

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/532 G01N 33/543



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02103867.8

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1450350A

[22] 申请日 2002.4.5 [21] 申请号 02103867.8

[71] 申请人 任 翊

地址 100050 北京市宣武区北纬路 49 号 5-2
-504

共同申请人 朱学骏 高彦芳

[72] 发明人 任 翊

权利要求书 2 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 纳米磁性微粒用于酶联免疫

[57] 摘要

本发明纳米磁性微粒用于酶联免疫所属技术领域：生物材料领域。本发明是结合纳米级磁性微粒合成技术以及磁分离技术，来提高传统酶联免疫的敏感性和方便性。纳米级磁性微粒合成技术是利用共沉淀法生成 Fe_3O_4 等具有磁响应性的纳米无机粒子，再以此无机粒子作为种子，在其表面聚合上有机聚合物，利用有机聚合物提供的活性集团，在催化剂的作用下与蛋白质共价结合。磁性分离技术是利用纳米级的磁性微粒作为载体，磁性微粒提供巨大的表面积和磁分离性，而共价结合于磁性微粒表面的蛋白质，能提供特异性的亲和特性，所以在外加磁场的定向控制下，通过亲和吸附、清洗、解吸等操作，可以一步从复杂的生物体系中分离到目标生物分子，具有磁性分离简单方便、亲和吸附高特异性以及巨大表面积的高敏感性等众多优点。该磁性微粒用于酶联免疫能实现自动化、并提高其敏感性。

知识产权出版社出版

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 纳米磁性微粒用于酶联免疫的方法，其技术特征为用共沉淀法合成具有磁响应性的无机粒子，以无机粒子为核心进行有机聚合，在有机聚合物表面共价结合蛋白质，在酶联免疫中利用磁分离技术进行检测。

2. 根据权利要求 1 所述的纳米磁性微粒用于酶联免疫，其特征是：在共沉淀合成具有磁响应性的无机粒子时加入下一步有机聚合时所用的有机单体的盐类，起到分散和表面改性的作用。如本发明专利中合成 Fe_3O_4 时用以下方法 1M FeCl_3 80ml, 1M FeSO_4 40ml, 在快速搅拌、60℃水浴情况下滴加 60ml 浓氨水与 30ml 27% 甲基丙烯酸钠 (MA-Na) 的混和液，继续 60℃水浴 15min。

3. 根据权利要求 1 所述的纳米磁性微粒用于酶联免疫，其特征是：在具有磁响应性的无机粒子表面进行无皂有机聚合时采用如下配方： Fe_3O_4 10g, 苯乙烯 35g, 甲基丙烯酸 15g, 乙二胺四乙酸 (0.5M) 1g, 过硫酸铵 1g 溶于 20g ddH₂O, ddH₂O 69g。聚合步骤： Fe_3O_4 10g、ddH₂O 69g、乙二胺四乙酸 (0.5M) 1g 置于四口瓶中，充分搅拌。80℃水浴、通氮气、10ml 过硫酸铵，开始滴加单体，速度控制在 4-6h 滴完。3h 后补加 5ml 过硫酸铵，再 3h 后补加余下的 5ml 过硫酸铵，迅速提高水浴温度至 90℃，继续合成 2h，聚合时间共计 8h。其中 Fe_3O_4 与单体的比例为 20% (w/w)，甲基丙烯酸占单

体的比例为 30% (w/w)，过硫酸铵与单体的比例为 2% (w/w)。

4. 根据权利要求 1 所述的纳米磁性微粒用于酶联免疫，其特征是：
在磁性微粒表面标记蛋白质时采用如下方法：取 100mg/ml 的磁性微粒悬浮液 2ml，用 2- (N-吗啡啉) 乙磺酸缓冲液缓冲液 10ml 清洗 2 次，最后悬于 10ml 2- (N-吗啡啉) 乙磺酸缓冲液缓冲液，加 100mg 1-Cyclohexyl-3- (2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulphonate 以及所需蛋白质，室温 200rpm 混匀 4h。利用磁铁弃上清，加 10ml 中和缓冲液，室温 200rpm 混匀 30min，弃上清。磷酸缓冲液 (0.1%吐温 20) 20ml 洗 2 次，磷酸缓冲液 20 ml 洗 2 次，最后悬于 10ml 保存缓冲液中，4℃保存。在酶联免疫中利用磁场进行分离。

纳米磁性微粒用于酶联免疫

所属技术领域

本发明专利所属生物材料领域, 涉及纳米磁性材料的合成并用于酶联免疫检测。

背景技术

纳米级磁性微粒合成技术是利用共沉淀法生成 Fe_3O_4 等具有磁响应性的纳米无机粒子, 再以此无机粒子作为种子, 在其表面聚合上有机聚合物, 利用有机聚合物提供的活性集团, 在催化剂的作用下与蛋白质共价结合。磁性分离技术是利用纳米或微米级的磁性微粒作为载体, 磁性微粒提供巨大的表面积和磁分离性, 而共价结合于磁性微粒表面的蛋白质, 能提供特异性的亲和特性, 所以在外加磁场的定向控制下, 通过亲和吸附、清洗、解吸等操作, 可以一步从复杂的生物体系中分离到目标生物分子, 具有磁性分离简单方便、亲和吸附高特异性以及巨大表面积的高敏感性等众多优点。纳米级磁性微粒用于酶联免疫检测能提高该方法的敏感性, 并实现自动化控制。

发明内容

传统酶联免疫检测方法是把所需蛋白质标记于面积有限的固相载体上, 限制了该方法的敏感性。本发明专利的技术配方能合成纳米级的磁性材料, 能在其表面标记所需蛋白质, 用于酶联免疫检测方法能大大提高该方法的敏感

性，并实现自动化控制。

本发明专利解决其技术问题所采用的技术方案是：利用共沉淀时加入MA-Na，有利于 Fe_3O_4 的分散及有机聚合。有机聚合时 Fe_3O_4 与单体的比例为20% (w/w)，甲基丙烯酸占单体的比例为30% (w/w)，过硫酸铵与单体的比例为2% (w/w)，乙二胺四乙酸作为螯合剂为防止残留的铁离子对有机聚合的抑制，反应温度80℃，反应时间8h，在此条件下产生的有机聚合磁性微粒粒径分布14nm-42nm，平均 $25.1 \pm 6.1\text{nm}$ 。用1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulphonate 为催化剂能有效把所需蛋白质标记于磁性微粒表面，用于酶联免疫检测。

具体实施方式

1.共沉淀法合成 Fe_3O_4 : 合成公式 $2\text{FeCl}_3 + \text{FeSO}_4 + 8\text{NH}_3\text{H}_2\text{O} = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 6\text{NH}_4\text{Cl} + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ ，用 1M FeCl_3 80ml，1M FeSO_4 40ml，在快速搅拌、60℃水浴情况下滴加 60ml 浓氨水与 30ml 27% 甲基丙烯酸钠 (MA-Na) 的混和液，继续 60℃水浴 15min。

2.以 Fe_3O_4 为核心进行有机聚合：利用磁铁反复清洗合成的 Fe_3O_4 ，以下列配方进行有机聚合： Fe_3O_4 10g，苯乙烯 35g，甲基丙烯酸 15g，乙二胺四乙酸 (0.5M) 1g，过硫酸铵 1g 溶于 20g ddH₂O，ddH₂O 69g。聚合步骤： Fe_3O_4 10g、ddH₂O 69g、乙二胺四乙酸 (0.5M) 1g 置于四口瓶中，充分搅拌。80℃水浴、通氮气、10ml 过硫酸铵，开始滴加单体，速度控制在 4-6h 滴完。3h 后补加 5ml 过硫酸铵，再 3h 后补加余下的 5ml 过硫酸铵，迅速提高水浴温度至 90℃，继续合成 2h，聚合时间共计 8h。

3.直接法标记：取 100mg/ml 的磁性微粒悬浮液 2ml，用 2-（N-吗啡啉）乙磺酸缓冲液缓冲液 10ml 清洗 2 次，最后悬于 10ml 2-（N-吗啡啉）乙磺酸缓冲液缓冲液，加 100mg WSC 以及所需蛋白质，室温 200rpm 混匀 4h。利用磁铁弃上清，加 10ml 中和缓冲液，室温 200rpm 混匀 30min，弃上清。磷酸缓冲液（0.1%吐温 20）20ml 洗 2 次，磷酸缓冲液 20 ml 洗 2 次，最后悬于 10ml 保存缓冲液中，4℃保存。

专利名称(译)	纳米磁性微粒用于酶联免疫		
公开(公告)号	CN1450350A	公开(公告)日	2003-10-22
申请号	CN02103867.8	申请日	2002-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	任翊 高彦芳		
申请(专利权)人(译)	任翊 高彦芳		
当前申请(专利权)人(译)	任翊 高彦芳		
[标]发明人	任翊		
发明人	任翊		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明纳米磁性微粒用于酶联免疫所属技术领域：生物材料领域。本发明是结合纳米级磁性微粒合成技术以及磁分离技术，来提高传统酶联免疫的敏感性和方便性。纳米级磁性微粒合成技术是利用共沉淀法生成Fe₃O₄等具有磁响应性的纳米无机粒子，再以此无机粒子作为种子，在其表面聚合上有机聚合物，利用有机聚合物提供的活性集团，在催化剂的作用下与蛋白质共价结合。磁性分离技术是利用纳米级的磁性微粒作为载体，磁性微粒提供巨大的表面积和磁分离性，而共价结合于磁性微粒表面的蛋白质，能提供特异性的亲和特性，所以在外加磁场的定向控制下，通过亲和吸附、清洗、解吸等操作，可以一步从复杂的生物体系中分离到目标生物分子，具有磁性分离简单方便、亲和吸附高特异性以及巨大表面积的高敏感性等众多优点。该磁性微粒用于酶联免疫能实现自动化、并提高其敏感性。