

QCM 对牙釉基质蛋白在牙釉质表面的吸附行为

王志伟¹, 赵月萍¹, 周长忍², 廖国威³

(暨南大学 1. 医学院口腔医学系, 2. 理工学院材料系, 广东 广州 510632;

3. 暨南大学附属第一医院口腔科, 广东 广州 510630)

[摘要] 目的: 通过石英晶体微天平技术在牙釉质表面吸附牙釉基质蛋白, 进而研究牙釉质表面对不同质量浓度蛋白吸附性能的影响。方法: 在石英晶片上制备牙釉质膜, 将其分别浸入 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的牙釉基质蛋白溶液; 通过共振频率、耗散因子、吸附量随质量浓度的变化关系, 得出牙釉基质蛋白吸附的规律。结果: 共振频率随质量浓度的提高而降低; 吸附量随质量浓度的提高稳定的增长; 结论: 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白溶液中, 牙釉质表面吸附蛋白的成膜刚性较好。石英晶体微天平技术对牙釉基质蛋白吸附机理的研究显得更直观, 是研究蛋白吸附行为的有效工具。

[关键词] 石英晶体微天平; 牙釉质; 牙釉基质蛋白; 吸附

[中图分类号] O632.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)06-0587-04

Study on adsorption of enamel matrix proteins onto enamel surface by QCM

WANG Zhi-wei¹, ZHAO Yue-ping¹, ZHOU Chang-ren², LIAO Guo-wei³

(1. Department of Conservative Dentistry;

2. Department of Materials, College of Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

3. Department of Stomatolaogy, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Aim:** The technology of quartz crystal microbalance (QCM) was applied to research on the adsorption behavior of enamel matrix proteins (EMPs) which are available on the enamel surface, to study enamel matrix proteins on the impact of the enamel surface's adsorbable performance. **Methods:** The film of enamel was prepared for quartz wafer, soaked in a variety of EMPs concentrations ranging from 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$; the adsorbed regularity of EMPs was acquired by the relation between the resonant frequency, energy dissipation, adsorbed mass and the various concentration. **Results:** The resonant frequency change decreased with the concentration, but the adsorbed amount increased steeply with the concentration. **Conclusion:** The adsorption at 20 $\mu\text{g/mL}$ exhibited a much more viscose outer-layer structure. QCM which looks direct-viewing for the adsorbable mechanism of EMPs is an effective tool for study on the adsorbed behavior of protein.

[Key words] quartz crystal microbalance; enamel; enamel matrix proteins; adsorption

石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)作为一种感应表面质量变化的技术仪器,具有在线跟踪监测微观过程的变化,获取丰富的在线信息的优点,可进行实时、原位研究材料表面与蛋白质的相互作用。

用于生物材料表面蛋白质吸附的研究方法很多,如原子力显微镜、ATR-IR、椭圆偏振仪、紫外光谱、核磁共振、顺磁共振、热分析、X射线、X光电子能谱、色谱、电子显微镜和免疫显微镜接触角和表面自由能、电泳、同位素标记、圆二色性和旋光色散等^[1],但上述方法无法实时的提供蛋白质吸附行为的信息,也不能及时反映材料表面和蛋白质的相互作用。因此,QCM对吸附机理的研究显得更直观,是研究吸附行为的有效工具。具有灵敏度高、快速准确,同时样品无需纯化和标记,所需样品量少等优点广泛应用于动力学分析、蛋白质静电吸附和DNA检测等。

本研究将牙釉质粉固定在传感片的表面,研究牙釉质表面对牙釉基质蛋白的吸附行为及牙釉基质蛋白与牙釉质表面的相互作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料及仪器

实验标本 临床正畸减数拔除的初萌双尖牙15颗,要求根尖孔完全发育形成,牙面无裂纹,由暨南大学第一附属医院口腔科提供。牙釉基质蛋白,乙酸法自提;石英晶体微天平,芬兰KSV Instruments Ltd;超声波发生器,天津奥特赛恩斯仪器公司;全自动电脑干燥箱,杭州蓝天化验仪器厂;无水乙醇,分析纯,广州试剂厂;乙酸,分析纯,广州试剂厂。

1.2 实验方法

(1) QCM样品池、金片表面的准备 选用5MHz、AT切型的Au电极石英晶振作为基本元件,石英晶片直径为12.5 cm,Au膜气相沉积在盘片的两边(直径250~300 nm)。由金电极石英晶振为核心元件制作检测池。电极表面的处理是用无水乙醇清洗电极表面3次,每次5 min;随后用去离子水漂洗3次,每次5 min,干燥后测定其在气相中的基本频率 f_0 ,频率稳定的用做检测池,不稳定的弃之。

(2) 牙釉质膜的制备 取新鲜正畸拔出的人的后牙,根尖发育完整,无龋坏及其它牙体疾病,剔去

牙根表面软组织,用体积分数为1% HClO₄溶液浸泡30 min后,再于超声条件下分别浸泡在无水乙醇和去离子水中10 min清洗;用金刚砂钻将牙釉质从牙体上磨削下来制得粉末样品;按照文献[2]方法进行脱脂、脱蛋白处理。

称取1 g处理后牙釉质粉溶解在50 mL蒸馏水中,静置备用。将刚配制好的牙釉质粉悬浊液滴在金电极表面,使其在表面形成一层均匀的液面层,置于室温下干燥备用。

(3) 牙釉基质蛋白溶液的配制 牙釉基质蛋白溶解到10 mmol/L的醋酸溶液中得到0.5~5.0 mg/mL的储备溶液。储备溶液根据测量仪器的需要通过缓冲溶液调节成适宜pH(pH=7.4)值的溶液。

(4) 石英晶体微天平的实时监控 首先在检测池外,通过缓冲溶液稀释牙釉基质蛋白(enamel matrix proteins, EMPs)储备溶液到所需10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度。稀释后,EMPs溶液在浸入检测池前进入温控回路7 min,使其达到稀释平衡。将已镀好牙釉质膜的QCM基片固定在石英晶体微天平上,大小为80 μL 。先用对应pH值的改良磷酸盐缓冲液(phosphate saline buffer, PSB)浸泡,并穿过一个温控回路。待QCM频率稳定后,分别加入10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的EMPs溶液,置于室温进行吸附。

2 结果

在pH=7室温条件下,用QCM监测不同质量浓度下(10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)的吸附,吸附量随质量浓度的提高稳定的增长。频率响应及其Sauerbrey聚集,随着质量浓度的增加而增多,如图1、3所示。另一方面,耗散因子在这两个比较低的质量浓度下,其数值较低。对于最高质量浓度来说,耗散因子明显的增长,如图2所示。在图4中,可以很清楚的反映不同的吸附行为。在质量浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 情况下,直线的倾斜率较低,而在20 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,直线的倾斜率略高。最高质量浓度的釉原蛋白溶液在开始时与20 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白溶液倾斜率相同,随着时间的增长,其倾斜率有了显著的增加,这表明,在薄膜的最外层结构上产生了较多的纤维胶。综合图1~4分析,在20 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,牙釉质表面吸附了一层具有一定附着力和膜刚性的蛋白膜。

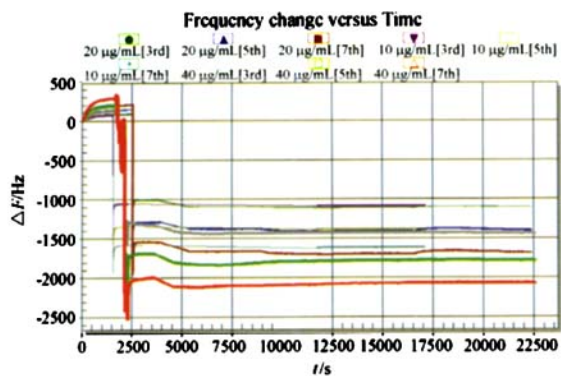


图 1 在第 3(15 MHz)、5(25 MHz)、7(35 MHz)谐波下共振频率变化与时间曲线

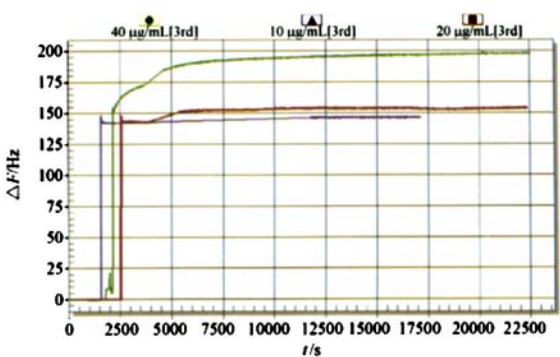


图 2 在第 3 个谐波下的耗散因子变化与时间的曲线

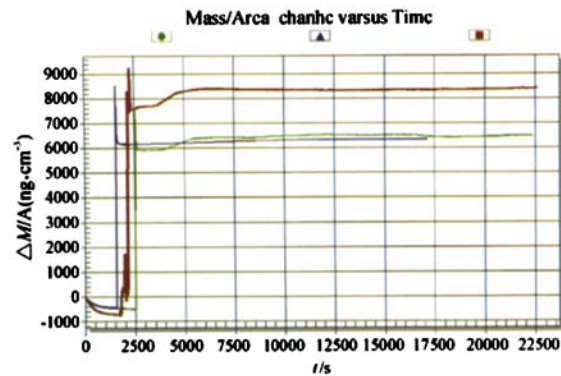


图 3 在第 3 个谐波下的吸附量变化与时间的曲线

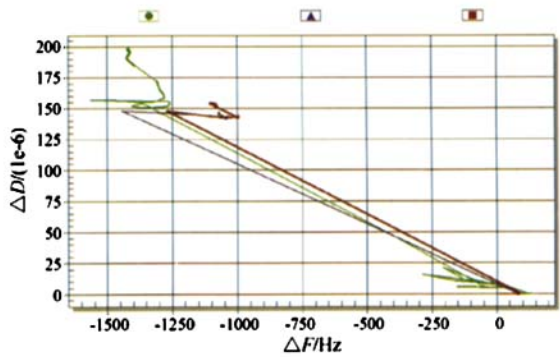
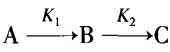


图 4 在第 3 个谐波泛频数下的耗散因子变化对共振频率变化曲线

3 讨论

3.1 蛋白质吸附动力学

描述蛋白质吸附动力学过程最简单的方法是在电极/溶液界面发生如下的连串反应^[3]:



这里 A 代表自由蛋白质分子,B 代表吸附到电极表面的分子,而 C 代表重排的分子或者第二层被吸附的蛋白质分子。

通常人们认为蛋白质和生物材料之间的作用力主要是亲疏水性作用及静电作用力^[4-5]。牙釉基质蛋白与牙釉质中的羟基磷灰石(hydroxyapatite,HAP)之间的相互作用使得电极表面的亲水性增加从而增大了界面电容,这说明牙釉基质蛋白与 HAP 之间还可能有别的作用力或蛋白质分子的其他部分与 HAP 的作用。文献报道^[5],蛋白质与 HAP 之间的作用不仅包括蛋白质带正电部分和 HAP 之间的作用,还包括蛋白质羧基与 HAP 表面的 Ca 离子的

作用。由于牙釉基质蛋白疏水端的羧基与 HAP 表面的 Ca 离子相结合,使得 HAP 表面吸附牙釉基质蛋白的亲水部分暴露出来,界面电容增加。

3.2 牙釉基质蛋白在牙釉质表面的吸附规律

研究发现重组牙釉基质蛋白 rM179^[6]和天然牙釉基质蛋白^[7]都能在溶液中自组装成微球。在研究中,我们发现吸附行为是在固液界面累积的小自组装微球导致的。本研究结果展示釉原蛋白的吸附行为非常依赖于浓度。在低质量浓度情况下,牙釉基质蛋白吸附直径在 15~20 nm 的自组装粒子,通过薄膜厚度得出稀少的粒子分布在牙釉质表面。随着质量浓度的增加,微球附着稠密。在最高质量浓度的情况下,微球开始在已吸附粒子上形成第二层,获得的薄层厚度大约为 40 nm,等同于一个 20 nm 的双层膜。因此,在高质量浓度下的膜聚集由两层稀疏的包覆层组成,这两个包覆层在吸附量上等于 10~20 μg/mL 质量浓度下的稠密的单包覆层。在图中我们可以看到在高质量浓度下的动态吸附时间

非常快,以至于在此质量浓度下不能表示出第二层的形成。第二层是否在过渡质量浓度下形成可能依赖于在注入和混和储备蛋白溶液引起的局部质量浓度的变化。在清洗过程中,吸附量总是减少,与此同时,仅仅在高质量浓度下形成多层膜的厚度减少,这样可以表明最外层属于松弛性黏附。

在 10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下 QCM 表征的吸附量相对较很低的原因在于迅速的聚集。由于在检测池中不能注入和稀释 EMPs 储存溶液,所以必须在检测池外用缓冲溶液($\text{pH} = 7.4$)稀释。在稀释溶液最终进入吸附样本池前,要在温控回路中进行 5 min 的稀释平衡处理。因而,在 EMPs 溶液开始吸附前,进入温控回路 7 min,使其达到稀释平衡,这样就导致低质量浓度溶液中存在的微球减少。在这两种质量浓度的情况下,吸附的薄膜表现出了期望的低耗散因子。然而,通过观察图 3~4,这两个不同质量浓度的蛋白溶液表现出了不同的倾斜度。其中 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下牙釉质表面的吸附膜曲线产生了低的倾斜度,表明产生了一层刚性薄膜;而最高质量浓度(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下曲线产生了比较高的倾斜度,表明生成了弱刚性薄膜,能量被耗散到稀松分布粒子之间的水中。在 QCM 监测高质量浓度(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的结果中,溶液中含有足够多的剩余微球进而吸附到了第二层薄膜上。我们通过 QCM 表征的高吸附量结果可以得出,在稀松的包覆微球之间大量的水被吸附。

牙釉基质蛋白通过自组装微球方式吸附到牙釉质表面。在高质量浓度(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和中性 pH 值的条件下,这些微球可以形成多层。在多层中促进微球吸附的疏水性相互作用也导致其快速的聚集成大的微观粒子,从而在溶液中有效的降低游离微球的浓度。因此,吸附量和微球在牙釉质表面组成多层的与否主要受到微球浓度的调控。多层也可以通过连续注入新鲜的釉原蛋白溶液得以形成。

本实验将人的初萌双尖牙制成粉末样品,运用 QCM 成膜技术将其附着在石英微量天平的基片表面,浸入到盛有在不同质量浓度下(10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的蛋白溶液的检测池中,通过共振频率、耗散因子、吸附量随质量浓度的变化关系,得出牙釉基质蛋

白吸附的规律。结果显示,共振频率随质量浓度的提高而降低;吸附量随质量浓度的提高稳定的增长;从耗散因子-频率变化曲线中,可以得出在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白溶液中,牙釉质表面吸附蛋白的成膜刚性较好,形成了自组装单层膜。本研究采用新方法 QCM 实时原位监测牙釉质对牙釉基质蛋白的吸附,为吸附蛋白牙釉质再矿化的研究提供试验基础,并为进一步研究生物矿化法预防与治疗龋病提供参考依据。

[参考文献]

- [1] 金关泰. 分子化学的理论和应用进展[M]. 北京:中国石化出版社,1995:335-338.
- [2] HOOK F, FANT C, SOT K, et al. Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study[J]. Anal Chem, 2001, 73(24): 5796-5804.
- [3] XIANG C, XIE Q, YAO S. Electrochemical quartz crystal impedance study of glucose oxidation on a nickel hydroxide modified Au electrode in alkaline solution[J]. Electroanalysis, 2003, 15(11): 987-990.
- [4] ANSELMA K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. Biomaterials, 2002, 21(7): 667-681.
- [5] LI L G, CHEN S F, JIANG S Y. Protein adsorption on alkanethiolate self-Assembled monolayers: nanoscale surface structural and chemical effects[J]. Langmuir, 2003, 19(7): 2974-2982.
- [6] RODDICK-LANZILLOTTA A D, CONNER P A, McQuillan A J. An in situ infrared spectroscopic study of the adsorption of lysine to TiO_2 from an aqueous solution[J]. Langmuir, 1998, 14(22): 6479-6484.
- [7] WEN H B, FINCHAM A G, MORADIAN-OLDAK. Progressive accretion of amelogenin molecules during nanospheres assembly revealed by atomic force microscopy[J]. Matrix Biol, 2001, 20(5): 387-395.
- [8] WEN H B, MORADIAN-OLAACK J, LEUNG W, et al. Microstructures of an amelogenin gel matrix[J]. Struct Biol, 1999, 126(1): 42-51.

[责任编辑:朱颖娜]