

制备聚电解质空腔胶囊及其荧光蛋白装载*

李 晔** 韩伟伟 廖明霞 王 瑾 赵晓东

(北京科技大学应用科学学院化学系 北京 100083)

摘 要 以三聚氰胺甲醛(MF)微粒为模板,采用逐层静电自组装技术交替吸附聚苯乙烯磺酸钠(PSS)和聚丙烯胺盐酸盐(PAH),得到具有核壳结构的复合式微球,然后通过 $\text{pH} = 1$ 的盐酸溶液除去中心模板,得到直径约为 $3 \sim 4 \mu\text{m}$ 的空腔胶囊. 使用藻红蛋白作为探针分子,通过比较空腔胶囊装载前后荧光强度的变化,发现 pH 在 $4 \sim 5$ 之间时,胶囊呈现最大的蛋白装载量. pH 在 $6 \sim 10$ 的范围内,藻红蛋白在胶囊上的装载量几乎不变. $\text{pH} < 3$ 时,装载能力很差. 此外,通过荧光共聚焦显微镜对不同 pH 条件下的蛋白装载规律进行了成像分析. 一部分藻红蛋白在 $\text{pH} = 4$ 的条件下通过扩散进入了胶囊的内部,而 $\text{pH} = 7$ 的条件下,藻红蛋白不进入胶囊内部,而是吸附在表面.

关键词 层层自组装, 聚电解质, 藻红蛋白, 空腔胶囊, 蛋白装载

空壳式胶囊是近年来出现的一种新型技术. 它通过在纳米到微米级颗粒表面上的层层自组装(layer-by-layer self-assembly), 又称逐层自组装或静电自组装的方法合成得到^[1~3]. 制备得到的微胶囊显示出独特的结构与多变的性能, 因此极大地拓宽了自组装技术的应用范围^[4~6], 这种聚电解质胶囊的重要特点是壁厚和孔径可在纳米尺度上调控. 所得胶囊囊壁具有透过性, 一般情况下, 小离子或有机小分子可以自由通过囊壁, 但对于分子量超过 4200 的大分子则不易通过^[7]. 此外, 胶囊囊壁的透过性依赖所处的外部环境, 如 pH 值等因素^[8]. 例如, Donath 等^[9] 通过改变离子强度成功地把荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记的清蛋白装载入 PSS/PAH 胶囊中. 原因是改变离子强度可以使 PSS/PAH 胶囊由关闭状态转换至开启状态. Mendelsohn 等^[10] 报道了简单调控溶液的 pH 值就可以引发聚阴、阳离子之间电荷分布的不平衡, 进而导致聚电解质多层膜层间结合变得松散, 出现微孔, 控制 pH 值就可以实现 PEM 胶囊的可逆开合. 此外, 有机溶剂也会引发胶囊可逆的开合, 从而达到生物分子装载的目的^[11]. 正是由于这些特性使功能性物质(如酶、蛋白质、天然高分子等)在囊壁开启的时候载入胶囊, 再改变条件使之关闭. 从而使得这种胶囊有望成为装载生物分子的“微型笼子”, 并作为细胞尺寸级的生物活性材料而加以利用. 胶囊装载生物分子本身有

重要的意义. 一方面是因为通过这种聚电解质胶囊特别是以可生物降解聚电解质为囊壁材料制成的微胶囊或纳米胶囊与人体有良好的生物相容性. 另一方面是因为随着基因工程和生命科学的迅速发展, 使得多肽及蛋白质类药物大量涌现. 然而, 大多数多肽与蛋白质类药物存在半衰期短、容易失活, 口服效果差的问题. 胶囊装载是延长多肽与蛋白质类药物活性, 提高药效的有效手段, 具有重要的实用价值^[12~14]. 要实现胶囊在药物控释方面的真正应用, 其实质是理解微胶囊囊壁和生物分子的相互作用, 以及生物分子在胶囊中的渗透性等核心问题. 尽管目前存在一些有关生物分子的胶囊装载和渗透性的报道, 但是所用的模型分子均为荧光标记蛋白质, 而制备荧光标记蛋白时需要试剂与蛋白所带的活性基团如: 巯基、氨基及羧基等基团发生置换或缩合反应连接在一起. 反应后对蛋白质结构、电性、活性产生什么样的影响并不清楚. 因此使用荧光标记蛋白质研究胶囊装载和渗透性所得到的某些结论相比其对应的天然蛋白可能还是显得不够直接. 目前还鲜见直接用发光蛋白进行胶囊装载的报道, 因此我们选用了天然的发光蛋白藻红蛋白(R-PE)作为研究对象. 藻红蛋白是一种水溶性的荧光蛋白. 这些蛋白含有共价连接的四吡咯基团作为发色团, 其生物学作用是捕获自然光并传递激发能, 因此, 它在可见区有很强的吸收和荧光发射, 便于光谱研究. 可以

* 2009-09-16 收稿, 2009-10-28 修稿; 国家自然科学基金(基金号 20873005)和北京市自然科学基金(基金号 2083028)资助项目;

** 通讯联系人, E-mail: liye@sas.ustb.edu.cn

预见,本实验所得的结论也应该容易扩展到其它生物分子胶囊装载的研究中去。

1 实验部分

1.1 材料

三聚氰胺,纯度 $\geq 99.0\%$,甲醛溶液,分析纯,甲醛含量为 $37\% \sim 40\%$,分析纯的聚乙烯醇(PVA),分子量约 8.0×10^4 ,均为北京化工厂生产。高纯度的藻红蛋白(R-Phycoerythrin, R-PE)晶体购于鸿瑞生物科技有限公司。聚烯丙基胺盐酸盐(PAH)(平均分子量15000)和聚苯乙烯磺酸钠(PSS)(平均分子量70000)为美国Adrich公司产品。

1.2 仪器和方法

漩涡混合机(江苏省海林市其林贝尔仪器制造有限公司)、超声振荡器(宁波科声仪器厂)、精密pH计(上海雷磁仪器厂)被用于样品制备过程中。紫外可见光谱通过Cary 500型(美国Varian公司)紫外-可见光谱仪测定。荧光发射光谱通过F4500型(日本,Hitachi公司)荧光光谱仪检测。制备粒子的大小与形貌分别使用JEM-1400和JEM-100CX型透射电子显微镜进行表征(日本,JEOL公司)。电镜观察前先将样品用超声振荡器分散均匀,悬浮制样,置于铜网上干燥后测量。样品的荧光成像通过激光共聚焦扫描显微镜来实现(型号Leica TCS SP2,德国,Leica公司)。测量前,实验所用的盖玻片和载玻片放置于 H_2O_2 和 H_2SO_4 混合溶液中(体积比为1:3),在 $80^\circ C$ 温度下,加热保持30 min后,再用大量去离子水冲洗3次,然后用氮气将表面吹干备用。测定荧光发射光谱时激发波长设定为565 nm,检测步长为1 nm,狭缝宽度为5 nm,检测灵敏度为中度灵敏,扫描速度为1200 nm/min。所有样品的荧光发射强度测量时设定的仪器参数均保持不变。

1.3 样品制备

1.3.1 聚电解质微球及空腔胶囊的制备 三聚氰胺甲醛粒子采用文献[15]报道的方法制得。取10 mL浓度为2%的三聚氰胺甲醛粒子悬浮液和10 mL PSS溶液(1 g/L,含0.5 mol/L的NaCl)充分混合以后,超声分散吸附20 min,离心后用去离子水洗涤5 min,重复洗涤3次。除去未吸附的聚电解质,离心后和PAH溶液(1 g/L,含0.5 mol/L NaCl)混合,超声分散、吸附20 min,离心后用去离子水洗涤3次、每次5 min。重复上述步骤。

交替吸附PSS和PAH 4次后,得到了4个双层的核壳结构的微胶囊。再离心浓缩,将得到的高浓度核壳式微球悬浮液加入 $pH = 1.0$ 的盐酸溶液中,反应30 min,离心分离沉淀。并用去离子水反复洗涤,直至中性。

1.3.2 藻红蛋白的胶囊装载 取55 μL 藻红蛋白(1.6 mg/mL)溶于2 mL水中,将100 μL 的藻红蛋白溶液和100 μL 的聚电解质空腔胶囊悬浮液分别和2 mL浓度为0.01 mol/L $pH = 4.5$ 、6、7、8、9、10的磷酸盐缓冲溶液混合均匀,在冰箱中放置1.5 h后离心,测其上清液的荧光强度。在同样条件下,将100 μL 的藻红蛋白与相应2.1 mL pH 值的缓冲液分别混合以后,于冰箱中放置1.5 h。以备光谱分析。光谱检测中,在未进行胶囊装载之前,所有溶液的藻红蛋白溶液浓度均相同。胶囊装载后,相同浓度未胶囊装载藻红蛋白溶液作为空白跟胶囊装载藻红蛋白后溶液的荧光发射强度进行比较。并保证两个相互比较的样品的 pH 值、离子强度都完全相同。

2 结果与讨论

2.1 核壳式微球的结构与形貌

制备三聚氰胺甲醛微球,通过逐层自组装的方法在三聚氰胺甲醛微球的表面吸附了4个(PSS/PAH)双层,图1是未吸附聚电解质的三聚氰胺甲醛微球的TEM图,图中未吸附聚电解质三聚氰胺甲醛的微球表面光滑。尽管微球的大小有一定差别,但是并不影响其用做模板构建空心胶囊。图2是吸附了4个(PSS/PAH)双层的三聚氰胺甲醛微球的TEM图,可以看出,组装了聚电解质的微球表面变得较为粗糙。如果制备过程中吸附聚电解质的层数较少时,模板溶解时会导致囊壁坍塌,以至于得不到完整的空腔胶囊。如果层数太多,则渗透性变差。实验中我们制备的聚电解质层数为8层,在聚电解质层数在8~10层时,聚电解质囊壁的渗透性才具有可控性^[16]。

2.2 空腔胶囊的形貌

将得到的吸附了聚电解质的三聚氰胺甲醛微球置于适量 $pH = 1$ 的HCl溶液中,反应30 min,三聚氰胺甲醛微球发生降解,降解生成的低聚物反应产物快速地扩散出来,形成中空的胶囊。图3即为得到的空腔胶囊的TEM图片,胶囊的直径约4~5 μm ,呈现不规则多边形结构,从微胶囊的TEM图上可以看出,微胶囊在干燥的状态下完全

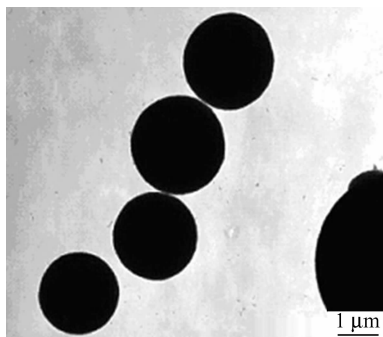


Fig. 1 TEM photographs of melamine formaldehyde (MF) microsphere

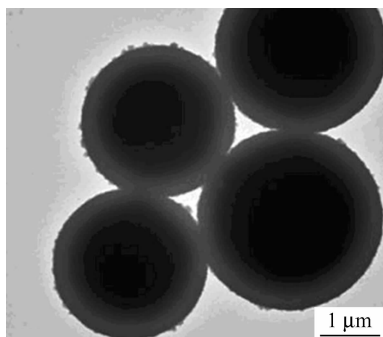


Fig. 2 TEM photographs of melamine formaldehyde (MF) microsphere doped with (PSS/PAH)₄ bilayers

坍塌,表面形成很多褶皱,这也表明了这类微胶囊的空心结构和超薄的囊壁结构.

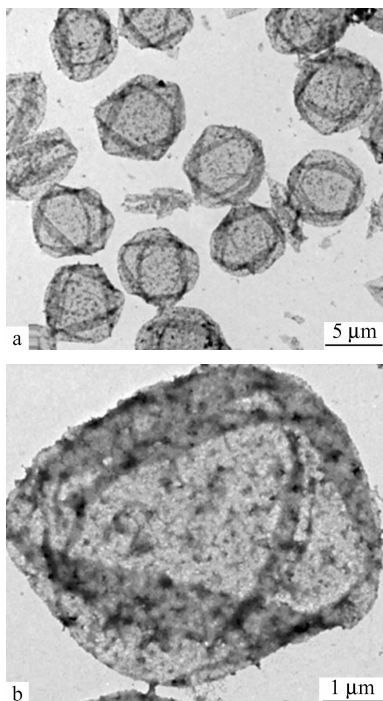


Fig. 3 TEM photographs of hollow polyelectrolyte microcapsules

2.3 藻红蛋白的装载

图4表示藻红蛋白的荧光发射光谱,激发波长为565 nm. 藻红蛋白的荧光发射光谱符合已有的文献报道^[17]. 图中虚线代表了藻红蛋白荧光发射曲线,实线代表了在藻红蛋白溶液加入微胶囊后,部分藻红蛋白被装载以后,所剩余的藻红蛋白溶液的发射曲线. 图4中可以明显看出来微胶囊引入可以使藻红蛋白溶液的荧光强度明显下降.

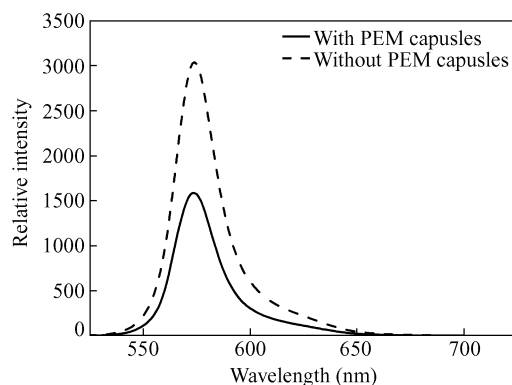


Fig. 4 The fluorescent intensity of R-Phycoerythrin is compared before (dotted line) and after (solid line) mixing with microcapsules

在pH值3~10的条件下,重复上述实验. 藻红蛋白溶液中加入聚电解质空腔胶囊以后,在相同条件下,藻红蛋白溶液的荧光强度均比未加入聚电解质空腔胶囊的溶液低. 藻红蛋白的荧光强度下降应该源于溶液中的藻红蛋白的数目减少. 即部分藻红蛋白被微胶囊所装载. 而且荧光强度下降的量也应该正比于其胶囊装载的量. 图5显示了在pH值为3~10的范围内,胶囊对藻红蛋白装载关系. 不同的pH值下,胶囊表现出不同的藻红蛋白装载行为. pH>6时,胶囊最外层的聚苯乙烯磺酸钠可以充分解离,而使得胶囊的最外层带负电荷,由于藻红蛋白的等电点在4.10~4.38的范围,而这时候藻红蛋白也同样带有负电荷. 静电的排斥作用使得藻红蛋白在胶囊上不易吸附. 然而,结果表明在pH=6~10的范围内藻红蛋白在胶囊上仍然具有一定的装载量,并且几乎不变. 这是因为胶囊表面特殊的表面多孔结构,使得其具有较高的表面能,在水溶液中,胶囊可以通过吸附溶液中的溶质来降低其表面能^[18,19]. 当pH位于4到5之间时,胶囊表面的装载量在pH=4的时候出现一个最大值. 该最大值的出现,是由于pH值小于藻红蛋白的等电点,而使得藻红蛋白带正电,最大值的出现是表面的范德华吸附力和静

电吸引力共同作用的结果. 当 $\text{pH} = 3$ 时, H^+ 浓度的增加, 会使得胶囊表面优先吸附扩散快的 H^+ , 结果表面高度电荷化, 吸附量反而会迅速降低. 这是因为在高电荷化的表面, 吸附的链节必须和小离子竞争, 这会使聚合物链节很难找到适当的位置吸附体积较大的蛋白分子.

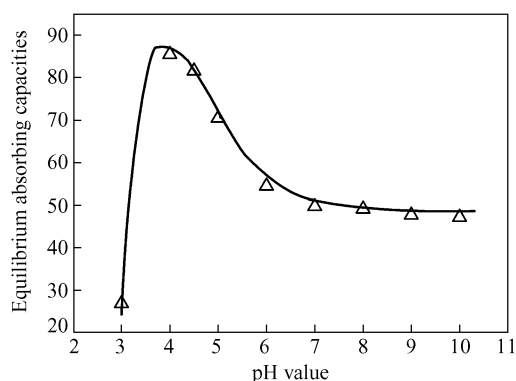


Fig. 5 Equilibrium absorbing capacities of R-PE at different pH value

最后通过荧光共聚焦显微镜研究藻红蛋白在胶囊中的分布, 结果如图 6 所示. 图 6 表明不论是 $\text{pH} = 4$ 还是 $\text{pH} = 7$ 的条件下, 绝大部分的藻红蛋白都被吸附或者镶嵌在胶囊壁上. 原因是囊壁上荧光强度很大. 为了更好地比较藻红蛋白在胶囊中的分布情况, 在不同 pH 值条件下, 一个装载后的胶囊经过放大以后示于图 7. 图 7 可以更清楚的观察到, 对比 $\text{pH} = 7$ 和 $\text{pH} = 4$ 的结果, 尽管大部分藻红蛋白被装载到胶囊的囊壁上, 但是仍然有一部分藻红蛋白在 $\text{pH} = 4$ 的条件下通过扩散进入了胶囊的内部. 而 $\text{pH} = 7$ 的条件下, 藻红蛋白不进入胶囊. 而是吸附在表面. Tiourina 等^[20]用 α -糜蛋白酶渗透入 PSS/PAH 胶囊中也发现了类似情况, 他们通过实验测得约 90% 的蛋白被吸附在胶囊壁上, 而只有约 10% 的蛋白进入胶囊内部. 值得注意的是我们所用的藻红蛋白的分子量为 240 kD^[21] 是 α -糜蛋白酶的分子量 (约 25 kD) 的 10 倍.

3 结论

利用层层静电自组装法制备了核壳结构的微球, 然后用盐酸溶解 MF, 得到聚电解质空腔胶囊. 作为细胞尺寸级的“微型笼子”, 聚电解质空心胶囊有望在生物传感器, 药物控释等领域产生实际应用. 研究生物分子在胶囊中的装载、渗透、及其相互作用规律等是实现上述应用的基础. 对

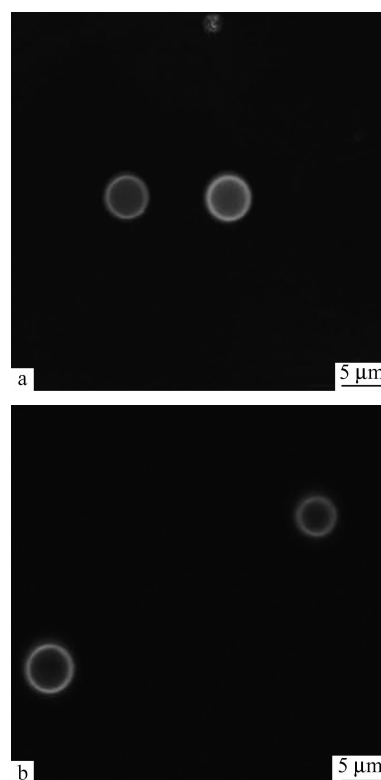


Fig. 6 Laser scanning confocal microscope (LSCM) image of R-PE loading capsule at $\text{pH} = 4$ (a) and $\text{pH} = 7$ (b)

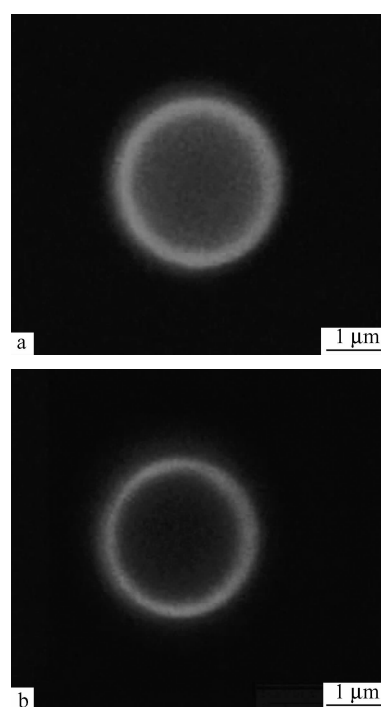


Fig. 7 Enlarged laser scanning confocal microscope image of a R-PE loading capsule at $\text{pH} = 4$ (a) and $\text{pH} = 7$ (b)

于荧光蛋白-藻红蛋白, pH 在 4 ~ 5 之间时, 胶囊呈现最大的蛋白装载量. pH 在 6 ~ 10 的范围内, 藻红蛋白在胶囊上的装载量几乎不变. $\text{pH} < 3$

时,胶囊的装载能力很差. 荧光成像的结果表明尽管大部分藻红蛋白被装载到胶囊的囊壁上,但是仍然有一部分藻红蛋白在 $\text{pH} = 4$ 的条件下通过扩

散进入了胶囊的内部. 这可能也使得胶囊在 $\text{pH} = 4$ 时,呈现最大地蛋白装载量. 而 $\text{pH} = 7$ 的条件下,藻红蛋白不能进入胶囊.

REFERENCES

- 1 Caruso F, Caruso R A, Mohwald H. *Science*, 1998, 282: 1111 ~ 1114
- 2 Donath E, Sukhorukov G B, Caruso F, Davis S A, Mohwald H. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37: 2202 ~ 2205
- 3 Caruso F. *Top Curr Chem*, 2003, 227: 145 ~ 168
- 4 Skirtach A G, Antipov A A, Shchukin D G, Sukhorukov G B. *Langmuir*, 2004, 20: 6988 ~ 6992
- 5 Dalhne L, Leporatti S, Donath E, Mohwald H. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 5431 ~ 5436
- 6 Sukhorukov G B, Antipov A A, Voigt A, Donath E, Mohwald H. *Macromol Rapid Commun*, 2001, 22: 44 ~ 46
- 7 Sukhorukov G B, Brumen M, Donath E, Möhwald H. *J Phys Chem B*, 1999, 103: 6434 ~ 6440
- 8 Liang Zhenpeng(梁振鹏), Wang Chaoyang(王朝阳), Sun Qilong(孙启龙), Tong Zhen(童真). *Progress in Chemistry(化学进展)* 2004, 16(04): 485 ~ 491
- 9 Donath E, Moya S, Neu B, Sukhorukov G B, Georgieva R, Voigt A, Bäuml H, Kiesewetter H. Möhwald H. *Chem Eur J*, 2002, 8: 5481 ~ 5485
- 10 Mendelsohn J D, Barrett C J, Chan V V, Pal A J, Mayes A M, Rubner M F. *Langmuir*, 2000, 16(11): 5017 ~ 5023
- 11 Lvov Y, Antipov A A, Mamedov A, Möhwal H, Sukhorukov G B. *Nano Lett*, 2001, 1: 125 ~ 128
- 12 Liu Bing(刘斌), Li Xinyang(李昕阳), Heyaning(和亚宁), Wang Xiaogong(王晓工). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2008, (2): 148 ~ 154
- 13 Yan Xuejia(焉学佳), Deng Yonghong(邓永红), Wang Xiaogong(王晓工). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)* 2007, (5): 440 ~ 445
- 14 Caruso F. *Adv Mater*, 2001, 13: 11 ~ 22
- 15 Liu Yajun(刘亚军), Zhu Yihua(朱以华), Zhang Suqiu(张素秋), Yang Xiaoling(杨晓玲). *Journal of Functional Polymers(功能高分子学报)*, 2004, 17(1): 113 ~ 118
- 16 Antipov A A, Sukhorukov G B, Donath E, Möhwald H. *J Phys Chem B*, 2001, 105: 2281 ~ 2284
- 17 Ma Jinshi(马金石), He Huizhu(何慧珠), Zhenzhen(甄珍), Liu Rongrong(刘颢颢) Jiang Lijing(蒋丽金). *Chin Sci Bull(科学通报)*, 1981, (4): 240 ~ 242
- 18 Antipov A A, Sukhorukov G B, Leporatti S. *Colloid Surf A*, 2002, 198-200: 535 ~ 541
- 19 Shiratori S S, Rubner M F. *Macromolecules*, 2000, 33: 4213 ~ 4219
- 20 Tiourina O P, Antipov A A, Sukhorukov G B, Larionova N I, Lvov Y, Möhwald H. *Macromol Biosci*, 2001(1): 209 ~ 214
- 21 Wang Sheng(王盛). Isolation and Purification of Phycoerythrin from *Corallina Officinalis* and Its Characteristic(珊瑚藻藻红蛋白的分离纯化与相关特性). Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University(福建农林大学博士论文), 2002

PREPARATION OF HOLLOW POLYELECTROLYTE MICROCAPSULES AND THEIR FLUORESCENT PROTEINS LOADING

LI Ye, HAN Weiwei, LIAO Mingxia, WANG Jin, ZHAO Xiaodong

(*Department of Chemistry, School of Applied Science, University of Science and Technology, Beijing 100083*)

Abstract Hollow polyelectrolyte microcapsules with size around $4 \sim 5 \mu\text{m}$, have been prepared by layer-by-layer (LbL) adsorption technique, based on template of weakly crosslinked melamine formaldehyde (MF) latex microspheres. In the presence of aqueous HCl solution ($\text{pH} = 1.0$), the MF cores are decomposed and hollow polyelectrolyte microcapsules are acquired. This kind of microcapsules can be utilized in many fields such as biosensor, drug release. Therefore, understandings on loading, penetrability of biomolecules on cell size microcapsules and their interaction with capsules are important, which are definitely favorable to their employment in real industry. In this study, R-phycoerythrins (R-PE) are used as a model to examine protein load behaviors and protein-capsules interaction. The R-PE is a kind of phycobiliprotein, which is found in red algae. It plays a crucial role in efficiently harvesting sunlight and then transfers this energy via a series of energy transfer mechanisms to chlorophyll in the membranes of photosynthetic organisms. The fluorescent intensity of R-phycoerythrin is compared before and after mixing with microcapsules where the pH value ranges at $3 \sim 10$. It shows a maximum protein loading at $\text{pH} 4 \sim 5$. Moreover, the pH dependent protein loading of microcapsules is analyzed on laser scanning confocal microscope. The further results indicate some R-phycoerythrin is entrapped into capsules at $\text{pH} 4 \sim 5$. However, the R-phycoerythrin mainly adsorbs at the surface of the microspheres at a pH range of $6 \sim 10$ and has a constant amount. It attributes microcapsules to have porous structure and high surface free energy. The capsules have a very poor protein loading amount at $\text{pH} < 3$.

Keywords Layer-by-layer, Polyelectrolyte, R-phycoerythrin, Hollow capsule, Loading