



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109813895 A

(43)申请公布日 2019.05.28

(21)申请号 201711157156.0

(22)申请日 2017.11.20

(71)申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路17号

(72)发明人 江海洋 沈建忠 谢洁 彭涛

王战辉 温凯 李建成 夏曦

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 王春霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

免疫壳聚糖磁性微球及其制备方法和在样品前处理中的应用

(57)摘要

本发明提供了一种免疫壳聚糖磁性微球及其制备方法和在样品前处理中的应用。本发明提供的免疫壳聚糖磁性微球的制备方法包括如下步骤:采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺活化壳聚糖磁性微球,然后加入生物识别材料进行反应,然后加入封闭液进行封闭处理即得。将本发明免疫壳聚糖磁性微球用于样品前处理,有效解决了食品安全领域样品前处理中有机溶剂用量大、操作繁琐、耗时长、基质效应明显等缺点,大大简化了样品前处理过程,缩短前处理时间,提高了分析方法灵敏度,从而实现食品样品中有害小分子物质的超灵敏检测。

1. 一种壳聚糖磁性微球的制备方法,包括如下步骤:

向六水合氯化铁的乙二醇溶液中加入壳聚糖,然后加入醋酸钠的乙二醇溶液,氮气保护下进行反应即得。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述六水合氯化铁与所述壳聚糖的投料质量比为1~5:1。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:所述醋酸钠与所述壳聚糖的投料质量比为10~15:1。

4. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:所述反应的温度可为180~190℃,时间为48小时。

5. 权利要求1-4中任一项所述方法制备的壳聚糖磁性微球。

6. 一种免疫壳聚糖磁性微球的制备方法,包括如下步骤:采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺活化权利要求4所述壳聚糖磁性微球,然后加入生物识别材料进行反应,然后加入封闭液进行封闭处理,即得所述免疫壳聚糖磁性微球。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于:所述壳聚糖磁性微球采用吗啉乙磺酸缓冲溶液溶解。

8. 根据权利要求6或7所述的制备方法,其特征在于:所述生物识别材料为单克隆抗体、核酸适配体、受体或分子印迹材料。

9. 权利要求6-8中任一项所述方法制备的免疫壳聚糖磁性微球。

10. 权利要求9所述免疫壳聚糖磁性微球在食品检测、食品前处理或从样品中富集目标物质中的应用。

免疫壳聚糖磁性微球及其制备方法和在样品前处理中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫壳聚糖磁性微球及其制备方法和在样品前处理中的应用,属于纳米磁性材料领域以及生物学领域。

背景技术

[0002] 免疫磁性微球作为一种新型的功能性纳米材料近年来受到高度的重视和研究,它在食品安全和生物医学等领域得到广泛的应用。免疫磁性微球表面的生物识别材料可以特异性地和目标物结合,在外加磁场的作用下会发生定向移动,可以实现样品中目标物的富集分离纯化。但是在单独的磁性微球表面偶联生物识别材料形成免疫磁性微球,会出现偶联效率低、磁分离速度慢、非特异性吸附等问题,从而阻碍了免疫磁性微球的发展与应用。因此,在磁性微球表面包裹有机或无机物形成核壳型的结构,可以在很大程度上提高免疫磁性微球的性能,达到提高富集分离效率的目的。

[0003] 食品安全问题已成为全世界关注的公共卫生问题,但是由于所需分析的样品种类繁多,样品基质复杂,加上大多数化合物都是以微量或痕量形式存在,所以样品前处理提高分析方法灵敏度的关键。样品前处理的主要任务是去除干扰物、提高选择性、浓缩目标物,从而达到提高分析方法的灵敏度、选择性和准确度,缩短操作时间,节省有机溶剂。尤其对痕量或超痕量目标物检测,样品前处理技术显得尤为重要。现有前处理技术主要包括液液萃取、固相萃取、免疫亲和色谱等,但是这些技术存在有机溶剂消耗量大、非特异性吸附明显、操纵繁琐、耗时长等缺点。基于此,需要对免疫磁性微球进行改进并提供新的样品前处理方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种免疫壳聚糖磁性微球及其制备方法,所制备的免疫壳聚糖磁性微球具有吸附容量大、选择性高、灵敏度好、分离快速的优点,将其用于样品前处理,大大简化操作过程、节省大量有机溶剂,提高了分离净化效率,同时可以实现超灵敏检测样品基质中的痕量或超痕量有害化合物。

[0005] 本发明首先提供一种壳聚糖磁性微球($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTS}$)的制备方法,包括如下步骤:

[0006] 向六水合氯化铁的乙二醇溶液中加入壳聚糖,然后加入醋酸钠的乙二醇溶液,氮气保护下进行反应即得。

[0007] 所述六水合氯化铁与所述壳聚糖的投料质量比可为1~5:1,具体可为3.6:1;

[0008] 所述醋酸钠与所述壳聚糖的投料质量比可为10~15:1,具体可为12:1;

[0009] 所述反应的温度可为180~190℃,时间为48小时;

[0010] 所述反应可在油浴下进行。

[0011] 所述反应结束,可采用乙醇和去离子水交替洗涤数次,60℃真空干燥24小时。

[0012] 壳聚糖作为一种天然氨基多糖,具有优良的生物亲和性、无毒和易于化学改性,富含氨基($-\text{NH}_2$)和羟基($-\text{OH}$)等功能基团。通过本发明“氮气保护油浴水热法”合成的壳聚糖

磁性微球兼具两者的优点,可作为生物识别材料的固定载体,提高磁性微球与生物识别材料的偶联效率,有效避免壳聚糖磁性微球本身的非特异性吸附的缺点,用于快速浓缩富集并高效分离净化复杂样品基质。

[0013] 进一步地,在所述壳聚糖磁性微球的基础上,本发明制备免疫壳聚糖磁性微球,其是以四氧化三铁为磁核、壳聚糖为中间体、生物识别材料为壳层的核壳型结构。

[0014] 所述免疫壳聚糖磁性微球具体可按照如下方法制备:

[0015] 采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHSS)活化所述壳聚糖磁性微球,然后加入生物识别材料进行反应,然后加入封闭液进行封闭处理,即得所述免疫壳聚糖磁性微球。

[0016] 所述壳聚糖磁性微球采用吗啉乙磺酸缓冲溶液(0.05M, pH 5.0)溶解。

[0017] 所述活化步骤后,磁分离后弃上清以除去未反应的EDC和NHSS,用去离子水洗涤 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTS}$ 。

[0018] 所述封闭液可为BSA溶液。

[0019] 所述生物识别材料以其PBS溶液的方式加入。

[0020] 所述生物识别材料可为单克隆抗体、核酸适配体、受体或分子印迹材料,可根据待分析检测的目标物,选择相应的生物识别材料,如检测黄曲霉毒素B1时,可选择黄曲霉毒素B1的核酸适配体。

[0021] 本发明采用的新型生物识别材料如核酸适配体、分子印迹材料相比于传统的抗体具有化学稳定、特异性强、成本低廉等优点。

[0022] 本发明制备方法简单,反应条件不苛刻,制备好的免疫壳聚糖磁性微球的粒径均一(200nm)。

[0023] 本发明制备的免疫壳聚糖磁性微球具有吸附容量大、选择性高、灵敏度好、分离快速的优点。

[0024] 将本发明制备的免疫壳聚糖磁性微球用于样品前处理,有效解决了食品安全领域样品前处理中有机溶剂用量大、操作繁琐、耗时长、基质效应明显等缺点,大大简化了样品前处理过程,缩短前处理时间,提高了分析方法灵敏度,从而实现食品样品中有害小分子物质的超灵敏检测。

附图说明

[0025] 图1为本发明免疫壳聚糖磁性微球的制备方法的示意图。

[0026] 图2为本发明实施例1制备的壳聚糖磁性微球表征图谱,其中,图2(A)为扫描电镜图,图2(B)为透射电镜图,图2(C)为傅里红外光谱图,图2(D)为X射线衍射谱图。

[0027] 图3为本发明基于免疫壳聚糖磁性微球的样品前处理方法的示意图。

具体实施方式

[0028] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0029] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0030] 实施例1:合成并表征壳聚糖磁性微球

[0031] 六水合氯化铁(7.2g)溶解于160mL乙二醇,加入2.0g壳聚糖,然后逐滴加入40mL乙

二醇(含有24.0g醋酸钠),剧烈搅拌30min,氮气保护油浴185℃反应48小时,反应完毕后,用乙醇和去离子水交替洗涤数次,60.0±0.5℃真空干燥24小时,即可得到Fe₃O₄@CTS。

[0032] 本实施例制备的Fe₃O₄@CTS的表征图谱如图2所示,其中,图2(A)为扫描电镜照片,图2(B)为透射电镜照片,图2(C)为傅里红外光谱图,图2(D)为X射线衍射图,由上述表征图谱可以看出,本实施例成功合成了壳聚糖磁性微球,且粒径均一(200nm)。

[0033] 实施例2:制备黄曲霉毒素免疫壳聚糖磁性微球

[0034] 通过活泼酯法,将黄曲霉毒素B1的核酸适配体用于制备黄曲霉毒素免疫壳聚糖磁性微球(Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer):将Fe₃O₄@CTS用MES溶液(0.05M,pH 5.0)溶解,涡旋混匀;(2)分别加入EDC和NHSS溶液进行活化;(3)磁分离后弃上清以除去未反应的EDC和NHSS,用去离子水洗涤Fe₃O₄@CTS;(4)加入含有黄曲霉毒素B1核酸适配体的PBS溶液,在室温下柔和振荡反应;(5)加入浓度为20%的BSA溶液,封闭未反应的活性位点。(6)将制备好的免疫磁性微球于4℃下保存。

[0035] 在PBS溶液中添加不同浓度的黄曲霉毒素标准品,将制备的Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer进行浓缩富集后,提取液用超高液相串联质谱法检测,结果如表1所示,6种黄曲霉毒素的回收率大于98.9%,相对标准偏差小于8.1%,说明Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer对食品样品中的黄曲霉毒素B1具有较高的特异性识别和净化能力。

[0036] 表1 Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer对黄曲霉毒素B1的分离净化效果

	AFB1 添加浓度	回收率 (%)	标准偏差 (%)
	(μg/L)		
[0037]	0.5	100.6	7.4
	1	104.3	5.6
	5	100.1	3.8
	10	98.9	8.1

[0038] 实施例3:Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer吸附量测定

[0039] 取0.5mL浓度为1000ng/mL的黄曲霉毒素B1标准品于20mL的10%甲醇溶液中(v/v),混匀后加入1mL的Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer,室温反应30min后磁分离,超纯水洗涤后,用1mL甲醇洗脱并收集,50℃氮吹至干,1mL乙腈-水(3:7,v/v)复溶,过0.22μm的滤膜并收集于棕色进样小瓶中,UPLC-MS/MS进行检测。结果表明Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer对黄曲霉毒素B1的最大吸附量分别为346ng/mL。

[0040] 实施例4:Fe₃O₄@CTS@AFs-aptamer分离净化玉米、花生、橄榄油中的黄曲霉毒素

[0041] 玉米、花生样品用刀式混合研磨仪研磨成面,橄榄油样品不做前处理,取阴性样品25g添加一定浓度标准品后涡旋混匀1min,室温静置2h后用于后续实验。按照分离净化步骤,如图3所示,可在1min内达到净化吸附和解吸过程,快速高效提取样品中的黄曲霉毒素,提取液用超高液相串联质谱法检测,结果如表3所示,三种样品的添加回收率范围在86%~104%之间。

[0042] 表3玉米、花生、橄榄油样品中黄曲霉毒素B1的回收率和精密度(n=3)

[0043]

AFB1 添加浓度 (μg/L)	玉米	花生	橄榄油
	平均回收率 (日内精密度/日间精密度) (%)		
0.5	101 (4.8/8.9)	99 (5.8/7.0)	96 (6.1/9.4)
1.0	99 (6.3/5.6)	86 (2.3/9.2)	90 (5.6/8.9)
5.0	96 (5.2/10.1)	98 (2.7/4.5)	100 (9.0/11.7)
10	89 (6.7/9.4)	92 (7.4/6.1)	104 (7.4/10.8)

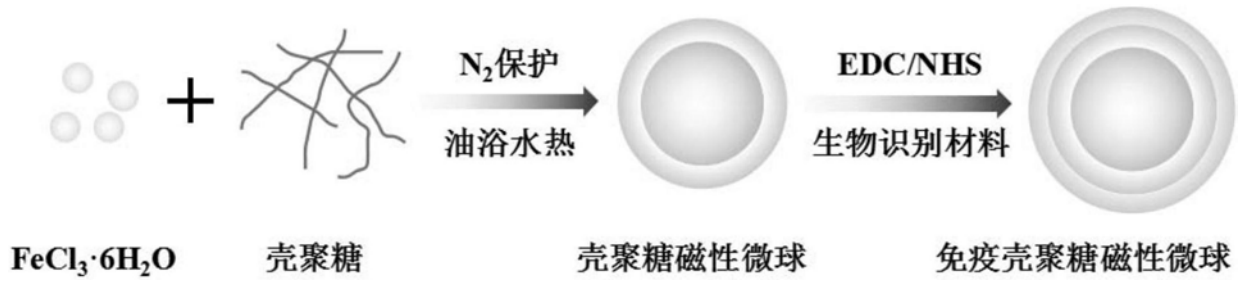


图1

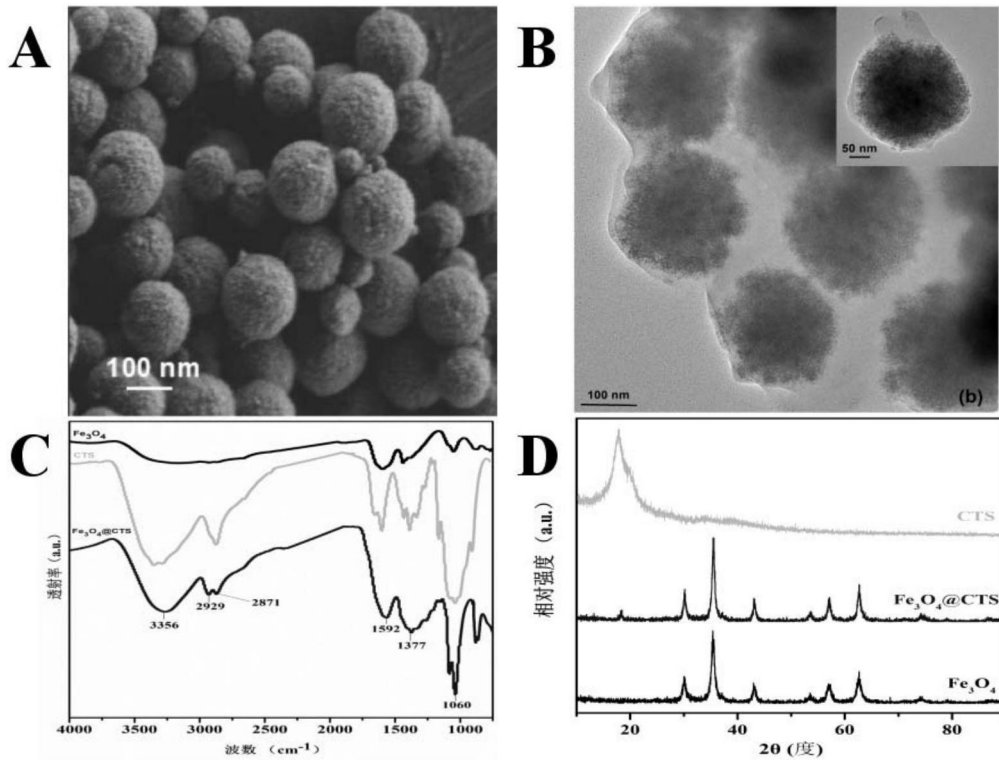


图2

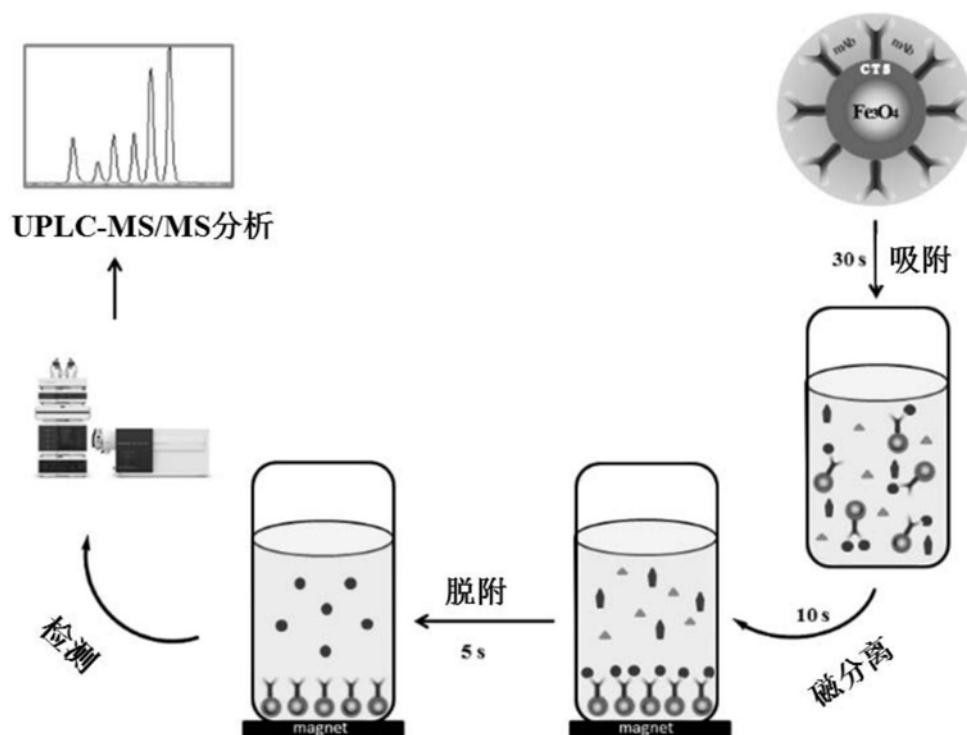


图3

专利名称(译)	免疫壳聚糖磁性微球及其制备方法和在样品前处理中的应用		
公开(公告)号	CN109813895A	公开(公告)日	2019-05-28
申请号	CN2017111157156.0	申请日	2017-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	江海洋 沈建忠 谢洁 彭涛 王战辉 温凯 李建成 夏曦		
发明人	江海洋 沈建忠 谢洁 彭涛 王战辉 温凯 李建成 夏曦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	关畅 王春霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种免疫壳聚糖磁性微球及其制备方法和在样品前处理中的应用。本发明提供的免疫壳聚糖磁性微球的制备方法包括如下步骤：采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羧基琥珀酰亚胺活化壳聚糖磁性微球，然后加入生物识别材料进行反应，然后加入封闭液进行封闭处理即得。将本发明免疫壳聚糖磁性微球用于样品前处理，有效解决了食品安全领域样品前处理中有机溶剂用量大、操作繁琐、耗时长、基质效应明显等缺点，大大简化了样品前处理过程，缩短前处理时间，提高了分析方法灵敏度，从而实现食品样品中有害小分子物质的超灵敏检测。

AFB1 添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	标准偏差 (%)
0.5	100.6	7.4
1	104.3	5.6
5	100.1	3.8
10	98.9	8.1