适用于聚合物磁珠的产品检验方法

Technical Note 005

纳 微
NanoMicro

简介

本文档概述了MagneStar®系列聚合物磁珠在用于化学发光试剂制备前的质量控制点，并简单介绍了对各质量控制点进行监测的方法，监测内容主要包含以下几个方面：

- 目视检查外观
- 目视分散性-显微镜镜检
- 磁响应时间
- 分散稳定性
- 试剂本底
- 链霉亲和素的脱落验证

实验材料

为了完成上述的监测内容，除了使用的聚合物磁珠外，还需要准备如下实验材料：

- 滚轴混合器——用于聚合物磁珠的混匀
- 超声波清洗机——用于聚合物磁珠的混匀
- 光学显微镜——用于目视分散性的检测
- 分光光度计——用于磁响应时间的监测
- 磁铁/磁力架——用于磁响应时间的监测
- 秒表和相机——用于分散稳定性的监测
- 烘箱——用于链霉亲和素脱落的监测
- 层析柜——用于磁珠包被
- 全自动化学发光仪——用于试剂本底和链霉亲和素脱落的监测

实验准备

MagneStar®系列聚合物磁珠的正常存储温度为2–8 °C，同时由于磁珠在长时间的重力作用下会沉降在包装瓶底部，因此在对各项内容进行监测前需将磁珠进行复温并混匀。

通常推荐的磁珠试剂混匀复温方式为先手动上下颠倒混匀20次，然后放置于滚轴混合器上混合至少60 min并确保包装瓶的底部没有磁珠沉淀。

根据磁珠试剂的包装规格不同，混匀和复温的时间也会不同，体积越大所需要的混匀和复温时间越长。如果在混匀中增加超声波处理将有助于磁珠更快的混匀。

目视检查外观

在开始使用磁珠前，首先应对其外观进行检查，主要对磁泄露、粘壁和大颗粒沉淀等几个方面进行检查。

- 磁泄露：当出现磁泄露时，会在包装瓶的底部看到黑色沉淀物。当磁珠包层太薄或结构不完整时可能会导致磁泄露。
- 粘壁：如在上下颠倒过程中，发现有大量磁珠溶液滞留在瓶壁上，则为明显的粘壁现象。磁珠亲水性不够或者包材质量都会导致粘壁问题。
- 大颗粒沉淀：大颗粒沉淀是指在试剂有肉眼可见的磁珠聚集物，通常出现在磁珠干结或冷冻后，也会因为磁珠本身的亲水性不够产生目视可及的团聚。

目视分散性-显微镜镜检

当磁珠在出现轻微团聚时，通过肉眼是无法分辨的，此时需要借助光学显微镜进行镜检观察，通常其步骤如下：

- 根据磁珠的标称固含用去离子水将磁珠稀释至0.5–1 mg/mL浓度得到工作液磁珠；
- 取3–5 μL 工作液磁珠于载玻片上并盖上盖玻片；
- 打开显微镜光源并调节至合适的亮度，再将载玻片至于载物台上并用样本夹固定好，移动标本移动器使待观察区位于通光孔处；
- 旋转物镜转换器至合适的物镜（放大倍数通常选取40×或60×），先调节粗粗准焦螺旋后调节细准焦螺旋直至视野中能看到清晰的磁珠颗粒。通过移动标本移动器观察不同位置磁珠的分散情况。

磁响应时间

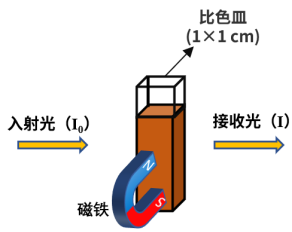
磁响应时间反映了磁珠在特定磁场下的移动速度，过快或过慢的磁响应都会对后续的实验产生影响。过快的磁响应可能说明磁珠的磁含量高，从而会使磁珠更易沉淀，或者外加磁场的强度过大导致后续分散难度加大；而过慢的磁响应会影响整个测试的时间，不利于高通量检测的开展。

影响磁响应的因素主要有：磁含量、粒径、外加磁场的强度和磁珠的浓度。

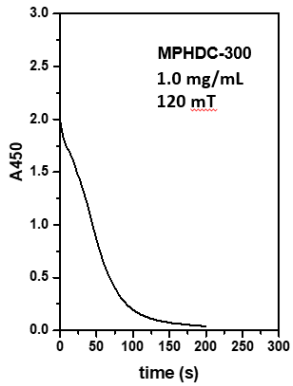
简易的磁响应时间测定方法如下：

- 用去离子水将磁珠稀释至1 mg/mL浓度得到工作液磁珠并放置于比色皿中；
- 打开分光光度计，选择时间扫描功能，设置检测波长为450 nm，扫描时间为200 s；
- 在样品池的外侧固定位置放置准备好的磁铁，用高斯计测得与磁铁相邻内壁的磁感应强度并记录；
- 放入空白样品并完成校准；
- 快速放入待测磁珠工作液并点击“开始”按键，观察样品吸光度随着时间的变化，待样品溶液吸光度小于0.1时，可手动停止测试，保留测试结果。绘制吸光度随时间变化的曲线图，找到当吸光度降至起始吸光度10%以下时所对应的时间，即为磁响应时间。

下图为1.0 mg/mL MP3-COOH磁珠在120 mT的磁场强度下的磁响应时间曲线。



$$A = -Log\frac{I}{I_0}$$



分散稳定性

MagneStar®系列聚合物磁珠采用了独有的表面包被技术使得磁珠表面高度亲水，沉降速率低，在水中可以保持长时间悬浮，满足大部分自动化分析仪器的需求。

常规分散稳定性的测试方法如下：

- 用去离子水将磁珠稀释至1 mg/mL浓度得到工作液磁珠；
- 用涡旋混匀器充分混匀10–15 s后转移至比色皿中；
- 分别在比色皿静置了15 min、30 min、45 min和 60 min后拍照记录磁珠的沉降情况。

试剂本底

MagneStar ®系列聚合物磁珠表面的官能团主要有羧基、甲苯磺酰基以及以羧基或甲苯磺酰基为基础偶联的链霉亲和素蛋白。其中羧基和甲苯磺酰基磁珠需要共价结合抗原或抗体制备成磁珠组分用于测试，而链霉亲和素磁珠既可以直接做为单组分磁珠试剂，也可以预包被生物素化的抗原或抗体后作为磁珠试剂用于检测。下面就这四种磁珠试剂的特性对本底的影响做简单介绍：

- 羧基磁珠试剂：表面的羧基基团为亲水基团，在包被抗原或抗体后，仍有较好的亲水性，所以不需要进行过多的封闭也能有较好的本底；
- 甲苯磺酰基磁珠试剂：表面的甲苯磺酰基基团为疏水基团，在抗原或抗体偶联后要进行充分的封闭才能获得较低的本底；
- 链霉亲和素单组份磁珠试剂：本底受到偶联SA前的官能团类型和SA磁珠封闭程度的影响，此外磁珠稀释液也会对本底产生较大影响；
- 链霉亲和素预包被磁珠试剂：试剂的本底除了受到SA磁珠本身的影响，还会受到生物素化抗原/抗体中标记比例以及预包被后的封闭情况的影响。

链霉亲和素的脱落验证

链霉亲和素（以下简称SA）在存放的过程中脱落是链霉亲和素磁珠最常见的问题，随着溶液中游离SA浓度的增加，会显著影响试剂的反应性。因此如何简便快速的验证链霉亲和素磁珠是否存在明显的SA脱落问题成为了必要。

通常我们会通过热加速的方法来判断链霉亲和素磁珠是否存在SA脱落问题。具体方法如下：

- 取约20 mg SA磁珠，磁吸分离并用磁珠稀释液重悬清洗3次后，用磁珠稀释液稀释到0.5 mg/mL的工作浓度。
- 将磁珠工作液等分成2份，一份放置于4°C下保存，另一份放置于37°C下老化。7天后同时取出并上机测试校准品；
- 如果在37°C下老化7天后测试的校准品信号值与未老化磁珠试剂的信号值偏差在10%以内，说明SA的脱落不明显；如果37°C老化后的信号值与未老化磁珠试剂的信号值偏差超出10%以上，需要将老化的磁珠磁吸分离并置换新的磁珠稀释液，然后重新测试校准品，如果反应性恢复到与未加速的试剂一样，说明磁珠在老化过程中有SA的脱落，因为稀释液的置换可以去除溶液中游离的SA，使试剂的性能恢复到未老化时的水平。

注意事项：

a) 在测试SA脱落时，最好选用竞争法的试剂，因为SA的脱落量大约只占总SA量的0.2–0.3%，并不影响磁珠的生物素载量，有些夹心法的试剂并不受这部分游离SA的影响。

b) SA磁珠的脱落情况会受到热加速温度、热加速时间和磁珠稀释液的配方等因素的影响。通常温度越高，时间越长，SA的脱落越严重；SA磁珠在低盐浓度的稀释液中比在高盐浓度的稀释液中脱落的要严重。因为高盐更利于SA吸附在磁珠表面而不脱落。