



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687280 A

(43)申请公布日 2020.01.14

---

(21)申请号 201910970803.2

(22)申请日 2019.10.14

(71)申请人 河南省商业科学研究所有限责任公司

地址 450002 河南省郑州市金水区文化路  
87号

(72)发明人 周莉 陈世伟 朱海华 王晓瑞  
杜瑞 平洋 谭静 闫格 王珂  
李远远

(74)专利代理机构 郑州翊博专利代理事务所  
(普通合伙) 41155  
代理人 付红莉 周玉青

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

---

(54)发明名称

一种用于检测乙二胺四乙酸盐的免疫磁珠  
的制备方法及其制备的免疫磁珠

(57)摘要

本发明属于化学检测技术领域,公开了一种  
用于检测乙二胺四乙酸盐免疫磁珠的制备方法  
及制备的免疫磁珠。免疫磁珠制备方法如下:(1)  
取磁珠,洗涤后用缓冲液悬浮,得到磁珠悬液;  
(2)向磁珠悬液中加入乙二胺四乙酸盐单克隆抗  
体溶液,震荡混匀,10~45℃偶联活化20~  
120min,然后置于磁力架静置分层,弃上清,得到  
磁珠-抗体复合物;(3)向磁珠-抗体复合物中加  
入缓冲液使悬浮,再加入封闭液,室温孵育后于  
磁力架上静置分层,得到免疫磁珠。本发明制备  
的免疫磁珠特异性强,灵敏度高,能快速与待测  
样品溶液中的乙二胺四乙酸盐特异性结合,快速  
富集待测样品中乙二胺四乙酸盐,极大地提高了  
乙二胺四乙酸盐的检出限和检测准确性。

1. 一种用于检测乙二胺四乙酸盐的免疫磁珠的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 取磁珠,洗涤后用缓冲液将磁珠悬浮,得到磁珠悬液;

(2) 向步骤(1)制得的磁珠悬液中加入乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液,震荡混合均匀,在10~45℃偶联活化反应20~120min,然后置于磁力架静置分层,弃上层清液,得到磁珠-抗体复合物;

(3) 向步骤(2)制备的磁珠-抗体复合物中加入缓冲液使悬浮,然后再加入封闭液,室温孵育后于磁力架上静置分层,弃上清,得到免疫磁珠;

其中,所述缓冲液为含Tween-20的Earle's BSS溶液。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述Earle's BSS溶液的pH为6.8~8.0,Earle's BSS溶液中Tween-20的浓度为0.025g/L。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述Earle's BSS溶液是由NaCl、KC1、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCL<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHC0<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液,所述Earle's BSS溶液中各组分的浓度分别为:NaCl为6.8g/L,KC1为0.4g/L,Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>为0.11g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>为0.14g/L,CaCL<sub>2</sub>为0.2g/L,MgSO<sub>4</sub>为0.1g/L,葡萄糖为1.0g/L,NaHC0<sub>3</sub>为2.0 g/L,Tween-20为0.025g/L。

4. 根据权利要求1~3任一所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中所述封闭液的用量为磁珠-抗体复合物总重的10%;所述封闭液为血清蛋白溶液或卵清蛋白溶液,所述血清蛋白溶液的质量分数为5%,所述卵清蛋白溶液的浓度为2%。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液的浓度为0.1~0.5mg/ml,所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液与磁珠悬液的体积比为1:1。

6. 根据权利要求1或2或3或5所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述洗涤的具体操作为:向磁珠中加入Earle's BSS溶液,经混合、振荡后置于磁力架上静置分层,弃上清,得到洗涤后的磁珠。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述磁珠为商品化的磁珠;所述乙二胺四乙酸盐为乙二胺四乙酸二钠;所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体为乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,偶联活化反应前,需对磁珠与乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液的混合物进行水浴热处理、离心处理,离心后弃上层清液,用缓冲液对下层样品悬浮,悬浮后进行偶联活化反应;其中,所述水浴热处理的温度为40~45℃,时间为2~4min;所述离心温度为4℃,转速为6000rpm,离心时间为1 min~6min。

9. 一种利用权利要求1或2或3或5或7或8所述制备方法制备的免疫磁珠。

10. 权利要求9所述免疫磁珠在检测乙二胺四乙酸盐中的应用。

## 一种用于检测乙二胺四乙酸盐的免疫磁珠的制备方法及其制备的免疫磁珠

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学检测技术领域,具体涉及一种用于检测乙二胺四乙酸盐的免疫磁珠的制备方法及其制备的免疫磁珠。

### 背景技术

[0002] 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)被列为国家食品安全标准GB2760-2014《食品添加剂使用标准》中允许使用的食品添加剂,有防腐、稳定、抗氧化、凝固的作用,可以被用于饮料制品、乳制品、酱腌菜、罐头及果脯等食品中。由于乙二胺四乙酸可与钙、镁等人体所必需的微量金属形成螯合物,长期过量摄入会在一定程度上导致人体中微量金属元素流失,对人体造成伤害,而且EDTA-Na<sub>2</sub>对眼睛、皮肤、粘膜及呼吸道会产生刺激作用,如果长期大量食用EDTA-Na<sub>2</sub>超标的食品,则对人体健康产生不良影响,因此,世界各国对于食品添加剂的EDTA-Na<sub>2</sub>均有严格的限量规定,我国食品安全标准GB2760-2014规定了EDTA-Na<sub>2</sub>作为食品添加剂的使用原则,允许使用的品种、使用范围及最大使用量或残留量。其中,最大使用量为0.25g/kg,可用于果脯、蔬菜罐头、杂粮罐头等食品类别,在允许使用EDTA-Na<sub>2</sub>作为食品添加剂的食品品种中,并不包含面粉及其制品。面粉及其制品在制作完成后会出现酶促褐变现象,影响产品营养成分和感官品质。为延缓面粉制成品的褐变过程,一些面粉生产及加工企业通常会加入EDTA-Na<sub>2</sub>、柠檬酸、抗坏血酸等多酚氧化酶抑制剂作用于多酚氧化酶上的铜离子,降低酶活性,减缓酶促褐变过程。相关法规规定,将EDTA-Na<sub>2</sub>应用于面粉及其制品中属于超范围使用。

[0003] 目前,食品中乙二胺四乙酸盐的检测方法包括气相色谱法、高效液相色谱法和液相色谱串联质谱法等;标准方法有GB5009.278-2016和SN/T 3855-2014,但是上述检测方法均不包括面粉及面粉制品中乙二胺四乙酸盐的检测。目前没有用于检测面粉及面粉制品中乙二胺四乙酸二钠的参照标准。而且,上述的乙二胺四乙酸二钠检测方法操作步骤复杂,费时,特异性差,检测灵敏度低;尤其是当待测样品中EDTA-Na<sub>2</sub>含量较低时,检测结果误差较大,准确性低。因此,迫切需要建立一种快速、准确、可靠的检测食品中乙二胺四乙酸二钠的方法。

### 发明内容

[0004] 针对现有技术中存在的问题和不足,本发明的目的是提供一种用于检测乙二胺四乙酸盐的免疫磁珠的制备方法及其制备的免疫磁珠。

[0005] 为实现发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 一种用于检测乙二胺四乙酸二钠免疫磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1)取磁珠,洗涤后用缓冲液将磁珠悬浮,得到磁珠悬液;

[0008] (2)向步骤(1)制得的磁珠悬液中加入乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液,震荡混合均匀,在10~45℃偶联活化反应20~120min,然后置于磁力架静置分层,弃上清,得到磁珠-

抗体复合物；

[0009] (3) 向步骤(2)制备的磁珠-抗体复合物中加入缓冲液使悬浮，然后再加入封闭液，室温孵育后于磁力架上静置分层，弃上清，得到免疫磁珠；

[0010] 其中，所述缓冲液为含Tween-20的Earle's BSS溶液。

[0011] 根据上述的制备方法，优选地，所述Earle's BSS溶液的pH为6.8~8.0，Earle's BSS溶液中Tween-20的浓度为0.025g/L。

[0012] 根据上述的制备方法，优选地，所述Earle's BSS溶液是由NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液，所述Earle's BSS溶液中各组分的浓度分别为：NaCl为6.8g/L，KCl为0.4g/L，Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>为0.11g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>为0.14g/L，CaCl<sub>2</sub>为0.2g/L，MgSO<sub>4</sub>为0.1g/L，葡萄糖为1.0g/L，NaHCO<sub>3</sub>为2.0g/L，Tween-20为0.025g/L。

[0013] 根据上述的制备方法，优选地，步骤(3)中所述封闭液的用量为磁珠-抗体复合物总重的10%，所述封闭液为血清蛋白溶液或卵清蛋白溶液；更加优选地，所述血清蛋白溶液的质量分数为5%，所述卵清蛋白溶液的浓度为2%。

[0014] 根据上述的制备方法，优选地，所述血清蛋白为人血清蛋白或牛血清蛋白。

[0015] 根据上述的制备方法，优选地，步骤(2)中，所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液的浓度为0.1~0.5mg/ml，所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液与磁珠悬液的体积比为1:1。更加优选地，所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液的浓度为0.1mg/ml。

[0016] 根据上述的制备方法，优选地，步骤(1)中所述洗涤的具体操作为：向磁珠中加入Earle's BSS溶液，经混合、振荡后置于磁力架上静置分层，弃上清，得到洗涤后的磁珠。更加优选地，所述洗涤次数为2~3次。

[0017] 根据上述的制备方法，优选地，所述磁珠为商品化的磁珠(羧基磁珠，已加EDC和NHS活化)；所述乙二胺四乙酸盐为乙二胺四乙酸二钠；所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体为乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体。

[0018] 根据上述的制备方法，优选地，步骤(2)中，在偶联活化反应前，需对磁珠与乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液的混合物进行水浴热处理、离心处理，离心后弃上层清液，然后用缓冲液对下层样品洗涤，洗涤后再用缓冲液对下层样品悬浮，悬浮后进行偶联活化反应；其中，所述水浴热处理的温度为40~45℃，时间为2~4min；所述离心温度为4℃，转速为6000rpm，离心时间为1min~6min；所述缓冲液为含Tween-20的Earle's BSS溶液。

[0019] 根据上述的制备方法，优选地，步骤(2)中所述乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液使用前采用孔径为0.22μm的过滤器进行过滤。

[0020] 根据上述的制备方法，优选地，步骤(2)中偶联活化的温度为37℃，时间为20min。

[0021] 根据上述的制备方法，优选地，所述Earle's BSS溶液配制方法为：称取NaCl 6.8g、KCl 0.4g、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.265g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g、葡萄糖1.0g、NaHCO<sub>3</sub> 2.0g，将上述各物质溶于800ml蒸馏水中，再加入500μL 0.05% Tween-20，用NaOH调节溶液的pH值至7.0，最后加蒸馏水定容至1L，即得Earle's BSS溶液。

[0022] 一种利用上述制备方法制备的免疫磁珠；该免疫磁珠能够用于检测乙二胺四乙酸盐。

[0023] 本发明制备的免疫磁珠用于检测乙二胺四乙酸盐的原理为：本发明制备的免疫磁

珠偶联有乙二胺四乙酸盐单克隆抗体,乙二胺四乙酸盐单克隆抗体能够与抗原(乙二胺四乙酸盐)特异性结合,将免疫磁珠与待测样品溶液混合,如果待测样品溶液中存在相应抗原,免疫磁珠就会特异性地捕获、吸附待测样品中的抗原,形成抗原-免疫磁珠复合物,然后在适当的磁场条件下分离出来,达到富集待测样品中乙二胺四乙酸盐的目的,解决了乙二胺四乙酸盐量少不易检出的问题,提高加乙二胺四乙酸盐的检出限,进一步提高了检测结果的准确性。

[0024] 与现有技术相比,本发明取得的积极有益效果为:

[0025] (1) 本发明中Earle's BSS溶液是由NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液,与传统的厄尔平衡盐溶液或PBS缓冲液相比,本发明中Earle's BSS溶液能够提供更稳定的离子环境和更强的pH缓冲能力,能够更好的保护和稳定磁珠,而且,溶液中含有 Tween-20,Tween-20能够提高磁珠与乙二胺四乙酸盐单克隆抗体的特异性结合,降低非特异性结合,提高制备的免疫磁珠的稳定性,同时Tween-20还具有良好的洗涤功效,能有效除去免疫磁珠中的杂质,制备得到的免疫磁珠杂质少,纯度高,有效避免了免疫磁珠中杂质对乙二胺四乙酸二钠检测的干扰,提高了乙二胺四乙酸二钠检测结果的准确性。

[0026] (2) 本发明在磁珠与单克隆抗体偶联活化反应结束后,向磁珠-抗体复合物中加入了血清蛋白或卵清蛋白封闭液,血清蛋白或卵清蛋白能够与磁珠结合,起到封闭磁珠的作用,能够防止制备的免疫磁珠与待测样品中蛋白类杂质结合,有效解决了利用免疫磁珠富集待测样品中乙二胺四乙酸盐时,存在免疫磁珠与待测样品中的蛋白类杂质结合,导致免疫磁珠对乙二胺四乙酸盐的富集效果差,存在杂质较多干扰乙二胺四乙酸盐的检测等问题,降低了非特异性背景对乙二胺四乙酸检测的影响,极大地提高了乙二胺四乙酸二钠检测结果的准确性。此外,血清蛋白或卵清蛋白是酶的稳定剂,能够进一步促进抗体与磁珠紧密结合,提供磁珠与抗体结合的稳定性。

[0027] (3) 本发明偶联活化处理选择在10℃~45℃偶联活化10~40min,该偶联活化条件下,能得到去除杂蛋白,得到纯度较高的免疫磁珠,而且,乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的活性高,有利于乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体与磁珠的快速特异性结合。如果偶联活化温度过高,时间过长,可能会导致单克隆抗体失活,偶联活化温度过低,单克隆抗体可能与磁珠结合不紧密,制得的免疫磁珠无法起到富集乙二胺四乙酸二钠的作用。

[0028] (4) 本发明在磁珠上偶联乙二胺四乙酸单克隆抗体,与多克隆抗体相比,偶联单克隆抗体制备的免疫磁珠具有更高的稳定性和特异性,能够快速与待测样品中的乙二胺四乙酸二钠特异性结合,达到快速富集待测样品中乙二胺四乙酸二钠的目的,提高乙二胺四乙酸二钠的检出率;而且,本发明乙二胺四乙酸单克隆抗体溶液在使用前采用微孔过滤器(0.22μm)进行过滤,减少了抗体中的杂质,使抗体更加纯化,制备得到的免疫磁珠杂质少,纯度高,有效避免了免疫磁珠中杂质对检测结果的干扰,提高了乙二胺四乙酸二钠检测结果的准确性。

[0029] (5) 本发明首先将磁珠与乙二胺四乙酸单克隆抗体混匀,然后经短暂的水浴热处理(热处理温度为40~45℃,时间为2~4min)后进行低温离心,水浴后低温快速离心处理,能够进一步除去磁珠和抗体中的杂质,使样品中的目标物更加纯净,极大地降低了制得的免疫磁珠中杂质的含量,制备得到的免疫磁珠杂质少,纯度高,有效避免了免疫磁珠中杂质对

乙二胺四乙酸二钠检测的干扰,提高了乙二胺四乙酸二钠检测的准确性。

[0030] (6) 本发明制备的免疫磁珠特异性强,灵敏度高,能够快速与待测样品溶液中的乙二胺四乙酸二钠特异性结合,达到快速富集待测样品中乙二胺四乙酸二钠的目的,解决了现有检测方法对低含量目标物检测存在的灵敏度低,检测结果不准确,误差大的问题;极大地提高了乙二胺四乙酸二钠的检出限和检测准确性。

### 具体实施方式

[0031] 以下通过具体的实施例对本发明作进一步说明,但并不限制本发明的范围。

#### 实施例1:缓冲液的筛选

[0033] 取四份200 $\mu$ L磁珠,分别置于四个离心管中,震荡1min后置于磁力架;分别向四个离心管中加入400 $\mu$ L的ddH<sub>2</sub>O、PBS、Earle's BSS溶液(pH 7.0)、碳酸盐缓冲液,再分别向每个离心管中加入200 $\mu$ L浓度为0.1mg/mL的乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体溶液,震荡混合均匀,然后将四个离心管置于振荡器上30℃反应4h,置于磁力架上静置分层,分离上层清液,用紫外分光光度计测定上层清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体浓度。其中,所述Earle's BSS溶液是由NaCl、KC1、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCL<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液,Earle's BSS溶液中各组分的浓度分别为:NaCl为6.8g/L, KC1为0.4g/L, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>为0.11g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>为0.14g/L, CaCL<sub>2</sub>为0.2g/L, MgSO<sub>4</sub>为0.1g/L, 葡萄糖为1.0g/L, NaHCO<sub>3</sub>为2.0g/L, Tween-20为0.025g/L。实验结果如表1所示。

#### 表1磁珠偶联抗体过程缓冲液的筛选

反应介质	上层清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的浓度(μg/mL)
	76.32
ddH <sub>2</sub> O	76.32
PBS 缓冲液	64.56
Earle's BSS 溶液	52.75
碳酸盐缓冲液	75.26

[0036] 由表1可知,在反应条件相同的情况下,采用不同的缓冲液作为反应介质时,磁珠与单克隆抗体的偶联量具有明显区别,其中,采用Earle's BSS溶液为反应介质时,反应4h后上清液中单克隆抗体浓度最低,这说明磁珠吸附单克隆抗体的量最多。因此,选用Earle's BSS溶液作为最佳的缓冲液。

#### 实施例2:缓冲液pH的筛选

[0038] 取四份200 $\mu$ L磁珠,分别置于四个离心管中,震荡1min后置于磁力架,分别向四个离心管中加入400 $\mu$ L pH分别为6.8、7.0、7.4、8.0的Earle's BSS溶液,再分别向每个离心管中加入200 $\mu$ L浓度为0.1mg/mL的乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体,震荡混合均匀,然后将四个离心管置于振荡器上30℃反应4h,置于磁力架上静置分层,分离上层清液,用紫外分光光度计测定上层清液中单克隆抗体浓度。其中,Earle's BSS溶液是由NaCl、KC1、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCL<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液,Earle's BSS溶液中各组分的浓度与实施例1相同。实验结果如表2所示。

[0039] 表2缓冲液最佳pH和反应时间的筛选

时间	pH				上层清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的浓度 (μg/mL)
	pH 6.8	pH 7.0	pH 7.4	pH 8.0	
[0040]	0h	100	100	100	100
	1h	83.17	82.74	87.23	86.12
	2h	67.31	60.25	65.12	66.45
	3h	64.28	56.14	60.21	61.38
	4h	59.46	52.75	56.68	57.18

[0041] 由表2可知,在单克隆抗体用量相同、反应条件相同的情况下,采用不同 pH 的 Earle's BSS 溶液作为反应介质时,磁珠与单克隆抗体的偶联量具有明显区别。在反应时间相同的情况下,以 pH 7.0 的 Earle's BSS 作为反应介质时,上清中抗体浓度均最低,这说明磁珠吸附单克隆抗体的量最多。因此,Earle's BSS 溶液的 pH 优选为 7.0。以 pH 7.0 的 Earle's BSS 作为反应介质时,反应 4h 后,上清中抗体浓度最低,但是,反应时间过长,效率低;在反应 2h 后,上清中的抗体含量仅有 60.25μg/mL,反应体系中大部分的单克隆抗体已被磁珠吸附,因此,反应时间选为 2h。

[0042] 实施例3:偶联活化反应温度的筛选

[0043] 取六份 200μL 磁珠,分别置于六个离心管中,震荡 1min 后置于磁力架,分别向六个离心管中加入 pH 7.0 的 Earle's BSS 溶液,加入量为 400μL,然后再分别向每个离心管中加入 200μL 浓度为 0.1mg/mL 的乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体,震荡混合均匀,然后将六个离心管分别置于 10℃、20℃、25℃、30℃、37℃ 和 45℃ 下反应,反应 2h 后将各离心管置于磁力架上静置分层,分离上层清液,并紫外分光光度计测定上层清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的浓度。其中,所述 Earle's BSS 溶液是由 NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、Tween-20 和水组成的混合溶液,所述 Earle's BSS 溶液中各组分的浓度分别为: NaCl 为 6.8g/L, KCl 为 0.4g/L, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 为 0.11g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 为 0.14g/L, CaCl<sub>2</sub> 为 0.2g/L, MgSO<sub>4</sub> 为 0.1g/L, 葡萄糖为 1.0g/L, NaHCO<sub>3</sub> 为 2.0g/L, Tween-20 为 0.025g/L。实验结果如表 3 所示。

[0044] 表3偶联活化反应温度筛选实验结果

温度 (°C)	上层清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的浓度 (μg/mL)
10	68.24
20	66.83
25	65.57
30	60.25
37	55.13
45	58.64

[0046] 由表3可知,不用的偶联活化反应温度,磁珠与单克隆抗体的偶联量具有明显区别。在反应时间相同的情况下,以偶联活化反应温度为37℃时,上清中抗体浓度均最低,这说明磁珠吸附单克隆抗体的量最多。因此,偶联活化反应的反应温度优选为37℃。

[0047] 实施例4:偶联活化反应时间的筛选

[0048] 取五份200μL磁珠,分别置于五个离心管中,震荡1min后置于磁力架,分别向五个离心管中加入pH 7.0的Earle's BSS溶液,加入量为400μL,然后再分别向每个离心管中加入200μL浓度为0.1mg/mL的乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体,震荡混合均匀,然后将五个离心管置于37℃分别反应20min、40min、60min、90min、120min,反应结束后将各离心管置于磁力架上静置分层,分离上层清液,用紫外分光光度计测定上清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的浓度。其中,所述Earle's BSS溶液是由NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液,所述Earle's BSS溶液中各组分的浓度与实施例1相同。实验结果如表4所示。

[0049] 表4偶联活化反应时间筛选实验结果

时间 (min)	上层清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的浓度 (μg/mL)
20	73.25
40	70.57
60	67.54
90	61.56
120	55.13

[0051] 由表4可看出,磁珠与菌液的最佳偶联活化反应时间为120min,结合时间过长或过短,都会增加非特异性反应。因此,选用120min作为磁珠偶联抗体的最佳时间。

[0052] 实施例5:乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体浓度的筛选

[0053] 取五份200μL磁珠,分别置于五个离心管中,震荡1min后置于磁力架,分别向五个离心管中加入pH 7.0的Earle's BSS溶液,加入量为400μL,然后向五个离心管中分别加入

200 $\mu$ L浓度为0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL的乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体,震荡混合均匀,40℃水浴处理3min,然后在4℃6000rpm条件下离心5min,弃上层清液,用Earle's BSS溶液洗涤下层样品两次,洗涤后再次用400 $\mu$ L Earle's BSS溶液对下层样品悬浮;然后将五个离心管置于37℃反应2h,反应结束后将各离心管置于磁力架上静置分层,弃上层清液,得到磁珠-抗体复合物;向抗体-磁珠复合物中加入400 $\mu$ L Earle's BSS溶液重悬使悬浮,然后再加入质量分数为5%牛血清蛋白溶液,牛血清蛋白溶液的加入量为抗体-磁珠复合物重量的10%,室温孵育20min后于磁力架上静置分层,弃上清,下层样品用Earle's BSS溶液洗涤重悬,得到五种免疫磁珠。其中,所述Earle's BSS溶液是由NaCl、KC1、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCL<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHC0<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液,所述Earle's BSS溶液中各组分的浓度与实施例1相同。

[0054] 上述制备的5种免疫磁珠各取100 $\mu$ L,然后向五种免疫磁珠中分别加入50 $\mu$ L乙二胺四乙酸二钠溶液(2.0 $\mu$ g/mL),室温混旋孵育20min,置于磁力架上静置分层,分离上层清液,采用GB5009.278-2016中记载的液相色谱法检测上层清液中乙二胺四乙酸二钠溶液的浓度。然后根据捕获率计算公式计算上述制备的五种免疫磁珠对乙二胺四乙酸二钠的捕获率,具体实验结果参见表5所示。

[0055] 捕获率的计算公式为:捕获率=(乙二胺四乙酸二钠初始浓度-上层清液中乙二胺四乙酸二钠浓度)/乙二胺四乙酸二钠初始浓度×100%,其中,乙二胺四乙酸二钠初始浓度为乙二胺四乙酸二钠溶液加入免疫磁珠中后形成的混合物中乙二胺四乙酸二钠的浓度(0.667 $\mu$ g/mL)。

[0056] 表5乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体筛选实验结果

乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体浓度 (mg/mL)	免疫磁珠对乙二胺四乙酸二钠的捕 获率
0.1	78.84%
0.2	72.29%
0.3	70.41%
0.4	69.54%
0.5	66.98%

[0057] [0058] 由表5可知,乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体浓度为0.1mg/mL时,制备的免疫磁珠对乙二胺四乙酸二钠的亲和力最高,对乙二胺四乙酸二钠的捕获率达到78.84%;继续增加抗体浓度,制备的免疫磁珠对乙二胺四乙酸二钠的捕获率无明显增加,表明磁珠上的抗体量饱和,因此选择0.1mg/mL作为乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的优选浓度。

[0059] 实施例6:封闭液对制备的免疫磁珠性能影响的探究

[0060] 取六支离心管,六支离心管中均加入200 $\mu$ L磁珠,震荡1min后置于磁力架,向每个离心管中加入400 $\mu$ L pH 7.0的Earle's BSS溶液和200 $\mu$ L浓度为0.1mg/mL的乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体,震荡混合均匀,40℃水浴处理3min,然后在4℃ 6000rpm条件下离心5min,弃上层清液,用Earle's BSS溶液洗涤下层样品两次,洗涤后再次用400 $\mu$ L Earle's BSS溶

CN 110687280 A

液对下层样品悬浮；然后将六个离心管置于 37℃反应2h,反应结束后将各离心管置于磁力架上静置分层,弃上层清液,得到磁珠-抗体复合物;向六个离心管的抗体-磁珠复合物中加入400μL Earle's BSS 溶液重悬使悬浮,然后向其中5个离心管中加入占抗体-磁珠复合物重量的10%的牛血清蛋白(牛血清蛋白的质量分数为5%) ,5个离心管中牛血清蛋白溶液的浓度分别为1%、3%、5%、10% ;室温孵育20min后于磁力架上静置分层,弃上清,下层样品用Earle's BSS溶液洗涤重悬,得到六种免疫磁珠。其中,所述 Earle's BSS溶液是由NaCl、KC1、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCL<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、Tween-20和水组成的混合溶液,所述 Earle's BSS溶液中各组分的浓度与实施例1相同。

[0061] 上述制备的6种免疫磁珠各取100μL,然后向六种免疫磁珠中分别加入50μL 乙二胺四乙酸二钠溶液(2.0μg/mL),室温混旋孵育20min,置于磁力架上静置分层,分离上层清液,采用GB5009.278-2016中记载的液相色谱法检测上层清液中乙二胺四乙酸二钠溶液的浓度。然后根据捕获率计算公式计算上述制备的六种免疫磁珠对乙二胺四乙酸二钠的捕获率,具体实验结果参见表6所示。

[0062] 捕获率的计算公式为:捕获率=(乙二胺四乙酸二钠初始浓度-上层清液中乙二胺四乙酸二钠浓度)/乙二胺四乙酸二钠初始浓度×100%,其中,乙二胺四乙酸二钠初始浓度为乙二胺四乙酸二钠溶液加入免疫磁珠中后形成的混合物中乙二胺四乙酸二钠的浓度(0.667μg/mL)。

[0063] 表6封闭液对制备的免疫磁珠性能的影响

封闭液加入量	封闭液浓度	免疫磁珠对乙二胺四乙酸二钠的捕获率
占抗体-磁珠复合物重量的 10%	--	38.21%
	1%	50.12%
	3%	61.38%
	5%	81.56%
	10%	67.55%

[0065] 由表6可知,不添加牛血清蛋白进行封闭的免疫磁珠,其对乙二胺四乙酸二胺的捕获率仅有38.21%,捕获率极低;采用牛血清蛋白封闭的免疫磁珠,捕获率均在50%以上,其中采用5%的牛血清蛋白进行封闭,制备的免疫磁珠对乙二胺四乙酸二钠的捕获率可达到81.56%,故选取5%的牛血清蛋白作为免疫磁珠的封闭液。

[0066] 实施例7:利用本发明制备的免疫磁珠对市售面粉制品进行检测

[0067] 取离心管中均加入200μL磁珠,震荡1min后置于磁力架,向离心管中加入 400μL pH 7.0的Earle's BSS溶液和200μL浓度为0.1mg/mL的乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体,震荡混合均匀,40℃水浴处理3min,然后在4℃6000rpm条件下离心5min,弃上层清液,用Earle's BSS溶液洗涤下层样品两次,洗涤后再次用 400μL Earle's BSS溶液对下层样品悬浮;然后将离心管置于37℃反应2h,反应结束后将离心管置于磁力架上静置分层,弃上层清液,得到磁珠-抗体复合物;向离心管的抗体-磁珠复合物中加入400μL Earle's BSS溶液重悬使悬

浮,然后再加入占抗体-磁珠复合物重量的10%的牛血清蛋白(牛血清蛋白的质量分数为5%),室温孵育20min后于磁力架上静置分层,弃上清,下层样品用Earle's BSS溶液洗涤重悬,得到免疫磁珠。

[0068] 利用上述制备的免疫磁珠对市售的面粉、面条、饺子皮等90份面粉及制品进行测定。具体的测定方法为:取5g待测样品,加入25mL无菌水,用均质机粉碎,涡旋混匀,超声20min,7500r/min离心5min,取上清液置于50mL容量瓶中。剩余残渣重复提取一次,离心后合并上清液,加水定容至50mL,得到样品待测液。取上述制备的免疫磁珠100μL置于离心管中,向其中加入1mL样品待测液,室温混旋孵育20min,孵育过程中免疫磁珠捕获样品待测液中的乙二胺四乙酸二钠形成复合物。然后,将离心管置于磁力架上磁分离3min(在外加磁场的作用下分离的免疫磁珠和免疫磁珠-乙二胺四乙酸二钠复合物聚集在离心管壁上形成沉淀),弃上层清液,收集下层样品,采用GB5009.278-2016中的液相色谱法进行检测下层样品中乙二胺四乙酸二钠或其钠盐的含量。经检测发现,90份待测样品中,有2份面粉检出乙二胺四乙酸二钠,其含量为10~18mg/kg;1份面条和一份饺子皮中均检出乙二胺四乙酸二钠,含量为20mg/kg;其余样品中未检出。由此说明,采用本发明制备的免疫磁珠能有效富集待测样品(尤其是一些难以直接采用GB5009.278-2016中规定方法直接检测的样品)中乙二胺四乙酸二钠,并用于乙二胺四乙酸二钠的检测,极大地提高了待测样品中乙二胺四乙酸二钠盐的检出限和检测准确性。

[0069] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,但不仅限于上述实例,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种用于检测乙二胺四乙酸盐的免疫磁珠的制备方法及其制备的免疫磁珠		
公开(公告)号	<a href="#">CN110687280A</a>	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201910970803.2	申请日	2019-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	河南省商业科学研究所有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	河南省商业科学研究所有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	河南省商业科学研究所有限责任公司		
[标]发明人	周莉 陈世伟 朱海华 王晓瑞 杜瑞 平洋 谭静 闫格 王珂 李远远		
发明人	周莉 陈世伟 朱海华 王晓瑞 杜瑞 平洋 谭静 闫格 王珂 李远远		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	周玉青		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明属于化学检测技术领域，公开了一种用于检测乙二胺四乙酸盐免疫磁珠的制备方法及制备的免疫磁珠。免疫磁珠制备方法如下：(1)取磁珠，洗涤后用缓冲液悬浮，得到磁珠悬液；(2)向磁珠悬液中加入乙二胺四乙酸盐单克隆抗体溶液，震荡混匀，10~45°C偶联活化20~120min，然后置于磁力架静置分层，弃上清，得到磁珠-抗体复合物；(3)向磁珠-抗体复合物中加入缓冲液使悬浮，再加入封闭液，室温孵育后于磁力架上静置分层，得到免疫磁珠。本发明制备的免疫磁珠特异性强，灵敏度高，能快速与待测样品溶液中的乙二胺四乙酸盐特异性结合，快速富集待测样品中乙二胺四乙酸盐，极大地提高了乙二胺四乙酸盐的检出限和检测准确性。

反应介质	上层清液中乙二胺四乙酸二钠单克隆抗体的浓度(μg/mL)
ddH <sub>2</sub> O	76.32
PBS 缓冲液	64.56
Earle's BSS 溶液	52.75
碳酸盐缓冲液	75.26

