

基于 EDC/sulfo-NHS 的羧基化 SPIO 表面抗体耦联

刘琳^{1,2}, 张小强^{1,2*}, 张宇³, 浦跃朴^{1,2}, 尹立红^{1,2}, 刘卉^{1,2}, 徐靓^{1,2}, 杨文倩¹, 徐春雨¹

(¹东南大学公共卫生学院, ²环境医学工程教育部重点实验室, ³江苏省生物材料与器件重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:研究羧基化超顺磁性氧化铁纳米颗粒(SPIO)纳米粒子与 anti-EMMPRIN 单克隆抗体耦联的有效方法,考察不同 pH 条件下进行耦联反应的效率及 anti-EMMPRIN-SPIO 的粒径水平。方法:用 EDC/sulfo-NHS 法将 anti-EMMPRIN 单克隆抗体耦联到羧基化 SPIO 纳米粒子表面,用动态光散射法检测所得 anti-EMMPRIN-SPIO 的粒径,并用 Bradford 法和 SDS-PAGE 法分析不同酰胺化 pH 条件下的耦联效率。结果:通过 EDC/sulfo-NHS 的作用,anti-EMMPRIN 单克隆抗体有效地耦联到羧基化 SPIO 表面。pH7.8 时酰胺化的 anti-EMMPRIN-SPIO 纳米粒子的粒径最小,为 63.15 nm。pH6.8 和 pH7.3 条件下酰胺化所得上清中的抗体含量较低,分别为 $1.943 2 \times 10^{-4}$ g/L 和 $3.511 1 \times 10^{-4}$ g/L,SDS-PAGE 凝胶图谱上可明显观察到 pH6.8、pH7.3 和 pH7.8 条件下所制备样品的谱带分别位于 55 000 和 25 000。结论:EDC/sulfo-NHS 法是 anti-EMMPRIN 单克隆抗体耦联于羧基化 SPIO 表面的有效方法。在 pH6.8、pH7.3、pH7.8 条件下酰胺化耦联效率较高,所制备的 anti-EMMPRIN-SPIO 粒径较小。pH 值对 EDC/sulfo-NHS 介导的耦联反应的耦联效率及 anti-EMMPRIN-SPIO 的粒径有较大影响。

[关键词] EDC/sulfo-NHS;超顺磁性氧化铁纳米颗粒;EMMPRIN 单克隆抗体;耦联

[中图分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)04-480-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130412

Conjugation of antibody on carboxyl-SPIO nanoparticles based on EDC/sulfo-NHS

Liu Lin^{1,2}, Zhang Xiaoqiang^{1,2*}, Zhang Yu³, Pu Yuepu^{1,2}, Yin Lihong^{1,2}, Liu Hui^{1,2}, Xu Liang^{1,2}, Yang Wenqian¹, Xu Chunyu¹

(¹School of Public Health, ²Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, ³Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] Objective: To conjugate anti-EMMPRIN monoclonal antibody on the surface of carboxyl-SPIO nanoparticles. The efficiency of superparamagnetic iron oxide (SPIO) conjugated with anti-EMMPRIN monoclonal antibody and the size of anti-EMMPRIN-SPIO were investigated in different pH values. **Methods:** Anti-EMMPRIN monoclonal antibody conjugated SPIO nanoparticles were performed through a coupling strategy of EDC and sulfo-NHS. Bradford assay and SDS-PAGE analysis were used for measuring the conjugation efficiency. The size of anti-EMMPRIN-SPIO was evaluated by dynamic light scattering method. **Results:** The smallest diameter of 63.15 nm was obtained when pH 7.8 was used. The lower concentration of antibody in supernatant with pH6.8 and pH7.3 was $1.943 2 \times 10^{-4}$ g/L and $3.511 1 \times 10^{-4}$ g/L, respectively. Anti-EMMPRIN mAb was detected in lanes of pH6.8, pH7.3 and pH7.8 which revealed two bands with weight of 55 000 and 25 000. **Conclusion:** EDC/sulfo-NHS method is an efficient method for conjugating anti-EMMPRIN monoclonal antibody on SPIO nanoparticles. Under the amidation condition with pH value of 6.8, 7.3 and 7.8, higher conjugation efficiency and smaller size of anti-EMMPRIN-SPIO were obtained. The results showed that pH value is a very important factor which influences conjugation efficiency and the size of anti-EMMPRIN-SPIO.

[Key words] EDC/sulfo-NHS; SPIO; anti-EMMPRIN monoclonal antibody; conjugation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 480-484]

[基金项目] 江苏省生物材料与器件重点实验室开放基金 (2012LBMD05); 环境医学工程教育部重点实验室开放基金 (2012EMEO05)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangxq7843@yahoo.com.cn

超顺磁性氧化铁纳米颗粒 (superparamagnetic iron oxide, SPIO) 是指具有磁响应性的氧化铁纳米粒子,在液体中处于悬浮状态,在外加磁场作用下可被磁化而发生定向移动,具有良好的分散性和可操作性。SPIO 表面可被修饰,与不同的化学物质或酶、抗体、DNA 等生物大分子结合使其具有靶向性,且具有毒性低、磁性高、生物相容性好、靶向性强等特点,被广泛应用于生物分子的纯化、组织工程、靶向释药、生物传感、磁共振成像等生物医学领域^[1-5]。

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 (extracellular matrix metalloprotease inducer, EMMPRIN) 是一种跨膜糖蛋白,是免疫球蛋白超家族的成员之一^[6],可诱导基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的释放,促进肿瘤细胞的浸润和转移^[7]。由于 EMMPRIN 在肿瘤细胞表面高表达,故其单克隆抗体 anti-EMMPRIN 与 SPIO 耦联构成的 anti-EMMPRIN-SPIO 纳米探针可高效地靶向到肿瘤细胞表面。纳米探针的应用效果直接受到抗体在磁性纳米粒子表面的耦联效率和粒径变化的影响^[8-9]。

本文采用化学耦联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羧基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 将 anti-EMMPRIN 单克隆抗体耦联到羧基化 SPIO 纳米粒子表面。由于不同 pH 条件对 EDC/sulfo-NHS 的耦联效率有很大影响,故通过 Bradford 法和 SDS-PAGE 对耦联效率进行评估,并利用动态光散射法检测耦联得到的 anti-EMMPRIN-SPIO 粒径,为未来进一步的应用研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

anti-EMMPRIN 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); N-羧基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 羧基化 SPIO 纳米粒子 (东南大学生物科学与医学工程系提供); Bradford 蛋白测定试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司); 甘氨酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris 和 SDS (南京生兴生物技术有限公司); 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硼酸和四硼酸钠 (上海凌峰化学试剂有限公司)。

全温度恒温振荡培养器 (北京柏莱斯特科技发展有限公司); 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (英国 Malvern 公司); 小型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); RT-

6000 酶标分析仪 (美国 Rayto 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 SPIO 纳米粒子与 anti-EMMPRIN 单克隆抗体的耦联

羧基化 SPIO 纳米粒子与 anti-EMMPRIN 单克隆抗体的耦联采用 EDC 和 sulfo-NHS 的化学耦联剂法^[10-11],其原理如图 1 所示。SPIO 表面的羧基可与 EDC 反应生成不稳定的中间产物 O-酰基脲,该中间产物易水解,而加入体系中的 sulfo-NHS 可与 O-酰基脲生成具有氨基反应活性的 sulfo-NHS 酯,从而减少水解的发生并提高反应效率。这种氨基反应活性的 sulfo-NHS 酯较稳定,可将耦联反应分解成两步进行。加入 anti-EMMPRIN 单克隆抗体后,抗体上的氨基与 sulfo-NHS 酯共价结合形成稳定的酰胺键,从而达到 SPIO 与 anti-EMMPRIN 单克隆抗体耦联的目的。具体步骤如下:①活化反应阶段:250 μ l 羧基化的 SPIO 加入到 0.5 ml 磷酸盐缓冲液 (pH6.2) 中,再加入新鲜配制的 EDC 和 sulfo-NHS 溶液,混合均匀,于室温下震荡反应 30 min 后将粒子进行磁分离;②酰胺化反应阶段:将分离出的粒子加入到 0.5 ml 硼酸盐缓冲液 (pH7.8) 中,并加入 15 μ l anti-EMMPRIN 单克隆抗体,混合均匀后在室温下震荡反应 2 h。磁分离收集上清和耦联了抗体的 SPIO 纳米粒子,用硼酸盐缓冲液洗涤 3 次后重悬于等体积硼酸盐缓冲液中,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 不同酰胺化 pH 条件下 SPIO 与抗体的耦联

用硼酸和四硼酸钠配制 pH 值为 6.8、7.3、7.8、8.4 和 9.0 的硼酸盐缓冲液,按 1.2 节中的方法完成活化反应后,再分别于上述 5 个 pH 值的缓冲液中进行酰胺化反应,反应结束后用 Malvern 纳米粒度仪检测平均粒径,并进行磁分离得到上清和耦联了抗体的 SPIO 纳米粒子样品,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 Bradford 法评估耦联效率

SPIO 纳米粒子表面 anti-EMMPRIN 抗体的耦联量以耦联反应后的回收上清液为样本,采用经典的 Bradford 法^[12]检测抗体含量,抗体加入量减去上清中的抗体量即可间接评估 SPIO 表面耦联的 anti-EMMPRIN 抗体量。

1.2.4 SDS-PAGE 分析 SPIO 表面耦联的 anti-EMMPRIN 抗体量

采用 SDS-PAGE 法直接评估耦联反应后磁分离得到的纳米粒子上耦联的抗体量^[13]。不同 pH 的缓冲液中进行酰胺化反应的抗体耦联量的差别可从凝胶上直观观察出来。具体步骤如下:将 10 μ l 上样缓

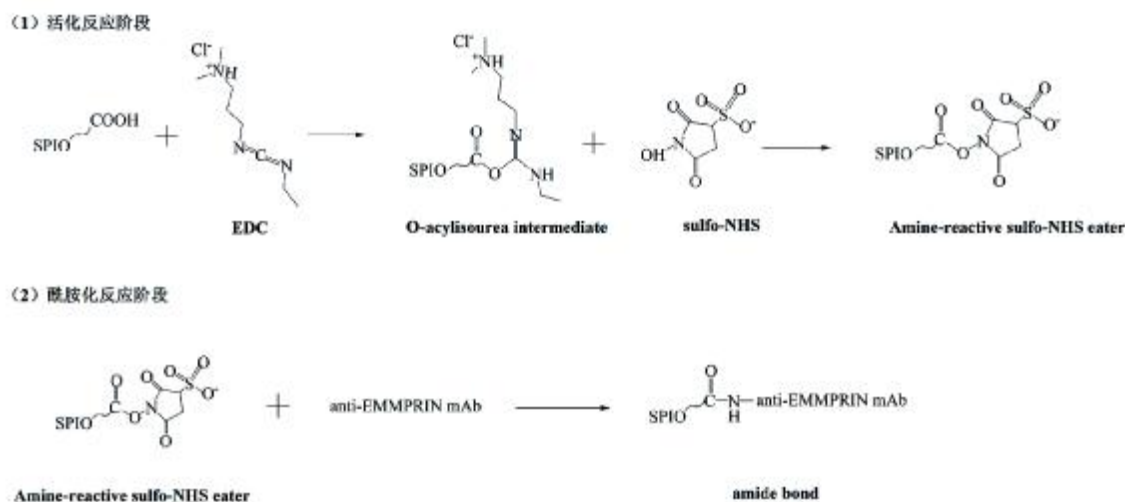


图 1 SPIO 纳米粒子与 anti-EMMPRIN 单克隆抗体耦联原理

Figure 1 Strategy of anti-EMMPRIN mAb conjugated on carboxyl-SPIO nanoparticles

冲液加入到 40 μl 磁分离后备用的 SPIO 悬液中混匀,煮沸 5 min。按文献[13]的步骤进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,待指示染料下行到距胶末端 1~2 cm 处,停止电泳。将凝胶剥下后用考马斯亮蓝 R-250 染色过夜,染色完成后用水冲洗凝胶,再用脱色液充分浸泡,摇床摇动至凝胶背景无色。

1.3 统计学方法

数据统计采用 SPSS13.0 软件进行 ANOVA 方差分析,并采用 SNK 法进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同酰胺化 pH 条件下制备的 anti-EMMPRIN-SPIO 纳米粒子的粒径

耦联反应结束后,不同酰胺化缓冲液 pH 条件下耦联了 anti-EMMPRIN 单克隆抗体的 SPIO 纳米粒子的平均粒径结果如图 2 所示。经单因素方差分析,结果表明不同酰胺化 pH 条件下制备的 anti-EMMPRIN-SPIO 粒径有显著性差异($F = 214.390, P < 0.05$)。pH 值在 7.8 时进行酰胺化反应得到的 anti-EMMPRIN-SPIO 纳米粒子的粒径最小,为 63.15 nm。在 pH 值 6.8、7.3、8.4 和 9.0 条件下制备的 anti-EMMPRIN-SPIO 纳米粒子的粒径分别为 96.58、73.96、88.40 和 172.55 nm。耦联反应中,不同 pH 条件下进行酰胺化反应得到的 anti-EMMPRIN-SPIO 纳米粒子粒径有较大差别。

2.2 Bradford 法检测不同酰胺化 pH 条件对耦联效率的影响

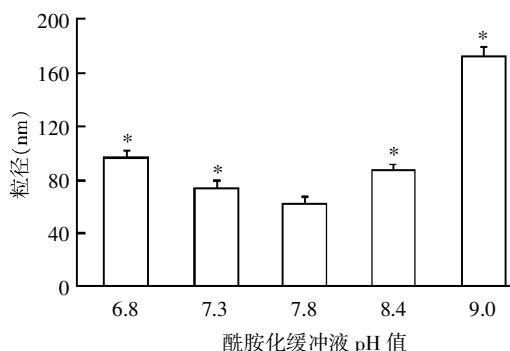
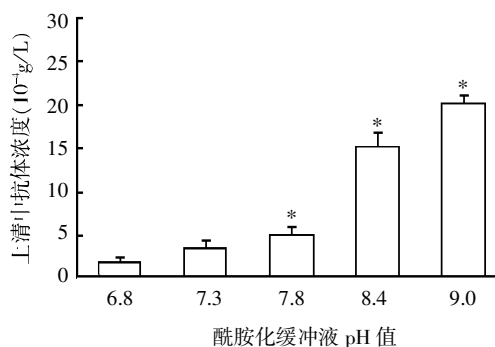


图 2 不同酰胺化缓冲液 pH 条件下制备的 anti-EMMPRIN-SPIO 的粒径

Figure 2 Size of anti-EMMPRIN-SPIO produced in different amidation pH conditions

不同酰胺化缓冲液 pH 条件下反应所得上清样品中的抗体含量如图 3 所示。加入反应体系的抗体量为 3.0×10^{-3} g/L,用反应前加入的抗体量减去反应后上清中游离的抗体量即为耦联到 SPIO 纳米粒子表面的抗体量。上清中抗体含量越高,则耦联到 SPIO 纳米粒子表面的 anti-EMMPRIN 抗体量越少,说明耦联效率越低。经单因素方差分析,结果表明不同酰胺化 pH 条件所得上清中的抗体含量有显著性差异($F = 239.532, P < 0.05$)。pH6.8 和 pH7.3 条件下所得上清中的抗体含量最低,分别为 $1.943 2 \times 10^{-4}$ g/L 和 $3.511 1 \times 10^{-4}$ g/L;pH 9.0 条件下所得上清中的抗体含量最高,为 $2.031 4 \times 10^{-3}$ g/L。在 pH 7.8 时上清中的抗体含量较低,为 $5.191 3 \times 10^{-4}$ g/L;pH8.4 时上清中的抗体含量为 $1.517 2 \times 10^{-3}$ g/L。



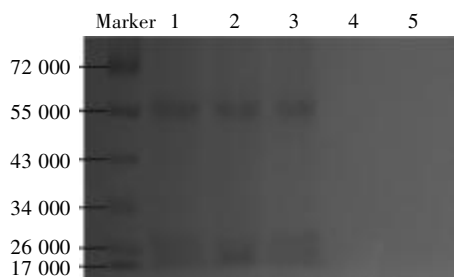
与 pH6.8 组相比, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 3 不同酰胺化 pH 条件下制备 anti-EMMPRIN-SPIO 的上清中抗体含量

Figure 3 Concentration of mAb in the supernatant of anti-EMMPRIN-SPIO production under different amidation pH conditions

2.3 SDS-PAGE 法分析不同酰胺化 pH 条件对耦联效率的影响

以 pH6.8、pH7.3、pH7.8 进行酰胺化反应所得 anti-EMMPRIN-SPIO 样品分别上样于泳道 1、泳道 2 和泳道 3, 均可观察到有明显的谱带, 谱带数为 2 条, 分别位于 55 000 和 25 000; 泳道 4 和泳道 5 分别为 pH8.4 和 pH9.0 时所得 anti-EMMPRIN-SPIO 样品, 未观察到明显谱带(图 4)。说明以 pH 值为 6.8、7.3、7.8 时进行酰胺化反应可以形成利于 anti-EMMPRIN 单克隆抗体与 SPIO 进行耦联的反应条件。



1、2、3、4、5 分别代表以 pH 值为 6.8、7.3、7.8、8.4、9.0 进行酰胺化反应所得 anti-EMMPRIN-SPIO 样品。

图 4 不同酰胺化 pH 条件下的 anti-EMMPRIN-SPIO 的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis on anti-EMMPRIN-SPIO produced in different amidation pH conditions

3 讨论

EDC 属于碳化二亚胺类化学耦联剂, 被广泛地应用于蛋白之间的耦联或将蛋白、抗体等固定到玻璃、塑料等固体表面^[14]。EDC 能活化羧基使其能与

蛋白、肽、抗体及具有氨基的小分子反应形成稳定的共价酰胺键。EDC 介导的耦联反应中形成的中间体 O-酰基脲不稳定, 易水解, 因此需要在 sulfo-NHS 存在下反应形成稳定且具有氨基反应活性的中间体 sulfo-NHS 酯, 再与伯胺反应形成稳定的酰胺键。反应体系的 pH 值对反应的效率高影响很大。在低 pH 时, EDC 与羧基形成的中间体 O-酰基脲极不稳定, 容易水解; 但 pH 过高时, 不稳定的中间体 O-酰基脲可能会水解或使 sulfo-NHS 酯中间体产量减少而造成氨基与中间体反应速率降低, 从而使抗体耦联量下降^[15]。因此 pH 是影响抗体耦联效率的非常重要的一个因素。

纳米粒子的表面效应和界面效应导致纳米粒子表面具有较大的自由能, 因此颗粒发生团聚从而降低自由能是一种自发的过程^[16]。纳米粒子在液体介质中发生团聚而难以保持稳定是限制纳米粒子应用的重要因素。在耦联反应过程中, 耦联剂 EDC、sulfo-NHS 及抗体与纳米粒子表面进行的反应使 SPIO 粒子表面性质发生了改变, 从而改变了粒子与介质、粒子与粒子之间的相互作用, 使稳定性改变。粒径及其分布是评价纳米粒子稳定性的重要参数指标。动态光散射法(dynamic light scattering, DLS) 常用于测定纳米粒子的平均粒径和粒径分布范围。粒径分析的结果表明, 随着 pH 升高, anti-EMMPRIN-SPIO 纳米粒子的粒径呈现先降低后升高的趋势, 在 pH 值为 6.8、7.3、7.8、8.4 条件下进行酰胺化反应获得的 anti-EMMPRIN-SPIO 制备产物粒径均在 100 nm 以下, 且在 pH7.8 条件下制备的 anti-EMMPRIN-SPIO 纳米粒子的粒径最小。与传统耦联剂戊二醛相比, 耦联剂 EDC 具有生物相容性好、效率高等特点。在 NHS 存在下, EDC 的耦联效率提高且能增加 EDC 耦联产物的稳定性。实验中采用的 sulfo-NHS 不仅能提高 EDC 的耦联效率, 还由于磺化基团的存在而克服 NHS 水溶性低的缺点。通过测定 SPIO 纳米粒子表面耦联的 anti-EMMPRIN 抗体量可评估耦联效率。Bradford 法通过比较反应前后上清中游离抗体的含量可间接地评估 SPIO 表面耦联的抗体量, 从而估计耦联效率, 而 SDS-PAGE 法则是直观地评估耦联到 SPIO 表面的抗体量。本研究采用了 Bradford 法和 SDS-PAGE 法综合评价本试验条件下 anti-EMMPRIN-SPIO 的制备效率, 两者的试验结果一致, 说明在 pH 值为 6.8、7.3、7.8 条件下进行酰胺化反应有利于 EDC/sulfo-NHS 发挥较高的耦联效率。

[参考文献]

- [1] Bao J, Chen W, Liu T, et al. Bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles for protein separation[J]. ACS Nano, 2007, 1(4): 293–298
- [2] Schladt TD, Schneider K, Schild H, et al. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment[J]. Dalton Trans, 2011, 40: 6315–6343
- [3] Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, et al. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications[J]. Nano Lett, 2010, 10(9): 3223–3230
- [4] Baby TT, Ramaprabhu S. SiO₂ coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticle dispersed multiwalled carbon nanotubes based amperometric glucose biosensor[J]. Talanta, 2010, 80(5): 2016–2022
- [5] Maeng JH, Lee DH, Jung KH, et al. Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer[J]. Biomaterials, 2010, 31(18): 4995–5006
- [6] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily[J]. Cancer Res, 1995, 55(2): 434–439
- [7] Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, et al. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors[J]. Int J Cancer, 2006, 119(8): 1800–1810
- [8] Yu S, Chow GM. Carboxyl group (-CO₂H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications[J]. J Mater Chem, 2004, 14: 2781–2786
- [9] Gélinas S, Finch JA, Vreugdenhil AJ. Coupling of diethylenetriamine to carboxyl-terminated magnetic particles[J]. Colloids Sur A; Physicochemi Eng Asp, 2000, 164(2): 257–266
- [10] Zou P, Yu Y, Wang YA, et al. Superparamagnetic iron oxide nanotheranostics for targeted cancer cell imaging and pH-dependent intracellular drug release[J]. Mol Pharm, 2010, 7(6): 1974–1984
- [11] Muller DA, Corrie SR, Coffey J, et al. Surface modified microprojection arrays for the selective extraction of the dengue virus NS1 protein as a marker for disease[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(7): 3262–3268
- [12] Carlsson N, Brode A, Wölfel S, et al. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers[J]. Anal Biochem, 2011, 411(1): 116–121
- [13] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685
- [14] Bhargava A, Muller DA, Kendall MAF, et al. Surface modifications of microprojection arrays for improved biomarker capture in the skin of live mice[J]. Appl Mater Interfaces, 2012, 4(5): 2483–2489
- [15] Hermanson GT. Bioconjugate techniques[M]. 2nd edition, London: Academic Press, 2008
- [16] Gravina PP, Bakuzis AF, Neto KS, et al. Investigation of the pH effect on the stability of biocompatible magnetic fluids using time-dependent birefringence measurements[J]. J Magn Magn Mater, 2005, 289(3): 448–451

[收稿日期] 2012–10–19



欢迎投稿 欢迎订阅