



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160070

等离子体聚合法制备生物大分子印迹聚合物

郝杰, 褚立强

(天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457)

摘要: 分别以缩水甘油和二乙二醇单乙烯基醚(EO2)为单体,采用等离子体聚合方法,在金基底表面制备特异性识别牛血清蛋白(BSA)的生物大分子印迹聚合物(BMIPs).利用傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)和接触角测试仪对沉积薄膜的物理化学特性进行表征,利用表面等离子体共振光谱(SPR)研究所制备印迹聚合物中 BSA 模板分子的洗脱和结合过程.实验结果表明,通过控制等离子体沉积过程中等离子体功率和占空比,可以制备对 BSA 具有一定特异性识别能力的 BMIPs,这为将来以 BMIPs 为基础构建生物传感器提供了一种新的思路.

关键词: 等离子体聚合; 生物大分子印迹聚合物; 表面等离子体共振光谱; 生物传感器

中图分类号: TB324 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2017)05-0045-05

Preparation of Biomacromolecularly Imprinted Polymers by Plasma Polymerization Method

HAO Jie, CHU Liqiang

(College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology,
Tianjin 300457, China)

Abstract: Biomacromolecularly imprinted polymers (BMIPs) on gold substrates were prepared with plasma polymerization method by using glycidol and di(ethylene glycol) monovinyl ether (EO2) as functional monomers, respectively. The physico-chemical properties of the plasma deposited films were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and contact angle measurement. Surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) was employed to monitor the desorption and adsorption of BSA template on the resulting BMIPs. Experimental results showed that, by adjusting the conditions of plasma input power and duty cycle during the deposition process, the resulting BMIPs can recognize BSA to some extent. The fabrication process can provide a new way for the construction of BMIPs-based biosensors.

Key words: plasma polymerization; biomacromolecularly imprinted polymer; surface plasmon resonance spectroscopy; biosensor

生物大分子印迹聚合物 (biomacromolecularly imprinted polymers, BMIPs) 是模拟抗体/抗原相互作用原理,对模板分子具有特异性识别能力的仿生高分子材料^[1-3].基本制备过程是选择合适的反应物和聚合方法在模板分子周围形成具有一定空间孔穴和识别位点的交联结构聚合物.印迹聚合物具有造价低、稳定性好、对目标分析物具有高度选择性和专一性等优点,因此在生物传感器^[4-5]、蛋白质分离提纯^[6]、免疫分析^[7]等领域具有广阔的应用前景.

分子印迹技术从诞生至今,主要集中在对小分子有机物的研究,其技术已经比较完善,有些甚至得到了工业化的应用^[8-9].相对于小分子有机物而言,蛋白质类大分子的体积庞大,功能基团结构复杂,构象灵活^[10],因此以其为模板制备 BMIPs 需要克服更多困难.目前制备 BMIPs 的常用方法有本体聚合、抗原决定基以及表面印迹等方法^[11].但是,本体聚合会造成模板分子的包埋现象和洗脱困难,而抗原决定基法只适用于部分有特定抗原的模板分子,导致其应

收稿日期: 2016-03-04; 修回日期: 2016-04-26

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-12-1064)

作者简介: 郝杰(1990—),男,河北石家庄人,硕士研究生;通信作者: 褚立强,教授, chuliqiang@tust.edu.cn

用受到限制. 因此报道最多的是利用表面印迹法制备 BMIPs.

等离子体聚合^[12]作为一种新兴的聚合方法,能够在各种表面制备化学结构稳定的功能聚合物,目前已经在膜分离技术^[13]、材料表面改性^[14]以及生物医学材料^[15-16]领域获得广泛的应用. Shi 等^[17]提出利用射频辉光放电(RFGD)等离子体沉积法制备 BMIPs,以云母为基底,在模板分子周围包裹一层二糖分子,最后除去模板分子即得到印迹聚合物,通过此方法已制备出特异性识别多种蛋白质的 BMIPs. 缩水甘油单体具有环氧官能团,容易发生聚合反应,且可以吸附蛋白质,而二乙二醇单乙烯基醚(EO2)^[18]是常见的制备抗蛋白吸附材料的单体,能够降低 BMIPs 的非特异性吸附性. 因此本研究以上述两种物质为单体,通过等离子体聚合制备不同物理化学特性的功能薄膜,直接在金基片上以牛血清蛋白(BSA)为模板分子制备 BMIPs 并利用表面等离子体共振光谱(SPR)研究了 BMIPs 对 BSA 的洗脱和结合过程.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

缩水甘油、EO2, 西格玛奥德里奇公司; BSA, 上海源叶生物科技有限公司; 十二水合磷酸氢二钠(优级纯)、二水合磷酸二氢钠(分析纯)、氯化钠(优级纯)、氯化钾(优级纯), 阿拉丁试剂公司; 无水乙醇(分析纯), 天津市江天化工技术有限公司; 单面抛光硅片, 浙江立晶光电科技有限公司; SF11 玻璃, 苏北光学镜片厂. 实验中所有溶液均用 Milli-Q 水配制.

ZHD-400 型高真空电阻蒸发镀膜机, 北京泰科诺科技有限公司; DSA 30 型全自动接触角测量仪, 德国 Krüss 公司; Vector 22 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国布鲁克公司; 表面等离子体共振光谱仪, 本实验室自行搭建^[19]; 电感耦合等离子体反应器.

1.2 制备方法

1.2.1 基底材料制备

将硅片和 SF11 玻璃基底材料放置于染色缸中, 分别用体积分数 1% 的细胞清洗液(cell cleaning solution)和蒸馏水超声处理, 然后用乙醇冲洗, 氮气吹扫干净, 清洗后的硅片基底直接使用. 对于 SPR 测试, 利用高真空电阻蒸发镀膜机分别在 SF11 玻璃表面蒸镀 2 nm 的 Cr 金属层和 47 nm 的金, 即得到实验所需金基底, 最后将两种基底密封保存备用.

1.2.2 BMIPs 制备

按照图 1 所示的合成路线在金基底表面制备 BMIPs. 首先通过等离子体聚合, 在金基底表面沉积一定厚度的聚缩水甘油(PPG)蛋白质吸附层, 然后吸附模板分子 BSA, 最后等离子体聚合一层聚二乙二醇单乙烯基醚(PPEO2)抗蛋白吸附层, 即得到 BMIPs.

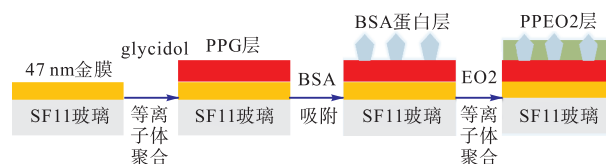


图 1 BMIPs 合成路线图

Fig. 1 Schema of the fabrication process of BMIPs

实验过程采用自行设计的电感耦合等离子体反应器^[20]完成, 反应器腔体由内径 100 mm、长度 400 mm 的圆柱玻璃管组成. 利用射频电源产生等离子体能量, 然后通过玻璃管外缠绕线圈传送至反应器, 通过真空计监测反应器腔体内部压力, 通过侧臂上单体进气阀调节单体流量. 实验时基底材料放置于反应室内距左端线圈 150 mm(线圈长度 350 mm)的位置, 启动旋片真空泵将体系压力抽至 0.9 Pa. 等离子体聚合过程中, 缩水甘油单体压力为 10 Pa, 采用连续模式, 等离子体功率 20 W, 沉积时间 1 min, 控制沉积厚度在 20 ~ 30 nm. EO2 单体压力为 5 Pa, 采用脉冲模式, 反应器通电时间 $t_{on} = 1$ ms, 未通电时间 $t_{off} = 19$ ms, 占空比($t_{on}/(t_{on} + t_{off})$)为 1/20, 等离子体峰值功率 20 W, 沉积时间 30 s, 控制沉积厚度在 4.5 nm 左右.

以 pH = 7.4 的 PBS 缓冲液为溶剂, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的 BSA 溶液, 将沉积有 PPG 的金基底放置其中浸泡并置于 80 r/min 摇床上 3 h, 完成蛋白质的吸附过程. 作为空白对照, 非分子印迹聚合物(NIPs)制备过程选用同样聚合物, 只是直接浸泡等量的 PBS 缓冲液.

1.3 表征与测试

用 Vector 22 型傅里叶红外光谱仪测定薄膜中官能团的结构, 扫描范围为 400 ~ 4 000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描次数为 16 次. 采用躺滴法, 用 DSA 30 型全自动接触角测量仪测量接触角, 分别测试 5 个不同位置, 计算取平均值. 利用 SPR 测试 PPG 薄膜对 BSA 的吸附量以及 BMIPs 对 BSA 模板分子的洗脱和结合过程.

2 结果与讨论

2.1 PPG底膜性能表征

2.1.1 FTIR 结果分析

连续模式不同功率下沉积的 PPG 薄膜的 FTIR 结果如图 2 所示. 由图 2 可知:不同功率条件下沉积的 PPG 薄膜具有类似的官能团,只是随着功率的增加,在 3400 cm^{-1} 位置处的—OH 吸收峰强度逐渐变弱. 图中 1720 cm^{-1} 的位置是 C=O 的伸缩振动特征吸收峰, 2875 cm^{-1} 和 2931 cm^{-1} 是亚甲基的伸缩振动峰,这说明在连续模式下,缩水甘油单体发生了开环聚合反应,在聚合过程中形成 C=O 官能团,并且功率越大,得到的 PPG 薄膜交联程度越大,单体中的—OH 结构保留越少.

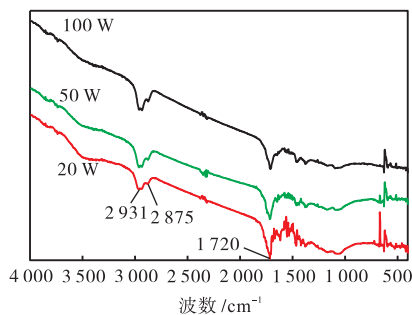


图 2 连续模式下不同功率沉积 PPG 薄膜的红外光谱图
Fig. 2 FTIR spectra of PPG films deposited at different plasma power in a CW mode

2.1.2 BSA 在 PPG 薄膜上的吸附

SPR 是一种免标记、高灵敏的光学检测技术,能够实时检测反应的动态过程. 本文在连续模式 20 W 条件下沉积 PPG 功能薄膜,利用 SPR 测试仪实时检测其对 BSA 的原位吸附过程,结果如图 3 所示.

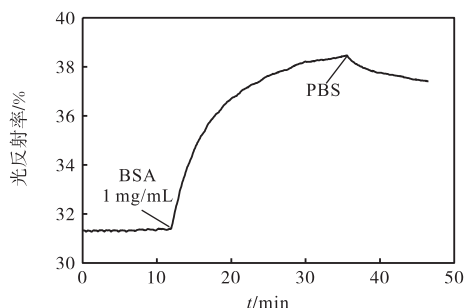


图 3 SPR 实时检测 BSA 在 PPG 薄膜上的吸附
Fig. 3 SPR of real time BSA adsorption on a PPG film

当 1 mg/mL 的 BSA 溶液流经 PPG 薄膜样品时,其动力学曲线出现突变,表明 BSA 发生明显的吸

附. 待吸附达到平衡状态,再次通入 PBS 缓冲液,将未能吸附在薄膜表面的 BSA 全部洗脱掉.

通过 Winspall2 模拟软件对 PPG 薄膜和 BSA 的厚度参数进行模拟,可知 PPG 薄膜的沉积厚度为 28 nm , BSA 的吸附厚度为 2.9 nm . 利用 Feijter's 方程^[18]计算 PPG 薄膜表面的 BSA 吸附浓度.

$$M = d_A \times \frac{n_A - n_s}{dn/dc} \quad (1)$$

式中: M 表示单位面积蛋白质的吸附质量; d_A 和 n_A 分别是 BSA 在薄膜表面的吸附厚度和自身折光指数,分别是 2.9 nm 和 1.45 ; n_s 是周围环境介质折光指数,数值为 1.33 ; dn/dc 是折光指数增量,对于蛋白质分子, dn/dc 等于 0.182 g/cm^3 .

将各个数值代入式(1),计算可得 BSA 在 PPG 薄膜表面的单位面积吸附量为 1.91 ng/mm^2 ,说明 PPG 薄膜能够吸附足量的模板分子.

2.2 PPEO2 抗蛋白吸附薄膜性能表征

2.2.1 FTIR 结果分析

连续模式和脉冲模式下沉积的 3 种 PPEO2 薄膜的 FTIR 结果如图 4 所示. 由图 4 可知:连续模式下制备的 PPEO2 薄膜,在 1712 cm^{-1} 的位置均出现 C=O 的伸缩振动峰,而 EO2 单体中并不存在 C=O,说明在连续模式下,单体结构发生断裂重组,形成新的结构. 脉冲模式下制备的 PPEO2 薄膜,在 1712 cm^{-1} 的位置吸收峰强度很低,而在 1067 cm^{-1} 的位置存在明显的 C—O—C 的伸缩振动吸收峰,说明此条件下,EO2 单体中的 C—O—C 结构保留完好,只是单体双键打开发生了聚合.

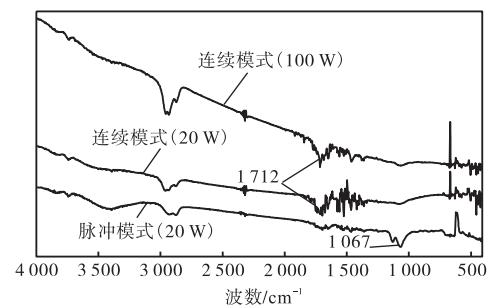


图 4 不同沉积条件 PPEO2 薄膜的红外光谱图
Fig. 4 FTIR spectra of PPEO2 films deposited under different deposition conditions

2.2.2 接触角结果分析

连续和脉冲模式下沉积的 3 种 PPEO2 薄膜的接触角测量结果见表 1. 连续模式薄膜的接触角没有明显区别,均在 64° 左右. 脉冲模式下,其接触角明显偏

小, 均值只有 22.15°, 亲水性非常好. 根据文献^[21]可知, 等离子体聚合过程中, 功率和占空比是影响聚合物结构的主要参数, 功率越大, 则单体结构中的化学键更容易发生裂解, 甚至一些活性较低的化学键也会断裂形成各种活性种, 这些活性种在等离子体作用下会重新组合, 形成新的化学键和交联结构. 反之降低功率或者在脉冲模式下, 其平均功率较低, 只有活性较高的官能团参与聚合, 单体结构保留完好. EO2 单体中含有高活性官能团 C=C 以及亲水性的 C—O—C 结构, 由 FTIR 和接触角结果可以得出, 连续模式下, C=C 和 C—O—C 都会断裂重组发生反应, 而脉冲模式下只是 C=C 发生聚合.

表 1 不同沉积条件下 PPEO2 薄膜的接触角

Tab. 1 Water contact angles for PPEO2 films under different deposition conditions

沉积条件	接触角/(°)
连续模式 (20 W)	64.87 ± 2.03
连续模式 (100 W)	62.69 ± 0.69
脉冲模式 (20 W)	22.15 ± 2.88

2.3 BMIPs 性能表征

2.3.1 SPR 检测 BMIPs 制备过程

BMIPs 制备过程中不同步骤中的 SPR 角度扫描结果如图 5 所示. 由图 5 可知, 在金基底上每增加一层物质, 其 SPR 共振角都会向高角度移动, 表明金上薄膜的厚度增加. 利用 Winspall2 模拟软件对其各层薄膜的厚度进行模拟, 得到 PPG 薄膜厚度为 22.4 nm, BSA 吸附厚度为 3 nm, PPEO2 薄膜厚度为 4.5 nm, 上述结果表明制备的 BMIPs 中已经有模板分子存在. 作为空白对照, 制备了不含 BSA 模板分子的样品 (即 NIPs), 其制备过程中唯一的区别是在蛋白质吸附步骤中, NIPs 浸泡等量 PBS 缓冲液.

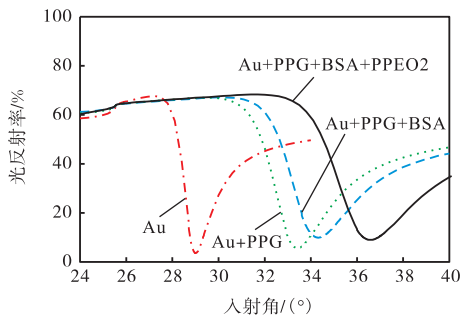


图 5 不同步骤薄膜 SPR 角度扫描结果

Fig. 5 SPR angular scans of various films at different steps

2.3.2 洗脱液对 BMIPs 与 NIPs 的影响

利用 SPR 对 BMIPs 与 NIPs 的动力学洗脱过程进行实时动态检测, 洗脱液是 1 mol/L 的 NaCl 溶液,

SPR 实时检测洗脱过程的动力学曲线如图 6 所示. 从图 6 中可知: 对于 BMIPs 来说, 利用洗脱液进行两次洗脱之后, 最终的平衡基线明显低于起始状态, 这说明部分模板分子被洗脱掉, 而 NIPs 在用洗脱液洗脱前后, 其平衡基线几乎没有变化. 同样利用 Winspall2 模拟软件模拟 BMIPs 中 BSA 洗脱后的厚度, 约为 2.6 nm, 相对于洗脱前的 3 nm, 表明有 0.4 nm 的 BSA 被洗脱掉. 这说明对于 BMIPs, 洗脱液可将部分模板 BSA 分子从中洗脱掉, 使印迹识别位点暴露出来.

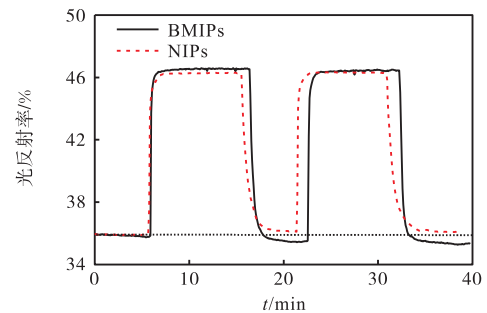


图 6 SPR 检测洗脱液对 BMIPs 和 NIPs 的影响

Fig. 6 SPR of the influence of elution solution on BMIPs and NIPs

2.3.3 BMIPs 对 BSA 特异性识别表征

最后利用 SPR 实时检测 BMIPs 和 NIPs 对 BSA 的动力学吸附过程, 结果如图 7 所示.

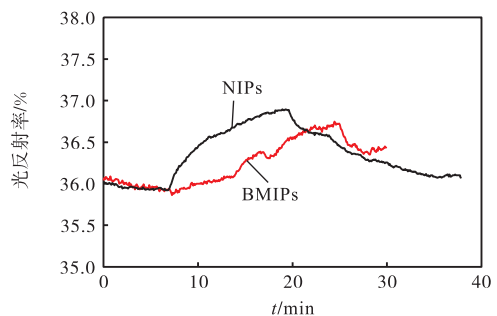


图 7 SPR 检测 BMIPs 和 NIPs 吸附模板 BSA 过程

Fig. 7 SPR detection of BSA adsorption on BMIPs and NIPs

通入 0.5 mg/mL 的 BSA 溶液时, BMIPs 与 NIPs 的动力学吸附曲线均发生缓慢上升, 但是明显低于 PPG 薄膜的 BSA 吸附过程, 这说明抗蛋白吸附膜降低了表面的非特异性吸附. 待吸附接近平衡, 通入 PBS 缓冲液冲洗, 对比 BMIPs 和 NIPs 的蛋白质洗脱过程, 可以发现 NIPs 吸附在表面的蛋白质基本可以洗脱掉, 而 BMIPs 降低到一定程度之后, 就达到平衡状态. 此结果说明制备的 BMIPs 对模板蛋白质具有特异性识别能力, 能够部分识别模板分子 BSA.

3 结 语

采用等离子体聚合沉积技术,以缩水甘油制备了能吸附足量模板分子的 PPG 功能薄膜,以 EO2 为单体制备了能够降低蛋白质吸附的 PPEO2 功能薄膜,并利用两种薄膜构建生物大分子印迹聚合物. 实验结果表明,当 PPEO2 的膜厚为 4.5 nm 时,所制备的 BMIPs 能够特异性识别模板蛋白 BSA. 需要注意的是,由于模板蛋白质的体积较大,目前模板分子的洗脱效率较低. 未来需要尝试更多的洗脱方案,提高模板分子的洗脱效率,从而进一步提升 BMIPs 对模板蛋白质的特异性识别能力.

参考文献:

- [1] Kryscio D R, Fleming M Q, Peppas N A. Conformational studies of common protein templates in macromolecularly imprinted polymers[J]. *Biomedical Microdevices*, 2012, 14(4) : 679–687.
- [2] Turner N W, Jeans C W, Brain K R, et al. From 3D to 2D: A review of the molecular imprinting of proteins[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(6) : 1474–1489.
- [3] Bossi A, Bonini F, Turner A P F, et al. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(6) : 1131–1137.
- [4] Algieri C, Drioli E, Guzzo L, et al. Bio-mimetic sensors based on molecularly imprinted membranes[J]. *Sensors*, 2014, 14(8) : 13863–13912.
- [5] Wackerlig J, Lieberzeit P A. Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing: Synthesis, characterisation and application[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 207: 144–157.
- [6] Chen F, Zhao W, Zhang J, et al. Magnetic two-dimensional molecularly imprinted materials for the recognition and separation of proteins[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, 18(2) : 718–725.
- [7] Huval C C, Bailey M J, Braunlin W H, et al. Novel cholesterol lowering polymeric drugs obtained by molecular imprinting[J]. *Macromolecules*, 2001, 34(6) : 1548–1550.
- [8] Jiang X M, Jiang N, Zhang H X, et al. Small organic molecular imprinted materials: Their preparation and application[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389(2) : 355–368.
- [9] 杨卫海,严守雷,卫晨,等. 沉淀聚合法制备三聚氰胺分子印迹聚合物微球[J]. *高分子学报*, 2010, 1(10) : 1163–1169.
- [10] 盖青青,刘秋叶,何锡文,等. 分子印迹技术用于蛋白质的识别[J]. *化学进展*, 2008, 20(6) : 957–968.
- [11] 郑超,高如瑜,张玉奎. 分子印迹技术在生物大分子分离识别中的应用[J]. *色谱*, 2006, 24(3) : 309–314.
- [12] Denes F S, Manolache S. Macromolecular plasma-chemistry: An emerging field of polymer science[J]. *Progress in Polymer Science*, 2004, 29(8) : 815–885.
- [13] 张丹霞,王保国,陈翠仙. 等离子体技术在膜分离领域的应用[J]. *膜科学与技术*, 2002, 22(4) : 65–70.
- [14] Wang C X, Du M, Lü J C, et al. Surface modification of aramid fiber by plasma induced vapor phase graft polymerization of acrylic acid. I. Influence of plasma conditions[J]. *Applied Surface Science*, 2015, 349: 333–342.
- [15] Förch R, Chifen A N, Bousquet A, et al. Recent and expected roles of plasma-polymerized films for biomedical applications[J]. *Chemical Vapor Deposition*, 2007, 13(6/7) : 280–294.
- [16] Desmet T, Morent R, Geyter N D, et al. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: A review[J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(9) : 2351–2378.
- [17] Shi H, Tsai W B, Garrison M D, et al. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition[J]. *Nature*, 1999, 398(6728) : 593–597.
- [18] Chu L Q, Knoll W, Förch R. Pulsed plasma polymerized di(ethylene glycol) monovinyl ether coatings for nonfouling surfaces[J]. *Chemistry of Materials*, 2006, 18(20) : 4840–4844.
- [19] Chu L Q, Zhang Q, Förch R. Surface plasmon-based techniques for the analysis of plasma deposited functional films and surfaces[J]. *Plasma Processes and Polymers*, 2015, 12(9) : 941–952.
- [20] Liu X J, Wang L, Hao J, et al. Pulsed plasma polymerization of perfluorooctyl ethylene for transparent hydrophobic thin coatings[J]. *Plasma Science and Technology*, 2015, 17(12) : 1013–1018.
- [21] Shi F F. Recent advances in polymer thin films prepared by plasma polymerization synthesis, structural characterization, properties and applications[J]. *Surface and Coatings Technology*, 1996, 82(1) : 1–15.

责任编辑:周建军