学校编码：10384　　分类号_____密级_____
学号：200425015　　UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

全内反射荧光法研究蛋白质与壳聚糖的相互作用

Study of Interaction between Protein and Chitosan by Total Internal Reflection Fluorescence Spectroscopy

陈 喆

指导教师姓名：李 耀 群 教 授
专 业 名 称：分 析 化 学
论文提交日期：2007 年 10 月
论文答辩时间：2007 年 10 月
学位授予日期：2007 年 月

答辩委员会主席：_____
评 阅 人：_____

2007 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（　），在　　年解密后适用本授权书。

2、不保密（　）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：　　日期：　　年　　月　　日

导师签名：　　日期：　　年　　月　　日

目　录

CATALOG

摘　　要

壳聚糖作为重要的天然聚合物，以良好的生物相容性、生物可降解性，对细胞组织不产生毒性影响，在生物医学等方面得到了广泛的研究应用。壳聚糖对蛋白质有良好的亲和能力，研究蛋白质与壳聚糖在界面上的相互作用、理解蛋白质与壳聚糖分子在界面接触时的吸附过程变化对蛋白药物的开发和生物化学研究具有非常重要的意义。全内反射荧光法是研究界面蛋白质吸附的一种有效的手段。它利用指数衰减的倏逝波选择性激发介质表面的荧光团分子，产生全内反射荧光，具有高度的界面(表面)特异性，从而可有效排除本体干扰，获取界面信息，而且又具有非破坏性，能够实时、原位检测蛋白质吸附过程。本文致力于改进实验室已有的固/液界面全内反射荧光分析的部件，考察壳聚糖超薄膜的固定方案，继而研究三种模型蛋白在壳聚糖超薄膜上的吸附情况。此外，还对罗丹明6G（R6G）在石英/水界面上的吸附进行研究，进一步认识咕吨染料在界面的情况。论文分为四章：

第一章综述了全内反射荧光法在生物体系中的研究应用，以及壳聚糖与蛋白质相互作用的研究概况。简要介绍全内反射荧光法的原理和应用，对目前全内反射荧光法在生物体系，特别是固/液界面蛋白质吸附的研究作了详尽的概述，同时还介绍了壳聚糖的性质、应用以及它与蛋白质相互作用研究的状况，最后提出整篇论文的设想。

第二章在现有可行的实验条件下，以石英片为载体，改进实验室已有全内反射荧光部件，使其易于进行表面修饰，并且使样品的检测体积减少至200 μL。考察了旋涂法与化学键合法固定壳聚糖薄膜的情况，同时应用全内反射恒波长同步荧光分析方法，监测壳聚糖表面固定情况。最后确定了以硅烷化试剂自组装在石英载体上引入活性基团进行表面接枝壳聚糖的化学键合法，并对接枝方法进行了优化，获得了表面均一的壳聚糖超薄膜。

第三章用荧光素异硫氰酸酯（FITC）标记常见的模型球型蛋白（牛血清白蛋白、溶菌酶、牛血纤维蛋白原），应用全内反射荧光法分析它们分别与壳聚糖

超薄膜相互作用的情况，以及对牛血纤维蛋白原和牛血清白蛋白的二元竞争吸附体系进行研究。

首先成功用FITC标记各种模型蛋白质，标记率在0.6-3.8之间，观测其吸收、荧光波长均有所红移，荧光各向异性值有6-10倍的增长。

牛血清白蛋白（BSA）在壳聚糖上随着本体浓度增加，出现两个吸附增长区。随浓度增加，吸附在壳聚糖表面上的 BSA 可能从平躺取向排布向竖直取向变化；在平衡浓度大于 400 μg/mL 以上可能出现多层吸附。pH 对 BSA 在壳聚糖上的吸附作用也有显著的影响，随着 pH 增加，BSA 在 pH 6.5 附近出现了极值，说明主要以静电相互作用驱动了 BSA 吸附。离子强度的增加，屏蔽了蛋白质与壳聚糖表面、蛋白质-蛋白质分子之间的静电斥力，使得 BSA 的吸附量增加；而当盐浓度大于 0.1 mol/L 之后，由于壳聚糖分子链的刚性变小，容易成团，与蛋白质接触面积减小，导致吸附量下降。

此外，还考察了另外两种模型蛋白吸附随本体溶液浓度变化的影响，以及对模型蛋白的吸附过程进行动力学方程拟合。牛血纤维蛋白原的界面荧光随着蛋白质本体浓度的增加而增加；在低浓度下，双常数速率方程能够得到较好拟合性，而在高浓度下，准二级动力学模型能够得到较好的拟合性。而溶菌酶在考察浓度范围内，界面信号随浓度增长变化曲线与 Langmuir 吸附等温线形状近似。溶菌酶对壳聚糖的表面亲和能力比 BSA 更好，这可能由于壳聚糖与溶菌酶的底物结构相似，溶菌酶易吸附于壳聚糖膜上。溶菌酶的吸附动力学过程可用准二级吸附动力学模型描述，随着吸附初始浓度的增加，吸附速率常数 k 也总体有一个数量级的增长。

比较壳聚糖膜上 BSA 与牛血纤维蛋白原在生理条件下竞争吸附的情况，在壳聚糖界面上，牛血纤维蛋白原的相对竞争吸附能力要大于 BSA。这表明壳聚糖也能够正常驱动牛血纤维蛋白原的吸附，激发血小板和凝血因子而发生凝血。

第四章利用全内反射恒波长同步荧光法直接测量在石英/水界面上的罗丹明6G（R6G）。通过对其本体、界面荧光光谱的分析，观察到 R6G 分子在亲水石英/水界面上出现 5 nm 红移，红移的原因主要是染料分子旋转运动受到限制，石英表面的刚性限制了分子的自由度，同时，石英/水界面更低的极性也对红移产生影响。同时还考察了 R6G 在石英/水界面上的吸附情况与本体溶液的浓度、pH

以及离子强度的关系。

关键词：壳聚糖薄膜；蛋白质；全内反射荧光法

Abstract

As an important natural polymer, chitosan has been applied extensively in biomedicine for its biocompatibility, biodegradation, as well as non-toxicity to cellular tissues. There is good affinity between chitosan and protein. For the development of protein drugs and the research of biochemistry, it is significant to probe the interaction between chitosan and protein, and to observe changes of adsorption when both of them contact at interface. Total internal reflection fluorescence spectroscopy (TIRF) is an effective technique to investigate protein adsorption at interface. The total internal reflection fluorescence generates from interfacial fluorophore, which is selectively excited by evanescent wave. Therefore, there are several characteristics for evanescent wave inducing fluorescence, such as surface specificity, elimination of bulk interference and non-destruction. It has been successful to investigate protein adsorption in situ, real-time by this technique. This dissertation is concerned on the improvement of instrumental device of TIRF for probing solid/liquid interface, the option of suitable method for immobilizing chitosan, and the analysis of interaction between model proteins and ultrathin chitosan film which was immobilized on silica substrate. In addition, the adsorption behavior of rhodamine 6G (R6G) at silica/water interface was also concerned. The dissertation is composed of following parts:

In the first chapter, the application of total internal reflection fluorescence technique in the research of biological systems and the advance on the study of interaction between chitosan and protein were reviewed. The principle and application of TIRF were introduced briefly. The research on biological systems, especially on the study of protein adsorption at solid/water interface, was described in detail. Then the property and application of chitosan were introduced, as well as the hot topics on the study of chitosan-protein interaction. The plan of dissertation was put forward at the last part of this chapter.

In the second chapter, a new TIRF cell was developed based on the present experimental