



改性聚苯乙烯微球对蛋白质的吸附与解吸特性

程绍玲, 倪丽琴, 杨迎花
(天津科技大学理学院, 天津 300457)

摘要: 通过蒸馏-沉淀法制备单分散的聚苯乙烯(PS)微球,并用两亲性聚合物聚乙二醇(PEG)对 PS 进行修饰.以牛血清蛋白(BSA)为模型,研究 PS-PEG 微球对 BSA 的吸附与解吸特性.结果表明,聚合物微球对 BSA 的吸附受 pH、微球上 PEG 含量以及 NaCl 溶液质量浓度的影响,作用力为疏水吸附.在无盐水体系下解吸,解吸率最高为 96.2%,表明微球在蛋白质分离应用中可重复使用.

关键词: 聚合物微球; 吸附; 疏水作用; 蛋白质

中图分类号: O063.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)01-0028-04

Adsorption and Desorption of Proteins on Modified Polystyrene Microspheres

CHENG Shao-ling, NI Li-qin, YANG Ying-hua

(College of Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Monodisperse polystyrene microspheres (PS) were prepared by distillation-precipitation polymerization and modified by amphipathic polymers polyethylene glycol (PEG). Bovine serum albumin (BSA) was used as model proteins to investigate the adsorption and desorption properties on PS-PEG microspheres. As a result, BSA adsorption on polymer microspheres was driven by hydrophobic interaction and effected by the value of pH, the capacities of PEG on the microspheres and inorganic salt concentration. The maximum desorption ratios of BSA on PS-PEG was 96.2% at none salt aqueous. So the microspheres can be reused when they are used to separate proteins.

Keywords: polymer microsphere; adsorption; hydrophobic interaction; protein

蛋白质作为组成生命体的重要物质之一,其分离纯化一直以来受到广泛关注^[1-3]. 高分子聚合物结构具有可设计性,且比表面积大、强度高,已广泛应用于分离、纯化、固定化等诸多领域. 近年来聚合物微球作为蛋白质的分离材料之一倍受青睐,在生物传感器、细胞分离、药物输送体系、人造器官及固相免疫分析等方面都有很重要的研究价值^[4-6]. 目前聚合物分离材料研究较多的是聚苯乙烯微球,但该载体有很强的疏水性,不仅生物相容性不好,而且强烈的疏水吸附作用使蛋白质构象改变,导致变性,并且吸附后不易脱附,载体难以重复使用,因此对载体进行亲水性修饰或设计开发新型骨架载体成为研究重点^[7-8].

Chern 等^[9]通过乳液聚合获得了 PEG 修饰的聚苯乙烯(PS)微粒,并研究该微粒对牛血清蛋白的吸附行为,但他们是用非共价键的方法将 PEG 修饰到 PS 微粒上,因此几次离心后,PEG 就会被洗掉;同时由于是乳液聚合,体系引入表面活性剂,污染了微粒表面;另外微粒表面有负电荷,在蛋白质等电点以下吸附时,产生絮凝现象. 杨新林、白枫等^[10]在沉淀聚合的基础上发明的蒸馏-沉淀法具有以下优点:在制备过程不加稳定剂等杂质,微球表面洁净;制备出的微球尺寸在亚微米级,分布很窄;转化率较高,溶剂可回收. 该方法可以克服以上问题. 本文用该方法合成了单分散的 PS 微球,并用 PEG 通过共价键修饰,得到

收稿日期: 2009-08-25; 修回日期: 2009-09-10

基金项目: 天津科技大学引进人才科研启动基金资助项目(20060419)

作者简介: 程绍玲(1970—),女,吉林人,副教授,博士, yhcs1@tust.edu.cn.

表面洁净、不含电荷、可重复使用并具有生物相容性的微球。以牛血清蛋白为模型,研究微球对蛋白质的吸附性能与吸附机理。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

苯乙烯(St),分析纯,天津市红岩化学试剂厂;二乙烯基苯(DVB),纯度 55%,上海盛众精细化工有限公司;乙腈,分析纯,天津市赢达稀贵化学试剂厂;偶氮二丁腈(AIBN),化学纯,天津北方天医化学试剂厂;氯甲醚,工业级,天津和成科技有限公司;PEG₂₀₀₀单甲醚,分析纯,Aldrich-sigma 公司;牛血清蛋白(BSA),分析纯,上海化学试剂公司。

S-3500N 型扫描电子显微镜(SEM);TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 单分散交联聚苯乙烯(PS)微球的制备

采用蒸馏-沉淀法制备聚合物微球:在 500 mL 的两口瓶中加入 400 mL 乙腈、9 mL St、1 mL DVB、0.16 g AIBN,混合均匀。安装好蒸馏-沉淀装置,加热,在 30 min 内使反应体系沸腾后,用 2 h 左右时间蒸出一半的乙腈得到微球乳液。冷却至室温后离心分离微球,并通过离心-再分散的方法用乙腈、丙酮和甲醇依次洗涤微球至少 3 次,真空干燥。

1.2.2 聚苯乙烯微球的氯甲基化

取 5 g 聚苯乙烯微球于 100 mL 三口瓶中,加不同体积的氯甲醚,充分溶胀,加入催化剂 ZnCl₂,于 38 °C 反应 8 h。用上述方法洗涤干燥。氯含量按 Volhard 法测定。

1.2.3 PEG 修饰聚苯乙烯微球

取 2 g 氯甲基化微球,用 30 mL 1,4-二氧六环溶胀 2 h,加入 5 mL 聚乙二醇单甲醚钠盐,回流反应 20 h,直至检测微球上无氯离子为止。通过离心-再分散的方法用 1,4-二氧六环、水、乙醇彻底洗涤,真空干燥,可得到 PS-PEG 微球。

1.2.4 PS-PEG 微球对牛血清蛋白的吸附实验

分别用邻苯二甲酸氢钾、醋酸-醋酸钠和磷酸二氢钾-磷酸氢二钠配制四个不同 pH(4、5、6 和 7)的缓冲体系,取 0.02 g PS-PEG 微球,加入 10 mL 不同 BSA 质量浓度的缓冲溶液,密封,在摇床上振荡一定时间后,离心,取上清液,在 280 nm 处测吸光度,根据标准曲线计算溶液中残留的 BSA 量,进而计算得到微球的吸附量。

1.2.5 PS-PEG 微球对牛血清蛋白的解吸实验

取约 0.02 g 不同吸附剂,各加入 0.3 mg/mL 的 BSA 溶液 10 mL,其中 NaCl 质量浓度为 1.0 mg/mL,吸附平衡后抽滤除去母液,再分别加入 10 mL 蒸馏水振荡 2 h,取上清液测 BSA 质量浓度,计算解吸率。

2 结果与讨论

2.1 PS 微球的制备与形态

应用于生物医药领域的聚合物微球分离材料要求表面洁净、尺寸均一,具有一定的刚性,这就对制备方法提出了较高的要求。常规的微球制备方法有多种,如悬浮聚合、乳液聚合、分散聚合等,但能满足生物医用的主要是沉淀聚合,该方法制备过程不加稳定剂等杂质,微球尺寸在亚微米级范围内可控,且分布很窄。本文使用了沉淀聚合基础上发展起来的一种新方法,即蒸馏-沉淀法,由图 1 可知,微球呈极规整的球形,尺寸在 0.5 μm 左右,几乎呈单分散状态。

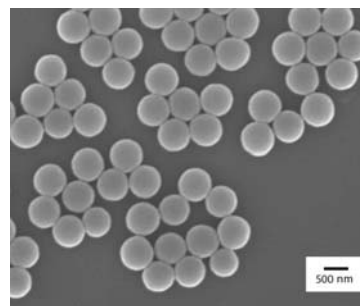


图 1 PS 扫描电镜图

Fig.1 SEM micrograph of PS microspheres

2.2 PEG 修饰 PS 微球

众所周知,PS 微球具有很强的疏水性,可用作水溶液中疏水化合物的吸附,但由于其强烈的疏水作用,导致解吸困难,要用强疏水的有机溶剂,造成污染。因此用两亲性聚合物 PEG 对其进行修饰,能有效地减弱其疏水性,达到对蛋白分子的可逆吸附目的。为考察不同 PEG 负载量对蛋白吸附的影响,合成了氯含量不同的氯甲基化微球,并用 PEG 全部取代微球上的氯,以 PEG 的平均相对分子量 2 000 为计,可换算得到微球上 PEG 负载量,结果见表 1。

表 1 微球功能基含量

Tab.1 Capacities of functional groups on the microspheres

微球	氯甲醚加入量/mL	氯含量/(mmol·g ⁻¹)	PEG 含量/(mmol·g ⁻¹)
PS	0.0	0.000	0.000
PS-PEG1	0.5	0.036	0.033
PS-PEG2	1.0	0.092	0.077
PS-PEG3	5.0	0.413	0.226

2.3 PS-PEG 对牛血清蛋白的吸附性能

图 2 是 PS-PEG1 对牛血清蛋白吸附动力学曲线. 从图中可见, 在 2 h 左右能达到平衡吸附的 90% 以上, 在 3 h 内基本能达到吸附平衡. 因此吸附实验一般做到 5 h.

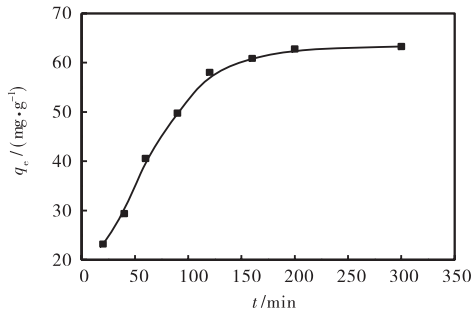


图 2 BSA 在 PS-PEG1 微球上的吸附时间曲线
Fig.2 Time curve of BSA adsorption on PS-PEG1

牛血清蛋白的等电点为 4.9, 为研究吸附作用力, 测定了不同 pH 条件下的平衡吸附量, 结果见图 3. 图中表明, 无论对哪种微球, pH 在 5 附近吸附量最大, 此时, BSA 接近等电点, 呈电中性, 疏水性最大, 因此微球对 BSA 的吸附作用力以疏水作用力为主. 同时看到, 在相同的 pH 下, 随 PEG 负载量的增加, 微球疏水性减弱, 吸附量减少, 这进一步说明了疏水作用为主要驱动力.

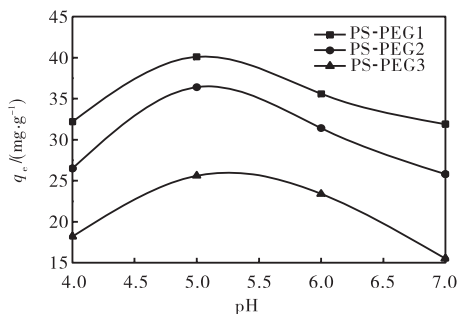


图 3 pH 对 BSA 吸附的影响
Fig.3 Effects of pH on adsorption of BSA

为考察 PEG 修饰 PS 前后对吸附能力的影响, 测定了几种微球的吸附等温线, 见图 4. 图中可见, 没有修饰的 PS 微球, 饱和吸附量明显高于修饰后的微球, 并且随 PEG 负载量的增加, 吸附容量减小. 这说明吸附作用力主要为疏水作用, 因为 PEG 的接入, 有效地降低了微球的疏水性, 即削弱了微球与 BSA 之间的疏水作用力, 因此 PEG 含量越高, 吸附能力越弱.

吸附作用力不同, 解吸方法也不同. 对静电作用的吸附, 解吸用更强电荷的溶剂; 对氢键作用的吸附, 解吸要增强溶剂的极性; 对疏水作用的吸附, 解吸通常要用有机溶剂, 但对生物体系来说, 不希望用有机

试剂. 众所周知, 许多体系具有盐析效应, 因此, 可用盐析的办法调节体系的疏水性, 改变微球、BSA 和体系之间疏水作用力的平衡关系, 从而有望控制吸附和解吸. 图 5 为不同质量浓度 NaCl 水溶液中 PS-PEG2 微球对牛血清蛋白的吸附曲线.

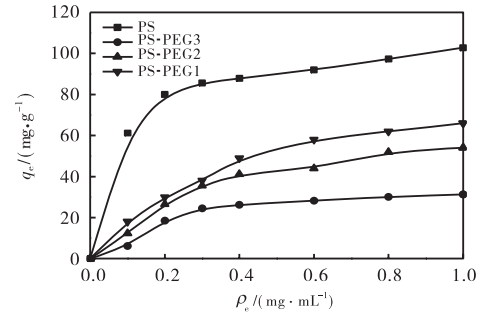


图 4 不同微球对 BSA 的吸附等温线
Fig.4 Isotherms of adsorption of BSA on different microspheres

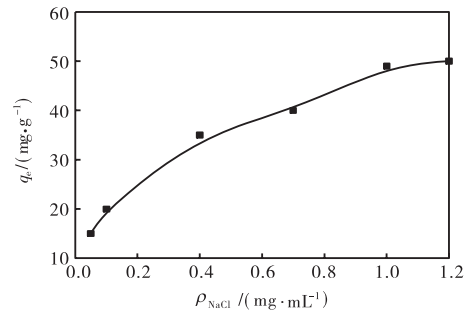


图 5 NaCl 质量浓度对 BSA 吸附的影响
Fig.5 Effects of NaCl concentration on adsorption of BSA

由图可知, 随着介质盐浓度的增加, 微球对牛血清蛋白的吸附量增多. PS-PEG2 微球不含有电荷, 对牛血清蛋白的吸附主要应为疏水作用和氢键吸附. 在水体系中, 氢键吸附会受到水分子的作用而削弱, 疏水作用应为主要吸附驱动力, 实验中随着盐浓度的增加吸附增强也证明了这一推断.

2.4 PS-PEG 对牛血清蛋白的解吸性能

BSA 在微球上的吸附主要驱动力为疏水作用, 盐浓度增加吸附增强, 反之, 盐浓度降低吸附减弱, 解吸更容易. 因此, 考察了在有盐条件下吸附平衡后, 在无盐条件下的解吸情况, 结果见表 2. 经 PEG 修饰的 PS 微球, 解吸率最高可达 96.2%, 而没有修饰的 PS 解吸率低得多, 为 65.0%. 这是因为没有修饰的 PS 与蛋白质间的疏水作用太强, 解吸较难; 而 PEG 具有两亲性和很好的生物相容性, 将其接枝到 PS 的表面, 可大大降低微球的疏水性, 减弱吸附过程的疏水作用力, 因此 PS-PEG 具有较好的解吸特性, 可重复使用. 对 PS-PEG3 微球进行重复吸附-解吸实验,

经过5次循环后,吸附量减少7.2%,表明PEG修饰的PS微球作为蛋白质分离材料重复使用性能较好.

表2 BSA的解吸率
Tab.2 BSA desorption ratios

微球	吸附量/(mg·g ⁻¹)		解吸率/%
	初始	解析后	
PS	79.8	27.9	65.0
PS-PEG1	62.7	7.8	87.6
PS-PEG2	52.4	2.3	95.6
PS-PEG3	31.3	1.2	96.2

3 结 论

制备了粒径在0.5 μm左右的单分散聚合物微球PS,将两亲性聚合物PEG接枝到PS的表面上.PS-PEG微球对牛血清蛋白的吸附在3 h内可基本达到平衡,吸附能力随微球上PEG含量的增加而降低,并受盐浓度的影响,随盐浓度的增加而增强,说明吸附驱动力主要为疏水作用.在无盐体系中,BSA的解吸率最高可达96.2%,表明微球在蛋白质分离应用上可重复使用.

参考文献:

- [1] Yang R M, Liu Y H, Wang Y M. Hydroxyethylcellulose-graft-poly(4-vinylpyridine) as a novel, adsorbed coating for protein separation by CE [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(13): 2321-2327.
- [2] Suda E J, Thomas K E, Pabst T M, et al. Comparison of agarose and dextran-grafted agarose strong ion exchangers for the separation of protein aggregates [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(27): 5256-5264.
- [3] 丁明玉, 郑睿, 彭虹. 弱阳离子交换毛细管整体柱的制备与蛋白质分离[J]. *分析化学*, 2009, 37(3): 395-398.
- [4] Chen L L, Deng L, Liu L L, et al. Immunomagnetic separation and MS/SPR end-detection combined procedure for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and protein A [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(7): 1487-1492.
- [5] Ishizu K, Shiratori S. Microsphere synthesis by dispersion copolymerizations using poly(*t*-butyl methacrylate) macromonomers in nonaqueous media [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, 236(2): 266-269.
- [6] Belattar N, Mekhalif T. Adsorption of human serum albumin on to synthesized dye-like polystyrene gel beads [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2004, 24(4): 507-511.
- [7] 贺锐, 曹光群, 陈明清, 等. 表面带磺酸基团的聚苯乙烯微球的制备及其对蛋白质的吸附[J]. *化工进展*, 2007, 26(7): 991-994.
- [8] 邓俊, 李明春, 辛梅华, 等. α -酮戊二酸修饰壳聚糖微球对牛血清蛋白的吸附[J]. *化工进展*, 2008, 27(12): 1991-1995.
- [9] Chern C S, Lee C K, Liu K C. Synthesis and characterization of PEG-modified polystyrene particles and isothermal equilibrium adsorption of bovine serum albumin on these particles [J]. *Journal of Polymer Research*, 2006, 13(3): 247-254.
- [10] Bai F, Yang X L, Huang W Q. Synthesis of narrow or monodisperse poly(divinylbenzene) microspheres by distillation-precipitation polymerization [J]. *Macromolecules*, 2004, 37(26): 9746-9752.