

含官能基磁性乳膠顆粒之性質及其實際應用之研究

計畫編號：NSC-89-2216-E-041-001

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：李佳芬

計畫參與人員：王炳傑 台大化工所

一、摘要

本研究採用兩步驟無乳化劑乳化聚合反應合成內部包覆磁性材料的乳膠顆粒，其合成方法參考前年度計畫。經過兩步驟反應後，合成出內部包覆磁性材料，表面具官能基的磁性乳膠顆粒，此種合成的乳膠顆粒，可以增加表面官能基，而且也可以利用磁場增加分離效果。利用此種磁性乳膠顆粒，接枝特定的抗體，再和細胞混合，讓抗體和特定細胞表面上的抗原結合，通過一磁場，專一性的選取想要的細胞。

關鍵詞：無乳化劑乳化聚合，抗體，抗原
Abstract

In this study the method of two step soapless emulsion polymerization is used to synthesize the magnetic polymer latex with functional groups on its surface. In order to increase the density of functional groups, we will synthesize the magnetic polymer latex by the method of two step soapless emulsion polymerization. The increasing density of the functional groups will increase the effect of cells separation. Magnetic latex chemically bound antibody, and mix with cells. Let antibody covalently bond with antigen of the cells, place in the magnetic field. Get the cells you wish to sort.

Keyword: two step soapless emulsion

polymerization, antibody, antigen.

二、計畫緣由與目的

利用表面具官能基的乳膠顆粒，將特定的抗體接在乳膠顆粒的官能基上，形成接有特定抗體的乳膠顆粒，將此接有抗體的乳膠顆粒與欲分離的細胞樣品混和，由於細胞上有抗原，因此乳膠顆粒上的特定抗體會和具有特定抗原的細胞結合，然後再以離心的方式將結合乳膠顆粒的細胞與未結合乳膠顆粒的細胞分離，但以離心方式分離乳膠顆粒，有些乳膠顆粒不易離心至下層，使細胞分離的效率降低。因此發展出包覆磁性材料且表面具有官能基的磁性乳膠顆粒，將某特定抗原接於乳膠顆粒上，將此接有抗原的磁性乳膠顆粒與不同種類的細胞樣品混和，則此時磁性乳膠顆粒上的抗原可與細胞上某一特定細胞上的抗體結合，將其通過一磁場，結合某一特定細胞的磁性乳膠顆粒會被磁場吸住，而其他細胞則通過磁場，以這種方式分離細胞。

在1991年 J.U.gelstad et.al⁽¹⁾指出，做為細胞分離的乳膠顆粒需具備下列性質：(1)在細胞分離的過程中，磁性乳膠顆粒不可以產生凝結的現象。(2)磁性乳膠顆粒不可以具有殘留磁化。(3)結合細胞的磁性乳膠顆粒能夠快速且完全的與未接合磁性乳膠顆粒的細胞分離。(5)磁性乳膠顆粒不可以太小以免產生食菌作用。

有學者⁽²⁾以熱起始方式直接包覆磁性材料粉末，但是此種方法製得的磁性乳膠顆粒，粒徑不均勻而且內部磁性材料包覆

不均勻。在 1993 年 Noriko Yanase et. al. (3-4) 以苯乙烯單體，油酸鈉為乳化劑，以乳化聚合法聚合內部為 Fe_3O_4 磁性材料的乳膠顆粒，可以製備出均勻度高的磁性乳膠顆粒，他們的研究也指出： Fe_3O_4 的含量會影響乳膠顆粒的包覆均勻度，且起始劑濃度會影響磁性乳膠顆粒的粒徑大小。

在 1981 年，M. B. Davis et. al. (5) 利用碳二醯胺(carbodiimide)方法，讓免疫球蛋白 IgG 和低分子量的化合物（馬尿酸）鍵結，調控反應時 pH 值，可以防止 IgG 造成分子內和分子間的交通。

針對以上的問題，本研究採取兩步驟無乳化劑乳化聚合表面具有官能基的磁性乳膠顆粒，並且利用碳二醯胺方法，接枝 anti-IgG 抗體，並和溶血性病人的血液混合，並利用磁場分離。

貳、實驗

磁性流體的製備

請參考 88 年度“含官能基磁性乳膠顆粒之合成動力及性質之研究”。

磁性乳膠顆粒製備

請參考 88 年度“含官能基磁性乳膠顆粒之合成動力及性質之研究”。

BET 測量

把合成完的磁性乳膠顆粒，在 $60^{\circ}C$ 烘箱中烘乾，在 Micromeritics ASAP-2100 測量乳膠顆粒表面積。

乳膠顆粒的透析(6)

將乳液樣品中未反應的單體(MMA 或 MAA) 去除，以確保之後實驗的準確性（導電度及抗原、抗體化學鍵結）。將適量乳液樣品裝入透析袋中，而後置入裝滿去離子水的燒杯中進行透析（約一個禮拜），以將未反應的單體(MMA and MAA)透析出來。

電導度測定

估計乳膠顆粒表面羧酸基(COOH)的含量(8)。取 0.01N NaOH 水溶液，另準備透析過乳液，取適量總體積先測乳液之電導度，然後將 NaOH 水溶液慢慢滴入乳液中，持續記錄滴入 NaOH 體積和電導度 (conductivity) 值。

TGA 分析

以 TGA 去分析磁性乳膠顆粒中 Fe_3O_4 的含量。

磁場分離

利用商業級產品 MidiMACS 和 separation column。在先把 separation column 至於磁場中，用二次水潤濕 separation column，加入 3mL 磁性乳膠顆粒，收集流出物並烘乾秤重，再用 $3 \times 3mL$ 二次水洗滌，收集流出物並烘乾秤重，從磁場中取出 separation column，加入 5mL 二次水，收集流出物並烘乾秤重。

蛋白質（抗原或抗體）的化學鍵結先吸附(Pre-adsorption)方式(5)

- (1) 乳膠顆粒先行震盪 5~10 分鐘。
- (2) 取定量(150mg)乳膠顆粒、已知量抗原（或抗體）溶於 PBS (pH=5) 中，總體積約等於 20ml，進行吸附步驟約 2 小時。
- (3) 取偶合劑 E. D. C 10mg 加入步驟 2 中，進行羧酸基 COOH 的活化與化學鍵結反應約 4 小時。

脫附(Desorption)

- (1) 將化學鍵結的產品，先以超音波震盪約 10 分鐘，後在高速離心機下以 4800rpm 進行離心約 30 分鐘。
- (2) 將離心後的上層液吸出後，再將免疫乳膠顆粒懸浮於 pH=11 的 glycine buffer 中進行脫附步驟約 1 小時。

(3)將脫附後的免疫乳膠顆粒再以超音波震盪 10 分鐘，後同樣再以 4800rpm 離心 30 分鐘。

(4)最後，將脫附後的免疫乳膠顆粒懸浮於 pH=7.4 的磷酸鹽緩衝液(PBS)中，再滴入 0.02%的 NaN_3 ，保存於 4°C 環境下。

表面電位(Zeta potential)測量實驗

利用 Zetasizer，和自動低定儀，測量不同 pH 值，磁性乳膠顆粒抗體化學鍵結前後表面電荷量的變化。

溶血性病人血球的檢驗

1. 以先吸附(Pre-adsorption)方式進行抗人體免疫球蛋白(Anti-human IgG)與乳膠顆粒的化學鍵結。
2. 取適量鍵結有 Anti-human IgG 的乳膠顆粒與溶血性病人血液混合(mixing)，在 37°C 下進行免疫反應 20-30 分鐘
3. 以磷酸鹽緩衝液(PBS)沖洗後，通過磁性管柱，利用同體積磷酸鹽緩衝液洗滌 3 次，取出磁場，再加入磷酸鹽緩衝液 5mL，使血球及鍵結的乳膠顆粒流出。
4. 將反應完且處理過的產品以 PBS 稀釋後滴於 Nylon 膜上，於 4°C 下靜置數小時以使血球吸附於薄膜上以方便於觀察。
5. 進行血球細胞固定後以臨界點乾燥(Critical point dry, CPD)法乾燥，最後將樣品鍍金後於掃描式電子顯微鏡下觀察結果。

電子顯微鏡的觀察

取磁性流體、磁性乳膠顆粒稀釋後，以 JEOL JSM-1200 EX II Transmission Electron Microscope 穿透式電子顯微鏡觀察包覆均勻度及粒徑，以及 Hitachi S-800 Field Emission Scanning Electron Microscope 掃描式的電子顯微鏡觀察細胞表面鍵結免疫磁性乳膠顆粒。

三、結果與討論

乳膠顆粒代號：M：第一步加入的單體

量(g)，F：加入的磁性流體量(mL)，1/2 表示 core 和 shell 的重量比，CS：表示第二步合成時所加的 MMA 和 MAA 的比例。

BET 測量

隨著 MMA 比 MAA 的比例增加時，磁性乳膠顆粒的表面積增大，如表一。

電導度測定

由導電度和滴入 0.1M NaOH 的體積作圖，可以得到在當量點時，會有一轉折點，可以由回歸線求得，如圖一。如果直接由 pH 值求得當量點會有誤差，因為沒辦法得到精確的體積。假如要用指示劑去量測當量點，因為磁性乳膠顆粒的顏色是咖啡色，所以在當量點的時候會產生干擾，對當量點的判讀不易。由當量點滴定 NaOH 量，和磁性乳膠顆粒的固含量(solid content)及 BET 表面積，可以推算磁性乳膠顆粒的表面官能基(COOH)，如表二，可以發現 MMA：MAA=5：5 的磁性乳膠顆粒表面 COOH 基為 MMA：MAA=7：3 約 2 倍，雖然反應的 MAA 比例約 1.6 倍，因為在第二步反應 MMA：MAA=7：3 時，有部分 PMAA 被埋在 PMMA 內，因為導電度測量當量點為快速的，並未考慮到內部 PMAA 的(COOH)官能基。

TGA 分析

改變 shell (第二步) 比例對 Fe₃O₄ 含量不會改變很大，如表三。

磁場分離

在磁場分離中，滯留於磁場中的表示可以使用的磁性乳膠顆粒，用以接枝抗體，避免浪費，所以先用磁場分離，但是由表四顯示，只有 M30F200C73 可以達到 33.33%，因此我們在接枝抗體時止採用此一磁性乳膠顆粒。

表面電位(Zeta potential)測量實驗

由 Zetasizer 測量磁性乳膠顆粒抗體化學鍵結前後表面電荷量的變化，如圖

二，在鍵結 IgG 的乳膠顆粒，在 pH=3 時的表面電位為正，因為接了抗體以後，在 pH< 抗體的 pI(等電位點)時，磁性乳膠表面因為抗體而帶正電，如果沒鍵結抗體的磁性乳膠顆粒，因為合成表面官能基為 COOH，所以不管在任何 pH 值中，其表面電位皆為負值。

電子顯微鏡的觀察

改變不同的條件，由 TEM 觀察所得到的磁性乳膠顆粒粒徑，如表五，和表一比較，當粒徑越大，所測得的表面積越小。經過 CPD 後的紅血球，在 SEM 下觀察，如圖六，表面顆粒約 100nm，和所使用的磁性乳膠顆粒差不多，而且紅血球表面，並沒有全部鍵結免疫磁性乳膠顆粒，因為紅血球表面並不是完全都帶 IgG 的抗原。

四、計畫成果自評

本研究採用兩步驟無乳化劑乳化聚合，合成出表面具有官能基的磁性乳膠顆粒，本研究只鍵結 anti-igG antibody；再鍵結其他抗體，可以藉由抗體抗原的特殊鍵結，選取所想要的細胞，對於生醫工程上，以及臨床治療，可以達到不錯效果。

六、參考文獻

1. A. Berge, T. Ellingsen, J. Bjorgum, R. Schmid and J. Ugelstand, Preprints of International Symposium on Polmeric Microspheres, Fukui, Japan, 231, 1991
2. 鄭昭德"Fe₃O₄/MMA 磁性超微粒及 BaTiO₃/DGEBA 負荷材料製程和物性之探討"國立台灣大學材料科學與工程學研究所碩士論文(1994)
3. N. Yanase, H. Noguchi, Y. Uchida and T. Suzuta, J. Appl. polym. Sci., 40, 1539 (1993)
4. N. Yanase, H. Noguchi, H. Asakura and T.

Suzuta, J. Appl. polym. Sci., 50, 765 (1993)

5. M. B. Davis and J. F. Preston, Analytical

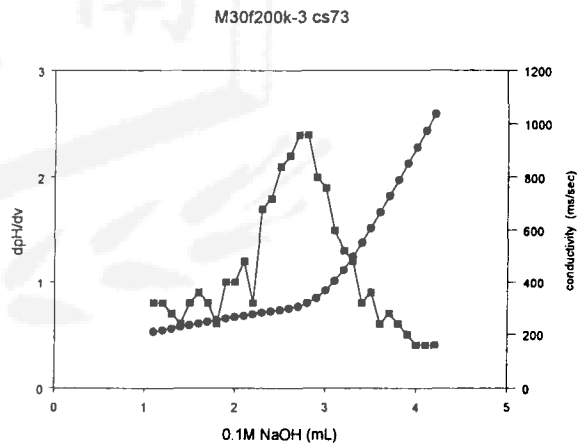
Biochemistry, 116. 402. (1981)

6. J. P. H. Zwetsloot and J. C. Leyte, J. colloid interface.

Sci., 163. 362. (1994)

表一 不同磁性乳膠顆粒之表面積

磁性乳膠顆粒	Surface Area (m ² /g)
M30F200CS55	29.0214
M30F200CS73	34.5178
M30F200CS91	42.5591
M40F2001/2CS55	21.3440
M40F2001/2CS73	28.2603
M40F2001/2CS91	28.7259



圖一 M30F200cs73 導電度和 dpH/dV vs. NaOH 體積

表二 表面官能基

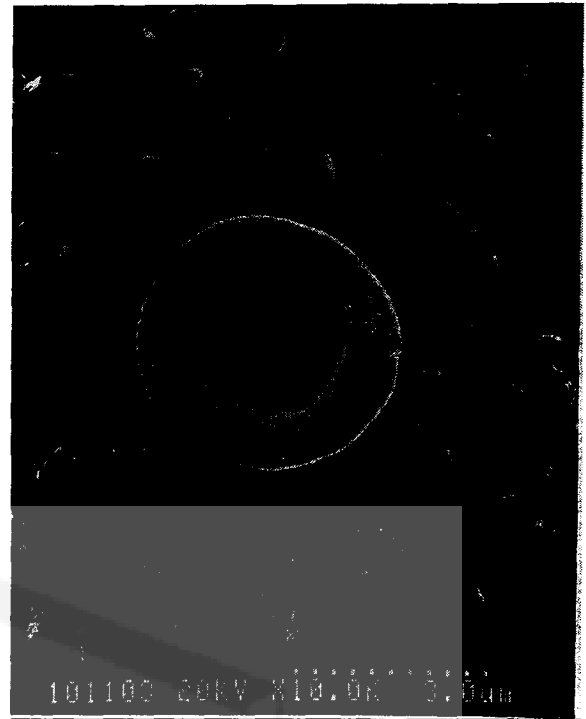
磁性乳膠顆粒	當量點 NaOH (mL)	表面官能基 (mole/g)
M30F200CS55	5.605	8.36*10 ⁻⁵
M30F200CS73	2.985	4.00*10 ⁻⁵
M40F2001/2CS55	2.526	5.44*10 ⁻⁵
M40F2001/2CS73	2.567	2.62*10 ⁻⁵

表三 Fe₃O₄ 含量 (由 TGA 測得)

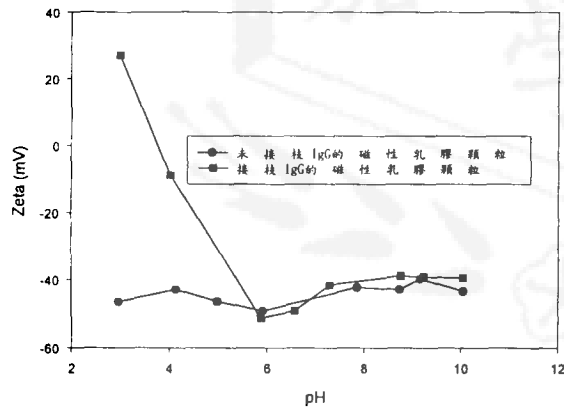
磁性乳膠顆粒	Fe ₃ O ₄ 含量(%)
M30F200CS55	4.2298
M30F200CS73	4.7866
M30F200CS91	4.2633
M40F2001/2CS55	2.9492
M40F2001/2CS73	2.8725
M40F2001/2CS91	2.8474

表四 可使用的磁性乳膠顆粒比率 (%)

磁性乳膠顆粒	比率 (%)
M30F200CS55	3.73
M30F200CS73	33.33
M40F2001/2CS55	2.21
M40F2001/2CS73	5.74



圖三 紅血球鍵結免疫磁性乳膠顆粒



圖二 接枝 IgG 和未接枝 IgG 的磁性乳膠顆粒 pH 不同之 zeta potential

表五 粒徑

磁性乳膠顆粒	粒徑 (nm)
M30F200CS55	103.95
M30F200CS73	102.24
M30F200CS91	97.58
M40F2001/2CS55	105.83
M40F2001/2CS73	101.69
M40F2001/2CS91	