

## 纳米/微米—水草酸钙、二水草酸钙对牛血清白蛋白的吸附性能

温小玲 欧阳健明\*

(暨南大学生物矿化与结石病防治研究所;暨南大学化学系,广州 510632)

**摘要:** 研究了牛血清白蛋白(BSA)在尺寸分别为 100 nm、3  $\mu\text{m}$  的一水草酸钙(COM)和二水草酸钙(COD)晶体上的吸附等温线及晶体  $\zeta$  电位随 BSA 浓度( $c_{\text{BSA}}$ )的变化。结果表明,4 种晶体对 BSA 的最大吸附量顺序为 COD-100 nm>COM-100 nm $\geq$ COD-3  $\mu\text{m}$ >COM-3  $\mu\text{m}$ ,即吸附量与晶体的比表面积成正相关。而比表面积归一化后,吸附量顺序为 COD-3  $\mu\text{m}$ >COM-3  $\mu\text{m}$ >COM-100 nm>COD-100 nm,说明 COM 和 COD 晶体的结晶水数量和晶面电荷密度影响了 BSA 的吸附。吸附等温线都很好地拟合了 Langmuir 模型,表明 BSA 在纳米/微米 COM、COD 晶体上的吸附属于单分子层吸附。COM 和 COD 等电点大小顺序为 COM-100 nm(7.2)>COD-100 nm(6.7) $\geq$ COM-3  $\mu\text{m}$ (4.7)>COD-3  $\mu\text{m}$ (4.3),因此在病理生理条件下( $\text{pH}\approx 6.3$ )纳米级晶体的团聚比微米级晶体的更严重。纳米级和微米级晶体对 BSA 的最大吸附量都在 BSA 等电点附近( $\text{pH}=4.8$ )。BSA 在纳米/微米 COM 和 COD 晶体上的吸附与晶体的比表面积、晶面电荷、团聚、结晶水数量和 pH 值有关。本文结果有助于阐明尿液中不同性质微晶与尿蛋白质对草酸钙结石形成的影响。

**关键词:** 纳米;微米;草酸钙;牛血清白蛋白;吸附等温线;等电点;pH 值

中图分类号: O614.23<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2016)01-0103-08

DOI: 10.11862/CJIC.2016.011

## Adsorption Properties of Bovine Serum Albumin on Micron/Nano Calcium Oxalate Monohydrate and Dihydrate Crystals

WEN Xiao-Ling OUYANG Jian-Ming\*

(Institute of Biom mineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The adsorption isotherms of bovine serum albumin (BSA) on calcium oxalate monohydrate (COM) and calcium oxalate dehydrate (COD) crystals with a size of 100 nm and 3  $\mu\text{m}$  were detected, and Zeta potential of the crystals after adsorption of various concentration of BSA was measured. Adsorption quality change of BSA at different pH value were also measured. Results showed that the adsorption quality of BSA were positively related to the specific surface area of crystals, that was, following the order: COD-100nm>COM-100 nm $\geq$ COD-3  $\mu\text{m}$ >COM-3  $\mu\text{m}$ . However, after surface area normalization, the adsorption order was COD-3  $\mu\text{m}$ >COM-3  $\mu\text{m}$ >COM-100 nm>COD-100 nm. It indicated that the crystal water and charge density on crystal surface of COM and COD also affected BSA adsorption. These adsorption isotherms were fitted better with Langmuir model, indicating a monolayer adsorption of BSA on micron/nano COD and COM surface. The isoelectric point of the four crystals followed an order: COM-100 nm (7.2)>COD-100 nm (6.7) $\geq$ COM-3  $\mu\text{m}$  (4.7)>COD-3  $\mu\text{m}$  (4.3), which indicated more serious aggregation of nanocrystals under pathophysiological conditions ( $\text{pH}\approx 6.3$ ). The maximum BSA adsorption occurred at around isoelectric point of BSA ( $\text{pH}=4.8$ ). The adsorption of BSA on micron/nano COM is related to the specific surface area of crystals, its surface charge, crystal aggregation, crystal water number, and the pH value of system.

收稿日期:2015-08-10。收修改稿日期:2015-09-27。

国家自然科学基金(No.21371077)资助项目。

\*通信联系人。E-mail: toyjm@jnu.edu.cn

These results can help to clarify the effect of various urine microcrystalline and urine proteins on the formation of  $\text{CaO}_x$  stones.

**Keywords:** nano; micron; calcium oxalate; bovine serum albumin; adsorption isotherms; isoelectric point; pH value

## 0 前言

尿液中存在许多结石抑制因子,如蛋白质和葡胺聚糖等,这些物质可以吸附到草酸钙晶体表面,封闭晶体表面的生长、聚集位点,从而发挥其抑制作用。白蛋白是尿液中最丰富的蛋白之一,能降低草酸钙的饱和程度,抑制大尺寸晶体形成和聚集;同时,白蛋白能够促进二水草酸钙(COD)晶体形成,并抑制一水草酸钙(COM)的生长,这有利于抑制  $\text{CaO}_x$  结石的形成<sup>[1]</sup>。Liu 等<sup>[2]</sup>发现牛血清白蛋白不仅能促进 COD 的形成,还能抑制 COM 的成核。白蛋白还可以通过吸附到 COM 表面螺旋位错的台阶,从而抑制晶体的生长<sup>[3]</sup>。Grohe 等<sup>[4]</sup>发现带负电的弱亲水白蛋白可以吸附到尿微晶上,并通过静电斥力抑制尿微晶的团聚和吸附到肾上皮细胞,这种情况使得晶体更容易被冲出肾小管。可见白蛋白对抑制尿结石的形成有很重要的作用。

之前的报道注重研究白蛋白对草酸钙晶体聚集、成核和生长的影响以及蛋白对草酸钙晶体不同晶面的选择性吸附差异。例如, Farmanesh 等<sup>[5]</sup>通过荧光标记硫酸软骨素、白蛋白和转铁蛋白,发现这些大分子结合在 COM 的不同的结晶面,导致晶体的形态改变。Grohe 等<sup>[5]</sup>利用共聚焦显微镜研究了磷酸化多肽与 COM 晶体的吸附,发现荧光主要出现在 COM 的(100)晶面,说明这些多肽优先吸附在 COM 的(100)晶面。Taller 等<sup>[6]</sup>将骨桥蛋白(OPN)先用荧光染料标记,再用激光扫描共聚焦显微镜研究这些 OPN 对 COM 的特异性吸附,发现 OPN 主要吸附在(100)和(121)晶面的边缘,原因之一是这些边缘的吸附位点有较高表面能。

虽然这些文献报道了尿液蛋白对草酸钙晶体形貌、晶相的影响以及对晶面的选择性吸附,但尿液中的蛋白质在不同尺寸、不同晶相的草酸钙晶体的吸附性质的差异至今未有研究。我们前期的研究表明尿液中存在纳米和微米尺寸的 COM 和 COD 晶体<sup>[7-9]</sup>,这些尺寸和晶相不同的草酸钙晶体具有不同的比表面积、不同的  $\zeta$  电位和不同的聚集状态。基于此,本文研究了尿蛋白在纳米、微米 COM 和 COD 晶

体上的吸附差异,研究了这些晶体的性质(如晶体尺寸、聚集程度、 $\zeta$  电位、比表面积、晶相等)对蛋白吸附的影响,这有助于阐明尿液中存在的蛋白质和尿微晶性质差异对草酸钙结石形成的影响。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

PBS 磷酸盐缓冲溶液(北京索莱宝科技有限公司),牛血清白蛋白(BSA, Roche, Shanghai, China)。

Varian Cary 500 型紫外可见分光光度计(美国 Varian 公司)。Zetasizer Nano-ZS 型纳米粒度仪-Zeta 电位分析仪(英国 Malvern 公司)。数字酸度计(PHS-3C, 郑州宝晶电子科技有限公司)。

### 1.2 纳米/微米 COM、COD 晶体的合成方法

参照前文<sup>[10]</sup>合成尺寸分别约为 100 nm 和 3  $\mu\text{m}$  的 COM、COD 晶体,并分别用 COM-100nm、COD-100nm、COM-3 $\mu\text{m}$ 、COD-3 $\mu\text{m}$  表示。XRD 和 FTIR 表明合成的晶体为纯的目标产物。各晶体的比表面( $S_{\text{BET}}$ )和孔容通过全自动比表面积及孔隙度分析仪(Tristar 3000, Micromeritics, USA)得到。以 He 作为载气,  $\text{N}_2$  为被吸附气体。仪器对记录数据分别采用 BET 方程(Brunauer-Emmett-Teller)和 BJH (Barrett-Joyner-Halenda)方法处理,得到晶体的比表面积和孔容值。

### 1.3 $\zeta$ 电位测定方法

参照文献<sup>[11]</sup>的方法测量不同 pH 值下 BSA 和草酸钙的  $\zeta$  电位,通过不同 pH 值下的  $\zeta$  电位得到晶体和 BSA 的等电点。

(1) 取 12 个小烧杯,分别加入 50 mg COM 或 COD 晶体,加入 20 mL 的蒸馏水溶解,用 10  $\mu\text{L}$  微量注射器滴加浓度为  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 或 NaOH 调节 pH 值分别至 3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 和 9,摇匀后,取约 1 mL 悬浮液加入电位池中,测量对应的  $\zeta$  电位;

(2) 同上面方法,将晶体替换为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA 溶液,测量不同 pH 值下 BSA 的  $\zeta$  电位。

$\zeta$  电位的测量是通过测定体系的电泳迁移率,运用 Smoluchowski 方程计算出  $\zeta$  电位,

Smoluchowski 方程如下:  $\zeta = \frac{U_E \eta}{\varepsilon}$ , 其中  $U_E$  是电泳迁移率,  $\varepsilon$  是介电常数,  $\eta$  是粘度。

#### 1.4 BSA 标准曲线测定

准确称取 100 mg BSA 固体, 用 PBS 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.3±0.1)定容至 100 mL, 配置成浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 BSA 标准溶液。于 10 mL 具塞管中加入不同体积的  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  标准 BSA 溶液, 用 PBS 定容至 10 mL。以 PBS 溶液为参比, 采用分光光度计于 280 nm 处测定蛋白质溶液的吸光值( $A$ )。以浓度为横坐标,  $A$  为纵坐标, 获得 BSA 浓度标准曲线, 其线性方程为:  $y=0.7171x-0.0021$ ;  $R^2=0.9992$ 。

#### 1.5 BSA 吸附试验方法

准确称取不同质量的 BSA 固体, 用 PBS 定容至 100 mL, 配置成浓度( $C_0$ )分别为 0、2、4、6、8、10、12、15、20、25  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 BSA 标准溶液。分别称取 10 份 50 mg 草酸钙晶体于 25 mL 烧杯中, 分别加入预先配置好的 BSA 标准溶液 10 mL。超声 10 min 完全分散后, 放入 37 °C 恒温干燥箱中, 吸附 24 h 后取出离心, 取上清液适量测定剩余 BSA 浓度( $C_{eq}$ ), 同时测量悬浮液的  $\zeta$  电位。根据公式  $Q_{ads} = \frac{V(C_0 - C_{eq})}{m}$  计算出晶体对 BSA 的吸附量( $Q_{ads}$ )。以  $C_{eq}$  为横坐标,  $Q_{ads}$  为纵坐标绘制吸附等温线。

#### 1.6 pH 值对吸附的影响

分别称取 10 份 50 mg 草酸钙晶体于 25 mL 烧杯中, 分别加入初始浓度( $C_0$ )为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 BSA 标准溶液 15 mL。超声 10 min 完全分散后, 用 10  $\mu\text{L}$  微量注射器滴加浓度为  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 或 NaOH 调节 pH 值分别至 3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5 和 8。放入 37 °C 恒温干燥箱中, 吸附 24 h 后, 取出离心, 取上清液适量测定剩余 BSA 浓度( $C_{eq}$ )。根据

公式  $Q_{ads} = \frac{10(1-C_{eq})}{m}$  计算出晶体对 BSA 的吸附量( $Q_{ads}$ )。以 pH 值为横坐标,  $Q_{ads}$  为纵坐标绘制吸附曲线。

## 2 结果与讨论

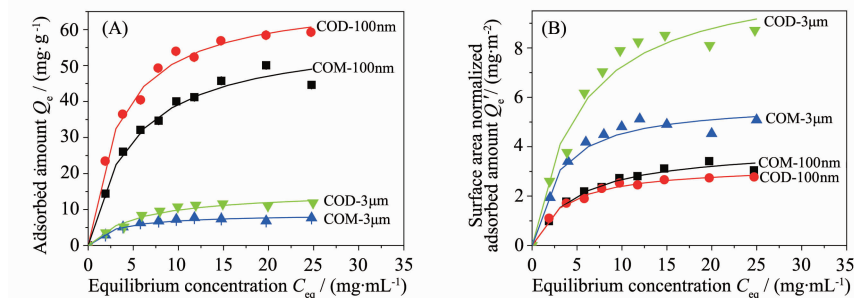
### 2.1 纳米/微米 COM 和 COD 晶体对 BSA 的吸附

#### 2.1.1 吸附等温线

纳米/微米 COM 和 COD 晶体对 BSA 的吸附等温线如图 1A 所示, BSA 的最大吸附量顺序为 COD-100 nm > COM-100 nm  $\geq$  COD-3  $\mu\text{m}$  > COM-3  $\mu\text{m}$ , 即: 纳米级晶体的吸附量远大于微米级的晶体。这是因为纳米级晶体的比表面积大于微米级晶体, 说明 BSA 的吸附量与晶体的比表面积成正相关。

#### 2.1.2 表面积归一化后的吸附等温线

为了排除比表面积的影响, 比较相同面积时纳米/微米 COM 和 COD 晶体对 BSA 的吸附量, 对平衡吸附量进行晶体的比表面积归一化, 得到比表面积归一化的吸附量  $Q_e'$  (即每平方米晶体面积吸附的 BSA 质量,  $Q_e' = Q_e / S_{BET}$ ), 如图 1B 所示。可以看出, 比表面积归一化后, BSA 的最大吸附量的顺序为 COD-3  $\mu\text{m}$  > COM-3  $\mu\text{m}$  > COM-100 nm > COD-100 nm, 即微米级晶体的吸附量大于纳米级的晶体。这与图 1A 中结果相反, 这归因于 COM 和 COD 晶体在水溶液中会存在聚集现象。用  $D_{ratio}$  代表水溶液中的粒径和单个粒子的直径之比,  $D_{ratio}$  值越大代表粒子聚集越严重。在聚合过程中, 单个粒子先形成小聚集体, 再形成大聚集体。粒子的聚集会导致粒子的间隙关闭 (BSA 分子无法进入聚集体内部的间隙), 因此减少了纳米粒子用来吸附的暴露表面<sup>[12]</sup>。由表 1 可知, 纳米级晶体的  $D_{ratio}$  比微米级的高很多, 说明纳米晶体比微米晶体聚集更严重。由于 BSA 分子无法进入



(A) Adsorption isotherms; (B) Isotherms after surface area normalization.

图 1 BSA 在纳米/微米 COM 和 COD 晶体上的吸附等温线

Fig.1 Adsorption isotherms of BSA on micron/nano COM and COD

表 1 纳米/微米 COM、COD 的性质  
Table 1 The properties of micron/nano COM and COD

| Crystal             | Specific surface area $S_{\text{BET}}$ /<br>( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) | $\zeta$ potential /<br>mV | Pore volume /<br>( $\text{mm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) | Crystal size /<br>nm | $D_{\text{ratio}}$ | $\text{PZC}_{\text{CaO}_2}$ | $\text{PI}_{\text{BSA}}$ |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|
| COM-100nm           | 15                                                                               | 0.17                      | 37.3                                                   | 1 146                | 11.46              | 7.2                         | 4.8                      |
| COD-100nm           | 21                                                                               | -2.22                     | 40.9                                                   | 1 212                | 12.12              | 6.7                         | 4.8                      |
| COM-3 $\mu\text{m}$ | 2                                                                                | -6.95                     | 3.3                                                    | 4 252                | 1.417              | 4.7                         | 4.8                      |
| COD-3 $\mu\text{m}$ | 1                                                                                | -15.5                     | 1.2                                                    | 3 443                | 1.148              | 4.3                         | 4.8                      |

Note:  $D_{\text{ratio}}$  represents the ratio of particle hydrodynamic diameter to individual particle diameter.

$\text{PZC}_{\text{CaO}_2}$  is the measured point of zero charge of COM and COD (Fig.4).

$\text{PI}_{\text{BSA}}$  is the measured isoelectric point of BSA (Fig.4).

聚集体中的间隙,减少了它们用来吸附的暴露表面,因此比表面积归一化后,纳米级晶体吸附量小于微米级晶体。这种差异说明晶体聚集越严重,吸附量越小。

### 2.1.3 COM 与 COD 吸附量的比较

如图 1A 所示,对于相同尺寸的晶体,COD 的吸附量大于 COM,说明晶体的亲水性影响了 BSA 的吸附。COD 比 COM 多含一个结晶水,水化程度比 COM 高<sup>[13]</sup>,所以 BSA 与 COD 会形成更多的氢键。Walton 等<sup>[14]</sup>报道白蛋白在 COD 的吸附量大于 COM 是因为白蛋白对 COM 晶体的面选择性吸附,主要吸附在 COM 带正电荷的(101)晶面。而 COD 是一个对称的双锥体,白蛋白对 COD 所有的面都有类似的亲和力,这导致 COD 晶体上用于蛋白吸附的位点比 COM 晶体多。这说明吸附量不仅与晶体的比表面积有关,还与吸附是否存在氢键作用有极大的关系。

比表面积归一化后,微米级 COD 的吸附量仍大于 COM,但纳米级 COM 的吸附量会稍高于 COD 晶体。这是因为 COM-100nm 的  $\zeta$  电位接近中性(0.17 mV),导致覆盖在粒子表面的蛋白层密度更高。所以比表面积归一化后,COM 的吸附量会稍高于 COD 晶体。这与 Rezwan 等<sup>[15]</sup>的结果一致,BSA 分子与氧化物粒子带相同或相反电荷时,都会减小覆盖在粒子表面的 BSA 密度(即单位面积吸附的 BSA 质量);只有纳米  $\text{Al}_2\text{O}_3$  粒子电荷接近中性 (-0.114 mV),与 BSA 所带电荷既不相反也不相同,会增大覆盖在粒子表面的 BSA 密度。以上结果表明吸附量与晶面电荷有关。

COD 对 BSA 的吸附量大于 COM,这一结果与表面活性剂的吸附结果相反,因为不同表面活性剂在 COM 的吸附量常常大于 COD<sup>[13,16]</sup>。这是因为在

pH=7 时,BSA 与晶体的吸附力主要是氢键作用,COD 晶体的水化程度大于 COM 晶体,因此,BSA 与 COD 会形成更多的氢键,导致 COD 的吸附量增加。而表面活性剂分子尺寸较小,其与晶体的吸附主要由静电力主导,表面活性剂吸附在晶体表面带电荷的位点(如钙位点和草酸根位点),由于 COM 表面的这些位点数比 COD 多<sup>[16]</sup>,所以不同表面活性剂在 COM 的吸附量大于 COD。

### 2.1.4 吸附等温线的拟合结果

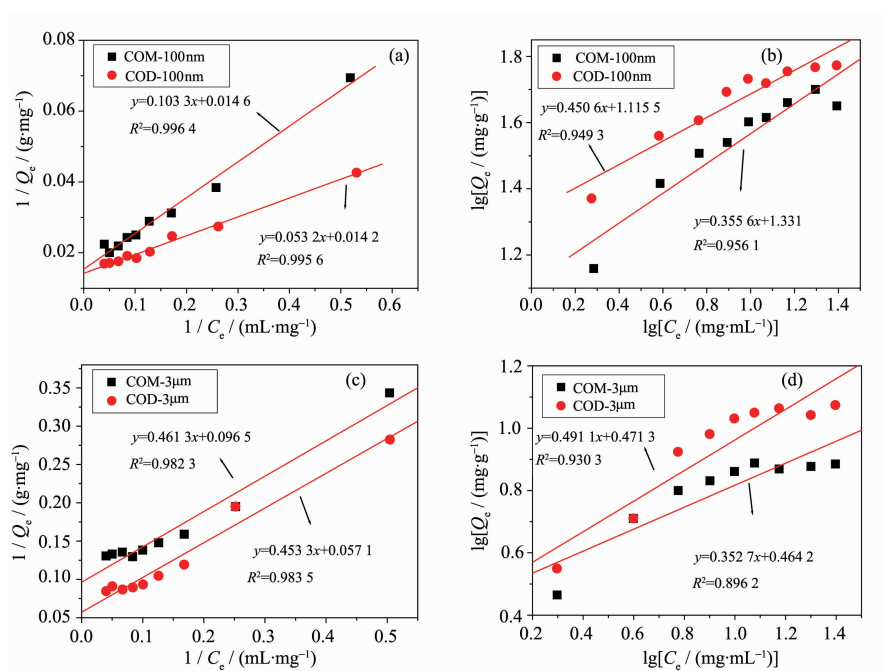
吸附模型最常用的是 Langmuir 模型和 Freundlich 模型<sup>[17]</sup>。Langmuir 模型假设溶剂吸附可以忽略,吸附质分子(如 BSA)以单分子层吸附在吸附剂(如 COM、COD)表面的吸附位点,形成凸型吸附等温线。Freundlich 模型表示在低浓度下已被吸附的分子(如 BSA)又能吸附在液相中的分子(如 BSA,其他分子),形成多分子层吸附,为凹型吸附等温线。Langmuir 模型的线性方程为<sup>[12]</sup>:  $\frac{1}{Q_e} = \frac{1}{Q_0} + \frac{1}{Q_0 b C_e}$ ,  $Q_e$  为平衡时的吸附量,  $C_e$  为平衡时的溶液浓度,  $Q_0$  为吸附剂饱和吸附量,  $b$  是 Langmuir 等温吸附方程式常数。

图 2a 和图 2c 给出了 100 nm 和 3  $\mu\text{m}$  的 COM 和 COD 晶体吸附等温线按照 Langmuir 模型线性拟合的结果,其相关系数在 0.982 3~0.996 4 范围内。

Freundlich 模型的线性方程为<sup>[18]</sup>:  $\lg Q_e = \frac{1}{n} \lg C_e + \lg K_f$ ,  $Q_e$  为平衡时的吸附量,  $C_e$  为平衡时的溶液浓度,  $K_f$  为吸附系数,  $n$  为常数。图 2b 和图 2d 给出了上述 4 种晶体吸附等温线按照 Freundlich 模型线性拟合的结果,其相关系数在 0.896 2~0.949 3 范围内。

可以看出,这 4 种晶体均很好的拟合了





(a) nanocrystals fitted with Langmuir linear equations; (b) nanocrystals fitted with Freundlich linear equations; (c) micron crystals fitted with Langmuir linear equations; (d) micron crystals fitted with Freundlich linear equations.

图 2 纳米/微米 COM 和 COD 对 BSA 吸附等温线的拟合结果

Fig.2 Fitting results of adsorption isotherms of BSA on micron/nano COM and COD

Langmuir 模型(图 2a, 2c), 而与 Freundlich 模型(图 2b, 2d)差异较大, 说明 BSA 在 COM 和 COD 晶体上的吸附属于单分子层吸附。

## 2.2 吸附 BSA 后的 $\zeta$ 电位

为了将吸附行为和  $\zeta$  电位联系起来, 在测量吸附等温线的相同条件下测量了体系的  $\zeta$  电位(图 3)。随 BSA 浓度的增加, 纳米/微米 COM 和 COD 的吸附量增加后(图 1), 对应的  $\zeta$  电位变得更负。

BSA 含 607 个氨基酸残基, 其等电点为  $\text{pH}=4.7\sim 4.8$ <sup>[15,19]</sup>, 所以在实验  $\text{pH}=7.3$  时 BSA 带负电荷, 吸附 BSA 后会使得  $\zeta$  电位变得更负。图 3 也进一步验证了晶体对 BSA 的吸附。

纳米级晶体对 BSA 的吸附量大于微米级晶体(图 1), 吸附 BSA 后纳米级晶体的  $\zeta$  本应比微米晶体更负。但是从图 3 可知, 吸附后纳米级晶体和微米级晶体的  $\zeta$  电位相差不大。这与晶体原始的  $\zeta$  电位和晶体的孔容有关(表 1)。微米级 COM 和 COD 晶体的原始  $\zeta$  电位(分别为  $-6.95$  和  $-15.5$  mV) 比纳米级 COM 和 COD 晶体的原始  $\zeta$  电位 ( $0.17$  和  $-2.22$  mV) 更负, 加上纳米级晶体的孔容比微米级晶体的大, 所以 BSA 进入纳米级晶体孔结构的分子数比微米级晶体的多, 导致吸附在表面的 BSA 分子减少。而  $\zeta$

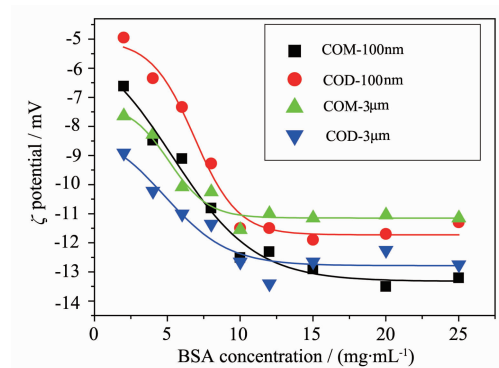


图 3 纳米/微米 COM 和 COD 吸附 BSA 后的  $\zeta$  电位

Fig.3  $\zeta$  potential of micron/nano COM and COD after BSA adsorption

电位反映的是晶体的表面电荷<sup>[20]</sup>, 当晶体表面的 BSA 分子减少时, 其表面电荷也会随着降低。所以吸附后, 纳米级晶体和微米级晶体的  $\zeta$  电位相差不大。

## 2.3 pH 值对吸附的影响

### 2.3.1 不同 pH 值下晶体的荷电情况和对应的吸附量

图 4 为纳米/微米 COM、COD 和 BSA 的  $\zeta$  电位随 pH 值的变化及对应 4 种晶体的 BSA 吸附量变化, 晶体的零  $\zeta$  电位点( $\text{PZC}_{\text{CaO}}$ )和 BSA 零  $\zeta$  电位点

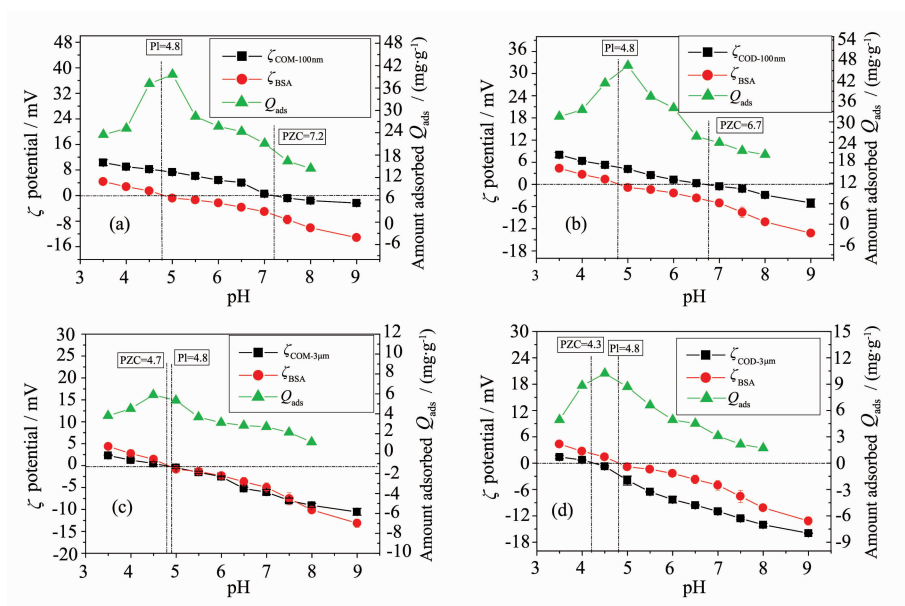
(a) COM-100nm; (b) COD-100nm; (c) COM-3 $\mu\text{m}$ ; (d) COD-3 $\mu\text{m}$ .图 4 BSA 在纳米/微米 COM、COD 的吸附随平衡 pH 的变化及晶体和 BSA 在不同 pH 值下  $\zeta$  电位

Fig.4 Change of BSA adsorption quantity and Zeta potential of micron/nano COM and COD crystals with equilibrium pH

( $\text{PI}_{\text{BSA}}$ )如表 1 所示。COM 和 COD 等电点大小顺序为 COM-100 nm (7.2)>COD-100 nm (6.7) $\geq$ COM-3  $\mu\text{m}$  (4.7)>COD-3  $\mu\text{m}$  (4.3), 纳米级晶体的等电点远大于微米级晶体。草酸钙结石患者的尿液 pH 值约为 6.3<sup>[21-22]</sup>, 接近 COM-100 nm 和 COD-100 nm 晶体的等电点(分别为 7.2 和 6.7)。在晶体的等电点附近, 晶体间的斥力最小, 聚集最为严重, 因此纳米晶体的聚集较微米晶体严重。研究表明尿微晶通过肾脏的时间只有 5~10 min。在滞留时间内, 晶体不足以通过成核生长到足够大的尺寸造成肾脏堵塞。晶体的聚集才是导致尿微晶尺寸迅速增大最为重要的一步<sup>[23-24]</sup>, 人体尿液 pH 值升高时会加重纳米级晶体聚集, 导致形成结石的几率增加。

### 2.3.2 不同 pH 值下 BSA 与晶体的相互作用

蛋白质分子可通过静电作用与荷电表面结合, 通过氢键作用与亲水表面结合<sup>[25]</sup>。COM-100 nm 和 COD-100 nm 的最大吸附量在 pH=5, 而 COM-3  $\mu\text{m}$  和 COD-3  $\mu\text{m}$  的最大吸附量在 pH=4.5, 都在实验测得的 BSA 的等电点(pH=4.8)附近。Zhang 等<sup>[26]</sup>研究了 BSA 在 4 种聚吡咯类吸附剂上的吸附, 其最大吸附量在 pH=5 或 4.5 处; Alkan 等<sup>[27]</sup>研究了 BSA 在不同氧化物表面的吸附, 其最大吸附量也在约 pH 为 5 处。最大吸附量在 BSA 等电点附近, 是因为此时 BSA 分子显中性, 吸附在晶体表面的 BSA 分子之间

的静电斥力最小, 吸附层最紧凑, 所以吸附量最大。

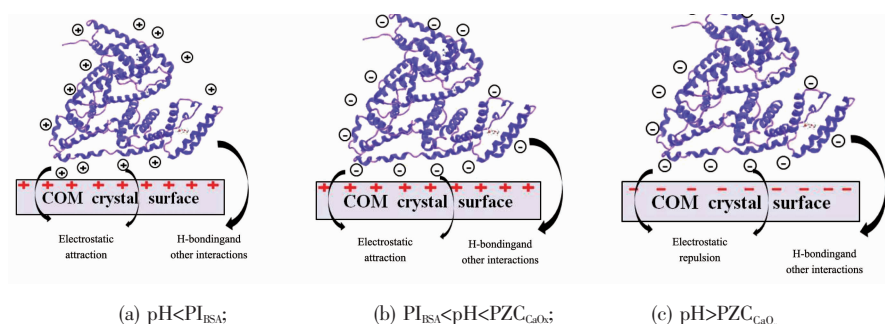
pH 值变化使晶体和 BSA 荷电性质的改变, 影响晶体与 BSA 分子之间的相互作用, 从而影响 BSA 的吸附量。以 COM-100 nm 为例, BSA 与 COM-100nm 在不同 pH 下的荷电情况及相互作用如图 5 所示。BSA 与其它 3 个晶体的相互作用与 COM-100 nm 相似。

(1) 在  $\text{pH} < \text{PI}_{\text{BSA}}$  (BSA 的等电点) 时, 随 pH 值的降低, 晶体和 BSA 的  $\zeta$  电位不断变正(图 5a)。

在  $\text{pH} > \text{PZC}_{\text{CaO}}$  (COM 晶体的零电荷点) 时, 随 pH 值的升高, 晶体和 BSA 的  $\zeta$  电位不断变负(图 5c)。

上述两种情况均使得 BSA 分子之间的静电排斥和 BSA 分子与晶体之间的静电斥力增大, 导致吸附量下降。但晶体对 BSA 分子仍然有明显的吸附, 说明 BSA 与晶体之间还有其他的作用, 如氢键和表面配位<sup>[26]</sup>, 这些作用力可以部分弥补因静电斥力增加导致的 BSA 吸附量减少。

(2) 在  $\text{PI}_{\text{BSA}} < \text{pH} < \text{PZC}_{\text{CaO}}$ , 蛋白质分子带负电, 而晶体带正电(图 5b), BSA-晶体之间存在静电引力作用。BSA 分子和晶体之间的静电引力有利于 BSA 吸附到晶体表面。但当晶体表面吸附了一定量的 BSA 分子后, 不但 BSA 分子之间存在静电斥力使吸附量下降, 而且已经吸附在晶体表面的 BSA 分子对溶液中的 BSA 分子会产生静电排斥作用, 阻碍溶液中的



$PZC_{CaO_x}$  is the measured point of zero charge of nano COM,  $PI_{BSA}$  is the measured isoelectric point of BSA. (a)  $pH < PI_{BSA}$  ( $pH < 4.8$ ), both BSA and crystal surface are positively charged, and electrostatic repulsion interactions occur between BSA and crystal. (b)  $PI_{BSA} < pH < PZC_{CaO_x}$  ( $4.8 < pH < 7.2$ ), BSA is negatively charged while the crystal surface remains positively charged, and electrostatic attraction occur between BSA and crystal. (c)  $pH > PZC_{CaO_x}$  ( $pH > 7.2$ ), both BSA and crystal are negatively charged, and electrostatic repulsion interactions occur between BSA and crystal.

图 5 BSA 与纳米 COM 在不同 pH 下的荷电情况及其相互作用

Fig.5 Charged situation of BSA and nano COM and their interaction under different pH

BSA 继续吸附到晶体表面,因而使得 BSA 的吸附量下降。

对于 3  $\mu m$  的 COM 和 COD 晶体,晶体的零电荷点就在 BSA 等电点附近,所以最大吸附量都在  $pH=4.5$  处。

在  $pH > 4.5$  时,随着  $pH$  值增大,吸附量逐渐下降。这是因为 BSA 分子带负电荷,晶体也带负电荷,晶体与 BSA 分子的静电斥力以及 BSA 分子间的静电斥力共同导致 BSA 吸附量下降。

而在  $pH < 4.5$  时,随着  $pH$  值减小,吸附量也逐渐下降。这是因为此时 BSA 分子带正电荷,晶体也带正电荷,晶体与 BSA 分子的静电斥力以及 BSA 分子间的静电斥力共同导致 BSA 吸附量下降。

纳米、微米 COM 和 COD 晶体对 BSA 的最大吸附量都在实验测得的 BSA 的等电点( $pH=4.8$ )附近。在等电点附近,BSA 分子显中性,吸附在晶体表面的 BSA 分子之间静电斥力最小,吸附层最紧凑,此时吸附量最大。 $pH > 4.8$  时,BSA 的吸附量随  $pH$  值增大而减小。

在草酸钙结石患者尿液环境下 ( $pH \approx 6.3$ ),BSA 的吸附量小,晶体聚集严重,成石风险提高。在  $pH=6.3$  时,BSA 分子间静电斥力和晶体与 BSA 分子间的静电斥力,共同作用导致 BSA 吸附量的下降(图 5b,5c)。

### 3 结 论

尺寸分别为 100 nm 和 3  $\mu m$  的 COM 和 COD 晶体对 BSA 的吸附等温线很好的拟合了 Langmuir 模

型,表明 BSA 在纳米/微米 COM 和 COD 晶体上的吸附属于单分子层吸附。上述 4 种晶体对 BSA 的最大吸附量都在 BSA 等电点(4.8)附近。吸附 BSA 后,这些晶体的  $\zeta$  电位绝对值增加,这有利于抑制晶体的聚集。由于 COM 和 COD 等电点(PI)大小顺序为  $COM-100nm(7.2) > COD-100nm(6.7) \geq COM-3\mu m(4.7) > COD-3\mu m(4.3)$ ,表明在草酸钙结石尿液中( $pH \approx 6.3$ )纳米级晶体团聚较严重。BSA 的吸附与晶体的比表面积、晶面电荷、团聚以及结晶水的数量密切相关。晶体的比表面积越大、团聚越小,晶面的结晶水数量越多,吸附量越大。当晶面电荷接近中性时,吸附量也会增大。

### 参考文献:

- [1] Cerini C, Geider S, Dussol B, et al. *Kidney Int.*, **1999**,**55**(5): 1776-1786
- [2] Liu J F, Jiang H D, Liu X Y. *J. Phys. Chem. B*, **2006**,**110**: 9085-9089
- [3] Farmanesh S, Ramamoorthy S, Chung J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**,**136**(1):367-376
- [4] Grohe B, Taller A, Vincent P L, et al. *Langmuir*, **2009**,**25** (19):11635-11646
- [5] Grohe B, O'Young J, Ionescu D A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**:14946-14951
- [6] Taller A, Grohe B, Rogers K A, et al. *Biophys. J.*, **2007**,**93** (5):1768-1777
- [7] LIU Yi-Ming(柳一鸣), XIA Zhi-Yue(夏志月), OUYANG Jing-Ming(欧阳健明), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2013**,**29**(5):903-909

- [8] Ouyang J M, Xia Z Y, Zhang G N, et al. *Rev. Inorg. Chem.*, **2012**,**32**(2/3/4):101-110
- [9] He J Y, Deng S P, Ouyang J M. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, **2010**,**9**(2):156-163
- [10] Sun X Y, Ouyang J M, Liu A J, et al. *Mater. Sci. Eng. C*, **2015**,**57**:147-156
- [11] Oliva F Y, Avallé L B, Cámara O R, et al. *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**,**261**(2):299-311
- [12] Song L, Yang K, Jiang W, et al. *Colloids Surf. B*, **2012**,**94**:341-346
- [13] Tunik L, Fueredi-Milhofer H, Garti N. *Langmuir*, **1998**,**14**(12):3351-3355
- [14] Walton R C, Kavanagh J P, Heywood B R, et al. *BBA-Gen. Subjects*, **2005**,**1723**(1/2/3):175-183
- [15] Rezwan K, Meier L P, Rezwan M, et al. *Langmuir*, **2004**,**20**(23):10055-10061
- [16] Sikiri M D, Füredi-Milhofer H. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2006**,**128**:135-158
- [17] Mohsen-Nia M, Bidgoli M M, Behrashi M, et al. *Protein J.*, **2012**,**31**(2):150-157
- [18] Puskas J E, Dahman Y, Margaritis A. *Biomacromolecules*, **2004**,**5**(4):1412-1421
- [19] Kandori K, Oda S, Tsuyama S. *J. Phys. Chem. B*, **2008**,**112**(8):2542-2547
- [20] Thielbeer F, Donaldson K, Bradley M. *Bioconjugate Chem.*, **2011**,**22**(2):144-150
- [21] Srinivasan S, Kalaiselvi P, Sakthivel R, et al. *Clin. Chim. Acta*, **2005**,**353**(1):45-51
- [22] Gao J, Xue J F, Xu M, et al. *Int. J. Nanomed.*, **2014**,**9**:4399
- [23] Finlayson B, Reid S. *Invest. Urol.*, **1978**,**15**:442-448
- [24] Kok D J, Khan S R. *Kidney Int.*, **1994**,**46**:847
- [25] Shemetov A A, Nabiev I, Sukhanova A. *ACS Nano*, **2012**,**6**(6):4585-4602
- [26] Zhang X, Bai R, Tong Y W. *Sep. Purif. Technol.*, **2006**,**52**(1):161-169
- [27] Alkan M, Demirba Doan M, et al. *Microporous Mesoporous Mater.*, **2006**,**96**(1):331-340