



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105807047 B

(45)授权公告日 2018.12.11

(21)申请号 201610237547.2

审查员 刘莉丹

(22)申请日 2016.04.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105807047 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(73)专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 王志民 侯彩玲 何珊珊 王媛媛

(74)专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 郭国中

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页

(54)发明名称

基于核酸序列编码的ELISA检测芯片及其制备和应用

(57)摘要

本发明公开了一种基于核酸序列编码的ELISA检测芯片及其制备和应用;所述芯片的制备包括将编码核酸、捕获分子固定在微纳米珠表面形成微纳米珠复合物的步骤、在所得微纳米珠复合物表面固定靶向标志物、带有标记的检测分子形成微纳米珠复合体的步骤、将所得微纳米珠复合物装载至分布有微纳米坑阵列的基底上制备ELISA检测芯片的步骤以及ELISA检测和编码核酸解码步骤。与现有技术相比,本发明可在一张芯片上同时检测海量样品及多种标志物,ELISA检测在微纳米坑内进行,反应体积可小于 10^{-24} L级,可大大降低试剂用量。本发明可广泛用于临床医学检测、献血者检测、体检、农副产品毒素、非法食品添加剂及环境污染的检测。

1. 一种基于核酸序列编码的ELISA检测芯片的制备方法,其特征在于,包括将编码核酸、捕获分子固定在微纳米珠表面形成微纳米珠复合物的步骤、在所得微纳米珠复合物表面固定靶向标志物、带有标记的检测分子形成微纳米珠复合体的步骤、将所得微纳米珠复合体装载至分布微纳米坑阵列的基底上制备ELISA检测芯片的步骤;

应用制得的ELISA检测芯片检测时,包括先ELISA检测、后测序解码从而确定待测样品溶液中所含靶向标志物的步骤,或者先测序解码、后ELISA检测从而确定待测样品溶液中所含靶向标志物的步骤;

其中,所述ELISA检测具体为向所述的ELISA检测芯片上加入检测分子底物溶液、充分反应后测试;或者加入发光试剂后直接进行光学检测;

所述测序解码包括对所述微纳米坑装载微纳米珠复合体上的编码核酸进行测序;

所述编码核酸除含有编码区以外,还依据测序方法的不同而带有至少一段供引物或探针配对的必要序列;其中所述测序方法,可以是合成测序,也可以是连接测序;

所述微纳米坑阵列中,依据所采用的微纳米珠直径 ϕ 的大小,微纳米坑直径和深度控制在大于 ϕ 和小于 2ϕ 之间;微纳米坑的中心间距依据测序和ELISA检测所采用的荧光、发光材料而异,2色或多色光学检测时,样点中心间距不小于其中最长波长的1/2。

2. 根据权利要求1所述的基于核酸序列编码的ELISA检测芯片的制备方法,其特征在于,所述编码核酸为DNA或RNA,所述编码核酸为线性单链核酸或者呈发卡结构;

所述捕获分子为抗体、抗原或半抗原;

所述微纳米珠的直径在百纳米至数十微米级之间;所述微纳米珠的材质包括有机硅、磁性材料或多聚物。

3. 根据权利要求1或2所述的基于核酸序列编码的ELISA检测芯片的制备方法,其特征在于,所述编码核酸、捕获分子的固定具体是通过所述微纳米珠表面携带的活性基团和修饰核酸、捕获分子的活性基团发生反应形成活性基团对实现的。

4. 根据权利要求1所述的基于核酸序列编码的ELISA检测芯片的制备方法,其特征在于,所述检测分子为抗体或者抗原;所述标记为酶或者荧光分子。

5. 根据权利要求1所述的基于核酸序列编码的ELISA检测芯片的制备方法,其特征在于,微纳米珠复合体的制备步骤中,所述靶向标志物、带标记的检测分子的固定步骤依据所采用ELISA体系的不同而不同;其中,所述ELISA体系为①双抗体夹心法、②双抗原夹心法、③间接法、④直接竞争法、⑤间接竞争法、⑥捕获法中的一种。

6. 根据权利要求1所述的基于核酸序列编码的ELISA检测芯片的制备方法,其特征在于,所述微纳米坑阵列是通过微纳加工方法在固相基底上制备的;

其中,所述的微纳加工方法包括深硅刻蚀方法、光纤拉伸、腐蚀方法或铸模方法;所述的基底,其材质包括硅片、普通玻璃、石英玻璃、光纤束、聚二甲基硅氧烷或聚丙烯材料。

7. 一种基于核酸序列编码的ELISA检测芯片,其特征在于,可通过权利要求1~6任一项所述的制备方法获得。

8. 一种权利要求7所述的ELISA检测芯片在疾病标志物,农药残留、兽药残留、生物毒素、非法食品添加剂检测中的应用。

基于核酸序列编码的ELISA检测芯片及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物芯片技术,具体是一种基于核酸序列编码的ELISA检测芯片及其制备和应用,即具体是一种经核酸序列编码的酶联免疫吸附反应(简称ELISA)芯片的制作与检测方法,可在一张芯片上同时检测多个样品和多个靶向标志物,检测样品数 \times 标志物数的总量可高达百万以上。不仅通量高,还能大幅度节省耗材。在医学领域,可实现疾病的早期检测与诊断,为预防和治疗提供足够时间,还可用于环境污染检测以及农副产品的农药残留、兽药残留、生物毒素和非法食品添加剂物等检测。

背景技术

[0002] 在生物芯片制作和使用过程中,编码(encode、encoded或encoding)技术,也称条形码(barcode、barcoded或barcoding)技术,可以在一张芯片上同时检测多来源样品的多个标志物,最后,芯片中的每个样点,可以通过解码而追溯到各个标志物及其样品的来源,能大幅度提高生物芯片的并行化检测水平。目前,这种编码技术已应用于DNA测序领域。但是,在以蛋白质及其他核酸以外物质为标志物的药物筛选、新药发现、疾病早期诊断、食品安全和环境污染等检查中,还缺乏这种与DNA检测相类似的编码技术。

[0003] 经对现有文献检索发现,2002年,Kevin Braeckmans等在Nature Reviews Drug Discovery (第1卷,第6期,第447-456页)发表了题为“Encoding microcarriers:Present and future technologies”论文,综述了几种已发表的微米珠编码方法,主要有光(质)谱编码、电子编码、图形编码和物理编码。这些技术均存在一种或多种限制,例如,编码数量少、操作简便性差和检测通量低。本发明要解决的是一种编码量几乎无限、可在一张芯片上同时检测多来源样品和多靶向标志物的核酸序列编码微纳米珠的ELISA芯片的制作与检测方法。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种基于核酸序列编码的ELISA检测芯片及其制备和应用,即提供一种新的核酸序列编码微纳米珠的ELISA芯片的制作与检测技术,同时检测多样品的多个标志物。

[0005] 本发明的目的是通过如下所述的技术方案实现的:

[0006] 1、微纳米珠编码:用活性基团修饰也称包被微纳米珠,根据待检样品数(X)和每个样品的待检靶向标志物数(Y),将微纳米珠分为N份,其中 $N = (X + \text{对照}) \times Y$,据此设计并合成N种带有序列独特编码区的核酸,核酸用可与微纳米珠表面活性基团发生连接反应的活性基团修饰,将每一种序列连接到一份微纳米珠表面,清洗并纯化,直至完成N份微纳米珠的编码,将微纳米珠划分为(X+对照)组,每组Y份,记载、备用。如果微纳米珠表面的活性基团既用于固定编码核酸,又用于后续ELISA的分子固定时,在固定编码核酸分子时,使编码核酸分子数少于微纳米珠表面的活性基团数,便于留有足够的活性基团用于后续ELISA的分子固定。

[0007] 2、ELISA样品制备:ELISA检测有多种体系,主要包括:①双抗体夹心法:当靶向标志物为大分子抗原时,即具有至少两个抗原决定簇的多价抗原。这时首先向微纳米珠表面固定已知抗体A,利用待测抗原上两个抗原决定簇A'和B'分别与固定在载体上(对于本发明来讲此处的载体即指微纳米珠)的抗体A和标记的第二个抗体B结合,后者也称为二抗,形成“固定的抗体A-待测抗原-标记检测抗体B”复合物,该复合物的抗体标记,一般采用可催化底物发生某种颜色改变的酶,这时称为酶标检测抗体,形成复合物后,再添加酶底物,酶催化显色反应后,光学检测;如果这里的标记是荧光团或荧光分子时,则不需添加底物而靠荧光团发光检测,下同。②双抗原夹心法,与双抗体夹心法类似,所不同的是形成“固定的已知抗原-待测抗体-标记检测抗原”复合物,最后添加酶底物检测。③间接法:形成“抗原(或半抗原)-待测抗体-标记检测二抗”复合物,再添加酶底物检测;④直接竞争法:有直接竞争法I,固定的已知抗体,同时添加待测抗原和标记检测抗原,再加底物显色;直接竞争法II,固定已知抗原,同时添加待测抗原和酶标检测抗体,再加底物显色;⑤间接竞争法:固定已知抗原,同时添加已知抗体和待测抗原,再加入标记检测二抗,然后加底物显色;⑥捕获法:固定抗人IgM抗体,捕获待测IgM抗体,IgM抗体再结合特异抗原,加入酶标二抗检测。无论上述哪种格式,这里将首先固定到微纳米珠表面的分子统称为捕获分子。

[0008] 将Y种捕获分子分别固定到每组Y份的微纳米珠上,直至完成(X+对照)组的捕获分子固定;用封阻溶液封阻微纳米珠表面可能剩余的活性基团,清洗纯化,除对照外,将组内Y种微纳米珠混合,备用。

[0009] 采用不同ELISA体系时,后续步骤略有不同,当采用①双抗体夹心法、②双抗原夹心法和③间接法时,每个样品溶液和对照,分别与微纳米珠反应,清洗后与标记检测分子反应,清洗;

[0010] 采用④直接竞争法时,直接竞争法I:标记检测抗原分别与待测样品及对照溶液等量混合后与微纳米珠反应,清洗;直接竞争法II:标记检测抗体分别与待测样品及对照溶液等量混合后与微纳米珠反应,清洗;

[0011] 采用⑤间接竞争法时,已知抗体和待测样品(含对照),等量混合后与微纳米珠反应,清洗后再加入标记检测二抗,清洗后备用。

[0012] 采用⑥捕获法时,待测样品及对照与微纳米珠反应,再加特异抗原后,加入标记检测二抗,清洗。

[0013] 3、微纳米坑基底的制备:用微纳加工方法,在固相基底上制备微纳米坑阵列。

[0014] 4、编码ELISA芯片的制备与检测:将上述制备的微纳米珠装载到微纳米坑阵列基片中,除去基片表面未装载的自由微纳米珠,形成检测芯片;将检测芯片置放到设有进、出样口的微流室中并密封,从微流室进样口向微纳米坑阵列添加酶底物溶液,光学显微镜检测并记录结果,之后清洗;少数情况下,检测分子上的酶标记用荧光团替代,这时无需添加底物,可直接光学检测。

[0015] 5、微纳米珠解码:去除上步ELISA检测留下的荧光后,用DNA测序方法测序每个微纳米珠上编码核酸的序列,完成解码。根据解码结果,将微纳米坑内的检测结果追踪到具体样品的具体靶向标志物。

[0016] 所述技术方案具体实施如下:

[0017] 第一方面,本发明提供一种基于核酸序列编码的ELISA检测芯片的制备方法,包括

将编码核酸、捕获分子固定在微纳米珠表面形成微纳米珠复合物的步骤、在所得微纳米珠复合物表面捕获靶向标志物、带有标记的检测分子形成微纳米珠复合体的步骤,及将所得微纳米珠复合体装载至分布有微纳米坑阵列的基底上制备ELISA检测芯片的步骤。

[0018] 优选地,所述编码核酸为DNA或RNA。本发明中所述的带有单链编码核酸序列的核酸,从编码序列的第一个碱基开始,每一个碱基位置,均有4种选择(当编码核酸为DNA时,4种碱基为dA、dC、dG和dT,当编码核酸为RNA时,4种碱基为A、C、G和U);也即,在第一个碱基位置可以编码4种微纳米珠,在第二个碱基位置又有4种选择,即:两个碱基可以编码 $4 \times 4 = 16$ 种微纳米珠,以此类推;理论上,核酸编码区的n个碱基,可编码微纳米珠的种类接近 4^n (在核酸较长时,富含多聚G或多聚dG的链易形成4重折叠结果,还有少数可经链内配对而形成二级结构,均不宜用于编码,但与总体序列相比,其数量极少,可忽略不计)。根据所需微纳米珠种类的数目N而设计编码区核酸的长度,遵从如下关系: $N = 4(1 - 4^n) / (1 - 4)$,其中,N为微纳米珠种类数,即样品数X与靶向标志物数Y的乘积再加对照数,n为编码所需的碱基数,可通过两边取对数得出编码碱基数的估值。这里之所以称之为估值,是因为当所需编码序列较长时,少数候选序列不符合测序要求,包括可能发生链内配对而形成二级结构的序列和多聚(dG)序列等,需要被剔除。从N种序列中剔除不符合测序要求的序列后,留下的所有序列组成“初级编码库。”库中的每一种编码序列的序号,按A、C、G和T依次排列。当编码区为1个碱基长度时,A、C、G和T分别为1、2、3和4,2个碱基长度时,AA、AC、AG、AT分别为5、6、7和8,CA、CC、CG和CT分别为9、10、11和12,GA、GC、GG和GT分别为13、14、15和16,TA、TC、TG和TT分别为17、18、19和20,以此类推。

[0019] 进一步优选地,所述编码核酸为DNA。

[0020] 优选地,所述编码核酸为线性单链核酸或者呈发卡结构。

[0021] 优选地,所述编码核酸除含有编码区以外,还依据测序方法的不同而带有至少一段供引物或探针配对的必要序列;其中所述测序方法,可以是合成测序,包括焦磷酸测序、单碱基逐一循环添加的分步合成测序和4碱基同时添加的可逆终止合成测序;也可以是连接测序。采用合成测序方法时,编码DNA可以设计为线性单链,也可以为发卡结构。在编码DNA为线性单链情况下,编码区的3'端需要连接有一段供引配对的识别序列,称为接头,修饰接头的3'端用于固定,接头要有足够的长度,除了可提高配对特异性和引物稳定性外,还避免了微纳米珠表面对DNA聚合酶产生的位阻效应,具体长度依采用的DNA聚合酶三维尺度而异(一般在18个碱基以上);在编码DNA为发卡结构的情况下,用活性基团修饰位于近环顶端的碱基,所设计的发卡结构应位于编码DNA的近3'端,以便DNA从5'向3'方向的自引发合成而实现编码区的解码,近环的双链区(也称为发卡结构DNA的茎)应足够长,以避免微纳米珠对聚合酶产生位阻效应。采用连接测序方法时,编码DNA设计为线性,不采用DNA纳米球,在编码序列的5'端添加的供引物(也称探针)配对的接头末端修饰,用于固定在微纳米珠表面,其长度应足够长,以避免微纳米珠表面对连接酶产生位阻效应为宜。

[0022] 优选地,所述编码区选自含有均聚物序列的初级编码库或者不含均聚物序列的优选编码库。其中,所述初级编码库中包括了含均聚物(指两个或多个相同碱基相邻排列,如-AA-、-CC-、-GG-和-TT-等)的序列,用这种序列编码时,适于采用3'羟基保护的dNTPs(四种脱氧核苷三磷酸)荧光标记类似物(即可逆终止物)混合物来延伸引物,以确保每次只延伸一个碱基,从而保证测序准确性;而采用无3'羟基保护的dNTPs荧光标记类似物的的合成测

序法,需要将荧光标记的dNTPs类似物逐一延伸引物,重复4次完成一个碱基的延伸,但是,当遇到均聚物时,正确配对的dNTP将连续延伸,影响测序的准确性。本发明将通过选用特殊的编码序列加以克服。具体做法是,从初级编码库中剔除编码区含均聚物以及可以形成二级结构的序列,从而得到“优选编码库。”库中的每一种编码序列的序号,仍按A、C、G和T依次排列。当编码区为1个碱基长度时,A、C、G和T分别为1、2、3和4,2个碱基长度时,AC、AG、AT分别为5、6和7,CA、CG、CT分别为8、9和10,GA、GC和GT分别为11、12和13,TA、TC和TG分别为14、15和16,以此类推。

[0023] 优选地,所述微纳米珠的直径在百纳米至数十微米级之间。

[0024] 优选地,所述微纳米珠的材质为有机硅、磁性材料或多聚物等。

[0025] 优选地,所述编码核酸、捕获分子的固定具体是通过所述微纳米珠表面携带的活性基团和修饰核酸、捕获分子的活性基团发生反应形成活性基团对实现的。更具体地,是指能够发生免疫反应、直接或间接形成共价键的活性基团对。

[0026] 进一步优选地,所述活性基团对中,微纳米珠表面活性基团与修饰核酸的活性基团对,可以与微纳米珠表面活性基团与修饰捕获分子的活性基团对为相同的活性基团对,也可以是不同活性基团对。更优选地,采用相同活性基团对。在具体实施中,凡是能够实现绑定目的的活性基团对均可用于本发明,包括但不限于生物素-抗生物素蛋白、地高辛-抗地高辛抗体、氨基-琥珀酰亚胺、氨基-环氧树脂、氨基-羧基、氨基-醛基、巯基-环氧树脂、巯基-马来酰亚胺、巯基-巯基、酮基-羟胺、酮基-酰肼、酰肼-醛基、酰肼-羧基等。

[0027] 优选地,所述微纳米珠复合物的制备还包括对微纳米珠复合物上多余的活性基团进行封闭的步骤。优选地,所述封闭溶液的有效组分包括但不限于牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白和生物素等。

[0028] 优选地,所述的捕获分子,是指ELISA芯片检测步骤中第一步固定到微纳米珠表面活性基团上的分子,包括已知抗体、已知抗原或已知半抗原,但不包括修饰它们的活性基团;所述的检测分子,可以是抗体,也可以是抗原;所述的标记,可以是酶分子,也可以是荧光分子。优选地,所述检测分子上的标记为酶或者荧光分子。一般情况下采用酶标记,能催化相应的底物形成可显色产物,用于光学检测,包括但不限于 β -半乳糖苷酶(BG)、辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶类分子(AP)等;荧光分子,也称荧光团,在相应波长的激发光激发下而发射荧光,从而加以检测,包括但不限于青色素类、吖啶类和Alexa Fluor类,检测时不需要再添加底物。

[0029] 优选地,所述的基底,包括但不限于硅片、普通玻璃、石英玻璃、光纤束、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚丙烯等材料等。

[0030] 优选地,所述微纳米坑阵列是通过微纳加工方法在固相基底上制备的;其中,所述的微纳加工方法,包括但不限于深硅刻蚀方法、光纤束拉伸、切片与腐蚀方法、铸模方法等。

[0031] 优选地,所述微纳米坑阵列中,依据对微纳米坑阵列的密度要求不同,微纳米坑的直径和深度可控制在百纳米到微米量级。依据所采用的微纳米珠直径 Φ 的大小,微纳米坑直径和深度控制在大于 Φ 和小于 2Φ 之间,以确保一个坑内不能同时容纳 ≥ 2 个微纳米珠;微纳米坑的中心间距依据测序和ELISA所采用的荧光、发光材料而异,2色或多色光学检测时,样点中心间距不小于其中最长的1/2,避免样点间距过小而超出光学分辨率,例如4色荧光检测时,样点中心间距 $\geq 500\text{nm}$,采用非光学测序时,样点中心间距 \geq ELISA检测时底物发

射光波长的1/2。例如,在较极端情况下,采用直径200nm的纳米珠,纳米坑的直径300nm、中心间距500nm,获得的纳米坑阵列密度高达4.6亿纳米坑/cm²。

[0032] 本发明中所述的靶向标志物的捕获与标记检测分子的固定,不同的ELISA体系虽然有差别,但一旦完成标记检测分子固定后,不同ELISA体系制备的微纳米珠,只要采用相同的酶标体系,可以单独装载到微纳米坑阵列,也可以混合后装载,最后进行ELISA检测和解码。

[0033] 优选地,微纳米珠复合体的制备步骤中,所述靶向标志物、标记检测分子的固定步骤依据所采用ELISA体系的不同而不同;其中,所述ELISA体系包括①双抗体夹心法、②双抗原夹心法、③间接法、④直接竞争法、⑤间接竞争法、⑥捕获法中的一种或者几种;更具体地,固定的步骤为:

[0034] 当ELISA体系采用①双抗体夹心法、②双抗原夹心法或③间接法时,所述固定具体为:待测样品溶液和对照分别与各组微纳米珠反应、清洗,再与标记检测分子充分反应、清洗,混合所得微纳米珠复合体、备用;

[0035] 当ELISA体系采用④直接竞争法时,直接竞争法I:待测样品溶液和对照分别与标记检测分子混合后再与微纳米珠复合物反应、清洗,混合所得微纳米珠复合体、备用;直接竞争法II:待测样品溶液及对照与标记检测分子混合后与微纳米珠复合物反应、清洗,混合所得微纳米珠复合体、备用;

[0036] 当ELISA体系采用⑤间接竞争法时,待测样品溶液及对照分别与微纳米珠复合物反应、清洗,分别加入相应标记检测分子充分反应、清洗,混合所得微纳米珠复合体、备用。

[0037] 当ELISA体系采用⑥捕获法时,待测样品溶液、对照分别与微纳米珠复合物混合,充分反应、清洗并混合,再与靶向标志物特异抗原混合反应,清洗后加入相应带标记的检测分子,充分反应后,清洗备用。

[0038] 本发明中,将编码核酸、捕获分子固定在微纳米珠表面形成微纳米珠复合物的步骤,按一般步骤,先固定编码核酸,再固定捕获分子;实际操作时,二者可以互换,但为了简化操作程序,编码核酸可与捕获分子按比例混合后,同时固定到微纳米珠表面。当采用相同活性基团对固定编码核酸和捕获分子、并且分步固定时,第一个被固定的分子数要少于微纳米珠表面活性基团数,为第二步分子的固定留下足够的活性基团。当采用不同活性基团对分别固定编码核酸和捕获分子时,可分步固定其中的一个,再固定第二个,优选的,同时固定。

[0039] 本发明中,所述的对照,包括阴性对照、阳性对照或二者皆存在,也可以是梯度对照。

[0040] 第二方面,本发明提供一种基于核酸序列编码的ELISA检测芯片,可通过上述制备方法获得。

[0041] 第三方面,本发明提供一种所述ELISA检测芯片在疾病标志物,农药残留、兽药残留、生物毒素、非法食品添加物检测中的应用。

[0042] 第四方面,本发明提供一种基于所述ELISA检测芯片的检测方法,包括先ELISA检测、后测序解码从而确定待测样品溶液中所含靶向标志物的步骤,或者先测序解码、后ELISA检测从而确定待测样品溶液中所含靶向标志物的步骤;

[0043] 其中,所述ELISA检测具体为向所述的ELISA检测芯片上加入检测分子底物溶液、

充分反应后测试;或者加入发光试剂后直接进行光学检测;

[0044] 所述测序解码包括对所述微纳米坑装载微纳米珠复合体上的编码核酸进行测序。

[0045] 本发明中,测序与ELISA检测采用的光学系统,是指用CCD、EMCCD或光电倍增管装备的显微镜系统,可以在计算机及相应软件辅助下,完成编码核酸编码区的测序、ELISA的检测、记载、结果分析和最终的解码等指令。也可以对现有相关测序仪稍做改装后而实现,包括但不限于Roche/454系列测序仪。测序与ELISA检测时,芯片固定在微流室中进行,可大幅度节约试剂用量。

[0046] 与国内外同类技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0047] 1、本发明采用的核酸编码ELISA方法,是一种很灵活的检测技术,除可进行传统的ELISA外,突出特点是可同时对多样品、多靶向标志物检测。

[0048] 2、以往报道,用 β G检测体系,可以灵敏到单分子水平,所以,本发明也能够检测到单分子水平,特别适用于超灵敏的早期诊断。

[0049] 3、本发明将芯片与微流控结合,ELISA检测在微纳米坑内进行,反应体积可小于 10^{-24} L级,可大大降低试剂用量。

[0050] 4、本发明可广泛用于临床医学检测、献血者检测、体检、农副产品毒素、非法食品添加物及环境污染的检测,应用局限性小。

具体实施方式

[0051] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0052] 本发明是通过如下实施例方式实现的:

[0053] 第一步,微纳米珠编码:用化学方法修饰微纳米珠表面,使之携带特殊的活性基团,用于固定编码核酸和捕获分子。根据待检样品数(X)和每个样品的待检靶向标志物数(Y),将微纳米珠分为N份,其中 $N = (X + \text{对照数}) \times Y$ 。设计并合成N种带有各自独特单链编码区的核酸(以下称为“编码核酸”),编码核酸用可与微纳米珠表面活性基团发生反应的活性基团修饰,分别固定到微纳米珠表面,实现N份微纳米珠的编码,将微纳米珠分成(X+对照数)组,每组合Y份微纳米珠。固定时使编码核酸条数少于微纳米珠表面的活性基团数(约4000个/ μm^2),便于留有活性基团用于固定捕获分子。

[0054] 本发明中,所述的将微纳米珠分为N份,是指每份微纳米珠都有一定数量n,在混合微纳米珠时,每一种特异性编码的微纳米珠数目基本相等,以便在高概率下保证各个样品、靶向标志物和对照不发生明显的偏差。遵从如下关系: $(1 - 1/N)^n = (1 - P)$,其中N为微纳米珠总份数,P为预设概率,n为在N和P条件下,所需每份微纳米珠最小值平均值。

[0055] 第二步,捕获分子的固定:将Y种捕获分子分别固定到各组的Y份微纳米珠表面,清洗后,除对照外,组内微纳米珠混合。再用封阻溶液封阻微纳米珠表面可能剩余的活性基团,清洗后备用。

[0056] 第三步,靶向标志物的捕获与标记检测分子的固定:采用不同的ELISA体系时,步骤略有不同,当采用①双抗体夹心法、②双抗原夹心法和③间接法时,样品溶液和对照分别

与各组微纳米珠反应,清洗后与标记检测分子充分反应后,清洗、混合所有组的微纳米珠、备用;

[0057] 采用④直接竞争法时,直接竞争法I:样品及对照与带标记检测抗原混合后与微纳米珠反应,清洗后,混合所有组的微纳米珠、备用;直接竞争法II:样品及对照与带标记检测抗体混合后与微纳米珠反应,清洗后,混合所有组的微纳米珠、备用;

[0058] 采用⑤间接竞争法时,样品及对照等分别与各组带已知抗体的微纳米珠反应,清洗后分别加入相应标记检测二抗,充分反应并清洗,混合所有组的微纳米珠、备用。

[0059] 采用⑥捕获法时:待测样品、阳性(含已知特异性抗体)和阴性对照(无已知特异性抗体)对照分别与微纳米珠混合,充分反应后,清洗并混合所有组微纳米珠,再与含Y种特异抗原混合液反应,清洗后加入Y种相应的标记检测二抗混合液,充分反应后,清洗备用。

[0060] 第四步,微纳米坑基底的制备:用微纳加工方法,在固相基底上制备微纳米坑阵列。

[0061] 第五步,检测芯片的制备:将第三步制备的微纳米珠复合物装载到微纳米坑阵列中,表面清洗后,获得检测芯片。

[0062] 第六步,ELISA检测:将检测芯片安装到设有进、出样口的微流室中并密封,从微流室进样口向微纳米坑阵列添加标记报告分子的底物溶液,隔离微纳米坑并充分反应后,光学系统检测发生催化反应的微纳米坑并记载。

[0063] 所述的隔离微纳米坑,在微米级时,当微米坑相距较远时,阳性反应的微米坑溶液扩散不到相邻微纳米坑时,可以不隔离。当需要隔离时,宜采用先测序、后ELISA检测的顺序,优选的,采用油封。

[0064] 第七步,微纳米珠解码:去除ELISA检测溶液的荧光后,用核酸测序方法检测芯片中每一个微纳米坑内微纳米珠的编码核酸编码区序列,完成解码。根据解码结果,将各微纳米珠的反应结果追踪到具体样品的具体靶向标志物。

[0065] 更具体地,本发明的实施方式如下:

[0066] 实施例1

[0067] 本实施例提供一种基于ELISA芯片的制备及其应用,具体涉及双抗体夹心法,多人、多标志物检测,具体如下:

[0068] 步骤一,微米磁珠的表面修饰:用生物化学方法将约110万粒直径 $3.5\mu\text{m}$ 磁珠表面包被抗链霉生物素(简称SA),磁珠表面上SA的密度约为 $4000\text{个}/\mu\text{m}^2$,所以,一粒直径 $3.5\mu\text{m}$ 的磁珠表面积SA的总量约为其表面积S与密度的乘积,即 $4000\text{个}/\mu\text{m}^2 \times 4\pi r^2 \approx 15\text{万个SA}$ 。将磁珠分为10020等份,每份约110粒;重复三次。

[0069] 步骤二,微米珠编码:从初级编码库中取前10020个序列,设计并合成带编码序列的发卡DNA,发卡结构的环顶端用生物素标记;在连接缓冲液【Hou et al., J. Appl. Polym. Sci., 132, 41560, doi:10.1002/app.41560 (2015)】中,将每种约10万个拷贝的编码DNA分别连接到每份磁珠上,完成编码,将每10份磁珠归为一组,但每份都单独保存,共形成1002组磁珠,备用。

[0070] 步骤三,磁珠表面的抗体固定:在连接缓冲液【Kim et al., Lab on a Chip, 12: 4986-4991 (2012); Teste et al., Lab on a Chip, 13: 2344-2349 (2013)】中,将10种生物素标记的捕获分子(表1)分别固定到上述的每组10份磁珠上,再用生物素封阻磁珠上可能留

下的自由SA,清洗,直至完成10020份磁珠的抗体固定,将每组10份磁珠混合,共获得1002组,备用。

[0071] 步骤四,抗原捕获:将1000份待检人的血清分别与1000组磁珠混合,完成抗原捕获,10种抗原溶液和无抗原溶液分别与两组磁珠混合,作为阳性对照组和阴性对照组。完成抗原固定后清洗,样品和对照全部混合,备用。

[0072] 步骤五,检测抗体绑定:将10种HRP标记的靶向标志物抗体混合物与步骤三制备的磁珠混合,充分反应后清洗备用。

[0073] 步骤六,微米坑阵列与检测芯片的制备:用铸模法制备中心 $10 \times 20 \text{mm}^2$ 区域内含微米坑阵列的PDMS基底,微米坑直径 $5 \mu\text{m}$,中心间距 $10 \mu\text{m}$,阵列约含200万个微米坑。用重力法将步骤四制备的微米珠装载到微米坑阵列,表面清洗后备用。

[0074] 步骤七,ELISA检测:将检测芯片置于连接进、出样口的微流室并密封,向流室注入增强化学发光试剂(简称ECL)溶液(Amersham ECL prime),充分反应后,光学系统在425nm下多次采集光信号,记录并统计结果。

[0075] 步骤八,磁珠解码:将ELISA反应液清洗后,向微流室加入DNA聚合酶和4色荧光标记的dNTP可逆终止物,完成一个碱基延伸后,洗去未发生反应的dNTP类似物,光学成像,记载每一个微米坑的颜色反应,完成一个碱基的延伸测序后,用化学方法去除编码DNA上结合的荧光标记,并恢复引物3' 羟基后,进入下一轮延伸测序;如此循环,直至测序完成。根据序列信息,将ELISA检测结果追踪到具体人的具体标志物。

[0076] 实施效果,解码准确率在99.99%-100%,灵敏度和特异性与报道的ELISA相当(表1)。

[0077] 表1. 10种标志物及其传统ELISA检测结果

[0078]

捕获分子 (抗体)	靶向标志物 (抗原)	HRP 酶标检测抗体	疑似病症	灵敏度 (%)	特异性 (%)	参考文献
山羊抗人 IgA 抗体	甲肝病毒	人 HAV 抗体	甲型肝炎	100	100	Oba <i>et al.</i> , Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 42: 197-200 (2000)
乙肝病毒 HbsAg 单克隆抗体	乙肝病毒	HbsAg 单克隆抗体	乙型肝炎	100	98	Piacentini <i>et al.</i> , Ann. New York Acad. Sci., 694: 334-336 (1993)
丙肝病毒 IgG 抗体	丙肝病毒	IgG 抗体	丙型肝炎	99	100	
戊肝单克隆抗体 MAb I2F12	戊肝病毒	单克隆抗体 MAb no. 4	戊型肝炎	100	100	Wen <i>et al.</i> , J. Clin. Microbiol., 53: 782-788 (2015)
抗恶性疟原虫富含组氨酸蛋白 2 单克隆抗体 PfHRP2	恶性疟原虫	PfHRP2 单克隆抗体	恶性疟疾	98.8	100	Noedl <i>et al.</i> , Am. J. Trop. Med. Hyg., 75: 1205-1208 (2006)
热激蛋白 HSP70 抗体	抗热激蛋白 HSP70	抗热激蛋白 HSP70 抗体	非小细胞肺癌	82	83	刘淑真, 于国华, 《中国肿瘤防治杂志》, 16: 1507-1508 (2009)
热激蛋白 HSP90 抗体	热激蛋白 HSP90	热激蛋白 HSP90 抗体				
核仁磷蛋白 p130 抗体	核仁磷蛋白 p130	核仁磷蛋白 p130 抗体				
糖蛋白 GAGE 抗体	糖蛋白 GAGE	糖蛋白 GAGE 抗体				
原癌基因 BMI-1 抗体	原癌基因 BMI-1	原癌基因 BMI-1 抗体				

[0079] 实施例2

[0080] 本实施例提供一种基于ELISA芯片的制备及其应用,涉及间接法:已知抗原-待测抗体-检测二抗,捕获法:IgM抗抗体-待测IgM抗体-特异抗原-标记抗体,单标志物多人群综合检测,具体如下:

[0081] 步骤一,聚苯乙烯(PS)微米珠的表面活化:利用化学方法将约71万粒直径2 μ m的PS珠表面包被戊二醛,将珠子分为7组,每组1002份,每份约100粒;重复三次。

[0082] 步骤二,PS珠编码与捕获分子固定:合成氨基修饰的编码DNA,由两部分组成,在3'端为氨基标记的引物配对区,序列3' NH₂-CAGCACTGACCCTTTTGGGACCGC-5',接下来为编码区,取自优选编码库的前7014种序列,合成后分为7组。每一组对应于表2中的一种疑似病症,其中1000份用于样品检测的磁珠编码,2个用于阳性和阴性对照的编码。将纯化的捕获分子(表2)分别与编码DNA序列逐一按1:5摩尔比混合后,分别与各组1002份PS珠连接,然后用BSA封阻未反应的戊二醛,纯化后备用。

[0083] 步骤三,靶向标志物捕获:将4个间接法(表2)的每组1000个疑似病症待检人血清

分别与各组内1000份编码的PS珠混合,阳性对照PS珠与相应抗体溶液混合,阴性对照PS珠与无抗体溶液混合,充分反应后清洗、纯化。3个捕获法的每组1000个疑似病症待检人血清的开始几步与间接法同,完成IgM抗体捕获后,再与已知抗原结合,充分反应后,清洗、纯化。将7组PS珠及其对照全部混合。

[0084] 步骤四,检测抗体的连接:将7种HRP标记的检测抗体与步骤三的PS珠混合,充分反应后,清洗备用。

[0085] 步骤五,微米坑基底与芯片的制备:用深硅刻蚀方法在硅片的中心区 $3 \times 3\text{mm}^2$ 面积上,制作中心间距 $3\mu\text{m}$ 、直径和深度均为 $3\mu\text{m}$ 的微米坑阵列,阵列含约100万个微米坑。用重力法将步骤四PS珠装载到微米坑阵列中,表面清洗后获得芯片,备用。

[0086] 步骤六,DNA测序:将检测芯片置于光学系统下连接有进、出样口的微流室并密封,向微流室加入引物、DNA聚合酶、焦磷酸测序的其他试剂成分和dATP,光学系统成像,洗去流室反应液后,将上述混合液中的dATP依次用dCTP、dGTP和dTTP代替重复上述步骤,完成一个碱基延伸测序。然后,进入下一轮测序,直至测序完成,再将荧光信号转换为碱基序列信息。

[0087] 步骤七,ELISA检测:将测序溶液清洗后,向流室注入ECL检测溶液,封闭微米坑,充分反应后,425nm下多次采集光信号,记录并统计结果。

[0088] 步骤八,解码:根据每个微米坑内微纳米珠上DNA的碱基序列,将ELISA反应结果确认到具体人的具体标志物。

[0089] 实施效果,解码准确率 $\geq 99\%$,灵敏度和特异性与报道的ELISA相当(表2)。

[0090] 表2间接法和捕获法ELISA检测疑似病症

[0091]

捕获分子	待测抗体	HRP-抗体	疑似病症	灵敏度	特异性	参考文献	
间接法							
重组蛋白 rPvMSA-142	血清	山羊抗人 IgG 抗体	间日疟	86.9%	94.05%	Mirahmadi <i>et al.</i> , <i>J. Microbiol. Meth.</i> , 123: 44-50 (2016)	
OipA6 重组肽	血清	抗人 IgG	高毒力幽门 螺杆菌感染	95.16 %	95.45%	李妮等,《世界华人 消化杂志》23: 2549-2554 (2015)	
包虫叠层抗原 (LL antigen)	血清	山羊抗人 IgG4	包虫病	92%	96%	Rady <i>et al.</i> , <i>Res. J. Parasitol.</i> , 9: 41-54 (2014)	
ZEBOV(扎伊尔 埃博拉病毒 Makona 毒株)	血清	多克隆抗体 (DAKO)	ZEBOV	100%	96 %	Krähling <i>et al.</i> , <i>Med. Microbiol. Immunol.</i> , DOI 10.1007/s00430-015 -0438-6	
捕获法							
捕获分子	待测 IgG 抗 体	抗原	HRP-抗体	疑似病症	灵敏度	特异性	参考文献
抗人 IgM 抗 体	血清	肠道病毒 71 型 (EV71)	小鼠抗 EV71 单克 隆抗体	手足口病	98.68 %	95.60 %	Wang <i>et al.</i> , <i>Virus Res.</i> , 176: 33-36 (2013)
兔抗人 IgM 抗体	血清	西尼罗病 毒 (WNV) 前膜蛋白/ 膜蛋白	小鼠抗黄病 毒抗体	西尼罗病 毒病	98%	100%	Welch <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Lab. Anal.</i> , 22:362-366 (2008)
抗人 IgM 抗 体 (Panbio)	血清	登革热病 毒 I、II、 III 和 IV 重组膜蛋 白	登革热单克 隆抗体	登革热	96.8%	99.4%	Vazquez <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Virol.</i> , 39: 194-198 (2007)

[0092] 实施例3

[0093] 本实施例提供一种基于ELISA芯片的制备及其应用,涉及双抗体夹心法、双抗原夹心法和间接法、多人多标志物检测,具体如下:

[0094] 步骤一,硅纳米珠表面活化:将表面由SA活化的约1500万粒直径350nm的硅纳米珠分成36组,其中的12组检测珠各约120万粒,另24组对照珠各约500粒,即阳性和阴性对照各12组。重复2次。

[0095] 步骤二,硅珠的捕获分子固定与DNA编码:将12种生物素标记的捕获分子(表3)分别与各组用于检测、阳性对照和阴性对照组纳米珠混合,固定到纳米珠表面,捕获分子的数目相当于纳米珠表面SA数的约1/3,清洗后,将每一组检测珠分为2185份,每份约550粒纳米珠,12组检测珠共26220份,与24组对照珠合计26244份。从初级编码库中取前26244种编码序列,设计发卡结构DNA,环位于编码区的近3'端,由生物素标记,可自引发合成,合成发卡DNA后,每一种与1份纳米珠混合,完成编码后,用生物素封阻纳米珠表面可能残留的自由SA,清洗备用。

[0096] 步骤三,靶向标志物与酶标检测分子的捕获:从12组检测珠各取1份,混合后与一个被检人血浆混合,充分反应后完成靶向标志物捕获,直至完成2185人血浆的标志物捕获,

清洗;12种阳性对照珠与相应纯化后的标志物溶液混合反应,12种阴性对照珠与不含标志物的溶液混合作为空白对照,两种对照充分反应后清洗。再将全部检测珠和两种对照混合。再将βG标记的12种酶标分子等量混合,与纳米珠反应后清洗、备用。

[0097] 步骤四,检测芯片的制备:用等离子体深硅刻蚀方法,在 $6 \times 10 \text{mm}^2$ 的矩形石英玻璃中心,制备一个与之平行的 $2 \times 6 \text{mm}^2$ 矩形纳米坑阵列,纳米坑直径与深度为500nm、中心间距700nm,约含2400万个纳米坑。用重力法将上述约1500万个纳米珠装载到纳米坑阵列,清洗表面,完成检测芯片的制备。

[0098] 步骤五,DNA测序:将检测芯片安装到设有进、出样口的微流室后密封,通过进样口向微流室注入4色荧光标记的3'可逆终止dNTPs类似物、DNA聚合酶溶液,纳米珠上带发卡结构的DNA自引发延伸1个碱基,洗去未反应的dNTPs类似物,荧光成像并记录,之后,用化学方法去除荧光标记并使延伸链3'解保护,完成一个碱基的合成测序;再进入下一个测序循环,直至完成编码区的碱基测序,计算机软件辅助解码每一个纳米坑内纳米珠携带DNA的序列。

[0099] 步骤六,ELISA检测:去除测序步骤荧光标记后,注入含过氧化氢的试卤灵β-D-吡喃半乳糖苷(RGP)溶液,油封闭纳米坑,577nm下光学系统多次重复成像,记录并统计结果。

[0100] 步骤七,纳米珠解码:根据编码序列,将阳性反应追溯到具体人的具标志物上。

[0101] 实施效果,灵敏度和特异性相当于报道的传统ELISA方法(表3),解码准确率99.99%-100%。

[0102] 表3. 12种标志物的捕获、酶标分子及其传统ELISA检测效果

[0103]

捕获分子	靶向标志物	βG 酶标分子	疑似病症	灵敏度(%)	特异性(%)	参考文献
双抗体夹心法						
山羊抗人IgA 抗体	甲肝病毒	人 HAV 抗体	甲型肝炎	100	100	Oba <i>et al.</i> , Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 42: 197-200 (2000)
乙肝病毒 HbsAg 单克隆抗体	乙肝病毒	HbsAg 单克隆抗体	乙型肝炎	100	98	Piacentini <i>et al.</i> , Ann. New York Acad. Sci., 694: 334-336 (1993)
丙肝病毒 IgG 抗体	丙肝病毒	IgG 抗体	丙型肝炎	99	100	
戊肝单克隆抗体 MAb	戊肝病毒	单克隆抗体 MAb no.	戊型肝炎	100	100	Wen <i>et al.</i> , J. Clin. Microbiol., 53: 782-788

[0104]

12F12		4				(2015)
抗恶性疟原虫富含组氨酸蛋白 2 单克隆抗体 PfHRP2	恶性疟原虫	PfHRP2 单克隆抗体	恶性疟疾	98.8	100	Noedl <i>et al.</i> , Am. J. Trop. Med. Hyg., 75: 1205-1208 (2006)
山羊抗人 SPON2 多克隆抗体	SPON2	小鼠抗人 SPON2 单克隆抗体	前列腺癌	100	84	Qian <i>et al.</i> , PLoS ONE 7: e37225 (2012).
CD166 抗体	CD166	CD166 抗体	肝细胞癌	100	89	Ma <i>et al.</i> , Clin. Chim. Acta, 441: 156-162 (2015)
鼠抗 TA-90 单克隆抗体 AD1-40F4	TA-90	山羊抗人 IgG (Fab) 抗体	黑素瘤转移	77	76	Kelley <i>et al.</i> , Cancer, 83: 1355-1361 (1998)
双抗原夹心法						
乙肝病毒核心抗原 AB014368	乙肝病毒核心抗体	AB090269	乙型肝炎	99.7	100	Li <i>et al.</i> , Clin. Vac. Immunol., 17: 464-469 (2010)
HTLV-I/II gp46 合成肽	HTLV-I/II 抗体	HTLV-I/II gp46 合成肽	人类 T 淋巴细胞白血病	99.98	100	Qiu <i>et al.</i> , J. Med. Virol., 80 484-493 (2008)
HTLV-II gp21 重组蛋白	HTLV-I 抗体	HTLV-I gp21 重组抗原				
间接法 (已知抗原-待测抗体-酶标二抗)						
p-H1N1-09 HA 蛋白	p-H1N1-09 HA 抗体	抗人 IgG 抗体	H1N1 禽流感	100	97.7	Arankalle <i>et al.</i> , Clin. Vac. Immunol., 17: 1481-1483 (2010)

[0105] 实施例4

[0106] 本实施例涉及一种基于ELISA芯片的制备及其应用,涉及畜牧、双抗体夹心法、双抗原夹心法、直接竞争法II,具体如下:

[0107] 步骤一,微米珠活化:将约20万粒直径1 μ m磁珠表面用SA活化,分成972份,每份约200粒。重复3次。

[0108] 步骤二,磁珠编码:从优选编码库中取前972个编码序列,设计并合成带发卡结构的DNA,环位于编码区的近3'端,环顶端用生物素标记,可自引发合成。每一种编码DNA分别与1份磁珠混合,混合时使DNA条数约占珠子表面SA数的1/2。完成编码后,将磁珠分为三组,每组324份,清洗备用。

[0109] 步骤三,捕获分子固定:用3种生物素标记的捕获分子(表4),分别与每组324份磁珠充分反应,BSA封阻磁珠表面,清洗后备用。

[0110] 步骤四,靶向标志物与Alexa Fluor 555标记检测分子的捕获:用鸭和鸡各322个个体血清分别与两组各324份中的322份磁珠混合,另2份磁珠,一份与相应抗体溶液混合,另一份与不含抗体溶液混合,分别作为阳性和阴性对照,充分反应,清洗,组内磁珠混合;两组磁珠分别与Alexa Fluor 555标记的小鼠mAB和甲型流感病毒重组核蛋白rNP混合,充分反应后清洗。

[0111] 用322个猪个体血清与Alexa Fluor 555标记的山羊抗猪IgG混合后分别与322份

磁珠混合反应,已知抗原溶液与Alexa Fluor 555标记的山羊抗猪IgG溶液混合后,再与1份磁珠反应作为阳性对照,无已知抗原溶液与山羊抗猪IgG溶液混合后,再与1份磁珠反应作为阴性对照,充分反应后清洗,混合。

[0112] 将3组磁珠全部混合,备用。

[0113] 步骤三,检测芯片的制备:用反应离子刻蚀法,在硅片中央 $1.5 \times 1.5 \text{mm}^2$ 区域制备纳米坑直径与深度为 $1.5 \mu\text{m}$ 、中心间距 $2 \mu\text{m}$ 的微米坑阵列,约含55万个微米坑。用重力法将上述约20万个微米珠装载到微米坑阵列,清洗表面,完成检测芯片的制备。

[0114] 步骤五,ELISA检测:565nm下,光学系统对芯片成像Alexa Fluor 555荧光标记,记录并统计结果。

[0115] 步骤六,DNA测序:将Alexa Fluor 555标记淬灭后的检测芯片安装到设有进、出样口的微流室后密封,注入DNA聚合酶和4色荧光标记、可逆终止dNTPs,洗去未反应的dNTPs,光学系统成像并记录,完成一个碱基的测序,用化学试剂淬灭荧光标记,洗去流室反应液后,进入下一轮测序,直至完成编码区的测序后,计算机软件辅助解码每一个微米坑内微米珠携带DNA的序列。

[0116] 步骤七,解码:根据编码序列,将反应结果追溯到受检个体的具标志物上。

[0117] 实施效果,灵敏度和特异性相当于报道的传统ELISA方法(表4),解码准确率99.99%-100%。

[0118] 表4动物标志物及其ELISA检测

[0119]

捕获分子	靶向标志物	Alexa Fluor 555 标记检测分子	疑似病症	灵敏度(%)	特异性(%)	参考文献
双抗体夹心法						
小鼠抗坦布苏病毒(TMUV)单克隆抗体 mAb	TMUV 壳蛋白	小鼠 mAb	鸭 TMUV 感染	99.1	93.1	Chen <i>et al.</i> , PloS One, 9: e96366 (2014)
直接竞争法 II (抗原-待测抗原+标记检测抗体)						
GT3-Ctr (人畜共患戊肝病毒基因型 3 壳蛋白 C 端片段)	戊型肝炎基因型 3 衣壳蛋白	山羊抗猪 IgG/无标记待测血清	猪戊型肝炎病毒感染	85.5	91.9	ELISA Dremsek <i>et al.</i> , Journal of Virological Methods 190: 11-16

[0120]

						(2013)
双抗原夹心法						
甲型流感病毒重组核蛋白 rNP	甲流感抗体	甲型流感病毒重组核蛋白 rNP	鸡 H5N1 病毒感染	98	97.3	Watcharatanayatip <i>et al.</i> , Journal of Virological Methods, 163: 238-243 (2010)

[0121] 实施例5

[0122] 本实施例提供一种基于ELISA芯片的制备及其应用,具体涉及环境污染、农产品农药残留、农产品生物毒素、直接竞争法I,具体如下:

[0123] 步骤一,微米珠表面活化:用化学方法将约55万粒直径28 μ m玻璃珠表面用戊二醛修饰后,分为1073份,每份约500粒。重复3次。

[0124] 步骤二,微米珠编码与分组:从优选编码库中取前1073种编码序列,设计并合成1073种发卡DNA,近3'端的环顶端由氨基修饰,每一种编码DNA分别与每份玻璃珠混合,混合时使DNA条数约占珠子表面戊二醛分子数的3/4,完成编码后,清洗备用。

[0125] 将微米珠分为三组,第一组为二恶英(剧毒环境污染物)组,309份,第二组为速灭威(农药)组,208份,第三组为黄曲霉毒素(生物毒素)组556份。

[0126] 步骤三,捕获分子的固定:每份微米珠分别与捕获分子(表5)混合,完成抗体固定后,卵清蛋白封阻溶液清洗珠子表面3次,备用。

[0127] 步骤四,直接竞争法I复合物的制备:

[0128] 第一组:将9个不同浓度梯度2,3,7-TricDD(二恶英类物质的一种)(表5)对照和300个被检土壤样品溶液,分别与酶标2,3,7-TricDD等量混合后,再逐一与步骤三制备的微米珠混合,充分反应后清洗,再将所有样品及对照混合。

[0129] 第二组:将8个不同浓度梯度速灭威(农药)(表5)对照和橙汁、白菜、黄瓜、大米各50份样品提取液,分别与酶标半抗原SN等量混合后,再逐一与步骤三制备的微米珠混合,充分反应后清洗,再将所有样品及对照混合。

[0130] 第三组:将6个不同浓度梯度黄曲霉毒素(AFB1,生物毒素)(表5)对照和花生、玉米、小麦、高粱、大麦、大豆、绿豆、大米、牛奶、杏仁、核桃各50份样品提取液,分别与酶标AFB1等量混合后,再逐一与步骤三制备的微米珠混合,充分反应后清洗,再将所有样品及对照混合。

[0131] 将3组微米珠样品全部混合备用。

[0132] 步骤五,检测芯片的制备:将混合微米珠装载到454/Roche测序仪匹配的光纤微米坑芯片中。

[0133] 步骤六,ELISA检测:将芯片安装到流控系统中,向芯片注入增强化学发光试剂溶液(Amersham ECL prime),425nm下多次采集光信号,记录并统计结果。

[0134] 步骤七,DNA测序:清洗去反应产物后,对微米珠芯片进行商业化焦磷酸测序。

[0135] 步骤八,解码:将测序结果用于解码ELISA检测结果。

[0136] 实施效果,检测灵敏度与已报道的结果相当(表5),解码准确率 $\geq 99\%$ 。

[0137] 表5.直接竞争法I(抗体-酶标检测抗原+待测抗原)

[0138]

分组	样品	捕获分子	HRP 酶标靶向分子/无酶标竞争性样品	靶向分子浓度梯度	IC50 或 LOD	参考文献
组 I	土壤	小鼠抗 Co-PCB 单克隆抗体 IgG	2,3,7-TriCDD/土壤待测样品	二恶英 2,3,7-TriCDD 浓度: 0、0.005、0.05、0.5、5、50、500、5000、50000 ppt	0.005 ppt	Endo <i>et al.</i> , Proceedings of SPIE, 5270: 101-110 (2004)
组 II	橙汁、白菜、黄瓜、大米	兔抗速灭威 (metolcarb) 多克隆抗体	半抗原 SN/无酶标待测样品	速灭威浓度: 0、0.001、0.01、0.1、1、10、100 和 1000 ng/mL	4 ppb	Sun <i>et al.</i> , Food Additives and Contaminants, 27: 338-346 (2010)
组 III	花生、玉米、小麦、高粱、大麦、大豆、绿豆、大米、牛奶、杏仁、核桃	兔抗 AFB ₁ 多克隆抗体	AFB ₁ /无酶标待测样品	AFB ₁ 浓度: 0、0.12、0.72、3.6、14.4 和 43 ng/mL	0.85 ppb	Lee & Rachmawati, Food and Agricultural Immunology, 17: 91-104 (2006)

[0139] 实施例6

[0140] 本实施例提供一种基于ELISA芯片的制备及其应用,具体涉及食品安全、间接竞争法:抗原-已知抗体+待测抗原-标记检测二抗,具体如下:

[0141] 步骤一,微米珠表面活化:用化学方法将约15万粒直径28 μ m的玻璃微米珠用戊二醛修饰,将微米珠分为634份,每份约230粒。重复3次。

[0142] 步骤二,玻璃微米珠编码与分组:从优选编码库中取前634个序列,设计并合成634种带编码序列的发卡DNA,其环顶端由氨基修饰,分别与每份玻璃珠混合,混合时使DNA条数约占珠子表面戊二醛分子数的3/4,完成编码后,清洗备用。

[0143] 将微纳米珠分为五组,第一组为氯丙嗪(兽药)组,107种,第二组为p硝基苯甲酰组胺(NPHA,生物毒素)组,158种,第三组为三氯氰胺(非法食品添加剂)组,156种。第四组,苏丹红I、对位红(非法食品添加剂)组,106种,第五组,马波沙星(兽药)组,107种。

[0144] 步骤三,微米珠的捕获分子固定:各组微米珠分别与捕获分子(表5)混合,完成固定后,BSA封阻溶液清洗珠子表面3次,备用。

[0145] 步骤四,间接竞争法复合物的制备:将各组不同浓度梯度的标准对照以及样品(表

5) 提取液分别与其对应的一抗等量混合,充分反应后,再与相应的微米珠反应,清洗后,将各组微米珠全部混合,将5种酶标二抗混合液与微米珠混合,充分反应后,清洗备用。

[0146] 步骤五,检测芯片的制备:将混合微米珠装载到454/Roche测序仪匹配的光纤微米坑芯片中。

[0147] 步骤六,ELISA检测:将芯片安装到流控系统中,向芯片注入增强化学发光试剂溶液(Amersham ECL prime),425nm下多次采集光信号,记录并分析结果。

[0148] 步骤七,DNA测序:清洗去反应产物后,对微米珠芯片进行焦磷酸测序。

[0149] 步骤八,解码:将测序结果用于解码ELISA结果。

[0150] 实施效果,检测灵敏度与已报道的结果相当(表6),解码准确率 $\geq 99\%$ 。

[0151] 表6. 间接竞争法检测农副产品的药物残留、生物毒素和非法食品添加物

[0152]

分组	样品	捕获分子	一抗	HRP 酶标二抗	靶向分子及其浓度梯度	IC 50 或 LOD	参考文献
组 I	猪肝、鸡	阳离子卵清蛋白-氯丙嗪	小鼠抗氯丙嗪单克隆抗体	山羊抗小鼠 IgG	氯丙嗪: 0、0.05、0.25、0.5、1.0、2.0 和 10.0 ng/mL	0.73 ppb	Liu <i>et al.</i> , Journal of the Science of Food and Agriculture, 90: 1789-1795 (2010)
组 II	鱼、葡萄酒、酸奶	半抗原 4-((2-(1H-Imidazol-4-yl)ethyl)amino)-4-oxobutanoic Acid - 卵清蛋白	兔抗 NPHA 多克隆抗体	山羊抗兔 IgG 抗体	NPHA: 0、0.01、0.1、1、10、100、1000、10000 ng/mL	1.8 ppm (鱼), 93.6 ppb (葡萄酒和酸)	Luo <i>et al.</i> , Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62: 12299-12308 (2014)

[0153]

组 III	牛奶、猫食、狗食	三氯氰胺-阳离子卵清蛋白(OVA)复合物	小鼠抗三氯氰胺单克隆抗体	山羊抗小鼠 IgG	三氯氰胺: 0、0.001、0.01、1、10 和 1000 ng/mL	0.01 ppm (奶)	Zhou <i>et al.</i> , Food Chemistry, 135: 2681-2686 (2012)
组 IV	辣椒酱、辣椒油	半抗原苏丹红 I-OVA 复合物	小鼠抗苏丹红 I 单克隆抗体	山羊抗小鼠 IgG	苏丹红 I、对位红: 0、0.5、1.5、4.5、13.5 和 40.5 ng/mL	1.7 ppm	Xu <i>et al.</i> , Analyst, 135: 2566-2572 (2010)
组 V	牛肉、猪肉	马波沙星-OVA 复合物	兔抗马波沙星多克隆抗体	山羊抗兔 IgG	马波沙星: 0、0.2、1、5、25、125 和 625 ng/mL	4.6 ppm	Sheng <i>et al.</i> , Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 5971-5975 (2009)

[0154] 由以上实施例可以看出,本发明采用的核酸编码ELISA,结合微纳米珠阵列技术,除可对海量样本的单项标志物、单样本多项标志物进行ELISA检测外,更重要的是:①可对

多样本、多标志物同时检测;②同时采用不同的ELISA体系检测;③ELISA检测在微纳米坑内进行,ELISA检测和解码所需的溶液体积可小于 10^{-24} L量级。

[0155] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍,但应当认识到,上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后,对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此,本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。