



QCM-D 研究蛋白质与多糖的相互作用

林园^a 黄庆荣^b 苏朝晖^{a*}

(^a中国科学院长春应用化学研究所, 高分子化学与物理国家重点实验室 长春 130022;

^bRutgers 大学食品科学系, 美国新泽西州 08901)

摘要 应用具有耗散因子功能的石英晶体微天平(QCM-D)检测了多糖多层膜的构筑过程以及蛋白质在多层膜上的吸附行为。研究表明,通过层层组装的方法,可以实现多糖卡拉胶多层膜的构筑,并且随着卡拉胶电荷密度的增加,其组装量减少。研究了牛体血清蛋白(BSA)在卡拉胶上的吸附行为。结果发现,BSA的吸附行为强烈地依赖于卡拉胶的电荷密度和基体的粗糙度。通过QCM-D实时监测了BSA在卡拉胶上的动力学吸附曲线,同时根据 ΔD 值推测了BSA在不同的基底表面上所形成的结构及吸附行为。

关键词 石英晶体微天平(QCM-D), 蛋白质, 多糖

中图分类号: O636.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2010)05-0505-05

DOI: 10.3724/SP.J.1095.2010.90447

蛋白质和多糖是生物体系和食品工程中2种主要的物质,二者的相互作用在食品工业中对控制食品的组织结构及稳定性起着决定性的作用^[1],因此,更好地理解蛋白质和多糖间的相互作用对于设计一些具有功能性的食物有重要意义。在过去的20多年中,有关蛋白质和多糖间的相互作用的研究均侧重在溶液状态下展开^[2~5]。大量的研究表明,蛋白质和多糖间的相互作用主要是静电力起主导作用,因此溶液的pH值、离子强度、多糖上的电荷密度以及蛋白质和多糖的混合比例均强烈地影响着蛋白质和多糖间的相互作用^[6]。尽管关于蛋白质和多糖在溶液状态下的相互作用已有大量的报道^[2~5],但有关蛋白质和多糖在表面上的相互作用的报道很少^[7],特别是关于蛋白质在生物表面上的很多吸附行为还不很清楚,这主要是因为缺乏有效的检测手段。石英晶体微天平(QCM)作为微质量传感器具有结构简单、成本低和测量精度高(可以达到纳克量级)的优点,被广泛应用于化学、物理、生物、医学和表面科学等领域^[8,9]。随着科学技术的发展,出现了具有耗散因子功能的石英晶体微天平(QCM-D),极大地拓宽了QCM的应用空间。通过测量耗散系数(Dissipation, D),能够给出更多关于表面上吸附的薄膜的性质,从而极大地丰富了薄膜的表面信息,为研究微观变化过程,破译微观作用机理提供了一种强有力的手段。并且其具有实时跟踪检测微观过程的变化、获取丰富在线信息的优点,是其它方法无法比拟的。本文利用层层组装方法将多糖固定在表面上,利用QCM-D研究了蛋白质在多糖表面上的吸附行为。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

D300型石英晶体微天平(QCM-D,瑞士Q-Sense公司);Multimode IIIa™型原子力显微镜(AFM,美国Nanoscope公司)。聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐(PDDA, M_w 为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$),及4种不同电荷密度的卡拉胶 furcelleran (FC)、 κ -carrageenan (KC)、 ι -carrageenan (IC)和 λ -carrageenan (LC)均由美国Aldrich

公司购得,分析纯试剂。牛体血清蛋白(BSA, Sigma 公司),分析纯试剂,超纯水由 Millipore 纯水器制得。

1.2 (PDDA/卡拉胶)_n 多层膜的制备

将双面镀金的电极用紫外光照射 10 min,浸泡到 $V(25\% \text{ 氨水}):V(30\% \text{ H}_2\text{O}_2):V(\text{超纯水}) = 1:1:5$ 混合清洗液中,加热至 75 °C,清洗 5 min,取出,用大量超纯水清洗, N_2 气吹干,用紫外光照射 10 min,以充分保证电极表面的清洁度。将清洗干净的电极浸泡至 PDDA($1.0 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$) 溶液中,1 h 后取出用大量超纯水冲洗, N_2 气吹干。将表面已吸附一层 PDDA 的电极放到 QCM-D 的测量样品池中,待其基线稳定后,交替注入 500 μL 质量浓度为 $0.5 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ 的卡拉胶和 $1.0 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ 的 PDDA 溶液中,其中每隔 20 min 吸附一层后,用 500 μL 的超纯水冲洗。所有的实验均在室温下进行。

1.3 BSA 在 (PDDA/卡拉胶)_n 多层膜上的吸附

将表面已经组装了 (PDDA/卡拉胶)_n 多层膜的电极放到 QCM-D 的测量样品池中,注入缓冲溶液,待基线稳定后,将溶解了 BSA 的相同缓冲溶液注入到样品池中,待吸附饱和后用缓冲溶液冲洗 3 次。

1.4 表面粗糙度测试

首先用 $V(98\% \text{ 浓硫酸}):V(30\% \text{ H}_2\text{O}_2) = 7:3$ 清洗液清洗硅片 30 min,然后用大量的超纯水冲洗, N_2 气吹干;将清洗后的硅片按本文 1.2 节中的实验步骤组装 2 个 PDDA/卡拉胶双层,卡拉胶为最外层。然后每个样品至少取 3 个点在 $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ 的区域内测试其表面粗糙度。

2 结果与讨论

2.1 (PDDA/卡拉胶)_n 多层膜

图 1 所示为 QCM-D($f = \nu \times 5 \text{ MHz}, \nu = 3$) 对 PDDA/卡拉胶的层层组装监测过程。圆形状箭头代表注入卡拉胶,三角形状箭头代表注入 PDDA,虚线箭头代表注入超纯水冲洗。每当注入卡拉胶和 PDDA 时频率的降低表明卡拉胶和 PDDA 已成功地组装到金电极表面上。当用超纯水冲洗时,频率的升高表明了一些在表面上物理吸附的卡拉胶和 PDDA 被超纯水冲洗后脱附。

由 QCM-D 的数据可见,随着组装层数的增加,频率也随之降低,表明卡拉胶可与 PDDA 通过层层组装的办法来构筑多层膜。根据每个二糖单元上的磺酸基团的数目,FC、KC、IC 和 LC 4 种卡拉胶的电荷密度分别为 0.67、0.93、1.53 和 2.07。

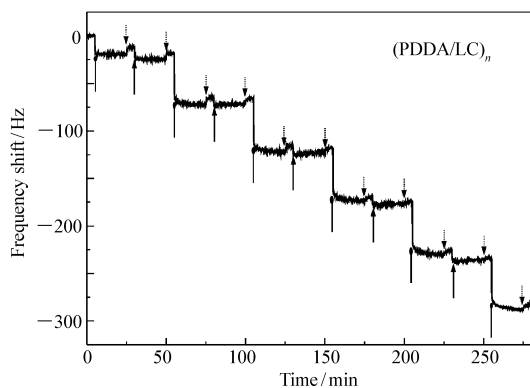


图 1 卡拉胶和 PDDA 通过层层组装所引起的电极频率的变化图

Fig. 1 QCM-D frequency shifts during the alternate deposition of carrageenan and PDDA layers on a gold crystal

Carrageenan and PDDA exposures and water rinses are indicated by circular, triangular, and dotted arrows, respectively

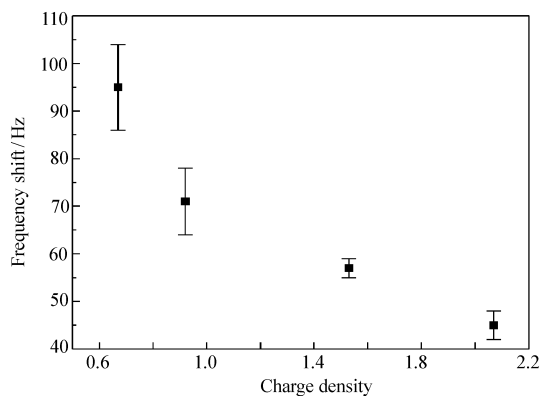


图 2 卡拉胶的电荷密度对卡拉胶的平均每层组装量的影响

Fig. 2 Dependence of average frequency shift for each carrageenan layer on the charge density of carrageenan

图 2 为不同电荷密度的卡拉胶吸附到 PDDA 上时平均每一层所引起的频率的变化。从图中可以看

出,随着卡拉胶电荷密度的增加,其每层平均吸附量相应降低。对于电荷密度最小的 FC,其单层吸附所引起的频率变化为 $\Delta f = (95 \pm 9)$ MHz;相反,对于电荷密度最大的 LC,其单层吸附所引起的频率变化为 $\Delta f = (45 \pm 3)$ MHz。这是因为电极表面的面积是一定的,当吸附了 PDDA 后,电极表面上所携带的正电荷数目也是一定的;对于电荷密度最小的 FC,因为其电荷密度仅为 0.67,其分子链段上的负电荷数目也是最少的;为了补偿基底表面上的正电荷,就需要有更多的 FC 吸附到 PDDA 的表面上。相反,对于 LC,其电荷密度为 2.07,其分子链段上的负电荷数目也是最多的,因此少量的 LC 即可补偿基底表面上的正电荷。

2.2 BSA 在 (PDDA/卡拉胶)_n 多层膜上的吸附行为

2.2.1 基底的影响 图 3a 为 BSA 在 pH=4.0 质量浓度为 1.0×10^{-3} g/mL 的条件下,分别在空白的金表面 (gold)、PDDA 表面 (gold/PDDA) 和卡拉胶的表面 (gold/PDDA/IC) 上的吸附动力学曲线。从图中可以看出,约 60 min 后在 3 种不同表面上几乎均达到了吸附饱和平台。文献^[10]中已有关于 BSA 可以通过疏水作用力直接吸附到金的表面上报道。对于 BSA 在 PDDA 表面上的吸附,由于 BSA 在 pH=4.0 条件下所携带的净电荷为正电荷,尽管此时 BSA 分子所携带的电荷与基底表面 PDDA 所携带的电荷相同,同为正电荷,但作者依旧观察到了 BSA 在其表面上的吸附,这是因为尽管 BSA 在 pH=4.0 的条件下所携带的净电荷为正电荷,在其分子表面依旧存在部分负电荷。这些负电荷可以与基底表面 PDDA 上的正电荷相互吸引,使 BSA 可以吸附到其表面上。同时由于相同电荷间的排斥力作用使得 BSA 在 PDDA 表面上的吸附量较少。当 BSA 吸附到带负电荷的 IC 上时,观察到了大量的吸附。以上数据表明,静电力是影响 BSA 吸附的主要驱动力,同时一些如氢键、范德华力以及疏水作用力同样也起着一定作用。图 3B 为当 BSA 吸附到不同的表面上时能量的耗散 ΔD 的变化, ΔD 值可以提供一些关于 BSA 吸附到不同的表面上时的薄膜的性质及其分子在薄膜中的结构信息。对于厚度较薄并且致密度较高的薄膜, ΔD 值几乎没有多大的变化;相反,对于一些厚度较厚并且粘弹性较大的薄膜, ΔD 值会有较大的变化。因此由图 3B 可以看出,当 BSA 吸附到 PDDA 表面上时, ΔD 值非常小,表明 BSA 吸附到 PDDA 表面后形成了非常致密的薄膜。由于 BSA 是一种椭球状的蛋白,因此可以推测,此时 BSA 分子均是平躺在 PDDA 表面上的;相反,当其吸附到 IC 上时, ΔD 值有了相对较大的变化。结合图 3A 的数据分析,有大量的 BSA 分子吸附到了 IC 的表面上,此时的 BSA 分子不再是完全平躺在基底上,而可能有部分分子直立表面上,从而使得更多的 BSA 分子可以吸附到表面,此外由于蛋白质本身是一种较软的物质,大量的蛋白质增加了薄膜的粘弹性。而在空白的金的表面上的吸附, ΔD 值有了更大的变化,但在图 3A 中其吸附量不是最大的,这可能是由于 BSA 在金表面上的吸附不是通过静电力而是通过疏水作用力,因而

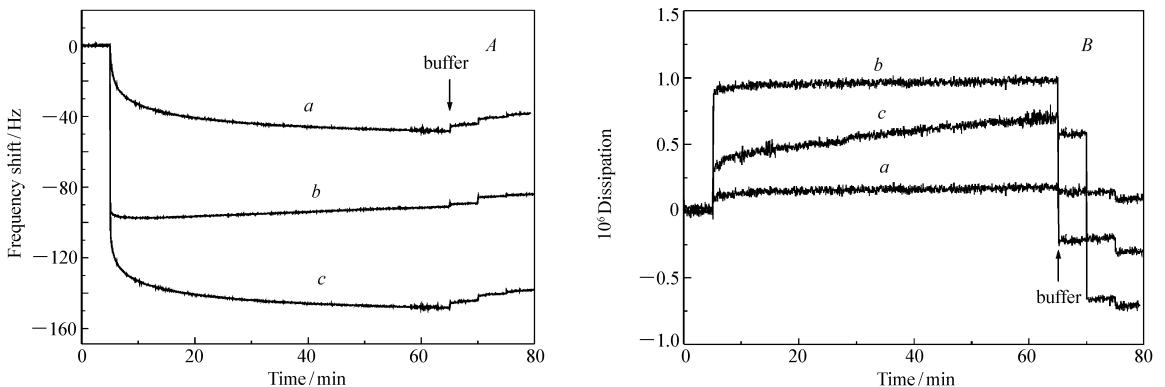


图 3 BSA 在 pH=4.0, 质量浓度为 1.0×10^{-3} g/mL 的条件下吸附在不同的表面上所引起的(A)频率及(B)耗散系数的改变

Fig. 3 (A) Frequency shifts (Δf) and (B) energy dissipation (ΔD) induced by the adsorption of BSA onto different surfaces (1.0×10^{-3} g/mL BSA in acetic buffer solution at pH=4.0)
a. gold/PDDA/BSA; b. gold/BSA; c. gold/PDDA/IC/BSA

可能导致更加复杂的结构,使得薄膜的粘弹性增加了更多。由此可见,通过 QCM-D 不仅可以实时监测 BSA 在不同表面上的动力学吸附曲线,同时又可以根据 ΔD 值推测 BSA 在不同的基底表面上所形成的不同结构。

2.2.2 卡拉胶上电荷密度的影响 由于蛋白质和多糖间的作用力主要是静电力,因此多糖上的电荷密度将对蛋白质的吸附行为有着一定的影响。研究了 BSA 在 pH = 4.0, 质量浓度为 1.0×10^{-3} g/mL 条件下,在不同电荷密度下的卡拉胶上的吸附行为。通过频率的变化可知,除了 IC 外,其它 3 种卡拉胶,随着其电荷密度的增加,BSA 在其上的吸附量也随之增大,而最大的吸附量是 BSA 在 IC 表面上的吸附。由于 IC 在溶液中具有特殊的螺旋状结构,当其组装到表面上时,使得表面的粗糙度要高于其它 3 种卡拉胶的表面。利用原子力测试了不同卡拉胶表面的粗糙度,发现 IC 表面的粗糙度为 (0.89 ± 0.03) nm,而 FC、KC 和 LC 表面的粗糙度分别为 (0.77 ± 0.03) nm、 (0.53 ± 0.02) nm 和 (0.61 ± 0.02) nm。由此可见,基底表面的粗糙度也会影响蛋白质的吸附。图 4 为 BSA 在 FC 和 IC 上的吸附行为。图中可见,BSA 在不同电荷密度下的卡拉胶上,在 FC 上的吸附量最小,而在 IC 上的吸附量最大,表明基底表面上的电荷密度可以控制蛋白质的吸附量。图 4b 为 BSA 吸附在 FC 和 IC 上的 ΔD 值的变化。图中可见,BSA 在 IC 上 ΔD 值的变化要高于在 FC 表面上 ΔD 值的变化,表明当 BSA 在 IC 表面上吸附时,所形成的薄膜的粘弹性更高。由此可见,蛋白质和多糖间的相互作用,很大程度上取决于多糖上的电荷密度,不同电荷密度下的多糖,使得蛋白质可在其上形成不同粘弹性结构的蛋白质薄膜,这对将来制备一些食品包装材料以及生产一些具有功能性食品方面有着一定的指导作用。

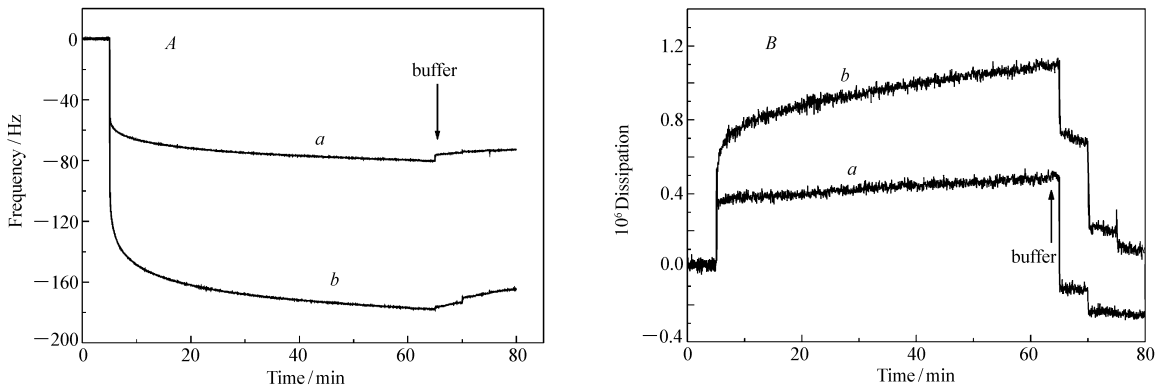


图 4 BSA 在 pH = 4.0 浓度为 1.0×10^{-3} g/mL 的条件下吸附在不同的卡拉胶表面上所引起的(A)频率及(B)耗散系数的改变

Fig. 4 (A) Frequency shifts (Δf) and (B) energy dissipation (ΔD) induced by the adsorption of BSA onto different carrageenan surfaces (1.0×10^{-3} g/mL BSA in acetic buffer solution at pH = 4.0)
a. gold/PDDA/BSA; b. gold/BSA; c. gold/PDDA/IC/BSA

参 考 文 献

- 1 Dickinson E, Pawlowsky K J. *Agric Food Chem*[J], 1997, **45**:3799
- 2 Arltoft D, Ipsen R, Madsen F, Vries J. *Biomacromolecules*[J], 2007, **8**:729
- 3 Galazka V B, Smith D, Ledward D A, Dickinson E. *Food Chem*[J], 1999, **64**:303
- 4 Alizadeh N, Li-Chan E C Y. *Food Hydrocolloids*[J], 2001, **15**:285
- 5 Seyrek E, Dubin P L, Tribet C, Gamble E A. *Biomacromolecules*[J], 2003, **4**:273
- 6 Schmitt C, Sanchez C, Desobry-Banon S, Hardy J. *Crit Rev Food Sci Nutri*[J], 1998, **38**:689
- 7 Salloum D S, Schlenoff J B. *Biomacromolecules*[J], 2004, **5**:1089
- 8 Höök F, Rodahl M, Brzezinski P, Kasemo B. *Langmuir*[J], 1998, **14**:729
- 9 Richert L, Lavalley P, Vautier D, Senger B, Stoltz J F, Schaaf P, Voegel J C, Picart C. *Biomacromolecules*[J], 2002, **3**:1170
- 10 Kaufman E D, Belyea J, Johnson M C, Nicholson Z M, Ricks J L, Shah P K, Bayless M, Pettersson T, Feldot Z, Blomberg

E, Claesson P, Franzen S. *Langmuir*[J], 2007, 23:6053

Interactions between Protein and Polysaccharide Studied by QCM-D

LIN Yuan^a, HUANG Qing-Rong^b, SU Zhao-Hui^{a*}

(^aState Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022;

^bDepartment of Food Science, Rutgers University, NJ 08901, USA)

Abstract Polysaccharide surfaces were constructed from carrageenan and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) via layer-by-layer assembly technique. The adsorption of bovine serum albumin (BSA), an ellipsoidal model protein, on the surface of the multilayers was studied in detail by means of a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D). Four carrageenans with different charge densities were investigated, and the amount of the carrageenan assembled was found to decrease with the increase of the charge density. When BSA was adsorbed on the PDDA surface, the dissipation factor (ΔD) was small, indicating that BSA lay down on the surface to form a thin layer. When BSA was adsorbed to the ι -carrageenan (IC) surface, both the QCM frequency shifts (ΔF) and the dissipation factor ΔD were larger, suggesting that BSA stood on the carrageenan surface to form a thicker layer. In addition, it was found that both the amount of adsorption and the packing of BSA on the carrageenan surface depended on the charge density and the surface roughness of the carrageenan substrate.

Keywords quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), protein, polysaccharide