

# 氨基化聚苯乙烯微球的制备及在克伦特罗抗体纯化中的应用

赵书阁, 刘丽强, 彭池方, 徐丽广, 胡拥明, 徐万仁, 胥传来\*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 进行氨基聚苯乙烯微球制备方法及其应用于克伦特罗抗体纯化的研究。通过分散聚合法制备聚苯乙烯微球, 硝基反应成硝基化聚苯乙烯微球, 再还原成氨基化微球。并利用电子显微镜及红外光谱仪对微球形态及结构进行表征。成功制备氨基聚苯乙烯微球后, 将微球与盐酸克伦特罗分子发生重氮化反应, 得到连接克伦特罗分子的微球。将这种微球免疫亲和吸附分离盐酸克伦特罗的抗体。最后将纯化后的抗体通过紫外检测, 电泳检测等方法证明所制备的微球用于抗体的纯化可行。

**关键词:** 聚苯乙烯微球; 盐酸克伦特罗; 抗体纯化; 免疫亲和纯化

## Preparation of Amino-polystyrene Microspheres and Its Application in Purification of Antibodies against Clenbuterol

ZHAO Shu-ge, LIU Li-qiang, PENG Chi-fang, XU Li-guang, HU Yong-ming, XU Wan-ren, XU Chuan-lai\*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The objectives of this study were to develop a preparation method for amino-polystyrene microspheres and to evaluate its application in purification of antibodies against clenbuterol. Polystyrene was prepared by dispersion polymerization, and converted into polystyrene microspheres by nitration reaction, which were reduced into amino-microspheres. Scanning electron microscopy and infrared spectrometry was used to characterize the shape and structure of microspheres. Amino-polystyrene microspheres were bound with clenbuterol molecules by diazotization reaction. Amino-polystyrene microspheres with clenbuterol were applied in the immunoaffinity adsorption and separation of anti-clenbuterol antibodies. Finally, purified antibodies were detected by UV and electrophoresis assay. We proved that it is feasible to use amino-polystyrene microspheres with clenbuterol prepared in this study to purify anti-clenbuterol antibodies.

**Key words:** polystyrene; clenbuterol; antibody purification; immunoaffinity

中图分类号: TQ316.3; S859.84

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2011)08-0318-05

高分子微球是直径在纳米级至微米级、形状为球形或其他几何体的高分子材料及高分子复合材料, 包括实心微球、空心微球、多孔微球及一些各向异性微球。高分子微球的起源非常悠久, 最早的高分子微球来自天然的橡胶树的树液, 被称为乳胶<sup>[1-6]</sup>。也许正是由于这个原因, 合成的高分子微球最早被应用于橡胶制品或橡胶制品的添加剂, 这些高分子微球都是由具有弹性的聚合物组成, 如聚丁二烯、聚异戊二烯等。随着微球制备技术的发展, 高分子微球又被应用于涂料、纸张的表面加工、黏接剂、塑料添加物、建筑材料等一般工业领域<sup>[7-13]</sup>。近十几年来, 高分子微球制备技术逐步完

善, 建立了 0.02~100 μm 的均一尺寸的制备方法, 尤其是纳米级微球(数纳米)和超大微球的制备技术有了突破性的进展。高分子微球的制备及应用已经发展成材料学的一个重要研究方向<sup>[14-16]</sup>。聚苯乙烯微球作为一种高分子微球, 因其特殊的形状、大小及结构, 被应用于许多重要领域。杨春洪等<sup>[17]</sup>利用碳化二亚胺法, 将表面带有羧基的聚丙烯酰胺固相微球作为载体, 共价结合黄曲霉毒素抗体, 对其最佳的偶联条件进行了研究。贺锐等<sup>[18]</sup>制备了带磺酸基的聚苯乙烯微球, 并研究其对蛋白质的吸附作用。本实验用制备的氨基聚苯乙烯微球对克伦特罗抗体的纯化效果进行研究, 并与普通的饱和硫

收稿日期: 2010-07-17

作者简介: 赵书阁(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为残留物检测。E-mail: shugezhao@126.com

\*通信作者: 胥传来(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。E-mail: xcl@jiangnan.edu.cn

酸铵沉淀法的纯化效果进行比较,采用传统的ELISA方法对各自纯化后的抗体进行检测,旨在考察高分子聚合物微球纯化抗体的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

盐酸克伦特罗、盐酸克伦特罗抗体 自制;偶氮二异丁腈 华美生物工程公司;聚乙炔吡咯烷酮 北京拜尔迪生物技术公司;对羧基苯甲醛、*N,N*-二甲基苯胺 上海晶纯试剂有限公司;乙腈 美国Fisher公司;乙二胺四乙酸 北京精益化工厂;聚丙烯酰胺 中国医药集团上海化学试剂总公司。

### 1.2 仪器与设备

TGL-40B 台式低速离心机 上海安亭科学仪器厂;1810-B 石英自动双重纯水蒸馏器 金坛市荣华仪器制造有限公司;U-3000 紫外扫描仪 日本岛津公司;Platform ZMD 4000 液相色谱质谱联用仪 美国Waters公司;DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;Nexus 470 傅里叶变换(原位)红外光谱仪 美国Thermo Nicolet公司;Nova NanoSEM x30 超高分辨率场发射扫描电子显微镜 FEI 香港有限公司;DYY-8C 型琼脂糖凝胶电泳仪 北京六一仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 氨基聚苯乙烯微球(amino-polystyrene microspheres, PAS)的制备及鉴定

##### 1.3.1.1 聚苯乙烯(polystyrene microsphere, PS)微球的合成

制备PS微球的配方见表1。将聚乙炔基吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、无水乙醇和去离子水按配方加入反应釜中,搅拌转速130r/min,使其形成均相物系,并通氮气鼓气泡排空气20min,然后开启温控系统,使物系迅速升温到70℃,当温度稳定后,加入定量的苯乙烯(styrene, St)和偶氮二异丁腈(azobisisobutyronitrile, AIBN)振荡混合物,保持搅拌转速不变,在氮气气氛中反应12h后自然冷却终止,得到白色乳液。将上述白色乳液以5000r/min的转速进行离心沉降,除去上清液,加入无水乙醇经超声分散清洗下层微球,然后再离心沉降,洗涤,如此反复操作3遍。最后将洗涤后的微球37℃真空干燥24h,即得到白色粉末状PS微球。

表1 制备PS微球的配方

Table 1 Preparation formula for polystyrene (PS) microspheres

组分	St	AIBN	PVP	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	H <sub>2</sub> O
加入量/g	18.180(20mL)	0.182	1.818	74.984(95mL)	4.999(5mL)

注:括号中为实际加入体积。

##### 1.3.1.2 硝基聚苯乙烯微球(nitro polystyrene microspheres, PNS)的制备

烧瓶中加入1.0g聚苯乙烯微球,加入10mL去离子水,配制成10g/100mL的聚苯乙烯微球乳液。在50℃水浴中高速搅拌下,加入硫酸与硝酸比例为3:2的混合酸,反应2h。将反应混合物注入去离子水中,过滤,并用去离子水洗涤至滤除产物的pH值呈中性,将洗涤后的微球37℃真空干燥24h,得到淡黄色粉末。

##### 1.3.1.3 PAS的制备

取0.5g硝基聚苯乙烯微球于烧瓶中,在75℃油浴中高速搅拌下,加入2mol/L KOH溶液30mL,加入2g还原剂Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,反应4h。将反应混合物过滤,并用去离子水洗涤至滤除产物的pH值呈中性,将洗涤后的微球37℃真空干燥24h,得到黄色粉末。

##### 1.3.1.4 产物的鉴定表征

用场发射高分辨扫描电子显微镜观察微球形态,红外光谱仪测定微球表面官能团性质。

#### 1.3.2 硫酸铵法纯化克伦特罗的抗体

采用两步沉淀法:①取等量的抗体血清(质量浓度为10mg/mL)500μL和生理盐水混匀,然后加入1mL饱和硫酸铵,混匀,4℃静置1h;然后5000r/min离心20min,弃上清;②把沉淀用500μL生理盐水混匀,再加入500μL饱和硫酸铵,混匀,4℃静置1h后5000r/min离心20min,弃上清液;③把沉淀用500μL生理盐水重悬,置0.01mol/L的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中透析24h。最后得到纯化后的抗体。

#### 1.3.3 氨基PS微球偶联克伦特罗(clenbuterol, CL)方法

##### 1.3.3.1 克伦特罗重氮化

取0.2mmol的盐酸克伦特罗,加入到2mL 1mol/L预冷的HCl溶液中,冰浴搅拌,慢慢滴加1mol/L的NaNO<sub>2</sub>,期间不断用KI试纸检测,直至试纸变为深紫色,停止滴加,继续搅拌30min。

##### 1.3.3.2 氨基PS微球偶联克伦特罗

取10mg的氨基PS微球,加入到制备的重氮化盐酸克伦特罗中,避光反应,室温持续搅拌3h。透析3d除去多余的克伦特罗小分子,过滤,37℃真空干燥24h,得到淡黄色粉末状固体,即为CL-PS(clenbuterol-polystyrene)微球。

#### 1.3.4 CL-PS微球纯化抗体方法

分别取所得到的不同量CL-PS微球0.5、1、2、5、7.5、10mg溶解在1mL的PBS中,均分别加入200μL克伦特罗抗体(质量浓度为10mg/mL),室温条件下反应1h,得到吸附克伦特罗抗体的微球。离心,弃去上清液,收集吸附克伦特罗抗体的微球,将微球置于1mL 70%甲醇中,振荡反应1h,离心,收集上清液,用

超滤管离心, 置换甲醇, 重新溶解于 200  $\mu\text{L}$  PBS 中, 得到纯化后的克隆特罗抗体。

### 1.3.5 抗体纯化的鉴定

#### 1.3.5.1 紫外检测

以波长( $\lambda$ )为横坐标(nm), 吸光度(A)为纵坐标作图, 即得到紫外光谱(ultra violet spectra, UV)。取纯化后的抗体溶液 100  $\mu\text{L}$  用 PBS 稀释 10 倍后, 在 200~400nm 波长范围进行紫外扫描测定。

#### 1.3.5.2 电泳检测(SDS-PAGE 鉴定法)<sup>[19]</sup>

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)鉴定法。

#### 1.3.6 纯化抗体的效价测定

采用间接 ELISA<sup>[20]</sup>方法, 方阵滴定法测定抗体的效价。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨基 PS 微球的表征

#### 2.1.1 SEM 表征

分别将各样品用场发射高分辨扫描电子显微镜进行观察。图 1 所示的是 PS 微球的 SEM 图片, 可以看出, PS 微球具有良好的球形度并且单分散性好, 这为 PS 微球的进一步硝基化和氨基化提供了可靠的保证。

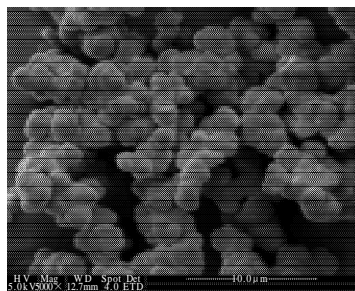


图 1 表面无官能团的聚苯乙烯微球

Fig.1 PS microspheres without surface functional groups

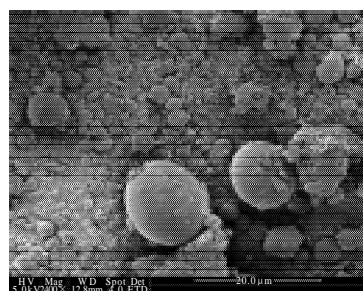


图 2 硝基聚苯乙烯微球

Fig.2 PNS microspheres

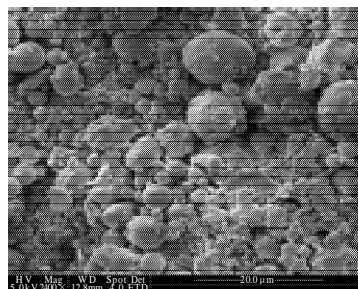


图 3 氨基聚苯乙烯微球

Fig.3 PAS microspheres

图 2、3 分别是 PNS 和 PAS 微球的 SEM 图片, PS 微球在经过氧化性和腐蚀性极强的混合酸硝化之后, 虽然保持了较好的球形度, 但结构和形态遭到破坏, 分散性不是很好。此外强还原剂  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  对微球的结构和形态产生一定的影响, PAS 微球的球形度和分散性不是很好, 微球形成条件仍需探索调整。

#### 2.1.2 红外光谱表征

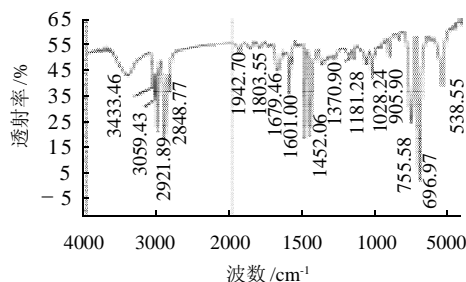


图 4 氨基聚苯乙烯微球的红外光谱图

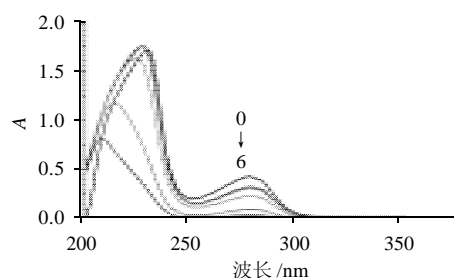
Fig.4 Infrared spectrum of PAS microspheres

采用 KBr 制样法, 设定分辨率  $4\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数 32 次。从图 4 中可以看出,  $1452\text{cm}^{-1}$  和  $1492\text{cm}^{-1}$  处为苯环 C—C 的伸缩振动峰,  $697\text{cm}^{-1}$  和  $755\text{cm}^{-1}$  为苯环上 C—H 键的同位相面外弯曲振动吸收峰,  $3025\text{cm}^{-1}$  尖锐峰为烯烃上 C—H 伸缩振动峰,  $1540\text{cm}^{-1}$  附近 C=C 伸缩振动吸收。1028 $\text{cm}^{-1}$  和 905 $\text{cm}^{-1}$  为乙烯基上 C—H 弯曲振动的重要特征。1679 $\text{cm}^{-1}$  处为 C=O 基的伸缩振动峰。3433 $\text{cm}^{-1}$  为一  $\text{NH}_2$  的反对称伸缩振动峰。红外光谱结果说明聚苯乙烯微球的氨基化是成功。

#### 2.2 纯化抗体的紫外鉴定

图 5 中 280nm 处为盐酸克隆特罗抗体的特征峰, 在所用微球量由 0.5mg 逐渐增大到 5mg 时, 纯化得到的克隆特罗抗体量逐渐增大, 但是再增加到 7.5、10mg 时, 得到的抗体量不再变化, 最大抗体吸光度  $A_{280\text{nm}}$  约为 0.3, 硫酸铵沉淀法纯化的抗体最大吸光度为 0.41, 因为抗体浓度是在稀释 10 倍的条件下测定, 因此纯化后得到的最大抗体浓度分别是: 微球法为 3mg/mL, 普通的硫酸铵沉淀法为 4.1mg/mL, 与抗体原质量浓度 10mg/mL 相比,

低了很多,说明在纯化的过程中除去了很多杂蛋白。



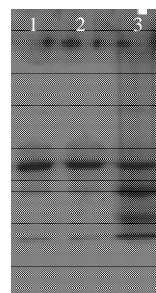
0~6 分别代表硫酸铵法纯化后的抗体以及分别使用微球量为 10、7.5、5、2、1、0.5mg 的微球法纯化后的抗体。

图5 盐酸克伦特罗抗体的紫外光谱图

Fig.5 UV spectra of antibodies purified by sulphuric acid ammonium method or with different amounts of PS microspheres

### 2.3 纯化抗体的效果

从图6可看出,经纯化的抗体纯度提高,杂质较少,微球亲和纯化的抗体条带较硫酸铵纯化的抗体条带稍窄,说明亲和纯化过程中,去除了一些非特异的IgG,而且在洗脱过程中,也可能存在抗体没有完全洗脱,造成纯化后的抗体浓度比传统的硫酸铵法的稍低,与紫外图的最大吸光度相符,说明微球法纯化的抗体纯度更高一些,但是得到的纯化抗体量没有硫酸铵法高。



1.硫酸铵法纯化的抗体; 2. CL-PS 纯化的抗体; 3.未纯化的抗体。

图6 盐酸克伦特罗抗体的电泳图

Fig.6 Electrophotogram of anti-clenbuterol antibodies

### 2.4 纯化抗体的效价测定

将微球纯化法所得抗体与硫酸铵法纯化所得抗体均配成 1mg/mL, 然后分别做间接 ELISA 实验, 测定结果分别见表 2、3。

阳性血清的  $A_{450}$  大于等于阴性对照孔的 2.1 倍并且  $A_{450}$  大于 0.1, 此时的抗体稀释倍数即是该抗血清的效价。由测定结果可知, 两种方法的抗体效价分别为硫酸铵法 72900、微球纯化法 218700。微球纯化法的效价相对较高, 证明了微球纯化的可行性与高效性。

## 3 结 论

本研究探索了聚苯乙烯微球、硝基化微球、氨基

表2 硫酸铵法纯化抗体的效价及其作用浓度

Table 2 Titer and working concentration of antibody purified by sulphuric acid ammonium method

包被原	抗体											
	100	300	900	2700	8100	24300	72900	218700	656100	1968300	N2000	抗体稀释液
300	2.757	2.638	2.451	2.328	2.274	1.934	1.179	0.541	0.274	0.169	0.071	0.072
900	2.632	2.523	2.344	2.189	2.312	1.900	1.253	0.490	0.218	0.127	0.054	0.065
2700	2.626	2.522	2.369	2.336	2.154	1.801	1.076	0.421	0.181	0.097	0.049	0.049
8100	2.602	2.470	2.367	2.319	2.036	1.541	0.746	0.232	0.141	0.085	0.046	0.049
24300	2.573	2.320	2.294	2.091	1.703	1.067	0.454	0.185	0.104	0.073	0.048	0.051
72900	2.511	2.207	2.152	1.966	1.528	0.752	0.301	0.136	0.087	0.068	0.044	0.045
218700	2.084	1.950	1.821	1.452	1.002	0.436	0.178	0.096	0.078	0.056	0.039	0.042
656100	1.902	1.502	1.317	0.892	0.608	0.226	0.108	0.077	0.057	0.051	0.037	0.039

表3 微球纯化抗体的效价及其作用浓度

Table 3 Titer and working concentration of antibody purified by this method

包被原	抗体											
	100	300	900	2700	8100	24300	72900	218700	656100	1968300	N2000	抗体稀释液
300	2.414	2.431	2.325	2.187	2.218	2.099	2.020	1.811	1.050	0.763	0.073	0.071
900	2.192	2.102	2.071	1.652	1.639	1.850	1.777	1.316	0.941	0.587	0.059	0.062
2700	2.200	2.173	2.122	1.890	1.880	1.878	1.892	1.261	0.464	0.239	0.051	0.050
8100	2.308	2.171	2.090	2.067	2.054	1.958	1.831	1.067	0.350	0.103	0.055	0.054
24300	2.005	1.978	1.909	1.905	1.852	1.806	1.607	0.745	0.143	0.084	0.047	0.049
72900	1.775	1.801	1.722	1.746	1.631	1.497	1.247	0.460	0.095	0.076	0.045	0.043
218700	1.690	1.429	1.278	1.181	0.979	0.783	0.617	0.145	0.046	0.041	0.042	0.048
656100	1.557	1.144	0.841	0.727	0.607	0.475	0.345	0.198	0.034	0.030	0.039	0.041

化微球的制备条件并对所得进行表征,初步确定了氨基聚苯乙烯微球制备方法。得到氨基聚苯乙烯微球后,与克伦特罗分子发生重氮化反应,将克伦特罗分子成功连接在微球上。所得微球与盐酸克伦特罗抗体进行亲和纯化。最后进行了表征,通过紫外检测,电泳检测等方法证明所制备的微球可以用于抗体的纯化。并用纯化的抗体做克伦特罗的ELISA检测,并与硫酸铵法纯化所得抗体相互比较,证明了微球纯化的可行性及高效性。

#### 参考文献:

- [1] 胡忠良, 马承银, 黄可龙, 等. 无皂乳液聚合的理论研究及其制备方法[J]. 安徽化工, 2001, 112(4): 46-48.
- [2] 钱晓峰, 陈涛, 郭商勇. 准分子激光加工 PMMA 生物芯片片基的实验研究[J]. 微纳电子技术, 2006, 43(1): 47-49.
- [3] 杨旭, 李欣. 悬浮聚合法制备稳定的多孔高分子微球[J]. 材料导报, 2007(2): 146-147.
- [4] 汪静, 李康, 钱卫平, 等. 垂直沉积法制备二氧化硅胶体晶体及其表征[J]. 东南大学学报: 自然科学版, 2003, 33(2): 208-210.
- [5] 张洪涛, 吕睿, 陈敏. 分散共聚合制备 PSt-AA-EGDMA 功能性单分散微米级交联微球的研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(2): 366-371.
- [6] 张凯, 雷毅, 王宇光, 等. 微米级单分散共聚物微球的制备[J]. 高分子学报, 2002(3): 341-344.
- [7] 黄锦霞, 许俊鸿, 孙蓉, 等. 苯乙烯/二乙烯基苯在乙醇/乙二醇单甲醚中分散共聚合速率及粒子大小的研究[J]. 高分子学报, 2003(4): 535-539.
- [8] 由英才, 祁东风, 张保龙, 等. 种子聚合法制备单分散交联聚苯乙烯微球的研究[J]. 高分子材料科学与工程, 1994(6): 13-17.
- [9] 罗正平, 张秋禹, 谢钢, 等. 分散聚合研究[J]. 高分子通报, 2002(5): 35-40.
- [10] 曹同玉, 戴兵, 戴俊燕. 单分散大粒径聚合物微球的合成及应用[J]. 高分子通报, 1995(3): 174-180.
- [11] MASCHER D G, UNGER C P, MASCHER H J. Determination of neomycin and bacitracin in human or rabbit serum by HPLC-MS/MS [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43(2): 691-700.
- [12] van BRUIJNSVOORT M, OTTINK S J M, JONKER K M, et al. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. J Chromatography A, 2004, 1058(1/2): 137-142.
- [13] FLURER C L. The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1995, 13(7): 809-816.
- [14] HAASNoot W, STOUTEN P, CAZEMIER G, et al. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney [J]. The Analyst, 1999, 124(3): 301-305.
- [15] LOOMANS E E, van WILTENBURG J, van AMERONGEN A, et al. Neamin as immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin and neomycin in milk[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(3): 587-593.
- [16] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 52-81.
- [17] 杨春洪, 李培武, 刘学群. 聚丙烯酰胺固相微球与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 抗体偶联条件的研究[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(2): 62-65.
- [18] 贺锐, 曹光群, 杨吉. 表面带磺酸基团的聚苯乙烯微球的制备及其对蛋白质的吸附[J]. 化工进展, 2007, 26(7): 991-994.
- [19] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 11-45.
- [20] FENG Weiyun, ZHAO Luhang, WANG Keyi, et al. Interaction of polysaccharides with interferon-gamma using an improved ELISA approach[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 58(1): 89-94.