

光化学制备用于链亲和素固定的胺基磁性纳米凝胶的研究

宫培军^{1,3} 洪军^{1,3} 刘兴奋^{1,3} 余家会² 樊春海¹ 董黎^{1,3} 姚思德¹

¹ (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

² (华东师范大学信息学院生物工程材料与器件研究所 上海 200062)

³ (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 本工作提出制备胺基磁性纳米凝胶的一种改进方法。在含有烯丙基胺的 Fe_3O_4 水分散液中,运用紫外光辐照引发烯丙基胺原位聚合,一步法制备了聚烯丙基胺磁性纳米凝胶 (Polyallylamine magnetic nanogels, PAA-MNGs)。透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 和光子相关光谱 (Photo correlation spectroscopy, PCS) 表征了 PAA-MNG 的形貌和粒径分布;热重分析 (Thermogravimetric analysis, TGA) 确定了磁性成分的含量,振动样品磁强计 (Vibrating sample magnetometer, VSM) 测试表明其呈现超顺磁性。利用表面的伯胺基, PAA-MNGs 可以方便地偶联蛋白等生物大分子。链亲和素 (Streptavidin, SA) 经 1-乙基 3-(3-二甲氨基) 碳化二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺活化后可以共价固定在 PAA-MNGs 上,得到链亲和素包覆的纳米磁球 (Streptavidin-coated magnetic nanoparticles, SA-MNPs)。使用探针生物素对硝基苯酯 (Biotin p-nitrophenyl ester, BNPE) 通过光谱检测证实了 SA-MNPs 的生物素结合能力。表明 PAA-MNGs 适合于作为载体偶联蛋白等生物大分子,并可能用于生物技术领域的诸多方面。

关键词 聚烯丙基胺, 磁性纳米凝胶, 紫外辐照, 链亲和素

中图分类号 O644.14, O631.3⁺2, O614.81⁺1

近年来高选择性磁分离技术广泛被研究并用于生物技术、生物医学诊断及环境分析等领域。这一技术系将某亲和试剂固定于事先制成的磁珠表面,用于分离与富集生物大分子、微组织以及细胞等^[1-5]。该亲和试剂与被分离物质能特异性结合,所以该方法具有很高的选择性。例如,利用抗体为媒介分离细胞是磁珠最为广泛的实际应用之一^[3,6]。亲和素/链亲和素对生物素的结合作用,在自然界中蛋白与配体已知相互作用中最强 (解离常数 $K_D \sim 10^{-15}$ mol/L)。因此亲和素/链亲和素-生物素体系成为一种生物技术中普遍应用的工具,如酶联免疫分析。Hultman 等^[7]在磁珠表面的聚合物上固定链亲和素 (Streptavidin, SA),然后结合寡聚核苷酸用以聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 和直接固相 DNA 测序。Ashtari 等^[8]在胺基改性的磁球表面偶联 SA,结合上单链 DNA 后,实现了对特定靶 DNA 的高效回收。

基于上述的应用,作为载体的磁珠的制备和相

关研究备受关注。已有多种方法可制备合适的磁珠,如包埋法、乳液聚合法、辐射聚合等^[9-11]。然而,这些磁珠的比表面积小、粒径分布较宽,也可能含有未能完全去除的添加剂,使其在某些生物技术领域的应用受到限制。我们曾提出紫外光辐照法制备纳米磁珠,将 Fe_3O_4 纳米粒子分散在单体和交联剂的水溶液中,运用紫外光引发单体和交联剂原位聚合,可制备表面带有不同官能团、壳层具有很大溶胀性且粒径分布窄的超顺磁性纳米凝胶^[12,13]。此方法仅涉及单体和交联剂,无须化学引发剂和添加剂,反应后经简单的磁分离和洗涤即可获得纯净的磁性纳米凝胶。以丙烯酰胺为原料制备的聚丙烯酰胺磁性凝胶经 Hofmann 降解,使其表面获得伯胺基官能团,可载放射性药物后实现小动物体内的磁靶向^[14]。然而,这种胺基磁性纳米凝胶的制备步骤多、耗时长,成本高且不利于环保。

本工作提出一种改进的路线制备胺基官能化的磁性纳米凝胶,即以烯丙基胺为单体,紫外光辐照

上海市科委纳米专项基金 (0452nm068) 资助

第一作者: 宫培军,男,1978年11月出生,2003年于内蒙古大学获硕士学位,现为中科院上海应用物理研究所在读博士生,从事磁性纳米材料的表面修饰及在生物方面的应用研究

通讯联系人: 姚思德

收稿日期: 初稿 2006-08-31, 修回 2006-09-26

一步法制备聚烯丙基胺磁性纳米凝胶 (Polyallylamine magnetic nanogels, PAA-MNG), 用热重分析、透射电子显微镜、光子相关光谱和振动样品磁强计等手段表征了其化学构成、形貌和粒径分布、表面电位和磁学性质。以 1-乙基 3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimid, NHS) 作为活化偶联剂, 将 SA 固定在 PAA-MNG 表面, 得到链亲和素包覆的纳米磁球 (Streptavidin-coated magnetic nanoparticles, SA-MNPs), 并检测了其生物素结合能力。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

链亲和素 (SA, 分子量 66 kDa) 购自 Promega 公司, 生物素对硝基苯酯 (Biotin p-nitrophenyl ester, BNPE) 购自 Sigma 公司。其余所用试剂均为国产商品试剂, 分析纯级。单体烯丙基胺 (Allaylamine, AA) 在氮气氛下减压蒸馏后使用, 交联剂 N, N-亚甲基双丙稀酰胺 (N, N'-methylene-bis-(acrylamide), MBA) 重结晶后使用。亲水性 Fe_3O_4 磁流体的制备采用还原共沉淀的方法^[13], TEM 测量表明, 它们的平均粒径为 $(8\pm1)\text{nm}$ 。实验过程使用双蒸水, 磁性纳米凝胶的制备过程在纯 N_2 (99.99%) 气氛下完成。实验过程所用的缓冲液包括 PBS (pH 5.8, 10mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4), 洗液 A (pH 7.4, 75mmol/L NaCl, 15mmol/L 柠檬酸钠), 洗液 TTL (pH 8.0, 100mmol/L Tris-HCl, 0.1% Tween 20 和 1mol/L LiCl) 和杂交液 (pH 7.4, 750mmol/L NaCl, 150mmol/L 柠檬酸钠) 均按标准配制。

紫外光源装置自制, 使用两支 8W 低压汞灯 (单一波长: 254nm), 装置示意图可参见文献^[13]。

1.2 PAA-MNGs 的制备

溶液的用水超声 1min 后使用。向柱状三口石英烧瓶中加入含有 50 μL AA 和 5mg MBA 的 58mL 双蒸水, 快速搅拌下通 N_2 除氧 30min, 加入超声 1min 的 Fe_3O_4 磁流体 2mL (固含量为 7.3mg), 分散均匀后搅拌下紫外光辐照。辐照 3min 后滴加含有 550 μL AA 的水溶液 10mL, 用时 8min, 继续辐照 2min 后停止反应。所得液体作磁分离, 洗涤数次后加 5mL 三蒸水超声重新分散, 得到纯净的 PAA-MNGs 磁性纳米凝胶。

1.3 表征

PHILIPS CM120 型透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 用于观测磁性凝胶的形貌, 将 5 μL 稀释样品滴于铜网, 液 N_2 温度下冷冻真空干燥; 由多张 TEM 照片测定 150 颗磁球的粒径, 用直方图统计得出干态粒子的粒径分布; 用 Maerween 公司 Zetasizer NanoZS 型激光粒度分析仪的光子相关光谱分析 (Photo correlation spectroscopy, PCS) 测定磁球在水中的平均水合粒径及粒径分布。用 ZSCH STA 409 型热重分析仪 (Thermogravimetric analysis, TGA, 上海天平仪器厂) 测试磁含量; 用 Princeton Applied Research Model 155 型振动样品磁强计 (Vibrating sample magnetometer, VSM) 测定室温样品的磁学性质。其中用于 TGA 和 VSM 测试的样品均室温真空干燥 48h 后使用, 用于 TEM 和 PCS 的样品分别分散于水和 PBS 中并稀释到适当浓度。

1.4 SA-MNPs 的制备

向 0.2mL 含 1mg/mL SA 的 PBS 溶液中加入现配的 10mg/mL EDC 和 11mg/mL NHS 溶液各 50 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡孵育 30min, 然后加入分散于 2.5mg/mL PAA-MNG 0.4mL (PBS 分散), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡孵育 24h。加入 1mol/L 乙醇胺 0.2mL, 室温振荡 2h 以封闭未完全失活的活性酯。磁分离, 用 PBS 洗 5 次磁性组分后分散于 1mL PBS 中, 得到 SA-MNPs 分散液。若以牛血清蛋白 (Bovine serum albumen, BSA) 替代 SA, 则所得样品为牛血清蛋白包覆的磁性粒子 (BSA-coated magnetic nanoparticles, BSA-MNPs)。SA-MNPs 的平均水合粒径及粒径分布用 PCS 表征。

1.5 SA-MNPs 的活性检测

以生物素对硝基苯酯 (Biotin p-nitrophenyl ester, BNPE) 检测 SA-MNPs 的生物素结合能力^[15]。具体过程为: 取 200mg SA-MNPs, 依次用洗液 A 洗 3 次和 TTL 洗 2 次后, 加入 0.5mg/mL BNPE 100 μL , 摇匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30min。用杂交液洗磁性组分 6 次, 向磁性组分中加入 0.1 mol/L NaOH 50 μL , 分散后室温孵育 8min, 磁分离, 用岛津公司 UV3101 型紫外可见分光光度计 (UV-Vis spectroscopy, UV-Vis) 测定磁球水解后的上清液的 UV-Vis 谱 (微量比色皿体积为 50 μL , 光程为 1cm)。对照实验中, 分别以 PAA-MNGs 和 BSA-MNPs 代替

SA-MNPs, 测试其对 BNPE 的结合情况。

2 结果

2.1 PAA-MNGs 的光化学制备

相比于热化学引发, 紫外光引发单体聚合制备高分子聚合物的优点在于不必添加引发剂, 所得产物无引发剂残基, 这对于一些特殊的生物应用尤为重要。本实验浓度下的 AA 在 254nm 有较强的吸光度, 这为光化学制备 PAA-MNGs 提供了必要条件。纳米 Fe_3O_4 粒子表面对单体和交联剂分子具有一定的吸附作用, 且 Fe_3O_4 的吸收紫外光截面远大于烯类小分子, 紫外光辐照时, 吸附于 Fe_3O_4 表面的烯类分子比在溶液中的更易于获得光子, 自由基聚合反应最先发生于纳米粒子表面, 而溶液中烯类分子均聚的可能性很小。光照开始时, MBA 与 AA 的质量比 $m_{\text{MBA}}/m_{\text{AA}}=1:10$, 而滴加单体溶液后 $m_{\text{MBA}}/m_{\text{AA}}=1:120$, 故聚合初期交联剂参与反应的几率较高, 聚

合物的交联度较高; 随着单体的不断加入, $m_{\text{MBA}}/m_{\text{AA}}$ 不断减小, 聚合物交联度也在下降。因此, 控制光照时间, 分批加入单体, 可得外壳层松散的磁性凝胶颗粒。

2.2 PAA-MNGs 的形貌和粒径

图 1 给出了 PAA-MNGs 的 TEM 图像及粒径统计图。由图 1(a)所示, PAA-MNGs 呈不规则毛团状, Fe_3O_4 粒子被聚合物包敷在内。由 TEM 图像得出 PAA-MNG 的粒径统计 (见图 1(b))。接近于正态分布, 平均粒径为 $(21\pm5)\text{nm}$ 。少数大粒子可能源于反应中不同凝胶粒子间碰撞、发生自由基复合而形成大粒子。可以推测, 当用于固定蛋白、核酸等生物分子时, 与球形粒子相比, 这种具有不规则表面 PAA-MNGs 的凝胶外层将提供更大的表面积和更多可参与反应的胺基, 单位质量凝胶负载的生物分子将更多。

PCS 分析给出了 PAA-MNGs 的水合粒径分布

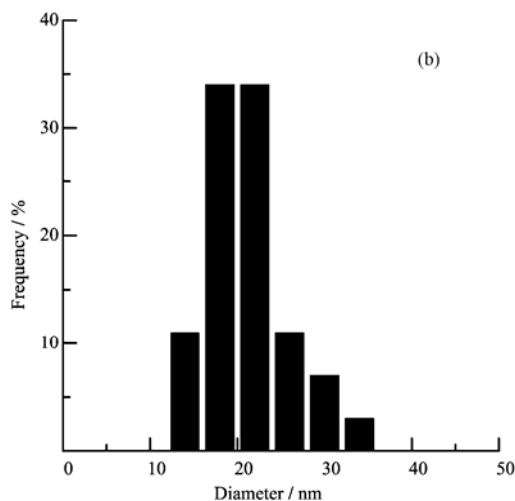
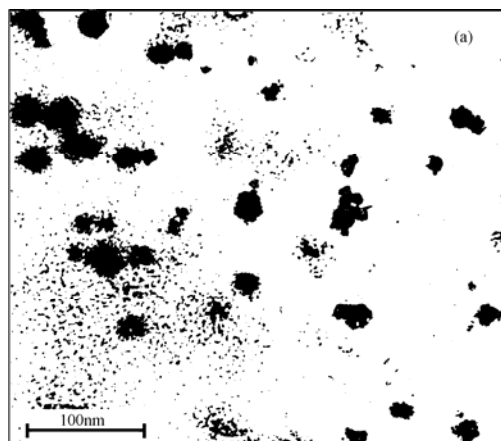


Fig.1 TEM image of the PAA-MNGs (a) and histogram of the size distribution (b)

(见图 2), 平均水合粒径为 33.0nm , 多分散系数为 0.272 。图中粒子主要分布在 $(30\pm6)\text{nm}$ 范围且分布很窄, 但极少数大粒子存在于 $(90\pm10)\text{nm}$ 范围, 对整个体系的多分散系数影响很大, 总体分布趋势与 TEM 统计图一致。

2.3 PAA-MNGs 的化学组成

由图 3 TG 曲线可见, 磁性凝胶在 140°C 前失重 $(4.9\pm0.1)\%$ 是由于样品凝胶层中含的部分水受热蒸发。继续升温有机物开始分解, 至 500°C 附近重量趋于恒定, 共失重 $(6.5\pm0.1)\%$, 由此计算出室温真空干燥的条件下凝胶的磁含量约为 88% 。

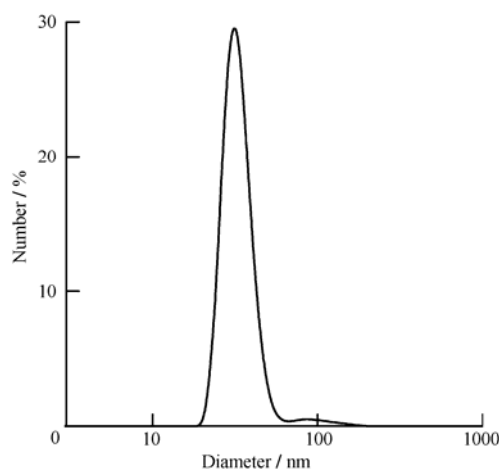


Fig.2 PCS analysis of the PAA-MNGs

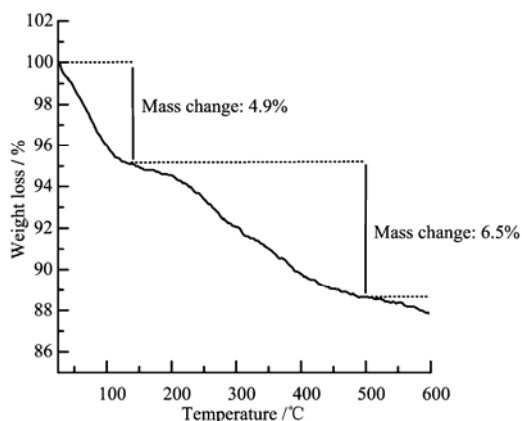


Fig.3 TG curve of the PAA-MNGs

2.4 PAA-MNGs 的磁学性质

PAA-MNGs 的室温磁滞回线见图 4。磁化曲线通过原点, 显示无磁滞现象。当外磁场达到 8kOe 时, 样品的磁化强度已达到饱和, 其饱和磁化强度 M_s 为 50emu/g, 说明 PAA-MNGs 具有超顺磁性性质。

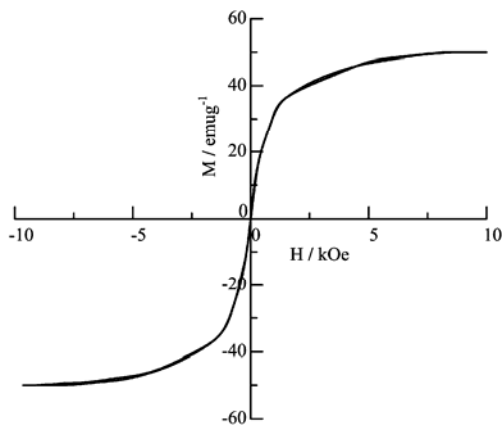


Fig.4 Magnetization curve of the PAA-MNGs

2.5 SA-MNPs 的制备和活性检测

碳化二亚胺是化学反应和生物技术中常用的一种偶联试剂, 因其参与的反应经历中间态活性酯又被称为酯交换反应。本文选用了 EDC/NHS 活化 SA, 实现了胺基磁性凝胶与 SA 的连接, 反应过程见示意图 5a。SA-MNPs 经 PCS 分析 (见图 6) 得出平均水合粒径为 39.6nm, 比 PAA-MNGs 的平均值大 6.6nm。根据 SA 分子的尺寸 ($5.4\text{nm} \times 5.8\text{nm} \times 4.8\text{nm}$)^[16] 及相邻 SA 分子间的空间位阻作用, 每个 PAA-MNGs 上可能只有一个或几个 SA 分子。

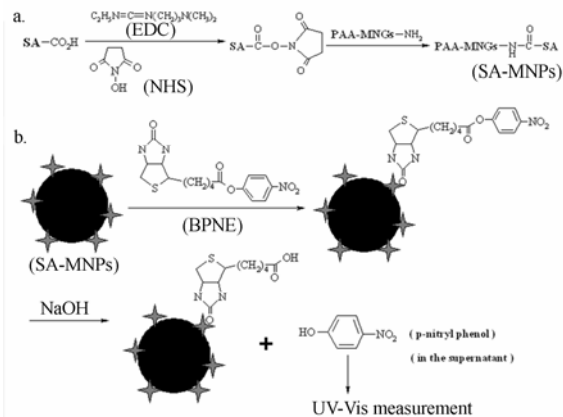


Fig.5 Fabrication of the SA-MNPs (a) and measurement of the biotin binding capacity of the SA-MNPs by using BNPE (b)

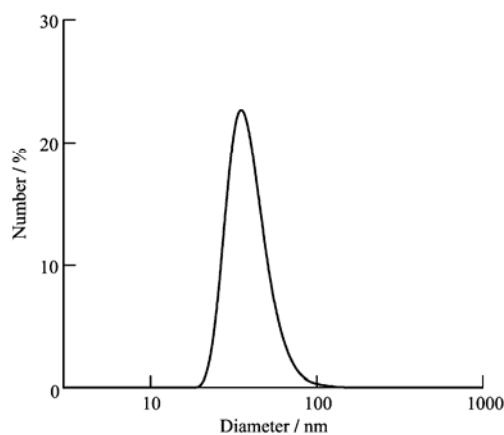


Fig.6 PCS analysis of the SA-MNPs

本文使用了 BNPE 作为探针来考察 SA-MNPs 的生物素结合能力^[15], 图 5b 给出了 BNPE 被结合和水解过程的示意图。链亲和素与生物素的结合是非常快的, 据文献^[17]报道可以在 1min 内完成, 本文选用 37°C 下孵育 30 min 是为了使 BNPE 可以充分接触磁球表面上 SA 活性位点, 以期达到最大结合量。洗掉游离的 BNPE 后, 加入 NaOH 使得磁球上结合的 BNPE 水解, 生成的对硝基苯酚在 400nm 有吸收, 所以对水解液的光度测定可以求得 SA-MNPs 的生物素结合能力。

图 7 中, 1 为 SA-MNPs 结合 BNPE 水解后的对硝基苯酚吸收曲线, 2 和 3 分别为对照实验 PAA-MNGs 和 BSA-MNPs 的结果。可见探针和对照样品间并无非特异性吸附, 而 SA-MNPs 的结果显示出其对探针的显著结合能力, 据此可知, 该 SA-MNPs 对生物素探针的结合是特异性结合。

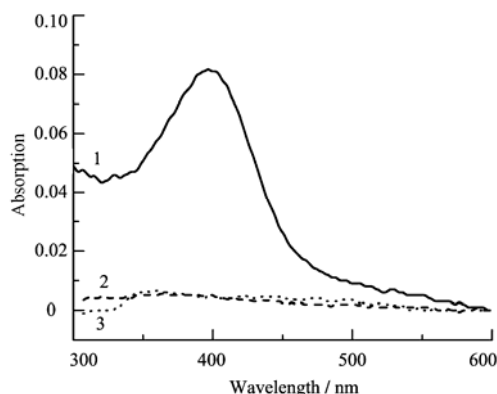


Fig.7 The UV-vis spectra of the p-nitryl phenol, the hydrolyzed product of the BNPE bound with the 1. SA-MNPs, 2. PAA-MNGs and 3. BSA-MNPs

SA-MNPs 对生物素探针结合能力 (C) 可由下式计算:

$$C = \frac{V \cdot \text{Abs}_{400}}{m\varepsilon} \times 10^6$$

式中, m 是 SA-MNPs 的质量, V 是 NaOH 水解液的体积, ε 是水解产物对硝基苯酚在 400nm 处的摩尔吸光系数。计算可得 SA-MNPs 的 C 为 0.73 nmol/mg。

现有商品 Promega 链亲和素磁球是粒径在 1 μ m 左右的不规则形状颗粒, 以生物素修饰的寡聚核苷酸 (小于 20 个碱基) 评价的生物素结合能力 C 为 1nmol/mg [商品信息参见 <http://www.promega.com/tbs/tb246/tb246.pdf>]。制备的 SA-MNPs 对生物素的结合能力低于 Promega 商品磁球, 其可能原因在于载体 PAA-MNGs 中聚合物所占比例偏低所致。进一步调整 PAA-MNGs 的制备方法以适当提高其中聚合物占有的比例, 此时凝胶粒径会适当增大, 当用以制备 SA-MNPs 时, 适当增大的磁性凝胶表面和较多的可用胺基可能使得 SA-MNPs 的生物素结合能力会增大。但本文 SA-MNPs 的一个重要优点是其粒径仅为 40 nm 左右, 粒径小的特点将更有利于其在生物领域的应用。

3 结论

本文提出一种制备胺基官能化的磁性纳米凝胶的简化方法, 得到的磁性纳米凝胶具有表面不规则、磁含量高和超顺磁性的特点。用链亲和素为模型考

察磁性凝胶偶联生物大分子, 表明制备的链亲和素纳米磁球具有确定的生物素结合能力, 从而验证了胺基磁性纳米凝胶有可能作为载体偶联生物大分子用于生物技术等领域。

参考文献

- 1 Dunnill P, Lilly M. *Biotechnol Bioeng*, 1974, **16**(7): 987-990
- 2 Gabrielsen O S, Huet J. *Meth Enzymol Prat I*, 1993, **218**(1): 508-525
- 3 Hancock J P, Kemshead J T. *J Immun Methods*, 1993, **164**(1): 51-60
- 4 Halling P J, Dunnill P. *J Appl Microbiol*, 1979, **6**(1): 195-205
- 5 Uhlen M. *Nature*, 1989, **340**(6236): 733-734
- 6 Khng H P, Cunliffe D, Davies S, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1998, **60**(4): 419-424
- 7 Hultman T, Stahl S, Hornes E, *et al.* *Nucl Acids Res*, 1989, **17**(13): 4937-4946
- 8 Ashtari P, He X, Wang K, *et al.* *Talanta*, 2005, **67**(3): 548-554
- 9 Ghassabian S, Ehtezazi T, Forutan S M, *et al.* *Int J Pharm*, 1996, **130**(1): 49-55
- 10 Zaitsev V S, Filimonov D S, Presnyakov I A, *et al.* *J Colloid Interf Sci*, 1999, **212**(1): 49-57
- 11 葛学武, 吴大珍, 储松南, 等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2005, **23**(1): 40-44
GE Xuewu, WU Dazhen, CHU Songnan, *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2005, **23**(1): 40-44
- 12 Sun H, Yu J, Gong P, *et al.* *J Magn Magn Mater*, 2005, **294**(3): 273-280
- 13 Gong P, Yu J, Sun H, *et al.* *J Appl Polym Sci*, 2006, **101**(3): 1283-1290
- 14 Sun H, Gong P, Liu X, *et al.* *Nucl Sci Tech (in China)*, 2005, **28**(4): 278-282
- 15 Gao F, Pan B, Zheng W, *et al.* *J Magn Magn Mater*, 2005, **293**(1): 48-54
- 16 Green N M. Eds: Wilchek M, Bayer E A. *Methods in Enzymology*. London: Academic Press, 1990, 184: 51-69
- 17 Nilsson P, Persson B, Uhlen M, *et al.* *Anal Biochem*, 1995, **224**(1): 400-408

Photochemical preparation of amino-functionalized magnetic nanogels for immobilization of streptavidin

GONG Peijun^{1,3} HONG Jun^{1,3} LIU Xingfen^{1,3} YU Jiahui²

FAN Chunhai¹ DONG Li^{1,3} YAO Side¹

¹(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

²(Institute of Biofunctional Materials and Devices, East China Normal University, Shanghai 200062)

³(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

ABSTRACT An improved approach for preparing amino-modified magnetic nanogels has been developed in this paper. Polyallylamine magnetic nanogels (PAA-MNGs) were synthesized in one step by photoinitiation and *in situ* photopolymerization of allylamine in Fe₃O₄ aqueous suspension under UV irradiation. Morphology, mean diameter and diameter distribution of the PAA-MNGs were measured by TEM and PCS respectively, while the magnetite content was confirmed by TG and the superparamagnetism identified by VSM. Biomolecules, such as proteins, can be coupled to the surface of PAA-MNGs in virtue of amino groups. Streptavidin-coated magnetic nanoparticles (SA-MNPs) were prepared by covalent immobilization of streptavidin (SA) activated by 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimid (NHS) on PAA-MNGs. The biotin binding capacity of SA-MNPs was proved by colorimetric measurements using the probe biotin p-nitrophenyl ester (BNPE). Therefore, PAA-MNGs may be a suitable vehicle to carry biomolecules for applications in many areas of biotechnology.

KEYWORDS Polyallylamine, Magnetic nanogels, UV irradiation, Streptavidin

CLC O644.14, O631.3⁺2, O614.81⁺1