



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105699666 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 22

(21) 申请号 201610052879. 3

(22) 申请日 2016. 01. 26

(71) 申请人 北京中科圆融生物科技发展有限公司

地址 102208 北京市昌平区回龙观镇科星西路 106 号院 2 号楼 6 层 602

(72) 发明人 张金菊 王红光

(74) 专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务所 (特殊普通合伙) 11419

代理人 王玉松 怀春颖

(51) Int. Cl.

G01N 33/80(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书2页 说明书14页

(54) 发明名称

超顺磁性功能颗粒、磁化红细胞及其临床应用

(57) 摘要

本发明提供一种超顺磁性功能颗粒及磁化红细胞,细菌磁颗粒表面天然带有丰富的-NH₂基团,通过一定的化学方法修饰使其活化并与抗红细胞糖蛋白 GP A 单克隆抗体偶联连接,制备成超顺磁性功能颗粒;在临床血型抗体检测前,将其与红细胞孵育并使其快速磁化,然后进行样本检测,检测过程中,磁力分离取代离心力分离,可为临床提供一种快速、简便的试验方法,并且提供的超顺磁性功能颗粒特别有利于红细胞快速磁化及临床血型抗体检测过程中固相-液相分离。

1. 一种超顺磁性功能颗粒,其特征在于,所述颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体孵育而成。

2. 如权利要求1所述的超顺磁性功能颗粒,其特征在于,所述偶联剂为质量比为1:1-1.2的EDC和NHS的混合物。

3. 如权利要求1所述的超顺磁性功能颗粒,其特征在于,所述孵育中加入重量份数比为2:5.5-7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物作为孵育剂。

4. 一种磁化红细胞,其特征在于,所述磁化红细胞是由权利要求1-3任意所述的超顺磁性功能颗粒与红细胞孵育而成。

5. 权利要求4所述的磁化红细胞在临床ABO血型抗体检测、血型不规则抗体检测筛查、交叉配血或吸收放散实验中的应用。

6. 一种权利要求1所述的超顺磁性功能颗粒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括如下步骤:

a. 活化:加入偶联剂对细菌磁颗粒进行活化,制得活化后的细菌磁颗粒;

b. 孵育:将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体,室温孵育;

c. 分离:磁铁吸附,洗涤,即得超顺磁性功能颗粒;

优选地,所述细菌磁颗粒先经过处理步骤再进行活化;

优选地,所述细菌磁颗粒的处理步骤具体方法如下:

(1)取细菌磁颗粒,加入处理剂搅拌条件下反应,反应完成后将产物洗涤至中性;所述处理剂为体积比是40-60:1-3:0.3-1的无水乙醇、氨水和正硅酸乙酯的混合液;

(2)将步骤(1)反应后得到的细菌磁颗粒配成浓度为0.1%~0.3%的溶液,调节溶液pH值至3.0-5.0,向上述溶液中加入浓度为5-15%的3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中,搅拌条件下反应,反应完成后将产物洗涤至中性,制得经过处理的细菌磁颗粒;

优选地,所述活化步骤具体方法如下:

(a)取经过处理的细菌磁颗粒,加入偶联剂,搅拌反应,过滤,制得活化后的细菌磁颗粒,所述偶联剂为质量比为1:1-1.2的EDC和NHS的混合物;

优选地,孵育的条件为:140-160rpm涡旋振荡,室温,反应过夜;

优选地,步骤b的孵育过程还加入孵育剂,所述孵育剂为重量份数比为2:5.5-7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物。

7. 如权利要求6所述的超顺磁性功能颗粒的制备方法,其特征在于,所述细菌磁颗粒的制备方法包括如下步骤:

1)将趋磁细菌MSR-1菌株进行扩大培养;

2)离心并收集趋磁细菌MSR-1菌株,用Tris-HCl缓冲液悬浮,得悬浮液;

3)超声波破碎悬浮液中的细胞;

4)磁铁吸附破碎后的细胞,静置过夜,弃去上清,用磷酸盐缓冲液重新悬浮吸附到的沉淀,超声波清洗,磁铁再次吸附,弃上清,将吸附到的沉淀用磷酸盐缓冲液悬浮,洗涤3次,即得细菌磁颗粒;

优选地,

离心条件为:转速8000-10000rpm,离心时间5-10min;

超声波破碎条件为:超声功率250-350w,超声时间2-7s,间隔时间2-7s,超声次数80-

100次,重复3次;

超声波清洗条件为:超声功率70-90w,超声时间2-7s,间隔时间2-7s,超声次数40-60次。

8.如权利要求6所述的超顺磁性功能颗粒的制备方法,其特征在于,所述抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的制备方法包括如下步骤:

I用红细胞糖蛋白GPA免疫小鼠;

II取免疫后的小鼠,通过融合剂与杂交瘤细胞进行融合,将融合后的细胞悬浮于选择培养基中,进行培养;

III抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体筛选;

IV抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的制备及纯化。

9.如权利要求8所述的超顺磁性功能颗粒的制备方法,其特征在于,所述融合剂为质量比为5.6:1.2的聚乙二醇4000和聚乙二醇1500的混合物;所述选择培养基由DMEM培养液和悬浮溶质组成,所述悬浮溶质及其在DMEM培养液中的浓度为15-25 μ g/ml牛血清、15-20ng/ml β -胡萝卜素、1-3ng/ml丙酮酸钠、5-10ng/ml维生素E、5-10ng/ml多聚谷氨酸、2-5 μ g/ml壳聚糖和25-30ng/ml碱性成纤维细胞。

10.如权利要求7所述的超顺磁性功能颗粒的制备方法,其特征在于,所述趋磁细菌MSR-1菌株扩大培养包括如下步骤:

a.在培养罐内加入第一培养基,105-110 $^{\circ}$ C灭菌10min,静置1h后,将趋磁细菌MSR-1菌株接种到培养罐中,进行第一次培养,获得第一培养液;第一次培养的条件为:起始pH值为5.5-6,培养温度为28-30 $^{\circ}$ C,培养时间为3-5天,摇床转速为250-300转/分钟,培养过程中通入氧气,通入氧气的方式为:间隔20min,通入50min氧气;

b.将第一培养液加入含有第二培养基的培养罐中,无氧状态进行第二次培养;第二次培养的条件为:起始pH值为6.5-7.0,培养温度为20-25 $^{\circ}$ C,培养时间为2-3天,摇床转速为100-200转/分钟;

优选地,

所述第一培养基由重量份数为5-10份的谷氨酰胺、1-3份麦芽糖醇、2-5份、0.5-1份泛酸钙、0.5-1份酪蛋白酸钠、0.2-0.5份磷酸二氢钾、0.5-1份月桂酸肌氨酸和1-2份氯化钠组成;

所述第二培养基由重量份数为2-3份蛋白胨、2-5份生物素、1-2份甘氨酸、0.5-1份酒石酸钠、1-2份硝酸铵、1-2份磷酸酰丝氨酸和0.2-0.5份月桂醇硫酸酯钠的组成。

超顺磁性功能颗粒、磁化红细胞及其临床应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,特别涉及超顺磁性功能颗粒、磁化红细胞及其临床应用。

背景技术

[0002] 红细胞血型是人类遗传多态型标志之一,自20世纪初发现ABO血型以来,已发现500多个人类红细胞血型抗原,目前已确认200多个。其中,与临床最为密切的血型系统包括ABO、Rh、MNS等29个系统。临床血型血清学检测主要有:血型检测、抗体筛检和鉴定、交叉配血。目前,血型血清学检测所使用的红细胞均为新鲜红细胞,在检测过程中需要将红细胞与样本反应,离心后才能观察结果,然而离心时间较长,并且红细胞离心后容易贴试管壁,不利于观察结果。

[0003] 趋磁细菌(Magnetotactic bacteria,MTB)是一类能沿磁力线方向排列或作定向运动、在细胞内合成由生物膜包围的细菌磁颗粒的革兰氏阴性细菌,其在自然界普遍分布,但是由于其对生长条件、营养要求非常苛刻,使得其纯培养和特性的研究相当困难。在80年代和90年代初期对趋磁细菌的研究一度处于低迷状态。近年来,随着分子生物学技术等的迅速发展,对趋磁细菌的形态学、生物学特性、培养条件等的研究也迅速发展起来。

[0004] 趋磁细菌是从环境中吸收大量的铁,形成一种特殊的细胞器,即细菌磁颗粒,其内部含有一个单磁畴的四氧化三铁(Fe_3O_4)或四硫化三铁(Fe_3S_4)的晶体,其外部有脂类和蛋白组成的单位膜包被。不同的菌株可以合成不同形状的细菌磁颗粒,具有种专一性。细菌磁颗粒主要有平截八面体、棱柱状、子弹状、箭头状、齿状等,直径30~120nm。在细胞内,细菌磁颗粒通常高度有序地排列成一条或几条链,形成一个或多个“小磁针”,从而使菌体可以感知外界磁场;细菌磁颗粒的形成过程属于生物矿化(biomineralization),其整个过程多在50nm左右的泡囊内进行,受到严格的生物调控,条件温和,产物为单磁畴晶体,粒径均一、晶形稳定,在同类材料中磁性最强,是名副其实的“纳米工厂(Nanofactory)”。同时,细菌磁颗粒有单位膜包被,与裸露的磁性材料相比,其具有超顺磁性,易于分散,目前尚无法人工模拟。此外,细菌磁颗粒大小均匀、表面积大,并且外有生物膜包被,颗粒间不容易聚集,具有良好的分散性和生物相容性。

[0005] 细菌磁颗粒是一种天然磁性纳米生物材料,由于其优良的性能而在许多领域具有巨大的潜在应用价值,例如CN102419370公开的用抗Bt杀虫蛋白多克隆抗体包被的细菌磁颗粒可用于检测小鼠组织内Bt杀虫蛋白;CN101077418公开的载阿霉素细菌纳米细菌磁颗粒可用于抑制癌细胞的增殖等;但是现有技术还没有公开利用细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体偶联并用于血型抗体检测的相关报道。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种细菌磁颗粒及其磁化红细胞,其可用于检测血型抗体,检测方法简便、高效,结果准确、可靠。

[0007] 本发明具体技术方案如下：

[0008] 本发明一方面提供一种超顺磁性功能颗粒，其中该颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体孵育而成。

[0009] 进一步的改进，该偶联剂选自质量比为1:1-1.2的EDC和NHS的混合物。其中EDC为1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺，NHS为N-羟基琥珀酰亚胺，通过采用EDC和NHS的混合物作为偶联剂可以显著提高细菌磁颗粒偶联抗红细胞蛋白GPA单克隆抗体的量。

[0010] 进一步的改进，为了进一步提高细菌磁颗粒的活化效果，上述偶联剂中还加入了质量比为1:2.5的琼脂和无水硫酸钙的混合物。

[0011] 进一步的改进，所述孵育中还加入重量份数比为2:5.5-7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物作为孵育剂。通过加入壳聚糖和海藻酸钠的混合物作为孵育剂，可以显著提高细菌磁颗粒对抗红细胞蛋白GPA单克隆抗体的负载量。

[0012] 本发明另一方面，还提供一种磁化红细胞，该红细胞是由超顺磁性功能颗粒与红细胞孵育而成；本发明提供的超顺磁性功能颗粒可与红细胞共同孵育并使其快速磁化，然后进行样本检测，检测过程中，磁力分离取代离心力分离，可为临床提供一种快速、简便的血型抗体检测试验方法。

[0013] 本发明另一方面提供的超顺磁性功能颗粒和磁化红细胞在临床ABO血型抗体检测、血型不规则抗体检测筛查、交叉配血或吸收放散实验等中的应用。

[0014] 进一步的改进，超顺磁性功能颗粒与红细胞孵育过程还加入了重量份数比为2:5.5-7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物作为孵育剂。

[0015] 本发明另一方面还提供一种细菌磁颗粒的制备方法，该制备方法包括如下步骤：

[0016] a. 活化：加入偶联剂对细菌磁颗粒进行活化，制得活化后的细菌磁颗粒；

[0017] b. 孵育：将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体，室温孵育；

[0018] c. 分离：磁铁吸附，洗涤，即得超顺磁性功能颗粒。

[0019] 优选地，所述细菌磁颗粒先经过处理步骤再进行活化；

[0020] 优选地，所述细菌磁颗粒的处理步骤具体方法如下：

[0021] (1)取细菌磁颗粒，加入处理剂搅拌条件下反应，反应完成后将产物洗涤至中性；所述处理剂为体积比是40-60:1-3:0.3-1的无水乙醇、氨水和正硅酸乙酯的混合液；

[0022] (2)将步骤(1)反应后得到的细菌磁颗粒配成浓度为0.1%~0.3%的溶液，调节溶液pH值至3.0-5.0，向上述溶液中加入浓度为5-15%的3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中，搅拌条件下反应，反应完成后将产物洗涤至中性，制得经过处理的细菌磁颗粒；

[0023] 优选地，所述活化步骤具体方法如下：

[0024] (a)取经过处理的细菌磁颗粒，加入偶联剂，搅拌反应，过滤，制得活化后的细菌磁颗粒，所述偶联剂为质量比为1:1-1.2的EDC和NHS的混合物；

[0025] 优选地，孵育的条件为：140-160rpm涡旋振荡，室温，反应过夜；

[0026] 优选地，步骤b的孵育过程还加入孵育剂，所述孵育剂为重量份数比为2:5.5-7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物。

[0027] 本发明另一方面还提供了一种细菌磁颗粒的制备方法，其包括如下步骤：

[0028] 1)将趋磁细菌MSR-1菌株进行扩大培养；

[0029] 2)离心并收集趋磁细菌MSR-1菌株，用Tris-HCl缓冲液悬浮，得悬浮液；

[0030] 3)超声波破碎悬浮液中的细胞;

[0031] 4)磁铁吸附破碎后的细胞,静置过夜,弃去上清,用磷酸盐缓冲液重新悬浮吸附到的沉淀,超声波清洗,磁铁再次吸附,弃上清,将吸附到的沉淀用磷酸盐缓冲液悬浮,洗涤3次,即得细菌磁颗粒。

[0032] 优选地,细菌磁颗粒制备过程中,

[0033] 离心条件为:转速8000-10000rpm,离心时间5-10min;

[0034] 超声波破碎条件为:超声功率250-350w,超声时间2-7s,间隔时间2-7s,超声次数80-100次,重复3次;

[0035] 超声波清洗条件为:超声功率70-90w,超声时间2-7s,间隔时间2-7s,超声次数40-60次。

[0036] 本发明另一方面还提供了抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的制备方法,该方法包括如下步骤:

[0037] I用红细胞糖蛋白GPA免疫小鼠;

[0038] II取免疫后的小鼠,通过融合剂与杂交瘤细胞进行融合,将融合后的细胞悬浮于选择培养基中,进行培养;

[0039] III抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体筛选;

[0040] IV抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的制备及纯化。

[0041] 进一步的改进,融合剂为质量比为5.6:1.2的聚乙二醇4000和聚乙二醇1500的混合物;选择培养基由DMEM培养液和悬浮溶质组成,所述悬浮溶质及其在DMEM培养液中的浓度为15-25 μ g/ml牛血清、15-20ng/ml β -胡萝卜素、1-3ng/ml丙酮酸钠、5-10ng/ml维生素E、5-10ng/ml多聚谷氨酸、2-5 μ g/ml壳聚糖和25-30ng/ml碱性成纤维细胞。

[0042] 本发明另一方面还提供了趋磁细菌MSR-1菌株扩大培养方法,其包括如下步骤:

[0043] a.在培养罐内加入第一培养基,105-110 $^{\circ}$ C灭菌10min,静置1h后,将趋磁细菌MSR-1菌株接种到培养罐中,进行第一次培养,获得第一培养液;第一次培养的条件为:起始pH值为5.5-6,培养温度为28-30 $^{\circ}$ C,培养时间为3-5天,摇床转速为250-300转/分钟,培养过程中通入氧气,通入氧气的方式为:间隔20min,通入50min氧气;

[0044] b.将第一培养液加入含有第二培养基的培养罐中,无氧状态进行第二次培养;第二次培养的条件为:起始pH值为6.5-7.0,培养温度为20-25 $^{\circ}$ C,培养时间为2-3天,摇床转速为100-200转/分钟;

[0045] 优选地,

[0046] 所述第一培养基由重量份数为5-10份的谷氨酰胺、1-3份麦芽糖醇、2-5份、0.5-1份泛酸钙、0.5-1份酪蛋白酸钠、0.2-0.5份磷酸二氢钾、0.5-1份月桂酸肌氨酸和1-2份氯化钠组成;

[0047] 所述第二培养基由重量份数为2-3份蛋白胨、2-5份生物素、1-2份甘氨酸、0.5-1份酒石酸钠、1-2份硝酸铵、1-2份磷酸酰丝氨酸和0.2-0.5份月桂醇硫酸酯钠的组成。

[0048] 本发明的有益效果在于细菌磁颗粒与裸露的磁性材料相比,易于分散、大小均匀、表面积大,并且外有生物膜包被,颗粒间不容易聚集,具有良好的分散性、超顺磁性和生物相容性。将细菌磁颗粒偶联抗红细胞蛋白GPA单克隆抗体后,可更好直接牢固结合在红细胞上,这比普通磁颗粒非特异性吸附在红细胞表面实现磁化细胞要更可靠,更加标准可控;进

一步与红细胞进行孵化,可用于红细胞的快速磁化,为临床提供一种快速、简便的血清学检测试验方法。

具体实施方式

[0049] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0050] 实施例1一种超顺磁性功能颗粒

[0051] 该颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体孵育而成:

[0052] 该超顺磁性功能颗粒的制备方法如下:

[0053] a. 活化:加入质量比为1:1的EDC和NHS的混合物对细菌磁颗粒进行活化,制得活化后的细菌磁颗粒;

[0054] b. 孵育:将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体,室温孵育;

[0055] c. 分离:磁铁吸附,洗涤,即得超顺磁性功能颗粒。

[0056] 实施例2一种超顺磁性功能颗粒

[0057] 该颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体孵育而成:

[0058] 该超顺磁性功能颗粒的制备方法如下:

[0059] a. 活化:加入质量比为1:1的EDC和NHS的混合物对细菌磁颗粒进行活化,制得活化后的细菌磁颗粒;

[0060] b. 孵育:将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体,加入孵育剂,室温孵育;所述孵育剂为重量份数比为2:5.5的壳聚糖和海藻酸钠的混合物;

[0061] c. 分离:磁铁吸附,洗涤,即得超顺磁性功能颗粒。

[0062] 实施例3一种超顺磁性功能颗粒

[0063] 该颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体孵育而成:

[0064] 该超顺磁性功能颗粒的制备方法如下:

[0065] (1)取细菌磁颗粒,加入处理剂搅拌条件下反应,反应完成后将产物洗涤至中性;该处理剂为体积比是40:1:0.3的无水乙醇、氨水和正硅酸乙酯的混合液;

[0066] (2)将步骤(1)反应后得到的细菌磁颗粒配成浓度为0.1%的溶液,调节溶液pH值至3.0,向上述溶液中加入浓度为5%的3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中,搅拌条件下反应,反应完成后将产物洗涤至中性,制得经过处理的细菌磁颗粒;

[0067] (3)取经过处理的细菌磁颗粒,加入质量比为1:1.2的EDC和NHS的混合物,搅拌反应,过滤,制得活化后的细菌磁颗粒;

[0068] (4)将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体,室

[0069] 温孵育;

[0070] (5)磁铁吸附,洗涤,即得超顺磁性功能颗粒。

[0071] 实施例4一种超顺磁性功能颗粒

[0072] 该颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体孵育而成：

[0073] 该超顺磁性功能颗粒的制备方法如下：

[0074] (1)取细菌磁颗粒，加入处理剂搅拌条件下反应，反应完成后将产物洗涤至中性；该处理剂为体积比是40:1:0.3的无水乙醇、氨水和正硅酸乙酯的混合液；

[0075] (2)将步骤(1)反应后得到的细菌磁颗粒配成浓度为0.1%的溶液，调节溶液pH值至3.0，向上述溶液中加入浓度为5%的3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中，搅拌条件下反应，反应完成后将产物洗涤至中性，制得经过处理的细菌磁颗粒；

[0076] (3)取经过处理的细菌磁颗粒，加入质量比为1:1的EDC和NHS的混合物，搅拌反应，过滤，制得活化后的细菌磁颗粒；

[0077] (4)将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体，加入孵育剂，室温孵育；所述孵育剂为重量份数比为2:7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物；

[0078] (5)磁铁吸附，洗涤，即得超顺磁性功能颗粒。

[0079] 实施例5一种超顺磁性功能颗粒

[0080] 该颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体孵育而成：

[0081] 该超顺磁性功能颗粒的制备方法如下：

[0082] 该方法包括如下步骤：

[0083] (1)取细菌磁颗粒，用蒸馏水配制成0.1%~0.3%(w/v)浓度，超声处理10min；

[0084] (2)取30mL上述细菌磁颗粒，然后加入50mL无水乙醇、2mL氨水和500 μ L正硅酸乙酯，在200rpm搅拌条件下反应5h，反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性；

[0085] (3)用无水乙醇配制0.1%~0.3%(w/v)浓度的细菌磁颗粒，用冰乙酸调节溶液pH值至4.0，取20mL上述溶液加入至30mL 10%3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中，在200rpm搅拌条件下反应3h，反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性，制得经过处理的细菌磁颗粒；

[0086] (4)用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH为6.0)洗涤经过处理的细菌磁颗粒，并配制成1%~5%(w/v)浓度的悬液；

[0087] (5)取2mL上述细菌磁颗粒悬液，加入100 μ L浓度为10%(w/v)的EDC溶液和100 μ L 10%(w/v)的NHS溶液，室温150rpm涡旋振荡反应3h，然后用去离子水洗去过量的EDC和NHS，并最终悬浮至2mL，备用；

[0088] (6)用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH6.0)稀释抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体至1mg/mL，制得活化后的细菌磁颗粒；

[0089] (7)向活化后的细菌磁颗粒悬液中加入100~200 μ L上述抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体；

[0090] (8)室温150rpm涡旋振荡孵育反应过夜；

[0091] (9)磁铁吸附，然后用0.01M磷酸盐缓冲液洗涤3次，即得超顺磁性功能颗粒。

[0092] 实施例6一种超顺磁性功能颗粒

[0093] 该颗粒是由表面基团通过偶联剂活化后的细菌磁颗粒和抗红细胞糖蛋白GPA单克

隆抗体孵育而成：

[0094] 该超顺磁性功能颗粒的制备方法如下：

[0095] 与实施例5不同的是，在步骤(8)制备过程中加入了孵育剂，所述孵育剂为重量份数比为2:6的壳聚糖和海藻酸钠的混合物。

[0096] 实施例7一种磁化红细胞

[0097] 其是由超顺磁性功能颗粒与红细胞孵育而成，该红细胞优选为A型红细胞、B型红细胞或O型红细胞。

[0098] 该磁化红细胞的制备方法为：

[0099] a. 将超顺磁性功能颗粒用0.01M磷酸盐缓冲液悬浮至2mL；

[0100] b. 取红细胞，用生理盐水洗涤3次后配成50%(V/V)浓度；

[0101] c. 取1mL红细胞悬液，加入等体积的超顺磁性功能颗粒悬液，37℃孵育30min，然后磁力吸附，分离，即得磁化红细胞。

[0102] 实施例8一种磁化红细胞

[0103] 其是由超顺磁性功能颗粒与红细胞孵育而成，该红细胞优选为A型红细胞、B型红细胞或O型红细胞。

[0104] 该磁化红细胞的制备方法为：

[0105] a. 将超顺磁性功能颗粒用0.01M磷酸盐缓冲液悬浮至2mL；

[0106] b. 取红细胞，用生理盐水洗涤3次后配成50%(V/V)浓度；

[0107] c. 取1mL红细胞悬液，加入等体积的超顺磁性功能颗粒悬液，加入孵育剂，37℃孵育30min，然后磁力吸附，分离，即得磁化红细胞，孵育剂优选为重量份数比为2:6.5的壳聚糖和海藻酸钠的混合物。

[0108] 实施例9一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0109] 该方法包括如下步骤：

[0110] a. 活化：加入质量比为1:1的EDC和NHS的混合物对细菌磁颗粒进行活化，制得活化后的细菌磁颗粒；

[0111] b. 孵育：将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体，室温孵育；

[0112] c. 分离：磁铁吸附，洗涤，即得超顺磁性功能颗粒。

[0113] 实施例10一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0114] 该方法包括如下步骤：

[0115] a. 活化：加入质量比为1:1的EDC和NHS的混合物对细菌磁颗粒进行活化，制得活化后的细菌磁颗粒；

[0116] b. 孵育：将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体，加入孵育剂，室温孵育；该孵育剂为重量份数比为2:7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物；

[0117] c. 分离：磁铁吸附，洗涤，即得超顺磁性功能颗粒。

[0118] 实施例11一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0119] 该方法包括如下步骤：

[0120] (1)取细菌磁颗粒，加入处理剂搅拌条件下反应，反应完成后将产物洗涤至中性；该处理剂为体积比是40:1:0.3的无水乙醇、氨水和正硅酸乙酯的混合液；

[0121] (2)将步骤(1)反应后得到的细菌磁颗粒配成浓度为0.1%的溶液，调节溶液pH值

至3.0,向上述溶液中加入浓度为5%的3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中,搅拌条件下反应,反应完成后将产物洗涤至中性;

[0122] (3)取步骤(2)反应后得到的细菌磁颗粒,加入质量比为1:1.2的EDC和NHS的混合物,搅拌反应,过滤,制得活化后的细菌磁颗粒;

[0123] (4)将活化后的细菌磁颗粒与抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体,室温孵育;

[0124] (5)磁铁吸附,洗涤,即得超顺磁性功能颗粒。

[0125] 实施例12一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0126] 该制备方法与实施例11不同的是,步骤(4)孵育过程中加入了重量份数比为2:6.5的壳聚糖和海藻酸钠的混合物作为孵育剂。

[0127] 实施例13一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0128] 该方法包括如下步骤:

[0129] (1)取细菌磁颗粒,用蒸馏水配制成0.1%~0.3%(w/v)浓度,超声处理10min;

[0130] (2)取30mL上述细菌磁颗粒,然后加入50mL无水乙醇、2mL氨水和500 μ L正硅酸乙酯,在200rpm搅拌条件下反应5h,反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性;

[0131] (3)用无水乙醇配制0.1%~0.3%(w/v)浓度的细菌磁颗粒,用冰乙酸调节溶液pH值至4.0,取20mL上述溶液加入至30mL 10%3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中,在200rpm搅拌条件下反应3h,反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性;

[0132] (4)用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH为6.0)洗涤细菌磁颗粒,并配制成1%~5%(w/v)浓度的悬液;

[0133] (5)取2mL上述细菌磁颗粒悬液,加入100 μ L浓度为10%(w/v)的EDC溶液和100 μ L 10%(w/v)的NHS溶液,室温150rpm涡旋振荡反应3h,然后用去离子水洗去过量的EDC和NHS,并最终悬浮至2mL,备用;

[0134] (6)用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH6.0)稀释抗红细胞糖蛋白GP A单克隆抗体至1mg/mL;

[0135] (7)向活化后的细菌磁颗粒悬液中加入100~200 μ L上述抗红细胞糖蛋白GP A单克隆抗体;

[0136] (8)室温150rpm涡旋振荡孵育反应过夜;

[0137] (9)磁铁吸附,然后用0.01M磷酸盐缓冲液洗涤3次,即得超顺磁性功能颗粒。

[0138] 实施例14一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0139] 该方法包括如下步骤:

[0140] (1)取细菌磁颗粒,用蒸馏水配制成0.1%~0.3%(w/v)浓度,超声处理10min;

[0141] (2)取30mL上述细菌磁颗粒,然后加入50mL无水乙醇、2mL氨水和500 μ L正硅酸乙酯,在200rpm搅拌条件下反应5h,反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性;

[0142] (3)用无水乙醇配制0.1%~0.3%(w/v)浓度的细菌磁颗粒,用冰乙酸调节溶液pH值至4.0,取20mL上述溶液加入至30mL 10%3-氨丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液中,在200rpm搅拌条件下反应3h,反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性;

[0143] (4)用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH为6.0)洗涤细菌磁颗粒,并配制成1%~5%(w/v)浓度的悬液;

[0144] (5)取2mL上述细菌磁颗粒悬液,加入100 μ L浓度为10%(w/v)的EDC溶液和100 μ L

10% (w/v) 的 NHS 溶液, 室温 150rpm 涡旋振荡反应 3h, 然后用去离子水洗去过量的 EDC 和 NHS, 并最终悬浮至 2mL, 备用;

[0145] (6) 用乙酸-乙酸钠缓冲溶液 (pH6.0) 稀释抗红细胞糖蛋白 GP A 单克隆抗体至 1mg/mL;

[0146] (7) 向活化后的细菌磁颗粒悬液中加入 100~200 μ L 上述抗红细胞糖蛋白 GP A 单克隆抗体;

[0147] (8) 加入孵育剂, 室温 150rpm 涡旋振荡孵育反应过夜; 孵育剂为重量份数比为 2:7 的壳聚糖和海藻酸钠的混合物;

[0148] (9) 磁铁吸附, 然后用 0.01M 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 即得超顺磁性功能颗粒。

[0149] 实施例 15 一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0150] 该制备方法与实施例 9 不同的是, 该制备方法还包括细菌磁颗粒的制备方法, 其包括如下步骤:

[0151] 1) 将趋磁细菌 MSR-1 菌株进行扩大培养;

[0152] 2) 离心并收集趋磁细菌 MSR-1 菌株, 用 Tris-HCl 缓冲液悬浮, 得悬浮液;

[0153] 3) 超声波破碎悬浮液中的细胞;

[0154] 4) 磁铁吸附破碎后的细胞, 静置过夜, 弃去上清, 用磷酸盐缓冲液重新悬浮吸附到的沉淀, 超声波清洗, 磁铁再次吸附, 弃上清, 将吸附到的沉淀用磷酸盐缓冲液悬浮, 洗涤 3 次, 即得细菌磁颗粒。

[0155] 实施例 16 一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0156] 该制备方法与实施例 15 不同的是, 细菌磁颗粒的制备方法包括如下步骤:

[0157] (1) 将趋磁细菌 MSR-1 菌株进行扩大培养。

[0158] (2) 离心收集菌株 (10000rpm, 5min), 用适量 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 悬浮, 得悬浮液;

[0159] (3) 超声波破碎悬浮液中的细胞, 超声波破碎条件为: 超声功率 300w, 超声时间 5s, 间隔时间 5s, 超声次数 90 次, 重复 3 次, 至细胞完全破碎;

[0160] (4) 磁铁吸附破碎后的菌体细胞, 静置过夜后, 弃去上清, 用 10mM 磷酸盐缓冲液重新悬浮吸附到的沉淀, 超声波清洗, 磁铁再次吸附, 弃上清, 磷酸盐缓冲液悬浮, 重复洗涤 3 次, 超声波清洗条件为: 超声功率 80w, 超声时间 5s, 间隔时间 5s, 超声次数 50 次;

[0161] (5) 纯净的细菌磁颗粒在蒸馏水中超声波清洗两次, 磁铁吸附, 即得细菌磁颗粒。

[0162] 实施例 17 一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0163] 该制备方法与实施例 9 不同的是, 该方法还包括抗红细胞糖蛋白 GPA 单克隆抗体的制备方法, 其包括如下步骤:

[0164] I 用红细胞糖蛋白 GPA 免疫小鼠;

[0165] II 取免疫后的小鼠, 通过融合剂与杂交瘤细胞进行融合, 将融合后的细胞悬浮于选择培养基中, 进行培养;

[0166] III 抗红细胞糖蛋白 GPA 单克隆抗体筛选;

[0167] IV 抗红细胞糖蛋白 GPA 单克隆抗体的制备及纯化。

[0168] 实施例 18 一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0169] 该制备方法与实施例 17 不同的是, 抗红细胞糖蛋白 GPA 单克隆抗体的制备方法包

括如下步骤：

[0170] 1. 小鼠免疫

[0171] 将红细胞糖蛋白GPA通过腹腔、背部皮下等途径多点免疫小鼠，共免疫4次，间隔期为10天；融合前2天用0.2ml血小板悬液经鼠尾静脉加强注射1次；

[0172] 2. 细胞融合

[0173] (1)取免疫后的小鼠脾脏，制备脾细胞悬液，并将小鼠脾细胞和培养好的NS1骨髓瘤细胞按10:1比例混合；

[0174] (2)采用50%聚乙二醇4000作融合剂，将小鼠脾细胞和NS1骨髓瘤细胞进行融合；

[0175] (3)融合细胞悬于含选择培养基内培养数日；

[0176] 3. 克隆筛选

[0177] (1)将红细胞糖蛋白GPA用0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液稀释至10 μ g/ml，包被酶标板100 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C过夜；

[0178] (2)次日用含0.03~0.06%Tween-20的磷酸盐缓冲液洗涤5次，控干；

[0179] (3)加入待检的细胞培养上清，37 $^{\circ}$ C孵育后采用间接ELISA法进行检测；

[0180] (4)Cutoff值设为阴性对照值的2.1倍，高于Cutoff值为阳性结果；

[0181] (5)选取检测结果阳性孔内的融合细胞经有限稀释法进行多次单克隆培养，待单细胞生长成亚克隆后再进行测定，阳性克隆扩大后液氮冷冻保存；

[0182] 4. 单抗制备及纯化

[0183] (1)培养经克隆筛选的杂交瘤细胞株，注射至经致敏的小鼠腹腔内，每只约10⁶个细胞；

[0184] (2)观察小鼠腹腔，并在约5~10天内采集小鼠腹水；

[0185] (3)取小鼠腹水，边搅拌边缓慢加入等比例的饱和硫酸铵溶液，搅拌1h后4 $^{\circ}$ C静置过夜；

[0186] (4)次日将已沉淀的小鼠腹水离心，收集沉淀并用少量生理盐水溶解；然后采用G-25凝胶层析柱去除其中的硫酸铵；

[0187] (5)继续采用DEAE-52阴离子交换层析柱纯化单抗，并用不同浓度的NaCl溶液洗脱；

[0188] (6)采用SDS-PAGE电泳和间接ELISA法进行纯化抗体的纯度和效价测定。

[0189] 实施例19一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0190] 该制备方法与实施例17不同的是，抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的制备方法中，所用的融合剂为质量比为5.6:1.2的聚乙二醇4000和聚乙二醇1500的混合物；选择培养基由DMEM培养液和悬浮溶质组成，所述悬浮溶质及其在DMEM培养液中的浓度为20 μ g/ml牛血清、17.5ng/ml β -胡萝卜素、2ng/ml丙酮酸钠、7.5ng/ml维生素E、7.5ng/ml多聚谷氨酸、3 μ g/ml壳聚糖和27.5ng/ml碱性成纤维细胞。

[0191] 实施例20一种超顺磁性功能颗粒的制备方法

[0192] 该制备方法与实施例15不同的是，该方法还包括趋磁细菌MSR-1菌株的扩大培养，其包括如下步骤：

[0193] a. 在培养罐内加入第一培养基，107 $^{\circ}$ C灭菌10min，静置1h后，将趋磁细菌MSR-1菌株接种到培养罐中，进行第一次培养，获得第一培养液；第一次培养的条件为：起始pH值为

5.8,培养温度为30℃,培养时间为5天,摇床转速为300转/分钟,培养过程中通入氧气,通入氧气的方式为:间隔20min,通入50min氧气;

[0194] b.将第一培养液加入含有第二培养基的培养罐中,无氧状态进行第二次培养;第二次培养的条件为:起始pH值为6.5,培养温度为25℃,培养时间为2天,摇床转速为150转/分钟;

[0195] 其中,第一培养基由重量份数为7.5份的谷氨酰胺、2份麦芽糖醇、3份、0.7份泛酸钙、0.7份酪蛋白酸钠、0.3份磷酸二氢钾、0.7份月桂酸肌氨酸和1.5份氯化钠组成;

[0196] 所述第二培养基由重量份数为2.5份蛋白胨、3份生物素、1.5份甘氨酸、0.75份酒石酸钠、1.5份硝酸铵、1.5份磷酸酰丝氨酸和0.3份月桂醇硫酸酯钠的组成。

[0197] 对照例1

[0198] 该对照例与实施例20不同的是:

[0199] 第一次培养的条件为:起始pH值为5,培养温度为32℃,培养时间为5天,摇床转速为200转/分钟,培养过程中一直通入氧气;

[0200] 第二次培养的条件为:起始pH值为7.2,培养温度为30℃,培养时间为2天,摇床转速为250转/分钟;

[0201] 第一培养基由重量份数为7.5份的谷氨酰胺、3份、0.7份泛酸钙、0.7份酪蛋白酸钠、0.3份磷酸二氢钾和1.5份氯化钠组成;

[0202] 第二培养基由重量份数为2.5份蛋白胨、1.5份甘氨酸、0.75份酒石酸钠、1.5份硝酸铵、和0.3份月桂醇硫酸酯钠的组成。

[0203] 对照例2

[0204] 该对照例与实施例20不同的是:

[0205] 第一次培养的条件为:起始pH值为6.2,培养温度为25℃,培养时间为5天,摇床转速为350转/分钟,培养过程中不通入氧气;第二次培养的条件为:起始pH值为6,培养温度为15℃,培养时间为2天,摇床转速为100转/分钟;

[0206] 第一培养基由重量份数为7.5份的谷氨酰胺、2份麦芽糖醇、3份、0.7份泛酸钙、0.7份酪蛋白酸钠、0.3份磷酸二氢钾、2份琼脂、0.7份月桂酸肌氨酸和1.5份氯化钠组成;

[0207] 第二培养基由重量份数为2.5份蛋白胨、3份生物素、1.5份甘氨酸、0.75份酒石酸钠、1.5份硝酸铵、2份琼脂、2份葡萄糖、1.5份磷酸酰丝氨酸和0.3份月桂醇硫酸酯钠的组成。

[0208] 试验例1磁化红细胞在临床血型相容性检测中的应用

[0209] 1.红细胞反定型检测

[0210] 用已知血型的A型红细胞、B型红细胞、O型红细胞按上述具体实施方式制备A型磁化红细胞、B型磁化红细胞、O型磁化红细胞,以替代新鲜红细胞进行ABO血型系统反定型,即血浆中抗A、抗B检测。

[0211] 检测步骤如下:

[0212] (1)取洁净试管三支,分别标记A、B、O;

[0213] (2)各加入待检样本(血清或血浆)50ul;

[0214] (3)对应管分别加入制备的A型磁化红细胞、B型磁化红细胞、O型磁化红细胞50ul;

[0215] (4)混匀,室温反应1min;

[0216] (5)磁铁吸附,振荡试管并判定结果,若磁化红细胞发生凝集,则为阳性反应;反之,若磁化红细胞不发生凝集,则为阴性反应。反应格局判定标准如下:

[0217]

磁化红细胞			血型
A	B	O	
-	+	-	A
+	-	-	B
-	-	-	AB
+	+	-	O

[0218] 2.红细胞不规则抗体检测

[0219] 用已知血型的覆盖我国临床有意义红细胞抗原的多人份O型红细胞按上述具体实施方式制备成磁化红细胞,以替代新鲜红细胞进行红细胞不规则抗体检测。

[0220] 检测步骤如下:

[0221] (1)取洁净试管,做好标记;

[0222] (2)加入待检样本(血清或血浆)50ul;

[0223] (3)加入上述磁化红细胞50ul;

[0224] (4)混匀,室温反应1min;

[0225] (5)磁铁吸附,振荡试管并判定结果,若磁化红细胞发生凝集(阳性反应),表明待检样本中含有与该红细胞抗原相对应的抗体,反之,若磁化红细胞不发生凝集(阴性反应),表明待检样本中不含与红细胞抗原对应的抗体。

[0226] 3.交叉配血

[0227] 用鲜血员红细胞按上述具体实施方式制备成磁化红细胞,以替代新鲜红细胞进行交叉配血。

[0228] 检测步骤如下:

[0229] (1)取洁净试管,做好标记;

[0230] (2)加入受血者(血清或血浆)50ul;

[0231] (3)加入鲜血员磁化红细胞50ul;

[0232] (4)混匀,室温反应1min;

[0233] (5)磁铁吸附,振荡试管并判定结果,若磁化红细胞发生凝集(阳性反应),表明待检样本中含有与该红细胞抗原相对应的抗体,配型不合;反之,若磁化红细胞不发生凝集(阴性反应),表明待检样本中不含与红细胞抗原对应的抗体配型相合。

[0234] 试验例2细菌磁颗粒负载抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体效果试验

[0235] 选择不同的偶联剂,其余的方法按照实施例13的方法制备超顺磁性功能颗粒,细菌磁颗粒对抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的负载效果见表1;

[0236] 表1不同偶联剂对负载效果的影响

[0237]

不同偶联剂	抗红细胞糖蛋白 GPA 单克隆抗体/细菌磁颗粒	
	(μg/mg)	
质量比为 1:1.2 的 EDC 和 NHS	551	
质量比为 1:1 的 EDC 和 NHS	533	
质量比为 1:0.9 的 EDC 和 NHS	375	
质量比为 1:1.3 的 EDC 和 NHS	424	
质量比为 1:1; 1:2.5 的 EDC、NHS、琼脂和无水硫酸钙	783	
质量比为 1:1; 1 的 EDC、NHS 和琼脂	572	
质量比为 1:1; 2.5 的 EDC、NHS 和无水硫酸钙	538	
戊二醛	138	
SPDP	246	

[0238] 选择不同的孵育剂,其余的方法按照实施例14的方法制备超顺磁性功能颗粒,细菌磁颗粒对抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的负载效果见表2;

[0239] 表2不同孵育剂对负载效果的影响

[0240]

不同孵育剂	抗红细胞糖蛋白 GPA 单克隆抗体/细菌磁颗粒	
	(μg/mg)	
质量比为 2:5.5 的壳聚糖和海藻酸钠	975	
质量比为 2:7.2 的壳聚糖和海藻酸钠	1028	
质量比为 2:5 的壳聚糖和海藻酸钠	542	
质量比为 2:7.5 的壳聚糖和海藻酸钠	563	
壳聚糖	324	
海藻酸钠	378	
聚乙二醇 4000	123	

[0241] 从表1中可看出,通过选择4中不同的偶联剂进行偶联,抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的负载量可达到783μg/mg,当采用2或3种偶联剂进行混合,或者采用本发明之外的偶联剂进行偶联,细菌磁颗粒负载的抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的量均显著降低;从表2中可以看出,当选择不同壳聚糖和海藻酸钠混合孵育剂时,可提高细菌磁颗粒对抗红细胞

糖蛋白GPA单克隆抗体的负载量。

[0242] 选择不同的处理条件,偶联剂选自质量比为1:1.2:1:2.5的EDC、NHS、琼脂和无水硫酸钙的混合物,孵育剂选自质量比为2:7.2的壳聚糖和海藻酸钠的混合物,其余的步骤按照实施例14的方法制备超顺磁性功能颗粒,细菌磁颗粒对抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的负载效果见表3;

[0243] 表3不同处理步骤对负载效果的影响

[0244]

不同处理步骤	抗红细胞糖蛋白 GPA 单克隆抗体/细菌磁颗粒 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
省略实施例 14 的步骤 (2)	613
省略实施例 14 的步骤 (3)	843
处理剂: 体积比是 50: 2 的无水乙醇和氨水	735
处理剂: 体积比是 2: 0.2 的氨水和正硅酸乙酯	687
处理剂: 体积比是 50: 0.2 的无水乙醇和正硅酸乙酯	814
体积比是 50: 2: 0.2 的无水乙醇、氨水和正硅酸乙酯	1402

[0245] 从表3中可知,细菌磁颗粒的处理步骤对细菌磁颗粒对抗红细胞糖蛋白GPA单克隆抗体的负载效果具有很大的影响。

[0246] 试验例3趋磁细菌MSR-1菌株扩大培养情况

[0247] 1)分组

[0248] 试验1组:本发明实施例20所述的制备方法;

[0249] 对照1组:对照例1的制备方法;

[0250] 对照2组:对照例2的制备方法;

[0251] 对照3组:CN1952112公开的一种兼性厌氧趋磁细菌及其分离、纯培养方法和细菌磁颗粒的提取、纯化方法中公开的培养方法;

[0252] 2)采用台盼蓝经典染色法对细胞进行计数,接种时细胞为 1×10^4 个/ml,分别统计原代细胞和扩大培养后的数量,结果见表4。

[0253] 表4各组趋磁细菌MSR-1菌株体外培养扩增试验结果

[0254]

组别	细胞数量 (个/ml)	
	原代	培养后
试验 1 组	1×10^4	3.6×10^9
对照 1 组	1×10^4	2.7×10^7
对照 2 组	1×10^4	8.3×10^6
对照 3 组	1×10^4	1.5×10^5

[0255] 由表中可以看出,本发明提供的趋磁细菌培养方法可以有效的体外培养趋磁细菌 MSR-1 菌株。

[0256] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其它相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。