



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101269844 B

(45) 授权公告日 2010.09.08

(21) 申请号 200710038353.0

审查员 李应会

(22) 申请日 2007.03.23

(73) 专利权人 中国科学院上海应用物理研究所

地址 201808 上海市嘉定区宝嘉公路 2019 号

(72) 发明人 汪勇先 梁胜 张国欣 尹端沚

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
31002

代理人 薛琦

(51) Int. Cl.

C01G 49/08 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

氨基修饰的磁性纳米粒子及免疫磁性纳米分离试剂的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种氨基修饰的磁性纳米粒子的制备方法,其包括:①将磁性纳米粒子通过硅烷试剂在甲苯和低级一元醇混合溶剂中醇解对磁性纳米粒子表面进行硅胶包覆,得到硅胶包覆的磁纳米粒子;②将上述硅胶包覆的磁纳米粒子与硅烷偶联剂反应,制得表面修饰氨基官能团的硅胶包覆磁性纳米粒子。本发明还公开一种包括上述制备方法的免疫磁性纳米分离试剂的制备方法。本发明制备方法的反应体系稳定、温和,操作简单易控制,所用试剂原料成本低廉,反应废液易处理不造成环境污染,适于工业化生产。制得的氨基修饰的磁性纳米粒子粒径小且分布范围窄,分散性良好;制得的免疫磁性纳米分离试剂具有高的抗体结合率和低的非特异性结合率、磁性分离快速等特性。

1. 一种氨基修饰的磁性纳米粒子的制备方法,其包括下列步骤:
 - ①将磁性纳米粒子与硅烷试剂按比例 1 : 0.5 ~ 10(g/ml) 添加,以体积比为 1 : 1 ~ 30 的甲苯和低级一元醇混合溶液为反应溶剂,加热至 80°C ~ 120°C 在磁性纳米粒子表面进行硅胶包覆,得硅胶包覆的磁纳米粒子;
 - ②将步骤①中硅胶包覆的磁纳米粒子与硅烷偶联剂按 1 : 0.5 ~ 10(g/ml) 比例进行反应,反应溶剂及条件同步骤①,制得氨基修饰的磁性纳米粒子;其中,所述的磁性纳米粒子为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,所述的硅烷试剂为正硅酸四乙酯或硅酸钠,所述的硅烷偶联剂为 DB550、KH792 或 SG-Si900。
2. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于步骤①中所述的低级一元醇为甲醇或乙醇。
3. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于步骤①中所述的磁性纳米粒子与硅烷试剂的比例为 1 : 4 ~ 6(g/ml),反应溶剂为体积比为 1 : 1 的甲苯和甲醇混合溶液。
4. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于步骤①是在惰性气体保护下,搅拌并控温回流 18 ~ 30 小时进行硅胶包覆。
5. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于步骤②中所述的硅胶包覆的磁纳米粒子与硅烷偶联剂的比例为 1 : 2 ~ 4(g/ml),反应溶剂为体积比为 1 : 1 的甲苯和甲醇混合溶液。
6. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于步骤②是在惰性气体保护下,搅拌并控温回流 18 ~ 30 小时进行氨基修饰磁纳米粒子。
7. 一种免疫磁性纳米分离试剂的制备方法,其包括权利要求 1 ~ 6 任一项所述的制备方法的步骤,然后将步骤②制得的氨基修饰的磁性纳米粒子进行活化后,与抗体或配体进行偶联反应。
8. 如权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于所述的活化包括将该制得的氨基修饰的磁性纳米粒子与活化剂戊二醛按比例 1 : 0.01 ~ 1(g/ml),反应 3 ~ 8 小时。
9. 如权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于所述的与抗体进行偶联反应包括将戊二醛活化后的磁性纳米粒子与抗体在 -8 ~ 8°C 下反应 24 ~ 48h,并采用有机羧酸或生化试剂作为封闭试剂,并用清洗液清洗;其中清洗液为含有 1w/v% NaN_3 、0.01M Tris、0.1w/v% BSA、0.15M NaCl 和 0.001M EDTA 的水溶液。
10. 如权利要求 9 所述的制备方法,其特征在于所述的戊二醛活化后的磁性纳米粒子与羊抗兔抗体按重量比 1:0.025,在 0°C 反应 36 小时;所述的有机羧酸为甘氨酸,生化试剂为牛血清白蛋白。

氨基修饰的磁性纳米粒子及免疫磁性纳米分离试剂的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种适于产业化的氨基修饰的磁性纳米粒子及由其制得的免疫磁性纳米分离试剂的制备方法。

背景技术

[0002] 在 20 世纪 70 年代后期,磁性分离技术开始应用于生物学领域,目前已经在细胞学、分子生物学、生物化学和生物医学等方面取得了令人瞩目的研究成果。

[0003] 磁性分离技术是以磁性粒子为载体,包被酶、蛋白质、多肽、抗体和抗原等生物分子,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物分子,具有磁性分离简单方便、亲和吸附高特异性及高敏感性等众多优点,从而作为一类新型功能性材料被广泛应用于生物医学、免疫分析领域。磁性纳米粒子(粒径 1~100nm)作为生物分子载体具有:(1)高的比表面积及能量和良好的分散性,可吸附或键合更多生物分子;(2)纳米级磁性粒子更易悬浮于目标分离剂中,可大大提高吸附或键合目标分子效率;(3)低的质量传递阻力;(4)因磁性纳米粒子粒径小可在体内被细胞吞噬,从而为诊断与治疗体内疾病提供了广阔的发展空间。

[0004] 目前,文献报道中制备磁性纳米粒子的方法大致有如下几大类:a.共沉淀法;b.微乳液法;c.热分解法;d.生物合成法;e.部分还原法;f.水热合成法等,这些方法均为成熟的纳米粒子制备技术,为了防止合成出来的磁性纳米粒子之间因范德华力作用产生团聚、沉降现象,通常需要在其表面引入高密度保护分子作为稳定剂,保护层可以是无机材料、有机分子或聚合物,这样可以有效的保持磁性纳米粒子在溶液中良好的分散性。

[0005] 迄今为止,有关对磁纳米粒子进行修饰,并应用于免疫磁性纳米分离试剂的研究较多,但国内多限于实验室研究阶段,国外已有此类产品销售。如申请号为 CN200610049213.9 的专利申请公开了一种硅烷偶联化纳米磁性复合四氧化三铁材料的制备方法,利用硅烷偶联剂直接对 Fe_3O_4 磁纳米粒子进行修饰,因磁粒子兼具有顺磁性和铁磁性,使得这种方法所制得的产物易于团聚、粘连,从而不易分散,且 Fe_3O_4 易于氧化。再如申请号为 CN200510025324.1 的专利申请公开了一种免疫磁性纳米粒子细胞分离器及其制法和应用,其中所涉及的免疫磁性纳米粒子细胞分离器为首先通过油包水型反相微乳液法制得具有核壳结构的磁性纳米粒子,再通过 N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷在粒子表面修饰氨基,然后与抗体或配体偶联反应制得。然而,该发明仍处实验室阶段,其采用反相微乳液法制备的产物粒径、形貌虽均一但其产量极低,不适合产业化生产。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种粒径分布范围窄且分散性较佳的氨基修饰的磁性纳米粒子以及由其制得的免疫磁性纳米分离试剂的制备方法,两种制备方法均适于工业化生产。

[0007] 本发明将磁性 Fe_3O_4 纳米粒子通过一定量硅烷试剂在甲苯和低级一元醇混合溶剂中醇解,对磁性纳米粒子表面进行硅胶包覆从而形成核壳结构,再在相似反应条件下采用一定量硅烷偶联剂以键合形式在硅胶包覆的磁性纳米粒子表面修饰氨基官能团,氨基经活化后,在一定的反应条件下偶联生物分子,从而得到最终产物——免疫磁性纳米分离试剂。本发明采用在甲苯和低级一元醇混合溶剂中醇解方式包覆硅胶,反应体系应充分除水,否则由于水解速度快无法控制包覆过程,而使硅胶无法包覆磁纳米粒子或包覆不均一。醇解则可避免这一情况的发生,通过磁性 Fe_3O_4 粒子表面羟基与硅烷试剂反应而最终实现硅胶包覆磁性 Fe_3O_4 纳米粒子,并通过控制磁性 Fe_3O_4 纳米粒子与硅烷试剂、硅烷偶联剂的用量比例及反应时间,使得制备的硅胶包覆及氨基修饰的磁性纳米粒子粒径分布范围窄且分散性较佳、不易团聚;进一步制得的免疫磁性纳米分离试剂具有高的抗体结合率和低的非特异性结合率、磁性分离快速等特性。而本发明制备方法选用的各种工艺条件温和,无需高温高压,重复性好;选用的试剂均为常规、价廉产品,且部分试剂可回收再利用;故而成本低廉、适于工业化大生产。

[0008] 因此,本发明通过下列技术方案来解决上述技术问题。其中,氨基修饰的磁性纳米粒子的制备方法,可以包括下列步骤:

[0009] ①将磁性纳米粒子与硅烷试剂按比例 1:0.5 ~ 10(g/ml) 添加,以体积比为 1:1 ~ 30 的甲苯和低级一元醇混合溶液为反应溶剂,加热至 80°C ~ 120°C 在磁性纳米粒子表面进行硅胶包覆,得硅胶包覆的磁纳米粒子;

[0010] ②将步骤①中硅胶的包覆磁纳米粒子与硅烷偶联剂按 1:0.5 ~ 10(g/ml) 比例进行反应,反应溶剂及条件同步骤①,制得氨基修饰的磁性纳米粒子。

[0011] 根据本发明,步骤①中所述的磁性纳米粒子可以是现有任何铁氧体磁性纳米粒子,所说的铁氧体是指具有铁磁性的金属氧化物。本发明选用常用的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子为例来说明。所说的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子可根据现有技术自行合成,本发明优选共沉淀法来合成,如将强碱溶液先在 N_2 等惰性气体保护条件下,恒温加热至 $60 \sim 90^\circ\text{C}$ 温度范围之后,取适当配比的三价铁盐、二价铁盐、强酸混合溶液,快速加入至强碱溶液中,强烈搅拌片刻后冷却至室温,进行充分除水及除杂质,得到黑色的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子。

[0012] 本发明硅烷试剂是指一类单体表面具有硅醇、硅醚等基团与铁氧体表面羟基起反应生成硅胶,达到包覆磁纳米粒子效果的试剂。本发明优选正硅酸四乙酯 (TEOS) 或硅酸钠。

[0013] 所说的低级一元醇是指 C_{1-4} 一元醇,优选甲醇或乙醇。

[0014] 本发明步骤①中所述的磁性纳米粒子与硅烷试剂的比例若过大,超过 1:10,不仅造成试剂浪费、产物损失、难于清洗,而且未清洗净的产物会影响氨基修饰的效果;反之,比例太小,则无法完全包覆磁纳米粒子。本发明优选比例为 1:4 ~ 6(g/ml)。

[0015] 因硅烷试剂易溶于甲苯,所以本发明反应溶剂选用甲苯作为介质,而低级一元醇则为醇解介质,因此醇的用量可较甲苯过量,但太多,则不仅浪费,还增加后处理的工作。本发明反应溶剂最优选体积比为 1:1 的甲苯和甲醇混合溶液。

[0016] 本发明步骤①较佳地是进行回流 18 ~ 30 小时反应,在 Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面包覆硅胶,得硅胶包覆的磁纳米粒子。

[0017] 本发明步骤②中所述的硅胶包覆的磁纳米粒子与硅烷偶联剂的比例若过大,不仅

造成试剂浪费、产物损失、难于清洗,而且未清洗净的产物会直接影响下一步的反应;反之,比例太小,磁纳米粒子表面修饰的氨基密度不足,从而无法偶联足够的抗体。本发明优选为 1:2 ~ 4(g/ml)。

[0018] 较佳地,为操作简便和节约成本,步骤②中的反应溶剂与反应条件可设置成与步骤①相同,故反应溶剂也优选体积比为 1:1 的甲苯和甲醇混合溶液,并控温回流 18 ~ 30 小时进行氨基修饰,使核壳结构的磁性纳米粒子表面修饰有较高密度的氨基活性基团,制备出氨基修饰的磁性纳米粒子。

[0019] 其中,本发明所采用的硅烷偶联剂为一类具有氨基修饰的反应试剂,如市售各种型号硅烷偶联剂, DB550、KH792 及 SG-Si900 等。

[0020] 另外,同常规,上述步骤①、②反应条件优选在惰性气体保护下以防止 Fe_3O_4 磁性纳米粒子氧化,反应过程中以 50 ~ 100rpm 速度进行充分搅拌;每一步制得的产物均需充分清洗除去杂质和未反应物,其中,步骤①采用甲苯,步骤②依次用甲苯、甲醇、水及 PBS 缓冲溶液清洗。

[0021] 在上述制备过程中,所产生的有机废液均可通过蒸馏方式回收重新利用,不可回收利用的剩余废液可以通过在指定地点燃烧进行处理,燃烧产物为 CO_2 和水,不造成环境污染;清洗过程产生的水废液中无环境污染物质,可直接排放。

[0022] 本发明上述制备方法制得的氨基修饰的磁性纳米粒子可直接应用于免疫磁性纳米分离试剂的制备,因此,本发明免疫磁性纳米分离试剂的制备方法包括上述氨基修饰的磁性纳米粒子制备方法的步骤,然后将步骤②制得的氨基修饰的磁性纳米粒子进行活化后,与抗体或配体进行偶联反应。

[0023] 其中,活化步骤可以采用常规技术,氨基活化所选用的活化剂为具有二个醛基基团以上的试剂,本发明优选戊二醛作为活化剂,具体步骤包括将该制得的氨基修饰的磁性纳米粒子与活化剂戊二醛按比例 1:0.01 ~ 1(g/ml),优选 1:0.08 ~ 0.2(g/ml) 反应 3 ~ 8 小时,依次用去离子水、 $\text{pH} = 7.0 \sim 8.5$ 的 PBS 缓冲溶液清洗;更优选比例约为 1:0.1(g/ml) 的氨基修饰的磁性纳米粒子与活化剂戊二醛搅拌反应 6 小时左右。

[0024] 所述的抗体或配体可根据需分离的样品来选用,可以是蛋白质、氨基酸、多肽、核酸等。较佳地,本发明与抗体进行偶联反应,偶联反应也可以采用现有技术,包括将活化后的氨基修饰磁性纳米粒子与抗体在 $-8 \sim 8^\circ\text{C}$ 下反应 24 ~ 48h,并采用有机羧酸或生化试剂封闭产物的醛基作为封闭试剂;更佳地,本发明选用特定清洗液清洗,以更好地降低产品的非特异性结合率,所说的特定清洗液为含有 1w/v% NaN_3 、0.01M Tris、0.1w/v% BSA、0.15M NaCl 和 0.001M EDTA 的水溶液。

[0025] 上述在经活化、偶联生物分子的制备过程中,除清洗液外其它反应废液均直接排放,不造成环境污染。

[0026] 在本发明一较佳实施例中,所述的活化后的氨基修饰磁性纳米粒子与羊抗兔抗体按重量比 1:0.025,在 0°C 反应 36 小时;而所说的有机羧酸优选甘氨酸,生化试剂优选牛血清白蛋白 (BSA)。

[0027] 本发明制备方法中所需试剂除 NaN_3 外,其它均为常规试剂,来源充足,产品的附加值高,因此适合规模化生产。本工艺方法在各阶段反应体系中均无严格的客观条件要求例如高温、高压等等,反应体系稳定,仅需在惰性气体保护、50 ~ 100rpm 快速搅拌等常规条

件下,适当对反应体系温度进行控制即可得到所需产物,大大提高了合成效率,且可重复性好;也无需特殊设备,易于操作,推广性强。本发明两种制备方法在整个生产过程中条件温和,部分试剂可回收、纯化再利用,可进一步节约成本,废弃的反应液易处理,对环境不造成污染,符合可持续发展的绿色环保要求。制得的氨基修饰的磁性纳米粒子粒径小且粒径分布范围窄(20~60nm)、分散性好、顺磁性、磁响应能力强。而制得的免疫磁性纳米分离试剂质量稳定,可低温存放,具有高的抗体结合率和低的非特异性结合率、磁性分离快速等特性。

附图说明

[0028] 图1为本发明制备方法各步骤制得的磁性纳米粒子产物的透射电子显微镜(TEM)形貌图,其中,a)图为本发明采用共沉淀法自制的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子;b)图为硅胶包覆的磁性纳米粒子(硅烷化磁纳米粒子);c)图为偶联蛋白的免疫磁性纳米分离试剂。

[0029] 图2为本发明采用共沉淀法自制的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的磁滞回曲线。

[0030] 图3为本发明 Fe_3O_4 磁性纳米粒子及硅胶包覆的磁性纳米粒子的X射线粉末衍射(XRD)图。

[0031] 图4为本发明氨基修饰的磁性纳米粒子活化后的原子力显微镜(AFM)图。

[0032] 图5为本发明免疫磁性纳米分离试剂零结合管结合率及非特异性管结合率曲线(A)和Logit-Log校准曲线(B)。

具体实施方式

[0033] 下面用实施例来进一步说明本发明,但本发明并不受其限制。

[0034] 实施例1

[0035] 1)分别配制1250ml0.5M NaOH、125ml1M FeCl_3 、125ml0.5M FeCl_2 和125ml0.4M HCl溶液,将NaOH溶液置于三颈烧瓶中,在 N_2 保护条件下恒温水浴加热至60℃,将已配制的 FeCl_3 、 FeCl_2 和HCl溶液混合后,快速加入到三颈烧瓶中,并以50rpm速度搅拌15min后冷却至室温。依次用去离子水、甲醇清洗5次,所得产物 Fe_3O_4 磁性纳米粒子分散于甲醇中。所得产物TEM图如图1(a)所示;并对产物的磁性质进行检测,如图2磁滞回曲线所示。

[0036] 2)将上一步制备的产物(分散于甲醇中的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,20g)置于烧瓶中,按体积比1:1加入甲苯与甲醇共1000ml,添加100ml正硅酸四乙酯(TEOS),并将烧瓶升温至80℃,通入 N_2 进行保护,以50rpm速度强烈搅拌、回流18h后,用甲苯清洗6次得到包覆硅胶的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,并分散于甲苯中。所得产物TEM图见图1(b)所示。对产物进行了结构表征——XRD分析,如图3所示,说明硅胶为无定型的胶态,衍射峰说明磁纳米粒子为尖晶石结构 Fe_3O_4 。

[0037] 3)将步骤2)20g包覆硅胶的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子产物置于烧瓶中,加入500ml甲苯与500ml甲醇,并加入60ml硅烷偶联剂(KH792)。并将烧瓶升温至80℃,通入 N_2 进行保护,以50rpm速度搅拌、回流18h后,依次用甲苯、甲醇、水、pH7.0的PBS缓冲溶液清洗数次得到氨基修饰的磁纳米粒子,并分散于PBS缓冲溶液中。产物TEM图参见图1(c)。

[0038] 4)将步骤3)修饰氨基的磁纳米粒子20g与2ml戊二醛置于烧瓶中以50rpm速度搅拌反应3h,产物依次用去离子水、pH7.0的PBS缓冲溶液清洗数次,之后分散于PBS缓冲

溶液中。其 AFM 图谱请参见图 4。

[0039] 5) 在 -8°C 条件下, 将步骤 4) 所得 20g 活化后的磁纳米粒子与羊抗兔 IgG500mg 以 50rpm 转速搅拌反应 24h, 以 pH7.0 的 PBS 清洗数次后, 添加 1M、pH7.0 的甘氨酸 100ml 搅拌 30min 后, 产物依次以去离子水, pH7.0PBS 缓冲溶液清洗, 之后将所得产物再以特制的清洗液 (1w/v% NaN_3 、0.01MTris、0.1w/v% BSA、0.15M NaCl 和 0.001M EDTA 的水溶液) 清洗 3 次, 再以其分散产物, 即可得到最终产物——免疫磁性纳米分离试剂。

[0040] 实施例 2

[0041] 1) 分别配制 1250ml0.5M KOH、125ml1M $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、125ml0.5M FeSO_4 和 125ml0.4M HCl 溶液, 将 KOH 溶液置于三颈烧瓶中, 在氩气 (Ar) 保护条件下恒温加热至 70°C , 将已配制的 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 FeSO_4 和 HCl 溶液混合后, 快速加入到三颈烧瓶中, 并以 100rpm 转速强烈搅拌 20min 后冷却至室温。依次以去离子水、乙醇清洗数次, 所得产物 Fe_3O_4 磁性纳米粒子分散于乙醇中。

[0042] 2) 将上一步制备的产物 20g 磁纳米粒子置于烧瓶中, 按体积比 1:15 加入甲苯与乙醇 1050ml, 添加 10ml 硅酸钠, 并将烧瓶升温至 100°C , 通入 Ar 进行保护, 以 100rpm 转速强烈搅拌、回流 24 后, 用甲苯清洗数次得到包覆硅胶的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子。

[0043] 3) 将步骤 2) 产物 20g 包覆硅胶的磁纳米粒子置于烧瓶中, 按体积比 1:15 加入甲苯与乙醇 1050ml, 并加入 10ml 硅烷偶联剂 (DB550)。并将烧瓶升温至 100°C , 通入 Ar 进行保护, 以转速为 100rpm 强烈搅拌、回流 24h 后, 依次用甲苯、乙醇、水、pH7.8 的 PBS 缓冲溶液清洗数次得到修饰氨基的磁纳米粒子。

[0044] 4) 将修饰氨基的磁纳米粒子 20g 与 0.2ml 戊二醛置于烧瓶中以 100rpm 转速搅拌反应 6h, 产物依次用去离子水、pH7.8 的 PBS 缓冲溶液清洗数次。

[0045] 5) 在 0°C 条件下, 步骤 4) 所得活化后的磁纳米粒子 20g 与人抗兔 IgG500mg 反应 40h, 以 pH7.8PBS 清洗数次后, 添加 0.1w/v% BSA150ml 并搅拌 30min 后分别用去离子水及 pH7.8PBS 缓冲溶液清洗数次, 再将所得产物以上述特制的清洗液清洗数次, 即可得到最终产物本发明免疫磁性纳米分离试剂。

[0046] 实施例 3

[0047] 1) 分别配制 1250ml0.5M KOH、125ml1M $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、125ml0.5M FeSO_4 和 125ml0.4M HCl 溶液, 将 KOH 溶液置于三颈烧瓶中, 在 N_2 保护条件下恒温加热至 90°C , 将已配制的 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 FeSO_4 和 HCl 溶液混合后, 快速加入到三颈烧瓶中, 并以 80rpm 转速强烈搅拌 30min 后冷却至室温。依次用去离子水、甲醇清洗数次, 所得产物 Fe_3O_4 磁性纳米粒子分散于甲醇中。

[0048] 2) 将上一步制备的产物 20g 磁纳米粒子置于烧瓶中, 按体积比 1:30 加入甲苯与甲醇 1000ml, 添加 200ml 正硅酸四乙酯, 并将烧瓶升温至 120°C , 通入 N_2 进行保护, 以 80rpm 速度强烈搅拌、回流 30h 后, 通过甲苯清洗数次得到包覆硅胶的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子。

[0049] 3) 将步骤 2) 产物 20g 包覆硅胶的磁纳米粒子置于烧瓶中, 按体积比 1:30 加入甲苯与甲醇 1000ml, 并加入 200ml 硅烷偶联剂 (SG-Si900)。并将烧瓶升温至 120°C , 通入 Ar 进行保护, 以转速为 80rpm 强烈搅拌、回流 30h 后, 依次用甲苯、甲醇、水、pH8.2 的 PBS 缓冲溶液清洗数次得到修饰氨基的磁纳米粒子。

[0050] 4) 将修饰氨基的磁纳米粒子 20g 与 20ml 戊二醛置于烧瓶中反应 8h, 产物依次用

去离子水、pH8.5 的 PBS 缓冲溶液清洗数次。

[0051] 5) 在 8℃ 条件下, 步骤 4) 所得活化后的磁纳米粒子 20g 与单抗 500mg 反应 48h, 以 pH8.5PBS 清洗数次后, 添加 0.2w/v% BSA100ml 并以 80rpm 搅拌 45min 后以去离子水、pH8.5PBS 清洗数次, 再将所得产物以上述特制的清洗液清洗数次, 即可得到最终产物本发明免疫磁性纳米分离试剂。

[0052] 上述实施例中的硅烷偶联剂 (KH792, DB550, SG-Si900) 购自南京曙光化工总厂和湖北德邦化工新材料有限公司; 抗体 (单抗, 二抗) 购自华美生物工程有限公司上海分公司; 其它试剂均购自上海国药集团, 且均为分析纯。

[0053] 试验实施例 1

[0054] 按放射免疫分析法和标准检测本发明产物的质量——抗体结合率及非特异性 (通过北京科美东雅生物技术有限公司提供的药盒, 按照内附检测说明书进行检测), 结果如图 5 所示, 说明本发明免疫磁性纳米分离试剂具有较高的零结合管结合率及较低的非特异性管结合率, Logit-Log 校准曲线方程式为 $Y = 2.80234 - 0.5708X$, $R = 0.9975$ 。

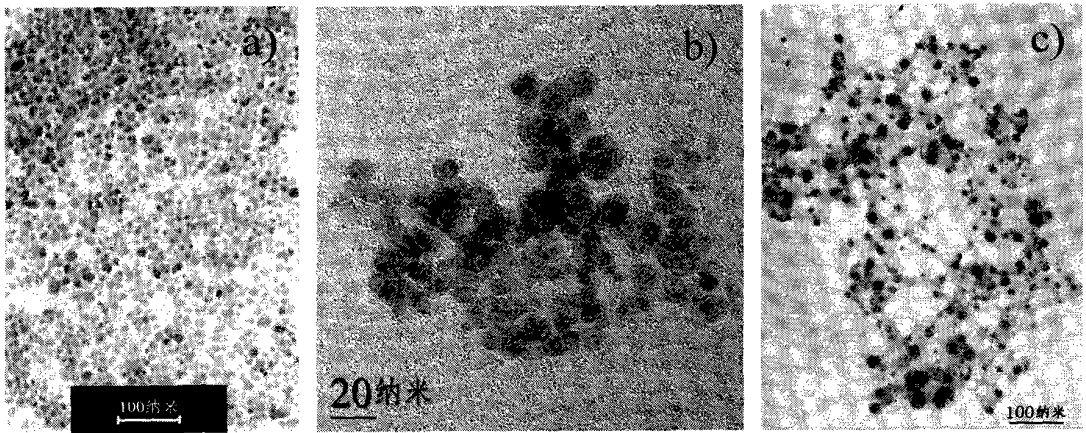


图 1

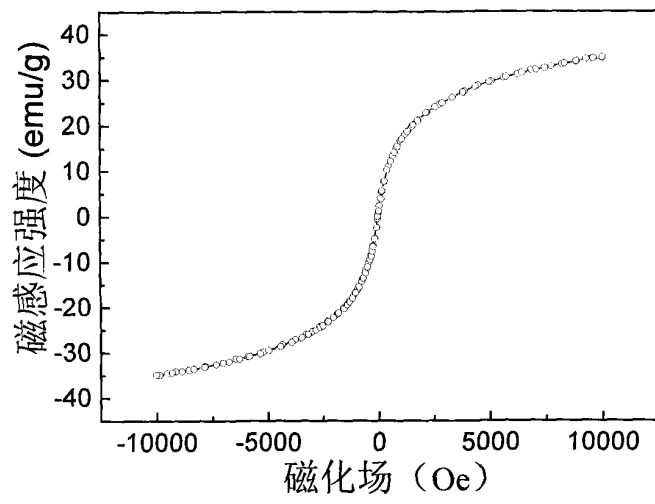


图 2

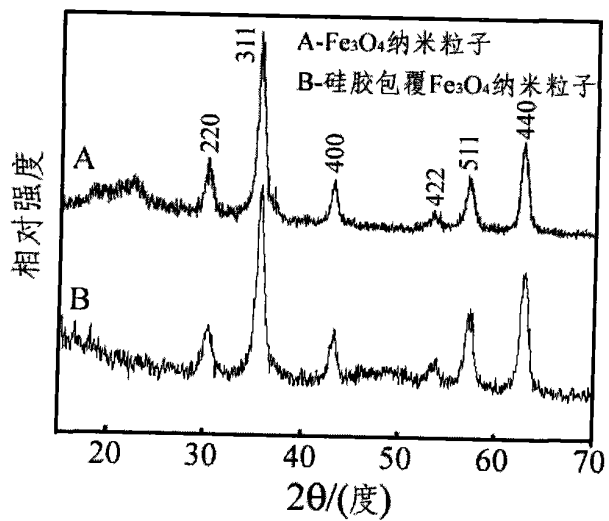


图 3

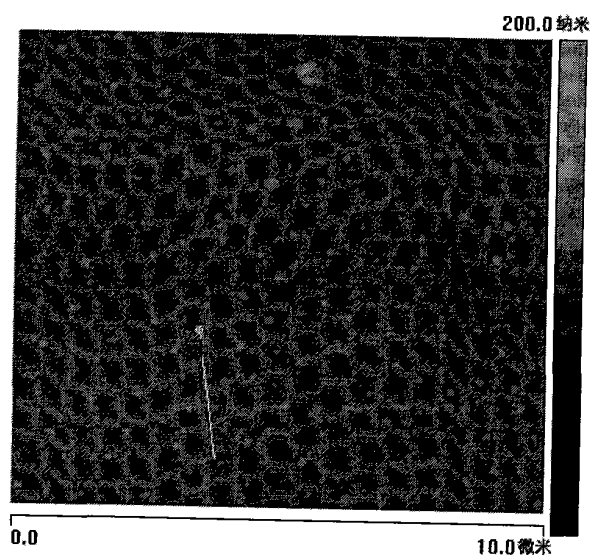


图 4

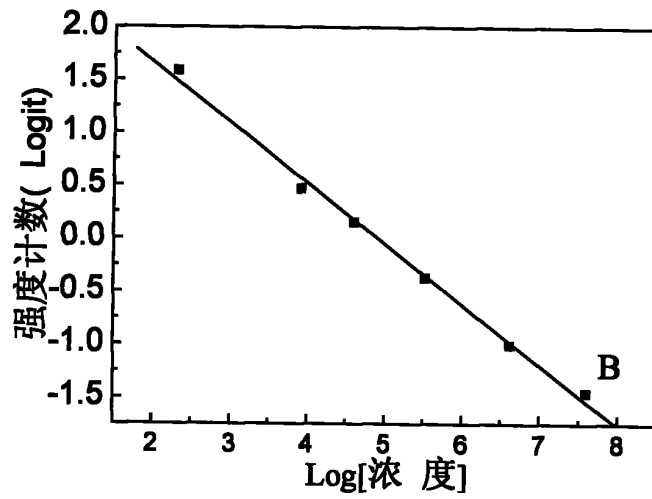
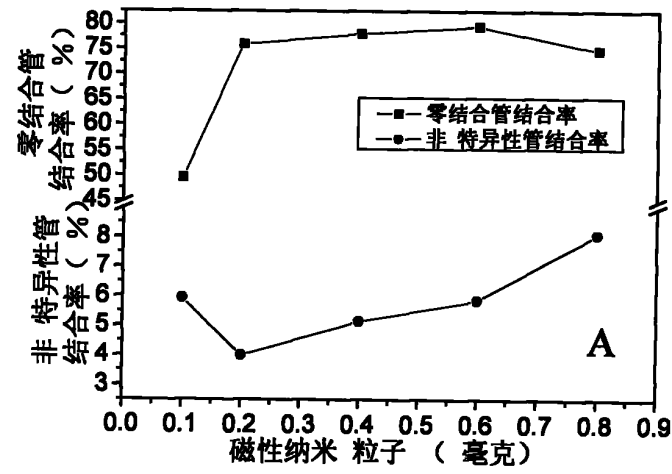


图5