

pH 响应性表面对蛋白质吸附的调控*

李 鑫¹ 于 谦^{1,2} 张燕霞^{1,2} 武照强¹ 陈 红^{1**}

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

摘 要 通过表面引发原子转移自由基聚合在固定了引发剂的硅表面接枝了聚甲基丙烯酸叔丁酯 (PtBMA), 而后通过水解得到聚甲基丙烯酸 (PMAA) 聚合物刷. 通过 X 射线光电子能谱、椭圆偏振仪和水接触角测试证明了接枝改性的成功. 研究发现 PMAA 改性表面的浸润性和对蛋白质的吸附行为都具有一定的 pH 响应性. 在较低 pH 值时改性表面相对疏水, 随着 pH 的升高, 表面的亲水性增强. 这种浸润性的 pH 响应性具有可逆性和可重复性. 蛋白质吸附测试发现, 相对于 pH = 9, 在 pH = 4 时改性表面对纤维蛋白原的吸附量增加了近 39 倍. 初步表明应用该表面可以实现利用溶液 pH 值控制蛋白质在表面的吸附.

关键词 聚甲基丙烯酸, pH 响应性, 浸润性, 蛋白质吸附

蛋白质在材料表面的吸附是自然界存在的一种非常普遍但又十分复杂的现象, 生物功能材料表面所吸附蛋白质的种类及数量将直接影响其与生命体的生物相容性和功能诱导^[1]. 不同的应用领域对材料表面蛋白质吸附的要求各不相同. 对于蛋白质纯化分离以及药物控制释放等应用领域, 需要材料表面能够随着外部环境因素的变化实现对蛋白质的吸附与解吸附^[2~4]. 目前普遍认为, 蛋白质吸附的驱动力主要包括疏水作用和静电作用^[5]. 因此, 通过采用合适的方法控制这两种弱相互作用就可以进而控制蛋白质与表面的相互作用以满足实际应用需要.

聚甲基丙烯酸 (PMAA) 是一种常见的聚电解质, 其分子链上带有大量容易离解的羧基. 在较高的 pH 时, 羧基发生电离而带负电荷, 由于静电斥力导致分子链呈伸展构象; 而在较低的 pH 时, 羧基不发生电离, 静电斥力消失, 分子链由于彼此之间的疏水作用呈收缩的构象^[6~9]. 当把 PMAA 通过物理或化学方法固定在基材表面上后, 随着环境 pH 值的变化, 改性表面性质 (如浸润性、带电情况) 会发生响应性的变化, 而这些变化必然会对表面与蛋白质的相互作用产生影响^[10]. 因此, 研究蛋白质与 PMAA 改性材料表面的相互作用以及 pH 改变造成的表面特性的响应性变化对蛋白质吸附的影响, 以调控特异性蛋白质在表面的吸附具有重要的理论价值和潜在的应用前景.

本文通过表面引发原子转移自由基聚合 (SI-ATRP) 的方法制备了 PMAA 改性表面. 利用水接触角和蛋白质吸附测试研究了环境 pH 值对改性表面的浸润性以及和蛋白质相互作用的影响.

1 实验部分

1.1 试剂

单晶硅片 (n 型掺杂, (100) 取向, 厚度为 0.56 mm), 切割成固定面积 (0.5 cm × 0.5 cm) 的方形备用. 甲基丙烯酸叔丁酯 (*t*BMA, Aldrich) 通过中性氧化铝层析柱除去阻聚剂后使用; 溴化亚铜 (CuBr, Fluka) 用冰乙酸和甲醇反复洗涤至苍白色, 抽滤后真空干燥; 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES, Aldrich), 2-溴异丁酰溴 (BIBB, Aldrich), *N,N,N',N'',N'''*-五甲基二亚乙基三胺 (PMDTA, Aldrich) 均未经处理直接使用; 纤维蛋白原 (Fibrinogen, MW = 341 kDa, pI = 5.5, Calbiochem 公司); ¹²⁵I (以 NaI 形式存在, 中国同位素公司). 其他试剂均为分析纯, 使用前按照标准方法进行纯化处理.

1.2 PMAA 改性表面的制备

通过 SI-ATRP 技术在硅表面接枝 PMAA 的合成路线如图 1 所示. 首先按照文献 [11] 的方法将硅片表面氨基化而后固定具有引发 ATRP 活性的引发剂. 将 3.3 mg CuBr₂、7.15 mg CuBr、0.031 mL PMDTA、4 mL *t*BMA 溶于 3 mL 丙酮配制成

* 庆祝卓仁禧院士 80 华诞专稿; 2011-03-25 收稿, 2011-04-25 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 20974086, 20920102035) 资助项目;

** 通讯联系人, E-mail: chenh@suda.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11075

反应溶液. 在反应溶液中通入微弱氮气流 30 min 以排出其中的氧气. 将反应溶液在 60℃ 下加热 10 min 直至溶液颜色变得均匀. 而后用注射器将反应溶液加入到盛有表面固定了引发剂的硅片且充满氮气的 Schlenk 烧瓶内, 在 60℃ 下反应, 反应时间分别为 30 min, 120 min 和 240 min. 反应结束

后用丙酮超声清洗改性表面, 氮气吹干. 而后将接枝有 PtBMA 的硅片放到盛有 20 mL 二氧六环和 3 mL 浓盐酸 (37%) 的烧瓶中, 在 80℃ 下反应 2 h 使叔丁酯基团水解为羧酸基团. 最后将得到的表面用大量的丙酮和乙醇清洗, 氮气吹干.

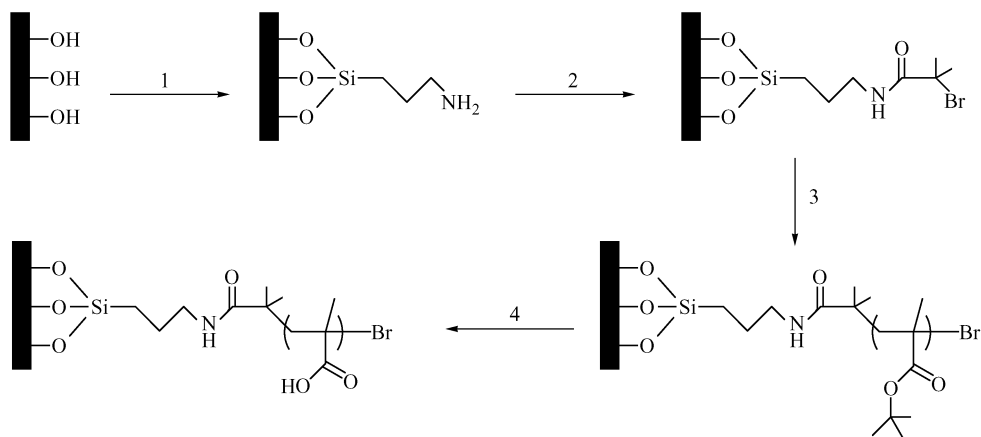


Fig. 1 Process for grafting PMAA from silicon surface: (1) aminosilanization of surface, (2) immobilization of initiator, (3) SI-ATRP of tBMA from initiator-immobilized surface and (4) hydrolysis of PtBMA to PMAA

1.3 表面表征

改性表面化学组成由 ESCALAB MK II 型 X 光电子能谱仪 (XPS, VG Scientific 公司) 进行表征; 聚合物接枝层厚度利用 M-88 光学椭圆偏振仪 (J. A. Woollam 公司) 测量; 改性表面水接触角利用 SL200C 型水接触角仪 (梭伦技术有限公司) 测定. 浸润性的 pH 响应性测试在室温下进行. 将 Si-PMAA 表面浸泡在不同 pH 值的水溶液中, 30 min 后取出, 迅速用去离子水清洗, 氮气吹干后测试表面水接触角值. 每种样品平行测定 6 次, 求其平均值.

1.4 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 [12]. 将纤维蛋白原进行 ^{125}I 标记, 利用 ^{125}I 的示踪作用来定量测试其吸附情况. 先将样品浸泡于磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 根据实验的不同要求 pH 分别为 4, 7 和 9) 中过夜, 然后将其取出放入 96 孔板中, 加入 0.25 mL 标记过的蛋白质溶液 (1 mg/mL, PBS), 室温下静置浸泡 3 h 后取出. 样品用 0.25 mL PBS 静置浸泡洗涤 3 次 (10 min/次), 滤纸吸干后转入离心管, 放入 Wallac 2480 Wizard 3"型伽马计数器 (Perkin Elmer 公司) 中测试放射量. 每种样品取 3 片同时测试, 取平均值. 纤维蛋白原的吸附量以 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 表示.

2 结果与讨论

2.1 改性表面的表征

由于 PMAA 侧链上的羧酸基团能够与 ATRP 反应所需要的金属催化剂发生较强的配合作用, 这使得直接通过 ATRP 聚合 MAA 单体是十分困难的^[13]. 因此, 本文中首先在固定有引发剂的硅表面引发聚合得到 PtBMA 聚合物刷. 而后在酸性条件下将 PtBMA 侧链的叔丁酯基团水解成对应的羧酸基团从而得到 PMAA 聚合物刷, 水解前后表面接枝层厚度如图 2 所示.

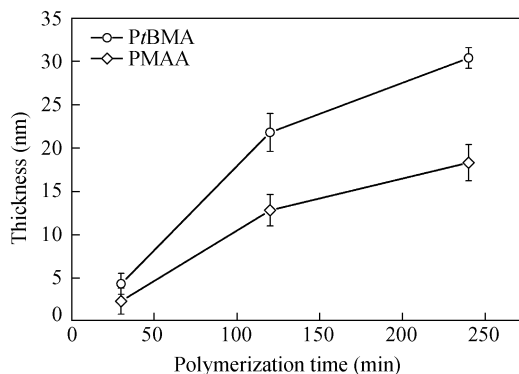


Fig. 2 Relationship of the thickness of PtBMA and PMAA graft layer with the polymerization time

我们选择聚合时间为 4 h 的样品进行进一步

表面表征. 水解前后的表面化学组成、接枝层厚度和水接触角的变化见表 1. 可以看出, 水解后聚合物接枝层的厚度和水接触角都发生了明显的降低, 这是由于体积较大、疏水性的叔丁酯基团已转变为体积较小、亲水性的羧酸基团^[14, 15], 以上结果表明水解过程比较完全. 此外, Si-PtBMA 和 Si-PMAA 的 C/N 比分别为 3.54 和 1.95, 与理论值 3.50 和 2.00 十分接近, 进一步证明了接枝改性及叔丁酯基团水解的成功性.

Table 1 Properties of the sample surfaces^a

Surface	C/N (experiment)	C/N (theory)	Thickness (nm)	Contact angle (°)
Si-PtBMA	3.54	3.50	30.4 ± 1.2	94.0 ± 1.3
Si-PMAA	1.95	2.00	19.2 ± 0.8	45.3 ± 1.6

^a Each value was averaged from six parallel measurements.

改性前后表面性质的变化也表现在表面对非特异性蛋白质的吸附情况(见图 3). 纤维蛋白原是一种血浆中含量较为丰富的蛋白质, 它在凝血过程中起到十分重要的作用^[16]. 因此, 本研究中采用纤维蛋白原作为模型蛋白质. 从图 3 可以看出, 与未改性的硅表面相比, 纤维蛋白原在 Si-PtBMA 表面的吸附量增加了 53.2%; 而当 PtBMA 水解为 PMAA 后, 表面的蛋白质吸附量出现了明显的下降. 考虑到 Si-PtBMA 表面和 Si-PMAA 表面浸润性的较大差异, 我们认为疏水作用是蛋白质在表面吸附的主要驱动力^[17, 18]. Si-PMAA 表面亲水性的增强是其蛋白质吸附量较低的主要原因. 此外, 当蛋白质溶液 pH = 7.4 时, PMAA 分子链和纤维蛋白原都带负电荷, 二者之间的静电斥力也导致表面蛋白质吸附量的减少^[19].

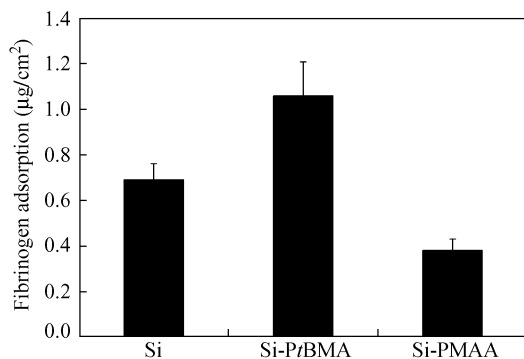


Fig. 3 Adsorption of fibrinogen under PBS buffer (pH = 7.4) on Si, Si-PtBMA and Si-PMAA surfaces

Data are mean ± standard error (n = 3).

2.2 PMAA 改性表面的 pH 响应性

PMAA 是一种典型的聚弱酸, 主链上具有可以电离的侧基——羧酸基团. 随着外界 pH 值的变化, 它可以接受和释放质子导致负载电荷的改变, 而这种改变进而会导致 PMAA 分子链构象的变化以及 PMAA 改性表面性质的变化^[15]. 在水溶液中, PMAA 分子链的构象主要由可电离基团之间的静电作用和烷基链之间的疏水作用所决定. 从图 4 可以看出, 当环境 pH 值较高时, 羧酸基团电离为羧酸根负离子 (COO⁻), 聚合物链的静电排斥作用起主导作用进而导致了分子链的伸展, 表面表现出较小的接触角; 而当环境 pH 值较低时, 羧酸基团不发生电离, 聚合物链的静电作用消失, 疏水作用起主导作用导致分子链呈现收缩的构象, 表面疏水性增强. 以上结果表明, Si-PMAA 表面具有浸润性对 pH 值的响应性.

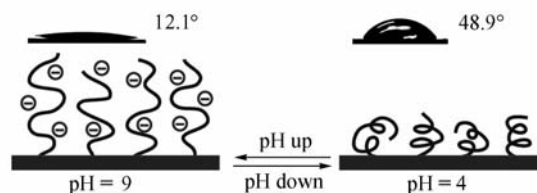


Fig. 4 Reversible conformation changes of PMAA chains and water contact angle of Si-PMAA surface at different pH

为了验证该响应性的可逆性, 我们将 Si-PMAA 表面反复浸泡到 pH = 9 的碱性溶液和 pH = 4 的酸性溶液中并测试表面的水接触角. 如图 5 所示, 改性表面的浸润性对水溶液 pH 值的响应具有较好的可逆性.

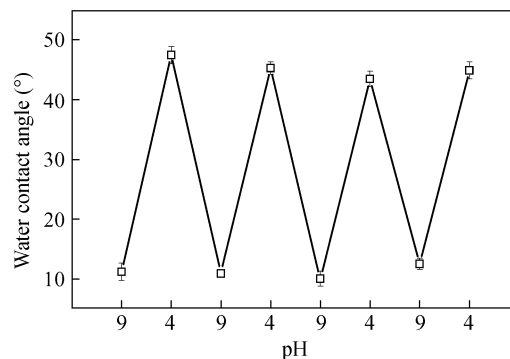


Fig. 5 Reversible change of the static water contact angle (room temperature) for the Si-PMAA surface after exposing to solutions with two different pH

Data are means ± the standard error (n = 6).

进一步, 本文考察了不同 pH 值下 Si-PMAA

表面对纤维蛋白原的吸附情况. 由于纤维蛋白原的等电点为 5.5, 因此在 $\text{pH} = 4$ 时蛋白质带正电而在 $\text{pH} = 9$ 时蛋白质带负电. 从图 6 可以看出, 对于硅表面, $\text{pH} = 4$ 时吸附的纤维蛋白原要比 $\text{pH} = 9$ 时高. 这可能是由于在测试 pH 范围内, 硅表面均带有负电荷^[20], 表面与蛋白质之间的静电相互作用导致了吸附量的差异. 经过 PMAA 改性后, $\text{pH} = 4$ 时的蛋白质吸附量增加到约 $3.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 而 $\text{pH} = 9$ 时的蛋白质吸附量则降低到约 $0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 二者相差近 39 倍. 这种明显的 pH 响应性可以由蛋白质的吸附机理得到解释. 研究

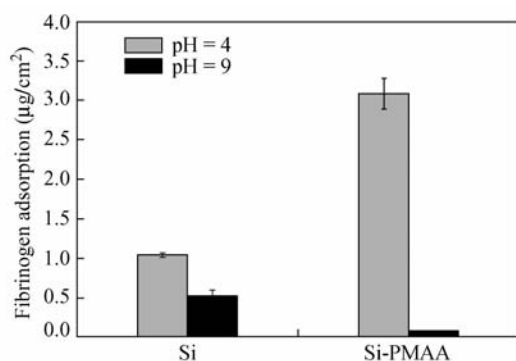


Fig. 6 Adsorption of fibrinogen under PBS buffer with different pH on unmodified and PMAA-grafted silicon surfaces

Data are mean $\pm$ standard error ($n = 3$).

表明, 疏水作用和静电作用是蛋白质在材料表面吸附的主要驱动力^[5, 21]. 从水接触角测试结果可以看出, Si-PMAA 表面在较低 pH 值下的疏水性要比其在较高 pH 值的要强, 从而疏水作用相对较大. 同时, 在 $\text{pH} = 4$ 时, PMAA 分子链不发生电离, 表面与蛋白质之间没有静电作用; 而在 $\text{pH} = 9$ 时, PMAA 分子链发生电离使表面带负电, 此时表面与蛋白质之间的静电斥力使得蛋白质吸附量降低. 此外, 由于 $\text{pH} = 4$ 更接近纤维蛋白原的等电点, 因此蛋白质之间的静电斥力相对较低, 使其更容易聚集吸附在材料表面^[22].

3 结论

本文通过表面引发 ATRP 方法在硅表面接枝了 PtBMA 聚合物刷, 通过水解将其转变为 PMAA 聚合物刷. 水接触角测试结果表明 Si-PMAA 表面具有浸润性的 pH 响应性, 在低 pH 值下表面相对较为疏水, 而随着 pH 的升高, 表面亲水性增强, 同时该响应性具有可逆性. 这种表面性质的变化进而导致表面对蛋白质吸附量的改变. $\text{pH} = 4$ 和 $\text{pH} = 9$ 时 Si-PMAA 对纤维蛋白原的吸附量相差近 39 倍. 通过该表面可以实现利用溶液 pH 值控制蛋白质在表面的吸附, 这在蛋白质分离领域有着潜在的应用前景.

REFERENCES

- Chen H, Yuan L, Song W, Wu Z, Li D. *Prog Polym Sci*, 2008, 33(11): 1059 ~ 1087
- Wang Yijuan(汪一娟), Jiang Hongliang(蒋宏亮), Hu Yingqian(胡应乾), Zhu Kangjie(朱康杰). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2005, (4): 524 ~ 528
- Sun Liping(孙立苹), Du Yumin(杜予民), Chen Lingyun(陈凌云), Huang Ronghua(黄荣华), Chen Xiao(陈效). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2004, (2): 191 ~ 195
- Gil E S, Hudson S A. *Prog Polym Sci*, 2004, 29(12): 1173 ~ 1222
- Tsapikouni T S, Missirlis Y F. *Mater Sci Eng, B*, 2008, 152(1-3): 2 ~ 7
- Yu Q, Chen H, Zhang Y, Yuan L, Zhao T, Li X, Wang H. *Langmuir*, 2010, 26(23): 17812 ~ 17815
- Yang Jun(杨军), Liu Xiaoyun(刘晓云), Yan Jie(阎捷), Li Lan(李兰), Zha Liusheng(查刘生). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2009, (7): 638 ~ 644
- Konradi R, Ruhe J. *Macromolecules*, 2005, 38: 4345 ~ 4354
- Parnell A J, Martin S J, Dang C C, Geoghegan M, Jones R A L, Crook C J, Howse J R, Ryan A J. *Polymer*, 2009, 50: 1005 ~ 1014
- Cole M A, Voelcker N H, Thissen H, Griesser H J. *Biomaterials*, 2009, 30(9): 1827 ~ 1850
- Yu Q, Zhang Y, Chen H, Wu Z, Huang H, Cheng C. *Colloids Surf, B*, 2010, 76(2): 468 ~ 474
- Yu Q, Zhang Y, Chen H, Zhou F, Wu Z, Huang H, Brash J L. *Langmuir*, 2010, 26(11): 8582 ~ 8588
- Sankhe A Y, Husson S M, Kilbey S M. *Macromolecules*, 2006, 39(4): 1376 ~ 1383
- Boyes S G, Akgun B, Brittain W J, Foster M D. *Macromolecules*, 2003, 36(25): 9539 ~ 9548
- Treat N D, Ayres N, Boyes S G, Brittain W J. *Macromolecules*, 2006, 39(1): 26 ~ 29
- Kwak D, Wu Y G, Horbett T A. *J Biomed Mater Res*, 2005, 74A(1): 69 ~ 83

- 17 Ostuni E, Chapman R G, Holmlin R E, Takayama S, Whitesides G M. *Langmuir*, 2001, 17(18): 5605 ~ 5620
- 18 Prime K L, Whitesides G M. *J Am Chem Soc*, 1993, 115(23): 10714 ~ 10721
- 19 de Vos W M, Biesheuvel P M, de Keizer A, Kleijn J M, Cohen Stuart M A. *Langmuir*, 2008, 24(13): 6575 ~ 6584
- 20 Chen L, Liu M, Bai H, Chen P, Xia F, Han D, Jiang L. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(30): 10467 ~ 10472
- 21 Nath N, Hyun J, Ma H, Chilkoti A. *Surf Sci*, 2004, 570(1-2): 98 ~ 110
- 22 Huo D, Li Y, Qian Q, Kobayashi T. *Colloids Surf, B*, 2006, 50(1): 36 ~ 42

REGULATION OF PROTEIN ADSORPTION ON pH-RESPONSIVE SURFACES

LI Xin¹, YU Qian^{1,2}, ZHANG Yanxia^{1,2}, WU Zhaoqiang¹, CHEN Hong¹

(¹ College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Soochow University, Suzhou 215123)

(² School of Materials Science and Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070)

Abstract Poly(methacrylic acid) (PMAA) modified silicon surface (Si-PMAA) was prepared *via* surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP) of *tert*-butyl methacrylate (*t*BMA) on initiator-immobilized silicon followed by the hydrolysis of PtBMA to PMAA. The successful graft process was confirmed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), ellipsometry and water contact angle characterization. The PMAA modified surface exhibited pH responsibility of both surface wettability and protein adsorption. At lower pH (pH = 4), the Si-PMAA surface was relative hydrophobic (with a water contact angle (WCA) value *ca.* 48.9°). With an increasing pH, the surface turned more hydrophilic and at pH = 9 the WCA value was *ca.* 12.1°. This pH-responsive surface wettability can be explained by the conformational transition of polymer chains. The addition of base will deprotonate the pendant carboxylic acidic groups, resulting in swollen polymer chains with many ionized COO⁻, which are favorable for the entrance of water molecules and make the surface more hydrophilic. This pH-sensitive wettability of the Si-PMAA surface was reversible for repeated cycles of alternating treatment by solution with different pH. Fibrinogen adsorption on the Si-PMAA and unmodified silicon surface was evaluated by radio-labeling method. The results indicated that fibrinogen adsorption on unmodified silicon surface at pH 9 was slightly lower than that at pH 4, while after modification with PMAA, the effect of pH was greater. The adsorption at pH 4 was *ca.* 39 times higher than that at pH 9, suggesting that control over the adsorption of proteins through adjusting the pH value could be achieved on the PMAA modified surface.

Keywords Poly(methacrylic acid), pH responsibility, Wettability, Protein adsorption