

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
B01J 20/285 (2006.01)
B01J 20/30 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810151335.8

[43] 公开日 2009年1月21日

[11] 公开号 CN 101347721A

[22] 申请日 2008.9.17

[21] 申请号 200810151335.8

[71] 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路94号

[72] 发明人 陈朗星 王新 王莲艳 何锡文
张玉奎 王彦芬

[74] 专利代理机构 天津佳盟知识产权代理有限公司
代理人 侯力

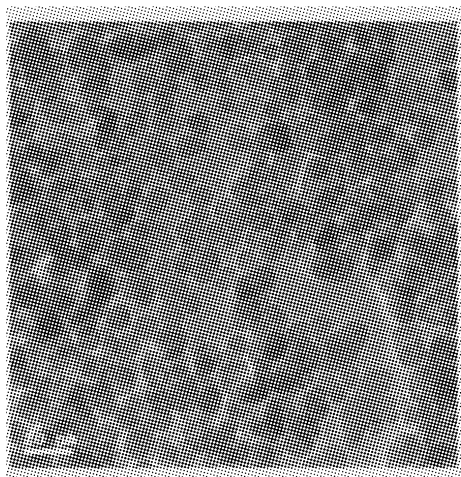
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

[54] 发明名称

蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法

[57] 摘要

一种蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法，是以血红蛋白、溶菌酶、血清蛋白中的一种为模板分子的蛋白质磁性印迹纳米球制备方法，包括有如下阶段：磁性纳米粒子的合成，磁性纳米粒子是表面包有二氧化硅的 Fe_3O_4 纳米粒子；磁球表面氨基硅烷化；用戊二醛连接蛋白；用硅烷化试剂固定模板蛋白的空间结构；碱洗脱磁球表面蛋白形成印迹位点。本发明制备的血红蛋白、溶菌酶、血清蛋白磁性纳米印迹聚合物微球，将分子印迹准确专一的识别特性和磁性纳米微球在外界磁场作用下迅速分离的特性相结合，集二者优点于一体，避免了复杂的离心操作，在细胞、蛋白质、核酸的分离，生物分子的检测，肿瘤诊断，药物靶向治疗中发挥了重大作用，在分离分析领域有着广泛的应用前景。



1. 一种蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法, 其特征在于, 是以血红白蛋白、溶菌酶、血清蛋白中的一种为模板分子的蛋白质磁性印迹纳米球制备方法, 包括有如下阶段:

- (一) 磁性纳米粒子的合成;
- (二) 磁球表面氨基硅烷化;
- (三) 用戊二醛连接蛋白;
- (四) 用硅烷化试剂固定模板蛋白的空间结构;
- (五) 碱洗脱磁球表面蛋白形成印迹位点。

2. 根据权利要求1所述的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法, 其特征在于, 所述的第(一)阶段是采用共沉淀的方法合成磁性纳米粒子, 所述的共沉淀方法基本反应方程式: $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$, 并由如下步骤得到磁性 Fe_3O_4 纳米粒子:

(1) 将 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 置于氮气除氧的二次水中, 搅拌溶解, 其中 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}=2: 1$, 为摩尔比;

(2) 升高环境温度到 80°C 以上, 在氮气氛围下逐滴加入 25% 氨水溶液, 并过量, 使 $\text{OH}^-:\text{Fe}^{3+}$ 的摩尔比大于 15, 并机械搅拌反应进行 30 分钟, 得到黑色磁性流体;

(3) 冷却后用磁铁磁性分离将混合液分为两相, 除去上层清液, 得到黑色超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子, 用乙醇、超纯水清洗 5~6 次, 真空干燥, 得到磁性 Fe_3O_4 纳米粒子。

3. 根据权利要求1或2所述的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法, 其特征在于, 所述的磁性纳米粒子是表面包有二氧化硅的 Fe_3O_4 纳米粒子, 是由如下步骤得到的:

(1) 将干燥的 Fe_3O_4 溶于异丙醇溶液, 异丙醇为溶剂, 使 Fe_3O_4 完全分散, 形成均匀的溶液, 再依次加入高纯水、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 使溶液的 $\text{pH} > 11$, 超声 30min;

(2) 常温下加入四乙氧基硅烷化试剂 (TEOS), 使四乙氧基硅烷化试剂的浓度范围为 0.1% 到 5%, 搅拌 12 h, 外加磁场进行磁性分离, 高纯水洗至中性, 真空干燥至粉末。

4. 根据权利要求1所述的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法, 其特征在于, 所述的磁性纳米粒子的粒径约为 12nm 左右。

5. 根据权利要求1所述的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法, 其特征在于, 第(二)阶段所述的磁球表面氨基硅烷化是以 3-氨基丙基三乙氧基硅烷为试剂, 在二氧化硅磁性纳米球表面采用溶胶-凝胶法实现的, 包括如下步骤:

(1) 二氧化硅磁性纳米球溶于甲醇和丙三醇的混合溶液, 甲醇: 丙三醇=1: 1 (体积比), 二氧化硅磁性纳米球能完全分散在甲醇和丙三醇混合溶剂中, 超声 30 min, 没有二氧化硅磁性纳米球沉淀;

(2) 升高环境温度到 $80-90^\circ\text{C}$, 依次加入高纯水和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷化试剂, 两者的体积比为 1: 5 即水: 3-氨基丙基三乙氧基硅烷化试剂=1: 5, 反应体系中水的含量 $< 1\%$, 机械搅拌反应 3h 后, 磁性分离高纯水洗, 甲醇洗, 真空干燥。

6. 根据权利要求1所述的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法, 其特征在于, 第(三)

阶段所述的戊二醛是以共价键的方式与血红白蛋白、溶菌酶、血清蛋白表面的氨基作用形成亚胺键，从而将模板蛋白固定在磁性纳米球表面，具体是：将等体积含氨基衍生的二氧化硅磁性纳米球 5%-10%和含 1%戊二醛的磷酸缓冲溶液（pH 为 5.0-7.0）混合，在室温反应 12h，磁性分离，大量水洗备用，得到醛基修饰氨基衍生 Fe_3O_4 纳米球。

7. 根据权利要求 1 所述的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法，其特征在于，第（四）阶段所述的用硅烷化试剂固定模板蛋白的空间结构，包括如下步骤：

（1）将醛基修饰的氨基衍生化的二氧化硅磁性纳米球加入到含有模板蛋白质（牛血红蛋白或溶菌酶或血清白蛋白）的磷酸缓冲溶液，4℃振荡反应 12h，外加磁场分离，水洗；

（2）固定上模板蛋白的磁性纳米印迹聚合物球加入至 pH 为 5.0-7.0 的磷酸缓冲液，并加入比例为 1:1 的丙基三甲氧基硅烷和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷的混合硅烷化试剂，硅烷试剂的浓度保持为 0.5%-5%，4℃振荡反应 36h，磁性分离，大量水洗，重复 3-5 次。

8. 根据权利要求 1 所述的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法，其特征在于，第（五）阶段所述的洗脱液为氢氧化钠或氢氧化钾碱洗脱液，其浓度为 0.1mol/mL。

蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法

技术领域

本发明涉及一种蛋白质分子印迹聚合物的制备。特别是涉及一种对模板蛋白有一定的特异性吸附性能，以磁性为载体可在外界磁场的作用下迅速分离，能够避免传统的离心等复杂操作，使分离识别过程更加简化的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法。

背景技术

分子印迹技术(Molecular Imprinting Technique, MIT),是制备对特定目标分子(模板分子也称印迹分子)具有特异预定选择性的高分子化合物—分子印迹聚合物(Molecular Imprinted Polymers, MIPs)的技术(M. D. Yan, O. Ramstrom, Ed., *Molecularly Imprinted Materials Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 2005)。分子印迹聚合物它具有形状与底物分子相匹配的孔穴,而且有着特定排列的功能基团可以与底物分子产生识别作用。分子印迹技术广泛应用于色谱填料、固相萃取、模拟酶、催化,相似物分离识别、以及生物传感器等诸多领域(R. J. Ansell, D. Kriz, Mosbach, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1996, 7, 89; 赖家平, 何锡文, 郭洪声, 梁宏, *分析化学*, 2001, 7, 836; K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.*, 2000, 100, 2495; D. Kriz, O. Ramstrom, K. Mosbach, *Anal. Chem.*, 1997, 69, A345; G. Wulff, *Chem. Rev.*, 2002, 102, 1.)。对于一些低分子量,水溶性差的目标分子体系已经具备了成熟的分子印迹技术,但是对于水溶性生物大分子蛋白质的研究工作有待于进一步发展,原因由于生物大分子体积大而且空间结构变化复杂,使得印迹过程中很难合成有效的识别位点,不过经过科学研究的不断尝试目前已经有一部分工作取得了可喜进展。制备蛋白质印迹聚合物的方法一般分为包埋法、微球表面印迹法和抗原决定基法(A. Bossi, S. A. Piletsky, E. V. Piletska, P. G. Righetti, A. P. F. Turner. *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5281; F. Bonini, S. Piletsky, A. P. F. Turner, A. Speghini, A. Bossi. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 2322; T. Shiomi, M. Matsui, F. Mizukami, K. Sakaguchi. *Biomaterials*, 2005, 26, 5564; A. Rachkov, N. Minoura. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1544, 255; H. Nishino, C. S. Huang, K. J. Shea. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 2392.)，其中微球表面印迹法应用广泛,在微球表面接枝印迹蛋白,从而在微球表面形成蛋白质部分包埋得聚合物层,再通过洗脱形成与蛋白质结构相匹配的结合位点,由于结合孔穴分布在微球表面,模板分子在吸附过程就会较快的接近识别位点,因而具有较高的结合速率。文献中报道的方法大都是以硅球作为印迹载体,原因在于硅球具有一定的硬度和粒径,具有一定的机械强度和稳定性。但是硅球由于粒径较大,比表面积相对较低,一些识别位点容易包埋其中,造成吸附容量较低,而且采用硅球作分离介质,

会涉及离心分离等繁琐操作，不利于广泛应用。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是，提供一种对模板蛋白有一定的特异性吸附性能，以磁性为载体可在外界磁场的作用下迅速分离，能够避免传统的离心等复杂操作，使分离识别过程更加简化的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法。

本发明所采用的技术方案是：一种蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法，是以血红白蛋白、溶菌酶、血清蛋白中的一种为模板分子的蛋白质磁性印迹纳米球制备方法，包括有如下阶段：

- (一) 磁性纳米粒子的合成；
- (二) 磁球表面氨基硅烷化；
- (三) 用戊二醛连接蛋白；
- (四) 用硅烷化试剂固定模板蛋白的空间结构；
- (五) 碱洗脱磁球表面蛋白形成印迹位点。

所述的第（一）阶段是采用共沉淀的方法合成磁性纳米粒子，所述的共沉淀方法基本反应方程式： $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ ，并由如下步骤得到磁性 Fe_3O_4 纳米粒子：

(1) 将 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 置于氮气除氧的二次水中，搅拌溶解，其中 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}=2:1$ ，为摩尔比；

(2) 升高环境温度到 80°C 以上，在氮气氛围下逐滴加入 25% 氨水溶液，并过量，使 $\text{OH}^-:\text{Fe}^{3+}$ 的摩尔比大于 15，并机械搅拌反应进行 30 分钟，得到黑色磁性流体；

(3) 冷却后用磁铁磁性分离将混合液分为两相，除去上层清液，得到黑色超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，用乙醇、超纯水清洗 5~6 次，真空干燥，得到磁性 Fe_3O_4 纳米粒子。

所述的磁性纳米粒子是表面包有二氧化硅的 Fe_3O_4 纳米粒子，是由如下步骤得到的：

(1) 将干燥的 Fe_3O_4 溶于异丙醇溶液，异丙醇为溶剂，使 Fe_3O_4 完全分散，形成均匀的溶液，再依次加入高纯水、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，使溶液的 $\text{pH} > 11$ ，超声 30min；

(2) 常温下加入四乙氧基硅烷化试剂 (TEOS)，使四乙氧基硅烷化试剂的浓度范围为 0.1% 到 5%，搅拌 12 h，外加磁场进行磁性分离，高纯水洗至中性，真空干燥至粉末。

所述的磁性纳米粒子的粒径约为 12nm 左右。

第（二）阶段所述的磁球表面氨基硅烷化是以 3-氨基丙基三乙氧基硅烷为试剂，在二氧化硅磁性纳米球表面采用溶胶-凝胶法实现的，包括如下步骤：

(1) 二氧化硅磁性纳米球溶于甲醇和丙三醇的混合溶液，甲醇：丙三醇=1：1（体积比），二氧化硅磁性纳米球能完全分散在甲醇和丙三醇混合溶剂中，超声 30 min，没有二氧化硅磁性纳米球沉淀；

(2) 升高环境温度到 $80-90^\circ\text{C}$ ，依次加入高纯水和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷化试剂，两者的体积比为 1：5 即水：3-氨基丙基三乙氧基硅烷化试剂=1：5，反应体系中水

的含量<1%，机械搅拌反应 3h 后，磁性分离高纯水洗，甲醇洗，真空干燥。

第（三）阶段所述的戊二醛是以共价键的方式与血红白蛋白、溶菌酶、血清蛋白表面的氨基作用形成亚胺键，从而将模板蛋白固定在磁性纳米球表面，具体是：将等体积含氨基衍生的二氧化硅磁性纳米球 5%-10%和含 1%戊二醛的磷酸缓冲溶液(pH 为 5.0-7.0)混合，在室温反应 12h，磁性分离，大量水洗备用，得到醛基修饰氨基衍生 Fe_3O_4 纳米球。

第（四）阶段所述的用硅烷化试剂固定模板蛋白的空间结构，包括如下步骤：

(1) 将醛基修饰的氨基衍生化的二氧化硅磁性纳米球加入到含有模板蛋白质（牛血红蛋白或溶菌酶或血清白蛋白）的磷酸缓冲溶液，4℃振荡反应 12h，外加磁场分离，水洗；

(2) 固定上模板蛋白的磁性纳米印迹聚合物球加入至 pH 为 5.0-7.0 的磷酸缓冲液，并加入比例为 1:1 的丙基三甲氧基硅烷和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷的混合硅烷化试剂，硅烷化试剂的浓度保持为 0.5%-5%，4℃振荡反应 36h，磁性分离，大量水洗，重复 3-5 次。

第（五）阶段所述的洗脱液为氢氧化钠或氢氧化钾碱洗脱液，其浓度为 0.1mol/mL。

本发明的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法制备的血红蛋白、溶菌酶、血清蛋白磁性纳米印迹聚合物微球将分子印迹准确专一的识别特性和磁性纳米微球在外界磁场作用下迅速分离的特性相结合，集二者优点于一体，避免了复杂的离心操作，将传统的离心分离过程大大简化，在细胞、蛋白质、核酸的分离，生物分子的检测，肿瘤诊断，药物靶向治疗中发挥了重大作用，在分离分析领域有着广泛的应用前景。

磁性纳米球不仅具有普通纳米晶体的共性而且具有特有的物理性质，粒径小，比表面积大，耦联配基容量相对较高；悬浮稳定性好，亲和反应迅速；具有超顺磁性，在外磁场的作用下固液分离迅速，用倾倒法即可完成，不需其他设备。

附图说明

图1是实施例1、2、3所制得的四氧化三铁磁性纳米粒子的效果图；

图2是实施例1中所制得的血红蛋白磁性印迹聚合物纳米粒子的效果图；

图3是实施例1中所制的血红蛋白磁性印迹聚合物纳米粒子对模板分子血红蛋白的等温吸附曲线；

具体实施方式

下面结合实施例对本发明的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法做出详细说明。

本发明的蛋白质磁性印迹纳米球的制备方法，是以血红白蛋白、溶菌酶、血清蛋白中的一种为模板分子的蛋白质磁性印迹纳米球制备方法，包括有如下阶段：

（一）磁性纳米粒子的合成；

是采用共沉淀的方法合成磁性纳米粒子，所述的共沉淀方法基本反应方程式： $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ ，并由如下步骤得到磁性 Fe_3O_4 纳米粒子：

(1) 将 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 置于氮气除氧的二次水中, 搅拌溶解, 其中 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}=2:1$ (摩尔比);

(2) 升高环境温度到 80°C 以上, 在氮气氛围下逐滴加入氨水溶液, 并过量, 使 $\text{OH}^-:\text{Fe}^{3+}$ 的摩尔比大于 15, 机械搅拌反应进行 30 分钟, 得到黑色磁性流体;

(3) 冷却后用磁铁磁性分离将混合液分为两相, 除去上层清液, 得到黑色超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子, 用乙醇、超纯水清洗 5~6 次, 真空干燥, 得到磁性 Fe_3O_4 纳米粒子;

所述的磁性纳米粒子是表面包有二氧化硅的 Fe_3O_4 纳米粒子, 是由如下步骤得到的:

(1) 将干燥的 Fe_3O_4 溶于异丙醇溶液, 异丙醇为溶剂, 使 Fe_3O_4 完全分散, 形成均匀的溶液, 依次加入高纯水、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 使溶液的 $\text{pH}>11$, 超声 30min;

(2) 常温下加入四乙氧基硅烷化试剂 (TEOS), 使四乙氧基硅烷化试剂的浓度范围为 0.1%到 5%, 搅拌 12 h, 磁性分离, 高纯水洗至中性, 真空干燥至粉末。得到的磁性纳米粒子的平均粒径约为 12nm。

(二) 磁球表面氨基硅烷化;

所述的磁球表面氨基硅烷化是以 3-氨基丙基三乙氧基硅烷为试剂, 采用溶胶-凝胶法实现的, 包括如下步骤:

(1) 二氧化硅磁性纳米球溶于甲醇和丙三醇的混合溶液, 甲醇: 丙三醇=1: 1 (体积比), 二氧化硅磁性纳米球的能完全分散在甲醇和丙三醇混合溶剂中, 超声 30 min, 没有二氧化硅磁性纳米球沉淀;

(2) 升高环境温度到 $80\text{--}90^\circ\text{C}$, 依次加入高纯水和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷化试剂 (APTES), 两者的体积比为 1: 5 即水: 3-氨基丙基三乙氧基硅烷化试剂=1: 5, 反应体系中水的含量 $<1\%$, 机械搅拌反应 3h 后, 磁性分离高纯水洗, 甲醇洗, 真空干燥。

(三) 用戊二醛连接蛋白;

所述的戊二醛是以共价键的方式与血红白蛋白、溶菌酶、血清蛋白表面的氨基作用形成亚胺键, 从而将模板蛋白固定在磁性纳米球表面, 具体是: 将等体积含氨基衍生的二氧化硅磁性纳米球 5%~10% 和 1%戊二醛的磷酸缓冲溶液 (pH 为 5.0~7.0) 混合, 在弱酸性环境中室温反应 12h, 磁性分离, 大量水洗备用, 得到醛基修饰氨基衍生 Fe_3O_4 纳米球。

(四) 用硅烷化试剂固定模板蛋白的空间结构;

所述的用硅烷化试剂固定模板蛋白的空间结构, 包括如下步骤:

(1) 将醛基修饰的氨基衍生的二氧化硅磁性纳米球加入到含有模板蛋白质 (牛血红蛋白或溶菌酶或血清白蛋白) 的磷酸缓冲溶液, 4°C 振荡反应 12h, 外加磁场分离, 水洗;

(2) 固定上模板蛋白的磁性纳米印迹聚合物球加入至 pH 为 5.0~7.0 的磷酸缓冲液中, 并加入比例为 1: 1 的丙基三甲氧基硅烷 (PTMS) 和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 的混合硅烷化试剂, 硅烷试剂的浓度保持为 0.5%~5%, 4°C 振荡反应 36h, 磁性分离, 大

量水洗，重复 3-5 次。

(五) 碱洗脱磁球表面蛋白形成印迹位点；

所述的碱洗脱液为氢氧化钠洗脱液，其浓度为 0.1mol/mL。印迹有模板蛋白的磁性纳米球用 0.1M 氢氧化钠或氢氧化钾溶液振荡洗涤 12h，除去蛋白模板分子，磁性分离后大量水洗，真空干燥得到含有模板蛋白印迹识别位点的超顺磁性纳米印迹聚合物粒子。

本发明根据分子印迹原理，采用溶胶-凝胶法和共价键分子印迹制备方法解决了磁性纳米粒子与聚合物相容性的问题，将聚合物包覆在二氧化硅修饰的磁性 Fe_3O_4 的表面， Fe_3O_4 表面的二氧化硅层不仅具有很好的生物相容性，而且表面含有的 $-\text{Si}-\text{OH}$ 很容易与硅烷试剂发生反应，使表面含有 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{SH}$ 等基团，以便于将生物分子键合在表面。本发明以共沉淀合成的四氧化三铁磁性纳米粒子为载体，将其表面硅烷化修饰氨基基团，利用戊二醛双醛基的特性将其修饰到磁性纳米粒子表面，而另一端醛基与蛋白质上的氨基基团以亚胺共价键键合，再利用两种硅烷化试剂正丙基三甲氧基硅烷和氨丙基三乙氧基硅烷进行聚合，合成表面印迹有蛋白质分子的核壳型超顺磁性纳米聚合物球。并研究了其吸附性能和对模板蛋白分子的分离识别性能，结果表明，合成的超顺磁性印迹聚合物在外加磁场地作用下分离迅速，对模板蛋白的特异性吸附能力明显高于其他蛋白，研究也表明磁性纳米材料用于蛋白质生物大分子的分离与富集，有效地解决了分子印迹技术存在的吸附容量少、传输速度慢、固液分离操作复杂等不足。

下面给出具体的实施例：

实施例 1：血红蛋白磁性纳米印迹聚合物球的制备

1、共沉淀法合成超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

基本反应方程式： $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$

(1) 将 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.72g) 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3.72g) 溶于氮气除氧的 80mL 二次水中，搅拌溶解，其中 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}=2:1$ (摩尔比)；

(2) 将溶液转移至 250ml 的三颈烧瓶中，在氮气氛围下加热至 80°C ，逐滴加入 10ml 氨水 (25%)，并机械搅拌 (速度为 800rpm)，反应进行 30 分钟，得到黑色磁性流体；

(3) 冷却后用磁铁磁性分离将混合液分为两相，除去上层清液，得到黑色超顺磁性 Fe_3O_4 凝胶，二次水洗至中性，真空干燥至粉末。

2、制备二氧化硅磁性纳米球

(1) 0.5 g Fe_3O_4 溶于 30 mL 异丙醇，加入 2 mL H_2O ，3 mL $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，超声 30 min；

(2) 再加入 1 mL 四乙氧基硅烷 (TEOS)，常温搅拌 12 h (1000 rpm)，二次水洗至中性，真空干燥至粉末。

3、溶胶-凝胶制备氨基衍生的二氧化硅磁性纳米微球

(1) 0.5 g 硅烷化 Fe_3O_4 溶于 30 mL 甲醇和 30 mL 丙三醇的混合溶液，超声 30 min；

(2) 加热至 $80-90^\circ\text{C}$ ，依次加入 $400 \mu\text{L H}_2\text{O}$ ，2 mL APTES，机械搅拌 3 h (500 rpm)，

磁性分离后二次水洗，甲醇洗，真空干燥至粉末。

4、磁性聚合物表面接枝戊二醛

(1) 氨基衍生的二氧化硅磁性纳米聚合物微球1 g和20 mL1% 戊二醛 (pH=5.8磷酸盐缓冲溶液) 混合；

(2) 室温反应12 h，得到醛基修饰氨基衍生 Fe_3O_4 纳米粒子，大量水洗备用。

5、共价键合血红蛋白磁性印迹聚合物的制备

(1) 100 mg 醛基修饰氨基衍生二氧化硅磁性纳米聚合物，加入10 mL 2.0 mg/mL 牛血红蛋白 (pH=7.0, 0.01 mol/L磷酸缓冲溶液, 1 mol/L NaCl)，4℃震荡反应12h，外加磁场分离，水洗；

(2) 固定牛血红蛋白的磁性纳米印迹聚合物微球加入至10 mL pH=7.0的磷酸缓冲液，并加入一定比例的丙基三甲氧基硅烷 (PTMS) 和3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (3-APTES) 的混合硅烷化试剂，PTMS: APTES=1: 1的混合硅烷化试剂 (各25 μ L)，4℃震荡反应36h，磁性分离后大量水洗；

6、模板分子的洗脱

印迹有牛血红蛋白磁性纳米微球用0.1M 氢氧化钠溶液10 mL振荡洗涤12 h，除去血红蛋白模板分子，磁性分离后大量水洗，真空干燥得到含有血红蛋白印迹位点的超顺磁性纳米印迹聚合物。

7、血红蛋白磁性纳米印迹聚合物微球对模板分子的吸附

20mg BHb-MIP磁性纳米聚合物若干份置于玻璃瓶中，加入浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mg/mL的BHb磷酸缓冲溶液 (0.01M, pH=7.0)，将玻璃瓶封口，置于恒温振荡器中振荡吸附12小时，用磁铁将固液磁性分离后用紫外分光光度计测定吸附后溶液中BHb的浓度，采用差减法计算吸附容量。

实施例2：溶菌酶磁性纳米印迹聚合物球的制备

加入模板蛋白为溶菌酶，其他同实例1，可得溶菌酶磁性纳米印迹聚合物球。

实施例3：血清白蛋白磁性纳米印迹聚合物球的制备

加入模板蛋白为血清白蛋白溶菌酶，其他同实例1，可得血清白蛋白磁性纳米印迹聚合物球。

在图1所示的实施例1、2、3中四氧化三铁磁性纳米粒子的效果图中，平均粒径12nm；图2所示的实施例1中所制得的血红蛋白磁性纳米印迹聚合物的效果图中，平均粒径100nm；图3所示是实施例1中所制的血红蛋白磁性纳米印迹聚合物微球对模板分子血红蛋白的等温吸附曲线。

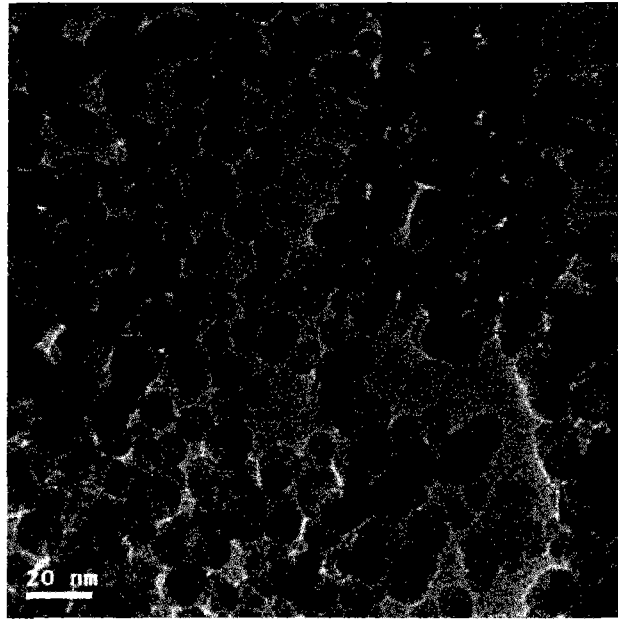


图 1

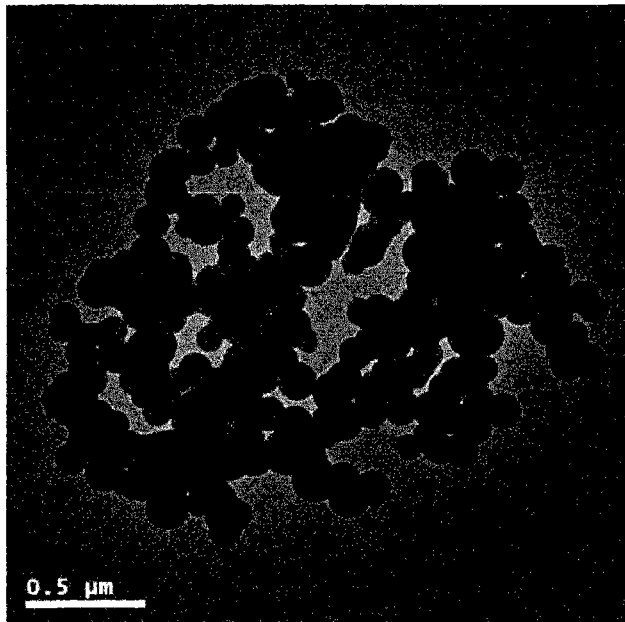


图 2

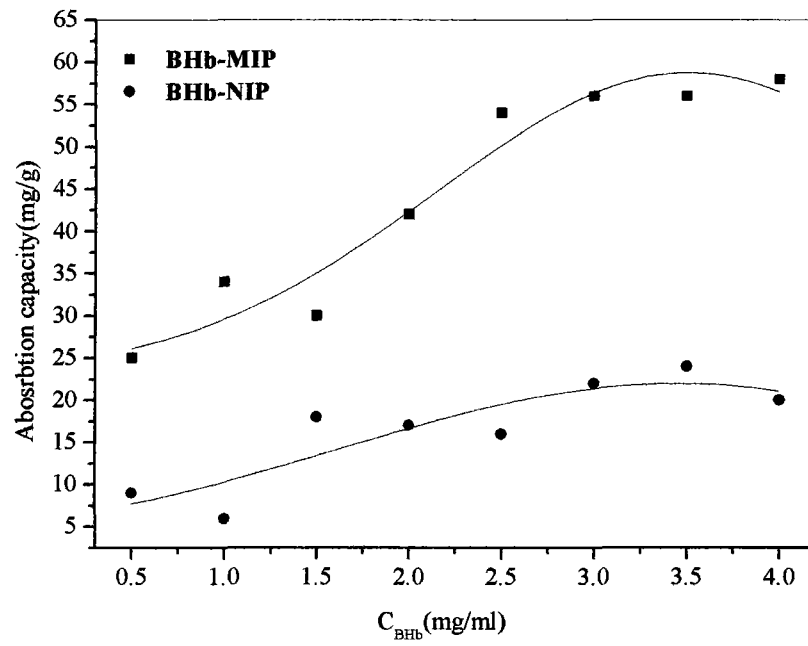


图 3