



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102023209 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201010281100. 8

(22) 申请日 2010. 09. 09

(30) 优先权数据

2009-210605 2009. 09. 11 JP

(73) 专利权人 富士胶片株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 笠置典之 桑原知子 渡边裕也

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 陈平

(51) Int. Cl.

G01N 33/545(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

C08F 212/08(2006. 01)

C08F 220/06(2006. 01)

C09K 11/06(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101213226 A, 2008. 07. 02,

JP 2009139214 A, 2009. 06. 25,

JP H10239316 A, 1998. 09. 11,

WO 2004/001414 A1, 2003. 12. 31,

JP 3182819 B2, 2001. 07. 03,

Koichi Aoki et al. Voltammetric electrodes coated with carboxyl latex particles. 《Journal of Electroanalytical Chemistry》. 2008, 第 613 卷 (第 1 期),

闫翠娥等. St-MMA-AA 三元无皂共聚胶乳性质的研究. 《高分子材料科学与工程》. 2001, 第 17 卷 (第 1 期),

Nathalie Khreich et al. Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. 《Analytical Biochemistry》. 2008, 第 377 卷 (第 2 期),

严昌虹等. 诊断用高分子胶乳载体微球的合成. 《化学试剂》. 1990, 第 12 卷 (第 1 期),

严昌虹等. 诊断用高分子胶乳载体微球的合成. 《化学试剂》. 1990, 第 12 卷 (第 1 期),

审查员 舒霏霏

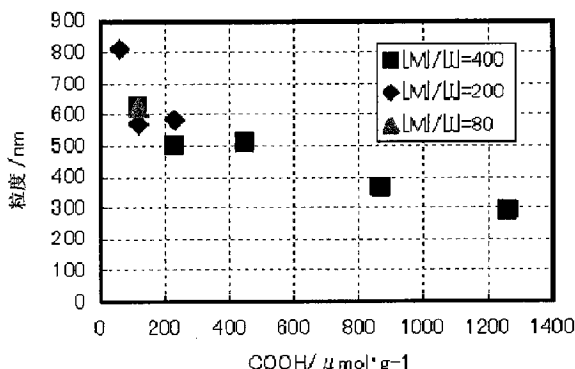
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

使用胶乳粒子的免疫测定方法

(57) 摘要

本发明的一个目的是提供具有高生产再现性的胶乳粒子,通过其可以在免疫诊断中实现足够高的信号 ΔS 值 (=信号值 - 噪声值)。本发明提供了一种测定方法,其包括以下步骤:(1) 使待测物质与结合物质标记的荧光胶乳粒子接触或竞争,所述结合物质标记的荧光胶乳粒子通过使结合物质与荧光胶乳粒子结合而获得,以及(2) 测量来自结合物质标记的荧光胶乳粒子的荧光,其中:(a) 所述荧光胶乳粒子是通过将荧光物质加入至胶乳粒子而获得,所述胶乳粒子的特征在于所述胶乳粒子的表面上存在的 COOH 基团的量为 40 μeq/g 至 300 μeq/g,或(b) 所述荧光胶乳粒子包含胶乳粒子和荧光物质,其特征在于所述荧光胶乳粒子的表面上存在的 COOH 基团的量为 40 μeq/g 至 300 μeq/g。



1. 一种测定方法,所述测定方法包括以下步骤:(1)使待测物质与结合物质标记的荧光胶乳粒子接触或竞争,所述结合物质标记的荧光胶乳粒子是通过使结合物质与荧光胶乳粒子结合而获得,以及(2)测量来自所述结合物质标记的荧光胶乳粒子的荧光,其中:

(a)所述荧光胶乳粒子是通过将荧光物质加入至胶乳粒子而获得,所述胶乳粒子的特征在于所述胶乳粒子的粒度为  $225 \pm 5\text{nm}$ ,并且所述胶乳粒子的表面上存在的COOH基团的量为  $270 \pm 20 \mu \text{eq/g}$ ,或

(b)所述荧光胶乳粒子包含胶乳粒子和荧光物质,其特征在于所述胶乳粒子的粒度为  $225 \pm 5\text{nm}$ ,并且所述荧光胶乳粒子的表面上存在的COOH基团的量为  $270 \pm 20 \mu \text{eq/g}$ ,并且

其中所述胶乳粒子是通过将聚合引发剂逐滴地加入至包含苯乙烯和丙烯酸或甲基丙烯酸的含水悬浮液中进行聚合而制备的,其中所述苯乙烯的浓度为1.4M以下。

2. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述胶乳是通过无皂聚合获得。

3. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述胶乳是包含苯乙烯作为单体的共聚物。

4. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述胶乳是苯乙烯和丙烯酸或甲基丙烯酸的共聚物。

5. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述结合物质是针对待测物质的抗体。

6. 根据权利要求1所述的测定方法,其中在步骤(2)中,通过表面等离子体荧光测定法或落射荧光测定法来测量荧光。

7. 一种生产胶乳粒子的方法,其中所述胶乳粒子的粒度为  $225 \pm 5\text{nm}$ ,并且所述胶乳粒子的表面上存在的COOH基团的量为  $270 \pm 20 \mu \text{eq/g}$ ,所述方法包括:通过将聚合引发剂逐滴地加入至包含苯乙烯和丙烯酸或甲基丙烯酸的含水悬浮液中而进行聚合,其中所述苯乙烯的浓度为1.4M以下。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中在加入所述聚合引发剂之前将所述含水悬浮液升高至  $75^\circ\text{C}$ 至  $95^\circ\text{C}$ 。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述聚合引发剂是过硫酸钾。

10. 根据权利要求7所述的方法,其中在交联剂的存在下进行聚合。

## 使用胶乳粒子的免疫测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及使用胶乳粒子的免疫测定方法。

### 背景技术

[0002] 常规地, 荧光检测已经广泛地用作用于生物测量等的简单和高度敏感的测量方法。荧光检测是一种涉及以下的方法: 使用具有特定波长的激发光, 照射被认为含有待测物质的样品, 所述待测物质当被具有此特定波长的光激发时发射荧光; 以及在此时检测荧光, 从而确认该待测物质的存在。此外, 还广泛地进行下列步骤: 当待测物质不是荧光物质时, 使与待测物质特异性结合的荧光染料标记的物质与样品接触; 以及然后以与上述相同的方式检测荧光, 从而确认已经发生了结合; 即, 存在待测物质。

[0003] 此外, 就所述荧光检测而言, 在 JP 专利公开号 10-307141 (1998)A (Kokai) 等中提出了使用基于等离子体共振的电场增强效应的方法来提高灵敏度。对于等离子体共振的产生, 此方法包括提供在透明载体的指定区内设置有金属层的传感器芯片, 使激发光关于载体和金属膜之间的边界以大于反射的总角度的指定角度从与其上形成金属层的 (载体) 的面相反的面的一侧进入; 通过用激发光照射在金属层上生成表面等离子体; 并且由此使用电场增强效应来激发荧光物质。

### 发明内容

[0004] 上述的常规免疫诊断仍然是存在问题的, 因为不能获得充分的信号值 ( $\Delta S$  (= 信号值 - 噪声值))。本发明要达到的一个目的是解决上述常规技术的问题。具体地, 本发明要达到的一个目的是提供一种免疫测定方法, 通过该方法在使用具有高生产再现性的胶乳粒子的免疫诊断中可以实现足够高的信号  $\Delta S$  值 (= 信号值 - 噪声值), 并且提供一种生产所述胶乳粒子的方法。

[0005] 作为为了达到上述目的而进行的深入研究的结果, 本发明人已经发现: 可以通过将胶乳粒子的表面上存在的 COOH 基团的量调节为 40-300  $\mu\text{eq/g}$  而提供具有高生产再现性的胶乳粒子; 并且可以进行免疫测定, 通过该免疫测定, 使用所述胶乳粒子可以实现足够高的信号  $\Delta S$  值 (= 信号值 - 噪声值)。基于这些发现已经完成了本发明。

[0006] 本发明提供了一种测定方法, 其包括以下的步骤: (1) 使待测物质与结合物质标记的荧光胶乳粒子接触或竞争, 通过使结合物质与荧光胶乳粒子结合而获得所述结合物质标记的荧光胶乳粒子, 以及 (2) 测量来自所述结合物质标记的荧光胶乳粒子的荧光, 其中:

[0007] (a) 所述荧光胶乳粒子是通过将荧光物质加入至胶乳粒子而获得, 所述胶乳粒子的特征在于所述胶乳粒子的表面上存在的 COOH 基团的量为 40  $\mu\text{eq/g}$  至 300  $\mu\text{eq/g}$ , 或

[0008] (b) 所述荧光胶乳粒子包含胶乳粒子和荧光物质, 其特征在于所述荧光胶乳粒子的表面上存在的 COOH 基团的量为 40  $\mu\text{eq/g}$  至 300  $\mu\text{eq/g}$ 。

[0009] 优选地, 所述胶乳是通过无皂聚合获得。

[0010] 优选地, 所述胶乳是包含苯乙烯作为单体的共聚物。

- [0011] 优选地,所述胶乳是苯乙烯、和丙烯酸或甲基丙烯酸的共聚物。
- [0012] 优选地,所述乳胶粒子和 / 或荧光胶乳粒子的平均粒度 (particle size) 为 150nm-330nm。
- [0013] 优选地,所述乳胶粒子和 / 或荧光胶乳粒子的平均粒度为 190nm-270nm。
- [0014] 优选地,所述结合物质是针对待测物质的抗体。
- [0015] 优选地,在步骤 (2) 中,荧光通过表面等离子体荧光测定法或落射荧光测定法来测量。
- [0016] 本发明进一步提供了一种生产胶乳粒子的方法,其中所述胶乳粒子的表面上存在的 COOH 基团的量为  $40 \mu\text{eq/g}$  至  $300 \mu\text{eq/g}$ ,所述方法包括:通过将聚合引发剂逐滴地加入至包含苯乙烯和丙烯酸或甲基丙烯酸的含水悬浮液中而进行聚合,其中所述苯乙烯的浓度为 1.4M 以下。
- [0017] 优选地,在加入所述聚合引发剂之前将所述含水悬浮液升高至  $75^{\circ}\text{C}$  - $95^{\circ}\text{C}$ 。
- [0018] 优选地,所述聚合引发剂是过硫酸钾。
- [0019] 优选地,在交联剂的存在下进行聚合。
- [0020] 根据本发明,可以通过将胶乳粒子的表面上的 COOH 基团的量调节为  $40 \mu\text{eq/g}$  至  $300 \mu\text{eq/g}$  而提供可以在免疫测定中发挥充分的性能的胶乳粒子。在使用本发明的荧光胶乳粒子的免疫测定中,由于非特异性吸附造成的本底非常低,使得可以对信号值进行高灵敏度评价。此外,本发明的胶乳粒子是有优势的,因为其生产再现性很高。

#### 附图说明

- [0021] 图 1 显示了引入羧酸的量和粒度之间的关系 ( $[M] = 2.9M$ )。
- [0022] 图 2 显示引入羧酸的量和粒度之间的关系。
- [0023] 图 3 显示使用荧光胶乳粒子的 SPF 免疫测定的结果。
- [0024] 图 4 显示在引入荧光染料之前和之后测量粒度分布的结果。
- [0025] 图 5 显示在引入荧光染料之前和之后测量  $\zeta$  电位 (Zeta potential) 的结果。

#### 具体实施方式

- [0026] 本发明将进一步详细地描述如下。
- [0027] (1) 本发明中使用的胶乳粒子
- [0028] 本发明中使用的胶乳粒子的特征在于表面上的 COOH 基团的量为  $40 \mu\text{eq/g}$  至  $300 \mu\text{eq/g}$ 。胶乳粒子的表面上的 COOH 基团的量可以通过测量电导率来测量。具体地,胶乳表面上 COOH 基团的量可以如下测定:通过根据 Journal of Colloid and Interface Science (胶体和界面科学杂志) 49 (3), 第 425-432 页,1974 中所述的方法使用 pH 计 (例如, pH 计 D-54 (HORIBA, Ltd.)) 进行电导滴定。具体地,如下所述进行测定。将重量已经准确测量的胶乳样品用去离子水稀释。将一套 pH 计和 Thomas-Serfass 电导率装置的电极两者放置在稀释的胶乳分散液中。将胶乳搅拌,然后用稀 NaOH 溶液将胶乳样品的 pH 调节至  $\text{pH } 11.5 \pm 0.2$ 。该样品用  $0.421\text{N H}_2\text{SO}_4$  每次增加  $0.50\text{ml}$  而进行滴定。电导率和 pH 作为耗酸量的函数进行分析直至 pH 达到约 2.4。
- [0029] 另外,范围在  $40 \mu\text{eq/g}$  至  $300 \mu\text{eq/g}$  的 COOH 基团的量与范围在  $40 \mu\text{mol/g}$  至

300  $\mu\text{mol/g}$  的 COOH 基团的量的含义是相同的。

[0030] 胶乳物质的具体实例包括聚苯乙烯、苯乙烯-丙烯酸共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-(甲基)丙烯酸缩水甘油酯共聚物、苯乙烯-苯乙烯磺酸酯共聚物、甲基丙烯酸聚合物、丙烯酸聚合物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物和聚醋酸乙烯酯-丙烯酸酯。胶乳优选是含有至少苯乙烯作为单体的共聚物,并且特别优选是苯乙烯、和丙烯酸或甲基丙烯酸的共聚物。

[0031] 不特别地限制生产胶乳的方法,并且胶乳可以通过任何聚合方法生产。然而,由于当在抗体标记期间存在表面活性剂时抗体的固定化变得很困难,因此优选无皂聚合用于胶乳的生产。

[0032] 胶乳粒子的平均粒度的差异取决于粒子材料、用于测定待测物质的浓度范围、测量仪器等。平均粒度优选为 150nm-330nm,并且进一步优选 190nm-270nm。

[0033] 就胶乳粒子的平均粒度和表面 COOH 基团的量之间的关系而言,胶乳粒子尺寸通常取决于表面 COOH 基团的量。表面 COOH 基团的量越低,平均粒度越高。这是因为羧酸的量越小,胶乳粒子之间的电荷排斥越小。此外,这特别是因为,在无皂聚合系统中,胶乳变得难以在水中稳定地存在。因此,对于本发明中的具有优选范围内的粒度以及具有优选范围内的表面 COOH 基团的量的胶乳粒子的合成,优选地借助于如下所述的生产胶乳粒子的工艺或基于其的方法来进行聚合。

[0034] (2) 生产胶乳粒子的工艺

[0035] 在本发明中使用的具有 40  $\mu\text{eq/g}$  至 300  $\mu\text{eq/g}$  的 COOH 基团(存在于其表面上)的量的胶乳粒子,根据特别优选的实施方案,包含苯乙烯和丙烯酸或甲基丙烯酸。此外,所述胶乳粒子可以通过将聚合引发剂逐滴地加入至含水悬浮液(其中苯乙烯的浓度为 1.4M 以下)中以便进行聚合而产生。不优选使用其中苯乙烯的浓度高于 1.4M 的含水悬浮液,因为在聚合系统中生成的胶乳粒子彼此结合,导致生成的胶乳具有增加的平均粒度。

[0036] 此外,含水悬浮液的温度优选地在加入聚合引发剂之前升高至 75 $^{\circ}\text{C}$  -95 $^{\circ}\text{C}$ 。通过所述温度升高,引发剂在其加入的同时被分解,并且然后马上在聚合系统中生成自由基,使得可以引发单体的消耗。优选这样的温度调节,因为其具有使胶乳粒度均等化的作用。

[0037] 不特别地限制用于本发明中的聚合引发剂,只要使用其可以进行聚合,并且可以使用已知的聚合引发剂。例如,可以使用过硫酸钾、2,2'-偶氮二异丁腈、2,2'-偶氮二(2,4-二甲基)戊腈、2,2'-偶氮二 4-甲氧基-2,4-二甲基戊腈、过氧化苯甲酰、2,4-二氯过氧化物、过氧化碳酸异丙酯、氢过氧化枯烯、过氧化月桂酰等进行聚合。特别优选地,可以使用过硫酸钾进行聚合。在此使用的聚合引发剂的量优选为单体组合物的约 0.1 重量% -5 重量%。

[0038] 此外,可以在交联剂的存在下进行聚合。在此可以使用的交联剂的实例包括,但不限于,二乙烯基苯和 1,4 丁二烯。

[0039] (3) 荧光胶乳粒子

[0040] 本发明中使用的胶乳粒子优选是荧光物质。当如上面(2)中所述通过聚合获得的胶乳本身是发荧光的,所述胶乳的粒子可以直接用作荧光胶乳粒子。当通过聚合获得的胶乳是不发荧光的,则可以通过将荧光物质(例如,荧光染料)加入至胶乳中而生成荧光胶乳粒子。具体地,例如,可以通过如下步骤产生荧光胶乳粒子:将荧光染料加入至含水和溶解

性有机溶剂的胶乳粒子的溶液中,然后例如搅拌该混合物。在胶乳粒子的溶液中胶乳的浓度优选为 0.1 重量% -10 重量%。该溶液优选地含有电解质。作为电解质,优选 NaCl,并且溶液中电解质的浓度优选为 1mM-500mM。此外,作为胶乳粒子溶液中包含的水溶性有机溶剂,优选四氢呋喃 (THF)、二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基乙酰胺 (DMAc) 或丙酮。水溶性有机溶剂对水的百分比优选大约为 10% -80%。

[0041] 如本文所使用的术语“含有胶乳粒子和荧光物质的荧光胶乳粒子”指以下两者:当如上面 (2) 中所述通过聚合获得的胶乳本身发荧光时的荧光胶乳粒子;以及当通过聚合获得的胶乳不发荧光时通过加入荧光物质(例如,荧光染料)至胶乳而获得的荧光胶乳粒子。

[0042] (4) 结合物质标记的胶乳粒子

[0043] 本发明的胶乳粒子可以通过使结合物质与胶乳粒子结合而用在荧光测定中。在此,本文使用的术语“结合物质”可以指经由待测物质与传感器部件结合的物质或与待测物质竞争地结合传感器部件的竞争性物质。例如,当抗原是用于检测抗原-抗体反应的荧光测定中的待测物质并且通过夹心法进行测定时,固定层由与抗原特异性结合的一抗(固定化抗体)构成,并且结合物质由与所述抗原特异性结合的二抗构成。此外,当通过竞争法进行测定时,结合物质可以由与抗原特异性结合的抗体或与抗原竞争性地结合固定化抗体的竞争性抗原构成。

[0044] 当结合物质是与抗原特异性结合的二抗时,不特别地限制与抗原特异性结合的所述抗体的实例。例如,可以使用由用待测物质免疫的动物的血清制备的抗血清、从抗血清纯化的免疫球蛋白级分、通过使用用待测物质免疫的动物的脾细胞进行细胞融合获得的单克隆抗体,或其片段[例如, F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab' 或 Fv]。所述抗体可以通过常规方法制备。此外,可以在此使用的此类抗体可以是修饰的抗体诸如嵌合抗体、市售的抗体和通过已知方法从动物血清或培养上清液中制备的抗体。可以使用片段化抗体,无论其动物种属、亚型等。例如,可以在本发明中使用的抗体是来自小鼠、大鼠、山羊、兔、绵羊等的抗体。其具体实例包括小鼠 IgG、小鼠 IgM、大鼠 IgG、大鼠 IgM、兔 IgG、兔 IgM、山羊 IgG、山羊 IgM、绵羊 IgG 和绵羊 IgM。所述抗体可以是多克隆的或单克隆的。片段化抗体是由以下制备的分子:完整抗体,其具有至少一个抗原结合位点。其具体实例包括 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>。这些片段化抗体是通过用酶,或化学处理,或基因工程技术处理而获得的分子。

[0045] 下一步,描述用于将抗体与荧光胶乳结合的方法。将含有抗体的溶液加入至荧光胶乳粒子的水溶液中,然后搅拌该混合物。随后,将 WSC(产品号 01-62-0011, Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 水溶液加入至该溶液中,然后搅拌生成物。进一步将甘氨酸水溶液加入至该溶液中,搅拌该溶液,然后通过离心沉淀荧光胶乳粒子。去除上清液,加入 PBS 溶液,然后使用超声洗涤机将荧光胶乳粒子再分散。通过进一步离心去除上清液后,加入含 1% BSA 的 PBS 溶液,导致荧光胶乳粒子再分散,使得可以获得抗体结合的荧光胶乳粒子的溶液。

[0046] (5) 测定模式

[0047] 本发明进一步涉及测定方法,该测定方法包括以下步骤:(1) 使待测物质与结合物质标记的荧光胶乳粒子接触或竞争,所述结合物质标记的荧光胶乳粒子是通过使结合物质与本发明的荧光胶乳粒子结合而获得;以及 (2) 测量上述结合物质标记的荧光胶乳粒子的荧光。

[0048] 根据本发明的测定方法应该根据最可能宽的概念来理解,包括检测待测物质的存在与否或测量(即,测定)待测物质的量。测定的实例不受限制地包括普遍已知的免疫学测量方法。之后,下面将描述夹心法和竞争法作为本发明的测定的具体实施方案,但本发明不限于此。

[0049] (夹心法)

[0050] 使用夹心法,例如,待测物质可以通过下列的步骤来测量,但测量不限于此。首先,预先制备具有对待测物质(抗原)的特异性的一抗和二抗。下一步,一抗固定在固相诸如基底上,然后使二抗与荧光胶乳粒子结合,从而制备抗体标记的荧光胶乳粒子。随后,可以包含待测物质(抗原)的测试样品(或其提取物)和抗体标记的荧光胶乳粒子在基底上彼此接触。当测试样品中存在待测物质时,待测物质和抗体标记的荧光胶乳粒子之间以及待测物质和基底之间发生抗原-抗体反应。所述抗原抗体反应可以类似于通常的抗原-抗体反应的方式进行。结果,当测试样品中存在待测物质时,固定在基底上的一抗、待测物质(抗原)和与荧光胶乳粒子结合的二抗形成免疫复合物。在夹心法中,在固定在基底上的一抗、待测物质(抗原)和结合荧光胶乳粒子的二抗之间的反应结束后,去除不形成上述免疫复合物的二抗,紧接着洗涤。作为荧光强度来检测形成上述免疫复合物的程度,使得可以测量待测物质等的浓度。另外,在荧光强度和待测物质的浓度之间存在正相关。

[0051] (竞争法)

[0052] 随着竞争法的使用,例如,可以通过下列的步骤测量待测物质,但所述测量并不特别地限于此。已知竞争法是一种用于检测不能被夹心法检测到的低分子量化合物的抗原的技术。

[0053] 首先,预先制备具有对待测物质(抗原)的特异性的一抗。然后使一抗与荧光胶乳粒子结合。将本身与一抗具有亲和性的(待测)物质或具有类似于待测物质的位点和类似于待测物质的一抗所针对的表位的化合物固定在固相诸如基底上。然后可以包含待测物质(抗原)的测试样品(或其提取物)和一抗结合的荧光胶乳粒子与基底接触。当测试样品中不存在待测物质时,在基底上发生一抗和本身与一抗具有亲和性的(待测)物质或具有类似于待测物质的一抗所针对的表位的化合物之间的抗原抗体反应。另一方面,当存在待测物质时,待测物质(抗原)结合一抗。因此,抑制了随后和本身与一抗具有亲和性的(待测)物质或具有类似于待测物质的位点并且具有类似于待测物质的一抗所针对的表位的化合物的(基底上的)抗原-抗体反应。因此,由此抗原-抗体反应导致的结合没有发生。在与一抗具有亲和性的固定物质和结合荧光胶乳粒子的一抗之间的反应结束后,去除没有形成如上所述的免疫复合物的荧光胶乳粒子。随后,将形成上述免疫复合物的程度作为荧光强度检测,使得可以测量待测物质等的浓度。

[0054] 备选地,根据另一个实施方案,当通过竞争法进行测定时,使“待测物质本身,或具有类似于待测物质的位点和具有类似于待测物质的一抗所针对的表位的化合物”与荧光胶乳粒子结合。具有对待测物质(抗原)的特异性的一抗可以固定在固相诸如基底上。此外在此情况下,可以通过与如上所提及的相同方式进行抗原-抗体反应来测量待测物质等的浓度。

[0055] (6) 检测荧光的方法

[0056] 不特别地限制本发明中的检测荧光的方法。例如,可以使用能够检测荧光强度的

仪器来检测荧光强度。具体的实例是酶标仪 (microplate reader) 或用于使用表面等离子体激发的表面等离子体荧光 (SPF) 检测的生物传感器。荧光强度的检测通常在在抗原-抗体反应后指定的时间段内完成, 诸如在几分钟至几小时内完成。通过借助于荧光强度检测形成上述免疫复合物的程度, 可以基于荧光强度和待测物质的浓度之间的关系来测定待测物质的浓度。荧光测量的类型可以是平板读取器测量方式或流动测量方式。另外, 可以借助于具有高于使用落射光 (epi-illumination) 激发的荧光检测法 (此后, 称为“落射荧光法”) 时的灵敏度的测量方式进行使用表面等离子体激发的表面等离子体荧光 (SPF) 检测。

[0057] 可以用作上述表面等离子体荧光 (SPF) 生物传感器的传感器, 例如, 如 JP 专利申请号 2008-249361A (Kokai) 中所公开的, 包括由具有指定波长的激发光可以穿透的材料形成的光波导、在光波导的表面上形成的金属膜、用于生成光束的光源、使光束以一定的入射角 (通过该入射角朝向光波导和金属膜之间的边界生成表面等离子体) 进入光波导的光学系统以及用于检测由于被表面等离子体增强的倏逝波的激发而生成的荧光的荧光检测装置。

[0058] 使用本发明的荧光粒子的表面等离子体荧光 (SPF) 检测系统不同于胶乳凝集法。在胶乳凝集法中, 胶乳试剂中的抗体敏化的胶乳和样品中的抗原彼此结合, 从而由于抗体反应而发生凝集。生成的凝集物随着时间变化而增加, 然后用远红光照射凝集物。基于由此获得的每单位时间吸光度的变化来定量抗原浓度的方式是胶乳凝集法。作为免疫比浊法的结果, 由抗原-抗体反应生成的凝集物非常小, 使得在抗原量小的情况下难以光学检测低浓度范围内的凝集程度。因此, 常规地在其中用抗体敏化相对大 ( $\mu\text{m}$  尺寸) 的胶乳粒子的胶乳凝集法中, 抗原-抗体反应以明显的胶乳凝集的形式出现。因此, 即使当低浓度范围内的抗原量很小时, 出现大的凝集物并且可以光学俘获凝集物中甚至微小的变化。所述方法的实例包括其中凝集物的形成被检测为浊度的增加的比浊法、其中凝集物的形成被检测为粒度分布或平均粒度的变化的方法以及积分球比浊法, 该方法包括使用积分球测量由于形成凝集物而导致的前向散射光的变化, 然后比较其与透射光的强度的比值。上述测量方法的实例包括速率分析法, 该方法包括在不同的时间点获得至少两个测量值, 然后基于这些时间点之间出现的差异 (增加) 获得凝集程度 (即, 增加速率), 以及终点分析法, 该方法包括通常在被认为是反应终点的一个时间点获得一个测量值, 然后基于该测量值获得凝集程度。用于临床实验室检验的自动装置 (其适合用于免疫学胶乳凝集反应测量) 的实例, 包括市售的自动分析仪诸如日立 (Hitachi) 7070、7150、7170、LPIA-A700 和 S500。

[0059] 本发明进一步通过下面的实施例来具体的说明, 但本发明并不限于这些实施例。

## 实施例

[0060] 无皂聚合优选地用于产生粒子, 因为当抗体标记过程中存在表面活性剂时难以进行抗体固定化。然而, 当粒度为 200nm 以下时难以进行无皂聚合。此外, 采用 300nm 以上的粒度, 由于抗体标记后凝集而不可能进行评价。因此, 采用缩小至 200nm-250nm 的粒度进行实验。结果显示在下面的实施例中。

[0061] 在下面的实施例中, 使用 ZETA SIZER (Sysmex) Nano 系列测量粒度。将样品制备为具有 0.01% 的浓度, 然后使用 10mM 磷酸盐 pH 7.0 (800  $\mu\text{L}$ ) 测量。参数如下。聚苯乙烯胶乳: RI : 1.590 ; 吸光度 : 0.01 ; 溶剂 : 水 ; 温度 : 25 $^{\circ}\text{C}$  ; 粘度 : 0.8872cP ; RI : 1.330。

[0062] 此外,胶乳中羧酸的量是通过根据 Journal of Colloid and Interface Science(胶体和界面科学杂志)49(3),425-432 页,1974 中所述的方法使用 pH 计 D-54(HORIBA, Ltd.) 进行电导滴定来测定。

[0063] 实施例 1 :胶乳粒子的产生

[0064] 使用苯乙烯、丙烯酸和过硫酸钾 (KPS) 检验无皂聚合的结果描述如下。

[0065] (1) 检验引发剂 (过硫酸钾 :KPS) 的量

[0066] 图 1 显示了粒子表面上羧酸的量和粒度 ( $[M] = 2.9M$ ) 之间的关系。在  $2.9\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的单体浓度下,粒度的测定取决于粒子表面上羧酸的量,而不依赖于引发剂的量 (引入  $[M]/[I]$  的比值)。

[0067] (2) 胶乳粒子 (直径 :511nm ;以及 COOH 基团为  $146 \mu\text{mol/g}$ ) 的合成实施例

[0068] 苯乙烯 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) (30g) (288mmol) 和 1g(56mol) 丙烯酸 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 悬浮并溶解在 100mL milli-Q 水中。向其加入通过在  $85^\circ\text{C}$  下将 0.2g KPS(Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 溶解在 10mL 中制备的水溶液,紧接着在  $65^\circ\text{C}$  和 250rpm 下搅拌 6 小时。随后,以 8000rpm 离心 3 小时,进行 3 次,然后生成物最终在 milli-Q 水中再分散。

[0069] (3) 待引入的单体 (苯乙烯) 的浓度的检验

[0070] 图 2 显示了待引入的单体 (苯乙烯) 的浓度的检验结果。当引入的浓度降低时,引入的羧酸的量小,并且有可能产生具有 275nm 的粒度的粒子。

[0071] (4) 胶乳粒子的产生

[0072] 产生具有下表 1 中列举的物理性质的胶乳粒子的方法描述如下。

[0073] 表 1 :

[0074]

样品号	粒度 (nm)	COOH 基团的量 ( $\mu\text{eq. /g}$ )
(1)	203nm	56
(2)	199nm	265
(3)	214nm	420
(4)	264nm	417
(5)	254nm	84

[0075] 样品号 (1) 的产生

[0076] 将苯乙烯 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) (30g) (288mmol) 和 0.5g(7mmol) 丙烯酸 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 悬浮在 660mL milli-Q 水中,温度升高至  $85^\circ\text{C}$ , 然后向其加入通过将 1g KPS(Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 溶解在 10mL 中制备的水溶液,紧接着在  $85^\circ\text{C}$  和 250rpm 下搅拌 6 小时。随后,以 10,000rpm 离心 3 小时,进

行 3 次,然后生成物最终在 milli-Q 水中再分散。

[0077] 样品号 (2) 的产生

[0078] 将苯乙烯 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) (30g) (288mmol) 和 3g(42mmol) 丙烯酸 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 悬浮在 440mL milli-Q 水中,温度升高至 85°C,然后向其加入通过将 1g KPS(Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 溶解在 10mL 中制备的水溶液,紧接着在 85°C 和 250rpm 下搅拌 6 小时。随后,以 10,000rpm 离心 3 小时,进行 3 次,然后生成物最终在 milli-Q 水中再分散。

[0079] 样品号 (3) 的产生

[0080] 将苯乙烯 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) (30g) (288mmol) 和 6g(84mmol) 丙烯酸 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 悬浮在 330mL milli-Q 水中,温度升高至 85°C,然后向其加入通过将 1g KPS(Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 溶解在 10mL 中制备的水溶液,紧接着在 85°C 和 250rpm 下搅拌 6 小时。随后,以 10,000rpm 离心 3 小时,进行 3 次,然后生成物最终在 milli-Q 水中再分散。

[0081] 样品号 (4) 的产生

[0082] 将苯乙烯 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) (30g) (288mmol) 和 6g(83mmol) 丙烯酸 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 悬浮在 220mL milli-Q 水中,温度升高至 85°C,然后向其加入通过将 1g KPS(Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 溶解在 10mL 中制备的水溶液,紧接着在 85°C 和 250rpm 下搅拌 6 小时。随后,以 10,000rpm 离心 3 小时,进行 3 次,然后生成物最终在 milli-Q 水中再分散。

[0083] 样品号 (5) 的产生

[0084] 将苯乙烯 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) (30g) (288mmol) 和 1g(14mmol) 丙烯酸 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 悬浮在 660mL milli-Q 水中,温度升高至 85°C,然后向其加入通过将 1g KPS(Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)) 溶解在 10mL 中制备的水溶液,紧接着在 85°C 和 250rpm 下搅拌 6 小时。随后,以 10,000rpm 离心 3 小时,进行 3 次,然后生成物最终在 milli-Q 水中再分散。

[0085] 实施例 2 :荧光胶乳粒子的产生

[0086] 将胶乳粒子 (如表 1 中列举的样品号 (1)-(5)) (13.4% 固体,745  $\mu$ L) 溶解在 9.255mL 500mM NaCl 水溶液中,然后加入 10mL 二甲基甲酰胺 (DMF),紧接着在室温下在避光下搅拌 30 分钟。随后,加入 0.5mg(50  $\mu$ DMF 溶液) 荧光染料 BODIPY650/665(Invitrogen),然后生成物在室温下搅拌 30 分钟。通过反复离心 (15,000rpm,60 分钟,4°C) 并再分散至 1 $\times$ PBS 中 3 次而进行纯化。最后,加入 5mL milli-Q 水,从而将固体含量浓度调节为 2% 固体。

[0087] 实施例 3 :结合抗体的荧光胶乳粒子的产生

[0088] 将 250  $\mu$ L 含有 2mg/mL 抗 hCG 单克隆抗体抗 - $\alpha$  亚基 6601 SPR-5(IgG2a(Medix)) 的 50mM MES 缓冲溶液 (pH 6.0) 加入至 250  $\mu$ L 在实施例 2 中制备的 2% (固体含量浓度)

荧光胶乳粒子的水溶液中,紧接着在室温下搅拌 15 分钟。随后,加入 5  $\mu$  L 10mg/mL WSC(产品编号 01-62-0011, (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 水溶液,并且将该溶液在室温下搅拌 2 小时。向其中加入 2mol/L 甘氨酸水溶液 (25  $\mu$  L),然后将该溶液搅拌 30 分钟。然后通过离心 (15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 分钟) 沉淀荧光胶乳粒子。去除上清液,加入 500  $\mu$  L PBS 溶液 (pH 7.4),然后使用超声清洗机再分散荧光胶乳粒子。进一步进行离心 (15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 分钟),然后去除上清液。然后加入含有 1% BSA 的 PBS (pH 7.4) 溶液 (500  $\mu$  L),然后再分散荧光胶乳粒子,从而获得抗 -hCG 抗体结合的荧光胶乳粒子的 1% (w/v) 溶液。

[0089] 实施例 4:流动系统中的 SPF 免疫测定 (使用 hCG 抗原的测定系统) 的检验

[0090] 关于夹心抗体对,将抗 hCG 5008SP-5 (IgG1) (Medix) 用在固相上,将抗  $\alpha$  亚基 6601SPR-5 (IgG2a (Medix)) 用在荧光粒子上。

[0091] 将抗体溶液使用包含聚甲基丙烯酸甲酯作为基底的芯片点样在金膜上,金膜已经沉积在所述基底上,从而将抗体固定。随后,根据下列的步骤通过使用实施例 3 中制备的抗体标记的荧光粒子进行免疫测定。

[0092] 在上壁贴附在传感器芯片的流路的顶部上之前,将 100  $\mu$  L 被调节至 10  $\mu$  g/mL 抗 -hCG 单克隆抗体抗 -hCG 5008SP-5 (IgG1) (Medix) 的 150mM 氯化钠溶液加入至传感器芯片的测量区。使该传感器芯片在室温下放置 1 小时。去除抗体溶液,然后用预先制备的 (含有 0.05% (w/v) 吐温 -20 的 PBS (pH 7.4)) 的洗涤缓冲液洗涤该传感器芯片 (300  $\mu$  L/洗涤, 3 次)。洗涤后,为了封闭未吸附的抗体部分,加入 300  $\mu$  L 含有 1% 酪蛋白的 PBS (pH 7.4),然后将生成物在室温下放置 1 小时。用上述洗涤缓冲液洗涤后,300  $\mu$  L 免疫测定稳定剂 (ABI) 作为稳定剂加入至各孔中,然后将各孔在室温下放置 30 分钟。去除溶液,然后在干燥器中完全地去除水分。在抗 -hCG 抗体结合的处理后,使用封盖材料密封传感器芯片的流路,然后制备流路传感器芯片。可以采用超声沉积等来密封流路。

[0093] 制备含有 0pM、0.9pM、9pM 或 90pM 纯化的 hCG 抗原的 1% BSA 的 PBS 溶液 (磷酸盐缓冲液),并且用作样品溶液。0pM 的浓度表示 1% BSAPBS 溶液本身。

[0094] 向 500  $\mu$  L 的各个样品溶液中,加入 5  $\mu$  L 通过上述步骤制备的各种 1% 抗 -hCG 抗体结合的荧光标记溶液并混合,从而制备反应溶液。在使用样品池使反应溶液向下流至测量区的同时,在多个不同的时间点测量来自测量区的荧光信号。通过使用来自未结合抗体侧的 NIR 激光照射其中在金膜上形成复合物 (抗体 - 抗原 - 抗体) 的区域从而产生倏逝波来测量荧光信号。倏逝波仅到达在金膜附近的区域,然后主要激发上述夹心复合物中包含的标记,从而发出荧光。使用光电二极管检测荧光。此时,将泵连接到样品池的透气孔,以 1.4mm/s 的恒定流速 (线速度) 进行泵吸。在将 300  $\mu$  L 反应溶液运送至测量区上的同时进行测量。

[0095] 图 3 显示了在 SPF 测量中使用血浆系统评价俘获抗原的密度,从而评价免疫测定的性能的结果。具体地,图 3 显示了使用  $\Delta S = \text{信号值} - \text{噪声值}$ ,比较各种类型的荧光粒子的结果。

[0096] 反应条件:

[0097] 初次反应:10 分钟;

[0098] 流速:10  $\mu$  L/分钟;

[0099] 流动时间 :5 分钟 ;

[0100] 洗涤时间 :5 分钟。

[0101] 实施例 5 :在 SPF 检测法中显示良好的免疫测定性能的样品 (2) 的再现性和适当的生产方法的检验

[0102] 将苯乙烯 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) (30g) (288mmol) 和 4g (56mmol) 丙烯酸 (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 悬浮在 480mL milli-Q 水中, 温度升高至 85°C, 然后向其加入通过将 1.16g KPS (Wako 纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) 溶解在 10mL 中制备的水溶液, 紧接着在 85°C 和 250rpm 下搅拌 6 小时。随后, 以 10,000rpm 离心 3 小时, 进行 3 次, 然后生成物最终在 milli-Q 水中再分散。

[0103] 将在  $[M]/[I] = 80M$ 、 $[St]/[AA] = 5.12$ 、 $[M] = 1.72M$ 、80°C 和 4 小时的条件下检验聚合再现性的结果显示在下表 2 中。

[0104] 表 2 :

[0105]

样品号	粒度/nm (DLS)	COOH/ $\mu\text{eq}\cdot\text{g}^{-1}$ (电导率)	Mn (Mw/Mn) (GPC)	剩余单体 (苯乙烯)/% ( $^1\text{H-NMR}$ )
(6)	229	252	20.700(2.98)	< 0.1%
(7)	223	290	20.500(2.89)	< 0.1%
(8)	224	269	23.800(2.86)	< 0.1%

[0106] 产生了三个样品。可以建立具有良好再现性的制剂, 其中粒度为  $225 \pm 5\text{nm}$ , 并且 COOH 基团的量在  $270 \pm 20 \mu\text{eq/g}$  范围以内。

[0107] 实施例 6 :

[0108] 用于合成胶乳粒子 (粒度为 200-210nm ; 约  $60-120 \mu\text{mol/g}$ ) 的制剂的检验

[0109] 在  $[M]/[I] = 80$ 、 $[M] = 0.45\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $[St]/[AA] = 26.18$ 、80°C 和 6 小时的条件下检验聚合再现性。

[0110] 表 3 :

[0111]

批号	粒度/nm (DLS)	COOH/ $\mu\text{eq}\cdot\text{g}^{-1}$ (电导率)	Mn (Mw/Mn) (GPC)	剩余单体 (苯乙烯)/% ( $^1\text{H-NMR}$ )
(9)	222	106	17,100 (4.21)	< 0.1%
(10)	223	*	43,300 (5.37)	1.3
(11)	219	*	23,100 (4.78)	2.4

[0112] \* 未测量到

[0113] 粒度的再现性是令人满意的, 但分子量是不稳定的, 并且有单体剩余。在具有小量

的羧酸的胶乳粒子的情况下难以达到聚合再现性。

[0114] 实施例 7 :在引入荧光染料之前和之后的粒度分布以及表面 COOH 量

[0115] 图 4 显示了在引入荧光染料 (BODIPY650/665 :Invitrogen) 之前和之后检验粒度分布的结果。证明在引入荧光染料之前和之后粒度没有变化。

[0116] 此外,在引入荧光染料之后没有测量到电导率。使用  $\zeta$  电位作为指标来评价引入荧光染料 (BODIPY650/665 :Invitrogen) 之前和之后的表面 COOH 量。图 5 显示了结果。在引入荧光染料之前和之后表面 COOH 量基本上没有变化。

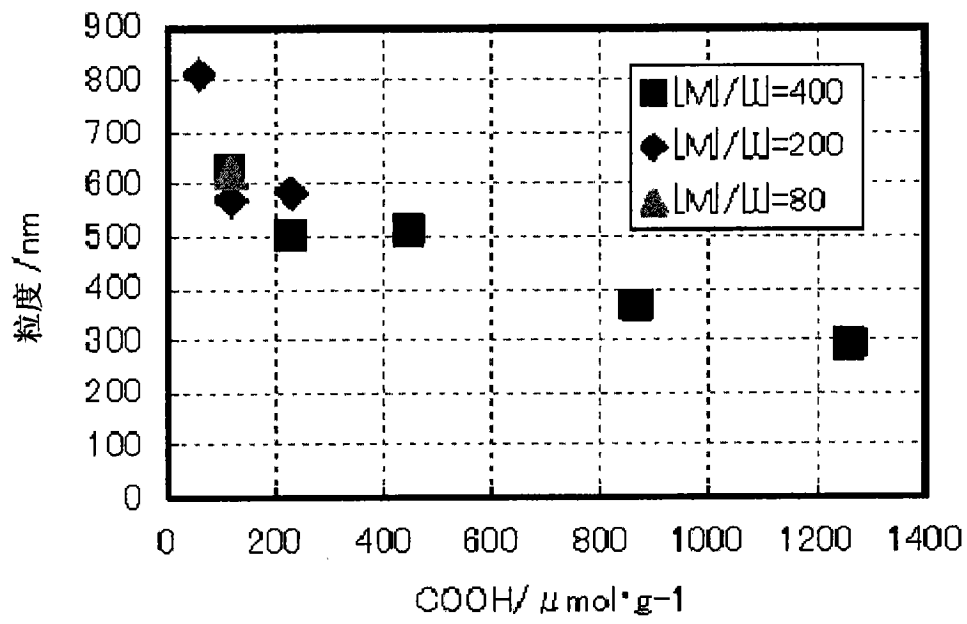


图 1

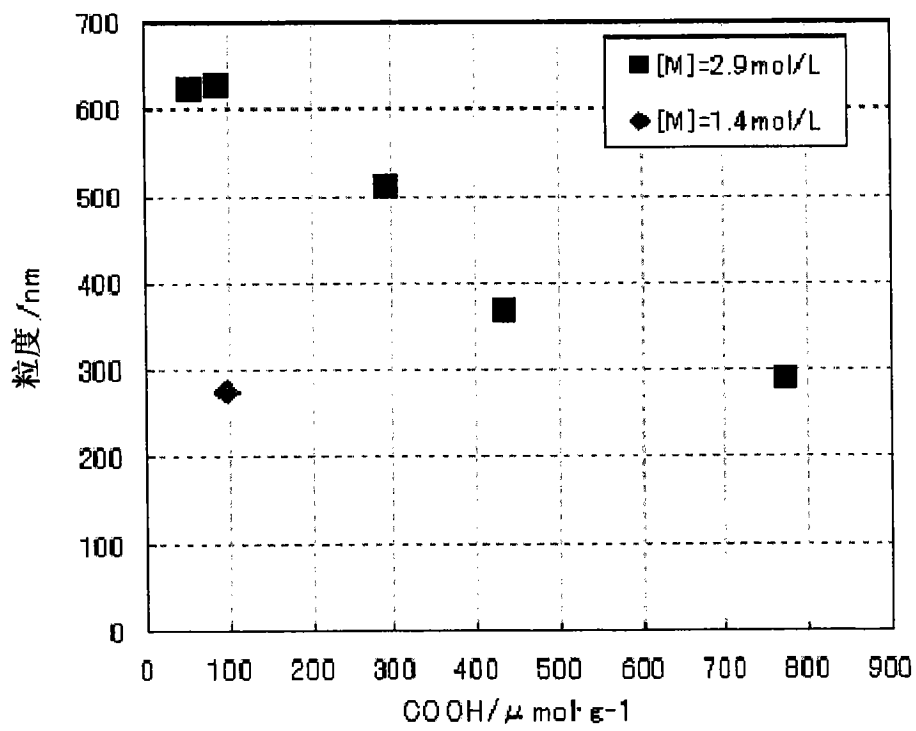


图 2

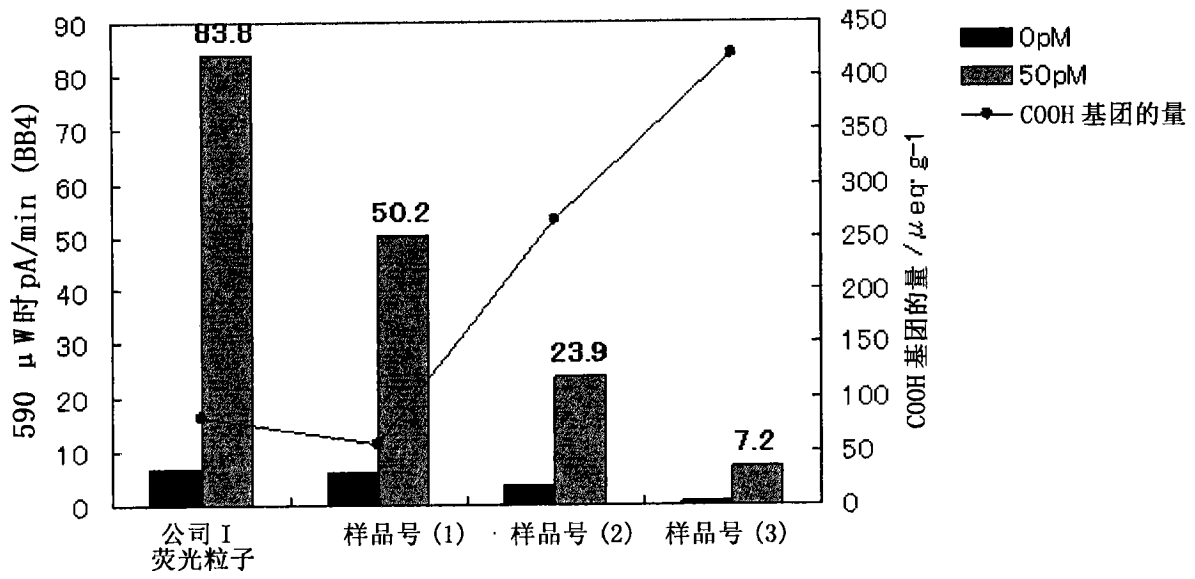


图 3

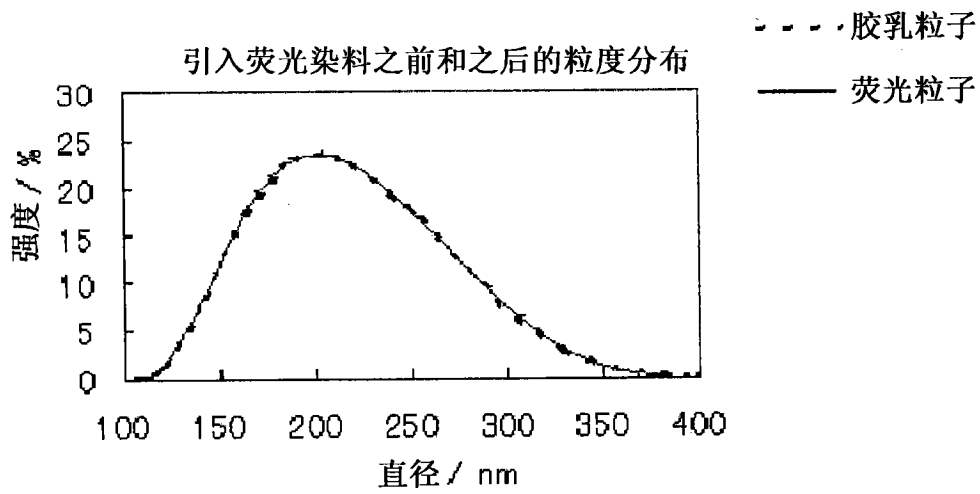


图 4

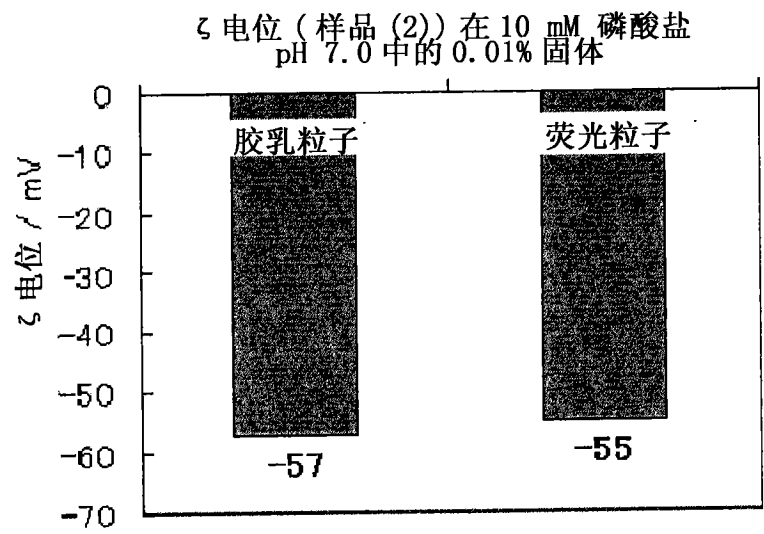


图 5

专利名称(译)	使用胶乳粒子的免疫测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102023209B</a>	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201010281100.8	申请日	2010-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	笠置典之 桑原知子 渡边裕也		
发明人	笠置典之 桑原知子 渡边裕也		
IPC分类号	G01N33/545 G01N33/533 C08F212/08 C08F220/06 C09K11/06		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/585 G01N33/54393		
代理人(译)	陈平		
优先权	2009210605 2009-09-11 JP		
其他公开文献	CN102023209A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供具有高生产再现性的胶乳粒子，通过其可以在免疫诊断中实现足够高的信号 $\Delta S$ 值(=信号值-噪声值)。本发明提供了一种测定方法，其包括以下步骤：(1)使待测物质与结合物质标记的荧光胶乳粒子接触或竞争，所述结合物质标记的荧光胶乳粒子通过使结合物质与荧光胶乳粒子结合而获得，以及(2)测量来自结合物质标记的荧光胶乳粒子的荧光，其中：(a)所述荧光胶乳粒子是通过将荧光物质加入至胶乳粒子而获得，所述胶乳粒子的特征在于所述胶乳粒子的表面上存在的COOH基团的量为 $40\mu\text{eq/g}$ 至 $300\mu\text{eq/g}$ ，或(b)所述荧光胶乳粒子包含胶乳粒子和荧光物质，其特征在于所述荧光胶乳粒子的表面上存在的COOH基团的量为 $40\mu\text{eq/g}$ 至 $300\mu\text{eq/g}$ 。

