



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104914241 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201410096004. 4

(22) 申请日 2014. 03. 14

(71) 申请人 中国科学院过程工程研究所
地址 100190 北京市海淀区中关村北二条 1 号

(72) 发明人 张欣 代凤英

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332
代理人 巩克栋 侯桂丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 1/40(2006. 01)

G01N 1/34(2006. 01)

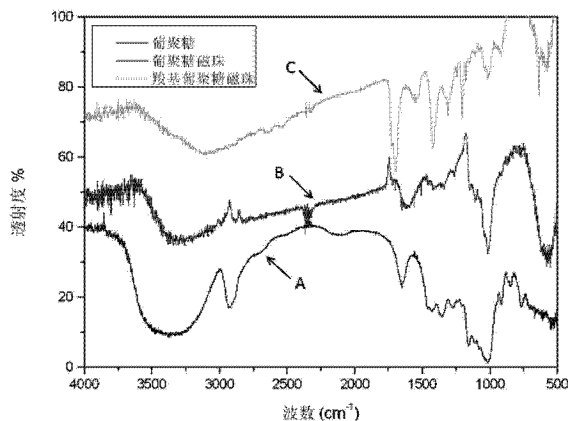
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种免疫磁珠及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫磁珠及其制备方法和应用。所述免疫磁珠包括磁性粒子内核和包被在所述磁性粒子内核外表面的羧基糖类,其中所述磁性粒子包括超顺磁性四氧化三铁。所述制备方法包括如下步骤:(1)磁珠的制备:使三价铁源、二价铁源和糖类在碱性溶液作用下共沉淀生成包含顺磁性四氧化三铁的磁性粒子,所述磁性粒子表面包被有糖类分子;(2)磁珠的羧基化:用多元酸酐与磁性粒子表面的糖类分子反应生成羧基糖类包被的免疫磁珠。本发明的免疫磁珠表面富含羧基,抗体固定效率高;且在检测缓冲液环境下粒度稳定性高。



1. 一种免疫磁珠,包括磁性粒子内核和包被在所述磁性粒子内核外表面的羧基糖类,其中所述磁性粒子包括超顺磁性四氧化三铁。

2. 根据权利要求1所述的免疫磁珠,其特征在于,所述糖类选自葡萄糖、果糖、葡聚糖、蔗糖和麦芽糖中的1种或至少2种的组合,优选葡萄糖、果糖和葡聚糖中的1种或至少2种的组合。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫磁珠,其特征在于,所述免疫磁珠的粒径介于20nm-3 μ m范围内,优选100nm-1 μ m范围内。

4. 一种制备权利要求1-3任一项所述的免疫磁珠的方法,包括如下步骤:

(1)磁珠的制备:使三价铁源、二价铁源和糖类在碱性溶液作用下共沉淀生成包含顺磁性四氧化三铁的磁性粒子,所述磁性粒子表面包被有糖类分子;

(2)磁珠的羧基化:用多元酸酐与磁性粒子表面的糖类分子反应生成羧基糖类包被的免疫磁珠。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述三价铁源与糖类的质量比为0.1:1~6:1,优选为1:1~4:1。

6. 根据权利要求4或5所述的方法,其特征在于,所述磁珠的制备在温度为60~95℃下进行,优选为80~90℃下进行;

优选地,所述共沉淀的反应时间为15分钟~1小时,优选为30分钟~45分钟;

优选地,所述共沉淀反应在惰性气体保护下进行。

7. 根据权利要求4-6任一项所述的方法,其特征在于,所述三价铁源选自氯化铁、硝酸铁和硫酸铁中的1种或至少2种的组合;

优选地,所述二价铁源选自氯化亚铁、硝酸亚铁和硫酸亚铁中的1种或至少2种的组合;

优选地,所述糖类选自葡萄糖、果糖、葡聚糖、蔗糖和麦芽糖中的1种或至少2种的组合,优选葡萄糖、果糖和葡聚糖中的1种或至少2种的组合;

优选地,所述碱性溶液选自氨水、氢氧化钠和氢氧化钾溶液中的1种或至少2种的组合;

优选地,所述氨水占反应液总重量的25-75%;

优选地,所述氢氧化钠和/或氢氧化钾占反应液总重量的0.5-5%;

优选地,所述步骤(1)生成的磁性粒子的粒径介于20nm-3 μ m范围内,优选100nm-1 μ m范围内。

8. 根据权利要求4-7任一项所述的方法,其特征在于,所述多元酸酐选自戊二酸酐、马来酸酐和丁二酸酐中的1种或至少2种的组合,优选丁二酸酐;

优选地,所述多元酸酐的用量按质量计为所述磁性粒子用量的1~5倍。

9. 根据权利要求4-8任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1)在惰性气体保护下,将以铁计浓度为1~10mg/mL的三价铁源和二价铁源的混合溶液与以糖分子计浓度为2~40mg/mL的糖类溶液混合,并升温到60~95℃;

(2)加入碱性溶液,在惰性气体保护下反应15分钟~1小时,生成包含顺磁性四氧化三铁的磁性粒子;

(3)将所述磁性粒子磁分离并清洗后,分散于水中制成分散液;

(4) 向所述分散液中加入相当于所述磁性粒子质量 1 ~ 5 倍的多元酸酐, 反应 3 ~ 24 小时得到羧基糖类包被的免疫磁珠。

10. 根据权利要求 1-3 任一项所述的免疫磁珠在食源性致病菌检测中的应用;

优选地, 所述应用为将检测用抗体和 / 或多肽分子固定在所述免疫磁珠表面用于食源性致病菌检测;

优选地, 所述食源性致病菌包括沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、志贺氏菌和大肠杆菌 0157。

一种免疫磁珠及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫磁珠技术领域,尤其涉及一种表面基团为羧基的免疫磁珠及其制备方法和其在食源性致病菌检测中的应用。

背景技术

[0002] 食源性致病菌检测免疫磁珠制备技术是将检测用抗体分子固定在磁性粒子表面,在外加磁场作用下,利用特异性识别结合作用将免疫磁珠以及捕获到的致病菌富集分离的技术。这一检测方法灵敏度高,且具有操作简单便捷的优势。

[0003] 在食源性致病菌检测分离用免疫磁珠中,采用羧基固定抗体分子的免疫磁珠应用较广。这类免疫磁珠多是将羧基材料(如聚丙烯酸)包裹在磁珠表面,利用免疫磁珠表面存在的大量自由羧基与多肽或者抗体结构中氨基反应,将抗体或者多肽固定在免疫磁珠表面。这种免疫磁珠表面大量自由羧基的存在利于提高抗体固定效率。但是也存在弊端,由于电荷屏蔽作用降低了粒子间斥力,单纯的聚丙烯酸包被的免疫磁珠在检测液体中粒度稳定性下降,易于发生粒子间团聚导致沉淀失去检测能力。

[0004] 为保证上述免疫磁珠粒度稳定性,免疫磁珠的表面自由羧基量受到一定限制。然而,羧基数量以及由之决定的抗体分子的固定量直接决定免疫分离识别效率。因此,在基于羧基磁珠的分离体系中,设法平衡磁珠粒度稳定性以及羧基数量相关的免疫分离效果极为重要。寻求一种制备简单的表面富含羧基并能维持检测缓冲液环境下粒度稳定性的羧基化磁珠成为目前免疫磁珠研究领域面临的难题之一。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供一种免疫磁珠及其制备方法和应用,所述免疫磁珠为羧基磁珠,其表面富含羧基,抗体固定效率高;并且所述免疫磁珠在检测缓冲液环境下粒度稳定性高。

[0006] 在第一方面,本发明提供一种免疫磁珠,包括磁性粒子内核和包被在所述磁性粒子内核外表面的羧基糖类,其中所述磁性粒子包括超顺磁性四氧化三铁。

[0007] 本发明的免疫磁珠中,超顺磁性四氧化三铁为免疫磁珠提供磁分离所需要的磁性,除此之外还可能在不影响磁性的情况下包含三氧化二铁或杂质成分。

[0008] 本发明的免疫磁珠中,羧基糖类分子中众多羟基的水合性能保证磁珠的水力学尺寸稳定性,能够长期稳定地分散在电解质溶液中,而不发生沉淀或团聚现象,例如本发明的尺寸为 30nm 的羧基葡聚糖免疫磁珠在磷酸缓冲液中能够维持长期(24 小时以上)稳定而不沉淀,而相同条件下尺寸相当的聚丙烯酸免疫磁珠在磷酸缓冲液中静置 2 小时就会完全沉淀至容器底部;同时糖类分子中部分羟基转化为羧基,利于抗体或多肽的高效固定。

[0009] 本发明的免疫磁珠中,糖类的作用在于一方面提供大量的羟基,其水合性能保证磁珠的水力学尺寸稳定性;另一方面部分羟基转化为羧基提供抗体或多肽固定所需要的位点。因此本发明中糖类的具体种类可以不做限定,只要具有大量羟基,并且部分羟基能够转

化为羧基即可。

[0010] 作为本发明的优选技术方案,所述糖类选自葡萄糖、果糖、葡聚糖、蔗糖和麦芽糖中的 1 种或至少 2 种的组合,所述组合典型并非限定性的实例比如葡萄糖和果糖的组合,葡萄糖和葡聚糖的组合,葡萄糖和蔗糖的组合,果糖和葡聚糖的组合,果糖和蔗糖的组合,果糖和麦芽糖的组合,蔗糖和麦芽糖的组合,葡萄糖、果糖和葡聚糖的组合,果糖、葡聚糖和蔗糖的组合,葡聚糖、蔗糖和麦芽糖的组合,等等;优选葡萄糖、果糖和葡聚糖中的 1 种或至少 2 种的组合。

[0011] 作为本发明的优选技术方案,所述免疫磁珠的粒径介于 20nm-3 μ m 范围内,例如 30nm、50nm、100nm、200nm、300nm、500nm、700nm、900nm、1.2 μ m、1.5 μ m、1.8 μ m、2.1 μ m、2.4 μ m、2.7 μ m、2.8 μ m、2.9 μ m、50nm-800nm 或 200nm-1.5 μ m,优选 100nm-1 μ m 范围内。免疫磁珠的粒径过大会造成沉淀或团聚现象的发生,分散性能差;免疫磁珠的粒径过小往往导致与抗体或多肽结合的困难,可能由于空间位阻效应。

[0012] 在第二方面,本发明提供一种制备第一方面所述的免疫磁珠的方法,包括如下步骤:

[0013] (1)磁珠的制备:使三价铁源、二价铁源和糖类在碱性溶液作用下共沉淀生成包含顺磁性四氧化三铁的磁性粒子,所述磁性粒子表面包被有糖类分子;

[0014] (2)磁珠的羧基化:用多元酸酐与磁性粒子表面的糖类分子反应生成羧基糖类包被的免疫磁珠。

[0015] 作为本发明的优选技术方案,所述三价铁源与糖类的质量比为 0.1:1~6:1,例如 0.1:1、0.2:1、0.5:1、0.8:1、1:1、1.2:1、1.5:1、2:1、3:1、4:1、5:1 或 5.8:1,优选为 1:1~4:1。如果三价铁源过多,会导致形成的磁性粒子不能被糖类充分包被,在免疫反应过程中可能会有不希望发生的非特异性结合;如果糖类过多可能会影响共沉淀反应的发生,导致不能形成良好的磁性粒子,并且也是不必要的浪费。

[0016] 作为本发明的优选技术方案,所述磁珠的制备在温度为 60~95 $^{\circ}$ C 下进行,例如在温度为 62 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、67 $^{\circ}$ C、69 $^{\circ}$ C、71 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C、78 $^{\circ}$ C、82 $^{\circ}$ C、88 $^{\circ}$ C、92 $^{\circ}$ C 或 94 $^{\circ}$ C 下进行,优选为 80~90 $^{\circ}$ C 下进行。

[0017] 作为本发明的优选技术方案,所述共沉淀的反应时间为 15 分钟~1 小时,例如 16 分钟、18 分钟、20 分钟、25 分钟、28 分钟、32 分钟、36 分钟、40 分钟、45 分钟、48 分钟、52 分钟、55 分钟或 58 分钟,优选为 30 分钟~45 分钟。

[0018] 作为本发明的优选技术方案,所述共沉淀反应在惰性气体保护下进行,所述惰性气体包括但不限于氮气、氦气、氖气和氩气中的 1 种或至少 2 种的组合。

[0019] 本发明中,所述三价铁源的作用在于提供反应所需要的三价铁离子,因此对于三价铁源的种类不做限定,可以是任何能够提供三价铁离子的含铁化合物。作为本发明的优选技术方案,所述三价铁源选自氯化铁、硝酸铁和硫酸铁中的 1 种或至少 2 种的组合;所述组合典型并非限定性的实例比如氯化铁和硝酸铁的组合,氯化铁和硫酸铁的组合,硝酸铁和硫酸铁的组合,氯化铁、硝酸铁和硫酸铁的组合。

[0020] 本发明中,所述二价铁源的作用在于提供反应所需要的亚铁离子,因此对于二价铁源的种类不做限定,可以是任何能够提供亚铁离子的含铁化合物。作为本发明的优选技术方案,所述二价铁源选自氯化亚铁、硝酸亚铁和硫酸亚铁中的 1 种或至少 2 种的组合;所

述组合典型并非限定性的实例比如氯化亚铁和硝酸亚铁的组合,氯化亚铁和硫酸的组合,硝酸亚铁和硫酸的组合,氯化亚铁、硝酸亚铁和硫酸的组合。

[0021] 作为本发明的优选技术方案,所述糖类选自葡萄糖、果糖、葡聚糖、蔗糖和麦芽糖中的 1 种或至少 2 种的组合,所述组合典型并非限定性的实例比如葡萄糖和果糖的组合,葡萄糖和葡聚糖的组合,葡萄糖和蔗糖的组合,果糖和葡聚糖的组合,果糖和蔗糖的组合,果糖和麦芽糖的组合,蔗糖和麦芽糖的组合,葡萄糖、果糖和葡聚糖的组合,果糖、葡聚糖和蔗糖的组合,葡聚糖、蔗糖和麦芽糖的组合,等等;优选葡萄糖、果糖和葡聚糖中的 1 种或至少 2 种的组合。

[0022] 本发明中,所述碱性溶液的作用在于为共沉淀反应提供碱性环境,因此对于碱性溶液的具体选择可以不做限定。作为本发明的优选技术方案,所述碱性溶液选自氨水、氢氧化钠和氢氧化钾溶液中的 1 种或至少 2 种的组合;所述组合典型并非限定性的实例比如氨水和氢氧化钾溶液的组合,氨水和氢氧化钠溶液的组合,氢氧化钠和氢氧化钾溶液的组合,氨水、氢氧化钠和氢氧化钾溶液的组合。如果用氨水作为碱性溶液,所述氨水占反应液总重量的 25-75% 能够取得比较好的效果;如果用氢氧化钠和 / 或氢氧化钾溶液作为碱性溶液,所述氢氧化钠和 / 或氢氧化钾占反应液总重量的 0.5-5% 能够取得比较好的效果。

[0023] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(1)生成的磁性粒子的粒径介于 20nm-3 μm 范围内,例如 30nm、50nm、100nm、200nm、300nm、500nm、700nm、900nm、1.2 μm、1.5 μm、1.8 μm、2.1 μm、2.4 μm、2.7 μm、2.8 μm、2.9 μm、50nm-800nm 或 200nm-1.5 μm,优选 100nm-1 μm 范围内。免疫磁珠的粒径过大会造成沉淀或团聚现象的发生,分散性能差;免疫磁珠的粒径过小往往导致与抗体或多肽结合的困难,可能由于空间位阻效应。

[0024] 作为本发明的优选技术方案,所述多元酸酐选自戊二酸酐、马来酸酐和丁二酸酐中的 1 种或至少 2 种的组合,所述组合典型并非限定性的实例比如戊二酸酐和丁二酸酐的组合,戊二酸酐和马来酸酐的组合,马来酸酐和丁二酸酐的组合,戊二酸酐、马来酸酐和丁二酸酐的组合,优选丁二酸酐。

[0025] 作为本发明的优选技术方案,所述多元酸酐的用量按质量计为所述磁性粒子用量的 1~5 倍,比如 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.5 倍、1.7 倍、1.9 倍、2.1 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.2 倍、4.5 倍、4.7 倍、4.8 倍或 4.9 倍。如果多元酸酐的用量偏少,会导致羧基化不充分,提供给抗体或多肽结合的羧基位点偏少,影响固定效率;如果多元酸酐的用量偏多,会导致羧基化过量,虽然提供给抗体或多肽结合的羧基位点多,但是其水合性能会受到影响,导致磁珠的水力学尺寸稳定性降低。

[0026] 作为本发明的优选技术方案,所述方法包括如下步骤:

[0027] (1)在惰性气体保护下,将以铁计浓度为 1~10mg/mL 的三价铁源和二价铁源的混合溶液与以糖分子计浓度为 2~40mg/mL 的糖类溶液混合,并升温到 60~95℃;

[0028] (2)加入碱性溶液,在惰性气体保护下反应 15 分钟~1 小时,生成包含顺磁性四氧化三铁的磁性粒子;

[0029] (3)将所述磁性粒子磁分离并清洗后,分散于水中制成分散液;

[0030] (4)向所述分散液中加入相当于所述磁性粒子质量 1~5 倍的多元酸酐,反应 3~24 小时得到羧基糖类包被的免疫磁珠。

[0031] 其中,步骤(3)中清洗可以使用蒸馏水、去离子水或双蒸水等多次进行,比如重复

清洗 3 ~ 5 次;步骤(4)反应完成后,可以反复清洗 3 ~ 5 次后得到较纯的免疫磁珠。

[0032] 上述方法获得的羧基磁珠分散在超纯水中,通过碳二亚胺和琥珀酰亚胺活化羧基后可以与抗体或多肽连接,用于食源性致病菌检测。

[0033] 在第三方面,本发明提供第一方面所述的免疫磁珠在食源性致病菌检测中的应用。

[0034] 具体地,可以将检测用抗体和 / 或多肽分子固定在所述免疫磁珠表面用于食源性致病菌检测。

[0035] 所述食源性致病菌包括但不限于沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、志贺氏菌和大肠杆菌 O157。

[0036] 本发明的有益效果为:

[0037] 本发明的免疫磁珠,通过将包被到磁性粒子表面的糖类分子的部分羟基转化为羧基,利于抗体或多肽的高效固定;同时羧基糖类分子中众多羟基的水合性能保证磁珠的水力学尺寸稳定性,能够长期稳定地分散在电解质溶液中,而不发生沉淀或团聚现象。

附图说明

[0038] 图 1 为本发明实施例 1 制备的羧基葡聚糖磁珠磁分离前后对照图,其中左图为磁分离前的情况,羧基葡聚糖磁珠均匀分散在溶液中,稳定性好,没有沉淀或团聚现象;右图为磁分离后的情况,羧基葡聚糖磁珠在磁铁施加的磁场作用下贴壁,溶液呈澄清透明,可见羧基葡聚糖磁珠的磁性良好。

[0039] 图 2 为本发明实施例 1 制备的羧基葡聚糖磁珠的红外傅里叶变换光谱图,其中曲线 A 为葡聚糖的红外傅里叶变换光谱曲线,曲线 B 为葡聚糖磁珠的红外傅里叶变换光谱曲线,曲线 C 为羧基葡聚糖磁珠的红外傅里叶变换光谱曲线。

[0040] 图 3 为本发明实施例 1 制备的羧基葡聚糖磁珠固定沙门氏菌抗体的捕获效率与目前市场上的 Dynal 磁珠的捕获效率的对比结果。

具体实施方式

[0041] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,以下实施例仅为本发明的优选实施例,以便于更好地理解本发明,因而不应视为限定本发明的范围。

[0042] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所用的实验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂厂商购买得到的。

[0043] 实施例 1

[0044] 称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 350mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300mg, 超纯水溶制成有 40mL 溶液,再称取 1.0g 葡聚糖 T7 (分子量 7000), 加水制成 50mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶,一斜口通氮气,另一斜口排出空气,直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中,再量取 50mL 氨水,从斜口倒入三口烧瓶中,溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中,调整温度至 80°C , 调整转速为 1000rpm, 持续通氮气,反应 35 分钟。反应完成后,溶液呈乌黑色,无明显大块沉淀。反复磁分离水洗重复三次后,重新分散于去离子水中,得到葡聚糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 30mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四

氧化三铁颗粒 100mg) 溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 450mg 丁二酸酐溶于装有 20mL 溶剂二甲基甲酰胺(DMF)的离心管中,将溶液倒入单口烧瓶中,通氮气排空气,加盖子封口,置于 40℃磁力搅拌油浴锅中,持续搅拌反应 12h。反应结束后,将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例制备的磁珠尺寸在 200-300nm 之间,具有超顺磁性。

[0045] 实施例 2

[0046] 称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 350mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300mg, 超纯水溶制成有 40mL 溶液, 再称取 0.7g 葡聚糖 T7 (分子量 7000), 加水制成 50mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶, 一斜口通氮气, 另一斜口排出空气, 直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中, 再量取 50mL 氨水, 从斜口倒入三口烧瓶中, 溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中, 调整温度至 80℃, 调整转速为 500rpm, 持续通氮气, 反应 35 分钟。反应完成后, 溶液呈乌黑色。反复磁分离水洗重复三次后, 重新分散于去离子水中, 得到葡聚糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 30mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四氧化三铁颗粒 100mg)溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 450mg 丁二酸酐溶于装有 20mL 溶剂 DMF 的离心管中, 将溶液倒入单口烧瓶中, 通氮气排空气, 加盖子封口, 置于 40℃磁力搅拌油浴锅中, 持续搅拌反应 12h。反应结束后, 将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例制备的磁珠尺寸在 300-500nm 之间, 具有超顺磁性。

[0047] 实施例 3

[0048] 称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 350mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300mg, 超纯水溶制成有 40mL 溶液, 再称取 0.6g 葡萄糖, 加水制成 50mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶, 一斜口通氮气, 另一斜口排出空气, 直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中, 再量取 50mL 氨水, 从斜口倒入三口烧瓶中, 溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中, 调整温度至 80℃, 调整转速为 500rpm, 持续通氮气, 反应 35 分钟。反应完成后, 溶液呈乌黑色, 无明显大块沉淀。反复磁分离水洗重复三次后, 再分散于去离子水中, 得到葡萄糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 30mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四氧化三铁颗粒 100mg)溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 450mg 丁二酸酐溶于装有 20mL 溶剂 DMF 的离心管中, 将溶液倒入单口烧瓶中, 通氮气排空气, 加盖子封口, 置于 40℃磁力搅拌油浴锅中, 持续搅拌反应 12h。反应结束后, 将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例所制备的磁珠尺寸在 100nm-300nm 之间, 具有超顺磁性。

[0049] 实施例 4

[0050] 称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 350mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300mg, 超纯水溶制成有 40mL 溶液, 再称取 0.2g 葡萄糖, 加水制成 50mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶, 一斜口通氮气, 另一斜口排出空气, 直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中, 再量取 50mL 氨水, 从斜口倒入三口烧瓶中, 溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中, 调整温度至 80℃, 调整转速为 500rpm, 持续通氮气, 反应 35 分钟。反应完成后, 溶液呈乌黑色。反复磁分离水洗重复三次后, 再分散于去离子水中, 得到葡萄糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 30mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四氧化三铁颗粒 100mg)溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 450mg 丁二酸酐溶于装有 20mL 溶剂 DMF 的离心管中, 将溶液倒入

单口烧瓶中,通氮气排空气,加盖子封口,放于 40℃磁力搅拌油浴锅中,持续搅拌反应 12h。反应结束后,将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例所制备的磁珠尺寸在 600nm-800nm 之间,具有超顺磁性。

[0051] 实施例 5

[0052] 称取 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 700mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 600mg,超纯水溶制成有 40mL 溶液,再称取 1.5g 葡聚糖 T10 (分子量 10000D),加水制成 50mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶,一斜口通氮气,另一斜口排出空气,直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中,再量取 50mL 氢氧化钠溶液(氢氧化钠质量浓度 5%),从斜口倒入三口烧瓶中,溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中,调整温度至 60℃,调整转速为 1000rpm,持续通氮气,反应 60 分钟。反应完成后,溶液呈乌黑色,无明显大块沉淀。反复磁分离水洗重复三次后,重新分散于去离子水中,得到葡聚糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 30mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四氧化三铁颗粒 120mg)溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 600mg 马来酸酐溶于装有 20mL 溶剂二甲基甲酰胺(DMF)的离心管中,将溶液倒入单口烧瓶中,通氮气排空气,加盖子封口,放于 40℃磁力搅拌油浴锅中,持续搅拌反应 24h。反应结束后,将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例制备的磁珠尺寸在 100-200nm 之间,具有超顺磁性。

[0053] 实施例 6

[0054] 称取 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 800mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 620mg,超纯水溶制成有 40mL 溶液,再称取 0.2g 葡聚糖 T7 (分子量 7000),加水制成 50mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶,一斜口通氮气,另一斜口排出空气,直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中,再量取 50mL 氢氧化钾溶液(氢氧化钾质量浓度 2%),从斜口倒入三口烧瓶中,溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中,调整温度至 90℃,调整转速为 500rpm,持续通氮气,反应 15 分钟。反应完成后,溶液呈乌黑色。反复磁分离水洗重复三次后,重新分散于去离子水中,得到葡聚糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 30mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四氧化三铁颗粒 150mg)溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 150mg 戊二酸酐溶于装有 20mL 溶剂 DMF 的离心管中,将溶液倒入单口烧瓶中,通氮气排空气,加盖子封口,放于 60℃磁力搅拌油浴锅中,持续搅拌反应 3h。反应结束后,将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例制备的磁珠尺寸在 700-1000nm 之间,具有超顺磁性。

[0055] 实施例 7

[0056] 称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 85mg,超纯水溶制成有 10mL 溶液,再称取 1.0g 果糖,加水制成 25mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶,一斜口通氮气,另一斜口排出空气,直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中,再量取 50mL 氨水,从斜口倒入三口烧瓶中,溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中,调整温度至 80℃,调整转速为 500rpm,持续通氮气,反应 30 分钟。反应完成后,溶液呈乌黑色,无明显大块沉淀。反复磁分离水洗重复三次后,再分散于去离子水中,得到葡萄糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 30mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四氧化三铁颗粒 30mg)溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 60mg 丁二酸酐溶于装有 20mL 溶剂 DMF 的离心管中,将溶液倒入单口烧瓶中,通氮气排空气,加盖子封口,放于 40℃磁力搅拌油浴锅中,持续搅拌

反应 15h。反应结束后,将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例所制备的磁珠尺寸在 100nm-200nm 之间,具有超顺磁性。

[0057] 实施例 8

[0058] 称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 700mg, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 600mg, 超纯水溶制成有 200mL 溶液, 再称取 0.1g 葡萄糖, 加水制成 50mL 溶液。取 250mL 三口圆底烧瓶, 一斜口通氮气, 另一斜口排出空气, 直口中插入机械搅拌器的搅拌棒。将铁盐溶液和糖类溶液依次从斜口倒入三口烧瓶中, 再量取 50mL 氨水, 从斜口倒入三口烧瓶中, 溶液立即变成乌黑色。将三口烧瓶放在水浴锅中, 调整温度至 95°C , 调整转速为 500rpm, 持续通氮气, 反应 15 分钟。反应完成后, 溶液呈乌黑色。反复磁分离水洗重复三次后, 再分散于去离子水中, 得到葡萄糖包覆的四氧化三铁磁珠。量取上述 50mL 葡聚糖包覆的磁珠液体(含四氧化三铁颗粒 80mg) 溶液加入到 100mL 的圆底单口烧瓶中。称取 240mg 丁二酸酐溶于装有 20mL 溶剂 DMF 的离心管中, 将溶液倒入单口烧瓶中, 通氮气排空气, 加盖子封口, 放于 40°C 磁力搅拌油浴锅中, 持续搅拌反应 12h。反应结束后, 将磁珠产物磁分离水洗分离三次后保存在无菌磷酸缓冲液中待用。本实施例所制备的磁珠尺寸在 800nm-1000nm 之间, 具有超顺磁性。

[0059] 试验例 1

[0060] 为确认实施例 1 制备的羧基葡聚糖磁珠结构, 取冻干后的羧基葡聚糖磁珠约 10mg, 压片后使用傅里叶变换红外光谱仪进行红外分析, 以葡聚糖和葡聚糖磁珠作为对照。图 2 为红外傅里叶变换光谱图, 对其红外光谱特征峰与官能团归属分析如下: 3050cm^{-1} 、 3276cm^{-1} 和 3120cm^{-1} : -OH 伸缩振动峰; 1700cm^{-1} : C=O 的伸缩振动峰; 1360cm^{-1} 和 1410cm^{-1} : 甲基和亚甲基弯曲振动峰; 990cm^{-1} 、 1000cm^{-1} 和 1010cm^{-1} : C-O 伸缩振动峰; 555cm^{-1} 和 574cm^{-1} : Fe-O 伸缩振动峰; 从图中可以得到羟基、羧基等官能团特征峰, 确认为羧基葡聚糖包裹的四氧化三铁磁珠结构。

[0061] 实施例 2-7 制得的羧基糖类免疫磁珠采用相同方法分析得知, 其各自得到的包被羧基糖类的免疫磁珠与预期得到的结果相同。

[0062] 试验例 2

[0063] 本试验例用免疫捕获实验证实本发明实施例 1 制备的羧基葡聚糖磁珠具有较高的捕获效率。其具体操作如下:

[0064] 分别取等量羧基糖类磁珠以及商品 Dynal 磁珠(购自 Life Technologies) 加入到 2 毫升离心管中, 用 $30\ \mu\text{L}$ 磷酸缓冲液清洗 3 次, 磁分离后移除上清。分别用 4°C 存储的 10mM PBS (pH=6.0) 溶液配制 5mg/mL 碳二亚胺(EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 溶液; 经注射过滤器除菌待用。分别加入 $15\ \mu\text{L}$ EDC 再加入 $15\ \mu\text{L}$ NHS 溶液混匀后, 恒温振荡器下 37°C 100rpm 活化反应 30min。磁分离移除上清, 再用 $30\ \mu\text{L}$ PBST 清洗 3 次, 磁分离, 移除上清。用 $30\ \mu\text{L}$ LPBS (pH=7.4) 重悬磁球。向其中加入 $10\ \mu\text{L}$ 1mg/mL 沙门抗体和 $60\ \mu\text{L}$ PBS, 于 37°C 水浴震荡 140rpm 下反应 3h。吸取上清, 下沉用 $30\ \mu\text{L}$ PBS 缓冲液清洗 3 次, 进行磁分离, 取走上清。加入 $30\ \mu\text{L}$ PBS 清洗 3 次, 磁分离后弃上清。去磁场后, 各加 1mL $1 \times$ PBS 冲洗离心管壁上的菌体-免疫磁球, 打散成浑浊溶液, 进行微生物平板培养, 36°C 下经过 24h 后对菌落计数。同时将原混合菌平板培养计数。通过比较捕获前后的培养物计算免疫磁球捕获率。具体地, 免疫捕获效率 y : 通过平板培养计数, 利用公式 $y=b/(a+b)$ 计算磁分离效率(其中, a 表示上清液菌落数; b 表示下沉液菌落数), 对 $10^2\text{CFU}/\mu\text{L}$ 浓度目标菌的免疫磁

球微生物捕获结果进行分析。结果如图 3 所示,可见本发明实施例 1 制备的羧基葡聚糖磁珠相比商品 Dynal 磁珠具有较高的捕获效率。

[0065] 实施例 2-7 制得的羧基糖类免疫磁珠用相同方法分析其捕获效率,均显示比商品 Dynal 磁珠具有较高的捕获效率。

[0066] 试验例 3

[0067] 将本发明上述实施例制备的羧基免疫磁珠与相同条件下尺寸相当的聚丙烯酸免疫磁珠在磷酸缓冲液中静置,发现本发明上述实施例制备的羧基免疫磁珠在磷酸缓冲液中能够维持长期(3-30 小时不等)稳定而不沉淀或团聚,而聚丙烯酸免疫磁珠一般 2 小时就会完全沉淀至容器底部,说明本发明制备的羧基免疫磁珠比同类羧基免疫磁珠具有更好的水力学尺寸稳定性。

[0068] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细特征以及详细方法,但本发明并不局限于上述详细特征以及详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细特征以及详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明选用组分的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

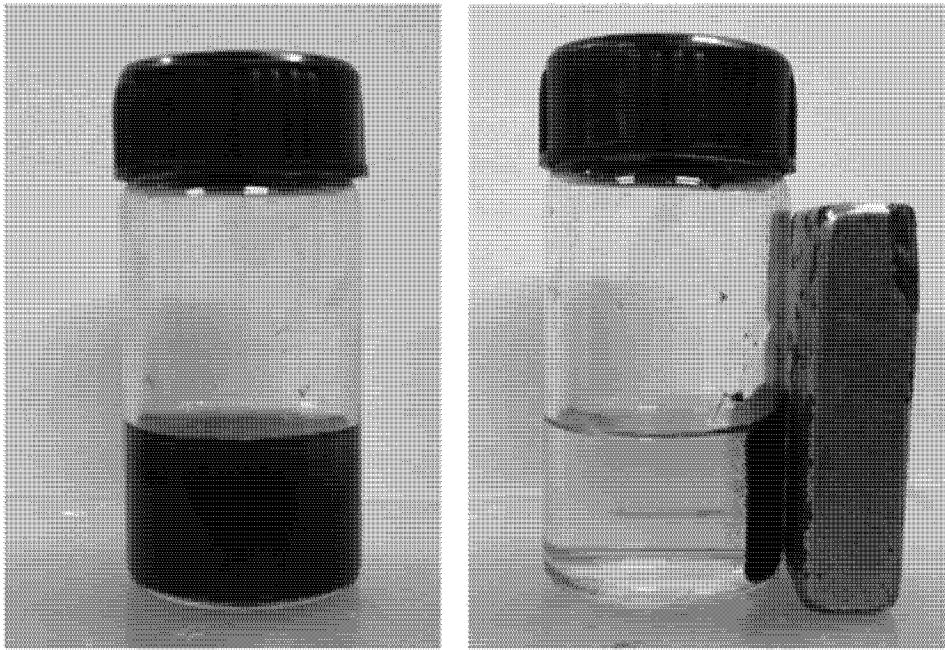


图 1

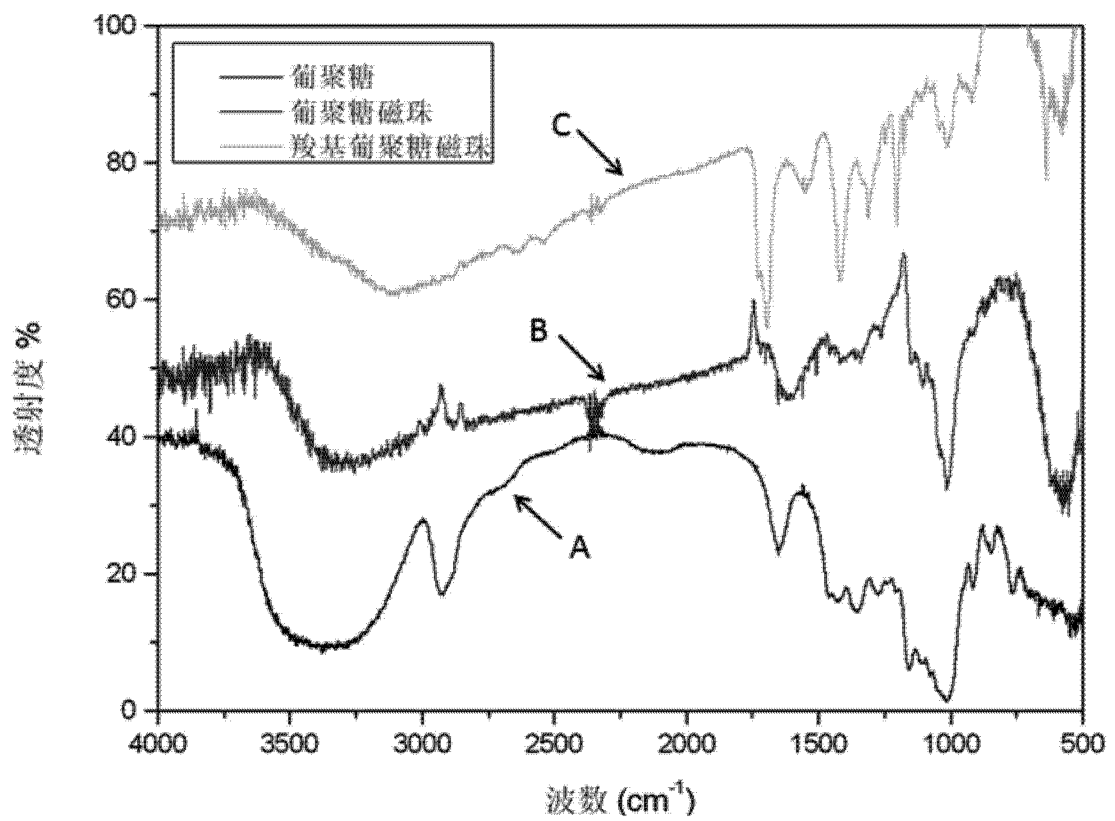


图 2

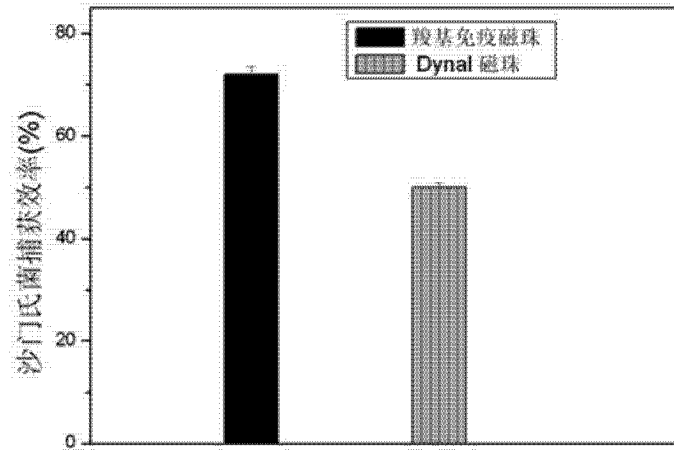


图 3

专利名称(译)	一种免疫磁珠及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104914241A	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201410096004.4	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院过程工程研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院过程工程研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院过程工程研究所		
[标]发明人	张欣 代凤英		
发明人	张欣 代凤英		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N1/40 G01N1/34		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/531 G01N33/56911		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫磁珠及其制备方法和应用。所述免疫磁珠包括磁性粒子内核和包被在所述磁性粒子内核外表面的羧基糖类，其中所述磁性粒子包括超顺磁性四氧化三铁。所述制备方法包括如下步骤：(1)磁珠的制备：使三价铁源、二价铁源和糖类在碱性溶液作用下共沉淀生成包含顺磁性四氧化三铁的磁性粒子，所述磁性粒子表面包被有糖类分子；(2)磁珠的羧基化：用多元酸酐与磁性粒子表面的糖类分子反应生成羧基糖类包被的免疫磁珠。本发明的免疫磁珠表面富含羧基，抗体固定效率高；且在检测缓冲液环境下粒度稳定性高。

