



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108287235 B

(45) 授权公告日 2021. 03. 09

(21) 申请号 201810121445.3

G01N 1/34 (2006.01)

(22) 申请日 2018.02.07

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 101551394 A, 2009.10.07

申请公布号 CN 108287235 A

CN 1524878 A, 2004.09.01

(43) 申请公布日 2018.07.17

CN 102939096 A, 2013.02.20

(73) 专利权人 常州天地人和生物科技有限公司

CN 103212377 A, 2013.07.24

地址 213100 江苏省常州市武进区西太湖

CN 104094119 A, 2014.10.08

科技产业园兰香路8号

US 2017037450 A1, 2017.02.09

审查员 许珊萍

(72) 发明人 单玉飞 曹飞婷

(74) 专利代理机构 北京华际知识产权代理有限公司

公司 11676

代理人 杨觅

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

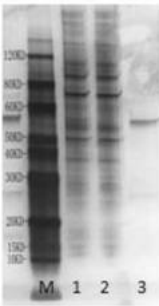
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备和应用

(57) 摘要

本发明一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备和应用,用于方便、可控的制备磁性免疫微球技术,其通过预活化的磁性微球与带有半胱氨酸的抗原或抗体混合反应,制备磁性免疫微球,用于进行酶联免疫检测。偶联抗原/抗体的磁性微球可以快速的制备,偶联后也可以长期保存,节省了检测的时间和成本,提高了检测的通量。本发明还可以显著提高检测灵敏度。实验结果显示:磁性酶联免疫是将小分子抗原偶联至活化好的磁性微球上,直接进行ELISA检测,节约时间和成本,将具有广泛的应用前景,产生良好的经济效益。



1、样品
2、纯化后样品
3、样品洗脱

1. 一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备方法,其特征在于,步骤如下:

1) 磁性微球的选择:磁性免疫微球的制备中,所使用的磁性微球为预活化的磁性微球;

2) 氨基磁性微球制备:反应体系中磁性微球占30%-50%,环氧氯丙烷占5-20%,1-2M的NaOH,2mg/ml的硼氰化钠,反应温度为20-40℃,反应时间2-6小时,去离子水洗至无环氧氯丙烷后,加入5%氨水并在20-40℃反应10-24小时,然后去离子水清洗即为氨基磁性微球;

3) 预活化微球制备:取步骤2) 制备的氨基磁性微球100ml,加入100ml去离子水、6-15g碘乙酸或溴乙酸,再加50%的NaOH调节pH至4.0-6.0,然后加入10g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),在15-30℃的温度下反应1小时后,再调pH至4.0-6.0后继续反应2-5小时,即为预活化微球;

4) 取步骤3) 制备的预活化微球10ml,加入10ml含自由巯基的0.1-1mg/ml抗原溶液,偶联液为50mM三羟甲基氨基甲烷(Tris),5mM乙二胺四乙酸一钠(EDTA-Na),pH 8.0-8.5,在20-40℃的温度下反应30-60min;

5) 将步骤4) 反应后产物,再加入50mM的Tris封闭液,5mM的EDTA-Na,50mM的L-半胱氨酸,pH调节至8.5,在37℃的温度下反应1小时,即为偶联抗原的磁性免疫磁珠;

步骤4) 中抗原为含一个半胱氨酸的Flag多肽。

2. 根据权利要求1所述的一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备方法,其特征在于:步骤1) 中所述预活化的磁性微球为琼脂糖微球或者聚合物微球。

3. 根据权利要求1所述的一种高效、稳定的磁性免疫微球的应用,其特征在于:取偶联好抗原的磁性免疫微球进行酶联免疫检测,即取1mg偶联好抗原的磁性免疫微球,置于磁分离器上分离1min,待溶液变澄清后,用移液器吸弃清液;再用1×PBST清洗2次,然后第一次加入100ul抗体样品,37℃孵育30min;再用1×PBST清洗3-5次,第二次加入100ul抗体样品,37℃孵育30min;然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色液(TMB)显色测吸光度,或者用鲁米诺化学发光试剂盒检测。

4. 根据权利要求1所述的一种高效、稳定的磁性免疫微球的应用,其特征在于:磁性免疫微球用于纯化,即取1mg偶联好抗原的磁性免疫微球,用1×PBS清洗3次,加入含相应抗体溶液,混合吸附30min,再用1×PBS清洗3次,去除上清液待用;然后加入100ul 0.1M甘氨酸,pH3.0的洗脱液混合5min,置于磁分离器上,待溶液变澄清后,吸取上清液,收集洗脱组分,即为目标抗体。

一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体是一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备和应用。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ;ELISA) 是一种利用酶催化生色在固相材料的表面检测抗体和抗原之间结合的技术方法,这种方法广泛应用于科学研究、医学检测、环境保护、食品安全等许多方面。1971年发明以来,经典的ELISA方法获得了各种改进,包括方法学的改进、材料的改进、检测用酶以及底物的改进等等,极大的提高了检测的灵敏度以及操作的便利与可靠性。

[0003] 利用化学合成的表位多肽制备抗体是一种规模化抗体制备的技术手段,一次可以制备成千上万种特定抗原的抗体。这一方法目前常规的操作方法是:1) 利用生物学软件获取需要制备的抗原信息(通常是蛋白质序列)建立需要制备抗体的蛋白质组的数据库;2) 利用软件对数据库里面的蛋白质序列进行单独分析,预测其特定的线性B细胞表位氨基酸序列,根据序列设计需要制备抗体的多肽序列;3) 化学合成多肽,并将多肽偶联到牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、血蓝蛋白(KLH)等具有免疫刺激作用的载体蛋白上,获得偶联多肽用作抗原;4) 利用偶联后的抗原免疫适龄的实验兔,多次加强免疫后,获得抗血清;5) 利用多肽或者偶联多肽包板,进行ELISA实验,测定抗血清中特定抗体的效价,筛选效价达标的抗血清;6) 使用不同的策略对抗血清进行纯化,包括抗原亲和纯化、Protein A 纯化、盐析沉淀纯化等多种方法。

[0004] 在上述第5)步中,存在3个问题:1) 使用偶联多肽包板,可以获得很好的稳定性,但是偶联多肽的载体蛋白可以和抗血清反应,ELISA结果并不能反应阳性血清中的抗体是针对载体蛋白还是针对表位多肽的;2) 使用多肽直接包板,可以区分阳性血清是和表位多肽还是和载体蛋白反应,但是由于多肽分子小,性质偏差大,多肽直接包板效率低。即使包板成功,由于空间位阻大,下游ELISA检测的信号值很低,重复性差;3) 板式ELISA的操作时间长,有包板、封闭、洗涤等诸多步骤,操作麻烦。因此,以上问题迫切需要一种有效的方法予以解决,其中磁性免疫微球捕获法是一个具有前景的替代方案。

[0005] 感染性疾病包括细菌感染、真菌感染、病毒感染等。二十世纪以来,研究者陆续开发了许多有效的抗生素用于细菌感染、真菌感染的治疗。但是对于病毒感染的疾病,如禽流感、狂犬病、埃博拉、艾滋病等等,一直没有很好的特效药,通常使用疫苗等防御性手段进行预防。随着研究的进展,我们对于病原体与宿主免疫系统之间的互作认识得到了深入。哺乳动物的免疫系统可以划分为固有免疫和获得性免疫,后者包括了体液免疫和细胞免疫。对于病原体来说,其结构上存在T细胞表位和B细胞表位。B细胞表位和B细胞上的受体结合,促进特定的抗体的产生。而T细胞表位和T细胞上的受体(T Cell receptor, TCR)结合促进CD8⁺细胞产生CTL作用,也通过激发T细胞分泌趋化因子,细胞因子等促进B细胞产生针对特定病原体的体液免疫抗体的产生。病原体和宿主细胞之间的互作是一个非常复杂的问题,对这一问题的研究,不仅促进高效的预防性疫苗的开发,而且推动针对乳头瘤病毒(HPV),乙

肝病毒(HBV)等危害极大的慢性感染的治疗性疫苗开发。

[0006] 研究病原体与宿主细胞之间的互作的一个重要方面,是研究病原体在宿主体内的有效T细胞表位和B细胞表位。对于T表位的研究有多种策略,其中一种是分离免疫细胞,用合成的多肽或者蛋白质片段刺激免疫细胞,观察其干扰素(interferon-gamma),白介素(IL6)的分泌表达。这种方法较为有效,但是操作非常繁琐,依赖于高效的抗体捕获技术。对于B细胞表位的研究,可以用预测的多肽序列和B细胞的结合或者体液中的抗体的结合来验证。通常,测定免疫后的阳性血清对预测表位的结合是一种简单而高效的方法。磁性免疫微球在研究抗原和T细胞、B细胞互作方面已经较多文献报道,在研究抗原和血清抗体的互作方面也已经获得了巨大的成功。

[0007] 磁性免疫微球分离技术是利用抗原抗体的高度特异性识别作用,使抗体(或抗原)固定于免疫磁性微球(IMMS)表面,形成固相抗体/抗原的复合物,经外磁场作用后,复合物被滞留,磁性微球载抗原/抗体复合物与其他组分分离,从而达到分离目的。由于磁性微球代替其他固相载体用于免疫分离,不仅简单易行,而且特异性高,损失小,还可将免疫分离与富集结合为一体。因此它在医学、生物分离、食品卫生检测、环境检测等诸多领域展现了广阔的研究和应用前景。

[0008] 磁性免疫微球具有广泛的应用,但目前采用的方法之一是“活化偶联法”。该方法利用表面修饰了氨基、羧基、羟基等的微球在EDC等化学试剂的催化下活化,临时与抗原、抗体偶联制备磁性免疫微球。这一类型的反应有以下缺点:1)反应的特异性差,偶联反应时,不仅微球与抗原(或抗体)之间可以发生化学交联作用,而且抗原(或抗体)自身也会发生交联反应,改变了抗原(或抗体)自身的性质,造成沉淀、失活等弊端。2)反应强烈依赖操作人员的经验以及试剂的批次稳定性,可控性差。

[0009] 另外一种制备磁性免疫微球的方法是:利用预活化的磁性微球和抗原抗体简单混合,完成偶联反应。目前市场上有N-羟基琥珀酰亚胺预活化磁性微球、马来酰亚胺预活化磁性微球、环氧基团预活化磁性微球等。这些微球的稳定性较差,通常需要抽干冷冻保存,或者在无水有机溶剂中保存。使用前要进行苛刻的处理,也存在操作繁琐不可控的缺点。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备和应用,以解决现有技术中的问题。

[0011] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0012] 一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备方法,步骤如下:

[0013] 1) 磁性微球的选择:磁性免疫微球的制备中,所使用的磁性微球为预活化的磁性微球;

[0014] 2) 氨基磁性微球制备:反应体系中磁性微球占30%-50%,环氧氯丙烷占5-20%,1-2M的NaOH,2mg/ml的硼氰化钠,反应温度为20-40℃,反应时间2-6小时,去离子水洗至无环氧氯丙烷后,加入5%氨水并在20-40℃反应10-24小时,然后去离子水清洗即为氨基磁性微球;

[0015] 3) 预活化微球制备:取步骤2)制备的氨基磁性微球100ml,加入100ml去离子水、6-15g碘乙酸或溴乙酸,再加50%的NaOH调节pH至4.0-6.0,然后加入10g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),在15-30℃的温度下反应1小时后,再调pH至4.0-6.0后继续反

应2-5小时,即为预活化微球。

[0016] 4)取步骤3)制备的预活化微球10ml,加入10ml含自由巯基的0.1-1mg/ml抗原溶液,偶联液为50mM三羟甲基氨基甲烷(Tris),5mM乙二胺四乙酸一钠(EDTA-Na),pH 8.0-8.5,在20-40℃的温度下反应30-60min;

[0017] 5)将步骤4)反应后产物,再加入50mM的Tris封闭液,5mM的EDTA-Na,50mM的L-半胱氨酸,pH调节至8.5,在37℃的温度下反应1小时,即为偶联抗原的磁性免疫磁珠。该步骤是为了封闭未反应的活性位点,从而降低活性位点对使用时的影响。

[0018] 作为优化,步骤1)中的磁性微球为预活化的磁性微球,所述预活化的磁性微球为琼脂糖微球或者聚合物微球。

[0019] 作为优化,步骤4)中抗原为含一个半胱氨酸的Flag多肽。

[0020] 作为优化,取偶联好抗原的磁性免疫微球进行酶联免疫检测,即取1mg偶联好抗原的磁性免疫微球,置于磁分离器上分离1min,待溶液变澄清后,用移液器吸弃清液;再用1×PBST(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 0.01% TritonX-100,pH 7.4)清洗2次,然后第一次加入100μl抗体样品,37℃孵育30min;再用1×PBST清洗3-5次,第二次加入100μl抗体样品,37℃孵育30min;然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色液(TMB)显色测吸光度,或者用鲁米诺化学发光试剂盒检测。

[0021] 作为优化,磁性免疫微球用于纯化,即取1mg偶联好抗原的磁性免疫微球,用1×PBS(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH 7.4)清洗3次,加入含相应抗体溶液,混合吸附30min,再用1×PBS清洗3次,去除上清液待用;然后加入100μl0.1M甘氨酸,pH3.0的洗脱液混合5min,置于磁分离器上,待溶液变澄清后,吸取上清液,收集洗脱组分,即为目标抗体。

[0022] 本发明一种高效、稳定的磁性免疫微球的制备和应用,用于方便、可控的制备磁性免疫微球技术,其通过预活化的磁性微球与带有半胱氨酸的抗原或抗体混合反应,制备磁性免疫微球,用于进行酶联免疫检测。偶联抗原/抗体的磁性微球可以快速的制备,偶联后也可以长期保存,节省了检测的时间和成本,提高了检测的通量。本发明还可以显著提高检测灵敏度。实验结果显示:磁性酶联免疫是将小分子抗原偶联至活化好的磁性微球上,直接进行ELISA检测,节约时间和成本,将具有广泛的应用前景,产生良好的经济效益。

附图说明

[0023] 图1为本发明的实施例6实验的SDS-PAGE电泳结果图。

具体实施方式

[0024] 下面将结合本发明的实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0025] 实施例1:

[0026] 6×His多肽磁珠的制备。

[0027] 氨基磁性微球制备:取100ml预活化的聚合物磁性微球,加入80ml 2M NaOH,2mg/

ml 硼氰化钠溶液, 环氧氯丙烷 20ml, 在 30℃ 下, 反应时间 2 小时。去离子水洗至无环氧氯丙烷。加入 5% 氨水 30℃ 反应 16 小时, 去离子水清洗即为氨基磁性微球;

[0028] 预活化磁珠的制备: 取 100ml 氨基磁性微球, 加入 100ml 去离子水, 10g 碘乙酸, 50% NaOH 调 pH 5.0, 加入 EDC 10g。20℃ 反应 1 小时后调 pH 4.5, 继续反应 2 小时, 即为预活化微球。

[0029] 取 10ml 碘乙酸预活化磁珠, 加入 10ml 含一个半胱氨酸的 6×His 肽 1mg/ml, 偶联液为 50mM Tris, 5mM EDTA-Na, pH 调至 8.0, 25℃ 反应 1 小时。

[0030] 取 50mM Tris 封闭液, 5mM EDTA-Na, 50mM L-半胱氨酸, 调节 pH 至 8.5, 在 37 度下封闭 1 小时, 即为偶联抗原的磁性免疫磁珠。

[0031] 实施例 2:

[0032] Flag (天冬氨酸-酪氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸) 多肽磁珠的制备。

[0033] 氨基磁性微球制备: 取 100ml 预活化的琼脂糖磁性微球, 加入 90ml, 1M NaOH, 2mg/ml 硼氰化钠溶液, 环氧氯丙烷 10ml, 在 30℃ 下, 反应时间 4 小时。加入 5% 氨水 20-40℃ 反应 16 小时, 去离子水清洗即为氨基磁性微球;

[0034] 预活化微球制备: 取 100ml 氨基磁性微球, 加入 100ml 去离子水, 12g 溴乙酸, 50% NaOH 调 pH 4.5, 加入 EDC 10g。20℃ 反应 1 小时后调 pH 4.5, 继续反应 5 小时, 即为预活化微球。

[0035] 取 10ml 溴乙酸预活化磁珠, 加入 10ml 含一个半胱氨酸的 flag 多肽 1mg/ml, 偶联液为 50mM Tris, 5mM EDTA-Na, pH 调至 8.5, 在温度 28 度下反应 60min。

[0036] 取 50mM Tris 封闭液, 5mM EDTA-Na, 50mM L-半胱氨酸, 调节 pH 至 8.5, 在 37 度下封闭 1 小时, 即为偶联抗原的磁性免疫磁珠。

[0037] 实施例 3:

[0038] 蛋白 A 磁珠的制备。

[0039] 氨基磁性微球制备: 取 100ml 预活化的琼脂糖磁性微球, 加入 90ml, 1M NaOH, 2mg/ml 硼氰化钠溶液, 环氧氯丙烷 10ml, 在 30℃ 下, 反应时间 4 小时。加入 5% 氨水 20-40℃ 反应 16 小时, 去离子水清洗即为氨基磁性微球;

[0040] 预活化微球制备: 取 100ml 氨基磁性微球, 加入 100ml 去离子水, 12g 溴乙酸, 50% NaOH 调 pH 4.5, 加入 EDC 10g。20℃ 反应 1 小时后调 pH 4.5, 继续反应 5 小时, 即为预活化微球。

[0041] 取 10ml 溴乙酸预活化磁珠, 加入 10ml 含一个半胱氨酸的 flag 多肽 1mg/ml, 偶联液为 50mM Tris, 5mM EDTA-Na, pH 调至 8.5, 在温度 28 度下反应 60min。

[0042] 取 50mM Tris 封闭液, 5mM EDTA-Na, 50mM L-半胱氨酸, 调节 pH 至 8.5, 在 37 度下封闭 1 小时, 即为偶联抗原的磁性免疫磁珠。

[0043] 实施例 4:

[0044] 实施例 1 中制备的 6×His 多肽磁性免疫微球的应用, 即进行酶联免疫检测:

[0045] 分别取 1mg 偶联好抗原的磁性免疫微球, 置于磁分离器上分离 1min, 待溶液变澄清后, 用移液器吸弃清液; 再用 1×PBST 清洗 2 次, 然后第一次加入 100μl 不同稀释倍数的兔抗 His 样品, 37℃ 孵育 30min; 再用 1×PBST 清洗 3-5 次, 第二次加入 100μl 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔溶液, 37℃ 孵育 30min; 然后用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色液 (TMB) 显色测吸光度。

[0046] 如下表所示: 6X His 多肽磁性免疫微球检测结果

[0047]	样品稀释倍数	传统方法检测	磁性免疫检测
	3200	0.0365	0.167
	1600	0.0565	0.288
	800	0.062	0.439
	400	0.054	0.617
	200	0.0775	0.8
	100	0.091	0.941
	50	0.133	1.044
	10	0.1515	1.136

[0048] 通过实验结果显示,兔抗His稀释100倍时传统方法数值很低,而采用磁性酶联免疫磁珠检测时数值很高,稀释1600倍时仍可读数。因此节省了抗体,提高了样品检测灵敏度。

[0049] 实施例5:

[0050] 实施例2中制备的flag多肽磁性免疫微球的应用,即进行酶联免疫检测:

[0051] 分别取1mg偶联好抗原的磁性免疫微球,置于磁分离器上分离 1min,待溶液变澄清后,用移液器吸弃清液;再用1×PBST清洗2次,然后第一次加入100 μ l不同浓度的鼠抗flag样品,37℃孵育30min;再用1×PBST清洗3-5次,第二次加入100 μ l辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠溶液, 37℃孵育30min;然后用鲁米诺化学发光试剂盒检测。

[0052] 如下表所示:Flag多肽磁性免疫微球检测结果。

[0053]		鼠抗flag稀释倍数	传统方法	磁性免疫检测
	A	0	98.94	132.195
	B	1000	507.678	1056.194
	C	500	525.883	1145.831
	D	250	776.684	1359.727
	E	125	951.926	1551.79

[0054] 通过实验结果显示,采用磁性酶联免疫磁珠检测鼠抗体flag在低浓度时,数值约为传统方法的2倍,提高了样品检测灵敏度。

[0055] 实施例6:

[0056] 实施例3中制备的蛋白A磁性免疫微球的应用:

[0057] 取1mg实施例3中的偶联好抗原的磁性免疫微球,用1×PBS清洗3次,加入含5 μ g/ml抗体裂解液,混合吸附30min,用1×PBS清洗3次,去除上清待用;加入100 μ l 0.1M 甘氨酸, pH3.0的洗脱液混合5min,置于磁分离器上,待溶液变澄清后,吸取上清液,收集洗脱组分,即为目标抗体。

[0058] 如图1电泳结果显示,蛋白A磁性免疫微球可以在低浓度5 μ g/ml条件下吸附,裂解液中目标抗体全部被吸附,洗脱样品中抗体纯度高,磁珠灵敏度高。

[0059] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有

变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何标记视为限制所涉及的权利要求。

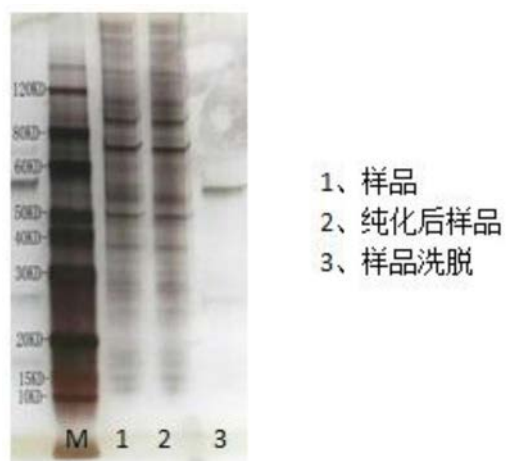


图1