



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108508195 A

(43)申请公布日 2018.09.07

(21)申请号 201810300413.X

(22)申请日 2018.04.04

(71)申请人 北京农学院

地址 100000 北京市昌平区回龙观镇北农  
路7号

(72)发明人 丁轲 孙毅蒙 韩涛 陈湘宁

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11371

代理人 王闯

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

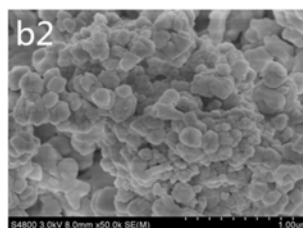
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

### (54)发明名称

一种免疫磁珠及其制备方法及应用

### (57)摘要

本发明提供了一种免疫磁珠及其制备方法及应用。免疫磁珠的制备方法:将一磷酸腺苷或其金属盐、水相缓冲液、四氧化三铁、石蜡和司盘80混合,搅拌形成乳化体系;石蜡和司盘80的体积比为7:93~100;一磷酸腺苷或其金属盐与四氧化三铁的质量比为0.1~0.3:0.2;向乳化体系中加入戊二醛,恒温下发生第一步交联反应;然后再加入抗体和锌盐,发生第二步交联反应,之后用磁铁分离出其中的固体物。该制备方法利用金属-有机凝胶固定蛋白的性质,将抗体与四氧化三铁同时固定于金属-有机凝胶固体体系中,所用的反应条件温和,无需特殊操作或者复杂的预处理工序,因此,该制备方法为免疫磁珠的广泛应用拓展了有利条件。



1. 一种免疫磁珠的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤A:将一磷酸腺苷或其金属盐、水相缓冲液、四氧化三铁、石蜡和司盘80混合,搅拌形成乳化体系;其中,所述石蜡和所述司盘80的体积比为7:93~100;所述一磷酸腺苷或其金属盐与所述四氧化三铁的质量比为0.1~0.3:0.2;

步骤B:向所述乳化体系中加入戊二醛,恒温下发生第一步交联反应;然后再加入抗体和锌盐,发生第二步交联反应,之后用磁铁分离出其中的固体物。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述水相缓冲液的pH值为7~8;

优选地,所述水相缓冲液为4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述第一步交联反应的温度为:35~45℃;

优选地,所述第二步交联反应的温度为:20~30℃。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤B中,抗体和锌盐的加入方式为:先逐滴加入抗体,后逐滴加入锌盐;

优选地,所述形成乳化体系时的搅拌方式为机械搅拌,转速在300~1000r/min。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤B中,所述抗体为玉米赤霉烯酮抗体,优选玉米赤霉烯酮单抗。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述一磷酸腺苷或其金属盐与锌盐中锌离子的摩尔比为1:1;

优选地,所述玉米赤霉烯酮抗体与所述一磷酸腺苷或其金属盐的质量比为0.2~0.3:19。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤B中,所述步骤B中,戊二醛的加入方式为:加入体积浓度为20~30%的戊二醛溶液。

8. 根据权利要求1或5所述的制备方法,其特征在于,所述步骤B中,抗体和锌盐的加入方式为:先以0.9~1.1mg/min的速度滴加抗体,后以0.045~0.055mmol/min  $\text{Zn}^{2+}$ 的速度滴加锌盐。

9. 一种免疫磁珠,其特征在于,采用权利要求1-8任一项所述的制备方法制得。

10. 权利要求9所述的免疫磁珠的应用,其特征在于,所述免疫磁珠用于分离、纯化或检测抗原。

## 一种免疫磁珠及其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其是涉及一种免疫磁珠及其制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 免疫磁珠是超顺磁性物质与抗体的偶联物,可用于结合相应的抗原或抗体。由于免疫磁珠在外加磁场的吸引下可做定向移动,因此可用于目标物的分离和检测,达到纯化基因、蛋白质、细胞、微生物等的目的。由于免疫反应的快速和特异性,免疫磁珠比常规的检测或分离方法具有良好的灵敏度和特异性。

[0003] 传统的免疫磁珠的制备方法复杂,操作条件苛刻,需要在顺磁性物质表面修饰特殊的功能基团,以便结合抗体或抗原,并且修饰过程复杂,反应条件苛刻。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种免疫磁珠的制备方法,该制备方法利用金属-有机凝胶固定蛋白的性质,将抗体与四氧化三铁同时固定于金属-有机凝胶固体体系中,所用的反应条件温和,无需特殊操作或者复杂的预处理工序,因此,该制备方法为免疫磁珠的广泛应用拓展了有利条件。

[0006] 本发明的第二目的在上述免疫磁珠的应用,该免疫磁珠可应用到各种各样的抗体,因此相应可应用的抗原类型广泛,包括不同分子量的化合物或不同微生物。

[0007] 为了实现以上目的,本发明提供了以下技术方案:

[0008] 一种免疫磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 步骤A:将一磷酸腺苷或其金属盐、水相缓冲液、四氧化三铁、石蜡和司盘80混合,搅拌形成乳化体系;其中,所述石蜡和所述司盘80的体积比为7:93~100;所述一磷酸腺苷或其金属盐与所述四氧化三铁的质量比为0.1~0.3:0.2;

[0010] 步骤B:向所述乳化体系中加入戊二醛,恒温下发生第一步交联反应;然后再加入抗体和锌盐,发生第二步交联反应,之后用磁铁分离出其中的固体物。

[0011] 上述制备方法先用乳化剂将一磷酸腺苷或其金属盐与四氧化三铁连接,并且形成油包水的均匀稳定体系;之后以戊二醛为交联剂,将抗体与一磷酸腺苷/一磷酸腺苷盐交联,再将锌离子交联在凝胶的网络结构中,最终形成固体的高分子免疫磁珠。综上,该方法制备的免疫磁珠兼具金属-有机凝胶、四氧化三铁和抗体的优良特性,即兼具高比表面、多孔结构、超顺磁性、反应特异性和高选择性等特性,而且比传统免疫磁珠的抗体负载量高,因此,本发明免疫磁珠的性能远远优于传统免疫磁珠,可广泛应用于抗体作用对象的分离、纯化和检测。

[0012] 另外,如上文所述,本发明的制备方法的所有步骤均在常温常压(或接近常温)下完成,无需苛刻的操作条件,更利于保护抗体的活性,更容易推广。

[0013] 本发明所述的一磷酸腺苷的金属盐是任意的盐,例如钠盐、钾盐等。

[0014] 本发明中,所述石蜡和所述司盘80的体积比对乳化体系的形成至关重要,可以采用7:93~100范围内的任意值,例如7:93、7:94、7:95、7:96、7:97、7:98、7:99、7:100等。

[0015] 本发明中,所述一磷酸腺苷或其金属盐与所述四氧化三铁的配比对乳化体系的稳定性和免疫磁珠的磁性都有重要影响,可以采用0.1~0.3:0.2范围内的任意质量比,例如0.1:0.2、0.15:0.2、1:1、0.25:0.2、0.1:0.3等。

[0016] 本发明不限定抗体的类型,既可以是不同作用对象的抗体(抗毒素、抗菌抗体、抗病毒抗体和亲细胞抗体),也可以使不同化学结构的抗体(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD),而且这些抗体制备免疫磁珠的制备方法相同。

[0017] 另外,以上制备方法还可以进一步改进,以简化工艺、提高效率或提高负载量或改善免疫磁珠的物化性能等,具体如下。

[0018] 优选地,所述水相缓冲液的pH值为7~8。

[0019] 本发明的乳化反应适宜在中性环境中完成,缓冲液可选用无机或有机缓冲液。

[0020] 优选地,所述水相缓冲液优选为4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES buffer)。

[0021] 在此有机缓冲液下的乳化液更稳定。

[0022] 优选地,所述第一步交联反应的温度为:35~45℃。

[0023] 由于一磷酸腺苷与戊二醛的交联主要为酰胺反应,因此,以戊二醛为交联剂,35~45℃下的反应速率更高,例如35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃等。

[0024] 优选地,所述第二步交联反应的温度为:20~30℃。

[0025] 为了充分保留抗体的活性,第二步交联反应的温度为20~30℃,例如20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃等。

[0026] 优选地,所述步骤B中,抗体和锌盐的加入方式为:先逐滴加入抗体,后逐滴加入锌盐。

[0027] 抗体、锌盐与一磷酸腺苷的结合方式不同,而且两者的分子量不同,从空间位阻对反应的影响角度而言,向加入抗体后加入锌盐的方式,抗体的负载量以及锌的结合量更高,并且采用逐滴加入的方式更利于充分反应。

[0028] 优选地,所述步骤B中,所述抗体为玉米赤霉烯酮抗体,优选玉米赤霉烯酮单抗。

[0029] 优选地,所述形成乳化体系时的搅拌方式为机械搅拌,转速在300~1000r/min。此时的搅拌速率对金属有机框架材料内部结构的形成有重要影响,影响其结合位点的外露、孔径、比表面积等物化性质。

[0030] 优选地,所述一磷酸腺苷或其金属盐与锌盐中锌离子的摩尔比为1:1。

[0031] 优选地,所述玉米赤霉烯酮抗体与所述一磷酸腺苷或其金属盐的质量比为19:0.2~0.3。

[0032] 优选地,所述步骤B中,所述步骤B中,戊二醛的加入方式为:加入体积浓度为20~30%的戊二醛溶液。

[0033] 优选地,所述步骤B中,抗体和锌盐的加入方式为:先以0.9~1.1mg/min的速度滴加抗体,后以0.045~0.055mmol/min  $\text{Zn}^{2+}$ 的速度滴加锌盐。

[0034] 一种免疫磁珠,采用如上文所述的制备方法制得。

[0035] 经SEM表征和红外光谱表征,免疫磁珠是AMP、锌、抗体和四氧化三铁结合而成的高

分子化合物。

[0036] 如上文所述,由于免疫磁珠集合了AMP、锌、抗体和四氧化三铁,因此兼具比表面、多孔结构、超顺磁性、反应特异性和高选择性等特性,可广泛应用于抗体作用对象的分离、纯化和检测。

[0037] 综上,与现有技术相比,本发明达到了以下技术效果:

[0038] (1) 简化了顺磁性物质与抗体的偶联工艺;

[0039] (2) 将顺磁性物质、抗体与金属-有机凝胶结合为一种新型高分子材料,其兼具所有原料的优良特性,在分离、检测或纯化领域具有优越性;

[0040] (3) 优化了反应各步骤的条件,从而提高了抗体负载量以及稳定性(主要指耐水洗次数)。

## 附图说明

[0041] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0042] 图1为本发明实施例提供的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米磁核的SEM图片( $\times 20$ );

[0043] 图2为本发明实施例提供的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米磁核的SEM图片( $\times 40$ );

[0044] 图3为本发明实施例提供的免疫磁珠的SEM图片( $\times 20$ );

[0045] 图4为本发明实施例提供的免疫磁珠的SEM图片( $\times 40$ );

[0046] 图5为本发明实施例提供的免疫磁珠的红外光谱图。

## 具体实施方式

[0047] 下面将结合附图和具体实施方式对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,但是本领域技术人员将会理解,下列所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0048] 实施例1

[0049] 一种免疫磁珠

[0050] 第一步:制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米磁核

[0051] 称取20.0g七水合硫酸亚铁溶解于140.0mL去离子水中,水浴加热到90℃并在转速400r/min的机械搅拌条件下反应1h。同时另取1.6g硝酸钾和11.2g氢氧化钾溶解于60.0mL去离子水中,配制好的溶液用恒流泵逐滴(1mL/min)加入至亚铁离子溶液中。添加完毕继续在90℃下搅拌2h,得黑色浑浊溶液,用去离子水洗涤数次并烘干,黑色固体即为四氧化三铁,其SEM图如图1和2, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米磁核粒径在100~300nm之间,磁核成球不稳定,有些磁核呈不规则状。由于磁珠性质较为活泼和外加磁场分离过程中导致的部分磁珠磁化,使得磁珠易发生团聚。

[0052] 第二步:AMP&ZnCl<sub>2</sub>水凝胶包覆磁珠

[0053] 称取0.196g一磷酸腺苷二钠盐溶解于20mL HEPES buffer (10mM, pH 7.4) 中,再加入200mg四氧化三铁,充分搅拌。将150mL含7%司盘80的石蜡混合液在搅拌状态下逐滴加入其中,经500r/min搅拌形成乳化体系,持续搅拌30min水浴加热至40℃,然后加3mL戊二醛溶液(C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>,体积分数25%),恒温交联反应30min。降低温度,在常温条件下将2mL 1mg/mL ZEA单抗用恒流泵逐滴(1mL/min)加入反应体系中,搅拌均匀后再用恒流泵逐滴(1mL/min)加入10mL 50mM的ZnCl<sub>2</sub>溶液,常温交联反应2h。

[0054] 反应结束后,依次用石油醚、乙醇、去离子水洗涤数次,用磁铁分离出固体物即获得包覆了水凝胶并偶联了ZEA单抗的磁性微球,将其封存于HEPES buffer (10mM, pH 7.4) 中。

[0055] 第三步:产品表征

[0056] 用冷场发射高分辨扫描电子显微镜观察Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠(即最终的免疫磁珠)形态,如图3和图4所示;红外光谱仪测定Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠表面官能团性质:称取样品1~2mg,加入200mg溴化钾粉末研磨,压片法测定其红外光谱,如图5所示。

[0057] 对比Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米磁核的SEM图片,可以看出不规则状磁核的棱角被钝化,图3和4这些包覆后的磁珠都趋于球形,磁珠表面也由光滑变得粗糙。通过对比分析磁珠包覆前后的SEM图片,可以看出图3和4中磁珠表面有包覆物存在。

[0058] 从图5中可以看出,3440cm<sup>-1</sup>处为为-NH<sub>2</sub>的反对称伸缩振动峰,1648cm<sup>-1</sup>、1606cm<sup>-1</sup>附近分别为AMP碳氮杂化环上C=C、C=N伸缩振动吸收峰,1109cm<sup>-1</sup>处吸收带是C-O-C不对称伸缩振动,1295cm<sup>-1</sup>处为P=O的伸缩振动吸收峰,1017cm<sup>-1</sup>左右是P-O的不对称伸缩振动,582cm<sup>-1</sup>处为Fe-O吸收峰。结合SEM表征分析的结果和红外光谱结果证明,该方法成功将AMP&ZnCl<sub>2</sub>水凝胶包覆在Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁珠表面。

[0059] 第四步:测量抗体的负载量

[0060] 取1mL100mg/mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠于50mL离心管中,先用超纯水洗涤两遍,用磁铁收集磁珠除去水洗液。加入3mL 1.2μg/mL的ZEN毒素标准溶液,混合均匀,在摇床上振荡反应30min。反应结束后,用磁铁收集磁珠,取出上清液用微滤膜过滤后,测定其中的ZEA的量。用3mL超纯水洗涤两次磁珠,用磁铁收集磁珠,合并两次水洗液用微滤膜过滤洗涤液,测定水洗液中ZEA的量。用3mL甲醇(3mL/次)洗涤磁珠三次,每次加入甲醇后振摇10min,洗脱磁珠上吸附的ZEA毒素,用磁铁收集磁珠,取出甲醇洗脱液用微滤膜过滤后,三次洗脱液不合并,分别测定甲醇洗脱液中的ZEA的量。计算公式如式(1)和(2)。

[0061] ZEA负负量=ZEA加入量-上清液中ZEA的量-水洗液中ZEA的量(1)

[0062] 
$$\text{ZEA回收率}/100\% = \frac{\text{ZEA甲醇解析量}}{\text{ZEA负载量}} \times 100\% \quad (2)$$

[0063] 结果见表1,发现每100mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠的ZEA毒素负载量为3000ng左右,随着使用次数的增加,负载量逐渐下降。这是因为一方面洗脱剂甲醇会对抗体结构造成破坏,使得部分抗体活性降低甚至失活,部分抗原抗体结合能力减弱或消失;另一方面,由于部分ZEA毒素未能从抗体上洗脱掉,使得抗原抗体的部分结合位点被占据,导致毒素能够结合抗体的位点减少,负载量下降。

[0064] 通过对三次重复使用的效果分析,可以发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AMP}\&\text{ZnCl}_2 \cdot \text{ZEA}$ 单抗磁珠对ZEA毒素的有高效的吸附能力,毒素的解吸效果良好,可以实现较高回收率,且具有可多次重复性使用的优点。

[0065] 表1  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AMP}\&\text{ZnCl}_2 \cdot \text{ZEA}$ 单抗磁珠重复使用3次的吸附及回收率情况

[0066]

重复次数	平行个数 (n)	平均负载量 (ng/每 100mg 水凝胶免疫磁珠)	平均回收率 (%)
第 1 次	3	3100.5054	99.52
第 2 次	3	2646.26623	94.85
第 3 次	3	2368.8629	91.02

[0067] 注:ZEA毒素的检测方法为:

[0068] 本实验使用1200高效液相色谱-6410三重四级杆质谱联用仪,来测定样品中提取ZEA毒素含量。建立了ZEA液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。

[0069] 色谱条件:Agilent ZORBAX Bonus-RP色谱柱(50mm×2.1mm,3.5μm),柱温45℃,进样量50μL;流动相为10mM乙酸铵水溶液(A)和乙腈(B),梯度条件:0~0.1min,B为10%;0.1~2min,B由10%升到50%;2~10min,B由50%升到80%;10~15min,B为80%;15~16min,B由80%降至10%;16~20min,B保持10%。电离模式、监测离子对(m/z)和其他参数见表2。

[0070] 质谱条件:离子化模式采用电喷雾电离正离子模式( $\text{ESI}^+$ )和负离子模式( $\text{ESI}^-$ );质谱扫描方式选择多反应监测(MRM);正离子模式( $\text{ESI}^+$ )喷雾电压为4500V;负离子模式( $\text{ESI}^-$ )喷雾电压为2500V;离子源温度450℃;气帘气8L/min。

[0071] 表2 ZEA毒素的质谱参数

[0072]

毒素种类	毛细管电压 (kV)	电离模式 ( $\text{ESI}^+/\text{ESI}^-$ )	母离子/子离子	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)
ZEA	2.5	$\text{ESI}^-$	317.3/131.1 <sup>*</sup>	135	40
			317.3/175.2	135	34

[0073] 注:\*.定量离子。

[0074] 采用本实施例的免疫磁珠分离ZEA毒素,并与免疫亲和柱的分离方法作比较。

[0075] 实验方法:

[0076] 一、实际样品中ZEA毒素的提取

[0077] 称取玉米粉样品25.0g(精确至0.1g,本实验选取了市面上6种玉米粉,编号为a~f)于500mL具塞锥形瓶中,加入100mL70%甲醇溶液(v/v),浸泡15min,超声振荡40min,过滤得到样品提取液。

[0078] 二、免疫亲和柱分离ZEA毒素

[0079] 取16mL样品提取液,以2mL/min的速度过免疫亲和柱,再用16mL  $\text{H}_2\text{O}$ 以5mL/min的速度洗涤柱子;用1mL 100%甲醇溶液(v/v)以1d/s的速度洗脱柱子,将洗脱液收集于2mL的

样液瓶中,再用1mL H<sub>2</sub>O以5mL/min的速度洗涤免疫亲和柱,同样收集于上述样液瓶中。用Agilent 1200-ESI 6410液相色谱-质谱联用仪上机检测,进样量为50μL。

### [0080] 三、免疫磁珠分离ZEA毒素

[0081] 取1mL 100mg/mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠于50mL离心管中,先用超纯水洗涤两次,用磁铁收集磁珠除去水洗液。然后加入30mL样品提取液,振荡反应30min,用磁铁收集磁珠去除上清液,加入20mL超纯水以10mL/次洗涤磁珠两遍。最后加入30mL甲醇以10mL/次洗涤3次,收集三次的醇洗液,用Agilent 1200-ESI 6410液相色谱-质谱联用仪分别测定三次甲醇洗脱液中的ZEA毒素。

[0082] 本实验还测试了免疫磁珠的添加回收率,结果如表3所示。结果见表3,c样品玉米粉3个水平的添加回收率在84.61%~90.00%之间,相对标准偏差为4.86%~9.44%,符合痕量分析的要求,说明制备的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠能用于实际样品的纯化。

[0083] 表3 免疫磁珠纯化c样品中ZEA毒素的添加回收率

	添加水平 (μg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
[0084]	30	90.00	4.86
	60	85.94	6.49
	90	84.81	9.44

[0085] 注:添加水平为30、60、90μg/kg,每个水平进行6次重复实验。

[0086] 对6种玉米粉a~f中ZEA毒素进行提取后,然后采用上文所述的方法对6种样品提取液中ZEA毒素进行纯化,每组实验重复3次,进行检测。结果见表4,通过与免疫亲和柱对实际样品的纯化结果比较,免疫磁珠纯化结果略微偏大,但是整体上和免疫亲和柱的纯化效果相符。原因可能是使用的免疫亲和柱是可同时纯化多种毒素的,而制备的免疫磁珠是专一纯化ZEA毒素,所以检测结果更高效。

[0087] 按照食品安全国家标准GB 2761-2017规定,玉米粉中玉米赤霉烯酮ZEA的限量指标是60μg/kg,所以6种样品中b样品ZEA含量超标。

[0088] 表4免疫亲和柱和免疫磁珠两种方法对6种玉米粉纯化后ZEA毒素的检测结果

	免疫亲和柱 检测结果 (μg/kg)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @AMP&ZnCl <sub>2</sub> ·Z EA 单抗磁珠 检测结果 (μg/kg)
[0089]	a	1.8456 <sup>x</sup> ±0.09 <sup>y</sup>
	b	67.8800±3.56
	c	1.1516±0.05
	d	5.0800±0.27
	e	1.0596±0.07
	f	32.2716±2.85

[0090] 注:x为平均值;y为标准偏差。

[0091] 实施例2

[0092] 其与实施例1的区别在于AMP&ZnCl<sub>2</sub>水凝胶包覆磁珠的反应条件不同,具体如下。

[0093] 称取0.3g一磷酸腺苷二钠盐溶解于20mL HEPES buffer (10mM,pH7.4)中,再加入200mg四氧化三铁,充分搅拌。将150mL含6.5%司盘80的石蜡混合液在搅拌状态下逐滴加入其中,经500r/min搅拌形成乳化体系,持续搅拌30min水浴加热至40℃,然后加3mL戊二醛溶液(C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>,体积分数25%),恒温交联反应30min。降低温度,在常温条件下将2mL 1mg/mL ZEA单抗用恒流泵逐滴(1mL/min)加入反应体系中,搅拌均匀后再用恒流泵逐滴(1mL/min)加入10mL 50mM的ZnCl<sub>2</sub>溶液,常温交联反应2h。

[0094] 反应结束后,依次用石油醚、乙醇、去离子水洗涤数次,用磁铁分离出固体物即获得包覆了水凝胶并偶联了ZEA单抗的磁性微球,将其封存于HEPES buffer (10mM,pH 7.4)中。

[0095] 采用与实施例1相同的方法对免疫磁珠表征,结果与实施例1一致,并且每100mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠的ZEA毒素负载量约为3200ng(第一次检测)。

[0096] 实施例3

[0097] 其与实施例1的区别在于AMP&ZnCl<sub>2</sub>水凝胶包覆磁珠的反应条件不同,具体如下。

[0098] 称取0.3g一磷酸腺苷二钠盐溶解于20mL HEPES buffer (10mM,pH 7.4)中,再加入200mg四氧化三铁,充分搅拌。将150mL含6.5%司盘80的石蜡混合液在搅拌状态下逐滴加入其中,经500r/min搅拌形成乳化体系,持续搅拌30min水浴加热至45℃,然后加3mL戊二醛溶液(C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>,体积分数25%),恒温交联反应25min。降低温度,在常温条件下将2mL 1mg/mL ZEA单抗用恒流泵逐滴(1mL/min)加入反应体系中,搅拌均匀后再用恒流泵逐滴(1mL/min)加入10mL 50mM的ZnCl<sub>2</sub>溶液,常温交联反应2h。

[0099] 反应结束后,依次用石油醚、乙醇、去离子水洗涤数次,用磁铁分离出固体物即获得包覆了水凝胶并偶联了ZEA单抗的磁性微球,将其封存于HEPES buffer (10mM,pH 7.4)中。

[0100] 采用与实施例1相同的方法对免疫磁珠表征,结果与实施例1一致,并且每100mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub>·ZEA单抗磁珠的ZEA毒素负载量约为3000ng(第一次检测)。

[0101] 实施例4

[0102] 其与实施例1的区别在于AMP&ZnCl<sub>2</sub>水凝胶包覆磁珠的反应条件不同,具体如下。

[0103] 称取0.195g一磷酸腺苷二钠盐溶解于20mL HEPES buffer (10mM,pH 7.4)中,再加入200mg四氧化三铁,充分搅拌。将150mL含6.5%司盘80的石蜡混合液在搅拌状态下逐滴加入其中,经500r/min搅拌形成乳化体系,持续搅拌30min水浴加热至35℃,然后加3mL戊二醛溶液(C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>,体积分数30%),恒温交联反应40min。降低温度,在常温条件下将3mL 1mg/mL ZEA单抗用恒流泵逐滴(0.9mL/min)加入反应体系中,搅拌均匀后再用恒流泵逐滴(0.55mL/min)加入10mL 50mM的ZnCl<sub>2</sub>溶液,常温交联反应2h。

[0104] 反应结束后,依次用石油醚、乙醇、去离子水洗涤数次,用磁铁分离出固体物即获得包覆了水凝胶并偶联了ZEA单抗的磁性微球,将其封存于HEPES buffer (10mM,pH 7.4)中。

[0105] 采用与实施例1相同的方法对免疫磁珠表征,结果与实施例1一致,并且每100mg

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@AMP&ZnCl<sub>2</sub> • ZEA单抗磁珠的ZEA毒素负载量约为3200ng (第一次检测)。

[0106] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

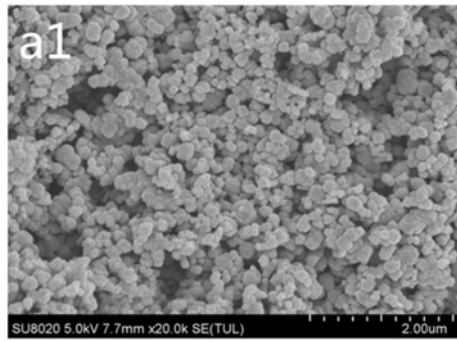


图1

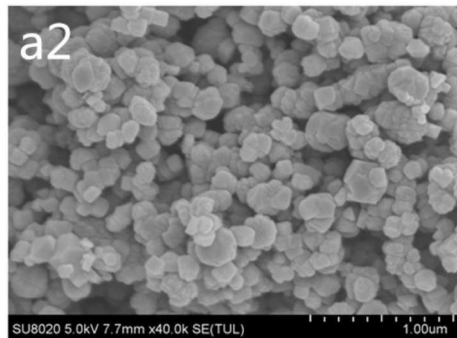


图2

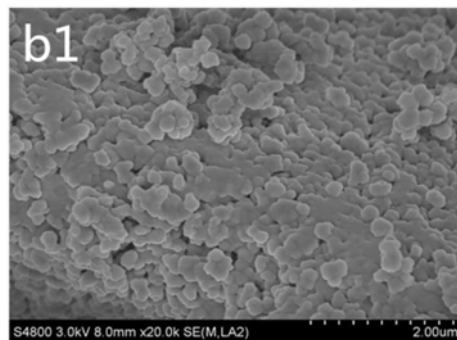


图3

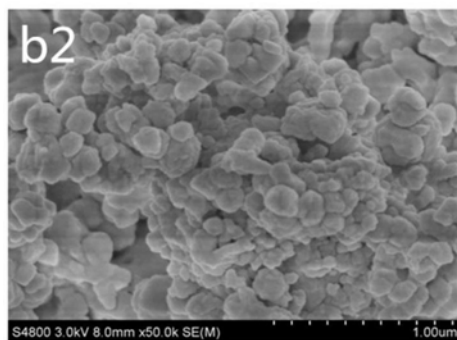


图4

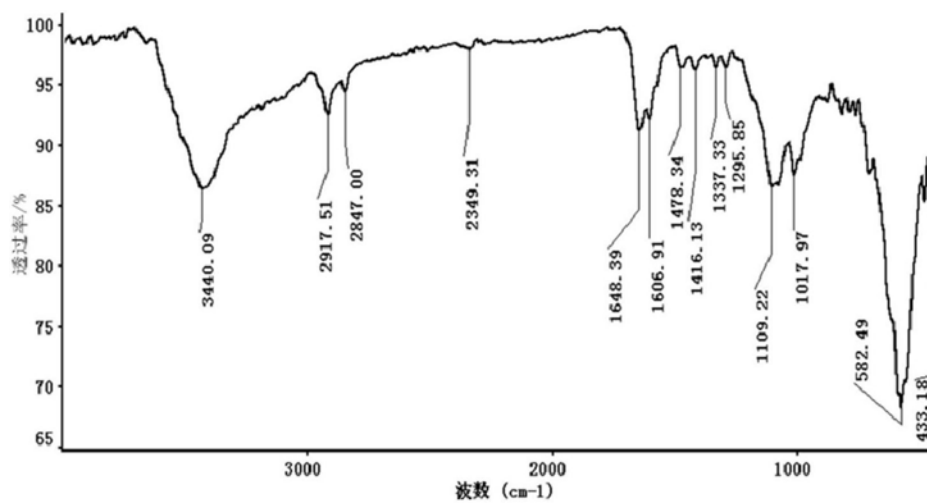


图5

专利名称(译)	一种免疫磁珠及其制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108508195A</a>	公开(公告)日	2018-09-07
申请号	CN201810300413.X	申请日	2018-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	北京农学院		
申请(专利权)人(译)	北京农学院		
当前申请(专利权)人(译)	北京农学院		
[标]发明人	丁轲 孙毅蒙 韩涛 陈湘宁		
发明人	丁轲 孙毅蒙 韩涛 陈湘宁		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326		
代理人(译)	王闯		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种免疫磁珠及其制备方法及应用。免疫磁珠的制备方法：将一磷酸腺苷或其金属盐、水相缓冲液、四氧化三铁、石蜡和司盘80混合，搅拌形成乳化体系；石蜡和司盘80的体积比为7:93~100；一磷酸腺苷或其金属盐与四氧化三铁的质量比为0.1~0.3:0.2；向乳化体系中加入戊二醛，恒温下发生第一步交联反应；然后再加入抗体和锌盐，发生第二步交联反应，之后用磁铁分离出其中的固体物。该制备方法利用金属-有机凝胶固定蛋白的性质，将抗体与四氧化三铁同时固定于金属-有机凝胶固体体系中，所用的反应条件温和，无需特殊操作或者复杂的预处理工序，因此，该制备方法为免疫磁珠的广泛应用拓展了有利条件。

