

聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯)改性金表面用于构建生物检测基材*

李 丹^{1,2} 王莎莎^{1,2} 郑 军^{1,2} 陈 红^{2**}

(¹武汉理工大学 材料科学与工程学院 武汉 430070) (²苏州大学 材料与化学化工学部 苏州 215123)

摘 要 采用电子活化再生原子转移自由基聚合 (AGET ATRP) 的方法将聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯) (PHEMA) 接枝在金表面, 对经修饰的金表面的生物惰性做了系统的研究, 并利用 PHEMA 的羟基末端固定生物素 (biotin) 分子, 以 biotin 对抗生物素蛋白 (avidin) 的识别为模型, 研究了不同厚度的 PHEMA 对结合 avidin 的影响, 以及该表面作为生物检测基材的可行性. 生物惰性研究表明, PHEMA 修饰的金表面不但能够有效的排斥纤维蛋白原 (Fg)、人血清白蛋白 (HSA) 和溶菌酶 (Lys) 的非特异性吸附, 还能够抑制 3 种细胞 (L02、L929 和 EC) 的黏附, 是一种良好的抗污表面. 通过控制聚合时间制备了不同厚度的 PHEMA-biotin 修饰的表面, 同位素 ¹²⁵I 标记 HSA 吸附结果表明这几种表面均能够有效排斥非特异性蛋白质吸附, 特异性 FITC-avidin 吸附结果表明, 厚度较小时 (16 nm) 由于荧光淬灭而难以检测到荧光信号, 厚度在 16 nm 和 49 nm 之间, 荧光信号随厚度增加而增强, 通过比较信噪比, 认为厚度在 49 nm 以上时比较理想. 该表面在应用于 QCM 与荧光检测中均表现出良好的检测性能.

关键词 聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯), 生物检测, 荧光, 蛋白质吸附, 金表面

金表面由于具有独特的物理化学性质而广泛应用于各种不同的生物传感界面, 例如, 电化学传感^[1,2]、表面等离子体共振 (SPR)^[3] 和石英晶体微天平 (QCM)^[4,5]. 更重要的是, 由于金与巯基之间的高亲和性, 使得金表面易于修饰^[6], 并可获得规整的、可设计的自组装单分子层^[7], 这样便有利于探针分子在表面的固定, 特别是易于获得集成了大量识别分子的微点阵. 因此, 金是发展新型生物芯片的理想基材. 但是, 金表面可以通过非辐射能量转移的方式对荧光物质进行荧光淬灭^[8~10], 不利于新的生物芯片技术与传统的依赖于荧光信号收集的芯片技术进行比较或结合. 此外, 金表面与生物分子之间的非特异性相互作用, 特别是与蛋白质分子中的二硫键直接键合, 将会影响到检测的灵敏度. 因此, 在固定生物识别分子之前对表面进行合理的修饰是十分必要的.

在金表面引入可排斥非特异性蛋白质吸附且含有大量活性侧基的聚合物层可以有效提高检测的信噪比, 并能够将荧光基团与金表面隔离开, 从而避免荧光淬灭. 在这方面研究较广泛的是聚(甲基丙烯酸低聚乙二醇酯) (POEGMA)^[11,12], 此外 Jiang 课题组在金表面聚合两性离子的羧基甜

菜碱 (CB) 并利用末端的羧基固定探针分子, 也获得与 POEGMA 相当的效果^[13~15]. 聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯) (PHEMA) 具有良好的生物相容性且广泛应用于组织工程^[16], 药物控释^[17] 以及抗污材料^[18] 等, 以 PHEMA 修饰的材料表面具有良好的生物惰性, 且 PHEMA 具有大量的羟基末端, 可作为固定生物识别分子的活性点^[19,20], 已有研究表明, PHEMA 能够比 POEGMA 更有效的固定探针分子^[12], 是用来构建生物芯片表面修饰层的良好选择.

然而, 目前对 PHEMA 修饰金片表面的研究仍不够系统, 本研究采用电子活化再生原子转移自由基聚合 (AGET ATRP) 的方法将 PHEMA 修饰在金表面, 对其生物惰性做了系统的研究. 同时利用 PHEMA 的羟基末端固定生物素分子, 以生物素 (biotin) 对抗生物素蛋白 (avidin) 的识别为模型, 研究了不同厚度的 PHEMA 对结合 avidin 的影响, 以及该表面作为生物检测基材的可行性.

1 实验部分

1.1 试剂

HEMA (Aldrich 公司), 使用前通过减压蒸馏

* 2010-10-08 收稿, 2010-11-23 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 20974086; 20920102035) 资助; ** 通讯联系人, E-mail:

chenh@suda.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.10284

除去阻聚剂;甲醇、乙醇、乙腈和三乙胺(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),使用前均经过纯化处理; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,上海实验试剂有限公司);2,2'-联吡啶($\geq 99\%$,Aldrich 公司);抗坏血酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); N,N' -二琥珀酰亚胺碳酸酯(DSC,99%,Shanghai Medpep 公司);生物素酰肼(biotin- NH_2 ,98%,Sigma 公司);牛血清白蛋白(BSA,Solarbio 公司);纤维蛋白原(Fg,Calbiochem 公司);溶菌酶(Lys,Sigma 公司);人血清白蛋白(HSA,Sigma 公司);异硫氰酸荧光素(FITC,Amresco);荧光素标记抗生物素蛋白(FITC-avidin,武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 金表面聚合 PHEMA 及接枝 biotin

通过 AGET ATRP 在金表面聚合 PHEMA 以及在其羟基末端固定 biotin 的合成路线如图 1 所示.首先按照文献[21]的方法制备引发剂 SH(CH_2)₁₁ OOC(CH₃)₂Br.将金片(0.5 cm × 0.5 cm)和 QCM 芯片浸入含有氨水和双氧水的水溶液中(去离子水:氨水:双氧水 = 5:1:1,体积比),75℃下清洗 5 min,然后依次用水和乙醇清洗并用氮气吹干.将引发剂配制成 5 mol/L 的乙醇溶液

并将清洗好的金片和 QCM 芯片浸泡其中,室温下组装 24 h,然后用乙醇清洗并用氮气吹干.

将 1.3 g HEMA 单体、12.5 mg 2,2'-联吡啶和 1 mL CuCl_2 溶液(0.04 mol/L)加入到 5 mL 甲醇和 5 mL 去离子水中配制成反应溶液,通入氮气流进行排氧,10 min 后用注射器注入 1 mL 抗坏血酸溶液(0.04 mol/L),继续通氮气流 20 min.将除氧后的反应溶液和组装了引发剂的金片和 QCM 芯片转移至手套箱中,将反应溶液倒入放置了金片和 QCM 芯片的玻璃器皿中,室温下聚合 10,30,60 和 180 min.最后用去离子水清洗接枝了 PHEMA 的金片和 QCM 芯片表面(Au-PHEMA),然后在甲醇中浸泡过夜并用氮气吹干.

将 0.256 g DSC 和 0.1 g 三乙胺溶于 20 mL 无水乙腈中,将 Au-PHEMA 浸泡其中,室温下反应 6 h,然后用无水乙腈清洗,氮气吹干.将 DSC 激活后的 Au-PHEMA 加入到 1 mg/mL 的 biotin- NH_2 乙醇溶液中,室温反应 24 h,反应完毕用乙醇清洗,氮气吹干,获得 PHEMA-biotin 修饰的表面(Au-PHEMA-biotin).最后将 Au-PHEMA-biotin 浸泡于 0.1 mg/mL 的(EG)₂NH₂ 乙醇溶液中 2 h,将未反应的琥珀酰亚胺活性酯基团进行灭活.

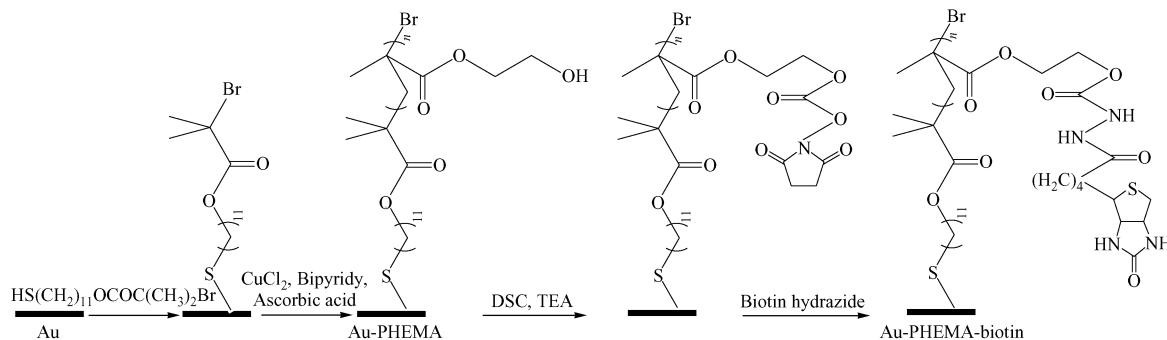


Fig. 1 Schematic illustrating the processes of surface modification

1.3 表面性能测试

利用傅里叶红外光谱仪(Nicolet 6700)对 PHEMA 接枝后的表面化学结构进行表征,采用 MCT 检测器,SAGA 附件,采集信号次数为 64 次;利用 M-88 光学椭圆偏振仪(J. A. Woollam 公司)测量 PHEMA 接枝层厚度;利用 SL200C 型接触角仪表征 PHEMA 改性表面浸润性(每种样品平行测定 6 次,求其平均值)。

1.4 同位素标记蛋白质吸附测试

采用同位素标记法测定表面的蛋白质吸附量,具体方法见文献[22].将 Lys、Fg 和 HSA 用同

位素¹²⁵I 标记,利用¹²⁵I 的示踪作用来定量测试其吸附情况.首先,将样品浸泡于含有 0.002 mg/mL NaI 的磷酸盐缓冲溶液(NaI-PBS, pH = 7.4,下同)中过夜,然后将标记与未标记的蛋白质溶液按蛋白质质量 1:49 的比例进行混合,并以 NaI-PBS 为体积补充溶剂.将待吸附的金片浸泡于该蛋白质溶液中,室温下静置浸泡 3 h 后取出,然后用 NaI-PBS 溶液静置浸泡洗涤 3 次(10 min/次),用滤纸吸干后转入样品管,放入 Wallac 1480 Wizard 型伽马计数器(Perkin Elmer 公司)中测试放射量,通过计算将放射量转换成蛋白质质量.每

种样品取 3 片同时测试,取平均值,吸附量以 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 表示.

1.5 细胞黏附测试

L929 细胞、内皮细胞 (EC) 和 L02 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养. 通过胰酶解离收集细胞,经苔盼蓝染色计算细胞存活率大于 95%. 将 3 种细胞分别以 $22000 \text{ cells}/\text{cm}^2$ 的密度种到已消毒的待测材料表面,培养 66 h 后取出,于显微镜 (Olympus, IX-71) 下拍照.

1.6 QCM 测试蛋白质吸附

通过 QCM (E4, Q-Sense) 定量检测表面对 avidin 和 BSA 的吸附. 将改性与未改性的 QCM 芯片置于 QCM 样品池中,进行实时检测. 待空气中基线平衡后通入 PBS 缓冲液,待平衡后通入 $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$ 的蛋白质溶液,再次平衡后通入 PBS 缓冲液进行清洗. 取 3 次倍频的 ΔF ,利用 Sauerbrey 方程将 ΔF 换算蛋白质的吸附量.

1.7 荧光标记蛋白质吸附

通过荧光标记蛋白吸附检测改性与未改性的表面结合 avidin 以及抗 BSA 吸附的能力. 按照文献[23]的方法用 FITC 标记 BSA,将 FITC-avidin 和 FITC-BSA 均配制成 $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$ 的 PBS 溶液,将改性与未改性的金片浸泡其中,避光条件下室温吸附 3 h,然后用 PBS 清洗 ($3 \times 10 \text{ min}$),室温自然晾干. 最后用荧光显微镜 (Olympus, IX-71) 进行拍照,并通过软件 Image J 对绿色光亮度进行分析.

2 结果与讨论

2.1 PHEMA 改性表面的表征

通过红外光谱对 PHEMA 改性后表面的化学组成进行表征. 如图 2 所示, 3426 cm^{-1} 处为羟基的 O—H 的伸缩振动吸收峰; 2950 cm^{-1} 处为亚甲基的 C—H 伸缩振动吸收峰; 1729 cm^{-1} 处为酯基的 C=O 伸缩振动吸收峰; 1276 cm^{-1} 处为酯基的 CO—O 伸缩振动吸收峰; 1168 cm^{-1} 处为 O—C—C 的反对称伸缩振动吸收峰, 1080 cm^{-1} 和 1026 cm^{-1} 处为 C—O 的伸缩振动吸收峰. 以上均为 PHEMA 特征官能团的振动吸收,表明 PHEMA 成功接枝在金的表面. 水接触角测试结果表明, PHEMA 接枝后,水接触角值由空白金片表面的 70° 降为 49° ,这是由于 PHEMA 带有大量的亲水性羟基所导致的.

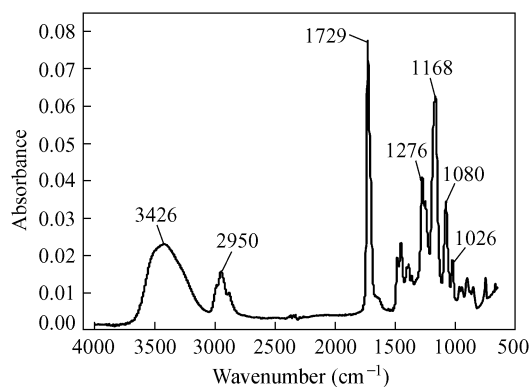


Fig. 2 Grazing angle IR spectrum recorded for PHEMA-modified surface

2.2 PHEMA 改性表面的生物惰性测试

材料表面的生物惰性主要体现在排斥非特异性蛋白质吸附及细胞黏附的性能上. 本研究选用 3 种不同大小和不同带电性的蛋白质,即 Fg、HSA 和 Lys,来研究 PHEMA 修饰的金表面对非特异性蛋白质吸附的排斥性. 如图 3 所示,与未改性的金表面相比, Au-PHEMA 表面对 Lys、HSA 和 Fg 的吸附量分别下降了 84%、82% 和 82%,说明 PHEMA 修饰的表面具有很好的排斥非特异性蛋白质吸附的能力,且该能力基本上不受蛋白质自身性质的影响. 这一方面是由于 PHEMA 自身具有良好的亲水性^[18],往往有利于排斥蛋白质的吸附;另一方面是由于表面致密的聚合物刷的“尺寸排斥效应”^[24],有效地抑制了蛋白质在表面的一级和三级吸附^[25],而表面仍存在的少量吸附则可能是由于二级吸附,即发生在聚合物刷最外层的吸附,而该种吸附往往是不牢固的,在存在竞争吸附的情况下易被取代.

3 种细胞在改性与未改性的金片表面的黏附结果如图 4 所示,在培养了足够长的时间 (66 h)

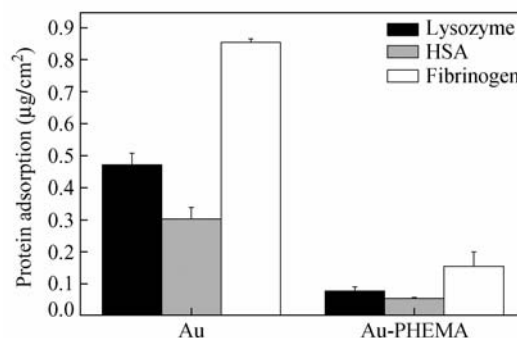


Fig. 3 ^{125}I -protein adsorption from buffer (3 h exposure) on PHEMA-modified and unmodified gold surfaces (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

后,未改性金片表面生长出致密的细胞层,而在 PHEMA 接枝表面,除了有极少量的 L929 细胞黏附以外,EC 和 L02 的黏附被完全抑制了.细胞的黏附在一定程度上与蛋白质的吸附相关,不利于蛋白质吸附的表面往往也不利于细胞的黏附,此

外,表面的结合水层也从很大程度上阻碍了细胞直接与表面发生作用.由以上结果可以说明所制备的 Au-PHEMA 是一种很好的生物惰性表面,以该表面作为生物芯片的基材将有利于避免被检测物质与芯片之间的非特异性相互作用.

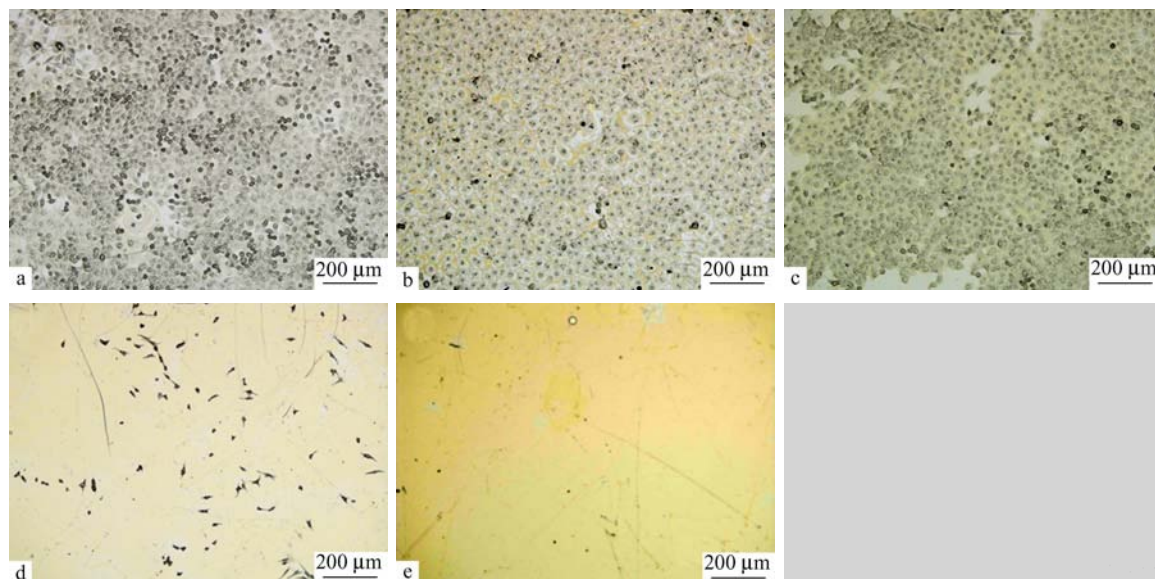


Fig. 4 Cell adhesion on PHEMA-modified (second row) and unmodified (first row) gold surfaces: (a, d) L929, (b, e) EC, (c, f) L02

2.3 PHEMA 间隔层厚度对 Au-PHEMA-biotin 表面检测 avidin 性能的影响

PHEMA 层的厚度对表面排斥非特异性蛋白质吸附、所固定的探针对目标分子的结合以及荧光信号的淬灭均会产生一定的影响.因此,在该部分中,通过控制聚合反应时间制备了不同厚度的 PHEMA (如图 5),并利用末端羟基固定 biotin,将具有不同厚度 PHEMA 层的 biotin 化表面与 FITC-avidin 相互作用,所获得的荧光信号结果如图 6 所示.在纯金片以及 16 nm 厚的 PHEMA-biotin 表面几乎检测不到任何荧光信号,这主要是由于所结合的 avidin 十分靠近金表面,因此荧光信号通过非辐射能量转移的方式被金表面淬灭.荧光信号从 16 nm 到 49 nm 出现明显的上升趋势,这可能由两方面的原因,一是由于 PHEMA 厚度的增加,其末端活性点的数量也随之增加,从而固定 biotin 的量也增加,因此较厚的 PHEMA-biotin 修饰的表面能够更多的结合 FITC-avidin;二是由于 PHEMA 厚度的增加使所结合的 FITC-avidin 远离金表面,从而很大程度的避免了荧光淬灭的发生.49 nm 以后荧光信号强度趋于饱和,这是因为表面的 PHEMA 层非常致密,导致蛋白质难以渗入到聚合物层内部,而只是结合在上层,因此厚度的

变化对 avidin 的结合量已无明显影响.

非特异性 HSA 吸附实验如图 6 所示,各种厚度的 PHEMA-biotin 所修饰的表面与未修饰的金表面相比,均能够有效的排斥非特异性蛋白质吸附,随着厚度的增加,蛋白质吸附量略呈现出下降的趋势.通过比较各种表面的信噪比,厚度在 49 nm 以上比较理想.因此,选择厚度为 49 nm 的 PHEMA-biotin 修饰表面进一步研究其检测性能.

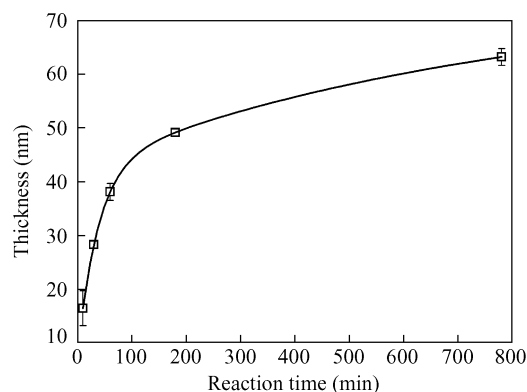


Fig. 5 PHEMA thickness versus polymerization time (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

2.4 Au-PHEMA-biotin 表面的生物检测性能

利用 QCM-D 验证所构建的表面 PHEMA-

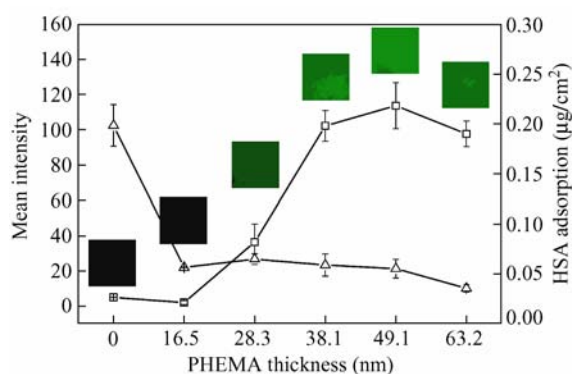


Fig. 6 ^{125} I-HSA adsorption on gold and PHEMA-biotin surfaces with varied PHEMA thickness (triangle) and mean intensity of the color produced by FITC-avidin that adsorbed on these surfaces (square)

Inserts are images of surfaces taken under blue light after FITC-avidin adsorption and the mean intensity of color was obtained by analyzing these images using Image J. (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

biotin 分子识别体系是否适用于生物传感的应用. QCM-D 技术测得的参数主要有频率变化 ΔF 和耗散因子变化 ΔD , ΔF 主要反映的是表面的质量变化, 而 ΔD 主要反映表面的黏弹性变化. 该研究中, 每种表面吸附蛋白质的过程中 ΔD 都没有显著的变化, 因此 ΔF 直接与表面的蛋白质吸附量相关, 且可以通过 Sauerbrey 方程换算出蛋白质的单位面积吸附量. 如图 7 所示, 未改性的 QCM 芯片表面对 avidin 有显著的吸附, ΔF 值为 -36 Hz (212 ng/cm ^{2}), 这主要是由非特异性吸附所导致的, 而修饰了 PHEMA 以后, 对 avidin 的吸附被完

全抑制了, 再次表明 Au-PHEMA 可以有效的排斥非特异性蛋白质吸附. 通过 PHEMA 链接 biotin 以后, 表面通过特异性作用而结合了 avidin, ΔF 值为 -36 Hz (212 ng/cm ^{2}), 而同等浓度的 BSA 在该表面却几乎没有发生任何吸附, 充分证明了 Au-PHEMA-biotin 表面可以在排斥非特异性蛋白质吸附的同时有效的识别并结合目标蛋白质 avidin.

Au-PHEMA 是否适用于传统生物芯片的检测模式主要取决于该基材能否进行荧光检测, FITC-avidin 在各种表面吸附的结果如图 8(a) ~ 8(c) 所示, 只有 avidin 修饰的表面显示出很强的绿色荧光信号, 且荧光分布均匀, 说明表面 avidin 覆盖的比较均匀. 上述 QCM 结果显示空白金片表面与

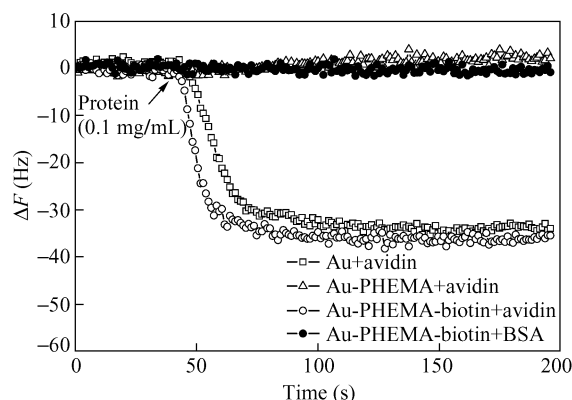


Fig. 7 QCM frequency shift of avidin (hollow) and BSA (solid) onto various surfaces

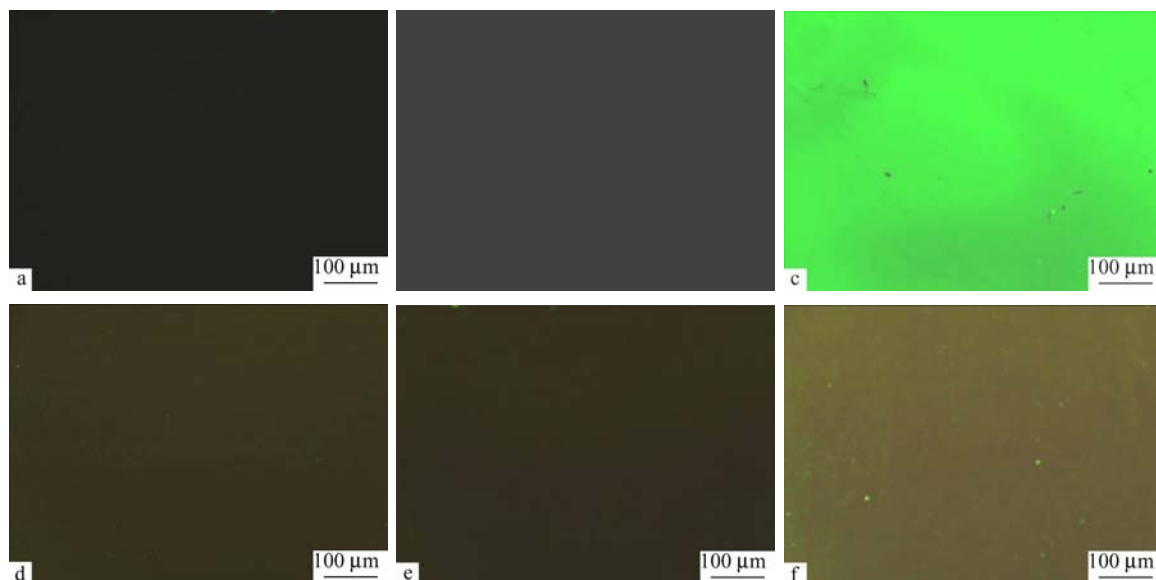


Fig. 8 Images of Au (a,d), Au-PHEMA (b,e) and Au-PHEMA-biotin (c,f) surfaces taken under blue light after incubated in FITC-avidin solution (first row) and FITC-BSA solution (second row)

biotin 修饰的表面,对 avidin 的吸附量相当,但此处空白金片表面并未显示出任何荧光信号(图 8(a)),这主要是由于直接吸附在金表面的 FITC-avidin,其荧光基团 FITC 十分靠近金表面而被淬灭,而 biotin 修饰的表面由于有较厚的 PHEMA 层将荧光基团隔离开表面从而避免了荧光淬灭.空白金片表面吸附 FITC-BSA 后没有荧光信号(图 8(d)),同样是由荧光淬灭导致的,而在 PHEMA 和 PHEMA-biotin 修饰的表面观察不到荧光(图 8(e)、8(f))则是由于 PHEMA 良好的排斥性避免了蛋白的非特异性吸附所导致的.荧光标记蛋白吸附结果表明了所制备的 Au-PHEMA-biotin 表面可以在排斥非特异性蛋白质吸附的同时有效的识别并结合目标蛋白质 avidin.总之,该种修饰了的基材不但适用于生物传感检测形式,也适用于荧光标记检测形式.

3 结论

本文通过 AGET ATRP 的方法将 PHEMA 修饰在金表面,对其生物惰性做了系统的研究,并利用 PHEMA 的羟基末端固定 biotin,以 biotin 对 avidin 的识别为研究模型,研究了不同厚度的 PHEMA 对结合 avidin 的影响,以及该表面作为生物检测基材的可行性.蛋白质吸附以及细胞黏附结果表明,PHEMA 修饰的金表面具有良好的抗污性能.通过控制聚合时间制备了不同厚度的 PHEMA-biotin 修饰的表面,同位素¹²⁵I 标记 HSA 吸附以及特异性 FITC-avidin 吸附结果表明,PHEMA 厚度在 49 nm 以上时的 biotin 化表面能够达到较理想的信噪比.该表面在应用于 QCM 与荧光检测中均表现出良好的检测性能,在基于生物传感以及荧光检测的生物芯片领域中有很好的应用前景.

REFERENCES

- 1 Yeo W S, Mrksich M. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 3121 ~ 3124
- 2 Meunier-Prest R, Bouyon A, Rampazzi E, Raveau S, Andreoletti P, Cherkaoui-Malki M. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 2598 ~ 2602
- 3 Bolduc O R, Pelletier J N, Masson J F. *Anal Chem*, 2010, 82: 3699 ~ 3706
- 4 Ayela C, Roquet F, Valera L, Granier C, Nicu L, Pugniere M. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 3113 ~ 3119
- 5 Otto K. *Res Microbiol*, 2008, 159: 415 ~ 422
- 6 Liu W, Yang X L, He X G. *Chinese J Polym Sci*, 2009, 27(2): 275 ~ 284
- 7 Love J C, Estroff L A, Kriebel J K, Nuzzo R G, Whitesides G M. *Chem Rev*, 2005, 105: 1103 ~ 1169
- 8 Du H, Disney M D, Miller B L, Krauss T D. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 4012 ~ 4013
- 9 Du H, Strohsahl C M, Camera J, Miller B L, Krauss T D. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 7932 ~ 7940
- 10 Kaiser W, Rant U. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 7935 ~ 7945
- 11 Lee B S, Chi Y S, Lee K B, Kim Y G, Choi I S. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 3922 ~ 3929
- 12 Trmcić-Cvitas J, Hasan E, Ramstedt M, Li X, Cooper M A, Abell C, Huck W T S, Gautrot J E. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 2885 ~ 2894
- 13 Zhang Z, Chen S F, Jiang S Y. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 3311 ~ 3315
- 14 Vaisocherova H, Yang W, Zhang Z, Cao Z Q, Cheng G, Pilarik M, Homola J, Jiang S Y. *Anal Chem*, 2008, 80: 7894 ~ 7901
- 15 Yang W, Xue H, Li W, Zhang J L, Jiang S Y. *Langmuir*, 2009, 25: 11911 ~ 11916
- 16 Lahooti S, Sefton M V. *Tissue Eng*, 2000, 6: 139 ~ 149
- 17 He H Y, Cao X, Lee L J. *J Control Release*, 2004, 95: 391 ~ 402
- 18 Hu M X, Yang Q, Xu Z K. *J Membrane Sci*, 2006, 285: 196 ~ 205
- 19 Xu F J, Zhong S P, Yung L Y L, Tong Y W, Kang E T, Neoh K G. *Tissue Eng*, 2005, 11: 1736 ~ 1748
- 20 Hu M X, Wan L S, Xu Z K. *J Membrane Sci*, 2009, 335: 111 ~ 117
- 21 Ma H W, Wells M, Beebe T P, Chilkoti A. *Adv Funct Mater*, 2006, 16: 640 ~ 648
- 22 Li D, Chen H, McClung W G, Brash J L. *Acta Biomater*, 2009, 5: 1864 ~ 1871
- 23 Chen H, Song W, Zhou F, Wu Z, Huang H, Zhang J, Lin Q, Yang B. *Colloid Surface B*, 2009, 71: 275 ~ 281
- 24 Yoshikawa C, Goto A, Tsujii Y, Fukuda T, Kimura T, Yamamoto K, Kishida A. *Macromolecules*, 2006, 39: 2284 ~ 2290
- 25 Currie E P K, Norde W, Stuart M A C. *Adv Colloid Interfac*, 2003, 100: 205 ~ 265

POLY(2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE) MODIFIED GOLD SURFACES AS BIO-DETECTION SUBSTRATES

LI Dan^{1,2}, WANG Shasha^{1,2}, ZHENG Jun^{1,2}, CHEN Hong²

(¹ School of Materials Science and Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070)

(² College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Soochow University, Suzhou 215123)

Abstract Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) was grafted from initiator-immobilized gold surfaces *via* activator generated by electron transfer atom transfer radical polymerization (AGET ATRP) to repel nonspecific protein adsorption and immobilize biotin for specific avidin binding. The surface polymerization of HEMA was demonstrated by FTIR and contact angle measurements. The bioinertness of the PHEMA-modified surfaces was systematically studied. ¹²⁵I-labeled protein (Fg, HSA and Lys) adsorption experiments showed that modification with PHEMA could decrease nonspecific protein adsorption by 82% at least. Cell adhesion results indicated that the Au-PHEMA surface could, to a great extent, resist the adhesion of L929, L02 and endothelium cell (EC). L929 showed slight adhesion while L02 and EC could not adhere at all. PHEMA-biotin modified surfaces with varied PHEMA thickness were prepared with different reaction time, and all these surfaces showed good nonspecific protein-repellant property. In the specific FITC-avidin adsorption experiments, the fluorescence was undetectable when the thickness of PHEMA was below 16 nm due to fluorescence quenching. The fluorescence increased with the thickness between 16 nm and 49 nm. The best signal-to-noise ratio was obtained when the thickness was above 49 nm. The optimized PHEMA-biotin surface performed quite well in the QCM and fluorescence bio-detections and showed potential applications as a substrate of biochip.

Keywords Poly (2-hydroxyethyl methacrylate), Bio-detection, Fluorescence, Protein adsorption, Gold surface