



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103386282 B

(45) 授权公告日 2016.06.22

(21) 申请号 201310299325.X

CN 103007845 A, 2013.04.03, 说明书第  
[0005]-[0012] 段.

(22) 申请日 2013.07.17

US 4345015 A, 1982.08.17, 全文.

(73) 专利权人 江苏泽成生物技术有限公司

CN 1459433 A, 2003.12.03, 全文.

地址 214434 江苏省无锡市江阴市澄江中路  
159号D405室

审查员 郭小红

(72) 发明人 刘振世 郭翠 夏振伟 刘振华

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理  
有限公司 11401

代理人 巴晓艳

(51) Int. Cl.

*B01J 13/02*(2006.01)

*G01N 33/531*(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101053827 A, 2007.10.17, 权利要求 2.

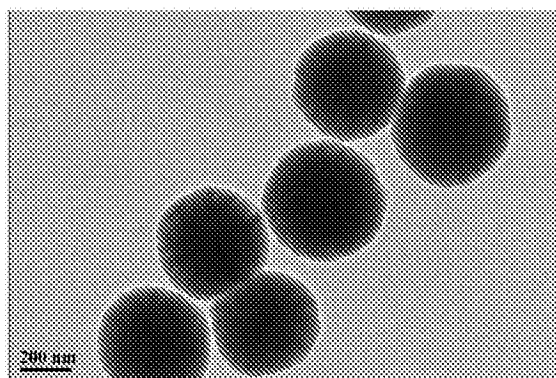
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的  
合成以及环氧基与蛋白连接的方法

(57) 摘要

一种合成具有超顺磁性四氧化三铁微球、微球的表面环氧基活化以及环氧基与蛋白连接的方法,本发明以可溶性三价铁离子盐为原料,溶在乙二醇溶液中,于 200 ~ 300℃ 下进行溶剂热反应,形成 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米磁珠。采用正硅酸四乙酯在氨水的参与下合成核壳式二氧化硅微球。以  $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(KH-560)为硅烷偶联剂在 pH=4.0, 40℃ 水浴条件下反应,修饰环氧基。环氧基磁性微粒在 pH=9 的偶联缓冲液环境中 37℃ 震荡反应 4-6 小时,磁性微球表面的环氧基(-CH(O))和蛋白氨基(NH<sub>2</sub>-)发生共价反应连接蛋白。该方法原料价廉易得,设备简单,易于实现控制,工艺重复性好,产品质量稳定,操作安全可靠。本方法偶联后磁性微球可应用于临床诊断、细胞分选和食品安全检测等领域。



1. 表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的制备的方法, 其特征在于, 实现步骤: 采用水热合成法制备粒径为300-500nm的具备超顺磁性的四氧化三铁微球, 采用正硅酸四乙酯在氨水的参与下合成核壳式二氧化硅微球, 将清洗好的磁性微球加入到由  $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷20%, 甲醇72%, 水8% 体积比组成的混合溶液中调节pH3.5-4.0, 35-50°C水浴条件下反应8-16小时, 修饰环氧基。

2. 采用表面活性基团为环氧基的具有超顺磁性微球与蛋白连接的方法, 其特征在于, 实现步骤:

(1) 权利要求1所述的表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的清洗: 用

pH7.5-10.0的偶联缓冲液洗涤分散环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球;

(2) 更换蛋白溶液体系: 将蛋白溶液体系更换为偶联缓冲液体系且浓缩至终浓度为5mg/mL-10mg/mL;

(3) 连接反应: 配制好的蛋白溶液加入到(1)中37°C 震荡反应8-12小时磁性微球表面的环氧基(-CH(O))和蛋白氨基(NH<sub>2</sub>-)发生共价反应连接蛋白;

(4) 封闭未反应的活性基团: 加入0.1-1.0.mg/mL的牛血清白蛋白缓冲液封闭未反应的环氧基;

(5) 偶联好蛋白的环氧基磁珠的保存: 将连接好蛋白的磁性微球保存于由20%乙醇, 0.1%BSA和5‰叠氮钠组成的缓冲液中4°C 保存;

其中, 偶联缓冲液为含十二水磷酸氢二钠1M, 乙二胺四乙酸0.1M的混合溶液经0.22 $\mu$ m水系滤膜过滤后, 120°C 20min高压灭菌制得。

3. 根据权利要求书2所述的一种采用表面活性基团为环氧基的具有超顺磁性微球与蛋白连接的方法, 其特征在于磁性微球偶联检测方法为酶联免疫吸附试验(ELISA)或化学发光酶免疫检测法(CLIA)。

## 一种表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的合成以及环氧基与蛋白连接的方法

### 技术领域

[0001] 本发明中表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的合成方法是一种系列铁酸盐纳米磁珠的制备方法,属于无机材料制备工艺技术领域,环氧基与蛋白连接的实验采用环氧基( $-CH(O)$ )和氨基( $NH_2-$ )发生共价反应属于生物免疫检测领域。

### 技术背景

[0002] 磁性微球是一类直径在纳米或微米级的球形复合材料。磁性微球的核心有四氧化三铁或三氧化二铁等超顺磁性材料构成,外围包覆聚苯乙烯或葡聚糖等高分子材料。核心物质具有超顺磁性,使磁珠可以在外加磁场作用下向磁场方向移动达到分离的目的;外围高分子材料可以通过物理或化学的方法活化产生氨基( $NH_2-$ )、羧基( $COOH-$ )或环氧基( $-CH(O)$ )等基团,可以与蛋白等生物活性分子偶联。偶联后的磁珠广泛应用于生物标记,生物分子的分离,蛋白的纯化,抗体纯化,分子诊断等领域。

[0003] 环氧基活化的磁珠,即表面含有环氧基基团的磁珠,环氧基磁珠与蛋白的连接不需要其他活化剂的加入,磁性微球表面的环氧基( $-CH(O)$ )和蛋白氨基( $NH_2-$ )发生共价反应连接。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的合成方法和环氧基与蛋白连接的方法。磁性微球的制备方法原料价廉易得,设备简单,易于实现控制,工艺重复性好,产品质量稳定,操作安全可靠。环氧基与蛋白连接的方法,方法相对简单,不需要活化剂的加入,实验设备要求较低,普通实验室即可实验有效的蛋白连接,重复性好。在环氧基表面活化中,免疫磁性微珠不发生团聚和不吸附杂蛋白是应用领域具有高特异性、准确性、可靠性的重要保证,也是本专利产品十分关键的技术问题。为了解决这些问题,我们采用合适的活化剂对磁性微球表面进行活化,在活化的同时加入分散剂,阻止活化期间的团聚,选择合适的缓冲液及其pH值,确保制备出的免疫磁性微珠的直径在 $0.5-1\mu m$ 大小。为了降低非特异性结合,我们则采用一种封闭剂。使用该封闭剂封闭剩余的活化基团,从而充分保证了产品的高特异性。

[0005] 本发明的技术方案如下

[0006] 1.表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的合成方法其特征包括以下步骤

[0007] (1)配制金属离子溶液, ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )和醋酸钠( $NaAc$ )以1:6-1:10的摩尔比混合成金属离子溶液,其中铁离子的浓度为 $0.01mol/L-0.05mol/L$ ,机械搅拌至完全溶解;

[0008] (2)于 $200\sim 300^\circ C$ 下进行溶剂热反应8-16h,得四氧化化三铁超顺磁性微球黑色悬浊液;

[0009] (3)用乙醇和水清洗磁性微球;

[0010] (4) $40^\circ C-60^\circ C$ 烘干4-6h得具有超顺磁性四氧化三铁微球,磁性微球的粒径为 $300-$

500nm;

[0011] (5)将制备所得的超顺磁性四氧化三铁微球于0.1M的HCl中超声分散30-60min;

[0012] (6)将分散好的微球用纯净水反复洗涤至中性;

[0013] (7)洗涤好的微球分散于乙醇,蒸馏水,氨水(体积比为80:20:1)组成的混合溶液中;

[0014] (8)向上述溶液中加入正硅酸四乙酯(四氧化三铁与正硅酸四乙酯的摩尔比为10:3)室温机械搅拌反应6-18h;

[0015] (9)用乙醇和水清洗磁性微球;

[0016] (10)将清洗好的磁性微球加入到由 $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷20%,甲醇72%,水8%体积比组成的混合溶液中调节pH4,40℃水浴条件下反应8-16小时;

[0017] (11)用甲苯和丙酮清洗微球;

[0018] (12)60℃烘干得表面活性基团数量在100-200 $\mu\text{mol/g}$ 的环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球。

[0019] 2.环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球与蛋白连接的方法其特征包括以下步骤:

[0020] (1)用pH=7.5-10.0的偶联缓冲液(含十二水磷酸氢二钠1M,乙二胺四乙酸0.1M的混合溶液0.22 $\mu\text{m}$ 水系滤膜过滤后,120℃20min高压灭菌,)洗涤分散环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球;

[0021] (2)将蛋白溶液更换体系为偶联缓冲液体系终浓缩至终浓度为5mg/mL-10mg/mL;

[0022] (3)配制好的蛋白溶液加入到(1)中37℃震荡反应8-12小时磁性微球表面的环氧基(-CH(O))和蛋白氨基(NH<sub>2</sub>-)发生共价反应连接连接蛋白;

[0023] (4)加入0.1-1.0mg/mL的牛血清白蛋白缓冲液封闭未反应的环氧基;

[0024] (5)将连接好蛋白的磁性微球保存于由20%乙醇,0.1%BSA和5%叠氮钠组成的缓冲液中4℃保存;

[0025] (6)检测磁珠偶联效果:利用酶联免疫检测原理:使用可与偶联蛋白质特异反应的生物酶标记分子(如碱性磷酸酶)做指示剂,使用可与偶联蛋白质特异反应的异硫氰酸荧光素(FITC)作为桥连物,使用可与磁珠反应的多克隆抗体作为桥连物,利用抗原与抗体特异性结合的原理,免疫磁珠在37℃下参与免疫反应,洗涤磁珠后去除上清,加入发光底物(该底物可被指示剂催化持续发光),测试结果的变异系数和发光值能反映出环氧基磁珠的偶联效果。

[0026] 本发明具有以下优点:

[0027] 1.超顺磁性微球的合成过程中采用高温水热反应制备过程中步骤相对简单,减少洗涤以及反应过程中微球的损失,制备的微球粒径均匀,成球性好,尺寸均一,磁含量高,磁性分布均一。

[0028] 2.微球的表面环氧基活化方法先采用微球表面包被二氧化硅在进行环氧基活化的方式微球的物化稳定性高。不容易被氧化,不易出现团聚,耐酸碱性好,环氧基活化采用( $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷,甲醇,水组成的混合溶液中调节pH=4,40℃水浴条件下反应制备所得表面活性基团数量在100-200 $\mu\text{mol/g}$ 磁珠。偶联容量高,可以与多种活性物质发生偶联,与抗体结合的特异性高,可以满足体外分子诊断的需求。在外磁场的作用

下环氧基磁珠可以定向移动和集中,磁感应距离大,用普通磁铁即可轻松实现对磁珠的富集与转移,避免了高磁场对人的伤害。

[0029] 3. 环氧化微球与蛋白铰链过程是采用37℃震荡反应并采用了BSA进行未反应环氧基的封闭,解除了磁珠的非特异性结合。

[0030] 4. 主要应用方向:

[0031] (1)免疫沉淀蛋白与蛋白复合物;(2)纯化温度敏感型蛋白或活性蛋白,如酶;(3)通过共价偶联酶,进行酶活的分析;(4)固定proteinA和proteinG进行抗体的纯化检验验证;(5)成功应用于化学发光免疫分析平台。

[0032] 5. 本发明采用环氧基磁珠制备以及环氧基与蛋白铰链,相比较羧基微球与蛋白铰链相实验过程简单,实验设备投入少,反应时间短在对抗体或蛋白活性要求高的实验中尤为重要。

#### 附图说明:

[0033] 图1制备四氧化三铁裸珠(具体放大倍数等等技术参数)

[0034] 图2二氧化硅包被四氧化三铁磁性微球

[0035] 图3本方法在癌胚抗原(CEA)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)中的应用效果图,标准曲线 $y=2645.7x+18564$

[0036] 图4高效液相色谱仪外标法标准曲线: $y=0.0022x+0.0301$

#### 具体实施方式

[0037] 1. 表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的合成方法其特征包括以下步骤

[0038] (1)配制金属离子溶液150mL,( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )和醋酸钠(NaAc)以1:8的摩尔比混合成金属离子溶液其中铁离子的浓度为0.01mol/L,机械搅拌至完全溶解;

[0039] (2)于200~300℃下进行溶剂热反应8h;

[0040] (3)用乙醇和水分别清洗磁性微球3次;

[0041] (4)60℃烘干4h得具有超顺磁性四氧化三铁微球1.1g,磁性微球的粒径为300-500nm;

[0042] (5)将制备所得的超顺磁性四氧化三铁微球去0.9g于0.1M的HCl中超声分散30-60min;

[0043] (6)将分散好的微球用纯净水反复洗涤至中性;

[0044] (7)洗涤好的微球分散于480mL由乙醇,蒸馏水,氨水(体积比为80:20:1)组成的混合溶液中;

[0045] (8)向上述溶液中加入0.81g正硅酸四乙酯(四氧化三铁与正硅酸四乙酯的摩尔比为10:3)室温机械搅拌反应6-18h;

[0046] (9)用乙醇和水分别清洗磁性微球3次;

[0047] (10)将清洗好的磁性微球加入到40mL由 $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷20%,甲醇72%,水8%组成的混合溶液中调节pH=4,40℃水浴条件下反应8-16小时;

[0048] (11)用甲苯和丙酮分别清洗微球2次;

[0049] (12)60℃烘干得表面活性基团数量在100-200 $\mu$ mol/g的环氧基活化的具有超顺磁

性四氧化三铁微球1g。

[0050] 2. 环氧基磁性微球包面环氧基数量的测定

[0051] 环氧基磁性微球表面环氧基数量的测定采用荧光分光光度法测定环氧基活性基团数量为100-200 $\mu\text{mol/g}$ 。

[0052] 3. 环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球与蛋白连接的方法其特征包括以下步骤:

[0053] (1)取环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球100mg用pH=9的偶联缓冲液(含十二水磷酸氢二钠1M,乙二胺四乙酸0.1M的混合溶液0.22 $\mu\text{m}$ 水系滤膜过滤后,120 $^{\circ}\text{C}$  20min高压灭菌,)洗涤分散环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球,磁性微球用偶联缓冲液定容至50mg/mL;

[0054] (2)将蛋白溶液用Sephadex G25层析柱更换体系为偶联缓冲液体系,用超滤管浓缩至终浓度为5mg/mL-10mg/mL计算蛋白体积后取5mg抗体对应的蛋白溶液体积;

[0055] (3)配制好的蛋白溶液加入到(1)中37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡反应8-12小时磁性微球表面的环氧基(-CH(O))和蛋白氨基(NH<sub>2</sub>-)发生共价反应连接蛋白;

[0056] (4)将连接好蛋白的磁性微球磁分离10分钟,将上清溶液小心移出后保存于4 $^{\circ}\text{C}$ ,用于偶联效率测试;

[0057] (5)加入2mL0.2mg/mL的牛血清白蛋白缓冲液封闭未反应的环氧基37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡反应2小时;

[0058] (6)将连接好蛋白的磁性微球用保存缓冲液清洗3次,每次用4mL,用磁珠保存液将磁珠稀释到10mg/mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。磁珠保存液由20%乙醇,0.1%BSA和5%叠氮钠组成的。

[0059] 4. 环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球与蛋白连接的偶联效率测定方法

[0060] 用高效液相色谱仪外标法测定环氧基磁性微球偶联后上清溶液内抗体浓度,计算未结合抗体的质量。用参与偶联的抗体总质量减去未结合抗体质量再除以抗体总量即为抗体偶联率。

[0061] 5. 环氧基活化的具有超顺磁性四氧化三铁微球与蛋白连接的效果检测

[0062] 检测偶联后磁珠的效果,方法如下:

[0063] (1)使用癌胚抗原(CEA)国际标准品(国际卫生组织WHO认证,英国国家生物制品检定所NIBSC生产,货号为73/601)稀释6个已知浓度:0,5,10,25,50,150ng/mL,每点加入15 $\mu\text{L}$ ;

[0064] (2)用碱性磷酸酶(ALP)标记的小鼠单克隆抗体作为指示剂,稀释到已知的工作浓度1.5 $\mu\text{g/mL}$ ;

[0065] (3)用磁珠保存液将偶联后的磁珠(浓度20mg/mL)稀释为2mg/mL;

[0066] (4)在60 $\mu\text{L}$ 酶标抗体溶液中加入30 $\mu\text{L}$ 工作浓度为2mg/mL的磁珠,混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴30分钟;

[0067] (5)在外加的磁场保护下,使用清洗浓缩液洗涤磁珠3次,每次300 $\mu\text{L}$ ;

[0068] (6)加入200 $\mu\text{L}$ 发光底物,用化学发光仪检测发光强度;

[0069] (7)随着抗原浓度升高,读取的发光值也明显在升高,说明该免疫磁珠的活性越好。

[0070] 所需缓冲液:

[0071] 上述磁珠偶联缓冲液:十二水磷酸氢二钠1M,乙二胺四乙酸0.1M,pH7.5,

[0072] 上述磁珠保存清洗液:Tris6.02g/L,甲基纤维醚4.97g/L,叠氮钠0.99g/L,Tween-200.9946mL/L,硫酸新霉素0.99g/L,四环素0.03g/L,BSA4.97g/L pH8.0

[0073] 上述磁珠保存缓冲液:20%乙醇,0.1%BSA和5%叠氮钠。

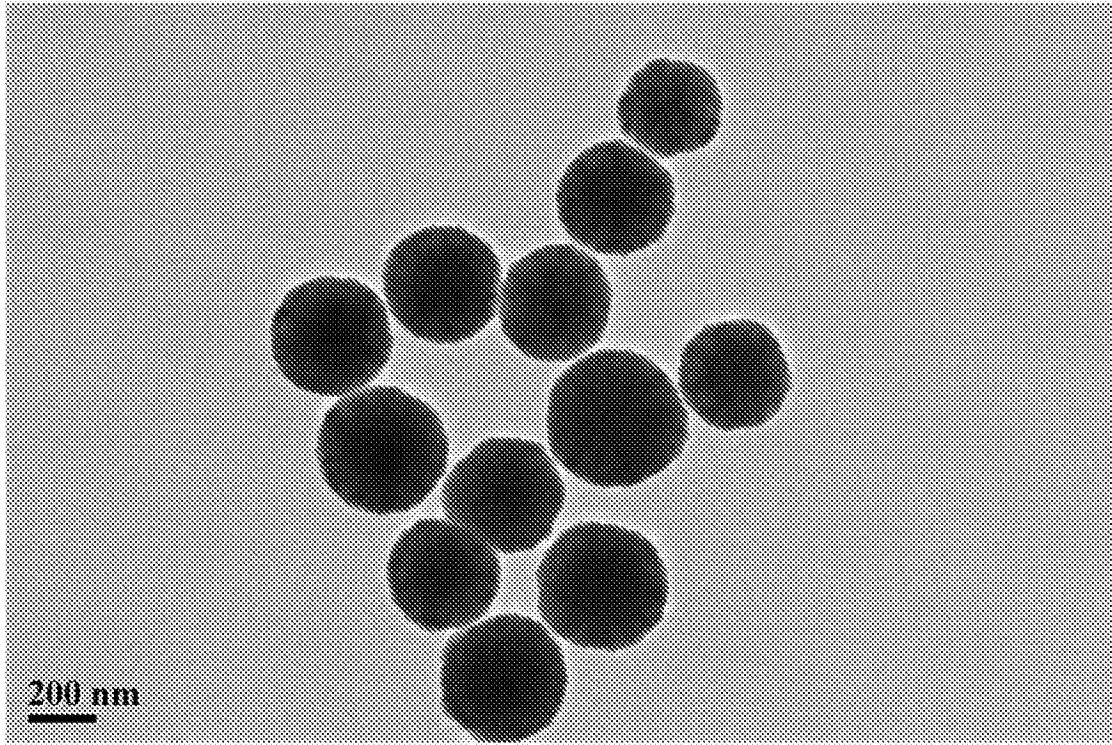


图1

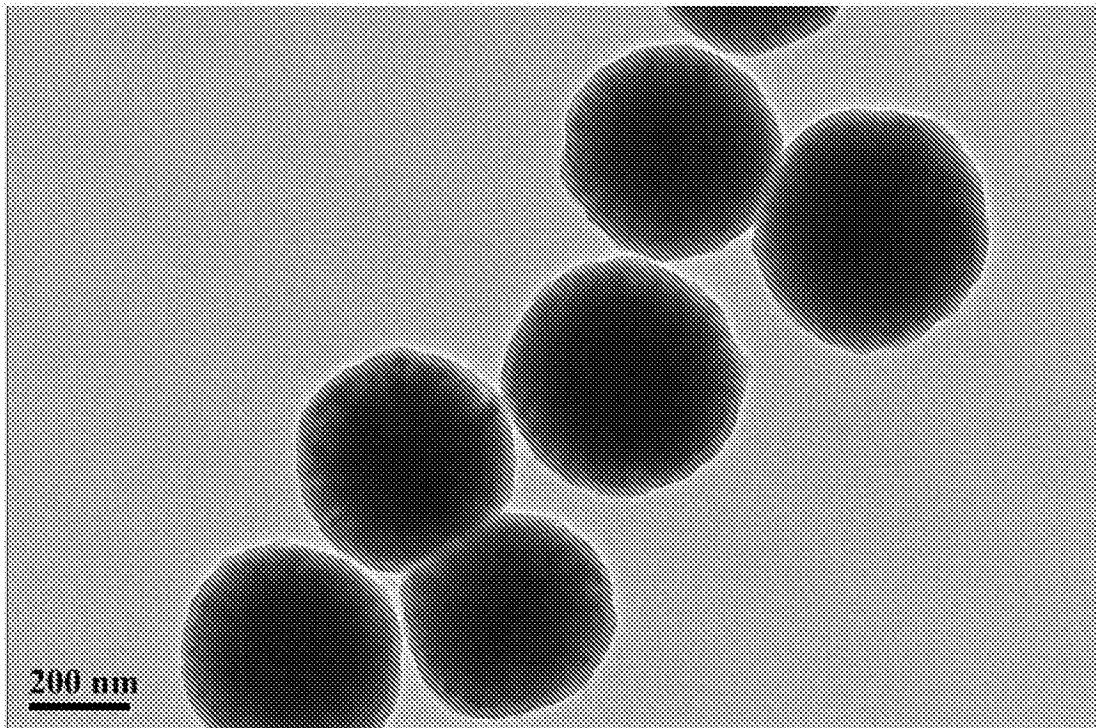


图2

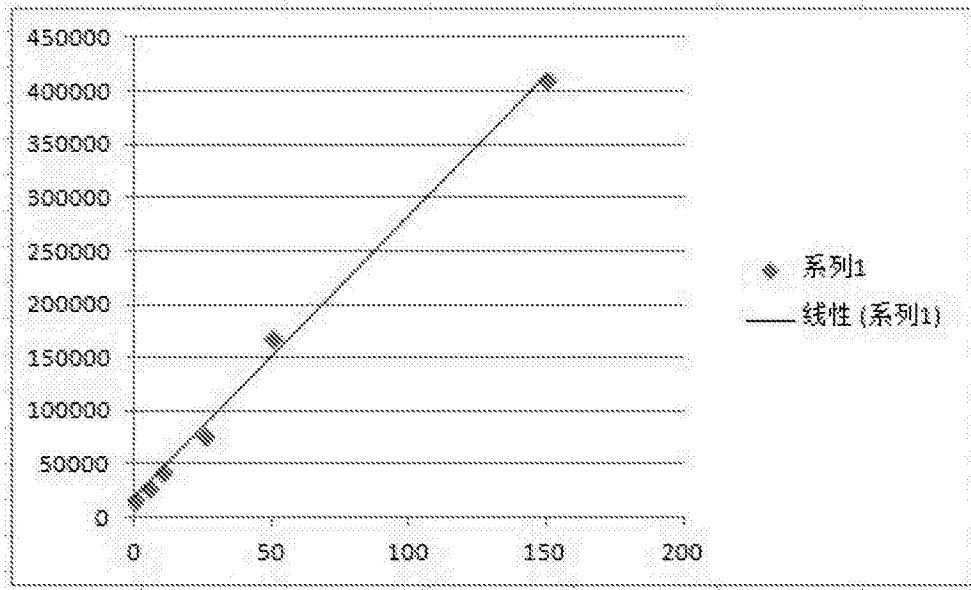


图3

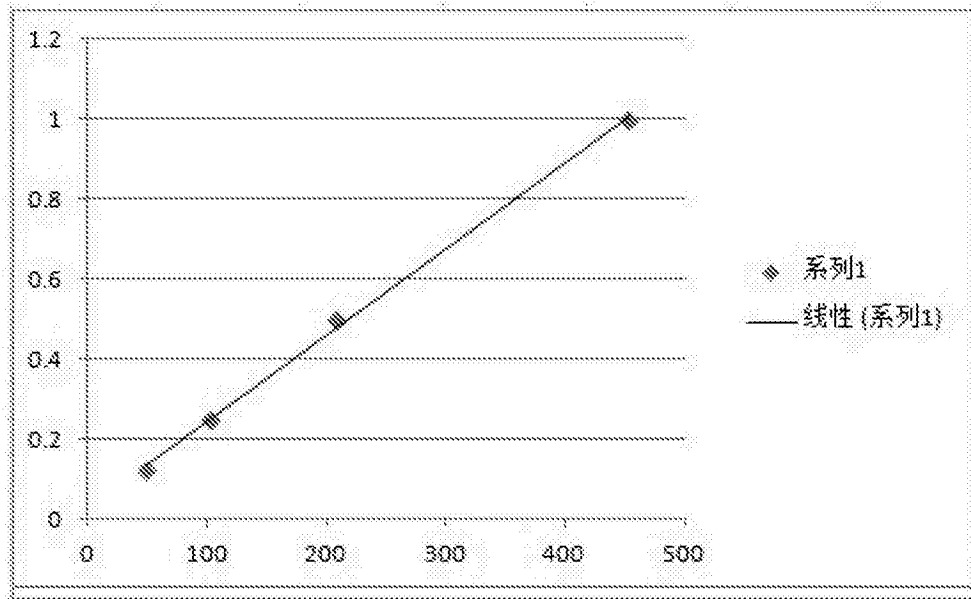


图4

专利名称(译)	一种表面环氧基活化的具有超顺磁性微球的合成以及环氧基与蛋白连接的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103386282B</a>	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201310299325.X	申请日	2013-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	江阴泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	江阴泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	刘振世 郭翠 夏振伟 刘振华		
发明人	刘振世 郭翠 夏振伟 刘振华		
IPC分类号	B01J13/02 G01N33/531		
审查员(译)	郭小红		
其他公开文献	CN103386282A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种合成具有超顺磁性四氧化三铁微球、微球的表面环氧基活化以及环氧基与蛋白连接的方法，本发明以可溶性三价铁离子盐为原料，溶在乙二醇溶液中，于200~300°C下进行溶剂热反应，形成Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米磁珠。采用正硅酸四乙酯在氨水的参与下合成核壳式二氧化硅微球。以γ-(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(KH-560)为硅烷偶联剂在pH=4.0，40°C水浴条件下反应，修饰环氧基。环氧基磁性微粒在pH=9的偶联缓冲液环境中37°C震荡反应4-6小时，磁性微球表面的环氧基(—CH(O))和蛋白氨基(NH<sub>2</sub>-)发生共价反应连接蛋白。该方法原料价廉易得，设备简单，易于实现控制，工艺重复性好，产品质量稳定，操作安全可靠。本方法偶联后磁性微球可应用于临床诊断、细胞分选和食品安全检测等领域。

