



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109283326 A

(43)申请公布日 2019.01.29

(21)申请号 201811567717.9

(22)申请日 2018.12.21

(71)申请人 湖南华腾制药有限公司

地址 410205 湖南省长沙市岳麓区麓谷企业广场E1栋

(72)发明人 邓泽平 罗容 许慧 陈瑶 陈选
张安林 刘赛文

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

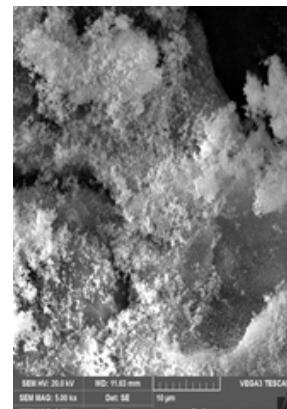
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

偶联有链霉亲和素的磁小体及生物分离、免疫检测方法

(57)摘要

本发明公开了偶联有链霉亲和素的磁小体及生物分离、免疫检测方法,其中链霉亲和素通过化学共价键交联在所述磁小体表面,且所述磁小体表面带有氨基、羧基、巯基、或羟基功能基团。所述磁小体的制备工序包括了磁小体的提取和偶联链霉亲和素2个步骤。本发明的偶联有链霉亲和素的磁小体具有交联效果好、生物相容性高、磁控性强、超顺磁性和较低毒性优势。



1. 一种偶联有链霉亲和素的磁小体,其特征在于,链霉亲和素通过化学共价键交联在所述磁小体表面,且所述磁小体表面带有氨基、羧基、巯基或羟基功能基团,其通过包含以下工序的方法制造:

1) 磁小体的提取

将趋磁细菌的发酵液以3000 r/min的转速离心25min后收集菌体,菌体以1:8的质量体积比悬浮于HEPES缓冲液中,高压均质后分离,收集磁小体;

2) 偶联链霉亲和素

取1mg磁小体于离心管中,加入HEPES缓冲液,保证磁小体的终浓度为0.8mg/mL,以3000 r/min的转速离心后,加入13μL的NHS-Biotin和10mmol/L的PBS缓冲液,使终体积为0.5mL,33℃下温育28min后离心收集Biotin-磁小体;向Biotin-磁小体中按1:6的摩尔比添加链霉亲和素,25℃的温度下温育3h后离心、分离收集偶联有链霉亲和素的磁小体。

2. 如权利要求1所述的磁小体,其特征在于,步骤1)中的所述的收集菌体采用电磁诱导法。

3. 如权利要求1所述的磁小体,其特征在于,步骤1)中的分离为采用磁选柱、超临界流体萃取或亚临界流体萃取技术中的一种。

4. 如权利要求3所述的磁小体,其特征在于,磁选柱的分选区存在交变磁场。

5. 如权利要求1所述的磁小体,其特征在于,步骤1)趋磁细菌体内的磁小体长度为80~150nm。

6. 如权利要求1所述的磁小体,其特征在于,步骤2)中以钕铁硼磁铁及磁力架来分离收集偶联有链霉亲和素的磁小体。

7. 一种生物分离、免疫检测方法,其特征在于,应用如权利要求1~6任一项所述的磁小体。

偶联有链霉亲和素的磁小体及生物分离、免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物材料技术领域,具体涉及偶联有链霉亲和素的磁小体及生物分离、免疫检测方法。

背景技术

[0002] 趋磁细菌是一种依靠体内生物矿化所产生的磁性纳米颗粒能够在外磁场的作用下定向运动的革兰氏阴性菌,一般为微好氧或厌氧型。其内部的磁性纳米颗粒为磁小体,在趋磁细菌体内组装成长链状,沿菌体长轴排列,在外磁场中引导菌体的运动。磁小体主要由外层脂质膜和内部磁铁矿晶体构成,磁小体的外膜由趋磁细菌细胞膜内陷生成,外膜整体带负电,目前已证实大约有 30 种特异性蛋白出现在磁小体表面膜上,因而磁小体表面膜结构具有多态性,富含氨基、羧基、巯基或羟基功能基团。磁铁矿晶体形态多样,大小均一,为单磁畴纳米颗粒,具有较好的生物相容性、磁控性、磁热性、超顺磁性和较低的毒性。

[0003] 链霉亲和素是链霉亲和素菌在培养过程中的分泌产物,其生物学特性与亲和素相似,与生物素的结合常数为 $10^{15}/M$,是抗原抗体反应的一万倍以上。同时,链霉亲和素不含任何糖基和等电点较低,因此在检测应用中非特异性结合很低,有利于提高检测方法的灵敏度。

[0004] 通过将具有强特异性结合能力的链霉亲和素偶联于磁小体表面,当施予外加磁场时,便可快速、简便地实现生物素的分离,该分离纯化技术在生物分离、免疫检测等方面具有重要的应用价值。

[0005] 如中国专利(申请号2012800090399)提供了一种生物素结合能力高的链霉亲和素结合磁性粒子及其制造方法,该粒子通过添加戊二醛,使磁性粒子与链霉亲和素发生交联反应制备而成。但是该方法中的磁性粒子表面仅具有氨基,因此其与链霉亲和素的交联效果较差,交联率较低,且粒子来源为化学合成。化学合成磁纳米颗粒普遍存在反应温度极端、反应条件难以控制、有毒试剂使用、后修饰复杂费力等问题,同时其的均匀度、结晶度、纯度、粒径分布、晶型控制及可操作性都远远不及生物合成的磁小体。

发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题,本发明提供了偶联有链霉亲和素的磁小体及生物分离、免疫检测方法,本发明通过下述技术方案实现。

[0007] 偶联有链霉亲和素的磁小体,链霉亲和素通过化学共价键交联在所述磁小体表面,且所述磁小体表面带有氨基、羧基、巯基或羟基功能基团。趋磁细菌体内积累的磁小体是由双层磷脂膜包被的磁核纳米晶体颗粒,其中磁小体膜的主要组分包括了糖脂、硫脂、磷脂和特异的蛋白成分等。外膜整体带负电,目前已证实大约有 30 种特异性蛋白出现在磁小体表面膜上,因而磁小体表面膜结构具有多态性,富含氨基、羧基、巯基或羟基功能基团。磁小体磁核的单个磁纳米颗粒的直径一般分布在单磁畴磁晶体范围(35~100nm),以 Fe_3O_4 居多,有时会有 Fe_3S_4 以及一些微量的过渡金属元素的掺入,其晶型多样,有立方八面体形、

长菱形和子弹头等形式,呈单链或多链或分散排布于膜内。

[0008] 所述磁小体通过包含以下工序的方法制备:

1) 磁小体的提取

将趋磁细菌的发酵液以3000 r/min的转速离心25min后收集菌体,菌体以1:8的质量体积比悬浮于HEPES缓冲液中,高压均质后层析分离,收集磁小体。趋磁细菌通常是微好氧或者厌氧型的革兰氏阴性菌,具有丛生、一端或两端生的鞭毛,可以在外磁场的作用下沿磁感线方向运动。

[0009] 2) 偶联链霉亲和素

取1mg磁小体于离心管中,加入HEPES缓冲液,保证磁小体的终浓度为0.8mg/mL,以3000 r/min的转速离心后,加入13μL的NHS-Biotin和10mmol/L的PBS缓冲液,使终体积为0.5mL,33℃下温育28min后离心收集Biotin-磁小体;向Biotin-磁小体中按1:6的摩尔比添加链霉亲和素,25℃的温度下温育3h后离心、分离收集偶联有链霉亲和素的磁小体。通过上述操作使得链霉亲和素与富含氨基、羧基、巯基或羟基功能基团的磁小体表面膜较好偶联。

[0010] 所述磁小体的特征在于,步骤1)中的菌体收集采用电磁诱导法。趋磁细菌的富集、收集和筛选过程主要为:采集泥样,化学培养基培养富集,以电磁诱导法收集,即利用通电螺线管产生磁场诱导趋磁细菌的原理进行收集。

[0011] 所述磁小体的特征在于,步骤1)中的层析分离至少采用磁选柱、超临界流体萃取或亚临界流体萃取技术中的一种。磁选柱不仅具有收集磁小体的作用,还可以消除静电吸附造成的污染,提高磁小体的纯化程度。

[0012] 进一步,限定所述磁小体的特征在于,磁选柱的分选区存在交变磁场。

[0013] 所述磁小体的特征在于,步骤1)趋磁细菌体内的磁小体长度为80~150nm。

[0014] 所述磁小体的特征在于,步骤2)中以钕铁硼磁铁及磁力架来分离收集偶联有链霉亲和素的磁小体。

[0015] 所制备的磁小体主要应用于生物分离、免疫检测等领域。

[0016] 本发明有益效果:

1) 磁小体表面带有氨基、羧基、巯基或羟基功能基团,其能与链霉亲和素更好的交联偶合;

2) 磁小体具有较好的生物相容性、磁控性、磁热性、超顺磁性和较低的毒性。

附图说明

[0017] 图1偶联有链霉亲和素的磁小体电镜扫面图。

[0018] 图2偶联有链霉亲和素的磁小体磁滞回线。

具体实施方式

[0019] 下面结合附图以具体实施例的形式对本发明做进一步说明,需要指出的是以下实施方式仅是以例举的形式对本发明所做的解释性说明,但本发明的保护范围并不仅限于此,所有本领域的技术人员以本发明的精神对本发明所做的等效的替换均落入本发明的保护范围。

[0020] 实施例1

磁选柱层析分离磁小体

将趋磁细菌 (*Magnetospirillum magneticum* AMB-1) 菌种接种在5 L强化的磁螺菌培养基中, 奎宁酸铁总添加量为60 μ mol/L, 在26℃静置培养96 h。培养完成后, 将趋磁细菌的发酵液以3000 r/min的转速离心25min后借助通电螺线管收集收集菌体, 菌体以1:8的质量体积比悬浮于HEPES缓冲液中, 缓冲液经压力为80MPa的高压均质机破碎后用磁选柱层析分离, 收集磁小体。

[0021] 实施例2

超临界流体萃取分离磁小体

将趋磁细菌 (*Magnetospirillum magneticum* AMB-1) 菌种接种在5 L强化的磁螺菌培养基中, 奎宁酸铁总添加量为60 μ mol/L, 在26℃静置培养96 h。培养完成后, 将趋磁细菌的发酵液以3000 r/min的转速离心25min后借助通电螺线管收集收集菌体, 菌体以1:8的质量体积比悬浮于HEPES缓冲液中, 缓冲液经压力为80MPa的高压均质机破碎后以超临界流体萃取分离, 收集磁小体。(以二氧化碳进行超临界流体萃取, 添加5%的乙醇溶液, 萃取温度为50℃, 萃取压力为13MPa, 萃取时间15min)

实施例3

亚临界流体萃取分离磁小体

将趋磁细菌 (*Magnetospirillum magneticum* AMB-1) 菌种接种在5 L强化的磁螺菌培养基中, 奎宁酸铁总添加量为60 μ mol/L, 在26℃静置培养96 h。培养完成后, 将趋磁细菌的发酵液以3000 r/min的转速离心25min后借助通电螺线管收集收集菌体, 菌体以1:8的质量体积比悬浮于HEPES缓冲液中, 缓冲液经压力为80MPa的高压均质机破碎后以亚临界流体萃取分离, 收集磁小体。(以丁烷进行亚临界流体萃取, 萃取温度43℃, 萃取压力3 MPa, 萃取时间30min)

实施例4

链霉亲和素的偶联

取1mg磁小体于离心管中, 加入HEPES缓冲液, 保证磁小体的终浓度为0.8mg/mL, 以3000 r/min的转速离心后, 加入13 μ L的NHS-Biotin和10mmol/L的PBS缓冲液, 使终体积为0.5mL, 33℃下温育28min后3000 r/min离心收集Biotin-磁小体; 向Biotin-磁小体中按1:6的摩尔比添加链霉亲和素, 25℃的温度下温育3h后, 链霉亲和素与富含氨基、羧基、巯基或羟基功能基团的磁小体表面膜较好偶联。3000 r/min离心, 以钕铁硼磁铁及磁力架来分离、收集偶联有链霉亲和素的磁小体。

[0022] 偶联有链霉亲和素的磁小体电镜扫面图

在扫描电压20KV的条件下, 将偶联有链霉亲和素的磁小体于扫面电镜下观察, 如图1。由图1可知, 粒子之间出现一定程度上的聚集, 表面覆盖着块状链霉亲和素, 且偶联面不均匀。

[0023] 偶联有链霉亲和素的磁小体磁滞回线

磁滞回线是表征磁性材料特性的一个重要曲线, 如图2所示它反映了磁性材料对磁场变化的反应能力, 以比饱和磁化强度表示, 比饱和磁化强度越大, 磁响应性越强。采用振动样品磁强仪对偶联有链霉亲和素的磁小体进行磁滞回线分析, 证明所制备的磁颗粒具有超顺磁性。

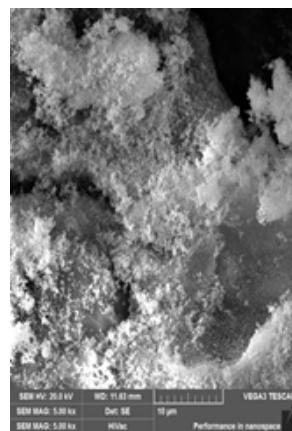


图1

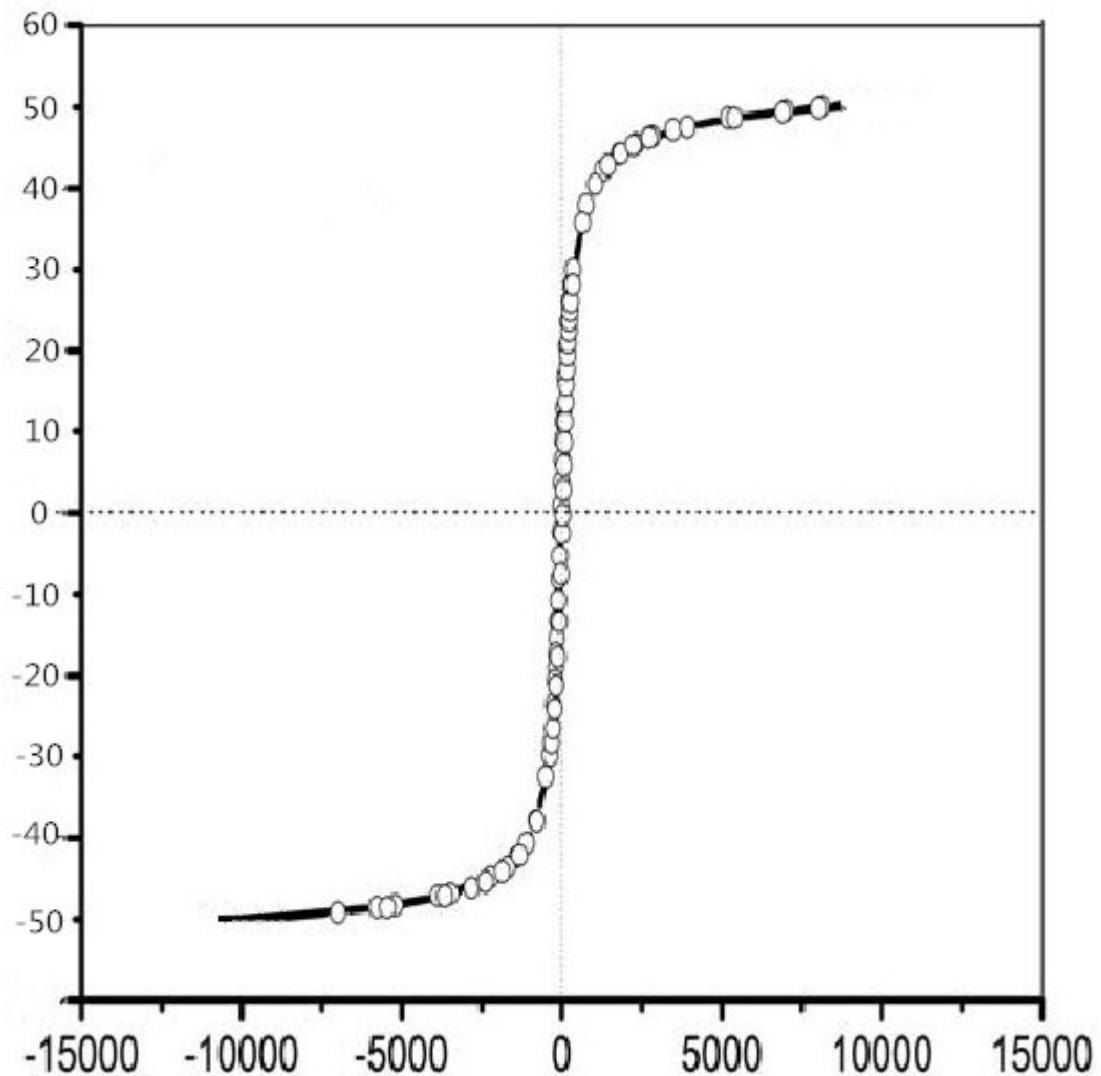


图2

专利名称(译)	偶联有链霉亲和素的磁小体及生物分离、免疫检测方法		
公开(公告)号	CN109283326A	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201811567717.9	申请日	2018-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	湖南华腾制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	湖南华腾制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	湖南华腾制药有限公司		
[标]发明人	邓泽平 罗容 许慧 陈瑶 陈选 张安林 刘赛文		
发明人	邓泽平 罗容 许慧 陈瑶 陈选 张安林 刘赛文		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/54326 G01N33/56911		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了偶联有链霉亲和素的磁小体及生物分离、免疫检测方法,其中链霉亲和素通过化学共价键交联在所述磁小体表面,且所述磁小体表面带有氨基、羧基、巯基、或羟基功能基团。所述磁小体的制备工序包括了磁小体的提取和偶联链霉亲和素2个步骤。本发明的偶联有链霉亲和素的磁小体具有交联效果好、生物相容性高、磁控性强、超顺磁性和较低毒性的优势。

