

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520061152673

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于阳极氧化铝膜的亲和膜的制备
及其性能研究

Preparation and Characteristics Research of Affinity
Membrane based on Anodic Aluminum Oxide (AAO)
Membrane

沈雨青

指导教师姓名: 石 巍 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩时间: 2009 年 6 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

理想的亲和膜应该具有良好的均一性，然而，现在大部分亲和膜所使用的基质膜材的孔隙率和孔径分布较宽，且膜厚不一，由于这些缺陷导致了亲和分离效率的大大降低。本课题从构建理想的亲和膜膜材入手，遴选具有有序孔排列、可控孔径和优良结构形态的无机膜—阳极氧化铝膜（AAO）为基质膜材，首次通过两种方法对其改性，获得有机无机复合和无机复合无机膜，使其满足亲和膜膜材的要求，并通过功能化的方法，偶联不同配基，制得新型亲和膜，并考察其形貌特征、亲和吸附性能、探索吸附机理及再生性能。主要研究内容如下：

（一）膜材料的改性。本文选择 AAO 作为基质膜材，将具有良好生物相容性的生物大分子壳聚糖（CS）和无机物二氧化硅（SiO₂）作为改性材料，分别通过化学偶联法和溶胶-凝胶法，复合于 AAO 膜中，获得有机无机复合膜（CS-AAO）和无机复合无机膜（SiO₂-AAO）。通过活化，偶联配基后，分别获得了 Cu²⁺螯合亲和膜和固载赖氨酸（Lys）亲和膜。通过 SEM、TEM 观察，所制备的复合膜，均一，平整，保留了空白 AAO 膜超均一的形貌结构。其中 Cu²⁺螯合亲和膜上 CS 和 Cu²⁺的固载量为 49.7 和 27.15 mg/g 膜；固载 Lys 亲和膜对 Lys 的固载量为 5.57 mg/g 膜。

（二）吸附影响因素的考察。将制备所得的 Cu²⁺螯合亲和膜和固载赖氨酸（Lys）亲和膜，分别用于亲和分离血红蛋白（Hb）和胆红素（BR），并通过静态吸附和动态吸附两方面的影响因素对亲和膜的吸附性能进行系统考察，包括初始浓度、离子强度、pH 值、温度、进样流速等。结果表明：（1）构建的 CS-AAO 和 SiO₂-AAO 两种复合膜，均有效降低了 AAO 膜的非特异性吸附；（2）两种复合膜所制备的亲和膜均对其分离目标物展现了良好的吸附特异性，其吸附容量随着离子强度的增加而减少，随着温度的升高而有所增加；（3）Cu²⁺螯合亲和膜在 pH 值等于 Hb 等电点（pI = 6.8）时，对 Hb 的吸附容量最大，随着 pH 值增大或减小，吸附容量均减少；（4）固载 Lys 的亲和膜对 BR 的吸附容量随着白蛋白浓度的增加而减少；（5）在膜堆积实验中发现，两种亲和膜的动态吸附容量均低于静态吸附容量，且随着流速的增加而降低。

（三）吸附机理的推导。经过实验数据拟合，Cu²⁺螯合亲和膜对 Hb 的吸附符合 Freundlich

等温吸附机理，且 $R^2=1$ ；而固载 Lys 亲和膜对 BR 的吸附行为则属于 Langmuir 等温吸附机理， $R^2=0.9937$ ， $q_{\max}=18.08 \text{ mg/g}$ 膜。

（四）洗脱和再生性能考察。使用 0.5 mol/L 的咪唑对吸附 Hb 后的 Cu^{2+} 螯合亲和膜进行洗脱，可以达到较大的洗脱率（91.2%），吸附—解吸过程重复 5 次后，亲和膜对 Hb 的吸附量仅减少 6%；依次使用 0.05 mol/L NaOH 和白蛋白溶液对吸附 BR 的固载 Lys 亲和膜进行洗脱，可以达到 95% 的洗脱率，吸附—解吸过程重复 5 次后，Lys 亲和膜对 BR 的吸附量仅减少 6%。

关键词：阳极氧化铝膜（AAO）；亲和膜；壳聚糖（CS）；二氧化硅（ SiO_2 ）

Abstract

An ideal affinity membrane should own well uniformities. However, most existing microporous membranes were manufactured by phase-inversion method. Membranes produced from this method generally have wide pore size distribution and some thickness variation. These nonuniformities may severely degrade the performance of affinity membranes. In this paper, chitosan (CS)–anodic aluminum oxide (AAO) composite membrane and silica (SiO₂)–AAO composite membrane with excellent uniformities, such as narrow pore size and porosity distribution, as well as uniform membrane thickness, were fabricated, for the first time. Then, through the activation method to coupling different ligands for obtain new model of affinity membrane. The characteristics and adsorption mechanism of affinity membrane were studied. The main research contents are as follows:

1. Modification of membrane materials. Select AAO membranes as a matrix, use biological macromolecule of chitosan (CS) and inorganic silica (SiO₂) as modified materials, respectively, by chemical coupling and sol–gel method to obtain organic-inorganic composite membrane (CS–AAO) and inorganic-inorganic composite membrane (SiO₂–AAO). After ligand coupling, the affinity membrane of Cu²⁺–attached and lysine (Lys)–attached were fabricated. The morphologies of composite membrane were observed by SEM, TEM. And, composite membrane retained the morphology of ultra-uniform structure of blank AAO membrane. The contents of CS and Cu²⁺ of Cu²⁺–attached affinity membranes were ~49.7 and 27.15mg/g membrane; the contents of Lys of Lys–attached affinity membranes were 5.57 mg/g membrane.

2. Adsorption performance of affinity membrane. The Cu²⁺–attached affinity membranes were used to recover a model protein, hemoglobin, from hemoglobin–phosphate solution (batch manner) and from the hemolysate (dynamic manner). The Lys–attached affinity membranes were used to removal lipophilic toxins Bilirubin (BR), through the static adsorption and dynamic adsorption to study the

adsorption performance of affinity membrane. Adsorption experiments indicated that: (1) The non-specific adsorption capacity of two different composite membrane reduced significantly; (2) The prepared affinity membranes showed good adsorption specificity for adsorbate; the adsorption capacity decreased with increasing the concentration of NaCl and increased with increasing temperature; (3) Cu^{2+} -attached affinity membrane can be attained maximum adsorption from aqueous solutions is observed at Hb pI (pI of Hb:6.8) and significantly lower adsorption capacities were obtained with all affinity membranes in more acidic and in more alkaline pH regions; (4) The adsorption capacity of Lys-attached affinity membrane decreased with increasing the concentration of BSA; (5) The dynamic capacities smaller than the corresponding static adsorption capacities, because some adsorptive capacity remains unused mainly due to slow sorption kinetics and resistance from mass transport rate processes.

3. Adsorption mechanisms of affinity membrane. The mechanisms of Hb adsorption on the Cu^{2+} -attached affinity membranes fitted the Freundlich model well, and $R^2=1$. The mechanisms of BR adsorption on the Lys-attached affinity membranes fitted the Langmuir model well, and $R^2=0.9937$, $q_{\max}=18.08$ mg/g membrane.

4. Elution and Regeneration of affinity membrane. The adsorbed Hb on the Cu^{2+} -attached affinity membranes was desorbed up to 91.2 % with 0.5 M imidazole aqueous solution as the desorption agent. The BR adsorbed on Lys-attached affinity membranes can be eluted by the NaOH and BSA, and the elute rate was 95 %. In order to show the reusability of the affinity membranes, the adsorption-elution cycle was repeated five times using the same affinity membranes. The adsorption capacity of both Cu^{2+} -attached affinity membranes and Lys-attached affinity membranes decrease only 6 %.

Keywords: Anodic aluminum oxide (AAO); Affinity membrane; Chitosan (CS); Silica (SiO_2)

目 录

第一章 绪论	1
1.1 亲和膜技术研究进展	1
1.1.1 亲和膜分离原理.....	2
1.1.2 亲和膜的制备.....	3
1.1.3 亲和膜分离机理.....	7
1.1.4 亲和膜分离技术的展望.....	8
1.2 本文工作	9
参考文献	12
第二章 Cu^{2+} 螯合亲和膜的制备及性能研究	15
2.1 引言	15
2.2 实验材料和设备	16
2.2.1 实验材料.....	16
2.2.2 实验设备.....	17
2.3 CS-AAO复合膜的制备	18
2.3.1 AAO膜的活化.....	18
2.3.2 CS的固载.....	18
2.3.3 CS-AAO复合膜的形貌表征.....	19
2.3.4 膜上CS含量的测定.....	20
2.4 Cu^{2+} 螯合亲和膜的制备	21
2.4.1 Cu^{2+} 的固载.....	21
2.4.2 膜上固载 Cu^{2+} 含量的分析.....	22
2.4.3 Cu^{2+} 泄露实验.....	23
2.5 Cu^{2+} 螯合亲和膜吸附性能研究	24
2.5.1 实验的准备工作.....	24
2.5.2 静态实验.....	27
2.5.3 真实体系动态吸附实验.....	32

2.5.4 膜的洗脱和再生.....	34
2.5.5 膜分离蛋白纯度分析.....	35
2.6 本章小结	37
参考文献	39
第三章 固载赖氨酸 (Lys) 亲和膜的制备及性能研究.....	43
3.1 引言	43
3.2 实验材料和设备	43
3.2.1 实验材料.....	43
3.2.2 实验设备.....	44
3.3 SiO ₂ -AAO复合膜的制备.....	45
3.3.1 Sol-gel液的配置.....	45
3.3.2 SiO ₂ -AAO复合膜的制备	45
3.3.3 SiO ₂ -AAO复合膜的表征	45
3.4 固载Lys亲和膜的制备	48
3.4.1 SiO ₂ -AAO复合膜的活化	48
3.4.2 Lys的固载.....	48
3.4.3 膜上固载Lys含量的分析.....	49
3.5 固载Lys亲和膜的吸附性能研究	50
3.5.1 胆红素 (BR) 的分析方法	50
3.5.2 静态吸附实验.....	52
3.5.3 动态吸附实验.....	58
3.5.4 膜的洗脱和再生.....	59
3.6 本章小结	60
参考文献	62
第四章 结论与展望	64
4.1 全文结论	64
4.2 创新点	65
4.3 对今后工作的建议和展望	65
硕士期间发表专利及论文	67

致 谢.....68

厦门大学博硕士论文摘要库

Content

Chapter 1 Review	1
1.1 The research progress of affinity membrane.....	1
1.1.1 Principle and process of affinity membrane	2
1.1.2 Preparation of affinity membrane	3
1.1.3 Theoretical fundation of affinity separation.....	7
1.1.4 Expectation of affinity membrane.....	8
1.2 Main focus of this thesis	9
Reference.....	12
 Chapter 2 Prepartion and characteristics research of the	
Cu²⁺– attached affinity membrane.....	15
2.1 Introduction.....	15
2.2 Materials and apparatus	16
2.2.1 Materials	16
2.2.2 Apparatus	17
2.3 Fabrication of the CS–AAO composite membrane	18
2.3.1 Activation of AAO membrane.....	18
2.3.2 Immobilization of CS.....	18
2.3.3 Charecterization of the CS–AAO composite membrane.....	19
2.3.4 The content of CS immobilized on the composite membrane.....	20
2.4 Fabrication of the Cu²⁺–attached affinity membrane	21
2.4.1 Immobilization of Cu ²⁺	21
2.4.2 The content of Cu ²⁺ immobilized on the affinity membrane.....	22
2.4.3 The ions leakage of Cu ²⁺	23
2.5 Adsorption performance of the Cu²⁺–attached affinity membrane	24
2.5.1 Solution preparation and analysis methods.....	24
2.5.2 Batch adsorption experiments.....	27
2.5.3 Dynamic adsorption of Hb from hemolysate.....	32

2.5.4 Elution and regeneration of affinity membrane	34
2.5.5 Analysis of protein purity.....	35
2.6 Summary.....	37
Reference.....	39
Chapter 3 Preparation and characteristics research of the Lys- attached affinity membrane.....	43
3.1 Introduction.....	43
3.2 Materials and apparatus	43
3.2.1 Materials	43
3.2.2 Apparatus	44
3.3 Fabrication of the SiO₂-AAO composite membrane.....	45
3.3.1 Preparation of Sol-gel solution	45
3.3.2 Fabrication of the SiO ₂ -AAO composite membrane.....	45
3.3.3 Characterization of the SiO ₂ -AAO composite membrane	45
3.4 Fabrication of the Lys-attached affinity membrane	48
3.4.1 Activation of SiO ₂ -AAO composite membrane	48
3.4.2 Immobilization of Lys.....	48
3.4.3 The content of Lys immobilized on the affinity membrane.....	49
3.5 Adsorption performance of the Lys-attached affinity membrane	50
3.5.1 Analysis methods of BR.....	50
3.5.2 Batch adsorption experiments.....	52
3.5.3 Dynamic adsorption experiments	58
3.5.4 Elution and regeneration of affinity membrane	59
3.6 Summary.....	60
Reference.....	62
Chapter 4 Conclusion and future works.....	64
4.1 Conclusion	64
4.2 Creative points.....	65
4.3 Future works	66

Publications67

Acknowledgements68

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

1.1 亲和膜技术研究进展

随着生物工程和生命科学的迅速发展,对生物大分子纯化分离的要求越来越高。尽管采用传统的分离方法如沉淀、结晶、层析等可使产品获得较高的纯度,但在很多情况下,存在工艺复杂、活性回收率低等问题。近年来发展的亲和色谱技术部分解决了这些问题,它是根据生物分子与特定的配基之间的亲和作用发展起来的。该法具有良好的选择性、优异的特异性和较高的纯化倍数。但是由于传统的亲和色谱柱采用多孔的粒状填料,如葡聚糖、琼脂糖凝胶等,作为配基载体,在凝胶颗粒内目标产物向配基扩散传质的阻力大,分离周期长,有些目标产物和配基结合后必须在极端的溶液环境下解脱,洗脱时间过长,往往导致配基、目标产物变性失活。此外,填料琼脂糖凝胶极易压缩,致使吸附柱的放大受到限制^[1]。膜分离技术的出现和快速发展,极大地推动了生物大分子的纯化和分离技术的发展^[2]。膜分离是利用分子量大小进行分离的技术,其特点是表面积大、扩散路径短、操作压降低、处理量大,然而这些特点并不能完全满足生物分子的分离与纯化要求。

亲和膜色谱(Affinity Membrane Chromatography, AMC)是膜分离与亲和色谱技术相结合形成的一种新型分离纯化技术^[3]。AMC利用微孔膜作为配基的载体,在膜内外表面偶联配基,再按吸附、清洗、洗脱、再生的步骤对生物产品进行分离,其在生物纯化方面已获得了亲和色谱无法比拟的优势。(1)亲和膜与传统亲和色谱相比具有“通孔”或“对流孔”,则只受表面液膜扩散及吸附动力学的影响,消除了孔扩散这一速度控制过程,从而可在较低的操作压力和较高的流速下对目标生物组分进行快速的分离和纯化^[4];(2)由于在亲和膜柱床上的配基和液流之间的扩散路径极短,传质效率很高,可更有效的利用配基,缩短分离时间;(3)由于分离纯化时间的缩短,减少了生物大分子变性失活的比例;(4)膜床的厚度一般较小,液流通过膜时的阻力也小,因此压力降也较小,一般不会超过 0.5 MPa,这就降低了操作设备成本,也便于实现大规

膜分离和连续自动操作^[5]。

近几十年来 AMC 的出现和投入使用使它在生物产品纯化分离技术中占有越来越重要的地位，目前利用亲和膜已能纯化和制取白蛋白、单克隆抗体、干扰素、纤维蛋白、葡聚糖、胰蛋白酶及其抑制剂等医药制品^[6]。

1.1.1 亲和膜分离原理

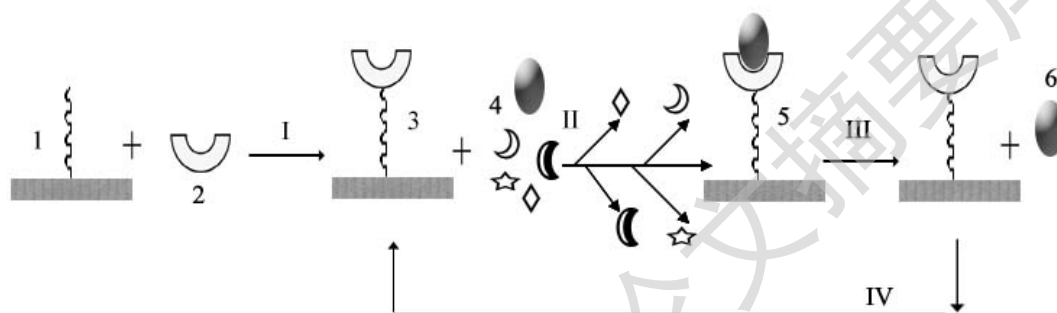


图 1-1 亲和膜吸附分离过程示意图^[3]: 1, 基膜; 2, 配基; 3, 亲和膜; 4, 蛋白溶液; 5, 配基与配体相结合; 6, 得到的目标分子, 过程: I 配基固载, II 吸附与清洗, III 洗脱, IV 膜再生。

Fig. 1-1 Process of affinity membrane separation^[3]: 1, Membrane matrix; 2, ligand; 3, affinity membrane; 4, mixture solution; 5, ligand-ligand complex; 6, target molecular Process: I, immobilization; II, adsorption and washing; III, eluting; IV, regeneration.

亲和膜分离原理与亲和色谱基本相同，主要是基于欲分离物质和键合在膜上的亲和配基之间的特异性相互作用，整个亲和分离过程如图 1-1 所示^[3]。先将膜进行活化，使其能与间隔臂分子产生化学结合，生成带有间隔臂的膜 1。再用适当的化学试剂使带间隔臂的膜与具有生物特异性的亲和配基 2 共价结合，生成带有配位基的亲和膜 3。当含多种组分的生物大分子混合物 4 通过亲和膜时，混合物中与亲和配基具有特异性相互作用的物质便会与膜上的配位基产生相互作用，生成络合物 5，并被吸附在膜上。其余没有特异性相互作用的物质则通过膜被排阻出去。然后再选用一种也能与膜上亲和配基产生相互作用

的试剂通过膜或调节体系的理化特性，使原来在膜上形成的络合物解离，并被洗脱下来，得到纯化好的产物 6，膜上亲和配基则被顶替试剂分子所占有。再选用一种洗涤试剂，对被顶替试剂分子所占有的亲和膜进行清洗，使顶替试剂分子从膜上洗脱下来，从而使膜获得再生，以便下次使用。

1.1.2 亲和膜的制备

亲和膜的制备是亲和分离的关键，其过程主要分为四步：成膜、功能化、活化、配基的固载等。功能化是指通过引入活性基团使膜材料或膜改性。活化则是使引入的基团活性增强，便于与配基偶合。

1.1.2.1 膜基质材料

要使 AMC 得以发展和获得应用，首先要合成和制备出能对生物活性物质，如酶、蛋白质等，能有效进行固载的基质材料，理想的膜基材应具有以下的特性^[7-9]：（1）良好的成膜性，可制备出孔径均匀、通透性好的膜；（2）优良的化学反应性能，含羟基、氨基、羧基等可反应基团，或采用化学改性方法将其它官能团转化为上述可利用基团，以便在膜上共价键合配基；（3）对生物活性物质相容性好，不引起失活、变性，以获得高回收率和所希望的产物；（4）非特异性吸附低；（5）良好的化学稳定性，耐酸、碱、盐、有机溶剂；（6）机械强度好，可在搅拌及压力作用下操作；（7）耐生物性，能有效抵御微生物的感染，且易消毒。

目前，膜基质材料的获得主要是通过直接对材料进行加工制膜和在成膜后进行化学改性两种方式。膜材料可分为有机高分子材料 and 无机材料两大类。

有机高分子材料按来源可分为天然高分子及其改性衍生物类材料与人工合成高分子材料^[10,11]。天然高分子材料主要包括纤维素、多糖及其衍生物等。这类材料一般都具有良好的生物相容性和亲水性，并且含有大量的活性基团，是良好的亲和膜基质材料，但这类材料往往难于成膜，并且其强度和材料的物理结构差，因此其应用受到限制^[12,13]。人工合成高聚物材料中应用较多的主要有尼龙和聚砜，尼龙微孔滤膜机械性能良好，孔径分布窄，但端氨基少，而且由于疏水性和混合离子结合位点作用使得非特异性吸附严重^[14]；此外还有聚丙

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库