



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104535761 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 27

(21) 申请号 201410794537. X

(22) 申请日 2014. 12. 18

(73) 专利权人 基蛋生物科技股份有限公司

地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业  
开发区博富路 9 号

(72) 发明人 金晶 罗雅赛 朱宗哲 童鏊  
苏恩本

(51) Int. Cl.

G01N 33/546(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

审查员 黄晓丽

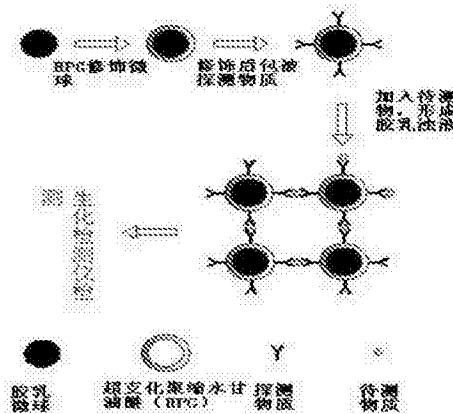
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫  
比浊法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法及其应用。本发明专利利用超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球,制备获得表面亲水并富含官能团的胶乳微球材料。在实际使用这种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的免疫比浊试剂时,发现试剂能够很好的抑制蛋白的非特异性吸附,抗体偶联量也较商品化的一般胶乳微球高。在项目性能分析中发现基于此种胶乳微球试剂可以大大增强抗原抗体之间的反应,与商品化一般胶乳微球试剂做对比时发现,灵敏度、检测范围都有明显的提高,具有优秀的相关性、稳定性和重复性表现。



1. 一种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法,其特征在于包括以下方法:

方法一:超支化聚缩水甘油醚经修饰后包被在胶乳微球表面形成超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球,对超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的端基进行活化后连接能与待测分子特异性结合的探测分子,形成了超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物,将超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物和待测样本混合,待反应后,形成了超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物~待测分子复合物,用生化检测仪检测反应溶液指标,再回算得出待测样本中的目标分析物的浓度;

方法二:连有缩水甘油醚的胶乳微球去质子化后缓慢滴加缩水甘油醚,制得超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球,经修饰后再在其端基上连接能与待测分子特异性结合的探测分子,形成了超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物,将超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物和待测样本混合,待反应后,形成了超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物~待测分子复合物,用生化检测仪检测反应溶液指标,再回算得出待测样本中的目标分析物的浓度。

2. 根据权利要求1所述的超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法,其特征在于所述的胶乳微球大小为50nm~400nm。

3. 根据权利要求1所述的超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法,其特征在于所述方法一中的超支化聚缩水甘油醚由三羟甲基丙烷和缩水甘油聚合而成;所述方法二中的连有缩水甘油醚的胶乳微球由苯乙烯、甲基丙烯酸和缩水甘油醚共聚而成;所述的去质子化采用 $\text{CH}_3\text{OK}$ 完成;方法一、方法二中所述的经修饰后的修饰为琥珀酰亚胺基碳酸酯、氯甲酸酯、卤代烃提高超支化聚缩水甘油醚端基活性的修饰。

4. 根据权利要求1所述的超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法,其特征在于检测的待测物质为抗原、抗体、半抗体、半抗原;探测分子为能够与待测物质特异性结合的抗体、抗原、半抗原、半抗体。

5. 一种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊的检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂,其特征在于所述R1试剂包含缓冲液、防腐剂、表面活性剂、稳定剂和反应增强剂,R2试剂包含超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子胶乳试剂。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于所述缓冲液选自甘氨酸~NaOH缓冲液、甘氨酸~Tris缓冲液、Tris~HCl缓冲液、PB缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种;所述的防腐剂选自叠氮钠、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸、P300,浓度为0.1%~1%;所述的表面活性剂选自吐温、脂肪醇聚乙二醇醚类、聚氧乙烯苯基醚或其组合,浓度为0.01%~1%;所述的稳定剂选自酪蛋白、壳聚糖、牛血清蛋白或其组合,浓度为0.1%~5%;所述反应增强剂选自PEG~300、PEG~2000或PEG~6000中的一种或几种,浓度为0.1%~2%。

7. 根据权利要求5或6所述的试剂盒,其特征在于所述超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子胶乳试剂的制备包括以下步骤:

方法一:

1)超支化聚缩水甘油醚的制备:以三羟甲基丙烷(TMP)作为反应的引发剂,采用甲醇钾( $\text{CH}_3\text{OK}$ )对TMP的羟基去质子化,然后将缩水甘油缓慢滴加进入体系引发聚合,得超支化聚

缩水甘油醚；

2)超支化聚缩水甘油醚的修饰:将超支化聚缩水甘油醚在二甲基二酰胺(DMF)溶液中使用琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)进行修饰得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚；

3)超支化聚缩水甘油醚对胶乳微球的修饰:向胶乳微球溶液中滴加上一步制备的DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚溶液,向反应体系中加入PBS溶液继续反应,水解多余的NHS酯后,用PBS溶液清洗,离心法清洗分离胶乳微球,清洗结束后,用PBS溶液重悬,得预留大量羧基的胶乳微球；

4)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球偶联探测分子:对上一步制备的超支化聚缩水甘油醚修饰的胶乳微球的羧基进行活化,活化结束后使用PBS溶液清洗,将探测分子用碳酸氢钠缓冲液稀释后,加入到胶乳微球溶液中,摇床上反应,反应结束后使用PBS溶液清洗悬浮胶乳微球,制得超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物胶乳试剂；

方法二：

1)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的制备:甲基丙烯酸、苯乙烯和缩水甘油醚共聚形成表面连接缩水甘油醚的微球,用 $\text{CH}_3\text{OK}$ 对微球上缩水甘油醚羟基进行去质子化,后再加入缩水甘油醚,其与去质子化的缩水甘油醚反应,连接在微球表面的缩水甘油醚上,得超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球；

2)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚在二甲基二酰胺(DMF)溶液中使用琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)进行修饰得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚,经DSC修饰后的超支化聚缩水甘油醚胶乳微球表面有许多琥珀酰亚胺酯(NHS酯),再用缓冲液水解后清洗分离,得到预留大量羧基的超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球；

3)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球偶联探测分子:对上一步制备的超支化聚缩水甘油醚修饰的胶乳微球的羧基进行活化,活化结束后使用PBS溶液清洗,将探测分子用碳酸氢钠缓冲液稀释后,加入到胶乳微球溶液中,摇床上反应,反应结束后使用PBS溶液清洗悬浮胶乳微球,制得超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物胶乳试剂。

## 超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测试剂领域,涉及超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法及其应用。

### 背景技术

[0002] 免疫比浊法(Immunoturbidimetric Assays)是抗原抗体结合动态测定方法。其基本原理是:当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适(一般规定抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中的促聚剂(聚乙二醇等)的作用下,自液相析出,形成微粒,使反应液出现浊度。当抗体浓度固定时,形成的免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照,即可计算出检样中抗原的含量。

[0003] 一般免疫比浊可分为以下几类:

[0004] 免疫透射比浊法:抗原抗体结合后,形成免疫复合物,在一定时间内复合物聚合出现浊度。当光线通过溶液时,可被免疫复合物吸收。免疫复合物量越多,光线吸收越多。光线被吸收的量在一定范围内与免疫复合物的量成正比。利用比浊计测定光密度值,复合物的含量与光密度值成正比,同样当抗体量一定时,光密度值也与抗原含量成正比。本法较单向琼脂扩散试验和火箭电泳等一般免疫化学定量方法敏感、快速简便,但要求免疫复合物的数量和分子量达到一定高度,否则就难以测出。

[0005] 免疫散射比浊法:一定波长的光沿水平轴照射,通过溶液使遇到抗原抗体复合物粒子,光线被粒子颗粒折射,发生偏转,光线偏转的角度与发射光的波长和抗原抗体复合物颗粒大小和多少密切相关。散射光的强度与复合物的含量成正比,即待测抗原越多,形成的复合物也越多,散射光也越强。散射光的强度还与各种物理因素,如加入抗原或抗体的时间、光源的强弱和波长、测量角度等密切相关。散射比浊法又分为速率散射比浊法和终点散射比浊法。

[0006] 免疫胶乳比浊法:胶乳比浊法即是待测物质相对应的抗体包被在胶乳颗粒上,使抗原抗体结合物的体积增大,光通过之后,透射光和散射光的强度变化更为显著,从而提高试验的敏感性。

[0007] 胶乳颗粒增强比浊法(particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA)是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测方法。PETIA法大体分为两种。一种是散射比浊检测法;另一种是透射比浊检测法。这两种方法的基本原理非常相似,都是在高分子胶乳微球的表面交联单克隆抗体,当交联有抗体的微球与抗原结合后,在短时间内会迅速聚集在一起,改变了反应液的散光性能或透光性能。而且,反应液散光性能或透光性能(即吸光度)的改变与被测抗原的浓度有较强的相关性,在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。PETIA检测方法是在均相反应体系中进行抗原、抗体反应及结果的测定。抗原、抗体反应后,直接测定反应液的吸光度值,省却了ELISA法反复孵育和洗板等烦琐操作步骤,几分钟就能获得结果,省时省力。此外,免疫比浊法操作步骤的简化也相应地避免

了许多人为操作因素和试剂、环境等外界因素的干扰,稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被测物质的含量。免疫比浊法的灵敏度虽然比ELISA法差一些,但足以检测到健康人血浆中许多标志蛋白的下限值,可完全满足临床检测要求。

[0008] 目前,PETIA检测试剂所采用的胶乳颗粒多为惰性微球、羧基化微球及氨基化微球。表面修饰的胶乳粒子与抗体的结合是通过其表面的羧基或氨基与抗体的氨基端共价结合,在微球与抗体之间有一个桥联化学臂,降低了位阻效应,不仅提高了抗体的结合率,而且还为抗体提供合适的三维空间立体结构,有效地保护了抗体与抗原结合的活性区域。检测的灵敏度得到了极大的改善,检测灵敏度最高可达到1.0ng/ml。可以作为多克隆抗体和单克隆抗体的载体。中国专利CN102645537公开了一种用于诊断胃病或胃癌的胶乳增强免疫比浊试剂盒,包括稀释液、含有胃蛋白酶I或胃蛋白酶II的抗体的胶乳试剂和空白液,其中所述的胶乳试剂含有偶联了胃蛋白酶I或胃蛋白酶II的抗体的不同粒径的聚苯乙烯纳米微球;专利CN103777023公开了一种纳米胶增强免疫比浊法测定脂联素的试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和脂联素抗原校准品溶液,其中R1试剂包括电解质、稳定剂、表面活性剂、防腐剂和缓冲液;R2试剂包括偶联抗体的胶乳颗粒、电解质、稳定剂、表面活性剂、防腐剂和缓冲液;所述胶乳颗粒为苯乙烯和丙烯酸聚合而成的共聚物。上述两种胶乳增强免疫比浊法都具有灵敏度高、特异性强、准确性和稳定性高的特点。

[0009] 但是随着现代医学诊断手段的发展,对于疾病的早期预防和控制要求越来越细致,疾病的早期诊断以及分期成为越来越受人重视的研究方向,小微型的待测样本的测定成为一种新趋势,在这种情况下,有时候上述传统胶乳增强免疫比浊法所用的材料往往达不到所需要的检测下限和检测下限,运用新的材料成为一种必然趋势。

[0010] 聚乙二醇(PEG)是在生物医药方向中使用非常广泛的一个亲水性物质,其生物相容性以及非免疫源性的特征使得它在很多领域作为改性材料使用,例如抗体、蛋白、核苷酸、脂质体的修饰,聚合物和聚合物微球的表面改性等。在免疫分析中,纳米粒子表面的PEG可以有效的降低非特异性吸附,减少本底值,提高反应的灵敏度,降低假阳性和假阴性结果。但是线性的PEG聚合物由于其结构中只在聚合物端基部分有官能团,因此整个聚合物结构中只有一个或者两个活性位点可供于偶联,结合能力较弱,偶联效率不高,这点限制了其更广泛的应用。

[0011] 与线性聚合物不同,超支化聚合物(支化程度至少大于等于2)在结构分支处包含较多的官能团。超支化聚合一般有很好的溶解性,溶解后粘度较低和流动性也较好,使用上简单方便。再者,超支化聚合物合成方法也比较简单,主要分成三种:第一,利用多官能团的单体缩聚制备;第二,在已经制备好的聚合物前驱体中进行接枝修饰,第三,利用环氧的开环反应来制备超支化的结构。

[0012] 超支化聚缩水甘油醚是一种特殊的超支化聚合物,有着类似聚乙二醇的主链结构,在支链结构上富含羟基,这部分羟基一方面为化学偶联提供了大量结合位点,另一方面又给聚合物带来了良好的亲水性能。这些结构特点使超支化聚缩水甘油醚具有大量的末端官能团,拥有良好的生物相容性、高溶解性和高流变性。专利CN101774628公开了一种水溶性金属硫化物半导体纳米粒子的制备方法,专利CN101774630公开了一种水溶性卤化银纳米粒子的制备方法,都说明了超支化聚缩水甘油醚具有良好的亲水效果,具有大量的末端官能团。

[0013] 所以利用超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球应用于免疫比浊分析上,由于其大量的末端官能团效应,可以大大加强免疫分析中抗原抗体结合效率和形成聚合物出现浊度,能够极大的增强分析的灵敏度。目前,还没有相关超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球在增强免疫比浊上的报道。

## 发明内容

[0014] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供一种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法。

[0015] 本发明的另一目的是提供一种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊试剂盒。

[0016] 本发明的目的可通过如下技术方案实现:

[0017] 一种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法,其特征在于包括以下方法:

[0018] 方法一:超支化聚缩水甘油醚经修饰后包被在胶乳微球表面形成超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球,对超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的端基进行活化后偶联能与待测分子特异性结合的探测分子,形成了超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物,将超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物和待测样本混合,待反应后,形成了超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物~待测分子复合物,用生化检测仪检测检测反应溶液指标,再回算得出待测样本中的目标分析物的浓度;

[0019] 方法二:连有缩水甘油醚的胶乳微球去质子化后缓慢滴加缩水甘油醚,制得超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球,经修饰后再在其端基上偶联能与待测分子特异性结合的探测分子,形成了超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物,将超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子复合物和待测样本混合,待反应后,形成了超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物~待测分子复合物,用生化检测仪检测检测反应溶液指标,再回算得出待测样本中的目标分析物的浓度。

[0020] 所述的胶乳微球大小为50nm~400nm。

[0021] 所述方法一中的超支化聚缩水甘油醚由三羟甲基丙烷和缩水甘油聚合而成;所述方法二中的连有缩水甘油醚的胶乳微球由苯乙烯、甲基丙烯酸和缩水甘油醚共聚等方法合成;所述的去质子化采用 $\text{CH}_3\text{OK}$ 完成;所述方法一、方法二中的修饰为琥珀酰亚胺基碳酸酯、氯甲酸酯、卤代烃等提高超支化聚缩水甘油醚端基活性的修饰。

[0022] 所述的待测物质为抗原、抗体、半抗体、半抗原、小分子化学物质等;探测分子为能够与待测物质特异性结合的抗体、抗原、半抗原、半抗体或小分子等。

[0023] 一种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊的应用,包括一种免疫比浊检测试剂盒,其特征在于包括R1试剂、R2试剂,所述R1试剂包含缓冲液、防腐剂、表面活性剂、稳定剂和反应增强剂,R2试剂包含超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子胶乳试剂。

[0024] 所述的缓冲液选自甘氨酸~NaOH缓冲液、甘氨酸~Tris缓冲液、Tris~HCl缓冲液、PB缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种;所述的防腐剂选自叠氮钠、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸、P300等,浓度为0.1%~1%;所述的表面活性剂选自吐温、脂肪

醇聚乙二醇醚类、聚氧乙烯苯基醚或其组合,浓度为0.01%~1%;所述的稳定剂选自酪蛋白、壳聚糖、牛血清蛋白等或其组合,浓度为0.1%~5%;所述反应增强剂选自PEG~300、PEG~2000或PEG~6000中的一种或几种,浓度为0.1%~2%。

[0025] 优选的缓冲液为200mM PB缓冲液,防腐剂为0.02%P300,表面活性剂为0.01%吐温,稳定剂为3.6%牛血清蛋白,反应增强剂为1%PEG~6000。

[0026] 所述的超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球~探测分子胶乳试剂的制备包括以下步骤:

[0027] 方法一:

[0028] 1)超支化聚缩水甘油醚的制备:以三羟甲基丙烷(TMP)作为反应的引发剂,采用甲醇钾(CH<sub>3</sub>OK)对TMP的羟基去质子化,然后将缩水甘油缓慢滴加进入体系引发聚合,得超支化聚缩水甘油醚;

[0029] 2)超支化聚缩水甘油醚的修饰:将超支化聚缩水甘油醚在二甲基二酰胺(DMF)溶液中用琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)进行修饰得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚;

[0030] 3)超支化聚缩水甘油醚对胶乳微球的修饰:向胶乳微球溶液中滴加上一步制备的DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚溶液,向反应体系中加入PBS溶液继续反应,水解多余的NHS酯后,用PBS溶液清洗,离心法清洗分离胶乳微球,清洗结束后,用PBS溶液重悬,得预留大量羧基的胶乳微球;

[0031] 4)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球偶联探测分子:对上一步制备的超支化聚缩水甘油醚修饰的胶乳微球的羧基进行活化,活化结束后使用PBS溶液清洗,将探测分子用碳酸氢钠缓冲液稀释后,加入到胶乳微球溶液中,摇床上反应,反应结束后使用PBS溶液清洗悬浮胶乳微球,制得超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物胶乳试剂;

[0032] 方法二:

[0033] 1)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的制备:甲基丙烯酸、苯乙烯和缩水甘油醚共聚形成表面连接缩水甘油醚的微球,用CH<sub>3</sub>OK对微球上缩水甘油醚羟基进行去质子化,后再加入缩水甘油醚,其与去质子化的缩水甘油醚反应,连接在微球表面的缩水甘油醚上,重复上述步骤,得超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球;

[0034] 2)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚在二甲基二酰胺(DMF)溶液中用琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)进行修饰得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚,经DSC修饰后的超支化聚缩水甘油醚胶乳微球表面有许多琥珀酰亚胺酯(NHS酯),再用缓冲液水解后清洗分离,得到预留大量羧基的超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球;

[0035] 3)超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球偶联探测分子:对上一步制备的超支化聚缩水甘油醚修饰的胶乳微球的羧基进行活化,活化结束后使用PBS溶液清洗,将探测分子用碳酸氢钠缓冲液稀释后,加入到胶乳微球溶液中,摇床上反应,反应结束后使用PBS溶液清洗悬浮胶乳微球,制得超支化聚缩水甘油醚胶乳微球~探测分子复合物胶乳试剂。

[0036] 一种制备上述试剂盒的方法,优选包括以下步骤:

[0037] 1)R1试剂:R1试剂包含:200mM PB缓冲液,0.02%P300防腐剂,0.01%吐温表面活性剂,3.6%牛血清蛋白稳定剂,1%PEG~6000反应增强剂;

[0038] 2)R2试剂的制备

[0039] 方法一:

[0040] 超支化聚缩水甘油醚的制备:在配有机械搅拌和微量恒流泵的三口烧瓶中,加入0.24g三羟甲基丙烷(TMP),作为反应的引发剂,采用3.7M  $\text{CH}_3\text{OK}$ (溶解于甲醇中)对TMP的羟基进行部分去质子化,去质子化部分占总部分的10%,多余甲醇通过加热蒸发除去。然后50mL的缩水甘油缓慢滴加进入体系引发聚合,注意缩水甘油的滴加速度,滴加过快可能会引起爆聚。反应温度95°C,反应12小时,反应结束后产物溶解在甲醇中,通过强酸性阳离子交换树脂(AMBERJET™1500H Resin)中和;聚合物通过在丙酮中析出,甲醇中溶解,重复两次进行提纯,最后在75~85°C的真空中干燥13~16小时,得超支化聚缩水甘油醚;

[0041] 超支化聚缩水甘油醚的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,配制成10mg/mL的溶液,取1mL,加入20mg琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)于常温下进行反应,得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚(DSC~HPG);

[0042] 超支化聚缩水甘油醚对胶乳微球的修饰:取5mg胶乳微球,根据固含量25mg/ml进行换算,去除上清液保留固体物质。之后向胶乳微球溶液中滴加500 $\mu\text{L}$ 的DSC~HPG溶液,于摇床中反应30min。反应结束后,向反应体系中加入1mL 50mM PBS溶液继续反应30min,将多余的NHS酯水解后,离心法清洗分离胶乳微球,使用50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗三次,清洗结束后,使用1mL 50mM PBS溶液(pH=7.5)重悬;

[0043] 超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球偶联探测分子:对微球的羧基进行活化,活化结束后使用500 $\mu\text{L}$  50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗胶乳微球。将探测分子用100mM碳酸氢钠缓冲液(pH=8.0)稀释到1mg/mL后,加入到胶乳微球溶液中,置于220rpm 37°C摇床上反应3h。反应结束后使用400 $\mu\text{L}$  50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗悬浮胶乳微球,清洗三次,制得超支化聚缩水甘油醚胶乳微球探测分子复合物;

[0044] 方法二:

[0045] 超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的制备:取3ml甲基丙烯酸、3ml苯乙烯和3ml缩水甘油醚在85°C条件下进行8h共聚反应,反应结束后形成表面连接缩水甘油醚的微球,在升温至95°C用 $\text{CH}_3\text{OK}$ 对微球上缩水甘油醚羟基进行去质子化,后以0.1ml/min加入缩水甘油醚,缩水甘油醚与微球表面缩水甘油醚聚合反应形成超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球;

[0046] 超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚在二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,配制成10mg/mL的溶液,取1mL,加入20mg琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)于常温下进行反应,得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚(DSC~HPG);

[0047] 取500 $\mu\text{L}$ 经DSC修饰后的超支化聚缩水甘油醚胶乳微球,微球表面有许多琥珀酰亚胺酯(NHS酯),在胶乳微球中加入1mL 50mM PBS(pH=7.5)溶液反应30min,将多余的NHS酯水解,离心法清洗分离反应液,使用50mM PBS溶液清洗,清洗后再用1ml 50mM PBS(pH=7.5)对溶液重悬;

[0048] 超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球偶联探测分子:对微球的羧基进行活化,活化结束后使用500 $\mu\text{L}$  50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗胶乳微球。将探测分子用100mM碳酸氢钠缓冲液(pH=8.0)稀释到1mg/mL后,加入到胶乳微球溶液中,置于220rpm 37°C摇床上反应3h。反应结束后使用400 $\mu\text{L}$  50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗悬浮胶乳微球,清洗三次,制得超支化聚缩水甘油醚胶乳微球探测分子复合物;

[0049] 有益效果

[0050] 本发明专利在胶乳免疫比浊法中引入超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球,利用超

支化聚缩水甘油醚的高度亲水性和支化高官能团密度的特点,可同时提高胶乳微球试剂在检测下限和检测上限的表现。具体来说,超支化聚缩水甘油醚亲水性强,可以大大地降低在检测过程中因疏水作用而导致的非目标蛋白的非特异性吸附,能够较大程度的降低本底并减少噪声,从而能够优化试剂的最低检测限;支化高官能团密度的特点使得修饰了该分子的胶乳微球在包被抗体时,能够提高包被量,从而拓宽检测范围。另外超支化聚缩水甘油醚的亲水性使得偶联在上面的抗体能够更好地保持其构象,从而提高了结合抗原的能力。

[0051] 本发明专利利用超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球,制备获得表面亲水并富含官能团的纳米微球材料。在实际使用这种基于这种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的免疫比浊试剂时,在项目的性能分析中发现基于此种胶乳微球的试剂可以大大增强抗原抗体之间的反应,与商品化胶乳微球试剂做对比时发现,灵敏度、检测上限、检测范围都有明显的提高。对于试剂的线性相关性、重复性、稳定性等其它性能时,分析发现均可以达到国标或者行标的要求,试剂性能优越。

[0052] 本试剂的发明可以很好解决目前试剂中普遍存在的非特异性吸附的问题,对于一些线性要求很宽,灵敏度要求很高的项目,使用本试剂亦可以取得很好的效果,因此该试剂具有更高的临床检验应用价值。

## 附图说明

[0053] 图1本发明技术路线示意图

[0054] 图2本发明试验组和对照组检测限范围图

[0055] 图3聚苯乙烯胶乳微球CRP检测试剂检测线性图

[0056] 图4超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的CRP检测试剂检测线性图

[0057] 图5超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球的CRP检测试剂稳定性图

## 具体实施方式

[0058] 实施例1超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球~探测分子诊断试剂的制备方法

[0059] 一、超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯微球制备:

[0060] 方法一:

[0061] 超支化聚缩水甘油醚的制备:在配有机械搅拌和微量恒流泵的三口烧瓶中,加入0.24g三羟甲基丙烷(TMP),作为反应的引发剂,采用3.7M  $\text{CH}_3\text{OK}$ (溶解于甲醇中)对TMP的羟基进行部分去质子化,去质子化部分占总部分的10%,多余甲醇通过加热蒸发除去。然后50mL的缩水甘油缓慢滴加进入体系引发聚合,注意缩水甘油的滴加速度,滴加过快可能会引起爆聚。反应温度95°C,反应12小时,反应结束后产物溶解在甲醇中,通过强酸型阳离子交换树脂(AMBERJET™1500H Resin)中和;聚合物通过在丙酮中析出,甲醇中溶解,重复两次进行提纯,最后在75~85°C的真空中干燥13~16小时,得超支化聚缩水甘油醚。

[0062] 超支化聚缩水甘油醚的修饰:将超支化聚缩水甘油醚溶解于二甲基甲酰胺(DMF)中,配制成10mg/mL的溶液,取1mL,加入20mg琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)于常温下进行反应,得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚(DSC~HPG)。

[0063] 超支化聚缩水甘油醚对聚苯乙烯胶乳微球的修饰:分别取大小为50nm、60nm、

100nm、150nm、200nm、300nm、400nm、450nm粒径的5mg聚苯乙烯微球,根据固含量25mg/ml进行换算,去除上清液保留固体物质。之后向聚苯乙烯微球溶液中滴加500 $\mu$ L的DSC~HPG溶液,于摇床中反应30min。反应结束后,向反应体系中加入1mL 50mM PBS溶液继续反应30min,将多余的NHS酯水解后,使用50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗三次,清洗过程中使用离心清洗分离微球,清洗结束后,使用1mL 50mM PBS溶液(pH=7.5)重悬,得含有大量羧基的超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯胶乳微球,微球粒径为50nm~400nm。

[0064] 方法二:

[0065] 超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的制备:取3ml甲基丙烯酸、3ml苯乙烯和3ml缩水甘油醚在85 $^{\circ}$ C条件下进行8h共聚反应,反应结束后形成表面连接缩水甘油醚的微球,在升温至95 $^{\circ}$ C用CH<sub>3</sub>OK对微球上缩水甘油醚羟基进行去质子化,后以0.1ml/min加入缩水甘油醚,缩水甘油醚与微球表面缩水甘油醚聚合反应形成超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球。

[0066] 超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的修饰:将超支化聚缩水甘油醚在二甲基二酰胺(DMF)溶液中,配制成10mg/mL的溶液,取1mL,加入20mg琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)于常温下进行反应,得DSC修饰的超支化聚缩水甘油醚(DSC~HPG);

[0067] 取500 $\mu$ L经DSC修饰后的超支化聚缩水甘油醚胶乳微球,微球表面有许多琥珀酰亚胺酯(NHS酯),在胶乳微球中加入1mL 50mM PBS(pH=7.5)溶液反应30min,将多余的NHS酯水解,离心法清洗分离反应液,使用50mM PBS溶液清洗,清洗后再用1ml 50mM PBS(pH=7.5)对溶液重悬;

[0068] 二、超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球偶联CRP抗体

[0069] 对超支化聚缩水甘油醚修饰的聚苯乙烯微球的羧基进行活化,通常方法为加入EDC,其摩尔含量为羧基摩尔含量的1~10倍,混合均匀后震荡反应30分钟,活化结束后离心使用500 $\mu$ L 50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗聚苯乙烯微球。将CRP抗体(生产厂家Roche货号30293857)用100mM碳酸氢钠缓冲液(pH=8.0)稀释到1mg/mL后,加入到微球溶液中,置于220rpm 37 $^{\circ}$ C摇床上反应3h。反应结束后使用400 $\mu$ L 50mM PBS溶液(pH=7.5)清洗悬浮微球,清洗三次,制得超支化聚缩水甘油醚聚苯乙烯胶乳微球~CRP抗体复合物。

[0070] 实施例2中作为对照试剂的商品化羧基聚苯乙烯胶乳微球(南京基蛋生物医药,货号PM023)与CRP抗体的偶联方法同上,仅使用商品化羧基聚苯乙烯微球替代超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯微球。

[0071] 实施例2超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球增强免疫比浊法和聚苯乙烯胶乳微球增强免疫比浊法比较

[0072] 将超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球~CRP抗体复合物30 $\mu$ L,加入到100 $\mu$ L待分析样本中,反应15分钟,由于特异性的免疫反应形成超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球~CRP抗体~CRP抗原的免疫复合物,用生化仪(日立7020生化仪)检测检测反应溶液的吸光度,聚苯乙烯胶乳微球~CRP抗体复合物和待测物反应测定方法和上述超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球~CRP抗体复合物相同。

[0073] 检测限的评估

[0074] 取CRP蛋白,用生理盐水稀释到0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1、5、10、20、40、60、80、100、120、140、160、180、200、220、240、260mg/L20个浓度水平,使用本发明建立的检测试剂盒对照试剂对每个浓度水平重复测试3次,所得吸光度至如表1所示,以浓度为X轴,吸光度

为Y轴,分别对检测试剂和对照试剂所得结果如图2所示。

[0075] 表1对比组和试验组检测限评估

[0076]

浓度(mg/L)	对比吸光度	试验吸光度
0.01	0	0.509
0.05	0	4.260
0.1	3.389	5.652
0.2	10.396	7.523
0.5	15.775	23.006
1	40.300	29.685
5	135.044	144.358
10	289.805	312.645
20	389.995	486.458
40	1251.005	1280.365
60	1296.940	1562.135
80	1756.873	2252.987
100	2665.103	2490.578
120	2805.007	3202.650
140	3693.860	3580.698
160	4290.015	4300.250
180	4310.915	4465.287
200	4191.650	5000.624
220	4230.650	5765.009
240	4265.012	6020.575
260	4212.325	5300.000

[0077] 结合表1和图2所示,对于对照组来说,当检测浓度低于0.1mg/L时,反应完成以后生化检测仪检测不到反应液吸光度变化,当检测浓度高于180mg/L时,反应液中抗原量过多,影响了反应进行,吸光度反而下降,由图1可知在浓度为0.1mg/L~180mg/L检测浓度范围内时,对照组聚苯乙烯胶乳微球具有较好的线性关系,同样的,由图2可知,当检测浓度范围为0.1mg/L~240mg/L时,本发明所述的超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球具有较好的线性关系。由此可见,本发明相比对照组具有更好的检测下限和上限。

[0078] 标本检测相关性评估

[0079] 由图3、图4所示分别是本发明和对照试验中浓度、吸光度线性图形和相关性公式,由图可知,本发明相关性公式为 $y = 25.41x + 43.10$ ,相关系数 $r = 0.998$ ,对照组相关性公式为 $y = 25.12x - 5.267$ ,相关系数 $r = 0.994$ 。可见本发明所述超支化聚缩水甘油醚修饰聚苯乙烯胶乳微球相关性也比传统聚苯乙烯胶乳微球好。

[0080] 重复性测试

[0081] 采用本发明所建CRP检测系统分别对质控血清1(10mg/L)和质控血清2(200mg/L)进行重复性测定,每个质控血清重复测定20次,考察本发明所建系统的重复性。结果显示

(见表2),检测系统在10mg/L质控点和200mg/L质控点测量的变异系数分别为2.12%和0.216%。表明本发明所建系统检测精密度高,重复性好,能满足临床的使用要求。

[0082] 表2重复性评估

[0083]

浓度(mg/L)	吸光度	浓度(mg/L)	吸光度
10	312.645	200	5001.064
10	300.245	200	4980.235
10	315.120	200	5020.455
10	306.699	200	5006.156
10	315.566	200	4991.486
10	319.146	200	4995.158
10	323.456	200	4986.174
10	321.126	200	5015.749
10	301.156	200	5002.544
10	312.155	200	5004.793
10	310.575	200	5012.934
10	320.155	200	5016.489
10	323.458	200	4987.346
10	308.156	200	5008.315
10	309.105	200	5015.346
10	321.681	200	5008.135
10	315.978	200	5010.482
10	316.359	200	5003.147
10	309.854	200	4995.140
10	318.463	200	5004.684
平均值	314.055	平均值	5003.292
标准偏差	6.655	标准偏差	10.797
CV	2.120%	CV	0.216%

[0084] 稳定性评估

[0085] CRP测定试剂后,置于37℃恒温培养箱,每隔1d考察浓度分别为5mg/L和200mg/L的低高两个浓度的参考血清,每个样本重复测定3次,共计7天,计算每天检测结果的均值。结果如图5所示,本发明所建CRP检测试剂于37℃保存7天后,检测结果同第一天检测结果稍有降低,但最大相对偏差不高于15%,表明试剂稳定性好,可以进行长期保存。

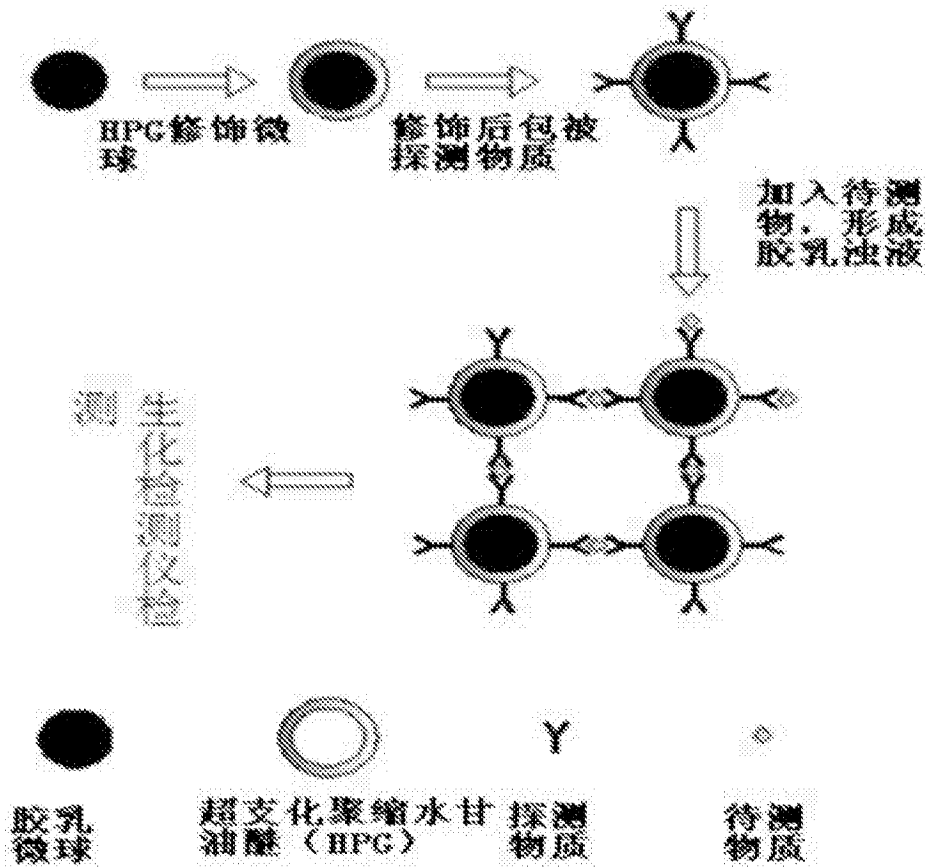


图1

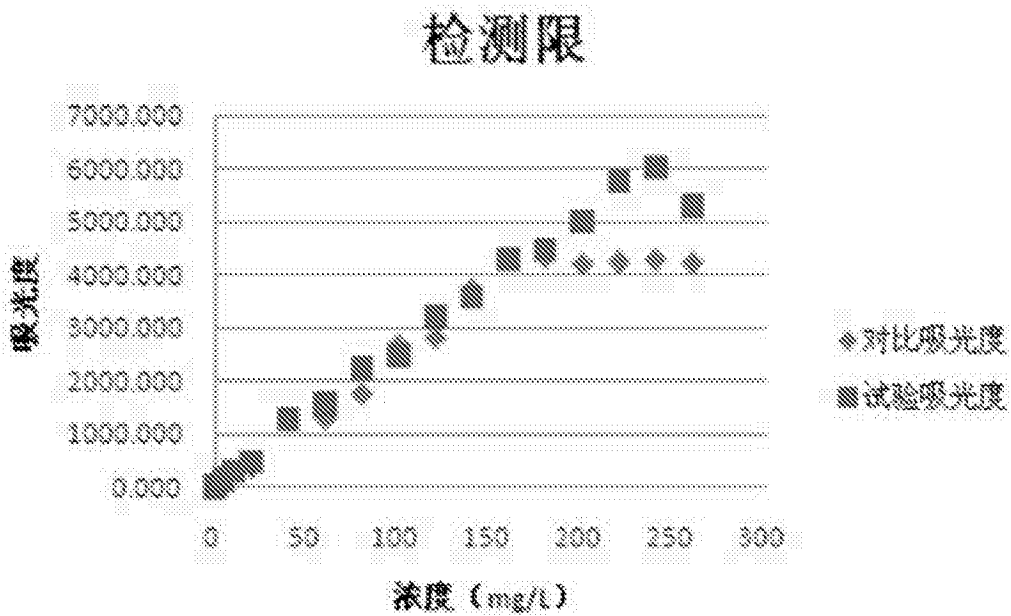


图2

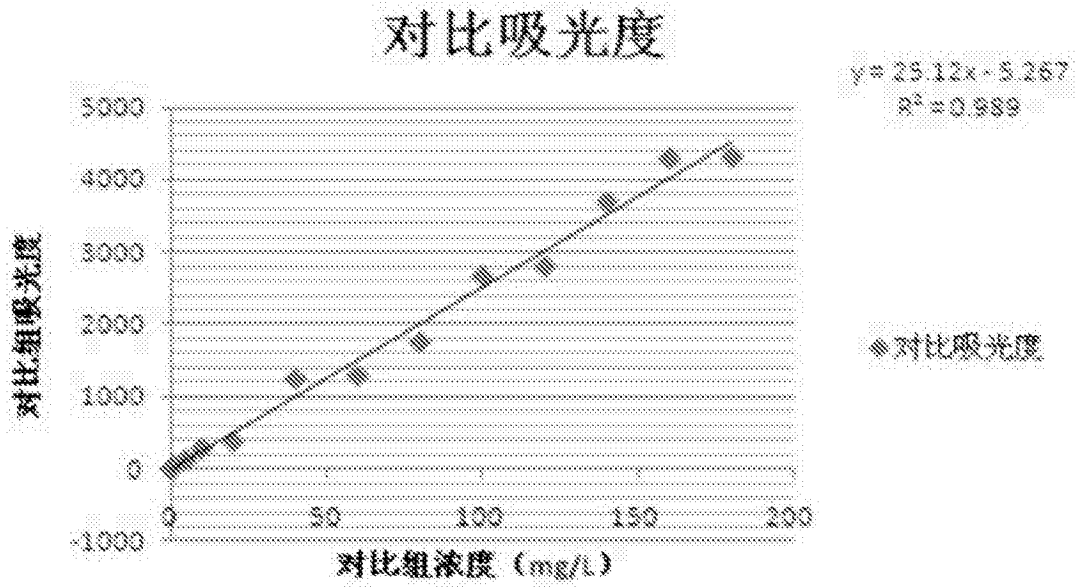


图3

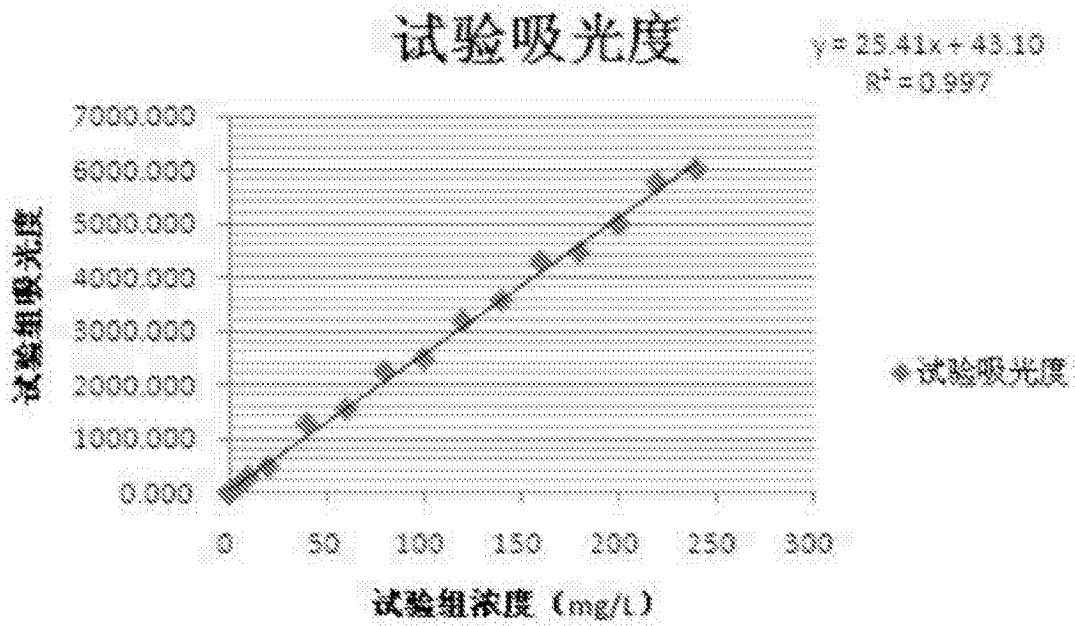


图4

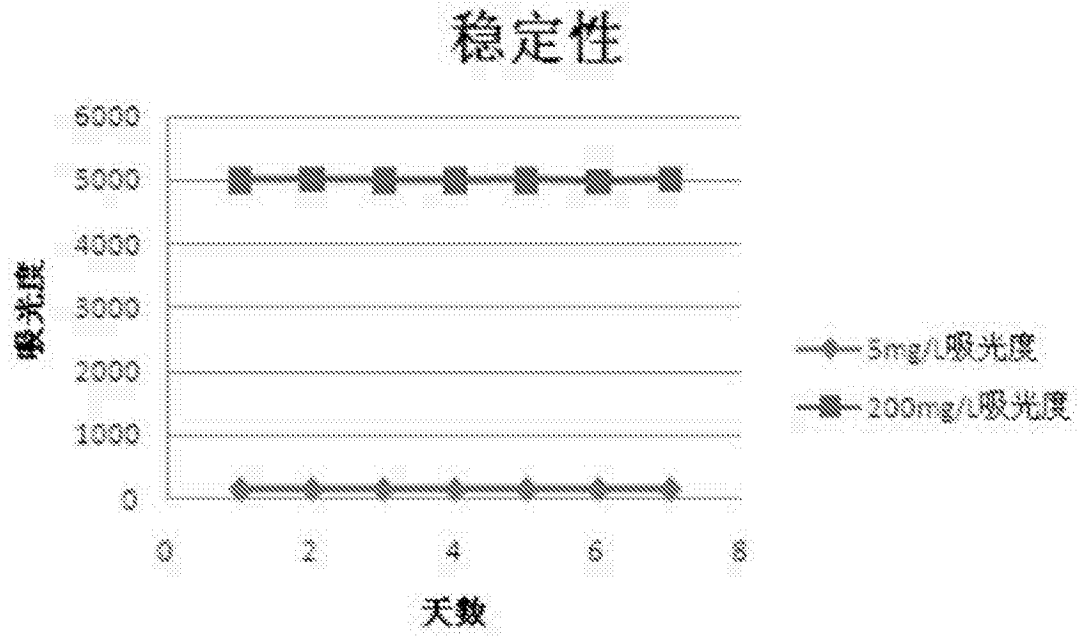


图5

专利名称(译)	超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104535761B</a>	公开(公告)日	2016-04-27
申请号	CN201410794537.X	申请日	2014-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
[标]发明人	金晶 罗雅赛 朱宗哲 董鏊 苏恩本		
发明人	金晶 罗雅赛 朱宗哲 董鏊 苏恩本		
IPC分类号	G01N33/546 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/54393		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN104535761A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球增强免疫比浊法及其应用。本发明专利利用超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球，制备获得表面亲水并富含官能团的胶乳微球材料。在实际使用这种超支化聚缩水甘油醚修饰胶乳微球的免疫比浊试剂时，发现试剂能够很好的抑制蛋白的非特异性吸附，抗体偶联量也较商品化的一般胶乳微球高。在项目性能分析中发现基于此种胶乳微球试剂可以大大增强抗原抗体之间的反应，与商品化一般胶乳微球试剂做对比时发现，灵敏度、检测范围都有明显的提高，具有优秀的相关性、稳定性和重复性表现。

