



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110441514 A

(43)申请公布日 2019. 11. 12

(21)申请号 201910527896.1

(22)申请日 2019.06.18

(71)申请人 北京利德曼生化股份有限公司

地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区  
兴海路5号

(72)发明人 胡国庆

(74)专利代理机构 北京思元知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11598

代理人 余光军

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

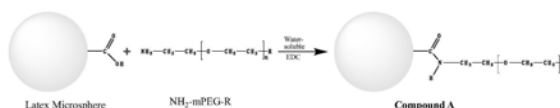
权利要求书4页 说明书11页 附图4页

## (54)发明名称

一种胶乳微球与抗体复合物的制备方法、产品及其应用

## (57)摘要

本发明公开了一种胶乳微球与抗体复合物的制备方法、产品及其应用。本发明提供两种制备方法,分别是“两步法”和“一步法”。“两步法”包括:1)羧基胶乳微球与氨基封端聚乙二醇衍生物支架进行反应,制得新型支架-羧基胶乳微球复合物;2)将步骤1)中制备完成的新型支架-羧基胶乳微球复合物与抗体进行反应,制得新型支架-羧基胶乳微球-抗体复合物。“一步法”包括:将抗体与高分子支架混合均匀,与合适粒径的羧基胶乳微球进行反应,制得新型支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液。采用本发明所提供的制备方法,能够大大增强试剂稳定性、改善校准品线性、大幅度节约生产成本,不仅提高试剂性能,而且降低成本,具有非常好的应用前景。



1. 一种通过“两步法”制备胶乳微球与抗体复合物的方法,其特征在于,所述的胶乳微球与抗体复合物为氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物,包括如下步骤:

1) 选用合适粒径的羧基胶乳微球与氨基封端聚乙二醇衍生物支架进行反应,制得氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物;

2) 将步骤1)中制备完成的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物与抗体进行反应,制得氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 制备氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物

1-1) 把0.1-1ml质量百分比分数浓度为5-10%的羧基胶乳微球加入5-10ml活化缓冲溶液A,将0.1mg-8mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)加入胶乳微球溶液中进行活化,磁力搅拌,混合均匀,得到EDC活化的羧基胶乳微球溶液;

1-2) 将0.01-8ml质量百分比分数浓度10%氨基封端聚乙二醇衍生物溶液加入到EDC活化的羧基胶乳微球溶液中,室温搅拌2-4小时,混合均匀;

1-3) 3000g-25000g离心处理,去除上清,用1-10ml活化缓冲溶液B进行超声复溶,换液重复3次,得到氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物溶液,以供后续使用;

2) 制备氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物

2-1) 向步骤1)制备的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物溶液中加入5-50mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和7.5-75mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)进行活化,磁力搅拌,混合均匀;

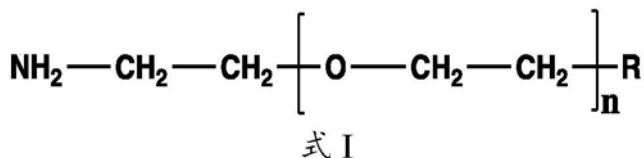
2-2) 用3000g-25000g离心处理10分钟,去除上清,用1-10ml偶联缓冲溶液进行超声复溶,换液重复3次,得到活化的复合物溶液;

2-3) 将活化的复合物溶液加入到1-20ml 0.25mg/ml单克隆抗体或者多克隆抗体溶液中,室温搅拌2-4小时后,混合均匀;

2-4) 将0.1-0.5ml封闭液加入步骤2-3)得到的混合物溶液中;

2-5) 室温搅拌1小时后,3000g-25000g离心处理,去除上清,用保护液进行超声复溶,重复3次换液,得到氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述步骤1)中所述的氨基封端聚乙二醇衍生物支架为单臂氨基封端聚乙二醇衍生物或多臂氨基封端聚乙二醇衍生物,所述的单臂氨基封端聚乙二醇衍生物的分子式如式I所示:

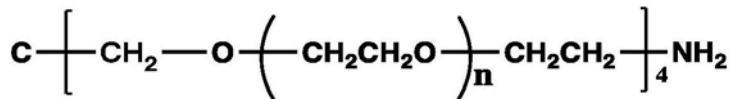


其中-R基为甲氧基(-OCH<sub>3</sub>)、羟基(-OH)、叠氮基(-N<sub>3</sub>)、醛基(-CHO)、丙烯酸酯基团(-COCHCH<sub>2</sub>)、甲基丙烯酸酯基团(-COCCCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、聚乳酸基团( $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-$ )、甲基氨基甲酸叔丁酯基团( $-\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ),单臂聚乙二醇衍生物分子量(Mn)从400到20000,优选的,单臂氨基封端聚乙二醇衍生物分子量为1000、2000、3400、5000、10000、20000,更优选的,所述的单臂氨基封

端聚乙二醇衍生物为甲氧基聚乙二醇胺、氨基聚乙二醇羟基、氨基聚乙二醇叠氮、氨基聚乙二醇醛基、氨基聚乙二醇丙烯酸酯、氨基聚乙二醇甲基丙烯酸酯或BOC-氨基聚乙二醇氨基；

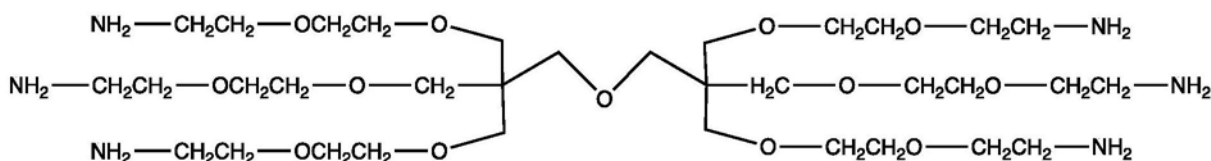
所述的多臂氨基封端聚乙二醇衍生物包括四臂氨基封端聚乙二醇衍生物、六臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物以及八臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物,多臂聚乙二醇衍生物氨基分子量(Mn)从2000到20000,优选的,多臂氨基封端聚乙二醇衍生物氨基分子量为2000、5000、10000、20000、40000;

其中,四臂氨基封端聚乙二醇衍生物的分子式如式II所示:



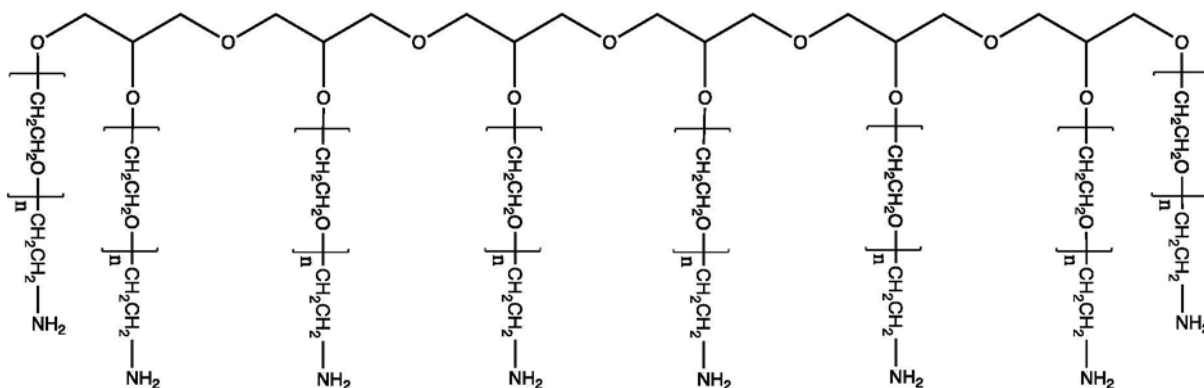
式 II

六臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物分子式如式III所示:



式 III

八臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物分子式如式IV所示:



式 IV。

4.如权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤1-1)中,羧基胶乳微球为聚苯乙烯微球,粒径范围从50-500nm,固含量5%-10%,表面电荷密度0.025-0.5meq/g,优选的,粒径范围为70-420nm,表面电荷密度0.043-0.325meq/g,活化缓冲溶液A为MES缓冲溶液,浓度为0.01-0.1M,pH为4.5-6.5;步骤1-3)中,活化缓冲溶液B为MES、MOPs或PBS缓冲溶液,浓度为0.01-0.1M,pH为4.5-6.5;步骤2-1)中,EDC和NHS或Sulfo-NHS的质量比为1:1.5,EDC与氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物的质量比为1:20到10:1;步骤2-2)中,偶联缓冲溶液为PBS缓冲溶液、MES缓冲溶液、MOPs缓冲溶液、硼酸缓冲溶液或TAPs缓冲溶液,浓度为10-100mM,pH为5.5-7.8;步骤2-3)中,单克隆抗体和多克隆抗体为羊单抗、鼠单抗、兔单抗、人单抗、驴单抗、马单抗、羊多抗、兔多抗、鼠多抗、人多抗、驴多抗、马多抗,优选的抗体为羊抗肌红蛋白(MYO)单克隆抗体,抗体与氨基封端聚乙二醇衍生物-羧基胶乳微球复合物的质量比为1:1000-1:20;步骤2-4)中,封闭液为TRIS-HCl或甘氨酸缓冲体系,浓度为5-1000mM,其中含有牛血清白蛋白的浓度为0.02-5%w/v,硫柳汞的浓度为0.2-1g/L;步骤2-

5) 中, 保护液为PBS、TAPs、MOPs、BB或TRIS-HCl缓冲体系, pH=5.5-8.5, 浓度为10-100mM, 其中含有海藻糖浓度为1-15%w/v, 甘露醇浓度为2-10%w/v, 牛血清白蛋白的浓度为0.1-4%w/v, TWEEN-80浓度为0.01-0.05%w/v, 硫柳汞的浓度为0.2-1g/L。

5. 一种通过“一步法”制备胶乳微球与抗体复合物的方法, 其特征在于, 所述的胶乳微球与抗体复合物为高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物, 包括如下步骤: 将抗体与高分子支架混合均匀, 与合适粒径的羧基胶乳微球进行反应, 制得高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液。

6. 如权利要求5所述的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 把0.1-1ml质量百分比分数浓度为5-10%的羧基胶乳微球加入到5-10ml pH=5.5-6.5的活化缓冲溶液B中, 混合均匀, 随后加入5-50mg1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和7.5-75mgN-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或7.5-75mg N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)进行活化, 磁力搅拌, 混合均匀;

2) 用3000g-25000g离心处理10分钟, 去除上清, 用pH=6-8的偶联缓冲溶液进行超声复溶, 换液重复3次, 得到活化的羧基胶乳微球溶液;

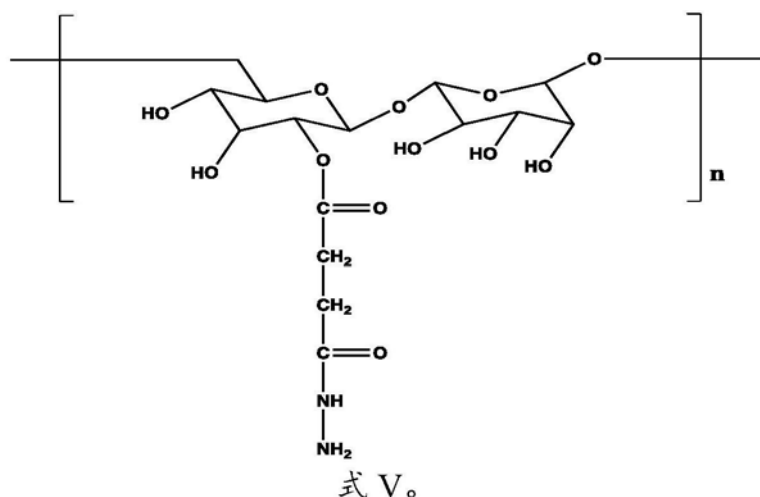
3) 将1-20ml0.25mg/ml单克隆抗体或者多克隆抗体溶液和0.1-10ml2%w/v高分子支架溶液加入到活化的羧基胶乳微球溶液中, 室温搅拌2-4小时, 混合均匀;

4) 将0.1-0.5ml封闭液加入步骤3)得到的混合物溶液中;

5) 室温搅拌1小时后, 3000g-25000g离心处理, 去除上清, 用保护液进行超声复溶, 重复3次换液, 得到高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液。

7. 如权利要求6所述的方法, 其特征在于, 步骤1)中, 羧基胶乳微球为聚苯乙烯微球, 粒径范围从50-500nm, 固含量5%-10%, 表面电荷密度0.025-0.5meq/g, 优选的, 粒径为320nm, 固含量10%, 表面电荷密度为0.043meq/g; EDC和NHS或Sulfo-NHS的质量比为1:1.5, EDC与羧基胶乳微球的质量比为1:20到10:1; 活化缓冲溶液B为MES、MOPs、PBS缓冲溶液, 浓度为0.01-0.1M, pH为4.5-6.5; 步骤2)中, 偶联缓冲溶液为PBS缓冲溶液、MES缓冲溶液、MOPs缓冲溶液、硼酸缓冲溶液、TAPs缓冲溶液, 浓度为10-100mM, pH为5.5-7.8; 步骤3)中, 单克隆抗体和多克隆抗体为羊单抗、鼠单抗、兔单抗、人单抗、驴单抗、马单抗、羊多抗、兔多抗、鼠多抗、人多抗、驴多抗、马多抗, 优选的, 抗体为羊抗肌红蛋白(MYO)单克隆抗体; 步骤4)中, 封闭液为TRIS-HCl或甘氨酸缓冲体系, 浓度为5-1000mM, 其中含有牛血清白蛋白的浓度为0.02-5%w/v, 硫柳汞的浓度为0.2-1g/L; 步骤5)中, 保护液为PBS、TAPs、MOPs、BB、TRIS-HCl等缓冲体系, pH=5.5-8.5, 浓度为10-100mM, 其中含有海藻糖浓度为1-15%w/v, 甘露醇浓度为2-10%w/v, 牛血清白蛋白的浓度为0.1-4%w/v, TWEEN-80浓度为0.01-0.05%w/v, 硫柳汞的浓度为0.2-1g/L。

8. 如权利要求5或6所述的方法, 其特征在于, 所述步骤3)中所述的高分子支架为单臂氨基封端聚乙二醇衍生物、多臂氨基封端聚乙二醇衍生物、氨基修饰葡聚糖(Dextran-Amine)、链霉亲和素、牛血清白蛋白、酪蛋白、卵清蛋白, 其中, 单臂氨基封端聚乙二醇衍生物、多臂氨基封端聚乙二醇衍生物的限定范围与权利要求3中相同; 氨基修饰葡聚糖的分子结构式如式V所示, 其分子量从6kDa-2000kDa, 优选的, 氨基修饰葡聚糖的分子量有6kDa、10kDa、20kDa、40kDa、70kDa、100kDa、200kDa、500kDa、2000kDa, 所述高分子支架与羧基胶乳微球质量比为1:100到80:1;



9. 一种胶乳微球与抗体复合物,其特征性在于,所述的胶乳微球与抗体复合物是由权利要求1-4任一项所述的方法制备得到的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物,或是由权利要求5-8任一项所述的方法制备得到的高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物。

10. 权利要求9所述的胶乳微球与抗体复合物在制备胶乳增强免疫比浊法检测试剂中的用途。

11. 一种免疫比浊试剂盒,含有R1试剂以及R2试剂,其特征在于,所述的R2试剂中含有由权利要求1-4任一项所述的方法制备得到的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液,或是由权利要求5-8任一项所述的方法制备得到的高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液。

12. 如权利要求11所述的免疫比浊试剂盒,其特征在于,所述的R1试剂为10-1000mmol/L的碳酸钠-碳酸氢钠(CB)、PBS、MES、TRIS-HCl、甘氨酸-盐酸、甘氨酸-强氧化钠、MOPs或TAPs缓冲溶液,pH=3.5-8.7,其中含有牛血清白蛋白的浓度为0.2-5%w/v,酪蛋白的浓度为0.02-5%w/v,硫柳汞的浓度为0.01-0.5%w/v,TWEEN-20的浓度为0.02-0.2%w/v,PEG8000的浓度为0.3-5%w/v,氯化钠的浓度为150-2000mmol/L,异嗜性抗体阻断剂浓度为0.02-2mg/ml,优选的,所述的R1试剂为含有2%w/v牛血清白蛋白、0.2%w/v酪蛋白、0.1%w/v硫柳汞、0.05%w/vTWEEN-20、4%w/vPEG8000、150mM氯化钠以及0.1%w/v异嗜性抗体阻断剂的25mM MES缓冲溶液;优选的,所述的试剂盒还包括校准品稀释液,所述的校准品稀释液为10-200mmol/L的MES、MOPs、TAPs、BB、PBS、CB、TRIS-HCl、甘氨酸-氢氧化钠缓冲体系,pH=4.5-8,其中含有蛋白保护剂为0.01-0.5%w/v,蔗糖浓度为0.2-15%w/v,甘露醇浓度为1-10%w/v,硫柳汞浓度为0.02-0.2%w/v,氯化钠浓度为150-2000mmol/L,TWEEN-80浓度为0.01-0.1%w/v,优选的,所述的校准品稀释液为含有5%w/v牛血清白蛋白、0.1%w/v蛋白保护剂、8%w/v蔗糖、3%w/v甘露醇、0.1%w/v硫柳汞、150mM氯化钠、0.05%w/vTWEEN-80的100mM的甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液。

## 一种胶乳微球与抗体复合物的制备方法、产品及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶乳微球与抗体复合物的制备方法、产品及其应用,本发明属于体外诊断技术领域。

### 背景技术

[0002] 胶乳增强免疫比浊法(latex-enhanced immunoturbidimetry)是近年开发的一种比较稳定、准确的均相液体蛋白免疫比浊检测方法,用于体外诊断检测。乳胶增强免疫比浊法通过在羧基胶乳微球表面偶联单克隆抗体或者多克隆抗体,然而当抗原与交联有抗体的胶乳微球结合后,在短时间内迅速聚集在一起,形成一定结构的复合物,改变了反应液的吸光度。而且吸光度的改变与被测抗原的浓度有较强的相关性,在特定的范围内反映被测抗原的浓度。因此,利用抗原和抗体的特异性结合形成的一定结构的复合物,通过检测复合物形成量用于对抗原进行定量检测。

[0003] 目前,胶乳增强免疫比浊法所使用的胶乳微球多为聚苯乙烯微球,包括羧基化胶乳微球、氨基化胶乳微球、甲苯磺酰基胶乳微球、醛基化胶乳微球等。通常对胶乳微球表面官能团进行修饰,与抗体通过共价键的形式结合,一方面提高与抗体的结合率,第二方面为提供了合适的三维结构与抗原进行结合,提升检测的敏感性和特异性。胶乳微球通常是纳米级粒子尺寸,属于原子簇和宏观体系过度区域,具有高比表面积的特性,加速吸附平衡的时间和吸附平衡的稳定性。大大增加了免疫比浊法在临床的广泛应用,胶乳增强免疫比浊法广泛应用于特种蛋白、肿瘤标志物等方面的检测,是非常实用的免疫测定技术。

[0004] 随着体外诊断技术的发展,对试剂的质量要求越来越高,并且市场竞争压力越来越激烈,因此开发质量更高、成本节约型试剂成为本领域从业者所追求的目标。传统改善试剂性能的方法通常采用更换抗体厂家,更换微球大小,选用不同缓冲体系等,改善幅度很有限,并且会大大增加试剂的生产成本。

[0005] 因此,本发明提出了一种新型的胶乳微球与抗体复合物的制备方法,不仅能够满足试剂性能检测要求,而且能够降低生产试剂的成本,在胶乳增强免疫比浊法检测领域将具有广阔的应用前景。

### 发明内容

[0006] 鉴于传统胶乳微球抗体复合物制备的局限性,本发明的目的是提供一种新型胶乳微球抗体复合物的制备方法,以达到降低抗体使用量,降低成本,大幅度改善线性和增加稳定性的目的,用于解决传统胶乳微球抗体复合物线性差,不稳定和成本高问题。

[0007] 为了实现上述目的及其相关目的,本发明采用了以下技术手段:

[0008] 一方面,本发明提供了一种通过“两步法”制备胶乳微球与抗体复合物的方法,所述的胶乳微球与抗体复合物为氨基封端聚乙二醇衍生物支架(NH<sub>2</sub>-mPEG-R)-羧基胶乳微球-抗体复合物,包括如下步骤:

[0009] 1) 选用合适粒径的羧基胶乳微球与氨基封端聚乙二醇衍生物支架进行反应,制得

氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物；

[0010] 2) 将步骤1) 中制备完成的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物与抗体进行反应, 制得氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物。

[0011] 其中, 优选的, 所述的方法包括如下步骤:

[0012] 1) 制备氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物

[0013] 1-1) 把0.1-1ml 质量百分比分数浓度为5-10%的羧基胶乳微球加入5-10ml 活化缓冲溶液A, 将0.1mg-8mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 加入胶乳微球溶液中进行活化, 磁力搅拌, 混合均匀, 得到EDC活化的羧基胶乳微球溶液;

[0014] 1-2) 将0.01-8ml 质量百分比分数浓度10%氨基封端聚乙二醇衍生物溶液加入到EDC活化的羧基胶乳微球溶液中, 室温搅拌2-4小时, 混合均匀;

[0015] 1-3) 3000g-25000g 离心处理, 去除上清, 用1-10ml 活化缓冲溶液B进行超声复溶, 换液重复3次, 得到氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物 (Compound A) 溶液, 以供后续使用, 化学反应式如图1所示;

[0016] 2) 制备氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物

[0017] 2-1) 向步骤1) 制备的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物溶液中加入5-50mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和7.5-75mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 或N-羟基硫代琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS) 进行活化, 磁力搅拌, 混合均匀;

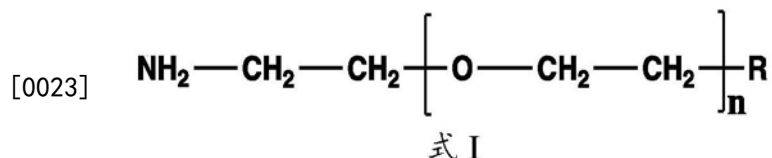
[0018] 2-2) 用3000g-25000g 离心处理10分钟, 去除上清, 用1-10ml 偶联缓冲溶液进行超声复溶, 换液重复3次, 得到活化的复合物溶液;

[0019] 2-3) 将活化的复合物溶液加入到1-20ml 0.25mg/ml 单克隆抗体或者多克隆抗体溶液中, 室温搅拌2-4小时后, 混合均匀;

[0020] 2-4) 将0.1-0.5ml 封闭液加入步骤2-3) 得到的混合物溶液中;

[0021] 2-5) 室温搅拌1小时后, 3000g-25000g 离心处理, 去除上清, 用保护液进行超声复溶, 重复3次换液, 得到氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物 (compound B) 溶液, 化学反应式如图2所示。

[0022] 其中, 优选的, 所述步骤1) 中所述的氨基封端聚乙二醇衍生物支架为单臂氨基封端聚乙二醇衍生物或多臂氨基封端聚乙二醇衍生物, 所述的单臂氨基封端聚乙二醇衍生物分子式如式I所示:



[0024] 其中-R基为甲氧基 (-OCH<sub>3</sub>)、羟基 (-OH)、叠氮基 (-N<sub>3</sub>)、醛基 (-CHO)、丙烯酸酯基团

(-COCHCH<sub>2</sub>)、甲基丙烯酸酯基团 (-COCCCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、聚乳酸基团  $\left(\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{O})\right)_n$ 、甲基氨基甲酸

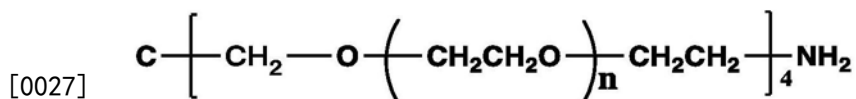
叔丁酯基团  $\left(\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\right)_n$ 、单臂聚乙二醇衍生物分子量 (Mn) 从400到20000, 优选的,

单臂氨基封端聚乙二醇衍生物分子量为1000、2000、3400、5000、10000、20000, 更优选的, 所

述的单臂氨基封端聚乙二醇衍生物为甲氧基聚乙二醇胺、氨基聚乙二醇羟基、氨基聚乙二醇叠氮、氨基聚乙二醇醛基、氨基聚乙二醇丙烯酸酯、氨基聚乙二醇甲基丙烯酸酯或B0 C-氨基聚乙二醇氨基；

[0025] 所述的多臂氨基封端聚乙二醇衍生物包括四臂氨基封端聚乙二醇衍生物、六臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物以及八臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物，多臂聚乙二醇衍生物氨基分子量 (Mn) 从2000到20000，优选的，多臂氨基封端聚乙二醇衍生物氨基分子量为2000、5000、10000、20000、40000；

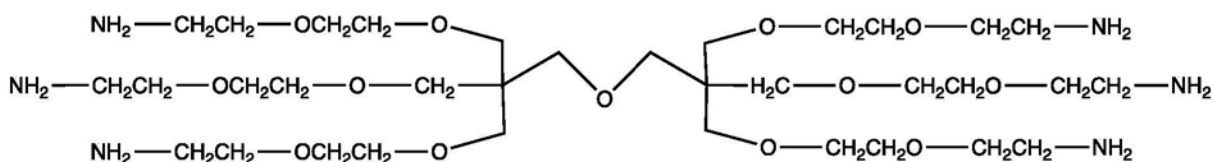
[0026] 其中，四臂氨基封端聚乙二醇衍生物分子式如式II所示：



式 II

[0028] 六臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物分子式如式III所示：

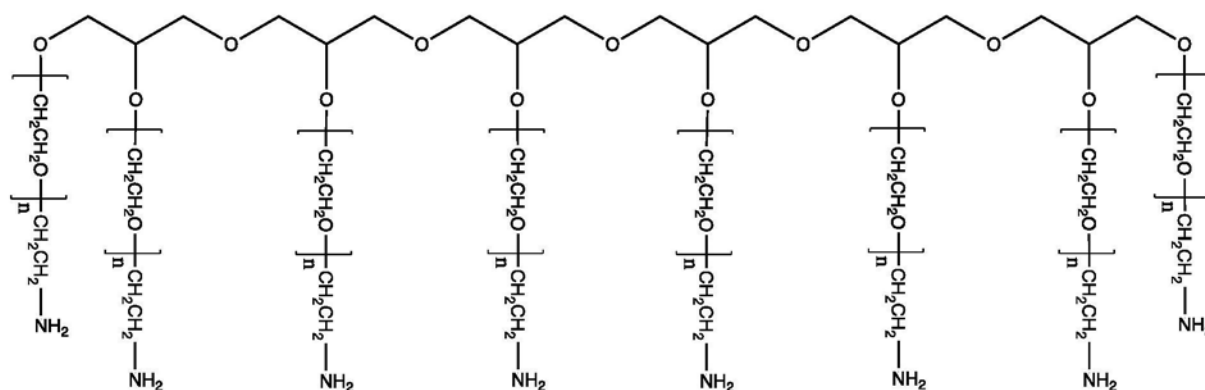
[0029]



式 III

[0030] 八臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物分子式如式IV所示：

[0031]



式 IV。

[0032] 其中，优选的，步骤1-1)中，羧基胶乳微球为聚苯乙烯微球，粒径范围从50-500nm，固含量5%-10%，表面电荷电荷密度0.025-0.5meq/g，优选的，粒径范围为70-420nm，表面电荷密度0.043-0.325meq/g，活化缓冲溶液A为MES缓冲溶液，浓度为0.01-0.1M，pH为4.5-6.5；步骤1-3)中，活化缓冲溶液B为MES、MOPs或PBS缓冲溶液，浓度为0.01-0.1M，pH为4.5-6.5；步骤2-1)中，EDC和NHS或Sulfo-NHS的质量比为1:1.5，EDC与氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物的质量比为1:20到10:1；步骤2-2)中，偶联缓冲溶液为PBS缓冲溶液、MES缓冲溶液、MOPs缓冲溶液、硼酸缓冲溶液或TAPs缓冲溶液，浓度为10-100mM，pH为5.5-7.8；步骤2-3)中，单克隆抗体和多克隆抗体为羊单抗、鼠单抗、兔单抗、人单抗、驴单抗、马单抗、羊多抗、兔多抗、鼠多抗、人多抗、驴多抗、马多抗，优选的，抗体为羊抗肌红蛋白



(MY0) 单克隆抗体, 抗体与氨基封端聚乙二醇衍生物-羧基胶乳微球复合物的质量比为1:1000-1:20; 步骤2-4) 中, 封闭液为TRIS-HCl或甘氨酸缓冲体系, 浓度为5-1000mM, 其中含有牛血清白蛋白的浓度为0.02-5%w/v, 硫柳汞的浓度为0.2-1g/L; 步骤2-5) 中, 保护液为PBS、TAPs、MOPs、BB或TRIS-HCl缓冲体系, pH=5.5-8.5, 浓度为10-100mM, 其中含有海藻糖浓度为1-15%w/v, 甘露醇浓度为2-10%w/v, 牛血清白蛋白的浓度为0.1-4%w/v, TWEEN-80浓度为0.01-0.05%w/v, 硫柳汞的浓度为0.2-1g/L。

[0033] 另一方面, 本发明还提供了一种通过“一步法”制备胶乳微球与抗体复合物的方法, 所述的胶乳微球与抗体复合物为高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物, 包括如下步骤: 将抗体与高分子支架混合均匀, 与合适粒径的羧基胶乳微球进行反应, 制得高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液。

[0034] 其中, 优选的, 所述的方法包括以下步骤:

[0035] 1) 把0.1-1ml质量百分比分数浓度为5-10%的羧基胶乳微球加入到5-10ml pH=5.5-6.5的活化缓冲溶液B, 混合均匀, 随后加入5-50mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 和7.5-75mgN-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 或7.5-75mg N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS) 进行活化, 磁力搅拌, 混合均匀;

[0036] 2) 用3000g-25000g离心处理10分钟, 去除上清, 用pH=6-8的偶联缓冲溶液进行超声复溶, 换液重复3次, 得到活化的羧基胶乳微球溶液;

[0037] 3) 将1-20ml 0.25mg/ml单克隆抗体或者多克隆抗体溶液和0.1-10ml 2%w/v高分子支架溶液加入到活化的羧基胶乳微球溶液中, 室温搅拌2-4小时, 混合均匀;

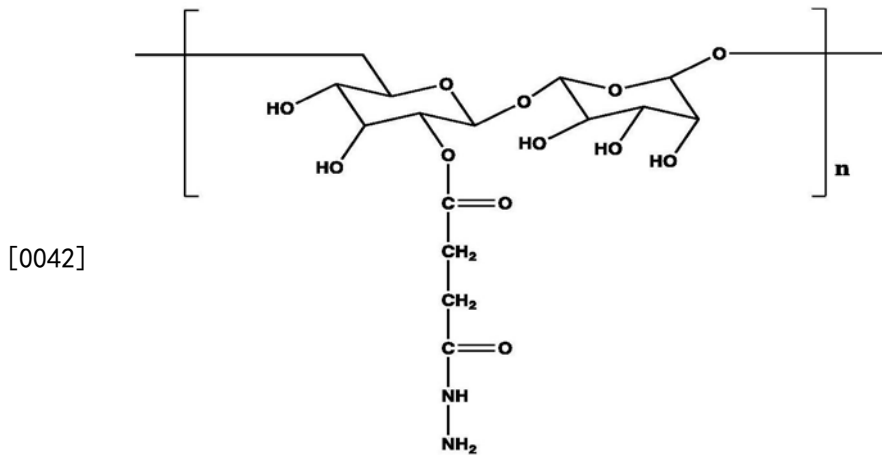
[0038] 4) 将0.1-0.5ml封闭液加入步骤3) 得到的混合物溶液中;

[0039] 5) 室温搅拌1小时后, 3000g-25000g离心处理, 去除上清, 用保护液进行超声复溶, 重复3次换液, 得到高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物(Compound C), 化学反应式如图3所示。

[0040] 其中, 优选的, 步骤1) 中, 羧基胶乳微球为聚苯乙烯微球, 粒径范围从50-500nm, 固含量5%-10%, 表面电荷电荷密度0.025-0.5meq/g, 优选的, 粒径为320nm, 固含量10%, 表面电荷密度为0.043meq/g; EDC和NHS或Sulfo-NHS的质量比为1:1.5, EDC与羧基胶乳微球的质量比为1:20到10:1; 活化缓冲溶液B为MES、MOPs、PBS缓冲溶液, 浓度为0.01-0.1M, pH为4.5-6.5; 步骤2) 中, 偶联缓冲溶液为PBS缓冲溶液、MES缓冲溶液、MOPs缓冲溶液、硼酸缓冲溶液、TAPs缓冲溶液, 浓度为10-100mM, pH为5.5-7.8; 步骤3) 中, 单克隆抗体和多克隆抗体为羊单抗、鼠单抗、兔单抗、人单抗、驴单抗、马单抗、羊多抗、兔多抗、鼠多抗、人多抗、驴多抗、马多抗, 优选的, 抗体为羊抗肌红蛋白(MY0) 单克隆抗体; 步骤4) 中, 封闭液为TRIS-HCl或甘氨酸缓冲体系, 浓度为5-1000mM, 其中含有牛血清白蛋白的浓度为0.02-5%w/v, 硫柳汞的浓度为0.2-1g/L; 步骤5) 中, 保护液为PBS、TAPs、MOPs、BB、TRIS-HCl等缓冲体系, pH=5.5-8.5, 浓度为10-100mM, 其中含有海藻糖浓度为1-15%w/v, 甘露醇浓度为2-10%w/v, 牛血清白蛋白的浓度为0.1-4%w/v, TWEEN-80浓度为0.01-0.05%w/v, 硫柳汞的浓度为0.2-1g/L。

[0041] 其中, 优选的, 所述步骤3) 中所述的高分子支架为单臂氨基封端聚乙二醇衍生物、多臂氨基封端聚乙二醇衍生物、氨基修饰葡聚糖(Dextran-Amine)、链霉亲和素、牛血清白蛋白、酪蛋白、卵清蛋白, 其中, 单臂氨基封端聚乙二醇衍生物、多臂氨基封端聚乙二醇衍生物

物的限定范围与“二步法”中相同；氨基修饰葡聚糖分子量从6kDa-2000kDa，优选的，氨基修饰葡聚糖的分子结构式如式V所示，其分子量从6kDa-2000kDa，优选的，氨基修饰葡聚糖的分子量有6kDa、10kDa、20kDa、40kDa、70kDa、100kDa、200kDa、500kDa、2000kDa，所述高分子支架与羧基胶乳微球质量比为1:100到80:1；



式 V。

[0043] 再一方面，本发明还提供了一种胶乳微球与抗体复合物，所述的胶乳微球与抗体复合物是由以上所述的方法制备得到的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物，或是由以上所述的方法制备得到的高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物。

[0044] 进一步的，本发明还提出了所述的胶乳微球与抗体复合物在制备胶乳增强免疫比浊法检测试剂中的用途。

[0045] 再一方面，本发明还提供了一种免疫比浊试剂盒，含有R1试剂以及R2试剂，其中，所述的R2试剂是由以上任一项所述的方法制备得到的氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液，或是由以上任一项所述的方法制备得到的高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液组成。

[0046] 其中，优选的，所述的R1试剂为10-1000mmol/L的碳酸钠-碳酸氢钠(CB)、PBS、MES、TRIS-HCl、甘氨酸-盐酸、甘氨酸-强氧化钠、MOPs、TAPs缓冲缓冲溶液，pH=3.5-8.7，其中含有牛血清白蛋白的浓度为0.2-5%w/v，酪蛋白的浓度为0.02-5%w/v，硫柳汞的浓度为0.01-0.5%w/v，TWEEN-20的浓度为0.02-0.2%w/v，PEG8000的浓度为0.3-5%w/v，氯化钠的浓度为150-2000mmol/L，异嗜性抗体阻断剂浓度为0.02-2mg/ml，更优选的，所述的R1试剂为含有2%w/v牛血清白蛋白、0.2%w/v酪蛋白、0.1%w/v硫柳汞、0.05%w/vTWEEN-20、4%w/vPEG8000、150mM氯化钠以及0.1%w/v异嗜性抗体阻断剂的25mM MES缓冲溶液。

[0047] 其中，优选的，所述的试剂盒还包括校准品稀释液，所述的校准品稀释液为10-200mmol/L的MES、MOPs、TAPs、BB、PBS、CB、TRIS-HCl、甘氨酸-氢氧化钠缓冲体系，pH=4.5-8，其中含有蛋白保护剂为0.01-0.5%w/v，蔗糖浓度为0.2-15%w/v，甘露醇浓度为1-10%w/v，硫柳汞浓度为0.02-0.2%w/v，氯化钠浓度为150-2000mmol/L，TWEEN-80浓度为0.01-0.1%w/v，更优选的，所述的校准品稀释液为含有5%w/v牛血清白蛋白、0.1%w/v蛋白保护剂、8%w/v蔗糖、3%w/v甘露醇、0.1%w/v硫柳汞、150mM氯化钠、0.05%w/vTWEEN-80的100mM的甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液。

[0048] 在本发明中，根据抗原抗体结合后，形成免疫复合物，在一定时间内复合物聚合出

现浊度。当光线通过溶液时,可被免疫复合物吸收。免疫复合物量越多,光线吸收越多。光线被吸收的量在一定范围内与免疫复合物的量成正比。利用比浊计测定光密度值,复合物的含量与光密度值成正比,同样当抗体量一定时,光密度值也与抗原含量成正比。相对传统胶乳微球-抗体复合物(简易模型如图4左所示,3D结构如图5所示),本发明通过制备新型支架-胶乳微球-抗体复合物(简易模型如图4右所示,3D结构如图6所示),目的是为了提提高胶乳试剂的稳定性,大幅度改善试剂线性,同时减少抗体使用量,大大节约生产成本。

[0049] 本发明与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0050] 1.改善试剂性能:本发明发明人发现,与传统胶乳微球-抗体复合物相比较,新型支架-胶乳微球-抗体复合物可以明显改善试剂的性能,在传统胶乳微球-抗体复合物中,由于空间位阻,部分抗体与抗原的结合位点(即Fab区域)被相互屏蔽,引起检测灵敏度低,高值上不去,造成检测线性范围窄。通过填充支架,排除空间位阻效应,同时起固定抗体作用,将抗体与抗体之间被支架相互隔离开,给抗体与抗原结合位点留有足够的空间,使检测更加准确,线性范围更加宽,大幅度提高试剂性能。

[0051] 2.大大提升试剂的稳定性能:本发明发明人发现,通过搭建高分子支架或氨基封端聚乙二醇衍生物支架(NH<sub>2</sub>-mPEG-R),高分子支架在三维结构中第一方面起空间填充,对抗体起到一定的支撑作用,可以更好地定向排列;第二方面作用是高分子支架包含大量聚乙二醇或者羟基(-OH),在微球表面与水形成水化层,增加胶乳微粒在水溶液中的溶解度,同时,大量的羟基(-OH)与抗体之间可以形成氢键,聚乙二醇高分子衍生物与抗体间形成氢键,大幅度提高抗体稳定性。因此,大大提升试剂的稳定性能。

[0052] 3.大幅度降低试剂成本:本发明发明人发现,在支架-胶乳微球复合物模型中,支架的填充,大幅度降低抗体的使用量,高分子支架和氨基封端聚乙二醇衍生物支架成本大约是抗体价格的1/20-1/40。通过支架填充,减少抗体使用量,不仅性能不会受到影响,抗体量减少大约30%-40%,因此,在生产中可大幅度节约生产成本,提高试剂的市场竞争力。

## 附图说明

[0053] 图1为制备氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物(Compound A)的化学反应式;

[0054] 图2为制备氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物(compound B)的化学反应式;

[0055] 图3为制备高分子支架-羧基胶乳微球-抗体复合物(Compound C)的化学反应式;

[0056] 图4为传统胶乳微球-抗体复合物(左)以及本发明制备的新型支架-胶乳微球-抗体复合物(右)的简易模型图;

[0057] 图5为传统胶乳微球-抗体复合物的3D结构;

[0058] 图6为本发明制备的新型支架-胶乳微球-抗体复合物的3D结构;

[0059] 图7为本发明试剂的校准曲线;

[0060] 图8为对照试剂的校准曲线;

[0061] 图9为本发明试剂与对照校准曲线对照。

## 具体实施方式

[0062] 以下通过具体实例说明发明的实施方式,本领域技术人员可以通过本发明阐述的内容简单地明白本发明的优点与作用。在没有背离支架-胶乳微球-抗体复合物这种模型的思路下,各个细节可以进行各种修饰与变化。

[0063] 进一步阐述本发明具体实施方式之前,本发明的保护范围不局限于下列特定的具体实施方案;同时还应该理解,本发明实施案例中使用的术语目的是阐述特定具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。

[0064] 当本发明给出的数值范围时,应当认为,除了本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值都可以选用。除了另外定义,本发明中使用的所有技术、科学术语与本领域技术人员通常理解的意义相同。

[0065] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、实验方法都是采用本技术领域常规的生物化学、分子生物学、胶体化学、物理化学、高分子化学以及相关领域的常规技术。本发明中的技术在现有的文献以及书籍中已经详细的说明,具体可以参考生物化学,第三版,王镜岩等、Molecular Biology, Five Edition, SCIENCE PRESS, 2013, Robert F. Weaver; Bioconjugate techniques, Third Edition, Academic Press, 2013, Greg T. Hermanson等; Chemistry of Bioconjugates, First Edition, 2014, Ravin Narain, John Wiley & Sons等; The Immunoassay Handbook Theory and applications of ligand binding, Forth Edition, 2013, Elsevier, David Wild等; Immunoassays Development, Applications and Future Trends, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2017, Richrd O' Kennedy等; Wikipedia等。

[0066] 进一步说明,本发明所用的原料均为市售产品,其中羧基胶乳微球溶液来自日本JSR公司;羊抗肌红蛋白(MYO)单克隆抗体购自芬兰Hytest公司,氨基封端聚乙二醇衍生物购自日本JSR公司、Aladdin公司、Trash-Tech公司等;所使用常规化学试剂,例如三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或N-羟基硫代琥珀酰亚胺等,均购自Sigma;酪蛋白与牛血清白蛋白购自罗氏;生化检测仪为贝克曼AU680。

[0067] 实施例1“二步法”制备单臂氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物

[0068] 1. 制备单臂氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球

[0069] 1-1) 把0.5ml 5%的320nm羧基胶乳微球加入活化缓冲液A(5ml 15mM pH=4.7MES缓冲溶液)中,将80mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)用0.1ml水溶解,取50ul溶液加入胶乳微球溶液中进行活化,磁力搅拌5分钟,混合均匀,得到EDC活化的羧基胶乳球溶液;

[0070] 1-2) 将1ml 10%分子量为1000的单臂氨基封端聚乙二醇氨基衍生物(甲氧基聚乙二醇胺)溶液加入到EDC活化的羧基胶乳球溶液中,混合均匀;

[0071] 1-3) 室温搅拌2小时后,20000g离心处理,去除上清,用5ml活化缓冲溶液B(15mM pH=6MES缓冲溶液)进行超声复溶,换液重复3次,得到单臂氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物(Compound A)溶液,以供后续使用,化学反应式如图1所示。

[0072] 2. 制备单臂氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-MYO抗体复合物

[0073] 2-1) 向上述5ml单臂氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球复合物溶液中直接加入25mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和48mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行活化,磁力搅拌30分钟,混合均匀;

[0074] 2-2) 用20000g离心处理10分钟,去除上清,用5ml偶联缓冲液(10mM pH=7.4 5ml PBS缓冲溶液)进行超声复溶,换液重复3次,得到活化的复合物溶液;

[0075] 2-3) 将活化的复合物溶液加入到5ml 0.25mg/ml羊抗MY0单克隆抗体,室温搅拌2小时,混合均匀;

[0076] 2-4) 将0.25ml封闭液(1M甘氨酸、5%w/vBSA、1g/L硫柳汞)加入步骤2-3)得到的复合物溶液中;

[0077] 2-5) 室温搅拌1小时后,12000g离心处理,去除上清,用20ml保护液进行超声复溶,其中,保护液为含有5%w/v海藻糖、3%w/v甘露醇、2%w/v牛血清白蛋白、0.05%w/vTWEEN-20、0.1%w/v硫柳汞的10mM pH=7.4的PBS,重复3次换液,得到20ml单臂氨基封端聚乙二醇衍生物支架-羧基胶乳微球-抗体复合物(compound B)溶液,化学反应式如图2所示。即胶乳试剂免疫比浊试剂盒R2试剂。

[0078] 实施例2胶乳增强免疫比浊试剂盒的稳定性测试

[0079] 一、胶乳免疫比浊试剂盒R1试剂的制备

[0080] R1试剂为含有2%w/v牛血清白蛋白、0.2%w/v酪蛋白、0.1%w/v硫柳汞、0.05%w/vTWEEN-20、4%w/vPEG8000、150mM氯化钠、0.1%w/v异嗜性抗体阻断剂的25mM MES缓冲溶液,制备方法如下:

[0081] 1L烧杯中放入800ml去离子水,磁力搅拌,依次称取4.88g MES、20g牛血清白蛋白(罗氏第五组分)、2g酪蛋白、1g硫柳汞、0.5g TWEEN-20、40g PEG8000、8.76g氯化钠、1g异嗜性抗体阻断剂分别加入到烧杯中,用4N氢氧化钠调试pH值到6.5,用容量瓶准确定容至1L。

[0082] 二、胶乳免疫比浊试剂盒R2试剂的制备

[0083] 本发明的R2试剂(其中所含有的胶乳微球-抗体复合物的简易模型如图4右所示,3D结构如图6所示)按照实施例1的方法制备。

[0084] 对照R2试剂(其中所含有的胶乳微球-抗体复合物的简易模型如图4左所示,3D结构如图5所示)按照现有常规方法制备。

[0085] 三、胶乳免疫比浊试剂盒校准品的制备

[0086] 校准品稀释液为含有5%w/v牛血清白蛋白、0.1%w/v蛋白保护剂、8%w/v蔗糖、3%w/v甘露醇、0.1%w/v硫柳汞、150mM氯化钠、0.05%w/v TWEEN-80的100mM的甘氨酸缓冲溶液。

[0087] 校准品的制备:将MY0溶于上述配置好的校准品稀释液中,用梯度稀释法,配成MY0的浓度为0ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml的溶液,即得到校准品。

[0088] 四、胶乳增强免疫比浊试剂盒的线性测试以及37℃加速稳定性对比试验

[0089] 1、用AU680生化仪进行检测,试剂参数设置完成后,将本发明试剂与对照试剂分别放入仪器中进行测试。反应过程如下:R1试剂与校准品混合均匀,37℃孵育5分钟,之后加入R2试剂,37℃孵育12s后开始读取吸光度值,即A1,反应4分钟后读取吸光度值,即A2,计算吸光度变化值 $\delta = A2 - A1$ ;以 $\delta$ 为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,绘制校准曲线,本发明试剂与对照校准曲线如图7和图8。

[0090] 2、37℃加速老化测试低值与高值质控稳定性测试

[0091] 稳定性测试,将本发明与对照试剂的低值和高值质控分别分装1ml/支,各5支,分别冻存于-20℃。将本发明试剂与对照试剂的R1与R2分别分装4ml/支,各5支,放入37℃恒温箱中。分别在第1天、第4天、第8天、第12天、第16天各取出一支本发明和对照试剂的低值高值质控和试剂进行检测。本发明试剂与对照试剂稳定性对比数据表如下,即表1。

[0092] 表1

[0093]

稳定性		低值	高值	低值偏差	高值偏差
靶值范围 (ng/ml)		90 (76.5-103.5)	260 (221-299)	0.0%	0.0%
第1天	本发明	90.3	260.5	0.3%	0.2%
	对照	90.2	260.1	0.2%	0.0%
第4天	本发明	87.0	263.5	-3.3%	1.3%
	对照	83.4	259.2	-7.3%	-0.3%
第8天	本发明	89.4	265.3	-0.7%	2.0%
	对照	82.2	249.8	-8.7%	-3.9%
第12天	本发明	86.4	261.4	-4.0%	0.5%
	对照	81.4	246.9	-9.6%	-5.0%
第16天	本发明	85.2	258.1	-5.3%	-0.7%
	对照	77.8	243.5	-13.6%	-6.3%

[0094] 由表1结果可知,相较于传统方法制备的R2试剂,采用本发明方法制备得到的R2试剂能够大幅度提高抗体稳定性,大大提升了试剂的稳定性能。

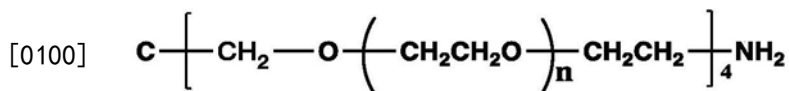
[0095] 实施例3“一步法”制备高分子支架 (Polymer scaffolds)-羧基胶乳微球-抗体复合物

[0096] 1) 将0.25ml 10%的羧基胶乳微球加入到10ml活化缓冲溶液B (15mM pH=6MES缓冲溶液) 中,混合均匀,随后加入36mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和54mgN-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 进行活化,磁力搅拌30分钟,混合均匀;

[0097] 2) 用20000g离心10分钟,去除上清,用5ml偶联缓冲溶液 (10mM pH=7.2PBS缓冲溶液) 进行超声复溶,换液重复3次,得到活化的羧基胶乳微球溶液;

[0098] 3) 将10ml 0.25mg/ml羊抗MY0单克隆抗体和5ml 2%分子量2000的四臂氨基封端聚乙二醇高分子衍生物加入到活化的羧基胶乳微球溶液中,室温搅拌2小时,混合均匀;

[0099] 其中,四臂氨基封端聚乙二醇高分子衍生物的结构如下式所示:



[0101] 4) 将0.25ml封闭液 (1M TRIS-HCl、5%BSA、1g/L硫柳汞) 加入步骤3) 的混合物溶液中;

[0102] 5) 室温搅拌1小时后,12000g离心,去除上清,用20ml保护液进行超声复溶,所述的保护液为含有5%w/v海藻糖、3%w/v甘露醇、2%牛w/v血清白蛋白、0.05%w/vTWEEN-20、0.1%硫柳汞的10mM pH=7.4的PBS,换液重复3次,得到四臂氨基封端聚乙二醇衍生物-羧基胶乳微球-抗体复合物 (Compound C),化学反应式如图3所示。即胶乳增强免疫比浊试剂盒R2试剂。

[0103] 实施例4胶乳增强免疫比浊试剂盒的稳定性测试

[0104] 一、胶乳免疫比浊试剂盒R1试剂的制备

[0105] R1试剂为含有2%w/v牛血清白蛋白、0.2%w/v酪蛋白、0.1%w/v硫柳汞、0.05%w/vTWEEN-20、4%w/vPEG8000、150mM氯化钠、0.1%w/v异嗜性抗体阻断剂的25mM MES缓冲溶液,制备方法如下:

[0106] 1L烧杯中放入800ml去离子水,磁力搅拌,依次称取4.88g MES、20g牛血清白蛋白(罗氏第五组分)、2g酪蛋白、1g硫柳汞、0.5g TWEEN-20、40g PEG8000、8.76g氯化钠、1g异嗜性抗体阻断剂分别加入到烧杯中,用4N氢氧化钠调试pH值到6.5,用容量瓶准确定容至1L。

[0107] 二、胶乳免疫比浊试剂盒R2试剂的制备

[0108] 本发明的R2试剂(其中所含有的胶乳微球-抗体复合物的简易模型如图4右所示,3D结构如图6所示)按照实施例3的方法制备。

[0109] 对照R2试剂(其中所含有的胶乳微球-抗体复合物的简易模型如图4左所示,3D结构如图5所示)按照现有常规方法制备。

[0110] 三、胶乳免疫比浊试剂盒校准品的制备

[0111] 校准品稀释液为含有5%w/v牛血清白蛋白、0.1%w/v蛋白保护剂、8%w/v蔗糖、3%w/v甘露醇、0.1%w/v硫柳汞、150mM氯化钠、0.05%w/v TWEEN-80的100mM的甘氨酸缓冲溶液。

[0112] 校准品的制备:将MYO溶于上述配置好的校准品稀释液中,用梯度稀释法,配成MYO的浓度为0ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml的溶液,即得到校准品。

[0113] 四、本发明胶乳增强免疫比浊试剂与对照试剂进行校准品线性对照

[0114] 1、用AU680生化仪进行检测,试剂参数设置完成后,将本发明试剂与对照试剂分别放入仪器中进行测试。反应过程如下:R1试剂与校准品混合均匀,37℃孵育5分钟,之后加入R2试剂,37℃孵育12s后开始读取吸光度值,即A1,反应4分钟后读取吸光度值,即A2,计算吸光度变化值 $\delta = A2 - A1$ ,如表2;以 $\delta$ 为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,绘制校准曲线,本发明试剂与对照校准曲对照,如图9。

[0115] 表2

[0116]

校准品) (ng/ml)	本发明试剂 吸光度	对照试剂 吸光度
0	-0.0017	-0.0017
100	0.0372	0.0382
200	0.0891	0.0862
400	0.1864	0.1789
800	0.3536	0.3128

[0117] 与对照试剂相比较,本发明支架-胶乳微球-抗体复合物试剂参数大幅度提升,大大改善校准品线性,高值校准品线性依然成倍比关系,同时相对于传统对照试剂,稳定性大幅度提升,使用的抗体量节约33%,大幅度降低生产成本,提升了产品的市场竞争力。

[0118] 综上所述,本发明有效克服传统技术中的种种缺陷而具有高产业价值。

[0119] 上述实施案例仅仅作作为例子说明发明的原理以及特点,然而并不是限制本发明。任何相关领域技术的人士皆可在不违背本发明的思路以及范畴内,对上述实施案例进行修

饰与改变。因此,凡所属技术领域中具有通常知识在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰与改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。



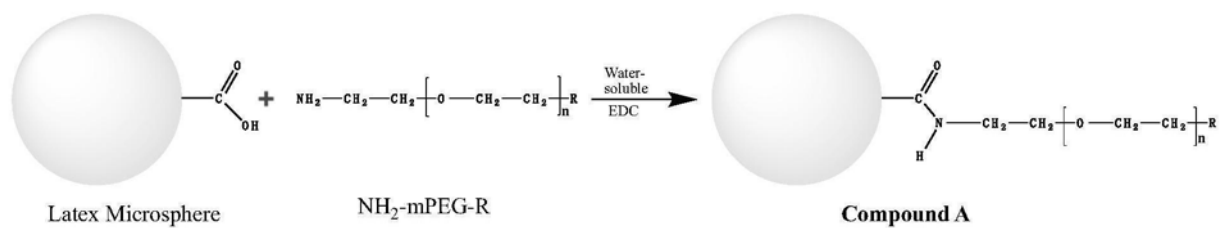


图1

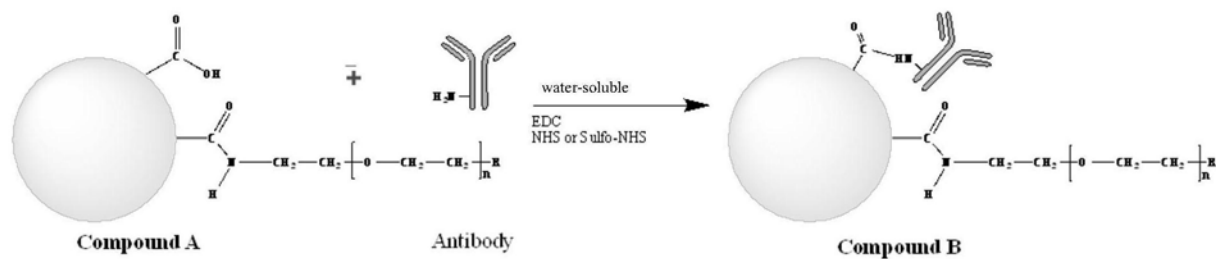


图2

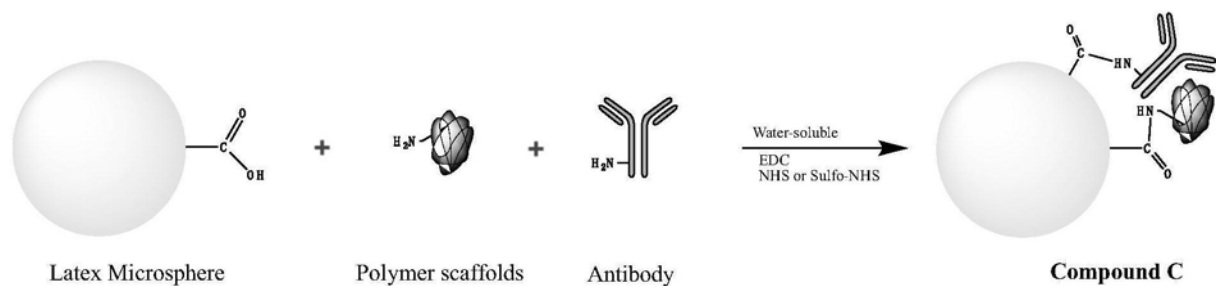


图3

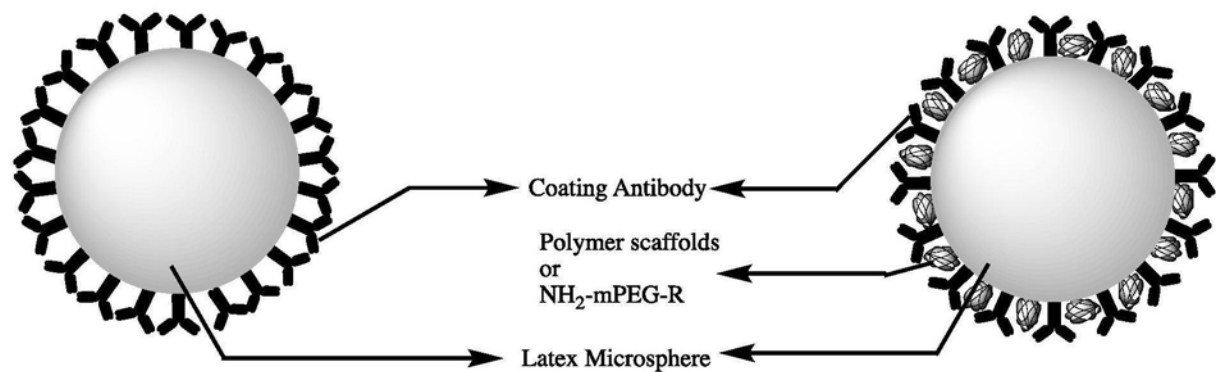


图4

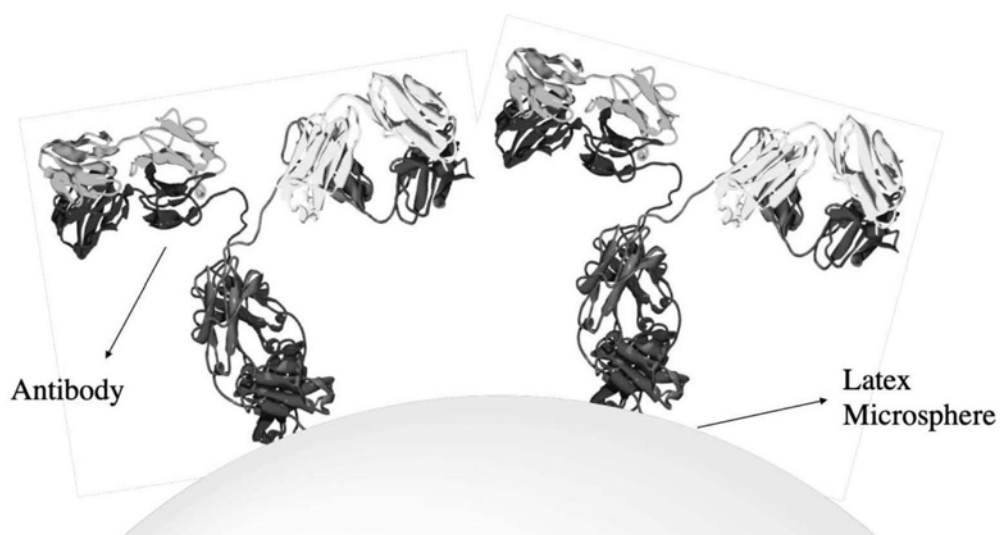


图5

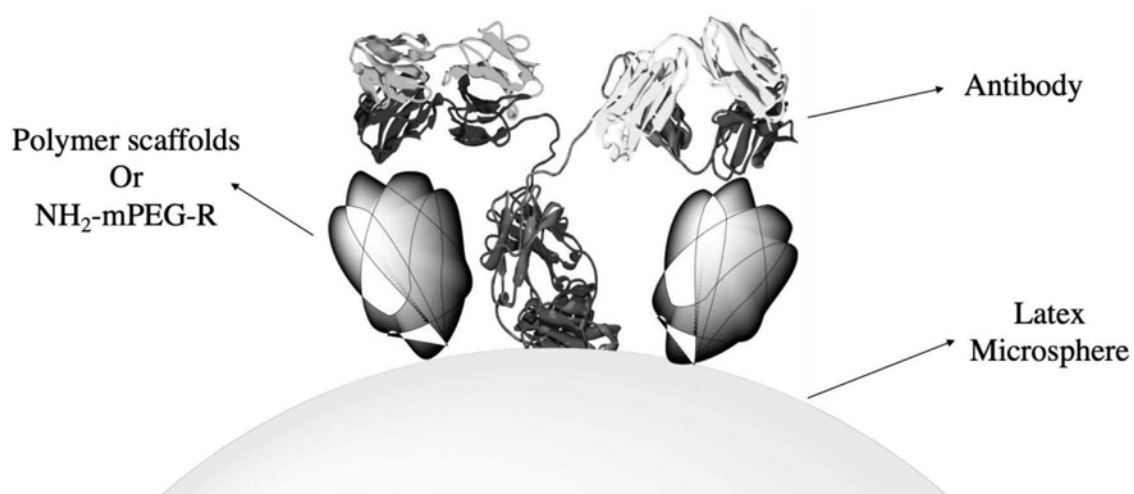


图6

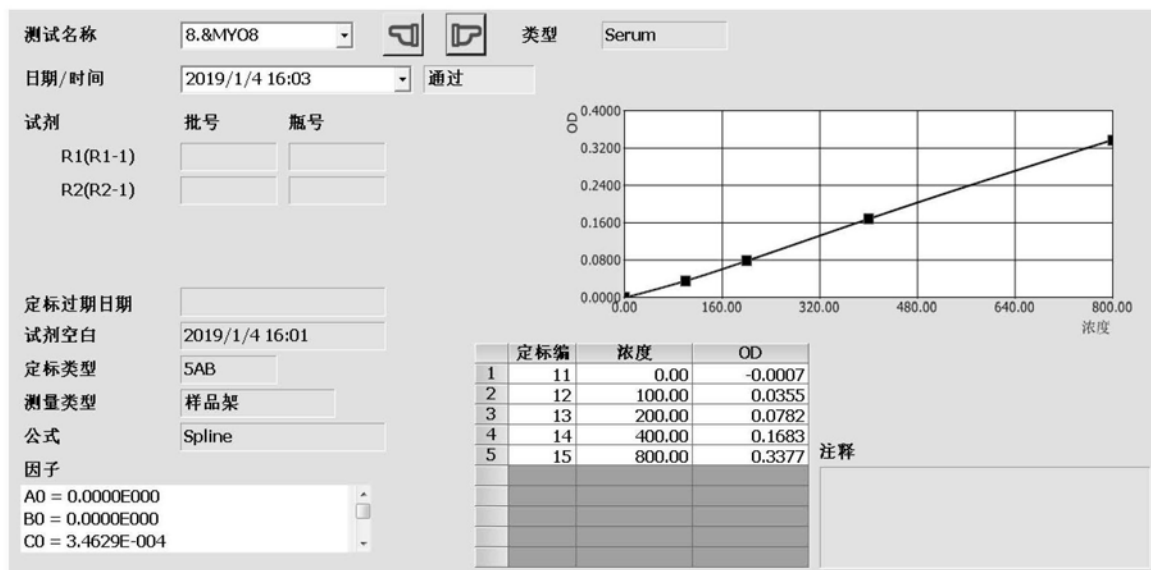


图7

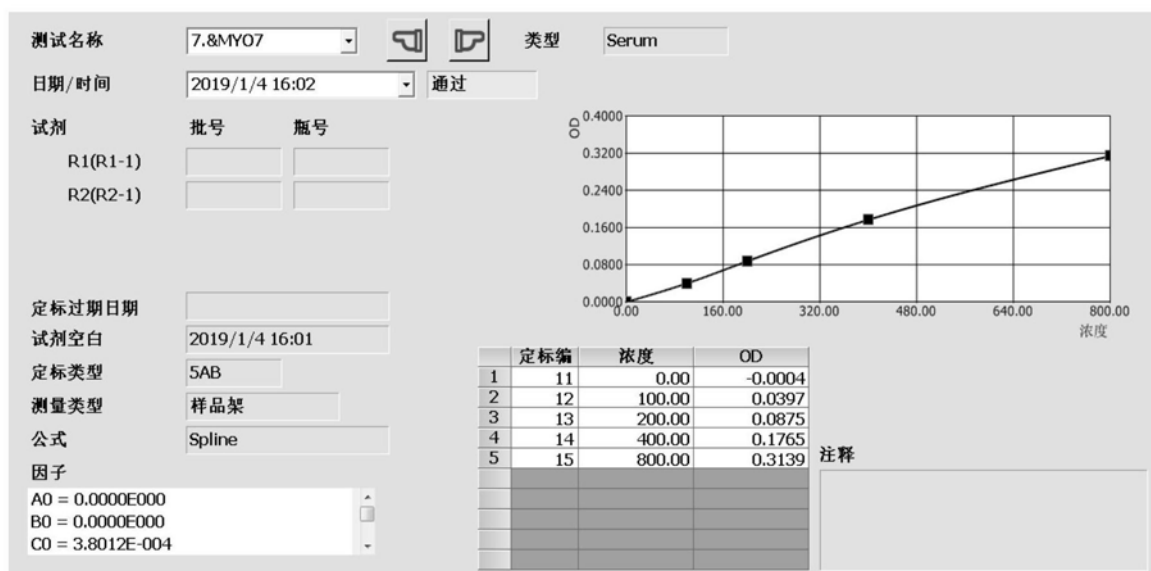


图8

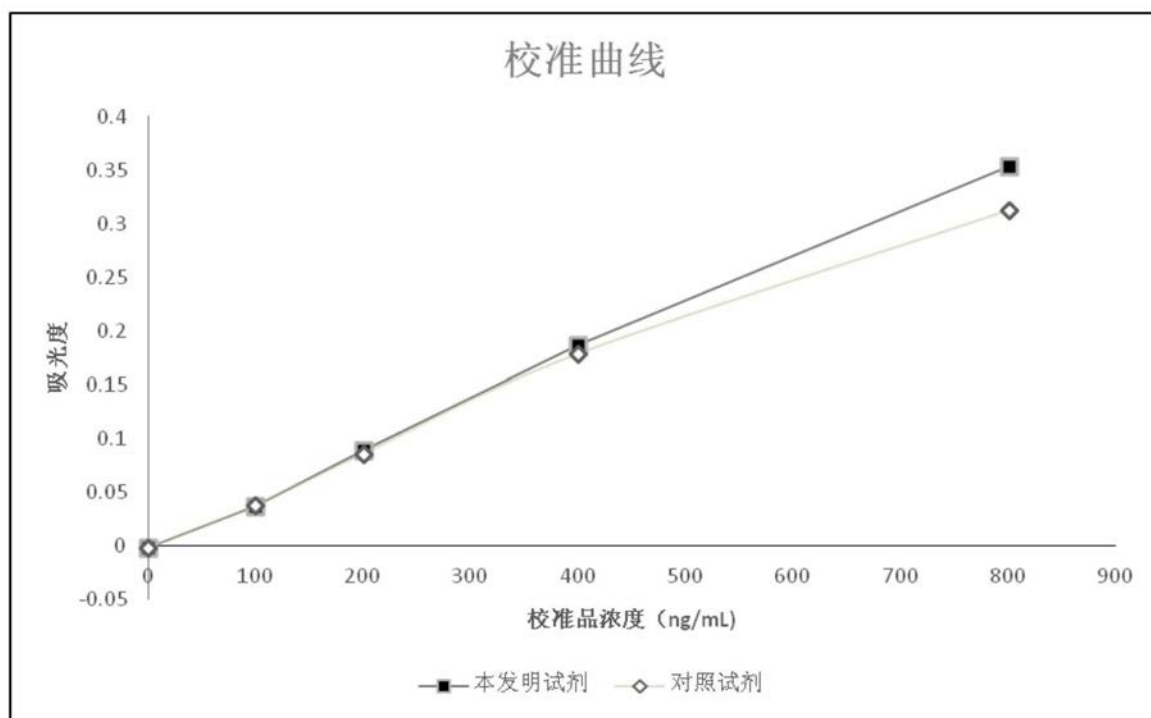


图9

专利名称(译)	一种胶乳微球与抗体复合物的制备方法、产品及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110441514A</a>	公开(公告)日	2019-11-12
申请号	CN201910527896.1	申请日	2019-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
[标]发明人	胡国庆		
发明人	胡国庆		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/539		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/539 G01N33/5432 G01N33/54346		
代理人(译)	余光军		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种胶乳微球与抗体复合物的制备方法、产品及其应用。本发明提供两种制备方法，分别是“两步法”和“一步法”。“两步法”包括：1)羧基胶乳微球与氨基封端聚乙二醇衍生物支架进行反应，制得新型支架-羧基胶乳微球复合物；2)将步骤1)中制备完成的新式支架-羧基胶乳微球复合物与抗体进行反应，制得新型支架-羧基胶乳微球-抗体复合物。“一步法”包括：将抗体与高分子支架混合均匀，与合适粒径的羧基胶乳微球进行反应，制得新型支架-羧基胶乳微球-抗体复合物溶液。采用本发明所提供的制备方法，能够大大增强试剂稳定性、改善校准品线性、大幅度节约生产成本，不仅提高试剂性能，而且降低成本，具有非常好的应用前景。

