



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106990250 B

(45)授权公告日 2017.12.08

(21)申请号 201710368314.0

(22)申请日 2017.05.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106990250 A

(43)申请公布日 2017.07.28

(73)专利权人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路
1037号

专利权人 武汉纳达康生物科技有限公司

(72)发明人 杨海 汪业红 杨勇 张德军

栗静 杨祥良

(74)专利代理机构 华中科技大学专利中心

42201

代理人 许恒恒 李智

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

CN 106124758 A,2016.11.16,全文.

CN 101172666 A,2008.05.07,全文.

CN 101239295 A,2008.08.13,全文.

CN 106124758 A,2016.11.16,全文.

CN 101519482 A,2009.09.02,全文.

WO 9637313 A1,1996.11.28,全文.

审查员 吕小蒙

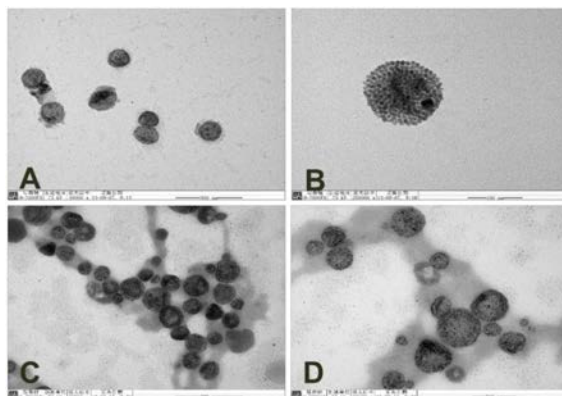
权利要求书1页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法。该方法利用巯基乙醇、二硫苏糖醇或者3-巯基-1,2-丙二醇作为还原剂,通过还原反应打开蛋白质的二硫键,使蛋白质暴露出巯基和疏水区域,与磁性纳米颗粒通过巯基配位以及疏水作用自组装形成核壳结构的蛋白质包裹磁性微球。本发明制备的蛋白质包裹微球粒径易调控,稳定性、水溶性好,不易聚集,非特异性吸附小,具有优异的生物相容性,无需使用特殊设备、耗时短、易操作、生产成本低廉,制备条件温和,在制备过程中直接固定特异性抗体,得到偶联抗体的蛋白质包裹磁性微球活性高,可很好的应用于磁性免疫层析中。



1. 一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,该方法按如下步骤进行:

(1) 将油性纳米颗粒溶解于有机相中,再加入水相,预混,加入蛋白质混合后得到粗乳液;

(2) 向步骤(1)中得到的粗乳液中加入巯基还原剂,通过还原反应,打开蛋白质分子中的二硫键,使蛋白质暴露出巯基和疏水区域,蛋白质通过巯基配位和疏水作用与磁性纳米颗粒自组装形成核壳结构的蛋白质包裹磁性微球反应液;

(3) 向步骤(2)中所得到的反应液中加入 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液终止还原反应,用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸附在试管底部,倒去上清,加入缓冲液进行涡旋清洗后,倒去上清,得到纯化的蛋白质包裹磁性微球。

2. 如权利要求1所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述粗乳液还经过以下处理:先采用磁分离方法对所述粗乳液进行处理,使得所述粗乳液分层,然后除去该粗乳液分层后得到的上清液,从而得到表面吸附有蛋白质的磁性微球的下层,接着,向该下层中加入的水相和抗体,搅拌混匀即得到处理后的粗乳液。

3. 如权利要求1或2所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中的油性纳米颗粒是油溶性的超顺磁性纳米颗粒;优选地为四氧化三铁纳米颗粒、三氧化二铁纳米颗粒或是二者的混合纳米颗粒。

4. 如权利要求1所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中蛋白质是牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血红蛋白、酪蛋白、胶原蛋白、腹水或乳汁;所述步骤(1)中有机相是乙醇与正己烷、氯仿和环己烷中三种有机物中至少一种的混合物;加入的水相是Tris buffer溶液;所述步骤(2)中的还原剂是巯基乙醇、二硫苏糖醇或3-巯基-1,2-丙二醇;所述步骤(3)中加入的终止还原反应缓冲液是Tris buffer溶液,且与蛋白质包裹的磁性微球反应液是等体积的;加入的用于涡旋清洗的缓冲液是Tris buffer溶液。

5. 如权利要求2所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)除去上清液后所加水相是Tris buffer溶液,且与步骤(1)中溶解油性纳米颗粒的水相是等体积的;所述抗体是鼠IgG或甲胎蛋白AFP单克隆抗体。

6. 如权利要求1或2所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中的预混方式包括超声、高剪切或机械搅拌中的一种或多种的混合方式。

7. 如权利要求1或2所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述油性纳米颗粒和蛋白质的质量比为 $1:2\sim 10$,所述油性纳米颗粒和抗体的质量比为 $1:0.01\sim 0.07$ 。

8. 如权利要求1或2所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)还原反应的温度为 $4\sim 45^{\circ}\text{C}$,反应时间为 $5\sim 50\text{min}$,还原剂浓度为 $0.4\sim 1.838\text{mol/L}$ 。

9. 一种还原自组装蛋白质包裹的磁性微球,其特征在于,按照权利要求1至8任意一项所述的制备方法制得。

10. 如权利要求2所述的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法制备得到的蛋白质包裹磁性微球的应用,其特征在于,应用于磁性免疫层析检测。

一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于材料领域,更具体地,涉及一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法及其在磁性免疫分析中的应用。

背景技术

[0002] 超顺磁性氧化铁纳米粒(SPIO)是粒径在1~100nm之间的无机铁磁物质,因具有高的磁响应性、超顺磁性、较大的比表面积、易分离等独特的特征,现已被广泛应用于生物医学领域,例如生物传感器、细胞分选、组织工程、磁共振成像(MRI)、光学多通道成像、靶向药物运输、癌症的高热治疗和免疫分析等。

[0003] SPIO的合成方法主要有化学共沉淀法,热分解法,乳液合成法,水热合成法等,通过这些方式合成的裸的、未经修饰的SPIO不能直接在磁性免疫分析中进行应用。SPIO应用于磁性免疫分析的先决条件为长时间的稳定性,即无团聚或沉淀,未修饰的SPIO由于其巨大的表面能和磁化强度使其变得非常容易聚集成团簇,而失去其单分散性及独有的性质;热分解法制备SPIO时,因反应过程中需要使用带有疏水长烷基链的酸、醇和胺等表面配体,所得到的产物均表现出疏水性,且粒径仅有10nm左右、磁分离困难,这些都限制了SPIO在磁性免疫分析中的应用。

[0004] 可以通过使用包被材料对SPIO进行包裹制成磁性微球来解决这些问题。核壳结构的磁性微球可以对SPIO起保护作用,防止其被氧气氧化、被酸碱腐蚀、团聚;包被材料的包裹可实现油性SPIO的水溶性转换;制成的磁性微球中因含有多个SPIO,具有较强的磁性,大大改善了SPIO磁分离的速度;此外,包被材料的包裹还使SPIO带上一些活性功能基团(如-NH₂、-COOH),便于偶联抗体等生物活性物质,可以更好地在磁性免疫分析中进行应用。

[0005] 生物大分子如蛋白质(人血清白蛋白HSA、牛血清白蛋白BSA、抗体、酶等),属于天然高分子,具有很好的生物相容性,是很好的SPIO包裹材料。目前文献报导的制备蛋白质包裹的SPIO方法有热变性法,化学交联法,超声法和高压均质法。

[0006] 通过水浴、微波等热变性的方式制备蛋白质包裹磁性微球是通过加热使蛋白质变性,暴露出疏水区域,以疏水相互作用、或者通过与蛋白质分子中的巯基结合,在SPIO表面形成包裹层(Food Hydrocolloids, 2008, 22: 995-1005)。热变性法是制备蛋白质包裹磁性微球最简单的方法,但是该方法可控性差,在高温条件下,蛋白质聚集在SPIO的不同表面上,得到的产物粒径不均匀,分散性差且易造成SPIO包裹不完全。此外,热变性法会不可逆地改变蛋白质结构,导致其生物学特征的损失。

[0007] 化学交联法是使用化学交联剂,如戊二醛、甲醛等,使蛋白质通过交联反应在SPIO表面形成包裹层(Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2013, 436: 1145-1151)。由于化学交联是非特异性的,存在于蛋白质结构内的任何亲核基团(如胺和羟基)都有反应活性,导致非特异性吸附偏高;所得蛋白质包裹的磁性微粒的生物相容性差,残留的交联剂甲醛、戊二醛等醛类物质具有较大毒性。

[0008] 蛋白质等是两亲性物质,亲水基团暴露在分子表面,疏水基团埋藏在分子内部。超

声条件下,在油水混合体系中,会自发迁移到油水界面,自身的亲疏水基会起到类似表面活性剂的作用,降低两相间的界面张力,从而起到稳定乳化液的作用,能够使热分解油性SPI0在水溶液中分散开来(ACS Appl Mater Interfaces, 2012, 4: 6479-6486)。超声法虽可实现对油性SPI0的蛋白质包裹,但是其与蛋白质的结合较弱,蛋白包裹层易在保存的过程中脱落、或者在盐溶解中解离下来。

[0009] 高压均质法是使蛋白质在高剪切力的作用下产生气穴空化作用,从而引起了局部高热,生成了超氧化物离子,超氧化物离子氧化蛋白质自身带有的巯基、断裂蛋白质分子内的二硫键,暴露出疏水区域后,从而通过疏水作用、或者通过和巯基配位,在SPI0周围形成一个壳体(201610416623.6)。此过程需将SPI0和蛋白质一起泵入到高压均质机中进行均质,SPI0属于铁氧化物、刚性物质,具有很强的硬度,用高压均质机进行均质,对机器会有很严重的磨损;且该方法需要使用高压均质机这种昂贵、复杂的仪器设备,不易操作。

[0010] 综上,现有技术用热变性法、化学交联法、超声法、高压均质法制备蛋白质包裹磁性微球均有缺陷,需要探索新的制备方式来解决这些问题。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于克服现有技术制备蛋白质包裹磁性微球所存在的产物粒径不均匀、非特异吸附性高、稳定性差、制备过程复杂等缺陷,提供一种具有制备工艺简单、成本低廉、稳定性好、生物相容性高、非特异吸附性低等优点的水溶性磁性微球的制备方法及其用途。

[0012] 为实现上述目的,本发明提供了一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 将油性纳米颗粒溶解于有机相中,再加入水相,预混,加入蛋白质混合后得到粗乳液;

[0014] (2) 向步骤(1)中得到的粗乳液中加入巯基还原剂,通过还原反应,打开蛋白质分子中的二硫键,使蛋白质暴露出巯基和疏水区域,蛋白质通过巯基配位和疏水作用与磁性纳米颗粒自组装形成核壳结构的蛋白质包裹磁性微球反应液;

[0015] (3) 向步骤(2)中所得到的反应液中加入0~4℃的缓冲液终止还原反应,用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸附在试管底部,倒去上清,加入缓冲液进行涡旋清洗后,倒去上清,得到纯化的蛋白质包裹磁性微球。

[0016] 优选地,所述步骤(1)中,所述粗乳液还经过以下处理:先采用磁分离方法对所述粗乳液进行处理,使得所述粗乳液分层,然后除去该粗乳液分层后得到的上清液,从而得到表面吸附有蛋白质的磁性微球的下层,接着,向该下层中加入的水相和抗体,搅拌混匀即得到处理后的粗乳液。所述所加水相是Tris buffer溶液,且与步骤(1)中溶解油性纳米颗粒的水相是等体积的;所述抗体是鼠IgG或甲胎蛋白AFP单克隆抗体。

[0017] 优选地,所述步骤(1)中的油性纳米颗粒是油溶性的超顺磁性纳米颗粒;优选地为四氧化三铁纳米颗粒、三氧化二铁纳米颗粒或是二者的混合纳米颗粒。

[0018] 优选地,所述步骤(1)中蛋白质是牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血红蛋白、酪蛋白、胶原蛋白、腹水或乳汁;所述步骤(1)中有机相是乙醇与正己烷、氯仿和环己烷中三种有机物中至少一种的混合物;加入的水相是Tris buffer溶液;所述步骤(2)中的还原剂是巯

基乙醇、二硫苏糖醇或3-巯基-1,2-丙二醇。

[0019] 优选地,所述步骤(1)中的预混方式包括超声、高剪切或机械搅拌中的一种或多种的混合方式。

[0020] 优选地,步骤(1)中所述油性纳米颗粒和蛋白质的质量比为1:2~10,所述油性纳米颗粒和抗体的质量比为1:0.01~0.07。

[0021] 优选地,所述步骤(2)还原反应的温度为4~45℃,反应时间为5~50min,还原剂浓度为0.4~1.838mol/L。

[0022] 按照本发明了另一个方面,提供了一种还原自组装蛋白质包裹的磁性微球,按照以上所述的制备方法制得。

[0023] 优选地,所述步骤(3)中加入的终止还原反应缓冲液是Tris buffer溶液,且与蛋白质包裹的磁性微球反应液是等体积的;加入的用于涡旋清洗的缓冲液是Tris buffer溶液。

[0024] 按照本发明了另一个方面,提供了蛋白质包裹磁性微球的应用,应用于磁性免疫层析检测。

[0025] 总体而言,通过本发明所构思的以上技术方案与现有技术相比,具有如下的有益效果:

[0026] (1) 本发明还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,采用还原剂打开蛋白质分子中的二硫键,使蛋白质的疏水区域和巯基暴露出来,SPIO通过配位键以及疏水作用与蛋白质紧密的结合在一起,形成包裹紧密、不易脱落、解离的蛋白质外壳,因而磁性微球具有较强的稳定性。通过对还原反应的时间、还原剂加入量以及温度等的有效控制,可得到不同粒径大小的磁性微球,因而该方法制备磁性微球粒径易调控。

[0027] (2) 还原自组装制备的蛋白质包裹磁性微球,所得的磁性微球水溶性好、不易聚集,非特异吸附低且具有优异的生物相容性,带有多种功能性基团,为其偶联标记抗体等生物活性分子提供位点,便于其在生物医学领域进行应用。

[0028] (3) 本发明还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,避免了高压均质法制备需使用昂贵、复杂仪器的不足;避免了化学交联法制备时交联剂造成的醛类物质残留、毒性大等问题。

[0029] (4) 本发明还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,条件温和,可在制备过程中直接固定特异性抗体,一步即可得到免疫磁性微球,磁性免疫层析实验证明该磁性微球具有活性,可用于磁性免疫层析、有望在环境监测和食品安全检验、医疗诊断等领域进行应用。

[0030] (5) 本发明还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,制备过程简单,无特殊设备、耗时短、易操作、生产成本低廉。

[0031] 综上所述,本发明所提供的还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法简单,反应条件温和,制备的磁性微球稳定性、均一性较好,生物相容性高,非特异吸附性低,带有多种功能性基团;制备的偶联抗体的蛋白质包裹磁性微球活性高,可广泛用于生物分析、环境分析、食品安全检测、样品分离纯化、医学检验与成像以及生物医药研究等领域。

附图说明

- [0032] 图1是蛋白质包裹磁性微球的透射电镜(TEM)图片;
- [0033] 图2是超顺磁性氧化铁、牛血清白蛋白和牛血清白蛋白包裹磁性微球的热重曲线;
- [0034] 图3是制备的偶联IgG的蛋白质包裹磁性微球磁性免疫层析试验结果;
- [0035] 图4是双抗夹心磁性免疫层析检测AFP抗原磁性免疫层析试验结果;
- [0036] 图5是双抗夹心磁性免疫层析检测AFP抗原四参数拟合曲线。

具体实施方式

[0037] 本发明提供了一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,该方法按如下步骤进行:

[0038] (1) 物理混合:将油溶性纳米颗粒溶解于有机相中,再加入水相,通过物理混匀手段进行预混,加入蛋白质混合后得到粗乳液;采用磁分离方法除去粗乳液中的上清液后得到表面吸附有蛋白质的磁性微球,再次加入水相,并加入抗体,机械搅拌混匀后得到粗乳液。

[0039] 其中,油溶性纳米颗粒包括油溶性的超顺磁性纳米颗粒,优选为四氧化三铁纳米颗粒、三氧化二铁纳米颗粒或是二者的混合纳米颗粒;有机相是正己烷、氯仿、环己烷中的一种或是它们任意的混合液与乙醇的混合液;预混方式包括超声、高剪切或机械搅拌中的一种或多种的混合方式;蛋白质是牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血红蛋白、酪蛋白、胶原蛋白、腹水或乳汁;抗体是鼠IgG或甲胎蛋白AFP单克隆抗体;油溶性纳米颗粒和蛋白质的质量比为1:2~10;油溶性纳米颗粒和抗体的质量比为1:0.01~0.07。

[0040] (2) 还原自组装包裹:在步骤(1)所获得的粗乳液中加入巯基还原剂,通过还原反应,打开蛋白质分子中的二硫键,使蛋白质暴露出巯基和疏水区域,蛋白质通过巯基配位和疏水作用与磁性纳米颗粒自组装形成核壳结构的蛋白质包裹磁性微球反应液。

[0041] 其中,还原剂可以是巯基乙醇、二巯苏糖醇、3-巯基-1,2-丙二醇。还原反应的温度为4~45℃,反应时间为5~50min,还原剂浓度为0.4~1.838mol/L。

[0042] (3) 分离纯化:向步骤(2)中所得到的反应液中加入tris buffer溶液终止还原反应,用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸在EP管底部,倒去上清,加入tris buffer涡旋、这样清洗两次,得到纯化的蛋白质包裹磁性微球。

[0043] 其中,加入的tris buffer与蛋白质包裹的磁性微球反应液是等体积的,tris buffer的温度为0~4℃。

[0044] 为了更好的理解本发明,下面通过具体的实施例对本发明做进一步的详细说明。所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0045] 实施例1

[0046] 一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

[0047] (1) 物理混合:取一定体积的超顺磁性氧化铁纳米粒(SPIO),确保SPIO的质量为5mg。加入3mL乙醇后涡旋30s,磁铁收集SPIO,去上清,加入100μL正己烷重新将SPIO溶解,再加入100μL乙醇,1mL pH 7.2 Tris buffer。于超声清洗器中超声3min将SPIO转至25mL玻璃瓶中继续超声1min,然后边超声边加入4mL pH 7.27 Tris buffer,再超声2min,将50mg的牛血清白蛋白(BSA)加入SPIO中,血浆混匀器上混匀12h得到粗乳液。

[0048] (2) 还原自组装包裹:将粗乳液转至25mL圆底烧瓶中,37℃水浴、300rpm机械搅拌

下加入1.38mol/L 3-巯基-1,2-丙二醇,反应5min。

[0049] (3) 分离纯化:以反应液和4℃Tris buffer 1:1的比例终止反应。用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸在EP管底部,倒去上清,加入Tris buffer涡旋、这样清洗两次,最后用2.5mL Tris buffer保存BSA包裹的磁性微球,其最终浓度为2mg/mL。

[0050] 按照上述制备方法制备得到的BSA包裹的磁性微球,取25 μ L,用1mL超纯水稀释,涡旋混匀后用激光粒度电位分析仪(英国马尔文仪器有限公司,Zeta Sizer Nano-ZS90)测得其水合粒径为222.6nm,单分散指数(PDI,PDI越小说明溶液的均一性越好)为0.108。将磁性微球稀释至0.5mg/mL,取15 μ L滴在封口膜上,将铜网正面盖在水滴上,等待10min,将铜网转至滤纸上,以吸去铜网上的水,室温自然晾干,TEM观察磁性微球的图像,如图1所示呈球形。将磁性微球收集在1.5mL的EP管中,放进-20℃冰箱中冷冻24h,取出EP管放进冷冻干燥器中冷冻干燥24h,得到冷冻粉末,用热重分析仪分析粉末质量随温度的变化情况,得到TG曲线,如图2所示,磁含量约为61.53%。将磁性微球在pH 8.0的tris buffer、磁球清洗液(MBW)、0.1%BSA的溶液4℃保存8天,其粒径保持稳定,如表1所示,说明蛋白质和SPIO结合紧密,磁性微球比较稳定。

[0051] 表1

[0052]

实验条件	MBW	pH 8.0 tris buffer	0.1%BSA
Control	221.1nm	229.4nm	225.7nm
4℃放置2天	221.3nm	220.7nm	221.2nm
4℃放置8天	229.2nm	228.7nm	227.1nm

[0053] 通过调整还原剂3-巯基-1,2-丙二醇的加入量、超顺磁性氧化铁纳米粒(SPIO)与BSA的质量比、反应温度和反应时间进行BSA包裹SPIO的制备,可以得到不同水合粒径和PDI值的产物。如表2所示,在相同还原剂3-巯基-1,2-丙二醇用量条件下,随着还原反应时间的延长,可以收集到粒径逐渐增大的磁性微球;磁性微球的粒径和还原剂用量、温度成呈正相关。

[0054] 表2

还原剂加入量 (mol/L)	油性纳米颗粒和 BSA 质量比	温度 (℃)	反应时间 (min)	水合粒径 (nm)	PDI
0.919	1: 10	37	15	244.9	0.077

[0055]

[0056]	0.919	1: 10	37	20	261.5	0.09
	0.919	1: 10	37	25	274.6	0.097
	0.919	1: 10	37	30	292.1	0.198
	1.38	1: 10	37	8	264.7	0.136
	1.38	1: 10	37	12	302.4	0.071
	1.38	1: 10	37	15	364.9	0.134
	1.838	1: 10	37	5	355.0	0.224
	1.838	1: 10	37	8	579.6	0.283
	1.38	1: 10	45	4	242.2	0.203
	1.38	1: 10	45	8	274.2	0.264
	1.38	1: 10	45	12	324.8	0.306
	1.38	1: 10	45	15	526.9	0.698
	1.38	1: 2	37	10	212.7	0.109
	1.38	1: 2	37	20	233	0.210
	1.38	1: 2	37	30	306.8	0.337

[0057] 实施例2

[0058] 一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

[0059] (1) 物理混合:取一定体积的超顺磁性氧化铁纳米粒(SPIO),确保SPIO的质量为5mg。加入3mL乙醇后涡旋30s,磁铁收集SPIO,去上清,加入100 μ L氯仿重新将SPIO溶解,再加入100 μ L乙醇,1mL pH 7.27 Tris buffer。于超声清洗器中超声3min将SPIO转至25mL玻璃瓶中继续超声1min,然后边超声边加入4mL pH 7.27 Tris buffer,再超声2min,将50mg的BSA加入SPIO中,血浆混匀器上混匀12h得到粗乳液。

[0060] (2) 还原自组装包裹:将粗乳液转至25mL圆底烧瓶中,37 $^{\circ}$ C水浴、300rpm机械搅拌下加入1.838mol/L巯基乙醇,反应6min。

[0061] (3) 分离纯化:以反应液和0 $^{\circ}$ C Tris buffer 1:1的比例终止反应。用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸在EP管底部,倒去上清,加入Tris buffer涡旋、这样清洗两次,最后用2.5mL Tris buffer保存BSA包裹的磁性微球,其最终浓度为2mg/mL。

[0062] 如表3所示,收集到的BSA包裹磁性微球的水合粒径为229.5nm,PDI为0.123,在反应12min收集磁性微球水合粒径为260.1nm。将水浴温度降为4 $^{\circ}$ C进行制备,还原反应速度减慢,在6min和12min收集的磁性微球水合粒径均比在37 $^{\circ}$ C制备时收集的小。将还原剂更换为二硫苏糖醇(DTT),其加入浓度为0.4mol/L时,在反应10min、20min可以收集到水合粒径为209nm、220.4nm比较均一的磁性微球,因而DTT也可用于BSA包裹磁性微球的制备。

[0063] 表3

还原剂	温度 (°C)	还原剂加入量 (mol/L)	反应时间 (min)	水合粒径 (nm)	PDI
[0064] 巯基乙醇	37	1.838	6	229.5	0.123
巯基乙醇	37	1.838	12	260.1	0.252
巯基乙醇	4	1.838	6	214.6	0.097
巯基乙醇	4	1.838	12	226.4	0.107
二硫苏糖醇	37	0.4	10	209	0.103
二硫苏糖醇	37	0.4	20	220.4	0.24

[0065] 实施例3

[0066] 一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

[0067] (1) 物理混合:取一定体积的超顺磁性氧化铁纳米粒(SPIO),确保SPIO的质量为5mg。加入3mL乙醇后涡旋30s,磁铁收集SPIO,去上清,加入100 μ L正己烷重新将SPIO溶解,再加入100 μ L乙醇,1mL pH 7.27 Tris buffer。于超声清洗器中超声3min将SPIO转至25mL玻璃瓶中继续超声1min,然后边超声边加入4mL pH 7.27 Tris buffer,再超声2min,将50mg的人血清白蛋白(HSA)加入SPIO中,血浆混匀器上混匀12h得到粗乳液。

[0068] (2) 还原自组装包裹:将粗乳液转至25mL圆底烧瓶中,37°C水浴、300rpm机械搅拌下加入1.38mol/L 3-巯基-1,2-丙二醇,反应6min。

[0069] (3) 分离纯化:以反应液和4°C Tris buffer 1:1的比例终止反应。用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸在EP管底部,倒去上清,加入Tris buffer涡旋、这样清洗两次,最后用2.5mL Tris buffer保存HSA包裹的磁性微球,其最终浓度为2mg/mL。

[0070] 如表4所示,收集到的HSA包裹磁性微球的水合粒径为228.5nm,PDI为0.113;按照该步骤将HSA换成血红蛋白、酪蛋白、胶原蛋白、腹水、乳汁,都可以收集到水合粒径在230nm左右的蛋白质包裹磁性微球。

[0071] 表4

[0072]

蛋白质	水合粒径 (nm)	PDI
人血清白蛋白	228.5	0.113
血红蛋白	230.1	0.237
酪蛋白	226.6	0.156
胶原蛋白	231.4	0.212
腹水	225.9	0.189
乳汁	237.1	0.168

[0073] 实施例4

[0074] 还原自组装偶联IgG的蛋白质包裹磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

[0075] (1) 物理混合:取一定体积的SPIO,确保SPIO的质量为5mg。加入3mL乙醇后涡旋30s,磁铁收集SPIO,去上清,加入100 μ L氯仿重新将SPIO溶解,再加入100 μ L乙醇,1mL pH 7.27 Tris buffer。于超声清洗器中超声3min将SPIO转至25mL玻璃瓶中继续超声1min,然后边超声边加入4mL pH 7.27 Tris buffer,再超声2min,将50mg的BSA加入SPIO中,血浆混匀器上过夜混匀得到粗乳液。磁分离,用等体积(5mL)的pH 7.27 Tris buffer重悬后,以

SPIO和IgG的质量比为1:0.07的比例加入IgG,300rpm机械搅拌混合50min后得到粗乳液。

[0076] (2) 还原自组装包裹:将粗乳液转至25mL圆底烧瓶中,37℃水浴、300rpm机械搅拌50min,加入1.38mol/L 3-巯基-1,2-丙二醇,反应50min。

[0077] (3) 分离纯化:以反应液和4℃Tris buffer 1:1的比例终止反应。用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸在EP管底部,倒去上清,加入Tris buffer涡旋、这样清洗两次,最后用2.5mL Tris buffer保存偶联IgG的BSA包裹的磁性微球,最终浓度为2mg/mL。

[0078] 以下为抗原抗体反应检测磁性微球活性试验:

[0079] 用1%PBST溶解BSA,制备1%的BSA溶液作为展层液,分别取2μL、4μL、6μL、8μL、10μL上述制备的偶联IgG的BSA包裹磁性微球,均加入100μL的展层液,涡旋混匀后用包被有羊抗鼠二抗(GAM,作为质控线、即C线)的试纸条进行磁性免疫层析试验。

[0080] 如图3所示,分为A、B、C三组试验,三组试验中2、4、6、8、10代表磁性免疫层析时所加偶联IgG的BSA包裹磁性微球的体积(μL),图3中A组是进行磁性免疫层析后的试纸条,试纸条出现灰色条带(T线),且颜色随着所加磁性微球体积量的增加逐渐加深,说明磁性微球具有活性。将SPIO和IgG的质量比调整为为1:0.05,1:0.03分别进行制备,相同的方式进行磁性免疫层析试验,如图3中B、C组所示,因为所加抗体量减少,试纸条显色颜色变浅。

[0081] 实施例5

[0082] 一种还原自组装偶联AFP单克隆抗体的蛋白质包裹磁性微球的制备方法:

[0083] (1) 物理混合:取一定体积的SPIO,确保SPIO的质量为5mg。加入3mL乙醇后涡旋30s,磁铁收集SPIO,去上清,加入100μL氯仿重新将SPIO溶解,再加入100μL乙醇,1mL pH 7.27 Tris buffer。于超声清洗器中超声3min将SPIO转至25mL玻璃瓶中继续超声1min,然后边超声边加入4mL pH 7.27 Tris buffer,再超声2min,将50mg的BSA加入SPIO中,血浆混匀器上过夜混匀得到粗乳液。磁分离,用等体积(5mL)的pH 7.27 Tris buffer重悬后,以SPIO和AFP标记抗体(mAb₁)的质量比为1:0.01的比例加入mAb₁,300rpm机械搅拌混合50min后得到粗乳液。

[0084] (2) 还原自组装包裹:将粗乳液转至25mL圆底烧瓶中,37℃水浴、300rpm机械搅拌50min,加入1.38mol/L 3-巯基-1,2-丙二醇,反应50min。

[0085] (3) 分离纯化:以反应液和4℃Tris buffer 1:1的比例终止反应。用磁铁将蛋白质包裹的磁性微球吸在EP管底部,倒去上清,加入Tris buffer涡旋、这样清洗两次,最后用2.5mL Tris buffer保存偶联AFP单克隆抗体的BSA包裹的磁性微球,最终浓度为2mg/mL。

[0086] 以下是双抗夹心磁性免疫层析检测AFP抗原:

[0087] 将AFP包被抗体(mAb₂)和GAM包被在试纸条上,作为试纸条上的检测线(T线)和质控线(C线),即得到组装好的试纸条。

[0088] 用1%PBST溶解BSA,制备1%的BSA溶液作为展层液,检测时用展层液将AFP抗原稀释成256,128,64,32,16,8,4,2,1,0.5IU/mL十个浓度梯度,取100μL,加入1.5μL上述制备的偶联AFP单克隆抗体的BSA包裹的磁性微球,涡旋后室温于血浆混匀器上混匀1h。将EP管中的液体取出置于96孔板中,用组装好的试纸条过夜进行磁层析试验。

[0089] 如图4所示,256,128,64,32,16,8,4,2,1,0.5代表AFP抗原的浓度,单位为IU/mL,随AFP抗原浓度的减小,磁性免疫层析后试纸条T线处颜色逐渐变浅,扫描,用光学比色法测试纸条T线处的灰度值,通过四参数拟合得到灰度值和AFP抗原浓度的拟合曲线,如图5所

示, IC_{50} 为7.53IU/mL (6.25ng/mL), 其灵敏度低于商品化AFP胶体金免疫层析试剂盒的检测限 (10ng/mL)。

[0090] 本领域的技术人员容易理解, 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

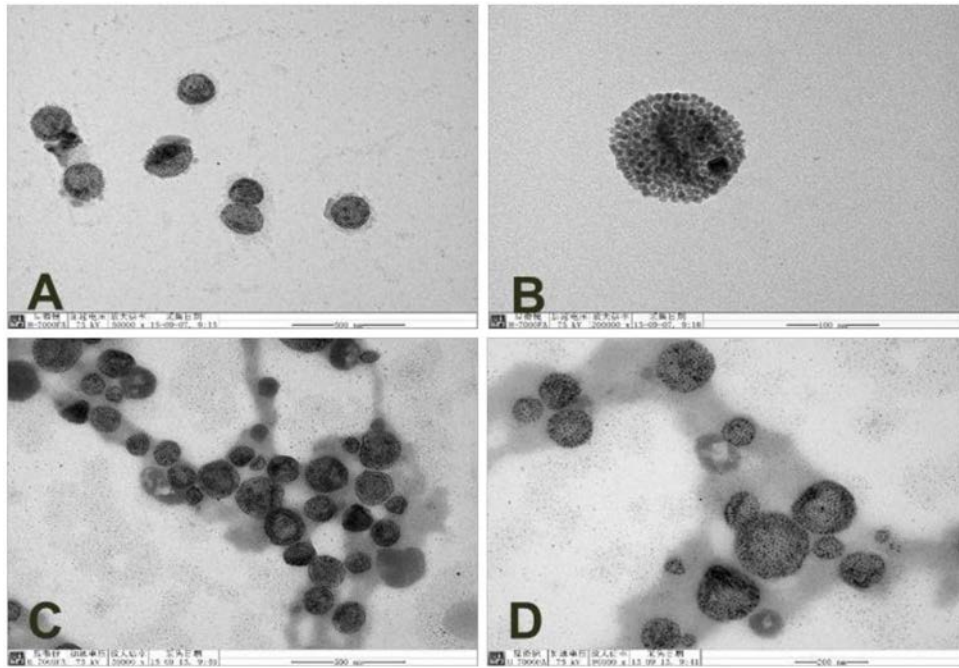


图1

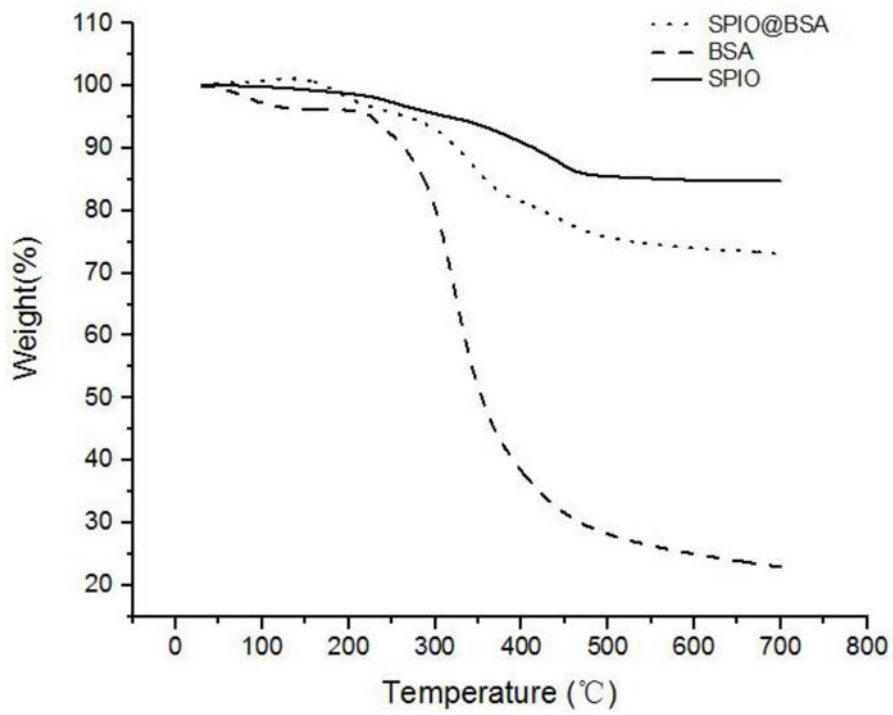


图2

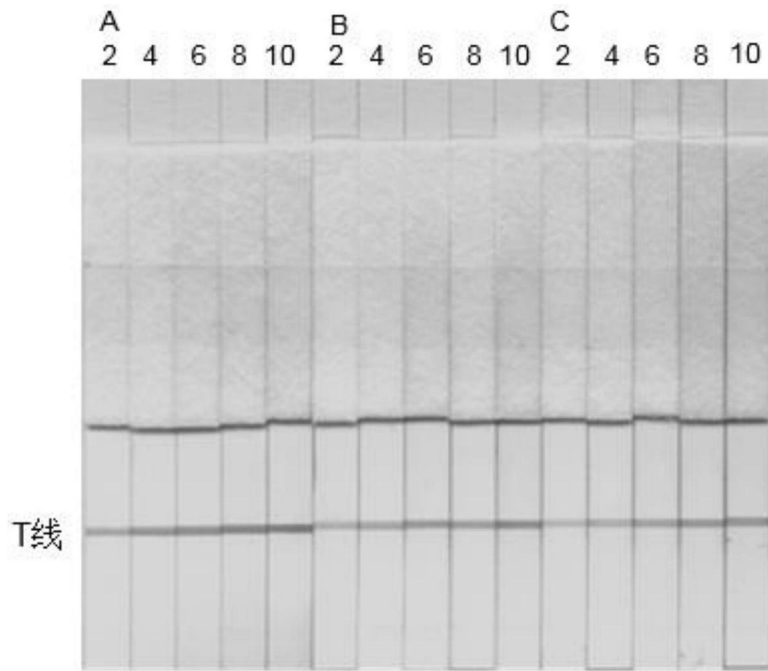


图3

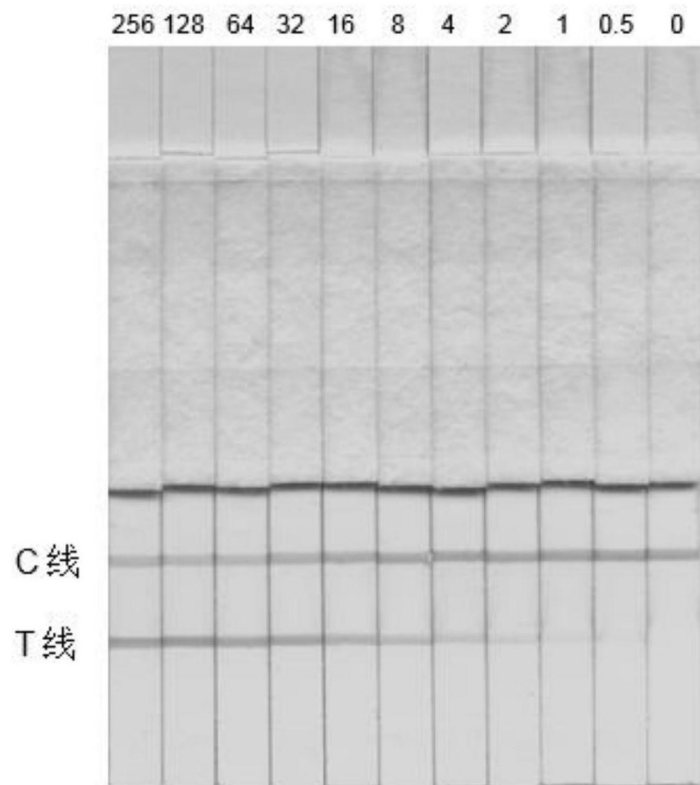


图4

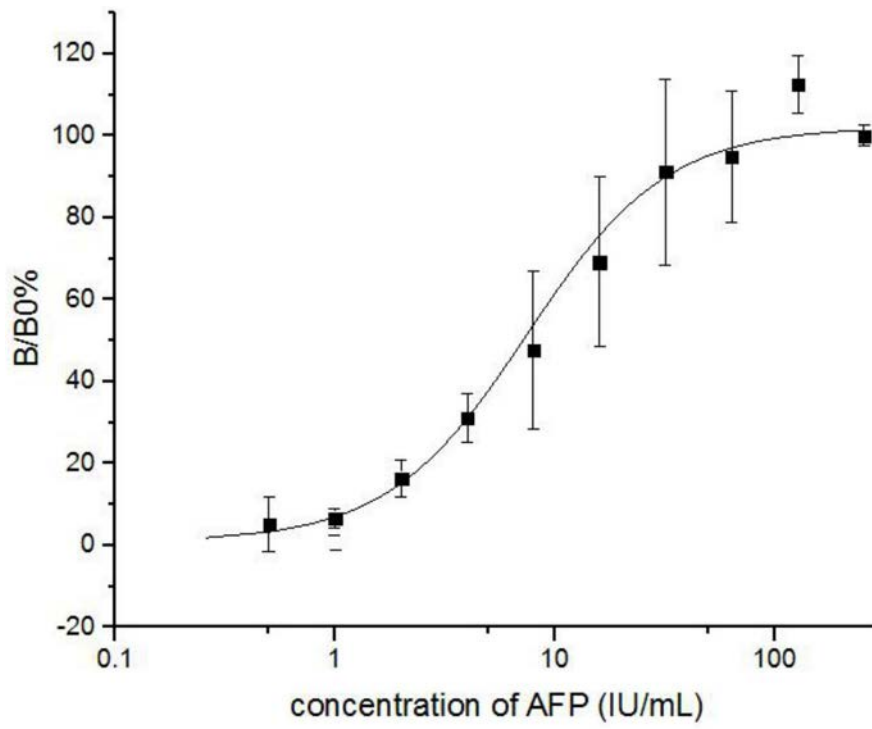


图5

专利名称(译)	一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106990250B	公开(公告)日	2017-12-08
申请号	CN2017110368314.0	申请日	2017-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
[标]发明人	杨海 汪业红 杨勇 张德军 栗静 杨祥良		
发明人	杨海 汪业红 杨勇 张德军 栗静 杨祥良		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	李智		
其他公开文献	CN106990250A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种还原自组装蛋白质包裹磁性微球的制备方法。该方法利用巯基乙醇、二硫苏糖醇或者3-巯基-1,2-丙二醇作为还原剂，通过还原反应打开蛋白质的二硫键，使蛋白质暴露出巯基和疏水区域，与磁性纳米颗粒通过巯基配位以及疏水作用自组装形成核壳结构的蛋白质包裹磁性微球。本发明制备的蛋白质包裹微球粒径易调控，稳定性、水溶性好，不易聚集，非特异性吸附小，具有优异的生物相容性，无需使用特殊设备、耗时短、易操作、生产成本低廉，制备条件温和，在制备过程中直接固定特异性抗体，得到偶联抗体的蛋白质包裹磁性微球活性高，可很好的应用于磁性免疫层析中。

