



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102617810 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201210046309. 5

C07K 1/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 27

C12N 15/10 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(73) 专利权人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路 1 号

(56) 对比文件

CN 101553889 A, 2009. 10. 07, 全文.

CN 1732900 A, 2006. 02. 15, 全文.

CN 101014531 A, 2007. 08. 08, 全文.

CN 101319101 A, 2008. 12. 10, 全文.

(72) 发明人 廖飞 杨晓兰 龙高波 蒲军

刘红博 李元丽

Ajay Kumar Gupta 等. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. 《IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE》. 2004, 第 3 卷 (第 1 期), 第 66-73 页.

(51) Int. Cl.

C08F 290/06 (2006. 01)

C08F 2/44 (2006. 01)

C08F 2/32 (2006. 01)

C08K 3/22 (2006. 01)

H01F 1/00 (2006. 01)

H01F 1/42 (2006. 01)

C12N 11/14 (2006. 01)

C12N 11/08 (2006. 01)

C12Q 1/44 (2006. 01)

C12Q 1/48 (2006. 01)

C07K 17/14 (2006. 01)

C07K 17/08 (2006. 01)

审查员 刘雅婷

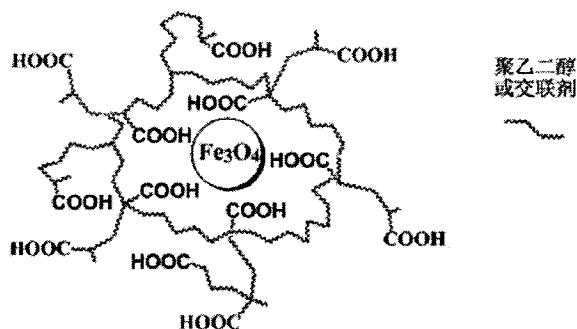
权利要求书 4 页 说明书 13 页 附图 12 页

(54) 发明名称

用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法及其应用

(57) 摘要

一种用两端带羧基的直链亲水聚合物包被磁流体制备微纳米磁性材料的方法及其应用;具体涉及将两端为羟基或氨基的聚乙二醇或寡聚甘氨酸链与马来酸酐、琥珀酸酐反应得两端有羧基但仅有一个或两个碳碳双键的单体;用化学共沉淀法制备纳米磁芯并用带双键的短链单体分散成磁流体;在水/二辛基琥珀酸酯磺酸/正庚烷或类似微乳体系,用有两个双键的短链单体加上仅一个双键的长链单体或类似混合物、交联剂、催化剂和引发剂,自由基共聚合包被磁流体,获得表面有大量羧基的亲水微纳米磁珠;常用蛋白包括但不限于药物靶蛋白或链亲和素或免疫分析用捕获多抗、小分子配体、核酸,都可直接固定化在此磁珠上用于基于磁力生物亲和分离或靶向运送。



1. 一种用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法,此微纳米磁性材料制备的特征性过程如下:

(一) 单体及其制备特征包括:

(1) 以平均分子量为 60 到 10000 道尔顿的聚乙二醇,与马来酸酐反应制备两端都有羧基且含碳碳双键的聚合物;或一端与马来酸酐而另一端与琥珀酸酐分别反应生成两端含羧基但仅一端含共轭碳碳双键的直链双羧酸聚合物;此类两端带羧基的直链亲水聚合物即以下所指单体;

(2) 在二氯甲烷、四氢呋喃、二甲基甲酰胺、二氧六环中反应制备这些单体,除去大部分溶剂后用乙醚或其它醚类沉淀单体,再用醚洗涤后就可直接用;或用聚乙二醇与马来酸酐及琥珀酸酐分别熔融反应制备单体;

(二) 用化学共沉淀法制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米磁芯,特征性过程包括:

(1) 将二价和三价铁盐水溶液混合,惰性气体保护和机械搅拌,用浓氨水制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁芯;所用三价铁和二价铁的摩尔比例对应从 2.5 : 1 到 1 : 1;

(2) 再用步骤(一)所得的单体,或其两种的混合物作为分散剂,分散步骤(二)中第(1)所得磁芯,获得粒径在 10-500nm 间且悬浮稳定性好的纳米磁芯即磁流体;

(三) 用油包水微乳体系分散磁流体和所选单体的混合物,自由基聚合包被磁流体制备表面带大量羧基的亲水微纳米磁性材料,此过程有如下特征:

(1) 选步骤(一)所得两端有羧基且至少有一个碳碳双键的一种单体,或两种或多种此类单体混合物,用于自由基聚合包被磁流体;

(2) 将上述包被用单体和磁流体在水相混合得到混合物,以二辛基琥珀酸磺酸钠即 AOT 为表面活性剂,并机械搅拌将所得混合物分散到 AOT/ 正庚烷中制成反相微乳体系;

(3) 加甲叉双丙烯酰胺为交联剂,用过硫酸铵或过硫酸钾为引发剂,用 N, N', N' - 四甲基乙二胺为催化剂,在 20 到 60 摄氏度和惰性气体及机械搅拌下聚合包被磁流体;来自长直链单体的长链在包被后的产物中转变成连接臂伸展到磁性微球表面而基本没有空间位阻,其末端的羧基用于与所需生物分子连接而固定化这些功能分子;

(4) 所得带柔性长链连接臂和羧基官能团的表面亲水微纳米磁性材料,用四氢呋喃且以下缩写为 THF、甲醇 / 丙酮、缓冲液反复洗涤至无可检测的小分子物质或单体;

(5) 将所得表面亲水微纳米磁性材料用中性磷酸缓冲液或蒸馏水或 THF 保存备用。

2. 如权利要求 1 所述一种用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法,其所制备的微纳米磁性材料有与其应用领域和应用方式相关的如下特征:

(一) 此微纳米磁性材料表面有大量羧基而亲水性很强;在用有机溶剂洗涤且在摄氏 70 度烘干 24 小时后,单位质量磁珠干重所含可滴定羧基最大达到 0.43mmole/g 干重;

(二) 所得微纳米磁性材料对脂水分配系数即  $\log P$  小于 4.0 且不带正电荷的有机小分子在浓度低于  $10 \mu\text{mol/L}$  时非特异性结合可忽略,不带正电荷的蛋白质非特异性吸附也可忽略;

(三) 无外加磁场时在 pH6 ~ 8 的中性缓冲液中或水中,所得微纳米磁性材料在室温下的悬浮稳定性很好;在常规应用所需量或浓度下在 30 分钟内即使不振荡也基本不生成沉淀;

(四) 用水、THF 和二甲基甲酰胺溶剂将所制备的微纳米磁性材料反复洗涤后再使用, 常用有机溶剂或缓冲液从该微纳米磁性材料中可再提取出来的小分子杂质可忽略;

(五) 此微纳米磁性材料表面羧基可用只有一个碳碳双键但两端都有羧基的长直链单体与其它短链单体共聚生成; 这类羧基用长链单体的柔性链为臂固定化所需功能的生物分子: 蛋白或核酸或多糖或生物素配体; 被固定化的目标分子参与生物亲和作用时空间位阻很小;

(六) 此微纳米磁性材料表面为共价聚合包裹的惰性保护外壳而使其组成成分稳定; 用 pH4.0 到 pH9.0 缓冲液浸蚀 1 小时, 其饱和磁化率基本不变且仍很容易用磁力分离;

(七) 此微纳米磁性材料中  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  含量达 80%; 烘干后饱和磁化率可达 46emu/g;

(八) 调节包被时含有两个碳碳双键单体的用量、单体混合物的组成、水相体积和表面活性剂 AOT 的量可调节其粒径; 其粒径在均值上下 60% 范围内波动;

(九) 此微纳米磁性材料在 THF 或二氯甲烷的惰性有机溶剂中, 用二环己基碳二亚胺脱水, 用 N-羟基琥珀酰亚胺可将羧基转变成活泼酯; 此表面为大量活泼酯的微纳米磁性材料可进一步与过量乙二胺反应将原来的羧基转变成氨基;

(十) 此微纳米磁性材料的活泼酯形式与带氨基目标小分子物质反应, 或用其羧酸形式直接在脱水剂作用下与带氨基的目标小分子物质反应, 使目标小分子物质被固定化在磁珠表面; 其带有氨基的形式可与带羧酸活泼酯形式的目标小分子物质反应、或与带羧基的目标小分子物质在脱水剂作用下反应将目标小分子物质固定化; 固定化小分子物质可用于与来自溶液的大分子物质发生高选择性的生物亲和作用, 从而选择性分离和鉴定或测量相互作用成分;

(十一) 此微纳米磁性材料表面的羧基转变成活泼酯, 可在中性到 pH8.0 的磷酸盐或硼酸盐或其它无机盐缓冲液中与带氨基的蛋白质、核酸衍生物、多糖、肽核酸这些大分子物质反应而将它们固定化在表面, 或用纳米磁珠表面的羧基在脱水剂作用下直接与这些带有氨基的物质反应而将其固定化; 这类固定化有特殊大分子微纳米磁性材料可用于选择性磁分离相互作用成分; 这种微纳米磁性材料的非特异性结合很低而不需要但不排斥对磁珠表面先包被链亲和素或清蛋白降低其疏水性; 将链亲和素或亲和素固定化在此表面亲水微纳米磁性材料上用于借助生物素修饰间接固定化或分离活性分子; 所固定化大分子为药物靶蛋白、特定序列的核酸或肽核酸、免疫分析所需通用性捕获成分或特异性免疫反应成分。

3. 如权利要求 1 所述一种用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法, 其所得微纳米磁性材料的特性可控制且调控规律如下:

(一) 用长度相差很大但两端都有羧基和碳碳双键的单体自由基聚合包被纳米磁芯所得微纳米磁性材料悬浮稳定性都很好; 用两端都有羧基和碳碳双键的一种单体自由基聚合包被纳米磁芯时, 所用单体越短则所得微纳米磁性材料平均粒径小、聚合物外壳耐浸蚀性强、可滴定羧基含量高、饱和磁化率高, 但表面羧基位阻增加而妨碍所固定化的生物分子的活性; 用含两个碳碳双键的单体聚合包被磁流体时磁珠之间易交联而使磁珠粒径分布范围宽;

(二) 用两端都有碳碳双键和都有羧基的一种单体, 所用表面活性剂 AOT 用量固定时其单体用量越少、所用水相体积越小则所得微纳米磁性材料平均粒径越小, 单体用量和水相体积固定时表面活性剂 AOT 用量越大则所得微纳米磁性材料平均粒径越小;

(三) 此微纳米磁性材料用两端都含碳碳双键且都含羧基的短链亲水单体聚合形成保护性外壳;用仅一端含碳碳双键但两端都含羧基的长链亲水单体共聚获得带直链长臂的羧基用于固定化目标分子;此共聚方案中两端都有碳碳双键的短链单体摩尔比例大于 50%;仅一端含碳碳双键的长链单体比短链多 12 个原子以上时提供的柔性长链连接臂有利于降低表面羧基周围的空间位阻。

4. 如权利要求 1 所述一种用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法,其所得微纳米磁性材料有如下应用模式和应用特征:

(一) 链亲和素或亲和素直接固定化在此亲水微纳米磁性材料表面,通过对特定成分生物素修饰以实现对该生物素修饰成分间接固定化或对混合物中生物素修饰成分高选择性分离;

(二) 可溶性表达的人磷酸二酯酶同工酶和谷胱甘肽 S-转硫酶,直接固定化在此亲水微纳米磁性材料表面,用于从溶液中分离可与靶蛋白结合的小分子配体,并用于后续对这些小分子配体的定性和定量分析;

(三) 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体直接固定化在此亲水微纳米磁性材料表面,用于分离鼠 IgG 参与形成的免疫复合物,用于鼠 IgG 结合微量蛋白的分离纯化或竞争性免疫分析;这类固定化多抗的微纳米磁性材料属于针对鼠源单抗的通用性亲和分离材料;针对不同抗体的其它多抗也可固定化在此表面亲水微纳米磁性材料上,用于免疫分析的通用性分离过程;

(四) 用于化学发光免疫分析或时间分辨荧光免疫分析或酶标免疫分析的捕获抗原或抗体或用于竞争结合的检测单抗,直接固定化在此亲水微纳米磁性材料表面用于免疫分析,不需但不排斥借助于生物素修饰后用固定化亲和素或链亲和素的磁珠进行间接固定化或分离;

(五) 有脂肪族氨基的核酸链或肽核酸链,直接固定化在此微纳米磁性材料表面,用于分离混合物中的互补核酸链,不需但不排斥借助于生物素-亲和素或链亲和素间接固定化或分离;

(六) 在 THF 或二氯甲烷或二甲基甲酰胺中,表面为活泼酯的微纳米磁性材料将含有脂肪族氨基的有机化合物固定化:固定化双-(N-依他尼酰胺乙基)亚胺后与谷胱甘肽-S-转硫酶作用、固定化 N-单生物素化乙二胺后与链亲和素或亲和素作用;固定化这类基团的表面亲水微纳米磁性材料可作为针对相应融合表达蛋白标签或相应加合物的通用分离材料;

(七) 所得表面亲水微纳米磁性材料用碳酸氢钠弱碱中和为中性后,对实验用哺乳动物缓慢静脉输注时没有血管刺激性,不诱发急性炎症反应。

5. 如权利要求 1 所述一种用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法,此表面亲水微纳米磁性材料制备过程还有如下特征:

(一) 所述表面带有羧基的亲水微纳米磁性材料制备方法在于用含碳碳双键的一种或多种两端带羧基的直链亲水聚合物为单体,在油包水微乳体系仅通过一步自由基共聚反应,在包被磁流体生成共价聚合保护性外壳的时候,同时提供伸展到表面的可用于固定化生物分子的羧基;所用单体中羧基之间的排斥促进更多羧基伸展到磁珠表面用于固定化所需生物分子;用多种单体混合物时,表面羧基主要来自长链单体,短链单体主要形成共价聚合的保护性外壳;

(二) 分散纳米磁芯和包被磁流体所用亲水单体可相同但不要求相同；

(三) 化学共沉淀制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁芯时, 铁盐可为盐酸盐、硫酸盐或乙酸盐, 所用浓氨水质量浓度为 20%~28%; 分散纳米磁芯时分散剂可用有两个羧基且至少一个碳碳双键的任一单体, 且用量为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁芯理论产量的 50% 到 200% ;

(四) 反相微乳中自由基聚合包被磁流体时, 包被用单体为一种或两种或多种单体的混合物; 聚合时直接用水为溶剂溶解单体, 或将 pH 调节到弱碱性或碱性; 中性条件下在 42 摄氏度聚合 10 小时, 但弱碱性或碱性条件下聚合需较长时间;

(五) 聚合包被磁流体时所需油包水反相微乳用正庚烷/AOT、环己烷/石油醚/AOT、环己烷/二氯甲烷/AOT、环己烷/二氯甲烷/磷脂酸钠为连续相。

## 用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料领域,为自由基聚合制备高分子核壳型复合材料的技术,所得材料可用于生物亲和磁力分离、磁标记检测及磁力输送,具体如磁标记免疫层析、磁分离免疫检测、磁分离筛选混合物组合库、磁分离筛选混合物中相互作用蛋白、磁靶向给药等。

[0002] 发明的技术背景

[0003] 基于磁芯包被技术制备的微纳米超顺磁性颗粒表面连接可反应基团后可固定化生物大分子、配体或半抗原等物质,包括酶、核酸片段、抗体、抗原、半抗原等,用于痕量或微量物质的磁力分离富集实现超高灵敏度分析、磁力分离复合物筛选配体混合物、磁力 pull-down 筛选相互作用蛋白、磁标记免疫分析和磁共振增强显影等。用于生物领域的亚微米磁性颗粒要求表面亲水且非特异性结合低、含通过长链连接臂伸向外表面的足够多可反应基团用于固定化生物分子并有效发生生物亲和作用、悬浮稳定性好且超顺磁性强而易于磁分离、基本不含会被有机溶剂提取的杂质、耐酸碱浸蚀能力强,且不同应用可能还有特殊要求。

[0004] 制备满足上述生物医药应用要求的磁性微纳米颗粒即 Magnetic submicron particles(以下缩写为 MSP),目前最常用的策略是先制备含  $\text{Fe}_4\text{O}_3$  的磁流体,然后用亲水物质包被以降低非特异性结合,最后再添加带有所需连接臂的可反应基团用于固定化生物分子。

[0005] 磁流体指吸附有分散剂的磁性微粒且在液体中高度分散而形成稳定的胶体体系。磁流体的制备方法有物理法和化学法,例如研磨法、微乳液法、超声波法、气相沉积法、水热合成法、溶胶凝胶法、溶剂蒸发法、热分解法及化学沉淀法等。其中,化学沉淀法制备条件温和而广泛应用。用三价铁和二价铁溶液在剧烈搅拌下滴加碱的过程中生成四氧化三铁,在一定分散剂作用下搅拌析出,并经陈化可得磁流体。通过优化碱滴加速度、机械搅拌速度、分散剂量和陈化时间,所得纳米或亚微米磁流体可具备超顺磁性和可控的沉降速度。

[0006] MSP 主要制备方法为磁流体物理吸附包埋法和单体共价聚合包被法。物理吸附包埋法是将磁流体分散在聚合物溶液中,通过雾化、絮凝、沉积、蒸发、乳化等复合过程制得 MSP;其 MSP 粒径分布宽且不易控制、壳层中混有很多杂质。单体共价聚合包被法是指在磁流体和可共价聚合单体存在下,加入引发剂、催化剂等通过聚合反应而成的核/壳式 MSP。共价包被磁流体外壳为高分子聚合物并分成疏水性和亲水性两类,其中亲水聚合物主要是聚丙烯酰胺、聚乳酸、聚乙烯醇、聚乙二醇等合成聚合物,及葡聚糖、壳聚糖等天然聚合物。这些聚合物的单体通过共价聚合包被磁流体、聚合包被时诱发磁芯共沉淀、与磁芯配位等方式可制备核/壳型 MSP(Horak, D., et al. J. Sep. Sci. 2007 ;30,1751-1772 ;Lu A H, et al, Angew Chem Int Ed 2007 ;46 :1222-1244 ;Dresco P. A., et al. Langmuir 1999 ;15 :1945-1951)。

[0007] 最常用且所得 MSP 化学组成稳定的是单体共价聚合包被磁流体的方法。据共价聚

合包被磁流体所用单体的性质,制备 MSP 的方法又分成两类:(1)用疏水单体在水包油微乳体系自由基聚合包被磁流体,通过亲水材料进行表面修饰提高生物相容性,再经复杂过程生成带有连接臂的可反应基团以固定化生物分子;(2)用生物相容性亲水聚合物在油包水微乳体系包被磁流体,经表面修饰生成带所需连接臂的可反应基团以固定化生物分子。显然,此两类 MSP 制备工艺都繁杂,容易带来杂质,且伴随较高的成本和很长的制备时间。

[0008] 将用生物相容性好的亲水性单体共价聚合包被磁流体和添加带长链连接臂的可反应基团合二为一,通过一步聚合反应制备基本满足所有要求的 MSP 是更理想的制备方法(Lin, P. C., et al. Anal Chem 2007 ;79 :3401-3408 ;Khng HP, et al. Biotech Bioeng, 1998 ; 60 :419-424.)。聚乙二醇(PEG)是理化性质稳定且亲水的非离子型聚合物,用其单甲醚的马来酸单酯为单体聚合包被磁流体可制备生物相容性好的磁性微球[Gupta A K, et al. IEEE Trans NanoBioSci 2004 ;3 :66-73.],但其表面没有可反应基团无法固定化生物分子;通常认为这种条件下来自马来酸的羧基被包埋在亲水外壳中不能暴露在表面。所以,需特殊的设计策略才能实现通过一步聚合反应制备基本满足所有要求的 MSP,从而用于生物医药领域的磁标记、磁力分离与输送。

[0009] 理论上,一步法制备表面亲水、有带连接臂可反应基团的 MSP 可采用如下策略:

[0010] (1)用短链聚乙二醇单甲醚不饱和酸酯为单体,一端为羟基长链聚乙二醇马来酸单酯作为带连接臂和可反应基团的单体,通过油包水反相微乳法一步自由基共聚反应包被磁流体,用有机溶剂等反复洗涤去除小分子杂质,活化连接臂末端羟基或转变成羧基、氨基等可在温和条件下固定化常见生物分子。但此法所得 MSP 尽管亲水性、非特异性结合、悬浮稳定性、顺磁性、粒径等满足要求,但表面可反应基团太少,不能固定化足够多的生物分子。

[0011] (2)用不同长度 PEG 与马来酸酐反应获得以聚乙二醇为骨架、马来酸为碳碳双键和羧基来源的两端都含有羧基和碳碳双键的亲水单体;同时以长链 PEG 与马来酸酐及琥珀酸酐分别反应获得两端含羧基但仅一端含有碳碳双键的长链亲水单体;两种单体恰当比例混合后,油包水反相微乳体系一步自由基共聚反应包被磁流体制备表面带大量羧基的亲水性 MSP。

[0012] 亚微米乳液由表面活性剂、助表面活性剂及水组成各面同性的热力学体系,其大小可控在几十至几百纳米之间。在此特殊的微环境中,可进行多种化学沉淀反应或聚合包被磁流体制得包被颗粒,其大小决定于反应微环境的大小,故调节油水比例和表面活性剂的量可控制粒径。为保证有足够多的羧基伸向 MSP 表面用于固定化生物分子,需优选水包油乳液体系和长短链单体及其比例;同时,控制微水相的 pH 让足够比例的羧基电离增大相互之间的排斥,驱动部分羧基分布到 MSP 表面而使得其表面亲水且抗聚集;但此微水相 pH 不能过高,否则太多羧基电离后会降低单体的聚合反应速度而降低 MSP 收率,同时 MSP 的外壳抗外部酸碱浸蚀的能力下降而组成不稳定;为了降低表面可反应羧基周围的空间位阻以便于固定化生物分子后参与生物亲和作用,需优化生成连接臂单体的长度,其长度要比生成外壳单体足够长,伸向表面羧基的空间位阻才能足够小。获得满足基本要求的表面有丰富羧基的 MSP 后,此羧基可活化成活泼酯或进一步转化成氨基,以固定化带有氨基或羧基的常见生物分子。

[0013] 各种水溶性蛋白质、带有可反应基团的核酸、多糖、各类小分子配体或半抗原等,都可经恰当反应直接固定化在本发明技术所制备的 MSP 上,用于磁力分离分析或磁力输

送。

[0014] 链亲和素或亲和素可以固定化在所得 MSP 上作为通用生物亲和分离材料,其它蛋白质也可直接固定化在此类 MSP 表面用于发生生物亲和作用。使用此类 MSP 时不必预先包被蛋白质提高亲水性再间接固定化目标蛋白质,即不依赖于生物素修饰后与 MSP 表面的链亲和素或亲和素结合间接固定化或分离,这可显著降低磁分离和磁标记的成本。

[0015] 用针对靶蛋白融合表达标签谷胱甘肽-S 转硫酶 (GST)、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 或组氨酸标签的亲和标记试剂固定化在此类 MSP 上,还可位点选择性地共价固定化融合表达的靶蛋白,用于混合物组合库的筛选 (Yang XL, et al, BMC Biotechnology, 2011 ;11 : 44 ;Yang XL, et al. Microchim Acta, 2012, 176 :243-249)。磁共振成像已广泛用于影像诊断 [Qiao R R, et al. J Mater Chem, 2009, 19 (35) :6274-6293]。本发明所制备的 MSP 生物相容性好,在恰当大小的此类 MSP 上固定化特定识别成分,可实现靶向分子成像 [Lee J H, et al. Nat Med, 2007, 13(1) :95-99]。

[0016] 具体而言,本发明所制备的 MSP 主要可用于但不限于如下领域:

[0017] (1) 固定化通用性生物活性大分子用于分离对应大分子及其复合物,如固定化链亲和素或亲和素用于间接固定化或分离各类生物素修饰物质,固定化羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用于鼠 IgG 参与的免疫分析或微量蛋白分离过程、磁力细胞分类和筛选过程等。

[0018] (2) 固定化通用性生物活性小分子成分,用于从溶液中分离可相互作用的大分子成分及其复合物,包括固定化针对 GST 的高亲和力配体用于 GST-Pull down 技术、固定化 MBP 的高亲和力配体用于分离带有 MBP 标签的融合蛋白及其复合物。

[0019] (3) 固定化特定的药物靶蛋白用于定性和定量筛选混合物组合库。

[0020] (4) 固定化免疫分析技术所需各类捕获抗原或捕获抗体实现磁分离免疫分析,包括化学发光免疫分析技术;此类固定化方法尤其有利于低成本实现自动化免疫分析。

[0021] (5) 固定化各类核酸链,用于快速磁分离带有互补链的各种成分及其复合物。

[0022] (6) 固定化多糖,用于分离与其有相互作用的各种大分子成分或小分子成分。

[0023] (7) 固定化特定的小分子,从溶液中分离相互作用的大分子成分,包括筛选靶蛋白。

[0024] (8) 将 MSP 与特定免疫分析识别成分连接,用于磁标记免疫分析。

[0025] (9) 将特殊的识别疾病标志物的生物大分子或小分子固定化在 MSP 上,用于在存在对应可识别分子的部位富集 MSP 从而进行磁共振成像显影。

[0026] (10) 将特殊的可分裂释放的药物固定化在此亚微米磁珠表面,实现磁靶向运送给药。

[0027] 发明内容概述

[0028] 本发明的核心内容是用带至少一个碳碳双键且至少一个羧基的 PEG 或聚甘氨酸衍生物为单体在反相微乳体系自由基共聚包被磁流体,一步聚合生成亲水共价外壳且带连接臂的大量羧基;优化单体亲水链长度、单个碳碳双键单体与有多个碳碳双键单体比例、聚合时水相 pH 等,借助羧基之间的排斥促进部分羧基经长链连接臂伸展到 MSP 表面;将表面的羧基转变成活泼酯,直接与生物分子中的氨基反应,或与乙二胺等反应后转变成带有氨基的形式再与生物分子中的羧基反应,从而固定化生物分子用于磁分离和磁力运送。本发明主要内容包括:

[0029] 1. 亲水聚合物单体制备:用聚乙二醇与过量马来酸酐反应制备两端含碳碳双键和羧基的亲水单体;或分别与马来酸酐和琥珀酸酐反应生成两端含羧基但仅一端含碳碳双键的亲水单体;或分别与马来酸酐和丙烯酸反应生成一端有羧基但两端有碳碳双键的亲水单体;或用聚乙二醇单甲醚与马来酸酐反应制备单端为碳碳双键和羧基的单体;或用寡聚甘氨酸链与丙烯酰氯或马来酸酐反应制备仅一端有碳碳双键的亲水单体;或用乙醇胺和丙烯酸反应连上碳碳双键再与丁二酸酐反应获得羧基,循环添加乙醇胺和丁二酸获得一端有碳碳双键而另一端有羧基的亲水单体;制备此类单体只需在二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃即 THF、二甲基甲酰胺或二甲亚砜等溶剂中,用相应酸酐或酰氯和 PEG 或聚甘氨酸在室温下或回流反应,减压除去溶剂,用乙醚沉淀并用乙醚洗涤单体,将此过程重复数次就获得可用的单体(图 1)。

[0030] 2. 化学共沉淀法或其它恰当方法制备磁流体:由氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、氯化亚铁( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )的一定比例混合液,在搅拌条件下滴加氨水(25%~28%)制备的纳米磁芯,用制备的聚合物单体进行分散,获得控制粒径、悬浮稳定性好的磁流体。

[0031] 3. 反相微乳中一步自由基聚合包被磁流体获得表面亲水且含有带长链连接臂羧基的 MSP:以含至少一个羧基和至少一个碳碳双键的亲水聚合物为单体和磁流体的水悬液,分散在正庚烷/AOT 中组成微乳体系,添加交联剂、自由基引发剂和催化剂,在 40 度左右自由基聚合反应 8 小时左右,制备表面有大量带长链连接臂可反应羧基的表面亲水性 MSP(图 2);优化水相 pH、单体长度、不同单体含量比例、水相体积、交联剂用量等参数,可调节颗粒大小和表面的羧基含量;借助磁分离用甲醇/丙酮、水、THF 多次洗涤至基本无小分子或单体杂质,可在磷酸缓冲液中或恰当有机溶剂保存备用。

[0032] 4. 将所得 MSP 表面的羧基用 N-羟基琥珀酰亚胺和二环己基碳二亚胺(DCC)转变成活泼酯在 THF 中保存备用、将活泼酯与过量乙二胺反应转变成氨基再储存在 THF 中备用。

[0033] 5. 将此 MSP 的活泼酯形式,在中性到 pH 9.0 的硼酸盐、磷酸盐等无机盐缓冲液中,与需要固定化的蛋白质反应,磁分离 MSP 并用缓冲液洗涤就获得固定化各类功能蛋白的 MSP;或者用该 MSP 的氨基形式、羧基形式,与蛋白质直接在无机缓冲液中用 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-碳酰二亚胺(EDC)脱水将蛋白质固定化,用于各种分离分析或磁信号检测

[0034] 5. 将此 MSP 的活泼酯形式或氨基形式,在有机溶剂或恰当缓冲液中,与需要固定化的恰当小分子反应,辅助以 DCC 或 EDC 脱水,可制备带有特殊功能化小分子的 MSP。

[0035] 本发明制备 MSP 过程中,所用单体的长度、水相的 pH、各种长度单体的比例、所用单体的总量、所用单体中含有两个碳碳双键单体的长度和含量,对所得 MSP 的粒径、饱和磁化率、可反应羧基含量、固定化生物分子的生物亲和作用能力都有显著影响。

[0036] 本发明所制备 MSP 经有机溶剂反复洗涤,可有效清除用常见有机溶剂可提取的小分子杂质,使得该 MSP 用于固定化靶蛋白筛选混合物组合库有明确优势;在此 MSP 表面固定化高亲和力的 GST 配体,如双-(N-衣他尼酰乙胺基)-亚胺通过中间的仲胺与该 MSP 表面的活泼酯相连后,可用于分离各类带有 GST 标签的融合蛋白及其复合物或分离 GST 本身,包括用于蛋白质相互作用网络的 Pull-down 技术;类似地将 N-单生物素化乙二胺固定化在此 MSP 上,可分离各类带有链亲和素或亲和素的蛋白加合物或核酸加合物等。

[0037] 本发明所制备的 MSP 含通过柔性长链连接臂延伸到表面的大量羧基;单用优化长度的两端有碳碳双键和羧基的单体也可得到所需可反应羧基含量高、悬浮稳定性好、饱和

磁化率高的 MSP ;这种方式制备满足绝大多数要求的 MSP 在成本和效率上优势最明显 ( 表 1)。

[0038] 说明书附图说明

[0039] 图 1 本发明可用代表性单体的合成路线示意图

[0040] 图 2 本发明所制备表面亲水带羧基磁珠的结构示意图

[0041] 图 3 FTIR 测定比较 PEG 及单体、磁流体及 MSP-PEG-D8

[0042] 1 :Magnetofluids1540 ;2 :MSP-PEG-D8 ;

[0043] 3 :PEG-1540- 双 - 马来酸单酯 ;4 :PEG-1540 ;

[0044] 图 4a 用 PEG-1540 制备磁流体和磁珠的悬浮稳定性

[0045] 图 4b 用 PEG-400 制备磁珠和磁流体的悬浮稳定性

[0046] 图 5a 用 PEG-1540 制备磁流体和相应磁珠的饱和磁化率

[0047] 图 5b 用 PEG-400 制备磁流体和相应磁珠的饱和磁化率

[0048] 图 5c 用 PEG-1540 制备磁流体和相应磁珠对磁分离器的响应

[0049] 图 5d 用 PEG-400 制备磁流体和相应磁珠对磁分离器的响应

[0050] 图 6a 磁珠和磁流体的热失重分析

[0051] 1 :Magnetofluids1540 ;2 :MSP-PEG-D4 ;3 :MSP-PEG-D8 ;

[0052] 图 6b 磁珠和磁流体的热失重分析

[0053] 4 :Magnetofluids400 ;5 :MSP-PEG-A ;6 :MSP-PEG-B ;

[0054] 图 7 磁珠和磁流体的在 pH 4.0 的耐酸碱浸蚀性

[0055] 1 :Magnetofluids1540 ;2 :MSP-PEG-D8 ;3 :MSP-PEG-D4 ;

[0056] 4 :Magnetofluids400 ;5 :MSP-PEG-A ;6 :MSP-PEG-B ;

[0057] 7 :用甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、丙烯酸钠聚合生成保护性外壳加上一端为丙烯酸酯而另一端为丁二酸单酯的 PEG-800 共聚合所制备磁珠

[0058] 图 8 用激光粒度仪测定 Magnetofluids1540 和对应磁珠的粒径分布

[0059] a :Magnetofluids1540 ;b :MSP-PEG-D8 ;c :MSP-PEG-D4 ;

[0060] d :Magnetofluids400 ;e :MSP-PEG-A ;f :MSP-PEG-B ;

[0061] g :用甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、丙烯酸钠聚合生成保护性外壳加上一端为丙烯酸酯而另一端为丁二酸单酯的 PEG-800 共聚合所制备磁珠

[0062] 图 9 PEG-1540 分散的磁流体和对应磁珠的 X- 射线粉末衍射

[0063] a :Magnetofluids1540 ;b :MSP-PEG-D8

[0064] 图 10 磁珠表面的羧基用 NaOH 滴定时的电位变化曲线和等当量点等当量点为混悬液电位由正变负的位置。

[0065] 图 11 固定化生物素从混合物中分离 CIAP-SAV 的量效关系

[0066] 1 :MSP-PEG-D8 ;2 :MSP-PEG-B ;3 :MSP-PEG-D4 ;

[0067] 4 :用甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、丙烯酸钠聚合生成保护性外壳加上一端为丙烯酸酯而另一端为丁二酸单酯的 PEG-800 共聚合所制备磁珠

[0068] 5 :MSP-PEG-A ;

[0069] 图 12 两种疏水物质对生物素化 -MSP-PEG-D8 的非特异性结合疏水物质的浓度单位为  $\mu\text{mol/L}$ , 取对数化的浓度。

[0070] 图 13 跟踪用不同磁珠固定化 GST 的反应过程测定其活性 Nake MSP-PEG-D4 为无固定化 GST 的裸磁珠。

[0071] 图 14 在 MSP-PEG-D4 上被固定化 SAV 量对固定化反应体系中 SAV 总量的响应和固定化 SAV 后对 N-生物素化 -N'-(1-萘替)乙二胺为探针的结合容量

[0072] 1:固定化 SAV 的磁珠对探针结合容量;2:被固定化的 SAV 量

[0073] 图 15a 透射电镜观察 MSP-PEG-D4 形貌,放大 50000 倍

[0074] 图 15b 透射电镜观察 MSP-PEG-B 形貌,放大 50000 倍

## 具体实施方式

[0075] 1. 具体实施方式实例部分所用主要化学试剂来源、所用特殊器械和表征方法

[0076] 1.1 主要试剂和材料:四水合氯化亚铁 ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、六水合氯化铁 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、马来酸酐(顺丁烯二酸酐)、N, N' - 甲叉双丙烯酰胺、各种长度聚乙二醇 (PEG) 都为国药集团的分析纯化学试剂,浓氨水 ( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 质量含量约 28%) 为重庆川东化工有限公司分析纯试剂,N, N' - 二环己基碳二亚胺 (DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、过硫酸钾为上海晶纯实业有限公司分析纯试剂,PEG 单甲醚 350 和 4-硝基苯基磷酸二钠盐 (PNPP) 来自 Sigma,对甲苯磺酸为天津光复精细化工研究所分析纯试剂,碱性磷酸酶标记链亲和素 (CIAP-SAV) 来自 Promega,二辛基琥珀酸磺酸钠 (AOT)、4-硝基苯甲酸甲酯、4-硝基-1-萘酚来自 Alfa Aesar。大肠杆菌裂解液为常规培养 BL21 细胞压积后加 10mmol/L pH 7.0 的 HEPES 缓冲液,超声裂解后离心上清稀释到蛋白浓度为 0.20g/L。如未另作说明,用 pH 7.0 的 20mmol/L 磷酸钠缓冲液表征磁流体和磁珠的性质。

[0077] 1.2 磁分离器:在本说明书中所用磁分离器都是 Promega PolyAtract<sup>®</sup> System 1000 磁架。

[0078] 1.3 悬浮稳定性和对磁分离器的响应:将待测材料悬浮在中性磷酸钠中且稀释到在 570nm 透过率为 10%,将 2.2ml 样品转移到 4.0ml 容量 1cm 光径的比色杯中,在新茂 UV7504 上测定 570nm 透过率变化。测定对磁分离器响应时,将上述比色杯置于单个磁分离架上固定,再置于光路测定透过率;用磁分离器 2.0min 内可将 95%以上 MSP 和磁流体吸附到试管壁(图 5a 和 b)。

[0079] 1.4 羧基含量测定:测定羧基含量时将有机溶剂洗涤后在 70 度真空干燥的材料称重约 15mg,转移到 25ml 的小烧瓶中,加 15ml 重蒸水悬浮摇匀,每次滴加 20  $\mu\text{l}$  浓度为 5.0mmol/L NaOH 溶液,用 PHSS 003 型 pH 计测定 pH;等当量点为电位由正变负所用 NaOH 溶液体积。

[0080] 1.5 耐酸浸蚀性:将 0.10ml 压积样品悬浮于 5.0ml 乙酸缓冲液 (0.2mol/L, pH4.0),到指定时间磁分离 3 分钟,取上清 50  $\mu\text{l}$  和 50  $\mu\text{l}$  含量 10%的盐酸羟胺混合在 25 $^{\circ}\text{C}$  恒温 30 分钟;加入 250  $\mu\text{l}$  质量浓度 10%醋酸钠和 100  $\mu\text{l}$  质量含量 0.15% 1,10-邻菲罗琳反应 15,测 510nm 吸收表示铁量。

[0081] 实施例 1. 聚合物单体制备实例 1

[0082] 聚乙二醇 -1540- 双 - 不饱和酸单酯:将 PEG-1540 (平均分子量 1540 Dalton) 共 50.0g 加入 250ml 三颈烧瓶,水浴至摄氏 55 度融化,机械搅拌加入马来酸酐 6.9g (按每个 PEG 有两个羟基计算,过量 10%),对甲苯磺酸 1.7g;再升温到 80 $^{\circ}\text{C}$  熔融反应 6h 后;降温到

摄氏 55 度,加四氢呋喃 10ml,加 100ml 乙醚室温沉淀产物并用乙醚洗涤;将沉淀再用四氢呋喃溶解、乙醚沉淀和洗涤 3 次,得白色固体即聚乙二醇-1540-双-马来酸单酯作为候选单体,收率大于 70%。PEG-1540 原料和产物用 FTIR 分析确认生成不饱和酸酯,结果见图 3。制备流程图见图 1。

[0083] 实施例 2. 聚合物单体制备实例 2

[0084] 聚乙二醇-单马来酸单酯-单琥珀酸单酯:将 PEG-1540 共 20g 加入 250ml 三颈烧瓶,55℃水浴融化,机械搅拌加马来酸酐 1.4g,对甲苯磺酸 0.3g;升温到 70℃熔融反应 3h;在上述产物混合物中直接加入琥珀酸酐,并补加对甲苯磺酸 0.3g,再升温到 80℃熔融反应 3h;降到室温,加四氢呋喃 10ml,再加 100ml 乙醚并用乙醚洗涤沉淀;将白色沉淀再用四氢呋喃溶解、乙醚沉淀和洗涤 3 次,得聚乙二醇 1540-单顺丁烯二酸单酯-单琥珀酸单酯为候选单体(图 1)。

[0085] 实施例 3. 聚合物单体制备实例 3

[0086] 聚乙二醇单不饱和酸单酯:将 PEG-350 单甲醚共 20g 加入三颈瓶,水浴至 55℃,机械搅拌下加马来酸酐 1.4g,对甲苯磺酸 0.3g;升温到 70℃熔融反应 3h;降到室温,加四氢呋喃 10ml,再加 100ml 乙醚将产物在摄氏 4 度沉淀并用乙醚洗涤;将白色沉淀用四氢呋喃溶解、乙醚沉淀和洗涤 3 次,得白色固体为聚乙二醇 350 单甲醚马来酸单酯作为候选单体。制备流程图见图 1。

[0087] 实施例 4. 聚合物单体制备实例 4

[0088] 双-(聚乙二醇单丁二酸单酯)-丁烯二酸酯:将 PEG-400 共 20g 加入三颈瓶,水浴至 55℃,机械搅拌下加丁二酸酐 1.4g,对甲苯磺酸 0.3g;再升温到 70℃熔融反应 3h 后;降温到摄氏 55 度,加四氢呋喃 10ml,再加 100ml 乙醚将产物在摄氏 4 度沉淀并用乙醚洗涤;将白色沉淀再用 THF 溶解、乙醚沉淀和洗涤 3 次,得白色固体为 PEG-400-单丁二酸单酯;将顺丁烯二酸的两个羧基用二氯亚砷在 70 度回流制备成双酰氯;将此双酰氯用恒压漏斗滴加到 3 倍摩尔量 PEG-400-单丁二酸单酯的氯仿溶液中,回流 3 小时;加压去溶剂和氯化氢;用乙醚沉淀和洗涤,得到碳碳双键在中间的双-(聚乙二醇单丁二酸单酯)-丁烯二酸酯作为候选单体。制备流程图见图 1。

[0089] 实施例 5. 纳米四氧化三铁的磁流体制备实例 1

[0090] 取  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  共 1.5g 和  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  共 1.0g 依次溶于超声脱气的 100ml 水中,移入三颈瓶,在  $\text{N}_2$  保护下 2000rpm 机械搅拌,向溶液中缓慢滴加浓氨水 10ml(至  $\text{pH} > 9.0$ );当生成棕褐色  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒时立即加入 2.0g PEG-400-双-马来酸单酯,持续机械搅拌反应 20min;将混合物在 70℃熟化 30min;磁分离所得磁流体,用水反复洗涤备用;以磁分离所得磁流体的压积体积表示其量(此方法也用于 MSP 的初步计量;以下的应用实施例相同);所得压积磁流体约 5.0ml。此磁流体缩写 Magnetofluids400,在 pH 7.0 磷酸盐的悬浮稳定性见图 4、饱和磁化率和磁分离器响应见图 5、热失重分析见图 6、耐酸碱浸蚀性见图 7、粒径分布见图 8,其余见表 1。

[0091] 实施例 6. 纳米四氧化三铁的磁流体制备实例 2

[0092] 取  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  共 1.5g 和  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  共 1.0g 依次溶于超声脱气的 100ml 水中,移入三颈瓶,  $\text{N}_2$  保护下 2000rpm 机械搅拌,缓慢滴加浓氨水 10ml(至  $\text{pH} > 9.0$ );当棕褐色  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒生成时立即加入 2.0g PEG-1540-双-马来酸单酯,持续机械搅拌反应 20min;将

混合物在 70℃ 熟化 30min ;用磁分离器分离磁流体,用水反复洗涤备用 ;所得压积磁流体约 5ml。此磁流体缩写为 Magnetofluids1540 ;其 FTIR 见图 3、悬浮稳定性见图 4、饱和磁化率和磁分离器响应见图 5、热失重分析见图 6、耐酸碱浸蚀性见图 7、粒径分布见图 8、X- 射线粉末衍射图 9,其余见表 1。

[0093] 实施例 7. 聚乙二醇不饱和酸酯自由基共价聚合包被磁流体制备 MSP 实例 1

[0094] 将 PEG-1540- 双 - 马来酸单酯分散的磁流体 Magnetofluids1540 共 0.70ml 用 2.5ml 水悬浮,与用 5.0ml 水溶解的 PEG-1540- 双 - 顺丁烯二酸单酯共 4.0g 混匀,再加入甲叉双丙烯酰胺饱和水溶液 1.0ml,混匀作为水相共约 9ml ;将 12g AOT 溶于 500ml 正庚烷,超声除氧并通氮气,机械搅拌混匀为油相 ;将前述水相与油相混合,室温下恒速 2000rpm 持续机械搅拌 20 分钟后加入 1.0ml 过硫酸铵饱和水溶液,继续搅拌 5 分钟 ;将 5  $\mu$  l 催化剂 N, N' - 四甲基乙二胺稀释到 1.0ml 后加入上述体系,37℃ 恒速 2000rpm 搅拌反应 8h。停止搅拌,自然冷却并使得所得亚微米磁珠沉降 ;用磁分离器压积和分离,甲醇 : 丙酮 (1 : 9) 每次 80ml 洗涤 3 次,四氢呋喃洗涤每次 80ml 洗涤 3 次,再用每次 100ml 双蒸水洗涤 3 次后悬浮于水中备用,用磁分离器压积后产物总体积约 1.0ml。所得 MSP 平均粒径 0.78  $\mu$  m, 缩写为 MSP-PEG-D8,其密度大于 0.13g/ml (压积体积) ;其 FTIR 分析见图 3、悬浮稳定性见图 4、饱和磁化率和磁分离器响应见图 5、热失重分析见图 6、耐酸碱浸蚀性见图 7、粒径分布见图 8、X- 射线粉末衍射见图 9、可用 NaOH 滴定羧基见图 10、羧基活化为活泼酯连接 N- 单生物素化乙二胺后分离碱性磷酸酶标记链亲和素 (CIAP-SAV) 见图 11、疏水物质非特异结合见图 12,其余见表 1。

[0095] 实施例 8. 聚乙二醇不饱和酸酯自由基共价聚合包被磁流体制备 MSP 实例 2

[0096] 将 PEG-1540- 双 - 马来酸单酯分散的磁流体 Magnetofluids1540 共 0.70ml 用 2.5ml 水悬浮,与用 5.0ml 水溶解的 PEG 1540- 双 - 顺丁烯二酸单酯共 2.0g 混匀 (除此之外的其它配方及后续操作全部同实施例 7),再加入甲叉双丙烯酰胺饱和水溶液 1.0ml,振荡混匀作为水相共约 9ml ;将 12g AOT 溶于 500ml 正庚烷,超声除氧并通氮气,机械搅拌,此体系为油相 ;将前述水相与油相混合,室温下恒速 2000rpm 持续机械搅拌 20 分钟后加入 1.0ml 过硫酸铵饱和水溶液,继续搅拌 5 分钟 ;将 5  $\mu$  l 催化剂 N, N' - 四甲基乙二胺稀释到 1.0ml 后加入上述体系,37℃ 恒速 2000rpm 搅拌 8h。自然冷却使所得亚微米磁珠沉降 ;用磁分离器压积和分离,甲醇 : 丙酮 (1 : 9) 每次 80ml 洗 3 次,四氢呋喃洗涤每次 80ml 洗 3 次,再用 100ml 双蒸水洗 3 次后悬浮于水中,用磁分离器压积后总体积约 1.0ml。所得 MSP 平均粒径 0.38  $\mu$  m, 缩写为 MSP-PEG-D4 ;其悬浮稳定性见图 4、饱和磁化率和磁分离器响应见图 5、热失重分析见图 6、耐酸碱浸蚀性见图 7、粒径分布见图 8、NaOH 滴定羧基见图 10、羧基活化为活泼酯连接 N- 单生物素化乙二胺后分离 CIAP-SAV 图 11、透射电镜观察的外貌见图 15a,其余见表 1。

[0097] 实施例 9. 聚乙二醇不饱和酸酯共价聚合包被磁流体制备 MSP 实例 3

[0098] 将 PEG-400- 双 - 马来酸单酯分散的磁流体 Magnetofluids400 共 0.70ml 用 2.5ml 水悬浮,与用 5.0ml 水溶解的 PEG-1540- 单马来酸单酯 - 单琥珀酸单酯 1.0g、PEG-400- 双马来酸单酯 0.35g 混匀,再加入甲叉双丙烯酰胺饱和水溶液 1.0ml,振荡混匀作为水相共约 9ml ;将 12gAOT 溶于 500ml 正庚烷,超声除氧并通氮气,机械搅拌,此体系为油相 ;将前述水相与油相混合,室温下恒速 2000rpm 持续机械搅拌 20 分钟后加入 1.0ml 过硫酸铵饱和水溶

液,继续搅拌 5 分钟;将  $5 \mu\text{l}$  催化剂  $\text{N}, \text{N}'$ -四甲基乙二胺稀释到  $1.0\text{ml}$  水中加入,  $37^\circ\text{C}$  恒速  $2000\text{rpm}$  搅拌反应  $8\text{h}$ 。停止搅拌,自然冷却使磁珠沉降;用磁分离器压积和分离,甲醇:丙酮 (1 : 9) 每次  $80\text{ml}$  洗涤 3 次,四氢呋喃洗涤每次  $80\text{ml}$  洗涤 3 次,再用每次  $100\text{ml}$  双蒸水洗涤 3 次后悬浮于水中备用,用磁分离器压积后总体积约  $1.0\text{ml}$ 。所得 MSP 平均粒径  $0.32 \mu\text{m}$ , 缩写为 MSP-PEG-B;其悬浮稳定性见图 4、饱和磁化率和磁分离器响应见图 5、热失重分析见图 6、耐酸碱浸蚀性见图 7、粒径分布见图 8、 $\text{NaOH}$  滴定羧基见图 10、羧基活化为活泼酯连接  $\text{N}$ -单生物素化乙二胺后分离 CIAP-SAV 图 11、透射电镜观察的外貌见图 15b,其余见表 1。

[0099] 实施例 10. 聚乙二醇不饱和酸酯共价聚合包被磁流体制备 MSP 实例 4

[0100] 将 PEG-400-双-马来酸单酯分散的磁流体 Magnetofluids400 共  $0.70\text{ml}$  用  $2.5\text{ml}$  水悬浮,与用  $5.0\text{ml}$  水溶解的 PEG-1540-双-马来酸单酯  $2.0\text{g}$ 、PEG-400 双马来酸单酯  $0.35\text{g}$ 、氢氧化钠  $47\text{mg}$  混匀,再加入甲叉双丙烯酰胺饱和水溶液  $1.0\text{ml}$ ,振荡混匀作为水相共约  $9\text{ml}$ ;将  $12\text{g}$  AOT 溶于  $500\text{ml}$  正庚烷,超声除氧并通氮气,机械搅拌,此体系为油相;将前述水相与油相混合,室温下恒速  $2000\text{rpm}$  持续机械搅拌 20 分钟,加入  $1.0\text{ml}$  过硫酸铵饱和水溶液,继续搅拌 5 分钟;将  $5 \mu\text{l}$  催化剂  $\text{N}, \text{N}'$ -四甲基乙二胺稀释到  $1.0\text{ml}$  后加入上述体系,  $37^\circ\text{C}$  恒速  $2000\text{rpm}$  搅拌反应  $8\text{h}$ 。停止搅拌,自然冷却并使得所得亚微米磁珠沉降;用磁分离器压积和分离,甲醇:丙酮 (1 : 9) 每次  $80\text{ml}$  洗涤 3 次,四氢呋喃洗涤每次  $80\text{ml}$  共洗涤 3 次,再用每次  $100\text{ml}$  双蒸水洗涤 3 次后悬浮于水中备用,用磁分离器压积后总体积约  $0.40\text{ml}$ 。所得 MSP 平均粒径  $0.33 \mu\text{m}$ , 缩写为 MSP-PEG-A;其悬浮稳定性见图 4、饱和磁化率和磁分离器响应见图 5、热失重分析见图 6、耐酸碱浸蚀性见图 7、粒径分布见图 8、 $\text{NaOH}$  滴定羧基见图 10、羧基活化为活泼酯连接  $\text{N}$ -单生物素化乙二胺后分离 CIAP-SAV 图 11,其余见表 1。

[0101] 实施例 11. 磁性微球表面羧基活化和生物素化修饰

[0102] 参照文献用  $\text{N}$ -羟基琥珀酰亚胺和二环己基碳二亚胺在二甲基甲酰胺中将生物素活化 (Biosens Bioelectron 2009;25:112-117),同 10 倍摩尔量的乙二胺室温振荡反应 4 小时;加乙醚沉淀并反复洗涤得到  $\text{N}$ -单生物素化乙二胺;将所得表面为羧基的 MSP 压积体积共  $0.3\text{ml}$  于干燥四氢呋喃中,加入  $\text{N}$ -羟基琥珀酰亚胺共  $1.0\text{g}$ ,二环己基碳二亚胺 DCC 共  $1.8\text{g}$ ,  $30^\circ\text{C}$  振荡反应 ( $250\text{r}/\text{min}$ ) 反应  $24\text{h}$  得表面为活泼酯的磁珠;磁力回收羧基活化的 MSP,用四氢呋喃充分洗涤后悬浮于干燥二甲基甲酰胺中,再加入二甲基甲酰胺溶解的  $\text{N}$ -单生物素化乙二胺,室温振荡反应  $4\text{h}$ ,磁力回收表面生物素化的磁珠,用四氢呋喃洗涤 3 次,悬浮在  $\text{pH} 7.0$  的  $10\text{mmol}/\text{L}$  磷酸钠缓冲液中,通过测定碱性磷酸酶标记的链亲和素,即 CIAP-SAV,的结合容量来反映固定化在带有连接臂的羧基上的生物素周围的空间位阻,特征见表 1。

[0103] 实施例 12. 生物素化磁性微球同碱性磷酸酶标记链亲和素的特异结合

[0104] 将大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞株超声裂解,  $10000\text{rpm}$  离心  $15\text{min}$  取上清液并用  $\text{pH} 7.0$  的  $10\text{mmol}/\text{L}$  HEPES 缓冲液稀释到  $0.2\text{g}/\text{L}$  蛋白;在  $1.5\text{ml}$  的 EP 管中,加此稀释的大肠杆菌细胞裂解液  $20 \mu\text{l}$ ,加入 CIAP-SAV 共  $2\text{ng}$  和  $\text{pH} 7.0$  的  $10\text{mmol}/\text{L}$  HEPES 缓冲液共  $0.50\text{ml}$  混合均匀作为样品;加不同量压积体积生物素化磁珠 ( $0.10\text{ml}$  压积体积用  $\text{pH} 7.0$  的  $10\text{mmol}/\text{L}$  HEPES 缓冲液稀释到  $1.0\text{ml}$ ),  $25^\circ\text{C}$  摇床  $250\text{rpm}$  反应 30 分钟,磁力去上清液后磁珠再悬浮

于上述 HEPES 缓冲液中为含所分离的结合 CIAP-SAV 样品 ;加入 2.0mol/L 二乙醇胺 pH 9.8 缓冲液溶解的对硝基苯基磷酸酯 (1.0mg/ml) 共 0.10ml,温和涡旋混匀 ;25℃以 250r/min 振荡反应 30min,磁分离 3.0min 去磁珠取上清液 150  $\mu$  L,立即加入 50  $\mu$  L 浓度为 1.0M 的 NaOH 溶液终止反应 ;Botek ELX800 酶标仪测定 405nm 吸收。根据 CIAP-SAV 标准曲线确定可分离出来的 CIAP-SAV 量,多数磁珠按干重计算结合容量 > 1.0mg/g(干重),详见表 1。

[0105] 实施例 13. 生物素化磁性微球同疏水性物质非特异结合

[0106] 取压积的 0.10ml 生物素化磁珠用磷酸盐缓冲液稀释到 1.0ml ;再取 200  $\mu$  L 磁珠悬液于 0.5mL 的 EP 管中,磁力去上清液 ;分别加入含 (4- 硝基 -1- 萘基) - 苯甲酸酯 (0.25 ~ 64  $\mu$  M, LogP ~ 4.0)、4- 硝基苯甲酸甲酯 (0.25 ~ 64  $\mu$  M, LogP ~ 1.6) 的磷酸盐缓冲液 100  $\mu$  L,温和混匀后在 25℃以 250r/min 震荡反应 30min ;磁力回收磁珠并尽可能除去上清液 (上清液残留量约 10  $\mu$  L) ;磁珠用 60  $\mu$  L 四氢呋喃在 25℃以 250r/min 震荡 30min 溶解得到结合的疏水物质。在 Agilent-1100 HPLC 系统,用伊利特 ODS2 C18 柱 (4.6 $\times$ 250mm,5  $\mu$  m) 测定结合的疏水物质 ;流动相都为甲醇和水混合物,流速都是 0.8ml/min ;分析 (4- 硝基 -1- 萘基) 苯甲酸酯流动相含 90% 甲醇,检测波长 335nm ;分析 4- 硝基苯甲酸甲酯流动相含 70% 甲醇,检测波长 260nm ;进样量都是 20  $\mu$  L 且柱温 25℃。考虑去上清液时残留 10  $\mu$  L 和在不同测试浓度下结合率响应,可认为 LogP 小于 4.0 物质在 10  $\mu$  mol/L 以下基本没有非特异形结合 (图 12),但是 LogP > 5.9 的物质非特异性结合在 2  $\mu$  mol/L 以上就非常明显。

[0107] 实施例 14. 固定化融合表达标签蛋白 GST

[0108] 14.1 GST 的制备 :将 pGST-MOLUC 质粒转入 Escherichia coli BL 21 (DE3) 感受态细胞,挑选阳性克隆菌株在 LB/Amp 培养基中 37℃培养至平台期,以 1 : 1000 的稀释比例接种于 LB/Amp 培养基在 37℃扩大培养至菌液 OD<sub>600</sub> 接近 0.6,加入 IPTG 终浓度为 0.1mmol/L,16℃低温诱导表达 18 小时,4℃下 10,000r/min 离心 10min 收集菌体。菌体用预冷到 4℃的 pH 7.3 磷酸盐缓冲液 (PBS, 含 140mmol/L NaCl,2.7mmol/L KCl,10mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,1.8mmol/LKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 洗涤,每 100ml 新鲜菌液所得湿菌用 15ml 细胞裂解液 (PBS,1mmol/L EDTA,1mmol/L PMSF,1%  $\beta$ -巯基乙醇) 重悬,用超声破碎细胞 30min,4℃下 1,2000r/min 离心 20min 收集裂解上清液。裂解上清液加入已用上述 PBS 平衡的 Glutathione Sepharose 4B(GEHealthcare) 琼脂糖层析柱,控制流速约为 0.5ml/min,待上清液全部流过柱床后,用相同缓冲液洗去未与琼脂糖介质结合的杂蛋白,直至在 280nm 吸收的基线平稳后,加入含 10mmol/L 还原型谷胱甘肽的 50mmol/L Tris-HCL 缓冲液 (pH 为 8.0),将结合在琼脂糖介质上的 GST 洗脱。收集过 Glutathione Sepharose 4B 柱后蛋白含量高的样品用 PEG 6000 浓缩至体积为 2ml 左右,4℃用 1L 透析液 (10mmol/L pH 7.0 磷酸钠,30% 甘油,1mmol/L EDTA,1mmol/LPMSF,1%  $\beta$ -巯基乙醇,1mmol/L 对氨基苯甲脒,0.1mmol/L DTT) 透析 18 小时,每 6 小时更换一次透析液。十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate-PAGE,SDS-PAGE) 检测发现所得 GST 基本无杂蛋白,该 GST 亚基分子量接近 26kDa ;透析后 GST 样品中蛋白浓度约 8.0mg/ml,按如下方法测定的比活性大于 2.6U/mg 蛋白质。

[0109] 14.2 GST 活性测定 :反应体系为 0.10mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5,含 0.50mmol/L 二乙三氨基五乙酸)1.20mL,2,4- 二硝基氯苯 (CDNB) 和新鲜配制的还原型谷胱甘肽 (GSH) 溶液终浓度同为 1.0mmol/L,加入 5  $\mu$  L 经恰当稀释的 GST 样品启动反应,在 Mapda 1600 PC

上延迟 25s 后每 10s 间隔记录 340nm 吸收变化,共记录 5min。按照产物在 340nm 的差摩尔消光系数为  $10000\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  估算生成产物的速度,每分钟生成 1 微摩尔产物的酶量为 1 单位 (U)。

[0110] 14.3 GST 在 MSP 表面的固定化:取 MSP-PDE-D4、MSP-PEG-D8 和 MSP-PEG-B 的羧基活化产物各 0.10ml,用冰冷的 10mmol/L 且 pH 8.0 的硼酸-硼砂缓冲液快速洗涤三次,立即重新悬浮在 10mmol/L 且 pH 8.0 的硼酸-硼砂缓冲液共 2.0ml 中并分成两等份转移到 EP 管中;在活化的 MSP 中,各加入 10  $\mu$ l 透析后的 GST 样品(含纯化后 GST 蛋白 80  $\mu$ g),在室温下振荡反应 40min 后磁分离分出上清液和 MSP;上清液中的 GST 活性如上所述测定,固定化 GST 活性如下所述测定。设置相同条件下无磁珠的对照体系。

[0111] 14.4 固定化 GST 活性测定:在 1.50ml EP 管中加入测定活性所用 0.10mol/L 磷酸钠缓冲液和底物溶液共 1.0ml(浓度和缓冲液与连续跟踪 GST 反应时完全相同);在 25 度恒温振荡下反应;每隔 20 分钟将反应体系用磁分离器分离固定化的 GST 和产物溶液 2.5 分钟,立即取上清液 0.70ml 测定 340nm 吸收,并尽快将测定后液体转移回到原来的反应体系(整个过程在 3.3 分钟内完成),连续检测 60 分钟,得到三种 MSP 固定化 GST 反应过程曲线如图 13。

[0112] 14.5 结果:(1) 在相同条件下无 MSP 的 GST 在 40 分钟内基本无热失活;分离出固定化 GST 的磁珠后,上清液剩余的 GST 活性约占所用总量的 65%。(2) MSP-PEG-D4 固定化 GST 的容量 > 0.4mg/ml(压积),相当于 2.6mg/g(干重);MSP-PEG-D8 固定化 GST 的容量约 0.35mg/ml(压积),相当于 2.0mg/g(干重);MSP-PEG-B 固定化 GST 的容量约 0.53mg/ml(压积),相当于 3.1mg/g(干重)。(3) 固定化 GST 的 MSP 悬浮于含 0.02%叠氮钠的 10mmol/L 磷酸钠缓冲液中(pH6.5),在摄氏 4 度保存 90 小时后活性保留率均值为  $(70\pm 10)\%$ 。(4) GST 可通过与 MSP 上活化酯反应而被固定化,用短链两端都有碳碳双键和羧基的单体加上长链两端都有羧基但仅一端有碳碳双键的单体自由基共聚包被磁流体所得 MSP 的结合容量更理想。

[0113] 实施例 15. 固定化链亲和素

[0114] 15.1 链亲和素固定化:取 MSP-PEG-D4 的活泼酯共 0.20ml,用冰冷的 10mmol/L 且 pH 8.0 的硼酸-硼砂缓冲液快速洗涤三次,立即重新悬浮在 10mmol/L 且 pH 8.0 的硼酸-硼砂缓冲液共 2.0ml 中并分成两等份转移到 EP 管中;各加入 80 ~ 320  $\mu$ g 链亲和素(SAV, Promega),在室温下振荡反应 40min 后磁分离分出上清液和 MSP;测定上清液中的 SAV 参照文献方法,用 N-生物素化-N'-(1-萘基)-乙二胺(BNEDA)作为探针,在 280nm 激发下测定 430nm 发射(文献见 Biosens Bioelectron 2009;25:112-117);所用荧光分光光度计为 Agilent Cary Eclipse;如未说明,所用激发狭缝和发射狭缝都为 10nm;被固定化 SAV 蛋白量对固定化反应体系中 SAV 总量的关系如图 14;用如下所述方法测定固定化 SAV 的活性。

[0115] 15.2 固定化链亲和素的结合活性测定:采用磁分离固定化 SAV 结合 BNEDA 后的剩余量确定固定化 SAV 结合小分子的容量。先在 10mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)中,测定 BNEDA 在 325nm 激发下在 442nm 发射信号强度对 BNEDA 量的响应曲线,结果显示可测范围在 0.5nmol/L 到 40nmol/L 以上。然后在 10mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)中加入终浓度为 240nmol/L 的 BNEDA,并加入设定量的稀释后固定化 SAV 的磁珠,加缓冲液共 2.0ml;室温振荡反应 5.0 分钟后,磁分离结合的 BNEDA,取上清液用 10mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)稀

释 6 倍,测定 325nm 激发下 442nm 发射。从标准曲线上确定上清液中的 SAV 量。所得被固定化 SAV 结合 BNEDA 量同固定化反应体系中所用 SAV 总量的关系如图 14。

[0116] 15.3 结果:(1) 固定化在 MSP 上的 SAV 和上清液中 SAV 之和占到所加入 SAV 总量的 90%~103%。(2)MSP-PEG-D4 的活泼酯固定化 SAV 容量约 6.5mg/g(干重)。(3) 固定化 SAV 按压积体积计算,对 BNEDA 结合容量约 70nmole/ml(压积体积),相当于 400nmole/g。

[0117] 实施例 16. 用丙烯酸钠、丙烯酰胺和长链单体共价聚合包被磁流体制备 MSP 实例 5

[0118] 将 PEG-400-双-马来酸单酯分散的磁流体 Magnetofluids400 共 1.0ml 用 1.5ml 水悬浮;再取 7.0ml 质量浓度为 1%的甲叉双丙烯酰胺水溶液加 1.0g 丙烯酰胺,18mg 丙烯酸钠,0.56g 一端丙烯酸酯另一端为丁二酸单酯的聚乙二醇 800,配制成溶液,与磁流体混匀作为水相共约 9.5ml;将 12g AOT 溶于 500ml 正庚烷,超声除氧并通氮气,机械搅拌,此体系为油相;将前述水相与油相混合,室温下恒速 2000rpm 持续机械搅拌 20 分钟后加入 1.0ml 饱和过硫酸铵饱和水溶液,继续搅拌 5 分钟;将 3 $\mu$ l 催化剂 N,N'-四甲基乙二胺稀释到 0.50ml 水中加入,37 $^{\circ}$ C 恒速 2000rpm 搅拌反应 4h。然后停止搅拌自然冷却使亚微米磁珠沉降并转移到塑料杯中;用磁分离器压积和分离,甲醇:丙酮(1:9)每次 80ml 洗涤 3 次,四氢呋喃洗涤每次 80ml 洗涤 3 次,再用每次 100ml 双蒸水洗涤 3 次后悬浮于水中备用,用磁分离器压积后总体积约 1.0ml。所得 MSP 平均粒径 0.32 $\mu$ m(图 8),其在 10.0mmol/L pH 磷酸钠缓冲液中的悬浮稳定性与 Magnetofluids400 相当但低于 MSP-PEG-D4;羧基活化为活泼酯连接 N-单生物素化乙二胺后分离 CIAP-SAV 的容量约为 1.4mg/g(干重),与 MSP-PEG-D4 相当(表 1)。

[0119] 实施例 17. 用中间有多碳碳双键的聚酰胺和长链单体共价聚合包被磁流体制备 MSP 实例 6

[0120] 17.1 中间有多碳碳双键的聚酰胺单体制备

[0121] 17.1.1 双-(马来酸单酯)-乙二胺:在 50ml 丙酮中溶解 49g 马来酸酐,50 度水浴下滴加 15.2ml 乙二胺(液体);析出浅黄色沉淀用丙酮洗涤,挥干丙酮;该产物在水中溶解度约 1%。

[0122] 17.1.2 双-(马来酸单酯)-乙二胺活化:取前述所得浅黄色固体 1.3g 加热到溶于共 10ml 二甲基甲酰胺中,加入 1.15g N-羟基琥珀酰亚胺固体,滴加 2.1g 二环己基碳二亚胺的二甲基甲酰胺溶液共 2ml,室温反应 12 小时;过滤去沉淀;用 200ml 乙醚在 4 度下长时间沉淀可得未干燥的浅黄色粉末约 0.8g;

[0123] 17.1.3 中间有多个碳碳双键的聚酰胺单体:取前述步骤所得浅黄色粉末 0.72g 加热溶于 5ml 二甲基甲酰胺中,加牛磺酸固体 0.60g,室温悬浮反应 12 小时,直接用 60ml 乙醚沉淀,用乙醚洗涤产物,得到未干燥的浅黄色粉末约 0.35g;

[0124] 17.2 磁珠制备:将 PEG-400-双-马来酸单酯分散的磁流体 Magnetofluids400 共 0.2ml 用 0.50ml 水悬浮;将上述中间有多个碳碳双键的聚酰胺单体 0.12g 悬于 2.5ml 水中加 NaHCO<sub>3</sub> 到 pH 约为 5.5 使其溶解,再加入甲叉双丙烯酰胺固体在 25 度达到饱和,加入 0.44g 一端为丙烯酸酯而另一端为丁二酸单酯的聚乙二醇 800 固体配成溶液,再与磁流体混匀共约 3.0ml 作为水相;将 4g AOT 溶于 170ml 正庚烷,超声除氧并通氮气,机械搅拌混匀

为油相；将前述水相与油相混合，室温下 2000rpm 机械搅拌 20 分钟，加 0.25ml 饱和过硫酸铵水溶液，搅拌 5 分钟；将 2 μ l 催化剂 N,N'-四甲基乙二胺稀释到 0.25ml 水中加入，37℃ 恒速 2000rpm 搅拌反应 6 小时。停止搅拌自然冷却使磁珠沉降；用磁分离器分离，甲醇：丙酮（1：9）每次 80ml 洗涤 3 次，四氢呋喃洗涤每次 80ml 洗涤 3 次，再用每次 100ml 双蒸水洗涤 3 次后悬浮于水中备用，用磁分离器压积后总体积约 0.30ml。所得 MSP 平均粒径 0.34 μ m，其在 10.0mmol/LpH 磷酸钠缓冲液中的悬浮稳定性与 MSP-PEG-D4 相当；羧基活化为活泼酯连接 N-单生物素化乙二胺后分离 CIAP-SAV 的容量约为 1.2mg/g（干重），略低于 MSP-PEG-B（表 1）。

[0125] 表 1 参照实施例 7 ~ 10 所制备磁流体和表面亲水磁珠的主要性质

[0126]

| 样品/特性                              | 样品 1 | 样品 2 | 样品 3 | 样品 4 | 样品 5 | 样品 6 | 样品 7 | 样品 8 | 样品 9 | 样品 10 | 样品 11 | 样品 12 |
|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 激光粒度仪测定粒径(nm)                      | 357  | 509  | 886  | 685  | 553  | 510  | 380  | 772  | 317  | 339   | 325   | 335   |
| 饱和磁化率 (emu·g <sup>-1</sup> )       | 55   | 57   | 18   | 21   | 24   | 21   | 47   | 26   | 41   | 46    | 45    | 41    |
| SAV-CIAP 结合量 (mg·g <sup>-1</sup> ) |      |      | 0.02 | 0.30 | 0.55 | 0.50 | 1.7  | 1.1  | 1.0  | 2.1   | 1.4   | 1.2   |
| 可滴定羧基量 (mmole·g <sup>-1</sup> )    |      |      | 0.25 | 0.23 | 0.19 | 0.16 | 0.43 | 0.28 | 0.13 | 0.21  | 0.22  | 0.43  |
| 900 度时仍保留的质量 (%)                   | 85.4 | 87.2 | 76.2 | 76.0 | 77.2 | 75.5 | 79.2 | 78.0 | 82.5 | 80.8  | 80.1  | 80.5  |

[0127] 样品 1:Magnetofluids400；样品 2:Magnetofluids1540；样品 3:磁流体用聚乙二醇 400 的双马来酸单酯分散且仅用该单体聚合包被所得 MSP；样品 4:磁流体用聚乙二醇 800 的双马来酸单酯分散且仅用该单体聚合包被所得 MSP；样品 5:磁流体用聚乙二醇 4000 的双马来酸单酯分散且仅用该单体聚合包被所得 MSP；样品 6:磁流体用聚乙二醇 6000 的双马来酸单酯分散且仅用该单体聚合包被所得 MSP；样品 7:MSP-PEG-D4；样品 8:MSP-PEG-D8；样品 9:MSP-PEG-A；样品 10:MSP-PEG-B；样品 11:实施例 16 中用丙烯酸钠、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺加一端为丙烯酸酯而另一端为丁二酸单酯的聚乙二醇 800 作为长链单体，自由基聚合包被 Magnetofluids400 所得磁珠；样品 12:实施例 17 中用双-(马来酸单酯)-乙二胺与两分子牛磺酸所得在中间有两个双键者为短链单体，加一端为丙烯酸酯而另一端为丁二酸单酯的聚乙二醇 800 为长链单体，自由基聚合包被 Magnetofluids400 共反应 6 小时所得磁珠。



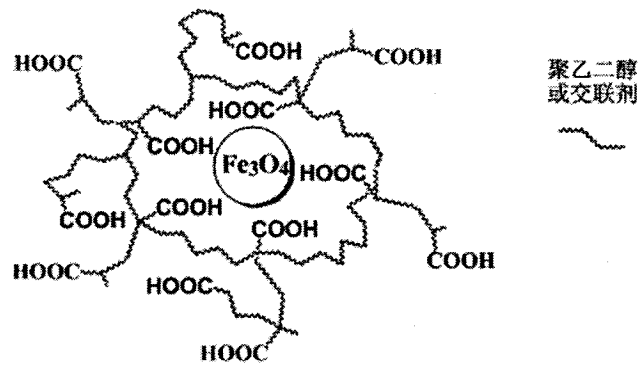


图 2

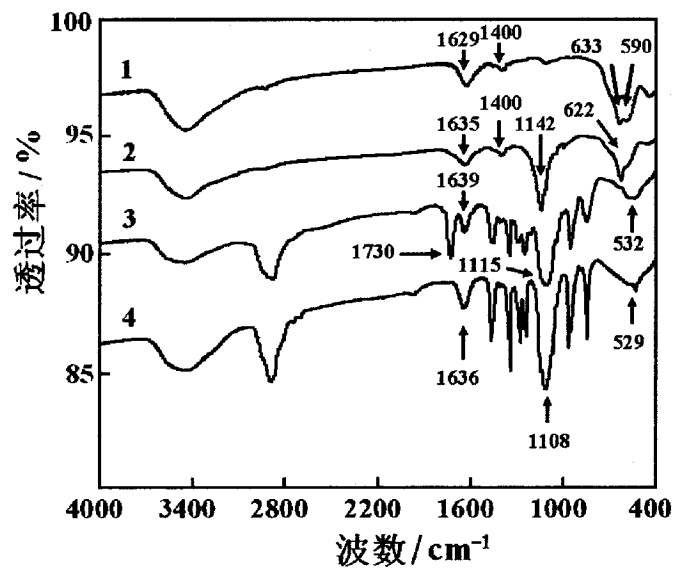


图 3

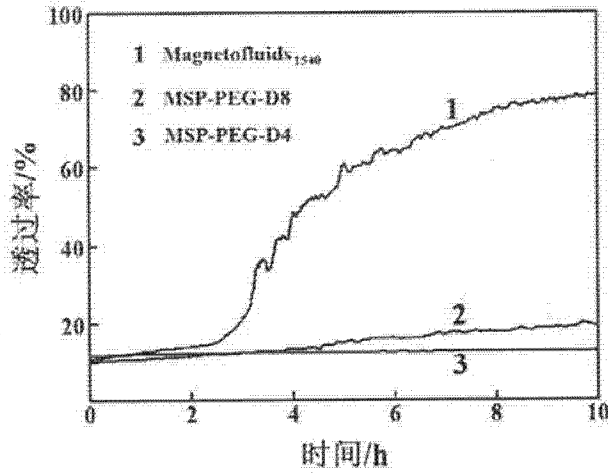


图 4a

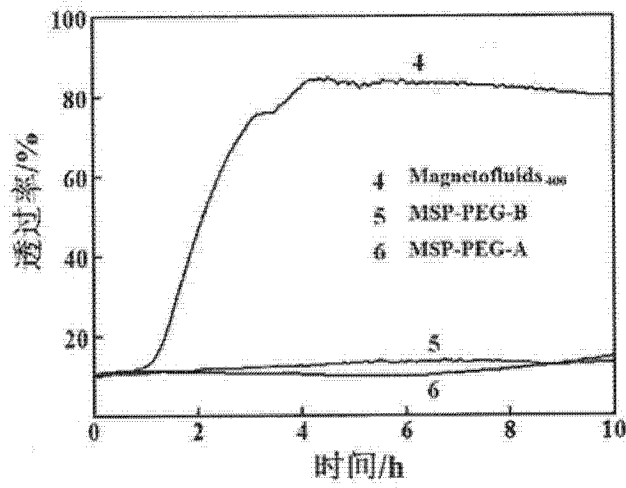


图 4b

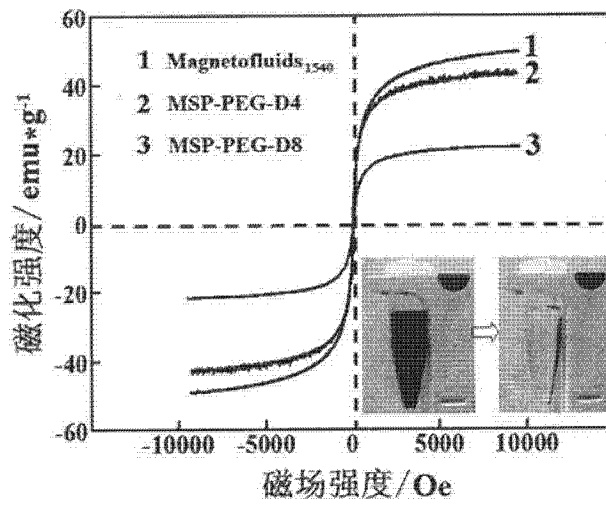


图 5a

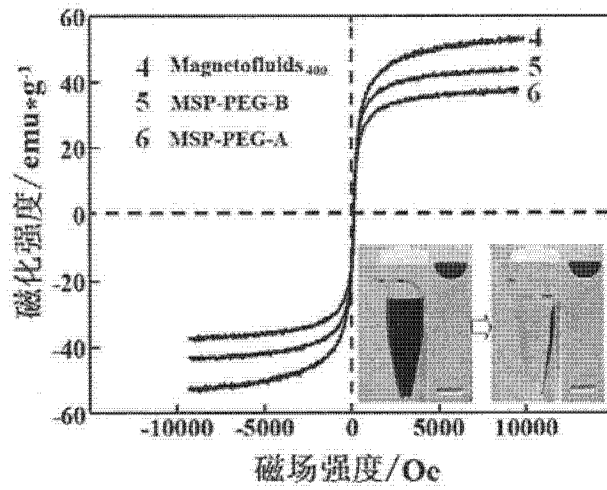


图 5b

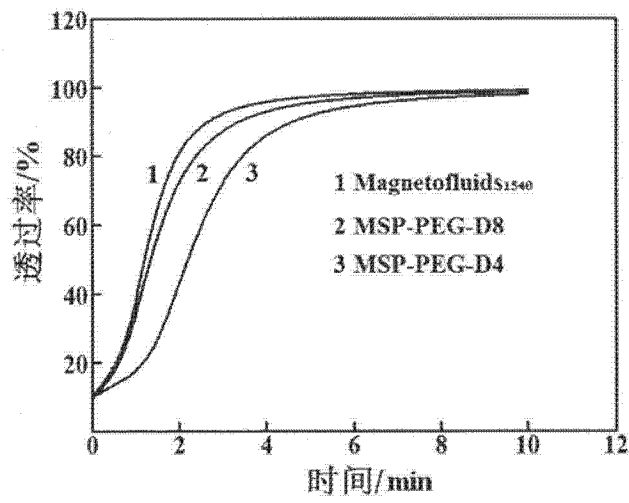


图 5c

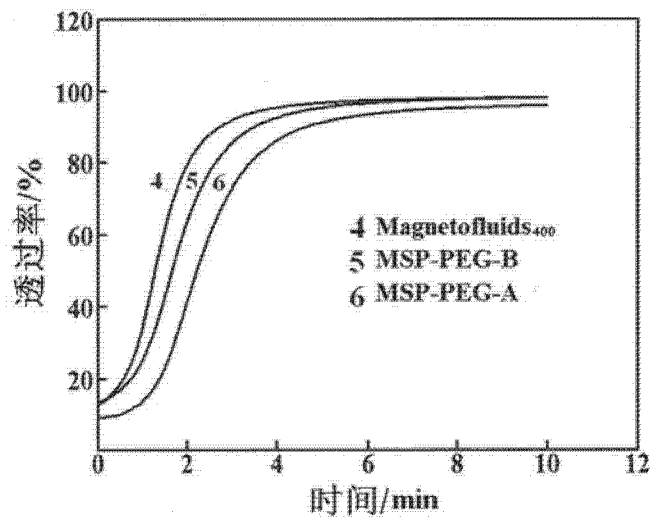


图 5d

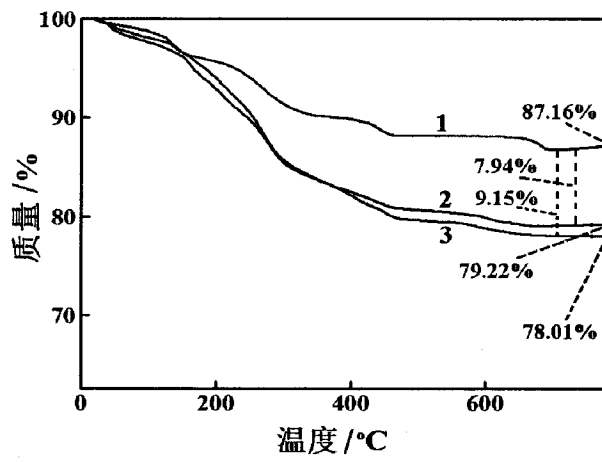


图 6a

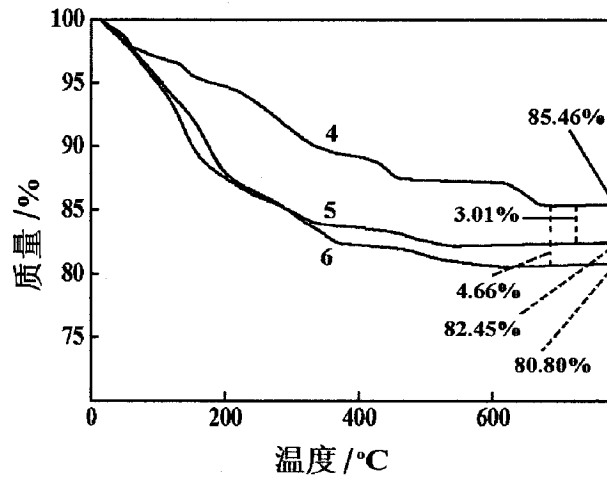


图 6b

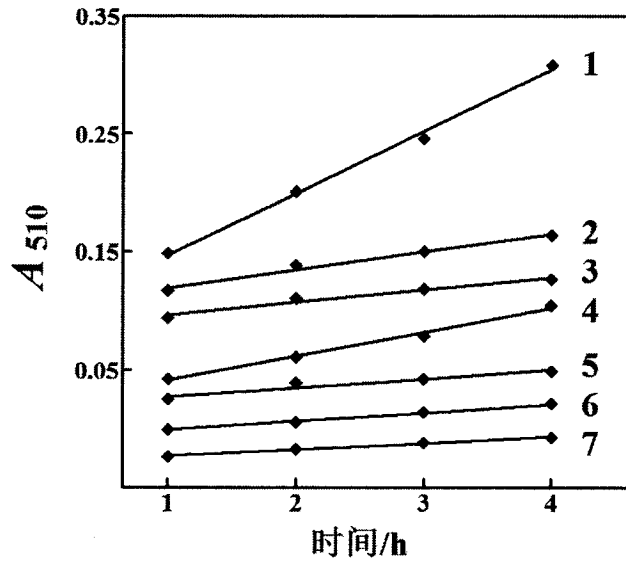


图 7

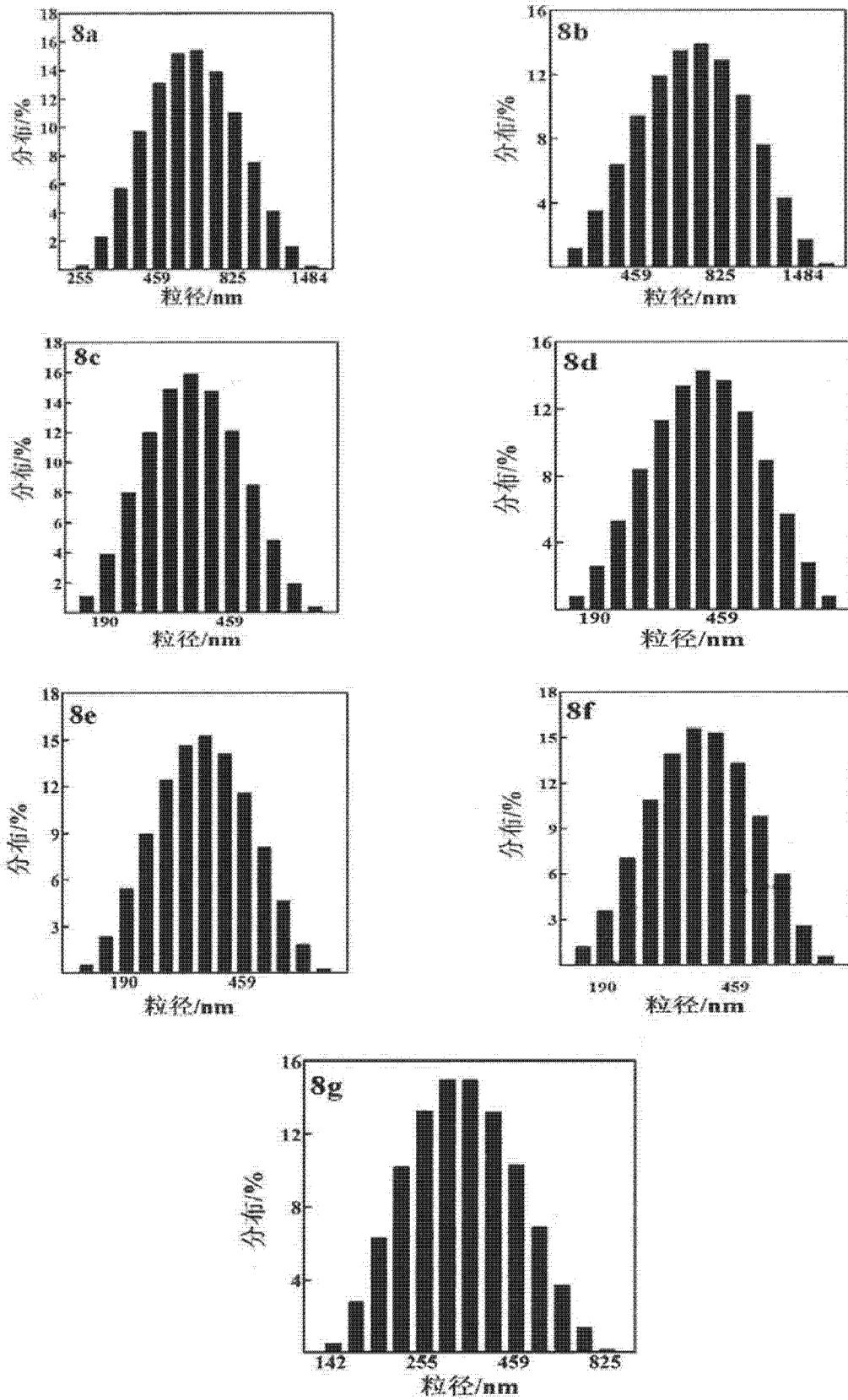


图 8

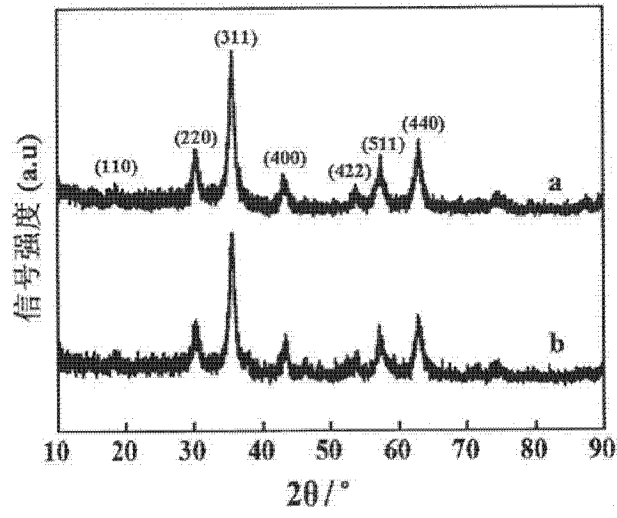


图 9

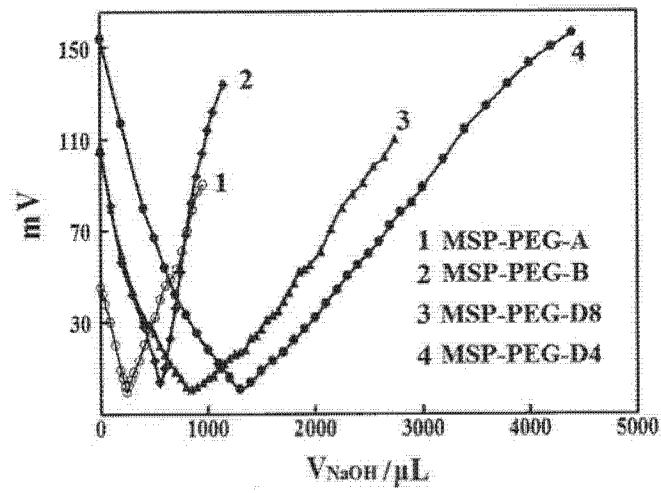


图 10

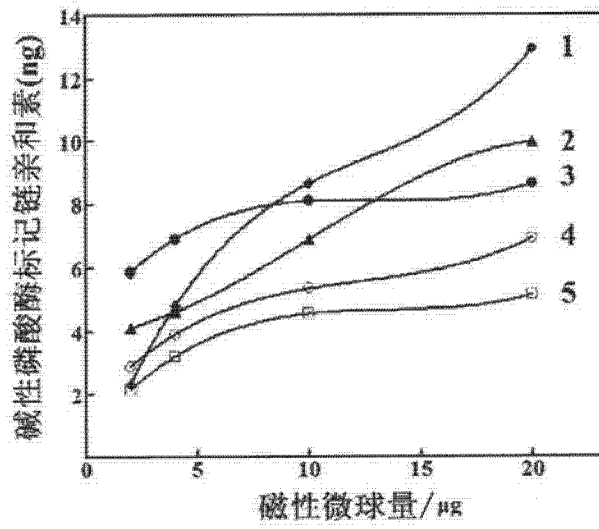


图 11

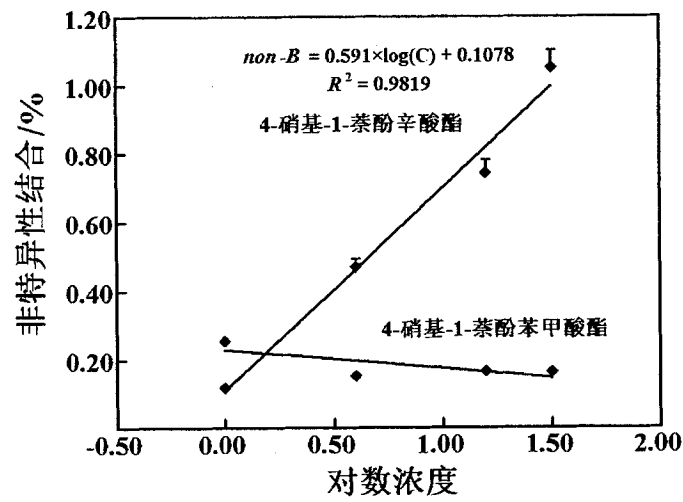


图 12

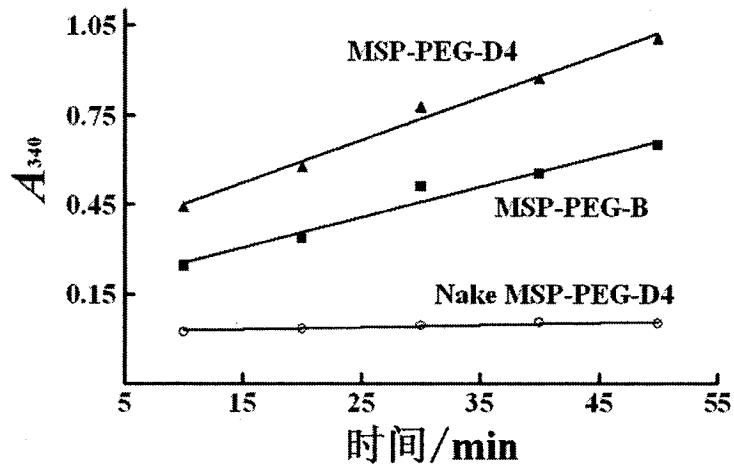


图 13

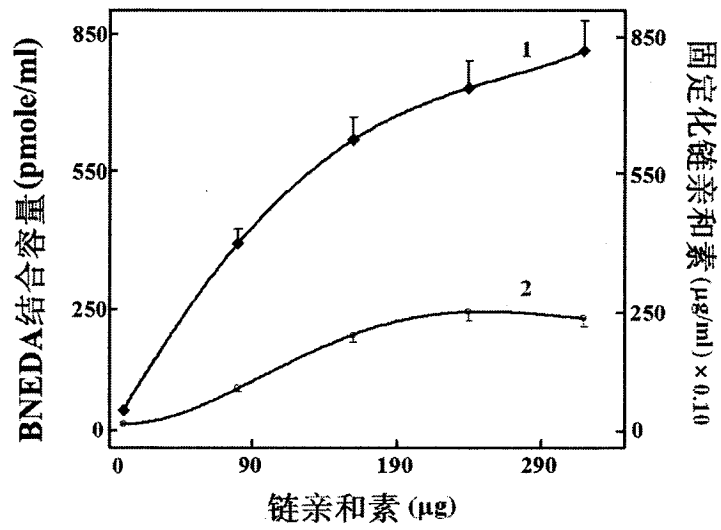


图 14

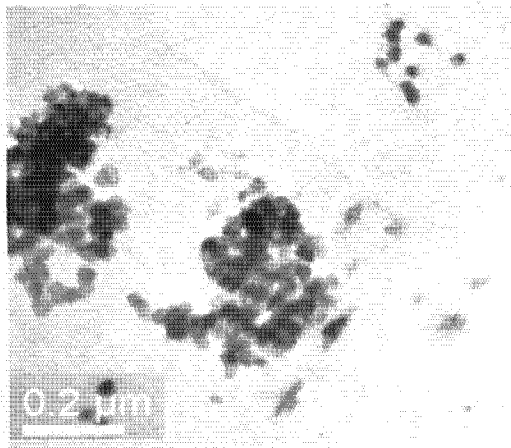


图 15a

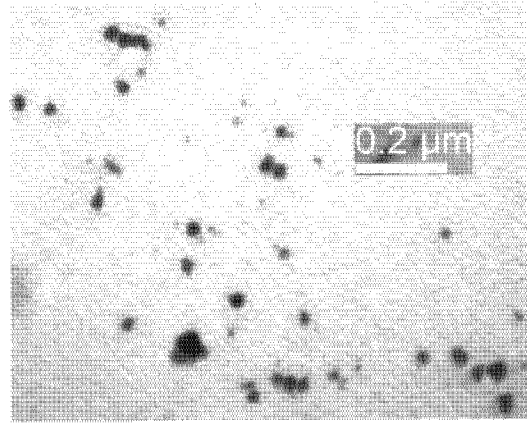


图 15b

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用两端带羧基的直链亲水聚合物包被纳米磁芯制备微纳米磁性材料的方法及其应用  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102617810B</a>  | 公开(公告)日 | 2014-09-24 |
| 申请号            | CN201210046309.5  | 申请日     | 2012-02-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 重庆医科大学  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 重庆医科大学  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 重庆医科大学  |         |            |
| [标]发明人         | 廖飞<br>杨晓兰<br>龙高波<br>蒲军<br>刘红博<br>李元丽  |         |            |
| 发明人            | 廖飞<br>杨晓兰<br>龙高波<br>蒲军<br>刘红博<br>李元丽  |         |            |
| IPC分类号         | C08F290/06 C08F2/44 C08F2/32 C08K3/22 H01F1/00 H01F1/42 C12N11/14 C12N11/08 C12Q1/44 C12Q1/48 C07K17/14 C07K17/08 C07K11/14 C12N15/10 G01N33/53 |         |            |
| 审查员(译)         | 刘雅婷   |         |            |
| 其他公开文献         | CN102617810A  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>  |         |            |

摘要(译)

一种用两端带羧基的直链亲水聚合物包被磁流体制备微纳米磁性材料的方法及其应用；具体涉及将两端为羟基或氨基的聚乙二醇或寡聚甘氨酸链与马来酸酐、琥珀酸酐反应得两端有羧基但仅有一个或两个碳碳双键的单体；用化学共沉淀法制备纳米磁芯并用带双键的短链单体分散成磁流体；在水/二辛基琥珀酸酯磺酸/正庚烷或类似微乳体系，用有两个双键的短链单体加上仅一个双键的长链单体或类似混合物、交联剂、催化剂和引发剂，自由基共聚合包被磁流体，获得表面有大量羧基的亲水微纳米磁珠；常用蛋白包括但不限于药物靶蛋白或链亲和素或免疫分析用捕获多抗、小分子配体、核酸，都可直接固定化在此磁珠上用于基于磁力生物亲和分离或靶向运送。

