



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103116020 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201310024311. 7

(22) 申请日 2013. 01. 23

(71) 申请人 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

(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 33/533 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

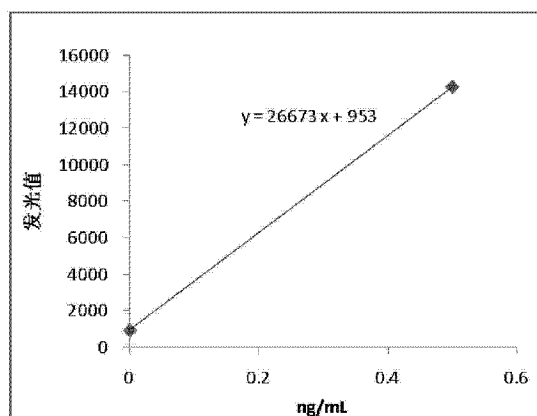
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种纳米磁微粒的重悬方法

(57) 摘要

本发明公开一种纳米磁微粒的重悬方法, 包括步骤: 取纳米磁微粒的悬浮液置于容器内并将该容器置于冰水浴中, 采用超声波破碎机对纳米磁微粒进行超声重悬。较佳地, 所述超声重悬的工艺参数为: 超声功率 50~500W, 超声时间 1~10 分钟。相较于现有技术, 采用本发明提供的纳米磁微粒的重悬方法对纳米磁微粒的悬浮液进行重悬后, 再将其应用到纳米磁微粒化学发光免疫诊断试剂中, 试剂的灵敏度有较大提高。



1. 一种纳米磁微粒的重悬方法,其特征在于:取纳米磁微粒的悬浮液置于容器内并将该容器置于冰水浴中,采用超声波破碎机对纳米磁微粒进行超声重悬。

2. 根据权利要求1所述的纳米磁微粒的重悬方法,其特征在于:所述纳米磁微粒的表面包被有抗体或抗原。

3. 根据权利要求1所述的纳米磁微粒的重悬方法,其特征在于:所述超声重悬的超声功率为 50~500W,超声时间为 1~10 分钟。

一种纳米磁微粒的重悬方法

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重悬方法。

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,纳米磁微粒包被抗体或抗原后,保存的过程中容易发生集聚现象,形成直径在几微米到几百微米大小的团簇,甚至肉眼可见聚集块,导致纳米磁微粒应用到试剂中,试剂的灵敏度降低。

[0005] 因此,实有必要开发一种纳米磁微粒的重悬方法,以解决其包被抗体后保存过程中产生集聚现象造成应用时试剂灵敏度低的问题,该方法是纳米磁微粒化学发光免疫诊断试剂生产和发展的核心技术之一。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的是提供一种纳米磁微粒的重悬方法,以解决纳米磁微粒包被抗体或抗原后保存过程中产生集聚现象造成应用时灵敏度低的问题。

[0007] 为了达到上述目的,本发明提供一种纳米磁微粒的重悬方法,其特征在于:取纳米磁微粒的悬浮液置于容器内并将该容器置于冰水浴中,采用超声波破碎机对纳米磁微粒进行超声重悬。

[0008] 较佳地,所述超声重悬的工艺参数为:超声功率 50~500W,超声时间 1~10 分钟。

[0009] 相较于现有技术,采用本发明提供的纳米磁微粒的重悬方法对表面包被有抗体或抗原的纳米磁微粒的悬浮液进行重悬后,再将其应用到纳米磁微粒化学发光免疫诊断试剂中,试剂的灵敏度有较大提高。

附图说明

- [0010] 图 1 为对比例中 PSA 试剂的灵敏度评价拟合曲线。
- [0011] 图 2 为本发明实施例一中 PSA 试剂的灵敏度评价拟合曲线。
- [0012] 图 3 为本发明实施例二中 PSA 试剂的灵敏度评价拟合曲线。
- [0013] 图 4 为本发明实施例三中 PSA 试剂的灵敏度评价拟合曲线。

具体实施方式

[0014] 在以下对比例和实施例中,均通过采用前列腺特异性抗原单克隆抗体包被的纳米磁微粒化学发光测试试剂(PSA 试剂)对“0”浓度的待测血清样本进行检测,并通过计算和拟合曲线进行灵敏度评价。

[0015] 材料与仪器:

[0016] 前列腺特异性抗原单克隆抗体包被的纳米磁微粒化学发光测试试剂(PSA 试剂),所述试剂中的纳米磁微粒的悬浮液为包被有 PSA 的纳米磁微粒(即 PSA 纳米磁微粒)的悬浮液;Magl i a60 化学发光免疫分析仪,市售;JY92-II 超声波破碎机,购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

[0017] 其中,所述的前列腺特异性抗原单克隆抗体包被的纳米磁微粒化学发光测试试剂包括:

[0018] 该 PSA 试剂包括含有荧光素(F I TC)标记的 PSA 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 PSA 抗体的溶液(简称第二试剂)。

[0019] 所述的 PSA 试剂通过以下方法制备得到:

[0020] 第一试剂的制备

[0021] (1) 材料与仪器:以磷酸盐缓冲液保存的 PSA 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。

[0022] (2) 制备步骤:

[0023] ①用 0.2mol/L pH9.0 的碳酸盐缓冲液配制 0.5mg/ml 的 FITC 溶液;

[0024] ②按照 PSA 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 PSA 抗体-FITC 连接物;

[0025] 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 PSA 抗体-FITC 连接物(即 FITC 标记的 PSA 抗体)的溶液;

[0026] ④将步骤③所得含有 PSA 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 PSA 抗体-FITC 连接物浓度为 1 μ g/ml, pH 为 8,即为第一试剂。

[0027] 第二试剂的制备

[0028] (1) 材料与仪器:以磷酸盐缓冲液保存的 PSA 单克隆抗体(纯度超过 95wt%,浓度为 1mg/ml,下称 PSA 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(SMCC 和 2-IT 固体粉末,用 DMF(二甲基甲酰胺)配成上述溶液使用;SMCC 和 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。

[0029] (2) 制备步骤 :

[0030] ①取 1mg PSA 抗体溶液,加入 10mg/ml 的 2-IT 溶液 2~4 μ l,室温静置 20min,加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μ l,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 ;

[0031] ②取 1.5mg ALP 溶液,加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 20 μ l,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 ;

[0032] ③将上述活化的 PSA 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 PSA-ALP 连接物(ALP 标记的 PSA 抗体)的溶液,2-8℃保存备用 ;

[0033] ④将抗体 PSA-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 μ g/ml, pH8,即为第二试剂。

[0034] 磁分离试剂的制备

[0035] (1) 材料与仪器 :

[0036] 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 μ m ;

[0037] 抗 FITC 抗体 :多克隆抗体,纯度为 90wt% 以上,稀释效价超过 1:100 万 ;

[0038] 2- 吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、TRIS 和其他试剂应达到化学纯。

[0039] (2) 制备步骤 :

[0040] 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 ;

[0041] ②加入 4mg 的抗 FITC 抗体,室温混悬 60min ;

[0042] ③加入 0.5ml 新鲜配制的 10mg/ml 的 EDC 水溶液,室温混悬 2h ;

[0043] ④磁分离,去上清,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。

[0044] 对比例

[0045] 以前述方法制备得到的 PSA 试剂为例,其中磁分离剂中的 PSA 纳米磁微粒在保存过程中发生聚集,直接使用该试剂检测血清样本,并使用 Maglia60 化学发光免疫分析仪测定试剂的灵敏度。

[0046] 检测步骤为 :

[0047]

步骤	操 作
1	加 10 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

[0048]

[0049] 灵敏度评价

[0050] 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。其中 :A 点发光值参见表 1。

[0051] 表 1

[0052]

PSA-STD-A(RLU)			
2265	2638	1565	2987
1897	714	1068	884
1536	1845	2015	1056
1142	789	1023	3265
1025	2487	895	1247

[0053] A 点发光均值 X=1617 ;

[0054] SD=773 ;

[0055] X+2SD=3163。

[0056] B 点发光值参见表 2。

[0057] B 点发光均值 X=8327。

[0058] B 点浓度 0.5ng/mL。

[0059] 表 2

[0060]

PSA-STD-B(RLU)
8957
7697

[0061] A, B 点连点拟合曲线参见图 1, 灵敏度 =0.115ng/mL。

[0062] 实施例一

[0063] 本实施例采用与对比例相同的 PSA 试剂检测“0”浓度血清样本,与对比例的区别在于,将磁分离剂中发生聚集现象的 PSA 纳米磁微粒采用以下重悬方法进行超声重悬,然后再用于对血清样本进行检测。检测步骤与对比例相同,并使用 Maglia60 化学发光免疫分析仪测定试剂的灵敏度。

[0064] 上述重悬方法为:

[0065] 取 50ml 浓度为 1mg/ml 的 PSA 纳米磁微粒的悬浮液(即磁分离剂)于容器内并将该容器玻璃烧杯置于冰水浴中,使用 JY92-II 超声波破碎机进行超声重悬,超声功率 50W,超声时间 1 分钟。

[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。其中:A 点发光值参见表 3。

[0068] 表 3

[0069]

PSA-STD-A(RLU)			
989	1165	1236	1035
1032	968	989	868
1068	1088	956	914
895	1069	1064	996
1169	1247	1067	1136

[0070] A 点发光均值 $X=1048$;

[0071] $SD=106$;

[0072] $X+2SD=1259$ 。

[0073] B 点发光值参见表 4。

[0074] B 点发光均值 $X=13678$ 。

[0075] B 点浓度 0.5ng/mL。

[0076] 表 4

[0077]

PSA-STD-B(RLU)
13658
13698

[0078] A, B 点连点拟合曲线参见图 2,灵敏度 =0.008ng/mL。

[0079] 实施例二

[0080] 本实施例采用与对比例相同的 PSA 试剂检测“0”浓度血清样本,与对比例的区别在于,将试剂的磁微粒剂中发生聚集现象的 PSA 纳米磁微粒采用以下重悬方法进行超声重悬,然后再用于对血清样本进行检测。检测步骤与对比例相同,并使用 Maglia60 化学发光免疫分析仪测定试剂的灵敏度。

[0081] 上述重悬方法为:

[0082] 取 50ml 浓度为 1mg/ml 的 PSA 纳米磁微粒的悬浮液(即磁分离剂)于容器内并将该容器置于冰水浴中,使用 JY92-II 超声波破碎机进行超声重悬,超声功率 300W,超声时间 5 分钟。

[0083] 灵敏度评价

[0084] 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。其中:A 点发光值参见表 5。

[0085] 表 5

[0086]

PSA-STD-A(RLU)			
798	891	848	984
869	832	719	996
896	1025	834	1236
935	1148	1026	1067
745	1069	1069	1074

[0087] A 点发光均值 X=953 ;

[0088] SD=138 ;

[0089] X+2SD=1229。

[0090] B 点发光值参见表 6。

[0091] B 点发光均值 X=14290。

[0092] B 点浓度 0.5ng/mL。

[0093] 表 6

[0094]

PSA-STD-B(RLU)
14221
14358

[0095] A, B 点连点拟合曲线参见图 3。灵敏度 =0.010ng/mL。

[0096] 实施例三

[0097] 本实施例采用与对比例相同的 PSA 试剂检测“0”浓度血清样本,与对比例的区别在于,将试剂的磁分离剂中发生聚集现象的 PSA 纳米磁微粒采用以下重悬方法进行超声重悬,然后再用于对血清样本进行检测,并使用 Maglia60 化学发光免疫分析仪测定试剂的灵敏度。

[0098] 上述重悬方法为 :

[0099] 取 50ml 浓度为 1mg/ml 的 PSA 纳米磁微粒的悬浮液(即磁分离剂)于容器内并将该容器置于冰水浴中,使用 JY92-II 超声波破碎机进行超声重悬,超声功率 500W,超声时间 10 分钟。

[0100] 灵敏度评价

[0101] 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。其中:A 点发光值参见表 7:

[0102] 表 7

[0103]

PSA-STD-A(RLU)			
1026	1456	986	1365
1325	1124	1068	1204
1485	1156	1065	1248
1201	1230	1023	1159
1054	1048	1068	1196

[0104] A 点发光均值 $X=1174$;

[0105] $SD=144$;

[0106] $X+2SD=1462$ 。

[0107] B 点发光值参见表 8。

[0108] B 点发光均值 $X=13225$ 。

[0109] B 点浓度 0.5ng/mL 。

[0110] 表 8

[0111]

PSA-STD-B(RLU)
13250
13200

[0112] A, B 点连点拟合曲线参见图 4。灵敏度 $=0.012\text{ng/mL}$ 。

[0113] 以上数据可以看出,PSA 纳米磁微粒的悬浮液在保存过程中产生的集聚现象导致了 PSA 试剂的灵敏度降低,而经过超声重悬后,PSA 纳米磁微粒的悬浮液的集聚现象被消除,再用于 PSA 试剂中对血清样本进行检测,使试剂的灵敏度得到大幅提高。

[0114] 因此,本发明提供的一种纳米磁微粒的重悬方法,有效地解决了纳米磁微粒的悬浮液在保存过程中产生集聚现象造成应用于试剂时灵敏度低的问题。

[0115] 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。

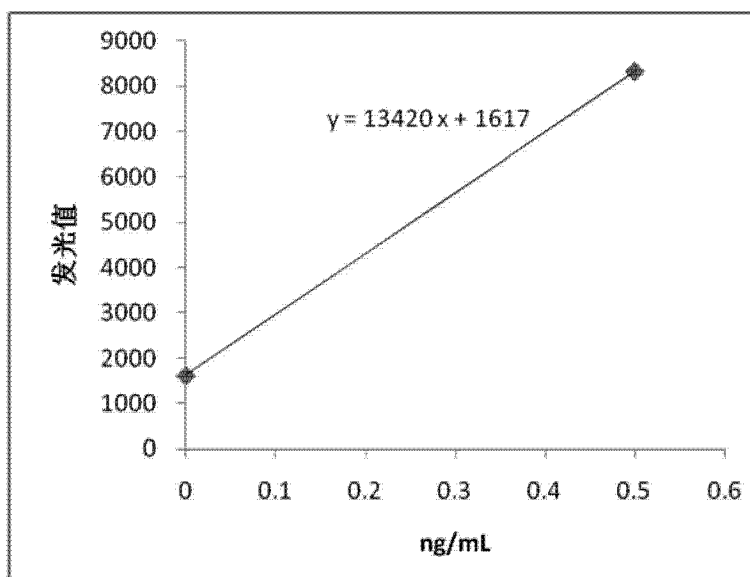


图 1

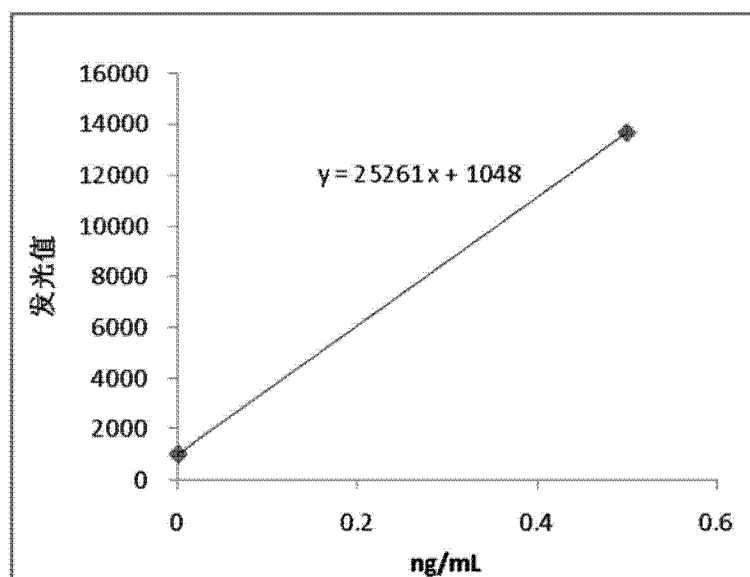


图 2

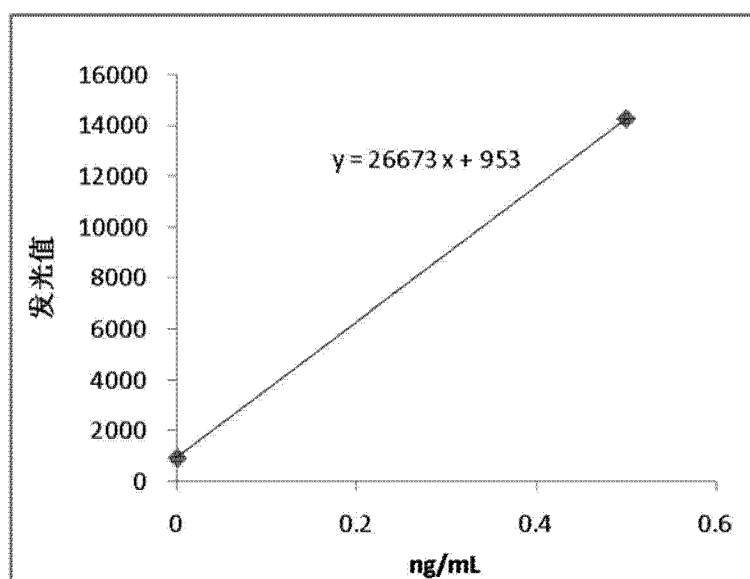


图 3

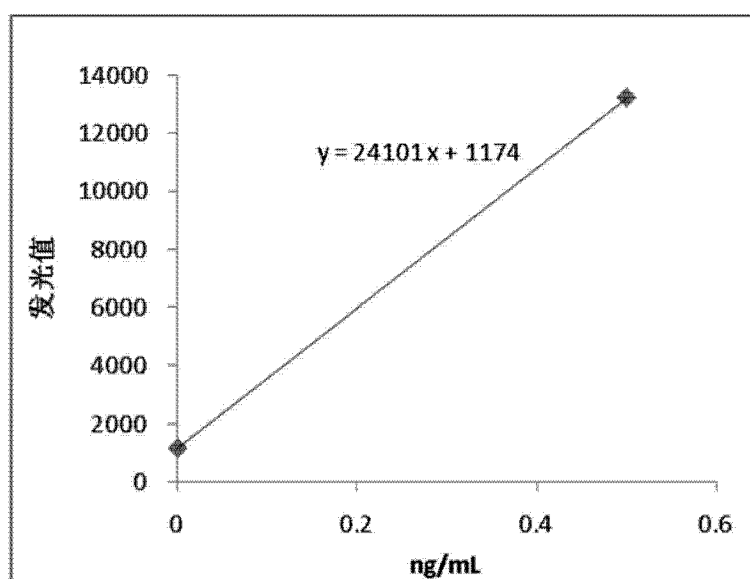


图 4

专利名称(译)	一种纳米磁微粒的重悬方法		
公开(公告)号	CN103116020A	公开(公告)日	2013-05-22
申请号	CN201310024311.7	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	G01N33/533 G01N21/76		
代理人(译)	赵艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种纳米磁微粒的重悬方法，包括步骤：取纳米磁微粒的悬浮液置于容器内并将该容器置于冰水浴中，采用超声波破碎机对纳米磁微粒进行超声重悬。较佳地，所述超声重悬的工艺参数为：超声功率50~500W，超声时间1~10分钟。相较于现有技术，采用本发明提供的纳米磁微粒的重悬方法对纳米磁微粒的悬浮液进行重悬后，再将其应用到纳米磁微粒化学发光免疫诊断试剂中，试剂的灵敏度有较大提高。

