



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101968440 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 200910304885.3

(22) 申请日 2009.07.27

(71) 申请人 上海慧普生物医药科技有限公司  
地址 201400 上海市奉贤区金海公路 5885  
号 3051 室

(72) 发明人 刘睿强

(74) 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限  
责任公司 11223

代理人 王明霞

(51) Int. Cl.

G01N 21/41 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片

(57) 摘要

本发明涉及生物芯片领域,特别是涉及一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原蛋白芯片及其基于表面等离子谐振原理的检测方法。本发明的芯片在基底上有金属膜,在金属膜表面上固定有连接层,在连接层上固定有凝集素或其他抗原或抗体;所述的连接层是由一端具有活性基团、另一端通过巯基与金属膜反应的长链巯基乙醇构成的自组装单分子层,再经激活制备而成。本发明的芯片利用凝集素与特定糖链蛋白的特异性结合、特异性抗原抗体结合来诊断疾病,为疾病的诊断提供了新的途径。该方法简便易行,成本较低,简化了操作步骤,缩短了检测时间,是一种适宜推广的新方法。

1. 一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,其特征在于,所述的特定糖链蛋白包括糖链异常蛋白,所述的生物芯片在基底上有金属膜,在金属表面上固定有连接层,在连接层上固定有凝集素、抗原或抗体。

2. 如权利要求 1 所述的利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,其特征在于,所述金属膜的厚度为 55 ~ 100nm。

3. 如权利要求 1 所述的利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,其特征在于,所述的金属膜选自金膜、银膜或铂膜。

4. 如权利要求 1 所述的利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,其特征在于,所述的连接层是由一端具有活性基团、另一端通过巯基与金属膜反应的长链巯基乙醇构成的混合自组装单分子层,再经激活制备而成。

5. 如权利要求 4 所述的利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,其特征在于,所述的激活的过程包括以下步骤:

(1) 将固定有混合自组装单分子层表面的芯片用交联剂 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺活化,再与 2-(2-氨基乙氧基)乙醇反应;

(2) 将步骤 (1) 得到的芯片与表氯醇反应生成环氧功能化的表面,然后与多聚糖或可膨胀的有机聚合体结合;

(3) 用溴乙酸处理 2 ~ 5 次使多聚糖或可膨胀的有机聚合体的多糖链羧基化。

6. 如权利要求 5 所述的利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,其特征在于,所述的多聚糖选自葡聚糖、甘露聚糖、半乳甘露聚、果胶半乳糖或琼脂糖。

7. 如权利要求 4 所述的利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,其特征在于,所述的长链巯基乙醇的为:

(1) HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R 和 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R' 的混合物,

(2) 不对称的二烷基二硫化物 R-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>S-S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R', 和

(3) 不对称的二烷基硫化物 R-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R' ;

其中, m 和 n 分别选自 5 到 20 的正整数, R 和 R' 分别表示烷基的末端基团,选自甲基、羟基、羧基或氨基。

8. 一种特定糖链蛋白、抗体或抗原的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 建立标准品的表面等离子谐振技术的标准曲线;

a) 取权利要求 1 ~ 7 所述的检验特定糖链、抗体或抗原的生物芯片,用 SPR 分析仪或分光光度计测量得到第一组数据;

b) 在所述的生物芯片上加入标准品,待凝集素、抗原或抗体与特定糖链蛋白、抗体或抗原结合后,用 SPR 分析仪或分光光度计测量得到第二组数据;

c) 分析比较所述的第一组数据和所述的第二组数据,得到标准曲线;

(2) 按照同步步骤 (1) 相同的方法建立待测样品的曲线;

(3) 将标准品的曲线与待测样品的曲线比较,从而确定待测样品中特定糖链蛋白、抗体或抗原是否存在以及存在的数量。

9. 权利要求 8 所述的特定糖链蛋白、抗体或抗原的检验方法在检测肿瘤、代谢性疾病或免疫性疾病的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,其特征在于,所述的肿瘤、代谢性疾病或免疫性疾病选自肝癌、胃癌、肺癌、肠癌、肝癌、前列腺癌、食管癌、鼻咽癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、糖链异常 IgA 肾病或糖尿病。

## 一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物芯片领域,特别是一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片及其基于表面等离子谐振原理的检测方法。

### 背景技术

[0002] 表面等离子谐振 (SPR) 是一种物理光学现象。当平行表面的偏振光以称之为表面等离子角的入射角照在界面上发生全反射时,入射光被耦合入表面等离子体内,在这个角度由于表面等离子体谐振将引起界面反射率显著减少。SPR 对附着在金属表面的电介质的折射率非常敏感,而折射率是所有材料的固有特征。因此,任何附着在金属表面上的电介质均可被检测,不同电介质其表面等离子角不同。而同一种材料,附着在金属表面的量不同,则 SPR 的响应强度不同。根据上述原理,SPR 生物传感器通常将已知的生物分子固定在几十纳米厚的金属(金、银等)膜表面,加入与其互补的目标生物分子,两者结合(杂交)将使金属膜与溶液界面的折射率上升,从而导致谐振角改变,如果固定入射角度,就能根据谐振角的改变程度对互补的目标生物分子进行定量检测。整个传感过程包括:

[0003] (1) 生物分子的相互作用(藕联);

[0004] (2) 敏感层电介质变化(介电常数折射率改变);

[0005] (3) 传感器电磁场变化(反射光波衰减);

[0006] (4) 光电信号检测;

[0007] (5) 信号的连续检测与分析。

[0008] 生物芯片是通过平面微细加工与生物分子的自组装技术相结合,在微小玻片上组装成数目众多的不同生物分子微阵列,以实现目标分子信息的大规模检测。SPR 传感技术尤其适用于检测生物大分子之间的相互作用过程。它具有免标记、无需纯化、实时动态检测等优点,具有很高的灵敏度。且能测定生物大分子相互反应过程中的动力学常数。这种技术被认为是生命科学中的高效工具,因而成为目前国内外科学技术发展的热点。

[0009] 糖生物学(glycobiology)是研究聚糖及其衍生物的结构、化学、生物合成及生物功能的科学。科学家把研究生物体内多糖的科学叫做“糖生物学”,也有人沿袭“基因组学”和“蛋白质组学”的概念把这门学科叫做“糖原组学”。蛋白质、核酸和多糖是构成生命的三类大分子,蛋白质和核酸的研究已经成为生命科学中的热点问题。随着蛋白质和核酸研究的深入,糖类的重要性也浮出水面,成为生命科学研究中的新热点。

[0010] 1990 年,有 3 家实验室几乎同时发现当组织受到损伤时,白血球和免疫细胞穿过血管壁,进入受损组织,以便杀灭入侵的微生物。然而,过多白血球的进入则可能导致炎症的产生。并且发现炎症过程与糖类和相关的糖结合蛋白参与有关。更进一步的研究表明,进入血液循环系统的癌细胞可能借助了糖链改变的机制穿过血管,导致癌症的转移。随后又出现了以这一基础研究成果为依据,开发抗炎和抗肿瘤药物的热潮。最近的研究结果表明,糖复合物表面糖链结构的改变和很多疾病的发生相伴随。

[0011] 糖生物学之所以落后于基因和蛋白质的研究,在于糖分子本身的复杂性以及研究人员缺乏研究糖类分子的有效工具。近年来在糖类研究方面已取得不少进展。目前研究结果表明,糖类作为信息分子在受精、发生、发育、分化、神经系统和免疫系统衡态的维持等方面起着重要作用;炎症和自身免疫疾病、老化、癌细胞的异常增殖和转换、病原体感染等生理和病理过程都与糖类的参与有关。

[0012] 糖蛋白是一种结合蛋白质 <http://baike.baidu.com/view/15472.htm>,由短的寡糖链与蛋白质共价连接构成。糖与蛋白质之间以蛋白质为主,其一定部位上以共价键与若干短的寡糖链相连,这些寡糖链常常是具分支的杂糖链,不呈现重复的双糖系列,一般由2~10个单体(少于15)组成,末端成员常常是唾液酸或L岩藻糖。通常每个分子的含糖量较少(约4%)。一些糖蛋白只含一个或几个糖基,另一些含有多个线性或分支的寡糖侧链。糖蛋白包括酶 <http://baike.baidu.com/view/1326.htm>、激素 <http://baike.baidu.com/view/1322.htm>、载体 <http://baike.baidu.com/view/184171.htm>、凝集素 <http://baike.baidu.com/view/557005.htm>、抗体 <http://baike.baidu.com/view/66869.htm> 等。

[0013] 糖蛋白的生物学功能有:

[0014] 一、糖蛋白携带某些蛋白质代谢去向的信息。糖蛋白寡糖链末端的唾液酸残基,决定着某种蛋白质是否在血流中存在或被肝脏除去的信息。

[0015] 二、寡糖链在细胞识别、信号传递中起关键作用。淋巴细胞正常情况应归巢到脾脏,而切去唾液酸后,结果竟归巢到了肝脏。在原核中表达的真核基因,无法糖基化。

[0016] 糖蛋白可以是胞溶性的,也可以是膜结合型的,可以存在于细胞内在也可存在于细胞间质中。糖蛋白在动植物中较为典型,脊柱动物中糖蛋白尤为丰富,如金属转运蛋白(转铁蛋白)、血铜蓝蛋白,凝血因子、补体系统、一些激素, RNase、膜结合蛋白、主要组织相容性抗原(major histocompatibility antigen)。绝大多数糖蛋白的寡糖是糖蛋白的功能中心。有些糖蛋白的糖对于糖蛋白自身及机体起着保护作用或润滑作用,如牛的RNaseB(糖蛋白)对热的抗性大于RNaseA,大量的唾液酸能增强唾液粘蛋白的粘性从而增强唾液的润滑性。南极鱼抗冻蛋白的糖组分能与水形成氢键,阻止冰晶的形成从而提高了抗冻性。糖蛋白在细胞间信号传递方面起着更为复杂的作用。HIV的靶细胞结合蛋白GP120是一个糖蛋白,能与人类靶细胞表面的CD4受体结合从而附着在靶细胞表面,如果去掉GP120的糖部分则不能与CD4受体结合从而失去感染能力。细胞表面的糖蛋白形成细胞的糖萼(糖衣)、参与细胞的粘连,这在胚胎组织的生长、发育以及分化中起着关键性作用。

[0017] 糖蛋白的异常对于很多疾病具有诊断意义,因此,可通过检测异常糖蛋白为疾病的检测提供新途径。

## 发明内容

[0018] 本发明的发明目的在于提出一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片。

[0019] 本发明的又一发明目的在于提出一种特定糖链蛋白、抗体或抗原的检测方法。

[0020] 本发明的再一发明目的在于提出这种特定糖链蛋白、抗体或抗原的检测方法的应用。

[0021] 为了完成本发明的发明目的,本发明采的技术方案为:

[0022] 本发明涉及一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,所述的特定糖链蛋白包括糖链异常蛋白,所述生物芯片在基底上有金属膜,在金属表面上固定有连接层,在连接层上固定有凝集素、抗体或抗原;其中基底选自玻璃基底等。

[0023] 本发明的一个优选技术方案为:金属膜的厚度为 55 ~ 100nm;优选为 60 ~ 80nm。

[0024] 本发明的又一个优选技术方案为:金属膜选自金膜、银膜或铂膜。

[0025] 凝集素选自蜗牛凝集素、扁豆凝集素、长柔毛野豌豆凝集素、豌豆凝集素 [http://www.1798.cn/qybl/InfoShow\\_704892\\_232569.shtml](http://www.1798.cn/qybl/InfoShow_704892_232569.shtml) (PSA)、刀豆凝集素、大豆凝集素、双花扁豆凝集素 (DBA)、欧曼陀罗凝集素或曼陀罗凝集素等。

[0026] 其中,本发明中的连接层是由一端具有活性基团、另一端通过巯基与金属膜反应的长链巯基乙醇构成的混合自组装单分子层 (SAM),再经激活制备而成;激活的过程包括以下步骤:

[0027] (1) 将固定有混合自组装单分子层表面的芯片用交联剂 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺活化,再与 2-(2-氨基乙氧基)乙醇反应;

[0028] (2) 将步骤 (1) 得到的芯片与表氯醇反应生成环氧功能化的表面,然后与多聚糖或可膨胀的有机聚合体结合;

[0029] (3) 用溴乙酸处理 2 ~ 5 次使多糖链羧基化。

[0030] 本发明的生物芯片的制备过程包括以下三个步骤:

[0031] 一、在玻璃载体上铺置具有等离子共振感应型的金膜,其步骤包括:

[0032] 按柠檬酸三钠还原法 (Frens 法) 制备金溶液;

[0033] 以 N-β-(氨乙基)-γ-氨丙基三价氧基硅烷 (APTMS) 为核心铺制性质均一的表面等离子共振金膜;

[0034] 所铺设的金膜氮气干燥后密封备用。

[0035] 二、在铺设好金属膜的芯片表面固定一层连接层,连接层为长链巯基乙醇构成的混合自组装单分子层,其固定方法的步骤包括:

[0036] 彻底清洁铺制好金膜的芯片;

[0037] 将铺制好金膜的芯片浸在有机硫化物的乙醇溶液中,其中有机硫化物的浓度为 1 ~ 10mmol/L,时间为 8 ~ 20 小时,优选 13 ~ 16 小时,温度为室温;

[0038] 其中,所述的有机硫化物为长链巯基乙醇为:

[0039] (1) HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R 和 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R' 的混合物,

[0040] (2) 不对称的二烷基二硫化物 R-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>S-S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R',

[0041] (3) 不对称的二烷基硫化物 R-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R';

[0042] 其中,m 和 n 分别选自 3 到 21 的正整数,R 和 R' 分别表示烷基的末端基团,选自甲基、羟基、羧基或氨基。

[0043] 三、SAM 层的修饰

[0044] 1. 直接反应法

[0045] 在一定的反应条件下,SAM 表明暴露的功能集团,如羟基、羧基,可以直接与反应溶液中的生物分子上相应的配体反应。

[0046] 2. SAM 表面的活化

[0047] 将固定有 SAM 表面的芯片用 EDC/NHS 活化后与 2-(2-氨基乙氧基)乙醇 (AEE) 反

应,然后与表氯醇反应生成环氧功能化的表面,再与多聚糖或可膨胀的有机聚合物相连接;最后用溴乙酸处理 2~5 次,使多聚糖或可膨胀的有机聚合物羧基化。其中,多聚糖或可膨胀的有机聚合物选自葡聚糖、甘露聚糖、半乳甘露聚、果胶半乳糖、琼脂糖;优选为葡聚糖,EDC/NHS 的浓度为 0.2M EDC/0.05M NHS 的水溶液。

[0048] 3. 凝集素、抗体或抗原与芯片的固定

[0049] 将结合有羧基化的多聚糖的芯片与活化试剂反应,反应完毕洗去活化试剂,在芯片表面加上含有凝集素、抗体或抗原的缓冲溶液;结合反应完毕后,加入去活化试剂将芯片上没有与凝集素、抗体或抗原反应的活化基团失活。其中,活化试剂优选 EDC/NHS 溶液或 EDC/ 硫代 NHS,去活化试剂优选为乙醇胺的碱性溶液,乙醇胺碱性溶液的浓度为 0.5~2mol/L, pH 值为 7.5~8.5,优选为 8.0;缓冲溶液优选 10mM 的乙酸盐缓冲溶液, pH 值为 3.5~5.5,优选为 4.5;凝集素、抗体或抗原的浓度优选为 10~100 μg/ml。

[0050] 将反应完毕的芯片在潮湿的环境中孵育 30 分钟到 2 小时,然后在 0~4℃ 条件下密封保存。

[0051] 本发明的蛋白芯片在用于检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的步骤为:

[0052] (1) 提取组织或体液中的蛋白质;

[0053] (2) 在本发明的蛋白芯片上加样,特定糖链蛋白与凝集素结合、抗体/抗原特异结合;

[0054] (3) 将处理好的芯片注入微流动反应池中进行反应,条件为:

[0055] 缓冲液为 pH7.4 的 HBP EP 缓冲液或 PBS 缓冲液;反应容积为 10 μl~50 μl,反应时间为 15 分钟~2 小时。

[0056] 每一轮实验完毕后,芯片表面用含 0.1% SDS 的 HBS-EP 溶液再生 30 秒,循环反应速度为 5~20 转/min,反应温度为 10~38℃。

[0057] 本发明还涉及一种特定糖链蛋白、抗体或抗原的检测方法,包括以下步骤:

[0058] (1) 建立标准品的表面等离子谐振技术的标准曲线;

[0059] a) 取本发明的检验特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片,用 SPR 分析仪或分光光度计测量得到第一组数据;

[0060] b) 在所述的生物芯片上加入标准品,待凝集素、抗原或抗体与特定糖链蛋白、抗体或抗原结合后,用 SPR 分析仪或分光光度计测量得到第二组数据;

[0061] c) 分析比较所述的第一组数据和所述的第二组数据,得到标准曲线;

[0062] (2) 按照同步步骤 (1) 相同的方法建立待测样品的曲线;

[0063] (3) 将标准品的曲线与待测样品的曲线比较,从而确定待测样品中特定糖链蛋白、抗体或抗原是否存在以及存在的数量。

[0064] 本发明还涉及特定糖链蛋白、抗体或抗原的检验方法在检测肿瘤、代谢性疾病或免疫性疾病的应用。

[0065] 其中,肿瘤、代谢性疾病或免疫性疾病包括肝癌、胃癌、肺癌、肠癌、肝癌、前列腺癌、食管癌、鼻咽癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、糖链异常 IgA 肾病或糖尿病。

[0066] 本发明所具有的技术优势为:

[0067] 本发明的生物芯片利用凝集素与特定糖链蛋白特异性结合、抗体/抗原特异结合,对疾病尤其是糖链异常蛋白的检测来进行诊断,为疾病的诊断提供新途径。

[0068] 本发明的生物芯片利用凝集素与糖蛋白的特异性结合,抗体/抗原特异结合,具有更高的特异性行和敏感性。

[0069] 本发明的生物芯片应用表面等离子体共振原理进行信号检测,该方法简便易行,成本较低,简化了操作步骤,缩短了检测时间。

### 具体实施方式

[0070] 本发明的具体实施方式目的在于对本发明进行进一步的解释和说明,并不对本发明的内容进行限制。

[0071] 实施例 1 利用生物芯片检测肝癌

[0072] 1. 铺制金膜

[0073] 1.1 按柠檬酸三钠还原法制备金溶胶:取 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 加热煮沸,边搅拌边加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.75ml,金黄色的氯金酸水溶液在 2 分钟内变成紫红色,继续煮沸 15 分钟,冷却后以蒸馏水补足到原体积。

[0074] 1.2 金膜铺制:

[0075] 1.2.1 玻片酸洗清洁后,放入 N-β-(氨乙基)-γ-氨丙基三价氧基硅烷 (APTMS)/甲苯溶液中回流 12 小时后洗净,取出,氮气吹干,置于清洁干燥处备用;

[0076] 1.2.2 处理好的玻片置纳米金溶液中浸泡 12 小时后,浸入 0.01mol/L 的 PDPA 水溶液中 10~15 分钟,取出用超净水清洗。烘干后移入羟胺/氯金酸溶液中,浸泡 20~30 分钟,玻片表面形成光亮的金属膜。

[0077] 2. 制备 SAMs

[0078] 2.1 将制备好的金膜在 piranha 液 (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:浓硫酸体积比=1:3) 中浸泡清洗,然后用双蒸水反复清洗,氮气吹干;

[0079] 2.2 将铺制好金膜的芯片浸在有机硫化物的乙醇溶液中,其中有机硫化物的浓度为 10mmol/L,时间为 16 小时,温度为室温;其中,所述的有机硫化物为长链巯基乙醇为:HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-OH 和 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-COOH 的混合物。

[0080] 2.3 SAM 层的修饰

[0081] 2.3.1 将固定有 SAM 表面的芯片加入 0.2M EDC/0.05M NHS 的水溶液活化,加入 0.2M 2-(2-氨基乙氧基)乙醇 (AEE) 反应,

[0082] 2.3.2 加入质量百分比为 6% 的表氯醇,再加入葡聚糖,用 1mol/L 溴乙酸处理 3 次,使葡聚糖羧基化。

[0083] 3. 小扁豆凝集素 (LCA)、AFP 抗体与芯片的固定

[0084] 3.1 将结合有羧基化的多聚糖的芯片与 0.2M EDC/0.05M NHS 反应,反应完毕用 10mM 的 pH4.5 乙酸钠缓冲溶液洗去活化试剂,

[0085] 3.2 在芯片表面不同的位点上分别滴加含有小扁豆凝集素 (LCA) 的缓冲溶液、含有 APF 抗体的缓冲溶液;缓冲溶液为 10mM 的 pH4.5 乙酸钠缓冲溶液,小扁豆凝集素的浓度为 100 μg/ml;

[0086] 3.3 结合反应完毕后,加入去 pH 8.0 的 2mol/L 乙醇胺溶液将芯片上没有与凝集素反应的活化基团失活,将反应完毕的芯片在潮湿的环境中孵育 1 小时,然后在 0~4℃ 条件下密封保存。

[0087] 4. 处理样本

[0088] 取肝癌病人血清样本 300 份, 正常人血清样本 700 份;

[0089] 5. SPR 检测

[0090] 5.1 测定标准甲胎蛋白异质体及甲胎蛋白的标准曲线

[0091] 5.1.1 将制备好的芯片组装到所制作的表面等离子共振传感器棱镜表面, 流动反应池中注入  $20 \mu\text{l}$  HBP-EP 缓冲液, 预热  $37^\circ\text{C}$  30 分钟, 读取此时反射光反射角度初始数值;

[0092] 5.1.2 将甲胎蛋白异质体及甲胎蛋白标准品分别注入到  $20 \mu\text{l}$  流动反应池中,  $37^\circ\text{C}$  反应 2 小时, 并读取甲胎蛋白异质体标准品及甲胎蛋白标准品点样点反射管反射角数值; 流动反应池中充入  $20 \mu\text{l}$  HBP-EP 缓冲液,  $37^\circ\text{C}$  清洗 1 小时, 重复 3 次;

[0093] 5.1.3; 分别分析所得数据, 得到甲胎蛋白异质体标准品及甲胎蛋白标准品标准曲线;

[0094] 5.2 按照相同的方法建立待测甲胎蛋白异质体及甲胎蛋白的表面等离子谐振技术的曲线;

[0095] 5.3 分别将甲胎蛋白异质体、甲胎蛋白标准品的曲线与待测甲胎蛋白异质体及甲胎蛋白的曲线比较, 从而确定待测样品中甲胎蛋白异质体、甲胎蛋白是否存在以及存在的数量。

[0096] 6. 结果判定

[0097] 6.1  $\text{AFP-L3 比率} = (\text{AFP-L3 含量} / \text{AFP 含量}) \times 100\%$

[0098] 阳性结果: 甲胎蛋白异质体 (AFP-L3) 占总甲胎蛋白 (AFP) 比率  $\geq 10\%$

[0099] 阴性结果: 甲胎蛋白异质体 (AFP-L3) 占总甲胎蛋白 (AFP) 比率  $\leq 10\%$

[0100] 检测结果:

[0101] 用本方法检测 700 例正常人的血清样品, 检测结果 685 例为阴性, 15 例为假阳性, 特异性为 97.86%; 用本方法检测 300 例原发性肝癌患者血清, 287 例为阳性, 13 例为假阴性, 与病理检测结果的符合率为 95.67%。

[0102] 实施例 2 利用生物芯片检测糖链异常 IgA 肾炎

[0103] 1. 铺制金膜

[0104] 1.1 按柠檬酸三钠还原法制备金溶胶: 取 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 加热煮沸, 边搅拌边加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.75ml, 金黄色的氯金酸水溶液在 2 分钟内变成紫红色, 继续煮沸 15 分钟, 冷却后以蒸馏水补足到原体积。

[0105] 1.2 金膜铺制:

[0106] 1.2.1 玻片酸洗清洁后, 放入  $\text{N-}\beta\text{-(氨乙基)-}\gamma\text{-氨丙基三价氧基硅烷 (APTMS) / 甲苯}$  溶液中回流 12 小时后洗净, 取出, 氮气吹干, 置于清洁干燥处备用;

[0107] 1.2.2 处理好的玻片置纳米金溶液中浸泡 12 小时后, 浸入 0.01mol/L 的 PDDA 水溶液中 15 分钟, 取出用超净水清洗。烘干后移入羟胺 / 氯金酸溶液中, 浸泡 30 分钟, 玻片表面形成光亮的金属膜。

[0108] 2. 制备 SAMs

[0109] 2.1 将制备好的金膜在 piranha 液 (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  : 浓硫酸体积比 = 1 : 3) 中浸泡清洗, 然后用双蒸水反复清洗, 氮气吹干;

[0110] 2.2 将铺制好金膜的芯片浸在有机硫化物的乙醇溶液中, 其中有机硫化物的浓度

为 10mmol/L, 时间为 13 小时, 温度为室温; 其中, 所述的有机硫化物为长链巯基乙醇为:  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{OH}$  和  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$  的混合物。

[0111] 2.3 SAM 层的修饰

[0112] 2.3.1 将固定有 SAM 表面的芯片加入 0.2M EDC/0.05M NHS 的水溶液活化, 加入 0.2M 2-(2-氨基乙氧基)乙醇 (AEE) 反应,

[0113] 2.3.2 加入质量百分比为 6% 的表氯醇, 再加入葡聚糖, 用 1mol/L 溴乙酸处理 5 次, 使葡聚糖羧基化。

[0114] 3. 蜗牛凝集素 (HAA/HPA) 或长柔毛野豌豆凝集素 (VVL) 与芯片的固定

[0115] 3.1 将结合有羧基化的多聚糖的芯片与 0.2M EDC/0.05M NHS 反应, 反应完毕后用 10mM 的 pH4.5 乙酸钠缓冲溶液洗去活化试剂;

[0116] 3.2 在芯片表面加上含有蜗牛凝集素的缓冲溶液; 缓冲溶液为 10mM 的 pH4.5 乙酸钠缓冲溶液, 蜗牛凝集素的浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;

[0117] 3.3 结合反应完毕后, 加入去乙醇胺的碱性溶液将芯片上没有与凝集素反应的活化基团失活, 乙醇胺碱性溶液的浓度为 2mol/L, pH 值为 8.0。

[0118] 将反应完毕的芯片在潮湿的环境中孵育 1 小时, 然后在 0 ~ 4°C 条件下密封保存。

[0119] 4. 处理样本

[0120] 取糖链异常 IgA 肾炎患者血清 300 份和正常人血清 700 份

[0121] 5. SPR 检测

[0122] 5.1 测定糖链异常 IgA 标准品的标准曲线

[0123] 5.1.1 将制备好的芯片组装到所制作的表面等离子共振传感器棱镜表面, 流动反应池中注入 20  $\mu\text{l}$  HBP-EP 缓冲液, 预热 37°C 30 分钟, 读取此时反射光反射角度初始数值;

[0124] 5.1.2 将糖链异常 IgA 标准品注入到 20  $\mu\text{l}$  流动反应池中, 37°C 反应 2 小时, 并读取糖链异常 IgA 标准品反射角数值; 流动反应池中充入 20  $\mu\text{l}$  HBP-EP 缓冲液, 37°C 清洗 1 小时, 重复 3 次;

[0125] 5.1.3; 分析比较上述检测数据, 得到标准曲线;

[0126] 5.2 按照相同的方法建立待测样品的表面等离子共振技术的曲线;

[0127] 5.3 将标准品的曲线与待测样品的曲线比较, 从而确定待测样品中待测物是否存在以及存在的数量。

[0128] 6. 实验结果:

[0129] 用本方法检测 700 例正常人的血清样品, 检测结果 694 例为阴性, 6 例为假阳性, 特异性为 99.14%; 用本方法检测 300 例糖链异常 IgA 肾炎患者血清, 297 例为阳性, 3 例为假阴性, 与肾穿刺病理检测结果的符合率为 99%。

专利名称(译)	一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原的生物芯片		
公开(公告)号	<a href="#">CN101968440A</a>	公开(公告)日	2011-02-09
申请号	CN200910304885.3	申请日	2009-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	上海慧普生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海慧普生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海睿昂生物技术有限公司		
[标]发明人	刘睿强		
发明人	刘睿强		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N21/41		
代理人(译)	王明霞		
其他公开文献	CN101968440B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及生物芯片领域，特别是涉及一种利用表面等离子谐振技术检测特定糖链蛋白、抗体或抗原蛋白芯片及其基于表面等离子谐振原理的检测方法。本发明的芯片在基底上有金属膜，在金属膜表面上固定有连接层，在连接层上固定有凝集素或其他抗原或抗体；所述的连接层是由一端具有活性基团、另一端通过巯基与金属膜反应的长链巯基乙醇构成的自组装单分子层，再经激活制备而成。本发明的芯片利用凝集素与特定糖链蛋白的特异性结合、特异性抗原抗体结合来诊断疾病，为疾病的诊断提供了新的途径。该方法简便易行，成本较低，简化了操作步骤，缩短了检测时间，是一种适宜推广的新方法。