

液相芯片中功能性聚苯乙烯微球的合成及鉴定

许艳军, 王春明, 龙 瑶, 潘建波, 颜晓梅*

(厦门大学 化学化工学院, 化学生物学福建省重点实验室, 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用分散聚合法合成了粒径可控、单分散的聚苯乙烯微球, 考察了单体苯乙烯和引发剂偶氮二异丁腈的浓度以及稳定剂聚乙烯基吡咯烷酮的分子量对微球粒径的影响. 采用后修饰法对合成的空白微球进行表面羧基功能性修饰, 耦联单克隆抗体的免疫测试结果表明微球表面结合探针分子的能力达到国际同类产品水准.

关键词: 功能性聚苯乙烯微球; 液相芯片; 微球免疫

中图分类号: O 631

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)06-0836-04

液相芯片技术也称流式微珠阵列技术, 是将溶液中可溶性的待测物质通过生物分子之间的特异性亲和反应结合在类似细胞大小的微球上, 利用流式细胞仪对微量样本中的多元待测组分进行快速定量分析的超强检测技术^[1]. 液相芯片具有重现性好、灵敏度高、线性范围宽、检测迅速、通量大等许多优点, 正在成为科研及临床的重要检测平台^[2-4]. 光学编码的功能性聚苯乙烯微球是液相芯片的载体, 探针分子可以通过吸附或共价结合的方式固定在微球的表面. 功能性微球可分为醛基微球、氨基微球、羧基微球、羟基微球等. 液相芯片中羧基微球应用最为广泛, 因为羧基与探针可通过交联剂共价结合, 耦联技术成熟可靠, 操作简单, 交联剂的毒性较小^[5]. 目前, 国内使用的相应产品全部依赖进口^[6], 检测成本的上升限制了液相芯片技术的推广应用, 因此有必要发展羧基功能性聚苯乙烯微球的制备技术.

聚苯乙烯微球的合成方法主要有乳液聚合法^[7], 分散聚合法^[8]和种子聚合法^[9]等. 乳液聚合法合成的微球为亚微米级; 分散聚合法和种子聚合法合成的微球均为微米级, 种子聚合法的反应周期较长, 操作步骤繁琐. 在微球表面共价修饰羧基的传统方法为分散共聚合法^[10], 虽然可以合成表面具有一定羧基密度的聚合物微球, 但是由于微球表面羧基密度随共聚单体浓度增加而增大, 而当单体浓度增大到一定程度时, 微球单分散性下降^[11]. 2006 年有研究人员提出采用二步聚

合法(Two-step polymerization)合成羧基功能性微球^[12], 该方法在第一阶段将引发剂、分散稳定剂、单体在乙醇中混合反应, 1 h 后(第二阶段)加入功能单体, 与第一阶段等量的单体及乙醇继续反应. 这样可以减少外界条件以及试剂配比变化对成核过程的影响. 本文采用后修饰方法对分散聚合法合成的空白微球进行羧基功能性修饰^[13], 耦联单克隆抗体的免疫测试结果表明微球表面结合探针分子的能力达到国际同类产品水准.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

苯乙烯购自广东汕头西陇化工厂, 以 0.1 mol/L NaOH 溶液洗去阻聚剂, 去离子水洗至中性, 加入无水硫酸钠干燥后低温保存. 无水乙醇(Ethanol), 偶氮二异丁腈(AIBN), 甲基丙烯酸(MAA), 甲醇(Methanol), 过硫酸钾(K₂S₂O₈), 十二烷基磺酸钠(SDS), 十一烯酸(Undecylenic acid)购自国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯. 聚乙烯基吡咯烷酮(PVP, K-30, 国药集团化学试剂有限公司; K-360, 北京楚和霞光生物技术发展中心; K-106, Polysciences Inc.), 二乙烯基苯(DVB, Fluka), 氢氧化钠(NaOH, 厦门试剂厂)均为分析纯. N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC), 藻红蛋白标记的山羊抗小鼠抗体(PE-GAM)购自美国 Pierce 公司. SpherotechTM 5.28 μm 羧基微球购自美国 Spherotech 公司. 戊肝单克隆抗体(HEV IgG)由国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心友情提供. 活化缓冲溶液(10 mmol/L 醋酸钠溶液, pH 5.0); 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4); 封闭缓冲溶液(1% 牛血清蛋白和 0.05% 叠氮化钠溶解于磷酸盐缓冲溶液中, pH 7.4); 清洗缓冲溶液

收稿日期: 2008-05-09

基金项目: 国家基础科学人才培养基金(J0630429), 2007 年度教育部新世纪优秀人才支持计划, 教育部留学回国人员科研启动基金, 2006 年度福建省新世纪优秀人才支持计划资助

* 通讯作者: xmyan@xmu.edu.cn

(0.05% Tween 20 溶解于磷酸盐缓冲液中, pH 7.4); 温育缓冲溶液(1% 牛血清蛋白和 0.2% Tween 20 溶解于磷酸盐缓冲溶液中, pH 7.4)。

XL30 环境扫描电镜(荷兰 Philips-FEI 公司); FACS Aria 流式细胞仪(美国 BD 公司); Lumindex 200 液相芯片仪(美国 Lumindex 公司); RCT basic 磁力搅拌器(IKA); JJ1 精密增力搅拌器(常州国华仪器厂)。

1.2 实验过程

1.2.1 微球合成及表征

向 14 mL 苯乙烯中加入 0.125 g 引发剂 AIBN, 0.375 g 稳定剂 PVP, 125 μ L 助稳定剂 MAA, 以乙醇为分散介质, 将所有试剂加入三颈瓶中搅拌混合均匀。保持一定搅拌速度, 在 70 $^{\circ}$ C 油浴中反应 24 h。聚合反应结束后, 待聚合反应产物静置分层, 弃去上层清液。聚合物分别醇洗、水洗 3 次, 洗涤后保存于去离子水中。表征时移取适量的微球, 滴于硅片上。抽真空后在 60 mA 电流下喷金 45 s, 在环境扫描电子显微镜上观察并拍照记录; 另取适量微球稀释后在流式细胞仪上测试微球粒径的变异系数。

1.2.2 微球表面羧基功能性修饰及表征(后修饰法)

准确称取 1.0 g 自制的经真空干燥微球, 25 mg SDS, 250 mg 过硫酸钾均匀分散在 40 mL 去离子水中; 980 μ L 十一烯酸溶解在 4 mL 甲醇中, 加入 20 μ L 交联剂 DVB 混合均匀, 移取 248 μ L 十一烯酸溶液至聚苯乙烯微球的悬浊液中, 于 70 $^{\circ}$ C 搅拌反应 7.5 h; 反应结束醇洗、水洗各 3 次, 保存于去离子水中或 24 h 真空干燥后保存。

1.2.3 功能性微球的免疫测试

取 5×10^6 个羧基化微球分散在活化缓冲溶液中, 经 EDC 和 NHS 活化后加入 HEV IgG 抗体进行偶联, 反应结束以清洗缓冲溶液洗涤数次, 加入封闭缓冲溶液在 4 $^{\circ}$ C 下保存。取 2 μ L 耦联有 HEV IgG 抗体的微球, 加入藻红蛋白标记的山羊抗小鼠抗体, 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 30 min, 以清洗缓冲溶液洗涤后加入磷酸盐缓冲溶液混合均匀, 用 Lumindex 200 液相芯片仪检测微球上的荧光信号^[14]。

2 结果与讨论

2.1 试剂比对对合成微球粒径及均匀性的影响

分别考察了单体苯乙烯、分散稳定剂 PVP 和引发剂 AIBN 的比对对微球粒径的影响。在保持其他试剂的用量不变的情况下, 首先对单体的用量进行了微调。实验结果表明, 随着单体用量的增加, 微球粒径逐渐增

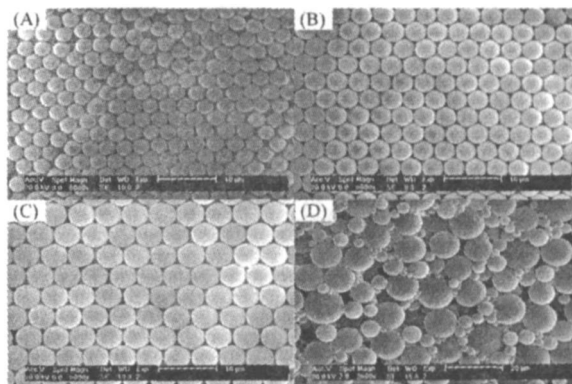


图 1 单体浓度对微球粒径影响电镜图

Fig. 1 SEM Images of polymer particles at different volume of styrene

Volume of styrene: (A) 14.0 mL; (B) 14.5 mL; (C) 15.0 mL; (D) 15.5 mL

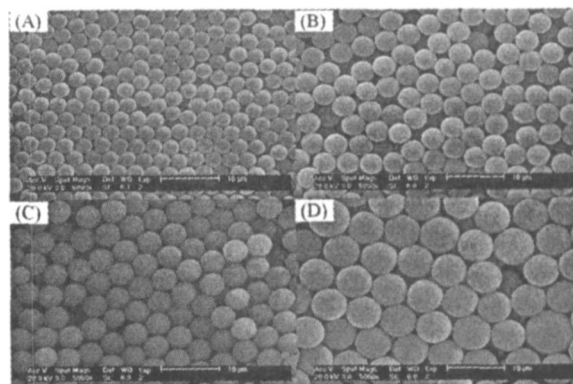


图 2 AIBN 质量对微球粒径影响电镜图

Fig. 2 SEM Images of polymer particles at different mass of AIBN

Mass of AIBN: (A) 0.10 g; (B) 0.15 g; (C) 0.20 g; (D) 0.25 g

大。由图 1 可见, 当苯乙烯的体积由 14.0 mL 增加至 15.0 mL 时, 微球的粒径由 2.8 μ m 增加至 4.6 μ m (图 1(A)、(B)、(C)), 且微球均匀性良好。在流式细胞仪上测试微球的前向角散射光, 微球粒径的变异系数均在 5% 左右。然而, 如果继续增加单体的用量至 15.5 mL 时, 微球粒径分布变宽, 均匀性变差, 小粒径的微球开始出现(图 1(D))。这主要是因为当分散稳定剂的用量一定时, 聚合反应体系中的成核数目也被确定, 随着单体用量的增加, 每个核上分配的单体的量相应增加, 引起微球粒径增大; 然而如果过度加大单体的用量, 分散稳定剂的保护作用减弱, 使得一些微球处于不稳定状态, 微球相互粘结, 进而形成了粒径较大但不均匀的微球^[15]。

将苯乙烯单体的体积固定为 14.0 mL, 对引发剂 AIBN 用量对微球粒径的影响进行了考察。当引发剂

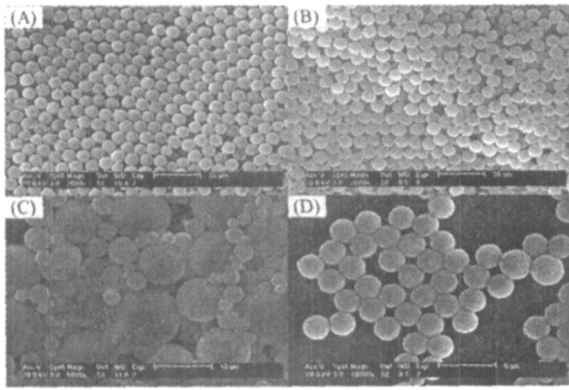


图 3 不同的制备功能性微球方法的比较电镜图

Fig.3 SEM Images of Carboxylic particles synthesized by different methods

(A) Before being functionalized; (B) After being functionalized; (C) Dispersion polymerization; (D) Two-step polymerization.

的质量由 0.10 g 增加至 0.20 g 时,微球粒径由 3.1 μm 增大至 4.7 μm (图 2(A)、(B)、(C)),当 AIBN 质量继续增加至 0.25 g 时,微球粒径增大至 6.2 μm ,分布稍微变宽,但是总体比较均匀(图 2(D)),微球粒径的变异系数均在 5% 左右.这是由于引发剂用量增加有利于在反应初期形成较多的活性链,较多的活性链相互缠绕有利于形成较大粒径的微球.考察了 PVP 分子量对微球粒径影响,结果表明 PVP 分子量越大,微球粒径越小,同样浓度不同分子量的 PVP 对微球均匀性的影响不大.为了合成较大粒径微球,选用分子量为 K-30 的 PVP.

2.2 微球表面羧基修饰方法的比较

分别考察了后修饰法、分散共聚合法及二步合法制备出的羧基功能性微球的性状.电镜扫描结果表明采用后修饰法对分散聚合制备出的空白微球表面进行羧基功能性修饰,聚苯乙烯微球的粒径及单分散性均未发生明显变化(图 3(A)、(B)).单抗耦联实验表明羧基修饰后的微球其结合探针分子的能力大幅度提高.采用分散共聚法合成微球,当功能单体甲基丙烯酸的用量低于单体苯乙烯的 2.5% 时,虽然微球的单分散性可以得到保证,但是微球耦联单抗的能力较弱.如果继续增大甲基丙烯酸的质量分数,微球粒径分布变宽,有小粒径的微球出现(图 3(C)),说明分散共聚法无法兼顾微球的单分散性和较高的羧基密度.二步聚合法合成的功能化微球的粒径较小,且合成的微球之间有粘连(图 3(D)).上述实验结果表明,分散聚合法合成空白微球之后进行羧基后修饰是确保羧基功能性聚苯乙烯微球粒径可控、单分散性好的最佳手段.

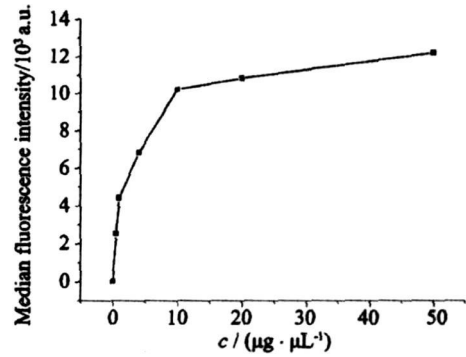


图 4 GAM-PE 浓度与微球荧光强度的关系曲线

Fig.4 PE-GAM concentration effect on the median fluorescence intensity

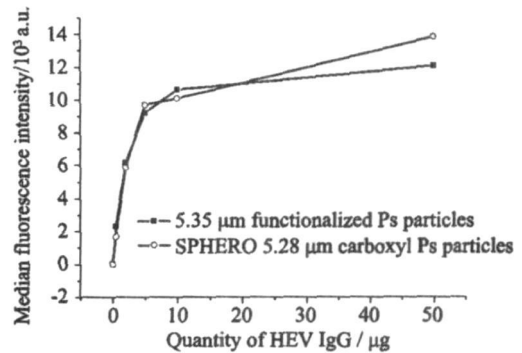


图 5 抗体的加入质量与表面荧光强度关系曲线

Fig.5 HEV IgG quantity effect on the median fluorescence intensity

2.3 羧基功能性微球的探针分子结合能力鉴定

在液相芯片体系中,微球表面可耦联的捕获探针越多,能够结合至微球上的样本中待测分析物的量越多,微球的荧光信号越强,因此羧基微球表面耦联探针的能力在某种程度上决定了检测的灵敏度.通过在羧基微球上共价耦联单克隆抗体,与溶液中藻红蛋白标记的山羊抗小鼠二抗(PE-GAM)反应,来测试实验室自制微球的探针结合能力,并与国外商品化的微球进行比较.在 Luminex 200 液相芯片仪上,每一份样品对 1000 个微球进行统计,记录微球的中值荧光强度(Median fluorescence Intensity).首先考察了 PE-GAM 浓度对于微球荧光信号的影响.图 4 为 GAM-PE 浓度与微球荧光强度的关系曲线.体系中使用的微球是耦联反应时加入了 50 μg HEV IgG 的 SpheroTM 5.28 μm 羧基微球(微球表面的 IgG 已经饱和).从图中可以看出当 PE-GAM 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,微球表面 IgG 可结合的 PE-GAM 已经基本饱和,PE-GAM 的浓度确定为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.图 5 比较了本实验室自制的微球与商品微球(SpheroTM 5.28 μm 羧基微球)的

HEV IgG 耦联效率.从图中看出,随着单克隆抗体质量的增加,微球上的荧光信号逐渐增大,大约在用量为 10 μg 时达到饱和,且自制羧基微球与商品微球所得到的测试结果基本一致,说明自制微球结合探针的性能达到了国外同类商品的水准.

3 结 论

采用分散聚合方法合成了粒径可控、单分散的聚苯乙烯微球,微球的粒径可以在 2.0~7.0 μm 范围内调节;采用后修饰法对空白微球进行表面羧基化功能性修饰,羧基密度较高,且微球的粒径和单分散性不受影响.单克隆抗体耦联的实验结果表明实验室自制的羧基功能性微球其探针的结合能力已经达到国外同类产品水准,能够满足液相芯片体系的实验需求.

参考文献:

[1] Nolan J P, Sklar L A. Suspension array technology: evolution of the flat array paradigm [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20: 9-12.

[2] 王蕾, 吴英松, 李明. 液相芯片分析技术及其应用简介 [J]. 热带医学杂志, 2005, 5(4): 562-564.

[3] 王建中. 最新流式细胞分析技术在实验诊断中的应用 [J]. 诊断学理论与实践, 2004, 3(5): 310-312.

[4] 杨洋, 汤华. 液相芯片技术在检验医学和生物学中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(4): 256-261.

[5] 吴道澄, 刘有初, 赵小宁, 等. 含氮功能基高分子胶乳的研制及其在多种疾病快速诊断中的应用 [J]. 生物医学工程杂志, 1999, 16(1): 1-4.

[6] 吴盛海, 于道军. 悬浮芯片技术及其在病原微生物检测中的应用 [J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2007, 34(6):

418-420.

[7] Tuncel A, Tuncel M, Ergun B, et al. Carboxyl carrying large uniform latex particles [J]. Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002, 197: 79-94.

[8] Menshikova A Y, Evseeva T G, Skurkis Y O, et al. Monodisperse carboxylated polystyrene particles: synthesis, electrokinetic and adsorptive properties [J]. Polymer, 2005, 46(4): 1417-1425.

[9] Hoshino F, Fujimoto T, Kawaguchi H, et al. N-substituted acrylamide styrene copolymer latexes, II. Polymerization behavior and thermosensitive stability of latexes [J]. Polym J, 1987, 19(2): 241-247.

[10] Tseng C M, Lu Y Y, EFAasser M S, et al. Uniform polymer by dispersion polymerization in alcohol [J]. J Polym Sci, Part A: Polymer Chemistry, 1986, 24(11): 2995-3007.

[11] 张洪涛, 吕睿, 陈敏. 分散共聚合制备 PS-r-AA-EGDMA 功能性单分散微米级交联微球的研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(2): 366-371.

[12] Song J S, Chagal L, Winnik M A. Monodisperse micrometer size carboxyl functionalized polystyrene particles obtained by two stage dispersion polymerization [J]. Macromolecules, 2006, 39: 5729-5737.

[13] Wang Chao Huei, Shah J, et al. Process to make magnetically responsive fluorescent polymer particles: USA, 5283079[P]. 1994-02-01.

[14] Yan X M, Zhong W W, Tang A J, et al. Multiplexed flow cytometric immunoassay for influenza virus detection and differentiation [J]. Anal Chem, 2005, 77: 7673-7678.

[15] 张凯, 雷毅, 王宇光, 等. 微米级单分散共聚物微球的制备 [J]. 高分子学报, 2002, 15: 189-193.

Synthesis and Application of Carboxyl Functionalized Polystyrene Microspheres

XU Yan jun, WANG Chun ming, LONG Yao, PAN Jiar bo, YAN Xiaomei*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Key Laboratory of Analytical Sciences of the Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Microsphere based assay is a powerful platform to carry out biological detection. The carboxyl functionalized, micro-sized polystyrene microsphere is important carrier in the microsphere based assay. Monodispersed polystyrene particles with the size range of 2.0 μm to 7.0 μm were synthesized by dispersion polymerization. The surface of microspheres was carboxyl functionalized by post modification. It is demonstrated that the functionalized polystyrene microsphere can be well coupled with monoclonal antibodies with comparable performance achieved as that of commercial carboxyl polystyrene microspheres (Spherotech Inc.).

Key words: functionalized polystyrene particles; suspension array; microsphere based immunoassay