



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108828209 A

(43)申请公布日 2018.11.16

(21)申请号 201810694550.6

(22)申请日 2018.06.29

(71)申请人 迈克生物股份有限公司

地址 611731 四川省成都市高新区百川路
16号

(72)发明人 耿英利 马春霞 甘萍萍 吴昌英
龙腾镶

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有
限公司 11270

代理人 陈万青 张颖玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书19页 附图3页

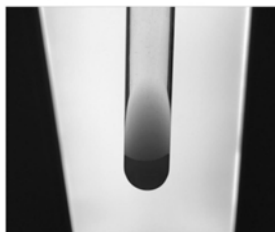
(54)发明名称

用于免疫检测的微球的制备方法

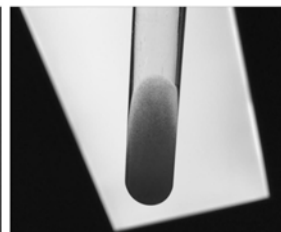
(57)摘要

本发明涉及一种用于免疫检测的微球的制备方法,该方法包括1)使用缓冲液稀释所述微球和待标记物;2)得到所述微球与待标记物的混合溶液;3)加入交联剂进行孵育;4)加入封闭剂封闭;其中,所述微球为羧基微球;步骤1)中的缓冲液的pH为6.3~9.5。本发明还涉及由该方法制备得到的微球及含有该微球的试剂盒。

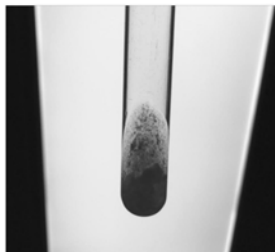
实验4



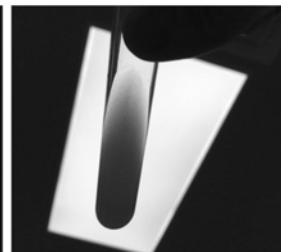
常规法A



比较例A1



比较例A2



1. 一种标记微球的方法,所述方法包括以下步骤:
 - 1) 使用缓冲液稀释所述微球和待标记物;
 - 2) 得到所述微球与待标记物的混合溶液;
 - 3) 加入交联剂进行孵育;
 - 4) 加入封闭剂封闭;其中,所述微球为羧基微球;步骤1)中的缓冲液的pH为6.3~9.5。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤1)中的缓冲液的pH为7.0~9.0。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤1)中的缓冲液是离子强度为3~30mM的Good's缓冲液,或者是离子强度为10~500mM的氨基酸类缓冲液。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述Good's缓冲液为选自HEPES、MOPS、MES、TES、TAPS和HEPPSO中的一种或更多种。
5. 根据权利要求3所述的方法,所述Good's缓冲液的离子强度为5mmol/L~25mmol/L。
6. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述氨基酸类缓冲液为中性脂肪族氨基酸缓冲液和/或碱性氨基酸缓冲液。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述中性脂肪族氨基酸缓冲液为甘氨酸缓冲液和/或丙氨酸缓冲液。
8. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述碱性氨基酸缓冲液为精氨酸缓冲液和/或赖氨酸缓冲液。
9. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述氨基酸类缓冲液的离子强度为15mmol/L~300mmol/L。
10. 根据权利要求1~9中任一项所述的方法,其中,所述交联剂与微球的重量比为0.5%~4.0%,优选为1.0%~3.5%。
11. 根据权利要求1~9所述的方法,其中,所述待标记物为含氨基的待标记物。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述含氨基的待标记物为选自蛋白质、肽和多肽中的一种或更多种。
13. 根据权利要求11所述的方法,所述含氨基的待标记物为抗原和/或抗体。
14. 根据权利要求13所述的方法,所述抗体为单克隆抗体和/或多克隆抗体。
15. 根据权利要求1~9所述的方法,所述方法还包括:
 - 5) 加入保护剂、防腐剂和表面活性剂中的一种或更多种。
16. 根据权利要求1~9所述的方法,其中,所述交联剂为EDC、DCC或DIC,优选为EDC。
17. 根据权利要求1~9所述的方法,其中,所述方法不包括纯化步骤。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中,所述纯化步骤采用超滤和/或离心来进行。
19. 根据权利要求1~9所述的方法,其中,所述方法不包括分散微球的步骤。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中,所述分散微球的步骤采用超声或振荡来进行。
21. 由权利要求1~20中任一项的方法制备得到的经标记的微球溶液。
22. 一种试剂盒,所述试剂盒包括权利要求21所述的经标记的微球溶液。

用于免疫检测的微球的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测领域,具体涉及一种制备用于免疫检测的羧基微球的方法。

背景技术

[0002] 免疫学检测方法主要有酶免疫测定法、免疫比浊法、胶体金免疫测定法、化学发光测定法、荧光免疫测定法、放射免疫测定等。其中,使用微球的免疫学方法制备的诊断试剂,由于能够为自动分析仪器所利用,因此近年来在临床检查等中被广泛使用。在将微球用于免疫检测诊断时,通常使用与测定对象结合的待标记物对微球进行标记。在样本中含有测定对象时,通过使其与微球所负载的待标记物结合,引起微球凝集。从而通过测定该凝集的程度,确定测定对象的有无或其含量。

[0003] 目前,微球与待标记物连接方法主要有物理吸附和化学偶联。其中,化学偶联是利用活化交联剂将待标记物和微球通过化学反应连接在一起,连接后的稳定性较物理吸附更好(JL Ortega-Vinuesa et al., Journal of Colloid&Interface Science, 1995)。用于化学偶联的微球表面会修饰有一些化学基团,如羧基、氨基和羟基(对应于羧基微球、氨基微球和羟基微球)等。而在这些之中,羧基微球应用更为广泛。

[0004] 利用活化剂制备羧基微球的方法是众所周知的,比如CN106353507A公开了一种将抗体偶联至微球的方法,该方法在用缓冲液重悬微粒后加入EDC和 sulfo-NHS活化反应15分钟,反应后离心清洗并超声重悬;随后将溶解的抗体与微粒混合再进行偶联反应,偶联后需再次进行离心清洗及重悬。又如 CN105606822A公开了一种使用抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒的方法,具体用 pH5.0的MES洗涤胶乳三次并超声分散,加入EDAC活化15分钟,洗涤2次并超声分散,然后依次加入抗体混合,封闭得到致敏颗粒。

[0005] 然而,上述方法在制备过程中不仅需要进行离心以去除游离的活化剂和游离未结合的抗体,还需要对微球进行超声重悬以使其分散。这些步骤虽然去除了多余组分并解决了羧基微球制备时易凝集的问题,但使得操作过程变得效率低且耗时,不利于工业化制备。

[0006] 针对这种情况,已提出了不需纯化的方法,例如在CN107167586A公开了这样的方法:先将胶乳加到缓冲液,在加入EDC进行活化15分钟,之后调节 pH至7.60,再加入SLO进行交联反应2h,最后加入两种封闭剂封闭得到成品的方法,该方法不需要进行离心或超滤步骤,从而提高制备效率。

[0007] 但是,这一方法仍需要先用交联剂活化微球一段时间,之后还需要额外调节pH值后才能进行交联反应,这不可避免地延长制备时间、增加了操作的复杂度从而不便于在工业中应用。

[0008] 因此,在免疫检测领域,仍然存在对操作更简单、耗时更短的羧基微球标记方法的需求。

发明内容

[0009] 为此,本发明要解决的技术问题是提供一种操作简单的羧基微球标记方法。另一

方面进一步解决如何在羧基微球标记过程中防止微球凝集的问题。再一方面还解决了如何提高羧基微球的标记效率的问题。又一方面还解决了提高羧基微球的稳定性的问题。

[0010] 为达到上述目的,本发明人对羧基微球的标记方法进行研究,并意外地发现通过调整微球稀释缓冲液和抗体稀释缓冲液的pH可以使得加入交联剂后(即对活化反应来说),pH仍处于最适范围之内,这确保致敏后羧基微球具有更好的稳定性,从而无需对微球进行提前活化,也无需在加入交联剂后对pH进行额外的调整;在研究过程中,发明人还发现了至少通过减少交联剂预先活化这一步骤(即先将微球与待标记物接触混匀再加入交联剂使微球与待标记物交联),降低了微球敏感性,使标记过程中不容易出现凝聚,从而不必要在标记过程中使用离心步骤和/或分散步骤。

[0011] 也就是说,通过对pH参数和标记步骤的同时调整,对于羧基微球的标记,本发明实现了简化操作过程及缩短操作时间的效果,同时生产中不需要大型离心设备,提高了生产的安全性。并且如下文所证实的,该方法制备得到的经标记微球可用于免疫检测之中。

[0012] 据此,本发明提供了一种标记微球的方法,所述方法包括以下步骤:

[0013] 1) 使用缓冲液稀释所述微球和待标记物;

[0014] 2) 得到所述微球与待标记物的混合溶液;

[0015] 3) 加入交联剂进行孵育;

[0016] 4) 加入封闭剂封闭;

[0017] 5) 得到标记后的羧基微球;

[0018] 其中,所述微球为羧基微球,步骤1)中的缓冲液的pH约为6.3~9.5。

[0019] 在一些实施方式中,步骤1)中的缓冲液的pH约为7.0~9.0。

[0020] 在一些实施方式中,步骤1)中的稀释可根据任何常规的稀释方式进行,例如可以分别稀释微球和待标记物,然后将二者混合;或是先用缓冲液稀释微球,然后向其中加入待标记物。在一些实施方式中,步骤4)和步骤5)之间可以包括稀释微球的步骤。优选地,可以用本领域常用的缓冲液稀释微球,所述缓冲液包括但不限于Good's缓冲液、氨基酸类缓冲液等。在本发明方法所涉及的pH条件下,发明人进一步发现:对缓冲液种类及其离子缓冲液的选择,可有助于进一步防止微球的凝集并提高标记效率。

[0021] 因此,本发明的方法还涉及:

[0022] 在一个实施方式中,步骤1)中的缓冲液是离子强度约为3~30mM的Good's缓冲液。

[0023] 优选地,所述Good's缓冲液为选自HEPES、MPOS、MES、TES、TAPS 和HEPPSO中的一种或更多种。

[0024] 优选地,所述Good's缓冲液的离子强度约为5mmol/L~25mmol/L。

[0025] 在另一个实施方式中,步骤1)中的缓冲液是离子强度约为10~500mM的氨基酸类缓冲液。

[0026] 优选地,所述氨基酸类缓冲液为中性脂肪族氨基酸缓冲液和/或碱性氨基酸缓冲液。

[0027] 进一步优选地,所述中性脂肪族氨基酸缓冲液为甘氨酸缓冲液和/或丙氨酸缓冲液。

[0028] 进一步优选地,所述碱性氨基酸缓冲液为精氨酸缓冲液或赖氨酸缓冲液。

- [0029] 在一些实施方式中,所述交联剂为EDC、DCC或DIC。
- [0030] 优选地,所述氨基酸类缓冲液的离子强度约为15mmol/L~300mmol/L。
- [0031] 另外,对于本发明的方法,本发明人还发现:通过调整交联剂的使用量,可使受活化的微球数量维持在一个相对合适的区间,从而有助于避免因微球过量活化后相互竞争待标记物,造成标记过程凝集。
- [0032] 因此,本发明的方法还涉及:
- [0033] 在一个实施方式中,交联剂与微球的重量比约为0.5%~4.0%。
- [0034] 优选地,交联剂与微球的重量比约为1.0%~3.5%。
- [0035] 除上述方法和进一步的实施方式外,本发明的方法还涉及:
- [0036] 在一个实施方式中,所述待标记物为含氨基的待标记物。
- [0037] 优选地,所述含氨基的待标记物为选自蛋白质、肽和多肽中的一种或更多种。
- [0038] 更优选地,所述含氨基的待标记物为抗原和/或抗体。
- [0039] 进一步优选地,所述抗体为单克隆抗体和/或多克隆抗体。
- [0040] 在一个实施方式中,本发明的方法还包括:
- [0041] 在步骤4)和步骤5)之间的加入保护剂、防腐剂和/或表面活性剂的步骤。
- [0042] 在一个实施方式中,本发明的方法不包括任何纯化步骤。
- [0043] 优选地,所述纯化步骤采用超滤和/或离心来进行。
- [0044] 在一个实施方式中,本发明的方法不包括任何用于分散微球的步骤。
- [0045] 优选地,所述用于分散微球的步骤采用超声来进行。
- [0046] 在另一方面,本发明还涉及经标记的微球溶液,其由本发明的方法制备得到。
- [0047] 在又一方面,本发明还涉及一种用于免疫检测的试剂盒,所述试剂盒包括本发明的经标记的微球溶液。
- [0048] 因此,本发明的方法简化了微球标记方法的操作过程并减少了操作时长,提高生产过程的安全性,更有利于工业化。进一步地,本发明的方法还防止了标记过程中微球的凝集。再进一步地,本发明的方法还提高了微球的标记效率。

附图说明

- [0049] 图1为标记过程中的微球的外观图片;
- [0050] 图2为标记过程中的微球的外观图片;
- [0051] 图3示出了本发明实验组、比较例和常规法所标记的微球在检测时的剂量反应曲线图。

具体实施方式

[0052] 下文将结合具体实施方式和实施例,具体阐述本发明,本发明的优点和各种效果将由此更加清楚地呈现。本领域技术人员应理解,这些具体实施方式和实施例是用于说明本发明,而非限制本发明。

[0053] 在整个说明书中,除非另有特别说明,本文使用的术语应理解为如本领域中通常所使用的含义。因此,除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员的一般理解相同的含义。若存在矛盾,本说明书优先。

[0054] 微球

[0055] 在本发明中,“微球”是指可用作待标记物的载体以用于免疫学检测的微小实体的集合,其直径一般小于5微米。

[0056] 如本发明所使用的,“羧基微球”是指表面修饰有用于与待标记物的氨基端共价结合的羧基的微球。羧基微球与抗体之间有一个桥联化学臂,降低了位阻效应,不仅提高了抗体的结合率,而且还为抗体提供合适的三维空间立体结构,有效地保护了抗体与抗原结合的活性区域。国外已有多家公司提供表面修饰有羧基的微球粒子原料,例如,四川新材料公司生产的羧基微球,Bangs Laboratories公司生产的羧基微球等。

[0057] 在本发明中,可使用任何合适类型的羧基微球,只要其能够与含有氨基的待标记物偶联即可。常见的微球可例如为:胶乳(例如聚苯乙烯微球、壳聚糖微球、聚乳酸微球、聚丙烯酸微球和/淀粉微球等)、荧光微球、磁珠。但本发明不限于此。

[0058] 对于羧基微球的直径,本发明没有特别的限制,例如20nm~5000nm范围内的直径都可用于本发明的标记方法中。

[0059] 待标记物

[0060] 如本发明所使用的,“待标记物”是指能与羧基微球偶联且可用来特异性结合样品中存在的待测物的物质。

[0061] 与待测物特异性结合的物质在本领域是众所周知的,例如,在一种诊断乙型肝炎的方法中,乙型肝炎表面抗体可作为待测物,在此情况下乙型肝炎表面抗原可用作为本发明微球的待标记物。类似地,在这些周知的待标记物中,本领域技术人员知晓哪些待标记物可以与羧基微球进行偶联。

[0062] 对于待标记物的种类,本发明没有特别的限制,只要其能与羧基微球偶联即可。例如,待标记物可以是抗体或抗原。又如,待标记物可以是多肽或荧光化合物

[0063] 当待标记物为抗体时,可以选自单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或抗体片段(优选与抗原结合的片段)等。

[0064] 在一些实施方式中,抗体来源可以是兔源、鼠源、山羊源、绵羊源、鸡源和/或人源等。

[0065] 当待标记物为抗原时,可以选自抗原或其片段(优选抗原表位)等。

[0066] 可以通过纯化、表达和/或人工合成等方式来得到本发明的待标记物。

[0067] 可以为示例性的待标记物包括:抗血清淀粉样蛋白A抗体、视黄醇结合蛋白抗体、 β 2微球蛋白多克隆抗体、抗人胱抑素C多克隆抗体、兔抗人脂蛋白 a抗体、抗肌红蛋白多克隆抗体或抗人D-二聚体单克隆抗体等。但本发明不限于此。

[0068] 在一些实施方式中,所述待标记物可以是经修饰的。

[0069] 缓冲液

[0070] 本发明方法中包括微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液。

[0071] 微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液可选自为Good's缓冲液或氨基酸缓冲液。

[0072] 本发明的缓冲液的pH可为6.3~9.5,例如为6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4或9.5。

[0073] 发明人进一步发现:在本发明方法中,低离子强度的Good's缓冲液能够进一步降

低胶乳凝集的风险。

[0074] 因此,在一个优选的实施方式中本发明的微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液是离子强度约为3~30mM的Good' s缓冲液。

[0075] Good' s缓冲液又称为两性离子缓冲液,它们在作为缓冲体系时具有共同的特性: 1) pKa在6-8之间;2) 在水中的溶解度高;3) 不易穿透生物膜;4) 盐效应性小;5) 离子浓度、溶液组成和温度对解离的影响小;6) 不与金属离子生成复合物或沉淀;7) 该缓冲剂化学稳定;8) 紫外和可见光波长范围内光吸收小;9) 易制得高纯度的盐。常用的Good' s缓冲液包括: MES、Bis-Tris、ADA、ACES、PIPES、MOPSO、Bis-Tris Propane、BES、MOPS、HEPES、TES、DIPSO、TAPSO、TRIZAMA、HEPPSO、POPSO、EPPS、TEA、Tricine、Bicine、TAPS、AMPSO、CHES、CAPSO或AMP等。

[0076] 在更优选的实施方式中,本发明的Good' s缓冲液可为MOPS、HPEPS、MES、TES、TAPS和HEPPSO中的一种或更多种。

[0077] 当微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液选自Good' s缓冲液时,其离子强度可以为3mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、26mM、27mM、28 mM、29mM或30mM。

[0078] 此外,发明人还意外地发现:在本发明方法中,氨基酸缓冲液的使用能够进一步降低胶乳凝集的风险,而且在使用氨基酸缓冲液时,其离子强度可以在较宽的范围内适用。对此,我们推测这是由于氨基酸缓冲液也在一定程度上参与了交联,使交联速度放缓,从而使标记过程更不易出现凝集。

[0079] 因此,在另一个优选的实施方式中,微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液是离子强度约为10~500mM的氨基酸类缓冲液。常用的氨基酸缓冲液包括甘氨酸缓冲液、丙氨酸缓冲液、缬氨酸缓冲液、亮氨酸缓冲液、异亮氨酸缓冲液、组氨酸缓冲液、精氨酸缓冲液或赖氨酸缓冲液等。

[0080] 在更优选的实施方式中,本发明的氨基酸类缓冲液为中性脂肪族氨基酸缓冲液,例如,甘氨酸缓冲液、丙氨酸缓冲液、缬氨酸缓冲液、亮氨酸缓冲液或异亮氨酸缓冲液。

[0081] 在另一个更优选的实施方式中,本发明的氨基酸类缓冲液为碱性氨基酸缓冲液,例如精氨酸缓冲液、组氨酸缓冲液或赖氨酸缓冲液。

[0082] 当微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液选自氨基酸类缓冲液时,其离子强度可以为10mM、15mM、40mM、50mM、100mM、150mM、200mM、250 mM、300mM、350mM、400mM、450mM或500mM。

[0083] 在本发明的方法中,微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液可以相同或不同。在一个优选的实施方式中,微球稀释缓冲液以及抗体稀释缓冲液相同。

[0084] 封闭剂

[0085] 如本发明所使用的,“封闭剂”是指能够将微球上未结合的羧基基团封闭的试剂。

[0086] 本领域技术人员能够理解,任何能够将羧基基团封闭的试剂都可以用作本发明的封闭剂。示例性的封闭剂可选自蛋白类封闭剂,如BSA、酪蛋白、脱脂奶粉或含氨基类物质,如,TRIS、氨基酸类封闭剂(如丙氨酸、精氨酸、赖氨酸等)中的一种或几种。

[0087] 对于封闭剂的使用剂量,本领域技术人员能够根据其种类进行选择,比如,在使用BSA时可以采用例如1~5g/L的浓度。

[0088] 保护剂

[0089] 在本发明中,保护剂是指用来保护标记物活性提高经标记的微粒稳定性的试剂。

[0090] 对于保护剂的种类,本发明没有特别的限制,可以使诊断试剂领域中常见任何常见的保护剂。示例性的保护剂可为选自糖类保护剂,如蔗糖、海藻糖、葡聚糖、葡萄糖、果糖;蛋白类保护剂,如BSA、酪蛋白、脱脂奶粉;醇类保护剂,如甘露醇;对于保护剂的使用剂量,本领域技术人员能够根据保护剂的种类进行选择,比如,在使用海藻糖时可采用5~100g/L的浓度。

[0091] 防腐剂

[0092] 在本发明中,防腐剂是指用来延长经标记的微粒保存时间的试剂。

[0093] 对于防腐剂的种类,本发明没有特别的限制,可以使用诊断试剂领域中常见任何常见的防腐剂。示例性的防腐剂可选自叠氮钠、苯酚、对羟基苯甲酸、苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸、山梨酸钾、丙酸钙、二甲苯酚、尼泊金酯、高锰酸盐、抗生素类(如庆大霉素、二氯乙酰胺、SUPELCO公司推出的ProClin系列等)、对羟基苯甲酸乙酯和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或几种。

[0094] 对于防腐剂的使用剂量,本领域技术人员能够根据防腐剂的种类进行选择,比如,在使用ProClin300时可以采用例如0.1~10g/L的浓度。

[0095] 表面活性剂

[0096] 在本发明中,表面活性剂是指加入少量能使其溶液体系的界面状态发生明显变化的物质;其具有固定的亲水亲油基团且在溶液的表面能定向排列。

[0097] 对于表面活性剂种类,本发明没有特别的限制,可以使用诊断试剂领域中常见任何常见的表面活性剂。示例性的表面活性剂可选自Tween、SPAN、曲拉通、EMULGEN系列表面活性剂(如吐温20、吐温40和曲拉通100)以及月桂酸聚乙二醇甘油酯、阴离子烷基多苷、十二烷基二甲基甜菜碱、3ARAMT1、SH062C和AM PHITOL中的一种或几种。

[0098] 对于表面活性剂的使用剂量,本领域技术人员能够根据表面活性剂的种类进行选择,比如,在使用曲拉通100时可以采用例如1~20g/L的浓度。

[0099] 标记方法

[0100] 本发明提供一种标记微球的方法,所述方法包括以下步骤:

[0101] 1) 使用缓冲液稀释所述微球和待标记物;

[0102] 2) 得到所述微球与待标记物的混合溶液;

[0103] 3) 加入交联剂进行孵育;

[0104] 4) 加入封闭剂封闭;

[0105] 5) 得到经标记的微球;

[0106] 其中,所述微球为羧基微球;步骤1)中的缓冲液的pH为6.3~9.5。

[0107] 在本发明的方法中,步骤1)可通过以下方式进行:

[0108] 使用缓冲液A和缓冲液B分别稀释微球和待标记物以得到微球溶液和待标记物溶液,其中,缓冲液A和缓冲液B可以是相同的或是不同的;或者

[0109] 先使用缓冲液稀释微球以得到微球溶液,之后将待标记物直接加入到该微球溶液中。

[0110] 当分别稀释微球和待标记物时,微球溶液的浓度例如可为0.01~100mg/ml,还可为0.1~50mg/ml;而待标记物溶液的浓度例如可为0.1~100mg/ml,还可为0.1~30mg/ml。

[0111] 在一些实施方式中,待标记物可以相对于微球的0.1%~30%重量比来使用,该重量也可0.5%~25%,还可为1%~15%。

[0112] 如本发明方法所描述的,该方法中在步骤4)之前不包括任何使用活化剂来活化微球的步骤。

[0113] 本领域中任何羧基微球的交联剂均可以用于本发明的方法中。示例性的交联剂包括但不限于EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、DCC (二环己基碳二亚胺)和DIC (N,N'-二异丙基碳二亚胺),它们在通常情况下为干粉形式。在一些优选实施方式中,交联剂优选以相对于微球的0.5~4%重量比来使用,如下文实施例中所证实的,在本发明的方法采用该交联剂使用量时,将进一步有助于得到标记效果良好的羧基微球。此外,交联剂更优选以相对于微球的1.0%~3.5%的重量比来使用,该重量比又或如1.0%、1.5%、2%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%或4.0%。

[0114] 如下述实施例中所表明的,在本发明的方法中无需进行任何纯化或分散步骤。其中,纯化步骤例如可以包括:在对微球进行活化后去除游离的活化剂的纯化步骤,在标记步骤之后去除游离的待标记物的纯化步骤;而分散步骤可以包括:对离心后的微球或凝集后的微球进行重悬的步骤。常见纯化步骤例如采用离心(低温)或超滤等方式,而常见的分散步骤例如采用超声或振荡等方式,上述这些方式将不可避免的延长反应时间并提高了对反应环境和设备要求。而本发明的方法则克服了上述缺陷。

[0115] 本发明的方法中步骤3)的孵育过程实际上将羧基微球的活化与微球的标记(偶联)同步进行。在孵育过程中,孵育时间可大于等于10分钟,例如,10分钟、20分钟、1小时、2小时、4小时等;孵育的温度可为2~80℃,例如为室温(25℃)。

[0116] 本发明的方法的步骤4)中,封闭可以例如进行至少10分钟,例如,10分钟、20分钟、半小时、1小时等。

[0117] 在一些实施方式中,本发明的方法在封闭步骤和得到经标记的微粒的步骤之间的加入保护剂、防腐剂和表面活性剂中的一种或更多种的步骤。当加入多种时可以采用同时、次序或其组合的方式进行。

[0118] 试剂盒

[0119] 经本发明方法所产生的经标记的微球可用于制备免疫检测试剂盒,其中,免疫检测可例如为胶乳免疫比浊试剂盒、荧光免疫检测试剂盒、化学发光检测试剂盒等。

[0120] 例如,在一个实施方式中,本发明的方法所产生的经标记的微球可作为免疫比浊试剂盒中的检测试剂(R2),在这种情况下,该免疫检测试剂盒还可以包括用于孵育样品的试剂(R1)、还可以包括用于制作工作曲线的校准品/校准物、还可以包括用于质控控制的质控品/质控物等。

[0121] 在又一个实施方式中,本发明的方法产生的经标记的微球可以为带荧光的羧基微球,当抗原或抗体标记荧光微球后被样本中的抗体或抗原捕获形成带荧光的抗原抗体复合物,再通过检测荧光信号的强弱即可计算出样本中待测物的浓度。

[0122] 在再一个实施方式中,本发明的方法产生的经标记的微球可以为带磁性的羧基微球(即磁珠),当经过发光物标记的抗原或抗体标记到磁珠上以后可以结合样本中相应的抗体或抗原,形成磁珠抗原抗体复合物,再加入底物引起化学发光,通过检测化学发光信号值

即可计算出待测物的浓度。

[0123] 本发明的免疫试剂盒可以用于各种待测物,示例性的试剂盒包括:视黄醇结合蛋白检测试剂盒、 β 2微球蛋白检测试剂盒、胱抑素C检测试剂盒、CRP 检测试剂盒、血清淀粉样蛋白检测试剂盒、脂蛋白检测试剂盒、抗链球菌溶血素O检测试剂盒、肌红蛋白检测试剂盒等。但本发明不限于此。

[0124] 分析方法

[0125] 仪器与材料

[0126] 配制用于孵育样品的R1试剂:

Tris	50 mmol/L
苯酚	0.5 g/L
EDTA-Na2	1.8 g/L
[0127] EMULGENA90	5.000 g/L
氯化钠	80.00 g/L
PEG20000	0.1 g/L

[0128] pH调整至 7.4 ± 0.1 。

[0129] 制备用于检测的R2试剂:采用本发明的标记方法,具体请见下述的实施例1和2。

[0130] 仪器:日立7180全自动生化分析仪。

[0131] 仪器参数设置:

[0132] 方法:2点终点法;

[0133] 样本/试剂1/试剂2分别为 $2\mu\text{l}$ / $155\mu\text{l}$ / $25\mu\text{l}$;

[0134] 主波长:546nm;

[0135] 副波长:700nm;

[0136] 反应时间:10min;

[0137] 测光点:19~34点;

[0138] 反应温度: 37°C 。

[0139] 校准品(胱抑素C):标准品1,0.00mg/L;标准品2,0.50mg/L;标准品 3,1.00mg/L;标准品4,2.00mg/L;标准品5,4.00mg/L;标准品6,8.00mg/L。

[0140] 质控品(胱抑素C):质控品水平1,标示值0.86 (0.68~1.04) mg/L;质控品水平2,标示值3.8 (3.04~4.56) mg/L。

[0141] 胱抑素C高值样本:人血清样本,胱抑素C浓度约36mg/L

[0142] 校准曲线信号测定

[0143] 使用全自动生化分析仪对制制好的试剂R2进行校准及质控品的测定分析,具体结果请见下述实施例1和2。

[0144] 分析灵敏度测定

[0145] 使用校准品6和校准品5重复测定2次,计算吸光度差值的平均值,换算为1.00mg/L的 ΔA ,计算公式如下:

$$[0146] \quad \Delta A = \frac{\overline{\Delta A_{C_6}} - \overline{\Delta A_{C_5}}}{C_6 - C_5} \times 1.00$$

[0147] 式中：

[0148] $\overline{\Delta A_{C_6}}$ 表示Ca1-6吸光度差值的平均值；

[0149] $\overline{\Delta A_{C_5}}$ 表示Ca1-5吸光度差值的平均值；

[0150] C6表示Ca1-6的标示浓度；

[0151] C5表示Ca1-5的标示浓度。

[0152] 根据换算结果判断，若1.00mg/L的 ΔA 越高，表示分析灵敏度越高，试剂在测定高端浓度校准品时具有更好的反应梯度，同时也间接表明试剂的标记效果越好，结果请见下述实施例1和2。

[0153] 批内CV测定

[0154] 使用质控物水平1和质控物水平2分别重复测定10次，按如下公式计算其批内变异系数 (CV)：

$$[0155] \quad CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

[0156] 式中：

[0157] CV表示变异系数；

[0158] S表示标准差；

[0159] $\bar{x}$ 表示测定均值。

[0160] 根据CV值判断试剂重复性差异，CV越小表示试剂重复性越好，反之则越差。

[0161] 等价带测定

[0162] 用生理盐水对胰抑素C高值样本进行稀释，制备得到一系列含有不同浓度抗原(理论浓度为4.00mg/L、8.00mg/L、16.00mg/L、20.00mg/L、25.00mg/L、30.00mg/L、32.00mg/L、34.00mg/L、36.00mg/L)的样本；之后从低浓度到高浓度依次进行测定，测定结果的趋势为先升高后降低，当测定浓度第二次低于线性范围上限(8.00mg/L)时即可终止实验，然后以样本理论浓度为横坐标，实测浓度作为纵坐标，绘制剂量反应曲线图，当实测浓度再次出现与线性范围上限浓度(8.00mg/L)相当时，该区间浓度范围即为该试剂的等价带。实验结果请见下述实施例3、表14及图3。

[0163] 2~8℃下的长期稳定性测定

[0164] 外观观察：将配制好的试剂混匀后取出约3ml于试管中，并封闭保存放置在2~8℃，分0天、6个月、12个月时取出对光肉眼观察试剂，若为乳白色悬浊液、无沉淀则表示试剂外观正常，通过质控品测定结果进一步判定试剂稳定性；反之若试剂有沉淀则表示试剂稳定性欠佳，通过质控品测定进一步判定试剂稳定性是否可接受。

[0165] 质控品测定方法：在使用系列校准品校准试剂后，分0天、6个月、12个月测定质控品水平1和水平2(每组三个重复)后分别计算平均值，随后通过以下公式计算得到相对偏差(%)：

[0166] (保存一定时间后的质控水平的测定平均值-0天时的质控水平的测定平均值)/0

天时的质控水平的测定平均值 $\times 100\%$ 。

[0167] 当相对偏差与首次测定结果差异超出 $\pm 10\%$ 时,通常认为试剂稳定性欠佳并不可接受。

[0168] 以下通过实施例更详细地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0169] 实施例1使用Good's缓冲液来制备经标记的羧基微球

[0170] 常规法A

[0171] 目前一种通常使用的羧基微球标记方法如下:

[0172] 1) 使用50mM pH 6.0的醋酸溶解抗人朊抑素C多克隆抗体(四川迈克生物新材料技术有限公司)分至抗体浓度为1mg/mL;

[0173] 2) 用50mM pH 6.0的MES悬浮微球,使其浓度为1%w/v;

[0174] 3) 边搅拌边将一倍体积的抗体溶液加入到10倍体积的羧基微球(98nm 胶乳,四川迈克生物新材料技术有限公司)悬液中,室温下持续搅拌20分钟;

[0175] 4) 加入EDC溶液,使得EDC与微球重量比为5%;

[0176] 5) 室温下,立即调节pH至7.4,混匀反应30分钟;

[0177] 6) 离心去除上清液,用储存缓冲液(2g/L Tris、10g/L蔗糖和5g/L山梨酸)超声重悬。

[0178] 由上述内容可知,该方法需要在加入交联剂后进行调节pH值的步骤;同时为了防止微球凝集,该方法在交联后需要离心以去除上清中游离的活化剂和游离未结合的抗体,还需要对微球进行超声重悬步骤以使其分散。因此,存在操作过程复杂耗时、需要大型设备不利于工业化等问题。

[0179] 据此,本发明进行了以下实验。

[0180] 实验1

[0181] 方法:

[0182] 使用30mM、pH6.3的HEPES缓冲液将羧基微球与抗人朊抑素C多克隆抗体分别稀释为20mg/ml和30mg/ml;将稀释后的抗体溶液和稀释后的微球溶液混合,使得抗体与微球的重量比为14~16%。

[0183] 向混合后的溶液中加入EDC母液,使得EDC与微球的重量比为5%,并于25℃下标记30分钟。

[0184] 随后加入TRIS(终浓度2g/L)封闭30分钟。

[0185] 加入蔗糖(终浓度10g/L)和山梨酸(5g/L),静置30分钟后得到标记有抗体的微球。

[0186] 实验2~6和比较例A1

[0187] 对照于实验1,下表1中给出了实验2~6和比较例A1的操作参数,其中,未给出的参数与实验1相同。

[0188] 表1

[0189]

	缓冲液 pH	缓冲液类型	离子强度 mM
--	--------	-------	---------

[0190]

实验 1	6.3	HEPES	30
实验 2	7.0	MES	5
实验 3	8.5	MOPS	20
实验 4	7.8	HEPES	10
实验 5	9.0	MES	25
实验 6	9.5	MOPS	3
比较例 A1	6.0	HEPES	20

[0191] 结果:

[0192] 为了验证实验1~6与比较例A1和上文提及的常规法A所制备试剂的分散性、反应性和标记效率等方面的效果,对其标记过程中的外观进行了观测,结果如图1所示。由该图可见,以实验4为例的实验组在标记过程中保持澄清,而常规法A及比较例A1在标记过程中均出现严重凝集。进一步地,根据上述“分析方法”部分中的描述,对校准曲线信号以及分析灵敏度进行了测定。结果如下表2所示。

[0193] 表2

[0194]

	外观	校准品						分析灵敏度(ΔA)
		0.00 mg/L	0.50 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L	8.00 mg/L	
实验 1	澄清	-9(3882)	95	206	581	1598	2627	0.026
实验 2	澄清	-9(3078)	108	211	604	1610	2716	0.028
实验 3	澄清	-9(2937)	119	230	615	1701	2912	0.030
实验 4	澄清	-9(2964)	113	228	610	1651	2847	0.030
实验 5	澄清	-9(3081)	101	213	599	1625	2799	0.029
实验 6	澄清	-9(3767)	92	203	564	1526	2533	0.025
比较例 A1	凝集严重	120(6258)	50	132	381	1024	2052	0.021
常规法 A	凝集严重	50(4058)	126	214	598	1658	2752	0.027

[0195] 注:括号中为试剂反应终点的空白吸光度

[0196] 由表2可知,首先,在利用本发明的方法进行标记时,采用pH6.3~9.5的Good's缓冲液的实验1~6在标记过程中保持澄清状态;常规法A在制备过程中出现凝集现象,在后续实验过程中进行了离心和超声重悬操作;而缓冲液pH为6.0的比较例A1在标记过程中同样出现凝集严重的情况,在后续实验过程中不得不进行了离心和超声重悬处理。其次,由校准曲线信号结果可以看出,实验1~6的反应终点的空白吸光度均远远小于常规法A和比较例A1,说明实验1~6所得到的试剂的分散性更好;此外,在0.50、1.00、2.00、4.00和8.00各校准点处,实验1~6的吸光度均明显高于常规法A及比较例A1,这证明实验1~6的反应更为

强烈、标记效果更优。最后,由分析灵敏度结果可知,实验1~6的分析灵敏度明显高于常规法A和比较例A1,也就是说实验1~6所制得的反应试剂具有更优的标记效率。

[0197] 进一步,通过比较实验1~6的校准曲线和分析灵敏度实验结果可知:相对于pH6.3和pH9.5的缓冲液而言,pH为7.0~9.0时制备的试剂具有更佳的分散性、标记效率;而在pH为7.8~8.5时,试剂的分散性与标记效率达到最佳。

[0198] 此外,通过比较实验1~6的结果还可以看出:相对于离子强度为3mM或 30mM的Good' s缓冲液而言,5mM~25mM的离子强度制备的试剂具有更佳的分散性、标记效率;而在10mM~20mM的离子强度下,试剂的分散性与标记效率达到最佳。

[0199] 比较例A2

[0200] 方法:

[0201] 为了证实本发明的方法在使用3~30mM Good' s缓冲液时可以达到更佳的效果,进行了比较例A2,该比较例所采用的缓冲液的离子强度为50mM,其余实验条件与实验3相同。

[0202] 结果:

[0203] 为了验证比较例A2所制备试剂的分散性、反应性和标记效果等,对其标记过程中的外观进行了观测,由图1可见,比较例A2在标记过程中微球出现严重凝集;同时根据上述“分析方法”部分中的描述,对校准曲线信号以及分析灵敏度进行了测定。结果如下表3所示。

[0204] 表3

[0205]

	外观	校准品						分析灵敏度(ΔA)
		0.00 mg/L	0.50 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L	8.00 mg/L	
实验 3	澄清	-9(2937)	119	230	615	1701	2912	0.030
比较例	凝集严重	101(8431)	44	144	397	955	1363	0.010

[0206]

A2								
----	--	--	--	--	--	--	--	--

[0207] 注:括号中为试剂反应终点的空白吸光度

[0208] 由表3可知,在利用本发明的方法进行标记时,采用3mM~30mM离子强度的Good' s缓冲液相比于50mM的Good' s缓冲液能够达到更佳的分散性、反应性和标记效果。

[0209] 实验7~10

[0210] 方法:

[0211] 选取实验1~6中的实验3,按照该方法进行实验7~10,改变的参数如下表 4所示,其余实验条件与实验3相同。

[0212] 表4

[0213]

	EDC与微球的重量比
实验3	5.0%
实验7	4.0%

实验8	3.0%
实验9	1.0%
实验10	0.5%

[0214] 结果:

[0215] 为了验证实验7~10所制备试剂的分散性、反应性和标记效果等,根据上述“分析方法”部分中的描述,对校准曲线信号以及分析灵敏度进行了测定。结果如下表5所示。

[0216] 表5

[0217]

	校准品						分析灵敏度(ΔA)
	0.00 mg/L	0.50 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L	8.00 mg/L	
实验 3	-9(2937)	119	230	615	1701	2912	0.030
实验 7	-9(2832)	128	263	657	1762	3014	0.031
实验 8	-9(2673)	152	311	695	1817	3206	0.035
实验 9	-10(2814)	124	264	652	1708	3012	0.033
实验 10	-12(2883)	121	265	637	1712	3025	0.033

[0218] 注:括号中为试剂反应终点的空白吸光度

[0219] 由表5可知,通过在实验3的方法及其参数的基础上将EDC与微球的重量比由5.0%调整为0.5%~4.0%,能够进一步优化所制备试剂的分散性、反应性和标记效果。其中,当EDC与微球的重量比为3.0%左右时达到最佳的效果。

[0220] 实验11~13

[0221] 方法:

[0222] 选取实验7~10中效果较佳的实验8,按照该方法继续进行实验11~13,改变的参数如下表6所示,其余实验条件与实验8相同。

[0223] 表6

[0224]

	缓冲液种类	微球粒径nm
实验8	MOPS	98
实验11	MOPS	300
实验12	TAPS	98
实验13	HEPPSO	98

[0225] 结果:

[0226] 为了验证实验11~13所制备试剂的分散性、反应性和标记效果等,根据上述“分析方法”部分中的描述,对校准曲线信号以及分析灵敏度进行了测定。结果如下表7所示。

[0227] 表7

[0228]

	校准品						分析灵敏度(ΔA)
	0.00 mg/L	0.50 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L	8.00 mg/L	
实验 8	-9(2673)	152	311	695	1817	3206	0.035
实验 11	-8(2652)	149	298	695	1812	3207	0.035
实验 12	-8(2678)	149	306	688	1821	3197	0.034
实验 13	-10(2675)	157	310	690	1826	3233	0.035

[0229] 注:括号中为试剂反应终点的空白吸光度

[0230] 由表7可知,在调整了微球的粒径,或者将缓冲液更换为其它Good's缓冲液后,对本发明的方法所制备试剂的分散性、反应性和标记效果没有明显的影响。

[0231] 实施例2使用氨基酸类缓冲液来制备经标记的羧基微球

[0232] 常规法B

[0233] 目前一种通常使用的羧基微球标记方法如下:

[0234] 1) 使用500mM pH 6.0的甘氨酸缓冲液溶解抗人胰抑素C多克隆抗体(四川迈克生物新材料技术有限公司)至抗体浓度为1mg/mL;

[0235] 2) 用500mM pH 6.0的甘氨酸缓冲液悬浮微球(126nm胶乳,四川迈克生物新材料技术有限公司),使其浓度为1%w/v;

[0236] 3) 边搅拌边将一倍体积的抗体溶液加入到10倍体积的微球悬液中,室温下持续搅拌20分钟;

[0237] 4) 加入EDC溶液,使得EDC与微球重量比为5%;

[0238] 5) 室温下,立即调节pH至7.4,混匀反应30分钟;

[0239] 6) 离心去除上清液,用储存缓冲液(2g/L Tris、10g/L蔗糖和5g/L山梨酸)超声重悬。

[0240] 实验21

[0241] 方法:

[0242] 使用500mM、pH6.3的甘氨酸缓冲液将羧基微球(126nm胶乳,四川迈克生物新材料技术有限公司)与抗人胰抑素C多克隆抗体分别稀释为15mg/ml 和20mg/ml;将稀释后的抗体溶液和稀释后的微球溶液混合,使得抗体与微球的重量比为14~16%。

[0243] 向混合后的溶液中加入EDC母液,使得EDC与微球的重量比为5%,并于 25℃下标记20分钟。

[0244] 随后加入酪蛋白(终浓度5g/L)封闭20分钟。

[0245] 加入海藻糖(终浓度5g/L)和苯酚(1g/L),静置20分钟后得到标记有抗体的微球。

[0246] 实验22~26和比较例B

[0247] 对照于实验21,下表8中给出了实验22~26和比较例B的操作参数,其中,未给出的参数与实验21相同。

[0248] 表8

[0249]

	缓冲液pH	缓冲液类型	离子强度mM
实验21	6.3	甘氨酸	500
实验22	7.0	精氨酸	15
实验23	7.8	甘氨酸	40
实验24	8.5	精氨酸	250
实验25	9.0	甘氨酸	300
实验26	9.5	精氨酸	10
比较例B1	6.0	甘氨酸	250

[0250] 结果:

[0251] 为了验证实验21~26与比较例B所制备试剂的分散性、反应性和标记效率等方面的效果,对其标记过程中的外观进行了观测,结果如图2所示。由该图可见,以实验24为例的实验组在标记过程中保持澄清,比较例B在标记过程中均出现严重凝集。同时根据上述“分析方法”部分中的描述,对校准曲线信号以及分析灵敏度进行了测定。结果如下表9所示。

[0252] 表9

[0253]

	外观	校准品						分析灵敏度(ΔA)
		0.00 mg/L	0.50 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L	8.00 mg/L	
实验 21	澄清	-14(3788)	93	192	562	1568	2658	0.027
实验 22	澄清	-13(3068)	108	213	592	1598	2786	0.030
实验 23	澄清	-11(2869)	116	230	625	1706	2921	0.030
实验 24	澄清	-15(2875)	112	231	606	1615	2838	0.031
实验 25	澄清	-18(3097)	103	211	602	1601	2735	0.028
实验 26	澄清	-16(3699)	91	199	550	1532	2633	0.027
比较例 B1	凝集严重	154(9833)	34	152	492	1058	1895	0.021
常规法 B	凝集严重	50(4058)	126	214	598	1658	2752	0.027

[0254] 注:括号中为试剂反应终点的空白吸光度

[0255] 由表9可知,首先,在利用本发明的方法进行标记时,采用pH6.3~9.5的氨基酸类缓冲液的实验21~26在标记过程中保持澄清状态;常规法B在制备过程中出现凝集现象,且在后续实验过程中进行了离心和超声重悬操作;缓冲液 pH为6.0的比较例B在标记过程中同样出现凝集严重的情况,在后续实验过程中也进行了离心和超声重悬处理。其次,由校准曲线信号结果可以看出,实验 21~26的反应终点的空白吸光度均远远小于常规法B和比较例B,说明实验 21~26所得到的试剂的分散性更好;而在0.50、1.00、2.00、4.00和8.00各校准点处,实验21~26的吸光度均明显高于常规法B及比较例B,这证明实验21~26 的反应更为强烈、标记效果更优。最后,由分析灵敏度结果可知,实验21~26 的分析灵敏度明显高于常规法B和比较例B,这说明实验21~26所制得的反应试剂具有更优的标记效率。

[0256] 进一步,通过比较实验21~26的校准曲线和分析灵敏度实验结果可知:相对于pH6.3和pH9.5的缓冲液而言,pH为7.0~9.0时制备的试剂具有更佳的分散性、标记效率;而在pH为7.8~8.5时,试剂的分散性与标记效率达到最佳。

[0257] 此外,通过比较实验21~26的结果还可以看出:相对于离子强度为10mM 或500mM的氨基酸类缓冲液而言,15mM~300mM的离子强度制备的试剂具有更佳的分散性、标记效率;而在40mM~250mM的离子强度下,试剂的分散性与标记效率达到最佳。

[0258] 实验27~30

[0259] 方法:

[0260] 选取实验21~26中的实验24,按照该方法进行实验27~30,改变的参数如下表10所示,其余实验条件与实验24相同。

[0261] 表10

[0262]

	EDC与微球的重量比
实验24	5.0%
实验27	4.0%
实验28	3.0%
实验29	1.0%
实验30	0.5%

[0263] 结果:

[0264] 为了验证实验27~30所制备试剂的分散性、反应性和标记效果等,根据上述“分析方法”部分中的描述,对校准曲线信号以及分析灵敏度进行了测定。结果如下表11所示。

[0265] 表11

[0266]

	校准品						分析灵敏度 (ΔA)
	0.00 mg/L	0.50 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L	8.00 mg/L	
实验 24	-15(2875)	112	231	606	1615	2838	0.031
实验 27	-10(2712)	121	271	654	1782	3048	0.032
实验 28	-10(2682)	155	320	701	1859	3236	0.034
实验 29	-9(2711)	129	266	662	1758	3045	0.032
实验 30	-10(2698)	131	275	674	1736	3021	0.032

[0267] 注:括号中为试剂反应终点的空白吸光度

[0268] 由表11可知,通过在实验24的方法及其参数的基础上将EDC与微球的重量比由5.0%调整为0.5%~4.0%,能够进一步优化所制备试剂的分散性、反应性和标记效果。其中,当EDC与微球的重量比为3.0%左右时达到最佳的效果。

[0269] 实验31~33

[0270] 方法:

[0271] 选取实验27～30中的实验28,按照该方法继续进行实验31～33,改变的参数如下表12所示,其余实验条件与实验28相同。

[0272] 表12

[0273]

	缓冲液种类	微球粒径nm
实验28	精氨酸	126
实验31	精氨酸	350
实验32	丙氨酸	126
实验33	赖氨酸	126

[0274] 结果:

[0275] 为了验证实验31～33所制备试剂的分散性、反应性和标记效果等,根据上述“分析方法”部分中的描述,对校准曲线信号以及分析灵敏度进行了测定。结果如下表13所示。

[0276] 表13

[0277]

	校准品						分析灵敏度(ΔA)
	0.00 mg/L	0.50 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L	8.00 mg/L	
实验 28	-10(2682)	155	320	701	1859	3236	0.034
实验 31	-12(2697)	154	321	693	1828	3258	0.036
实验 32	-9(2669)	153	315	685	1847	3244	0.035
实验 33	-10(2682)	159	312	712	1866	3215	0.034

[0278] 注:括号中为试剂反应终点的空白吸光度

[0279] 由表13可知,在调整了微球的粒径,或者将缓冲液更换为其它氨基酸类缓冲液后,仍可达到本发明方法所实现的效果。

[0280] 实施例3性能测试

[0281] 根据前文“分析方法”部分中的描述,对常规法、本发明的实验和比较例进行批内CV测试、等价带和2～8℃下长期稳定性,以验证本发明的方法在用作诊断试剂时的效果。结果如表14、图3所示。

[0282] 表14

[0283]

	CV%		等价带	2~8℃稳定性（6 个月）			2~8℃稳定性（12 个月）		
	水平	水平		相对偏差（%）		外观	相对偏差（%）		外观
	1	2		质控 1	质控 2		质控 1	质控 2	
常规法 A	2.2	1.5	8.00~20.00	-8.24	-4.94	少量 沉淀	-24.71	-10.39	大量 沉淀
比较例 A1	4.1	4.0	8.00~16.00	-7.41	-8.24	少量 沉淀	-20.99	-11.70	大量 沉淀
比较例 A2	4.6	3.6	无	-8.33	-8.49	少量 沉淀	-23.81	-14.85	大量 沉淀
实验 1	1.3	1.1	8.00~25.00	3.37	2.33	乳白	6.74	4.92	乳白
实验 2	1.2	0.8	8.00~30.00	1.12	2.35	乳白	4.49	3.39	乳白
实验 3	1.0	1.0	8.00~30.00	0.00	1.04	乳白	3.37	2.08	乳白
实验 4	1.2	0.8	8.00~30.00	2.25	1.04	乳白	3.37	2.07	乳白
实验 5	1.6	0.7	8.00~30.00	2.25	1.04	乳白	4.49	3.11	乳白

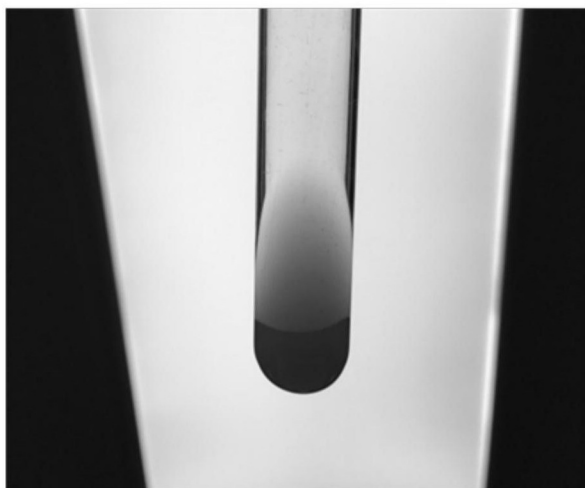
[0284]

实验 6	1.4	0.9	8.00~25.00	4.55	1.04	乳白	6.82	4.15	乳白
实验 7	1.1	0.6	8.00~32.00	1.09	0.52	乳白	2.17	1.82	乳白
实验 8	0.7	0.6	8.00~34.00	1.09	0.26	乳白	1.09	0.79	乳白
实验 9	1.2	0.5	8.00~32.00	1.09	1.04	乳白	2.17	1.56	乳白
实验 10	0.9	0.8	8.00~32.00	0.00	1.30	乳白	2.17	1.82	乳白
实验 11	1.0	0.9	8.00~34.00	1.12	0.26	乳白	3.37	0.78	乳白
实验 12	0.7	0.5	8.00~34.00	0.00	0.26	乳白	1.12	0.78	乳白
实验 13	0.8	0.6	8.00~34.00	1.12	0.26	乳白	1.12	0.78	乳白
常规法 B	2.2	1.5	8.00~20.00	-8.24	-4.94	少量 沉淀	-24.71	-10.39	大量 沉淀
比较例 B	1.0	2.0	无	-48.86	-58.03	大量 沉淀	-93.18	-96.11	大量 沉淀
实验 21	1.2	1.4	8.00~25.00	2.22	0.79	乳白	6.67	3.40	乳白
实验 22	1.2	1.3	8.00~30.00	3.33	0.79	乳白	5.56	2.62	乳白
实验 23	1.0	1.3	8.00~30.00	1.11	1.04	乳白	4.44	1.82	乳白
实验 24	1.0	1.4	8.00~30.00	2.22	1.31	乳白	5.56	1.83	乳白
实验 25	1.1	1.2	8.00~30.00	1.12	0.78	乳白	5.62	2.87	乳白
实验 26	1.3	1.0	8.00~25.00	4.49	1.04	乳白	6.74	3.13	乳白
实验 27	1.0	0.8	8.00~32.00	0.00	0.26	乳白	2.20	1.04	乳白
实验 28	0.8	0.9	8.00~34.00	1.10	0.52	乳白	2.20	1.04	乳白
实验 29	1.0	0.5	8.00~32.00	1.10	0.26	乳白	2.20	1.04	乳白
实验 30	0.8	0.4	8.00~32.00	1.10	0.26	乳白	1.10	1.04	乳白
实验 31	0.6	0.7	8.00~34.00	1.10	0.52	乳白	3.30	2.08	乳白
实验 32	0.8	0.8	8.00~34.00	0.00	0.52	乳白	1.10	1.04	乳白
实验 33	0.7	0.8	8.00~34.00	1.10	0.26	乳白	3.30	0.78	乳白

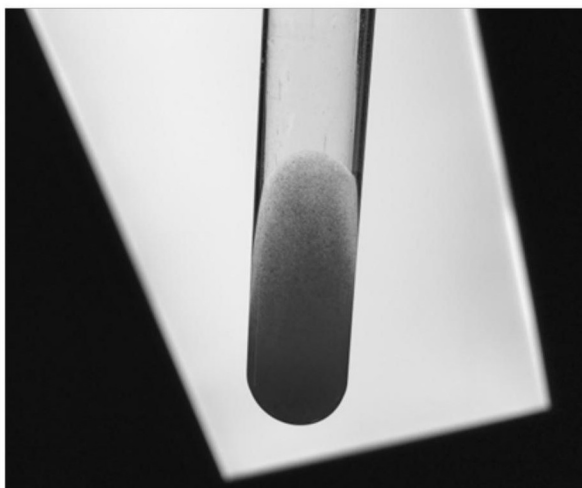
[0285] 注：“乳白”表示乳白色悬浊液、无沉淀

[0286] 由表14、图3可以看出,相比于常规法和比较例,本发明的实验方法所制备试剂具有更低的批内CV,从而重复性更好;同时本发明的实验方法所制备试剂具有更宽的等价带,证明本发明的方法进一步改善了微球的标记效率且随着参数的逐步优化标记效率逐步提高,从而能降低在检测应用中出现假阳性或假阴性的概率;此外,稳定性结果看,本发明的方法所制备的试剂在6个月和 12个月时质控相对偏差的绝对值均小于10%,稳定性良好;而本领域在标记微球时所使用常规法在6个月时已出现少量沉淀,12个月时则出现大量沉淀,稳定性较差。

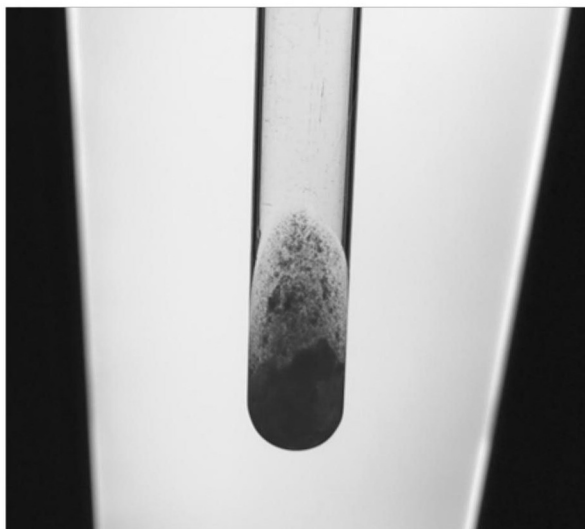
实验4



常规法A



比较例A1



比较例A2

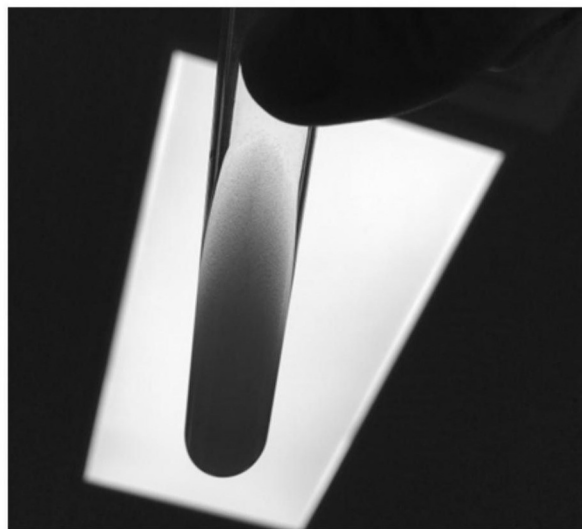


图1

实验24

比较例B

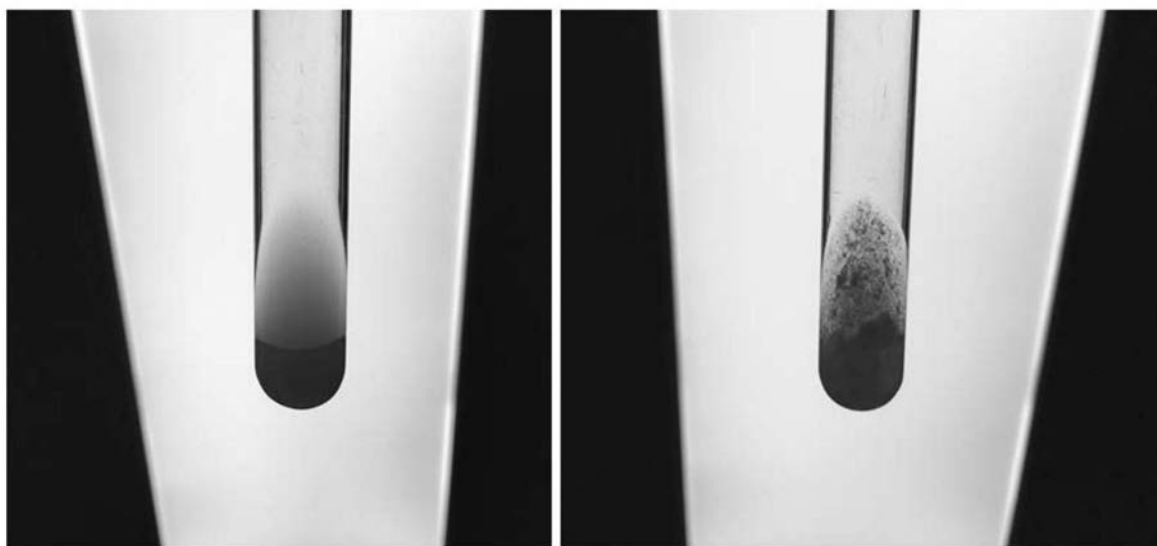


图2

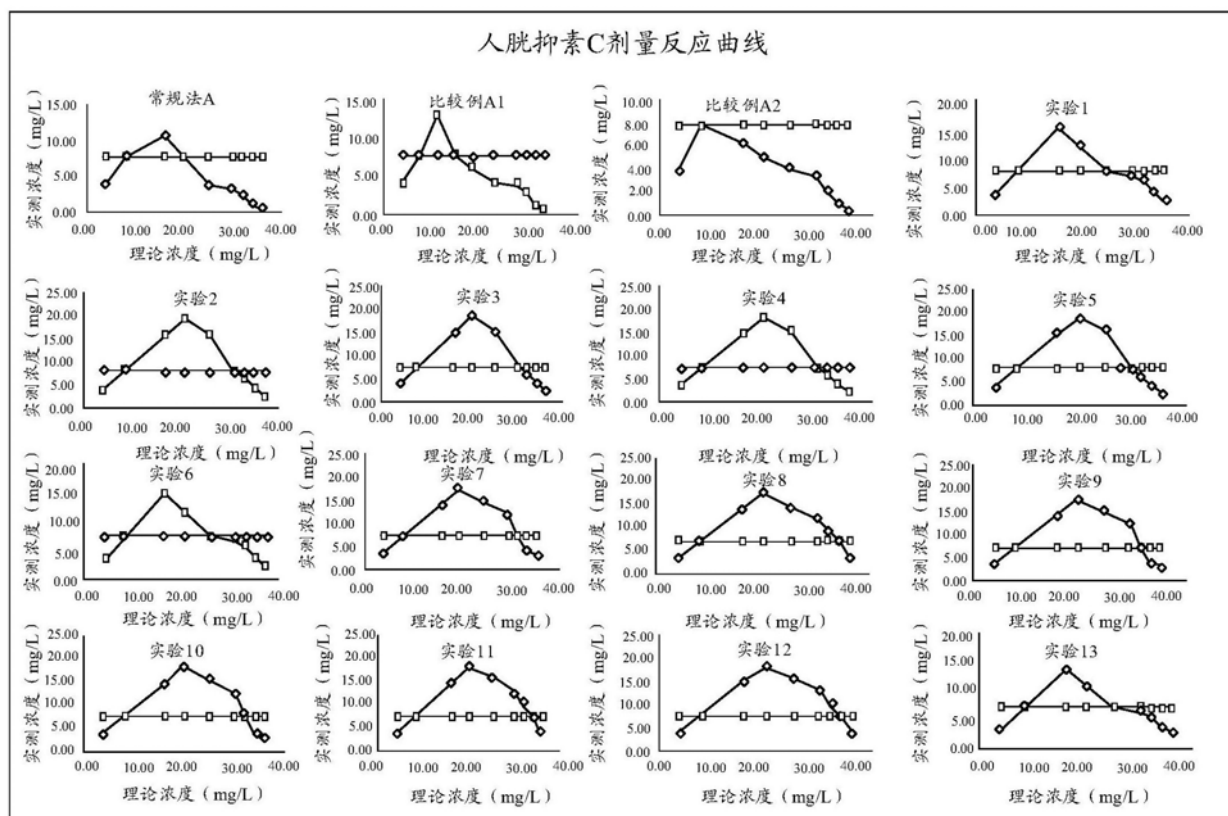


图3(a)

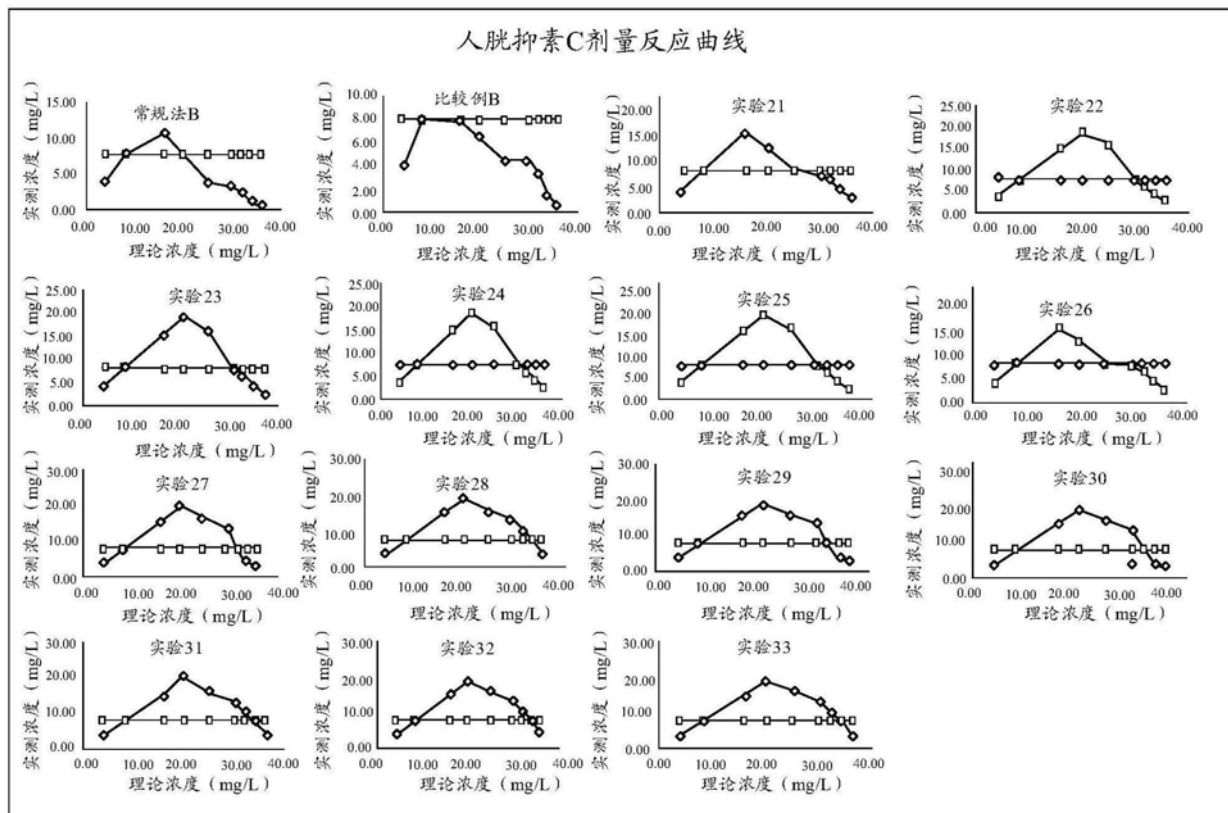


图3(b)

专利名称(译)	用于免疫检测的微球的制备方法		
公开(公告)号	CN108828209A	公开(公告)日	2018-11-16
申请号	CN201810694550.6	申请日	2018-06-29
[标]发明人	耿英利 马春霞 甘萍萍 吴昌英 龙腾镶		
发明人	耿英利 马春霞 甘萍萍 吴昌英 龙腾镶		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	陈万青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于免疫检测的微球的制备方法，该方法包括1)使用缓冲液稀释所述微球和待标记物；2)得到所述微球与待标记物的混合溶液；3)加入交联剂进行孵育；4)加入封闭剂封闭；其中，所述微球为羧基微球；步骤1)中的缓冲液的pH为6.3~9.5。本发明还涉及由该方法制备得到的微球及含有该微球的试剂盒。

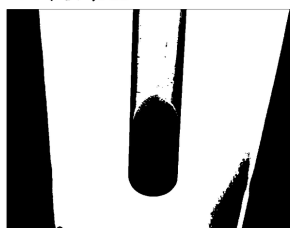
实验4



常规法A



比较例A1



比较例A2

