

研究简报

应用基因遗传算法优化单分散荧光微球制备工艺

张琦¹, 王伟财¹, 张磊¹, 李双艳¹, 张兵波¹, 阎凤英², 张宇光²,
何大水², 屈浩², 张毅², 常津^{1*}

(1 天津大学材料学院纳米生物技术研究所, 天津 300072;

2 国家协和干细胞有限公司, 天津 300064)

摘要:以偶氮二异丁腈为引发剂, 乙醇为反应介质的单分散聚合法制得了粒径为 4.5 μm 的高度单分散聚苯乙烯 (polystyrene) 微球。用三氯甲烷和正丙醇将 PS 微球溶胀, 同时吸附荧光素—罗丹明和吖啶橙, 制得的微球在荧光显微镜下可观察到被激发出红、绿、蓝等多种颜色的荧光, 其发射光谱范围为 505 到 610 nm。红外光谱分析表明荧光素被吸收到 PS 微球内部, 而表面没有检测到残余荧光素。从平行试验数据中选出几组最佳条件, 采用基因遗传算法优化了溶胀过程中的反应参数, 在第六代时得到一组最优反应条件, 即 10% (wt) 的三氯甲烷, 15 mmol 的荧光素 (其中含有 33% 的吖啶橙), 溶胀时间为 24 h。

关键词:单分散聚合; 荧光微球; 基因遗传算法; 聚苯乙烯

引言

流式细胞分析 (Flow cytometric analysis) 可应用于高通量分析, 代谢过程分析, 药物发明等许多领域^[1~3]。相对于其它方法, 该方法具有更好的灵敏度、选择性、便利性。可检测一个样品的多个参数, 同时提供细胞的多方面信息。FCM 分析可应用于特殊的淋巴细胞分化簇 (CD) 的计数, 而 CD3 与 CD4 细胞的比值可表征人体的健康状态^[4], 但需要一种绝对计数试剂来参照计数细胞的绝对个数; 许多流式细胞仪的绝对计数产品都以聚苯乙烯微球作为荧光素的载体^[5]。

本实验设计了一种绝对计数试剂——聚苯乙烯 (PS) 荧光微球用以参照计量细胞个数, 首先采用单分散聚合法制备了高度单分散的聚苯乙烯微球, 进而溶胀微球以吸附荧光素。溶胀剂的种类和浓度、荧光素的用量、溶胀时间、不同荧光素的比例等对荧光微球的亮度和均一度都有很大影响, 因此采用基因遗传算法优化溶胀过程。

基因遗传算法是一种可以快速的从非最优的、组合优化问题中鉴别出最优解的搜索算法, 这个方法基于基因科学和自然选择过程中的一些原理, 一般包括三个过程: (1) 最优解的选择, (2) 杂交, (3) 突变^[6]; 在实验中使用这个算法, 选择合适的杂交和突变参数, 不仅可以有效的避免最终结果收敛于局部最优解, 甚至可以得到不在求解区间内的最优解; 应用这个算法, 最终得到一组最优溶胀条件, 制备了高度单分散的荧光微球。

1 结果和讨论

1.1 荧光素的吸收光谱和荧光光谱

图 1 表示吖啶橙 (AO) 在 λ_{E} 为 491 nm 处有最大吸收峰, 在 λ_{F} 为 522 nm 处有最大荧光峰; 罗丹明

作者简介:张琦, 男, 25 岁, 硕士研究生, 从事检测技术研究。

* 联系人, E-mail: jinchang@tju.edu.cn; Tel: +86-022-27401821.

(R101)在 λ_E 为 565 nm 处有最大吸收峰, 在 λ_F 为 589 nm 处有最大荧光峰, 且荧光效率较高。如图 1-B 所示: 当激发光 λ_E 为 490 nm 时, R101 发射光谱峰值很低, 这是由于其激发光不在最大吸收处所致; 但当体系中存在 AO 时, R101 发射光谱的峰值显著增强, 同时, 2 倍 AO 用量其荧光强度也略低于不含 R101 时的荧光强度, 这是由于 AO 发出的荧光被 R101 吸收, 同时 R101 被激发出荧光, 表明 AO 和 R101 间存在能量转移。混合物的发射光谱为 505~610 nm。

1.2 苯乙烯浓度对 PS 微球的影响

分散聚合相较于其他均相聚合对反应条件更敏感, 比如: 反应器氧气的量, 反应体系的配比等。有时, 一个很小的改变, 就可能导致最终颗粒变得非常不均匀^[7], 图 2 表示 PS 微球的 SEM 图片, 不同图片对应合成时使用苯乙烯的不同浓度, 使用 20、30、40%(wt) 的苯乙烯所得微球的粒径分别为 2.1 μ m、4.5 μ m、10.4 μ m, 且微球的粒径分布随着苯乙烯用量的增多变得非常之宽, 苯乙烯浓度最佳为 30%(wt), 低和高苯乙烯浓度均得不到单分散的聚苯乙烯微球。这是由于在较低苯乙烯浓度时, 形成的初级粒子没有足够的苯乙烯低聚物可以吸收, 许多初级粒子形成后不能长大, 因此分布变宽; 而在较高苯乙烯浓度时, 形成了较多的初级粒子, 粒子间相互碰撞形成更大的颗粒的概率增加, 较大的颗粒又由于其比表面积比较小, 稳定剂分散能力变差, 低聚物的吸收能力增强, 成球过程加速进行, 因此颗粒分布变宽。

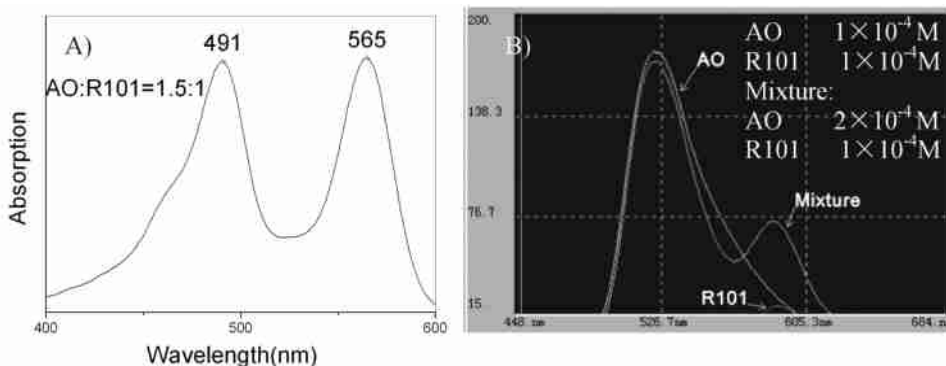


图 1 R101 和 AO: (A) 吸收光谱, (B) 荧光光谱 ($\lambda_E=490$, 混合荧光素中 AO 浓度增加一倍)

Figure 1 Spectrums of R101 and AO: (A) Absorption spectrum, (B) Fluorescence spectrum

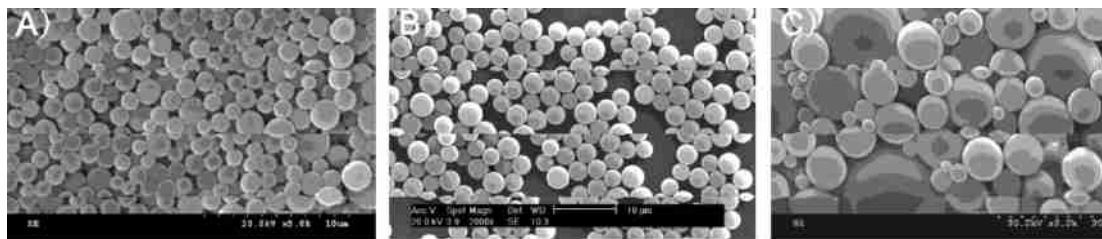


图 2 不同苯乙烯浓度对 PS 微球形貌的影响 (A) 20 wt% $\times 5k$, (B) 30 wt% $\times 2k$, (C) 40 wt% $\times 2k$

Figure 2 PS Microspheres with a Varying Concentration of Styrene

(A) 20 wt% styrene $\times 5k$, (B) 30 wt% styrene $\times 2k$, (C) 40 wt% styrene $\times 2k$

1.3 不同溶胀剂浓度对 PS 球的影响

溶胀过程改变了微球的形貌, 较高的三氯甲烷浓度可以缩短溶胀时间和提高球的荧光强度。图 3-C 表明当三氯甲烷的浓度增加到 20%(wt) 时, 球相互溶合形成雪人形状。最佳溶胀剂浓度为 5~15%(wt) 的三氯甲烷, 溶胀剂会从球上腐蚀掉一些碎屑, 这将影响 FCM 分析。

1.4 微球的荧光表征

在溶胀过程中使用了两种荧光素标记微球: 图 4-A、B 表明如果只使用一种荧光素—吖啶橙(AO), 则球被激发出绿光; 在罗丹明的共同作用下, 如图 4-C, 球被激发出红、绿、蓝等不同波长的荧光, 荧光光谱范围较宽, 满足不同荧光检测要求; 进一步表明这两种荧光素之间能发生能量转移, 使得微球在 FCM 上使

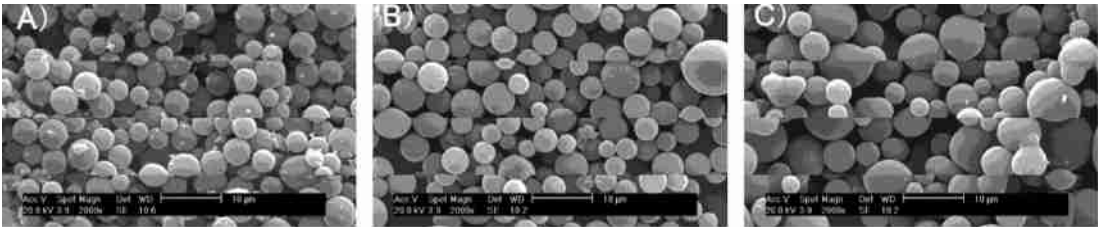


图 3 三氯甲烷浓度对微球形貌的影响(×2k) 与正丙醇的重量比分别为 (A) 5 %, (B) 10 %, (V) 20 %
Figure 3 Variation of PS Particles with Chloroform Concentration(×2k)
(A) 5%, (B) 10%, (V) 20%, wt % relative to 1-propanol medium

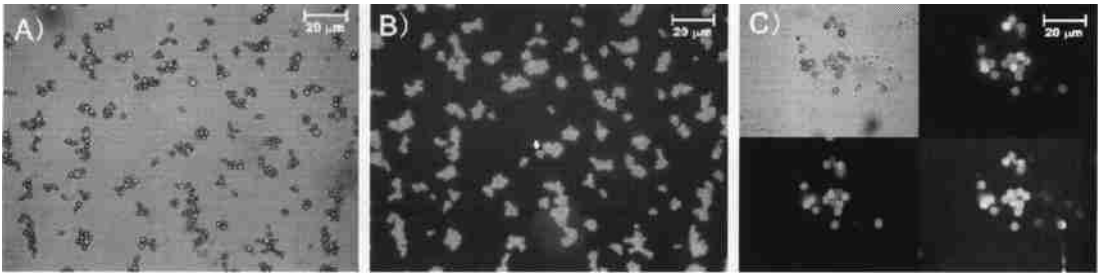


图 4 荧光显微镜照片(×400)
(A)AO 染色球未激发;(B) AO 染色球被激发发出绿光;(C)AO+R101 染色球被激发发出红、绿、蓝光
Figure 4 Pictures of Microscope (×400)
(A) beads labeled by AO with no excited light ; (B) beads labeled by AO were excited to green light ;
(C) beads labeled by AO and R101 were excited to red, green and blue light

用时更易检出。

1.5 微球的红外表征

荧光微球表面的荧光素容易失活,内部荧光素由于聚苯乙烯的保护,稳定性较好,因此要除去表面吸附的荧光素;为了检测荧光标记微球表面荧光素是否去除干净,分别对荧光素标记球和未标记球进行了红外光谱对比分析。聚苯乙烯的特征峰在图 5 上很明显:在 2921 cm^{-1} 存在 C-H 伸缩振动峰,在 1492 cm^{-1} 存在 C-C 芳环伸缩振动峰,在 755 cm^{-1} 存在 C-H 面外弯曲振动峰,在 699 cm^{-1} 存在芳环 C-C 面外弯曲振动峰,在 1700~2000 cm^{-1} 可观察到芳环的倍峰。在谱图上没有发现很明显的荧光素峰(如 N-H, C-N),这表明荧光素渗入到 PS 微球内部,表面没有检测到明显的残余荧光素。

1.6 应用基因遗传算法优化微球制备工艺

本实验从一组来自实验结果的初始解(population)开始,初始解由一组 0、1 二进制代码构成,长度经过优化,以简化求解过程;共选出 5 组初始解,编码过程和数据见表 1。每一代解还原成溶胀参数后均在实验中检验,并对整体效果(均匀度、荧光强度、形貌)评估,从而决定该解是否参与生成下一代解,具有更好实验结果的解拥有更大的概率生成下一代候选解,经过杂交和突变(突变率 0.4)过程后,产生了第二代解,将其还原成实验参数,并在实验中检验;重复这个过程——评估、杂交、突变、检验,最终可获得最优解。

对实验整体效果进行评估的公式如下:

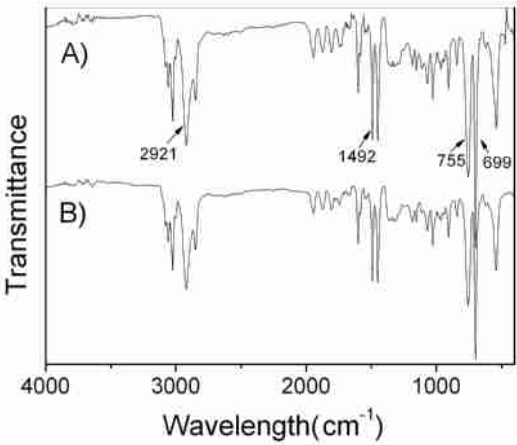


图 5 PS 球的 FTIR 谱图
(A)荧光素标记球,(B)未标记球
Figure 5 FTIR Spectrum of PS Beads: (A) Labeled with fluoresceins, (B) Unlabeled-PS-beads

表 1 基因遗传算法所用的初始解

Table 1 The initial population coded from experiment data

三氯甲烷浓度/%	荧光素量/mmol	AO 含量%(wt)	溶胀时间/h	编码后的初始解
5	10	0	8	00101,01010,0000000,001000
10	6	33	9	01010,00110,0100001,001001
5	4	50	10	00101,00100,0110010,001010
10	8	66	24	01010,01000,1000010,011000
7	12	66	24	00111,01100,1000010,011000

整体效果 = $\begin{cases} x_1 \times 0.4 & (x_1 \text{ 均匀度}) \\ x_2 \times 0.4 & (x_2 \text{ 荧光强度}) \\ x_3 \times 0.2 & (x_3 \text{ 形貌}) \end{cases}$

各代的整体效果评分如图 6 所示:在第一、二代时,微球的评分不但没有提高,反而有所降低,仅仅是偏差有所减小;在第三代时,由于一个解发生突变(荧光素用量增加),因此评分得到很大提高;在接下的几代中,杂交过程使得微球的评分稳步提高;在第六代时,偏差已经较小,微球的性能也已满足要求,因此结束计算。从第六代中选出的优化解是 01010,01110,0100101,011000,解析为实验参数是 10%(wt)的三氯甲烷,15 mmol 的荧光素(含有 33%的 AO),溶胀 24h。

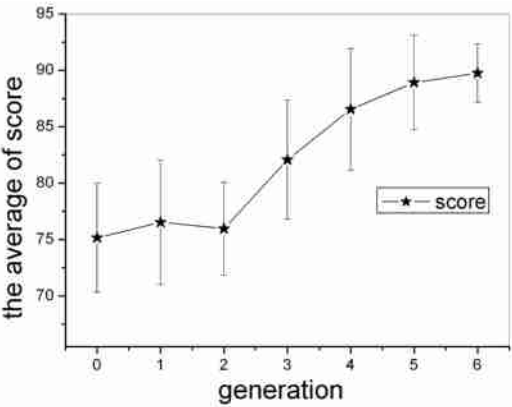


图 6 整体效果的各代平均值和标准偏差

Figure 6 Average Score and Standard Deviation of Generations

2 结论

单分散聚合对反应条件非常敏感,因此仔细选择了反应条件制得粒径为 4.5 μ m 的单分散微球;使用了扫描电子显微镜(SEM)对微球表面形貌、粒径进行了表征,结果表明微球较均匀、表面光滑、球形很圆;使用了 FTIR 对微球的表面官能团进行了分析,结果表明荧光素被很好的吸附到微球内部;荧光显微镜分析表明,微球可以被激发出多种不同波长的荧光,基本满足了 FCM 分析对微球发射光谱的要求;使用了基因遗传算法优化了荧光标记微球的实验参数,合成了更亮、更稳定、更均一的荧光微球。

3 实验

3.1 试验仪器和原料

苯乙烯(99%)使用前要先用 1mol/L 的 NaOH 洗涤,再用蒸馏水洗涤,并减压蒸馏后备用。偶氮二异丁腈(AIBN)用作引发剂,聚乙烯基吡咯烷酮(PVPK-30, $M_w=40,000$ g/mol, Aldrich)用作稳定剂,酒精作为反应介质。优级纯的三氯甲烷和正丙醇用作溶胀剂,罗丹明(Fluka)和 AO(Introvengen)用作荧光素,所有别的试剂均为化学纯并由本地供应商提供。

日立 SEM (S-4300)用以观察 PS 微球形貌,FTIR 分析用于检测微球表面是否有荧光素残留,紫光分光光度计用于检测荧光素最大激发波长,荧光分光光度用于检测荧光光谱;微球被激发出荧光的照片使用荧光显微镜(Olympus)照得。

3.2 聚合

苯乙烯的单分散聚合以 AIBN 为引发剂,乙醇为反应介质,氮气为保护气体,聚合反应在 150mL 三口圆底烧瓶、磁力搅拌下水浴中进行,首先将 50mL 乙醇加入烧瓶,然后加入苯乙烯(约占反应介质 25~40%(wt));AIBN 的用量为 2%(wt)的苯乙烯,PVPK-30 的量为 5%(wt)的苯乙烯。聚合的温度稳定在 70 $^{\circ}$ C,聚合 12 h 后,产物冲洗三次以除去残余的苯乙烯和 PVPK-30,在聚合过程中,周期性取出很少一部分样品用以检测。

3.3 微球的荧光标记

PS 微球用含 2-20 wt% 的三氯甲烷的正丙醇溶液进行溶胀, 将 1.25-5 mL 三氯甲烷, 0.1 g PS 微球, 1-10 mg R101, 1-10 mg AO 加入到 100 mL 烧杯中, 均匀溶胀 24 h 后离心分离, 用酒精多次洗涤微球以除去表面荧光素。

参考文献:

- [1] Steff A M, Fortin M, Arguin C, Hugo P. Cytometry, 2001, 47: 237~243.
- [2] Nolan J P, Sklar L A. Nat Biot, 1998, 16: 833~838.
- [3] Edwards B S, Oprea T, Prossnitz E R, Sklar L A, Curr Opin Chem Biol, 2004, 8: 392~398.
- [4] Vale O M C E, Jose A. USA, 5538855, 1993.
- [5] Schwartz A R, Emma F. USA, 5073498, 1991.
- [6] Panny J, Lindfield G. Numerical methods using matlab. 2th edition. NJ. USA : Prentice Hall, 2004, 358~371.
- [7] Lee J, Ha J U, Choe S, Lee CS, Shim SE. J Coll Interface Sci. 2006, 15: 298.

Optimization of Preparation of Monodisperse Fluorescent Microsphere ——Using Genetic Algorithms

ZHANG Qi¹, WANG Wei-cai¹, ZHANG lei¹, LI Shuang-yan¹, ZHANG Bing-bo¹, YAN Feng-ying²,
ZHANG Yu-guang², HE Da-shui², QU Hao², ZHANG Yi¹, CHANG Jin¹

(1. Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science & Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. National Union Stem Cell Limited Corporation, Tianjin 300064, China)

Abstract: The highly monodisperse polystyrene (PS) microspheres were produced by dispersion polymerization using an initiator, 2,2-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) in alcoholic media, the diameter of PS beads was 4.5 μ m. The highly monodisperse PS beads were swollen by chloroform and 1-propanol and absorbed such fluoresceins as rhodamine and acridine orange (AO). The products emitted various colors, such as red, green, blue etc., and the range of emission wavelength was between 505 and 610 nm, which was measured by fluorescence microscope and spectrophotometer. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis indicated that the fluoresceins were absorbed into the inner of the PS particles, and residual fluoresceins were not detected in the surface. Choosing the best groups of paralleled experiment data and using genetic algorithms (GA) method, the optimal swollen parameters, which were 10 (wt) percents of chloroform, 15 mmol fluoresceins, 33 percents of AO and swollen for 24h, were obtained after fifth generation.

Key words: Monodisperse Polymerization; Fluorescent Microsphere; Genetic Algorithms; Polystyrene