



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106405075 B

(45)授权公告日 2018.08.28

(21)申请号 201610780209.3

(22)申请日 2016.08.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106405075 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(73)专利权人 上海美吉生物医药科技有限公司

地址 201321 上海市浦东新区国际医学园
区康新公路3399弄3号楼

(72)发明人 刘关 蔡红东 陈昌岳 张培培
张祥林

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

审查员 张婷

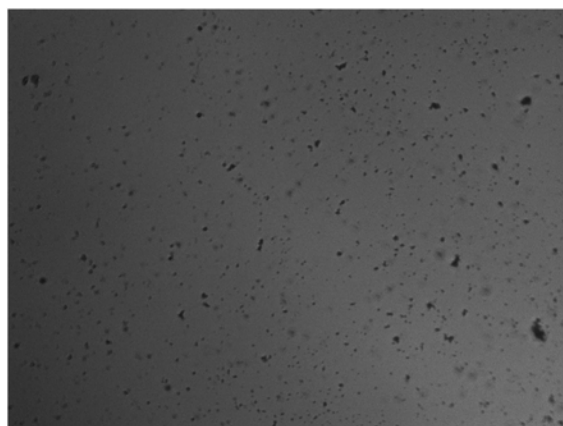
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种免疫磁珠及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种免疫磁珠及其制备方法,包括磁性微球和生物配基,所述免疫磁珠的结构由内至外为:磁性微球-生物素-链霉亲和素-生物素-生物配基。本发明的免疫磁珠性质稳定,而且磁性好,粒径小。本发明采用生物素-链霉亲和素-生物素的连接方式,先通过酰胺化反应得到生物素化磁性微球,然后将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合。由于生物素-链霉亲和素的结合具有亲和性高和特异性的特点,使磁性微球与生物配基可以定向结合,不易交联,不易引起链霉亲和素结构改变。同时,本发明的制备方法简单,反应条件温和,使生物配基可以保留生物活性。



1. 一种用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠,包括磁性微球和生物配基,其特征在于:所述免疫磁珠的结构由内至外为:磁性微球-生物素-链霉亲和素-生物素-生物配基,所述磁性微球为核壳结构的无机或有机高分子包裹的磁性纳米簇,所述生物配基层为BSA、酶、抗体、DNA或RNA中的一种。

2. 一种制备权利要求1中所述用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠的方法,其步骤包括:

s1. 磁性纳米簇的制备;

s2. 氨基修饰的磁性微球的制备;

s3. 生物素化磁性微球的制备;

s4. 将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合;

s5. 免疫磁珠的制备:将步骤s4中结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球与生物素化生物配基结合得到所述免疫磁珠。

3. 根据权利要求2所述用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述步骤s3中的生物素化磁性微球的制备是将氨基修饰的磁性微球分散在二甲亚砜或N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入生物素活性酯,进行酰胺化反应后得到的,其中氨基修饰的磁性微球和生物素活性酯的质量比为1:(0.25~1)。

4. 根据权利要求2所述用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述步骤s4是将生物素化磁性微球与链霉亲和素在室温下反应60~90分钟后得到,其中链霉亲和素的添加量为生物素化磁性微球质量的0.1~0.6。

5. 根据权利要求2所述用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述步骤s5中步骤s4中结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球与生物素化生物配基的质量比为1:(0.01~1)。

6. 根据权利要求2所述用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述步骤s1中的磁性纳米簇是通过水热法、溶剂热法或共沉淀法制备得到。

7. 根据权利要求2所述用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述步骤s2中的氨基修饰的磁性微球为核壳结构的二氧化硅包裹的磁性纳米簇,通过如下方法制备得到:向含有磁性纳米簇的溶液中加入氨水、硅烷化试剂和氨基硅烷偶联剂,反应1~3天后得到氨基修饰的磁性微球;所述磁性纳米簇、氨水、硅烷化试剂、氨基硅烷偶联剂加入量的质量比为:1:(12.5~40):(2~8):(0.5~3)。

8. 一种权利要求1所述用于捕获外周血血液中肿瘤细胞的免疫磁珠在细胞分选中的应用。

一种免疫磁珠及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫磁珠的制备领域,具体地说是一种免疫磁珠及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫磁珠(Immunomagnetic beads,简称IMB),是由磁性微球和生物配基结合而成。磁性微球与生物配基的结合一般有物理结合和化学偶联的方法。化学偶联法具有结合容量大,稳定性好,制备得到的免疫磁珠通常可以保存数月。但是为了防止抗体失活,化学偶联法一般只能使用比较温和的条件,因此会导致抗体的包被效率不佳;而且化学偶联会利用过多的抗体活性基团,可控度低因而会导致抗体失活。物理吸附方法是最早被John Ugelstad等采用的方法,具有包被简单,反应条件温和的特点,但是其主要利用蛋白的疏水性在磁性微球表面进行包被,磁性微球在包被之前必须具有疏水性,免疫磁珠保存时间不能太长,磁珠表面活性物质易脱落,蛋白稳定性和活性会受到影响。

[0003] 通过生物素-亲和素化磁珠的结合来制备免疫磁珠是目前最常用的亲和性高的物理结合包被方式,其反应快速,产物稳定,专一性强,克服了一般物理吸附的缺点,又具有高的亲和性,可以维护生物基质的活性以及特异性。亲和素本身背景高,常用的物理结合包括生物素-链霉亲和素连接的方法,具体是先将磁性微球表面修饰一层链霉亲和素后,再与生物素标记的生物配基进行定向的生物素-链霉亲和素结合,得到免疫磁珠。由于每个链霉亲和素分子能结合4个分子的生物素,可以提高磁性微球表面生物配基的包被量。如公开号为CN103443626A的中国专利《链霉亲和素结合磁性粒子及其制造方法》公开了一种蛋白质结合磁性粒子即免疫磁珠,它是将链霉亲和素结合磁性粒子和生物素化蛋白质连接得到。其中链霉亲和素结合磁性粒子是通过使表面具有氨基的磁性粒子与链霉亲和素及戊二醛反应再还原后得到。链霉亲和素的每条肽链含159个氨基酸残基,其中赖氨酸、精氨酸等碱性氨基酸的含量比一般亲合素少,含酸性氨基酸较多,其等电点为6.0,因此链霉亲和素上的氨基反应掉过多容易导致等电点发生变化或者失活;且该方法在进行还原时还需要添加强还原剂(如硼氢化钠或者氰基硼氢化钠),容易引起蛋白等活性物质失活,而且戊二醛会导致磁性粒子自身,以及蛋白质自身内部发生交联,不利于蛋白质的偶联。

发明内容

[0004] 本发明的主要目的是针对现有技术存在的不足提供一种免疫磁珠及其制备方法,用该方法制备得到的免疫磁珠,生物配基与磁性微球定向连接,不会导致内部交联和蛋白质失活,而且生物配基包被量大,生物活性好。

[0005] 在本发明的一方面,本发明是通过如下技术方案实现的:一种免疫磁珠,包括磁性微球和生物配基,所述免疫磁珠的结构由内至外为:磁性微球-生物素-链霉亲和素-生物素-生物配基。

[0006] 优选的,所述生物配基为BSA、酶、抗体、DNA或RNA中的一种。

[0007] 优选的,所述磁性微球为核壳结构的无机或有机高分子包裹的磁性纳米簇。比如

二氧化硅包裹的磁性四氧化三铁、或者葡聚糖包裹的磁性四氧化三铁等等,最优选为二氧化硅包裹的磁性四氧化三铁。

[0008] 在本发明的另一方面,提供了一种制备上述免疫磁珠的方法,其步骤包括:

[0009] s1. 磁性纳米簇的制备;

[0010] s2. 氨基修饰的磁性微球的制备;

[0011] s3. 生物素化磁性微球的制备;

[0012] s4. 将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合;

[0013] s5. 免疫磁珠的制备:将步骤s4中结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球与生物素化生物配基结合得到所述免疫磁珠。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述步骤s3中的生物素化磁性微球的制备是将氨基修饰的磁性微球分散在二甲亚砜或N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入生物素活性酯,进行酰胺化反应后得到的,其中氨基修饰的磁性微球和生物素活性酯的质量比为1:(0.25~1)。由于活性酯在水相中易失活,反应时间短,在碱性条件下可以有利于提高反应效率制备生物素化磁性微球。本发明以二甲亚砜或N,N-二甲基甲酰胺为溶剂,可以防止活性酯的失活。同时延长反应时间提高磁性微球表面的生物化,优选为反应10~24小时至生物素活性酯反应完全。作为本领域技术人员公知的,所述步骤s3中,酰胺化反应完成后应当进行磁分离,磁分离得到的生物素化磁性微球用pH为7.2的PBS溶液洗涤并分散在PBS溶液中。

[0015] 优选的,所述步骤s4是将生物素化磁性微球与链霉亲和素在室温下反应60~90分钟后得到,其中链霉亲和素的添加量为生物素化磁性微球质量的0.1~0.6。

[0016] 优选的,所述步骤s5中步骤s4中结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球与生物素化生物配基的质量比为1:(0.01~1)。由于链霉亲和素和生物素的亲和性很高,因此不需要考虑浓度和比例问题,只要结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球不饱和,生物素化生物配基都可以与磁性微球偶联。但是考虑到生物配基的成本因素,本发明采取质量比为1:(0.01~0.2)。

[0017] 优选的,所述步骤s1中的磁性纳米簇是通过水热法、溶剂热法或共沉淀法制备得到,也可以采用市售商品。制备磁性纳米簇的方法为本领域技术人员所熟知的技术,得到的产品只需要满足具有良好的磁性,并且可以与有机或无机高分子形成核壳结构即可。

[0018] 进一步的,所述步骤s2中的氨基修饰的磁性微球部分为核壳结构的二氧化硅包裹的磁性纳米簇,效果更加优于直接在磁性纳米簇粒子表面进行氨基修饰得到的磁性微球,可以采用市售商品或者按照本领域技术人员所知的常规方法制备,均不影响本发明的结果。可以使纳米簇聚集在二氧化硅内部,形成核壳结构,增大粒径,并且增加磁性和稳定性即可。优选的,本发明采用如下方法制备氨基修饰的二氧化硅包裹的磁性纳米簇:向含有磁性纳米簇的溶液中加入氨水、硅烷化试剂和氨基硅烷偶联剂,反应1~3天后得到氨基修饰的磁性微球;所述磁性纳米簇、氨水、硅烷化试剂、氨基硅烷偶联剂加入量的质量比为:1:(12.5~40):(2~8):(0.5~3)。所述氨水的质量百分浓度为25~28%。其中,硅烷化试剂可以为正硅酸四乙酯(CAS:562-90-3),氨基硅烷偶联剂可以为(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(CAS:919-30-2)。本领域技术人员在选择其他的硅烷化试剂与氨基硅烷偶联剂时,可以对反应原料的比例进行调整,均不超出本发明的保护范围。

[0019] 在本发明的第三方面,提供了一种上述免疫磁珠在细胞分选中的应用。

[0020] 本发明的有益效果为：

[0021] (1) 本发明提供了一种免疫磁珠，其免疫磁珠的结构由内至外为：磁性微球-生物素-链霉亲和素-生物素-生物配基，得到的免疫磁珠性质稳定，而且磁性好，同时粒径为200~400nm。

[0022] (2) 本发明采用生物素-链霉亲和素-生物素的连接方式，先通过酰胺化反应得到生物素化磁性微球，然后将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合。由于生物素-链霉亲和素的结合具有亲和性高和特异性的特点，使磁性微球与生物配基可以定向结合，不易交联，不易引起链霉亲和素结构改变。亲和素的高等电点(等电点10-10.5)及高含糖结构导致在聚苯乙烯板和硝酸纤维素膜上或与组织细胞DNA结合时，易产生一定程度的非特异性结合，造成较高的显色背景，而链霉亲和素(不含糖基，等电点5-6)在应用中克服了这一缺点。同时，由于一个链霉亲和素分子有四个结合位点，可以结合四个生物素分子，而空间位阻的作用会使链霉亲和素在与生物素化磁性微球结合后，仍然有1~3个剩余位点可以与生物素化生物配基结合，使包被在磁性微球外侧的生物配基包被量增大。

[0023] (3) 本发明的制备方法简单，反应条件温和，反应均可以在室温下进行，不容易造成生物配基的变质、降解等，同时避免了使用还原剂，且是通过亲和性结合可以维持生物配基的生物活性和特异性。

[0024] (4) 本发明原料简单易得，成本低，工艺步骤简单，具有很强的实用性。

附图说明

[0025] 图1为本发明CD45抗体免疫磁珠1的光学显微镜下形貌图；

[0026] 图2为本发明CD45抗体免疫磁珠1的荧光显微镜下形貌图；

[0027] 图3为本发明EpCAM免疫磁珠分选的CTC细胞免疫荧光图。

具体实施方式

[0028] 以下通过具体实施例来进一步说明本发明：下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

[0029] 实施例1

[0030] (1) 磁性纳米簇的制备：通过共沉淀法制备磁性纳米簇 Fe_3O_4 1；

[0031] (2) 氨基修饰的磁性微球的制备：向含有10mg磁性纳米簇 Fe_3O_4 1的溶液中加入125mg氨水、30mg正硅酸四乙酯和30mg (3-氨基丙基) 三乙氧基硅烷，反应1天后进行磁分离，并且用乙醇和水交替洗涤各两次，得到氨基修饰的磁性微球1；

[0032] (3) 生物素化磁性微球的制备：将20mg氨基修饰的磁性微球1分散在二甲亚砜中，然后加入10mg生物素活性酯，进行酰胺化反应，反应过夜后进行磁分离，用pH为7.2的PBS溶液洗涤后得到生物素化磁性微球1；

[0033] (4) 将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合：将1mg生物素化磁性微球1与200 μL 链霉亲和素(浓度为0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 在室温下反应60分钟后得到结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球1；

[0034] (5) 免疫磁珠的制备：将结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球1与标记荧光的生物素化抗体CD45结合，进行磁分离得到所述CD45抗体免疫磁珠1。

[0035] 用nanodrop检测溶液中反应前和反应后生物素修饰的生物配基1的浓度,计算得到加入的生物素化抗体约在50 μ g左右可以完全与1mg结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球偶联,并且继续加入生物素化抗体,通过nanodrop检测剩余生物素化抗体不与结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球继续反应,说明结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球达到饱和。

[0036] 对上述CD45抗体免疫磁珠1进行显微镜检测,得到的光学显微镜下形貌图如图1所示,荧光显微镜下形貌图如图2所示。通过图1和图2可以看出,本发明的CD45抗体免疫磁珠1上,免疫磁珠上偶联有标记荧光的CD45,偶联效率高。

[0037] 实施例2

[0038] (1) 磁性纳米簇的制备:通过共沉淀法制备磁性纳米簇 Fe_3O_4 2;

[0039] (2) 氨基修饰的磁性微球的制备:向含有10mg磁性纳米簇 Fe_3O_4 2的溶液中加入250mg氨水、20mg正硅酸四乙酯和10mg (3-氨基丙基) 三乙氧基硅烷,反应2天后进行磁分离,并且用乙醇和水交替洗涤各两次,得到氨基修饰的磁性微球2;

[0040] (3) 生物素化磁性微球的制备:将20mg氨基修饰的磁性微球2分散在N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入5mg生物素活性酯,进行酰胺化反应,反应过夜后进行磁分离,用pH为7.2的PBS溶液洗涤后得到生物素化磁性微球2;

[0041] (4) 将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合:将1mg生物素化磁性微球2与200 μ L链霉亲和素(浓度为1 μ g/ μ L)在室温下反应90分钟后得到结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球2;

[0042] (5) 免疫磁珠的制备:将结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球2与标记荧光的生物素化抗体CD45结合得到所述CD45抗体免疫磁珠2。

[0043] 加入的生物素化抗体约在100 μ g左右可以完全与1mg结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球偶联,并且继续加入生物素化抗体,通过nanodrop检测剩余生物素化抗体不与结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球继续反应,说明结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球达到饱和。

[0044] 实施例3

[0045] (1) 磁性纳米簇的制备:通过共沉淀法制备磁性纳米簇 Fe_3O_4 3;

[0046] (2) 氨基修饰的磁性微球的制备:向含有10mg磁性纳米簇 Fe_3O_4 3的溶液中加入125mg氨水、40mg正硅酸四乙酯和5mg (3-氨基丙基) 三乙氧基硅烷,反应3天后进行磁分离,并且用乙醇和水交替洗涤各两次,得到氨基修饰的磁性微球3;

[0047] (3) 生物素化磁性微球的制备:将20mg氨基修饰的磁性微球部分1分散在二甲亚砜或N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入20mg生物素活性酯,进行酰胺化反应,反应过夜后进行磁分离,用pH为7.2的PBS溶液洗涤后得到生物素化磁性微球3;

[0048] (4) 将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合:将1mg生物素化磁性微球3与200 μ L链霉亲和素(浓度为3 μ g/ μ L)在室温下反应75分钟后得到结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球3;

[0049] (5) 免疫磁珠的制备:将结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球3与生物素化抗体EpCAM结合得到所述EpCAM抗体免疫磁珠3。

[0050] 加入的生物素化抗体约在80 μ g左右可以完全与1mg结合了链霉亲和素的生物素化

磁性微球偶联,并且继续加入生物素化抗体,通过nanodrop检测剩余生物素化抗体不与结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球继续反应,说明结合了链霉亲和素的生物素化磁性微球达到饱和。

[0051] 实施例4癌症病人的CTC细胞捕获

[0052] 取健康人和不同癌症病人的外周血血液,对血液中的CTC进行捕获。要求受试者血常规白细胞值位于 $2 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7$ 个/mL之间,全血样本未出现溶血或血块凝结。并且受试者相关信息完整,样本采集、保存方法规范,实验操作规范,具体步骤如下:取不同癌症病人血液3mL,将实施例3中的EpCAM抗体免疫磁珠依次加入到上述各混合细胞悬液中,在4℃下孵育30分钟,然后在1分钟内进行磁分选并用PBS洗涤2~3次,将孵育回收的CTC进行抗体染色、并在载玻片上固定、然后进行细胞核DAPI染色、封片后,用荧光显微镜鉴定,结果如图3所示,细胞膜表面显示有荧光,在荧光显微镜下为绿光荧光,说明捕获到的细胞表面呈EpCAM阳性,说明为肿瘤细胞。而正常人的血液中没有捕获到肿瘤细胞。

[0053] 如果先对血液进行红细胞裂解,并且用CD45抗体免疫磁珠去除血液中的白细胞后再用EpCAM抗体免疫磁珠进行肿瘤细胞的捕获,捕获效率更高。

[0054] 对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明实施例原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明实施例的保护范围。

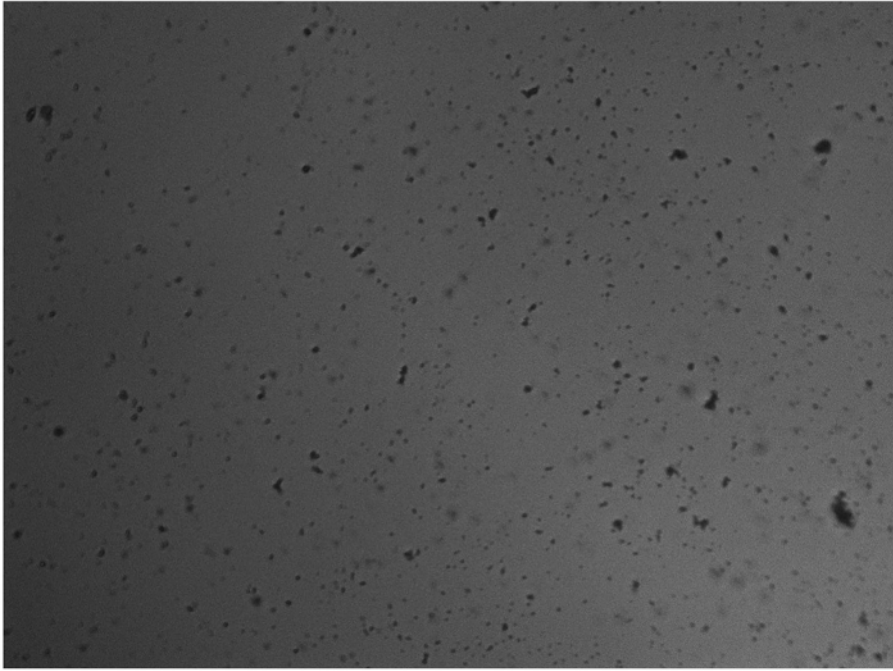


图1



图2

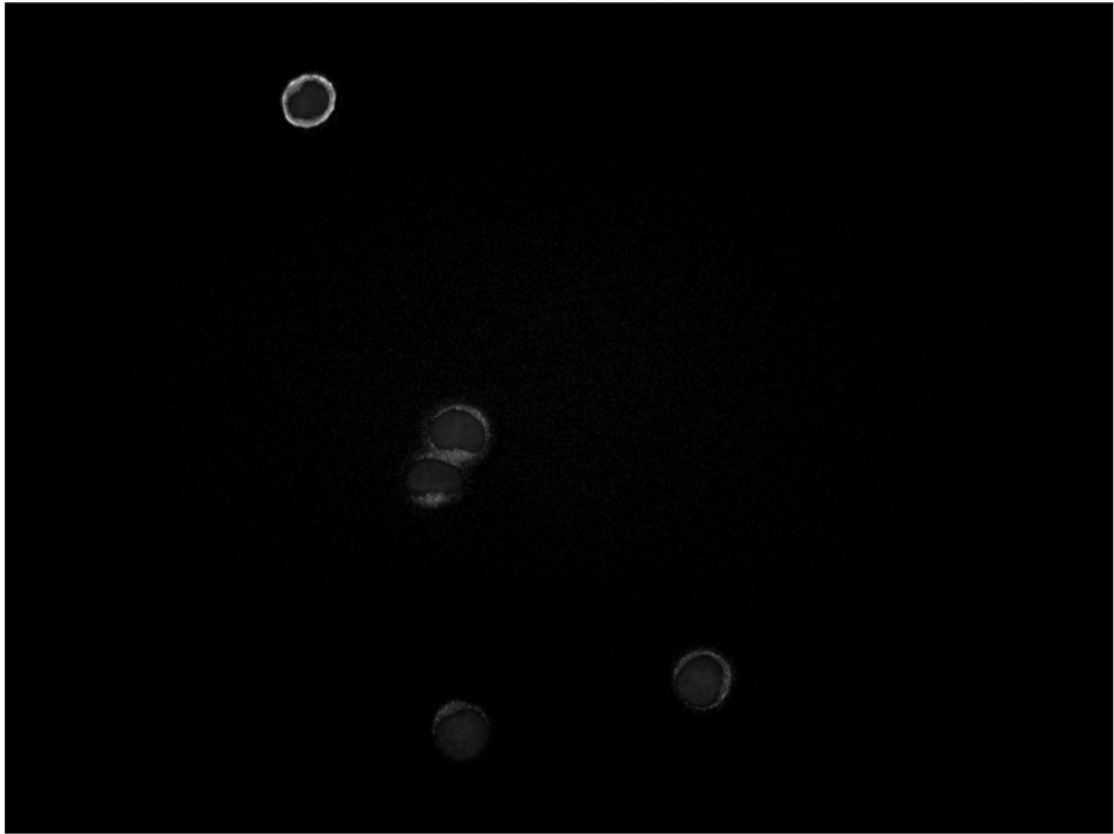


图3

专利名称(译)	一种免疫磁珠及其制备方法		
公开(公告)号	CN106405075B	公开(公告)日	2018-08-28
申请号	CN201610780209.3	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	上海美吉生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海美吉生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海美吉生物医药科技有限公司		
[标]发明人	刘关 蔡红东 陈昌岳 张培培 张祥林		
发明人	刘关 蔡红东 陈昌岳 张培培 张祥林		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326		
审查员(译)	张婷		
其他公开文献	CN106405075A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫磁珠及其制备方法，包括磁性微球和生物配基，所述免疫磁珠的结构由内至外为：磁性微球-生物素-链霉亲和素-生物素-生物配基。本发明的免疫磁珠性质稳定，而且磁性好，粒径小。本发明采用生物素-链霉亲和素-生物素的连接方式，先通过酰胺化反应得到生物素化磁性微球，然后将生物素化磁性微球与链霉亲和素结合。由于生物素-链霉亲和素的结合具有亲和性高和特异性的特点，使磁性微球与生物配基可以定向结合，不易交联，不易引起链霉亲和素结构改变。同时，本发明的制备方法简单，反应条件温和，使生物配基可以保留生物活性。

