



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680673 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201210171169. 4

WO 2008130977 A2, 2008. 10. 30, 全文.

(22) 申请日 2012. 05. 29

刘伟伟 等. 超顺磁性免疫磁珠体系用于植物油中黄曲霉毒素 B1 的检测研究. 《分析测试学报》. 2011, 第 30 卷 (第 12 期), 1345-1350.

(73) 专利权人 西安金磁纳米生物技术有限公司  
地址 710077 陕西省西安市高新区丈八五路  
2 号现代企业中心东区 3 栋 4 层 10402A

审查员 胡晓佳

(72) 发明人 崔亚丽 王艳霞 张秦鲁

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限公司 61211

代理人 陈广民

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 1/28 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102086225 A, 2011. 06. 08, 摘要, 说明书  
第 3-25, 35-39 段, 实施例 1.

CN 101780284 A, 2010. 07. 21, 全文.

CN 101975808 A, 2011. 02. 16, 全文.

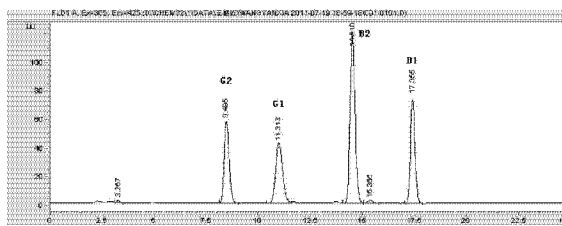
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒及其制备和应用方法

(57) 摘要

本发明的目的在于提供用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒及其制备、应用方法, 以解决背景技术中黄曲霉毒素样品净化分离操作复杂、分离效率低、存在较大的安全隐患的技术问题。本发明将黄曲霉毒素抗体与磁性微粒共同反应一段时间后, 制备出具有特异性的免疫磁性微粒。将粗提取的黄曲霉毒素与免疫磁性微粒共同反应一段时间后, 即可实现黄曲霉毒素亲和吸附到免疫磁性微粒表面。经磁性分离后, 即可实现将黄曲霉毒素样本净化得到相对纯的黄曲霉毒素样本, 进一步用于荧光光度计、HPLC 和 ELISA 检测。



1. 一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒,其特征在于:1)所述免疫磁性微粒以粒径在 20nm~200nm 并具有超顺磁性的磁性复合微粒为载体,黄曲霉毒素单克隆抗体为配基;2)磁性复合微粒末端具有苯异硫氰酸根基团;3)磁性微粒经共价反应或亲和作用与黄曲霉毒素抗体连接;4)磁性复合微粒的饱和磁化强度大于 30emu/g。

2. 一种制备如权利要求 1 所述免疫磁性微粒的方法,包括以下步骤:

a. 黄曲霉毒素抗体在异硫氰酸根磁性磁微粒表面固定

取磁性微粒悬液加入到离心管中,轻摇重悬;置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;加入偶联缓冲液,轻摇重悬;将离心管置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清后备用;

取黄曲霉毒素抗体配制得到浓度为 0.3~2mg/ml 的抗体溶液,取适量加入磁性微粒中,使磁性微粒和黄曲霉毒素抗体反应浓度为 0.5~5mg/ml 使得抗体达到最大偶联率,在摇床中反应;反应完毕,磁性分离,弃上清;加入清洗缓冲液,轻摇重悬磁粒;磁性分离,弃上清,除去非特异性吸附在磁性微粒表面的黄曲霉毒素抗体,得到免疫磁性微粒粗品;

b. 磁性微粒的封闭

在步骤 a 得到的免疫磁性微粒粗品中加入封闭剂,在摇床中反应,封闭免疫磁性微粒粗品上未与黄曲霉毒素抗体结合的位点;用清洗缓冲液多次清洗,最后悬于保存缓冲液中,2~8℃保存,即制得免疫磁性微粒。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于:所述偶联缓冲液为 0.01~0.1M,PH7.0~7.6 的 PBS 缓冲液或 0.02~0.2M,pH7.0~7.6 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液;清洗缓冲液是含 0.05%吐温的 0.01~0.1M,pH7.4 的 PBS 缓冲液或 0.02~0.2M,pH7.0~7.6 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液;封闭剂是含 5~10%脱脂奶 1~10%牛血清白蛋白 BSA,或 1~5%小牛血清,或 1~5%的聚乙二醇的的偶联缓冲液;保存缓冲液是含 0.1%叠氮钠和 0.1~1%BSA 的 0.01~0.1M,PH7.4 的 PBS 缓冲液。

4. 一种净化黄曲霉毒素样本的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)按照权利要求 2 所述的制备方法制得免疫磁性微粒;

2)免疫磁性微粒捕获黄曲霉毒素

a. 样本中黄曲霉毒素的提取

取样本溶于甲醇-水、或者乙腈-水中,充分提取,提取液经过滤后以 PBS 稀释;

b. 取步骤 1)制得的免疫磁性微粒,磁性分离,弃上清,再加入捕获缓冲液,满足最大限度捕获样品中的黄曲霉毒素;轻摇重悬,磁性分离,弃上清;加入稀释后的黄曲霉毒素样本,在摇床中 37℃,180r/min 反应 10~15min;免疫磁性微粒捕获黄曲霉毒素完成后,再经磁性分离,从而实现黄曲霉毒素样本的净化;去除磁性分离后的上清,沉淀即为捕获了黄曲霉毒素的免疫磁性微粒;

本步骤中采用的捕获缓冲液为 pH6.5~7.6 的 1×PBS 缓冲液;

3)磁性微粒的洗脱

向步骤 2)中得到的免疫磁性微粒中加入洗脱液进行洗脱,室温震荡,磁性分离,上清即为净化后的黄曲霉毒素样本。

5. 根据权利要求 4 所述的净化黄曲霉毒素样本的方法,其特征在于:步骤 2)b 中,加入稀释后的黄曲霉毒素样本,在摇床中 37℃,180r/min 反应 10min。

6. 根据权利要求 4 所述的净化黄曲霉毒素样本的方法,其特征在于:步骤 3)中所述

洗脱液采用甲醇或乙腈,免疫磁性微粒在洗脱液中的浓度为 0.01 ~ 20mg/ml ;室温震荡 0.5 ~ 3min。

## 一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒及其制备和应用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及黄曲霉毒素样本的净化处理工艺,具体涉及一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒及其制备、应用方法。

### 背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(AFT)是真菌的次级代谢产物,主要由黄曲霉、寄生曲霉和特曲霉产生,广泛存在土壤,动植物,各种坚果,特别是花生和核桃中。黄曲霉毒素主要有4种:即B1、B2、G1、G2,其中B1被认为是目前化学致癌物中最强的一种致癌剂和诱变剂。为了防止被AFT污染的食品进入人类消费链中,及时检测将是一种有效的手段。

[0003] 目前测定黄曲霉毒素(AFT)的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附测定法、质谱法、放射免疫测定法、荧光光度法、层析试纸条法、化学发光和电化学发光法等。现在应用很普遍的高效液相色谱法和酶联免疫吸附法都存在样品前处理的问题,尤其是一些样本很难处理,如坚果类、花生、谷物、中药等。现在市场上卖的免疫亲和柱价格昂贵,而且单位体积柱容量相对较低,样品处理能力有限,样品处理量也相对固定,同时柱子容易堵塞。

[0004] 现有的黄曲霉毒素样品的净化方法存在以下不足:

[0005] 1、存在安全很大的安全问题,提取黄曲霉毒素需要使用多种有毒、异味、易挥发的有机溶剂,同时黄曲霉毒素本身就是剧毒物质,而目前的免疫亲和柱操作比较繁琐,需要操作者的实时操作,所以存在带来很大的安全问题。

[0006] 2、样品处理容量比较低而且受规格限制不能根据需要做调整。目前黄曲霉毒素免疫亲和柱多是1ml和3ml两种规格。

[0007] 3、免疫亲和柱制备和样品净化操作步骤繁琐同时样品粗体要求比较高,如免疫亲和柱很容易因为样品颗粒较大而造成堵塞,同时在提取时要过0.2或0.45微米的滤膜。

[0008] 4、免疫亲和柱对不同样品的净化处理效果差别比较大,有的样品回收率不到70%,如一些中药中的黄曲霉毒素。

### 发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒及其制备、应用方法,以解决背景技术中黄曲霉毒素样品净化分离操作复杂、分离效率低、存在较大的安全隐患的技术问题。

[0010] 本发明的技术解决方案是:

[0011] 一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒,其特殊之处在于:所述免疫磁性微粒以粒径在20nm-200nm并具有超顺磁性的磁性复合微粒为载体,黄曲霉毒素单克隆抗体为配基;磁性复合微粒末端具有有反应活性的氨基/羧基/巯基/苯异硫氰酸根(等可与蛋白质反应的)基团,或者磁性复合微粒是具有类似胶体金可与蛋白质亲和结合的性质

的磁性复合微粒；磁性微粒经共价反应或亲和作用与黄曲霉毒素抗体连接；磁性复合微粒的饱和磁化强度大于 30emu/g。

[0012] 一种制备上述免疫磁性微粒的方法，包括以下步骤：

[0013] a. 黄曲霉毒素抗体在异硫氰酸根磁性微粒表面固定

[0014] 取磁性微粒悬液加入到离心管中，轻摇重悬；置于磁性分离器上，磁性分离，弃上清；加入偶联缓冲液，轻摇重悬；将离心管置于磁性分离器上，磁性分离，弃上清后备用；

[0015] 取黄曲霉毒素抗体配制得到浓度为 0.3 ~ 2mg/ml 的抗体溶液，取适量加入磁性微粒中，使磁性微粒和黄曲霉毒素抗体反应浓度为 0.5-5mg/mL 使得抗体达到最大偶联率，在摇床中反应；反应完毕，磁性分离，弃上清；加入清洗缓冲液，轻摇重悬磁粒；磁性分离，弃上清，除去非特异性吸附在磁性微粒表面的黄曲霉毒素抗体，得到免疫磁性微粒粗品；

[0016] b. 磁性微粒的封闭

[0017] 在步骤 a 得到的免疫磁性微粒粗品中加入封闭剂，在摇床中反应，封闭免疫磁性微粒粗品上未与黄曲霉毒素抗体结合的位点；用清洗缓冲液多次清洗，最后悬于保存缓冲液中，2 ~ 8℃ 保存，即制得免疫磁性微粒。

[0018] 上述制备免疫磁性微粒的方法中，偶联缓冲液优选 PH 7.4 的 0.01 ~ 0.1M 的 PBS 缓冲液或 0.02 ~ 0.2M, pH7.0 ~ 7.6 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液；清洗缓冲液优选含 0.05% 吐温的 0.01 ~ 0.1M, pH 7.4 的 PBS 或 0.02 ~ 0.2M, pH7.0 ~ 7.6 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液；封闭剂优选含 5 ~ 10% 脱脂奶 5 ~ 10% 脱脂奶或 1 ~ 10% 牛血清白蛋白 BSA, 或 1 ~ 5% 小牛血清, 或 1 ~ 5% 的聚乙二醇的偶联缓冲液；保存缓冲液优选含 0.1% 叠氮钠和 0.1% BSA 的 0.01 ~ 0.1M, PH 7.4 的 PBS 缓冲液。

[0019] 基于上述免疫磁性微粒的净化黄曲霉毒素样本的方法，包括以下步骤：

[0020] 1) 按照权利要求 2 所述的制备方法制得免疫磁性微粒；

[0021] 2) 免疫磁性微粒捕获黄曲霉毒素

[0022] a. 样本中黄曲霉毒素的提取

[0023] 取样本溶于甲醇 - 水、或者乙腈 - 水中，充分提取，提取液经过滤后以 PBS 稀释；

[0024] b. 取步骤 1) 制得的免疫磁性微粒，磁性分离，弃上清，再加入捕获缓冲液，满足最大限度捕获样品中的黄曲霉毒素；轻摇重悬，磁性分离，弃上清；加入稀释后的黄曲霉毒素样本，在摇床中 37℃, 180r/min 反应 10 ~ 15min；免疫磁性微粒捕获黄曲霉毒素完成后，再经磁性分离，从而实现黄曲霉毒素样本的净化；去除磁性分离后的上清，沉淀即为捕获了黄曲霉毒素的免疫磁性微粒；

[0025] 本步骤中采用的捕获缓冲液为 pH6.5 ~ 7.6 的 1×PBS 缓冲液，以 pH6.5 最佳；

[0026] 3) 磁性微粒的洗脱

[0027] 向步骤 2) 中得到的免疫磁性微粒中加入洗脱液进行洗脱，室温震荡，磁性分离，上清即为净化后的黄曲霉毒素样本。（将净化后的样本冻存，以便于采用 HPLC 或 ELISA 进一步完成检测。）

[0028] 上述步骤 2)b 中，加入稀释后的黄曲霉毒素样本，在摇床中 37℃, 180r/min 反应 10min, 此条件下反应最佳。

[0029] 上述步骤 3) 中所述洗脱液采用甲醇或乙腈，免疫磁性微粒在洗脱液中的浓度一般采用 0.01 ~ 20mg/ml；室温震荡 0.5-3min 较为适宜。（免疫磁性微粒在洗脱液中的浓度

以 10mg/ml 最佳 ;若洗脱液太少,则洗脱时间延长并且洗脱也不充分 ;若太多,则降低检测线同时浪费洗脱液 ;室温震荡以 1min 最佳,将毒素最大限度地洗脱下来。)

[0030] 若本发明的免疫磁性微粒以末端具有有反应活性的氨基或羧基或巯基的磁性微粒作为载体,由于其特性相似,经试验,这几种免疫磁性微粒的制备和应用方法也可以参照以上(免疫异硫氰酸根磁性磁微粒)的方法,仅适应性调整偶联缓冲液、封闭剂即可。具体的优化选择如下:

[0031] 偶联缓冲液用 0.02 ~ 0.2M, pH7.0 ~ 7.6 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液比较好,封闭剂用 1 ~ 10% 小牛血清和 1 ~ 5% 的聚乙二醇的偶联缓冲液比较好。

[0032] 本发明的优点是:

[0033] 1、黄曲霉毒素样品净化效率高。因为磁性微粒具有较大的比表面积,所以具有固定化容量高的优点。由于磁性微粒对生物分子的固定化容量很高,使得利用此种固定了目的生物大分子抗体的磁性微粒对黄曲霉毒素的分离效率很高。

[0034] 2、黄曲霉毒素净化分离过程简单便捷。本发明方法只需要对样品进行简单的前处理(较免疫亲和柱),即可进行相应黄曲霉毒素样品的净化步骤;而且本发明方法不需要对所用的载体基质即磁性微粒进行使用前的活化处理及离心操作,可直接使用,操作方便快捷,缩短了去除所需时间,也无需使用昂贵的实验仪器。亦可根据实验需要调整反应体积,整个净化过程在 15min 内完成。

[0035] 3、黄曲霉毒素净化正确性和可靠性强,采用单克隆抗体免疫技术,可以特效性地将黄曲霉毒素或其它真菌毒素分离出来,分离效率和回收率高达 80% ~ 95% (不同的样本回收率不同),尤其对难处理的身无样本,比如中药、坚果等中的黄曲霉毒素样本。

[0036] 4、黄曲霉毒素净化操作过程安全,本发明对样品处理简单,减少了有毒提取物对操作者的伤害和污染环境。黄曲霉毒素样本净化处理也是在封闭的反应容器中进行,最大限度的避免了黄曲霉毒素与人和操作者的接触。

## 附图说明

[0037] 图 1 :HPLC 评价黄曲霉毒素花生样品净化结果图。

## 具体实施方式

[0038] 本发明以磁性微粒为载体,黄曲霉毒素单克隆抗体为亲和配基,制备出一种免疫磁性微粒。这种免疫磁性微粒可用于黄曲霉毒素样本的净化处理,以用于后续的荧光光度计、HPLC 和 ELISA 检测。磁性微粒是指粒径在 20nm ~ 200 μ m,具有超顺磁性和高比表面积的复合微粒。样本指所有含有黄曲霉毒素的食品、中药等样本。

[0039] 本发明将黄曲霉毒素抗体与磁性微粒共同反应一段时间后,制备出具有特异性的免疫磁性微粒。将粗提取的黄曲霉毒素与免疫磁性微粒共同反应一段时间后,即可实现黄曲霉毒素亲和吸附到免疫磁性微粒表面。经磁性分离后,即可实现将黄曲霉毒素样本净化得到相对纯的黄曲霉毒素样本,进一步用于荧光光度计、HPLC 和 ELISA 检测。

[0040] 以下实施例对本发明的方案以具体实验操作的形式示例,其中的实验条件和设定参数不应视为对本发明基本技术方案的局限。

[0041] 实施例 1 样本中净化黄曲霉毒素免疫磁性微粒的制备过程,及其对样本中黄曲霉

### 毒素的净化的具体过程

[0042] 1) 免疫磁性微粒的制备：

[0043] a. 黄曲霉毒素单克隆抗体在异硫氰酸根磁性磁微粒表面固定：取 1mg 磁性微粒悬液加入到一个 2ml 容量的离心管中，轻摇重悬。置于磁性分离器上，磁性分离，弃上清。加入 1ml 偶联缓冲液 (0.01M, PH 7.4 的 PBS 缓冲液)，轻摇重悬。置于磁性分离器上，磁性分离，弃上清。重复操作一次。将黄曲霉毒素单克隆抗体 250  $\mu$ g，配置成浓度为一定浓度的溶液 (0.01 ~ 10mg/ml)，取适宜的量加入磁性微粒中，在摇床中 37 $^{\circ}$ C, 180r/min 反应 45min。反应完毕，磁性分离，弃上清。加入 1ml 清洗缓冲液 (含 0.05%吐温的 pH 7.4 的 PBS 缓冲液)，轻摇重悬磁粒。磁性分离，弃上清。

[0044] b. 磁性微粒的封闭：在上一步的磁粒中加入 1ml 的封闭剂 (含 5%脱脂奶的偶联缓冲液)，在摇床中 37 $^{\circ}$ C, 180r/min 反应 2h。用 2ml 的上述清洗缓冲液清洗 3 次，最后悬于 1ml 保存缓冲液 (含 0.1%  $\text{NaN}_3$  和 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液) 中，2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0045] 2) 免疫磁性微粒捕获黄曲霉毒素

[0046] a. 样本中黄曲霉毒素的提取：取样本 5g，溶于 25mL 甲醇-水，或者乙腈-水提取，提取液经过滤后以 PBS 稀释。

[0047] b. 将 1) 步骤中的磁性微粒磁性分离，弃上清。加入 1ml 的捕获缓冲液 (pH6.5 的 1 $\times$ PBS 缓冲液)，轻摇重悬金磁微粒，磁性分离，弃上清。加入 a 步骤中的黄曲霉毒素样本，在摇床中 37 $^{\circ}$ C, 180r/min 反应 10min。免疫磁性微粒捕获黄曲霉毒素完成后，再经磁性分离，从而实现黄曲霉毒素样本的净化。去除磁性分离后的上清，沉淀即为捕获了黄曲霉毒素的免疫磁性微粒。

[0048] 3) 磁性微粒的洗脱：向步骤 2) 中得到的免疫磁性微粒中加入 100  $\mu$ l 洗脱液 (甲醇)，室温震荡 1min，磁性分离，上清即为净化后的黄曲霉毒素样本。将净化后的样本保存于 -20 $^{\circ}$ C，以备荧光光度计、HPLC 或 ELISA 进一步检测。如图 1 可以看出用免疫磁粒净化的花生中黄曲霉毒素具有很高的纯度，同时具有很高的回收率 92.5%，同时具有很高的灵敏度 (0.01ng/ml)。

[0049] 若本发明的免疫磁性微粒以末端具有有反应活性的氨基或羧基或巯基的磁性微粒作为载体，由于其特性相似，经试验，这几种免疫磁性微粒的制备和应用方法也可以参照以上实施例 (免疫异硫氰酸根磁性磁微粒) 的方法，仅适应性调整偶联缓冲液、封闭剂即可。具体的优化选择如下：

[0050] 偶联缓冲液用 0.02 ~ 0.2M, pH7.0 ~ 7.6 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液比较好，封闭剂用 1 ~ 10%小牛血清和 1 ~ 5%的聚乙二醇的偶联缓冲液比较好。

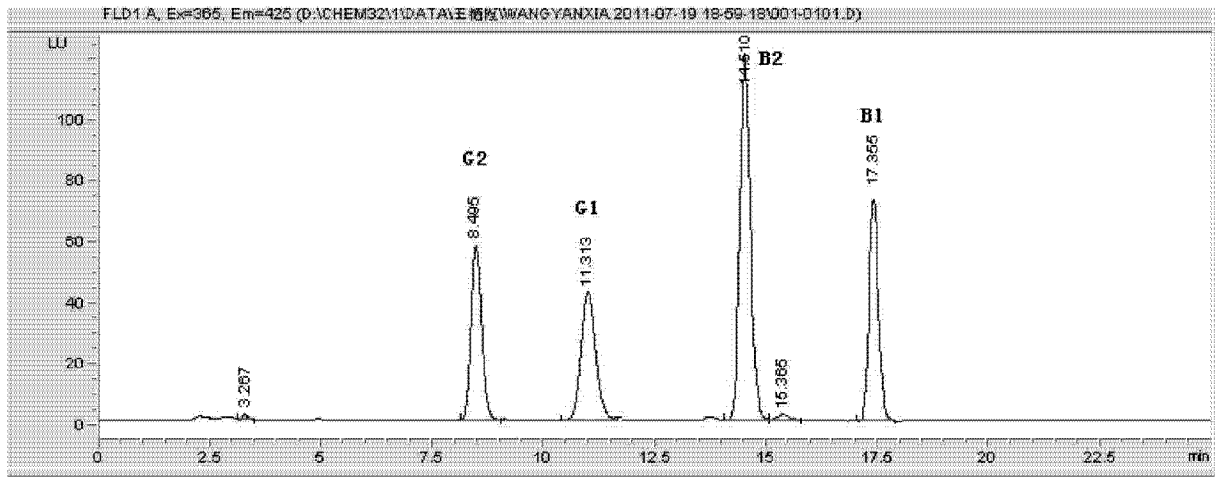


图 1

专利名称(译)	一种用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒及其制备和应用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102680673B</a>	公开(公告)日	2014-06-25
申请号	CN201210171169.4	申请日	2012-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
[标]发明人	崔亚丽 王艳霞 张秦鲁		
发明人	崔亚丽 王艳霞 张秦鲁		
IPC分类号	G01N33/531 G01N1/28		
代理人(译)	陈广民		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN102680673A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的目的在于提供用于净化黄曲霉毒素样本的免疫磁性微粒及其制备、应用方法，以解决背景技术中黄曲霉毒素样品净化分离操作复杂、分离效率低、存在较大的安全隐患的技术问题。本发明将黄曲霉毒素抗体与磁性微粒共同反应一段时间后，制备出具有特异性的免疫磁性微粒。将粗提取的黄曲霉毒素与免疫磁性微粒共同反应一段时间后，即可实现黄曲霉毒素亲和吸附到免疫磁性微粒表面。经磁性分离后，即可实现将黄曲霉毒素样本净化得到相对纯的黄曲霉毒素样本，进一步用于荧光光度计、HPLC和ELISA检测。

