

·研究简报·

牛血清蛋白在聚甲基丙烯酸甲酯微球表面的吸附*

胡 杰** 李松军 刘白玲***

(中国科学院成都有机化学研究所 成都 610041)

关键词 牛血清蛋白, 聚甲基丙烯酸甲酯微球, 磺酸基, 吸附

血清蛋白在聚合物微球上的吸附在生物传感器^[1]、细胞分离^[2]、药物输送体系^[3]、人造器官^[4]及固相免疫分析^[5]等方面都有很重要的研究价值,因此近二十年来受到了越来越多的重视。

一般认为,蛋白在微球表面吸附的步骤首先是蛋白从本体溶液向界面区域迁移,然后蛋白分子吸附到载体表面,并在其表面发生构象松弛,也就是说使蛋白分子-载体表面的相互作用最优化^[6]。现已知道,蛋白吸附于微球表面主要有 3 种相互作用,即疏水作用、静电作用和氢键相互作用^[7]。根据载体材料表面性质的不同,这 3 种作用力中起主要作用的作用力有所不同。表面疏水性强的微球,如聚苯乙烯微球,疏水相互作用在蛋白吸附中就起主要作用^[8];当微球表面亲水性强时,如羧基化微球,氢键作用在吸附中起主要作用^[9];而当微球表面带电荷时,静电吸引起主要作用^[10]。

目前,国内外的研究基本上都以聚苯乙烯微球为载体。然而,其表面的强疏水性易使蛋白分子发生构象改变,进而使蛋白变性,这是我们不希望发生的。即使聚苯乙烯微球表面引入磺酸基或羧酸基,它表面的强疏水作用依然是不可忽视的^[11]。因此,在我们的研究中,采用了疏水性较弱的聚甲基丙烯酸甲酯微球作为载体,研究了其对血清蛋白的吸附,并建立了较为完整的数学模型。

1 试剂

甲基丙烯酸甲酯(MMA, 分析纯,天津市博迪化工有限公司);丙烯酰胺丙磺酸(AMPS,分析纯, Sigma 公司);聚乙烯吡咯烷酮(PVP, K30, 进口分装);过氧化苯甲酰(BPO, 分析纯,天津市博迪化工有限公司);牛血清蛋白(BSA, Sigma 公司,分类

号 A-7906, pI 4.7)。其中 MMA 和 AMPS 经减压蒸馏后使用,其它试剂直接使用,实验用水为三次重蒸水。

2 磺酸化 PMMA 微球的制备及表征

功能化 PMMA 微球用分散聚合方法制备得到。以 MMA 单体为基准,2% (W/W) BPO 为引发剂,1% PVP 为分散稳定剂,溶于水/甲醇介质中。通 N₂ 保护预分散 30 min,然后在 70℃ 下反应 10 h 后,滴加一定量功能单体 AMPS(0, 2, 4, 8 wt%)以引入磺酸基,在 70℃ 下再反应 10 h。反应结束后,离心分离收集微球,洗涤备用。

用激光衍射粒度分析仪(Mastersizer 2000 型,英国马尔文仪器有限公司)对微球的粒径及粒度分布进行检测。微球表面磺酸基含量以电导滴定法测定(Suntex SC-17A conductivity meter, 台湾)。测得的数据列于表 1 中。

Table 1 Characteristics of modified PMMA microspheres

Polymer	$D_n(\mu\text{m})^*$	$M_s(\times 10^{-2}\text{mmol/g support})^{**}$
1	3.13	0
2	3.26	4.26
3	3.57	5.36
4	3.63	6.32

* Number average diameter

** Amount of sulfonate group on the surface of microsphere

3 蛋白在微球表面的吸附

0.20 g PMMA 微球分散于 10 mL BSA 缓冲溶液中(0.5 mg/mL, pH 4.3),于 37℃ 孵育 3 h。吸附结束后,将悬浮液离心分离,上清液以紫外-可见分光光度计(U-2010, Hitachi)在波长 280 nm 处测得特征吸收值,参照标准曲线,从而可知道上清液中残留的牛血清蛋白含量,进而可计算得到微球上蛋白的吸附量^[12,13]。

* 2004-01-12 收稿,2004-03-20 修稿;** 现在江苏大学材料学院高分子教研室 镇江 212013;*** 通讯联系人

4 讨论

由图 1 可知,血清蛋白的平衡吸附量按聚合物微球样品 1~4 的顺序逐渐增大,这是因为四者表面的磺酸基数量依次增加引起的.很明显.此时静电相互作用在吸附过程中起了重要作用.

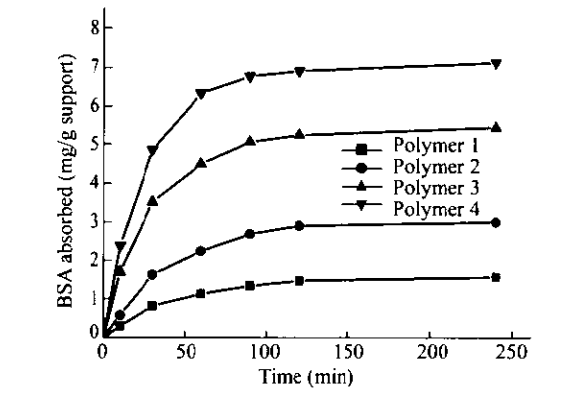


Fig. 1 Time course of BSA loading on microspheres
BSA concentration = 0.5 mg/mL, pH = 4.3, Temperature = 37 °C

如图 1 所示,所有的 4 个样品都在 90 min 内达到平衡吸附量的 90%. 120 min 时基本达到平衡.从此可以看出,尽管微球表面的磺酸基数量不同,使平衡吸附量有所差异,但各个微球样品对蛋白的相对吸附速度并无很大差异.

根据图 1, BSA 在微球表面的吸附曲线可以用一级反应方程来拟合^[14]:

$$-\frac{dc}{dt} = kt \tag{1}$$

上式积分可以得到:

$$c = c_0 \exp(-kt) \tag{2}$$

因此,吸附量可表示为:

$$q_t = q_e [1 - \exp(-kt)] \tag{3}$$

其中 t 为孵育时间; c 和 c_0 分别代表血清蛋白初始浓度及平衡浓度; q_t 和 q_e 则代表微球的平衡吸附量及时间 t 时的吸附量; k 代表表观速率常数.

根据公式(3),可以计算出各聚合物微球样品对血清蛋白吸附的表观速率常数,结果列于表 2 中.

Table 2 Apparent rate constants of various microspheres				
	Polymer 1	Polymer 2	Polymer 3	Polymer 4
$k \text{ (min}^{-1} \times 10^{-2} \text{)}$	2.28	2.70	3.01	3.18

从表 2 中可以看出,从聚合物微球样品 1~4,随着表面磺酸基密度的增大,表观速率常数也随之增大.这与图 1 所表现的规律是一致的,即表

面磺酸基密度越大,在相同时间内微球吸附的蛋白的绝对数量也就越多.

血清蛋白在微球表面的等温吸附曲线如图 2 所示.在其它一些研究当中,采用了 Langmuir 等温模型来拟合吸附曲线^[15].然而 Langmuir 模型有几个很重要的假设^[16],即载体上吸附目标分子的位置是确定的,每个吸附位置在能量上是等同的,且每个位置只能吸附一个目标分子;并且要求被吸附的相邻分子间没有任何相互作用.但是,在实际操作中,这些假设往往难以满足.因此,以 Langmuir 吸附模型拟合吸附等温曲线,计算得到的结果与测量得到的数据往往有很大的偏差^[15].

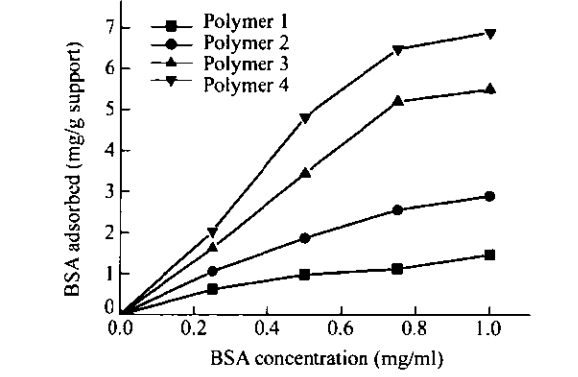


Fig. 2 Adsorption isotherms on sulfonated microspheres
at pH 4.3, temperature: 37

因此,我们采用了更为合理的 Langmuir-Freundlich 模型对吸附等温曲线进行了拟合^[17].

$$c_s = c_m \frac{Kc^{1/n}}{1 + Kc^{1/n}} \tag{4}$$

(4)式取倒数:

$$\frac{1}{c_s} = \frac{1}{c_m Kc^{1/n}} + \frac{1}{c_m} \tag{5}$$

其中, c_m 代表微球载体的最大吸附量; c_s 代表一定蛋白浓度下的平衡吸附量; K 是吸附常数,代表了吸附速率与脱附速率的比值, K 值越大,说明吸附速率比脱附速率越大; c 代表了蛋白溶液浓度.上式中的指数 n 是介于 0.5~0.6 之间的一个常数,一般取 n 值为 0.5 来计算上式^[17] (取值为 0.6, 计算结果相差不大).

Table 3 c_m and K values of different sulfonated microspheres			
Polymer	$c_m \text{ (mg/g support)}$	K	R^*
1	1.37	13.07	0.979
2	3.01	8.52	0.994
3	6.87	5.28	0.980
4	8.61	4.96	0.999

* Linear relation coefficient

根据(5)式,以 $1/c_m \sim 1/c_m^{1/n}$ 作图,计算出的 c_m 及 K 值列于表 3 中.与图 2 对比,计算出的 c_m 与实际测量值符合较好,拟合直线的线形相关系数也很高.从表 3 中可以看出,随着微球表面磺酸基密度的增加, c_m 值随之增大.这说明了在吸附过程中,静电作用起了主导作用.如果是疏水作用为主,那么随着亲水基团数量的增加, c_m 值会相应降低^[8].而与 c_m 相比, K 值表现出了相反的规

律,即随着磺酸基密度的增加, K 值降低.前面已经提到, K 值的大小与吸附动力学过程关系密切. K 值越大,则吸附越快.因此,增加微球表面的磺酸基密度,降低了血清蛋白的吸附速度.综上所述,静电作用的吸附量大于疏水作用;而两者的吸附速度则正相反,即疏水作用的吸附速度快于静电作用^[18,19].

REFERENCES

- 1 Lu H B, Homola J I, Campbell C T, Nenninger G G, Yee S S, Ratner B D. *Sensor Actuator B*, 2001, 74(3): 91 ~ 99
- 2 Panphilov A S, Bekish O J L. *Immunol Lett*, 1997, 56(2): 462 ~ 464
- 3 Glen S K, You H B, Harry C, Jan F J, Sung W K. *J Contr Rel*, 1992, 22(2): 83 ~ 93
- 4 Norman E, Williams P, Illum L. *Biomaterials*, 1993, 14(3): 193 ~ 202
- 5 Butler J E. *Methods*, 2000, 22(1): 4 ~ 23
- 6 Ball V, Schaal P, Voegel J C. *Mechanism of Interfacial Exchange Phenomena for Proteins Adsorbed at Solid-Liquid Interfaces*. New York: Marcel Dekker, 1998. 453 ~ 484
- 7 Andrade J D. *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers, Protein Adsorption*, New York: 1985. Vol. 2, 80
- 8 Okubo M, Azume I, Yamamoto Y. *Colloid Polymer Science*, 1990, 268: 598 ~ 604
- 9 Shirahama H, Suzawa T. *Colloid Polymer Science*, 1985, 263: 141 ~ 146
- 10 Burns N L, Holmberg K, Brink C. *J Colloid Interface Sci*, 1996, 178: 116 ~ 121
- 11 Kawaguchi H. *Progress in Polymer Science*, 2000, 25(8): 1171 ~ 1210
- 12 Yoon J Y, Kim J H, Kim W S. *Colloids Surf A*, 1999, 153(3): 413 ~ 419
- 13 Javier R, Abdelhamid E, Pascal C, Christian P. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, 180: 405 ~ 412
- 14 Gang Y, Zheng L, Jin Z, Fuxin D, Naiju Y. *Chemical Engineering Journal*, 2002, 87: 181 ~ 186
- 15 Adil D, Handan Y, Yakup A. *Colloids and Surfaces: A*, 2000, 174: 307 ~ 317
- 16 Labrou N E, Karagouni A, Clonis Y D. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 48: 278 ~ 282
- 17 Joon T O, Kim J H. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27: 356 ~ 361
- 18 Yoon J Y, Kim J H, Kim W S. *Colloids Surf B*, 1998, 12(1): 15 ~ 22
- 19 Yoon J Y, Kim J H, Kim W S. *Colloids Surf A*, 1999, 153(3): 413 ~ 419

ADSORPTION OF BOVINE SERUM ALBUMEN ON PMMA MICROSPHERES

HU Jie, LI Songjun, LIU Bailing

(Chengdu Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract The adsorption of serum proteins on polymer microspheres is very important for their application in many fields. Various amounts of sulfonate groups were introduced to PMMA microspheres, and the adsorption behaviors of BSA on them was studied. The apparent rate constants of various microspheres increased with the increase amount of sulfonate groups on the surface of microspheres. Adsorption isotherm curves were fitted to the Langmuir-Freundlich model. With the increase of sulfonate groups on the surface of microspheres, c_m values increased, however, K showed an opposite tendency to c_m . It is indicated that the electrostatic interaction plays a dominant role in the adsorption process, and adsorption based on electrostatic interaction is higher than that due to hydrophobic interaction, but the adsorption due to electrostatic interaction has a lower rate than that of the latter.

Key words BSA, PMMA microspheres, Sulfonate group, Adsorption