



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115254067 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 01

(21) 申请号 202211200268.0

(22) 申请日 2022.09.29

(71) 申请人 山东博科科学仪器有限公司

地址 250101 山东省济南市高新区大正路
1777号生物医药园中小企业产业化基
地13号楼101厂房

(72) 发明人 袁文虎 陈学银 杨彤 谭树昊
武夏夏

(51) Int. Cl.

B01J 20/26 (2006.01)

B01J 20/28 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

B01J 20/30 (2006.01)

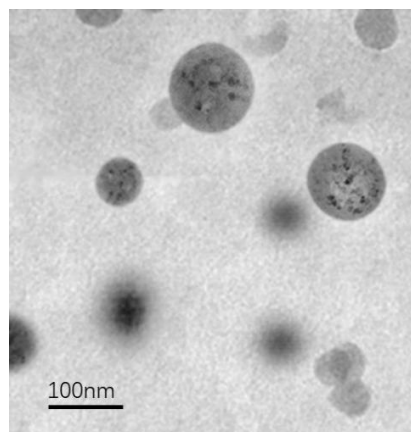
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种硅羟基磁珠及其合成方法、应用

(57) 摘要

本发明属于纳米材料领域,具体涉及一种硅羟基磁珠及其合成方法、应用。本发明通过溶剂热法制备 Fe_3O_4 纳米粒子, Fe_3O_4 纳米粒子包覆聚合物, $Fe_3O_4@PDA$ 纳米粒子表面包覆 SiO_2 等步骤成功合成的硅羟基磁珠,结构空隙小,使用过程中避免水存积;其次,本发明的第二个改进点为将 SiO_2 初级粒子先进行超声分散,在加入包覆聚合物的 Fe_3O_4 纳米粒子,相比沉积法,本发明利用聚多巴胺的自粘附性,吸附性的结合 SiO_2 初级粒子,使 Fe_3O_4 纳米粒子表面更均匀包覆一层 SiO_2 粒子,同时聚多巴胺表面丰富的活性官能团提高了对核酸的吸附效率,减少了非特异性吸附性。



1. 一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 溶剂热法制备 Fe_3O_4 纳米粒子:将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入乙二醇中,搅拌均匀,依次加入聚乙二醇、醋酸钠得到混合溶液,超声分散20min~60min,200℃保温10~16h,磁分离,洗涤干燥,得到 Fe_3O_4 纳米粒子;

(2) Fe_3O_4 纳米粒子包覆聚合物:将步骤(1)制备的 Fe_3O_4 纳米粒子分散到pH=8.5的Tris缓冲液中,加入多巴胺单体,再加入 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,避光搅拌6~12h,多巴胺单体自聚,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子,得到 Fe_3O_4 @PDA纳米粒子;

(3) 表面包覆 SiO_2 :将正硅酸乙酯、催化剂、水分散于有机溶剂中,600w超声处理15min,形成 SiO_2 初级粒子溶液; Fe_3O_4 @PDA纳米粒子分散于超纯水中,600w超声处理1~2h,加入至 SiO_2 初级粒子溶液中, Fe_3O_4 纳米粒子表面包覆 SiO_2 ,合成硅羟基磁珠。

2. 如权利要求1所述的一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,步骤(1)中,将所述混合溶液进行超声分散20min~60min得到乳液;将所述乳液过滤除去未完全分散的颗粒;将所述乳液倒入聚四氟乙烯反应釜中,于200℃保温12h后进行磁性分离,洗涤干燥,得到 Fe_3O_4 纳米粒子。

3. 如权利要求1所述的一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,步骤(1)中,所述 Fe_3O_4 纳米粒子的平均粒径为20~500nm。

4. 如权利要求1所述的一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,步骤(1)中,所述聚乙二醇为聚乙二醇4000,按摩尔比, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:聚乙二醇=18~24:1。

5. 如权利要求1所述的一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,步骤(2)中,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子后,聚多巴胺的厚度 $\leq 50\text{nm}$ 。

6. 如权利要求1所述的一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,步骤(3)中, SiO_2 初级粒子的平均粒径为100~200nm。

7. 如权利要求1所述的一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,步骤(3)中,所述催化剂选自氨水、乙醇胺、氢氧化钠、氢氧化钾中的至少一种。

8. 如权利要求1所述的一种硅羟基磁珠的合成方法,其特征在于,步骤(3)中,所述有机溶剂选自乙二醇、甲醇、乙醇、二乙胺、丙酮中的至少一种。

9. 一种由权利要求1~8任一项所述的硅羟基磁珠的合成方法制备得到的硅羟基磁珠。

10. 权利要求9所述的硅羟基磁珠在提取DNA中的应用。

一种硅羟基磁珠及其合成方法、应用

技术领域

[0001] 本发明属于核酸提取领域,具体涉及一种硅羟基磁珠及其合成方法、应用。

背景技术

[0002] 磁珠通常指的是具有超顺磁性的磁珠在磁场中能够迅速聚集,离开磁场后又能够再度均匀分散,其已经广泛的应用于DNA提取、免疫学检测等领域。磁珠的首次被制备为具有超顺磁性的聚苯乙烯微球,之后磁性微球的相关技术快速发展起来,在各类磁珠中,二氧化硅磁珠由于其表面具有羟基而便于进行多样性修饰,已经成为了DNA提取领域最常用的磁珠形式。

[0003] 目前,常见的硅羟基磁珠制备方法为Stober法,具体是在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面修饰一层纳米 SiO_2 ,但是该方法存在 Fe_3O_4 纳米颗粒包覆的 SiO_2 层粒径不均一或包覆不均匀,且有容易团聚的缺陷。

[0004] 而现有的 Fe_3O_4 纳米颗粒表面包覆 SiO_2 的方法也存在一些问题,如下:

1. 常见的沉积法包覆的 SiO_2 层的厚度不一,造成了磁珠的粒径差异大,导致后续在提取DNA时的提取效率受到了较大的影响;
2. 碱性条件下非常不稳定;
3. 硅胶自身结构空隙较多,容易造成表面大量的水存积,增加了化学反应的复杂性;
4. 存在较大的非特异性吸附性。

[0005] 因此,寻找一种核酸提取效率高,粒径均匀, Fe_3O_4 纳米颗粒表面包覆率高的硅羟基磁珠是当前领域亟待解决的问题。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种硅羟基磁珠的合成方法及其应用;本发明对硅羟基磁珠的合成方法改进点之一在于,将 Fe_3O_4 纳米粒子与 SiO_2 粒子层之间以聚多巴胺作为结合层,使 Fe_3O_4 纳米粒子更致密的连接 SiO_2 初级粒子,减少了结构空隙,避免了水存积;其次,本发明的第二个改进点为将 SiO_2 初级粒子先进行超声分散,加入包覆聚合物的 Fe_3O_4 纳米粒子,相比沉积法,本发明利用聚多巴胺的自粘附性,吸附性的结合 SiO_2 初级粒子,使 Fe_3O_4 纳米粒子表面更均匀包覆一层 SiO_2 初级粒子,同时聚多巴胺表面丰富的活性官能团有利于提高对核酸的吸附效率。

[0007] 具体的,本发明的技术方案如下:

一种硅羟基磁珠的合成方法,包括以下步骤:

(1) 溶剂热法制备 Fe_3O_4 纳米粒子:将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入乙二醇中,搅拌均匀,依次加入聚乙二醇、醋酸钠得到混合溶液,超声分散20min~60min,200℃保温8~20h,磁分离,洗涤干燥,得到 Fe_3O_4 纳米粒子;

(2) Fe_3O_4 纳米粒子包覆聚合物:将步骤(1)制备的 Fe_3O_4 纳米粒子分散到pH=8.5的

Tris缓冲液中,向反应体系中加入多巴胺单体,加入 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,避光搅拌6~12h,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子,得到 Fe_3O_4 @PDA纳米粒子;

(3) 表面包覆 SiO_2 :将正硅酸乙酯、催化剂、水分散于有机溶剂中,600w超声处理15min,形成 SiO_2 初级粒子溶液; Fe_3O_4 @PDA纳米粒子分散于超纯水中,600w超声处理1~2h,加入至 SiO_2 初级粒子溶液中, Fe_3O_4 纳米粒子表面包覆 SiO_2 ,合成硅羟基磁珠。

[0008] 进一步的,步骤(1)中,将所述混合溶液进行超声分散20min~60min得到乳液;将所述乳液过滤除去未完全分散的颗粒;将所述乳液倒入聚四氟乙烯反应釜中,于 180°C ~ 220°C 保温12h后进行磁性分离,洗涤干燥,得到 Fe_3O_4 纳米粒子。

[0009] 进一步的,步骤(1)中,所述 Fe_3O_4 纳米粒子的平均粒径为20~500nm。

[0010] 进一步的,步骤(1)中,所述聚乙二醇为聚乙二醇4000,按摩尔比, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:聚乙二醇=18~24:1。

[0011] 进一步的,步骤(2)中,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子后,聚多巴胺包裹的厚度 \leq 50nm。

[0012] 进一步的,步骤(3)中, SiO_2 初级粒子的平均粒径为100~200nm。

[0013] 进一步的,步骤(3)中,所述催化剂选自氨水、乙醇胺、氢氧化钠、氢氧化钾中的至少一种。

[0014] 进一步的,步骤(3)中,所述有机溶剂选自乙二醇、甲醇、乙醇、二乙胺、丙酮中的至少一种。

[0015] 本发明还提供了上述一种硅羟基磁珠的合成方法制备得到的硅羟基磁珠以及所述硅羟基磁珠在提取DNA中的应用。

[0016] 本发明的有益效果在于:

1. 本发明的一种硅羟基磁珠的合成方法,首先将 Fe_3O_4 纳米粒子表面包裹一层聚多巴胺,利用聚多巴胺的自粘附性,吸附性的结合 SiO_2 初级粒子,在碱性条件下非常稳定;

2. 本发明的方法是将 SiO_2 初级粒子先行分散,这种工艺使 SiO_2 初级粒子的包覆率更高,更致密,减少了结构空隙,避免了水存积;而且相比沉积法,包覆原理的改变导致 SiO_2 初级粒子的包裹厚度可以控制,制备得到的硅羟基磁珠粒径更均匀,极大地减少了非特异性吸附性;

2. 由于聚多巴胺在碱性下即可温和自聚,硅羟基磁珠制备方便快捷,本发明的制备方法更适合大规模的合成;且聚多巴胺表面丰富的活性官能团有利于提高对核酸的吸附效率,且相比其他聚合物,聚多巴胺具有更优秀的生物相容性,不仅具有良好的机械强度,化学稳定性也同样优秀。

附图说明

[0017] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0018] 图1为本发明中 Fe_3O_4 纳米粒子的TEM图;

图2为本发明中 Fe_3O_4 @PDA纳米粒子的TEM图。

具体实施方式

[0019] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0020] 在本发明的一些实施例中,一种硅羟基磁珠的合成方法,包括以下步骤:

(1) 溶剂热法制备 Fe_3O_4 纳米粒子:将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入乙二醇中,搅拌均匀,依次加入聚乙二醇、醋酸钠得到混合溶液,混合溶液进行超声分散20min~60min得到乳液;将所述乳液过滤除去未完全分散的颗粒;将所述乳液倒入聚四氟乙烯反应釜中,于 160°C ~ 240°C 保温12h后进行磁性分离,洗涤干燥,得到 Fe_3O_4 纳米粒子;

(2) Fe_3O_4 纳米粒子包覆聚合物:将步骤(1)制备的 Fe_3O_4 纳米粒子分散到pH=8.5的Tris缓冲液中,向反应体系中加入多巴胺单体,加入微量的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,避光搅拌6~12h,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子,得到 Fe_3O_4 @PDA纳米粒子;加入微量 Fe^{3+} 使其与聚多巴胺的螯合作用加强,有利于聚多巴胺的包覆,通过控制多巴胺的自聚时间,可以控制聚多巴胺层的厚度,为了防止过厚的聚多巴胺影响后续吸附 SiO_2 ,本发明的实施例优选反应时间6~8h,更优选7h;

(3) 表面包覆 SiO_2 :将正硅酸乙酯、催化剂、水分散于有机溶剂中,600w超声处理15min,形成 SiO_2 初级粒子溶液; Fe_3O_4 @PDA纳米粒子分散于超纯水中,600w超声处理1~2h,加入至 SiO_2 初级粒子溶液中, Fe_3O_4 纳米粒子表面包覆 SiO_2 ,合成硅羟基磁珠。

[0021] 优选的,步骤(1)中,所述 Fe_3O_4 纳米粒子的平均粒径为20~500nm,更优选的, Fe_3O_4 纳米粒子的平均粒径20~100nm。

[0022] 优选的,步骤(1)中,所述聚乙二醇为聚乙二醇4000,按摩尔比, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:聚乙二醇=18~24:1。

[0023] 优选的,步骤(2)中,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子后,聚多巴胺包裹的厚度 $\leq 50\text{nm}$,更优选的聚多巴胺包裹的厚度 $\leq 40\text{nm}$ 。

[0024] 优选的,步骤(3)中, SiO_2 初级粒子的平均粒径为100~200nm。

[0025] 优选的,步骤(3)中,所述催化剂包括但不限于氨水、乙醇胺、氢氧化钠、氢氧化钾中的至少一种,更优选,所述催化剂为氨水。

[0026] 优选的,步骤(3)中,所述有机溶剂包括但不限于乙二醇、甲醇、乙醇、二乙胺、丙酮中的至少一种,更优选的,有机溶剂为乙醇。

[0027] 在溶剂热中添加聚乙二醇合成 Fe_3O_4 纳米粒子,一步完成 Fe_3O_4 纳米粒子的合成以及对其表面改性。工艺操作简单,得到的 Fe_3O_4 纳米粒子粒径均一,分散性好,不易团聚,利于后续反应。

[0028] 采用超声辅助合成硅羟基磁珠,让其前驱体先在特定体系中水解形成 SiO_2 初级粒子,再加入 Fe_3O_4 @PDA纳米粒子分散液进行超声,经过保温、洗涤,即可得到硅羟基磁珠。工艺操作简单,反应时间远远快于机械搅拌的方式,得到的硅羟基磁珠分散性好,不易团聚,磁性好,提高了产品质量和反应时间。

[0029] 采用超声辅助合成的硅羟基磁珠在病毒核酸提取过程中也表现出了良好的性能,

磁珠无残留,对核酸吸附性好。

[0030] 实施例1

1.将3.37 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 放入盛有100 ml乙二醇的聚四氟乙烯内胆中,超声搅拌使其完全溶解形成均匀分散液,将2.5 g聚乙二醇4000、9 g乙酸钠依次加入分散液中600 w超声搅拌120 min,后放入反应釜中,在200 °C保温12h后取出;将反应釜冷却至室温,先用磁铁分离出黑色沉淀,去除上层溶液,后用无水乙醇洗涤3次,再用超纯水洗涤3次,放入鼓风干燥箱进行干燥。

[0031] 2.将2g Fe_3O_4 纳米粒子分散到200mL pH=8.5的Tris缓冲液(10mmol/L),向反应体系中加入0.5g多巴胺单体,加入1.2mg/L的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,避光搅拌8h,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子,聚多巴胺层的厚度为 $30 \pm 2\text{nm}$,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子,乙醇洗涤3次,真空干燥;

3.将2 ml超纯水、3.4 ml氨水、0.6 ml正硅酸乙酯依次加入盛有100 ml无水乙醇的体系中,600 w超声处理15 min,形成 SiO_2 初级粒子;

4.称取1 g合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子粉末,分散于2ml超纯水中,将其加入步骤3的反应体系中,600 w超声处理2h,利用由扩散控制的聚集成核机理对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子进行表面 SiO_2 的包覆,合成硅羟基磁珠。

[0032] 实施例2

1.将2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 放入盛有80 ml丙酮的聚四氟乙烯内胆中,超声搅拌使其完全溶解形成均匀分散液,将2.5 g聚乙二醇4000、7 g乙酸钠依次加入分散液中600 w超声搅拌30 min,后放入反应釜中,在200°C保温16 h后取出;将反应釜冷却至室温,先用磁铁分离出黑色沉淀,去除上层溶液,后用无水乙醇洗涤3次,再用超纯水洗涤3次,放入鼓风干燥箱进行干燥。

[0033] 2.将2g Fe_3O_4 纳米粒子分散到200mL pH=8.5的Tris缓冲液(10mmol/L),向反应体系中加入0.5g多巴胺单体,加入1.2mg/L的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,避光搅拌8h,聚多巴胺包裹 Fe_3O_4 纳米粒子,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子,乙醇洗涤3次,真空干燥;

3.将2 ml超纯水、3.4 ml乙醇胺、0.6 ml正硅酸乙酯依次加入盛有100 ml无水乙醇的体系中,600 w超声处理120 min,形成 SiO_2 初级粒子;

4.称取1 g合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子粉末,分散于2ml超纯水中,将其加入步骤3的反应体系中,600 w超声处理2h,利用由扩散控制的聚集成核机理对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子进行表面 SiO_2 的包覆,合成硅羟基磁珠。

[0034] 实施例3

将合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子和硅羟基磁珠分别通过TEM观察其纳米颗粒的形貌和尺寸。

[0035] 从图1可以看出 Fe_3O_4 纳米粒子本身为球形,粒径在30~100nm,图2为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ 纳米粒子粒径在80~200nm,这表明在Tris溶液存在下加入多巴胺单体,在 Fe_3O_4 表面包覆一层聚多巴胺膜,膜的厚度约为20~30nm,相同条件包覆两层聚多巴胺(即反应时间增加4h),膜的厚度约为30~40nm,相同条件包覆三层聚多巴胺膜(即反应时间增加8h),膜的厚度约为40~50nm,聚多巴胺吸附剂,吸附 SiO_2 初级纳米粒子在聚多巴胺表面,随着聚多巴胺膜的厚度增加,表面吸附的 SiO_2 初级纳米粒子数量相对的增加;进一步表明了本发明硅羟基磁珠的成

功制备,也表示本发明的方法能够精准的控制硅羟基磁珠的大小,有利于提高检测试剂盒的稳定性和精准度。

[0036] 从图1和图2中可以看出,颗粒分布均匀,在包覆了聚多巴胺之后,纳米粒子的厚度明显增加,这证明聚多巴胺的成功包覆。

[0037] 实施例4

本实施例使用一种核酸提取试剂盒,进行DNA提取实验,所述核酸提取试剂盒的配方如下:

裂解液:3%吐温20

蛋白酶K溶液:10mg/ml的蛋白酶K,50mM Tris-HCl,10mM CaCl₂,PH为7.5

洗涤液1:20mM Tris,甘露醇2%

洗涤液2:10mM Tris

洗脱液:无DNase/RNase水

磁珠悬液:本发明实施例1制备的磁珠50mg/ml,包含于含0.5-1mM的IDHA的10mM PBS溶液中

将实施例1制备的硅羟基磁珠用于病毒DNA提取,实验步骤如下:

本发明所有试剂均使用1%DEPC处理的超纯水配制,所有耗材均无DNA/RNA 酶污染。

[0038] 1. 取样:将采样管中裂解15min的采集样本加入到预分装的96深孔板中,阴性样本只加200ul采集样本,阳性样本加150ul采集样本和50ul阳性质控品。

[0039] 2. 试剂预分装:按以下表格预分装试剂:

3. 磁分离试剂中的磁珠为本发明实施例1制备的硅羟基磁珠。

[0040] 表1孔位组分及用量

孔位	A1~H1/ A7~H7	A2~H2/ A8~H8	A3~H3/ A9~H9	A4~H4/ A10~H10	A5~H5/ A11~H11
试剂	裂解液 600ul	清洗液I 800ul	清洗液II 800ul	磁分离试剂 200ul 磁珠 20ul	洗脱液 100ul

分别添加200ul样本和20ul蛋白酶k溶液到A1~H1/ A7~H7孔中,5个重复,使用博科生产核酸提取仪。提取程序如下:

表2 核酸提取仪步骤

步骤	孔位	名称	等待时间(S)	混合时间(S)	磁吸时间(S)	混合速度	容积(ul)	裂解温度(°C)	洗脱温度(°C)
1	4	Bind(磁珠准备)	0	30	0	F(快)	200	0	0
2	1	Lysis(裂解)	0	240	30	F(快)	800	80	0
3	2	Wash(清洗)	0	30	30	F(快)	800	0	0
4	3	Wash(清洗)	0	60	30	F(快)	800	0	0
5	5	Elution(洗脱)	0	180	30	S(慢)	100	0	80
6	3	Bead(磁珠回收)	0	30	0	F(快)	800	0	0

提取完成后,取A5~H5/ A11~H11相应孔位的洗脱液得到基因组DNA。

[0041] 按照核酸提取试剂盒说明书相关说明进行相应操作提取,提取后的基因组DNA吸收到1.5ml离心管中备用。

[0042] 用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,琼脂糖购自全式金(货号GS201-01),荧光核酸

染色试剂购自全式金(货号GS101-01),Marker,购自全式金(货号BM311-01),电压200V,电流150mA,运行45min。

[0043] 按照核酸检测试剂盒(荧光PCR法)说明书来进行PCR反应体系的配制,加入体系的比例为:

表3组分用量

组分名称	加入体积(u1)/人份
PCR检测混合液	10
酶混合液	1
引物探针混合液	2
总体积	13

然后在PCR反应管中加入13u1反应体系,从核酸提取完成后的离心管中分别取阳性和阴性各7u1,终体积为20u1/管,然后盖紧管盖,振荡器振荡,离心机离心,按照顺序放入PCR仪中,按照下列条件进行反应:

表4PCR仪检测步骤

步骤1	逆转录(循环1)	55°C	15min
步骤2	预变性(循环1)	95°C	30sec
步骤3	循环反应(循环45)	95°C	10sec
		57°C(采集荧光)	30sec

将PCR仪的各项参数按上表进行设置,设置完成后按照顺序将PCR管放入PCR仪中,开始运行。

[0044] PCR结果判读

表5PCR仪检测结果

检测通道			结果判读
FAM通道	ROX通道	HEX/VIC通道	
Ct值≤38	Ct值≤38	Ct值≤38	样本阳性
无Ct值或Ct值>38	无Ct值或Ct值>38	Ct值≤38	样本阴性
无Ct值或Ct值>38	Ct值≤38	Ct值≤38	复测
Ct值≤38	无Ct值或Ct值>38	Ct值≤38	

实施例5

将3.37g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 放入盛有100 ml乙二醇的聚四氟乙烯内胆中,超声搅拌使其完全溶解形成均匀分散液,将2.5 g聚乙二醇4000、9 g乙酸钠依次加入分散液中600 w超声搅拌30 min、1h、1.5h、2h、2.5h、3h。

[0045] 本实施例为验证超声时间对磁珠吸附核酸能力的影响,做了以下单因素实验(其

余步骤同实施例1)：

按实施例4的检测方法,检测浓度6250cp/ml的50ul阳性质控品,检测结果如表3所示(表中1+:超声时间30 min;2+:超声时间1 h;3+:超声时间1.5 h;4+:超声时间2 h;5+:超声时间2.5 h;6+:超声时间3 h)。

[0046] 表6 不同超声时间合成的硅羟基磁珠PCR数据

样本名称	基因名称	报告基团	C _T
1+	检测项目 1	FAM	33.630
1+	检测项目 2	ROX	32.770
1+	检测项目 3	VIC	29.647
2+	检测项目 1	FAM	29.610
2+	检测项目 2	ROX	28.894
2+	检测项目 3	VIC	24.712
3+	检测项目 1	FAM	31.421
3+	检测项目 2	ROX	32.768
3+	检测项目 3	VIC	31.263
4+	检测项目 1	FAM	23.189
4+	检测项目 2	ROX	24.415
4+	检测项目 3	VIC	24.120
5+	检测项目 1	FAM	27.329
5+	检测项目 2	ROX	28.154
5+	检测项目 3	VIC	26.269
6+	检测项目 1	FAM	25.087
6+	检测项目 2	ROX	26.465
6+	检测项目 3	VIC	24.592

以上数据显示,超声2h合成的硅羟基磁珠效果最好,因此上述实施例均采用2h超声时间合成。

[0047] 实施例6

将本发明实施例1的硅羟基磁珠同购买磁珠(常州天地人和生物科技有限公司 MagSilica Beads 100ml (50mg/ml))作对比试验,如下:

1+和2+均是购买的磁珠,3和4均是用本发明实施例1方法制备的硅羟基磁珠,按照实施例4的检测方法,得到了表7中的两种磁珠的PCR实验数据:

表7 不同硅羟基磁珠的PCR数据

样本名称	基因名称	报告基团	C _T
1+	检测项目 1	FAM	26.873
1+	检测项目 2	ROX	29.153
1+	检测项目 3	VIC	23.939
2+	检测项目 1	FAM	25.968
2+	检测项目 2	ROX	27.278
2+	检测项目 3	VIC	24.305

3+	检测项目 1	FAM	25.399
3+	检测项目 2	ROX	26.356
3+	检测项目 3	VIC	24.838
4+	检测项目 1	FAM	25.260
4+	检测项目 2	ROX	26.277
4+	检测项目 3	VIC	24.874

上述数据显示,按照实施例1合成的硅羟基磁珠与购买的磁珠在核酸提取试剂盒中体现的性能几乎相差无几,本实施例1制备的硅羟基磁珠效果满足试剂盒检测要求。

[0048] 实施例7

本实施例使用实施例2制备的硅羟基磁珠进行不同批次间的实验数据对比,其中样本1+、2+、3+分别是不同批次间的硅羟基磁珠

表8 不同批次间合成的硅羟基磁珠的PCR数据

样本名称	基因名称	报告基团	C _T
1+	检测项目 1	FAM	28.725
1+	检测项目 2	ROX	28.913
1+	检测项目 3	VIC	26.543
2+	检测项目 1	FAM	27.893
2+	检测项目 2	ROX	28.566
2+	检测项目 3	VIC	24.866
3+	检测项目 1	FAM	27.211
3+	检测项目 2	ROX	28.169
3+	检测项目 3	VIC	25.565

以上实验数据结果表明本发明合成的硅羟基磁珠具有优异的稳定性和重复性。

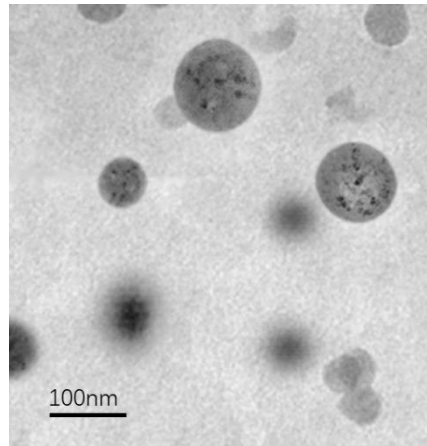


图1

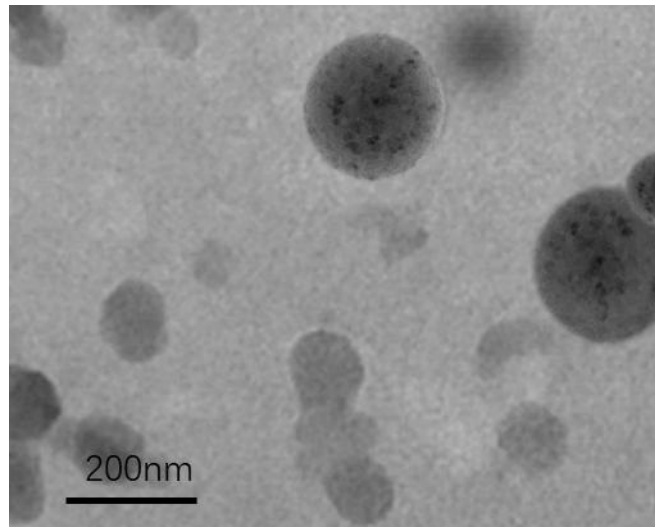


图2