



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102818901 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201210292972. 3

(22) 申请日 2012. 08. 16

(71) 申请人 天津博敏达生物科技有限公司

地址 300384 天津市塘沽区高新技术产业园  
区华苑产业区华天道 2 号 (火炬大厦)  
2034 室

(72) 发明人 程爱阳

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理  
有限公司 12211

代理人 杨慧玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/546 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

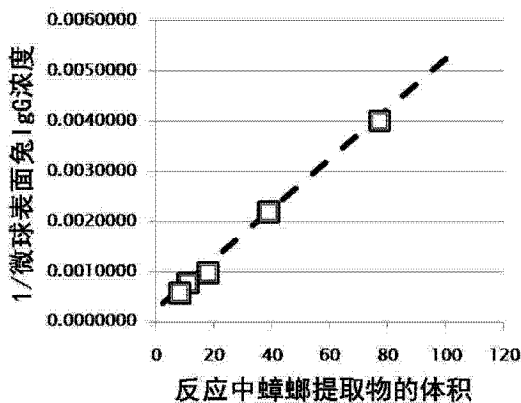
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

基于示踪分子的蛋白质 - 微球化学偶联效率  
的检测方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种基于示踪分子的蛋白质 - 微球化学偶联效率的检测方法, 包括如下步骤: (1) 将蛋白质与外源性示踪分子按照一定质量比或者摩尔比混合; (2) 在特定偶联反应条件下, 将羧基化聚苯乙烯微球与蛋白质 - 外源性示踪分子溶液进行化学偶联; 并通过改变偶联反应条件以及使用不同浓度的蛋白质 - 外源性示踪分子溶液, 对化学偶联反应进行进一步的优化; (3) 对羧基化聚苯乙烯微球表面的外源性示踪分子进行定量。本发明通过向氨基 - 羧基的偶联反应中加入少量的外源性示踪分子, 并对其跟踪, 可以有效地监测蛋白质与聚苯乙烯微球之间化学偶联的效率。该方法可以迅速、合理、有效地监测偶联反应。



1. 一种基于示踪分子的蛋白质-微球化学偶联效率的检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 将蛋白质与外源性示踪分子按照一定质量比或者摩尔比混合;

(2) 在特定偶联反应条件下,将羧基化聚苯乙烯微球与蛋白质-外源性示踪分子溶液进行化学偶联;并通过改变偶联反应条件以及使用不同浓度的蛋白质-外源性示踪分子溶液,对化学偶联反应进行进一步的优化;

(3) 对羧基化聚苯乙烯微球表面的外源性示踪分子进行定量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,所述蛋白质为蛋白质粗提取物或者纯化的蛋白质溶液,所述外源性示踪分子为兔子正常免疫球蛋白G或者其它纯化的蛋白质。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述步骤(2)为:取羧基化聚苯乙烯微球经水洗处理后,均匀分散于pH值为5.0~6.0,含0.05M~0.2M的2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲溶液中或者pH值为5.0~7.0,含0.05M~0.2M的磷酸盐缓冲溶液中,经超声处理后,再加入过量新鲜配置的50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和50mg/ml 水溶性碳二亚胺水溶液,在室温下暗处震荡孵育15~60min,而后离心移去上清,获得活化的聚苯乙烯微球;向活化后的聚苯乙烯微球加入含有蛋白质/兔IgG的MES缓冲溶液或磷酸盐缓冲溶液,室温下暗处震荡孵育1~2h,其后离心移去上清,以pH值为7.2~8.0,含0.05M~0.2M的磷酸盐缓冲溶液洗涤沉淀物,并使用贮存液进一步封闭微球的活性基团,偶联后的聚苯乙烯微球保存于贮存液中。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于:所述步骤(3)为:取偶联后的聚苯乙烯微球,使用PBST缓冲溶液洗涤数次,将微球悬浮于含有辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体的PBST缓冲溶液中,室温下暗处震荡孵育0.5~1h,其后离心移去上清,以PBST缓冲溶液洗涤沉淀物3-5次,之后使用3',3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色,数分钟后,加入2N的硫酸终止反应,采用酶标仪或分光光度计在450nm波长处读取吸光度;

或者是,取偶联后的聚苯乙烯微球,使用PBST缓冲溶液洗涤数次,将微球悬浮于含有荧光基团标记的山羊抗兔IgG抗体的PBST缓冲溶液中,室温下暗处震荡孵育0.5~1h,其后离心移去上清。以PBST缓冲溶液洗涤沉淀物3-5次,之后使用流式细胞仪进行定量。

5. 一种采用外源性示踪分子测定待测蛋白溶液中有效成分浓度的方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 按照质量比或摩尔比,将固定量的外源性示踪分子与不同量的待测蛋白质分子混合;

(2) 将羧基化聚苯乙烯微球与蛋白质-外源性示踪分子溶液进行化学偶联;

(3) 对偶联后的聚苯乙烯微球表面的外源性示踪分子进行定量;

(4) 通过数学计算,测量蛋白质溶液中有效成分的含量。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,所述蛋白质为蛋白质粗提取物或者纯化的蛋白质溶液,所述外源性示踪分子为兔子正常免疫球蛋白G(IgG)或者其它纯化的蛋白质。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其特征在于:所述步骤(2)为:取羧基化聚苯乙烯微球经水洗处理后,均匀分散于pH值为5.0~6.0,含0.05M~0.2M的2-(N-吗啉代)乙

磺酸 (MES) 缓冲溶液中或者 pH 值为 5.0 ~ 7.0, 含 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液中, 经超声处理后, 再加入过量新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺水溶液, 在室温下暗处震荡孵育 15 ~ 60min, 而后离心移去上清, 获得活化的聚苯乙烯微球; 向活化后的聚苯乙烯微球加入含有蛋白质 / 兔 IgG 的 MES 缓冲溶液或磷酸盐缓冲溶液, 室温下暗处震荡孵育 1 ~ 2h, 其后离心移去上清, 以 pH 值为 7.2 ~ 8.0, 含 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤沉淀物, 并使用贮存液进一步封闭微球的活性基团, 偶联后的聚苯乙烯微球保存于贮存液中。

8. 根据权利要求 5-7 任一项所述的方法, 其特征在于: 所述步骤 (3) 为: 取偶联后的聚苯乙烯微球, 使用 PBST 缓冲溶液洗涤数次, 将微球悬浮于含有辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体的 PBST 缓冲溶液中, 室温下暗处震荡孵育 0.5 ~ 1h, 其后离心移去上清。以 PBST 缓冲溶液洗涤沉淀物 3-5 次, 之后使用 3', 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色, 数分钟后, 加入 2N 的硫酸终止反应, 采用酶标仪或分光光度计在 450nm 波长处读取吸光度;

或者是, 取偶联后的聚苯乙烯微球, 使用 PBST 缓冲溶液洗涤数次, 将微球悬浮于含有荧光基团标记的山羊抗兔 IgG 抗体的 PBST 缓冲溶液中, 室温下暗处震荡孵育 0.5 ~ 1h, 其后离心移去上清, 以 PBST 缓冲溶液洗涤沉淀物 3-5 次, 之后使用流式细胞仪进行定量。

9. 根据权利要求 5-8 任一项所述的方法, 其特征在于: 步骤 (4) 中, 在偶联反应中, 羧基化聚苯乙烯微球同蛋白质上的氨基结合, 形成共价键, 当偶联反应中, 蛋白质的浓度  $\gg$  羧基化聚苯乙烯微球的结合蛋白质的最大值时,

Y 值为微球表面结合的兔 IgG 的量;  $Y_{\max}$  = 微球表面结合兔 IgG 的最大值, (也近似于微球表面可结合蛋白质的最大值)

[IgG] 为偶联反应中兔 IgG 的浓度, [X] 为偶联反应中待测蛋白质的浓度;

微球表面上兔 IgG 的比例与反应中的比例一致, 即  $Y = \frac{[IgG]}{[X] + [IgG]} \times Y_{\max}$

通过方程式的转换得到  $\frac{1}{Y} = \frac{[X]}{[IgG] \times Y_{\max}} + \frac{1}{Y_{\max}}$

即通过  $\frac{1}{Y}$  对 [X] 可以求解出斜率与截距, 并进一步得到  $Y_{\max}$  和待测蛋白质溶液的有效成分的浓度。

## 基于示踪分子的蛋白质 - 微球化学偶联效率的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学技术领域,涉及一种蛋白质 - 固体支持介质化学偶联的检测办法,具体涉及一种蛋白质 - 羧基化聚苯乙烯微球之间化学偶联效率的检测办法,尤其适用于变应原提取物与羧基化聚苯乙烯微球之间化学偶联效率的检测与评估。

### 背景技术

[0002] 在免疫化学产品的开发过程中,经常需要将抗体等蛋白质以共价键的方式同固相支持介质偶联。在偶联反应中,通常使用高纯度的蛋白质溶液作为偶联底物。但是在一些情况下,高纯度的蛋白质难以获得,蛋白质溶液中混有大量杂质。以血清变应原特异性 IgE 或 IgG4 检测产品开发为例,需要将变应原提取物同固相支持介质(如羧基化聚苯乙烯微球)之间进行化学偶联。变应原提取物是动物、植物、微生物的蛋白质粗提物,其有效成分是可以引发过敏的蛋白质或多肽。许多变应原提取物成分复杂、杂质较多。以屋尘螨提取物为例,其中蛋白质总含量较低,通常只占总重量的 1/8 到 1/5,有效成分的含量更低,其余为杂质,并且其中已知的引发过敏的蛋白质就有 19 种。由于目前还没有一个完善的变应原提取物标准,以及蛋白质化学性质不稳定、容易降解,造成不同供应商、不同批次的变应原提取物之间有很大差异。此外,变应原种类繁多,仅常见的变应原就有六十余种。合理、精确、有效地监测偶联反应是产品开发、原材料质量评估和产品质量控制的关键。

[0003] 通常而言,对于蛋白质与固相支持介质之间偶联反应的效率有两个检测方案。第一个技术方案是直接测定偶联后固相支持介质表面上的目标蛋白质浓度。这一技术方案的实施需要使用针对目标蛋白的特异性抗体。例如,在屋尘螨血清变应原特异性 IgE 检测产品开发过程中,需要测定偶联后的固相支持介质表面变应原的种类与数量,但是已知的引发过敏的蛋白质就有 19 种。此外,由于常见的变应原就有六十余种,每一个变应原 - 固相支持介质之间偶联反应的检测就需要使用多个抗体,这一技术方案的工作量大,成本高。第二个方案是测定固体介质表面上的目标蛋白质与其对应检测对象的结合。以屋尘螨血清变应原特异性 IgE 检测产品为例,需要测定固相支持介质表面的变应原可以特异性地结合多少 IgE。这一技术方案的实施的难点在于实验步骤多,并且需要大量来源于不同过敏患者的血清。

[0004] 此外,当偶联反应出现问题时,由于在反应中缺乏内参,上面两个技术方案均无法对偶联反应的结果进行直接分析。例如,当上述两个方案均测定出偶联反应的效率低于预期值时,两个方案均无法确定失误的具体原因是由于化学试剂或反应条件的问题,还是变应原提取物的质量问题。

### 发明内容

[0005] 为了解决上述的技术问题,本发明提出一种基于外源性示踪分子的蛋白质 - 羧基化聚苯乙烯微球之间化学偶联效率的检测方法,其通过向氨基 - 羧基的偶联反应中加入少量的外源性示踪分子,并对其跟踪,可以有效地监测蛋白质与聚苯乙烯微球之间化学

偶联的效率。此外,通过外源性示踪分子上的氨基与反应中其它蛋白质的氨基竞争,可以计算出其它蛋白质的氨基浓度,其可以作为蛋白质提取物质量好坏的评估指标之一。由于外源性示踪分子不干扰下游的免疫化学反应,不会对偶联后的聚苯乙烯微球的正常使用造成不良影响。

[0006] 为实现上述发明目的,本发明采用了如下技术方案:

[0007] 一种基于外源性示踪分子的蛋白质-羧基化聚苯乙烯微球之间化学偶联效率的检测方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 将蛋白质与外源性示踪分子按照一定质量比或者摩尔比混合;

[0009] (2) 在特定偶联反应条件下,将羧基化聚苯乙烯微球与蛋白质-外源性示踪分子溶液进行化学偶联;并通过改变偶联反应条件以及使用不同浓度的蛋白质-外源性示踪分子溶液,对化学偶联反应进行进一步的优化;

[0010] (3) 对羧基化聚苯乙烯微球表面的外源性示踪分子进行定量。

[0011] 优选地,所述步骤(1)中,所述蛋白质为蛋白质粗提取物(例如变应原提取物)或者纯化的蛋白质(例如牛血清白蛋白)溶液,所述外源性示踪分子为兔子正常免疫球蛋白G(IgG)或者其它纯化的蛋白质。

[0012] 优选地,所述步骤(2)为取羧基化聚苯乙烯微球经水洗处理后,均匀分散于pH值为5.0~6.0,含0.05M~0.2M的2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲溶液中或者pH值为5.0~7.0,含0.05M~0.2M的磷酸盐缓冲溶液中,经超声处理后,再加入过量新鲜配置的50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和50mg/ml 水溶性碳二亚胺水溶液,在室温下暗处震荡孵育15~60min,而后离心移去上清,获得活化的聚苯乙烯微球;向活化后的聚苯乙烯微球加入含有蛋白质/兔IgG的MES缓冲溶液或磷酸盐缓冲溶液,室温下暗处震荡孵育1~2h,其后离心移去上清,以pH值为7.2~8.0,含0.05M~0.2M的磷酸盐缓冲溶液洗涤沉淀物,并使用贮存液进一步封闭微球的活性基团,偶联后的聚苯乙烯微球保存于贮存液中。

[0013] 优选地,所述步骤(2)中,所述超声处理的时间为20秒~5分钟,超声频率为20KHz。

[0014] 优选地,所述步骤(2)中,所述偶联后的聚苯乙烯微球是被悬浮于贮存液中保藏的,所述贮存液为pH值为7.2~8.0,浓度为0.05M~0.2M的磷酸盐缓冲溶液(PBS),其含0.1~1.0wt%牛血清白蛋白、0.01~0.05wt%吐温-20和0.1~0.5wt%叠氮钠。更优选地,所述磷酸缓冲盐溶液采用含0.8%wtNaCl的磷酸盐缓冲液。

[0015] 优选地,所述步骤(3)为,取偶联后的聚苯乙烯微球,使用PBST缓冲溶液洗涤数次,将微球悬浮于含有辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体的PBST缓冲溶液中,室温下暗处震荡孵育0.5~1h,其后离心移去上清,以PBST缓冲溶液洗涤沉淀物3~5次,之后使用3',3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色,数分钟后,加入2N的硫酸终止反应,采用酶标仪或分光光度计在450nm波长处读取吸光度。更优选地,所述PBST缓冲溶液的pH值为7.2~8.0,浓度为0.05M~0.2M的磷酸盐缓冲溶液(PBS),其含0.1~1.0wt%牛血清白蛋白和0.01~0.05wt%吐温-20;

[0016] 或者是,取偶联后的聚苯乙烯微球,使用PBST缓冲溶液洗涤数次,将微球悬浮于含有荧光基团标记的山羊抗兔IgG抗体的PBST缓冲溶液中,室温下暗处震荡孵育0.5~1h,其后离心移去上清。以PBST缓冲溶液洗涤沉淀物3~5次,之后使用流式细胞仪(如

FACS Calibur 等) 进行定量。更优选地, 所述 PBST 缓冲溶液的 pH 值为 7.2 ~ 8.0, 浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 其含 0.1 ~ 1.0wt% 牛血清白蛋白和 0.01 ~ 0.05wt% 吐温 -20。

[0017] 本发明还提供了一种采用外源性示踪分子测定待测蛋白溶液中有效成分浓度的方法, 包括如下步骤:

[0018] (1) 按照质量比或摩尔比, 将固定量的外源性示踪分子与不同量的待测蛋白质分子混合;

[0019] (2) 将羧基化聚苯乙烯微球与蛋白质 - 外源性示踪分子溶液进行化学偶联;

[0020] (3) 对偶联后的聚苯乙烯微球表面的外源性示踪分子进行定量;

[0021] (4) 通过数学计算, 测量蛋白质溶液中有效成分的含量。

[0022] 优选地, 所述步骤 (1) 中, 所述蛋白质为蛋白质粗提取物 (例如变应原提取物) 或者纯化的蛋白质 (例如牛血清白蛋白) 溶液, 所述外源性示踪分子为兔子正常免疫球蛋白 G (IgG) 或者其它纯化的蛋白质。偶联反应中, 将固定量的外源性示踪分子 (如 5ug 兔 IgG) 与不同量的蛋白质溶液 (如 5、10、20ug 未知纯度的蛋白质) 混合。

[0023] 优选地, 所述步骤 (2) 为取羧基化聚苯乙烯微球经水洗处理后, 均匀分散于 pH 值为 5.0 ~ 6.0, 含 0.05M ~ 0.2M 的 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲溶液中或者 pH 值为 5.0 ~ 7.0, 含 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液中, 经超声处理后, 再加入过量新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐和 50mg/ml 水溶性碳二亚胺水溶液, 在室温下暗处震荡孵育 15 ~ 60min, 而后离心移去上清, 获得活化的聚苯乙烯微球; 向活化后的聚苯乙烯微球加入含有蛋白质 / 兔 IgG 的 MES 缓冲溶液或磷酸盐缓冲溶液, 室温下暗处震荡孵育 1 ~ 2h, 其后离心移去上清, 以 pH 值为 7.2 ~ 8.0, 含 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤沉淀物, 并使用贮存液进一步封闭微球的活性基团, 偶联后的聚苯乙烯微球保存于贮存液中。

[0024] 优选地, 所述步骤 (2) 中, 所述超声处理的时间为 20 秒 ~ 5 分钟, 超声频率为 20KHz。

[0025] 优选地, 所述步骤 (2) 中, 所述偶联后的聚苯乙烯微球是被悬浮于贮存液中保藏的, 所述贮存液为 pH 值为 7.2 ~ 8.0, 浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 其含 0.1 ~ 1.0wt% 牛血清白蛋白、0.01 ~ 0.05wt% 吐温 -20 和 0.1 ~ 0.5wt% 叠氮钠。更优选地, 所述磷酸缓冲盐溶液采用含 0.8% wtNaCl 的磷酸盐缓冲液。

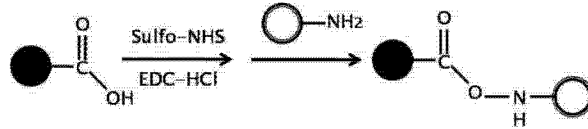
[0026] 优选地, 所述步骤 (3) 为, 取偶联后的聚苯乙烯微球, 使用 PBST 缓冲溶液洗涤数次, 将微球悬浮于含有辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体的 PBST 缓冲溶液中, 室温下暗处震荡孵育 0.5 ~ 1h, 其后离心移去上清。以 PBST 缓冲溶液洗涤沉淀物 3-5 次, 之后使用 3', 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色, 数分钟后, 加入 2N 的硫酸终止反应, 采用酶标仪或分光光度计在 450nm 波长处读取吸光度。更优选地, 所述 PBST 缓冲溶液的 pH 值为 7.2 ~ 8.0, 浓度为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 其含 0.1 ~ 1.0wt% 牛血清白蛋白和 0.01 ~ 0.05wt% 吐温 -20。

[0027] 或者是, 取偶联后的聚苯乙烯微球, 使用 PBST 缓冲溶液洗涤数次, 将微球悬浮于含有荧光基团标记的山羊抗兔 IgG 抗体的 PBST 缓冲溶液中, 室温下暗处震荡孵育 0.5 ~ 1h, 其后离心移去上清。以 PBST 缓冲溶液洗涤沉淀物 3-5 次, 之后使用流式细胞仪 (如 FACS Calibur 等) 进行定量。更优选地, 所述 PBST 缓冲溶液的 pH 值为 7.2 ~ 8.0, 浓度

为 0.05M ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 其含 0.1 ~ 1.0wt% 牛血清白蛋白和 0.01 ~ 0.05wt% 吐温 -20。

[0028] 步骤 (4) 中, 在偶联反应中, 羧基化聚苯乙烯微球同蛋白质上的氨基结合, 形成共价键。

[0029]



[0030] ●羧基化聚苯乙烯微球○蛋白质

[0031] 当偶联反应中, 蛋白质的浓度  $\gg$  羧基化聚苯乙烯微球的可结合蛋白质的最大值时,

[0032] Y 值为微球表面结合的兔 IgG 的量;  $Y_{max}$  = 微球表面结合兔 IgG 的最大值, (也近似于微球表面可结合蛋白质的最大值)

[0033] [IgG] 为偶联反应中兔 IgG 的浓度, [X] 为偶联反应中待测蛋白质的浓度;

[0034] 微球表面上兔 IgG 的比例与反应中的比例一致, 即  $Y = \frac{[IgG]}{[X] + [IgG]} \times Y_{max}$

[0035] 通过方程式的转换得到  $\frac{1}{Y} = \frac{[X]}{[IgG] \times Y_{max}} + \frac{1}{Y_{max}}$

[0036] 即通过  $\frac{1}{Y}$  对 [X] 可以求解出斜率与截距, 并进一步得到  $Y_{max}$  和待测蛋白质溶液的有效成分的浓度。

[0037] 本发明所具有的有益效果:

[0038] 本发明通过向氨基-羧基的偶联反应中加入少量的外源性示踪分子, 并对其进行跟踪, 可以有效地监测蛋白质与聚苯乙烯微球之间化学偶联的效率。该方法可以迅速、合理、有效地监测偶联反应。此外, 通过外源性示踪分子上的氨基与反应中其它蛋白质的氨基竞争, 可以计算出其它蛋白质的氨基浓度, 其可以作为蛋白质提取物质量好坏的评估指标之一。由于外源性示踪分子不干扰下游的免疫化学反应, 不会对偶联后的聚苯乙烯微球的正常使用造成不良影响, 主要适用于血清变应原特异性 IgE 或 IgG4 检测产品的开发中, 变应原提取物同固相支持介质 (如羧基化聚苯乙烯微球) 之间进行化学偶联反应的监控。

## 附图说明

[0039] 图 1 为实施例 1 中以偶联反应的总蛋白 (BSA+IgG) 量为横坐标, 以抗兔 IgG-HRP 信号强度为纵坐标所作的图; 通过测量微球表面示踪分子 (IgG) 评估总蛋白的偶联情况。

[0040] 图 2 为实施例 2 中以反应中蟑螂提取物的体积为横坐标,  $1/Y$  微球表面兔 IgG 浓度为纵坐标所作的图。

## 具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明, 但不限定本发明的保护范围。

[0042] 实施例 1

[0043] 一种基于外源性示踪分子的蛋白质-羧基化聚苯乙烯微球之间化学偶联效率 (优化偶联反应的条件) 的检测方法, 该方法包括如下具体步骤:

[0044] (1) 羧基化聚苯乙烯微球的活化

[0045] 取  $5 \times 10^6$  个羧基化聚苯乙烯微球, 经过水洗, 离心并去除上清液后, 加入 100  $\mu$  L 活化液 (0.1M 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲溶液, pH6.0), 漩涡混合 30 秒, 然后超声 30 秒, 加入新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐 (sulfo-NHS) 和水溶性碳二亚胺 (EDC-HCl) 水溶液各 10  $\mu$  L, 漩涡混合 10s 后, 室温下暗处震荡孵育 20min, 将活化后的微球离心移去上清, 采用 0.5mL 磷酸盐缓冲溶液 (0.1M 磷酸盐, 150mM 氯化钠, pH7.2) 洗涤两次, 制得表面活化的微球;

[0046] (2) 蛋白质同羧基化聚苯乙烯微球的化学偶联

[0047] 向上述活化的微球中加入 0.5mL 牛血清白蛋白 (BSA)- 兔 IgG (比例为 9:1) 蛋白质溶液 (总蛋白量分别为 1、5、25、50、125ug, 溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液), 漩涡混合 20 秒, 然后超声 30 秒, 室温下暗处震荡孵育 60min, 离心移去上清, 以贮存液洗涤沉淀两次, 制得 BSA- 兔 IgG 包被的微球。贮存液为 0.1M 磷酸盐, 150mM 氯化钠, pH7.2, 含 0.1wt% 牛血清白蛋白, 0.02wt% Tween-20, 0.2wt% 叠氮钠。

[0048] (3) 检测微球表面的兔 IgG 分子

[0049] 取  $2 \times 10^5$  个表面标记的微球, 离心移去上清, 采用 0.5mL PBST 缓冲液 (0.1M 磷酸盐, pH7.2, 0.8% wtNaCl, 0.1wt% 牛血清白蛋白, 0.02wt% Tween-20) 洗涤两次。加入 0.5mL 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (0.5ug, 采用 PBST 缓冲液稀释), 漩涡混合 20 秒, 然后超声 30 秒, 室温下暗处震荡孵育 30min, 离心移去上清, 以 PBST 缓冲液洗涤沉淀三次。将微球悬浮于 0.1mL PBST 缓冲液, 加入 0.1mL 单组分 3', 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物, 数分钟后, 加入 0.1mL 2N 的硫酸终止反应, 采用酶标仪或分光光度计在 450nm 波长处读取吸光度, 如图 1 所示, 通过测量微球表面示踪分子 (IgG) 评估总蛋白的偶联情况。

[0050] 实施例 2

[0051] 采用外源性示踪分子测定溶液中有效分子的相对浓度, 该方法包括如下步骤:

[0052] (1) 羧基化聚苯乙烯微球的活化

[0053] 取  $5 \times 10^6$  个羧基化聚苯乙烯微球, 经过水洗, 离心并去除上清液后, 加入 100  $\mu$  L 活化液 (0.1M 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 /MES 缓冲溶液, pH6.0), 漩涡混合 30 秒, 然后超声 30 秒, 加入新鲜配置的 50mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺磺酸盐 (sulfo-NHS) 和水溶性碳二亚胺 (EDC-HCl) 水溶液各 10  $\mu$  L, 漩涡混合 10s 后, 室温下暗处震荡孵育 20min, 将活化后的微球离心移去上清, 采用 0.5mL 磷酸盐缓冲溶液 (0.1M 磷酸盐, 150mM 氯化钠, pH7.2) 洗涤两次, 制得表面活化的微球;

[0054] (2) 蛋白质同羧基化聚苯乙烯微球的化学偶联

[0055] 取 10mg 蟑螂变应原提取物, 溶于 2ml 磷酸盐缓冲溶液中, 并对 0.1M 磷酸盐缓冲溶液透析。向上述活化的微球中加入 0.5mL 蛋白质溶液 (其中含有 5ug 的兔 IgG 和分别为 80、40、20、10、5  $\mu$  L 的蟑螂变应原提取物, 溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液), 漩涡混合 20 秒, 然后超声 30 秒, 室温下暗处震荡孵育 60min, 离心移去上清, 以贮存液洗涤沉淀两次, 制得 BSA- 兔 IgG 包被的微球。贮存液为 0.1M 磷酸盐, 150mM 氯化钠, pH7.2, 含 0.1wt% 牛血清白蛋白, 0.02wt% Tween-20, 0.2wt% 叠氮钠。

[0056] (3) 检测微球表面的兔 IgG 分子

[0057] 取  $2 \times 10^5$  个表面标记的微球, 离心移去上清, 采用 0.5mL PBST 缓冲液 (0.1M 磷酸

盐, pH7.2, 0.8% wtNaCl, 0.1wt% 牛血清白蛋白, 0.02wt% Tween-20) 洗涤两次。加入 0.5mL 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (0.5ug, 采用 PBST 缓冲液稀释), 漩涡混合 20 秒, 然后超声 30 秒, 室温下暗处震荡孵育 30min, 离心移去上清, 以 PBST 缓冲液洗涤沉淀三次。将微球悬浮于 0.1mL PBST 缓冲液, 加入 0.1mL 单组分 3', 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物, 数分钟后, 加入 0.1mL 2N 的硫酸终止反应, 采用酶标仪或分光光度计在 450nm 波长处读取吸光度。

[0058] (4) 计算蟑螂提取物中, 可以偶联的蛋白质浓度。对  $\frac{A}{V}$  与蟑螂提取物体积作图, 如图 2 所示。通过测量微球表面示踪分子 (IgG) 估算蟑螂提取物中蛋白的浓度。偶联反应中, 蟑螂提取物中的蛋白质的浓度等量于 0.7mg/ml 兔 IgG, 而直接用 Branford 法测定蛋白浓度为 1.45mg/ml。

[0059] 以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非对本发明的技术方案作任何形式上的限制。凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰, 均仍属于本发明的技术方案的范围内。

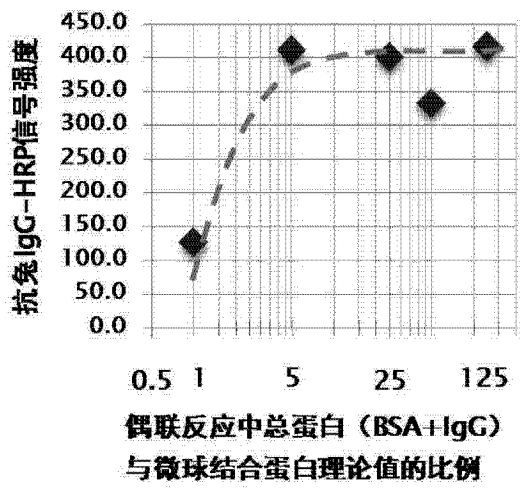


图 1

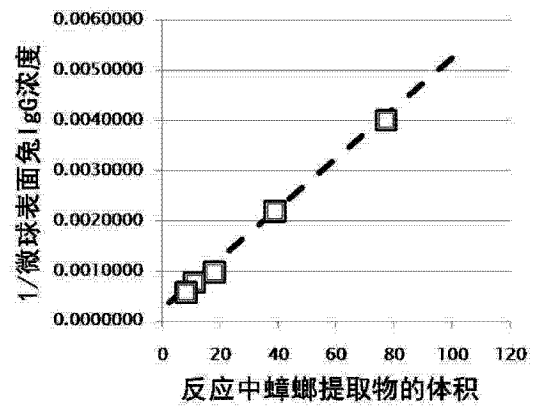


图 2

专利名称(译)	基于示踪分子的蛋白质-微球化学偶联效率的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102818901A</a>	公开(公告)日	2012-12-12
申请号	CN201210292972.3	申请日	2012-08-16
[标]发明人	程爱阳		
发明人	程爱阳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/546 G01N33/532		
代理人(译)	杨慧玲		
其他公开文献	CN102818901B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种基于示踪分子的蛋白质-微球化学偶联效率的检测方法，包括如下步骤：(1)将蛋白质与外源性示踪分子按照一定质量比或者摩尔比混合；(2)在特定偶联反应条件下，将羧基化聚苯乙烯微球与蛋白质-外源性示踪分子溶液进行化学偶联；并通过改变偶联反应条件以及使用不同浓度的蛋白质-外源性示踪分子溶液，对化学偶联反应进行进一步的优化；(3)对羧基化聚苯乙烯微球表面的外源性示踪分子进行定量。本发明通过向氨基-羧基的偶联反应中加入少量的外源性示踪分子，并对其进行跟踪，可以有效地监测蛋白质与聚苯乙烯微球之间化学偶联的效率。该方法可以迅速、合理、有效地监测偶联反应。

