[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/00
G01N 33/48 G01N 33/53
G01N 33/543 G01N 33/68
G01N 21/00 G01N 21/64
G01N 21/76

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03117787.5

[43] 公开日 2004 年 7 月 21 日

[11] 公开号 CN 1514243A

[22] 申请日 2003.4.30 [21] 申请号 03117787.5

[71] 申请人 成都夸常科技有限公司
地址 610041 四川省成都市人民南路四段桐梓林中路 1 号芳草地中心会所 6 楼
[72] 发明人 邹方霖 陈春生 陈 宁 王建霞

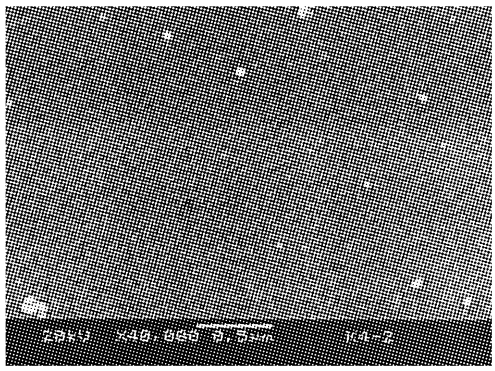
[74] 专利代理机构 成都天元专利事务所
代理人 张 新

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 2 页

[54] 发明名称 对目标物进行定性和/或定量分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种对生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒，更特别是生物芯片分析、酶联免疫 ELISA 分析和试剂条快速分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒，本发明可以提高检测灵敏度或/和降低检测成本或/和提供更大的检测方案选择自由度。



ISSN1008-4274

1、一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其包括下列基本步骤:

a、将目标物或含目标物的物质与检测装置的固相反应器接触并在其中与探针反应,所述固相反应器包括纳米反应器与常规反应器,所述纳米反应器的片基表面上分布有纳米结构;

b、对步骤 a 所述反应的结果进行标记,上述固相反应器为纳米反应器时标记物为常规标记物或/和纳米标记物,上述固相反应器为常规反应器时标记物为纳米标记物或包含纳米标记物的标记系统,所述纳米标记物包括标记物质、配基及纳米结构载体;

c、检出步骤 b 所述标记的结果;

d、根据步骤 c 所述标记结果分析 a 所述反应结果。

2、根据权利要求 1 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其特征在于:所述纳米反应器中的纳米结构为纳米粒子或纳米凹凸结构,所述纳米标记物中的纳米结构为纳米粒子。

3,根据权利要求 2 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其特征在于:所述纳米反应器片基表面上和纳米标记物中的纳米粒子的平均粒径尺寸为 1-1000nm,优选方案为 1-100nm,更优选方案为 1-50nm。

4、根据权利要求 1-3 之一所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其特征在于:所述纳米反应器中的反应包括抗原-抗体反应、单链或多链 DNA、RNA、核苷酸与其配对物的反应及配体-配基反应,所述纳米标记物的标记方法包括自主发光标记法、激发发光标记法、非选择性光反射标记法和选择性光反射标记法。

5、一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:其至少含有一个纳米反应器,所述纳米反应器中片基表面上以大于 1 个/mm^2 的密度分布有纳米结构。

6、根据权利要求 5 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:所述纳米结构为纳米粒子或纳米凹凸结构,其平均尺寸为

1-1000nm、优选方案为 1-100nm、更优选方案为 1-50nm。

7、根据权利要求 6 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置，其特征在于:所述纳米粒子包括金、钒、铅、银及其它金属微粒，氧化硅、氧化钛、氧化铝、氧化铁及其它氧化物微粒，塑料、多糖、乳胶、树脂及其它高分子微粒，还包括上述微粒修饰结合有功能基团和/或功能物的微粒衍生物。

8、根据权利要求 7 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置，其特征在于:所述功能基团包括胺基、胺基脲、酰基、羧基、羟基、醛基和环氧基。

9、根据权利要求 5-8 之一所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置，其特征在于：其是一种至少含有一个纳米反应器的生物芯片。

10、根据权利要求 9 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置，其特征在于:所述生物芯片中纳米反应器的片基包括透明、有色、反光和多孔膜固相片基。

11、根据权利要求 5-8 之一所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置，其特征在于：其是一种至少含有一个纳米反应器的酶标板。

12、一种对目标物进行定性和/或定量分析的标记物，其特征在于：其含有纳米粒子载体，所述纳米粒子载体平均粒径为 1-1000nm、优选方案为 1-100nm、更优选方案为 1-50nm。

13、根据权利要求 12 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的标记物，其特征在于：所述纳米粒子包括金、钒、铅、银、铁及其它金属微粒，氧化硅、氧化钛、氧化铝、氧化铁及其它氧化物微粒，塑料、多糖、乳胶、树脂及其它高分子微粒，还包括上述微粒修饰结合有功能基团和/或功能物的微粒衍生物。

14、根据权利要求 13 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的标记物，其特征在于:所述功能基团包括胺基、胺基脲、酰基、羧基、羟基、醛基和环氧基。

15、根据权利要求 14 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的标

记物，其特征在于:所述标记物质包括荧光染料、化学发光催化剂、有色金属或有色金属盐、染料和颜料。

16、根据权利要求 15 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的标记物，其特征在于：所述标记物质为下述之一种或几种的组合：罗丹明、荧光素、银盐、酶、碱性黑、碱性紫、胺基黑、考马斯亮蓝、结晶紫、胶体或纳米金、胶体硒。

17、根据权利要求 16 所述的一种对目标物进行定性和/或定量分析的标记物,其特征在于：所述标记物质为在白光下主波长为红色、绿色、蓝色、青色或紫色的物质。

18、一种对目标物进行定性和/或定量分析的检测试剂盒,其至少包含有对目标物进行定性和/或定量分析的检测装置和标记物，其特征在于：当其检测装置为至少含有一个纳米反应器的纳米检测装置,其标记物为常规标记物或/和纳米标记物;当其检测装置为不含纳米反应器的检测装置，其标记物为纳米标记物或包含纳米标记物的标记系统。

19、根据权利要求 18 所述的一种检测试剂盒,其特征在于:其为生物芯片试剂盒。

20、根据权利要求 19 所述的一种检测试剂盒,其特征在于:其为酶联免疫（ELISA）试剂盒。

21、根据权利要求 19 所述的一种检测试剂盒,其特征在于:其为快速检测试剂条试剂盒。

对目标物进行定性和/或定量分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒

技术领域

本发明涉及一种对样品、尤其是对生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒，更特别是生物芯片分析、酶联免疫ELISA分析和试剂条快速分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒。

背景技术

对样品中、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析的方法,其范围很广，其中基于探针-目标物特异性反应的一类的基本原理为:使探针与样品中的目标分子进行特异反应，再分析此一特异反应的结果。此类分析方法的基本步骤为：准备一种含探针反应器的装置、使样品与所述反应器接触并进行相关反应、分析所述反应结果。由于所用的探针反应器装置的不同,衍生出很多定性和/或定量分析的方法,例如，生物芯片法、PCR法、快速检测试剂条法、ELISA法、免疫荧光法、等等。

本发明中,“检测装置”是指定性和/或定量分析方法中含有反应器的装置,例如生物芯片、快速检测试剂条、酶标板等等。检测装置的必不可少的组成是反应器,反应器的必不可少的组成是探针和用以固定探针的载体。在本发明中,“反应器”是指探针与目标物发生特异性反应的场所及与其连通的其它相关结构,例如生物芯片中的反应器、96孔酶标板中的孔、快速检测试剂盒的试剂条等等。本发明中的探针，包括所有可以固定在固相载体上的具有生物活性的物质,例如抗原、抗体、单链和多链DNA、RNA、核苷酸、配体、配基、多肽、细胞、组织成分等生物成分。在本发明中，“片基”是指反应器中用作固定探针或/和包含探针的物质的固相载体。例如,抗原包被生物芯片中的探针为包被抗原而片基通常为活化玻片、抗原包被酶标板中的探针为包被抗原而片基通常为多孔板、等等。

下面以生物芯片分析为例来简单地说明现有定性和/或定量分析方法及尚待解决的问题。

在本发明中,“生物芯片”、也简称“芯片”，是指定性和/或定量分析方法中的一种检测装置,其反应器中探针同样品中的目标分子发生特异反应的结果可以以可寻址的方式进行识别。在本发明中,“生物芯片试剂盒”是指包含

有生物芯片及标记系统等其它检测反应介质的检测装置。

生物芯片包括基因芯片、多肽芯片、糖芯片、细胞芯片和组织芯片等。目前最常用的生物芯片是多肽芯片和基因芯片。多肽芯片是以多个胺基酸的序列结构（包括蛋白质）作为探针固定在片基上制备的生物芯片。基因芯片是用待检标本中核酸、核苷酸与互补核酸、核苷酸探针杂交，形成杂交体，或与特异性抗体结合，再用呈色反应显示检测结果的芯片。生物芯片有着广泛的应用范围，包括基因表达检测、基因筛选、药物筛选、疾病诊断治疗、环境监测和治理、司法鉴定等领域。

目前的生物芯片是基于常规片基的生物芯片反应器。在本发明中，常规片基是指其表面未分布有纳米结构、特别是纳米粒子或纳米凹凸结构的片基。常规片基生物芯片的一个例子是显微镜载玻片经活化(例如胺基化、醛基化或胺基肼化)制成片基、再在片基上点样固定探针制成的芯片。这类芯片的片基，除活化玻片外还包括塑料、多孔膜等等。

在定性和/或定量分析中，检测装置是一个重要的灵敏度控制因素。生物芯片的核心是其上的反应器。本发明中的生物芯片的反应器，是指生物芯片中固定有探针阵列，在检测时与目标物发生特异性反应的场所及与其连通的其它相关结构。目前的生物芯片反应器，由于其中探针直接固定在平面基片上，探针反应的动力学条件、基板表面对探针稳定性的影响、等等方面，都还有若干尚待解决的问题，其后果为：固定化探针的反应效率较低，表现为探针-目标物反应时间较长(通常在1小时以上)和灵敏度不太高。目前，以探针固定在平面片基或多孔膜的表面上形成反应器的其它检测装置，例如酶标板和快检试剂条等等，也都有与生物芯片同样的灵敏度问题。

在定性和/或定量分析中，除检测装置外另一个重要的灵敏度控制因素是标记物。很多能够显色的物质由于其与配基直接结合的收率很低，能提供的检测灵敏度很低，不能作为标记物质使用，从而限制了信号读取方法和装置的选择自由度。目前生物芯片分析中最常用的是荧光染料标记物(例如罗丹明标记物)，荧光染料标记物对扫描仪有较高技术要求从而要求较高的检测成本，限制了生物芯片的普及应用。目前，其它分析，例如ELISA分析和试剂条快速分析中亦有类似的标记物灵敏度问题。

发明内容

本发明以提高对样品、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析、更特别是生物芯片检测、ELISA检测和试剂条快速检测的灵敏度为主要目标。

或者说，本发明主要目标是提高检测灵敏度或在不降低灵敏度的条件下降低检测成本。

本发明所述的方法如下：

本发明提供一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法，其包括下列基本步骤：

a、将目标物或含目标物的物质与检测装置的固相反应器接触并在其中与探针反应，所述固相反应器包括纳米反应器与常规反应器，所述纳米反应器的片基表面上分布有纳米结构；

b、对步骤 a 所述反应的结果进行标记，上述固相反应器为纳米反应器时标记物为常规标记物或/和纳米标记物，上述固相反应器为常规反应器时标记物为纳米标记物或包含纳米标记物的标记系统，所述纳米标记物包括标记物质、配基及纳米结构载体；

c、检出步骤 b 所述标记的结果；

d、根据步骤 c 所述标记结果分析 a 所述反应结果。

本发明所述纳米反应器中的纳米结构为纳米粒子或纳米凹凸结构，所述纳米标记物中的纳米结构为纳米粒子。

本发明所述纳米反应器片基表面上和纳米标记物中的纳米粒子的粒径尺寸为 1-1000nm，优选方案为 1-100nm，更优选方案为 1-50nm。

本发明所述纳米反应器中的反应包括抗原-抗体反应、单链或多链 DNA、RNA、核苷酸反应与其配对物的反应及配体-配基反应，所述纳米标记物的标记方法包括自主发光标记法、激发发光标记法、非选择性光反射标记法和选择性光反射标记法。

在本发明中，“固相反应器” 区别于流体生物芯片等流体反应器，是指探针固定在固相载体上形成的反应器；“探针”是指固定在反应器中同目标物发生选择性反应以对目标物进行定性和/或定量分析的物质，探针按其形态分为分子探针和微粒探针，微粒探针是指分子探针与微粒结合固定在载体上所形成的探针(参考我们申请的专利《一种对目标物进行定性和/或定量分析的检

测装置及其检测方法》，申请号 03117446.9)；“纳米反应器” 是指其片基表面上以大于 1 个/mm^2的密度分布有尺寸在 1-1000nm 的纳米结构的反应器，纳米结构的一个例子是凹凸结构；“常规反应器”是指不含所述纳米结构表面的固相反应器；“纳米标记物” 是指含有纳米结构载体、例如纳米粒子的标记物，本发明纳米标记物中纳米粒子用作载体，而在个别常规标记物中纳米粒子仅用作标记物质(例如纳米金粒子、稀有金属纳米粒子、等等)；“常规标记物”是指不含纳米结构载体的标记物。在本发明中，纳米结构的尺寸是指其三维尺寸中尺寸最小的一维的尺寸，例如线状结构的直径。

本发明的检测方法，由于纳米反应器或/和与纳米标记物的使用，而与目前的检测方法区别开来。本发明的纳米反应器，其片基表面的纳米结构的引入，可以使反应器在表面性质、反应动力学性质及光学性质等方面获得新的性质。本发明的纳米标记物，引入了一种新的标记物组成、即含有纳米粒子载体的组成，纳米粒子载体的高活性表面，可能使得与配基通过间接连接的标记物质有更多选择，还可能为配基/标记物质分子比例的变化提供另一种方法。

另一方面，本发明的一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法，其检测装置中的纳米反应器中的片基表面上的纳米结构为纳米粒子或纳米凹凸结构，其纳米标记物中的纳米结构为纳米粒子。本发明的检测方法中使用的含有表面分布有纳米粒子的载体的纳米反应器，与目前的检测装置的固相反应器不同。与通常的平面载体反应器比较(例如市面上的二维生物芯片、ELISA包被酶标板的反应池)，本发明的纳米反应器其探针不是或不仅是固定在固相载体的曲率接近零的微表面上、而特别是在分布有纳米粒子的微表面上。与我们的另一发明的微粒探针反应器比较(参考我们申请的专利《一种对目标物进行定性和/或定量分析的检测装置及其检测方法》，申请号 03117446.9)，本发明的纳米反应器中可以有更大面积的纳米粒子分布，在需要时可利用其来改变探针反应的环境，例如反应器的亲水性或疏水性、反应器光学背景的透光性或反光性、等等。

另一方面，本发明的一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法，其检

测装置中的纳米反应器和纳米标记物中的纳米粒子的粒径尺寸为 1-1000nm，优选方案为 1-100nm、更优选方案为 1-50nm。尽管在本发明实施例中只涉及金属及氧化物纳米粒子，专业人士应当知道在本发明的条件下，所述纳米粒子的范围很广。从原则上讲，包括所有可联接在固相载体上、并可同探针或标记物质和/或配基结合且不掩敝其活性的金属纳米粒子、无机非金属纳米粒子、有机纳米粒子或上述纳米粒子的衍生物。

本发明的一种对目标物进行定性和/或定量分析的方法，其检测装置中的纳米反应器中的反应包括抗原-抗体反应、单链或多链 DNA、RNA、核苷酸反应与其配对物的反应、配体-配基反应，等等；其纳米标记物的标记方法包括自主发光标记法、激发发光标记法、非选择性光反射标记法和选择性光反射标记法，等等。自主发光标记法的一个例子为 ELISA 检测中的酶标法(见实施例 2)，激发发光标记法的一个例子为生物芯片检测中的荧光染料标记法(见实施例 1)，非选择性光反射标记法的一个例子为生物芯片检测中的黑色标记法，选择性光反射标记法的一个例子为快速试剂条检测中的金标法(见实施例 8)。

本发明所述的装置如下：

一种对目标物进行定性和/或定量分析的装置，其特征在于：其至少含有一个纳米反应器，所述纳米反应器中片基表面上以大于 1 个/mm^2 的密度分布有纳米结构。

本发明所述的纳米结构为纳米粒子或纳米凹凸结构，其平均尺寸为 1-1000nm、优选方案为 1-100nm、更优选方案为 1-50nm。

本发明所述纳米粒子包括金、钒、铅、银及其它金属微粒，氧化硅、氧化钛、氧化铝、氧化铁及其它氧化物微粒，塑料、多糖、乳胶、树脂及其它高分子微粒，还包括上述微粒修饰结合有功能基团和/或功能物的微粒衍生物。

本发明所述功能基团包括胺基、胺基脲、酰基、羧基、羟基、醛基和环氧基。

又一方面，本发明所述的装置是一种至少含有一个纳米反应器的生物芯

片。

本发明所述的生物芯片中纳米反应器的片基包括透明、有色、反光和多孔膜固相片基。

本发明所述的装置是一种至少含有一个纳米反应器的酶标板。

在本发明中“纳米检测装置”是指至少含有一个纳米反应器的检测装置。

本发明所述的检测装置，其纳米反应器中的片基上分布的纳米粒子为可连接在固相载体表面上且可固定探针而不损失其生物活性的纳米粒子，例如已用于生化和免疫检测方法中的纳米微球、用作药物缓释载体的某些纳米载体等等；金属微粒(例如金、钒、铅、银)；氧化物微粒(例如氧化硅、氧化钛、氧化铝微粒)、塑料(例如：聚苯乙烯类、聚氯乙烯类、聚丙烯类、聚丙烯酰胺类、聚酰亚胺类、聚醚酮类)、多糖(例如：葡聚糖、琼脂糖、淀粉、及它们的衍生物)、乳胶、树脂和其它微粒(例如：尼龙)，还包括上述微粒修饰结合有功能基团和/或功能物的微粒衍生物。

本发明是一种至少含有一个纳米反应器的生物芯片，其中纳米反应器的片基包括透明、有色、反光和多孔膜固相片基。透明片基的例子为胺基化玻片(见实施例 1)，有色片基的例子为白色涂层片基，反光片基的例子为银箔片基，多孔膜固相片基的例子为快检试剂条片基(见实施例 8)。

又一方面，本发明所述的检测装置是至少含有一个纳米反应器的包被 ELISA 酶标板，所述纳米反应器中探针以不可寻址的方式固定在表面分布有纳米粒子的微孔内。

本发明所述的一种标记物如下：

一种对目标物进行定性和/或定量分析的标记物，其特征在于：其含有纳米粒子载体，所述纳米粒子载体粒径为 1-1000nm、优选方案为 1-100nm、更优选方案为 1-50nm。

本发明所述纳米粒子包括金、钒、铅、银、铁及其它金属微粒，氧化硅、氧化钛、氧化铝、氧化铁及其它氧化物微粒，塑料、多糖、乳胶、树脂及其它高分子微粒，还包括上述微粒修饰结合有功能基团和/或功能物的微粒衍生物。

本发明所述的功能基团包括胺基、胺基脲、酰基、羧基、羟基、醛基和

环氧基。

本发明所述的标记物质包括荧光染料、化学发光催化剂、有色金属或有色金属盐、染料和颜料。

本发明所述的标记物质为下述之一种或几种的组合：罗丹明、荧光素、银盐、酶、碱性黑、碱性紫、胺基黑、考马斯亮蓝、结晶紫、胶体或纳米金、胶体硒。上述物质均为目前市场上已有产品。

本发明所述标记物质为在白光下主波长为红色、绿色、蓝色、青色或紫色的物质。

本发明所述的纳米标记物，其纳米粒子载体为可固定配基或/标记物质而不损失其生物活性的纳米粒子,例如已用于生化和免疫检测方法中的纳米微球、用作药物缓释载体的某些纳米载体等等;金属微粒(例如金、钒、铅、银、铁);氧化物微粒(例如氧化硅、氧化钛、氧化铝微粒)、塑料(例如:聚苯乙烯类、聚氯乙烯类、聚丙烯类、聚丙烯酰胺类、聚酰亚胺类、聚醚酮类)、多糖(例如:葡聚糖、琼脂糖、淀粉、及它们的衍生物)、乳胶、树脂和其它微粒(例如:尼龙),还包括上述微粒修饰结合有功能基团和/或功能物的微粒衍生物。

本发明所述的检测试剂盒如下：

一种对目标物进行定性和/或定量分析的检测试剂盒,其至少包含有对目标物进行定性和/或定量分析的检测装置和标记物，其特征在于：当其检测装置为至少含有一个纳米反应器的纳米检测装置,其标记物为常规标记物或/和纳米标记物;当其检测装置为不含纳米反应器的检测装置，其标记物为纳米标记物或包含纳米标记物的标记系统。

本发明所述的检测试剂盒为生物芯片试剂盒。

本发明所述的检测试剂盒为酶联免疫（ELISA）试剂盒。

本发明所述的检测试剂盒为快速检测试剂条试剂盒。

本发明的所述的生物芯片试剂盒,其组成包括纳米生物芯片(至少含有一个微粒制备纳米片基反应器的生物芯片)和常规标记物或/和纳米标记物,或常规生物芯片(不含纳米反应器的生物芯片)和纳米标记物或包含纳米标记物的标记系统。

本发明所述的检测试剂盒为酶联免疫（ELISA）试剂盒，其组成包括纳米酶标板(至少含有一个微粒制备纳米片基反应池的酶标板)和常规标记物或/和纳米标记物,或常规酶标板(不含微粒制备纳米片基反应池的酶标板)和纳米标记物或包含纳米标记物的标记系统。

本发明所述的检测试剂盒为快速检测试剂条试剂盒，其快速检测试剂条的组成包括至少一个表面分布有纳米粒子的反应区的和常规标记物或/和纳米标记物,或不含表面纳米粒子的反应区和纳米标记物或包含纳米标记物的标记系统。

本发明检测方法的优点是：通过利用纳米检测装置或/和纳米标记物，可以提高检测灵敏度或/和降低检测成本或/和提供更大的检测方案选择自由度。本发明纳米检测装置的优点是：通过在固相载体表面上引入纳米结构,例如纳米粒子，可以提高检测灵敏度或/和降低探针的耗量或/和降低对固相载体的某些技术要求;本发明纳米标记物的优点是：通过引入纳米粒子载体，可以提高检测灵敏度或/和降低配基的耗量或/和降低对标记物质与配基结合的某些技术要求。

附图及其图面说明

图1本发明所述的在胺基改性玻片上包被氧化硅纳米粒子的片基表面图

图2本发明所述的片基材料为胺基改性玻片的片基表面图

上述图均为电子显微镜照片图。

具体实施例

实施例 1：纳米生物芯片检测和纳米生物芯片

在本例中，所用生物芯片为含有纳米反应器的纳米生物芯片,所用标记物为常规标记物(罗丹明标记的羊抗人二抗)。

- 纳米片基的制备:

本实施例纳米反应器的纳米片基为表面分布有纳米粒子的片基。

本实施例用于制备纳米片基的纳米粒子分别为粒径 20-30nm 的胶体金(中国福建泉州长立生化有限公司)、粒径 20-40nm 的氧化硅粒子 (胶体氧化硅,美国 Sigma-Aldrich 公司),用来制备纳米片基的片基材料为胺基改性玻片(自制,参考蒋中华等《生物分子固定化技术及应用》，化学工业出版社，北京，1998),其尺寸为 75X25X1mm。

本实施例纳米片基制备方法为:将含纳米粒子的液体按预先已优化的浓度配制成含纳米粒子的缓冲液,再将胺基改性玻片与其接触，在室温下按预先已优化的条件(pH 等)反应 15 小时,再用蒸馏水反复清洗，干燥后用电子显微镜

检测在玻片表面上分布的纳米粒子(四川大学分析测试中心检测)。如图1所示,玻片表面上的纳米粒子的分布密度大于1个/mm^2。

对照片基为未用含纳米粒子缓冲液处理的胺基改性玻片。

纳米生物芯片的制备:

本实施例所用探针为 HCV 抗原(北京人民医院肝病研究所)和 HIV_{1+2} 抗原(北京人民医院肝病研究所)。

将上述制备的二种纳米片基和对照片基,在选定位置涂上高疏水有机硅涂料(成都晨光化工设计院)形成高疏水层隔离结构(参考我们的另一发明《一种反应器隔离结构高度最小化的生物芯片及制备方法》,申请号03117397.7),从而形成2行8个反应池,反应池尺寸为4.5mmX4.5mm。

将两种浓度(0.5mg/ml 和 1.5mg/ml)的 HCV 抗原和 HIV_{1+2} 抗原溶液分别进行点样。相同浓度的 HCV 抗原和 HIV_{1+2} 抗原溶液分别点在同一个反应池中,各点2个点,形成2X2探针-微粒阵列。抗原包被后,用牛血清白蛋白溶液封闭后备用。

对照片基制备的芯片用作对照芯片,0.5mg/ml 和 1.5mg/ml 抗原浓度制作的芯片分别记作 A11 和 A12,在金粒子制备纳米片基上由不同抗原浓度(0.5mg/ml 和 1.5mg/ml)制作的芯片分别记作 B11 和 B12,在氧化硅粒子制备纳米片基上由不同抗原浓度(0.5mg/ml 和 1.5mg/ml)制作的芯片分别记作 C11 和 C12。

- 生物芯片检测:

在本实施例中,4种样品分别为 HCV 抗体阳性血清、HIV_{1+2} 抗体阳性人血清、阳性对照物(HCV 抗体和 HIV_{1+2} 抗体阳性血清对照物的混合物)和阴性对照物(HCV 抗体和 HIV_{1+2} 抗体都为阴性的血清对照物)。所有的样品,均预先用经典的 ELISA 方法检测确定其阴、阳性。

实验时,4种样品分别加入上述2个常规芯片(A11 和 A12)及4个纳米芯片(B11、B12、C11 和 C12),每种样品加 2 个反应池。加样时样品作适当稀释,加样量为5ul,反应温度37度,反应时间5分钟。洗涤液每次加入量为15ul,洗涤 5 次。标记物为罗丹明标记的羊抗人二抗(Jackson ImmunoRresearch Laboratories 公司),加入量为5ul,反应温度37度,反应时间5分钟。反应后以 15ul 洗涤液洗涤 5 次。干燥后进行扫描 (Afymetrix 公司 GMS 418 芯片扫描仪),数据处理后得到结果如表1。

表1 生物芯片检测结果

芯片	抗原浓度	HCV抗体阳性血清	HIV抗体阳性血清	阳性对照物	阴性对照物

	(mg/ml)	HCV 抗体	HIV 抗体	HCV 抗体	HIV 抗体	HCV 抗体	HIV 抗体	HCV 抗体	HIV 抗体
A11	0.5	-	-	-	-	+	+	-	-
A12	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-
B11	0.5	+	-	-	+	+	+	-	-
B12	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-
C11	0.5	+	-	-	+	+	+	-	-
C12	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-

表中，“+”为阳性结果，“-”为阴结果。

实施例 2：纳米 ELISA 检测和纳米酶标板（1）

在本例中，所用酶标板为含有纳米反应池的纳米酶标板，所用标记物为常规标记物(酶标记的羊抗人二抗)。

- 纳米片基的制备：

本实施例纳米反应池的纳米片基为表面分布有纳米粒子的片基。

本实施例用于制备纳米片基的纳米粒子为粒径 20-40nm 的氧化硅粒子(胶体氧化硅，Sigma-Aldrich 公司)，用于制备纳米片基的片基材料为用于 ELISA 的常规 96 孔聚苯乙烯板（中国深圳金灿华实业有限公司)。

将含纳米粒子的液体按预先已优化的浓度配制成含纳米粒子的缓冲液，再加入 96 孔聚苯乙烯板的孔中，在室温下按预先已优化的条件(pH 等)反应 15 小时，再用蒸馏水反复清洗，干燥后用电子显微镜检测在孔底表面上分布的纳米颗粒，其密度大于 1 个/mm^2。

对照片基为未用含纳米粒子的液体处理的 96 孔聚苯乙烯板。

- 纳米酶标板的制备：

本实施例所用探针为 HCV 抗原(中国北京人民医院肝病研究所)。

将两种浓度（0.3ug/ml 和 1.0ug/ml）的 HCV 抗原分别包被到纳米微孔板和对照微孔板上，每一种浓度的抗原在每一种微孔板上包被 8 个孔。包被后用牛血清白蛋白溶液封闭后备用。

在对照微孔板上由不同抗原浓度(0.3ug/ml 和 1.0ug/ml)制作的酶标板分别记作 A21 和 A22，在氧化硅粒子制备纳米片基上由不同抗原浓度(0.3ug/ml 和 1.0ug/ml)制作的酶标板分别记作 B21 和 B22。

- 酶标板检测：

在本实施例中，所用样品为 HCV 抗体阳性血清和 HCV 抗体阴性血清。所有的样品，均预先用经典的 ELISA 方法检测确定其阴、阳性。

实验时 2 种样品分别加入上述 2 个对照酶标板(A21 和 A22)及 2 个纳米酶

标板(B21 和 B22)中,每种样品加 4 个反应池。加样时样品作适当稀释,加样量为 100ul,反应温度 37 度,反应时间 30 分钟。洗涤液每次加入量为 300ul,洗涤 3 次。标记物为酶标记的羊抗人二抗(北京天坛生物制品股分有限公司),加入量为 100ul,反应温度 37 度, 反应时间 30 分钟。加入底物的反应条件和与经典的 ELISA 法相同。利用酶标仪(Thermo Labsystems 上海雷勃分析仪器有限公司)进行比色分析,8 孔平均结果见表 2。

表 2 ELISA 检测结果

酶标板	包被抗原浓度	阳性血清	阴性血清
A21	0.3ug/ml	-	-
A22	1.0ug/ml	+	-
B21	0.3ug/ml	+	-
B22	1.0ug/ml	+	-

表中,“+”为阳性结果, “-”为阴性结果。

实施例 3:纳米 ELISA 检测和纳米酶标板(2)

在本例中,所用酶标板为含有纳米反应池的纳米酶标板,所用标记物为常规标记物(酶标记的羊抗人二抗)。

- 纳米片基的制备:

本实施例纳米反应池的纳米片基为表面分布有纳米凹凸结构的片基。

本实施例纳米片基的制备,为以聚苯乙烯为材料,经热塑模压成型的内径为 5.7mm、高度为 12.8mm、壁厚 1.0mm 的孔。模具表面经特别处理,成型后孔内底表面上分布有尺寸在 25-350nm 的凸起结构。

- 纳米酶标板的制备:

本实施例所用探针及纳米酶标板的制备同实施例 2。

- 酶标板检测:

在本实施例中,所用样品同实施例 2。

在本实施例中,所用检测方法同实施例 2。利用酶标仪进行比色分析的 4 孔平均结果见表 3。

表 3 ELISA 检测结果

包被抗原浓度	阳性血清	阴性血清
0.3ug/ml	+	-
1.0ug/ml	+	-

表中,“+”为阳性结果, “-”为阴性结果。

实施例 4：纳米生物芯片检测和纳米标记物（1）

在本例中，所用生物芯片为不含有纳米反应器的常规芯片,所用标记物为纳米标记物。

在本例中常规芯片片基为胺基改性玻片(自制,参考蒋中华等《生物分子固定化技术及应用》，化学工业出版社，北京，1998),其尺寸为 75X25X1mm。所用探针及芯片制备方法同于实施例 1 中制备的芯片 A12。

- 纳米标记物的制备:

本实施例用于制备纳米标记物的纳米粒子为粒径 20-40nm 的氧化硅粒子(胶体氧化硅,美国 Sigma-Aldrich 公司),所用标记物质为罗丹明(公司),所用配基为羊抗人二抗(北京天坛生物制品股分有限公司)。

将含纳米粒子的液体按预先已优化的浓度配制成含纳米粒子的缓冲液,再按已优化的比例与罗丹明和羊抗人二抗混合，在 37°C 反应 2 小时。再将此混合物滴入装有凝胶的旋转管,在 3000r/min 条件下离心,所制备的纳米标记物记作 b4。

本实施例对照标记物为未用含纳米粒子液体处理的常规标记物(罗丹明标记羊抗人二抗, 美国 Jackson ImmunoRresearch Laboratories 公司),记作 a4。

- 纳米芯片检测:

在本实施例中，所用样品同实施例 1。

实验时 4 种样品分别加入 2 个上述常规芯片，每种样品加 4 个反应池。加样时样品作适当稀释,加样量为 5ul,反应温度 37 度，反应时间 5 分钟。洗涤液每次加入量为 15ul,洗涤 5 次。不同稀释浓度(以二抗浓度表示:1.0mg/ml 和 1.5mg/ml)的常规标记物和纳米标记物分别加入不同芯片的反应池中,加入量为 5ul，反应温度 37 度，反应时间 5 分钟。反应后以 15ul 洗涤液洗涤 5 次。干燥后进行扫描 (Afymetrix 公司 GMS 418 芯片扫描仪)，数据处理后得到结果如表 4。

表 4 利用纳米标记物的芯片检测结果

标记物	二抗浓度 mg/ml	HCV抗体阳性血清		HIV抗体阳性血清		阳性对照物		阴性对照物	
		HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体
a4	1.0	+	-	-	-	-	-	-	-
a4	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-
b4	1.0	+	-	-	+	+	+	-	-

b4	1.5	+	−	−	+	+	+	−	−

表中，“+”为阳性结果，“-”为阴结果。

实施例 5：纳米生物芯片检测、纳米生物芯片与纳米标记物(2)

在本例中，所用生物芯片为含有纳米反应器的纳米生物芯片,所用标记物为纳米标记物。

- 纳米生物芯片的制备:

本实施例纳米反应器的纳米片基为表面分布有纳米粒子的片基。

本实施例用于制备纳米片基的纳米粒子分别为粒径 20-40nm 的氧化硅粒子（胶体氧化硅,美国 Sigma 公司),用来被制备纳米片基的片基材料为胺基改性玻片(自制,参考蒋中华等《生物分子固定化技术及应用》，化学工业出版社，北京，1998),其尺寸为 75X25X1mm。

纳米片基的制备方法如同实施例 1。

本实施例所用探针如同实施例 1。本实施例纳米生物芯片的制备方法如同实施例 1,但点样抗原的浓度为 1.5mg/ml。

- 纳米标记物的制备:

本实施例用于制备纳米标记物的纳米粒子为粒径 20-40nm 的氧化硅粒子(胶体氧化硅,美国 Sigma-Aldrich 公司),所用配基为羊抗人二抗(北京天坛生物制品股分有限公司),所用标记物质为结晶紫(成都科龙化工试剂厂)、碱性紫和碱性黑（天津市东军涂料助剂厂)。

本实施例纳米标记物的制备方法如同实施例 4，标记物质为结晶紫、碱性紫和碱性黑所制备的纳米标记物分别记作 a5、b5 和 c5。

-芯片检测:（肉眼,相机和扫描仪)

在本实施例中，所用样品同实施例 1,所有的样品均经使用常规 ELISA 方法预先检测。

实验时 4 种样品分别加入 3 个上述纳米芯片，每种样品加 2 个反应池。加样时样品作适当稀释,加样量为 5ul,反应温度 37 度，反应时间 5 分钟。洗涤液每次加入量为 15ul,洗涤 5 次。三种纳米标记物分别加入 3 个芯片的反应池中,加入量为 5ul，反应温度 37 度，反应时间 5 分钟。反应后以 15ul 洗涤液洗涤 5 次。干燥后进行信号检出，扫描仪为 EPSON 1260 扫描仪(EPSON 公司),扫描照射光线为白光,信号光线亦为白光，读取的信号经处理软件(Afymetrix JAGUAR 2.0)处理，然后取平均值后得到反应结果（表 5）。此一结果与用肉眼观察到的结果一致。

表 5 利用纳米标记物的芯片检测结果

标记物	HCV抗体阳性血清		HIV抗体阳性血清		阳性对照物		阴性对照物	
	HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体
a5	+	-	-	+	+	+	-	-
b5	+	-	-	+	+	+	-	-
c5	+	-	-	+	+	+	-	-

表中，“+”为阳性结果，“-”为阴结果。

实施例 6：改性纳米粒子与纳米生物芯片

在本例中，所用标记物为常规标记物(罗丹明标记的羊抗人二抗)，所用生物芯片为含有表面分布有纳米粒子的片基的纳米反应器的生物芯片，用以制备纳米片基的纳米粒子表面结合有胺基肼基团。

- 改性纳米粒子的制备：

本实施例用以进行改性的纳米粒子为粒径 20-40nm 的氧化硅粒子（胶体氧化硅，美国 Sigma-Aldrich 公司）。

改性纳米粒子的制备方法为：在含有 Fmoc-甘氨酸(0.5mmol)和 TBTU(0.5mmol)的 DMF(N,N-二甲基甲酰胺)中，溶入二异丙基乙胺，再加入预先已优化浓度的胶体氧化硅，在室温下反应 1 小时。然后加入含 20%哌啶的 DMF 溶液，在室温下反应 15 分钟后，在 4000r/min 离心 5 分钟，倾去上清液，反复洗涤 3 次后备用。

- 纳米生物芯片的制备：

本实施例用来被制备纳米片基的片基材料为改性玻片(SuperEpoxy，Telechem International 公司)。本实施例纳米片基的制备方法与实施例 1 相同，不同的是本实施例所用纳米粒子为上述制备的表面有胺基肼基团的氧化硅粒子。

对照片基为未用含纳米粒子的液体处理的胺基改性玻片。

本实施例所用探针如同实施例 1。本实施例纳米生物芯片的制备方法如同实施例 1。对照片基上由不同抗原浓度(0.5mg/ml 和 1.5mg/ml)制作的芯片分别记作 A61 和 BA62，在改性氧化硅粒子制备纳米片基上由不同抗原浓度(0.5mg/ml 和 1.5mg/ml)制作的芯片分别记作 B61 和 B62。

- 芯片检测：

在本实施例中，所用样品同实施例 1。所有的样品，均预先用经典的 ELISA 方法检测确定其阴、阳性。

实验时，4 种样品分别加入上述 2 个常规芯片(A61 和 A22)及 2 个纳米芯片

(B61 和 B62)，每种样品加 2 个反应池。加样时样品作适当稀释,加样量为 5ul,反应温度 37 度，反应时间 5 分钟。洗涤液每次加入量为 15ul,洗涤 5 次。标记物为罗丹明标记的羊抗人二抗(Jackson ImmunoRresearch Laboratories 公司),加入量为 5ul，反应温度 37 度，反应时间 5 分钟。反应后以 15ul 洗涤液洗涤 5 次。干燥后进行扫描 (Afymetrix 公司 GMS 418 芯片扫描仪)，数据处理后得到结果如表 6。

表6 生物芯片检测结果

芯片	抗原浓度 (mg/ml)	HCV抗体阳性血清		HIV抗体阳性血清		阳性对照物		阴性对照物	
		HCV 抗体	HIV 抗体	HCV 抗体	HIV 抗体	HCV 抗体	HIV 抗体	HCV 抗体	HIV 抗体
A61	0.5	-	-	-	-	+	+	-	-
A62	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-
B61	0.5	+	-	-	+	+	+	-	-
B22	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-

表中,“+”为阳性结果,“-”为阴结果。

实施例 7：改性纳米粒子与纳米标记物

在本实施例中，所用生物芯片为不含有纳米反应器的常规芯片,所用标记物为纳米粒子表面分别结合有胺基及胺基肼基团的纳米标记物。表面结合有胺基的纳米粒子为单顺丁烯二乙酰亚胺修饰的纳米金 (粒径 1.4nm 美国 Nanoprobes 公司)，表面结合有胺基肼的纳米粒子为实施例 6 中制备的改性纳米粒子。

在本实施例中常规芯片为实施例 1 中制备的芯片 A12。

- 纳米标记物的制备:

本实施例所用标记物质为罗丹明,所用配基为羊抗人二抗，所用纳米粒子为上述单顺丁烯二乙酰亚胺修饰的纳米金和改性氧化硅纳米粒子。本实施例纳米标记物的制备方法如同实施例 4。以单顺丁烯二乙酰亚胺修饰的纳米金制备的纳米标记物记作 b7，以改性氧化硅纳米粒子制备的纳米标记物记作 c7。

对照标记物为未用含纳米粒子液体处理的常规标记物(罗丹明标记的羊抗人二抗,Jackson ImmunoRresearch Laboratories 公司),记作 a7。

- 芯片检测:

在本实施例中,所用样品同实施例 1。所有的样品，均预先用经典的 ELISA 方法检测确定其阴、阳性。

实验时,4 种样品分别加入芯片反应池中，每种样品加 2 个反应池。加样、洗涤及标记方法同实施例 1。每种标记物分别以 2 种不同浓度(以二抗浓度表示:0.5 和 1.5mg/ml)加入不同芯片。干燥后进行扫描 (Afymetrix 公司 GMS 418 芯片扫描仪)，数据处理后得到结果如表 7。

表7 生物芯片检测结果

标记物	二抗浓度 (mg/ml)	HCV抗体阳性血清		HIV抗体阳性血清		阳性对照物		阴性对照物	
		HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体	HCV抗体	HIV抗体
a7	0.5	-	-	-	+	-	+	-	-
a7	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-
b7	0.5	+	-	-	+	+	+	-	-
b7	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-
c7	0.5	+	-	-	+	+	+	-	-
c7	1.5	+	-	-	+	+	+	-	-

表中,“+”为阳性结果，“-”为阴结果。

实施例 8：微粒快检试纸条法和微粒快检试纸条

在本实施例中,所用快检试纸条为含有表面分布有纳米粒子的片基的纳米反应器的纳米快检试纸条,所用标记物为常规标记物(胶体金标记羊抗人二抗)。

-纳米快检试纸条的制备:

本实施例用于制备纳米片基的纳米粒子为粒径 20-40nm 的氧化硅粒子(胶体氧化硅,美国 Sigma 公司),用来被制备纳米片基的片基材料为硝酸纤维膜条(福建泉州长立生化有限公司)。

本实施例纳米片基制备方法为:将含纳米粒子的液体按预先已优化的浓度配制成含纳米粒子的缓冲液,再将硝酸纤维膜条与其接触，在室温下按预先已优化的条件(pH 等)反应 2 小时,再用蒸馏水反复清洗。对照片基为未用含纳米粒子缓冲液处理的硝酸纤维膜条。

本实施例所用探针为 HCV 抗原(中国北京人民医院肝病研究所)。

将两种浓度 (0.5mg/ml 和 1.0mg/ml) 的 HCV 抗原分别在纳米片基和对照片基上进行点样(检测线),再按常规方法分别点上兔抗羊 IgG 质控线后用牛血清白蛋白溶液封闭，再组装上加样区、胶体金标记羊抗人标记物区、吸水区组合而成。

在对照片基上以 0.5mg/ml 和 1.0mg/ml 抗原浓度制作的快检试纸条分别记作 A81 和 A82,在氧化硅粒子制备纳米片基上由不同抗原浓度(0.5mg/ml 和 1.0mg/ml)制作的芯片分别记作 B81 和 B82。

-快检试剂条的检测:

在本实施例中，2 种样品分别为 HCV 抗体阳性血清和 HCV 抗体阴性血清,所有的样品均预先用经典的 ELISA 方法检测确定其阴、阳性。

实验时,2 种样品分别加入上述快检试纸条 (A81、 A82、B81 和 B82)。加样时样品作适当稀释，加样量为 50ul,加样后接着缓慢加入洗涤液至质控线出现。结果见表 8。

表8 快检试剂条检测结果

试剂条	抗原浓度(mg/ml)	HCV抗体阳性血清	HCV抗体阴性血清
A81	0.5	-	-
A82	1.0	+	-
B81	0.5	+	-
B82	1.0	+	-

表中，“+”为HCV抗体阳性结果，“-”为HCV抗体阴性结果。

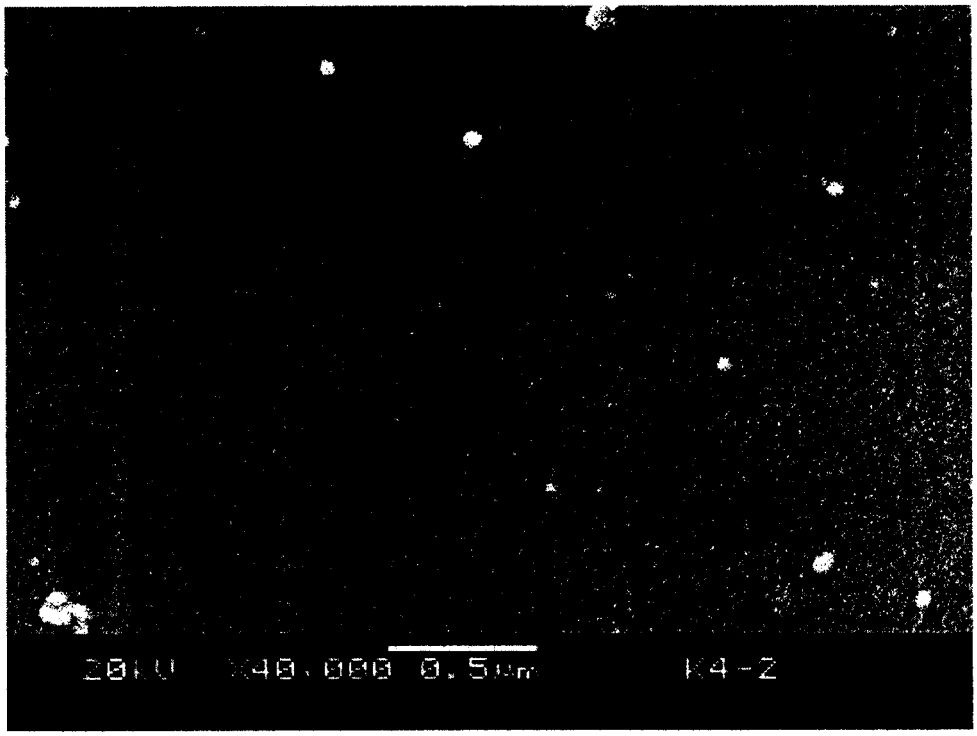


图 1

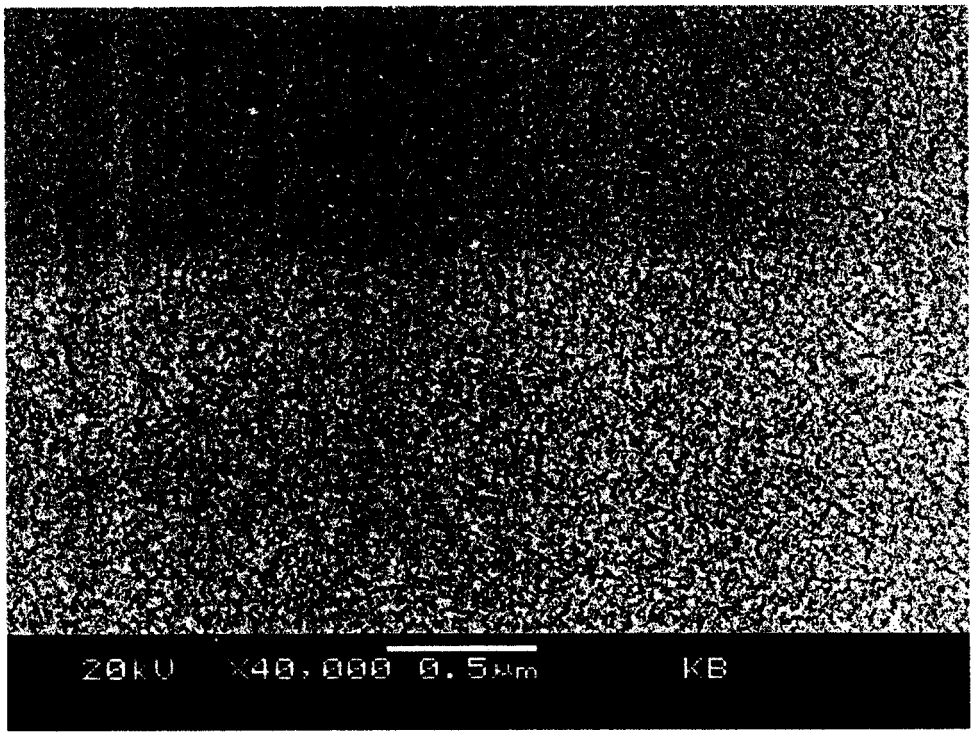
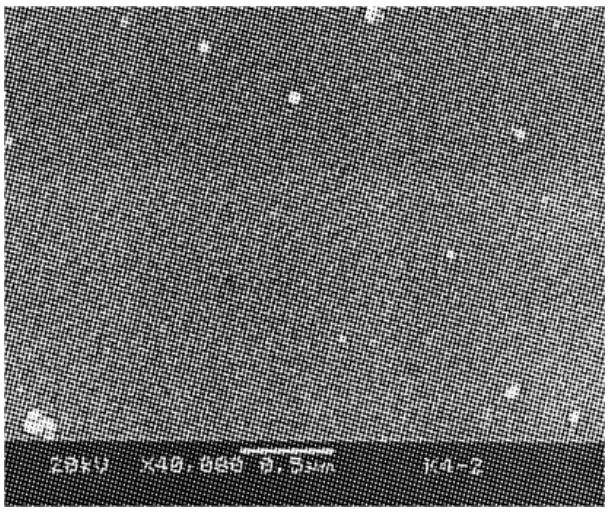


图2

专利名称(译)	对目标物进行定性和/或定量分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1514243A	公开(公告)日	2004-07-21
申请号	CN03117787.5	申请日	2003-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
[标]发明人	邹方霖 陈春生 陈宁 王建霞		
发明人	邹方霖 陈春生 陈宁 王建霞		
IPC分类号	G01N21/00 G01N21/64 G01N21/76 G01N33/00 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/543 G01N33/5434 Y10S977/702 Y10S977/705 Y10S977/773 Y10S977/789 Y10S977/791 Y10S977/792 Y10S977/793 Y10S977/794 Y10S977/795 Y10S977/92 Y10S977/957 Y10S977/958		
代理人(译)	张新		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种对生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒，更特别是生物芯片分析、酶联免疫ELISA分析和试剂条快速分析的方法、装置和标记物及检测试剂盒，本发明可以提高检测灵敏度或/和降低检测成本或/和提供更大的检测方案选择自由度。