



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103926398 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201410181299. 5

CN 103357359 A, 2013. 10. 23,

(22) 申请日 2014. 04. 30

CN 101323454 A, 2008. 12. 17,

(73) 专利权人 洛阳惠尔纳米科技有限公司

CN 103667483 A, 2014. 03. 26,

地址 471003 河南省洛阳市高新区河洛路与
凌波路交汇处东北点的公司场院

CN 101684138 A, 2010. 03. 31,

CN 101306841 A, 2008. 11. 19,

JP S63189473 A, 1988. 08. 05,

(72) 发明人 杜德光 高祥辉 姜夏 马睿

审查员 肖吉

(74) 专利代理机构 洛阳市凯旋专利事务所

41112

代理人 符继超

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

B82Y 15/00(2011. 01)

B82Y 40/00(2011. 01)

B82Y 30/00(2011. 01)

(56) 对比文件

CN 100999559 A, 2007. 07. 18,

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种免疫磁珠的制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种免疫磁珠的制备方法, 首先取冷冻干燥过的硅基磁珠分散到极性有机溶剂中超声处理后, 加入溶解于该极性有机溶剂中的分散剂, 搅拌后, 滴加溶解于该极性有机溶剂的带有双端羧基的有机小分子, 滴加完毕后反应 6~18h; 反应结束后, 磁分离出羧基磁珠, 依次用无水乙醇及去离子水反复洗涤沉淀物数次至洗涤液 pH 值为 6~7, 超声处理 15~30min, 分散在万分之二 Na₂N₃ 水中, 即得到羧基磁珠; 羧基磁珠用 MES 缓冲液清洗至少一次, 重悬羧基磁珠于 MES 缓冲液中, 通过活化剂碳二亚胺将磁珠活化后, 在 MES 缓冲液环境中偶联抗体。本发明工艺流程简单, 操作简便, 适于批量化生产。

CN 103926398 B

1. 一种免疫磁珠的制备方法,其特征是:其包括以下步骤:

S1、羧基磁珠的制备

取冷冻干燥过的硅基磁珠 2~100 g 分散到 0.2~3L 极性有机溶剂中超声处理 30 ~ 60min 后,加入溶解于该极性有机溶剂中的分散剂 10 ~ 100ml,分散剂浓度为 10 ~ 50g/L,搅拌 30~60min 后,滴加溶解于该极性有机溶剂的带有双端羧基的有机小分子 30 ~ 500ml,带有双端羧基的有机小分子浓度为 4~20g/L,控制滴加速度为 0.1 ~ 0.5ml/min,体系温度为 60 ~ 80°C,滴加完毕后反应 6~18h;反应结束后,磁分离出羧基磁珠,依次用无水乙醇及去离子水反复洗涤沉淀物数次至洗涤液 pH 值为 6 ~ 7,超声处理 15 ~ 30min,分散在万分之二 NaN_3 水中,即得到羧基磁珠;其中,采用的硅基磁珠为核壳结构,包括 Fe_3O_4 纳米颗粒内核, SiO_2 外壳层, SiO_2 外壳层包覆在多个 Fe_3O_4 纳米颗粒外表面;硅基磁珠经超声分散处理 1h 后,用纳米激光粒度仪测得其二次粒径为 400nm ~ 1 μm ,饱和磁化强度为 43.0 ~ 74.5emu/g;

S2、免疫磁珠的制备

上述步骤 S1 中所得的羧基磁珠用 MES 缓冲液清洗至少一次,重悬(1 ~ 20) mg 羧基磁珠于 200 μl MES 缓冲液中,通过活化剂碳二亚胺将磁珠活化后,在 MES 缓冲液环境中偶联抗体,羧基磁珠与活化剂碳二亚胺按照(4 ~ 10):1 的体积比。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠的制备方法,其特征是:硅基磁珠的制备方法,其包括以下步骤:

(1)、 Fe_3O_4 纳米颗粒的制备

分别配制浓度为 0.1 ~ 1mol/L 的 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 盐溶液,按 Fe^{3+} 与 Fe^{2+} 物质的量的比为 1.5 ~ 2.0 混合;上述混合液搅拌均匀后,加入 0.15mol/L 的聚乙二醇-8000 水溶液,聚乙二醇-8000 体积为 Fe 盐溶液总体积的 1/10~1/5,通入氩气除氧 30 min,调整反应体系温度 60 ~ 70°C,再向混合液中滴加质量浓度为 25%氨水至体系 PH 值为 10 ~ 11,在温度为 70 ~ 80°C 条件下反应 3 ~ 6h,冷却至室温后,磁分离出黑色沉淀,依次用质量浓度为 1%氨水、5%NaCl 及去离子水反复洗涤沉淀物数次至洗涤液为中性, -10 ~ -20°C 冷冻干燥 24 ~ 48h,得到超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒;

其中磁性纳米 Fe_3O_4 粒子颗粒分散到超纯水中经超声分散处理 1h 后,用纳米激光粒度仪测得其二次粒径为 100 ~ 300nm,饱和磁化强度为 57.4 ~ 79.4 emu/g;

(2)、纳米硅基磁珠的制备

将步骤 S1 中所得的超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒称取 2 ~ 500g 分散到 0.1 ~ 3L 无水乙醇中超声波处理 30 ~ 60min 后,加入 20 ~ 1000ml 浓度为 10 ~ 50g/L 的分散剂,搅拌均匀后,向混合液中加入质量浓度为 25%氨水至体系 PH 值为 10,再滴加 0.25 ~ 500ml 体积比为 1:1 的正硅酸四乙酯与乙醇混合溶液,控制滴加速度为 0.1 ~ 0.5ml/min,体系温度为 30 ~ 50°C,滴加完毕后反应 3 ~ 5h,磁分离出表面硅基修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒,用去离子水反复洗涤数次至洗涤液 PH 值为 6 ~ 7,超声分散 15 ~ 30min,分散在万分之二 NaN_3 水中,即得到硅基包被磁珠。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠的制备方法,其特征是:步骤 S1 中采用的极性有机溶剂为四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、乙二胺、三乙胺、乙二醇及、丙三醇中的一种。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠的制备方法,其特征是:步骤 S1 中采用的分散剂为

柠檬酸三钠、十六烷基溴化铵、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇-1000、聚乙二醇-2000、聚乙二醇-8000 中的一种。

5. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠的制备方法,其特征是:步骤 S1 中采用的带有双端羧基的有机小分子为 1,4-丁二酸、庚二酸、十二酸、丁二酸酐中的一种。

6. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠的制备方法,其特征是:步骤 S2 的具体方法是:

S2-1、活化磁珠:取羧基磁珠于离心管中,震荡 30 ~ 60min;将离心管放置于磁分离架上,待磁珠完全被吸附,把上清液抽掉;加入 1ml PH 6.0 的 MES 溶液洗涤羧基磁珠,重复洗涤一次;用 100 μ L 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 重悬磁珠,再加入 100 μ L 浓度为 10mg/ml 的碳二亚胺溶液,混匀,将磁珠在室温条件下震荡孵育 30 ~ 60min,将磁珠活化;

S2-2、包被磁珠:用 1ml 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 洗涤活化后的磁珠数次,将抗体加入 500 μ L 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 MES 溶液中,混匀,在室温条件下震荡孵育 24h,得到免疫磁珠;

S2-3、免疫磁珠活性检测

取 100 μ L 浓度为 10mg/ml 的免疫磁珠,用 PBST 洗涤三次,加入 500 μ L 按 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 30min,用 PBST 洗涤四次,加入显色液 100 μ L,待显色完全后加入 50 μ L 终止液终止反应,用酶标仪检测试验结果。

7. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠的制备方法,其特征是:其制得的羧基磁珠为核壳结构,包括 Fe_3O_4 纳米颗粒内核,包覆在多个 Fe_3O_4 纳米颗粒外表面的 SiO_2 中间层, SiO_2 层外键合带有双端羧基的有机小分子;10mg 羧基磁珠分散在 100ml 无水乙醇中经超声分散处理 1h 后,用纳米激光粒度仪测得其二次粒径为 500nm~1.2 μ m,饱和磁化强度为 41.0 ~ 77.4emu/g。

8. 一种权利要求 1 ~ 7 中任一权利要求所述的方法制得的免疫磁珠应用于人体、动物、食品、化妆品、饲料和临床样本检验中。

一种免疫磁珠的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测技术领域,特别是涉及一种免疫磁珠的制备方法。

背景技术

[0002] 目前,免疫检测和免疫诊断使用的方法是使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗原或抗体)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅判定定性或定量分析。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。但是,目前所用的固相载体存在问题有:批间差异不易控制,包被操作繁复,自动化程度不高,不适宜大批量样本的操作。

[0003] 免疫磁珠是由作为载体的磁性微球和免疫配基结合而成的纳米级材料。磁性微球载体通常是带有氨基、羧基、羟基或巯基等化学官能团的磁珠,该官能团与不同的免疫配基如活性蛋白、抗体、抗原、亲和素、生物素等结合形成免疫磁珠。磁性微球载体具有超顺磁性特点,可使免疫磁珠置于磁场时,显示其磁性,从磁场移出时,磁性消除,免疫磁珠重新分散。

[0004] 包被抗体的免疫磁珠作为固相载体,其上的抗体与相应抗原发生特异性结合形成抗原-抗体-磁珠复合物,这种复合物在磁场作用下,迅速向磁场移动,使复合物与其他物质分离,达到分离特异性抗原的目的,这种分离方法具有检测速度快、特异性高、灵敏度高、重复性好等优点。免疫磁珠的磁分离方法还可借助亲和素-生物素系统的生物放大作用进行更深入的应用。免疫磁珠的磁分离方法可重复性好,操作简单,不需要昂贵的仪器设备,不影响被分离生物材料的生物学性状和功能;并且由于磁珠特殊的性能,可以将免疫检测实现自动化,用于大规模样本的检测,其反应动力学较传统免疫检测方法快,并且具有更大的固相结合表面。

[0005] 纳米 Fe_3O_4 由于制备简单、稳定性高、较强的超顺磁性、生物相容性和表面易于修饰等特点,成为目前应用最广泛的磁珠材料之一。但是,由于纳米 Fe_3O_4 的小尺寸效应、磁偶极子引力等作用,磁性纳米粒子易于团聚,且化学稳定性不高易受氧化,表面羟基不足,导致其难以直接应用到生物领域。

发明内容

[0006] 为解决上述问题,本发明的目的是提供一种免疫磁珠的制备方法,其工艺流程简单,操作简便,原料成本低,适宜于工业化大批量生产。

[0007] 为实现上述发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 一种免疫磁珠的制备方法,其包括以下步骤:

[0009] S1、羧基磁珠的制备

[0010] 取冷冻干燥过的硅基磁珠 2~100 g 分散到 0.2~3L 极性有机溶剂中超声处理 30 ~

60min 后,加入溶解于该极性有机溶剂中的分散剂 10 ~ 100ml,分散剂浓度为 10 ~ 50g/L,搅拌 30~60min 后,滴加溶解于该极性有机溶剂的带有双端羧基的有机小分子 30 ~ 500ml,带有双端羧基的有机小分子浓度为 4~20g/L,控制滴加速度为 0.1 ~ 0.5ml/min,体系温度为 60 ~ 80℃,滴加完毕后反应 6~18h;反应结束后,磁分离出羧基磁珠,依次用无水乙醇及去离子水反复洗涤沉淀物数次至洗涤液 pH 值为 6 ~ 7,超声处理 15 ~ 30min,分散在万分之二 NaN_3 水中,即得到羧基磁珠;

[0011] S2、免疫磁珠的制备

[0012] 上述步骤 S1 中所得的羧基磁珠用 MES 缓冲液清洗至少一次,重悬(1 ~ 20) mg 羧基磁珠于 200 μl MES 缓冲液中,通过活化剂碳二亚胺将磁珠活化后,在 MES 缓冲液环境中偶联抗体,羧基磁珠与活化剂碳二亚胺按照(4 ~ 10):1 的体积比。

[0013] 上述免疫磁珠的制备方法中,步骤 S1 中采用的硅基磁珠为本申请人的专利申请“一种核酸提取磁珠的制备方法及应用”(申请号:201410125272.4、申请日:2014年3月31日)中的硅基磁珠。此硅基磁珠为核壳结构,包括 Fe_3O_4 纳米颗粒内核, SiO_2 外壳层, SiO_2 外壳层包覆在多个 Fe_3O_4 纳米颗粒外表面;硅基磁珠经超声分散处理 1h 后,用纳米激光粒度仪测得其二次粒径为 400nm ~ 1 μm ,饱和磁化强度为 43.0 ~ 74.5 emu/g。

[0014] 此硅基磁珠的制备方法,其包括以下步骤:

[0015] (1)、 Fe_3O_4 纳米颗粒的制备

[0016] 分别配制浓度为 0.1 ~ 1mol/L 的 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 盐溶液,按 Fe^{3+} 与 Fe^{2+} 物质的量的比为 1.5 ~ 2.0 混合;上述混合液搅拌均匀后,加入 0.15mol/L 的聚乙二醇-8000 水溶液,聚乙二醇-8000 体积为 Fe 盐溶液总体积的 1/10~1/5,通入氩气除氧 30 min,调整反应体系温度 60 ~ 70℃,再向混合液中滴加质量浓度为 25%氨水至体系 PH 值为 10 ~ 11,在温度为 70 ~ 80℃ 条件下反应 3 ~ 6h,冷却至室温后,磁分离出黑色沉淀,依次用质量浓度为 1%氨水、5%NaCl 及去离子水反复洗涤沉淀物数次至洗涤液为中性, -10 ~ -20℃ 冷冻干燥 24 ~ 48h,得到超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒;

[0017] 其中磁性纳米 Fe_3O_4 粒子颗粒分散到超纯水中经超声分散处理 1h 后,用纳米激光粒度仪测得其二次粒径为 100 ~ 300nm,饱和磁化强度较高为 57.4 ~ 79.4 emu/g;

[0018] (2)、纳米硅基磁珠的制备

[0019] 将步骤 S1 中所得的超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒称取 2 ~ 500g 分散到 0.1 ~ 3L 无水乙醇中超声波处理 30 ~ 60min 后,加入 20 ~ 1000ml 浓度为 10 ~ 50g/L 的分散剂,搅拌均匀后,向混合液中加入质量浓度为 25%氨水至体系 PH 值为 10,再滴加 0.25 ~ 500ml 体积比为 1:1 的正硅酸四乙酯与乙醇混合溶液,控制滴加速度为 0.1 ~ 0.5ml/min,体系温度为 30 ~ 50℃,滴加完毕后反应 3 ~ 5h,磁分离出表面硅基修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒,用去离子水反复洗涤数次至洗涤液 PH 值为 6 ~ 7,超声分散 15 ~ 30min,分散在万分之二 NaN_3 水中,即得到硅基包被磁珠。

[0020] 进一步地,上述步骤(1)中采用的分散剂为乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸三钠、十六烷基溴化铵、聚乙烯吡咯烷酮中的一种或几种混合。

[0021] 此硅基磁珠,无外加磁场时,呈黑色悬浮液状态,放置有永磁铁时,核酸提取磁珠能够与水快速分离。

[0022] 上述免疫磁珠的制备方法中,步骤 S1 中采用的极性有机溶剂为四氢呋喃、N,N-二

甲基甲酰胺、乙二胺、三乙胺、乙二醇及、丙三醇中的一种。

[0023] 上述免疫磁珠的制备方法中,步骤 S1 中采用的分散剂为柠檬酸三钠、十六烷基溴化铵、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇-1000、聚乙二醇-2000、聚乙二醇-8000 中的一种。

[0024] 上述免疫磁珠的制备方法中,步骤 S1 中采用的带有双端羧基的有机小分子为 1,4-丁二酸、庚二酸、十二酸、丁二酸酐中的一种。

[0025] 上述免疫磁珠的制备方法中,步骤 S2 的具体方法是:

[0026] S2-1、活化磁珠:取羧基磁珠于离心管中,震荡 30 ~ 60min;将离心管放置于磁分离架上,待磁珠完全被吸附,把上清液抽掉;加入 1ml PH 6.0 的 MES 溶液洗涤羧基磁珠,重复洗涤一次;用 100 μ L 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 重悬磁珠,再加入 100 μ L 浓度为 10mg/ml 的碳二亚胺溶液,混匀,将磁珠在室温条件下震荡孵育 30 ~ 60min,将磁珠活化;

[0027] S2-2、包被磁珠:用 1ml 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 洗涤活化后的磁珠数次,将抗体加入 500 μ L 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 MES 溶液中,混匀,在室温条件下震荡孵育 24h,得到免疫磁珠;

[0028] S2-3、免疫磁珠活性检测

[0029] 取 100 μ L 浓度为 10mg/ml 的人 IgG 磁珠,用 PBST 洗涤三次,加入 500 μ L 按 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 30min,用 PBST 洗涤四次,加入显色液 100 μ L,待显色完全后加入 50 μ L 终止液终止反应,用酶标仪检测试验结果。

[0030] 上述免疫磁珠的制备方法,其制得的羧基磁珠为核壳结构,包括 Fe_3O_4 纳米颗粒内核,包覆在多个 Fe_3O_4 纳米颗粒外表面的 SiO_2 中间层, SiO_2 层外键合带有双端羧基的有机小分子;10mg 羧基磁珠分散在 100ml 无水乙醇中经超声分散处理 1h 后,用纳米激光粒度仪测得其二次粒径为 500nm~1.2 μ m,饱和磁化强度为 41.0 ~ 77.4emu/g。

[0031] 上述免疫磁珠的制备方法,其制得的羧基磁珠,无外加磁场时,呈黑色悬浮液状态,放置有永磁铁时,羧基磁珠能够与水快速分离。

[0032] 一种免疫磁珠的应用方法,免疫磁珠利用酶联免疫吸附法进行病原检测。

[0033] 上述免疫磁珠应用于人体、动物、食品、化妆品、饲料和临床样本检验中。

[0034] 由于采用如上所述的技术方案,本发明具有如下优越性:

[0035] 本发明免疫磁珠的制备方法,其在硅基磁珠表面化学偶联羧基小分子,工艺流程简单,操作简便,适于批量化生产;制得的羧基磁珠,饱和磁化强度较高为 41.0 ~ 77.4emu/g,剩磁和矫顽力接近于零,能够在较小的磁场作用下达到快速彻底的固液分离效果,当撤去外加磁场后又能很快到分散到溶液中;采用的硅基磁珠通过在 Fe_3O_4 纳米颗粒外表面包覆 SiO_2 壳层,能很大程度地降低粒子的零电点和屏蔽磁偶极子的互相作用,使粒子具有良好的水溶性、化学稳定性及生物相容性,且 SiO_2 表面存在丰富的羟基,可使复合粒子容易进一步生物功能化;在极性有机溶剂条件下加入带有双端羧基的有机小分子,该分子一端羧基与硅基磁珠的表面键合,另一端裸露在外部,形成了羧基磁珠;羧基磁珠能够与蛋白特异性结合,经验证磁珠法酶联免疫吸附实验操作简便,灵敏度高,背景值低。

[0036] 本发明免疫磁珠的制备方法,其制得的免疫磁珠具有高的表面质量比,可以结合更多的抗体参加免疫反应;免疫磁珠表面通过共价键结合抗体,较物理吸附更坚固;免疫磁珠由于粒径很小,在温育过程中,均匀分散在反应液中,近似于均相反应,反应迅速、高均一性;免疫磁珠超顺磁性在后期洗涤分离过程中更利于全自动仪器应用。

具体实施方式

[0037] 参照以下实施例可以对本发明作进一步详细说明；但是，以下实施例仅仅是例证，本发明并不局限于这些实施例。

[0038] 实施例一

[0039] S1、硅基磁珠的制备

[0040] 称取无水三氯化铁 300g 溶解于 1L 超纯水中，称取六水硫酸亚铁铵 392g 溶解于 1L 超纯水中，把两种溶液转入 5L 反应釜中 200r/min 搅拌 30min 后，称取 45g 聚乙二醇-8000 溶解于 400ml 超纯水中转入反应釜；通氩气除氧 30min，调整反应温度为 60℃，调整转速为 500r/min，向溶液中滴加 25% 氨水至体系 pH 值为 11，升温至 80℃，调整转速为 100r/min 条件下反应 3h；反应完毕后冷却至室温，停止搅拌关闭氩气，取出反应物，磁分离出黑色沉淀，依次用质量浓度为 1% 氨水、5% NaCl 及去离子水反复洗涤沉淀物 3 次至洗涤液为中性，-10℃ 冷冻干燥 48h，得到超顺磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒；

[0041] 称取超顺磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒 100g 分散到 3L 无水乙醇中，超声处理 30min 后，加入 1L 浓度为 50 g/L 乙二胺四乙酸钠的水溶液；200r/min 搅拌 30min 后，向体系中加入质量浓度为 25% 氨水至体系 pH 值为 10；再滴加体积比为 1:1 的正硅酸四乙酯与乙醇混合溶液 30ml，控制滴加速度为 0.5ml/min，体系温度为 50℃，滴加完毕后反应 3h；取出反应物，磁分离出表面硅基修饰的 Fe₃O₄ 纳米颗粒，用无水乙醇清洗 3 遍后，超纯水反复洗涤数次至洗涤液 pH 值为 7，超声分散 30min，分散在万分之二 NaN₃ 水中即得到硅基包被磁珠，将其固含量调整为 100mg/ml。

[0042] S2、羧基磁珠的制备

[0043] 取冷冻干燥过的硅基磁珠 2g 分散到 200ml 四氢呋喃中超声处理 30min 后，加入 10ml 浓度为 20g/L 的聚乙二醇-1000 的四氢呋喃溶液，500r/min 搅拌 30min 后，滴加溶解于四氢呋喃中的 1,4-丁二酸溶液 30ml 其浓度为 4g/L，控制滴加速度为 0.1ml/min，体系温度为 60℃，滴加完毕后反应 6h；反应结束后，磁分离用无水乙醇及去离子水依次洗涤数次至洗涤液 pH 值为 6，超声处理 30min，分散在万分之二 NaN₃ 水中，调整其浓度为 10mg/ml，即得到羧基磁珠；

[0044] S3、羧基磁珠偶联人 IgG

[0045] S3-1、活化磁珠：取 1ml 羧基磁珠于离心管中，在样品混合仪上震荡 30min；将离心管放置于磁分离架上，待磁珠完全被吸附，把上清液抽掉；加入 1ml PH 6.0 的 MES 溶液洗涤羧基磁珠，重复洗涤一次；用 100 μL 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 重悬磁珠，再加入 100 μL 浓度为 10mg/ml 的碳二亚胺溶液，混匀，将磁珠在室温条件下震荡孵育 30 ~ 60min，将磁珠活化；

[0046] S3-2、包被磁珠：用 1ml 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 洗涤活化后的磁珠 2 遍，将 400 μg 人 IgG 加入 500 μl 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 MES 溶液中，混匀，在室温条件下震荡孵育 24h，制成人 IgG 免疫磁珠；

[0047] S3-3、免疫磁珠活性检测

[0048] 取 100 μL 浓度为 10mg/ml 的人 IgG 磁珠，用 PBST 洗涤三次，加入 500 μL 按 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记二抗，室温孵育 30min，用 PBST 洗涤四次，加入显色液

100 μ L,待显色完全后加入 50 μ L 终止液终止反应,用酶标仪检测试验结果。

[0049] 实施例二

[0050] S1、硅基磁珠的制备

[0051] 与实施例一中步骤 S1 相同；

[0052] S2、羧基磁珠的制备

[0053] 取冷冻干燥过的硅基磁珠 10 g 分散到 700ml N,N-二甲基甲酰胺溶液中超声处理 60min 后,加入 20ml 浓度为 50g/L 的柠檬酸三钠的 N,N-二甲基甲酰胺溶液,500r/min 搅拌 30min 后,滴加溶解于 N,N-二甲基甲酰胺中的顺丁烯二酸溶液 100ml 其浓度为 10g/L,控制滴加速度为 0.5ml/min,体系温度为 60 $^{\circ}$ C,滴加完毕后反应 10h;反应结束后,磁分离用无水乙醇及去离子水依次洗涤数次至洗涤液 pH 值为 6,超声处理 30min,分散在万分之二 NaN_3 水中,调整其浓度为 10mg/ml,即得到羧基磁珠；

[0054] S3、羧基磁珠偶联甲胎蛋白

[0055] S3-1、活化磁珠:取 1ml 羧基磁珠于离心管中,在样品混合仪上震荡 30min;将离心管放置于磁分离架上,待磁珠完全被吸附,把上清液抽掉;加入 1ml PH 6.0 的 MES 溶液洗涤羧基磁珠,重复洗涤一次;用 100 μ L 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 重悬磁珠,再加入 100 μ L 浓度为 10mg/ml 的碳二亚胺溶液,混匀,将磁珠在室温条件下震荡孵育 30 ~ 60min,将磁珠活化；

[0056] S3-2、包被磁珠:用 1ml 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 洗涤活化后的磁珠 2 遍,将 400 μ g 甲胎蛋白加入 500 μ l 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 MES 溶液中,混匀,在室温条件下震荡孵育 24h,得到免疫磁珠;用 PBS 洗涤 3 次,磁分离,将共价键结合配体的磁珠分散于 PBS 中,4 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0057] S3-3、免疫磁珠活性检测

[0058] 取 100 μ L 浓度为 10mg/ml 的免疫磁珠,用 PBST 洗涤三次,加入 500 μ L 按 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 30min,用 PBST 洗涤四次,加入显色液 100 μ L,待显色完全后加入 50 μ L 终止液终止反应,用酶标仪检测试验结果。

[0059] 实施例三

[0060] S1、硅基磁珠的制备

[0061] 与实施例一中步骤 S1 相同；

[0062] S2、羧基磁珠的制备

[0063] 取冷冻干燥过的硅基磁珠 100 g 分散到 3L N,N-二甲基甲酰胺溶液中超声处理 60min 后,加入 100ml 浓度为 50g/L 的柠檬酸三钠的 N,N-二甲基甲酰胺溶液,500r/min 搅拌 30min 后,滴加溶解于 N,N-二甲基甲酰胺中的顺丁烯二酸溶液 500ml 其浓度为 5g/L,控制滴加速度为 0.5ml/min,体系温度为 60 $^{\circ}$ C,滴加完毕后反应 18h;反应结束后,磁分离用无水乙醇及去离子水依次洗涤数次至洗涤液 pH 值为 6,超声处理 30min,分散在万分之二 NaN_3 水中,调整其浓度为 10mg/ml,即得到羧基磁珠；

[0064] S3、羧基磁珠偶联甲肝抗原

[0065] S3-1、活化磁珠:取 1ml 羧基磁珠于离心管中,在样品混合仪上震荡 30min;将离心管放置于磁分离架上,待磁珠完全被吸附,把上清液抽掉;加入 1ml PH 6.0 的 MES 溶液洗涤羧基磁珠,重复洗涤一次;用 100 μ L 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 重悬磁珠,再加入

100 μ L 浓度为 10mg/ml 的碳二亚胺溶液,混匀,将磁珠在室温条件下震荡孵育 30 ~ 60min,将磁珠活化;

[0066] S3-2、包被磁珠:用 1ml 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 的 MES 洗涤活化后的磁珠 2 遍,将 400 μ g 甲肝抗原加入 500 μ l 浓度为 15mmol/L、PH 6.0 MES 溶液中,混匀,在室温条件下震荡孵育 24h,得到免疫磁珠;

[0067] S3-3、免疫磁珠活性检测

[0068] 取 100 μ L 浓度为 10mg/ml 的免疫磁珠,用 PBST 洗涤三次,加入 500 μ L 按 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 30min,用 PBST 洗涤四次,加入显色液 100 μ L,待显色完全后加入 50 μ L 终止液终止反应,用酶标仪检测试验结果。

[0069] 免疫磁珠活性检测结果:

[0070]

免疫磁珠项目	背景值	样品
人 IgG 磁珠	0.005	2.303
甲胎蛋白磁珠	0.002	1.943
甲肝抗原磁珠	0.019	1.841

[0071] 抗体和磁珠偶联后仍具有很高的活性,并且磁珠对活性检测的干扰影响很小。

专利名称(译)	一种免疫磁珠的制备方法		
公开(公告)号	CN103926398B	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201410181299.5	申请日	2014-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳惠尔纳米科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳惠尔纳米科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳惠尔纳米科技有限公司		
[标]发明人	杜德光 高祥辉 姜夏 马睿		
发明人	杜德光 高祥辉 姜夏 马睿		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 B82Y15/00 B82Y40/00 B82Y30/00		
CPC分类号	B82Y15/00 B82Y30/00 B82Y40/00 G01N33/54326 G01N33/54346 G01N2446/00		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN103926398A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种免疫磁珠的制备方法，首先取冷冻干燥过的硅基磁珠分散到极性有机溶剂中超声处理后，加入溶解于该极性有机溶剂中的分散剂，搅拌后，滴加溶解于该极性有机溶剂的带有双端羧基的有机小分子，滴加完毕后反应6~18h；反应结束后，磁分离出羧基磁珠，依次用无水乙醇及去离子水反复洗涤沉淀物数次至洗涤液pH值为6~7，超声处理15~30min，分散在万分之二NaN₃水中，即得到羧基磁珠；羧基磁珠用MES缓冲液清洗至少一次，重悬羧基磁珠于MES缓冲液中，通过活化剂破二亚胺将磁珠活化后，在MES缓冲液环境中偶联抗体。本发明工艺流程简单，操作简便，适于批量化生产。