

丝素蛋白包裹的银纳米粒子稳定性及抗菌性研究

李 振 刘素美 贾 兰* 陈 松 朱晶心

(太原理工大学材料学院,太原 030024)

摘 要 丝素蛋白(SF)是从蚕丝中提取的一种具有嵌段结构的高相对分子质量蛋白,生物相容性良好,可用于稳定银纳米粒子(Ag NPs)。以硝酸银、硼氢化钠为原料,SF 为稳定剂制备了丝素蛋白包裹的银纳米粒子(SF-Ag NPs),以柠檬酸钠、牛血清蛋白(BSA)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为稳定剂分别制备了不同的 Ag NPs 样品作为对照,通过紫外-可见分光光度计研究了 SF-Ag NPs 在不同 pH 溶液及不同浓度盐离子体系中的稳定性。结果表明:SF-Ag NPs 在 pH=3~11 以及不同浓度盐离子(NaCl 50~400mmol/L,CaCl₂ 12.5~100mmol/L)中稳定性良好。稳定机理研究表明,空间位阻效应以及 SF 中氮原子与 Ag NPs 的结合力使得 SF 具有良好的稳定作用。抗菌测试结果表明 SF-Ag NPs 具有良好的抗菌性。

关键词 银纳米粒子,稳定性,丝素蛋白,抗菌性

Stability and antibacterial activity of silk fibroin-capped silver nanoparticle

Li Zhen Liu Sumei Jia Lan Chen Song Zhu Jingxin

(College of Materials Science and Engineering,Taiyuan University of Technology,Taiyuan 030024)

Abstract Protein silk fibroin (SF), which belongs to a class of unique, biocompatible, block copolymer-like proteins, was investigated for the stabilization of Ag NPs in an aqueous dispersion. Three representative stabilizers, including sodium citrate, bovine serum albumin (BSA) and polyvinyl pyrrolidone (PVP), were utilized as control. The effects of pH value, salt type and concentration on the stability of SF capped Ag NPs (SF-Ag NPs) for against aggregation was confirmed over a wide pH value ranged from 3 to 11 and different salt ion (NaCl 50~400mmol/L, CaCl₂ 12.5~100mmol/L) concentration through UV-Vis spectroscopy. The stabilization effect of SF may be attributed to the steric effect and the nitrogen atoms of SF. Moreover, SF-Ag NPs maintained high antibacterial activity. Thus, SF-Ag NPs can be potentially used in biomedical applications.

Key words silver nanoparticle, stability, silk fibroin, antibacterial activity

银纳米粒子(Ag NPs)优异的光电子效应、电子效应和催化性能使得其广泛应用于传感器制备^[1]、纳米光子学^[2]、催化^[3-4]及表面增强拉曼散射^[5-6]等领域。此外,Ag NPs 还具有良好的抗菌性能,即使使用量很小也能在生物产品和抗菌制品中起到良好的抗菌作用^[7-8]。一般通过还原硝酸银(AgNO₃)制备 Ag NPs,并利用稳定剂保持其稳定性^[9]。常用的稳定剂包括有机药品(柠檬酸钠^[10]、油酸、多糖^[11]等)、表面活性剂[十二烷基硫酸钠(SDS)^[12]、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)^[13]等]以及葡聚糖^[14]、聚乙烯醇(PVA)^[15]、聚乙二醇(PEG)^[16]、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)^[17]等聚合物,但大部分稳定剂属于有毒或低毒物质。随着 Ag NPs 作为抗菌剂在医药行

业越来越受青睐,对其生物相容性的要求也越来越高,因此制备稳定性和生物相容性良好的 Ag NPs 成为研究热点。

丝素蛋白(SF)是一种从天然蚕丝中提取、具有高相对分子质量和嵌段结构的蛋白^[18]。作为天然蛋白,SF 具有无毒、易获取、生物相容性好和可降解等优点,广泛应用于生物材料和医药领域。

本研究以 AgNO₃、硼氢化钠(NaBH₄)为原料,SF 为稳定剂制备了丝素蛋白包裹的银纳米粒子(SF-Ag NPs)。以柠檬酸钠、牛血清蛋白(BSA)和 PVP 为稳定剂分别制备了不同的 Ag NPs 样品作为实验对照,评价了 SF 对 Ag NPs 的稳定作用并研究了稳定机理;考察了 SF-Ag NPs 在不同 pH 缓冲

基金项目:国家自然科学基金(青年基金)(51303124)

作者简介:李振(1991-),男,硕士研究生,从事丝素蛋白自组装研究。

联系人:贾兰(1985-),女,副教授,硕士生导师,从事生物检测研究工作。

液以及不同盐离子中的稳定性。同时,以大肠杆菌为实验菌种,利用抑菌环法测试了 SF-Ag NPs 的抗菌性能。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

AgNO₃、NaBH₄、BSA,生工生物工程(上海)股份有限公司;PVP360、PVA、柠檬酸钠、无机盐,国药集团(上海)化学有限公司;所有试剂均为分析纯,所有溶液均用超纯水配制。

超纯水制备机(XYA2-50-H型),北京湘顺源科技有限公司;pH计(pHS-30型),上海精密科学仪器有限公司;紫外-可见分光光度计(UV-Vis, UV-8000s型),上海元析仪器有限公司。

1.2 SF-Ag NPs 的制备

SF 溶液的制备方法见参考文献[19]。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测试得到 SF 相对分子质量为 25~86kDa。SF-Ag NPs 的制备方法如下:将 30mL 浓度为 2mmol/L 的 NaBH₄ 溶液置于冰水浴中,搅拌的同时向溶液中逐滴加入 10mL 浓度为 1mmol/L 的 AgNO₃ 溶液,反应完全后溶液变成鲜亮的黄色,随后加入 60mg SF 溶液,搅拌 24h 得到 SF-Ag NPs。以柠檬酸钠、BSA 和 PVP 为稳定剂,采用同样方法制备的样品分别记作 cit-Ag NPs、BSA-Ag NPs、PVP-Ag NPs。

1.3 分析测试

采用 UV-8000s 型紫外-可见分光光度计对样品进行测试,扫描范围 300~550nm。

1.4 稳定性测试

为研究 Ag NPs 在不同 pH 缓冲液中的稳定性,配制 pH 不同的三羟甲基氨基甲烷-2-(N-吗啡啉)乙磺酸(Tris-MES)缓冲液(浓度 20mmol/L),将用不同稳定剂包覆的 Ag NPs 溶液与 Tris-MES 缓冲液等体积混合,室温放置 2h。通过 UV-Vis 测定 Ag NPs 的稳定性。

为研究不同种类盐离子及盐离子浓度对 Ag NPs 稳定性的影响,将含有不同浓度 NaCl, CaCl₂ 的 Tris-MES 缓冲液(浓度 20mmol/L, pH=7)分别与用不同稳定剂包覆的 Ag NPs 溶液等体积混合,室温放置 2h。通过 UV-Vis 测定 Ag NPs 的稳定性。

1.5 抗菌性实验

以大肠杆菌为实验菌种,将大肠杆菌在营养液培养基中于 37℃ 培养 12h,然后稀释到 $(1\sim5)\times10^7$ 个/mL。把质量浓度均为 25μg/mL 的 Ag NPs 溶液和 SF-Ag NPs 溶液(2 种溶液均为 40μL)分别滴到直径为 8mm 的尼龙膜上,在室温下晾干。把晾干的尼龙膜放置在含有 100μL 大肠杆菌的培养基中,于 37℃ 培养 24h,利用抑菌环法测试 SF-Ag NPs 和 Ag NPs 的抗菌性^[20]。

2 结果与讨论

2.1 UV-Vis 分析

Ag NPs 的表面等离子共振对粒子间距比较敏感,分散性良好的 Ag NPs 溶液为黄色,最大吸收峰在 400nm 附近,且峰型较窄。粒子聚集后紫外光谱最大吸收峰峰位红移,峰型变宽,溶液变色。所以 UV-Vis 可用来表征 Ag NPs 的稳定性。应用于生物领域的 Ag NPs 要有一定的耐盐和耐 pH 稳定性。为研究 SF 的稳定效果,实验中使用柠檬酸钠、BSA 和 PVP 这 3 种常用的稳定剂作为参照。柠檬酸钠是最为常见的金属纳米粒子稳定剂,BSA 具有与 SF 接近的等电点(pI=4.7)^[21],PVP 具有高极性特征和能接受氢键的酰胺基团,同时又存在非极性基团,是一种良好的分散稳定剂。研究表明从生物学观点来看,PVP 结构与 SF 相似,是优质的 Ag NPs 稳定剂^[22]。

图 1 为用不同稳定剂包裹的 Ag NPs 样品的 UV-Vis 谱图。从图可以看出:未调节 pH 时,cit-Ag NPs 和 PVP-Ag NPs 的最大吸收波长均为 396nm;BSA-Ag NPs 和 SF-Ag NPs 的最大吸收波长分别为 400nm 和 403nm。用 4 种稳定剂包裹的 Ag NPs 样品最大吸收峰均在 400nm 左右,且峰型较窄,说明用不同稳定剂包裹的 Ag NPs 在初始条件下均分散良好。

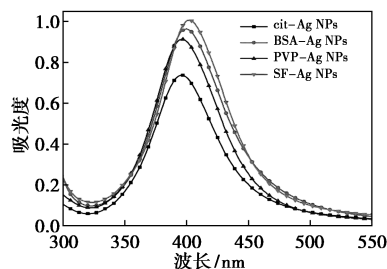


图 1 用不同稳定剂包裹的 Ag NPs 样品的 UV-Vis 谱图

2.2 溶液 pH 对样品吸光度的影响

利用 Tris-MES 缓冲液调节 4 种 Ag NPs 溶液的 pH, 将 pH 控制在 3~11。在溶液 pH 不同条件下, Ag NPs 样品的最大吸光度变化趋势见图 2。由图可知: pH 小于 7 时, cit-Ag NPs 在 396nm 处的吸光度明显下降, 实验过程中可以观察到溶液颜色从黄色变为橘红色或无色, 这意味着 Ag NPs 发生了聚集。在 pH = 3~6 范围内, 与碱性条件相比, BSA-Ag NPs 最大吸光度明显降低, 表现出与 cit-Ag NPs 相似的变化趋势; 此外, UV-Vis 谱图显示其最大吸收峰位发生红移, 表明 BSA-Ag NPs 在酸性条件下不稳定。在 pH = 3~11 范围内, SF-Ag NPs 和 PVP-Ag NPs 表现较稳定, 没有出现吸光度明显下降和最大吸收峰位的移动, 而且溶液颜色几乎未发生改变。根据文献报道^[23-24], cit-Ag NPs 与 BSA-Ag NPs 都是通过静电排斥实现稳定, 因此酸性条件下稳定剂表面的负电荷减少导致 Ag NPs 不稳定^[25]。PVP-Ag NPs 主要通过空间位阻实现稳定。SF 是具有嵌段结构的高相对分子质量蛋白, 等电点为 5 左右, 既具有空间位阻效应, 又具有静电作用, 从实验结果来看, 空间位阻对 pH 稳定性的贡献要大于静电效应。

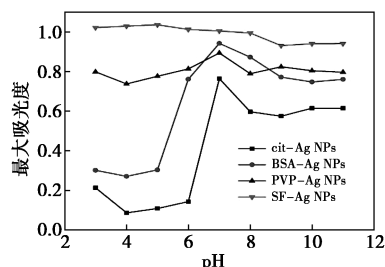


图 2 pH 不同条件下 Ag NPs 样品最大吸光度变化趋势

2.3 盐离子浓度对样品吸光度的影响

研究盐离子浓度影响时, 固定溶液 pH = 7, 将盐离子浓度为 0mmol/L 时每种 Ag NPs 溶液的最大吸光度定义为 100%。在 NaCl 和 CaCl₂ 浓度不同条件下, 将 Ag NPs 溶液的最大吸光度与盐离子浓度为 0mmol/L 时的最大吸光度进行比较, 通过计算得到最大吸光度百分比。4 种 Ag NPs 样品的最大吸光度百分比变化趋势见图 3。由图 3(a)可以看出: 随着 NaCl 浓度的增加, cit-Ag NPs 的最大吸光度降低; NaCl 浓度为 50mmol/L 和 100mmol/L 时, 其最大吸光度分别降到 75% 和 42%。当 NaCl 浓度超过 100mmol/L 时, 实验过程中发现溶液变

为无色且有沉淀产生, 说明 cit-Ag NPs 发生团聚。相比之下, BSA-Ag NPs、PVP-Ag NPs 和 SF-Ag NPs 溶液中加入不同浓度 NaCl 时, 其最大吸光度基本没有变化。

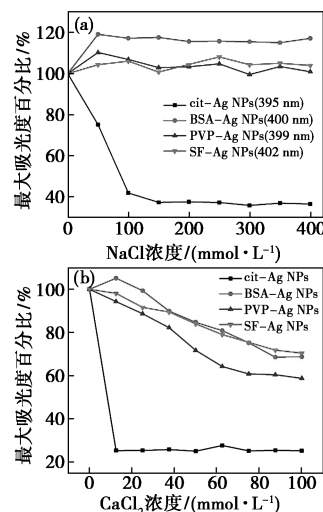


图 3 NaCl 和 CaCl₂ 浓度不同时 4 种 Ag NPs 样品的最大吸光度百分比变化趋势
[(a) NaCl; (b) CaCl₂]

为保证盐离子强度一致, 将 CaCl₂ 浓度控制在 12.5~100mmol/L。从图 3(b)可以看出: CaCl₂ 浓度为 12.5mmol/L 时, cit-Ag NPs 最大吸光度降到 80%, 而其他 3 种 Ag NPs 样品保持较好的稳定性。随着 CaCl₂ 浓度的增加, SF-Ag NPs、BSA-Ag NPs、PVP-Ag NPs 的最大吸光度逐渐降低, 其中 PVP-Ag NPs 下降比例更大。CaCl₂ 浓度为 100mmol/L 时, SF-Ag NPs 和 BSA-Ag NPs 的最大吸光度下降 30% 左右, 而 PVP-Ag NPs 下降 40%。

2.4 SF-Ag NPs 稳定机理研究

从盐离子稳定性来看, BSA 也具有非常优良的稳定作用。BSA 是一种大分子蛋白, 相比柠檬酸钠而言, 其空间位阻效应更强, 因此空间位阻在盐离子稳定性中起着重要的作用。为进一步分析稳定机理, 用长链不带电的聚合物 PVA 包裹 Ag NPs (PVA-Ag NPs) 作为实验对照。在 pH 及 CaCl₂ 浓度不同的条件下, PVA-Ag NPs 的 UV-Vis 谱图见图 4。由图 4(a)可以看出: pH 不同时, PVA-Ag NPs 的吸光度基本保持不变, 溶液呈淡黄色, 说明 Ag NPs 稳定存在没有发生聚集。由图 4(b)可知: 随着 CaCl₂ 浓度的升高, PVA-Ag NPs 吸光度逐渐下降; CaCl₂ 浓度为 100mmol/L 时, 最大吸光度下降约 70%, 同时溶液逐渐变为灰色, Ag NPs 发生聚

集。此外,还测试了 PVA-Ag NPs 在 NaCl 中的稳定性。实验过程中发现:随着 NaCl 浓度的升高,最大吸光度逐渐下降;当 NaCl 浓度为 400mmol/L 时,NaCl 最大吸光度下降 35%。结果表明:尽管 pH 不同,但 PVA-Ag NPs 稳定性良好;但在盐离子溶液中其却不能稳定存在。这与实验的预期目标不同,因此单纯的空间位阻并不能解释稳定机理。

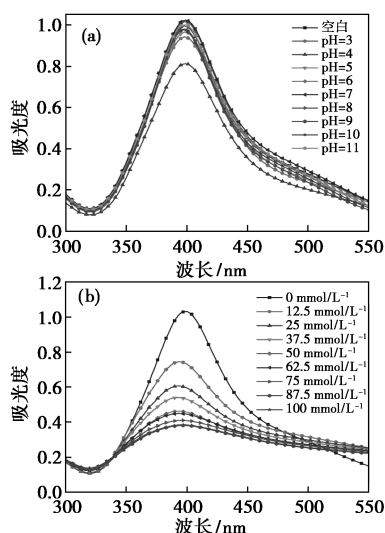


图4 pH 及 CaCl_2 浓度不同条件下 PVA-Ag NPs 的 UV-Vis 谱图
[(a)pH;(b) CaCl_2 浓度]

根据文献报道^[26],稳定剂中不同的原子与 Ag NPs 表面的结合力在稳定纳米粒子过程中发挥了重要的作用。例如,PVP 中的氮原子与 Ag NPs 结合力比 PVA 或 PEG 中的氧原子与 Ag NPs 结合力更强。SF 和 PVP 中同时包含了与 Ag NPs 表面结合力作用较强的氮原子和较弱的氧原子,因而在稳定 Ag NPs 过程中起作用的可能不仅仅是 SF 长链的空间位阻作用,同时原子间的结合力也发挥了重要作用。SF-Ag NPs 的稳定机理如图 5 所示。

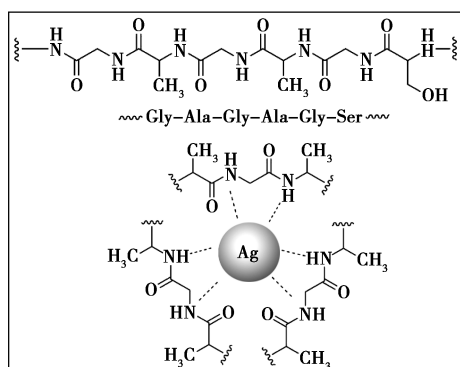


图5 SF-Ag NPs 的稳定机理

2.5 抗菌性能研究

利用抑菌环法测试了 Ag NPs 和 SF-Ag NPs 对大肠杆菌的抗菌性能,测试结果见图 6。由图可以看出:SF 没有表现出抗菌性,Ag NPs 和 SF-Ag NPs 均表现出较好的抗菌性,抑菌环直径分别为 10mm 和 11mm。SF-Ag NPs 具有良好的抗菌性,原因可能是 SF 赋予了 Ag NPs 良好的稳定性。

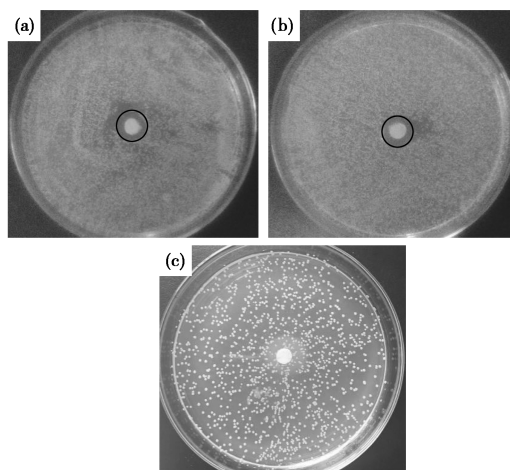


图6 Ag NPs(a)、SF-Ag NPs(b)和 SF(c)的抗菌效果

3 结论

(1)通过 SF 的修饰,成功制备了稳定性良好且具有抗菌性能的 SF-Ag NPs。

(2)SF-Ag NPs 在 pH 不同的溶液和不同的盐离子体系中稳定性良好,同时 SF 的修饰并没有影响 Ag NPs 的抗菌性。

(3)SF-Ag NPs 具有良好的稳定性,主要是因为 SF 的空间位阻作用和 SF 中氮原子与 Ag NPs 的结合作用;SF-Ag NPs 抑菌环直径达 11mm,具有很强的抗菌性能。

(4)利用 SF 作为 Ag NPs 稳定剂是简单高效、经济的方法,SF-Ag NPs 在生物医药领域应用前景广阔。

参考文献

- [1] 王春霞,李英琳,徐磊.PVP 保护下纳米银颗粒的液相化学还原法制备及表征[J].贵金属,2014(4):30-34.
- [2] Chen D, Qiao X, Qiu X, et al. Synthesis and electrical properties of uniform silver nanoparticles for electronic applications [J]. Journal of Materials Science, 2009, 44(4): 1076-1081.
- [3] Xu R, Wang D, Zhang J, et al. Shape-dependent catalytic activity of silver nanoparticles for the oxidation of styrene [J]. Chemistry-an Asian Journal, 2006, 1(6): 888-893.

- [4] Jiang Z J, Liu C Y, Sun L W, et al. Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres[J]. *Journal of Physical Chemistry*, 2005, 5(109): 1730-1735.
- [5] Liang H, Li Z, Wang W, et al. Highly surface-roughened “Flower-like” silver nanoparticles for extremely sensitive substrates of surface-enhanced Raman scattering[J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(45): 4614-4618.
- [6] Canamares M V, Gaarcia-Ramos J V, Gomez-Varga J D, et al. Comparative study of the morphology aggregation adherence to glass, and surface enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticle prepared by chemical reduction of Ag^+ using citrate and hydroxylamine[J]. *Langmuir*, 2005, 18(21): 8546-8553.
- [7] Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(1): 76-83.
- [8] Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles[J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(10): 2346-2353.
- [9] Levard C, Hotze E M, Lowry G V, et al. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(13): 6900-6914.
- [10] Huynh K A, Chen K L. Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions[J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(13): 5564-5571.
- [11] Park Y, Hong Y N, Weyers A, et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles[J]. *Let Nanobiotechnology*, 2011, 5(3): 69-78.
- [12] Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs)[J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112(15): 5825-5834.
- [13] Al-Thabaiti S A, Al-Nowaiser F M, Obaid A Y, et al. Formation and characterization of surfactant stabilized silver nanoparticles: a kinetic study[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 67(2): 230-237.
- [14] Bankura K P, Maity D, Mollick M M, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(4): 1159-1165.
- [15] Filippo E, Serra A, Manno D. Poly(vinyl alcohol) capped silver nanoparticles as localized surface plasmon resonance-based hydrogen peroxide sensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 138(2): 625-630.
- [16] Shameli K, Ahmad M B, Jazayeri S D, et al. Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6639-6650.
- [17] Zhang H, Smith J A, Oyanedel-Craver V. The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers[J]. *Water Res*, 2012, 46(3): 691-699.
- [18] Kim U J, Park J, Kim H J, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2775-2785.
- [19] Zhu J, Zhang Y, Shao H, et al. Electrospinning and rheology of regenerated Bombyx mori silk fibroin aqueous solutions: the effects of pH and concentration[J]. *Polymer*, 2008, 49(12): 2880-2885.
- [20] Guo R, Yin G, Sha X, et al. The significant adhesion enhancement of Ag-polytetrafluoroethylene antibacterial coatings by using of molecular bridge[J]. *Applied Surface Science*, 2015, 341: 13-18.
- [21] 武海, 彭丽, 都浩来, 等. 基于蛋白构象变化研究 pH 值对茜素红与牛血清白蛋白相互作用的影响[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(4): 475-478.
- [22] 王志栋, 徐自力, 杨英歌, 等. 利用水溶性聚合物 PVP 作稳定剂合成 CdS、CdSe 半导体纳米晶体[J]. *材料导报*, 2006(S2): 53-57.
- [23] 杜虹, 赵淑贤, 董磊. 光诱导合成三角板银纳米粒子的研究[J]. *山西大学学报: 自然科学版*, 2011, 34(4): 633-637.
- [24] 梁真飞, 王欢, 刘顺鹏, 等. Ag 纳米粒子表面 BSA 隔离层对聚苯乙烯荧光的增强效应[J]. *功能材料*, 2015, 46(21): 21031-21035.
- [25] 沈星灿, 袁琦, 梁宏, 等. 血清白蛋白与银纳米粒子相互作用的滞后效应[J]. *中国科学(B 辑 化学)*, 2003, 33(2): 176-184.
- [26] 姚宝慧, 徐国财, 张宏艳, 等. PVP 催化还原及稳定化纳米银的微波合成[J]. *无机化学学报*, 2010, 26(9): 1629-1632.

收稿日期: 2018-01-10

修稿日期: 2019-01-10

欢迎登陆《化工新材料》投稿系统, www.hgxx.org