

表面等离子体共振传感技术在高分子研究中的应用

许鑫华^{1*}, 韩明川¹, 陈 强², 李冬光¹, 姚康德¹

(1. 天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要:介绍了表面等离子体共振(SPR)的基本原理和 SPR 传感器技术的应用现状, 综述了 SPR 传感器在分子科学研究中的应用和发展前景。

关键词:表面等离子体共振; 传感器; 高分子

前言

1902 年, Wood^[1] 在光学实验中发现了表面等离子体共振(SPR)现象。1982 年, Liedberg 和 Nylander^[2] 首次将 SPR 原理应用于传感器研究, 1990 年, 首台商用 SPR 传感器面世。十几年来, 基于 SPR 原理的传感器及其应用研究获得长足的发展。由于检测过程具有实时、方便、快捷, 无须标记、可保持分子的生物活性等特点, SPR 传感器首先在生命科学领域研究中获得广泛应用, 特别是生物分子间特异相互作用的研究。SPR 传感器研究对象开始主要是蛋白质、多肽、DNA、RNA、抗体、抗原、类脂、病毒、细胞、药物等^[3], 随着科学发展和技术进步, SPR 传感器的应用已开始向其它领域扩展, 近几年, 利用其在分子间相互作用研究上的特殊优势, 已逐渐渗透到化学、化工、材料、食品、环境等研究领域, 在免疫检测、环境监测、材料的表面及界面、电化学聚合等研究方面得到应用。本文主要介绍 SPR 传感器的原理, 特别是在高分子科学研究中的应用进展。

1 基本原理

当光线从光密介质向光疏介质传播且入射角度在一定的范围时, 在两种物质的界面将发生全内反射。但是, 光波的电场强度在界面处并不立即衰减为零, 而是部分地进入光疏介质。在光疏介质中, 电场强度随入射深度呈指数衰减, 形成消失波, 消失波的有效深度一般为 $100\sim 200\text{nm}$ ^[4]。

当一束相干光透过玻璃或石英基体, 照射到镀在该基体上的高反射金属薄膜时, 金属与溶液的表面电子被激发, 产生振荡电荷, 该电荷以向量形式沿表面运动, 但不辐射能量, 这就是表面等离子体基元^[5]。若金属膜的厚度在 50nm 左右, 且在消失波的有效范围内, 则消失波在金属与溶液的界面仍起作用, 当调整入射角(θ)为一定值时, 消失波与表面等离子体基元发生耦合, 产生共振, 入射光的能量部分地转移给表面等离子体基元, 使反射光的强度急剧下降, 此时的入射角称为共振角。共振角随金属膜表面的折射率变化而变化, 这一变化又与金属表面结合的分子质量成正比^[6]。当金属膜表面附近的物质发生纳克数量级变化时, 共振角即发生明显变化, SPR 谱(反射光强度与入射角的关系)非常灵敏地随之发生移动。因此通过 SPR 谱, 即可对样品进行分析。SPR 传感器原理

基金项目:教育部南开大学、天津大学共建科学技术研究重点项目;

作者简介:许鑫华(1963—)男, 天津市人, 博士, 教授, 主要研究方向为有机光电信息材料、化学传感器等;

* 通讯联系人。

如图1所示。

2 SPR 传感器用于生物大分子的研究

SPR 技术在生物分子间特异相互作用研究中具有独特的优势和特点,应用领域包括蛋白质相互作用分析、DNA 与蛋白质相互作用分析、蛋白质的构象、DNA 分子间的相互作用、药物与蛋白质的相互作用、药物筛选及鉴定等^[3]。利用 SPR 传感器进行免疫分析,可以识别抗原的种类,测定抗原的浓度,进行抗体-抗原相互作用的动力学分析,获得动力学、热力学参数,并可进行抗原决定簇表型的分析。在蛋白质的相互作用研究中,通过动力学分析和蛋白质构象的分析,可获得结合常数、解离常数,并可推测相互作用机理。此外,还可进行蛋白质和多肽、DNA 和 DNA 的相互作用的研究,DNA 序列的测定,HIV(艾滋病病毒)的抗体及药物筛选,复杂样品中生物分子浓度的测定等^[3,4]。例如,应用 SPR 生物传感器研究 G-蛋白耦合受体视紫质的固定^[7,8];利用亲和素-生物素系统研究 FLAG 序列和其单克隆抗体^[9];利用传感片固定胆磷脂,研究胆磷脂与蛋白质的相互作用^[10];还可用于研究纤维蛋白原和纤连蛋白的相互作用^[11]、生长因子与其受体的相互作用^[12]、糖类和外源凝集素的相互作用^[13]。另外还可进行 K-ras 基因变异的研究^[14],应用表面等离子共振技术进行纤维原细胞生长因子浓度的测定^[15]和果糖浓度的测定^[16]等。

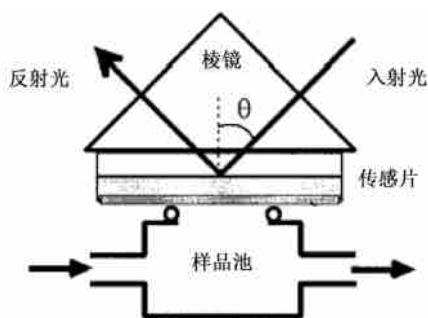


图1 SPR 传感器原理示意图

Figure 1 Principle of surface plasmon resonance biosensor detection

3 SPR 传感器在高分子科学研究中的应用

随着 SPR 传感技术的不断成熟,为 SPR 传感器在高分子研究中的应用奠定了基础。由于 SPR 传感器的传感片为金属膜,在最初用于材料科学的研究中,主要是对金属薄膜的研究。随着高分子薄膜制备技术的发展,采用旋涂法、共价键连接法、L-B 膜法、自组装(SAM)法等将高分子材料固定在传感片上的方法日益成熟。旋涂法对于大多数高分子来说,较为适合,只需将高分子溶解于适当的溶剂,然后旋涂即可。共价键连接一般采用在传感片上固定硫醇或末端具有功能基团的改性硫醇、羧基、葡聚糖凝胶的方法,利用它们的功能基团与高分子的活性基团反应,将高分子膜固定。L-B 法是采用适当的方法对传感片进行表面处理,然后将高分子的单分子层转移到传感片的表面。SAM 法将传感片做基底,用自组装的方法将高分子固定在传感片的表面。高分子薄膜制备技术的发展为开拓 SPR 传感器在高分子材料研究中应用提供了契机。

3.1 薄膜厚度、介电常数的测定

影响 SPR 谱的主要因素有:入射光的波长、棱镜的折射率、金属膜及表面介质膜(样品膜)的厚度、介电常数、折射率等。当上述参数发生变化时,SPR 谱即发生移动。因此通过 SPR 谱,按照菲涅尔公式,可以获得金属膜以及样品膜的介电常数、膜厚等。Helene 等^[17]利用 SPR 谱的起始参数,提出了一种新的快速计算材料介电常数和膜厚的方法,其结果与其它测量方法相吻合。Burijn 等^[18]利用改变溶液的介电常数的方法,利用多条 SPR 谱图分别确定样品膜的厚度和介电常数。杜卫冲等^[19]利用 SPR 技术,采用 Otto 耦合结构,建立了通过测量相对于空气隙厚度变化,取最小反射率来唯一确定介质膜的介电常数和厚度的方法。

3.2 高分子生物材料表面蛋白质吸附行为的研究

生物高分子材料的表面及界面直接与生物体接触,因此表面和界面性质在生物材料的研究中具有非常重要的作用,它直接影响宿主反应、生物相容性等。例如当生物高分子材料植入生物体,与血液接触时,表面首先可能会立即吸附一层血浆蛋白质,其后发生血小板的粘附、聚集、激活,在材料表面形成血栓,引起肌体致命性的后果^[20]。因此,对生物材料表面、界面性质的研究具有非常重要的意义。生物材料表面蛋白质吸附的研究方法很多,如原子力显微镜(AFM)、ATR-IR(衰减全反射-红外光谱)、椭圆偏振仪、石英晶体微天平(QCM)等。AFM可以观测到表面及界面的形貌,ATR-IR能够研究界面处生物大分子的构象的变化,椭圆偏振仪可用于研究材料表面吸附的厚度,QCM可得到吸附量的大小,而SPR传感器不但能够进行实时、原位研究材料表面与蛋白质的相互作用,而且可以进行吸附的动力学分析。

隋森芳等^[21]研究了磷脂 DSPC 膜、聚氨酯膜、有机玻璃膜对纤维蛋白原的吸附特性。将聚氨酯膜、有机玻璃膜、磷脂 DSPC 膜分别用旋涂法或 L-B 法固定在金膜上。在相同的纤维蛋白原的浓度下,利用 SPR 传感器研究了纤维蛋白原在不同材料表面的吸附速度、吸附量。研究表明:磷脂 DSPC 膜表面吸附纤维蛋白原的速度最低,饱和吸附量最小,聚氨酯膜居中,有机玻璃膜最大。从吸附量可推测出纤维蛋白原在三种材料的表面是单分子吸附;吸附量的大小与三种材料的血液相容性相一致。

汪尔康等^[22]研究了免疫球蛋白、葡萄球菌蛋白 A 在羧甲基化葡聚糖表面的静电吸附行为。SPR 传感器的实验结果说明蛋白质在羧基化葡聚糖表面的静电吸附过程符合 Langmuir 吸附模型;蛋白质溶液的离子强度、浓度、pH 值是影响蛋白质在羧甲基化葡聚糖表面静电吸附的主要因素;蛋白质浓度的增加将导致更大的静电吸附量,低浓度时静电吸附时间较长,而且吸附的初始速率要慢于高浓度的蛋白质溶液。

Green 等^[23]研究了人血清白蛋白、免疫球蛋白、纤维蛋白原在聚苯乙烯(PS)薄膜表面的吸附过程。利用 SPR 传感器分析了蛋白质浓度对吸附过程的影响。研究表明:当蛋白质的浓度大于 0.05%(w/v),共振角不再随浓度的增加而增大,在聚苯乙烯表面形成稳定的单分子层。实验发现蛋白质的大小及结构对吸附行为也有较大的影响。人血清白蛋白为椭圆形,尺寸较小,所以其吸附的速度较快,形成的单分子膜也较薄,在 SPR 谱上共振角的改变幅度也很小;免疫球蛋白为 Y 型,纤维蛋白原为三花瓣形,相对分子质量较大,外形尺寸也较大,因此在吸附速度较慢,SPR 谱上共振角的改变幅度也很大,形成的单分子膜也较厚。

Green 等还利用 SPR 传感器研究了血浆中蛋白质在聚苯乙烯(PS)表面的竞争吸附行为^[24]。实验中,首先将血浆溶液流经 PS 表面,使血浆中蛋白竞争吸附到其表面,然后利用各种蛋白的单克隆抗体与其发生特异性结合来检测吸附蛋白的多少。实验表明:人血清白蛋白首先吸附在材料的表面,然后免疫球蛋白、纤维蛋白原竞争取代人血清白蛋白吸附在材料的表面,并且免疫球蛋白的取代速度大于纤维蛋白原的取代速度。利用 SPR 传感技术还能分析时间、血浆浓度、pH 值、缓冲溶液等对蛋白质竞争吸附的影响。

3.3 静电自组装过程的原位监测

静电自组装制备多层累积膜是制备高分子纳米薄膜的重要手段。利用正负电荷的吸引,可以获得不同厚度和结构的薄膜。以往的研究方法大多只能对制备的薄膜进行表征,SPR 传感器的出现,提供了一种新的原位监测自组装过程的手段。不但能够实时检测组装膜的厚度,对电解质薄膜还可获得膜的介电常数,更为重要的是可以分析组装的动力学过程。由于 SPR 传感器的传感片大

多为金膜,在早期的自组装研究中,主要对象是烷基硫醇,这方面的研究工作也比较深入^[25]。

Advincula 等^[26]利用 SPR 传感器研究了聚磺化苯乙烯(PSS)、聚磺化间苯二甲酸丙二酯(PES)、聚[4-(3'-羧基-4'-羟基苯偶氮基)-苯磺酰氨基乙烯](PAZO)与三种聚电解质(I-6, 6-18-X, I-6, 6-Me-X, I-Do, -Pip-Me-X, 分子结构如图 2 所示)的组装行为。实验研究了聚合物的相对分子质量、聚电解质的浓度、离子强度、pH 值等对组装的影响。发现随着组装层数的增加,入射角 θ 逐渐增大,反射光强度也逐渐增大。如果在组装过程中,第一层的电荷数较少,其组装过程将偏离线性行为。实验中组装的膜较传统的组装过程获得的膜厚,可能的原因是传统的方法在组装每一层后有一个干燥的过程,而 SPR 的组装过程中一直在水溶液中进行,高分子链更易伸展。利用 SPR 传感器对自组装过程的监测能很好地说明高分子链的构象对组装过程的影响。

Baba 等^[27]将 SPR 传感器和电化学综合测试系统结合起来,研究了聚苯胺和聚磺化苯胺的静电自组装过程。他们将传感片上金薄膜作为工作电极,利用循环伏安法进行了组装过程电化学分析。随着电位的循环变化,共振角也随之变化。实验将 SPR 谱与循环伏安曲线有机结合起来,可以用于导电聚合物薄膜的厚度、介电常数、折射系数、电化学性质以及组装动力学研究。

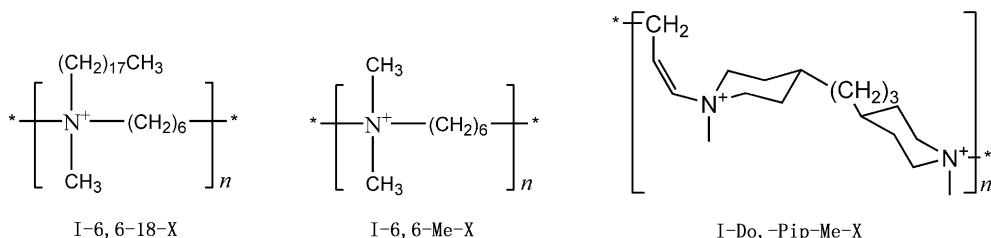


图 2 三种聚电解质分子结构

Figure 2 Molecular structures of three kinds of polyelectrolytes

3.4 高分子电化学聚合反应过程的研究

由于 SPR 传感器可以与电化学综合分析测试系统相连,拓宽了其应用领域,因此可以将其应用于电化学聚合过程的研究。以聚苯胺电化学聚合为例^[28],与上述静电自组装研究相似,在聚苯胺的电化学聚合过程中以金膜作为工作电极,将苯胺溶于稀硫酸中,随着电化学反应的进行,聚苯胺逐渐沉积在金膜上。实验通过聚苯胺电化学聚合过程中共振角的变化和聚合过程的循环伏安曲线的测定,可实时监测聚合过程中聚苯胺薄膜的厚度、介电常数以及聚合的动力学过程。在聚合过程中,随着聚苯胺薄膜厚度的增加,共振角逐渐增加。对于电化学聚合过程可以通过共振角的变化监测薄膜的生长过程。当电位在氧化电位和还原电位之间变化过程中,可以观测到反射光强度发生较大的变化。Bund 等^[29]进一步将 SPR 传感器和石英晶体微天平(QCM)、电化学综合测试分析系统结合起来,可实时监测聚吡咯电化学聚合反应过程中的反射光强度的变化、共振角的变化、石英晶体共振频率的变化,实现了实时获得电化学聚合过程中聚合膜的质量、厚度、介电常数等变化定量信息的目的,而且根据获得的聚吡咯薄膜的循环伏安曲线,还可对聚吡咯薄膜在水溶液中的掺杂/非掺杂行为进行研究。

3.5 高分子其它研究方面的应用

聚合物薄膜遇水会引起折射系数变化,在 SPR 谱图上表现为共振角减小,因此可以利用 SPR 传感器研究高分子薄膜的吸水性。Green 等利用 SPR 传感器研究了聚氧化乙烯/聚氧化丙烯(PEO/PPO)共聚物的吸水性^[30]。结果表明随着 PEO 在共聚物中的含量增加,材料的吸水性增加。

在材料的表面及界面研究中,将 SPR 传感器与其它表面分析仪器相结合,更能发挥其特点和作用。例如 Chen 等^[31]在研究聚原酸酯的降解过程中,采用 SPR 与原子力显微镜(AFM)连用,将聚原酸酯固定在金薄膜上,然后将不同 pH 值的缓冲溶液以一定的速度在样品池中流动。随着降解反应的进行,在 SPR 谱图可观测到共振角的变化。利用 SPR 传感器与 AFM 连用,不但可以分析降解的过程,而且还可以实时分析材料表面结构的变化。

另外利用 SPR 传感器还可研究高分子材料在生物酶作用下的降解行为。Claire 等^[32]研究了聚环氧乙烷琥珀酸酯、丁二酸-苯丙氨酸-丁二醇-苯丙氨酸共聚物、右旋糖苷水凝胶分别在脂肪酶、糜蛋白酶、葡聚糖酶的作用下的降解行为。研究表明:随着酶浓度的增加,降解速度加快,样品薄膜的厚度对降解速度影响较微弱。

SPR 传感器还是研究某些聚合物材料表面改性效果的有力工具。Black 等^[33]利用 SPR 传感器研究了以生物素(Biotin)作为末端基的聚乳酸-聚乙二醇(PLA-PEG)共聚物。这种聚合物由于分子链末端标记有生物素基团,可以很容易利用生物素-亲和素特异性相互作用进行表面改性。实验研究了 PLA-PEG、PLA-PEG-Biotin(聚乳酸-聚乙二醇-生物素)与亲和素的作用过程。从实验中可以看到,对于 PLA-PEG 的共聚物,PEG 段可以抑制亲和素在聚合物表面的非特异性吸附,共振角的变化非常微弱;而对于 PLA-PEG-Biotin,由于具有生物素末端基可以与亲和素进行特异性的结合,共振角的变化较大。实验表明:在某些聚合物链的末端引入生物素基团是一种较好的表面改性方法。

另外利用 SPR 传感器可进行高分子与小分子的相互作用的研究。例如,一般通常采用表面张力、荧光分析、核磁共振等方法研究高分子与表面活性剂的相互作用。与传统研究方法相比,SPR 传感器具有无需标记样品、感应灵敏、并可进行动力学和高分子的构象分析,因此在高分子与小分子的相互作用研究中具有独特的优势。Sarker 等^[34]研究了聚丙烯酸和十二烷基三甲基氯化铵的相互作用。将不同聚合度的聚丙烯酸硫酸化固定在金传感片上,将十二烷基三甲基氯化铵溶液流经传感片研究其相互作用。利用 SPR 传感器发现聚丙烯酸和十二烷基三甲基氯化铵的相互作用可以分为三个阶段,高分子的构象的变化是影响其相互作用的主要因素。

4 结束语

与高分子传统的研究手段相比,SPR 传感器的特点非常明显。SPR 传感器不但可以进行材料表面性质的研究,而且还可以进行固/液界面的动态作用,以及材料的吸附性能、吸水性、降解性能的研究等。SPR 传感器在分子研究中的应用才刚开始。由于 SPR 传感器具有流动的样品池,可以进行流速、温度、离子强度、pH 值等影响因素的研究。在研究的过程中可以与石英晶体微天平(QCM)、原子力显微镜(AFM)、X 光电子能谱(XPS)、椭圆偏振仪、电化学综合分析测试系统等仪器结合起来,在分子科学的研究中具有广阔的应用前景。SPR 传感器有可能成为 21 世纪分子科学研究有力的手段之一。

参考文献:

[1] Wood R W. Phil Mag., 1902, 4, 396.

[2] Nylander C, Liedberg B, Lind T G. Sensors and Actuators, 1982, 3, 79.

[3] 陈焕文, 牟颖, 张寒琦, 等. 分析仪器, 2001, 2, 3.

[4] Kooyman R P H, Lenferink A T M, Eenink R G. Anal Chem, 1991, 63, 83.

[5] Raether H. Springer Tracts Mod Phys, 1988, 111, 1.

- [6] Lofas S, Malmqvist M, Ronnberg I, et al. *Sensor and Actuators*, 1991, B5, 79.
- [7] Bieri C, Ernst O P, Heyse S, et al. *Nat Biotechnol*, 1999, 17, 1105.
- [8] Slepak V Z. *Mol Recognit*, 2000, 13, 20.
- [9] Whelan R J, Wohland T, Neumann L, et al. *Anal Chem*, 2002, 74, 4570.
- [10] Osmond R I, Kott W C, Skett S E, et al. *Analytical Biochemistry*, 2002, 310, 199.
- [11] Evgeny M, Gaiina T, Kenneth I, et al. *Biochemistry*, 2002, 41, 7907.
- [12] Crescenzo G D, Phan P L, Durocher Y, et al. *J Mol Biol*, 2003, 328, 1173.
- [13] Duverger E, Frison N, Roche A C, et al. *Biochimie*, 2003, 85, 167.
- [14] Sato Y, Fujimoto K, Kawaguchi H. *Colloids and Surfaces B*, 2003, 27, 23.
- [15] Song D Q, Mu Y, Liu X, et al. *Microchemical Journal*, 2003, 74, 93.
- [16] Lee M, Hvr Y, Kim T, et al. *Microchemical Journal*, 2002, 72, 315.
- [17] Helene E, Bruijn D, Kooyman R P, et al. *Appl Opt*, 1990, 29, 1974.
- [18] Bruijn D, Kooyman R P, Greve J, et al. *Optics Communications*, 1991, 82, 452.
- [19] 杜卫冲, 陈抗生. *光学学报*, 1991, 11, 1125.
- [20] 俞耀庭, 张兴栋, 姚康德, 等. *生物医用材料*. 第一版. 天津: 天津大学出版社, 2000, 20.
- [21] 肖才德, 隋森芳, 赵南明, 等. *中国生物医学工程学报*, 2000, 19, 60.
- [22] 裴仁君, 杨秀荣, 汪尔康, 等. *高等学校化学学报*, 2001, 22, 1128.
- [23] Green R J, Davies J, Davies M C, et al. *Biomaterials*, 1997, 18, 405.
- [24] Green R J, Davies M C, Roberts C, et al. *Biomaterials*, 1999, 20, 385.
- [25] Emanuele O, Yan L, Whitesides G M, et al. *Langmuir*, 1999, 15, 3.
- [26] Advincula R, Aust E, Mever W, et al. *Langmuir*, 1996, 12, 3536.
- [27] Baba A, Park M K, Advincula R, et al. *Langmuir*, 2002, 18, 4648.
- [28] Kang X F, Jie Y D, Dong S J. *Langmuir*, 2002, 18, 1713.
- [29] Bund A, Baba A, Berg S, Johannsmann D, et al. *J Phys Chem B*, 2003, 107, 6743.
- [30] Green R J, Corneillie S, Davies M C, et al. *Langmuir*, 2000, 16, 2744.
- [31] Chen X, Shakeshe K M, Davies M C, et al. *J Phys Chem*, 1995, 99, 11537.
- [32] Claire S, Andrea S, Katrina T, et al. *Anal Chem*, 2000, 72, 5225.
- [33] Black F E, Hartshorne M, Davies M C, et al. *Langmuir*, 1999, 15, 3157.
- [34] Sarker D, Somasundaran P. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 261, 197.

The Applications of Surface Plasmon Resonance Sensor in Polymer Science

XU Xin-hua¹, HAN Ming-chuan¹, CHEN Qiang², LI Dong-guang¹, YAO Kang-de¹

(¹ School of Material Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(² Life Science Institute, Nankai University Tianjin 300071, China)

Abstract: The principles of surface plasmon resonance (SPR) and the current applications of SPR sensor technique are introduced. In particular, the applications of SPR in the field of polymer science sensor are reviewed in details.

Key words: Surface plasmon resonance; Sensor; Polymer