中国科学: 化学 2011 年 第 41 卷 第 2 期: 374 ~ 379
SCIENTIA SINICA Chimica www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文

# 明胶-聚丙烯酸纳米微球的一维自组装制备纳米棒

丁丹, 王晶, 陈莹, 武伟, 蒋锡群*

介观化学教育部重点实验室; 南京大学化学化工学院高分子科学与工程系, 南京 210093
*通讯作者, E-mail: jiangx@nju.edu.cn

收稿日期: 2010-10-20; 接受日期: 2010-11-30
doi: 10.1007/s11426-010-4207-5

**摘要** 明胶-聚丙烯酸纳米微球可在 4 ℃下自组装形成纳米棒, 所形成的纳米棒结构规整并具有与纳米微球相同的直径. 通过观察纳米棒形成的中间状态, 发现该纳米棒由明胶-聚丙烯酸纳米微球一维排列而成. 由于只有在较低温度下纳米微球才能形成棒状结构, 并且圆二色性光谱数据证明明胶-聚丙烯酸纳米微球表面的明胶分子具有在低温下复性成为三螺旋构象的能力, 因此可以推断明胶-聚丙烯酸纳米棒是由纳米微球表面的明胶分子通过复性为三螺旋结构所产生的氢键以及静电等力的作用一维自组装而形成的.

**关键词**
明胶
纳米棒
三螺旋构象
一维自组装

## 1 引言

近年来, 一维纳米材料在生物医药领域的应用潜力引起了国际上的广泛关注. 一维纳米材料能在流动的流体中伸展, 是流动性强烈的药物运输系统的理想载体. 此外, 一维高分子纳米材料在体内长循环的性质可以有效提高药物的输送效率并且改变药物的组织分布和代谢[1]. 目前, 一维高分子纳米材料的制备主要是通过不同的化学驱动力自组装而形成的. 制备一维纳米材料的主要材料有嵌段高分子[2, 3]、蛋白质[4]、肽[5]以及肽-高分子复合结构[6]等. 尤其蛋白质或肽形成的纳米棒或纳米管, 由于其良好的生物相容性, 分子识别能力, 以及线性结构而在生物医药领域中引起了广泛的关注[4~7]. 目前, 大量的报道集中于肽纳米管的制备与应用, 而关于蛋白质或肽纳米棒的报道则很少. 本文中, 我们发展了一种简单并且新颖的方法, 在不使用任何有机溶剂和表面活性剂的条件下, 通过明胶-聚丙烯酸纳米微球的一维自组装来制备明胶-聚丙烯酸纳米棒.

明胶是由动物皮、骨、腱和韧带组织中的胶原蛋白部分水解得到的, 是蛋白质片断的混合物, 由 18 种氨基酸组成. 明胶由于其低的抗原性、良好的生物相容性和可生物降解性, 广泛应用于医药领域[8]. 当温度升高至明胶的凝固点(35 ℃)以上时, 明胶分子以任意的卷曲状存在. 而在凝固点以下, 明胶分子的某些链段复性为左手螺旋, 其中每 3 个氨基酸残基形成一圈螺旋. 相邻的 3 条左手螺旋链段间产生氢键交联, 复性为类似胶原的右手大螺旋, 这样的螺旋称为三螺旋[9, 10]. 与胶原类似, 明胶中总是包含大量的脯氨酸(proline)、羟基脯氨酸(hydroxyproline)和甘氨酸(glycine), 三螺旋的氨基酸序列通常为$(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, 脯氨酸和羟基脯氨酸通常处于 X 和 Y 的位置[10, 11]. 此外, 在明胶或胶原三螺旋的相互作用中, 带电荷的氨基酸残基如赖氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸等的静电相互作用也起到了相当重要的作用[11].

本课题组之前发展了高分子-单体对的方法制备尺寸可控, 粒径均一的高分子复合纳米微球[12, 13]. 在本文中, 我们选用带正电荷的明胶和带负电荷的丙烯酸作为起始原料, 通过高分子-单体对的方法在水相中制备了分散性良好的, 粒径约为 35 nm 的明胶-聚丙烯酸纳米微球. 然后我们利用明胶在低温下能够复性成为三螺旋构象的性质将明胶-聚丙烯酸纳米微球一维自组装成为了明胶-聚丙烯酸纳米棒, 并通过动态光散射(DLS)、透射电子显微镜(TEM)以及原

子力显微镜(AFM)对纳米棒进行了表征, 同时对影响纳米棒形成的因素进行了考察.

## 2　实验部分

### 2.1　材料

B 型明胶(225 bloomstrength; Sigma-Aldrich), 其数均分子量为 40~50 kDa, 平均每 100 g 明胶中含有 100~115 mmol 的羧基. 使用前先溶于蒸馏水中, 然后用丙酮沉淀, 沉淀物在室温下真空干燥 48 h 后备用. 过硫酸钾($K_2S_2O_8$)使用前经过重结晶纯化. 丙烯酸(AA, 上海光华化学试剂有限公司)使用前经过减压蒸馏纯化. 其他分析纯试剂使用前未经任何处理.

### 2.2　明胶-聚丙烯酸纳米棒的制备

将 0.8 g 明胶溶于含有 0.16 g 丙烯酸的水溶液中, 当体系变为均相且澄清透明后, 于氮气气氛下升温至 85 ℃, 然后加入计算量的 $K_2S_2O_8$ 溶液引发丙烯酸的聚合, 反应时间为 180 min. 反应结束后, 得到带有浅蓝色乳光的溶液, 经过滤后在截留分子量为 12 kDa 的透析袋中用蒸馏水透析 24 h 以除去剩余的单体和引发剂. 然后将纳米微球溶液置于 4 ℃的冰箱中冷藏 2 d 得到含有明胶-聚丙烯酸纳米棒的分散液, 待用.

### 2.3　理化性质表征

体系的 pH 值由 Delta 320 pH 计(Mettler Toledo Instruments Co., 瑞士)测定. 纳米材料的平均粒径通过 Brookhaven BI9000AT 动态光散射仪(Brookhaven Instruments Co., USA)测得.

### 2.4　形貌观察

纳米棒的形貌观察通过透射电子显微镜(TEM; JEM-100S, JEOL, 日本)来进行, 将一滴纳米棒分散液滴在覆盖有硝酸纤维素膜的铜网上, 在空气中干燥后即可观察. 为了对纳米棒的表面有更细致的了解, 我们使用原子力显微镜(AFM, SPI3800, Seiko Instruments Inc, 日本)对制得的纳米棒进行了观察. 在一片洁净的硅片上滴一滴分散液, 用氮气吹干后使用 20 μm 的探头在轻敲模式下进行扫描.

### 2.5　圆二色(CD)光谱分析

配置一系列浓度的明胶溶液和明胶-聚丙烯酸纳米微球溶液, pH 值调至 3. 分别置入圆二色仪(J-500C; JASCO 公司, 日本)中进行扫描. 测试条件: 温度 4 ℃或 40 ℃、灵敏度 2 m°/cm、时间常数 4 s, 光径 0.02 cm, 狭缝宽度 1 nm.

## 3　结果与讨论

在前期工作中我们发展了高分子-单体对法制备天然高分子复合纳米微球, 即在天然高分子的水溶液中, 使与天然高分子有相互作用(静电或氢键等)的单体聚合, 聚合过程中自组装形成尺寸可控, 粒径均一的高分子复合纳米微球[12, 13]. 在本文中, 我们选用带正电荷的明胶和带负电荷的丙烯酸作为起始原料, 在不使用任何有机溶剂和表面活性剂的条件下通过丙烯酸的自由基聚合得到稳定的粒径约为 35 nm 的明胶-聚丙烯酸纳米微球. 然后我们将纳米微球溶液冷却至 4 ℃并放置一段时间(约 2 d 左右), 发现在溶液中出现了一维纳米结构. 我们通过 TEM 与 AFM 对其形貌进行了考察(图 1). 从图 1 可以清楚地看到, TEM 和 AFM 图像都显示了所得纳米材料为一维棒状结构, 并且其直径约为 30 nm.

通过对纳米棒 TEM 照片的进一步观察我们发现, 纳米棒的棒身呈现许多明暗交替的条纹, 并且周围散落着一些相同直径大小的纳米微球(如图 2(a)所示). 基于这一发现, 我们采用 AFM 的相图来考察了单根纳米棒的结构, 从纳米棒的相图中(如图 2(b)和(c)所示)我们可以清楚地看到, 纳米棒是由许多类似于盘状结构的聚集体沿着圆柱体轴向一维排列而成的, 这也证实了该一维纳米材料的非管状结构. 根据以上结果, 明胶-聚丙烯酸纳米棒可能是由明胶-聚丙烯酸纳米微球的一维自组装而形成的.

为了证实上述推论, 我们将制备好的明胶-聚丙烯酸纳米微球置于 4 ℃下, 在冷藏相对较短的一段

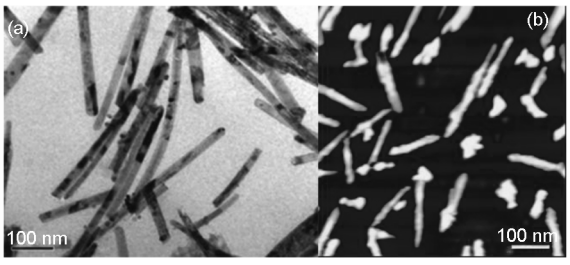



**图 1**　明胶-聚丙烯酸纳米棒的 TEM 照片(a)和 AFM 照片(b)

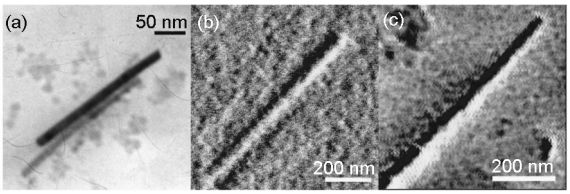



**图 2** 单根明胶－聚丙烯酸纳米棒的TEM照片(a)和AFM相图照片((b)和(c))

时间(约为 8~12 h)后取出并对样品进行 AFM 扫描, 如图 3 所示, 我们发现了纳米棒形成过程的中间状态. 从 AFM 的高度图(图 3(a))和相图(图 3(b)), 我们可以看到大量的直径在 30 nm 左右的纳米微球, 在图片的中央, 十几个大小相近的纳米微球已排列成棒状结构, 而且从图中我们可以清楚地观察到球与球之间的连接, 而在有的地方, 球的形状已经变得模糊, 形成类似于图 2 所观察到的条纹状或类似盘状的结构. 由图 3(c)可以看出, 纳米棒表面为许多一维排列的球形凸起, 进一步证实了纳米球之间的一维连接. 因此, 根据以上结果可以推测明胶-聚丙烯酸纳米棒是由明胶-聚丙烯酸纳米微球一维自组装而形成的, 纳米球首先通过某种作用力的驱动一维排列(图 3), 然后通过球与球之间的相互作用和挤压, 逐渐变为类似盘状结构的一维堆积(图 2), 最后老化成为结构规整的纳米棒(图 1).

接下来, 我们研究了明胶-聚丙烯酸纳米微球形成纳米棒的过程以及影响因素. 我们注意到了温度

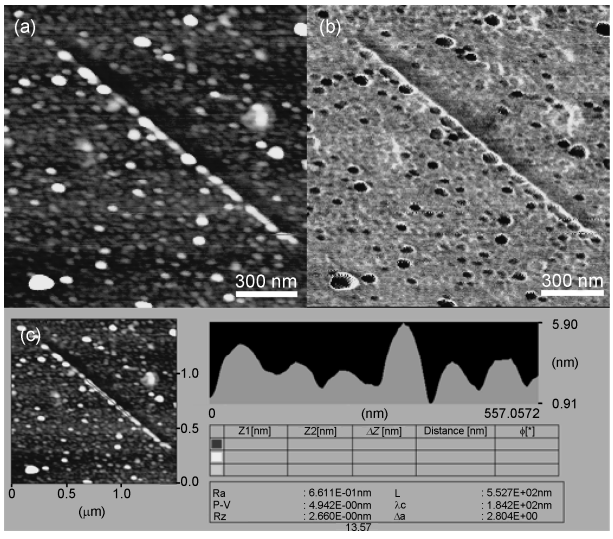



**图 3** 明胶－聚丙烯酸纳米微球一维自组装成纳米棒的中间状态. (a): AFM 高度图; (b): AFM 相图; (c): 表面形态

是形成纳米棒的关键因素. 因为明胶的凝固点约为 35 ℃, 在这个温度以下, 明胶分子间会部分复性成为胶原蛋白的三螺旋结构[9~11]. 因此, 我们考察了 4 ℃和 40 ℃ 这两个温度下纳米球一维自组装. 通过 TEM 的表征, 我们观察到, 刚刚制备出来的明胶-聚丙烯酸纳米微球分散性良好, 粒径较为均一, 约为 30 nm 左右(如图 4(a)所示). 而将纳米微球在 40 ℃下放置 2 d 后, 体系中出现了少量的沉淀, 将沉淀滤去后, 我们通过TEM观察到, 体系中仍为纳米微球, 没有出现棒状结构. 并且纳米微球的数量有所减少, 分散性变差(如图 4(b)所示). 这是由于纳米微球没有经过交联, 结构比较疏松, 在 40 ℃下不能长期稳定. 而将纳米微球在 4 ℃的条件下放置 2 d 后, 如图 4(c)所示, 我们则观察到了纳米棒的存在. 另外, 我们利用 DLS 来考察了这一过程. 由图 5(a)可以看到, 刚刚制备的纳米微球的平均粒径为 34.3 nm, 光散射强度为 87.8 kcps. 而将其在 40 ℃放置 2 d 并滤去沉淀后, 如图 5(b)所示, 粒径约为 23.1 nm, 相比刚制备出来时略微减小, 光散射强度为 34.4 kcps, 表明纳米微球数量的减少. 而在 4 ℃放置 2 d 后, 其流体力学直径增长为 98.5 nm, 光散射强度增长为 386.7 kcps (图 5(c)), 表明了体系中纳米棒的形成. 以上结果证明, 温度是形成明胶－聚丙烯酸纳米棒的至关重要的因素, 只有在较低温度下, 才能制备出具有一维结构的纳米棒.

对于明胶-聚丙烯酸纳米微球, 由于纳米微球溶液的 Zeta 电位为正值(25.08 mV), 所以明胶-聚丙烯酸纳米微球的外壳层应由带有正电荷的明胶分子构

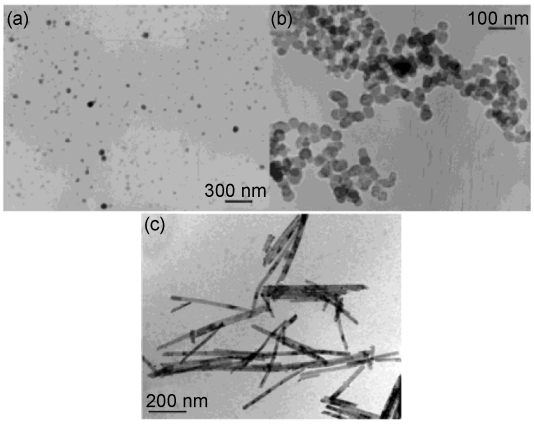



**图 4** (a) 刚制备出来的粒径约为 30 nm 的明胶-聚丙烯酸纳米微球; (b) 将(a)在 40 ℃的条件下放置了 2 d 后的 TEM 照片; (c) 将(a)在 4 ℃的条件下放置了 2 d 后的 TEM 照片

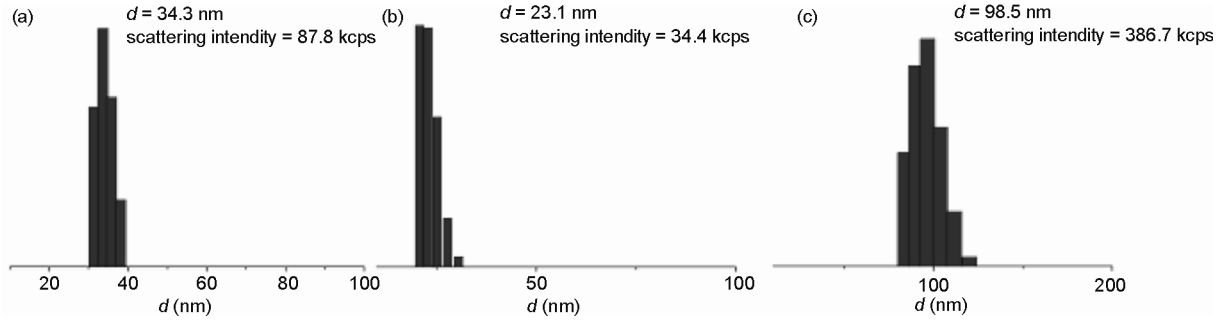



**图 5**　(a) 刚制备出来的明胶-聚丙烯酸纳米微球的 DLS 数据; (b) 将(a)在 40 ℃的条件下放置了 2 d 后的 DLS 数据; (b) 将(a)在 4 ℃的条件下放置了 2 d 后的 DLS 数据.

成, 而其内部由电中性的明胶-聚丙烯酸聚电解质复合物构成. 由于明胶-聚丙烯酸纳米微球只有在较低的温度下才能自组装成为纳米棒, 这提示我们纳米棒的形成与纳米微球中明胶分子的性质密切相关, 即当温度降至明胶的凝固点(35 ℃)以下, 明胶多肽链的若干区段形成了类似胶原的三螺旋结构[9~11]. 为了确定明胶-聚丙烯酸纳米微球中的明胶分子是否具有复性成为胶原三螺旋构象的能力, 我们考察了纯明胶溶液和纳米微球溶液的圆二色性(CD)光谱, 如图 6(a)所示, 在 4 ℃时, 纯明胶溶液在 198 nm 处出现圆二色性负峰, 在 225 nm 处出现正峰, 这两个峰表明明胶分子复性为三螺旋构象. 而在 40 ℃时, 只存在 198 nm 处的负峰, 225 nm 处的正峰消失, 表明明胶分子为无规线团结构[14~17]. 而对于明胶－聚丙烯酸纳米微球溶液, 我们发现在 4 ℃时, 198 nm 处的负峰和 225 nm 处的正峰均存在(图 6(b)), 表明纳米微球中的明胶分子能够复性成为三螺旋结构. 此外, 我们发现对于纳米微球溶液, 要得到与纯明胶溶液相似的圆二色值, 纳米微球溶液中明胶分子的浓度要达到纯明胶溶液浓度的 10 倍. 这一结果表明, 纳米微球中大量的明胶分子不能够复性成为三螺旋结构, 这可能是由于明胶分子与聚丙烯酸分子静电作用导致的, CD 光谱测得的信号应该来源于纳米微球表面没有被聚丙烯酸分子束缚住的明胶分子的复性.

根据以上结果, 我们提出了明胶-聚丙烯酸纳米棒可能的形成机理. 当纳米微球溶液置于 4 ℃的条件下, 纳米微球表面的明胶分子开始有复性成为三螺旋结构的趋势, 对于粒径为 35 nm 的纳米微球, 由于其比表面积较大, 并且由于其内部聚丙烯酸分子量较小(约 800 Da), 使得纳米微球表面的明胶分子链上含有足够的氨基酸可以用来复性. 因此, 当两个纳米微球相互碰撞后, 纳米微球之间则会由于三螺旋构象的形成而通过氢键、静电等力的作用连接在一起, 当第三个球与其接触后, 由于静电排斥力和位阻的影响, 它与另两个球形成直线排列会使得体系的能量最低. 因此, 纳米微球就通过这样的过程一维自组

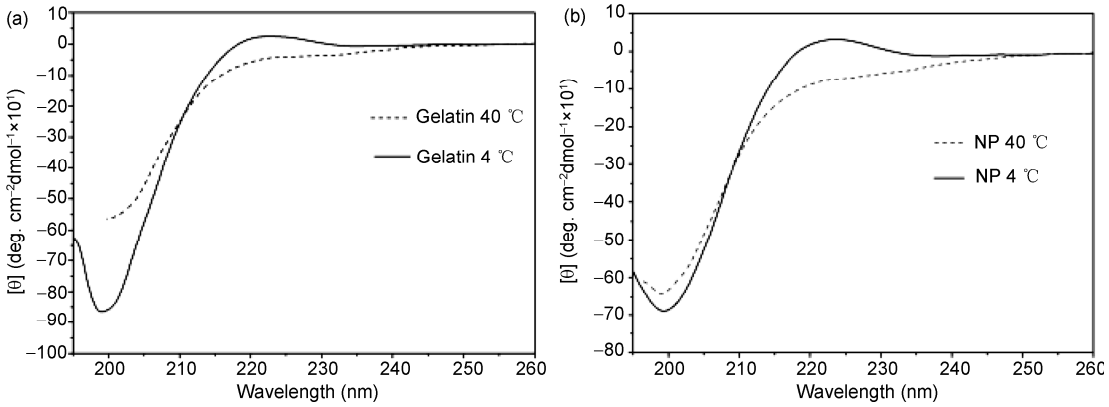



**图 6**　(a): 纯明胶溶液在 4 ℃和 40 ℃时的 CD 光谱图; (b):明胶－聚丙烯酸纳米微球溶液在 4 ℃和 40 ℃时的 CD 光谱图

装成为了纳米棒.

## 4 结论

通过对直径为 35 nm 的明胶-聚丙烯酸纳米微球进行冷藏, 得到了结构规整的明胶-聚丙烯酸纳米棒. 实验证明纳米棒是由明胶-聚丙烯酸纳米微球一维自组装而形成的. 纳米棒的形成受温度的影响较大, 只有在较低温度下, 明胶-聚丙烯酸纳米微球才能有效地组装成纳米棒. CD 光谱的研究发现, 纳米微球表面的明胶分子在低温下复性成三螺旋结构是纳米棒形成的关键.

**致谢** 本工作得到国家自然科学基金(50625311, 20874042, 50802040 & 51033002)项目资助, 特此致谢.

## 参考文献

1 Geng Y, Dalhaimer P, Cai SS, Tsai R, Tewari M, Minko T, Discher DE. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol*, 2006, 2: 249–255
2 Wang XS, Guerin G, Wang H, Wang YS, Manners I, Winnik MA. Cylinderical block copolymer micelles and co-micelles of controlled length and architecture. *Science*, 2007, 317: 644–647
3 Cui HG, Chen ZY, Zhong S, Wooley KL, Pochan DJ. Block copolymer assembly via kinetic control. *Science*, 2007, 317: 647–650
4 Graveland-Bikker JF, Schaap IAT, Schmidt CF, de Kruif CG. Structural and mechanical study of a self-assembling protein nanotube. *Nano Lett*, 2006, 6: 616–621
5 Yan XH, He Q, Wang KW, Duan L, Cui Y, Li JB, Transition of cationic dipeptide nanotubes into vesicles and oligonucleotide delivery. *Angew Chem Int Ed, 2007*, 46: 2431–2434
6 Konig HM, Kilbinger AFM. Learning from nature: Beta-sheet-mimicking copolymers get organized. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 8334–8340
7 Jahnke E, Lieberwirth I, Severin N, Rabe JP, Frauenrath H. Topochemical polymerization in supramolecular polymers of oligopeptide-functionalized diacetylenes. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 5383–5386
8 Kaul G, Amiji M. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm Res*, 2002, 19: 1061–1067
9 Shah NK, Brodsky B, Kirkpatrick A, Ramshaw JAM. Structural consequences of D-amino acids in collagen triple-helical peptides. *Biopolymers*, 1999, 49: 297–302
10 Guo L, Colby RH, Lusignan CP, Whitesides TH. Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 2003, 36: 9999–10008
11 Venugopal MG, Ramshaw JAM, Braswell E, Zhu D, Brodsky B. Electrostatic interactions in collagen-like triple-helical peptides. *Biochemistry*, 1994, 33: 7948–7956
12 Hu Y, Jiang XQ, Ding Y, Chen Q, Yang CZ. Core-template-free strategy for preparing hollow nanospheres. *Adv Mater*, 2004, 16: 933–937
13 Guo R, Zhang LY, Jiang Z, Cao Y, Ding Y, Jiang XQ. Synthesis of alginic acid-poly[2-(diethylamino)ethyl methacrylate] monodispersed nanoparticles by a polymer-monomer pair reaction system. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 843–850
14 Ramzi A, Sutter M, Hennink WE, Jiskoot W. Static light scattering and small-angle neutron scattering study on aggregated recombinant gelatin in aqueous solution. *J Pharm Sci*, 2006, 95: 1703–1711
15 Yu YC, Berndt P, Tirrell M, Fields GB. Self-assembling amphiphiles for construction of protein molecular architecture. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 12515–12520
16 Feng YB, Jefferson EA, Goodman M. Cold denaturation of a synthetic collagen mimetic. *Biopolymers*, 1998, 45: 347–350
17 Feng YB, Melacini G, Taulane JP, Goodman M. Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. 2. Synthesis and conformational analysis by circular dichroism, ultraviolet absorbance, and optical rotation. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 10351–10358

# Synthesis of novel gelatin/poly (acrylic acid) nanorods via the self-assembly of nanospheres

DING Dan, WANG Jing, CHEN Ying, WU Wei & JIANG XiQun

Laboratory of Mesoscopic Chemistry and Department of Polymer Science & Engineering, College of Chemistry & Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China

**Abstract:** In this paper, gelatin-poly(acrylic acid) (GEL-PAA) nanospheres with diameter of around 35 nm were prepared using a polymer-monomer (gelatin-AA) pair reaction system. These nanospheres can self-assemble into nanorods in aqueous solution at 4 $^{o}$C. Base on the observation of the intermediate state of the formation of the nanorods and the facts that the self-assembly can only occur at relatively low temperature and the gelatin molecules on the outermost layer of the GEL-PAA nanospheres can be renatured to triple helix conformation, it can be rationally inferred that the hydrogen bonding and electrostatic interactions between the gelatin molecules with the triple helix structure induce the one-dimensional self-assembly of the nanospheres into nanorods.

**Keywords:** gelatin, nanorods, triple helical conformation, one-dimensional self-assembly