



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111122851 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201811290671.0

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2018.10.31

(71)申请人 博阳生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试
验区蔡伦路88号1幢三楼、五楼

申请人 科美诊断技术股份有限公司

(72)发明人 章春奇 金鑫 赵卫国 刘宇卉

李临 其他发明人请求不公开姓名

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限
公司 11372

代理人 刘建军 吴大建

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页

(54)发明名称

一种抗干扰剂的制备方法及由此方法制备
的抗干扰剂的应用

(57)摘要

本发明涉及一种抗干扰剂的制备方法及由此方法制备的抗干扰剂的应用。本发明提供的抗干扰剂的制备方法中,所述抗干扰剂包含载体和填充于所述载体中的活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子能够与生物素分子特异性结合,所述方法包括:步骤S1,使载体与活性分子进行接触。本发明制备的抗干扰剂用在化学发光免疫检测分析能够消除生物素干扰的问题。

1. 一种抗干扰剂的制备方法,其中,所述抗干扰剂包含载体和填充于所述载体中的活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子能够与生物素分子特异性结合,所述方法包括:步骤S1,使载体与活性分子进行接触。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述接触在第一缓冲液体系中进行。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述方法还包括步骤S0:用第二缓冲液体系将载体进行清洗,步骤S0在步骤S1之前进行。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括步骤S2:除去未填充到载体中的活性分子,步骤S2在步骤S1之后进行。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,通过向步骤S1处理后的载体中加入第三缓冲液体系,然后进行固液分离,以除去未填充到载体中的活性分子。

6. 根据权利要求2-5中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。

7. 根据权利要求3-6中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。

8. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其特征在于,所述第三缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。

9. 根据权利要求2-8中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

10. 根据权利要求3-9中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

11. 根据权利要求5-10中任一项所述的方法,其特征在于,所述第三缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂、3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂和三羟甲基氨基甲烷中的一种或多种。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述第三缓冲液体系还包含表面活性剂。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,所述表面活性剂包含选自Tween-20、Tween-80、Triton X-405、Triton X-100、BRIJ 35和Pluronic L64中的一种或多种。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其特征在于,所述接触的温度为0-50℃,优选20-40℃;和/或,接触的时间为6-24小时,优选为8-12小时。

15. 根据权利要求2-5中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。

16. 根据权利要求3-5或15中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,

最优选6.0。

17. 根据权利要求5或15-16中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述第三缓冲液体系的pH值为3.0至7.0, 优选3.5至6.8, 更优选4.0至6.5, 再优选5.0至6.4, 进一步优选5.5至6.3, 最优选6.0。

18. 根据权利要求2-5或15中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述第一缓冲液体系包含选自2-吗啉代乙磺酸缓冲剂和磷酸盐缓冲剂中的一种或多种。

19. 根据权利要求3-5或15-16中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述第二缓冲液体系包含选自2-吗啉代乙磺酸缓冲剂和磷酸盐缓冲剂中的一种或多种。

20. 根据权利要求5或15-17中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述第三缓冲液体系包含选自2-吗啉代乙磺酸缓冲剂和磷酸盐缓冲剂中的一种或多种。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其特征在于, 所述第三缓冲液体系还包含表面活性剂。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其特征在于, 所述表面活性剂包含选自Tween-20、Tween-80、Triton X-405、Triton X-100、BRIJ 35和Pluronic L64中的一种或多种。

23. 根据权利要求1-5或15-22中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述接触的温度为0-50℃, 优选20-40℃; 和/或, 接触的时间为1-10小时, 优选为2-6小时。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述抗干扰剂能够识别游离生物素分子和生物素标记物。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述抗干扰剂能够选择性吸附游离生物素分子。

26. 根据权利要求24或25所述的方法, 其特征在于, 所述游离生物素分子能够扩散到所述载体中, 并与其中的所述活性分子特异性结合。

27. 根据权利要求24-26中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述生物素标记物是生物素与生物大分子的偶联物, 其中所述生物大分子选自蛋白质分子、核酸分子、多糖分子和脂类分子, 优选为蛋白质分子。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其特征在于, 所述蛋白质分子选自抗原和/或抗体; 其中, 所述抗原是指具有免疫原性的物质; 所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

29. 根据权利要求1-28中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述抗干扰剂能够限制比所述活性分子尺寸更大的生物大分子进入其载体之中。

30. 根据权利要求1-29中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述抗干扰剂能够在液相反应体系中均匀分布。

31. 根据权利要求1-30中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述载体的内表面积大于其外表面积; 优选地, 所述载体的内表面积为其外表面积的5倍以上, 优选为10倍以上, 更优选为20倍以上。

32. 根据权利要求1-31中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述载体的粒径为15-300nm, 优选为30-250nm, 更优选为50-200nm。

33. 根据权利要求1-32中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述载体的比表面积为200m²/g以上, 优选为400m²/g以上, 更优选为600m²/g以上, 最优选为1000m²/g以上。

34. 根据权利要求1-33中任意一项所述的方法,其特征在于,所述载体的最小孔隙率大于40%,优选大于50%,更优选大于60%。

35. 根据权利要求1-34中任意一项所述的方法,其特征在于,所述多孔介质选自多孔金属材料、多孔非金属材料和多孔高分子材料中的一种或多种。

36. 根据权利要求1-35中任意一项所述的方法,其特征在于,所述载体为介孔微球,优选为有序介孔微球。

37. 根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述介孔微球的孔径为2-50nm,优选为4-30nm,更优选为5-15nm。

38. 根据权利要求35或36所述的方法,其特征在于,所述介孔微球为笼状中空介孔微球。

39. 根据权利要求36-38中任意一项所述的方法,其特征在于,所述介孔微球选自 Al_2O_3 介孔材料、 WO_3 介孔材料、 TiO_2 介孔材料、 ZrO_2 介孔材料、硅基介孔材料和/或介孔碳材料中的至少一种,优选选自硅基介孔材料。

40. 根据权利要求1-39中任意一项所述的方法,其特征在于,所述活性分子选自亲和素和/或链霉亲和素。

41. 根据权利要求1-40中任意一项所述的方法,其特征在于,所述活性分子通过物理吸附,或直接或间接化学交联的方式填充于所述载体之中。

42. 根据权利要求1-41任意一项所述的方法,其特征在于,所述载体内表面修饰有化学基团,所述活性分子通过与所述化学基团的共价偶联而填充于所述载体之中;其中,所述化学基团选自羧基、醛基、氨基、巯基和羟基中的一种或多种。

43. 根据权利要求1-42中任意一项所述的方法,其特征在于,所述载体内表面连接有生物素分子,所述活性分子通过与生物素分子的特异结合作用而填充于所述载体之中。

44. 根据权利要求1-43中任意一项所述的方法,其特征在于,还包括步骤S3,加入第四缓冲体系,优选所述第四缓冲体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

45. 根据权利要求1-44中任意一项所述的方法,其特征在于,所述载体以及填充在所述载体中的活性分子在抗干扰剂中的总浓度为5-50ug/mL,优选8-30ug/mL,更优选10-20ug/mL。

46. 如权利要求1-45中任意一项所述的方法制备的抗干扰剂在化学发光免疫分析中的应用。

一种抗干扰剂的制备方法及由此方法制备的抗干扰剂的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种抗干扰剂的制备方法及由此方法制备的抗干扰剂的应用。

背景技术

[0002] 生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin-System,BAS)是70年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。BAS系统具有高亲和力,灵敏度高,稳定性高等优点的信号放大标记技术。结合二者即可偶联抗原抗体等大分子生物活性物质。它们的结合迅速、专一、稳定,并具有多级放大效应。目前BAS系统主要应用于免疫学,分子生物学等领域。在体外诊断的实际应用中更是具有巨大的优越性,该法最大的缺点是有生物素的干扰,造成检测的误差。

[0003] 生物素干扰可能产生假阳性,也可能产生假阴性。一般来说,夹心法产生假阴性,竞争法产生假阳性。目前常见解决方法:1.更换非使用亲和素-生物素系统的平台;2.停用相关药物/食物后隔日或一周后重测;3.样本预处理:链霉抗生物素蛋白包被的微粒去除样品中的生物素。

[0004] 但是,目前还没有一种方法在亲和素-生物素系统中能够很好地解决生物素干扰的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的不足提供一种抗干扰剂,其在化学发光免疫分析中能够很好地解决生物素干扰的问题。

[0006] 为了实现上述目的,本发明第一个方面提供了一种抗干扰剂的制备方法。

[0007] 在上述方法的一些实施方式中,所述抗干扰剂包含载体和填充于所述载体中的活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子能够与生物素分子特异性结合,所述方法包括:步骤S1,使载体与活性分子进行接触。

[0008] 在上述方法的一些实施方式中,所述接触在第一缓冲液体系中进行。

[0009] 在上述方法的一些实施方式中,所述方法还包括步骤S0:用第二缓冲液体系将载体进行清洗,步骤S0在步骤S1之前进行。

[0010] 在上述方法的一些实施方式中,所述方法还包括步骤S2:除去未填充到载体中的活性分子,步骤S2在步骤S1之后进行。

[0011] 在上述方法的一些实施方式中,通过向步骤S1处理后的载体中加入第三缓冲液体系,然后进行固液分离,以除去未填充到载体中的活性分子。

[0012] 在上述方法的一些实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在上述方法的另外一些实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。

[0013] 在上述方法的一些实施方式中,所述第二缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至

8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在上述方法的另外一些实施方式中,所述第二缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。

[0014] 在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在上述方法的另外一些实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。

[0015] 在上述方法的一些实施方式中,所述第一缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂、3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

[0016] 在上述方法的一些实施方式中,所述第二缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、(4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂、3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

[0017] 在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、(4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂、3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂、三羟甲基氨基甲烷中的一种或多种。

[0018] 在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系还包含表面活性剂。

[0019] 在上述方法的一些实施方式中,所述表面活性剂包含选自吐温-20、Tween-80、Triton X-405、Triton X-100、BRIJ 35和Pluronic L64中的一种或多种。

[0020] 在上述方法的一些实施方式中,所述接触的温度为0-50℃,优选20-40℃;和/或,接触的时间为6-24小时,优选为8-12小时。

[0021] 在上述方法的一些实施方式中,所述表面活性剂包含选自吐温-20 (Tween-20)、Tween-80、Triton X-405、Triton X-100、BRIJ 35、Pluronic L64中的一种或多种。

[0022] 在上述方法的一些实施方式中,所述接触的温度为0-50℃,优选20-40℃;和/或,接触的时间为1-10小时,优选为2-6小时。

[0023] 在上述方法的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够识别游离生物素分子和生物素标记物。

[0024] 在上述方法的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够选择性吸附游离生物素分子。

[0025] 在上述方法的一些实施方式中,所述游离生物素分子能够扩散到所述载体中,并与其中的所述活性分子特异性结合。

[0026] 在上述方法的一些实施方式中,所述生物素标记物是生物素与生物大分子的偶联物,其中所述生物大分子选自蛋白质分子、核酸分子、多糖分子和脂类分子,优选为蛋白质分子。

[0027] 在上述方法的一些实施方式中,所述蛋白质分子选自抗原和/或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质;所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0028] 在上述方法的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够限制比所述活性分子尺寸更大的生物大分子进入其载体之中。

[0029] 在上述方法的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够在液相反应体系中均匀分布。

[0030] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体的内表面积大于其外表面积;优选地,所述载体的内表面积为其外表面积的5倍以上,优选为10倍以上,更优选为20倍以上。

[0031] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体的粒径为15-300nm,优选为30-250nm,更优选为50-200nm。

[0032] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体的比表面积为 $200\text{m}^2/\text{g}$ 以上,优选为 $400\text{m}^2/\text{g}$ 以上,更优选为 $600\text{m}^2/\text{g}$ 以上,最优选为 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 以上。

[0033] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体的最小孔隙率大于40%,优选大于50%,更优选大于60%。

[0034] 在上述方法的一些实施方式中,所述多孔介质选自多孔金属材料、多孔非金属材料和多孔高分子材料中的一种或多种。

[0035] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体为介孔微球,优选为有序介孔微球。

[0036] 在上述方法的一些实施方式中,所述介孔微球的孔径为2-50nm,优选为4-30nm,更优选为5-15nm。

[0037] 在上述方法的一些实施方式中,所述介孔微球为笼状中空介孔微球。

[0038] 在上述方法的一些实施方式中,所述介孔微球选自 Al_2O_3 介孔材料、 WO_3 介孔材料、 TiO_2 介孔材料、 ZrO_2 介孔材料、硅基介孔材料和/或介孔碳材料中的至少一种,优选选自硅基介孔材料。

[0039] 在上述方法的一些实施方式中,所述活性分子选自亲和素和/或链霉亲和素。

[0040] 在上述方法的一些实施方式中,所述活性分子通过物理吸附,或直接或间接化学交联的方式填充于所述载体之中。

[0041] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体内表面修饰有化学基团,所述活性分子通过与所述化学基团的共价偶联而填充于所述载体之中;其中,所述化学基团选自羧基、醛基、氨基、巯基和羟基中的一种或多种。

[0042] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体内表面连接有生物素分子,所述活性分子通过与生物素分子的特异结合作用而填充于所述载体之中。

[0043] 在上述方法的一些实施方式中,还包括步骤S3,加入第四缓冲体系。优选地,所述第四缓冲体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

[0044] 在上述方法的一些实施方式中,所述载体以及填充在所述载体中的活性分子在抗干扰剂中的总浓度为5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选8-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,更优选10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0045] 在本发明的第二个方面,提供了上述制备方法制备的抗干扰剂在化学发光免疫分析中的应用。

[0046] 本发明的有益效果为:

[0047] 1、本发明的制备方法通过将活性分子如SA或avidin蛋白质分子等作为“客体分子”,以恰当方式填充于多孔介质的孔内,形成“介孔组装主客体”体系,从而可以作为免疫反应中抗生物素干扰的新型功能材料。

[0048] 2、本发明制备的抗干扰剂可以有效区分游离生物素分子与生物素标记物,从而达到去干扰目的。

[0049] 3、本发明制备的抗干扰剂用于化学发光免疫分析中,能够消除游离生物素的干

扰,避免了免疫测定中的假阳性和/或假阴性结果。

[0050] 4、本发明制备的抗干扰剂还具有实用性和通用性,可以在不同的技术平台上应用,对试剂的性能影响小。

具体实施方式

[0051] 为使本发明容易理解,下面将详细说明本发明。但在详细描述本发明前,应当理解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解,本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式,而并不表示限制性的。

[0052] 在提供了数值范围的情况下,应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围中的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中,并且也涵盖在本发明内,服从规定范围中任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下,排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0053] 除非另有定义,本文中使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用,但是现在描述了优选的方法和材料。

[0054] I. 术语

[0055] 本发明所使用的术语“载体”是指能载带活性分子共同参与化学或物理过程的物质。本发明对载体的化学成分没有特别的限制,可以是有机材质的、也可以无机材质的,如高分子聚合物、金属、玻璃、矿物盐、硅藻、磷脂囊泡、硅颗粒、微晶染料等等。

[0056] 本发明所使用的术语“多孔介质”是指由固体物质组成的骨架和由骨架分隔成大量密集成群的微小空隙所构成的物质。

[0057] 本发明所使用的术语“活性分子”是指具有与生物素分子特异性结合能力的分子。示例性的活性分子为亲和素和链霉亲和素。

[0058] 本发明所使用的术语“特异性结合”是指两种物质之间的相互辨别和选择性结合反应,从立体结构角度上说就是相应的反应物之间构象的对应性。

[0059] II. 具体实施方案

[0060] 下面将更详细地说明本发明。

[0061] 本发明通过将能够与生物素分子特异性结合的活性分子作为“客体分子”,以恰当方式填充于载体之中,形成“介孔组装主客体”体系,从而可以用于化学发光免疫检测,以减少检测体系中游离生物素的干扰,进而避免因游离生物素造成的假阳性或假阴性结果。

[0062] 在本发明提供的抗干扰剂的制备方法中,所述抗干扰剂包含载体和填充于所述载体中的活性分子,所述载体为多孔介质,所述活性分子能够与生物素分子特异性结合,所述方法包括:步骤S1,使载体与活性分子进行接触。根据本发明,“活性分子填充于载体之中”是指活性分子位于载体中的空隙中,可以与骨架接触,也可以与骨架不接触。

[0063] 根据一些具体实施方式,所述接触在第一缓冲液体系中进行。在上述方法的一些实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、9.0等。

[0064] 在上述方法的另外一些实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6等。

[0065] 根据一些具体实施方式,所述方法还包括步骤S0:用第二缓冲液体系将载体进行清洗,步骤S0在步骤S1之前进行。在上述方法的一些实施方式中,所述第二缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、9.0等。在上述方法的另外一些实施方式中,所述第二缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。在该实施方式中,所述第一缓冲液体系的pH值的示例包括3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6等。

[0066] 根据一些具体实施方式,所述方法还包括步骤S2:除去未填充到载体中的活性分子,步骤S2在步骤S1之后进行。优选地,通过向步骤S1处理后的载体中加入第三缓冲液体系,然后进行固液分离,以除去未填充到载体中的活性分子。

[0067] 在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值为7.0至9,优选7.1至8.0,更优选7.2至7.8,再优选7.3至7.7,进一步优选7.35至7.50,最优选7.40。在该实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值的示例包括7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、9.0等。在上述方法的另外一些实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值为3.0至7.0,优选3.5至6.8,更优选4.0至6.5,再优选5.0至6.4,进一步优选5.5至6.3,最优选6.0。在该实施方式中,所述第三缓冲液体系的pH值的示例包括3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6等。

[0068] 在上述方法的一些实施方式中,所述第一缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂、3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。在上述方法的一些实施方式中,所述第二缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

[0069] 在上述方法的一些实施方式中,所述第三缓冲液体系还包含表面活性剂。根据一些实施例,所述表面活性剂包含选自吐温-20、Tween-80、Triton X-405、Triton X-100、BRIJ 35和Pluronic L64中的一种或多种。根据一些实施例,所述表面活性剂包含吐温-20。

[0070] 在上述方法的一些实施方式中,步骤S1中,所述接触的温度为0-50℃,优选20-40℃,例如25-30℃(即室温);和/或,接触的时间为6-24小时,优选为8-12小时,例如8小时、9小时、10小时、11小时、12小时等。在上述方法的一些另一些实施方式中,所述接触的温度为0-50℃,优选20-40℃,例如25-30℃(即室温);和/或,接触的时间为1-10小时,优选为2-6小时、例如2小时、3小时、4小时、5小时、6小时等。

[0071] 在上述方法的一些实施方式中,还包括步骤S3,加入第四缓冲体系。优选地,所述

第四缓冲体系包含选自磷酸盐缓冲剂、哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲剂、3-吗啉丙磺酸缓冲剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲剂和3-(羟乙基哌嗪)-2-羟基丙磺酸缓冲剂中的一种或多种。

[0072] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够识别游离生物素分子和生物素标记物。在本发明中,“识别”可以是指抗干扰剂中的活性分子与游离生物素分子和/或生物素标记物通过分子间作用力的协同作用达到相互结合。

[0073] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够选择性吸附游离生物素分子。在本发明中,“选择性吸附”可以是指游离生物素分子在载体中的空隙中(可以与骨架接触,也可以与骨架不接触)产生积累。

[0074] 在本发明的一些实施方式中,所述游离生物素分子能够扩散到所述载体中,并与其中的所述活性分子特异性结合。在本发明中,所述“扩散”可以是指由于分子的无规则运动而导致的游离生物素分子分散到载体中。

[0075] 在本发明的一些实施方式中,所述生物素标记物是生物素与生物大分子的偶联物,其中所述生物大分子选自蛋白质分子、核酸分子、多糖分子和脂类分子,优选为蛋白质分子。

[0076] 在本发明的一些实施方式中,所述蛋白质分子选自抗原和/或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质;所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0077] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够限制比所述活性分子尺寸更大的生物大分子进入其载体之中。

[0078] 在本发明的一些实施方式中,所述抗干扰剂能够在液相反应体系中均匀分布。

[0079] 在本发明的一些实施方式中,所述载体满足以下条件中的至少一个:a)载体的内孔有足够大的表面积(远超过载体表面积),并且空隙仅能让活性分子进入,但限制活性分子更大的蛋白质,比如抗体或大的抗原等;b)能将活性分子如SA或Avidin通过化学或物理吸附方法填充于载体中,例如空隙内部;c)载体能稳定地均匀分布在溶液(如水溶液)中,而不发生沉淀。

[0080] 在本发明的一些实施方式中,所述载体的内表面积大于其外表面积。优选地,所述载体的内表面积为其外表面积的5倍以上,优选为10倍以上,更优选为20倍以上。在本发明的一些优选实施方式中,所述载体的内表面积为其外表面积的倍数包括但不限于:5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、16倍、18倍、20倍、22倍、24倍、26倍、28倍或30倍。。

[0081] 在本发明的一些实施方式中,所述载体的比表面积为 $200\text{m}^2/\text{g}$ 以上,例如 $200\text{m}^2/\text{g}$ 、 $400\text{m}^2/\text{g}$ 、 $600\text{m}^2/\text{g}$ 、 $800\text{m}^2/\text{g}$ 、 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 、 $1200\text{m}^2/\text{g}$ 、 $1500\text{m}^2/\text{g}$ 等,优选为 $400\text{m}^2/\text{g}$ 以上,更优选为 $600\text{m}^2/\text{g}$ 以上,最优选为 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 以上。

[0082] 在本发明的一些实施方式中,所述载体的粒径为15-300nm,例如15nm、20nm、25nm、30nm、40nm、50nm、100nm、250nm、300nm等,优选为30-250nm,更优选为50-200nm。载体粒径过大,会造成载体沉降过快,不利于形成稳定的均匀溶液。

[0083] 在本发明的一些实施方式中,所述载体的最小孔隙率大于40%,优选大于50%,更优选大于60%。

[0084] 在本发明的一些实施方式中,所述多孔介质选自多孔金属材料、多孔非金属材料和多孔高分子材料中的一种或多种。

[0085] 在本发明的一些实施方式中,所述载体为介孔微球,优选为有序介孔微球。

[0086] 在本发明的一些实施方式中,所述介孔微球的孔径为2-50nm,例如2nm、5nm、10、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、50nm等,优选为4-30nm,更优选为5-15nm。

[0087] 在本发明的一些实施方式中,所述介孔微球为笼状中空介孔微球。

[0088] 在本发明的一些实施方式中,所述介孔微球选自 Al_2O_3 介孔材料、 WO_3 介孔材料、 TiO_2 介孔材料、 ZrO_2 介孔材料、硅基介孔材料和/或介孔碳材料中的至少一种,优选选自硅基介孔材料。

[0089] 硅基介孔材料是一类由 $\text{SiO}_2(\text{CH}_2)_2$ 四面体结构单元所构成的周期性介孔物质。介孔二氧化硅材料从微观上可以分为两类:一类是以二氧化硅干凝胶和气凝胶类为代表的无序介孔固体。无序介孔二氧化硅宏观上可以是粉体,块体,片状或者薄膜。另一类是以MCM41为代表的有序介孔二氧化硅。有序介孔二氧化硅的结构特点是孔径大小均匀,按六方有序排列,介孔孔径可以在2-10nm之间可调。由于其孔壁较薄,硅基单元交流度不高,水热稳定性不好。其比表面积可达 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 。还有SBA系列,HMM系列,TUD系列,FSM系列,KIT系列,CMK系列,FDU系列,starbon等。其中SBA-15研究也较多,材料的水热稳定性比MCM系列要好。孔径在5-30nm可调。HMM是球形的介孔材料,其孔径是4-15nm,外径20-80nm可调。

[0090] 在本发明的一些实施方式中,所述活性分子选自亲和素和/或链霉亲和素。亲和素是一种糖蛋白,可由蛋清中提取,其分子量约60kD,每个分子由4个亚基组成,可以和4个生物素分子紧密结合。所述亲和素包括但不限于:卵白亲和素、链亲和素、卵黄亲和素及类亲和素。链霉亲和素(SA)是与亲和素(A)有类似生物学特性的一种蛋白质,其是由Streptomyces avidin菌在培养过程中分泌的一种蛋白质产物,SA也可以通过基因工程手段生产。SA的分子量为65000,由4条序列相同的肽链构成,每条SA肽链可以结合1个生物素分子。因此与亲和素一样,每个SA分子也具有4个可与生物素分子结合位点,其结合常数与亲和素相同为 10^{15}mol/L 。

[0091] 在本发明的一些实施方式中,所述活性分子通过物理吸附方式填充于所述载体中。物理吸附也称范德华吸附,它是由吸附质和吸附剂分子间作用力所引起,此力也称作范德华力。

[0092] 在本发明的另一些实施方式中,所述活性分子通过在含有缓冲液的体系中与载体接触而填充于所述载体之中。

[0093] 在本发明的一些实施方式中,所述活性分子通过直接或间接化学交联的方式填充于所述载体之中。

[0094] 在本发明的一些实施方式中,所述载体内表面修饰有化学基团,所述活性分子通过与所述化学基团的共价偶联而填充于所述载体之中;其中,所述化学基团选自羧基($-\text{COOH}$)、醛基($-\text{CHO}$)、氨基($-\text{NH}_2$)、巯基($-\text{SH}$)和羟基($-\text{OH}$)中的一种或多种。

[0095] 在本发明的一些实施方式中,所述载体内表面连接有生物素分子,所述活性分子通过与生物素分子的特异结合作用而填充于所述载体之中。

[0096] 在本发明的一些实施方式中,所述载体以及填充在所述载体中的活性分子在抗干扰剂中的总浓度为5-50 $\mu\text{g/mL}$,例如5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、35 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、45 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 等,优选8-30 $\mu\text{g/mL}$,更优选10-20 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0097] 本发明第二个方面提供了如上所的方法制备的抗干扰剂在化学发光免疫分析中的应用。

[0098] III. 实施例

[0099] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0100] 试剂和仪器:

[0101] SA (Sigma Aldrich公司),羧基官能团化的硅基微球(粒径15-200nm,孔径2-15nm, Sigma Aldrich公司),磷酸盐缓冲液(0.02M PBS, pH 7.4),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDAC (Thermo fisher),Tween-20,0.1M MES缓冲液(pH 6.0),生物素(D-biotin),去激素血清,三碘甲状原氨酸(T3)试剂盒,(光激化学激光分析系统通用液GG-NA (感光珠溶液))。

[0102] LiCA HT(上海博阳生物科技有限公司),日立高速冷冻离心机。

[0103] 物理吸附方式制备本发明的抗干扰剂

[0104] 实施例1

[0105] 第一步,2mL离心管中,取10mg羧基官能团化的硅基微球(粒径15nm,孔径2nm),加入0.02M PBS (pH 7.4)的缓冲液,4℃离心10000rpm,15min清洗一次。

[0106] 第二步,加入200uL PBS缓冲液超声分散均匀,再加入150uL 10mg/mL SA的水溶液,补充PBS缓冲液至微球反应浓度20mg/mL,室温搅拌过夜。

[0107] 第三步,用含有0.5%Tween-20的0.02M PBS (pH 7.4)缓冲溶液将SA微球离心,4℃离心10000rpm,15min,清洗三次,去除未吸附的SA,最后用0.02M PBS (pH 7.4)缓冲液定容至10mg/mL。

[0108] 实施例2-7

[0109] 制备方法同实施例1,区别在于各实施例采用了不同粒径和/或孔径的羧基官能团化的硅基微球(参见表1)。

[0110] 共价偶联方式制备本发明的抗干扰剂

[0111] 实施例8 (共价偶联方式)

[0112] 第一步,2mL离心管中,取10mg羧基官能团化的硅基微球,用0.1M MES (pH 6.0)的缓冲溶液,4℃离心10000rpm,15min清洗一次。

[0113] 第二步,加入200uL 0.1M MES (pH 6.0)缓冲液超声分散均匀,再加入150uL 10mg/mL SA的水溶液,接着加入100uL 10mg/mL EDAC (0.1M MES)溶液,室温搅拌4h。

[0114] 第三步,用含有0.5%Tween-20的0.02M PBS (pH 7.4)缓冲溶液将SA微球离心清洗三次,去除未吸附的SA,最后用PBS缓冲液定容至10mg/mL。

[0115] 本发明抗干扰剂的效果评价一

[0116] 实验步骤:

[0117] 1.添加T3浓溶液于去激素血清中,配制成浓度为1nmol/L、2nmol/L的T3溶液。

[0118] 2.配制感光珠溶液40ug/mL,采用实施例1-7中制备的抗干扰剂配制不同浓度的溶液(用PBS稀释),见表1。

[0119] 3.添加Biotin于上述T3溶液中,配制成Biotin浓度为0,128ng/ml的样本溶液。

[0120] 4.加入25uL样本溶液,再依次加入T3试剂盒中的试剂一和试剂二各25uL按反应模式手工加入25uL样本及25uL试剂,再按照如下表1加入25uL步骤2制备的溶液,其中条件1、2

不加入抗干扰剂。

[0121] 5.放入LICA HT中,进行第一阶段温育:37℃温育17min。

[0122] 6.手工加入175ul感光珠溶液。

[0123] 7.进行第二阶段温育:37℃温育15min。

[0124] 8.读数。参见表2和3。

[0125] 表1

载体信息					Biotin 浓度
编号	粒径	孔径	浓度	比表面积	
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	128ng/mL
3 (实施例 1)	15 nm	2nm	5 ug/mL	200 m ² /g	128ng/mL
4 (实施例 2)	50 nm	5nm	5 ug/mL	400 m ² /g	128ng/mL
5 (实施例 3)	50 nm	10nm	5 ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
6 (实施例 4)	50 nm	10nm	10ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
7 (实施例 5)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
8 (实施例 5)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
9 (实施例 6)	150 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
10 (实施例 7)	200 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL

[0126]

表 2

表 3

1nmol/L T3,T3 试剂盒 1701 感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	242378	
2	25680	-89%
3	26755	-89%
4	64327	-73%
5	113522	-53%
6	179467	-26%
7	229875	-5%
8	220986	-9%
9	178621	-26%
10	144351	-40%

[0127]

2nmol/L T3,T3 试剂盒 1701 感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	138706	
2	9322	-93%
3	10026	-93%
4	36707	-74%
5	45006	-68%
6	98670	-29%
7	132557	-4%
8	124205	-10%
9	102145	-26%
10	92205	-34%

[0128] 数据分析:

[0129] 当T3浓度为1nM/L、Biotin浓度为128ng/mL时,信号下跌89%,生物素干扰较严重。加入孔径2nm的微球(条件3)时,信号几乎无明显变化,当采用粒径50nm,孔径5nm,10nm(条件4,5)时,信号出现一定的提升,下跌幅度50%-70%。

[0130] 当粒径和孔径不变时,提高抗干扰剂的浓度至10ug/mL(条件5和条件6对比),信号进一步提升,下跌幅度25%左右。当孔径10nm,浓度10ug/ml,增大微球粒径至100nm(条件6和条件7)时,下跌幅度偏差10%以内,生物素干扰现象消失。当浓度提高至20ug/ml(条件7和条件8)时,信号下跌偏差10%以内。当浓度20ug/mL不变,增大粒径和孔径时,信号出现一定程度下跌,下跌幅度20%-40%。

[0131] 实验结论:

[0132] 当填充SA的微球粒径100nm,孔径10nm,浓度10-20ug/mL时,抗生物素干扰能力最强。当孔径较小,2nm时,无抗生物素干扰能力。当粒径大于100nm,孔径10nm,继续增大粒径和孔径时,抗生物素干扰能力会下降。

[0133] 本发明抗干扰剂的效果评价二

[0134] 实验步骤:

[0135] 1.添加T3浓溶液于去激素血清中,配制成浓度为1nmol/L、2nmol/L的T3溶液。

[0136] 2.配制感光珠溶液40ug/mL,采用实施例5和8中制备的抗干扰剂配制不同浓度的溶液(用PBS稀释),见表4(用PBS稀释)10ug/mL、20ug/mL。

[0137] 3.添加Biotin于上述T3溶液中,配制成Biotin浓度为0、128ng/ml的样本溶液

[0138] 4.加入25ul样本溶液,再依次加入T3试剂盒中的试剂一和试剂二各25uL按反应模式手工加入25ul样本及25uL试剂,再按照如下表格加入25uL步骤2中制备的抗干扰剂,条件1和2不加入抗干扰剂。

[0139] 5.放入LICA HT中,进行第一阶段温育:37℃温育17min。

[0140] 6.手工加入175ul感光珠溶液。

[0141] 7.进行第二阶段温育:37℃温育15min。

[0142] 8.读数。见表5和6。

[0143] 表4

编号	载体信息				Biotin 浓度	结合方式
	粒径	孔径	浓度	比表面积		
1	0	0	0	0	0	-
2	0	0	0	0	128ng/mL	-
3(实施例5)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	物理
4(实施例5)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	吸附
5(实施例8)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	共价 偶联
6(实施例8)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL	

表 5

1nmol/L T3,T3 试剂盒 1701		
感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	258459	
2	25368	-90%
3	239848	-7%
4	231546	-10%
5	139665	-46%
6	172236	-33%

[0146]

表 6

2nmol/L T3,T3 试剂盒 1701		
感光珠溶液 40 ug/mL		
编号	信号	偏差
1	137715	
2	9744	-93%
3	131026	-5%
4	122596	-11%
5	75305	-45%
6	98424	-29%

[0147] 数据分析：

[0148] 从条件3和条件5对比，物理吸附方式制备的抗干扰剂的抗生物素干扰能力强，信号下跌10%左右，共价偶联方式制备的抗干扰剂的信号下跌50%左右。条件4和条件6对比，物理吸附方式制备的抗干扰剂抗生物素干扰能力也优于共价偶联的方式制备的抗干扰剂。

[0149] 实验结论：

[0150] 对于相同粒径，孔径，浓度，比表面积，物理吸附方式制备的抗干扰剂抗生物素干扰能力也优于共价偶联的方式制备的抗干扰剂。

[0151] 应当注意的是，以上所述的实施例仅用于解释本发明，并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述，但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇，而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改，以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例，但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例，相反，本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

专利名称(译)	一种抗干扰剂的制备方法及由此方法制备的抗干扰剂的应用		
公开(公告)号	CN111122851A	公开(公告)日	2020-05-08
申请号	CN201811290671.0	申请日	2018-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	金鑫 赵卫国 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
发明人	章春奇 金鑫 赵卫国 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76 G01N33/58		
代理人(译)	刘建军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种抗干扰剂的制备方法及由此方法制备的抗干扰剂的应用。本发明提供的抗干扰剂的制备方法中，所述抗干扰剂包含载体和填充于所述载体中的活性分子，所述载体为多孔介质，所述活性分子能够与生物素分子特异性结合，所述方法包括：步骤S1，使载体与活性分子进行接触。本发明制备的抗干扰剂用在化学发光免疫检测分析能够消除生物素干扰的问题。

编号	载体信息				Biotin
	粒径	孔径	浓度	比表面积	浓度
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	128ng/mL
3 (实施例 1)	15 nm	2nm	5 ug/mL	200 m ² /g	128ng/mL
4 (实施例 2)	50 nm	5nm	5 ug/mL	400 m ² /g	128ng/mL
5 (实施例 3)	50 nm	10nm	5 ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
6 (实施例 4)	50 nm	10nm	10ug/mL	600 m ² /g	128ng/mL
7 (实施例 5)	100nm	10nm	10 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
8 (实施例 5)	100nm	10nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
9 (实施例 6)	150 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL
10 (实施例 7)	200 nm	15nm	20 ug/mL	1000 m ² /g	128ng/mL