



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103323603 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 25

(21) 申请号 201310226070. 4

(22) 申请日 2013. 06. 07

(71) 申请人 博奥生物有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命科学园路
18号

申请人 清华大学

(72) 发明人 郭建夫 杨宝君 韩学栋 周玉祥

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法。本发明提供的方法,包括如下步骤:
(1) 将磁珠与活化剂共孵育,得到活化后的磁珠;
(2) 将所述活化后的磁珠与蛋白质共孵育,得到偶联有所述蛋白质的磁珠;(3) 将所述偶联有所述蛋白质的磁珠用封闭液进行处理,封闭表面的活性位点;(4) 将步骤(3)得到的磁珠边进行振荡边过筛,收集过筛后的磁珠。本发明具有如下优点:蛋白偶联效率高、重复性好、具有通用性、不影响偶联在磁珠上的蛋白质的生物学活性。本发明提供的方法得到的共价偶联蛋白质的磁珠可用于免疫检测、生化检测、分子检测、细胞分型等领域。

1. 一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法,包括如下步骤:
 - (1) 将磁珠与活化剂共孵育,得到活化后的磁珠;
 - (2) 将所述活化后的磁珠与蛋白质共孵育,得到偶联有所述蛋白质的磁珠;
 - (3) 将所述偶联有所述蛋白质的磁珠用封闭液进行处理,封闭表面的活性位点;
 - (4) 将步骤(3)得到的磁珠边进行振荡边过筛,收集过筛后的磁珠。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,所述磁珠为羧基磁珠。
3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,所述活化后的磁珠表面具有含N-羟基丁二酰亚胺键的化学基团。
4. 如权利要求2或3所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,所述活化剂为EDC和NHS,或所述活化剂为EDC和Sulfo-NHS。
5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于:

所述步骤(1)中,所述共孵育的反应体系为pH4.0-7.0、0.01-0.1M的MES缓冲液;

所述步骤(1)中,所述活化剂为EDC和NHS时,所述EDC的初始浓度为0.1-30mM,所述NHS的初始浓度为0.3-100mM;

所述步骤(1)中,所述活化剂为EDC和Sulfo-NHS时,所述EDC的初始浓度为0.1-30mM,所述Sulfo-NHS的初始浓度为0.3-100mM;

所述步骤(1)中,所述共孵育的时间为6-300分钟,优选为10-240分钟。
6. 如权利要求1至5中任一所述的方法,其特征在于:所述步骤(2)中,所述共孵育的反应体系为pH4.0-7.0、0.01-0.1M的MES缓冲液;所述步骤(2)中,所述共孵育的条件为:2-26℃、2-20小时。
7. 如权利要求1至6中任一所述的方法,其特征在于:所述步骤(3)中,所述封闭液为含0.2-5g/100mL封闭蛋白的缓冲液;所述缓冲液为MES缓冲液、PBS缓冲液或Tris缓冲液;所述步骤(3)中,所述“将所述偶联有所述蛋白质的磁珠用封闭液进行处理”的处理时间为1-9小时。
8. 如权利要求1至7中任一所述的方法,其特征在于:所述步骤(4)中,所述过筛为过800目-1500目筛。
9. 权利要求1至8中任一所述方法制备得到的磁珠产品。
10. 权利要求9所述磁珠产品在鉴定和/或分离与所述蛋白质结合的物质中的应用。

一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法。

背景技术

[0002] 磁珠, 又称磁性微粒, 是一类直径在纳米或微米级的球形复合材料。磁珠由三部分组成, 核心是金属小颗粒(氧化铁、四氧化三铁), 核心外均匀包裹一层高分子材料(如聚苯乙烯、聚氯乙烯等), 最外层是功能基层, 具有功能基团, 如氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、羟基(-OH)等。

[0003] 磁珠呈均匀球形, 具有超顺磁性, 使磁珠可以在外加磁场作用下向磁场方向移动达到分离目标物的目的, 最外层的化学功能基团被用来与蛋白质或核酸等生物活性分子偶联。偶联后的磁珠广泛用于细胞分离与纯化、细胞分型、免疫检测、核酸分离、靶向释药系统等领域。

[0004] 羧基磁珠, 即最外层具有羧基功能基团(-COOH)的磁珠, 是较为常用的一类磁珠。目前羧基磁珠与蛋白质的偶联方法有很多种。由于活化剂的选择、活化条件、偶联条件及偶联工艺上的差异, 导致偶联蛋白质的磁珠存在偶联效率低、蛋白利用率低、偶联磁珠自身凝集、磁珠非特异吸附严重、不能通用等不足。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法。

[0006] 本发明提供的在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法, 包括如下步骤:

[0007] (1) 将磁珠与活化剂共孵育, 得到活化后的磁珠;

[0008] (2) 将所述活化后的磁珠与蛋白质共孵育, 得到偶联有所述蛋白质的磁珠;

[0009] (3) 将所述偶联有所述蛋白质的磁珠用封闭液进行处理, 封闭表面的活性位点;

[0010] (4) 将步骤(3)得到的磁珠边进行振荡边过筛(以除去团聚的磁微粒), 收集过筛后的磁珠。

[0011] 所述步骤(1)中, 所述磁珠可为羧基磁珠。所述步骤(1)中, 所述活化后的磁珠表面具有含 N-羟基丁二酰亚胺键的化学基团。所述步骤(1)中, 所述活化剂可为 EDC 和 NHS, 或所述活化剂可为 EDC 和 Sulfo-NHS。所述步骤(1)中, 所述共孵育的反应体系可为 pH4.0-7.0、0.01-0.1M 的 MES 缓冲液。所述步骤(1)中, 所述活化剂为 EDC 和 NHS 时, 所述 EDC 的初始浓度可为 0.1-30mM, 所述 NHS 的初始浓度可为 0.3-100mM。所述步骤(1)中, 所述活化剂为 EDC 和 Sulfo-NHS 时, 所述 EDC 的初始浓度可为 0.1-30mM, 所述 Sulfo-NHS 的初始浓度可为 0.3-100mM。所述步骤(1)中, 所述共孵育的时间可为 6-300 分钟, 优选为 10-240 分钟。所述步骤(1)中, 所述共孵育的温度具体可为室温。

[0012] 所述步骤(2)中, 所述共孵育的反应体系可为 pH4.0-7.0、0.01-0.1M 的 MES 缓冲液; 所述步骤(2)中, 所述共孵育的条件可为: 2-26°C、2-20 小时。

[0013] 所述步骤(3)中, 所述封闭液可为含 0.2-5g/100mL 封闭蛋白的缓冲液, 优选为含

1-5g/100mL BSA 的缓冲液。所述缓冲液可为 MES 缓冲液、PBS 缓冲液或 Tris 缓冲液。MES 缓冲液即 2- (吗啉代) 乙磺酸缓冲液。PBS 缓冲液即磷酸盐缓冲液。Tris 缓冲液即三羟甲基氨基甲烷缓冲液。所述步骤(3)中,所述“将所述偶联有所述蛋白质的磁珠用封闭液进行处理”的处理时间可为 1-9 小时,优选为 90-180 分钟。所述步骤(3)中,所述共孵育的温度具体可为室温。

[0014] 所述步骤(4)中,所述过筛可为过 800 目 -1500 目筛。所述过筛具体可为过不锈钢筛网。所述不锈钢筛网具体可为 304 钢不锈钢筛网或 316 钢不锈钢筛网。所述步骤(4)中,所述过筛借助的液相体系具体可为 pH4.0-7.0、0.01-0.1M 的 MES 缓冲液。

[0015] 所述方法还可包括将步骤(4)得到的过筛后的磁珠用保存液混悬后 4℃ 保存的步骤。所述保存液为含有 0.1-5g/100mL BSA 和 0.1g/100mL NaN_3 的 pH7-10、0.01-0.1M Tris 缓冲液。

[0016] 所述步骤(2)中,所述蛋白质具体可为抗体,如羊抗异硫氰酸荧光素 IgG 抗体或甲状腺素单克隆抗体。

[0017] 本发明还保护以上任一所述方法制备得到的磁珠产品。

[0018] 本发明还保护所述磁珠产品在鉴定和 / 或分离与所述蛋白质结合的物质中的应用。所述蛋白质为抗体时,所述“与所述蛋白质结合的物质”为与所述蛋白质特异结合的抗原或二抗。

[0019] 本发明具有如下优点:

[0020] (1) 蛋白偶联效率高;使用双活化剂 EDC 和 NHS 活化磁珠,可以使磁珠上的活化羧基处于半稳定状态,不易水解,加入蛋白质后,与蛋白质侧链的氨基形成稳定的酰胺键,增加了磁珠和抗体的利用率,增加了偶联效率;

[0021] (2) 重复性好;通过振荡过筛的步骤,去除了产生凝集的磁珠颗粒,使磁珠颗粒均一,易混匀无团聚,免疫反应效率得到提高,避免非特异性吸附,保证了免疫反应良好的重复性;

[0022] (3) 具有通用性;通过封闭的步骤,使磁珠本身未反应的位点得到饱和,大大减少了非特异吸附的发生,增加了磁珠的通用性;

[0023] (4) 不影响偶联在磁珠上的蛋白质的生物学活性;一方面,活化和偶联反应发生的温度、离子强度、pH 等条件温和,不会引起蛋白质变性;另一方面,蛋白质与磁珠偶联后蛋白质的空间构型不受影响,仍能保持其原有的生物活性。

[0024] 本发明提供的方法得到的共价偶联蛋白质的磁珠可用于免疫检测、生化检测、分子检测、细胞分型等领域。

附图说明

[0025] 图 1 EDC 和 NHS 活化羧基磁珠反应示意图。

[0026] 图 2 活化后磁珠与蛋白质反应示意图。

[0027] 图 3 磁珠过筛前效果图。

[0028] 图 4 磁珠过筛后效果图。

具体实施方式

[0029] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。实施例中,通过紫外分光光度法检测溶液中的蛋白质浓度。IgG 抗体和单克隆抗体均为蛋白质,因此实施例中,IgG 抗体的量和单克隆抗体的量均以蛋白量计。

[0030] EDC,中文全称为 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺,英文全称为 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride。 Sulfo-NHS,中文全称为 N-羟基琥珀酰亚胺,英文全称为 N-hydroxysulfosuccinimide。 NHS,中文全称为 N-羟基琥珀酰亚胺,英文全称为 N-hydroxysuccinimide。

[0031] EDC: 购自 Sigma-Aldrich, CAS:25952-53-8CAT:E7750。 Sulfo-NHS: 购自 Sigma-Aldrich, CAS:106627-54-7CAT:56485。 NHS: 购自 Sigma-Aldrich, CAS:6066-82-6CAT:56480。 羧基磁珠胶体溶液:购自默克,货号为 EM1-100/40。 羊抗异硫氰酸荧光素抗体血清:购自解放军总医院第一附属医院实验动物科,货号:Y11005。 甲状腺素单克隆抗体:购自 Meridia, CAT:MAT02-211。

[0032] 实施例 1、羧基磁珠偶联羊抗异硫氰酸荧光素抗体

[0033] 一、羧基磁珠的活化

[0034] 本步骤的目的为:在磁珠表面生成含碳亚二氨的化学基团。

[0035] 1、磁珠预处理

[0036] 取 1000mg 羧基磁珠胶体溶液在磁场作用下沉降 20 分钟,弃上清,然后将磁珠用 50ml pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液洗涤 1 次。

[0037] 2、将步骤 1 得到的磁珠用 20ml pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液充分混悬后加入 EDC 和 NHS,使 EDC 的浓度为 0.1mM,NHS 的浓度为 100mM,室温振荡反应(30 转/分钟)240 分钟,得到活化磁珠溶液。

[0038] 二、羧基磁珠偶联羊抗异硫氰酸荧光素抗体

[0039] 1、取 10ml 羊抗异硫氰酸荧光素抗体血清,用 protein-G 亲和层析柱纯化得到羊抗异硫氰酸荧光素 IgG 抗体(羊抗异硫氰酸荧光素 IgG 抗体总量大于 200mg)。

[0040] 2、将步骤 1 得到的羊抗异硫氰酸荧光素 IgG 抗体上样于 Sephadex G25 层析柱进行脱盐,采用 pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液洗脱,收集抗体溶液(抗体总量大于 150mg)。

[0041] 3、偶联

[0042] 将步骤 2 得到的抗体溶液加入到步骤一得到的活化磁珠溶液中,轻摇混匀,2℃ 振荡反应(20 转/分钟)20 小时。该反应过程中,活化的 N-羟基丁二酰亚胺键与抗体的氨基的发生共价反应,抗体被共价偶联在磁珠表面。

[0043] 4、封闭

[0044] 取完成步骤 3 的液相体系,在磁场作用下沉降 20 分钟,弃上清,加入 100ml 封闭液,轻摇混匀,室温振荡反应(30 转/分钟)90 分钟。

[0045] 封闭液:含有 1g/100mL BSA 的 pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液。

[0046] 5、过筛

[0047] 取完成步骤 4 的液相体系,在磁场作用下沉降 20 分钟后弃上清;将磁珠用 pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液洗涤 3 次,每次 100ml;将磁珠悬浮于 100ml pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲

液后过 1500 目材质为 304 钢的不锈钢筛,过筛过程中,不断振荡并用 pH7.0、0.01M 的 MES 缓冲液反复冲洗,直至筛面上剩余不能过筛的团聚颗粒,过筛后的磁珠重新混悬后应颗粒均一,无凝集。

[0048] 6、稀释和保存

[0049] 收集步骤 5 得到的过筛后的磁珠溶液,在磁场作用下沉降 20 分钟后弃上清;将磁珠用保存液清洗 3 次,每次 100ml;然后将磁珠用保存液稀释至 5mg/ml,室温混悬 2 小时后 4℃ 保存。

[0050] 保存液:含有 0.1g/100mL BSA 和 0.1g/100mL NaN₃ 的 pH7.0、0.01M Tris 缓冲液。

[0051] 三、羧基磁珠偶联羊抗异硫氰酸荧光素抗体后的非特异性吸附

[0052] 用于检测非特异性吸附的为博奥生物有限公司的癌胚抗原(CEA)检测试剂盒(磁微粒化学发光法),产品编号 330410,主要组分有抗体试剂(异硫氰酸荧光素标记的 CEA 抗体和碱性磷酸酶标记的 CEA 抗体)、CEA 校准品(包括 0 浓度点与 5 个梯度浓度点)、CEA 质控品(Q1、Q2)、磁微粒试剂、发光底物(酶促发光)、清洗浓缩液。试剂盒工作原理:异硫氰酸荧光素标记的 CEA 抗体、CEA 标准品和碱性磷酸酶标记的 CEA 抗体形成“三明治”结构的复合物,该复合物通过异硫氰酸荧光素与羊抗异硫氰酸荧光素抗体的作用与磁微粒连接,洗涤磁微粒后加入发光底物,酶促发光,即可检测到荧光。

[0053] 1、用步骤二的 5 制备的磁珠代替试剂盒中的磁微粒试剂,按照说明书进行操作,得到以 CEA 浓度和荧光强度为坐标的标准曲线。

[0054] 2、用步骤二的 5 制备的磁珠代替试剂盒中的磁微粒试剂,不加入异硫氰酸荧光素标记的 CEA 抗体,其它按照说明书进行操作,采用 0 浓度的 CEA 标准品,检测到的荧光强度对照标准曲线,得到的 CEA 浓度即为非特异性吸附的结果。步骤二的 5 制备的磁珠的非特异性吸附 < 0.001ng/ml。

[0055] 用步骤二的 5 制备的磁珠代替试剂盒中的磁微粒试剂,采用 CEA 质控品 Q1 作为检测样本,按说明书进行操作,检测到的荧光强度对照标准曲线,得到的 CEA 浓度即为质控品 Q1 的拟合结果,5 次重复实验的变异系数为 1.31%。

[0056] 3、用步骤二的 4 制备的磁珠代替试剂盒中的磁微粒试剂,按照说明书进行操作,得到以 CEA 浓度和荧光强度为坐标的标准曲线。

[0057] 4、用步骤二的 4 制备的磁珠代替试剂盒中的磁微粒试剂,不加入异硫氰酸荧光素标记的 CEA 抗体,其它按照说明书进行操作,采用 0 浓度的 CEA 标准品,检测到的荧光强度对照标准曲线,得到的 CEA 浓度即为非特异性吸附的结果。步骤二的 4 制备的磁珠的非特异性吸附为 2.03ng/ml。

[0058] 用步骤二的 4 制备的磁珠代替试剂盒中的磁微粒试剂,采用 CEA 质控品 Q1 作为检测样本,按说明书进行操作,检测到的荧光强度对照标准曲线,得到的 CEA 浓度即为质控品 Q1 的拟合结果,5 次重复实验的变异系数为 8.63%。

[0059] 四、羧基磁珠偶联羊抗异硫氰酸荧光素抗体后的活性

[0060] 1、取步骤二的 5 制备的磁珠,用保存液梯度稀释后,得到各个稀释悬液。

[0061] 2、将 30 μl 步骤 1 得到的稀释悬液与 30 μl 碱性磷酸酶标记兔抗羊 IgG 抗体(购自上海研卉生物技术有限公司,产品编号:E030230)混匀,37℃ 温育 5 分钟。

[0062] 3、在磁场作用下沉降 2 分钟后弃上清,将磁珠用清洗液(购自博奥生物有限公司,

产品编号 330410 的试剂盒组份之一) 洗涤 3 次, 每次 300 μ l。

[0063] 4、避光加入 200 μ l 碱性磷酸酶催化发光底物(Lumigen APS-5), 检测发光值。

[0064] 当采用较高浓度的稀释悬液时, 磁珠发光值基本保持一致(由于磁珠相对碱性磷酸酶标记兔抗羊 IgG 抗体为过量的状态, 所有碱性磷酸酶标记兔抗羊 IgG 抗体均能被磁珠吸附), 但当采用某一低浓度的稀释悬液时磁珠发光值会出现明显下降(此时磁珠不足以吸附所有的碱性磷酸酶标记兔抗羊 IgG 抗体), 该出现发光值明显下降的磁珠浓度反映磁珠活性, 该浓度越低磁珠活性越好, 比该发光值明显下降的浓度高一级的浓度即为最佳活性浓度(例如稀释悬液中磁珠浓度依次为 5、4、3、2、1mg/ml, 如果在 2mg/ml 的浓度时发光值开始明显下降, 最佳活性浓度为 3mg/ml)。用步骤二的 5 制备的磁珠的最佳活性浓度为 1.5mg/ml。

[0065] 取步骤二的 4 制备的磁珠, 按照以上相同的步骤检测最佳活性浓度。步骤二的 4 制备的磁珠的最佳活性浓度为 3.5mg/ml。

[0066] 实施例 2、羧基磁珠偶联单克隆抗体

[0067] 一、羧基磁珠的活化

[0068] 1、磁珠预处理

[0069] 取 200mg 羧基磁珠胶体溶液在磁场作用下沉降 10 分钟, 弃上清, 将沉降的磁珠用 pH4.0、0.1M 的 MES 缓冲液清洗 3 次, 每次 20ml。

[0070] 2、将步骤 1 得到的磁珠用 20ml pH4.0、0.1M 的 MES 缓冲液充分混悬后加入 EDC 和 NHS, 使 EDC 的浓度为 30mM, NHS 的浓度为 0.3mM, 室温振荡反应(20 转 / 分钟)10 分钟, 即为活化磁珠溶液。

[0071] 二、羧基磁珠偶联单克隆抗体

[0072] 1、取甲状腺素单克隆抗体, 上样于 Sephadex G25 层析柱, 采用 pH4.0、0.1M 的 MES 缓冲液洗脱, 收集到 4ml 抗体溶液。

[0073] 2、偶联

[0074] 将步骤 1 得到的抗体溶液加入到步骤一得到的活化磁珠溶液中, 轻摇混匀, 室温振荡反应(20 转 / 分钟)2 小时。

[0075] 3、封闭

[0076] 取完成步骤 2 的液相体系, 在磁场作用下沉降 10 分钟, 弃上清, 加入 20ml 封闭液, 轻摇混匀, 室温振荡反应(20 转 / 分钟)180 分钟。

[0077] 封闭液: 含有 5g/100mL BSA 的 pH4.0、0.1M 的 MES 缓冲液。

[0078] 4、过筛

[0079] 取完成步骤 3 的液相体系, 在磁场作用下沉降 10 分钟后弃上清; 将磁珠用 4.0、0.1M 的 MES 缓冲液洗涤 3 次, 每次 20ml; 将磁珠悬浮于 20ml pH4.0、0.1M 的 MES 缓冲液后过 800 目材质为 316 钢的不锈钢筛, 过筛过程中, 不断振荡并用 pH4.0、0.1M 的 MES 缓冲液反复冲洗, 直至筛面上剩余不能过筛的大颗粒。过筛后的磁珠重新混悬后应颗粒均一, 无凝集。

[0080] 5、稀释和保存

[0081] 收集过筛后的磁珠溶液, 在磁场作用下沉降 20 分钟后弃上清; 将磁珠用保存液清洗 3 次, 每次 100ml; 然后将磁珠用保存液稀释至 5mg/ml, 室温混悬 2 小时后 4℃ 保存。

[0082] 保存液:含有 5g/100mL BSA 和 0.1g/100mL NaN_3 的 pH10.0、0.1M Tris 缓冲液。

三、羧基磁珠偶联甲状腺素单克隆抗体后的活性

[0083] 1、取步骤二的 4 制备的磁珠,用保存液梯度稀释后,得到各个稀释悬液。

[0084] 2、将 30 μ l 步骤 1 得到的稀释悬液与 60 μ l 碱性磷酸酶标记的甲状腺素(购自博奥生物有限公司,产品编号:330150 的试剂盒组份之一)混匀,37°C 温育 6 分钟。

[0085] 3、在磁场作用下沉降 2 分钟后弃上清,将磁珠用清洗液(购自博奥生物有限公司,产品编号 330150 的试剂盒组份之一)洗涤 3 次,每次 300 μ l。

[0086] 4、避光加入 200 μ l 碱性磷酸酶催化发光底物(Lumigen APS-5),检测发光值。当采用较高浓度的稀释悬液时,磁珠发光值基本保持一致(由于磁珠相对碱性磷酸酶标记的甲状腺素为过量的状态,所有碱性磷酸酶标记的甲状腺素均能被磁珠吸附),但当采用某一低浓度的稀释悬液时磁珠发光值会出现明显下降(此时磁珠不足以吸附所有的碱性磷酸酶标记的甲状腺素),该出现发光值明显下降的磁珠浓度反映磁珠活性,该浓度越低磁珠活性越好,比该发光值明显下降的浓度高一级的浓度即为最佳活性浓度(例如稀释悬液中磁珠浓度依次为 5、4、3、2、1mg/ml,如果在 2mg/ml 的浓度时发光值开始明显下降,最佳活性浓度为 3mg/ml)。用步骤二的 4 制备的磁珠的最佳活性浓度为 0.5mg/ml。

[0087] 取步骤二的 3 制备的磁珠,按照以上相同的步骤检测最佳活性浓度。步骤二的 3 制备的磁珠的最佳活性浓度为 2mg/ml。

[0088] 采用 Sulfo-NHS 代替 NHS 分别进行实施例 1 和实施例 2 的具体实验,得到了相同的结果。

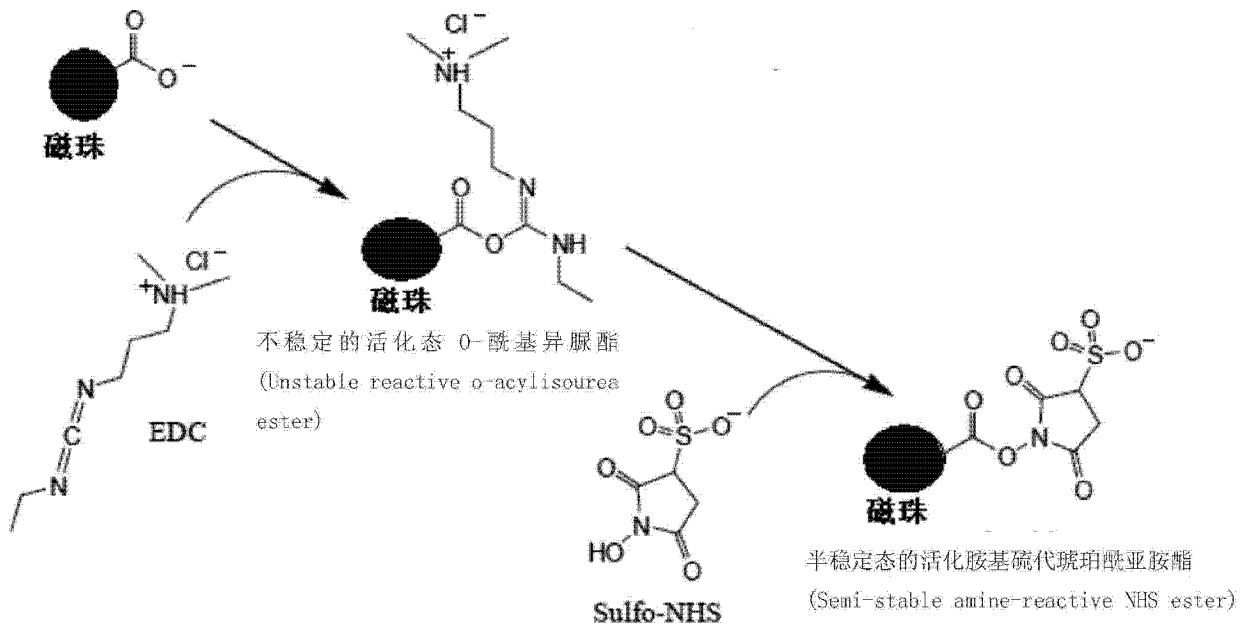


图 1

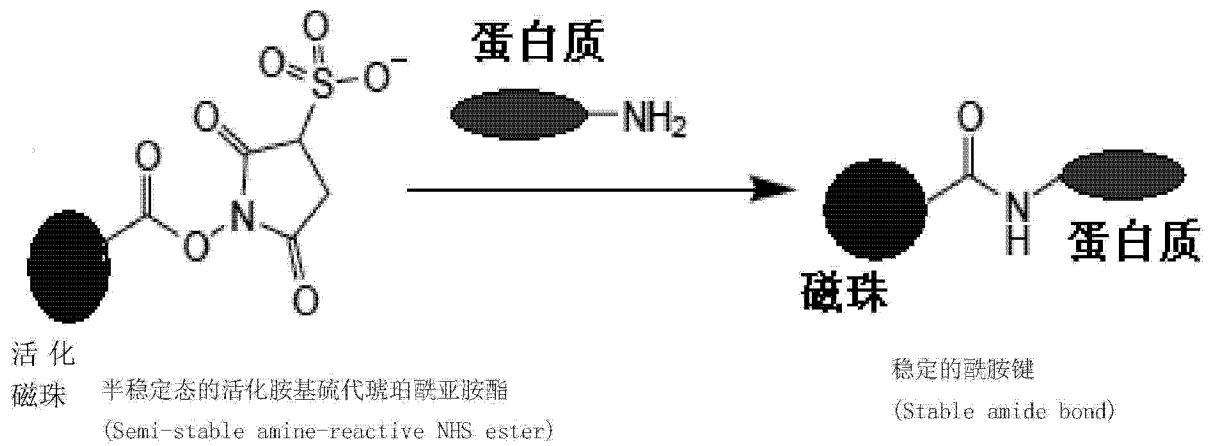


图 2

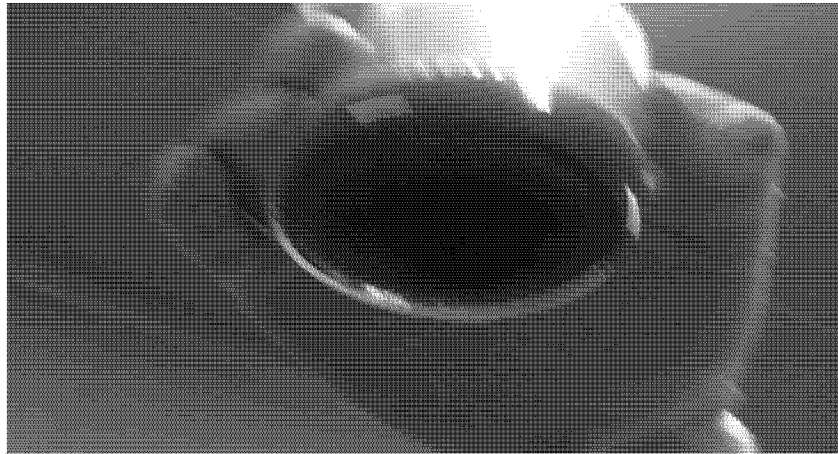


图 3



图 4

专利名称(译)	一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法		
公开(公告)号	CN103323603A	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201310226070.4	申请日	2013-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	博奥生物有限公司 清华大学		
申请(专利权)人(译)	博奥生物有限公司 清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	博奥生物有限公司 清华大学		
[标]发明人	郭建夫 杨宝君 韩学栋 周玉祥		
发明人	郭建夫 杨宝君 韩学栋 周玉祥		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种在磁珠表面共价偶联蛋白质的方法。本发明提供的方法，包括如下步骤：(1)将磁珠与活化剂共孵育，得到活化后的磁珠；(2)将所述活化后的磁珠与蛋白质共孵育，得到偶联有所述蛋白质的磁珠；(3)将所述偶联有所述蛋白质的磁珠用封闭液进行处理，封闭表面的活性位点；(4)将步骤(3)得到的磁珠边进行振荡边过筛，收集过筛后的磁珠。本发明具有如下优点：蛋白偶联效率高、重复性好、具有通用性、不影响偶联在磁珠上的蛋白质的生物学活性。本发明提供的方法得到的共价偶联蛋白质的磁珠可用于免疫检测、生化检测、分子检测、细胞分型等领域。

