

生物分子吸附膜层的图像显示

——光学椭圆显微成像技术应用之一

靳刚 孟永宏 邢建华

(中国科学院力学研究所 北京100080)

赵子彦

(山东省医学科学院药物研究所 济南250001)

摘要 本文采用以扩展平行光为光源的椭圆显微成像技术,以图像形式显示吸附于固体表面上的蛋白单分子膜层的几何厚度分布。此测量技术为表面检测和超薄膜研究提供了手段。

关键词 椭圆显微成像; 单分子膜层; 图像显示

0 引言

生物分子薄膜构造工程是近年来的新兴学科,是细胞组织培养和分子生物医学研究所提出的新课题,具有生理活性和类细胞膜厚度的生物分子薄膜已成为功能材料科学的热点。几何厚度仅有几埃至几百埃厚的生物分子薄膜,是薄而透明的,在物理上,属于超薄相位体。由于相位体不引起探测光波的幅值变化,即使用显微镜也难以探测。

椭圆光学显微成像是近几年发展起来的一种新型超薄膜及表面显示技术[1、2、3],它将传统的光学椭圆术[4]和CCD摄像、计算机采样和图像处理技术相结合。不仅可以测量光波的幅值变化,而且对于光波的位相变化很敏感,即对于相位体所引起的光波的位相变化有极高的灵敏度。它具有传统椭圆法对厚度测量具有高灵敏度的优点(厚度分辨率达 10^{-10} 米),并且具有测量面积大(显示面积达 10^{-4} 平方米量级)、取样速度快(对于 10^5 以上像元的图像,每秒采样25帧以上)、横向分辨率高(达 10^{-6} 米量级)和测量结果直观等优点,并且可以定量地显示厚度的变化和厚度的分布。还可以用于大规模集成电路表面检测,生物薄膜构造工程中生物分子薄膜厚度分布的显示和测量。在电子工业,生物工程和生物医学,尤其在分子生物医学中具有潜在的应用前景。

1 原理和实验装置

光学椭圆偏测量是用偏振光波为探测光照射样品,样品会对入射光波进行调制,使得反射或透射光波中载有样品的信息,通过偏振光波检测与样品相应的物理模型相结合,而得到样品的信息。光学椭圆偏测量装置已有多种,原理一致,仅采样方法不同。它们都是测量探测光束照射范围内样品参数的统计值。

在此,椭圆偏光学显微成像基本实验装置是传统的消光椭圆偏仪:起偏器—补偿器—样品—检偏器[4]。在该装置中,用一个扩展光束代替了传统的窄光束;光源是Xe灯加上一个633毫微米干涉滤光片,与一个光学准直系统结合,形成光强均匀分布的探测光束;CCD摄像机代替了传统的光电倍增管和光电管等光探测器。相应的光学系统可以同时显示 15×25 平方毫米表面面积,像元达 10^6 以上。通常消光椭圆偏仪在所谓消光条件下工作,即设置补偿器于 $+45^\circ$ 或 -45° 时,调整起偏器和检偏器的位置,使到达光探测器的光强至最小。从起偏器和检偏器的偏振角度,借助合适的光学模型,即可以获得反射表面的信息,例如:吸收薄膜的厚度等。椭圆偏光学显微成像测量表面吸附层,可以同时对待测表面进行多元显示。这里所研究的样品表面上,由于各处附着不同的生物分子,其分子几何尺寸的不同、复合分子的形成、以及表面吸附分子密度的非均匀性导致膜层的非均匀性,决定了其吸附膜层的厚度是不一样的,表面上的各点不可能同时在椭圆偏成像中满足消光条件。因此,消光条件仅设置在无吸附膜层的基底表面或参考像元上。这样,来自样品表面各处的反射光强可用于测量该处的薄膜厚度,即应用了非消光椭圆偏原理。可以证明,在这种条件下,薄膜的厚度是正比于反射光强的平方根[5],在所研究的生物分子薄膜范围内,相对误差小于5%。可以引入参考膜层或用消光椭圆偏法测量样品表面的一处或几处的厚度来进行厚度校对。本椭圆偏成像系统的测厚灵敏度优于 5×10^{-10} 米,取决于光波波长的选择和成像光学系统的设置。进一步, 1×10^{-10} 米的测厚灵敏度是可以预见的。然而,这里给出的厚度值是任意单位的,它是每一像元所记录的光强[8-bit数字灰度型(0—255)的平方根与16的乘积]。为了优化吸附膜层和基底之间的成像反差,入射角选在接近基底的准布儒斯特角的临域中。

待测样品的制备,是在处理过的硅基底疏水表面上,吸附蛋白分子层。这里使用了多种蛋白质,例如:人血纤维蛋白(Fib),人血浆白蛋白(HAS),人血免疫G蛋白(IgG),牛血浆白蛋白(BSA)和它们相应的抗体蛋白等(全部使用SIGMA公司的蛋白制品)。

2 实验结果和讨论

在此,为了展示椭偏光学显微成像系统在显示生物单分子吸附膜层的效果,将一些测量结果叙述如下。

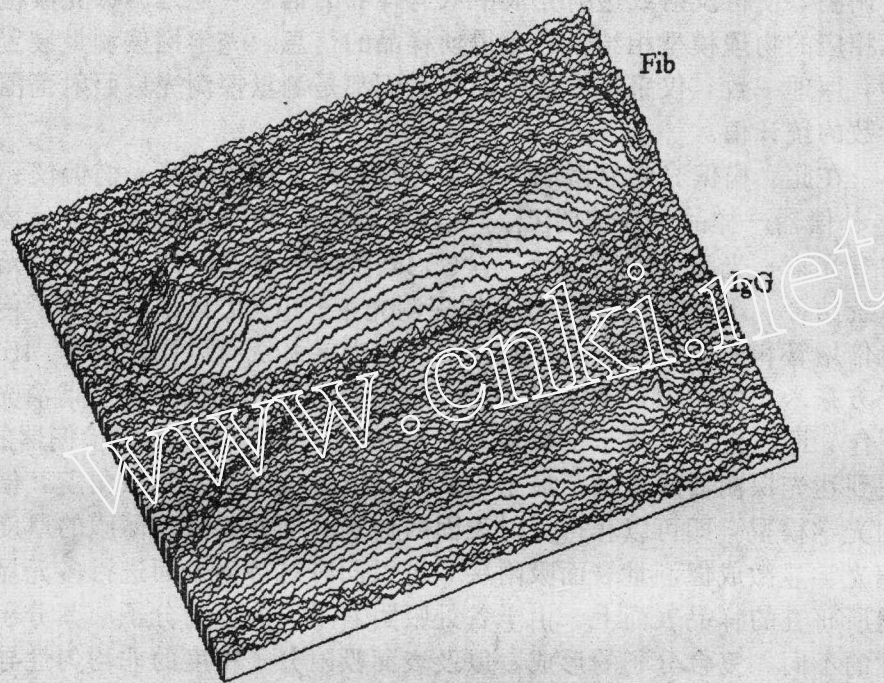


图1 Fib 和 IgG 单分子吸附膜层

图1展示了一幅具有两种蛋白分子吸附膜层的样品的椭偏图像立体图,背景是硅片表面。其中膜层的厚度分布,与所摄椭偏图象中的光强分布的平方根成比例。这些膜层是人血纤维蛋白层和人血免疫G蛋白层。在处理过的硅片疏水表面上,用溶在Hanks'溶液中,浓度为1毫克/毫升的蛋白分子溶液,制备成直径约4毫米的圆形饱和吸附层。在制备蛋白吸附层时,均采取30分钟吸附时间,以达到蛋白分子在表面饱和吸附的程度;然后用Hanks'溶液清洗5次,再用去离子水清洗5次以上,彻底清除表面上的非吸附蛋白分子;最后用氮气吹干。在图中,上面的圆形凸起部分是人血纤维蛋白层,下面的是人血免疫G蛋白层。在饱和吸附的条件下,吸附层的厚度取决于蛋白分子的几何尺寸:人血纤维蛋白层比人血免疫G蛋白层厚得多。根据以往的厚度校对[3],人血纤维蛋白分子的饱和吸附层的几何厚度约为 70×10^{-10} 米,而人血免疫G蛋白层的厚度约为 35×10^{-10} 米。

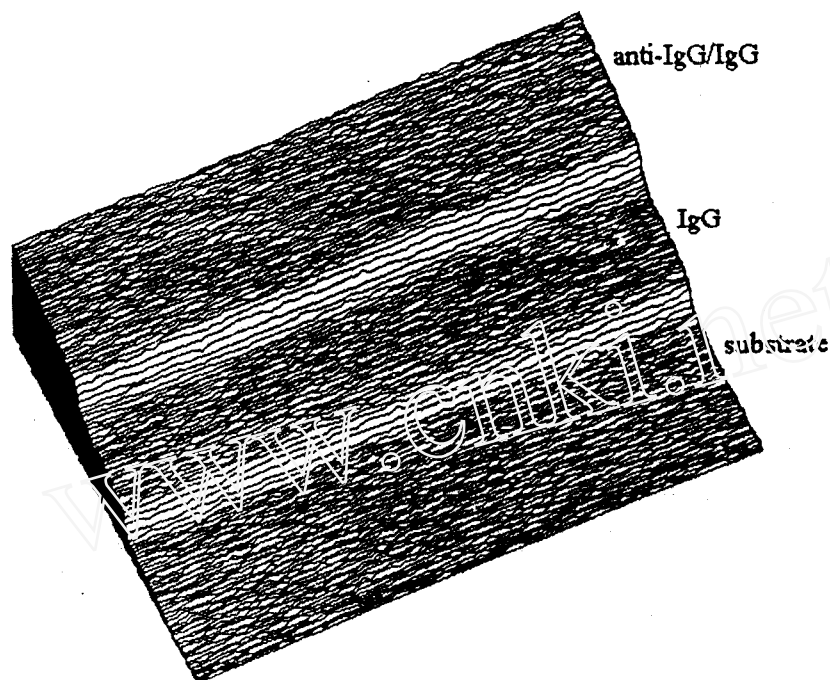


图2 IgG 和 IgG 及其抗体的复合吸附膜层

图2展示出一个阶梯形厚度分布的蛋白分子层。从低向高的各层是做为基底的硅表面，人血免疫G蛋白饱和分子吸附层和人血免疫G蛋白与它的抗体(anti-IgG)相结合形成的复合蛋白层。其中硅表面的疏水处理和人血免疫G蛋白饱和分子吸附层的制备与图1所示的样品一样。当这个样品的人血免疫G蛋白饱和分子吸附层制备完成以后，将该膜层的一部分插入含有人血免疫G蛋白抗体的溶液中(抗体浓度约100微克/毫升)，浸泡时间30分钟以上，根据抗原-抗体的特异结合性，以使溶液中的抗体分子与表面上的人血免疫G蛋白抗原充分结合，再经过清洗和吹干。与其抗体结合处的人血免疫G蛋白层的厚度明显地上升了，反映出在此形成了抗原-抗体复合物。在椭圆图像立体图中形成了一个新的厚度阶梯。它的厚度与人血免疫G蛋白层基本一样。类似的结果，已经在其它抗原-抗体对中观测到。例如：人血纤维蛋白和它的抗体，人血浆白蛋白和它的抗体，牛血浆白蛋白和它的抗体等。类似的特异结合性也会观测出来。

此方法的应用决不是仅限于免疫学系统,而是可以扩展到所有的生物大分子吸附层和具有特异结合性的分子系统,例如:抗原-抗体,配体-受体,蛋白-蛋白等。一个明显的例子就是将抗体吸附到固体表面代替抗原。这会扩展表面探测生物分子试样的能力。当然,生物分子相互作用所引起有机膜层的可测量和可重复的尺寸变化是必要的。我们可以预见到,椭偏光学显微成像在分子生物学研究和生物功能膜研究中的应用。

3 结论

椭偏光学显微成像对厚度测量具有优越的高灵敏度(厚度分辨率达 1×10^{-10} 米量级),可以有效地用于显示和测量几何厚度仅有几埃至几百埃厚的生物分子薄膜或同量级的表面结构分布;具有测量面积大(显示面积达平方厘米量级),可以同时测量同一表面上的多元样品;取样速度快(对于 10^5 以上像元的图像,每秒采样25帧以上),可以实时研究薄膜材料的动态特性,例如:生物分子之间的相互作用;薄膜制备和演变过程等;横向分辨率高(达微米量级)和测量结果直观,全部实验结果均以图像显示。并且可以定量地显示膜层厚度的变化和分布。在微电子工业,分子生物工程和分子生物医学中具有应用前景。

此研究得到国家自然科学基金委和中国科学院的资助,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 R.F. Cohn and J.W. Wagner, United States Patent No. 5,076,696 (31 December 1991)
- 2 C.J. Brinker, A.J. Hurd, G.C. Frye, K.J. Ward, and C.S. Ashley, *J. Non-Cryst. Solid* **121**,294 (1990)
- 3 G. Jin, R. Jansson, and H. Arwin, *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 2930 (1996)
- 4 R.M.A. Azzam and N.M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light* (North-Holland, Amsterdam, 1997)
- 5 H. Arwin, S. Welin, and R. Jansson, *J. Colloid Interface Sci.*, **156**, 377 (1993)

VISUALIZATION OF ADSORBED BIOMOLECULAR LAYERS

--ONE OF ELLIPSOMETRIC MICRO-IMAGING APPLICATIONS

G.Jin Y.H.Meng J.H.Xing

(Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Z.Y.Zhao

(Institute of Pharmacology, Academy of Medical Sciences of Shandong, Jinan 250001)

Abstract It is reported that the thickness distribution of adsorbed molecular layers of proteins on top of solids is visualized with ellipsometric micro-imaging technology.

With the development of cell culture and molecular biology, the artificial construction of biomolecular layers has become more and more attractive in both research and applications, especially ultrathin membranes with physiological activity and thickness similar to cell membrane. The ultrathin membrane with a thickness between subnanometer and several nanometer is transparent in visible range, belonging to phase object which results in only a phase variation of probe light, but no variation of amplitude. It is very difficult to visualize the thickness distribution of ultrathin membranes.

Ellipsometric micro-imaging is non-destructive and exhibits a high sensitivity to phase transitions with thin layers. It is capable of imaging local variations in the optical properties such as thickness due to the presence of different surface concentration of molecule or different adsorbed molecules. Experimentally, ellipsometric micro-imaging combined conventional ellipsometry with charge coupled device (CCD) as a detector and images are caught by computer with image processing technique. It has advantages of high sensitivity to thickness (resolution in the order of angstrom), big area of view (in square centimeter), high sampling speed (more than 25×10^5 pixel/second), and lateral resolution (in the order of micrometer). Furthermore it may be used quantitatively to visualize the thickness distribution of monolayers. It has also shown a potential application in molecular biology and medicine.

Key words imaging ellipsometry; adsorbed biomolecular layer; visualization