

表面改性的纳米 Fe_3O_4 颗粒用于抗血清快速分离纯化

毛占伟, 王 慧, 张娟琨

天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

摘 要: 采用硅烷化试剂 $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ (APTES) 对纳米 Fe_3O_4 颗粒表面进行氨基化改性后, 考察了不同浓度偶联剂戊二醛对于颗粒表面固定牛血清白蛋白 (BSA) 量的影响。此超顺磁性免疫铁颗粒 (SPIO) 加入兔抗 BSA 血清中特异性结合 BSA 抗体后, 用 Gly-HCl 缓冲液洗脱得到 IgG。结果表明当戊二醛浓度大于 10% 时, 单位颗粒固定蛋白的量达到最大值约 $140 \mu\text{g}/\text{mg}$, 10 min, 15 mg 的 SPIO 即可将 1 mL 抗血清完全分离, 经过两次快速洗脱, 颗粒表面吸附的抗体即可得到纯化; 琼脂扩散实验表明分离后的抗体仍保持较高活性, SDS-PAGE 电泳结果表明用此方法纯化后的兔抗 BSA IgG 纯度大于 99%, 比传统的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 法有了较大提高, 但纯化量并没有减少; SPIO 在经过五次重复利用后仍能保持 78% 以上的分离效果。

关键词: 纳米 Fe_3O_4 颗粒, 兔抗血清, IgG, 戊二醛, 磁性分离

Rapid Separation of Antiserum by Surface Modified Fe_3O_4 Nano-particles

Zhanwei Mao, Hui Wang, and Juankun Zhang

Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: The nano-particles' surface were modified by silane reagent $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$. Bovine serum albumin (BSA) was coupled by a series of glutaraldehyde concentration. Under optimal reaction conditions the maximum amount of immobilized BSA was $140 \mu\text{g}/\text{mg}$ Fe_3O_4 , when glutaraldehyde concentration was above 10%. After immersing in anti-BSA rabbit serum and regenerating by Gly-HCl buffer, the purity of IgG by super-paramagnetic iron oxide (SIPO) nano-particles was characterized by UV-spectrometer, SDS-PAGE and immuno-diffuse. Results showed that subtotal separation was achieved at 10 min, 15mg SPIO in 1ml serum. The purity was much higher than that with the traditional $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ method. The activity of special protein probe maintained above 78% after 5 consecutive uses.

Keywords: Fe_3O_4 nano-particles, antiserum, IgG, glutaraldehyde, magnetic separation

纳米材料是指材料的几何尺寸达到纳米级 (1nm~100nm) 尺度水平, 并且具有特殊性能的材料^[1]。磁性纳米 Fe_3O_4 微粒具有许多特殊物理和化学性能,

例如, 随着微粒粒径减小至纳米级时, 微粒的比表面积激增, 表面官能团密度、选择性和吸附能力变大, 达到吸附平衡的时间大大缩短, 粒子的稳定性提高, 当

Received: April 5, 2007; Accepted: June 11, 2007

Corresponding author: Juankun Zhang. Tel: +86-22-60600063; E-mail: zhangjk@tust.edu.cn.

磁性 Fe₃O₄ 微粒直径小于某个临界尺寸时, 产生超顺磁性, 即在磁场中有较强磁性, 没有磁场时磁性很快消失, 使得纳米微粒在磁场中不会被永久磁化。这种超顺磁性具有广泛的实际用途, 例如, 在生物、医药领域, 由于超顺磁性 Fe₃O₄ 纳米微粒的磁响应性, 使其在细胞分离、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得到应用^[2-4]。

自 1966 年, 固相分离技术在免疫分析中首次运用以来, 固相分离技术以其快捷有效的分离方式正逐步取代大多数经典的均相分离方法, 固相分离技术的相关研究也有大量报道, 涌现出大量新的固相材料^[5]。而磁性微粒体积小, 几千万颗微粒的表面积比传统的试管或 96 孔板的表面积大得多, 可吸附更多的抗体, 同时磁性微粒的核心是有磁性的, 在磁场中很快下沉, 容易进行洗涤和分离, 被各国科学家给予高度重视。Roberts Molday 等将多聚糖包裹的磁微粒与蛋白水解酶连接, 用来降解一些水体中难以溶解的或不需要的物质以净化水体^[6]。John 等用连有单克隆抗体的磁性纳米微球检测沙门氏菌, 其速度快, 灵敏度高且抗干扰能力强^[7]。Ryan C Kuhn 等采用免疫分离的方法来研究进行污水中隐性孢子虫卵囊的分离^[8]。Min Lu 等用标记特异性抗体的 SPIO 来进行尿液中白蛋白的定量检测^[9]。功能化的磁性颗粒在国外已实现生产化, 并有商品出售, 其中比较成熟的是 Dynal 公司的产品, 该产品性能优越, 但价格昂贵。目前国内研究磁性纳米粒子的单位很多, 如北美基因等, 但详细报道的不多。

对血清中蛋白质分离比较传统的方法有盐析沉淀, 等电点分离, 吸附分离等多种方法^[10], 但在分离纯度, 蛋白活性, 操作时间和成本投入等方面各有不足之处。本文在纳米 Fe₃O₄ 颗粒表面引入功能基团, 作为固相载体对兔抗血清中的 IgG 进行了比较系统的分离纯化研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试剂

氯丙基三乙氧基硅烷 A302(APTES), 分析纯, 大连 Aolikai 公司; 牛血清白蛋白(BSA), 北京鼎国生物技术有限公司; 戊二醛, 分析纯, 天津瑞金特化学品有限公司; 氨基乙酸(Gly), 北京奥博星生化公司; 抗 BSA 兔血清, 粒径 20~30nm 的 Fe₃O₄ 纳米

颗粒, 实验室自制; 考马斯亮蓝试剂, 自配; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器

直径 2.4cm 永久超磁, 市购; JB-4A 恒温磁力搅拌器, 上海理达仪器厂; UVPC-2401 紫外可见光分光光度计, 日本岛津; 蛋白质电泳设备, 美国 Bio-Rad。

1.2 方法

1.2.1 纳米铁颗粒表面固定 BSA 及偶联剂的使用量研究

准确称取 1 g 纳米 Fe₃O₄ 颗粒, 用 95% 的乙醇洗涤 3 次, 加入 4 mL 无水乙醇和 1 mL APTES 混合液中, 将反应液于塑料密闭容器中, 60 搅拌反应 3 h, 多次洗涤, 取干重为 30 mg 的纳米铁颗粒悬浊液, 再分别加入不同浓度的戊二醛, 加 PBS 定容到 3 mL, 置于 25 培养箱中, 120 r/min 摇动反应 4 h, 而后用 PBS 进行多次洗涤, 取出三分之一, 加入 1 mg/mL 的 BSA 的 PBS 溶液 3 mL, 于 4 搅拌反应过夜, 用磁铁吸附法分离沉淀和上清, 用 Bradford 染色法确定上清液中蛋白浓度^[11], 对应确定偶联剂戊二醛用量的最佳值。

1.2.2 用 BSA 包被的颗粒对抗血清的分离和纯化

用浓度为 2 mg/mL 的卵清白蛋白溶液对表面固定 BSA 的铁颗粒进行包被, 加入 1 mL 抗血清, 室温下, 轻度震荡反应不同时间, 对应时间取出上清液, 稀释 100 倍, 测吸光度, 取定最佳反应时间。对于沉淀物用 5 mL 的预冷 PBS 进行多次洗涤至无蛋白洗脱, 向其中加入预冷的 1 mL pH 2.2, 0.05 mol/L 的 Gly-HCl 缓冲液摇匀, 快速洗脱, 用 EP 管依次收集 3 次洗脱液, 调整 PH 为中性。稀释 10 倍, 测吸收曲线。

1.2.3 SPIO 的使用最佳量, 非特异性和重复使用性研究

向若干 1 mL 10 倍稀释的抗血清 EP 管加入不同干重的 SPIO 悬浊液, 用 PBS 补齐至体积均为 1.5 mL。室温振荡反应 10 min 后, 磁性分离, PBS 多次洗涤, 用洗涤液将上清液稀释 6 倍, 根据 280 nm 下的吸光值, 确定完全吸附抗血清中特异性 IgG 的 SPIO 最佳用量。以正常血清作为阴性对照确定 SPIO 的非特异性。用同一 SPIO, 按照上面方法重复 5 次对抗血清进行分离, 确定重复使用率。

1.2.4 分离后 IgG 的活性和纯度检测

采用双向琼脂扩散实验, 从同批等量血清出发,

用 PBS 将血清、(NH₄)₂SO₄ 法纯化的 IgG 和 SPIO 法纯化的 IgG 均稀释至原体积的 3 倍, 进行活性变化比较。采用 SDS-PAGE 电泳实验, 对 (NH₄)₂SO₄ 提纯法和 SPIO 法的 IgG 进行纯度检验。

2 结果与分析

2.1 偶联剂的最佳使用量

从曲线 2 可以看出, 纳米铁颗粒表面固定蛋白的量随偶联剂用量增加而增加, 10% 是个转折点, 当偶联剂戊二醛的用量浓度大于 10% 时, 表面固定的蛋白 BSA 的量基本上保持不变, 此时上清液中蛋白的浓度最低。单位铁颗粒表面固定的最大蛋白量为: $M_{max} = (1000 - 533) \mu\text{g/mL} \times 3\text{mL} / 10\text{mg Fe}_3\text{O}_4 = 140 \mu\text{g 蛋白/mg Fe}_3\text{O}_4$ 。

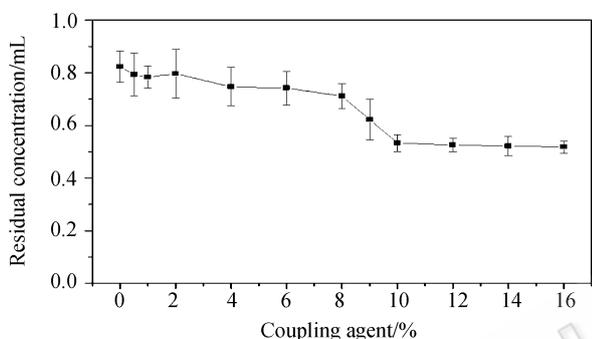


图 1 不同偶联剂用量的氨基化纳米铁引起 BSA 标准液浓度变化曲线

Fig. 1 Variety of BSA solution concentration caused by different dosage of coupling agent nano-Fe₃O₄

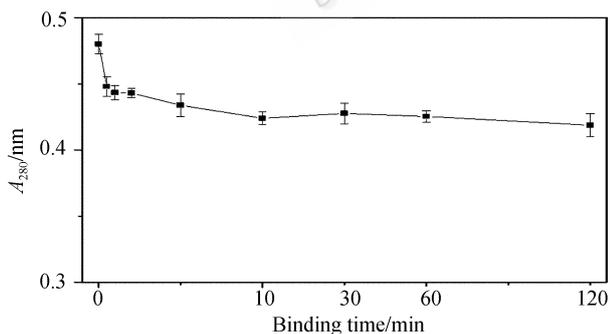


图 2 不同时间抗血清残液的吸光度变化趋势图

Fig. 2 Absorbance trendline of residual serum after different binding time

2.2 最佳结合时间, 洗脱次数和洗脱量的研究

从图 3 趋势可以看出, SPIO 从抗血清中吸附相应的 IgG 的量随接触时间的延长而增加, 但 10 min 后, 基本上保持不变, 所以确定 10 min 为最佳反应时间。

从图 4 中可以看出在第一次洗脱时有较多的蛋白进入洗脱液, 第二次洗脱, 蛋白量减少, 第三次洗脱时, 基本上没有蛋白进入洗脱液。说明正常情况下两次洗脱就可以将与 BSA 特异性吸附的 IgG 完全洗脱。

根据 Lamber-Beer 公式, 按照 IgG 吸光系数为 1.2 计算^[12], 每毫升血清中分离的 IgG 的量(mg) = $(OD_{280}/K \times L) \text{ mg/mL} \times 10 \text{ m} = 9.2 \text{ mg}$, 与实际中用 (NH₄)₂SO₄ 盐析沉淀法所分离的 IgG 的量基本上持平。

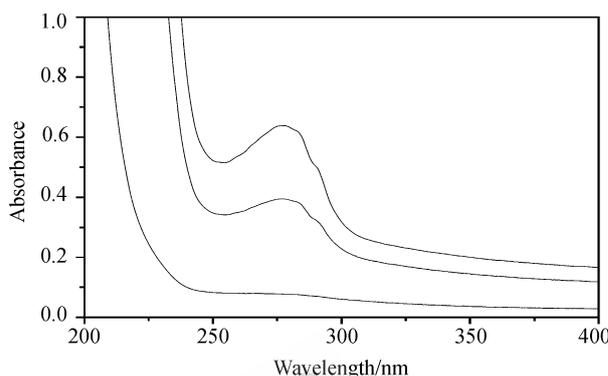


图 3 不同洗脱次数的吸光度曲线

Fig. 3 Absorbance curve of different washing times

Upper one: 1st washing time; middle curve: 2nd washing time; bottom one: 3rd washing time

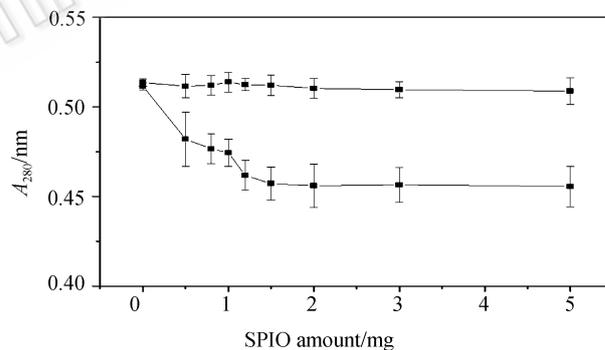


图 4 不同量 SPIO 结合后抗血清残液的吸光度变化趋势

Fig. 4 Absorbance trendline of residual serum after different amount SPIO

Upper one: negative serum; bottom one: antiserum

2.3 SPIO 的单位使用量, 非特异性和重复性研究

图 4 中, 对于阴性血清, SPIO 的加入基本上不会引起血清中蛋白含量的变化。10 倍稀释的抗血清中蛋白含量随 SPIO 加入量不同而改变, 1.2~1.5 mg 是一个饱和的转折点, 最终确定最佳用量为: 15 mg SPIO/mL 纯血清。

图 5 中, 当 SPIO 在首次使用时, 分离后洗脱液中蛋白质在 280 nm 下的吸收峰能达到 1.25, 但随着使用次数的增加, 分离后蛋白含量逐渐下降, 在第

五次使用时, 280 nm 下的吸收峰仅为 0.97 左右, 下降了大约 22%。

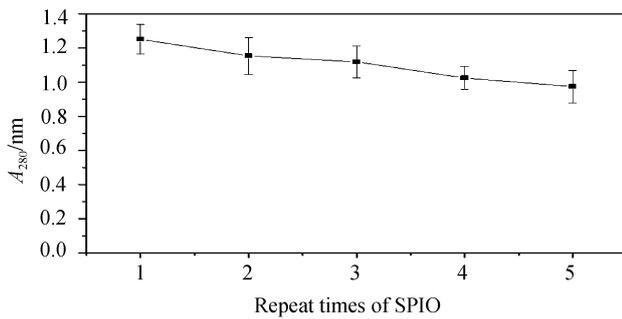


图5 同一SPIO重复使用5次得到IgG量的变化趋势

Fig. 5 IgG trendline separated from serum by same SPIO after 5 times

2.4 分离后 IgG 活性和纯度

以 1mg/mL 的 BSA 作为中心点, 分别以 1 倍、5 倍、8 倍、10 倍 PBS 稀释的血清、(NH₄)₂SO₄ 法纯化的 IgG 和 SPIO 法纯化的 IgG 作为抗体, 进行免疫扩散实验, 观察抗原抗体的结合线, 粗略估算各效价变化对应情况。参照图 3, 对 2 次洗脱的 IgG 和 (NH₄)₂SO₄ 法纯化的 IgG 进行电泳, 纯度对照。

从图 6 可以看出, 抗血清, (NH₄)₂SO₄ 法和 SPIO 法分离的 IgG, 在 5 倍稀释之前都能看到结合线, 但在逐倍稀释过程中, (NH₄)₂SO₄ 法 IgG 首先看不到结合线, 而 SPIO 法 IgG 基本上能和抗血清效价保持一致。同时 SPIO 法分离之后的残余血清在各个浓度阶段均没有出现结合线, 说明 SPIO 法已经将血清中与 BSA 相结合的 IgG 沉淀完全。

从图 7 可以看出, 所有图谱分别在 53 000 和

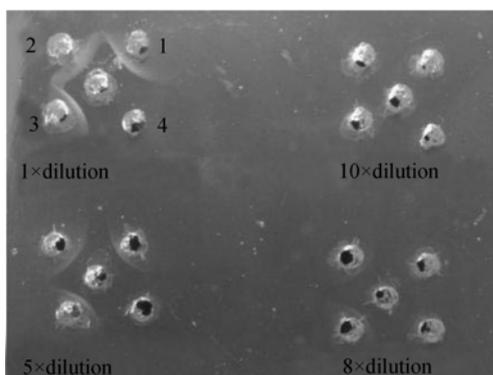


图6 不同方法得到抗体的效价对比图

Fig. 6 Titer contrast of antibody prepared by different methods

1: IgG separated by (NH₄)₂SO₄; 2: IgG separated by SPIO;
3: rabbit antiserum; 4: residual serum by SPIO

28 000 左右有两条带, 对应为 IgG 的重链和轻链。SPIO 法 IgG 在其它分子量区域均没有显色, 说明纯度达到 99% 以上; 但用 (NH₄)₂SO₄ 法所得到的 IgG 在分子量 53 000 到 70 000 中间有部分杂质, 可能是血清白蛋白等物质。

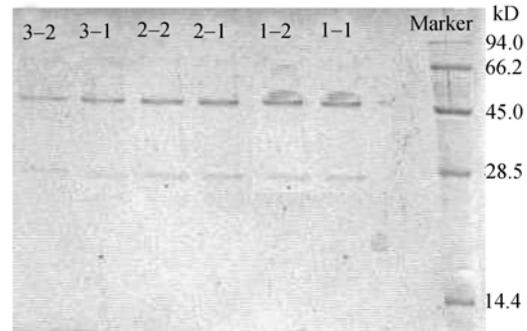


图7 不同方法得到 IgG 的电泳图谱

Fig. 7 SDS-PAGE contrast of IgG prepared by different methods

1-1 and 1-2: IgG separated by (NH₄)₂SO₄; 2-1 and 2-2: IgG separated by SPIO of first washing; 3-1 and 3-2: IgG separated by SPIO of second washing

3 讨论

颗粒表面固定蛋白的量, 随偶联剂用量增加而增加, 但当达到一定量时, 蛋白的固定量基本上不再增加。因为偶联剂量的增加会在纳米颗粒表面形成一种空间网状结构, 但当偶联剂的量足以将颗粒表面完全包被, 再增加偶联剂用量不会增加与蛋白结合的活性基团^[13]。同时, 由于配基蛋白与醛基化纳米颗粒之间通过共价结合, 会导致起抗原决定簇作用的部分蛋白活性降低, 多于最佳量的偶联剂只会导致 SPIO 稳定性和结合力的降低。

抗血清与 SPIO 结合量也随时间的增加而增加, 但室温结合 10 min 后, 血清中蛋白量不再变化, 可能是颗粒表面蛋白特异性结合点已经饱和, 不会使得血清中浓度再发生变化。

同一颗粒重复使用过程, 在 Gly-HCl 缓冲液洗脱过程中, pH 较低, 会导致颗粒表面固定的蛋白部分失活, 使得分离效率降低。

在用传统的饱和 (NH₄)₂SO₄ 法沉淀分离 IgG 时, 利用的是盐析原理, 但血清中不同蛋白之间等电点和溶解度相差不大, 不可避免的会混入杂蛋白^[14], 而使用 SPIO 法因为利用的是特异性吸附法, 会使得纯度大大

提高。同时因为分离中各种溶液均经过预冷,整个分离过程基本上不会对活性方面造成影响。

4 结语

试验结果表明:以 20~30 nm 粒径均匀的 Fe_3O_4 作为载体,当偶联剂戊二醛浓度 10% 时,单位颗粒固定蛋白的量达到最大值 140 $\mu\text{g}/\text{mg}$; 10 min, 15 mg 的 SPIO, 两次快速洗脱,即可从 1mL 抗血清中分离高活性,电泳纯的 IgG; 颗粒在经过五次重复利用后仍能保持 78% 以上的分离效果。与传统 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 法对比,分离量并没有减少,但时间大大缩短,活性和纯度均有较大提高。用 SPIO 法对血清之中的 IgG 进行分离,可以达到低成本、快速、高效、高活性、高纯度的分离效果。

REFERENCES

- [1] Jiang ZY, Cheng GX. Nanometer Biology Technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 1.
姜忠义, 成国祥. 纳米生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2003, 1.
- [2] Lambert G, FattM E, Couvreur P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**(1): 99.
- [3] A Halbreich, J Roger, JN Pons, *et al.* Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie*, 1998, **80**: 379-390.
- [4] Koneracka M, Kopcansky F, Antalík M. Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999, **201**: 427-430.
- [5] Tong XD, Xue B, Sun Y. A novel magnetic affinity support for protein adsorption and purification. *Biotechnol Prog*, 2001, **17**: 134-139.
- [6] Daniel. Magnetic polymer latex and preparation process. United States Patent 4358388, 1982.
- [7] John, Nitta M, Kabuto H. Magnetic fields (MF) of 50Hz at 1.2 μT as well as 100 μT cause uncoupling of inhibitory pathways of adenylyl cyclase mediated by melatonin 1a receptor in MF-sensitive MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, 2001, **22**: 1043-1048.
- [8] Ryan C Kuhn, Channah M. Rock, Kevin H. Oshima, *et al.* Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of cryptosporidium oocysts from concentrated water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 2066-2070.
- [9] Min Lu, Filiz Ibraimi, Dario Kriz, *et al.* A combination of magnetic permeability detection with nanometer-scaled superparamagnetic tracer and its application for one-step detection of human urinary albumin in undiluted urine. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, **21**: 2248-2254.
- [10] Fan LJ, Pan DD. Isolation and purification of IgG from immune colostrums. *Food Science*, 2005, **26**(8): 146-150.
范丽娟, 潘道东. 免疫初乳中 IgG 的分离与纯化. 食品科学, 2005, **26**(8): 146-150.
- [11] Bradford.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem*, 1976, **72**: 248-254.
- [12] Alexander C Brownie, John C Kernohan. Medical Biochemistry. Beijing: Beijing University Medical Press, 2005.
- [13] Jiang ZH, Zhang JH. Immobilization and Application of Biological Molecular. Beijing: Chemical Engineering Express, 1998.
蒋中华, 张津辉. 生物分子固定化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [14] Luo L, Zhu YD, Ding XL. Study of ammonium sulfate fractionation of porcine serum protein by polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Science*, 2006, **27**(2): 218-222.
罗磊, 朱雅东, 丁霄霖. 聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白硫酸铵分级盐析. 食品科学, 2006, **27**(2): 218-222.

致 谢

新的一年开始了,《生物工程学报》将在既有的成绩上继续努力,为广大生命科学研究人员创造更快、更好的交流平台。在此向各位专家、作者、读者和所有对我们予以支持和帮助的人表示衷心感谢! 恭祝大家新的一年

万事如意!!
吉祥幸福!!

《生物工程学报》编辑部