

· 研究简报 ·

聚苯乙烯免疫检测球珠的表层改性及其性能*

李汝宜 赖青莲 麻文英

(中国药品生物制品检定所,北京)

关键词 聚苯乙烯球珠、改性、免疫检测、苯乙烯-丙烯酸共聚体、肝炎B的检测

随着免疫检测在生物医学研究及临床诊断中的发展和应用,七十年代后期由高聚物制成的乳胶或球珠作为免疫载体亦得到较快的发展;八十年代以来有多种产品问世^[1],其中聚苯乙烯球珠及检测板、盒国外已有专厂生产。

由于聚苯乙烯球珠对免疫体、酶等的固定系物理吸附。在制备及检测过程中,这些蛋白体容易解脱。近年来,国内外开始研制带功能基的乳胶^[2,3],或用特殊方法处理球体^[4],也有用辐射接枝丙烯酸的方法改性球珠表层来制备化学结合型的免疫检测试剂,以期增加检测的灵敏度准确性和免疫球珠的存活期。

我们为了提高聚苯乙烯球珠检测乙型肝炎的准确性和稳定性,应用高分子相容共混原理,使聚苯乙烯球珠表层渗入聚苯乙烯-丙烯酸共聚体,形成聚苯乙烯-丙烯酸与聚苯乙烯的缠结层;球珠表层具有一定羧酸功能基后,用碳化二亚胺为活化剂,先接手臂6-氨基己酸(防止位阻),再使手臂末端的羧酸与抗体蛋白的自由胺基共价结合^[5],制成化学结合型的免疫检测球珠。

经过改性处理后的球珠,尺寸大小无变化(卡尺误差为0.01mm),但其性能与缠结层的性状密切相关,必须注意渗贯液的制备及渗贯工艺。

制备方法及条件

1. 苯乙烯-丙烯酸渗贯液的制备 以过氧化苯甲酰(或偶氮二异丁腈)为引发剂,采用游离基本体聚合或溶液聚合方法。称取一定量的苯乙烯、丙烯酸及引发剂置于反应器内,通氮避氧,在66—70℃下搅拌一定时间(溶液聚合反应为1.5小时左右),制得相对粘度2.5左右的无色透明的苯乙烯-丙烯酸共聚体渗贯液。

制备共聚体渗贯液时需注意丙烯酸与苯乙烯的投料比例,当丙烯酸克分子比例逐渐增加时,共聚体与聚苯乙烯的相容性逐渐降低,苯乙烯与丙烯酸投料克分子比值大于1:1时,所得共聚体即不能很好的渗贯于聚苯乙烯球珠。曾用不同投料克分子比的苯乙烯与丙烯酸的渗贯液处理球珠,制成乙肝免疫检测试剂,按常规放射免疫法进行检测,结果见表1:

* 1986年8月30日收到。

表 1 共聚液改性球珠的性状

样 品	克分子比 (丙烯酸:苯乙烯)	球珠表层性状	容 量* (P/N)	灵 敏 度 (cpm/ml)
Y-1-SA	2:1	乳白色不甚均匀	115.89	0.6
Y-2-SA	1:10	乳白色均匀	185.61	0.1—0.2
Y-11-SA	0.1:10	透明	10.00	

* P/N 中 P 为阳性 cpm (每分钟的放射居里数); N 为阴性即本底的 cpm.

制备共聚物胶液时,要求所用溶剂既能使聚苯乙烯球珠溶胀,又是引发剂,苯乙烯及丙烯酸单体溶解,才利于聚合反应和渗贯工艺较好地进行。我们曾采用混合溶剂和本体聚合方法制备苯乙烯-丙烯酸共聚物溶液,发现聚合的均一性及速度难于控制,不利于苯乙烯-丙烯酸共聚体与聚苯乙烯互渗纠缠,溶液聚合时曾分别选用甲苯或丁酮为溶剂,比较起来丁酮与水混溶性好。球珠渗入胶液后,在水液中悬浮继续聚合固化时,丁酮能渗入水中,促使渗贯链固化,减少球间粘度,因此,效果优于甲苯。

用于渗贯球珠的胶液,其粘度对渗贯效果有很大影响;一般相对粘度(η_r)为 2.5 左右时较为理想。粘度较小时,渗贯量低,羧酸含量少,球面呈不均一的花斑状;相对粘度达 3.2 左右时即有凝胶化现象发生(如图 1),共聚体难以渗贯于聚苯乙烯球珠表层。

2. 渗贯工艺 将在 62—70°C 下反应制成的共聚物胶液(相对粘度 2.5 左右)冷至 30°C 左右,将球珠投入反应瓶内搅拌渗贯数分钟,倒入筛网内,滚动球珠,使附着的流动胶液滤出然后将渗贯胶液的球珠悬浮在水液中搅拌加热至共聚反应终止,球珠表层(即纠缠层)随之固化。

3. 接抗体 先将渗贯了共聚体的球珠置于 0.01 mol 的 6-氨基己酸水溶液中,在 3 ± 1°C 下搅拌半小时后,加入碳化二亚胺(EOC),继续搅拌 2 小时(此步骤称为接手臂)。而后将接好手臂的球珠洗净,置于 0—4°C 的含抗体的 0.1 mol NaCl 液中加入 1 ml 1% EDC 水溶液搅拌 2 小时,加入甘氨酸液,调节其 pH 值,使反应完成而终止,洗去附着的试剂即得成品。

改性聚苯乙烯免疫球珠的性能及检测效果

1. 表层厚度及结构 扫描电镜观测结果如图 1、2。表层(纠缠层)厚度约为 0.5mm,表面为不均匀附着聚合体的凝胶形态(用八十倍立体显微镜观察为平滑形态)。试验时需



图 1 改性聚苯乙烯球珠的表层切面扫描电镜图

图 2 聚苯乙烯免疫球珠的表面形态扫描电镜图

注意离子渗透速度及反应速度,一般测试转型洗净附着试剂时,显示凝胶型离子交换树脂需渗透数月才能完成的特点。

2. 羧酸含量 采用微电导终点法测定表层羧酸含量为 $3.0 \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{eq}/\text{cm}^2$ 。

3. 熔融温度 用刀刮剥表层,从差热分析得出结果如图 3、4, 熔融温度为 135.32°C 及 171.42°C , 对照图 4、2 说明, 表层(即纠缠层)系以苯乙烯-丙烯酸共聚体为主的与聚苯乙烯的共混复合物。

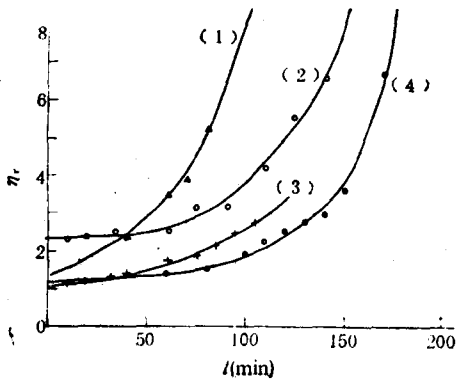


图3 粘度与聚合时间关系

(1)、(4), 以甲苯为溶剂; (2)、(3), 以丁酮为溶剂。

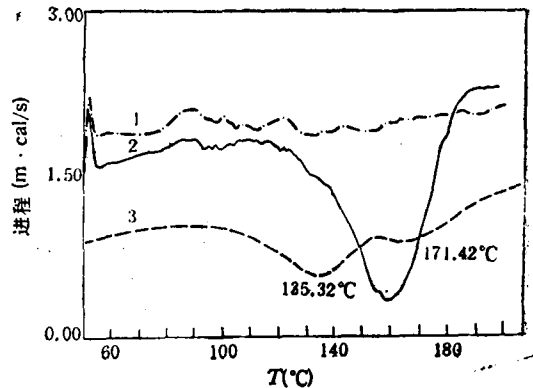


图4 三种聚合物的熔融温度

1, Pst; 2, Pst-AA; 3 PstEntPst-AA.

4. 检测效果 按常规放射免疫法, 即抗体-抗原- I^{125} 标记抗体夹心法测定反应后球珠每分钟的放射居里数 (cpm), 以评定其结合量(容量)及最低检出量(灵敏度)。改性后的聚苯乙烯球珠经我所乙肝病毒室, 对乙肝表面抗原进行检测灵敏度为 $0.1-0.2 \text{ ng}/\text{ml}$ (标准品 $0.2-0.3 \text{ ng}/\text{ml}$), 抗体容量指标符合要求 ($P/N > 100$) 非特异性吸附(即假阳性)在 5% 以下, 初步检测结果表明: 经表层改性处理后的球珠, 具有化学结合型的生物固化试剂的灵敏度高, 非特异性吸附低、稳定性好等优点。

致谢 本工作微量羧酸含量测定方法及数据为本所高分子室张文龙同志提供; 熔融温度数据为本所化药室杨腊虎同志提供。

参 考 文 献

- [1] 马立人、刘耀清, 上海免疫学杂志, 1982, 2(1), 59.
- [2] 久下伦生, 机能材料, 1983, (2); 55.
- [3] Okubo, M. Kamei S. and Matsumoto. T. 特殊性能高分子学术论文报告会预印集, 1984, 7 中国, 桂林.
- [4] Rembaum, A., *Macromolecules*, 1976, 9(2), 328.
- [5] Robert, S. Moddey, William, J. Dreyer and Alan Rembaum, S. P. S. Yen, *The Journal of Cell Biology*. 1975, 64, 75.

MODIFICATION OF THE SURFACE LAYER OF POLYSTYRENE IMMUNOASSAY BEADS AND IT'S PROPERTIES

LI Ruyi LAI Qinglian and MA Wenying

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

ABSTRACT

A Covalently bounded immunoassay beads has been prepared by entanglment styrene-acrylic acid copolymer to the surface layer of polystyrene beads, then the protein (Hepatitis B antibody) bounded with the functional group (carboxylic acid) in the modified layer .

The methods of preparation, the influence of the conditions of preparation and immersion of the copolymer on the properties of modified beads and the results of testing for the Virus of Hepatitis B are discribed.

Key words Polystyrene bead, Modification, Immunoassay, Styrene-Acrylic acid copolymer, Detection of Hepatitis B