



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106680486 B

(45)授权公告日 2018.07.20

(21)申请号 201710054241.8

(22)申请日 2017.01.24

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106680486 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(73)专利权人 广东顺德工业设计研究院(广东  
顺德创新设计研究院)  
地址 528300 广东省佛山市顺德区北滘镇  
广东工业设计城设计广场二期B2区三  
层

(72)发明人 唐平

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理  
有限公司 44224  
代理人 王雯雯 万志香

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

C12N 5/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 106310257 A,2017.01.11,

CN 104914241 A,2015.09.16,

CN 105301030 A,2016.02.03,

CN 105903013 A,2016.08.31,

CN 102879564 A,2013.01.16,

CN 101553889 A,2009.10.07,

WO 2007114758 A1,2007.10.11,

US 4452773 A,1984.06.05,

US 2002000398 A1,2002.01.03,

审查员 黄晓丽

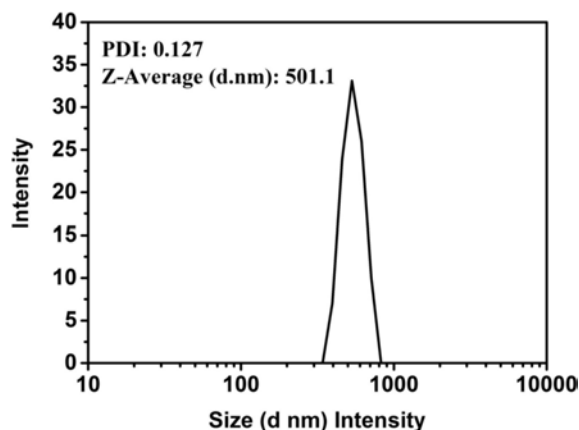
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

免疫磁珠的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种免疫磁珠的制备方法。该制备方法包括以下步骤:1)将铁盐、分解促进剂、亲水性高分子及油酸加入到溶剂中溶解,得到混合溶液;2)将上述混合溶液在180℃-250℃的温度条件下反应5分钟-30分钟后冷却,得到含有反应产物的冷却溶液;3)将所述冷却溶液中的反应产物洗涤后得到免疫磁珠;其中,制备过程中铁盐、分解促进剂、油酸、溶剂和亲水性高分子的用量比为(1.5-2.5)mmol:(8-12)mmol:(4-8)mmol:(15-30)ml:(0.05-1.5)g。该方法制备的免疫磁珠分散性好、粒径分布均匀且不易团聚。



1. 一种免疫磁珠的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将铁盐、分解促进剂、亲水性高分子及油酸加入到溶剂中溶解,得到混合溶液;

2) 将所述混合溶液于180℃-250℃的温度条件下反应5分钟-30分钟后冷却,得到含有反应产物的冷却溶液;

3) 将所述冷却溶液中的反应产物洗涤后得到免疫磁珠;

其中,制备过程中铁盐、分解促进剂、油酸、溶剂和亲水性高分子的用量比为(1.5-2.5) mmol:(8-12) mmol:(4-8) mmol:(15-30) ml:(0.05-1.5) g;

所述亲水性高分子为葡聚糖、羧基葡聚糖和羧甲基壳聚糖的一种或多种;

所述铁盐为三乙酰丙酮铁和草酸铁的一种或两种。

2. 根据权利要求1所述的免疫磁珠的制备方法,其特征在于,所述分解促进剂为1,2-十六烷二醇和1,12-十二烷二醇的一种或两种。

3. 根据权利要求1所述的免疫磁珠的制备方法,其特征在于,所述溶剂为二苯醚和乙二醇苯醚的一种或两种。

4. 根据权利要求1所述的免疫磁珠的制备方法,其特征在于,所述步骤1)还包括加入油胺溶解的步骤,所述油胺与所述油酸的摩尔比为(4-8) mmol:(4-8) mmol。

5. 根据权利要求1所述的免疫磁珠的制备方法,其特征在于,所述步骤2)还包括通入氮气进行保护反应的步骤。

6. 根据权利要求1所述的免疫磁珠的制备方法,其特征在于,所述步骤3)的具体过程是:向所述冷却溶液中加入去离子水,搅拌后静置得到分层溶液,将所述分层溶液中的反应产物取出进行洗涤,洗涤过程中用磁铁吸附所述反应产物,倒出洗涤液,即得免疫磁珠。

7. 根据权利要求6所述的免疫磁珠的制备方法,其特征在于,所述分层溶液包括有机溶液和水溶液两层,将所述有机溶液和所述水溶液中的反应产物分别取出进行洗涤,其中,所述有机溶液中的反应产物用乙醇洗涤,所述水溶液中的反应产物用去离子水洗涤。

## 免疫磁珠的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫磁珠技术领域,特别是涉及一种免疫磁珠的制备方法。

### 背景技术

[0002] 免疫磁珠(IMB)技术是一种以特异的抗原抗体反应为基础的免疫学检测和分离技术。它是以抗体包被的磁珠为载体,用过抗体与反应介质中特异性抗原结合,形成抗原-抗体复合物,此复合物在外加磁场的作用下发生定向移动,从而达到分离抗原的目的。免疫磁珠(IMB)是一种均匀、具有超顺磁性及保护性壳的球形小粒子,由载体微球和免疫配基结合而成,其中载体微球包含磁性物质和高分子层。

[0003] 当免疫磁珠(IMB)技术应用于细胞分离和DNA、RNA提取技术领域时。需要免疫磁珠(IMB)在水中具有较好的分散性。

[0004] 免疫磁珠一般采用水热法、共沉淀法或溶剂热法制备。但该类传统方法制备的免疫磁珠分散性差、粒径不均匀且易团聚。

### 发明内容

[0005] 基于此,有必要提供一种分散性好、粒径均匀且不易团聚的免疫磁珠的制备方法。

[0006] 一种免疫磁珠的制备方法,包括如下步骤:

[0007] 1) 将铁盐、分解促进剂、亲水性高分子及油酸加入到溶剂中溶解,得到混合溶液;

[0008] 2) 将所述混合溶液在180℃-250℃的温度条件下反应5分钟-30分钟后冷却,得到含有反应产物的冷却溶液;

[0009] 3) 将所述冷却溶液中的反应产物洗涤后得到免疫磁珠;

[0010] 其中,制备过程中铁盐、分解促进剂、油酸、溶剂和亲水性高分子的用量比为(1.5-2.5) mmol:(8-12) mmol:(4-8) mmol:(15-30) ml:(0.05-1.5) g。

[0011] 在其中一个实施例中,所述铁盐为三乙酸丙酮酸和草酸铁的一种或两种。

[0012] 在其中一个实施例中,所述分解促进剂为1,2-十六烷二醇和1,12-十二烷二醇的一种或两种。

[0013] 在其中一个实施例中,所述亲水性高分子包含羟基、羧基或氨基亲水基团的一种或多种。

[0014] 在其中一个实施例中,所述亲水性高分子为葡聚糖、羧基葡聚糖和羧甲基壳聚糖的一种或多种。

[0015] 在其中一个实施例中,所述溶剂为二苯醚和乙二醇苯醚的一种或两种。

[0016] 在其中一个实施例中,所述步骤1)还包括加入油胺溶解的步骤,所述油胺与所述油酸的摩尔比为(4-8) mmol:(4-8) mmol。

[0017] 在其中一个实施例中,所述步骤2)还包括通入氮气进行保护反应的步骤。

[0018] 在其中一个实施例中,所述步骤3)的具体过程是:向所述冷却溶液中加入去离子水,搅拌后静置得到分层溶液,将所述分层溶液中的反应产物取出进行洗涤,洗涤过程中用

磁铁吸附所述反应产物,倒出洗涤液,即得免疫磁珠。

[0019] 在其中一个实施例中,所述分层溶液包括有机溶液和水溶液两层,将所述有机溶液和所述水溶液中的反应产物分别取出进行洗涤,其中,所述有机溶液中的反应产物用乙醇洗涤,所述水溶液中的反应产物用去离子水洗涤。

[0020] 在制备过程中,通过加入亲水性高分子,且严格控制铁盐、分解促进剂、油酸、溶剂和亲水性高分子的用量比为(1.5-2.5) mmol:(8-12) mmol:(4-8) mmol:(15-30) ml:(0.05-1.5) g,于180°C-250°C的温度条件下反应5分钟-30分钟。该反应条件下,铁盐分解生成的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性颗粒与亲水性高分子的热运动加剧,有利于亲水性高分子包覆在磁性颗粒表面,并且亲水性高分子易于Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性颗粒表面形成氢键进而稳定的键合在一起。该方法制备的免疫磁珠具有粒径分布均匀、不易团聚且较好的分散性,可以用于细胞分离和DNA、RNA提取等生物技术领域。

### 附图说明

[0021] 图1为本发明一实施例制备的免疫磁珠的粒度分布图;

[0022] 图2为本发明一实施例制备的免疫磁珠的扫描电镜图;

[0023] 图3为本发明一实施例制备的免疫磁珠与葡萄糖的红外光谱对比图;

[0024] 图4为本发明一实施例制备的免疫磁珠的粒径分布图。

### 具体实施方式

[0025] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。

[0026] 一实施方式中制备免疫磁珠的方法包括以下步骤:

[0027] 1) 称取一定量的铁盐、分解促进剂、亲水性高分子、油酸及油胺加入到溶剂中,通过搅拌将上述原料在溶剂中混合均匀、溶解得到混合溶液。

[0028] 其中,铁盐、分解促进剂、油酸、溶剂和亲水性高分子的用量比为(1.5-2.5) mmol:(8-12) mmol:(4-8) mmol:(15-30) ml:(0.05-1.5) g。

[0029] 铁盐是含有三价铁离子的盐,铁盐热分解后用于生成四氧化三铁或三氧化二铁颗粒。具体地,铁盐为三乙酸丙酮铁或草酸铁中的一种或两种。

[0030] 分解促进剂用于促进铁盐的分解,具体地,分解促进剂为1,2-十六烷二醇或1,12-十二烷二醇的一种或两种。

[0031] 亲水性高分子能溶解或溶胀于水中形成水溶液或分散体系,在水溶性聚合物的分子结构中含有大量的亲水基团。亲水性高分子可以用于免疫磁珠颗粒的表面包裹层。具体地,亲水性高分子包含羟基、羧基或氨基等亲水基团。更具体地,亲水性高分子为葡聚糖、羧基葡聚糖和羧甲基壳聚糖的一种或多种。

[0032] 溶剂用于溶化固体、液体或气体溶质进而成为溶液。具体地,溶剂的沸点要高于上述铁盐的分解温度。更具体地,溶剂为二苯醚和乙二醇苯醚等溶剂的一种或多种。

[0033] 可以理解,在其他实施方式中,步骤1)中还可以加入油胺,其中油胺与油酸的用量比为(4-8) mmol:(4-8) mmol。

[0034] 2) 将步骤1)得到的混合溶液放入三口烧瓶中,加热至180℃-250℃的温度反应5分钟-30分钟,至铁盐分解,将反应温度自然降至室温,得到含有反应产物的冷却溶液。在一个实施例中,加热至190℃-220℃的温度反应8分钟-25分钟,可以通过调节反应温度和保温时间来控制所得产物的粒径及分散性。

[0035] 可以理解,在其他实施方式中,步骤2)中还包括通入氮气进行保护反应的步骤。

[0036] 3) 将步骤2)中得到冷却溶液中分反应产物洗涤后得到免疫磁珠;

[0037] 可以理解,在其他实施方式中,所述步骤3)中冷却后的溶液中加入去离子水,搅拌后静置得到分层溶液,将分层溶液中的反应产物取出进行洗涤,洗涤过程中用磁铁吸附所述反应产物,倒出洗涤液,即得免疫磁珠。

[0038] 具体地,上述分层溶液包括有机溶液和水溶液两层,分别将有机溶液和水溶液中的反应产物取出进行洗涤,其中,有机溶液中的反应产物用乙醇洗涤,水溶液中的反应产物用水洗涤,再将洗涤后的反应产物混合使用去离子水洗涤数次,将所得免疫磁珠分散在去离子水中保存。

[0039] 在制备过程中,通过加入亲水性高分子,且严格控制铁盐、分解促进剂、油酸、溶剂和亲水性高分子的用量比为(1.5-2.5)mmol:(8-12)mmol:(4-8)mmol:(15-30)ml:(0.05-1.5)g,并设定温度条件为180℃-250℃的温度条件下反应5分钟-30分钟。该反应条件下,铁盐分解生成的 $Fe_3O_4$ 磁性颗粒与亲水性高分子的热运动加剧,有利于亲水性高分子包覆在磁性颗粒表面,并且亲水性高分子易于 $Fe_3O_4$ 磁性颗粒表面形成氢键进而稳定的键合在一起。该方法制备的免疫磁珠具有粒径分布均匀、不易团聚且较好的分散性,可以用于细胞分离和DNA、RNA提取等生物技术领域。

[0040] 以下为具体实施例部分:

[0041] 实施例1:制备葡聚糖包裹的免疫磁珠

[0042] 称取0.0515g葡聚糖T40、0.7135g三乙酸丙酮铁、2.0646g1,12-十二烷二醇、4.2316ml油酸、2.1485ml油胺和20ml二苯醚放入到100mL三口烧瓶中混合溶解。升温至90℃,磁力搅拌20分钟得到混合溶液。然后将得到的混合溶液转入到三口烧瓶中升温至200℃,加热10分钟。待温度降至室温后,在冷却溶液中加入去离子水,搅拌后静置得到分层溶液。分层溶液包括水溶液和有机溶液两层,将水溶液中的反应产物用去离子水洗涤,有机溶液中的反应产物用乙醇洗涤。将洗涤后的两部分反应产物混合,再用去离子水洗涤数次,得到的葡聚糖包裹的免疫磁珠分散在去离子水中保存。

[0043] 实施例2:制备羧甲基壳聚糖包裹的免疫磁珠

[0044] 称取0.0515g羧甲基壳聚糖、0.7135g三乙酰丙酮铁、2.0646g1,12-十二烷二醇4.2316ml油酸、2.1485ml油胺和20ml二苯醚放入到100mL三口烧瓶中混合溶解。加热至215℃,磁力搅拌5分钟。待温度降至室温后,在冷却溶液中加入去离子水,搅拌静置后得到分层溶液。分层溶液包括水溶液和有机溶液两层,将水溶液中的反应产物用去离子水洗涤,有机溶液中的反应产物用乙醇洗涤。将洗涤后两部分反应产物混合,再用去离子水洗涤数次,得到的羧甲基壳聚糖包裹的免疫磁珠分散在去离子水中保存。

[0045] 实施例3:制备的免疫磁珠的效果评价

[0046] 图1为实施例1所制备的葡聚糖包裹免疫磁珠的粒度分布图,如图1所示,该免疫磁珠平均粒径为501.1nm,分散性系数PDI为0.127。理论上,PDI数值越小,则粒径分布越均匀。

当 $PDI \leq 0.05$ 时,颗粒呈理想的单分散状态。传统技术制备的免疫磁珠的 $PDI$ 一般为0.2左右,大于0.127。因此,本方法制备的葡聚糖包裹的免疫磁珠相对于传统技术制备的免疫磁珠在水中分散性好,粒径分布均匀。

[0047] 图2为实施例1所制备的葡聚糖包裹免疫磁珠的扫描电镜图,如图2所示,该免疫磁珠的粒径在300-800nm之间,且免疫磁珠的分散性较好,未出现明显的团聚现象。

[0048] 图3为实施例制备的葡聚糖包裹免疫磁珠与葡萄糖的红外光谱对比图。如图3所示,两者的红外谱曲线形状非常相似,均在 $3200-3600\text{cm}^{-1}$ 之间出现强而宽的吸收峰,这是由于糖类分子中含有大量-OH所致,-OH的伸缩振动峰多在此范围内出现。而葡聚糖包裹的免疫磁珠的光谱图在 $585.18\text{cm}^{-1}$ 处有较强的吸收,这是因为免疫磁珠中 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的Fe-O键转动所造成的红外吸收峰。葡聚糖包裹免疫磁珠与葡萄糖的红外光谱对比图证实免疫磁珠表面已包裹上一层亲水性的葡聚糖壳层。

[0049] 图4为实施例2制备的羧甲基壳聚糖包裹的免疫磁珠的粒度分布图。如图4所示,该免疫磁珠的平均粒径为 $1\mu\text{m}$ 左右,分散性系数 $PDI$ 为0.131。理论上, $PDI$ 数值越小,则粒径分布越均匀。传统技术制备的免疫磁珠的 $PDI$ 一般为0.2左右,大于0.131。因此,该方法制备的羧甲基壳聚糖包裹的免疫磁珠相对于传统技术制备的免疫磁珠在水中分散性好,粒径分布均匀。

[0050] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0051] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

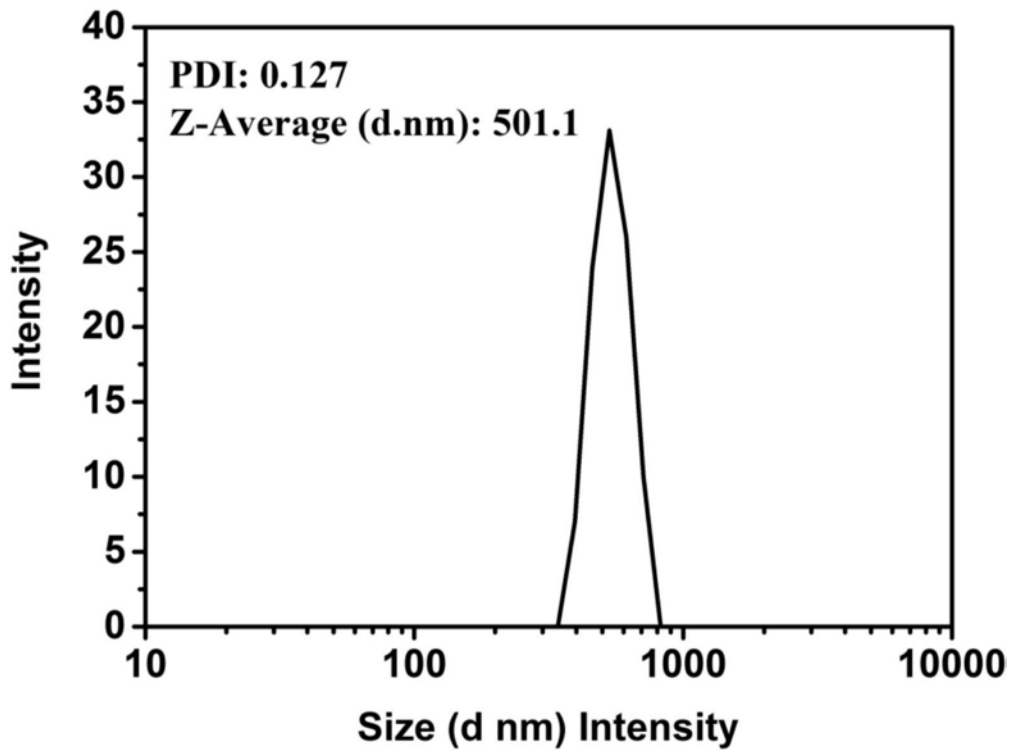


图1

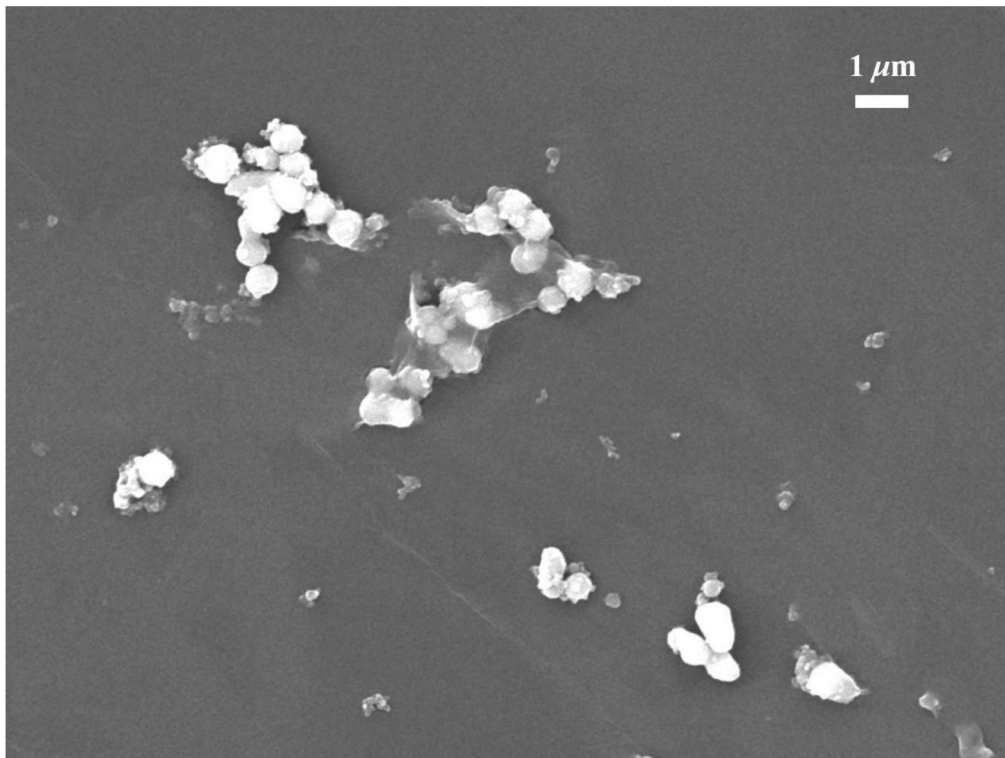


图2

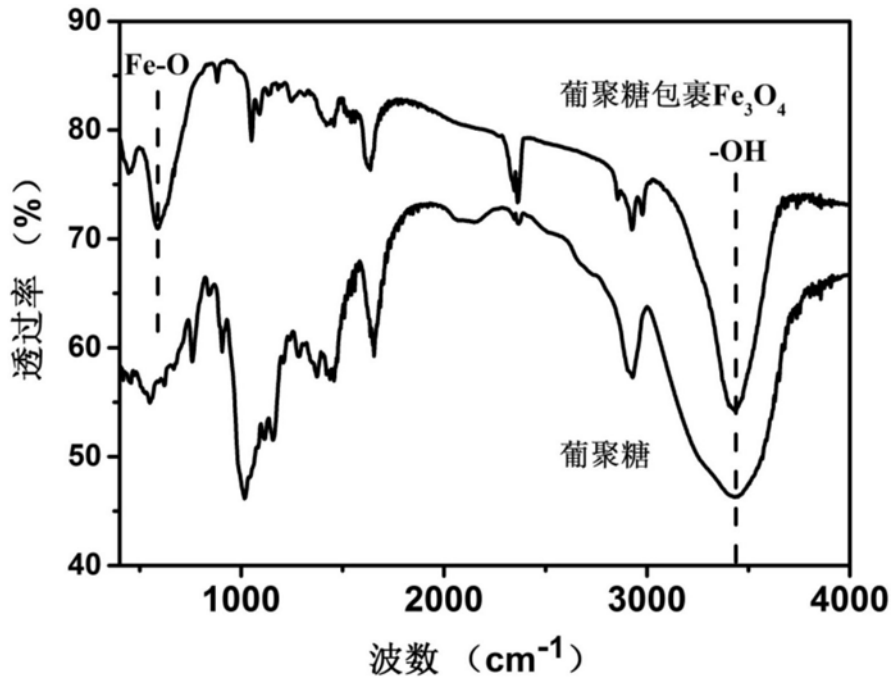


图3

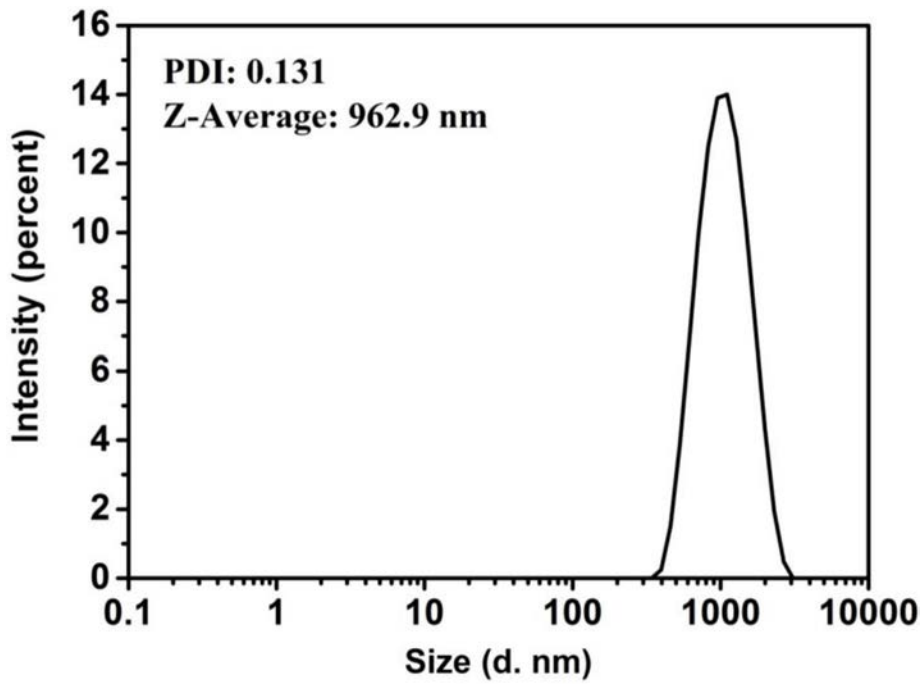


图4

专利名称(译)	免疫磁珠的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106680486B</a>	公开(公告)日	2018-07-20
申请号	CN201710054241.8	申请日	2017-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	广东顺德工业设计研究院(广东顺德创新设计研究院)		
申请(专利权)人(译)	广东顺德工业设计研究院(广东顺德创新设计研究院)		
当前申请(专利权)人(译)	广东顺德工业设计研究院(广东顺德创新设计研究院)		
[标]发明人	唐平		
发明人	唐平		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 C12N15/10 C12N5/00		
CPC分类号	C12N5/00 C12N15/1013 C12N2509/00 G01N33/531 G01N33/5434		
代理人(译)	王雯雯		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN106680486A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫磁珠的制备方法。该制备方法包括以下步骤：1)将铁盐、分解促进剂、亲水性高分子及油酸加入到溶剂中溶解，得到混合溶液；2)将上述混合溶液在180°C-250°C的温度条件下反应5分钟-30分钟后冷却，得到含有反应产物的冷却溶液；3)将所述冷却溶液中的反应产物洗涤后得到免疫磁珠；其中，制备过程中铁盐、分解促进剂、油酸、溶剂和亲水性高分子的用量比为(1.5-2.5)mmol : (8-12)mmol : (4-8)mmol : (15-30)ml : (0.05-1.5)g。该方法制备的免疫磁珠分散性好、粒径分布均匀且不易团聚。

