



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114395135 B

(45) 授权公告日 2023. 02. 28

(21) 申请号 202111599520.5

B01J 20/30 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.24

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 112108128 A, 2020.12.22

申请公布号 CN 114395135 A

CN 104316679 A, 2015.01.28

CN 103446964 A, 2013.12.18

(43) 申请公布日 2022.04.26

CN 113061601 A, 2021.07.02

JP 2007254650 A, 2007.10.04

(73) 专利权人 东南大学

审查员 周伟

地址 211189 江苏省南京市江宁区东南大学路2号

(72) 发明人 王志飞 周蒙

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

专利代理师 李倩

(51) Int. Cl.

C08G 83/00 (2006.01)

B01J 20/28 (2006.01)

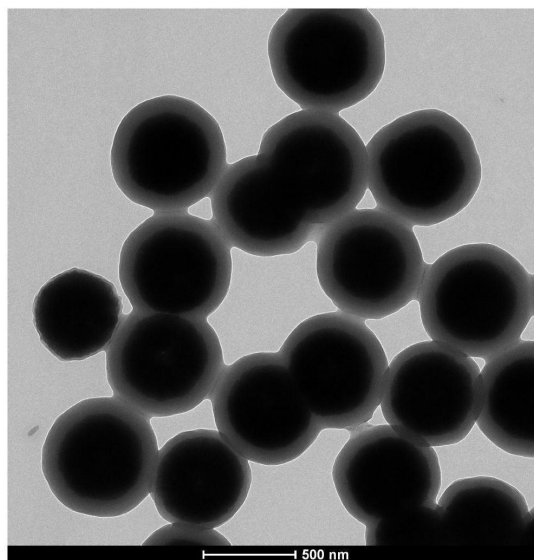
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

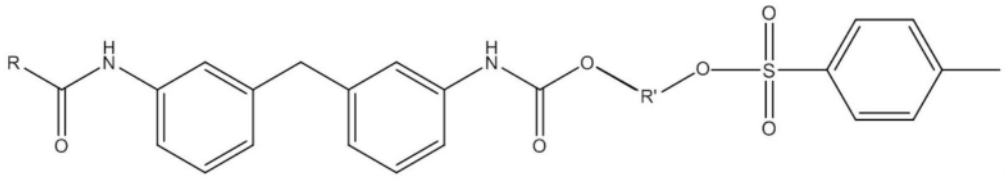
一种具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球及其制备方法,所述磁性微球以二苯甲烷二异腈酸酯作为桥联中间体在羧基化磁性纳米颗粒表面修饰超支化聚缩水甘油醚,接枝超支化聚缩水甘油醚后再与对甲基苯磺酰氯反应生成具有磺酸酯活性基团的磁性微球。本发明的磁性微球既能抗蛋白质非特异性吸附又能偶联其他生物分子,从而能在复杂环境中特异性吸附目标蛋白,大大提高检测灵敏度。



1. 一种具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球,其特征在于,所述磁性微球的化学结构式为:



其中,R为磁性纳米颗粒,R'为超支化聚缩水甘油醚。

2. 权利要求1所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于,所述制备方法为:先以二苯甲烷二异氰酸酯作为桥联中间体在羧基化磁性纳米颗粒表面修饰超支化聚缩水甘油醚,接枝超支化聚缩水甘油醚后再与对甲基苯磺酰氯反应生成具有磺酸酯活性基团的磁性微球。

3. 根据权利要求2所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:羧基化磁性纳米颗粒为羧基化四氧化三铁纳米颗粒。

4. 根据权利要求2所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:二苯甲烷二异氰酸酯作为桥联中间体连接羧基化四氧化三铁和超支化聚缩水甘油醚,二苯甲烷二异氰酸酯与羧基化四氧化三铁的质量比为2.5~4:1。

5. 根据权利要求4所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:超支化聚缩水甘油醚和羧基化四氧化三铁的质量比为2~3:1。

6. 根据权利要求4所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:羧基化四氧化三铁与二苯甲烷二异氰酸酯反应过程中,反应温度为80~90℃,反应时间为12~24h。

7. 根据权利要求4所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:与超支化聚缩水甘油醚反应过程中,反应温度为80~90℃,反应时间为12~24h。

8. 根据权利要求2所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:羧基化四氧化三铁与对甲基苯磺酰氯的质量比为1~2:1。

9. 根据权利要求8所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:与对甲基苯磺酰氯反应过程中,还加入有氢氧化钠溶液,氢氧化钠溶液的浓度为0.25~0.3M。

10. 根据权利要求8所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,其特征在于:与对甲基苯磺酰氯反应过程中,反应温度为0~1℃,反应时间为12~24h。

## 一种具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球,还涉及上述磁性微球的制备方法。

### 背景技术

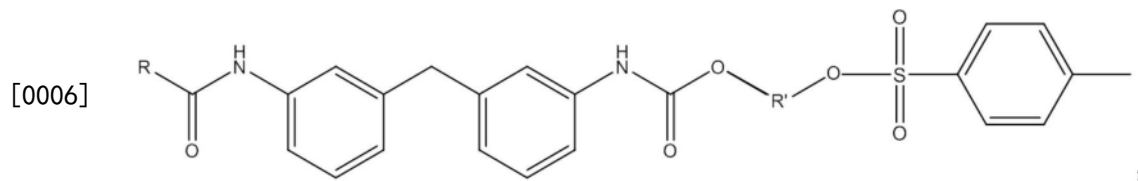
[0002] 磁性纳米粒子由于具有超顺磁性、巨大的比表面积、大小可控、分散性好、稳定性高的优点,在核磁共振、蛋白纯化、药物传递、细菌检测、催化等生物学领域得到迅速发展。磁性纳米粒子要实现在生物学方面的应用,必须具备足够的稳定性和良好的生物相容性。然而传统的磁性纳米微球在复杂的生物体环境中易于和大量蛋白质发生非特异性吸附使检测灵敏度降低,同时也会使磁性纳米球聚集或沉淀,因而磁性微球的功能化修饰,改善其水分散性,提高稳定性和生物相容性,提高抗蛋白质非特异性吸附能力,增加反应活性位点,已变得日益迫切。

[0003] 抗蛋白非特异性吸附材料主要分为两大类,分别是亲水非两性离子聚合物和两性离子聚合物。非两性离子聚合物的抗蛋白质非特异性吸附材料包括聚乙二醇及其衍生物、多糖和聚酰胺等,它们都是良好的亲水性物质,电中性和含有氢的受体。两性离子材料主要是聚甜菜碱类和聚两性电解质类。从1970年开始,就陆续有研究在纳米材料表面进行聚乙二醇化修饰,增加纳米颗粒的亲水性和胶体稳定性,应用于影像诊断和疾病治疗等方面。

### 发明内容

[0004] 发明目的:本发明目的之一是提供一种既能够抗蛋白质非特异性吸附又能利用表面活性位点与抗体发生化学偶联的磁性微球;本发明另一目的是提供上述磁性微球的制备方法。

[0005] 技术方案:本发明所述的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球,所述磁性微球的化学结构式为:



[0007] 其中,R为磁性纳米颗粒,R'为超支化聚缩水甘油醚。

[0008] 超支化聚缩水甘油醚具有高度支化结构的亲水高分子材料,支化结构可以有效阻隔磁性纳米粒子表面与环境中的蛋白质接触,通过将材料表面与非特异性吸附蛋白进行有效隔离而减少吸附,另外超支化聚缩水甘油醚分子末端带有大量羟基官能团,分子内还含有大量醚键,均可和水分子形成氢键,通过与水分子通过氢键作用结合成水化层而减少吸附,同时还在水中有很高的溶解度。

[0009] 上述具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的制备方法,所述制备方法为:先以

二苯甲烷二异腈酸酯作为桥联中间体在羧基化磁性纳米颗粒表面修饰超支化聚缩水甘油醚，接枝超支化聚缩水甘油醚后再与对甲基苯磺酰氯反应生成具有磺酸酯活性基团的磁性微球。

[0010] 利用回流沉淀法制得的羧基化磁性微球，先在其表面接枝超支化聚缩水甘油醚，再与对甲基苯磺酰氯反应，该磁性微球表面既具有有效抗蛋白质非特异性吸附成分的超支化聚缩水甘油醚，同时又具有活性位点可偶联其他生物分子。

[0011] 其中，羧基化磁性纳米颗粒为羧基化四氧化三铁纳米颗粒。

[0012] 其中，二苯甲烷二异腈酸酯作为桥联中间体连接羧基化四氧化三铁和超支化聚缩水甘油醚，二苯甲烷二异腈酸酯与羧基化四氧化三铁的质量比为2.5~4:1。

[0013] 其中，超支化聚缩水甘油醚和羧基化四氧化三铁的质量比为2~3:1。

[0014] 其中，羧基化四氧化三铁与对甲基苯磺酰氯的质量比为1~2:1。

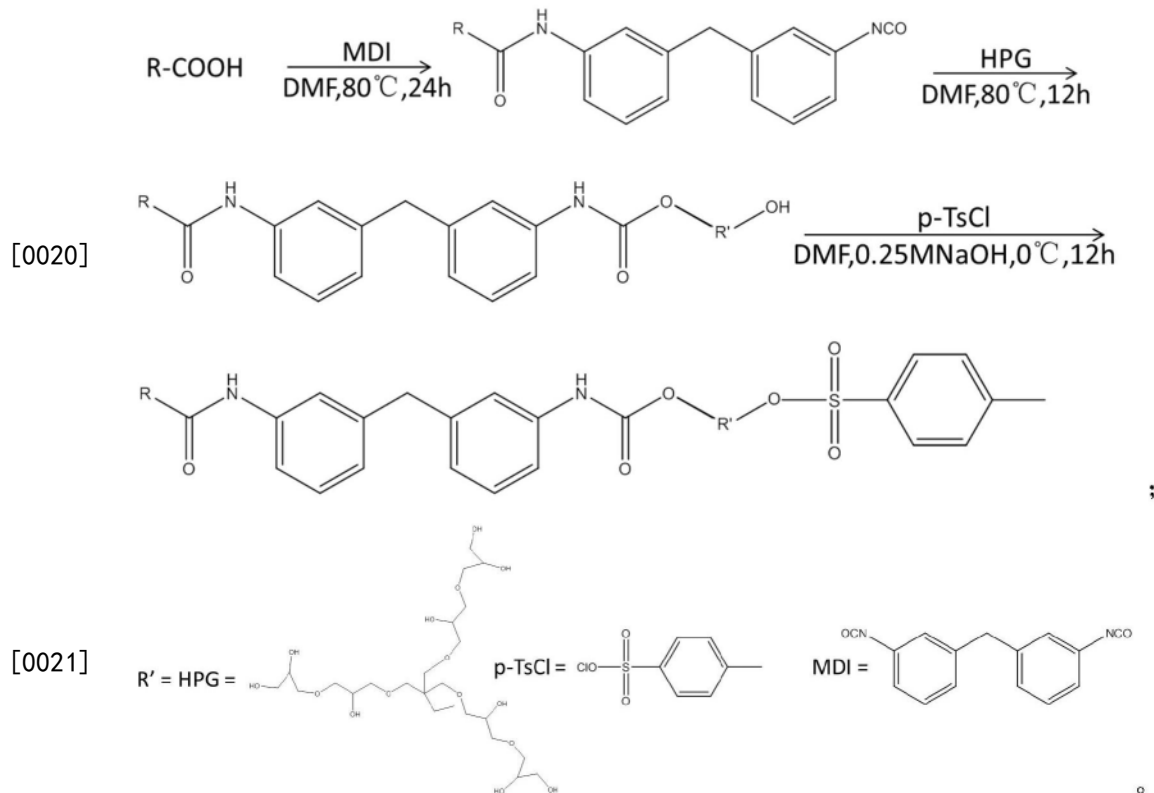
[0015] 其中，羧基化四氧化三铁与二苯甲烷二异腈酸酯反应过程中，反应温度为80~90℃，反应时间为12~24h。

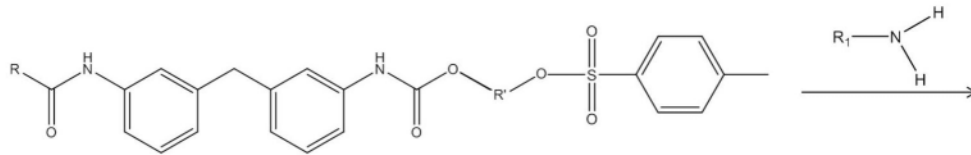
[0016] 其中，与超支化聚缩水甘油醚反应过程中，反应温度为80~90℃，反应时间为12~24h。

[0017] 其中，与对甲基苯磺酰氯反应过程中，还加入有氢氧化钠溶液，氢氧化钠作为催化剂，保持反应在碱性环境下发生，氢氧化钠溶液的浓度为0.25~0.3M。

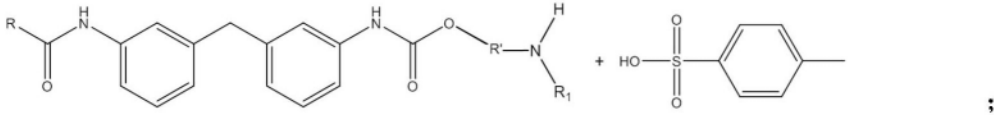
[0018] 其中，与对甲基苯磺酰氯反应过程中，反应温度为0~1℃，反应时间为12~24h。

[0019] 本发明磁性微球的化学反应方程式为：





[0023]

[0024]  $R_1$ 为抗体分子。

[0025] 在37℃下,将本发明得到的磁性微球与特定的抗体接枝,抗体分子的氨基取代磁性微球的活性基团磺酸酯,由于磺酸酯不稳定,氨基与超支化聚缩水甘油醚生成更稳定的基团,磁性微球接枝特定的抗体分子后,再对该抗体对应的抗原进行检测,从而实现对抗原含量的检测。

[0026] 有益效果:本发明在羧基化磁性微球上先接枝超支化聚缩水甘油醚,从而有效降低磁性微球对蛋白质的非特异性吸附,再用对甲基苯磺酰氯和超支化聚缩水甘油醚上的羟基反应,使磁性微球表面含有活性位点,得到既能抗蛋白质非特异性吸附又能偶联其他生物分子的磁性微球,最终产物在复杂环境中能够特异性吸附目标蛋白,从而大大提高了检测灵敏度,在生物方面有极大的应用前景。

## 附图说明

[0027] 图1为通过回流沉淀法制备的羧基化磁性微球的透射电镜图;

[0028] 图2为实施例1制得的具有抗蛋白质非特异性吸附的磁性微球的透射电镜图;

[0029] 图3为采用考马斯亮蓝 (Bradford) 法测定磁性微球牛血清蛋白浓度的标准曲线;

[0030] 图4为羧基化磁性微球接枝超支化聚缩水甘油醚前后对牛血清蛋白的非特异性吸附实验,取上清液做紫外对比图;

[0031] 图5为根据紫外数据计算求得接枝前后具体的非特异性吸附数值。

## 具体实施方式

[0032] 实施例1

[0033] 本发明抗蛋白质非特异性吸附磁性微球的制备方法,包括如下步骤:

[0034] (1) 称取0.1g羧基化磁性微球 $Fe_3O_4@MAA$ 分散在20mLDMF溶剂(N,N-二甲基甲酰胺溶液)中,超声10min,往其中加入0.25gMDI(二苯甲烷二异腈酸酯),继续超声10min,形成均匀的溶液,在80℃下反应12h,反应完成后进行磁分离;

[0035] (2) 步骤(1)的产物磁分离后重新分散到20mLDMF溶剂中,加入0.3PGH(超支化聚缩水甘油醚)在80℃下反应12h,反应完成后再次磁分离;

[0036] (3) 步骤(2)的产物磁分离后再次分散到20mLDMF溶剂中,加入0.1gTosyl(对甲基苯磺酰氯)和20mL浓度为0.25M的NaOH水溶液,在0℃下反应12h,将反应后的产物 $Fe_3O_4@MAA-HPG-Tosyl$ 用乙醇洗涤两次,蒸馏水洗涤三次,分散至蒸馏水中,备用。

[0037] 实施例2

[0038] 本发明抗蛋白质非特异性吸附磁性微球的制备方法,包括如下步骤:

[0039] (1) 称取0.1g羧基化磁性微球 $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAA$ 分散在30mLDMF溶剂中,超声10min,往其中加入0.3gMDI,继续超声10min,形成均匀的溶液,在80℃下反应24h,反应完成后进行磁分离;

[0040] (2) 步骤(1)的产物磁分离后重新分散到40mLDMF溶剂中,加入0.3PGH在80℃下反应24h,反应完成后再次磁分离;

[0041] (3) 步骤(2)的产物磁分离后再次分散到40mLDMF溶剂中,加入0.1gTosyl和40mL浓度为0.3M的NaOH水溶液,在0℃下反应24h,将反应后的产物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAA-HPG-Tosyl$ 用乙醇洗涤两次,蒸馏水洗涤三次,分散至蒸馏水中,备用。

[0042] 实施例3

[0043] 本发明抗蛋白质非特异性吸附磁性微球的制备方法,包括如下步骤:

[0044] (1) 称取0.1g羧基化磁性微球 $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAA$ 分散在40mLDMF溶剂中,超声10min,往其中加入0.4gMDI,继续超声10min,形成均匀的溶液,升温至90℃下反应24h,反应完成后进行磁分离;

[0045] (2) 步骤(1)的产物磁分离后重新分散到40mLDMF溶剂中,加入0.3PGH在80℃下反应24h,反应完成后再次磁分离;

[0046] (3) 步骤(2)的产物磁分离后再次分散到40mLDMF溶剂中,加入0.1gTosyl和40mL浓度为0.3M的NaOH水溶液,在0℃下反应24h,将反应后的产物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@MAA-HPG-Tosyl$ 用乙醇洗涤两次,蒸馏水洗涤三次,分散至蒸馏水中,备用。

[0047] 对磁性微球进行抗蛋白质非特异性吸附测试:采用Bradford法(考马斯亮蓝法)测定蛋白质浓度,得到如图3的标准曲线,并通过计算结果发现改性后的磁性微球非特异性吸附降低到原来的46.85%,说明制得的磁性微球具有抗蛋白质非特异性吸附性能。标准曲线是不同浓度的牛血清蛋白紫外吸收峰强度呈线性增加,用牛血清蛋白和磁珠孵育,磁分离后测上清液的紫外吸收强度,对应标准曲线,可得到此时上清液牛血清蛋白浓度,从而计算出磁珠的非特异性吸附量。改性后的磁性微球对蛋白的非特异性吸附较改性前相比,大大降低,因此在特异性结合抗原的应用前景上可以降低背景值,从而提高检测灵敏度。

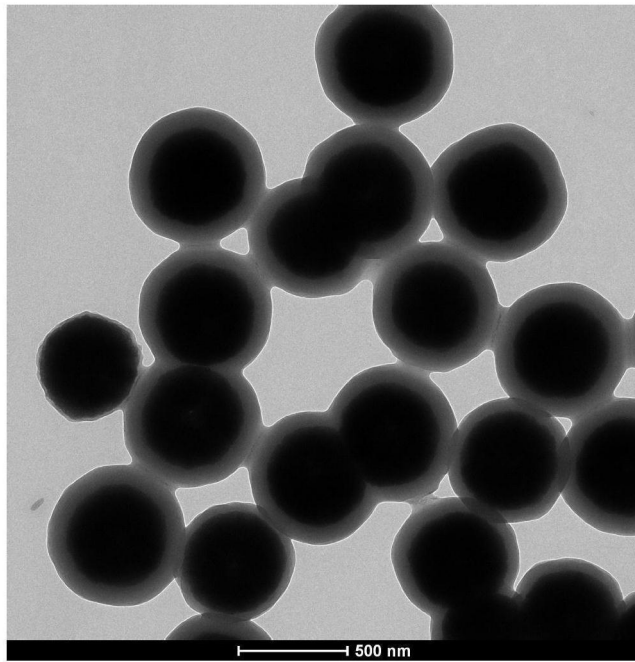


图1

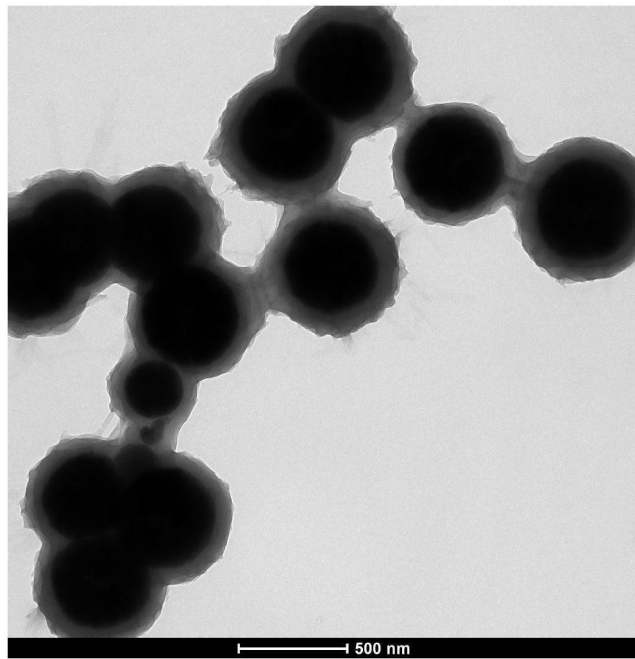


图2

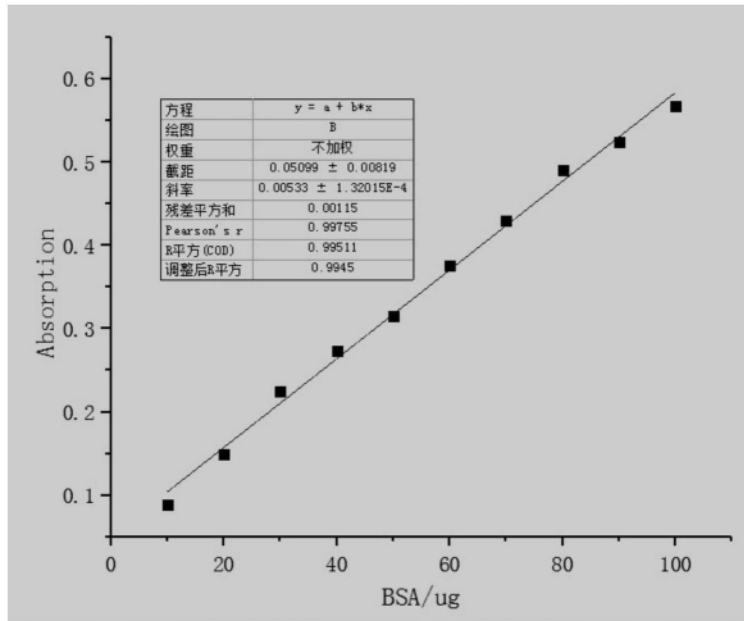


图3

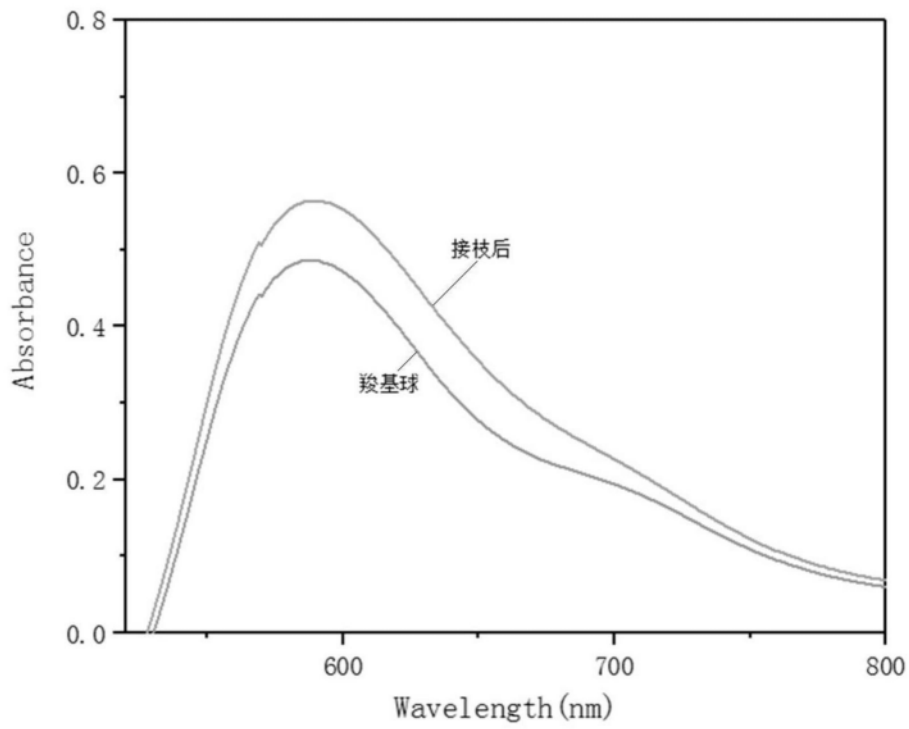


图4



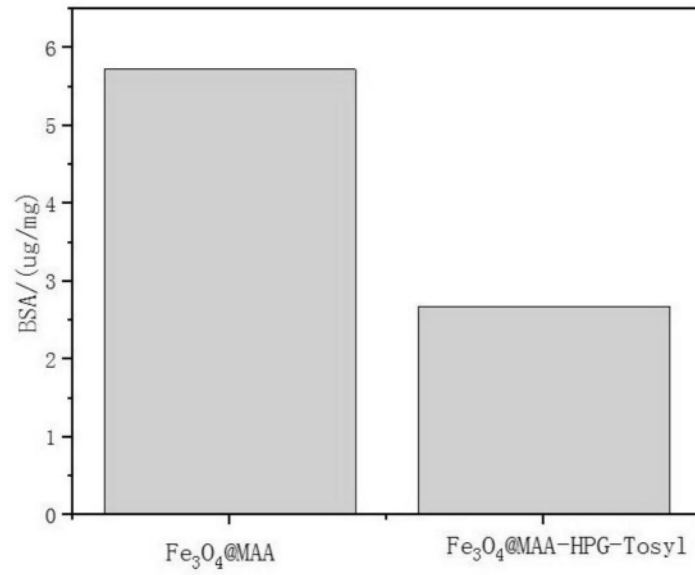


图5