



中华人民共和国国家标准

GB/T 37908—2019

基于光学椭偏成像的无标记蛋白质芯片 分析方法通则

General analysis regulation of the label-free protein microarray based on
imaging ellipsometry

2019-10-18 发布

2020-05-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生物芯片标准化技术委员会(SAC/TC 421)提出并归口。

本标准起草单位:中国科学院力学研究所、贵州金玖生物技术有限公司。

本标准主要起草人:靳刚、牛宇、韩克兵、王磊。



基于光学椭偏成像的无标记蛋白质芯片 分析方法通则

1 范围

本标准规定了基于光学椭偏成像的无标记蛋白质芯片的术语和定义、原理、仪器组成与要求、技术指标、测试方法和检测分析方法与步骤。

本标准适用于基础生物学、生物医学和临床医学中分析检测单一的或混合的靶标蛋白质分子。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 27990—2011 生物芯片基本术语

GB/T 28641—2012 蛋白质微阵列芯片通用技术条件

JJF 1265 生物计量术语及定义

3 术语和定义

GB/T 27990—2011、GB/T 28641—2012 和 JJF 1265 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

无标记蛋白质芯片 label-free protein microarray

能够直接将探针分子识别靶标分子的过程定性或定量显示,而无需借助物理、化学或生物的方法(如放射性元素标记、荧光标记等)对识别过程进行标记的蛋白质芯片。

3.2

质量面密度 surface mass density

单位面积的蛋白质芯片表面上生物分子的质量。

3.3

芯片布局 microarray design

由检测需求和待测靶标分子性质所决定的,探针分子在芯片表面上的设计和排布。

3.4

表面改性 surface modification

采用物理、化学、生物学方法,为实现探针分子的组装和阻隔非特异性吸附的目的,对芯片基底进行表面处理的过程。

3.5

探针组装 probe immobilization

通过物理吸附、共价结合和定向固定等方法,将探针分子装配到芯片表面上的过程。

3.6

分子识别 recognition

利用生物分子间的特异亲和性,实现探针分子对靶标分子特异性捕获的过程。

3.7

标准片 calibration substrate

预先在抛光硅基片上制作并进行厚度标定的二氧化硅膜层。膜层厚度在 1 nm~20 nm 范围内,成台阶状分布。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

anti-IgG:抗免疫球蛋白抗体(Anti-Immunoglobulin G Antibody)

BSA:牛血清白蛋白(Albumin from Bovine Serum)

CCD:电荷耦合元件(Charge-coupled Device)

IgG:免疫球蛋白(Immunoglobulin G)

ROC:受试者工作特征(Receiver Operating Characteristic)

5 原理

基于光学椭圆成像的无标记蛋白质芯片是将多元蛋白质芯片技术和高空间分辨率的光学椭圆成像技术相结合发展而成的一种无标记、快速、高灵敏度、多通量、自动检测的蛋白质分子间相互作用分析方法,具有如下特点:

- a) 样品无需标记、直接检测;
- b) 集成了芯片制备和检测功能,可快速进行多指标、多样本的并行检测;
- c) 主动输运式分子反应,速度快、样品消耗少;
- d) 采用高空间分辨光学椭圆成像测量,非接触、无扰动、对样品无破坏、检测灵敏度高,可进行定性和定量检测;
- e) 结果直观,可鉴别伪信号。

在用于蛋白质分子间相互作用检测时,首先将探针分子分别装配在芯片基底的格式化表面上各个单元中,形成格式化的探针微阵列。当含有靶标分子的溶液输运到探针微阵列后,探针分子由于分子识别会与靶标分子发生特异性结合,导致该反应单元上质量面密度增加。具有原子层量级厚度分辨能力的光学椭圆成像技术对这一变化及其敏感,可以定量显示质量面密度的变化,实现靶标分子的检测,判断靶标分子的存在与否或含量多少。

6 仪器组成及要求

6.1 芯片反应器

芯片反应器用于实现蛋白质芯片的表面格式化、溶液输运、样品分配、探针组装以及探针分子对靶标分子的识别、清洗和吹干等过程,由此生成适用于椭圆成像技术检测的多元蛋白质芯片。芯片反应器由微量流体泵、微量液池、微流道输运系统、微反应器阵列、清洗吹干装置和机械运动组件以及控制装置等组成。其基本工作原理是:适时、定量、按程序在微量流体泵的推动下将各种溶液输送到微反应器的指定的反应单元中,进行探针装配及生物分子与探针相互作用。其中,微量流体泵多采用多通道蠕动泵,流量在 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ~50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 范围内可控,并至少具有八个独立通道。微量液池的容积不少于 0.2 mL。微流道输运系统采用聚四氟乙烯材质制作。微反应器阵列至少为独立八单元,每反应单元的容积不多于 500 μL ,相邻两反应单元的距离大于 2 mm。清洗吹干装置能够实现 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ~50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速范围内液路清洗和 10 kPa~50 kPa 压力范围内的气路吹干。

6.2 芯片检测器

芯片检测器采用光学椭圆偏振成像技术对蛋白质芯片进行检测,通过推算质量面密度的变化量,得到各反应单元上靶标分子与探针分子相互作用的结果,计算出靶标分子溶液浓度等。芯片检测器通常包括入射光源、扩束准直光路、起偏器、补偿器、样品台、检偏器、成像系统、CCD、图像采集部分和控制部分等。其基本工作原理是:扩展的偏振光束平行地照射到芯片表面上,芯片对探测光束进行调制从而使得反射光波中载有芯片的信息,再经检偏部分,由 CCD 摄取图像。最后利用图像灰度与靶标分子的质量面密度之间的关系,获得靶标分子溶液浓度。其中,入射光源的波长多用 633 nm,带宽 50 nm,功率稳定性优于 2%。扩束准直光路直径大于 1 cm,照度均匀性高于 95%。起偏器、补偿器和检偏器的消光比大于 1 000 : 1(针对中心波长)。样品台被检测面与自准直仪光轴垂直度在 30"范围内,工作台倾斜调整精度小于 1',工作台升降调整精度小于 0.01 mm。CCD 的信噪比高于 60 dB,照度高于 0.2 lm。

6.3 计算机操控系统

计算机操控系统是以计算机作为信息处理中心,对系统各部分,包括,微流道芯片反应器和芯片检测器,进行操作和自动控制,并实现对系统数据和检测结果的采集、处理和分析。计算机操控系统包括计算机、运动控制器、操作和控制软件以及图像采集、处理和分析软件。其基本工作原理是:根据芯片制备和靶标分子检测的要求,在操作和控制软件的指令下,计算机通过控制器对芯片反应器和芯片检测器中的机械运动和数据采集进行程序控制,其控制定位精度小于 0.02 mm,运行速度小于 300 mm/s,实现适时、定量、按程序的运行效果,数据结果反馈回计算机和控制器进行处理;在图像处理和分析软件的指令下,计算机进行图像采集、处理和数据分析,获得检测结果的数据,并打印输出。

7 仪器的性能指标及测试方法

7.1 正常工作条件

在如下条件下进行试验:

- a) 电源:交流 220 V \pm 22 V;50 Hz \pm 1 Hz;
- b) 环境温度:10℃ \sim 30℃;
- c) 相对湿度:30% \sim 75%;
- d) 大气压力:86 kPa \sim 106 kPa。

7.2 检测动态范围

检测动态范围是指仪器能够检测的靶标分子浓度的有效范围。检测前,需要利用硅基底上带有 2 nm、4 nm 和 8 nm 厚度台阶的二氧化硅膜层标准片检查仪器的动态检测范围是否达到要求,具体测试步骤为:

- a) 将标准片置于芯片检测器平台上,分别对基底 2 nm、4 nm 和 8 nm 台阶部分进行测量,读取各梯度样品的信号值(Y_i),进行分析;
- b) 调整芯片检测器中起偏器和检偏器的角度,使上述四个测量值(Y_i)与厚度(X_i)之间均于线性,利用式(1)计算的相关系数应大于 95%。

$$\text{相关系数} = \frac{\sum (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2} \cdot \sqrt{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}} \dots\dots\dots (1)$$

7.3 最低检测限

最低检测限是指仪器能够检测出的某类待测靶标分子溶液的最低浓度值,具体测试步骤为:

- a) 将 anti-IgG 溶液用磷酸盐缓冲液等比例稀释为 100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL 和 1 ng/mL 备用。
- b) 将浓度为 10 $\mu\text{L/mL}$ 的 IgG 作为探针装配在芯片表面,用 BSA 封闭。将上述 5 个浓度的 anti-IgG 样品每种各取 25 μL 输运到探针单元上进行反应,每个浓度样品重复 5 次。将制备好的芯片通过芯片检测器测量,读取各浓度样品的信号值,进行分析。
- c) 如果灰度增加值大于三倍标准差,即认为该浓度可以被检测到,最低检测限的推荐值不低于 10 ng/mL。

7.4 重复性

重复性是指在相同条件下对同一样品进行多次检测所得结果之间的一致程度,包括芯片内重复性和芯片间重复性,具体测试步骤为:

- a) 在同一芯片上采用同样方法制备 5 个样品单元,通过芯片检测仪对各单元读取样品信号值 I_i (其中 $i=1,2,3,4,5$),利用式(2)计算芯片内重复性误差;

$$\text{重复性误差} = \frac{\left| I_i - \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 I_i \right|}{\frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 I_i} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

- b) 在 5 片芯片上选取同一反应单元,采用同样方法制备 5 个样品单元,通过芯片检测仪对各单元读取样品信号值 I_i (其中 $i=1,2,3,4,5$),利用式(2)计算芯片间重复性误差;
- c) 芯片内重复性误差应小于 3%;芯片间重复性误差应小于 10%。

7.5 准确度

准确度是指样品检测结果与真值的一致程度,利用与其他公认方法测量结果对比的方法进行测试,具体测试步骤为:

- a) 在抛光硅片上制备一个饱和的 IgG 膜层作为样品备用;
- b) 通过标定过的光学椭偏仪测量 IgG 的膜层厚度 a ,利用芯片检测器测量膜层的厚度为 d ;
- c) 利用式(3)进行计算准确度,应大于 95%。

$$\text{准确度} = \left(1 - \frac{|d - a|}{a} \right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

8 分析方法及步骤

8.1 仪器的校准

采用二氧化硅膜层厚度在 1 nm~50 nm 的标准片对仪器进行校准,并测试仪器各项指标是否符合使用要求,具体参数指标如 7.2~7.5 所示。

8.2 芯片反应器清洗

每次使用前,均需清洗芯片反应器,推荐的清洗流程如下:

- a) 将充足的清洗液以 20 $\mu\text{L/min}$ 的速度注入微流道芯片反应器,持续 5 min;
- b) 将充足的去离子水以 20 $\mu\text{L/min}$ 的速度抽入微流道芯片反应器,持续 5 min;
- c) 重复以上过程至少两次后,抽干微流道芯片反应器残余的液体。

8.3 芯片的制备方法

8.3.1 芯片布局设计

蛋白质芯片上需同时具备空白对照单元、探针对照单元、阴性对照单元、反应单元以及阳性对照单元等。

8.3.2 芯片基底

一般要求具有高反射率、具有原子层量级平整度的光学表面,如抛光硅片等。

8.3.3 表面改性

表面改性的目的是组装探针分子、控制探针分子的面密度、保持探针分子活性、抑制非特异性吸附。常采用的方法包括羧基化处理、醛基化处理、疏水处理、定向固定和仿生学改性等。

8.3.4 探针组装

探针组装的目的是高效捕获靶标分子,从而提高检测灵敏度和控制动态检测范围。探针组装的过程包括探针分子输运,并装配到芯片表面、清洗、封闭等步骤,应选择合适的浓度、流速、反应时间等参数及清洗和封闭的试剂条件。

8.3.5 靶标分子捕获

靶标分子捕获过程包括靶标分子输运到芯片表面,并与探针分子发生识别以及后续的清洗等步骤,应选择合适的浓度、流速、反应时间等参数。

8.4 样品的测定

清洗吹干芯片后,利用芯片检测器,根据靶标分子检测方法的规定,采用标准样品所使用的常数和给定方法的信号对测量获得的数据进行定量处理,得到样品参数(如,溶液浓度、质量面密度等)。

8.5 结果判定和分析

对于测定的量化结果,根据实际应用的要求,对其进行判定。在定性检测中,利用统计学中的 ROC 曲线确定阴阳性临界值,并分析检测方法的效能。在定量检测中,采用标准曲线的方法实现检测结果与靶标分子含量的确立。



参 考 文 献

- [1] Jin,G.,et al. (1995). “A Biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interactions.” *Analytical Biochemistry* 232(1):69-72.
- [2] Jin,G.,et al. (1996). “Imaging ellipsometry revisited;Developments for visualization of thin transparent layers on silicon substrates.” *Review of Scientific Instruments* 67(8):2930-2936.
- [3] Jin,G. (2008). “Development of biosensor based on imaging ellipsometry.” *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* 205(4):810-816.
- [4] Jin,G.,et al. (2011). “Development of biosensor based on imaging ellipsometry and bio-medical applications.” *Thin Solid Films* 519(9):2750-2757.
-

