



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104475041 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 01

(21) 申请号 201410566633. 9

(22) 申请日 2014. 10. 22

(71) 申请人 哈尔滨工业大学

地址 150006 黑龙江省哈尔滨市南岗区西大直街 92 号格物楼 900 室

(72) 发明人 赵九蓬 马丽华 李垚 李娜
李会成 梁秋波 曹喜生

(74) 专利代理机构 北京瑞思知识产权代理事务
所(普通合伙) 11341

代理人 李涛

(51) Int. Cl.

B01J 20/24(2006. 01)

B01J 20/28(2006. 01)

B01J 20/30(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

制备琼脂糖磁性微球的新方法及其在分离纯化 IgG 抗体中的用途

(57) 摘要

本发明涉及制备琼脂糖磁性微球的新方法及利用免疫磁性分离技术,将所制备的琼脂糖磁性微球用于分离纯化 IgG 抗体。具体而言,本发明通过在琼脂糖磁性微球的表面导入活性氨基,并以戊二醛作为交联臂来偶联配基,所述配基为可以与 IgG 抗体发生特异性结合的金黄色葡萄球菌蛋白 A,从而制备得到可特异性吸附 IgG 抗体的免疫磁性微球。此外,借助磁性分离纯化装置对发酵产生 IgG 抗体的菌体的裂解液进行分离纯化,所制备的抗体活性可达 1.5×10^8 IU/mg, 所对应的活性回收率超过 90%;经纯度分析,纯度近 100%,各项指标均达到国家标准。

1. 一种制备琼脂糖磁性微球的方法,所述方法包括如下步骤:(i) 制备无磁芯琼脂糖微球;(ii) 使得无磁芯琼脂糖微球活化交联;(iii) 制备琼脂糖微球-铁离子溶液;(iv) 制备琼脂糖磁性微球;(v) 将交联臂接入琼脂糖磁性微球;(vi) 将配基接入琼脂糖磁性微球。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (i) 为将琼脂糖加热溶于超纯水中,制备 0.1wt% -20wt% 的琼脂糖水相 W;随后将包含乳化剂和有机试剂的油相 O 与水相 W 混合,获得 W/O 乳液,所述 W/O 乳液的油相中乳化剂为 0.1wt% -1.5wt%,水相与油相体积比 1:1-1:1000;在 40℃ -90℃ 恒温下对 W/O 乳液加热,并在 200-1000rpm 下机械搅拌,反应 1-5h;随后,使得 W/O 乳液快速冷却至 15-40℃,获得 W/O 乳液滴,从而形成无磁芯的琼脂糖微球。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述有机溶剂为液体石蜡、石油醚、橄榄油、棉籽油、大豆油、向日葵籽油、烷烃类或上述有机溶剂的组合。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (ii) 为:按照琼脂糖微球与硼氢化钠质量比 1000:1-10:1 称取微球,加入 0.1mol/L-2mol/L 的氢氧化钠溶液,使琼脂糖微球-硼氢化钠混合物在氢氧化钠溶液中的浓度为 0.01-10g/ml,恒温下恒速搅拌;随后,向上述液体中加入环氧氯丙烷与二甲基亚砜的混合溶液,恒温下恒速搅拌,所述环氧氯丙烷与二甲基亚砜的体积比为 1:1-1:100。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (iii) 为:将步骤 (ii) 获得的溶液与二价铁离子-三价铁离子混合溶液进行或混合,使铁离子混合溶液中琼脂糖微球浓度范围在 0.01-2g/ml。在 30-60℃ 恒温下,200-600rpm 恒速,浸泡 10-120h,从而使得琼脂糖微球与铁离子活化交联。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (iv) 为:在步骤 (iii) 的琼脂糖微球-铁离子溶液中加入氨水,使得琼脂糖微球-铁离子溶液与氨水的体积比 1:1-100:1;在 40-80℃ 恒温下,200-1000rpm 恒速的氮气环境中,反应 0.5-3h,制备具有四氧化三铁磁芯的琼脂糖磁性微球;用磁场分离获得的琼脂糖磁性微球,洗涤后保存备用。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (v) 为:在氨水中加入步骤 (iv) 制备的琼脂糖磁性微球,室温下反应 2-4 小时,充分淋洗后再加入 2-20% 的戊二醛水溶液,室温下反应 1-3 小时,用超纯水彻底洗净过量的戊二醛。

8. 如权利要求 1-7 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (vi) 为:在含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液中加入步骤 (v) 中获得的带有交联臂的琼脂糖磁性微球,反应后用超纯水冲洗干净,加入乙醇胺溶液封闭未反应的环氧基团;随后加入牛血清蛋白,封闭未反应的醛基,减少非特异性吸附,最后用大量的超纯水洗净,获得琼脂糖磁性微球产品。

9. 利用权利要求 1-8 所述的方法制备的琼脂糖磁性微球,其特征在于,所述琼脂糖磁性微球带有戊二醛交联臂和与 IgG 抗体发生特异性结合的配基金黄色葡萄球菌蛋白 A。

10. 一种分离纯化 IgG 抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

a) 将如权利要求 9 所述的琼脂糖磁性微球与表达 IgG 抗体细胞的裂解液混合,使得 IgG 抗体吸附于琼脂糖微球;

b) 利用磁场将吸附有 IgG 抗体的琼脂糖磁性微球分离;

c) 使用解离液将 IgG 抗体从琼脂糖磁性微球上洗脱,收集 IgG 抗体。

制备琼脂糖磁性微球的新方法及其在分离纯化 IgG 抗体中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及制备琼脂糖磁性微球的新方法及利用免疫磁性分离技术,将所制备的琼脂糖磁性微球用于分离纯化 IgG 抗体,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 抗体是指由单一克隆杂交瘤细胞产生的只识别某一特定抗原表位的同源抗体,是经过人工制备的一类特殊抗体。所述抗体是 B 细胞分化为浆细胞时所产生的一类球蛋白,存在于体液中,与相应抗原(如病原体)发生特异性结合,并在其他免疫分子和细胞的参与下发挥免疫效应,能够介导体液免疫。抗体具有的理化性质高度均一、生物活性单一、与抗原结合的特异性强、便于人为处理和质量控制,还具有易于获得、易于进行大规模的体外制备和纯化等优点。这些优点使它一问世就受到高度重视,并广泛应用于生物学和医学研究领域,有广阔的发展前景。

[0003] IgG 抗体是人体免疫球蛋白的一种,也是唯一可以通过胎盘的免疫球蛋白,它是血清成分中的主要抗体成分,约占血清蛋白的 75% 左右。约 40 ~ 50% 的 IgG 分布于血清中,其余的分布在各种组织中。IgG 抗体的主要功能作用是在机体免疫中起保护作用。大多数抗病毒、抗毒素和抗菌抗体均属于 IgG 抗体。IgG 抗体能够应对麻疹、甲型肝炎等疾病,并能有效地预防相应的感染性疾病。因此,在中和毒素、抗细菌、抗病毒、对抗癌细胞方面,IgG 抗体起着重要作用。

[0004] IgG 单克隆抗体主要利用基因工程菌发酵产生,系具有胞内活性的表达产物。然而,其分离纯化过程复杂,需要依次经过细胞破碎、离心分离、盐析沉淀、溶解沉淀、疏水层析、阴阳离子交换层析和凝胶过滤层析等步骤。由于上述分离纯化过程步骤多,费时长,导致产品收率低、成本高,目前,市售的 IgG 单克隆抗体通常采用亲和层析以提高纯化效率和产品特异性,但在亲和层析之前也要经过盐析、疏水或离子交换层析等处理才能获得较高的产率。另外,亲和层析介质同特异性抗体的连接多采用剧毒的溴化氰作为偶联剂,增加了工艺流程的危险性。因此,开发能够简单、快速分离纯化 IgG 单克隆抗体的新技术已成为本领域的主流。

[0005] 琼脂糖是从海藻中提取的一种线性、水溶性天然多糖。由于其表面富含羟基,经化学活化后,可偶联各种配基;并且,琼脂糖具有多空网状结构,便于大分子物质在琼脂糖内的扩散,从而增加配基的有效密度;具有良好的亲水性特性,可以使生物分子易于靠近并与配体作用,又不会失去生物活性;最重要的一点是,其表面不带电荷,故非特异性吸附能力极小,特别是对蛋白质几乎没有非特异性吸附。因此,琼脂糖是蛋白质分离纯化的理想材料。

[0006] 琼脂糖磁性微球,是利用琼脂糖包覆磁性物质,形成具有磁芯的琼脂糖磁性微球,该琼脂糖磁性微球不但利用了琼脂糖天然存在的优点,还能够借助磁场的作用实现快速分离目的,从而大大的减少操作步骤,缩短操作时间,降低成本。近年来,已有将琼脂糖

磁性微球应用于分离纯化领域的报道,例如董聿生等人(参考 Journal of North west University, Natural Science Edition, Apr. 2001, Vo. 1 31No. 2) 利用反相微乳法包覆四氧化三铁来制备琼脂糖磁性微球,并将该琼脂糖磁性微球用于分离尿激酶;李嘉兴等人(Chemical Engineering Journal 172(2011)892 - 897) 利用反相微乳法包覆四氧化三铁,并将该琼脂糖磁性微球用于吸附放射性核素;中国专利 CN 1524878A 公开了一种将反相微乳法制备的琼脂糖磁性微球用于纯化基因工程重组干扰素的技术等。

[0007] 然而,目前应用的琼脂糖磁性微球琼脂糖磁性微球制备方法均存在着一定的缺陷,如琼脂糖包覆不均匀、包覆效率低、磁性物质成核性差、磁球不成球、团聚严重、比表面积小、分离纯化率低和磁响应性差。

[0008] 迄今为止,将琼脂糖磁性微球应用于抗体的研究还未有报道,本发明提出一种制备琼脂糖磁性微球的新方法,根据本发明方法获得的琼脂糖磁性微球不具有上述缺点,而且,还可对制备的琼脂糖磁性微球进行表面修饰,使得微球活化。所述表面修饰例如在其表面导入活性氨基,并以戊二醛作为交联臂来偶联配基,所述配基为可以与 IgG 抗体发生特异性结合的金黄色葡萄球菌蛋白 A,从而得到可用于特异性吸附 IgG 抗体的琼脂糖磁性微球。通过配合使用相应磁性分离纯化装置,省去了 IgG 抗体的传统纯化中的各个前处理步骤,实现了“一步分离纯化”,最大限度的缩短了操作时间,降低了产品成本。根据本发明的方法可以实现 IgG 抗体的快速分离纯化,纯化率可达 90% 以上;所制备的抗体活性可达 1.5×10^8 IU/mg, 所对应的活性回收率超过 90%, 各项指标均达到国家标准。

发明内容

[0009] 在第一方面,本发明提供了一种制备琼脂糖磁性微球的方法,所述方法包括如下步骤:(i) 制备无磁芯琼脂糖微球;(ii) 使得无磁芯琼脂糖微球活化交联;(iii) 制备琼脂糖微球-铁离子溶液;(iv) 制备琼脂糖磁性微球;(v) 将交联臂接入琼脂糖磁性微球;(vi) 将配基接入琼脂糖磁性微球。

[0010] 在第二方面,本发明提供了利用第一方面的方法制备的琼脂糖磁性微球,所述琼脂糖磁性微球带有戊二醛交联臂和与 IgG 抗体发生特异性结合的配基金黄色葡萄球菌蛋白 A。

[0011] 在第三方面,本发明提供了一种分离纯化 IgG 抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

[0012] a) 将第二方面的琼脂糖磁性微球与表达 IgG 抗体细胞的裂解液混合,使得 IgG 抗体吸附于琼脂糖微球;

[0013] b) 利用磁场将吸附有 IgG 抗体的琼脂糖磁性微球分离;

[0014] c) 使用解离液将 IgG 抗体从琼脂糖磁性微球上洗脱,收集 IgG 抗体。

[0015] 所述分离纯化方法还可包括步骤

[0016] d) 对琼脂糖磁性微球进行回收。

[0017] 在第四方面,本发明提供了一种用于实施第三方面所述方法的磁性分离纯化装置,所述磁性分离纯化装置包括放置于集液器(3)侧壁的磁铁(1),并带有分液阀(2)。

[0018] 具体包括:

[0019] 一种制备琼脂糖磁性微球的方法,所述方法包括如下步骤:(i) 制备无磁芯琼脂

糖微球；(ii) 使得无磁芯琼脂糖微球活化交联；(iii) 制备琼脂糖微球-铁离子溶液；(iv) 制备琼脂糖磁性微球；(v) 将交联臂接入琼脂糖磁性微球；(vi) 将配基接入琼脂糖磁性微球。

[0020] 所述步骤 (i) 为将琼脂糖加热溶于超纯水中, 制备 0.1wt% -20wt% 的琼脂糖水相 W; 随后将包含乳化剂和有机试剂的油相 O 与水相 W 混合, 获得 W/O 乳液, 所述 W/O 乳液的油相中乳化剂为 0.1wt% -1.5wt%, 水相与油相体积比 1:1-1:1000; 在 40℃ -90℃ 恒温下对 W/O 乳液加热, 并在 200-1000rpm 下机械搅拌, 反应 1-5h; 随后, 使得 W/O 乳液快速冷却至 15-40℃, 获得 W/O 乳液滴, 从而形成无磁芯的琼脂糖微球。

[0021] 所述有机溶剂为液体石蜡、石油醚、橄榄油、棉籽油、大豆油、向日葵籽油、烷烃类或上述有机溶剂的组合。

[0022] 所述乳化剂是甘油醚聚合物 (PO-500)、脱水山梨糖醇倍半油酸酯 (Arlace 183)、聚乙二醇氢化蓖麻油、脱水山梨糖醇三油酸酯 (Span 85)、脱水山梨糖醇单油酸酯 (Span80)、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯 (Span 65) 或亲脂-亲水嵌段聚合物的油性乳化剂。

[0023] 所述步骤 (ii) 为: 按照琼脂糖微球与硼氢化钠质量比 1000:1-10:1 称取微球, 加入 0.1mol/L-2mol/L 的氢氧化钠溶液, 使琼脂糖微球-硼氢化钠混合物在氢氧化钠溶液中的浓度为 0.01-10g/ml, 恒温下恒速搅拌; 随后, 向上述液体中加入环氧氯丙烷与二甲基亚砷的混合溶液, 恒温下恒速搅拌, 所述环氧氯丙烷与二甲基亚砷的体积比为 1:1-1:100。

[0024] 所述步骤 (iii) 为: 将步骤 (ii) 获得的溶液与二价铁离子-三价铁离子混合溶液进行或混合, 使铁离子混合溶液中琼脂糖微球浓度范围在 0.01-2g/ml。在 30-60℃ 恒温下, 200-600rpm 恒速, 浸泡 10-120h, 从而使得琼脂糖微球与铁离子活化交联。

[0025] 所述二价铁离子与三价铁离子的混合溶液中, 二价铁离子与三价铁离子的摩尔比是 1:1-10:1; 所述二价铁离子与三价铁离子的混合溶液为氯化亚铁-氯化铁溶液、硝酸亚铁-硝酸铁溶液。

[0026] 所述步骤 (iv) 为: 在步骤 (iii) 的琼脂糖微球-铁离子溶液中加入氨水, 使得琼脂糖微球-铁离子溶液与氨水的体积比 1:1-100:1; 在 40-80℃ 恒温下, 200-1000rpm 恒速的氮气环境中, 反应 0.5-3h, 制备具有四氧化三铁磁芯的琼脂糖磁性微球; 用磁场分离获得的琼脂糖磁性微球, 洗涤后保存备用。

[0027] 所述步骤 (v) 为: 在氨水中加入步骤 (iv) 制备的琼脂糖磁性微球, 室温下反应 2-4 小时, 充分淋洗后再加入 2-20% 的戊二醛水溶液, 室温下反应 1-3 小时, 用超纯水彻底洗净过量的戊二醛。

[0028] 所述步骤 (vi) 为: 在含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液中加入步骤 (v) 中获得的带有交联臂的琼脂糖磁性微球, 反应后用超纯水冲洗干净, 加入乙醇胺溶液封闭未反应的环氧基团; 随后加入牛血清蛋白, 封闭未反应的醛基, 减少非特异性吸附, 最后用大量的超纯水洗净, 获得琼脂糖磁性微球产品。

[0029] 利用上述的方法制备的琼脂糖磁性微球, 其特征在于, 所述琼脂糖磁性微球带有戊二醛交联臂和与 IgG 抗体发生特异性结合的配基金黄色葡萄球菌蛋白 A。

[0030] 一种分离纯化 IgG 抗体的方法, 所述方法包括如下步骤:

[0031] a) 将如权利要求 11 所述的琼脂糖磁性微球与表达 IgG 抗体细胞的裂解液混合, 使得 IgG 抗体吸附于琼脂糖微球;

- [0032] b) 利用磁场将吸附有 IgG 抗体的琼脂糖磁性微球分离；
- [0033] c) 使用解离液将 IgG 抗体从琼脂糖磁性微球上洗脱, 收集 IgG 抗体。
- [0034] 所述解离液是甘氨酸—盐酸缓冲液。
- [0035] 所述方法还包括步骤
- [0036] d) 对琼脂糖磁性微球进行回收。
- [0037] 其特征在于, 所述步骤 d) 使用 PBS 进行清洗, 并将清洗后的琼脂糖磁性微球保存于 20% 乙醇水溶液中。
- [0038] 在进行步骤 a) 前, 用 PBS 缓冲液对所述免疫磁性微球进行充分清洗平衡。
- [0039] 所述 IgG 抗体是 IgG 单克隆抗体。
- [0040] 所述分离纯化在磁性分离纯化装置中进行, 所述磁性分离纯化装置包括放置于集液器 (3) 侧壁的磁铁 (1), 并带有分液阀 (2)。
- [0041] 有益效果
- [0042] 根据本发明第一方面方法制备的琼脂糖磁性微球具有良好的呈球形, 球体圆润, 不易团聚结块, 分散性好, 粒径分布均匀, 比表面积大, 磁芯产率达 90% 以上, 可以重复使用, 使用寿命平均 20 次以上。
- [0043] 根据本发明第二方面方法对 IgG 抗体和 / 或 IgG 单克隆抗体进行分离纯化, 可省去细胞破碎、离心等一系列前处理, 实现“一步分离纯化”的目的。抗体纯化回收率可达 90% 以上, 抗体纯度接近 100%, 抗体动态吸附载量 >27mg/mL, 经活性测试, 各项指标均达到国家标准。
- [0044] 根据本发明第三方面的磁性分离纯化装置, 该装置内置强磁铁, 磁场强度大, 下方可放置锥形瓶回收液体, 中间分液阀控制。这样的设置使得操作简便省时。

附图说明：

- [0045] 图 1 为本发明的磁性分离纯化装置, 其中, 图中编号对应于 (1) 磁铁; (2) 分液阀; (3) 集液器; (4) 琼脂糖磁性微球; (5) 反应液; (6) 收集液。
- [0046] 图 2 为根据本发明方法制备的琼脂糖磁性微球的光学显微镜照片。
- [0047] 图 3 为对根据本发明方法分离纯化获得的 IgG 单克隆抗体的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。其中, 泳道 A 和 B 分别为利用本发明的琼脂糖磁性微球分离纯化获得的 IgG 单克隆抗体; 泳道 C 为与测试样品同等浓度的 IgG 抗体标准品; 泳道 D 为与泳道 E 的 Marker 同等浓度的 IgG 抗体标准品; 泳道 E 为与 Marker#SM0661。
- [0048] 图 4 为利用本发明的琼脂糖磁性微球分离纯化获得的高效液相色谱测试结果。
- [0049] 图 5 为琼脂糖磁性微球的吸附百分比与其重复使用次数的关系的结果。

具体实施方式

- [0050] 下面针对如下方面详细阐述本发明。
- [0051] 琼脂糖磁性微球制备
- [0052] 制备本发明的琼脂糖磁性微球的方法包括如下步骤: (i) 制备无磁芯琼脂糖微球; (ii) 使得无磁芯琼脂糖微球活化交联; (iii) 制备琼脂糖微球-铁离子溶液; (iv) 制备

琼脂糖磁性微球；(v) 将交联臂接入琼脂糖磁性微球；(vi) 将配基接入琼脂糖磁性微球。

[0053] 在一个实施方式中,所述步骤(i)为:将琼脂糖加热溶于超纯水中,制备 0.1wt% -20wt% 的琼脂糖水相 W;随后将包含乳化剂和有机试剂的油相 O 与水相 W 混合,获得 W/O 乳液,所述 W/O 乳液的油相中乳化剂为 0.1wt% -1.5wt%,水相与油相体积比 1:1-1:1000;在 40℃ -90℃ 恒温下对 W/O 乳液加热,并在 200-1000rpm 下机械搅拌,反应 1-5h;随后,使得 W/O 乳液快速冷却至 15-40℃,获得 W/O 乳液滴,从而形成无磁芯的琼脂糖微球。

[0054] 步骤(i)所述的油相与水相不能相混溶,所述油相为溶解有一种或几种乳化剂的一种或几种有机溶剂。所述有机溶剂必须与水互不相溶、具有一定的粘度且室温下为液体,优选具有高沸点、低挥发性的有机试剂,如,液体石蜡、石油醚、橄榄油、棉籽油、大豆油、向日葵籽油或一些烷烃类。油相的有机溶剂也可以是上述多种有机溶剂的混合。油相中包含的一种或多种乳化剂必须能够溶解于所述油相中,所述乳化剂例如甘油醚聚合物(P0-500)、脱水山梨糖醇倍半油酸酯(Arlace 183),聚乙二醇氢化蓖麻油、脱水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)、脱水山梨糖醇单油酸酯(Span 80)、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯(Span 65)或亲脂-亲水嵌段聚合物的油性乳化剂。

[0055] 在一个实施方式中,所述步骤(ii)为:按照无磁芯琼脂糖微球与硼氢化钠的质量比为 1000:1-10:1 称取微球,加入 0.1mol/L-2mol/L 的氢氧化钠溶液,使琼脂糖微球-硼氢化钠混合物在氢氧化钠溶液中的浓度为 0.01-10g/ml,恒温下恒速搅拌;随后,向上述液体中加入环氧氯丙烷与二甲基亚砷的混合溶液(环氧氯丙烷与二甲基亚砷的体积比为 1:1-1:100),恒温下恒速搅拌。

[0056] 在一个实施方式中,所述步骤(iii)为:将步骤(ii)获得的溶液与二价铁离子-三价铁离子混合溶液进行或混合,使铁离子混合溶液中微球浓度范围在 0.01-2g/ml。在 30-60℃ 恒温下,200-600rpm 恒速,浸泡 10-120h,从而使得琼脂糖微球与铁离子活化交联。

[0057] 所述二价铁离子与三价铁离子的混合溶液中,二价铁离子与三价铁离子的摩尔比是 1:1-10:1。所述二价铁离子与三价铁离子的混合溶液可以是氯化亚铁-氯化铁溶液、硝酸亚铁-硝酸铁溶液等。

[0058] 在一个实施方式中,所述步骤(iv)为:在步骤(iii)的微球-铁离子溶液中加入氨水,使得微球-铁离子溶液与氨水的体积比 1:1-100:1;在 40-80℃ 恒温下,200-1000rpm 恒速的氮气环境中,反应 0.5-3h,制备具有四氧化三铁磁芯的琼脂糖磁性微球,用磁场分离获得的琼脂糖磁性微球,洗涤后保存备用。

[0059] 在一个实施方式中,所述步骤(v)为:在氨水中加入步骤(iv)制备的琼脂糖磁性微球,室温下反应 2-4 小时,充分淋洗后再加入 2-20% 的戊二醛水溶液,室温下反应 1-3 小时,用超纯水彻底洗净过量的戊二醛。

[0060] 在一个实施方式中,所述步骤(vi)为:在含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液中加入步骤(v)中获得的带有交联臂的琼脂糖磁性微球,反应后用超纯水冲洗干净,加入乙醇胺溶液封闭未反应的环氧基团;随后加入牛血清蛋白,封闭未反应的醛基,减少非特异性吸附,最后用大量的超纯水洗净,所获得的产品为本发明的琼脂糖磁性微球。

[0061] 利用免疫磁性技术分离纯化 IgG 抗体

[0062] 用 PBS 缓冲液对根据本发明的方法制备的免疫磁性微球进行充分清洗平衡,加入含有 IgG 抗体的 PBS 缓冲液稀释的细胞裂解液,300rpm 缓慢震荡 0.5-3 小时,反应后将液体移入磁性分离纯化装置中(如图 1),静置 3h,使得吸附有 IgG 抗体的琼脂糖磁性微球被吸引至分液器的侧壁,打开控制阀,弃去反应液。随后,在分液器中加入 PBS 缓冲液,将所述琼脂糖磁性微球冲洗平衡,撤去磁场,从分液器中取出吸附有 IgG 抗体的琼脂糖磁性微球缓冲液,加入 pH2.8 的甘氨酸-盐酸缓冲液,300rpm 缓慢震荡反应 0.5-1 小时,使得 IgG 抗体从琼脂糖磁性微球上解吸附。随后,将反应液移入磁性分离纯化装置中,使得琼脂糖磁性微球与 IgG 抗体分离,收集解离液,立即用 PBS 缓冲液清洗,获得分离纯化的 IgG 抗体。可通过撤去磁场回收琼脂糖磁性微球,清洗后的微球可保存在 20% 的乙醇水溶液中,重复使用。

[0063] 实施例

[0064] 实施例中采用采用的药品来源:琼脂糖:上海惠世生化试剂有限公司;液体石蜡:西陇化工股份有限公司;

[0065] 石油醚:西陇化工股份有限公司;戊二醛:西陇化工股份有限公司;

[0066] 金黄色葡萄球菌蛋白 A:哈药生物制药;IgG 抗体标准品:哈药生物制药;表达 IgG 抗体细胞的裂解液:哈药生物制药。

[0067] 实施例 1:琼脂糖磁性微球的制备

[0068] (i) 制备无磁芯琼脂糖微球:

[0069] 将 2.0g 琼脂糖加入 100ml 超纯水,100℃ 加热,制备琼脂糖水相 W。随后,在液体石蜡 180ml、石油醚 40ml 中,加入 8.0g 乳化剂 Span 80,充分分散制备油相 O。将油相 O 在 80℃ 恒温加热,以 400rpm 机械搅拌,迅速将水相移入,反应 3h。冰水浴迅速降温至 15℃。

[0070] (ii) 使得无磁芯琼脂糖微球活化交联:

[0071] 取微球 5g,加入 0.8mol/L 的 NaOH7.5ml,硼氢化钠 0.01g,25℃,400rpm 震荡 30min。向这样制备的溶液中加入二甲基亚砷 7.5ml,环氧氯丙烷 3.75ml。30℃ 恒温 400rpm 反应 20h。随后洗涤,除去未反应的试剂。

[0072] (iii) 制备琼脂糖-铁离子溶液

[0073] 称取 4.32gFeCl₃和 15.92gFeCl₂,溶于 200ml 去氧水,配制铁离子溶液。将 30g 微球溶于上述铁离子溶液中,45℃,400rpm 震荡浸泡 90h。

[0074] (iv) 制备琼脂糖磁性微球

[0075] 将 15g 上述浸泡后的微球加入 150ml 去氧水。60℃ 下,加入 40ml 氨水,搅拌通入氮气,反应 3h。外加磁场将琼脂糖磁性微球分离,先后采用无水乙醇、水洗涤。最后,将微球保存在 20% 乙醇溶液中,4℃ 保存。

[0076] (v) 将交联臂接入琼脂糖磁性微球

[0077] 取 3g 上述琼脂糖磁性微球加入 6ml 氨水,室温下反应 4 小时。使环氧基团彻底氨解。将水解后的的琼脂糖磁性微球洗净,加入 20ml 体积分数 15% 的戊二醛水溶液,室温下反应 3 小时,彻底清洗干净,得到带有活性醛基的琼脂糖磁性微球,放置 20% 的乙醇水溶液中 4℃ 保存。

[0078] (vi) 将配基接入琼脂糖磁性微球

[0079] 取活化并连接好交联臂的磁性微球 2ml,加入 10ml 含有 30mg 金黄色葡萄球菌蛋

白 A 的 NaHCO_3 — Na_2CO_3 缓冲液, 4°C 反应过夜, 用超纯水冲洗干净, 加入 5mL 1mol/L 乙醇胺溶液, 37°C 下反应 4 小时。以封闭未反应的环氧基团, 然后加入 5ml 1mg/ml 的牛血清蛋白反应, 封闭未反应的醛基, 减少非特异性吸附, 最后用大量的超纯水洗净, 备用。

[0080] 实施例 2 : IgG 单克隆抗体的磁性分离纯化

[0081] 取制备好的琼脂糖磁性微球 1ml, 经 PBS 缓冲液充分清洗平衡后, 加入用缓冲液稀释至一定浓度的表达 IgG 单克隆抗体细胞的裂解液 10ml, 缓慢震荡反应 1 小时, 将液体移至磁性分离纯化装置中, 吸附固定磁性微球, 移出分离装置弃去反应液, 然后用 10ml PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入 4ml 0.1M 的甘氨酸—盐酸缓冲液, 缓慢震荡反应 1 小时用于解离吸附的抗体, 继续移入磁性分离纯化装置中, 吸附磁性微球, 收集解离液。

[0082] 实施例 3 : 磁性微球的洗脱回收

[0083] 收集解离液后, 向实施例 2 吸附磁球中加入 PBS 缓冲液充分清洗数次, 平衡磁性微球, 弃去清洗液, 将清洗后的微球放在 20% 的乙醇水溶液中 4°C 保存, 可重复使用 20 次以上。

[0084] 实施例 4 : IgG 抗体活性的测定

[0085] 采用 ELISA 法测定纯化后 IgG 抗体的免疫活性, 纯化后的抗体的各项指标均达到国家标准, 直接纯化发酵菌裂解液的抗体动态吸附载量 $>27\text{mg/mL}$ 。平均活性回收率为 92%, 平均比活性为 $1.5 \times 10^8 \text{ IU/mg}$ 。经 SDS-PAGE 凝胶电泳以及高效液相色谱纯度分析可知, 纯度大约 99.7%, 各项指标均达到国家标准, 根据重复使用次数在 50% 以上为允许使用的标准, 经分析微球使用次数大约在 20 次左右。

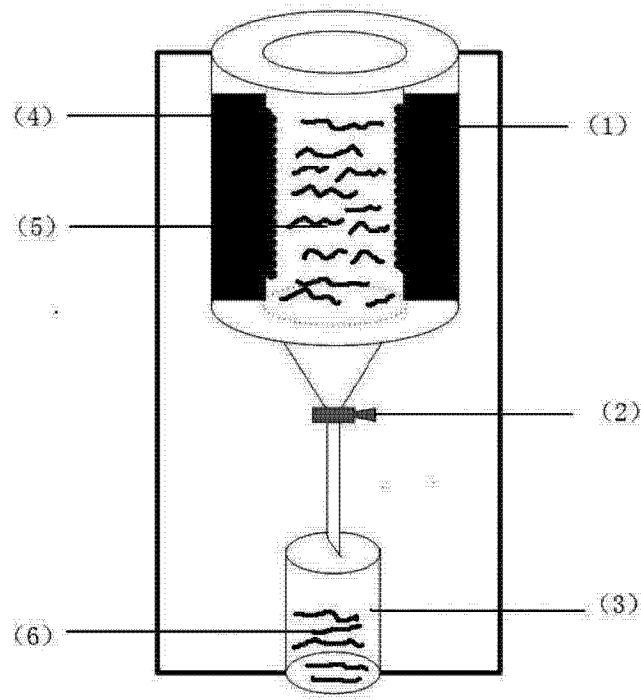


图 1

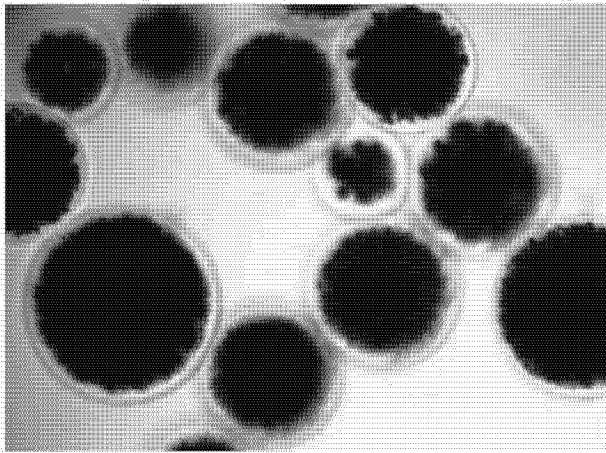


图 2

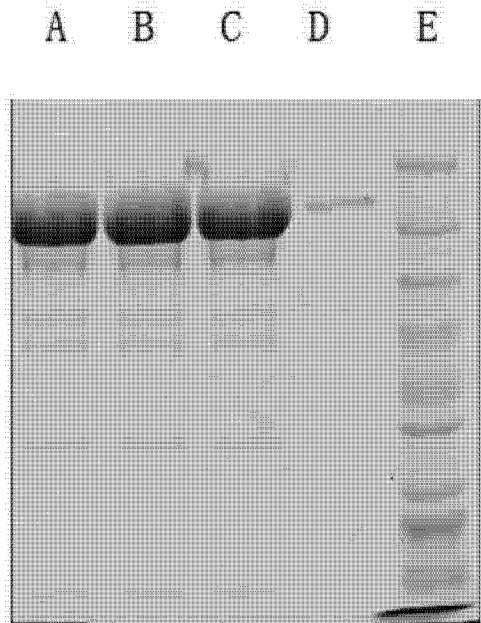


图 3

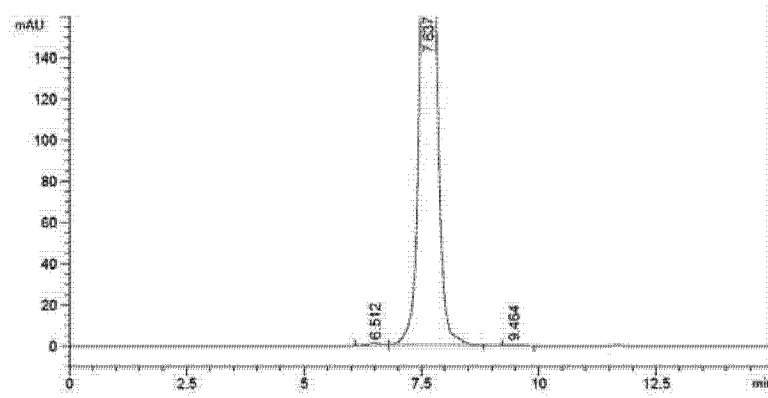


图 4

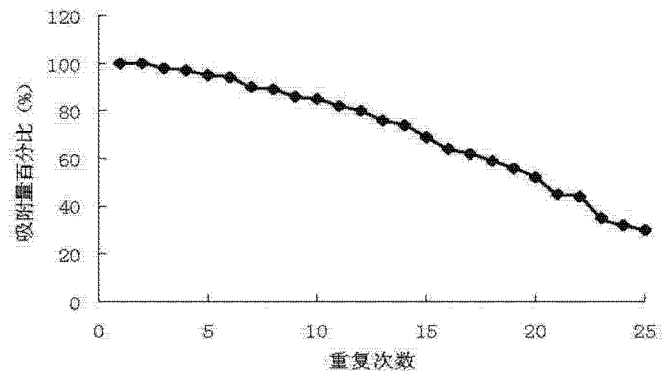


图 5

专利名称(译)	制备琼脂糖磁性微球的新方法及其在分离纯化IgG抗体中的用途		
公开(公告)号	CN104475041A	公开(公告)日	2015-04-01
申请号	CN201410566633.9	申请日	2014-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学		
申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学学报		
[标]发明人	赵九蓬 马丽华 李垚 李娜 李会成 梁秋波 曹喜生		
发明人	赵九蓬 马丽华 李垚 李娜 李会成 梁秋波 曹喜生		
IPC分类号	B01J20/24 B01J20/28 B01J20/30 G01N33/531		
CPC分类号	B01J20/24 B01J20/28009 B01J20/3085 B01J2220/4825 G01N33/53		
代理人(译)	李涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及制备琼脂糖磁性微球的新方法及利用免疫磁性分离技术，将所制备的琼脂糖磁性微球用于分离纯化IgG抗体。具体而言，本发明通过在琼脂糖磁性微球的表面导入活性氨基，并以戊二醛作为交联臂来偶联配基，所述配基为可以与IgG抗体发生特异性结合的金黄色葡萄球菌蛋白A，从而制备得到可特异性吸附IgG抗体的免疫磁性微球。此外，借助磁性分离纯化装置对发酵产生IgG抗体的菌体的裂解液进行分离纯化，所制备的抗体活性可达 1.5×10^8 IU/mg,所对应的活性回收率超过90%；经纯度分析，纯度近100%，各项指标均达到国家标准。

