

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

溫度感應型磁性免疫乳膠顆粒之製造及其實際應用之研究
(II)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2216-E-041-007-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：李佳芬

計畫參與人員：林家正

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

溫度感應型磁性免疫乳膠顆粒之製造及其實際應用之研究

計劃編號：92-2216-E-041-007

執行期限：92年8月1日至93年10月31日

計劃主持人：李佳芬 嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計劃參與人員：林家正 國立台灣大學化學工程研究所

Abstract

In this study, making use of the magnetic polymer latex with the property of temperature sensitivity synthesized by the method of two-step soapless seeded emulsion polymerization to bind with protein (BSA). First, stable ferrofluid with Fe_3O_4 nanoparticle was synthesized by using PAA oligomer combined traditional co-precipitation method, then styrene was added into the ferrofluid and initiator was added to synthesize the first shell of the magnetic polymer latex (ferrofluid was adsorbed on the surface of the particle of PS). Then the temperature-sensitivity NIPAAm, and the functional group donor MAA are used as monomers; $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ nanoparticles are used as magnetic powder, and AIBA is used as initiator to synthesize the temperature sensitive magnetic latex by the method of two-step seeded emulsion polymerization. The effect of the particle size, particle structure and uniformity in the ratio of the monomers are studied. Choose the uniform and suitable latex particle to conjugate with BSA. Make a diagram of the Absorbance V.S Concentration, and then use the UV spectrophotometer at 280nm to measure absorbance in different condition. Compare with the diagram, and calculate the ratio of conjugated BSA indirectly.

摘要

本研究主要是利用兩步驟無乳化劑聚合

反應合成具溫度感應性之磁性乳膠顆粒，來與蛋白質(BSA)鍵結。首先以PAA寡聚物結合傳統的共沉法合成具有 Fe_3O_4 微粒的穩定磁性流體。第一步先加入苯乙烯(styrene)於磁性流體懸浮液中，而後加入起始劑(AIBA)進行乳化聚合反應合成磁性乳膠微粒，進行磁性流體的第一層包覆(磁性流體吸附於PS顆粒表面)，接下來使用具有溫度感應性的NIPAAm及具有-COOH官能基的MAA為單體，使用陽離子型起始劑AIBA，以無乳化劑乳化聚合的方法合成poly(NIPAAm-MAA)的共聚物包覆在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ 微粒之外，形成具有溫度感應性的磁性乳膠微粒。探討不同單體比例下對乳膠顆粒型態大小、包覆均勻性的影響，選出包覆均勻且顆粒大小適中的乳膠顆粒，進行下一步驟的蛋白質接枝。利用吸收度V.S濃度(BSA)圖，接著使用紫外光分光光度計於280nm波長下測出不同條件下的吸收度，比對濃度下，間接算出BSA的鍵結率。

1、前言

在免疫學的研究中，或是臨床醫療的過程中，都需要使用磁性免疫乳膠顆粒來分離篩選細胞，磁性免疫乳膠顆粒的製造方法首先是合成出表面具有特定官能基(例如：COOH, COH, NH_2 等)，內部包覆有磁性粉末材料的磁性乳膠顆粒，而後再將特定的蛋白質(抗體或抗原)與磁性乳膠顆粒表面的官能基反應，使蛋白質接在磁性乳膠顆粒的表面上，形成磁性免疫乳膠顆粒。在實際應用上，是將此接有特

定蛋白質的磁性乳膠顆粒與包含有不同種類細胞的樣品混合，則此時磁性乳膠顆粒表面上的特定蛋白質即可與細胞樣品中的某一特定細胞上的特定蛋白質結合，再將其通過磁場，此時，由於乳膠顆粒中包含有磁性材料，因此結合著某一特定細胞的磁性乳膠顆粒將被磁場吸引住，而其它的細胞則通過磁場，而後將磁場去除，此時接合著特定細胞的磁性乳膠顆粒即可從磁場上脫離，而後加熱使得特定細胞與免疫磁性乳膠顆粒分開，如此即可完成細胞分離篩選的工作。目前磁性乳膠顆粒是以乳化共聚合的方法來製造，但以此方法所合成的磁性乳膠顆粒，其表面的官能基數目並不多，大部分的官能基都在聚合的過程中被包覆於乳膠顆粒的內部，為改善此問題，在前期的研究計劃中，我們以兩步驟 soapless seeded emulsion polymerization 的方法成功的合成出表面具大量官能基的磁性乳膠顆粒，而後再接合上蛋白質形成免疫磁性乳膠顆粒，此免疫磁性乳膠顆粒已可成功的用來分離篩選出特定細胞，且其效率比以乳化共聚合方法所得的免疫乳膠顆粒好。在前期計畫的研究過程中，雖然可合成出表面具大量官能基的磁性乳膠顆粒，但是我們發現，當蛋白質與乳膠顆粒表面的官能基進行接合反應時，由於蛋白質的體積較大，因此容易因為立體障礙的因素而影響抗體的接合效率，造成雖然乳膠顆粒的表面官能基很多，但是所能接上的蛋白質數量並不多的現象，如此即會使得分離細胞的效率降低，為進一步改善此問題，在本研究計畫中預

計使用 NIPAAm、含有 COOH 官能基的單體(例如：acrylic acid(AA)或 methyl acrylic acid(MAA))與磁性材料 Fe_3O_4 ，以 soapless seeded emulsion polymerization 的方法，合成出具有熱敏感性(thermo-sensitive)且表面具有 COOH 官能基的磁性乳膠顆粒。

2、實驗

2.1 藥品

四水合氯化亞鐵 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 、六水合氯化鐵 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、聚丙烯酸 PAA oligomer(poly acrylic acid)分子量 2000、氨水(ammonia hydroxide)(28%)、苯乙烯(styrene)、起始劑 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AIBA)、氮-異丙基丙烯醯胺 (*N*-isopropylacrylamide, NIPAAm)、甲基丙酸(methacrylic acid, MAA)、無鈣鎂磷酸鹽緩衝液粉末(Phosphate Buffer Saline,PBS)、偶合劑 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide(EDC)、胎牛血清白蛋白 Bovine Serum Albumin(BSA)。

2.2 Fe_3O_4 微粒製備

本實驗示利用共沉法來合成穩定懸浮之 Fe_3O_4 微粒，稱為磁性流體。取 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.86g， $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2.35g，及 PAA 寡聚物 0.5g，加入 40g 的去離子水中，於 60°C 水浴中通氮氣預熱 6 分鐘後，加入 10ml 的 28% 的氨水，在 60°C、300rpm 轉數下攪拌 30 分鐘。

2.3 Fe_3O_4 /PS/P(NIPAAm-MAA)複合膠體之合成

第一步：取去離子水，加入苯乙烯，再加入磁性流體，以 300rpm 轉速攪拌，當溫度達反應溫度 80°C 時，加入起始劑(AIBA)進行反應，

以合成 Fe₃O₄/PS 複合乳膠微粒。

第二步：以第一步反應所獲得的複合乳膠為種子，再加入不同比例的氮-異丙基丙烯醯胺(NIPAAm)、甲基丙醯酸(MAA)單體，以 300rpm 的轉速攪拌，當到達反應溫度 80^oC，加入起始劑(AIBA)進行反應。

2.4 Fe₃O₄/PS/P(NIPAAm-MAA)複合膠體之型態及粒徑觀察

以 JEOL JSM-1200 EX II Transmission Electron Microscope 穿透式電子顯微鏡觀察具有 PS 核吸附 Fe₃O₄ 再包覆 P(NIPAAm-MAA) 層之乳膠顆粒，於不同配方下的差異，並觀察其粒徑大小。其中固定 NIPAAm 及 styrene 的量，控制 NIPAAm 與 MAA 的比例來控制反應條件。

2.5 Fe₃O₄/PS/P(NIPAAm-MAA)複合膠體受溫度影響之粒徑觀察

將乳液樣品分別以 pH4、pH7、pH9 之緩衝溶液稀釋後，以 Malvern Zeta Sizer2000 於不同溫度下進行 Zeta Potential 及 Light Scattering 粒徑分析。

2.6 蛋白質的接枝

首先，測定各種不同濃度之 BSA 在波長 280nm 之 UV 吸收值，建立 BSA 之 Calibration curve。

(1) BSA 先吸附：取 0.01g 乳膠顆粒懸浮於 10g PH7.4 之磷酸鹽緩衝溶液中，以超音波震盪 10 分鐘後，加入 0.004g BSA 再以超音波震盪 3 分鐘，並分別置於 25^oC、37^oC 的恆溫環境下 2 小時。而後加入 0.004g EDC 進行 BSA 的接枝 4 小時。後以離心機 12000rpm 離心 20 分鐘，取上澄液測量在 280nm 的 UV 吸收值，並計算 BSA 的接枝量。

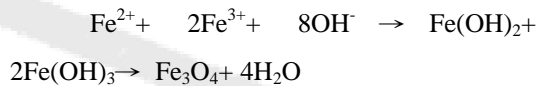
(2) EDC 先活化：取 0.01g 乳膠顆粒懸浮於 10g PH7.4 之磷酸鹽緩衝溶液中，以超

音波震盪 10 分鐘後，加入 0.004g EDC，活化官能基 5~10 分鐘，再加入 0.004g BSA 再以超音波震盪 3 分鐘，並分別置於 25^oC、37^oC 的恆溫環境下 6 小時/18 小時。後以離心機 12000rpm 離心 20 分鐘，取上澄液測量在 280nm 的 UV 吸收值，並計算 BSA 的接枝量。

3、結果與討論

3.1 Fe₃O₄ 微粒製備

本實驗利用共沉法來製備 Fe₃O₄ 奈米微粒，其反應式如下：



由反應式我們可以計算出若要形成 Fe₃O₄ 奈米微粒，[Fe²⁺]:[Fe³⁺]=1:2，根據文獻，反應環境的 pH 值應該大於 7，維持在鹼性的環境下可以增加磁性流體的穩定性，經由量測我們的磁性流體 pH 值約在 8.8~9.2 之間，完全符合上述計算結果。

但是由於所形成的奈米微粒會因為減少表面自由能而發生聚集的現象，所以我們在合成的同時加入 PAA 寡聚物，利用 PAA oligomer 上具有 -COOH 的官能基，在鐵離子加入後會形成 -COOFe²⁺ 及 -COOFe³⁺ 之鍵結，故當氨水參與反應時，Fe₃O₄ 奈米微粒會以 in-situ 的方式形成，並且由於這些 -COOH 官能基的存在，使得磁性微粒的成長受到一定程度的限制，因而所形成的微粒較傳統共沉法所得之微粒粒徑要小，同時官能基在氨水的作用下易形成 -COO⁻，故能使其鏈段上鍵結的 Fe₃O₄ 奈米微粒能穩定的懸浮在水中。

3.2 Fe₃O₄/PS/P(NIPAAm-MAA)複合膠體之合成及型態、粒徑觀察

當採用陽離子型的 AIBA 作為起始劑時，可能發生的反應為：

第一階段可能發生的反應有：

(1) AIBA 的正電荷自由基起始 Styrene 單體而成核，進行聚合反應，形成表面帶有正電荷的 PS 顆粒。

(2) 水溶液中帶負電的磁性流體。

(3) 被 AIBA 起始的 Styrene 與帶負電的磁性流體進行反應而成核，形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ 乳膠微粒。

第二階段可能發生的反應有：

(1) AIBA 的正電荷自由基起始 NIPAAM 及 MAA 單體而成核，進行聚合反應，形成表面帶有正電荷的 P(NIPAAM-MAA) 顆粒。

(2) 被 AIBA 起始帶正電荷的 NIPAAM 及 MAA 與 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ 乳膠微粒進行反應，形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}/\text{P}(\text{NIPAAM-MAA})$ 乳膠微粒。

在第一階段被 AIBA 起始的 styrene 單體形成表面帶正電荷的 PS 顆粒，而此時溶液中的磁性流體會由於 PAA 的解離形成 COO^- 而帶負電荷，於是，正負電荷相吸的結果會導致磁性流體被吸附在帶正電的 PS 顆粒表面。由於 styrene 單體呈現疏水性，形成的 PS 顆粒亦呈疏水性，而磁性流體由於 PAA 的存在而呈親水性，於是兩種不同的顆粒型態出現，第一、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ 顆粒形成後，水溶液中的 styrene 單體 diffuse 入顆粒中而使顆粒繼續成長；第二、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ 顆粒間相互碰撞而成核，並繼續成長，因此我們可以看出合成的顆粒有些表面附著大量磁性流體，而有些顆粒則可以在顆粒中間看到磁性流體（參照圖 1.、2.、3.）。將 sample 經過凍乾後切片的 TEM 照片（圖 4.、5.、6.）更可以印證以上的推論，圖中看出有些顆粒的切片只有顆粒的表面有磁性流體的存在，而部分顆粒則可以在顆粒內部清楚看到磁性流體的分佈。

在第二階段實驗後所得的結果如圖 7.、8.、9. 所示，由 TEM 圖中我們可以明顯的看出 core-shell 的結構出現，而磁性流體則類似夾心的結構存在於顆粒的中間。這個階段的成核機制，首先在第一階段合成帶正電荷的 PS 顆粒之後，由於正負電荷間的互相吸引我們可

以得到表面吸附大量負電荷的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ ，在第二階段反應進行時，溶液中會存在許多被 AIBA 起始而帶正電荷的 NIPAAM 及 MAA 單體，再加上溶液中未反應完全的 styrene 單體，一樣由於正負電荷相吸的結果而在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}$ 顆粒的表面進行反應，遂形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PS}/\text{P}(\text{NIPAAM-MAA})$ 顆粒。在此一系統中，成核的大小由於 PS 成核不均的關係仍然呈現大小分佈，並且可由圖 8. 中看到仍有少數自成核的現象發生。

而本實驗中原計畫為四組不同比例的 NIPAAM/MAA (2/0.2 ; 2/0.4 ; 2/0.6 ; 2/0.8) 來做比較，但實驗幾次後發現，後兩組因酸基量過量，使得 pH 值低於 Fe_3O_4 可穩定範圍，導致最後的乳液產品發生嚴重的 Fe_3O_4 聚集，因此最後選取前兩組做接下來的實驗及測試，而後兩組所呈現之數據僅供參考。

3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{PS}/\text{P}(\text{NIPAAM-MAA})$ 複合膠體受溫度影響之粒徑觀察

圖 10. 顯示不同組成的乳膠顆粒在不同 pH 環境下的表面電位，其中發現當 pH 在 7~9 時 PMAA 上的 COOH 幾乎完全解離為 COO^- ，造成所顯示的表面電位均在 -30 ~ -40mV 間。而當 pH 在 4 時，由於少量 NH_3 變為 NH_4^+ ，造成表面電位在 -5 ~ -15mV 附近。

圖 11. ~16. 顯示不同組成的乳膠顆粒在不同溫度環境下的 Light Scattering 分析結果。其中由 $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{PS}$ 此組看出隨著溫度提高，粒子似乎也有類似 LCST 的效應出現，但比較 NIPAAM/MAA(2/0.2 ; 2/0.4) 的 LCST 效應，較不明顯，因此推測溫度升高破壞氫鍵的作用力，導致粒子間吸引力下降，而所測出之粒徑大小自然就變小，雖然無法真實呈現 NIPAAM 所造成的 LCST 效應，但還是可看出其趨勢是正確的，而氫鍵對於粒徑的影響似乎也是一個需要解決得問題，而提高溫度卻不是一個可行的方法，因為我們要的就是在 LCST

下，顆粒的表面積大的時候將 BSA 接上去，參照圖 17.、18. 可明顯比較出 NIPAAAM/MAA(2/0.2)的顆粒較圓潤，表面積較大，可接上較多的 BSA，因此選擇此組來繼續接下來的實驗步驟。

2.6 蛋白質的接枝

圖 19.為不同 BSA 濃度下的吸收度對照圖，以此為標準，將測得之吸收度與之比對，以下為最終結果：

BSA 接枝率(%)

	25°C	37°C
先吸附	42.25	30.07
先活化, 6h	27.825	16.225
先活化, over-night	28.02	22.12

由此數據可看出先吸附的接枝率較高，這是因為 EDC 與蛋白質同步進行活化及接枝反應會有雙重立體障礙的效應產生，而先吸附就只有蛋白質間的立體障礙，且吸附之後蛋白質上的胺基離乳膠顆粒上的 COOH 更近了，當 EDC 活化了 COOH 後，但蛋白質上的胺基就更容易進行鍵結步驟了，所以導致放置時間(6hr)相近，卻有不小的接枝率差距；溫度較低其接枝率較高，因該是立體障礙導致接枝率的差距；先活化 6hr 與先活化 over-night 的接枝率差別度不大，但於 37°C 時，因為 particle 較小產生立體障礙，因此需要較多時間才能達最大接枝率。

4、結論

本研究以陽離子型起始劑 AIBA 合成以 Fe_3O_4/PS 為核層，以 polyNIPAAAM 及 PMAA 為殼層的共聚乳膠磁性顆粒，並針對 NIPAAAM 及 MAA 的比例加以改變，最後取得最適合的磁性乳膠顆粒 NIPAAAM/MAA(2/0.2)來做蛋白質的接枝，發現先吸附蛋白質的接枝率較高；溫度低時的接枝率也較高。

5、參考文獻

- 1.黃耀輝，”免疫乳膠顆粒的製備”台大化工所碩士論文(1998)
- 2.周玉惠，”溫度感應型磁性乳膠顆粒之製造與研究”台大化工所碩士論文(2004)
3. J.P. Chen, D.R. Su, J. Chin. Inst. Chem. Engrs., Vol.32, No.3, (200)241-251.



圖 1.



圖 2.



圖 3.

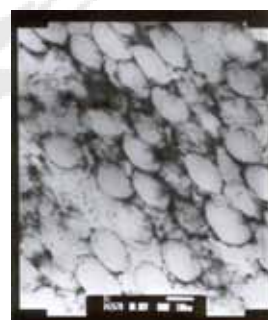


圖 4.



圖 5.



圖 6.

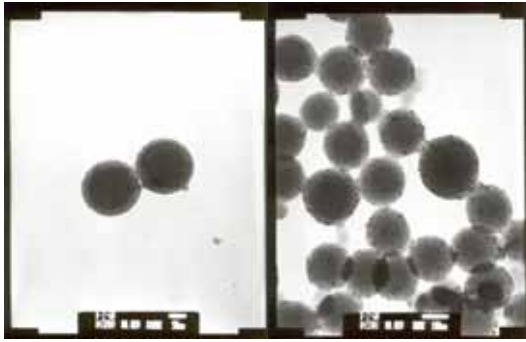


圖 7.

圖 8.

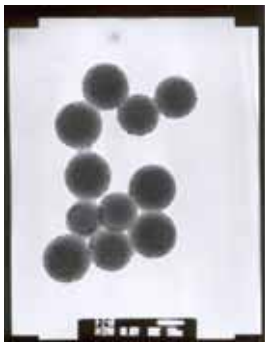


圖 9.

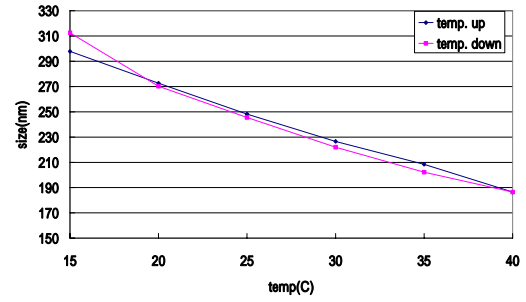


圖 12. Fe₃O₄/PS 於不同溫度下的 Z-Avg.變化

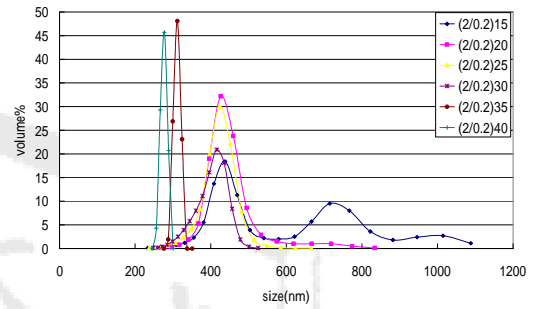


圖 13. Fe₃O₄/PS/P(NIPAAAM-MAA)(2/0.2)於不同溫度下的粒徑變化

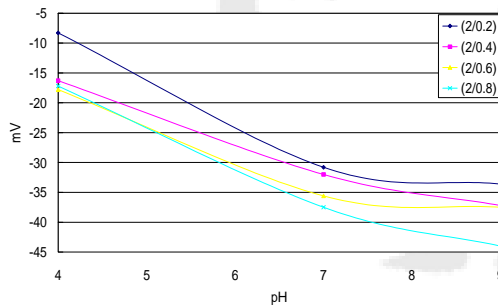


圖 10. 不同 particle 於不同 pH 下的 zeta potential

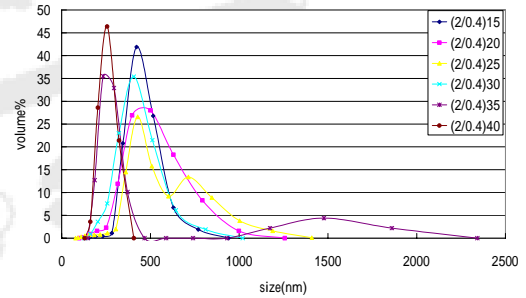


圖 14. Fe₃O₄/PS/P(NIPAAAM-MAA)(2/0.4)於不同溫度下的粒徑變化

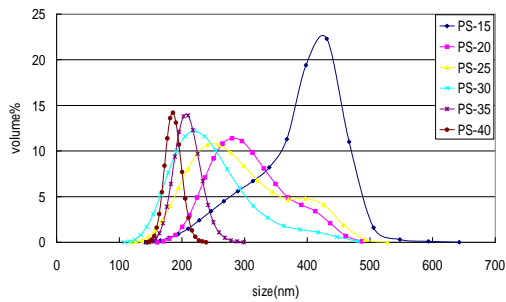


圖 11. Fe₃O₄/PS 於不同溫度下的粒徑變化

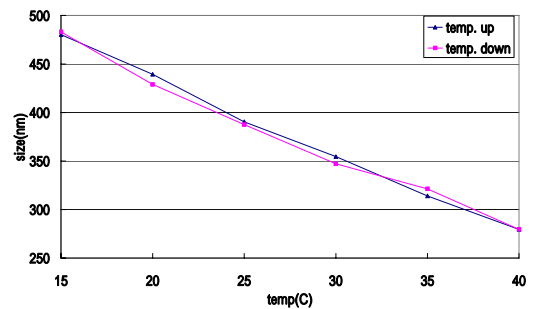


圖 15. Fe₃O₄/PS/P(NIPAAAM-MAA)(2/0.2)於不同溫度下的 Z-Avg.變化

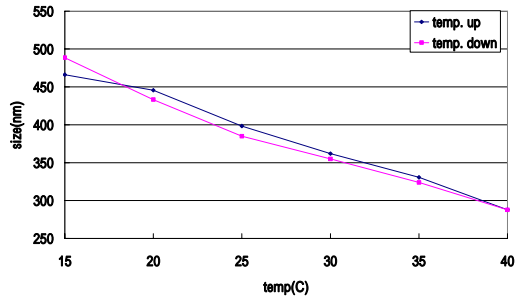


圖 16. Fe_3O_4 /PS/P(NIPAAM-MAA)(2/0.4)於不同溫度下的 Z-Avg.變化

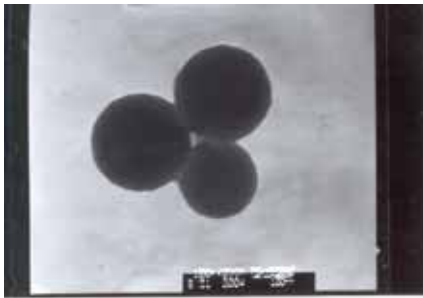


圖 17. Fe_3O_4 /PS/P(NIPAAM-MAA)(2/0.2)的 TEM

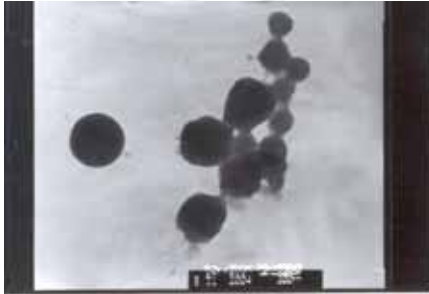


圖 18. Fe_3O_4 /PS/P(NIPAAM-MAA)(2/0.4)的 TEM

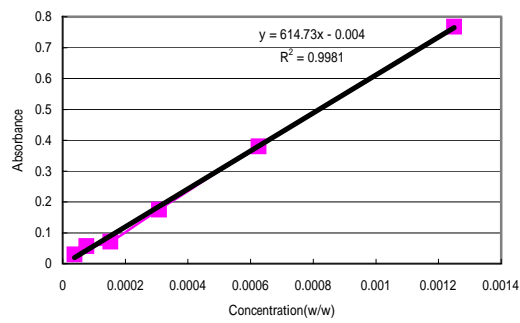


圖 19. 不同 BSA 濃度的吸收度對照圖