

丝素蛋白-金纳米粒子复合体系的稳定性

郭 丽, 朱晶心, 贾 兰, 柯 靖, 吉立静

(太原理工大学 新材料界面科学与工程教育部重点实验室, 山西 太原 030024)

摘 要:将柠檬酸钠还原法制备的金纳米粒子与再生丝素蛋白复合得到了高度稳定的丝素蛋白-金纳米粒子(SF-Au NPs)体系。研究了 SF-Au NPs 在不同 pH 值以及 KCl 浓度的磷酸盐缓冲液中的稳定性, 应用紫外-可见光光谱(UV-Vis)、透射电子显微镜(TEM)和红外光谱(FTIR)等测试方法对 SF-Au NPs 体系进行了表征。结果表明: SF-Au NPs 在 pH 为 3~11 的范围内及 50~1000 mmol/L 的 KCl 溶液中均具有良好的稳定性。以柠檬酸钠和牛血清白蛋白稳定的金纳米粒子作为对照实验的结果表明, SF-Au NPs 的稳定性主要与丝素蛋白空间阻隔效应有关。该制备方法简单、高效、成本低。

关键词: 丝素蛋白; 金纳米粒子; 稳定性

中图分类号: TB333

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2016)01-0217-05

金纳米粒子以其良好的稳定性、小尺寸效应、表面效应以及光学效应, 在工业催化、生物医药、生物分析化学、光化学与电化学催化、食品安全快速检测等领域具有广阔的应用前景^[1-4]。金纳米粒子的制备方法已有许多报道, 其中以柠檬酸盐做稳定剂和还原剂的化学合成法最为经典, 整个反应原料易得、操作简单、粒径可控。然而当溶液的 pH 值发生变化或者在高离子强度环境中, 金纳米粒子由于粒子表面电荷的改变易发生聚集^[5]。

在生理环境中保持稳定是金纳米粒子(Au NPs)在生物医学中应用的前提条件, 目前获得稳定性较好的金纳米粒子的有效方法之一就是在制备纳米粒子时加入适当的保护剂, 从而达到形貌可控、纳米颗粒稳定或分散的效果。这些保护剂吸附在粒子表面, 通过静电或空间阻隔作用避免了粒子间的直接接触, 使胶体粒子能稳定地存在于溶液中^[6,7]。已有报道, 采用聚电解质^[8]、蛋白质^[9]、层层自组装的聚电解质^[10]和硫醇化合物^[11-13]等对胶体金进行表面修饰, 以改善溶胶的稳定性。然而, 这些修饰方法仍存在一些缺点, 如某些修饰剂合成步骤复杂, 部分复合体系抗盐稳定性不是很好, 以及生理环境中稳定性差等。

家蚕丝素蛋白属于一类独特的具有高分子量的嵌段共聚蛋白质^[14], 丝素蛋白由于具有良好的生物相容性, 生物可降解性和无毒等特点被广泛应用于生物和医药领域^[15-17]。本实验选用丝素蛋白作为金纳米粒子

的稳定剂, 赋予了金纳米粒子更好的生物稳定性, 通过透射电镜和紫外-可见光光谱的表征, 研究了丝素蛋白稳定的金纳米粒子在较宽 pH 范围及不同盐离子浓度下的稳定性。采用柠檬酸钠及牛血清白蛋白稳定的金纳米粒子作为对照, 对丝素蛋白稳定机理进行了初步探讨。

1 实 验

实验材料为春蚕茧; 四氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 纯度>99%), 百灵威科技有限公司生产; 牛血清白蛋白(BSA, 纯度>98%, 分子量 66 kDa), 生工生物公司制造; 柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、无水碳酸钠、溴化锂、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸、磷酸钾、氯化钾、酪氨酸, 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司产品; 实验用水为超纯水(电阻率为 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

将春蚕茧去蛹剥为数层, 置于 0.5% (质量分数) 碳酸钠水溶液中, 于 100 °C 脱胶 30 min, 重复上述操作一次后, 用去离子水充分冲洗后风干待用。将脱胶丝置于 9.0 mol/L 的溴化锂水溶液中, 40 °C 下溶解 2 h, 溶解后的溶液过滤后装入透析袋中, 用去离子水连续透析 3 d, 以去除残留的盐离子。采用 SDS-PAGE 法测定再生丝素蛋白的分子量在 25~86 kDa 之间。

金纳米粒子按文献[18]采用传统的柠檬酸钠还原法制备, 即在含有高价金离子的氯金酸中加入柠檬酸

收稿日期: 2015-01-30

基金项目: 国家自然科学基金(51303124); 山西省青年科技研究基金(2013021009-2); 山西省自然科学基金(2013011012-2)

作者简介: 郭 丽, 女, 1989 年生, 硕士生, 太原理工大学材料科学与工程学院, 山西 太原 030024, 电话: 0351-6010021, E-mail: guoli0169@link.tyut.edu.cn

三钠还原剂, 金离子被还原成金纳米粒子。根据文献[19]可得出本实验制备的金纳米粒子的浓度约为 15 nmol/L。

配置 pH 值为 3~11 及不同盐浓度的磷酸盐缓冲液, 将丝素蛋白或牛血清白蛋白溶液加入 300 μ L(约 15 nmol/L)的纳米金溶液中混合静置 30 min, 然后向混合溶液中加入 pH 值不同的磷酸盐缓冲溶液或加入不同 KCl 含量(本实验所用 KCl 的终浓度范围为 0.05~1 mol/L)的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 混合均匀静置 24 h 后, 对试样进行紫外-可见吸收光谱测试。体系中丝素蛋白和牛血清白蛋白的终浓度为 2 mg/mL, 缓冲溶液的终浓度为 10 mmol/L。

分别将柠檬酸钠稳定的金纳米粒子和丝素蛋白稳定的金纳米粒子滴在碳膜覆盖的铜网上, 干燥后用 JEM-1200EX 型 (JEOL) 透射电子显微镜观察粒子形貌和分散情况。

使用 UV-8000S 型 (上海元析) 紫外-可见分光光度计测试复合体系紫外吸收光谱, 波长范围 200~800 nm, 研究其在较宽 pH 范围及不同离子浓度下的稳定性。

丝素蛋白稳定的金纳米粒子冷冻干燥 24 h 后, KBr 粉末混合压片, 在 Vector22 型 (Bruker) 红外光谱分析仪上测试红外光谱。

2 结果与讨论

2.1 金纳米粒子与丝素蛋白-金纳米粒子复合体系的表征

柠檬酸钠水溶液体系制备的金纳米粒子 (Au NPs) 及丝素蛋白-金纳米粒子复合体系 (SF-Au NPs) 的紫外-可见光光谱图如图 1 所示。Au NPs 在 520 nm 处出现明显的吸收峰, 这是典型的金纳米粒子的表面等离子体共振紫外吸收特征^[20], 且峰形对称, 半峰宽

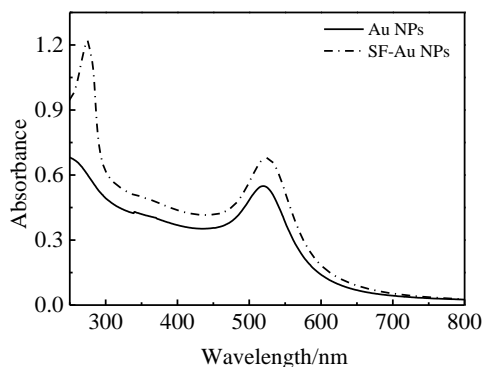


图 1 柠檬酸钠稳定的金纳米粒子和丝素蛋白稳定的金纳米粒子的紫外-可见光谱图

Fig.1 UV-Vis spectra of citrate-stabilized Au NPs and SF-stabilized Au NPs

较窄, 说明所制得金纳米粒子粒径分布较窄。经过丝素蛋白稳定的金纳米粒子在 275 nm 处显示出较强的吸收峰, 主要来源于丝素蛋白(SF)氨基酸残基中的酪氨酸芳香基团的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁。而金纳米粒子的特征吸收峰红移至 525 nm, 吸收峰强度增加, 表明丝素蛋白吸附到了金纳米粒子表面^[21]。

使用透射电镜对制得的 Au NPs 及 SF-Au NPs 进行表征, 结果如图 2a 和 2b 所示。采用柠檬酸钠水溶液体系所制备的 Au 纳米粒子近似球形, 粒径分布比较均匀, 且平均粒径为 13 nm 左右, 而经 SF 稳定的 Au NPs, 粒子形貌和粒径均没有太大的改变, 仍然保持良好的分散性和稳定性。

2.2 pH 对 SF-Au NPs 与 BSA-Au NPs 稳定性的影响

本工作首先研究了丝素蛋白稳定的金纳米粒子在不同 pH 值的磷酸盐缓冲体系中的稳定性。金纳米粒子的表面等离子体共振特征对粒子之间间距比较敏感, 分散性良好的金纳米粒子呈现红色, 紫外吸收峰在 520 nm 附近且峰形对称, 半峰宽较窄, 而聚集后则为蓝色, 紫外吸收峰红移, 峰宽化, 因此金纳米粒子的稳定性可通过紫外-可见光光谱来表征。

图 3 所示为丝素蛋白-金纳米粒子复合体系 (SF-Au NPs) 及柠檬酸钠-金纳米粒子 (citrate-Au NPs), 牛血清白蛋白-金纳米粒子 (BSA-Au NPs) 在不同 pH 时的 UV-Vis 吸收光谱图。如图 3a 所示, 当缓冲液的 pH 值在 3~11 之间变化时, 即使在丝素蛋白的等电点 (~4.58~5.00)^[22]附近, 丝素蛋白-金纳米粒子复合体系中 Au NPs 特征吸收峰的吸收强度和峰值位置几乎没有发生变化, 表明 SF-Au NPs 没有发生团聚。

如图 3c 所示, 当 $\text{pH} > 7$ 时, BSA 稳定的金纳米粒子可以稳定存在, 但在 $\text{pH} < 7$ 的体系中出现聚集。这可能是因为在 pH 低于 BSA 的等电点 (~5) 时, BSA 带正电荷, 金纳米粒子带负电荷, 表面正、负电荷的中和使粒子之间静电斥力减小导致金纳米粒子的聚集; 当 pH 大于等电点时, BSA 与金纳米粒子都带负

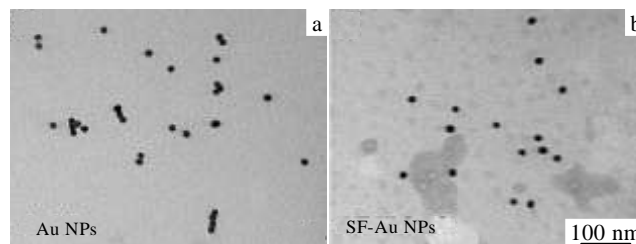


图 2 柠檬酸钠稳定的金纳米粒子和丝素蛋白稳定的金纳米粒子的 TEM 照片

Fig.2 TEM images of citrate-stabilized Au NPs (a) and SF-stabilized Au NPs (b)

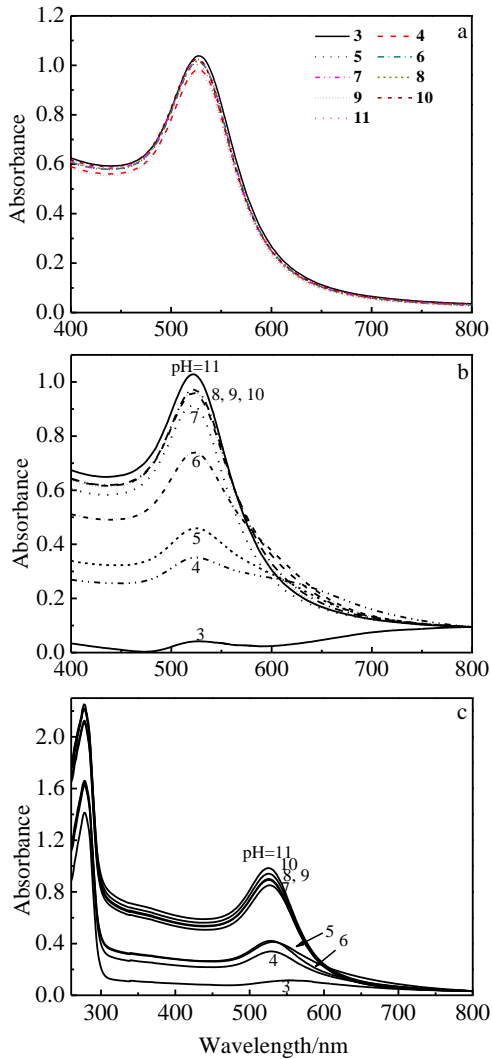


图 3 不同 pH 值 (3~11) 条件下不同样品的紫外-可见光谱图
Fig.3 UV-Vis spectra of SF-stabilized Au NPs (a), citrate-stabilized Au NPs (b), and BSA-stabilized Au NPs (c) in PB buffer with pH ranging from 3 to 11

电荷而相互排斥，导致它们不易结合。采用柠檬酸钠稳定的金纳米粒子表现出与 BSA 稳定的金纳米粒子类似的情形，如图 3b 所示。这表明柠檬酸盐稳定的金纳米粒子与 BSA 稳定的金纳米粒子其主要稳定机理都是静电作用，而丝素蛋白的空间阻隔效应可能对金纳米粒子的稳定起着重要作用。

丝素蛋白的空间阻隔效应是与其构象相关的，由于 pH 会影响丝素蛋白的构象，故本工作研究了 SF-Au NPs 在不同 pH 条件下的构象。丝素蛋白可呈无规卷曲和 β -折叠 2 种构象，且其构象的变化常用红外光谱的酰胺带来表征，丝素蛋白的红外特征吸收如在表 1 所列的特定位置所示。由丝素蛋白-金纳米粒子复合体系 (pH=4, 7) 干燥制得的粉末的红外光谱如图 4 中曲线所示。酰胺吸收带的位置也列于表 1 中。

表 1 丝素红外光谱酰胺特征吸收谱带和样品测试结果
Table 1 Characteristic amide bands in FT-IR spectra of SF and the results (cm^{-1})

Structure	Amide I band $\nu\text{C}=\text{O}$	Amide II band $\nu\text{C}-\text{N}+$ $\delta\text{N}-\text{H}$	Amide III band $\nu\text{C}-\text{N}+$ $\delta\text{N}-\text{H}$
Random coil	1650~1660	1535~1545	1235
β -sheet	1625~1640	1515~1525	1265

图 4 为丝素蛋白稳定的金纳米粒子在不同 pH 下的红外图谱。通过对比 pH 为 4 和 pH 为 7 时的 2 条曲线，可以看出 2 种 SF-Au NPs 中丝素蛋白的红外吸收峰均出现在 1650 (无规线团)、1540 (无规线团) 和 1235 (无规线团) cm^{-1} 处，说明其构象均为无规线团结构。并没有出现文献[23]描述的酸性环境下的 β -折叠构象。这可能是由于所用丝素蛋白浓度太低的缘故，所以酸性和中性条件下丝素蛋白构象均为无规线团。

文献研究表明，金纳米粒子在不同 pH 值缓冲液中的稳定性是通过以下 2 种作用实现的^[24]：其一为静电作用，另一种为空间阻隔稳定作用。对于柠檬酸盐稳定的金纳米粒子与 BSA 稳定的金纳米粒子来说，静电作用起主导作用。而对于丝素蛋白稳定的金纳米粒子来说，低浓度的 SF 呈无规线团，可以较好地包裹在 Au NPs 上，充当纳米粒子表面的保护层，阻止了金纳米粒子的相互接触，SF 中其它氨基酸和带电基团也对 Au NPs 的稳定起到了一定的作用，从而使 SF-Au NPs 与 BSA 稳定的 Au NPs 不同，在很强的酸性条件下都表现出较强的稳定性。

2.3 不同浓度的 KCl 对 SF-Au NPs 稳定性的影响

图 5 所示为柠檬酸钠稳定的金纳米粒子 (Au NPs) 及丝素蛋白稳定的金纳米粒子 (SF-Au NPs) 在不同浓度 KCl 溶液中的紫外-可见吸收光谱。在柠檬酸钠稳定的金纳米粒子溶液中加入 KCl 后，溶液颜色由红色

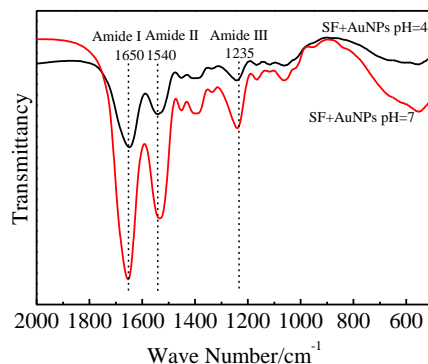


图 4 丝素蛋白稳定的金纳米粒子在不同 pH 下的红外图谱
Fig.4 FT-IR spectra of SF-stabilized Au NPs at different pH values

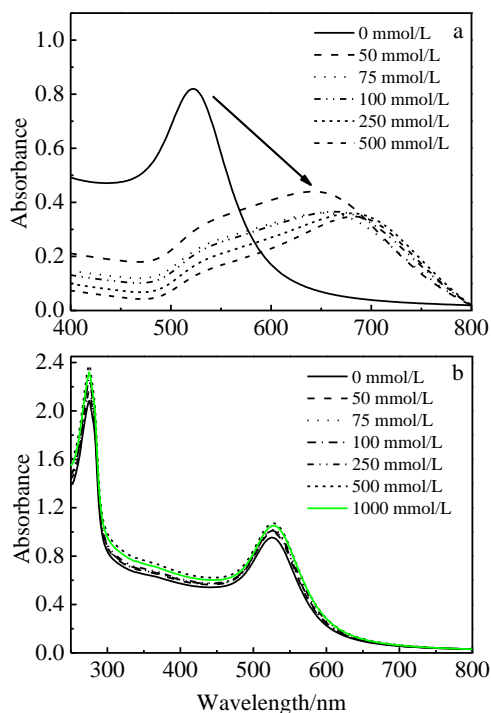


图 5 不同 KCl 浓度下不同样品的紫外-可见光谱图

Fig.5 UV-Vis spectra of citrate-stabilized Au NPs (a) and SF-stabilized Au NPs (b) in PB buffer with different KCl concentrations

变为蓝色，Au NPs 紫外吸收峰红移，峰宽化。当离子浓度达到 0.05 mol/L 时发生聚集和沉淀，且随着 KCl 浓度的增加，吸收峰红移较明显（图 5a）。相比之下，加入不同浓度 KCl 的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液后，SF-Au NPs 溶液仍呈红色，且金纳米粒子和丝素蛋白吸收峰的位置分别在 525 和 275 nm 附近，即使当 KCl 浓度达到 1 mol/L 时，也没有观察到明显的峰偏移（图 5b）。表明当 KCl 浓度在 0.05~1 mol/L 之间变化时，所得 SF-Au NPs 可以稳定存在。由此可知丝素蛋白稳定的金纳米粒子在远高于生理盐水浓度的 KCl 溶液中都可以保持稳定。

这进一步表明空间阻隔效应对金纳米粒子的稳定作用。静电作用稳定的金纳米粒子很容易因加入大量带异种电荷的离子而发生中和产生聚集，就像柠檬酸钠稳定的金纳米粒子。而空间阻隔稳定的金纳米粒子在较高的离子浓度下仍可保持稳定。丝素蛋白大分子链的空间阻隔效应使纳米粒子阻隔开来，保持了在高离子浓度下的稳定性。作者也进行了其它盐离子如 Na⁺，Ca²⁺ 以及 Mg²⁺ 的实验，得到与 K⁺ 一致的实验结果。

2.4 不同 SF 浓度对 SF-Au NPs 稳定性的影响

图 6 所示为不同浓度丝素蛋白稳定的金纳米粒子在 pH 为 4 的缓冲溶液中的紫外-可见光谱图。实验中

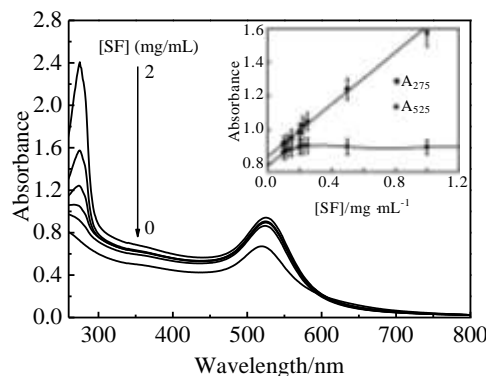


图 6 不同浓度丝素蛋白稳定的金纳米粒子在 pH=4 的缓冲溶液中的紫外-可见光谱图，插图为 A₂₇₅、A₅₂₅ 与丝素浓度的关系图

Fig.6 UV-Vis spectra of SF-stabilized Au NPs with different SF concentrations in PB buffer at pH 4, and the inset is the plots of A₂₇₅ and A₅₂₅ vs. the mass concentration of SF

保持 Au NPs 的量相同（300 μL），改变 SF 的终浓度。通过比较金纳米粒子的特征吸收峰，可以发现当 SF 含量降低时，SF-Au NPs 在 275 nm 处的峰值呈线性变化，而 525 nm 处的吸收峰强度由几乎不变到缓慢降低。可以得出当丝素蛋白临界浓度为 0.2 mg/mL 时，便可以稳定 300 μL(约 15 nmol/L)的金纳米粒子。

3 结 论

- 1) SF-Au NPs 体系在较宽的 pH 范围和高盐浓度（1 mol/L KCl）环境中仍具有良好的生物稳定性，盐离子缓冲液的加入并没有导致金纳米粒子的沉积。
- 2) 与柠檬酸钠和牛血清白蛋白稳定的金纳米粒子相比，丝素蛋白稳定的金纳米粒子在更广的生理环境中具有良好的稳定性，其稳定机理可能与金纳米粒子和丝素蛋白之间的静电作用以及丝素蛋白无规线团大分子链空间阻隔效应有关，且空间阻隔稳定可能发挥了更大的作用。
- 3) 当丝素蛋白临界浓度为 0.2 mg/mL 时，便可以稳定 300 μL(约 15 nmol/L)的金纳米粒子。该丝素蛋白稳定的金纳米粒子体系的制备方法简单环保，生理环境中稳定性优良。

参考文献 References

[1] Huang H C, Barua S, Sharma G *et al.* *J Controlled Release*[J], 2011, 155(3): 344
 [2] Yeh Y C, Czeran B, Rotello V M. *Nanoscale*[J], 2012, 4(6): 1871
 [3] Pissuwan D, Niidome T, Cortie M B. *J Controlled Release*[J],

- 2011, 149(1): 65
- [4] Jin Q, Xu J P, Ji J *et al. Chem Commun*[J], 2008, 26: 3058
- [5] Ojea-Jiménez I, Puentes V. *J Am Chem Soc*[J], 2009, 131(37): 13320
- [6] Rao C N R, Kulkarni G U, Thomas P J *et al. Chem Soc Rev*[J], 2000, 29(1): 27
- [7] Bännemann H, Richards R M. *Eur J Inorg Chem*[J], 2001, 10: 2455
- [8] Guo X, Ballauff M. *Langmuir*[J], 2000, 16(23): 8719
- [9] Lu L H, Ai K L, Ozaki Y. *Langmuir*[J], 2008, 24(3): 1058
- [10] Kim K, Lee H S, Kim N H. *Anal Bioanal Chem*[J], 2007, 388(1): 81
- [11] Brust M, Walker M, Bethell D *et al. J Chem Soc Chem Comm* [J], 1994, 7(7): 801
- [12] Gao J, Huang X Y, Liu H *et al. Langmuir*[J], 2012, 28(9): 4464
- [13] Zhang F, Skoda M W A, Jacobs R M J *et al. J Phys Chem A* [J], 2007, 111(49): 12229
- [14] Murphy A R, Kaplan D L. *J Mater Chem*[J], 2009, 19(36): 6443
- [15] Kim U J, Park J, Kim H J *et al. Biomaterials*[J], 2005, 26(15): 2775
- [16] Mori H, Tsukada M. *Rev Mol Biotechnol*[J], 2000, 74(2): 95
- [17] Kong X D, Cui F Z, Wang X M *et al. J Cryst Growth*[J], 2004, 270(1-2): 197
- [18] Grabar K C, Freeman R G, Hommer M B *et al. Anal Chem*[J], 1995, 67(4): 735
- [19] Mucic R C, Storhoff J J, Mirkin C A *et al. J Am Chem Soc*[J], 1998, 120(48): 12 674
- [20] Cliffel D E, Zamborini F P, Gross S M *et al. Langmuir*[J], 2000, 16(25): 9699
- [21] Vangala K, Ameer F, Salomon G *et al. J Phys Chem C*[J], 2012, 116(5): 3645
- [22] Zhou Y, Chen W X, Itoh H *et al. Chem Commun*[J], 2001, 23: 2518
- [23] Xie Xun(谢 梅), Zhou Ping(周 平), Deng Feng(邓 风) *et al. Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2004, 25(5): 961
- [24] Brewer S H, Glomm W R, Johnson M C *et al. Langmuir*[J], 2005, 21(20): 930

Stability of Silk Fibroin-Gold Nanoparticles Composite System

Guo Li, Zhu Jingxin, Jia Lan, Ke Jing, Ji Lijing

(Key Laboratory of Interface Science and Engineering in Advanced Materials, Ministry of Education, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: Highly stable silk fibroin-gold nanoparticles (SF-Au NPs) was obtained using regenerated protein silk fibroin (SF) to stabilize gold nanoparticles (Au NPs), which were prepared through a citrate reduction method. The stability of SF-Au NPs in buffer solutions with different pH conditions and different KCl concentrations were investigated. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), transmission electron microscopy (TEM) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were employed to characterize the SF-Au NPs system. The results reveal that SF-Au NPs possess remarkable stability in the pH range from 3 to 11 and salt concentrations range from 50 mmol/L to 1000 mmol/L. Taking citrate and BSA stabilized gold nanoparticles as comparison, the results indicate that steric hindrance may play a dominated role for the stability of SF-Au NPs. The proposed method is simpler, more efficient, and more cost effective than the conventional modification strategies for Au NPs.

Key words: silk fibroin; gold nanoparticles; stability

Corresponding author: Zhu Jingxin, Ph. D., Associate Professor, College of Material Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, P. R. China, Tel: 0086-351-6010021, E-mail: zhujingxin@tyut.edu.cn