



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105652000 B

(45)授权公告日 2019.01.11

(21)申请号 201511021760.1

(22)申请日 2015.12.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105652000 A

(43)申请公布日 2016.06.08

(66)本国优先权数据

201410849610.9 2014.12.31 CN

201410848939.3 2014.12.31 CN

(73)专利权人 天津东亚生物技术有限公司

地址 300457 天津市滨海新区开发区洞庭
路220号国际生物医药联合研究院实
验楼S1402

(72)发明人 苏殿杰

(74)专利代理机构 北京鼎佳达知识产权代理事
务所(普通合伙) 11348

代理人 王伟锋 刘铁生

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/552(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

审查员 段晓露

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种蛋白芯片

(57)摘要

本发明公开了一种新型蛋白芯片,所述新型蛋白芯片的基质材料采用以免疫微量测定板为代表的具孔的玻璃片、具孔的高分子聚合物板、玻璃球或高分子聚合物球代替传统蛋白芯片的基质材料NC膜。普通免疫分析仪通过检测免疫反应所产生的颜色或光强代替传统蛋白芯片的判读仪。新型蛋白芯片配合免疫软件能够在溶液中联合定性、定量检测多种免疫配体。广谱肿瘤新型蛋白芯片是利用多个肿瘤标志物联合定性、定量检测癌症的仪器。新型广谱肿瘤蛋白芯片能有效排除假阳性和假阴性,提高检测的准确度,并且降低芯片制作成本。

未知样品加入方向

	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	← HLA-G 试剂
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	← CEA 试剂
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	← HBsAg 试剂
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	← HLA-G 试剂
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	← CEA 试剂
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	← HBsAg 试剂
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	← 标准试剂
H	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	← 标准试剂

1. 一种蛋白芯片, 其特征在于, 所述蛋白芯片的基质材料为具孔的玻璃片、具孔的高分子聚合物板、玻璃球或高分子聚合物球,

其中, 所述的高分子聚合物为聚乙烯、聚丙烯、尼龙或有机玻璃;

所述蛋白芯片为肿瘤蛋白芯片,

所述肿瘤蛋白芯片为Tumor Chip-8或Tumor Chip-3, 其中,

所述Tumor Chip-8用于联合检测的标志物由广谱肿瘤标志物HLA-G和常用肿瘤标志物CEA、HBsAg、Her2、CA153、NSE、AFP、PSA组成;

所述Tumor Chip-3用于联合检测的标志物由HLA-G、CEA和HBsAg组成。

2. 根据权利要求1所述的蛋白芯片, 其特征在于, 以免疫微量测定板作为蛋白芯片的基质材料。

3. 根据权利要求2所述的蛋白芯片, 其特征在于, 所述免疫微量测定板的孔数具有96孔或384孔或更多。

4. 根据权利要求1所述的蛋白芯片, 其特征在于,

利用硅烷偶联剂或碳二亚胺使玻璃片小孔或玻璃球带上氨基, 再利用双功能蛋白交联剂戊二醛使玻璃片小孔或玻璃球带上醛基, 然后把第一抗体通过与醛基共价键结合使其固定在玻璃片小孔或玻璃球壁上, 使玻璃片小孔或玻璃球变成具有免疫活性的小孔或玻璃球。

5. 根据权利要求1所述的蛋白芯片, 其特征在于, 高分子聚合物板的小孔或高分子聚合物球在pH7.0-9.5的条件下, 把第一抗体吸附在高分子聚合物板的小孔或高分子聚合物球壁上, 使聚合物板的小孔或高分子聚合物球活化成具有免疫活性的小孔或高分子聚合物球, 然后利用封闭液封闭剩余的结合位点, 以防产生非特异结合。

6. 根据权利要求4或5所述的蛋白芯片, 其特征在于, 共价键结合或静电吸附在所述玻璃或高分子聚合物材质的小孔或球壁上的第一抗体与被测的抗原结合后, 再与酶标第二抗体结合完成双抗体夹心法结合, 加入酶底物后可产生颜色或荧光, 通过免疫分析仪检测免疫反应所产生颜色的OD值或荧光强度定性或定量测定出待测抗原的含量, 标记第二抗体的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

7. 根据权利要求1所述的蛋白芯片, 其特征在于,

能够利用多种抗体对溶液中的肿瘤标志物蛋白抗原进行联合定性或定量测定; 利用蛋白芯片仅需作一次免疫测定, 配合免疫分析软件可实现对多种抗原进行定性或定量检测。

8. 根据权利要求1所述蛋白芯片, 其特征在于, 所述蛋白芯片还配有一种专用的免疫软件, 该免疫软件能够处理高通量的反应数据, 能自动生成N个标准曲线, 自动用此标准曲线分别计算出各个被测物的含量, 软件根据N种被测物各自的正常值, 给出被测物属于正常或超标, 软件再根据预先设定的判断肿瘤的标准, 于是该蛋白芯片具有能判断被检者有无任何癌症的性能。

一种蛋白芯片

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、生物医学、临床免疫分析技术领域,尤其涉及一种新型蛋白芯片。

背景技术

[0002] 肿瘤是一种常见病和多发病,发病率居第二位。据世界卫生组织 1997年报告称全球肿瘤患者每年死亡人数高达660万,到2020年全球的肿瘤患者将达到1500万。各种恶性肿瘤严重地威胁着人类的身体健康。在肿瘤发病的早期往往没有自觉症状,一旦发觉自觉症状时已到无法治疗的中晚期。在肿瘤发病机理和治疗问题尚未彻底解决的今天,要降低肿瘤患者死亡率必须开展基层肿瘤普查工作,做到早发现早治疗。

[0003] 尽管研究人员已经发现了多种肿瘤相关抗原,例如CEA(癌胚抗原)、AFP(甲胎蛋白)、CA15-3、CA19-9、CA50、CA125、PSA等等。由于免疫分析具有高度的特异性、专一性,所以利用某种肿瘤相关抗原做成的试剂盒只能检测其对应的一类肿瘤。如果要检查体内是否存在常见的某些肿瘤必须作多项检查,被检查者需支付多个项目检查费用。

[0004] 1987年Geraghty等发现并克隆了HLA-G。HLA-G是人类白细胞抗原(HLA) I组中非典型的组织相容性抗原,在恶性肿瘤患者的血清中出现,在正常人的血清中不存在HLA-G。HLA-G最初发现于胎盘绒毛细胞滋养层。初期有关HLA-G的研究集中于胎儿同母亲之间的免疫耐受作用。由于胎盘分泌HLA-G使母体产生免疫耐受,从而使胎儿避免了母体的排斥作用。近20年,HLA-G已成为重要的免疫分子,在免疫、生殖、肿瘤、器官移植等方面发挥着重要作用。免疫组化检测结果证实在喉癌、食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌等多种恶性肿瘤组织中都能表达HLA-G。

[0005] 大量的实验证明,HLA-G是一个具有高度肿瘤特异性的肿瘤标志物,在恶性肿瘤的表达具有普遍性。在肿瘤发生和发展过程中其水平在肿瘤组织、血液及其它体液中增高。从理论上讲检测HLA-G能广泛用于诊断各种常见的恶性肿瘤,探明受检者体内是否存在常见的任何恶性肿瘤。

[0006] 但是通过临床检测证实,中晚期肿瘤患者血清中HLA-G含量并不是随肿瘤细胞的增多而含量随之升高,在某种情况下会降到很低水平,以致用检测HLA-G的技术检测不到,产生假阴性结果。这给临床应用 HLA-G诊断癌症带来严重困难。

[0007] 此外我们还了解到某些化合物还会产生干扰作用,使检测结果产生假阳性。检测癌症产生假阳性是绝对要不得的。

[0008] 因此为了发挥HLA-G检测肿瘤的广谱性,防止产生假阳性和假阴性结果,我们发明了多肿瘤标志物联合检测的新型广谱蛋白芯片技术。

[0009] 另外,当代分子生物学也需要高通量定地对溶液中某些种类的蛋白或核酸进行定性或定量分析,同样需求性能练好的新型蛋白芯片分析技术。

[0010] 目前传统蛋白芯片法是从基因芯片法发展起来的。蛋白芯片法参照基因芯片制备方法制备而成。在一个狭小的硝酸纤维素膜(即NC膜)上用特殊的点样机喷上十几个乃至几

十个蛋白点进行免疫分析。由于蛋白的化学性质与DNA不同,多种蛋白在一个狭小的NC膜上产生了空间相互作用,使蛋白芯片产生了很严重的假阳性和假阴性结果。为了解决上述问题,发挥蛋白芯片的高通量检测的性能,必须改进蛋白芯片的制作模式。为此我们研发出新型蛋白芯片新技术。利用新型蛋白芯片检测各种蛋白及肿瘤标志物,收到了良好的检测效果,提高了检出率和准确度,降低了出现假阳性和假阴性的结果,并且显著降低了制作成本。新型肿瘤蛋白芯片成为高通量定性或定量检测蛋白、核酸及肿瘤标志物的良好方法。

发明内容

[0011] 有鉴于此,本发明实施例提供一种新型蛋白芯片,主要目的是提高检测准确度,降低制作成本。

[0012] 为达到上述目的,本发明主要提供如下技术方案:

[0013] 一方面,本发明实施例提供了一种新型蛋白芯片,所述蛋白芯片的基质材料采用以免疫微量测定板为代表的具孔的玻璃片、具孔的高分子聚合物板、玻璃球或高分子聚合物球代替传统蛋白芯片的基质材料NC膜。

[0014] 作为优选,以免疫微量测定板作为新型蛋白芯片的基质材料,其中免疫微量测定板的孔数具有96孔或具有384孔或更多。

[0015] 作为优选,所述玻璃片通过氢氟酸腐蚀成一定规格的小孔,利用硅烷偶联剂、双功能蛋白交联剂戊二醛或碳二亚氨使玻璃小孔或玻璃球带上氨基,再利用双功能蛋白交联剂使玻璃小孔或玻璃球带上醛基,然后把第一抗体通过与醛基共价键结合使其固定在玻璃小孔或玻璃球壁上,使玻璃小孔或玻璃球变成具有免疫活性的小孔或玻璃球;包含免疫微量测定板的高分子聚合物板的小孔或高分子聚合物球在pH7.0-9.5的条件下,把第一抗体吸附在高分子聚合物板的小孔或高分子聚合物球壁上,使聚合物的小孔或高分子聚合物球活化成具有免疫活性的小孔或高分子聚合物球,然后利用封闭液封闭剩余的结合位点,以防产生非特异结合。

[0016] 作为优选,所述高分子聚合物为聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、尼龙或有机玻璃。

[0017] 作为优选,共价键结合或静电吸附在所述玻璃或高分子聚合物材质的小孔或球壁上的第一抗体与被测的抗原结合后,再与酶标第二抗体结合完成双抗体夹心法结合,加入酶标底物后可产生颜色或荧光,通过免疫分析仪检测免疫反应所产生颜色的OD值或荧光强度定性或定量测定出待测抗原的含量,摒弃了传统蛋白芯片的判读仪,标记第二抗体的酶通常用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或吖啶酯。

[0018] 作为优选,能够利用多种免疫配体对溶液中的蛋白或核酸进行联合定性或定量测定,其中所述蛋白包括抗原、抗体、多肽和肿瘤标志物;所述核酸包括单双链DNA和RNA;

[0019] 当被检测的溶液中含有M种核酸或蛋白,要求对其中N($N > 1$ 且 $N \leq M$)种核酸或蛋白进行定性或定量免疫分析,必须用N种免疫配体对上述溶液进行免疫联合检测,利用新型蛋白芯片仅需作一次免疫测定,配合免疫分析软件可实现对N种抗原或抗体进行定性或定量检测,可用于分子生物学蛋白飞行指纹分析。

[0020] 作为优选,用N种($N > 1$)免疫配体联合定量测定溶液中是否存在某种蛋白或核酸的抗原或抗体,该抗原或抗体通常具有多个交叉配体,仅限于作一次免疫测定,

[0021] 用于对某种肿瘤抗原联合免疫分析,由于某些肿瘤抗原除了能特异性地对某种肿

瘤标志物的配体发生特异反应外,同时还与其它多个免疫配体进行交叉反应而产生假阳性结果,用所述新型蛋白芯片配以免疫软件,仅作一次免疫检测即可完成用N种免疫配体联合检测溶液中的某种或多种抗原或抗体,并可以掌控或排除非特异交叉反应产生的假阳性和假阴性结果,从而提高测定的准确度。

[0022] 作为优选,除了上述免疫反应外,还在于配用一种专用的免疫软件,该免疫软件能够处理高通量的反应数据,能自动生成N个标准曲线,自动用此标准曲线分别计算出各个被测物的含量,软件根据N种免疫配体各自的正常值,给出被测物属于正常或超标,软件再根据预先设定的判断肿瘤的标准,于是该新型蛋白芯片具有能判断被检者有无任何癌症的性能。

[0023] 作为优选,所述新型肿瘤蛋白芯片为Tumor Chip-3,Tumor Chip-3 是由HLA-G、CEA和HBsAg联合组成,用于联合检测HLA-G,只需做一次检测,新型蛋白芯片Tumor Chip-3具有能确定被检者有无任何癌症的性能。

[0024] 作为优选,所述新型肿瘤蛋白芯片为Tumor Chip-8,Tumor Chip-8 是由广谱肿瘤标志物HLA-G和常用肿瘤标志物CEA、HBsAg、Her2、CA153、NSE、AFP、PSA等联合组成,利用Tumor Chip-8检测癌症只需做一次检测,TC-8不但具有能确定有无任何癌症的性能,还具有能确定癌症组织类型的功能。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0026] 本发明实施例通过采用新型芯片基质材料,各种蛋白在不同的小孔(或小球)中进行反应,互不干扰,避免发生假阳性和假阴性反应;摒弃传统蛋白芯片昂贵的加样枪采用常规加样器加样;摒弃了价格昂贵的传统蛋白芯片判读仪,采用普通免疫分析仪,例如酶联免疫分析仪或化学发光免疫分析仪进行定量或定性测定,降低了制备成本;采用以广谱肿瘤标志物HLA-G为主的多种肿瘤标志物联合检测,配以免疫软件自动处理高通量的反应数据,使用酶联或化学发光检测工具,可以有效提高检测肿瘤的灵敏度、准确度和临床符合率。

附图说明

[0027] 图1为本发明一实施例的加样示意图;

[0028] 图2为本发明另一实施例的加样示意图。

具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施例对本发明作进一步详细描述,但不作为对本发明的限定。在下述说明中,不同的“一实施例”或“实施例”指的不一定是同一实施例。此外,一或多个实施例中的特定特征、结构、或特点可由任何合适形式组合。

[0030] 实施例1

[0031] 制备具有免疫活性的玻璃片或玻璃球:

[0032] (1) 制备玻璃小孔阵列:选取无色平板玻璃,厚度为3-6mm。利用氟化氢把平板玻璃腐蚀成直径3-6mm小孔,容积以10-50微升为宜,孔距可自行掌握(一般应与测试仪相适应)。小孔制成后用超纯水洗涤 5至8次,每次用振荡器震荡5秒,倾掉洗液,晾干备用。玻璃小球的直径10nm-4mm不等,根据需要而定。

[0033] (2) 使玻璃小孔带上活泼氨基:用1-10%硅烷偶联剂10-50微升与玻璃小孔作用1-

2小时,每30分钟换液一次,使玻璃小孔产生活泼氨基。反应完成后用超纯水冲洗5-8次,每次用振荡器震荡5秒,倾去洗液,晾干。

[0034] (3) 把氨基转化为醛基:采用双功能蛋白交联剂例如戊二醛、碳二亚胺等,每孔加0.1-1%交联剂10-50微升,小孔上盖上玻璃片防止交联剂挥发,37℃反应2小时,30分钟换液一次。反应完成后甩出交联剂,用超纯水冲洗5-8次,每次用振荡器震荡5秒,晾干。

[0035] (4) 交联第一抗体:将第一抗体1 (HLA-G单抗) 加在第一横排,第一抗体2 (CEA单抗) 加在第二横排,以此类推,把第一抗体3 (beita-2M 单抗)、第一抗体4 (Her2)、第一抗体5 (AFP单抗)、第一抗体6 (NSE 单抗)、第一抗体7 (CA-153单抗)、第一抗体8 (PSA单抗)、第一抗体9 (HBsAg单抗)、第一抗体10 (HCG单抗) 依次加在第三至第十横排的小孔中。每种第一抗体须经适当稀释,每孔加10-50微升,37℃温育2小时。反应后吸出第一抗体。

[0036] (5) 封闭:每孔加封闭液10-50微升,37℃温育2小时。反应后甩出封闭液,晾干密闭4℃保存备用。

[0037] (6) 玻璃小球交联第一抗体的活化方式及封闭过程基本同玻璃小孔,只是把玻璃小球放在合适的塑料试管中进行,所添加试剂的量以淹没小球为准,试管的排列顺序参见图1所示。

[0038] 实施例2

[0039] 制备具有免疫活性孔的各种高分子聚合物板

[0040] 1. 在各种板材上制备小孔阵列:采用热压成孔或打钻成孔,孔的直径3-6mm小孔,容积以10-50微升为宜,孔距根据测定仪而定。也可用合适的酶标板。

[0041] 2. 包被第一抗体:在pH7.0-9.5条件下,每孔加适当稀释的第一抗体10-50微升,4℃过夜或37℃温育2小时,将第一抗体吸附在板材的小孔壁上,反应后吸出抗体溶液。

[0042] 3. 封闭:每孔加封闭液10-50微升,37℃温育2小时,或4℃过夜。反应后甩出封闭液,晾干密闭4℃保存备用。

[0043] 当然,采用免疫微量测定板来制备具有免疫活性的聚合物板,即直接在免疫微量测定板上按上述方法包被第一抗体,然后封闭。

[0044] 实施例3

[0045] 一般常用的高分子聚合物球有聚丙烯小球、尼龙小球、聚苯乙烯小球及其微球。高分子聚合物小球的直径在4-6mm之间,微球的直径在10-60nm之间。小球表面有的呈光滑表面,有的呈毛糙表面。

[0046] (1) 聚丙烯小球或微球可通过静电吸附的方法把第一抗体包被在小球或微球的球体表面详见实施例2。

[0047] (2) 尼龙球在室温下与1-4摩尔/升盐酸反应1-6小时使其暴露出氨基和羧基,再通过碳二亚胺或戊二醛把第一抗体包被在尼龙球的表面。

[0048] (3) 聚苯乙烯小球或微球包被第一抗体可通过静电吸附的方式把第一抗体包被在聚苯乙烯的小球或微球的表面,参见实施例2;聚苯乙烯小球或微球还可通过共价键结合的方式包被第一抗体:聚苯乙烯球在室温下与1-6摩尔/升硝酸作用1-8小时,用水冲洗小球洗净硝酸,使聚苯乙烯球的苯环上带上硝基,在4摄氏度条件下与还原粉作用1-6 小时使硝基转换为氨基。氨基通过双功能基团化合物戊二醛或碳二亚胺与第一抗体反应使第一抗体包被在聚苯乙烯球表面。水洗后晾干备用。

[0049] 实施例4:

[0050] 利用实施例1和实施例2制备的玻璃蛋白芯片和高分子芯片测定HLA-G

[0051] 1.测定待测血清:结合上第一抗体并封闭好的玻璃芯片或高分子芯片,将1号待测血清分别加在玻璃片(或球)或高分子聚合物板第1 竖排的各个活性孔中,2号血清加在第2竖排的各个活性孔中,以此类推,3号血清至n号血清依次加在第3至第n竖排各个活性孔中,每个活性孔加待测血清10-50微升。

[0052] 2.将活性玻璃片(或球)或高分子聚合物板(或球)置37℃温育60 分钟,反应中间震荡一次(5秒),吸出血清,经消毒后弃掉。

[0053] 3.洗涤:每个活性孔加洗涤液10-50微升,洗涤5-8次,每次震荡5秒,吸出洗涤液(消毒后弃掉),拍干。

[0054] 4.加入标记第二抗体:根据横排所加的第一抗体,在相同的横排上加入其相对应的标记第二抗体,每个活性孔加10-50微升,置37℃恒温水浴中温育1小时。

[0055] 5.洗涤:每个活性孔加洗涤液10-50微升,洗涤5-8次,每次震荡5秒,吸出洗涤液(消毒后弃掉),拍干。

[0056] 6.加入显色液或发光液:根据第二抗体所标记的标记物,每孔加入其相应的显色液或发光液10-50微升。

[0057] 7.测定:加入显色液者,需经37℃温育20-30分钟后用光密度计测定其颜色OD值;加入化学发光液者,加液后立即用化学发光仪测定其荧光发光强度。

[0058] 8.以上测定步骤总结于下表:

[0059]

血清编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	n
血清或标准(μl)	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50
	37℃ 温育 60 分钟, 洗涤									
标记第二抗体(μl)	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50
	37℃ 温育 60 分钟, 洗涤									
※发光液(μl)	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50	10-50
测定发光值										

[0060] ※注释:如果用酶联技术测定,则适当加酶联A、B显色液,加完后温育20-30分钟,

用酶标仪测定各孔的OD值。

[0061] 可以制做相关免疫分析软件,通过软件自动计算数据。

[0062] 经酶联免疫测定后或化学发光测定后,软件会自动绘制不同肿瘤标志物的各个标准曲线,利用各个肿瘤标志物的标准曲线,软件会自动计算出各个标志物在某个未知血清中浓度,根据各个肿瘤标志物的正常值,软件会自动给出某血清的某个指标是否正常或超标。之后软件根据我们给定的癌症判断标准,软件会自动给出所有未知血清是否属于患有癌症或患癌风险度高低的报告。

[0063] 实施例5

[0064] 蛋白芯片Tumor Chip-3的制备及应用:

[0065] Tumor Chip-3 (简称TC-3) 是由肿瘤标志物HLA-G、CEA和HBsAg 联合组成,利用免疫微量测定板作为蛋白芯片的基质材料。加样品的方式参见图1。

[0066] 1.包被第一抗体:第一抗体用pH7.0-9.5的缓冲液适当稀释,在ABC不同横排加入对应的第一抗体。例如第一横排A和第四横排D 的孔里加入HLA-G的第一抗体,第二横排B和第五横排E的孔里加入 CEA的第一抗体,第三横排C和第六横排F的孔里加入HBsAg的第一抗体。每孔加第一抗体5-100微升,4℃过夜或37℃温育2小时,将第一抗体吸附在免疫微量测定板的小孔壁上,反应后甩出抗体溶液。

[0067] 2.封闭:每孔加封闭液10-200微升,37℃温育2小时,或4℃过夜。反应后甩出封闭液,晾干密闭4℃保存备用。

[0068] 3.加3种标志物的标准品及待测血清样品:

[0069] (1) HLA-G的标准品加在第七横排G的1-5孔里,CEA的标准品加在第七横排G的6-10孔里,HBsAg的标准品加在第八横排H的1-5 孔里。每种标准品设5个孔,各孔所含标准品的浓度不同,每孔加不同浓度的标准品5-100微升。

[0070] (2) 加未知样品:1号样品加在第一竖排1的ABC 3个孔里,2 号样品加在第二竖排2的ABC孔里,13号样品加到第一竖排1的DEF 3 个孔里,14号样品加到第二竖排2的DEF3个孔里,如此类推。每孔加样品5-100微升。如果未知样品较多,可两个微量测定板或多个联用。37度温育1小时。反应后倾去样品,洗3-4次,拍干。倾掉的未知血清样品经消毒后弃掉。

[0071] 4.加酶标第二抗体:HLA-G的第二抗体加在第一横排A和第四横排 D的各孔里,CEA的第二抗体加在第二横排B和第五横排E的各孔里, HBsAg的第二抗体加在第三横排C和第六横排F的各孔里。每孔加第二抗体5-100微升,37度温育1小时。反应后倾去反应液,洗3-4次,拍干。

[0072] 5.加酶联显色液A、B液适量,37度温育1小时,加适量终止液,测定各孔的OD值;或加入化学发光液5-100微升,立即测定发光值,并记录发光值。

[0073] 可以通过免疫分析软件进行相关分析:

[0074] (1) 3种肿瘤标志物的标准曲线:以标准品的各个浓度对它的发光值作直线回归,得到直线回归方程:

[0075] $Y_1 = A_1 + B_1 \times X_1 \cdots \cdots$ HLA-G的回归方程

[0076] $Y_2 = A_2 + B_2 \times X_2 \cdots \cdots$ CEA的回归方程

[0077] $Y_3 = A_3 + B_3 \times X_3 \cdots \cdots$ HBsAg的回归方程

[0078] 把这3个回归方程放到软件里,以求未知样品含3种标志物的浓度。

[0079] (2) 把3个肿瘤标志物的正常值放到软件里,以比较未知样品3 种检测指标是否正常或超标。

[0080] (3) 再把我们制定的判断有无癌症的标准放到软件里,使新型广谱肿瘤蛋白芯片TC-3具有能判断被检者患各种癌症风险高低的能力。

[0081] 实施例6

[0082] 蛋白芯片Tumor Chip-8的制备及应用:

[0083] Tumor Chip-8(简称TC-8)是由8种肿瘤标志物组成的新型广谱肿瘤蛋白芯片。这8种肿瘤标志物是HLA-G,CEA,HBsAg,Her2,CA153, NSE,AFP,PSA。

[0084] 未知样品加样方向及标准品加样方向请阅图2。如果未知样品数量较多,手边的单块免疫微量测定板的孔数不够时,可以两块或多块免疫微量测定板联用。加样量、加样顺序及反应条件参见实施例4。

[0085] TC-8的功能:新型广谱肿瘤蛋白芯片TC-8不但具有能够判断被检者患各种癌症风险高低的能力,同时还能指出癌症的组织类型。

[0086] 本发明不限于上述实施例中的免疫反应类型、酶免疫测定仪的种类、肿瘤标志物的种类与数量、高分子聚合物的种类等。

[0087] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。



图1



图2