

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/538

G01N 33/52



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510025360.8

[43] 公开日 2005 年 11 月 16 日

[11] 公开号 CN 1696695A

[22] 申请日 2005.4.25

[21] 申请号 200510025360.8

[71] 申请人 上海朋远泰生物技术有限公司

地址 200023 上海市斜土路 716 号 3 号楼 513 室

[72] 发明人 何 元

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 朱黎明

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用于免疫分析的微球组合物或组件及免疫分析方法

[57] 摘要

公开了一种用于化学发光免疫分析的微球组合物或组件，它包括各自包被有抗体的感光微球和发光微球，其特征在于所述感光微球的粒径小于发光微球的粒径。还公开了使用本发明组合物或组件进行免疫分析的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于化学发光免疫分析的微球组合物，它包括各自包被有抗体的感光微球和发光微球，其特征在于所述感光微球的粒径小于发光微球的粒径。

5 2. 如权利要求1所述的微球组合物，其特征在于所述感光微球的粒径为20-400nm，发光微球的粒径为100-400nm，并且发光微球与感光微球的粒径比为1.05-8.80。

10 3. 如权利要求1或2所述的微球组合物，其特征在于所述感光微球的粒径为40-250nm，发光微球的粒径为150-350nm，并且发光微球与感光微球的粒径比为1.42-5.00。

4. 如权利要求1或2所述的微球组合物，其特征在于所述感光微球的粒径为80-120nm，发光微球的粒径为190-210nm，并且发光微球与感光微球的粒径比为1.90-2.10。

15 5. 一种用于化学发光免疫分析的微球组件，它包括包被有抗体的感光微球包装和包被有抗体的发光微球包装，其特征在于所述感光微球的粒径小于发光微球的粒径。

6. 如权利要求5所述的微球组件，其特征在于所述感光微球的粒径为20-400nm，发光微球的粒径为100-400nm，并且发光微球与感光微球的粒径比为1.05-8.80。

20 7. 如权利要求5或6所述的微球组件，其特征在于所述感光微球的粒径为40-250nm，发光微球的粒径为150-350nm，并且发光微球与感光微球的粒径比为1.42-5.00。

25 8. 如权利要求5或6所述的微球组件，其特征在于所述感光微球的粒径为80-120nm，发光微球的粒径为190-210nm，并且发光微球与感光微球的粒径比为1.90-2.10。

9. 一种化学发光免疫分析方法，它包括向被分析试样中加入如权利要求1-4中任一项所述的微球组合物。

10. 一种化学发光免疫分析方法，它包括向被分析试样中以任意次序加入如权利要求5-8中任一项所述的微球组件中的感光微球和发光微球。

用于免疫分析的微球组合物或组件
及免疫分析方法

5

技术领域

本发明涉及一种用于化学发光免疫分析的微球组合物或微球组件，它具有改进的高发光效率。还涉及使用所述组合物或组件进行免疫分析的方法。

10

背景技术

迄今为止，生物体内微量生物活性物质的免疫测定方法已经历了由放射免疫分析（RIA）、荧光免疫分析（FIA）、酶联免疫分析（EIA），以及化学发光免疫分析等诸阶段。这一衍变过程主要是基于对检测方法的敏感性、准确性、以及操作简捷性需求的不断提高而决定的。

15

正如放射免疫（RIA）分析技术当年从发明到应用的推陈出新所经过的历程一样，化学发光免疫定量检测法成为现今取代放射免疫分析的有力分析手段和技术。在国际领域内，化学发光免疫定量检测法已成为临床检验的一个非常重要的新技术和检测手段，并将延展至临床检验的各个领域，这也是临床检验界的一致共识。

20

化学发光免疫分析法是一种利用化学发光物质发射的光波进行检测的方法。化学发光物质作为标记应用于核酸检测与免疫检测中。例如，可通过多种途径将特异结合对中的某一分子与发光物质结合形成发光复合物。该复合物可与样品中被检测物（特异结合对中的另一分子）反应，分配于固相与液相中，且分配比例与检测物的量相关。通过测定固相或液相中发光量，即可得出样品中检测物的相应浓度。

25

具体地说，在均相条件下，将包被有活性分子并且内部带有染料的感光微球（纳米级）以及包被有活性分子并且内部带有发光化合物的发光微球（纳米级）的混合物作为试剂和有可能含有目标分子的检测样品混合。此时包被有活性分子的纳米感光微球和包被有活性分子的纳米发光微球可迅速有效地捕捉目标分子，纳米感光微球、纳米发光微球和目标分子一起形成近距离的夹心复合物。经激发光照射，纳米感光微球中的染料被诱导激活并释放高能态的活性氧离子（单线态氧）。该高能态的活性氧离子被近距离的纳米发光微球俘获，从而传递能量以激

30

活所述发光微球中的发光化合物。发光微球中的发光化合物可于数微秒后在零背景无干扰的情况下释放出高能级红光。用光子计数器测定这些高能级光子并通过电脑将光子数量换算为目标分子浓度，光子数量的多少即精确地反映了目标分子的浓度。

5 因此，感光微球和发光微球的发光效率决定了化学发光免疫分析法的检测灵敏度。为了提高感光微球和/或发光微球的发光效率，本领域一般采用提高感光微球中染料的感光效率和/或发光微球中发光化合物的接受光的效率和发光效率的方法。

10 例如，美国专利 5,709,994 公开了一种测定目标分子的方法，它包括对可能含有目标分子的组合物进行光辐照的步骤，所述组合物包括非颗粒基质或颗粒基质，所述基质包被有经光辐照会产生单线态氧的光敏剂和可被所述单线态氧活化的化学发光化合物。它还具体公开了所述化学发光化合物选自 9-亚烷基-N-甲基吡啶、烯醇醚和烯胺，所述光敏剂选自亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素。

15 美国专利 5,780,646 公开了一种发光组合物，它包括(a)一种至少六配位的金属螯合物和(b)一种具有两个芳基的带双键的化合物。

虽然采用本领域所述方法可极大地提高化学发光免疫分析法的检测灵敏度，但是仍需要开发一种能在现有技术基础上进一步提高发光效率的方法。

发明的内容

20 本发明的目的是提供一种用于化学发光免疫分析的微球组合物，它具有高的检测灵敏度。

本发明的另一个目的是提供一种用于化学发光免疫分析的微球组件，它具有高的检测灵敏度。

25 本发明的再一个目的是提供一种化学发光免疫分析法，它具有高的检测灵敏度。

本发明人经过大量研究发现，使感光微球的粒径小于发光微球的粒径可有效地提高化学发光的发光效率。本发明就是在该发现的基础上完成的。

30 因此，本发明提供一种用于化学发光免疫分析的微球组合物，它包括各自包被有抗体的感光微球和发光微球，其特征在于所述感光微球的粒径小于发光微球的粒径。

本发明还提供一种用于化学发光免疫分析的微球组件，它包括包被有抗体的感光微球包装和包被有抗体的发光微球包装，其特征在于所述感光微球的粒径小

于发光微球的粒径。

本发明还提供一种化学发光免疫分析方法，它包括向被分析试样中依次加入上述微球组件中的感光微球和发光微球，或者加入本发明微球组合物。

5 附图说明

图 1 是光激化学发光免疫分析系统(LICA)检测原理图，其中

图 1a 是包被第一抗体并含有光敏试剂的光敏微球的示意图；

图 1b 是加入检测试样后被检测抗原与第一抗体结合的示意图；

图 1c 是加入包被有第二抗体并含有发光组合物的微球的示意图；

10 图 1d 是光致发光的示意图。

具体实施方式

在本发明中，术语“粒径”是指微球的平均直径。它是用常规粒径仪测定的。

图 1 是本发明光激化学发光免疫分析系统(LICA)检测原理图。如图 1a 所示，
15 纳米级的感光微球 10 中带有光敏剂，该微球表面包被有第一抗体 1。如图 1b 所示，当将包被有第一抗体 1 并含有光敏剂的纳米微球加入含被检测抗原 2 的试样中以后，第一抗体 1 会与抗原 2 相结合。如图 1c 所示，发光微球 20 是含有发光组合物的纳米微球，它表面包被有第二抗体 3。当将所述发光微球 20 加入上述试样中以后，该发光微球上包被的第二抗体 3 也会与已经与第一抗体 1 结合的抗原
20 2 相结合，形成夹合体。如图 1d 所示，当用激光辐照光敏微球以后，感光微球中的光敏剂会放出单线态氧，该单线态氧被发光微球中的发光组合物俘获后，会激发发光组合物中的发光化合物，发出特定波长的光线。通过检测该波长的光线就可测定抗原的量。

下面结合附图更详细地说明本发明。

25

一. 微球基质

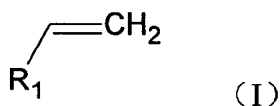
用作本发明感光微球 10 和发光微球 20 的纳米级微球基质是本领域已知的微球基质。用作感光微球的基质和用作发光微球的基质（下面统称为微球基质）无特别的限制，它们可相同或不相同，只要感光微球的粒径小于发光微球的粒径即可。
30

例如，所述微球基质可以是羧基改性的乳胶颗粒、醛基改性的乳胶颗粒或者环氧基或羟基改性的乳胶颗粒。这种颗粒的详细情况可参见美国专利 5,780,646

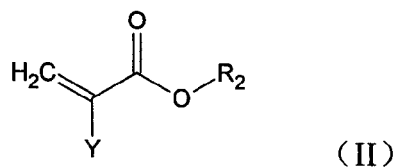
和 5,709,994 (该文献在此全文引为参考)。

所述微球基质可从市场上购得,例如购自上海朋远泰生物技术有限公司的 WQ 系列微球产品或者购自美国 Bangs Laboratories, Inc.

本发明微球基质也可通过单体聚合的方法得到。常用的方法有乳液聚合或微乳液聚合。在本发明的一个较好实例中,所述微球基质是由具有通式(I)的乙烯基芳香单体:

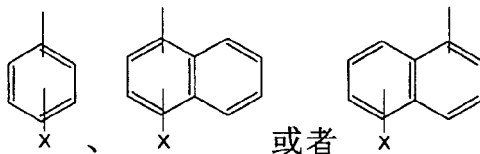


与具体通式(II)的丙烯酸酯单体:

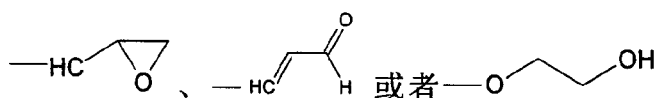


10 通过乳液聚合制得。上述通式中,

R_1 是选自下式的芳基,其中 X 是 H, 1-5 个碳原子的直链或支链烷基,所述烷基可被氯原子所取代:



15 R_2 是具有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基取代基,或者具有如下结构的取代基:



Y 是 H 或者甲基,

20 所述乳液聚合的聚合条件是本领域众所周知的。例如,在所述乳液聚合中使用的表面活性剂可以是离子型表面活性剂或非离子型表面活性剂或其混合物,常见的有十二烷基磺酸钠 (SDS),吐温-20 以及 Triton X-100 等。

二. 感光微球

如上所述,用作本发明感光微球 10 的纳米级微球基质是本领域已知的微球基质。其粒径应小于发光微球的粒径。

25 在本发明的一个较好实例中,所述感光微球的粒径为 20-400nm,较好为

40-250nm, 更好为 80-120nm。

用于感光微球中的光敏剂无特别的限制, 它可以是本领域已知的光敏剂, 其非限定性例子有例如美国专利 5,709,994 公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素。

5 在感光微球中光敏剂的载带量无特别的限制, 它可以是本领域常用的量。适用于本发明的感光微球以及第一抗体的包被方法可例如参见美国专利 5,709,994 与 5,780,646。

用于将光敏剂加入感光微球的方法以及包被该感光微球的方法可以是本领域常用的任何方法。这种方法可例如参见美国专利 5,709,994 与 5,780,646。

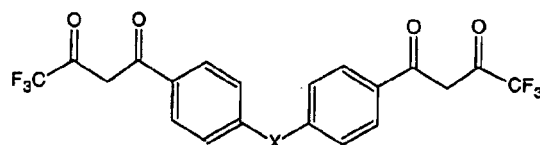
10

三. 发光微球

如上所述, 用作本发明发光微球 20 的纳米级微球基质是本领域已知的微球基质。其粒径应大于感光微球的粒径。

15 本发明发光微球中所含的发光组合物可以是本领域常见的发光组合物, 例如, 美国专利 5,780,646 所述的发光组合物。

在本发明的一个较好实例中, 所述发光组合物包括一种带双丁二酮化合物 M 作为配位体的铈配合物和一种含不饱和烯键的化合物 (参见 2005 年 2 月 4 日提交的中国专利申请 200510023820.3) (该文献在此全文引为参考)。所述双丁二酮化合物具有如下通式:



20

其中: X 是具有 1-5 个碳原子直链烷基; 或者具有下式的芳基, 其中 Y 是 1-5 个碳原子的直链或支链烷基取代基:

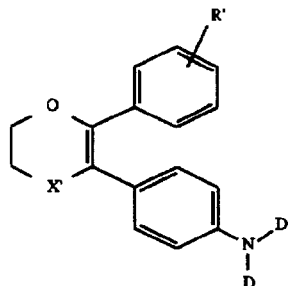


25 所述双丁二酮化合物较好选自: 1,1-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)甲烷、1,2-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)乙烷、1,3-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)丙烷、1,6-二(对(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)丁烷、4,4'-二(1'',1'',1''-三氟-2'',4''-丁二酮-4''-基)邻联三苯、3-甲基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯、4-甲基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)

苯基)苯、3-乙基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯、4-乙基-1,2-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)苯、2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、5-庚基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、5-(2"-甲基己基)-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、4-甲基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、4-乙基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、5-甲基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、4-丙基-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、5-庚基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、5-(2"-甲基己基)-2,3-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、4-甲基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、4-乙基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘、5-甲基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘或4-丙基-1,8-二(4-(1',1',1'-三氟-2',4'-丁二酮-4'-基)苯基)萘。

用所述双丁二酮化合物形成铈配合物的方法是本领域众所周知的。例如，可将化学计量的双丁二酮化合物与铈化合物混合即可。

15 所述含烯键化合物具有如下通式：

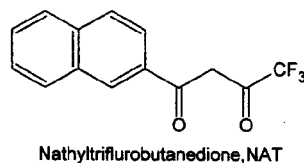


其中，X'是S或NR，R是具有1-10个碳原子的烷基或者6-18个碳原子的芳基；

R'是氢原子或者具有1-10个碳原子的烷基；

20 D和D'各自为氢原子或者具有1-20个碳原子的烷基。

在本发明的另一个较好实例中，所述发光组合物包括一种以萘基-三氟丁二酮(Nathyltrifluorobutanedione, NTA)作为配位体的铈配合物和上述含不饱和烯键的化合物：



25 这两种组分的含量无特别的限制，只要能使该组合物的发光效率满足最终免

疫分析即可。

适用于本发明的发光微球的粒径无特别的限制，只要其大于感光微球的粒径即可。在本发明的一个较好实例中，所述发光微球的粒径为 100-400nm，较好为 150-350nm，更好为 190-210nm。

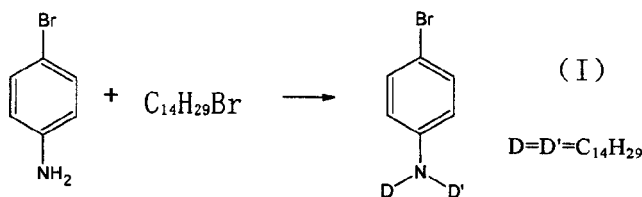
- 5 适用于本发明的发光微球与感光微球的粒径之比无特别的限制，只要其大于 1 即可。在本发明的一个较好实例中，所述纳米级微球的粒径比为 1.05-8.80，较好为 1.42-5.00，更好为 1.9-2.1。

下面结合实施例进一步说明本发明。

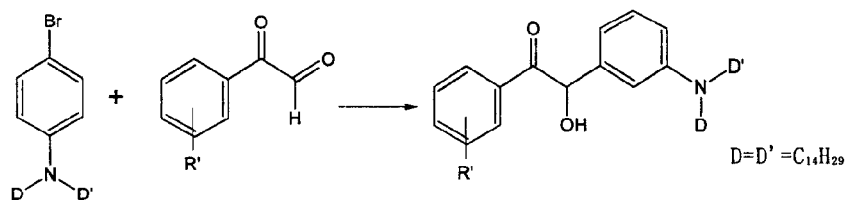
10 实施例 1 和比较例 1-2

合成含烯键化合物

- 合成含不饱和烯键的化合物：将 34.4g(0.2mol)溴代苯胺溶解在 125ml DMF 中，加入 0.6mol 溴代十四烷及 0.6mol 二异丙基乙胺，反应溶液加热到 100℃，然后反应 12 小时。反应的溶液加入 300ml 二氯甲烷，水洗三次除去 DMF。去除 15 二氯甲烷，产物用乙醇重结晶。得到 N,N-二取代的对溴苯胺（式 I 化合物），反应的产率为 70%

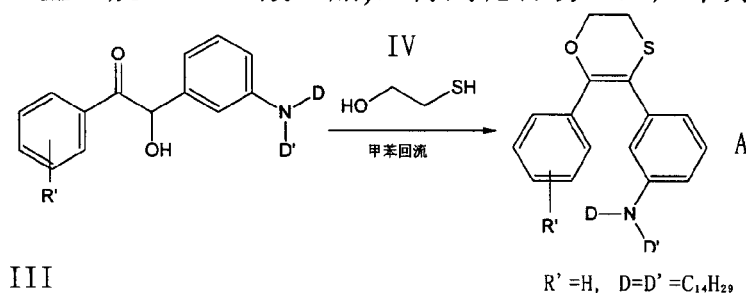


向一个装有滴液漏斗、温度计和回流冷凝管的 500ml 圆底三颈烧瓶中加入 100ml 干燥的 THF，随后加入 3g 金属镁条，在回流条件下加入少量上面得到的 N,N-二取代的对溴苯胺产物（式 I 化合物）以启动反应，并加入少量的碘以帮助反应启动。将 0.11mol 上述 N,N-二取代的对溴苯胺产物（式 I 化合物）溶解于 50ml 干燥的 THF 中，并置于滴加漏斗中，缓缓地滴加此溶液并保持回流。加液完毕后让反应回流 1 小时。用冰浴冷却反应体系，在 0℃ 时缓缓地滴加 0.1mol 下式 (II) 化合物(购自 Aldrich/Sigma)的 50ml THF 溶液。让反应在 0℃ 进行 30 分钟，然后放置于室温 2 小时。缓缓地加入 0.1N HCl 溶液以水解生成的镁盐。加入 200ml CH₂Cl₂，然后用水洗涤有机层 2-3 次。有机层用无水硫酸钠干燥。用硅胶柱分离所需产品。用 20% 乙酸乙酯 80% 正乙烷溶液分离产品，产品的 R_f 值在 0.5 左右。(20% 乙酸乙酯/80% 正乙烷/TLC) 纯化后的产品（式 III 化合物）产率为 35%。



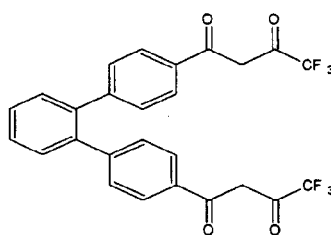
R' =H

在一个带有冷凝管的 500ml 圆底烧瓶中将 0.1mol 上述式 III 化合物溶解在 100ml 甲苯中，加入少量 ZnCl₂ 及 0.11mol 式 IV 化合物。回流并去除生成的水。反应 4 小时反应基本完成。用旋转蒸发仪去除多余的甲苯。然后用硅胶柱分离纯化最后的产品(用 95%正乙烷，5%乙酸乙酯)，得到化合物 A，产率为 60%。

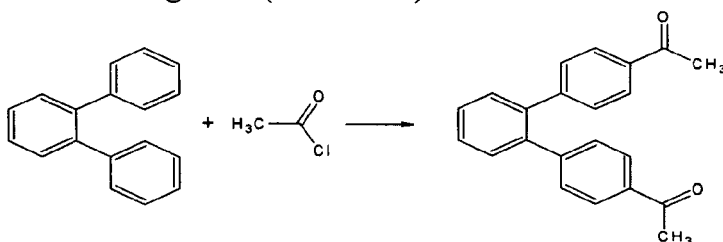


¹H NMR: 7.0ppm-7.26ppm(多重峰, 7H), 6.42ppm-6.44ppm(多重峰, 2H), 4.48ppm-4.50ppm(多重峰, 2H), 3.16ppm-3.32ppm(多重峰, 4H), 1.52ppm-1.57ppm(多重峰, 4H), 1.3ppm(多重峰, 44H), 0.86ppm(3重峰, 6H)。

合成配位体化合物

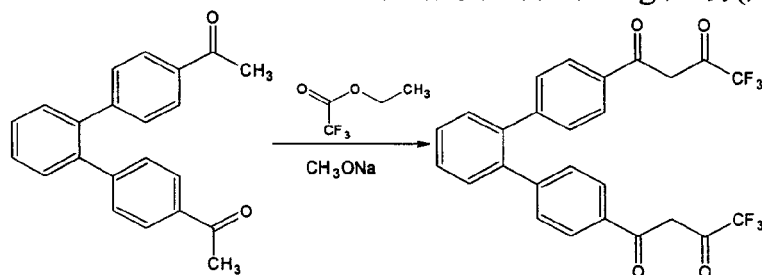


(1) 将 2.3g 邻苯基联苯溶解在 20ml 干燥的 CH₂Cl₂ 溶液中，加入 2.94g AlCl₃，然后冷却到 0℃。在剧烈的搅拌下加入 2g 的 CH₃C(O)Cl (购自 Aldrich/Sigma)。滴加完成后让反应在室温反应 1-2 小时。有机溶液用水洗三次，然后用无水硫酸钠干燥。去除溶剂后得到 2.6g 产物(产率 81%)。



$^1\text{H NMR}$: 7.1-7.9ppm(多重峰, 12H), 2.3ppm (单重峰, 6H)

(2) 将 1.6g 上述产物溶解在 20ml 的无水乙醚中, 加入 1g 的 CH_3ONa (甲醇钠) 及 2g $\text{CF}_3\text{-C(O)OEt}$ (三氟乙酸乙酯)。让反应在室温下搅拌 2-3 小时。然后用水洗三次。有机层用无水硫酸钠干燥, 除去有机溶液后得到 1.6g 产物(产率 80%)



$^1\text{H NMR}$ 7.1-7.9ppm(多重峰, 12H), 4.5ppm (单峰, 4H)

制造发光球

用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 合成例制得的含烯键化合物 A 和 100mg 用上述配位体制得的铈配合物放入 197nm 的醛基改性的乳胶颗粒(购自上海朋远泰生物技术有限公司)中, 形成 197nm 的发光球。

5 用同样的方法将含烯键化合物 A 和铈配合物放入 350nm 的纳米颗粒(购自上海朋远泰生物技术有限公司)中, 形成 350nm 的发光球。

包被抗体

取 10mL 上述制得的 197nm 的发光球 (20 mg/mL, 50 Mm MES 缓冲液, 内部染料为所述含烯键化合物与所述铈配合物) 离心清洗。Sorvall SA-600 转头 4
10 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1 小时, 转速为 15,000 rpm。离心后弃上清液, 以 8mL 50 mM MES 缓冲液重悬浮。重复离心清洗三次。

取上述清洗后得到的发光球 (25 mg/mL, 50 mM MES 缓冲液, 内部染料为所述含烯键化合物与本发明实施例制得的铈配合物) 0.04ml, 加入 5.72mg IgG1,
15 10mg NaCNBH_3 (50 mM MES 缓冲液), 37 度搅拌反应过夜。反应后, 加入 20mg BSA (50 mM MES 缓冲液) 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时。反应完毕后, Sorvall SA-600 转头 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1 小时, 转速为 15,000 rpm。离心后弃上清液, 以 10mL 50 mM MES 缓冲液重悬浮。重复离心清洗三次, 即制得实施例 1 所述的本发明醛基改性后的 197nm 发光球。用同样的方法制得实施例 1 所述的 350nm 发光球。

20

制造感光球

用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 叶绿素 A 放入粒径分别为 197nm、350nm、140nm、100nm、40nm 的纳米颗粒(购自上海朋远泰生物技术

有限公司)中, 并参照上述包被抗体的方法包被 IgG2, 形成一组本发明感光球。

发光效率的测定

按表 1 所述组合方式, 取等体积 500 μ l 的包被有抗体的感光球(50 μ g)与发光球(6.25 μ g), 加入 50 μ l 抗原与 100 μ l 作为检测缓冲液的 50mM MES 缓冲液(购自 Sigma) 混合。37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟后, 利用 PMT 光子计数器(购自上海朋远泰生物技术有限公司) 读取光子数。结果列于表 1。

表 1

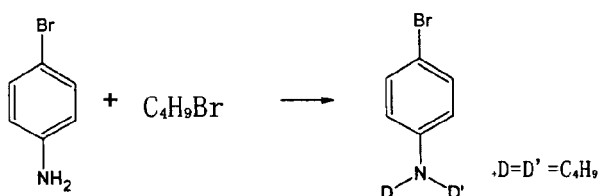
	发光球粒径 (nm)	感光球粒径 (nm)	粒径比*	光子计数 ($\times 10^4$)	信号增加比	基质表面改性基团
比较例 1	197	197	1.00	38.00	1.00	CHO
比较例 2	197	350	0.56	21.00	0.55	CHO
实施例 1	197	140	1.41	163.00	4.29	CHO
	197	100	1.97	357.00	9.39	CHO
	197	40	4.93	382.00	10.05	CHO
	350	40	8.75	397.00	10.45	CHO

由表 1 的结果可见, 在其它条件不变的情况下, 改变发光微球和感光微球的粒径使发光微球的粒径大于感光微球的粒径, 可极大地提高发光效率, 从而提高免疫分析的灵敏度。

实施例 2 和比较例 3-4

合成含不饱和烯键的化合物

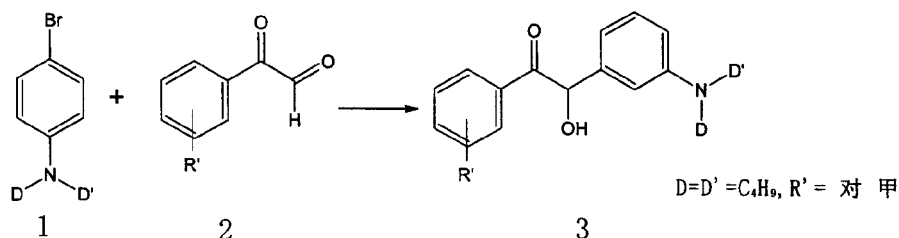
将 34.4g(0.2mol)溴代苯胺溶解在 125ml DMF 中, 加入 0.6mol 溴代丁烷及 0.6mol 二异丙基乙胺, 反应溶液加热到 100 $^{\circ}$ C, 然后反应 12 小时。反应的溶液加入 300ml 二氯甲烷, 水洗三次除去 DMF。去除二氯甲烷, 产物用乙醇重结晶。得到 N,N-二取代的对溴苯胺 (式 1 化合物), 反应的产率为 70%



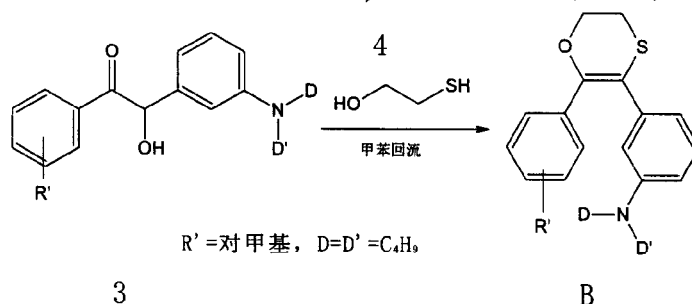
1

向一个装有滴液漏斗、温度计和回流冷凝管的 500ml 圆底三颈烧瓶中加入

100ml 干燥的 THF，随后加入 3g 金属镁条，在回流条件下加入少量上面得到的 N,N-二取代的对溴苯胺产物（式 1 化合物）以启动反应。将 0.11mol 上述 N,N-二取代的对溴苯胺产物（式 1 化合物）溶解于 50ml 干燥的 THF 中，并置于滴加漏斗中，缓缓地滴加此溶液并保持回流。加液完毕后让反应回流 1 小时。用冰浴冷却反应体系，在 0℃ 时缓缓地滴加 0.1mol 下式（2）化合物(购自 Aldrich/Sigm) 的 50ml THF 溶液。让反应在 0℃ 进行 30 分钟，然后放置于室温 2 小时。缓缓地加入 0.1N HCl 溶液以水解生成的镁盐。加入 200ml CH₂Cl₂，然后用水洗涤有机层 2-3 次。有机层用无水硫酸钠干燥。用硅胶柱分离所需产品。用 20% 乙酸乙酯 80% 正乙烷溶液分离产品，产品的 R_f 值在 0.5 左右。(20% 乙酸乙酯/80% 正乙烷/TLC) 纯化后的产品（式 3 化合物）产率为 35%。

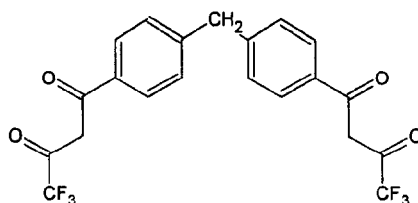


在一个带有冷凝管的 500ml 圆底烧瓶中将 0.1mol 上述式 3 化合物溶解在 100ml 甲苯中，加入少量 ZnCl₂ 及 0.11mol 式 4 化合物。回流并去除生成的水。反应 4 小时反应基本完成。用旋转蒸发器去除多余的甲苯。然后用硅胶柱分离纯化最后的产品(用 95% 正乙烷，5% 乙酸乙酯)，得到化合物 B，产率为 60%。

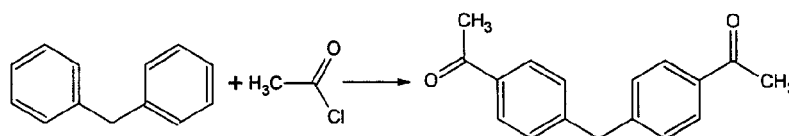


¹H NMR 7.0ppm-7.26ppm(多重峰, 6H), 6.42ppm-6.44ppm(多重峰, 2H), 4.48ppm-4.50ppm(多重峰, 2H), 3.16ppm-3.32ppm(多重峰, 4H), 2.2ppm(单重峰, 3H), 1.52ppm-1.57ppm(多重峰, 4H), 0.86ppm(3重峰, 6H), 1.3ppm(多重峰, 4H)。

合成配位体化合物

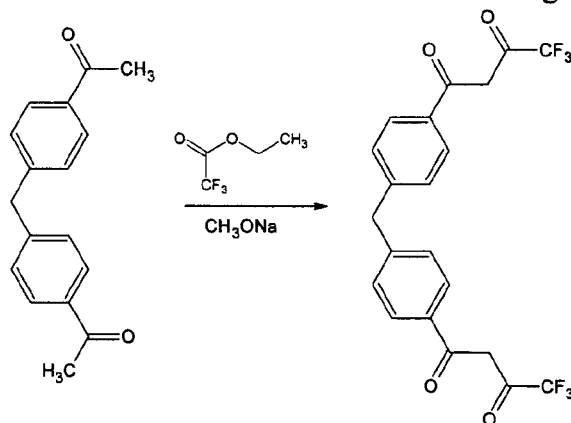


(1), 1.7g 二苯甲烷溶解在 20 干燥的 CH_2Cl_2 溶液中, 加入 2.94g AlCl_3 , 然后冷却到 0°C 。在剧烈的搅拌下加入 2g 的 $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ 。滴加完成后反应在室温反应 1-2 小时。有机溶液用水洗三次, 然后用无水硫酸钠干燥。去除溶剂后得到 1.4g 产物(70%产率)



$^1\text{H NMR}$: 7.6-7.9 (双重峰, 4H), 3.1 (单重峰, 2H), 2.3 (单重峰, 6H)

(2)上述 1.3 g 上述产物溶解在 20ml 的无水乙醚中, 加入 1g 的 CH_3ONa (甲醇钠)及 2g $\text{CF}_3\text{-COOEt}$ (三氟乙酸乙酯)。让反应在室温下搅拌 2-3 小时。然后用水洗三次。有机层用无水硫酸钠干燥, 除去有机溶液后得到 1.2 g 产物(产率 80%)



5

$^1\text{H NMR}$: 7.6-7.9 (双重峰, 4H), 4.5 (单重峰, 4H), 3.1 (单重峰, 2H)。

制造发光球

用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 合成例制得的含烯键化合物 A 和 100mg 用上面配位体制得的铈配合物放入 197nm 的环氧基改性的乳胶颗粒(购自上海朋远泰生物技术有限公司)中。

用同样的方法将含烯键化合物 A 和铈配合物放入 350nm 的环氧基改性的乳胶颗粒(购自上海朋远泰生物技术有限公司)中。

包被抗体

取 10mL 上述制得的 197nm 的发光球 (20 mg/mL, 50 mM 硼酸钠缓冲液, 内部染料为所述含烯键化合物与所述钨配合物) 离心清洗。Sorvall SA-600 转头 4 °C 离心 1 小时, 转速为 15,000 rpm。离心后弃上清液, 以 8mL 50 mM 硼酸钠缓冲液重悬浮。重复离心清洗三次。

取上述清洗后得到的发光球 (25 mg/mL, 50 mM 硼酸钠缓冲液, 内部染料为所述含烯键化合物与本发明实施例制得的钨配合物) 0.04ml, 加入 5.72mg IgG1, 37 度搅拌反应 24 小时。反应后, 加入 20mg BSA (50 mM 硼酸钠缓冲液) 37 度反应过夜。反应完毕后, Sorvall SA-600 转头 4 °C 离心 1 小时, 转速为 15,000 rpm。离心后弃上清液, 以 10mL 50 mM MES 缓冲液重悬浮。重复离心清洗三次, 即制得实施例 2 所述的本发明环氧基改性后的 197nm 发光球。

用同样的方法制得实施例 2 所述的 350nm 发光球。

制造感光球

用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 叶绿素 A 放入粒径分别为 197nm、350nm、140nm、100nm、40nm 的纳米颗粒(购自上海朋远泰生物技术有限公司)中, 并参照上述包被抗体的方法包被 IgG2, 形成一组本发明感光球。

发光效率的测定

按表 2 所列的组合, 取等体积 500 μ l 的包被有抗体的感光球(50 μ g)与发光球(6.25 μ g), 加入 50 μ l 抗原与 100 μ l 作为检测缓冲液的 50mM MES 缓冲液(购自 Sigma) 混合。37 度温育 15 分钟后, 利用 PMT 光子计数器 (购自上海朋远泰生物技术有限公司) 读取光子数。结果列于表 2

表 2

	发光球粒径 (nm)	感光球粒径 (nm)	粒径比*	光子计数 ($\times 10^4$)	信号增加比	基质表面改性基团
比较例 3	197	197	1.00	32.00	1.00	环氧乙基
比较例 4	197	350	0.56	15.00	0.47	环氧乙基
实施例 2	197	140	1.41	132.00	4.13	环氧乙基
	197	100	1.97	298.00	9.31	环氧乙基
	197	40	4.93	325.00	10.16	环氧乙基
	350	40	8.75	343.00	10.72	环氧乙基

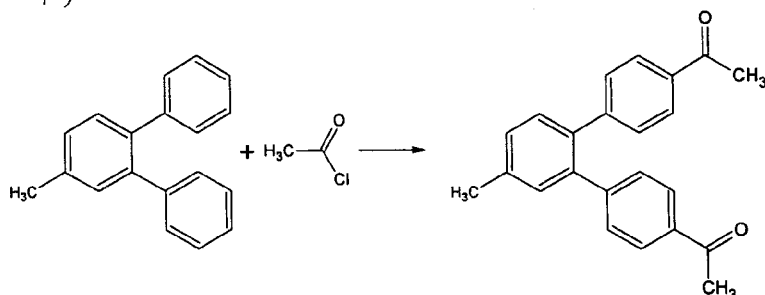
由表 2 的结果可见, 在其它条件不变的情况下, 改变发光微球和感光微球的粒径使发光微球的粒径大于感光微球的粒径, 可极大地提高发光效率, 从而提高

免疫分析的灵敏度。

实施例 3 和比较例 5 和 6

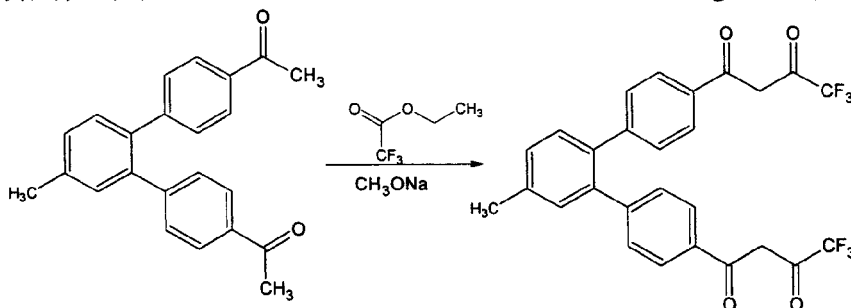
合成配位体化合物

- 5 (1), 2.5g 甲基邻苯基联苯溶解在 20 干燥的 CH_2Cl_2 溶液中, 加入 2.94g AlCl_3 , 然后冷却到 0°C 。在剧烈的搅拌下加入 2g 的 $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ 。滴加完成后反应在室温反应 1-2 小时。有机溶液用水洗三次, 然后用无水硫酸钠干燥。去除溶剂后得到 1.4g 产物(70%产率)



- 10 $^1\text{H NMR}$: 7.6-7.9 (多重峰, 7H), 2.1 (单重峰, 3H), 2.3(单重峰, 6H)

(2)上述 1.7g 上述产物溶解在 20ml 的无水乙醚中, 加入 1g 的 CH_3ONa (甲醇钠)及 2g $\text{CF}_3\text{-COOEt}$ (三氟乙酸乙酯)。让反应在室温下搅拌 2-3 小时。然后用水洗三次。有机层用无水硫酸钠干燥, 除去有机溶液后得到 1.6g 产物(产率 80%)



15

$^1\text{H NMR}$: 7.6-7.9 (多重峰, 7H), 4.5(单重峰, 4H), 2.1(单重峰, 3H)。

制造发光球

- 20 用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 本发明实施例 1 合成制得的含烯键化合物和 100mg 用上面配位体制得的铈配合物放入 197nm 的羧基改性后的乳胶颗粒(购自美国 Bangs Laboratories, Inc)中。

用同样的方法制得粒径为 350nm 的发光球。

包被抗体

取 10mL 上述制得的 197nm 发光球（20 mg/mL，50 mM MES 缓冲液，内部染料为所述含烯键化合物与所述铈配合物），加入 40mg NHS（4%，缓冲体系 0.05Mes buffer），20mg EDAC（4%，缓冲体系 50 mM MES 缓冲液）。室温搅拌反应 2 小时。Sorvall SA-600 转头 4℃ 离心 1 小时，转速为 15,000 rpm。离心后弃上清液，以 8mL 50 mM MES 缓冲液重悬浮。重复离心清洗三次。

取上述制备得到的发光球（25 mg/mL，50 mM MES 缓冲液，内部染料为所述含烯键化合物与本发明制得的铈配合物） 0.4ml，加入 5.72mg IgG1 按美国专利 5,780,646 实施例 3 所述制得的本发明发光球。

10 用同样的方法制得实施例 3 所述的 350nm 发光球。

制造感光球

15 用美国专利 5,780,646 的实施例所述的方法将 200mg 叶绿素 A 放入粒径分别为 197nm、350nm、140nm、100nm、40nm 的纳米颗粒(购自美国 Bangs Laboratories, Inc)中，并参照上述包被抗体的方法包被 IgG2，形成一组本发明感光球。用与实施例 1 相同的方法测定发光效率，结果列于表 3。

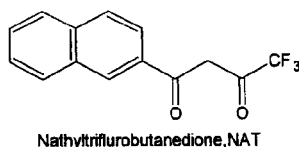
表 3

	发光球粒径 (nm)	感光球粒径 (nm)	粒径比	光子计数 ($\times 10^4$)	信号增加比	基质表面改性基团
比较例 5	197	197	1.00	36.00	1.00	COOH
比较例 6	197	350	0.56	19.00	0.53	COOH
实施例 3	197	140	1.41	152.00	4.22	COOH
	197	100	1.97	340.00	9.44	COOH
	197	40	4.93	372.00	10.33	COOH
	350	40	8.75	385.00	10.69	COOH

20 由表 3 的结果可见，在其它条件不变的情况下，改变发光微球和感光微球的粒径使发光微球的粒径大于感光微球的粒径，可极大地提高发光效率，从而提高免疫分析的灵敏度。

实施例 4 和比较例 7 和 8

使用与实施例 1 相同的方法制得发光微球和感光微球，但是在发光微球中使用下式三氟丁二酮萘作为铈配位体：



用与实施例 1 相同的方法测定发光效率，结果列于表 4。

表 4

	发光球粒径 (nm)	感光球粒径 (nm)	粒径比	光子计数 ($\times 10^4$)	信号增加比	基质表面改性基团
比较例 7	197	197	1.00	27.00	1.00	CHO
比较例 8	197	350	0.56	14.00	0.52	CHO
实施例 4	197	140	1.41	116.00	4.30	CHO
	197	100	1.97	260.00	9.63	CHO
	197	40	4.93	284.00	10.52	CHO
	350	40	8.75	295.00	10.93	CHO

- 5 由表 3 的结果可见，在其它条件不变的情况下，改变发光微球和感光微球的粒径使发光微球的粒径大于感光微球的粒径，可极大地提高发光效率，从而提高免疫分析的灵敏度。

实施例 5 和比较例 9 和 10

- 10 用与实施例 4 相同的方法制得发光微球和感光微球，但是使用羧基改性的微球基质（购自美国 Bangs Laboratories, Inc），结果列于表 5：

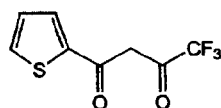
表 5

	发光球粒径 (nm)	感光球粒径 (nm)	粒径比*	光子计数 ($\times 10^4$)	信号增加比	基质表面改性基团
比较例 9	197	197	1.00	26.00	1.00	COOH
比较例 10	197	350	0.56	12.00	0.46	COOH
实施例 5	197	140	1.41	112.00	4.31	COOH
	197	100	1.97	250.00	9.62	COOH
	197	40	4.93	270.00	10.38	COOH
	350	40	8.75	280.00	10.77	COOH

实施例 6 和比较例 11 和 12

- 15 使用与实施例 2 相同的方法制得发光微球和感光微球，但是在发光微球中使

用下式化合物作为铈配位体：



Thiophenetri-fluorobutanedione (TTA)

用与实施例 1 相同的方法测定发光效率，结果列于表 5。

表 5

	发光球粒径 (nm)	感光球粒径 (nm)	粒径比	光子计数 ($\times 10^4$)	信号增加比	基质表面改性基团
比较例 11	197	197	1.00	23.00	1.00	环氧乙基
比较例 12	197	350	0.56	11.00	0.48	环氧乙基
实施例 6	197	140	1.41	102.00	4.43	环氧乙基
	197	100	1.97	220.00	9.57	环氧乙基
	197	40	4.93	238.00	10.35	环氧乙基
	350	40	8.75	252.00	10.96	环氧乙基

5 由上面数据可见，通过改变发光微球和感光微球这两者的粒径大小，可以增强发光效果。将发光球与感光球的粒径比率由 1 增加到 2，光子计数器的信号提高了近 10 倍。继续增加两者的粒径比率，信号值仍有一定程度的增加，但增强速率下降。另外，发光微球内部发光组合物、微球基质的组成等对光信号增强趋势无明显影响。

10 本发明组合物可有效提高化学发光的检测范围，提高检测的灵敏度与准确性，并使降低相关检测仪器的硬件配置成为可能。

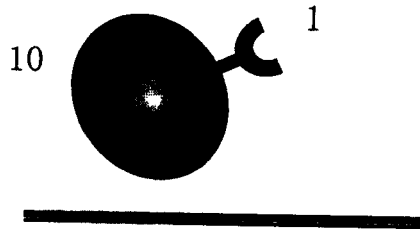


图 1a

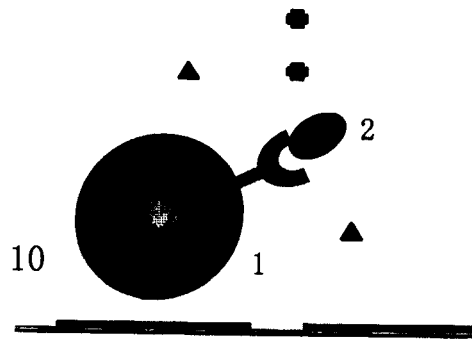


图 1b

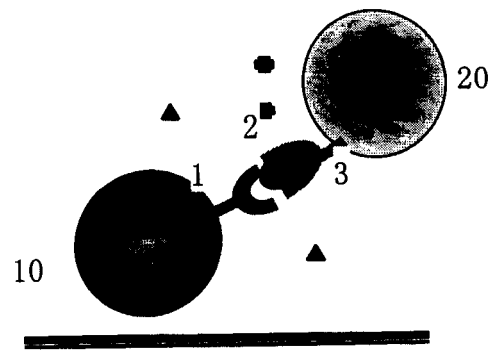


图 1c

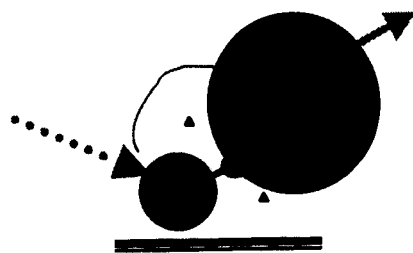


图 1d

专利名称(译)	用于免疫分析的微球组合物或组件及免疫分析方法		
公开(公告)号	CN1696695A	公开(公告)日	2005-11-16
申请号	CN200510025360.8	申请日	2005-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	上海朋远泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海朋远泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海朋远泰生物技术有限公司		
[标]发明人	何元		
发明人	何元		
IPC分类号	G01N33/538 G01N33/52		
代理人(译)	朱黎明		
其他公开文献	CN100445744C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种用于化学发光免疫分析的微球组合物或组件，它包括各自包被有抗体的感光微球和发光微球，其特征在于所述感光微球的粒径小于发光微球的粒径。还公开了使用本发明组合物或组件进行免疫分析的方法。

