



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103175953 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201110440134. 1

CN 1866012 A, 2006. 11. 22,

(22) 申请日 2011. 12. 26

CN 1675545 A, 2005. 09. 28,

(73) 专利权人 苏州新波生物技术有限公司

CN 101941676 A, 2011. 01. 12,

地址 215400 江苏省苏州市太仓市太平北路
115 号

CN 101038202 A, 2007. 09. 19,

WO 2004/021004 A1, 2004. 03. 11,

(72) 发明人 吴俊清 任媛媛 杨挥

审查员 舒霏霏

(74) 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司 31211

代理人 高月红

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101712866 A, 2010. 05. 26,

CN 101183073 A, 2008. 05. 21,

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

镉纳米粒子荧光质控品及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种镉纳米粒子荧光质控品及其制备方法和应用,该质控品是一种由具有荧光信号微孔反应板按顺序排列,形成的固相质控板;其制备方法,包括:1) 制备荧光镉纳米粒子;2) 在荧光镉纳米粒子表面标记蛋白;3) 在微孔反应板样品池上包被抗体或抗原;4) 把包被有抗体或抗原的微孔反应板样品池与标记有荧光镉纳米粒子的蛋白进行免疫反应,制备具有荧光信号微孔反应板;5) 把具有荧光信号微孔反应板按一定顺序排列,制备成镉纳米粒子荧光质控品;该镉纳米粒子荧光质控品,可应用于对生物芯片检测的时间分辨免疫分析荧光仪校验和保养,而且具有使用方便、性能稳定等优点。

1. 一种铈纳米粒子荧光质控品,其特征在于:所述铈纳米粒子荧光质控品是一种由具有荧光信号微孔反应板按顺序排列,形成的固相质控板;

其中,具有荧光信号微孔反应板,是由包被有抗体或抗原的微孔反应板样品池与标记有荧光铈纳米粒子的蛋白,经免疫反应后获得;

其中,所述铈纳米粒子荧光质控品是通过包括以下步骤的方法所制备的:

(1) 按以下 IA 或 IB 的方法,制备表面带有羧基、氨基或羟基的纳米乳胶微粒,其中,

IA、使用苯乙烯、丙烯酸、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯或丙烯酰胺中的两种以上,采用如下方式合成有机高分子纳米乳胶微粒:

采用乳液聚合反应,原料苯乙烯:丙烯酸或甲基丙烯酸或丙烯酰胺:SDS:过硫酸钾的摩尔比为 7:0.3~1:0.04:0.5,在 65~70℃,反应 6~10 小时,合成粒径 10~100nm 有机高分子纳米乳胶微粒;

或采用种子乳液聚合反应,上述经乳液聚合反应制备的有机高分子纳米乳胶微粒作为种子液的以克为单位的重量:苯乙烯的摩尔数:甲基丙烯酸甲酯的摩尔数:丙烯酸或甲基丙烯酸或丙烯酰胺的摩尔数:过硫酸钾的摩尔数为 1~5:0.07:0~0.05:0.005~0.02:0.005,在 65~70℃,反应 15~25 小时,合成粒径 50~250nm 有机高分子纳米乳胶微粒;

或采用无皂乳液聚合反应,原料苯乙烯:甲基丙烯酸甲酯:丙烯酸或甲基丙烯酸或丙烯酰胺:过硫酸氨的摩尔比为 7~2:2~5:0.5~2:0.5,在 65~70℃,反应 6~10 小时,合成粒径 200~500nm 有机高分子纳米乳胶微粒;

IB、使用四乙氧基硅烷或 3-氨基丙基三乙氧基硅烷为原料,以环己烷为油相,以聚氧乙烯基辛基苯基醚、聚氧乙烯基壬基苯基醚或聚乙二醇辛基苯基醚中的一种为表面活性剂,其中,反应原料四乙氧基硅烷或 3-氨基丙基三乙氧基硅烷:表面活性剂:环己烷:正己醇:氨水的摩尔比为 0.5~4:2~8:100~200:20~40:0.1~0.4,在室温反应 20~28 小时,制备成粒径在 40~400nm 硅胶纳米乳胶微粒;

(2) 将表面带有羧基、氨基或羟基的纳米乳胶微粒,通过包裹、浸入荧光物质,形成荧光铈纳米粒子;

(3) 在碳二亚胺、溴化氰或戊二醛的活化作用后,荧光铈纳米粒子与蛋白进行偶联反应,形成表面标记有蛋白的荧光铈纳米粒子,其中,荧光铈纳米粒子与蛋白的质量比为 2~100:1;

(4) 采用以下 a、b 或 c 方法,制备具有荧光信号的微孔反应板:

a、通过在微孔反应板样品池上包被的一抗,与荧光铈纳米粒子表面标记的二抗,进行免疫反应,形成具有荧光信号的微孔反应板;或

通过在微孔反应板样品池上包被的二抗,与荧光铈纳米粒子表面标记的一抗,进行免疫反应,形成具有荧光信号的微孔反应板;

b、在微孔反应板样品池上包被抗体或抗原,荧光铈纳米粒子表面标记抗体或抗原,最后在包被有抗体或抗原的微孔反应板样品池内,进行荧光铈纳米粒子与抗原或抗体的双抗夹心免疫反应,形成具有荧光信号的微孔反应板;

c、把标记有蛋白的荧光铈纳米粒子直接包被到微孔反应板样品池上,形成具有荧光信号的微孔反应板;

(5) 将步骤 (4) 得到的微孔反应板,按一定的顺序排列,制备成用于时间分辨免疫分析

荧光仪生产调试和维护保养的镱纳米粒子荧光质控品,其中,排列方式为下面两种顺序的任意组合:

a) 用于确定时间分辨免疫分析荧光仪灵敏度和检测范围的具有荧光信号微孔反应板样品池按荧光大小顺序按列:

具有荧光信号的微孔反应板样品池的荧光信号从 1000CPS 到 1000 万 CPS 按顺序排列,每种荧光信号微孔反应板样品池至少保持两个平行样孔,安排六个荧光信号梯度,保持在四到五个数量级荧光信号变化量,其中,六个荧光信号梯度以从小到大的方式,每孔荧光信号分别是 500 到 1500CPS、2500 到 5000CPS、8000 到 1.2 万 CPS、8 万到 12 万 CPS、80 万到 120 万 CPS、700 万到 1200 万 CPS;或微孔反应板样品池荧光信号从大到小顺序排列;

b) 用于确定时间分辨免疫分析荧光仪边孔效应和调试光路准确性的具有荧光信号微孔反应板样品池的按以下顺序排列:

中间微孔反应板样品池的荧光信号在 400 万到 600 万 CPS,此样品池的左、右、上、下样品池荧光信号保持在 2500 到 5000CPS。

2. 如权利要求 1 所述的镱纳米粒子荧光质控品,其特征在于:所述蛋白,包括:抗体、抗原、半抗原、链亲合素、生物素、蛋白 A、蛋白 G。

3. 如权利要求 1 所述的镱纳米粒子荧光质控品,其特征在于:所述步骤(2)中,荧光物质包括:Eu³⁺、Sm³⁺、Tb³⁺或 Dy³⁺稀土元素与其配位体形成的螯合物。

4. 如权利要求 1 所述的镱纳米粒子荧光质控品,其特征在于:所述步骤(3)中,对于表面带羧基的荧光镱纳米粒子,使用 1~10mg/ml 碳二亚胺,室温活化时间 20~40 分钟,室温偶联反应时间 20~28 小时;

对于表面带氨基的荧光镱纳米粒子,使用体积浓度 0.5~2% 戊二醛,室温活化时间 20~40 分钟,室温偶联反应时间 20~28 小时;

对于表面带羟基的荧光镱纳米粒子,使用 1~10mg/ml 溴化氰,室温活化时间 20~40 分钟,室温偶联反应时间 20~28 小时。

5. 如权利要求 1 所述的镱纳米粒子荧光质控品的应用,其特征在于:应用于对生物芯片检测的时间分辨免疫分析荧光仪校验和保养。

6. 如权利要求 5 所述的应用,其特征在于:所述生物芯片,包括:蛋白质芯片、基因芯片、核酸芯片。

铈纳米粒子荧光质控品及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种时间分辨免疫分析荧光仪的固相质控板,特别是涉及一种铈纳米粒子荧光质控品及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 随着生物标记技术的不断进步,免疫分析技术得到了长足的发展。虽然放射免疫分析(RIA)使生物化学分析进入了一个真正的超微量分析时代,但RIA的缺陷也是非常明显,其短暂的使用期、废物处理和射线防护方面的要求为它的使用带来了不便,其标记物不受环境影响的衰变行为使其难以建立均相免疫分析等。由此涌现了一大批非放射免疫技术,例如酶免分析技术、化学发光免疫分析技术、时间分辨荧光免疫分析技术(time-resolved fluorescence immunoassay,TRFIA)等。但是从灵敏度来说,只有时间分辨荧光免疫分析技术与放射免疫媲美。TRFIA就成为20世纪80年代迅速发展起来的一种公认的、最有发展前途的、非放射免疫标记技术。

[0003] TRFIA技术是集酶标记、同位素标记技术的优点于一身,其灵敏度高、特异性强、稳定性好,且测定范围更宽(跨越4-5个数量级),试剂寿命长,样品用量少、分析速度快、操作简便和非放射性等特点,受到基础医学、临床检测、分子生物学等领域学者的关注,因此非常适用于生物学、医学上的超微量分析,是一项非常有前途的、值得推广的技术。国外该项技术已经成熟,我国近年来检测项目也不断增多。目前已经推出几十种商品化的时间分辨免疫分析试剂盒。

[0004] 时间分辨免疫分析荧光仪是用于时间分辨免疫分析试剂盒定量分析的检测设备,目前设备生产调试均采用标准量稀土元素与增强液形成螯合物产生荧光信号为标准来调试。用配制一定量稀土元素与增强液反应产生荧光信号,组成一种荧光信号梯度板条,进行时间分辨免疫分析仪的梯度和灵敏度调试;用配制一定量稀土元素与增强液反应产生荧光信号,把荧光信号排列成中间信号强,前后上下信号弱的组合方式来调试光路和确定边孔效应。由于稀土元素与增强液组成调试设备标准信号板条易受环境污染(我国是一个富含稀土元素国家,调试设备所用稀土含量极低,外源性稀土离子污染的概率较大),因此液相标准板条存放非常困难。另外,采用液相标准板条对设备维护保养和定期校验也比较困难。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种铈纳米粒子荧光质控品及其制备方法和应用。该铈纳米粒子荧光质控品,性能稳定,即使在高稀土环境污下,对该铈纳米粒子荧光质控品也不影响,因此,非常适合时间分辨免疫分析荧光仪的生产调试和维护保养,解决了时间分辨免疫分析荧光仪生产调试和维护保养过程中,液相标准信号板条的易受环境污染、稳定差、携带使用不方便的问题。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明的铈纳米粒子荧光质控品,是一种由具有荧光信号

微孔反应板按顺序排列,形成的固相质控板;其中,具有荧光信号微孔反应板,是由包被有抗体或抗原的的微孔反应板样品池(容量可为 50 ~ 300 微升)与标记有荧光镧纳米粒子的蛋白,经免疫反应后获得。

[0007] 所述荧光镧纳米粒子,是由以下方法制备得到:

[0008] 将 A 或 B 方法制备的纳米乳胶微粒,通过包裹、浸入荧光物质,形成表面带有羧基、氨基或羟基的具有荧光的镧纳米粒子,其中, A、B 方法如下:

[0009] A、使用苯乙烯、丙烯酸、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯或丙烯酰胺单体中的两种以上,通过乳液聚合、种子乳液聚合或无皂乳液聚合中的一种聚合方式,制备成粒径在 10 ~ 500nm 有机高分子纳米乳胶微粒;

[0010] B、使用四乙氧基硅烷或 3- 氨丙基三乙氧基硅烷中的一种为原料,以环己烷为油相,以聚氧乙烯基辛基苯基醚、聚氧乙烯基壬基苯基醚或聚乙二醇辛基苯基醚为表面活性剂,制备成粒径在 40 ~ 400nm 的硅胶纳米乳胶微粒;其中,该硅胶纳米乳胶微粒的表面带有羟基。

[0011] 所述蛋白,包括:抗体、抗原、半抗原、链亲合素、生物素、蛋白 A、蛋白 G。

[0012] 所述标记有荧光镧纳米粒子的蛋白,其制备(标记)过程中,荧光镧纳米粒子与蛋白的质量比为 2 ~ 100 : 1。

[0013] 所述按顺序排列中,其排列方式为下面两种顺序的任意组合:

[0014] I、按 1000 ~ 1000 万 CPS 的荧光信号的微孔反应板样品池,以从小到大或从大到小的顺序排列;

[0015] II、按边孔效应排列:中间微孔反应板样品池荧光信号在 400 ~ 600 万 CPS,该样品池的左、右、上、下样品池的荧光信号保持在 2500 ~ 5000CPS。

[0016] 另外,本发明还公开了一种镧纳米粒子荧光质控品的制备方法,包括步骤:

[0017] (1) 制备荧光镧纳米粒子;

[0018] (2) 在荧光镧纳米粒子表面标记蛋白;

[0019] (3) 在微孔反应板样品池上包被抗体或抗原;

[0020] (4) 把包被有抗体或抗原的微孔反应板样品池与标记有荧光镧纳米粒子的蛋白进行免疫反应,制备具有荧光信号微孔反应板;

[0021] (5) 把具有荧光信号微孔反应板按一定的顺序排列,制备成镧纳米粒子荧光质控品。

[0022] 对于上述方法,其具体步骤,包括:

[0023] (1) 按以下 IA 或 IB 的方法,制备表面带有羧基、氨基或羟基的纳米乳胶微粒(即镧纳米粒子),其中,

[0024] IA、使用苯乙烯、丙烯酸、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯或丙烯酰胺单体中的两种以上,采用如下方式合成有机高分子纳米乳胶微粒:

[0025] 采用乳液聚合反应,原料苯乙烯:丙烯酸(或甲基丙烯酸或丙烯酰胺):SDS(十二烷基磺酸钠):过硫酸钾的摩尔比为 7 : 0.3 ~ 1 : 0.04 : 0.5,在 65 ~ 70°C,反应 6 ~ 10 小时,合成粒径 10 ~ 100nm 有机高分子纳米乳胶微粒;

[0026] 或采用种子乳液聚合反应,将种子液(上述经乳液聚合反应制备的有机高分子纳米乳胶微粒)的重量(g):苯乙烯的摩尔数(mol):甲基丙烯酸甲酯的摩尔数(mol):丙

烯酸（或甲基丙烯酸或丙烯酰胺）的摩尔数（mol）：过硫酸钾的摩尔数（mol）比为 1 ~ 5 : 0.07 : 0 ~ 0.05 : 0.005 ~ 0.02 : 0.005（即 1 ~ 5g : 70mmol : 0 ~ 50mmol : 5 ~ 20mmol : 5mmol），在 65 ~ 70℃，反应 15 ~ 25 小时，合成粒径 50 ~ 250nm 有机高分子纳米乳胶微粒；

[0027] 或采用无皂乳液聚合反应，原料苯乙烯：甲基丙烯酸甲酯：丙烯酸（或甲基丙烯酸或丙烯酰胺）：过硫酸氨的摩尔比为 7 ~ 2 : 2 ~ 5 : 0.5 ~ 2 : 0.5，在 65 ~ 70℃，反应 6 ~ 10 小时，合成粒径 200 ~ 500nm 有机高分子纳米乳胶微粒；

[0028] IB、使用四乙氧基硅烷或 3- 氨丙基三乙氧基硅烷的一种为原料，以环己烷为油相，以聚氧乙烯基辛基苯基醚、聚氧乙烯基壬基苯基醚或聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）中的一种为表面活性剂，其中，反应原料四乙氧基硅烷或 3- 氨丙基三乙氧基硅烷：表面活性剂：环己烷：正己醇：氨水的摩尔比为 1 : 2 ~ 8 : 100 ~ 200 : 20 ~ 40 : 0.1 ~ 0.4，室温搅拌反应 20 ~ 28 小时。制备粒径在 40nm ~ 400nm 硅胶纳米乳胶微粒；

[0029] 本步骤中，通过上述的带功能性基团单体之间的聚合反应或经化学修饰修改方法，形成表面带有羧基、氨基或羟基的纳米乳胶微粒；

[0030] (2) 将表面带有羧基、氨基或羟基的纳米乳胶微粒，通过包裹、浸入荧光物质，形成荧光铈纳米粒子；

[0031] 本步骤也可参见 CN1866012A “一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置”所公开的内容；

[0032] (3) 在碳二亚胺（EDC）、溴化氰或戊二醛的活化作用后，荧光铈纳米粒子与蛋白进行偶联反应，形成表面标记有蛋白的荧光铈纳米粒子，即把蛋白连接在荧光铈纳米粒子上；其中，蛋白包括：抗体、抗原、半抗原、链亲合素、生物素、蛋白 A、蛋白 G；荧光铈纳米粒子与蛋白的质量比为 2 ~ 100 : 1；

[0033] 对于表面带羧基的荧光铈纳米粒子，使用 1 ~ 10mg/ml 碳二亚胺，室温活化时间 20 ~ 40 分钟，室温偶联反应时间 20 ~ 28 小时；

[0034] 对于表面带氨基的荧光铈纳米粒子，使用体积浓度 0.5 ~ 2% 戊二醛，室温活化时间 20 ~ 40 分钟，室温偶联反应时间 20 ~ 28 小时；

[0035] 对于表面带羟基的荧光铈纳米粒子，使用 1 ~ 10mg/ml 溴化氰，室温活化时间 20 ~ 40 分钟，室温偶联反应时间 20 ~ 28 小时。

[0036] (4) 采用以下 a、b 或 c 方法，制备具有荧光信号的微孔反应板：

[0037] a、通过在微孔反应板样品池上包被的一抗，与荧光铈纳米粒子表面标记的二抗，进行免疫反应，形成具有荧光信号的微孔反应板；或

[0038] 通过在微孔反应板样品池上包被的二抗，与荧光铈纳米粒子表面标记的一抗，进行免疫反应，形成具有荧光信号的微孔反应板；

[0039] b、在微孔反应板样品池上包被抗体或抗原，荧光铈纳米粒子表面标记抗体或抗原，最后在包被有抗体或抗原的微孔反应板样品池内，进行荧光铈纳米粒子与抗原或抗体的双抗夹心免疫反应，形成具有荧光信号的微孔反应板；

[0040] c、把标记有蛋白（包括：抗体、抗原、半抗原、链亲合素、生物素、蛋白 A、蛋白 G）的荧光铈纳米粒子直接包被到微孔反应板样品池上，形成具有荧光信号的微孔反应板；

[0041] (5) 将步骤(4)得到的微孔反应板,按一定的顺序排列,制备成用于时间分辨免疫分析荧光仪生产调试和维护保养的铕纳米粒子荧光质控品,其中,排列方式为下面两种顺序的任意组合:

[0042] a) 用于确定时间分辨免疫分析荧光仪灵敏度和检测范围的具有荧光信号微孔反应板样品池按荧光大小顺序按列:

[0043] 具有荧光信号微孔反应板样品池的荧光信号从 1000CPS 到 1000 万 CPS 按顺序排列,每种荧光信号微孔反应板样品池至少保持两个平行样孔,安排六个荧光信号梯度,保持在四到五个数量级荧光信号变化量,其中,六个荧光信号梯度以从小到大的方式,每孔荧光信号分别是 500 到 1500CPS、2500 到 5000CPS、8000 到 1.2CPS、8 到 12CPS、80 万到 120 万 CPS、700 万到 1200 万 CPS ;或微孔反应板样品池荧光信号从大到小顺序排列;

[0044] b) 用于确定时间分辨免疫分析荧光仪边孔效应和调试光路准确性的具有荧光信号微孔反应板样品池的按以下顺序排列(边孔效应排列):中间微孔反应板样品池的荧光信号在 400 万到 600 万 CPS,此样品池的左、右、上、下样品池荧光信号保持在 2500 到 5000CPS。

[0045] 对于上述的两种排列方式的任意组合方式,如:只测试时间分辨免疫分析荧光仪灵敏度和检测范围的梯度排列顺序、只测试时间分辨免疫分析荧光仪边孔效应和调试光路准确性的边孔效应排列顺序和梯度排列顺序与边孔效应排列顺序两种方式组合在一起。

[0046] 所述步骤(2)中,荧光物质包括:Eu³⁺、Sm³⁺、Tb³⁺或 Dy³⁺稀土元素与其配位体形成的螯合物。

[0047] 本发明的铕纳米粒子荧光质控品,可应用于对生物芯片检测的时间分辨免疫分析荧光仪校验和保养,其中,生物芯片,包括:蛋白质芯片、基因芯片、核酸芯片。

[0048] 本发明中,稀释一定浓度的标记有荧光铕纳米粒子的蛋白与包被一浓度有抗体或抗原的微孔反应板样品池反应,其中,稀释的标记有荧光铕纳米粒子的蛋白的浓度是根据荧光质控品的荧光信号要求调整;或包被一浓度有抗体或抗原的微孔反应板样品池的包被浓度是根据荧光质控品的荧光信号要求调整。

[0049] 本发明通过制备一种荧光铕纳米粒子,并把荧光铕纳米粒子结合在微孔反应板样品池上,使微孔反应板样品池在干燥状态下仍具有一定量荧光信号,并用此荧光铕纳米粒子制作成质控品,代替铕离子与增强液制作的液相标准质控品。本发明的质控品具有使用方便、性能稳定等优点,可用于时间分辨免疫分析荧光仪的生产调试和维护保养,其具体的有益效果如下:

[0050] (1) 时间分辨免疫分析荧光仪固相质控板是一种使用方便、性能稳定、用于时间分辨免疫分析荧光仪的设备生产调试、设备维护保养而设计的固相质控板,由于该质控板是干燥、固体状态,因此,外界环境稀土元素对固相板条信号没有影响;

[0051] (2) 固相板条非常稳定,固相质控板制备通过对处理过的带一定荧光信号微孔反应板样品池按梯度排列来调试时间分辨免疫分析荧光仪的灵敏度和检测范围;它通过对处理过的带一定荧光信号微孔反应板样品池按边孔效应排列来调试时间分辨免疫分析荧光仪的光路准确性的检测信号的边孔效应;

[0052] (3) 固相质控板可随身携带,非常方便用于时间分辨免疫层析检测仪的设备定期维护保养和检修的质量控制标准。

具体实施方式

[0053] 实施例 1 :通过乳液聚合反应制备聚苯乙烯 - 丙烯酸纳米微粒

[0054] 步骤如下 :

[0055] (1) 在加有一粒搅拌子的圆底烧瓶内加入含 0.4mmol SDS (十二烷基磺酸钠) 10ml 去离子水,通氮气保护 ;

[0056] (2) 搅拌下加入 70mmol 苯乙烯 (去除阻聚剂) 和 10mmol 丙烯酸单体 (去除阻聚剂) ;

[0057] (3) 逐渐升高反应温度至 70℃,加入过硫酸钾 (经过重结晶) 5mmol,搅拌反应 10 小时 ;

[0058] (4) 将反应体系冷却至室温 ;

[0059] (5) 将产物置于 0.45 微米针头过滤器中过滤,超速离心机离心,转速 6 万转 / 分钟,离心 50 分钟,沉淀用 100mM 的碳酸氢钠缓冲液 (pH9.0) 溶解,贮存于 4℃ 环境。

[0060] 本实施例中合成的聚苯乙烯 - 丙烯酸纳米微粒,其粒径在 10 ~ 100nm。

[0061] 实施例 2 :通过乳液聚合反应制备聚苯乙烯 - 甲基丙烯酸纳米微粒

[0062] 按照实施例 1 的方法进行,但将其中的丙烯酸单体 (去除阻聚剂) 改成 3mmol 甲基丙烯酸 (去除阻聚剂) 单体,反应温度改为 68℃,搅拌反应改为 6 小时,其余不变,得到聚苯乙烯 - 甲基丙烯酸纳米微粒。

[0063] 实施例 3 :通过乳液聚合反应制备聚苯乙烯 - 丙烯酰胺纳米微粒

[0064] 按照实施例 1 的方法进行,但将其中的丙烯酸单体 (去除阻聚剂) 改成 6mmol 丙烯酰胺,反应温度改为 65℃,搅拌反应改为 8 小时,其余不变,得到聚苯乙烯 - 丙烯酰胺纳米微粒。

[0065] 实施例 4 :通过无皂乳液聚合反应制备聚苯乙烯 - 丙烯酸 - 甲基丙烯酸甲酯纳米微粒

[0066] 步骤如下 :

[0067] (1) 在加有一粒搅拌子的圆底烧瓶内加入 10ml 去离子水,通氮气保护 ;

[0068] (2) 搅拌下加入 70mmol 苯乙烯 (去除阻聚剂)、30mmol 甲基丙烯酸甲酯 (去除阻聚剂) 和 10mmol 丙烯酸单体 (去除阻聚剂) ;

[0069] (3) 逐渐升高反应温度至 65℃,加入过硫酸铵 (经过重结晶) 5mmol,搅拌反应 10 小时 ;

[0070] (4) 将反应体系冷却至室温 ;

[0071] (5) 采用 0.45 微米针头过滤器过滤后,用高速离心机离心,10000g,离心 40 分钟,沉淀用 100mM 的碳酸氢钠缓冲液 (pH9.0) 溶解,并存放于 4℃ 环境。

[0072] 本实施例中合成的聚苯乙烯 - 丙烯酸 - 甲基丙烯酸甲酯纳米微粒,其粒径在 200 ~ 500nm。

[0073] 实施例 5 :通过无皂乳液聚合反应制备聚苯乙烯 - 甲基丙烯酸 - 甲基丙烯酸甲酯纳米微粒按照实施例 4 的方法进行,但将其中的苯乙烯 (去除阻聚剂) 改成 20mmol,甲基丙烯酸甲酯 (去除阻聚剂) 改成 50mmol,并将丙烯酸单体 (去除阻聚剂) 改成 5mmol 甲基丙烯酸 (去除阻聚剂) 单体,反应温度改为 70℃,搅拌反应改为 6 小时,其余不变,得到聚苯乙

烯-甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯纳米微粒。

[0074] 实施例 6:通过无皂乳液聚合反应制备聚苯乙烯-丙烯酰胺-甲基丙烯酸甲酯纳米微粒按照实施例 4 的方法进行,但将其中的苯乙烯(去除阻聚剂)改成 50mmol,甲基丙烯酸甲酯改成 20mmol,并将丙烯酸单体(去除阻聚剂)改成 20mmol 丙烯酰胺,反应温度改为 68℃,搅拌反应改为 8 小时,其余不变,得到聚苯乙烯-丙烯酰胺-甲基丙烯酸甲酯纳米微粒。

[0075] 实施例 7:通过种子乳液聚合反应制备聚苯乙烯-丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯纳米微粒

[0076] 步骤如下:

[0077] (1) 按实施例 1 的方法,取 1g 制备得到的聚苯乙烯-丙烯酸纳米微粒产物,加入 90ml 去离子水,通氮气保护,同时搅拌下,加入 70mmol 苯乙烯(去除阻聚剂)、50mmol 甲基丙烯酸甲酯(去除阻聚剂)、5mmol 丙烯酸单体(去除阻聚剂),溶胀一个晚上;

[0078] (2) 逐渐升高反应温度至 65℃,加入过硫酸钾(经过重结晶)5mmol,搅拌反应 15 小时;

[0079] (3) 采用 0.45 微米过滤器过滤后,用高速离心机离心,15000g,离心 50 分钟,用 100mM 的碳酸氢钠缓冲液(pH9.0)溶解,并存放于 4℃环境。

[0080] 本实施例中合成的聚苯乙烯-丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯纳米微粒,其粒径在 50~250nm。

[0081] 实施例 8:通过种子乳液聚合反应制备聚苯乙烯-丙烯酸-甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯纳米微粒

[0082] 按照实施例 7 的方法进行,但将其中的聚苯乙烯-丙烯酸纳米微粒产物改成 5g,甲基丙烯酸甲酯(去除阻聚剂)改成 20mmol,丙烯酸单体(去除阻聚剂)改成 20mmol 甲基丙烯酸(去除阻聚剂),反应温度改为 68℃,搅拌反应改为 25 小时,其余不变,得到聚苯乙烯-丙烯酸-甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯纳米微粒。

[0083] 实施例 9:通过种子乳液聚合反应制备聚苯乙烯-丙烯酰胺纳米微粒

[0084] 按照实施例 7 的方法进行,但将其中的聚苯乙烯-丙烯酰胺纳米微粒产物改成 3g,甲基丙烯酸甲酯=0,丙烯酸单体(去除阻聚剂)改成 10mmol 丙烯酰胺,反应温度改为 70℃,搅拌反应改为 20 小时,其余不变,得到聚苯乙烯-丙烯酰胺纳米微粒。

[0085] 实施例 10:硅胶纳米乳胶微粒的制备

[0086] 步骤如下:

[0087] (1) 在加有一粒搅拌子的 100ml 圆底烧瓶内加入 2ml 去离子水、200 μl 的四乙氧基硅烷、2.4g 的 TritonX-100、1.9g 的正己醇和 7.5g 的环己烷,制成 W/O 型微乳液;

[0088] (2) 在加有一粒搅拌子的 100ml 圆底烧瓶内加入 2.4g 的 Triton X-100、1.9g 的正己醇、7.5g 的环己烷和 200 微升的浓氨水,制成另一种微乳液。

[0089] (3) 把(2)的微乳液在剧烈搅拌情况下加入到(1)微乳液,室温搅拌聚合反应 24 小时,加入 50ml 丙酮结束反应,用 0.45 微米过滤器过滤后,超速离心机离心,转速 6 万转/分钟,离心 50 分钟,沉淀用 100mM 的碳酸氢钠缓冲液(pH9.0)溶解,并存放于 4℃环境。

[0090] 本实施例中合成的硅胶纳米乳胶微粒,其粒径在 40~400nm。

[0091] 实施例 11:硅胶纳米乳胶微粒的制备

[0092] 按照实施例 10 的方法进行,但将其中的四乙氧基硅烷改成 0.5mmol,表面活性剂采用聚氧乙烯基辛基苯基醚总量为 2mmol,环己烷总量改成 100mmol,正己醇总量为改成 20mmol,氨水改成 0.1mmol,聚合反应 20 小时,得到硅胶纳米乳胶微粒。

[0093] 实施例 12:硅胶纳米乳胶微粒的制备

[0094] 按照实施例 10 的方法进行,但采用 4mmol 3-氨丙基三乙氧基硅烷为原料,表面活性剂采用聚氧乙烯基壬基苯基醚总量为 8mmol,环己烷总量改成 200mmol,正己醇总量改成 40mmol,氨水改成 0.4mmol,聚合反应 28 小时,得到硅胶纳米乳胶微粒。

[0095] 实施例 13:强荧光有机高分子纳米微粒的制备

[0096] 步骤如下:

[0097] (1) 在 10mL 100mM 的碳酸氢钠缓冲液中 (pH9.0) 中加入 8 毫升丙酮 (甲醇或四氢呋喃),再加入 4 μmol 氯化铕 (EuCl_3), 12 μmol β -萘基甲酰三氟丙酮 (β -NTA), 12 μmol 三正辛基氧磷 (TOPO), 逐滴加入到 1ml 实施例 1 制备的聚苯乙烯-丙烯酸纳米微粒悬浮体 (或实施例 2 到 12 制备的所有微粒);

[0098] (2) 螯合物经搅拌扩散到纳米微粒内部;

[0099] (3) 用旋转蒸发去除有机溶剂,剩余强荧光有机高分子纳米微粒用超速离心机离心,转速 40000 转/每分钟,离心 50 分钟,沉淀用 pH6.8 的磷酸盐缓冲液 PBS (0.1M) 缓冲液溶解,得到表面带羧基的强荧光有机高分子纳米微粒,并存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境。

[0100] 实施例 14:以强荧光有机高分子纳米微粒 (表面带羧基) 标记兔 IgG (EDC 法)

[0101] 步骤如下:

[0102] (1) 搅拌下,将 1mL 按照实施例 13 方法制备得到的表面带羧基的强荧光有机高分子纳米微粒 (20mg), 在 pH6.8 的磷酸盐缓冲液 PBS (0.1M) 缓冲液稀释到 5ml;

[0103] (2) 加入 10mg 碳二亚胺 (EDC), 10mg N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐 (N-hydroxysulfosuccinimide Sodium salt) 搅拌溶解,室温反应 30 分钟;

[0104] (3) 加入 2mg 兔 IgG (辛酸硫酸铵法纯化,自制),搅拌均匀,室温反应 24 小时;

[0105] (4) 反应结束后,加入乙醇胺封闭 30 分钟,然后用高速离心机离心,15000g,离心 30 分钟,用稀释液 (含有 5g/L 的酪蛋白、5g/L 的 PVP、0.2% 叠氮钠的 pH8.0 的 50mM 的 Tris 缓冲液) 溶解沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。

[0106] 实施例 15:以强荧光有机高分子纳米微粒 (表面带硅羟基) 标记兔 IgG (CNBr 法)

[0107] 步骤如下:

[0108] (1) 搅拌下,将 1mL 按照实施例 13 的方法制备的得到的表面带硅羟基的强荧光有机高分子纳米微粒 (20mg), 在 pH8.5 的硼酸盐缓冲液 (0.1M) 缓冲液稀释到 5ml;

[0109] (2) 加入 10mg 溴化氰 (CNBr), 搅拌溶解,活化 20 分钟后,加入 2mg 兔 IgG (辛酸硫酸铵法纯化,自制),搅拌均匀,室温反应 20 小时;反应结束后,高速离心机离心,15000g,离心 30 分钟;

[0110] (3),沉淀用封闭液 (含 5g/L 的 BSA 的 pH8.5 的 50mM 的 Tris 缓冲液) 封闭 8~16 小时,然后用高速离心机离心,15000g,离心 30 分钟,用稀释液 (含 5g/L 的酪蛋白、5g/L 的 PVP、0.2% 叠氮钠的 pH8.0 的 50mM 的 Tris 缓冲液) 溶解沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。

[0111] 实施例 16:以强荧光有机高分子纳米微粒 (表面带氨基) 标记兔 IgG (戊二醛法)

[0112] 按照实施例 15 的方法进行,但采用表面带氨基的强荧光有机高分子纳米微粒,采

用体积浓度为 1% 的戊二醛进行活化 40 分钟后,与蛋白的室温偶联反应改成 28 小时,且强荧光有机高分子纳米微粒与蛋白的质量比为 2 : 1 或 100 : 1,其他条件不变,最终得到强荧光有机高分子纳米微粒(表面带氨基)标记兔 IgG。

[0113] 实施例 17 :制备包被羊抗兔 IgG 微孔反应板样品池

[0114] 步骤如下 :

[0115] (1) 把羊抗兔 IgG(辛酸硫酸铵法纯化,自制)用 100mM 碳酸钠缓冲液中 (pH9.6) 稀释到 2 微克 / 毫升 ;

[0116] (2) 在每个微孔反应板样品池内放入 100 微升上述 2 微克 / 毫升羊抗兔 IgG,室温静止放置 24 小时 ;

[0117] (3) 用包被机或洗板机吸干包被液,注入洗涤液 (50mM pH7.8 的 Tris,其中,含有 9g/L NaCl、质量浓度 0.2% 叠氮钠、质量浓度 0.25% Tween-20) 350ul/ 孔,立即吸干,重复 2 次。

[0118] (4) 注入封闭液 (50mM pH7.8 的 Tris,其中,含有 9g/L NaCl、质量浓度 0.2% 叠氮钠、BSA 10g/L、糖 40g/L) 200ul/ 孔,放 37°C 2 小时或室温放置 12 小时 ;

[0119] (5) 吸干封闭液,将板子放入甩干机甩干 5 分钟 ;

[0120] (6) 放入 37 度恒温箱 1 小时,取出。

[0121] 实施例 18 :免疫反应制备一定荧光信号的样品池

[0122] 步骤如下 :

[0123] (1) 把实施例 14 或 15 制备的标记有兔 IgG 的强荧光有机高分子纳米乳胶微粒按 10 倍梯度稀释,稀释 6 个梯度 ;

[0124] (2) 根据表 1、2、3 的方式微孔反应板样品池荧光信号要求,按梯度各取 100 微升上述稀释了的强荧光有机高分子纳米乳胶微粒,放入实施例 17 制备的包被有羊抗兔 IgG 微孔反应板样品池,室温免疫反应 1 小时 ;

[0125] (3) 用洗板机洗板 6 次,放入甩干机甩干 5 分钟,干燥。

[0126] 表 1

[0127]

1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万

[0128]

1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万

[0129] 表 2

[0130]

			3000					3000			
			3000					3000			
			3000					3000			
			3000					3000			
			3000					3000			
			3000					3000			
			3000					3000			
			3000					3000			

[0131] 表 3

[0132]

		3000		3000			3000		3000		
		3000		3000			3000		3000		
		3000		3000			3000		3000		
		3000		3000			3000		3000		
		3000		3000			3000		3000		
		3000		3000			3000		3000		
		3000		3000			3000		3000		

		3000		3000			3000		3000		
--	--	------	--	------	--	--	------	--	------	--	--

[0133] 实施例 19 :把标记有兔 IgG 的铈纳米粒子直接包被在样品池内

[0134] 步骤如下 :

[0135] (1) 把实施例 14 或 15 制备的标记有兔 IgG 的荧光铈纳米粒子按 10 倍梯度稀释, 稀释 6 个梯度 ;

[0136] (2) 根据表 1、2、3 的方式微孔反应板样品池内荧光信号要求, 在微孔反应板样品池内加入 100 微升上述稀释了不同倍数的荧光有机高分子纳米乳胶微粒, 室温包被 24 小时 ;

[0137] (3) 用洗板机洗板 6 次, 放入甩干机甩干 5 分钟, 干燥。

[0138] 实施例 20 :组装成铈纳米粒子荧光质控品 (时间分辨免疫分析荧光仪固相质控板)

[0139] 步骤如下 :

[0140] (1) 将实施例 18-19 制备的微孔反应板, 按表 1 组装成按信号梯度排列时间分辨免疫分析荧光仪固相质控板 ;

[0141] (2) 将实施例 18-19 制备的微孔反应板, 按表 4 组装成按信号孔效应排列顺序的时间分辨免疫分析荧光仪固相质控板 ;

[0142] (3) 将实施例 18-19 制备的微孔反应板, 按表 5 组装成按信号梯度排列和信号边孔效应排列顺序组合在一起的时间分辨免疫分析荧光仪固相质控板。

[0143] 表 4

[0144]

500 万			3000					3000			500 万
		3000		3000			3000		3000		
			3000					3000			
			3000					3000			
		3000		3000			3000		3000		
500 万			3000					3000			500 万

[0145] 表 5

[0146]

500 万			3000	3000				3000			500 万
		3000		3000			3000		3000		

[0147]

			3000					3000			
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
1500	1500	3000	3000	1 万	1 万	10 万	10 万	100 万	100 万	800 万	800 万
			3000					3000			
		3000		3000			3000		3000		
500 万			3000					3000			500 万

[0148] 实施例 21 :制备一定荧光信号的镉纳米粒子荧光质控品 (用于生物芯片检测的时间分辨免疫分析荧光仪)

[0149] 步骤如下 :

[0150] (1) 用 Biodot Arrayer 在生物芯片的固相载体上,喷点按表 1、2、3 的方式组合的一定浓度羊抗兔 IgG,在湿盒过夜,用封闭液 (含 5g/L 的 BSA 的 pH8.5 的 50mM 的 Tris 缓冲液) 封闭 3 ~ 8 小时,干燥备用 ;

[0151] (2) 把实施例 14 或 15 制备的标记有兔 IgG 的荧光镉纳米粒子稀释一定浓度,与步骤 (1) 制备的固相载体反应,室温免疫反应 1 小时 ;

[0152] (3) 用洗液 (50mM pH7.8 的 Tris,其中,含有 9g/L NaCl、质量浓度 0.2%叠氮钠、质量浓度 0.25% Tween-20) 清洗固相载体板,放入甩干机甩干 5 分钟,干燥,得到具有一定荧光信号的镉纳米粒子荧光质控品。该质控品可用于生物芯片检测的时间分辨免疫分析荧光仪。

[0153] 实施例 22 :制备好镉纳米粒子荧光质控品的应用 :

[0154] 考查时间分辨荧光检测仪有两个重要的参数,时间分辨荧光检测仪的检测范围和仪器光学系统是否调试准确,同时对于荧光检测仪 (苏州新波生物技术有限公司 AnyTest2000),会存在仪器高端“HOOK EFFECT”和低端“HOOK EFFECT“,因此,按表 1 质控品就可是评估检测仪的调试范围,如果表 1 质控品时间分辨检测仪线性回归达到 99.5%以上,说明仪器检测灵敏度和线性合格;按表 4 质控品评估时间分辨荧光检测仪光学系统调试准确性,先按表 4 检测,再把四个角的 500 万微孔反应板样品池放进四个 3000CPS 微孔反应板样品池中间,检测 500 万微孔反应板样品池对四周影响,如果两次检测结果 500 万微孔反应板样品池对周围 3000CPS 影响小于 15%,证明设备光学系统合格。在维修保养也是按同样这种方式评估检测仪。

[0155] 表 5 是表 1 和表 4 合在一起的质控品。

专利名称(译)	销纳米粒子荧光质控品及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103175953B	公开(公告)日	2015-04-15
申请号	CN201110440134.1	申请日	2011-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	苏州新波生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州新波生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州新波生物技术有限公司		
[标]发明人	吴俊清 任媛媛 杨挥		
发明人	吴俊清 任媛媛 杨挥		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/68		
代理人(译)	高月红		
其他公开文献	CN103175953A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种销纳米粒子荧光质控品及其制备方法和应用，该质控品是一种由具有荧光信号微孔反应板按顺序排列，形成的固相质控板；其制备方法，包括：1)制备荧光销纳米粒子；2)在荧光销纳米粒子表面标记蛋白；3)在微孔反应板样品池上包被抗体或抗原；4)把包被有抗体或抗原的微孔反应板样品池与标记有荧光销纳米粒子的蛋白进行免疫反应，制备具有荧光信号微孔反应板；5)把具有荧光信号微孔反应板按一定顺序排列，制备成销纳米粒子荧光质控品；该销纳米粒子荧光质控品，可应用于对生物芯片检测的时间分辨免疫分析荧光仪校验和保养，而且具有使用方便、性能稳定等优点。

1500	1500	3000	3000	1万	1万	10万	10万	100万	100万	800万	800万
1500	1500	3000	3000	1万	1万	10万	10万	100万	100万	800万	800万
1500	1500	3000	3000	1万	1万	10万	10万	100万	100万	800万	800万
1500	1500	3000	3000	1万	1万	10万	10万	100万	100万	800万	800万