

·研究简报·

丙烯酸在聚苯乙烯小球表面预辐射接枝 及其对蛋白质固定化*

李 军 伊 敏 吴清泉 哈鸿飞

(北京大学技术物理系 北京 100871)

关键词 聚苯乙烯, 丙烯酸, 辐射接枝共聚, 固定化

作为免疫化学标记物的载体, 聚苯乙烯小球被广泛应用于放免药盒^[1], 在这一应用中, 聚苯乙烯与抗体等蛋白质之间靠非特异性物理吸附结合在一起. 但这种固定化较微弱, 吸附量难以控制, 时间稍长后, 蛋白质易于脱落而使放免药盒失效, 为解决这一问题, 有人曾在聚苯乙烯小球上 γ 辐射接枝丙烯酸, 希望能将蛋白质的氨基与丙烯酸的羧基键合, 而使其固定化在聚苯乙烯表面, 但结果并不理想^[2].

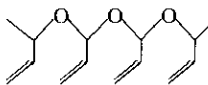
文献中报道曾用⁶⁰Co- γ 辐射技术合成的聚丙烯醛进行蛋白质键合, 在牛血清白蛋白、酶或抗体固定化和随后的细胞分离、免疫分析中获得成功^[3]. 本文以丙烯酸为单体, 以预辐射接枝技术将其接枝在聚苯乙烯小球的表面, 使接枝链上的醛基与蛋白质的氨基形成西佛碱而完成蛋白质的固定化, 这种化学键合法使蛋白质固定化牢固、不会脱落, 且蛋白质固定化量易于控制, 从而有可能改善放免药盒的质量.

1 试剂

聚苯乙烯(polystyrene, PS)小球: 0.13g/粒, 国产; 肝炎抗体: 国产; 丙烯酸: 北京化工厂, 分析纯; 胰蛋白酶(trypsin): 日本半井株式会社; 对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME); Na¹²⁵I; 中国原子能研究院.

2 丙烯酸在聚苯乙烯小球的预辐射接枝与醛基加成物的覆盖

经清洗、恒重过的小球放入玻璃管内, 在室温下⁶⁰Co- γ 辐照(剂量率 440Gy/min, 剂量 24.2kGy), 样品经辐照后转移至 37.5% 丙烯酸溶液中, 为减少均聚加入 0.05% 的摩尔盐((NH₄)₂Fe(SO₄)₂), 通 N₂ 除氧密封, 反应 5h. 实验发现未经辐照的聚苯乙烯小球在反应液中亦可观察到与接枝表面相似的白色覆盖物, 这是由于丙烯酸在聚苯乙烯小球表面发

生醛基加成反应, 生成的醛基加成物  覆盖在小球表面; 而经辐照过的小球表面除发生醛基间的反应外, 还会发生碳碳双键加成的接枝反应. 采用盐酸羟胺-茚三酮法($\lambda = 570\text{nm}$)测定小球上的醛基量, 见表 1.

* 1998-09-10 收稿, 1998-11-06 修稿

Table 1 The amount of aldehyde group on PS determined by ninhydrin method*

Sample	PS blank	PS covered by polyacrolein	PS grafted by acrolein
Increased weight after treatment(%)	0	1.6	1.7
Amount of aldehyde(μ mol)	0	0.5	6.5

* The data in this table were the average values of four experiments, and the errors were not more than 7%

由表 1 可见,经辐射接枝后的苯乙烯小球上的醛基量远高于未辐照接枝的样品,本文的蛋白质固定化实验结果也证实了这一点.

3 接枝丙烯醛的 PS 小球对胰蛋白酶的固定化

将空白的、仅用丙烯醛浸泡的和辐射接枝的 PS, 每组四个小球分别浸入 5mg/mL trypsin-PBS(+)溶液中, 然后测定对底物 TAME 的催化作用, 结果见图 1.

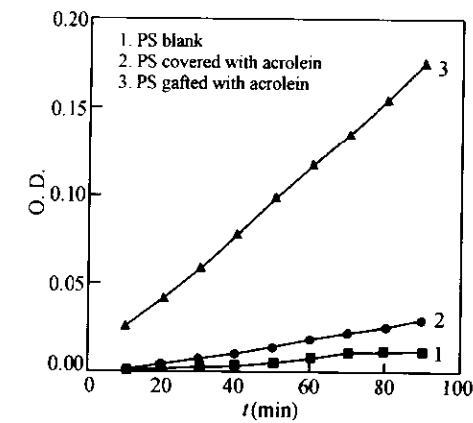


Fig. 1 The activity of different samples treated with trypsin

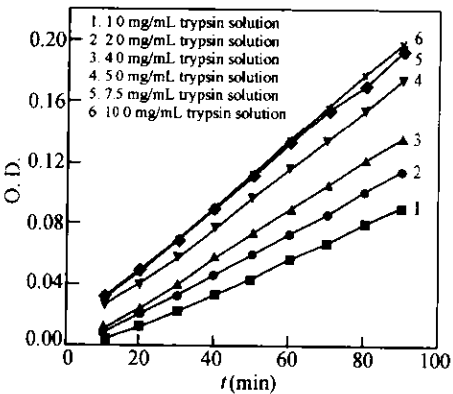


Fig. 2 The effect of concentration of trypsin on the activity of immobilized enzyme

结果表明,经 trypsin 浸泡的空白样品由于没有醛基,仅通过物理作用吸附少量的蛋白,其催化活性极低,接近于零;仅丙烯醛覆盖的 PS,醛基含量极低,通过化学键合而固定化的 trypsin 量也极少,催化活性很弱;而辐射接枝丙烯醛的样品,醛基含量较高,通过醛基与蛋白质氨基生成西佛碱而键合固定化.改变溶液中胰蛋白酶的浓度,对经丙烯醛接枝的 PS 小球进行固定化.固定化酶活性测定结果示于图 2.

由图 2 可见,在胰蛋白酶浓度为 7.5mg/mL 前,酶固定化量随溶液中酶初始浓度的增加而增加.

4 放射性¹²⁵I 标记蛋白的固定化

将 10.0 μ L 肝炎抗体加入 3.0 μ L Na¹²⁵I 后,加入 10 μ L 氯胺-T 反应 3min,用 15 ~

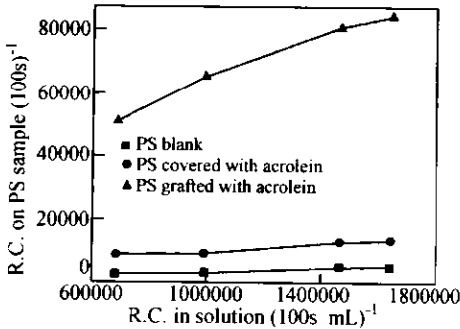


Fig. 3 The effect of protein concentration on the immobilized protein in different samples (R. C. = radioactivity count)

20 μ L 偏重亚硫酸钠终止反应,注入 4cm 高的已被 pH 7.4 PBS 淋洗、小牛血清白蛋白饱和过的葡聚糖(G50)凝胶柱,再用 PBS 洗脱,收集放射性标记的抗体溶液,标记的蛋白溶液中游离¹²⁵I 须分离除去.将接枝丙烯醛的 PS 小球浸入一定放射性的蛋白溶液中室温反应 24h,取出小球,H₂O 洗后用 1% 十二烷基硫酸钠溶液清洗 5 次,共 2h,再用 H₂O 洗 5 遍,擦干小球,置于 γ 探井中测放射性强度,比较小球上固定的蛋白量,以未处理的 PS 小球作为空白,结果见图 3.

结果表明经丙烯醛接枝的 PS 小球上的蛋白量远大于空白或仅有聚丙烯醛覆盖的 PS 小球,说明了接枝醛基对蛋白键合固定化是十分有效的,但由于丙烯醛具有刺激性且与聚苯乙烯易发生羰基的加成聚合,实用时可用其它含醛基物代替.

REFERENCES

- 1 Marlin S, Edwards S. *Nature*, 1972, 235:182~184
- 2 Xu Ziyang(许自炎), Xu Meizhong(徐美中), Rao Zhigong(饶志工), Yang Shubin(杨树斌). *Isotopes(同位素)*, 1990, 3 (3):170~174
- 3 Rembaun A, Yen D'C K, Kempner D H, Ugelstad J. *J Immunol Methods*, 1982, 52:341~351

PREIRRADIATION GRAFTING OF ACROLEIN ON POLYSTYRENE AND IMMOBILIZATION OF PROTEINS

LI Jun, YI Min, WU Qingquan, HA Hongfei

(*Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871*)

Abstract Polystyrene spheres are widely used in radioimmunoassay kit, but it is limited by weak physical adsorption of proteins and the hard control of the amount of adsorbed proteins. The acrolein was grafted on the surface of polystyrene spheres via gamma induced pre-irradiation technique. The induced aldehyde groups could react with the amino groups of proteins to form Schiff base, through which trypsin and ¹²⁵I-labeled antibody were successfully immobilized on the polystyrene spheres by chemical bond. Comparing with the polystyrene blank, the acrolein grafted polystyrene spheres obviously enhanced the amount of immobilized proteins. So by using this method, the radioimmunoassay kit could be improved, but it is better to change to another monomer with aldehyde group because acrolein is irritant and easy to induce oxo-addition reaction with polystyrene.

Key words Polystyrene, Acrolein, Radiation graft polymerization, Immobilization