



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107389916 A

(43)申请公布日 2017.11.24

(21)申请号 201710493624.5

G01N 33/50(2006.01)

(22)申请日 2017.06.26

(71)申请人 安徽安龙基因医学检验所有限公司

地址 230000 安徽省合肥市庐阳区工业区
阜阳路与北城大道交口A6号1-2层

(72)发明人 韦玉军 李航 陆宝石 苏军
吴远航

(74)专利代理机构 杭州君度专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33240

代理人 王桂名

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种CD133免疫磁珠的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种CD133免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:磁珠的制备;磁性壳聚糖微球制备:称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;取1g Fe₃O₄纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌;加入200ml液体石蜡油,40℃下,300r/min条件下搅拌;温度升高至50℃,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌;向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60℃条件下搅拌,调节pH为10,搅拌2-6h;反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,在50℃条件下真空干燥;磁性壳聚糖微球的羧基化;羧基化的免疫磁珠与抗体的偶联。本发明具有稳定性好、灵敏度高等优点。

1. 一种CD133免疫磁珠的制备方法,其特征在于:具体步骤如下:

一、磁珠的制备:

1.1、在通氮气的条件下,将12.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、23.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于800ml蒸馏水中,加热回流,加热至90℃时,在机械搅拌下把30ml氨水加入以上溶液中;

1.2、1h后反应结束,在外加磁场作用下,弃上清;

1.3、加入100ml乙醇,充分搅拌洗涤磁珠,在外加磁场下,收集磁珠,再用100ml蒸馏水洗涤,常温下真空干燥,即得 Fe_3O_4 纳米磁珠;

二、磁性壳聚糖微球制备:

2.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;

2.2、取1g Fe_3O_4 纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌15-25min;

2.3、加入200ml液体石蜡油,40℃下,300r/min条件下搅拌25-35min;

2.4、温度升高至50℃,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌25-35min;

2.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60℃条件下搅拌,调节pH为10,搅拌2-6h;

2.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50℃条件下真空干燥;

三、磁性壳聚糖微球的羧基化:

3.1、取1g磁性壳聚糖微球,加入50ml异丙醇和50ml 30%的NaOH溶液,60℃搅拌25-45min;

3.2、滴入含有7g氯乙酸的异丙醇溶液20ml,每5min滴加2ml;

3.3、60℃条件下反应7h,用稀盐酸中和;

3.4、反应结束后,用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,真空干燥;

四、羧基化的免疫磁珠与抗体的偶联:

4.1、取2mg羧基磁珠于2ml离心管中,加入500 μL 活化缓冲液,在漩涡振荡器上混合均匀,再将离心管放置于磁分离架上,待磁珠完全被吸附,用微型台式真空泵把上清抽提掉;

4.2、加入500 μL 活化缓冲液重新洗涤磁珠2遍,向磁珠中加入485 μL 活化缓冲液,再分别加入2.5mg碳二亚胺与2.5mg N-羟基琥珀酰亚胺,在涡旋振荡器上混匀,室温活化2mg磁珠表面的羧基30min;

4.3、加500 μL 活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠3遍后,再用500 μL 偶联缓冲液洗涤磁珠2遍;

4.4、加475 μL 偶联缓冲液重悬洗涤后的磁珠,再加25 μL 6mg/ml的AC133抗体,使得磁珠表面活化的羧基同抗体AC133的氨基室温反应3h,将抗体偶联于磁珠表面,得到免疫磁珠;

4.5、用500 μL 含有1%牛血清白蛋白的偶联缓冲液封闭磁珠30min;

4.6、用500 μL 的偶联缓冲液洗涤封闭磁珠2遍,用500 μL 含0.02% Na_3N 、0.1%牛血清白蛋白、0.05%Tween-20的pH7.4,0.01mol/L磷酸盐吐温溶液重悬磁珠,保存于4℃冰箱,制备即完成。

2. 根据权利要求1所述的一种CD133免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤3.3

中,用稀盐酸中和至pH为7。

3.根据权利要求1所述的一种CD133免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤3.4中,真空干燥的温度为50℃。

4.根据权利要求1所述的一种CD133免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤四中,所述的活化缓冲液为pH 6.0,含0.05%Tween-20溶液的0.01mol/L的 NaH_2PO_4 溶液。

5.根据权利要求1所述的一种CD133免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的步骤四中,所述的偶联缓冲液为pH7.4,含0.05%Tween-20的0.01mol/L的磷酸盐吐温溶液。

一种CD133免疫磁珠的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体来说是一种CD133免疫磁珠的制备方法。

背景技术

[0002] 近几十年来,世界范围内肿瘤的发病率和病死率越来越高,虽然针对肿瘤的治疗手段有了很多新的进展,但绝大多数肿瘤患者仍然无法获得根治、容易复发和转移,恶性肿瘤患者的生存时间和生活质量始终较低。人肿瘤干细胞首次报道给我们带来新的希望。寻找特异性的表面标志物,通过其分选肿瘤干细胞,是进一步研究肿瘤发生、转移、复发和预后的关键。

[0003] CD133是一种独特的干细胞和肿瘤干细胞的表面标志,分子量为120kDa,具有5个跨膜区,CD133抗原可被3种CD133抗体识别:克隆AC133、293C3和AC141,AC133直接与CD133/1糖基化抗原表位结合,可用于从外周血、骨髓、脐带血及其它组织中分析和分选CD133+细胞,单克隆抗体293C3和AC141识别抗原表位CD133/2,主要用于MACS分选后CD133+细胞的荧光染色。

[0004] 目前一些细胞分选技术如免疫流式分选、SP分选和免疫磁珠法等都开始应用于肿瘤干细胞的分选。

[0005] 免疫流式分选是利用流式细胞仪,由细胞液流在电信号作用下发生震动,断裂成均匀的小液滴,经过荧光标记染色的细胞受到适合的光激发后产生的荧光被识别,而后由充电电路对选定的细胞液滴充电,带电液滴携带细胞通过静电场而发生偏转,落入收集器而分选,这种方法成本高昂,而且操作中细胞易聚集,影响分选纯度。

[0006] SP分选技术的原理是:肿瘤干细胞较其他的肿瘤细胞具有荧光染料Hoechest33342排出优势,表现为细胞核不着色或者很低称程度着色,利用流式细胞仪可以将这些不着色的细胞加以分离,这种技术操作较复杂,对温度和时间要求高,也不能出现细胞聚集;同时也要求高能紫外激光激发器,使得成本极高。

[0007] 免疫磁珠法是高效简捷的免疫细胞及其他细胞的分离纯化技术,该技术基于细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合,在外加磁场中,通过抗体与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中,无该种表面抗原的细胞由于不能与连接着磁珠的特异性单抗结合而没有磁性,不在磁场中停留,从而使细胞得以分离,这种技术则成为目前研究和关注的焦点。

[0008] 本发明也是基于免疫磁珠法而进行的创新。

发明内容

[0009] 本发明所要解决的技术问题是为了克服现有技术中的肿瘤干细胞分选的纯度不高、操作复杂等缺陷,而提供一种CD133免疫磁珠的制备方法。

[0010] 本发明解决上述技术问题提供的技术方案是:本发明公开了一种CD133免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:

[0011] 一、磁珠的制备：

[0012] 1.1、在通氮气的条件下，将12.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、23.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于800ml蒸馏水中，加热回流，加热至90℃时，在机械搅拌下把30ml氨水加入以上溶液中；

[0013] 1.2、1h后反应结束，在外加磁场作用下，弃上清；

[0014] 1.3、加入100ml乙醇，充分搅拌洗涤磁珠，在外加磁场下，收集磁珠，再用100ml蒸馏水洗涤，常温下真空干燥，即得 Fe_3O_4 纳米磁珠；

[0015] 二、磁性壳聚糖微球制备：

[0016] 2.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜，使之溶解；

[0017] 2.2、取1g Fe_3O_4 纳米磁珠加入其中，室温下，300r/min条件下搅拌15-25min；

[0018] 2.3、加入200ml液体石蜡油，40℃下，300r/min条件下搅拌25-35min；

[0019] 2.4、温度升高至50℃，加入40ml甲醛，300r/min条件下，搅拌25-35min；

[0020] 2.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛，170r/min，60℃条件下搅拌，调节pH为10，搅拌2-6h；

[0021] 2.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚，充分搅拌，用布氏漏斗进行抽滤，获得磁性壳聚糖微球颗粒，然后再用乙醇充分搅拌洗涤，去除乙醇后再用蒸馏水洗涤，重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作，在50℃条件下真空干燥；

[0022] 三、磁性壳聚糖微球的羧基化：

[0023] 3.1、取1g磁性壳聚糖微球，加入50ml异丙醇和50ml 30%的NaOH溶液，60℃搅拌25-45min；

[0024] 3.2、滴入含有7g氯乙酸的异丙醇溶液20ml，每5min滴加2ml；

[0025] 3.3、60℃条件下反应7h，用稀盐酸中和；

[0026] 3.4、反应结束后，用乙醇充分搅拌洗涤，去除乙醇后再用蒸馏水洗涤，重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作，真空干燥；

[0027] 四、羧基化的免疫磁珠与抗体的偶联：

[0028] 4.1、取2mg羧基磁珠于2ml离心管中，加入500μL活化缓冲液，在漩涡振荡器上混合均匀，再将离心管放置于磁分离架上，待磁珠完全被吸附，用微型台式真空泵把上清抽提掉；

[0029] 4.2、加入500μL活化缓冲液重新洗涤磁珠2遍，向磁珠中加入485μL活化缓冲液，再分别加入2.5mg碳二亚胺与2.5mg N-羟基琥珀酰亚胺，在涡旋振荡器上混匀，室温活化2mg磁珠表面的羧基30min；

[0030] 4.3、加500μL活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠3遍后，再用500μL偶联缓冲液洗涤磁珠2遍；

[0031] 4.4、加475μL偶联缓冲液重悬洗涤后的磁珠，再加25μL 6mg/ml的AC133抗体，使得磁珠表面活化的羧基同抗体AC133的氨基室温反应3h，将抗体偶联于磁珠表面，得到免疫磁珠；

[0032] 4.5、用500μL含有1%牛血清白蛋白的偶联缓冲液封闭磁珠30min；

[0033] 4.6、用500μL的偶联缓冲液洗涤封闭磁珠2遍，用500μL含0.02% Na_3N 、0.1%牛血清白蛋白、0.05%Tween-20的pH7.4，0.01mol/L磷酸盐吐温溶液重悬磁珠，保存于4℃冰箱，制备即完成。

- [0034] 作为优选,所述的步骤3.3中,用稀盐酸中和至pH为7。
- [0035] 作为优选,所述的步骤3.4中,真空干燥的温度为50℃。
- [0036] 作为优选,所述的步骤四中,所述的活化缓冲液为pH 6.0,含0.05%Tween-20溶液的0.01mol/L的NaH₂PO₄溶液。
- [0037] 作为优选,所述的步骤四中,所述的偶联缓冲液为pH7.4,含0.05%Tween-20的0.01mol/L的磷酸盐吐温溶液。
- [0038] 与现有技术相比,本发明具有以下有益优点:
- [0039] 1、本发明对磁性微球进行了壳聚糖包被,使其球状规则,粒径分布均匀,无聚集状态,表面光滑、致密、无孔,可减少非特异性吸附,具有很好的磁响应性和超顺磁性;
- [0040] 2、本发明对磁性壳聚糖微球进行了羧基化修饰,即增强了磁性壳聚糖的表面功能性,又避免了羧基壳聚糖制备的微球易溶胀、硬度差的缺点,提高了磁性微球的稳定性;
- [0041] 3、本发明采用单克隆抗体AC133来偶联羧基化的磁性壳聚糖微球,其可特异性识别肿瘤干细胞表面标志物CD133;
- [0042] 综上所述本发明的免疫磁珠的稳定性好、特异性好、灵敏度高,对细胞无毒性、成本低。

具体实施方式

- [0043] 以下结合具体实施例进一步说明,但本发明并不仅限于这些实施例。
- [0044] 实施例1
- [0045] 本发明公开了一种CD133免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:
- [0046] 一、磁珠的制备:
- [0047] 1.1、在通氮气的条件下,将12.1g FeSO₄·7H₂O、23.5g FeCl₃·6H₂O溶解于800ml蒸馏水中,加热回流,加热至90℃时,在机械搅拌下快速把30ml氨水加入以上溶液中;
- [0048] 1.2、1h后反应结束,在外加磁场作用下,弃上清;
- [0049] 1.3、加入100ml乙醇,充分搅拌洗涤磁珠,在外加磁场下,收集磁珠,再用100ml蒸馏水洗涤,常温下真空干燥,即得Fe₃O₄纳米磁珠;
- [0050] 二、磁性壳聚糖微球制备:
- [0051] 2.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;
- [0052] 2.2、取1g Fe₃O₄纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌20min;
- [0053] 2.3、加入200ml液体石蜡油,40℃下,300r/min条件下搅拌30min;
- [0054] 2.4、温度升高至50℃,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌30min;
- [0055] 2.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60℃条件下搅拌,调节pH为10,搅拌4h;
- [0056] 2.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50℃条件下真空干燥;
- [0057] 三、磁性壳聚糖微球的羧基化:
- [0058] 3.5、取1g磁性壳聚糖微球,加入50ml异丙醇和50ml 30%的NaOH溶液,60℃搅拌40min;

- [0059] 3.6、滴入含有7g氯乙酸的异丙醇溶液20ml,每5min滴加2ml;
- [0060] 3.7、60℃条件下反应7h,用稀盐酸中和,调节PH为7;
- [0061] 3.8、反应结束后,用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复4次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50℃条件下真空干燥;
- [0062] 四、羧基化的免疫磁珠与抗体的偶联:
- [0063] 4.1、以pH 6.0,含0.05%Tween-20溶液的0.01mol/L的 $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_4$ 溶液作为活化缓冲液,取2mg羧基磁珠于2ml离心管中,加入500 μL 活化缓冲液,在漩涡振荡器上混合均匀,再将离心管放置于磁分离架上,待磁珠完全被吸附,用微型台式真空泵把上清抽提掉;
- [0064] 4.2、加入500 μL 活化缓冲液重新洗涤磁珠2遍,向磁珠中加入485 μL 活化缓冲液,再分别加入2.5mg碳二亚胺与2.5mg N-羟基琥珀酰亚胺,在涡旋振荡器上混匀,室温活化2mg磁珠表面的羧基30min;
- [0065] 4.3、以500 μL ,pH7.4,含0.05%Tween-20的0.01mol/L的磷酸盐吐温溶液做偶联缓冲液,加500 μL 活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠3遍后,再用500 μL 偶联缓冲液洗涤磁珠2遍;
- [0066] 4.4、加475 μL 偶联缓冲液重悬洗涤后的磁珠,再加25 μL 6mg/ml的AC133抗体,使得磁珠表面活化的羧基同抗体AC133的氨基室温反应3h,将抗体偶联于磁珠表面,得到免疫磁珠;
- [0067] 4.5、用500 μL 含有1%牛血清白蛋白的偶联缓冲液封闭磁珠30min;
- [0068] 4.6、用500 μL 的偶联缓冲液洗涤封闭磁珠2遍,用500 μL 含0.02% Na_3N 、0.1%牛血清白蛋白、0.05%Tween-20的pH7.4,0.01mol/L磷酸盐吐温溶液重悬磁珠,保存于4℃冰箱,制备即完成。
- [0069] 实施例2
- [0070] 本发明公开了一种CD133免疫磁珠的制备方法,具体步骤如下:
- [0071] 一、磁珠的制备:
- [0072] 1.1、在通氮气的条件下,将12.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、23.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于800ml蒸馏水中,加热回流,加热至90℃时,在机械搅拌下把30ml氨水加入以上溶液中;
- [0073] 1.2、1h后反应结束,在外加磁场作用下,弃上清;
- [0074] 1.3、加入100ml乙醇,充分搅拌洗涤磁珠,在外加磁场下,收集磁珠,再用100ml蒸馏水洗涤,常温下真空干燥,即得 Fe_3O_4 纳米磁珠;
- [0075] 二、磁性壳聚糖微球制备:
- [0076] 2.1、称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜,使之溶解;
- [0077] 2.2、取1g Fe_3O_4 纳米磁珠加入其中,室温下,300r/min条件下搅拌16min;
- [0078] 2.3、加入200ml液体石蜡油,40℃下,300r/min条件下搅拌27min;
- [0079] 2.4、温度升高至50℃,加入40ml甲醛,300r/min条件下,搅拌27min;
- [0080] 2.5、向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛,170r/min,60℃条件下搅拌,调节pH为10,搅拌3h;
- [0081] 2.6、反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚,充分搅拌,用布氏漏斗进行抽滤,获得磁性壳聚糖微球颗粒,然后再用乙醇充分搅拌洗涤,去除乙醇后再用蒸馏水洗涤,重复3-5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作,在50℃条件下真空干燥;

[0082] 三、磁性壳聚糖微球的羧基化：

[0083] 3.9、取1g磁性壳聚糖微球，加入50ml异丙醇和50ml 30%的NaOH溶液，60℃搅拌25min；

[0084] 3.10、滴入含有7g氯乙酸的异丙醇溶液20ml，每5min滴加2ml；

[0085] 3.11、60℃条件下反应7h，用稀盐酸中和；

[0086] 3.12、反应结束后，用乙醇充分搅拌洗涤，去除乙醇后再用蒸馏水洗涤，重复5次乙醇和蒸馏水的洗涤操作，真空干燥；

[0087] 四、羧基化的免疫磁珠与抗体的偶联：

[0088] 4.1、取2mg羧基磁珠于2ml离心管中，加入500μL活化缓冲液，在漩涡振荡器上混合均匀，再将离心管放置于磁分离架上，待磁珠完全被吸附，用微型台式真空泵把上清抽提掉；

[0089] 4.2、加入500μL活化缓冲液重新洗涤磁珠2遍，向磁珠中加入485μL活化缓冲液，再分别加入2.5mg碳二亚胺与2.5mg N-羟基琥珀酰亚胺，在涡旋振荡器上混匀，室温活化2mg磁珠表面的羧基30min；

[0090] 4.3、加500μL活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠3遍后，再用500μL偶联缓冲液洗涤磁珠2遍；

[0091] 4.4、加475μL偶联缓冲液重悬洗涤后的磁珠，再加25μL 6mg/ml的AC133抗体，使得磁珠表面活化的羧基同抗体AC133的氨基室温反应3h，将抗体偶联于磁珠表面，得到免疫磁珠；

[0092] 4.5、用500μL含有1%牛血清白蛋白的偶联缓冲液封闭磁珠30min；

[0093] 4.6、用500μL的偶联缓冲液洗涤封闭磁珠2遍，用500μL含0.02%Na₃N、0.1%牛血清白蛋白、0.05%Tween-20的pH7.4，0.01mol/L磷酸盐吐温溶液重悬磁珠，保存于4℃冰箱，制备即完成。

[0094] 所述的步骤3.3中，用稀盐酸中和至pH为7。

[0095] 所述的步骤3.4中，真空干燥的温度为50℃。

[0096] 所述的步骤四中，所述的活化缓冲液为pH 6.0，含0.05%Tween-20溶液的0.01mol/L的NaH₂PO₄溶液。

[0097] 所述的步骤四中，所述的偶联缓冲液为pH7.4，含0.05%Tween-20的0.01mol/L的磷酸盐吐温溶液。

[0098] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效，而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下，对上述实施例进行修饰或改变。因此，举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变，仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种CD133免疫磁珠的制备方法		
公开(公告)号	CN107389916A	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	CN2017110493624.5	申请日	2017-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	安徽安龙基因医学检验所有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽安龙基因医学检验所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽安龙基因医学检验所有限公司		
[标]发明人	韦玉军 李航 苏军 吴远航		
发明人	韦玉军 李航 陆宝石 苏军 吴远航		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/5073 G01N33/54326 G01N33/54346 G01N33/57484 G01N33/577 G01N2446/90		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种CD133免疫磁珠的制备方法，具体步骤如下：磁珠的制备；磁性壳聚糖微球制备：称取10克壳聚糖加到200ml 2%乙酸溶液中浸泡过夜，使之溶解；取1g Fe₃O₄纳米磁珠加入其中，室温下，300r/min条件下搅拌；加入200ml液体石蜡油，40℃下，300r/min条件下搅拌；温度升高至50℃，加入40ml甲醛，300r/min条件下，搅拌；向混合溶液中加入20ml 50%体积浓度的戊二醛，170r/min，60℃条件下搅拌，调节pH为10，搅拌2-6h；反应结束后向反应体系中加入100ml石油醚，充分搅拌，用布氏漏斗进行抽滤，获得磁性壳聚糖微球颗粒，然后再用乙醇充分搅拌洗涤，去除乙醇后再用蒸馏水洗涤，在50℃条件下真空干燥；磁性壳聚糖微球的羧基化；羧基化的免疫磁珠与抗体的偶联。本发明具有稳定性好、灵敏度高等优点。