



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102086225 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 200910219283. 8

(22) 申请日 2009. 12. 03

(73) 专利权人 西安金磁纳米生物技术有限公司
地址 710077 陕西省西安市高新区丈八五路
2 号现代企业中心东区 3 栋 4 层 10402A

(72) 发明人 崔亚丽 胡佳 陈超

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限公司 61211

代理人 徐平

(51) Int. Cl.

C07K 1/22 (2006. 01)

C07H 1/06 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

C12N 5/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101165490A , 2008. 04. 23,

CN 101165466A , 2008. 04. 23,

Jia-hui Lei. Detection of circulating

antigen in serum of mice infected with
Schistosoma. 《Acta Tropica 111》. 2009,

Yoshinori Mine. Separation of Salmonella
enteritidis from Experimentally. 《J. Agric.
Food Chem. 》. 1997,

林芳等. 鸡卵黄抗体的制备以及金磁微粒为
载体去除人血浆部分高丰度蛋白的研究. 《细胞
与分子免疫学杂志》. 2008,

林芳等. 鸡卵黄抗体的制备以及金磁微粒为
载体去除人血浆部分高丰度蛋白的研究. 《细胞
与分子免疫学杂志》. 2008,

审查员 唐慧

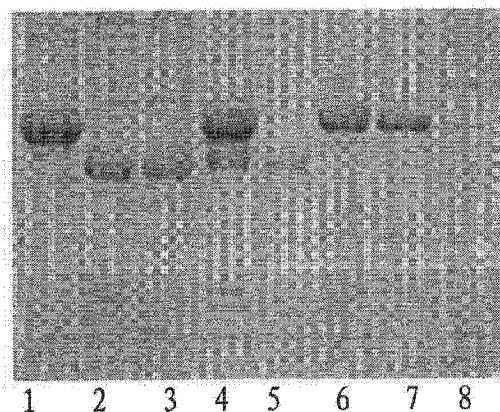
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及基于卵黄抗体 (IgY) 和磁性微粒的免疫磁性微粒的制备方法及其应用。卵黄抗体 (IgY) 是指从禽类, 如鸡、鸭、鹅的卵黄中分离得到的抗体。磁性微粒是指粒径在 1nm-200 μm, 具有超顺磁性和高比表面积磁性复合微粒。免疫磁性微粒的应用包括生物样本中蛋白、核酸等生物大分子分离, 细胞的分离, 免疫沉淀试验。本发明方法是通过将卵黄抗体 (IgY) 固定到磁性微粒表面制备出一种基于卵黄抗体 (IgY) 免疫磁性微粒。利用生物大分子与其相应卵黄抗体的亲和作用以及免疫磁性微粒的超顺磁性从而达到在磁场中将生物大分子、细胞从生物样品中分离的目的。



1. 一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

1) 磁性微粒的平衡:用偶联缓冲液平衡,使磁性微粒处于适宜反应的缓冲液中;

所述磁性微粒的平衡步骤包括:

a) 将偶联缓冲液放入离心管,使磁性微粒分散于偶联缓冲液中;

b) 用磁性分离器进行磁性分离,弃上清;

c) 对步骤 a)、b) 重复三次;

2) 平衡后的磁性微粒与卵黄抗体的结合:

平衡后的磁性微粒与卵黄抗体的结合包括以下条件:

a) 卵黄抗体以偶联缓冲液配制,用偶联缓冲液调节反应体积,使磁性微粒和卵黄抗体处于合适的反应浓度,其体积为使所取磁性微粒浓度为 1.5mg/mL 的体积;其浓度为磁粒浓度的 1 倍;

b) 采用恒温振荡器进行振荡反应,温度为 37℃;反应时间为 20 分钟;

3) 获得的免疫磁性微粒的清洗:除去非特异性吸附在免疫磁性微粒表面的卵黄抗体;所述对免疫磁性微粒的清洗包括以下步骤:

a) 将清洗缓冲液放入离心管,使磁性微粒分散于清洗缓冲液中;

b) 用磁性分离器进行磁性分离,弃上清;

c) 对步骤 a)、b) 重复三次;

在步骤 1) 和 2) 中的偶联缓冲液使用 0.02-0.2M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(Tris-HCl), pH=7.0-7.6;或 0.02-0.2M 磷酸缓冲液(PBS), pH=7.0-7.6;或 0.02-0.2M 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液, pH=7.0-7.6;所述偶联缓冲液中加入 0.1-1.0M 的 NaCl;

在步骤 3) 中的清洗缓冲液为含 0.05%(v/v) 吐温 20 (Tween20) 的偶联缓冲液,或含有 10mM 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA) 和 0.15M 的 NaCl 的 0.02M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, pH=7.0-7.6;所述清洗所用清洗缓冲液体积为使磁性微粒的浓度为 0.5-4mg/mL 的体积。

2. 根据权利要求 1 所述的基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法,其特征在于:所述方法还包括对免疫磁性微粒的封闭;所述免疫磁性微粒的封闭符合以下条件:

1) 加入封闭剂,其体积为使免疫磁性微粒浓度为 0.5-2mg/mL 的体积,振荡反应;

2) 采用恒温振荡器,温度为 37℃;

3) 反应时间为 120 分钟。

3. 根据权利要求 2 所述的基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法,其特征在于:所述方法还包括对免疫磁性微粒的清洗,即除去非特异性吸附在免疫磁性微粒表面的卵黄抗体或封闭剂。

4. 根据权利要求 3 所述的基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法,其特征在于:所述方法还包括对免疫磁性微粒的保存步骤:即将免疫磁性微粒悬于保存含 0.1% 叠氮钠和 0.1%BSA 的 PBS 缓冲液中,在温度为 2~8℃中保存备用。

5. 根据权利要求 4 所述的基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法,其特征在于:

所述封闭剂采用含 5% 脱脂奶粉的偶联缓冲液;或 1-5% 牛血清白蛋白 BSA,或 1-5% 赖

氨酸,或 0.2-2.0% 的明胶,或 1-5% 的聚乙二醇的偶联缓冲液。

一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒、其制备方法及其用途。

背景技术

[0002] 在现有技术中对生物大分子特异性亲和分离最常用的方法是以琼脂糖或树脂为载体,以哺乳动物来源的抗体 IgG 为亲和配基的免疫亲和层析法。然而这种层析方法有两方面的限制因素:一是以层析柱的形式进行生物大分子分离,需要复杂的前处理过程,且需要较大反应体积,对样品稀释度大,不适合处理小体积样品;二是哺乳动物来源的抗体特异性不高,并且会与类风湿因子等结合,导致分离特异性不好。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒、其制备方法及其用途,解决了生物大分子亲和分离操作复杂,分离特异性低、效率低的技术问题。

[0004] 本发明的技术解决方案是:

[0005] 一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒,该免疫磁性微粒由磁性微粒和经共价反应或非共价作用结合在磁性微粒表面的卵黄抗体组成;所述磁性微粒为具有与蛋白质/抗体有较强结合能力的金磁微粒,或者末端具有与蛋白质反应的功能基团的磁性微粒;所述基团包括具有反应活性的氨基、羧基、巯基以及苯异硫氰酸根;所述磁性微粒具有超顺磁性的微粒;粒径为 1nm-200 μ m。所述卵黄抗体为具有免疫亲和反应活性,可以与待分离生物大分子、细胞特异性结合的生物分子;所述待分离生物大分子指蛋白,核酸,及其复合物以及细胞等。

[0006] 一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0007] 1) 磁性微粒的平衡:用偶联缓冲液平衡,使磁性微粒处于适宜反应的缓冲液中;

[0008] 所述磁性微粒的平衡步骤包括:

[0009] a) 将偶联缓冲液放入离心管,使磁性微粒分散于偶联缓冲液中;

[0010] b) 用磁性分离器进行磁性分离,弃上清;

[0011] c) 对步骤 a)、b) 重复一次或多次,以三次为宜;

[0012] 2) 平衡后的磁性微粒与卵黄抗体的结合:

[0013] 平衡后的磁性微粒与卵黄抗体的结合包括以下条件:

[0014] a) 卵黄抗体以偶联缓冲液配制,用偶联缓冲液调节反应体积,使磁性微粒和卵黄抗体处于合适的反应浓度,其体积为使所取磁性微粒浓度为 0.5-3mg/mL 的体积;卵黄抗体的浓度为磁粒浓度的 0.05-5 倍。

[0015] b) 采用恒温振荡器进行振荡反应,温度为 4℃至 37℃;反应时间为 20-30 分钟;

[0016] 3) 获得的免疫磁性微粒的清洗:除去非特异性吸附在免疫磁性微粒表面的卵黄抗体;所述对免疫磁性微粒的清洗包括以下步骤:

[0017] a)、将清洗缓冲液放入离心管,使磁性微粒分散于清洗缓冲液中;

[0018] b)、用磁性分离器进行磁性分离,弃上清;

[0019] c)、对步骤 a)、b) 重复一次或多次,以三次为宜。

[0020] 上述方法还包括对免疫磁性微粒的封闭;所述免疫磁性微粒的封闭符合以下条件:1) 加入封闭剂,其体积为使免疫磁性微粒浓度为 0.5-2mg/mL 的体积,振荡反应;2) 具体可采用恒温振荡器,温度为 4℃至 37℃;3) 反应时间为 20-120 分钟。

[0021] 上述方法还包括对免疫磁性微粒的清洗,即除去非特异性吸附在免疫磁性微粒表面的卵黄抗体或封闭剂。

[0022] 上述方法还包括对免疫磁性微粒的保存步骤:即将免疫磁性微粒悬于保存含 0.1%叠氮钠和 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液中,在温度为 2~8℃中保存备用。

[0023] 上述在步骤 1) 和 2) 中的偶联缓冲液使用 0.02-0.2M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (Tris-HCl), pH = 7.0-7.6;或 0.02-0.2M 磷酸缓冲液 (PBS), pH = 7.0-7.6;或 0.02-0.2M 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液, pH = 7.0-7.6;所述偶联缓冲液中加入 0.1-1.0M 的 NaCl 的为宜。

[0024] 上述步骤 3) 中的清洗缓冲液为含 0.05% (v/v) 吐温 20 (Tween 20) 的偶联缓冲液,或含有 10mM 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) 和 0.15M 的 NaCl 的 0.02M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, pH = 7.0-7.6;所述清洗所用清洗缓冲液体积以使磁性微粒的浓度为 0.5-4mg/mL 的体积为宜。

[0025] 上述封闭剂采用含 1-10%的脱脂奶粉,或 1-5%牛血清白蛋白 BSA,或 1-5%赖氨酸,或 0.2-2.0%的明胶,或 1-5%的聚乙二醇的偶联缓冲液. 以含 5%脱脂奶粉的偶联缓冲液为宜。

[0026] 一种基于卵黄抗体免疫磁性微粒的用途:所述基于卵黄抗体免疫磁性微粒用于从血浆、腹水、组织培养上清等样本中蛋白的分离;所述免疫磁性微粒用于从血浆、腹水、组织培养上清等样本中核酸的分离;所述免疫磁性微粒用于免疫沉淀试验;所述免疫磁性微粒用于细胞分选。

[0027] 上述免疫磁性微粒与从血浆、腹水、组织培养上清的反应应符合以下条件:

[0028] a:样品以反应缓冲液配制,其体积为使所取磁性微粒浓度为 0.5-20mg/mL 的体积,以 10mg/mL 为宜;

[0029] b:采用恒温振荡器进行振荡反应的温度为 4℃至 37℃,以 37℃为宜;反应时间为 20-30 分钟,以 20 分钟为宜;

[0030] c:反应缓冲液使用 0.02-0.2M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (Tris-HCl), pH = 6.0-8.5;或 0.02-0.2M 磷酸缓冲液 (PBS), pH = 6.0-8.5;或 0.02-0.2M 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液, pH = 6.0-8.5;所述反应缓冲液中加入 0.1-1.0M 的 NaCl 的为宜。

[0031] 上述免疫磁性微粒的再生符合以下条件:

[0032] a:以再生缓冲液再生反应后免疫磁性微粒,再生缓冲液体积为使磁性微粒浓度为 0.5-20mg/mL 的体积,以 10mg/mL 为宜;

[0033] b:采用恒温振荡器进行振荡反应的温度为 4℃至 37℃,以 37℃为宜;反应时间为 1-10 分钟,以 3 分钟为宜;

[0034] c:再生缓冲液使用 0.02-2M 尿素,0.01-0.05M 的十二烷基磺酸钠或 0.01-0.05M, pH2.5-4.5 的 Gly-HCl 缓冲液。

[0035] 本发明的优点是：

[0036] 1、生物大分子分离效率高。因为磁性微粒具有较大的比表面积，所以具有固定化容量高的优点。比如金磁微粒对卵黄抗体的固定，1mg 的金磁微粒能够固定 0.3mg 以上的卵黄抗体。由于磁性微粒对生物分子的固定化容量很高，使得利用此种固定了目的生物大分子卵黄抗体的磁性微粒对目的生物大分子、细胞的分离效率很高。

[0037] 2、抗体特异性强，生物大分子分离效果更好。由于禽类与哺乳动物亲缘关系较远，生成的抗体特异性较哺乳动物更强。而且，禽类的 IgY 不激活补体，不与哺乳动物的类风湿因子结合，也不与哺乳动物球蛋白发生血清学交叉反应，不与葡萄球菌 A 蛋白、链球菌 G 蛋白等反应，避免在分离过程中非特异性生物分子的损失。

[0038] 3、分离过程便捷。本发明方法不需要对生物样品进行前处理，直接对生物样品进行适度倍数的稀释即可进行相应生物大分子、细胞的分离步骤；而且本发明方法不需要对卵黄抗体所用的载体基质即磁性微粒进行使用前的活化处理及离心操作，可直接使用，操作方便快捷，缩短了去除所需时间，也无需使用昂贵的实验仪器。亦可根据实验需要调整反应体积，适合于对小体积生物样品的处理。

[0039] 4、以磁性微粒作为载体，卵黄抗体 (IgY) 取代哺乳动物抗体作为亲和配基，这种亲和方法同时结合了磁性微粒和卵黄抗体的优点，可以广泛应用于在生物大分子（如蛋白、核酸）的分离领域。并且以磁性微粒作为载体的亲和分离方法还可扩大到在细胞分离领域的应用。

附图说明

[0040] 图 1 为金磁微粒对血清中白蛋白，抗体分离后样品所做的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色电泳图，其中：泳道 1 为白蛋白标准品的电泳图，泳道 2 和 3 为血清样品分离去除白蛋白后的电泳图，泳道 4 为血清样品的电泳图，泳道 5 为抗体标准样品的电泳图，泳道 6 和 7 为血清样品分离去除抗体后的电泳图泳道，8 为蛋白分子量标准 (14 ~ 97KD) 电泳图。

具体实施方式

[0041] 下面以具体实施例来对本发明进行详细说明，但并不是对本发明的具体限制。

[0042] 实施例 1：是基于抗人抗体的卵黄抗体 (IgY) 和金磁微粒的免疫磁性微粒的制备过程，及免疫磁性微粒应用于从血清 / 浆等生物样品中分离去除抗体的具体过程：

[0043] 1] 免疫磁性微粒的制备：

[0044] a. 抗人抗体的卵黄抗体在金磁微粒表面的固定：取 1ml 金磁微粒悬液加入到一个 2ml 容量的离心管中，轻摇重悬。置于磁性分离器上，磁性分离，弃上清。加入 1ml 偶联缓冲液 (0.2M 的 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液)，轻摇重悬。置于磁性分离器上，磁性分离，弃上清。重复操作一次。将卵黄抗体配置成浓度为 1mg/ml 的溶液，取 100 ~ 200 μ l 加入金磁微粒中，在摇床中 37℃，180r/min 反应 30min。反应完毕，磁性分离，弃上清。加入 1ml 清洗缓冲液 (含 0.1% 吐温的 pH6.0 的 PBS 缓冲液)，轻摇重悬磁粒。磁性分离，弃上清。

[0045] b. 金磁微粒的封闭：在上一步的磁粒中加入 1ml 的封闭剂 (含 1% 牛血清白蛋白和 1% 赖氨酸的偶联缓冲液)，在摇床中 37℃，180r/min 反应 2h。用 2ml 的上述清洗缓冲液清洗 3 次，最后悬于 1ml 保存缓冲液 (含 0.1% 叠氮钠和 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液) 中，

2 ~ 8℃保存备用。

[0046] 2] 血清 / 浆等生物样品中抗体的分离去除 :

[0047] a. 血清 / 浆等生物样品的稀释 : 取 5 μ l 血清 / 浆等生物样品, 用去除缓冲液 (pH6.0 的 1 $\times$ PBS 缓冲液) 稀释至 50 μ l。

[0048] b. 将 1] 步骤中的金磁微粒磁性分离, 弃上清。加入 1ml 的去除缓冲液 (pH6.0 的 1 $\times$ PBS 缓冲液), 轻摇重悬金磁微粒, 磁性分离, 弃上清。加入 a 步骤中的血清 / 浆等生物样品, 在摇床中 37℃, 180r/min 反应 10min。抗体就被结合到免疫磁性微粒上, 再经磁场中磁性分离, 从而实现抗体从血清 / 浆等生物样品中的分离去除。移取磁性分离后的上清, 即为分离去除了抗体的样品。

[0049] 3] 金磁微粒的再生和保存 : 加入 1ml 再生缓冲液 (0.05M, pH3.5 的 Gly-HCl 缓冲液) 到上步骤中的金磁微粒中, 在摇床中 37℃, 180r/min 反应 2min, 将吸附到金磁微粒上的抗体从金磁微粒上洗脱下来, 磁性分离, 弃上清。加入 1ml 的上述清洗缓冲液, 轻摇重悬金磁微粒, 磁性分离, 上清即为分离得到的人抗体。加入 1ml 的上述保存缓冲液 2 ~ 8℃保存备用。

[0050] 实施例 2 是基于抗人血清白蛋白的 IgY (卵黄抗体) 和金磁微粒的免疫磁性微粒的制备过程, 及这种免疫磁性微粒应用于从血清 / 浆等生物样品中分离除去人血清白蛋白的过程, 具体如下 :

[0051] 1] 免疫磁性微粒的制备

[0052] a. 抗人血清白蛋白卵黄抗体在金磁微粒表面的固定 : 取 4ml 金磁微粒到一个 5ml 容量的离心管中, 轻摇重悬。置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清。加入 4ml 偶联缓冲液, 轻摇重悬。置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清。重复操作一次。将抗人血清白蛋白的卵黄抗体配置成浓度为 1mg/ml 的溶液, 取 1.5ml 加入金磁微粒中, 在摇床中 37℃, 180r/min 反应 30min。反应完毕, 磁性分离, 弃上清。加入 4ml 清洗缓冲液, 轻摇重悬磁粒。磁性分离, 弃上清。

[0053] b. 金磁微粒的封闭 : 在上一步的磁粒中加入 4ml 的封闭剂, 在摇床中 37℃, 180r/min 反应 2h。用 4ml 的清洗缓冲液清洗 3 次, 最后悬于 2ml 保存缓冲液中, 2 ~ 8℃保存备用。

[0054] 2] 血清 / 浆等生物样品中白蛋白的分离去除 :

[0055] a. 血清 / 浆等生物样品稀释 : 取 1 μ l 血清 / 浆等生物样品, 用去除缓冲液稀释至 100 μ l。

[0056] b. 将 1] 步骤中的金磁微粒磁性分离, 弃上清。加入 4ml 的去掉缓冲液, 轻摇重悬金磁微粒, 磁性分离, 弃上清。加入 a 步骤中的血清 / 浆等生物样品, 在摇床中 37℃, 180r/min 反应 30min。白蛋白就被结合到免疫磁性微粒上, 再经磁场中磁性分离, 从而实现白蛋白从血清 / 浆等生物样品中的分离去除。移取磁性分离后的上清, 即为分离去除了白蛋白的样品。

[0057] 3] 金磁微粒的再生和保存 : 加入 3ml 再生缓冲液 (0.05M, pH3.5 的 Gly-HCl 缓冲液) 到上步骤金磁微粒中, 在摇床中 37℃, 180r/min 反应 2min, 将吸附到金磁微粒上的白蛋白从金磁微粒上洗脱下来, 磁性分离, 上清即为分离得到的白蛋白。加入 4ml 的清洗缓冲液, 轻摇重悬金磁微粒, 磁性分离, 弃上清。加入 2ml 的保存缓冲液 2 ~ 8℃保存备用。

[0058] 从附图可以看出,泳道 2 和泳道 3 中,已无明显的白蛋白条带出现,说明白蛋白分离去除的较为彻底。从附图可以看出,泳道 5 和泳道 6 中已无明显的抗体条带出现,说明抗体分离去除的较为彻底。

[0059] 本申请以磁性微粒为载体,某生物大分子的特异性卵黄抗体为亲和配基,制备出一种免疫磁性微粒。这种免疫磁性微粒可用于从生物样品中进行某生物大分子及细胞的特异性亲和分离。磁性微粒是指粒径在 1nm-200 μ m,具有超顺磁性和高比表面积 of 复合微粒。卵黄抗体是指从鸡,鸭等禽类动物卵黄中提取出的抗体。生物大分子指蛋白,核酸,及其免疫沉淀复合物。

[0060] 本发明将生物大分子的特异性卵黄抗体与磁性微粒共同反应一段时间后,制备出具有特异性的免疫磁性微粒。将稀释好的生物样品与免疫磁性微粒共同反应一段时间后,即可实现生物大分子亲和吸附到免疫磁性微粒表面。经磁性分离后,即可实现将生物大分子、细胞从生物样品中分离出去的目的。

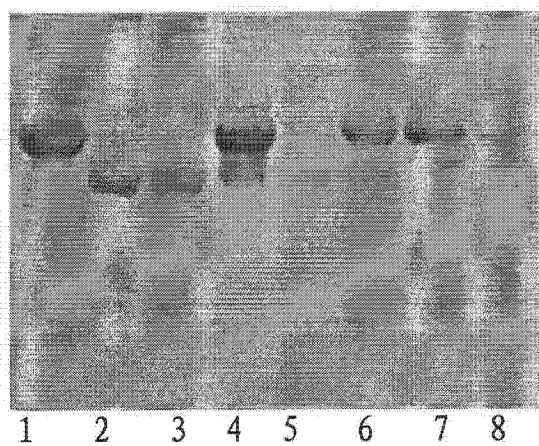


图 1

专利名称(译)	一种基于卵黄抗体的免疫磁性微粒的制备方法		
公开(公告)号	CN102086225B	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN200910219283.8	申请日	2009-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	陕西北美基因股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西北美基因股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
[标]发明人	崔亚丽 胡佳 陈超		
发明人	崔亚丽 胡佳 陈超		
IPC分类号	C07K1/22 C07H1/06 C12N15/10 C12N5/00 G01N33/53		
代理人(译)	徐平		
审查员(译)	唐慧		
其他公开文献	CN102086225A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基于卵黄抗体(IgY)和磁性微粒的免疫磁性微粒的制备方法及其应用。卵黄抗体(IgY)是指从禽类,如鸡、鸭、鹅的卵黄中分离得到的抗体。磁性微粒是指粒径在1nm-200μm,具有超顺磁性和高比表面积磁性复合微粒。免疫磁性微粒的应用包括生物样本中蛋白、核酸等生物大分子分离,细胞的分离,免疫沉淀试验。本发明方法是通过将卵黄抗体(IgY)固定到磁性微粒表面制备出一种基于卵黄抗体(IgY)免疫磁性微粒。利用生物大分子与其相应卵黄抗体的亲和作用以及免疫磁性微粒的超顺磁性从而达到在磁场中将生物大分子、细胞从生物样品中分离的目的。

