(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111381022 A
(43)申请公布日 2020.07.07

(21)申请号 201811653706.2

(22)申请日 2018.12.29

(71)申请人 苏州海狸生物医学工程有限公司
地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6楼101室

(72)发明人 任辉　万东菊

(74)专利代理机构 苏州华博知识产权代理有限公司 32232
代理人 何蔚

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页　说明书10页

(54)发明名称

一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法

(57)摘要

本发明提供一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法,包括以下步骤:步骤一,制备羧基磁性微球;步骤二,通过活化偶联上标志物对应的特异性抗体形成免疫磁性微球;步骤三,用免疫磁性微球去富集血清中的标志物蛋白;步骤四,用洗脱液把蛋白洗脱下来,定性定量。本发明能够为计量实验室、参考实验室、体外诊断试剂厂家和临床检验机构研制可溯源的标准物质提供有效的方法。

CN 111381022 A

1.一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述富集方法包括以下步骤：步骤一，制备羧基磁性微球；步骤二，将所述羧基磁性微球通过活化偶联上所述标志物对应的特异性抗体形成免疫磁性微球；步骤三，用所述免疫磁性微球富集血清中的标志物蛋白；步骤四，用洗脱液把免疫磁性微球富集的标志物蛋白洗脱下来，定性定量；

所述磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法不用于疾病诊断和治疗。

2.如权利要求1所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述步骤一的羧基磁性微球粒径为300nm-500nm。

3.如权利要求1所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述步骤一的羧基磁性微球的制备过程为：首先用$FeCl_3 \cdot 6H_2O$制备Fe_3O_4磁核，然后对Fe_3O_4磁核包被SiO_2，形成Fe_3O_4@SiO_2，再加MPS反应形成Fe_3O_4@SiO_2-MPS，接下来以Fe_3O_4@SiO_2-MPS包被GMA、MBA形成Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)，最后加入碳酸钠、碳酸氢钠和6-氨基己酸、硼氢化钠形成Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)-COOH，即步骤一的羧基磁性微球。

4.如权利要求3所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述以Fe_3O_4@SiO_2-MPS包被GMA、MBA形成Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)的步骤中，Fe_3O_4@SiO_2-MPS与GMA、MBA、AIBN的加入比例为每3g Fe_3O_4@SiO_2-MPS加入9mL GMA、9.0g MBA、360mg AIBN。

5.如权利要求1所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述步骤二采用EDC/Sulfo-NHS水相活化的方法将所述羧基磁性微球活化，活化后的羧基磁性微球与所述标志物对应的特异性抗体溶液反应，得到所述免疫磁性微球。

6.如权利要求3所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述步骤二的具体方法是：将所述羧基磁性微球用MEST buffer洗涤后，加入EDC和Sulfo-NHS活化，再加入对应的抗体溶液进行反应，再以BSA溶液封闭，最后洗涤保存，形成所述免疫磁性微球。

7.如权利要求1所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述步骤三的富集过程即免疫磁性微球与目标血清样本混合孵育。

8.如权利要求1所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述步骤四的洗脱液选自pH 2.5-3.1、0.1M的甘氨酸-盐酸溶液，或者pH 2.5-3.1、0.1M的柠檬酸溶液，或者2.5%的醋酸溶液，或者pH 10.0-11.0、0.1M的氢氧化铵溶液。

9.如权利要求1～8任一所述的磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，其特征在于，所述心肌损伤血清标志物为cTnI、NT-ProBNP、CRP，所述肾损伤血清标志物为Cys C、C-Peptide、NGAL。

一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法。

背景技术

[0002] 临床实践已陆续发现多种反应(表征)心肌组织损伤和肾损伤的标志物。如与心肌损伤相关的:cTnI(肌钙蛋白I)、NT-ProBNP(B型氨基端利钠肽原)、CRP(人类C反应蛋白)等,与肾损伤相关的:Cys C(胱抑素C)、C-Peptide(C肽)、NGAL(中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白)等。正常情况下,这些标志物在血液中极其微量。但在发生组织损伤时,血液中这些标志物的含量会有明显的变化。目前临床上已有非常成熟的快速检测方法来检测上述标志物,如化学发光免疫分析法,金标免疫法,免疫比浊法等。这些检测使用的标准物质大都为合成所得。

[0003] 临床常见的检测方法都是快速检测得到结果,这在诊断时非常便利,但如果想通过此类方法溯源标准物质却并非易事。目前市面上还没有针对富集血清中诊断标志物的标准物质而开发的应用方案。

发明内容

[0004] 为克服现有技术的不足,本发明提供一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法,本发明通过针对所述标志物的免疫磁性微球富集血清中的低丰度蛋白和肽类,提供可溯源的标准物质,为计量实验室、参考实验室、体外诊断试剂厂家和临床检验机构研制可溯源的标准物质提供有效的方法。

[0005] 为实现上述技术目的,本发明的技术方案是,一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法,包括以下步骤:步骤一,制备羧基磁性微球;步骤二,将所述羧基磁性微球通过活化偶联上所述标志物对应的特异性抗体形成免疫磁性微球;步骤三,用所述免疫磁性微球富集血清中的标志物蛋白;步骤四,用洗脱液把免疫磁性微球富集的标志物蛋白洗脱下来,定性定量;所述磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法不用于疾病诊断和治疗。

[0006] 优选的,所述步骤一的羧基磁性微球粒径为300nm-500nm。

[0007] 优选的,所述步骤一的羧基磁性微球粒径为300nm。

[0008] 优选的,所述步骤一的羧基磁性微球的制备过程为:首先用$FeCl_3 \cdot 6H_2O$制备Fe_3O_4磁核,然后对Fe_3O_4磁核包被SiO_2,形成$Fe_3O_4@SiO_2$,再加MPS(γ-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷)反应形成$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS,接下来包被GMA(甲基丙烯酸缩水甘油酯)、MBA(N,N'-亚甲基双丙烯酰胺)形成$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS@P(GMA-MBA),最后加入碳酸钠、碳酸氢钠和6-氨基己酸,硼氢化钠形成$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS@P(GMA-MBA)-COOH,即步骤一的羧基磁性微球。

[0009] 优选的,所述以$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS包被GMA、MBA形成$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS@P(GMA-MBA)的步骤中,$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS与GMA、MBA、AIBN的加入比例为每3g $Fe_3O_4@SiO_2$-MPS加入9mL GMA、 9.0g MBA、360mg AIBN。

[0010] 优选的，所述步骤二采用EDC/Sulfo-NHS水相活化的方法将所述羧基磁性微球活化，活化后的羧基磁性微球与标志物对应的特异性抗体溶液反应，得到免疫磁性微球。

[0011] 优选的，所述步骤二的具体方法是:将所述羧基磁性微球用MEST buffer洗涤后，加入EDC和Sulfo-NHS活化，再加入对应的抗体溶液进行反应，再以BSA溶液封闭，最后洗涤保存，形成所述免疫磁性微球。

[0012] 优选的，所述步骤三的富集过程即免疫磁性微球与目标血清样本混合孵育。

[0013] 优选的，所述步骤四的洗脱液选自pH 2.5-3.1、0.1M的甘氨酸-盐酸溶液，或者pH 2.5-3.1、0.1M的柠檬酸溶液，或者2.5％的醋酸溶液，或者pH 10.0-11.0、0.1M的氢氧化铵溶液。

[0014] 优选的，所述心肌损伤血清标志物为cTnI、NT-ProBNP、CRP，所述肾损伤血清标志物为Cys C、C-Peptide、NGAL。

[0015] 本方法的基本步骤为先制备一种磁响应时间短、悬浮时间长、粒径均一、配基含量足够高的羧基磁性微球，然后通过活化偶联上所述心肌损伤和肾损伤血清标志物对应的特异性抗体形成独特的免疫磁性微球，再用免疫磁性微球去富集血清中的标志物蛋白，最后用洗脱液把标志物蛋白洗脱下来，定性定量。

[0016] 本发明方法所用工具为粒径300nm-500nm(尤其是300nm)的羧基磁性微球，其制备方法如下，首先用$FeCl_3 \cdot 6H_2O$制备Fe_3O_4磁核，然后对磁核包被SiO_2，形成$Fe_3O_4@SiO_2$，再加MPS反应形成$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS，接下来包被GMA、MBA形成$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS@P(GMA-MBA)，最后加入碳酸钠、碳酸氢钠和6-氨基己酸，硼氢化钠形成$Fe_3O_4@SiO_2$-MPS@P(GMA-MBA)-COOH，即本发明所使用的羧基磁性微球。反应结束后拆除反应装置，用磁性分离器分离磁性微球，接着用纯化水反复洗涤5次以上，最终将磁性微球保存在纯化水内，并测试质量浓度。磁性微球浓度标定完后，取磁性微球拍电镜，观察聚合物包覆效果，粒径均一程度，并测试有无剩磁。测试磁吸时间，悬浮时间。全部质检达到标准后，投入下一步使用。

[0017] 羧基磁性微球的活化采用EDC/Sulfo-NHS水相活化的方法。EDC是可溶于水的碳二亚胺。在酰胺合成中用作羧基的活化试剂，也用于活化磷酸酯基团、蛋白质与核酸的交联和免疫偶连物的制取。使用时的pH范围为4.0-6.0，常和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)联用，以提高偶联效率。NHS是改进酰胺化以及肽偶联反应中的添加剂，用于在酰胺键形成时活化羰基基团。Sulfo-NHS是NHS的衍生物，Sulfo-NHS的水溶性比NHS要好，另外sulfo-NHS具有负电荷不易造成连接底物(例如蛋白质)聚合。此反应既可以选择NHS又可以选择Sulfo-NHS，Sulfo-NHS效果更优。制备方法为把10mg/ml的羧基磁性微球用MEST buffer(pH5.0-6.0)洗涤后，加一半体积的20mg/mL EDC及20mg/mL Sulfo-NHS到MEST，活化15min，后加0.1-1.0 mg/ml的抗体溶液反应两小时，再用1％的BSA溶液封闭两小时，最后洗涤保存，形成免疫磁性微球。

[0018] 所用抗体为兔抗人多克隆抗体，SDS-PAGE检测纯度不低于90％，ELISA检测显色下限低于5ng/ml，与无关抗原无非特异性结合。所用血清标志物的标准对照为重组蛋白，纯度合格，在ELISA实验中作为包板抗原的浓度要在1-3μg/ml就能包被成功，特异性识别对应抗体，与无关抗体无非特异性结合。

[0019] 免疫磁性微球制备完成后开始富集血清中的标志物蛋白，富集过程即免疫磁性微

球与血清样本混合孵育。孵育完成后应立即进行洗脱,并对洗脱所得液进行中和。所用洗脱液为0.1M glycine-HCl,pH 2.5-3.1(甘氨酸-盐酸),可替代洗脱液有0.1M citric acid,pH 2.5to 3.1(柠檬酸),2.5%acetic acid(醋酸),0.1M ammonium hydroxide,pH10.0-11.0(氢氧化铵)。如果用低pH的洗脱缓冲液,则需要偏碱性的1M phosphate(磷酸盐)中和缓冲液或者1M Tris,pH7.5-9.0的中和缓冲液来中和,按1:10比例加入。

[0020] 富集到的蛋白溶液用酶联免疫分析法进行初步鉴定。标准抗原检测试剂盒,双抗夹心法检测,带标准物质。包被抗体包板,封闭液封闭,标品和样品孵育,HRP标记的检测抗体检测,TMB显色,终止后读数。与标准曲线对照,计算回收蛋白的浓度。此步也可以用化学发光免疫试剂盒,想要进一步定性,可用色谱法进行鉴定。

[0021] 本发明选择磁性微球粒径为300nm-500nm,市面常见免疫磁性微球普遍是大于等于1μm的粒径,粒径较大的磁性微球普遍存在的问题是悬浮时间短,对后续反应不利。也有专利文献中采用小于150纳米的微球,但粒径过小则磁性微球的磁性得不到保证,很容易导致磁响应时间过长,或者磁吸时磁性微球被液体带走,影响实验效率和实验结果。300nm磁性微球经测试有非常好的悬浮性能,悬浮时间长达三小时以上,且磁响应时间较短,完全磁吸时间低于10s。

[0022] 磁核包被SiO_2时温度的控制很重要,反应过程中,要隔每隔30-40分钟给超声仪换水防止反应温度高于50摄氏度,反应温度过高容易导致磁核氧化,磁核氧化会降低磁性微球的磁性,磁性较弱的磁性微球会在磁吸过程中慢慢流失,达不到使用标准。

[0023] 本发明的300nm羧基磁性微球在制备过程中包被了两层聚合物,一方面能够形成网状结构,减少磁核泄露,另一方面也使磁性微球的耐酸性更强,使磁性微球能够在酸性条件下使用,而不对磁性微球本身结构造成破坏。

[0024] 磁性微球制备过程中加入的聚合物种类多,很容易形成很难清洗的副产物,直接影响磁性微球的性能,故在包被高分子层时要严格控制好GMA、MBA、AIBN的加入量、浓度和比例,如3g Fe_3O_4@SiO_2-MPS磁性微球反应体系为9mL GMA、9.0g MBA、360mg AIBN,磁性微球制备量增多时,按此比例扩增。且这一步的温度也非常关键,需要严格控温。除氧和搅拌时间结束后,打开油浴锅开关及冷却循环水开关,升温至75℃,另需关注仪器自带显示温度与实际温度的一致性,必要时需用温度计自行检测验证。保证整个体系受热均匀,才能保证制备出粒径均一,没有副产物的磁性微球。

[0025] 在磁性微球活化中,NHS是改进酰胺化以及肽偶联反应中的添加剂,用于在酰胺键形成时活化羰基基团。Sulfo-NHS是NHS的磺化产物,Sulfo-NHS的水溶性比NHS更好,另外Sulfo-NHS具有负电荷不易造成连接底物(例如蛋白质)聚合。且在活化方式上不仅NHS可以选择,还有有机活化和水相活化两种。有机活化选择DMF(N,N-二甲基甲酰胺)作为溶剂,在使用前DMF(N,N-二甲基甲酰胺)要严格除水,在活化过程中也要操作尽量快速防止水分进入,使中间产物水解。通过反复试验,对比活化方式、活化条件,本发明找到了一种最佳的活化偶联方式,即用EDC/Sulfo-NHS水相活化的方法。首先在实验过程中避免了使用DMF(N,N-二甲基甲酰胺),DMAC(二甲基乙酰胺)等有刺激性气味和微毒的有机溶剂,对操作人员的健康和环境更友好;其次水相活化能大大提高羧基磁性微球包被蛋白的量,使免疫磁性微球载量得到显著提升;再者一步水相活化步骤简便易操作,避免了中间产物NHS磁性微球的制备,直接制备形成免疫磁性微球;并且在活化过程中不会出现磁性微球黏连聚团等现象,很

好地保持了磁性微球的物理和化学性能。

[0026] 抗原抗体间结合为非共价键结合:静电引力、范德华引力、氢键结合力、疏水作用力。抗原抗体洗脱液的原理就是利用强酸环境下,破坏结合力等因素,使得抗原抗体复合物变成抗原抗体单体。在免疫磁性微球捕获标志物蛋白后,形成磁性微球-抗体-抗原复合体,此时需要仅把抗原洗脱下来,由于抗体与磁性微球形成酰胺键的稳定结合,故使用强酸性的0.1M glycine-HCl,pH2.5-3.1(甘氨酸-盐酸),可以不改变蛋白结构,又把抗原洗脱下来。注意洗脱液中不可含有SDS(十二烷基硫酸钠),因为SDS是离子型表面活性剂会破坏蛋白的结构。另洗脱产物应立即用中和缓冲液进行中和,防止强酸对蛋白造成不可逆影响。

[0027] 本发明以羧基300nm磁性微球为工具,活化偶联相应的兔抗人多克隆抗体,对血清中心肌损伤和肾损伤标志物进行富集,得到可溯源的天然蛋白,解决了计量实验室、参考实验室体外诊断标准物质溯源困难的问题。使用模拟蛋白测试时,免疫磁性微球可捕获浓度在50ng-4000ng/ml范围的血清标志物。模拟蛋白分子量为60KD;CRP分子量为115-140KD,在正常血液中的浓度为0.8-8μg/mL;Cys C分子量为13.3KD,在正常血液中浓度为0.51-1.09μg/mL;C-Peptide分子量为0.9KD,在正常血液中浓度为1.0±0.23ng/mL;NGAL分子量为25kD,在正常血液中浓度为<50ng/ml。经验证,本发明可以有效富集血清中心肌损伤标志物CRP,以及血清中肾损伤标志物Cys C,C-Peptide,NGAL。

具体实施方式

[0028] 下面将结合实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法,包括以下步骤:步骤一,制备羧基磁性微球;步骤二,将所述羧基磁性微球通过活化偶联上标志物对应的特异性抗体形成免疫磁性微球;步骤三,用所述免疫磁性微球去富集血清中的标志物蛋白;步骤四,用洗脱液把免疫磁性微球富集的标志物蛋白洗脱下来,定性定量;所述磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法不用于疾病诊断和治疗。

[0030] 实施例1,300nm羧基磁性微球的制备

[0031] (1)Fe_3O_4磁核的制备

[0032] 称取50g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$溶解在1000mL乙二醇内;

[0033] 在上述溶液内按顺序分别加入1g柠檬酸钠和55g乙酸钠,继续搅拌至溶解,得到前驱体溶液;

[0034] 将上述前驱体溶液分装入250mL水热反应釜内;

[0035] 将安装好的反应釜放入烘箱,设定反应温度为200℃,反应时间20h;

[0036] 反应结束后收集磁性微球并用乙醇和纯化水反复洗涤十次以上;

[0037] 将洗涤完毕的Fe_3O_4保存在纯化水内,并测试质量浓度。

[0038] (2)$Fe_3O_4@SiO_2$的制备

[0039] 在5L圆底烧瓶内分别装入2500mL乙醇、700mL纯化水、30mL氨水和6g上述Fe_3O_4;

[0040] 在超声清洗仪上安装机械搅拌装置,打开开关,设置超声时间6.5h,边搅拌边超声

处理反映溶液，搅拌速度200rpm；

[0041] 取9mL TEOS(正硅酸四乙酯)溶液稀释在100mL乙醇内，然后加入到100mL恒压滴液漏斗内；

[0042] 超声30min后在圆底烧瓶上安装恒压漏斗，将TEOS/乙醇混合溶液滴加入反应体系中，继续维持超声搅拌反应6h；

[0043] 反应过程中，间隔时间给超声仪换水防止温度过高；

[0044] 反应结束后拆除装置，用磁性分离器收集Fe_3O_4@SiO_2磁性微球，接着用乙醇和纯化水洗涤10次以上，最后将Fe_3O_4@SiO_2磁性微球保存在纯化水内，并测试质量浓度。

[0045] (3)Fe_3O_4@SiO_2-MPS的制备

[0046] 在2L的圆底烧瓶内分别加入1000mL乙醇、500mL纯化水、10mL氨水和Fe_3O_4@SiO_2磁性微球；

[0047] 将反应溶液超声30min；

[0048] 安装机械搅拌装置，设置搅拌速度为200rpm；

[0049] 取9mL MPS稀释在100mL乙醇内，并加入到100mL恒压滴液漏斗中；

[0050] 在圆底烧瓶上安装恒压漏斗，将MPS/乙醇混合溶液滴加入反应体系中，搅拌反应20h；

[0051] 反应结束后拆除反应装置，用磁性分离器收集Fe_3O_4@SiO_2-MPS磁性微球，用乙醇洗涤5次，最后将Fe_3O_4@SiO_2-MPS磁性微球保存在乙醇内，并测试质量浓度。

[0052] (4)Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)的制备

[0053] 将3g Fe_3O_4@SiO_2-MPS磁性微球在离心管内用乙醇分散并洗涤3次，最终分散在50mL乙醇内成为磁性微球分散液；

[0054] 在5L的圆底烧瓶内分别加入3L纯化水和上述磁性微球分散液，300mg十二烷基苯磺酸钠，然后超声10min，接着安装油浴反应装置，设置搅拌速度为300rpm并搅拌1h；

[0055] 在反应体系内加入9mL GMA、9.0g MBA、360mg AIBN(偶氮二异丁腈)，继续搅拌1h，同时向烧瓶内通氮气除氧；

[0056] 除氧和搅拌时间结束后，打开油浴锅开关及冷却循环水开关，升温至75℃，继续通氮气保护和搅拌，反应16h；

[0057] 反应结束后拆除反应装置，用磁性分离器分离磁性微球，接着用乙醇和纯化水反复洗涤10次以上，最终将Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)磁性微球保存在纯化水内，并测试质量浓度。

[0058] (5)Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)-COOH的制备

[0059] 取烧杯并分别加入20g碳酸钠、3g碳酸氢钠和40g 6-氨基己酸，并加入1200mL纯化水，磁力搅拌至溶解，然后加入1.9g硼氢化钠继续溶解，最后将溶液pH控制在10.6左右，并将溶液转移至2L圆底烧瓶内；

[0060] 将Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)磁性微球加入上述反应体系内，超声20min；

[0061] 安装油浴反应和机械搅拌装置，设定搅拌速度200rpm，并向烧瓶内通氮气，除氧30min；

[0062] 待除氧结束后，打开油浴锅开关及冷却循环水开关，升温至70℃，继续通氮气保护和搅拌，反应16h；

[0063] 反应结束后拆除反应装置，用磁性分离器分离磁性微球，接着用纯化水反复洗涤5次以上，最终将Fe_3O_4@SiO_2-MPS@P(GMA-MBA)-COOH磁性微球保存在纯化水内，并测试质量浓度。

[0064] 实施例2，300nm羧基磁性微球活化偶联Anti-CRP兔抗人antibody，形成免疫磁性微球

[0065] 1、试剂：

[0066] 洗涤缓冲液：MEST buffer，TBST buffer(0.05M TBS+0.15M NaCl+0.05％Tween，pH 7.5)

[0067] 活化缓冲液：MEST buffer(0.1M MES+0.05％Tween，pH 5.0)

[0068] 偶联缓冲液：MEST buffer(0.1M MES+0.05％Tween，pH 5.0)

[0069] 封闭液：含10mg/mL BSA的TBST buffer，即含1％BSA的TBST buffer

[0070] 保存液：PBS缓冲液

[0071] 2、步骤：

[0072] (1)取羧基300nm磁性微球15mg于2mL EP管中，用MEST buffer(1.5mL)洗涤3次；

[0073] (2)配置20mg/mL EDC in MEST及20mg/mL Sulfo-NHS in MEST各1mL(现配现用)；

[0074] (3)向磁性微球离心管中分别加入750μL EDC及Sulfo-NHS，混匀放置于垂直混合仪反应活化15min；

[0075] (4)配置0.1mg/mLAnti-CRP兔抗人antibody溶液：取160μL抗体原液(1mg/ml)加入到1.44mL MEST buffer中，混匀备用；

[0076] (5)磁性微球活化结束后，磁吸去上清，加入1.5mL配置的抗体溶液，混匀，放置于垂直混合仪上混合反应2h；

[0077] (6)配置10mg/mL BSA封闭液：称取16mg BSA加入至1.6mL TBST buffer中，混匀备用；

[0078] (7)磁性微球接枝SA反应结束，磁吸去上清，加入1.5mL BSA封闭液，混匀，放置于垂直混合仪上混合反应封闭1h；

[0079] (8)封闭反应结束后，磁吸去上清，用TBST buffer反复洗涤磁性微球(10次或更多)；

[0080] (9)用SA storage buffer反复洗涤，1.5mL-3次；

[0081] (10)磁吸去上清，精确加入1.5mL SA storage buffer定容，维持浓度10mg/mL，得到所述免疫磁性微球。

[0082] 实施例3，CRP与Cys C抗原抗体ELISA检测

[0083] 1、试剂

[0084] 包被缓冲液 0.05M pH 9.6的碳酸盐缓冲液

[0085] 洗涤缓冲液 (pH7.4PBST)：0.15M，含0.1％Tween-20

[0086] 封闭液 5％BSA牛血清白蛋白(BSA)

[0087] 样品稀释液 PBS(pH7.4PBST)：0.15M，不加吐温

[0088] 5％BSA溶液：称取0.5g BSA，用10mL 1×PBST溶解，混合均匀，保存于4℃，保质期24h；

[0089] 羊抗兔HRP工作液：用5％BSA稀释10000倍，保存于4℃；

[0090]　TMB反应终止液：2M浓H_2SO_4：量取54.5mL 98％硫酸溶液，逐滴加入到350mL超纯水中，边滴加边搅拌，待冷却至室温后，继续加入超纯水定容至500mL；

[0091]　2、步骤

[0092]　(1)包被：(共4条)用0.05M pH9.6包被缓冲液将两种抗原均稀释成特定浓度；每个聚苯乙烯板的反应孔中加100μl，4℃过夜。各包两列。CRP原始浓度1mg/ml，吸取2μl稀释到2ml即1μg/ml；Cys C原始浓度1mg/ml，吸取2μl稀释到2ml即1μg/ml；

[0093]　(2)次日，弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液洗3次，每孔加200μl，每次3分钟；

[0094]　(3)每孔加200μl，5％BSA封闭液，37℃封闭一小时，甩去孔内液体，洗涤三次；

[0095]　(4)加样：稀释多抗到特定浓度，每孔加50μl，对应加多抗，再交叉加多抗，观察非特异性反应。孵育两小时；

[0096]　标准品稀释：

[0097]

标号	浓度	配制方法	稀释液体积
原液	Anti-CRP 1mg/ml　A Anti-Cys C 1mg/ml　B	先分装成1mg/ml每管	
初级稀释（A,B）	1μg /ml	各吸1μl	各加1ml
1（A,B）	200ng/ml	从上面吸100μl	加400μl
2（A,B）	100ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
3（A,B）	50ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
4（A,B）	25ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
5（A,B）	12.5ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
6（A,B）	6.25ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
7（A,B）	3.125ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
8	0		加200μl

[0098]　(5)孵育时间结束后，甩去孔内液体，用200μl洗涤缓冲液洗涤三次，每次三分钟；

[0099]　(6)每孔加入100μL1∶10000HRP-羊抗兔工作液，37℃，混合孵育2小时；

[0100]　(7)孵育时间结束后，甩去孔内液体，用200μl洗涤缓冲液洗涤五次，每次三分钟；

[0101]　(8)加入100μL TMB显色液，避光孵育15min，后加入50μL终止液；

[0102]　(9)移至酶标仪OD450处读值。酶标仪操作步骤：新建---操作---光度测量---滤光片---450nm---运行。

[0103]　板条设置：

[0104]

板条1	板条2	板条3	板条4
CRP 包板，Anti-CRP孵育	CRP包板，Anti-Cys C孵育	Cys C包板，Anti-Cys C孵育	Cys C包板，Anti-CRP孵育

[0105] 实验结果如下：

[0106]

多抗浓度 ng/ml	CRP 抗原抗体 OD 值	Cys C 抗原抗体 OD 值	CRP 非特异性 OD 值	Cys C 非特异性 OD 值
200	1.4207	2.0896	0.0622	0.0715
100	0.9659	0.9259	0.0668	0.0693
50	0.6569	0.4308	0.0630	0.0682
25	0.4207	0.2145	0.0715	0.0697
12.5	0.2088	0.1379	0.0489	0.0675
6.25	0.1147	0.0983	0.0504	0.0681
3.125	0.0893	0.0823	0.0558	0.0758
0	0.0629	0.0671	0.0555	0.0957

[0107] 结果分析:抗原抗体能够特异性识别,且灵敏度较好。

[0108] 实施例4,免疫磁性微球捕获CRP抗原,并洗脱

[0109] 1、试剂

[0110] Binding/Washing Buffer:PBST缓冲液(0.1%Tween 20)

[0111] Elution Buffer:0.1M glycine-HCl,pH 2.0(0.1%Tween 20)

[0112] Neutralization Buffer:1M Tris-HCl;pH8.6的中和缓冲液

[0113] 2、步骤

[0114] 磁性微球准备

[0115] (1)准备2个1.5毫升EP管,每管添加20μl(0.2毫克)免疫磁性微球,分别标记好;

[0116] 样品准备

[0117] (2)用Binding/Wash Buffer(PBST缓冲液)稀释CRP抗原样品。工作浓度4μg/ml;

[0118] (3)将离心管放置在磁力架上,收集磁性微球并丢弃上清液;

[0119] (4)20μL(0.2mg)免疫磁性微球,500μL样本溶液,在垂直混匀仪上,室温孵育1-2小时,每隔10-15分钟,轻轻涡旋磁性微球,以确保磁性微球悬浮;

[0120] (5)反应结束后,将EP管置于离心机中,3500rpm离心3min。用磁力架分离磁性微球和未结合的样品(收集未结合样品,放2个不同的EP管标记);

[0121] 洗涤

[0122] (6)加500μl Binding/Washing Buffer,轻轻地清洗。将离心管放置在磁力架上,收集磁性微球然后丢弃上清液;共洗涤三次;

[0123] (7)加500μl超纯水到EP管中,轻轻混合,将离心管放置在磁力架上,收集磁性微球然后丢弃上清液;

[0124] 洗脱

[0125] (8)磁性微球洗涤后每管加100μl洗脱缓冲液(0.1M glycine pH 2.0),在垂直混匀仪上,室温孵育5分钟,磁性分离磁性微球,并保存含有目标抗原的上清液;此步共进行三

次；

[0126] 中和

[0127] (10)每100μl抗原上清液，加10μl的1M Tris-HCl，pH8.6的中和缓冲液；2管保存于4℃冰箱，分别标记为样本1和样本2。实施例5，对富集到的CRP抗原用化学发光免疫分析试剂盒进行鉴定。

[0128] 1、试剂

[0129] Wash Buffer：TBST缓冲液(20mM Tris30mM NaCl0.1％Tween20)

[0130] 酶标抗体稀释液：含5％BSA的PBST，ALP标记抗体1∶2000稀释，取1ul稀释到2ml

[0131] 生物素化抗体稀释液：1*PBS含0.1％Tween 20

[0132] 抗原稀释液：1*PBS含0.1％Tween 20

[0133] 游离生物素：2μg/ml，用1*PBS含0.1％Tween 20稀释

[0134] 底物液：深圳美凯特intlus-A04

[0135] SA磁性微球：Dynal 1um(T1)(ThermoFisher)，生物素化抗体偶联后，再用游离生物封闭，磁性微球封闭后用一步法；

[0136] 化学发光仪：郑州安图抗原配制方法：

[0137]

标号	浓度	配制方法	稀释液体积
原液	1mg/ml		
1	1μg /ml	从原液吸1μl	加1ml
2	500ng/ml	从上面吸500μl	加500μl

[0138]

3	250ng/ml	从上面吸500μl	加500μl
4	125ng/ml	从上面吸500μl	加500μl
5	62.5ng/ml	从上面吸500μl	加500μl
6	31.25ng/ml	从上面吸500μl	加500μl
7	15.625ng/ml	从上面吸500μl	加500μl
8	7.8125 ng/ml	从上面吸500μl	加500μl
9	3.90625 ng/ml	从上面吸500μl	加500μl
10	0 ng/ml		加500μl

[0139] 2、步骤

[0140] (1)配10μg/ml的生物素化抗体1ml，取10μl生物素化CRP抗体稀释到1ml；

[0141] (2)取SA磁性微球50μl(10mg/ml)磁吸去上清，加10μg/ml的生物素化抗体1000μl室温孵育1h；

[0142] (3)洗涤3次后，加200μl，2μg/ml的游离生物素，室温孵育1h。洗涤3次后，加1000μ lPBST稀释到0.5mg/ml；

[0143] (4)将实施例4收集到的两个样本分别稀释50倍和100倍，每个倍数每个样本分别做副孔，共8孔；

[0144] (5)加50μL磁性微球至96孔板中，再每孔加入50μL待测物标准品(3-10)，和待测样本，再每孔加入100μL酶标抗体，充分震荡重悬磁性微球，37℃恒温箱中孵育15min后，磁性分离，用移液器吸去上清液，从磁性分离器上取下96孔板；

[0145] (6)每孔加入200μL的Washing buffer，充分震荡重悬磁性微球，磁性分离，用移液器吸去上清液，从磁性分离器上取下96孔板，该步骤再重复2次，共洗涤3次；

[0146] (7)每孔加入150μL的底物液，充分震荡重悬磁性微球，避光孵育5min；

[0147] (8)将96孔板放入化学发光仪读数，点开安图2.0-登录-快速测量-允许震荡(低强度5S，所有孔)---开始测量---Ctrl-C---Ctrl-V到U盘。

[0148] 结果分析：通过与标准曲线对照计算，样本1平均回收率为88.03％，样本2平均的回收率为86.41％，均大于85％，符合中华人民共和国医药行业标准要求回收率85％-115％。注：样本1与样本2均为实施例4中的洗脱样品。

[0149] 本发明通过针对所述标志物的免疫磁性微球，富集血清中的低丰度蛋白和肽类，提供可溯源的标准物质，为计量实验室、参考实验室、体外诊断试剂厂家和临床检验机构研制可溯源的标准物质提供有效的方法。

[0150] 对所公开的实施例的上述说明，使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的，本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下，在其它实施例中实现。因此，本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例，而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

patsnap

专利名称(译)	一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法
公开(公告)号	[CN111381022A](CN111381022A)
公开(公告)日	2020-07-07
申请号	CN201811653706.2
申请日	2018-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	苏州海狸生物医学工程有限公司
申请(专利权)人(译)	苏州海狸生物医学工程有限公司
当前申请(专利权)人(译)	苏州海狸生物医学工程有限公司
[标]发明人	任辉
发明人	任辉 万东菊
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543
代理人(译)	何蔚
外部链接	Espacenet SIPO

摘要(译)

本发明提供一种磁性微球对心肌损伤及肾损伤血清标志物的富集方法，包括以下步骤：步骤一，制备羧基磁性微球；步骤二，通过活化偶联上标志物对应的特异性抗体形成免疫磁性微球；步骤三，用免疫磁性微球去富集血清中的标志物蛋白；步骤四，用洗脱液把蛋白洗脱下来，定性定量。本发明能够为计量实验室、参考实验室、体外诊断试剂厂家和临床检验机构研制可溯源的标准物质提供有效的方法。

标号	浓度	配制方法	稀释液体积
原液	Anti-CRP 1mg/ml A Anti-Cys C 1mg/ml B	先分装成1mg/ml每管	
初级稀释（A,B）	1μg /ml	各吸1μl	各加1ml
1（A,B）	200ng/ml	从上面吸100μl	加400μl
2（A,B）	100ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
3（A,B）	50ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
4（A,B）	25ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
5（A,B）	12.5ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
6（A,B）	6.25ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
7（A,B）	3.125ng/ml	从上面吸200μl	加200μl
8	0		加200μl