



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593938 A
(43)申请公布日 2018. 09. 28

(21)申请号 201810552662.8

(22)申请日 2018.05.31

(71)申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街2699号

(72)发明人 徐力 郭轶 刘鸿翔 徐婉琦

(74)专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任公司 22201

代理人 刘世纯 王恩远

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

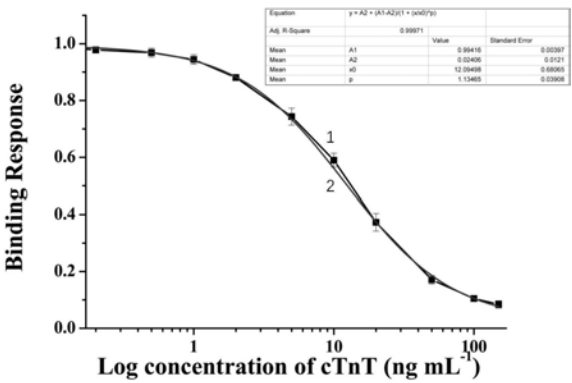
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

表面偶联心肌肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球及其在检测血清中心肌肌钙蛋白中的应用

(57)摘要

一种表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球及其在检测血清中心肌特异性肌钙蛋白中的应用,属于生物技术领域。本发明基于化学偶联法将心肌特异性肌钙蛋白抗原(cTnT抗原)偶联到磁性高分子微球表面,从而制备表面具有cTnT抗原的功能化磁性高分子微球,该微球可用于血清中心肌特异性肌钙蛋白浓度的检测。本发明具快速获取样品、多参数分析、高分辨率等优点,本检测方法操作简便、可靠性强、获取数据量大,而磁性高分子微球的应用,更是简化了操作程序、减少非特异性吸附,本检测手段应用竞争模式更是节省了试剂的损耗。



1. 一种表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球,其特征在于:是取磁性高分子微球悬液1mL,其中微球的数量为 $1.074 \times 10^6 \sim 1.074 \times 10^7$,悬液为PBS溶液,于洗涤缓冲液中磁吸洗涤,弃去上清杂质;再向其中加入20~500 μ L的活化缓冲液,振荡20~40s,充分混匀后静置3~10min,磁吸弃上清,重复活化步骤2~3次;再加入20~500 μ L的偶联缓冲液、5~50 μ L的EDC水溶液、5~50 μ L的NHS水溶液,于常温空气振荡培养箱孵育10~50min,磁吸弃去上清;再加入20~500 μ L的偶联缓冲液和300~600ng的cTnT抗原充分混匀,于空气振荡培养箱孵育1~3h,期间每隔10~20min取出EP管于漩涡混匀器混匀,磁吸弃上清,PBS洗涤2~3次;然后加入300~600 μ L的封闭液,于空气振荡培养箱孵育1~3h,期间每隔10~20min取出EP管于漩涡混匀器混匀;最后磁吸去上清,加入1mL的保存缓冲液于4℃冰箱保存,得到偶联cTnT抗原的功能化磁性高分子微球。

2. 如权利要求1所述的一种表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球,其特征在于:磁性高分子微球为核壳式单分散聚苯乙烯磁性微球。

3. 如权利要求1所述的一种表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球,其特征在于:EDC溶液为50mM的EDC水溶液,NHS溶液为50mM的NHS水溶液;活化缓冲液为50mM的吗啉乙磺酸水溶液,pH=6.0;偶联缓冲液为50mM的吗啉乙磺酸水溶液,pH=5.0;洗涤缓冲液是在PBS溶液中加入0.1% (v/v) Tween 20得到;封闭缓冲液是在PBS溶液中加入0.1% (v/v) Tween 20和1% (w/v) BSA得到;保存缓冲液是在PBS溶液中加入0.01% (v/v) Tween 20、0.1% (w/v) BSA和0.05% (w/v) Na_3N 得到。

4. 权利要求1所述的表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球在检测血清中心肌特异性肌钙蛋白中的应用。

5. 如权利要求4所述的表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球在检测血清中心肌特异性肌钙蛋白中的应用,其特征在于:是依次于微型离心管中加入表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的功能化磁性高分子微球悬液8 μ L、100 μ L待测血清或者cTnT抗原标准品以及100 μ L一抗溶液,其中cTnT标准品的浓度为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0和100.0ng/mL,于30~50℃振荡反应1.5~3.5h,期间每30min取出来于漩涡混匀器中混匀;之后,用PBS磁吸洗涤1~2次,加入100 μ L的荧光二抗溶液,于空气振荡器37℃孵育0.5~1.5h,600rpm;所有反应过程避光,保持荧光发光效率;取出磁吸离心,加入500 μ L的PBS溶液,上机检测;检测时,488nm激光激发微球表面的荧光二抗,在流式细胞仪的FL1通道检测微球表面荧光信号,收集门内细胞数量为5000~6000个,每个样品设置3个平行对照,从而获得标准品组以及待测血清样品组中微球表面荧光强度;然后以功能化微球-cTnT抗原复合物饱和偶联一抗溶液的检出荧光信号强度为阳性对照 $S_{\max}$,空白对照组的检出信号强度为阴性对照组 $S_{\min}$,依照公式 $R = [(S_n - S_{\min}) / (S_{\max} - S_{\min})]$, S_n 为cTnT标准品或待测血清检出信号的强度,以R和标准品中cTnT抗原浓度制作标准曲线,进一步计算出血清样品中待检测cTnT抗原的浓度;其中,一抗为兔抗cTnT抗原的抗体,一抗溶液为一抗的磷酸盐缓冲液溶液;荧光二抗为异硫氰酸标记的山羊抗兔二抗,二抗溶液为二抗的磷酸盐缓冲液溶液。

表面偶联心肌肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球及其在检测血清中心肌肌钙蛋白中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球及其在检测血清中心肌特异性肌钙蛋白中的应用。

背景技术

[0002] 急性心肌梗死(AMI)因持久而严重的心肌缺血所致的部分心肌急性坏死,是一种较为常见的临床疾病,其主要特征是发病急,病情凶险,而且危害极大,及时的诊断并采取有效治疗是降低该种疾病病死率、致残率的主要措施。AMI的诊断标准有三个:缺血性胸痛临床史、心电图的动态演变、AMI的血清标志物的动态变化,其中血清学的动态变化是该疾病的诊断意义重大。目前对于急性心肌梗死的诊断大多采用的是心肌三项血清标志物(cTnT、Mb、CK-MB)联合检测诊断法,具有较高的应用价值,其中cTnT称为心肌特异性肌钙蛋白,美国及欧洲心脏病学会已经将cTnT的指标变化作为诊断AMI的首要条件。

[0003] 磁性高分子微球是一种新型功能材料,其大的比表面积、磁导向性以及良好的生化活性等诸多优点,在生物医学领域方面具有巨大的应用前景。磁性高分子微球具有强的磁响应性,如果在微球表面修饰抗原、抗体、寡聚核苷酸等生物探针,可以将靶向结合物快速与基质溶液分离,极大的缩短了样品的分析时间,而且还能提高分离效率,大大的降低了非特异性吸附。利用磁性高分子微球强分离能力与一些生化检测手段进行结合,可以大幅度提高检测手段的灵敏度。基于磁性高分子微球表面修饰不同的功能基团或者结合单克隆抗体,从而与抗原等迅速分离,主要应用有酶固定、细胞快速分离、疾病标志物诊断等方面都表现出广阔的应用前景。

[0004] 流式细胞术是在细胞分子水平上通过单克隆抗体对单个细胞或者其他生物颗粒进行多参数、快速的定量分析。它可以高速分析上万个细胞或者微球,并能从其中测得多个参数,具有速度快、精准度高、准确性好的优点,是当今主流的定量分析技术之一。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球及其在检测血清中心肌特异性肌钙蛋白中的应用。

[0006] 本发明基于化学偶联法将心肌特异性肌钙蛋白抗原(cTnT抗原)偶联到磁性高分子微球表面,从而制备表面具有cTnT抗原的功能化磁性高分子微球。试剂如下:兔抗cTnT抗原的抗体,也即一抗,异硫氰酸(FITC)标记的山羊抗兔二抗(goat anti-rabbit IgG/FITC),也即荧光二抗。

[0007] 其检测的程序:1)首先利用化学偶联法将心肌肌钙蛋白抗原偶联到流式载体磁性高分子微球表面,制备得到表面有cTnT抗原的功能化磁性高分子微球;2)在微型离心管(EP管)中加入一定数量的功能化磁性高分子微球、待检测血清或者标准品、一抗磷酸盐缓冲液溶液,并混合均匀,此时,待检测血清或者标准品中游离的cTnT抗原和功能化磁性高分

子微球表面的cTnT抗原,竞争结合一抗的免疫活性结构域,待测血清样品或cTnT标准品中游离的cTnT抗原越多,则结合到磁性高分子微球表面的一抗越少,待测血清样品或cTnT标准品中游离的cTnT抗原越少,则结合到磁性高分子微球表面的一抗越多;3)经过一段时间的孵育后,磁吸洗涤除去未反应的成分,得到磁性高分子微球-cTnT抗原-一抗复合物,再向其中加入荧光二抗磷酸盐缓冲液溶液,经过一段时间的孵育,磁吸洗涤除去未反应的成分,得到磁性高分子微球-cTnT抗原-一抗-荧光二抗复合物;4)向其中加入磷酸盐缓冲液,进入流式细胞仪检测分析,根据标准品浓度及仪器检出信号强度制作标准曲线(以cTnT标准品浓度为横坐标,流式细胞仪检出的荧光信号强度值为纵坐标制作标准曲线),再根据待测血清样品的检出荧光信号强度值和标准曲线计算待测血清样品中cTnT抗原的浓度。

[0008] 本发明采用的流式载体是磁性高分子微球(核壳式单分散聚苯乙烯磁性微球),购自天津贝斯乐色谱中心,粒径为100nm~10 μ m,磁性高分子微球表面本身带有羧基、氨基、羟基或酰肼基中的一个活性基团,采用EDC/NHS偶联剂,将cTnT抗原偶联到磁性高分子微球表面,以增加其偶联效率。

[0009] 磁性高分子微球表面的cTnT抗原与待检测血清或标准品中游离的cTnT抗原同时加入到同一个反应体系,以直接竞争法结合一抗,一抗在此是只针对于 cTnT抗原某一个抗原决定簇的单克隆抗体。

[0010] 磁性高分子微球表面活性基团偶联cTnT抗原的形成表面cTnT抗原饱和的磁性高分子微球的比例是,1.074 $\times 10^6$ ~1.074 $\times 10^7$ /mL个磁性高分子微球和比 300~600ng的cTnT抗原。

[0011] 本发明所述的功能化磁性高分子微球的制备和检测方法包括以下步骤:

[0012] 1、功能化磁性高分子微球的制备:取磁性高分子微球悬液1mL,其中微球的数量为1.074 $\times 10^6$ ~1.074 $\times 10^7$,悬液为PBS溶液(0.01M磷酸盐缓冲液pH=7.4),于洗涤缓冲液中磁吸洗涤,弃去上清杂质;再向其中加入20~500 μ L的活化缓冲液,振荡20~40s,充分混匀后静置3~10min,磁吸弃上清,重复活化步骤2~3次;再加入20~500 μ L的偶联缓冲液、5~50 μ L的EDC水溶液、5~50 μ L的NHS水溶液,于常温空气振荡培养箱孵育(25 $^{\circ}$ C,600rpm)10~50min,磁吸弃去上清;再加入20~500 μ L的偶联缓冲液和300~600ng的cTnT抗原充分混匀,于空气振荡培养箱孵育(37 $^{\circ}$ C,600rpm)1~3h,期间每隔10~20min取出EP管于漩涡混匀器混匀,磁吸弃上清,PBS洗涤2~3次;然后加入300~600 μ L的封闭液,于空气振荡培养箱孵育(37 $^{\circ}$ C,600rpm)1~3h,期间每隔10~20min取出EP管于漩涡混匀器混匀;最后磁吸去上清,加入1mL的保存缓冲液于4 $^{\circ}$ C冰箱保存,得到偶联cTnT抗原的功能化磁性高分子微球;

[0013] 2、标准曲线的制定和待测血清样品中心肌特异性肌钙蛋白的检测:依次于微型离心管(EP管)中加入步骤1所得的功能化磁性高分子微球悬液8 μ L(8600~86000个)、100 μ L待测血清或者cTnT抗原标准品以及100 μ L一抗溶液,其中cTnT标准品的浓度设定为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL,于30~50 $^{\circ}$ C振荡反应1.5~3.5h,期间每30min取出来于漩涡混匀器中混匀。之后,用PBS磁吸洗涤1~2次,加入100 μ L的荧光二抗溶液,于空气振荡器37 $^{\circ}$ C孵育0.5~1.5h,600rpm;所有反应过程避光,保持荧光发光效率;取出磁吸离心,加入500 μ L的PBS溶液,上机检测。检测时,488nm激光激发微球表面异硫氰酸(FITC)标记二抗,在流式细胞仪的FL1通道检测微球表面荧光信号,收集门内细胞数量为5000~6000个,每个样品设置3个平行对照,获得标准品组以及待测血清样品组中微球表面

荧光强度。

[0014] 3、数据分析：以功能化微球-cTnT抗原复合物饱和偶联一抗溶液的检出荧光信号强度为阳性对照 $S_{\max}$ ，空白对照组的检出信号强度为阴性对照组 $S_{\min}$ ，依照公式 $R = [(S_n - S_{\min}) / (S_{\max} - S_{\min})]$ ， S_n 为cTnT标准品或待测血清检出信号的强度，以R和标准品中cTnT抗原浓度制作标准曲线，计算血清样品中待检测cTnT 抗原的浓度。

[0015] 本发明的优点在于：具快速获取样品、多参数分析、高分辨率等优点，本检测方法操作简便、可靠性强、获取数据量大，而磁性高分子微球的应用，更是简化了本实验的操作程序、减少非特异性吸附，本检测手段应用竞争模式更是节省了试剂的损耗。

附图说明

[0016] 图1：为标准品浓度—荧光信号强度曲线；

[0017] 以浓度为横坐标，纵坐标R为功能化高分子微球表面一抗的结合率；图中曲线1代表的是标准曲线，曲线2表示的是基于标准曲线用绘图软件origin8.0制作的拟合曲线，右上角表示的是拟合曲线的公式及其各项参数。

[0018] 图2(a)：为功能化磁性高分子微球扫描电镜图片；

[0019] 左上微球为未功能化的磁性高分子微球，图片中央微球为表面偶联有cTnT 抗原的功能化磁性高分子微球；

[0020] 图2(b)：为磁性高分子微球表面分别偶联cTnT抗原和BSA对一抗的响应示意图；

[0021] 纵坐标为功能化磁性高分子微球表面的荧光强度，图中，只有偶联cTnT抗原的功能化磁性高分子微球能与一抗特异性结合，而表面偶联BSA的功能化微球对一抗不具有特异性结合，control表示的是纯粹的磁性高分子微球，综合图2 说明用本发明方法制备了表面偶联有cTnT抗原的功能化磁性高分子微球。

具体实施方案

[0022] 实施例1：利用磁性高分子微球检测血清中心肌特异性肌钙蛋白的方法

[0023] 1、磁性高分子微球的功能化：取100 μ L (1.074×10^7 个)的磁性高分子微球（核壳式单分散聚苯乙烯磁性微球）于EP管中，加入PBS磁吸洗涤，去掉杂质和磁性效果不好的微球。加入200 μ L的活化缓冲液振荡30s，充分混匀后静置5 min，磁吸2min弃去上清，重复活化步骤三次。再加入160 μ L的偶联缓冲液、20 μ L的EDC、20 μ L的NHS，于常温空气振荡培养箱孵育（25 $^{\circ}$ C，600rpm）30 min，磁吸弃去上清，再加入200 μ L的偶联缓冲液以及500ng的cTnT抗原充分混匀，于空气振荡培养箱孵育（37 $^{\circ}$ C，600rpm）2h，期间每隔20min取出EP 管于漩涡混匀器混匀，磁吸弃上清，PBS洗涤2次，后加入500 μ L的封闭液。于空气振荡培养箱孵育（37 $^{\circ}$ C，600rpm）2h，期间每隔20min取出EP管于漩涡混匀器混匀，最后取出磁吸去上清，加入1mL的保存缓冲液于4 $^{\circ}$ C冰箱保存，获得表面富有cTnT抗原的功能化磁性高分子微球。

[0024] 2、标准曲线的制定和待测血清样品中心肌特异性肌钙蛋白的检测：依次于微型离心管（EP管）中加入步骤1所得的功能化磁性高分子微球悬液8 μ L（86000 个）、100 μ L待测血清或者cTnT抗原标准品以及100 μ L浓度为200ng/mL的一抗溶液，其中cTnT的标准品的浓度设置为0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、150ng/mL，于空气振荡器37 $^{\circ}$ C孵育2.5h，600rpm，期间每30min 取出来于漩涡混匀器中混匀。之后，用PBS磁吸洗涤2次，加入

100 μ L的荧光二抗探针 (goat anti-rabbit IgG/FITC) 溶液,浓度为4 μ g/mL,于空气振荡器 37 $^{\circ}$ C 孵育1.0h,600rpm,所有反应过程避光。取出磁吸离心,加入500 μ L的PBS溶液,进入流式细胞仪检测。检测时,488nm激光激发微球表面荧光素 (FITC) 标记二抗,在流式细胞仪的 FL1通道检测微球表面荧光信号,收集门内细胞数量为5000~6000个,每个样品设置3个平行对照,获得标准品组以及血清样品组中微球表面荧光强度。

[0025] 3、数据分析:以功能化磁性高分子微球饱和偶联一抗为阳性对照组 $S_{\max}$,空白对照组为阴性对照组 $S_{\min}$, S_n 为cTnT标准品或检测样品的检出信号,依照公式 $R = [(S_n - S_{\min}) / (S_{\max} - S_{\min})]$,R表示的是功能化磁性高分子微球-cTnT抗原复合物偶联一抗的结合率,以R和标准品浓度制作标准曲线,并计算血清样品中 cTnT抗原的浓度。

[0026] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

[0027] 附本发明中缓冲溶液如下:

[0028] PBS溶液 (8.0g NaCl,1.2g NaPO_4 ,0.2g KH_2PO_4 ,0.2g KCl,溶于1L高纯水中, pH7.4);

[0029] EDC溶液 (50mM EDC水溶液)、NHS溶液 (50mM NHS水溶液);

[0030] 活化缓冲液 (50mM吗啉乙磺酸水溶液, pH6.0);

[0031] 偶联缓冲液 (50mM吗啉乙磺酸水溶液, pH5.0);

[0032] 洗涤缓冲液:在PBS溶液中加入0.1% (v/v) Tween 20;

[0033] 封闭缓冲液:在PBS溶液中加入0.1% (v/v) Tween 20和1% (w/v) BSA (牛血清白蛋白);

[0034] 保存缓冲液:在PBS溶液中加入0.01% (v/v) Tween 20、0.1% (w/v) BSA 和0.05% (w/v) Na_3N 。

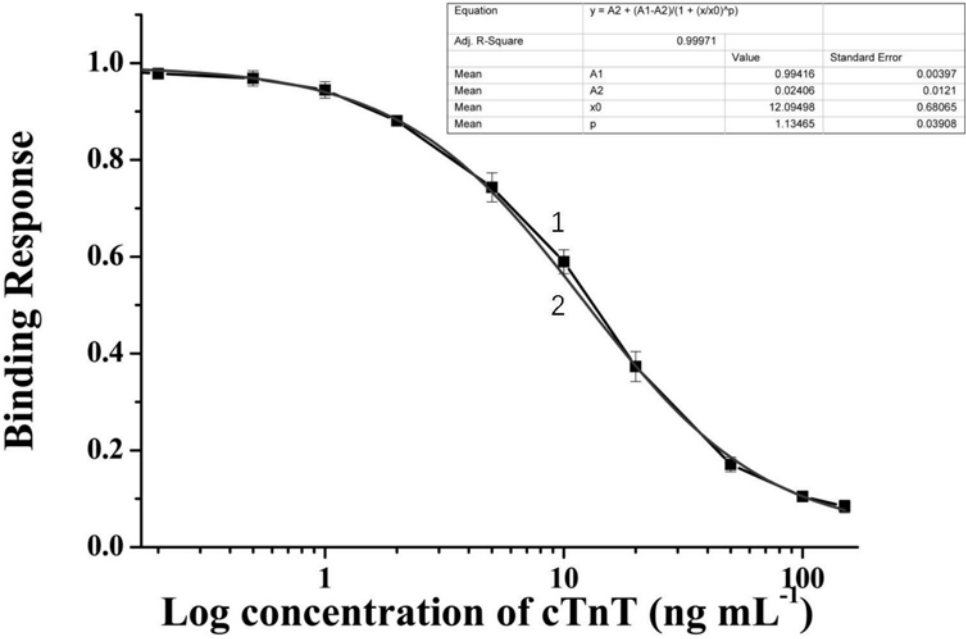


图1

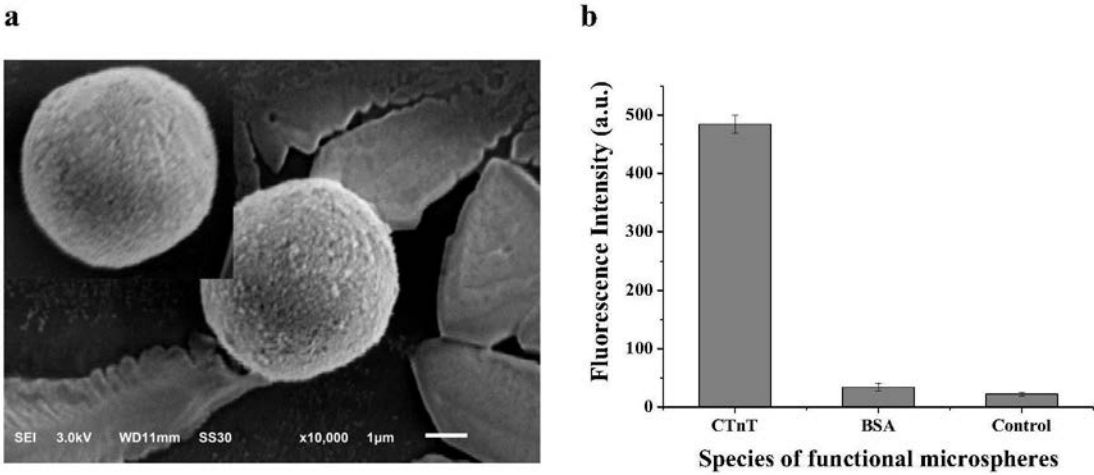


图2

专利名称(译)	表面偶联心肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球及其在检测血清中心肌钙蛋白中的应用		
公开(公告)号	CN108593938A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201810552662.8	申请日	2018-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	徐力 郭轶 刘鸿翔 徐婉琦		
发明人	徐力 郭轶 刘鸿翔 徐婉琦		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	刘世纯 王恩远		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种表面偶联心肌特异性肌钙蛋白抗原的磁性高分子微球及其在检测血清中心肌特异性肌钙蛋白中的应用,属于生物技术领域。本发明基于化学偶联法将心肌特异性肌钙蛋白抗原(cTnT抗原)偶联到磁性高分子微球表面,从而制备表面具有cTnT抗原的功能化磁性高分子微球,该微球可用于血清中心肌特异性肌钙蛋白浓度的检测。本发明具快速获取样品、多参数分析、高分辨率等优点,本检测方法操作简便、可靠性强、获取数据量大,而磁性高分子微球的应用,更是简化了操作程序、减少非特异性吸附,本检测手段应用竞争模式更是节省了试剂的损耗。

