

热敏性磁性高分子微球同蛋白质的相互作用*

丁小斌 孙宗华 万国祥

(中国科学院成都有机化学研究所 成都 610041)

江英彦

(中国科学院化学研究所 北京 100080)

摘 要 热敏性磁性微球被用于人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的吸附/解吸研究,考察了温度、pH值、蛋白质浓度以及保温时间等因素对蛋白质吸附/解吸的影响,结果显示微球对蛋白质的吸附/解吸具有明显的温度依赖性;pH值增大使蛋白质的吸附量减小;延长保温时间和增大蛋白质的初始浓度均有利于增加蛋白质的吸附量。

关键词 热敏性,磁性,高分子微球,蛋白质,吸附

聚(*N*-异丙基丙烯酰胺, *N*-isopropylacrylamide, NIPAM)具有低临界溶解温度(lower critical solution temperature, LCST),该热敏性已经被用于多种领域,特别是生物工程、生物医学等领域的应用研究^[1]. 交联的聚异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)水凝胶微球的流体动力学直径(hydrodynamic size)随温度升高而收缩,同时微球表面的亲/疏水性也随之发生变化^[2],研究者们利用 PNIPAM 凝胶微球的这种可逆的热敏特性,将其用于一些生物大分子、表面活性剂等吸附/解吸研究,如: γ -球蛋白(γ -globulins, HGG)、肌红蛋白(myoglobin, MG)、人血清白蛋白(HSA)、十二烷基磺酸钠(sodium dodecylbenzene sulfonate, SDBS)、三甲基硬脂酰氯化铵(trimethyl stearyl ammonium chloride, TSAC)^[3,4]等,结果表明,这些物质在 PNIPAM 微球上的吸附量明显依赖于温度的变化,该特性有望在生物大分子的纯化、分离等领域得到实际应用. 但热敏微球从混合液中的分离仍然是一个比较突出的问题,一般均采用高速离心分离,该法不仅操作繁琐、耗能、耗时,而且微球在离心分离过程中容易发生凝集,不利于吸附物质的解吸及微球的循环使用。

我们曾报道了具有热敏性和磁性特征的多功能微球的合成工作^[5],本工作将热敏性磁性高分子微球用于人血清白蛋白(HSA)的吸附/解吸研究,讨论了温度、保温吸附时间、蛋白质初始浓度等因素对微球吸附/解吸蛋白质的影响规律. 结果

表明该微球具有简便、快捷的磁分离特性,而且微球在分离过程中无凝集现象,可循环使用。

1 实验部分

1.1 试剂

苯乙烯(St, 分析纯, 武汉化学试剂公司), 经 10% NaOH 洗涤(反复三次)除阻聚剂, 蒸馏水洗至中性后, 用适量 CaCl_2 干燥, 4℃ 贮存备用; *N*-异丙基丙烯酰胺(*N*-isopropylacrylamide, Aldrich, 97%), 经 1:1 甲苯/正己烷重结晶, 减压干燥; 其它试剂包括人血清白蛋白(生化试剂, >95%, 卫生部上海生物制品研究所), 聚乙二醇($M_w = 4000$, 试剂级, 天津天泰精细化学品有限公司, 进口分装), 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 成都化学试剂厂, 分析纯), 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 成都化学试剂厂, 分析纯), 柠檬酸(分析纯, 重庆东方试剂厂), *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(*N,N'*-methylenebisacrylamide, MBA, 北京化工厂, 化学纯), 过硫酸钾(天津东方化工厂, KPS)等, 以上试剂均未经进一步处理, 直接使用, 水为重蒸馏水。

1.2 合成

1.2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-NIPAM})$ (PSN)微球的合成
在 250mL 四颈瓶中加入 39mL H_2O 、66mL EtOH、6.0g PEG 和 10mL Fe_3O_4 磁流体($d = 50\text{nm}$, 自制), 搅拌分散、溶解后加入 15g 单体(11.0g St + 4.0g NIPAM)和 0.45g KPS, 通 N_2 驱氧, 400rpm 下搅拌 1h 后, 升温至 70℃

(300rpm) 反应 24h. 产物经磁分离, 洗涤, 并用 1mol/L HCl 溶液浸泡 48h 以除去未包裹的 Fe_3O_4 , 反复洗涤, 透析后备用.

1.2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-NIPAM})$ 微球的种子聚合

2.0g PSN 微球作为种子加入到装有 100mL H_2O 、0.09g KPS 及 4.0g PEG 的四颈瓶中, 加入三分之一单体溶液 (1.5g NIPAM + 0.15g MBA + 30mL H_2O), 70°C 下反应 40min 后, 滴加余下单体, 1.5h 左右滴完, 在 70°C 下反应 6h, 产物经磁分离, 洗涤, 透析后得到外包 PNIPAM 水凝胶的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{P}(\text{St-NIPAM})$ 微球, 即 PSNN 微球.

1.3 微球表征

干态微球形貌由扫描电镜 (AMRAY-1000) 观察, 其粒径分析由与之联机的计算机图象处理系统分析; 微球在水中的流体动力学直径 (hydrodynamic size) 用 SALD-2001 激光衍射粒径分析仪 (laser diffraction particle size analyzer, Shimadzu, Japan) 测定.

1.4 蛋白质的吸附/解吸

将 3mL 分散有 50mg PSN 或 PSNN 微球的蒸馏水悬浮液加入到 4mL 一定 pH 值的 HSA 磷酸盐和柠檬酸缓冲溶液中, 于一定温度下保温吸附/解吸一定时间后, 在 4200 高斯磁场下 (室温) 进行 15min 磁分离, 用 751-Gw 型分光光度计 (上海分析仪器厂) 测定上清液在 280nm 波长时的吸光度, 据测得的变化值计算蛋白质的吸附量/解吸量.

2 结果与讨论

2.1 HSA 吸光度-浓度标准曲线的测定

用 pH = 4.6 的缓冲溶液配制浓度分别为 0.1mg/mL、0.4mg/mL、0.7mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL 的标准 HSA 溶液, 分别测其在 280nm 波长下的吸光度 A , 其结果如图 1 所示. 根据公式 $A = \epsilon CL$, 将图 1 中的结果进行线性回归处理, 可得 $\epsilon = 0.8706\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$. 对于未知浓度的 HSA 溶液, 测其吸光度 A , 通过计算即可得到其浓度.

2.2 热敏性磁性微球与蛋白质的相互作用

2.2.1 热敏性磁性微球 图 2、3 分别为 PSN 和 PSNN 微球的扫描电镜照片, 干态下其平均粒径分别为 $11.5\mu\text{m}$ 和 $13.3\mu\text{m}$, 图 4 显示的是 PSN、PSNN 微球的流体动力学直径随温度的变化曲线, 可见微球粒径随温度的升高而收缩, 其收缩幅度为 10%~20%. Kawaguchi 等^[2] 利用荧光检测、

电泳淌度测定等手段对 PNIPAM 水凝胶微球的表面特性研究结果表明, 温度高于低临界溶解温度 (LCST), 微球发生收缩的同时, 表面由亲水性变为疏水性, 由此引起与一些物质 (如表面活性剂、蛋白质等) 的相互作用发生变化. 在以下的工作中, 我们将热敏性磁性微球用于蛋白质的吸附/解吸的研究, 讨论包括温度、pH 值、蛋白质浓度、保温时间等因素对蛋白质吸附/解吸的影响规律.

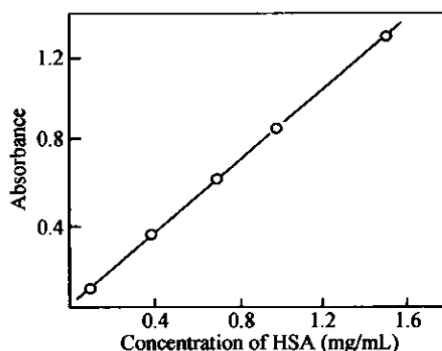


Fig. 1 Absorbance-concentration curves of human serum albumin (HSA) at 280nm

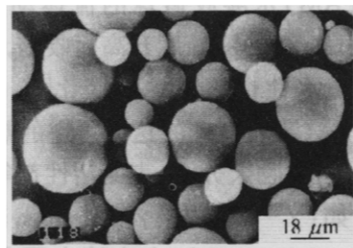


Fig. 2 Scanning electron micrograph of PSN

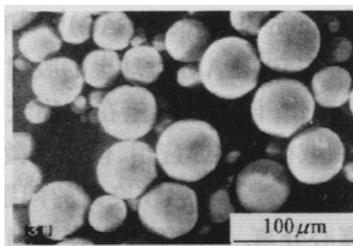


Fig. 3 Scanning electron micrograph of PSNN

2.2.2 温度的影响 为了考察温度对热敏性磁性微球吸附 HSA 的影响, 我们研究了在 30°C 到 45°C 间, PSN、PSNN 微球对 HSA 的吸附量随温度变化关系, 其结果如图 5 所示, PSN 和 PSNN 微球对蛋白质分子的吸附量均随温度升高而增加. 温度升高将产生两方面的效应, 一方面, 微球

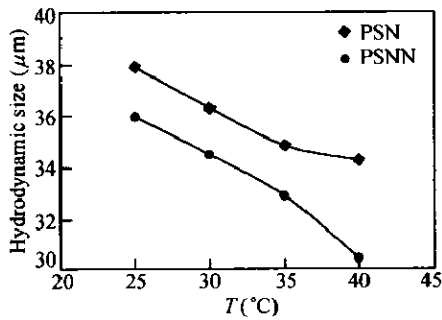


Fig. 4 Temperature dependence of the hydrodynamic size of PSN and PSNN

体积减小,表面积减小,对蛋白质的吸附产生一定的负效应;另一方面,微球随温度升高表面由亲水性转变为疏水性^[2],其对蛋白质分子的吸附能力增强,对蛋白质的吸附产生一定的正效应.从实验结果可知,该正效应在蛋白质的吸附过程中起着主导作用,这说明微球对蛋白质的吸附量主要取决于微球表面的亲疏水特性的变化.由于 PSN 和 PSNN 微球中所含的热敏成份 PNIPAM 的量不同,其对蛋白质的吸附量随温度变化的幅度、趋势有所差异,PSN 微球对 HSA 的吸附只在 35℃ ~

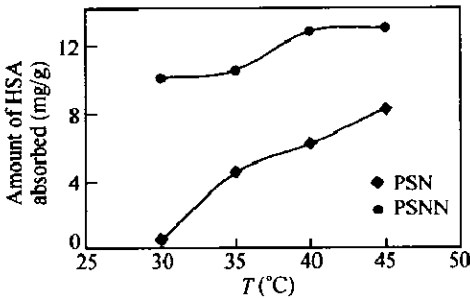


Fig. 5 Effect of temperature on adsorption of HSA on PSN and PSNN, pH = 4, incubated for 30 min, HSA = 1.0mg/mL

40℃ 区间表现出一定的温度依赖性,而外包有 PNIPAM 凝胶层的 PSNN 对蛋白质的吸附量一直随温度升高而增加,表现出更强的温度敏感性.由于 PSN 微球表面含有疏水性的苯乙烯链段,而 PSNN 微球表面为一层 PNIPAM 凝胶层,换言之,PSN 的表面比 PSNN 更具疏水特性,其对蛋白质具有更大的吸附作用,所以相同温度下,PSN 对蛋白质的吸附量大于 PSNN.图 6 为 PSN、PSNN、Fe₃O₄/PSt 微球在 40℃ 和 25℃ 间交替变换的温度条件下,微球对蛋白质的吸附/解吸的循环过程中,溶液中蛋白质浓度的变化结果.40℃ 时微球

发生收缩呈疏水性,部份蛋白质吸附于微球表面,25℃ 时微球发生膨胀呈亲水性,部份蛋白质从微球中解吸下来,表现为 40℃ 时溶液中蛋白质浓度比 25℃ 时低.图 6 结果表明,微球的收缩/膨胀可逆变化,也使得其对蛋白质的吸附/解吸表现出可逆性.而在相同条件下,Fe₃O₄/PSt 微球对蛋白质的吸附/解吸没有类似的温度敏感性.

不同温度下微球吸附的蛋白质,在相同时间内解吸的量有所不同,吸附温度越低,能解吸的部份越多(图 7 所示);在较高温度下,虽然蛋白质的吸附量较高,但相对解吸的部份较少,产生这种现象的原因可能是在较高温度下蛋白质与高分子链接触比低温时容易发生变性,造成不可逆吸附.

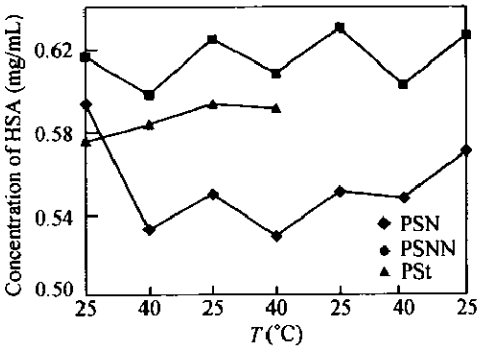


Fig. 6 Variations of the concentration of HSA in the solution of PSNN and HSA mixture, measured alternatively at 40℃ (incubated for 30min) and 25℃ (incubated for 60min), at pH = 4.0, HAS = 1.0mg/mL

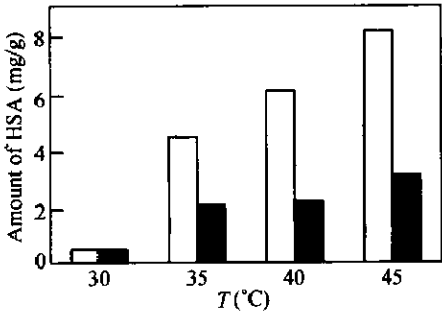


Fig. 7 Desorption of HSA absorbed on PSNN at higher temperature for 30 min at 25℃ temperature
Total bar: amount of HSA adsorbed at 40℃ for 30min; solid part of bar: amount of HSA desorbed on lowering the temperature to 25℃
□ absorption ■ desorption

2.2.2.3 pH 值的影响 由于蛋白质分子在不同 pH 值条件下,尤其在等电点附近蛋白质分子所带电荷的变化,将会影响微球对蛋白质的吸附量.图

8 为 40℃ 时,微球在 pH 分别为 4.0、4.6、5.2、5.8 的条件下,对蛋白质的吸附量变化结果,图中显示,蛋白质的吸附量随 pH 的增大而降低,特别是 pH 值小于 5.2 时,蛋白质的吸附量随 pH 的增大而急剧下降.我们认为,随着溶液的 pH 增大,特别是当 pH 值高于 HSA 的等电点(pH = 4.6)时, HSA 具有负电荷,而另一方面,PSN(N)微球的制备是采用过硫酸钾(KPS)作引发剂,其高分子链末端带有一 SO_4^- 残基,呈负电荷,所以,在较高的 pH 值条件, HSA 分子与 PSN(N)微球间存在着静电斥力,导致 HSA 分子不易被微球吸附.

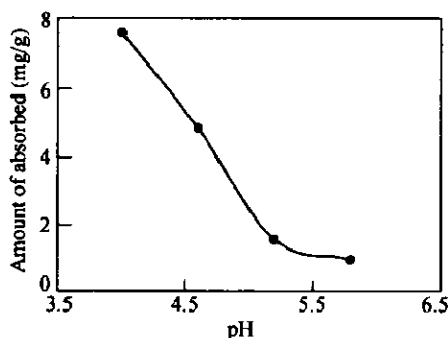


Fig. 8 Effect of pH on adsorption of HSA on PSNN microspheres, incubated at 40℃ for 30min, HSA = 1.0/mL

2.2.4 保温时间的影响 保温时间的长短对蛋白质的吸附有比较明显的影响,图 9、10 的结果表明,延长保温时间,有利于蛋白质的吸附.从图中结果可知,吸附时间小于 15min 时,保温时间对蛋白质的吸附量有较大的影响,蛋白质的吸附量随时间变化几乎呈线性增长,而在 15min 之后,吸附量随时间变化显得很平缓.这是因为在较短的保温时间内,微球的收缩还没有达到平衡,随着保温时间的延长,其收缩幅度越大,其表面的疏水特征越明显,因此,蛋白质的吸附量持续增加,而当达到一定的保温时间(如 15min 以后),此时的微球收缩已基本达到平衡状态,其表面的亲/疏水性不再发生明显的改变,因此,蛋白质的吸附也基本达到饱和状态,再延长其中温时间,其吸附量不会有太大的变化.

2.2.5 HSA 浓度的影响 微球对蛋白质的吸附量也受 HSA 初始浓度的影响.图 11 的结果表明,微球对蛋白质的吸附量随 HSA 浓度的增加而增大,在较低浓度范围(小于 1.0mg/mL)时,吸附量随 HSA 浓度的增加而增大的趋势比较明显,二者

几乎成线性关系;而在较高的浓度范围(> 1.0mg/mL),吸附量随 HSA 初始浓度的增加而增大的趋势变缓,这主要因为随着 HSA 浓度的增加,微球表面所吸附的蛋白质分子也逐渐增加,直至达到饱和状态,此时,虽然再增加 HSA 的初始浓度,受微球表面积的限制,蛋白质的吸附量也不会发生太大的变化.

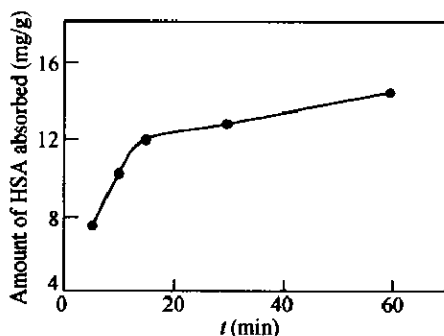


Fig. 9 Adsorption of HSA on PSN microspheres at different incubation time, pH = 4.0, HSA = 1.0mg/mL

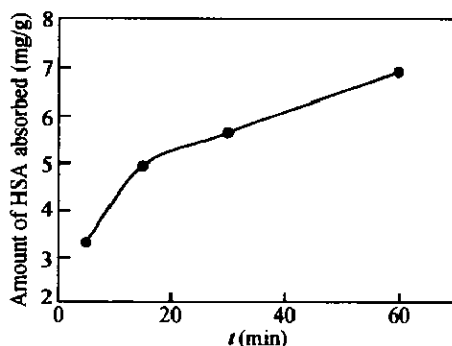


Fig. 10 Adsorption of HSA on PSNN microspheres at different incubation time, pH = 4.0, HSA = 1.0mg/mL

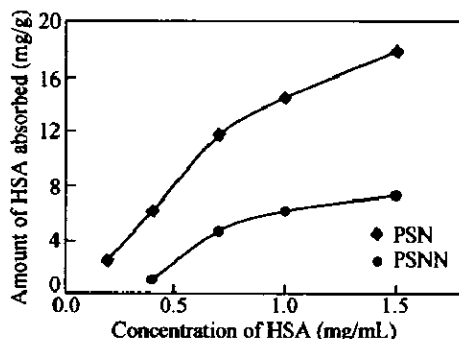


Fig. 11 Effect of HSA concentration on adsorption of HSA on thermosensitive magnetic microspheres

热敏微球对蛋白质的吸附/解吸是一个比较

复杂、综合的动力学过程,它包括微球与蛋白质间静电引力/斥力作用,微球表面和蛋白质分子的亲疏水性作用,微球表面和蛋白分子间界面相互作用,以及由这些作用引起的蛋白质分子的重排,变性,构象变化和 PNIPAM 高分子链的运动等一系列微观变化,因此蛋白质在微球上的吸附/解吸过程会受到众多因素的制约,除了上述讨论的温度, pH 值, 保温时间, 蛋白质浓度外, 还包括离子强度, 蛋白质种类(蛋白质分子量、蛋白质分子大小、形状、等电点、柔软性、亲疏水性)等因素的影响。

虽然热敏性(磁性)微球在吸附/解吸蛋白质分子过程中的动力学机理有待深入研究,但其宏观表现出的吸附蛋白质的温度敏感性却显示其在生物大分子的纯化,分离方面有着潜在的应用价值。Cussler 等^[6]已将 PNIPAM 水凝胶用于蛋白质分子的浓缩研究。Kawaguchi 等^[3]也将

PNIPAM 水凝胶微球用于蛋白质的吸附研究。这些研究都取得了预期的结果,其存在的问题是,水凝胶从蛋白质溶液中分离时需要繁琐的高速离心分离或过滤操作,而且 PNIPAM 水凝胶微球本身在离心分离过程中很容易发生凝聚,不利于下一步的解吸和微球的循环使用。

而我们的研究结果表明,热敏性磁性微球不存在上述问题,它通过以下简单的操作即可达到分离、纯化蛋白质、酶等生物分子的目的,即在 $T < \text{LCST}$ 条件下,将微球加入到待分离的生物分子(如蛋白质)混合液中,然后升温至 $T > \text{LCST}$,此时微球可吸附大量的蛋白质,通过磁分离,在 $T < \text{LCST}$ 的温度下,将吸附的蛋白质解吸,如此反复,即可达到蛋白质等分子的纯化、分离的目的。

REFERENCES

- 1 Chen J P, Hoffman A S. *Biomaterials*, 1990, 11: 631 ~ 634
- 2 Fujimoto K, Nakajima Y, Kashiwabara M, Kawaguchi H. *Polym International*, 1993, 30: 237 ~ 241
- 3 Fujimoto K, Mizuhara Y, Tamura N, Kawaguchi H. *J Intelligent Mater Systems and Structures*, 1993, 4: 184 ~ 189
- 4 Okubo M, Ahmad H. *Colloid Polym Sci*, 1996, 274(2): 112 ~ 116
- 5 Ding Xiaobin(丁小斌), Sun Zonghua(孙宗华), Wan Guoxiang(万国祥), Jiang Yingyan(江英彦). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 1998, 5: 628 ~ 631
- 6 Frank S J, Johnson W, Cussler E L. *Food Technology*, 1989, June, 78 ~ 83

INTERACTIONS BETWEEN THERMOSENSITIVE MAGNETIC POLYMER MICROSPHERES AND PROTEINS

DING Xiaobin, SUN Zonghua, WAN Guoxiang

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

JIANG Yingyan

(*Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract Adsorption and desorption behaviours of protein human serum albumin (HSA) on thermosensitive magnetic polymer microspheres were investigated. At higher temperature, microspheres deswelled and susceptible to absorb larger amount of proteins, some of them could be desorbed at lower temperature. The extent of adsorption was found to depend on the pH value, protein concentration and incubation time also. At higher pH value, less of proteins could be absorbed because of the electrostatic repulsive force between the protein and microspheres. Increasing incubation time or protein concentration was favorable to the adsorption of proteins.

Key words Thermosensitive, Magnetic, Microsphere, Polymer, Absorption