ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ПОЛИМЕТИЛМЕТАКРИЛАТ/МАГНЕТИТ ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА

А. И. Гурова

Белорусский государственный университет, г. Минск;
ГНУ "Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси", г. Минск
alexxgurova@gmail.com
науч. рук. – Т. Г. Шутова, канд. хим. наук,
В. В. Паньков, д-р хим. наук, проф.

Разработана методика получения магнитных субмикронных частиц полиметилметакрилат/магнетит методом безэмульгаторной эмульсионной полимеризации метилметакрилата. В качестве стабилизатора эмульсии использован сополимер поли(метилметакрилата-со-метакриловой кислоты), дополнительно деметилированный в концентрированной серной кислоте. Полученные композитные частицы содержат 1,7-3,8 % мас. магнитной фазы, стабилизированной олеиновой кислотой. Показано, что карбоксильные группы на поверхности частиц полиметил-метакрилат / магнетит могут быть использованы для конъюгирования с белками.

Ключевые слова: полиметилметакрилат; поли(метилметакрилат-со-метакриловая кислота); магнетит; магнитные полимерные микрочастицы.

ВВЕДЕНИЕ

Магнитные полимерные нано- и микрочастицы представляют интерес для биологии, биотехнологии, медицины и фармацевтики. Магнитные микросферы используются в магнитной сепарации биохимических продуктов, в клеточной сортировке, для адресной доставки лекарственных веществ и контрастирования изображений магнитно-резонансной томографии.

Магнитные микросферы, конъюгированные с антителами, применяют в различных методах иммуноанализа в качестве оптических и магнитных меток. Это позволяет значительно увеличить чувствительность анализа, а также упростить процессы обнаружения, выделения и концентрирования интересующих биообъектов [1].

Целью данной работы являлось получение и исследование физико-химических свойств субмикронных частиц полиметилметакрилат (ПММА)/магнетит с карбоксильными группами на поверхности, пригодными для ковалентного связывания с макромолекулами белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Магнитные наночастицы (МНЧ) получали методом совместного осаждения солей железа (II) и (III), взятых в соотношении 1:2, раствором щелочи NaOH [2]. Полученный осадок магнетита диспергировали погружным ультразвуковым диспергатором УЗГ в водном растворе и стабилизировали цитратом натрия. Для повышения сродства МНЧ к органической фазе, их стабилизировали олеиновой кислотой. Диаметр полученных МНЧ равен 32,5 нм.

Кислотный гидролиз сополимера поли(метилметакрилат-со-метакриловая кислота) (ПИ), соотношение мономерных звеньев метилметакрилата (ММА) и метакриловой кислоты в котором составляет 1:0,016, проводили в концентрированной серной кислоте при температуре 40-45 °С в течение 2 ч [3]. Полученный частично деметилированный полимер (ПГ) после отмывки до pH 7,0 и сушки использован в качестве стабилизатора эмульсии ММА. Концентрацию карбоксильных групп в ПИ и ПГ оценивали спектрофотометрически (*CM2203, Solar*), используя раствор родамина 6G в бензоле [4].

Субмикронные частицы ПММА и ПММА/МНЧ получали безэмульгаторной эмульсионной полимеризацией. Органическую фазу эмульсии готовили добавлением к ММА заданного объема 150 мг/мл раствора ПГ в мономере. Стабилизированные олеиновой кислотой МНЧ (~1,19 мг) диспергировали в 0,1 мл ММА, содержащего ПГ. Водная фаза эмульсии представляла собой 0,001 г/мл раствор $K_2S_2O_8$ с pH ~ 7-8. Водную фазу эмульсии (0,9 мл) смешивали с органической фазой и диспергировали в ультразвуковой ванне 2 мин. Синтез проводили в микроцентрифужных пробирках Эппендорф объемом 1,5 мл на водяной бане при температуре 70-75 °С в течение 2 ч. Концентрацию магнетита в ПММА определяли с использованием о-фенантролина [5].

Коньюгирование белков (бычий сывороточный альбумин (БСА), альбумин человеческой сыворотки (САЧ) и протамин сульфат (ПрС)) с карбоксильными группами на поверхности частиц ПММА и ПММА/МНЧ проводили с помощью 1-этил-3(3-диметиламинопро пил)карбодиимида (ЭДК) по модифицированной одностадийной методике [6]. Количество белка в дисперсии частиц ПММА-белок проводили с использованием Кумасси G250 с детектированием при двух длинах волн [7].

Гидродинамический диаметр по светорассеянию (Z_{av}), среднечисловой диаметр (d_N) и индекс полидисперсности (PDI) частиц определяли методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) на приборе *Zetasizer Nano ZS, Malvern*. ИК-спектры получали на приборе *Tensor 27, Bruker* в таблетках KBr.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При обработке ПИ серной кислотой концентрация карбоксильных групп увеличивается с 8,9 до 269,8 мкмоль/г, или в 30,5 раза. Использование данного полимера для эмульгирования ММА позволяет повысить содержание карбоксильных групп на поверхности микрочастиц и избежать неполной отмывки от ПАВ в случае использования других реагентов.

Для ИК спектра частиц ПММА/МНЧ (рис.1) характерна широкая полоса поглощения с максимумом при 3434 $см^{-1}$, которая представляет собой суперпозицию валентых колебаний гидроксильных групп –ОН воды и карбоксильных групп. Пик поглощения с максимумом при 1732 $см^{-1}$ и 1731 $см^{-1}$ в спектрах частиц ПММА и ПММА/МНЧ, соответственно, является характеристическим для группы >C=O в сложных эфирах и карбоновых кислотах. Наличие широкой полосы поглощения в области 500-600 $см^{-1}$ в ИК спектре частиц ПММА/МНЧ соответсвует интенсивной полосе ассиметричных валентных колебаний связей Fe-O в магнетите при 576 $см^{-1}$ и свидетельствует о наличии магнетита в полимерной матрице. Концентрация МНЧ в материале композитных частиц ПММА/МНЧ составляет 1,7-3,8 % мас.

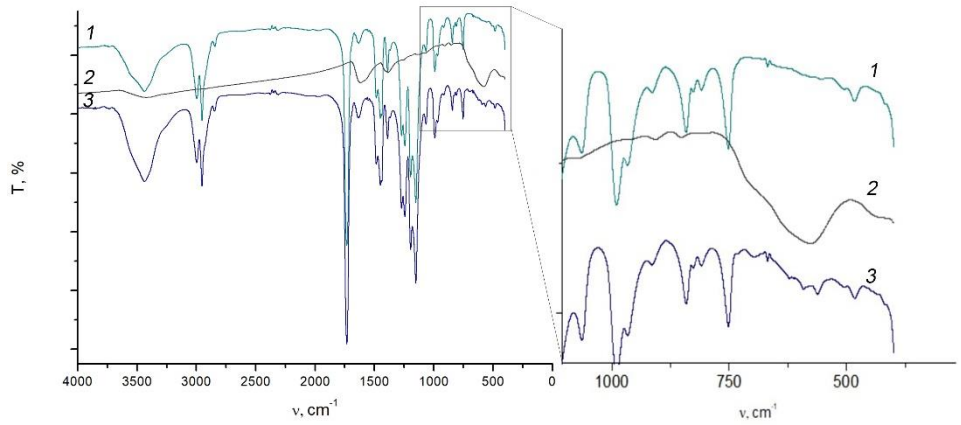

Рис. 1. ИК-спектры микрочастиц ПММА (1), наночастиц магнетита (2) и микрочастиц ПММА/МНЧ (3)

Концентрации ПГ в органической фазе влияет на характеристики частиц ПММА/магнетит (Таблица 1). С уменьшением количества используемого ПГ закономерно увеличиваются средний диаметр и полидисперсность частиц ПММА. Величина ξ–потенциала субмикронных частиц в воде составляет -42,1 – -45,3 мВ для разных образцов. Так как значение ξ – потенциала является отрицательным и достаточно большим, можно сделать вывод о присутствии на поверхности частиц карбоксильных групп.

Таблица 1

Характеристики частиц ПММА/МНЧ*

Таблица	$C_{ПГ}$, мг/мл	Z_{av}, нм	d_N, нм	PDI	ξ – потенциал, мВ
ПММА	30	498,7 ± 7,9	33 7,4	0,248 ± 0,003	-32,3 ± 1,1
ПММА/МНЧ	50	172,9 ± 3,3	11 3,2	0,218 ± 0,008	-45,3 ± 1,6
	40	250,9 ± 9,3	18 5,5	0,194 ± 0,051	-42,1 ± 1,0
	30	276,0 ± 13,1	18 2,2	0,384 ± 0,043	-43,8 ± 0,1
	20	416,5 ± 66,5	22 3,5	0,429 ± 0,048	-44,1 ± 2,5

*$V_{H2O}/V_{орг}$ =10, C_{Fe3O4}= 11,9 мг/мл

Карбоксильные группы на поверхности частиц ПММА и ПММА/МНЧ могут быть ковалентно связаны с молекулами белков. В Таблице 2 приведены результаты определения БСА, САЧ и ПрС, связанных ковалентно с поверхностью субмикронных частиц ПММА и ПММА/МНЧ. Масса белка, связанного с частицами, зависит от его структуры и свойств. На поверхности частиц могут быть иммобилизованы белки различной молекулярной массы, имеющие изоэлектрические точки как в растворах с высоким, так и с низким pH. Микрочастицы ПММА с карбоксильными группами на поверхности могут быть использованы для конъюгирования с иммуноглобулинами.

Таблица 2

Содержание белка, связанного с поверхностью частиц ПММА/МНЧ

Частицы	Белок	$M_в$, кг/моль	pI	$m_{белок}/m_{частиц}$, мкг/мг
ПММА	БСА	64,0	4,9	3,0±0,2
	ПрС	4,5	12-13	1,7±0,3
ПММА/МНЧ	САЧ	66,4	4,7	7,5±1,8

Библиографические ссылки

1. *Осипов, А.П.* Наночастицы металлов как новый класс меток в быстрых методах иммуноанализа/ А.П. Осипова, Ж.В. Самсонова, С.Э. Кондаков// Вестн. Моск. ун-та. сер. 2. химия. – 2015. – Т. 56. – С. 164-174.
2. *Laurent, S.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications Sophie/ S. Laurent [et al.]// Chem. Rev. – 2008. – V. 108. – P. 2064-2110.
3. *Semen, J.* The Acid Hydrolysis of Isotactic and Syndiotactic Poly (methyl methacrylate)/ J. Semen, B. Lando// Macromolecules. – 1969. – V. 2. – P. 570 - 575.

4. *Palit, S.R.* Quantitative determination of carboxyl endgroups in vinyl polymers by the dye-interaction method/ S.R. Palit, P. Ghosh// J.Polym.Sci.–1962.–V.58.–P.1225-1232.
5. Вода питьевая. Методы измерения массовой концентрации общего железа: ГОСТ 4011-72. – Введ. 01.04.1974. – М.: Госстандарт, 1972. – 8 с.
6. *Hermanson, G.T.* Bioconjugate Techniques. 3rd Edition/ G.T. Hermanson// Academic Press. – 2013.
7. *Zor, T.* Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies/ T. Zor, Z. Selinger// Anal. Biochem. – 1996. – V. 236. – P. 302-308.