



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103091306 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201310024278. 8

WO 2012/054588 A2, 2012. 07. 05, 说明书第 47 页第 21-22 行, 第 49 页第 10-20 行, 第 60 页第 15-22 行, 第 61 页第 24-25 行, 第 64 页第 23-26, 33 行, 第 83 页第 1-5 行.

(22) 申请日 2013. 01. 23

(73) 专利权人 苏州浩欧博生物医药有限公司
地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街 218 号 C6 栋

审查员 严小波

(72) 发明人 于大为 程晓蕾

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 孙仿卫 赵艳

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101561432 A, 2009. 10. 21, 说明书第 5 页.

CN 102662061 A, 2012. 09. 12, 全文.

CN 102346187 A, 2012. 02. 08, 全文.

CN 1501084 A, 2004. 06. 02, 全文.

WO 2012/054639 A2, 2012. 04. 26, 全文.

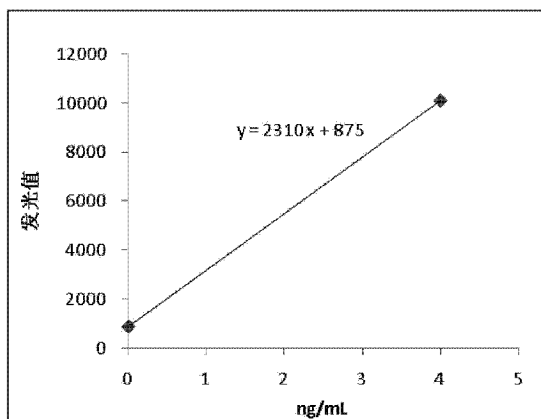
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种纳米磁微粒的封闭保存液

(57) 摘要

本发明提供一种纳米磁微粒的封闭保存液, 以水为溶剂, 每 1L 所述封闭保存液含有: Tris 0. 01mol; 牛 γ 球蛋白 0. 5-5g; 鱼皮凝胶 1-10g; 新生牛血清 1-10mL; 吐温型乳化剂 0. 2-5g; 硫酸新霉素 0. 01-0. 5g。相较于现有技术, 采用本发明提供的纳米磁微粒的封闭保存液用于封闭保存包被有抗原或抗体的纳米磁微粒, 能够有效减少纳米磁微粒在免疫反应过程中的非特异性吸附, 提高了纳米磁微粒化学发光测定试剂的灵敏度。



1. 一种纳米磁微粒的封闭保存液,其特征在于:以水为溶剂,每 1L 所述封闭保存液含有:

Tris 0.01mol ;
牛 γ 球蛋白 0.5-5g ;
鱼皮凝胶 1-10g ;
新生牛血清 1-10mL ;
吐温型乳化剂 0.2-5 g ;
硫酸新霉素 0.01-0.5g ;
所述的 Tris 的 pH 为 8.0 ;
所述的吐温型乳化剂为吐温 -20。

一种纳米磁微粒的封闭保存液

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种纳米磁微粒的封闭保存液。

背景技术

[0002] 磁性分离技术是以纳米或微粒级的磁性微粒为载体,利用结合于磁性微粒表面的蛋白质所提供的特异的亲和特性,在加磁场的定向控制下,通过亲和吸附、清洗、解吸操作,可以进一步从复杂的生物体系中分离到目标物分子,具有磁性分离简单方便、亲和吸附高特异性及高敏感性等众多优点。应用于磁性分离技术的磁性载体应具备以下特点:①粒径比较小,比表面积较大,具有较大的吸附容量;②物理和化学性能稳定,有较高机械强度,使用寿命长;③含有可活化的反应基团,以用于亲和配基的固定化;④粒径均一,能形成单分散体系;⑤悬浮性好,便于反应的有效进行。

[0003] 纳米技术的出现,促进了磁性微粒的应用。纳米磁微粒粒径小,加至反应液中呈悬浮状态,加磁场后可迅速分离。纳米磁微粒还可通过免疫反应与标记有荧光素、化学发光物质、酶等物质连接,建立各种免疫分析方法。

[0004] 纳米磁微粒化学发光免疫诊断试剂综合采用了目前国际上的两大主流免疫分析尖端技术——悬浮纳米磁微粒载体技术、化学发光检测技术,能够准确定量的检测人类血清中的免疫抗原或抗体,可用于过敏、自身免疫、甲状腺功能、肿瘤、性激素、传染病等相关标志物的检测。然而,包被了抗原或抗体的纳米磁微粒在反应过程中会导致非特异性吸附,导致纳米磁微粒应用到试剂中,试剂的灵敏度降低,因此,保证纳米磁微粒的稳定性成为该平台发展的关键技术之一。

[0005] 因此,实有必要开发一种纳米磁微粒的封闭保存液,以确保纳米磁微粒的稳定性,避免纳米磁微粒包被抗原或抗体后在保存过程中产生非特异性吸附而导致试剂的灵敏度降低的缺陷。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的是克服现有技术的缺陷,提供一种纳米磁微粒的封闭保存液,以避免纳米磁微粒包被抗原或抗体后在保存过程中产生非特异性吸附而导致试剂的灵敏度降低的缺陷。

[0007] 为了达到上述目的,本发明提供一种纳米磁微粒的封闭保存液,其特征在于:以水为溶剂,每 1L 所述封闭保存液含有:

- | | | |
|--------|----------------|------------|
| [0008] | Tris | 0.01mol; |
| [0009] | 牛 γ 球蛋白 | 0.5-5g; |
| [0010] | 鱼皮凝胶 | 1-10g; |
| [0011] | 新生牛血清 | 1-10mL; |
| [0012] | 吐温型乳化剂 | 0.2-5g; |
| [0013] | 硫酸新霉素 | 0.01-0.5g。 |

- [0014] 较佳地,所述的 Tris (三羟甲基氨基甲烷)的 pH 为 7-9。最佳地,所述
- [0015] Tris 的 pH 为 8.0。
- [0016] 较佳地,所述的吐温型乳化剂为吐温 -20 (TWEEN-20)。
- [0017] 相较于现有技术,采用本发明提供的纳米磁微粒的封闭保存液用于封闭保
- [0018] 存包被有抗原或抗体的纳米磁微粒,能够有效减少纳米磁微粒在免疫反应过程
- [0019] 中的非特异性吸附,提高了纳米磁微粒化学发光测定试剂的灵敏度。

附图说明

- [0020] 图 1 为本发明实施例一中 CEA 试剂的灵敏度评价拟合曲线。
- [0021] 图 2 为本发明实施例二中 CEA 试剂的灵敏度评价拟合曲线。
- [0022] 图 3 为本发明实施例三中 CEA 试剂的灵敏度评价拟合曲线。

具体实施方式

[0023] 在以下实施例中,以癌胚抗原单克隆抗体包被的纳米磁微粒化学发光测试试剂(CEA 试剂)为例对“0”浓度的待测血清样本进行检测,CEA 试剂中的纳米磁微粒采用本发明提供的封闭保存液封闭保存,然后采用化学发光免疫分析仪通过计算和拟合曲线测定灵敏度。

[0024] 以下实施例中除特别说明外,Tris、牛 γ 球蛋白、鱼皮凝胶、新生牛血清、Tween-20 及硫酸新霉素均为市售获得。所述的封闭保存液通过常规混合溶液的制备方法调制。

[0025] 实施例一

[0026] 材料与仪器:

[0027] 癌胚抗原单克隆抗体包被的纳米磁微粒化学发光测试试剂(CEA 试剂),所述试剂中的纳米磁微粒的悬浮液为包被有 FITC (异硫氰酸荧光素)抗体的纳米磁微粒(即 CEA 纳米磁微粒)的悬浮液;Maglia60 化学发光免疫分析仪,市售。

[0028] 其中,所述的 CEA 试剂包括:

[0029] 该 CEA 试剂包括含有荧光素标记的 CEA 抗体的溶液(简称第一试剂)和包被有荧光素抗体的磁微粒的悬浮液(简称磁分离试剂),碱性磷酸酶(ALP)标记的 CEA 抗体的溶液(简称第二试剂)。

[0030] 所述的 CEA 试剂通过以下方法制备得到:

[0031] 第一试剂的制备

[0032] (1) 材料与仪器:以磷酸盐缓冲液保存的 CEA 抗体(纯度超过 95wt%,浓度为 1mg/ml);异硫氰酸荧光素(FITC),碳酸氢钠等试剂应达到化学纯;G-25 凝胶纯化柱采购自 GE 公司。

[0033] (2) 制备步骤:

[0034] ①用 0.2mol/L pH9.0 的碳酸盐缓冲液配制 0.5mg/ml 的 FITC 溶液;

[0035] ②按照 CEA 抗体与 FITC 分子比为 1:20 的比例在抗体溶液中加入步骤①所配 FITC 溶液,混合均匀,室温静置 12h 小时,反应生成 CEA 抗体-FITC 连接物;

[0036] ③将经过步骤②的反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离,除去未反应的 FITC,得到含

有 CEA 抗体-FITC 连接物(即 FITC 标记的 CEA 抗体)的溶液;

[0037] ④将步骤③所得含有 CEA 抗体-FITC 连接物的溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 Tris 缓冲液稀释到 CEA 抗体-FITC 连接物浓度为 1 μg/ml, pH 为 8, 即为第一试剂。

[0038] 第二试剂的制备

[0039] (1) 材料与仪器:以磷酸盐缓冲液保存的 CEA 单克隆抗体(纯度超过 95wt%, 浓度为 1mg/ml, 下称 CEA 抗体溶液);以磷酸缓冲液保存的碱性磷酸酶(ALP 溶液, ALP 纯度为约 99%, 比活性为约 1500U/mg, 浓度为 10mg/ml);5mg/ml SMCC (4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯)溶液、10mg/ml 2-IT(2-亚氨基硫烷盐酸盐)溶液(交联剂 SMCC 和 2-IT 为固体粉末,用 DMF(二甲基甲酰胺)配成上述溶液使用;SMCC、2-IT 购自 THERMO 公司);Tris 等化学试剂应达到化学纯;G-25 凝胶纯化柱、AKTA-purifier100 蛋白纯化仪和 Supperdex200 凝胶纯化柱均为 GE 公司产品。

[0040] (2) 制备步骤:

[0041] ①取 1mg CEA 抗体溶液,加入 10mg/ml 的 2-IT 溶液 2~4 μl, 室温静置 20min, 加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μl, 室温静置 5min;用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化的抗体, 2-8℃ 保存备用;

[0042] ②取 1.5mg ALP 溶液,加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 20 μl, 室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化的 ALP 抗体, 2-8℃ 保存备用;

[0043] ③将上述活化的 CEA 抗体与活化的 ALP 抗体混合, 2-8℃ 条件下静置 15h, 通过 Supperdex200 凝胶纯化柱进行纯化,获得含有抗体 CEA-ALP 连接物(ALP 标记的 CEA 抗体)的溶液, 2-8℃ 保存备用;

[0044] ④将抗体 CEA-ALP 连接物的溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 1 μg/ml, pH8, 即为第二试剂。

[0045] 磁分离试剂的制备

[0046] (1) 材料与仪器:

[0047] 磁微粒的悬浮液:磁微粒含量 5wt%, 磁微粒含羧基(COOH)活性集团, 每克(g)磁微粒(干重)羧基含量 0.7 毫摩尔(mmol), 具有超顺磁性, 直径在 1 μm;

[0048] 抗 FITC 抗体:多克隆抗体, 纯度为 90wt% 以上, 稀释效价超过 1:100 万;

[0049] 2-吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、Tris 和其他试剂应达到化学纯。

[0050] (2) 制备步骤:

[0051] ①取 100mg 磁微粒的悬浮液,磁分离去上清,用 0.05mol/L, pH4.5MES 缓冲液 10ml 重悬;

[0052] ②加入 4mg 的抗 FITC 抗体, 室温混悬 60min;

[0053] ③加入 0.5ml 新鲜配制的 10mg/ml 的 EDC 水溶液, 室温混悬 2h;

[0054] ④磁分离, 去上清, 用封闭保存液将磁微粒重悬为 10mg/ml, 2-8℃ 保存 24 小时;

[0055] ⑤用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 1mg/ml, pH8.0, 即为磁分离试剂。

[0056] 以前述方法制备得到的 CEA 试剂为例, 该试剂中的 CEA 纳米磁微粒用下面的封闭保存液进行封闭保存, 并使用 Maglia60 化学发光免疫分析仪测定试剂的灵敏度。

[0057] 本实施例中 CEA 纳米磁微粒的封闭保存液为：以水为溶剂，每 1L 所述封闭保存液含有：

[0058] Tris 0.01mol pH8.0；

[0059] 牛 γ 球蛋白 0.5g；

[0060] 鱼皮凝胶 1g；

[0061] 新生牛血清 1mL；

[0062] TWEEN-20 0.2g；

[0063] 硫酸新霉素 0.01g。

[0064] 采用该 CEA 试剂检测“0”浓度血清样本，检测步骤为：

步骤	操 作
1	加 20 μ l 样本至检测管中
2	加 50 μ l 第一试剂至检测管中
3	加 50 μ l 第二试剂至检测管中
4	混匀后，37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟
5	加 50 μ l 磁分离试剂至检测管中
6	混匀后，37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟
7	磁分离去上清
8	加 300 μ l 清洗液至检测管中，混匀
9	磁分离去上清
10	重复步骤 8、9，两遍
11	加 150 μ l 发光底物至检测管中，混匀 3 秒
12	检测发光强度

[0066] 灵敏度评价

[0067] 检测“0”浓度血清样本，重复检测 20 次，计算相对发光强度 (RLU) 的平均值 (M) 和标准差 (SD)，并计算 M+2SD 值，根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度 -RLU 进行两点回归拟合得出一次方程，将 M+2SD 值带入上述方程中，求出对应的浓度值，即为最低检测限。由于采用本实施例的封闭保存液封闭保存所述 CEA 纳米磁微粒，本实施例中 CEA 试剂的灵敏度远高于行业标准 (YY/T1160-2009 癌胚抗原 (CEA) 定量测定试剂 (盒) (化学发光免疫分析法)) 的 1ng/mL。其中：A 点发光值参见表 1。

[0068] 表 1

CEA-STD-A(RLU)			
789	696	712	847
854	775	865	861
954	905	965	869
789	889	954	878
795	867	846	785

[0070] A 点发光均值 X=845；

[0071] SD=74；

[0072] X+2SD=993。

[0073] B 点发光值参见表 2。

[0074] B 点发光均值 $X=10621$ 。

[0075] B 点浓度 4ng/mL 。

[0076] 表 2

[0077]

CEA-STD-B(RLU)
10256
10986

[0078] A, B 点连点拟合曲线参见图 1。灵敏度 $=0.06\text{ng/mL}$ 。

[0079] 实施例二

[0080] 本实施例中所采用的 CEA 试剂与实施例一相同, 区别在于将 CEA 试剂中的 CEA 纳米磁微粒用下面的封闭保存液进行封闭保存, 并使用 Maglia60 化学发光免疫分析仪测定试剂的灵敏度。本实施例中采用 CEA 试剂检测“0”浓度血清样本的检测步骤也与实施例一相同。

[0081] 本实施例中 CEA 纳米磁微粒的封闭保存液为: 以水为溶剂, 每 1L 所述封闭保存液含有:

[0082] Tris 0.01mol pH8.0 ;

[0083] 牛 γ 球蛋白 2.5g ;

[0084] 鱼皮凝胶 5g ;

[0085] 新生牛血清 5mL ;

[0086] TWEEN-20 2.5g ;

[0087] 硫酸新霉素 0.25g。

[0088] 灵敏度评价

[0089] 检测“0”浓度血清样本, 重复检测 20 次, 计算相对发光强度 (RLU) 的平均值 (M) 和标准差 (SD), 并计算 $M+2SD$ 值, 根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度 -RLU 进行两点回归拟合得出一次方程, 将 $M+2SD$ 值带入上述方程中, 求出对应的浓度值, 即为最低检测限。由于采用本实施例的封闭保存液封闭保存所述 CEA 纳米磁微粒, 本实施例中 CEA 试剂的灵敏度远高于行业标准 (YY/T1160-2009 癌胚抗原 (CEA) 定量测定试剂 (盒) (化学发光免疫分析法)) 的 1ng/mL 。其中: A 点发光值参见表 3。

[0090] 表 3

CEA-STD-A(RLU)			
969	862	905	886
956	996	836	931
885	905	798	792
869	941	765	847
914	789	805	856

[0092] A 点发光均值 $X=875$;

[0093] $SD=65$;

[0094] $X+2SD=1006$ 。

- [0095] B 点发光值参见表 4。
- [0096] B 点发光均值 X=10117。
- [0097] B 点浓度 4ng/mL。
- [0098] 表 4
- [0099]

CEA-STD-B(RLU)
9968
10265

[0100] A, B 点连点拟合曲线参见图 2。灵敏度 =0.057ng/mL。

[0101] 实施例三

[0102] 本实施例中所采用的 CEA 试剂与实施例一相同,区别在于将 CEA 试剂中的 CEA 纳米磁微粒用下面的封闭保存液进行封闭保存,并使用 Maglia60 化学发光免疫分析仪测定试剂的灵敏度。本实施例中采用 CEA 试剂检测“0”浓度血清样本的检测步骤也与实施例一相同。

[0103] 本实施例中 CEA 纳米磁微粒的封闭保存液为 :以水为溶剂,每 1L 所述封闭保存液含有 :

- [0104] Tris 0.01mol pH8.0 ;
- [0105] 牛 γ 球蛋白 5g ;
- [0106] 鱼皮凝胶 10g ;
- [0107] 新生牛血清 10mL ;
- [0108] TWEEN-20 5g ;
- [0109] 硫酸新霉素 0.5g。

[0110] 灵敏度评价

[0111] 检测“0”浓度样本,重复检测 20 次,计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD),并计算 M+2SD 值,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度 -RLU 进行两点回归拟合得出一次方程,将 M+2SD 值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。由于采用本实施例的封闭保存液封闭保存所述 CEA 纳米磁微粒,本实施例中 CEA 试剂的灵敏度远高于行业标准(YY/T1160-2009 癌胚抗原 (CEA) 定量测定试剂(盒)(化学发光免疫分析法))的 1ng/mL。其中 :A 点发光值参见表 5。

[0112] 表 5

CEA-STD-A(RLU)			
1096	998	1026	1025
895	1369	1026	789
968	788	968	898
995	945	847	784
789	887	998	789

[0114] A 点发光均值 X=944 ;

[0115] SD=140 ;

- [0116] $X+2SD=1224$ 。
- [0117] B 点发光值参见表 6。
- [0118] B 点发光均值 $X=11482$ 。
- [0119] B 点浓度 4ng/mL 。
- [0120] 表 6
- [0121]

CEA-STD-B(RLU)
11265
11698

- [0122] A, B 点连点拟合曲线参见图 3。灵敏度 $=0.106\text{ng/mL}$ 。
- [0123] 从以上实施例可见,本发明的封闭保存液用于封闭保存包被有抗体或抗原的纳米磁微粒在保存中具有较好的稳定性,将其应用到试剂中非特异性吸附较少,提高了试剂的灵敏度。
- [0124] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

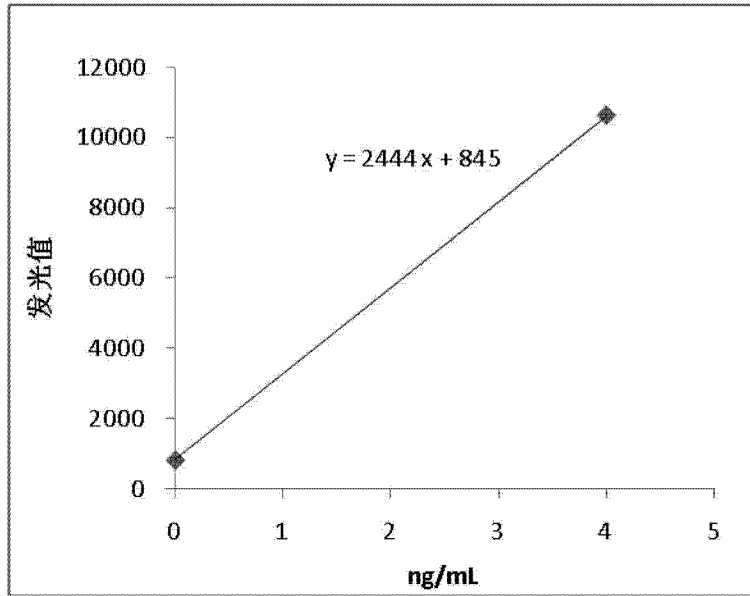


图 1

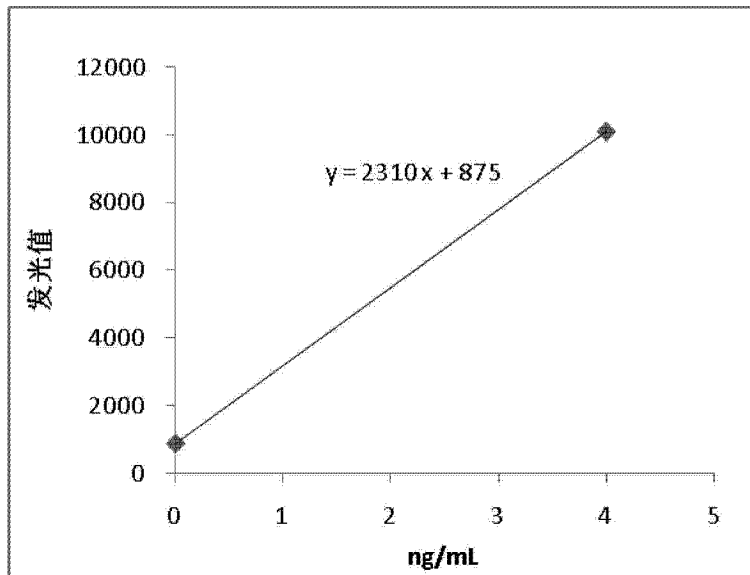


图 2

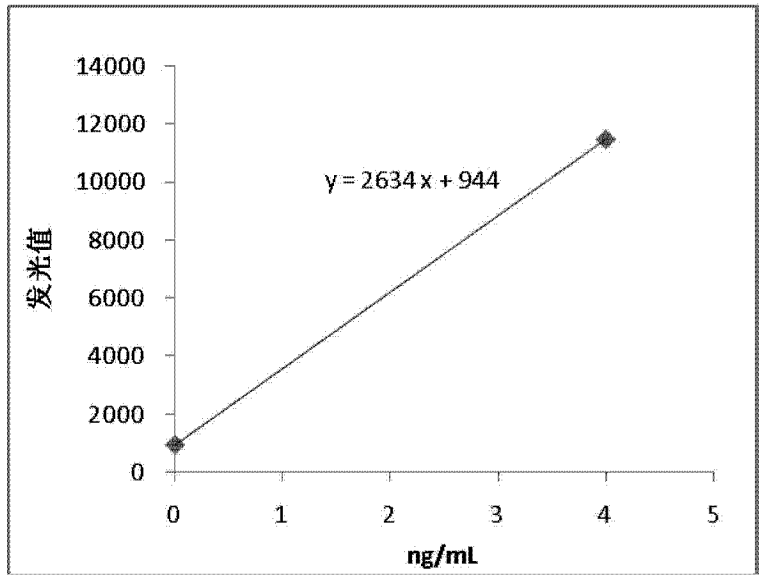


图 3

专利名称(译)	一种纳米磁微粒的封闭保存液		
公开(公告)号	CN103091306B	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201310024278.8	申请日	2013-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	于大为 程晓蕾		
发明人	于大为 程晓蕾		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/533		
代理人(译)	赵艳		
审查员(译)	严小波		
其他公开文献	CN103091306A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种纳米磁微粒的封闭保存液，以水为溶剂，每1L所述封闭保存液含有：Tris 0.01mol；牛γ球蛋白0.5-5g；鱼皮凝胶1-10g；新生牛血清1-10mL；吐温型乳化剂0.2-5g；硫酸新霉素0.01-0.5g。相较于现有技术，采用本发明提供的纳米磁微粒的封闭保存液用于封闭保存包被有抗原或抗体的纳米磁微粒，能够有效减少纳米磁微粒在免疫反应过程中的非特异性吸附，提高了纳米磁微粒化学发光测定试剂的灵敏度。

