



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110850017 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911162865.7

(22)申请日 2019.11.25

(71)申请人 中国计量科学研究院

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路18号

(72)发明人 宋德伟 职承瑶 李红梅 李志林  
王馨雪 马凌云 刘健仪 朱文

(74)专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司 11241

代理人 李厚铭

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

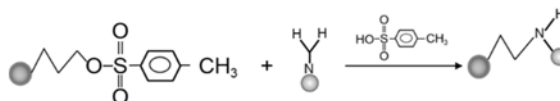
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

### (54)发明名称

一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法

### (57)摘要

本发明公开了一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法,从提高C肽提取源头效率出发,使其能够不通过衍生化处理就可以进一步提高方法定量限。从增加抗体和抗原的接触面积,确定抗原和磁珠的接触方向为出发点,制备了多孔PVDF模板几何约束免疫磁珠的复合材料。将制备的PVDF模板分散免疫磁珠复合材料应用于C肽定量限考察,通过与未分散免疫磁珠对比,用PVDF模板分散免疫磁珠复合材料提取C肽纯品后将定量限由柱上0.3ng降低至0.05ng,与日本计量院发表的C肽潜在参考测量程序相比,不通过衍生化处理后就能达到定量正常人血清C肽的目标,简化了检测流程,同时减少了磁珠和抗体的用量。



1. 一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 模板分散免疫磁珠复合材料的制备;(2) 血清中C肽的定量。

2. 根据权利要求1所述的非衍生化准确定量血清中C肽的方法,其特征在于,模板分散免疫磁珠复合材料的制备步骤具体为:

通过Stöber法制备单分散SiO<sub>2</sub>微球,室温干燥后在30%过氧化氢中浸泡12h,真空干燥后丁二酸改性备用;

将2g PVDF粉末溶解在10mL二甲基亚砷中,搅拌均匀,滴适量在SiO<sub>2</sub>浸渍后的载玻片上,保持均匀,在60℃烘箱中干燥6h,取出后浸泡在去离子水中,膜自动与载玻片分离;

配置刻蚀液1mL乙醇、1mL氢氟酸和5mL去离子水,将得到的膜浸泡在刻蚀液中5天,刻蚀后的PVDF膜用大量去离子水冲洗;将免疫磁珠悬浮在涂层缓冲液中,把刻蚀SiO<sub>2</sub>后的PVDF膜浸泡在其中,室温振荡孵育5h,取出制备好的组装磁珠膜材料,冲洗表面残留磁珠。

3. 根据权利要求2所述的非衍生化准确定量血清中C肽的方法,其特征在于:所述模板分散免疫磁珠复合材料的制备步骤中,将载玻片在使用前用质量分数为30%的过氧化氢和质量分数为98%的浓硫酸的混合溶液中浸泡静置12h,再经去离子水反复漂洗后在氮气流中干燥备用;其中,过氧化氢和浓硫酸的体积比3:7。

4. 根据权利要求3所述的非衍生化准确定量血清中C肽的方法,其特征在于:所述模板分散免疫磁珠复合材料的制备步骤中,用去离子水配成质量分数为2%SiO<sub>2</sub>分散溶液,超声分散转移至染色缸中;将过氧化氢和浓硫酸混合溶液处理后的载玻片插入染色缸中垂直置于悬浮液中,真空干燥后取出载玻片。

5. 根据权利要求4所述的非衍生化准确定量血清中C肽的方法,其特征在于:实验所用磁珠表面的官能团为对甲苯磺酰基,可以与抗体上的氨基发生二级亲核取代反应,使磁珠可以通过共价键偶合不同抗体,并且产生等摩尔质量的对甲苯磺酸。

6. 根据权利要求1所述的非衍生化准确定量血清中C肽的方法,其特征在于,所述血清中C肽的定量步骤具体为:准确称取500μL血清样品,按免疫法测得的C肽浓度加入等质量C肽标记物,准确称量、混匀;将制备好的模板分散免疫磁珠复合材料与抗体偶合,加入50μL磁珠-抗体复合物,室温下混匀一小时,结合了目标物的磁珠以1mL TBST洗涤三次,再用1mL TBS洗涤一次;最后用100μL 0.1%三氟乙酸水溶液将磁珠上结合的C肽收集下来,上机检测。

## 一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,特别是涉及一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法。

### 背景技术

[0002] 测定C肽的浓度能得知胰岛细胞的功能,对糖尿病的诊断和治疗具有重要的意义。C肽商业化的免疫测定方法是通过C肽免疫反应活性来测定C肽浓度,但是通常会出现检测值偏高的情况。同位素稀释质谱法时能够区别内源和外源蛋白质,从而能直接准确的测定目标物质。日本计量院将6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)修饰C肽N端氨基,氨基喹啉基可以通过在肽段中添加正电荷来提高电离效率,化学修饰和磁珠免疫提取法提高了血清中C肽的定量限,其柱上0.003~2.9ng范围内线性关系良好,相对标准偏差为4.0%,加入NMIJ CRM 6901-b作为标准物质,提供了一种潜在的C肽标准测量程序,但是该方法流程复杂,会影响结果准确度。

[0003] 目前,在同位素稀释质谱法的样品前处理中,蛋白质类样品通常是通过抗原和抗体免疫结合进行分离,其特异性和高效性为提取低丰度复杂基质中样品提供了便捷途径。因此将具有超顺磁性物质的表面包覆不同的官能团与抗体或抗原进行共价或非共价结合,既可以发挥抗原抗体的特性结合优势,又可以发挥超顺磁性物质的特点,通过磁场的改变达到混合均匀、高效分离和基质残留量少的目的。目前的研究都集中在建立颗粒表面功能化和探索固定抗体最优方法方面,以达到特异性富集和获得最佳提取效率的目的。由于磁性粒子可以用不同的合成方法来制备,它们的大小和理化性质有很大的差异,这限制了对抗体可靠结合能力的预测。因此,定量控制颗粒的可变性和功能化,开发通用的分析方法来准确定量结合抗体的数量是非常重要的。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法。从提高C肽提取源头效率出发,使其能够不通过衍生化处理就可以进一步提高方法定量限。从增加抗体和抗原的接触面积,确定抗原和磁珠的接触方向为出发点,制备多孔PVDF模板几何约束免疫磁珠的复合材料。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案具体如下:

[0006] 一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法,包括以下步骤:

[0007] (1)模板分散免疫磁珠复合材料的制备;(2)血清中C肽的定量。

[0008] 其中,模板分散免疫磁珠复合材料的制备步骤具体为:

[0009] 通过Stöber法制备单分散SiO<sub>2</sub>微球,室温干燥后在30%过氧化氢中浸泡12h,真空干燥后丁二酸改性备用;

[0010] 将载玻片在使用前用质量分数为30%的过氧化氢和质量分数为98%的浓硫酸的混合溶液中浸泡静置12h,再经去离子水反复漂洗后在氮气流中干燥备用;其中,过氧化氢

和浓硫酸的体积比3:7。

[0011] 用去离子水配成质量分数为2%SiO<sub>2</sub>分散溶液,超声分散转移至染色缸中;将过氧化氢和浓硫酸混合溶液处理后的载玻片插入染色缸中垂直置于悬浮液中,真空干燥后取出载玻片。

[0012] 将2g PVDF粉末溶解在10mL二甲基亚砷中,搅拌均匀,滴适量在SiO<sub>2</sub>浸渍后的载玻片上,保持均匀,在60℃烘箱中干燥6h,取出后浸泡在去离子水中,膜自动与载玻片分离;

[0013] 配置刻蚀液1mL乙醇、1mL氢氟酸和5mL去离子水,将得到的膜浸泡在刻蚀液中5天,刻蚀后的PVDF膜用大量去离子水冲洗;将免疫磁珠悬浮在涂层缓冲液中,把刻蚀SiO<sub>2</sub>后的PVDF膜浸泡在其中,室温振荡孵育5h,取出制备好的组装磁珠膜材料,冲洗表面残留磁珠。

[0014] 实验所用磁珠表面的官能团为对甲苯磺酰基,可以与抗体上的氨基发生二级亲核取代反应,使磁珠可以通过共价键偶合不同抗体,并且产生等摩尔质量的对甲苯磺酸。

[0015] 其中,血清中C肽的定量步骤具体为:准确称取500μL血清样品,按免疫法测得的C肽浓度加入等质量C肽标记物,准确称量、混匀;将制备好的模板分散免疫磁珠复合材料与抗体偶合,加入50μL磁珠-抗体复合物,室温下混匀一小时,结合了目标物的磁珠以1mL TBST洗涤三次,再用1mL TBS洗涤一次;最后用100μL 0.1%三氟乙酸水溶液将磁珠上结合的C肽收集下来,上机检测。

[0016] 同现有技术相比,本发明的突出效果在于:

[0017] 本发明从提高C肽提取源头效率出发,使其能够不通过衍生化处理就可以进一步提高方法定量限。从增加抗体和抗原的接触面积,确定抗原和磁珠的接触方向为出发点,制备了多孔PVDF模板几何约束免疫磁珠的复合材料。将制备的PVDF模板分散免疫磁珠复合材料应用于C肽定量限考察,通过与未分散免疫磁珠对比,用PVDF模板分散免疫磁珠复合材料提取C肽纯品后将定量限由柱上0.3ng降低至0.05ng,与日本计量院发表的C肽潜在参考测量程序相比,不通过衍生化处理就能达到定量正常人血清C肽的目标,简化了检测流程,同时减少了磁珠和抗体的用量。

[0018] 另外,建立了血清中C肽的同位素稀释质谱检测方法:以稳定同位素标记的C肽为内标,与血清样品混合,经磁珠免疫富集以及液相色谱-串联质谱仪分析,可以准确测定在色谱柱上样品量为0.3ng-10.0ng范围内血清中C肽的含量,同时考察了当C肽和同位素标记C肽的质量比在0.2-4.0的范围内时,线性关系良好,相关系数 $r^2$ 为0.9995。

[0019] 下面结合附图说明和具体实施例对本发明所述的非衍生化准确定量血清中C肽的方法作进一步说明。

## 附图说明

[0020] 图1为磁珠偶合抗体反应机理;

[0021] 图2中,(a)为对甲苯磺酸液相色谱图;(b)为对甲苯磺酸线性拟合图;

[0022] 图3中,(a)丁二酸改性二氧化硅;(b)2wt.%SiO<sub>2</sub>负载在载玻片上;(c)PVDF填充SiO<sub>2</sub>微球间隙;(d)刻蚀SiO<sub>2</sub>后多孔PVDF膜;(e)将免疫微球负载在PVDF膜上;(f)改性前后SiO<sub>2</sub>XRD图;

[0023] 图4为血清中C肽定量MRM图谱;

[0024] 图5为同位素稀释质谱法检测C肽线性考察结果;

[0025] 图6为上清液C肽与提取C肽MRM对比谱图;

[0026] 图7中, (a) 结构调控前后液相对比图 (红色: 磁珠结构调控前; 黑色: PVDF调控磁珠结构后); (b) C肽检测限线性拟合图。

## 具体实施方式

### [0027] 1、材料

[0028] 正硅酸乙酯 (99.9%, 美国阿法埃沙公司), 免疫磁珠 (美国 Thermo Fisher Scientific、Dynabeads MyOne Tosylactivated), 血清 (中国航天总医院提供)、C肽 (南京金斯瑞生物科技有限公司), C肽抗体 (芬兰 Hytest, clone#7E10), BSA (中国计量科学研究院)、载玻片 (美国赛默飞公司)、丁二酸 (比利时 ACROS, 99%)、对甲苯磺酸 (比利时 ACROS)。

### [0029] 2、免疫磁珠偶合效率

[0030] 将磁珠与抗体孵育后的液体过滤后直接进样, 通过称量法准确配置对甲苯磺酸标准品浓度分别为 5.132、10.264、20.528 和 41.056  $\mu\text{g/g}$ , 将标准品以相同条件进液相检测, 测量三次取积分面积的平均值, 拟合线性曲线。

[0031] 液相色谱条件: 岛津液相 LC-20AT; 色谱柱: SHISEIDO ACR C18 色谱柱 (150mm  $\times$  4.6mm  $\times$  5 $\mu\text{m}$ ); 洗脱条件: 等度洗脱; 流动相 A: 100% 甲醇; 流动相 B: 1.15wt.% 的磷酸二氢铵水溶液, 体积比为 15:85; 流速: 1ml/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ ; 进样体积: 10 $\mu\text{L}$ ; 检测波长: 221nm。

[0032] 实验所用磁珠表面的官能团为对甲苯磺酰基, 可以与抗体上的氨基发生二级亲核取代反应, 使磁珠可以通过共价键偶合不同抗体, 并且产生等摩尔质量的对甲苯磺酸, 其反应机理如图1所示。因此, 通过抗体与磁珠上偶联官能团反应的生成产物对甲苯磺酸对其结合密度进行评价。

[0033] 如图2(a)所示, 反应后溶液中的主要物质出峰时间和甲苯磺酸纯品的保留时间一致, 出峰时间在 9.7min 左右。标准品以相同条件进液相检测, 拟合线性曲线, 如图2(b)所示, 相关系数为 0.9999。通过线性拟合后, 将样品三次测量的积分面积代入拟合公式  $y = 24597.45x + 37095.66$ , 计算得出样品中对甲苯磺酸的浓度为 18.9928  $\mu\text{g/g}$ 。免疫磁珠活性基团物质的量浓度为 40~60  $\mu\text{mol/g}$ , 计算结合率为 13.79%, 其结合密度相对较低是由于为保证抗体的结合效率, 磁珠的添加量过量。相对较低的结合密度会减少在抓取抗原时抗体和抗原的有效碰撞几率, 降低反应灵敏度。在提取低丰度蛋白质时加入过量的磁珠, 在造成磁珠和抗体浪费的同时会减小磁珠间的空隙, 对偶合在磁珠表面的抗体产生遮蔽作用, 降低免疫效率。有文献表明抗体与磁珠结合密度的增大会增加其捕获抗原的能力, 从而可以获得更高响应。增加抗体与磁珠的结合密度不仅需要增加抗体加入的质量, 还需要增加磁珠与磁珠之间的间距, 增大比表面积从而减少抗原与免疫磁珠结合的空间位阻。

### [0034] 3、模板分散免疫磁珠复合材料制备方法

[0035] 传统 Stöber 法制备单分散  $\text{SiO}_2$  微球, 室温干燥后在 30% 过氧化氢中浸泡 12h, 真空干燥后丁二酸改性备用。将载玻片在使用前用质量分数为 30% 的过氧化氢和质量分数为 98% 的浓硫酸的混合溶液中 (体积比 3:7) 浸泡静置 12h, 再经去离子水反复漂洗后在氮气流中干燥备用。用去离子水配成质量分数为 2%  $\text{SiO}_2$  分散溶液, 超声分散转移至染色缸中。将处理后的载玻片插入染色缸中垂直置于悬浮液中, 真空干燥后取出载玻片。将 2g PVDF 粉末溶解在 10mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中, 搅拌均匀, 滴适量在  $\text{SiO}_2$  浸渍后的载玻片上, 保持均匀,

在60℃烘箱中干燥6h,取出后浸泡在去离子水中,膜自动与载玻片分离。配置刻蚀液1mL乙醇、1mL氢氟酸和5mL去离子水,将得到的膜浸泡在刻蚀液中5天,刻蚀后的PVDF膜用大量去离子水冲洗。将免疫磁珠悬浮在涂层缓冲液中,把刻蚀SiO<sub>2</sub>后的PVDF膜浸泡在其中,室温振荡孵育5h,取出制备好的组装磁珠膜材料,冲洗表面残留磁珠。

[0036] 所用的Dynabeads免疫磁珠粒径为1μm左右,因此选用制备粒径为0.7~1μm的制备条件,并通过丁二酸改性制备出了粒径均一、球型完整的SiO<sub>2</sub>微球颗粒,其形貌如图3(a)所示。对所制备的SiO<sub>2</sub>颗粒进行成分分析,如图3(f)所示。XRD图与SiO<sub>2</sub>标准卡片对比,在2θ为23°左右出现非晶态的衍射峰,表明所合成的微球为无定形SiO<sub>2</sub>固体颗粒。将SiO<sub>2</sub>微球在载玻片上浸渍后,形成了多层紧密堆积结构,如图3(b)所示。这是由于载玻片在浓硫酸和过氧化氢溶液中浸泡后,其表面羟基化增加了亲水能力,形成了自组装层。将载玻垂直置于丁二酸改性SiO<sub>2</sub>分散液中后,载玻片上的羟基会和丁二酸改性后SiO<sub>2</sub>表面残留的羧基发生反应,通过共价键结合形成结构稳定的单层铺展SiO<sub>2</sub>微球结构。同时由于SiO<sub>2</sub>微球间的相互作用力会在部分区域形成多层排列结构。PVDF通过涂敷法烘箱干燥后形成光滑致密皮层,如图3(c)所示。膜厚度较薄在电镜图中能够观察到下方的SiO<sub>2</sub>微球,并在该条件下能够保持SiO<sub>2</sub>微球原有的浸渍结构。多孔表面的疏水程度可以根据杨氏方程 $\cos\theta' = r\cos\theta$ 计算,θ'为粗糙面的表观接触角,θ为光滑面接触角,r代表粗糙度。由于r总是大于1,光滑表面的疏水性最弱,较低的疏水性可以降低PVDF膜对于蛋白质的吸附程度,增加其在血清中提取蛋白质时的抗污染能力。当SiO<sub>2</sub>微球被刻蚀留下孔洞后,如图3(d)所示,空气被困在固体和液体之间的空隙中,形成复合界面,用Cassie-Baxter模型来描述其润湿行为,疏水性会随着孔隙直径的增大而增强。制备的多孔PVDF膜表面的微孔和周围的平滑致密区域就可以形成具有疏水能力差的微观结构,为免疫磁珠的组装提供驱动力。同时根据Wenzel公式,粗糙表面的自由能是光滑表面的r倍,免疫磁珠在组装时更倾向于降低表面自由能而填充孔洞,使其在PVDF膜表面形成按照孔洞结构排列的单分散免疫磁珠复合材料。另外在旋转组装免疫磁珠过程中,由于PVDF膜的去湿作用,毛细管力足够大能把免疫磁珠推入模板孔洞,同时重力驱动的沉积作用,以及孔洞尖端与微球之间的范德华力强相互作用和布朗运动的多重力推动下使其按照模板图案进行排列

[0037] 当免疫磁珠悬浮液的浓度足够高时,模板填满免疫磁珠的最大数量由几何约束图形和直径比所决定。通过PVDF孔状结构的导向作用,从图3(e)可以看出疏水PVDF膜上排列出了单层,分散性好的免疫磁珠。在PVDF膜上所有视野范围内未见孔状结构,磁珠对孔隙的利用率可达约100%。当孔径d小于免疫磁珠的直径D时,会形成在表面突出的立体结构,同时保证每个孔只被一个免疫磁珠占据,可以有效防止PVDF膜对免疫磁珠在抓取蛋白时的遮蔽作用,同时又最大限度的提高比表面积。免疫磁珠在膜上的定向排列,可以使偶合的抗原具有方向性,遮蔽的部分官能团可以提高抗体偶合密度。露出的光滑PVDF表面疏水能力较弱,可以减少对蛋白质的特异性吸附,增强其抗污染能力。

[0038] PVDF模板辅助自组装免疫磁珠间的相互作用是多方面的。从扫描图3(d)和图3(b)可以看出分散在PVDF模板上的免疫磁珠的数量略多于孔的数量,Kralchevsky等人证明了微球部分浸入水平固体衬底上的液体层时,由于旋转孵育过程中引起的液-气界面变形,产生了强而远距离的粒子间相互作用,这种引力可能是毛细管相互作用的结果。这种粒子间的相互作用使孔洞被填充完之后也能一定程度上在PVDF表面进行自发排列,提高了PVDF膜

上的负载量。

#### [0039] 4、C肽定量

[0040] 准确称取500 $\mu$ L血清样品,按免疫法测得的C肽浓度加入等质量C肽标记物,准确称量、混匀;加入50 $\mu$ L磁珠-抗体复合物,室温下混匀一小时,结合了目标物的磁珠以1mL TBST (含0.05%吐温20的TBS缓冲液)洗涤三次,再用1mL TBS洗涤一次,以此减少非特异性结合,降低背景干扰;最后用100 $\mu$ L 0.1%三氟乙酸水溶液将磁珠上结合的C肽收集下来,上机检测。准确称量C肽纯品,加入DMSO溶解后用去离子水稀释,将制备好的模板分散免疫磁珠复合材料和未模板分散的免疫磁珠分别与抗体偶合,提取C肽。

[0041] 液相色谱条件:色谱柱:Shiseido Capcellpak C18柱(1.5mm $\times$ 150mm $\times$ 5.0 $\mu$ m);柱温:室温;进样体积:10 $\mu$ L;流速:0.2ml/min;流动相:A为0.1%甲酸的超纯水,B为0.1%甲酸的乙腈;质谱条件:多反应收集模式(MRM),正离子模式,C肽检测离子对 $m/z=1007.7>147.1$ ,出口电压156V,碰撞能20eV。使用仪器Agilent 6410-QQQLC-MS/MS。

[0042] 添加了同位素标记C肽的血清样本经磁珠富集后的MRM图谱如图4所示,图片上方是同位素标记的C肽色谱图,下方是血清中的天然C肽色谱图,两种物质的保留时间一致,根据二者的峰面积进行定量。

[0043] 用浓度约0.05 $\mu$ g/g的C肽校准溶液,经过磁珠富集后进行线性范围的考察,结果表明在柱上样品量为0.3~10.0ng的范围内,该方法线性关系较好,相关系数 $r^2$ 为0.9946(图5(a));以10倍信噪比作为该方法的定量限,计算得出定量限为0.3ng(柱上);同时考察了当C肽和同位素标记C肽的质量比在0.2~4.0的范围内时(比值为0.2的点对应的C肽柱上含量约为0.3ng),线性关系良好,相关系数 $r^2$ 为0.9995(图5(b))。

[0044] 该方法中最后C肽的剥离浓度由加入的三氟乙酸决定,可以在最大程度上达到对C肽的富集。在三氟乙酸的加入体积为80 $\mu$ L时,此方法在C肽浓度低于2.5ng/ml的情况下无法准确定量,需要进一步提高方法的检测限和定量限。

#### [0045] 5、复合材料性能评价

[0046] 收集未使用模板分散的免疫磁珠富集提取的C肽和上清液进行质谱分析,在上清液中仍然检测到C肽的存在,如图6所示。在C肽提取过程中洗脱液为100 $\mu$ L,上清液的缓冲液体积为500 $\mu$ L,根据其与样品中的峰面积响应比值推算浓度比值约为1:1.3,缓冲液中有大量的C肽没有被提取出来。虽然加入C肽的标记物可以在一定程度上校准实验误差,但是血清中C肽浓度很低,正常范围为0.5~10ng/ml,过大的损失会失去定量的意义,同时对检测方法的灵敏度有更高的要求。

[0047] 当C肽实际浓度1.09ng/g时,在未使用模板分散磁珠提取的样品中没有信号,但是使用模板分散磁珠提取的样品的信号稳定,如图7(a)所示。在PVDF模板分散免疫磁珠复合材料提取C肽后,柱上理论样品量为0.05~0.5ng范围内线性关系良好,相关系数 $R^2$ 为0.99951,如图7(b)所示。在对其上清液进行检测后没有出现C肽的响应信号,可见磁珠结构的优化确实能提高对C肽的提取效率。同时在使用结构优化磁珠样品时,磁珠的加入量约为未优化磁珠加入量的五分之一,大大减少了磁珠的用量和抗体的添加量。PVDF模板分散后的免疫磁珠在不衍生化条件下,在三氟乙酸的加入体积为100 $\mu$ L,上样体积为20 $\mu$ L时就能满足对正常人血清C肽浓度(0.5~10ng/mL)进行定量的要求,如果减少洗脱体积和使用更高灵敏度的质谱仪器,其定量限和检测限将会进一步降低。

[0048] PVDF模板分散免疫磁珠复合材料在提取C肽时能够发挥优势,可能的原因为磁珠在与抗体进行偶合后,由于磁珠的位点固定,其抗体的结合具有方向性,同时部分官能团被遮挡,可以提高抗体的表观结合密度。同时PVDF对于抗体也具有强烈的吸引力,能够提升抗体的偶合效率。在对磁珠进行官能团封闭时,PVDF表面未结合免疫磁珠部分表面光滑,疏水能力弱,加入过量的BSA后,PVDF膜上吸附BSA,也能达到封闭作用,减少实验过程中的非特异性结合。在对血清样品中高丰度蛋白进行去除后,PVDF膜的高比表面积增加了抗体和C肽的结合几率,通过三氟乙酸洗脱后,可以将与抗体结合的C肽洗脱下来,提高富集效率,从而显著提高方法的定量限。

[0049] 综上所述,本发明建立了一种血清中C肽的定量方法,通过向血清中添加同位素标记的C肽,经过磁珠免疫富集后,直接进行LC-MS/MS检测。整个样品前处理过程简单省时,目标物损失较少,并且在实验的一开始就加入了内标,可以很好地对实验过程中产生的所有误差进行校正,使得方法准确度很高。将制备的PVDF模板分散免疫磁珠复合材料应用C肽定量限考察,通过与未分散免疫磁珠对比,用PVDF模板分散免疫磁珠复合材料提取C肽纯品后将定量限由柱上0.3ng降低至0.05ng,与日本计量院发表的C肽潜在参考测量程序相比,不通过衍生化处理后就能达到定量正常人血清C肽的目标,简化了检测流程,同时减少了磁珠和抗体的用量。

[0050] 以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。



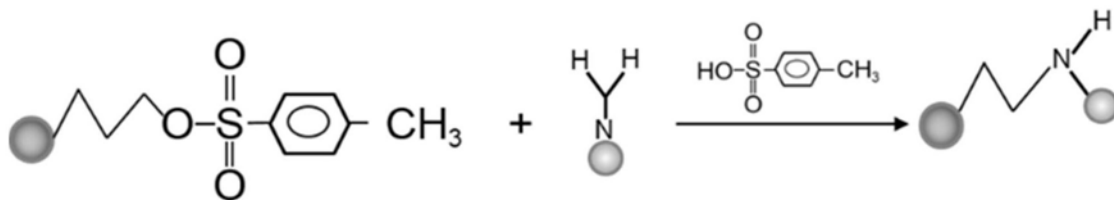


图1

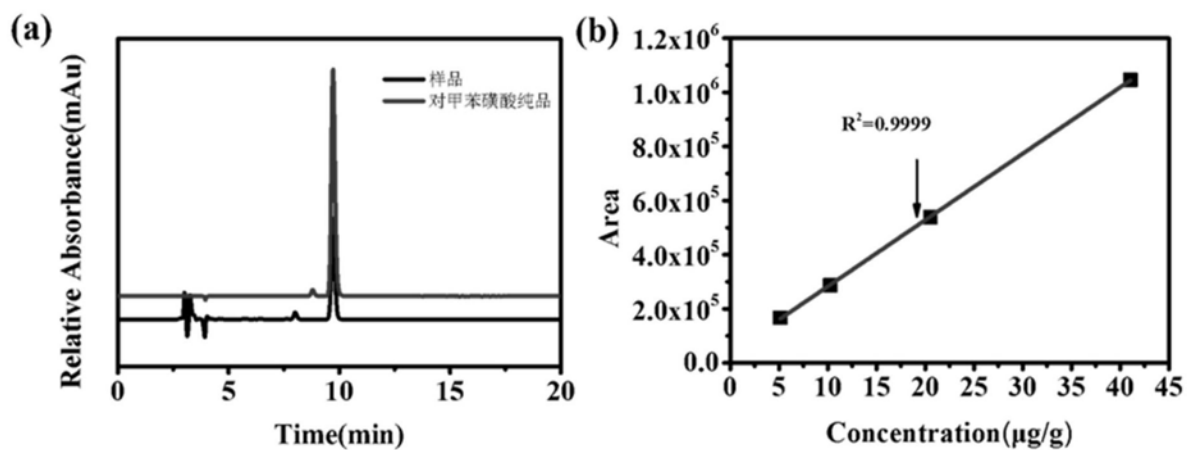


图2

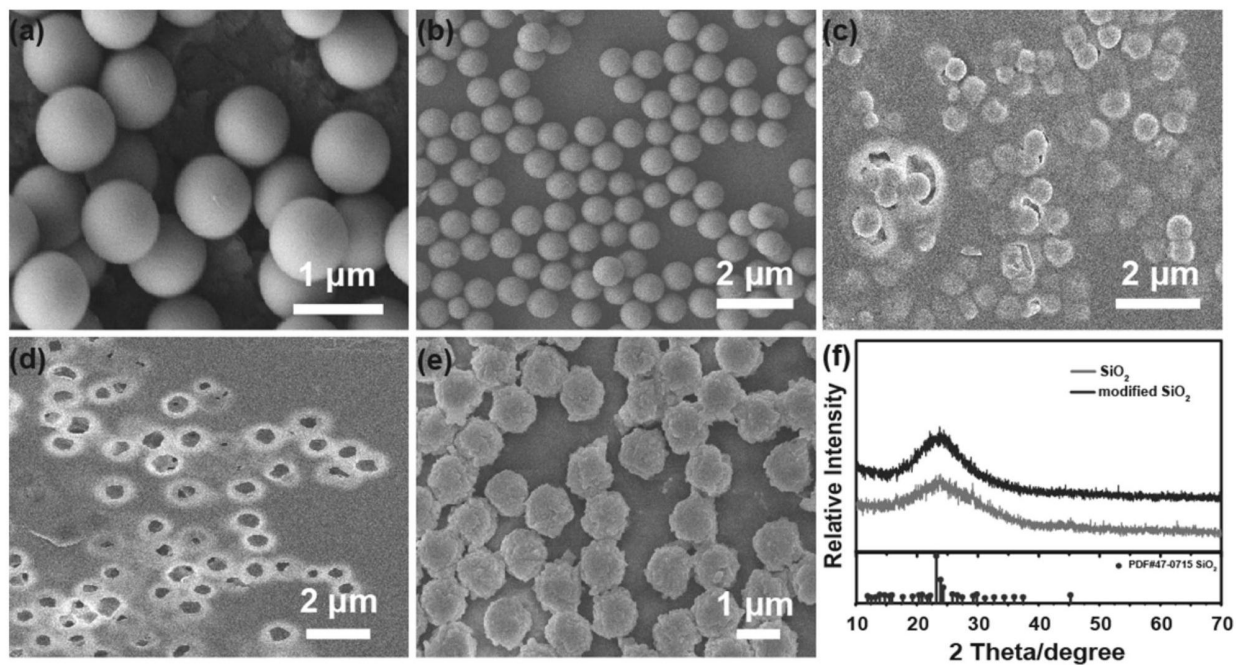


图3

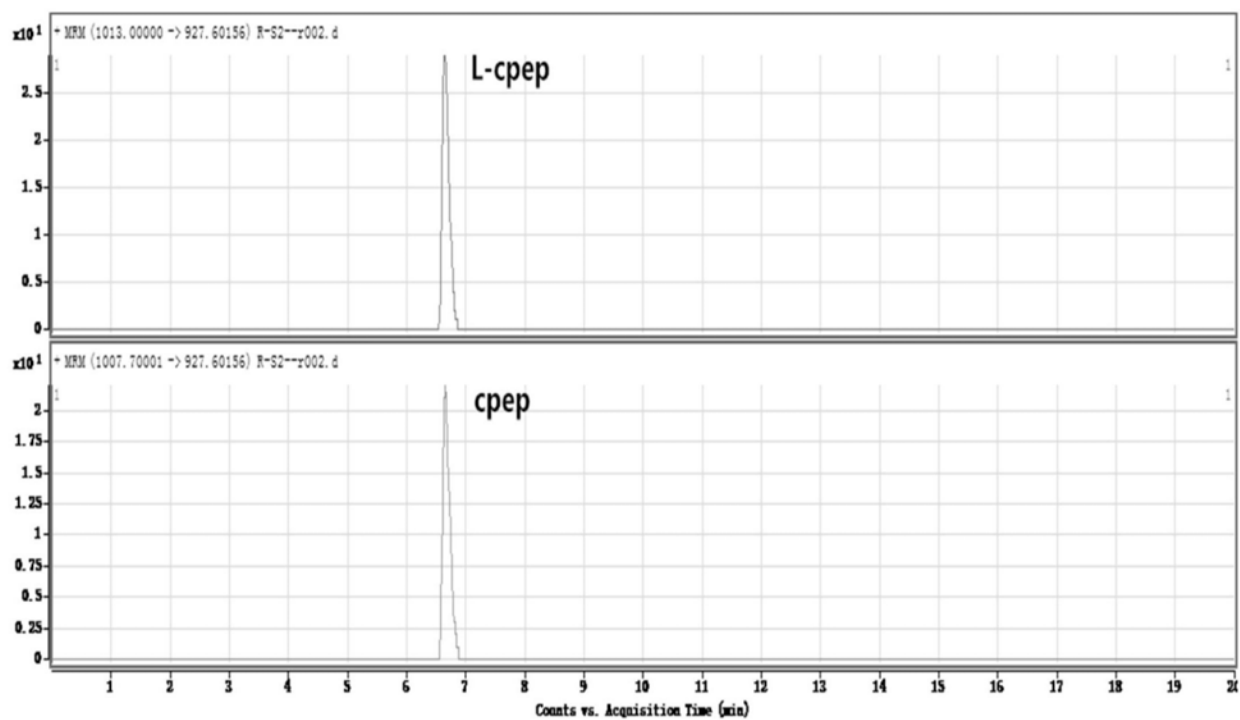
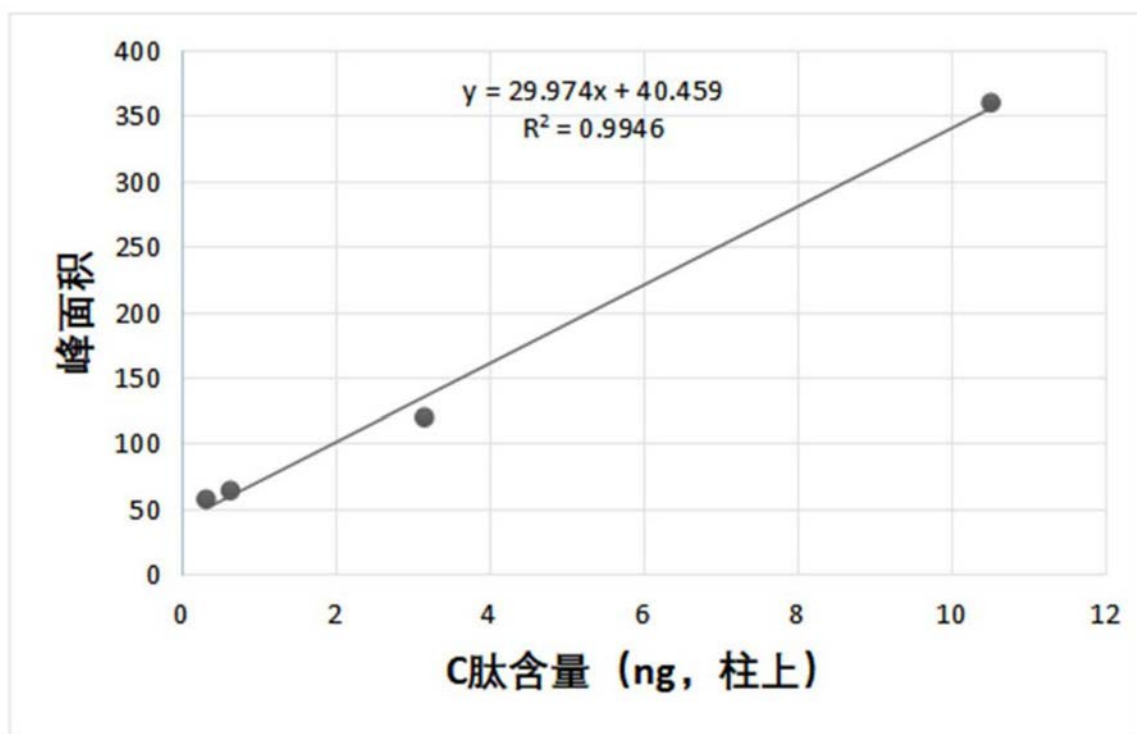
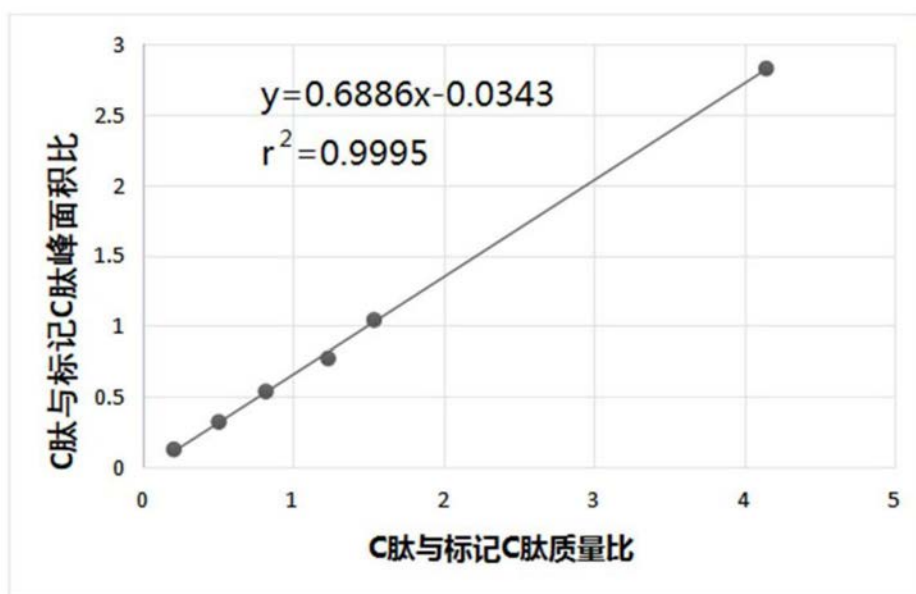


图4



(a)



(b)

图5

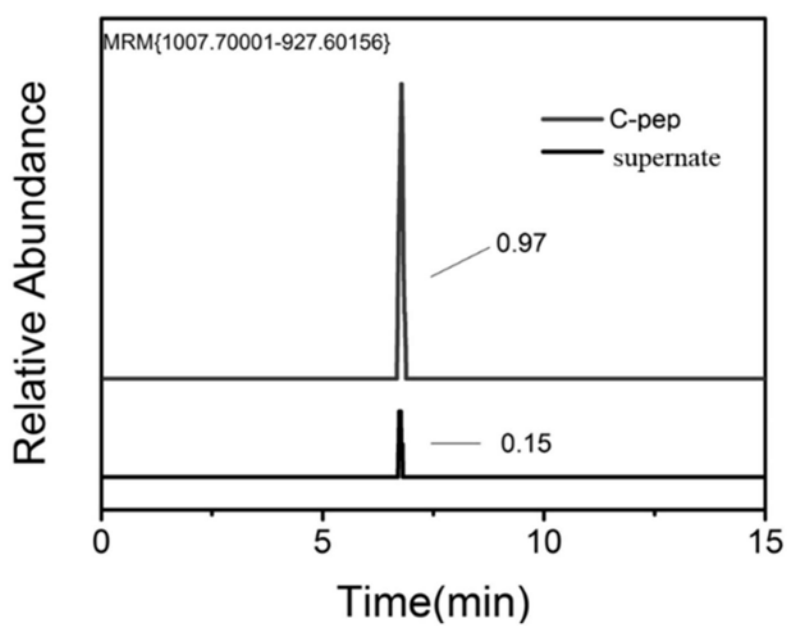


图6

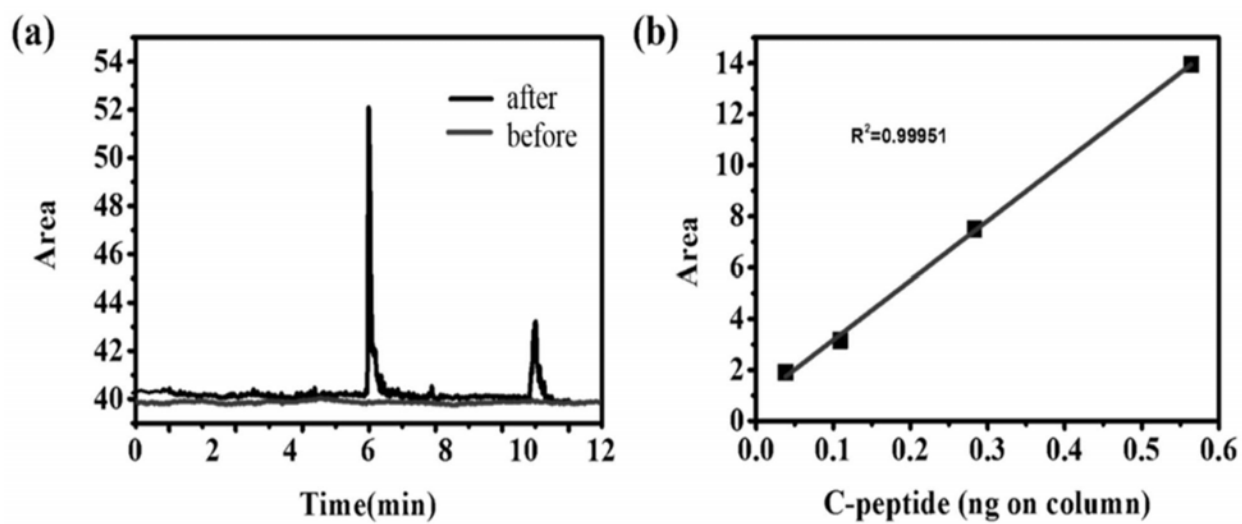


图7

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN110850017A</a>                                 | 公开(公告)日 | 2020-02-28 |
| 申请号            | CN201911162865.7   | 申请日     | 2019-11-25 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国计量科学研究院  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国计量科学研究院  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国计量科学研究院  |         |            |
| [标]发明人         | 宋德伟<br>李红梅<br>李志林<br>王馨雪<br>马凌云<br>刘健仪<br>朱文                 |         |            |
| 发明人            | 宋德伟<br>职承瑶<br>李红梅<br>李志林<br>王馨雪<br>马凌云<br>刘健仪<br>朱文          |         |            |
| IPC分类号         | G01N30/88 G01N33/543 G01N33/532                              |         |            |
| CPC分类号         | G01N30/88 G01N33/532 G01N33/54326 G01N2030/045 G01N2030/8822 |         |            |
| 代理人(译)         | 李厚铭  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>               |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种非衍生化准确定量血清中C肽的方法，从提高C肽提取源头效率出发，使其能够通过衍生化处理就可以进一步提高方法定量限。从增加抗体和抗原的接触面积，确定抗原和磁珠的接触方向为出发点，制备了多孔PVDF模板几何约束免疫磁珠的复合材料。将制备的PVDF模板分散免疫磁珠复合材料应用于C肽定量限考察，通过与未分散免疫磁珠对比，用PVDF模板分散免疫磁珠复合材料提取C肽纯品后将定量限由柱上0.3ng降低至0.05ng，与日本计量院发表的C肽潜在参考测量程序相比，不通过衍生化处理后就能达到定量正常人血清C肽的目标，简化了检测流程，同时减少了磁珠和抗体的用量。

