

利用表面等离子体共振技术测定 BSA-抗 BSA 抗体间二维反应动力学

李宝霞 龙勉[△]

(中国科学院力学研究所 国家微重力实验室, 北京 100080)

摘要 生物大分子间二维和三维反应动力学过程之间的本构关系还没有被完全认识。表面等离子体共振技术是成熟的研究三维反应动力学的方法。通过相同的技术实时记录耦联到载体(细胞、玻璃小球或脂质体)上的抗原分子与相应的耦联在芯片上的抗体分子之间,在不同实验条件下的反应动力学过程,建立了用表面等离子体共振技术测定抗体-抗原二维反应动力学的方法,可适用于建立生物大分子间二维与三维反应动力学间的定量关系。

关键词 等离子体共振 生物传感器 二维反应动力学 BSA BSA 抗体

Measuring 2D Kinetics of BSA-Anti-BSA Monoclonal Antibody Using a Surface Plasmon Resonance-based Biosensor

Li Baoxia Long Mian[△]

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

Abstract The correlation between two- (2D) and three-dimensional (3D) kinetics of biomolecular reactions has not been elucidated yet. Surface plasmon resonance (SPR) is a mature method to investigate 3D reaction kinetics. In current study, a new assay of measuring 2D kinetics, using the same principle of 3D SPR, was developed by firstly coupling antigen to the surfaces of carriers (cells, glass beads, or liposomes) and then monitoring the reaction kinetics of the antigen coated on carries to the antibody coupled to the sensor chip under various experimental condition. The assay enables to establish the quantitative correlation between 2D and 3D kinetics.

Key words Surface plasmon resonance Biosensor 2D kinetics BSA Anti-BSA antibody

1 引言

许多重要的生命过程本身是或者包含生物分子的二维反应过程,所以在实际应用中需要评价二维反应动力学过程,包括反应速率、反应亲和性及其受外力的影响等。而相对于测定生物分子的三维反应动力学的方法而言,目前测定二维反应动力学的实验方法比较复杂,难以掌握。

目前已经有多种测定生物大分子间二维和三维反应动力学的方法,例如微吸管实验(Micropipette)^[1]可以在细胞水平,光镊(Optical Trap)实验可以在亚细胞和单分子水平,原子力显微镜(AFM)实验可以在单分子水平得到力学条件下生物分子的二

维反应动力学常数;基于表面等离子体共振原理的生物传感器^[2]可以测得生物分子的三维反应动力学常数。不同的实验方法基于不同的原理,侧重于反应过程的不同方面,影响因素也不尽相同,因而方法不同会带来结果的差异,不利于完全理解二维和三维反应动力学过程间的本构关系。Li 等^[3]通过 2D 的离心机(Centrifugation)技术和 3D 的 SPR 技术考察了二维和三维反应间的相关性,并建立了相应的数学模型,但基于两种不同测量原理的实验技术会影响 2D 和 3D 反应动力学定量关系的建立,且文中只能以 IC50 间接得到的三维反应常数与直接得到的二维反应常数比较。目前二维、三维反应动力学的测定仍然未能基于同一技术实现。

本研究以 BSA 和其单克隆抗体作为模型蛋白,建立了基于同一实验原理——表面等离子体共振原

[△]联系人。E-mail: mlong@imech.ac.cn

理测定生物分子 2D 和 3D 反应动力学过程的方法。这种方法消除了方法不同带来的结果的差异,将会促进对生物分子 2D 和 3D 反应动力学过程间的本构关系的理解,有助于建立 2D 和 3D 间动力学参数的定量关系。

2 材料和方法

通过 CrCl_3 耦联^[4]的方法将抗原(BSA, Sigma)分子共价包被在不同的载体(红细胞、玻璃小球或脂质体)表面,采用流式细胞技术检测包被密度。通过标准的氨耦联方法将单克隆抗体(anti-BSA monoclonal antibody, Lab Vision)分子共价连接在生物传感器(BIAliteTM, Biacore AB)的芯片表面。将游离态的抗原或耦联了抗原的载体悬液作为流动相流,基于表面等离子体技术实时记录抗原与芯片上抗体分子的反应过程,分析得到 3D 反应动力学常数和相关的 2D 反应动力学信息。图 1 为反应测定模式图。

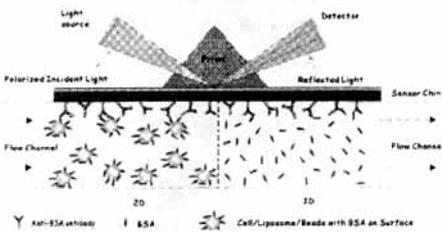


图 1 表面等离子体技术测定 2D、3D 反应动力学过程的模式图

3 结果与讨论

通过一系列的对照和阻断实验验证了方法的特异性,图 2 为部分实验结果。

根据二维反应的小概率动力学模型,2D 反应动力学过程主要与抗体和抗原分子在相应载体上的表面密度、加在抗体抗原复合体上的外力相关,实验中可以通过改变传感器芯片上抗体的耦联密度,载体上抗原的包被密度,载体悬液的不同流速(对应于不同的作用于在抗体-抗原复合体上的外力),从而研究这些因素对于二维反应动力学的影响。其次还可以研究载体性质对于反应的影响,例如以红细胞作为抗原载体,可以模拟在体条件,但是细胞膜的拓扑结构、变形性及膜上其它分子的存在会对目标分子

间的动力学过程产生一定的影响;以脂质体作为抗原载体,保持了类似于细胞的柔性和变形性,但其内部又较细胞结构简单的多,在一定程度上可以模拟在体情况,同时其表面没有其他蛋白分子的影响;玻璃小球作为载体,可以近似认为刚性小球,从而简化力学分析过程,同时其表面上抗原的包被密度可以非常大。另外可以研究不同载体悬液密度对二维反应动力学过程的影响。

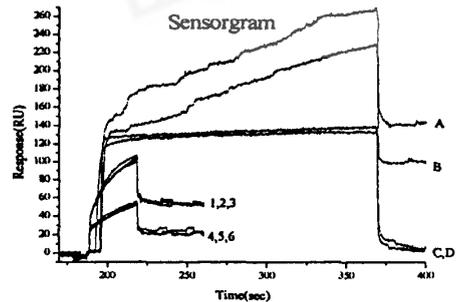


图 2 表面等离子体技术测量结果

Fig 2 Measuring results using surface plasmon resonance

曲线 A-D 和 1-6 分别为二维和三维反应结果。芯片上耦联抗体分别为 9833RU(2D)和 1270 RU(3D),流速分别为 5 (2D)和 100 $\mu\text{l}/\text{min}$,进样时间分别为 3 min (2D)和 30 s(3D)。A 和 B 为特异性实验,细胞浓度为 6.44×10^8 cells/ml,包被 BSA 密度为 2994 BSA/cell,C 和 D 为空白实验,细胞上没有包被 BSA 分子。1-3 和 4-6 BSA 浓度分别为 80 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

不同实验条件下的抗体-抗原分子的二维反应动力学信息,可以为从理论上比较、分析、建立生物分子的二维和三维反应动力学过程间的本构关系提供线索和实验基础。

参 考 文 献

- 1 龙 勉. 选择体/配体相互作用的二维反应动力学. 生物力学最新进展, 2001;17
- 2 Quinn JG, and R. O'kenney. Biosensor-based estimation of kinetic and equilibrium constants. Analytical Biochemistry. 2001, 290: 36
- 3 Li P, Selvaraj P, Zhu C. Analysis of competition binding between soluble and Membrane-bounded ligands for cell surface receptors. Biophysical Journal, 1999, 77: 3394-3406
- 4 Kofler R, Wick G. Some methodologic aspects of the chromium chloride method for coupling antigen to erythrocytes. Journal of Immunological Methods, 1977;16: 201-209