



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105467112 A

(43) 申请公布日 2016.04.06

(21) 申请号 201510852133.6

(22) 申请日 2015.11.27

(71) 申请人 温州生物材料与工程研究所

地址 325000 浙江省温州市龙湾区(高新区)  
新三路 16 号高新大厦 1510 室

(72) 发明人 周云龙 胡焯 雷海艳

(74) 专利代理机构 温州瓯越专利代理有限公司  
33211

代理人 陈加利

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

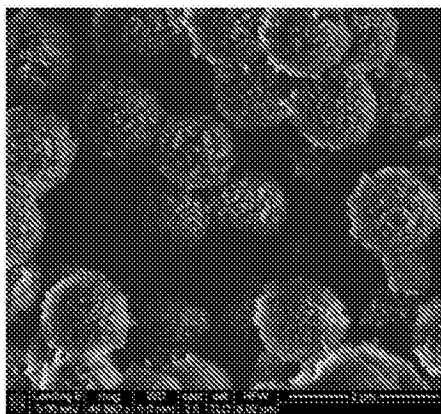
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种应用于免疫检测的免疫磁珠及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种应用于免疫检测的免疫磁珠及其制备方法,本发明以聚苯乙烯为单体制备聚苯乙烯微球,以四水氯化亚铁和六水氯化铁为铁源制备四氧化三铁磁性纳米粒子,以四乙氧基硅烷为硅源制备  $PS@(\text{Fe}_3\text{O}_4)_3@SiO_2$  磁珠,与免疫配基生物活性物质偶联结合为免疫磁珠。本发明制备方法简单,成本低,磁珠大小可控,免疫磁珠检测灵敏度高。



1. 一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)带正电的聚乙酰亚胺修饰的聚苯乙烯微球的制备:以聚乙酰亚胺为稳定剂,乙醇为分散介质,偶氮二异丁氰为引发剂,将苯乙烯单体分散聚合为带正电聚乙酰亚胺修饰的聚苯乙烯微球;

(2)带负电的柠檬酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子的制备:在氮气气氛下,六水氯化铁和四水氯化亚铁溶于去离子水中,高温搅拌下加入氨水,柠檬酸钠水溶液,氮气冷却下制备出带负电柠檬酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子;

(3)磁性纳米粒子的合成:取步骤(1)的水溶液和步骤(2)的水溶液溶于去离子水中,采用磁力吸附,将吸附的沉淀分散到去离子水中,重复2-3次,加入去离子水,乙醇,氨水,四乙氧基硅烷,室温下反应10-15h,获得PS@ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>磁性纳米粒子;

(4)免疫磁珠的合成:调节乙醇水溶液的pH至4.5-5.5,加入步骤(3)的产物,加入硅烷偶联剂对其表面改性,室温反应12-24h,溶解到PH为8-9的缓冲溶液中,加入免疫配基生物活性物质,搅拌温育,用PH为7-8的缓冲溶液磁力分离洗涤3次,保留上清液,加入牛血清蛋白或乙醇胺封闭,获得免疫磁珠。

2. 根据权利要求1所述的一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述步骤(1)的带正电聚乙酰亚胺修饰的聚苯乙烯微球的制备条件为60-70°C下反应20-25h。

3. 根据权利要求1所述的一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤(2)中六水氯化铁和四水氯化亚铁摩尔比为2:1。

4. 根据权利要求1所述的一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤(3)带负电柠檬酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子的制备条件为60-100°C,搅拌速度为800-1500r/min。

5. 根据权利要求1所述的一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤(4)中的乙醇水溶液中乙醇的体积分数为80%-95%。

6. 根据权利要求1所述的一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤(4)中硅烷偶联剂为以下物质中的一种: 3-缩水甘油丙基三甲氧基硅烷、 $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧基)丙基三甲氧基硅烷、氨丙基三乙氧基硅烷、氨丙基三甲氧基硅烷。

7. 根据权利要求1所述的一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤(4)中的免疫配基为以下物质中的一种:酶、抗体、抗原、DNA、RNA。

8. 根据权利要求1所述的一种应用于免疫检测的免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的制备方法中各步骤的产物均用乙醇清洗2-4次。

9. 一种应用于免疫检测的免疫磁珠,其特征在于:其结构为包括有PS@ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>磁性纳米粒子、以及偶联连接于PS@ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>磁性纳米粒子外的免疫配基。

## 一种应用于免疫检测的免疫磁珠及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学和磁力学领域,具体涉及一种应用于免疫检测的免疫磁珠及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 免疫磁珠是一种大小均一,表面具有特定化学基团的磁性微球。免疫磁珠的分离和检测是将纳米磁珠与免疫配基偶联,使其固定在磁性粒子表面,与相应的抗原特异性结合,在磁场的作用下,达到分离和检测的目的。

[0003] 免疫磁珠在检测和分离的过程中,在外磁场的作用下,会发生团聚而使免疫磁珠的稳定性下降。另外,现有的免疫磁珠均是基于 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性粒子,而 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性粒子化学稳定性不高,极易被氧化,且表面的活性基团较少,具有强烈的聚集倾向,不利于与免疫配基结合,限制展开应用。

[0004] 此外,现有的免疫磁珠的粒径均一性、表面活性官能团的含量、稳定性及制备方法的简单化依然有待提高。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了克服现有技术存在的缺点和不足,而提供一种应用于免疫检测的免疫磁珠及其制备方法。该方法制备工艺简单,磁珠均一性、稳定性好。

[0006] 为实现上述目的,本发明的技术方案是包括以下步骤:

(1)带正电的聚乙酰亚胺修饰的聚苯乙烯微球的制备:以聚乙酰亚胺为稳定剂,乙醇为分散介质,偶氮二异丁氰为引发剂,将苯乙烯单体分散聚合为带正电聚乙酰亚胺修饰的聚苯乙烯微球;

(2)带负电的柠檬酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子的制备:在氮气气氛下,六水氯化铁和四水氯化亚铁溶于去离子水中,高温搅拌下加入氨水,柠檬酸钠水溶液,氮气冷却下制备出带负电柠檬酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子;

(3)磁性纳米粒子的合成:取步骤(1)的水溶液和步骤(2)的水溶液溶于去离子水中,采用磁力吸附,将吸附的沉淀分散到去离子水中,重复2-3次,加入去离子水,乙醇,氨水,四乙氧基硅烷,室温下反应10-15h,获得 $\text{PS} @ (\text{Fe}_3\text{O}_4)_3 @ \text{SiO}_2$ 磁性纳米粒子;

(4)免疫磁珠的合成:调节乙醇水溶液的pH至4.5-5.5,加入步骤(3)的产物,加入硅烷偶联剂对其表面改性,室温反应12-24h,溶解到PH为8-9的缓冲溶液中,加入免疫配基生物活性物质,搅拌温育,用PH为7-8的缓冲溶液磁力分离洗涤3次,保留上清液,加入牛血清蛋白或乙醇胺封闭,获得免疫磁珠。

[0007] 进一步设置是所述步骤(1)的带正电聚乙酰亚胺修饰的聚苯乙烯微球的制备条件为60-70°C下反应20-25h。

[0008] 进一步设置是所述的步骤(2)中六水氯化铁和四水氯化亚铁摩尔比为2:1。

[0009] 进一步设置是所述的步骤(3)带负电柠檬酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子的制

备条件为60-100°C,搅拌速度为800-1500r/min。

[0010] 进一步设置是所述的步骤(4)中的乙醇水溶液中乙醇的体积分数为80%-95%。

[0011] 进一步设置是所述的步骤(4)中硅烷偶联剂为以下物质中的一种: 3-缩水甘油丙基三甲氧基硅烷、 $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧基)丙基三甲氧基硅烷、氨丙基三乙氧基硅烷、氨丙基三甲氧基硅烷。

[0012] 进一步设置是所述的步骤(4)中的免疫配基为以下物质中的一种: 酶、抗体、抗原、DNA、RNA。

[0013] 进一步设置是所述的制备方法中各步骤的产物均用乙醇清洗2-4次。

[0014] 本发明的另一个目的是提供了一种应用于免疫检测的免疫磁珠,其结构为包括有PS@ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>磁性纳米粒子、以及偶联连接于PS@ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>磁性纳米粒子外的免疫配基。

[0015] 本发明的磁性纳米粒子含有SiO<sub>2</sub>,SiO<sub>2</sub>具有良好的化学稳定性,无毒,表面含有大量的羟基基团,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>表面包裹一层SiO<sub>2</sub>,能够减小磁性材料的磁偶极相互作用,阻止团聚,同时增加了磁性纳米粒子的稳定性和生物相容性。

[0016] 本发明的优点是本发明磁珠具有以下特点:

1. 制备磁珠的方法简单,聚苯乙烯微球尺寸可以设计,尺寸可以控制在几百个纳米到2  $\mu$ m左右。

[0017] 2.SiO<sub>2</sub>包裹性好,硅烷可选种类多样,易于修饰不同种类抗体, SiO<sub>2</sub>包裹性好,硅烷偶联剂可选择种类多样,根据连接的氨基、环氧基、羧基基团的不同,可以结合不同的免疫配基。

[0018] 3.稳定性好,检测灵敏度高。

[0019] 下面结合说明书附图和具体实施方式对本发明做进一步介绍。

#### 附图说明

[0020] 图1为本发明实例1中磁珠的扫描电镜图片;

图2为本发明实例1中磁珠的透射电镜图片;

图3为本发明实例1中磁珠的元素分析图。

#### 具体实施方式

[0021] 下面通过实施例对本发明进行具体的描述,只用于对本发明进行进一步说明,不能理解为对本发明保护范围的限定,该领域的技术工程师可根据上述发明的内容对本发明作出一些非本质的改进和调整。

[0022] 实施例1

(1)在烧瓶中加入126ml乙醇,10g聚苯乙烯,1g聚乙烯亚氨,通氮气0.5-1h,温度升至65°C搅拌反应,将重结晶的偶氮二异丁腈溶解到5ml乙醇中超声,将其快速加入到上述溶液中反应24h,将上述溶液用乙醇清洗3次后,溶解到水中。

[0023] (2)100ml的水中通入氮气20min,加入4.9g的六水氯化铁,通入氮气至六水氯化铁溶解,加入1.96g的四水氯化亚铁,搅拌速度为1000r/min,温度升至70°C下反应20min,快速搅拌下迅速加入20ml 25%的氨水,反应15min,加入5ml 0.5g/ml 的柠檬酸钠水溶液,温度

升至90℃,反应60min后停止加热,通入氮气冷却,用水洗1-3次。

[0024] (3)取5ml步骤(1)的水溶液,加入15ml去离子水,500 $\mu$ l步骤(2)的水溶液,震荡2-3min,磁力分离得到沉淀,将沉淀分散到20ml去离子水中,重复2次,将其溶于20ml去离子水中,加入70ml乙醇,1.5ml 25%的氨水,在快速搅拌下迅速加入0.1g的四乙氧基硅烷,室温下反应12h,用乙醇洗涤三次。

[0025] (4)95ml乙醇加入5ml水中,乙酸调节PH至4.5-5.5,加入步骤(3)的产物,5ml  $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷,室温400 r/min搅拌反应12-24h,用乙醇洗涤三次后保存到丙酮中或干燥,溶解到PH为8.6的缓冲溶液中,加入免疫球蛋白G抗体,在室温下搅拌温育2h后,在4℃下搅拌温育0.5h,用PH为7.4的缓冲溶液磁力分离洗涤3次,用5%的牛血清蛋白或乙醇胺封闭。

#### [0026] 实施例2

(1)在烧瓶中加入126ml乙醇,5g聚苯乙烯,0.5g聚乙烯亚氨,通氮气0.5-1h,温度升至65℃搅拌反应,将重结晶的偶氮二异丁腈溶解到5ml乙醇中超声,将其快速加入到上述溶液中反应24h,将上述溶液用乙醇清洗3次后,溶解到水中。

[0027] (2)100ml的水中通入氮气20min,加入4.9g的六水氯化铁,通入氮气至六水氯化铁溶解,加入1.96g的四水氯化亚铁,搅拌速度为1000r/min,温度升至70℃下反应20min,快速搅拌下迅速加入20ml 25%的氨水,反应15min,加入5ml 0.5g/ml 的柠檬酸钠水溶液,温度升至90℃,反应60min后停止加热,通入氮气冷却,用水洗1-3次。

[0028] (3)取5ml步骤(1)的水溶液,加入15ml去离子水,500 $\mu$ l步骤(2)的水溶液,震荡2-3min,磁力分离得到沉淀,将沉淀分散到20ml去离子水中,重复2次,将其溶于20ml去离子水中,加入70ml乙醇,1.5ml 25%的氨水,在快速搅拌下迅速加入0.1g的四乙氧基硅烷,室温下反应12h,用乙醇洗涤三次。

[0029] (4)将乙醇,水,3-缩水甘油丙基三甲氧基硅烷按照35:35:30的体积比混合,用乙酸调节PH低于4,将步骤(3)的产物溶于上述溶液中,室温下温育3h,用乙醇洗涤三次后保存到丙酮中或干燥,溶解到PH为8.6的缓冲溶液中,加入生物素化金黄色葡萄球菌多克隆抗体,在室温下搅拌温育2h后,在4℃下搅拌温育0.5h,用PH为7.4的缓冲溶液磁力分离洗涤3次,用5%的牛血清蛋白或乙醇胺封闭。

#### [0030] 实施例3

(1)在烧瓶中加入126ml乙醇,10g聚苯乙烯,1g聚乙烯亚氨,通氮气0.5-1h,温度升至65℃搅拌反应,将重结晶的偶氮二异丁腈溶解到5ml乙醇中超声,将其快速加入到上述溶液中反应24h,将上述溶液用乙醇清洗3次后,溶解到水中。

[0031] (2)100ml的水中通入氮气20min,加入4.9g的六水氯化铁,通入氮气至六水氯化铁溶解,加入1.96g的四水氯化亚铁,搅拌速度为1000r/min,温度升至70℃下反应20min,快速搅拌下迅速加入20ml 25%的氨水,反应15min,加入5ml 0.5g/ml 的柠檬酸钠水溶液,温度升至90℃,反应60min后停止加热,通入氮气冷却,用水洗1-3次。

[0032] (3)取5ml步骤(1)的水溶液,加入15ml去离子水,500 $\mu$ l步骤(2)的水溶液,震荡2-3min,磁力分离得到沉淀,将沉淀分散到20ml去离子水中,重复2次,将其溶于20ml去离子水中,加入70ml乙醇,1.5ml 25%的氨水,在快速搅拌下迅速加入0.1g的四乙氧基硅烷,室温下反应12h,用乙醇洗涤三次。

[0033] (4)95ml乙醇加入5ml水中,乙酸调节PH至4.5-5.5,加入步骤(4)的产物, 5ml氨丙基三乙氧基硅烷,室温400 r/min搅拌反应12-24h,用乙醇洗涤三次后保存到丙酮中或干燥溶解到PH为8.6的缓冲溶液中,加入生物素标记的DNA,在室温下搅拌温育2h后,在4℃下搅拌温育0.5h,用PH为7.4的缓冲溶液磁力分离洗涤3次,用5%的牛血清蛋白或乙醇胺封闭。

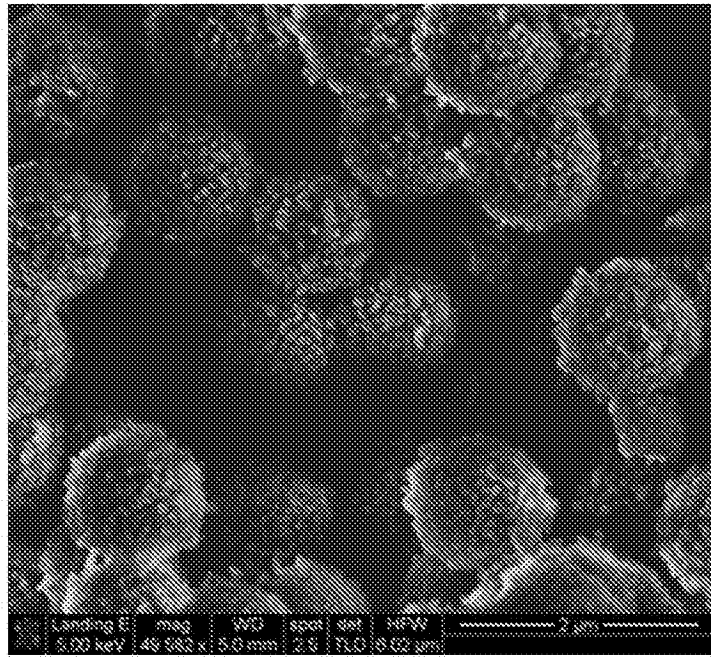


图1

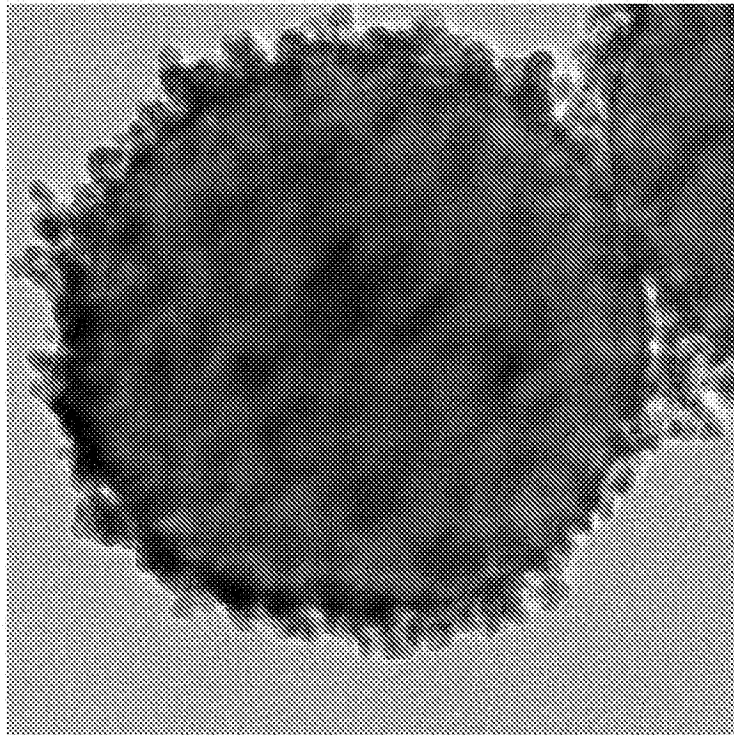


图2

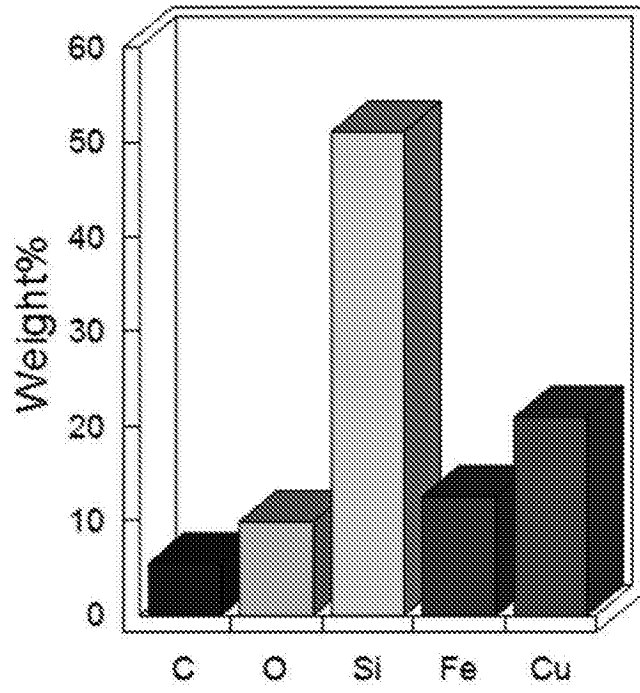


图3

专利名称(译)	一种应用于免疫检测的免疫磁珠及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105467112A</a>	公开(公告)日	2016-04-06
申请号	CN201510852133.6	申请日	2015-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	温州生物材料与工程研究所		
申请(专利权)人(译)	温州生物材料与工程研究所		
当前申请(专利权)人(译)	温州生物材料与工程研究所		
[标]发明人	周云龙 胡焯 雷海艳		
发明人	周云龙 胡焯 雷海艳		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N2446/60		
代理人(译)	陈加利		
其他公开文献	CN105467112B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种应用于免疫检测的免疫磁珠及其制备方法，本发明以聚苯乙烯为单体制备聚苯乙烯微球，以四水氯化亚铁和六水氯化铁为铁源制备四氧化三铁磁性纳米粒子，以四乙氧基硅烷为硅源制备PS(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>SiO<sub>2</sub>磁珠，与免疫配基生物活性物质偶联结合为免疫磁珠。本发明制备方法简单，成本低，磁珠大小可控，免疫磁珠检测灵敏度高。

