



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107899552 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201711053696.4

B01J 20/30(2006.01)

(22)申请日 2017.10.31

B01D 15/38(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107899552 A

(56)对比文件

CN 104031201 A, 2014.09.10,

CN 101323454 A, 2008.12.17,

US 2003077842 A1, 2003.04.24,

CN 103285791 A, 2013.09.11,

CN 106622181 A, 2017.05.10,

US 2014228549 A1, 2014.08.14,

CN 1975429 A, 2007.06.06,

CN 1943560 A, 2007.04.11,

(43)申请公布日 2018.04.13

审查员 王晓平

(73)专利权人 苏州博进生物技术有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区锦峰路8  
号15号楼412-2室

(72)发明人 瞿欢欢 朱至放

(74)专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11369

代理人 韩飞

(51)Int.Cl.

B01J 20/26(2006.01)

B01J 20/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种以磁性聚合物微球为基质的金属螯合  
亲和层析介质

(57)摘要

本案涉及磁性聚合物微球为基质的金属螯合亲和层析介质,以包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球作为内核,其中聚合物由海藻酸钠、聚丙烯酰胺、硅酸组成;该内核表面交联壳寡糖和纤维素,壳寡糖和纤维素与烯丙基缩水甘油醚键合,烯丙基缩水甘油醚与配基相连,配基用于络合金属离子;本发明所制备的金属螯合亲和层析介质能够重复使用多次,机械性能强,可以分别络合不同的金属离子,使用寿命更长,分离目标蛋白质效率高。

1. 一种以磁性聚合物微球为基质的金属螯合亲和层析介质，其特征在于，以包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球作为内核，所述四氧化三铁磁球的表面被氨基修饰；所述内核表面交联壳寡糖和纤维素；所述壳寡糖和纤维素与烯丙基缩水甘油醚键合；所述烯丙基缩水甘油醚与配基相连；所述配基络合金属离子；其中，所述聚合物由海藻酸钠、聚丙烯酰胺、硅酸组成，质量分数为：海藻酸钠70～75wt%；聚丙烯酰胺20～25wt%；硅酸5～10wt%。

2. 根据权利要求1所述的金属螯合亲和层析介质，其特征在于，所述四氧化三铁磁球与聚合物的质量比为1:10～12。

3. 根据权利要求1所述的金属螯合亲和层析介质，其特征在于，所述壳寡糖与纤维素的质量比为2:1～1.2。

4. 根据权利要求1所述的金属螯合亲和层析介质，其特征在于，所述四氧化三铁磁球的粒径为0.5～1μm。

5. 根据权利要求1所述的金属螯合亲和层析介质，其特征在于，所述包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球的粒径在30～100μm。

6. 根据权利要求1所述的金属螯合亲和层析介质，其特征在于，所述配基为亚氨基二乙酸、三羟甲基乙二胺、次氨基三乙酸中的一种。

7. 根据权利要求1所述的金属螯合亲和层析介质，其特征在于，所述金属离子为Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>中的一种。

## 一种以磁性聚合物微球为基质的金属螯合亲和层析介质

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种层析介质,具体涉及一种以磁性聚合物微球为基质的金属螯合亲和层析介质。

### 背景技术

[0002] 蛋白质作为最重要的生物大分子之一,是一切生命活动的主要体现者和物质基础,对蛋白质结构及其生物学功能的精确研究必须建立在获得高纯度目标蛋白的基础上,蛋白质分离纯化是用生物工程下游技术从混合物当中分离纯化出所需要的目标蛋白质的方法,是当代生物产业中的核心技术之一。

[0003] 蛋白质分离纯化的依据通常包括:利用溶解度差别、分子大小差别、表面电荷差别、亲疏水特性差别、特异生物学亲和性差别等。其中固定化金属螯合亲和层析法对目标蛋白具有很高的选择特异性、相对较低的经济成本和温和的洗脱条件,在重组蛋白质的纯化中具有明显的优势。固定化金属螯合亲和层析法是建立在目标蛋白与金属离子的亲和性的基础上进行的,现有的以琼脂糖凝胶为基质的金属螯合亲和层析介质中金属离子含量较低,不适合高通量的分离蛋白,同时介质机械强度较低,价格昂贵,重复使用次数有限,寿命较短。

### 发明内容

[0004] 针对现有技术的不足之处,本发明的目的在于提供一种以磁性聚合物微球为基质的金属螯合亲和层析介质。

[0005] 本发明的技术方案概述如下:

[0006] 以包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球作为内核,内核表面交联壳寡糖和纤维素,壳寡糖和纤维素与烯丙基缩水甘油醚键合,烯丙基缩水甘油醚与配基相连,配基络合金属离子;

[0007] 优选的是,所述聚合物由海藻酸钠、聚丙烯酰胺、硅酸组成。

[0008] 优选的是,所述聚合物中海藻酸钠、聚丙烯酰胺、硅酸三种组分的质量分数为:

[0009] 海藻酸钠 70~75wt%;

[0010] 聚丙烯酰胺 20~25wt%;

[0011] 硅酸 5~10wt%。

[0012] 优选的是,所述四氧化三铁磁球与聚合物的质量比为1:10~12。

[0013] 优选的是,所述壳寡糖与纤维素的质量比为2:1~1.2。

[0014] 优选的是,所述四氧化三铁磁球的粒径为0.5~1μm,所述四氧化三铁磁球的表面被氨基修饰。

[0015] 优选的是,所述包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球的粒径在30~100μm。

[0016] 优选的是,所述配基为亚氨基二乙酸、三羟甲基乙二胺、次氨基三乙酸中的一种。

[0017] 优选的是,所述金属离子为Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>中的一种。

[0018] 本发明的有益效果是：本案所制备的金属螯合亲和层析介质以包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球作为基质内核，该内核具有磁性，当重复利用亲和层析介质而需要络合另外一种金属离子时，在弱碱性溶液冲洗下并施加一定磁场即可洗脱已络合的金属离子，避免使用强碱或者高浓度盐溶液对层析介质进行洗脱，减少对配基和内核的损耗，延长了层析介质的使用寿命。

[0019] 包裹四氧化三铁磁球的聚合物由海藻酸钠、聚丙烯酰胺、硅酸三种成分组成，其中海藻酸钠富含羧基呈电负性，能够与表面修饰氨基的四氧化三铁磁球实现很好的交联，加入特定比例的聚丙烯酰胺和硅酸可以促使复合微球通过聚合、融合、固化达到亲和层析介质内核所要求的尺寸 $30\sim100\mu\text{m}$ ；壳寡糖具有良好的生物相容性，而且具有氨基、羟基等活性基团，键合配基量多，有助于提高分离效率，纤维素溶胀性弱，通过与壳寡糖混合后附着于微球表面，有助于维持亲和层析介质的内核形态；本发明所制备的金属螯合亲和层析介质能够重复多次使用并且络合不同的金属离子，使用寿命更长，分离目标蛋白质效率高。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明做进一步的详细说明，以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。发明提供了一种以磁性聚合物微球为基质的金属螯合亲和层析介质，通过下述实施例以及对比例具体阐述。

[0021] 实施例1

[0022] 制备过程如下：

[0023] (1) 将18g海藻酸钠、5g聚丙烯酰胺、2g硅酸溶解到200mL pH为3的稀盐酸溶液，在室温条件下充分搅拌以形成混合溶液A；将2.5g粒径为 $0.5\sim1\mu\text{m}$ 的四氧化三铁磁球加入20mL去离子水中，在室温下剧烈搅拌以形成悬浮液B；

[0024] (2) 在搅拌的条件下，将悬浮液B缓慢加入混合溶液A中，然后剧烈搅拌15~20分钟得到混合溶液C；将混合溶液C缓慢搅拌并升温至 $80\sim90^\circ\text{C}$ 保持1.5~2小时，然后超声分散，得到分散体，分再离心除去大颗粒沉淀；

[0025] (3) 将分散体加入注射器中，并将注射器固定在注射泵上，在注射器针头上加5kV的静电，然后以200mL/h的速率将混合溶液挤入到0.1mol/L的NaOH溶液中即得到包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球；

[0026] (4) 将步骤(3)所得复合微球加入含有10g壳寡糖、5g纤维素的50mL pH为6的稀盐酸中，在 $40\sim45^\circ\text{C}$ 下搅拌2~2.5小时，过滤，用去离子水冲洗并干燥，得到表面交联壳寡糖和纤维素的微球内核；

[0027] (5) 将步骤(4)所得的微球置于100mL浓度为到0.2mol/L的NaOH溶液中，同时加入5g烯丙基缩水甘油醚和2.5g硫酸钠，在 $45\sim50^\circ\text{C}$ 下搅拌8小时，反应结束后过滤并且真空干燥；

[0028] (6) 向步骤(5)所得微球中加入5g次氨基三乙酸、50mL乙醇和2g氢氧化钠，在 $55\sim60^\circ\text{C}$ 下搅拌反应6~8h，反应结束后过滤除去溶剂，洗涤干燥；

[0029] (7) 将步骤(6)所得微球浸泡于1mol/L的醋酸镍溶液，用醋酸调节溶液pH为4~4.5，在 $40^\circ\text{C}$ 下搅拌12小时，过滤并洗涤三次得到目标产品。

[0030] 实施例2

[0031] 制备过程如下：

[0032] 将实施例1的步骤(7)中醋酸镍溶液用相同浓度的醋酸铜溶液代替,其余操作过程与实施例1相同。

[0033] 对比例1

[0034] 制备过程如下:

[0035] (1) 将粒径在30~100μm的琼脂糖凝胶微球加入含有10g壳寡糖、5g纤维素的50mLpH为6的稀盐酸中,在40~45℃下搅拌2~2.5小时,过滤,用去离子水冲洗并干燥,得到表面交联壳寡糖和纤维素的微球内核;

[0036] (2) 将步骤(1)所得的微球置于100mL浓度为到0.2mol/L的NaOH溶液中,同时加入5g烯丙基缩水甘油醚和2.5g硫酸钠,在45~50℃下搅拌8小时,反应结束后过滤并且真空干燥;

[0037] (3) 向步骤(1)所得微球中加入5g次氨基三乙酸、50mL乙醇和2g氢氧化钠,在55~60℃下搅拌反应6~8h,反应结束后过滤除去溶剂,洗涤干燥;

[0038] (4) 将步骤(3)所得微球浸泡于1mol/L的醋酸镍溶液,用醋酸调节溶液pH为4~4.5,在40℃下搅拌2小时,过滤并洗涤三次得到目标产品。

[0039] 对比例2

[0040] 制备过程如下:

[0041] 将实施例1的步骤(1)中制备混合溶液A所用18g海藻酸钠、5g聚丙烯酰胺、2g硅酸以25g海藻酸钠代替,其余制备过程与实施例1相同。

[0042] 对比例3

[0043] 制备过程如下:

[0044] 将实施例1的步骤(1)中制备混合溶液A所用18g海藻酸钠、5g聚丙烯酰胺、2g硅酸以18g海藻酸钠、7g聚丙烯酰胺替代,其余制备过程与实施例1相同。

[0045] 对比例4

[0046] 制备过程如下:

[0047] 将实施例1的步骤(1)中制备混合溶液A所用18g海藻酸钠、5g聚丙烯酰胺、2g硅酸以23g海藻酸钠、2g硅酸替代,其余制备过程与实施例1相同。

[0048] 对比例5

[0049] 制备过程如下:

[0050] 省略实施例1的步骤(4),即在微球内核上不交联壳寡糖和纤维素,将步骤(3)所得包裹有四氧化三铁磁球的聚合物复合微球直接进行步骤(5)键合烯丙基缩水甘油醚的操作,其余制备过程与实施例1相同。

[0051] 对比例6

[0052] 制备过程如下:

[0053] 将实施例1步骤(4)中的10g壳寡糖、5g纤维素仅用15g壳寡糖代替,其余制备过程与实施例1相同。

[0054] 为了测试实施例1~2以及对比例1~6所制备的金属螯合亲和层析介质的性能,以带有6个连续组氨酸标签的重组蛋白A作为目标蛋白进行亲和层析实验,记录各亲和层析介质对目标蛋白的固载量。在第一次层析亲和层析实验结束后,对分别通过下述两种方法清

洗并重新螯合不同的金属离子。

[0055] 方法一：第一次层析实验结束后用3个柱体积的0.05mol/L氢氧化钠和0.01mol/L氯化钠混合溶液冲淋，同时沿层析柱柱长方向施加1000~1500Gs的磁场，随后用2个柱体积的平衡液平衡。对由实施例1和对比例1~6亲和介质所制备的层析柱，用5个柱体积的1mol/L醋酸铜溶液缓慢冲淋，再用2个柱体积的平衡液平衡，收集冲淋液和平衡液，检测其中铜离子浓度，铜离子浓度越低说明亲和层析柱重新螯合铜离子量越多。对实施例2用醋酸镍进行该步测试。记录经层析柱螯合后溶液中金属离子浓度。

[0056] 方法二：第一次层析实验结束后用3个柱体积的0.5mol/L氢氧化钠和0.15mol/L氯化钠混合溶液冲淋，随后用5个柱体积的平衡液平衡。对由实施例1和对比例1~6亲和介质所制备的层析柱，用5个柱体积的1mol/L醋酸铜溶液缓慢冲淋，并用2个柱体积的平衡液平衡，收集冲淋液和平衡液，检测其中铜离子浓度，铜离子浓度越低说明亲和层析柱重新螯合铜离子量越多。对实施例2用醋酸镍进行该步测试。记录经层析柱螯合后溶液中金属离子浓度。

[0057] 表1分别记录了各实施例和对比例的目标蛋白固载量，以及第二次螯合金属离子后冲淋液与平衡液中金属离子的浓度。首先分析各层析介质对目标蛋白质的固载量，实施例2的层析介质以铜离子对带有6个连续组氨酸标签的重组蛋白A进行螯合，铜离子对该目标蛋白的螯合效果比镍离子要差，因此实施例2的目标蛋白固载量较低；实施例1与对比例2~4对目标蛋白的固载量的差异来自于聚合物中成分，对比例2中聚合物仅有海藻酸钠组成，不含有聚丙酰胺和硅酸，会导致复合微球内核稳定性较差，机械强度低，在一定柱压下容易变形，从而致使对目标蛋白固载量较少，实施例1与对比例3~4的固载量表明当聚丙酰胺和硅酸同时存在时，可以增强亲和层析介质的机械强度，进而使磁性聚合物复合微球有较大的固载量和分离效率；由实施例1与对比例5~6的固载量可以发现，内核表面交联壳寡素和纤维素能够丰富内核表面基团，从而较多的络合金属离子进行目标蛋白的固载。

[0058] 然后分析表1第三列和第四列的数据，即经层析柱螯合后淋洗液与平衡液中金属离子浓度。对实施例1而言，采用方法一和方法二最终所得淋洗液和平衡液中金属离子浓度相差无几，而方法二中淋洗液中碱浓度是方法一中碱浓度的10倍，盐浓度是方法一中盐浓度的15倍，这说明若将层析柱洗脱到能重新螯合相同量的金属离子，方法二需要高浓度的盐和碱溶液，众所周知，高浓度的碱和盐会严重破坏亲和层析柱基质的结构，减少其使用寿命；对比例1中以琼脂糖凝胶作为内核，没有包裹磁性微球，对磁场不存在感应，因此采用方法一时并不能很好的洗脱原来络合的金属离子，表现在以弱碱弱盐溶液洗脱后，再以相同浓度金属离子溶液淋洗层析柱，淋洗液和平衡液中金属离子浓度大，即层析柱所络合的金属离子量就较少，当用方法二时，采用高的盐和碱浓度溶液可以很好的洗脱原先络合的金属离子，以从新吸附较多的金属离子，通过实施例1和对比例2可以证明，本发明采用带有磁性的聚合物复合微球能够实现在磁场条件下，以较低的碱和盐浓度清洗金属螯合亲和层析介质。

[0059] 表1

金属螯合亲和层析介质	目标蛋白固载量 (mg/mL)	方法一中金属离子浓度 (mol/L)	方法二中金属离子浓度 (mol/L)
实施例 1	45.9	0.574	0.581
实施例 2	37.6	0.569	0.593
对比例 1	43.8	0.708	0.605
对比例 2	35.4	0.617	0.624
对比例 3	37.1	0.619	0.622
对比例 4	36.5	0.628	0.625
对比例 5	35.8	0.621	0.620
对比例 6	37.2	0.624	0.626

[0060] [0061] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节。