

知识介绍

功能高分子材料载体在检测诊断中的应用

张军华, 刘学涌, 丁小斌, 彭宇行^{*}

(中国科学院成都有机化学研究所, 成都 610041)

摘要:综述了作为生物活性分子载体用功能高分子材料(生物传感器、胶乳、磁性粒子、凝胶)的合成、特点及其在检测诊断中的应用。

关键词:功能高分子材料; 载体; 检测; 诊断

前言

高分子材料具有廉价、可功能化等特点, 应用于临床检测具有诸多优点, 如高灵敏度、快速、简便, 可小型化、家用化、多样化等。快速准确、费用低廉是检测技术和手段的发展目标。随着高分子科学的发展和新型功能高分子材料的开发, 高分子材料在临床检测诊断领域的应用日益广泛, 以高分子材料为载体的生物传感器、胶乳、磁性粒子、凝胶等已经得到了日益广泛的研究和应用。

1 疾病诊断原理

生物体都有一种特殊的功能, 当外界的细菌、病毒等异物(抗原)侵入人体时, 会自动地产生与异物抗原相对应的抗体蛋白, 该抗体与入侵的抗原发生特异结合, 使入侵抗原失活。这就是生物体的自我保护功能。通过检测抗原或抗体的有无及浓度的高低, 便可诊断疾病感染、病变或在治疗过程中疾病的康复程度。这类检查是利用相对应的抗原和抗体特异而且定量地生成抗原-抗体复合物的基本原理实现的。当人体发生变态(比如生病)时, 在体内必然生成异种蛋白(抗原), 测定该蛋白抗原, 便可诊断疾病(或变态)^[1]。把抗原或抗体通过物理吸附或化学键合的方法, 固载于功能高分子材料表面, 这样的功能高分子材料便可应用于疾病的检测、诊断。

2 生物传感器

近几年, 生物传感器在医药、卫生、食品等领域引起越来越广泛的关注, 其特点为简单、快速、准确。酶传感器、免疫传感器、微生物传感器和 DNA 传感器等都得到迅速发展。

生物传感器是一种由生物元件和物理元件构成的分析仪器, 生物元件提供的特异性反应及信号经由物理元件转变为光信号或电信号。用作生物元件的材料有酶、细胞及细胞器、抗原、抗体、核

基金项目:国家自然科学基金 59903007;

作者简介:张军华, 男, 27 岁, 中国科学院成都有机化学研究所在读博士, 研究方向: 生物医学材料。

^{*} 通讯联系人。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

酸、受体等,它们可以同被测物起特异性反应。物理元件包括电化学的各种电极、光导纤维、测声仪器、压电晶体等^[2]。生物传感器的工作原理一般是固定在电极表面的生物大分子与被测生物活性分子发生特异性结合时,将引起电极表面电荷密度发生改变或者导致金属表面对入射单色光的反射率发生改变,通过检测这种改变而获得相关信息。

生物传感器中一个重要方面是对生物大分子的固定,方法很多,聚合物膜连接是其中应用较为广泛的一种。电极表面的聚合物膜可以采用聚合物涂覆法和单体在电极表面聚合法来生成^[3]。在涂覆法中应用的聚合物有聚乙烯亚胺、羧甲基纤维素、聚丙烯酰胺^[4]、甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸乙酯共聚物^[5,6]、聚苯乙烯^[7]等。单体在电极表面生成聚合物膜可以采用电聚合^[8]、等离子体聚合^[9,10]等技术来实现。例如酶生物传感器,通过电化学聚合在电极上制备导电高分子膜(聚苯胺、聚吡咯),将酶固定在膜中,可以改变酶与电极之间的电子转移,从而克服了通常固定化酶技术中常需加入电子转移介质或经特殊化学修饰而带来的酶电极稳定性较差的缺点。这样,导电高分子既是酶的固定化载体,又能发挥电子转移介质的作用,使酶电极的性能大为改善^[11]。

李毓琦等人^[12]以丝膜为载体做成抗体膜片,然后组成免疫电极来检测乙型肝炎表面抗原,其抗体膜可以预先制备,批量生产,一次性使用,使检测周期大为缩短。寇文朋等人^[13]以三元接枝共聚物为载体制备了葡萄糖生物传感器,其对葡萄糖的响应很快,一般在 7~10s 之内可以达到最大响应的 95%,最低检测极限为 5 $\mu\text{mol/L}$,且灵敏度高,线性范围大,重现性好。

3 胶乳

聚合物胶乳一般采用乳液聚合法或无皂乳液聚合法来制备,粒径在 0.05~1 μm 范围内。由于抗体抗原的直接观察是比较困难的,当抗原抗体的浓度较大时,就可能在抗原抗体的接触面后反应管的底部出现沉淀,如果浓度不够它们的结合就不易看到。因此如用粒径较大的颗粒作载体,当发生抗原抗体结合时,就使许多颗粒聚集起来,这样观察就比较容易^[14]。胶乳凝聚已用于多种疾病的检测诊断,如聚苯乙烯胶乳用于乙型肝炎、血吸虫病、类风湿、梅毒等的检测诊断^[15~17]。Yamashiki 等^[18]采用胶乳凝聚法快速检测乙型肝炎表面抗原,其最小检测极限是 15 ng/ml ,灵敏度是反相被动血细胞凝聚法的三倍,且不需昂贵设备。

测定凝聚反应的方法主要有^[1]:(a)载玻片法,这是一种定性的检测方法,简单易行。在载玻片上,将待测样本(血清、尿、唾液)和乳液诊断试剂混合后放置数分钟,观察乳液微球是否发生凝聚来进行判断;(b)微滴定板法,这是一种半定量的方法。将样本进行倍比稀释,根据乳液凝聚的结果来进行判断;(c)浊度滴定法,随着凝聚颗粒的生成,浊度增加,以此来推算出抗原的浓度;(d)测定凝聚物沉淀面积进行定量计算。

采用乳胶粒进行临床检测,要求只发生特异性凝聚反应,因此要求乳胶粒必须具有以下特点:

(1)粒子尺寸尽可能均匀;

(2)适当的乳液分散稳定性。

虽然胶乳凝聚具有快速、便宜的特点,现在已经能根据需要合成出期望尺寸、密度和表面特征的胶乳粒子,且胶乳粒子的敏感性和特异性跟酶免疫分析和放射免疫分析一样,但由于有时需要使用羰二亚胺等蛋白质偶联剂,使其成本升高,应用受限。另外由于乳化剂的存在使其表面彻底去除乳化剂是极其困难的,这些乳化剂的存在不仅影响蛋白质的吸附,还会对蛋白质产生破坏甚至使其失活,因此胶乳的灵敏性受限^[19,20]。

4 磁性粒子

磁性粒子包括磁性高分子微球、磁珠、磁性微粒子等^[21~24]。磁性粒子一般是指在微粒子中包含有磁性物质(如 Fe_3O_4 , Fe_2O_3), 这样的微粒子在外加磁场的作用下将能迅速移动, 因此这样的粒子将具有在临床检测中实现快速分离、迅捷方便的特点。

4.1 磁性粒子的合成方法:

4.1.1 物理方法^[25]

(1) 将磁性粒子注于功能化的聚苯乙烯孔洞中

含交联聚(苯乙烯、马来酸)结构的单分散聚合物粒子在 NaOH 存在下进行表面腐蚀, 产生微孔并被纳米分散磁性物质填充, 后用反应性聚合物覆盖。微粒直径 $2\sim 15\mu\text{m}$, 氧化铁分布在微球外部, 含量 $5\%\sim 20\%$, 应用于分子生物学或诊断工具。

(2) 多糖包覆氧化物粒子(核-壳法)

磁性氧化物被有化学亲和和静电作用的水溶性高分子聚合物包覆, 如多糖(葡萄糖, 淀粉, 聚氨基葡萄糖)或亲水合成高分子聚乙烯亚胺, 聚乙烯基吡咯烷酮。磁性物含量 $70\%\sim 80\%$, 易于分离, 应用于DNA分离和纯化, 蛋白检测和分离。

(3) 在多糖存在下沉淀氧化铁(Molday 法)

Molday 等人描述了在多糖存在下氧化铁沉淀合成超细磁性葡萄糖纳米粒子。多糖和三价铁, 氯化亚铁一起溶于水中, 水溶液在搅拌下加热至 $60\sim 80^\circ\text{C}$, 纳米粒子的形成开始于氢氧化钠溶液的加入, 在慢慢加入过量的氢氧化钠后, 水洗, 在高梯度磁性分离装置上分离。粒子尺寸 $50\sim 150\text{nm}$, 具有很低的沉降倾向, 含量 $25\%\sim 35\%$, 应用于细胞分离, 标记病毒模型及一些特殊分析技术。

(4) 在硅珠中嵌入氧化铁

一般来说, 单分散硅粒子通过四乙氧基硅烷在氨水和乙醇存在下在 40°C 缩聚反应得到, 直径小于 $2\mu\text{m}$, 磁性硅粒子是通过在室温下加入氧化铁, 搅拌, 加热至 40°C , 结果得到平均粒子直径 $5\sim 8\mu\text{m}$, 最后覆盖且引入官能团, 通过四乙氧基硅烷和功能化的烷氧基硅烷共聚来实现。磁性硅粒子在有机溶剂, 酸或碱性缓冲溶液中都稳定, 因此这些粒子可以在有机介质中表面改性或在有机溶剂中的特殊应用, 如应用于蛋白和核酸的分离和纯化, 也在酶的固定化和其他催化中应用, 因为高度稳定性也可用于工业中除去废水中重金属。

(5) 在聚合物基体中氧化铁均相分散

溶剂蒸发法 聚合物溶解在挥发性溶剂中, 把干燥的氧化铁粉加入并在超声处理下再悬浮, 接着混合物在非溶剂(可含乳化剂)中乳化, 将悬浮物搅拌直到挥发性溶剂从悬浮液中蒸发完毕, 留下微球悬浮在非溶剂中。

油包水悬浮技术 一般来说蛋白质和多糖在一定温度下溶解于水中, 把干燥氧化铁粉或磁流体加到聚合物溶液中, 水性蛋白溶液分散在热棉籽油中, 室温, 搅拌, 在这个过程中, 蛋白质变性, 在用石油醚和乙醚洗涤后, 它们在 $4\sim 10^\circ\text{C}$ 水相悬浮较稳定(几天)。

4.1.2 磁性微粒子的化学合成方法

磁性微粒子的化学合成方法有磁流体存在下的乳液聚合^[26]和磁流体存在下的分散聚合^[27,28]。一般是在磁流体存在, 将单体、乳化剂或分散剂、引发剂一起加入到反应瓶中, 氮气保护下进行乳液

或分散聚合而得到。化学合成的磁性高分子微粒子,其粒径一般可以从 $0.1\sim 100\mu\text{m}$ 。作为检测用功能高分子材料载体,必须有很好的粒径均一性。

4.2 磁性粒子的应用、检测方法及存在的缺点

挪威 Olsen 等用亲水超级磁性聚合物粒子通过杂交捕获特异 DNA 和 RNA 目标。在典型的诊断测试中,磁性粒子捕获目标物(如病毒、细菌、蛋白、核酸等),通过磁分离浓缩后用不同方法作分子标记。Faw·Rong 等将免疫磁珠技术应用在卵巢癌的研究中,免疫磁珠包覆着卵巢癌的单克隆抗体,从卵巢癌患者腹水中分离癌细胞^[29]。

磁性粒子的免疫测定技术有:微滴粒子凝聚法,铁蛋白免疫放射测定法,免疫过滤点测定法,免疫荧光法^[30]。

磁性粒子虽然在临床检测中获得了广泛的应用。但目前应用于检测的微粒子仍有一些缺点^[28]:(1)微粒子粒径较小,需在电镜下观察;(2)微粒子表面功能基活性低,与抗体结合有时需用交联剂。改进方法有:(1)在微粒子表面接上亲水性长链,这样亲水性官能团将可以在亲水介质中得到充分伸展,使反应活性提高;(2)在微粒子表面接上高反应活性叠氮羧基等的彩色微粒子,从而使微粒子接上抗体后易于观察,敏感性增加。

5 凝胶

凝胶作为一种载体也可用于疾病的诊断,如日本 Saito, Tomoo 等^[31]以磁性凝胶粒子经抗体致敏后,用来检测乙型肝炎表面抗原和乙肝病毒感染的诊断。随着各种新型凝胶如智能凝胶、可生物降解凝胶等的不断进步,必将为检测诊断提供更好的载体材料。寇文朋等^[13]用聚乙烯醇与 4-乙烯基吡啶和丙烯酰胺的共聚接枝凝胶固定葡萄糖氧化酶,该共聚凝胶对酶有良好的生物相容性。

6 前景展望

综上所述,各种各样的功能高分子载体材料作为生物活性分子载体用于临床检测,有的已可作为试纸、试剂盒等,以方便、快速、准确、便宜的特点而家用化、小型化。但这些材料还存在一些不太完善的地方,有待进一步的探索和提高。另外,这些高分子材料仅仅作为载体使用,而利用高分子材料本身的光、电、磁等性能作为检测信号来获取生物活性分子间相互作用信息几乎尚未涉及。作者及本课题组正致力于此项研究工作,这也是国际上最近出现的一个新领域,它必将更加丰富临床检测诊断的手段。

参考文献:

[1] 耿耀宗,曹同玉.合成聚合物乳液制造与应用技术.北京:中国轻工业出版社,1999,388.

[2] 刘志华,文孟良,王昌益.云南化工,1998,1,1.

[3] 许博,朱果逸.分析化学,1999,27(4):479

[4] Thomopson M, Arthur C L, Dhaliwal G K. Anal Chem, 1986, 58, 1206.

[5] Chu X, Jiang J H, Shen G L, Yu R Q. Anal Chem Acta, 1996, 336, 185.

[6] 楚霞,林朝晖,沈国励,等.高等学校化学学报,1996,17(6):870.

[7] Nakanishi K, Karube I, Hiroshi S, Uchida A, Ishida Y. Anal Chem Acta, 1996, 325, 73.

[8] Si S H, Chen J H, He F J, et al. Chinese J Chem, 1996, 14(3):222.

[9] Nakanishi K, Muguruma H, Harube I. Anal Chem, 1996, 68, 1695.

- [10] Kurosawa S, Tawara K E, Kamo N. *Anal Chem Acta*, 1997, 337; 1.
- [11] 马建标. 高等学校化学学报, 1997, 18(7); 1227.
- [12] 李毓琦, 陈开全, 何俊, 等. 分析化学, 1993, 21(2); 129.
- [13] 寇文朋, 李彬, 邓青, 等. 分析化学, 1998, 26(1); 73.
- [14] 翟俊辉, 崔红, 杨瑞馥. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(2); 112.
- [15] 上海市第六人民医院检验组. 快速检验诊断资料汇编, 北京: 人民卫生出版社, 1972.
- [16] Garcia. Amparo. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(3); 709.
- [17] Nakatomi. Yasuo. *Microbiol Immunol*, 1998, 42(11); 739.
- [18] Masayoshi Y, Akira N, Hiroshi K, et al. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 158; 251.
- [19] 吴道澄, 刘有初, 赵小宁, 等. 生物医学工程学杂志, 1999, 16(1); 1.
- [20] 刘有初, 吴道澄, 赵小宁. 医用高分子化学概论, 西安: 陕西科学技术出版社, 1995.
- [21] Torbjorn Bjerke, Soren Nielsen, et al. *Journal of Immunological Methods*. 1993, 157; 49.
- [22] 康继超, 沙木亚布卡, 谢蜀生, 等. 药学报, 1998, 33(1); 52.
- [23] Mark A Burns, George L Kvesitadze, et al. *Biotechnology and Bioengineering*. 1985, Vol XXV VIIp; 137.
- [24] 彭国新, 刘泽华. 功能材料, 1994, 25(1); 36.
- [25] International Symposium on Magnetic Carriers-Biological and clinical Applications. 22—24 October, 1999, Wuhan, China
- [26] Noriko. Yanase, Hiromichi Noguchi, Yasuzo Uchida, et al. *Journal of Applied Polymer Science*. 1993, 50; 765.
- [27] 李孝红, 丁小斌, 孙宗华. 功能高分子学报, 1995, 1; 73.
- [28] Ding Xiaobin, Sun Zonghua, Wan Guoxiang, et al. *Chin Chem Lett*, 1997, 8(2); 183.
- [29] 蔡文琴, 王伯云. 实用免疫细胞化学. 成都: 四川科学技术出版社, 1988.
- [30] 赵小宁, 刘有初, 吴道澄. 生物医学工程学杂志. 1994, 11(3); 247.
- [31] Saito, Tomoo. *Jp*, 11 160, 315, 1999.

Applications of Functional Polymer Materials as Carriers in Detection and Diagnosis

Zhng Jun-hua, Liu Xue-yong, Ding Xiao-bing, Peng Yu-xing

(Chengdu Institute of Organic chemistry, Chinese Academy of Science, Chengdu 610041, China)

Abstract: The applications of functional polymer materials as carriers (such as; biosensor, latex, magnetic particles and gel) in detection and diagnosis are reviewed. The prospects are also presented.

Key words: Functional polymer material; Carrier; Detection; Diagnosis