



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308698 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310236062. 8

(22) 申请日 2013. 06. 17

(71) 申请人 北京北检·新创源生物技术有限公
司

地址 102628 北京市大兴区工业开发区科苑
路 18 号 1 栋 1 至 2 层

(72) 发明人 姜敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/536 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶
联方法

(57) 摘要

本发明涉及一种将含氨基的分子共价偶联至
微球上的偶联方法。本发明将反应混合物同时接
触碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (或者 N- 羟基
硫代琥珀酰亚胺), 进行共价偶联反应。利用本方
法制备的试剂, 有效改善含氨基的分子在偶联过
程中的自我聚合 ; 且绘制标准曲线时具有更好的
线性。

1. 一种将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法,其包括步骤:

- 1) 提供微球;
- 2) 提供含氨基的分子;
- 3) 将微球与含氨基的分子混合均匀,获得微球与含氨基的分子的混合物;
- 4) 使步骤 3) 混合物同时接触碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺,进行共价偶联反应;
- 5) 收获偶联有含氨基的分子的微球,

其中所述步骤 1) 和步骤 2) 的顺序是可互换的。

2. 一种将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法,其包括步骤:

- 1) 提供微球;
- 2) 提供含氨基的分子;
- 3) 将微球与含氨基的分子混合均匀,获得微球与含氨基的分子的混合物;
- 4) 使步骤 3) 混合物同时接触碳二亚胺和 N- 羟基硫代琥珀酰亚胺,进行共价偶联反应;
- 5) 收获偶联有含氨基的分子的微球,

其中所述步骤 1) 和步骤 2) 的顺序是可互换的。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法,其中所述微球为羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法,其中所述含氨基的分子是多肽或蛋白质。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法,其中所述微球直径为 80nm 至 250nm;优选 100-200nm。

6. 一种偶联有含氨基的分子的微球,其是根据权利要求 1 或 2 所述的将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法所制备的。

7. 一种胶乳增强免疫比浊试剂,其特征在于所述试剂含有权利要求 6 所述的偶联有含氨基的分子的微球。

8. 一种胶乳增强免疫比浊试剂盒,其特征在于所述试剂盒含有权利要求 6 所述的偶联有含氨基的分子的微球、或含有权利要求 7 所述的胶乳增强免疫比浊试剂。

9. 根据权利要求 6 所述的偶联有含氨基的分子的微球在制备诊断试剂中的用途。

一种将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生化和临床检验领域。具体而言,本发明涉及一种共价偶联方法。更具体而言,涉及一种将含氨基的分子共价偶联到微球上的偶联方法。

背景技术

[0002] 在传统免疫比浊法当中,如果样本中待检测的抗原或抗体浓度太低、或者分子量过小,则抗原-抗体复合物极难形成浊度,除非放置比较长的时间。如要形成较大的复合物,则抗原和抗体的用量也相应增加。鉴于上述缺陷,便发展出了胶乳增强免疫比浊法。

[0003] 胶乳增强免疫比浊法利用生物化学方法将抗体(或抗原)与微球结合。当样本中待检测的抗原(或抗体)与标记到微球上的抗体(或抗原)相结合时,便形成了抗原-抗体-胶乳颗粒复合物。这无疑改善了浊度的形成,增强了反应吸光度。利用生化分析仪进行比浊测定,整个分析过程只需几分钟,该方法与传统免疫比浊法比较其灵敏度更高。

[0004] 在进行胶乳增强免疫比浊法过程中,需要将抗体(或抗原)与微球进行结合。结合方式可以分为两大类:物理吸附或共价偶联。其中物理吸附是靠蛋白质分子结构上的疏水基团与微球表面的疏水基团间的相互作用,将抗原或抗体吸附到微球表面。共价偶联法是通过蛋白质与微球表面的化学基团发生反应,将蛋白质共价偶联在微球上。

[0005] 共价偶联法由于特异性好、易保存、分散性良好等特点,现已广泛应用于体外诊断试剂中。市面上可见多种类型的微球,其中最为常见的是聚苯乙烯胶乳颗粒。很多胶乳颗粒表面带有化学基团包括但不限于羧基、氨基、酰肼、醛基、环氧基、巯基、羟基、金属基、硅羟基。这些基团,经过适当的反应,可以共价偶联上各种生物分子。其中,羧基胶乳颗粒可以采用多种策略进行活化,产生能够和蛋白质中的亲核基团(如氨基)发生偶联的反应性中间体。

[0006] 目前为止,用于将蛋白质以及其它含氨基的分子偶联到羧基胶乳颗粒上最常见的反应策略是水溶性碳二亚胺(EDC, 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺)介导的方法。该方法可以通过两种模式来进行:一步法;或者两步法。

[0007] 在一步法中,EDC直接加到蛋白质与微球混合液中,羧基胶乳颗粒被水溶性EDC激活而产生中间体酯,中间体酯可以直接与蛋白上的氨基发生反应。

[0008] 在两步法中,先用EDC激活胶乳颗粒,再进一步加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)来生成另一个二级中间体酯(NHS-酯或Sulfo-NHS酯)。和一步法的中间体酯相比,NHS-酯或Sulfo-NHS酯在结构上更加稳定。因此,两步法的产量通常更高(Greg T. Hermanson. Bioconjugate Techniques. Academic Press, 2010)。

[0009] 偶联过程中,由于大多数蛋白质上同时存在有很多氨基(如赖氨酸、精氨酸残基)和羧基(如丝氨酸、苏氨酸残基),过量的EDC容易介导蛋白质之间发生自我聚合,两步法能够克服这种缺陷,但是由于步骤繁多,不仅增加了时间成本,企业还不得不编写更多的SOP文件(操作规程文件)、不得不引入更多的质量控制环节。显然,从现代化的大规模生产的角度而言,两步法不是一种经济有效的方式。

[0010] 相比较而言,一步法的步骤简单快捷,更适合大规模生产。但是,自我聚合现象会相对比较严重,这无疑导致了原材料的浪费、成本增加。并且,制备出来的试剂空白值较高,可以想象这势必会有损产品的空白检测限和灵敏度。此外,传统一步法制备的试剂在测绘标准曲线时线性较差,从而最终影响到待测样本的测定值。因此,本领域仍需要一种改进的一步偶联方法。

发明内容

[0011] 发明人将只有两步法中才使用的 NHS 引入到一步法当中时,出乎意料地发现,通过这种方法所制备的试剂不仅空白低、线性也得到显著改善。并且,Sulfo-NHS 比 NHS 显示出了更加优越的效果。

[0012] 因此,根据本发明的一个方面,提供一种将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法,其包括步骤:

[0013] 1) 提供微球;

[0014] 2) 提供含氨基的分子;

[0015] 3) 将微球与含氨基的分子混合均匀,获得微球与含氨基的分子的混合物;

[0016] 4) 使步骤 3) 混合物同时接触碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺,进行共价偶联反应;

[0017] 5) 收获偶联有含氨基的分子微球,

[0018] 其中所述步骤 1) 和步骤 2) 的顺序是可互换的。

[0019] 在一些实施方式中,所述微球为羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0020] 本发明所用微球可以是任何合适的市售微球,比如 Bangs Laboratories、Sigma、Roche、Gibco、Merck、Amresco、Invitrogen、Millipore 等供应商都提供有各种型号、规格的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。本领域技术人员可以理解,自行制备的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒也可以用于实施本发明。

[0021] 在一些实施方式中,所述微球直径为 80nm 至 250nm。然而,本领域技术人员可以理解,本发明的实施并不依赖于微球的尺寸,只要其表面修饰有羧基基团就可以用于实施本发明。微球供应商提供各种不同尺寸微球,在胶乳增强免疫比浊检测领域当中,常见微球的尺寸为 80nm 至 250nm。在一个具体的实施方式中,所用微球直径为 150 或 200nm。

[0022] 在一些实施方式中,所述含氨基的分子选自多肽或蛋白质。然而,本领域技术人员可以理解,在偶联过程中,羧基微球经活化之后产生能够和亲核基团(如氨基)发生偶联的反应性中间体。鉴于此,理论上而言,任何含有氨基的分子都能通过本申请的方法共价偶联至羧基微球上。在免疫比浊检测的领域当中,通常的做法是将蛋白质或多肽偶联至微球上,以便于借此检测样本中的待测分子。所述蛋白质或多肽包括但不限于抗原、抗体、酶、配体、受体。在一个具体实施方式中,将抗体偶联至微球上。在一个具体实施方式中,将多肽偶联至微球上。

[0023] 在一些实施方式中,步骤 1) 可以按照现有技术中一步法操作进行。例如,将微球悬浮在适当的缓冲液中来提供微球,也可以按照微球供应商推荐的方法来提供微球。可用的缓冲液包括,但不限于,MES 缓冲液、PBS 缓冲液、HEPES 缓冲液、MOPS 缓冲液、或者上述缓冲液的组合。缓冲液 pH 可以在 pH5-8 范围内。应当理解,本领域技术人员可以根据胶乳

颗粒的类型自行确定缓冲液类型及其 pH 范围,也可以采用微球供应商推荐的缓冲液。在一个具体的实施方式中,将微球悬浮在 MES 溶液 pH6-7 的缓冲液中来提供微球。

[0024] 在一些实施方式中,步骤 2) 可以按照现有技术中的一步法操作进行。例如,将含氨基的分子溶解在适当的缓冲液中。在一个具体实施方式中,将抗体溶解在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中来提供含氨基的分子。但是,应当理解本申请的方法并不限于此,可用的缓冲液包括,但不限于,MES 缓冲液、PBS 缓冲液、HEPES 缓冲液、MOPS 缓冲液、或者上述缓冲液的组合。缓冲液 pH 可以在 pH5-8 范围内。应当理解,本领域技术人员可以根据待偶联的分子自行确定适当的缓冲液类型及其 pH 范围。

[0025] 在一些实施方式中,使微球和含氨基的分子的混合物同时接触碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,进行共价偶联反应。传统一步法仅采用碳二亚胺一种化合物作为偶联剂。和传统一步法相比,本申请的方法还同时引入了 N-羟基琥珀酰亚胺。N-羟基琥珀酰亚胺是在两步法当中才会用到的。两步法中,碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺是彼此分开,先后加入至反应体系中的。与两步法不同,本申请的方法是使微球和含氨基的分子的混合物同时接触碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺。

[0026] 在一些实施方式中,碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺配制在同一溶液中,加入反应体系。

[0027] 在一些实施方式中,步骤 4) 的 N-羟基琥珀酰亚胺可以替换为 N-羟基硫代琥珀酰亚胺。不限于这种理论,可以认为 N-羟基硫代琥珀酰亚胺比 N-羟基琥珀酰亚胺带有更多的负电荷,这有助于在微球之间赋予更多的静电排斥力,从而在偶联期间更长时间地保持微球稳定的混悬状态,这进一步改善了自我聚合的现象。

[0028] 在一些实施方式中,可以在传统一步法偶联反应条件下进行偶联反应;也可以按照微球供应商推荐的反应条件进行;也可以按照待偶联分子公知的偶联反应条件进行。本领域技术人员可以根据生产规模、微球规格、含有氨基分子的性质确定适当的反应容器、反应温度、反应时间、是否搅拌以及搅拌速度。对于有些蛋白质,需要在 2-8 摄氏度的反应温度下进行;对于有些蛋白质,可以在比较广范围的温度下进行,例如 2-40 摄氏度。反应时间可以为 0.5-5 小时,优选 1-4 小时,更优选 2-3 小时。通常提高搅拌速度有助于反应的进行,但是过快的搅拌速度,由于机械力会破坏蛋白质的活性。因此,本领域技术人员可以自行确定是否搅拌以及搅拌的速度。

[0029] 在一个具体的实施方式中,偶联反应在室温(20-25 摄氏度)下进行,温和搅拌,持续 2-3 小时。

[0030] 在一些实施方式中,可以按照现有技术收获经过偶联的微球。例如,离心、过滤、沉淀等。

[0031] 在一个具体的实施方式中,通过离心来收获经过偶联的微球。

[0032] 根据本发明的另一个方面,本发明提供一种根据上述方法所制备的偶联有含氨基的分子的微球。

[0033] 在一个具体的实施方式中,本发明提供了一种偶联有抗 Cys-C 抗体的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0034] 在另一个具体的实施方式中,本发明提供了一种偶联有链球菌溶血素 O 的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0035] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了一种胶乳增强免疫比浊试剂,其含有上述偶联有含氨基的分子的微球。

[0036] 在一个具体的实施方式中,本发明提供了一种 Cys-C 胶乳增强免疫比浊试剂,其含有偶联有抗 Cys-C 抗体的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0037] 在另一个具体的实施方式中,本发明提供了一种抗链球菌溶血素 O 的胶乳增强免疫比浊试剂,其含有偶联有链球菌溶血素 O 的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒。

[0038] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了一种胶乳增强免疫比浊试剂盒,所述试剂盒含有上述偶联有含氨基的分子的微球、或含有上述胶乳增强免疫比浊试剂。

[0039] 在一些实施方式中,本发明提供了一种胶乳增强免疫比浊试剂盒,其可以是单试剂形式、或者多试剂形式。

[0040] 在一些具体的实施方式中,本发明提供了一种 Cys-C 胶乳增强免疫比浊试剂盒,其是双试剂形式。所述试剂盒含有第一试剂和第二试剂。其中第一试剂含有缓冲液、盐、多聚物、表面活性剂,任选地根据需要还可以含有稳定剂和 / 或防腐剂。其中第二试剂含有偶联有抗 Cys-C 抗体的羧基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒和缓冲液,任选地根据需要还可以含有盐、多聚物、表面活性剂、稳定剂和 / 或防腐剂。

[0041] 其中所述表面活性剂为非离子表面活性剂。所述防腐剂选自山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、PC300 中的一种或几种。所述多聚物选自 PEG 系列、PVP 系列中的一种或几种。其中所述非离子表面活性剂选自 TWEEN 系列、SPAN 系列、TRITON 系列中的一种或几种。

[0042] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了根据上述方法所制备的偶联有含氨基的分子的微球在制备诊断试剂中的用途。

附图说明

[0043] 图 1 :用传统一步法制备的 Cys-C 胶乳增强免疫比浊试剂绘制的标准曲线。

[0044] 图 2 :用本发明的方法 (加入 Sulfo-NHS) 制备的 Cys-C 胶乳增强免疫比浊试剂绘制的标准曲线。

[0045] 图 3 :用传统一步法制备的抗链球菌溶血素 O 胶乳增强免疫比浊试剂绘制的标准曲线。

[0046] 图 4 :用本发明的方法 (加入 NHS) 制备的抗链球菌溶血素 O 胶乳增强免疫比浊试剂绘制的标准曲线。

具体实施方式

[0047] 为了使本发明易于理解,下面结合具体实施例进一步阐述本发明。除非另有指明,“%”表示质量 / 体积。

[0048] 以下提供了本发明实施方式中所使用的具体材料及其来源。但是,应当理解的是,这些仅仅是示例性的,并不意图限制本发明,与如下试剂和仪器的类型、型号、品质、性质或功能相同或相似的材料均可以用于实施本发明。

[0049] 以下实施例以抗 Cys-C 抗体和链球菌溶血素 O 为例进行了测试,但是本领域技术人员能够理解,其它多肽、蛋白质等含有氨基的分子同样可用来实施本发明。

[0050] 术语

[0051] 在本发明上下文中，“多肽”是指 α -氨基酸通过肽链连接在一起而形成的化合物，通常含有由 2-50 个氨基酸组成。

[0052] 在本发明上下文中，“蛋白质”是指 α -氨基酸通过肽链连接在一起而形成，再由一条或一条以上的多肽链按照特定方式结合而形成的高分子化合物，通常由 50 个以上的氨基酸组成的肽称为蛋白质。

[0053] 在本发明上下文中，“聚苯乙烯胶乳颗粒”是指以苯乙烯为单体聚合而成的聚合物；胶乳颗粒的大小，随聚合中各物质的比例不同而异，可根据不同用途进行合成，直径从几十纳米到几微米不等；常见的胶乳颗粒多为表面修饰的，因为此类颗粒可以广泛用于许多领域（如生物化学、医学、药学、色谱柱填料及临床检验等），这些修饰基团例如羧基、羟基、氨基、乙烯基、偶氮基、酰肼、醛基、环氧基、巯基、金属基、硅羟基等。

[0054] 材料和仪器

[0055]

| | |
|------------------|---|
| 聚苯乙烯胶乳颗粒 | 150 nm、10%、表面羧基含量 65 μ mol/g, 照康生物; 200 nm、10%、表面羧基含量 65 μ mol/g, 照康生物 |
| 兔抗人 Cys-C 多克隆抗体 | 百川飞虹生物技术有限公司, 总蛋白含量 22mg/mL, 效价大于 1:400000 |
| Cys-C 标准品 | 北京九强生物技术股份有限公司 |
| 链球菌溶血素 O 标准品 | 北京九强生物技术股份有限公司 |
| 链球菌溶血素 O 重组抗原 | 武汉友芝友生物制药有限公司 |
| EDC | 阿拉丁, 分析纯 |
| NHS | 阿拉丁, 分析纯 |
| Sulfo-NHS | 阿拉丁, 分析纯 |
| MES | 南京旋光科技有限公司 |
| 甘氨酸 | 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯 |
| BSA | APIS |
| NaCl | 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯 |
| NaN ₃ | 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯 |
| NaOH | 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯 |
| 全自动生化分析仪 | 东芝-40 |
| 磁力搅拌器 | 国产 |
| 离心机 | 国产。 |

[0056]

[0057] 实施例 1 :传统一步法偶联抗 Cys-C 抗体

[0058] 1) 取 100 μ L 10 % 胶乳颗粒 (150nm), 加 2mL 10mM MES 溶液 (pH6.1) 混匀,

15,000rpm 离心 50min,弃上清之后,加 2mL10mM MES 溶液 (pH6.1) 用吸液器反复抽吸使胶乳颗粒分散混匀,胶乳颗粒浓度为 0.5%。

[0059] 2) 取 4.5 μ L 浓度为 22mg/mL 的兔抗人 Cys-C 抗体,用 pH7.4 的 PBS 缓冲液稀释到 100 μ L,混匀。

[0060] 3) 将步骤 1) 获得的微球溶液与 40 μ L 步骤 2) 获得的抗 Cys-C 抗体溶液混合,置于磁力搅拌器上加转子搅拌 15min 使两者充分混匀。

[0061] 4) 精确称取 0.0050g EDC 溶于 1mL 去离子水中获得 5mg/mL 的 EDC,取 25 μ L 加到混匀的胶乳颗粒与抗 Cys-C 抗体混合溶液中,在室温下,持续搅拌反应 3h。

[0062] 5) 反应结束后,将反应液在 15,000rpm 离心 40min,弃上清,获得偶联有抗 Cys-C 抗体的胶乳颗粒。

[0063] 实施例 2:本发明方法(采用 Sulfo-NHS)偶联抗 Cys-C 抗体

[0064] 1) 取 100 μ L 10% 胶乳颗粒 (150nm),加 2mL10mM MES 溶液 (pH6.1) 混匀,15,000rpm 离心 50min,弃上清之后,加 2mL10mM MES 溶液 (pH6.1) 用吸液器反复抽吸使胶乳颗粒分散混匀,胶乳颗粒浓度为 0.5%。

[0065] 2) 取 4.5 μ L 浓度为 22mg/mL 的兔抗人 Cys-C 抗体,用 pH7.4 的 PBS 缓冲液稀释到 100 μ L,混匀。

[0066] 3) 将步骤 1) 获得的微球溶液与 40 μ L 步骤 2) 获得的抗 Cys-C 抗体溶液混合,置于磁力搅拌器上加转子搅拌 15min 使两者充分混匀。

[0067] 4) 取 25 μ L EDC(5mg/mL) 连同 25 μ L Sulfo-NHS(50mg/mL) 同时加到混匀的胶乳颗粒与抗 Cys-C 抗体混合溶液中,在室温下,持续搅拌反应 3h。

[0068] 5) 反应结束后,将反应液在 15,000rpm 离心 40min,弃上清,获得偶联有抗 Cys-C 抗体的胶乳颗粒。

[0069] 实施例 3:Cys-C 试剂的制备

[0070] 取实施例 1(或 2) 收获的胶乳颗粒加 2mL0.01M PBS(pH7.4) 超声分散进行清洗;15,000rpm 离心 40min 弃上清;加 5mL0.1M 甘氨酸缓冲液(含 0.5% BSA,0.05% NaN_3 ,pH8.4) 超声分散获得浓度为 0.2% 的胶乳颗粒;磁力搅拌 30min 后,置于 2-8 $^{\circ}$ C 储存直至使用。

[0071] 配方如下:

[0072] 0.1M 甘氨酸缓冲液 pH8.4;

[0073] 0.5% BSA;

[0074] 0.2% 偶联有抗 Cys-C 抗体的微球;

[0075] 0.05% NaN_3 。

[0076] 实施例 4:Cys-C 诊断试剂盒的制备

[0077] 按照如下配方制备 Cys-C 诊断试剂盒:

[0078] 第一试剂 R1:

[0079] 0.1M 甘氨酸缓冲液 pH8.4;

[0080] 0.8% NaCl;

[0081] 0.5% PEG-6000;

[0082] 0.05% Tween-20;

[0083] 0.05% NaN_3 。

[0084] 第二试剂 R2 :将实施例 3 制备的 Cys-C 试剂作为第二试剂 R2。

[0085] 分别将第一试剂和第二试剂放置在合适的容器中,例如当用于全自动生化分析仪时,可以将第一试剂和第二试剂放置仪器专用的小瓶中。

[0086] 实施例 5 :绘制标准曲线

[0087] 将实施例 4 制备的诊断试剂装载到东芝-40 生化分析仪上,对 Cys-C 标准品 (0.5、1、2、4、8mg/L) 按照如下参数进行检测,并绘制标准曲线:

[0088] 检测模式 :两点终点法 ;

[0089] 主波长 / 副波长 :546nm/700nm ;

[0090] 读点 :60-62/34-36 ;

[0091] 反应方向 :正向 ;

[0092] 校准类型 :Spline ;

[0093] 样品量 :2.1 μ L ;

[0094] R1/R2 :175 μ L/35 μ L。

[0095] 实施例 6 :实验结果

[0096] 1. 用传统一步法获得的微球所配制的试剂的结果,见表 1 和图 1 所示:

[0097] 表 1. Cys-C 标准品测定值 (三次重复实验的均值)

[0098]

| 标准品浓度 | ΔA | A(主-副) | A(主) |
|-------|------------|--------|--------|
| 0 | 0.0029 | 0.3328 | 0.6151 |
| 0.5 | 0.0256 | 0.3507 | 0.6585 |
| 1 | 0.0494 | 0.3847 | 0.7392 |
| 2 | 0.0815 | 0.4330 | 0.8655 |
| 4 | 0.1084 | 0.4857 | 1.0115 |
| 8 | 0.1169 | 0.5113 | 1.1024 |

[0099] 采用上述测定值建立标准曲线方程,线性方程和相关系数为:

[0100] $Y = 0.0133X + 0.0298, r^2 = 0.7591$

[0101] 在实施例 1 偶联反应的 3 小时过程中,在后期观察到了自我聚合的现象,颗粒不能稳定地处于混悬状态,有沉淀可见。

[0102] 2. 用本发明方法 (加 Sulfo-NHS) 获得的微球所配制的试剂的结果如表 2 和图 2 所示:

[0103] 表 2. Cys-C 标准品测定值 (三次重复实验的均值)

[0104]

| 标准品浓度 | ΔA | A(主-副) | A(主) |
|-------|------------|--------|------|
| | | | |

| | | | |
|-----|---------|--------|--------|
| 0 | -0.0033 | 0.2883 | 0.5161 |
| 0.5 | 0.0024 | 0.3008 | 0.5497 |
| 1 | 0.0086 | 0.3127 | 0.5805 |
| 2 | 0.0281 | 0.3483 | 0.6652 |
| 4 | 0.0723 | 0.4205 | 0.8519 |
| 8 | 0.1099 | 0.4963 | 1.0747 |

[0105]

[0106] 采用上述测定值建立标准曲线方程,线性方程和相关系数为:

[0107] $Y = 0.0148X - 0.002, r^2 = 0.9709$

[0108] 在实施例2偶联反应的3小时过程中,全程均没有观察到自我聚合的现象,颗粒稳定地处于混悬状态。并且申请人还尝试将反应时间延长至更长的时间比如4小时的时候,仍然可以保持混悬状态,未见胶乳颗粒的聚集。

[0109] 从理论上而言,理想的线性方程应当是经过原点的。通过比较可见,当 $X = 0$ 时, $Y = 0.0298$ (传统方法), $Y = -0.002$ (本发明方法);当 $Y = 0$ 时, $X = -2.24$ (传统方法), $X = 0.135$ (本发明方法)。这意味着本发明的方法所获得的线性方程与坐标轴的交叉点更加靠近原点。

[0110] 并且,本发明的方法具有更好的线性相关系数 $r^2 = 0.9709$ (而传统方法的线性相关系数仅为0.7591)。技术人员知道, r^2 越接近1相关性越强。可见这种优良线性完全能够满足临床检验的应用要求。

[0111] 实施例7:传统一步法偶联链球菌溶血素O

[0112] 1) 取 $100 \mu\text{L} 10\%$ 胶乳颗粒(200nm),加2mL10mM MES溶液(pH6.1)混匀,15,000rpm离心50min,弃上清之后,加2mL10mM MES溶液(pH6.1)用吸液器反复抽吸使胶乳颗粒分散混匀,胶乳颗粒浓度为0.5%。

[0113] 2) 取1mg链球菌溶血素O溶于1ml pH7.4的PBS缓冲液中,混匀。

[0114] 3) 将步骤1)获得的微球溶液与 $40 \mu\text{L}$ 步骤2)获得的链球菌溶血素O溶液混合,置于磁力搅拌器上加转子搅拌15min使两者充分混匀。

[0115] 4) 取 $25 \mu\text{L}$ LEDC(5mg/mL)加到混匀的胶乳颗粒与链球菌溶血素O混合溶液中,在室温下,持续搅拌反应2h。

[0116] 5) 反应结束后,将反应液在15,000rpm离心40min,弃上清,获得偶联有链球菌溶血素O的胶乳颗粒。

[0117] 实施例8:本发明方法(采用NHS)偶联链球菌溶血素O

[0118] 1) 取 $100 \mu\text{L} 10\%$ 胶乳颗粒(200nm),加2mL10mM MES溶液(pH6.1)混匀,15,000rpm离心50min,弃上清之后,加2mL10mM MES溶液(pH6.1)用吸液器反复抽吸使胶乳颗粒分散混匀,胶乳颗粒浓度为0.5%。

[0119] 2) 取1mg链球菌溶血素O溶于1ml pH7.4的PBS缓冲液中,混匀。

[0120] 3) 将步骤 1) 获得的微球溶液与 40 μ L 步骤 2) 获得的链球菌溶血素 O 溶液混合, 置于磁力搅拌器上加转子搅拌 15min 使两者充分混匀。

[0121] 4) 取 25 μ L EDC(5mg/mL) 连同 25 μ L NHS(20mg/mL) 同时加到混匀的胶乳颗粒与链球菌溶血素 O 混合溶液中, 在室温下, 持续搅拌反应 2h。

[0122] 5) 反应结束后, 将反应液在 15,000rpm 离心 40min, 弃上清, 获得偶联有链球菌溶血素 O 的胶乳颗粒。

[0123] 实施例 9 :链球菌溶血素 O 试剂的制备

[0124] 取实施例 7(或 8) 收获的胶乳颗粒加 2mL0.01M PBS(pH7.4) 超声分散进行清洗; 离心弃上清; 加 5mL0.1M pH8.4 甘氨酸缓冲液(含有 0.5% BSA、0.1% NaN_3) 超声分散获得浓度为 0.2% 的胶乳颗粒; 磁力搅拌 30min 后, 置于 2-8 $^{\circ}$ C 储存直至使用。

[0125] 配方如下:

[0126] 0.1M pH8.4 甘氨酸缓冲液;

[0127] 0.5% BSA;

[0128] 0.1% NaN_3 ;

[0129] 0.2% 偶联有链球菌溶血素 O 的微球。

[0130] 实施例 10 :抗链球菌溶血素 O 诊断试剂盒的制备

[0131] 按照如下配方制备抗链球菌溶血素 O 诊断试剂盒:

[0132] 第一试剂 R1:

[0133] 0.1M pH8.4 甘氨酸缓冲液;

[0134] 300mM NaCl;

[0135] 0.1% Tween20;

[0136] 1% PEG6000;

[0137] 0.1% NaN_3 。

[0138] 第二试剂 R2 :将实施例 9 制备的链球菌溶血素 O 试剂作为第二试剂 R2。分别将第一试剂和第二试剂放置在合适的容器中, 例如当用于全自动生化分析仪时, 可以将第一试剂和第二试剂放置仪器专用的小瓶中。

[0139] 实施例 11 :绘制标准曲线

[0140] 将实施例 10 制备的诊断试剂装载到东芝-40 生化分析仪上, 对链球菌溶血素 O 标准品(50、100、200、400、800IU/mL) 按照如下参数进行检测, 并绘制标准曲线:

[0141] 检测模式 :两点终点法;

[0142] 主波长 / 副波长 :570nm/700nm;

[0143] 读点 :48-50/34-36

[0144] 反应方向 :正

[0145] 校准类型 :Spline;

[0146] 样品量 :3 μ L;

[0147] R1/R2 :240 μ L/60 μ L。

[0148] 实施例 12 :实验结果

[0149] 1. 用传统一步法(实施例 7) 获得的微球所配制的试剂的结果, 如表 3 和图 3 所示:

[0150] 表 3. 链球菌溶血素 O 标准品测定值 (三次重复实验的均值)

[0151]

| 标准品浓度 | ΔA | A(主-副) | A(主) |
|-------|------------|--------|--------|
| 0 | 0.1893 | 0.4990 | 0.6679 |
| 50 | 0.2375 | 0.5234 | 0.7260 |
| 100 | 0.3350 | 0.5408 | 0.8137 |
| 200 | 0.4373 | 0.5659 | 0.9813 |
| 400 | 0.5046 | 0.6180 | 1.2906 |
| 800 | 0.5918 | 0.7255 | 1.3438 |

[0152] 采用上述测定值建立标准曲线方程,线性方程和相关系数为:

[0153] $Y = 0.0005X + 0.2597, r^2 = 0.8367$

[0154] 在实施例 7 偶联反应的 2 小时过程中,在后期观察到了自我聚合的现象,颗粒不能稳定地处于混悬状态,有沉淀可见。

[0155] 2. 用本发明方法 (实施例 8) 获得的微球所配制的试剂的结果如表 4 和图 4 所示:

[0156] 表 4. 链球菌溶血素 O 标准品测定值 (三次重复实验的均值)

[0157]

| 标准品浓度 | ΔA | A(主-副) | A(主) |
|-------|------------|--------|--------|
| 0 | -0.0018 | 0.4156 | 0.6613 |
| 50 | 0.0751 | 0.4490 | 0.7348 |
| 100 | 0.1263 | 0.4884 | 0.8283 |
| 200 | 0.2280 | 0.5594 | 0.9958 |
| 400 | 0.4544 | 0.6961 | 1.3348 |
| 800 | 0.6047 | 0.8137 | 1.5641 |

[0158] 采用上述测定值建立标准曲线方程,线性方程和相关系数为:

[0159] $Y = 0.0008X + 0.0515, r^2 = 0.9407$

[0160] 在实施例 8 偶联反应的 2 小时过程中,全程均没有观察到自我聚合的现象,颗粒稳定地处于混悬状态。申请人继续尝试将反应时间延长至更长的时间比如 3-4 小时,开始见到较微弱的胶乳颗粒聚集。和实施例 2 的情况相比,可见 Sulfo-NHS 对于抗自我聚合的效果要优于 NHS。但是无论如何,加入 NHS 仍然比传统的偶联方法具有更好的抗自我聚合效果。

[0161] 本发明的方法比传统方法具有更好的线性相关系数 $r^2 = 0.9407$ 。技术人员知道， r^2 越接近 1 相关性越强。可见这种优良线性完全能够满足临床检验的应用要求。

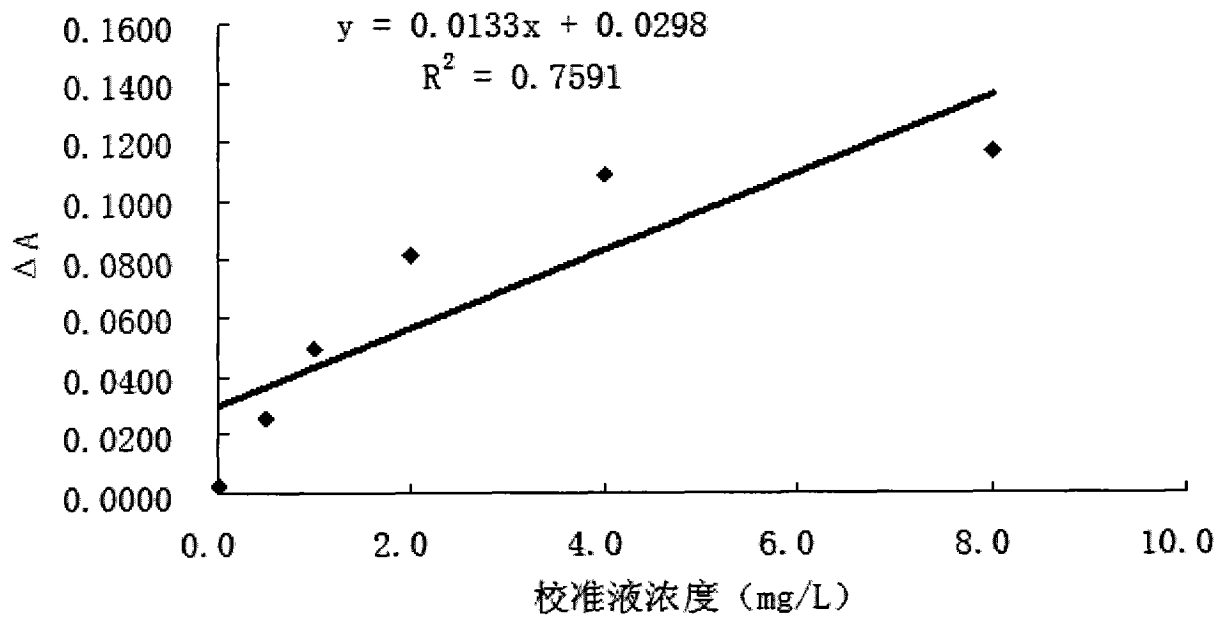


图 1

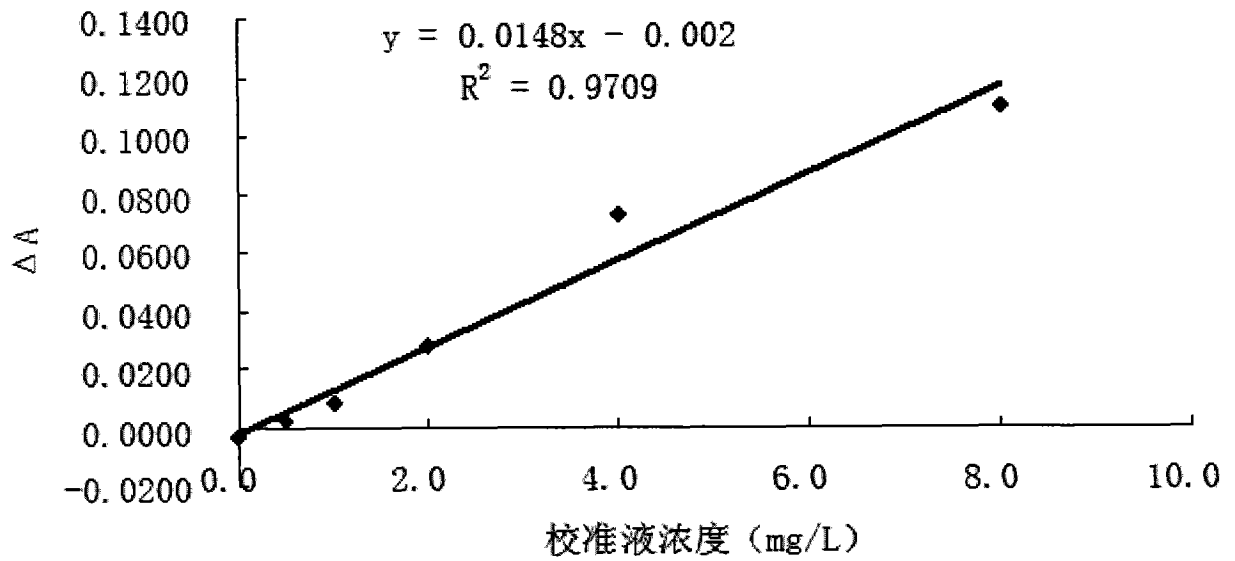


图 2

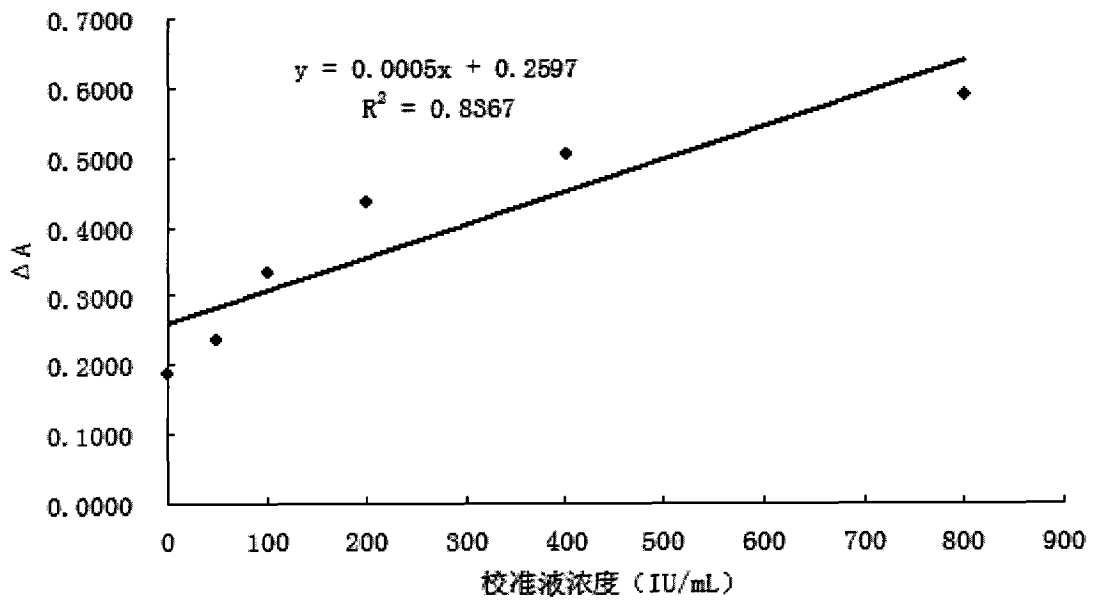


图 3

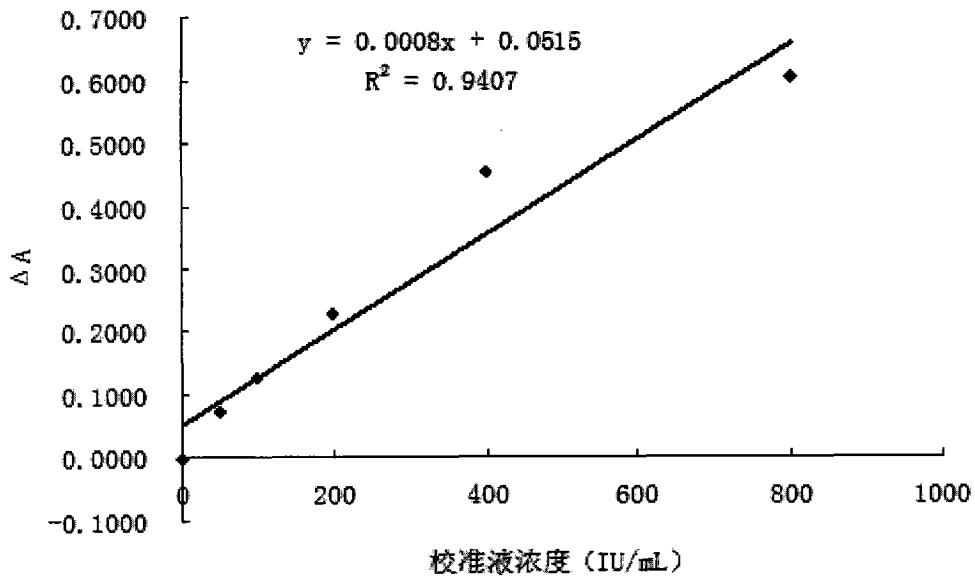


图 4

| | | | |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103308698A | 公开(公告)日 | 2013-09-18 |
| 申请号 | CN201310236062.8 | 申请日 | 2013-06-17 |
| [标]发明人 | 姜敏 | | |
| 发明人 | 姜敏 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/536 | | |
| 其他公开文献 | CN103308698B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种将含氨基的分子共价偶联至微球上的偶联方法。本发明将反应混合物同时接触碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺(或者N-羟基硫代琥珀酰亚胺),进行共价偶联反应。利用本方法制备的试剂,有效改善含氨基的分子在偶联过程中的自我聚合;且绘制标准曲线时具有更好的线性。

| | |
|-----------------|---|
| 聚苯乙烯胶乳颗粒 | 150 nm、10%、表面羧基含量 65 μ mol/g, 照康生物; 200 nm、10%、表面羧基含量 65 μ mol/g, 照康生物 |
| 兔抗人 Cys-C 多克隆抗体 | 百川飞虹生物技术有限公司, 总蛋白含量 22mg/mL, 效价大于 1:400000 |
| Cys-C 标准品 | 北京九强生物技术股份有限公司 |
| 链球菌溶血素 O 标准品 | 北京九强生物技术股份有限公司 |
| 链球菌溶血素 O 重组抗原 | 武汉友芝友生物制药有限公司 |
| EDC | 阿拉丁, 分析纯 |
| NHS | 阿拉丁, 分析纯 |
| Sulfo-NHS | 阿拉丁, 分析纯 |