



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201337972 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：101108537

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 13 日

(51)Int. Cl.:

H01F1/04 (2006.01)

C07K1/22 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：李耀坤 LI, YAW KUEN (TW)；詹富全 CHAN, FU CHAN (TW)；黃靜萍 HUANG, CHIN PING (TW)

(74)代理人：邱珍元；劉正格

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：6 共 32 頁

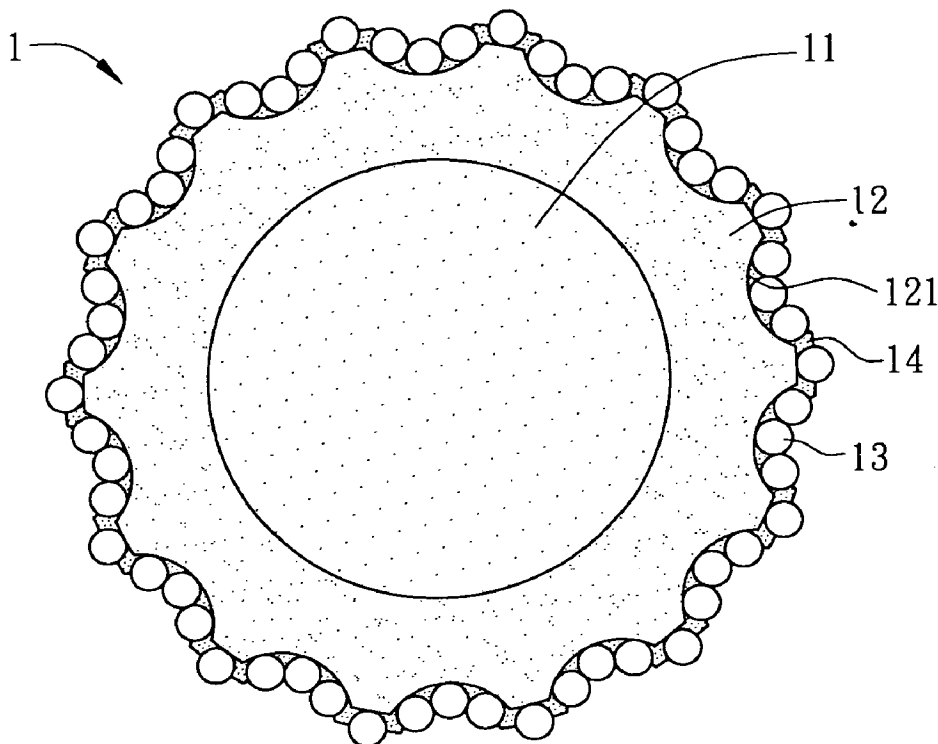
(54)名稱

磁性奈米複合材料及其製造方法及應用

MAGNETIC NANO-COMPOSITE MATERIAL, MANUFACTURING METHOD AND USE THEREOF

(57)摘要

本發明之一種磁性奈米複合材料，包括至少一磁性奈米粒子、一修飾層、一配位基團以及一高分子包覆層。修飾層係包括複數矽烷基團，並包覆至少部分磁性奈米粒子，且修飾層具有複數凹部。配位基團係連結於修飾層之凹部。高分子包覆層係連結修飾層。本發明另提供一種磁性奈米複合材料之製造方法以及磁性奈米複合材料應用於蛋白質之純化。



1：磁性奈米複合材料

11：磁性奈米粒子

12：修飾層

13：配位基團

14：包覆層

121：凹部

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101108537

※申請日：101.03.16

※IPC 分類：H01F 1/04 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

磁性奈米複合材料及其製造方法及應用/MAGNETIC
NANO-COMPOSITE MATERIAL, MANUFACTURING
METHOD AND USE THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明之一種磁性奈米複合材料，包括至少一磁性奈米粒子、一修飾層、一配位基團以及一高分子包覆層。修飾層係包括複數矽烷基團，並包覆至少部分磁性奈米粒子，且修飾層具有複數凹部。配位基團係連結於修飾層之凹部。高分子包覆層係連結修飾層。本發明另提供一種磁性奈米複合材料之製造方法以及磁性奈米複合材料應用於蛋白質之純化。

三、英文發明摘要：

A magnetic nano-composite material of the present invention includes at least one magnetic nano-particle, a modified layer, a ligand and a polymer coating. The modified layer includes a plurality of silane group and covers at least parts of the magnetic nano-particle, and it has a plurality of recesses. The ligand binds to the recesses.

The polymer coating binds to the modified layer. The present invention also provides a manufacturing method for the magnetic nano-composite material and the use of the magnetic nano-composite material to the field of protein purification.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

1：磁性奈米複合材料

11：磁性奈米粒子

12：修飾層

121：凹部

13：配位基團

14：包覆層

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種磁性奈米複合材料及其製造方法和其應用。

【先前技術】

近年來，在生醫研究與應用領域中，各項功能性蛋白與疾病的關係是相當重要的課題，而功能性蛋白之取得是該類研究須首要解決的問題。目前常用基因重組技術以表現蛋白質，再經純化、濃縮及定量後加以應用。常用之蛋白質純化技術包括酸鹼沉澱、硫酸銨純化（ammonium sulfate precipitation）、水溶性雙層萃取（aqueous two-phase extraction）、離子交換樹脂管柱（ion-exchange chromatography）、膠體過濾法（gel permeation chromatography）、疏水作用管柱分析（hydrophobic interaction chromatography）、或親和色層分析（ligand affinity chromatography）等。通常需多種技術交替運用以達純化之效，但耗時且處理程序繁複。於是，針對簡化流程及節省純化時間所開發出的磁性粒子，係於其外表面進行表面修飾如接合 NTA（nitrilotriacetic acid）、IDA（iminodiacetic acid）、或 TED（tris-carboxymethyl ethylene diamine）等，再螯合金屬離子，以利用此磁性粒子來與具有特定標記物之蛋白質結合並進行純化。

然而，藉由磁性粒子純化蛋白質的方法雖然已顯著簡

化純化步驟及縮短純化時間，但磁性粒子仍存在於製備過程發生聚集沉澱而影響純化效率、磁性粒子易受到氧化而影響磁性、磁性粒子表面接合的金屬脫落等問題影響純化蛋白的產量、以及因非專一性蛋白吸附而影響蛋白純度等問題。

因此，如何提供一種簡便、快速同時又能有效保護純化材料之磁性及提升目標蛋白之純化純度的磁性粒子及其製造方法，已成為生物技術領域所關切的問題之一。

【發明內容】

有鑑於上述課題，本發明之目的為提供一種簡便、快速同時又能有效保護純化材料之磁性及提升目標蛋白純度的磁性奈米複合材料及其製造方法及其相關應用。

為達上述目的，依據本發明之一種磁性奈米複合材料，包括至少一磁性奈米粒子、一修飾層、一配位基團以及一高分子包覆層。其中，修飾層係包括複數矽烷基團，並包覆至少部分磁性奈米粒子，且修飾層具有複數凹部。配位基團係連結於修飾層之凹部。高分子包覆層係連結修飾層。

在本發明一實施例中，磁性奈米粒子之材質係包括鐵、鈷、鎳、鉑、其氧化物、其合金或上述之組合。

在本發明一實施例中，修飾層係包括十八烷基三甲氧基矽烷、或四乙氧基矽烷、或其組合。

在本發明一實施例中，配位基團係為金屬或金屬氧化

物。

在本發明一實施例中，配位基團係為鐵、鎳、鈷、銅、鋅、或其氧化物。

在本發明一實施例中，磁性奈米複合材料之平均直徑大小係介於 20 nm 至 100 nm 之間。

本發明另提供一種磁性奈米複合材料之製造方法，包括提供複數磁性奈米粒子、混合一含矽烷化合物之溶液與磁性奈米粒子、燒結磁性奈米粒子，以於磁性奈米粒子之外表面形成一修飾層、浸置磁性奈米粒子於一含金屬離子之溶液、還原位於磁性奈米粒子上的金屬離子以及形成一高分子包覆層。

在本發明一實施例中，方法中所使用之磁性奈米粒子之材質係包括鐵、鈷、鎳、鉑、其氧化物、其合金或上述之組合。

在本發明一實施例中，製備磁性奈米粒子之製備方式，包括熱分解法、逆微胞法或共沉澱法。

在本發明一實施例中，製備方法中所用之矽烷化合物係為四乙氧基矽烷。

在本發明一實施例中，含矽烷化合物之溶液更包括一非極性長碳鏈化合物。

在本發明一實施例中，方法中之非極性長碳鏈化合物係包括十八烷基三甲氧基矽烷。

在本發明一實施例中，方法中之矽烷化合物與非極性長碳鏈化合物之莫爾數比為 1 : 0.1 至 1 : 0.5 之間。

在本發明一實施例中，方法中之修飾層形成複數凹部。

在本發明一實施例中，經過還原步驟係利用氫氣進行還原反應，金屬離子係還原成金屬，並至少部分位於凹部內。

在本發明一實施例中，方法中之金屬係包括鐵、鎳、鈷、銅、或鋅。

在本發明一實施例中，磁性奈米粒子經還原步驟後，再氧化成金屬氧化部，並形成複數配位基團。

在本發明一實施例中，形成高分子包覆層步驟係為將具有配位基團之磁性奈米粒子與一聚乙二醇溶液混合。

在本發明一實施例中，聚乙二醇溶液中之聚乙二醇之重量係介於磁性奈米粒子之重量的 0.25~1 倍之間。

本發明又提供一種蛋白質之純化方法，係包括提供一磁性奈米複合材料，磁性奈米複合材料係如上述之磁性奈米複合材料、提供一蛋白質溶液，其中蛋白質溶液係包括具有一標記物之目標蛋白質、混合蛋白質溶液及磁性奈米複合材料，目標蛋白質之標記物係與磁性奈米複合材料之配位基團親和性吸附以及取得吸附有目標蛋白質的磁性奈米複合材料。

在本發明一實施例中，純化方法中之標記物係包括咪唑、胺基基團之化合物及其衍生物、或組胺酸。

綜上所述，本發明所提供之磁性奈米複合材料及其製備方法及其應用，係藉由其修飾層之設置能減少磁性奈米

粒子受到氧化而降低其磁性，且修飾層上之凹部能增加結合配位基團所佔之表面積，可提供更多與目標蛋白之標記物螯合之空間。另外，本發明之磁性奈米複合材料尚具有一高分子包覆層，除了有效避免的磁性奈米粒子發生聚集沉澱情形以外，同時也能有效避免非專一性蛋白質之結合的情況發生，進而提升獲得目標蛋白之純度。除此之外，以本發明之磁性奈米複合材料配合本發明所提供之蛋白質純化方法，不僅能獲得純度較佳之目標蛋白，也可有效率地重覆使用磁性奈米複合材料來進行蛋白質純化，兼具了降低蛋白質純化成本之優勢。

【實施方式】

以下將參照相關圖式，說明依本發明較佳實施例之一種簡便、快速同時又能有效保護純化材料磁性及提升目標蛋白純度的磁性奈米複合材料及其製造方法及相關應用，其中相同的元件將以相同的參照符號加以說明。

圖 1 為本發明之磁性奈米複合材料之結構示意圖。如圖 1 所示，磁性奈米複合材料 1 包括至少一磁性奈米粒子 11、一修飾層 12、一配位基團 13 以及一高分子包覆層 14。為了方便說明磁性奈米複合材料 1，於此係以磁性奈米複合材料 1 包含一顆磁性奈米粒子 11 來作說明，當然磁性奈米複合材料也可具有複數磁性奈米粒子 11。需注意的是，圖 1 中的元件比例及尺寸只為了說明方便而繪製，不代表真實比例。

磁性奈米粒子 11 的材質係包括具有磁性之金屬、合金、金屬氧化物、或金屬合金氧化物，例如是鐵、鈷、鎳、鉑的氧化物、合金、金屬氧化物、或金屬合金氧化物或上述之組合。其中，金屬氧化物可為氧化鐵（如三氧化二鐵、四氧化三鐵）、氧化鈷、氧化鎳、或含有兩種金屬之合金氧化物如鐵酸鈷（cobalt ferrite, CoFe_2O_4 ）；而合金可例如為鐵鉑（FePt）合金、鈷鉑（CoPt）合金。本實施例中，磁性奈米粒子 11 係以四氧化三鐵為例。

為保護磁性奈米粒子 11 的磁力、生物相容性、提升磁性奈米粒子 11 的水溶性、以及油溶性與在溶液中的分散性，磁性奈米粒子 11 部分或全部外表面係包覆修飾層 12。而修飾層 12 係包括複數矽烷基團，其中矽烷基團主要係包括四乙氧基矽烷（tetraethyl orthosilicate, TEOS）、十八烷基三甲氧基矽烷（octadecyltrimethoxysilane, OTMS）、或其組合。在本發明一實施例中，修飾層 12 之材質係為四乙氧基矽烷。在本發明另一實施例中，修飾層 12 之材質係包含四乙氧基矽烷及十八烷基三甲氧基矽烷。而本發明之修飾層 12 可以共價或非共價鍵而結合於磁性奈米粒子 11 的外表面，且單一磁性奈米粒子 11 可具有兩層以上之修飾層 12，每層修飾層 12 可完全交疊或部分相互交疊，且每層修飾層 12 之厚度亦可隨使用者所需而進行調整。

另外，修飾層 12 係具有複數凹部 121，分散於修飾層 12 之外表面上。如此一來，可增加磁性奈米粒子 11 的表

面積。其中，每個凹部 121 可具有不同孔徑大小或不同深淺，在此亦不限制。

配位基團 13 係連結於修飾層 12 之該些凹部 121，當然，配位基團 13 亦可分佈於不具凹部 121 之修飾層 12 表面。配位基團 13 主要係能被咪唑 (imidazole)、胺基基團 (amino group) 之化合物及其衍生物、或組胺酸 (histidine) 所親和性結合之基團。本實施例中，配位基團 13 之材質係包括金屬或金屬氧化物，例如鐵、鎳、鈷、銅、或鋅、或上述的氧化物。在本實施例中，配位基團 13 係為氧化鎳。

於本發明之磁性奈米複合材料 1 之最外層，係具有高分子包覆層 14。高分子包覆層 14 係連結於修飾層 12，其中，高分子包覆層 14 並非完全緊密包覆住整個修飾層 12 及配位基團 13，也就是說配位基團 13 仍能自包覆層 14 中露出，而可進行後續的親和性吸附。於此，高分子包覆層 14 係以聚二乙烯 (polyethylene glycol, PEG) 為例。

本發明之磁性奈米複合材料 1 形狀可實質為圓形、方形、或不規則形狀本發明在此不限，且平均直徑約介於 20 ~ 100 nm 之間。

以下，請同時參照圖 1 及圖 2，以說明本發明之磁性奈米複合材料製造方法，其中圖 2 為本發明之磁性奈米複合材料之製造方法流程圖。如圖 2 所示，磁性奈米複合材料之製造方法係包括下列步驟：提供複數磁性奈米粒子 (S11)、混合一含矽烷化合物之溶液與磁性奈米粒子

(S12)、燒結磁性奈米粒子，以於磁性奈米粒子之外表面形成一修飾層 (S13)、浸置磁性奈米粒子於含金屬離子之溶液 (S14)、還原位於磁性奈米粒子上的金屬離子 (S15) 以及形成一高分子包覆層 (S16)。

於步驟 S11 中，係可透過熱分解法、逆微胞法 (reverse micelle)、或是共沉澱法來製備磁性奈米粒子 11。其中，熱分解法係將含有零價金屬的醯基 (CO) 或乙醯基丙酮 (acetylacetone) 於保護劑 (脂肪酸、油酸和十六烷氨) 中經高溫合成磁性奈米粒子 11；而逆微胞法係於介面活性劑中進行逆相微胞反應而形成磁性奈米粒子 11；共沉澱法則是利用二價金屬離子及三價金屬離子作為前驅物，並於特定酸鹼值及離子強度下進行合成磁性奈米粒子 11。其中，磁性奈米粒子 11 之金屬材質較佳係為鐵、鈷、或鎳。

在本發明一實施例中，磁性奈米粒子 11 係以共沉澱法製備。取 1.35 g 之氯化鐵 (FeCl_3) 和 0.69 g 之硫酸亞鐵 (FeSO_4) 於 50 ml 去離子水中溶解攪拌，待攪拌均勻後迅速加入 20 ml 濃度 1.5 M 之氫氧化鈉溶液，使原本呈橘黃色的溶液會瞬間轉變為黑色溶液，待其反應約 10 分鐘後，利用轉速 6000 rpm 離心除去上清液之後加入 95% 酒精清洗反覆行約三次，此時所得到之黑色粒子即為四氧化三鐵 (Fe_3O_4) 磁性奈米粒子 11。

於步驟 S12 中，係將製備好之磁性奈米粒子 11 置於水及酒精中並進行震盪，並添加含一矽烷化合物之溶液，以進行磁性奈米粒子 11 的表面修飾。其中，矽烷化合物

係包括四乙氧基矽烷 (tetraethyl orthosilicate, TEOS) 及/或十八烷基三甲氧基矽烷 (octadecyltrimethoxysilane, OTMS)。本發明之一實施例中，磁性奈米粒子 11 係混合於含有 TEOS 之矽烷化合物溶液，此外更可將一非極性長碳鏈化合物 (含有 6~18 個碳鏈化合物，例如 OTMS) 添加至含有 TEOS 的矽烷化合物溶液中，藉由 TEOS 以將 OTMS 的非極性長碳鏈相連結，以附著於磁性奈米粒子 11 的外表面。操作的細節如下：

將磁性奈米粒子 11 以 30 ml 去離子水回溶，以超音波震盪器震盪約 10 分鐘，待其磁性奈米粒子 11 再次均勻懸浮於溶液中時加入酒精 120 ml，以酒精和水 4:1 的比例進行表面修飾反應。於溶液中緩慢加入約 4 ml 之四氧乙基矽烷 (TEOS) 溶液，並保持攪拌的狀態。之後以氫氧化鈉調整溶液之酸鹼至 pH9~10 即可，反應時間約為 12 小時。

將上述反應 12 小時之溶液利用磁性或 6000 rpm 離心取得黑色磁性奈米粒子 11 後，加入酒精反覆清洗約 2~3 次，再使用旋轉抽乾儀會得到具有 TEOS 層之黑褐色磁性奈米粒子 11。

秤取約 100 mg 之具 TEOS 層之磁性奈米粒子 11，以 30 ml 去離子水回溶，並於超音波震盪器震盪約 10 分鐘，待磁性奈米粒子 11 再次均勻懸浮於溶液中時加入酒精 120 ml，同樣以酒精和水 4:1 的比例來進行表面修飾反應。此時緩慢滴入不同莫耳濃度比例之 TEOS 和 OTMS (另一矽烷溶液) 溶液，至完全懸浮之具 TEOS 層的磁性奈米粒

子 11 溶液，TEOS 和 OTMS 的莫耳數比例係為 1 比 0.25，再以氫氧化鈉調整溶液之 pH 值至 9~10 反應 12 小時，以於具有 TEOS 層的磁性奈米粒子 11 的外表面上再形成一具有 TEOS 及 OTMS 的層。

於步驟 S13 中，係將與矽烷化合物之溶液混合後之磁性奈米粒子 11，以酒精清洗乾燥後，可得表面呈現暗灰色之磁性奈米粒子 11。本實施例中，係將上述磁性奈米粒子 11 置於 500 °C 高溫燒結爐進行高溫燒結，使非極性長碳鏈化合物（OTMS）因高溫而斷裂，使得修飾層 12 上形成該些凹部 121。由於非極性長碳鏈化合物之濃度係影響後續形成於修飾層 12 之凹部 121 之大小及凹部 121 相互之間之密度，當非極性長碳鏈化合物之濃度越高，則會形成較多但較小之凹部 121。本發明之矽烷化合物與非極性長碳鏈化合物之莫爾數比較佳係介於 1:0.1 至 1:0.5 倍之間。而在本實施例中，矽烷化合物與非極性長碳鏈化合物之莫爾數比為 1:0.25，能形成大小約 5 nm 之凹部孔徑。

於步驟 S14 中，接著將具有修飾層 12 之磁性奈米粒子 11 混合於含金屬離子之溶液，以使金屬離子能充分接觸於磁性奈米粒子 11 之外表面及修飾層 12 上的凹部 121。在此所述之金屬係包括鐵、鎳、鈷、銅、或鋅。而在本發明一實施例中，取約 20 mg 的具修飾層 12 之磁性奈米粒子 11 加入 6 ml 濃度為 0.1 M 的氯化鎳（NiCl₂）溶液，浸泡 12 小時。為防止上述的磁性奈米粒子 11 聚集沉澱，會施予搖晃或震盪使之維持懸浮的狀態。

於步驟 S15 中，經還原步驟將金屬離子還原成金屬。本實施例中，於還原爐中通以氫氣及氫氣(1:3)進行 500°C 燒結還原 5 小時。出還原爐之後，待金屬經氧化反應形成金屬氧化物，即為具螯合能力之複數配位基團 13。配位基團 13 係能與如咪唑、胺基基團之化合物及其衍生物、或組胺酸結合。於此係以鎳金屬氧化成氧化鎳為例，其具有螯合組胺酸 (histidine) 的作用。

於步驟 S16 中，係於磁性奈米粒子 11 外圍再形成高分子包覆層 14，以有效降低磁性奈米複合材料 1 結合非專一性蛋白質的機率。其中，包覆層 14 之形成方式係將具有配位基團 13 之磁性奈米粒子 11 混合於含有一包覆劑 (例如為聚乙二醇 (PEG)) 之溶液中反應。為避免混合時磁性奈米粒子 11 發生沉澱現象，或包覆不均勻等問題，混合過程可輔以震盪或攪拌等方式懸浮磁性奈米粒子 11 於含一包覆劑之溶液中。由於包覆層 14 之濃度及包覆時間影響後續應用於蛋白質純化時是否能有效降低結合非專一性蛋白質的機率，因此本發明之包覆劑之重量係為具有配位基團 13 之磁性奈米粒子 11 之重量的 0.25 至 1 倍之間，反應約 2~10 小時。在本發明一較佳實施例中，包覆劑係為聚乙二醇，且聚乙二醇之重量為具有配位基團 13 之磁性奈米粒子 11 之重量的 0.75 倍，也就是將 1.5 mg 具有氧化鎳之磁性奈米粒子 11，與 0.75 倍的聚乙二醇也就是 0.375 mg 之聚乙二醇包覆約 5 小時，之後再利用磁性固定管壁內之磁性奈米粒子 11，以分離並移除含有聚乙二醇

之上清液，即可獲得具有高分子包覆層 14 的磁性奈米粒子 11。

依上述製造方法而製造的磁性奈米複合材料 1，係能應用於蛋白質純化領域。如圖 3 所示，其為本發明之將磁性奈米複合材料 1 應用於蛋白質純化方法之步驟流程圖。本發明之蛋白質之純化方法係包括提供一磁性奈米複合材料 (S21)、提供一蛋白質溶液 (S22)、混合蛋白質溶液及磁性奈米複合材料 (S23) 以及以磁力吸取磁性奈米複合材料 (S24)。於此，磁性奈米複合材料 1 於操作時，係可固設或連結於一固態承載體上，如固設於分析孔盤、管柱、濾膜上，而進行連續式的操作；也可以是將磁性奈米複合材料 1 懸浮於一溶液如蛋白粗萃取液中，而進行批次的操作。

請同時參照圖 1 及圖 3 所示，於步驟 S21 中，用於本發明蛋白質純化方法之磁性奈米複合材料，其結構係如圖 1 所示，而其結構及製備方式，則已於前面敘述，於此不再贅述。

於步驟 S22 及 S23 中，所提供的蛋白質溶液係可取自於原核生物或真核生物之細胞或組織之全蛋白、或是人工合成之蛋白質溶液、或是任何已經經過前處理的蛋白質粗萃液。原核生物可例如細菌，而真核生物係例如動物、植物、或真菌等。而關於取得原核生物或真核生物之全蛋白質之方法係為本技術領域具有通常知識者所能了解，故在此不多作贅述。其中，蛋白質溶液中，係包括具有一標記

物之目標蛋白質。當蛋白質溶液與磁性奈米複合材料 1 混合時，目標蛋白上的標記物係能與磁性奈米複合材料 1 上的配位基團 13 親和性吸附，而不具標記物之蛋白質則無法吸附至磁性奈米複合材料 1，並將於後續的清洗過程中被移除。而本發明之標記物係包括咪唑 (imidazole)、胺基基團 (amino group) 之化合物及其衍生物、或組胺酸 (histidine)。在本發明一實施例中，配位基團係為氧化鎳，能與目標蛋白質上的連續 6 至 8 個組胺酸相互螯合。

於步驟 S24 中，為取得吸附有目標蛋白質的磁性奈米複合材料，以分離目標蛋白及其他非專一性蛋白質，係可以磁力吸取磁性奈米複合材料 1，或是因為磁性奈米複合材料 1 原本就固著於管柱、濾膜或孔盤上，因此無須借助磁力之提供即可去除懸浮液即可取得吸附有目標蛋白質的磁性奈米複合材料 1。本實施例中，係針對懸浮於溶液中之磁性奈米複合材料 1，而磁性奈米複合材料 1 的蛋白質吸附能力最好大於所提供的蛋白質溶液所含的目標蛋白質含量。例如可將含有蛋白粗萃液及磁性奈米複合材料 1 混合於一容器中，於容器外壁以一磁鐵提供磁力吸取結合目標蛋白質之磁性奈米複合材料 1，接著移除其他溶液。除此之外，將結合目標蛋白之磁性奈米複合材料 1 與剩餘蛋白質溶液分離之方法亦可以離心分離。

以下，係以磁性奈米複合材料 1 純化前降鈣素為例，以說明本發明之磁性奈米複合材料 1 能應用於蛋白質純化領域。

前降鈣素蛋白質之生產及粗萃液的製備

首先將前降鈣素 (procalcitonin, 簡稱 PCT) 基因的 DNA 序列接合至載體 pRSET_A 中, 並轉形 (transformation) 至大腸桿菌 DH5 α 勝任細胞 (competent cell)。之後抽取其質體 DNA, 再轉型至大腸桿菌 BL21 (DE3) 勝任細胞中, 挑選單一菌落至 5ml LB 培養基中培養至適當之 OD 值後加入 IPTG 誘導具有 6 個組胺酸 (histidine, his) 之 PCT 蛋白質 (6his-PCT), 收集三管細菌培養液約 15 ml 加以離心除液態培養基, 並加入約 500 μ l 之 50 mM Tris 緩衝液 (pH7.5) 回溶菌體, 之後加以超音波震破後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後, 可得上清液, 即為 PCT 蛋白粗萃液。之後於 SDS-PAGE 檢視 6his-PCT 蛋白質 (以下簡稱 PCT 蛋白質) (約 15 kDa)。由於質體建構及以 SDS-PAGE 檢視蛋白質之詳細步驟流程係為本技術領域具有通常知識者所熟知, 故在此不再多加描述。

利用磁性奈米複合材料進行前降鈣素蛋白質之純化

取約 200 μ l 之 PCT 蛋白質粗萃取液與 0.4 mg 之磁性奈米複合材料混合震動約 10 分鐘, 之後以清洗緩衝液 (50 mM Tris, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris, 0.3 M NaCl, 5 mM imidazole, pH 值為 7.5) 清洗 2 次。再將吸附目標蛋白質 PCT 之磁性奈米複合材料加入 200 μ l 含有 0.3M 氯化鈉及 1M 咪唑 (imidazole) 之溶液進行沖提 (elution)。將其置於震盪器上反應 10 分鐘, 之後利用磁體磁性分離取得上清液, 分別取微量進行蛋白質電泳 SDS-PAGE 分析純化結

果。

以本發明之磁性奈米複合材料純化蛋白質具有高回收率

接著取已純化和利用 BCA 定量過之 PCT 蛋白質原液 (0.45 mg/ml) 作為樣本，測試經本發明之磁性奈米複合材料純化之蛋白質回收率。

純化結果係如圖 4 所示，於 SDS-PAGE 上由左至右分別為蛋白質標誌 (maker, lane 1)、PCT 蛋白質原液 (lane 2)、PCT 蛋白質原液通過磁性奈米複合材料後之殘餘蛋白液 (lane 3)、磁性奈米複合材料第一次清洗液 (lane 4)、磁性奈米複合材料第二次清洗液 (lane 5)、磁性奈米複合材料第三次清洗液 (lane 6)、磁性奈米複合材料第四次清洗液 (lane 7)、沖提磁性奈米複合材料之沖提液 (lane 8) 以及經沖提後殘留在磁性奈米複合材料上之蛋白質 (lane 9)。

利用本發明所合成之磁性奈米複合材料，除能有效純化 PCT 蛋白質 (lane 8 約 15 kDa 處之片段)，同時純化獲得之 PCT 量係經由 BCA 蛋白質定量方法定量，發現純化後所獲得之蛋白質量 (0.3 mg/ml) 相較於純化前之蛋白質量 (0.45 mg/ml) 可知以本發明之磁性奈米複合材料純化蛋白質之回收率至少約為 70% (未顯示於圖式)。

以本發明之磁性奈米複合材料重複進行純化

以清洗液去除前次殘留在磁性奈米複合材料表面之 PCT 後，將再生之磁性奈米複合材料重複使用以驗證其純化效率。本發明一實施例中，進行 6 次重複使用，並以

SDS-PAGE 檢視其結果，同時亦以商業用之磁性奈米粒子（PureProteome™ Nickel Magnetic Beads, Millipore）進行重複使用以與本發明之材料純化結果進行比較。

本發明之磁性奈米複合材料重複純化 PCT 蛋白質結果係如圖 5A 及圖 5B 所示。如圖 5A 所示，於 SDS-PAGE 上由左至右分別為蛋白質標誌（maker, lane 1）、粗萃取全蛋白液（lane 2）、粗萃取全蛋白通過磁性奈米複合材料後之殘餘蛋白液（lane 3）、磁性奈米複合材料第一次純化沖提液（lane 4）、磁性奈米複合材料第二次重複純化沖提液（lane 5）、磁性奈米複合材料第三次重複純化沖提液（lane 6）、磁性奈米複合材料第四次重複純化沖提液（lane 7）、磁性奈米複合材料第五次重複純化沖提液（lane 8）以及磁性奈米複合材料第六次重複純化沖提液（lane 9）。從 lane 4 至 lane 9 之 PCT 片段可知，本發明之磁性奈米複合材料可重複使用於蛋白質之純化，且仍具有極高純度，無其他非專一性蛋白片段結合之情形。

另再參照圖 5B 所示，經由 BCA 蛋白質定量每次純化之回收率。以第一次純化的回收率定為 100%，則本發明之磁性奈米複合材料能穩定維持回收率至第四次純化，直到第六次純化之回收率僅略為降至第一次純化回收率之 60%。

商業用之磁性奈米粒子重複純化 PCT 蛋白質結果係如圖 6A 及 6B 所示。如圖 6A 所示，於 SDS-PAGE 上由左至右分別為粗萃取全蛋白液（lane 1）、蛋白質標誌（maker,

lane 2)、商業用之磁性奈米粒子第一次純化沖提液 (lane 3)、商業用之磁性奈米粒子第二次重複純化沖提液 (lane 4)、商業用之磁性奈米粒子第三次重複純化沖提液 (lane 5)、商業用之磁性奈米粒子第四次重複純化沖提液 (lane 6)、商業用之磁性奈米粒子第五次重複純化沖提液 (lane 7) 以及商業用之磁性奈米粒子第六次重複純化沖提液 (lane 8)。從 lane 3 至 lane 8 之 PCT 片段可知，商業用之磁性奈米粒子雖可重複使用於進行蛋白質之純化，但從 SDS-PAGE 中之 PCT 片段粗細判斷所獲得之 PCT 濃度自第二次重複純化開始有逐漸下降之趨勢，另外商業用之磁性奈米粒子有結合非專一性蛋白片段之情形。

另再參照圖 6B 所示，經由 BCA 蛋白質定量每次純化之回收率。同樣以第一次純化的回收率定為 100%，則商業化之磁性奈米複合材料自第二次重複純化開始，每次純化得到之 PCT 濃度即逐漸下降，而第六次重複純化之蛋白量亦僅剩第一次純化之 60%~70% 左右。

因此，本發明之磁性奈米粒子相較商業化之磁性奈米粒子所純化獲得之蛋白質之純度較高，且能重複使用並穩定維持純化量至少至第四次重複。

綜上所述，本發明所提供之磁性奈米複合材料及其製備方法及其應用，係藉由其修飾層之設置能減少磁性奈米粒子受到氧化而降低其磁性，且修飾層上之凹部能增加結合配位基團所佔之表面積，可提供更多與目標蛋白之標記物螯合之空間。另外，本發明之磁性奈米複合材料尚具有

一高分子包覆層，除了有效避免的磁性奈米粒子發生聚集沉澱情形以外，同時也能有效避免非專一性蛋白質之結合的情況發生，進而提升獲得目標蛋白之純度。除此之外，以本發明之磁性奈米複合材料配合本發明所提供之蛋白質純化方法，不僅能獲得純度較佳之目標蛋白，也可有效率地重覆使用磁性奈米複合材料來進行蛋白質純化，兼具了降低蛋白質純化成本之優勢。

以上所述僅為舉例性，而非為限制性者。任何未脫離本發明之精神與範疇，而對其進行之等效修改或變更，均應包括於後附之申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

圖 1 為本發明之磁性奈米複合材料之結構示意圖；

圖 2 為本發明之一種磁性奈米複合材料之製造方法流程圖；

圖 3 為本發明之一種蛋白質之純化方法之步驟流程圖；

圖 4 為以本發明之磁性奈米複合材料檢視純化 PCT 蛋白質回收率之 SDS-PAGE 電泳圖；

圖 5A 為本發明之磁性奈米複合材料純化 PCT 蛋白質之 SDS-PAGE 電泳圖；

圖 5B 為本發明之磁性奈米複合材料純化 PCT 蛋白質回收率統計圖；

圖 6A 為商業化之磁性奈米複合材料純化 PCT 蛋白質之 SDS-PAGE 電泳圖；以及

圖 6B 為商業化之磁性奈米複合材料純化 PCT 蛋白質回收率統計圖。

【主要元件符號說明】

1：磁性奈米複合材料

11：磁性奈米粒子

12：修飾層

121：凹部

13：配位基團

14：包覆層

S11～S16、S21～S24：步驟

七、申請專利範圍：

- 1、一種磁性奈米複合材料，包括：
 - 至少一磁性奈米粒子；
 - 一修飾層，係包括複數矽烷基團，並包覆至少部分該磁性奈米粒子，且該修飾層具有複數凹部；
 - 一配位基團，連結於該修飾層之該些凹部；以及
 - 一高分子包覆層，連結該修飾層。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述之磁性奈米複合材料，其中該磁性奈米粒子之材質係包括鐵、鈷、鎳、鉑、其氧化物、其合金或上述之組合。
- 3、如申請專利範圍第 1 項所述之磁性奈米複合材料，其中該修飾層係包括十八烷基三甲氧基矽烷、或四乙氧基矽烷、或其組合。
- 4、如申請專利範圍第 1 項所述之磁性奈米複合材料，其中該配位基團係為金屬或金屬氧化物。
- 5、如申請專利範圍第 4 項所述之磁性奈米複合材料，其中該配位基團係為鐵、鎳、鈷、銅、鋅、或其氧化物。
- 6、如申請專利範圍第 1 項所述之磁性奈米複合材料，其平均直徑大小係介於 20 nm 至 100 nm 之間。
- 7、一種磁性奈米複合材料之製造方法，包括：
 - 提供複數磁性奈米粒子；
 - 混合一含矽烷化合物之溶液與該些磁性奈米粒子；
 - 燒結該些磁性奈米粒子，以於該些磁性奈米粒子之外表面形成一修飾層；

浸置該些磁性奈米粒子於一含金屬離子之溶液；
還原位於該些磁性奈米粒子上的金屬離子；以及
形成一高分子包覆層。

- 8、如申請專利範圍第 7 項所述之製造方法，其中該些磁性奈米粒子之材質係包括鐵、鈷、鎳、鉑、其氧化物、其合金或上述之組合。
- 9、如申請專利範圍第 7 項所述之製造方法，其中該些磁性奈米粒子之製備方式，包括熱分解法、逆微胞法或共沈澱法。
- 10、如申請專利範圍第 7 項所述之製造方法，其中該矽烷化合物係為四乙氧基矽烷。
- 11、如申請專利範圍第 7 項所述之製造方法，其中該含矽烷化合物之溶液更包括一非極性長碳鏈化合物。
- 12、如申請專利範圍第 11 項所述之製造方法，其中該非極性長碳鏈化合物係包括十八烷基三甲氧基矽烷。
- 13、如申請專利範圍第 11 項所述之製造方法，其中該矽烷化合物與該非極性長碳鏈化合物之莫爾數比為 1：0.1 至 1：0.5 之間。
- 14、如申請專利範圍第 7 項所述之製造方法，其中該修飾層係形成複數凹部。
- 15、如申請專利範圍第 14 項所述之製造方法，其中該還原步驟係利用氫氣進行還原反應，該金屬離子係還原成金屬，並至少部分位於該些凹部內。
- 16、如申請專利範圍第 7 項所述之製造方法，其中該金屬

係包括鐵、鎳、鈷、銅、或鋅。

- 17、如申請專利範圍第 7 項所述之製造方法，其中該些磁性奈米粒子經該還原步驟後，再氧化成金屬氧化物，並形成複數配位基團。
- 18、如申請專利範圍第 17 項所述之製造方法，其中形成該高分子包覆層步驟係為將具有該些配位基團之該些磁性奈米粒子與一聚乙二醇溶液混合。
- 19、如申請專利範圍第 18 項所述之製造方法，其中該聚乙二醇溶液中之聚乙二醇之重量係介於該些磁性奈米粒子之重量的 0.25~1 倍之間。
- 20、一種蛋白質之純化方法，包括：
 - 提供一磁性奈米複合材料，該磁性奈米複合材料係如申請專利範圍第 1 項至第 6 項中任一項所述之該磁性奈米複合材料；
 - 提供一蛋白質溶液，其中該蛋白質溶液係包括具有一標記物之目標蛋白質；
 - 混合該蛋白質溶液及該磁性奈米複合材料，該目標蛋白質之該標記物係與該磁性奈米複合材料之該配位基團親和性吸附；以及
 - 取得吸附有該目標蛋白質的該磁性奈米複合材料。
- 21、如申請專利範圍第 20 項所述之純化方法，其中該標記物係包括咪唑、胺基基團之化合物及其衍生物、或組胺酸。

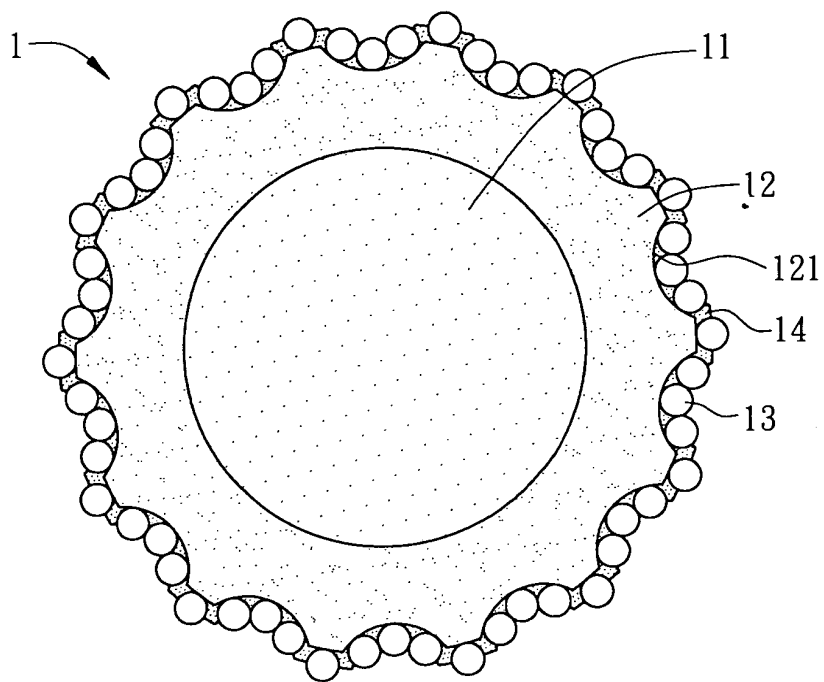


圖 1

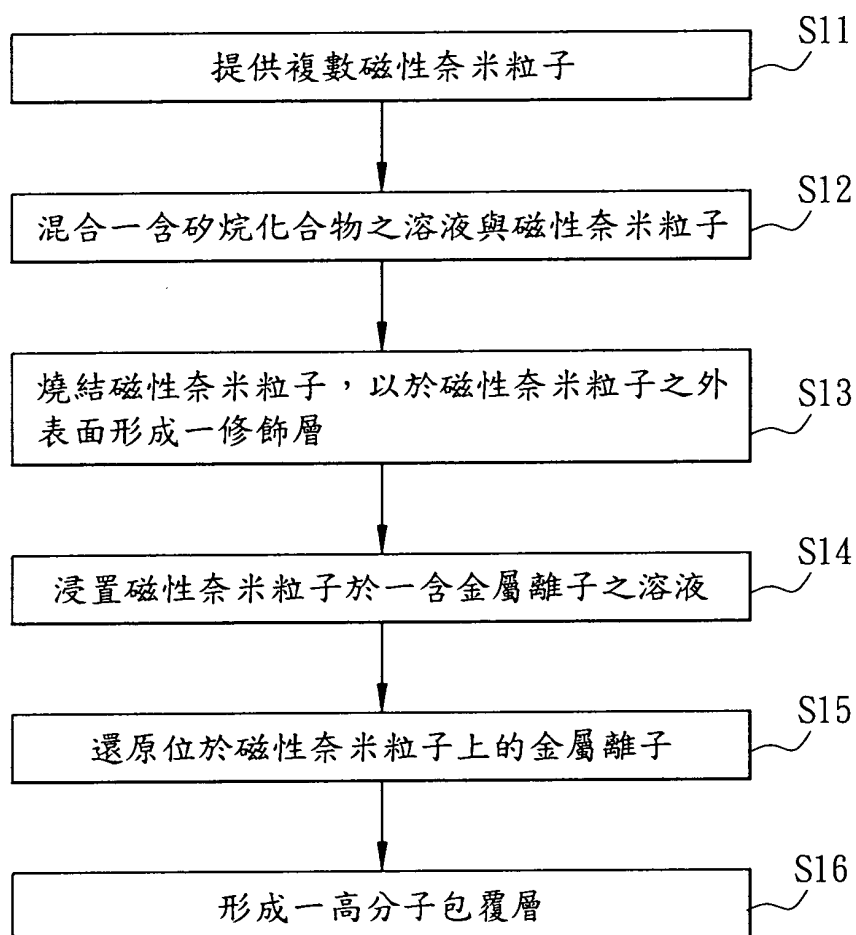


圖2

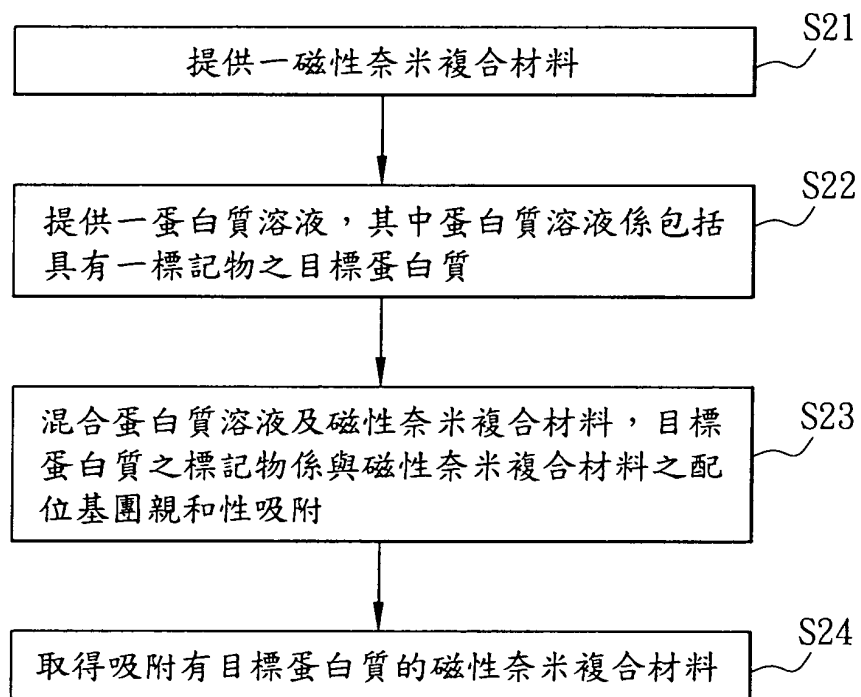


圖3

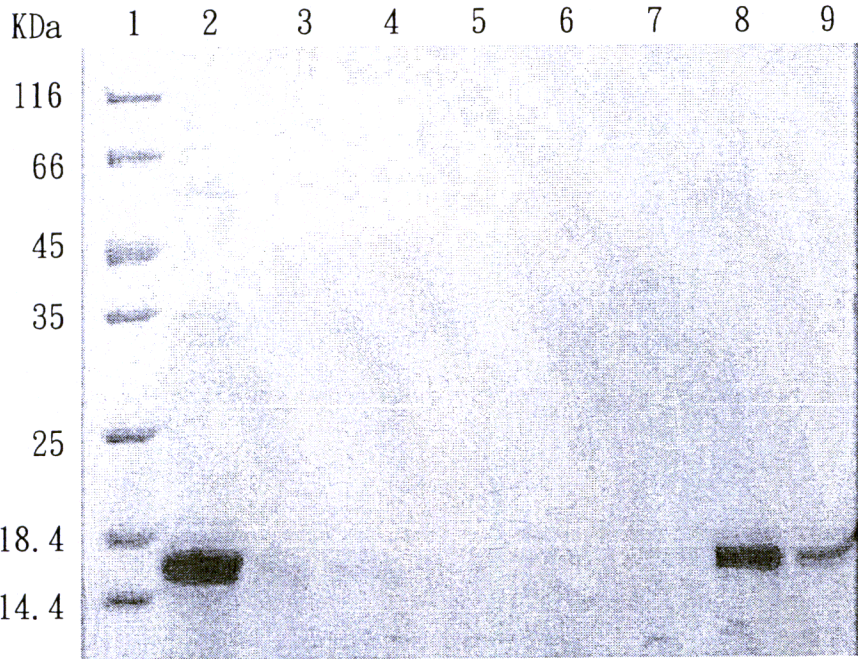


圖4

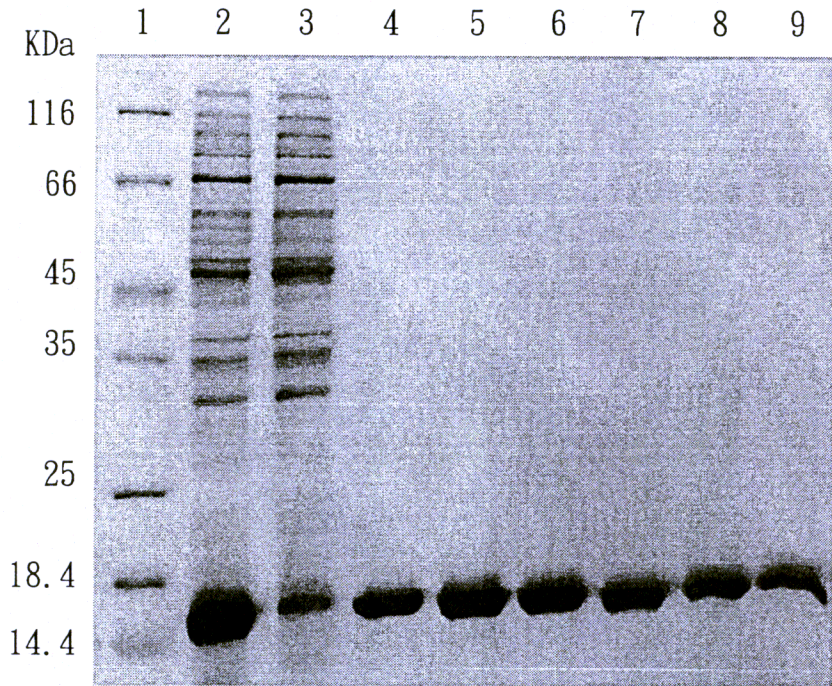


圖5A

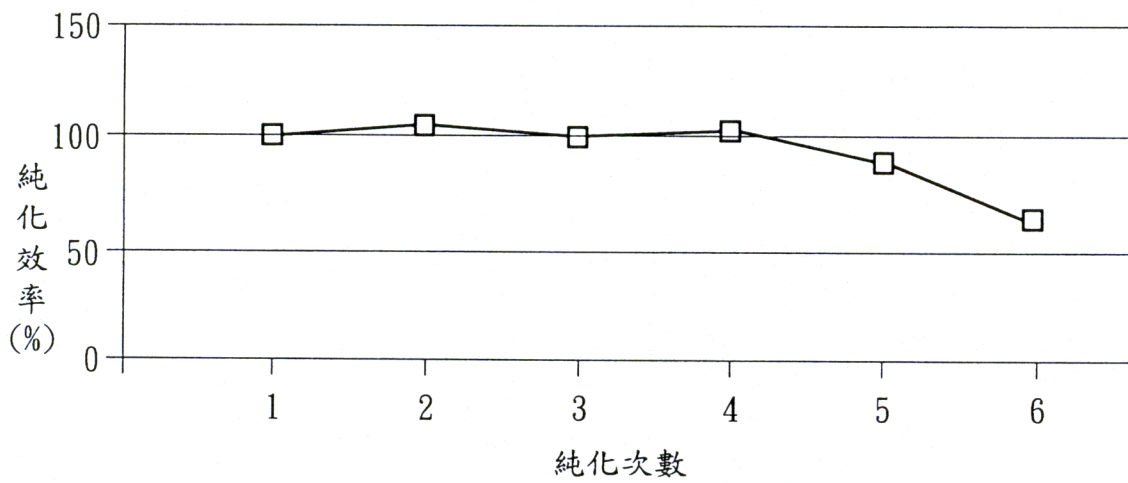


圖5B

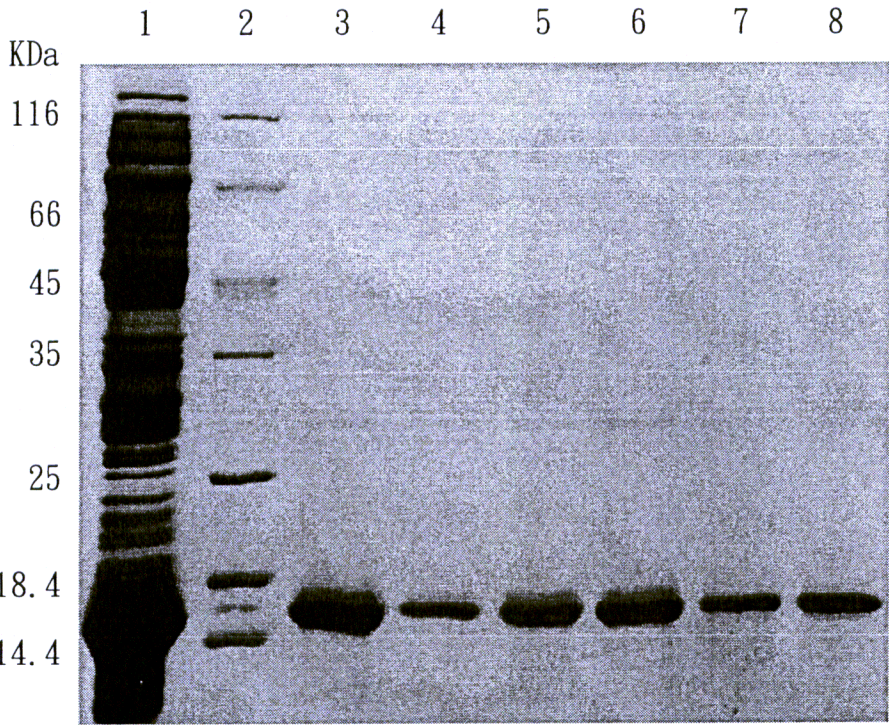


圖6A

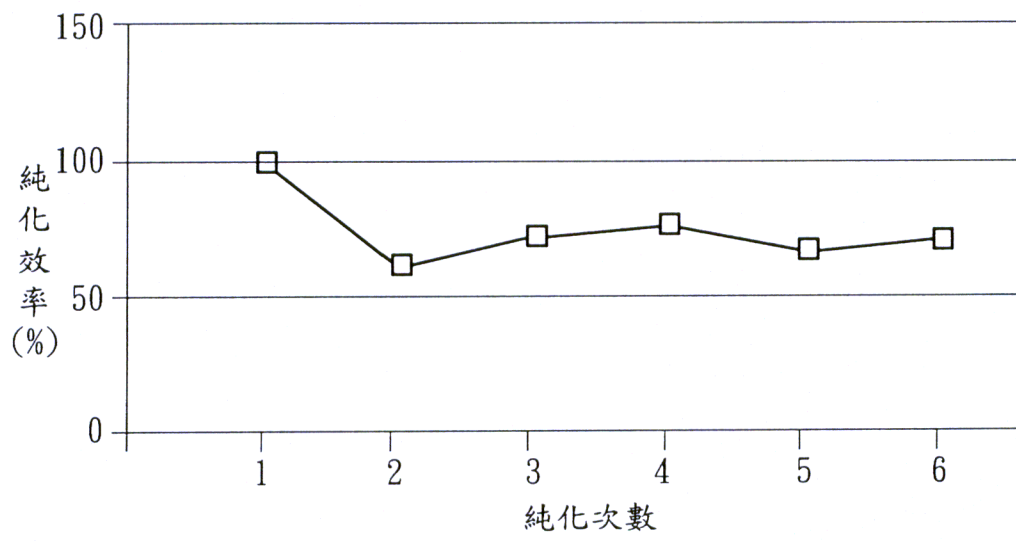


圖6B