

低温等离子体对生物材料表面改性固定生物分子的研究进展*

田继文¹ 陈敏¹ 李长敏¹ 张庆瑜² 任春生²

(1 大连轻工业学院材料科学与工程系,大连 116034; 2 大连理工大学三束材料改性国家重点实验室及物理系,大连 116024)

摘要 概述了等离子体技术在固定生物分子领域的应用。介绍了低温等离子体技术,包括等离子体直接处理、聚合、刻蚀、以及对生物材料表面改性以固定生物分子的方法、原理、影响因素及其发展趋势。

关键词 低温等离子体 生物材料 表面改性 固定生物分子

Advances in Biomaterial Surface Modification for Biomolecules Immobilization Using Low-temperature Plasma

TIAN Jiwen¹ CHEN Min¹ LI Changmin¹ ZHANG Qingyu² REN Chunsheng²

(1 Department of Materials Science and Engineering, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034;

2 State Key Laboratory of Materials Modification by Laser, Ion and Electron Beams & Department of Physics, Dalian Univ. of Tech., Dalian 116024)

Abstract The application of plasma technology in biomolecules immobilization on the surface of biomaterial is summarized. The novel methods, such as plasma exposure, plasma polymerization, plasma etching, and their application, mechanism, influence parameters and current trends in biomaterial surface modification for biomolecules immobilization are introduced.

Key words Low-temperature plasma, biomaterial, surface modification, biomolecules immobilization

0 介绍

低温等离子体技术(Low-temperature Plasma)作为一种性能独特的材料处理技术,已形成一个崭新的研究及应用领域。基于低温等离子体表面改性特有的性质,如反应体系处于低温;反应仅涉及材料的浅表面(纳米级),无损伤;空间同质性强,可处理形状复杂材料,表面处理均匀性好,这一技术在电子、化工、生物医学材料的表面改性等方面得到了广泛应用与发展,其中,对生物材料表面改性以固定生物分子就是其重要应用之一。

在惰性的无机或有机材料表面固定生物分子对于生物医用材料来说有重要意义。固定细胞、蛋白质、酶甚至DNA片断的生物载体被广泛用于细胞培养基、医用支架、蛋白质芯片、生物传感器和基因芯片之中。固定生物分子的方法之一就是材料表面进行改性,于表面上产生官能团,实现表面官能化。低温等离子体技术在这方面显示出了良好的应用性能。

1 等离子体表面改性方法

等离子体材料表面改性方法有湿化学法和物理法。湿化学法常需要特殊的针对性试剂,而试剂中的成分可能残留在材料固相内,对体系造成影响(例如生物体系)。相比之下,物理法激发气相以进行表面反应几乎无此缺陷,且在应用上表现出高度的灵活性。以现在的应用可将物理法分为两类:表面处理以及薄膜沉积(例如等离子体聚合),低温等离子体技术在这2个方面已被成功应用。

1.1 等离子体表面处理

最早使用低温等离子体对材料表面进行处理、直接接枝官能团(氨基、羧基、羟基等)的研究始于20世纪50年代末,Ross-

mann首先利用氧等离子体处理在聚乙烯(PE)表面接枝含氧官能团。Hollahan等利用含氮等离子体在聚丙烯(PP)表面接枝含氮官能团。现在,人们已了解到等离子体的诸多应用特性,例如对于很多聚合物材料来说,控制相关参数,利用特定的气体可于材料表面产生特定的官能团。例如, O_2 、 H_2O 、 O_2/O_3 、 O_2/H_2O_2 、空气等气体可产生羟基等含氧官能团; N_2 、 N_2/H_2 、 NH_3 可产生氨基等含氮官能团等,这些特性也已被应用于很多领域。

等离子体表面处理所用的气体可分为反应性和非反应性气体。在等离子体官能化处理中常使用反应性气体(O_2 、 NH_3 、 N_2 和 H_2 等),它们能够在放电气氛中产生大量相应的活性粒子(电子、离子、原子、亚稳态粒子等)。这些粒子拥有足够的能量,表现出相当强的反应活性,可与聚合物或其他材料的表面键化合,发生反应,在材料表面引入所需官能团。而非反应性气体(Ar、He等)的粒子不能直接进入材料表面键中,单独使用时必须利用其高能离子轰击材料,使表面化学键断裂或者激发表面粒子,产生自由基,同时使表面受到一定程度的刻蚀。某些稀有气体混合使用时,稀有气体原子和其他气体原子中的大量再结合的电子保持在寿命较长的激发状态(亚稳态),能够激发电离其他电离能较小的气体分子,产生彭宁效应(Penning Effect)^[1],进而提高气氛中多种粒子的反应活性;非反应性气体还可以在聚合中作为聚合膜前驱气体的载气或与反应性气体混合使用,可以大大增加反应的可控性和成膜均匀度。目前,等离子体表面处理的研究可按处理材料分成有机和无机材料2个方面。

有研究者利用含氮、氢、氨气体的等离子体在聚合物上接枝氨基^[2,3],使用脉冲及连续波2种微波(MW)以及射频(RF)激发等离子体处理聚苯乙烯(PS)等聚合物表面。研究表明,在低

* 大连理工大学三束材料改性国家重点实验室资助项目

田继文:男,硕士研究生 E-mail:tianjw@126.com

压区(约 100Pa),微波激发比射频激发产生更低的平均电子能量及更高的电子浓度,相应获得较高效的离解作用,对载体表面损伤也较少。虽然难以产生如射频激发所能获得的大面积的射频等离子体,但在应用中仍有较大的优势。汤建新等^[1]以 N₂ 和 H₂ 混合辉光放电等离子体对聚丙烯微孔膜进行处理,检测证实,在其表面接枝了大量活性氨基,可直接作为基因芯片载体进行 DNA 的原位合成,效果要比目前使用传统方法实现氨基修饰的玻璃片基更为理想。

A. J. Martinez^[5]使用 O₂ 和肼(N₂H₄)射频等离子体处理纤维素载体固定酶。对连续波和脉冲放电情况下活化纤维素进行了尝试,最后成功固定胰凝乳蛋白酶,并探讨了等离子体处理参数对酶活性的影响。

M. E. Avramescu 等还对比了多种湿化学法与低温等离子体活化 EVAL 共聚物微滤膜以固定牛血清蛋白(BSA)的效果^[6]。通过使用戊二醛、环氧乙烷、烷基磺酰氯和三氯均三氮苯等化学试剂,以及 CO₂ 等离子体对聚合物基体进行处理,发现等离子体处理对蛋白的固定效果大大优于其他湿化学法。

对有机材料进行表面处理时还可将常用的传统化学方法与等离子体处理结合使用。有研究者将湿化学法引入等离子体官能化羟基的研究之中^[7],使用乙硼烷和 LiAlH₄(或四氢呋喃),利用还原原理将 O₂ 等离子体处理过的聚丙烯或聚乙烯上大量出现的含氧基团还原成羟基基团,并达到了较高的产率。

目前对无机材料方面研究较少,但等离子体处理对于进行无机材料表面活化有很大的应用价值。苏葆辉^[8]利用 N₂ 与 NH₃ 混合气氛对聚羟基磷酸钙钠(HPPA)进行低温等离子体处理,结果表明,经等离子体改性后,氨基、羟基被引入材料表面,使其生物活性提高。另外,Ganapathy^[9]用二氯硅烷(DS)低温射频等离子体处理玻片和聚乙烯表面,表面接枝上 SiCl_x 基团,再进行原位衍生反应固定木瓜蛋白酶(Papain)。研究发现,载体性质以及连接酶与载体的间隔分子链的种类、长度对酶的固定效果有很大影响,并利用计算机辅助构象模型得出,载体与酶分子之间存在一个最佳距离,间隔分子链过短、过长都对酶的固定不利。

在研究中,低温等离子体表面处理接枝官能团被大量应用于改善材料的生物相容性、润湿性以及细胞、蛋白质等生物大分子的粘附性、DNA 片断的固定,如生物传感器、生物芯片、医用材料^[10]等领域。此外等离子体表面处理还可应用于改善分离膜的透过性能、纺织纤维的染色性、去污性、防缩性、半导体印刷基片的清洁、提高高分子膜的印刷性等。

1.2 等离子体聚合

等离子体聚合(Plasma Polymerization)是在有机单体气体或者其混合气氛中进行放电,使单体激发,在目标基体表面上生成聚合膜的方法。它容易使各种有机单体发生聚合,包括乙烯基单体、环状化合物,以及用常规法不能聚合的饱和烃、芳香族和有机金属化合物。等离子体聚合膜具有高度交联的网状结构,其性质介于无机高聚物和有机高聚物之间,拥有优越的物理化学性能。这就决定了它可以改善材料表面的粘附性能、结合性能^[11~13]。此外,低温等离子体聚合还被用于生物传感器、生物芯片的研究中,表现出良好的应用前景。

吴朝阳等^[14,15]利用等离子体聚合膜的特点在石英晶片上引入活性官能团(氨基等),应用石英晶振微量天平技术、射频等离子体技术于晶片上生成正丁胺聚合膜,再以磺化聚苯乙烯(PSS)进行自组装层处理,固定免疫球蛋白(IgG),制成可重复使用的蛋白免疫传感器。Jinmo Kim^[16]也利用聚合技术固定蛋白质分子,证实了等离子体聚合技术应用于玻璃片基或其他载

体上固定生物分子的可行性。研究者使用电感耦合等离子体(ICP)将乙二胺(EDA)聚合在玻璃片基上形成聚合膜,利用膜上高密度的伯胺基团固定免疫球蛋白,与其他含氨基玻片比较,此种方法处理的玻片固定的免疫球蛋白的连接性能高于其他玻片。同时指出,等离子体处理过程中,放电功率不宜过大,否则等离子体对载体表面的刻蚀作用将超过聚合作用,使氨基数量不升反降。低温等离子体聚合还应用在基因芯片的研究中。Miyachi^[17]在玻璃基片上聚合两层六甲基二硅氧烷(HMDSO)聚合膜,其间固定链白素分子,这样就可以利用生物素(Biotin)与链白素(Streptavidin)之间专一性亲和作用将生物素化的寡核苷酸分子与链白素分子连接起来,完成 DNA 片段在玻璃基片上的固定,构建出新型 DNA 阵列。研究表明,两层聚合膜的存在与厚度直接关系到 DNA 固定效果,影响最后 DNA 阵列的应用。而且等离子体聚合膜的憎水性质有利于减少 DNA 片段的非特异性键合,其效果大多好于由多聚赖氨酸等活化的载体。

等离子体表面处理及聚合联合使用可以取得独特的效果。D'Agostino^[18]在研究生物医用聚合物材料的微图形化中就将 2 种方法综合。他先用含氮等离子体对载体材料氨基化后,使用图形掩膜在表面聚合上抑制细胞生长的类聚乙烯氧化物微图形膜,则细胞按照所定图形生长在富含含氮基团的未聚合处,实现了细胞生长微图形化。

1.3 等离子体刻蚀

等离子体刻蚀在半导体工业中已取得了巨大成功,这种干式工艺不存在湿法刻蚀的污染、繁琐等缺点。虽然不能直接应用于生物材料表面改性,但仍然被间接用在该领域。例如,对材料表面进行微图形处理(Micro-patterning)以固定生物分子,进而构建三维生物芯片,制备细胞培养基^[19]等。

在具体应用中,选择性刻蚀成为重点。A. Ohl 等^[20]探讨了微波等离子体对聚合物进行处理制成细胞培养基的方法(等离子体辅助化学微图形)。利用低压微波激发等离子体(Ar+NH₃)对基体材料进行处理,使基体材料表面氨基数量增加、憎水性下降。然后以 Ar+H₂ 等离子体并使用图形掩膜对其进行图形刻蚀,使刻蚀部分呈现低活性、高憎水性,并在活性区域培养细胞,实现细胞培养图形化。还有研究者^[21]采用溶胶-凝胶法在基片表面制成氨基硅烷-有机钛酸脂膜层,再以氩气等离子体并利用图形掩膜选择性刻蚀有机层,获得具有大量氨基的微图形片基,可应用于生物分子传感器。

2 研究现状及影响因素

等离子体技术的理论研究始于 20 世纪 50 年代,但直到近年来才在多个领域中开始应用。其中,在生物医用材料改性方面的应用已引起广泛的关注,例如改善人造血管的血液相容性、隐形眼镜的表面润湿性、医用材料和器械的杀菌消毒等。然而,由于该技术的应用涉及到物理、化学、生物及材料等多个领域,使其汇聚成为一门交叉学科。因涉及面广、研究难度大,目前利用低温等离子体技术进行固定生物分子的研究大多也处于起步阶段。

等离子体于材料表面作用的机理非常复杂,所以其处理效果极易受到许多因素影响,诸如工艺参数、材料表面性质、生物分子的固定机理等。对于接枝氨基以固定生物分子来说,多项工艺参数,如处理气体(N₂、H₂、NH₃)的混合比例、等离子体的放电方式(MW/RF)、气体压力、处理时间、样品与等离子体间距离、以及对处理后的样品进行后处理(如氢等离子体处理)等,都对氨基接枝效果有明显的影

时可以直接接枝上特定的基团,但反应机理难于分析。在高度活性的状态下存在的副反应会引入其他官能团,直接导致官能团的接枝选择性下降;而使用非反应性气体要注意其刻蚀效果。另外,等离子体处理使用的气体无论是氮、氩之类的非反应性气体,还是氧之类的氧化性气体或是聚合气体,由于最终残留自由基的作用或出现新的表面层都会改变材料表面的润湿性能,这无疑会对最终结果产生影响。

对于表面改性效果的判断涉及官能化的选择性及效率、灵敏度等判断依据,这些都取决于官能团的密度。同时需要可靠的检测和基团的定量化分析,这已成为等离子体材料表面改性研究的关键问题。目前的表征手段还略显不足,也给此方面的研究造成了一定的障碍。

3 研究展望

利用低温等离子体对生物医用材料的表面改性可以直接、有效地改善材料表面的生物相容性、亲和性、润湿性以及生物分子的固定性能。随着这一交叉领域的研究不断深入,此技术必将在众多领域中有着广阔的应用前景。

参考文献

- 1 陈杰瑛. 低温等离子体化学及其应用. 北京:科学出版社, 2001. 6
- 2 Meyer-Plath A A, Schroder K, et al. Vacuum, 2003, 71: 391
- 3 Meyer-Plath A A, Finke B, et al. Surf Coat Techn, 2003, 174-175:877
- 4 汤建新,李松,等. 化学学报,2003,61(4):641
- 5 Martinez A J, Manolache S, et al. J Biomater Sci Polymer

- Edn,2000,11(4): 415
- 6 Avramescu M E, Sager W F C, Wessling M. J Membrane Sci, 2003, 216:177
- 7 Kuhn G, Weidner St, et al. Surf Coat Techn, 1999, 116-119:796
- 8 苏葆辉,冉均国,陈治清. 航天医学与医学工程,2003,16(1):689
- 9 Ganapathy R, Manolache S, et al. J Biomater Sci Polymer Edn, 2001, 12(9):1027
- 10 Ohl A, Schroder K. Surf Coat Techn, 1999, 116-119:820
- 11 Marks D J, Jones F R. Composites; Part A, 2002, 33:1293
- 12 Sciaratta V, Vohrer U, et al. Surf Coat Techn, 2003, 174-175:805
- 13 Cech V, Prikryl R, Balkova R, et al. Composites; Part A, 2002, 33:1367
- 14 Wu Zhaoyang, Yan Yonghong, et al. Analytica Chimica Acta, 2000, 412:29
- 15 吴朝阳,薛新奎,沈国励,等. 化学传感器,2001,21(2):24
- 16 Jinmo Kim, Heonyong Park, et al. Anal Biochem, 2003, 313:41
- 17 Miyachi H, Hiratsuka A, et al. Biotech Bioeng, 2000, 69(3):323
- 18 Favia P, Sardella E, et al. Surf Coat Techn, 2003, 169-170: 707
- 19 Ichiki T, Sugiyama Y, et al. Thin Solid films, 2003, 435: 62
- 20 Ohl A, Schroder K, et al. J Materials Sci, 1999, 10:747
- 21 Manso-Silvan M, Cecccone G, Rossi F. J Colloid Interface Sci, 2004, 275(2): 577

(责任编辑 何欣)

(上接第6页)

该模型可同时描述有序化和长程弹性交互作用对镍基合金沉淀动力学和微结构转变的影响,将形核、长大和粗化在统一物理框架内考虑,尤为重要是考虑了体积分数的影响以及沉淀相颗粒间的相互作用,与其他模型相比,具有明显的优点。

4 结语

共格沉淀处于微观高浓度梯度系统,可能出现经典或非经典形核长大、失稳分解等机制以及瞬时或过渡相,从沉淀形成初期至后期粗化,逐步由高度非平衡向接近平衡转化,而形核、长大和粗化过程又可能交叠,沉淀早期,界面厚度与体积尺度在同一数量级。

利用扩散界面场模型可以成功地对镍基合金的共格沉淀过程进行模拟研究。该模型无需预先设定新相结构和沉淀相的类型,将形核、长大和粗化在同一物理模型内加以考虑,与经典理论相比具有明显的优点。但上述模型也有其局限性,没有考虑实际合金中的种种缺陷,如空位、位错和晶界等,同时对弹性应变能的分析多局限于弹性均匀介质,忽略了基体和沉淀相的弹性不均匀性,与实际合金系统还存在一定的差距,因此上述模型有待于进一步完善。

参考文献

- 1 Wendt H, Hassen P. Acta Metal, 1993, 31(10):1649
- 2 Banerjee D, Banerjee R, Wang Y. Scr Mater, 1999, 41(9): 1023
- 3 Vaithyanathan V, Chen L Q. Acta Mater, 2002, 50: 4061

- 4 Soh J R, Lee H M. Acta Mater, 1997, 45(11): 4743
- 5 Ardell A J, Maheshwari A. Acta Metall Mater, 1995, 43(5): 1825
- 6 Wang Y, Chen L Q, Khachaturyan A G. Acta Metall Mater, 1993, 41(1):279
- 7 冯端,等. 金属物理学相变. 北京:科学出版社,1998. 111
- 8 冯端,等. 金属物理学相变. 北京:科学出版社,2000. 114
- 9 Cahn R W, Haasen P Kramer. 材料的相变. 北京:科学出版社,1998. 249
- 10 Wang Yunzhi, Chen Longqing, Khachaturyan A G. Scr Metall Mater, 1991, 25: 1387
- 11 Rundman K B, Hilliard J E. Acta Meter, 1967, 15:1025
- 12 Langer J S. Acta Metall Mater, 1973, 21:1649
- 13 Tsakalakos T. Scr Meter, 1981, 15:255
- 14 Wang Y, Kahchaturyan A G. Acta Metall Mater, 1995, 43(5): 1837
- 15 Khachaturyan A G. New York: Wiley, 1983. 129
- 16 Rubin G, Khachaturyan A G. Acta Mater, 1999, 47(7): 1995
- 17 Chen Longqing. Annu Rev Mater Res, 2002, 32:113
- 18 Chen L Q, Shen Jie. Comp Phys Comm, 1998, 108:147
- 19 Hu S Y, Chen L Q. Acta Mater, 2001, 49: 1897
- 20 Wang Y, Banerjee D, Su C C, et al. Acta Mater, 1998, 46(9): 2983
- 21 Wen Y H, Wang Y, Chen L Q. Acta Mater, 2002, 50:13
- 22 Wen Y H, Wang Y, Bendersky L A, et al. Acta Mater, 2000, 48:4125
- 23 Krill ■ C E, Chen L Q. Acta Mater, 2000, 50:3057
- 24 Lochte L, Titt A, Gottsten G, et al. Acta Mater, 2000, 48: 2969

(责任编辑 何欣)