

文章编号: 1000-5013(2009)06-0661-04

不同缓冲体系的牛血清白蛋白插层蒙脱石效果

吕英海, 周仕学, 李桂江, 王 斌, 吕东琴

(山东科技大学 化学与环境工程学院, 山东 青岛 266510)

摘要: 利用离子交换的原理, 研究等电点两侧的不同 pH 值、不同缓冲体系对牛血清白蛋白插层蒙脱石效果的影响。结果发现, pH 值对蒙脱石插层影响显著。在采用低于蛋白质等电点的 pH 值且利用乙酸-乙酸钠作为缓冲体系时, 蛋白质的插层容易造成蒙脱石层间的剥离。等电点两侧的 pH 值不同, 会造成蛋白质插入量的显著差异。热重分析表明, 蛋白质/蒙脱石复合物的热稳定性有一定程度的提高。

关键词: 蒙脱石; 牛血清白蛋白; 插层; pH 值; 缓冲液

中图分类号: TB 383.021

文献标识码: A

纳米复合材料中一相为有机聚合物, 另一相为无机相时, 称为有机-无机纳米复合材料。这种复合材料不是有机相与无机相的简单混合, 而是两相在纳米尺寸范围内复合而成的, 从而产生许多特异的性能, 在生物学等领域展现出广阔的应用前景^[1-3]。蒙脱石(MMT)具有耐化学溶剂、粒径小、晶层可被嵌入、比表面积大和易于吸附分子等特点^[4]。通过离子交换反应, 可改变 MMT 晶体表面的化学性质, 这为制备蛋白质/蒙脱石混杂复合材料奠定了基础。牛血清白蛋白(BSA)晶体呈等边三角形(宽为 14 nm, 高为 4 nm), 在溶液中的等电点为 4.8^[5]。BSA 可与多种阳离子、阴离子及其他小分子物质结合, 常用作研究蛋白质复合材料的模式蛋白; BSA 可以逐步插层^[5]进入蒙脱石。研究 BSA 与蒙脱石的相互作用, 有助于了解酶与粘土矿物的作用机制^[6], 对药物负载、可降解材料等方面的研究也具有重要意义。本文主要研究不同 pH 值下, 不同缓冲体系对牛血清白蛋白插层蒙脱石效果的影响。

1 实验部分

1.1 材料

钠基蒙脱石(吉林省长春市), 利用静沉降法提纯蒙脱石原土, 提纯后加入体积分数为 10% 的 H_2O_2 , 煮 2 h 以去除有机物, 过 200 目筛备用; 牛血清白蛋白(分析纯, 美国 Sigma 有限公司), 在分析天平上准确称量少量牛血清白蛋白, 溶解到 100 mL 蒸馏水中, 按照 Folin 酚方法测定蛋白质标准曲线^[7]; 其他药品均为分析纯。

1.2 蒙脱石对牛血清白蛋白的吸附

分别配制浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 4.6 的乙酸-乙酸钠、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液; pH 值为 6.2 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系。量取 40 mL 缓冲液, 加入一定量去有机物蒙脱石, 然后加入 3 倍质量的 BSA, 超声振荡 15 min, 混匀, 静置 12 h, 离心分离沉淀, 取出上清液; 然后, 用去离子水对沉淀物洗涤一次, 合并上清液; 最后, 利用 Folin 法测定上清液中蛋白质含量^[8], 沉淀于 50 °C 烘 48 h, 研磨至粒径小于 0.074 mm 备用。

1.3 复合材料的表征

晶体结构表征: 采用 TD-3000 型 X 射线衍射仪(中国辽宁)扫描, 钴靶, 管电压为 30 kV, 管电流为 20 mA, 扫描范围为 $2 \sim 30 (^\circ)$, 扫描速度为 $2 (^\circ) \cdot \text{min}^{-1}$ 。官能团分析: 采用 510P 型傅里叶变换红外光

收稿日期: 2009-02-23

通信作者: 周仕学(1966-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事矿物材料的研究。E-mail: zhoushixue66@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50574054); 山东科技大学春蕾计划(2008AZZ075)

谱仪(美国 Nicolet 公司)扫描, KBr 压片. 热失重分析(TGA): 采用 TGA/SDTA/851E 型热分析仪(瑞士梅特勒-托利多公司), 升温速率为 $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 氮气氛围, 扫描范围为 $30\sim 900^{\circ}\text{C}$.

2 结果与讨论

2.1 X射线衍射分析

不同 pH 值的缓冲液体系, BSA 插层蒙脱石而得到的复合材料的 X 射线衍射(XRD)谱图, 如图 1 所示. 在无水状态下, 测得的钠基蒙脱石(001)面衍射峰位于 8.2° , 由 Bragg 方程 $n = 2d\sin\theta$, 可推导出 $d_{(001)}$ 约为 $12.5 \times 10^{-10}\text{ m}$. 在 pH 值为 4.6 时, 使用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 层间距为 $42.7 \times 10^{-10}\text{ m}$; 而使用乙酸-乙酸钠缓冲液体系, 则蒙脱石剥离完全. 在 pH 值为 6.2 时, 使用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 层间距为 $27.2 \times 10^{-10}\text{ m}$; 而使用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液体系层间距为 $32.3 \times 10^{-10}\text{ m}$.

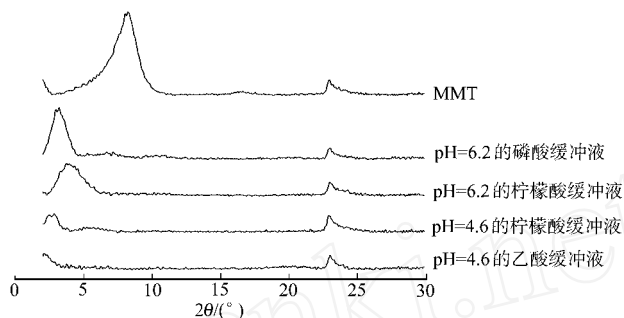


图 1 BSA 插层蒙脱石的 XRD 谱图

Fig. 1 XRD patterns of BSA-intercalated montmorillonite

通过上面数据可以看出, 不同缓冲体系对牛血清白蛋白插层蒙脱石有较大影响. 乙酸-乙酸钠缓冲液体系作用明显强于磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液与磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液插层效果差距不大, 但磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液的效果更明显. 乙酸缓冲液作用明显的原因, 可能是因为乙酸含的氢原子比例高于柠檬酸, 增加了氢原子与蒙脱石内部的氧原子形成氢键数目, 而且乙酸与柠檬酸相比分子体积小, 易进入蒙脱石层间. 这些可能都是有助于 BSA/MMT 剥离的一个重要因素. 由此可见, 不同基团间的化学键合、分子间的作用力(包括氢键等)、极性等性质^[9], 对 BSA/MMT 间的相互作用影响显著.

不同 pH 值的 BSA 插层蒙脱石, 如图 2 所示. 蒙脱石对带电荷的蛋白质或氨基酸的吸附, 是通过粘土表面上的负电荷与蛋白质上的正电荷的静电吸引完成的. 蛋白质的两性离子所带电荷, 因溶液的 pH 值不同而改变. 等电点是指两性离子净电荷为零时溶液的 pH 值, 牛血清白蛋白的等电点为 4.8. 当 pH 值为 4.6 时, 牛血清白蛋白带正电荷, 而蒙脱石带负电荷, 蒙脱石与 BSA 静电作用强烈, 大量 BSA 嵌入蒙脱石, 导致蒙脱石层间结合力降低. 蒙脱石片层由于 BSA 嵌入, 容易导致层间的剥离. 当 pH 值为 6.2 时, 此时的 BSA 带负电荷多于正电荷, 仅依靠少量正电荷基团作用而插入蒙脱石层间, 蒙

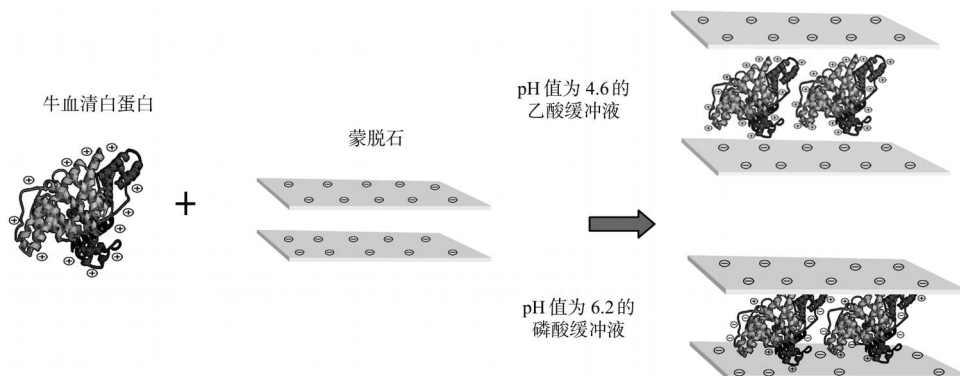


图 2 BSA 插层蒙脱石的图解

Fig. 2 Conceptual illustration of BSA-intercalated montmorillonite

脱石层间距稳定在 32.0×10^{-10} m 左右.

2.2 傅里叶变换红外光谱分析

牛血清白蛋白、蒙脱石,以及经过不同方式处理的 BSA/ MMT 复合材料,其傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 如图 3 所示. 图 3 中,蒙脱石的 $3\ 600 \sim 3\ 650\text{ cm}^{-1}$ 为自由羟基 O - H 的伸缩振动,是一个尖锐吸收峰,在蒙脱石中表现非常突出. 在 pH 值为 6.2 的复合材料中表现非常明显,但在 pH 值为 4.6 的复合物中则表现不够明显. $3\ 200 \sim 3\ 500\text{ cm}^{-1}$ 为分子间氢键 O - H 伸缩振动,复合物中由于有机物的存在而使峰型漫散.

在 pH 值为 6.2 的磷酸缓冲液和 pH 值为 4.6 的乙酸缓冲液条件下得到的复合物,以及牛血清白蛋白都具有明显的蛋白质的特征峰. 即 $1\ 690\text{ cm}^{-1}$ 为酰胺带,由于氢键缔合而偏移至 $1\ 640 \sim 1\ 650\text{ cm}^{-1}$, $1\ 530 \sim 1\ 550\text{ cm}^{-1}$ 为仲酰胺带特征峰, $1\ 260 \sim 1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 为酰胺带特征伸缩振动峰, $2\ 959\text{ cm}^{-1}$ 为烷基的不对称伸缩振动^[10]. $1\ 037\text{ cm}^{-1}$ 处的峰为 Si - OH 伸缩振动峰,是蒙脱石的特征峰,在复合材料中表现很突出.

综上所述,复合物具备蒙脱石和蛋白质的特征峰,而且 pH 值的不同复合物,其羟基伸缩振动峰差异明显,但分子间氢键 O - H 伸缩振动都得到加强.

2.3 热重分析

BSA 和 BSA/ MMT 纳米复合材料的热重分析 (TGA) 谱图,如图 4 所示. 复合物与蒙脱石相比都有较大程度的失重,其中 pH 值为 4.6 的乙酸缓冲液复合材料的失重比例更大一些.

复合物的导数热重 (DTG) 曲线,如图 5 所示. 从图 5 可看出,出现了两个明显的峰,第 1 个为水的蒸发吸热,第 2 个为蛋白质的分解峰. 由第 2 个峰的极值点来确定蛋白质的最大分解速率 $(dw/dt)_{\max}$ 时的温度 t_{\max} , BSA 的 t_{\max} 为 326 ,而蛋白质/ 蒙脱石复合物的 t_{\max} 为 356 (pH = 6.2). t_{\max} 有了一定程度的提高,可以认为在一定程度上,蒙脱石提高了蛋白质的热稳定性.

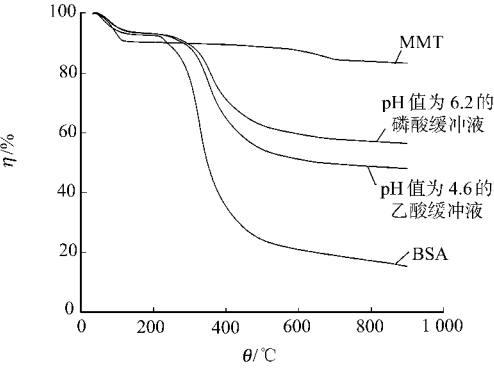


图 4 BSA 插层蒙脱石的 TGA 分析图
Fig. 4 TGA of BSA-intercalated montmorillonite

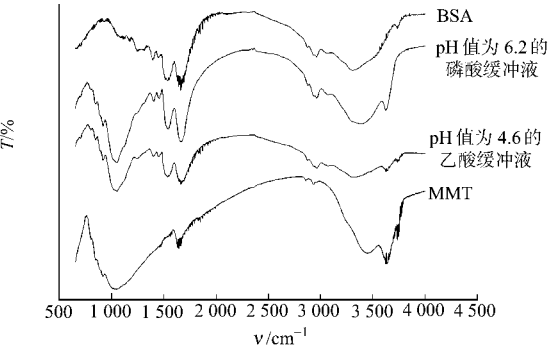


图 3 BSA 插层蒙脱石的红外光谱图
Fig. 3 IR spectra of BSA-intercalated montmorillonite

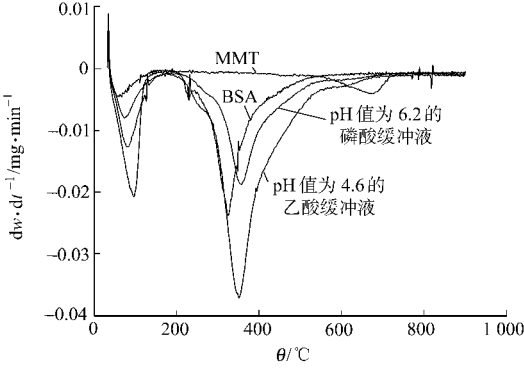


图 5 BSA 插层蒙脱石的 DTG 分析图
Fig. 5 DTG of BSA-intercalated montmorillonite

2.4 吸附量分析

通过 Folin 酚法测定 BSA 的吸附量,利用差减法可以得出,pH 值为 4.6 时,蒙脱石吸附量为 $1.423\text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$; pH 值为 6.2 时,蒙脱石吸附量为 $1.059\text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. 由此可见,pH 值对 BSA 插层蒙脱石影响显著,低于蛋白质等电点时,蛋白质的附着量远高于等电点的 pH 值的吸附量.

3 结论

复合材料的表征充分证明,虽然 BSA 分子相对分子质量很大,但仍可以插层进入蒙脱石中形成了

BSA/MMT 纳米复合物. 蒙脱石的剥离与 pH 值关系密切, 低于蛋白质等电点的 pH 值有利于蒙脱石的剥离, 高于等电点的 pH 值不利于蒙脱石的剥离. 在不同 pH 值下, 蛋白质插层量差异显著.

不同的缓冲体系对 BSA 插入蒙脱石影响显著, 乙酸-乙酸钠缓冲液体系有利于剥离的实现, 而磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液则不利于剥离的进行. 由 DTG 分析可知, 蛋白质插层蒙脱石后, 复合物热稳定性有了一定程度的提高.

参考文献:

- [1] JUDEINSTEIN P, SANCHEZ C. Hybrid organic-inorganic materials: A land of multi-disciplinarity[J]. J Mater Chem, 1996, 6(4): 511-525.
- [2] CHANDROSS E A, MILLER R D. Nanostructures: Introduction[J]. Chem Rev, 1999, 99(7): 1641-1642.
- [3] 洪伟良, 刘剑洪, 田德余, 等. 有机-无机纳米复合材料的制备方法[J]. 化学研究与应用, 2000, 12(2): 132-136.
- [4] 王一中. 聚合物/蒙脱土混杂材料的制备及其表征[D]. 北京: 北京化工大学, 1999.
- [5] LIN J J, WEIJ C, JUANG T Y, et al. Preparation of protein-silicate hybrids from polyamine intercalation of layered montmorillonite[J]. Langmuir, 2007, 23(4): 1995-1999.
- [6] CHEN Guo-jing, YEN Ming-cheng, WANG Jie-ming, et al. Layered inorganic/enzyme nanohybrids with selectivity and structural stability upon interacting with biomolecules[J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19(1): 138-144.
- [7] 郭蔼光, 郭泽坤. 生物化学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 60-62.
- [8] LOZZI I, PUCCIA, PANTANO L, et al. Interferences of suspended clay fraction in protein quantitation by several determination methods[J]. Analytical Biochemistry, 2008, 376(1): 108-114.
- [9] ZHAO Fang-ming, XIONG Chuan-xi, WEN Di-jiang. Role of tough interfacial layers in fibre reinforced composites[J]. J Wuhan Univ of Tech, 1996, 11(2): 38-43.
- [10] 李纯毅, 李赞忠, 付 渊. 红外光谱在二茂铁类化合物中的应用[J]. 内蒙古石油化工, 2008(1): 27-29.

Effect of Intercalation of Bovine Serum Albumin into Montmorillonite in Different Buffer Systems

L Ü Ying-hai, ZHOU Shi-xue, LI Gui-jiang,
WANG Bin, L Ü Dong-qin

(College of Chemical and Environmental Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao 266510, China)

Abstract: By applying the principle of ion exchange, the effect of intercalation of bovine serum albumin (BSA) into montmorillonite was investigated under the different pH near isoelectric point of BSA and impact of different buffer. It was found that pH value significantly affects the intercalation of the BSA. A pH lower than the isoelectric point together with the use of acetic acid-sodium acetate buffer system is often helpful to cause the spin-off of montmorillonite. The weight of BSA inserted exhibits a notable difference with different pH value and the thermal stability of protein/montmorillonite complex has been improved to some extent.

Keywords: montmorillonite; bovine serum albumin; intercalation; pH value; buffer

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 陈国华)