

文章编号: 0253-9721(2008)07-0017-04

# 再生蚕丝丝素蛋白纳米颗粒的制备及抗菌性

陈忠敏<sup>1</sup>, 郝雪菲<sup>1</sup>, 吴大洋<sup>2</sup>, 饶佳家<sup>1</sup>, 邵 飞<sup>1</sup>

(1. 重庆工学院 化学与生物工程学院, 重庆 400050; 2. 西南大学 纺织服装学院, 重庆 400700)

**摘 要** 采用一种高效简便新工艺, 用特定的溶剂将家蚕丝素蛋白溶解, 透析浓缩后用  $\alpha$ -糜蛋白酶酶解, 制备了蚕丝丝素蛋白纳米级颗粒, 进行了 4 种不同溶剂溶解的筛选性实验。结果表明: 采用 LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 溶剂溶解, 透析浓缩后用  $\alpha$ -糜蛋白酶酶解的整体工艺效果最优。对生成的纳米粒子尺寸用扫描电镜、场发射扫描电镜进行表征, 观察到 4 种混合溶剂溶解得到的丝素蛋白肽颗粒大小在 20 ~ 50  $\mu\text{m}$  之间; 再用  $\alpha$ -糜蛋白酶酶解后, 丝素蛋白肽颗粒的大小降解为 80 ~ 300 nm。测定了丝素蛋白粉末的抗菌性, 其纳米级颗粒比微米级颗粒具有更优异的抗菌效果。

**关键词** 丝素蛋白肽; 纳米丝素肽颗粒; 抗菌性能; 纳米生物材料

中图分类号: TS 141.921 文献标识码: A

## Preparation of silk fibroin peptide nano-scale particles and its antibacterial activity

CHEN Zhongmin<sup>1</sup>, HAO Xuefei<sup>1</sup>, WU Dayang<sup>2</sup>, RAO Jiajia<sup>1</sup>, SHAO Fei<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050, China;

2. College of Textile and Garment, Southwest University, Chongqing 400700, China)

**Abstract** Nano-scale particles of silk fibroin peptide (SFP) were prepared by a three-step process: dissolving silk fibroin fiber in special solvents, followed by dialysis and concentration, and finally enzymolysis with  $\alpha$ -chymotrypsin. Screening test was performed with 4 kinds of solvents and experimental results showed that LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O mixed solvent achieved the best effect. The size of SFP particles appeared about 20 ~ 50  $\mu\text{m}$ , and that of SFP nano-scale particles were about 80 ~ 300 nm. SFP nano-scale particles revealed better antibacterial activity than SFP particles.

**Key words** fibroin peptide; fibroin peptide nano-scale particles; antibacterial activity; nano-biomaterials

随着高分子技术的不断发展, 其研究领域也不断拓宽。生物大分子是目前高分子学科很活跃的一个研究领域, 其研究对象为糖类、蛋白质和核酸等。作为生物大分子的蚕丝蛋白, 是人类利用很早的天然蛋白质之一, 具有纯度高, 来源广等优点, 对其进行研究及有效利用具有重要的意义。蚕丝中, 丝素蛋白占总质量的 70% ~ 80%, 丝胶蛋白占 20% ~ 30%。丝素蛋白是一种纤维蛋白, 其在生物整体、细胞和分子生物学 3 个水平的实验结果都表明丝素蛋白安全可靠, 具有与胶原蛋白相同的生物、细胞亲和性, 适合于开发生物功能材料<sup>[1]</sup>。

近年来生物功能材料领域出现了纳米生物材料的研究热点。纳米生物材料可以应用在组织工程、再生医学材料以及生物相容界面材料等领域。其在生物相容界面材料领域应用时, 主要通过层层组装技术, 实现包括蛋白质、DNA 和聚电解质等在众多基材上的组装, 不仅实现了对天然生物材料的结构模拟, 而且可以获得表面层状生物材料, 解决了材料生物相容性的关键问题, 可以应用在细胞生长支架、药物缓释材料以及生物传感器材等领域<sup>[2]</sup>。将性能良好的丝素蛋白制成纳米级颗粒, 开发材料的应用性能, 已成为生物材料研究的一个热点。文献[3]将

收稿日期: 2007-08-27 修回日期: 2008-04-02

基金项目: 重庆市教委科学技术项目(2005CJ05); 国家教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2006CR01)

作者简介: 陈忠敏(1968—), 女, 教授, 博士。研究领域为功能高分子材料、纺织材料等。E-mail: chenzhongmin@cqit.edu.cn.

水溶性丝素溶液与能和水相溶的质子型有机溶剂或极性非质子型有机溶剂混合,形成球形微粒分散在有机溶剂体系中制得,纳米颗粒尺寸在 35 ~ 125 nm 之间;文献[4]运用生物纳米技术,将蚕丝蛋白质在适当条件下发生自组装形成纳米微球制备,纳米颗粒尺寸在 80 ~ 2 000 nm 之间。这些制备方法都具有将蚕丝蛋白纳米化,增大其应用范围的重要意义。本文采用无机盐或有机无机混合溶剂将丝素蛋白溶解,透析浓缩后再用蛋白酶进行酶解细化制备颗粒均匀的纳米丝素蛋白颗粒,同时测试了此纳米材料的抗菌性能。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

废弃茧壳由西南大学生物技术学院提供。 $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{LiBr}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{NaSCN}$ ,  $\text{NaCl}$ , 苦味酸胭脂红溶液等均为市售,分析纯。透析袋进口分装,标定截留分子量为 14 000。透析袋使用前,按照使用说明在 2% 碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA (pH 值为 8.0) 中煮沸 10 min,并用蒸馏水洗净。 $\alpha$ -糜蛋白酶、抗菌实验用牛肉膏,蛋白胨等,均购自重庆市化学试剂公司。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌由重庆工学院化学与生物工程学院免疫学实验室提供。

### 1.2 测试

FEG-SEM, FEI 公司生产,配备丹麦 HKL 公司的 EBSD 系统和英国牛津仪器公司的 Nova 400 Nano SEM 场发射扫描电子显微镜,用于纳米级蚕丝蛋白肽颗粒形状尺寸的观察,测试在低真空模式下进行。JOEL JSM-6460LV 型扫描电子显微镜(SEM),日本电子生产,用于微米级蚕丝蛋白肽颗粒形状尺寸的观察。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责任公司生产,用于测定蛋白质浓度。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 丝素纤维的制备

使用索氏萃取仪,用乙醚将茧壳进行 48 h 循环萃取,除去其中的蜡质物,用蒸馏水洗涤干燥后再用乙醇煮沸 1 h,除去碳水化合物及灰分,洗净后再在纯水中煮沸以脱去丝胶。用苦味酸胭脂红溶液法检验并确认丝胶已脱净后,将得到的纯净丝素用蒸馏水洗涤干燥备用。

#### 1.3.2 丝素蛋白粉末的制备

配制  $\text{LiBr}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (物质的量比为 1:2:1) 有机

无机混合溶剂,参考文献[5-6]的方法配制质量分数为 60% 的  $\text{ZnCl}_2$  和 60% 的  $\text{NaSCN}$  溶液、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (物质的量比为 1:2:4) 混合溶剂。将 1.3.1 得到的纯净丝素纤维各取 1 g,溶于上面配制的各类溶剂中。经透析、浓缩,50 °C 下真空干燥 24 h。

#### 1.3.3 再生丝素蛋白粉末酶解实验

将装有丝素蛋白水溶液的烧杯放在 80 °C 水浴中加热 5 min,然后用 25% 氨溶液调节 pH 值至 7.5,按照丝素蛋白与  $\alpha$ -糜蛋白酶质量比为 10:1 的比例加入  $\alpha$ -糜蛋白酶,在 37 °C 搅拌水解 1.5 h,将溶液直接放入 -40 °C 冻库中,使酶失活停止反应。经过滤、50 °C 真空干燥,得到酶解后丝素多肽粉末。

丝素蛋白质水溶液的浓度采用双光束紫外可见分光光度计测定。即将丝素蛋白溶液稀释到一定倍数后,在 280 nm 条件下测定其 OD 值,用式(1)计算样品蛋白的质量浓度,mg/mL。

样品蛋白质量浓度 = OD 值 × 稀释倍数 (1)

经测定及定容,本实验所用丝素蛋白肽溶液质量浓度均在 2 ~ 5 mg/mL 范围内。

#### 1.3.4 抗菌实验

使用牛肉膏、蛋白胨、NaCl、水来制作培养基。琼脂粉经溶解灭菌后接种金黄色葡萄球菌,麦康凯琼脂接种大肠杆菌。

将培养好的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌取出,用涂布方式将 2 种细菌分别接种到培养皿,将丝素蛋白肽粉末分别接种培养 18 h,观察细菌生长情况,实验均在无菌操作台上进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶解性能

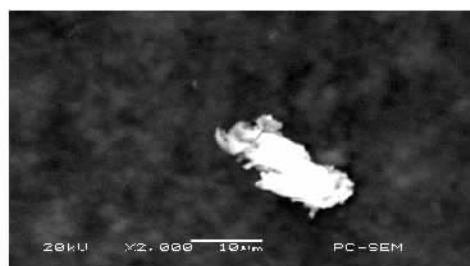
将 1 g 丝素纤维溶解在 100 mL  $\text{LiBr}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  的有机无机混合溶液中,在 60 °C 水浴,以 200 r/min 的转速搅拌,观察到大约 20 min 后丝素可完全溶解,溶解后的溶液呈黏性透明状。同量丝素在质量分数为 60% 的  $\text{ZnCl}_2$  溶液和  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  混合溶液、质量分数为 60% 的  $\text{NaSCN}$  溶液中以相同条件溶解,观察到其在  $\text{ZnCl}_2$  溶液和  $\text{NaSCN}$  溶液中大约用了 1 h 就溶解完毕,溶液略呈黄色。而  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  溶液显示出较差的溶解性,经过 3 h 丝素也未能完全溶解。 $\text{ZnCl}_2$  溶液溶解的丝素溶液在透析时出现白膜,阻碍了  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$  的透析,这可能是  $\text{Zn}^{2+}$  与丝蛋白形成了络合物,因此,  $\text{LiBr}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$

混合溶液和浓厚 NaSCN 溶液显示出对丝素纤维的良好溶解性。

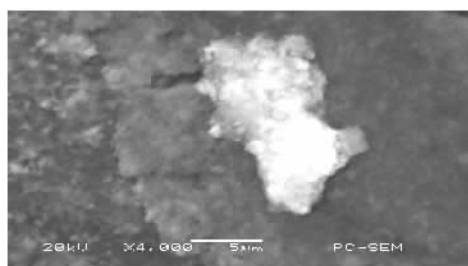
## 2.2 微米级丝素蛋白肽颗粒的形态

图1是在不同溶解条件下得到的丝素蛋白肽的扫描电镜照片。由图可知: LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O混合溶液溶解的丝素蛋白肽呈线粒状,大小约为20 μm,见图1(a); ZnCl<sub>2</sub>、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O混合溶液溶解得到的丝素蛋白肽呈粒状,见图1(b)、(d); NaSCN溶液溶解得到的丝素蛋白肽略呈线段状,见图1(c)。

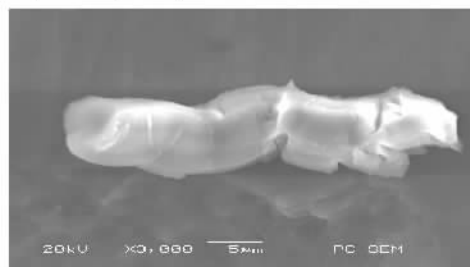
图1(c),大小均在20~50 μm之间。这是由于在溶解丝素时,不同的盐与丝素蛋白中的极性氨基酸残基如酪氨酸作用强度不同,使得肽链断裂的地方有所差别,呈现的链段大小不同。同时,还观察到 LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O混合溶液溶解的线粒状丝素蛋白肽颗粒大小差距相对较小,而 NaSCN 溶液溶解得到的线段状丝素蛋白肽规则度较低。因此,选择 LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O混合溶液溶解得到的丝素蛋白肽来进行酶解实验。



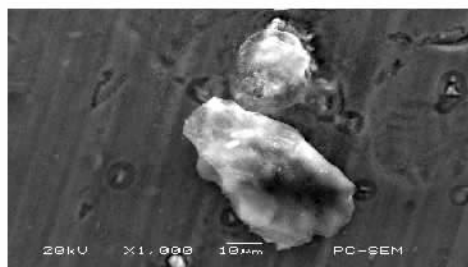
(a) LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O有机无机混合溶液溶解(X2 000)



(b) 60% ZnCl<sub>2</sub> 溶解(X4 000)



(c) 60% NaSCN 溶解(X3 000)



(d) Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O有机无机混合溶液溶解(X1 000)

图1 丝素蛋白肽 SEM 照片

Fig.1 SEM images of SFP particles, dissolving by (a) LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O mixed solvent, (b)60% ZnCl<sub>2</sub> solvent, (c) 60% NaSCN, (d)Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O mixed solvent

## 2.3 酶解后丝素蛋白肽颗粒的形态

图2所示为 LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 有机无机混合溶液溶解丝素蛋白肽经 α-糜蛋白酶酶解后得到丝素蛋白肽片段的 FEG-SEM 照片。由图2可见放大2.4万

倍的 SEM 照片丝素蛋白肽片段呈粒状;但放大10万倍的 SEM 照片可以观察到其颗粒是由80~300 nm 的纳米级小颗粒组成,即经过 α-糜蛋白酶处理后,丝素蛋白肽片段达到了纳米级。



(a) X24 000



(b) X100 000

图2 纳米蛋白肽颗粒的 FEG-SEM 照片

Fig.2 FEG-SEM images of SFP nano-scale particles

对丝素蛋白氨基酸组成的研究已有较长历史,到现在为止得到公认的丝素蛋白的分子量为3万~30万(由于取样方法、手段不同,结果相差极大),其氨基酸组成:甘氨酸约占44%、丙氨酸29%,丝氨酸12%,酪氨酸5%,其他约占10%<sup>[7]</sup>。本文采用LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O混合溶液溶解丝素蛋白,其机制为:丝素蛋白是按照(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)的顺序排列,以 $\beta$ -折叠形式堆积而成的多片层结构。 $\beta$ -折叠的形成是依靠不同肽链之间的氢键作用,而片层之间则是依靠范德华力的作用。一般条件下丝素蛋白纤维的肽链处于冻结状态,当浸入LiBr、CH<sub>3</sub>OH、H<sub>2</sub>O分子时,数量众多的强极性离子产生较强的水化作用,使丝素蛋白分子表面吸附大量的水,水是增塑剂,显著加强了多肽链的运动,削弱了分子链间的范德华力,从而使其逐步溶解,相当于将丝素蛋白无规则切断。这个过程得到的蛋白质,采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定得到丝素蛋白肽的分子量约为

26 kDa。对此片段用 $\alpha$ -糜蛋白酶进行酶解,由于 $\alpha$ -糜蛋白酶主要对酪氨酸起到切断作用<sup>[8]</sup>,酪氨酸在丝素蛋白大分子链段上的含量约为5%,从而得到大小均匀的丝素肽段。

## 2.4 丝素蛋白肽颗粒的抗菌性

表1所示为丝素蛋白肽颗粒对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌实验结果。表中所述的微米级丝素颗粒为LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O混合溶液溶解制备的丝素蛋白肽,纳米级丝素颗粒经 $\alpha$ -糜蛋白酶酶解后得到,其用量均为0.05 g。对1#、2#、3#培养皿中呈现的抑菌圈的面积进行测定,结果如表1所示。可以看出,丝素蛋白肽对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌都有一定的抗菌效果,而酶解后的纳米级丝素蛋白肽颗粒的抑菌效果略强于酶解前微米级丝素蛋白肽颗粒。丝蛋白具备抗菌性,可能是由于其具有微调节周围环境的功能,从而抑制了细菌繁殖条件所致<sup>[9]</sup>,颗粒越小,其微调节功能就越强。

表1 丝素蛋白肽颗粒抗菌性实验结果

Tab.1 Antibacterial activities of SFP particles and SFP nano-scale particles

颗粒	质量/g	金黄色葡萄球菌抑菌圈面积/cm <sup>2</sup>			大肠杆菌抑菌圈面积/cm <sup>2</sup>		
		1#	2#	3#	1#	2#	3#
微米级丝素颗粒	0.05	12.09	10.12	9.85	6.04	5.09	4.52
纳米级丝素颗粒	0.05	16.32	15.10	15.06	7.15	7.86	6.88

## 3 结 论

1) LiBr/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 有机无机混合液显示了对丝素纤维蛋白良好的溶解性能,在溶解过程中将丝素蛋白切断成20~30  $\mu$ m大小的线粒状物质。

2) 采用特定溶剂溶解丝素蛋白,透析浓缩后用 $\alpha$ -糜蛋白酶酶解的工艺可制备颗粒较均匀的纳米级丝素蛋白肽颗粒。

3) 微米级和纳米级丝素蛋白肽颗粒均具有抗金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的效果,纳米级丝素蛋白肽颗粒显示出更为优越的抗菌性,说明丝素蛋白肽颗粒越小,抗菌效果越好。

FZXB

### 参考文献:

[1] 盛伟华,谢宇锋,缪竟诚,等. 蚕丝蛋白材料对鼠胚表皮细胞毒性的实验研究[J]. 苏州大学学报:医学版, 2005, 25(4): 551-554.  
[2] 沈家骢. 纳米生物医用材料[J]. 中国医学科学院学

报, 2006, 28(4): 472-474.

[3] 张雨青. 丝素纳米颗粒的制造方法: 中国, 200410014228.2[P]. 2006-02-22.  
[4] 邵正中,曹正兵,陈新. 蚕丝蛋白纳米微球及其制备方法: 中国, 200410016856.4[P]. 2005-01-05.  
[5] 宗绪岩,王世富,李丽. pH及阳离子浓度对柞蚕蛹蛋白溶解性的研究[J]. 蚕业科学, 2005, 31(4): 494-496.  
[6] Sung WonHa, Samuel M, Hudson. The dissolution of bombyx mori silk fibroin in the calcium nitrate tetrahydrate-methanol system and aspects of wet spinning of the fibroin solution[C]//Shirai Hirofusa. 2<sup>nd</sup> International Conference on Advanced Fiber/Textile Materials 2002 in Ueda. Ueda: Advanced Fiber Center of Shinshu University: 2002: 33-44.  
[7] 志村宪助,片方阳太郎. フィブロインの化学構造[M]//北条舒正,白井汪芳. 続絹糸の構造. 日本: 信州大学出版, 1980: 335-340.  
[8] 夏其昌,曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 31-33.  
[9] 杨明英,朱良均,闵思佳. 丝绸服饰对人体保健功能的研究概况[J]. 纺织学报, 2000, 21(4): 65-66.