



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103903827 B

(45)授权公告日 2018.01.23

(21)申请号 201410105086.4

H01F 1/42(2006.01)

(22)申请日 2014.03.20

B01J 13/02(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12Q 1/00(2006.01)

申请公布号 CN 103903827 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2014.07.02

CN 101923932 A,2010.12.22,

(73)专利权人 哈尔滨益材新材料有限公司

CN 103212377 A,2013.07.24,

地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区西

CN 103357359 A,2013.10.23,

大直街92号哈尔滨工业大学格物楼
900室

审查员 钟健

(72)发明人 赵九蓬 赵长杰

(74)专利代理机构 北京瑞思知识产权代理事务

所(普通合伙) 11341

代理人 李涛 袁红红

(51)Int.Cl.

H01F 1/11(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种磁性二氧化硅复合微球的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种磁性二氧化硅复合微球及其制备方法和应用。本发明利用高温热解方法制备超顺磁性四氧化三铁纳米粒子(4~30nm),在磁性纳米粒子外表面,利用反相微乳液法包覆二氧化硅外壳(壳厚5~20nm),对二氧化硅表面进行氨基化修饰,用戊二醛作为交联臂,再接入配基蛋白,利用配基蛋白与目标蛋白的特异性结合,进行蛋白分离。本发明所制备的磁性微球粒径小,单分散性好,带有氨基的复合微球比表面积大,利用亲核加成反应,接入交联臂戊二醛后,可以接入多种配基蛋白,从而可以分离多种目标蛋白,十分适合生物样品中蛋白的快速分离及应用,在生物医学等领域具有广阔的应用前景和巨大的应用价值。

1. 一种磁性二氧化硅复合微球,包括超顺磁性四氧化三铁纳米粒子,其特征在于:超顺磁性四氧化三铁纳米粒子直径为4-30nm,超顺磁性四氧化三铁纳米粒子外表面包覆有壳厚5-20nm的二氧化硅外壳,所述二氧化硅外壳表面进行氨基化修饰,用戊二醛作为交联臂,再接入配基蛋白;

所述磁性二氧化硅复合微球的制备方法包括如下步骤:

- (1) 四氧化三铁前驱体的制备;
- (2) 利用反相微乳液法制备二氧化硅包覆的四氧化三铁磁性微球;
- (3) 磁性微球表面降低非特异性吸附的处理;
- (4) 接入配基蛋白;

所述步骤(1)具体分为两步:

第一步,将氯化铁和油酸钠以摩尔比为1:1~1:5溶于水、乙醇和正己烷混合溶液中,其中水、乙醇和正己烷体积比为3~4:4:7,在常温氮气环境下磁力搅拌,并加热至50~80℃,冷凝回流3~6h;待溶液冷却至室温,利用分液漏斗分离上层有机相,并用去离子水洗涤干燥,得到棕褐色蜡状固体,即得到油酸铁前驱体;

第二步,将第一步制备的油酸铁前驱体溶于十八烯中,加入油酸,其中油酸与十八烯的摩尔比为1:1~5:1,以加热速率2~10℃/min加热至300~380℃,冷凝回流一定时间30~60min至溶液中发生强烈反应,待溶液变浑浊,呈黑褐色,关闭反应器,直至溶液冷却至室温,加入过量乙醇沉淀Fe₃O₄纳米粒子,离心分离;

沉淀一再分散操作:将上清液倒出,将纳米粒子溶于正己烷中,再加入过量乙醇沉淀出Fe₃O₄纳米粒子,离心分离;

重复上述沉淀一再分散操作,洗涤4~5次,得到疏水Fe₃O₄纳米粒子;

所述步骤(2)具体分为三步:

第一步,将6.8~20g的表面活性剂分散在200~600ml的环己烷中,超声;

第二步,将40~120mg疏水Fe₃O₄纳米粒子加入到上述溶液中,持续搅拌,加入0.5~1.5ml浓度为25%-28%氨水到混合溶液中;

第三步,用衡压滴液方式将0.5~1.5ml TEOS分次滴入上述混合溶液中,搅拌反应8~24h,离心洗涤后获得Fe₃O₄@SiO₂复合微球,将Fe₃O₄@SiO₂复合微球再分散于乙醇中。

2. 权利要求1所述的磁性二氧化硅复合微球,其特征在于:所述步骤(3)具体分为两步:

第一步,将0.01g的Fe₃O₄@SiO₂复合微球溶于50ml的乙醇溶液中,加入25ml体积分数为5%或1mol/L的APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷),机械搅拌反应12~100h,反应后加热至25~100℃,冷凝回流一定时间0.5~10h,用乙醇清洗,真空干燥;

第二步,将上述微球溶于乙醇中,再将此溶液溶于PBS缓冲溶液中,其中乙醇与PBS缓冲溶液体积比1:1~10:1,加入体积分数为25%的戊二醛,乙醇与PBS体积比范围为1:1~100:1,常温机械搅拌一段时间4~20h,洗涤后将其分散于0~2000ml PBS缓冲溶液中,最后接入交联臂戊二醛。

3. 权利要求1所述的磁性二氧化硅复合微球,其特征在于:所述步骤(4)具体为:一定量的经步骤(3)处理后的Fe₃O₄@SiO₂复合微球溶于一定量的PBS缓冲溶液中,孵化浓度为0~1mg/mL的牛血清蛋白溶液,也就是BSA溶液,时间为0~10h;

所述复合微球经步骤(3)处理后带有醛基。

4. 权利要求1所述的磁性二氧化硅复合微球,其特征在于:所述的表面活性剂为长烷烃链类溶剂。

5. 权利要求1所述的磁性二氧化硅复合微球与目标蛋白特异性结合,进行蛋白分离的应用。

一种磁性二氧化硅复合微球的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学试验领域,涉及一种磁性二氧化硅复合微球及其制备方法和应用

背景技术

[0002] 20世纪90年代以来,随着纳米科技的发展,磁性材料已步入磁性纳米材料的新纪元。磁性纳米材料与体相磁性材料相比磁学性质发生了很大变化,具有非常广阔的应用前景,已经成为国际上的研究热点。磁性粒子在蛋白分离、药物靶向等方面的应用,也是当前生物领域中的热门研究课题之一。在众多的磁性纳米材料中,超顺磁性Fe₃O₄纳米粒子在生物体中易代谢分解,因此Fe₃O₄纳米粒子在生物医药方面具有潜在应用。一种合成单分散Fe₃O₄纳米粒子的常用方法是含铁的配体化合物(如乙酰丙酮化合物、乙酸盐、油酸盐等)的高温热分解,此反应是在非极性溶剂中发生的,获得颗粒接近单分散,但是疏水性的且不适合生物应用。为解决这个问题需要将疏水的Fe₃O₄纳米粒子进行表面修饰,使其变成亲水性的。SiO₂包覆方法是一种很好的改性方法,因为SiO₂具有很好的生物相容性和稳定性,无毒且容易进一步和不同官能团结合。对于二氧化硅表面的硅羟基进行氨基化修饰,再接入交联臂戊二醛。此磁性二氧化硅复合微球的交联臂含有醛基,通过亲核加成反应与配基蛋白结合,戊二醛与蛋白反应具有活性高、反应快、结合量高、交联性好且交联产物性质稳定,并可保持蛋白质的精细结构,对酶的活性影响小,固定的蛋白质染色性能好等特点。再通过配基蛋白与目标蛋白之间的特异性结合,进行目标蛋白的分离。相较于其他分离手段,磁分离纯化蛋白质技术具有如下优势:操作缓和,能确保蛋白质结果的完整性,可以从蛋白质含量较低的样品中迅速富集浓缩,获得较高浓度的提纯样品,纯化步骤简单,甚至可以集细胞裂解与蛋白质分离于一步完成。磁性二氧化硅复合微球具有抗酸碱腐蚀、抗压、无毒、稳定性好,可重复利用等优点。

[0003] 对现有技术的文献进行检索发现,研究磁性分离蛋白的文献专利很多。中国专利200410057258.1申请了一种生物多糖高分子磁性微球及其制备方法,中国专利200510116850.9申请了一种复合生物多糖磁性微球制备方法,上述方法制备的微球抗压和抗腐蚀性能都较差;中国专利200610147250.3申请了表面固定有蛋白酶的带氨基的纳米磁性微球及其制备方法和应用,中国专利200710047399.9申请了带有表面官能团的磁性微球的制备方法,上述方法直接在磁性微球表面氨基化后应用,磁芯四氧化三铁极易被腐蚀。本发明克服了这些缺点,而且粒径小,相同质量微球比表面积大大增加,增加分离效率,而且磁芯不易被腐蚀,可回收利用,利于工业化。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,制备出磁性微球粒径小,单分散性好,带有氨基的复合微球比表面积大的磁性二氧化硅复合微球。利用亲核加成反应,接入交联臂戊二醛后,可以接入多种配基蛋白,从而可以分离多种目标蛋白。

[0005] 本发明的技术方案如下：

[0006] 一种磁性二氧化硅复合微球，包括超顺磁性四氧化三铁纳米粒子，其特征在于：超顺磁性四氧化三铁纳米粒子直径为4-30nm，超顺磁性四氧化三铁纳米粒子外表面包覆有壳厚5-20nm的二氧化硅外壳，所述二氧化硅外壳表面进行氨基化修饰，用戊二醛作为交联臂，再接入配基蛋白。

[0007] 一种磁性二氧化硅复合微球的制备方法，该方法包含下面的步骤：

[0008] (1) 四氧化三铁前驱体的制备；

[0009] (2) 利用反相微乳液法制备二氧化硅包覆的四氧化三铁磁性微球；

[0010] (3) 磁性微球表面降低非特异性吸附的处理；

[0011] (4) 接入配基蛋白。

[0012] 所述步骤(1)具体分为两步：

[0013] 第一步，将氯化铁和油酸钠以摩尔比为1:1~1:5溶于水、乙醇和正己烷混合溶液中，其中水、乙醇和正己烷体积比为3~4:4:7，在常温氮气环境下磁力搅拌，并加热至50~80℃，冷凝回流3~6h；待溶液冷却至室温，利用分液漏斗分离上层有机相，并用去离子水洗涤干燥，得到棕褐色蜡状固体，即得到油酸铁前驱体；

[0014] 第二步，将第一步制备的油酸铁前驱体溶于十八烯中，加入油酸，其中油酸与十八烯的摩尔比为1:1~5:1，以加热速率2~10℃/min加热至300~380℃，冷凝回流一定时间30~60min至溶液中发生强烈反应，待溶液变浑浊，呈黑褐色，关闭反应器，直至溶液冷却至室温，加入过量乙醇沉淀Fe₃O₄纳米粒子，离心分离；

[0015] 沉淀一再分散操作：将上清液倒出，将纳米粒子溶于正己烷中，再加入过量乙醇沉淀出Fe₃O₄纳米粒子，离心分离；

[0016] 重复上述沉淀一再分散操作，洗涤4~5次，得到疏水Fe₃O₄纳米粒子。

[0017] 所述步骤(2)具体分为三步：第一步，将6.8~20g的表面活性剂分散在200~600ml的环己烷中，超声；

[0018] 第二步，将40~120mg疏水Fe₃O₄纳米粒子加入到上述溶液中，持续搅拌，加入0.5~1.5ml浓度为25%-28%氨水到混合溶液中；

[0019] 第三步，用衡压滴液方式将0.5~1.5ml TEOS分次滴入上述混合溶液中，搅拌反应8~24h，离心洗涤后获得Fe₃O₄@SiO₂复合微球，将Fe₃O₄@SiO₂复合微球再分散于乙醇中。

[0020] 所述步骤(3)具体分为两步：

[0021] 第一步，将0.01g的Fe₃O₄@SiO₂复合微球溶于50ml的乙醇溶液中，加入25ml体积分数为5%或1mol/L的APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷)，机械搅拌反应12~100h，反应后加热至25~100℃，冷凝回流一定时间0.5~10h，用乙醇清洗，真空干燥。

[0022] 第二步，将上述微球溶于乙醇中，再将此溶液溶于PBS缓冲溶液中，其中乙醇与PBS缓冲溶液体积比1:1~10:1，加入戊二醛(25%，v/v)，乙醇与PBS体积比范围(1:1~100:1)，常温机械搅拌一段时间4~20h，洗涤后将其分散于0~2000ml PBS缓冲溶液中，最后接入交联臂戊二醛。

[0023] 所述步骤(4)具体为：一定量的上述带有醛基的复合微球溶于一定量的PBS缓冲溶液中，孵化一定浓度(0~1mg/mL)的牛血清蛋白(BSA)溶液，时间(0~10h)。

[0024] 所述的表面活性剂为长烷烃链类溶剂。

[0025] 所述的磁性二氧化硅复合微球与目标蛋白特异性结合,进行蛋白分离的应用。

[0026] 本发明的有益效果是:本发明利用高温热解方法制备超顺磁性四氧化三铁纳米粒子(4~30nm),在磁性纳米粒子外表面,利用反相微乳液法包覆二氧化硅外壳(壳厚5~20nm),对二氧化硅表面进行氨基化修饰,用戊二醛作为交联臂,再接入配基蛋白,利用配基蛋白与目标蛋白的特异性结合,进行蛋白分离。本发明所制备的磁性微球粒径小,单分散性好,带有氨基的复合微球比表面积大,利用亲核加成反应,接入交联臂戊二醛后,可以接入多种配基蛋白,从而可以分离多种目标蛋白,十分适合生物样品中蛋白的快速分离及应用,在生物医学等领域具有广阔的应用前景和巨大的应用价值。

[0027] (1)本发明所制备的磁性微球粒径小,单分散性好,带有氨基的复合微球比表面积大;

[0028] (2)此磁性二氧化硅复合微球的交联臂含有醛基,通过亲核加成反应与配基蛋白结合,戊二醛与蛋白反应具有活性高、反应快、结合量高、交联性好且交联产物性质稳定,并可保持蛋白质的精细结构,对酶的活性影响小,固定的蛋白质染色性能好等特点;

[0029] (3)通过配基蛋白与目标蛋白之间的特异性结合,进行目标蛋白的分离,相较于其他分离手段,磁分离纯化蛋白质技术具有如下优势:操作缓和,能确保蛋白质结果的完整性,可以从蛋白质含量较低的样品中迅速富集浓缩,获得较高浓度的提纯样品,纯化步骤简单,甚至可以集细胞裂解与蛋白质分离于一步完成;

[0030] (4)磁性二氧化硅复合微球具有抗酸碱腐蚀、抗压、无毒、稳定性好,可重复利用等优点。

附图说明

[0031] 图1为利用油酸铁前驱体高温热解制备Fe₃O₄纳米粒子透射电镜图

[0032] 图2为利用反相微乳液法制备Fe₃O₄@SiO₂微球透射电镜图

具体实施方式

[0033] 以下通过具体实施方式对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。

[0034] 实施例一

[0035] 一、Fe₃O₄纳米粒子的制备

[0036] 1. 油酸铁前驱体的制备

[0037] 2.7gFeCl₃·6H₂O溶于水、乙醇和正己烷混合溶液中,体积为70mL,再加入8.875g油酸钠,常温氮气环境下磁力搅拌,加热至70℃,冷凝回流4h。反应完成后,关闭仪器,待溶液冷却至室温,利用分液漏斗分离,上层有机相中包含油酸铁的混合物,将上层有机相用去离子水洗涤,真空干燥,除去溶剂正己烷,得到棕褐色蜡状固体即油酸铁前驱体。

[0038] 2. 利用油酸铁前驱体高温热解制备Fe₃O₄纳米粒子

[0039] 将1g油酸铁前驱体溶于5.56mL十八烯中,加入0.16mL的油酸,磁力搅拌,以3.3℃/min的加热速率加热至320℃,冷凝回流30min。溶液中发生强烈反应,溶液逐渐变浑浊,至黑褐色,即合成了四氧化三铁纳米粒子。关闭反应器至溶液冷却至室温,加入过量乙醇沉淀Fe₃O₄纳米粒子,离心分离。将上清液轻轻倒出,将纳米粒子溶于正己烷中,再加入过量乙醇沉淀出Fe₃O₄纳米粒子,再离心分离。重复上述沉淀一再分散操作,洗涤4~5次,即可得到疏

水Fe₃O₄纳米粒子。

[0040] 二、利用反相微乳液法制备Fe₃O₄@SiO₂微球

[0041] 6.8g的表面活性剂分散在200mL的环己烷中,超声10min。将40mgFe₃O₄纳米粒子溶于10mL环己烷中,加入到上述溶液中,持续搅拌,加入0.5mL氨水(25%-28%),用衡压滴液方式将0.5mLTEOS分8次滴入上述混合溶液中,搅拌反应16h。离心洗涤后获得Fe₃O₄@SiO₂核壳纳米颗粒,将Fe₃O₄@SiO₂核壳纳米颗粒分散于乙醇中保存。

[0042] 三、降低磁球表面非特异性吸附的处理,即进行表面氨基化,再接入交联臂戊二醛

[0043] 1.0.01g的Fe₃O₄@SiO₂复合微球溶于50mL乙醇溶剂中,加入25uL的APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷),机械搅拌反应72h,加热至70℃,回流1h,用乙醇清洗,利用激光粒度仪测表面电位+2.17mV。

[0044] 2.将上述微球溶液溶于20mL的PBS(0.01M,Ph=7.4)缓冲溶液中,加入35uL戊二醛(25%,v/v),常温机械搅拌8h,洗涤后将其分散4.3mLPBS(0.2M,pH=6)的缓冲溶液中。利用激光粒度仪测表面电位-2.28mV。

[0045] 四、接入配基蛋白

[0046] 配置初始浓度为0.25mg/mL的牛血清蛋白(BSA)溶液,10mg上述带有醛基的复合微球溶于5mLPBS(0.01M,pH=7.4)缓冲溶液,取25mLBSA溶液放入磁球溶液中孵化3h,温度为30℃。测得剩余溶液中蛋白的吸光度0.1129,通过标准蛋白吸光度曲线可以得知,剩余BSA溶液浓度0.125109mg/mL,通过间接法计算:

[0047] $0.25\text{mg/mL} \times 25\text{mL} - 0.125109\text{mg/mL} \times 30\text{mL} = 2.49673\text{mg}$

[0048] 得知磁性复合微球接入配基蛋白的量为2.49673mg/10mg磁性微球。

[0049] 此带有醛基的复合磁性微球可以接多种配基蛋白,再利用此带有配基蛋白的磁性微球进行多种目标蛋白的分离。

[0050] 实施例二

[0051] 一、Fe₃O₄纳米粒子的制备

[0052] 1.油酸铁前驱体的制备

[0053] 2.7gFeCl₃·6H₂O溶于水、乙醇和正己烷混合溶液中,体积为70mL,再加入8.875g油酸钠,常温氮气环境下磁力搅拌,加热至50℃,冷凝回流6h。反应完成后,关闭仪器,待溶液冷却至室温,利用分液漏斗分离,上层有机相中包含油酸铁的混合物,将上层有机相用去离子水洗涤,真空干燥,除去溶剂正己烷,得到棕褐色蜡状固体即油酸铁前驱体。

[0054] 2.利用油酸铁前驱体高温热解制备Fe₃O₄纳米粒子

[0055] 将1g油酸铁前驱体溶于5mL十八烯中,加入0.15mL的油酸,磁力搅拌,以2℃/min的加热速率加热至330℃,冷凝回流50min。溶液中发生强烈反应,溶液逐渐变浑浊,至黑褐色,即合成了四氧化三铁纳米粒子。关闭反应器至溶液冷却至室温,加入过量乙醇沉淀Fe₃O₄纳米粒子,离心分离。将上清液轻轻倒出,将纳米粒子溶于正己烷中,再加入过量乙醇沉淀出Fe₃O₄纳米粒子,再离心分离。重复上述沉淀一再分散操作,洗涤4~5次,即可得到疏水Fe₃O₄纳米粒子。

[0056] 二、利用反相微乳液法制备Fe₃O₄@SiO₂微球

[0057] 13.6g的表面活性剂分散在400mL的环己烷中,超声10min。将80mgFe₃O₄纳米粒子溶于1mL环己烷中,加入到上述溶液中,持续搅拌,加入1mL氨水(25%-28%),用衡压滴液方式

将0.5mL TEOS分8次滴入上述混合溶液中,搅拌反应16h。离心洗涤后获得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 核壳纳米颗粒,将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 核壳纳米颗粒分散于乙醇中保存。如图2。

[0058] 三、降低磁球表面非特异性吸附的处理,即进行表面氨基化,再接入交联臂戊二醛

[0059] 1.0.01g的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 复合微球溶于50mL乙醇溶剂中,加入25 μL 的APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷),机械搅拌反应72h,加热至70 $^\circ\text{C}$,回流1h,用乙醇清洗,利用激光粒度仪测表面电位+2.17mV。

[0060] 2.将上述微球溶液溶于20mL的PBS(0.01M,Ph=7.4)缓冲溶液中,加入35 μL 戊二醛(25%,v/v),常温机械搅拌8h,洗涤后将其分散4.3mLPBS(0.2M,pH=6)的缓冲溶液中。利用激光粒度仪测表面电位-2.28mV。

[0061] 四、接入配基蛋白如实施例一。

[0062] 实施例三

[0063] 一、 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

[0064] 1.油酸铁前驱体的制备

[0065] 2.7g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于水、乙醇和正己烷混合溶液中,体积为70mL,再加入8.875g油酸钠,常温氮气环境下磁力搅拌,加热至80 $^\circ\text{C}$,冷凝回流3h。反应完成后,关闭仪器,待溶液冷却至室温,利用分液漏斗分离,上层有机相中包含油酸铁的混合物,将上层有机相用去离子水洗涤,真空干燥,除去溶剂正己烷,得到棕褐色蜡状固体即油酸铁前驱体。

[0066] 2.利用油酸铁前驱体高温热解制备 Fe_3O_4 纳米粒子

[0067] 将1g油酸铁前驱体溶于6mL十八烯中,加入0.18mL的油酸,磁力搅拌,以10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的加热速率加热至340 $^\circ\text{C}$,冷凝回流60min。溶液中发生强烈反应,溶液逐渐变浑浊,至黑褐色,即合成了四氧化三铁纳米粒子。关闭反应器至溶液冷却至室温,加入过量乙醇沉淀 Fe_3O_4 纳米粒子,离心分离。将上清液轻轻倒出,将纳米粒子溶于正己烷中,再加入过量乙醇沉淀出 Fe_3O_4 纳米粒子,再离心分离。重复上述沉淀一再分散操作,洗涤4~5次,即可得到疏水 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0068] 二、利用反相微乳液法制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 微球

[0069] 20g的表面活性剂分散在600mL的环己烷中,超声10min。将120mg Fe_3O_4 纳米粒子溶于1.5mL环己烷中,加入到上述溶液中,持续搅拌,加入1.5mL氨水(25%-28%),用衡压滴液方式将0.5mL TEOS分8次滴入上述混合溶液中,搅拌反应16h。离心洗涤后获得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 核壳纳米颗粒,将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 核壳纳米颗粒分散于乙醇中保存。

[0070] 三、降低磁球表面非特异性吸附的处理,即进行表面氨基化,再接入交联臂戊二醛

[0071] 1.0.01g的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 复合微球溶于50mL乙醇溶剂中,加入25 μL 的APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷),机械搅拌反应72h,加热至70 $^\circ\text{C}$,回流1h,用乙醇清洗,利用激光粒度仪测表面电位+2.17mV。

[0072] 2.将上述微球溶液溶于20mL的PBS(0.01M,Ph=7.4)缓冲溶液中,加入35 μL 戊二醛(25%,v/v),常温机械搅拌8h,洗涤后将其分散4.3mLPBS(0.2M,pH=6)的缓冲溶液中。利用激光粒度仪测表面电位-2.28mV。

[0073] 四、接入配基蛋白如实施例一。

[0074] 虽然已经关于其优选的实施例具体示出和描述了本发明,但本领域的技术人员应当理解对形式和细节可以做出上述和其它的改变而不脱离本发明的精神和范围。因此旨在

本发明不局限于描述和示例的精确形式以及细节,而是落入所附权利要求的范围内。

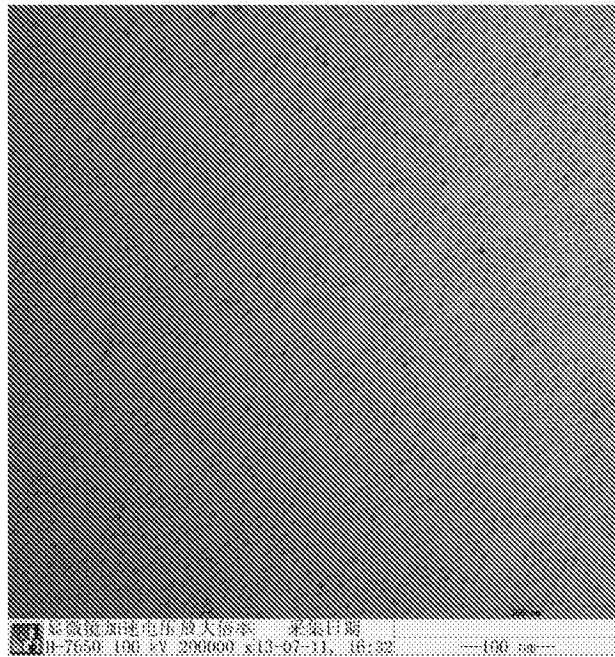


图1

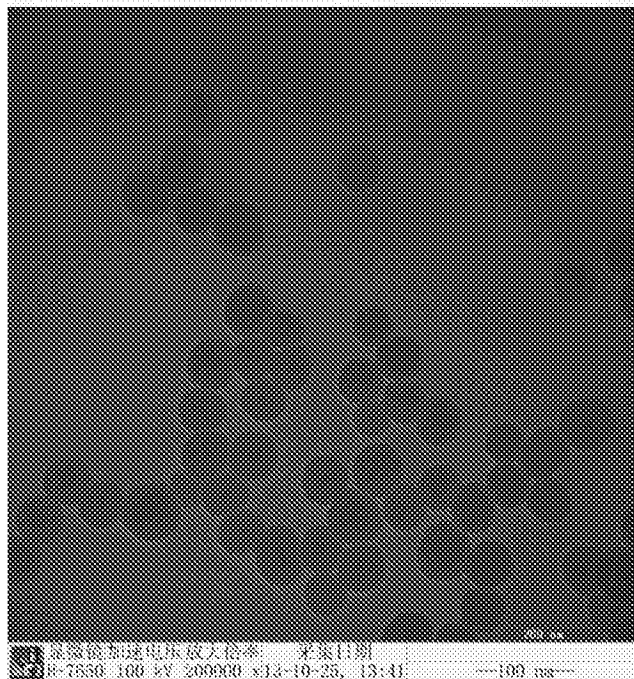


图2