



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105693906 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 22

(21) 申请号 201510038034. 4

*G01N 33/533*(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 01. 20

*G01N 33/558*(2006. 01)

(71) 申请人 于乐

地址 210003 江苏省南京市鼓楼区虎踞北路  
15号

(72) 发明人 不公告发明人

(51) Int. Cl.

*C08F 212/08*(2006. 01)

*C08F 230/02*(2006. 01)

*C08F 222/26*(2006. 01)

*C08F 220/34*(2006. 01)

*C08F 220/38*(2006. 01)

*C08F 257/02*(2006. 01)

*C09K 11/06*(2006. 01)

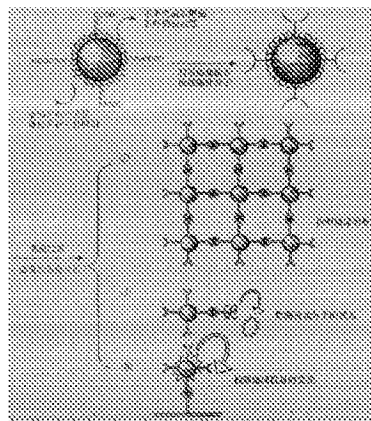
权利要求书2页 说明书13页 附图2页

## (54) 发明名称

一种两性离子型聚合物微球及其制备方法

## (57) 摘要

本发明提供了一种两性离子型聚合物微球及其制备方法,将两性离子通过共聚引入疏水性的聚合物微球上以改善其亲水性和降低其非特异性结合,同时在此基础上引入长链官能团分子,通过化学键偶联分子探针,一方面共价结合使得的复合物更加稳定,同时长链的官能团可以减少偶联时空间位阻,稳定结合的生物分子活性。本发明还提供了两性离子型聚合物磁性微球和荧光微球及它们制备方法,本发明在实际应用时,能够很好的抑制蛋白的非特异性吸附,抗体偶联量与商品化的纳米微球相似。可以有效改善试剂的稳定性,降低反应的本底值,对于试剂的线性相关性、重复性、回收率等其它性能均可以达到国标或者行标的要求。本发明具有非常广阔的免疫检验应用价值。



1. 一种两性离子型聚合物微球,其特征在于,包括载体和固载在载体上的功能性配基,所述载体为疏水性聚合物微球,其中,所述载体上还固载有两性离子基团,所述两性离子基团同时含有阳离子基团和阴离子基团。

2. 根据权利要求1所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,所述阳离子基团为胺基盐离子、季铵或吡啶阳离子,所述阴离子基团为羧酸基、磺酸基、磷酸基或硫酸酯基。

3. 根据权利要求2所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,所述两性离子基团为磷酸基类两性离子单体、磺酸基类两性离子单体和羧酸基类两性离子单体中的一种或多种。

4. 根据权利要求3所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,所述两性离子基团为2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱、磺酸基甜菜碱和羧酸基甜菜碱中的一种或多种。

5. 根据权利要求1所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,所述功能性配基为具有间隔臂的官能团单体。

6. 根据权利要求5所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,所述功能性配基为带有羧基的长链聚合物单体,再通过共聚引入到聚合物微球结构中。

7. 根据权利要求1~6中任意一项所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,载体上功能性配基的有效载量为 $100 \sim 1000 \mu\text{mol/g}$ ,更优为 $150 \sim 400 \mu\text{mol/g}$ ,最优为 $200 \sim 300 \mu\text{mol/g}$ 。

8. 根据权利要求1~6中任意一项所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,载体上两性离子基团的载量为 $0.01 \sim 10\text{wt}\%$ ,更优为 $0.1 \sim 5\text{wt}\%$ ,最优为 $0.1 \sim 1\text{wt}\%$ 。

9. 根据权利要求8所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,载体上两性离子基团的载量为 $0.5 \sim 2\text{wt}\%$ ,更优为 $0.1 \sim 1\text{wt}\%$ ,最优为 $0.3 \sim 0.5\text{wt}\%$ 。

10. 根据权利要求1~6中任意一项所述的两性离子型聚合物微球,其特征在于,所述疏水性聚合物微球为苯乙烯聚合物微球、聚甲基丙烯酸甲酯微球或聚脲醛微球。

11. 一种权利要求1~10中任意一项所述的两性离子型聚合物微球的制备方法,其特征在于,在惰性气氛下,将制备疏水性聚合物的单体与含有乳化剂的水分散液混合均匀,在搅拌的条件下,加入引发剂,加热至 $60 \sim 120^\circ\text{C}$ 引发自由基聚合反应,然后加入功能性配基单体和两性离子基团单体,反应 $6 \sim 12\text{h}$ ,纯化,既得。

12. 一种两性离子型聚合物磁性微球,其特征在于,所述两性离子型聚合物磁性微球为权利要求1~10任意一项所述的两性离子型聚合物微球内包覆纳米磁性物质。

13. 一种权利要求12所述的两性离子型聚合物磁性微球的制备方法,其特征在于,在惰性气氛下,将制备疏水性聚合物的单体与纳米磁性物质混合超声分散均匀,然后缓慢滴加到含有乳化剂的水分散液中,超声分散均匀,同时加入引发剂,加热至 $60 \sim 120^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2\text{h}$ ,最后加入功能性配基单体和两性离子基团单体,反应 $6 \sim 12\text{h}$ ,纯化,既得。

14. 一种两性离子型聚合物荧光微球,其特征在于,所述两性离子型聚合物荧光微球为权利要求1~10任意一项所述的两性离子型聚合物微球内包覆荧光物质。

15. 一种权利要求14所述的两性离子型聚合物荧光微球的制备方法,其特征在于,采用包裹法或者溶胀法;

其中,包裹法是指利用荧光物质分散在含有乳化剂的水分散液中,在随后的聚合反应中,荧光染料分子被缠结包埋在聚合物分子链中,其共聚单体中相应引入配基单体和两性

离子型基团单体；

其中，溶胀法是利用在有一定交联度的微球基础上，采用有机溶剂对微球进行浸泡，在微球溶胀的同时，荧光染料渗透进入微球内部。

## 一种两性离子型聚合物微球及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物分离和生物医学工程领域,具体涉及一种两性离子型聚合物微球及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 免疫检测技术是一种基于抗原和抗体特异性作用的生化检测方法,其发展来源于19世纪50年代发明的免疫比浊检测技术。免疫比浊检测可以利用抗原抗体反应后形成的沉淀或浊度来进行直接测定,但在临床检验中,某些待测物在标本中的含量很低(甚至只有纳克级别)。因此为了寻找增加敏感度的方法,将检测试剂中的抗原或抗体用可微量测定的物质加以标记,通过测定标记物来提高敏感度。相继出现的标记免疫分析技术如:酶免疫检测、化学发光免疫检测和荧光免疫检测等技术,其标记物分别为酶、化学发光物质和荧光物质,这样灵敏度可以提高数百至数千倍,检测下限可以到达纳克级别。由于抗体抗原之间特异性的作用,免疫检测常应用于复杂体系中某物质的检测,相比传统的化学检测方法,更加快捷,准确。

[0003] 酶免疫检测可分为均相和非均相两种类型。均相酶免反应中游离的和结合的标记物的分离比较困难,一般在不分离的情况下直接测定标记物,所以均相酶免疫检测的误差可能会比较大,在临床检验中较少应用。非均相EIA则利用了固相载体,可以对游离的和结合的标记物进行分离,这样检测的时候干扰就会比较小。但非均相酶免疫检测由于其操作上的复杂性阻碍了酶免疫检测的发展和应用。

[0004] 近年来,随着纳米科技的高速发展,其在医药、能源、环境、生物技术等多个领域应用越来越广泛。纳米材料的小尺寸效应和表面效应使得纳米材料具有区别于宏观材料所独特的性质。其中以聚合物纳米微球为例,一方面由于表面具有丰富的可修饰基团,便于与抗体,蛋白质,以及靶向配体的结合,另一方面作为固相载体,聚合物纳米微球的某些独特性质对于免疫反应的信号放大、便于分离清洗以及在机器上实现全自动化起到了突出作用,其在生物医学领域的应用十分具有代表性。

[0005] 例如胶乳增强免疫比浊法利用粒径均匀的聚合物胶乳颗粒作为固相载体,使其吸附特异性抗体,制成免疫性微球后,与传统免疫比浊法相比,解决了当检测少量的抗原抗体时,其复合物极难形成浊度变化的问题。这是因为当结合了抗体的微球与抗原发生免疫反应时,不溶性抗原抗体复合物快速在胶乳表面形成,由于聚合物胶乳复合物的粒径要比单纯抗原抗体复合物的粒径大得多,在可见光范围内,比对反应前后的溶液浊度变化,既吸光度的变化。胶乳增强免疫比浊法增强了免疫反应的反应信号,其吸光度的变化在一定范围内和被测物的含量成正比,由此可计算被测物含量。

[0006] 再如化学发光免疫检测的原理是利用小分子吖啶酯等标记物的氧化还原反应,发射的光子被光信号计量装置接收后,进行数字处理,计算出标记物的相应发光值。而这一检测系统中的关键组分——聚合物磁性微球承载了免疫反应固相载体的作用以及快速分离的重要作用。首先抗体结合在聚合物磁性微球上,由于免疫反应的高特异性,将待检测物从

待检测样本复杂的物质构成中分离捕获出来,当加入带有标记物的二抗时,在磁性微球上形成两株抗体夹待测物这一复合物形式,同时由于微球的超顺磁性,在外加磁场下可快速分离,以去除溶液中游离的带有标记物的二抗,从而构建出待测物质和标记物的关系,也将具体数字化的发光值与待测物含量联系起来。

[0007] 最后荧光增强免疫层析是近年来出现的一种新型检测方法,其方法是荧光(包括稀土螯合物、有机荧光染料等)聚合物微球上定向偶联抗体片段,通过毛细作用,样本中的抗原与荧光微球表面抗体结合后,从而带动继续在膜上延展,在检测线附近与固定的二抗形成荧光微球-抗体-抗原-二抗复合物,直接检测荧光微球的荧光,从而确定待测物中抗原的含量。要求荧光微球可以免受一般溶剂的干扰,荧光发射强而稳定,荧光微球标记的抗体在干燥溶解后仍然可以保持其荧光活性、生物活性和单分散的胶体状态。荧光微球由于可以实现很高的 F/P 值,对于实现高灵敏的荧光免疫分析提供了很好的应用前景。

[0008] 以上三种方法均采用的聚合物微球通常是非常疏水的材料,直接应用会不可避免存在蛋白质在材料表面吸附的问题,非特异性的蛋白吸附会造成试剂聚集,增加反映的本底值,导致反应基线的波动,严重时甚至会造成假阳性或者假阴性的结果,直接影响到检测的可信度,形成误诊或者漏诊等危害。因此,降低聚合物微球试剂非特异性吸附的研究越来越受到重视。提高胶乳微球试剂的稳定性,以防止其聚集,降低其非特异性吸附并减少其在血清或者全血中与样品组分的非特异性互相作用,是如今体外诊断测定中的一个挑战。

[0009] 疏水相互作用和静电场被认为是非特异性吸附的两大起因。疏水相互作用是通过疏水物的非极性疏水基与水相互排斥作用而发生的。这种作用使疏水基相互靠拢,当蛋白质分子与聚合物基质的作用时,会影响蛋白质的三维结构,使其变得结构松散,导致蛋白质在基质表面发生构型的延展,甚至失活。静电场的原理可以简单描述为“同性相斥,异性相吸”,因此静电场对吸附的作用取决于蛋白质的等电点、体系的 pH 和聚合物表面的电荷情况。另外聚合物表面也可以与杂质发生非特异性的覆盖结合,这也是非特异性吸附的重要起因。

[0010] 两性离子聚合物是带有等量正负电荷的聚合物,两性离子聚合物通过离子溶剂化作用,与水分子具有更强的结合能力。以细胞膜为例,其主要成分是磷脂类双亲性分子,在水溶液中,细胞膜可以有效保持细胞表面形成一层紧密的结合水,并不与杂蛋白结合。磷酸胆碱是组成细胞膜的基本单元的亲水基端,是细胞外层膜中的最外层基团,具有电中性、高亲水性、无毒和在生理 pH 值下稳定的特性。常见的两性离子聚合物单体有 2-甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱(MPC)、磺酸基甜菜碱和羧酸基甜菜碱等,使用这类物质修饰材料后,由于热力学作用使双亲性分子的疏水尾部与水的作用最小,亲水基团最大限度地暴露出来与水接触,从而可以形成一层类似膜结构。同时,由于它们都是电中性的,在一个给定的结构中正电荷和负电荷平衡,导致材料表面由于静电场的吸附也减少。将两性离子通过共聚引入疏水性的聚合物微球上以改善其亲水性和降低其非特异性结合的方法在现在技术中还没有被报道过。

## 发明内容

[0011] 本发明的目的在于克服现有技术中的不足,提供一种两性离子型聚合物微球及其制备方法,将两性离子通过共聚引入疏水性的聚合物微球上以改善其亲水性和降低其非特

异性结合,同时在此基础上引入长链官能团分子,通过化学键偶联分子探针,一方面共价结合使得的复合物更加稳定,同时长链的官能团可以减少偶联时空间位阻,稳定结合的生物分子活性。

[0012] 本发明的第一个方面是提供一种两性离子型聚合物微球,包括载体和固载在载体上的功能性配基,所述载体为疏水性聚合物微球,其中,所述载体上还固载有两性离子基团,所述两性离子基团同时含有阳离子基团和阴离子基团。

[0013] 优选地,所述阳离子基团为胺基盐离子、季铵或吡啶阳离子等,所述阴离子基团为羧酸基、磺酸基、磷酸基或硫酸酯基等。

[0014] 进一步优选地,所述两性离子基团为磷酸基类两性离子单体、磺酸基类两性离子单体和羧酸基类两性离子单体中的一种或多种。

[0015] 更进一步优选地,所述两性离子基团为 2- 甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱、磺酸基甜菜碱(例如 N,N- 二甲基 -N- 甲基丙烯酰胺基丙基 -N- 丙烷磺酸内盐)和羧酸基甜菜碱(例如 N,N- 二甲基 -N- 甲基丙烯酰氧乙基 -N- 乙酸内盐)。

[0016] 优选地,所述功能性配基为具有间隔臂的官能团单体。一方面引入的官能团结构为共价结合提供活性位点,官能团种类和含量可根据实际需要进行调节,另一方面其长链结构可避免两性离子型磷酸胆碱单体对官能基团的遮蔽,减少偶联时的空间位阻,为抗体抗原的结合提供了有利条件。

[0017] 进一步优选地,所述功能性配基为带有羧基的长链聚合物单体,例如带有羟基的聚合物单体(如甲基丙烯酸羟乙酯,甲基丙烯酸聚乙二醇单酯等)与带有酸酐的分子(如马来酸酐,丁二酸酐等)反应,羟基与酸酐形成酯键后,再裸露出另一分子的羧基,再通过共聚引入到聚合物微球结构中。

[0018] 优选地,载体上功能性配基的有效载入量为 100 ~ 1000  $\mu\text{mol/g}$ ,更优为 150 ~ 400  $\mu\text{mol/g}$ ,最优为 200 ~ 300  $\mu\text{mol/g}$ 。

[0019] 其中,载体上两性离子基团的载入量可根据实际需要进行调节,优选地,载体上两性离子基团的载入量为 0.01 ~ 10wt%,更优为 0.1 ~ 5wt%,最优为 0.1 ~ 1wt%。

[0020] 进一步优选地,载体上两性离子基团的载入量为 0.5 ~ 2wt%,更优为 0.1-1wt%,最优为 0.3 ~ 0.5wt%。

[0021] 优选地,所述疏水性聚合物微球为苯乙烯聚合物微球、聚甲基丙烯酸甲酯微球或聚脲醛微球。

[0022] 本发明的第二个方面是提供本发明的第一个方面所述的两性离子型聚合物微球的制备方法:

在惰性气氛下,将制备疏水性聚合物的单体与含有乳化剂的水分散液混合均匀,在搅拌的条件下,加入引发剂,加热至 60 ~ 120 $^{\circ}\text{C}$ 引发自由基聚合反应,然后加入功能性配基单体和两性离子基团单体,反应 6 ~ 12h,纯化,既得。

[0023] 其中,乳化剂为疏水性聚合物制备中常用的乳化剂,其用量也为疏水性聚合物制备中的常规用量,本发明在此不对其种类和用量进行特别限定。

[0024] 其中,引发剂为疏水性聚合物制备中常用的引发剂,其用量也为疏水性聚合物制备中的常规用量,本发明在此不对其种类和用量进行特别限定。

[0025] 本发明的第三个方面是一种两性离子型聚合物磁性微球,所述两性离子型聚合物

磁性微球为本发明第一个方面所述的两性离子型聚合物微球内包覆纳米磁性物质。

[0026] 本发明的第四个方面是提供本发明第三个方面所述的两性离子型聚合物磁性微球的制备方法：在惰性气氛下，将制备疏水性聚合物的单体与纳米磁性物质混合超声分散均匀（单体分散成包含磁性物质的纳米级的小油滴），然后缓慢滴加到含有乳化剂的水分散液中，超声分散均匀，同时加入引发剂，加热至 60 ~ 120℃ 反应 0.5 ~ 2h，最后加入功能性配基单体和两性离子基团单体，反应 6 ~ 12h，纯化，既得。

[0027] 其中，乳化剂为疏水性聚合物制备中常用的乳化剂，其用量也为疏水性聚合物制备中的常规用量，本发明在此不对其种类和用量进行特别限定。

[0028] 其中，引发剂为疏水性聚合物制备中常用的引发剂，其用量也为疏水性聚合物制备中的常规用量，本发明在此不对其种类和用量进行特别限定。

[0029] 本发明的第五个方面是提供一种两性离子型聚合物荧光微球，所述两性离子型聚合物荧光微球为权利要求 1 ~ 10 任意一项所述的两性离子型聚合物微球内包覆荧光物质。

[0030] 本发明的第六个方面是提供本发明第五个方面所述的两性离子型聚合物荧光微球的制备方法：采用包裹法或者溶胀法。

[0031] 其中，包裹法是指利用荧光物质分散在含有乳化剂的水分散液中，在随后的聚合反应中，荧光染料分子被缠结包埋在聚合物分子链中，其共聚单体中相应引入配基单体和两性离子型其团单体。

[0032] 包裹法具体为：在惰性气氛下，将荧光物质分散在含有乳化剂的水分散液中，随后缓慢加入制备疏水性聚合物的单体，混合分散均匀，再加入引发剂，加热至 60 ~ 120℃ 反应 0.5 ~ 2h，最后加入功能性配基单体和两性离子基团单体，反应 6 ~ 12h，纯化，既得。

[0033] 在聚合初期荧光分子分散在增溶胶束中，随着聚合物链的增长，胶束中的聚合物链将荧光分子缠绕包覆，最终形成的聚合物将荧光分子包裹在微球内部，荧光分子由于疏水性聚合物的保护作用，不受绝大多数溶剂或光漂白影响。制得的荧光微球荧光强度高，不发生荧光泄漏，单分散性好，同时由于荧光微球表面修饰有官能团和两性离子基团，表面亲水，富含可供于偶联的活性位点。

[0034] 其中，乳化剂为疏水性聚合物制备中常用的乳化剂，其用量也为疏水性聚合物制备中的常规用量，本发明在此不对其种类和用量进行特别限定。

[0035] 其中，引发剂为疏水性聚合物制备中常用的引发剂，其用量也为疏水性聚合物制备中的常规用量，本发明在此不对其种类和用量进行特别限定。

[0036] 其中，溶胀法是利用在有一定交联度的微球基础上，采用有机溶剂对微球进行浸泡，在微球溶胀的同时，荧光染料渗透进入微球内部。

[0037] 溶胀法具体为：在惰性气氛下，将制备疏水性聚合物的单体与含有乳化剂的水分散液混合均匀，在搅拌的条件下，加入交联剂和引发剂，加热至 60 ~ 120℃ 引发自由基聚合反应，然后加入功能性配基单体和两性离子基团单体，反应 6 ~ 12h，纯化，得到具有一定交联度的微球；将制得具有一定交联度的微球与含有表面活性剂的水溶液混合均匀，然后加入含有荧光染料的有机溶剂，超声处理至看不到两相分层为止，除去有机溶剂，离心，洗涤，既得。

[0038] 在微球的选择上必须有一定的交联度，从而可在有机溶剂下保持微球的外形不发生皱缩或者坍塌，其选择的交联剂可以是二乙烯基苯 (DVB)、乙二醇二甲基丙烯酸酯

(EGDMA)、三乙二醇二甲基丙烯酸酯 (TEGDMA) 等, 交联量为 1 ~ 20wt%, 更优的是 2 ~ 10wt%, 最优为 3 ~ 5wt%。

[0039] 表面活性剂的质量为具有一定交联度的微球的体积为 0.005g:

可用作溶胀的有机溶剂可以是很多种类, 常见的有二氯甲烷, 四氢呋喃, N, N-二甲基甲酰胺等, 用量为具有一定交联度的微球溶液体积的 5-50%, 更优为 10-30%, 最优为 15-20%。

[0040] 在胶乳免疫比浊上使用两性离子型聚合物微球作为胶乳试剂, 两性离子基团赋予了纳米微球亲水性的表面, 大大降低材料的非特异性吸附, 同时微球表面的等量正负电荷使得微球试剂更加稳定, 可以长期贮存。

[0041] 在化学发光免疫分析上使用两性离子型聚合物磁性微球作为免疫试剂, 两性离子基团可有效降低材料的非特异性吸附, 制备的化学发光免疫试剂, 有较低的本底值, 以及较高的信噪比。

[0042] 在荧光增强免疫分析上使用两性离子型聚合物荧光微球作为免疫试剂, 两性离子基团修饰向荧光微球有效降低了非特异性吸附, 在层析试纸条上, 有较好的展程, 较低的本底残留。同时微球自身的荧光附带荧光可大大提高产品灵敏度, 改善微球试剂的检测范围。

[0043] 本发明利用两性离子化合物修饰纳米微球, 制备获得表面亲水并富含官能团的纳米微球材料。在实际应用这种两性离子型聚合物微球的诊断试剂时, 发现试剂能够很好的抑制蛋白的非特异性吸附, 抗体偶联量与商品化的纳米微球相似。在项目的性能分析中发现基于此种纳米微球的诊断试剂可以有效改善试剂的稳定性, 降低反应的本底值。对于试剂的线性相关性、重复性、回收率等其它性能时, 分析发现均可以达到国标或者行标的要求, 试剂性能优越。本发明可以很好解决目前诊断试剂中普遍存在的非特异性吸附问题和试剂稳定性问题, 具有非常广阔的免疫检验应用价值。

## 附图说明

[0044] 图 1 为基于两性离子型聚苯乙烯磁性微球的 hGH 检测试剂标准曲线;

图 2 为本发明的微球作用原理示意图。

## 具体实施方式

[0045] 下面参照附图, 结合具体的实施例对本发明做进一步的描述, 以更好地理解到解本发明。

[0046] 长链官能团单体的制备: 电子天平称取 12g 的马来酸酐, 转移至 100ml 的单口烧瓶中, 加入 30ml 的无水丙酮 (无水硫酸镁除水后重蒸), 搅拌溶解后加入 15ml 的甲基丙烯酸- $\beta$ -羟乙酯, 常温下搅拌反应 6 小时。反应结束后的淡黄色液体, 先经行旋蒸除去溶剂丙酮, 再进行减压蒸馏, 收集 220pa 下 78°C 的馏分, 得无色透明液体, 此产物为长链羧基单体。为了更好地比较各实施例的性能, 下述实施例中的功能性配基单体均采用该长链羧基单体。应当理解的, 本发明还可以采用其他常用配基。同理, 为了更好地比较各实施例的性能, 本发明下述各实施例中制备聚合物微球均采用苯乙烯, 应当理解的是, 本发明可以采用其他常用的疏水性聚合单体。

[0047] 实施例 1 磷酸型两性离子型聚苯乙烯微球制备

在配有冷凝管（冷凝管上口需要接干燥管）、氮气通路、磁力搅拌和水浴加热的四口烧瓶中加入 45mg 十二烷基磺酸钠，加入纯化水 100mL 搅拌溶解。然后通氮气除氧，气流流速适中，以氮气引入介质以有连续小气泡冒出为宜，气流不间断。通氮气期间，用移液器量取 4mL 提纯后的苯乙烯，并经四口烧瓶的加料口缓慢滴加，称取 36mg 过硫酸钾，用 1mL 纯化水溶解后，加入到反应体系中，水浴锅温度设定至 85℃，加热引发聚合。称取 10mg 2- 甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱，用 1mL 长链羧基单体溶解，搅拌溶解至变成乳白色，此过程中保持氮气通入。将乳白色液体加入到苯乙烯反应体系中，温度稳定在 85℃，反应 8h 后结束。

[0048] 待制备聚苯乙烯微球的四口烧瓶冷却至室温后，将冷凝管上端的干燥管换为磨口具活塞，活塞处接真空泵抽提反应残留单体，真空度要求保持在 200Pa，持续 2 小时，由于苯乙烯的强挥发性，可有效除去残留未聚合单体。

[0049] 在 10ml 填料柱下端放上聚丙烯垫片，垫片在使用前需要超声清洗，在垫片上加入 4-5ml 琼脂糖离子交换 Q 柱，待填料自然沉降后，用纯化水清洗 3 次，置换填料中的溶剂。加入乳白色为全液 1ml 到填料中，待产物完全没入填料柱后，加入 3-4mL 纯水将产物完全冲出。舍弃前段不含胶乳的流出液，收集胶乳流出液，后半段微球溶液颜色变浅时，也舍弃之。待填料中残留的微球溶液完全冲去后，在进行上样。填料柱每过 10 次时，应用 0.01mol/L 的氯化钠溶液洗涤，后用纯水洗涤，再用于微球的过滤。

[0050] 对纯化后的微球溶液进行分装，离心浓缩，4℃下 15000rpm 离心 20min，弃上清。纯化水复溶沉淀并浓缩，重复清洗 3 次，除去游离的 2- 甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和长链羧基单体。

[0051] 所得微球对其进行烘干法测定固形物含量，留取备用。

#### 实施例 2 羧酸型两性离子型聚苯乙烯微球制备

制备方法参照实施例 1，具体实施方法如下：

在四口烧瓶中加入 45mg 十二烷基磺酸钠，加入纯化水 100mL 搅拌溶解。然后通氮气除氧，通氮气期间，用移液器量取 4mL 苯乙烯，并经四口烧瓶的加料口缓慢滴加。称取 36mg 过硫酸钾，用 1mL 纯化水溶解后，加入到反应体系中，将水浴锅温度设定至 85℃，加热引发聚合。称取 10mg N, N- 二甲基 -N- 甲基丙烯酰氧乙基 -N- 乙酸内盐，用 1mL 长链羧基单体溶解搅拌溶解至变成乳白色，此过程中保持氮气通入。将乳白色液体加入到苯乙烯反应体系中，温度稳定在 85℃，反应 8h 后结束。

[0052] 所得微球经过过离子交换柱纯化，并离心浓缩，最后对其进行烘干法测定固形物含量，留取备用。

#### 实施例 3 磷酸型两性离子型聚苯乙烯磁性微球的制备

在配有冷凝管、氮气通路、超声振幅杆和机械搅拌的四口烧瓶中加入 130ml 水和 20ml 乙醇两者混匀后加入 90mg 十二烷基磺酸钠和 270mg 十六醇，加热 50℃将其溶解并通氮气除氧设定搅拌浆转速为 500rpm，通氮气期间，用移液器移取 10ml 苯乙烯，加入到 0.4g 油酸修饰的四氧化三铁中，超声分散均匀后缓慢滴加到四口烧瓶反应体系中。加入 36mg 过硫酸钾的水溶液，并开启超声（功率 650W，频率 30%，工作 2 秒，间断 1 秒），将油溶性单体和磁性颗粒分散均匀，形成均一的灰色反应体系，最后加入正十六烷 2ml 来稳定小油滴，并设置水浴锅温度为 85℃，超声 1 小时后，关闭超声，向反应体系中加入 20mg 2- 甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和 2mL 长链羧基单体，于 85℃反应 10 个小时。

[0053] 反应结束后,将四口烧瓶中的产物转移到塑料小瓶中,利用磁铁对产物进行磁分离,去除磁性较弱的部分,然后复溶,重复筛选,要求直到产物能在 30 秒内能完成完全的磁分离。之后磁性微球使用 Sephadex G25 填料进行纯化,去除微球中颗粒较大的部分杂质。在微型层析柱中加入 G25 填料 4-5ml,待填料由于重力沉降,滤去原溶剂后,用水冲洗 3 次,后加入磁性微球溶液 2ml,待微球溶液完全没入填料后,用纯化水将产物冲出,收集流出液中夜色较深部分,舍弃后半段残余较浅的微球溶液,期间粒径较大杂质颗粒会残留在填料柱中。

[0054] 所得微球对其进行烘干法测定固形物含量,留取备用。

实施例 4 磺酸型两性离子聚苯乙烯磁性微球的制备

制备方法可参照实施例 3,具体方法如下:

在四口烧瓶中将 250mL 水和 50mL 乙醇混合均匀,通  $N_2$  约 30min 除氧,加入十二烷基磺酸钠 160mg 和十六醇 480mg 到上述溶剂中,机械搅拌同时加热至  $65^{\circ}C$ ,使溶解,得到略发白的分散液。向体系中加入磁流体 0.6g 和单体 20mL 混合液。对反应体系进行超声处理,并加入过硫酸钾 72mg,升温至  $85^{\circ}C$  开始聚合,反应进行 1h 后关闭超声,向反应体系中加入 20mg N,N-二甲基-N-甲基丙烯酰胺基丙基-N-丙烷磺酸内盐,和 2mL 长链羧基单体,反应 10 小时结束。

[0055] 反应结束后,对产物进行磁性分离纯化以及过凝胶柱纯化,最后对其进行烘干法测定固形物含量,留取备用。

实施例 5 磷酸型两性离子型聚苯乙烯荧光微球的制备

电子天平称取 25mg bodipy (542/564) 荧光染料,加入 8ml 95% 乙醇,超声溶解后,用油系 0.22um 的滤膜过滤,弃去不溶固体残渣,备用。向配有冷凝管,氮气通路、磁力搅拌和水浴加热的四口烧瓶中加入 45mg 十二烷基磺酸钠,量取 100ml 纯化水搅拌溶解。待固体粉末溶解完毕后加入乙醇溶解的荧光染料溶液,从导气管口通入氮气除氧,并将水浴锅的温度设定为  $70^{\circ}C$ ,待温度恒定后,持续通氮气 20min,此过程中冷凝管内部不通冷凝水,以除去多余的乙醇。之后,将整四口烧瓶从水浴锅中取出,将水浴锅内热水换为冷水,四口烧瓶也用冷水冲洗降至室温。

[0056] 重新将四口烧瓶放回水浴中,开启磁力搅拌,缓慢滴加 4ml 苯乙烯,整个过程维持在 10-15 分钟完成,重新将水浴锅温度设定为  $85^{\circ}C$ ,同时加入引发剂过硫酸钾 36mg,将冷凝水打开,进行回流反应,反应 1 小时后,加入 10mg 2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和 1ml 长链羧基单体,以引入官能基团和两性离子亲水基团。整个过程继续保持通氮气。反应 8 小时后,关闭水浴锅的加热以及搅拌。

[0057] 所得产物经过琼脂糖离子交换 Q 柱进行纯化后,进行离心清洗浓缩。其清洗过程要求一致洗到上清液中测不出荧光为止。

[0058] 所得微球对其进行烘干法测定固形物含量,留取备用。

实施例 6 包裹法制备磺酸型两性离子聚苯乙烯荧光微球

制备方法可参照实施例 5,具体方法如下:

称取 23mg 8-苯胺-1-萘磺酸荧光染料,用乙醇溶解后过滤,备用。向四口烧瓶中加入 45mg 十二烷基苯磺酸钠,量取 100ml 纯化水搅拌溶解。待固体粉末溶解完毕后加入荧光染料溶液,从导气管口通入氮气除氧,升温保持通氮 20min,以除去多余的乙醇。之后,将整

四口烧瓶降温,并重新向四口烧瓶缓慢滴加 4ml 苯乙烯,再次升温至 85℃,同时加入引发剂过硫酸钾 36mg,通冷凝水进行反应,1 小时后加入加入 10mg N,N-二甲基(甲基丙烯酰氧乙基)铵基丙磺酸内盐,1mL 长链羧基单体,整个过程继续保持通氮气,反应 8 小时后结束。

[0059] 所得产物经过琼脂糖离子交换 Q 柱进行纯化后,进行离心清洗浓缩。其清洗过程要求一直洗到上清液中测不出荧光为止。

[0060] 所得微球对其进行烘干法测定固形物含量,留取备用。

#### 实施例 7 溶胀法制备磷酸型两性离子聚苯乙烯荧光微球

先制备磷酸型两性离子型聚苯乙烯微球,参照实施例 1,具体如下:量取纯化水 100mL 倒入四口烧瓶中,称取 45mg 十二烷基磺酸钠,加入到烧瓶中溶解。通氮气除氧 20min。通氮气结束后,量取 5mL 苯乙烯,0.2mL 的二乙烯基苯经前口缓慢滴加入到四口烧瓶中,此过程维持在 15min 左右完成。

[0061] 称取 36mg 过硫酸钠,用 1mL 加入到反应体系加入到反应体系中,升温至 85℃,记下开始时间,反应 1 小时后,称取 10mg 2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱,加入反应体系中,继续反应直至 8h 后反应结束。所得的磷酸型双离子聚苯乙烯交联微球经离心清洗纯化后备用。

[0062] 用移液器移取 4mL 磷酸型双离子聚苯乙烯交联微球到圆底烧瓶中,并加入 2mL 的 1% 的十二烷基磺酸钠水溶液,摇匀。称取 10mg 三(1,3-二苯-1,3-苯三羟基)(1,10-邻二氮杂菲)钬,并溶解于 1mL 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中,得到稀土钬荧光染料的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液。

[0063] 将稀土钬荧光染料的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液加入含有 SDS 的交联微球溶液中,超声将混合液分散均匀,直至看不到两相分层为止,超声处理 30min,助微球溶胀。旋转蒸发器除去二氯甲烷,由于混合液中含有大量表面活性剂,二氯甲烷沸点比较低,旋蒸开始时,不需要加热,旋转速度也不需要太高。待烧瓶内泡沫较少时,可适当加快旋转速度,并适当辅以加热,整个旋蒸过程至少保证有 30min。对所得微球进行离心清洗,测定固形物含量备用。

#### 实施例 8 抗体偶联

取 1mg 磷酸基两性离子型聚苯乙烯微球(实施例 1)和 1mg 羧基两性离子型聚苯乙烯微球(实施例 2)(体积根据固含量计算)分别置于 2 支离心管中,加入 1mL Mes(20mM Mes, pH 5.6)缓冲液稀释得乳胶溶液。从 10mg/mL 的活化剂(EDC&NHS 两者等质量, Mes 缓冲液溶解,现配现用)中取 10 $\mu$ L 迅速加入胶乳溶液中,混匀,于 37℃ 震荡 30 分钟,为保证微球的充分反应,可采用摇床或者水浴锅加磁力搅拌。活化结束后,取胶乳离心清洗,吸取上清液,清洗一次,用 200 $\mu$ L PB 缓冲液(20mM PB, pH 7.4)复溶。取  $\beta$ 2-MG 抗体(根据抗体浓度,与微球的质量比为 0.3 : 1)加入 800 $\mu$ L PB 缓冲液稀释。将上步复溶的微球溶液加入稀释的抗体溶液中,立刻涡旋混匀,并需要超声将沉淀打碎,置于 37℃ 震荡反应 2 小时。反应结束,离心去上清,加入封闭液(10mM Gly, 5mg/mL BSA, 0.1% Triton 和 10% 氯化胆碱 pH8.0)封闭,震荡反应 1 小时后离心清洗,用封闭液复溶,清洗 1 次,于 2-8℃ 保存。

[0064] 两性离子型聚苯乙烯磁性微球(实施例 3 和实施例 4)和两性离子型聚苯乙烯荧光微球(实施例 5 和实施例 6)的偶联方法同上,其中两性离子型聚苯乙烯磁性微球可使用磁分离步骤代替离心步骤。

#### 实施例 9

##### 1、两性离子型聚苯乙烯微球的蛋白吸附性能

实施例 1 和 2 提供的两性离子型聚苯乙烯微球在完成与抗体结合后(参照实施例 7),

离心清洗时,取出上清液,采用考马斯亮蓝法测定上清液的蛋白浓度。同时设计物理吸附对比试验,具体方法为在 Mes (20mM Mes, pH 5.6) 缓冲液条件下,不加入活化剂,通过微球的疏水作用力直接与抗体蛋白结合,根据固含量,称取一定体积的胶乳溶液,确保量取的胶乳的质量为 1ng,加入 Mes 缓冲液 1mL。向微球溶液中加入  $\beta$  2-MG 抗体(根据浓度测算加入的体积,胶乳与抗体的质量比为 1 : 0.3),置于摇床中,温度在 30-36 $^{\circ}$ C,转速 250r/min,温育 2 小时后取出。离心取上清测定蛋白含量。结果如下表 1 所示。

[0065] 表 1 两性离子型聚苯乙烯微球的蛋白结合率

微球 种类	实施例 1		实施例 2	
	物理吸附	化学偶联	物理吸附	化学偶联
结合量	0.013mg/mg	0.136mg/mg	0.026mg/mg	0.123mg/mg

由表 1 可知,通过物理吸附时,磷酸基两性离子型聚苯乙烯微球的蛋白结合量仅有 0.013mg/g,通过化学偶联时,蛋白结合量达 0.136mg/mg,而羧基两性离子型聚苯乙烯微球有着相似的实验结果,说明两性离子型聚苯乙烯微球由于其特殊性能,与蛋白质几乎不发生物理吸附,而带有间隔臂的长链羧基,为共价偶联提供了较多的集合位点,同时避免了空间上的位阻,为抗体结合效率以及维持抗体活性提供了较好的条件。

[0066] 两性离子型聚苯乙烯微球的免洗性能

以羧基两性离子型聚苯乙烯微球(实施例 2)为例,微球的免清洗效果在 NanoDrop ND-2000 超微量分光光度计进行,具体方法是,在清洗后的胶乳上清液取 1 滴加入样品槽内,去除上清液后加入 1mL PB 缓冲液(20mM PB, pH 7.4)复溶,离心后重复测定 OD 值,取三次的的数据。结果见表 2。

[0067] 表 2 清洗次数的对比

	清洗第一遍	清洗第二遍	清洗第三遍
商品化羧基微球	0.508	0.314	0.118
实施例 2	0.375	0.110	0.023

由表 2 可知,与商品化的羧基微球相比,两性离子型聚苯乙烯微球对蛋白有较强的屏蔽作用,在偶联后的清洗中,两次的清洗后残留蛋白量就已经很低了,而商品化的羧基微球,在清洗过程中,持续有蛋白溶出,需要清洗多次。

[0068] 两性离子型聚苯乙烯微球在免疫比浊上的应用

以磷酸基两性离子型聚苯乙烯微球(实施例 1)为例,在胶乳增强免疫比浊项目选择了  $\beta$  2-MG 项目进行性能分析,在日立 7170-A 全自动生化分析仪上进行检测,检测参数为:主波 505,副幅波 0,样本进样量 2 $\mu$ l, R1 进样量 240, R2 进样量 60 $\mu$ l。其中 R1 试剂为含有 2.0% PEG6000 的 100mM PBS(pH7.4), R2 试剂为含有胶乳储存液以及 1%叠氮钠的致敏胶乳溶液。标准品和质控品分别为  $\beta$  2-MG 重组蛋白,辅料为小牛白蛋白,控品由 BiO-RAD 公

司提供,代码为 59X。

[0069] 选取 5 份临床患者样本,分别置于样本盘 1-5 号位置,以 X 为样本浓度,以 Y 为反应浊度,用 Y 对 X 作散点图,作直线回归分析,计算线性回归方程,并考察稳定性能,结果见表 3。

#### [0070] 线性回归分析

通过直线回归等计算得到结果为:血清  $\beta$  2-MG 线性回归方程为  $Y = 0.98X + 0.18$ ,相关系数  $r = 0.994$ ,  $r^2 = 0.988$ 。可认为试剂的测定范围合适,同时说明检测系统的线性较好,偏差较小。

#### [0071] 表 337℃加速稳定性能考察

反应值	0 天	3 天	降幅	4 天	降幅	5 天	降幅	6 天	降幅	8 天	降幅
样本一	364.5	372.7	2.25%	379.5	4.12%	329.2	-9.68%	350.2	-3.92%	310	-14.9%
样本二	1451.5	1377.2	-5.12%	1368.5	-5.72%	1416.2	-2.43%	1351	-6.92%	1434.5	-1.17%

#### 回收试验

##### 低浓度水平:

用浓度为 4.15mg/L 的标准液作系列稀释,检测低浓度水平回收率。20 次重复测定,理论值为 0.42mg/L、0.83mg/L、1.25mg/L、1.66mg/L、2.08mg/L、2.49mg/L、2.91mg/L、3.32mg/L、3.74mg/L、4.15mg/L,实测值为 0.41mg/L、0.85mg/L、1.26mg/L、1.66mg/L、2.07mg/L、2.49mg/L、2.91mg/L、3.34mg/L、3.77mg/L、4.19mg/L,回收率为 96.2%、101.8%、100.6%、99.9%、98.8%、99.9%、99.9%、100.4%、100.8%、100.5%。

##### [0072] 高浓度水平:

用浓度为 76.13mg/L 的标准液作系列稀释,检测高浓度水平回收率。20 次重复测定,理论值为 7.61mg/L、15.23mg/L、22.84mg/L、30.45mg/L、38.07mg/L、45.68mg/L、53.29mg/L、60.91mg/L、68.52mg/L、76.13mg/L,实测值为 7.61mg/L、15.04mg/L、22.50mg/L、30.16mg/L、37.29mg/L、44.94mg/L、53.44mg/L、62.00mg/L、70.58mg/L、77.99mg/L,回收率为 99.9%、98.7%、98.5%、99.0%、98.0%、98.4%、100.3%、101.8%、103.0%、102.4%。

#### [0073] 实施例 10

##### 1、两性离子型聚苯乙烯磁性微球的蛋白吸附性能

操作方法同实施例 8,检测两性离子型聚苯乙烯磁性微球对于 BSA 蛋白和 IgG 的吸附性能,结果见表 4。

#### [0074] 表 4 两性离子型聚苯乙烯磁性微球

	实施例3		实施例4		商品化 磁性琼脂微球	
	物理吸附	化学偶联	物理吸附	化学偶联	物理吸附	化学偶联
吸附量 BSA (ng/mg)	0.038	0.174	0.041	0.154	0.087	0.178
吸附量 IgG (ng/mg)	0.027	0.113	0.031	0.125	0.064	0.122

由表 4 可知,磺酸基两性离子型聚苯乙烯磁性微球与磷酸基两性离子型聚苯乙烯磁性微球有着相同的性质,对于 BSA 蛋白以及 IgG 的物理吸附量很少,而在化学偶联时 BSA 蛋白和 IgG 的吸附量均较多,说明与两性离子型聚苯乙烯磁性微球结合的蛋白质均以共价形式存在,而由于两性离子型聚苯乙烯磁性微球的亲水以及电中性表面,对于蛋白的物理吸附非常少。另一方面,在进行化学偶联时,不可避免地存在一部分物理吸附,因此按化学偶联时结合蛋白量为结合总量,则物理吸附时的蛋白结合量占蛋白结合总量的百分比可以计算出,以磷酸基两性离子型聚苯乙烯磁性微球为例,其物理吸附量占总量的 13% (BSA), 14% (IgG)。

#### [0075] 两性离子型聚苯乙烯磁性微球在化学发光上的应用

使用磷酸基两性离子型聚苯乙烯磁性微球(实施例 3)在化学发光 hGH 项目上进行了试剂的性能分析测定,具体参数为:待分析样本的加样量为 100  $\mu$ L;捕获抗体 5802 抗体的加入量为 30  $\mu$ L;标记抗体 5801-吡啶酯的加入量为 120  $\mu$ L;37 $^{\circ}$ C 温浴反应 15min,计算 0.45 ~ 3s 内的光子计数积分面积作为发光强度。

[0076] 在 hGH 项目上,对两性离子型聚苯乙烯磁性微球检测试剂的最低检测限和检测上限进行评估。

[0077] 两种检测试剂分别对人阴性血清样本重复测定 20 次,得到样本的发光强度,分别计算测得的发光强度的平均值( $\bar{x}$ )和标准差(SD),计算检测均值加两倍标准差。根据测定浓度和发光强度的拟合方程,计算出浓度值,此浓度即是检测系统最低检出限。结果如表 5 所示,以两性离子型聚苯乙烯磁性微球为固相载体的 hGH 检测系统,可检测的最低限为 0.011ng/ml,由于市面上绝大多数同类产品。

#### [0078] 表 5 最低检测限评估

	$\bar{x}$ (RLU)	SD (RLU)	+2SD (RLU)	最低检出限 (ng/mL)
实施例 3	342	13	368	0.011

检测上限评估:

取 hGH 重组蛋白,用生理盐水稀释到 0.01、0.02、0.05、0.5、5、15、25、35、45、65ng/mL 10 个浓度水平,使用本专利所建 hGH 检测试剂对每个浓度水平重复测定 4 次,以理论浓度为 x 轴,检测发光值为 y 轴,绘制散点图。结果显示实施例 3 试剂在 0 ~ 65ng/mL 范围内单调梯度分布,当样本浓度超过 45ng/mL,反应体系趋于饱和,检测进入平台期。试剂标曲拟合方

法为五参数拟合,公式为  $y = A_{min} + (A_{max} - A_{min}) / (1 + (x_0/x)^h)^s$ ,

其中各参数为:

$$A_{min} = 210.46098$$

$$A_{max} = 1.62E+06$$

$$x_0 = 45.02666$$

$$h = 7.65128$$

$$s = 0.1452。$$

#### [0079] 实施例 11

##### 1、两性离子型聚苯乙烯荧光微球在免疫层析上的应用

使用磷酸基两性离子型聚苯乙烯荧光微球(实施例 5)在免疫层析的 cTnI 项目上进行了试剂的性能分析。在 4mm x 60mm 的免疫层析试纸条上包含 5 个组分,分别是用于吸收样本溶液的样本垫,用作层析介质主题的 25mm 的硝酸纤维素膜(NC 膜),用于吸收液体的吸收垫以及 PVC 底板将这几个组分集装起来。

[0080] 样本垫上预先使用含有 0.5% (v/v) 的 Tween-20 的 PBS 缓冲液处理,等液体干燥后,样本点粘合在 NC 膜下方 2-3mm 处,吸收垫粘合在 NC 膜上端 2-3mm 处,确保样本溶液可以顺利在试纸条上的各个组分之间转移。检测线为涂覆的抗原(2ug/L),距离样本垫上方 27mm 处,质控线为羊抗鼠二抗(0.45ug/L)划在吸收垫下端 25mm 处,50ul 的两性离子型聚苯乙烯荧光微球-抗体复合物(制备参照实施例 7)通过 PBS 稀释后划在样本垫上端。检测时,将 50ul 的待分析物从样本垫处加入,10 分钟后通过 GT1100 系列免疫定量分析仪测定。

##### [0081] a、准确性和重复性

配制 1.0ng/L 和 0.2mg/L 的 cTnI 标准品溶液,采用本 cTnI 荧光检测试纸条进行测定,浓度分别重复测定 10 次,分别计算测定均值和标准差,结果见表 6。计算变异系数进行重复性考察,结果(表)显示变异系数分别为 0.85% 和 1.10%;以  $(1 - \text{均值} / \text{标准值}) \times 100\%$  计算相对差进行准确度考察,相对偏差分别为 0.19% 和 0.23%。

##### [0082] 表 6 cTnI 荧光检测试纸条重复性和准确性实验

序号	标准值 1.00ng/ml	标准值 0.20ng/ml
1	0.99	0.19
2	1.00	0.21
3	1.01	0.20
4	0.98	0.21
5	0.99	0.22
6	1.02	0.19
7	1.01	0.18

8	0.98	0.18
9	0.99	0.21
10	1.00	0.22
平均值	0.998	0.197
标准差	0.259	0.1067
变异系数 (%)	0.85%	1.1%
相对偏差 (%)	0.19%	0.23%

#### b、检测灵敏度

选择浓度垫为 4.00ng/ml 左右的检测样本进行梯度稀释样本,使用 GT1100 系列免疫定量分析仪重复测定,比较不同实验条件下的 cTnI 灵敏度,结果如表 7 所示。

[0083] 表 7 不同工艺的 cTnI 阳性梯度对比

浓度 (ng/ml)	0.03	0.06	0.12	0.24	0.48	0.96	1.92	3.84
实施例 5 (mv)	67	88	109	175	356	653	1053	2124
商品化聚丙烯微球 (mv)	0	0	53	85	131	201	332	534

结果显示在样本稀释梯度中实验组较对照组灵敏度约高 4 倍。

[0084] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

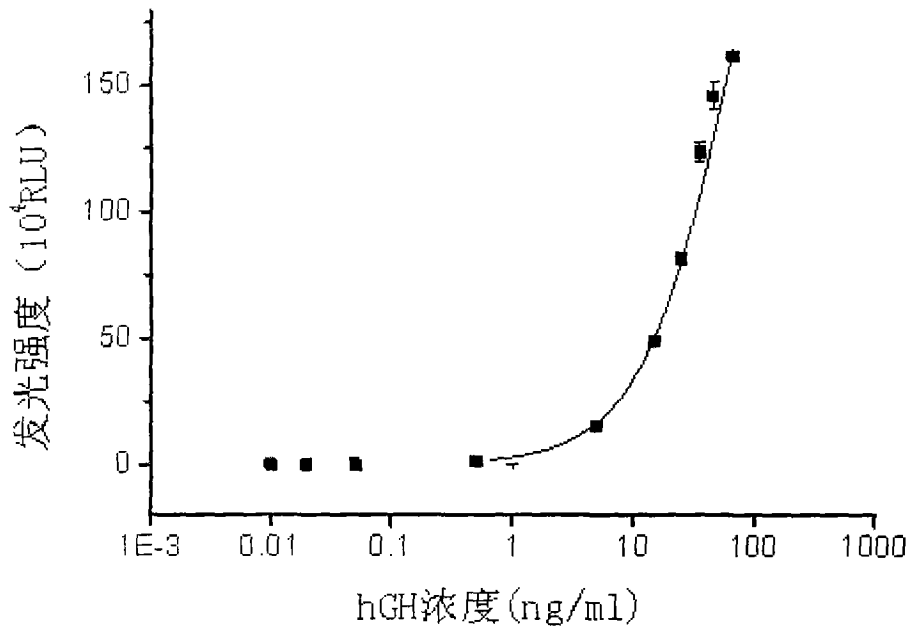


图 1

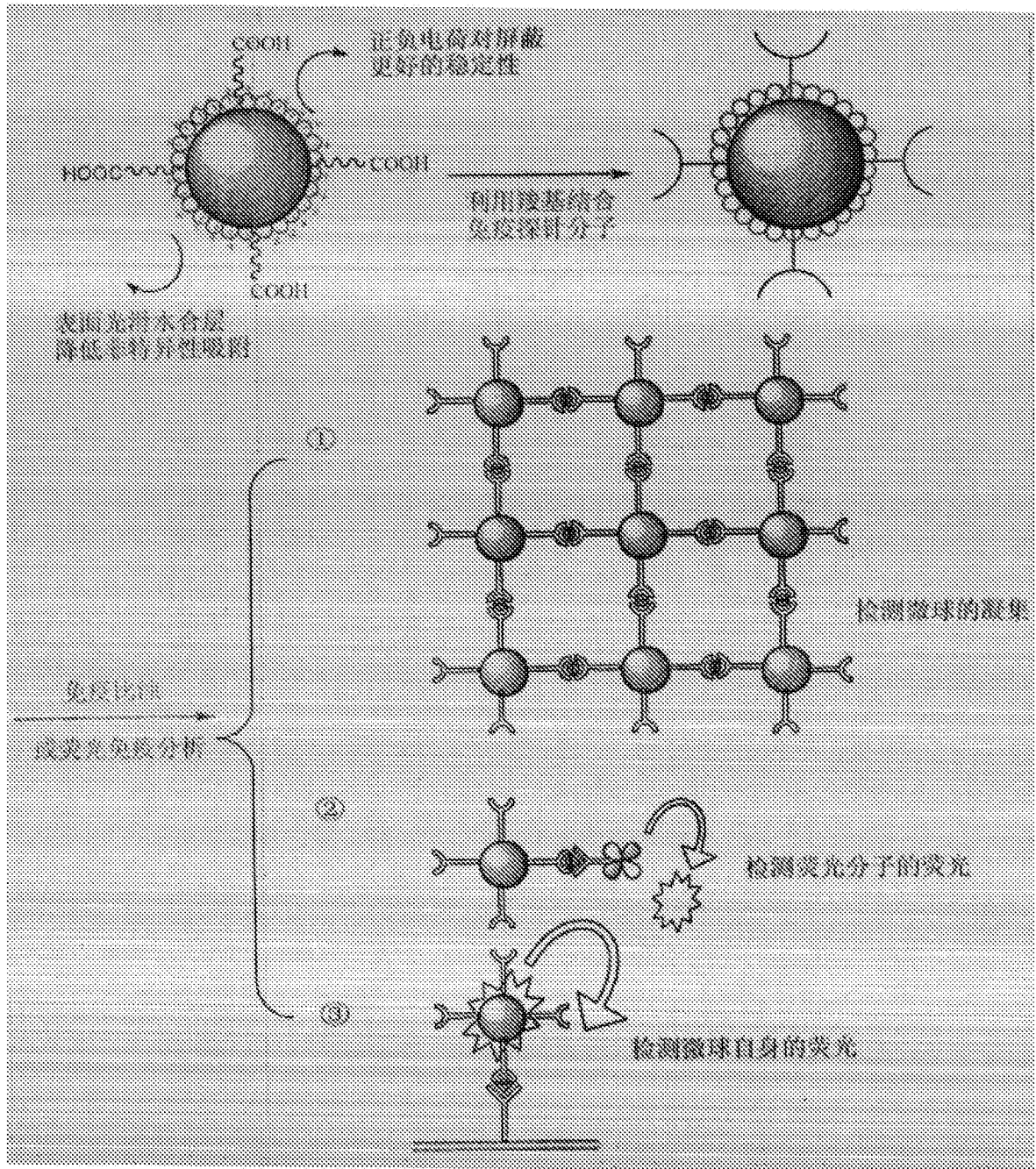


图 2

专利名称(译)	一种两性离子型聚合物微球及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105693906A</a>	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201510038034.4	申请日	2015-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	于乐		
申请(专利权)人(译)	于乐		
当前申请(专利权)人(译)	于乐		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	C08F212/08 C08F230/02 C08F222/26 C08F220/34 C08F220/38 C08F257/02 C09K11/06 G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种两性离子型聚合物微球及其制备方法，将两性离子通过共聚引入疏水性的聚合物微球上以改善其亲水性和降低其非特异性结合，同时在此基础上引入长链官能团分子，通过化学键偶联分子探针，一方面共价结合使得的复合物更加稳定，同时长链的官能团可以减少偶联时空间位阻，稳定结合的生物分子活性。本发明还提供了两性离子型聚合物磁性微球和荧光微球及它们制备方法，本发明在实际应用时，能够很好的抑制蛋白的非特异性吸附，抗体偶联量与商品化的纳米微球相似。可以有效改善试剂的稳定性，降低反应的本底值，对于试剂的线性相关性、重复性、回收率等其它性能均可以达到国标或者行标的要求。本发明具有非常广阔的免疫检验应用价值。

