(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2018 年 4 月 19 日 (19.04.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/068448 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/115 (2010.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/073024

(22) 国际申请日: 2017 年 2 月 7 日 (07.02.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610894672.0 2016年10月13日 (13.10.2016) CN

(71) 申请人: 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号, Jiangsu 210000 (CN)。

(72) 发明人: 许丹科 (XU, Danke); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号, Jiangsu 210000 (CN)。
李慧 (LI, Hui); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号, Jiangsu 210000 (CN)。 刘晓辉 (LIU, Xiaohui); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号, Jiangsu 210000 (CN)。 陈竹 (CHEN, Zhu); 中国江苏省南京市栖霞区仙林大道163号, Jiangsu 210000 (CN)。

(74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所（普通合伙） (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市中山东路198号龙台国际大厦1912室, Jiangsu 210005 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) **Title:** METHOD FOR SCREENING APTAMER BY USING MICROARRAY MICROFLUIDIC CHIP

(54) **发明名称**: 一种利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法

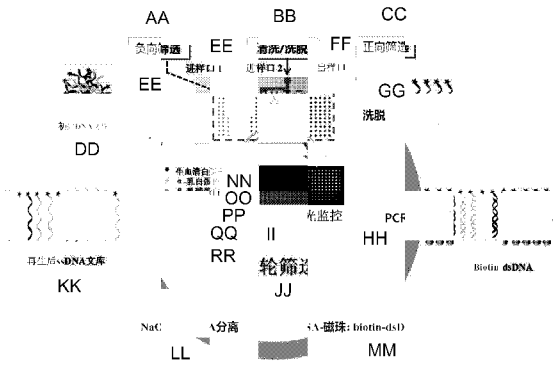


图 1

AA	Negative screening	JJ	Seven rounds of screening
BB	Cleaning/eluting	KK	Regenerated ssDNA library
CC	Positive screening	LL	NaOH: ssDNA separation
DD	Initial DNA library	MM	SA-magnetic bead: biotin-dsDNA capture
EE	Sample inlet	NN	Bovine serum albumin
FF	Sample outlet	OO	α-Lactalbumin
GG	Eluting	PP	β-Lactoglobulin
HH	PCR amplification	QQ	Casein
II	Online fluorescence monitoring	RR	Lactoferrin

(57) **Abstract:** Provided is a method for screening a lactoferrin aptamer by using a microarray microfluidic chip. The method comprises integrating a positive screening process and a negative screening process on one microfluidic chip, and obtaining a high affinity aptamer after seven rounds of screening. Also provided are an aptamer for detecting a lactoferrin content and the use thereof in detecting lactoferrin.

(57) **摘要**: 提供一种利用微阵列微流控芯片筛选乳铁蛋白适配体的方法，该方法将正负筛过程集合在一块微流控芯片上，筛选7轮后即获得高亲和力的适配体。还提供一种用于检测乳铁蛋白含量的适配体及其在检测乳铁蛋白中的应用。

WO 2018/068448 A1

[见续页]

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明：

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法

技术领域

本发明属于生物检测技术领域，具体涉及一种利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法。

背景技术

适配体具有与抗体相类似的性质，但是在许多方面还体现出了优于抗体的特点：(1) 特异性更强，对目标靶分子的亲和性比抗体更高；(2) 适配体较抗体更容易获得 (可人工合成，不依赖于动物和细胞)，并且可以大量、快速的在体外合成, 制备方法更为简单快捷；(3) 可以针对不同种类的目标靶分子进行筛选，包括生物毒性分子以及只具有半抗原性的分子，拓宽了其应用范围；(4) 无免疫原性，可在体内反复使用；(5) 稳定性优于抗体，利于储存。随着适配体技术的不断进步，适配体在许多领域将有可能成为抗体技术有益的补充。正是基于适配体的各种优点，适配体在分析、临床、环境、分子识别及药物筛选等方面都显示出了广阔的应用前景。

目前，基于纳米材料的适配体筛选技术可免除蛋白质在固相基片表面的固定，可有效减少筛选轮数，加速筛选流程。同时，基于微流控技术来提高筛选效果的方法获得了广泛的研究。这些方法包括：毛细管电泳的微流控适配体筛选，溶胶凝胶微流控适配体筛选，表面等离子共振（SPR）微流控适配体筛选，基于磁珠粒子的微流控筛选，以及基于各种材料微球的微流控筛选技术。科学工作者为了提高PCR扩增效率，采用琼脂糖液滴PCR扩增技术，聚乳液PCR扩增（ePCR）技术，此技术可以将阳性克隆子可以直接挑选出来进行测序，避免了传统适配体筛选过程克隆测序过程的繁琐。上述这些方法目的在于为了使适配体的筛选更加省时，自动化，高效并且可以降低整个筛选的成本。我们的工作在于发展一种更加稳定、筛选过程可重复、筛选步骤可量化的适配体筛选新技术。本方法优化了适配体筛选的过程使得适配体筛选过程更加简单化、标准化。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种新型微阵列微流控芯片应用于适配体筛选的方法。

为解决上述技术问题，本发明采用的技术方案如下：

一种利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法，所述的微阵列微流控芯片按照如下方法制备：

将 PDMS 前聚体与固化剂按照质量比为 5：1~100:1 的比例混合，优选 10：1，混合均匀后将其放入真空干燥器中，连接循环水真空泵进行抽真空 30 min 除气泡，再浇到微流控通道模板上，经固化后得到 PDMS 微流控通道，在玻璃基片上点制浓度为 0.1~10 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，对 PDMS 微流控通道和点样后的玻璃基片同时等离子处理，将上述两种基片紧密贴合，得到微阵列微流控芯片。

上述利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法，具体操作步骤如下：

(1) 筛选准备：将微阵列微流控芯片放入恒温水浴锅中，25~40 ℃下孵育蛋白 1~12 h；再通入 5~20 mg/ml BSA 和 0.01~0.5 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 25~40 ℃条件下封闭 1~3h，之后用 150 μL 1× PBST 溶液清洗正负筛通道；

(2) 第一轮筛选：将 0.1~10 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 3~15 min，并立即在冰上冷冻 10 s~5 min；用注射泵以 1~5 μL/min 流速将文库通入正筛通道，在 25~40℃条件下反应 30~120 min；之后以 5~30 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未结合的链；撕掉 PDMS 层，使用微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 3~10 min 洗脱芯片上乳铁蛋白结合的 ssDNA，所得溶液在 40~60℃条件下用高纯氮吹干至体积为 25~250 μL；

(3) PCR 扩增过程：将步骤(2)所得溶液分为体积均为 23 μL 的 3~10 份相同溶液，每份依次加入 25 μL、2× Taq 聚合酶， 1 μL、20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL、20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；

该步骤获得的产物作为模板稀释 5~40 倍后进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后的 PCR 产物与 1 μL 2× SYBR Premix Ex Taq™ 酶、1 μL 20 μM TAMRA 标记的前向引物、1 μL 20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL 超纯水混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(4) 分离纯化：将步骤(3)得到的 PCR 产物与 800 μL~5 mL Promega 磁珠充分混匀，在快速摇动 0.5~2 h 后除去上清液；再加入 25 μL、0.01~0.1 M NaOH 溶液涡旋 3~15 min，使磁珠上连接的双链解离到溶液中；之后取上层清液并依次加入 12.5 μL、0.1M HCl 25

μL，DPEC 水和 62.5 μL 2× PBSM 缓冲溶液，所得的中性溶液作为下一轮筛选的次级文库，其含量为 40 pmol~100 pmol；

(5) 第二轮筛选：用注射泵以 1~5 μL/min 流速将文库在 25~40℃条件下以 1~5 μL/min 依次输通入负筛，正筛通道；接着以 5~30 μL/min 流速通入 150 μL，1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 3~10 min 洗脱芯片上乳铁蛋白结合的 ssDNA 序列，所得溶液在 60℃吹干至体积为 25~250 μL，留作 PCR 扩增；

(7) 重复步骤(4)、(5)、(6)至第八轮筛选；

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物测序，重复上述的筛选过程，随机选取样品测序，分析测序结果，得到重复序列大于 2 的所有序列，再用 IDT 软件对得到的重复序列进行二级结构分析，IDT 软件根据序列自动生成可能的二级结构和序列的ΔG，将对序列末端序列进行二次裁剪以获得更为有效的序列和更稳定的二级结构（ΔG 值最小），获得最佳的适配体。

步骤(2)中，所述文库的中间为 40 个随机碱基，随机碱基 5’端的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，随机碱基 3’端的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，

步骤(3)中，所述的前向引物，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；所述的后向引物，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

一种用于检测乳铁蛋白含量的适配体，所述适配体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5~65 所示。

上述用于检测乳铁蛋白含量的适配体在检测乳铁蛋白中的应用在本发明的保护范围之内。

本发明原理：适配体的产生是借由一种指数富集配体的系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)，利用该技术可以从随机单链核酸序列库中筛选到特异性与靶物质高度亲和的核酸配体(aptamer)，本发明基于微阵列技术（Microarray）的大规模、高通量集成，占用体积小等特点与微流控技术(Microfluidic)自动化流体输送，分子反应效率增强和可避免外界污染的封闭式反应腔室等优势，将适

配体筛选的负筛过程和正筛过程集合在一块微流控芯片上，可快速高效完成适配体的筛选。通过筛选芯片正筛通道特异性捕获 ssDNA 序列后的微阵列荧光强度变化，可以直接直观的监测筛选过程中次级文库随着每一轮负筛选、正筛选的进化效果。本方法筛选 7 轮后即获得高亲和力的适配体。

此微阵列微流控芯片筛选适配体的方法是我们首次设计采用的。蛋白质微阵列的制作方法、筛选文库与蛋白阵列过程监控通用；另外，PCR 过程，PCR 产物纯化，次级文库的再生过程均可通用。所以，利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法具有很好的通用型和重要的研究意义。

有益效果：

本发明主要公开了一种微阵列微流控芯片筛选适配体的方法，该筛选芯片将正负筛过程集合在一块微流控芯片上，结合微流控和微阵列技术优点，筛选过程简单便捷且筛选 7 轮后即获得高亲和力的适配体。同时本发明还公开了乳铁蛋白适配体筛选的具体步骤，包括芯片制备、正负筛过程、PCR 扩增等详细过程。该方法筛选出的适配体对靶标蛋白的特异性好，亲和性高；且该适配体较抗体更容易获得，可以大量、快速的在体外合成，制备方法更为简单快捷，因此该适配体在许多领域将有望成为抗体技术有益的补充。此外，该正负筛集合的芯片模式方便、快捷、高效，可以用于其它蛋白、核酸适配体的筛选，为其他适配体筛选工作者提供了很好的思路设计和参考。

附图说明

图 1 微阵列微流控适用于适配体筛选流程图。

图 2 第一次筛选得到的结果图，（a）每一轮文库的用量，（b）适配体在芯片上的荧光信号强度，（c）适配体在芯片上的成像图，（d）芯片清洗后的图像。

图 3 第二次筛选得到的结果图，（a）每一轮文库的用量，（b）适配体在芯片上的荧光信号强度，（c）适配体在芯片上的成像图，（d）芯片清洗后的图像图。

图 4 第三次筛选得到的结果图，（a）每一轮文库的用量，（b）适配体在芯片上的荧光信号强度，（c）适配体在芯片上的成像图，（d）芯片清洗后的图像图。

图 5 其他适配体对乳铁蛋白荧光偏振检测线性图。

具体实施方式

根据下述实施例，可以更好地理解本发明。然而，本领域的技术人员容易理解，实施例所描述的内容仅用于说明本发明，而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

实施例 1：微阵列微流控芯片的制备

芯片制备：利光刻掩模与化学腐蚀相结合的技术制作微流控通道模板，留作后面的 PDMS 通道制备；称取质量比为 10：1 的 PDMS 前聚体与固化剂充分混合，抽真空后浇到微流控通道模板上经固化后得到 PDMS 微流控通道；使用点样仪在玻璃基片点制浓度为 5 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，并对 PDMS 和点样后的玻璃基片同时等离子处理，之后紧密贴合共同作为筛选芯片，用于接下来的每轮筛选；

实施例 2：PCR 扩增

将芯片上洗脱下来的溶液分为体积均为 23 μL 的 6 份相同溶液，每份依次加入 25 μL，2× Taq 聚合酶, 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL，20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；PCR 的热循环过程如下：94 ℃ 5 min； 循环 94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s 过程 10 轮，72 ℃ 5 min 终止反应；该步骤获得的产物稀释 10 倍后作为模板进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后 PCR 产物与 25 μL，2× SYBR Premix Ex Taq™ 酶 , 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物，1 μL，20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL 超纯水充分混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数。

实施例 3：乳铁蛋白适配体筛选

乳铁蛋白适配体筛选的具体步骤，包括芯片制备、正负筛过程、PCR 扩增等详细过程，具体如下所述，其中：

文库：5′-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-N40-CTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3′

TARMA 修饰的前向引物：5′-TARMA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-3′

生物素化的后向引物：5′Biotin-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3′

(1) 芯片制备：利首先利光刻掩模与化学腐蚀相结合的技术制作微流控通道模板作为 PDMS 通道制做磨具；后称取质量比为 10：1 的 PDMS 前聚体与固化剂充分混合，抽真空后浇到微流控通道模板上经固化后得到 PDMS 微流控通道；使用点样仪在玻璃基片点制浓度为 5 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，并对 PDMS 和点样后的玻璃基

片同时等离子处理，之后紧密贴合共同作为筛选芯片，用于接下来的每轮筛选；

(2) 筛选准备：将步骤（1）得到的筛选芯片放入恒温水浴箱中 37 ℃下孵育蛋白 2 h；再通入 20 mg/ml BSA 和 0.01 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 37 ℃条件下封闭 1 h；之后用 150 μL，1× PBST 溶液清洗正负筛通道；

(3) 第一轮筛选：将 0.5 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 5 min，并立即在冰上冷冻 10 s；再用注射泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；之后以 15 μL/min 流速通入 150 μL，1×PBS 缓冲溶液以除去正筛通道中未结合的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 5 min 洗脱乳铁蛋白结合的 ssDNA 序列，所得溶液在 50℃条件下高纯氮吹干至体积为 69 μL；

(4) PCR 扩增过程：将步骤（2）所得溶液分为体积均为 23 μL 的 3 份相同溶液，每份依次加入 25 μL，2× Taq 聚合酶, 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL，20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；PCR 的热循环过程如下：94 ℃ 5 min；循环 94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s 过程 10 轮，72 ℃ 5 min 终止反应；该步骤获得的产物稀释 10 倍后作为模板进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后 PCR 产物与 25 μL，2× SYBR Premix Ex Taq^{TM} 酶 , 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物，1 μL，20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL DPEC 水充分混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(5) 分离纯化：将步骤（4）得到的 PCR 产物与 600 μL Promega 磁珠充分混匀，在摇床上快速摇动 1 h 后除去上清液；再加入 25 μL，50 mM NaOH 涡旋 5 min 将磁珠上连接的双链解离；吸取上层清液并依次加入 12.5 μL 100 mM HCl ，25 μL H_2O，62.5 μL 2× PBSM 中和，所得的溶液作为下一轮筛选的次级文库, 其含量约为 40 pmol；

(6) 第二轮筛选：用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进负筛通道，在常温条件下反应 50 min；再用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；接着以 15 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的链；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱蛋白结合的链，所得溶液在 60℃吹干至体积为 92 μL，留作 PCR 扩增;

(7) 重复步骤（4）、（5）、（6）至第八轮筛选；

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物送至上海生工测序，每轮随机选取 120 条测序，再用 IDT 软件对得到的链进行二级结构分析，最终获得最佳的适配体。

实施例 4：乳铁蛋白适配体筛选

乳铁蛋白适配体筛选的具体步骤，包括芯片制备、正负筛过程、微量 PCR 扩增等详细过程，具体如下所述，其中：

文库： 5′-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-N40-CTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3′

TARMA 修饰的前向引物：5′-TARMA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-3′

生物素化的后向引物：5′-Biotin-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3′

(1) 芯片制备：利首先利光刻掩模与化学腐蚀相结合的技术制作微流控通道模板作为 PDMS 通道制做磨具；后称取质量比为 10：1 的 PDMS 前聚体与固化剂充分混合，抽真空后浇到微流控通道模板上经固化后得到 PDMS 微流控通道；使用点样仪在玻璃基片点制浓度为 2.5 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，并对 PDMS 和点样后的玻璃基片同时等离子处理，之后紧密贴合共同作为筛选芯片，用于接下来的每轮筛选；

(2) 筛选准备：将步骤（1）得到的筛选芯片放入水浴锅中 37 ℃下孵育蛋白 3 h；再通入 20 mg/ml BSA 和 0.01 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 37 ℃条件下封闭 2 h；之后用 150 μL，1× PBST 溶液清洗通道；

(3) 第一轮筛选：将 1 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 5 min，并立即在冰上冷冻 10 s；再用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；之后以 15 μL/min 流速通入 150 μL，1×PBS 缓冲溶液以除去正筛通道中未结合的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 5 min 洗脱乳铁蛋白结合的链，所得溶液在 50℃条件下高纯氮吹干至体积为 92 μL；

(4) PCR 扩增过程：将步骤（3）所得溶液分为体积均为 23 μL 的 4 份相同溶液，每份依次加入 25 μL，2× Taq 聚合酶, 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL，20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；PCR 的热循环过程如下：94 ℃ 5 min；循环 94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s 过程 10 轮，72 ℃ 5 min 终止反应；该步骤获得的产物稀释 10 倍后作为模板进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后 PCR 产物与 25 μL，2× SYBR Premix Ex Taq™ 酶 , 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物，1 μL，20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL 超纯水充分混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL

样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(5) 分离纯化：将步骤(4)得到的 PCR 产物与 800 μL Promega 磁珠充分混匀，在摇床上快速摇动 1 h 后除去上清液；再加入 25 μL，1 M NaOH 涡旋 5 min 将磁珠上连接的双链解离；吸取上层清液并依次加入 12.5 μL 2M HCl ，25 μL H_2O，62.5 μL 2× PBSM 中和，所得的溶液作为第二轮筛选的次级文库, 其浓度为 90 pmol；

(6) 第二轮筛选：用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进负筛通道，在常温条件下反应 50 min；再用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；接着以 15 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的链；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱蛋白结合的链，所得溶液在 60℃吹干至体积为 92μL，留作 PCR 扩增;

(7) 重复步骤（4）、（5）、（6）至第八轮筛选；

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物送至上海生工测序，每轮随机选取 120 条测序，再用 IDT 软件对得到的链进行二级结构分析，最终获得最佳的适配体。

实施例 5： 乳铁蛋白适配体筛选

乳铁蛋白适配体筛选的具体步骤，包括芯片制备、正负筛过程、微量 PCR 扩增等详细过程，具体如下所述，其中：

文库： 5′-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-N40-CTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3′

TARMA 修饰的前向引物：5′-TARMA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-3′

生物素化的后向引物：5′-Biotin-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3′

(1) 芯片制备：利首先利光刻掩模与化学腐蚀相结合的技术制作微流控通道模板作为 PDMS 通道制做磨具；后称取质量比为 10：1 的 PDMS 前聚体与固化剂充分混合，抽真空后浇到微流控通道模板上经固化后得到 PDMS 微流控通道；使用点样仪在玻璃基片点制浓度为 5 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，并对 PDMS 和点样后的玻璃基片同时等离子处理，之后紧密贴合共同作为筛选芯片，用于接下来的每轮筛选；

(2) 筛选准备：将步骤（1）得到的筛选芯片放入恒温水浴箱中 37 ℃下孵育蛋白 2 h；再通入 20 mg/ml BSA 和 0.01 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 37 ℃条件下封闭 1 h；之后用 150 μL，1× PBST 溶液清洗通道；

(3) 第一轮筛选：将 1 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 5 min，并立即在冰上冷

冻 10 s；再用泵以 5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；之后以 30 μL/min 流速通入 150 μL，1×PBS 缓冲溶液以除去正筛通道中未结合的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱乳铁蛋白结合的链，所得溶液在 50℃条件下高纯氮吹干至体积为 92 μL；

(4) PCR 扩增过程：将步骤（3）所得溶液分为体积均为 23 μL 的 4 份相同溶液，每份依次加入 25 μL，2× Taq 聚合酶, 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL，20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；PCR 的热循环过程如下：94 ℃ 5 min；循环 94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s 过程 10 轮，72 ℃ 5 min 终止反应；该步骤获得的产物稀释 10 倍后作为模板进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后 PCR 产物与 25 μL，2× SYBR Premix Ex Taq^{TM} 酶 , 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物，1 μL，20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL DPEC 水充分混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(5) 分离纯化：将步骤（4）得到的 PCR 产物与 800 μL Promega 磁珠充分混匀，在摇床上快速摇动 1 h 后除去上清液；再加入 25 μL，50 mM NaOH 涡旋 5 min 将磁珠上连接的双链解离；吸取上层清液并依次加入 12.5 μL 100 mM HCl，25 μL H_2O，62.5 μL 2× PBSM 中和，所得的溶液作为第二轮筛选的次级文库其含量为 60 pmol；

(6) 第二轮筛选：用泵以 5 μL/min 流速将文库输进负筛通道，在常温条件下反应 50 min；再用泵以 5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；接着以 30 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的链；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱蛋白结合的链，所得溶液在 60℃吹干至体积为 92 μL，留作 PCR 扩增；

(7) 重复步骤（4）、（5）、（6）至第八轮筛选；

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物送至上海生工做克隆测序，每轮随机选取 120 个克隆子进行测序，再用 IDT 软件对得到的链进行二级结构分析，最终获得最佳的适配体。

实施例 6：乳铁蛋白适配体筛选

乳铁蛋白适配体筛选的具体步骤，包括芯片制备、正负筛过程、微量 PCR 扩增等

详细过程，具体如下所述，其中：

文库：5′-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-N40-CTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3′

TARMA 修饰的前项引物：5′-TARMA~GACAGGCAGGACACCGTAAC-3′

生物素化的后项引物：5′-Biotin-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3′

(1) 芯片制备：利首先利光刻掩模与化学腐蚀相结合的技术制作微流控通道模板作为 PDMS 通道制做磨具；后称取质量比为 10：1 的 PDMS 前聚体与固化剂充分混合，抽真空后浇到微流控通道模板上经固化后得到 PDMS 微流控通道；使用点样仪在玻璃基片点制浓度为 5 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，并对 PDMS 和点样后的玻璃基片同时等离子处理，之后紧密贴合共同作为筛选芯片，用于接下来的每轮筛选；

(2) 筛选准备：将步骤（1）得到的筛选芯片放入水浴锅中 37 ℃下孵育蛋白 2 h；再通入 20 mg/ml BSA 和 0.01 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 37 ℃条件下封闭 1 h；之后用 150 μL，1× PBST 溶液清洗通道；

(3) 第一轮筛选：将 1 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 5 min，并立即在冰上冷冻 10；再用注射泵以 2.5 μL/min 流速将文库通入负筛、正筛通道，在常温条件下反应 50 min；接着以 15 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未结合的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱蛋白结合的 ssDNA，所得溶液在 50℃条件下高纯氮吹干至体积为 92 μL；

(4) PCR 扩增过程：将步骤（3）所得溶液分为体积均为 23 μL 的 4 份相同溶液，每份依次加入 25 μL，2× Taq 聚合酶, 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL，20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；PCR 的热循环过程如下：94 ℃ 5 min；循环 94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s 过程 10 轮，72 ℃ 5 min 终止反应；该步骤获得的产物稀释 10 倍后作为模板进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后 PCR 产物与 25 μL，2× SYBR Premix Ex Taq^{TM} 酶，1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物，1 μL，20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL 超纯水充分混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(5) 分离纯化：将步骤（4）得到的 PCR 产物与 800 μL Promega 磁珠充分混匀，在摇床上快速摇动 1 h 后除去上清液；再加入 25 μL，50 mM NaOH 涡旋 5 min 将磁珠上连

接的双链解离；吸取上层清液并依次加入 12.5 μL 100 mM HCl ，25 μL DPEC 水，62.5 μL 2× PBSM 中和，所得的溶液作为第二轮筛选的次级文库，其含量约为 60 pmol；

(6) 第二轮筛选：用泵以 5 μL/min 流速将文库输进负筛通道，在常温条件下反应 50 min；再用泵以 5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；接着以 30 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的链；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱蛋白结合的链，所得溶液在 60℃吹干至体积为 92 μL，留作 PCR 扩增；

(7) 重复步骤（4）、（5）、（6）至第八轮筛选。

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物送至上海生工做克隆测序，每轮随机选取 120 个克隆子进行测序，再用 IDT 软件对得到的链进行二级结构分析，最终获得最佳的适配体。

得到的检测适配体的序列如 SEQ ID NO.5～SEQ ID NO.65 所示。

实施例 7：荧光偏振法对乳铁蛋白标准样品进行检测：

(1) 在 10 μL, 250 nM FITC（异硫氰酸荧光素）标记的适配体 N2（碱基序列：AGGCAGGACACCGTAACCGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCT）溶液中加入 100 μL 浓度为 25 μg/mL 的乳铁蛋白标准样品，充分混匀。

(2) 将步骤(1)的混合液置于 96 微孔板中 37 ℃条件下反应 15 min，用 BioTeK 酶标仪直接扫描，激发波长为 480 nm，发射波长为 528 nm。

实施例 8：检测乳铁蛋白含量的方法

(1) 在 10 μL, 250 nM FITC（异硫氰酸荧光素）标记的适配体 N2（碱基序列：AGGCAGGACACCGTAACCGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCT）溶液中加入稀释 25-100 倍的牛奶样品，充分混匀。

(2)将步骤 (1) 的混合液置于 96 微孔板中 37 ℃条件下反应 15 min，用 BioTeK 酶标仪直接扫描，激发波长为 480 nm，发射波长为 528 nm。

(3) 对比标准曲线得到牛奶样品中乳铁蛋白的浓度。

实施例 9：检测乳铁蛋白含量的方法

(1) 在 10 μL, 250 nM FITC（异硫氰酸荧光素）标记的适配体 N6（碱基序列：AGGCAGGACACCGTAACCGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCT）溶液中

加入稀释 25-100 倍的牛奶样品，充分混匀。

(2)将步骤 (1) 的混合液置于 96 微孔板中 37 ℃条件下反应 15 min，用 BioTeK 酶标仪直接扫描，激发波长为 480 nm，发射波长为 528 nm。

(3) 对比标准曲线得到牛奶样品中乳铁蛋白的浓度，具体见图 5（a）。

实施例 10：检测乳铁蛋白含量的方法

(1) 在 10 μL, 250 nM FITC（异硫氰酸荧光素）标记的适配体 N14（碱基序列：AGGCAGGACACCGTAACCGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCT）溶液中加入稀释 25-100 倍的牛奶样品，充分混匀。

(2)将步骤 (1) 的混合液置于 96 微孔板中 37 ℃条件下反应 15 min，用 BioTeK 酶标仪直接扫描，激发波长为 480 nm，发射波长为 528 nm。

(3) 对比标准曲线得到牛奶样品中乳铁蛋白的浓度，具体见图 5（b）。

实施例 11：检测乳铁蛋白含量的方法

(1) 在 10 μL, 250 nM FITC（异硫氰酸荧光素）标记的适配体 N16（碱基序列：AGGCAGGACACCGTAACCGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCT）溶液中加入稀释 25-100 倍的牛奶样品，充分混匀。

(2)将步骤 (1) 的混合液置于 96 微孔板中 37 ℃条件下反应 15 min，用 BioTeK 酶标仪直接扫描，激发波长为 480 nm，发射波长为 528 nm。

(3) 对比标准曲线得到牛奶样品中乳铁蛋白的浓度，具体见图 5（c）。

实施例 12：检测乳铁蛋白含量的方法

(1) 在 10 μL, 250 nM FITC（异硫氰酸荧光素）标记的适配体 N31（碱基序列：AGGCAGGACACCGTAACCGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCT）溶液中加入稀释 25-100 倍的牛奶样品，充分混匀。

(2)将步骤 (1) 的混合液置于 96 微孔板中 37 ℃条件下反应 15 min，用 BioTeK 酶标仪直接扫描，激发波长为 480 nm，发射波长为 528 nm。

(3) 对比标准曲线得到牛奶样品中乳铁蛋白的浓度，具体见图 5（d）。

实施例 13：α-乳白蛋白适配体筛选

α-乳白蛋白适配体筛选的具体步骤，包括芯片制备、正负筛过程、PCR 扩增等详细过程，具体如下所述，其中：

文库：5′-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-N40-CTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3′

TARMA 修饰的前向引物：5′-TARMA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-3′

生物素化的后向引物：5′Biotin-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3′

(1) 芯片制备：利首先利光刻掩模与化学腐蚀相结合的技术制作微流控通道模板作为 PDMS 通道制做磨具；后称取质量比为 10：1 的 PDMS 前聚体与固化剂充分混合，抽真空后浇到微流控通道模板上经固化后得到 PDMS 微流控通道；使用点样仪在玻璃基片点制浓度为 5 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，并对 PDMS 和点样后的玻璃基片同时等离子处理，之后紧密贴合共同作为筛选芯片，用于接下来的每轮筛选；

(2) 筛选准备：将步骤（1）得到的筛选芯片放入恒温水浴箱中 37 ℃下孵育蛋白 2 h；再通入 20 mg/ml BSA 和 0.01 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 37 ℃条件下封闭 1 h；之后用 150 μL，1× PBST 溶液清洗正负筛通道；

(3) 第一轮筛选：将 0.5 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 5 min，并立即在冰上冷冻 10 s；再用注射泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；之后以 15 μL/min 流速通入 150 μL，1×PBS 缓冲溶液以除去正筛通道中未结合的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 5 min 洗脱 α -乳白蛋白结合的 ssDNA 序列，所得溶液在 50℃条件下高纯氮吹干至体积为 92 μL；

(4) PCR 扩增过程：将步骤（2）所得溶液分为体积均为 23 μL 的 4 份相同溶液，每份依次加入 25 μL，2× Taq 聚合酶, 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL，20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；PCR 的热循环过程如下：94 ℃ 5 min；循环 94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s 过程 10 轮，72 ℃ 5 min 终止反应；该步骤获得的产物稀释 10 倍后作为模板进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后 PCR 产物与 25 μL，2× SYBR Premix Ex Taq™ 酶 , 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物，1 μL，20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL DPEC 水充分混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(5) 分离纯化：将步骤（4）得到的 PCR 产物与 800 μL Promega 磁珠充分混匀，在摇床上快速摇动 1 h 后除去上清液；再加入 25 μL，50 mM NaOH 涡旋 5 min 将磁珠上连接的双链解离；吸取上层清液并依次加入 12.5 μL 100 mM HCl ，25 μL H_2O，62.5 μL 2× PBSM 中和，所得的溶液作为下一轮筛选的次级文库, 其含量约为 40 pmol；

(6) 第二轮筛选：用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进负筛通道，在常温条件下反应 50 min；再用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；接着以 15 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的链；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱蛋白结合的链，所得溶液在 60℃吹干至体积为 92 μL，留作 PCR 扩增;

(7) 重复步骤（4）、（5）、（6）至第八轮筛选；

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物送至上海生工测序，每轮随机选取 120 条测序，再用 IDT 软件对得到的链进行二级结构分析，最终获得最佳的适配体。

实施例 14：β-乳球蛋白适配体筛选

β-乳球蛋白适配体筛选的具体步骤，包括芯片制备、正负筛过程、PCR 扩增等详细过程，具体如下所述，其中：

文库：5′-TAMRA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-N40-CTGCTACCTCCCTCCTCTTC-3′

TARMA 修饰的前向引物：5′-TARMA-GACAGGCAGGACACCGTAAC-3′

生物素化的后向引物：5′Biotin-GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3′

(1) 芯片制备：利首先利光刻掩模与化学腐蚀相结合的技术制作微流控通道模板作为 PDMS 通道制做磨具；后称取质量比为 10：1 的 PDMS 前聚体与固化剂充分混合，抽真空后浇到微流控通道模板上经固化后得到 PDMS 微流控通道；使用点样仪在玻璃基片点制浓度为 5 mg/mL 的β-乳球蛋白和阴性蛋白微阵列，并对 PDMS 和点样后的玻璃基片同时等离子处理，之后紧密贴合共同作为筛选芯片，用于接下来的每轮筛选；

(2) 筛选准备：将步骤（1）得到的筛选芯片放入恒温水浴箱中 37 ℃下孵育蛋白 2 h；再通入 20 mg/ml BSA 和 0.01 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 37 ℃条件下封闭 1 h；之后用 150 μL，1× PBST 溶液清洗正负筛通道；

(3) 第一轮筛选：将 0.5 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 5 min，并立即在冰上冷冻 10 s；再用注射泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；之后以 15 μL/min 流速通入 150 μL，1×PBS 缓冲溶液以除去正筛通道中未结合的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 5 min 洗脱β-乳球蛋白结合的 ssDNA 序列，所得溶液在 50℃条件下高纯氮吹干至体积为 92 μL；

(4) PCR 扩增过程：将步骤（2）所得溶液分为体积均为 23 μL 的 4 份相同溶液，每

份依次加入 25 μL，2× Taq 聚合酶, 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL，20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；PCR 的热循环过程如下：94 ℃ 5 min；循环 94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s 过程 10 轮，72 ℃ 5 min 终止反应；该步骤获得的产物稀释 10 倍后作为模板进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后 PCR 产物与 25 μL，2× SYBR Premix Ex Taq™ 酶 , 1 μL，20 μM TAMRA 标记的前向引物，1 μL，20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL DPEC 水充分混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(5) 分离纯化：将步骤（4）得到的 PCR 产物与 800 μL Promega 磁珠充分混匀，在摇床上快速摇动 1 h 后除去上清液；再加入 25 μL，50 mM NaOH 涡旋 5 min 将磁珠上连接的双链解离；吸取上层清液并依次加入 12.5 μL 100 mM HCl ，25 μL H_2O，62.5 μL 2× PBSM 中和，所得的溶液作为下一轮筛选的次级文库, 其含量约为 40 pmol；

(6) 第二轮筛选：用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进负筛通道，在常温条件下反应 50 min；再用泵以 2.5 μL/min 流速将文库输进正筛通道，在常温条件下反应 50 min；接着以 15 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的链；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用无核水在 95℃下加热 5 min 洗脱蛋白结合的链，所得溶液在 60℃吹干至体积为 92 μL，留作 PCR 扩增;

(7) 重复步骤（4）、（5）、（6）至第八轮筛选；

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物送至上海生工测序，每轮随机选取 120 条测序，再用 IDT 软件对得到的链进行二级结构分析，最终获得最佳的适配体。

SEQUENCE LISTING

<110> 南京大学
<120> 一种利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法
<130> SG2016090002
<160> 65
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 随机碱基5'端的核苷酸序列
<400> 1
gacaggcagg acaccgtaac 20
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 随机碱基3'端的核苷酸序列
<400> 2
ctgctacctc cctcctcttc 20
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 前向引物
<400> 3
gacaggcagg acaccgtaac 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 后向引物
<400> 4
gaagaggagg gaggtagcag 20
<210> 5
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体N1
<400> 5
gcaggacacc gtaaccctaa cacgtacggg gcatttatgg catagctctt cctccctgc 59
<210> 6
<211> 50
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N2
<400> 6
aggcaggaca ccgtaaccgg tgcatctatg gctactagct tttcctgcct 50
<210> 7
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N3
<400> 7
gcaggacacc gtaacgggca atcttgctct tattttcaca cttgataaat atgtcctgc 59
<210> 8
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N4
<400> 8
gcaggacacc gtaacgggcg aacgctctaa ataaatggca tcaatttctt ttgccctgc 59
<210> 9
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N5
<400> 9
gcaggacacc gtaacgggct tatgctctta aaaatcctga gcgacttttt atgtactgc 59
<210> 10
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N6
<400> 10
gcaggacacc gtaactcggg caaagctctg aataatgttc aaccaatatt ctgtcctgc 59
<210> 11
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N7
<400> 11
gcaggacacc gtaacaatac tcctgttacc gtgcatctat ggccattggc ttttcctgc 59
<210> 12
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 适配体 N8
<400> 12
gcaggacacc gtaacacggg ctctgctttt ccaataatga caagtattgg atggcctgc 59
<210> 13
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N9
<400> 13
gcaggacacc gtaacactct caaccatgac ggtgcaatat tggcgctagc tcttcctgc 59
<210> 14
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N10
<400> 14
gcaggacacc gtaacgtatt aactagtacc agtgcatcta tggctattgc ttttcctgc 59
<210> 15
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N11
<400> 15
gcaggacacc gtaacgttcg taacaacacg gcatctatgg ctttagctct tgtacctgc 59
<210> 16
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N12
<400> 16
aggcaggaca ccgtaacacc ggtgcgtccc acggctccag ctcttcctgc ct 52
<210> 17
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N13
<400> 17
gcaggacacc gtaacacggg ctgatgctct ctttatttta cctaaataaa gtgtcctgc 59

<210> 18
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 适配体 14
<400> 18
gcaggacacc gtaacactgc tttatccccg tcggcttggc tcttcgacag tgtggctgc 59
<210> 19
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N15
<400> 19
agcagacggg agacctttag agttgtaact tgagtctgct 40
<210> 20
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N16
<400> 20
ggcaggacac cgtaacccct agttcctggt gcatttatgg caaagctttt cctgcc 56
<210> 21
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N17
<400> 21
caggcaggac accgtaaccg ggcatttgct ctcaatttag tctcaaattg tggcctgcct 60
g 61
<210> 22
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N18
<400> 22
aggcaggaca ccgtaaccgg tgcatctatg gctactagct cttcctgcct 50
<210> 23
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N19
<400> 23
gcaggacacc gtaacgggcg aacgctcttt attttggaac ccacaaaata atgttctgc 59
<210> 24
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 适配体 N20
<400> 24
gcaggacacc gtaacgggcg gagctcttcc atttcagatt tgtaaatgga tgtcactgc 59
<210> 25
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N21
<400> 25
gcaggacacc gtaacgggct atgctctaaa ttcttcctac tgacgcaatt ttggactgc 59
<210> 26
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N22
<400> 26
gcaggacacc gtaacgggtg cacactctta tttttacacg agccaaaaat atgtcctgc 59
<210> 27
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N23
<400> 27
caggcaggac accgtaacgg tgcaattatt ggtgaacact cttccttagc ctgctactct 60
g 61
<210> 28
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N24
<400> 28
gcaggacacc gtaactcatc ccaagctccg gtgccatcta tgggcttcgc ttttcctgc 59
<210> 29
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N25
<400> 29
aggcaggaca ccgtaactga acggtcttgg ctactgcaca tttttcctgc ct 52
<210> 30
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 适配体 N26
<400> 30
gcaggacacc gtaacaacaa cttcgtatcc ggtgcattta tggcgaatgc ttttcctgc 59
<210> 31
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N27
<400> 32
gcaggacacc gtaacactac cttctttcgg tgcgatccat tcggctttgc ttttcctgc 59
<210> 32
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N28
<400> 33
gcaggacacc gtaacactgc tttatccccg tcggcttggc tcttcgacag tgttgctgc 59
<210> 33
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N29
<400> 34
gcaggacacc gtaacactgc tttatccccg tcggcttgtc tcttcgacag tgtggctgc 59
<210> 34
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N30
<400> 36
agcagacggg agacttttag agttgtaact tgagtctgct 40
<210> 35
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N31
<400> 37
ggcaggacac cgtaaccagt ataggtgcat ttttggcgca agctcttcct gccctg 56
<210> 36
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> 适配体 N32
<400> 38
ggcaggacac cgtaaccatc gacggtgccg gtctcgggca ttttgctctt cctgcc 56
<210> 37
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N33
<400> 39
ggcaggacac cgtaacccca ctcgaggtgc aattttggcg tgagctcttc ctgcc 55
<210> 38
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N34
<400> 40
ggcaggacac cgtaaccccct agttcctggt gcatctatgg caaagctctt cctgcc 56
<210> 39
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N35
<400> 41
ggcaggacac cgtaaccccct agttcctggt gcatttatgg caaagctctt cctgcc 56
<210> 40
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 36
<400> 45
aggcaggaca ccgtaaccta caacggtgcc atctatgggc tttgcttttc ctgcct 56
<210> 41
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 37
<400> 48
gacaggcagg acaccgtaac ggtgcatcca tggcttttag ctcttcctga actgtc 56
<210> 42
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 38

<400> 49
aggcaggaca ccgtaacggt gcatctatgg ctttgctctt cctacctgtt ctacgagctg 60
ctacctccct 70
<210> 43
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 39
<400> 50
aggcaggaca ccgtaacggt gcgtgtacac ggctctgctt ttcctgcct 49
<210> 44
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 40
<400> 52
tgacaggcag gacaccgtaa caacaactcg atactggtgc cattttgggc gaacgctttt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 45
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N41
<400> 53
tgacaggcag gacaccgtaa caaccaacct acggtgcaat atttggcgga ttaagctctt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 46
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N42
<400> 54
tgacaggcag gacaccgtaa cacacgttaa cttacggcgc atttttggc ttcagctctt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 47
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N43
<400> 55
tgacaggcag gacaccgtaa cacggtgcaa actcttggcg aatgcttttc ctgacccgct 60
actgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 48
<211> 82

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N44
<400> 56
tgacaggcag gacaccgtaa catacgattc tctcgcacat tgtggctccg cttttatgtt 60
actgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 49
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N45
<400> 57
tgacaggcag gacaccgtaa ccatacttcg gtgcatccca tggcgaattc gctcttcctt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 50
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N46
<400> 58
tgacaggcag gacaccgtaa ccgggcggag ctcttattac atcaactcgc tgtaatatgg 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 51
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N47
<400> 59
tgacaggcag gacaccgtaa cgggcaatct tgctcttatt ttcacacctg ataaatatgt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 52
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N48
<400> 60
tgacaggcag gacaccgtaa cgggcttagc tctaaatcaa atcctcctta ttgattttgt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 53
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N49

<400> 61
tgacaggcag gacaccgtaa cgggtaacac tctacttata ccttgctata agttgtccgc 60
actgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 54
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N50
<400> 62
tgacaggcag gacaccgtaa cgggtttaac tctcaaatta gctctgcact acatttgtgc 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 55
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N51
<400> 63
tgacaggcag gacaccgtaa cgtaactacg gacggcatct atggctatgc tcttgtccct 60
gctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 56
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N52
<400> 64
tgacaggcag gacaccgtaa ctacctcttc catatcggtg caacatttgg cttagctctt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 57
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N53
<400> 65
tgacaggcag gacaccgtaa cttctgataa tcggtgcatc tatggcgtag ctcttcctca 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 58
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N54
<400> 66
tgacaggcag gacaccgtaa cacggggcaa ttttggtgaa gctcttcctg cccagcctac 60
tctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 59

<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N55
<400> 67
tgacaggcag gacaccgtaa ccgggctatt gctctcaaac ttacacttta acgtttgggt 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 60
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N56
<400> 68
tgacaggcag gacaccgtaa cgcgggcgaa gctcttaata cctctctatt atgtcctgtt 60
cctgctacct ccctcccctt ca 82
<210> 61
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N57
<400> 69
tgacaggcag gacaccgtaa cgggcgaatg ctctctttgt tttatatata acaaagtgtc 60
tctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 62
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N58
<400> 70
tgacaggcag gacaccgtaa cgggctctgc tctaaatttc gcccttgcac gaaattttgt 60
cctgctacct ccccccctct ca 82
<210> 63
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N59
<400> 71
tgacaggcag gacaccgtaa cgggcttatg ctcttaaaaa tcctgagcga ctttttatgt 60
actgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 64
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> 适配体 N60
<400> 72
tgacaggcag gacaccgtaa cggtgcggtc atatccggct ttgcttttcc tgccttctct 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82
<210> 65
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 适配体 N61
<400> 73
tgacaggcgg gacaccgtaa ccccaacacg tacggggcat ttatggcata gctcttcctc 60
cctgctacct ccctcctctt ca 82

1、一种利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法，其特征在于，所述的微阵列微流控芯片按照如下方法制备：

将 PDMS 前聚体与固化剂按照质量比为 5：1~100:1 的比例混合，混合均匀后，将其放入真空干燥器中，连接循环水真空泵进行抽真空 30 min 除气泡，再浇到微流控通道模板上，经固化后得到 PDMS 微流控通道，在玻璃基片上点制浓度为 0.1~10 mg/mL 的乳铁蛋白和阴性蛋白微阵列，对 PDMS 微流控通道和点样后的玻璃基片同时等离子处理，将上述两种基片紧密贴合，得到微阵列微流控芯片。

2、根据权利要求 1 所述的利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 筛选准备：将微阵列微流控芯片放入恒温水浴锅中，25~40 ℃下孵育蛋白 1~12 h；再通入 5~20 mg/ml BSA 和 0.01~0.5 mM 随机序列短链 ssDNA (20 nt) 在 25~40 ℃条件下封闭 1~3h，之后用 150 μL 1× PBST 溶液清洗正负筛通道；

(2) 第一轮筛选：将 0.1~10 nmol，125 μL 原始文库在 95℃加热 3~15 min，并立即在冰上冷冻 10 s~5 min；用注射泵以 1~5 μL/min 流速将文库通入正筛通道，在 25~40℃条件下反应 30~120 min；之后以 5~30 μL/min 流速通入 150 μL 1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未结合的链；撕掉 PDMS 层，使用微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 3~10 min 洗脱芯片上乳铁蛋白结合的 ssDNA，所得溶液在 40~60℃条件下用高纯氮吹干至体积为 25~250 μL；

(3) PCR 扩增过程：将步骤(2)所得溶液分为体积均为 23 μL 的 3~10 份相同溶液，每份依次加入 25 μL、2× Taq 聚合酶， 1 μL、20 μM TAMRA 标记的前向引物和 1 μL、20 μM 生物素化的后向引物，混合均匀后进行 PCR 扩增；

该步骤获得的产物作为模板稀释 5~40 倍后进行再一次扩增：取 5 μL 稀释后的 PCR 产物与 1 μL 2× SYBR Premix Ex Taq™ 酶、1 μL 20 μM TAMRA 标记的前向引物、1 μL 20 μM 生物素化的后向引物以及 18 μL 超纯水混合均匀，PCR 扩增每进行一轮便取 10 μL 样品至微孔板中用 BioTek 检测其荧光信号，荧光信号最高者作为最佳轮数，剩余产物均扩增该轮数；

(4) 分离纯化：将步骤(3)得到的 PCR 产物与 800 μL~5 mL Promega 磁珠充分混匀，在快速摇动 0.5~2 h 后除去上清液；再加入 25 μL、0.01~0.1 M NaOH 溶液涡旋 3~15 min，使磁珠上连接的双链解离到溶液中；之后取上层清液并依次加入 12.5 μL、0.1M HCl 25

μL，DPEC 水和 62.5 μL 2× PBSM 缓冲溶液，所得的中性溶液作为下一轮筛选的次级文库，其含量为 40 pmol~100 pmol；

(5) 第二轮筛选：用注射泵以 1~5 μL/min 流速将文库在 25~40℃条件下以 1~5 μL/min 依次输通入负筛，正筛通道；接着以 5~30 μL/min 流速通入 150 μL，1×PBS 缓冲溶液除去正筛通道中未反应的 ssDNA 序列；轻轻撕掉 PDMS 层，使用 Luxscan~10K/A 微阵列扫描仪扫描芯片；最后用 DPEC 水在 95℃下加热 3~10 min 洗脱芯片上乳铁蛋白结合的 ssDNA 序列，所得溶液在 60℃吹干至体积为 25~250 μL，留作 PCR 扩增；

(7) 重复步骤(4)、(5)、(6)至第八轮筛选；

(8) 将筛选的第五、六、七轮 PCR 扩增产物测序，重复上述的筛选过程，随机选取样品测序，分析测序结果，得到重复序列大于 2 的所有序列，再用 IDT 软件对得到的重复序列进行二级结构分析，获得最佳的适配体。

3、根据权利要求 2 所述的利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法，其中，步骤(2)中，所述文库的中间为 40 个随机碱基，随机碱基 5’端的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，随机碱基 3’端的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，

4、根据权利要求 2 所述的利用微阵列微流控芯片筛选适配体的方法，其中，步骤(3)中，所述的前向引物，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；

所述的后向引物，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

5、一种用于检测乳铁蛋白含量的适配体，其特征在于， 所述适配体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5~65 所示。

6、权利要求 5 所述用于检测乳铁蛋白含量的适配体在检测乳铁蛋白中的应用。

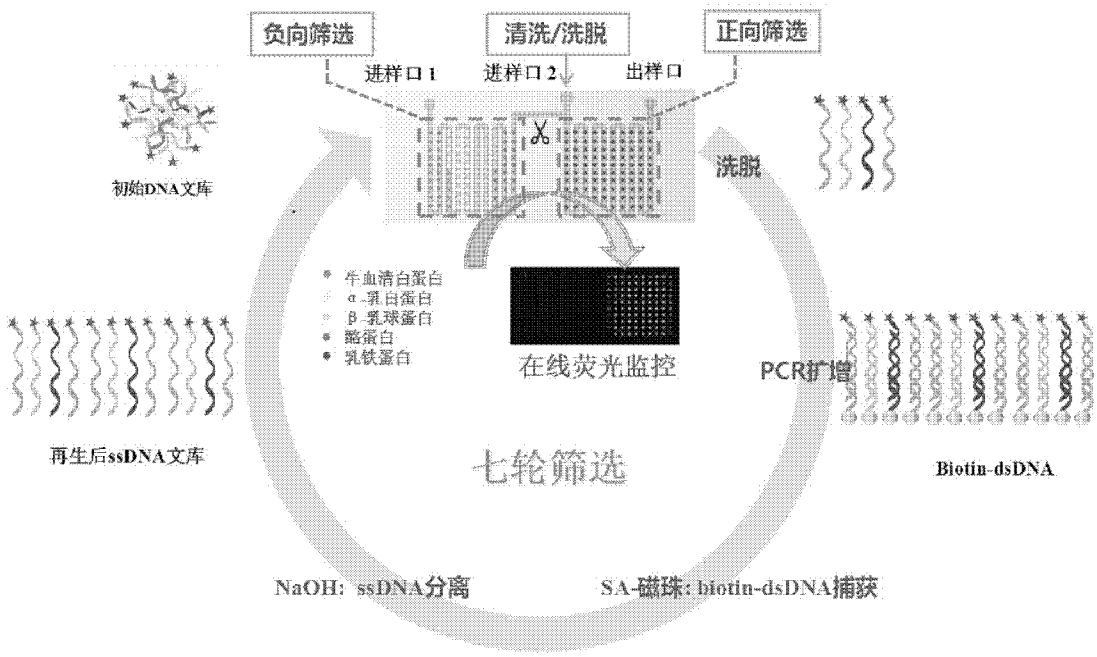

负向筛选
清洗/洗脱
正向筛选
进样口 1
进样口 2
出样口
初始DNA文库
洗脱
牛血清白蛋白
α-乳白蛋白
β-乳球蛋白
酪蛋白
乳铁蛋白
在线荧光监控
PCR扩增
再生后ssDNA文库
七轮筛选
Biotin-dsDNA
NaOH: ssDNA分离
SA-磁珠: biotin-dsDNA捕获

图 1

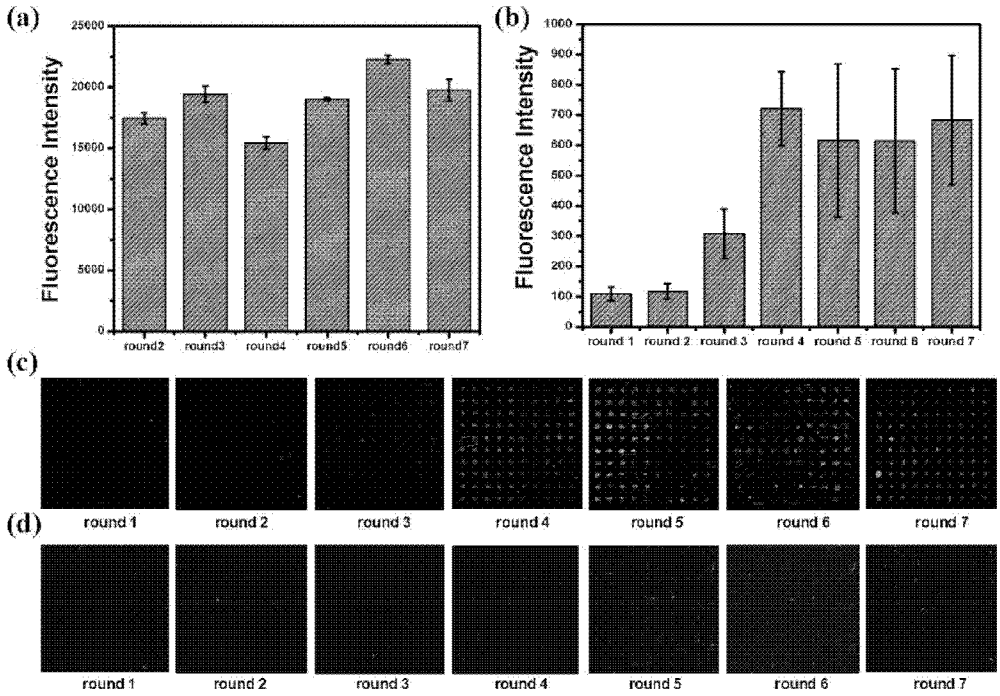

(a)
Fluorescence Intensity
round2
round3
round4
round5
round6
round7
(b)
Fluorescence Intensity
round 1
round 2
round 3
round 4
round 5
round 6
round 7
(c)
round 1
round 2
round 3
round 4
round 5
round 6
round 7
(d)
round 1
round 2
round 3
round 4
round 5
round 6
round 7

图 2

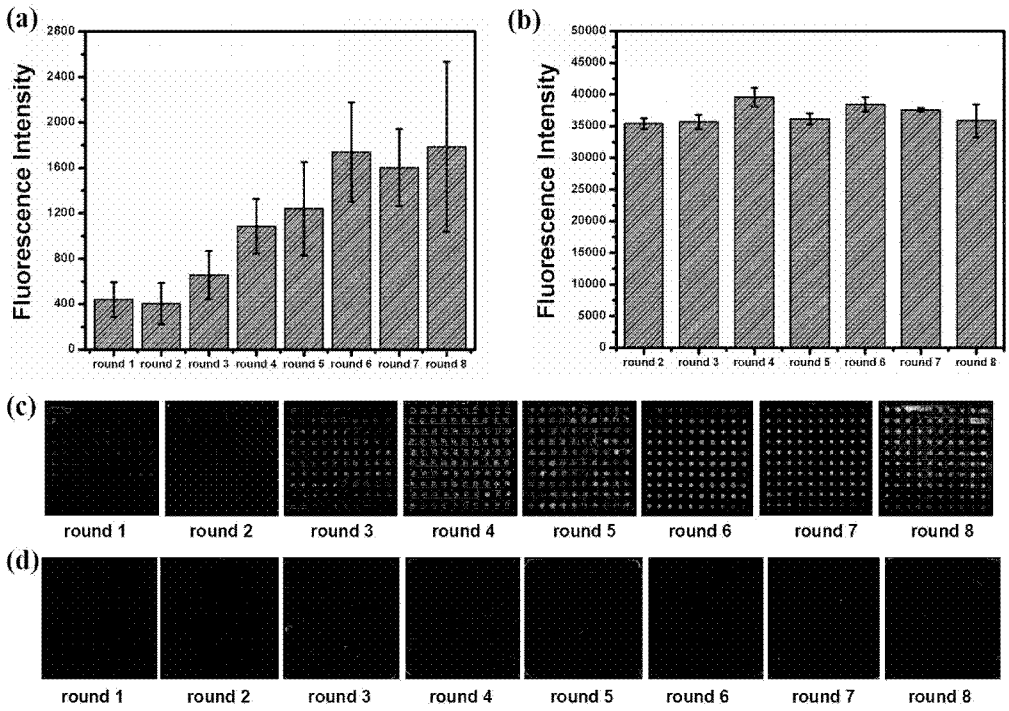

(a)
Fluorescence Intensity
round 1 round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8
(b)
Fluorescence Intensity
round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8
(c)
round 1 round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8
(d)
round 1 round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8

图 3

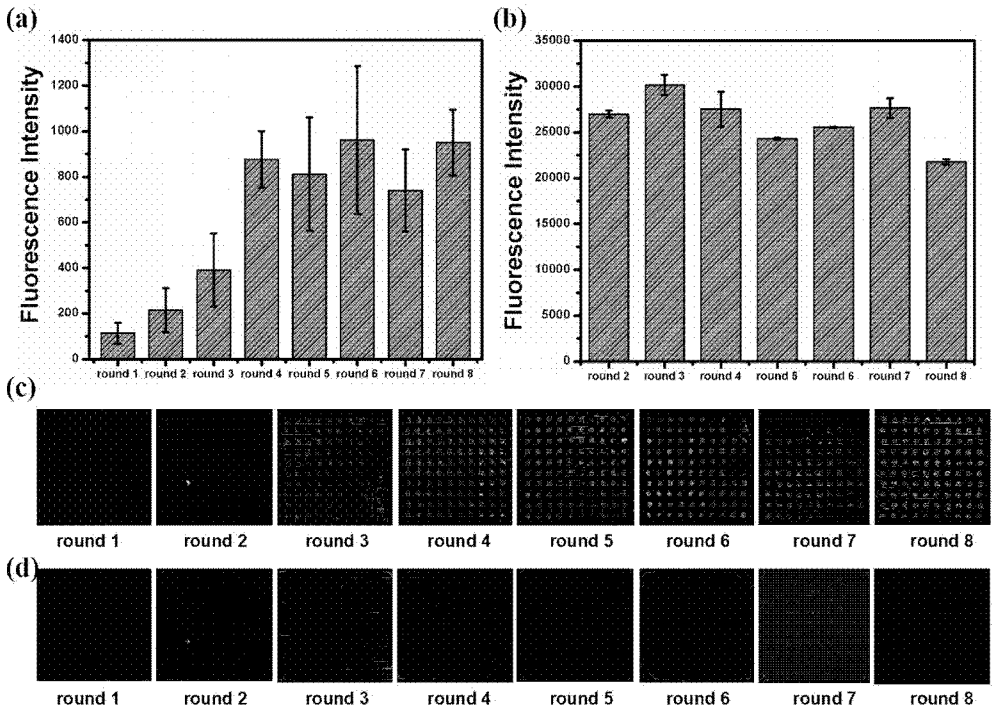

(a)
Fluorescence Intensity
round 1 round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8
(b)
Fluorescence Intensity
round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8
(c)
round 1 round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8
(d)
round 1 round 2 round 3 round 4 round 5 round 6 round 7 round 8

图 4

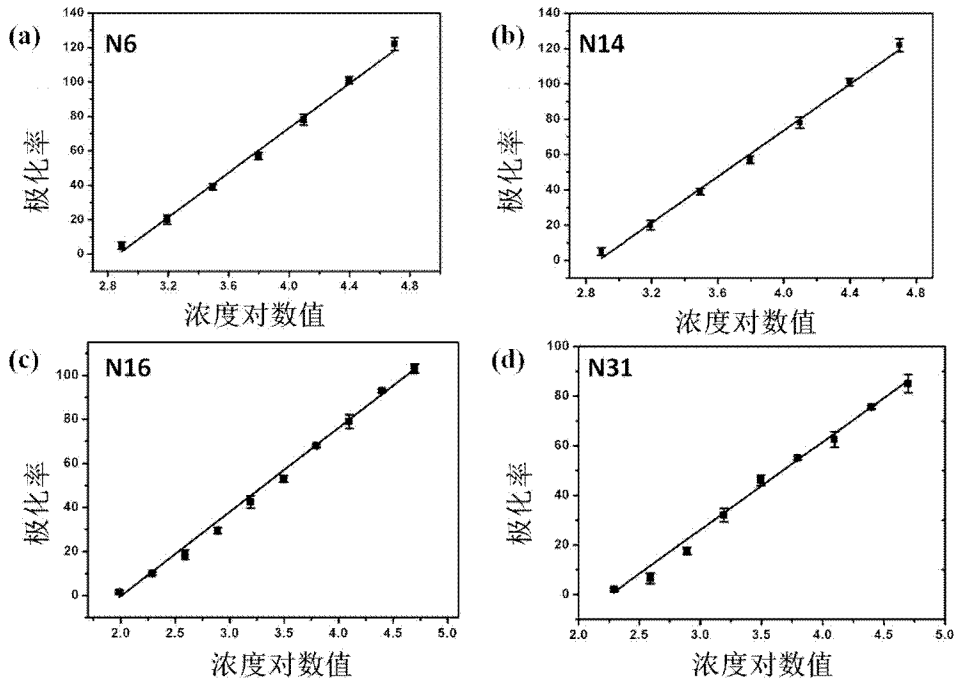


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/073024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/115 (2010.01) i; G01N 33/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, GENBANK, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT, GENOMEQUEST: 微阵列, 微流控, 适配体, 适体, 筛选, 乳铁蛋白, microarray, microfluidic, aptamer, screen, lactoferrin, search for sequence SEQ ID NO: 1-65

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102321616 A (HUNAN UNIVERSITY), 18 January 2012 (18.01.2012), see description, paragraphs [0004]-[0011], embodiments 1-2	1-6
A	W0 2011130511 A2 (UNIV CORNELL et al.), 20 October 2011 (20.10.2011), see entire document	1-6
A	肖忠华等, "核酸适配体在蛋白质组学研究中的应用", 中国生物制品学杂志, 21 March 2016 (21.03.2016), 29(3), ISSN: 1004-5503, see pages 333-336, (XIAO, Zhonghua et al., Application of Aptamer in Research on Proteomics, Chinese Journal of Biologicals)	1-6
A	MOSING, R.K. et al., "Microfluidic selection and applications of aptamers", Journal of Separation Science, 31 July 2007 (31.07.2007), 30(10), ISSN: 1615-9306, see pages 1420-1426	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 June 2017	10 July 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer XU, Yijun Telephone No. (86-10) 62411083

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/073024

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] Invention 1: claims 1-4, which relate to a method for screening Lactoferrin aptamers using a microarray microfluidic chip; and
[2] Inventions 2-62: claims 5 and 6, which relate to an aptamer of a nucleotide sequence as shown by SEQ ID NO: 5-65 used for detecting the content of Lactoferrin and the use thereof for detecting the Lactoferrin.
[3] Since invention 1 does not relate to the aptamer of the nucleotide sequence as shown by SEQ ID NO: 5-65, and the aptamers of the nucleotide sequence as shown by SEQ ID NO: 5-65 in inventions 2-62 have different sequence structures, there is no same or corresponding specific technical feature between inventions 1-62. The inventions are not technically linked to form a single general inventive concept, and do not comply with PCT Rules 13.1, 13.2 and 13.3. (211)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/073024

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102321616 A	18 January 2012	CN 102321616 B	21 November 2012
WO 2011130511 A2	20 October 2011	US 2015360195 A1	17 December 2015
		US 2013102501 A1	25 April 2013
		WO 2011130511 A3	01 March 2012

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/073024

A. 主题的分类

C12N 15/115(2010.01)i; G01N 33/68(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS,CPRSABS,DWPI,SIPOABS,CNKI,谷歌学术,GenBank,中国专利生物序列检索系统,GENOMEQUEST：微阵列，微流控，适配体，适体，筛选，乳铁蛋白，microarray, microfluidic, aptamer, screen, lactoferrin, 对序列SEQ ID NO:1-65的检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102321616 A (湖南大学) 2012年 1月 18日 (2012-01-18) 参见说明书第[0004]-[0011]段、实施例1-2	1-6
A	WO 2011130511 A2 (UNIV CORNELL等) 2011年 10月 20日 (2011-10-20) 参见全文	1-6
A	肖忠华等. "核酸适配体在蛋白质组学研究中的应用" 中国生物制品学杂志, 第29卷，第3期，2016年 3月 21日 (2016-03-21)， ISSN：1004-5503, 参见第333-336页	1-6
A	Mosing, RK等. "Microfluidic selection and applications of aptamers" JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE, 第30卷，第10期，2007年 7月 31日 (2007-07-31)， ISSN：1615-9306, 参见第1420-1426页	1-6

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 6月 29日	2017年 7月 10日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 徐益君 电话号码 (86-10)62411083

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/073024

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 发明1：权利要求1-4，涉及一种利用微阵列微流控芯片筛选乳铁蛋白适配体的方法；

[2] 发明2－发明62：权利要求5-6，涉及如SEQ ID NO:5-65所示核苷酸序列的用于检测乳铁蛋白含量的适配体及其在检测乳铁蛋白中的应用。

[3] 由于发明1中不涉及如SEQ ID NO:5-65所示核苷酸序列的适配体，而发明2－发明62中涉及的如SEQ ID NO:5-65所示核苷酸序列的适配体相互之间序列结构各不相同，因此，发明1-62之间没有相同或者相应的特定技术特征，不存在技术关联，不属于一个总的发明构思，不符合PCT实施细则13.1、13.2和13.3的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☑ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/073024

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	102321616	A	2012年 1月 18日	CN	102321616	B	2012年 11月 21日
WO	2011130511	A2	2011年 10月 20日	US	2015360195	A1	2015年 12月 17日
				US	2013102501	A1	2013年 4月 25日
				WO	2011130511	A3	2012年 3月 1日