



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106442971 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610795479.1

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130022 吉林省长春市人民大街5625号

(72)发明人 马姣 栾世方 殷敬华 石恒冲
宋凌杰

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

B82Y 30/00(2011.01)

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

一种免疫检测固相载体材料、其制备方法以及应用

(57)摘要

本发明提供了一种免疫检测固相载体材料,包括:纳米基底,和修饰于纳米基底表面的内层抗污聚合物刷层和外层抗体固定聚合物刷层。本发明利用内层抗污聚合物刷优异的亲水性,可有效减少蛋白在表面吸附,从而降低背景信号。同时由于纳米基底比表面积大以及外层抗体固定聚合物刷上大量的抗体固定单元,可以实现识别探针在表面的化学随机固定以及取向固定,最终制备得到的载体材料具有低背景以及高负载的特性。

1. 一种免疫检测固相载体材料,其特征在于,包括:纳米基底,和修饰于纳米基底表面的内层抗污聚合物刷层和外层抗体固定聚合物刷层。

2. 根据权利要求1所述的载体材料,其特征在于,所述抗污聚合物刷层由抗污单体聚合得到,所述抗污单体包括聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,2-羟基乙基甲基丙烯酸酯,1-乙烯基-2-吡咯烷酮,甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱,[3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵和2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸中的一种或多种;

所述抗体固定聚合物刷层由抗体固定单体聚合得到,所述抗体固定单体包括甲基丙烯酸,丙烯酸,甲基丙烯酸缩水甘油醚,2-乙烯基-4,4-二甲基-2-恶唑啉-5-酮,3-丙烯酰胺基苯硼酸,3-甲基丙烯酰胺基苯硼酸和烯丙基胺中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的载体材料,其特征在于,所述纳米基底、抗污聚合物刷层和抗体固定聚合物刷层的质量比为100:(20~60):(5~50)。

4. 根据权利要求1所述的载体材料,其特征在于,所述纳米基底为磁珠,上转换发光纳米粒子,碳纳米管或氧化锌纳米棒。

5. 一种免疫检测固相载体材料的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a) 将含苄基氯的偶联剂、二乙基二硫代氨基甲酸钠先后固定到纳米基底表面,得到可用于接枝聚合的基底;

b) 将步骤a)得到的基底与抗污单体进行聚合反应,得到抗污聚合物刷修饰的基底;

c) 将步骤b)得到的基底与抗体固定单体进行聚合反应,得到所述免疫检测固相载体材料。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述步骤b)具体为:

将步骤a)得到的基底分散在含抗污单体的溶液中,在紫外光照射的条件下进行聚合反应,得到抗污聚合物刷修饰的基底;

所述步骤c)具体为:

将步骤b)得到的基底分散在含抗体固定单体的溶液中,在紫外光照射的条件下进行聚合反应,得到所述免疫检测固相载体材料。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述抗污聚合物刷层由抗污单体聚合得到,所述抗污单体包括聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,2-羟基乙基甲基丙烯酸酯,1-乙烯基-2-吡咯烷酮,甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱,[3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵和2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸中的一种或多种;

所述抗体固定聚合物刷层由抗体固定单体聚合得到,所述抗体固定单体包括甲基丙烯酸,丙烯酸,甲基丙烯酸缩水甘油醚,2-乙烯基-4,4-二甲基-2-恶唑啉-5-酮,3-丙烯酰胺基苯硼酸,3-甲基丙烯酰胺基苯硼酸和烯丙基胺中的一种或多种。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述含苄基氯的偶联剂为4-氯甲基苯甲酰氯,3-氯甲基苯甲酰氯,4-氯甲基苯基异氰酸酯,4-氯甲基-1,3-苯二异氰酸酯和4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷中的任意一种或几种。

9. 权利要求1~4任一项所述的免疫检测固相载体材料或权利要求5~8任一项所述的制备方法制备的免疫检测固相载体材料在免疫分析、核酸分离提取、细胞分选或酶的固定中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,使用前在所述免疫检测固相载体材料表

面负载抗体。

一种免疫检测固相载体材料、其制备方法以及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,尤其涉及一种免疫检测固相载体材料、其制备方法以及应用。

背景技术

[0002] 利用抗原抗体间的特异性识别作用,免疫检测可以对体液中的微量物质进行检测,且具有灵敏度高,准确性好,以及特异性强的优点,在环境监测,疾病的预防以及治疗康复中扮演着重要角色。

[0003] 免疫检测平台种类很多,主要包括以酶联免疫试剂盒为代表的商业试剂盒,免疫传感器,微流控芯片以及即时检测设备四大类。目前这些免疫检测平台在复杂环境,如全血,100%血清以及血浆中进行微量识别时,均面临着非特异性蛋白含量高的问题,其浓度相对待测物质,可高达 $10^6\sim 10^7$ 倍。大量非特异性蛋白在检测溶液中的存在以及载体材料表面的吸附,会干扰并削弱抗原抗体间的特异性识别作用;同时标记信号分子的识别抗体在基底的吸附也会导致检测背景信号高,甚至出现假阳性结果;此外载体材料表面负载抗体的数量以及活性,也会影响最终免疫检测灵敏度。

[0004] 为了提高免疫检测灵敏度,研究者们设计了很多种可以用作免疫检测的固相载体。其中,凭借大的比表面积以及高的探针负载量,许多纳米材料,如四氧化三铁磁珠,碳纳米管,氧化锌纳米棒等均被用来构建三维纳米基底,从而提高检测信号。然而,纳米材料具有的高比表面积,在提高探针负载量的同时会导致非特异性蛋白吸附增强,导致高的背景信号,最终使信噪比降低。因此,构建一种既可以有效提高探针负载量,同时又能抑制非特异性蛋白吸附的免疫检测固相载体材料十分具有挑战性。

[0005] 中国发明专利103926398A公开了一种免疫磁珠的制备方法,其中将硅基磁珠与带有双端羧基的有机小分子反应制备得到羧基磁珠,随后直接进行抗体固定。中国发明专利104096548A公开的免疫磁珠制备方法中在惰性气氛中,将碱性溶液注入含有铁源和稳定剂的混合液中,得到磁性纳米粒子,随后在磁性纳米粒子表面直接修饰抗体。以上免疫磁珠表面均不具备良好的抗非特异性蛋白吸附性能,同时直接将抗体固定在免疫磁珠表面,抗体固定量有限且会导致抗体活性降低。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种免疫检测固相载体材料、其制备方法以及应用,制备的载体材料用于免疫检测时,背景信号低,负载量高,具有较高的检测灵敏度。

[0007] 本发明提供了一种免疫检测固相载体材料,包括:纳米基底,和修饰于纳米基底表面的内层抗污聚合物刷层和外层抗体固定聚合物刷层。

[0008] 优选的,所述抗污聚合物刷层由抗污单体聚合得到,所述抗污单体包括聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,2-羟基乙基甲基丙烯酸酯,1-乙炔基-2-吡咯烷酮,甲基丙烯酰乙基磺基甜

菜碱, [3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵和2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸中的一种或多种;

[0009] 所述抗体固定聚合物刷层由抗体固定单体聚合得到,所述抗体固定单体包括甲基丙烯酸,丙烯酸,甲基丙烯酸缩水甘油醚,2-乙炔基-4,4-二甲基-2-恶唑啉-5-酮,3-丙烯酰胺基苯硼酸,3-甲基丙烯酰胺基苯硼酸和烯丙基胺中的一种或多种。

[0010] 优选的,所述纳米基底、抗污聚合物刷层和抗体固定聚合物刷层的质量比为100:(20~60):(5~50)。

[0011] 优选的,所述纳米基底为磁珠,上转换发光纳米粒子,碳纳米管或氧化锌纳米棒。

[0012] 本发明还提供了一种免疫检测固相载体材料的制备方法,包括以下步骤:

[0013] a) 将含苄基氯的偶联剂、二乙基二硫代氨基甲酸钠先后固定到纳米基底表面,得到可用于接枝聚合的基底;

[0014] b) 将步骤a)得到的基底与抗污单体进行聚合反应,得到抗污聚合物刷修饰的基底;

[0015] c) 将步骤b)得到的基底与抗体固定单体进行聚合反应,得到所述免疫检测固相载体材料。

[0016] 优选的,所述步骤b)具体为:

[0017] 将步骤a)得到的基底分散在含抗污单体的溶液中,在紫外光照射的条件下进行聚合反应,得到抗污聚合物刷修饰的基底。

[0018] 所述步骤c)具体为:

[0019] 将步骤b)得到的基底分散在含抗体固定单体的溶液中,在紫外光照射的条件下进行聚合反应,得到所述免疫检测固相载体材料。

[0020] 优选的,所述抗污聚合物刷层由抗污单体聚合得到,所述抗污单体包括聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,2-羟基乙基甲基丙烯酸酯,1-乙炔基-2-吡咯烷酮,甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱, [3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵和2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸中的一种或多种;

[0021] 所述抗体固定聚合物刷层由抗体固定单体聚合得到,所述抗体固定单体包括甲基丙烯酸,丙烯酸,甲基丙烯酸缩水甘油醚,2-乙炔基-4,4-二甲基-2-恶唑啉-5-酮,3-丙烯酰胺基苯硼酸,3-甲基丙烯酰胺基苯硼酸和烯丙基胺中的一种或多种。

[0022] 优选的,所述含苄基氯的偶联剂为4-氯甲基苯甲酰氯,3-氯甲基苯甲酰氯,4-氯甲基苯基异氰酸酯,4-氯甲基-1,3-苯二异氰酸酯和4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷中的任意一种或几种。

[0023] 本发明还提供了上述免疫检测固相载体材料或上述制备方法制备的免疫检测固相载体材料在免疫分析、核酸分离提取、细胞分选或酶的固定中的应用。

[0024] 优选的,使用前在所述免疫检测固相载体材料表面负载抗体。

[0025] 与现有技术相比,本发明提供了一种免疫检测固相载体材料,包括:纳米基底,和修饰于纳米基底表面的内层抗污聚合物刷层和外层抗体固定聚合物刷层。本发明利用内层抗污聚合物刷优异的亲水性,可有效减少蛋白在表面吸附,从而降低背景信号。同时由于纳米基底比表面积大以及外层抗体固定聚合物刷上大量的抗体固定单元,可以实现识别探针在表面的化学随机固定以及取向固定,最终制备得到的载体材料具有低背景以及高负载

的特性。

[0026] 本发明还提供了上述载体材料的制备方法, 仅需将光引发剂固定在基底表面, 随后在紫外光照射下引发接枝聚合反应, 即可得到载体材料, 方法简单易操作, 适用性广。

具体实施方式

[0027] 本发明提供了一种免疫检测固相载体材料, 包括: 纳米基底, 和修饰于纳米基底表面的内层抗污聚合物刷层和外层抗体固定聚合物刷层。

[0028] 本发明提供的双层聚合物刷修饰的载体材料通过在紫外光照射下, 分别先后两次引发接枝抗污单体以及抗体固定单体聚合制备得到。

[0029] 由于本发明提供的载体材料具有抗污底层, 因此所制得的载体材料具有良好的亲水性, 可以均匀分散在水中, 同时有效减少非特异性蛋白在基底表面吸附。同时由于本发明提供的纳米基底比表面积大、且具有上层抗体固定层, 因此聚合物刷上存在的大量结合位点可以实现抗体化学固定并且进一步提高负载量, 因此本发明提供的载体材料不仅具有低的背景信号, 同时具有高的抗体负载量。

[0030] 上述修饰于基底表面的内层抗污聚合物刷层由抗污单体聚合得到, 所述抗污单体优选包括聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯, 2-羟基乙基甲基丙烯酸酯, 1-乙烯基-2-吡咯烷酮, 甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱, [3-(甲基丙烯酰氨基)丙基]二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵和2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸中的一种或多种。

[0031] 本发明利用抗污单体的亲水性, 使得到的内层抗污聚合物刷层可以减少非特异性蛋白在表面吸附。

[0032] 所述外层抗体固定聚合物刷层修饰于内层抗污聚合物刷层表面, 即所述载体材料的最外层。由抗体固定单体聚合得到, 所述抗体固定单体优选包括甲基丙烯酸, 丙烯酸, 甲基丙烯酸缩水甘油醚, 2-乙烯基-4, 4-二甲基-2-恶唑啉-5-酮, 3-丙烯酰胺基苯硼酸, 3-甲基丙烯酰胺基苯硼酸和烯丙基胺中的一种或多种。

[0033] 本发明利用上层中大量的抗体结合位点, 实现了抗体的化学固定以及高负载量。

[0034] 本发明中, 所述纳米基底、抗污聚合物刷层和抗体固定聚合物刷层的质量比优选为100:(20~60):(5~50), 更优选为100:(20~40):(10~50)。

[0035] 本发明对所述纳米基底并无特殊限定, 可以为本领域技术人员公知的适用于免疫检测的基底材料, 本发明优选为磁珠, 上转换发光纳米粒子, 碳纳米管或氧化锌纳米棒。更优选为四氧化三铁磁珠。

[0036] 磁珠不仅具有纳米结构的高比表面积特点, 同时具有超顺磁性, 在外界磁场作用下即可实现检测物质分离, 过程简便快速, 而且磁珠制备方法多, 磁珠种类多, 尺寸范围广, 且表面易于进行化学修饰, 因此在生物领域有着广泛的应用。本发明以磁珠作为基底, 制备的生物磁珠具有非常高的抗体负载量。

[0037] 所述磁珠的粒径优选为10nm~10 μ m。

[0038] 实验结果表明, 本发明制备得到的载体材料抗体负载量更大, 检测信号更强, 检测灵敏度同时增加。

[0039] 本发明还提供了上述免疫检测固相载体材料的制备方法, 包括以下步骤:

[0040] a) 将含苄基氯的偶联剂、二乙基二硫代氨基甲酸钠先后固定到纳米基底表面, 得

到可用于接枝聚合的基底；

[0041] b) 将步骤a) 得到的基底与抗污单体进行聚合反应, 得到抗污聚合物刷修饰的基底；

[0042] c) 将步骤b) 得到的基底与抗体固定单体进行聚合反应, 得到所述免疫检测固相载体材料。

[0043] 本发明首先将光引发剂含苄基氯的偶联剂、二乙基二硫代氨基甲酸钠两部分先后固定到纳米基底表面。

[0044] 优选的, 将纳米基底分散在无水甲苯中, 得到基底溶液, 然后将光引发剂含苄基氯的偶联剂溶解在上述基底溶液中, 氮气保护条件下, 回流反应, 得到固定含苄基氯的偶联剂的基底。随后将基底用甲苯溶液先后清洗3次, 分散在乙醇中备用。

[0045] 在本发明中, 所述含苄基氯的偶联剂与纳米基底反应的温度优选为40~100℃, 更优选为50~100℃, 最优选为60~80℃。反应时间优选为4~24h, 更优选为6~20h, 最优选为8~16h。

[0046] 本发明中, 所述含苄基氯的偶联剂优选为4-氯甲基苯甲酰氯, 3-氯甲基苯甲酰氯, 4-氯甲基苯基异氰酸酯, 4-氯甲基-1, 3-苯二异氰酸酯和4-(氯甲基) 苯基三甲氧基硅烷中的任意一种或几种, 更优选为4-(氯甲基) 苯基三甲氧基硅烷。

[0047] 得到固定含苄基氯的偶联剂的基底后, 本发明将其分散在乙醇中, 加入二乙基二硫代氨基甲酸钠反应, 最终得到固定引发剂的、可用于接枝聚合的基底。在本发明中, 所述二乙基二硫代氨基甲酸钠与固定了含苄基氯的偶联剂的基底反应的温度优选为20~80℃, 更优选为30~70℃, 最优选为40~60℃。所述反应时间优选为2~24h, 更优选为4~20h, 最优选为6~16h。

[0048] 得到可用于接枝聚合的基底后, 将其与抗污单体进行聚合反应, 在其表面引发抗污单体的聚合反应, 得到抗污聚合物刷修饰的基底。

[0049] 具体的, 将上述得到的基底分散在含抗污单体的溶液中, 在紫外光照射的条件下进行聚合反应, 得到抗污聚合物刷修饰的基底。

[0050] 优选的, 将抗污单体分散在溶剂中, 随后将上述得到的基底分散在上述溶液中, 置于紫外灯下照射, 得到内层抗污聚合物刷修饰的基底。在本发明中, 所述抗污单体的种类与上述技术方案中抗污单体的种类一致, 在此不再赘述。在本发明中, 所述反应溶剂优选为二甲苯, 甲苯, 四氢呋喃, N,N-二甲基甲酰胺和甲醇中的任意一种或多种, 更优选为二甲苯, 四氢呋喃, N,N-二甲基甲酰胺, 甲醇, 最优选为四氢呋喃, N,N-二甲基甲酰胺或甲醇。在本发明中, 所述基底在溶剂中的浓度优选为0.1~10mg/mL, 更优选为0.5~8mg/mL, 最优选为1~5mg/mL。所述抗污单体在溶剂中的浓度优选为5%~50%, 更优选为5%~40%, 最优选为10%~30%。上述浓度, 对于液体而言, 为体积百分含量; 对于固体而言, 为质量含量。

[0051] 在本发明中, 所述紫外灯的光源优选为低压汞灯、中压汞灯、高压汞灯、碘钨灯和加滤光片中的一种或几种, 所述紫外光的主透过波长优选为180~450nm, 更优选为200~400nm, 所述紫外照射时间优选为10~60min, 更优选为10~50min, 最优选为20~40min。

[0052] 本发明优选的, 完成所述抗污单体在基底表面的接枝聚合反应后, 将反应所得基底材料在摇床振荡条件下, 依次采用丙酮, 乙醇进行清洗, 得到清洗后的基底。

[0053] 得到抗污聚合物刷修饰的基底后, 将其与抗体固定单体进行聚合反应, 得到修饰

有抗污聚合物刷层和抗体固定聚合物刷层的免疫检测固相载体材料。

[0054] 具体的,将其分散在含抗体固定单体的溶液中,在紫外光照射的条件下进行聚合反应。

[0055] 本发明优选的,将内层抗污聚合物刷修饰的基底分散在溶剂中,加入抗体固定单体于上述基底溶液中,紫外灯照射,最终即得到修饰有抗污聚合物刷层和抗体固定聚合物刷层的固相载体材料。在本发明中,所述抗体固定单体的种类与上述技术方案中抗体固定单体的种类一致,在此不再赘述。在本发明中,所述反应溶剂优选为二甲苯,甲苯,四氢呋喃,N,N-二甲基甲酰胺,甲醇和水中的一种或多种,更优选为二甲苯,四氢呋喃,N,N-二甲基甲酰胺,甲醇或水,最优选为四氢呋喃,N,N-二甲基甲酰胺,甲醇或水。在本发明中,所述内层抗污聚合物刷修饰的基底在溶剂中的浓度优选为0.1~10mg/mL,更优选为0.5~8mg/mL,最优选为1~5mg/mL。所述抗体固定单体在溶剂中的浓度优选为5%~50%,更优选为5%~40%,最优选为5%~20%。上述浓度,对于液体而言,为体积百分含量;对于固体而言,为质量含量。

[0056] 在本发明中,所述紫外灯的光源优选为低压汞灯、中压汞灯、高压汞灯、碘钨灯和加滤光片中的一种或几种,所述紫外光的主透过波长优选为180~450nm,更优选为200~400nm,所述紫外照射时间优选为5~40min,更优选为5~35min,最优选为10~30min。

[0057] 完成上述反应后,本发明优选将上述双层聚合物刷修饰的载体材料进行清洗,清洗步骤与上述内层抗污聚合物刷修饰磁珠的清洗步骤一致,在此不再赘述。

[0058] 本发明提供的制备方法仅需将固定光引发剂的基底材料与接枝单体分散在溶液中,先后两次置于紫外光照射下进行接枝聚合反应,条件温和,反应速度快,不需额外催化剂,无其他副反应。且所需设备简单,方法易操作,有很好的应用前景。

[0059] 本发明还提供了上述免疫检测固相载体材料在免疫分析、核酸分离提取、细胞分选、或者酶的固定中的应用。

[0060] 本发明优选的,使用前在所述免疫检测固相载体材料表面负载抗体。

[0061] 具体的,将上述免疫检测固相载体材料与抗体溶液反应,进行抗体固定,最终得到免疫检测材料。

[0062] 在本发明中,所述缓冲溶液优选为磷酸盐缓冲液,4-羟乙基哌嗪乙磺酸和三(羟甲基)氨基甲烷中的任意一种或多种,更优选为磷酸盐缓冲液或4-羟乙基哌嗪乙磺酸;所述抗体的浓度优选为10~500 μ g/mL,更优选为50~300 μ g/mL,最优选为50~200 μ g/mL。所述反应温度优选为25~45 $^{\circ}$ C,最优选为37 $^{\circ}$ C;反应时间优选为2~24h,更优选为2~16h,最优选为6~12h。

[0063] 反应结束后,本发明优选的,将上述制备得到的双层聚合物刷修饰的免疫检测用含有0.05% Tween的磷酸盐缓冲液进行清洗,清洗后分散于磷酸盐缓冲液中,4 $^{\circ}$ C下保存备用。

[0064] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的免疫检测固相载体材料、其制备方法以及应用进行详细描述。

[0065] 实施例1

[0066] 三颈瓶中加入光引发剂4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷0.1g,100nm四氧化三铁磁珠50mg,二甲苯50mL,搅拌使磁珠充分分散。氮气保护下,密封进行反应,温度升高至60 $^{\circ}$ C,

回流6h。反应完毕,冷却至室温,二甲苯清洗三次,得到固定了4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷的磁珠。

[0067] 将50mg的4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷修饰磁珠分散在乙醇中,随后加入0.1g二乙基二硫代氨基甲酸钠,回流反应24h。反应完毕,冷却至室温,乙醇清洗三次,最终将固定了引发剂的磁珠保存备用。

[0068] 将固定了引发剂的磁珠分散在二甲苯中,浓度为10mg/mL,随后加入抗污单体聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,浓度为5% (v/v)。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射10min。丙酮、乙醇依次分别清洗30min,得到内层抗污聚合物刷修饰的磁珠。

[0069] 将上述内层抗污聚合物刷修饰的磁珠分散在二甲苯中,浓度5mg/mL,随后加入抗体固定单体单元甲基丙烯酸缩水甘油醚,浓度10% (v/v)。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射6min。丙酮、乙醇依次分别清洗30min,制得双层聚合物刷修饰的磁珠。

[0070] 取上述双层聚合物刷修饰的磁珠10mg,分散至磷酸盐缓冲液(pH=7.5)中,加入抗体,浓度为10 μ g/mL,45 $^{\circ}$ C下反应2h,在磁珠表面负载上抗体,制得免疫磁珠。将上述免疫磁珠在0.05% Tween的磷酸盐缓冲液中清洗1h,分散在PBS中,保存备用。

[0071] 本发明采用荧光标记蛋白对磁珠的非特异性蛋白吸附进行研究。以异硫氰酸荧光素标记牛血清白蛋白以及罗丹明标记纤维蛋白原为代表。首先取上述制得的免疫磁珠1mg,分散至含1mg/mL的异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白(或100 μ g/mL罗丹明标记纤维蛋白原)的PBS溶液中,37 $^{\circ}$ C下摇床吸附2h,随后PBS溶液清洗3次,每次10min,后分散至1mL PBS溶液中。取吸附荧光蛋白后的磁珠溶液200 μ L,加至黑色酶标板中,测试其荧光强度。荧光强度扫描采用多功能酶标仪(Biotek, Synergy H1)进行,其中对于异硫氰酸荧光素的测试条件为激发波长488nm,发射波长为520nm, gain值为100。对于罗丹明B标记纤维蛋白原样品的测试条件为激发波长560nm,发射波长为590nm。每种样品测试五个重复样品,记录荧光强度平均值。所得结果如表1所示,表1为本发明实施例以及比较例中,免疫磁珠上非特异性蛋白吸附量。

[0072] 本发明对抗体固定量的评价采用Alexa Fluor 555标记的二抗进行识别负载抗体,通过读取负载在磁珠表面抗体的荧光强度以及标准曲线计算,最后计算得到每毫克磁珠表面抗体负载量 μ g。首先取上述制得的免疫磁珠1mg,分散至含10 μ g/mL的Alexa Fluor 555标记的二抗溶液中,37 $^{\circ}$ C下摇床识别30min,随后PBS溶液清洗3次,每次5min,后分散至1mL PBS溶液中。取识别二抗后的磁珠溶液200 μ L,加至黑色酶标板中,测试其荧光强度。荧光强度扫描采用多功能酶标仪(Biotek, Synergy H1)进行,其中对于Alexa Fluor 555的测试条件为激发波长555nm,发射波长为590nm, gain值为100。每种样品测试五个重复样品,取平均值。配制1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL, 40 μ g/mL, 50 μ g/mL, 60 μ g/mL, 70 μ g/mL, 80 μ g/mL, 90 μ g/mL, 100 μ g/mL的Alexa Fluor 555标记的二抗溶液,测试其荧光强度,得到荧光强度与浓度的标准曲线,从而计算出免疫磁珠上抗体固定量。所得结果如表2所示,表2为本发明实施例以及比较例中,免疫磁珠上抗体负载量。

[0073] 实施例2

[0074] 三颈瓶中加入光引发剂4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷0.1g, 200nm四氧化三铁磁珠50mg, 二甲苯50mL, 搅拌使磁珠充分分散。氮气吹扫瓶内空气30min, 随后氮气保护, 反应密封, 温度升高至60 $^{\circ}$ C, 回流6h。反应完毕, 冷却至室温, 二甲苯清洗三次, 得到固定了4-(氯

甲基) 苯基三甲氧基硅烷的磁珠。

[0075] 将50mg的4-(氯甲基) 苯基三甲氧基硅烷修饰磁珠分散在乙醇中, 随后加入0.1g二乙基二硫代氨基甲酸钠, 温度升高至50℃, 回流反应24h。反应完毕, 冷却至室温, 乙醇清洗三次, 最终将固定引发剂的磁珠保存备用。

[0076] 将固定了引发剂的磁珠分散在二甲苯中, 浓度为5mg/mL, 随后加入抗污单体1-乙炔基-2-吡咯烷酮, 浓度为5% (v/v)。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射10min。丙酮乙醇先后清洗30min, 得到内层抗污聚合物刷修饰的磁珠。

[0077] 将上述内层抗污聚合物刷修饰磁珠分散在水中, 浓度5mg/mL, 随后加入抗体固定单体丙烯酸, 浓度10% (v/v)。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射6min。丙酮、乙醇先后清洗30min, 制得双层聚合物刷修饰的磁珠。

[0078] 取上述双层聚合物刷修饰的磁珠10mg, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐0.4g, N-羟基琥珀酰亚胺0.1g, 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸0.2g, 分散至10mL水中, 25℃下活化30min, 反应完毕后水清洗。将上述活化磁珠加入抗体的PBS溶液中, 浓度为10μg/mL, 37℃下反应2h, 在磁珠表面负载上抗体, 制得免疫磁珠。将上述免疫磁珠在0.05% Tween的磷酸盐缓冲液中清洗1h, 分散在PBS中, 保存备用。

[0079] 本发明按照实施例1中的方法测试了本实施例2得到的免疫磁珠的非特异性蛋白吸附以及抗体固定量。所得结果如表1和表2所示。

[0080] 实施例3

[0081] 三颈瓶中加入光引发剂4-(氯甲基) 苯基三甲氧基硅烷0.1g, 500nm四氧化三铁磁珠50mg, 二甲苯50mL, 搅拌使磁珠充分分散。氮气吹扫瓶内空气30min, 随后氮气保护, 反应密封, 温度升高至60℃, 回流6h。反应完毕, 冷却至室温, 二甲苯清洗三次, 得到固定了4-(氯甲基) 苯基三甲氧基硅烷的磁珠。

[0082] 将50mg的4-(氯甲基) 苯基三甲氧基硅烷修饰磁珠分散在乙醇中, 随后加入0.1g二乙基二硫代氨基甲酸钠, 温度升高至50℃, 回流反应24h。反应完毕, 冷却至室温, 乙醇清洗三次, 最终将固定引发剂的磁珠保存备用。

[0083] 将固定了引发剂的磁珠分散在甲醇中, 浓度为5mg/mL, 随后加入抗污单体甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱, 浓度为5wt%。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射10min。丙酮、乙醇先后清洗30min, 得到内层抗污聚合物刷修饰的磁珠。

[0084] 将上述内层抗污聚合物刷修饰的磁珠分散在N,N-二甲基甲酰胺中, 浓度5mg/mL, 随后加入抗体固定单体单元3-丙烯酰胺基苯硼酸, 浓度10wt%。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射6min。丙酮、乙醇先后清洗30min, 制得双层聚合物刷修饰的磁珠。

[0085] 取上述双层聚合物刷修饰的磁珠10mg, 加至10mL的4-羟乙基哌嗪乙磺酸(pH=8.5)的缓冲液中, 加入抗体, 浓度为10μg/mL, 37℃下反应6h, 在磁珠表面负载上抗体, 制得免疫磁珠。将上述免疫磁珠在0.05% Tween的磷酸盐缓冲液中清洗1h, 分散在PBS中, 保存备用。

[0086] 本发明按照实施例1中的方法测试了本实施例3得到的免疫磁珠的非特异性蛋白吸附以及抗体固定量。所得结果如表1和表2所示。

[0087] 实施例4

[0088] 三颈瓶中加入光引发剂4-(氯甲基) 苯基三甲氧基硅烷0.1g, 1μm磁珠50mg, 二甲苯

50mL, 搅拌使磁珠充分分散。氮气吹扫瓶内空气30min, 随后氮气保护, 反应密封, 温度升高至60℃, 超声搅拌回流6h。反应完毕, 冷却至室温, 磁铁分离, 二甲苯清洗三次, 得到固定了4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷的磁珠。

[0089] 将50mg的4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷修饰磁珠分散在乙醇中, 随后加入0.1g二乙基二硫代氨基甲酸钠, 温度升高至50℃, 回流反应24h。反应完毕, 冷却至室温, 乙醇清洗三次, 最终将固定引发剂的磁珠保存备用。

[0090] 将固定了引发剂的磁珠分散在甲醇中, 浓度为5mg/mL, 随后加入抗污单体甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱, 浓度为5wt%。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射10min。丙酮乙醇先后清洗30min, 得到底层抗污聚合物刷修饰的磁珠。

[0091] 将上述底层抗污聚合物刷修饰磁珠分散在二甲苯中, 浓度5mg/mL, 随后加入抗体固定单元2-乙烯基-4,4-二甲基-2-恶唑啉-5-酮, 浓度10% (v/v)。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射6min。丙酮清洗30min, 制得双层聚合物刷修饰的磁珠。

[0092] 取上述双层聚合物刷修饰的磁珠10mg, 加至10mL磷酸盐缓冲液中, 加入抗体, 浓度为10μg/mL, 37℃下反应2h, 在磁珠表面负载上抗体, 制得免疫磁珠。将上述免疫磁珠在0.05% Tween的磷酸盐缓冲液中清洗1h, 分散在PBS中, 保存备用。

[0093] 本发明按照实施例1中的方法测试了本实施例4得到的免疫磁珠的非特异性蛋白吸附以及抗体固定量。所得结果如表1和表2所示。

[0094] 比较例1

[0095] 三颈瓶中加入环氧丁基三甲氧基硅烷0.1g, 100nm磁珠50mg, 二甲苯50mL, 搅拌使磁珠充分分散。氮气吹扫瓶内空气30min, 随后氮气保护, 反应密封, 温度升高至60℃, 回流6h。反应完毕, 冷却至室温, 磁分离, 二甲苯乙醇先后清洗三次, 得到固定了环氧丁基三甲氧基硅烷的磁珠。

[0096] 取上述固定了环氧丁基三甲氧基硅烷的磁珠10mg, 分散至磷酸盐缓冲液 (pH=7.5) 中, 加入抗体, 浓度为10μg/mL, 45℃下反应2h, 在磁珠表面负载上抗体, 制得免疫磁珠。将上述免疫磁珠在0.05% Tween的磷酸盐缓冲液中清洗1h, 分散在PBS中, 保存备用。

[0097] 本发明按照实施例1中的方法测试了本比较例1得到的免疫磁珠的非特异性蛋白吸附以及抗体固定量。所得结果如表1和表2所示。

[0098] 比较例2

[0099] 三颈瓶中加入光引发剂4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷0.1g, 100nm磁珠50mg, 二甲苯50mL, 搅拌使磁珠充分分散。氮气吹扫瓶内空气30min, 随后氮气保护, 反应密封, 温度升高至60℃, 回流6h。反应完毕, 冷却至室温, 二甲苯清洗三次, 得到固定了4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷的磁珠。

[0100] 将50mg的4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷修饰磁珠分散在乙醇中, 随后加入0.1g二乙基二硫代氨基甲酸钠, 温度升高至50℃, 回流反应24h。反应完毕, 冷却至室温, 乙醇清洗三次, 最终将固定引发剂的磁珠保存备用。

[0101] 将固定了引发剂的磁珠分散在二甲苯中, 浓度为5mg/mL, 随后加入抗污单体聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯, 浓度为5% (v/v)。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射10min。丙酮乙醇先后清洗30min, 得到抗污底层修饰的磁珠。

[0102] 本发明按照实施例1中的方法测试了本比较例2得到的免疫磁珠的非特异性蛋白

吸附以及抗体固定量。所得结果如表1和表2所示。

[0103] 比较例3

[0104] 三颈瓶中加入光引发剂4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷0.1g,100nm磁珠50mg,二甲苯50mL,超声同时搅拌使磁珠充分分散。氮气吹扫瓶内空气30min,随后氮气保护,反应密封,温度升高至60℃,超声搅拌回流6h。反应完毕,冷却至室温,磁分离,二甲苯清洗三次,得到固定了4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷的磁珠。

[0105] 将50mg的4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷修饰磁珠分散在乙醇中,随后加入0.1g二乙基二硫代氨基甲酸钠,温度升高至50℃,回流反应24h。反应完毕,冷却至室温,乙醇清洗三次,最终将固定引发剂的磁珠分散在乙醇中,避光保存备用。

[0106] 将上述固定引发剂的磁珠分散在二甲苯中,浓度5mg/mL,随后加入抗体固定单体丙烯酸,浓度10%(v/v)。随后将反应溶液置于300W高压汞灯下照射6min。丙酮乙醇先后清洗30min,制得双层聚合物刷修饰的磁珠。

[0107] 取上述双层聚合物刷修饰的磁珠10mg,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐0.4g,N-羟基琥珀酰亚胺0.1g,2-(N-吗啡啉)乙磺酸0.2g,分散至10mL水中,25℃下活化30min,反应完毕后水清洗。将上述活化磁珠加入抗体的PBS溶液中,浓度为10μg/mL,37℃下反应2h,在磁珠表面负载上抗体,制得免疫磁珠。将上述免疫磁珠在0.05%Tween的磷酸盐缓冲液中清洗1h,分散在PBS中,保存备用。

[0108] 本发明按照实施例1中的方法测试了比较例3得到的免疫磁珠的非特异性蛋白吸附以及抗体固定量。所得结果如表1和表2所示。

[0109] 表1免疫磁珠上非特异性蛋白吸附

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	比较例 1	比较例 2	比较例 3
[0110] 牛血清 白蛋白 (a.u.)	320	357	51	57	2453	285	1772
纤维蛋	235	261	23	31	1956	198	1634
[0111] 白原 (a.u.)							

[0112] 表2免疫磁珠上抗体负载量

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	比较例 1	比较例 2	比较例 3
[0113] 抗体负 载量 (μg/mg)	132	154	84	213	17	2	173

[0114] 从表1可以看出,对于比较例1,无聚合物刷修饰的环氧官能团修饰的磁珠表面抗体固定量为每毫克磁珠上固定17 μ g,牛血清白蛋白吸附后产生的荧光强度为2453a.u.,纤维蛋白原吸附产生的荧光强度1956a.u.。对于比较例2,接枝单层抗污聚合物刷聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯后的磁珠表面则蛋白吸附减少,对于牛血清白蛋白,荧光强度为285a.u.,对于纤维蛋白原,荧光强度为198a.u.,表明亲水性分子刷修饰磁珠表面后,蛋白吸附量得到抑制,然而由于没有抗体固定单元,其抗体负载量仅有2 μ g/mg。而对于比较例3,只接枝单层抗体固定层丙烯酸后,抗体固定量明显增加,达到173 μ g/mg,然而由于其不具有抗非特异性蛋白吸附性能,因此同时引起非特异性蛋白吸附增加,对于牛血清白蛋白,荧光强度达到1772a.u.,对于纤维蛋白原,荧光强度达到1634a.u.。相对以上三个比较例,对于实施例1,由于聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯底层的存在,其可以有效抑制蛋白吸附,对于牛血清白蛋白,荧光强度为320a.u.,对于纤维蛋白原,荧光强度为235a.u.,同时由于上层抗体固定高分子刷聚甲基丙烯酸缩水甘油醚的引入,其具有更高的抗体负载量,达到132 μ g/mg的负载量。其他实施例,也表现出低的背景吸附和高的抗体负载量。

[0115] 由上述实施例及比较例可知,本发明制备得到的免疫磁珠抗体负载量可以高达,每毫克磁珠上负载213 μ g抗体,同时背景吸附可降低90%。

[0116] 本发明提供的制备方法简单方便,条件温和,成本低,适合大规模生产。

[0117] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

专利名称(译)	一种免疫检测固相载体材料、其制备方法以及应用		
公开(公告)号	CN106442971A	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201610795479.1	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
[标]发明人	马姣 栾世方 殷敬华 石恒冲 宋凌杰		
发明人	马姣 栾世方 殷敬华 石恒冲 宋凌杰		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 B82Y30/00		
CPC分类号	G01N33/543 B82Y30/00 G01N33/531 G01N33/54333 G01N33/54393		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫检测固相载体材料，包括：纳米基底，和修饰于纳米基底表面的内层抗污聚合物刷层和外层抗体固定聚合物刷层。本发明利用内层抗污聚合物刷优异的亲水性，可有效减少蛋白在表面吸附，从而降低背景信号。同时由于纳米基底比表面积大以及外层抗体固定聚合物刷上大量的抗体固定单元，可以实现识别探针在表面的化学随机固定以及取向固定，最终制备得到的载体材料具有低背景以及高负载的特性。

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	比较例 1	比较例 2	比较例 3
牛血清白蛋白 (a.u.)	320	357	51	57	2453	285	1772
纤维蛋	235	261	23	31	1956	198	1634