

[Article]

doi: 10.3866/PKU.WHXB201707121

www.whxb.pku.edu.cn

基于氨基与表面乙烯砜基反应动力学调控配基表面密度

程昉^{1,2,*}, 李明洋^{1,2}, 何炜^{1,3}, 王汉奇^{1,2}

¹ 大连理工大学精细化工国家重点实验室, 辽宁 大连 116023

² 大连理工大学制药科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

³ 大连理工大学化工学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 配基表面密度可控为定量研究生物分子相互作用提供了精准的分子基础。然而, 经典混合自组装的方法控制配基密度对于不同自组装体系不具有普适性。本文报道了一种基于表面乙烯砜基反应动力学的配基表面密度调控方法。以 *Nα,Nα*-二(羧甲基)-L-赖氨酸(ab-NTA)为生物配基模型, 对该表面反应进行了催化剂筛选并利用X射线光电子能谱(XPS)和表面膜电位对该表面反应进行了表征。采用静态水接触角的方法对表面反应的动力学进行了定量表征, 计算得到反应速率常数为 0.0012 min^{-1} 。采用表面等离子体共振(SPR)分析了该生物功能表面结合组氨酸标签蛋白(SA-6His)的能力, 结果表明该表面比传统NHS-NTA表面具有更高的蛋白结合量和结合强度。通过控制反应时间和催化剂种类制备了四种配基密度不同的生物功能表面, 并利用SPR对四种表面进行了蛋白质静态吸附实验。实验结果表明通过控制反应时间和催化剂类型均能够实现配基表面密度的调控, 并且可以实现表面多价态的调控。

关键词: 表面催化; 乙烯基砜; ab-NTA; 密度控制; SPR; 多价态

中图分类号: O643

Control of the Ligand Surface Density through Reaction Kinetics of Amino and Surface Vinyl Sulfone Groups

CHENG Fang^{1,2,*}, LI Mingyang^{1,2}, HE Wei^{1,3}, WANG Hanqi^{1,2}

¹ State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning Province, P. R. China.

² School of Pharmaceutical Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning Province, P. R. China.

³ School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning Province, P. R. China.

Abstract: Control over the ligand surface density provides an accurate molecular basis for the quantitative study of biomolecular interactions. However, the classic hybrid self-assembly method lacks general applicability toward different self-assembly systems. In this paper, we report a new method based on the reaction kinetics of vinyl sulfone groups presented on surface to control the surface ligand density. *Nα,Nα*-bis(carboxymethyl)-L-lysine (ab-NTA) was selected as the model biological ligand and the catalyst for surface reaction was screened. The surface reaction was characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and the surface membrane potential. Static water contact angle was used to quantify the kinetics of the surface reaction, and calculations showed that the rate constant was 0.0012 min^{-1} . The ability of the biological functional surface to bind a histidine labeling protein (SA-6His) was investigated by surface plasmon resonance (SPR). The results show that such a surface has a higher protein binding quantity and binding strength than the traditional NHS-NTA surface. Four biological functional surfaces with different ligand densities were prepared by

Received: June 5, 2017; Revised: June 27, 2017; Accepted: June 28, 2017; Published online: July 12, 2017.

*Corresponding author. Email: ffcheng@dlut.edu.cn; Tel: +86-411-84986336.

Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (DUT16RC(3)019) and Recruitment Program of Global Youth Experts, China.

中央高校基本科研业务费(DUT16RC(3)019)和青年千人计划资助项目

© Editorial office of *Acta Physico-Chimica Sinica*

controlling the reaction time and catalyst, and the protein static adsorption of these surfaces was analyzed by SPR. The results show that ligand density and multivalence of the biological functional surface can be controlled by modulating the reaction time and catalyst.

Key Words: Surface catalysis; Vinyl sulfone; ab-NTA; Density control; SPR; Multivalent

1 引言

自组装单分子膜用于表面修饰,能够在表面引入各种功能性分子,所以被广泛应用于生物传感器^{1,2}、酶固定化³、受体-配体相互作用⁴、蛋白纯化⁵、生物医学工程^{6,7}等研究工作中。在以上的研究工作中,通常需要对表面生物配基密度进行精准控制,例如在蛋白纯化配基密度优化工作中,需要制备不同配基密度的表面从而对最优配基密度进行筛选⁵;在功能性材料的研究中,也需要对配基表面密度进行优化从而降低非特异性吸附⁷⁻⁹。综上所述如何实现配基表面密度控制成为了一项具有重要意义的研究工作。

目前应用最为广泛的表面密度控制方法是混合自组装,通过调控功能分子与非功能分子的浓度比对表面密度进行调控¹⁰⁻¹³。例如,Bohmler等¹⁴利用混合自组装的方法得到了一系列密度梯度的Br/CH₃和NH₂/CH₃表面并进行了细菌粘附实验。Tomohiro等¹⁵利用混合自组装的方法分别在表面修饰了含有1-3个6-磺基-N-乙酰基-葡萄糖胺基团的分子并进行了多价态相互作用的研究。Liu等¹⁶通过优化混合自组装比例对固定于表面的蛋白质活性进行优化。本组之前工作¹⁷利用混合自组装对表面糖基功能分子密度进行调控,研究了葡萄糖与Con A蛋白的相互作用。然而,混合自组装的方法在应用中具有局限性,当进行混合自组装的两种分子极性相差较大时会产生相分离从而影响自组装效果,并且对于不同的自组装体系不具有普适性。

近年的研究表明利用反应进程控制的方法能够很好地控制表面密度^{18,19}。反应进程控制法结合表面反应动力学,通过控制配体与表面基团的反应进程实现密度控制。Zhang等¹⁹利用Azide-alkyne点击化学反应实现了表面叠氮基团的密度控制。与混合自组装的方法相比,操作上更为简便,可以根据配基的不同调整反应类型,并且对于不同的体系具有普适性。

本组之前工作合成了一种VS(Vinyl Sulfone, 乙烯磺基)末端的二硫化合物,利用该化合物构建了VS自组装表面,并对表面VS基团与巯基、氨基以及羟基在不同pH条件下的反应动力学进行

了研究²⁰。该工作为通过表面反应实现表面密度控制打下了基础。我们利用自组装的方法在表面引入VS基团,以ab-NTA为生物配基模型,通过表面催化反应实现NTA密度控制。首先我们利用接触角的方法对催化VS与氨基反应的催化剂进行了筛选,并对反应动力学进行了表征。利用反应动力学结果,得到不同配基密度的表面。最后我们利用SPR的方法对不同NTA密度表面与组氨酸标签蛋白的吸附/解离动态过程进行了研究。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

Na,Na-二(羧甲基)-L-赖氨酸(ab-NTA, 97%)购买于Sigma-Aldrich; 吡啶二甲酸(97.5%), 1-甲基咪唑(99%)购买于J&K(北京); 三苯基膦(分析纯)购买于天津市科密欧化学试剂有限公司; HS-C10-COONHS(90%)购买于ProChimia Surfaces; 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 99%), 氯化镍(分析纯), 磷酸二氢钠(分析纯), 乙二醇四乙酸(EDTA, 分析纯)购买于阿拉丁生化科技有限公司(上海); 咪唑(99%)、链霉亲和素(SA-6His)购买于索莱宝科技有限公司(北京)。其余有机溶剂均为分析纯,购买于阿拉丁生物科技有限公司。

水接触角测量使用的是接触角测量仪JC2000D1(中国,上海); 表面膜电位表征使用的是NanoBrook Omni(Brookhaven Instruments, 美国); 表面光电子能谱(XPS)表征使用的是PHI Quantera II Scanning XPS Microprobe(清华大学摩擦学国家重点实验室提供); SPR实验均使用的是一台具有发光二极管光源($\lambda = 670$ nm), 高折射率棱镜($n = 1.61$)和双通道流通单元的Biosuplar-400T SPR光谱仪(Analytical μ -Systems, 德国); 紫外分光光度计使用的是BioSpectrometer(Eppendorf, 德国)。

2.2 自组装表面制备

2.2.1 金衬底制备

硅片在食人鱼溶液(97%浓硫酸和30%过氧化氢比例3:1(V:V))。注意:食人鱼溶液对有机物有强烈腐蚀性。)中洗涤30 min后使用大量水和乙醇进行冲洗并用氮气吹干。利用Turbo Sputter

Coater K575XD (Kent, U.K.)将钛(5 nm)和金(45 nm)依次蒸镀到干净的硅片上。

2.2.2 基于 VS 的 ab-NTA 自组装表面制备

金衬底利用紫外臭氧仪清洗 30 min 并用乙醇冲洗。随后,配置 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1,2-二(11-(乙烯砷基)十一烷基)二硫烷溶液(二氯甲烷/乙醇 1 : 1 ($V : V$)), 其合成方法之前已有报道²⁰。将清洗干净的衬底浸入溶液中 25°C 放置 12 h 之后用乙醇冲洗, 氮气吹干。

将 VS 自组装样品浸入 ab-NTA 溶液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab-NTA、催化剂和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙胺溶于 DMSO)中进行反应。之后将样品浸入 $\text{EG}_3\text{-NH}_2$ 水溶液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.5)中反应 12 h 进行封闭。最后,用水和乙醇将自组装样品冲洗干净, 氮气吹干, 4°C 避光保存。

2.2.3 基于 NHS 的 NTA 自组装表面制备

将清洗干净的衬底浸入 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HS-C10-COONHS 乙醇溶液中 25°C 放置 12 h, 之后用乙醇冲洗, 氮气吹干。NHS 自组装样品浸入 ab-NTA 溶液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.5 磷酸盐缓冲液(PBS))中反应 12 h。最后自组装样品用水冲洗干净, 氮气吹干, 4°C 避光保存。

2.3 SPR 光谱学

为了测量 SA-6His 蛋白的特异性吸附量, 实验步骤如下: 首先通入 10 min $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NiCl_2 溶液进行螯合, 其次通入 10 min PBS 缓冲液($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)进行洗涤, 接下来通入 30 min 的蛋白溶液, 随后通入 10 min 含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑的 PBS 溶液进行洗脱, 再 10 min PBS 进行洗涤, 之后通入 5 min 含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 PBS 溶液对表面进行再生, 最后同入 10 min PBS 溶液对表面进行洗涤。在测量 BSA 非特异性吸附时, 洗脱溶液更换为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液。

2.4 吸附平衡和热力学

含有不同蛋白质浓度($0.001\text{--}0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的缓冲液通过传感器表面 30 min。达到吸附平衡后表面进行再生, 利用紫外分光光度计检测 280 nm 处吸光度确定蛋白质浓度。等温吸附曲线利用 Langmuir 方程进行拟合:

$$R_{\text{eq}} = \frac{R_{\text{max}} C_{\text{eq}}}{K_d + C_{\text{eq}}}$$

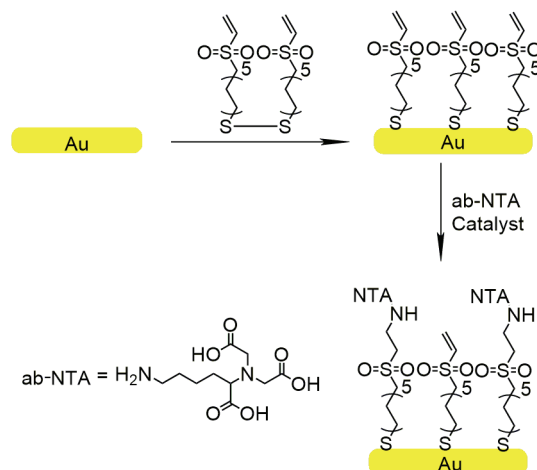
其中 R_{eq} 和 C_{eq} 分别表示平衡吸附时的 SPR 响应值和平衡蛋白浓度。 R_{max} 表示最大结合量, K_d 表示解离常数。

3 结果与讨论

3.1 催化剂和催化条件筛选

以 ab-NTA 为生物活性配基, 我们对表面 VS 基团与 ab-NTA 反应进行了催化剂筛选。由于氨基与乙烯砷基的反应属于氮参与的迈克尔加成反应²¹, 本文选择了五种常用迈克尔加成反应催化剂²²(如图 1 所示), 并采用静态水接触角对其催化性能进行了表征。VS 表面疏水性较强, 随着反应的进行表面逐渐被 ab-NTA 的羧基覆盖, 疏水性逐渐降低, 表面静态水接触角逐渐降低。

不同催化剂催化 2 和 6 h 后的 VS 表面静态水接触角变化值如图 2 所示。由结果可以看出, 除三乙胺之外的其余四种催化剂均具有催化该反应的能力, 其中吡啶二甲酸的催化效率最高, 反应 6 h 后接触角降低 17.0° , 添加三乙胺基本没有反应, 表明在反应体系中添加的三乙胺不会对催化结果产生影响。随后对吡啶二甲酸的用量进行了优化, 在 0.1%–20% 范围内选择了 5 个浓度进行了试验, 催化 2 h 后检测接触角变化值, 结果如图 2b 所示,



Scheme 1 表面修饰示意图

Scheme 1 Schematic showing surface modification.

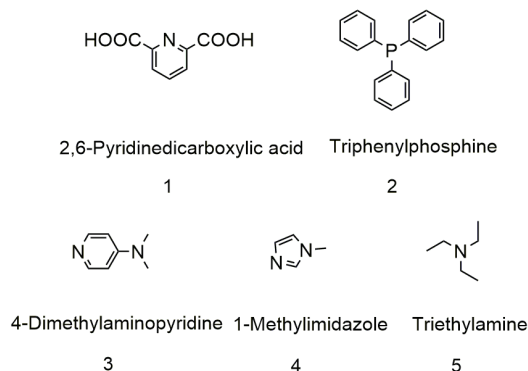


图 1 催化剂化学结构

Fig.1 Chemical structures of catalysts.

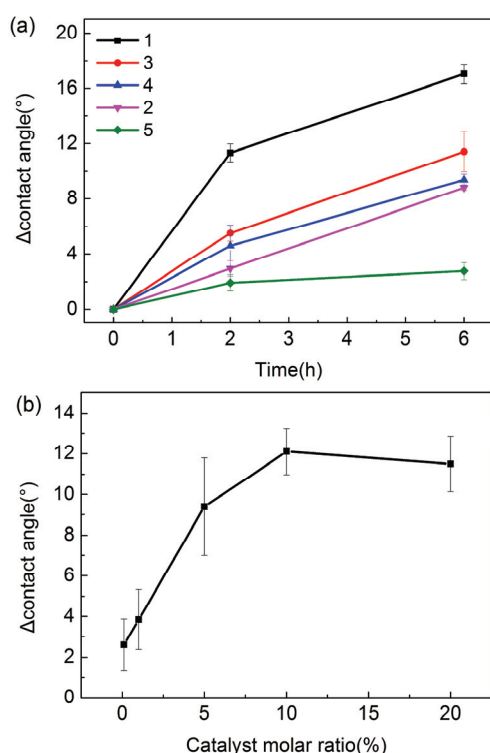


图2 (a)不同催化剂条件下接触角变化曲线;
(b)不同吡啶二甲酸浓度下接触角变化曲线

Fig.2 Contact-angle titrations for (a) different catalysts and (b) different 2,6-pyridinedicarboxylic acid concentrations.

结果显示催化剂用量在 10%之前催化效率随催化剂用量增加而逐渐升高,当催化剂用量大于 10%时,催化效率基本保持不变。以上结果表明,通过改变催化剂种类和催化剂的量可以对反应进程进行调控。

3.2 表面反应动力学测定

利用静态水接触角的方法同样可以对吡啶二甲酸催化 ab-NTA 和表面 VS 基团反应的反应动力学进行测定。在此选择了 10%吡啶二甲酸作为催化剂的条件进行研究。通过测量不同反应时间的表面静态水接触角,再利用 Cassie 公式计算可以得到表面覆盖度²³:

$$\cos \theta_{\text{esp}} = \chi_{\text{VS}} \cos \theta_{\text{VS}} + \chi_{\text{carboxyl}} \cos \theta_{\text{carboxyl}}$$

其中 χ_{carboxyl} 和 χ_{VS} 分别表示羧基的表面覆盖度以及相对于羧基 VS 基团的表面覆盖度。

由接触角照片(如图 3a)可以明显看出反应前后表面接触角变化。图 3b 为吡啶二甲酸作催化剂条件下金表面接触角的变化曲线,结果显示当表面为 VS 基团时疏水性较强接触角为 $66.1^\circ \pm 0.6^\circ$,随着反应的进行,反应 24 h 后接触角降为 $42.9^\circ \pm 0.5^\circ$ 。经测量利用羧基疏醇自组装得到的羧基表面接触角为 $\theta_{\text{carboxyl}} = 37.2^\circ \pm 1^\circ$ 。由于每个 NTA 分子

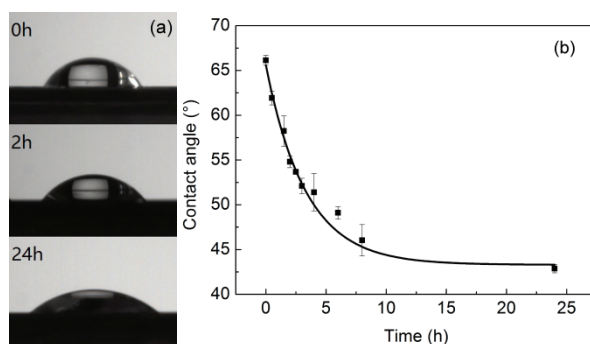


图3 吡啶二甲酸作催化剂条件下的(a)接触角照片和
(b)接触角变化趋势

Fig.3 (a) Representative photomicrographs of water droplets and (b) contact-angle titrations for 2,6-pyridinedicarboxylic acid as the catalyst.

含有三个羧基,通过换算可以得到不同反应时间 VS 基团的表面覆盖度。将 VS 基团的表面覆盖度取自然对数与时间作图得到图 4,可以看出 VS 表面覆盖度的自然对数与时间呈线性相关,这表明这一表面反应可以用一级反应动力学进行描述。反应的速率常数和半衰期可以表示为:

$$\ln \frac{\chi_{\text{VS}}}{\chi_{\text{VS}_0}} = -k_{\text{obs}}(t - t_0)$$

$$\ln \frac{1}{2} = -k_{\text{obs}} t_{1/2}$$

其中 χ_{VS} 和 χ_{VS_0} 分别表述 VS 测量的和最初的表面覆盖度, t 和 t_0 分别表示测量时间和最初时间, k_{obs} 为反应速率常数, $t_{1/2}$ 表示反应半衰期。

通过计算得到吡啶二甲酸催化表面 VS 基团与 ab-NTA 氨基的反应速率常数为 0.0012 min^{-1} ,半衰期为 569 min。从计算结果看出,该反应较为缓慢,易于通过调控反应时间对配基表面密度进行调控。

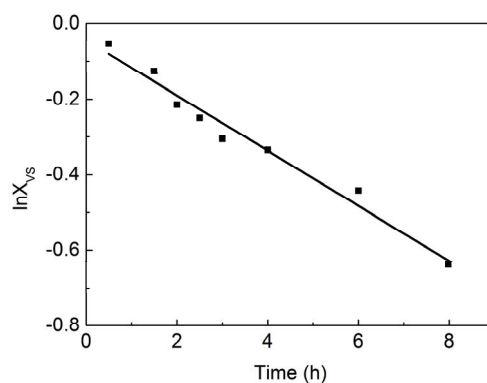


图4 VS(乙烯砜基)基团表面覆盖度的自然对数
Fig.4 Natural logarithm of VS (vinyl sulfone) coverage.

3.3 表面膜电位和 XPS 表征

为了对修饰前后表面进行表征, 分别利用表面膜电位和 XPS 的方法对 VS 表面和 ab-NTA 表面进行了检测。表面膜电位方法通过对表面电位变化进行检测, 可以反映出表面基团的变化。

如图 5 所示为不同表面的表面膜电位, 裸金表面的面电位是 -28.33 mV, 这是由于金表面含有大量自由电子造成的。当表面修饰上乙烯基砷二硫化化合物后变为 -5.45 mV, 吡啶二甲酸催化表面 VS 与 ab-NTA 反应 12 h 后, 由于表面羧基增多, 表面电位降为 -15.33 mV。表面膜电位的变化表明了 VS 二硫化化合物的自组装和 ab-NTA 与 VS 基团的反应均成功进行。为进一步对表面结构进行表征, 我们对 VS 表面和 ab-NTA 表面进行了 XPS 表征。结果如图 6 所示为 XPS 谱图, 从 S $2p$ 谱呈

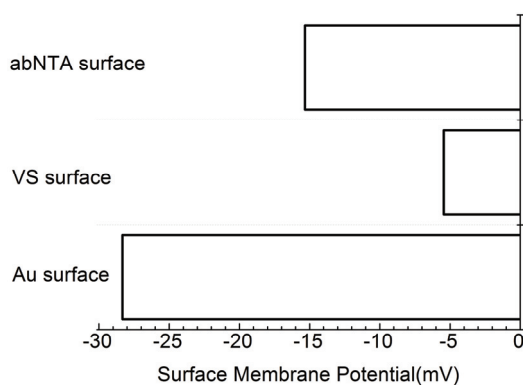


图 5 表面膜电位

Fig.5 Surface membrane potential.

现出两个峰, 分别裂分为峰面积 1 : 2 的双峰, 其中 163 eV 周围的峰归属为 S-Au 峰, 169 eV 周围的峰归属为砷基峰, 这表明 VS 二硫化化合物成功组装到了金表面。VS 表面的 C $1s$ 谱在进行拟合后可以分为两部分: 285 eV 处的峰归属为亚甲基链的峰, 另一处 285.6 eV 处的峰归属为与砷基相连的碳原子的峰。与 VS 表面相比 ab-NTA 表面的 C $1s$ 谱在 287 eV 和 288.5 eV 处出现两个峰, 分别可以归属为与亚胺相连的碳原子的峰和羧基上碳原子的峰。由两种表面的 N $1s$ 谱可以看出, VS 表面没有检测到 N 元素, ab-NTA 表面在 400.4 eV 处有 N 元素的峰, 可以归属为亚胺的峰。结果表明 ab-NTA 与表面 VS 基团成功发生了反应。

3.4 ab-NTA 表面生物功能表征

NTA 基团在与镍离子螯合之后可以与组氨酸上的咪唑残基发生配位, 从而可以特异性结合组氨酸标签的蛋白²⁴。因此通过 SPR 对 NTA 表面的蛋白质结合动力学和热力学进行研究, 可以对表面 NTA 密度进行表征。本文选用的蛋白是 SA-6His。以 NHS 活化羧基的方法^{25,26}作为对照。

基于 VS 和 NHS 的 ab-NTA 表面均反应 12 h 以保证充分反应。如图 7 所示为基于 VS 的 ab-NTA 表面在通入不同浓度蛋白时的 SPR 曲线。从图中可以看出随着蛋白浓度的升高, 其结合量呈现明显的梯度增高。在通过咪唑洗脱和 PBS 洗涤之后能够回到基线, 表面基本没有蛋白质残留, 这表明 SA-6His 蛋白与表面的结合为特异性结合。在通过 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白时可以看到蛋白结合量首

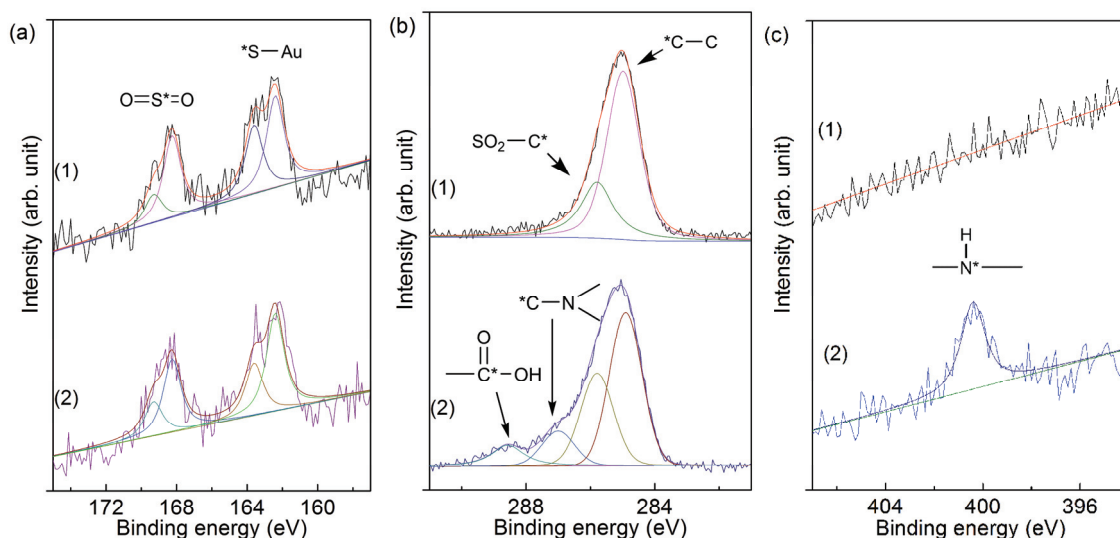


图 6 (1) VS 表面和(2) ab-NTA 表面的 XPS 表征结果

Fig.6 XPS spectra of (1) VS surface and (2) ab-NTA surface.

(a) S $2p$; (b) C $1s$; (c) N $1s$.

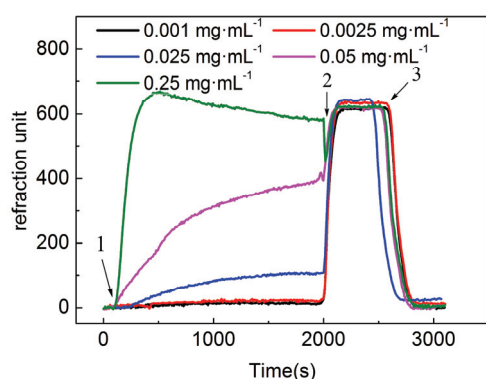


图7 蛋白质与 VS-ab-NTA 表面的 SPR 结合曲线
Fig.7 SPR sensorgrams of protein interactions with the VS-ab-NTA surface.

1 was protein solution; 2 was $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole solution;
3 was PBS.

先迅速增高, 随后出现缓慢降低的现象。我们推测, 在通入高浓度蛋白时, 蛋白与表面 NTA 首先形成了单价态结合, 随着蛋白溶液的持续通过, 蛋白与 NTA 逐渐转变为更稳定的多价态结合, 结合量随之有所降低。如图 8 所示, 选择通蛋白 30 min 时的响应值作为该浓度下的结合量, 利用 Langmuir 方程对数据进行拟合, 得到了 NTA 表面

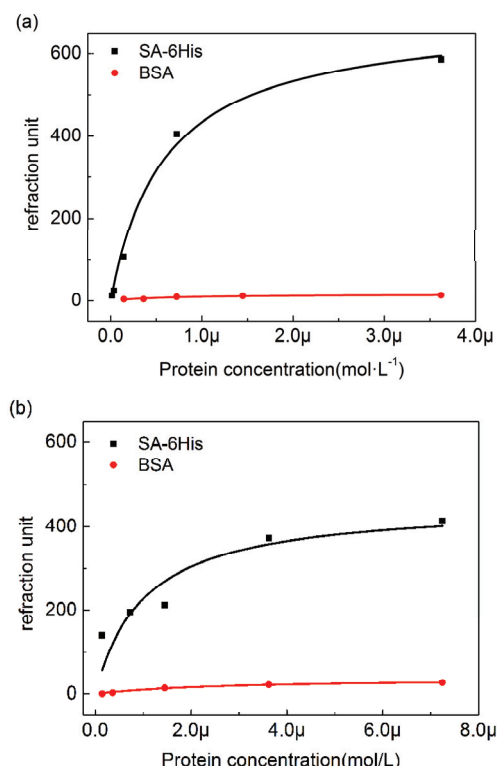


图8 基于 VS (a)和 NHS (b)的 ab-NTA 表面的等温吸附曲线

Fig.8 Isothermal adsorption curve of ab-NTA surface base on VS (a) and NHS (b).

对 SA-6His 和 BSA 的等温吸附曲线(图 8), 并与 NHS 方法进行对比。通过计算可以得到了两种表面的 K_d 和 $R_{\max}$ (表 1)。

对于 SA-6His 蛋白的等温吸附, 基于 VS 的 NTA 表面 K_d 为 $0.60 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 基于 NHS 的 NTA 表面 K_d 为 $1.01 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 由此可以看出基于 VS 的 NTA 表面对于 SA-6His 蛋白的结合强度更高。从最大结合量来看, 基于 VS 的 NTA 表面的最大结合量为 693, 基于 NHS 的 NTA 表面的是 457。

以上结果表明, 基于 VS 的 NTA 表面修饰方法较基于 NHS 的 NTA 表面修饰方法能够提供更高的结合强度和结合量, 说明相对于 NHS 的方法基于 VS 的表面修饰方法可以提供更高的配基密度。由图 8 也可以看出两种表面对 BSA 的非特异性吸附均很低, 表明基于 VS 的方法同样具有较好的抗非特异性吸附能力。

由于 NHS 酯在碱性水溶液中易水解, 导致反应过程伴随着水解使得基于 NHS 方法的配基表面密度难以提高。而基于 VS 的反应符合一级反应动力学, 最终可以达到较高的反应效率, 所以能够提高供更高的配基表面密度。与 NHS 方法相比, 基于 VS 的方法反应效率更高, 配基表面密度更高, 并且具有很好抗非特异性吸附能力。

3.5 NTA 配基密度控制

结合上文催化剂筛选以及反应动力学结果, 分别利用吡啶二甲酸催化 0.5、2、12 h 以及利用三苯基膦催化 12 h 得到四种不同 ab-NTA 密度的 SPR 芯片。利用 SPR 对四种芯片分别进行了 SA-6His 蛋白的静态吸附实验。如图 9 (Cat.1)所示为吡啶二甲酸作为催化剂催化不同时间得到的三种不同配基密度的芯片的静态吸附曲线, 从图中可以看出种不同催化时间芯片的静态吸附曲线呈现明显的梯度。图 9 中 12 h (Cat.2)为三苯基膦作为催化剂催化 12 h 表面的静态吸附曲线, 与图 9 12 h (Cat.1)曲线对比可以看出, 两个静态吸附曲线具有明显梯度。上述结果再次证明通过控制反应时间和催化剂种类能够对配基表面密度进行调控。

利用上文反应动力学结果可以计算出四种芯片表面羧基的表面覆盖度分别为 14.5%、41.2%、

表1 基于 VS 和 NHS 的 ab-NTA 表面的 K_d 和 $R_{\max}$
Table 1 K_d and $R_{\max}$ of ab-NTA surface base on VS and NHS.

	$10^6 K_d / \text{mol}^{-1}$	$R_{\max} / (\text{refraction unit})$
VS surface	0.60	693
NHS surface	1.01	457

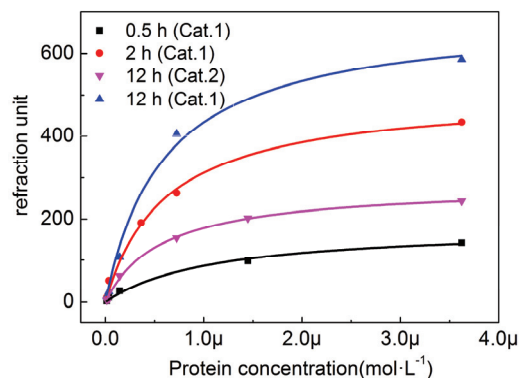


图 9 吡啶二甲酸催化不同时间和三苯基磷催化的表面的等温吸附曲线

Fig.9 Isothermal adsorption curve of the surface with different reaction time and catalyzed by 2,6-pyridinedicarboxylic acid and Triphenylphosphine.

80.6%和 34.5%。根据报道羧基硫醇自组装膜的密度为 $6.98 \text{ molecule nm}^{-2}$ ²⁷。通过估算可以得出四种表面的 ab-NTA 密度分别约为 0.34、0.96、1.88 和 $0.80 \text{ molecule} \cdot \text{nm}^{-2}$ 。利用 Langmuir 方程对数据进行拟合后可以到的表 2 所示结果，四种不同配基密度表面的蛋白最大结合量分别为 183、504、693 和 282，可以看出蛋白最大结合量与配基表面密度呈正相关，随着配基密度的增加，表面最大结合量增大。

表 2 结果显示四种不同配基密度表面对 SA-6His 蛋白的 K_d 值分别为 1.13×10^{-6} 、 0.62×10^{-6} 、 0.60×10^{-6} 和 $0.58 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-1}$ 。可以看出吡啶二甲酸催化 0.5 h 的表面配基与 SA-6His 蛋白的结合强度为 $1.13 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-1}$ ，明显低于另外三种表面。由表面 ab-NTA 密度可以估算得到四种表面的 NTA 分子平均间距分别约 1.7、1.0、0.7 和 1.1 nm。组氨酸标签与 NTA 的结合属于多价态结合²⁸，每两个咪唑基团可以与一个镍离子配位，六个组氨酸标签的长度约为 2.0 nm。对比以上数据可以看出，在低密度表面上每个组氨酸标签蛋白只能与 1–2 个 NTA 分子络合，此时蛋白与 NTA 之间多数形成单价态结合，所以结合强度较低。吡啶二甲酸催化 2、12 h 以及三苯基磷催化 12 h 的表面上每个蛋白则能够与 2–3 个 NTA 分子络合，可以形成多价态相互作用，结合强度明显提高。

上述实验结果通过控制表面 VS 基团与氨基的催化反应时间以及催化剂种类实现了配基表面密度调控，并建立了表面密度与性能之间的构效关系。该工作为表面密度控制提供了新的方法。

表 2 不同反应时间和催化剂催化的 ab-NTA 表面的 K_d 和 R_{max}

Table 2 K_d and R_{max} of ab-NTA surface with different reaction time and catalysts.			
Catalyst	Time/h	$10^6 K_d / \text{mol}^{-1}$	$R_{\text{max}} / (\text{refraction unit})$
1	0.5	1.13	183
1	2	0.62	504
1	12	0.60	693
2	12	0.58	282

1 was 2,6-pyridinedicarboxylic acid; 2 was triphenylphosphine.

对于生物传感器修饰、蛋白纯化配基密度优化、生物医学材料表面修饰等研究工作，利用本文的配基表面密度控制方法可以在表面模拟不同配基密度的材料表面环境，结合 SPR、QCM 等研究方法可以简便地不同配基密度表面的特异性/非特异性结合性能进行表征，提高了密度筛选的效率。

4 结论

本文利用静态水接触接触角的方法对一系列 N、P 中心的催化剂催化表面 VS 基团与氨基反应的催化性能进行了表征，结果显示吡啶二甲酸作为表面 VS 与氨基反应的催化剂具有最高的催化效率，DMAP、一甲基咪唑和三苯基磷也可以催化该反应。对吡啶二甲酸催化反应动力学的研究结果显示该反应符合一级反应动力学，其反应速率常数为 0.0012 min^{-1} ，半衰期为 569 min。本文以 ab-NTA 作为配基，分别利用传统的 NHS 活化和 VS 法对金表面进行了修饰，并利用 SPR 技术对表面蛋白静态吸附进行了研究，结果表明利用 VS 的方法能够提供更高的配基表面密度。根据反应动力学结果分别利用不同催化剂对 VS 表面进行不同时间的修饰，并结合 SPR 对不同反应时间的表面进行了蛋白质静态结合实验，结果表明通过控制反应时间和催化剂种类均可以实现配基表面密度控制。同时，在静态结合实验中观察到了单价态相互作用和多价态相互作用。反应 0.5 h 的表面由于配基密度低，配基分子间距大，造成蛋白质与配基的结合倾向于单价态结合，结合强度较高密度表面有明显的降低。

本文所发展的催化剂催化的表面乙烯砷基与氨基的反应能够高效地在表面引入含有氨基的分子，并能够通过控制反应时间和催化剂种类对表面反应进程进行控制，从而实现对配基表面密度的调控，为表面密度控制提供了新方法。与混合自组装方法相比本方法可控性强、应用广泛并且

具有一定普适性。

References

- (1) Yuan, P. X.; Deng, S. Y.; Yao, C. G.; Wan, Y.; Cosnier, S.; Shan, D. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *89*, 319. doi: 10.1016/j.bios.2016.07.031
- (2) Cabanas-Danes, J.; Rodrigues, E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12675. doi: 10.1021/ja505695w
- (3) Nakamura, I.; Horikawa, Y.; Makino, A.; Sugiyama, J.; Kimura, S. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 785. doi: 10.1021/bm101394j
- (4) Schartner, J.; Hoeck, N. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7467. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01823
- (5) Cheng, F.; Li, M. Y.; Wang, H. Q.; Lin, D. Q.; Qu, J. P. *Langmuir* **2015**, *31*, 3422. doi: 10.1021/la5044987
- (6) Rowley, J. A.; Mooney, D. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 217. doi: 10.1002/jbm.1287
- (7) Shoffstall, A. J.; Everhart, L. M. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2790. doi: 10.1021/bm400619v
- (8) Chen, X. W.; Pei, D. H. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 604. doi: 10.1021/cc9000168
- (9) Shao, Q.; Jiang, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 7630. doi: 10.1021/jp5027114
- (10) Tomohiro, H.; Kenji, W. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18795. doi: 10.1021/jp906494u
- (11) Subramanian, A.; Irudayaraj, J.; Ryan, T. *Sensor. Actuat. B: Chem.* **2006**, *114*, 192. doi: 10.1016/j.snb.2005.04.030
- (12) Ma, H.; Wells, M.; Beebe, T. P. Jr.; Chilkoti, A. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 640. doi: 10.1002/adfm.200500426
- (13) Bain, C. D.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6560.
- (14) Bohmler, J.; Ponche, A.; Anselme, K.; Ploux, L. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2013**, *5*, 10478. doi: 10.1021/am401976g
- (15) Tomohiro, F.; Yoshiko, M. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1079. doi: 10.1021/bc100053x
- (16) Liu, Y. T.; Yan, L.; Sun, L. M.; Li, H. Q.; Li, H. H. *Chem. Eng. (China)* **2014**, *42*, 69. [刘玉婷, 颜莉, 孙立民, 李慧琴, 李海华. 化学工程, **2014**, *42*, 69.] doi: 10.3969/j.issn.1005-9954.2014.03.014
- (17) Cheng, F.; Wang, H. Q.; Xu, K.; He, W. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2017**, *33*, 426. [程昉, 王汉奇, 许旷, 何炜. 物理化学学报, **2017**, *33*, 426.] doi: 0.3866/PKU.WHXB201609291
- (18) Eugene W. L.; Chan, M. N. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15542. doi: 10.1021/ja0658281
- (19) Zhang, S.; Maidenberger, Y.; Luo, K.; Koberstein, J. T. *Langmuir* **2014**, *30*, 6071. doi: 10.1021/la501233w
- (20) Wang, H. Q.; Cheng, F.; Li, M. Y.; Peng, W.; Qu, J. P. *Langmuir* **2015**, *31*, 3413. doi: 10.1021/la504087a
- (21) Esteves, A. P.; Silva, M. E.; Rodrigues, L.M.; Oliveira-Campos, A. M. F.; Hrdina, R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 9040. doi: 10.1016/j.tetlet.2007.10.077
- (22) Wang, C.; Qi, C. Z. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5348. doi: 10.1016/j.tet.2013.04.123
- (23) Cassie, A. B. D.; Baxter, S. *Trans. Faraday Soc.* **1944**, *40*, 546.
- (24) Kim, E. J.; Chung, B. H.; Lee, H. J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10091. doi: 10.1021/ac302584d
- (25) Maalouli, N.; Gouget-Laemmel, A. C. *Langmuir* **2011**, *27*, 5498. doi: 10.1021/la2005437
- (26) Pei, J.; Tang, Y.; Xu, N.; Lu, W.; Xiao, S. J.; Liu, J. N. *Sci. China Chem.* **2010**, *54*, 526. doi: 10.1007/s11426-010-4128-3
- (27) Shin-ichiro, I.; Takashi, K. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *428*, 33. doi: 10.1016/S0022-0728(97)00006-5
- (28) Suman L.; Jacob, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205. doi: 10.1021/ja050690c