

第三章 各种含卵清蛋白（OVA）的乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）纳米粒的制备及体外评价

乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）已被 FDA 批准应用于药品的生产，是一种无毒性、可生物降解、生物相容性较好的材料。同时也是制备生物降解性缓释、定向给药系统的合适材料。据文献报道，许多研究已将蛋白质或者多肽类药物制备成 PLGA 纳米粒或微球制剂，能起到缓释作用，并且保护了蛋白质和多肽药物的稳定性。而使用壳聚糖包衣，能改变 PLGA 纳米粒的表面电荷以及增加黏附性；使用甘露糖修饰的壳聚糖包衣后，通过甘露糖受体介导的吞噬作用，能增加树突状细胞或者巨噬细胞对纳米粒的摄取。

本实验以卵清蛋白(OVA)为模型药物，采用复乳法制备了含有 OVA 的 PLGA 纳米粒、壳聚糖以及甘露糖修饰壳聚糖包衣的 PLGA，研究了不同制备工艺、附加剂以及壳聚糖包衣等因素对纳米粒包封率、载药量、粒径和 zeta 电位的影响，并进行了纳米粒的体外释放实验。

1 实验材料和仪器

1.1 试剂

卵清蛋白（OVA，纯度：BR），购自国药集团化学试剂有限公司；

聚乙烯醇（PVA，17-88，纯度：工业级），购自苏州市中远化工供销有限公司；

乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA，50:50，MW=20000），购自济南岱罡生物技术有限公司；

2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠（BCA，纯度：BR），购自苏州工业园区亚科化学试剂有限公司；

壳聚糖（CS，分子量 8000-10000），购自南通兴成生物制品厂；

其余试剂均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

匀浆机（IKA T18），广州仪科实验室技术有限公司；

真空冷冻干燥机（LG-5），上海市离心机械研究所；

超声细胞粉碎仪（JY92-II），宁波新芝生物科技股份有限公司；

恒温振荡器 (HH-4) 和恒温磁力搅拌器 (85-2A), 金坛市富华仪器制造有限公司;

高速低温离心机, Beckman 公司;

二氧化碳培养箱 (HF151UV), Heal Force 公司;

酶标仪 (ELX808IU) 和电泳仪, Bio-rad 公司;

透射电镜 (TecnaiG220), 美国 FEI 公司;

激光粒度分析仪 (HPP 5001), 英国马尔文公司。

2 溶液的配制

2.1 BCA 试剂的配制

A 试剂: 取 BCA 1g (1%), NaOH 0.4g (0.4%), NaHCO₃ 0.95g (0.95%), Na₂CO₃ 1.7g (1.7%), 酒石酸钠 0.16g (0.16%), 加水至 100mL, 用 NaOH 或者 NaHCO₃ 调节 pH 至 11.24。

B 试剂: 取 CuSO₄·5H₂O 0.4g 加水 10mL。

BCA 工作液: A 试剂与 B 试剂 50:1 配制成 BCA 工作液。

2.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液的配制

取 0.1M NaOH 79mL, 加入 KH₂PO₄ 1.36g, 加水稀释至 200mL, 得到 pH 为 7.4 的 PBS 溶液。

2.3 蛋白质电泳试剂

30% 丙烯酰胺: 29g 丙烯酰胺加上 1g 双丙烯酰胺, 加蒸馏水至终体积为 100mL, 充分溶解, 即得。

1.5mol·L⁻¹ Tris (三羟甲基氨基甲烷)-HCl (pH8.8): 称取 18.17g Tris 置于 100mL 烧杯中, 加约 80mL 的去离子水, 充分搅拌溶解。用浓盐酸调节 pH 至 8.8 后, 定容至 100mL, 即得。

1mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH6.8): 称取 12.11g Tris 置于 100mL 烧杯中, 加约 80mL 的去离子水, 充分搅拌溶解。用浓盐酸调节 pH 至 6.8 后, 定容至 100mL, 即得。

10% SDS: 取 1g SDS 溶于去离子水中, 定容终体积至 10mL, 即得。

10% 过硫酸铵: 取 1g 过硫酸铵溶于 10mL 的去离子水, 即得。

5×Tris-甘氨酸电极缓冲液: 称量 Tris 15.1g, Glycine 94g, SDS 5.0g, 溶于 800mL 的去离子水中后, 定容至 1L。

5×上样缓冲液: 量取 1M Tris-HCl (pH6.8) 1.25mL, SDS 0.5g, BPB 25mg,