



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107132346 A

(43)申请公布日 2017.09.05

(21)申请号 201710366724.1

(22)申请日 2017.05.23

(71)申请人 天津农学院

地址 300384 天津市西青区津静路22号

(72)发明人 张爱琳 钟凯 樊秀花 张登科

(74)专利代理机构 北京鼎佳达知识产权代理事务
所(普通合伙) 11348

代理人 王伟锋 刘铁生

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

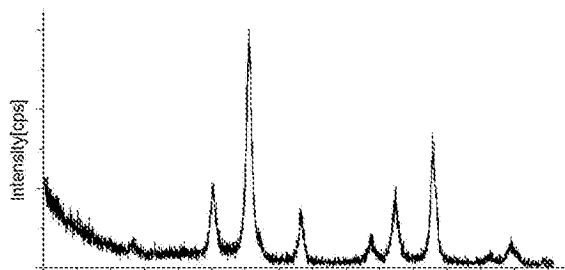
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明是一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用。一种四氧化三铁免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:(1)制备纳米磁珠;(2)纳米磁珠的表面修饰;(3)免疫磁珠的制备。本发明还公布了该四氧化三铁免疫纳米磁珠的应用。本发明所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,该制备方法可以不受氮气的限制,并改善了 Fe_3O_4 的磁学性质;通过对 Fe_3O_4 纳米磁珠表面进行改性,制成磁性高分子微球,与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠,增加了免疫纳米磁珠的种类和制备方法;使免疫磁珠与酶联免疫法结合,无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备,成本低,可以有效检测坚果过敏蛋白,提高预测与评估交叉过敏反应的准确性。



1. 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备纳米磁珠:

将 Fe^{2+} 的铁盐和 Fe^{3+} 的铁盐溶解于水中,得铁盐溶液;所述 Fe^{2+} 的铁盐中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的铁盐中 Fe^{3+} 的摩尔比为1:1-2;

在65-75°C的温度下,先超声铁盐溶液4-6分钟,再加入过量的氢氧化钠溶液并搅拌25-35分钟,再静置晶化2-3小时,得四氧化三铁沉淀;

通过磁分离将四氧化三铁沉淀分离出来,先用蒸馏水洗涤2-3次,再无水乙醇洗涤2-3次,得四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液;

(2) 纳米磁珠的表面修饰:

将四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液用无水乙醇稀释5-7倍,得稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液;

超声振荡稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液25-35分钟后,加入硅烷化试剂,室温下搅拌6-8小时,磁分离,得硅烷化四氧化三铁纳米磁珠;所述硅烷化试剂为APTES;

用无水乙醇溶液洗涤硅烷化四氧化三铁纳米磁珠2-3次,得到硅烷化四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液;

再用PBS缓冲液洗涤硅烷化四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液2-3次,得磁珠混合液;

向磁珠混合液中加入戊二醛溶液,室温下振荡交联1.5-2.5小时,再磁分离,弃去上清液,得氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液混合液;

(3) 免疫磁珠的制备:

用抗体包被氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液混合液,室温下振荡固定1.5-2.5小时,磁分离,得包被后的氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液,用蒸馏水和PBS缓冲液分别洗涤3-4次,得四氧化三铁免疫纳米磁珠;所述抗体为坚果过敏小鼠阳性血清。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,其中,

所述步骤(1)中,铁盐溶液中 Fe^{2+} 的摩尔浓度为0.2-0.35mol/L, Fe^{3+} 的摩尔浓度为0.2-0.4mol/L;

所述氢氧化钠溶液的摩尔浓度为0.5-1mol/L。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,其中,

所述 Fe^{2+} 的铁盐为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fe^{3+} 的铁盐为 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,其中,

所述步骤(2)中,所述APTES与稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为1:350-400;

所述戊二醛溶液的用量为硅烷化四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液的3-5倍。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,其中,

所述戊二醛溶液的体积分数为3-7%。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,其中,

所述步骤(3)中,抗体与氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液的体积比0.8-1.2:1。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,其中,

所述步骤(3)中,抗体的稀释度为1:600-1000。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,其中,所述抗体的稀释度为1:800。
9. 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠的应用,其特征在于,包括:
采用酶联免疫竞争法检测抗原;其中,所述抗原为坚果过敏蛋白,所述第一抗体为四氧化三铁免疫纳米磁珠。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,其中,所述第二抗体为羊抗鼠IgE-HRP抗体。

一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫纳米磁珠的技术领域,具体涉及一种 Fe_3O_4 免疫纳米磁珠及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 随着食品行业的快速发展,环境污染加剧,过敏食物越来越多,食品过敏的发病率和流行情况日益加剧,食品过敏性疾病已成为一个新兴的、公众性、全球性的健康问题。其中,坚果类制品的过敏更是占有很大的比重,因坚果类食品具有极高的营养价值及独特的风味,作为疗效食品和休闲食品深受消费者的喜爱,但是坚果类食品过敏涉及食物过敏症的90%。因此在食品标签上标清过敏原的存在是避免过敏患者食入潜在过敏原的最有效途径,坚果过敏原的检测是有必要的。现有的检测方法基本上都是通过前期的分离与富集后,再通过生物传感器法、质谱分析方法,进而确认靶标蛋白,检测速度慢,对设备要求高,成本高。

[0003] 纳米磁珠因其独特的磁学特性,如超顺磁性和高矫顽力,在生物医学领域具有广阔的应用前景而备受关注。纳米磁珠在细胞分离、固定化酶、免疫诊断及肿瘤靶向治疗、DNA分离及核酸杂交等方面均有广泛应用,其中将纳米磁珠和抗体结合制成免疫磁珠,因其在免疫检测、细胞分离和生物大分子纯化等方面的应用,受到人们的广泛研究。免疫磁珠(Immunomagnetic Beads, IMB)是表面包被有抗体(或配体)的磁性微球。免疫磁珠主要由载体微球和免疫配基两部分组成。载体微球包括金属小颗粒组成的核心和包裹在核心外层起修饰作用的高分子材料(如:聚苯乙烯、氨基硅烷化试剂、戊二醛等),最外层为功能基团即免疫配基,一般包括抗原、抗体、生物酶、细胞、凝集素、金属离子及有机物等。免疫磁珠的制备过程中,人们做了大量的研究。1979年,John Ugelstad等成功地制备了一种均匀性和粒度适宜的聚苯乙烯微球,将其磁化并与抗体连接后,成为一种分离细胞效果极佳的免疫磁珠—Dynabeads。迄今,我国尚没有生产高质量免疫磁珠的能力,而进口磁珠的价格昂贵,因而限制了免疫磁珠在我国生物医学研究领域中的应用。其次,免疫磁珠制备难度较大,要获得均一、球形、超顺磁性且易于结合蛋白的磁珠很难,但是随着科学的发展,免疫磁珠在整个医学领域尤其是临床上的作用会越来越大。

[0004] 在众多的纳米材料中, Fe_3O_4 纳米颗粒以其优良的性质和广泛地应用而备受关注。 Fe_3O_4 纳米颗粒的制备方法主要包括共沉淀法、热分解法等。其中,共沉淀法是在有两种或多种阳离子的溶液中加入沉淀剂,这种多元体系的溶液经过沉淀反应后,可以得到成分均一的沉淀。目前最普遍使用的方法是按方程式: $\text{Fe}^{2+}+2\text{Fe}^{3+}+8\text{OH}^-=\text{Fe}_3\text{O}_4\downarrow+4\text{H}_2\text{O}$ 为原理进行的,按照一定摩尔比例配置 Fe^{2+} , Fe^{3+} 的水溶液,向其中加入过量NaOH溶液作为沉淀剂,在一定条件下制成 Fe_3O_4 纳米磁珠。但是制备过程中要在氮气气体的保护下才可进行,具有一定的限制性,制备出的纳米磁珠饱和磁化强度低。

[0005] 有鉴于此,有必要提出一种新的 Fe_3O_4 免疫纳米磁珠及其制备方法和应用。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法,该方法可以不受双氧水或氮气的限制,改善了 Fe_3O_4 纳米磁珠的磁学性质,通过对纳米磁珠的表面修饰,与坚果过敏性血清抗体结合可以制成免疫磁珠。

[0007] 为了实现上述目的,所采用的技术方案是:

[0008] 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 制备纳米磁珠:

[0010] 将 Fe^{2+} 的铁盐和 Fe^{3+} 的铁盐溶解于水中,得铁盐溶液;所述 Fe^{2+} 的铁盐中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的铁盐中 Fe^{3+} 的摩尔比为1:1-2;

[0011] 在65-75℃的温度下,先超声铁盐溶液4-6分钟,再加入过量的氢氧化钠溶液并搅拌25-35分钟,再静置晶化2-3小时,得四氧化三铁沉淀;

[0012] 通过磁分离将四氧化三铁沉淀分离出来,先用蒸馏水洗涤2-3次,再无水乙醇洗涤2-3次,得四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0013] (2) 纳米磁珠的表面修饰:

[0014] 将四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液用无水乙醇稀释5-7倍,得稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0015] 超声振荡稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液25-35分钟后,加入硅烷化试剂,室温下搅拌6-8小时,磁分离,得硅烷化四氧化三铁纳米磁珠;所述硅烷化试剂为APTES;

[0016] 用无水乙醇溶液洗涤硅烷化四氧化三铁纳米磁珠2-3次,得到硅烷化四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0017] 再用PBS缓冲液洗涤硅烷化四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液2-3

[0018] 次,得磁珠混合液;

[0019] 向磁珠混合液中加入戊二醛溶液,室温下振荡交联1.5-2.5小时,再磁分离,弃去上清液,得氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液混合液;

[0020] (3) 免疫磁珠的制备:

[0021] 用抗体包被氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液混合液,室温下振荡固定1.5-2.5小时,磁分离,得包被后的氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液,用蒸馏水和PBS缓冲液分别洗涤3-4次,得四氧化三铁免疫纳米磁珠;所述抗体为坚果过敏小鼠阳性血清。

[0022] 进一步的,所述步骤(1)中,铁盐溶液中 Fe^{2+} 的摩尔浓度为0.2-0.35mol/L, Fe^{3+} 的摩尔浓度为0.2-0.4mol/L;

[0023] 所述氢氧化钠溶液的摩尔浓度为0.5-1mol/L。

[0024] 再进一步的,所述 Fe^{2+} 的铁盐为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fe^{3+} 的铁盐为 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

[0025] 进一步的,所述步骤(2)中,所述APTES与稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为1:350-400;

[0026] 所述戊二醛溶液的用量为硅烷化四氧化三铁纳米磁珠无水乙醇混合液的3-5倍。

[0027] 再进一步的,所述戊二醛溶液的体积分数为3-7%。

[0028] 进一步的,所述步骤(3)中,抗体与氨基化四氧化三铁纳米磁珠混合液的体积比0.8-1.2:1。

- [0029] 再进一步的,所述步骤(3)中,抗体的稀释度为1:600-1000。
- [0030] 再进一步的,所述抗体的稀释度为1:800。
- [0031] 本发明还有一个目的,在于提供上述四氧化三铁免疫纳米磁珠的应用,该应用可以有效检测坚果过敏蛋白。
- [0032] 为了实现上述目的,所采用的技术方案是:
- [0033] 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠的应用,其特征在于,包括:
- [0034] 采用酶联免疫竞争法检测抗原;其中,所述抗原为坚果过敏蛋白,所述第一抗体为四氧化三铁免疫纳米磁珠。
- [0035] 进一步的,所述第二抗体为羊抗鼠IgE-HRP抗体。
- [0036] 与现有技术相比,有益效果在于:
- [0037] 1、本发明所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法,该方法可以不受氮气的限制,制得的四氧化三铁纳米磁珠具有很高的饱和磁化强度,还提高了四氧化三铁的磁响应性,并显示出弱铁磁性特点,改善了四氧化三铁的磁学性质。
- [0038] 2、本发明所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法,该方法对四氧化三铁纳米磁珠表面进行改性,从而制成磁性高分子微球,与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠,增加了免疫纳米磁珠的种类和制备方法。
- [0039] 3、本发明所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠的应用,使免疫磁珠与酶联免疫法结合,无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备,成本低,可以有效检测坚果过敏蛋白,提高预测与评估交叉过敏反应的准确性,为我国食物过敏原标签标识制度的实施提供了检测技术方法。

附图说明

- [0040] 图1为实施例2中步骤(1)得到的 Fe_3O_4 纳米磁珠的X射线衍射图谱。
- [0041] 图2为实施例4中步骤(1)得到的 Fe_3O_4 纳米磁珠的X射线衍射图谱。

具体实施方式

[0042] 为了进一步阐述本发明一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,达到预期发明目的,以下结合较佳实施例,对依据本发明提出的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,其具体实施方式、结构、特征及其功效,详细说明如后。在下述说明中,不同的“一实施例”或“实施例”指的不一定是同一实施例。此外,一或多个实施例中的特定特征、结构或特点可由任何合适形式组合。

[0043] 在详细阐述本发明一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用之前,有必要对本发明中提及的相关材料、方法等做进一步说明,以达到更好的效果。

[0044] 本发明采用化学共沉淀法制备纳米磁珠,它是在有两种或多种阳离子的溶液中加入沉淀剂,这种多元体系的溶液经过沉淀反应后,可以得到成分均一的沉淀,是按方程式: $\text{Fe}^{2+}+2\text{Fe}^{3+}+8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4\downarrow + 4\text{H}_2\text{O}$ 为原理进行的。在无氮气气体保护或脱氧水等限制条件下,按照一定摩尔比例配置 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 的水溶液,向其中加入过量NaOH溶液作为沉淀剂,在一定条件下制成 Fe_3O_4 纳米磁珠。

[0045] 本发明采用有机小分子修饰方法中的偶联剂修饰,通过硅烷剂处理后就在纳米磁

珠表面引入反应基团,为其功能提供进一步的化学选择性。本发明氨基修饰磁珠用戊二醛活化,以戊二醛的两个醛基作为桥梁,一端的醛基与磁珠表面的活性基团结合,而另一个醛基则与阳性坚果过敏血清抗体分子中的氨基结合,从而使抗体偶联到磁珠表面,在检测时,用小牛血清白蛋白封闭未结合的位点,从而免疫磁珠可以用于检测坚果过敏原。

[0046] 七水合硫酸亚铁,分子式为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,分子量为278.01,浅蓝绿色单斜晶体,别名绿矾,易溶于水,不溶于乙醇,熔点为 64°C ,沸点为 330°C ,加热至 $70\text{--}73^\circ\text{C}$ 失去3分子水,至 $80\text{--}123^\circ\text{C}$ 失去6分子水,至 156°C 以上转变成碱式硫酸铁。

[0047] 六水合三氯化铁,分子式为 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,分子量为270.2962,中文别名有三氯化铁(六水)、高纯三氯化铁、三氯化铁(111)六水合物、六水氯化铁、六水三氯化铁,为橘黄色的晶体,熔点 37°C ,沸点 $280\text{--}285^\circ\text{C}$,易溶于水,不溶于甘油,易溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙醚。

[0048] 四氧化三铁,化学式 Fe_3O_4 ,俗称氧化铁黑、磁铁、吸铁石、黑铁,为具有磁性的黑色晶体,故又称为磁性氧化铁。此物质是铁的一种混合价态氧化物,熔点为 1597°C ,密度为 $5.17\text{g}/\text{cm}^3$,溶于酸溶液,不溶于水、碱溶液及乙醇、乙醚等有机溶剂。

[0049] 乙醇(Ethanol)俗称酒精,是一种有机物,结构简式 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$,分子式 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$,是最常见的一元醇。乙醇液体密度是 $0.789\text{g}/\text{cm}^3$,乙醇气体密度为 $1.59\text{kg}/\text{m}^3$,相对分子质量为 $46.07\text{g}/\text{mol}$,沸点是 78.4°C ,熔点是 -114.3°C 。纯乙醇是无色透明的液体,有特殊香味,易挥发。

[0050] 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline,简称PBS)的是常用的用于生物学研究的一个缓冲溶液,用于分子克隆及细胞培养,主要成分为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠以及氯化钾,其配制方法不同,pH值不同,发挥的生物学作用亦不完全相同。主要用于一些化学实验中不影响实验反应的情况下调节pH值,以便让实验的化学反应在最佳条件下进行,部分用于食品或是饲料行业加工,如食品或者饲料,真菌毒素检验中Elisa方法的洗板或者食品微生物检验中的稀释缓冲液。本发明中优先选用 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液。

[0051] APTES是一种化学物质,3-氨丙基三乙氧基硅烷,分子式是 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$,沸点 217°C ,折射率1.420,为浅黄色液体,吸入有毒,易水解,放出乙醇,生成相应的硅醇缩合物;分子中的 C—NH_2 键内氨基可与酸、羧酸酯、醛、酮、卤代烃、酰胺和腈等进行反应。APTES可以用来合成有机硅中间体及高分子化合物,也可用作硅烷偶联剂。

[0052] 戊二醛,分子式为 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$,分子量为100.1158,熔点: -5°C ,沸点: 189°C ,闪点: 66°C ,密度: $0.947\text{g}/\text{cm}^3$,带有刺激性气味的无色透明油状液体,溶于热水;可作为食品工业加工助剂,菌消毒剂、鞣革剂、木材防腐剂,药物和高分子合成原料等。

[0053] 磁分离技术是将物质进行磁场处理的一种技术,是利用液体中颗粒的磁性进行分离,该技术的应用已经渗透到各个领域。在本发明中,通过施加外加磁场,磁珠就汇集到磁场一边,吸走上清液则可以分离出磁珠。

[0054] 酶联免疫吸附剂测定法,简称酶联免疫法,或者ELISA法。它的中心就是让抗体与酶复合物结合,然后通过显色来检测。其基本原理为①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性;②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标

本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅来进行定性或定量分析。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。它的类型有双抗体夹心法、双位点一步法、间接法测抗体、竞争法、捕获法等,本发明所述的一种应用于检测坚果过敏蛋白的 Fe_3O_4 免疫纳米磁珠,采用的是竞争法。

[0055] 竞争法可用于测定抗原,也可用于测定抗体。本发明中用于检测抗原,操作步骤如下:(1)将特异抗体与固相载体连接,形成固相抗体;洗涤;(2)待测管中加受检标本和一定量酶标抗原的混合溶液,使之与固相抗体反应;如受检标本中无抗原,则酶标抗原能顺利地于固相抗体结合;如受检标本中含有抗原,则与酶标抗原以同样的机会与固相抗体结合,竞争性地占去了酶标抗原与固相载体结合的机会,使酶标抗原与固相载体的结合量减少;参考管中只加酶标抗原,保温后,酶标抗原与固相抗体的结合可达最充分的量;洗涤;(3)加底物显色:参考管中由于结合的酶标抗原最多,故颜色最深;参考管颜色深度与待测管颜色深度之差,代表受检标本抗原的量;待测管颜色越淡,表示标本中抗原含量越多。本发明是包被抗原,酶标二抗进行的间接竞争法,该方法的好处在于对第一抗体不存在操作影响(没有认为的进行标记或其他处理),一抗活性好,并且抗原的包被一般不会出现过量包被造成 IC_{50} 值较高,灵敏度降低的情况。

[0056] 包被,指将抗原或抗体固定的过程,常用的包被液为 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液、 $\text{pH}=9.6$ 的碳酸盐缓冲液、 $\text{pH}=7-8$ 的Tris-HCL缓冲液。本发明实施例中只采用了其中的一种或几种,未采用与采用的可以起到相同的作用。

[0057] 在板式ELISA中,常用的洗涤液为含0.05%吐温-20的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液(简称PBST)。

[0058] 封闭是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程,是为了让大量不相关的蛋白质填充这些空隙,从而排斥ELISA后的步骤中干扰物质的再吸附。常用的封闭剂有:0.05%-0.5%BSA(牛血清白蛋白)、10%的小牛血清、1%明胶、脱脂奶粉等,本发明优先选用BSA;每100ml的封闭液中含有0.5g的BSA和100ml的洗涤液。

[0059] 终止液,常用的终止液为硫酸,在板式ELISA中一般采用2mol/L的硫酸溶液。

[0060] 本发明中的底物溶液含有 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液、邻苯二胺和双氧水,需要现用现配,并且避光保存。底物溶液中 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液与双氧水的体积比为1:0.0015,每10ml的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液中有邻苯二胺0.004g。

[0061] OD是optical density(光密度)的缩写,表示被检测物吸收掉的光密度,是检测方法里的专有名词,检测单位用OD值表示, $\text{OD}=\lg(1/\text{trans})$,其中trans为检测物的透光值。 OD_{450} 是某溶液在450nm波长吸收光线多少的测量。

[0062] 第二抗体是能和抗体结合的,即抗体的抗体。主要用于检测抗体的存在。第二抗体应选用与使用的第一抗体相同的物种来源,本发明中优先选用羊抗鼠IgE-HRP抗体。

[0063] 本发明中所述洗涤指向待洗涤物中加入洗涤液,混合均匀,通过磁分离,磁珠汇集到磁场一边,吸走上清液则,分离出磁珠。但是磁珠不能够完全脱除洗涤液,最终会形成含有洗涤液和磁珠的混合液。

[0064] 在理想溶液中,溶液的体积有加成性,总体积等于所有成份混合前的体积和。此时的体积分数也可称为体积浓度,指某种成分在总体积中所占的百分比。

[0065] 过量,在化学反应中指加入某一反应物,使另一反应物全部发生反应,自身还有剩余。

[0066] 在了解了本发明中提及的相关材料、方法等之后,下面将结合具体的实施例,对本发明一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用做进一步的详细介绍:

[0067] 实施例1.

[0068] 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,包括以下步骤:

[0069] (1) 制备纳米磁珠:

[0070] ①称取2.78g的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和2.703g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,溶解于50ml的纯蒸水中,得铁盐溶液; $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 物质的量为 $2.78 \div 278.01 \approx 0.01\text{mol}$, Fe^{2+} 的摩尔浓度为 0.2mol/L , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 物质的量为 $2.703 \div 270.2962 \approx 0.01\text{mol}$, Fe^{3+} 的摩尔浓度为 0.2mol/L

[0071] ②在 65°C 的温度下,先超声铁盐溶液6分钟,再放入转子置于磁力搅拌器上高速搅拌25分钟,同时滴加160ml的 0.5mol/L 氢氧化钠溶液,随着 NaOH 的加入,反应液中晶化出现黑色值深红色沉淀,再静置晶化2小时,得 Fe_3O_4 沉淀;

[0072] ③用磁分离架将 Fe_3O_4 沉淀分离出来,先用蒸馏水洗涤2次,再无水乙醇洗涤2次,得 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0073] (2) 纳米磁珠的表面修饰:

[0074] ①量取25ml的 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液,用无水乙醇稀释至150ml,得稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0075] ②超声振荡稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液30分钟后,加入0.4ml的APTES,室温下搅拌7小时,用磁分离架分离,得硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠(APTES与稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为 $0.4:150=1:375$);

[0076] ③用无水乙醇溶液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠2次,得到硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0077] ④吸取1ml的硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液,用 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液3次,得磁珠混合液;

[0078] ⑤向磁珠混合液中加入4ml的体积分数为5%的戊二醛溶液,室温下振荡交联2小时,再用磁分离架分离,弃去上清液,得氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液;(戊二醛溶液与硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为4:1)

[0079] (3) 免疫磁珠的制备:

[0080] 用0.8ml的稀释度为1:600的坚果过敏小鼠阳性血清包被1ml的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,室温下振荡固定1.5-2.5小时,再通过磁分离器进行分离,将上清弃掉得包被后的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,用蒸馏水和 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液分别洗涤4次,得 Fe_3O_4 免疫纳米磁珠;

[0081] (4) Fe_3O_4 免疫纳米磁珠通过酶联免疫法检测坚果过敏蛋白

[0082] 不同稀释度的坚果蛋白,以核桃过敏蛋白为例:

[0083] 1倍稀释液:为核桃蛋白提取液原液。

[0084] 2倍稀释液:吸取核桃蛋白液2ml,加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml并混匀。

[0085] 4倍稀释液:吸取2倍稀释液2ml,加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0086] 8倍稀释液:吸取4倍稀释液2ml,加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0087] 16倍稀释液:吸取8倍稀释液2ml,加入pH=7.4的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0088] ①分别加入核桃蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液,同时设PBS缓冲液为阴性对照,100 μ L/孔;再加入pH=7.4的PBS缓冲液进行包被,100 μ L/孔,在37 $^{\circ}$ C恒温箱内孵育一小时,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0089] ②封闭:用洗涤液洗板3次,加入封闭液,300 μ L/孔,在摇床上37 $^{\circ}$ C震荡孵育2小时,洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的pH=7.4的PBS缓冲液;每100ml的封闭液中含有0.5g的BSA和100ml的洗涤液)

[0090] ③竞争:每孔加入50 μ L核桃蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液和50 μ L Fe₃O₄免疫纳米磁珠,37 $^{\circ}$ C震荡孵育2小时,用洗涤液洗板;然后每孔加入100 μ L的羊抗鼠IgE-HRP抗体,37 $^{\circ}$ C震荡孵育1小时,用洗涤液洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的pH=7.4的PBS缓冲液)

[0091] ④显色:每孔加入50 μ L临时配制的底物溶液并充分混合;37 $^{\circ}$ C避光显色20分钟后,每孔加入50 μ L终止液并充分混合,再用酶标仪测定OD₄₅₀。(底物溶液的配制:将10ml的pH=7.4的PBS缓冲液、0.004g的邻苯二胺和15 μ L的双氧水混合,现用现配,避光保存;终止液:2mol/l的硫酸溶液)

[0092] 本实施例所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,该制备方法可以不受氮气的限制,并改善了Fe₃O₄的磁学性质;通过对Fe₃O₄纳米磁珠表面进行改性,制成磁性高分子微球,与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠,增加了免疫纳米磁珠的种类和制备方法;使免疫磁珠与酶联免疫法结合,无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备,成本低,可以有效检测坚果过敏蛋白,提高预测与评估交叉过敏反应的准确性,为我国食物过敏原标签标识制度的实施提供了检测技术方法。

[0093] 实施例2.

[0094] 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,包括以下步骤:

[0095] (1) 制备纳米磁珠:

[0096] ①称取2.78g的FeSO₄·7H₂O和5.406g的FeCl₃·6H₂O,溶解于50ml的纯蒸水中,得铁盐溶液;(FeSO₄·7H₂O物质的量为2.78 \div 278.01 \approx 0.01mol,Fe²⁺的摩尔浓度为0.2mol/L,FeCl₃·6H₂O物质的量为5.406 \div 270.2962 \approx 0.02mol,Fe³⁺的摩尔浓度为0.4mol/L)

[0097] ②在75 $^{\circ}$ C的温度下,先超声铁盐溶液4分钟,再放入S21-1恒温磁力搅拌器上高速搅拌35分钟,同时滴加180ml的0.75mol/L氢氧化钠溶液,随着NaOH的加入,反应液中晶化出现黑色值深红色沉淀,再静置晶化3小时,得Fe₃O₄沉淀;

[0098] ③用磁分离架将Fe₃O₄沉淀分离出来,先用蒸馏水洗涤3次,再无水乙醇洗涤3次,得Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0099] 取出10个1mlFe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液放入离心管中,在有无外加磁场情况下观察其磁性。将得到的Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液分装在平皿中,于冰箱中冷冻,冻好后在冷冻干燥机中干燥12个小时,得到纳米磁珠粉末,取出观察,在显微镜及X射线粉末衍射仪下观察其形态,得到如图1所示的图谱。

[0100] (2) 纳米磁珠的表面修饰:

[0101] ①量取50ml的Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液,用无水乙醇稀释至250ml,得稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0102] ②超声振荡稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液25分钟后,加入0.7ml的APTES,室温下搅拌6小时,用磁分离架分离,得硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠;(APTES与稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为0.7:250=1:357.143);

[0103] ③用无水乙醇溶液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠2次,得到硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0104] ④吸取4ml的硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液,用 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液2次,得磁珠混合液;

[0105] ⑤向磁珠混合液中加入12ml的体积分数为7%的戊二醛溶液,室温下振荡交联2.5小时,再用磁分离架分离,弃去上清液,得氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液;(戊二醛溶液与硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为3:1)

[0106] (3) 免疫磁珠的制备:

[0107] 用1.2ml的的稀释度为1:1000的坚果过敏小鼠阳性血清包被1ml的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,室温下振荡固定1.5-2.5小时,再通过磁分离器进行分离,将上清弃掉得包被后的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,用蒸馏水和 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液分别洗涤4次,得 Fe_3O_4 免疫纳米磁珠;

[0108] (4) Fe_3O_4 免疫纳米磁珠通过酶联免疫法检测坚果过敏蛋白

[0109] 不同稀释度的坚果蛋白,以腰果过敏蛋白为例:

[0110] 1倍稀释液:为腰果蛋白提取液原液。

[0111] 2倍稀释液:吸取腰果蛋白液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0112] 4倍稀释液:吸取2倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0113] 8倍稀释液:吸取4倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0114] 16倍稀释液:吸取8倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0115] ①分别加入腰果蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液,同时设PBS缓冲液为阴性对照,100 μL /孔;再加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液进行包被,100 μL /孔,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育1小时,再4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

[0116] ②封闭:用洗涤液洗板3次,加入封闭液,300 μL /孔,在摇床上37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育2小时,洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液;每100ml的封闭液中含有0.5g的BSA和100ml的洗涤液)

[0117] ③竞争:每孔加入50 μL 腰果蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液和50 μL Fe_3O_4 免疫纳米磁珠,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育2小时,用洗涤液洗板;然后每孔加入100 μL 的羊抗鼠IgE-HRP抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育1h,用洗涤液洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液)

[0118] ④显色:每孔加入50 μL 临时配制的底物溶液并充分混合;37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色20分钟后,每孔加入50 μL 终止液并充分混合,再用酶标仪测定 OD_{450} 。(底物溶液的配制:将10ml的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液、0.004g的邻苯二胺和15 μL 的双氧水混合,现用现配,避光保存;终止液:2mol/l的硫酸溶液)

[0119] 本实施例所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,该制备方法可以不受氮气的限制,并改善了 Fe_3O_4 的磁学性质;通过对 Fe_3O_4 纳米磁珠表面进行改性,制成磁性高分子微球,与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠,增加了免疫纳米磁珠的

种类和制备方法;使免疫磁珠与酶联免疫法结合,无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备,成本低,可以有效检测坚果过敏蛋白,提高预测与评估交叉过敏反应的准确性,为我国食物过敏原标签标识制度的实施提供了检测技术方法。

[0120] 实施例3.

[0121] 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,包括以下步骤:

[0122] (1) 制备纳米磁珠:

[0123] ①称取4.17g的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和5.406g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,溶解于50ml的纯蒸水中,得铁盐溶液; $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 物质的量为 $4.17 \div 278.01 \approx 0.015\text{mol}$, Fe^{2+} 的摩尔浓度为 0.3mol/L , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 物质的量为 $5.406 \div 270.2962 \approx 0.02\text{mol}$, Fe^{3+} 的摩尔浓度为 0.4mol/L

[0124] ②在 70°C 的温度下,先超声铁盐溶液5分钟,再放入S21-1恒温磁力搅拌器上高速搅拌30分钟,同时滴加150ml的 1mol/L 氢氧化钠溶液,随着 NaOH 的加入,反应液中晶化出现黑色值深红色沉淀,再静置晶化2.5小时,得 Fe_3O_4 沉淀;

[0125] ③用磁分离架将 Fe_3O_4 沉淀分离出来,先用蒸馏水洗涤3次,再无水乙醇洗涤2次,得 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0126] (2) 纳米磁珠的表面修饰:

[0127] ①量取25ml的 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液,用无水乙醇稀释至175ml,得稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0128] ②超声振荡稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液35分钟后,加入0.5ml的APTES,室温下搅拌8小时,用磁分离架分离,得硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠;(APTES与稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为 $0.5:175=1:350$);

[0129] ③用无水乙醇溶液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠3次,得到硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0130] ④吸取1ml的硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液,用 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液3次,得磁珠混合液;

[0131] ⑤向磁珠混合液中加入5ml的体积分数为3%的戊二醛溶液,室温下振荡交联1.5小时,再用磁分离架分离,弃去上清液,得氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液;(戊二醛溶液与硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为 $5:1$)

[0132] (3) 免疫磁珠的制备:

[0133] 用1ml的稀释度为 $1:800$ 的坚果过敏小鼠阳性血清包被1ml的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,室温下振荡固定1.5小时,再通过磁分离器进行分离,将上清弃掉得包被后的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,用蒸馏水和 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液分别洗涤4次,得 Fe_3O_4 免疫纳米磁珠;

[0134] (4) Fe_3O_4 免疫纳米磁珠通过酶联免疫法检测坚果过敏蛋白

[0135] 不同稀释度的坚果蛋白,以松子过敏蛋白为例:

[0136] 1倍稀释液:为松子蛋白提取液原液。

[0137] 2倍稀释液:吸取松子蛋白液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0138] 4倍稀释液:吸取2倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0139] 8倍稀释液:吸取4倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0140] 16倍稀释液:吸取8倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0141] ①分别加入松子蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液,同时设PBS缓冲液为阴性对照,100 μ L/孔;再加入pH=7.4的PBS缓冲液进行包被,100 μ L/孔,在37 $^{\circ}$ C恒温箱内孵育一小时后,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0142] ②封闭:用洗涤液洗板3次,加入封闭液,300 μ L/孔,在摇床上37 $^{\circ}$ C震荡孵育2小时,洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的pH=7.4的PBS缓冲液;每100ml的封闭液中含有0.5g的BSA和100ml的洗涤液)

[0143] ③竞争:每孔加入50 μ L松子蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液和50 μ L Fe₃O₄免疫纳米磁珠,37 $^{\circ}$ C震荡孵育2小时,用洗涤液洗板;然后每孔加入100 μ L的羊抗鼠IgE-HRP抗体,37 $^{\circ}$ C震荡孵育1小时,用洗涤液洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的pH=7.4的PBS缓冲液)

[0144] ④显色:每孔加入50 μ L临时配制的底物溶液并充分混合;37 $^{\circ}$ C避光显色20分钟后,每孔加入50 μ L终止液并充分混合,再用酶标仪测定OD₄₅₀。(底物溶液的配制:将10ml的pH=7.4的PBS缓冲液、0.004g的邻苯二胺和15 μ L的双氧水混合,现用现配,避光保存;终止液:2mol/l的硫酸溶液)

[0145] 本实施例所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,该制备方法可以不受氮气的限制,并改善了Fe₃O₄的磁学性质;通过对Fe₃O₄纳米磁珠表面进行改性,制成磁性高分子微球,与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠,增加了免疫纳米磁珠的种类和制备方法;使免疫磁珠与酶联免疫法结合,无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备,成本低,可以有效检测坚果过敏蛋白,提高预测与评估交叉过敏反应的准确性,为我国食物过敏原标签标识制度的实施提供了检测技术方法。

[0146] 实施例4.

[0147] 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,包括以下步骤:

[0148] (1) 制备纳米磁珠:

[0149] ①称取9.73g的FeSO₄·7H₂O和10.812g的FeCl₃·6H₂O,溶解于100ml的纯蒸水中,得铁盐溶液;(FeSO₄·7H₂O物质的量为 $9.73 \div 278.01 \approx 0.035\text{mol}$,Fe²⁺的摩尔浓度为0.35mol/L,FeCl₃·6H₂O物质的量为 $10.812 \div 270.2962 \approx 0.04\text{mol}$,Fe³⁺的摩尔浓度为0.4mol/L)

[0150] ②在68 $^{\circ}$ C的温度下,先超声铁盐溶液5分钟,再放入(转子置于磁力搅拌器上高速搅拌28分钟,同时滴加340ml的0.9mol/L氢氧化钠溶液,随着NaOH的加入,反应液中晶化出现黑色值深红色沉淀,再静置晶化3小时,得Fe₃O₄沉淀;

[0151] ③用磁分离架将Fe₃O₄沉淀分离出来,先用蒸馏水洗涤2次,再无水乙醇洗涤3次,得Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0152] 取出10个1mlFe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液放入离心管中,在有无外加磁场情况下观察其磁性。将得到的Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液分装在平皿中,于冰箱中冷冻,冻好后在冷冻干燥机中干燥12个小时,得到纳米磁珠粉末,取出观察,在显微镜及X射线粉末衍射仪下观察其形态,得到图2所示的图谱。

[0153] (2) 纳米磁珠的表面修饰:

[0154] ①量取25ml的Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液,用无水乙醇稀释至140ml,得稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0155] ②超声振荡稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液28分钟后,加入0.4ml的APTES,室温下搅拌6.5小时,用磁分离架分离,得硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠;(APTES与稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为0.4:140=1:350);

[0156] ③用无水乙醇溶液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠3次,得到硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0157] ④吸取1ml的硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液,用 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液2次,每次 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液的用量为2ml,得磁珠混合液;

[0158] ⑤向磁珠混合液中加入3ml的体积分数为6%的戊二醛溶液,室温下振荡交联2小时,再用磁分离架分离,弃去上清液,得氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液;(戊二醛溶液与硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为3:1)

[0159] (3) 免疫磁珠的制备:

[0160] 用0.9ml的稀释度为1:700的坚果过敏小鼠阳性血清包被1ml的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,室温下振荡固定2.5小时,再通过磁分离器进行分离,将上清弃掉得包被后的氨基化 Fe_3O_4 纳米磁珠混合液,用蒸馏水和 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液分别洗涤3次,得 Fe_3O_4 免疫纳米磁珠;

[0161] (4) Fe_3O_4 免疫纳米磁珠通过酶联免疫法检测坚果过敏蛋白

[0162] 不同稀释度的坚果蛋白,以榛子过敏蛋白为例:

[0163] 1倍稀释液:为榛子蛋白提取液原液。

[0164] 2倍稀释液:吸取榛子蛋白液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0165] 4倍稀释液:吸取2倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0166] 8倍稀释液:吸取4倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0167] 16倍稀释液:吸取8倍稀释液2ml加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0168] ①分别加入榛子蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液,同时设PBS缓冲液为阴性对照,100 μL /孔;再加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液进行包被,100 μL /孔,在37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱内孵育一小时后,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。

[0169] ②封闭:用洗涤液洗板3次,加入封闭液,300 μL /孔,在摇床上37 $^\circ\text{C}$ 震荡孵育2小时,洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液;每100ml的封闭液中含有0.5g的BSA和100ml的洗涤液)

[0170] ③竞争:每孔加入50 μL 榛子蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液和50 μL Fe_3O_4 免疫纳米磁珠,37 $^\circ\text{C}$ 震荡孵育2小时,用洗涤液洗板;然后每孔加入100 μL 的羊抗鼠IgE-HRP抗体,37 $^\circ\text{C}$ 震荡孵育1小时,用洗涤液洗板。(洗涤液为:含0.05%吐温-20的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液)

[0171] ④显色:每孔加入50 μL 临时配制的底物溶液并充分混合;37 $^\circ\text{C}$ 避光显色20分钟后,每孔加入50 μL 终止液并充分混合,再用酶标仪测定OD₄₅₀。(底物溶液的配制:将10ml的 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液、0.004g的邻苯二胺和15 μL 的双氧水混合,现用现配,避光保存;终止液:2mol/l的硫酸溶液)

[0172] 表1n(Fe^{2+}):n(Fe^{3+})为1.75:2时样品X射线粉末衍射数据表

[0173]

峰号	衍射角	半宽高	D值	强度	透光率
1	18.140	0.353	4.8863	238	14
2	30.140	1.082	2.9626	600	34
3	35.560	0.988	2.5225	1784	100
4	43.260	0.729	2.0897	410	24
5	53.900	0.471	1.6996	235	14
6	57.140	0.965	1.6107	552	32
7	62.840	0.518	1.4776	873	50
8	71.680	0.329	1.3155	98	6
9	74.480	0.494	1.2729	146	10

[0174] 由表1以及图1和图2的对比可知,使用 $n(\text{Fe}^{2+}):n(\text{Fe}^{3+})$ 为1.75:2比例所制备的纳米磁性微球纯度较高。由于制备 Fe_3O_4 磁性微球理论上 $n(\text{Fe}^{2+}):n(\text{Fe}^{3+})$ 为1:2,所以在反应过程中应该是有部分损耗,综合分析得出,此种损耗是由于 Fe^{2+} 在空气中易被氧化。

[0175] 本实施例所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,该制备方法可以不受氮气的限制,并改善了 Fe_3O_4 的磁学性质;通过对 Fe_3O_4 纳米磁珠表面进行改性,制成磁性高分子微球,与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠,增加了免疫纳米磁珠的种类和制备方法;使免疫磁珠与酶联免疫法结合,无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备,成本低,可以有效检测坚果过敏蛋白,提高预测与评估交叉过敏反应的准确性,为我国食物过敏原标签标识制度的实施提供了检测技术方法。

[0176] 实施例5.

[0177] 一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,包括以下步骤:

[0178] (1) 制备纳米磁珠:

[0179] ①称取2.78g的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和4.055g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,溶解于50ml的纯蒸水中,得铁盐溶液; $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 物质的量为 $2.78 \div 278.01 \approx 0.01\text{mol}$, Fe^{2+} 的摩尔浓度为 0.2mol/L , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 物质的量为 $4.055 \div 270.2962 \approx 0.015\text{mol}$, Fe^{3+} 的摩尔浓度为 0.3mol/L)

[0180] ②在 72°C 的温度下,先超声铁盐溶液5分钟,再放入S21-1恒温磁力搅拌器上高速搅拌33分钟,同时滴加140ml的 0.8mol/L 氢氧化钠溶液,随着 NaOH 的加入,反应液中晶化出现黑色值深红色沉淀,再静置晶化3小时,得 Fe_3O_4 沉淀;

[0181] ③用磁分离架将 Fe_3O_4 沉淀分离出来,先用蒸馏水洗涤2次,再无水乙醇洗涤2次,得 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0182] (2) 纳米磁珠的表面修饰:

[0183] ①量取25ml的 Fe_3O_4 纳米磁珠无水乙醇混合液,用无水乙醇稀释至160ml,得稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液;

[0184] ②超声振荡稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液32分钟后,加入0.4ml的APTES,室温下搅拌7.5小时,用磁分离架分离,得硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠;(APTES与稀释后的纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为 $0.4:160=1:400$);

[0185] ③用无水乙醇溶液洗涤硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠3次,得到硅烷化 Fe_3O_4 纳米磁珠无水

乙醇混合液；

[0186] ④吸取1ml的硅烷化Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液，用pH=7.4的PBS缓冲液洗涤硅烷化Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液2次，得磁珠混合液；

[0187] ⑤向磁珠混合液中加入5ml的体积分数为4%的戊二醛溶液，室温下振荡交联2.5小时，再用磁分离架分离，弃去上清液，得氨基化Fe₃O₄纳米磁珠混合液；(戊二醛溶液与硅烷化Fe₃O₄纳米磁珠无水乙醇混合液的体积比为5:1)

[0188] (3) 免疫磁珠的制备：

[0189] 用1.1ml的稀释度为1:700的坚果过敏小鼠阳性血清包被1ml的氨基化Fe₃O₄纳米磁珠混合液，室温下振荡固定1.5-2.5小时，再通过磁分离器进行分离，将上清弃掉得包被后的氨基化Fe₃O₄纳米磁珠混合液，用蒸馏水和pH=7.4的PBS缓冲液分别洗涤3次，得Fe₃O₄免疫纳米磁珠；

[0190] (4) Fe₃O₄免疫纳米磁珠通过酶联免疫法检测坚果过敏蛋白

[0191] 不同稀释度的坚果蛋白，以杏仁过敏蛋白为例：

[0192] 1倍稀释液：为杏仁蛋白提取液原液。

[0193] 2倍稀释液：吸取杏仁蛋白液2ml加入pH=7.4的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0194] 4倍稀释液：吸取2倍稀释液2ml加入pH=7.4的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0195] 8倍稀释液：吸取4倍稀释液2ml加入pH=7.4的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0196] 16倍稀释液：吸取8倍稀释液2ml加入pH=7.4的PBS缓冲液2ml后混匀。

[0197] ①分别加入杏仁蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液，同时设PBS缓冲液为阴性对照，100μL/孔；再加入pH=7.4的PBS缓冲液进行包被，100μL/孔，在37℃恒温箱内孵育1小时，4℃过夜。

[0198] ②封闭：用洗涤液洗板3次，加入封闭液，300μL/孔，在摇床上37℃震荡孵育2小时，洗板。(洗涤液为：含0.05%吐温-20的pH=7.4的PBS缓冲液；每100ml的封闭液中含有0.5g的BSA和100ml的洗涤液)

[0199] ③竞争：每孔加入50μL杏仁蛋白提取液原液及稀释为2倍、4倍、8倍、16倍的蛋白液和50μL Fe₃O₄免疫纳米磁珠，37℃震荡孵育2小时，用洗涤液洗板；然后每孔加入100μL的羊抗鼠IgE-HRP抗体，37℃震荡孵育1小时，用洗涤液洗板。(洗涤液为：含0.05%吐温-20的pH=7.4的PBS缓冲液)

[0200] ④显色：每孔加入50μL临时配制的底物溶液并充分混合；37℃避光显色20分钟后，每孔加入50μL终止液并充分混合，再用酶标仪测定OD₄₅₀。(底物溶液的配制：将10ml的pH=7.4的PBS缓冲液、0.004g的邻苯二胺和15μL的双氧水混合，现用现配，避光保存；终止液：2mol/l的硫酸溶液)

[0201] 本实施例所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用，该制备方法可以不受氮气的限制，并改善了Fe₃O₄的磁学性质；通过对Fe₃O₄纳米磁珠表面进行改性，制成磁性高分子微球，与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠，增加了免疫纳米磁珠的种类和制备方法；使免疫磁珠与酶联免疫法结合，无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备，成本低，可以有效检测坚果过敏蛋白，提高预测与评估交叉过敏反应的准确性，为我国食物过敏原标签标识制度的实施提供了检测技术方法。

[0202] 以上所述，仅是本发明实施例的较佳实施例而已，并非对本发明实施例作任何形

式上的限制,依据本发明实施例的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明实施例技术方案的范围。

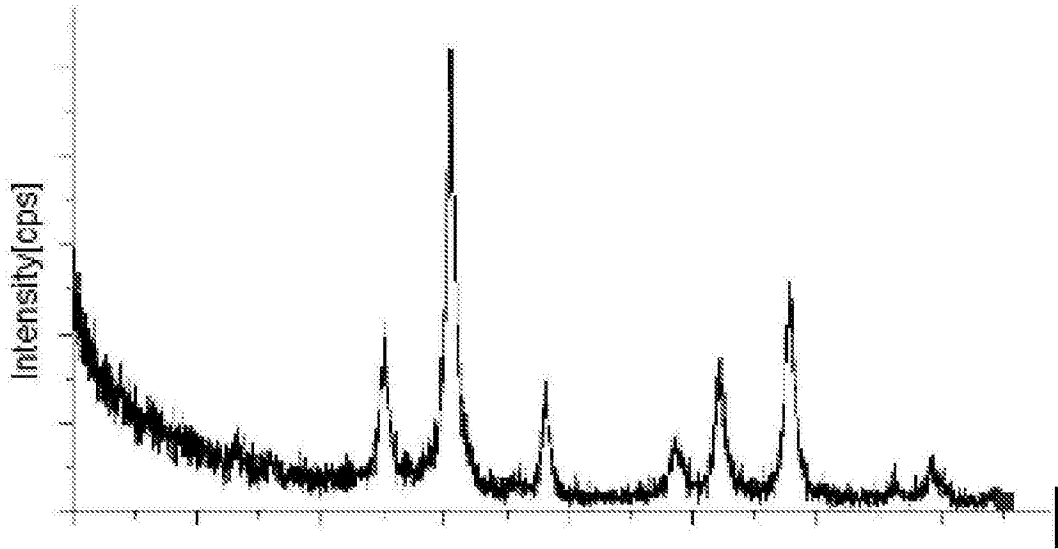


图1

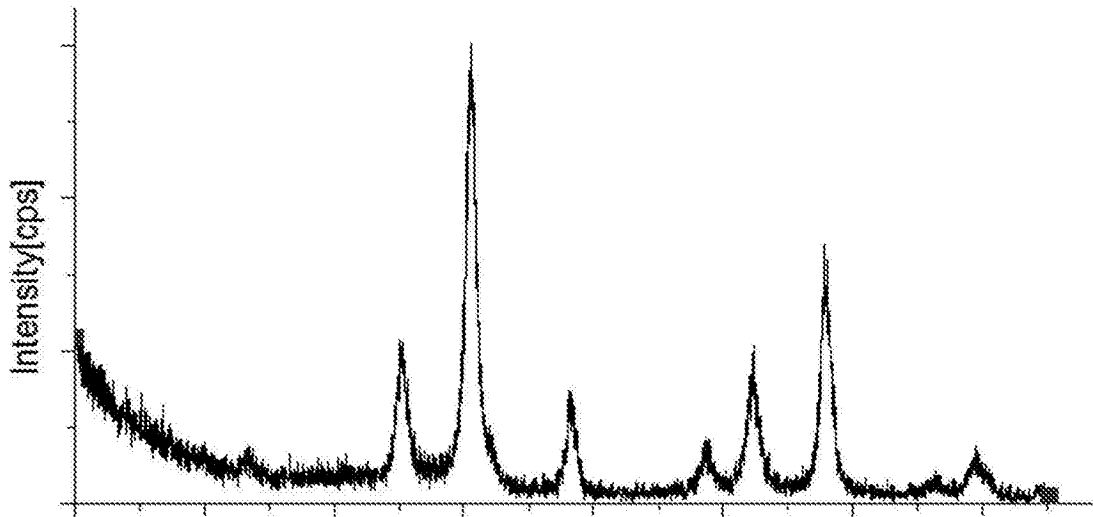


图2

专利名称(译)	一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107132346A	公开(公告)日	2017-09-05
申请号	CN2017110366724.1	申请日	2017-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	天津农学院		
申请(专利权)人(译)	天津农学院		
当前申请(专利权)人(译)	天津农学院		
[标]发明人	张爱琳 钟凯 樊秀花 张登科		
发明人	张爱琳 钟凯 樊秀花 张登科		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	王伟锋 刘铁生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用。一种四氧化三铁免疫纳米磁珠的制备方法，包括以下步骤：(1)制备纳米磁珠；(2)纳米磁珠的表面修饰；(3)免疫磁珠的制备。本发明还公布了该四氧化三铁免疫纳米磁珠的应用。本发明所述的一种四氧化三铁免疫纳米磁珠及其制备方法和应用，该制备方法可以不受氮气的限制，并改善了Fe₃O₄的磁学性质；通过对Fe₃O₄纳米磁珠表面进行改性，制成磁性高分子微球，与坚果过敏性血清抗体结合制成免疫磁珠，增加了免疫纳米磁珠的种类和制备方法；使免疫磁珠与酶联免疫法结合，无需生物传感器法、质谱仪等昂贵设备，成本低，可以有效检测坚果过敏蛋白，提高预测与评估交叉过敏反应的准确性。

