

·研究简报·

放射标记法研究壳聚糖与牛血清白蛋白的自组装超薄膜*

鲁从华 罗传秋 曹维孝**

(北京大学化学与分子工程学院高分子科学与工程系 北京 100871)

关键词 壳聚糖, 牛血清白蛋白, 放射标记法, 自组装超薄膜

基片在两种带有相反电荷的聚电解质溶液中交替吸附, 其表面形成致密有序的超薄膜的自组装(EA-electrostatic self-assembly)技术是由 Decher 及其合作者在 1991 年提出^[1], 由于简单易行, 从一出现就受到了广大研究者的极大兴趣^[2-4]. 对生物材料来说, 这无疑是一项非常重要且方便, 是否会被机体视为异物, 关键在于机体与材料表面的相互作用, 而与材料的本体性质基本无关^[5]. 因此利用这种技术, 可对生物材料, 特别是对那些生物相容性不好的材料表面进行改性, 同时保持了材料优异的本体性质. 如 Brynda 等^[6]利用牛血清白蛋白(BSA, Bovine serum albumin)与肝素(Heparin)在聚乙烯、聚醚氨酯、醋酸纤维素、锆、亲水或疏水硅片及云母上组装超薄膜, 以图改善材料表面的生物相容性和血液相容性, 因为 BSA 在材料表面的吸附, 有利于减少纤维蛋白原和血小板的吸附, 而肝素是天然的最好抗凝血剂. 壳聚糖(CS, chitosan)是甲壳素部分脱乙酰基化产物, 由于具有抗菌、生物相容、生物降解及金属离子整合等独特性质, CS 被广泛用于重金属回收、药物释放、伤口覆盖、膜分离、日用化工等方面. Chandy 等研究结果还表明, CS 与 BSA 形成的聚电解质薄膜可作为人造肾, 且 BSA 的引入极大地改善了薄膜的血液相容性^[7]. 本文拟用 I^{125} -BSA 的标记法研究 CS 与 BSA 在石英片上形成超薄膜, 考察不同实验条件, 如 pH, CS 的分子量, 离子强度, 外加聚电解质对其形成及稳定性的影响. 这有助于对这一类超薄膜应用的开发和对天然多糖与生物大分子相互作用的进一步了解.

1 原料

壳聚糖(CS, $M_n = 1.0 \times 10^6$), 东京化成产品, 脱乙酰化度为 80%; 牛血清白蛋白(BSA)为 Sigma 分装; 碘标记蛋白(I^{125} -BSA)由中国原子能科学同位素所提供; 聚苯乙烯磺酸钠(PSS, $M_n = 1.0 \times 10^5$)购于 ACROS, 磺化壳聚糖(SCS, 每个葡萄糖单元的磺化度约为 1.8)和降解壳聚糖($M_n = 1.2 \times 10^5$)分别按文献[8]和[9]方法合成. 其他试剂皆为分析纯.

2 超薄膜(CS/BSA)_n的形成及放射计数

经 3:1(V/V)的浓硫酸与双氧水处理的石英片, 交替浸到 CS (1.5 mg/mL)的一定 pH 值醋酸溶液和 BSA (1.016 mg/mL, 含微量 I^{125} -BSA)的磷酸缓冲溶液(PBS, 含有 0.025 mol/L KH_2PO_4 , 0.06 mol/L Na_2HPO_4)各 10 min 和 20 min, 去离子水漂洗干净后用 FT-646 微机放免测量仪计数, 这样完成一个组装循环, 在石英片的正反面各形成一个 CS/BSA 双层. 如此循环下去, 就可得到所需组装层的 CS/BSA 超薄膜, 表示为 (CS/BSA)_n, n 代表组装循环数. 做图时, 将计数转化为单位面积的吸附量. 除非特别说明, 所用的 CS 的分子量皆为 $M_n = 1.0 \times 10^6$.

3 超薄膜(CS/BSA)_n的稳定性测试

CS/BSA 超薄膜的稳定性是用十二烷基硫酸钠的水溶液(1% SDS)洗脱一定时间后的残留量来考察. SDS 是常用的蛋白质洗脱剂, 对蛋白质的洗脱率的大小可用来评价吸附的蛋白与聚合物表面相互作用的强弱^[10,11]. 经 1% SDS 洗脱后, BSA 在膜上的残留量越高, 则 CS/BSA 膜的稳定性越好. 膜上 BSA 的残留量可由以下公式计算:
$$\text{Remaining BSA \%} = 100 \% \times (\text{洗脱后的计数} - \text{空白})$$

* 2001-07-20 收稿, 2001-09-06 修改; 国家自然科学基金资助项目(基金号 39870227; 50173002); ** 通讯联系人

记数)/(洗脱前的记数 - 空白记数)。

4 pH 对 (CS/BSA)_n 的形成及稳定性的影响

图 1 表示的是石英片在 BSA(1.016 mg/mL) 的 PBS 缓冲溶液与 pH = 1 或 pH = 5.2 的 CS(1.5 mg/mL) 的醋酸溶液交替吸附形成超薄膜时, BSA 的吸附量($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)与组装循环数的关系。由图可见,两种 pH 值形成的超薄膜,前两个循环的 BSA 平均吸附量差不多,但都大于以后每个循环的平均吸附量。这是因为开始形成的超薄膜未完全覆盖石英片,它不光滑的表面及分布不均的电荷促进了 BSA 的吸附。这与文献^[6]报道用 XPS 表征在云母片上交替吸附 BSA 与硫酸软骨素时,云母片表面完全被超薄膜覆盖是在两个循环以后相一致。这也可由以下的补充实验得到验证,即在石英片上先组装四个循环的 CS/PSS 超薄膜以完全覆盖其表面,再按上述方法组装 CS/BSA,发现前两个循环超薄膜上的 BSA 的吸附量明显减少。从图 1 还可看到,除前 2 个循环外,吸附的 BSA 量($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)与组装循环数基本成线性关系,表明 CS 和 BSA 在石英片上自组装很成功。但在 pH = 1 和 pH = 5.2 时,每个组装循环的 BSA 吸附量分别是 0.07 和 0.18 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,显然 pH = 5.2 更有利 CS/BSA 超薄膜的形成。这是因为 BSA 是两性分子,其等电点(*iep*)约是 4.9^[12],当溶液的 pH < *iep*,BSA 的净电荷为正。因此当膜浸到小于等电点的 pH = 1 的 CS 溶液时,膜上 BSA 层的有效负电荷减少,与 CS 层的静电相互作用减弱,导致有一部分 BSA 在 CS 溶液中掉下来,不利于组装。图 1 的插图显示 BSA 的残留量与 1% SDS 水溶液洗脱时间的关系还说明在 pH = 1 时所形成的 CS/BSA 超薄膜的稳定性差。

5 离子强度对 (CS/BSA)_n 的形成及稳定性影响

采用两种离子强度的 BSA 溶液(PBS 或去离子水),两种情况下的组装循环数与对应的 BSA 吸附量($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)的关系如图 2 所示。与图 1 一样,前 2 个组装循环的 BSA 吸附平均量大于其后的每循环吸附量,且其后的组装数与单位面积吸附的 BSA 量基本成线性关系。但在 PBS 和二次去离子水中,每循环 BSA 的吸附量分别是 0.18 和 0.68 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,即在离子强度大的 PBS 缓冲溶液中,BSA 吸附量小,但形成的超薄膜 (CS/BSA)_n 稳定性却高(见图 2 插图)。一般来说,外加盐由于其屏蔽效应,引起线形聚电解质的构象由线型到卷曲状变化,从而增加了聚电解质的吸附量和膜的

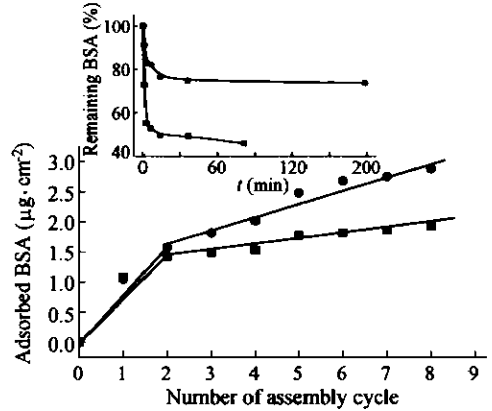


Fig. 1 The relationship between adsorbed BSA and the number of assembly cycle for (CS/BSA)_n films
The inset shows the remaining BSA percent on (CS/BSA)_n films versus elution time in 1% SDS aqueous solution
The pH of CS solution in which the films were formed: pH = 1 (■), pH = 5.2 (●).

厚度^[2,3]。同时,与低离子强度相比,较高离子强度所得超薄膜的稳定性较差^[13,14]。对含有蛋白质的两性性聚电解质体系而言,盐的影响则复杂些。例如,Caruso 等用 SPLS(Single particle light scattering)测得在纯水和 PBS 中,组装膜 BSA 单层厚度分别是 3.3 nm 和 5.5 nm,对应着 0.17 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 0.35 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的吸附量^[15]。而 Müller 等人的结果却表明,0.1 mol/L 的 NaCl 的加入降低了 HBS(Human bovine serum)的吸附^[16]。对于本实验得到的结果,我们认为这是由于 BSA 是椭圆形的两性聚电解质,溶液的离子强度大时,BSA 的负电荷结合点被部分小分子的反离子屏蔽,BSA 表面有效负电荷减少,导致吸附量减少,而离子强度引起椭圆型的 BSA 的构象变化相对较小,不足以增加 BSA 的吸附量。在去离子水中,每个吸附循环 BSA 的吸附量为 0.68 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-2}$,远大于根据分子尺寸理论计算的单层饱和吸附量 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ^[17],表明有 BSA 的多层吸附。这种多层吸附的 BSA 间的弱相互作用导致所得膜的稳定性较差。

6 CS 分子量对 (CS/BSA)_n 超薄膜的形成及稳定性影响

固定 BSA(1.016 mg/mL) 的 PBS 溶液不变,考察 pH = 5.2 两种分子量($M_n = 1.0 \times 10^6$, $M_n = 1.2 \times 10^5$)的 CS 对 (CS/BSA)_n 超薄膜的形成及稳定性影响。图 3 描述了两两种情况下组装循环数与 BSA 吸附量($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)的关系以及组装膜上 BSA 的残留率与 1% SDS 洗脱时间的关系(见插

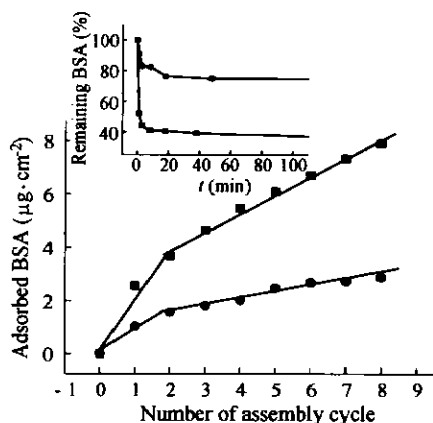


Fig.2 The relationship between adsorbed BSA and the number of assembly cycle for $(\text{CS/BSA})_n$ films

The inset shows the remaining BSA percent on $(\text{CS/BSA})_8$ films versus elution time in 1% SDS aqueous solution

Experiment conditions: BSA in PBS (●) and in deionized water (■)

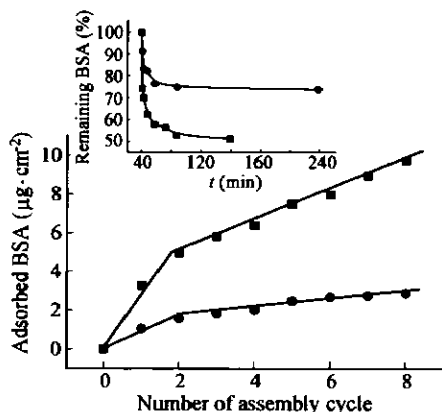


Fig.3 The plot of adsorbed BSA versus the number of assembly cycle for $(\text{CS/BSA})_n$ films with different MW of CS

Inset plot shows the remaining BSA percent on $(\text{CS/BSA})_8$ films versus elution time in 1% SDS aqueous solution

The M_n of CS: 1.0×10^6 (●) and 1.2×10^5 (■)

图).由此可得出分子量大的CS不利于BSA的吸

附(CS的分子量为 $M_n = 1.0 \times 10^6$ 和 $M_n = 1.2 \times 10^5$ 时,每循环的BSA吸附量分别约为 $0.18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $0.72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$),但有利于形成稳定的超薄膜(见插图).这是因为分子量越大,链越长的聚合物对BSA亲和性越强^[13,18].

7 外加聚电解质的影响

固定CS(1.5 mg/mL)溶液的pH值为5.2,在BSA(1.016 mg/mL)的PBS溶液中加入聚电解质(PSS或SCS),浓度都为 0.5 mg/mL ,按同样的方法在石英片上组装得到 $(\text{CS}/(\text{BSA} + \text{SCS}))_n$ 和 $(\text{CS}/(\text{BSA} + \text{PSS}))_n$ 超薄膜,其组装循环数与膜上BSA吸附量($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)的关系分别示于图4的(b)和(c),图4(a)表示不外加聚电解质的情况.从图

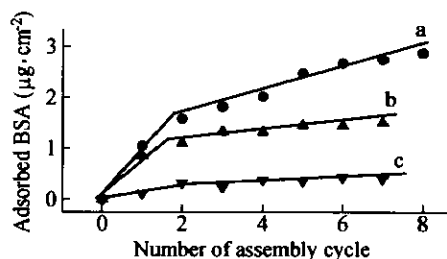


Fig.4 The plot of adsorbed BSA versus the number of assembly cycle for $(\text{CS/BSA})_n$ films (●, a), $(\text{CS}/(\text{BSA} + \text{SCS}))_n$ (▲, b) and $(\text{CS}/(\text{BSA} + \text{PSS}))_n$ (▼, c)

$[\text{PSS}] = [\text{SCS}] = 0.5 \text{ mg/mL}$

4可看出,外加聚电解质抑制了BSA的吸附,特别是PSS的抑制效果更显著.其主要原因是存在PSS的竞争吸附.这因为PSS是聚负电解质,也要与带正电荷的CS作用,且线形的强聚负电解质PSS,较椭圆形的两性聚电解质BSA与CS的静电相互作用更大.此外,PSS还能与BSA发生相互作用,导致BSA的构象发生变化^[12,19],结果是屏蔽了BSA表面的有效负电荷和疏水微区,致使其吸附量减少.

REFERENCES

- 1 Decher G, Hong J D. *Makromol Chem, Macromol Symp*, 1991, 46: 321 ~ 327
- 2 Bertrand P, Jonas A, Laschewsky A, Legras R. *Macromol Rapid Commun*, 2000, 21: 319 ~ 348
- 3 Lvov Y, Decher G, Möhwald H. *Langmuir*, 1993, 9: 481 ~ 486
- 4 Laschewsky A, Mayer B, Wischerhoff E, Arys X, Bertrand P, Delcorte A, Jonas A. *Thin Solid Film*, 1996, 284 ~ 285: 334 ~ 337
- 5 Hu D S G, Tsai C E. *J Appl Polym Sci*, 1996, 59: 1809 ~ 1817
- 6 Brynda E, Houska M. *J Colloid Interface Sci*, 1996, 183: 18 ~ 25
- 7 Chandy T, Sharma C P. *J Colloid Interface Sci*, 1989, 130: 331 ~ 340
- 8 Wolfrom M L, Shen Han T M. *J Am Chem Soc*, 1959, 81: 1764 ~ 1765
- 9 Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K. *Carbohydrate Research*, 2000, 324: 268 ~ 274
- 10 Galisteo F, Norde W. *Colloids and Surf*, 1995, B4: 389 ~ 400
- 11 Bohnert J L, Horbett T A. *J Colloid Interface Sci*, 1986, 111: 363 ~ 377
- 12 Shimabayashi S, Hirao K, Bando J, Shinohara C. *J Mater Sci*, 1994, A31: 65 ~ 81
- 13 Hoogeveen N G, Cohen Stuart M A, Fleer G J. *J Colloids and Interface Sci*, 1996, 182: 146 ~ 157
- 14 Hoogeveen N G, Cohen Stuart M A, Fleer G J. *Langmuir*, 1996, 12: 3675 ~ 3681
- 15 Caruso F, Möhwald H. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 6039 ~ 6046
- 16 Müller M, Rieser T, Dubin P L, Lunkwitz K. *Macromol Rapid Commun*, 2001, 22: 390 ~ 395
- 17 Peula J M, Delasnieves F J. *Colloids Surf*, 1994, A77: 199 ~ 208
- 18 Hoogeveen N G, Cohen Stuart M A, Fleer G J. *J Colloids and Interface Sci*, 1996, 182: 133 ~ 145
- 19 Teramoto A, Watanabe M, Iizuka E, Abe K. *J Mater Sci*, 1994, A31: 53 ~ 64

CHITOSAN/BOVINE SERUM ALBUMIN ULTRATHIN FILMS STUDIED BY RADIO-LABELED METHOD

LU Conghua, LUO Chuanqiu, CAO Weixiao

(Department of Polymer Science and Engineering, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Chitosan/bovine serum albumin (BSA) ultrathin films were fabricated on modified quartz wafer through layer-by-layer deposition. The effects of experimental conditions, such as pH value, molecular weight of CS, ionic strength and polyanions coexisting in BSA solution, on the fabrication and the stability of films were investigated with a radio-labeled method. The results show that the absorbed BSA is almost proportional to the number of assembly cycle except the first 2 cycles, and chitosan/BSA films are favorable to be fabricated in chitosan aq AcOH at pH = 5.2 as compared with at pH = 1.0. When two different molecular weight (MW) chitosans were used ($M_n \approx 1.2 \times 10^5$, $M_n \approx 1.0 \times 10^6$), the lower MW chitosan adsorbs more BSA, but less stable ultrathin films are fabricated. Similar results were obtained that the amount of adsorbed BSA is higher but the films formed are less stable in water than in phosphate-buffered saline (PBS). The adsorption of BSA is restricted greatly in the presence of poly(sodium styrene-sulfonate) (PSS) mainly because of the competitive adsorption.

Key words Chitosan, Bovine serum albumin, Radio-labeled method, Self-assembly ultrathin films