

文章编号 1006-8147(2014)06-0441-04

论 著

聚乙烯基萘纳米微球制备及在胶乳增强免疫比浊法检测中的应用

程 帅¹, 赵淑荣², 崔鹏飞¹, 王冬梅¹, 徐 亮¹, 杨志民¹

(1. 天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070; 2. 巴彦淖尔市医院护理部, 巴彦淖尔 015100)

摘要 目的: 采用乳液聚合法制备聚乙烯基萘(PVN)纳米微球, 将其用作 β_2 微球蛋白(β_2 -M)胶乳增强免疫比浊(LETIA)检测试剂的新型载体。方法: 以乙烯基萘(VN)为聚合单体, 十二烷基硫酸钠(SDS)为乳化剂, 碳酸盐缓冲液为水相, 制备PVN纳米微球, 并对微球的理化性能进行表征。以物理吸附的方式分别将 β_2 -M的抗体连接到PVN及聚苯乙烯微球表面, 制备得到用于 β_2 -M检测的两种LETIA试剂, 并在生化分析仪上对试剂的性能进行评价。结果: 制备的PVN纳米微球具有均一的粒径分布。利用自制的以PVN纳米微球为载体的LETIA免疫检测试剂在一定范围内有较好线性, 同时与自制的以同等粒径PS纳米微球为载体的LETIA检测试剂相比具有更高灵敏度。结论: PVN纳米微球作为LETIA检测试剂的载体具有很好应用前景。

关键词 聚乙烯基萘纳米微球; 胶乳增强免疫比浊法; β_2 微球蛋白; 物理吸附

中图分类号 R914+R446

文献标志码 A

Preparation of polyvinyl naphthalene nanoparticles and its application in LETIA

CHENG Shuai¹, ZHAO Shu-rong², CUI Peng-fei¹, WANG Dong-mei¹, XU Liang¹, YANG Zhi-min¹

(1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin 300070, China; 2. Department of Nursing, Bayan'nao'er Hospital, Bayan'nao'er 015100, China)

Abstract **Objective:** To prepare polyvinyl naphthalene (PVN) nanospheres and apply it in latex-enhanced turbidimetric immunoassay (LETIA) of beta 2 microglobulin (β_2 -M). **Methods:** PVN nanospheres were prepared by emulsion polymerization. Vinyl naphthalene, sodium dodecyl sulfate and carbonate buffer were applied as polymerizable monomer, emulsifier and aqueous phase, respectively. The physicochemical properties of PVN nanoparticles were identified. In addition, the anti- β_2 -M antibodies were immobilized on the surface of the PVN and polystyrene (PS) nanoparticles by physical absorption. The reagents were then evaluated by a biochemical analyzer. **Results:** The PVN nanoparticles were in identical size distribution. Compared with the LETIA reagent prepared with PS nanoparticles, the LETIA reagent with self-manufactured PVN nanoparticles manifested broader linear range and higher sensitivity. **Conclusion:** PVN nanoparticles can function efficiently as novel carriers of LETIA reagent.

Key words polyvinyl naphthalene nanoparticles; latex-enhanced turbidimetric immunoassay; β_2 -macroglobulin; physical absorbance

胶乳增强免疫比浊法(LETIA)是通过物理吸附或共价键和的方式将抗体或抗原偶联到纳米微球表面, 形成微球-抗体(抗原)复合物。此复合物与样品中抗原(抗体)发生抗体抗原反应, 致使溶液在一定波长(如 600 nm)下的吸光值(A)发生显著变化, 通过测定反应前后 A 值变化可以计算出样品中抗原(抗体)的浓度, 从而达到检测和诊断疾病的目的。迄今, LETIA 在临床中已经得到广泛应用, 涉及肿瘤、风湿、肝功能、肾功能等多个领域^[1-4]。LETIA 检测试剂常用载体为聚苯乙烯(PS)纳米微球, 小粒径 PS 微球偶联抗体量大, 可以保证较宽的线性范围, 然而透光率低, 灵敏度较差。较大粒径 PS 微球

可以提高灵敏度, 但偶联抗体量较小, 线性范围也相应较窄。因此, 开发一种以较小粒径微球为基质, 既可保证较大线性范围又可提供较好灵敏度的检测试剂具有重要意义。乙烯基萘(VN)因萘环与碳碳双键共轭, 其在一定波长范围内的吸光值比苯乙烯强。本研究研制了聚乙烯基萘(PVN)纳米微球, 并对其制备条件和影响因素进行了考察和优化; 首次将 PVN 微球用做 LETIA 试剂载体, 研制了适用于 β_2 微球蛋白(β_2 -M)检测的 LETIA 试剂。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 WE-2 水浴恒温振荡器(天津欧诺仪器仪表有限公司); SYC-15B 超级恒温水浴(南京桑力电子设备厂); DelsaTM Nano C 纳米粒度及 zeta 电势分析仪(Beckman Coulter); Nicolet 380 型傅里叶变换红外光谱仪(尼高力公司); XL30 ESEM 环境扫描电子显微镜(荷兰 Phillips); H7180 大型生化

基金项目 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(14JCYB-JC24300)

作者简介 程帅(1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 有机高分子微球的研制; 通信作者: 徐亮, E-mail: xuliang@tjmu.edu.cn。

分析仪、U-3310 spectrophotometer (日立公司); TGL-20M 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

VN(化学纯);SDS(电泳级);KPS、无水碳酸钠,均为分析纯,NaHCO₃(优级纯);免疫球蛋白 G(IgG 99%);考马斯亮兰 100T/96;牛血清白蛋白(BSA 99%),上述试剂均购于联星生物公司。

1.2 PVN 纳米微球的制备 利用乳液聚合法制备 PVN 纳米微球。在 50 mL 锥形瓶中加入一定量的 SDS 和碳酸盐缓冲液(C-buffer),再加入 0.1%KPS 溶液,然后加入 VN 单体,通氮气 10 min,密封,振摇乳化 10 min。在 80 ℃水浴摇床中以 120 r/min 的转速振摇反应 10 h,即可得到 PVN 纳米微球。将制备的微球使用透析袋以蒸馏水为透析液透析净制后,保存于 4 ℃冰箱中,待用。

1.3 PVN 纳米微球的表征方法 用 Delsa™Nano C 纳米粒度及 zeta 电势分析仪测量 PVN 纳米微球的粒径(d)以及粒径分布系数(PDI)。在 Nicolet 380 型傅里叶变换红外光谱仪上采用溴化钾(KBr)压片的方法制样并测定纳米微球及微球-抗体复合物的红外光谱图。用 XL30 ESEM 环境扫描电子显微镜观察纳米微球表面形貌。用 U-3310 spectrophotometer 分光光度计在特定波长下测量 PVN 纳米微球吸光度(A)并与同等粒径的 PS 的 A 对比。

1.4 β 2-M LETIA 检测试剂的制备 分别取 PVN 纳米微球和 PS 纳米微球适量,各加入等量 β 2-M 抗体,在 37 ℃恒温水浴中反应 3 h。采用切向流过滤除去反应后剩余 β 2-M 抗体,收集滤过液,用于定量微球上吸附的抗体量。洗净后的微球加 BSA 封闭 12 h 后,即可得到反应溶液 R2。配制一定离子强度的反应溶液 R1,此两种反应溶液共同组成 β 2-M LETIA 检测试剂。

1.5 β 2-M LETIA 检测试剂的性能考察 将浓度约为 15 mg/L 的高值标准品用生理盐水等梯度稀释(0、2.5、5、10 mg/L)作为线性标本,以粒径约为 120 nm PS、PVN 微球(PS120、PVN120)和粒径约为 150

nm 的 PS 微球(PS150)作为载体,自制 3 种 β 2-M LETIA 检测试剂,同时对标本中的 β 2-M 进行检测,考察检测试剂的线性范围。

用正常人血清和标准品配制 3 个样品即 S0:正常人血清 500 μ L;S1:正常人血清 450 μ L+50 mg/L 标准品 50 μ L;S2:正常人血清 350 μ L+50 mg/L 标准品 150 μ L。分别将自制的 3 种检测试剂在同一大型生化分析仪上对样本中的 β 2-M 进行检测,并将测试结果进行比对,从而对自制 PVN- β 2-M LETIA 检测试剂的性能进行评估。

2 结果

2.1 PVN 纳米微球的制备及反应条件的优化

2.1.1 缓冲体系对微球制备的影响 采用磷酸盐(PBS)缓冲体系时,聚合体系很不稳定,反应液发生严重聚合,无法制得均匀的球形聚合物。当进一步增加缓冲体系的 pH 值,聚合体系的稳定性显著改善,未发现反应液严重聚合现象。实验结果表明当采用 pH 9.7 的碳酸盐缓冲体系时制备出的 PVN 纳米微球的单分散性最好,其 PDI 值为 0.05 左右,其他 pH 条件制备出的微球 PDI 均大于 0.1。

2.1.2 乳化剂对微球粒径的影响 在 PVN 纳米微球的制备过程中,以不同浓度 SDS 制备 PVN 纳米微球,并测量了反应后 PVN 纳米微球的粒径及 PDI,加入 SDS 的量越多,所形成的 PVN 纳米微球的粒径就越小(表 1)。

表 1 SDS 浓度对 PVN 纳米微球粒径的影响

Tab 1 Effect of the SDS density on the size of polyvinyl naphthalene nanoparticles

SDS 的浓度/%	d/nm	PDI
0.02	568.3	0.250
0.04	198.7	0.039
0.10	86.9	0.032
0.20	65.1	0.057

2.2 PVN 纳米微球理化特性的表征

2.2.1 PVN 纳米微球的形貌 不同粒径的 PVN 微球均具有良好的球形度和单分散性,见图 1。

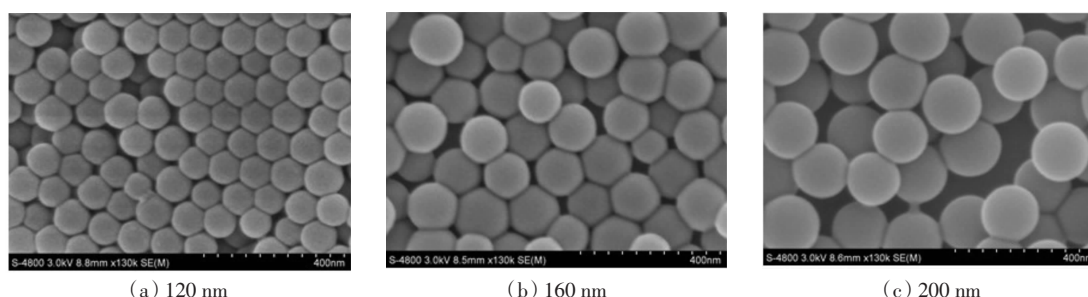


图 1 PVN 纳米微球的 SEM 照片

Fig 1 SEM photographs of polyvinyl naphthalene nanoparticles

2.2.2 主要产物红外光谱 分别测定了 VN、PVN 微球、PVN-IgG(图 2 a)以及 PS 微球、PS-IgG(图 2 b)的红外光谱。从图 2 a 中可以看出,与 VN 的 IR 图谱相比,PVN 的图谱出现了 $2\,920\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,848\text{ cm}^{-1}$ 新的吸收峰,为饱和- CH_2 振动谱带;同时 990 cm^{-1} 吸收峰消失,证明末端烯烃消失。说明单体 VN 发生了聚合反应合成了 PVN。而 PVN- β 2-M 抗体复合物的 IR 图谱中,在 $2\,500\sim 3\,200\text{ cm}^{-1}$ 出现一个强而宽的吸收带,此为- COOH 中的缔合-OH 振动谱带, $1\,631\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收峰为- $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰,说明 PVN 微球表面吸附了 β 2-M-IgG。图 2 b 中,与 PS 的 IR 图谱相比,PS-IgG 图谱中在 $2\,500\sim 3\,200\text{ cm}^{-1}$ 出现的强而宽的吸收峰为- COOH 中的缔合-OH 振动谱带, $1\,627\text{ cm}^{-1}$ 为- $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰,这两个吸收峰的出现说明 PS 微球表面吸附了 β 2-M-IgG。

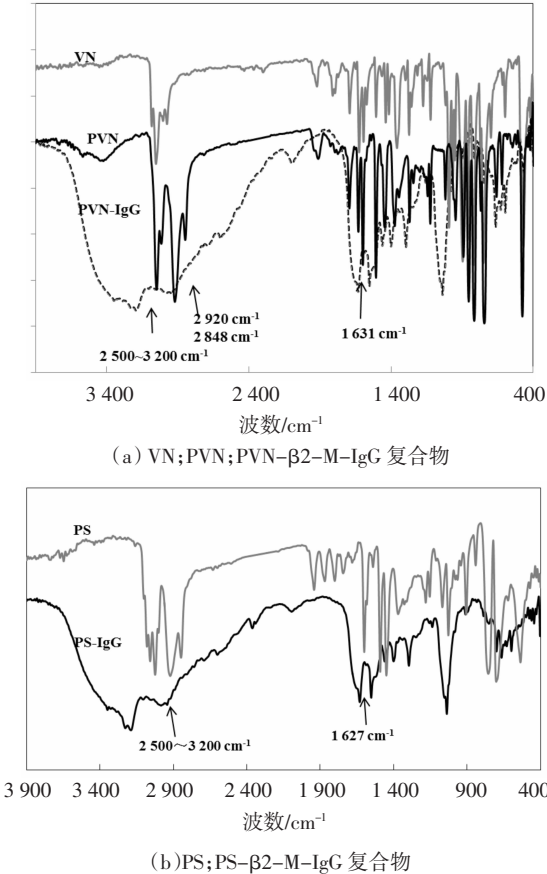


图 2 红外光谱图
Fig 2 Infra-red spectrograms

2.3 β 2-M LETIA 试剂的研制及应用

2.3.1 检测接入 β 2-M 抗体的量 经实验发现,当微球溶液(4.0% latex)中 β 2-M 抗体的浓度为 6 mg/mL 时,微球吸附抗体复合物的 PDI 较小,因此以下研究中采用的抗体加入量为 6 mg/mL latex 。不同微球在物理吸附 β 2-M 抗体后,微球的粒径和 PDI 均

有所增加,证明微球表面已吸附上抗体。同时微球粒径越小吸附的抗体量越大(PS120 的抗体接入量大于 PS150 的抗体接入量)(表 2)。

表 2 PS 和 PVN 吸附抗体的量
Tab 2 Absorption of antibody by PS and PVN

种类	吸附抗体前		吸附抗体后		抗体量/ (mg/mL) ^a
	d/nm	PDI	d/nm	PDI	
PS	121.2	0.054	171.5	0.134	5.224
PS	149.8	0.062	177.8	0.283	3.982
PVN	117.3	0.046	160.3	0.233	4.603

^a 抗体加入总量为: 6 mg/mL (4.0% latex)

2.3.2 标准曲线 在 $0\sim 10\text{ mg/L}$ 的浓度范围内,考察了 PVN- β 2-M LETIA 试剂和 PS- β 2-M LETIA 试剂的检测情况,所得到标准曲线见图 3。

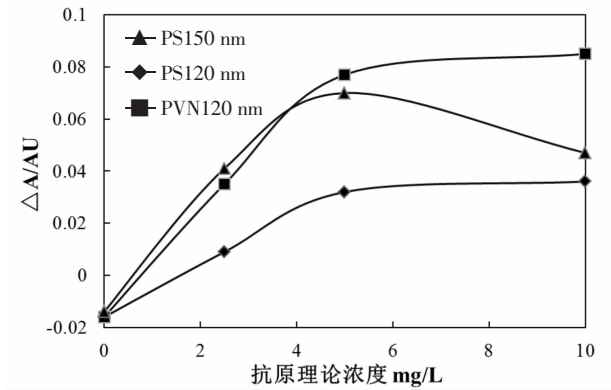


图 3 不同纳米微球所制检测试剂标准曲线
Fig 3 Standard curves of different immunoassay kits

2.3.3 β 2-M LETIA 检测试剂准确度考察 将以上 3 种自制 β 2-M LETIA 检测试剂在同一大型生化分析仪上对 S0、S1 和 S2 样本中的 β 2-M 进行检测,并将测试结果进行比对,结果见表 3。

表 3 自制 β 2-M LETIA 检测试剂准确度考察 (mg/L)
Tab 3 The accuracy of the self- prepared β 2-M LETIA (mg/L)

实际样品 及其回收率	PS(120 nm)- β 2-M LETIA 试剂测量浓度	PVN(120 nm)- β 2-M LETIA 试剂测量浓度	PS(150 nm)- β 2-M LETIA 试剂测量浓度
S0(b0)	1.219	1.179	1.113
S1(b1)	6.047	5.947	5.894
回收率/%	98.970	97.660	97.850
S2(b2)	12.480	12.172	12.081
回收率/%	92.350	90.070	89.740

b0,b1,b2 平均值($n=4$)

3 讨论

3.1 PVN 纳米微球的制备及反应条件的优化 聚合反应中所用的乳化剂为阴离子型乳化剂 SDS。由于离子型乳化剂只有在一定的 pH 值条件下才能起

到有效的乳化作用^[15],因此在 PVN 纳米微球的制备过程中笔者考察了多种 pH 值溶液体系。通过实验结果最终确定 pH 9.7 的 C-buffer 作为反应的缓冲体系。

乳液聚合反应中,SDS 浓度的大小对所制备出的 PVN 纳米微球的粒径具有显著影响。当 SDS 浓度较大时,所生成的胶束数目越多,而其形成的胶束粒径却随之减小,在一定范围可用调节 SDS 浓度的方法来调节乳胶粒的粒度。笔者考察了 SDS 的用量范围为 0.04%~0.2%,所制备的 PVN 微球的粒径范围为 60~200 nm。

3.2 PVN 纳米微球与 PS 纳米微球在特定波长下的紫外吸光度对比 在 600 nm 波长下测得 120 nmPS、PVN 纳米微球的 A 值分别为 0.041、0.043。这说明同等粒径的 PVN 微球在相同波长下比 PS 微球的 A 值大。这是由于与 PS 微球相比,PVN 微球中的萘环具有更大的共轭体系,更强的吸收。因此,在同一波长下,粒径较小的 PVN 微球与粒径较大的 PS 微球具有相近的 A 值。采用粒径较小的 PVN 微球作为 LETIA 检测试剂的载体,将有望扩大检测的线性范围,提高检测灵敏度。

3.3 β 2-M LETIA 试剂的研制及应用 不同微球在物理吸附 β 2-M 抗体后,微球的粒径和 PDI 均有所增加,证明微球表面已吸附上抗体。从表 2 中可知纳米微球粒径越小,比表面积越大,吸附抗体量越多。

从图 3 中可以看到 PS150- β 2-M LETIA 试剂在理论浓度为 0~10.0 mg/L 内不呈线性,而 PVN120- β 2-M LETIA 试剂和 PS120- β 2-M LETIA 试剂在同理论浓度内仍呈线性,说明在检测样本高值时,PVN120- β 2-M LETIA 试剂和 PS120- β 2-M LETIA 试剂检测较准确。

同时,对于相同浓度样品,PVN120- β 2-M LETIA 试剂较 PS120- β 2-M LETIA 试剂的 ΔA 值大,具有较强的检测信号,说明 PVN120- β 2-M LETIA 试剂有更高的灵敏度。笔者认为 PVN- β 2-M LETIA 试剂存在很大的临床应用潜力。

由表 3 得知,在检测低值实际样品时,120 nm 的 PVN 纳米微球试剂和 120 nm、150 nm PS 纳米微球试剂的回收率处于 95%~105%之间,说明检测准确。检测高值实际样品时,120 nm PVN 纳米微球的准确度仍能达到 90%以上,在具有较高的检测灵敏度的同时保持了较好的检测准确度。通过对实际样品的检测结果比较,可知 PVN- β 2-M LETIA 检测试剂具有一定的优势及应用潜力,PVN 用作 LETIA 检测试剂的载体具有一定应用可行性。

本实验利用乳液聚合法,制备了 PVN 纳米微球。制备的 PVN 微球具有很好的单分散性,粒径范围在 60~200 nm。

以 PVN 纳米微球为载体,将 β 2-M 抗体物理吸附包被于微球上,成功制备了 β 2-M LETIA 试剂。在将自制 PVN- β 2-M LETIA 检测试剂和 PS- β 2-M LETIA 检测试剂分别应用于对临床样本的检测时发现,自制 PVN 纳米微球检测试剂具有更好的线性范围及更高的灵敏度。结果表明以 PVN 为载体制备的 β 2-M LETIA 检测试剂具有一定的检测优势及临床应用前景。

参考文献:

- [1] 池继敏,张峰,张静. 不同类型关节炎患者血液及关节液中尿酸、抗链球菌溶血素 O 和类风湿因子含量比较[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(21): 9557
- [2] 黄志伟,沈均南,陈文. 胶乳增强免疫比浊法试剂测定 β 2-微球蛋白的临床使用评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2007, 14(2): 117
- [3] 李新星,杨泽松,罗效梅. 血清及尿液 β 2 微球蛋白检测在糖尿病肾病分期中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24): 3431
- [4] 瓯阳涓. 姜悦. 肾的损伤性诊断[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(8): 877
- [5] Spadaro A, Tortorella V, Morace C, et al. High circulating D-dimers are associated with ascites and hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(10): 1549
- [6] 元春玲. D-二聚体与 CEA、CA15-3 在乳腺癌新辅助化疗中的临床检测分析[J]. 社区医学杂志, 2013, 11(18): 20
- [7] 张利亚,李岩,汤继宏. 多发性抽动症患儿血清抗 DNA 酶 B 抗体、抗链球菌溶血素 O 和 C 反应蛋白的测定及其临床意义[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2010, 30(2): 438
- [8] 吴劲松. 胶乳增强免疫透射比浊法测定 CRP 的方法学评价[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(6): 686
- [9] Le Bricon T, Thervet E, Froissart M, et al. Plasma cystatin C is superior to 24-h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation[J]. Clin Chem, 2000, 46(8 Pt 1): 1206
- [10] 王定保,秦娜. 两种液相免疫比浊法测定胱抑素 C 的试剂性能平行比对[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(14): 2888
- [11] 陈建文,张凡,刘玉侠,等. 胶乳增强免疫比浊法测定血清肌钙蛋白 I 的实验探讨[J]. 中华全科医学, 2013, 11(11): 1777
- [12] 林天浩,莫恒勤. 免疫比浊法检测糖化血红蛋白的性能评价[J]. 现代医院, 2013, 13(11): 60
- [13] 吴宁梅. 胶乳增强免疫比浊法测定血清 IgE[J]. 中国当代医药, 2010, 17(17): 84
- [14] 邱志琦,温少磊,谭智毅. 胃蛋白酶原 I、II 及其比值在胃癌筛查中的应用[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(14): 1806
- [15] 曹同玉,刘庆普,胡金生. 聚合物乳液合成原理性能及应用[M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2007: 120-120

(2014-04-21 收稿)