



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103333299 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201310293616. 8

(22) 申请日 2013. 07. 12

(73) 专利权人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路 2 号

(72) 发明人 余玲 史转转 李长明

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

C08F 290/06(2006. 01)

C08F 220/32(2006. 01)

C08F 220/28(2006. 01)

C12N 11/08(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

C07K 1/22(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

B01D 15/38(2006. 01)

(56) 对比文件

李澧等. 紫外辐射共聚制备含环氧基团的多孔聚合物及其在固定化酶上的应用. 《辐射研究与辐射工艺学报》. 2013, 第 31 卷 (第 1 期), 第 010304-1 到 010304-5 页.

李澧等. 紫外辐射共聚制备含环氧基团的多孔聚合物及其在固定化酶上的应用. 《辐射研究与辐射工艺学报》. 2013, 第 31 卷 (第 1 期), 第 010304-1 到 010304-5 页.

审查员 杜田

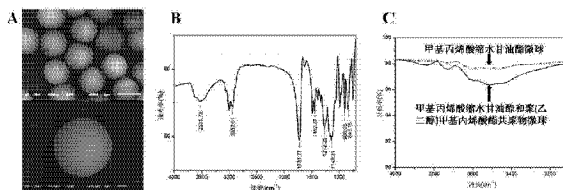
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球及其制备方法和应用,该共聚物微球由甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯按质量比为 1:1-1:10 聚合而成,共聚物微球直径为 4-6 微米,其制备方法简单,以溴离子为引发剂,诱发甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯进行交联、聚合,在液相中形成共聚物微球,制得的微球表面富含能够与蛋白质上的氨基直接进行共价结合的环氧基和亲水基团羧基,可吸附抗体、抗原、酶等蛋白质分子,在免疫分析、抗体纯化、葡萄糖检测等方面均有广泛应用。



1. 甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的制备方法,其特征在于,所述共聚物微球由甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯按体积比为1:1-1:10聚合而成,直径为4-6微米;其制备方法为:

a. 向体积分数为10-40%的甲醇溶液或体积分数为10-30%的乙醇溶液中加入溴化铜和联吡啶,记为混合溶液A;

b. 向步骤a所得混合溶液A中加入相当混合溶液A体积2~10%的甲基丙烯酸缩水甘油酯,还原剂和分散剂,混合均匀后倒入反应容器中,封口后在低于100转/分钟条件下避光反应至少0.5小时,得混合溶液B;所述还原剂为抗坏血酸水溶液,所述分散剂为柠檬酸钠水溶液或聚乙烯吡咯烷酮;

c. 向步骤b所得混合溶液B中加入相当于混合溶液A体积10%~20%的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,然后补加抗坏血酸水溶液,封口后继续在低于100转/分钟条件下避光反应至少0.5小时,倒掉废液,将反应容器底部聚合物先用乙醇清洗,再用水清洗,然后收集聚合物收集放入离心管中,最后加入无水乙醇置于振荡器上震荡,即得甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述步骤a中,混合溶液A中溴化铜的终浓度为3.35mg/mL,联吡啶的浓度为4.6mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述步骤a中,所述甲醇溶液的体积分数为20-30%。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述步骤b中,甲基丙烯酸缩水甘油酯的加入量相当于混合溶液A体积的5%。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的制备方法,其特征在于:所述步骤b中,抗坏血酸水溶液加入量是至抗坏血酸的终浓度为32mg/mL,柠檬酸钠水溶液加入量是至柠檬酸钠终浓度为0.06mg/mL,聚乙烯吡咯烷酮加入量是至聚乙烯吡咯烷酮的浓度为4-10mg/mL。

甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚（乙二醇）甲基丙烯酸酯共聚物微球及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于高分子领域,具体涉及甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚（乙二醇）甲基丙烯酸酯共聚物微球及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 聚合物微球是指具有圆球形且粒径在数十纳米到数百微米尺度范围内的聚合物粒子,如聚苯乙烯微球,聚甲基丙烯酸酯微球、聚丙烯酰胺微球、聚苯乙烯微球、聚丙烯腈微球以及聚对氯甲基苯乙烯微球等。由于聚合物微球具有体积小、比表面积大、稳定性和渗透性好等优点,因此化工、涂料、纸张表面涂层等领域得到了广泛的应用。近年聚合物微球开始作为固定酶、细胞、蛋白的载体,并在生物技术的应用中获得了成功,例如:作为蛋白质和其他生物活性物质的分析纯化的介质,作为细胞分选、蛋白芯片的介质等。

[0003] 但是,现有大部分聚合物微球的合成需要较为复杂的实验操作,并且合成得到的微球表面缺乏活性化学基团。为了进行蛋白和其他生物分析的固定,需要对微球进行进一步的化学处理,引入功能化基团。此外,通过聚合两种或两种以上高分子材料以获得共聚物微球报道较少,其相应的应用开发也鲜有研究报告。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚（乙二醇）甲基丙烯酸酯共聚物微球;本发明的目的之二在于提供上述共聚物微球的制备方法;本发明的目的之三在于提供上述共聚物微球的应用。

[0005] 为实现上述发明目的,技术方案为:

[0006] 1. 甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚（乙二醇）甲基丙烯酸酯共聚物微球,由甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚（乙二醇）甲基丙烯酸酯按体积比为 1:1-1:10 聚合而成,直径为 4-6 微米。

[0007] 优选的,甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚（乙二醇）甲基丙烯酸酯的体积比为 1:2-1:4。

[0008] 更优选的,在 400-4000 cm^{-1} 进行傅立叶转换红外光谱,吸收峰分别在:2952 cm^{-1} 、1731 cm^{-1} 、1452 cm^{-1} 、1272 cm^{-1} 、1149 cm^{-1} ,及 906 cm^{-1} ,843 cm^{-1} 处的环氧键特征吸收峰和 3531 cm^{-1} 处的羟基特征吸收峰。

[0009] 2、所述甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚（乙二醇）甲基丙烯酸酯共聚物微球的制备方法,包括如下步骤:

[0010] a. 向体积分数为 10-40%的甲醇溶液或体积分数为 10-30%的乙醇溶液中加入溴化铜和联吡啶,记为混合溶液 A;

[0011] b. 向步骤 a 所得混合溶液 A 中加入相当混合溶液 A 体积 2~10%的甲基丙烯酸缩水甘油酯,还原剂和分散剂,混合均匀后倒入反应容器中,封口后在低于 100 转/分钟条件

下避光反应至少 0.5 小时,得混合溶液 B;所述还原剂为抗坏血酸水溶液,所述分散剂为柠檬酸钠水溶液或聚乙烯吡咯烷酮;

[0012] c. 向步骤 b 所得混合溶液 B 中加入相当于混合溶液 A 体积 10%~20% 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,然后补加抗坏血酸水溶液,封口后继续在低于 100 转/分钟条件下避光反应至少 0.5 小时,倒掉废液,将反应容器底部聚合物先用乙醇清洗,再用水清洗,然后收集聚合物收集放入离心管中,最后加入无水乙醇置于振荡器上震荡,即得甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球。

[0013] 其中步骤 b 和步骤 c 的避光反应优选为 0.5~6 小时,避光反应时转速优选 45~65 转/分钟,最佳为 65 转/分钟,在此条件下形成的共聚物微球直径均一性好。

[0014] 优选的,所述步骤 a 中,混合溶液 A 中溴化铜的终浓度为 3.35mg/mL,联吡啶的浓度为 4.6mg/mL。

[0015] 优选的,所述步骤 a 中,所述甲醇溶液的体积分数为 20~30%。

[0016] 优选的,所述步骤 b 中,甲基丙烯酸缩水甘油酯的加入量相当于混合溶液 A 体积的 5%。

[0017] 更优选的,所述步骤 b 中,抗坏血酸水溶液加入量是至抗坏血酸的终浓度为 32mg/mL,柠檬酸钠水溶液加入量是至柠檬酸钠终浓度为 0.06mg/mL,聚乙烯吡咯烷酮加入量是至聚乙烯吡咯烷酮的浓度为 4~10mg/mL。

[0018] 3. 所述甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球在制备固相载体中的应用。

[0019] 优选的,所述固相载体为免疫分析载体、亲和层析载体或固定酶的载体。

[0020] 本发明的有益效果:本发明公开了甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球,以甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯为结构单元,通过简便、低成本的溴离子引发聚合制得一种具有表面环氧基和羟基功能基团的共聚物微球,该微球中的环氧基可与蛋白质中的氨基发生缩合反应可将蛋白质通过共价键的方式固定在共聚物微球表面;利用本发明制备的共聚物微球简化了用化学方法对微球进行活化步骤,方便引入功能化基团以实现蛋白质共价结合固定;同时,由于共聚物微球表面的羟基可以增加微球的亲水性,它不仅可以降低由疏水键介导的生物分子非特异性吸附于微球表面,还可以提高溶液中的待检测物接触到固定于微球表面的探针蛋白的机率;该共聚物微球通过与抗体、抗原、proteinA/G/L、葡糖糖氧化酶等蛋白的结合,可以得到分别用于免疫分析的免疫微球、抗体纯化的亲和层析微球和检测葡糖糖浓度的酶反应微球,使该微球在微生物、病原体、食品安全检测、抗体纯化、葡糖糖检测等方面均有广泛应用。

附图说明

[0021] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图:

[0022] 图 1 为甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的扫描电子显微镜照片和 FTIR 图谱(A:共聚物微球电子显微镜照片;B:共聚物微球 FTIR 图谱;C:甲基丙烯酸缩水甘油酯制成的聚和物微球与甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯生成的共聚物微球 FTIR 图谱)。

[0023] 图 2 为不同转速下制备共聚物微球的扫描电子显微镜图(A:摇床转速为 0 转/分钟;

B:摇床转速为 40 转 / 分钟 ;C:摇床转速为 65 转 / 分钟 ;D:摇床转速为 100 转 / 分钟)。

[0024] 图 3 为不同甲醇浓度下生成的甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的扫描电子显微镜图(A:体积分数 10% 的甲醇 ;B:体积分数 20% 的甲醇 ;C:体积分数 25% 的甲醇 ;D:体积分数 30% 的甲醇 ;E:体积分数 40% 的甲醇 ;F:体积分数 50% 的甲醇 ;G:体积分数 60% 的甲醇 ;H:体积分数 70% 的甲醇)。

[0025] 图 4 为不同乙醇浓度下生成的甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的扫描电子显微镜图(A:体积分数 10% 的乙醇 ;B:体积分数 25% 的乙醇 ;C:体积分数 30% 的乙醇 ;D:体积分数 40% 的乙醇 ;E:体积分数 50% 的乙醇 ;F:体积分数 60% 的乙醇)。

[0026] 图 5 为不同甲基丙烯酸缩水甘油酯浓度下生成的甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的扫描电子显微镜图(A:甲基丙烯酸缩水甘油酯体积分数为 2% ;B:甲基丙烯酸缩水甘油酯体积分数为 5% ;C:甲基丙烯酸缩水甘油酯体积分数为 10%)。

[0027] 图 6 为不同聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯浓度下生成的甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的扫描电子显微镜图(A:聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯体积分数为 10% ;B:聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯体积分数为 20%)。

[0028] 图 7 为不同反应时间生成的甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的扫描电子显微镜图(A:0.5 小时 ;B:1 小时 ;C:2 小时 ;D:4 小时)。

[0029] 图 8 为甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球为载体的免疫微球及在比色法酶联反应吸附试验中的应用(A. 共聚物微球为载体的免疫反应体系 ;B. 以包被抗体作为免疫微球的免疫分析示意图 ;C. 以包被抗原作为免疫微球的免疫分析法示意图 ;D. 以共聚物微球作为载体的免疫微球 ELISA 结果颜色深浅判断待检物的浓度结果 ;E. 显色反应读取吸光值量化结果图)。

[0030] 图 9 为甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球为载体的亲和层析微球及在抗体纯化中的应用(A. 以在共聚物微球表面固定 protein A, 并通过 protein A 与抗体 Fc 段检测特异性结合可从混合溶液中分离出抗体 ;B. 免疫印迹法检测共聚物微球为载体的亲和层析微球分离纯化抗体 :从亲和层析微球上洗脱的样品, 1. 待检测样品中不含抗体 ;2. 待检测液中含有抗体)。

具体实施方式

[0031] 下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0032] 实施例 1

[0033] 甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的制备方法,包括如下步骤:

[0034] a. 向体积分数为 30% 的甲醇溶液中加入溴化铜和联吡啶,加入后溴化铜的终浓度为 3.35mg/mL,联吡啶的浓度为 4.6mg/mL,记为混合溶液 A;

[0035] b. 向步骤 a 所得混合溶液 A 中加入相当混合溶液 A 体积 5% 的甲基丙烯酸缩水甘油酯,相当于混合溶液 A 体积 4/25 倍的浓度为 200mg/mL 的抗坏血酸水溶液和相当于溶液

A 体积 3/50 倍的浓度为 1mg/mL 的柠檬酸钠水溶液,混合均匀后倒入玻璃培养皿中,用封口膜封口,在转速为 65 转 / 分钟条件下避光反应 4 小时,得混合溶液 B ;所得溶液 B 中抗坏血酸的终浓度为 32mg/mL,柠檬酸钠的终浓度为 0.06mg/mL ;

[0036] c. 向步骤 b 所得混合溶液 B 中加入相当于混合溶液 A 体积 20% 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,然后补加相当于混合溶液 A 体积 10% 的浓度为 200mg/mL 的抗坏血酸水溶液,用封口膜封口,继续放在转速为 65 转 / 分钟条件下避光反应 4 小时,倒掉废液,将培养皿底部聚合物先用乙醇清洗,再用水清洗 2 次,然后将聚合物收集放入离心管中,再加入无水乙醇置于旋转振荡器上震荡后即得共聚物微球。

[0037] 实施例 2

[0038] 甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球的制备方法,包括如下步骤:

[0039] a. 向体积分数为 30% 的甲醇溶液中加入溴化铜和联吡啶,加入后溴化铜的终浓度为 3.35mg/mL,联吡啶的浓度为 4.6mg/mL,记为混合溶液 A ;

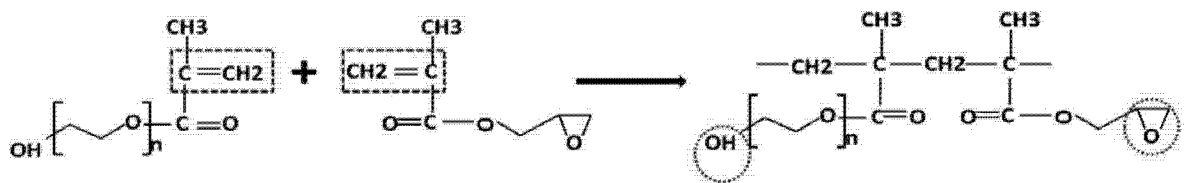
[0040] b. 向步骤 a 所得混合溶液 A 中加入相当混合溶液 A 体积 5% 的甲基丙烯酸缩水甘油酯,相当于混合溶液 A 体积 4/25 倍的浓度为 200mg/mL 的抗坏血酸水溶液和聚乙烯吡咯烷酮,加入聚乙烯吡咯烷酮后聚乙烯吡咯烷酮的终浓度为 6mg/mL,混合均匀后倒入玻璃培养皿中,用封口膜封口,在转速为 65 转 / 分钟条件下避光反应 4 小时,得混合溶液 B ;

[0041] c. 向步骤 b 所得混合溶液 B 中加入相当于混合溶液 A 体积 20% 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,然后补加相当于混合溶液 A 体积 10% 的浓度为 200mg/mL 的抗坏血酸水溶液,用封口膜封口,继续放在转速为 65 转 / 分钟条件下避光反应 4 小时,倒掉废液,将培养皿底部聚合物先用乙醇清洗,再用水清洗 2 次,然后将聚合物收集放入离心管中,再加入无水乙醇置于旋转振荡器上震荡后即得共聚物微球。

[0042] 本实施例中加入聚乙烯吡咯烷酮后聚乙烯吡咯烷酮的终浓度为 4-10mg/mL 均可实现发明目的。

[0043] 制备过程中,溴离子作为引发剂,诱发甲基丙烯酸缩水甘油酯和甲基丙烯酸寡聚乙二醇酯进行交联、聚合,在液相中形成共聚物微球。其反应原理如下:

[0044]



[0045] 制得的共聚物球以甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯为结构单元,其结构如图 1A 所示。由图 1A 可知,制得的共聚物微球尺寸均一,直径为 4-6 微米。将制得的共聚物微球采用傅里叶变换红外光谱仪检测,结果如图 1B 所示。由图 1B 可知,在 400-4000cm⁻¹进行傅立叶转换红外光谱,吸收峰分别在 :3531cm⁻¹、2952cm⁻¹、1731cm⁻¹、1452cm⁻¹、1272cm⁻¹、1149cm⁻¹、906cm⁻¹和 843cm⁻¹;其中 906cm⁻¹,843cm⁻¹处的峰为环氧键的特征吸收峰,3531cm⁻¹处为羟基的特征吸收峰。

[0046] 按照实施例 1 的方法,将甲基丙烯酸缩水甘油酯制成的共聚物微球,并将所形成的微球在 3000-4000cm⁻¹傅立叶转换红外光谱,如图 1C 所示。结果显示由甲基丙烯酸缩水

甘油酯聚合形成的微球不含有 3500cm^{-1} 左右的羟基,而甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球含有这一羟基特征峰(3500cm^{-1} 左右)。表明实施例 1 制成的共聚物微球是由甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚而得。

[0047] 本发明在研究过程中对影响共聚物微球形成的主要参数进行了优化。

[0048] 在避光反应过程中,分别在静止条件下,转速为 40 转/分钟、65 转/分钟和 100 转/分钟条件下制备共聚物微球,然后将制得的共聚物微球用扫描电子显微镜观察,结果如图 2 所示。由图 2 可知,在静止条件和 40 转/分钟条件下,可以形成分散较好的微球,但是微球的直径均一性差;在 100 转/分钟条件下,也能形成部分共聚物微球,但是聚合物团聚在一起,分散较差;当转速控制在 65 转/分钟左右时,可以形成分散良好,粒径均匀,形态完整的共聚物微球。结果表明在低于 100 转/分钟条件下能够形成微球,但是在低转速下形成微球的分散性更好,在 45-65 转/分钟条件下微球的粒径均一性好,当转速为 65 转/分钟时制成的微球效果最好。

[0049] 分别以体积分数为 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% 和 70% 的甲醇溶液配制混合溶液 A,然后按上述方法制备共聚物微球,其制得的共聚物微球扫描电子显微镜照片如图 3 所示。由图 3 可知,体积分数在 10%~40% 区间的甲醇溶液配制的混合溶液 A 中均可以生成共聚物微球,其中体积分数为 20%~30% 区间的甲醇溶液下生成的微球粒径均匀;但是当甲醇的体积分数大于 40% 条件下不能形成形态完整的微球。

[0050] 将步骤 a 中的甲醇替换为乙醇,并分别以体积分数为 10%, 25%, 30%, 40%, 50% 和 60% 的乙醇溶液配制混合溶液 A,然后按照上述方法制备共聚物微球,其制得的共聚物微球扫描电子显微镜照片如图 4 所示。由图 4 可知,体积分数在 10%-30% 区间的乙醇溶液配制的混合溶液 A 中均可以生成共聚物微球,所生成的微球粒径为 4-6 微米;但是随着乙醇的体积分数升高,升高至 40%-60% 区间,不能形成形态完整的微球。

[0051] 检测步骤 b 中甲基丙烯酸缩水甘油酯浓度对共聚物微球形成的影响,按照实施例 1 的方法分别加入相当于混合溶液 A 体积分数为 2%, 5% 和 10% 的甲基丙烯酸缩水甘油酯和相当于混合溶液 A 体积分数 20% 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯进行反应 4 小时,制得的共聚物微球扫描电子显微镜照片如图 5 所示。由图 5 可知,体积分数 2-10% 的甲基丙烯酸缩水甘油酯可以形成微球,但是甲基丙烯酸缩水甘油酯体积分数在 5% 条件下形成的共聚物微球效果最好,其均一度高,而在体积分数为 2% 或 10% 时,共聚物微球的形成受到了影响,其均一性较差。

[0052] 检测步骤 c 中聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯对共聚物微球形成的影响,按照上述的制备方法分别加入相当于混合溶液 A 体积分数 10% 和 20% 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯(体积分数)和相当于混合溶液 A 体积分数 5% 的甲基丙烯酸缩水甘油酯反应 4 小时,制得的共聚物微球扫描电子显微镜照片如图 6 所示。由图 6 可知,体积分数为 10%~20% 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯均能生成粒径均匀的微球。

[0053] 检测步骤 b 和 c 的避光反应时间对共聚物微球形成的影响,将避光反应分别进行 0.5 小时、1 小时、2 小时和 4 小时,制得的共聚物微球扫描电子显微镜照片如图 7 所示。由图 7 可知,0.5 小时即可以生成共聚物微球,反应时间在 2-4 小时区间,微球的粒径均匀且大小接近;而反应时间小于 0.5 小时,则不能形成微球。

[0054] 应用实施例 1

[0055] 一、制备免疫分析的载体：

[0056] 以实施例 1 制备的共聚物微球为载体,用于固定免疫分析中的抗体 / 抗原。本发明中合成的共聚物微球表面富含环氧基,环氧基可与抗体 / 抗原中的氨基形成共价键,实现抗体 / 抗原的固定,原理如图 8A-C 所示。具体实现条件:在离心空柱管(2 毫升、3 微米孔径)中加入 50 微升体积分数为 40% 的共聚物微球(溶液为 pH7.4 磷酸盐缓冲液)和浓度为 1ng/mL 的兔免疫球蛋白 G (rabbit IgG)为抗原,混合后在摇床上孵育 30 分钟。反应结束后,通过离心弃去液体,随后加入免疫分析洗涤液(pH7.4,含质量分数为 0.5%Tween20 的 Tris-HCl 缓冲液含或磷酸盐缓冲液),使微球沉淀充分悬浮于洗涤液中;再次离心,去除离心后收集的液体;重复该洗涤过程 2 次。随后加入质量分数为 10% 牛血清白蛋白(也可以添加体积分数为 10% 的奶酪蛋白)与抗体反应的环氧基团进行封闭后,通过离心获得负载抗体 / 抗原的共聚物免疫微球以供直接法、三明治夹心法、竞争法等酶联免疫吸附分析使用。

[0057] 本实施例中,负载抗原的共聚物免疫微球制备过程中,根据需要可以将抗原替换为抗体或其他蛋白分子,其加入抗原的浓度在 1ng/mL-10 μ g/mL 范围内,共聚物微球的体积分数在 20-40% 范围内均可以得到负载抗原的共聚物免疫微球。

[0058] 以下以直接法酶联免疫吸附实验为例,固定抗原的微球中加入 50 微升过氧化物酶标记的山羊抗体兔免疫球蛋白 G 抗体(goat anti-rabbit IgG Antibody)(抗体浓度为 1 μ g/mL),孵育 15 分钟,通过离心弃去液体,随后加入免疫分析洗涤液使微球沉淀充分悬浮于洗涤液中;再次离心,去除离心后收集的液体;重复该洗涤过程 3-4 次,以去除未反应的酶标记抗体。最后加入 50 微升酶反应地底物,酶催化底物从无色变为蓝色,反应结果可以通过肉眼直接判断,结果如图 8D 所示。由图 8D 可知,溶液中抗原浓度越高,底物颜色变化越大。也可以使用酶标仪或紫外分光光度计测量溶液在 540nm 波长的吸光值,其结果如图 8E 所示,结果显示溶液中抗原浓度越高,底物吸光值数值越大。

[0059] 本发明制备的共聚物微球还可用于多种类型的酶联免疫吸附实验,例如直接法、夹心法、竞争法等。

[0060] 二、利用共聚物微球纯化抗体

[0061] 以实施例 1 制备的共聚物微球为载体,用于固定可与抗体特异性结合的 protein A、protein G 或 protein L,其原理如图 9A 所示。共聚物微球表面的环氧基团可与 protein A、protein G 或 protein L 蛋白的氨基形成共价键,实现 protein A、protein G 或 protein L 蛋白的固定。以下以固定 protein A 为例,具体步骤如下:

[0062] 在离心空柱管(2 毫升、3 微米孔径)中加入 1 毫升体积分数为 40% 的共聚物微球(溶液为 pH7.4 磷酸盐缓冲液)和 5 微克 protein A,混合溶液在摇床上孵育 4 小时。离心去除上清;加入 1 毫升磷酸盐缓冲液,轻摇离心管,使共聚物微球在缓冲液中分散均匀;再次离心,去除分离所得液体。再次加入磷酸盐缓冲液以去除未固定于共聚物微球表面的 protein A。随后加入质量分数为 10% 牛血清白蛋白对未与 protein A 蛋白反应的环氧基团进行封闭,最后通过离心获得负载 protein A 蛋白的共聚物微球。负载 protein A 蛋白的共聚物微球可作为亲和层析纯化抗体(IgG)的载体,可用于亲和纯化抗体、免疫共沉淀反应等。本实施例中 protein A 可以用 protein G 或 protein L 蛋白替换,同样是可以实现发明目的。

[0063] 以下以亲和纯化为例纯化 IgG 抗体,具体步骤如下:在离心空柱管(2 毫升、3 微米

孔径)中加入 200 微升体积分数比为 20% 的负载了 protein A 蛋白的共聚物微球(pH7.4 磷酸盐缓冲液)中加入含抗体(IgG)的溶液。混合溶液与负载了 protein A 蛋白的共聚物微球在摇床上共同孵育 2 小时,通过离心去除未与负载 protein A 蛋白的共聚物微球反应的成分;加入磷酸盐缓冲液,轻摇离心管,使微球在缓冲液中分散均匀;再次离心,去除分离所得液体;该清洗步骤重复 3 次。随后加入 100 微升 pH3.0,100mM 柠檬酸缓冲液(或 pH2.5-3.0,100mM 甘氨酸-盐酸缓冲液,或 pH10.0,0.1M 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液),与微球快速、充分混合;离心收集液体,并在液体中加入适量氢氧化钠溶液(或者盐酸),将液体 pH 调节至 7.4。取适量收集的液体进行 SDS-PAGE 电泳,验证从混合溶液中分离纯化得到的抗体(IgG),结果如图 9B 所示。

[0064] 免疫沉淀研究蛋白质相互作用应用的具体实施如下:在离心空柱管(2 毫升、3 微米孔径)中加入 200 微升体积分数比为 30% 的负载了 protein A 的共聚物微球(溶液为 pH7.4 磷酸盐缓冲液)和与目标蛋白结合的抗目标蛋白抗体(IgG)。混合溶液在摇床上反应 2-4 小时,通过离心去除未与 protein A 反应的 IgG;加入磷酸盐缓冲液,使共聚物微球在缓冲液中分散均匀;再次离心,去除分离所得液体;该清洗步骤重复 2-3 次。随后加入待分析溶液,与共聚物微球充分混合,孵育 2-3 小时;去除离心分离所得液体;在离心空柱管中加入 1-1.5 毫升磷酸盐缓冲液,均匀分散微球,再次离心去除液体;重复上述洗涤步骤 3-5 次。离心并收集反应后得到的共聚物微球,随后加入 SDS-PAGE 电泳中的上样缓冲液,加热到 90-95℃,5 分钟。随后通过 SDS-PAGE 电泳分离加热后的样品,并通过免疫印迹法(western blot),验证待检物中是否含有目标蛋白。

[0065] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

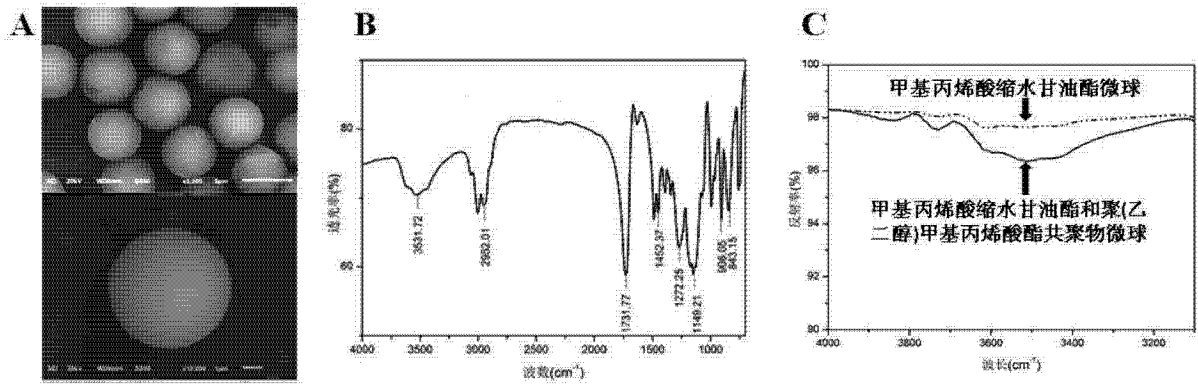


图 1

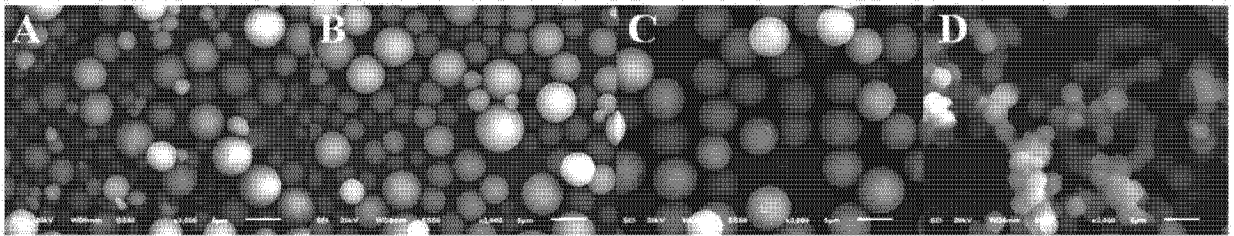


图 2

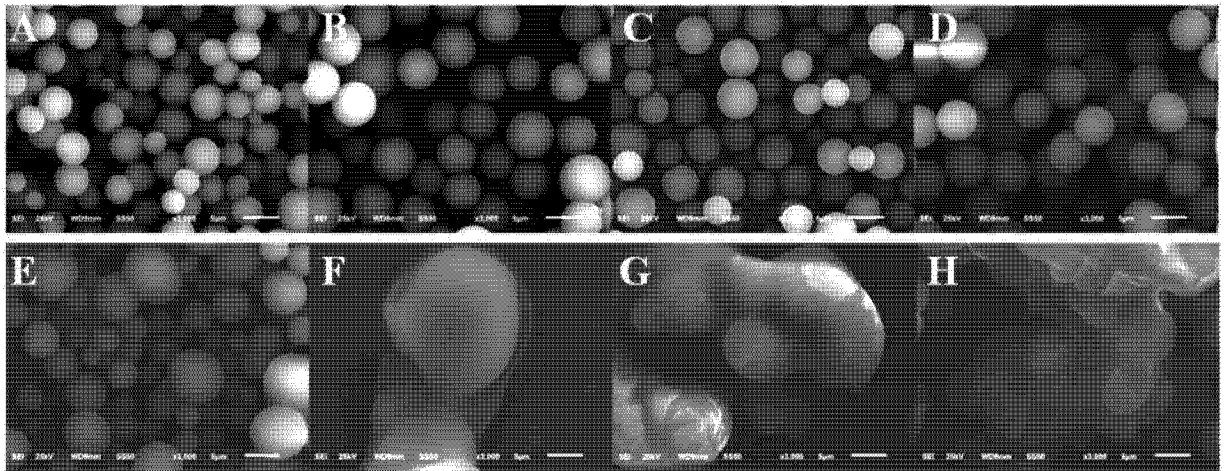


图 3

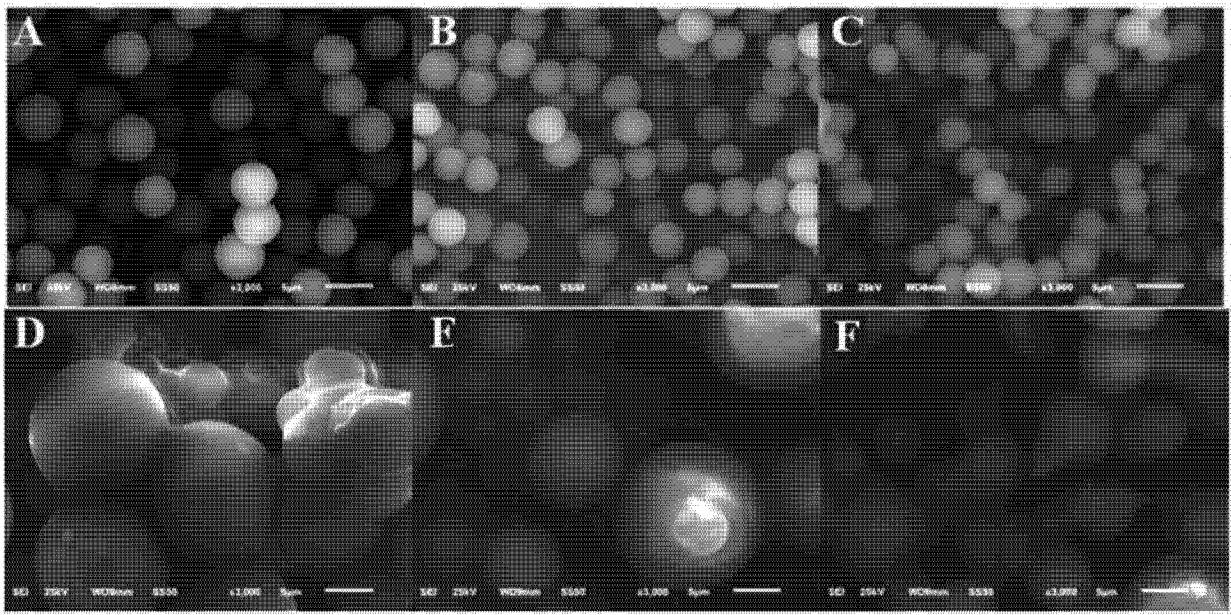


图 4

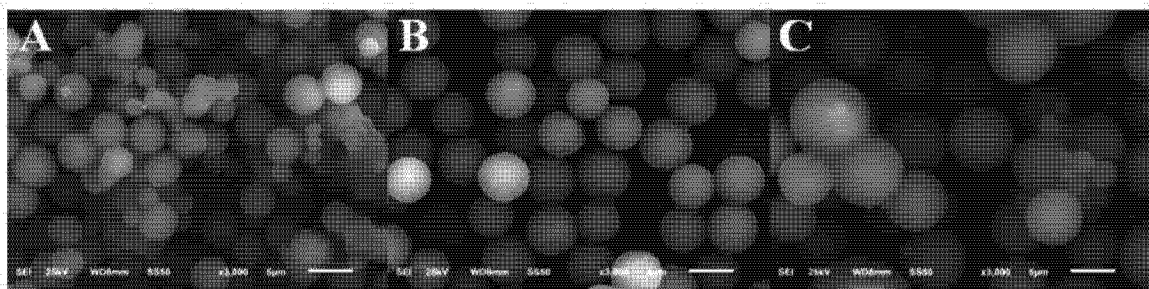


图 5

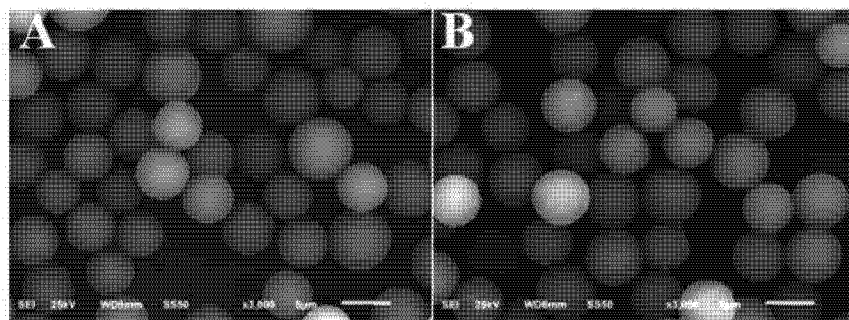


图 6

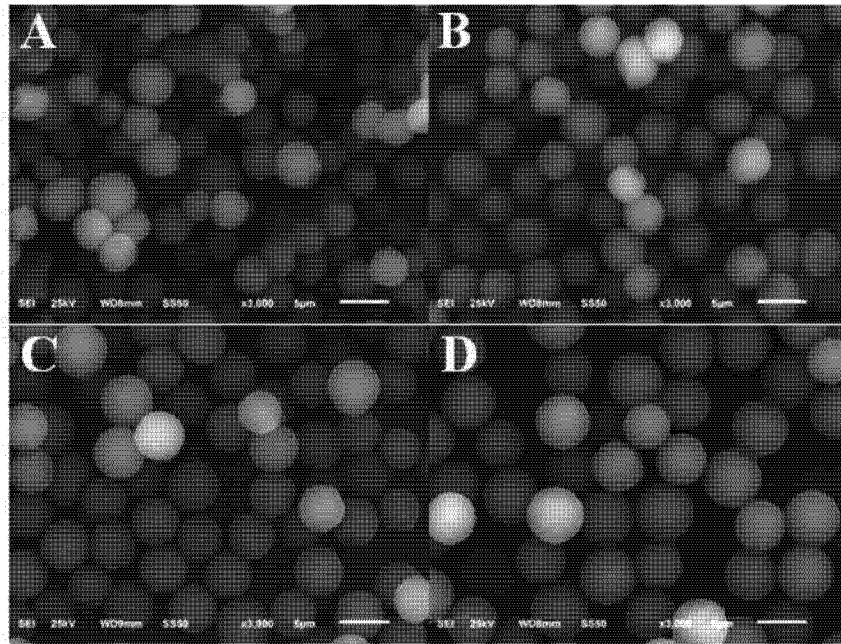


图 7

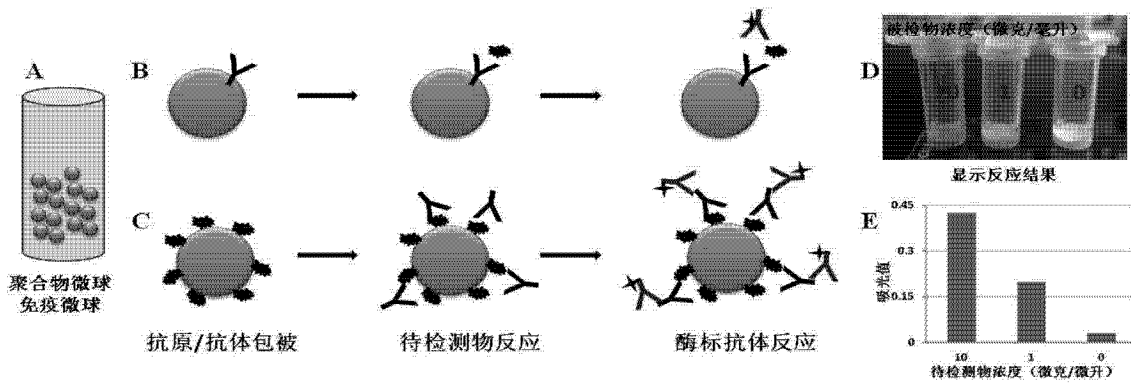


图 8

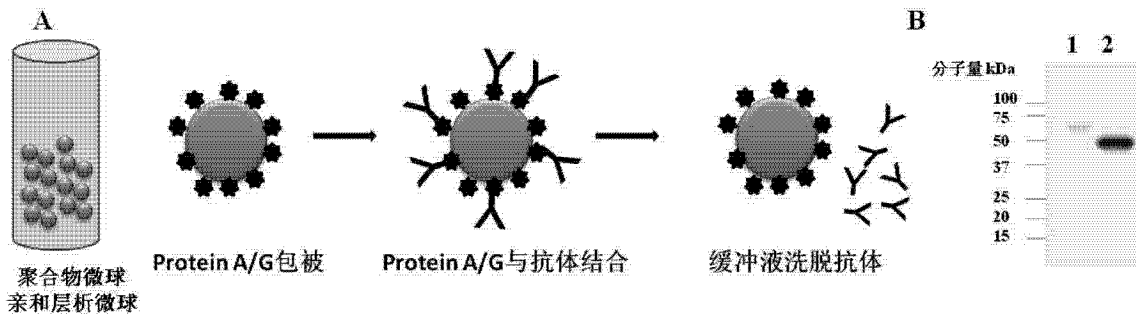


图 9

专利名称(译)	甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103333299B	公开(公告)日	2015-10-07
申请号	CN201310293616.8	申请日	2013-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	西南大学		
申请(专利权)人(译)	西南大学		
当前申请(专利权)人(译)	西南大学		
[标]发明人	余玲 史转转 李长明		
发明人	余玲 史转转 李长明		
IPC分类号	C08F290/06 C08F220/32 C08F220/28 C12N11/08 C07K16/00 C07K1/22 G01N33/531 B01D15/38		
审查员(译)	杜田		
其他公开文献	CN103333299A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯共聚物微球及其制备方法和应用,该共聚物微球由甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯按质量比为1:1-1:10聚合而成,共聚物微球直径为4-6微米,其制备方法简单,以溴离子为引发剂,诱发甲基丙烯酸缩水甘油酯和聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯进行交联、聚合,在液相中形成共聚物微球,制得的微球表面富含能够与蛋白质上的氨基直接进行共价结合的环氧基和亲水基团羧基,可吸附抗体、抗原、酶等蛋白质分子,在免疫分析、抗体纯化、葡萄糖检测等方面均有广泛应用。

