

文章编号:1000-6281(2003)01-0026-04

# 牛血清蛋白在亲水硅片表面吸附的原子力显微成像

于泳,应佩青,靳刚\*

(中国科学院力学研究所国家微重力实验室,北京 100080)

**摘要:**本文用原子力显微术(AFM)研究了牛血清白蛋白(BSA)在亲水硅片表面的吸附。硅片表面经亲水处理后,将牛血清蛋白(BSA)吸附在表面,采用轻敲模式,可获得清晰的 AFM 图像。牛血清蛋白(BSA)的 AFM 图像表明:BSA 在亲水硅片表面是单分子、水平吸附在硅片表面,且呈颗粒状;1mg/ml 的 BSA 在吸附 30min 后为饱和吸附。BSA 到达硅表面后,蛋白中可移动的带正电荷的基团可以趋向亲水表面,使 BSA 与硅表面的静电相互作用由斥力变为吸引力。BSA 可以稳定地吸附在亲水硅片表面。

**关键词:**原子力显微术;牛血清蛋白(BSA);蛋白质吸附

**中图分类号:** Q51; TN16; Q336 **文献标识码:** A

蛋白质几乎可以自发地吸附在任何表面上,材料表面的物理和化学性质对蛋白质的吸附具有很大的影响。对蛋白质吸附的研究是研制生物传感器、生物芯片和生物材料的基础。血清蛋白不仅是血浆中含量最多的蛋白,也是一种研究最广泛的蛋白。人血清蛋白和牛血清蛋白常被用作阻碍剂来防止细菌、血小板、细胞的黏附和血栓的形成。牛血清蛋白(BSA)被认为是  $14\text{nm} \times 4\text{nm}$  的椭圆型蛋白(图 1)<sup>[1]</sup>,随后的实验也支持了这一观点<sup>[2,3]</sup>。

原子力显微镜可以观测物体表面的形貌,其分辨率可达到观察蛋白质单个分子的水平。采用原子力显微术曾研究了吸附在烷硫醇自组装单分子层和十八烷基三氯硅烷(OTS)、2-全氟辛基乙基三氯硅烷(FOETS)等有机硅烷单分子层上牛血清蛋白的形貌<sup>[4-7]</sup>。硅表面的形貌也曾用原子力显微术进行过研究<sup>[8]</sup>。发现 BSA、溶菌酶和兔 IgG 在其等电点处,

均可吸附在烷硫醇自组装单分子层上;在 OTS 和 FOETS 有机硅烷单分子层上,BSA 是直立吸附于 OTS 而水平吸附于 FOETS;在 OTS 和 FOETS 混合单分子层上及  $\text{pH} > 7.5$  时,BSA 优先吸附于 FOETS,而在  $\text{pH}$  等于 BSA 的等电点时,BSA 是同时吸附于 OTS 和 FOETS。牛血清蛋白在亲水硅片表面的形貌尚未有报道。

本文中,首先对硅片表面进行了亲水处理,然后采用原子力显微术研究了牛血清蛋白(BSA)在亲水硅片表面的吸附。

## 1 实验部分

将硅片在含有  $\text{H}_2\text{O}$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 20%  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH} = 5:1:1$ ) 的溶液中恒温  $80^\circ\text{C}$  浸泡 5min,再在含有  $\text{H}_2\text{O}$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 37%  $\text{HCl}$  ( $\text{H}_2\text{O}$

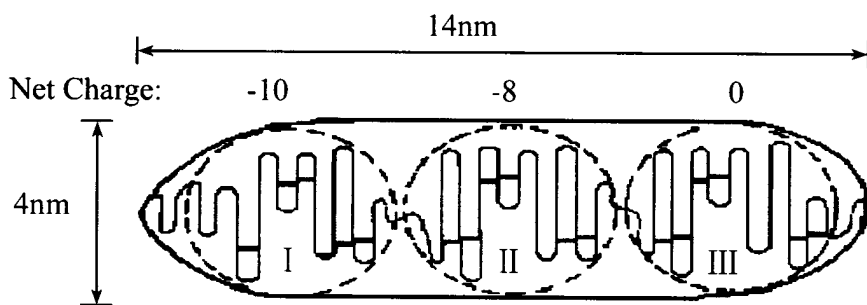


图1 牛血清蛋白 BSA 结构图(引自参考文献[1])。

Fig. 1 The graph of bovine serum albumin(BSA) structure(from reference 1).

收稿日期:2002-04-09;修订日期:2002-04-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 60178033),中国科学院知识创新工程重大项目(KJ CX1-60).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 60178033).

作者简介:于泳(1967-),男(汉族),山东济南人,博士后.

\* 通讯作者:靳刚(1957-),男(汉族),博士,研究员. E-mail: Gajin@imech.ac.cn

: $\text{H}_2\text{O}_2:\text{HCl} = 6:1:1$ ) 的溶液中恒温  $80^\circ\text{C}$  浸泡 5min 后,用水和乙醇冲洗,硅表面从 Si-O-Si 态变为 Si-OH 态,形成亲水表面。制好的亲水硅片在乙醇中保存<sup>[9]</sup>。将 BSA(购自 Sigma)用磷酸盐缓冲溶液(PBS  $0.1\text{mol/L}$ ,  $\text{pH} = 7.40$ )配成  $1\text{mg/mL}$ ,将硅片用氮气吹干,浸入 BSA 溶液 30min,取出后再用氮气吹干,用 AFM AutoProbe CP Research Scanning Probe Microscope (Park Scientific Instruments, CA)观察。采用 IC-AFM 模式及 Ultralevers 20 微悬臂 (Park Scientific Instruments, CA),实验结果是在  $25^\circ\text{C}$  室温,湿度  $50\% \sim 60\%$  下获得的。

## 2 结果与讨论

图 2a 为亲水硅片的 AFM 图,图 2b、2c 为亲水硅片吸附 BSA 1min 和 30min 后的 AFM 图。图 2a 中可清晰地看到硅表面的抛光痕迹,其起伏高度在  $0.5\text{nm}$  左右(最大起伏高度为  $0.52\text{nm}$ )。图 2b、2c 表明 BSA 呈颗粒状吸附在亲水硅片表面,且在 BSA ( $1\text{mg/mL}$ )吸附 1min 后的 AFM 图与吸附 30min 后的 AFM 图中,BSA 的覆盖度无太大差别。但在高分辨率的图 3 中,发现吸附 30min 后,BSA 的覆盖度达到饱和,而吸附 1min 的 BSA 覆盖度还未达到饱和。

按图 3 测量 BSA 的三维数据,得:BSA 吸附 1min 时的平均宽度为  $17.24 \pm 2.61\text{nm}$ ,平均高度为  $0.75 \pm 0.20\text{nm}$  ( $n = 23$ ,只选择了比较均匀的颗粒);BSA 吸附 30min 时的平均宽度为  $18.63 \pm 2.53\text{nm}$ ,平均高度为  $0.74 \pm 0.1792\text{nm}$  ( $n = 20$ ,也选择了比较均匀的颗粒)。这两组数据基本相同。

Taborelli<sup>[4]</sup>等曾测量过吸附在金基底修饰有烷硫醇自组装膜上的 BSA 尺度,烷硫醇末端连接有甲基或氨基。结果是吸附在末端为甲基的烷硫醇表面

上的 BSA 的三维数据是:平均宽度  $13.1 \pm 2.4\text{nm}$ ,平均高度  $3.4 \pm 1.2\text{nm}$  ( $1\mu\text{g/mL}$ , 吸附 1min)和平均宽度  $21.9 \pm 4.1\text{nm}$ ,平均高度  $4.0 \pm 1.3\text{nm}$  ( $1\mu\text{g/mL}$ , 吸附 3h)。而吸附在末端为氨基的烷硫醇表面上的 BSA 的三维数据是:平均宽度  $9.9 \pm 4.1\text{nm}$ ,平均高度  $1.6 \pm 0.6\text{nm}$  ( $1\mu\text{g/mL}$ , 吸附 3h)。认为吸附在末端为氨基的烷硫醇表面上的 BSA 呈单分子状态;吸附在末端为甲基的烷硫醇表面上的 BSA 在吸附时间少时为单分子状态,而在吸附时间长时为聚集态。吸附在固体表面的 BSA 结构与基体材料有关,故本文所得数据与文献中的略有差别。

由于原子力显微镜的探针针尖并非真正的原子级大小,而具有一定的直径宽度(约  $20\text{nm}$ ),因此在扫描过程中对蛋白质分子具有展宽效应,而且得到的高度也随密度而变。当硅片表面吸附的蛋白质分子密度越大,测量得到的高度就越小;BSA 在亲水硅片表面吸附的平均高度仅为  $0.75 \pm 0.20\text{nm}$  和  $0.74 \pm 0.18\text{nm}$ ,而测量附近有裸露基底的 BSA 分子的高度为  $1.51\text{nm}$ ,且 IC-AFM 成像模式对 BSA 的敲击也会使高度下降。AFM 图中最亮的区域即为 BSA 密度最大的区域,其高度并非 BSA 吸附膜层的厚度。附近有裸露基底的 BSA 分子的高度才是 BSA 吸附膜层的厚度。吸附在硅片表面的 BSA 平均宽度为  $17.24 \pm 2.61\text{nm}$  和  $18.63 \pm 2.53\text{nm}$ 。这说明 BSA 是水平的、单分子吸附在硅片表面, I、II、III 三个区域均与硅片表面接触。

蛋白质与固体表面的非共价相互作用力有静电力、疏水力和氢键三种。硅表面的  $\text{SiO}_2$  氧化层经亲水处理后变为 Si-OH,在  $\text{pH} = 7.40$  的 PBS 溶液中为中性略带负电。而 BSA 在结构上可分为 I、II、III 三个区域(见图 1),在  $\text{pH} = 7.40$  时 I、II 区均带负

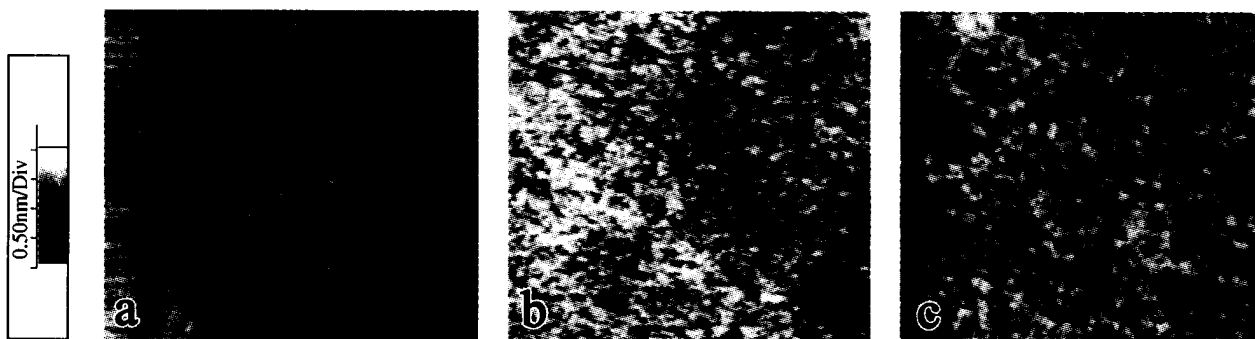


图 2 硅片表面和吸附 BSA 后的 AFM 图像 a:亲水硅片表面;b,c:吸附有 BSA 的亲水硅片表面,b:吸附时间为 1min,c:吸附时间为 30min,扫描范围为  $1\mu\text{m}$ ,图像灰度从黑到白为  $2\text{nm}$ 。

Fig.2 AFM images of hydrophilic silicon surface adsorbed with BSA. a:substrate; b,c: BSA; b:The incubation time in all adsorption was 1 min,c:The incubation time in all adsorption was 30 min; Scanning rang  $1\mu\text{m}$ ;  $2\text{nm}$ , black to white.

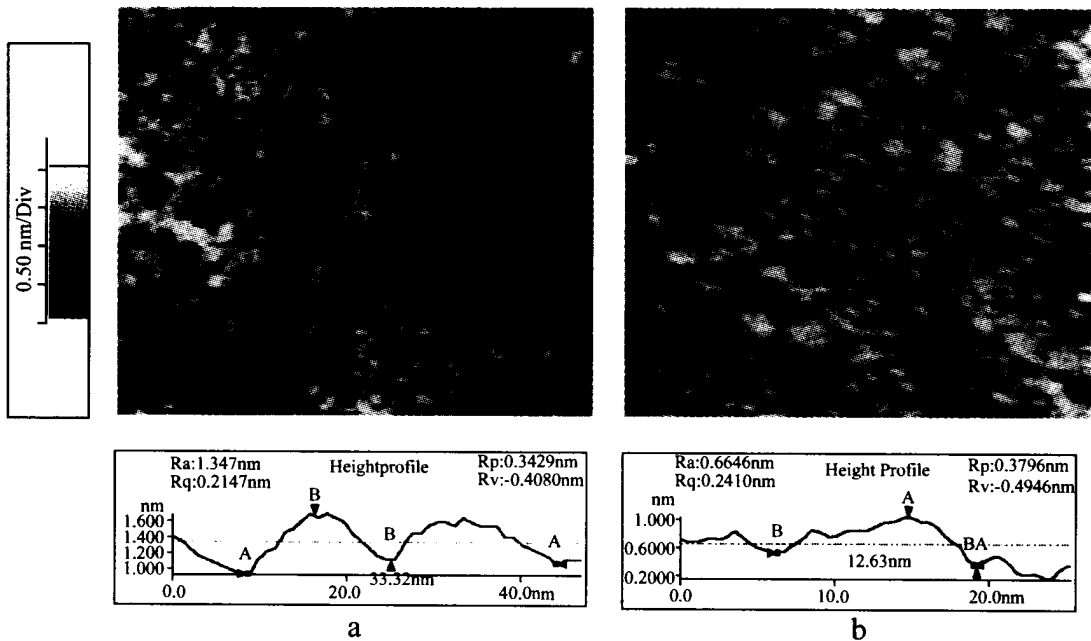


图 3 硅片表面吸附 BSA 的 AFM 图像。a: 吸附时间为 1min, b: 吸附时间为 30min, 扫描范围为 500nm, 图像灰度从黑到白为 2nm。

Fig.3 AFM images of silicon surface adsorbed with BSA. a: The incubation time in all adsorption was 1 min, b: The incubation time in all adsorption was 30 min; Scanning range 500nm; 2nm, black to white.

电荷, III 区为中性略带负电<sup>[4]</sup>。BSA 水平吸附在硅片表面, I、II、III 三个区域均与硅片表面接触。BSA 与硅表面的静电相互作用应为斥力, 且硅表面经亲水处理后, BSA 与硅表面不存在疏水力, BSA 与硅表面非共价相互作用力只有静电力和氢键。BSA 到达硅表面后, 蛋白中可移动的带正电荷的基团可以趋向亲水表面<sup>[10]</sup>, 使 BSA 与硅表面的静电相互作用由斥力变为吸引力。BSA 可以稳定地吸附在亲水硅表面。

### 3 结论

BSA 在亲水硅片表面是单分子、水平吸附在亲水硅片表面, 呈颗粒状; 1mg/ml 的 BSA 在吸附 30min 后为饱和吸附。BSA 到达硅表面后, 蛋白中可移动的带正电荷的基团可趋向亲水表面, 使 BSA 与硅表面的静电相互作用由斥力变为吸引力。BSA 可以稳定地吸附在亲水硅表面。

#### 参考文献:

- [1] Jr Peters T. Serum albumin[J]. Adv Protein Chem, 1985, 37: 161-245.
- [2] Bendedouch D, Chen S H. Structure and interparticle interactions of bovine serum albumin in solution studied by small-angle neutron scattering[J]. J Phys Chem, 1983, 87: 11473-11477.
- [3] Feng Li, Hu C Z, Andrade J D. Scanning tunneling microscopic images of adsorbed serum albumin on highly oriented pyrolytic graphite[J]. J Colloid Interface Sci, 1988, 126: 650-653.
- [4] Taborelli M, Eng L, Descouts P, Ranieri J P, Bellamkonda R, Aebischer P. Bovine serum albumin conformation on methyl and amine functionalized surfaces compared by scanning force microscopy[J]. J Biomed Mater Res, 1995, 29: 707-714.
- [5] Wadu-Mesthrige K, Amro N A, Liu G Y. Immobilization of proteins on self-assembled monolayers[J]. Scanning, 2000, 22(6): 380-388.
- [6] Ge S, Kojio K, Takahara A, Kajiyama T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 1998, 9(2): 131-150.
- [7] Takahara A, Ge S, Kojio K, Kajiyama T. In situ atomic force microscopic observation of albumin adsorption on phase-separated organosilane monolayer surface[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2000, 11(1): 111-120.
- [8] Alcantar N A, Aydil E S, Israelachvili J N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 55(3): 343-351.
- [9] Zhao Zi-Yan, Jin Gang, Wang Zhan-Hui. Detection of somatropin and corticosterone with imaging Ellipsometry[C].

Proceedings of the 20th annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society, Hong Kong, 1998, 20(2): 590-593.

[10] McGuire J, Krisdhasima V, Wahlgren M C, Arnebrant T. Comparative adsorption studies with synthetic structural

stability and charge mutants of bacteriophage T4 lysozyme [M]. In: Thomas A Horbett, John L Brash ed. Proteins at interface II: fundamentals and application. America: American Chemical Society, Washington DC, 1995. 52-65.

## Study of the adsorption of bovine serum albumin on hydrophilic silicon surface by atomic force microscope

YU Yong, YING Pei-qing, JIN Gang\*

(Laboratory of National Microgravity, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Atomic force microscope was used to study the adsorption of bovine serum albumin on hydrophilic silicon surface. The samples were imaged with an AutoProbe CP Research Scanning Probe Microscope (Park Scientific Instruments) with IC-AFM mode. These AFM images showed that bovine serum albumin adsorbed flatly in grain shape and mono-molecules. The adsorption of bovine serum albumin reached its saturation after 30min (1mg/ml). When bovine serum albumin arrived at surface, the molecules might rearrange to bring the most mobile regions of positive charge close to the interface, so BSA could be adsorbed on the hydrophilic surface steadily.

**Keywords:** AFM; bovine serum albumin; protein adsorption

---

\* Corresponding author