

利用微悬臂梁表面应力研究聚 *N*-异丙基丙烯酰胺分子的构象转变*

李 凯¹⁾ 刘 红²⁾ 张青川^{1)†} 侯 毅²⁾ 张广照²⁾ 伍小平¹⁾

1) 中国科学技术大学中国科学院材料力学行为和设计重点实验室, 合肥 230027)

2) 中国科学技术大学化学物理系, 合肥 230026)

(2005 年 11 月 1 日收到 2006 年 3 月 20 日收到修改稿)

提出了一种基于微悬臂梁传感技术研究大分子折叠/构象转变的新方法. 通过分子自组装的方法将热敏性的聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM) 分子链修饰到微悬臂梁的单侧表面, 用光杠杆技术检测温度在 20—40 °C 之间变化时由于微悬臂梁上的 PNIPAM 分子在水中的构象转变所引起的微悬臂梁变形. 实验结果显示: 在升温过程中, 微悬臂梁的表面应力发生了变化并且导致微悬臂梁产生了弯曲变形, 这个过程对应着微悬臂梁上的 PNIPAM 分子从无规线团构象到塌缩小球构象的构象转变. 在降温过程中, 微悬臂梁发生了反方向的弯曲变形, 这对应着 PNIPAM 分子从塌缩小球构象向无规线团构象的构象转变. 整个温度变化过程中构象转变是连续进行的, 而在低临界溶解温度 (约 32 °C) 附近转变幅度较大. 这与自由水溶液中 PNIPAM 分子的无规线团-塌缩小球构象转变相对应. 实验结果还显示: 由于 PNIPAM 分子在塌缩过程中氢键的形成和链段间可能的缠结效应, 整个温度循环过程中微悬臂梁的变形是不可逆的且有明显的迟滞效应.

关键词: 构象转变, 聚 *N*-异丙基丙烯酰胺分子链, 表面应力, 微悬臂梁

PACC: 3620C, 8120S, 8265

1. 引 言

分子量大于 10^4 g/mol 的分子称为大分子, 包括各种人工合成高分子 (如聚乙烯) 和天然高分子 (如 DNA、蛋白质、淀粉等). 由于存在原子间键内旋转的自由度, 大分子可呈现出不同的构象. 当外部环境变化时这种构象会发生相应的转变^[1-4]. 1960 年 Stockmayer^[5] 首次从理论上预言: 对于线型均聚大分子 (由相同的单体聚合而成的长链状分子), 存在着无规线团-塌缩小球的构象转变 (图 1). 此后, 研究者们对无规线团-塌缩小球的构象转变进行了大量的实验和理论研究^[6-10]. 无规线团-塌缩小球的构象转变不仅是高分子物理学中的重要问题, 同时也是生命科学中的基本问题 (譬如蛋白质的折叠); 水是最重要的大分子存在介质, 因此, 研究大分子在水溶液中的构象转变具有更重要的意义. 聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM) 在水中的低临界溶解温度

(LCST) 约在 32 °C 附近, 当溶液温度低于 LCST 时, PNIPAM 分子溶于水, 呈现无规线团构象 (图 1(a)); 当温度高于 LCST 时, PNIPAM 分子不溶于水, 呈现塌缩小球构象 (图 1(b)). 这种无规线团-塌缩小球的构象转变过程在 LCST 附近较窄的温度区间 (1—2 °C) 内完成, 呈突变性. 1995 年 Wu 等^[11] 运用激光光散射方法研究 PNIPAM 分子在水溶液中的无规线团-塌缩小球构象转变, 首次从实验上观察到了热力学稳定的塌缩小球构象, 阐明了在自由溶液中线型均聚大分子无规线团-塌缩小球的构象转变过程中, 存在着 4 个不同的构象状态, 即: 无规线团、皱缩线团、熔化球和完全塌缩小球. 由于熔化球构象是蛋白质折叠过程中的一个物理状态, 它与活细胞中的许多生理过程相关^[12-15], 因此在 PNIPAM 分子 (图 2) 的无规线团-塌缩小球构象转变过程中, 观察到熔化球构象无疑对蛋白质折叠的机理提供了有力的支持. 此外, 由于 PNIPAM 分子的 LCST 与人的体温接近, 因此其很适于作为研究生物大分子构象转变以及蛋

* 国家重点基础研究发展规划 (批准号: 2006CB300404), 国家自然科学基金 (批准号: 10232030, 10472111, 10472112) 和教育部博士点基金 (批准号: 20040358027).

† E-mail: zhangqc@ustc.edu.cn

白质折叠的模型. 最近, Balamurugan 等^[16]运用表面等离子体共振 (SPR) 技术实时研究了修饰在 Au 表面的 PNIPAM 分子的构象转变过程. 研究表明, 与自由溶液中的转变不同, 修饰在固体表面的 PNIPAM 分子的构象转变是一个渐变的过程. Liu 等^[17]采用石英晶体微天平 (QCM) 技术对修饰在固体表面的 PNIPAM 分子的研究结果亦表明: PNIPAM 分子的构象转变过程是渐变的. 这些实验结果与理论预测相符合^[18]. 另一方面, 在大分子构象转变的过程中, 分子间相互作用力的变化起着重要的作用, 检测这种变化对于研究大分子构象转化的机理至关重要. 迄今为止, 尚没有很好的方法解决这个问题.

构象转变过程的检测提供了一种新的方法.

2. 实 验

图 3 为将 PNIPAM 分子修饰到微悬臂梁表面进行构象检测的实验原理图. 当 PNIPAM 分子构象发生变化时, 分子之间的相互作用力随之变化并导致微悬臂梁发生变形, 通过检测这种变形就可实现对 PNIPAM 分子构象转变过程的检测.

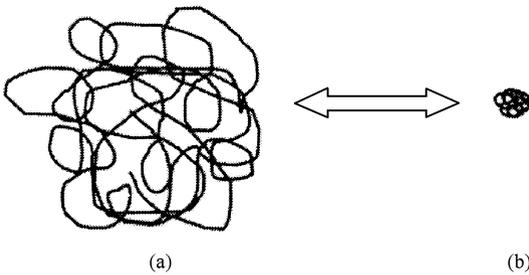


图 1 无规线团构象(a)和塌缩小球构象(b)

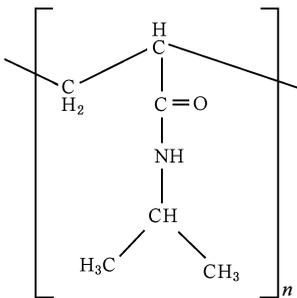


图 2 PNIPAM 分子结构

微悬臂梁传感是在原子力显微镜和微机电系统出现后迅速发展起来的一种新的传感方法, 其在生化传感中有着很好的应用前景^[19]. 研究发现, 当有生化反应在微悬臂梁的表面上发生时, 微悬臂梁的表面应力会发生改变并导致微悬臂梁产生弯曲变形. Berger 等^[20]用此方法研究了镀 Au 微悬臂梁表面硫醇分子的自组装生长过程. McKendry 等^[21]将它应用于 DNA 双链的配对杂交实验. 基于此以及本实验室在微悬臂梁传感技术方面的工作基础——微悬臂梁阵列红外成像^[22, 23], 本文提出将微悬臂梁传感技术应用于检测大分子的构象转变过程, 为大分子

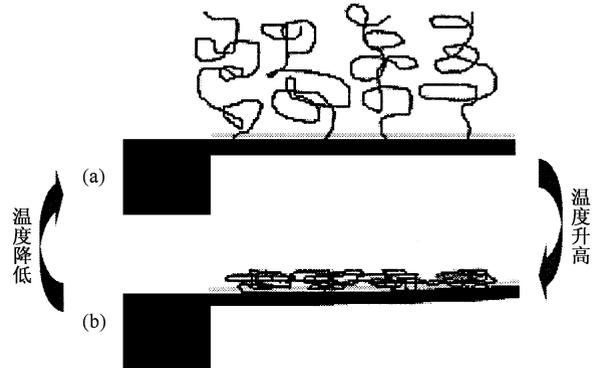


图 3 伸展状态的 PNIPAM 分子(a)和塌缩状态的 PNIPAM 分子(b)

实验系统如图 4 所示. $200 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ 的 SiN_x 微悬臂梁 (图 4 右侧为微悬臂梁放大图) 固定于玻璃盖封顶的不锈钢的小容器中 (容积约 1 ml). 半导体激光器发出的聚焦激光束经微悬臂梁自由端部反射后进入光电位置敏感器 (PSD) 的探测靶面. 当微悬臂梁发生弯曲变形时, 反射激光束随之发生偏转, PSD 感知此偏转信号后将其转化为相应的电信号输出, 由此即可实现对微悬臂梁变形的检测. 本实验系统中微悬臂梁自由端部的最小可分辨位移为 0.1 nm. 此外, 溶液进出容器由微流量蠕动泵控制, 容器底部的热电制冷器控制溶液温度, 温度稳定度为 0.01 K, 控温范围 18—42 °C.

将 PNIPAM 分子修饰到微悬臂梁单侧表面的过程如下: 首先, 在 SiN_x 微悬臂梁的单侧表面上蒸镀约 40 nm 厚的 Au 层, 随后置于 50 °C 的水虎鱼油 “piranha dip” ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{SO}_4 = 1 : 3$) 溶液中清洗 5 min, 取出后用蒸馏水冲洗, 氮气吹干, 接着放入一端修饰有巯基 (—SH) 的 PNIPAM 分子的水溶液中, 静置 3 d. 其间 PNIPAM 分子上的巯基 (—SH) 与微悬臂梁上的 Au 结合, 通过自组装的过程最终形成高分子刷 (图 3(a)), 完成修饰过程. 本文中所使用 PNIPAM 分子的分子量为 $M_w = 1.5 \times 10^5 \text{ g/mol}$, 分子量分布

$$M_w/M_n = 1.16.$$

将修饰了 PNIPAM 分子的微悬臂梁放入容器中并注入蒸馏水.通过恒温控制器控制溶液温度变化,监测在此过程中微悬臂梁的变形便可得到 PNIPAM 分子随温度变化时的构象转变信息.温度变化的方式如下:从 20 °C 升温至 40 °C,设定升温间隔为 1 °C,升温速率约为 0.5 °C/min,在每个温度点上停留 10 min 并提取微悬臂梁的变形信息.以同样的方式控制温度从 40 °C 降温至 20 °C.由于 SiN_x 和 Au 两种材料的热膨胀系数不同,温度变化时微悬臂梁自身也会产生热变形.为了得到仅由 PNIPAM 分子的构象转变引起的微悬臂梁变形,我们在修饰 PNIPAM 分子之前和修饰 PNIPAM 分子之后分别进行了温度的循环实验,两者的结果相减后便可除去微悬臂梁本身的热变形影响.

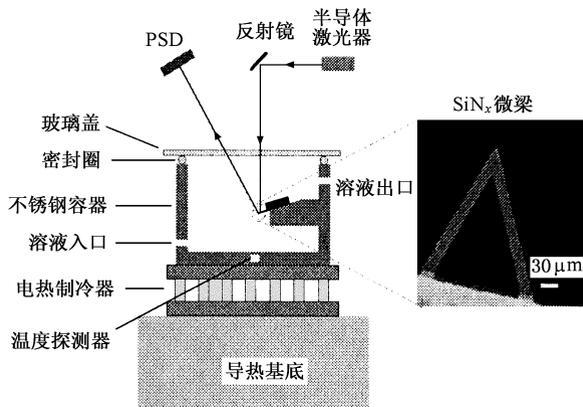


图 4 实验系统示意图

3. 实验结果及讨论

图 5 显示的是修饰 PNIPAM 分子之前微悬臂梁自由端部位移随温度变化的曲线(取微悬臂梁朝向镀 Au 一侧的弯曲为正向,全文同).微悬臂梁的这种变形是由于 SiN_x 和 Au 两种材料的热膨胀系数不同所引起的.以 Δz 、 ΔT 表示微悬臂梁的自由端部位移和温度变化,它们之间的关系可以由线弹性小变形理论得到,

$$\Delta z = K\Delta T,$$

式中 K 与微悬臂梁的尺寸以及两种材料的热膨胀系数和杨氏模量有关.在实验的温度范围内, K 可视为与温度无关的常数,于是 Δz 和 ΔT 呈线性关系.图 5 中显示了微悬臂梁自由端部位移-温度实验

曲线呈现出很好的线性关系,证实此方法是可靠的.

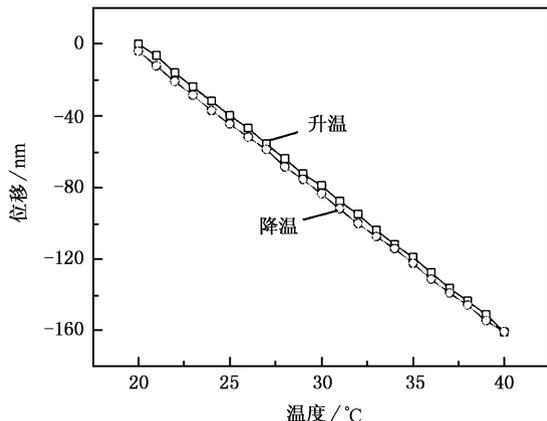


图 5 修饰 PNIPAM 分子之前的微悬臂梁变形

图 6 给出了修饰 PNIPAM 分子之后微悬臂梁自由端部位移随温度变化的曲线,此曲线中除 PNIPAM 分子构象转变的影响外,还耦合了图 5 中所显示的双材料热变形效应.将修饰了 PNIPAM 分子之后的微悬臂梁变形减去修饰 PNIPAM 分子之前

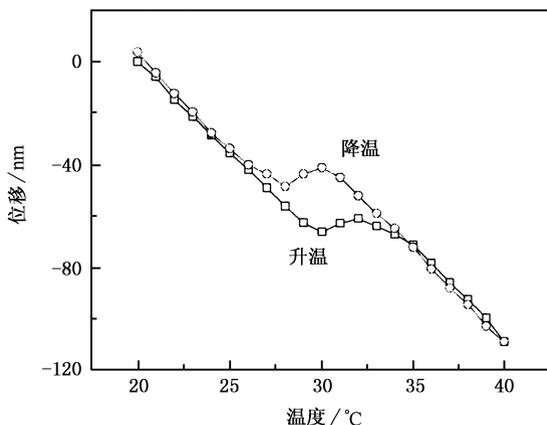


图 6 修饰 PNIPAM 分子后的微悬臂梁变形

的微悬臂梁变形,便可得出仅由 PNIPAM 分子构象转变所引起的微悬臂梁变形,结果如图 7 所示.微悬臂梁变形和微悬臂梁表面应力之间遵循 Stoney 公式^[24]

$$\frac{1}{R} = 6 \frac{1-\nu}{Et^2} (\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2), \quad (1)$$

式中, R 为微悬臂梁弯曲变形的曲率半径, E 、 ν 和 t 分别为微悬臂梁的杨氏模量、泊松比和厚度, $\Delta\sigma_1$ 和 $\Delta\sigma_2$ 对应微悬臂梁镀 Au 一侧表面和未镀 Au 一侧表面的表面应力变化值.微悬臂梁自由端的位移 Δz 与表面应力的关系可由下式得出:

$$\Delta z = \frac{3(1-\nu)L^2}{Et^2}(\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2), \quad (2)$$

式中 L 为微悬臂梁长度. 注意到微悬臂梁上未修饰 PNIPAM 分子的一侧, 其表面状态在整个温度变化过程中基本保持不变, 即 $\Delta\sigma_2 \approx 0$, 所以 (2) 式中 $\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2$ 实际上反映的就是修饰有 PNIPAM 分子那一侧表面的表面应力的变化值 $\Delta\sigma_1$. 将 $\Delta\sigma_1$ 简称为微悬臂梁的表面应力, 计算结果如图 8 所示.

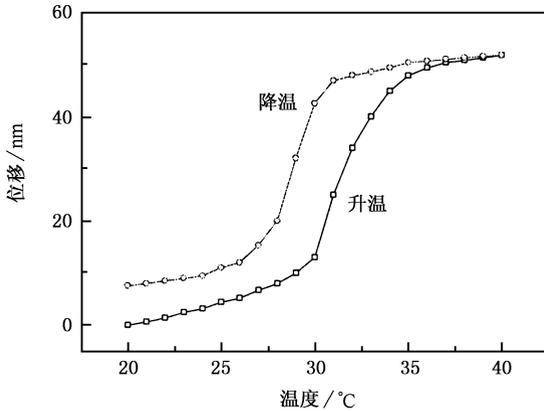


图 7 仅由 PNIPAM 分子引起的微悬臂梁变形

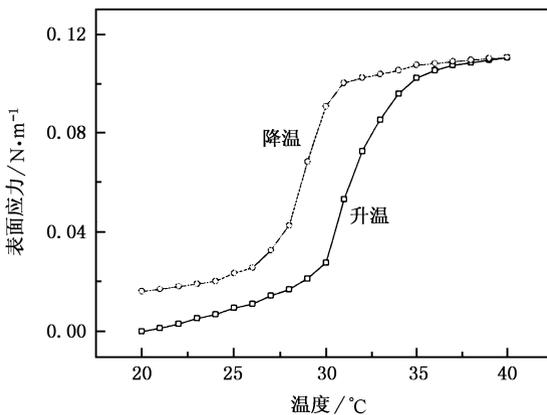


图 8 PNIPAM 分子构象转变引起的表面应力

实验中, 扣除了双材料热变形效应后, 微悬臂梁的变形就只是 PNIPAM 分子构象转变影响的结果. 通过对这种变形的分析便可以得出 PNIPAM 分子构象转变过程的信息. 那么, PNIPAM 分子的这种构象转变和微悬臂梁的变形以及微悬臂梁的表面应力之间是如何联系起来的呢? 根据高分子溶液理论^[25]: 溶液中的高分子, 按溶剂的性质不同分子链段之间以及分子链段与溶剂分子之间的相互作用会发生变化. 溶剂的性质良好时, 高分子链段之间相互排斥,

高分子链段与溶剂之间相互吸引, 整个高分子在溶剂中膨胀伸展, 呈现无规线团状的构象. 溶剂的性质变差时, 高分子链段之间相互吸引, 高分子链段与溶剂分子之间相互排斥, 整个高分子呈现塌缩小球状构象. 对本实验而言, 溶剂水的性质是随温度的变化而发生改变的. 水溶液中自由状态的 PNIPAM 分子, 其构象在 LCST 处发生间断性的转变, 说明此处溶剂的性质有较大的变化. 当 PNIPAM 分子被修饰到微悬臂梁表面, 由于受到固体表面的约束, 构象的转变表现出连续性, 这从图 7 中微悬臂梁变形的连续性可以看出. 当温度为 20 °C 时, 水对于 PNIPAM 分子而言是良溶剂, 此时 PNIPAM 分子链段伸展, 分子间相互排斥. 随着温度的上升, 溶剂的性质逐渐变差. 高分子链段间的相互排斥力减弱, 吸引力增强, 整个分子链收缩塌陷. 对于微悬臂梁, 这样一个过程相当于使其表面产生了一个收缩的表面应力, 也就表现为微悬臂梁产生正向的弯曲变形 (图 7) 和微悬臂梁表面应力的增加 (图 8). 同时, 图 7 和图 8 还显示出在 LCST 附近曲线的变化幅度较大, 这与以上提到的自由溶液中 PNIPAM 分子的实验结果相类似. 降温过程中的现象与升温过程中的现象正好相反, 微悬臂梁朝着负方向发生变形 (图 7), 微悬臂梁的表面应力减少 (图 8). 另外, 当温度循环结束 (回到 20 °C) 时, 微悬臂梁的变形未能完全恢复 (图 7), 有残余的表面应力存在 (图 8). 更一般地, 从整个循环曲线上看, 整个过程存在明显的迟滞性, 是不可逆的, 即在升温过程和降温过程中的同一个温度点上微悬臂梁的变形量是不相等的 (40 °C 除外). Wang 等^[26]认为, 这种现象是由于在升温过程中 PNIPAM 分子塌缩成小球构象时分子链段间形成了较强的相互作用力 (通常认为是氢键) 所致. 降温时这种较强的相互作用继续维持着小球的塌缩状态, 直到更低的温度 (相对升温过程而言) PNIPAM 分子才能克服它而伸展开来, 所以在同一个温度点上降温时的变形总是比升温时大 (迟滞). 本文的研究结果与此解释相符, 图 8 中的表面应力变化曲线也直观地反映出了这一过程. 另一方面, PNIPAM 分子在塌缩成小球的过程中链段之间可能发生了相互的缠结, 降温时 PNIPAM 分子未能完全解开缠结, 于是造成了微悬臂梁在降温过程中变形的迟滞. 图 9 给出了 PNIPAM 分子构象转变以及微悬臂梁变形过程的示意图.

与传统的实验方法 (如激光光散射、QCM、SPR

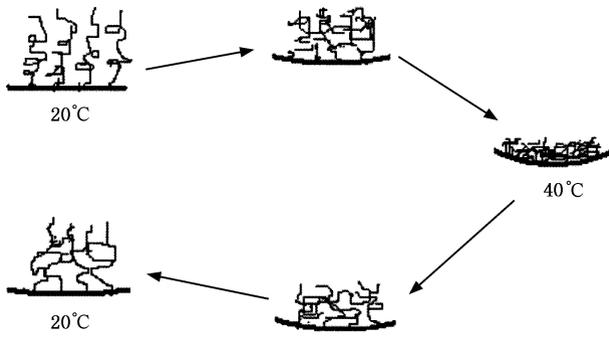


图9 PNIPAM 分子构象转变过程示意图

等)相比,本文所提出的微悬臂梁传感方法——通过检测微悬臂梁表面应力的变化观察大分子的构象转变——特点在于其反映的是大分子构象转变过程中分子之间相互作用力的变化信息,这对于人们认识大分子构象转变的微观机理、建立理论模型是很有

意义的.此外,对于伴随有力学信号变化的其他生物、化学过程也都可能以此作为平台进行研究.

4. 结 论

本文提出了一种基于微悬臂梁传感技术研究大分子构象转变的新方法.通过检测单侧表面上修饰有 PNIPAM 分子的微悬臂梁随温度变化时的表面应力变化,观察了 PNIPAM 分子的构象随温度转变的过程,发现这种转变过程是在 20—40℃ 之间连续发生的,在 LCST 附近转变幅度较大.整个过程显示出明显的迟滞性和不可逆性.该方法的特点在于:它探测的是微悬臂梁表面应力的变化,反映的是大分子构象转变过程中分子之间相互作用力的变化信息.这为我们认识大分子构象转变的微观机理提供了一种新的视角.

- [1] Wu S Y , Zhang Y , Lei X L *et al* 2002 *Acta Phys. Sin.* **51** 1887 (in Chinese) [吴世英、张 益、雷晓玲等 2002 物理学报 **51** 1887]
- [2] Xue Y , Chen L Q , Liu Y Z 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 2040 (in Chinese) [薛 纭、陈立群、刘延柱 2004 物理学报 **53** 2040]
- [3] Liu Y Y , Dou S X , Wang P Y *et al* 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 622 (in Chinese) [刘玉颖、窦硕星、王鹏业等 2005 物理学报 **54** 622]
- [4] Xie Y J , Shi Q W , Wang X P *et al* 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 2796 (in Chinese) [谢永军、石勤伟、王晓平等 2004 物理学报 **53** 2796]
- [5] Stockmayer W H 1960 *Makromol. Chem.* **35** 54
- [6] Ptitsyn O B , Kron A K , Eizner Y Y 1968 *J. Polym. Sci. C* **16** 3509
- [7] Yamakawa H 1971 *Modern Theory of Polymer Solutions* (New York : Harper & Row)
- [8] Grosberg A Y , Kuznetsov D V 1992 *Macromolecules* **25** 1996
- [9] Yamakawa H 1993 *Macromolecules* **26** 5061
- [10] Chu B , Yu J , Wang Z L 1993 *Prog. Colloid Polym. Sci.* **91** 142
- [11] Wu C , Zhou S Q 1995 *Macromolecules* **28** 8381
- [12] Ptitsyn O B 1995 *Adv. Protein Chem.* **47** 83
- [13] Kuwajima K 1992 *Curr. Opin. Biotechnol.* **3** 462
- [14] Christensen H , Pain R H 1991 *J. Eur. Biophys.* **19** 221

- [15] Bychkova V E , Ptitsyn O B , Chumtracts C H 1993 *Biochem. Mol. Biol.* **4** 133
- [16] Balamurugan S , Mendez S , Sreelatha S *et al* 2003 *Langmuir* **19** 2545
- [17] Liu G M , Zhang G Z 2005 *J. Phys. Chem. B* **109** 743
- [18] Zhulina E B , Borisov O V , Pryamitsyn V A *et al* 1991 *Macromolecules* **24** 140
- [19] Raiteri R , Grattarola M , Butt H J *et al* 2001 *Sensors and Actuators B : Chemical* **79** 115
- [20] Berger R , Delamarche E , Lang H P *et al* 1997 *Science* **276** 2021
- [21] McKendry R , Zhang J Y , Armtz Y *et al* 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** 9783
- [22] Pan L , Zhang Q C , Wu X P *et al* 2004 *J. Exper. Mech.* **19** 403 (in Chinese) [潘 亮、张青川、伍小平等 2004 实验力学 **19** 403]
- [23] Guo Z Y , Zhang Q C , Chen D P *et al* 2005 *J. Exper. Mech.* **20** 213 (in Chinese) [郭郑颖、张青川、陈大鹏等 2005 实验力学 **20** 213]
- [24] Sadra J E 2001 *J. Appl. Phys.* **89** 8911
- [25] Flory P J 1953 *Principles of Polymer Chemistry* (Ithaca , New York : Cornell University Press)
- [26] Wang X H , Qiu X P , Wu C 1998 *Macromolecules* **31** 2972

Investigation of conformation transition of poly(*N*-isopropylacrylamide) by surface stress detection using micro-cantilever^{*}

Li Kai¹⁾ Liu Hong²⁾ Zhang Qing-Chuan^{1)†} Hou Yi²⁾ Zhang Guang-Zhao²⁾ Wu Xiao-Ping¹⁾

1) *Key Laboratory of Mechanical Behavior and Design of Material of Chinese Academy of Sciences , University of Science and Technology of China , Hefei 230027 , China)*

2) *Department of Chemical Physics , University of Science and Technology of China , Hefei 230026 , China)*

(Received 1 November 2005 ; revised manuscript received 20 March 2006)

Abstract

A new method based on micro-cantilever sensors was presented and used to investigate conformation transition of macromolecules. Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) were grafted onto one surface of a micro-cantilever by self assemble monolayer method. Then the micro-cantilever was immersed into distilled water in which the temperature can be adjusted in the range of 20—40 °C. The deflection of the micro-cantilever induced by conformation transition of PNIPAM chains was measured using optical lever technique. The results show that the micro-cantilever deflects upon heating and opposite deflection occurs upon cooling , which indicates that the surface stress of the micro-cantilever changes when the conformation of PNIPAM changes upon heating and cooling. The surface stress changes continuously over the range of 20—40 °C. However , a sharp change appears around the low critical solution temperature (~ 32 °C) , at which a coil-globule transition occurs in free aqueous solution of PNIPAM. The whole process is irreversible and shows a clear hysteresis , which can be attributed to hydrogen bonding and the possible chain entanglement formed during the collapse process.

Keywords : conformation transition , poly(*N*-isopropylacrylamide) chains , surface stress , micro-cantilever

PACC : 3620C , 8120S , 8265

^{*} Project supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No. 2006CB300404) , the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 10232030 , 10472111 , 10472112) and the Doctoral Foundation of Ministry of Education of China (Grant No. 20040358027).

[†] E-mail : zhangqc@ustc.edu.cn