



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104031201 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201410232656.6

(22)申请日 2014.05.29

(73)专利权人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518052 广东省深圳市南山区艺园路200号A座3楼

(72)发明人 饶微 杜凯 赵莉

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 钟日红

(51)Int. Cl.

C08F 220/14(2006.01)

C08F 222/14(2006.01)

C08F 220/28(2006.01)

C08F 220/18(2006.01)

C08F 2/26(2006.01)

C08F 2/44(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(56)对比文件

CN 101241130 A,2008.08.13,说明书第2页第1、3段,第3页第2段.

CN 101241130 A,2008.08.13,说明书第2页第1、3段,第3页第2段.

CN 102364616 A,2012.02.29,说明书第8-14段.

(54)发明名称

一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法,通过配制并使用适宜的乳化液对磁性微球基体进行处理,并通过乳液聚合实现对磁性微球基体表面的修饰,从而获得一种表面包覆有聚丙烯酸酯类聚合物层的磁性微球。其

CN 102775543 A,2012.11.14,实施例2.

CN 1928560 A,2007.03.14,权利要求1-9.

JP 昭61-246203 A,1986.11.01,第2页左上第3段-第3页左上第2段.

US 2007/0105094 A1,2007.05.10,说明书第21-27段.

CN 1803859 A,2006.07.19,实施例2.

CN 1070509 A,1993.03.31,权利要求1-5.

刘春丽等.“聚甲基丙烯酸甲酯磁性微球的合成与表征”.《南阳理工学院学报》.2012,第4卷(第4期),第127-128页,第1.2、2.2部分.

刘春丽等.“聚甲基丙烯酸甲酯磁性微球的合成与表征”.《南阳理工学院学报》.2012,第4卷(第4期),第127-128页,第1.2、2.2部分.

王羽.“基于磁性微球限进功能化的新型生物样品预处理技术”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库·工程科技I辑》.2012,(第2012/07期),第B016-41页.

(续)

审查员 王铮

权利要求书2页 说明书18页

中,所述乳化液包括以下组分:丙烯酸单酯类化合物、丙烯酸二醇酯类化合物、引发剂以及任选地阴离子表面活性剂和水。当用于生物蛋白分离时,该磁性微球在不影响与特定蛋白的连接能力的前提下,显著减少了与其它蛋白的非特异性吸附,为实现高的蛋白特异性吸附的分离工程提供了新的选择。

CN 104031201 B

[接上页]

(56)对比文件

Hana Mackova et al. "Magnetic hollow poly(N-isopropylacrylamide-coN,N'-methylenebisacrylamide-co-glycidyl acrylate) particles prepared by inverse emulsion polymerization".《Colloid and Polymer Science》.2013,第291卷(第1期),第205-213页.

Gang Xie et al. "Preparation and Characterization of Monodisperse Magnetic Poly(styrene butyl acrylate methacrylic acid) Microspheres in the Presence of a Polar Solvent".《Journal of Applied Polymer Science》.2003,第87卷(第11期),第1733-1738页.

1. 一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

步骤a):制备乳化液;

步骤b):将具有磁性的磁性微球基体分散于所述乳化液中,得到分散体系;

步骤c):将所述分散体系进行聚合反应;

其中,

所述磁性微球基体为经过表面修饰使其表面带有活性基团的磁性微粒,所述活性基团能与生物蛋白键合;

所述乳化液包括以下组分:丙烯酸单酯类化合物、丙烯酸二醇酯类化合物和引发剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述乳化液还包括阴离子表面活性剂和水。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述乳化液包括基于乳化剂总重量计为0.5-30重量%的丙烯酸单酯类化合物、0.05-5重量%的丙烯酸二醇酯类化合物、0.2-2重量%的水溶性引发剂、0.1-1重量%的水溶性阴离子表面活性剂,以及62-99重量%的水。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,

所述丙烯酸单酯类化合物选自甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸正丙酯、甲基丙烯酸羟丙酯、甲基丙烯酸正丁酯和甲基丙烯酸羟丁酯中的一种或多种;

所述丙烯酸二醇酯类化合物选自乙二醇二甲基丙烯酸酯、1,3-丙二醇二甲基丙烯酸酯、1,3-丁二醇二甲基丙烯酸酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯、新戊二醇二甲基丙烯酸酯和1,6-己二醇二甲基丙烯酸酯中的一种或多种;

所述水溶性引发剂选自过硫酸钠、过硫酸钾和过硫酸胺中的一种或多种;

所述阴离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、十六烷基磺酸钠和正癸基硫酸钠中的一种或多种。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,在所述乳化液中,丙烯酸二醇酯类化合物的重量含量为丙烯酸单醇酯类化合物的重量含量的5-15%。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述丙烯酸二醇酯类化合物的重量含量为所述丙烯酸单醇酯类化合物的重量含量的10%。

7. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,所述活性基团选自下列组中的至少一种:巯基、羟基、羧基、氨基、环氧基、醛基、异氰酸酯基、氰酸酯基、氰基、异氰基、烯丙基、苄基、丙烯基、马来酰亚胺基、N-羟基琥珀酰亚胺酯基、羰基、酚羟基、磺酸基、肟基、偶氮基、脞基,以及其衍生基团。

8. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,所述磁性微球基体的粒径大小为0.1-5 μm 。

9. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,所述分散体系中的磁性微球基体的浓度为10-150mg/mL。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,步骤c)中的聚合反应在60-90 $^{\circ}\text{C}$ 下进行;聚合反应时间为10-40h。

11. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤a)中,将所述乳化液的组分相互混匀来制备所述乳化液;并且所述方法还包括步骤c)之后的步骤d):将步骤c)得

到的产物进行固液分离,洗涤固体,得到所述磁性微球;其中,在步骤d)中,所述固液分离采用磁分离或离心;所述洗涤依次以有机溶剂和水洗涤数次;所述有机溶剂选自醇类、酯类和卤代烃中的一种或多种。

12.一种根据权利要求1-11中任一项所述的方法制备的磁性微球,其包括具有磁性的磁性微球基体和包覆所述磁性微球基体的聚丙烯酸酯类。

13.根据权利要求12所述的磁性微球,其特征在于,所述聚丙烯酸酯类厚度为5nm-1000nm。

14.根据权利要求13所述的磁性微球,其特征在于,所述聚丙烯酸酯类厚度为10nm-100nm。

15.一种根据权利要求1-11中任一项所述的方法制备的磁性微球在化学发光免疫定量分析试剂的制备中的应用。

16.根据权利要求15所述的应用,其特征在于,所述磁性微球用于人血清中各种特异性总抗体、特异性IgG、IgM类抗体的化学发光免疫检测。

17.根据权利要求16所述的应用,其特征在于,所述磁性微球用于对弓形虫IgG抗体、弓形虫IgM抗体、谷氨酸脱羧酶抗体、风疹病毒IgG抗体、风疹病毒IgM抗体、巨细胞病毒IgG抗体、巨细胞病毒IgM抗体、I/II型单纯疱疹病毒IgG抗体、I/II型单纯疱疹病毒IgM抗体、EB病毒IgG抗体和EB病毒IgM抗体中的至少一种的化学发光免疫定量检测。

一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物蛋白分离的技术领域,具体涉及一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 磁性纳米粒子(例如 Fe_3O_4 纳米粒子)既具有纳米材料所特有的性质,如粒径小、比表面大、偶联容量高等,又具有磁响应性及超顺磁性,可以在恒定磁场下聚集和定位、在交变磁场下吸收电磁波产生热,此外磁性纳米粒子还可以通过表面改性而带有多种活性功能基团(如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 等)。因此,磁性纳米粒子在例如生物分离、药物释放、高热法制癌症等生物医药领域具有广阔的应用前景,从而受到了广泛关注。

[0003] 在生物和医药领域中,磁性微球通常指磁性高分子微球,其是一种近几年发展起来的磁性材料,一般是采用将磁性无机粒子(例如 Fe_3O_4 等)与有机高分子材料相结合形成具有磁性的复合微球。现有磁性微球通过其表面改性等方式即可达到赋予其表面多种功能基的目的,从而其已被广泛运用到生物学、细胞学和分离工程等领域中。特别是在生物分离纯化、免疫分析、以及生物检测等领域,显示出磁性微球使用方便、快捷、高效等特点。

[0004] 用于生物分离的磁性微球通常需要具备以下几个性质:(1)超顺磁性;(2)粒径均一;(3)在水相中分散性好;(4)非特异性吸附低;(5)具有可供修饰的表面化学基团。磁性微球在蛋白质分离方面也具有明显的优点:磁分离技术可用于大规模操作;分离过程可以直接在含有悬浮的固体粒子或另外的生物粒子的原始样品中进行;分离过程简单迅速。

[0005] 然而,蛋白质在磁性微球表面上的非特异性吸附是采用磁性微球进行生物分离中的一个致命的事件,不仅会降低微球的特异性分离效果,而且在检测测定中会增加背景信号,降低信噪比。通常,阻止蛋白对磁性纳米粒子或磁性微球的非特异性吸附的策略是对其表面进行化学修饰。

[0006] 专利文献CN102746529A公开了一种乳液聚合制备单分散磁性微球的方法,但是该方法制备的磁性微球对蛋白质的非特异性吸附高,在免疫检测中的信噪比不佳,且成本较高,不利于工业化生产。

[0007] 专利文献CN92105584.6公开了一种通过悬浮聚合制备免疫磁性微球的方法,在该方法中,将 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 或 Fe_3O_4 磁粉表面用长链脂肪酸进行改性处理,然后在苯乙烯溶液中进行悬浮聚合,得到免疫磁性微球。该方法制备的磁性微球虽然成本低,但是对蛋白质的非特异性吸附也较高,而且在水中分散性不佳。

[0008] 王羽等人采用多孔 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ 磁性硅胶作为基质,首先环氧基修饰,然后采用粒径约为 $50\mu\text{m}$ 聚合物酸将外表面的环氧基先开环形成二醇基,然后再以十八胺、亚硫酸氢钠及三乙胺盐酸盐分别与内表面残余的环氧基进行反应,最终得到内表面依次为十八烷基、磺酸基和季铵盐基而外表面为二醇基的新型磁性限进材料(王羽,基于磁性微球限进功能化的新型生物样品预处理技术[D],天津大学,2012年)。该材料外表面的二醇基可以起到排阻蛋白的作用,而且内表面为磺酸基和季铵盐基的磁性限进材料对小分子物质的吸附量

要远远高于内表面为十八烷基的材料。然而,该论文中公开的磁性微球的制备工艺较为复杂,其对生物蛋白的特异性分离效果还有待进一步考究。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种磁性微球,该磁性微球能够用于生物蛋白的分离并显著地减少或避免蛋白非特异性吸附。

[0010] 本发明的另一个重要的目的是提供如上所述的磁性微球的制备方法。在该方法中,本发明的发明人基于大量的研究和试验,选择合适的乳化液组分及其含量,结合具有磁性的基体,从而在不影响连接特定蛋白的同时又获得能够减少或避免与其它蛋白发生非特异性吸附的磁性微球。

[0011] 此外,本发明还提供了如上所述的磁性微球在免疫检测方面的应用。

[0012] 根据本发明,提供了一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法,包括以下步骤:步骤a):制备乳化液;步骤b):将具有磁性的磁性微球基体分散于所述乳化液中,得到分散体系;步骤c):将所述分散体系进行聚合反应;其中,所述磁性微球基体为经过表面修饰使其表面带有活性基团的磁性微粒;所述乳化液包括以下组分:丙烯酸单酯类化合物、丙烯酸二醇酯类化合物和引发剂。所述引发剂优选为水溶性引发剂。其中,丙烯酸单酯类化合物充当聚合单体,丙烯酸二醇酯类化合物起到交联剂的作用。在上述方法中所使用的磁性微球基体经改性处理后获得特定种类的官能团,且在引发剂的作用下丙烯酸单酯类和交联剂能够发生交联聚合而包覆在磁性微球基体表面,从而得到所述磁性微球。与现有技术不同,本发明采用上述乳化液对磁性微球基体进行修饰并不是为了引入活性基团,同时通过聚合物承载所述活性基团,而是在磁性微球基体已带有活性基团的基础上,通过特定的乳化液乳化聚合形成的聚合物层对磁性微球基体作进一步的修饰改性,从而使磁性微球在不影响通过活性基团特异性连接特定蛋白(例如抗原)的情况下,还可以减少或避免与其它蛋白的非特异性吸附。本发明的技术原理可以通过以下说明进行解释,但这并不能构成对本发明的限定。通过本发明提供的方法制备得到的包覆聚丙烯酸酯类聚合物的磁性微球,其表面的空洞、凹陷等缺陷得到填补(而这些空洞、凹陷等缺陷正是使得具有一定形状(例如Y形)的干扰抗体被非特异性吸附的重要原因),表面更为光滑,因此对其它蛋白的非特异性吸附大为减少。

[0013] 在一个优选的实施方案中,所述乳化液还包括阴离子表面活性剂和水。丙烯酸单酯类化合物与丙烯酸二醇酯类化合物疏水性强,而磁性微球基体的亲水性好,这样磁性微球与丙烯酸单酯类化合物与丙烯酸二醇酯类化合物得不到充分的接触,当加入水溶性好的表面活性剂时,不仅有利于使磁性微球分散性更好,而且使得聚合物易于吸附到磁性微球基体表面进行聚合,通过对磁性微球基体的包覆,也弥补了微球表面的某些物理缺陷。

[0014] 在本发明的一些实施方案中,所述乳化液包括基于乳化剂总重量计为0.5-30重量%的丙烯酸单酯类化合物、0.05-5重量%的丙烯酸二醇酯类化合物、0.2-2重量%的水溶性引发剂、0.1-1重量%的水溶性阴离子表面活性剂,以及62-99重量%的水。其中,丙烯酸单酯类化合物的含量优选为0.1-15重量%,还优选为2-10%。丙烯酸二醇酯类化合物的含量优选为0.1-2%。其中,所述丙烯酸单酯类化合物的量进一步优选为0.5-20重量%,还优选为2-15重量%。此外,应理解,如上所述“丙烯酸单酯类化合物”不限于单一化合物,可以

是丙烯酸单酯类化合物的任意混合物。上述“丙烯酸二醇酯类化合物”等组分与此类似。另外,上述各化合物的特定种类与含量不可单独看待,应从整体上考虑,通过乳化液各成分及其特定含量的协同作用,使得乳化液对修饰磁球表面效果达到最佳。例如,丙烯酸二醇酯类化合物含量低于0.05%时,与单体的交联聚合反应不佳,导致对磁球的表面修饰效果不理想,最终达不到本发明提高信噪比的技术效果;而当其含量过高,余量的丙烯酸二醇酯类化合物可能与磁性微球基体上的活性基团作用,降低后期磁性微球与抗原蛋白连接的能力,更不利于检测。同样,对丙烯酸单酯类化合物含量的限定原因亦如上所述。在本发明中,通过选择这样的乳化液配方,经乳液聚合之后,在磁性微球基体的表面形成聚合物层,该聚合物层既不影响磁性微球与特定蛋白(通过活性基团)的连接能力,同时又能减少该磁性微球与其它蛋白的非特异性作用,还能保证磁性微球的物化性能的稳定性。这些有益效果例如可以从下面的实施例得到验证。

[0015] 在本发明的一些优选实施方案中,为了获得合适厚度的聚合层以及优化聚合反应,使得交联剂与单体协同增效且不带来副产物,从而更好地保持磁性微球活性基团与特定蛋白的连接能力,同时减少磁性微球与其它蛋白的非特异性吸附,丙烯酸二醇酯类化合物的重量含量为丙烯酸单醇酯类化合物的重量含量的5-15%,还优选为10%。

[0016] 适用于本发明的丙烯酸单酯类化合物包括但不限于甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸正丙酯、甲基丙烯酸羟丙酯、甲基丙烯酸正丁酯和甲基丙烯酸羟丁酯。适用于本发明的丙烯酸二醇酯类化合物包括但不限于乙二醇二甲基丙烯酸酯、1,3-丙二醇二甲基丙烯酸酯、1,3-丁二醇二甲基丙烯酸酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯、新戊二醇二甲基丙烯酸酯、和1,6-己二醇二甲基丙烯酸酯。适用于本发明的水溶性引发剂包括但不限于过硫酸钠、过硫酸钾和过硫酸胺;适用于本发明的阴离子表面活性剂包括但不限于十二烷基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、十六烷基磺酸钠和正癸基硫酸钠。所使用的水优选为纯化水。

[0017] 在本发明中,为了不影响磁性微球与后期特定蛋白的连接能力的同时减少该磁性微球与其它蛋白的非特异性吸附作用,且不影响磁性微球本身的物化性能,例如磁性、水相中的分散性等,本发明通过使乳化液中的丙烯酸酯类化合物和丙烯酸二醇酯类化合物发生交联聚合反应,从而最终在磁性微球基体表面形成表面包覆聚丙烯酸酯类聚合物层的磁性微球。而磁性微球在既不影响与特定蛋白连接的同时又需要减少后续与其它蛋白的非特异性吸附的情况下,就需要在丙烯酸酯类化合物和丙烯酸二醇酯类化合物发生交联聚合反应之前对磁性微球基体进行表面引入活性基团。所述活性基团能与生物蛋白键合。所述活性基团例如为巯基、羟基、羧基、氨基、环氧基、醛基、异氰酸酯基、氰酸酯基、氰基、异氰基、烯丙基、苄基、丙烯基、马来酰亚胺基、N-羟基琥珀酰亚胺酯基、羰基、酚羟基、磺酸基、胍基(包括胍基、胍基等)、偶氮基、异氰基、胺基以及上述所有官能团的衍生基团。本发明所使用的磁性微球基体可以是根据已知的方法对未修饰的磁性微粒进行表面改性而获得,也可以通过直接购买获得。所述未修饰的磁性微粒例如可以是 γ -Fe₂O₃, MeFe₂O₃(Me=Co, Mn, Ni), Fe₃O₄, Ni, Co, Fe, Fe-Co和Ni-Fe合金等纳米粒子,优选为 γ -Fe₂O₃和/或Fe₃O₄纳米粒子。合适的磁性微球基体例如可以是Dynabeads(挪威DynaI公司生产)、Estapor微球(货号M1-070/60, Merck公司生产)、Sera-Mag磁珠(货号2415-2105-050250, Thermo Scientific公司生产)或Dynabeads磁珠(货号M-280, LifeTechnologies公司生产)等。

[0018] 本发明所使用的磁性微球基体的粒径大小优选为0.1-5 μm 。在这个粒径范围的磁性微球基体既在水相中具有良好的分散性,又保证了较大的比表面积。磁性微球基体可以是实心的或空心的,还可以是多孔的。磁性微球基体的形状优选为球形。球形的磁性微球基体,其表面积大,吸附效果最佳。

[0019] 在分散体系中,磁性微球基体的浓度太大容易产生聚集沉淀,浓度太小则乳化聚合效果不佳、生产效率低。因此,本发明的发明人经过大量实验后,将分散体系中的磁性微球基体浓度选择为10-400mg/mL,并优选为10-200mg/mL,还优选为10-150mg/mL,进一步优选为20-100mg/mL。在该浓度范围中,磁性微球基体能够在分散体系中均匀稳定地分散,又能获得较佳的聚合效果。

[0020] 为保证包覆在磁性微球基体表面的聚丙烯酸酯类聚合物层具有合适的厚度,且对磁性微球基体表面修饰效果最佳,所述方法的步骤c)中的聚合反应优选在60-90 $^{\circ}\text{C}$,更优选在70-75 $^{\circ}\text{C}$ 下进行;还优选在搅拌下进行聚合反应10-40h,更优选为15-30h。

[0021] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括步骤c)之后的步骤d):将步骤c)得到的产物进行固液分离,洗涤固体,得到所述磁性微球。

[0022] 在一些具体实施方案中,在步骤a)中,将所述乳化液的组分相互混匀来制备所述乳化液,例如通过搅拌或超声使乳化液的固体组分溶解,并任选地采用均质化处理(例如采用高压匀质机、高剪切乳化剂等进行均质化),使乳化液的组分相互充分混匀得到乳化液;在步骤b)中,通过超声使磁性微球基体分散于所述乳化液中;在步骤d)中,所述固液分离采用磁分离或离心;所述洗涤依次以有机溶剂和水洗涤数次;所述有机溶剂选自醇类(例如甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇等)、酯类(例如乙酸乙酯、乙酸丁酯等)和卤代烃中的一种或多种。

[0023] 本发明还提供了一种根据如上所述的方法制备得到的磁性微球,其包括具有磁性的磁性微球基体和包覆所述磁性微球基体的聚丙烯酸酯类。聚丙烯酸酯类材料的包覆能够弥补磁性微球基体表面的某些缺陷,从而减少后续的非特异性吸附,但不影响蛋白的连接能力。

[0024] 在本发明的磁性微球中,表面包覆的聚丙烯酸酯类聚合物的厚度尤为重要,厚度太大则容易将磁性微球基体表面的活性基团遮盖,从而影响其与后续的蛋白连接能力,厚度太小,则起不到对微球基体表面的物理修饰作用,从而达不到减少非特异性吸附的能力。通过本发明的发明人的大量研究,制备得到的磁性微球表面包覆的聚丙烯酸酯类厚度为0.001-5 μm ,优选为5nm-1000nm,还优选为10-500nm,进一步优选为10-100nm,更优选为50nm-100nm。该厚度范围的聚丙烯酸酯类聚合物层有利于不影响后期磁性微球表面基团与特定蛋白的连接,减少或避免磁性微球与其它蛋白的非特异性吸附,以及避免影响到磁性微球本身的物化性质,例如磁性。

[0025] 此外,本发明还提供了根据如上所述的方法制备得到的磁性微球在生化检测中的应用,例如在免疫检测,尤其是在化学发光免疫定量分析中的应用。此类应用,例如应用于人血清中各种特异性总抗体、特异性IgG、IgM类抗体的化学发光免疫检测。

[0026] 在一些具体的应用中,本发明提供的磁性微球可用于对弓形虫IgG抗体、弓形虫IgM抗体、谷氨酸脱羧酶抗体、风疹病毒IgG抗体、风疹病毒IgM抗体、巨细胞病毒IgG抗体、巨细胞病毒IgM抗体、I/II型单纯疱疹病毒IgG抗体、I/II型单纯疱疹病毒IgM抗体、EB病毒IgG

抗体和EB病毒IgM抗体中的至少一种的化学发光免疫定量检测。

[0027] 本发明提供的磁性微球的制备方法,通过配制并使用适宜的乳化液对磁性微球基体进行处理,并通过乳液聚合实现对磁性微球基体表面的修饰,从而获得一种可用于生物分离的磁性微球。当用于生物蛋白分离时,该磁性微球在不影响与特定蛋白的连接能力的前提下,显著减少了与后续的其他蛋白的非特异性吸附,解决了生物蛋白分离中面临的一个主要问题,为实现高的蛋白特异性吸附的分离工程提供了新的选择。通过该方法获得的磁性微球具有良好的分散性,其适用于大规模的操作,分离过程简单易行。此外,该制备方法的操作步骤简单,所采用的原料廉价易得,因此具有很大的利用价值和经济意义。

具体实施方式

[0028] 下面将通过具体实施例对本发明做进一步的说明,但应理解,本发明的范围并不限于此。

[0029] 实施例1

[0030] 1)磁性微球基体的制备

[0031] 按照中国专利CN92105584中的实施例1制备用于本实施例的带有羧基官能团的磁性微球基体。

[0032] 2)乳化液的制备

[0033] 乳化液的组分及其质量百分比如下:

甲基丙烯酸甲酯 5%;

乙二醇二甲基丙烯酸酯 0.5%;

[0034] 过硫酸钾 0.3%;

十二烷基硫酸钠 0.2%; 以及

纯化水 94%。

[0035] 将上述各组分按比例混合,超声处理,使其中固体组分全部溶解,然后进一步充分混匀。

[0036] 3)分散体系制备

[0037] 将步骤1)得到的磁性微球基体以20mg/mL的浓度分散于步骤2)所制备的乳化液中,并通过超声处理,使磁性微球基体分散均匀,得到分散体系。

[0038] 4)聚合反应和后处理

[0039] 将步骤3)制备得到的分散体系在75℃下搅拌反应30小时,经磁铁分离去上清液,固体用甲醇洗涤3次,水洗5次,得到磁性微球。

[0040] 5)磁性微球表面活性基团连接性能的检测

[0041] 5a)检测样品选择:弓形虫IgG(TOXO IgG)阴性和阳性样品各10例、谷氨酸脱羧酶(GAD65)阴性和阳性样品各10例,以及巨细胞病毒IgM(CMV IgM)阴性阴性和阳性样品各10例。以上所有样品均经过临床验证确认。

[0042] 5b)抗原磁性包被微球:用TOXO抗原GAD65抗原和CMV抗原包被本实施例制备得到的磁性微球,并用磷酸盐缓冲液PBS按一定比例稀释至工作浓度0.5mg/mL。

[0043] 5c)发光标记物的制备:使用ABEI(N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺)标记鼠抗人

单克隆IgG抗体(anti-hIgG-ABEI)(用PBS稀释至0.02μg/mL)、ABEI标记葡萄球菌A蛋白(SPA-ABEI)(用PBS稀释至0.04μg/mL)、ABEI标记鼠抗人单克隆IgM抗体(anti-hIgM-ABEI)(用PBS稀释至0.02μg/mL)分别作为TOXO IgG、GAD65和CMV IgM检测的发光标记物。

[0044] 5d)加样工艺确定:使用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供的弓形虫IgG抗体(TOXO IgG)测定试剂盒、谷氨酸脱羧酶抗体(GAD65)测定试剂盒和巨细胞病毒IgM抗体(CMV IgM)测定试剂盒,并参照相应的测试盒说明书进行加样测定。发光信号强度采用MAGLUMI 2000 Plus全自动化学发光测定仪(深圳市新产业生物医学工程股份有限公司)进行测定。

[0045] 测定结果见表1-3。

[0046] 6)磁性微球非特异吸附检测

[0047] 6a)检测样品选择:正常人血清,经临床确认TOXO IgG、GAD65和CMV IgM阴性。

[0048] 6b)发光标记物的制备:使用ABEI(N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺)标记鼠抗人单克隆IgG抗体(anti-hIgG-ABEI)(用PBS以1:4000进行稀释)、ABEI标记葡萄球菌A蛋白(SPA-ABEI)(用PBS以1:3000进行稀释)、ABEI标记鼠抗人单克隆IgM抗体(anti-hIgM-ABEI)(用PBS以1:4000进行稀释)分别作为TOXO IgG、GAD65和CMV IgM检测的发光标记物。

[0049] 6c)抗原磁性包被微球:用TOXO抗原GAD65抗原和CMV抗原包被本实施例的磁性微球,并用磷酸盐缓冲液PBS按一定比例稀释至工作浓度0.5mg/mL。

[0050] 6d)加样工艺确定:使用新产业生物医药公司提供的弓形虫IgG抗体(TOXO IgG)测定试剂盒、谷氨酸脱羧酶抗体(GAD65)测定试剂盒和巨细胞病毒IgM抗体(CMV IgM)测定试剂盒,并参照相应的测试盒说明书进行加样测定。测定结果见表4。

[0051] 对比例1

[0052] 按照中国专利CN92105584中公开的方法制备磁性微球基体,并测定其表面活性基团连接性能和非特异吸附性能。具体测定条件和过程与实施例1中的步骤5)和步骤6)相同,不同之处在于使用本对比例制备的磁性微球基体代替实施例1步骤5)和步骤6)中的磁性微球。结果见表1-4。

[0053] 表1

[0054]

测试项目	样品阴性/阳性	血清样品编号	实施例 1 的磁性微球的发光信号强度及阴性/阳性判断	对比例 1 的磁性微球基体的发光信号强度及阴性/阳性判断
CMV IgM	阴性	C336	5356 (阴性)	105983 (阳性)
		C128	1208 (阴性)	62563 (阳性)
		C500	4211 (阴性)	8359 (阴性)
		C228	1806 (阴性)	5698 (阴性)
		C86	2149 (阴性)	7562 (阴性)
		C471	2350 (阴性)	2359 (阴性)
		C60	4215 (阴性)	10698 (阴性)
		C348	1089 (阴性)	2439 (阴性)
		C502	4356 (阴性)	5326 (阴性)
		C377	6607 (阴性)	7659 (阴性)
	阳性	CP1	159563 (阳性)	165230 (阳性)
		CP2	32859 (阳性)	23597 (阳性)
		CP3	60538 (阳性)	53695 (阳性)
		CP4	254714 (阳性)	247796 (阳性)
		CP5	114689 (阳性)	120874 (阳性)
		CP6	70899 (阳性)	60899 (阳性)
		CP7	240563 (阳性)	257465 (阳性)
		CP8	95686 (阳性)	105693 (阳性)
		CP9	95631 (阳性)	75132 (阳性)
		CP10	586044 (阳性)	569212 (阳性)

[0055] 备注:发光信号强度高于20000标记为阳性,低于20000标记为阴性,下同。

[0056] 表2

[0057]

测试项目	样品阴性/阳性	血清样品编号	实施例 1 的磁性微球的发光信号强度及阴性/阳性判断	对比例 1 的磁性微球基体的发光信号强度及阴性/阳性判断
TOXO IgG	阴性	C336	7546 (阴性)	1168936 (阳性)
		C348	5327 (阴性)	5632 (阴性)
		C389	2358 (阴性)	905326 (阳性)
		C323	4781 (阴性)	5356 (阴性)
		C369	5632 (阴性)	153262 (阳性)
		C350	8461 (阴性)	50329 (阴性)
		C377	2596 (阴性)	268954 (阳性)
		C86	5632 (阴性)	7653 (阴性)
		C60	2579 (阴性)	4698 (阴性)
		C102	5612 (阴性)	7658 (阴性)
	阳性	TP1	286591 (阳性)	295336 (阳性)
		TP2	168354 (阳性)	170562 (阳性)
		TP3	105936 (阳性)	98653 (阳性)
		TP4	468992 (阳性)	450879 (阳性)
		TP5	56798 (阳性)	50598 (阳性)
		TP6	136587 (阳性)	143287 (阳性)
		TP7	154805 (阳性)	168953 (阳性)
		TP8	347761 (阳性)	332567 (阳性)
		TP9	269547 (阳性)	254687 (阳性)
		TP10	165392 (阳性)	170589 (阳性)

[0058] 表3

[0059]

测试项目	样品阴性/阳性	血清样品编号	实施例 1 的磁性微球的发光信号强度及阴性/阳性判断	对比例 1 的磁性微球基体的发光信号强度及阴性/阳性判断
GAD65	阴性	C336	5669 (阴性)	496652 (阳性)
		C348	3569 (阴性)	3956 (阴性)
		C369	7452 (阴性)	6724 (阴性)
		C323	4689 (阴性)	8693 (阴性)
		C377	3569 (阴性)	2563 (阴性)
		C321	5689 (阴性)	6395 (阴性)

[0060]

		C350	4567 (阴性)	7841 (阴性)
		C60	5966 (阴性)	3633 (阴性)
		C471	5368 (阴性)	5689 (阴性)
		C500	2045 (阴性)	196745 (阳性)
	阳性	GP1	40569 (阳性)	36995 (阳性)
		GP2	58611 (阳性)	56321 (阳性)
		GP3	106335 (阳性)	86596 (阳性)
		GP4	175986 (阳性)	187642 (阳性)
		GP5	40539 (阳性)	46952 (阳性)
		GP6	363571 (阳性)	369882 (阳性)
		GP7	140266 (阳性)	132569 (阳性)
		GP8	80563 (阳性)	78536 (阳性)
		GP9	253658 (阳性)	265714 (阳性)
		GP10	87420 (阳性)	86536 (阳性)

[0061] 由以上表1-3可见,包被本发明实施例1制备的磁性微球的TOXO抗原、GAD65抗原和CMV抗原分别与相应抗体阳性的样本中的抗体产生良好的结合,而对于相应抗体阴性的样本,则能检测出完全阴性的信号。这表明了实施例1制备的磁性微球的表面活性基团与蛋白、即抗原连接能力极好,磁性微球表面的聚丙烯酸酯类聚合物完全不影响磁性微球表面的活性基团与蛋白的结合。

[0062] 表4

[0063]

测试项目	血清样品编号	实施例1的磁性微球的发光信号强度及阴性/阳性判断	对比例1的磁性微球基体的发光信号强度及阴性/阳性判断
TOXO IgG	C336	4284 (阴性)	1224643 (阳性)
	C348	3999 (阴性)	3792 (阴性)
	C389	2736 (阴性)	824763 (阳性)
	C323	5742 (阴性)	6224 (阴性)
	C369	4840 (阴性)	123416 (阳性)
	C350	5631 (阴性)	62498 (阳性)
	C377	3829 (阴性)	243310 (阳性)
	C86	8763 (阴性)	8511 (阴性)
	C60	6012 (阴性)	5491 (阴性)

[0064]

	C102	5843 (阴性)	6161 (阴性)
GAD65	C336	4464 (阴性)	628768 (阳性)
	C348	3129 (阴性)	2560 (阴性)
	C369	5412 (阴性)	3072 (阴性)
	C323	3408 (阴性)	103748 (阳性)
	C377	4012 (阴性)	3178 (阴性)
	C321	3218 (阳性)	3400 (阴性)
	C350	3520 (阴性)	3078 (阴性)
	C60	1982 (阴性)	2634 (阴性)
	C471	2561 (阴性)	22766 (阳性)
	C500	2973 (阴性)	201428 (阳性)
	CMV IgM	C336	2636 (阴性)
C128		2715 (阴性)	139161 (阳性)
C500		5012 (阴性)	5843 (阴性)
C228		1892 (阴性)	3584 (阴性)
C86		2360 (阴性)	4509 (阴性)
C471		1743 (阴性)	3764 (阴性)
C60		3264 (阴性)	202597 (阳性)
C348		3464 (阴性)	2676 (阴性)
C502		1525 (阴性)	2127 (阴性)
C377		3672 (阴性)	2085 (阴性)

[0065] 由表4可见,本发明实施例1制备的磁性微球与样本中的抗体的非特异性吸附性能明显低于对比例1中未采用本发明所制备的乳化液修饰的磁性微球基体的非特异性吸附性能,而且,对于有些特殊的样本,对比例1的测试结果更出现与临床样本不符合的虚高现象。以上实验和数据表明了本发明实施例1的磁性微球具有减少或避免非特异性蛋白吸附的显著效果。

[0066] 实施例2

[0067] 1)磁性微球基体的制备

[0068] 按照中国专利公开CN102746529A中实施例1-6制备用于本实施例的磁性微球基体。即,首先制备聚苯乙烯聚合物种子粒子;然后使用包含聚乙烯吡咯烷酮、二乙烯基苯、苯乙烯和甲苯(成孔剂)的乳化液对该种子粒子进行修饰,经乳液聚合,得到多孔性聚苯乙烯颗粒;使用硝酸对所述多孔性聚苯乙烯颗粒进行硝化;再使用FeSO₄将铁结合至多孔性聚苯乙烯颗粒中;然后对所得颗粒进行包覆和羧基官能化之后,得到本实施例使用的带有羧基官能团的磁性微球基体。

[0069] 2)乳化液的制备

[0070] 乳化液的组分及其质量百分比如下:

- | | | |
|--------|-------------|----------|
| | 甲基丙烯酸羟乙酯 | 0.5%; |
| | 新戊二醇二甲基丙烯酸酯 | 0.05%; |
| [0071] | 过硫酸胺 | 0.2%; |
| | 十二烷基磺酸钠 | 0.5%; 以及 |
| | 纯化水 | 98.75%。 |
- [0072] 将上述各组份按比例混合,超声处理,使其中固体组份全部溶解,然后进一步充分混匀。
- [0073] 3)分散体系制备
- [0074] 将步骤1)得到的磁性微球基体以40mg/mL的浓度分散于步骤2)所制备的乳化液中,并通过超声处理,使磁性微球基体分散均匀,得到分散体系。
- [0075] 4)聚合反应和后处理
- [0076] 将步骤3)制备得到的分散体系在在80℃下搅拌反应18小时,经磁铁分离去上清液,固体用甲醇洗涤3次,水洗5次,得到磁性微球。
- [0077] 5)磁性微球表面活性基团连接性能的检测
- [0078] 按照实施例1的步骤5)进行测试,不同之处在于,所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。结果见表5~7。
- [0079] 6)磁性微球非特异吸附检测
- [0080] 按照重复实施例1的步骤6)进行测试,不同之处在于,所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。结果见表8。
- [0081] 实施例3
- [0082] 参照实施例2的步骤进行实验,不同之处仅在于用以下乳化液替换实施例2中的乳化液:
- | | | |
|--------|------------------|----------|
| [0083] | 乳化液的组份及其质量百分比如下: | |
| [0084] | 甲基丙烯酸羟乙酯 | 0.5%; |
| | 新戊二醇二甲基丙烯酸酯 | 0.2%; |
| | 过硫酸胺 | 0.2%; |
| [0085] | 十二烷基磺酸钠 | 0.5%; 以及 |
| | 纯化水 | 98.6%。 |
- [0086] 结果见表5-8。
- [0087] 对比例2
- [0088] 按照中国专利公开CN102746529A中实施例1-4制备磁性微球基体,并测定其表面活性基团连接性能和非特异吸附性能。具体测定条件和过程与实施例2中的步骤5)和步骤6)相同,不同之处在于使用本对比例制备的磁性微球基体代替实施例2步骤5)和步骤6)中的磁性微球。结果见表5~8。
- [0089] 表5

[0090]

测试项目	样品 阴性/ 阳性	血清样品 编号	实施例 2 的磁性微 球的发光信号强度 及阴性/阳性判断	实施例 3 的磁性 微球的发光信号 强度及阴性/阳性 判断	对比例 2 的磁性 微球基体的发光 信号强度及阴性/ 阳性判断
CMV IgM	阴性	C336	4728 (阴性)	5044 (阴性)	987762 (阳性)
		C128	5689 (阴性)	5682 (阴性)	156942 (阳性)
		C500	3529 (阴性)	3768 (阴性)	5782 (阴性)
		C228	5430 (阴性)	6048 阴性)	2634 (阴性)
		C86	1945 (阴性)	2044 (阴性)	6851 (阴性)
		C471	2356 (阴性)	3086 (阴性)	3654 (阴性)
		C60	4879 (阴性)	5047 (阴性)	4810 (阴性)
		C348	2561 (阴性)	2758 (阴性)	5730 (阴性)
		C502	5873 (阴性)	6048 (阴性)	6820 (阴性)
		C377	5126 (阴性)	4985 (阴性)	7873 (阴性)
	阳性	CP1	175642 (阳性)	172484 (阳性)	145637 (阳性)
		CP2	43215 (阳性)	49387 (阳性)	26548 (阳性)
		CP3	57863 (阳性)	68240 (阳性)	65487 (阳性)
		CP4	234561 (阳性)	234578 (阳性)	235611 (阳性)
		CP5	108431 (阳性)	118524 (阳性)	102453 (阳性)
		CP6	894321 (阳性)	824554 (阳性)	785421 (阳性)
		CP7	345210 (阳性)	304117 (阳性)	301245 (阳性)
		CP8	86510 (阳性)	86584 (阳性)	98703 (阳性)

[0091]

		CP9	76431 (阳性)	74438 (阳性)	103241 (阳性)
		CP10	421302 (阳性)	440378 (阳性)	486310 (阳性)

[0092] 表6

[0093]

测试项目	样品 阴性/ 阳性	血清样品 编号	实施例 2 的磁性微 球的发光信号强度 及阴性/阳性判断	实施例 3 的磁性 微球的发光信号 强度及阴性/阳性 判断	对比例 2 的磁性 微球基体的发光 信号强度及阴性/ 阳性判断
TOXO IgG	阴性	C336	5412 (阴性)	6685 (阴性)	1251097 (阳性)
		C348	5687 (阴性)	5487 (阴性)	6583 (阴性)
		C389	3654 (阴性)	1568 (阴性)	897621 (阳性)
		C323	4628 (阴性)	5724 (阴性)	4598 (阴性)
		C369	5132 (阴性)	5252 (阴性)	168439 (阳性)
		C350	2356 (阴性)	4435 (阴性)	19874 (阴性)
		C377	3541 (阴性)	2015 (阴性)	284710 (阳性)
		C86	6874 (阴性)	7593 (阴性)	8910 (阴性)
		C60	3559 (阴性)	3554 (阴性)	5431 (阴性)
		C102	6215 (阴性)	6861 (阴性)	7357 (阴性)
	阳性	TP1	275610 (阳性)	245810 (阳性)	259841 (阳性)
		TP2	176354 (阳性)	203357 (阳性)	201684 (阳性)
		TP3	96854 (阳性)	95794 (阳性)	102543 (阳性)
		TP4	385672 (阳性)	307972 (阳性)	475689 (阳性)
		TP5	46983 (阳性)	52988 (阳性)	49612 (阳性)
		TP6	156432 (阳性)	142583 (阳性)	184256 (阳性)
		TP7	179531 (阳性)	205953 (阳性)	135682 (阳性)
		TP8	354613 (阳性)	330610 (阳性)	354621 (阳性)
		TP9	254983 (阳性)	304988 (阳性)	201873 (阳性)
		TP10	196543 (阳性)	195579 (阳性)	196826 (阳性)

[0094] 表7

[0095]

测试项目	样品 阴性/ 阳性	血清样品 编号	实施例 2 的磁性微 球的发光信号强度 及阴性/阳性判断	实施例 3 的磁性 微球的发光信号 强度及阴性/阳性 判断	对比例 2 的磁性 微球基体的发光 信号强度及阴性/ 阳性判断
GAD65	阴性	C336	5596 (阴性)	4586 (阴性)	516892 (阳性)
		C348	3854 (阴性)	4573 (阴性)	4195 (阴性)
		C369	7261 (阴性)	6678 (阴性)	5792 (阴性)
		C323	4195 (阴性)	4458 (阴性)	7982 (阴性)
		C377	2943 (阴性)	3044 (阴性)	3018 (阴性)
		C321	6813 (阴性)	8427 (阴性)	5943 (阴性)
		C350	5192 (阴性)	6458 (阴性)	8019 (阴性)
		C60	5713 (阴性)	4397 (阴性)	3529 (阴性)
		C471	4952 (阴性)	5521 (阴性)	4695 (阴性)
		C500	2946 (阴性)	3486 (阴性)	186452 (阳性)
	阳性	GP1	50136 (阳性)	82754 (阳性)	49613 (阳性)
		GP2	69842 (阳性)	75864 (阳性)	47621 (阳性)
		GP3	163542 (阳性)	182475 (阳性)	98651 (阳性)
		GP4	132549 (阳性)	124458 (阳性)	175626 (阳性)
		GP5	50134 (阳性)	66457 (阳性)	56138 (阳性)
		GP6	431562 (阳性)	337581 (阳性)	416235 (阳性)
		GP7	150234 (阳性)	204574 (阳性)	153426 (阳性)
		GP8	90125 (阳性)	100254 (阳性)	86423 (阳性)
		GP9	176950 (阳性)	186990 (阳性)	214683 (阳性)
		GP10	65432 (阳性)	66784 (阳性)	95634 (阳性)

[0096] 由以上表5-7可见,包被本发明实施例2和3制备的磁性微球的TOXO抗原、GAD65抗原和CMV抗原分别与相应抗体阳性的样本中的抗体产生良好的结合,而对于相应抗体阴性的样本,则能检测出完全阴性的信号。这表明了实施例2和3制备的磁性微球的表面活性基团与蛋白、即抗原连接能力极好,磁性微球表面的聚丙烯酸酯类聚合物完全不影响磁性微球表面的活性基团与蛋白的结合。

[0097] 表8

[0098]

测试项目	血清样品编号	实施例 2 的磁性微球的发光信号强度及阴性/阳性判断	实施例 3 的磁性微球的发光信号强度及阴性/阳性判断	对比例 2 的磁性微球基体的发光信号强度及阴性/阳性判断
TOXO IgG	C336	5613 (阴性)	6717 (阴性)	135649 (阳性)
	C348	4201 (阴性)	4254 (阴性)	6739 (阴性)
	C389	3265 (阴性)	3858 (阴性)	984352 (阳性)
	C323	4952 (阴性)	5554 (阴性)	7762 (阴性)
	C369	5169 (阴性)	4867 (阴性)	163852 (阳性)
	C350	4821 (阴性)	2021 (阴性)	59613 (阳性)
	C377	2956 (阴性)	3467 (阴性)	34162 (阳性)
	C86	9543 (阴性)	10420 (阴性)	6591 (阴性)
	C60	6830 (阴性)	7240 (阴性)	6135 (阴性)
	C102	2465 (阴性)	1867 (阴性)	4261 (阴性)
GAD65	C336	5913 (阴性)	6785 (阴性)	694351 (阳性)
	C348	4256 (阴性)	4572 (阴性)	6521 (阴性)
	C369	6289 (阴性)	4420 (阴性)	2564 (阴性)
	C323	6205 (阴性)	5796 (阴性)	4694 (阴性)
	C377	6031 (阴性)	6457 (阴性)	6191 (阴性)
	C321	4316 (阴性)	4358 (阴性)	4603 (阴性)
	C350	2546 (阴性)	2781 (阴性)	6405 (阴性)
	C60	3194 (阴性)	3368 (阴性)	2019 (阴性)
	C471	2468 (阴性)	2941 (阴性)	3461 (阴性)
	C500	4619 (阴性)	5501 (阴性)	235874 (阳性)
CMV IgM	C336	3491 (阴性)	3934 (阴性)	191635 (阳性)
	C128	6159 (阴性)	6679 (阴性)	124671 (阳性)
	C500	3461 (阴性)	3587 (阴性)	3054 (阴性)
	C228	2016 (阴性)	2847 (阴性)	4916 (阴性)
	C86	3469 (阴性)	4013 (阴性)	2046 (阴性)
	C471	1954 (阴性)	2428 (阴性)	4671 (阴性)
	C60	5068 (阴性)	244618 (阳性)	2749 (阴性)
	C348	5319 (阴性)	5679 (阴性)	6942 (阴性)
	C502	1605 (阴性)	1785 (阴性)	3491 (阴性)
	C377	3259 (阴性)	4840 (阴性)	5192 (阴性)

[0099] 由表8可见,本发明实施例2和3制备的磁性微球与样本中的抗体的非特异性吸附性能明显低于对比例2中未采用本发明所制备的乳化液修饰的磁性微球基体与样本中的抗体的非特异性吸附性能,而且,对于有些特殊的样本,对比例2的测试结果更出现与临床样本不符合的虚高现象。以上实验和数据表明了本发明实施例2和3的磁性微球具有减少或避

免非特异性蛋白吸附的显著效果。

[0100] 实施例4

[0101] 1)磁性微球基体的制备

[0102] 按照中国专利公开CN102746529A中实施例1-6制备用于本实施例的磁性微球基体。

[0103] 2)乳化液的制备

[0104] 乳化液的组分及其质量百分比如下：

甲基丙烯酸丁酯 10%；

1,6-己二醇二甲基丙烯酸酯 2%；

[0105] 过硫酸钾 1%；

十二烷基硫酸钠 0.5%； 以及

水 86.5%。

[0106] 将上述各组分按比例混合，超声处理，使其中固体组分全部溶解，然后在高剪切乳化机中乳化20分钟。

[0107] 3)分散体系制备

[0108] 将步骤1)得到的磁性微球基体以50mg/mL的浓度分散于步骤2)所制备的乳化液中，并通过超声处理，使磁性微球基体分散均匀，得到分散体系。

[0109] 4)聚合反应和后处理

[0110] 将步骤3)制备得到的分散体系在75℃下搅拌反应28小时，经磁铁分离去上清液，固体用甲醇洗涤3次，水洗5次，得到磁性微球。

[0111] 5)磁性微球表面活性基团连接性能的检测

[0112] 按照实施例1的步骤5)进行测试，不同之处在于，所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。

[0113] 从实验结果数据(在此未列出)来看，本实施例制备得到的磁性微球的活性基团与抗原蛋白的结合能力与实施例1和2类似，包被该磁性微球的抗原与样本中的抗体结合极好，而对阴性样本展现出完全阴性的信号。

[0114] 6)磁性微球非特异吸附检测

[0115] 按照重复实施例1的步骤6)进行测试，不同之处在于，所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。

[0116] 从实验结果数据(在此未列出)来看，包被有抗原的本实施例制备的磁性微球在对样本中的抗体进行吸附检测时，与实施例1和2类似，非特异性吸附很少。

[0117] 实施例5

[0118] 1)磁性微球基体的制备

[0119] 按照中国专利公开CN102746529A中实施例1-4制备用于本实施例的磁性微球基体。

[0120] 2)乳化液的制备

[0121] 乳化液的组分及其质量百分比如下：

	甲基丙烯酸乙酯	10%;
	1,3-丙二醇二甲基丙烯酸酯	2%;
[0122]	过硫酸胺	1%;
	正癸基硫酸钠	0.5%; 以及
	水	86.5%。

[0123] 将上述各组份按比例混合,超声处理,使其中固体组份全部溶解,然后在高压匀质机中均质化20分钟。

[0124] 3)分散体系制备

[0125] 将步骤1)得到的磁性微球基体以50mg/mL的浓度分散于步骤2)所制备的乳化液中,并通过超声处理,使磁性微球基体分散均匀,得到分散体系。

[0126] 4)聚合反应和后处理

[0127] 将步骤3)制备得到的分散体系在70℃下搅拌反应24小时,经磁铁分离去上清液,固体用甲醇洗涤3次,水洗5次,得到磁性微球。

[0128] 5)磁性微球表面活性基团连接性能的检测

[0129] 按照实施例1的步骤5)进行测试,不同之处在于,所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。

[0130] 从实验结果数据(在此未列出)来看,本实施例制备得到的磁性微球的活性基团与抗原蛋白的结合能力与实施例1和2类似,包被该磁性微球的抗原与样本中的抗体结合极好,而对阴性样本展现出完全阴性的信号。

[0131] 6)磁性微球非特异吸附检测

[0132] 按照重复实施例1的步骤6)进行测试,不同之处在于,所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。

[0133] 从实验结果数据(在此未列出)来看,包被有抗原的本实施例制备的磁性微球在对样本中的抗体进行吸附检测时,与实施例1和2类似,非特异性吸附很少。

[0134] 实施例6

[0135] 1)磁性微球基体的制备

[0136] 按照中国专利公开CN102746529A中实施例1-4制备用于本实施例的磁性微球基体。2)乳化液的制备

[0137] 乳化液的组份及其质量百分比如下:

	甲基丙烯酸羟丙酯	12%;
	1,3-丙二醇二甲基丙烯酸酯	2%;
[0138]	过硫酸钠	1%;
	十二烷基硫酸钠	0.5%; 以及
	水	84.5%。

[0139] 将上述各组份按比例混合,超声处理,使其中固体组份全部溶解,然后在高剪切乳化机中乳化20分钟。

[0140] 3)分散体系制备

[0141] 将步骤1)得到的磁性微球基体以100mg/mL的浓度分散于步骤2)所制备的乳化液

中,并通过超声处理,使磁性微球基体分散均匀,得到分散体系。

[0142] 4)聚合反应和后处理

[0143] 将步骤3)制备得到的分散体系在70℃下搅拌反应20小时,经磁铁分离去上清液,固体用乙醇洗涤3次,水洗5次,得到磁性微球。

[0144] 5)磁性微球表面活性基团连接性能的检测

[0145] 按照实施例1的步骤5)进行测试,不同之处在于,所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。

[0146] 从实验结果数据(在此未列出)来看,本实施例制备得到的磁性微球的活性基团与抗原蛋白的结合能力与实施例1和2类似,包被该磁性微球的抗原与样本中的抗体结合极好,而对阴性样本展现出完全阴性的信号。

[0147] 6)磁性微球非特异吸附检测

[0148] 按照重复实施例1的步骤6)进行测试,不同之处在于,所使用的磁性微球替换为本实施例步骤4)制备得到的磁性微球。从实验结果数据(在此未列出)来看,包被有抗原的本实施例制备的磁性微球在对样本中的抗体进行吸附检测时,与实施例1和2类似,非特异性吸附很少。

[0149] 虽然本发明已作了详细描述,但对本领域技术人员来说,在本发明精神和范围内的修改将是显而易见的。此外,应当理解的是,本发明记载的各方面、不同具体实施方式的部分、和列举的各种特征可被组合或全部或部分互换。在上述的各个具体实施方式中,那些参考另一个具体实施方式的实施方式可适当地与其它实施方式组合,这是将由本领域技术人员所能理解的。此外,本领域技术人员将会理解,前面的描述仅是示例的方式,并不旨在限制本发明。

专利名称(译)	一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN104031201B	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201410232656.6	申请日	2014-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市新产业生物医学工程股份有限公司		
[标]发明人	饶微 杜凯 赵莉		
发明人	饶微 杜凯 赵莉		
IPC分类号	C08F220/14 C08F222/14 C08F220/28 C08F220/18 C08F2/26 C08F2/44 C07K1/22 G01N33/53 G01N33/577		
审查员(译)	王铮		
其他公开文献	CN104031201A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明提供了一种用于生物蛋白分离的磁性微球的制备方法，通过配制并使用适宜的乳化液对磁性微球基体进行处理，并通过乳液聚合实现对磁性微球基体表面的修饰，从而获得一种表面包覆有聚丙烯酸酯类聚合物层的磁性微球。其中，所述乳化液包括以下组分：丙烯酸单酯类化合物、丙烯酸二醇酯类化合物、引发剂以及任选地阴离子表面活性剂和水。当用于生物蛋白分离时，该磁性微球在不影响与特定蛋白的连接能力的前提下，显著减少了与其它蛋白的非特异性吸附，为实现高的蛋白特异性吸附的分离工程提供了新的选择。

甲基丙烯酸甲酯	5%;
乙二醇二甲基丙烯酸酯	0.5%;
过硫酸钾	0.3%;
十二烷基硫酸钠	0.2%; 以及
纯化水	94%。