

• 研究论文 •

牛血清蛋白质三维有序大孔材料

杨凌露 康娟 杨朝晖 曹维孝*

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 用胶体晶体为模板制备了牛血清白蛋白和异硫氰基荧光素标记的牛血清白蛋白的三维有序大孔材料. 表征了孔材料的结构和荧光发射光谱. 表明所制备的孔材料具有规整的三维有序孔结构, 荧光素标记的牛血清白蛋白三维有序大孔材料具有良好的荧光发射性质.

关键词 牛血清白蛋白; 异硫氰基荧光素; 三维有序孔材料

3D Ordered Macroporous Materials of Bovine Serum Albumin

YANG, Ling-Lu KANG, Juan YANG, Zhao-Hui CAO, Wei-Xiao*

(The Key Laboratory of Polymer Chemistry and Physics of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Three dimensionally (3D)-ordered macroporous materials of bovine serum albumin (BSA) and fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled BSA were prepared by means of colloidal crystal as template. The structure of the porous materials and the fluorescence behavior of the FITC labeled BSA materials were characterized. The results show that the porous materials possess three-dimensionally ordered structure and the FITC labeled BSA materials exhibit good fluorescence emission ability.

Keywords bovine serum albumin; fluorescein isothiocyanate; 3D-ordered porous material

具有三维有序结构的大孔材料由于在光子晶体、催化、吸附以及生物传感器等方面有重要应用, 因而引起了人们的广泛关注^[1~3]. 通常情况下, 胶体晶体中约含有 25% 的空隙率, 因此能用作模板来制备三维有序孔材料^[4]. 将所需要的材料填充至胶体晶体模板的缝隙, 再用化学刻蚀或煅烧的方法除去胶体晶体模板就可得到具有精确孔径的三维有序孔材料^[5,6]. 这种以胶体晶体为模板制备的孔材料的孔径通常在微米和亚微米量级, 属大孔材料范畴. 目前, 利用这种方法已制备了金属^[1]、金属氧化物^[2]、无机半导体^[3]、陶瓷^[4]、聚合物^[5]等的大孔材料. 然而, 生物大分子, 例如蛋白质或脱氧核糖核酸等的有序孔材料尚很少有报道. 我们用鲑鱼精 DNA 填充到胶体晶体模板, 成功地制备了三维有序 DNA 大孔材料^[7]. 本文中我们将牛血清白蛋白(BSA)和异硫氰基荧光素标记的牛血清白蛋白(BSA-FITC)分别填充至

聚(苯乙烯-甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸丙基磺酸钾 P(S-MMA-SPMAP)) 乳胶颗粒的胶体晶体模板中, 再用溶剂除去晶体模板, 首次得到了三维有序的 BSA 和 BSA-FITC 大孔材料. 这种材料预计在光子晶体、生物芯片等方面有潜在的应用.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白(BSA)为国药集团化学试剂上海有限公司试剂, 异硫氰基荧光素(FITC)购自 Acros 试剂公司, 直接使用. 约 180 nm 窄分布 P(S-MMA-SPMAP) 乳胶颗粒, 根据我们^[8]已发表的方法制备. 用于透析的纤维素透析膜的重均分子量(M_w)10000~12000 g/mol.

孔材料的结构在 Quanta 200 场发射环境扫描电镜

* E-mail: wxcao@pku.edu.cn

Received August 29, 2006; revised November 6, 2006; accepted December 11, 2006.

国家自然科学基金(No. 90406018)资助项目.

(FEI 公司, 美国)上进行观测; 孔材料的荧光照片由 BX-60M (Olympus, 日本)荧光显微镜拍摄. 荧光光谱的测试在 F-4500 荧光光谱仪(Hitachi, 日本)上进行. 紫外反射光谱在带有反射光谱附件的 Shimadzu-1800(日本)UV-vis 光谱仪上测得. 圆二色光谱的测量在 J-810 (Jasco, 日本)仪上进行(测量池厚度 1 mm).

1.2 BSA 孔材料制备

BSA 孔材料的制备过程见图 1.

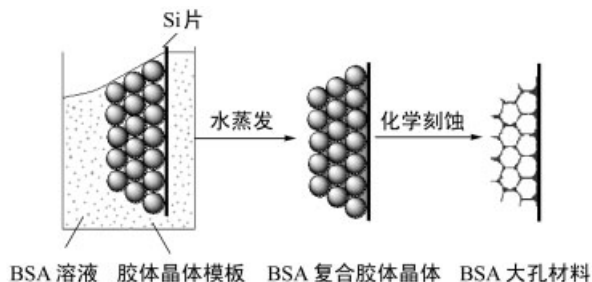


图 1 制备 BSA 孔材料的示意图

Figure 1 Schematic representation of preparing BSA porous materials

1.2.1 胶体晶体模板制备

参照我们^[9]已经发表的方法制备胶体晶体模板, 单晶硅片用 30% [V(双氧水): V(浓硫酸)=30: 70] 70 °C 处理 30 min, 水漂洗干净后待用. 将 3.5 mL P(S-MMA-SPMAP)乳胶颗粒的水分散液(1.5 mg/mL)注入到 5 mL 的容器, 将硅片(10 mm×10 mm×1 mm)竖直插入其中, 室温下放置 7~10 d, 待水分自然挥发至干, 乳胶颗粒在毛细管力驱动下在硅片表面自发形成胶体晶体. 为提高稳定性, 将其在 80 °C 下烘烤 30 min 后备用.

1.2.2 BSA 有序孔材料的制备

取 BSA 溶液(1 mg/mL) 3.5 mL 注入到 5 mL 的容器中, 将已沉积了胶体晶体模板的硅片垂直插入其中, 避光下待溶液的水分自然挥发干, BSA 自发填满胶体晶体缝隙, 即得到复合胶体晶体. 室温下, 将复合胶体晶体浸泡在四氢呋喃中(3 次, 每次 6 h), 除去胶体晶体模板后即得到 BSA 三维有序大孔材料.

1.2.3 用异硫氰基荧光素(FITC)标记 BSA

取 BSA 10 mg 溶于 10 mL 0.01 mol/mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液. 取相当于 BSA 1/100 量的 FITC, 溶于 2 mL pH 为 9.5 的碳酸钠溶液(0.5 mol/mL), 搅拌下, 将其慢慢加入到 0.5 mL 上面制备的 BSA 溶液中, 在室温下避光搅拌 4 h 进行标记. 将标记的蛋白质溶液用去离子水透析 2~3 d, 得到 BSA-FITC 的溶液(约 1 mL).

1.2.4 FITC 标记的 BSA 有序孔材料的制备

用 FITC 标记 BSA, 采用与 1.2.1 和 1.2.2 节同样的方法制备荧光标记的 BSA 三维有序大孔材料.

2 结果与讨论

2.1 BSA 三维有序大孔材料

图 2a 是胶体晶体模板的扫描电镜照片. 它是由粒径约 180 nm 的聚合物乳胶颗粒和空隙(图 2a 中较黑的部分)所组成. 图 2b 是填充 BSA 的复合胶体晶体的扫描电镜照片. 胶体晶体中的空隙已被 BSA 所填满. 图 2c 是溶去了胶体晶体模板的 BSA 大孔材料的扫描电镜照片. 从图 2c 可以清楚看到定向排列的有序孔结构, 从其左上角的孔结构的放大图, 可以看到每一个孔下的三叉形图案, 这是由于每一个孔正好位于下层的三个孔之上的缘故.

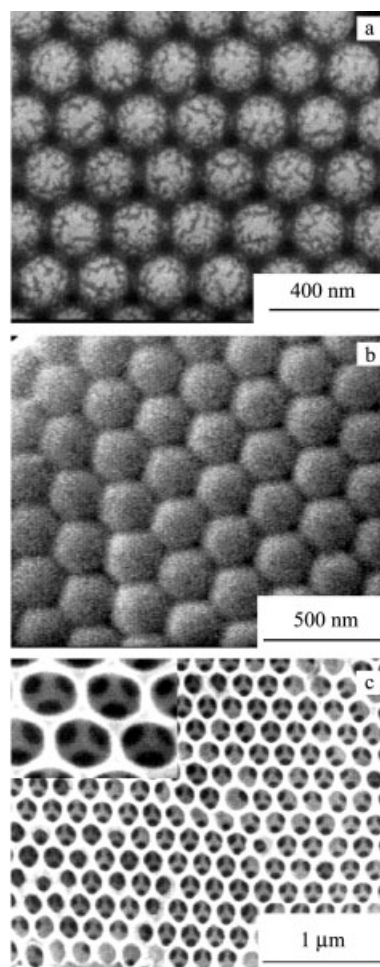


图 2 扫描电镜照片

a—胶体晶体; b—复合胶体晶体; c—BSA 孔材料, c 左上角的插图表示放大的孔

Figure 2 SEM images

a—colloidal crystal; b—composite colloidal crystal; c—porous BSA material, the inset of c is the amplified pores

牛血清白蛋白孔材料对热和有机溶剂的结构稳定性很好, 在白蛋白的熔点之下, 和在一般有机溶剂(四氢呋喃, 醇类等)中能保持孔结构不被破坏. 但在水中浸泡, 孔结构会被破坏, 所以对水的稳定性尚需提高.

图 3a 的曲线 1 和曲线 2 分别表示 BSA 复合胶体晶体和 BSA 孔材料的紫外-反射光谱. 它们的布拉格衍射峰分别位于 546 和 369 nm. 衍射峰的出现说明这两种材料都具有很好的长程有序结构. 由于 BSA 复合胶体晶体的周围是聚合物乳胶颗粒, 而 BSA 孔材料的周围是空气, 这种周围环境折射率 n 的变化导致它们衍射峰位置发生了大的变化.

因为复合胶体晶体的衍射峰(曲线 1)位于可见区(546 nm), 从而在白光照射下呈现鲜艳的灰色(图 3b), 这是一种结构颜色, 是三维有序结构材料发生布拉格衍射的结果.

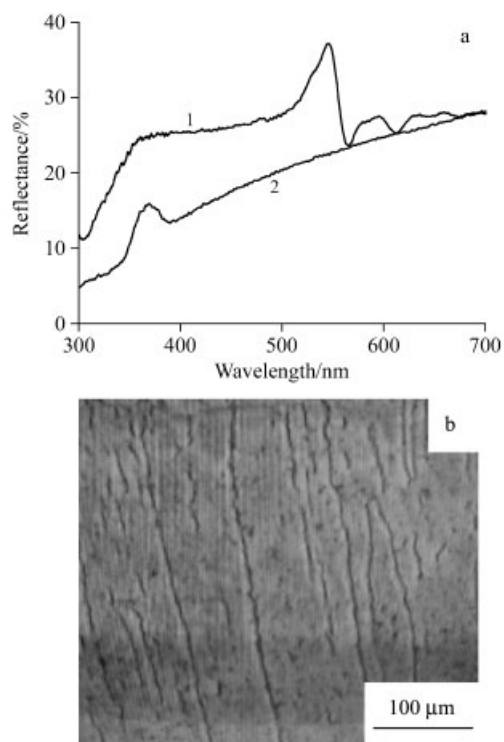


图 3 (a)复合胶体晶体(曲线 1)和 BSA 孔材料(曲线 2)的反射光谱(已归一化); (b) BSA 复合胶体晶体在白光下的灰色图像

Figure 3 (a) Normalized reflectance spectra of composite colloidal crystal (curve 1) and BSA porous material (curve 2); (b) Gray image of BSA composite colloidal crystal under white light

2.2 BSA-FITC 三维有序大孔材料

图 4a 是 BSA-FITC 溶液(曲线 1)、BSA-FITC 复合胶体晶体(曲线 2)和 BSA-FITC 孔材料(曲线 3)的荧光光谱. 溶液的荧光光谱从透析后的 BSA-FITC 溶液测量, 复合胶体晶体以及孔材料的荧光光谱直接在硅片上测量. 它们的最大荧光发射波长均位于 527 nm, 表明 FITC 荧光波长在溶液、复合胶体晶体和 BSA 孔材料的不同环境保持不变. 图 4b 是孔材料的荧光显微镜照片(照片中的裂纹是由胶体晶体模板的裂缝引起的), 呈明亮的灰色, 与最大发射波长 527 nm 一致, 表明 BSA-FITC 孔材料是一种荧光体, 具有良好的荧光发射性质.

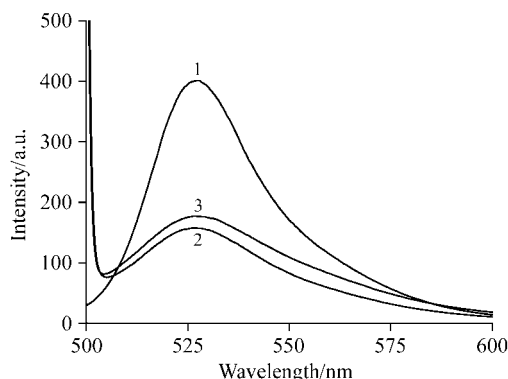


图 4a BSA-FITC 溶液(曲线 1), 复合胶体晶体(曲线 2)和 BSA 孔材料(曲线 3)的荧光光谱

Figure 4a Fluorescent spectra of BSA-FITC solution (curve 1), composite colloidal crystal (curve 2) and BSA porous material (curve 3)

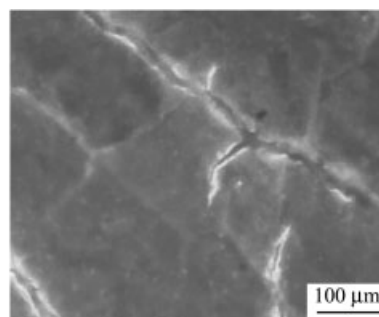


图 4b BSA 孔材料在白光下的荧光图像

Figure 4b Fluorescent image of BSA porous material under white light

圆二色谱是检测蛋白质构型转变的有效技术^[10]. 图 5 曲线 1 是 BSA 水溶液, 曲线 2, 3 是复合胶体晶体和 BSA 孔材料的圆二色谱. 从图线可以看出, 曲线 1 在 210 和 224 nm 处有两个负的吸收峰, 这是蛋白质 α -螺旋结构的特征吸收^[11]. 曲线 2 和曲线 3 均只有 223 nm 一

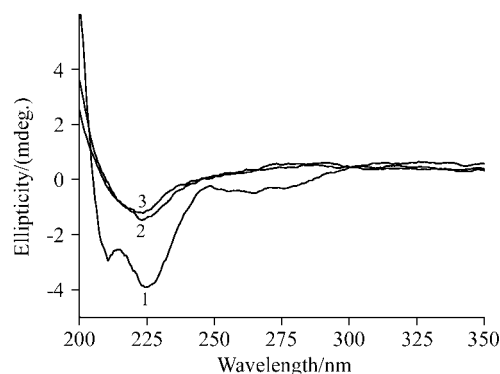


图 5 BSA 的圆二色谱

曲线 1—水溶液中; 曲线 2—复合胶体晶体中; 曲线 3—孔材料中

Figure 5 Circular dichroism spectra of BSA
curve 1—in aqueous solution; curve 2—in composite colloidal crystal ; curve 3—in porous material.

个负吸收峰, 这说明 BSA 在沉积至胶体晶体缝隙, 以及最后形成孔材料的过程之中, 构型发生了变化. 这种构型变化可能是由于沉积过程时间长, 以及在四氢呋喃浸泡时引起的.

3 结论

用一种简单易行的方法, 制备了牛血清白蛋白以及异硫氰基荧光素标记的牛血清白蛋白的三维有序大孔材料. 对材料结构和荧光性质的表征表明, 所得到的孔材料具有很好的三维长程有序结构; 荧光素标记的孔材料是良好的荧光体.

References

- 1 Velev, O. D.; Tessier, P. M.; Lobo, R. F.; Lenhoff, A. M.; Kaler, E. W. *Nature* **1999**, *401*, 548.
- 2 (a) Velev, O. D.; Jede, T. A.; Lobo, R. F.; Lenhoff, A. M. *Nature* **1997**, *389*, 447.
(b) Holland, B. T.; Blanford, C. F.; Stein, A. *Science* **1998**, *281*, 538.
- 3 (a) Braun, P. V.; Wiltzius, P. *Nature* **1999**, *402*, 603.
(b) Vlasov, Y. A.; Bo, X.; Sturm, J. C.; Norris, D. J. *Nature* **2001**, *414*, 289.
- 4 Liang, Z.; Susha, A. S.; Caruso, F. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1160.
- 5 Zakhidov, A. A.; Baughman, R. H.; Iqbal, Z.; Cui, C.; Khayrullin, I.; Dantas, S. O.; Marti, J.; Ralchenko, V. G. *Science* **1998**, *282*, 897.
- 6 (a) Johnson, S. A.; Ollivier, P. J.; Mallouk, T. E. *Science* **1999**, *283*, 963.
(b) Wang, D.; Caruso, F. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 350.
- 7 Yang, L.-L. *Ph.D. Dissertation*, Peking University, Beijing, **2006** (in Chinese).
(杨凌露, 博士论文, 北京大学, 北京, **2006**.)
- 8 Yang, L. L.; Cong, H. L.; Cao, W. X. *Acta Polym. Sinica* **2005**, (2), 223 (in Chinese).
(杨凌露, 从海林, 高分子学报, **2005**, (2), 223.)
- 9 Cong, H. L.; Cao, W. X. *Langmuir* **2003**, *19*, 8177.
- 10 Shaikh, S. M. T.; Seetharamappa, J.; Kandagal, P. B.; Ashoka, S. *J. Mol. Struct.* **2000**, *786*, 46.
- 11 Liu, J. Q.; Tian, J. N.; He, W. Y.; Xie, J. P.; Hu, Z. D.; Chen, X. G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 671.

(A0608291 QIN, X. Q.; ZHENG, G. C.)