

PEG 化磷脂膜在蛋白质芯片表面修饰中的应用

Application of PEGylated Phospholipid Membrane in Surface Modification of Protein Chips

张义滨¹, 陈艳艳^{1,2}, 靳 刚^{1,3}

(1 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 江苏 苏州 215125;

2 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; 3 中国科学院力学研究所, 北京 100190)

ZHANG Yi-bang¹, CHEN Yan-yan^{1,2}, JIN Gang^{1,3}

(1 Suzhou Institute of Nano-tech and Nano-bionics, Chinese Academy of Sciences,

Suzhou 215125, Jiangsu, China; 2 Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences,

Beijing 100101, China; 3 Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

摘要: 用 PEG 化磷脂膜修饰蛋白质芯片的二氧化硅表面, 通过调节 PEG 的含量, 考察磷脂膜对蛋白非特异性吸附的抑制, 以及对蛋白分子固定的影响。结果表明, 经过 PEG 化磷脂膜修饰的二氧化硅表面, 可以显著抑制蛋白的非特异性吸附, 并通过功能化的 PEG 分子有效固定配基及其抗体。

关键词: 磷脂膜; 表面修饰; 椭圆偏光成像技术

中图分类号: TP212 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4381(2008)10-0208-03

Abstract: Application of PEGylated phospholipid membrane in surface modification of oxidized silicon is studied here. Silicon dioxide surfaces are covered by phospholipid membrane with variable molar fractions of DSPE-PEG2000-COOH, and obvious resistance to non-specific protein adsorption on PEGylated phospholipid membrane is obtained. Also, ligand and its corresponding antibody can be effectively assembled on functionalized PEGylated phospholipid membrane.

Key words: phospholipid membrane; surface modification; imaging ellipsometry

细胞膜的骨架是由磷脂分子构成的双分子层 (Phospholipid Bilayers, PB), 其中镶嵌了大量的各种蛋白、酶、脂类、糖类活性分子。采用磷脂分子在固体表面人工模拟细胞膜结构, 形成的磷脂双层膜具有良好的液态流动性, 不仅可以高度保持生物分子的生物学活性^[1-3], 还能有效抑制其他生物分子的非特异性吸附^[4,5], 因此, 磷脂双层膜在跨膜蛋白、生物传感器等研究领域, 具有良好的应用前景。然而磷脂膜形成的驱动力是疏水作用力, 需要依赖周围的水分子, 因而在空气中不能形成稳定的磷脂双层膜, 不利于其在芯片表面修饰中的应用。有人^[6]采用聚乙二醇(PEG)分子使磷脂双层膜具有空气稳定性, 同时 PEG 分子还具有抑制蛋白非特异吸附的特点^[7]。以 1,2-二豆蔻酰磷脂酰胆碱 (1,2-Dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC) 为磷脂骨架分子, 在二氧化硅表面研究不同 PEG 含量的磷脂膜对蛋白非特异吸附的抑制以及对蛋白固定的影响。

1 实验材料和方法

1.1 磷脂囊泡的制备

采用水浴超声结合挤压过膜的方法制备尺寸均一的小单壁磷脂囊泡 (SUVs), 具体步骤如下: 将 DMPC 溶于氯仿中, 掺入不同摩尔比例的 1,2-二硬脂酰-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-羧基(聚乙二醇 2000) (1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Carboxy (Polyethylene Glycol) 2000]), DSPE-PEG-COOH, 用氮气将氯仿挥发殆尽后在真空下干燥至少 2h, 以在管壁形成磷脂薄膜。然后加入一定体积的 PBS 溶液 (pH 7.5), 使 DMPC 浓度为 1 mM, 漩涡振荡 5min 后, 水浴超声至清。采用 MiniExtruder (AvantiPolar Lipid Co.) 挤压溶液过聚碳酸酯膜 (孔径 50nm) 至少 11 次, 将制备好的囊泡溶液保存于 4℃ 备用, 并采用激光粒度仪 (Sympatec, GmbH) 分析囊泡粒径大小及分布。

1.2 硅片表面的磷脂膜修饰

将硅片(表面为自然氧化的二氧化硅层)切割成 $1\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 后,采用 Piranha 溶液($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$)清洗、氧化,使其表面呈亲水性(接触角约为 5°)。将硅片表面用磷脂囊泡溶液室温下处理 30~60min,即可在硅片表面形成磷脂膜层。由于磷脂分子具有亲水头基和烷基尾链,在亲水表面形成脂质双层结构,如图 1 所示。

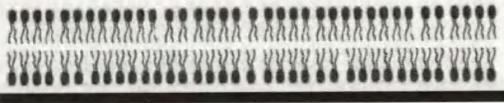


图 1 亲水表面形成的磷脂膜层结构示意图

Fig.1 Schematic picture of phospholipid bilayer on hydrophilic surface

1.3 磷脂膜对蛋白非特异性吸附的抑制及蛋白在膜层表面的固定

将不同摩尔含量 PEG 的的磷脂囊泡,在亲水性二氧化硅表面自组织形成磷脂双层膜结构。对磷脂膜表面的羧基采用 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)活化处理(NHS 和 EDC 的终浓度分别为 50mM 和 200mM),然后将人血清白蛋白(HSA, 0.1mg/mL)作为配基分子共价固定在膜层表面,再与 HSA 的抗体($30\mu\text{g}/\text{mL}$)反应,研究蛋白在该膜层表面的固定情况。同时做膜层未经 NHS/EDC 处理的对照,与同样的蛋白溶液反应,以考察磷脂膜修饰表面对蛋白非特异性吸附的抑制情况。结果采用椭偏光学成像系统观察。

1.4 椭偏光学成像系统及微流道反应系统

椭偏光学成像系统^[8],将传统的光学椭偏术、CCD 摄像、计算机取样和图像处理技术相结合,通过测量样品的反射光强变化实现对样品分析。测量结果以灰度图的形式保存下来,其灰度值的变化反映了表面组装配基分子的面密度变化。

脂膜的组装、溶液的运输、蛋白分子的反应以及清洗等操作均在微流道反应系统^[9]中完成。该系统包含一个 8×6 阵列排列的凹槽,每个凹槽两端开通孔,分别作为液体进口和出口。将该阵列凹槽与硅片表面接触,就会形成一个空腔,即形成了有一进一出的微流道。该方法可实现多种不同样品的同时检测,且所需样品量较少,每个阵列单元仅需数微升样品。

2 实验结果与分析

2.1 磷脂囊泡的制备

在硅片表面修饰磷脂膜,可采用磷脂囊泡在硅片表面发生吸附与融合的方法实现^[10],但需要制备尺寸均匀的 SUVs。SUVs 的直径一般不超过 100nm,通过将水浴超声至清后的囊泡溶液再挤压过 50nm 孔径的聚碳酸酯膜来控制囊泡的尺寸。通过比较发现,将水浴超声处理和挤压法结合起来制备磷脂囊泡,可以更为快捷方便地得到尺寸均一的 SUVs。经激光粒度仪分析,挤压过膜后的囊泡比聚碳酸酯膜的孔径略大,可能是 PEG 分子增加了囊泡的柔性,使其在溶液中伸展有关。另外,PEG 还有促使囊泡形成和稳定囊泡的作用,在 4°C 下保存数月后,溶液仍能保持澄清,分析其粒径为 $101.4\text{nm} \pm 2.5\text{nm}$ 。

2.2 磷脂膜对蛋白非特异性吸附的抑制及蛋白在膜层表面的固定

利用微流道系统,在亲水性二氧化硅表面形成磷脂双层膜,考察其对蛋白非特异性吸附的抑制情况,以及对膜层功能化后共价固定蛋白的效果,结果如图 2 所示。图中 A1 为囊泡空白对照(含 5%(摩尔分数) DSPE-PEG-COOH),B1 和 B4 分别为 HSA 配基及其抗体在基底上吸附的空白阳性对照和基底的空白阴性对照,而 A2, A4 和 B2 分别为含 0.5%, 1.5% 和 5%(摩尔分数,下同),DSPE-PEG-COOH 的磷脂囊泡处理后的表面对蛋白的非特异性吸附。

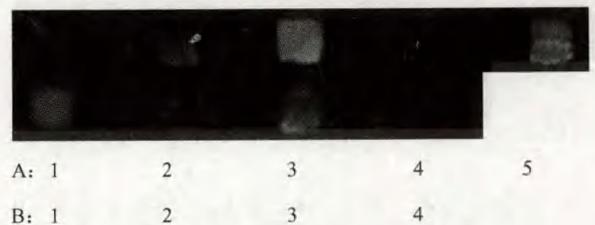


图 2 磷脂膜修饰表面与蛋白分子的相互作用
Fig.2 Interactions of proteins and PEGylated phospholipid membranes

从图中可以看出,经过 PEG 化磷脂膜修饰后的二氧化硅表面,同原亲水性表面相比,蛋白吸附的灰度值降低,并且随着 PEG 含量的增加,蛋白膜层灰度值逐渐减小。当 PEG 含量达到 1.5% 时,膜层与蛋白作用后的灰度值即无明显增加。这些结果表明,PEG 化的磷脂膜层可以抑制蛋白分子的非特异性吸附,并且抑制效果与 PEG 含量相关。

膜层表面的羧基基团通过 NHS/EDC 功能化,可与蛋白分子的氨基形成酰胺键,从而将蛋白分子固定在膜层表面,图 2 中 A3, A5 和 B3 分别为硅片表面经含 0.5%, 1.5% 和 5% DSPE-PEG-COOH 的磷脂囊泡处理,羧基进行 NHS/EDC 活化后,固定配基及其抗

体后的结果。

从图 2 中可以看出,膜层经过 NHS/EDC 功能化后,可以将蛋白分子固定到膜层表面并结合其抗体分子,但膜层中 DSPE-PEG-COOH 的含量与固定蛋白量不成正比。随 DSPE-PEG-COOH 含量的增加,膜层固定蛋白后的灰度反而有所下降,说明增加膜层中可功能化羧基的含量,并未提高固定的蛋白量。这很可能是由于在增加可功能化羧基含量的同时,膜层表面的 PEG 分子也同时在增加,PEG 为电中性分子,具有较强的亲水性,其在磷脂膜表面形成的水化层一方面阻碍蛋白分子的靠近,同时又掩蔽了 PEG 末端功能化的羧基,从而影响功能化羧基与蛋白的共价结合。此外,在亲水硅片表面形成的磷脂双层膜,随着膜层中 PEG 含量的增加,PEG 分子将从“蘑菇相”转变为“刷相”,此时磷脂膜层结构相对更为稳定。对于 PEG2000,理论的相变摩尔浓度为 1.4%^[11]。以上实验结果表明,在 PEG 处于相变浓度时,膜层既能保持对蛋白非特异性吸附的抑制,同时又能较好地固定蛋白分子。因此,在用 PEG 化的磷脂膜进行芯片表面修饰时,PEG 的含量可选择在其相变摩尔浓度附近。由于通过功能化羧基固定蛋白分子,其影响因素除表面的功能化羧基密度外,还与蛋白的浓度、分子量以及溶液的 pH 值,离子强度等有关,在将来的实际应用过程中,结合需要固定的蛋白分子,还应进行具体条件的选择和优化。

3 结论

(1)通过椭偏光学成像系统检测,在亲水性二氧化硅表面修饰 PEG 化的磷脂膜,随着膜层中 PEG 含量的增加,可以逐渐增强表面对蛋白非特异性吸附的抑制。

(2)对磷脂膜表面的活性基团进行功能化后,可实现配基的固定及其抗体的结合。

(3)PEG 化的磷脂膜,既能在其表面固定生物活性分子,同时能抑制其他生物分子的非特异性吸附,有望应用于蛋白芯片的表面修饰。

参考文献

[1] MATTHEW A C, DUDLEY H W. Kinetic analysis of antibody-

antigen interactions at a supported lipid monolayer[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 276(12): 36-47.

- [2] CUPERS P A, CORSEL J W, JANSSEN M P, et al. The adsorption of prothrombin to phosphatidylserine multilayers quantitated by ellipsometry[J]. Journal of Biological Chemistry, 1983, 258(4): 2426-2431.
- [3] CORESEL J W, WILLEMS G M, KOP J M, et al. The role of intrinsic binding rate and transport rate in the adsorption of prothrombin, albumin and fibrinogen to phospholipid bilayers[J]. Journal of Colloid Interface Science, 1986, 111(2): 544-554.
- [4] PHILLIPS K S, HAN J H, MARTINEZ M, et al. Nanoscale glassification of gold substrates for surface plasmon resonance analysis of protein toxins with supported lipid bilayers[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(2): 596-603.
- [5] GLASMASTAR K, LARSSON C, HOOK F, et al. Protein adsorption on supported phospholipids bilayers [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2002, 246(1): 40-47.
- [6] ALBERTORIO F, DIAZ, A J, YANG T, et al. Fluid and air-stable lipopolymer membranes for biosensor applications [J]. Langmuir, 2005, 21(16) 7476-7482.
- [7] HALPERIN G F, SCHILLIER A, SFERRAZZA M. Primary versus ternary adsorption of proteins onto PEG brushes [J]. Langmuir, 2007, 23(21): 10603-10617.
- [8] JIN G. Development of biosensor based on imaging ellipsometry [J]. Physica Statistica (a), 2008, 205(4): 810-816.
- [9] WANG Z H, MENG Y H, YING P Q, et al. A label-free protein microfluidic array for parallel immunoassays [J]. Electrophoresis, 2006, 27(20): 4078-4085.
- [10] EDWARD T C, PAUL S C. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design [J]. Surface Science Reports, 2006, 61(10): 429-444.
- [11] DAVID N, DENNIS H K. PEG-covered lipid surfaces: bilayers and monolayers [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2000(3-4), 18: 183-195.

基金项目:国家自然科学基金项目(20845003);中国科学院重要方向性项目(KJCX2. YW. M02 and M04);中国博士后科学基金资助项目

收稿日期:2008-06-25;修订日期:2008-08-15

作者简介:张义滨(1980—),男,中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所 07 级博士生,主要从事固体支撑磷脂膜及光学蛋白芯片表面改性研究,联系地址:江苏苏州工业园区高教区若水路 398 号苏州纳米所 A705(215125)。E-mail: ybzhang2007@sinano. ac. cn