

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510030664.3

[51] Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年12月10日

[11] 授权公告号 CN 100441677C

[22] 申请日 2005.10.20

[21] 申请号 200510030664.3

[73] 专利权人 上海师范大学

地址 200234 上海市桂林路100号

[72] 发明人 沈鹤柏 陈伟 严亚贤 朱向玲

[56] 参考文献

CN1662815A 2005.8.31

出血性大肠杆菌单克隆抗体的制备与鉴定.
赵志晶等. 卫生研究, 第31卷第2期. 2002

磁性纳米微粒分离中药蛋白质的实验研究.
李静等. 生物磁学, 第5卷第2期. 2005

沙门氏菌单克隆抗体应用研究的进展. 焦
新安等. 单克隆抗体通讯, 第6卷第4期.
1990

审查员 潘俊宇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 徐迅

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

[54] 发明名称

免疫磁性纳米粒子细菌分离器及其制法和应用

[57] 摘要

本发明涉及一种免疫磁性纳米粒子细菌分离器,它具有如下的三层结构:(1)由核壳型磁性纳米粒子构成的内核层;(2)包覆内核层的中间层;(3)包覆中间层的抗体/配体外壳层。本发明还涉及制备该免疫磁性纳米粒子细菌分离器的方法。本发明的免疫磁性纳米粒子细菌分离器可简单有效地分离目标细菌,例如 E. coil O157:H7 细菌。

1. 一种免疫磁性纳米粒子细菌分离器，其特征在于，它含有如下的三层结构：

(1)由核壳型磁性纳米粒子构成的内核层；所述核壳型磁性纳米粒子内核层包括内核和外壳，其中所述内核层的内核成分选自：铁的氧化物、铁、镍、镍-铁合金、或其组合，所述内核层的外壳成分选自二氧化硅、琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物、或其组合；

(2)包覆内核层的中间层；所述中间层为[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷]；

(3)包覆中间层的抗体/配体外壳层，所述抗体/配体外壳层是抗 E.coil O157:H7 单克隆抗体或抗沙门氏杆菌单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器，其特征在于，所述内核层的内核成分选自：铁的氧化物。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器，其特征在于，所述内核层的外壳成分是二氧化硅。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器，其特征在于，所述抗体/配体外壳层是通过戊二醛与中间层连接的抗体或配体。

5. 根据权利要求 1 所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器，其特征在于，它由包括如下步骤的方法制得：

(1)在含磁性纳米粒子和内核层外壳形成剂的微乳液体系中，通过油包水型反相微乳液法，形成核壳型磁性纳米粒子，所述的核壳型磁性纳米粒子包括内核和外壳，

所述的磁性纳米粒子选自：铁的氧化物、铁、镍、镍-铁合金、或其组合；

所述的内核层外壳形成剂形成成分选自下组的外壳：二氧化硅、琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物、或其组合；

(2)使用[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷]对步骤(1)的核壳型磁性纳米粒子表面进行修饰，得到修饰了氨基的磁性纳米粒子；

(3)用抗体或配体对步骤(2)的修饰了氨基的磁性纳米粒子的表面进行修饰，形

成免疫磁性纳米粒子细菌分离器。

6. 根据权利要求 5 所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器，其特征在于，所述微乳液体系中 TritonX-100、正己醇、环己烷按 1:1~3:4~6 的体积比例均匀混合。

7. 一种制备权利要求 1 所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器的方法，其特征在于，它包括以下步骤：

(1)在含磁性纳米粒子和内核层外壳形成剂的微乳液体系中，通过油包水型反相乳液法，形成核壳型磁性纳米粒子，所述的核壳型磁性纳米粒子包括内核和外壳，

所述的磁性纳米粒子选自：铁的氧化物、铁、镍、镍-铁合金、或其组合；

所述的内核层外壳形成剂形成成分选自下组的外壳：二氧化硅、琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物、或其组合；

(2)使用[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷]对步骤(1)的核壳型磁性纳米粒子表面进行修饰，得到修饰了氨基的磁性纳米粒子；

(3)用抗体或配体对步骤(2)的修饰了氨基的磁性纳米粒子的表面进行修饰，形成免疫磁性纳米粒子细菌分离器，

所述抗体或配体选自抗 E.coil O157:H7 单克隆抗体或抗沙门氏杆菌单克隆抗体。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述微乳液体系中 TritonX-100、正己醇、环己烷按 1:1~3:4~6 的体积比例均匀混合。

9. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述微乳液体系中异丙醇和水按 1~10:1 的体积比比例均匀混合。

10. 如权利要求 1 所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器的用途，其特征在于，用于分离细菌，所述的细菌的表面具有与所述抗体结合的抗原，或者与所述配体结合的受体。

免疫磁性纳米粒子细菌分离器及其制法和应用

技术领域

本发明涉及一种纳米生物分离器，更具体地说，本发明涉及一种免疫磁性纳米粒子细菌分离器。本发明还涉及该分离器的制备方法及应用。

背景技术

众所周知，纳米技术领域是当今最热门的科学技术研究领域，将纳米技术应用于生物科学领域中所形成的新兴科学技术-纳米生物技术，是利用纳米技术研究解决生命科学领域中的重大问题的科学，它正成为当前重要的前沿科学研究领域之一。

现在，磁性纳米粒子在生物技术领域中的应用前景日益受到人们的关注。磁性纳米粒子经常被用作生物样品磁场分离的分离介质。用磁性纳米粒子的分离方法操作简便、所需设备廉价，同时分离速度快，有利于保持样品的生物活性。目前，运用越来越广泛。

大肠杆菌 O157 是产 Vero 毒性大肠埃希氏菌(Verotoxigenic Escherichia coli) 中一群治病性极强的大肠杆菌,为一种新的人畜共患病病源,已经成为进出口动物源性产品 A 类检验对象.它除引起腹泻、出血性肠炎外,还可发生溶血性尿毒综合症(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)等严重的并发症,后者病情凶险,病死率高。自 1982 年在美国首次发现该细菌以来,疫情开始逐渐扩散和蔓延,相继在英国、加拿大、日本等多个国家引起腹泻暴发和流行。我国自 1997 年在一定范围内开展监测工作以来,已陆续有十余个省份在市售食品、进口食品、腹泻病患者、家畜家禽等分离到肠出血性大肠杆菌 O157:H7,特别是 1999 年我国部分地区发生了肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染性腹泻的暴发,表明肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染性腹泻已逐渐成为威胁人群健康的重要公共卫生问题。因此对于大肠杆菌的检测显得尤为重要.我国已加入 WTO,畜禽产品国际贸易量日益增加,为了达到进入国际场所必须的安全和品质标准,为了保证广大消费者的生命与健康,禽畜产品的安全检测技术迫切需要快速,自动化和标准化。

在动物产品中建立一个价格低廉,快速简便,重复性好的大肠杆菌 O157 的检测方法已经迫在眉睫。

目前,我国畜禽产品安全检测技术主要是采用了一些传统的方法如分离培养和鉴定,酶联免疫吸附试验(ELISA)等方法,存在操作过程复杂,检测时间长等诸多缺陷,国外的方法通常使用的检测大肠杆菌的方法主要有特点虽也能精确地检测出大肠杆菌 O157,但具有花费时间较长,代价较高等缺点,国外的方法如免疫乳胶,免疫金检测试剂盒等方法,存在易凝结,价格昂贵等问题。

因此,本领域迫切需要开发一种具有自主知识产权且技术含量高,操作简便,准确,快速的畜禽产品安全检测的免疫磁性纳米粒子细菌分离器,以便方便、快捷和高效的分离出细菌表面具有特定抗原标志物的细菌,如 E.coli O157 细菌、沙门氏杆菌等。

发明内容

本发明的目的是提供一种免疫磁性纳米粒子细菌分离器。

本发明的另一个目的是提供制备该免疫磁性纳米粒子细菌分离器的方法。

本发明的再一个目的是将该免疫磁性纳米粒子细菌分离器应用于分离具有特定细菌表面标记物的细菌。

在本发明的第一方面,提供了一种免疫磁性纳米粒子细菌分离器,它含有如下的三层结构:

(1)由核壳型磁性纳米粒子构成的内核层;

(2)包覆内核层的中间层;较好地,所述中间层为 AEAPS[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷];

(3)包覆中间层的抗体/配体外壳层,所述的抗体是抗 E.coil O157:H7 单克隆抗体或抗沙门氏杆菌单克隆抗体。

在另一优选例中,所述的核壳型磁性纳米粒子内核层包括内核和外壳。所述内核层的内核成分选自:铁的氧化物、铁、镍、镍-铁合金、或其组合。较佳地,所述内核层的内核成分是铁的氧化物。所述内核层的外壳成分选自二氧化硅、琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物、或其组合。较佳地,所述内核层的外壳成分是二氧化硅。

其中,所述抗体/配体外壳层是通过固化剂或交联剂(例如乙醇、甲醛、戊

二醛)与中间层连接的抗体或配体。更佳地,所述的固化剂或交联剂选自戊二醛。

在本发明的第二方面,提供了一种制备免疫磁性纳米粒子细菌分离器的方法,它包括以下步骤:

(1)在含磁性纳米粒子和内核层外壳形成剂(如正硅酸乙酯)的微乳液体系中,通过油包水型反相微乳液法,形成核壳型磁性纳米粒子,所述的核壳型磁性纳米粒子包括内核和外壳,

所述的磁性纳米粒子选自:铁的氧化物、铁、镍、镍-铁合金、或其组合;
所述的内核层外壳形成剂形成成分选自下组的外壳:二氧化硅、琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物、或其组合;

(2)使用[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷]对步骤(1)的核壳型磁性纳米粒子表面进行修饰,得到修饰了氨基的磁性纳米粒子;

(3)使用抗体或配体对步骤(2)的修饰了氨基的磁性纳米粒子的表面进行修饰,形成免疫磁性纳米粒子细菌分离器。

其中,所述微乳液体系中 TritonX-100、正己醇、环己烷按 1:(1~3):(4~6)的比例均匀混合;或是异丙醇和水按 1~10:1 的体积比例均匀混合,优选 5:1 的比例进行混合。

在本发明的第三方面,提供了本发明所述的免疫磁性纳米粒子细菌分离器的用途,它被用于分离细菌,所述的细菌的表面具有与所述抗体结合的抗原,或者与所述配体结合的受体。

在本发明的第四方面,提供了一种分离细菌的方法,包括步骤:将该免疫磁性纳米粒子细菌分离器与含有目标细菌的溶液接触,形成所述免疫磁性纳米粒子细菌分离器与目标细菌的复合物,然后在外磁场的引导下分离出所述的复合物。

附图说明

图 1 是包裹了二氧化硅的磁性纳米粒子的傅立叶转换红外图谱,表明二氧化硅已经很好地包裹在磁性纳米粒子的表面。

图 2 是修饰了氨基的磁性纳米粒子的傅立叶转换红外图谱,图谱表明氨基已经修饰在纳米粒子的表面。

表 3 是利用免疫磁性纳米粒子进行细菌分离的效果图,表明该细胞分离器

可以有效地分离:H7 细菌, 有较好地分离效果。

具体实施方式

本发明者经过广泛而深入的研究, 发明了磁性纳米粒子的表面修饰能识别并结合抗体或配体等蛋白质物质, 然后用这种磁性纳米粒子去捕获目标细菌, 再在外磁场的作用下进行分离的技术。

细菌分离器的结构

本发明的细菌分离器含有如下的三层结构:

- (1)由核壳型磁性纳米粒子构成的内核层;
- (2)包覆内核层的中间层;
- (3)包覆中间层的抗体/配体外壳层,

适用于本发明的抗体或配体没有特别的限制。可以是任何针对细菌表面上的抗原或受体的抗体或配体。例如, 抗 E.coil O157:H7 抗原的抗体。

所述抗体/配体外壳层是抗:H7 单克隆抗体或抗沙门氏杆菌单克隆抗体。

较佳地, 核壳型磁性纳米粒子内核层包括内核和外壳。

所述内核层的内核成分可以为铁、铁的氧化物、铁与其他金属的合金, 较佳地选自: 铁的氧化物、铁、镍、镍-铁合金、或其组合, 更佳地为铁的氧化物。

所述内核层的外壳成分可以是无机包裹层, 例如氨基硅烷、巯基硅烷, 还可以是有机包裹层, 例如糖苷、蛋白质等。无机包裹层优选氨基硅烷, 有机包裹层优选糖苷。较佳地, 外壳成分选自二氧化硅、琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物、或其组合。更佳地, 所述内核层的外壳成分是二氧化硅。对于选定的外壳成分, 可根据现有技术选用合适的内核层外壳形成剂。例如当外壳成分为二氧化硅时, 可选用正硅酸乙酯或其它合适的内核层外壳形成剂。

所述抗体/配体外壳层是大肠杆菌单克隆抗体、沙门氏细菌单克隆抗体, 较佳地, 为通过戊二醛与中间层连接的抗体或配体。

制备方法

本发明的制备免疫磁性纳米粒子细菌分离器的方法, 它包括以下步骤:

- (1)在含磁性纳米粒子和内核层外壳形成剂的微乳液体系中, 通过油包水型

反相微乳液法，形成核壳型磁性纳米粒子，所述的核壳型磁性纳米粒子包括内核和外壳，

所述的磁性纳米粒子选自：铁的氧化物、铁、镍、镍-铁合金、或其组合；

所述的内核层外壳形成剂形成成分选自下组的外壳：二氧化硅、琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物、或其组合；

(2)使用[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷]对步骤(1)的核壳型磁性纳米粒子表面进行修饰，得到修饰了氨基的磁性纳米粒子；

(3)用抗体或配体对步骤(2)的修饰了氨基的磁性纳米粒子的表面进行修饰，形成免疫磁性纳米粒子细菌分离器。

在本发明的一个实施例中，所述微乳液体系为 TritonX-100、正己醇、环己烷混合物，按 1: 1~3 : 4~6 的体积比比例均匀混合。在本发明的另一个实施例中，所述微乳液体系为异丙醇和水按 1~10: 1 的体积比比例均匀混合。

在一个优选例中，本发明的制备免疫磁性纳米粒子细菌分离器的方法包括以下步骤：

(1)制备磁性纳米粒子

用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的混合溶液及 NaOH 溶液。在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.1~0.2mol/l， Fe^{3+} 离子的浓度为 0.1~0.3mol/l，NaOH 溶液的浓度为 2~3mol/l。在剧烈搅拌下将体积为混合盐溶液体积一半的 NaOH 溶液缓慢地滴加到混合盐溶液中。将所得到的固体沉淀在 40°C~60°C 下陈化 12h，用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次，过滤后再在 40°C~80°C 的条件下干燥 24h，在玛瑙研钵中研磨后即得产物。

(2)二氧化硅在 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 表面的修饰

将 TritonX-100、正己醇、环己烷按 1:(1~3):(4~6)的比例均匀混合，形成透明稳定的微乳液体系。将上述微乳液体系置于超声波中处理 30-60 分钟，再向其中加入 0.01~1g 的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (磁性纳米粒子)，用超声波处理 3 分钟后取出上层液倒入三颈烧瓶中，搅拌 30~60 分钟使之均匀。取 1ml 一定浓度的浓氨水用 2ml 二次蒸馏水稀释，将其缓慢加入到不断搅拌的微乳液中，持续搅拌 10~60 分钟使氨水均匀分散在微乳液中。1 小时后，向微乳液中滴加 1~5ml 的正硅酸乙酯(内核层外壳形成剂)，同时不断地搅拌 10 小时，并将体系的温度保持

在 15~40℃ 之间。向体系中加入丙酮使粒子沉淀，或者将体系静置过夜使粒子自然沉淀，使用乙醇清洗粒子。将清洗后的粒子置于 300~700℃ 的条件下煅烧 1~4 个小时，收集核壳型磁性纳米粒子。

(3) 用 [N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷](AEAPS) 修饰磁性纳米粒子表面

取 15mg 磁性纳米粒子向其中加入 30~50ml 的甲醇和丙三醇的混合液(甲醇:丙三醇的体积比为 2:3-2:1)中,用超声波处理 20~60 分钟;称取 0.01~1g AEAPS([N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷]),用超声波处理 10~60 分钟;将这两种溶液混合均匀,在 10~95℃ 的条件下反应 1-6 小时,然后取出粒子并用甲醇清洗 3 次,接着在 100-300℃ 真空干燥,收集粒子。

(4) 抗体或配体在磁性纳米粒子表面的修饰

取步骤(3)中制备的粒子,加至 pH 为 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲体系中,加入用量为使交联剂(或固化剂)在体系中的浓度约为 0.5%-2%,形成混合溶液。所述的混合溶液用超声波处理 30-60 分钟。然后用磷酸盐缓冲液洗涤约 1-5 次(更佳地 2-3 次)。

取一定量的抗体或配体(与磁性纳米粒子的浓度比通常为 1:6-1:3),加入到上述粒子的混合溶液中。在 4-40℃ 的反应温度下反应 1-6 小时,从而将抗体或配体上的 NH₂ 在固定剂的作用下与中间层上的功能基团反应,使抗体或配体通过共价键连接于中间层。反应结束后,磁性分离所述的粒子,用磷酸盐缓冲液洗涤约 2-3 次。这样得到的免疫磁性纳米粒子细菌分离器可置于磷酸盐缓冲液中保存备用。

适用于本发明的抗体或配体没有特别的限制。可以是任何针对细菌表面上的抗原或受体的抗体或配体。例如,抗 E.coil O157:H7 抗原的抗体。

核壳型磁性纳米粒子内核层的内核成分除了铁的氧化物以外,还可包括铁、镍(Ni)或者镍(Ni)和铁(Fe)等的合金。

核壳型磁性纳米粒子内核层的外壳成分除了二氧化硅等无机包裹层以外,还有琼脂糖、烯烃聚合物、聚丙烯腈、环氧化合物等有机包裹层。对于选定的外壳成分,可根据现有技术选用合适的内核层外壳形成剂。例如当外壳成分为二氧化硅时,可选用正硅酸乙酯或其它合适的内核层外壳形成剂。

本发明的主要优点在于：

(1)使用的磁性纳米粒子是单分散性的且具有超顺磁性，不产生团聚现象，磁性纳米粒子的形状和直径易于控制；

(2)能识别靶细菌的抗体或配体通过化学键与磁性纳米粒子连接，牢固性好，不易脱落；

(3)本发明方法简便而高效。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1

磁性纳米粒子的内核层的制备方法

采用改进的化学共沉淀制备磁性粒子的内核层，具体方法如下：用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的混合溶液及 NaOH 溶液。在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 $0.1 \sim 0.2 \text{ mol/l}$ ， Fe^{3+} 离子的浓度为 $0.1 \sim 0.3 \text{ mol/l}$ ， NaOH 溶液的浓度为 $2 \sim 3 \text{ mol/l}$ 。在剧烈搅拌下将体积为混合盐溶液体积一半的 NaOH 溶液缓慢地滴加到混合盐溶液中。将所得到的固体沉淀在 $40^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 陈化 12h，用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次，过滤后再在 $40^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ 的条件下干燥 24h，在玛瑙研钵中研磨后即得产物。

实施例 2

核壳型核酸磁性纳米粒子的制备方法

将 TritonX-100、正己醇、环己烷按 1:2:5 的比例均匀混合，形成透明稳定的微乳液体系。将上述微乳液体系置于超声波中处理 30~60 分钟，再向其中加入 0.5g 的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ，用超声波处理 6 分钟后取出上层液倒入三颈烧瓶中，搅拌 30 分钟使之均匀。取 1ml 一定浓度的氨水用 2ml 二次蒸馏水稀释，30 分钟后将其缓慢加入到不断搅拌的微乳液中，持续搅拌 30 分钟使氨水均匀分散在微

乳液中。1 小时后，向微乳液中滴加 1~3ml 的正硅酸乙酯，同时不断地搅拌 10 小时，并将体系的温度保持在 15~30℃之间。向体系中加入丙酮使粒子沉淀，或者将体系静置过夜使粒子自然沉淀，使用乙醇清洗粒子。将清洗后的粒子置于 400~700℃的条件下，煅烧 1~4 个小时，收集粒子。

实施例 3

核壳型核酸磁性纳米粒子的制备方法

将异丙醇和水按照 5: 1 的比例均匀混合，超声 5min。称量约 1.g 的 γ -Fe₂O₃ 加入到上述配制的溶液体系中，超声处理 10min。取上层清液倒入三颈烧瓶中，不断搅拌使其保持分散状态。取 1ml 一定浓度的浓氨水，将其缓慢加入到不断搅拌的溶液体系中。接着取 1~3ml 的正硅酸乙酯，同样将其缓慢加入到不断搅拌的溶液体系中。体系在室温的条件下反应 3-5 个小时。将反应产物倒出，用二次蒸馏水洗涤粒子 3-5 次。清洗后的粒子在 20-50℃的温度下真空干燥 5 小时，然后在 500-600℃的条件下，煅烧 1-4 小时，收集粒子备用。

实施例 4

免疫磁性纳米粒子细菌分离器的制备

(a)用硅烷修饰磁性纳米粒子表面

取 20mg 实施例 2 中制得的磁性纳米粒子，加入 30-50ml 的甲醇和丙三醇 5: 3 的组成的混合液中，用超声波处理 20~60 分钟；称取 1-3ml AEAPS，用超声波处理 10~60 分钟；将这两种溶液混合均匀，在一定的温度条件下反应 5 小时，然后取出粒子并用甲醇清洗 3 次，接着在 40~80℃真空干燥 2 小时，收集粒子。

从图 1 中可以看出，氨基被修饰到磁性纳米粒子的表面。

(b)在磁性纳米粒子的表面修饰抗体

取 1-3mg 如上制备的粒子，加至 pH 为 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲体系中，加入用量为 50-200 μ l 交联剂 (戊二醛)，形成混合溶液。所述的混合溶液用超声波处理 10-30 分钟。然后用磷酸盐缓冲液洗涤 2-3 次。

取约 3 微克的抗:H7 单克隆抗体(购自 Sigma Aldrich 试剂公司)，加入到含约 2ml 的上述粒子的混合溶液中。在一定的反应温度下反应 3 小时，从而将抗体上的氨基与中间层上的功能基团在固定剂的作用下进行反应，使抗体通过共

价键直接连接于中间层。反应结束后，磁性分离出所述的粒子，用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。这样得到的免疫磁性纳米粒子细菌分离器被置于磷酸盐缓冲液中保存备用。

实施例 5

免疫磁性纳米粒子细菌分离器的制备

(a)用硅烷修饰磁性纳米粒子表面

取 10-20mg 实施例 2 中制得的磁性纳米粒子，加入 30-50ml 的 1:1 的甲醇和丙三醇组成的混合液中，用超声波处理 20~60 分钟；称取 2ml AEAPS，用超声波处理 10~60 分钟；将这两种溶液混合均匀，在 60-85℃ 的条件下反应 2-4 小时，然后取出粒子并用甲醇清洗 3 次，接着在 60℃ 真空干燥 2 小时，收集粒子。

(b)抗体对磁性纳米粒子的修饰

取 0.5mg 如上制备的粒子，加至 pH 为 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲体系中，加入用量为 50-100 μ l 交联剂(戊二醛)，形成混合溶液。所述的混合溶液用超声波处理 30-60 分钟。然后用磷酸盐缓冲液洗涤 2-3 次。

取约 1.5 微克的羊抗兔抗体（购自 Sigma 公司），加入到含约 0.5mg 的上述粒子的混合溶液中。在一定的反应温度下反应若干小时，从而将抗体上的 NH_2 与中间层上的功能基团在固定剂的作用下进行反应，使抗体通过共价键直接连接于中间层。反应结束后，磁性分离出所述的粒子，用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。这样得到的免疫磁性纳米粒子细菌分离器被置于磷酸盐缓冲液中保存备用。

实施例 6

免疫磁性纳米粒子细菌分离器的应用 1

取实施例 4 中制得的免疫磁性纳米粒子细菌分离器 50-100 μ l(0.5mg/ml)，向其中加入 50 μ l 的细菌溶液和一定量（50-200 μ l）的 PBS 缓冲溶液，在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下反应 20-40min，反应过程中不断混摇使反应充分。

在外界磁场的作用下收集免疫磁性纳米粒子，出去上清液。用 PBS 缓冲溶液洗涤 3-5 次。除去上清液，加入 100-200 μ l 的 LB 液体，混匀使粒子均匀分布，涂布营养琼脂板在 37°C 的条件下，培养 16-24 小时。用显微镜观察细菌集

落的生长情况，从而判断免疫磁性纳米粒子细菌分离器的效能。

实施例 7

免疫磁性纳米粒子细菌分离器的应用 2

取实施例 5 中制得的免疫磁性纳米粒子细菌分离器 100-200 μ l(0.5mg/ml)，向其中加入一定量的抗 E.coil O157:H7 单克隆抗体 (Sigma-Aldrich)，在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 不断振荡的条件下反应 15-30min。在外界磁场的作用下进行磁性分离，除去上清液，用 PBS 缓冲溶液洗涤 2-3 次。将分离的免疫磁性纳米粒子分散在 PBS 缓冲溶液中备用。

取上述分离得到的免疫磁性纳米粒子细菌分离器 50-100 μ l(0.5mg/ml)，向其中加入 50-100 μ l 的细菌溶液和一定量的 (50-100 μ l) 的 PBS 缓冲溶液，在 37°C 不断振荡的条件下反应 20-30min。

在外在磁场的作用下收集磁性纳米粒子，除去清液。用 PBS 缓冲溶液清洗磁性纳米粒子 3-5 次。除去上清液，加入 50-200 μ l 的 LB 液体，混匀使粒子均匀分布，涂布营养琼脂板在 37°C 的条件下，培养 16-24 小时。用显微镜观察细菌集落的生长情况，从而判断免疫磁性纳米粒子细菌分离器的效能。

实施例 8

免疫磁性纳米粒子细菌分离器的应用 3

取实施例 5 中制得的免疫磁性纳米粒子细菌分离器 100-200 μ l(0.5mg/ml)，向其中加入一定量的抗沙门氏杆菌单克隆抗体 (Sigma-Aldrich)，在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 不断振荡的条件下反应 20-30min。在外界磁场的作用下进行磁性分离，除去上清液，用 PBS 缓冲溶液洗涤 2-3 次。将分离的免疫磁性纳米粒子分散在 PBS 缓冲溶液中备用。

取上述分离得到的免疫磁性纳米粒子细菌分离器 50-100 μ l(0.5mg/ml)，向其中加入 50-100 μ l 的细菌溶液和一定量的 (50-100 μ l) 的 PBS 缓冲溶液，在 37°C 不断振荡的条件下反应 20-30min。

在外在磁场的作用下收集磁性纳米粒子，除去清液。用 PBS 缓冲溶液清洗磁性纳米粒子 3-5 次。除去上清液，加入 50-200 μ l 的 LB 液体，混匀使粒子均匀分布，涂布营养琼脂板在 37°C 的条件下，培养 16-24 小时。用显微镜观察细菌集落的生长情况，从而判断免疫磁性纳米粒子细菌分离器的效能。

结果：实施例 3-5 制得的核壳型核酸磁性纳米粒子是单分散性的且具有超

顺磁性，不会产生团聚现象，且其形状和直径易于控制。此外，能特异性地识别:H7 细菌(靶细菌)，而且与:H7 细菌的结合牢固性好，不易脱落，因此分离效果非常好。从表 2 中可以看出免疫磁珠的分离效果达到了比较理想的结果，具有很好地特异性识别目标细菌地能力。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文章被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

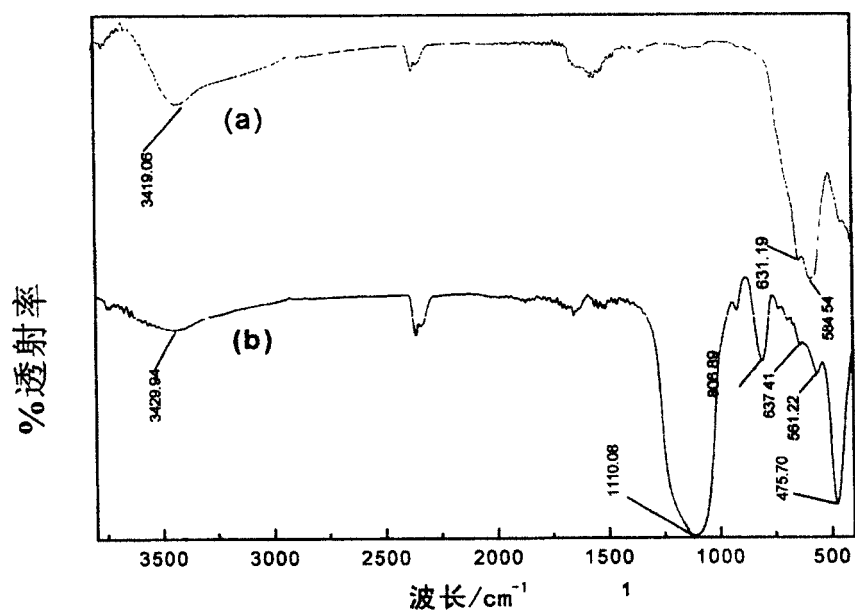


图 1 纳米磁性纳米粒子包裹二氧化硅的红外图谱

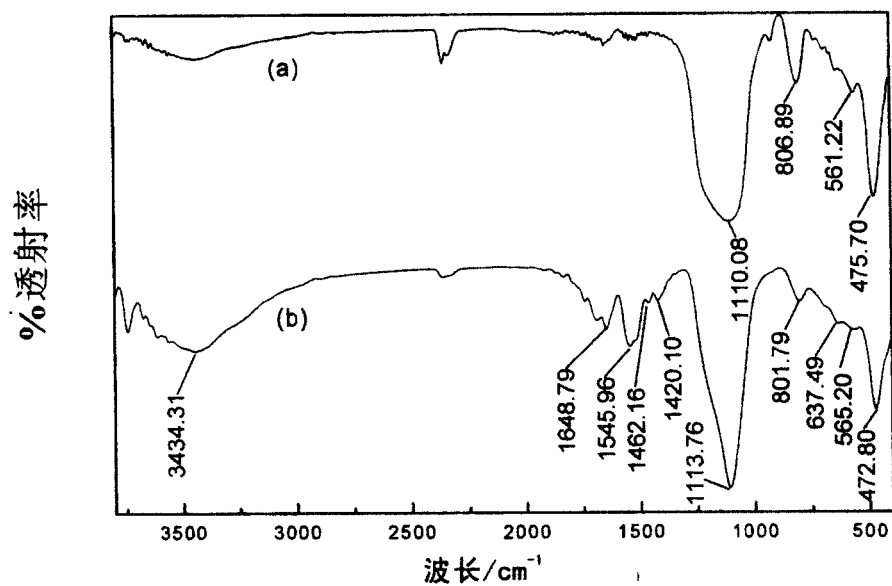


图 2 磁性纳米粒子表面修饰氨基的傅立叶转换红外图谱

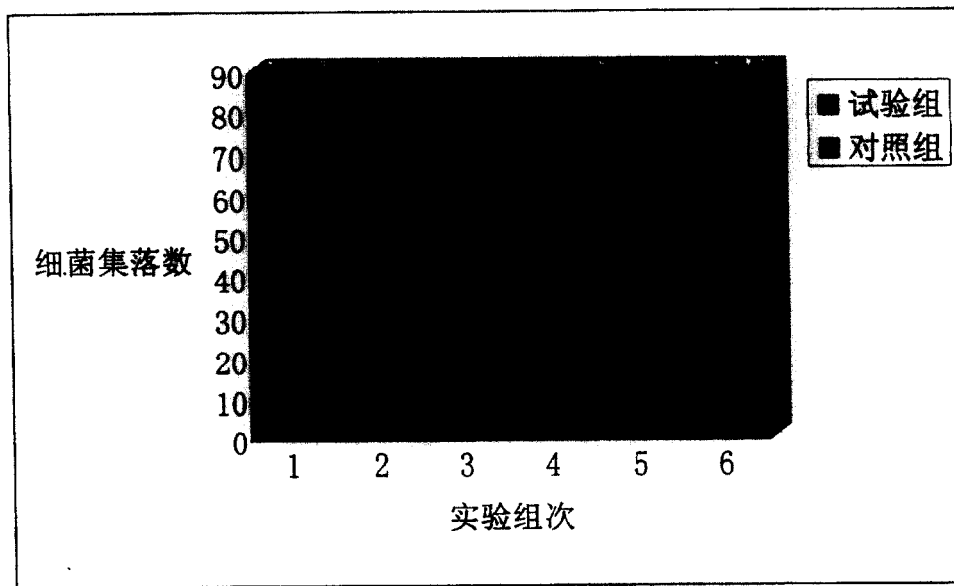


图 3 免疫磁性纳米粒子细菌分离效果图

专利名称(译)	免疫磁性纳米粒子细菌分离器及其制法和应用		
公开(公告)号	CN100441677C	公开(公告)日	2008-12-10
申请号	CN200510030664.3	申请日	2005-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学学报		
[标]发明人	沈鹤柏 陈伟 严亚贤 朱向玲		
发明人	沈鹤柏 陈伟 严亚贤 朱向玲		
IPC分类号	C12N1/20 G01N33/53 C12Q1/04		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	潘俊宇		
其他公开文献	CN1952113A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫磁性纳米粒子细菌分离器，它具有如下的三层结构：(1)由核壳型磁性纳米粒子构成的内核层；(2)包覆内核层的中间层；(3)包覆中间层的抗体/配体外壳层。本发明还涉及制备该免疫磁性纳米粒子细菌分离器的方法。本发明的免疫磁性纳米粒子细菌分离器可简单地分离目标细菌，例如E.coli O157:H7细菌。

