



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104049079 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 18

(21) 申请号 201310082103. 2

审查员 李倩

(22) 申请日 2013. 03. 14

(73) 专利权人 苏州德沃生物技术有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号生物纳米园 C7 楼 301 单元

(72) 发明人 王滨 赵年福 吴一凡 杜薇薇

(74) 专利代理机构 苏州华博知识产权代理有限公司 32232

代理人 黄珩

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004014073 A1, 2004. 01. 22,

US 2004014073 A1, 2004. 01. 22,

CN 101819202 A, 2010. 09. 01,

CN 1807457 A, 2006. 07. 26,

CN 102731657 A, 2012. 10. 17,

CN 102230935 A, 2011. 11. 02,

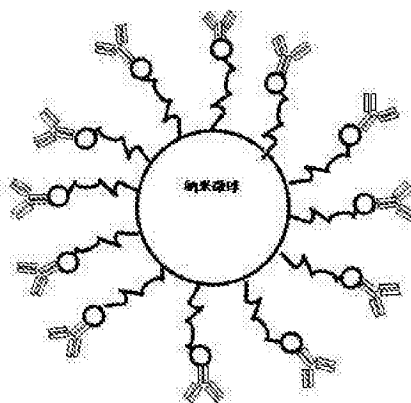
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法,所述方法包括以下步骤:对纳米颗粒进行改性和定向自标记免疫纳米微球的制备。本发明制备的定向自标记免疫纳米微球能够与抗体Fc区高特异性结合,使与纳米微球结合的抗体暴露出可结合抗原的Fab区域,从而提高免疫微球的生物活性,提高检测的灵敏度。



1. 一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:步骤一、对纳米颗粒进行改性,并且改性后成为ZZ-多肽纳米颗粒:1) 每10-20mg纳米颗粒,直径50-1000nm,加EDC 10-200mg,纳米颗粒和EDC的质量比为1:1-1:10,在pH4-6的50mmol/L MES缓冲液中活化10-500分钟;2) 加入ZZ-多肽0.1-10.0mg,纳米颗粒与蛋白的质量比为1:0.05-1:20,室温放置0.1-2.0小时;3) 加入牛血清白蛋白,使牛血清白蛋白终浓度为0.1-10%,室温反应1小时,封闭纳米颗粒上多余的空位;4)离心去除上清,用等体积磷酸盐缓冲液重悬;

步骤二、定向自标记免疫纳米微球的制备:1) 把步骤一所得的改性纳米颗粒用磷酸盐缓冲液稀释到0.1-2%的浓度;2) 向上述纳米颗粒中加入特异性的抗体,使抗体终浓度为0.1-5.0mg/ml,室温反应1-2小时;3) 加入与ZZ-多肽反应的IgG或其它衍生物,室温1小时封闭掉多余的ZZ-多肽的结合位点和非特异性结合位点;4)离心洗涤上述纳米颗粒即可得到相应的特异性定向自标记免疫纳米微球。

2. 如权利要求1所述的定向自标记免疫纳米微球的制备方法,其特征在于,所述纳米颗粒表面具有活性基团氨基、羧基、巯基、羟基、醛基中的一种。

3. 如权利要求1或2所述定向自标记免疫纳米微球的制备方法制备的定向自标记免疫纳米微球的应用,其特征在于,所述定向自标记免疫纳米微球应用在胶乳增强免疫比浊测定中。

4. 如权利要求3所述的定向自标记免疫纳米微球的制备方法制备的定向自标记免疫纳米微球的应用,其特征在于,应用内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒。

5. 如权利要求4所述的定向自标记免疫纳米微球的制备方法制备的定向自标记免疫纳米微球的应用,其特征在于,所述试剂盒为用于对D-二聚体进行比浊定量检测的D-二聚体比浊定量检测试剂盒,所述D-二聚体比浊定量检测试剂盒包括R1试剂和R2试剂;其中R1试剂配方为50 mmol/L Tris, 用盐酸调节pH到8.0,再加入0.85%氯化钠、2% PEG8000、0.1%叠氮钠;所述R2试剂配方为将所述定向自标记免疫纳米颗粒用50mmol/L Tris-Hcl, pH 8.0, 2% BSA, 0.1% 叠氮钠, 1% NaCl缓冲液稀释到0.1%。

6. 如权利要求4所述的定向自标记免疫纳米微球的制备方法制备的定向自标记免疫纳米微球的应用,其特征在于,内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒适用340nm-700nm波长的检测。

7. 如权利要求5所述的定向自标记免疫纳米微球的制备方法制备的定向自标记免疫纳米微球的应用,其特征在于,内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒适用于透射仪和散射比浊仪。

一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米生物技术领域,特别是涉及一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 胶乳增强免疫比浊法(particle-enhanced turbidimetric immol/Lune-assay, 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,目前已广泛应用于临床诊断领域。PETIA法是在高分子胶乳微球的表面交联特异性抗体,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。

[0003] 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,直接测定反应液的散光信号值或吸光度,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,纳米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略低于ELISA方法,但足以检测到健康人样本中许多标志蛋白的下限值,可完全满足临床检测要求。

[0004] 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,氨基化微球也有见报道。国外已有多家公司提供纳米级表面羧基化、氨基化修饰的微球粒子原料,并广泛应用于PETIA。这些厂家提供的粒子直径从20nm-4000nm,检测的灵敏度得到了较大的改善,检测灵敏度达到1.0 ng/ml。但由于胶乳颗粒可同时与抗体的结合区(Fab区)以及可结晶区域(Fc区)结合,使部分抗原结合区(Fab区)失活,这对抗体的特异性及浓度要求较高,通常需要结合高纯度的特异性抗体。同时,还存在临床检测线性范围窄,干扰因素多,实验稳定性差等缺点,大大地限制了免疫比浊法在临床上的广泛应用。

[0005] Protein A是从A型金黄色葡萄球菌分离而得的一种细胞壁蛋白,与多数哺乳动物的IgG Fc段结合(包括:人、山羊、绵羊、兔、豚鼠、马、猪、猴、小鼠等),不与狗IgG结合,不结合人IgM、IgD、和IgA,重组表达的蛋白A,亲和力、稳定性等方面更好。

[0006] Protein G是从G型链球菌分离而得的细胞壁蛋白,能与多种动物(兔、大鼠、豚鼠、牛、猫、小鼠、鸟、羊)的IgG的Fc区结合,以及与小鼠血清白蛋白发生结合,但不能与IgA和IgM结合。最为常用的是改造后重组表达的Protein G,具有2-5个结合结构域,亲和力、特异性及稳定性显著。

[0007] 金黄色葡萄球菌蛋白A(SPA)中的Z结构域,又叫免疫球蛋白结合结构域,其生物稳定性高,可耐受羟胺和溴化氢处理。首尾相连的两个Z结构域,被命名为ZZ结构域,其具有独特的反3 α 螺旋结构,可特异性地与抗体Fc区域结合。同时ZZ结构区具有与SPA相类似的抗体结合容量以及更高的稳定性,可以耐受工业纯化中苛刻的环境,已广泛应用于外源蛋白的可溶表达及免疫检测、抗体纯化等领域。

[0008] 因此,应用ZZ-多肽、protein A、protein G、protein A/G对高分子胶乳纳米微球表面进行改性,利用这些能特异性结合抗体Fc区的特性,使与生物纳米微球结合的抗体充分暴露出可结合抗原的Fab区域,从而提高免疫微球的生物活性,提高检测的灵敏度。

发明内容

[0009] 针对上述问题,本发明的目的是提供一种纳米微球的制备方法,其制备出的定向自标记纳米微球能够与抗体Fc区高特异性地结合,使与纳米微球结合的抗体暴露出可结合抗原的Fab区域,从而提高免疫微球的生物活性,提高检测的灵敏度。

[0010] 为达到上述目的,本发明的技术方案是:

[0011] 一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

[0012] 步骤一、对纳米颗粒进行改性,并且改性后成为ZZ-多肽或protein A或protein G或protein A/G 蛋白纳米颗粒:

[0013] 1) 每10-20mg纳米颗粒,直径50-1000nm, 加EDC 10-200mg,纳米颗粒和EDC的质量比为1:1-1:10,在pH4-6的50mmol/L MES缓冲液中活化10-500分钟;

[0014] 2) 加入ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G蛋白中的一种0.1-10.0mg,纳米颗粒与蛋白的质量比为1:0.05-1:20,室温放置0.1-2.0小时。

[0015] 3) 加入牛血清白蛋白,使牛血清白蛋白终浓度为0.1-10%,室温反应1小时,封闭纳米颗粒上多余的空位;

[0016] 4)离心去除上清,用等体积磷酸盐缓冲液重悬。

[0017] 步骤二、定向自标记免疫纳米微球的制备:

[0018] 1) 把步骤一所得的改性纳米颗粒用磷酸盐缓冲液稀释到0.1-2%的浓度;

[0019] 2) 向上述纳米颗粒中加入特异性的抗体,使抗体终浓度为0.1-5.0mg/ml,室温反应1-2小时;

[0020] 3) 加入可以与ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G反应的IgG或其它衍生物,室温1小时封闭掉多余的ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G的结合位点和非特异性结合位点;

[0021] 4)离心洗涤上述纳米颗粒即可得到相应的特异性定向自标记免疫纳米微球。

[0022] 优选的,所述步骤二为定向自标记免疫纳米微球的制备:

[0023] 1) 把步骤一所得的改性纳米颗粒用磷酸盐缓冲液稀释到0.1-2%的浓度;

[0024] 2) 向上述纳米颗粒中加入特异性的抗体,使抗体终浓度为0.1-5.0mg/ml,室温反应1-2小时;

[0025] 3) 加入可以与ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G反应的IgG或其它衍生物,室温1小时封闭掉多余的ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G的结合位点和非特异性结合位点;

[0026] 优选的,所述纳米颗粒表面具有活性基团氨基、羧基、巯基、羟基、醛基中的一种。

[0027] 优选的,所述纳米颗粒为ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G蛋白制成的定向自标记纳米颗粒。

[0028] 本发明还提供了一种定向自标记免疫纳米微球的应用,所述定向自标记免疫纳米

微球应用在胶乳增强免疫比浊测定中。

[0029] 优选的,应用内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒。

[0030] 优选的,所述试剂盒为用于对D-二聚体进行比浊定量检测的D-二聚体比浊定量检测试剂盒,所述D-二聚体比浊定量检测试剂盒包括R1试剂和R2试剂;其中R1试剂配方为50 mmol/L Tris, 用盐酸调节pH到8.0,再加入0.85%氯化钠、2% PEG8000、0.1%叠氮钠;所述R2试剂配方为将所述定向自标记免疫纳米颗粒用50mmol/L Tris-Hcl,pH 8.0,2% BSA,0.1%叠氮钠,1% NaCl缓冲液稀释到0.1%。

[0031] 优选的,内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒适用340nm-700nm波长的检测。

[0032] 优选的,内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒适用于透射仪和散射比浊仪。

[0033] 所述步骤一的纳米微球可以购自任何公司,也可自己制备,纳米微球直径20-4000nm,优选直径50-1000nm。

[0034] 所述步骤一中ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G可购自任何公司,也可自己表达制备。

[0035] 所述步骤一改性的原理如图1所示,其基本原理是在酸性环境中,使用EDC活化纳米颗粒表面羧基基团,活化的羧基基团可以快速和加入的蛋白进行结合,从而使纳米颗粒表面得以改性。

[0036] 步骤二定向自标记纳米免疫颗粒的制备原理如图2所示,其基本原理是利用ZZ-多肽、protein A、protein G或protein A/G可特异且快速结合抗体Fc端的特点,从而使抗体Fab端能定向排列在改性后的纳米颗粒表面。

[0037] 本发明还提供了定向自标记免疫纳米微球的应用,即将所述定向自标记免疫纳米微球应用在胶乳增强免疫比浊测定中。

[0038] 进一步的,应用内含有所述定向自标记免疫纳米微球的D-二聚体比浊定量检测试剂盒对D-二聚体进行比浊定量检测。

[0039] 进一步的,所述D-二聚体比浊定量检测试剂盒有R1试剂和R2试剂;其中R1试剂配方为50mmol/L Tris, 用盐酸调节pH到8.0,再加入0.85%氯化钠、2% PEG8000、0.1%叠氮钠;R2试剂配方为将所述定向自标记免疫纳米颗粒用50mmol/L Tris-Hcl,pH 8.0,2% BSA,0.1% 叠氮钠,1% NaCl缓冲液稀释到0.1%。

[0040] 进一步的,所述的定向自标记免疫纳米微球的应用,其特征在于,内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒适用340nm-700nm波长的检测。

[0041] 进一步的,所述的定向自标记免疫纳米微球的应用,其特征在于,内含有所述定向自标记免疫纳米微球的试剂盒适用于透射仪和散射比浊仪。

[0042] 本发明提供一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法及其应用,本方法制备的定向自标记纳米微球能够与抗体Fc区高特异性地结合,使与纳米微球结合的抗体暴露出可结合抗原的Fab区域,从而提高免疫微球的生物活性,提高检测的灵敏度,并应用在D-二聚体定量检测中。

附图说明

- [0043] 附图1是对纳米颗粒进行改性的示意图。
- [0044] 附图2是定向自标记纳米免疫颗粒的制备原理示意图。
- [0045] 附图3是Protein A纳米颗粒结构示意图。
- [0046] 附图4是葡萄球菌A蛋白ZZ结合位点纳米颗粒上的ZZ-domain。
- [0047] 附图5是定向自标记免疫纳米微球结构图。
- [0048] 附图6是Protein A定向自标记免疫纳米微球作用机理图。
- [0049] 附图7是实施例1中D-二聚体定标曲线

具体实施方式

[0050] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步的描述,但本发明并不限于这些实施例。

[0051] 实施例1 :ZZ-多肽纳米颗粒制备,并制成定向自标记D-二聚体纳米免疫颗粒,用于D-二聚体的检测。

[0052] 步骤一:对纳米颗粒进行改性

[0053] 1) 10mg纳米颗粒,直径150nm,羧基基团,加EDC 100mg,纳米颗粒和EDC的质量比为1:10. 在pH4.5的50mmol/L MES缓冲液中活化60分钟;

[0054] 2)加入ZZ-多肽1mg,室温放置2小时。

[0055] 3)加入牛血清白蛋白,使牛血清白蛋白终浓度为1%,到上述纳米颗粒中,室温反应1小时,封闭纳米颗粒上多余的空位;

[0056] 4)12000rpm离心去除上清,用等体积50mmol/L,pH7.4磷酸盐缓冲液重悬。

[0057] 步骤二:定向自标记免疫纳米微球的制备

[0058] 1)把步骤一所得的改性纳米颗粒用等体积50mmol/L,pH7.4磷酸盐缓冲液稀释到0.1%的浓度;

[0059] 2)向上述纳米颗粒中加入D-二聚体抗体,使D-二聚体抗体终浓度为0.5mg/ml,室温反应2小时;

[0060] 3)加入10%的牛血清,牛血清终浓度为5%,室温1小时封闭掉多余的ZZ、proteinA、protein G或protein A/G的结合位点和非特异性结合位点;

[0061] 4)离心洗涤上述纳米颗粒即可得到相应的特异性的定向自标记免疫纳米微球。

[0062] D-二聚体测定试剂盒制备及检测

[0063] 其中R1试剂配方为50mmol/L Tris, 用盐酸调节pH到8.0,再加入0.85%氯化钠、2% PEG8000、0.1%叠氮钠;R2试剂配方为将所述定向自标记免疫纳米颗粒用50mmol/L Tris-Hcl,pH 8.0,2% BSA,0.1% 叠氮钠,1% NaCl缓冲液稀释到0.1%。D-二聚体校准品为外购校准品,浓度为8mg/L,用生理盐水稀释成0mg/L, 0.4mg/L, 1.6mg/L, 4.8mg/L,8mg/L,在生化分析仪上进行定标,见附图7

[0064] 实施例2:Protein G蛋白纳米颗粒制备,并定向自标记D-二聚体纳米免疫颗粒,用于D-二聚体的检测。

[0065] 步骤一:对纳米颗粒进行改性

[0066] 1)15mg纳米颗粒,直径250nm,氨基基团,加EDC 120mg,纳米颗粒和EDC的质量比为1:8. 在pH5的50mmol/L MES缓冲液中活化120分钟;

[0067] 2)加入protein G蛋白3mg,室温放置2小时。

[0068] 3)加入牛血清白蛋白,使牛血清白蛋白终浓度为0.5%,到上述纳米颗粒中,室温反应1小时,封闭纳米颗粒上多余的空位;

[0069] 4)12000rpm离心去除上清,用等体积50mmol/L,pH8.0磷酸盐缓冲液重悬。

[0070] 步骤二:定向自标记免疫纳米微球的制备

[0071] 1)把步骤一所得的改性纳米颗粒用等体积50mmol/L,pH8.0磷酸盐缓冲液稀释到0.1%的浓度;

[0072] 2)向上述纳米颗粒中加入D-二聚体抗体,使D-二聚体抗体终浓度为1mg/ml,室温反应2小时;

[0073] 3)加入10%的牛血清,终浓度为5%,室温1小时封闭掉多余的ZZ、protein A、protein G、protein A/G的结合位点和非特异性结合位点;

[0074] 4)离心洗涤上述纳米颗粒即可得到相应的特异性的定向自标记免疫纳米微球。

[0075] D-二聚体测定试剂盒制备及检测

[0076] 其中R1试剂配方为50mmol/L Tris,用盐酸调节pH到8.0,再加入0.85%氯化钠、2%PEG8000、0.1%叠氮钠;R2试剂配方为将所述定向自标记免疫纳米颗粒用50mmol/L Tris-Hcl,pH 8.0,2% BSA,0.1% 叠氮钠,1% NaCl缓冲液稀释到0.1%。D-二聚体校准品为外购校准品,浓度为8mg/L,用生理盐水稀释成0mg/L, 0.4mg/L, 1.6mg/L, 4.8mg/L,8mg/L,进行定标。

[0077] 实施例3:Protein A蛋白纳米颗粒制备,并定向自标记D-二聚体纳米免疫颗粒,用于D-二聚体的检测。

[0078] 步骤一:对纳米颗粒进行改性

[0079] 1)20mg纳米颗粒,直径300nm,羧基基团,加EDC 180mg,纳米颗粒和EDC的质量比为1:9. 在pH5.5的50mmol/L MES缓冲液中活化100分钟;

[0080] 2)加入protein A蛋白8mg,室温放置2小时。

[0081] 3)加入牛血清白蛋白,使牛血清白蛋白终浓度为1%,到上述纳米颗粒中,室温反应1小时,封闭纳米颗粒上多余的空位;

[0082] 4)12000rpm离心去除上清,用等体积50mmol/L,pH8.0磷酸盐缓冲液重悬。

[0083] 步骤二:定向自标记免疫纳米微球的制备

[0084] 1)把步骤一所得的改性纳米颗粒用等体积50mmol/L,pH8.0磷酸盐缓冲液稀释到0.1%的浓度;

[0085] 2)向上述纳米颗粒中加入D-二聚体抗体,使D-二聚体抗体终浓度为2mg/ml,室温反应2小时;

[0086] 3)加入10%的牛血清,终浓度为5%,室温1小时封闭掉多余的ZZ、protein A、protein G、protein A/G的结合位点和非特异性结合位点;

[0087] 4)离心洗涤上述纳米颗粒即可得到相应的特异性的定向自标记免疫纳米微球。

[0088] D-二聚体测定试剂盒制备及检测

[0089] 其中R1试剂配方为50mmol/L Tris,用盐酸调节pH到8.0,再加入0.85%氯化钠、2%PEG8000、0.1%叠氮钠;R2试剂配方为将所述定向自标记免疫纳米颗粒用50mmol/L Tris-Hcl,pH 8.0,2% BSA,0.1% 叠氮钠,1% NaCl缓冲液稀释到0.1%。D-二聚体校准品为外购校

准品,浓度为8mg/L,用生理盐水稀释成0mg/L, 0.4mg/L, 1.6mg/L, 4.8mg/L,8mg/L,进行定标。

[0090] 本发明提供一种定向自标记纳米微球的制备方法,该方法制备的定向自标记纳米微球能与抗体Fc区域特异性地结合,暴露出结合抗原的Fab区域,从而提高免疫微球的生物活性。

[0091] 本发明制备的定向自标记免疫纳米微球应用到临床免疫比浊检测后,能明显提高免疫比浊检测方法的灵敏度。

[0092] 以上所述的仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,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。

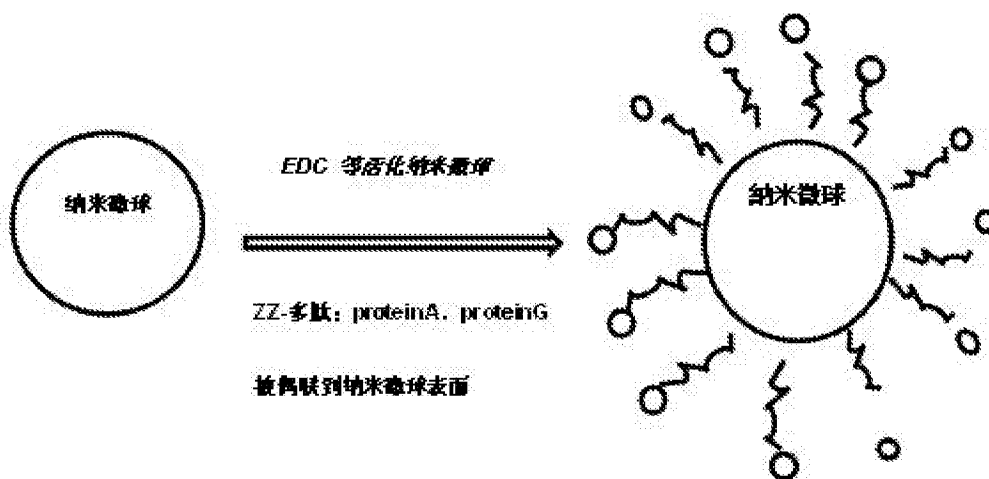


图1

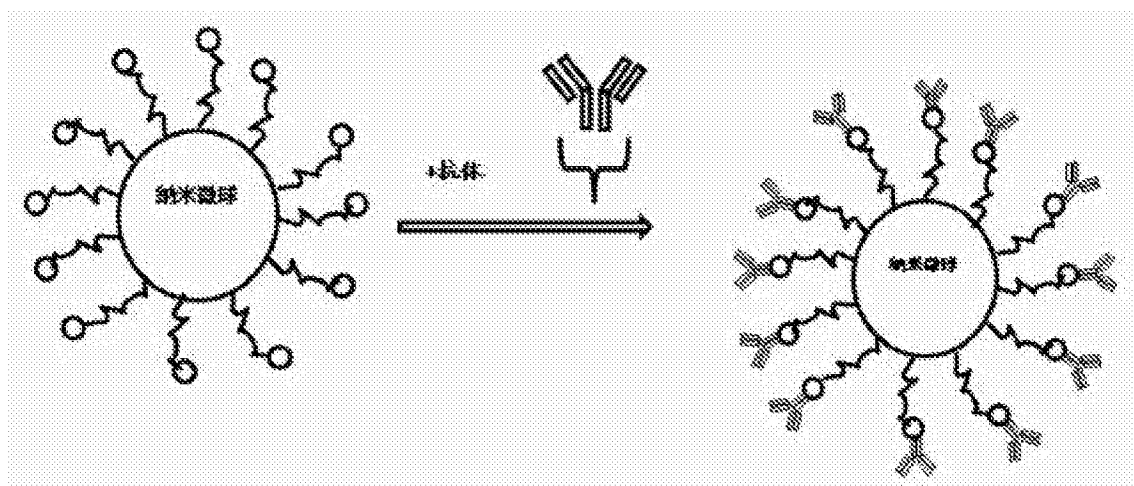


图2

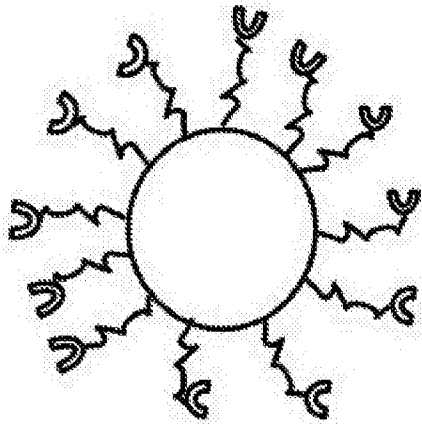


图3



图4

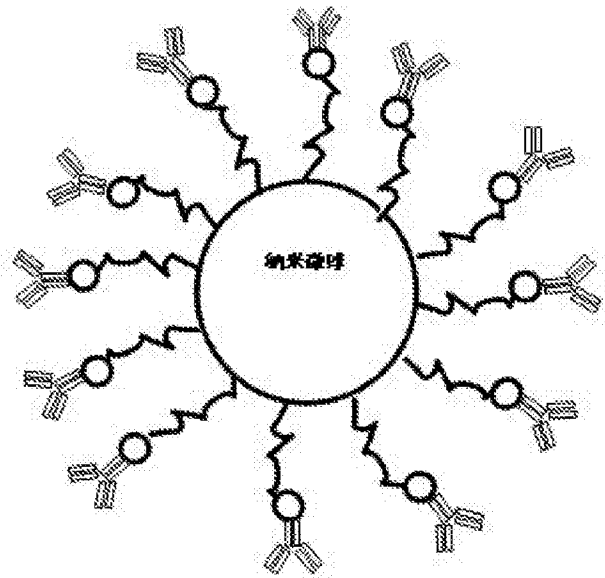


图5

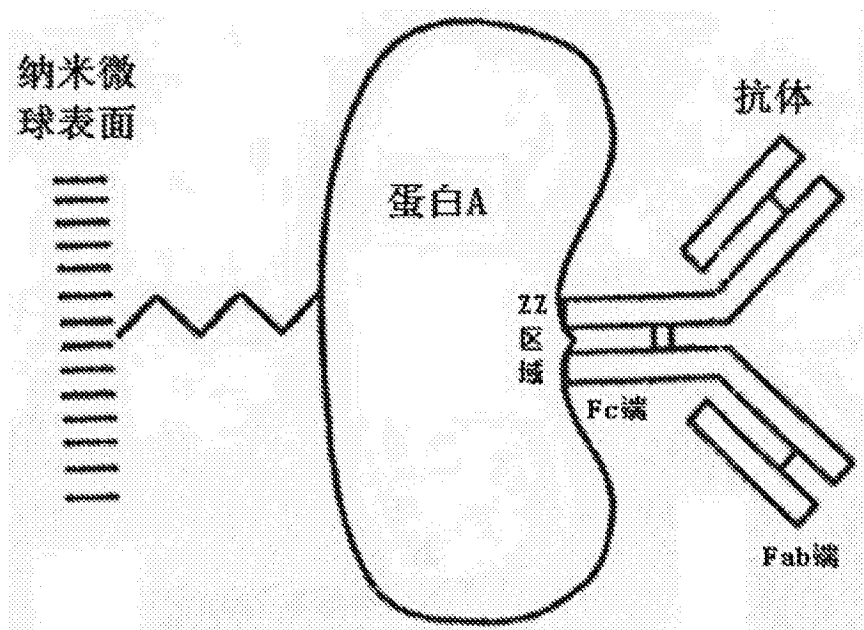


图6

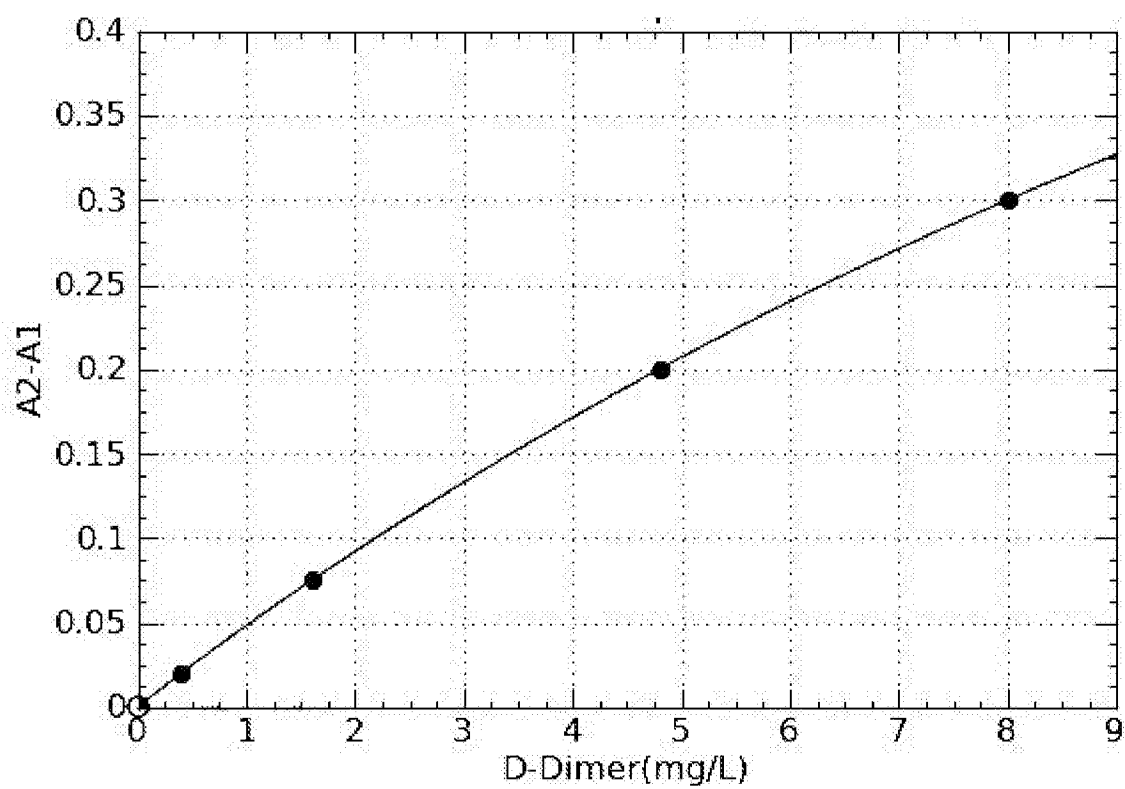


图7

专利名称(译)	一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN104049079B	公开(公告)日	2016-05-18
申请号	CN201310082103.2	申请日	2013-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	苏州德沃生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州德沃生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州德沃生物技术有限公司		
[标]发明人	王滨 赵年福 吴一凡 杜薇薇		
发明人	王滨 赵年福 吴一凡 杜薇薇		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54346		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN104049079A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种定向自标记免疫纳米微球的制备方法，所述方法包括以下步骤：对纳米颗粒进行改性和定向自标记免疫纳米微球的制备。本发明制备的定向自标记免疫纳米微球能够与抗体Fc区高特异性结合，使与纳米微球结合的抗体暴露出可结合抗原的Fab区域，从而提高免疫微球的生物活性，提高检测的灵敏度。

