

4/86



RRPA87021167

(5 . P)

國科會專題計畫成果報告

微
縮送
小
組

計畫名稱：含官能基乳膠顆粒之合成及動力研究

計畫編號：NSC-87-2216-E-041-003

計畫主持人：李佳芬

執行單位：私立嘉南藥理學院

含官能基乳膠顆粒之合成及動力研究

計畫編號：NSC-87-2216-E-041-003

計畫主持人：李佳芬

執行單位：私立嘉南藥理學院

摘要

本研究將探討表面具官能基的高分子乳膠顆粒在生醫材料上的應用。以表面具羧基(COOH)官能基的高分子乳膠顆粒以兩種不同的方式(Pre-activation and Pre-adsorption)分別與抗原(牛胚胎白蛋白, BSA; 抗人體免疫球蛋白, Anti-human IgG)進行化學鍵結, 比較其鍵結量與乳膠顆粒表面官能基多寡和不同鍵結方式的關係, 並以所製造的免疫乳膠顆粒與抗體進行免疫凝集反應, 以期能在臨床上應用於疾病的檢驗。結果顯示, 合成乳膠顆粒時藉由加入不同量的甲基丙烯酸(Methacrylic acid, MAA)可控制乳膠顆粒表面羧基(COOH)的含量, 並進而控制抗原的化學鍵結量。Pre-adsorption 的鍵結效率較Pre-activation好。在免疫凝集實驗中, 可看出乳膠顆粒表面鍵結抗原的量及加入免疫凝集反應系統抗體的量會影響免疫凝集反應靈敏度, 而溫度的效應以37°C的靈敏度較25°C好。

簡介

在醫學上, 經常需要利用各種方法來檢驗病患的尿液、血液或淋巴液等, 以了解病因, 利於診斷, 通常人體受到病毒感染後, 體內的血液或淋巴液即會存在著此一特定抗原, 若在病理檢驗中檢驗得此一抗原時, 即可判定病人已受到某一特定病毒感染。早期檢驗的方式是將抗體吸附於紅血球上, 將此吸附特定抗體的紅血球與血液或淋巴液的抗原反應後, 即會產生凝集現象, 由此, 即可檢驗得知病人已受到某一特定病毒的感染, 但是紅血球其性質經常會受到環境、溫度及光線的影響, 使保存期限不長。近年來, 已有學者們以 polystyrene 乳膠顆粒代替紅血球, 將抗體吸附於 polystyrene 乳膠顆粒上, 而後與病人的血液或淋巴液進行免疫凝集反應, 由此來判斷病患已受到某一病毒的感染, 但是, 由於抗體與 polystyrene 乳膠顆粒間是以物理吸附的方式結合, 因此結合力很差, 抗體蛋白很容易由

polystyrene 乳膠顆粒上脫落下來, 減低了檢驗的準確性, 後來學者便以化學鍵結方式使抗原或抗體與乳膠顆粒產生化學鍵結, 希望能減少檢驗時的干擾

實驗

高分子乳膠顆粒的合成

以無乳化劑種子乳聚合方式合成出核(Core)為甲基丙烯酸甲酯, 殼(Shell)為甲基丙烯酸甲酯(疏水性單體)與甲基丙烯酸(親水性單體)的乳膠顆粒(比例為7:3和8:2)。

乳膠顆粒的透析

將合成好的乳膠顆粒置入透析袋中, 以去離子水進行透析約一個禮拜, 以將未反應完的單體清除。

乳膠顆粒與抗原(BSA and Anti-human IgG)的化學鍵結

以E.D.C(Carbodiimide)為偶合劑, 同時以先活化(pre-activation)及先吸附(pre-adsorption)兩種方式進行抗原的化學鍵結, 之後進行脫附(Desorption)步驟, 將反應完成的樣品進行離心並分析上層液的抗原含量以對化學鍵結的抗原作定量的分析。

乳膠顆粒懸浮系統穩定度的觀察

將乳膠顆粒分別滴於不同離子強度的磷酸鹽緩衝液(P.B.S.), 後置於動態光散射儀(DLS)下, 觀察其穩態(steady-state)後乳膠顆粒平均粒徑的變化, 以粒子平均粒徑大小作為穩定度的一個指標。

免疫凝集實驗

將接有抗原的免疫乳膠顆粒與抗體於25°C及37°C下混合20分鐘後, 以分光光度計於360nm波長下觀察因免疫凝集反應所引起的吸收度(absorbance)的變化。

- **結果與討論**

- **乳膠顆粒粒徑及表面積的觀察**

- 以無乳化劑種子乳化合方式，改變殼(Shell)部驟甲基丙烯酸胺的進料含量(3:2)，其乳膠顆粒粒徑及表面積的結果如表一。

- **抗原的化學鍵結**

- **BSA system**

- 如圖一、圖二分別是BSA以Pre-activation及Pre-adsorption方式與乳膠顆粒進行化學鍵結的結果。

- 可發現：(1)抗原(BSA)的鍵結量與乳膠顆粒甲基丙烯酸的含量成正比的關係(即加入相同量的抗原，CS-70-73的抗原鍵結量約為CS-70-82的1.5倍)，如表二。(2)Pre-adsorption方式的鍵結量皆多於Pre-activation，如表二。而Pre-activation方式鍵結較少抗原的原因為立體障礙較大。

- **Anti-human IgG system**

- 如圖三是以CS-70-73與Anti-human IgG進行化學鍵結(Pre-activation and Pre-adsorption)的結果。同樣的，可以很清楚的發現Pre-adsorption有較好的鍵結效果。

- **穩定度的觀察(CS-70-73)**

- 圖四是穩定度觀察的結果，粒子的平均粒徑小，則此懸浮系統有較好的穩定度，由實驗結果知道在離子強度約等於0.02M時較穩定，而最主要的原因是低離子強度下有較厚的電雙層(electrical double layer)

- 導致靜電排斥力增強而使粒子較穩定。

- **免疫凝集實驗(CS-70-73)**

- 由穩定度觀察的結果，我們選擇離子強度約等於0.02M的PBS作為進行免疫凝集實驗的系統。

- **免疫凝集實驗(CS-70-73)**

- 由穩定度觀察的結果，我們選擇離子強度約等於0.02M的PBS作為進行免疫凝集實驗的系統。

- **抗原(BSA, Anti-human IgG)鍵結量對免疫凝集反應靈敏度的影響**

- 圖五、圖六分別是BSA和Anti-human IgG system抗原鍵結量對免疫凝集靈敏度的影響，由圖可知抗原得鍵結量越多其免疫凝集反應所引起的光學吸收值的變化越大。

- **溫度對免疫凝集反應靈敏度的影響**

- 圖七、圖八分別是BSA和Anti-human IgG system

- 進行免疫凝集反應時受溫度的影響。由圖中可發現

- 在37℃下的免疫凝集反應效果較好，這是因為此條件較符合人體進行免疫反應的環境，因此有較好的效果。

- **抗原分子大小對免疫反應靈敏度的影響**

- 由圖五~圖八可發現Anti-human IgG system的免疫反應靈敏度較高，根據Kondo的說法，較大的抗原抗體對進行免疫凝集反應時較不易受到乳膠顆粒電雙層的阻礙，因此有較好的效果，(BSA Mw~70000, Anti-human IgG Mw~150000)。

結論

●在抗原的化學鍵結反應中

1.控制乳膠顆粒合成時甲基丙烯酸含量可進而

控制抗原化學鍵結的量。

2.先吸附(Pre-adsorption)方式所鍵結蛋白質(抗原)

的量多於先活化(Pre-activation)方式。

●在乳膠顆粒穩定度觀察實驗中

1.溶液離子強度↓,穩定度↑。

2.鍵結蛋白質之後,穩定度↑。

●在免疫凝集實驗中

37°C下、大分子量的抗原、抗體對,靈敏度↑。

參考文獻

1.D.H.Napperand A.G.Parts, "Polymerization of Vinyl Acetate in Aqueous Media." *J. Polym. Sci.*,61, 113 (1962).

2.D.M.French,"Mechanism of Vinyl Acetate Emulsion Polymerization." *J.Polym.Sci.* 32, 395(1958).

3.S.Okamura and T.Motoyama, *J. Polym. Sci.*, 58,221(1962).

4.A.Rembaum,S.P.S.Yen,E.Cheong,S.Wallace,R.S.Molday ,I.L.Gorden, and W.J.Dreyer, "Functional polymeric microspheres based on 2-hydroxyethyl methacrylate for immunochemical studies." *Macromolecules*, 9,328(1976)

5.Akihiko Kondo, Takeharu Kawano and KoHigashitani, "Immunological Agglutination Kinetics of Latex Particles with Covalently Immobilized Antigens." *J.Fermentation and Bioengineering* , 73,6,435-439(1992)

表一.乳膠顆粒的性質

Latex	Average diameter (nm)	Average surface area (m ² /mg)
CS-70-73	346±6	12.484±0.024
CS-70-82	340±8	13.292±0.017

表5-2乳膠顆粒表面羧基含量與BSA鍵結量的關係

Latex	Bonding BSA by Pre-activation (mg/m ²)	Bonding BSA by Pre-adsorption (mg/m ²)
CS-70-73	4.47	6.98
CS-70-82	3.49	4.50

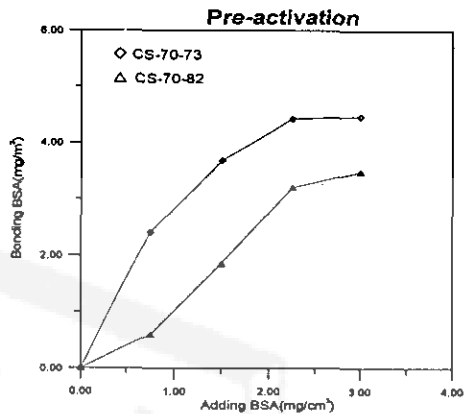


Fig1.Effect of the surface carboxyl group concentrations on the covalent bonding amount of BSA (antigen) by adding various concentrations of BSA use pre-activation method. (◇) CS-70-73 ; (△)CS-70-82

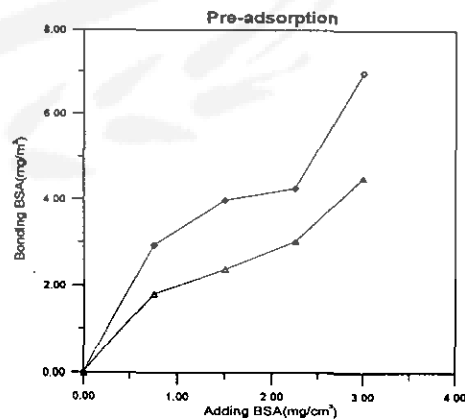


Fig2.Effect of the surface carboxyl group concentrations on the covalent bonding amount of BSA (antigen) by adding various concentrations of BSA use pre-adsorption method. (◇)CS-70-73 ; (△)CS-70-82

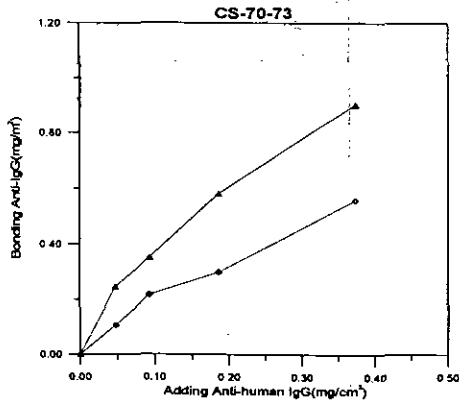


Fig3. Effect of different covalent bonding method on the amount of bonding antigen (Anti-IgG) to the Latex (CS-70-73) by adding various concentrations of antibody (Anti-IgG). (Δ) Pre-adsorption; (◇) Pre-activation

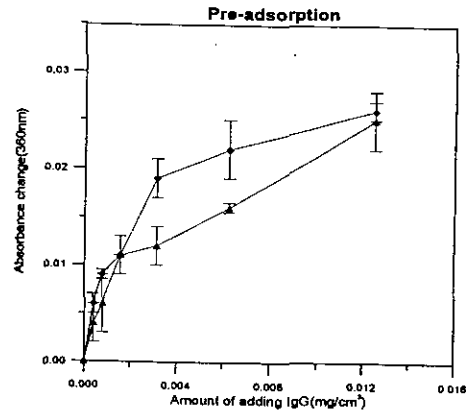


Fig6. Effect of the bonding amount of Anti-IgG (antigen) on the absorbance change (360nm) of the Latex- Anti-IgG suspensions initiated by adding IgG (antibody) of various concentrations at pH=7.4 and ionic strength=0.02 and temperature=25°C. (◇) 0.904 mg/m² Anti-IgG; (Δ) 0.246 mg/m² Anti-IgG.

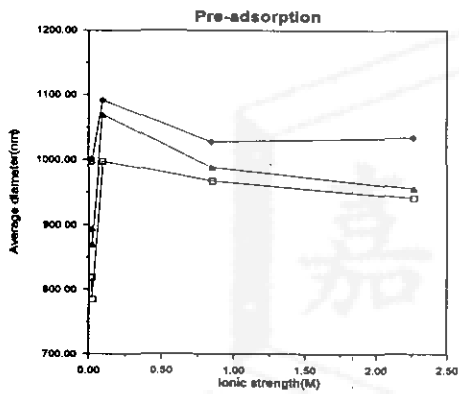


Fig4. Effect of changes of the ionic strength on the average diameter of the Latex and Latex-protein (antigen) particles at pH=7.4 temperature=25°C. (◇) Bare Latex; (□) Latex-BSA; (Δ) Latex-Anti-IgG

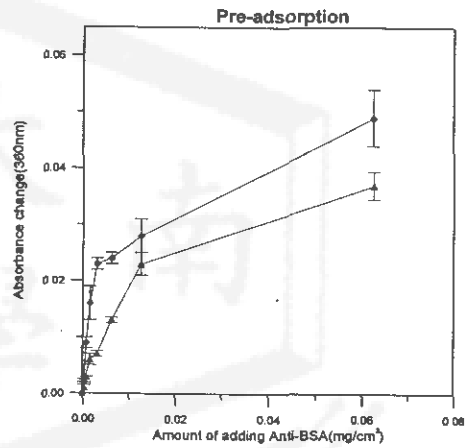


Fig7. Effect of temperature on the absorbance change (360nm) of the Latex-BSA suspensions initiated by adding Anti-BSA (antibody) of various concentrations at pH=7.4 and ionic strength=0.02. BSA=6.98 mg/m². (◇) 37°C; (Δ) 25°C

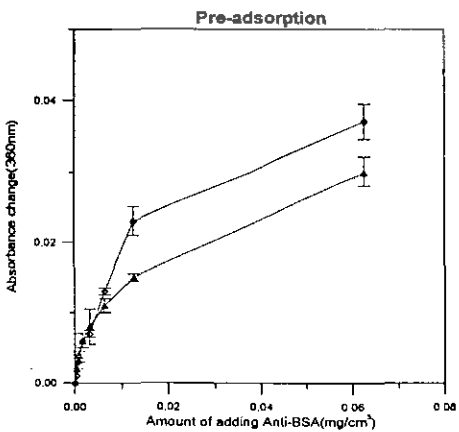


Fig5. Effect of the bonding amount of BSA (antigen) on the absorbance change (360nm) of the Latex-BSA suspensions initiated by adding Anti-BSA (antibody) of various concentrations at pH=7.4 and ionic strength=0.02 and temperature=25°C. (◇) 6.98 mg/m² BSA; (Δ) 2.94 mg/m² BSA.

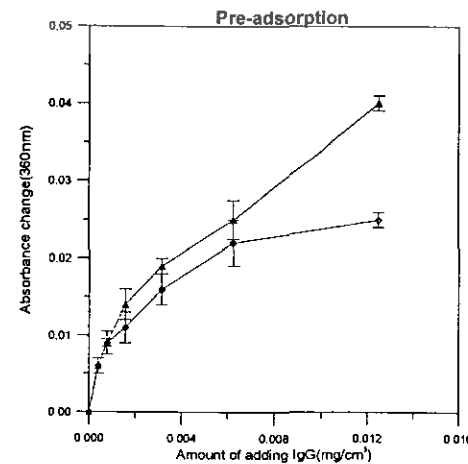


Fig8. Effect of temperature on the absorbance change (360nm) of the Latex-Anti-IgG suspensions initiated by adding IgG (antibody) of various concentrations at pH=7.4 and ionic strength=0.02. Anti-IgG=0.904 mg/m². (Δ) 37°C; (◇) 25°C