

知识介绍

蛋白质在固体表面吸附的研究进展

李 艺¹, 程^{1,2}

(1 南京大学化学化工学院, 南京 210093;

2 华南理工大学材料学院高分子研究所, 广州 510641)

摘要:蛋白质在固体表面的吸附有多种理论模型和实验分析。蛋白质吸附主要包括分子传递、吸附、重排、交换、解吸等步骤。蛋白质在表面的状态由表面性能、静电作用及蛋白质自身性质等因素决定。蛋白质分子在界面吸附后发生构象改变, 引起熵增。

关键词:蛋白质; 固体表面; 吸附

蛋白质在固体表面的吸附研究是一个活跃的领域。预防及减少材料表面主要由于蛋白质吸附造成的生物污染及生物薄膜的形成, 是船舶制造、生物制药、食品加工等产业关注的主要问题^[1]。另一方面, 在医疗移植材料如骨骼、牙齿、皮肤或组织的移植过程中, 又要求所选择的蛋白质具有优异的黏附性能, 才能保证移植体与肌体有良好的生物相容性, 并最大程度的恢复移植体的生理功能^[2]。控制各种材料表面吸附的蛋白质的数量、排列及构象成为了材料最终品质的决定因素。蛋白质在界面的吸附行为与静电相互作用、接触面的亲水憎水性能、以及蛋白质本身的性质如分子量、分子在溶液中的尺寸等因素有关^[3~7]。蛋白质分子在界面吸附时伴随构象的改变, 引起吸附层的结构和性质发生变化, 这更是一个研究的热点问题。一个统一的认识是, 蛋白质在吸附时构象变化引起的熵增足以弥补一些负面影响如静电作用等。但是这些构象变化的机理还远未明了, 例如, 构象变化的时间尺度如何? 界面性质对其有何影响? 因此, 有必要对蛋白质的吸附过程进行更加深入、定量的研究。蛋白质在固体表面的吸附情况如覆盖率、吸附层厚度和蛋白质分子的形状可用多种手段分析研究, 例如椭圆光度法^[8], 荧光光谱法^[9], 放射性示踪法^[10], 表面增强拉曼光谱法^[11], 衰减全反射富立叶变换红外光谱(ATR-FT-IR)流动细胞分析法^[12], 振动总频率波谱^[13], 原子力显微镜方法(AFM)^[14, 15], 平面极化干涉计^[16], 表面胞质基因共振(SPR)^[17], 动力学接触角分析(DCA)^[18], 时间飞行二次离子质谱(ToF-SIMS)^[19], 微分扫描量热法(DSC)^[20]等。研究吸附蛋白质构象的另一个途径是计算机拟合。例如, Euston 和 Naser^[21]采用 Monte Carlo 计算机拟合方法模拟了球蛋白在硬固体表面的吸附状态, 研究当表面压力上升后吸附分子结构的转变; Dickinson 等^[22-24]用该方法模拟了聚合物在表面的竞争吸附和蛋白质-多糖复合物的吸附; Liu 和 Haynes^[25]采用介观动力学 Monte Carlo 拟合方法讨论了在受限空间内蛋白质状 HP 链的吸附; 韩为振等^[26]采用刚体模型对聚十赖氨酸在固体界面上吸附过程进行了分子动力学模拟, 研究了吸附过程对肽链构象的影响。由于蛋白质分子的结构极其复杂, 阻碍了拟合方法的发展。

1 蛋白质吸附的理论发展

研究人员提出了从简单的 Langmuir 吸附模型^[27], 到考虑团簇形成^[28]或蛋白质与界面间非均相作用

基金项目:国家自然科学基金资助(20474026);

作者简介:李艺(1974—), 南京大学化学化工学院博士生, 苏州大学讲师, 研究方向为高分子化学与物理;

* 联系人: Tel: 86-25-83597355; E-mail: rscheng@nju.edu.cn.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

在内^[29]的各种吸附模型。例如, Cottin^[30]提出的模型中包含一个表观动力学常数, 它将吸附常数和速度常数合并起来; Lundström^[31]认为吸附的蛋白质分子存在多重构象状态, 并讨论了分子在表面的竞争吸附; Lee^[32]将蛋白质吸附模型分成两大类—扩散控制或动力学控制, 并提出了不同状态的单个蛋白质分子在固-水界面的吸附力学模型。一般认为蛋白质吸附包含下列全部或其中几个步骤: 蛋白质传递到表面; 蛋白质吸附到表面; 吸附的蛋白质发生重排; 吸附的蛋白质发生交换; 蛋白质解吸; 蛋白质离开表面。

1.1 蛋白质的传递

蛋白质传递到界面受实验设置、流动条件等因素的制约。即使是在对流支配的系统之中, 也存在一个静滞的边界层, 蛋白质分子通过该边界层进行扩散传递。在某些情况下这一步成为吸附速度的控制步骤。Corsel 等^[33]发现, 分子通过边界层的扩散在 0.3s 之内是线性的, 遵循如下方程

$$C_{\text{surface}} = C_{\text{bulk}} - \delta \frac{\partial \Gamma}{\partial t} \quad (1)$$

式中, C_{surface} 是表面层的溶液浓度, C_{bulk} 是本体溶液浓度, $C_{\text{surface}} \leq C_{\text{bulk}}$; δ 是边界层的厚度, Γ 是吸附量, D 是扩散系数, t 是时间。在完全由扩散控制的吸附过程中, 表面层的溶液浓度 C_{surface} 应当为零。但是在绝大多数情况下, 至少是在整个吸附过程中, C_{surface} 不为零。Kop 等^[34]报道边界层的厚度约为 20 μm 。

1.2 蛋白质的吸附

在许多情况下存在一个吸附屏障, 蛋白质分子必须克服这个障碍才能粘附到表面, 因此, 不是所有到达表面的分子都能够被吸附。如果吸附是受到扩散控制的话, 实际的吸附要慢一点, 吸附模型也要作相应的修正。蛋白质大分子的吸附一般是单层吸附。同时, 伴随可吸附位点的减少, 吸附过程也会受到影响, 如方程 2a 所示。但是, 一些蛋白质分子也可形成双层或多层吸附, 如果吸附的层数一定, 可用方程 2b 来表示

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = k_{\text{adsorption}} C_{\text{surface}} (1 - \theta_{\text{tot}}) \quad (2a)$$

$$\frac{\partial \theta_n}{\partial t} = k_{\text{adsorption}(n)} C_{\text{surface}} (\theta_{\text{tot}(n-1)} - \theta_{\text{tot}(n)}) \quad (2b)$$

式中, k 是速度常数, θ 是吸附蛋白质占据的表面位点的分数 ($0 \leq \theta \leq 1$), n 是吸附层数。

如果蛋白质传递到表面的速度比蛋白质吸附到表面的速度慢, 这个吸附过程就是扩散控制的, 反之则是动力学控制的。方程 2 中的速度 $k_{\text{adsorption}} C_{\text{surface}}$ 是传递到表面的蛋白质的流量 F 与蛋白质分子吸附到表面上空位点的概率 P (即粘附因子) 相乘的结果。Weaver 和 Pitt^[35]参照线性无规行走提出, 热平衡的蛋白质分子与气态分子 (在一个坐标上) 有统计上相同的平均热速率, 这可用于计算蛋白质的流量 F 。假定蛋白质分子的平均热速率为

$$v = (8RT/\pi M_w)^{1/2} \quad (3)$$

那么传递到表面的蛋白质分子的流量为^[36]

$$F = C_{\text{surface}} v/4 \quad (4)$$

式中, R 是气体常数; T 是温度; M_w 是蛋白质的分子量。引入一个粘附系数 P , 方程 2a 变为

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = v P C_{\text{surface}} (1 - \theta_{\text{tot}})/4 \quad (5)$$

在经典的扩散情况 (满足 Fick 定律) 下, 存在两个极限条件:

(a) 扩散-控制条件下,

$$\Gamma = 2(Dt/\pi)^{1/2} C_{\text{bulk}} \quad (6)$$

(b) 动力学-控制条件下,

$$\Gamma = v P C_{\text{bulk}}/4 \quad (7)$$

1.3 吸附蛋白质的变化

已经观察到界面上吸附的蛋白质会随着时间改变连接强度。例如, 用缓冲溶液或表面活性剂来冲洗吸附在表面的蛋白质, 发现随着时间增加, 清除的蛋白质的量减少。这可能是由于吸附的蛋白质分子发

生构象转变或取向具有时间依赖性。这种类型的反应可用一般的速度方程来描述

$$\begin{aligned}\frac{\partial \theta_1}{\partial t} &= -k_{\text{change}} \theta_1 \\ \frac{\partial \theta_2}{\partial t} &= k_{\text{change}} \theta_1\end{aligned}\tag{8}$$

1.4 交换反应

许多复杂的蛋白质溶液中可观察到交换反应,例如血液或血浆中观察到的吸附交换反应(Vorman 效应)^[37]。但是,交换反应不仅仅发生在不同类型的蛋白质分子之间,在溶液里和表面上的同种蛋白质分子之间也会发生交换。Ball 等^[38]通过同位素示踪法研究了吸附到聚苯乙烯橡胶颗粒表面的人类 IgG 分子与本体溶液中的 IgG 分子之间的交换反应,发现交换过程遵循动力学一级方程,且与 IgG 分子在本体溶液中的浓度有关。如果吸附的蛋白质存在多种取向和构象,这足以证明吸附蛋白质的连接强度有变化。另外,这也可能导致吸附到界面的蛋白质优先采取齐聚物的形式^[39]。交换反应一般描述为

$$\begin{aligned}\frac{\partial \theta_1}{\partial t} &= -k_{\text{exchange}} \theta_1 C_{\text{surface},2} \\ \frac{\partial \theta_2}{\partial t} &= k_{\text{exchange}} \theta_1 C_{\text{surface},2}\end{aligned}\tag{9}$$

1.5 解吸

吸附到界面的蛋白质分子也会同时发生解吸。实验观察到,不同的蛋白质/表面之间解吸程度的变化非常大。有时,蛋白质会完全解吸,总的吸附动力学就可以用一个 Langmuir 类型的方程来描述。有时则完全观察不到解吸发生。解吸过程遵循如下方程

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = -k_{\text{desorption}} \theta\tag{10}$$

方程 1~5 合并起来可从多方面来理解不同体系的吸附动力学。吸附的蛋白质存在着多种不同的状态(*i*),根据取向和构象改变程度的不同,蛋白质分子覆盖的表面积(*a*)也不同。在计算表面上可能存在的总的位点数时,必须将不同状态考虑在内

$$\theta_{\text{tot}} = \sum a_i \theta_i\tag{11}$$

在上述方程中,吸附速度常数 *k* 被当作一个真实的常数,实际上它也受到许多因素如时间、分子吸附量等的制约。随着时间延长,当吸附量增加时,速度常数通常会减小,这可能是由于已吸附的分子和正在吸附的分子之间存在排斥力,导致吸附能垒不断增大的缘故。对于不可逆的吸附反应,假定初始吸附速度很大,当单层吸附达到饱和时速度接近零,则速度常数的非线性时间依赖性可表示为

$$k = \alpha^{-\beta}\tag{12}$$

式中,α 和 β 是变量-比常数^[33]。将 von Smoluchowski^[40]的絮凝动力学方程应用到蛋白质分子从溶液到固体表面的吸附中,则动力学吸附常数 *k_{adsorption}* 可表示为

$$k_{\text{adsorption}} = 4 \pi l_0 D f \frac{N}{1000}\tag{13}$$

式中,*l₀* 是相邻的、非共价作用的分子的外部电子壳层边界之间的最短平衡距离(*l₀*=0.157 nm)^[41]; *N* 是阿佛加得罗常数(*N*=6.023×10²³); *f* 是 von Smoluchowski 因子^[40],它将分子彼此间相互接近到发生接触的所有“可能”或“不可能”合并起来考虑

$$f = \int_{\phi} \left\{ \exp \left[\frac{1}{l} \int_{l=l_0}^{l=\infty} \left(\frac{-\Delta G}{kT} \right) dl \right] \right\} d\phi\tag{14}$$

式中,*f* 包含了潜在吸附的蛋白质分子在整个距离 *l* 上,从 *l*=*l₀* 到 *l*=∞,以及所有方向(φ)上的相互作用(排斥和吸引)能。

动力学解吸常数 *k_{desorption}* 可表示为

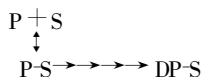
$$k_{\text{desorption}} = \frac{4 \pi l_0 D f \frac{N}{1000}}{K_{\text{equilibrium}}}\tag{15}$$

式 $K_{\text{equilibrium}}$ 是平衡吸附常数, 表达式为

$$K_{\text{equilibrium}} = \frac{k_{\text{adsorption}}}{k_{\text{desorption}}} \quad (16)$$

2 蛋白质的吸附状态及其影响因素

蛋白质在表面的吸附可简单的表示为,



P 代表天然蛋白质, S 代表表面, 而 DP 指吸附后发生形变的蛋白质。当蛋白质从 P 状态转变到 DP-S 状态后, 它通常会“粘”在表面上, 这时蛋白质很少发生解吸, 除非化学环境(例如 pH 或离子强度)发生变化。蛋白质的吸附状态主要与下列因素有关。

2.1 蛋白质与表面间的相互作用

由于蛋白质的两性特征, 它们是具有表面活性的分子。蛋白质与表面间的相互作用主要包括分子间力, 如库仑力、范德华力、路易斯酸碱作用, 以及与熵变化有关的因素如憎水作用、构象熵和受限的迁移率。

在亲水固体上, 带电表面与带相反电荷的蛋白质分子之间的静电引力成为蛋白质分子从溶液吸附到固体表面的驱动力。最终的吸附量的多少取决于吸附层内部静电引力与静电斥力之间的平衡。在憎水固体上, 憎水表面与蛋白质分子中憎水片段之间相互强烈吸引, 即使固体表面与蛋白质分子带相同电荷, 吸附作用也会发生。蛋白质分子在固体表面发生脱水或重排反应, 引起熵的改变, 进一步推动了蛋白质在表面的吸附^[42]。强烈的表面相互作用会损坏蛋白质分子的天然结构, 导致它的连续结构缺失。蛋白质吸附后伴随发生的结构改变已有许多报道^[43~47], 最主要的发现是: 蛋白质分子的二级和三级结构的微扰使得 α -螺旋含量下降。螺旋结构的缺失有可能增加多肽链之间的柔性, 蛋白质分子的构象熵随之增加。例如, Richard 等^[48]用圆二色性光谱(CD)技术研究了分别吸附到亲水和憎水表面的 β -乳球蛋白分子的构象变化, 发现亲水表面吸附的蛋白质分子的二级结构减少, 而憎水表面吸附的蛋白质分子的二级结构增多。Roach 和 Farrar^[49]利用石英晶体微量天平(QCM)和入射余角红外光谱(GA-FTIR)比较研究了牛血清蛋白(BSA)和牛纤维蛋白原(Fg)在固体(涂金玻璃)表面的吸附速度和吸附量, 以及与表面结合的蛋白质的构象, 定量解释了表面引起的蛋白质的构象变化。他们发现, BSA 吸附是一步完成的, 而 Fg 吸附是一个复杂的多步过程, 如图 1 所示。与吸附到亲水表面的 BSA 相比, 吸附到憎水表面的 BSA 的量要少一些, 但是分子的二级结构变得更加无序。而 Fg 吸附到亲水和憎水表面的速度比 BSA 要快, 但是分子的变形要少得多。McClellan 和 Franses^[50]报道了水溶液中的 BSA 在亲水的氧化硅/硅表面和涂有憎水油脂层的氧化硅/硅表面的吸附情况, 在实验浓度下(0.01~1 wt%)BSA 主要形成单层吸附, 并以侧向方式结合到表面上, 同时分子变得扁平。BSA 在憎水表面形成的吸附膜的厚度和密度大约为在亲水表面吸附条件下的一半, 说明蛋白质分子与憎水表面间的作用更强烈, 分子的变形程度更大。

从流动电位数据获得作为时间函数的吸附量数值的一个经典的假设是: 吸附量 Γ 与表面电位 ζ 的变化 $|V\zeta|$ 成比例, 比例常数为饱和吸附时最大界面浓度与 $|V\zeta|$ 之间的比值。Ethe'Ve 和 De'jardin^[51]利用放射性同位素示踪法研究了 pH=7.4 时磷酸盐缓冲溶液中的溶解酵素在硅石表面吸附时的流动电位和吸附量之间的关系。溶解酵素的等电点在 pH=11, 而硅石的 pI=2, 因此在实验的偏中性条件下硅石表面带负电。他们找到了一个临界浓度 Γ_c 将蛋白质的吸附分成了两个阶段。第一阶段是一个扩散控制过程, 吸附量和流动电位同时增长, 这显然是由于带正电的分子倾向于吸附到带负电的表面上; 第二阶段当界面浓度继续增大时, 流动电位却几乎不再变化, 暗示当硅石表面的电荷密度从低变高后, 分子的构象也发生变化。Mannen 等^[17]采用 BIACORE(一种应用表面胞质基因共振技术的生物传感器)观察了固定在表面上的蛋白质的带电状态和构象变化。一些蛋白质通过共价键连接到流动细胞的传感器表面的右旋糖苷链上, 然后置于一系列 pH 不同的缓冲溶液中。传感器表面周围的折光率的即时值变化反映了被固定

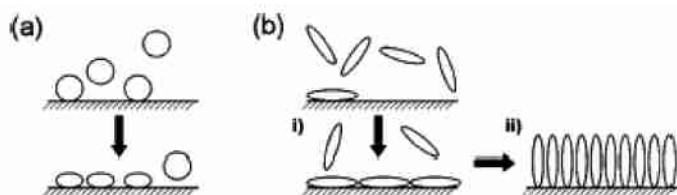


图1 蛋白质分子单层吸附示意图

(a)球形蛋白质—与表面间的相互作用使得构象扭曲；

(b)棒状蛋白质—发生多级吸附 (i) 蛋白质吸附，分子长轴平行表面；(ii) 分子重排，蛋白质分子-分子相互作用增强，表面浓度增加。

Figure 1 A schematic to show single-layer adsorption of (a) a globular protein whose conformation may become distorted on interaction with the surface and (b) a rod-like protein that undergoes a multistage adsorption process where (i) initially the protein adsorbs with its long axis parallel to the surface and then (ii) rearrangement occurs to increase protein-protein interaction and surface concentration of protein.

的蛋白质在缓冲溶液中的行为，并揭示了这些行为与蛋白质的总的带电状态密切相关。同时，折光率随时间的改变也反映了蛋白质构象变化的程度。

除了表面性质外，蛋白质吸附后结构变形的程度还与蛋白质自身的化学性质和结构的相对稳定性有关。Haynes 等^[52]采用微分热重法测定了鸡蛋白溶解酵素和牛奶乳清白蛋白的结构微扰和热力学稳定性，这两种蛋白质都是球形的，尺寸也相近。研究发现，固体表面和蛋白质分子之间的脱水反应为分子的吸附提供了充足的熵动力。在一个憎水的聚苯乙烯表面，吸附的两种蛋白质都发生显著的变性。但是，当吸附到亲水的 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 表面后，乳清白蛋白几乎完全变性，而溶解酵素仅仅失去一小部分二级结构。这种差异与天然溶解酵素具有良好的结构稳定性有关。Ishiguro 等^[53]采用衰减全反射富立叶变换红外光谱研究了 D_2O 溶液中的鸡蛋白溶解酵素和 BSA 在聚三甲基硅氧基硅基苯乙烯表面的吸附，发现吸附的溶解酵素分子的平均构象与本体溶液浓度无关，仅仅取决于吸附时间。说明溶解酵素分子在表面形成不连续的聚集体。而 BSA 分子发生构象转变的程度则仅仅取决于吸附量，与本体溶液浓度和吸附时间无关。这种差异反映了它们具有不同的构象稳定性。Billsten 等^[54]用 CD 技术研究了 T4 溶解酵素(T4L)在硅胶表面的吸附，发现不稳定的 T4L 变体与稳定的 T4L 变体相比，在吸附时更易失去二级结构。Lundqvist 等^[55]采用 CD、NMR 和 GPC 等技术研究了人类碳酸脱水酶 I(HCAI)在不同粒径的纳米硅石颗粒表面的吸附，他们发现，颗粒的曲率不同，吸附蛋白质发生微扰的二级结构的量不同，颗粒的直径越大，表面与蛋白质之间的相互作用越强，蛋白质的二级结构改变越多。但是蛋白质的三级结构的变化程度却不受颗粒曲率的影响。他们还比较了 HCAI(“硬”蛋白)和 HCAII(“软”蛋白)的吸附情况。一般认为，软蛋白吸附时较易发生构象的变化。他们发现，与 HCAI 相比，HCAII 吸附的速度更快，而且蛋白质失去了色氨酸残基周围所有的三级结构。

Kanthimathi 等^[56]报道了金属配合物的几何结构对固体表面的 BSA 的构象变化的影响。他们合成了两种新的金属配合物 $[\text{Cr}(\text{naphpm})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) 和 $[\text{Ni}(\text{naphpm})]$ (2)，并评估了它们与固/液表面的 BSA 之间的相互作用。CD 测定显示，与配合物 2 结合的 BSA 分子中的 α 螺旋一线团的平衡改变较小，而配合物 1 显著增加了 BSA 分子的螺旋化程度，两种 BSA-金属配合物表面电位变化的不同速度也进一步证实了上述差异。固体表面张力的计算显示，与单一 BSA 及 BSA-金属配合物 2 相比，BSA-金属配合物 1 在高表面能的表面(如玻璃)有最低的极化量 γ_s^p ，在低表面能的表面(如特氟纶)则有最高值。接触角测定显示，蛋白质的伸展和重新取向是受到了憎水作用的驱动。

2.2 溶液条件的影响

吸附到表面的蛋白质的量有多少、分布如何，采取哪种构象受到许多溶液条件(pH、浓度、离子强度

等)制约,而这些条件的影响也不是孤立的。溶液的 pH 值变化时,蛋白质的表面电荷会发生变化,电荷的变化影响蛋白质与溶剂之间、蛋白质分子之间的静电作用,从而影响着蛋白质分子的构象。Mori 和 Imae^[57]利用原子力显微镜观察了 BSA 在云母表面的吸附,发现当蛋白质的覆盖率增加时,分子的取向改变。有意思的是,他们发现溶液的 pH 值以一种复杂的方式影响着吸附动力学。在 pH=3 的强酸溶液中(BSA 的等电点是 4.712),带正电的 BSA 快速吸附到云母表面,由于分子间的静电排斥,蛋白质在固体表面形成单分子吸附层;当 pH=6 时,BSA 与云母之间的吸引力克服了静电斥力,蛋白质在固体表面形成多层吸附。Su 和 Lu 等^[58,59]采用镜像中子反射分别研究了 BSA 和溶解酵素在亲水的硅石-水界面的吸附:就 BSA 而言,pH 值的变化对 BSA 的吸附影响巨大。当溶液的 pH=5.1(接近 BSA 的等电点)时,BSA 的吸附量最大。当 BSA 溶液的本体浓度低于 0.5g/L 时,在 pH=3~7 范围内,BSA 分子在表面形成均匀的单层吸附。当 BSA 溶液的本体浓度高于该数值时,pH=5.1 时 BSA 分子在表面形成双层吸附。将吸附层的厚度与 BSA 的椭圆结构的尺寸比较发现,BSA 分子以侧向方式吸附到硅石表面。但是,BSA 分子短轴的长度约为 4nm,而吸附层的厚度小于 4nm,表明吸附到亲水表面的 BSA 分子“变扁”或结构发生变形。观察到的 BSA 结构变形程度与表面力测量的发现一致,显示出 BSA 具有较高的表面压。就溶解酵素而言,它在硅石表面的吸附情况如图 2 所示,低浓度时,溶解酵素分子以长轴平行表面的方式吸附到表面,吸附层分子之间以静电斥力为主。高浓度时,由于静电斥力,溶解酵素分子采取侧向方式吸附到表面,并随溶液 pH 值的升高开始形成多层吸附。但是分子的三级结构仍然保留,表明分子未发生显著的变性,这与 BSA 分子形成了鲜明的对比。

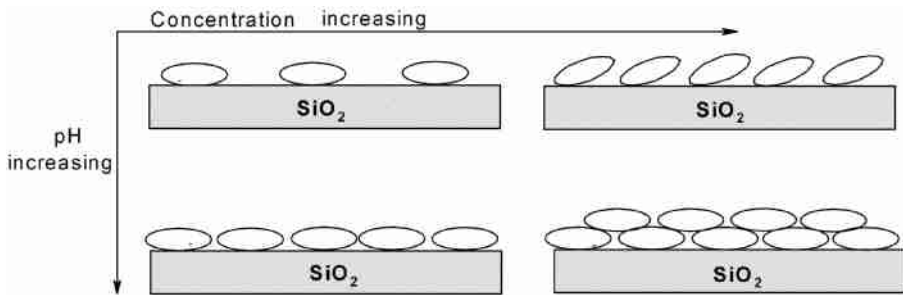


图 2 溶解酵素在硅石/水表面吸附示意图

Figure 2 A schematic to show adsorption of lysozyme on silica/water interface

Leemakers 等^[60]采用自洽场模型研究了本体相浓度对在固/液界面吸附的 β -酪蛋白的表面覆盖率和密度的影响,发现 β -酪蛋白溶液的浓度有一个极限值(取决于离子强度),当本体相浓度低于该极值时,蛋白质在表面形成单层吸附,反之形成多层吸附。Hook 等^[61]利用石英晶体微量天平(QCM)技术研究了血色素分子吸附到有憎水涂层的金表面的过程中结构的变化。发现在等电点附近,当溶液中的离子强度较高时,血色素分子形成单层吸附,离子强度较低时,血色素分子形成双层吸附,其中第二层的结构比较松散。而当溶液的 pH 值远离等电点后,由于吸附的蛋白质的表面电荷的增加,导致静电排斥力增大,分子难以形成第二层吸附。同时,静电排斥作用也使得吸附层中蛋白质分子的密度降低,分子的构象变得更加伸展。离子强度增大后,蛋白质分子的表面电荷被屏蔽,这时分子的吸附行为与 pH 的变化无关。Kondo 和 Fukuda^[62]研究了血色素在超细硅石颗粒表面的吸附行为,发现高温条件下吸附到表面的分子迅速发生较大的构象转变,构象转变的速度则随吸附量的增加而降低。同时,离子强度增大,吸附量降低,构象变化的速度放慢。

3 蛋白质吸附应用举例

3.1 生物传感器

生物传感器,以及免疫测定和免疫色谱方法的出发点是 IgG 能够以高度专一的方式与大量不同的分子连接^[63]。这些应用需要控制 IgG 的取向和构象,以保持它在吸附状态下的连接能力。利用椭圆法测

定出的 IgG 吸附层的厚度数值显示,在绝大多数吸附条件下,IgG 采取末端朝上的连接方式。就构象而言,分子中的包含连接点的 Fab 部分在吸附时要比 Fc 部分表现出相对高的结构稳定性。这种差异揭示了为什么在类似的吸附条件下 Fc 部分比 Fab 部分更容易吸附,这也反过来会影响到 IgG 分子的取向。上述应用的另一个关键是蛋白质与吸附剂表面间非特定的相互作用。许多研究集中在了解蛋白质的固定和蛋白质在电极上的沉积方面。科研人员还致力于发展新方法来制备多组分蛋白质和生物大分子膜。

3.2 生物材料

生物材料的表面通常暴露在蛋白质的浓溶液中。血浆中的三种蛋白 IgG、HSA 和纤维蛋白原的吸附研究得最多^[64~67],这可能是由于它们在血浆中的浓度较大。当两种或两种以上的蛋白质同时吸附到表面时,会观察到界面上的蛋白质与溶液中的蛋白质之间发生动力学交换。血浆中的白蛋白会抑制 IgG 在憎水表面的吸附,但是又会增加 IgG 在亲水表面的沉积。提高生物材料表面的生物相容性的一个路径是增强它们抵抗蛋白质吸附的能力,在生物材料的表面加上亲水的涂层是近年来研究的重点之一。例如,研究人员发现,当材料表面用 PEO 处理后,材料抵抗蛋白质吸附和细胞粘附的能力大大增强^[68]。

控制细胞在生物材料表面的粘附通常意味着控制细胞连接处蛋白质吸附层的成分。例如,当生物材料与血液接触时,吸附的血浆蛋白层中纤维蛋白原的浓度决定了血小板粘附的程度。一旦血小板在移植材料表面堆积,会导致血液凝结和血栓症。吸附蛋白质的密度大小控制了细菌在接触循环血液的移植植物表面的粘附。

3.3 膜表面改性

制约超滤技术在蛋白质分离中应用的一个重要原因是蛋白质在膜表面吸附所造成的膜污染。超滤膜通常为了经受膜清洗过程中的化学处理和温度变化,而由结构严密的高分子材料制得,但其显著的疏水性表面加强了蛋白质的吸附。因此,对膜表面进行改性是控制膜表面性质的有效途径。常用的方法有辐照接枝、表面化学反应、表面涂敷法、表面活性剂改性等^[69]。

4 展望

蛋白质的吸附问题涉及生物、材料、化学、医学等多个学科,由于其巨大的科学价值和应用背景,始终是科研工作者们关注的重点。伴随现代分析手段的不断组合和创新,人们对蛋白质吸附的机理和变化有了进一步的认识,在实验的基础上建立了多种模型并进行了多种拟合,甚至能预测蛋白质的结构和性质变化。今后的发展必然是更深入的理解吸附理论,同时指导实践如材料表面改性等。另外,蛋白质不同于一般的聚合物,在复杂的结构背后,蕴藏着生理活性。关于蛋白质的活性与吸附之间的关系报道甚少,我们相信这也是今后研究发展的重要方向之一。

参考文献:

- [1] Jansen B. Curr Opin Infect Dis, 1992, 6:526.
- [2] Williams D. Ed. Concise Encyclopedis of Medical and Dental Materials. New York: Pergamon Press, 1990.
- [3] Norde W, Lyklema J. J Colloid Interface Sci, 1978, 66:257.
- [4] Elwing H, Welin S, Askendal A. J Colloid Interface Sci, 1987, 119:203.
- [5] Tilton R D, Robertson C R. Langmuir, 1991, 7:2710.
- [6] Su T J, Lu J R, Thomas R K, Cui Z F. Langmuir, 1998, 14:438.
- [7] Horbett T A, Brash T A. Protein at Interfaces II. ACS Symposium Series 602, Washington DC, 1995.
- [8] Prime K L, Whitesides G M. Science, 1991, 252:1164.
- [9] Engel M F M, Mierlo C P M, Visser A J W G. J Biol Chem, 2002, 277(13): 10922~10930.
- [10] Dulm P, Norde W. J Colloid Interface Sci, 1983, 91:248.
- [11] Satoshi Y, Teruhisa M, Tamotsu Z. Biotechnol Prog, 2003, 19: 1348~1354.
- [12] Bellissimo J A, Cooper S L. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1984, 30: 359.
- [13] Gibum K, Marc G, Joonyeong K, Paul S C. Langmuir, 2002, 18: 2807~2811.

- [14] Lin J N, Drake B. *Langmuir*, 1990, 6;509
- [15] Cullem D C, Lowe C R. *Interf Sci*, 1994, 166;102.
- [16] Shirshov Y M, Snopok B A, et al. *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, 16(6);381~90.
- [17] Teruhisa M, Satoshi Y, Jun H, et al. *Anal Biochem*, 2001, 293(2); 185~193.
- [18] Davies J, Dawkes A C. *Nanobiology*, 1994, 3;89.
- [19] Jos B, Ce sar C V, Edy A, et al. *Anal Chem*, 1999, 71;3219~3225.
- [20] Welzel P B. *Thermochimica Acta*, 2002, 382; 175 188.
- [21] Euston S R, Naser M A. *Langmuir*, 2005, 21;4227~4235.
- [22] Dickinson E, Euston S R. *Adv Colloid Interface Sci*, 1992, 42;89~148.
- [23] Dickinson E, Euston S R. *J Colloid Interface Sci*, 1992, 152;562~572.
- [24] Dickinson E, Euston S R. *Food Hydrocolloids*, 1992, 6;345~357.
- [25] Liu S M, Haynes C A. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 282; 283~292.
- [26] 韩振为,等. *化学工业与工程*, 2005,22(3); 163~165.
- [27] Aptel J D, Voegel J C. *Colloid Surf*, 1988, 29;359.
- [28] Alaeddine S, Andersson H. *Biophys Chem*, 1995, 54;211.
- [29] Sevastianov V I, Kulik E A. *J Colloid Interface Sci*, 1991, 145;191.
- [30] Cottin I. *Colloids Surf. B; Biointerfaces*, 1995, 4;111.
- [31] Lundström I. *Prog Colloid Polym Sci*, 1985, 70;76.
- [32] Lee W K, Bothwell M K. *J Colloid Interface Sci*, 1999, 213;265~267.
- [33] Corsel J W, Willliems G M. *J Colloid Interface Sci*, 1986, 111;544.
- [34] Kop J M M, Corsel J W, Janssen M P. *J de Physique*, 1983, C10;491.
- [35] Weaver D R, Pitt W G. *Biomaterials*, 1992, 13;577.
- [36] Ortega-Vinuesa J L, Tengvall P. *Biomaterials*, 1998, 19;251~262.
- [37] Vroman L, Adams A L. *J Biomed Mater Res*, 1969, 3;43.
- [38] Ball V, Huetz P, Elaissari A. *Biophysics*, 1994, 91;7330~7334.
- [39] Zsom R L. *J Colloid Interface Sci*, 1986, 111;434.
- [40] Smoluchowski M. *Z Physik Chemie*, 1917, 92;129.
- [41] Oss C J, Chaudhur M K. *Chem Rev*, 1988, 88;927.
- [42] Susanne H M, Lene J, et al. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 27; 194~204.
- [43] Clark D C; Coke H; Mackie A R. *J Colloid Interface Sci*, 1990, 138;207.
- [44] Baszkin A; Boissonnade M M. *J Biomed Mater Sci*, 1993, 27;145.
- [45] Malmsten C. *J Colloid Interface Sci*, 1994, 16;333.
- [46] McGuire J; Wahlgren M, Arnebrant T. *J Colloid Interface Sci*, 1995, 170;182.
- [47] Liebmann-Vinson A, Lander L M. *Langmuir*, 1996, 1;2256.
- [48] Richard J M, Richard A L. *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces*, 2002, 23;31~42.
- [49] Roach P, Farrar D, Perry C C. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(22);8169~8173.
- [50] McClellan S J, Franses E I. *Colloids and Surfaces A; Physicochem Eng Aspects*, 2005,260; 265~275.
- [51] Etche've J, De jardin P. *Langmuir*, 2002, 18;1777~1785.
- [52] Haynes C A, Norde W J. *J Colloid Interface Sci*, 1995, 169;313.
- [53] Ryo Ishiguro, Yasuhiro Yokoyama, et al. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 290; 91~101.
- [54] Billsten P, Wahlgren M C. *J Colloid Interface Sci*, 1995, 175;77.
- [55] Martin L, Ingmar S, Bengt-Harald J. *Langmuir*, 2004, 20; 10639~10647.
- [56] Kanthimathi M, Maheshwari R, Dhathathreyan A. *Langmuir*, 2003, 19 (8); 3398~3402.
- [57] Mori T, Imae Y. *Colloids Surf B*, 1997, 9;31~36.
- [58] Su T J, Lu J R. *J Phys Chem B*, 1999, 103;3727~3736.
- [59] Su T J, Lu J R. *J Phys Chem B*, 1998, 102;8100~8108.
- [60] Leemakers F A M, Atkinson P J. *J Colloid Interface Sci*, 1996, 178;681~693.
- [61] Hook F, Rodhal M, et al. *Biophysics*, 1998, 95;12271~12276.
- [62] Malmsten M. *Colloids Surfaces [B]*, 1995, 3;297~308.
- [63] Buijs J, Hlady V, *Biotechnology*, 1996, 7;72~77.
- [64] Williams R A, Blanch H W. *Bioens Bioelectron*, 1994, 9;159~167.
- [65] Strike D J, De Rooij N F, Koudelka-Hep M. *Biosens Bioelectron*, 1995, 10; 61~66.

- [66] Khamlichi S, Serres A, Muller D, Jozefonvicz J, Brash J L. *Colloids Surfaces*, 1995, 4, 165~172.
- [67] Downard A J, Roddick A D. *Electroanalysis*, 1995, 7, 376~378.
- [68] Bae Y M, Oh B K, et al. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 286(2): 496~503.
- [69] 卞晓锴, 陆晓峰, 施柳青. *膜科学与技术*, 2001, 21(4): 47~49.

Development of Studying for Protein Adsorption on the Solid Surface

LI Yi¹, CHENG Rong-shi^{1,2}

(¹ *Department of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

(² *College of Material Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*)

Abstract: Many theoretical models and analytical techniques have been proposed for the protein adsorption on the solid surfaces. The adsorption process of pretein includes several steps such as molecular transfer, adsorption, rearrangement, exchange and desorption. The state of protein on the surface depends on the surface property, static electronic interaction, the self-performance of protein and the surrounding chemical conditions. The conformational changes often take place upon adsorption and arose the increasing of entropy.

Key words: Protein; Solid surface; Adsorption