(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108398495 B
(45)授权公告日 2020.07.03

(21)申请号 201810127148.X

(22)申请日 2018.02.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108398495 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(73)专利权人 兰州大学
地址 730000 甘肃省兰州市城关区天水南路222号
专利权人 兰州大学中卫高新技术研究院

(72)发明人 张海霞 王悦

(74)专利代理机构 兰州中科华西专利代理有限公司 62002
代理人 马正良

(51)Int.Cl.
G01N 30/02(2006.01)
G01N 30/08(2006.01)

(56)对比文件
CN 106560218 A,2017.04.12,
CN 104069537 A,2014.10.01,
CN 106018572 A,2016.10.12,
JP S59156431 A,1984.09.05,
WO 2017180489 A1,2017.10.19,
霍全等.海藻酸钠/羧甲基纤维素/丙烯酸双母系高吸水性树脂的合成与表征.《燕山大学学报》.2016,第40卷(第2期),
Xu,G等.Study of Normal and Modified Nucleosides in Serum by RP-HPLC.《CHROMATOGRAPHIA》.2000,第52卷(第3-4期),
黄品芳等.高效液相色谱法测定人血浆中氟脲脱氧核苷的浓度.《中国生化药物杂志》.2001,第22卷(第2期),
高志敏.海藻酸钠基复合吸附材料的制备及对重金属离子的吸附研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2016,(第8期),

审查员 张羽毳

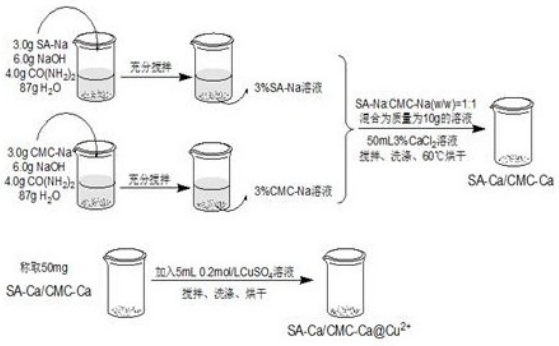
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

一种金属亲和吸附剂用于去除血清中的蛋白并检测血清中的核苷

(57)摘要

本发明涉及一种金属吸附剂用于去除血清中的蛋白及核苷的直接检测。采用了海藻酸钠和羧甲基纤维素钠对铜离子的吸附作用,并且进一步利用铜离子与组氨酸的络合作用,对表面具有裸露组氨酸的蛋白质进行吸附与去除。蛋白去检测率可以达到80%以上。本发明在实际应用中用于血清蛋白的去除以及血清中小分子的直接检测,该材料具有成本低,合成简单,检测效率高的优点。



CN 108398495 B

1.一种金属亲和吸附剂的制备方法,其步骤是:

a、将3.0 g 海藻酸钠(SA-Na)溶于97.0 g含有6wt%氢氧化钠和4wt%尿素的水溶液中,得到3wt%海藻酸钠溶液,经过充分搅拌使其形成透明溶液;同理,将3.0 g羧甲基纤维素钠溶于97.0 g含有6wt%氢氧化钠和4wt%尿素的水溶液中,得到3wt%的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液;

b、将上述两种溶液按照海藻酸钠:羧甲基纤维素钠的质量比为1:1进行混合,混合成总质量为10.0 g的溶液,用磁力搅拌为均一溶液后,加入50.0 mL、3%的氯化钙溶液进行交联,充分搅拌20min后,抽滤并用去离子水充分洗涤,洗涤后的材料放入60℃烘箱中干燥,干燥后对SA-Ca/CMC-Ca材料进行人工研磨,即可得到SA-Ca/CMC-Ca复合材料;

c、称取上述研磨好的SA-Na/CMC-Ca复合材料50.0 mg,将其与5.0 mL的0.2mol/L的硫酸铜溶液在磁力搅拌下反应4.0 h,使材料嫁接上Cu^{2+},然后用去离子水对材料进行充分洗涤,去除材料表面物理吸附的Cu^{2+},洗净后将材料放入60℃真空干燥箱烘干脱去水分,干燥后进行研磨,即可得到SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}。

2.如权利要求1制备一种金属亲和吸附剂,用于去除血清中的蛋白并检测血清中的核苷。

一种金属亲和吸附剂用于去除血清中的蛋白并检测血清中的核苷

技术领域

[0001] 本发明涉及功能材料制备及其检测技术领域，具体是指一种金属亲和吸附剂用于去除血清中的蛋白并检测血清中的核苷。

背景技术

[0002] 血清是由血浆去除纤维蛋白原而形成的一种很复杂的混合物。它主要由水和各种化学成分组成。这些化学成分包括白蛋白、α1、α2、β、γ-球蛋白，甘油三酯，总胆固醇，谷丙转氨酶等。在对血清当中的小分子进行检测时，由于血清中的复杂成分，特别是一些高丰度蛋白，会对这些物质的检测带来干扰，使样品无法直接进液相检测，会对色谱柱进行堵塞。因此，研究者常用的方法是将目标物选择性富集后进行检测，此过程需要解决选择性，吸附量以及洗脱条件等，工艺复杂，成本高。因此，设计合成一种金属亲和吸附剂可以对血清中高丰度蛋白去除后，不经过复杂的样品前处理，直接进液相色谱分析检测血清中小分子是科技工作者需要解决的问题。

发明内容

[0003] 鉴于上述，本发明的目的在于使用海藻酸钠和羧甲基纤维素钠作基质，进行Cu^{2+}固定后，利用Cu^{2+}与组氨酸的络合作用，大量富集表面富含组氨酸的蛋白质，然后，通过对血清两次吸附后去除其中80%的蛋白。去除复杂样品中高丰度蛋白后，随后直接检测血清中的核苷。

[0004] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现：

[0005] 金属亲和吸附剂的制备

[0006] 将3.0 g 海藻酸钠(SA-Na)溶于97.0 g含有6wt%氢氧化钠和4wt%尿素的水溶液中，得到3wt%海藻酸钠溶液，经过充分搅拌使其形成透明溶液；同理，将3.0 g羧甲基纤维素钠溶于97.0 g含有6wt%氢氧化钠和4wt%尿素的水溶液中，得到3wt%的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液；

[0007] 将上述两种溶液按照海藻酸钠:羧甲基纤维素钠的质量比为1:1进行混合，混合成总质量为10.0 g的溶液，用磁力搅拌为均一溶液后，加入50.0 mL、3%的氯化钙溶液进行交联，充分搅拌20min后，抽滤并用去离子水充分洗涤，洗涤后的材料放入60℃烘箱中干燥，干燥后对SA-Ca/CMC-Ca材料进行人工研磨，即可得到SA-Ca/CMC-Ca复合材料。

[0008] SA-Ca/CMC-Ca为白色粉末，不溶于水。

[0009] 称取上述研磨好的SA-Na/CMC-Ca复合材料50.0 mg，将其与5.0 mL的0.2mol/L的硫酸铜溶液在磁力搅拌下反应4.0 h，使材料嫁接上Cu^{2+}，然后用去离子水对材料进行充分洗涤，去除材料表面物理吸附的Cu^{2+}，洗净后将材料放入60℃真空干燥箱烘干脱去水分，干燥后进行研磨，即可得到SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}。

[0010] SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}为蓝色有孔粉末，不溶于水。

[0011] 本发明的优点和产生的有益效果：

[0012] 本发明制备的一种低成本的金属亲和吸附剂，使用海藻酸钠和羧甲基纤维素钠为基底，固定Cu^{2+}后，并且进一步利用铜离子与组氨酸的络合作用，对表面具有裸露组氨酸的蛋白质如牛血红蛋白、牛血清蛋白进行吸附与去除，对牛血红蛋白的吸附量可以达到33g/g，对牛血清蛋白的吸附量可以达到9.8g/g。在实际样品血清中，对蛋白的去除率也可以达到80％以上，从而可以实现SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对血清中小分子物质的直接分析，而不用经过复杂的样品前处理，拥有比较好的应用前景。

[0013] 本发明所制备的金属亲和吸附剂采用了海藻酸钠和羧甲基纤维素钠两种非常廉价易得的原料，制备的金属亲和吸附剂的成本大大降低；此外，金属亲和吸附剂的制备方法非常简单，金属亲和吸附剂对于表面富含组氨酸的蛋白质的吸附量很大，吸附所需的平衡时间也较短，使得材料在实际应用中可以用来对高丰度蛋白质进行去除，实用性较大，并且可以实现对复杂样品中小分子含量的直接测定。

附图说明

[0014] 图1为金属亲和吸附剂的合成步骤示意图。

[0015] 图2 中a、b、c、d分别为海藻酸钠、羧甲基纤维素钠、SA-Ca/CMC-Ca

[0016] 、SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的红外谱图。

[0017] 图3为所制备的SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的Zeta电势图。

[0018] 图4中a为SA-Ca/CMC-Ca的扫描电镜(SEM)图，c为SA-Ca/CMC-Ca的透射电镜(TEM)图；b分别为SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的SEM图，d为SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的TEM图。

[0019] 图5 a、b、c分别为SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对牛血红蛋白(BHb)、牛血清蛋白(BSA)、溶菌酶(LYZ)的吸附；d为SA-Ca/CMC-Ca对牛血红蛋白的吸附。

[0020] 图6 为SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对血清中的蛋白两次吸附的去除率。

[0021] 图7 为液相色谱检测血清中核苷的回收率。

具体实施方式

[0022] 下面结合具体实施例和实验例对本发明再做进一步说明：

[0023] 实施例1

[0024] 将3.0 g 海藻酸钠(SA-Na)溶于97.0 g含有6wt%氢氧化钠和4wt%尿素的水溶液中，得到3wt%海藻酸钠溶液，经过充分搅拌使其形成透明溶液；同理，将3.0 g羧甲基纤维素钠溶于97.0 g含有6wt%氢氧化钠和4wt%尿素的水溶液中，得到3wt%的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液；

[0025] 将上述两种溶液按照海藻酸钠:羧甲基纤维素钠的质量比为1:1进行混合，混合成总质量为10.0 g的溶液，用磁力搅拌为均一溶液后，加入50.0 mL、3%的氯化钙溶液进行交联，充分搅拌20min后，抽滤并用去离子水充分洗涤，洗涤后的材料放入60℃烘箱中干燥，干燥后对SA-Ca/CMC-Ca材料进行人工研磨，即可得到SA-Ca/CMC-Ca复合材料。

[0026] SA-Ca/CMC-Ca为白色粉末，不溶于水。

[0027] 称取上述研磨好的SA-Na/CMC-Ca复合材料50.0 mg，将其与5.0 mL的0.2mol/L的硫酸铜溶液在磁力搅拌下反应4.0 h，使材料嫁接上Cu^{2+}，然后用去离子水对材料进行充分

洗涤，去除材料表面物理吸附的Cu^{2+}，洗净后将材料放入60℃真空干燥箱烘干脱去水分，干燥后进行研磨，即可得到SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}。

[0028] SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}为蓝色有孔粉末，不溶于水。

[0029] 对SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}材料的表征：

[0030] 合成流程图如图1所示。

[0031] 红外和Zeta电势表征如图2、图3所示。

[0032] 图2中，a、b、c、d分别为海藻酸钠、羧甲基纤维素钠、SA-Ca/CMC-Ca、SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的红外光谱图，从图2中可以看出，海藻酸钠和羧甲基纤维素钠在1680cm^{-1}处有C=O的特征吸收峰，3400cm^{-1}处有-OH的吸收峰，2930cm^{-1}处为-CH_2的吸收峰，1460cm^{-1}处有-CH_2的吸收峰，在SA-Ca/CMC-Ca和SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}中同样有这些特征吸收峰，证明了SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}材料制备成功。同时发现，SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}与海藻酸钠、羧甲基纤维素钠和SA-Ca/CMC-Ca三种材料比较，SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}在1000 cm^{-1}处C-O的吸收峰向长波方向移动，说明Cu^{2+}与材料中的羧基发生了络合作用。

[0033] 由图3中Zeta电势结果可知，在pH4-9范围内，SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}材料的电势均为负值，且SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的表面电势逐渐变负，在pH=7后趋于稳定。牛血红蛋白和牛血清蛋白的表面均带正电荷，说明材料对蛋白质的吸附除了Cu^{2+}与蛋白表面组氨酸的配位作用以外，SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的表面电势为负值，牛血红蛋白和牛血清蛋白的表面均带正电荷，还具有静电吸引作用。

[0034] 图4 中，a为SA-Ca/CMC-Ca的扫描电镜(SEM)图，c为SA-Ca/CMC-Ca的透射电镜(TEM)图；(d)透射电镜图中可以看出SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}粉末状材料具有许多孔状结构。b分别为SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的SEM图，d为SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}的TEM图。从图4(b)扫描电镜图中可以看出，SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}材料在吸附Cu^{2+}之后，颗粒更加分散，是由于在吸附铜离子时剧烈搅拌的条件下，受到了水流的冲击作用。这使得材料的比表面积大大增加，将蛋白质更多地吸附在材料表面。

[0035] 试验例1

[0036] 准确称取2.0 mg SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}材料分别加入到5.0 mL不同浓度的(2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0mg/mL)的牛血红蛋白溶液中进行吸附。每隔10min用高速离心机离心后，取上清液稀释后，然后取500μL与2.5mL考马斯亮蓝溶液显色5-10 min后，用紫外分光光度计在595nm处测定吸光度值，并计算材料对牛血红蛋白的吸附量。同样，取2.00 mg材料对4.0 mg/mL的牛血清蛋白溶液和1.0 mg/mL的溶菌酶蛋白溶液进行吸附，操作同上。

[0037] 牛血红蛋白表面裸露的组氨酸个数为14个，牛血清蛋白表面裸露的组氨酸个数为4个，而溶菌酶表面没有裸露的组氨酸，因此在理论上SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对这三种蛋白质的吸附量应该为牛血红蛋白＞牛血清蛋白＞溶菌酶。从图5可以看出，SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对牛血红蛋白的吸附在50min的时候达到平衡，最大吸附量大约为33g/g；材料对牛血清蛋白的吸附在40 min时达到平衡，最大吸附量大约为9.8g/g；SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对溶菌酶的吸附量在0.1g/g左右；材料对三种蛋白的吸附量与蛋白表面裸露组氨酸的含量顺序一致。从图5中可以看出，没有固定铜离子的SA-Ca/CMC-Ca材料对牛血红蛋白的吸附量远远小于SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对牛血红蛋白的吸附量，说明SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对牛血红蛋白优越的吸附量

主要是基于铜离子与组氨酸的相互作用，吸附量大。而SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对溶菌酶的吸附量远远小于SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对牛血红蛋白和牛血清蛋白的吸附量，是由于溶菌酶表面不包含有裸露的组氨酸，不能与Cu^{2+}产生配位作用。SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对溶菌酶的吸附主要是基于非特异性吸附。

[0038] 试验例2

[0039] 准确称取10.0 mg对稀释10倍的1.0 mL人血血清中蛋白质吸附10min，离心取上清液后，另取10.0mg SA-Ca/CMC-Ca@Cu2+材料对上清液再次吸附10min，离心取上清液。将上清液稀释后，取500μL与2.5mL考马斯亮蓝溶液显色5-10 min后，用紫外分光光度计在595nm处测定吸光度值。由公式(1)计算出材料对血清中蛋白质的去除率。

[0040] $$去除率=\frac{血清蛋白去除前吸光度-血清蛋白去除后吸光度}{血清蛋白去除前吸光度}*100\%$$

[0041] 从图6可以得知，SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对血清进行两次吸附后，蛋白去除率可以达到80%以上。

[0042] 试验例3

[0043] 取100ul血清，在血清中分别加入10ug/mL的胞苷、尿苷、肌苷和胸苷混合核苷标准样品0，20，100，300uL，用水稀释至1mL，配置成含有标准样品浓度为0，0.2，1.0，3.0ug/mL混合核苷的血清样品。分别用10.0mg SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}对样品吸附两次，每次10min，离心后取最终上清液进行液相检测。使用赛默飞UHPLC3000色谱仪器，色谱柱为Phenomenox(150*3.20mm)，色谱的梯度洗脱条件为：流动相A，乙腈；流动相B，12.5mM甲酸铵溶液；0-2.5min，B:95%-86%；2.5-4min，B:86%-30%；4-10min，B:30%，流速：0.7mL/min，紫外检测波长：259nm。通过公式(2)计算出四种核苷在未加标时的浓度以及加标0.2，1.0，3.0ug/m三个浓度下的回收率。

[0044] $$回收率=\frac{加标后所测得的浓度-空白样品浓度}{标准样品浓度}*100\%$$

[0045] 表1 液相检测空白和加标不同浓度的血清样品中核苷的浓度

[0046]

ug/mL	胞苷	尿苷	肌苷	胸苷
空白	0.03	0.25	0.19	无法测得
加标0.2	0.2452	0.36785	0.2388	0.2196
加标1.0	0.93555	1.1743	0.62065	0.9989
加标3.0	2.70715	3.1241	1.75025	2.94245

[0047] 从表1中为液相色谱所测得的空白血清中核苷的浓度，在空白血清中含有少量胞苷，尿苷和肌苷，无法检测到胸苷。从图7中可以看出，在加标样品中，胞苷，尿苷和胸苷的回收率较为稳定，都在100%左右，而肌苷的回收率较低，是由于在蛋白质吸附过程中，部分肌苷被材料吸附，与材料和被吸附的蛋白一同被离心除去。

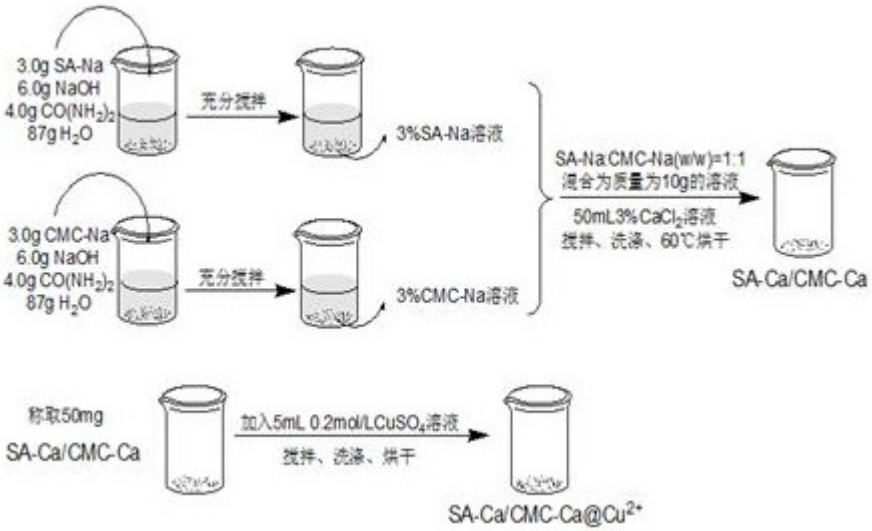

3.0g SA-Na
6.0g NaOH
4.0g $CO(NH_2)_2$
87g H_2O
充分搅拌
3%SA-Na溶液
3.0g CMC-Na
6.0g NaOH
4.0g $CO(NH_2)_2$
87g H_2O
充分搅拌
3%CMC-Na溶液
SA-Na:CMC-Na(w/w)=1:1
混合为质量为10g的溶液
50mL3% $CaCl_2$溶液
搅拌、洗涤、60℃烘干
SA-Ca/CMC-Ca
称取50mg
SA-Ca/CMC-Ca
加入5mL 0.2mol/L $CuSO_4$溶液
搅拌、洗涤、烘干
SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}

图1

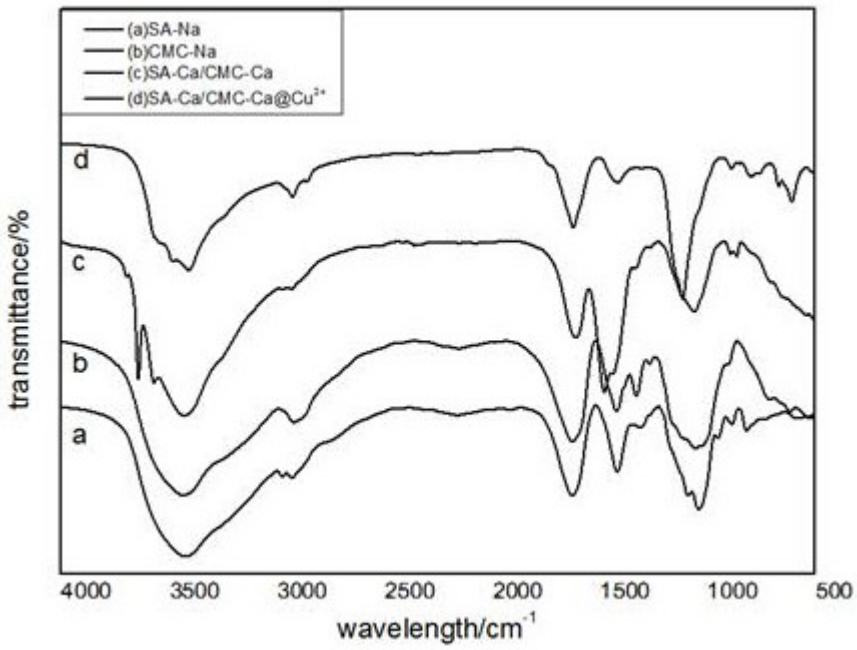

(a)SA-Na
(b)CMC-Na
(c)SA-Ca/CMC-Ca
(d)SA-Ca/CMC-Ca@Cu^{2+}
d
c
b
a
transmittance/%
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
wavelength/cm^{-1}

图2

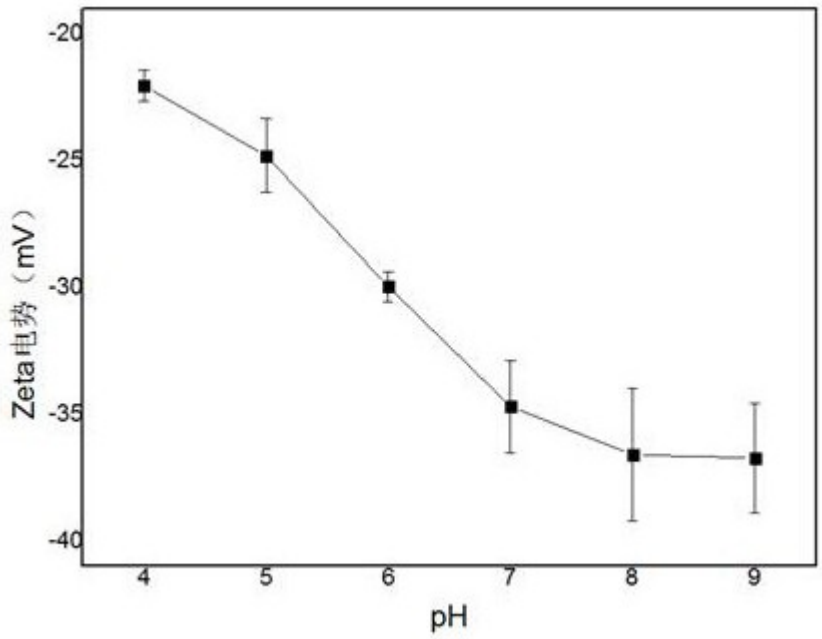


图3

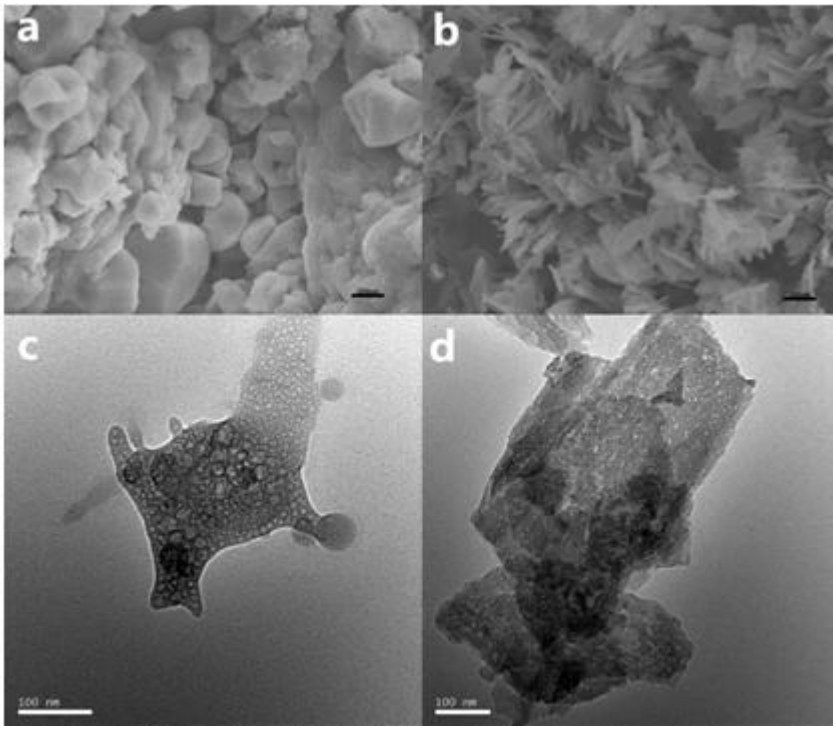


图4

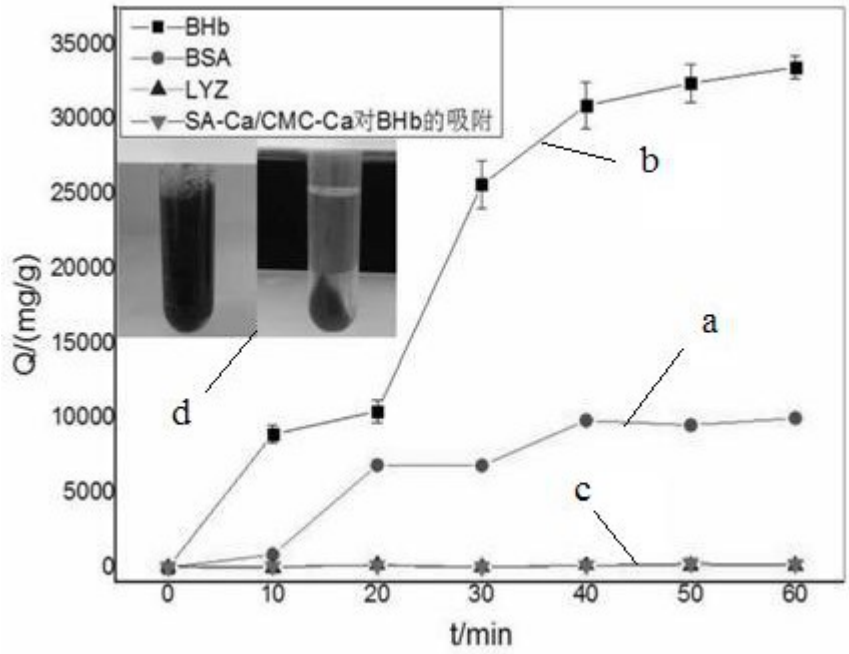

BHb
BSA
LYZ
SA-Ca/CMC-Ca对BHb的吸附
Q/(mg/g)
t/min
a
b
c
d
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
0
10
20
30
40
50
60

图5

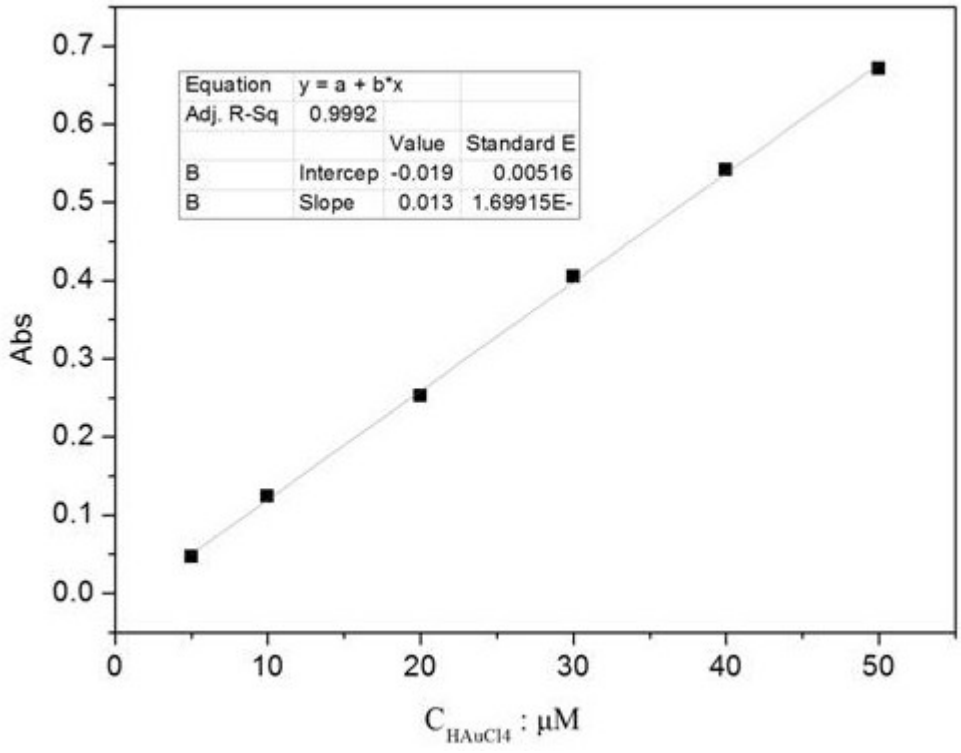

Equation y = a + b*x
Adj. R-Sq 0.9992
Value Standard E
B Intercep -0.019 0.00516
B Slope 0.013 1.69915E-
Abs
C_{HAuCl4} : μM
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0
10
20
30
40
50

图6

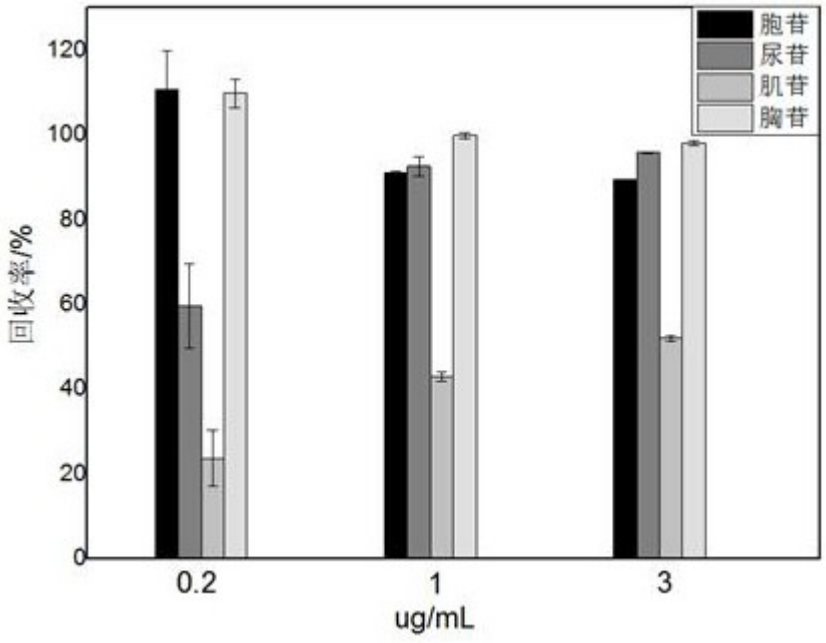


图7