



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107389917 A

(43)申请公布日 2017.11.24

(21)申请号 201710494245.8

(22)申请日 2017.06.26

(71)申请人 安徽安龙基因医学检验所有限公司

地址 230000 安徽省合肥市庐阳区工业区

阜阳路与北城大道交口A6号1-2层

(72)发明人 韦玉军 李航 陆宝石 苏军

吴远航

(74)专利代理机构 杭州君度专利代理事务所

(特殊普通合伙) 33240

代理人 王桂名

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:抗原制备;抗体制备;多克隆抗体纯化;磁珠制备;磁性壳聚糖微球制备;多克隆抗体与氨基化修饰的磁性壳聚糖微球的偶联:加入EDC·HCL溶液,戊二醛、兔抗单增李斯特菌多克隆抗体溶液,用的PBS溶液稀释至2ml,室温孵育5-15min;在外加磁场下,去除上清,使用PBS溶液反复多次清洗,直至上清蛋白为0,弃上清;加入氨基化修饰的磁性壳聚糖微球2倍体积的5%BSA溶液,孵育,使偶联抗体的磁性壳聚糖微球封闭;在外加磁场作用下,弃上清,使用含0.05%Tween-20的PBS溶液清洗偶联多克隆抗体的免疫磁珠多次,然后在室温下真空干燥上述免疫磁珠24h,即可。本发明具有高效、灵敏性好等优点。

1. 一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,其特征在于:具体步骤如下:

一、抗原制备:

- 1.1、单增李斯特菌于LB平板上划线,37℃过夜培养;
- 1.2、挑取李斯特菌落至10ml LB液体培养基中,摇菌;
- 1.3、再按1%接种量扩大培养,37℃,180r/min的条件下,摇菌24h;
- 1.4、加入体积浓度为40%的甲醛溶液,使甲醛溶液的最终体积浓度为0.3%,室温灭活24h;
- 1.5、将菌液离心4-8min,收集菌体,再加入PBS溶液重悬菌体,然后离心3-6min,去上清,重复3次;
- 1.6、使用200w超声波破碎仪破碎菌体,连续破碎30个循环,每循环5s,间隔9s;
- 1.7、在12000r/min的条件下离心5-15min,收集细胞碎片,无菌水重悬,制备得到抗原备用;

二、抗体制备:

2.1、取体重2.0kg健康纯种新西兰白兔,进行基础免疫,即取0.5ml上述抗原与弗氏完全佐剂1:1混匀,颈背部皮下多点注射,耳缘静脉每点注射0.1ml,3天后加强免疫,即取0.7ml抗原与弗氏不完全佐剂1:1混匀,颈背部每点注射0.1ml,耳缘静脉每点注射0.2ml,第5、7、9、11、13天采用和第3天一样的加强免疫;

2.2、6天后,颈动脉取血,置于无菌试管中,待凝固后收集血清,制备得到抗体备用;

三、多克隆抗体纯化:

采用Protein A亲和层析柱法:先用5-10倍柱体积的去离子水以25ml/min的速度洗出保护剂溶液,然后用平衡缓冲液平衡柱子,上样后继续用平衡缓冲液洗脱杂蛋白,然后用洗脱缓冲液洗脱,收集洗脱峰,每管1ml,加入50μL中和缓冲液,冷冻干燥;

四、磁珠制备:

- 4.1、在通氮气的条件下,将12.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、23.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于800ml蒸馏水中,加热回流,加热至90℃时,在机械搅拌下快速把30ml氨水加入以上溶液中;
- 4.2、1h后反应结束,在外加磁场作用下,弃上清;
- 4.3、加入100ml乙醇,充分搅拌洗涤磁珠,在外加磁场下,收集磁珠,再用100ml蒸馏水洗涤,常温下真空干燥,即得 Fe_3O_4 纳米磁珠;

五、磁性壳聚糖微球制备:

- 5.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;
- 5.2、取1g Fe_3O_4 纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌20min;
- 5.3、然后加入200ml液体石蜡油,40℃下,300r/min条件下搅拌30min;
- 5.4、温度升高至50℃,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌30min;
- 5.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60℃条件下搅拌,调节pH为10,搅拌4h;
- 5.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50℃条件下真空干燥;

六、磁性壳聚糖微球的表面氨基化修饰:

6.1、称取1g磁性壳聚糖微球于三角瓶中,加入2ml环氧氯丙烷和0.5mol/L的NaOH溶液,60℃振荡反应12h,过滤除去液体;

6.2、加入5ml的乙二胺和0.5mol/L的NaOH溶液,60℃振荡反应12h;

6.3、产物经乙醇和蒸馏水依次洗涤,再在55℃下真空干燥24h,得到氨基化磁性壳聚糖微球;

七、多克隆抗体与氨基化修饰的磁性壳聚糖微球的偶联:

7.1、取0.01g的氨基化修饰的磁性壳聚糖微球于5ml离心管中,加入10mg/ml的EDC·HCL溶液,400μL戊二醛、40-60μL 10mg/ml的兔抗单增李斯特菌多克隆抗体溶液,用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液稀释至2ml,室温孵育5-15min;

7.2、在外加磁场下,去除上清,使用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液反复多次清洗,直至上清蛋白为0,弃上清;

7.3、加入氨基化修饰的磁性壳聚糖微球2倍体积的5%BSA溶液,37℃下,孵育0.5-1.5小时,使偶联抗体的磁性壳聚糖微球封闭;

7.4、在外加磁场作用下,弃上清,使用含0.05%Tween-20的PBS溶液清洗偶联多克隆抗体的免疫磁珠多次,然后在室温下真空干燥上述免疫磁珠24h,即可。

2.根据权利要求1所述的一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤1.2中,在180r/min的条件下摇菌10-13h。

3.根据权利要求1所述的一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤1.5中,对菌液的离心转速为7000r/min。

4.根据权利要求1所述的一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤三中,所述的平衡缓冲液采用PBS溶液,所述的洗脱缓冲液采用甘氨酸缓冲液,所述的中和缓冲液采用Tris-HCl缓冲液。

5.根据权利要求1或4所述的一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤三中,所述的PBS溶液的浓度为0.01mol/L,所述的甘氨酸缓冲液的浓度为0.1mol/L,所述的Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L。

6.根据权利要求1或4所述的一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤三中,所述的PBS溶液的pH为7.4,所述的甘氨酸缓冲液的pH为2.7,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为9.0。

7.根据权利要求1所述的一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤5.3中,所述的液体石蜡油中含20%司盘-80。

一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料领域,具体来说是一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法。

背景技术

[0002] 单核细胞增生李斯特菌简称单增李斯特菌,是李斯特菌属中最重要的食源性病原菌,可以感染人和多种动物,引起人和动物脑膜炎、败血症、流产等症状,该菌在自然界中分布广泛,并且在4℃冰箱保存的食物中仍能生长繁殖,是冷藏食品中威胁人类健康的主要病原菌之一,极易污染肉、蛋、海产品、乳制品、蔬菜等食品,引起食物中毒和李斯特菌病的发生,尤其在欧美等发达国家经常发生,给人类健康和食品工业造成严重的危害。

[0003] 然而目前对于致病菌的检测,一般需要较复杂的样本处理及长时间的预增菌,来达到方法的检测灵敏度,因此开发一种快速、灵敏、准且、简便的检测方法具有尤为重要的意义。

[0004] 另一方面单一的免疫检测技术检测限往往较高,难以体现免疫检测技术的优势,已有研究者尝试将免疫检测技术与其他技术相结合或者两种免疫技术相结合来改进这一缺陷,目前已有免疫磁性微球富集技术与PCR技术相结合检测沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌的报道,与单一PCR技术相比较,检测速度明显提高,但是仍然存在假阳性、污染、仪器昂贵等问题,因此为了提高免疫磁珠富集技术,需要从制备高质量的免疫磁性微球和高效的多克隆抗体方面入手,进行深入细致的探索与实践。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是为了克服现有技术中的检测速度慢、效果不好、质量差的缺陷,而提供一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题提供的技术方案是:本发明公开了一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:

[0007] 一、抗原制备:

[0008] 1.1、单增李斯特菌于LB平板上划线,37℃过夜培养;

[0009] 1.2、挑取李斯特菌落至10ml LB液体培养基中,摇菌;

[0010] 1.3、再按1%接种量扩大培养,37℃,180r/min的条件下,摇菌24h;

[0011] 1.4、加入体积浓度为40%的甲醛溶液,使甲醛溶液的最终体积浓度为0.3%,室温灭活24h;

[0012] 1.5、将菌液离心4-8min,收集菌体,再加入PBS溶液重悬菌体,然后离心3-6min,去上清,重复3次;

[0013] 1.6、使用200w超声波破碎仪破碎菌体,连续破碎30个循环,每循环5s,间隔9s;

[0014] 1.7、在12000r/min的条件下离心5-15min,收集细胞碎片,无菌水重悬,制备得到抗原备用;

[0015] 二、抗体制备:

[0016] 2.1、取体重2.0kg健康纯种新西兰白兔,进行基础免疫,即取0.5ml上述抗原与弗氏完全佐剂1:1混匀,颈背部皮下多点注射,耳缘静脉每点注射0.1ml,3天后加强免疫,即取0.7ml抗原与弗氏不完全佐剂1:1混匀,颈背部每点注射0.1ml,耳缘静脉每点注射0.2ml,第5、7、9、11、13天采用和第3天一样的加强免疫;

[0017] 2.2、6天后,颈动脉取血,置于无菌试管中,待凝固后收集血清,制备得到抗体备用;

[0018] 三、多克隆抗体纯化:

[0019] 采用Protein A亲和层析柱法:先用5-10倍柱体积的去离子水以25ml/min的速度洗出保护剂溶液,然后用平衡缓冲液平衡柱子,上样后继续用平衡缓冲液洗脱杂蛋白,然后用洗脱缓冲液洗脱,收集洗脱峰,每管1ml,加入50μL中和缓冲液,冷冻干燥;

[0020] 四、磁珠制备:

[0021] 4.1、在通氮气的条件下,将12.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、23.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于800ml蒸馏水中,加热回流,加热至90℃时,在机械搅拌下快速把30ml氨水加入以上溶液中;

[0022] 4.2、1h后反应结束,在外加磁场作用下,弃上清;

[0023] 4.3、加入100ml乙醇,充分搅拌洗涤磁珠,在外加磁场下,收集磁珠,再用100ml蒸馏水洗涤,常温下真空干燥,即得 Fe_3O_4 纳米磁珠;

[0024] 五、磁性壳聚糖微球制备:

[0025] 5.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;

[0026] 5.2、取1g Fe_3O_4 纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌20min;

[0027] 5.3、然后加入200ml液体石蜡油,40℃下,300r/min条件下搅拌30min;

[0028] 5.4、温度升高至50℃,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌30min;

[0029] 5.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60℃条件下搅拌,调节pH为10,搅拌4h;

[0030] 5.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50℃条件下真空干燥;

[0031] 六、磁性壳聚糖微球的表面氨基化修饰:

[0032] 6.1、称取1g磁性壳聚糖微球于三角瓶中,加入2ml环氧氯丙烷和0.5mol/L的NaOH溶液,60℃振荡反应12h,过滤除去液体;

[0033] 6.2、加入5ml的乙二胺和0.5mol/L的NaOH溶液,60℃振荡反应12h;

[0034] 6.3、产物经乙醇和蒸馏水依次洗涤,再在55℃下真空干燥24h,得到氨基化磁性壳聚糖微球;

[0035] 七、多克隆抗体与氨基化修饰的磁性壳聚糖微球的偶联:

[0036] 7.1、取0.01g的氨基化修饰的磁性壳聚糖微球于5ml离心管中,加入10mg/ml的EDC·HCL溶液,400μL戊二醛、40-60μL 10mg/ml的兔抗单增李斯特菌多克隆抗体溶液,用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液稀释至2ml,室温孵育5-15min;

[0037] 7.2、在外加磁场下,去除上清,使用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液反复多次清洗,直至上清蛋白为0,弃上清;

- [0038] 7.3、加入氨基化修饰的磁性壳聚糖微球2倍体积的5%BSA溶液,37℃下,孵育0.5-1.5小时,使偶联抗体的磁性壳聚糖微球封闭;
- [0039] 7.4、在外加磁场作用下,弃上清,使用含0.05%Tween-20的PBS溶液清洗偶联多克隆抗体的免疫磁珠多次,然后在室温下真空干燥上述免疫磁珠24h,即可。
- [0040] 作为优选,所述的步骤1.2中,在180r/min的条件下摇菌10-13h。
- [0041] 作为优选,所述的步骤1.5中,对菌液的离心转速为7000r/min。
- [0042] 作为优选,所述的步骤三中,所述的平衡缓冲液采用PBS溶液,所述的洗脱缓冲液采用甘氨酸缓冲液,所述的中和缓冲液采用Tris-HCl缓冲液。
- [0043] 作为优选,所述的步骤三中,所述的PBS溶液的浓度为0.01mol/L,所述的甘氨酸缓冲液的浓度为0.1mol/L,所述的Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L。
- [0044] 作为优选,所述的步骤三中,所述的PBS溶液的pH为7.4,所述的甘氨酸缓冲液的pH为2.7,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为9.0。
- [0045] 作为优选,所述的步骤5.3中,所述的液体石蜡油中含20%司盘-80。
- [0046] 与现有技术相比,本发明具有以下有益优点:
- [0047] 1、本发明抗原自制,采用单增李斯特菌模式菌株CMCC 54007作为抗原来源;
- [0048] 2、本发明破碎菌体采用超声波破碎法,破碎均匀且彻底;
- [0049] 3、本发明抗体制备采用皮下多点注射与耳缘静脉注射相结合的方法用单增李斯特菌抗原免疫新西兰白兔,可快速高效制备多克隆抗体;
- [0050] 4、本发明采用protein A亲和柱层析法纯化多克隆抗体,纯度高,效价高;
- [0051] 5、本发明制备的纳米磁珠采用高分子壳聚糖包被,其具有以下特征:95%的脱乙酰度,分子量为5kDa;磁性壳聚糖微球表面光滑致密、无孔,特异性好,有很好的磁响应性和超顺磁性;
- [0052] 6、本发明对磁性壳聚糖进行表面氨基化修饰,提高其表面活性氨基含量,利于与抗体偶联,同时也可提高后期免疫磁珠对菌体富集效率;
- [0053] 7、本发明磁性壳聚糖微球与抗体的偶联时间为5-20min,作为优先取10min;
- [0054] 8、本发明偶连缓冲液的pH值6.6-8.2,作为优选pH值为7.4;
- [0055] 9、本发明0.01克免疫磁珠可偶联40-60μL浓度为10mg/ml的单增李斯特菌多克隆抗体,作为优先,本发明取50μL,
- [0056] 10、本发明制得的免疫磁珠采用5%的BSA溶液进行封闭。
- [0057] 本发明的有益之处在于,可以大大缩短单增李斯特菌检验时间、富集效率高、特异性好、灵敏性高、可重复利用、减少成本等。

具体实施方式

- [0058] 以下结合具体实施例进一步说明,但本发明并不仅限于这些实施例。
- [0059] 实施例1
- [0060] 本发明公开了一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:
- [0061] 一、抗原制备:
- [0062] 1.1、单增李斯特菌于LB平板上划线,37℃过夜培养;
- [0063] 1.2、挑取李斯特菌落至10ml LB液体培养基中,摇菌12h;

[0064] 1.3、再按1%接种量扩大培养,37℃,180r/min的条件下,摇菌24h;

[0065] 1.4、加入体积浓度为40%的甲醛溶液,使甲醛溶液的最终体积浓度为0.3%,室温灭活24h;

[0066] 1.5、在7000r/min的条件下,将菌液离心6min,收集菌体,再加入PBS溶液重悬菌体,然后离心5min,去上清,重复3次;

[0067] 1.6、使用200w超声波破碎仪破碎菌体,连续破碎30个循环,每循环5s,间隔9s;

[0068] 1.7、在12000r/min的条件下离心10min,收集细胞碎片,无菌水重悬,制备得到抗原备用;

[0069] 二、抗体制备:

[0070] 2.1、取体重2.0kg健康纯种新西兰白兔,进行基础免疫,即取0.5ml上述抗原与弗氏完全佐剂1:1混匀,颈背部皮下多点注射,耳缘静脉每点注射0.1ml,3天后加强免疫,即取0.7ml抗原与弗氏不完全佐剂1:1混匀,颈背部每点注射0.1ml,耳缘静脉每点注射0.2ml,第5、7、9、11、13天采用和第3天一样的加强免疫;

[0071] 2.2、6天后,颈动脉取血,置于无菌试管中,待凝固后收集血清,制备得到抗体备用;

[0072] 三、多克隆抗体纯化:

[0073] 采用Protein A亲和层析柱法:先用7倍柱体积的去离子水以25ml/min的速度洗出保护剂溶液,然后用平衡缓冲液平衡柱子,上样后继续用平衡缓冲液洗脱杂蛋白,然后用洗脱缓冲液洗脱,收集洗脱峰,每管1ml,加入50μL中和缓冲液,冷冻干燥;

[0074] 四、磁珠制备:

[0075] 4.1、在通氮气的条件下,将12.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、23.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于800ml蒸馏水中,加热回流,加热至90℃时,在机械搅拌下快速把30ml氨水加入以上溶液中;

[0076] 4.2、1h后反应结束,在外加磁场作用下,弃上清;

[0077] 4.3、加入100ml乙醇,充分搅拌洗涤磁珠,在外加磁场下,收集磁珠,再用100ml蒸馏水洗涤,常温下真空干燥,即得 Fe_3O_4 纳米磁珠;

[0078] 五、磁性壳聚糖微球制备:

[0079] 5.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;

[0080] 5.2、取1g Fe_3O_4 纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌20min;

[0081] 5.3、然后加入200ml液体石蜡油,40℃下,300r/min条件下搅拌30min;

[0082] 5.4、温度升高至50℃,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌30min;

[0083] 5.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60℃条件下搅拌,调节pH为10,搅拌4h;

[0084] 5.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50℃条件下真空干燥;

[0085] 六、磁性壳聚糖微球的表面氨基化修饰:

[0086] 6.1、称取1g磁性壳聚糖微球于三角瓶中,加入2ml环氧氯丙烷和0.5mol/L的NaOH溶液,60℃振荡反应12h,过滤除去液体;

[0087] 6.2、加入5ml的乙二胺和0.5mol/L的NaOH溶液,60℃振荡反应12h;

[0088] 6.3、产物经乙醇和蒸馏水依次洗涤,再在55℃下真空干燥24h,得到氨基化磁性壳聚糖微球;

[0089] 七、多克隆抗体与氨基化修饰的磁性壳聚糖微球的偶联:

[0090] 7.1、取0.01g的氨基化修饰的磁性壳聚糖微球于5ml离心管中,加入10mg/ml的EDC·HCL溶液,400μL戊二醛、50μL 10mg/ml的兔抗单增李斯特菌多克隆抗体溶液,用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液稀释至2ml,室温孵育10min;

[0091] 7.2、在外加磁场下,去除上清,使用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液反复3次清洗,直至上清蛋白为0,弃上清;

[0092] 7.3、加入氨基化修饰的磁性壳聚糖微球2倍体积的5%BSA溶液,37℃下,孵育1小时,使偶联抗体的磁性壳聚糖微球封闭;

[0093] 7.4、在外加磁场作用下,弃上清,使用含0.05%Tween-20的PBS溶液清洗偶联多克隆抗体的免疫磁珠5次,然后在室温下真空干燥上述免疫磁珠24h,即可。

[0094] 所述的步骤1.2中,在180r/min的条件下摇菌12h。

[0095] 所述的步骤三中,所述的平衡缓冲液采用PBS溶液,所述的洗脱缓冲液采用甘氨酸缓冲液,所述的中和缓冲液采用Tris-HCl缓冲液。

[0096] 所述的步骤三中,所述的PBS溶液的浓度为0.01mol/L,所述的甘氨酸缓冲液的浓度为0.1mol/L,所述的Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L。

[0097] 所述的步骤三中,所述的PBS溶液的pH为7.4,所述的甘氨酸缓冲液的pH为2.7,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为9.0。

[0098] 所述的步骤5.3中,所述的液体石蜡油中含20%司盘-80。

[0099] 实施例2

[0100] 本发明公开了一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:

[0101] 一、抗原制备:

[0102] 1.1、单增李斯特菌于LB平板上划线,37℃过夜培养;

[0103] 1.2、挑取李斯特菌落至10ml LB液体培养基中,180r/min的条件,摇菌12h;

[0104] 1.3、再按1%接种量扩大培养,37℃,180r/min的条件下,摇菌24h;

[0105] 1.4、加入体积浓度为40%的甲醛溶液,使甲醛溶液的最终体积浓度为0.3%,室温灭活24h;

[0106] 1.5、在7000r/min的条件下,将菌液离心5min,收集菌体,再加入PBS溶液重悬菌体,然后离心3-6min,去上清,重复3次;

[0107] 1.6、使用200w超声波破碎仪破碎菌体,连续破碎30个循环,每循环5s,间隔9s;

[0108] 1.7、在12000r/min的条件下离心15min,收集细胞碎片,无菌水重悬,制备得到抗原备用;

[0109] 二、抗体制备:

[0110] 2.1、取体重2.0kg健康纯种新西兰白兔,进行基础免疫,即取0.5ml上述抗原与弗氏完全佐剂1:1混匀,颈背部皮下多点注射,耳缘静脉每点注射0.1ml,3天后加强免疫,即取0.7ml抗原与弗氏不完全佐剂1:1混匀,颈背部每点注射0.1ml,耳缘静脉每点注射0.2ml,第5、7、9、11、13天采用和第3天一样的加强免疫;

[0111] 2.2、6天后,颈动脉取血,置于无菌试管中,待凝固后收集血清,制备得到抗体备

用;

[0112] 三、多克隆抗体纯化:

[0113] 采用Protein A亲和层析柱法:先用5柱体积的去离子水以25ml/min的速度洗出保护剂溶液,然后用平衡缓冲液平衡柱子,上样后继续用平衡缓冲液洗脱杂蛋白,然后用洗脱缓冲液洗脱,收集洗脱峰,每管1ml,加入50 μ L中和缓冲液,冷冻干燥;

[0114] 四、磁珠制备:

[0115] 4.1、在通氮气的条件下,将12.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、23.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于800ml蒸馏水中,加热回流,加热至90 $^{\circ}\text{C}$ 时,在机械搅拌下快速把30ml氨水加入以上溶液中;

[0116] 4.2、1h后反应结束,在外加磁场作用下,弃上清;

[0117] 4.3、加入100ml乙醇,充分搅拌洗涤磁珠,在外加磁场下,收集磁珠,再用100ml蒸馏水洗涤,常温下真空干燥,即得 Fe_3O_4 纳米磁珠;

[0118] 五、磁性壳聚糖微球制备:

[0119] 5.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;

[0120] 5.2、取1g Fe_3O_4 纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌20min;

[0121] 5.3、然后加入200ml液体石蜡油,40 $^{\circ}\text{C}$ 下,300r/min条件下搅拌30min;

[0122] 5.4、温度升高至50 $^{\circ}\text{C}$,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌30min;

[0123] 5.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌,调节pH为10,搅拌4h;

[0124] 5.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下真空干燥;

[0125] 六、磁性壳聚糖微球的表面氨基化修饰:

[0126] 6.1、称取1g磁性壳聚糖微球于三角瓶中,加入2ml环氧氯丙烷和0.5mol/L的NaOH溶液,60 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应12h,过滤除去液体;

[0127] 6.2、加入5ml的乙二胺和0.5mol/L的NaOH溶液,60 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应12h;

[0128] 6.3、产物经乙醇和蒸馏水依次洗涤,再在55 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥24h,得到氨基化磁性壳聚糖微球;

[0129] 七、多克隆抗体与氨基化修饰的磁性壳聚糖微球的偶联:

[0130] 7.1、取0.01g的氨基化修饰的磁性壳聚糖微球于5ml离心管中,加入10mg/ml的EDC $\cdot$ HCL溶液,400 μ L戊二醛、60 μ L 10mg/ml的兔抗单增李斯特菌多克隆抗体溶液,用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液稀释至2ml,室温孵育15min;

[0131] 7.2、在外加磁场下,去除上清,使用0.01mol/L pH7.4的PBS溶液反复多次清洗,直至上清蛋白为0,弃上清;

[0132] 7.3、加入氨基化修饰的磁性壳聚糖微球2倍体积的5%BSA溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下,孵育0.5小时,使偶联抗体的磁性壳聚糖微球封闭;

[0133] 7.4、在外加磁场作用下,弃上清,使用含0.05%Tween-20的PBS溶液清洗偶联多克隆抗体的免疫磁珠3次,然后在室温下真空干燥上述免疫磁珠24h,即可。

[0134] 所述的步骤三中,所述的平衡缓冲液采用PBS溶液,所述的洗脱缓冲液采用甘氨酸缓冲液,所述的中和缓冲液采用Tris-HCl缓冲液。

[0135] 所述的步骤三中,所述的PBS溶液的浓度为0.01mol/L,所述的甘氨酸缓冲液的浓度为0.1mol/L,所述的Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L。

[0136] 所述的步骤三中,所述的PBS溶液的pH为7.4,所述的甘氨酸缓冲液的pH为2.7,所述的Tris-HCl缓冲液的pH为9.0。

[0137] 所述的步骤5.3中,所述的液体石蜡油中含20%司盘-80。

[0138] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者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或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法		
公开(公告)号	CN107389917A	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	CN2017110494245.8	申请日	2017-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	安徽安龙基因医学检验所有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽安龙基因医学检验所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽安龙基因医学检验所有限公司		
[标]发明人	韦玉军 李航 苏军 吴远航		
发明人	韦玉军 李航 陆宝石 苏军 吴远航		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/5434		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种单核细胞增生李斯特菌免疫磁珠的制备方法，具体步骤如下：抗原制备；抗体制备；多克隆抗体纯化；磁珠制备；磁性壳聚糖微球制备；多克隆抗体与氨基化修饰的磁性壳聚糖微球的偶联：加入EDC·HCL溶液，戊二醛、兔抗单增李斯特菌多克隆抗体溶液，用的PBS溶液稀释至2ml，室温孵育5-15min；在外加磁场下，去除上清，使用PBS溶液反复多次清洗，直至上清蛋白为0，弃上清；加入氨基化修饰的磁性壳聚糖微球2倍体积的5%BSA溶液，孵育，使偶联抗体的磁性壳聚糖微球封闭；在外加磁场作用下，弃上清，使用含0.05%Tween-20的PBS溶液清洗偶联多克隆抗体的免疫磁珠多次，然后在室温下真空干燥上述免疫磁珠24h，即可。本发明具有高效、灵敏性好等优点。