



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112111042 A

(43) 申请公布日 2020.12.22

(21) 申请号 202010560956.2 *C12N 15/10* (2006.01)  
 (22) 申请日 2020.06.18 *C12N 15/87* (2006.01)  
 (66) 本国优先权数据 *C12N 11/14* (2006.01)  
 201910540132.6 2019.06.21 CN *C12N 11/08* (2020.01)

(71) 申请人 康码(上海)生物科技有限公司  
 地址 201321 上海市浦东新区芙蓉花路118  
 弄12号楼

(72) 发明人 郭敏 吴亮 徐丽琼 张政 苏杰  
 于雪

(51) Int. Cl.  
*C08F 292/00* (2006.01)  
*C08F 220/06* (2006.01)  
*G01N 33/543* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)  
*C07K 1/14* (2006.01)

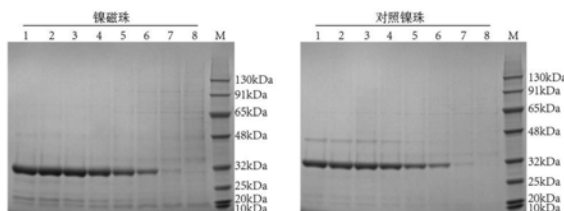
权利要求书2页 说明书25页 附图3页

(54) 发明名称

一种生物磁性微球及其制备方法和使用方法

(57) 摘要

本发明提供一种生物磁性微球及其制备方法和用于蛋白质分离纯化的方法,所述生物磁性微球的磁性微球本体外表面具有至少一种带有支链的线型聚合物,该带有支链的线型聚合物一端共价偶联于磁性微球本体外表面,其他部分游离于磁性微球本体外表面,所述线型聚合物的主链为聚烯烃主链,线型聚合物的主链形成过程中可以无需交联剂。制备的生物磁性微球能实现目标蛋白的高效洗脱,有效减少目标蛋白的滞留时间和滞留比例,且操作使用便捷,用途广泛。



1. 一种生物磁性微球,其特征在于:所述生物磁性微球的磁性微球本体外表面具有至少一种带有支链的线型聚合物,该带有支链的线型聚合物一端共价偶联于所述磁性微球本体外表面,其他部分游离于所述磁性微球本体外表面,所述线型聚合物的主链为聚烯烃主链;所述线型聚合物的支链含有功能基团,所述功能基团能够与目标物进行结合。

2. 根据权利要求1所述的生物磁性微球,其特征在于:所述线型聚合物由丙烯酸、丙烯酸盐、丙烯酸酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸盐、甲基丙烯酸酯、其它丙烯酸类单体之一或其组合通过聚合得到;

优选地,所述线型聚合物的主链形成过程中无需交联剂。

3. 根据权利要求1所述的生物磁性微球,其特征在于:所述功能基团含有特异性结合位点,所述特异性结合位点能够与目标物特异性结合;

优选地,所述特异性结合位点为镍离子,能够与His标签的标记物特异性结合。

4. 根据权利要求1所述的生物磁性微球,其特征在于:所述线型聚合物的功能基团为羧基、羟基、氨基、巯基之一或其组合。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的生物磁性微球,其特征在于:所述线型聚合物直接或通过连接基团间接固定于所述磁性微球本体的外表面。

6. 根据权利要求1-4任一项所述的生物磁性微球,其特征在于:所述磁性微球本体为SiO<sub>2</sub>包裹的磁性颗粒。

7. 根据权利要求6所述的生物磁性微球,其特征在于:所述磁性颗粒的化学成分包括铁化合物、铁合金、锌的氧化物、锰的氧化物、钆的氧化物、钴化合物、镍化合物、镍合金、锰氧化物、锰合金、锌的氧化物、钆的氧化物、铬的氧化物中任一种或其任意组合;

优选之一,所述磁性颗粒的化学成分包括铁的氧化物、锌的氧化物、锰的氧化物、钆的氧化物、钴的氧化物、镍的氧化物、锰氧化物、锌的氧化物、钆的氧化物、铬的氧化物中任一种或其任意组合;

优选方式之一,所述磁性颗粒的化学成分包括氧化铁、铁、钴、Co<sup>2+</sup>、氮化铁、Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、GdO、镍、Ni<sup>2+</sup>中任一种或其任意组合;其中,氧化铁优选为Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或者其组合;

另优选方式之一,所述磁性颗粒的化学成分包括Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、氮化铁、Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、AlNi(Co)、FeCr(Co)、FeCrMo、FeAlC、AlNi(Co)、FeCrCo、ReCo、ReFe、PtCo、MnAlC、CuNiFe、AlMnAg、MnBi、FeNi(Mo)、FeSi、FeAl、FeNi(Mo)、FeSiAl、BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SrO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、PbO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、GdO中任一种或其任意组合;其中,所述Re为稀土元素镱。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述生物磁性微球的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 对所述磁性微球本体进行化学修饰,将氨基引入到所述磁性微球本体的外表面,形成磁性微球A;

优选之一,利用硅烷偶联剂对磁性微球本体进行化学修饰;

(2) 利用羧基与氨基之间的共价反应将丙烯酸分子共价偶联到所述磁性微球A的外表面,从而引入碳碳双键,形成磁性微球B;

(3) 在无交联剂的条件下,利用碳碳双键的聚合反应,将丙烯酸类单体分子进行聚合,得到的线型聚合物共价偶联于所述磁性微球B的外表面,进行固液分离,去除液相,得到磁性微球C;

当所述功能基团含有特异性结合位点时,还包括以下步骤:(4)在所述磁性微球C的线型聚合物的支链处偶联特异性结合位点;

优选之一,所述丙烯酸类单体分子为丙烯酸钠单体分子。

9.根据权利要求1-7中任一项所述生物磁性微球的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(I)采用三甲氧基硅烷化的丙烯酸类分子对所述磁性微球本体进行化学修饰,将碳碳双键引入到所述磁性微球本体的外表面,形成磁性微球B;

所述三甲氧基硅烷化的丙烯酸类分子优选为 $\gamma$ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷;

(II)在无交联剂的条件下,利用碳碳双键的聚合反应,将丙烯酸类单体分子进行聚合,得到的线型聚合物共价偶联于所述磁性微球B的外表面,进行固液分离,去除液相,得到磁性微球C;

当所述功能基团含有特异性结合位点时,还包括以下步骤:(4)在所述磁性微球C的线型聚合物的支链处偶联特异性结合位点;

优选之一,所述丙烯酸类单体分子为丙烯酸钠单体分子。

10.根据权利要求8或9所述生物磁性微球的制备方法,其特征在于:还包括以下步骤:(4)将所述磁性微球C偶联三羧基胺,然后通过三羧基胺残基中的三个羧基络合 $\text{Ni}^{2+}$ 得到磁性微球D,即目标生物磁性微球;所述目标生物磁性微球能够与His标签的标记物特异性结合。

11.根据权利要求10所述生物磁性微球的制备方法,其特征在于:所述三羧基胺为N,N-双(羧甲基)-L-赖氨酸,优选其用量为0.5-550g/L。

12.根据权利要求8-11中任一项所述生物磁性微球的制备方法,其特征在于:步骤(2)制备磁性微球A所用丙烯酸的用量为0.002-20mol/L;步骤(3)制备磁性微球B所用丙烯酸钠的用量为0.53-12.76mol/L。

13.一种利用权利要求1-7任一项所述生物磁性微球分离蛋白质的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)将结合缓冲液加入所述生物磁性微球充分混合,磁吸分离所述生物磁性微球,将所分离到的生物磁性微球加入含有待分离蛋白质的溶液中充分混合孵育,得到结合了目标蛋白质的生物磁性微球E;

(2)固液分离,弃去上清液,用洗涤液洗涤所述生物磁性微球E,然后利用洗脱液进行洗脱,收集上清液;

(3)从上清液中分离纯化得到目标蛋白。

14.根据权利要求1-7任一项所述生物磁性微球在蛋白分离纯化、免疫分析、目标抗体药物富集、靶向给药、核酸分离提取、细胞分选、酶固定、基因载体构建中的应用。

## 一种生物磁性微球及其制备方法和使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种生物磁性微球及其制备方法、以及利用该生物磁性微球分离纯化蛋白质的方法。

### 背景技术

[0002] 蛋白质的分离纯化在生物药的制造、生物蛋白分子的检测诊断、蛋白结构的分析解析等领域拥有广泛的应用。现有技术中,常用分离纯化蛋白质的技术有镍柱、Protein A柱、生物素柱等。镍柱中,通过载体上固定的镍离子实现对带有组氨酸标签的蛋白质从混合体系中的分离,现阶段常用的载体是琼脂糖凝胶,凝胶类材料的三维多孔结构有利于提高材料的比表面积,从而增加固定镍离子的位点,增强对目标蛋白质的结合量。

[0003] 材料的三维多孔结构虽然可以大幅度地提高目标蛋白结合的位点数量,但是材料内部的多孔结构亦会在蛋白洗脱时增加蛋白的滞留时间,材料内部的一些不连续空间或死角亦会阻碍蛋白从材料内部洗脱出来,增加滞留比例。仅在材料的外表面上固定可与目标蛋白结合的位点,可以避免目标蛋白进入到材料的内部,大幅度减少洗脱时目标蛋白的滞留时间和滞留比例;但是如果仅仅利用材料的外表面,会大幅度降低材料的比表面积,大幅度降低目标蛋白的结合位点数量。

[0004] 聚合物是由单体分子聚合后形成的高分子化合物,具有活性位点的单体分子在聚合后能够使所生成的聚合物上富含大量的活性位点,从而大幅提高活性位点的数量,通过这些活性位点还可以进一步偶联相应的结合位点。聚合物的种类多种多样,包括分子链相互交联形成网状结构的聚合物、单一线性分子链的聚合物、具有众多分支链的聚合物等,不同类型的聚合物在不同领域拥有各自广泛的应用。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种生物磁性微球及其相应的制备方法、以及利用该磁性微球分离纯化蛋白质的方法。所述生物磁性微球是一种功能化磁性微球,仅利用其外表面对目标蛋白质进行分离纯化;所述生物磁性微球利用带有支链的线型聚合物修饰外表面,既能高效率高通量地结合目标蛋白,又能有效减少洗脱时目标蛋白的滞留时间和滞留比例。

[0006] 本发明第一方面提供一种生物磁性微球,所述生物磁性微球具有磁性微球本体,所述磁性微球本体外表面具有至少一种带有支链的线型聚合物,该带有支链的线型聚合物一端共价偶联于所述磁性微球本体外表面,所述线型聚合物的主链为聚烯烃主链;所述线型聚合物的支链含有功能基团,所述功能基团能够与目标物进行结合。

[0007] 优选之一,所述线型聚合物由丙烯酸、丙烯酸盐、丙烯酸酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸盐、甲基丙烯酸酯、其它丙烯酸类单体之一或其组合通过聚合得到;优选地,所述线型聚合物的主链形成过程中无需交联剂。

[0008] 所述线型聚合物的支链含有功能基团,所述功能基团能够与目标物进行结合。优选地,所述线型聚合物的支链含有特异性结合位点(也即所述功能基团为特异性结合位

点),所述特异性结合位点能够与目标物特异性结合。

[0009] 进一步优选地,所述特异性结合位点为镍离子,能够与His标签的标记物特异性结合。

[0010] 优选之一,所述线型聚合物的功能基团为羧基、羟基、氨基、巯基之一或其组合。

[0011] 优选之一,所述线型聚合物直接或通过连接基团间接固定于所述磁性微球本体的外表面。

[0012] 优选之一,所述磁性微球本体为SiO<sub>2</sub>包裹的磁性颗粒。

[0013] 优选之一,所述磁性颗粒的化学成分包括铁化合物、铁合金、锌的氧化物、锰的氧化物、钆的氧化物、钴化合物、镍化合物、镍合金、锰氧化物、锰合金、锌的氧化物、钆的氧化物、铬的氧化物等中任一种或其任意组合。

[0014] 优选之一,所述磁性颗粒的化学成分包括铁的氧化物、锌的氧化物、锰的氧化物、钆的氧化物、钴的氧化物、镍的氧化物、锰氧化物、锌的氧化物、钆的氧化物、铬的氧化物等中任一种或其任意组合。

[0015] 优选方式之一,所述磁性颗粒的化学成分包括氧化铁、铁、钴、Co<sup>2+</sup>、氮化铁、Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、GdO、镍、Ni<sup>2+</sup>等中任一种或其任意组合;其中,氧化铁优选为Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或者其组合。

[0016] 另优选方式之一,所述磁性颗粒的化学成分包括Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、氮化铁、Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、AlNi(Co)、FeCr(Co)、FeCrMo、FeAlC、AlNi(Co)、FeCrCo、ReCo、ReFe、PtCo、MnAlC、CuNiFe、AlMnAg、MnBi、FeNi(Mo)、FeSi、FeAl、FeNi(Mo)、FeSiAl、BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SrO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、PbO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、GdO等中任一种或其任意组合;其中,所述Re为稀土元素镱。

[0017] 本发明第二方面提供一种本发明第一方面所述生物磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1)对磁性微球本体进行化学修饰,将氨基引入到所述磁性微球本体的外表面,形成磁性微球A;

[0019] 优选之一,利用硅烷偶联剂对所述磁性微球本体进行化学修饰;

[0020] (2)利用羧基与氨基之间的共价反应将丙烯酸分子共价偶联到所述磁性微球A的外表面,从而引入碳碳双键,形成磁性微球B;

[0021] (3)在无交联剂的条件下,利用碳碳双键的聚合反应,将丙烯酸类单体分子进行聚合,得到的线型聚合物共价偶联于所述磁性微球B的外表面,进行固液分离,去除液相,得到磁性微球C;

[0022] 当所述功能基团含有特异性结合位点时,还包括以下步骤:(4)在所述磁性微球C的线型聚合物的支链处偶联特异性结合位点。

[0023] 优选之一,所述丙烯酸类单体分子为丙烯酸钠单体分子。

[0024] 上述步骤(1)和(2)可以合并为以下步骤(I):采用三甲氧基硅烷化的丙烯酸类分子对所述磁性微球本体进行化学修饰,将碳碳双键引入到所述磁性微球本体的外表面,形成磁性微球B。

[0025] 所述三甲氧基硅烷化的丙烯酸类分子比如γ-甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷(KH570酰氧基硅烷,CAS:2530-85-0)。

[0026] 优选之一,所述磁性微球C的线型聚合物的支链含有镍离子,此时,还可以包括以下步骤:(4)将所述磁性微球C偶联三羧基胺,然后通过三羧基胺残基中的三个羧基络合Ni<sup>2+</sup>

得到磁性微球D,即目标生物磁性微球。所述目标生物磁性微球能够与His标签的标记物特异性结合。

[0027] 优选方式之一,所述三羧基胺为N,N-双(羧甲基)-L-赖氨酸,更优选其用量为0.5-550g/L。

[0028] 优选方式之一,步骤(2)制备磁性微球A所用丙烯酸的用量为0.002-20mol/L。

[0029] 优选方式之一,步骤(3)制备磁性微球B所用丙烯酸钠的用量为0.53-12.76mol/L。

[0030] 本发明第三方面提供一种利用本发明第一方面所述生物磁性微球分离蛋白质的方法,其包括以下步骤:

[0031] (1) 将结合缓冲液加入所述生物磁性微球充分混合,磁吸分离所述生物磁性微球,将所分离到的生物磁性微球加入含有待分离蛋白质的溶液中充分混合孵育,得到结合了目标蛋白质的生物磁性微球E。

[0032] (2) 固液分离,弃去上清液,用洗涤液洗涤清洗所述生物磁性微球E,然后利用洗脱液进行洗脱,收集上清液;

[0033] (3) 从上清液中分离纯化得到目标蛋白。

[0034] 本发明第四方面提供本发明第一方面所述生物磁性微球在蛋白分离纯化、免疫分析、目标抗体药物富集、靶向给药、核酸分离提取、细胞分选、酶固定、基因载体构建等领域中的应用。

[0035] 本发明的主要优点和积极效果主要包括:

[0036] (1) 制备的生物磁性微球能高效地将目标蛋白从混合体系中大量捕获到所述生物磁性微球上,实现高通量地结合目标蛋白。

[0037] (2) 制备的生物磁性微球能在洗脱时实现目标蛋白的高效洗脱,有效减少目标蛋白的滞留时间和滞留比例。

[0038] (3) 制备的生物磁性微球操作使用便捷,仅需利用一小块磁铁便能高效地控制磁性微球的位置和聚集状态,实现生物磁性微球在溶液中的快速分散和聚沉,使蛋白的分离纯化变得更加简单、快捷,无需昂贵的大型实验设备,如高速离心机等。

[0039] (4) 所形成的生物磁性微球用途广泛,如,在免疫分析中的应用、快速分离纯化组氨酸标签蛋白质等目标蛋白、目标抗体药物富集、靶向给药、核酸分离提取、细胞分选、酶固定、基因载体构建等领域中的应用。

[0040] (5) 本发明的生物磁性微球可通过控制磁性微球本体的大小,并利用不同水溶性的聚合物偶联到磁性微球表面,来调整所形成的磁性微球的水溶性、溶液中的尺寸、悬浮性质等特性方面。

[0041] (6) 本发明提供的生物磁性微球,可以稳定地悬浮在水性液体中,能够在2天甚至更久的时间内不沉降。而且,所述生物磁性微球可以在不进行持续搅拌的条件下,稳定地悬浮在水性液态体系中,这是其独特的结构设计带来的优良性能;一方面,其磁性微球本体的尺寸可以控制在10微米以下,甚至可控制在1微米以下,另一方面,可以在所述磁性微球本体外表面包裹亲水性聚合物,并可以调节聚合物在所述磁性微球本体外表面的接枝密度,还可以调节聚合物本身的亲水性、结构类型、流体力学半径、链长度、支链数量、支链长度等特征,更好地控制生物磁性微球在体系中的悬浮状态。

## 附图说明

[0042] 图1是SDS-PAGE电泳检测图,左图和右图分别为本发明的生物磁性微球(一种镍磁珠,也记为KM磁珠)和对照组的微球(对照镍珠)的纯化结果对比。

[0043] 图2为聚丙烯酸磁珠以及KM磁珠对IVTT反应液处理前后RFU值的差值(为IVTT反应液RFU减去流穿液RFU)对比。其中,A、B对应两种不同条件合成的聚丙烯酸磁珠,B组参考KM磁珠的合成方法进行制备,A组合成过程中使用水相替换了溶液X、溶液Y。横坐标的标签中的体积(2 $\mu$ L、20 $\mu$ L)对应磁珠用量,即分别代表2 $\mu$ L磁珠,20 $\mu$ L磁珠。

[0044] 图3为KH570修饰路线制备的聚丙烯酸磁珠的RFU值(IVTT反应液的RFU-流穿液RFU)和IVTT反应液的RFU值对比。

[0045] 图4为聚丙烯酸钠磁珠(B-KM磁珠,191220-ZZ-1)的纯度测试电泳图,其中,100%指纯IVTT反应液,未经稀释;60%指60%体积的纯IVTT反应液与40%体积的稀释液进行混合。

[0046] 图5.二氧化硅包裹的磁性微球本体的倒置显微镜照片。(A)直径1 $\mu$ m,静止状态;(B)直径1 $\mu$ m,流动状态;(C)直径10 $\mu$ m;(D)直径100 $\mu$ m。其中,(A)和(B)的标尺为10 $\mu$ m;(C)和(D)的标尺为100 $\mu$ m。

[0047] 图6.采用1 $\mu$ m、10 $\mu$ m的磁性微球本体制备的KM磁珠(镍磁珠)的纯化效果对比。其中,PC对应待纯化的原液(IVTT反应液,1mL反应体系);Ni1 beads、Ni10 beads分别采用1 $\mu$ m、10 $\mu$ m的磁性微球本体;10 $\mu$ L、5 $\mu$ L、1 $\mu$ L分别对应镍磁珠的使用体积。

[0048] 图7.采用1 $\mu$ m、100 $\mu$ m的磁性微球本体制备的KM磁珠(镍磁珠)的纯化效果对比。其中,PC对应待纯化的原液(IVTT反应液,1mL反应体系);Ni1 beads、Ni100 beads分别采用1 $\mu$ m、100 $\mu$ m的磁性微球本体;10 $\mu$ L、5 $\mu$ L、1 $\mu$ L分别对应镍磁珠的使用体积。

## 具体实施方式

[0049] 下面结合具体实施方式和实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施方式及实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,优先按照、参考上文所述的具体实施方式指引的条件,然后可按照常规条件,例如“Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)”、《无细胞蛋白合成实验手册》“Edited by Alexander S.Spirin and James R.Swartz.Cell-free protein synthesis:methods and protocols[M].2008”等文献中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0050] 除非另外说明,否则本发明中提及的百分比和份数分别是重量百分比和重量份数。如无特别说明,则本发明实施例中所用的材料和试剂均为市售产品。本申请中的温度单位如无特殊说明,均为摄氏度( $^{\circ}$ C)。

[0051] 术语介绍

[0052] 物质,包括但不限于分子、分子的聚集体、分子的结合体、分子的络合物等形态。

[0053] 目标物,指本发明的生物磁性微球拟结合的物质,优选为生物分子或生物活性物质,举例如,包括但不限于蛋白(如抗体、抗原、抗生素、白介素等等)、蛋白络合物、蛋白结合物(如糖蛋白)、核酸分子(如DNA、RNA等)、蛋白与核酸的结合物或络合物、病毒、细胞、脂质体、囊泡等等。本发明的生物磁性微球,通过所述线型聚合物支链含有的功能基团,能够与

所述目标物进行结合,从而实现目标物的分离纯化。本发明中,所述目标物为优选为蛋白类物质。所述蛋白类物质,可以为蛋白或包括蛋白结构的物质,例如包括但不限于蛋白络合物、蛋白结合物、蛋白核酸结合物或络合物等。所述蛋白结合物通过共价键、动态共价键、超分子作用力(比如氢键)等方式形成。所述蛋白络合物通过络合作用形成。

[0054] 目标蛋白,蛋白类的目标物,为蛋白类物质。

[0055] His标签的标记物,可以作为一种目标物,指携带有His标签(组氨酸标签)的物质;携带His标签的方式包括但不限于共价键、动态共价键、超分子相互作用等连接方式,只要在通过His标签捕捉目标物时,His标签与被标记部分之间的连接稳定存在,捕捉过程中His标签的标记物能够以整体形式稳定存在即可。

[0056] 本发明中蛋白、蛋白质,具有相同含义,可以互换使用。融合蛋白也是一种蛋白。本发明的蛋白广义地包括多肽。本发明涉及的任一种蛋白,如无特别说明(例如指定具体序列),应理解还包括其衍生物。

[0057] 蛋白的衍生物:所述蛋白的衍生物,至少包括含有C端标签、含有N端标签、含有C端及N端标签。其中,C端指COOH端,N端指NH<sub>2</sub>端,本领域技术人员理解其含义。所述标签可以为多肽标签,也可以为蛋白标签。所述蛋白的衍生物,还可以包括其化学修饰产物,包括但不限于盐形式、络合物、酯化合物、取代产物等;化学修饰方法举例如离子化、盐化、脱盐化、络合、解络合、螯合、解螯合、加成反应、取代反应、消除反应、插入反应、氧化反应、还原反应、翻译后修饰等修饰方法,具体举例如氧化、还原化、甲基化、去甲基化、氨基化、羧基化、硫化等修饰方法。

[0058] 磁性微球,具有细小粒径的强磁性或可被强磁性化的微球,也可描述为磁珠,直径尺寸优选0.1 $\mu$ m~1000 $\mu$ m。

[0059] 磁性微球本体:二氧化硅包裹的磁性颗粒,如二氧化硅包裹的四氧化三铁颗粒。

[0060] 磁性微球A:氨基修饰的磁性微球。

[0061] 磁性微球B:含碳碳双键的磁性微球。

[0062] 磁性微球C:丙烯酸类聚合物修饰的磁性微球。

[0063] 磁性微球D:利用磁性微球C得到的络合有镍离子的生物磁性微球。

[0064] 磁性微球E:磁性微球D与目标物(如:蛋白)结合后的产物,即含被捕获物的磁性微球。

[0065] KM磁珠:使用丙烯酸钠作为单体分子进行聚合反应得到的聚丙烯酸钠磁珠,与实施例部分合成的聚丙烯酸磁珠的基本结构一致。制备聚丙烯酸磁珠时,采用丙烯酸作为单体分子进行聚合。

[0066] 线性聚合物与线型聚合物具有同等含义,可以互换使用。

[0067] 丙烯酸类聚合物:指具有-C(COO-)-C-单元结构的均聚物或共聚物,所述共聚物的共聚形式没有特别限制,以能够提供线性主链和计量的侧基COO-为宜。其中,碳碳双键上还允许存在其它的取代基,只要不影响聚合反应的进行即可,例如甲基取代基(对应-CH<sub>3</sub>C(COO-)-C-)。其中,COO-的存在形式可以为-COOH,也可以为盐形式(如钠盐),还可以为甲酸酯形式(优选甲酸烷基酯,例如甲酸甲酯-COOCH<sub>3</sub>,甲酸乙酯-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;还可以为甲酸羟乙酯-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)等。-C(COO-)-C-单元结构的具体结构形式包括但不限于-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-、-CH(COONa)-CH<sub>2</sub>-、-MeC(COOH)-CH<sub>2</sub>-、-MeC(COONa)-CH<sub>2</sub>-、-CH(COOCH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-CH

(COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)-CH<sub>2</sub>-、-MeC(COOCH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-MeC(COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)-CH<sub>2</sub>-等中任一种或其任意组合。其中,Me为甲基。一个聚合物分子的线性主链上,可以仅有一种上述单元结构(对应均聚物),也可以含有两种或两种以上的单元结构(对应共聚物)。

[0068] 丙烯酸类单体分子:可用于合成上述丙烯酸类聚合物的单体分子,具有C(COO-)=C的基本结构,举例如,CH(COOH)=CH<sub>2</sub>、CH(COONa)=CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>C(COOH)=CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>C(COONa)=CH<sub>2</sub>、CH(COOCH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>、CH(COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)=CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>C(COOCH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>C(COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)=CH<sub>2</sub>等。

[0069] 支链:本发明中支链、侧支链具有相同含义,可以互换使用。本发明中,支链是指聚合物线性主链上键合的侧链或侧基,对于支链的长度、大小无特殊要求,可以是羧基、羟基、氨基等短支链,也可以是包含原子数较多的长支链。支链的结构无特殊要求,可以是线型的,也可以是具有分支结构的支链。支链也可以包含另外的侧链或侧基。支链的数量、长度、大小、再分支的程度等结构特征,以顺利发挥线性主链的柔性摆动,不形成网状结构,不导致支链堆积,以致滞留比例增大为宜。支链在主链上的间隔距离可调节。

[0070] 纯化介质,指用于特异性地捕获目标物的功能性元件。本发明的生物磁性微球的纯化介质位于:偶联于磁性微球本体外表面的线型聚合物的支链处。

[0071] 基团:可以为单原子,也可以为原子团,可以为自由基形式,也可以为离子形式。

[0072] 聚合物支链的功能基团:是指具有反应活性或者经活化后具有反应活性,能够直接地与其它物质的反应性基团发生相互作用,或者经活化后能够与其它物质的反应性基团发生相互作用,从而将其它物质结合在聚合物的支链处。聚合物支链的功能基团,其优选方式之一为特异性结合位点。所述其它物质可以为纯化介质,也可以为待捕获的目标物。

[0073] 结合:可以为共价或非共价的方式,包括但不限于共价方式、动态共价方式、超分子相互作用方式等。所述超分子相互作用包括但不限于氢键、一些特异性结合作用等。

[0074] 特异性结合位点:本发明中,所述特异性结合位点,是指聚合物支链处的具备结合功能的基团或结构部位,该基团或结构部位具备对于某种特定目标物的特异性识别、结合功能,特异性结合可以通过配位、络合、静电力、范德华力、氢键、共价键等作用方式或其它作用方式实现。

[0075] 洗涤液:洗脱杂蛋白等杂质;经洗脱后,杂蛋白被洗涤液带走。

[0076] 流穿液:是经过纯化磁珠孵育后分离获得的穿出液,其中含有未被分离的残余目标物。比如,所述流穿液可以指加入亲和柱,经过柱后穿出的溶液,如:流穿液1、流穿液2和流穿液3,分别表示第一次穿出的溶液,第二次穿出的溶液和第三次穿出的溶液。

[0077] 洗脱液:洗脱目标蛋白;经洗脱后,目标蛋白存在于洗脱液中。

[0078] 结合力:结合能力,如磁性微球与某一蛋白的结合能力。

[0079] 亲和力:使用不同浓度梯度的底物溶液,当磁性微球只结合50%底物时的底物浓度。

[0080] PNA:肽核酸,一类以多肽骨架取代糖磷酸主链的DNA类似物,是丹麦有机化学家 Ole Buchardt和生物化学家Peter Nielsen于20世纪80年代开始潜心研究的一种新的核酸序列特异性试剂。它是在第一代、第二代反义试剂的基础上,通过计算机设计构建并最终人工合成的第三代反义试剂,是一种全新的DNA类似物,即以中性的肽链酰胺2-氨基乙基甘氨酸键取代了DNA中的戊糖磷酸二酯键骨架,其余部分的结构与DNA相同,PNA可以通过

Watson-Crick碱基配对的形式识别并结合DNA或RNA序列,形成稳定的双螺旋结构。由于PNA不带负电荷,与DNA和RNA之间不存在静电斥力,因而结合的稳定性和特异性都大为提高;不同于DNA或DNA、RNA间的杂交,PNA与DNA或RNA的杂交几乎不受杂交体系盐浓度影响,与DNA或RNA分子的杂交能力远优于DNA/DNA或DNA/RNA,表现在很高的杂交稳定性、优良的特异序列识别能力、不被核酸酶和蛋白酶水解。并可以与配基相连共转染进入细胞。这些都是其他寡核苷酸所不具备的优点。鉴于上述诸多DNA分子不具备的优点,近十年来,人们为PNA在许多高技术领域找到了用途。

[0081] eGFP:Enhanced Green Fluorescent Protein,增强型绿色荧光蛋白。

[0082] RFU:Relative Fluorescent Unit,相对荧光单位值。

[0083] RLU:Relative Light Unit,相对发光单位值。

[0084] 溶液X:含有终浓度0.01~1mol/L 2-吗啉乙磺酸(CAS:4432-31-9)、终浓度0.1~2mol/L NaCl的水溶液。

[0085] 溶液Y:pH 7.2~7.5的PBS缓冲溶液,如:含有终浓度0.0684mol/L磷酸氢二钠、终浓度0.0316mol/L磷酸二氢钠和终浓度0.15mol/L氯化钠的水溶液。

[0086] 本发明中,“优选(比如,prefer,preferable,preferably,preferred等)”、“较佳”、“更优选”、“更佳”、“最优选”等优选实施方式,不构成对发明的涵盖范围及保护范围的任何意义上的限制,并非用于限定本发明的范围和实施方式,仅用于提供一些实施方式作为举例。

[0087] 本发明的描述中,对于“优选之一”、“优选方式之一”、“优选实施方式之一”、“优选例之一”、“优选例”、“在一优选的实施方式中”、“一些优选例中”、“一些优选方式中”、“优选为”、“优选”、“优选地”、“更优选”、“更优地”、“进一步优选”、“最优选”等优选方式,以及“实施方式之一”、“方式之一”、“示例”、“具体示例”、“举例如”、“作为举例”、“例如”、“比如”、“如”等示意的列举方式,同样不构成对发明的涵盖范围及保护范围的任何意义上的限制,且各方式所描述的具体特征包含于本发明的至少一个具体实施方式中。本发明中,各方式所描述的具体特征可以在任何的一个或者多个具体实施方式中以合适的方式结合。本发明中,各优选方式对应的技术方案也可以通过任意合适的方式结合。

[0088] “可选地”,表示可以有,也可以无,以能够实现本发明的技术方案为选择标准。本发明中,“可选方式”,表示只要适用于本发明的技术方案,就可以用来实施本发明。

[0089] 本发明中,“其组合”、“其任意组合”均指前述列举对象的任意合适的组合,只要能够实现本发明的目的。上述定义涵盖的范围包括但不限于“或其组合”、“或者其组合”、“与其组合”、“及其组合”、“和其组合”等描述。本发明中,“其任意组合”,在数量上表示“大于1”,在涵盖范围上表示以下情形构成的组:“任选其中一个,或者任选其中至少两个构成的组”。

[0090] 本发明中,“一个或多个”、“一种或多种”等“一或多”的描述,与“至少一个”、“至少一种”、“其组合”、“或其组合”、“及其组合”、“或其任意组合”、“及其任意组合”等具有相同含义,可以互换使用,表示数量上等于“1”或“大于1”。

[0091] 本发明中,采用“或/和”、“和/或”表示“任选其一或者任选其组合”,也表示至少其一。

[0092] 本发明所述的“通常”、“常规”、“一般”、“经常”、“往往”等方式描述的现有技术手

段,也都被引用作为本发明内容的参考,如无特别说明,可视为本发明的部分技术特征的优选方式之一,且需要注意的是,不构成对发明的涵盖范围及保护范围的任何意义上的限制。

[0093] IVTT体系:In vitro transcription and translation system,体外转录与翻译系统,是一种以外源DNA为模板的无细胞蛋白合成体系(或称为体外蛋白合成体系)。无细胞蛋白合成体系是以外源的mRNA或DNA为蛋白质合成模板,通过人工控制补加蛋白质合成所需的底物和转录、翻译相关蛋白因子等物质,能够实现目标蛋白质的合成。本发明的无细胞蛋白合成体系无特别限制,可以是基于酵母细胞提取物、大肠杆菌细胞提取物、哺乳动物细胞提取物、植物细胞提取物、昆虫细胞提取物等细胞提取物的无细胞蛋白合成体系的一种或其任意组合。需要注意的是,本发明的体外蛋白合成体系并不排除完整细胞的存在,允许含有极少量或少量的完整细胞,但优选不含完整的细胞。

[0094] 应理解,在本发明范围内,本发明的上述各技术特征和在下文(包括但不限于实施例方式和实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案,只要能够实现本发明的技术方案即可。限于篇幅,不再一一累述。

[0095] 本发明第一方面,提供一种生物磁性微球,所述生物磁性微球具有磁性微球本体,所述磁性微球本体外表面具有至少一种带有支链的线型聚合物,该带有支链的线型聚合物一端共价偶联于所述磁性微球本体外表面,其他部分游离于所述磁性微球本体外表面,所述线型聚合物的主链为聚烯烃主链;优选地,所述线型聚合物的主链形成过程中无需交联剂。

[0096] 所述线型聚合物包括至少一条线性主链,每条线性主链携带至少三个含有功能基团的支链,也即每条线性主链携带至少三个功能化的支链;所述线型聚合物包括至少三个功能基团。此时,聚合物既具有线性主链的高柔顺性,又具有支链数量的高倍数放大优点,能够更好地实现高速率、高通量的结合,高效率、高比例(高产率)的分离。

[0097] 为了构建所述磁性微球本体,优选地选择磁性颗粒并包裹二氧化硅。所述磁性颗粒中含有磁性材料/磁性成分,所述磁性颗粒的化学成分可以包括铁化合物(如铁的氧化物)、铁合金、锌的氧化物、锰的氧化物、钆的氧化物、钴化合物(如钴的氧化物)、镍化合物(如镍的氧化物)、镍合金、锰氧化物、锰合金、锌的氧化物、钆的氧化物和铬的氧化物等中至少一种,也即其中的一种或多种,也即其中任一种或其任意组合。

[0098] 优选方式之一,所述磁性颗粒的化学成分包括氧化铁、铁、钴、 $\text{Co}^{2+}$ 、氮化铁、 $\text{Mn}_3\text{O}_4$ 、 $\text{GdO}$ 、镍、 $\text{Ni}^{2+}$ 等中任一种或其任意组合;其中,氧化铁优选为磁铁矿( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、磁赤铁矿( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )或者该两种氧化物的组合,更优选之一,氧化铁为四氧化三铁。

[0099] 另优选方式之一,所述磁性颗粒的化学成分选自: $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、氮化铁、 $\text{Mn}_3\text{O}_4$ 、 $\text{AlNi}(\text{Co})$ 、 $\text{FeCr}(\text{Co})$ 、 $\text{FeCrMo}$ 、 $\text{FeAlC}$ 、 $\text{AlNi}(\text{Co})$ 、 $\text{FeCrCo}$ 、 $\text{ReCo}$ 、 $\text{ReFe}$ 、 $\text{PtCo}$ 、 $\text{MnAlC}$ 、 $\text{CuNiFe}$ 、 $\text{AlMnAg}$ 、 $\text{MnBi}$ 、 $\text{FeNi}(\text{Mo})$ 、 $\text{FeSi}$ 、 $\text{FeAl}$ 、 $\text{FeNi}(\text{Mo})$ 、 $\text{FeSiAl}$ 、 $\text{BaO} \cdot 6\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{SrO} \cdot 6\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{PbO} \cdot 6\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{GdO}$ 及其组合。其中,所述Re为一种稀土元素,铈。所述Mo为钼。

[0100] 本发明所述磁性微球本体的尺寸(如体积)无特别限定,可以为任意可行的粒径尺寸,但优选所述磁性微球本体的直径为 $0.1\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ 。如无特别说明,所述直径尺寸指的是平均尺寸。举例如在 $1\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ 的范围内,具体举例如 $1\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ 、 $800\mu\text{m}$ 、 $1000\mu\text{m}$ ;本申请的优选方式之一为 $1\mu\text{m}$ 。

[0101] 对于所述生物磁性微球而言,较小的颗粒尺寸,有助于所述蛋白固体系统实现在

蛋白合成的反应体系中悬浮,更充分地、与蛋白表达产物相接触,提高对蛋白产物的捕获效率和结合率(结合效率)。

[0102] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径选自0.1~10 $\mu\text{m}$ 。

[0103] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径选自0.2~6 $\mu\text{m}$ 。

[0104] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径选自0.4~5 $\mu\text{m}$ 。

[0105] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径选自0.5~3 $\mu\text{m}$ 。

[0106] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径选自0.2~1 $\mu\text{m}$ 。

[0107] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径选自0.5~1 $\mu\text{m}$ 。

[0108] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径选自1 $\mu\text{m}$ ~1000 $\mu\text{m}$ 。

[0109] 一些优选方式中,所述磁性微球本体的直径尺寸为下述任一种粒径尺度(偏差可以为 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ )或任两种粒径尺度之间的范围:0.1 $\mu\text{m}$ 、0.15 $\mu\text{m}$ 、0.2 $\mu\text{m}$ 、0.25 $\mu\text{m}$ 、0.3 $\mu\text{m}$ 、0.35 $\mu\text{m}$ 、0.4 $\mu\text{m}$ 、0.45 $\mu\text{m}$ 、0.5 $\mu\text{m}$ 、0.55 $\mu\text{m}$ 、0.6 $\mu\text{m}$ 、0.65 $\mu\text{m}$ 、0.7 $\mu\text{m}$ 、0.75 $\mu\text{m}$ 、0.8 $\mu\text{m}$ 、0.85 $\mu\text{m}$ 、0.9 $\mu\text{m}$ 、0.95 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$ 、1.5 $\mu\text{m}$ 、2 $\mu\text{m}$ 、2.5 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$ 、3.5 $\mu\text{m}$ 、4 $\mu\text{m}$ 、4.5 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、5.5 $\mu\text{m}$ 、6 $\mu\text{m}$ 、6.5 $\mu\text{m}$ 、7 $\mu\text{m}$ 、7.5 $\mu\text{m}$ 、8 $\mu\text{m}$ 、8.5 $\mu\text{m}$ 、9 $\mu\text{m}$ 、9.5 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、15 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、25 $\mu\text{m}$ 、30 $\mu\text{m}$ 、35 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、45 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ 、55 $\mu\text{m}$ 、60 $\mu\text{m}$ 、65 $\mu\text{m}$ 、70 $\mu\text{m}$ 、75 $\mu\text{m}$ 、80 $\mu\text{m}$ 、85 $\mu\text{m}$ 、90 $\mu\text{m}$ 、95 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、150 $\mu\text{m}$ 、200 $\mu\text{m}$ 、250 $\mu\text{m}$ 、300 $\mu\text{m}$ 、350 $\mu\text{m}$ 、400 $\mu\text{m}$ 、450 $\mu\text{m}$ 、500 $\mu\text{m}$ 、550 $\mu\text{m}$ 、600 $\mu\text{m}$ 、650 $\mu\text{m}$ 、700 $\mu\text{m}$ 、750 $\mu\text{m}$ 、800 $\mu\text{m}$ 、850 $\mu\text{m}$ 、900 $\mu\text{m}$ 、950 $\mu\text{m}$ 、1000 $\mu\text{m}$ 。

[0110] 形成的磁性微球本体以及包含磁性微球本体的磁性微球,一方面可在外加磁场的作用下快速定位、导向和分离,另一方面可通过表面改性或化学聚合等方法赋予磁性微球本体或磁性微球的外表面活性功能基团,如羟基、羧基、醛基、氨基、镍离子等,此外,磁性微球本体或磁性微球也可以通过共价键、非共价键或其它方式来结合抗体、细胞、DNA等生物活性物质。

[0111] 用于偶联磁性微球本体的高分子可以选自聚丙烯酸、聚丙烯酸盐、聚甲基丙烯酸、聚甲基丙烯酸酯等带有羧基支链的高分子中的一种或多种。

[0112] 优选之一,所述生物磁性微球外表面偶联的线型聚合物由丙烯酸、丙烯酸盐、丙烯酸酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸盐、甲基丙烯酸酯等丙烯酸类单体之一或其组合通过聚合得到;优选地,所述聚合过程中无需交联剂。

[0113] 所述线型聚合物的支链含有功能基团,所述功能基团能够与目标物进行结合。优选地,所述线型聚合物的支链含有特异性结合位点(也即所述功能基团为特异性结合位点),所述特异性结合位点能够与目标物特异性结合。

[0114] 进一步优选地,所述特异性结合位点为镍离子,能够与His标签(组氨酸标签)的标记物特异性结合。

[0115] 优选之一,所述线型聚合物的功能基团为羧基、羟基、氨基、巯基之一或其组合。

[0116] 优选之一,所述线型聚合物直接或通过连接基团间接固定于所述磁性微球本体的外表面。

[0117] 形成的生物磁性微球可以用于用以结合活性物质,所述活性物质可以直接键接,也可以经由连接物分子键接,所述连接物分子可以是核酸分子、肽核酸、核酸适体、脱氧核糖核酸、核糖核酸、亮氨酸拉链、螺旋-转角-螺旋基序、锌指基序、寡核苷酸、生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素或抗半抗原抗体等中之一或其任意组合。当然,连接物分子也可以

是双链核酸构建体、双螺旋、从DNA-DNA、DNA-RNA、DNA-PNA、RNA-RNA、RNA-PNA或PNA-PNA中选择的同型杂交物或异型杂交物。

[0118] 本发明第二方面提供一种本发明第一方面所述生物磁性微球的制备方法,包括以下步骤:

[0119] 步骤(1):提供磁性微球本体,对所述磁性微球本体的表面进行化学修饰,引入反应性基团R1;

[0120] 步骤(2):可选地,利用与反应性基团R1之间的共价偶联反应,引入功能基团R2。所述功能基团R2能够作为反应性中心RC启动聚合反应;如果步骤(1)的反应性基团R1能够作为反应性中心RC启动聚合反应,本步骤可省略,直接进入第(3)步。对于加成聚合(自由基聚合、阳离子聚合、阴离子聚合),所述反应性中心RC即为引发中心;对于逐步聚合,所述反应性中心RC亦可作为聚合链“增长”的起始点。

[0121] 所述反应性基团,指能够进行偶合反应并生成共价键的基团。

[0122] 步骤(3):加入单体分子M1,以所述反应性中心RC为起点,进行单体分子MG的聚合反应;单体分子MG中至少包括一种能够提供功能化支链末端的单体分子MB;所述功能化支链末端,指支链末端为功能基团F1或者经修饰后能够转变为功能基团F1。通过聚合反应,形成带有支链的线型聚合物的链骨架,并在反应性中心RC处形成共价固定所述线型聚合物的连接点。

[0123] 所述功能基团,为具有能够形成共价键、动态共价键、超分子相互作用等结合力的功能性基团。

[0124] 所述聚合反应的机理没有特别限定,比如可以选自:自由基聚合、阳离子聚合、阴离子聚合、逐步聚合。

[0125] 所述单体分子MG可以为单一种类的分子,此时可以进行均聚反应;也可以为不同种类分子的组合,此时可以进行共聚反应;所述能够提供功能化支链的单体分子MB,比如:丙烯酸类单体分子(可进行自由基聚合)等。

[0126] 步骤(4):利用纯化介质与支链末端的功能基团F1之间的相互作用,将纯化介质结合到支链末端,得到“磁性微球本体-带有支链的线型聚合物-纯化介质”结构的生物磁性微球。

[0127] 上述步骤可以分别进行,也可以采用合适组合方式合并进行。

[0128] 所述纯化介质,指生物磁性微球中用于特异性地捕获目标物的功能性元件。

[0129] 所述“纯化介质与支链末端的功能基团F1之间的相互作用”,比如共价键、动态共价键、超分子相互作用(如亲和复合物相互作用)等。

[0130] 所述生物磁性微球的制备方法可以包括以下步骤:

[0131] 步骤(1):提供磁性微球本体,对所述磁性微球本体进行化学修饰,将氨基引入到所述磁性微球本体的外表面,形成磁性微球A;

[0132] 优选之一,利用硅烷偶联剂对磁性微球本体进行化学修饰;

[0133] 步骤(2):利用羧基与氨基之间的共价反应将丙烯酸分子共价偶联到所述磁性微球A的外表面,从而引入碳碳双键,形成磁性微球B;

[0134] 步骤(3):在无交联剂的条件下,利用碳碳双键的聚合反应,将丙烯酸类单体分子进行聚合,得到的线型聚合物共价偶联于所述磁性微球B的外表面,进行固液分离,去除液

相,得到磁性微球C;

[0135] 当所述功能基团含有特异性结合位点时,还包括以下步骤:(4)在所述磁性微球C的线型聚合物的支链处偶联特异性结合位点。

[0136] 优选之一,所述丙烯酸类单体分子为丙烯酸钠单体分子。

[0137] 优选之一,利用磁铁沉降磁性微球,去除液相,清洗后获得所述磁性微球C。

[0138] 上述步骤(1)和步骤(2)可以合并进行,也即可以省略步骤(2)。比如合并进行步骤(I):采用三甲氧基硅烷化的丙烯酸类分子对所述磁性微球本体进行化学修饰,将碳碳双键引入到所述磁性微球本体的外表面,形成磁性微球B。具体地,比如,采用3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(KH570酰氧基硅烷,CAS:2530-85-0)修饰磁性微球本体,可以引入碳碳双键,形成磁性微球B,并将该碳碳双键作为启动聚合反应的活性中心。该修饰路线也称为KH570修饰路线。

[0139] 优选之一,所述磁性微球C的线型聚合物的支链含有镍离子,此时,还可以包括步骤(4):将所述磁性微球C偶联三羧基胺,然后通过三羧基胺残基中的三个羧基络合 $\text{Ni}^{2+}$ 得到磁性微球D,即目标生物磁性微球。所述目标生物磁性微球能够与His标签的标记物特异性结合。

[0140] 优选地,所述三羧基胺中的三个羧基形成 $\text{N}(\text{C}-\text{COOH})_3$ 的结构,从而能够络合镍离子。

[0141] 优选方式之一,所述三羧基胺为N,N-双(羧甲基)-L-赖氨酸,更优选其用量为0.5-550g/L。

[0142] 优选方式之一,步骤(2)制备磁性微球A所用丙烯酸的用量为0.002-20mol/L。

[0143] 优选方式之一,步骤(3)制备磁性微球B所用丙烯酸钠的用量为0.53-12.76mol/L。

[0144] 具体地,本发明提供如下一种技术方案:

[0145] (1)以二氧化硅包裹的四氧化三铁磁珠作为磁性微球本体;先利用偶联剂(如3-氨基丙基三乙氧基硅烷,APTES,CAS:919-30-2,一种氨基化偶联剂,也是一种硅烷偶联剂,更具体的为一种氨基化硅烷偶联剂)对二氧化硅包裹的四氧化三铁磁性微球本体进行化学修饰,将氨基引入到磁性微球的外表面,获得磁性微球A;

[0146] (2)然后利用羧基与氨基之间的共价反应将丙烯酸分子共价偶联到磁性微球外表面,从而将碳碳双键引入到磁性微球的外表面,获得磁性微球B,其外表面修饰有碳碳双键;

[0147] (3)然后利用碳碳双键的聚合反应实现丙烯酸类单体分子(如丙烯酸钠单体分子)的线性聚合,进行聚合反应的同时把聚合产物共价偶联到磁性微球外表面,获得磁性微球C,其外表面共价地修饰有丙烯酸类聚合物。

[0148] 具体地,本发明还提供如下一种技术方案:

[0149] (I)以二氧化硅包裹的四氧化三铁磁珠作为磁性微球本体;先利用偶联剂(如3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷,CAS:2530-85-0)对二氧化硅包裹的四氧化三铁磁性微球本体进行化学修饰,将烯丙基类的碳碳双键引入到磁性微球的外表面,获得磁性微球B,其外表面修饰有碳碳双键;

[0150] (II)然后利用碳碳双键的聚合反应实现丙烯酸类单体分子(如丙烯酸钠单体分子)的线性聚合,进行聚合反应的同时把聚合产物共价偶联到磁性微球外表面,获得磁性微球C,其外表面共价地修饰有丙烯酸类聚合物。

[0151] 此处形成的线性聚合物,一端共价偶联于磁性微球外表面,其他部分游离于溶液中,可与溶液中的分子充分接触,加强对目标蛋白的捕获,洗脱时则能让目标蛋白直接摆脱磁性微球的束缚,直接进入洗脱液中,相比于物理缠绕在磁性微球外表面或者与磁性微球一体形成的聚合物,此共价固定的线性聚合物可有效减少分子链的堆叠,加强分子链在溶液中的伸展与摆动,增强对目标蛋白的捕获,减少洗脱时目标蛋白的滞留比例和滞留时间。

[0152] 以丙烯酸钠作为单体分子为例,聚合产物为聚丙烯酸钠,其主链为线性的聚烯烃主链,并且沿着主链共价连接有大量侧支链COONa,支链含有的功能基团亦为COONa;此处的聚合反应没有使用交联剂(如N,N'-亚甲基双丙烯酰胺,CAS:110-26-9),而是在不加交联剂的条件下使聚合产物产生具有线状主链的线型聚合物,避免形成分子链相互交联的网状聚合物。如果分子链相互交联的网状聚合物,则会导致多孔结构,影响目标蛋白的洗脱效率。

[0153] (4)以丙烯酸钠聚合得到的磁性微球C为例。因为反应在微酸性体系中进行,丙烯酸钠在水相中成为钠离子和丙烯酸根离子,微酸体系中,大部分丙烯酸根变成具有羧基的丙烯酸。在聚丙烯酸钠线性分子链共价交联到磁性微球外表面后,利用羧基与氨基之间的共价反应将三羧基胺(如N,N-双(羧甲基)-L-赖氨酸,CAS:113231-05-3)共价偶联到线性聚合物的支链上,然后再加入镍离子,螯合至N,N-双(羧甲基)-L-赖氨酸的三羧基处,以获得用于分离纯化带组氨酸标签蛋白质的生物磁性微球。

[0154] 本发明第三方面提供一种利用第一方面所述生物磁性微球分离蛋白质的方法,其包括以下步骤:

[0155] (1)将结合缓冲液加入所述生物磁性微球充分混合,磁吸分离所述生物磁性微球,将所分离到的生物磁性微球加入含有待分离蛋白质的溶液中充分混合孵育,得到结合了目标蛋白质的生物磁性微球E。

[0156] (2)固液分离,弃去上清液,用洗涤液洗涤清洗所述生物磁性微球E,然后利用洗脱液进行洗脱,收集上清液;

[0157] 优选之一,所述固液分离为磁吸处理;

[0158] 优选之一,所述固液分离为离心。

[0159] (3)从上清液中分离纯化得到目标蛋白。

[0160] 优选之一,所述生物磁性微球与待处理的蛋白液的体积比为1:10-1:80。

[0161] 优选之一,所述生物磁性微球与待处理的蛋白液的体积比为1:10-1:60。

[0162] 优选之一,所述生物磁性微球与待处理的蛋白液的体积比为1:10-1:50。

[0163] 优选之一,所述生物磁性微球与待处理的蛋白液的体积比为1:20-1:50。

[0164] 优选之一,所述生物磁性微球与待处理的蛋白液的体积比为1:20-1:40。

[0165] 一些实施例中,采用体外蛋白合成反应结束后的反应液直接作为所述含有待分离蛋白质的溶液。比如,采用IVTT反应(体外转录翻译反应)结束后所获得的IVTT反应液作为所述含有待分离蛋白质的溶液。

[0166] 一些优选例中,所述体外蛋白合成体系所需的各种因子通过外源添加的方式分别地或组合式的加入,参照如日本的PURE系统(比如PURExpress试剂盒)。

[0167] 一些优选例中,所述体外蛋白合成体系包括:

[0168] (a)细胞提取物;优选之一为酵母细胞提取物;

[0169] (b)任意合适的拥挤剂,如聚乙二醇;

[0170] (c) 任选的外源蔗糖;和

[0171] (d) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0172] 所述(c)和(d)中的“任选”各自独立地表示可有可无。

[0173] 在一优选的实施方式中,本发明提供的体外蛋白合成体系包括:酵母细胞提取物,三羟甲基氨基甲烷,醋酸钾,醋酸镁,核苷三磷酸混合物(NTPs),氨基酸混合物,磷酸钾,淀粉酶,聚乙二醇,麦芽糊精(maltodextrin)等。所述体外蛋白合成体系中可以进一步加入荧光蛋白DNA等编码目标蛋白质的核酸模板进行体外蛋白合成反应。

[0174] 所述体外蛋白合成体系中可以进一步加入核酸模板(比如编码荧光蛋白DNA)进行体外蛋白合成反应,得到含有目标蛋白的反应液。优选地,所述目标蛋白中含有纯化标签;当所述目标蛋白含有组氨酸纯化标签时,可以与镍离子特异性结合,从而可以采用本发明的生物磁性微球进行分离纯化。

[0175] 在本发明中,所述酵母细胞提取物在体外蛋白合成体系中的比例不受特别限制,通常所述酵母细胞提取物在体外无细胞蛋白合成蛋白合成体系中所占体积为20-70%(v/v),比如30-60%(v/v),比如40-50%(v/v),还举例如50%(v/v)。

[0176] 在本发明中,所述的细胞提取物优选不含完整的细胞。所述细胞提取物的制备可以选用合适的已报道的细胞提取物制备技术。细胞提取物的制备,通常地,至少包括以下步骤:提供适量酵母细胞,破碎细胞,固液分离,及收集上清液。按照细胞提取物的制备方法而获得的提取产物,有可能残留少量或者极少量的完整细胞,这类提取产物也落在本发明的细胞提取物的涵盖范围之内。所述细胞提取物并不排除完整细胞的存在。

[0177] 当体外蛋白合成体系包括细胞提取物时,所述体外蛋白合成体系同样地不排除完整细胞的存在。这些存在的完整细胞产生的原因可能是多样的。可能是由于制备细胞提取物的过程导致的残留;也可能是有意地引入,比如加入细胞进行简单破碎后得到的细胞破碎物,该细胞破碎物可能是完全破碎的产物与完整细胞的混合物;甚还可能是由于单独加入完整的细胞。

[0178] 典型的细胞提取物(包括酵母细胞提取物)中包括用于蛋白翻译的核糖体、tRNA、氨酰tRNA合成酶、蛋白质合成需要的起始因子和延伸因子以及终止释放因子。此外,细胞提取物(包括酵母细胞提取物)中还含有一些源自细胞质中的其他蛋白,尤其是可溶性蛋白。

[0179] 一些优选例中,所述酵母细胞提取物为克鲁维酵母细胞提取物。其中一些优选例中,所述克鲁维酵母为乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*,*K.lactis*)、*Kluyveromyces lactis* var.*drosophilorum*、*Kluyveromyces lactis* var.*lactis*、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、*Kluyveromyces marxianus* var.*lactis*、*Kluyveromyces marxianus* var.*marxianus*、*Kluyveromyces marxianus* var.*vanudenii*、多布克鲁维酵母(*Kluyveromyces dobzhanskii*)、海泥克鲁维酵母(*Kluyveromyces aestuarii*)、非发酵克鲁维酵母(*Kluyveromyces nonfermentans*)、威克海姆克鲁维酵母(*Kluyveromyces wickerhamii*)、耐热克鲁维酵母(*Kluyveromyces thermotolerans*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、湖北克鲁维酵母(*Kluyveromyces hubeiensis*)、多孢克鲁维酵母(*Kluyveromyces polysporus*)、暹罗克鲁维酵母(*Kluyveromyces siamensis*)、亚罗克鲁维酵母(*Kluyveromyces yarrowii*)等之一或者其组合。

[0180] 所述体外无细胞蛋白合成体系中需要的任一种蛋白组分(举例如RNA聚合酶),可

以通过内源方式提供,也可以通过外源方式添加;所述内源方式指作为细胞提取物的成分之一加入;所述外源方式指,以非细胞提取物的方式提供,可以是单一物质,也可以两种或两种以上物质的组合物,外源方式加入时优选为一种、两种或两种以上物质的纯化产物。通过内源方式提供时,可以参考包括但不限于文献CN108690139A、CN109423496A、CN106978439A、CN110408635A、CN110551700A、CN110093284A、CN110845622A、CN110938649A、CN2018116198190、“Molecular and Cellular Biology,1990,10(1):353-360”等现有文献及其引用文献提供的基因改造方法,具体地,包括但不限于:将编码序列插入到细胞内游离型质粒,将编码基因整合入细胞基因组,及其组合方式。通过外源方式提供时,用量可以根据体系所需进行控制和调节。

[0181] 一些优选例中,所述体外无细胞蛋白合成体系包括:酵母细胞提取物,三羟甲基氨基甲烷,醋酸钾,醋酸镁,核苷三磷酸混合物(NTPs),氨基酸混合物,磷酸钾,糖(葡萄糖、蔗糖、麦芽糊精等中任一种或者其组合,含有麦芽糊精时,还优选含有淀粉酶),聚乙二醇,RNA聚合酶等。所述RNA聚合酶可以通过内源方式提供,也可以通过外源方式添加。所述RNA聚合酶的更优选方式之一为T7 RNA聚合酶。

[0182] 一些优选例中,所述体外无细胞蛋白合成体系包括外源添加的RNA聚合酶。

[0183] 一些优选例中,所述体外无细胞蛋白合成体系包括外源添加的T7 RNA聚合酶。

[0184] 一些优选例中,所述体外无细胞蛋白合成体系包括乳酸克鲁维酵母细胞提取物、外源添加的T7 RNA聚合酶。其中一些优选例中,所述T7 RNA聚合酶的浓度为0.01-0.3mg/mL。还有一些优选例中,所述T7 RNA聚合酶的浓度为0.02-0.1mg/mL。还有一些优选例中,所述T7 RNA聚合酶的浓度为0.027-0.054mg/mL。还有一些优选例中,所述T7 RNA聚合酶的浓度为0.04mg/mL。

[0185] 在本发明中,所述的酵母细胞提取物所含蛋白含量优选为20-100mg/ml,较佳为50-100mg/ml。所述的测定蛋白含量方法为考马斯亮蓝测定方法。

[0186] 所述体外无细胞蛋白合成体系中的核苷三磷酸混合物优选为腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶核苷三磷酸。在本发明中,各种单核苷酸的浓度没有特别限制,优选之一为,每种单核苷酸的浓度为0.5-5mM,较佳地为1.0-2.0mM。

[0187] 所述体外无细胞蛋白合成体系中的氨基酸混合物可以包括天然或非天然氨基酸,也可以包括D型或L型氨基酸。代表性的氨基酸包括(但并不限于)20种天然氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。每种氨基酸的浓度优选之一为0.01-0.5mM,较佳地为0.02-0.2mM,举例如0.05mM、0.06mM、0.07mM、0.08mM。

[0188] 在一些优选例中,所述体外无细胞蛋白合成体系还含有聚乙二醇或其类似物。聚乙二醇或其类似物的浓度没有特别限制,通常,聚乙二醇或其类似物的浓度(w/v)为0.1-8%,较佳地,0.5-4%,更佳地,1-2%,以所述蛋白合成体系的总体积或总重量计。代表性PEG的举例包括(但并不限于):PEG3000,PEG8000,PEG6000和PEG3350。应理解,本发明的体系还可包括其他各种分子量的聚乙二醇(如PEG200、400、1500、2000、4000、6000、8000、10000等)。

[0189] 在一些优选例中,所述体外无细胞蛋白合成体系还含有蔗糖。蔗糖的浓度(w/v)没

有特别限制,通常,蔗糖的浓度为0.2-4%,较佳地,0.5-4%,更佳地,0.5-1%,以所述蛋白合成体系的总体积计。

[0190] 一些优选的体外无细胞蛋白合成体系,除了酵母提取物之外,还含有以下组分:22mM三羟甲基氨基甲烷(pH8),30-150mM醋酸钾,1.0-5.0mM醋酸镁,1.5-4mM核苷三磷酸混合物,0.08-0.24mM氨基酸混合物,20-25mM磷酸钾,0.001-0.005mg/mL淀粉酶,1%-4%(w/v)聚乙二醇,320-360mM麦芽糊精(以葡萄糖单元的摩尔量计),8-25ng/ $\mu$ L荧光蛋白DNA等。进一步地,所述体外无细胞蛋白合成体系的总体积为10-10000 $\mu$ L,较佳地,为15-100 $\mu$ L,优选地,为30 $\mu$ L。所述酵母提取物优选为克鲁维酵母细胞提取物,更优选为乳酸克鲁维酵母细胞提取物。

[0191] 一些优选的体外无细胞蛋白合成体系,除了酵母提取物之外,还含有以下组分:22mM三羟甲基氨基甲烷(pH8),30-150mM醋酸钾,1.0-5.0mM醋酸镁,1.5-4mM核苷三磷酸混合物,0.08-0.24mM氨基酸混合物,20-25mM磷酸钾,0.001-0.005mg/mL淀粉酶,1%-4%(w/v)聚乙二醇,320-360mM麦芽糊精(以葡萄糖单元的摩尔量计),0.027-0.054mg/mL T7 RNA聚合酶(内源的,外源的,或者其组合)等。可以和8-25ng/ $\mu$ L荧光蛋白DNA混合后进行体外蛋白合成反应。反应体积优选之一为10-300 $\mu$ L。反应体积优选之一为15-100 $\mu$ L。其中一种优选的反应体积为30 $\mu$ L。

[0192] 本发明第四方面提供第一方面所述生物磁性微球在蛋白分离纯化、免疫分析、目标抗体药物富集、靶向给药、核酸分离提取、细胞分选、酶固定、基因载体构建中的应用。

[0193] 实施例1生物磁性微球的合成

[0194] 1.1.制备方案

[0195] 具体为,量取0.5~1000mL(20%,v/v)二氧化硅包裹的四氧化三铁磁性微球的水溶液,用无水乙醇清洗磁性微球,将10~300mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES,CAS:919-30-2)的乙醇溶液(5%~50%,v/v)加入上述清洗后的磁性微球中,反应2~72小时,用无水乙醇和蒸馏水清洗磁性微球,得磁性微球A,其为氨基修饰的磁性微球。

[0196] 移取0.0001~1mol丙烯酸加入溶液X中(溶液X:含有终浓度0.01~1mol/L 2-吗啉乙磺酸(MES,CAS:4432-31-9)和终浓度0.1~2mol/L NaCl的水溶液),加入0.001~0.5mol 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl,CAS:25952-53-8)和0.001~0.5mol N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,CAS:6066-82-6),反应3~60min,将上述溶液加入混有0.5~50mL磁性微球A的PBS缓冲溶液中,反应1~48小时,用蒸馏水清洗磁性微球,得磁性微球B,其外表面修饰有碳碳双键。

[0197] 取0.5~50mL磁性微球B,加入0.5~200mL 5~30%(w/v)的丙烯酸钠溶液,再加入10 $\mu$ L~20mL 2%~20%(w/v)的过硫酸铵溶液和1 $\mu$ L~1mL的四甲基乙二胺,反应3~60分钟后用蒸馏水清洗磁性微球,得磁性微球C。

[0198] 取0.5~50mL磁性微球C转移至溶液X中,加入0.001~0.5mol 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和0.001~0.5mol N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),反应3~60min,加入溶有0.0001~1mol N,N-双(羧甲基)-L-赖氨酸(CAS:113231-05-3,一种三羧基胺)的溶液Y,反应1~48小时,向反应体系中加入0.0001~1mol硫酸镍固体颗粒,反应5分钟~24小时,用蒸馏水清洗磁性微球,得到磁性微球D,即为本发明的生物磁性微球,其以镍离子作为纯化介质,具有特异性结合His标签的标记物的分离、纯化能力。

### [0199] 1.2.具体制备方法

[0200] 其中,所述生物磁性微球合成的优选例为:量取50mL二氧化硅包裹的四氧化三铁磁性微球(磁性微球的粒径为1 $\mu$ m)的水溶液(固含量20% (v/v)),利用磁铁沉降磁性微球,去除液相,每次用60mL无水乙醇清洗磁性微球,总共清洗5次。将100mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES,CAS:919-30-2)的乙醇溶液(25%,v/v)加入上述清洗后的磁性微球中,在50 $^{\circ}$ C水浴下机械搅拌48小时,之后在70 $^{\circ}$ C水浴下机械搅拌2小时,磁铁沉降磁性微球,去除液相,每次用60mL无水乙醇清洗磁性微球,总共清洗2次,然后每次用60mL蒸馏水清洗磁性微球,总共清洗3次,得磁性微球A。

[0201] 移取0.01mol丙烯酸加入到100mL溶液X中(溶液X:含有终浓度0.1mol/L 2-吗啉乙磺酸(MES,CAS:4432-31-9)和终浓度0.5mol/L NaCl的水溶液),加入0.04mol 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(CAS:25952-53-8)和0.04mol N-羟基琥珀酰亚胺(CAS:6066-82-6),室温下搅拌混匀15min,用NaHCO<sub>3</sub>固体粉末将溶液的pH调至7.2,将调好pH的上述溶液加入混有10mL磁性微球A的100mL PBS缓冲溶液中,在30 $^{\circ}$ C水浴下机械搅拌20小时,磁铁沉降磁性微球,去除液相,每次用60mL蒸馏水清洗磁性微球,总共清洗6次,得磁性微球B。

[0202] 取1mL磁性微球B,加入12mL 2.08mol/L的丙烯酸钠溶液,加入450 $\mu$ L 10% (w/v)的过硫酸铵溶液和45 $\mu$ L的四甲基乙二胺,室温下反应30分钟,磁铁沉降磁性微球,去除液相,每次用10mL蒸馏水清洗磁性微球,总共清洗6次,得磁性微球C。

[0203] 将所合成的磁性微球C转移至10mL的溶液X中,加入0.004mol 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和0.004mol N-羟基琥珀酰亚胺,室温下搅拌混匀30min,磁铁沉降磁性微球,去除液相,每次用10mL蒸馏水清洗3次;称取0.002mol N,N-双(羧甲基)-L-赖氨酸(CAS:113231-05-3)溶于10mL的溶液Y中,用碳酸氢钠固体粉末将溶液pH调至7,加入至清洗后的磁性微球中,在30 $^{\circ}$ C水浴下机械搅拌20小时,向反应体系中加入0.02mol硫酸镍固体颗粒,继续搅拌2小时,磁铁沉降磁性微球,去除液相,每次用6mL蒸馏水清洗磁性微球,总共清洗10次,得到磁性微球D,一种镍磁珠,即为本发明的生物磁性微球,以下内容简记为KM磁珠。

### [0204] 实施例2生物磁性微球的效果

[0205] 为了验证KM磁珠的效果,进行KM磁珠(本发明生物磁性微球,一种镍磁珠,聚合反应采用丙烯酸钠作为单体)与对照镍珠的实验对比,对照镍珠为市售的生工镍珠(Ni-NTA琼脂糖树脂,型号为C600033-0025,生工生物工程(上海)股份有限公司),以及进行KM磁珠与聚丙烯酸磁珠(由本公司实验室制备,聚合反应使用丙烯酸作为单体)的实验对比,进行结合力和蛋白纯度对比实验。

[0206] 本实施例中,

[0207] S20190820-1:水相替换Y溶液,聚合过程未使用TEMED(促进聚合反应)。

[0208] S20190820-2:KH570修饰路线制备磁性微球B,再采用丙烯酸作为单体分子制备得到聚丙烯酸磁珠(S20190820-2),使用TEMED,缓冲液为Y溶液。

[0209] 组别A:合成过程中使用水相替换了溶液X、Y。采用丙烯酸作为聚合单体。其它制备条件与实施例1中制备KM磁珠时相同。

[0210] 组别B:参考KM磁珠的合成方法进行制备。采用丙烯酸作为聚合单体,其它制备条

件与实施例1中制备KM磁珠时相同。

[0211] 2.1.结合力对比测试

[0212] 2.1.1.KM磁珠(镍磁珠)与对照镍珠对比

[0213] 用结合缓冲液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,5mM咪唑)清洗KM磁珠三次,分离上清和沉淀。对照镍珠按上述结合缓冲液以同样的方式进行清洗后分离上清和沉淀。按照如下表1取相应量的珠子于离心管中。

[0214] 表1 KM磁珠(镍磁珠)与对照镍珠及其编号

编号	对照镍珠用量	编号	KM磁珠用量
S1	10 $\mu$ L	M1	10 $\mu$ L
S2	3.3 $\mu$ L	M2	3.3 $\mu$ L
S3	1.0 $\mu$ L	M3	1.0 $\mu$ L

[0216] 取3mL表达eGFP(其中,eGFP的N端连接有组氨酸标签)的IVTT反应液,加入3mL(RFU值为1265.33)结合缓冲液混匀后,4000转/min,4 $^{\circ}$ C离心10分钟。弃去沉淀,将上清液取1mL分别加入到上述的含有珠子悬浮液的各离心管中,充分混匀后,于4 $^{\circ}$ C旋转孵育3小时。

[0217] 分离上清液,即为流穿液。将珠子用1mL洗涤液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,20mM咪唑)洗涤两次,最后用1mL和200 $\mu$ L洗脱液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,250mM咪唑)分别洗脱一次。每一步的洗涤或洗脱,都在4 $^{\circ}$ C旋转孵育5~10分钟,收集每一步得到的上清液,使用Tecan Infinite F200/M200型多功能酶标仪测量其RFU读数,计算产物含量。

[0218] 根据纯化的eGFP拟定标准曲线,推算出eGFP的蛋白质量浓度与其RFU值之间的换算公式,得到的换算公式为:
$$X = -\frac{1}{0.0005} \times \ln\left(1 - \frac{Y - 38.089}{31692}\right)$$
。其中,X为蛋白质量浓度( $\mu$ g/mL),Y为RFU荧光读数。

[0219] 其中,磁性微球结合力的计算方法为:将Y的数值,代入上述公式,得到的X即为蛋白质量浓度,乘以洗脱体积,得到洗脱后的蛋白质量(W),用W除以磁性微球的柱床体积(比如编号S1的柱床体积是10 $\mu$ L),计算得出单位体积磁性微球结合目标蛋白的质量,即为结合力,单位为mg/mL。

[0220] 结果显示,KM磁珠的结合力比对照镍珠的结合力可高出3倍以上(如表2)。

[0221] 表2 KM磁珠与对照镍珠的结合力对比

RFU	10 $\mu$ L		3.3 $\mu$ L		1.0 $\mu$ L	
	KM 磁珠	对照镍珠	KM 磁珠	对照镍珠	KM 磁珠	对照镍珠
IVTT 反应液	1265.33					
流穿液	29.33	80.67	38.33	582.00	678.67	1083.67
洗涤液 1	12.67	148.00	48.00	195.00	208.67	98.33
洗涤液 2	10.33	98.00	64.33	63.33	130.67	26.00
洗脱液 1	1477.33	810.67	1328.67	406.00	551.33	59.00
洗脱液 2	228.00	75.00	144.33	40.33	31.00	8.67
结合力 (mg/mL)	10	4	28	8	32	2

[0223] 2.1.2.KM磁珠与聚丙烯酸磁珠(S20190820-1磁珠)的结合力对比

[0224] 采用实施例1的方法制备KM磁珠,采用丙烯酸钠作为聚合单体。

[0225] 采用丙烯酸代替丙烯酸钠作为聚合单体,制备聚丙烯酸磁珠(S20190820-1)。合成过程中使用水相替换了溶液Y。

[0226] 分别对相同体积的相同来源IVTT反应液进行处理,采用2.1.1.的测试分析方法进行结合力比较,结果如表3所示。所用IVTT反应液、流穿液体积均为1mL(流穿液损失量均可忽略)。结果显示,KM磁珠的流穿液RFU仅为272,而聚丙烯酸磁珠(S20190820-1磁珠)的流穿液RFU值均明显高于该值,尤其在2 $\mu$ L柱床量时,更是达到了1188,为KM磁珠的4-5倍。结果表明,KM磁珠(2 $\mu$ L柱床使用量)的结合力是聚丙烯酸磁珠(S20190820-1)2 $\mu$ L柱床使用量时的20倍以上,是聚丙烯酸磁珠(S20190820-1)10 $\mu$ L、50 $\mu$ L柱床使用量时的21倍、26倍左右。由此说明,至少需要20倍使用量的聚丙烯酸磁珠才能达到与KM磁珠相当的效果。

[0227] 表3 KM磁珠与S20190820-1磁珠的结合力对比

RFU	2 $\mu$ L 柱床		10 $\mu$ L 柱床	50 $\mu$ L 柱床
	KM 磁珠	S20190820-1	S20190820-1	S20190820-1
流穿液	272	1188	866	311

[0229] 2.1.3. 聚丙烯酸磁珠的效果分析

[0230] 制备聚丙烯酸磁珠,采用丙烯酸代替丙烯酸钠作为聚合单体。

[0231] 采用实施例1的方法制备KM磁珠。

[0232] 采用以下两种不同的条件制备聚丙烯酸磁珠。

[0233] 组别A:合成过程中使用水相替换了溶液X、Y。采用丙烯酸作为聚合单体。其它制备条件与实施例1中制备KM磁珠时相同。

[0234] 组别B:参考KM磁珠的合成方法进行制备。采用丙烯酸作为聚合单体,其它制备条件与实施例1中制备KM磁珠时相同。

[0235] 参考2.1.1.部分的测试分析方法,各组别采用相同体积的相同来源IVTT反应液进行处理。图2为组别A、组别B制备的聚丙烯酸磁珠以及KM磁珠,对IVTT反应液处理前后RFU值的差值,也即IVTT反应液RFU值减去流穿液RFU值。分析结果表明,KM磁珠的结合力比聚丙烯酸磁珠的结合力高很多,KM磁珠的结合力可达聚丙烯酸磁珠的5~10倍;2 $\mu$ L柱床量时,KM磁珠的结合力分别为A组、B组的结合力的10倍、5倍。

[0236] 2.1.4. KH570修饰路线

[0237] KH550修饰路线,采用氨基化硅烷偶联剂KH550(3-氨基丙基三乙氧基硅烷,CAS:919-30-2)先引入氨基(得到磁性微球A),然后引入碳碳双键得到磁性微球B。

[0238] KH570修饰路线不同于KH550修饰路线。KH570修饰路线采用三甲氧基硅烷化的甲基丙烯酸分子KH570(CAS:2530-85-0,3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷,一种烯丙基类的硅烷偶联剂)修饰磁性微球本体,直接引入碳碳双键,得到磁性微球B。

[0239] 采用KH570修饰路线制备磁性微球B,再采用丙烯酸作为单体分子制备得到聚丙烯酸磁珠(S20190820-2),缓冲液为Y溶液。分别对相同体积的相同来源IVTT反应液进行处理,采用2.1.1.中方法进行测试分析,所用磁珠体积为20 $\mu$ L,IVTT反应液的体积为1mL。分别测试IVTT反应液(原液)、流穿液、洗涤液、洗脱液的RFU值,其中IVTT反应液的RFU值为800,流穿液的RFU值为173,结果如图3所示。分析结果表明,采用KH570修饰路线得到的聚丙烯酸磁珠的结合力(约2mg/mL)低于上述KM磁珠。。

[0240] 2.1.5. 不同聚合单体浓度制备B-KM磁珠

[0241] 与KM磁珠的制备方法相比,将聚合单体丙烯酸钠的单体浓度由2.08mol/L提高到2.496mol/L,其它制备方法和参数与实施例1相同,获得聚丙烯酸钠磁珠(B-KM磁珠,191220-ZZ-1)。

[0242] 采用2.1.1.的方法进行结合力的测试分析,结果如表4所示。取不同磁珠体积(2 $\mu$ L、4 $\mu$ L、8 $\mu$ L)进行三组结合力测试,发现在磁珠体积为4 $\mu$ L、8 $\mu$ L时,磁珠过量,通过上述2.1.1的公式计算磁珠体积2 $\mu$ L时的结合力(Binding capacity),约为85.6mg/mL。

[0243] 表4 B-KM磁珠(191220-ZZ-1)的结合力测试分析

磁珠用量	RFU				结合效率 (%)	结合力 (mg/ml)
	Total	Flow-through	E1	E2		
[0244] 2 $\mu$ L	4428	214	20241	1729	95.2	85.6
4 $\mu$ L		132	23862	2741	97.0	/
8 $\mu$ L		93	23675	5631	97.9	/

[0245] 表4中,Total对应待处理的IVTT反应液,Flow-through对应流穿液,E1对应采用80 $\mu$ L洗脱液第一次洗脱所得溶液,E2对应采用80 $\mu$ L洗脱液第二次洗脱所得溶液。

[0246] 2.2.纯度测试

[0247] 2.2.1.KM磁珠和对照镍珠的纯化产物的纯度测试

[0248] 表5纯度测试

编号	表达 eGFP 的 IVTT 反应液 (加入 DNA 模板后反应)	未表达 eGFP 的 IVTT 反应液 (不加 DNA 模板后反应)	IVTT 反应液稀 释后的浓度
[0249] 1	1 mL	0	100%
2	0.8 mL	0.2 mL	80%
3	0.6 mL	0.4 mL	60%
4	0.4 mL	0.6 mL	40%
5	0.2 mL	0.8 mL	20%
6	0.1 mL	0.9 mL	10%
7	0.01 mL	0.99 mL	1%
8	0 mL	1 mL	0%

[0250] 用结合缓冲液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,5mM咪唑)分别清洗第2.1.1.部分对照镍珠和KM磁珠各三次,分离上清和沉淀。每种珠子分别吸取3 $\mu$ L置于8个离心管中(如表5)。

[0251] 取6mL表达eGFP的IVTT反应液和6mL未表达eGFP的IVTT反应液分别离心,4000转/min,4 $^{\circ}$ C离心10分钟。弃去沉淀,将两者的上清液按照表5的体积比例分别混合,得到8组具有不同eGFP蛋白浓度的溶液,分别加入到相应的珠子离心管中(分别采用KM磁珠和对照镍珠),充分混匀后,于4 $^{\circ}$ C旋转孵育1.5小时。

[0252] 所述表达eGFP的IVTT反应液,是指采用IVTT体系(采用编码eGFP的DNA模板)进行体外蛋白合成反应,所得到的反应液。所述未表达eGFP的IVTT反应液,作为稀释液,是指在IVTT体系中不加入编码eGFP的DNA模板,由此得到的反应液中的蛋白均为杂蛋白。向IVTT反应液中混入未表达目标蛋白的反应液,可以向IVTT反应中掺入不同比例的杂蛋白。对不同eGFP蛋白浓度的溶液进行SDS-PAGE电泳检测,对比纯化得到的eGFP蛋白的纯度。表5中,

IVTT反应液被稀释后的浓度越低,说明目标蛋白含量越少高,杂蛋白越多。

[0253] 分离上清液,即为流穿液。将对照镍珠和KM磁珠分别用1mL洗涤液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,20mM咪唑)洗涤两次,最后用200 $\mu$ L洗脱液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,250mM咪唑)洗脱一次。每一步的洗涤或洗脱,都在4 $^{\circ}$ C旋转孵育5~10分钟,收集每一步得到的上清液,测量其RFU读数。

[0254] 将洗脱液取30 $\mu$ L样品加入到8 $\mu$ L上样缓冲液(250mM pH 6.8Tris-HCl,10% (w/v) SDS,0.5% (w/v) 溴酚蓝(BPB,CAS:115-39-9),50% (v/v) 甘油,5% (v/v)  $\beta$ -巯基乙醇)中,混匀煮沸8分钟后,全部上样进行SDS-PAGE电泳检测。结果如图1所示,将图1的胶图用Image-J软件分析,得到条带的亮度值,计算结果如表6所示。

[0255] 表6中,lane为每个泳道的编号,Total为每个泳道中各条带的总亮度,eGFP为每个泳道中目标条带(eGFP,约26.7kDa)的亮度。eGFP/Total反映了磁珠纯化所得样品中目标蛋白的含量比例。

[0256] 以eGFP为目标条带的亮度与各条带总亮度的比值(eGFP/Total)来表示纯度,结果显示,KM磁珠纯化得到的纯度优于对照镍珠。其中,KM磁珠的纯化产物的纯度可达92.5%。

[0257] 表6两种磁珠纯化所得样品的电泳检测条带的亮度值对比

所用磁珠	lane	eGFP	Total	eGFP/Total
KM 磁珠	1	10061.5	11094	0.907
	2	9882.4	11001.4	0.898
	3	9684.8	10466.8	0.925
	4	9139.4	9959.5	0.918
	5	8121.6	9480.6	0.857
	6	6433.6	8999	0.715
	7	6057	35508.4	0.171
	8	2536.1	72200.9	0.035
对照镍珠	1	8164.4	9441.8	0.865
	2	8008.2	9237.6	0.867
	3	7509.4	8649.6	0.868
	4	7006.6	8061.7	0.869
	5	5847.6	6592.9	0.887
	6	5025.7	6278.2	0.801
	7	4221.3	37958.9	0.111
	8	1765	56558.8	0.031

[0258] 2.2.2.B-KM磁珠的纯化产物的纯度测试

[0260] 采用上述2.1.5.部分所得的B-KM磁珠进行上述纯度测试和分析,采用Image-J软件分析电泳谱图各条带的亮度值。结果表明,目标蛋白的纯度可高达97%。参阅图4,其中,100%指纯IVTT反应液;60%指60%体积的纯IVTT反应液与40%体积的稀释液进行混合。

[0261] 实施例3验证生物磁性微球的效果

[0262] 3.1.分离纯化萤火虫荧光素酶

[0263] 为了进一步验证KM磁珠的效果,利用IVTT反应表达萤火虫荧光素酶(firefly

luciferase,可简记为luciferase),并进行亲和力分析。所述萤火虫荧光素酶含有组氨酸标签,所得蛋白产物为His标签的标记物。

[0264] 用结合缓冲液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,5mM咪唑)分别清洗KM磁珠和对照镍珠各三次,分离上清和沉淀,每种珠子分别取3 $\mu$ L置于7个离心管中(如表7)。

[0265] 取1mL表达firefly luciferase(含有组氨酸标签)的IVTT反应液,离心,4000转/min,4 $^{\circ}$ C离心10分钟。弃去沉淀,将上清液按照表7的体积比与结合缓冲液混合后,加入到相应的珠子离心管中,充分混匀后,于4 $^{\circ}$ C旋转孵育1小时。

[0266] 表7 IVTT萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)体系

编号	Luciferase 占比/%	1mL 体系加样量	
		Luciferase/ $\mu$ L	结合缓冲液/ $\mu$ L
1	5	50	950
2	2	20	980
[0267] 3	1.5	15	985
4	1	10	990
5	0.8	8	992
6	0.6	66	994
7	0.4	4	996

[0268] 分离上清液,即为流穿液。将珠子用1mL洗涤液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,20mM咪唑)洗涤两次,最后用200 $\mu$ L洗脱液(50mM pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷盐酸,500mM氯化钠,250mM咪唑)洗脱一次。每一步的洗涤或洗脱,都在4 $^{\circ}$ C旋转孵育5~10分钟,收集每一步得到的上清液,采用Tecan Infinite F200/M200型多功能酶标仪测量其RLU读数。

[0269] 表8萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)的IVTT反应液处理结果检测

编号	Luciferase 占比 (%)	反应液 RLU	流穿液 RLU	结合效率 (%)	底物浓度/ (mg/mL)
1	5	168497750	6832107	95.9	0.339
2	2	63708857	2866446	95.5	0.129
[0270] 3	1.5	51453687	2366899	95.4	0.105
4	1	23863700	1249596	94.8	0.049
5	0.8	15474300	847806	94.5	0.033
6	0.6	10211157	623941	93.9	0.022
7	0.4	6620700	406262	93.9	0.015

[0271] 根据以下公式:结合效率=(1-流穿液RLU/反应液RLU) $\times$ 100%,计算出结合效率,亲和力的数值为结合50%底物时底物的浓度。

[0272] 根据纯化的Luciferase拟定标准曲线,推算出将Luciferase的RLU值换算成蛋白质量浓度的公式为: $Y=5(E+08)X-850502$ ,也即 $Y=5\times 10^8\times X-850502$ 。其中X为蛋白质量浓度(mg/mL),Y为RLU荧光读数。在测试范围内,Y与X基本呈正比。

[0273] 将所测得的反应液、流穿液的RLU读值分别代入上述公式中,分别计算得到目标蛋白质浓度。

[0274] 从实验结果(表8)中可以看出,当目标蛋白的质量浓度从339 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 降至15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后,KM磁珠对目标蛋白质的结合效率依然远高于90%,由于编号7中反应液的RFU数值已接近仪器的检测限,故未继续降低目标蛋白质浓度以使结合效率降至50%,从而得到亲和力的具体数值,但已可以得到半定性结论,KM磁珠对目标蛋白质具有较强的亲和力,其亲和力至少可以达到 $\text{ng}/\text{ml}$ 级。

[0275] 3.2.B-KM磁珠的亲和力测试分析

[0276] 采用上述第2.1.5.部分B-KM磁珠的制备方法制得聚丙烯酸钠磁珠(200224-ZZ-1)。采用表达eGFP的IVTT反应液,参考3.1.的方法进行亲和力测试分析,结果如表9所示。结合效率大于90%,可高达99.3%。

[0277] 90%目标蛋白吸附(90%结合效率)时的浓度为0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (300 $\text{ng}/\text{mL}$ ),可以得到半定性结论,磁珠亲和力可达 $\text{ng}/\text{mL}$ 级。

[0278] 表9 B-KM磁珠的亲和力分析

eGFP 占比(%)	RFU			结合效率 binding efficiency (%) (200224-ZZ-1)
	反应液 Total	流穿液 Flow-through (200224-ZZ-1)	NC	
0	1	1	2	0.0
[0279] 0.5	32	2	1	96.8%
1	58	3	2	98.2%
2	127	7	5	98.4%
5	310	8	6	99.3%
10	556	11	7	99.3%

[0280] 其中,NC为阴性对照,其RFU值为背景值。

[0281] 结合效率的计算公式为:(反应液RFU-流穿液RFU)/(反应液RFU-NCRFU)。

[0282] 实施例4.考察磁性微球尺寸对纯化效果的影响

[0283] 4.1.二氧化硅包裹的磁性微球的制备(也称为磁性微球本体、磁珠、玻璃珠)

[0284] 将20g  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球置入310mL乙醇和125mL水的混合溶剂中,加入45mL 28%(wt)氨水,逐滴加入22.5mL正硅酸乙酯,室温下搅拌反应24h,反应后用乙醇和水进行清洗。使用不同粒径(约1 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ )的四氧化三铁微球作为原料,控制所得玻璃珠的粒径大小。所述不同粒径的四氧化三铁微球可通过常规技术手段制备。

[0285] 所制得的磁性微球用作修饰纯化介质或连接元件-纯化介质的基础原料,因此也称为磁性微球本体。

[0286] 所制得的磁性微球具有磁性核心,能够通过磁力作用进行位置控制,实现移动、分散、沉降等操作,因此是一种广义的磁珠。

[0287] 所制得的磁性微球具有二氧化硅的包裹层,因此也称为玻璃珠,可以降低磁性核心对以下成分或组分的吸附:聚合物、纯化介质、体外蛋白合成体系各组分、核酸模板、蛋白表达产物等。

[0288] 4.2.制备具有不同玻璃珠(二氧化硅包裹的磁性微球)尺寸的镍磁珠

[0289] 采用步骤4.1.中的制备方法分别制备直径为1 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 的玻璃珠作为磁性微球本体,然后采用实施例1的方法分别制备镍磁珠Ni1、Ni10、Ni100。除玻璃珠原料不同

外,其它反应参数相同。

[0290] 采用显微镜进行拍照,观察所制得的镍磁珠的尺寸和形态。结果如图5所示,得到直径分别约1 $\mu\text{m}$ (图5(A)和(B))、10 $\mu\text{m}$ (图5(C))、100 $\mu\text{m}$ (图5(D))的玻璃珠。其中,图5(A)是静止状态的拍照结果,图5(B)是流动状态的抓拍结果。

[0291] 4.3.对IVTT反应液进行纯化的结果对比

[0292] 4.3.1.构建体外蛋白合成体系(D2P体系,DNA-to-Protein体系)

[0293] 在平底的细胞培养板中进行体外蛋白合成反应。每个样品设置3个平行样,计算均值和标准偏差(error bar)。

[0294] 各组分的终浓度分别为:9.78mM pH8.0三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris·HCl),80mM醋酸钾,5mM醋酸镁,1.8mM核苷三磷酸混合物(腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶核苷三磷酸,每种核苷三磷酸的浓度均为1.8mM),0.7mM氨基酸混合物(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸,每种氨基酸各自浓度均为0.1mM),15mM葡萄糖,320mM麦芽糊精(以葡萄糖单元计算摩尔浓度,质量体积浓度为52mg/mL),24mM磷酸三钾,2%(w/v)聚乙二醇8000,最后加入50%体积的乳酸克鲁维酵母细胞提取物;所述乳酸克鲁维酵母细胞提取物中含有内源性表达的T7 RNA聚合酶。

[0295] 所述乳酸克鲁维酵母细胞提取物采用CN109423496A所记载的方法进行制备。概括地,将T7 RNA聚合酶的编码基因整合到了乳酸克鲁维酵母的基因组中,使用获得的基因改造后的菌株进行培养,获得适量细胞后制备细胞提取物。

[0296] 4.3.2.制备编码8His-mEGFP的核酸模板(DNA模板)

[0297] 采用PCR扩增、同源片段重组方法,将含有8His-mEGFP(组氨酸标签标记的mEGFP,其中mEGFP为eGFP的A206K突变体)的编码基因的DNA片段插入到质粒载体中,构建成表达mEGFP的质粒载体。质粒经基因测序确认正确。所述质粒的组成元件包括T7启动子、5' UTR、前导肽的编码序列(leader peptide)、8 $\times$ His(组氨酸标签)、mEGFP的编码序列、3' UTR、LAC4终止子、f1 ori(复制起始位点)、AmpR启动子、AmpR基因(氨苄青霉素抗性基因)、ori(高拷贝数复制起始位点)、lacI启动子、lacI(lac抑制子)的编码基因等功能元件。

[0298] 通过RCA扩增法,以上述编码8His-mEGFP的质粒DNA为核酸模板,采用phi29 DNA聚合酶,进行体外DNA扩增,获得编码8His-mEGFP的DNA模板。

[0299] 4.3.3.进行体外蛋白合成反应(IVTT反应)

[0300] 向4.3.1.所构建的体外蛋白合成体系中,加入4.3.2.所制备的编码8His-mEGFP的DNA模板(15ng/ $\mu\text{L}$ ),混匀后,室温条件下(20~30 $^{\circ}\text{C}$ ),摇床反应3h,反应结束得到IVTT反应液(PC组,原蛋白液)。

[0301] 4.4.纯化与RFU测试

[0302] 采用4.2.制备的不同尺寸的镍磁珠对IVTT反应液进行纯化,考察磁性微球本体的尺寸对纯化效果的影响。

[0303] 取1mL IVTT反应液,分别加入10 $\mu\text{L}$ 、5 $\mu\text{L}$ 、1 $\mu\text{L}$ 的镍磁珠Ni1(1 $\mu\text{m}$ ),10 $\mu\text{L}$ 、5 $\mu\text{L}$ 、1 $\mu\text{L}$ 镍磁珠Ni10(10 $\mu\text{m}$ ),10 $\mu\text{L}$ 、5 $\mu\text{L}$ 、1 $\mu\text{L}$ 镍磁珠Ni100(100 $\mu\text{m}$ ),旋转仪旋转混匀,进行孵育,孵育3h。利用磁铁分离磁珠和溶液,收集的上清液记为穿出液。对穿出液进行荧光测试,RFU值反映

未结合到磁珠上的蛋白量。样品处理:4000转/分钟,4℃离心1分钟。将待测样品放置于酶标仪,采用激发波长/发射波长(Ex/Em):488nm/507nm,测定相对荧光单位值(RFU)。

#### [0304] 4.5. 纯化结果分析

[0305] 镍磁珠Ni1(1 $\mu$ m)、镍磁珠Ni10(10 $\mu$ m)的纯化结果对比如图6所示。镍磁珠Ni1(1 $\mu$ m)、镍磁珠Ni100(100 $\mu$ m)的纯化结果对比如图7所示。其中,PC组均为4.3.3.所获的IVTT反应液的RFU测试结果。10 $\mu$ L、5 $\mu$ L、1 $\mu$ L分别表示所加入的镍磁珠的体积。PC组的RFU值减去穿出液的RFU值,对应磁珠中的蛋白结合量,估算出蛋白结合效率。

[0306] 图6中,IVTT反应液中的蛋白产物8His-mEGFP的浓度为97.4 $\mu$ g/mL。镍磁珠Ni1(1 $\mu$ m)在体积用量为10 $\mu$ L、5 $\mu$ L、1 $\mu$ L时的蛋白结合效率分别为98.2%、97.6%、53.8%。镍磁珠Ni10(10 $\mu$ m)在体积用量为10 $\mu$ L、5 $\mu$ L、1 $\mu$ L时的蛋白结合效率分别为96.9%、51.9%、24.7%。镍磁珠Ni1(1 $\mu$ m)的蛋白结合效率分别提高1.3%、46.8%、54.1%。

[0307] 图7中,IVTT反应液中的蛋白产物8His-mEGFP的浓度为57.9 $\mu$ g/mL。镍磁珠Ni1(1 $\mu$ m)在三种体积用量时的蛋白结合效率均高于98%(98.3%~98.9%),镍磁珠Ni100(100 $\mu$ m)在体积用量为10 $\mu$ L、5 $\mu$ L、1 $\mu$ L时的蛋白结合效率分别为87.5%、46.9%、15.2%。镍磁珠Ni1(1 $\mu$ m)的蛋白结合效率分别提高11.5%、52.5%、84.6%。

#### [0308] 实施例5. 考察聚合物链长的影响

##### [0309] 5.1. 制备不同聚合物链长的磁性微球

[0310] 采用实施例1的方法制备以镍离子为纯化介质的磁性微球,其中聚合单体丙烯酸钠的浓度分别为2.08mol/L、2.496mol/L,分别记为L15、L18。

##### [0311] 5.2. 纯化与RFU测试

[0312] 采用实施例4中4.3.的方法制备PC液(IVTT反应结束时获得的IVTT反应液)。进行不同比例的稀释,得到含有不同蛋白产物(8His-mEGFP)浓度的原蛋白液。

[0313] 设置阴性对照(NC组):参考PC组,不加入DNA模板,进行相同操作,得到的“IVTT反应液”为NC组。

[0314] 采用实施例4中4.4.的方法进行纯化。取1mL不同稀释比例的原蛋白液,均加入2 $\mu$ L镍磁珠进行孵育反应,分别收集分离磁珠后的穿出液、两组洗脱液(洗脱液1、洗脱液2)。

[0315] 采用实施例4中4.4.的方法进行RFU测试(表10和表11)。还进行SDS-PAGE电泳检测(图谱未显示)。对待测液进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝R-250染色,过夜,脱色后,观察目标蛋白条带,可用来分析目标蛋白的分子量大小是否正确及纯度情况。检测参数:取30 $\mu$ L含融合蛋白产物的洗脱液(Elution),加入7.5 $\mu$ L加入含5% $\beta$ -巯基乙醇的5 $\times$  loading buffer,95℃加热10min,进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝R-250染色,过夜,脱色后,观察目标蛋白条带大小及纯度。

[0316] 表10中,蛋白结合效率通过以下公式 $1 - (\text{RFU}_{\text{ft}} - \text{RFU}_0) / (\text{RFU}_{\text{ori}} - \text{RFU}_0)$ 计算得到,也即 $(\text{RFU}_{\text{ori}} - \text{RFU}_{\text{ft}}) / (\text{RFU}_{\text{ori}} - \text{RFU}_0)$ 。其中,原蛋白液和相应稀释比例的NC组液的体积相同,穿出液的体积与前两者基本相同。从表10可知,随着聚合物链长的增加,镍磁珠对蛋白产物的捕获率(结合效率,结合率)有所增加。L15(2.08mol/L丙烯酸钠)RFU<sub>320</sub>与L18(2.496mol/L丙烯酸钠)RFU<sub>310</sub>的蛋白结合效率分别为85%、99%;L18的蛋白结合效率提高16.5%。

[0317] 表11中,采用高浓度蛋白液,L15(2.08mol/L丙烯酸钠)、L18(2.496mol/L丙烯酸钠)的蛋白结合效率分别为41.78%、55.55%,单位体积磁珠的蛋白结合量分别为40.0 $\mu$ g/ $\mu$

L、61.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。具有更长聚合物链、更多支链数量的L18的蛋白结合效率,单位体积磁珠的蛋白结合量均更高,分别提高33.0%、54.5%。

[0318] 此外,对含蛋白产物的洗脱液进行SDS-PAGE电泳检测的结果显示,L18(2.496mol/L丙烯酸钠)的纯度相比于L15(2.08mol/L丙烯酸钠)也有所提高。

[0319] 表10.分别采用2.08mol/L与2.496mol/L丙烯酸钠聚合所得镍磁珠的纯化结果对比

[0320]	L15 2.08 mol/L 丙烯酸钠				L18 2.496 mol/L 丙烯酸钠 (链更长)			
	RFU 均值			蛋白结合效率	RFU 均值			蛋白结合效率
	原蛋白液	NC 组	穿出液		原蛋白液	NC 组	穿出液	
	$RFU_{ori}$	$RFU_0$	$RFU_{ft}$		$RFU_{ori}$	$RFU_0$	$RFU_{ft}$	
21	3	4	94%	32	1	2	96.8%	
38	3	4	97%	58	2	3	98.2%	
79	5	8	96%	127	5	7	98.4%	
153	7	21	90%	310	6	8	99.3%	
320	14	61	85%	556	7	11	99.3%	

[0321] 表11.采用2.08mol/L与2.496mol/L丙烯酸钠聚合所得生物磁珠的纯化结果对比(磁珠体积均为2 $\mu\text{L}$ )

[0322]	丙烯酸钠浓度	计量方式	原蛋白液	穿出液	洗脱液 1	洗脱液 2	蛋白结合效率	结合力 (mg/mL)
	L15 2.08 mol/L	RFU		2820	323	10891	1902	/
浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			191.3	18.8	872.9	126.2	/	/
体积 (mL)			1	1	0.08	0.08	/	/
蛋白量 ( $\mu\text{g}$ )			191.3	18.8	69.8	10.1	41.78%	40.0
L18 2.496 mol/L	RFU		4521	879	16085	1140		
	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		317.5	56.0	1469.8	73.7	/	/
	体积 (mL)		0.7	0.7	0.08	0.08	/	/
	蛋白量 ( $\mu\text{g}$ )		222.3	39.2	117.6	5.9	55.55%	61.7

[0323] 浓度:采用实施例2中2.1部分的换算公式,计算得到蛋白产物的浓度。

[0324] 蛋白结合效率=(洗脱液1+洗脱液2)/原蛋白液,以蛋白量计。

[0325] 单位磁珠体积的蛋白结合量=(洗脱液1蛋白量+洗脱液2蛋白量)/磁珠体积,也称为结合力,单位mg/mL或者 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

[0326] 结合力:即单位体积磁珠的蛋白结合量。

[0327] 上述仅为本发明的部分实施例,本发明并不仅限于上述实施例的内容。

[0328] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

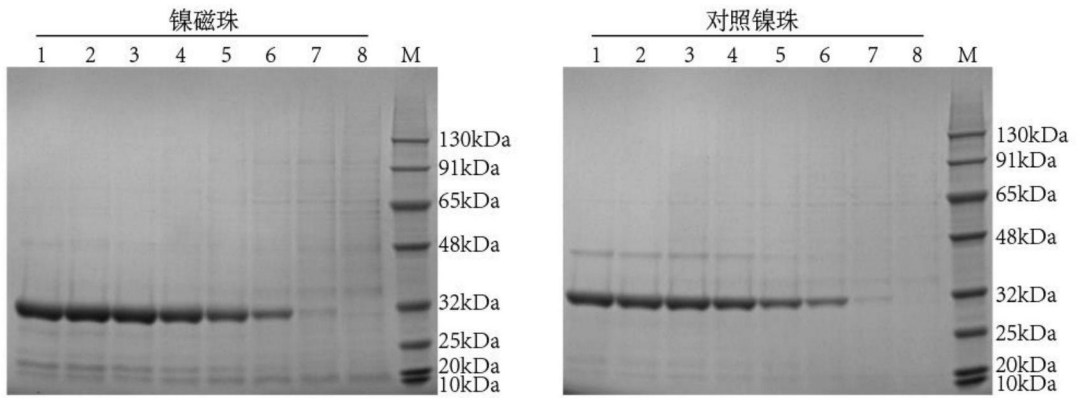


图1

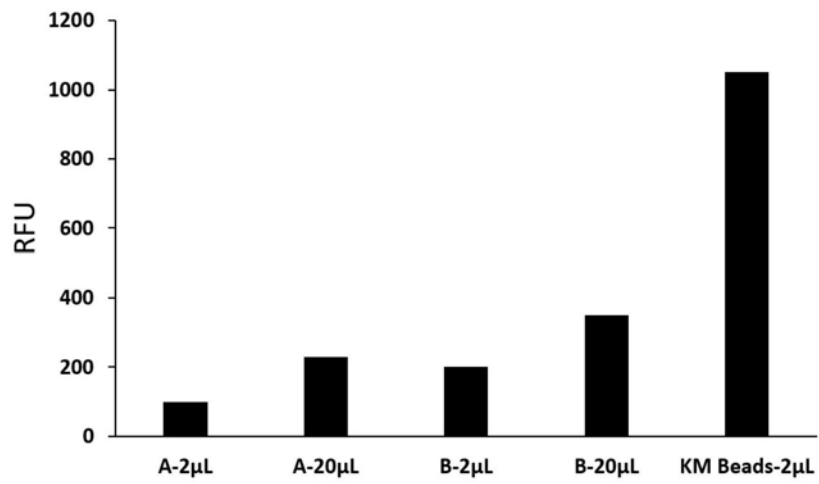


图2

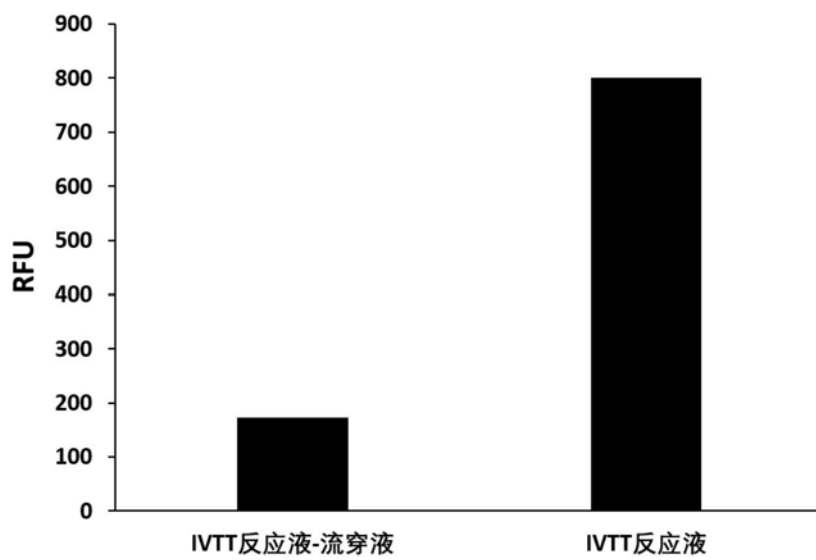


图3

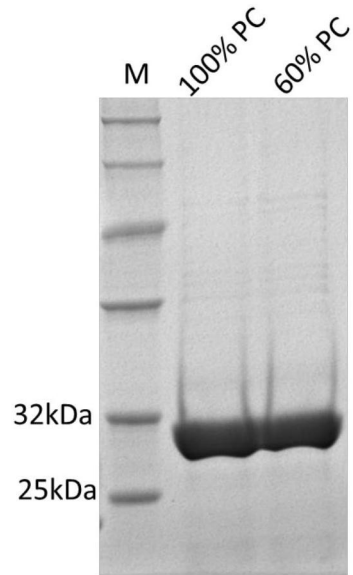


图4

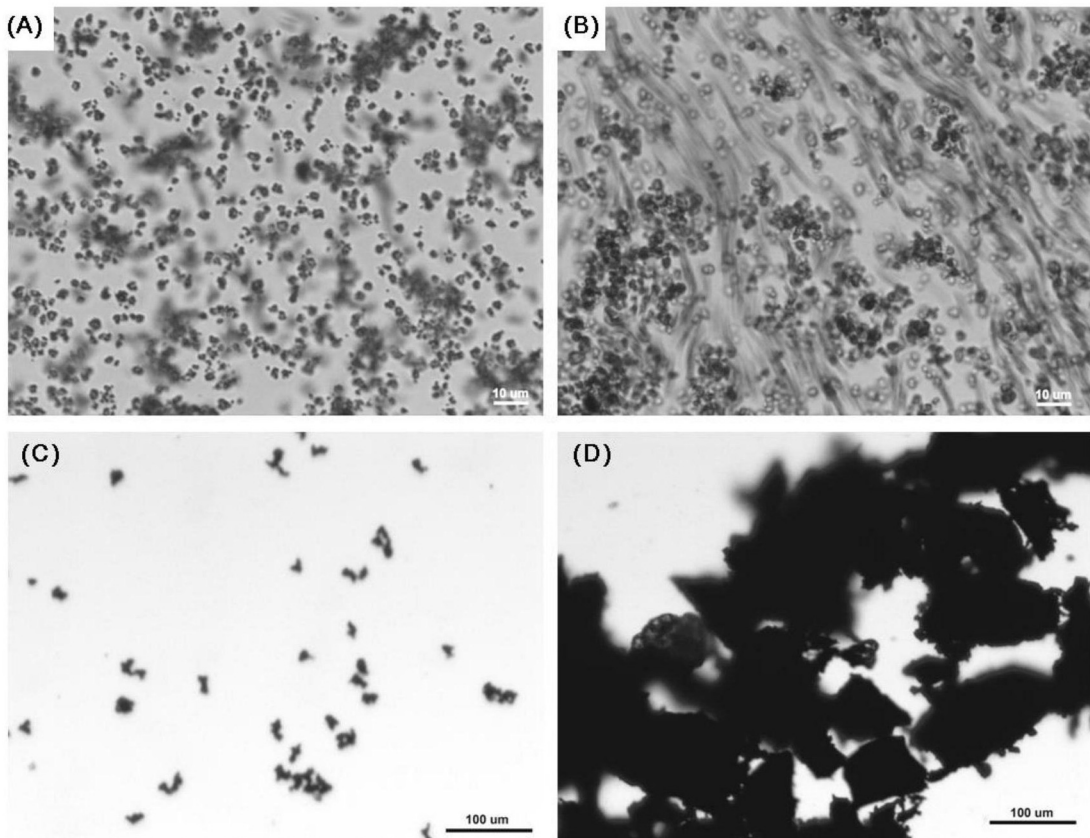


图5

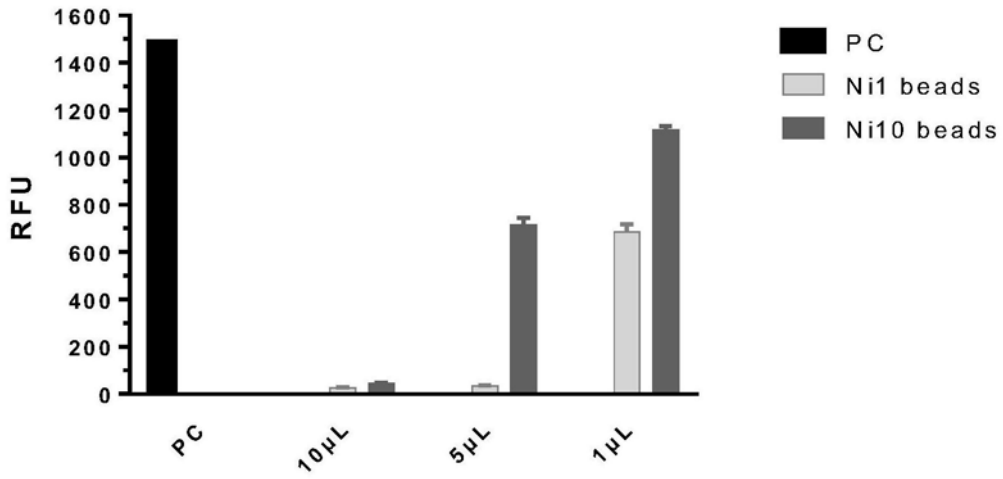


图6

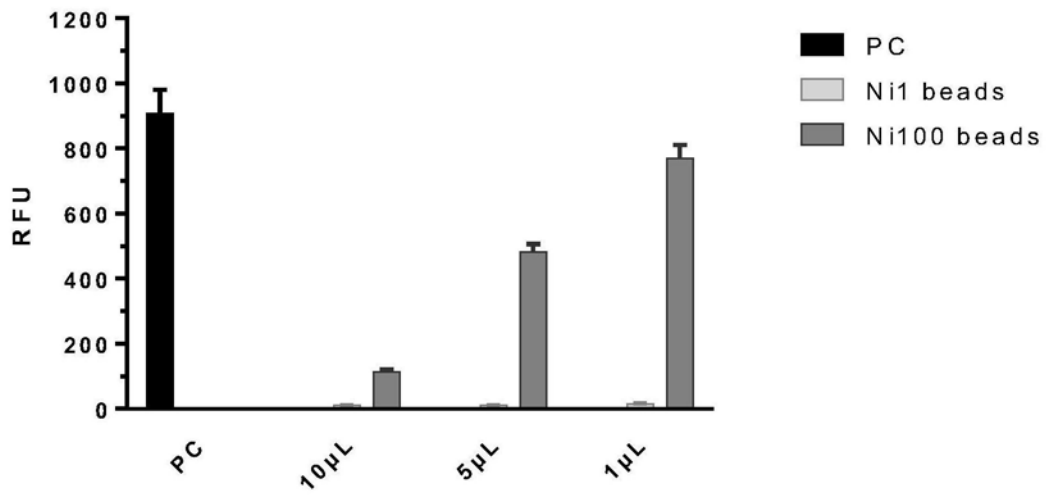


图7