

壳聚糖亲和磁性毫微粒的制备及其对蛋白质的吸附性能研究*

余艺华^{1,2} 薛博¹ 孙彦¹ 何炳林²

(¹天津大学生物化工系 天津 300072)

(²南开大学吸附分离功能高分子材料国家重点实验室 天津 300071)

摘要 以壳聚糖为包裹材料包埋自制的磁流体,制备了具有核-壳结构的磁性毫微粒,并偶联色素配基 Cibacron Blue 3GA(偶联量 14.5 $\mu\text{mol/mL}$)得到了一种新型亲和磁性毫微粒.结果表明,所得亲和磁性微粒具有较窄的粒径分布、形状规整.以牛血清白蛋白(BSA)和溶菌酶(Lys)为目标蛋白,考察了该亲和磁性毫微粒的吸附性能,发现其对 BSA 和 Lys 的吸附量分别为 4 和 28 mg/g,吸附行为满足 Langmuir 吸附等温式,且对时间依赖性小而对溶液离子强度敏感.

关键词 壳聚糖, Cibacron Blue 3GA, 亲和磁性毫微粒, 蛋白质

磁性粒子是指在外界磁场存在下能定向运动的粒子.由于它的这一特殊性能,使其在细胞分离、固定化酶、免疫诊断及肿瘤靶向治疗、DNA 分离及核酸杂交等方面均有广泛应用^[1~4].从目前研究的情况看,磁性粒子一般为核-壳结构,即由金属氧化物(如铁、钴、镍等氧化物)组成核,高分子材料组成壳层;或将高分子材料作为核,磁性材料作为壳层.除此之外,也可做成夹心式结构,即外层和内层为高分子材料,中间为磁性材料.就其制备方法而言,主要有包埋法^[5]及单体聚合法^[6].本文选用天然碱性多糖-壳聚糖为包裹材料,通过包埋自制的磁流体,并偶联色素配基 Cibacron Blue 3GA,制得了一种新型的亲和磁性微球,并考察了它对蛋白质的吸附性能.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

壳聚糖(南开大学高分子所提供, DD 值 80%, M_w 约 50×10^4); 50% 戊二醛(BR, 天津天泰精细化学品公司); 聚乙二醇(PEG4000)(Merck-Schuchardt, 德国); $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (AR, 天津市大港一中化工厂); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (AR, 天津市化学试剂二厂); 苯甲酸乙酯(AR, 天津市化学试剂一厂); Span 80(CP, 天津市天大化工实验厂); Cibacron Blue 3GA、牛血清白蛋白(BSA)和溶菌酶(Lys)均为 Sigma 公司产品.

JJ-2 组织捣碎均浆机(深圳国华仪器厂);

752C 紫外-可见分光光度计(上海第二分析仪器厂); Nicolet 5DX 红外光谱测定仪(美国); JEM-CX II 透射电镜(德国).

1.2 磁流体的制备

参考文献[7]进行,并做了改进.将 100g FEG4000、200mL 重蒸水置于组织均浆机中溶解后,依次加入 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 充分溶解,并通循环水保温 70℃,滴加 25% 氨水,继续反应 30min 后用 25% 乙酸中和至 pH7.0,置于广口瓶中备用.

1.3 壳聚糖包裹

于组织捣碎机中加 0.5% 壳聚糖溶液 40mL、2.0mL 磁流体、Span80 4.0g 及苯甲酸乙酯 160mL,开动搅拌,恒温于 40℃,滴加 50% 戊二醛与甲苯的混合液(3.0mL + 3.0mL),30min 后升温至 60℃,反应 30min 后停止.磁性粒子用 0.39T 磁场分离后分别用乙醇、丙酮、重蒸水洗涤多次后备用.

1.4 染料配基的偶联

于 100mL 锥形瓶中加入 5.0mL 壳聚糖包裹后的磁性粒子,并加入重蒸水 40mL、0.8g NaCl 及 0.1033g Cibacron Blue F3GA,45℃ 水浴振荡 30min 后加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1.3g 继续反应 24h 后,磁场分离,分别用大量蒸馏水、25% 乙醇、1.0mol/L NaCl 水溶液、0.01mol/L Tris-HCl (pH7.6)缓冲液洗涤,直到 620nm 处检测不出染料为止,收集淋洗液,并定容到一定刻度后测其

620nm处吸光度值,用工作曲线的方法计算染料的偶联量。

$$\text{固载量}(\mu\text{mol/mL 磁体}) = \frac{\frac{W}{774.2} \times 1000 - C_1 V_1}{V}$$

式中, W 和 774.2 分别为 Cibacron Blue 3GA 的重量(mg)和分子量; C_1 和 V_1 分别为所收集的淋洗液中色素的浓度($\mu\text{mol/L}$)及体积(L); V 为所用磁球的体积(mL)。

1.5 吸附实验

将 0.3~0.4g 亲和磁性微球置于磨口平底试管中,加入不同浓度的蛋白溶液 10mL,充分混合 15min 后磁场分离,测定上清液中的蛋白浓度,并根据标准曲线的方法计算吸附量。

2 结果与讨论

2.1 Cibacron Blue 3GA 配基及其固定化

近年来,以色素取代辅酶、单克隆抗体等生物

大分子配基进行大规模的蛋白质特异性亲和层析引起越来越多的研究兴趣^[8]。色素配基虽不如生物配基专一性高,但其优点是可以人工合成、不易失活、适合于工业应用。此外,一种配基可以用于分离几种蛋白质^[9]。其中 Cibacron Blue 3GA 是应用最为广泛的一种色素配基,其结构式如下:

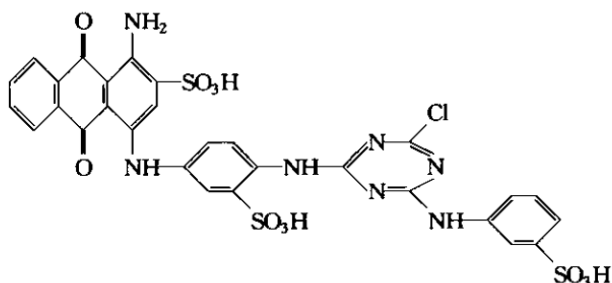
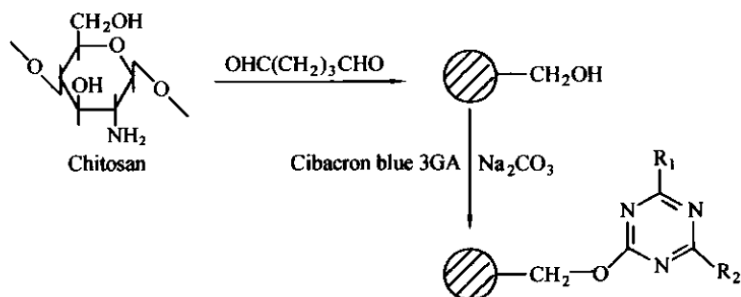


Fig. 1 Chemical structure of Cibacron Blue 3GA

在本研究中 Cibacron Blue 3GA 的固定化原理是基于壳聚糖中的—OH 或—NH₂ 与色素配基中的活泼—Cl 之间的亲核取代反应,其固定化过程可描述如下:



实验条件下,Cibacron Blue 3GA 在壳聚糖磁性微球上的偶联量为 14.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。

2.2 磁流体及亲和磁球的透射电镜

图 2 是磁流体(a)及亲和磁性微球(b)的电镜照片。在制备磁流体的过程中聚乙二醇(PEG)的加入可以起到分散剂和稳定剂的作用,它能包围在磁流体的表面,使之形成磁性胶体粒子。这是因为 PEG 可以借助配位键或氢键缠绕在磁性粒子表面,形成一个溶剂化壳层,这种溶剂化壳层有空间稳定作用,可以降低磁性胶体粒子的表面自由能,阻止小磁粒子相互聚集,从而保证了磁性胶体粒子能够稳定分散于介质中。由图可见,磁流体和磁球基本呈球形,其中磁流体的核-壳式结构较为明显,可认为中间较黑的部分为磁性氧化铁的小颗粒,颜色较浅的外壳是聚乙二醇,而用壳聚糖包裹后,由于所用交联剂戊二醛大大过量(相对于壳聚糖中的自由氨基),所以交联密度高、内部致密,核-壳结构不明显。

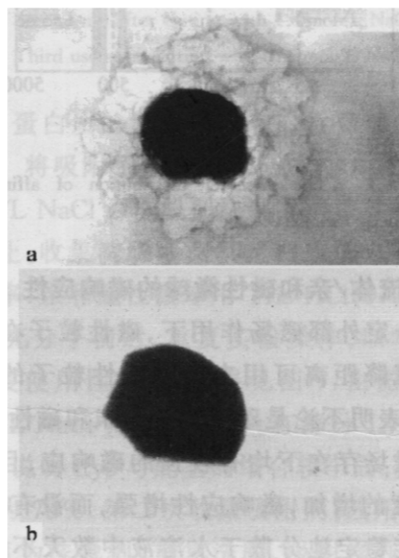


Fig. 2 The transmission electron microscope photographs of magnetic fluid (a) and affinity magnetic nanoparticles (b)

2.3 红外光谱分析

比较壳聚糖、交联壳聚糖、Cibacron Blue 3GA

及亲和磁性微球的红外光谱(图略). 可得如下结论. 3400 cm^{-1} 附近有强而宽的—OH 峰; 交联壳聚糖中 2800 cm^{-1} 处有—CHO 的 Femi 振动及—C—H 的伸缩振动, 其中—CHO 来自交联剂戊二醛, 这是因为壳聚糖分子主链中部分— NH_2 空间位置不匹配, 造成戊二醛中一个醛基未参与交联反应, 从而成为“悬垂”醛基; 1641 cm^{-1} 处有—C=N— 伸缩振动峰, 表明交联反应确已发生, 1000 cm^{-1} 附近是典型的 β -D 型吡喃苷的特征峰; Cibacron Blue 3GA 中 1059 cm^{-1} , 1163 cm^{-1} 和 1271 cm^{-1} 处为 —S=O 的振动峰, 此三特征在亲和磁性微球中均有反映, 表明配基的偶联是成功的.

2.4 磁性微球的粒径分布

图 3 是用小角激光光散射测得的磁性毫微粒的粒径分布, 由图可见所制备的毫微粒有较窄的粒径分布, 粒径大约为 700nm.

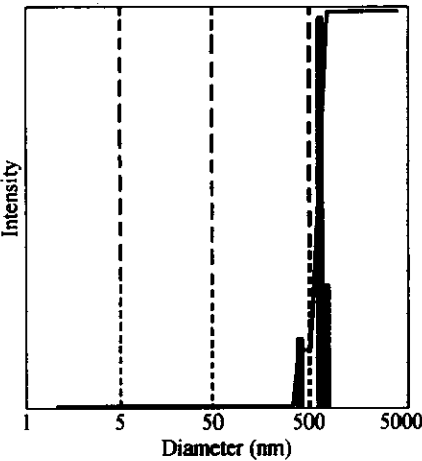


Fig. 3 The diameter distribution of affinity magnetic nanoparticles

2.5 磁流体/亲和磁性微球的磁响应性

在一定外部磁场作用下, 磁性粒子在一定时间内的沉降距离可用来表示磁性粒子的磁响应性. 表 1 表明不论是磁流体还是亲和磁性毫微粒, 在外部磁场存在下均有较强的磁响应, 且随外界磁场强度的增加, 磁响应性增强, 而没有磁场时, 磁流体能稳定地分散于水溶液中数天不沉降(观察 7 天后).

2.6 亲和磁球对蛋白质的吸附性能

2.6.1 对 BSA 的吸附等温线 色素配基与蛋白质的作用机理比较复杂. 一般认为, 离子交换作用、疏水作用、范德华力等对配基与蛋白的结合均

有贡献. 根据 Chase 等提出的理论^[10], 色素吸附剂对蛋白质的吸附行为可用 Langmuir 吸附等温式描述:

$$q = \frac{q_m \cdot C}{K_d + C}$$

式中 q 为平衡吸附量; q_m 为饱和吸附量; C 为液相蛋白质的平衡浓度; K_d 为解离常数, 是解吸和吸附反应速率常数的比值. 图 4 是磁性微球对 BSA 的吸附等温线.

Table 1 The magnetic properties of magnetic fluid and affinity nanoparticles

Magnetic field strength(T)	0.39	0.29	0.20	0.11
Settling time of magnetic fluid(S)	122	136	183	310
Settling time of magnetic affinity nanoparticles(S)	74	99	166	259

* Settling distance:5.3cm

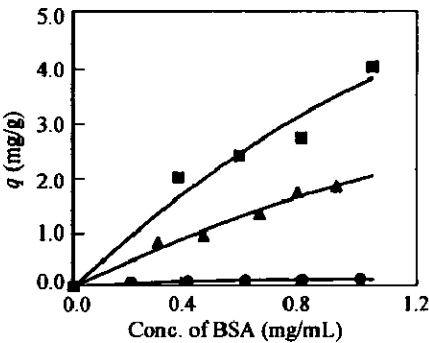


Fig. 4 Adsorption isotherms of BSA to magnetic nanoparticles

■ Affinity magnetic nanoparticles ($q_m = 10.6\text{mg/g}$; $K_d = 1.94\text{mg/mL}$)
▲ Particles with —CHO groups but have no dye-ligand
● Particles after reduced with NaBH_4 (also have no dye-ligand)

值得注意的是, 用壳聚糖包裹的磁流体即使没有偶联配基, 也对 BSA 有一定的吸附, 这是因为微球中的“悬垂”醛基与蛋白质中— NH_2 作用的结果, 如果不消除“悬垂”醛基势必会引入相当的非特异性吸附, 从而给分离纯化工作带来麻烦, 为此本文采用 NaBH_4 还原法将吸附剂中的“悬垂”醛基还原成醇, 由图可见, 还原后非特异性吸附大大降低, 证明这一方法是可行的.

2.6.2 吸附时间对吸附量的影响 选择不同的吸附时间为研究对象, 考察了它们对亲和磁性微球吸附性能的影响, 结果发现, 吸附行为对时间几

乎没有依赖性(图 5). 这是因为, 磁性微球是一种无孔的载体且尺寸很小, 微球对蛋白的吸附只是一种表面现象, 吸附反应主要发生在亲和磁性微球的外表面, 不存在内扩散现象, 故其反应速率常数很大, 亲和配基与蛋白质的作用很快就能达到平衡.

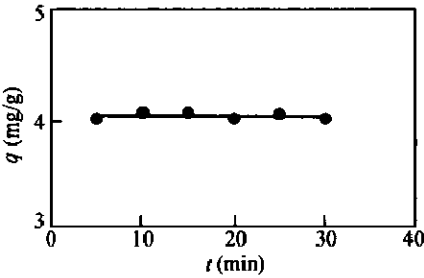


Fig. 5 The relationship between time and adsorption capacity for BSA
 $T = 25^{\circ}\text{C}$; 0.01mol/L tris-HCl buffer ($\text{pH}7.6$)

2.6.3 离子强度对吸附行为的影响 研究表明离子强度对吸附行为有重要影响. 由图 6 可见, 随

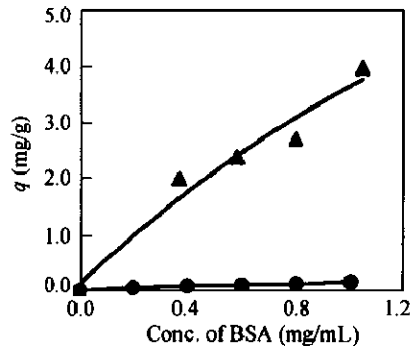


Fig. 6 Effect of ionic strength on adsorption isotherm
 $T = 25^{\circ}\text{C}$ $\text{pH}7.6$; NaCl concentration; ▲ 0.0, ● 1.0

着离子强度的增加, BSA 的吸附量明显减小. 这一结果与文献相吻合^[11,12]. 离子强度的影响可以从两个方面来考虑, 离子强度的增加使蛋白质处于更多的离子氛围中, 与配基结合的空间阻碍和静电排斥作用增大; 另一方面, 盐离子也会与配基分子的某些基团相作用, 阻碍配基与蛋白质的结合. 除此之外, 色素配基与壳聚糖之间可能还存在相互作用, 当离子强度较高时, 导致所固定的色素配基强烈地吸附于载体表面, 从而降低了能与蛋白有效结合的配基分子数目, 因此导致吸附量下

降. 这一结果提示我们, 为了提高配基对蛋白质的吸附量, 应尽量降低料液中的盐浓度. 但是在低盐浓度下, 虽然蛋白质被吸附得较多, 一些杂蛋白也可能被吸附, 影响洗脱时产物的纯度. 所以适当提高吸附时的盐浓度, 有助于白蛋白和配基的专一性吸附, 还可以简化洗脱步骤, 提高产物的纯度和洗脱回收率.

2.6.4 亲和磁球对溶菌酶的吸附性能 图 7 是亲和磁球对溶菌酶的吸附等温线. 对比图 4, 发现磁球对溶菌酶的吸附量要高得多, 即亲和磁性微球的吸附行为对目标蛋白具有较强的依赖性. 溶菌酶的分子量和 Stokes 半径均比 BSA 小得多^[13], 因而更容易接近亲和配基, 显示出较高的吸附量.

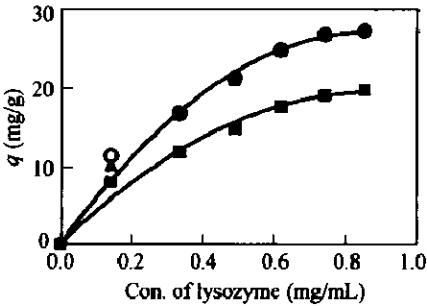


Fig. 7 Adsorption isotherm of lysozyme to affinity magnetic nanoparticles
 $T = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}7.6$, adsorption time: 15 min
○ First use ($q_m = 42.2\text{mg/g}$; $K_d = 0.455\text{mg/mL}$)
■ Second use after eluting with 1.0mol/L NaCl
▲ Third use after eluting with 0.1mol/L NaOH

2.6.5 蛋白质的洗脱及亲和磁性微球的重复使用性能 将吸附了蛋白质(Lys)的吸附剂收集, 用 1.0mol/L NaCl 为洗脱剂洗到上清液检测不出蛋白质为止, 收集洗脱液测其蛋白质的含量计算蛋白回收率. 亲和磁性微球用 Tris-HCl(0.01mol/L , $\text{pH}7.6$)充分平衡后, 重复实验操作, 以考察吸附剂的重复使用性能. 其结果见图 7. 由图可见, 用 1.0mol/L NaCl 为洗脱剂时, 有部分 Lys 未被洗脱下来, 说明 Lys 与配基的结合较牢固, 其蛋白回收率约为 70%. 第二次收集吸附剂, 改用 0.1mol/L NaOH 为洗脱剂, 重复洗脱、吸附操作, 可见经 0.1mol/L NaOH 再生后, 吸附剂的吸附量可以完全恢复, 证明此亲和磁性微球的重复使用性能是良好的.

REFERENCES

- 1 Dekker R F H. Appl Biochem Biotechnol, 1990, 23(1): 25~30
- 2 Kraunick P, Gilpin R W. J Biochem Biophys Methods, 1986, 12(1-2): 73~80
- 3 Gupta P K. Int J Pharm, 1988, 43: 167~177
- 4 Mehta R V, Upadhyay R V, Charles S W. Biotechnol Techniques, 1997, 11(7): 493~496
- 5 Cuyper M D, Jonian M. Langmuir, 1990, 7: 647~654
- 6 Iman M, Celebbi S S, Ozdural A R. Rective Polym, 1992, 17: 325~332
- 7 Sun Zonghua(孙宗华), Qiu Guangming(邱广明). Chemical Reagents(化学试剂), 1993, 15(4): 234~237
- 8 Nash D C, Chase H A. J Chromatogr A, 1997, 776: 55~63
- 9 Narayanan S R. J Chromatogr, 1994, 658: 237~258
- 10 Chase H A. J Chromatogr, 1984, 279: 179~202
- 11 Liu Y C, Ledger R, Stellwagen E. J Biol Chem, 1984, 259: 3796~3799
- 12 Boyer P M, Hsu J T. Biotechnol Tech, 1990, 4: 61~66
- 13 Nash D C, Chase H A. J Chromatogr A, 1997, 776: 65~73

THE PREPARATION OF CHITOSAN AFFINITY MAGNETIC NANOPARTICLES AND THEIR ADSORPTION PROPERTIES FOR PROTEINS

YU Yihua¹, XUE Bo¹, SUN Yan¹, HE Binglin²

(¹ Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

(² The State Key Laboratory of Functional Polymer Materials for Adsorption and
Separation, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Magnetic nanoparticles, containing a magnetic core and a polymer shell, were synthesized by coating magnetic fluid with chitosan. Novel affinity magnetic microspheres were obtained after immobilizing dye-ligand (Cibacron Blue 3GA) onto the nanoparticles by covalent coupling. Under the preparation conditions, the microspheres had a spherical appearance, narrow distribution of diameter, and 14.5 $\mu\text{mol/mL}$ immobilization capacity for reactive dye. The microspheres can be separated by magnetic field. Bovine serum albumin (BSA) and lysozyme (Lys) were used as target proteins to examine the adsorption properties of the adsorbent. Under appropriate conditions, the adsorbent had a capacity of 4 and 28 mg/g for BSA and Lys, respectively. Adsorption isotherm could be expressed by the Langmuir adsorption model. Unlike adsorption time, the liquid phase ionic strength affects the adsorption properties dramatically.

Key words Chitosan, Cibacron Blue 3GA, Affinity magnetic nanoparticle, Protein