗体、抗原、受体、配体、酶、底物以及蛋白结合因子等。其中抗体芯片应用最多，其次酵母双杂交技术也应用了阵列筛选法（array screening），将表达不同蛋白的酵母单克隆分别固定，检测能与相互作用的蛋白质的细胞。高通量、高速是高通量蛋白质表达技术平台所追求的目标。

抗体芯片（Antibody Microarray，抗体微阵列），是蛋白质芯片的一种，是检测生物样品中蛋白表达模式的新方法。这种新技术使得研究人员可以在一次实验中比较生物样品中成百上千的蛋白质的相对丰度。Clontech 公司第一代的抗体芯片 Ab Microarray 380 包含固定在玻璃片基上的 378 种已知蛋白质的单克隆抗体，可以在一次简单实验中同时检测样品中的 378 种蛋白质的表达情况，并且可以在一张芯片上对两种样品的表达模式进行比较分析。这使得抗体芯片在毒性实验、疾病研究和药物开发上有广泛的应用前景。Ab Microarray 380 芯片上每个抗体都是并列双点以增加结果的可靠性，抗体针对广泛的胞内蛋白和膜结合蛋白，已知参与信号传导、癌症、细胞周期调控、细胞结构、凋亡和神经生物学等广泛的生物功能，因而可以用于检测某一特定的生理或病理过程相关蛋白的表达模式。尽管抗原来自人，但很多抗体可以识别小鼠或大鼠的样品。

目前抗体芯片所采用的抗体，均是来自市售，有的为单克隆抗体有的是多克隆抗体，有的抗体是基于天然蛋白所制成，有的是利用重组技术获得重组蛋白后免疫制成，有的甚至是通过蛋白多肽片段与其他蛋白分子交联后再免疫所制成的。这就给抗体芯片的抗体筛选带来很大的问题。由于有的抗体亲和力高，有的则较低，由于芯片的因素，要求抗体必须具有足够高的亲和力和对环境的耐受力，因此在抗体芯片制作时必须对抗体进行筛选，挑选符合芯片制作的抗体。

其次，市售抗体种类有限，对于某一方面的研究，如细胞信号传导系统的研究，其抗体是相当的不全，甚至难以构建芯片。因此采用的常规单克隆抗体的抗体芯片，这些抗体都有下列缺陷：

1. 抗体亲和力低，由于有些抗体不是采用天然蛋白质免疫，抗体亲和力低，或高低不一，难以满足抗体芯片的要求；
2. 特异性低，或者交叉反应高。由于单抗制备的技术缺陷，抗原质量不高或不纯，所得到的抗体往往存在一定的交叉反应；
3. 由于采用小鼠制备单克隆抗体，抗体生产成本高、产量低，这是因为小鼠体积小，抗体容量小；
4. 抗体芯片要求有耐热、耐酸、耐碱的抗体，才能使蛋白芯片能保持蛋白

- 的天然活力。鼠单克隆一般不耐热、不耐酸，所以抗体芯片不易储存；
5. 单克隆抗体的制备步骤多，周期长，一般需要 6—9 个月，这对蛋白芯片产品开发很不利；
 6. 目前市售的抗体数量少，总共大约 300—400 个，可选择范围小，如果制备某一方面的抗体芯片，往往不能达到 30% 的可用抗体。
 7. 由于上述原因，应用市售单克隆抗体制作的抗体芯片难以做到高通量，体现不了生物芯片的优势所在。

本发明实现方法：

为了克服现有技术的不足与缺陷，本发明将采用 DNA 免疫母鸡、鸭、鹅等鸟类动物的方法，制备高亲和力的家禽、鸟类抗体 IgY (Yolk Immunoglobulin, 卵黄免疫球蛋白)，并作为蛋白芯片的检测抗体。其步骤如下 (图 2)：

- A) 候选抗原蛋白的选择；
- B) 或候选抗原基因 cDNA 或基因组 DNA 序列的选择；
- C) 构建 cDNA 或基因组 DNA 真核表达质粒；
- D) DNA 质粒转染、筛选、鉴定、扩增、提纯；
- E) DNA 真核表达质粒免疫母鸡、鸭、鹅等鸟类动物；
- F) 基因特异的 IgY 抗体的制备和纯化；
- G) 蛋白芯片的构建。

为了得到高通量蛋白芯片所需的大量抗体，采用 DNA 直接免疫法可以简化免疫程序和抗体生产时间。1990 年，Wolff 和他的同事首次报道裸质粒 DNA 注射到小鼠肌肉后成功得到表达。几年后发现，编码流感病毒蛋白的 DNA 注射后具有免疫保护作用，随后的许多实验都证明这种 DNA 直接注射都具有免疫保护作用，这些结果给人们制备 DNA 疫苗预防 AIDS 等疾病带来希望，同时也给人们提供了新的抗体制备技术。简单的表达质粒 DNA 注射可以诱导广泛的免疫反应，激活 CD8 淋巴细胞和 CD4 淋巴细胞，分泌细胞因子，活化产生抗体的 B 细胞，最终产生相应的抗体。

该方法根据人体所有抗原都由其 DNA 编码这一基本原理，将基因文库中的编码蛋白质的 DNA 片段插入特定的表达质粒中。被表达的蛋白质可在宿主体内正确地糖基化，从而诱导对抗原的高质量的免疫反应；它们能在大肠杆菌内扩增，但不能在哺乳动物细胞内复制。常用的质粒载体启动子多为来源于病毒基因组的巨细胞病毒 (CMV) 早期启动子，具有很强的转录激活作用；另外，表达质粒 DNA 中还可包含一些合适的增强子、终止子、内含子、免疫激活序列及多聚腺苷酸信号等。

采用对鸡的免疫，是因为免疫后的特异性抗体可大量存在于鸡蛋的蛋黄中，易于采集和分离。鸡卵黄免疫球蛋白 G 抗体 (IgY) 是一种 7S 免疫球蛋白 (7SIgG)，与哺乳动物 IgG 略有不同。该蛋白质分子量约为 180kDa，含两个亚单位，即 67~70kDa 的重链和 22~30kDa 的轻链，又称 IgY (Yolk Immunoglobulin)，存在于免疫后母鸡的卵黄中。

DNA 直接免疫制备 IgY 抗体的优点：

1. 快速的抗体制备：常规技术需要纯化抗原蛋白，或者基于氨基酸序列合成多肽，这些往往需要较长的时间，特别是重组蛋白的构建、表达、抗原蛋白的提纯，过程复杂。cDNA 质粒免疫仅累及到目标基因插入到真核表达质粒中，让其在体内表达抗原蛋白，刺激免疫系统，免除了蛋白提纯过程，可以节省4—6个月时间。目前市场上有2500多种人类cDNA真核细胞表达质粒供应。
2. 可以制作未知蛋白的抗体：DNA免疫可以根据基因序列或新的cDNA进行设计，制作抗体，再用抗体来定位被检蛋白。
3. 抗体可以识别天然蛋白：虽然合成多肽作为抗原，时间较短，但是抗体质量往往不高。cDNA真核表达质粒免疫方法制备的抗体可以识别天然构象的蛋白质。
4. 高亲和力抗体：通过cDNA真核表达质粒免疫方法产生的抗体可以在亚纳摩尔分子水平结合蛋白质，比常规技术产生的抗体的亲和力高约100倍，比单链抗体那就更高了。这种强烈的亲和力是抗体诊断治疗中一项非常重要的特性，特别是被结合蛋白浓度很低时。高亲和力抗体仍然有较好的结合能力。
5. 导航抗体：cDNA真核表达质粒免疫方法制备抗体的一个重要特点是可以进行操作DNA，将抗体识别位点限定于蛋白的某一区域，比如受体的结合位点或酶的活性位点，这对于蛋白的功能研究相当重要。另外，DNA还可以制造“突变”，制备蛋白的异构体、变异蛋白等。
6. 无蛋白污染的发生：常规免疫的蛋白提纯过程最大的问题是蛋白污染，它可使抗体的制备最终无功而返，cDNA真核表达质粒免疫方法没有这个问题。
7. IgY的特点：耐酸、耐热，最适合用于抗体芯片的制备。IgY耐热，经巴氏消毒后活性依旧；不与蛋白A、G和哺乳动物抗体的Fc端结合，不会活化补体，减少了交叉反应。
8. 卵黄作为特异抗体IgY的来源有许多优点：如，母鸡易于饲养，费用不高；收集鸡蛋方便，无需抽动物血，无损伤，符合现代动物保护规则；产生有效免疫反应所需抗原量小，尤其是高度保守的哺乳动物蛋白质对种系发生学上距离较远的禽类通常有较强的免疫原性。
9. 免疫效果好：与普通蛋白疫苗不同，基因免疫能在自身细胞中产生外源性蛋白，这种蛋白较之在原核生物表达系统中产生的蛋白质更接近天然分子，其抗原递呈过程与自然感染十分相似。因此，这样的免疫原将含有在构象上相关的表位，诱导产生对应于天然抗原的免疫应答。
10. 免疫应答持久：由于外源基因可以在体内存在较长时间，并不断表达外源蛋白，它可以持续地给免疫系统提供刺激，因此，很微量的抗原即可刺激机体产生强而持久的免疫应答。
11. 方法简便，价格低廉：cDNA真核表达质粒仅需在细菌中扩增，与普通抗原相比，cDNA质粒的制作省去了抗原提取和纯化等繁琐耗时的过程，cDNA真核表达质粒用量少，比其它蛋白抗原免疫更经济。
12. 稳定的抗体来源：1个鸡蛋含有的抗体与1只兔中1次取血或200只小鼠的抗体量相同。收蛋简单、温和。鸡一般1天下1个蛋，而兔却只能每2-3周抽1次血。
13. 降低免疫程控：鸡只需作1个月的免疫程控，就可获得高滴度抗体。让兔产

生高滴度抗体，免疫时间需 2-3 个月。

14. 对哺乳动物的抗原有效：由于鸟类与哺乳动物在遗传上相差远，鸡在产生抗保守哺乳动物蛋白的抗体时非常有效。高度保守的哺乳动物蛋白在兔中不能引起免疫应答，但在鸟类中却可成功地得到抗这些蛋白的抗体。

15. IgY 可以与 3~5 倍的二抗结合，具有放大效应，可以增加检测敏感性。

本发明实施步骤：

1. 相关候选表达基因的筛选

本发明的目的是建立新型抗体蛋白芯片技术（图 2）。在固定候选抗体的选择上，将选择容易收集和验证的抗体类型。例如可选择所有的白细胞介素(ILs)、所有的血细胞生长因子、和所有的白细胞分化抗原（CD），或所有的与细胞信号传导系统有关的蛋白质，或所有与肿瘤血清标志物诊断有关的蛋白质。这些蛋白质的 cDNA 克隆可以从国家人类基因组南方研究中心获得，或从商业途径获得芯片所需的 cDNA 克隆。

2. cDNA 真核表达质粒的制备

获得的 cDNA 克隆，最好进行重新测序，以证明克隆的正身。也可从商业途径直接获得各种 cDNA 真核细胞表达质粒，目前已有 2500 多种全长 cDNA 真核表达质粒的商品供应。

质粒载体必须是能在大肠杆菌中高拷贝地扩增，而在动物细胞内则能高效表达，但不复制，也不含有向宿主细胞基因组内整合的序列。可采用的真核细胞表达质粒有：pcDNA3.1（图 1a）、pBK-CMV、pVIV02（图 1b）和 pVAC+pBOOST（InvitroGen），其中 pVAC+pBOOST 是专用于 DNA 免疫的。

本发明以 pcDNA3.1/GS（图 1a）或 pBK 质粒为基本骨架，这些质粒带有细菌复制子(ori)，真核生物的启动子(有的含有增强子)和 Poly·A 加尾信号。启动子大多来源于病毒基因组，如 CMV，PSV，LTR 等，其中以 CMV 的转录活性最高；Poly·A 序列具有保证 mRNA 在体内的稳定性的作用，这种稳定性因 Poly·A 来源不同而异，目前认为较好的 Poly·A 来自牛生长激素基因或兔β球蛋白基因；载体中如果含 SV40 复制起始点，应该使其缺失。筛选基因可以选用卡那霉素，氨苄青霉素或新霉素等抗性基因。

选用 pBK-CMV、pVIV02 等空白质粒插入所需表达的 cDNA 基因片断，编码抗原的 cDNA 序列通过巨细胞病毒的启动子 pCMV 和未甲基化的 CpG 重复的免疫刺激序列，将 cDNA 序列直接转染到抗原提呈细胞，刺激免疫发生抗体、CD4 阳性细胞和 CD8 阳性细胞。在注射之前进行质粒扩增，先将质粒转染到大肠杆菌，培养扩增，然后应用质粒 DNA 抽提试剂抽提质粒，最后按照 DNA 免疫程序进行注射。

3. DNA 免疫

1) 肌肉注射

DNA 免疫过程是将总量 50~300μg 的真核细胞表达质粒 DNA 溶解在 200μl 0.9% 生理盐水中，分 3 次多部位注射到鸡的股四头肌肌肉内，每 2 周加强注射一次。30 天以后开始收集鸡蛋，滴度逐步升高，并可维持 1-6 个月。为保持高滴度抗体的产生，每 1 个月加强注射一次。

2) 基因枪皮下导入

通过粒子轰击(Particle bombardment)技术可将质粒 DNA 导入动物组织中去,这是目前用作基因免疫的最常用最有效的转移方法。其基本程序是,先将质粒 DNA 包被在金微粒子表面,用基因枪将被 DNA 包着的金颗粒加速,有效地将 DNA 带入靶组织。该方法效率高,几十纳克的 DNA 即可获得强烈的免疫应答;缺点是制备 DNA 包被的金颗粒操作较复杂,并有特殊的设备要求。按以下程序进行操作:

- 1) 在 1.5ml 离心管中加入 10 μ l DNA(1mg/ml), 25 μ l 微颗粒(约 10 μ g), 50 μ l CaCl₂ (2.5mol/L) 及 50 μ l 亚精胶(0.1mol/L), 混匀后静置 10 分钟, 以利于 DNA 包裹于微颗粒表面;
- 2) 离心(10000r/分钟), 5 分钟后, 去上清, 用 70%乙醇洗一遍;
- 3) 离心(10000r/min), 5 分钟后, 去上清, 用无水乙醇洗一遍
- 4) 离心去上清, 将沉淀重悬于 100ml 无水乙醇中;
- 5) 将包有 DNA 质粒微颗粒悬液用微量移液器加到基因枪载体上, 于室温下晾干, 真空保存;
- 6) 使用时将微颗粒的载体用甘油粘贴于基因枪 Kapton 盘下, 紧帖待导入的部位, 启动基因枪, 驱动微颗粒进入上皮组织。
- 7) 注射时间同肌肉注射。

4. 高通量抗体制备与纯化

采用 EGGstract IgY 纯化系统(Promega)从蛋黄中提纯 IgY。EGGstract IgY 纯化系统是一种从鸡蛋黄中快速、简便地纯化蛋黄免疫球蛋白 IgY 的方法。用鸡蛋作为抗体来源, 较传统的从哺乳动物中生产多克隆抗体的方法, 方便, 简单, 便宜。从鸡蛋中纯化 IgY 时, 首先用纯化系统中的一种分离器将蛋白和蛋黄分开。用沉淀溶液 A 将蛋黄中大量的脂肪除去。用溶液 B 进一步纯化抗体。用这两种溶液沉淀得到 75%纯度的 IgY 抗体。进一步用溶液 B 沉淀可得到大约 90%纯度的 IgY 抗体。

每 ml 鸡蛋黄中有 3-5mg IgY 抗体。每个蛋中大约有 60-100mg IgY 抗体。一般特异抗体占总多克隆抗体的 2-10%。用基本方法纯化的 IgY 抗体的纯度为 75%。进一步(可选择, 15 分钟), 用溶液 B 作第二次沉淀, 使抗体的纯度达 90%, 抗体的得率无明显下降。

5. IgY 抗体芯片构建

利用三维生物芯片点样装置(高密度和中密度)制备蛋白质芯片, 高密度蛋白质点样机(如 Cartesian Technology 公司的 MicroSys 5100 小型台式芯片工作站; PixSys 5500 PA Workstation)可以制造每平方厘米 2500 探针的芯片; 而中密度点样机(喷印机)可以在每平方厘米上排列 400 个探针; 按照芯片所固定抗体的多少, 按一定规律排列抗体。芯片支撑物可以是经过修饰的玻片或硝酸纤维膜等材料;

适合构建蛋白芯片的支撑物:

1) 醛基玻片

用于制作芯片的玻片必须特别清洁和平滑。玻片表面必须包被醛基功能基团,

能与蛋白质分子中的氨基基团反应形成稳定的共价键。玻片具有不浸润性，可以制作密度很高的蛋白芯片（2500 点/cm²），同时还可使反应体积降低到最小；玻片的荧光信号本底低，不会造成很强的背景干扰；玻璃芯片可使用双荧光甚至多荧光杂交系统，可在一个反应中同时对两个以上的样本进行平行处理。

2) 膜

与玻片相比，膜的优点是蛋白亲和力强，检测技术成熟，通常无需另外包被。硝酸纤维膜、尼龙膜、PVDF 膜等都是带有微孔的滤膜，其孔径一般在 0.45μm~15μm 左右，在显微镜下这种膜就是一个立体的纤维网络，可以结合更多的蛋白质 IgY 探针，使检测更加灵敏。同时，这种多孔结构可使液体在其中进行自由扩散，当在膜的一端给以液体扩散压力时，液体将沿一定方向扩散，例如沿条状膜条的单方向扩散。因此硝酸纤维膜及其他层析膜，既是立体的网络固定载体，又是层析的良好材料，是制作低密度层析蛋白芯片的最佳支撑载体。

S&S 公司的 CAST Slides (Cat. No. 10484181) 将 SuperCharge 正电荷尼龙膜附着在玻片上，这种特殊的玻片综合了尼龙膜的高亲和力和玻片刚性的优点，而 FAST Slides (Cat. No. 10484182) 则是在玻片表面包被一种硝酸纤维膜材料，能与蛋白质以非共价但是不可逆的方式结合。由于表面包被层的多孔性和厚度使单位面积的蛋白质结合能力比常规化学表面处理玻片要高得多，使得检测更加灵敏。适用的检测方法包括同位素检测、化学发光法和荧光检测——由于包被的多聚物有效降低对入射光的散射，FAST Slide 同样适合用激光共聚焦成像系统进行荧光扫描检测。

6. 膜蛋白抗原蛋白芯片检测流程：

- 1) 膜蛋白溶脱技术 使用适当的溶脱技术将蛋白从细胞膜上解离下来，因为待检测蛋白质物质是混合体，该方法必须涵盖所有被检测的蛋白。一般采用复合去污剂溶脱方法；
- 2) 膜蛋白直接标记技术 膜蛋白的标记涉及到标记物的选择、标记条件的控制等；可采用 FITC、Cy3、Cy5 等荧光物质标记；
- 3) 游离标记物快速分离技术 游离标记物的分离也是该蛋白芯片检测中的关键技术，适当的分离技术既能完全分离去除所有的游离的非标记物，又能快速简单的操作；游离标记物的分离目前主要采用滤膜离心法、层析离心法、离子交换层析法等，其中 Sephadex G-25 柱层析可以快速有效的去除游离非标记物。
- 4) 被检测物与蛋白芯片的反应 将上述收集的洗脱液加入经孵育缓冲液（10mM Tris, 2mM EDTA, 4% BSA, 0.5mM PMSF, pH 7.5）稀释，加到玻片孵育槽中，反应一定时间，洗去非结合蛋白，晾干待检。

7. 血清蛋白检测芯片的检测流程：

- 1) 抗体固定技术，同细胞膜蛋白抗原检测方法；
- 2) 取外周血、分离血清，夹心法可以直接芯片检测；
- 3) 直接标记法需经去脂和适当稀释；
- 4) 血清蛋白标记，Sephadex G-25 柱层析去除游离标记物；

- 5) 与芯片反应, 洗去游离非结合蛋白质, 晾干待检。
- 8. 蛋白芯片的检测过程
 - 1) 激光扫描仪扫描
激光扫描技术, 是目前最敏感也是最复杂的检测技术, 但需要昂贵的扫描仪 (例如 ScanArray 5000), 这些扫描仪具有很高的分辨率, 可用于高密度蛋白芯片的检测。
 - 2) 酶联显色或化学发光技术
本发明还可采用显色技术进行检测, 例如酶联显色技术和化学发光技术, 这些技术适用于低密度蛋白芯片的检测, 不需昂贵设备。
 - 3) 胶体金免疫层析技术
在所检测的项目较少时, 可以采用胶体金层析检测技术, 由于胶体金本身具有颜色, 可以省去标记显色过程, 同时胶体金层析检测过程快速, 不需特殊仪器, 但是检测灵敏度有所降低。
- 9. 资料分析
一般借助扫描仪自带软件进行数据处理分析。

以下根据实例和附图解释本发明的实施过程。

图 1. 真核细胞表达质粒结构。

- 图 1a. pcDNA3.1/GS。
- 图 1b. pVIV02。

图 2. IgY 蛋白芯片制作流程。

图 3. 胶体金夹心层析检测法。

- | | | | |
|---|-----------|----|---------------|
| 1 | 样本垫 (加样区) | 7 | 吸水垫 |
| 2 | 胶体金试剂垫 | 8 | 固定的 IgY 探针 |
| 3 | 硝酸纤维膜层析区 | 9 | 检测的 IgY 抗体 |
| 4 | 测试区 | 10 | 胶体金颗粒 |
| 5 | 对照区 | 11 | 抗 IgY 抗体 (对照) |
| 6 | 支撑膜 | | |

实例 1. 真核细胞表达质粒的制备操作

- 1. 用 Bgl II (根据需要选择) 酶切目的基因 (PCR 产物或 cDNA 克隆)
 - 1) 目标基因 5 μ (5 μ g); Bgl II 2 μ l (10U/ μ l); 酶切缓冲液 B 5 μ l (10 $\times$); ddH₂O; 37 $^{\circ}$ C 水浴 2~3 小时。
 - 2) 取 5 μ l 酶切反应液, 加入 5 μ l 2 $\times$ 样品缓冲液, 电泳 (电泳液用 0.5 $\times$ TAE),

电泳后,在紫外灯下观察,应该所需的目标基因的条带。

- 3) 将剩余酶切样品,加入制备用琼脂糖胶加样孔中,电泳。用手术刀片切下所需的条带,将不含 DNA 的琼脂糖尽量去除。
- 4) 置琼脂糖于 1.5ml 离心管中。加入 3 倍体积的胶溶解缓冲液,56℃水浴 10 分钟。
- 5) 待胶完全溶解后,加入 10 μ l 玻璃奶,置室温 10 分钟,其间经常振动使玻璃粉保持悬浮状态。
- 6) 15000r/min 离心 30 秒,弃去上清,加入 500 μ l 洗液,悬起玻璃粉,重复洗 3 次;
- 7) 吸去管内残余液体,室温空气干燥。
- 8) 加入 20 μ l ddH₂O,悬起玻璃粉,置室温 20 分钟。
- 9) 15000r/min 离心 1 分钟,将上清移至另一新离心管,置-20℃保存。如果重复上一步骤,可以提高 DNA 回收率。

2. 用 Bgl II 酶切 pcDNA3 及去磷酸化

- 1) pcDNA3 2 μ l (2 μ l); Bgl II 2 μ l (10U/ μ l); 酶切缓冲液 B 4 μ l (10 $\times$); ddH₂O 32 μ l; 37℃水浴 2~3 小时。
- 2) 取 5 μ l 酶切反应液,进行琼脂糖凝胶电泳,检查酶切是否完全,酶切完全时,应该仅见到一条 5.4kb 左右的 DNA 带。
- 3) 酶切完全后,加 65 μ l TE 到离心管中,再加等量酚,充分混合后,15000r/min 离心 10 分钟。
- 4) 将上层水相移至另一离心管,加入等量氯仿,充分混合后,15000/min 离心 10 分钟。
- 5) 将上层水相移至另一离心管,加入等量酚/氯仿/异戊醇,充分混合后,15000r/min 离心 10 分钟。
- 6) 将上层水相移至另一离心管,加入 1/10 体积的 5mol/L NaCl、2 倍体积的无水乙醇,置-20℃ 30 分钟。
- 7) 15000r/min 离心 15 分钟,沉淀 DNA,弃去上清,加入 300 μ l 预冷的 70%乙醇,悬起沉淀,15000r/min 离心 15 分钟,弃上清,吸去管内残余液体,室温干燥。
- 8) 加入 17 μ l ddH₂O,溶解 DNA。
- 9) 加 2 μ l CIAP 缓冲液到 DNA 溶液中,然后加 1 μ l CIAP(1 μ g/ μ l),置 37℃ 1 小时。
- 10) 重复步骤 3-7。
- 11) 用 10 μ l ddH₂O 将沉淀悬起,-20℃保存。

3. 连接反应及转化细胞

- 1) 取 5 μ l (约 0.3 μ g) 纯化的目标 DNA 片断、3 μ l (约 0.3 μ g) pc DNA Bgl II 消化完全并去磷酸化)、1 μ l 连接缓冲液(10 $\times$)和 1 μ l (1U) T4 DNA 连接酶,混匀后置 16℃ 8 小时。

- 2) 取-70℃保存的感受态细菌(DH5)一管(100μl), 置冰浴中, 待溶解后使用。
 - 3) 取 2μl 连接产物, 加到溶解的细胞中, 轻轻混匀, 置冰浴 30 分钟。
 - 4) 将试管移至 42℃水浴 1 分钟。
 - 5) 将试管移至冰浴 5 分钟。
 - 6) 加 900μl SOC 培养基(无抗菌素), 置 37℃摇床, 250r/min 振荡培养 1 小时。
 - 7) 取 200μl 细菌, 涂含有氨苄青霉素的琼脂平皿, 37℃培养过夜。
 - 8) 配制 400μl PCR 反应液: 40μl 10×PCR 缓冲液; 32μl 25mmol/L MgCl₂; 32μl 2.5mmol/L dNTPs; 4μl T7 引物, 10μmol/L; 4μl 目标基因反向引物, 10μl μmol/L; 2μl Taq 酶(5U/μl); 286μl ddH₂O。
 - 9) 混合后分到 20 个 PCR 管, 每管 20μl, 标记号码。
 - 10) 取一有氨苄青霉素的琼脂平皿, 划上 5×5 方格, 标记号码。
 - 11) 将过夜培养的平皿取出, 用牙签挑菌落, 先接种划格的平皿, 然后将牙签放到 PCR 管中, 旋转数遍。
 - 12) 将 PCR 管置于 PCR 仪, 循环参数: 95℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 45 秒, 20~30 个循环。
 - 13) 用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果, 在阳性和阴性对照均成立时, 如果样品出现所需的 PCR 产物, 则为 PCR 阳性。
 - 14) 挑选一个 PCR 阳性菌落, 置含 5ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃振荡培养过夜。
 - 15) 将细菌培养液到入 1.5ml 离心管, 15000r/min 离心 30 秒, 弃上清, 吸去管内残留液体。
 - 16) 加入 100μl EDTA、葡萄糖液, 将细菌沉淀完全悬起。
 - 17) 加入 200μl 1% SDS, 0.2mol/L NaOH 液, 充分混匀, 置冰浴 10 分钟。
 - 18) 加入 150μl 3mol/L 醋酸钠液, 充分混匀, 置冰浴 15 分钟。
 - 19) 15000r/min 离心 10 分钟, 将上清移至另一离心管。
 - 20) 酚、氯仿、酚/氯仿/异戊醇各抽提一遍。
 - 21) 将上清移至另一离心管, 加入 1/10 体积 5mol/L NaCl 和 2 倍体积无水乙醇, 混匀, 置-20℃ 30 分钟。
 - 22) 15000r/min 离心 10 分钟, 弃上清, 用预冷的 70%乙醇洗一遍, 室温干燥。
 - 23) 将 DNA 沉淀悬于 40μl TE 中。
 - 24) 用限制性内切酶酶切或 PCR 鉴定所提取质粒是否有目的片段插入, 插入的方向是否正确。如果可能, 应进行瞬时表达或核苷酸序列测定。
4. 大量制备有正确外源基因插入的质粒 DNA (Qiagen Tip100)
- 1) 取 50ml 过夜培养的转化细菌, 用高速离心机沉淀细菌。弃去上清, 将离心管倒置流尽管内液体。
 - 2) 加 4ml P1 缓冲液(试剂盒提供, 下同), 将细菌沉淀完全悬起。
 - 3) 加 4ml P2 缓冲液, 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟。

- 4) 加 4ml P3 缓冲液, 立即轻轻混匀, 4℃离心 30 分钟(大于 15000g)。
- 5) 将 3ml QBT 缓冲液加到 Tip100 柱中, 让液体自行流出, 平衡分离介质。
- 6) 将离心后的上清液加到 Tip100 柱中, 待液体自行流完。
- 7) 用 QC 缓冲液 10ml 洗 Tip100 柱三遍, 待洗液完全流完。
- 8) 加入 5ml QF 洗脱液, 洗脱质粒 DNA。
- 9) 在流出的洗脱液中, 加入 0.7 倍体积室温平衡的异丙醇, 室温或 4℃离心沉淀 DNA。
- 10) 用 70%乙醇洗 DNA, 室温空气干燥 5 分钟, 用适当体积的 TE 或去离子水溶解 DNA。在 OD260 测定 DNA 浓度。

5. 质粒的肌肉注射

- 1) 选取 6 月龄的成熟健康母鸡, 全身麻醉(腹腔注射戊巴比妥钠 75mg/kg), 以防肌肉收缩将 DNA 挤出;
- 2) 将溶于无内毒素的 0.9% NaCl 溶液的真核细胞表达质粒 DNA(浓度约 0.1~2mg/ml), 吸入注射器, 在注射针头上加套一小管, 使针头仅外露 3~5mm, 以保证每次注射时针头扎入的深度一致, 并均处于肌肉中;
- 3) 将针垂直扎入股四头肌, 将 50μl DNA 溶液缓慢地(约大于 10s)、多方向注入肌肉中; 注射两侧的股四头肌;
- 4) 将针头保持原位 5~10s, 以防 DNA 泄漏, 然后再将针头缓慢拔出;
- 5) 每 2 周加强注射一次。30 天以后开始收集鸡蛋, 滴度逐步升高, 并可维持 1~6 个月。为保持高滴度抗体的产生, 每 1 个月加强注射一次。

6. 鸡蛋 IgY 提纯方法(Eggstract IgY, Promega)

- 1) 从冰箱取出鸡蛋, 留置到室温;
- 2) 用蛋黄分离器分离蛋黄, 测量体积;
- 3) 室温下搅拌, 慢慢加入3倍体积的沉淀溶液A(试剂盒提供);
- 4) 搅拌混合5分钟, 10000g 4℃离心10分钟;
- 5) 收集上清, 4层纱布过滤, 上清应该是无色透明液体; 测量体积;
- 6) 室温下搅拌, 慢慢加入1/3体积的沉淀溶液B;
- 7) 搅拌5分钟, 10000g 4℃离心10分钟;
- 8) 弃去上清, 用原体积的PBS重悬IgY, IgY浓度大约2~5mg/ml, 纯度75%;
- 9) 重复6~8步骤, 可以获得90%的IgY纯度;
- 10) 无菌过滤, 4℃ 储存, 长期保存应稀释至2mg/ml, -20℃——70℃保存。

实例 2. 白细胞分化抗原的蛋白芯片(细胞膜蛋白抗体芯片检测法)

我国每年约有 15 万新发病人, 约有 70 万白血病老病人在接受白血病治疗。在新发病的病人中, 均需作一次或数次的白细胞分化抗原(CD)的检测, 目的在于确定白血病的类型以及治疗进程中病人对化疗药物的反应。在老病人中, 绝大多数需要每年进行多次随访, 随访时可根据需要进行白血病细胞 CD 表达的检

测,以监测白血病的发展和制定随后的治疗方案。目前用于白血病 CD 抗原检测的方法是免疫组织化学技术,或是流式细胞仪技术,每次检测一项指标,费时长,费用高。根据现有常用免疫组织化学技术,每个病人在初次入院检查时,用于 CD 抗原检查的开销费用约为 1000 元左右,我国所有新病人(15 万人)每年需支出 1.5 亿元,就是说最低的估计,白血病诊断芯片具有 1.5 亿元的潜在市场,这还不包括约 70 万老病人的检查。

1. 候选白细胞分化抗原基因(表 1)

表 1. 白细胞分化抗原(CD)基因的筛选

CD1A	CDW12	CD27	CD43	CD54	CD66B	CD81	CD101	CD120A	CDW136	CD155
CD1b	CD13	CD28	CD44	CD55	CD66c	CD82	CD102	CD120b	CDw137	CD156a
CD2	CD14	CD29	CD44R	CD56	CD66d	CD83	CD103	CD121a	CD138	CD156b
CD3d	CD15	CD30	CD45	CD57	CD66e	CD84	CD104	CDw121b	CD139	CD157
CD3e	CD15s	CD31	CD46	CD58	CD66f	CD85	CD105	CD122	CD140a	CD158
CD3g	CD15u	CD32	CD47	CD59	CD68	CD86	CD106	CD123	CD149b	CD159a
CD4	CD16a	CD33	CD47R	CD60a	CD69	CD88	CD107a	CD124	CD141	CD160
CD5	CD16b	CD34	CD48	CD60b	CD70	CD90	CD107b	CDw125	CD142	CD161
CD6	CDw17	CD35	CD49a	CD60c	CD71	CD91	CD108	CD126	CD143	CD162
CD7	CD18	CD36	CD49b	CD61	CD72	CD92	CD109	CD127	CDw145	CD162R
CD8a	CD19	CD37	CD49c	CD62E	CD73	CDw93	CD110	CDw128a	CD146	CD163
CD8b	CD20	CD38	CD49d	CD62L	CD74	CD94	CD111	CDw128b	CD147	CD164
CD9	CD21	CD39	CD49e	CD62P	CD75	CD95	CD112	CD130	CD148	CD165
CD10	CD22	CD40	CD49f	CD63	CD75s	CD96	CD114	CDw131	CD150	CD166
CD11a	CD23	CD41	CD50	CD64	CD77	CD97	CD115	CD132	CD151	
CD11b	CD24	CD42a	CD51	CD65	CD79a	CD98	CD116	CD133	CD152	
CD11c	CD25	CD42b	CD52	CD65s	CD79b	CD99	CD117	CD134	CD153	
CD11d	CD26	CD42c	CD53	CD66a	CD80	CD100	CDw119	CD135	CD154	

2. 将上述候选基因的全部或部分白细胞分化抗原(CD)的基因通过定向克隆的方式插入到 pcDNA3(Invitrogen)或 pBK-CMV 质粒中去,然后转化大肠杆菌,通过克隆、筛选、扩增,获得大量带有特定基因的表达克隆。使用时收集并裂解细菌,通过适当方法(Qiagen Tip100)将质粒抽提出来,并进行纯化。
3. DNA 免疫 将上述纯化的 DNA 表达质粒分别按照 DNA 免疫的程序注射到鸡的肌肉中去。将总量 100 μ g 的 DNA 溶解在 200 μ l 0.9%生理盐水中,分 3 次多部位注射到鸡的肌肉内(100 μ g/kg 体重),每 2 周加强注射一次。30 天以后开始收集鸡蛋,滴度逐步升高,并可维持 1—6 个月。
4. IgY 的纯化 从鸡蛋中纯化 IgY 时,首先用纯化系统中的一种分离器将蛋白和蛋黄分开。用沉淀溶液 A 将蛋黄中大量的脂肪除去。用溶液 B 进一步纯化抗体。用这两种溶液沉淀得到 75%纯度的 IgY 抗体。进一步用溶液 B 沉淀可得到大约 90%纯度的 IgY 抗体。
5. IgY 抗体列阵点样 将制备的 IgY 抗体按一定顺序加到点样机的样品板中,

启动点样机或者喷印机（如 Telechem 公司 SpotBot Personal Microarrayer; Cartesian Technology 公司的 MicroSys 5100 小型台式芯片工作站; PixSys 5500 PA Workstation), 准确、快速地将不同蛋白质抗体 IgY 定量点样于经过醛基包被的硅烷玻片, 每个 IgY 点样 2-3 次, 采用 β -actin 等细胞内表达相对稳定的蛋白 IgY 作为内控制。蛋白点样完成后, 芯片在室温水化条件下, 结合 2 小时, 用含有 2% BSA 的 10mM PBS 冲洗, 在该 PBS 液中反应 1 小时, 取出, 蒸馏水冲洗, 室温晾干, 在放有干燥剂的密封盒中 4℃ 保存。

6. 芯片检测过程

- 1) 白细胞膜蛋白溶脱 使用适当的溶脱技术将蛋白从细胞膜上解离下来, 因为待检测蛋白质物质是混合体, 该方法必须涵盖所有被检测的蛋白。收集 10^7 细胞, 冷 PBS (10mM PBS; 150mM NaCl; 1.5mM PMSF; pH 7.5) 洗 2 次, 加入 1 ml 抽提标记液 (15mM PBS, 120mM NaCl, 25mM KCl, 2mM EGTA, 2mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.5% Triton X-100, 10mg/ml leupetin, 0.5mM PMSF), 4℃ 孵育 30 分钟; 14000rpm 4℃ 离心 15 分钟, 收集上清液;
- 2) 蛋白标记技术 用 BCA 方法检测抽上清液中的蛋白质浓度, 并调整蛋白浓度为 1.1mg/ml, 每 ml 加入 50 μ g FITC 或其他荧光标记物, 4℃ 反应 90 分钟; 如果用于比较分析, 可以将 2 份标本分别采用不同波长的荧光素标记, 如 Cy3 和 Cy5。标记反应完成后加入 1/10 体积的 0.1M 羟胺 (pH7.5) 终止反应。
- 3) 游离标记物快速分离技术 游离标记物的分离也是该蛋白芯片检测中的关键技术, 适当的分离技术既能完全分离去除所有的游离的非标记物, 又能快速简单的操作; 本发明采用 PD-10 去盐层析 (Amershan Biosciences) 分离游离荧光物质, 洗脱时收集第二个荧光带 (蛋白部分), 如有蛋白检测仪, 可以分段收集, 监测蛋白质浓度, 一般洗脱液中, 可以达到 0.2mg/ml 的蛋白质。
- 4) 孵育检测 将 1ml 收集的洗脱液加入 3ml 孵育缓冲液 (10mM Tris, 2mM EDTA, 4% BSA, 0.5mM PMSF, pH 7.5) 混匀, 加到玻片孵育槽中, 如是 2 个样本分别用 Cy3 和 Cy5 标记的洗脱液, 则等比例混匀, 一同孵育。孵育时间为 1 小时, 孵育槽应放在震摇器上, 每分钟 15 次左右的频率摇动。
- 5) 检测扫描技术 根据所标记的荧光物质, 选用适当的激光波长扫描, 获取图像进行比较分析。如是贴膜的玻片, 还可采用酶标显色技术进行检测。

实例 3. 血清细胞因子检测蛋白芯片 (体液蛋白抗体芯片检测法)

血清细胞因子的检测, 包括各种血清因子, 血细胞生长因子、白介素系列、干扰素系列。

1. 候选基因的筛选 主要是细胞因子、免疫调节因子 (白细胞介素、干扰素)、趋化因子等, 见表 2。

表 2. 用于构建血清细胞因子蛋白芯片的部分血清细胞因子

4-1bbl	Activin A(β a)	ALCAM	Angiopoietin-1	B7-2	Bmp-2
--------	-----------------------	-------	----------------	------	-------

4-1BBL	Activin B(β b)	Amphiregulin	Angiopoietin-2	BCAM	BMP-3
6Ckine	Decorin	Angiogenin	April	BDNF	MIC-1
BMP-6	DNAM	FGF-11	AXL	Betacellulin	Midkine
BMP-7	EBAF	FGF-12	B7-1	BLC/BCA-1	MIF
BMP-8	E-Cadherin	FGF-13	IFN- α/β R α	IL-7	MIG
Bob	EMMPRIN	FGF-14	IFN- α/β R β	IL-8	MIP-1
CAD-11	ENA-78	FGF-16	IFN- β	IL-9	MIP-1 α
CAD-12	Endoglin	FGF-17	IFN- γ	Inhibin A(α)	MIP-1 β
CAD-5	β -NGF	FGF-18	IFN- γ	iNOS	MIP-3 α
CAD-8	Endothelin-2	FGF-3	IFN- γ	Integrin- α 1	MIP-3 β
Caspase-1	Endothelin-3	FGF-4	IGF BP 1	Integrin- α 2	MMP-1
c-kit Ligand	eNOS	FGF-5	IGF BP 4	Integrin- α 3	MMP-10
c-kit Ligand	Eotaxin	FGF-6	IGF BP 5	Integrin- α 4	MMP-12
CKRL-1	Eotaxin-2	FGF-7	IGF BP 6	Integrin- α 5	MMP-13
CKRL-2	EpCAM	FGF-9	IGF BP 7	Integrin- α 6	MMP-14
c-met	EphA1	Flk-1	IGF BP 8	Integrin- α 7	MMP-15
CNTF	EphA2	Flt-3Ligand	IGF-I	Integrin- α 8	MMP-3
Cripto	EphA3	Follistatin	IGF-II	Integrin- α 9	MMP-7
CTLA-4	EphA4	Fractalkine	IK	Integrin- α E	MMP-8
Cyclophilin A	EphA7	Furin	IL-10	Integrin- α L	MMP-9
Plasminogen	EphB1	GAPDH	IL-11	Integrin- α V	MPIF-1
PP14	EphB2	G-CSF	IL-12 p35	Integrin- β 1	MSP
PREF-1	EphB3	GDNF	IL-12 p40	Integrin- β 2	MUSK
Prolactin	EphB4	GM-CSF	IL-13	Integrin- β 3	N-Cadherin
P-Selectin	EphB6	gp130	IL-15	Integrin- β 4	NCAM
pUC19	Ephrin-A1	GPR-17	IL-16	Integrin- β 5	Neuritin
RANK	Ephrin-A2	GPR-19	IL-17	Integrin- β 6	Neuropilin-1
RANTES	Ephrin-A3	GPR-24	IL-18	Integrin- β 7	Neuropilin-2
R-Cadherin	Ephrin-A4	GPR-3	IL-1ra	Integrin- β 8	nNOS
RDC-1	Ephrin-A5	GPR-31	IL-1 α	IP-10	NT-3
SPC4	Ephrin-B1	GPR-5	IL-1 β	K-Cadherin	NT-4
ST2	Epo	GRO- α	IL-2	L19	Oncostatin M
STRL33/Bonzo	erbB1	GRO- β	IL-3	LAMP	Osteopontin
TECK	erbB3	GRO- γ	IL-4	LDGF	Osteoprotegerin
TGF- α	erbB4	HB-EGF	IL-6	Leptin	OX40L
TGF- β 1	E-Selectin	HCC-1	TIMP-1	LIF	PARC
TGF- β 2	Fas	HCC-4	TIMP-2	LIGHT	PBEF
TGF- β RI	FasL	HGF	TIMP-3	L-Selectin	P-Cadherin

TGF- β RII	FGF acidic	HPRT	TIMP-4	LT- β R	PD-ECGF
TGF- β RIII	FGF basic	HVEM	TNF-A382	Lymphotoxin	PDGF-A Chain
Tie-2	FGF-10	I-309	TNF- β	Lymphotoxin β	PDGF-B Chain
TRAIL	SARP-1	ICAM-1+C110+C281	TOSO	MCAM	PECAM
TRAIL R4	SARP-3	ICAM-2	Tpo	MCP-1	Pieiotrophin
TRANCE	SDF-1	ICAM-3	VEGF-B	MCP-2	PIGF
Transferrin R	Semaphorin F	TACE	VEGF-D	MCP-3	PIN
TrkA	Semaphorin III/D	TARC	α -Tubulin	MCP-4	TWEAK
TrkB	SLAM		β 2 M	M-CSF	VCAM-1
TrkC	SMDF		β -Actin	MDC	VEGF

2. 将上述候选基因通过定向克隆的方式插入到 pcDNA3 质粒中去, 然后转化大肠杆菌, 通过克隆、筛选、扩增, 获得大量带有特定基因的表达克隆。使用时收集并裂解细菌, 通过适当方法 (Qiagen Tip 100) 将质粒抽提出来, 并进行纯化。

3. DNA 免疫 通过基因枪技术将质粒 DNA 导入鸡皮下组织中去:

- 1) 在上述定向克隆的 cDNA 质粒 DNA (1mg/ml) 取 10 μ l 加到 1.5ml 离心管中, 再加入 25 μ l 微颗粒 (约 10 μ g), 50 μ l CaCl₂ (2.5mol/L) 及 50 μ l 亚精胶 (0.1mol/L), 混匀后静置 10 分钟, 以利于 DNA 包裹于微颗粒表面;
- 2) 离心 (10000r/分钟), 5 分钟后, 去上清, 用 70% 乙醇洗一遍;
- 3) 离心 (10000r/分钟), 5 分钟后, 去上清, 用无水乙醇洗一遍
- 4) 离心去上清, 将沉淀重悬于 100ml 无水乙醇中;
- 5) 将包有 DNA 质粒微颗粒悬液用微量移液器加到基因枪载体上, 于室温下晾干, 真空保存;
- 6) 使用时将微颗粒的载体用甘油粘贴于基因枪 Kapton 盘下, 紧贴待导入的部位, 启动基因枪, 驱动微颗粒进入上皮组织。

分 3 次多部位打入到鸡的皮内/皮下组织内, 每 2 周加强一次。30 天以后开始收集鸡蛋, 滴度逐步升高, 并可维持 1—6 个月。为保持高滴度抗体的产生, 每 1 个月加强一次。收集的鸡蛋用于步骤 4 的 IgY 纯化。

4. IgY 的纯化 采用 EGGstractIgY 纯化系统 (Promega) 从蛋黄中提纯 IgY。从鸡蛋中纯化 IgY 时, 首先用纯化系统中的一种分离器将蛋白和蛋黄分开。用沉淀溶液 A 将蛋黄中大量的脂肪除去。用溶液 B 进一步纯化抗体。用这两种溶液沉淀得到 75% 纯度的 IgY 抗体。进一步用溶液 B 沉淀可得到大约 90% 纯度的 IgY 抗体。

5. IgY 抗体列阵点样 将制备的 IgY 抗体按一定顺序加到点样机的样品微板中, 启动点样机 SpotArray (PerkinElmer), 将不同 IgY 抗体定量点样于经过醛基包被的硅烷玻片, 每个 IgY 点样 2—3 次, 采用抗 β -actin 的 IgY 作为内

控制。蛋白点样完成后，芯片在室温水化条件下，结合 2 小时，用含有 2% BSA 的 10mM PBS 冲洗，在该 PBS 液中反应 1 小时，取出，蒸馏水冲洗，室温晾干，在放有干燥剂的密封盒中 4℃ 保存。

6. 血清细胞因子蛋白芯片的检测操作

1) 去脂

血清含有不少脂质物质，应去脂，以防止脂质物质干扰荧光物质的标记、游离物的分离去除以及较少最后的本底。乙醚是最常用的有机溶剂，其优点是去脂效果好，挥发快。去脂时，将 0.2ml 血清加 0.8ml 乙醚，在室温下不断摇动 5 分钟，将上层带脂溶剂去掉，换入新鲜乙醚，继续摇动，反复去脂，直至乙醚不再有色为止。去除乙醚。

2) 荧光标记

将去脂血清用 10mM PBS (pH 7.6) 稀释，并调整蛋白浓度至 1mg 蛋白/ml，每 ml 加 50 μ g FITC (1mg/ml, DMSO 稀释)，混匀，4℃ 反应 90 分钟；如果用于比较分析，可以将 2 份标本分别采用不同波长的荧光素标记，如 Cy3 和 Cy5。标记反应完成后加入 0.1M 羟胺 (pH7.5) 终止反应。

3) 游离荧光物质的分离

采用 PD-10 去盐柱层析 (Amersham Biosciences) 分离游离荧光物质，洗脱时收集第二个荧光带 (蛋白部分)，如有蛋白检测仪，可以分段收集，监测蛋白质浓度，一般洗脱液中，可以达到 0.2mg/ml 的蛋白质。

4) 孵育检测

将 1ml 收集的洗脱液加入 3ml 孵育缓冲液 (10mM Tris, 2mM EDTA, 4% BSA, 0.5mM PMSF, pH 7.5) 混匀，加到玻片孵育槽中，如是 2 个样本分别用 Cy3 和 Cy5 标记的洗脱液，则等比例混匀，一同孵育。孵育时间为 1 小时，孵育槽应放在震摇器上，每分钟 15 次左右的频率摇动。

5) 芯片扫描

根据所标记的荧光物质，选用适当的激光波长扫描，获取图像进行比较分析。如是贴膜的玻片，还可采用酶标显色技术进行检测。

实例 4. 血清肿瘤标志物检测蛋白芯片 (IgY-抗原-IgY-胶体金法)

九十年代我国肿瘤发病率已上升为 0.127%。过去 20 年中肿瘤发病率总体呈上升之势。近几年来国内每年新增肿瘤病人 200 万人，死亡 130 多万人左右，目前全国肿瘤患者总数估计在 450 万人左右。保守估计，我国每年将有 200 万人接收肿瘤的早期筛查，200 万肿瘤患者接收肿瘤标志物的检测，每年将有 400 万份肿瘤筛选与诊断芯片的市场。假定每份检测费用为 200 元，将有 8 亿元潜在市场。

1. 候选基因的筛选

肿瘤血清标志物检测芯片，包含 TSGF、PSA、PAP、CA 125、CEA、AFP、HCG、CA 19-9、CA 15-3、CA 27-29、LDH、NSE 以及一些肿瘤基因产物、肿瘤相关酶类和肿瘤耐药基因产物等；

2. cDNA 真核表达质粒的构建 参见实例 2 步骤 2。

3. DNA 免疫和 IgY 抗体的抽提和纯化 参见实例 2 步骤 3 和 4。

4. 蛋白芯片的构建

采用胶体金层析检测。免疫层析试验采用 IgY 抗体夹心法（图 3）。将多个试剂组合在一个约 6mm×70mm 的塑料板条上，成为单一试剂条，试剂条上端 7 和下端 1 分别粘贴吸水材料和玻璃纤维样本垫，免疫金复合物干片粘贴在近下端 2 处，紧贴其上为硝酸纤维素膜条 3。硝酸纤维素膜条 3 上有数个测试区，测试区 4 包被有 IgY 特异抗体 8，对照区 5 包被有抗 IgY 的 IgG 抗体 11。

1) 膜条准备

采用 Millipore 公司的中等流速的硝酸纤维膜。试剂垫、样本垫、吸收垫等均可采用 Millipore 或 Whatman 公司的产品。

2) 喷样

将 IgY 抗体浓度调节至 1-3mg/ml，应用微量喷膜机（BioDot），将抗体溶液喷线于膜的相应位置，喷膜的抗体量为 1μl/cm，室温真空抽干，使抗体探针牢固地固定于硝酸纤维膜的表面。干燥后的膜应保存于干燥和 4℃ 环境。

3) 胶体金制备技术

制备方法胶体金的制备多采用还原法。将 HauCl_4 先配制成 0.01% 水溶液，取 100ml 加热至沸。搅动下准确加入 1.5ml 的 1% 柠檬酸三钠（ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）水溶液。继续加热煮沸 15min。此时可观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变灰色，续而转成黑色，随后逐渐稳定成红色。全过程约 2~3min。冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积。

4) 胶体金标记 IgY

用胶体金标记蛋白质，就是指蛋白质吸附到胶体金颗粒表面。胶体金表面带有负电荷，能与蛋白质的正电荷静电吸引而形成牢固的结合。由于这种结合主要是物理作用，所以不会引起蛋白质活性的改变。标记前，需确定胶体金与待标记蛋白质的比例和将 pH 值调节到标记蛋白质的等电点或略高（pH7.6）。标记时，将待标记 IgY 1mg 加 15ml 胶体金溶液（1 OD），混合，室温搅拌 15 分钟，加入 10mg BSA，混合 5 分钟，再加入 pH7.0 的 10% NaCl 溶液 0.3ml，混匀，离心，再通过离心法或凝胶层析法纯化标记的蛋白质。

5) 切割与芯片装配

采用切割机将复合好的膜片切成所需的规格和形状，即成单人用检测试剂膜条。将单人分试剂膜条及干燥剂装入铝薄膜小袋并封闭。或将单人分检测膜条装配在小型塑料盒，配以相应的层析液小袋和吸水纤维，制成完整的检测装置，然后将检测装置放置在干燥袋内。

6) 层析检测

测定时将膜条下端 1 浸入被检液体标本中，由于层析效应，液体向上端 7 移动，流经胶体金试剂垫 2 处时使干片上的免疫金复合物复溶，并带动其向膜条渗移。若标本中有待测特异抗原，其时可与免疫金复合物之抗体结合，此抗原抗体复合物流至测试区 4 即被固相抗体所获，在膜上显出红色反应线条。过剩的免疫金复合物继续前行，至参照区 5 与固相兔抗 IgY 的 IgG 结合，而显出红色质控线条。反之，阴性标本则无反应线条，而仅

显示质控线条。

层析 5~30 分钟，肉眼观察结果，也可将检测膜条干燥后，应用一般平板扫描仪扫描，将结果输入电脑并分析、报告。

实例 5 心血管疾病预警蛋白芯片（胶体金直接标记血清蛋白法）

心血管冠心病、心肌梗死早期诊断芯片，如诊断心肌损伤的心肌肌钙蛋白 T、脂肪酸结合蛋白、斑块不稳定的可溶性细胞间粘附分子-1、C 反应蛋白、淀粉样蛋白 A、细胞色素 C、纤维原、补体 C9 等抗体构建心肌梗塞早期诊断芯片。

1. 候选基因的筛选

包括心肌肌钙蛋白 I/T、肌红蛋白(Mb)、肌酸激酶(CK-MB)、脂肪酸结合蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、C 反应蛋白、淀粉样蛋白 A、细胞色素 C、纤维原、TPP、E-6、TNF- α 、P-Selectin、补体 C9 等。

2. cDNA 真核表达质粒的构建 参见实例 2 步骤 2。

3. DNA 免疫和 IgY 抗体的抽提和纯化 参见实例 2 步骤 3 和 4。

4. 蛋白芯片的构建

采用胶体金层析检测（参见实例 4 第四步）。采用 Millipore 公司的中等流速的硝酸纤维膜。试剂垫、样本垫、吸收垫等均可采用 Millipore 或 Whatman 公司的产品。

5. IgY 抗体喷样

将 IgY 抗体浓度调节至 1-3mg/ml，应用微量喷膜机 (BioDot)，将抗体溶液喷线于膜的相应位置，喷膜的抗体量为 1 μ l/cm，室温真空抽干，使抗体探针牢固地固定于硝酸纤维膜的表面。干燥后的膜应保存于干燥和 4 $^{\circ}$ C 环境。

6. 切割与芯片装配

采用切割机将复合好的膜片切成所需的规格和形状，即成单人用检测试剂膜条。将单人分试剂膜条及干燥剂装入铝薄膜小袋并封闭。或将单人分检测膜条装配在小型塑料盒，配以相应的层析液小袋和吸水纤维，制成完整的检测装置，然后将检测装置放置在干燥袋内。

7. 血清去脂

去脂时，将 0.2ml 血清加 0.8ml 乙醚，在室温下不断摇动 5 分钟，将上层带脂溶剂去掉，换入新鲜乙醚，继续摇动，反复去脂，直至乙醚不再有色为止。去除乙醚。将蛋白浓度用 10mM PBS (pH 7.6) 调节至 1mg/ml。

8. 胶体金直接标记

取 0.1ml 上述去脂稀释血清，加入到 1ml 胶体金溶液 (pH 7.6)。混合，室温放置 10 分钟，加入 100 μ l 5% BSA，混合 5 分钟，再通过离心法或凝胶层析法纯化标记的蛋白质。

9. 层析检测

检测时将膜的胶体金的一端浸于检测样品内，或者将样本加于加样孔内，层析 5~30 分钟，肉眼观察结果，也可将检测膜条干燥后，应用一般平板扫描仪扫描，将结果输入电脑并分析、报告。

图 1.

图 1a.

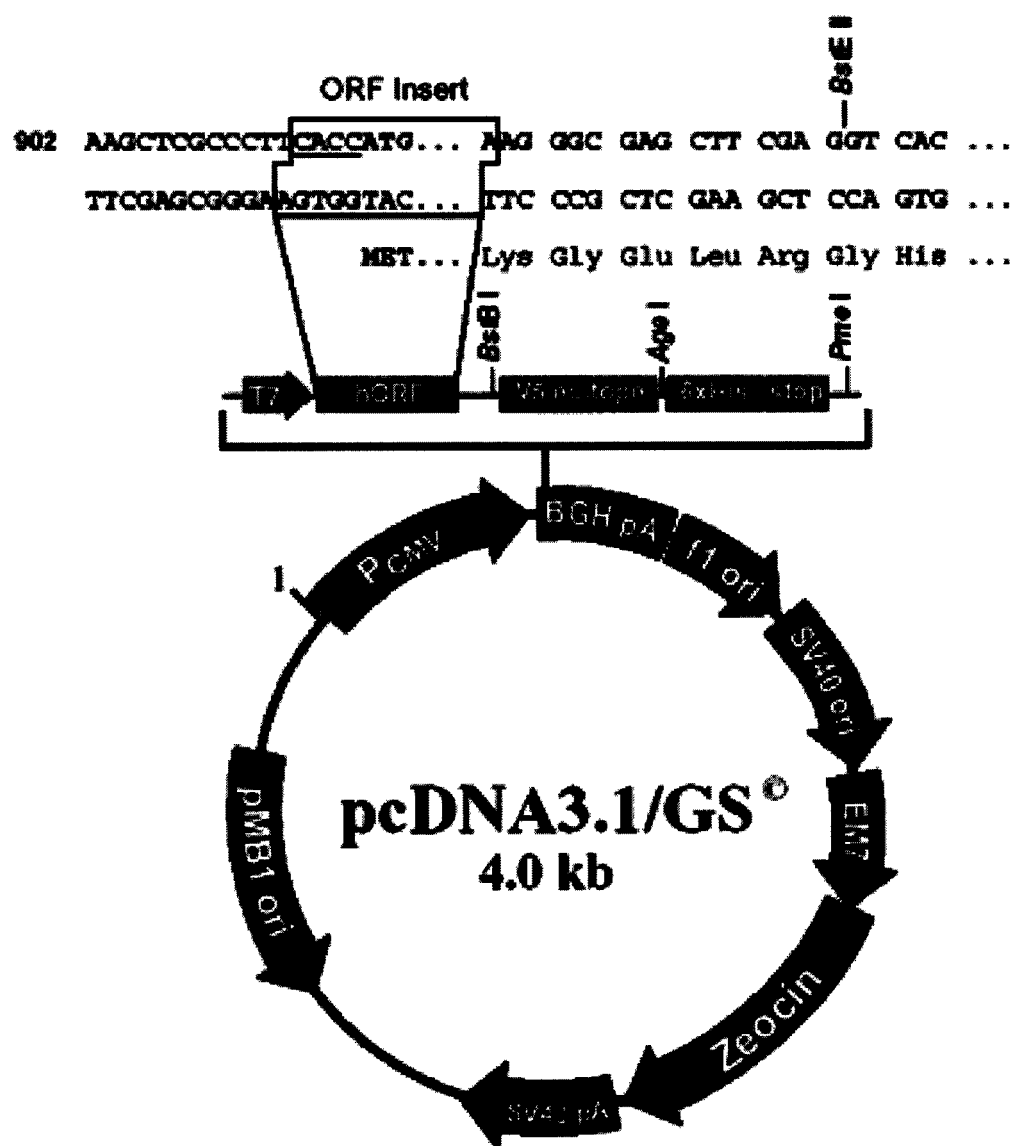


图 1b.

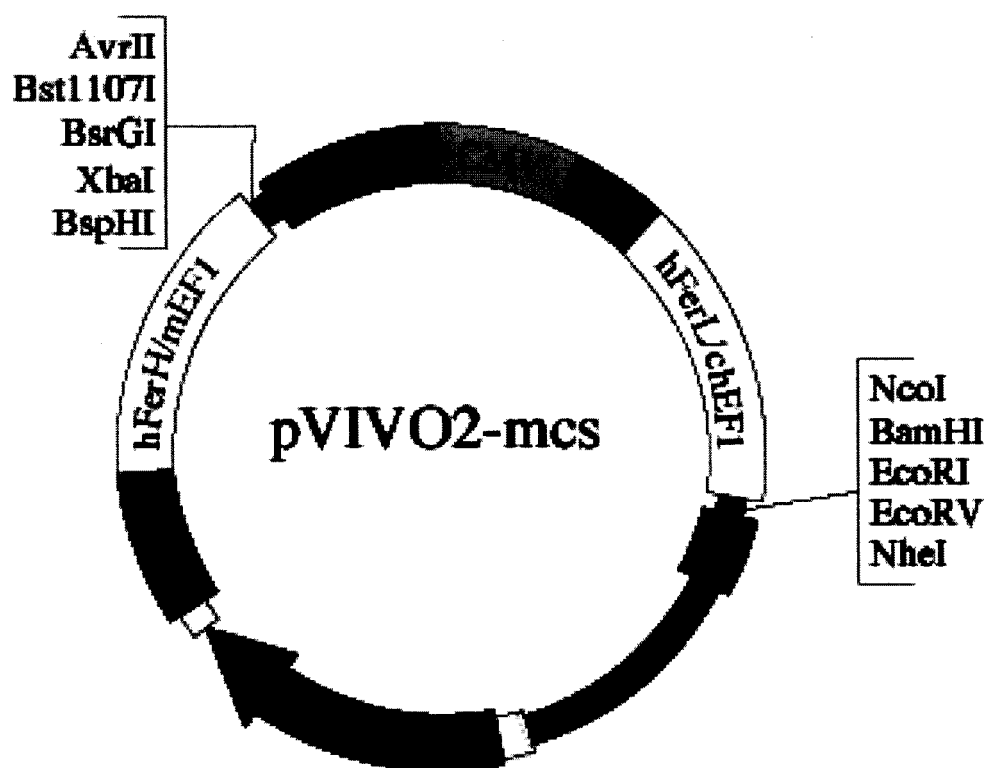


图 2.

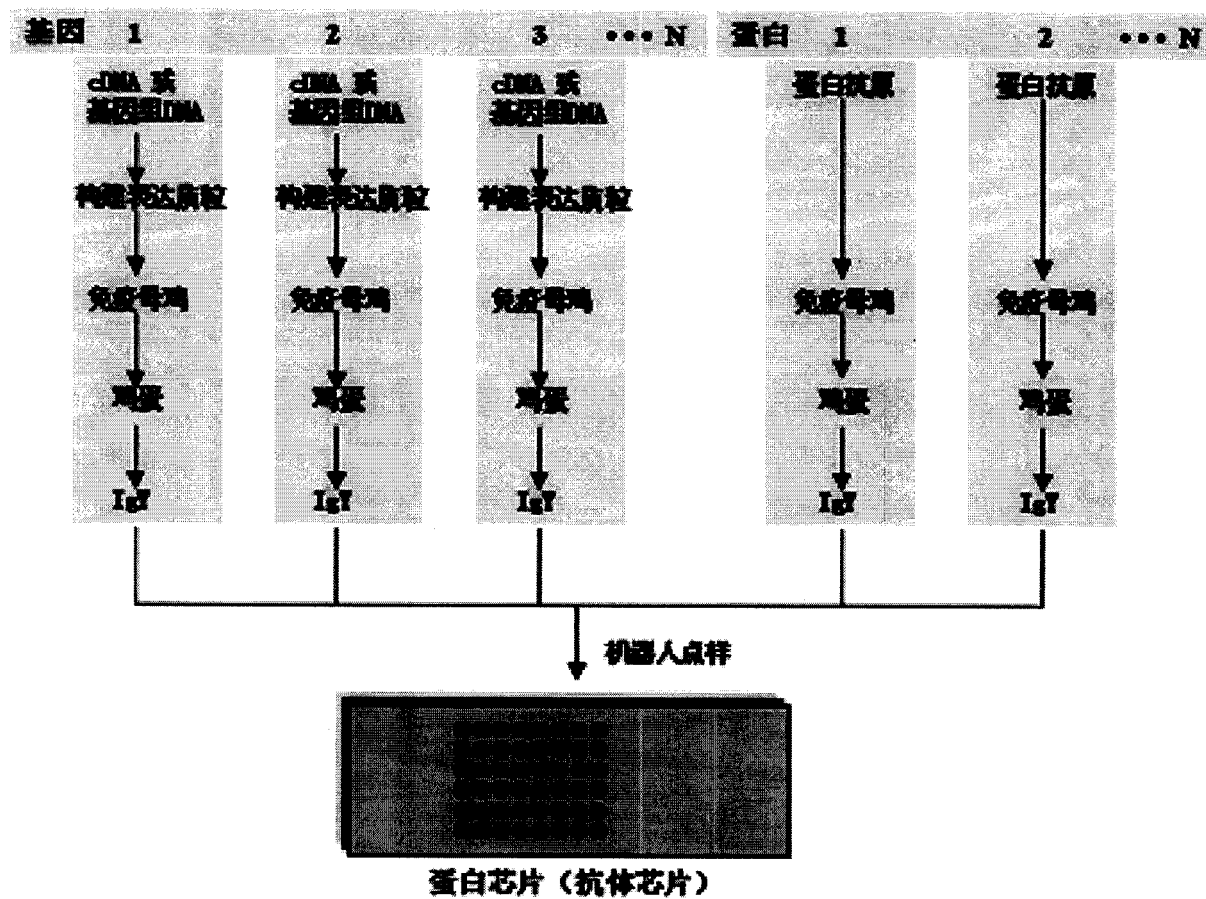
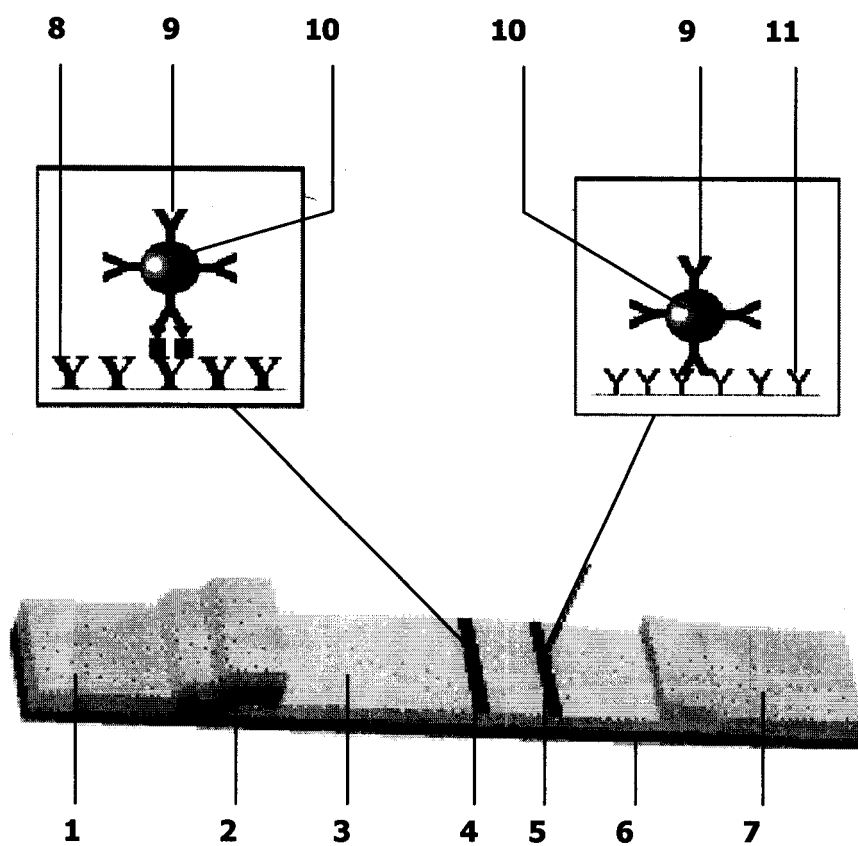


图 3.



专利名称(译)	高通量IgY抗体芯片构建技术		
公开(公告)号	CN1479098A	公开(公告)日	2004-03-03
申请号	CN02136668.3	申请日	2002-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	缪金明		
申请(专利权)人(译)	缪金明		
当前申请(专利权)人(译)	缪金明		
[标]发明人	缪金明		
发明人	缪金明		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是涉及一种IgY(Yolk Immunoglobulin)高通量蛋白芯片的制作技术，以及采用这种技术开发的四种蛋白质芯片产品。本发明采用候选抗原蛋白直接免疫母鸡；或将候选抗原cDNA构建cDNA真核表达质粒，再将DNA真核表达质粒免疫母鸡；收集鸡蛋，从蛋黄中分离纯化抗原特异的IgY抗体；利用玻片或多孔滤膜构建IgY蛋白芯片。由于IgY具有亲和力高(100倍以上)、与之结合的二抗多(3~5倍)、交叉反应小、不与蛋白A、G、哺乳动物抗体Fc段、补体等结合、耐酸耐热等优点，是构建蛋白芯片的最佳材料。本发明还应用该技术开发了白细胞分化抗原检测芯片、血清细胞因子检测芯片、血清肿瘤标志物检测芯片和心肌疾病早期预警芯片等产品。

