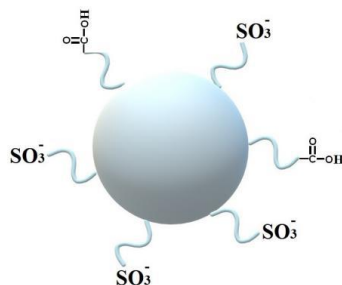


聚苯乙烯羧基胶乳 (PS-COOH)

产品简述

- 苯乙烯为主单体，自由基聚合制备胶乳
- 可聚合表面活性剂，引入表面短链羧基
- 可聚合磺酸表面活性剂，引入表面磺酸
- 磺酸阴离子吸附多抗，促多抗高效偶联
- 粒径规格成系列，从 85nm 到 550 nm
- 每种规格胶乳粒径分布均匀，PDI<7%
- 无待测抗原时，胶乳标记试剂信号稳定
- 胶乳标记多抗，对待测抗原响应信号强
- 羧基胶乳偶联多抗后不洗涤，使用简便



FlyW&Y 羧基胶乳微球表面官能团示意

性能/规格

指标/特征	FlyW&Y 羧基胶乳 (PS-COOH) 性能/性状				
粒径 (nm)	~85	~100	~180	~225	~525
羧基含量 (μmol/g)	~83	~62	~32	~29	~27
粒径分散指数(PDI)	~0.03	~0.03	~0.03	~0.03	~0.07
浓度	50g/L (固含量 5%; 胶乳尽可能去液相, 37 度干燥 100 h 到恒重的质量)				
包装规格	10 ml, 100 ml, 1000 ml				
保存介质	0.09%叠氮钠, 水溶液				
保质期	2~8 °C、不开封、避光保存; 保质期不短于 24 个月				
可活化羧基量	~0.1 μmol/g 胶乳 (DMF 中, DCC 及 NHS 室温活化过夜的活泼酯量)				
多抗偶联量	~17 mg 抗体/g 羧基羧基胶乳				

活化偶联操作步骤 (二步法)

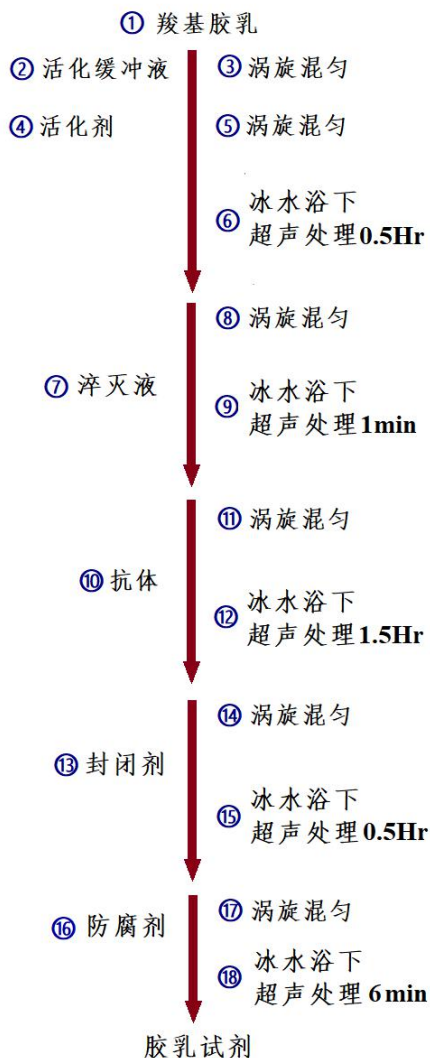
一、试剂、器械和设备

1. 活化缓冲液: 25 mM MES, pH6.0, 含 2% NaCl; 4°C保存
2. 偶联缓冲液: 50 mM HEPES, pH 7.4, 含 2% NaCl; 4°C保存
3. 活化剂: NHS 和 EDC 分别溶于预冷活化缓冲液, 终浓度 1.0 g/L; 配制后 1h 内用
4. 分散剂: 活化缓冲液(25 mM MES, pH6.0, 含 2% NaCl)含 1% Tween 20, 4°C保存
5. 抗体溶液: 多抗或单抗, 溶解于预冷的偶联缓冲液中到~0.46 g/L; 4°C保存
6. FlyW&Y 羧基胶乳(PS-COOH): 使用前剧烈涡旋振荡或超声处理, 确保充分混匀
7. 淬灭液: 1.0 M HEPES, pH 7.4, 含 2% NaCl(降低甚至淬灭活化剂的作用)
8. 封闭液: 偶联缓冲液(50 mM HEPES pH 7.4 含 2% NaCl)含 10%牛血清白蛋白, 4°C保存
9. 防腐液: 偶联缓冲液(50 mM HEPES pH 7.4 含 2% NaCl)含 5%叠氮钠, 4°C保存
10. 磁力搅拌器、旋转混合仪、滚轴混匀器或恒温摇床 (通常仅需要其中任一种)
11. 涡旋振荡器、(手持式)超声处理器、移液器、EP 管等

二、应用过程示意图

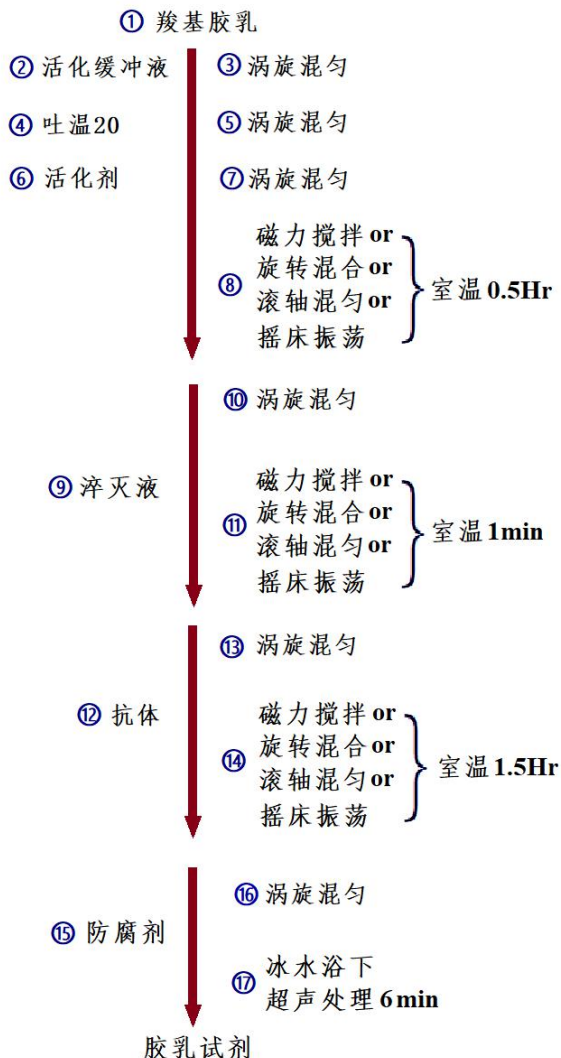
二步法(全程超声)

不用吐温20, 宜封闭



二步法(温和混匀)

用吐温20, 不宜封闭



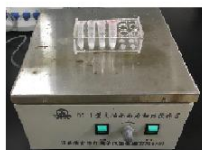
涡旋振荡器



旋转混合仪



滚轴混匀器



磁力搅拌器



恒温摇床



手持式超声处理器

三、羧基胶乳活化和蛋白偶联

提示: FlyW&Y 羧基胶乳 1.0 mg, 适合标记~20 μ g 抗体(考马斯亮蓝法测定蛋白量)

二步法(全程超声) 不用吐温 20，宜封闭	二步法(温和混匀) 用吐温 20，不宜封闭
1. 用 EDC 和 NHS 活化胶乳表面羧基 ①羧基胶乳剧烈涡旋振荡分散，取 100 μ L (5mg) 到 5.0 mL 离心管中； ②加 410 μ L 活化缓冲液，涡旋振荡混匀； ③加 50 μ L 活化剂 NHS 溶液、50 μ L 活化剂 EDC 溶液，立即涡旋混匀； ④冰水浴下，持续超声处理(每隔 2 min 超声处理 20 s)30 min，活化羧基； 2. 淬灭活化剂 ①活化反应结束后，加 100 μ L 淬灭液，涡旋振荡混匀； ②冰水浴下，超声处理 20 s，放置 1 min，淬灭活化剂。 3. 抗体与活化羧基胶乳的偶联 ①加入 220 μ L 蛋白溶液(摸索时调节抗体用量)，立即涡旋振荡混匀； ②冰水浴，超声处理(每隔 2 min 超声 20 s)90 min，抗体与胶乳偶联。 4. 封闭表面未反应的羧基活酯 偶联结束后加 60 μ L 封闭液，涡旋振荡混匀，冰水浴维持超声处理(每隔 2 min 超声 20s)30 min，封闭表面活酯； 5. 分散、分装、保存 偶联反应结束后，加入 10 μ L 防腐剂，涡旋振荡混匀，维持超声处理 6.0 min (每隔 10 s 超声 10 s)；稀释到胶乳终浓度为 5.0 g/L 或所需浓度，得抗体-胶乳微球；4 - 8℃保存。	1. 用 EDC 和 NHS 活化胶乳表面羧基 ①将羧基胶乳剧烈涡旋振荡分散混匀，取 100 μ L (5mg) 到 5.0 mL 离心管中； ②加 400 μ L 活化缓冲液，再加入 10 μ L 分散剂，涡旋振荡混匀； ③加入 50 μ L 活化剂 NHS 溶液、50 μ L 活化剂 EDC 溶液，立即涡旋振荡混匀； ④室温下，维持磁力搅拌(旋转混合或滚轴混匀或恒温摇床)30 min，活化羧基； 2. 淬灭活化剂 ①活化反应结束后，加 100 μ L 淬灭液，涡旋振荡混匀； ②室温下，磁力搅拌(旋转混合或滚轴混匀或恒温摇床)1 min，淬灭活化剂。 3. 抗体(多抗或单抗)与活化羧基胶乳的偶联 ①加入 220 μ L 蛋白溶液(摸索时调节抗体用量)，立即涡旋振荡混匀； ②室温下，维持磁力搅拌(旋转混合或滚轴混匀或恒温摇床)90 min，促进抗体与羧基胶乳偶联。 4. 分散、分装、保存 偶联反应结束后，加入 70 μ L 偶联缓冲液，再加入 10 μ L 防腐剂，涡旋振荡混匀，维持超声处理 6min (每隔 10 s 超声 10 s)； 稀释到胶乳终浓度为 5.0 g/L 或所需浓度，得抗体-胶乳微球；按需分装，4 - 8℃保存。

应用提示

- 应用示例为 FlyW&Y 羧基胶乳活化标记多抗的备选流程，适合该胶乳标记大多数多抗；
- 所用多抗必需确保有预期活性且应不含小分子氨基化合物；多抗制剂，宜不含叠氮钠；
- 动物来源多抗组成有批间差且未知氨基酸序列，宜用考马斯亮蓝染料结合法测蛋白量；
- FlyW&Y 羧基胶乳标记多抗比浊测定大分子抗原时，需优化比浊反应 pH 及 PEG 浓度；
- FlyW&Y 羧基胶乳标记多抗后，需优化偶联物保存液的 pH，以保障偶联物的分散性；
- FlyW&Y 羧基胶乳饱和偶联时需多抗量~20 mg/g 胶乳微球；不同多抗需优化投料比；
- 用 FlyW&Y 羧基胶乳标记多抗，推荐过程为：全程超声波分散胶乳、活化及偶联过程不用分散剂(表面活性剂)、偶联后用 BSA 封闭、比浊反应 PEG 终浓度~2%；
- 用 FlyW&Y 羧基胶乳标记多抗，全程超声处理，如活化或/和偶联使用分散剂，需比较偶联后封闭与不封闭、比浊反应 PEG 浓度(0.25%或 2%)的效应，以提升标记效果；
- 用 FlyW&Y 羧基胶乳标记多抗过程，用温和混匀加分散剂利于简化操作，但需优化多抗的投料比、比较偶联后 BSA 封闭效应、比较免疫比浊的 PEG 浓度效应；如标记多抗过程中没有用分散剂，则偶联后宜封闭，但仍需优化免疫比浊反应的 pH 及 PEG 浓度。

注意事项

1. 冷冻、干燥都会引起羧基胶乳团聚无法再分散，失去效用；
2. 在使用本品前，务必充分振荡混合，使羧基胶乳分散均匀；
3. 移液器吸头和反应管，需避免粘附而造成羧基胶乳损失；
4. 产品保存液中含剧毒成分，切记避免吞咽且远离儿童；
5. 本产品严禁用于人体，仅适合用于研究及体外分析。

附录 1: FlyW&Y 聚苯乙烯羧基胶乳的制备技术

用苯乙烯为主要单体经自由基乳液聚合制备羧基胶乳；自由基聚合反应体系添加设计合成的反应性羧基乳化剂引入表面短链羧基、设计合成的反应性磺酸乳化剂引入表面惰性磺酸；优化偶联抗体的pH，利用胶乳表面的磺酸阴离子吸附多抗，促进多抗高效偶联；无大分子抗原时胶乳标记试剂自发凝聚慢，胶乳标记检测试剂对待测抗原响应信号强。

FlyW&Y羧基胶乳(图1、图2)制备时所用两种特殊表面活性剂使其具有特殊的表面功能基团，用于偶联标记抗体的过程具有一定特殊性。

利用表面静电属性促进抗体偶联及控制偶联物的分散稳定性，是FlyW&Y羧基胶乳设计的技术思路；该思路借鉴于本公司发光免疫用羧基磁珠表面官能团的设计。

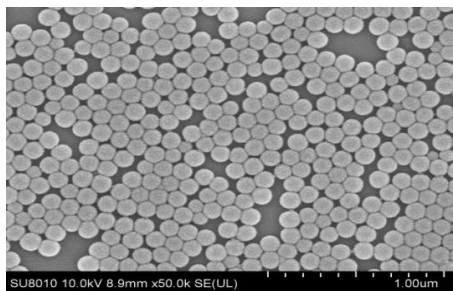


图 1. 100 nm 胶乳扫描电镜

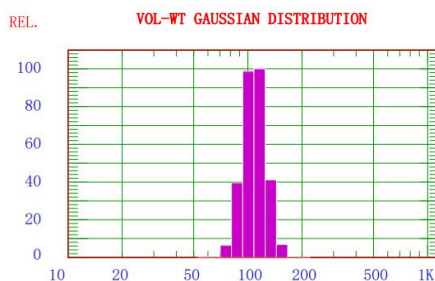


图 2. 100 nm 胶乳 DLS

附录 2:

FlyW&Y 羧基胶乳(180nm)的表征 (全程超声与温和混匀比较)

3.1 FlyW&Y 胶乳偶联抗体的投料比 (磁力搅拌)

25 mM MES pH 6.0 活化胶乳、50 mM HEPES pH 7.4 偶联、磁力搅拌、0.01%吐温 20、BSA 封闭。比浊体系 R1 为 692 μ l (PEG 终浓度 0.25%)、胶乳标记抗体 100 μ l (100 μ g 胶乳)、8 μ l CRP 质控品(含 400 ng CRP)；比浊反应 6.0 min 达到平衡；测定 10 min 后在 600 nm 信号增量 ΔA 。图 3 说明，吐温体系中胶乳标记抗体的最适投料比为 20 μ g/mg 胶乳。

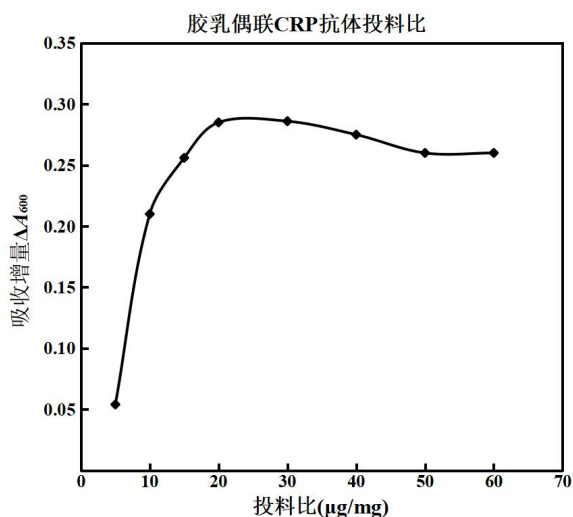


图 3

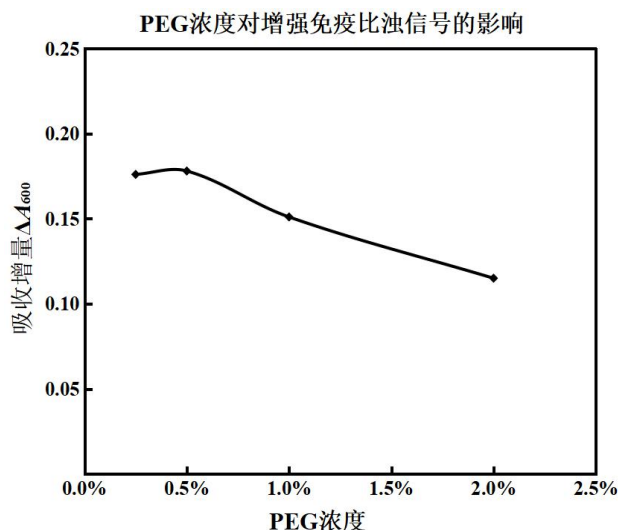


图 4

3.2 FlyW&Y 胶乳偶联抗体后，测试时 PEG 浓度对免疫比浊的影响

优化投料比再测 FlyW&Y 胶乳标记多抗在不同 PEG 浓度下免疫比浊反应信号 (ΔA_{600})；免疫比浊体系，除了 R1 的 PEG 浓度在变化，其余同 3.1 所述，详见图 4。可见，FlyW&Y 胶乳标记 CRP 多抗比浊反应最适 PEG 浓度为 0.25%。

3.2 FlyW&Y 胶乳测量的最佳 pH

优化测试时最佳 PEG 浓度，再测 FlyW&Y 胶乳标记多抗在不同 pH 下免疫比浊反应信号 (ΔA_{600})；免疫比浊体系，除了 R1 的 pH 在变化，其余同 3.1 所述，可见反应 pH 对免疫比浊的影响不大，最佳反应 pH 定为 7.4，详见图 5。

3.3 FlyW&Y 胶乳偶联抗体时吐温 20 浓度与偶联后超声时间对免疫比浊的影响

优化测试时最佳 pH，再测 FlyW&Y 胶乳标记多抗在不同吐温浓度，不同超声分散时间下免疫比浊反应信号 (ΔA_{600})；免疫比浊体系同 3.1 所述，测试结果见图 6。由图可知，FlyW&Y 胶乳偶联抗体所需吐温 20 的最佳浓度为 0.01%，偶联后最佳超声时间为 6 min。

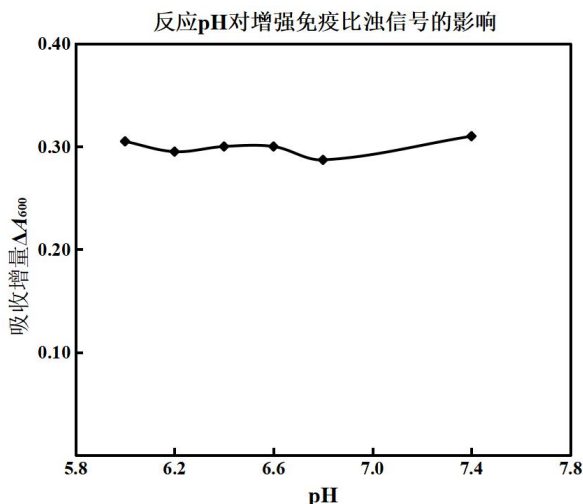


图 5

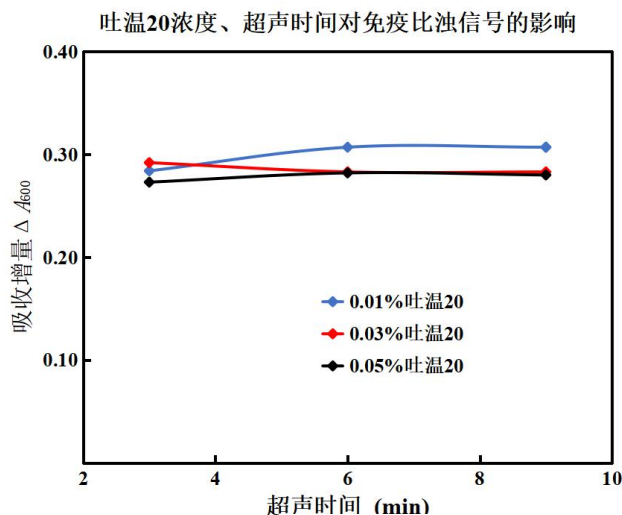


图 6

3.4 FlyW&Y 胶乳测量的量效关系

在最适比浊反应条件下，测定 FlyW&Y 胶乳标记多抗测定 CRP 的量效关系。

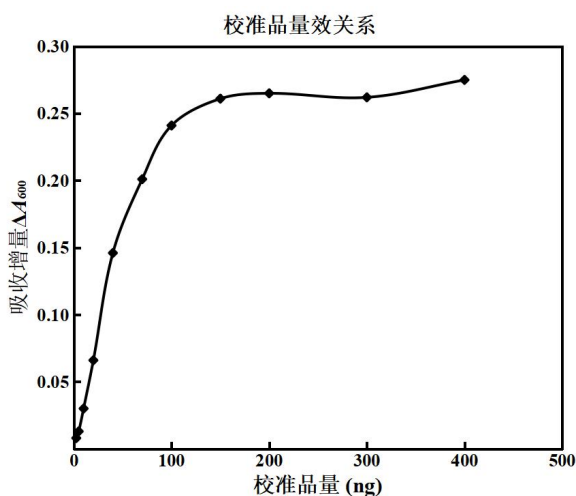


图 7

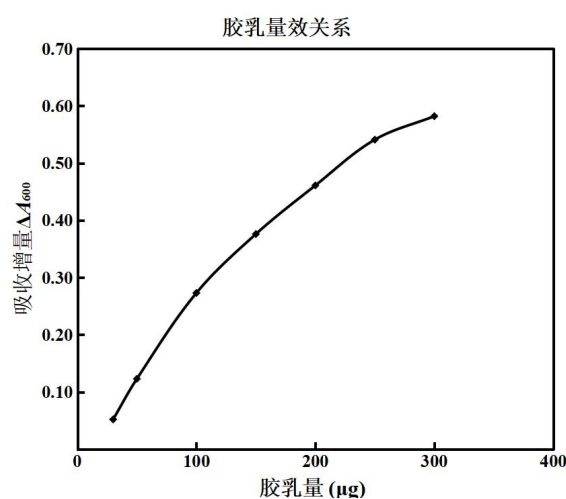


图 8

FlyW&Y-180nm-CRP-胶乳 100 μg 时检测下线为 2.5 ng，检测上线为 150 ng(图 7)。当固定校正品量 400 ng，FlyW&Y-180nm-CRP-胶乳在 30 μg -300 μg 范围接近现线性关系(图 8)。

3.5 不同混匀方式对 FlyW&Y 胶乳偶联抗体的影响

分别使用磁力搅拌、涡旋振荡、旋转混合和手动混匀等 4 种方式，测 FlyW&Y 胶乳标记多抗在不同混匀方式下免疫比浊反应信号(ΔA_{600})；免疫比浊体系同 3.1 所述。活化及偶联用 0.01%吐温 20，BSA 封闭体系中对于混匀方式要求不高(图 9)。

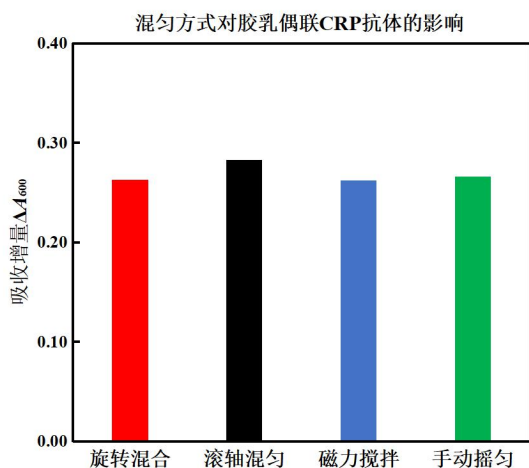


图 9

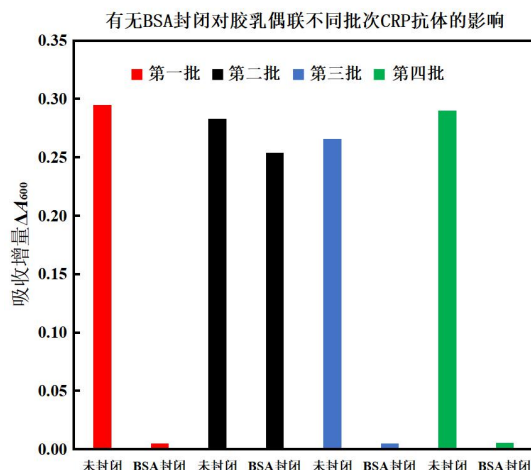


图 10

3.6 有无 BSA 封闭对胶乳偶联不同批次 CRP 抗体的影响

25 mM MES pH 6.0 活化胶乳、50 mM HEPES pH 7.4 偶联、磁力搅拌、0.01%吐温 20、BSA 封闭、比浊时 0.25% PEG。比较 FlyW&Y 胶乳标记不同批次多抗的比浊信号(ΔA_{600})，免疫比浊体系同 3.1。BSA 封闭对 4 批抗体影响不同，未用 BSA 封闭则无差别(图 10)。

3.7 FlyW&Y 胶乳偶联抗体的投料比

考察第四批抗体投料比(图 11)。全程超声、无吐温 20、BSA 封闭、比浊反应 2%PEG, 最适投料比为 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。磁力搅拌、0.01%吐温、BSA 封闭、2% PEG, 最适投料比为 40 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 但当比浊反应时 PEG 浓度降为 0.25%则最适投料比为 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。可见, 不同批次抗体间的差异导致不同批次抗体的最适投料比不同, 所需最适比浊反应 PEG 浓度也不同。

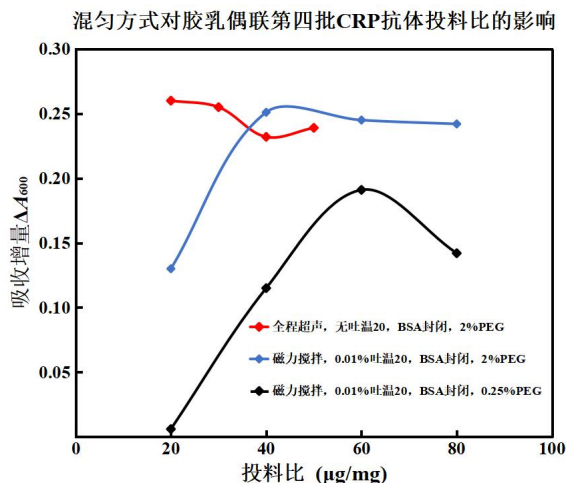


图 11

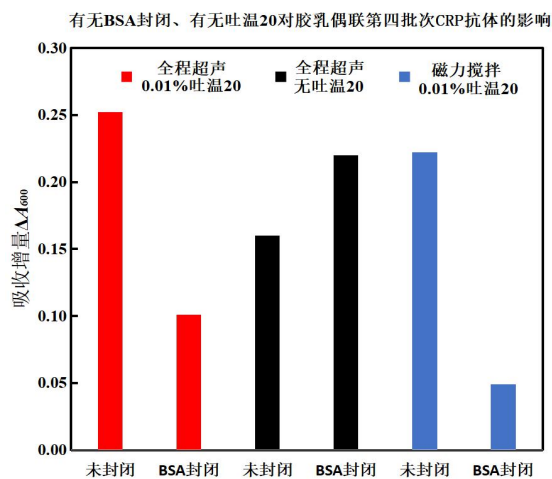


图 12

3.8 混匀方式、BSA 封闭、吐温 20 对胶乳偶联 CRP 抗体试剂性能的影响

优化投料比, 比较混匀方式、BSA 封闭、吐温 20 对胶乳标记第四批 CRP 抗体所得试剂性能的影响(图 12)。全程超声、0.01%吐温 20、比浊体系 2%PEG, 标记后不用 BSA 封闭所得标记试剂性能更好; 全程超声、无吐温 20、比浊体系 2%PEG, 标记后用 BSA 封闭所得标记试剂性能更好; 磁力搅拌、0.01%吐温、比浊体系 0.25%PEG, 则不宜用 BSA 封闭。

可见, FlyW&Y 胶乳活化及抗体偶联时如用吐温, 则标记抗体后不宜用 BSA 封闭。

3.9 不同混匀方式制备的 FlyW&Y 胶乳测量的校准品量效关系

最适比浊反应条件下, 不同方式制备 FlyW&Y 胶乳标记多抗测定 CRP 的量效关系。

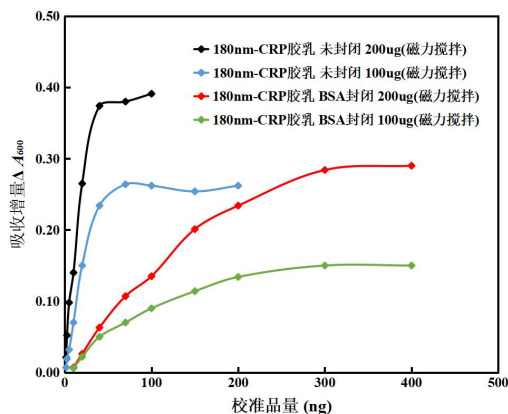


图 13

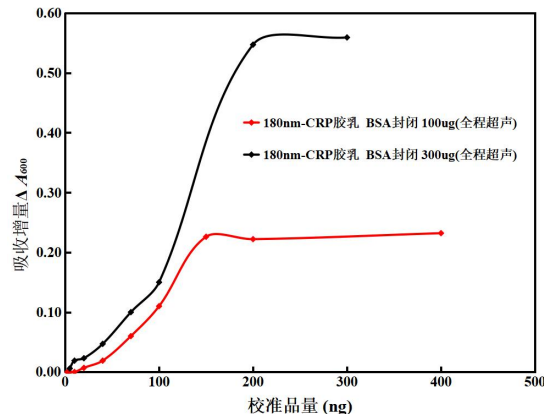


图 14

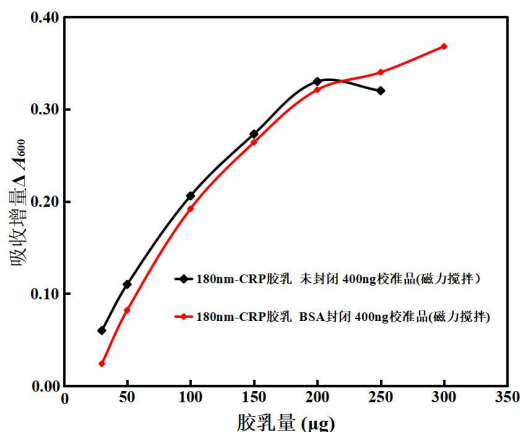


图 15

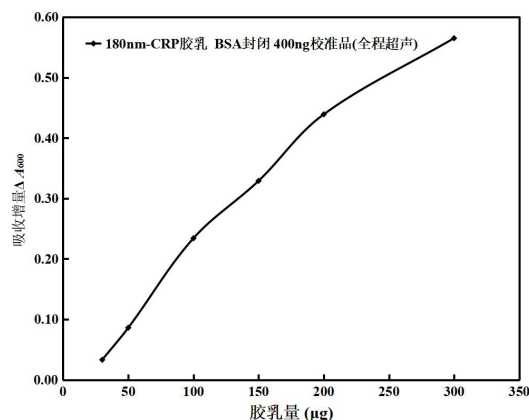


图 16

FlyW&Y-180nm-CRP-胶乳 100 μg 时检测下线为 1.5 ng-5 ng, 检测上线根据胶乳用量增加而升高, 胶乳标记抗体的常规用量下为 50 ng-150 ng(图 13、图 14)。固定校正品量 400 ng, FlyW&Y-180nm-CRP-胶乳标记抗体用量 30 μg -200 μg 范围呈现线性关系(图 15、图 16)。

综上所述, 对 CRP 抗体, 如下三种标记及应用能得到性能较好比浊试剂:

- (1) 全程超声, 活化标记时无吐温 20, 比浊时 2% PEG, 胶乳标记抗体后用 BSA 封闭;
- (2) 全程超声, 体系用 0.01%吐温 20, 比浊时 2% PEG, 胶乳标记抗体后不用 BSA 封闭;
- (3) 磁力搅拌, 体系用 0.01%吐温 20, 比浊时 0.25% PEG, 胶乳标记抗体后不用 BSA 封闭。

3.9 FlyW&Y-CRP 胶乳加速稳定实验

将 FlyW&Y-CRP 胶乳标记抗体在 37 度饱和湿度条件下加速老化 1-4 周, 测 FlyW&Y 胶乳用不同混匀方式标记多抗后的免疫比浊反应信号(ΔA_{600}); 免疫比浊体系同 3.1 所述, 结果见图 17。可见, 加速 4 周后, FlyW&Y-CRP 胶乳标记抗体的信号相当。

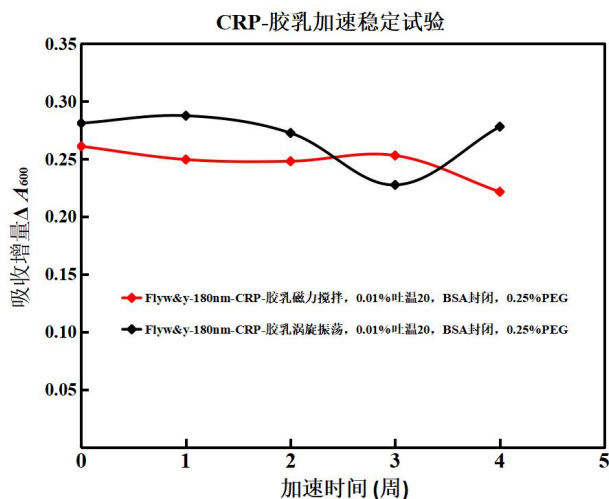


图 17

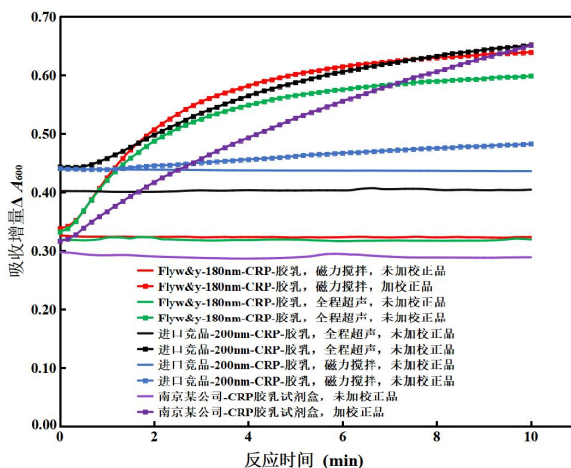


图 18

3.10 FlyW&Y-CRP 胶乳反应过程

比浊体系 R1 为 692 μl (PEG 终浓度 0.25%)、胶乳标记抗体 100 μl (100 μg 胶乳)、8 μl CRP 质控品(含 400 ng CRP)。可见, FlyW&Y-CRP 胶乳标记抗体比浊反应 6.0 min 就接近平衡(图 18); 进口自进口竞品胶乳标记的相同抗体及南京某公司 CRP 试剂盒中的标记抗体, 在各自优化的比浊反应体系中 10min 内仍然未达到平衡。可见, FlyW&Y-CRP 胶乳标记抗体试剂与相同大分子抗原反应的速度更快。