

椭偏光学生物传感器及生物医学应用[△]

陈艳艳*, 靳 刚*

(中国科学院 力学研究所国家微重力实验室, 北京 100080)

摘要: 椭偏光学生物传感器是识别和检测蛋白质的一种新型的高通量、快速生物分子分析技术。它可以实现无标记多元生物分子自动化检测、静态或动态测量及定性和定量测量等, 已应用于生物医学与临床检测等方面, 如肿瘤标志蛋白检测、乙肝五项同时检测、蛋白质竞争吸附以及多元蛋白质相互作用动态测量等, 显示出了广阔的应用前景。

关键词: 椭偏光学显微成像; 蛋白质微阵列; 生物传感器; 蛋白质检测

中图分类号: Q6-33; Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2006)04-0596-04

Protein Microarray Biosensor Based on Imaging Ellipsometry and Its Biomedical Applications[△]

CHEN Yan-yan*, JIN Gang*

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

ABSTRACT: A protein microarray biosensor based on imaging ellipsometry has been developed as a high-throughput and fast technique for protein analysis. As an automatic technique, it has advanced properties such as label-free, multi-protein simultaneous detection, static or kinetic analysis for protein interaction, and qualitative or quantitative analysis. It has been used for the biomedical applications including tumor markers detection, hepatitis B test, protein competitive adsorption and kinetic visualization for protein interactions. It has demonstrated promising potential for further applications in biomedicine.

Key words: imaging ellipsometry; protein microarray; biosensor; protein detection

Acta Acad Med Sin, 2006, 28(4): 596 - 599

微阵列生物传感器技术是融微电子学、生物学、物理学、化学与计算机科学及微制造技术为一体的实用化技术, 涉及许多重要的基础科学问题。它的主要特点是高通量、微型化和自动化。通过成千上万密集排列的分子微阵列的集成, 能够在很短时间内并行分析多种生物分子, 快速准确地获取大量的生物分子信息, 相对传统检测手段, 其检测效率可以成百上千倍地提高, 因此, 受到广泛重视。生物传感器的出现对于生物学、临床检验医学、遗传学、肿瘤学、药理学和毒理学等学科的进步具有极大的

推动作用。

椭偏光学生物传感器是检测和分析蛋白质的新技术^[1-4]。它是将集成化多元蛋白质芯片技术、微流道技术和高分辨率的椭偏光学显微成像技术相结合发展而成的新型无标记、高通量自动检测技术。该技术解决了许多其他类型蛋白质芯片中如低丰度信号的检测、不同的点样质量带来的定量困难和基于标记方法的限制等问题。因此, 有希望广泛地用于生物医学、健康预测、临床诊断、新药筛选和鉴定以及生物工业流程中的活性监测等。

[△]基金项目: 国家自然科学基金(90206029)、中国科学院知识创新工程重大项目(KJ CX1-SW-07-03) Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (90206029) and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (KJ CX1-SW-07-03); * Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; # Corresponding author Tel/Fax: 010-62631816, E-mail: gajin@imech.ac.cn

椭圆光学生物传感器的工作 原理、方法及其特点

工作原理 椭圆光学生物传感器的基本原理是将具有生物活性的生物分子作为感应分子（即配基）装配在固体表面上，形成生物活性感应膜层，即生物活性探针。当感应表面与含有生物分子的溶液接触时，如果溶液中的生物分子与探针上的配基发生特异性结合，就会生成生物分子复合物，膜层的厚度增加（或表面分子面密度提高），此膜层的变化可以通过椭圆光学显微成像系统高分辨地观测到。根据膜层厚度的变化判定溶液中是否含有能够与感应分子发生特异性结合的生物分子^[1]。

蛋白质芯片实质上是根据芯片设计和配基装配，将多个不同的生物活性探针以阵列式集成在同一基底上。每一个蛋白质微单元阵列对应一种生物活性探针，由此形成新型多元蛋白质分析技术，即利用这种芯片，可以完成多个微阵列单元同时进行单指标多种蛋白质检测，也可以实现多指标多种蛋白质同时检测。表面分子面密度不同的各个微单元，经椭圆光学显微成像系统检测，结果显示为各个单元灰度的亮暗不同。

技术方法

芯片设计：针对特定的检测对象，优选与之特异性结合的配基，并设计合适的芯片模式。如临床疾病检测应用，对于较少检测指标，可以设计低通量的蛋白质芯片；生物工业上的应用，特别是单一生物活性的检测，仅需设计单点的蛋白质芯片；对于生物学研究，尤其是蛋白质组研究，需要设计高通量芯片，这也是目前蛋白质芯片传感器的发展方向。

配基装配：是蛋白质芯片技术中的关键内容之一。由于蛋白质分子的生物活性是通过蛋白质分子的空间构向来体现的，所以配基装配不仅要稳定，同时要保持其原有的生物活性。为此需要选择合适的芯片基底，进行有针对性的表面改性，并且要统筹考虑配基来源、装配位点、活性位点趋向、表面位阻、非特异性吸附等诸多问题。目前，已经实现的配基装配方法有：（1）硅表面亲疏水化处理^[4]，如甲基硅表面、氨基硅表面、醛基硅表面和羧基硅表面等；（2）选择带有甲基、羟基和羧基的不同链长的烷硫醇分子进行金表面改性^[5]；（3）混合自组

装单分子膜层芯片表面改性^[6]；（4）共价固定生物分子的硅表面改性方法^[7]等。

芯片反应器：蛋白质芯片的突出优点是并行微型化分析，为了体现这一特点，需要特殊设计微型芯片反应器，使其能够有效地降低待测样品的消耗、缩短检测时间、提高灵敏度，使蛋白质芯片应用更具有灵活性，如并行检测或串行检测等。如果蛋白质芯片技术仿照 DNA 芯片技术，采用蛋白标记测量，会导致一系列问题^[8-10]。而将芯片整个浸泡在待测样品溶液中这一被动反应方式，则需要消耗较多的样品和较长时间，灵敏度也低^[10]。为此，有报道发展了微流道蛋白质输运和芯片微反应系统^[4]，实现在同一微型分析系统中进行蛋白质芯片的制备和样品检测，使得样品消耗从毫升降低至微升量级，反应时间从几小时缩短到十几分钟，检测灵敏度从每毫升微克提高至次纳克量级。

芯片信号采样和处理：所采用的芯片检测系统是具有高空间分辨率的光机电组合的非接触型椭圆光学显微成像系统^[2,3,11-13]，它的运行、条件调试和设置、校对、芯片图像信号采集、多元信息处理以及人机对话均由计算机完成。其稳定性、信噪比、时空分辨率和均一性已经经过近 10 年的验证。

芯片数据库：由于蛋白质的种类繁多，仅人体内就超过 10 万种。建立相应的蛋白质数据库将为蛋白质芯片技术的用户提供蛋白质分子种类、特点、检测条件、标准的检测结果等信息，有利于蛋白质芯片传感器技术的大规模推广使用。

特点 无标记，可分析非纯化分析物；高通量，可同时测量多个样品或多种类型蛋白质；灵敏度高；快速检测，可进行实时定量测定，提供分子相互作用的动态数据；样品用量少；自动化操作，使用简便；检测结果均以数字图像形式输出，结果直观，具有分辨和排除干扰信号能力，同时便于处理、储存和传输。

椭圆光学生物传感器的 生物医学应用

椭圆光学生物传感器已经用于多项生物医学相关的蛋白质检测以及生物分子相互作用的研究，如抗原—抗体相互作用^[4]、蛋白类激素检测^[14]、配体—受体相互作用^[15,16]、肿瘤标记蛋白检测^[16,17]、单克隆药物鉴定^[18]、乙肝五项检测^[19]、蛋白质动

态相互作用^[4,20,21]、蛋白质竞争吸附^[22,23]、病毒检测以及蛋白质复性等^[24]。

肿瘤标志物检测 肿瘤标志物的检测为肿瘤研究和临床诊断、治疗、愈后的观测提供了科学的依据。乳腺癌标志物 CA15-3 检测对乳腺癌以及其他恶性肿瘤的临床诊断有参考价值^[25,26]。有研究应用椭圆偏光学生物传感器对 60 例患者血清中的 CA15-3 进行定量检测,同时与电化学发光免疫试剂盒的检测结果对比,二者符合很好^[17]。电化学发光免疫检测法是目前临床金标准,对比结果表明了椭圆偏光学生物传感器对肿瘤标志物 CA15-3 定量检测的可行性。

乙肝五项检测 乙肝病毒感染,不仅引起急性、慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生密切相关。临床上,乙肝检测时需要同时对五项指标包括乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 及其抗体 (HBsAb)、乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 及其抗体 (HBeAb)、乙型肝炎核心抗体 (HBcAb) 等同时检测。目前国内检测血清指标的方法大多沿用酶联免疫方法 (ELISA),该法检测乙肝五项是逐项做,操作烦琐,检测时间长。

利用椭圆偏光学生物传感器并行检测的优势可对这五项指标进行同时检测^[19]。通过微流道系统把 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 与 HBcAb 固定在芯片上,每种试剂固定在每行的三个单元上,共五行。三个单元中,一个单元与患者血清反应 30 min,一个单元与乙型肝炎阴性血清反应 30 min,第三个单元作为参考点,用于与前两个单元的比对。得到该患者血清中乙型肝炎表面抗原、乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎核心抗原抗体阳性,临床医学对该结果的解释是处于乙型肝炎急性期,有较强的感染性。

上述检测结果同 ELISA 方法检测结果完全一致。同 ELISA 方法比较,显著降低了试剂及样品的消耗、缩短了检测时间、提高了检测效率。

蛋白质竞争吸附 蛋白质的吸附和竞争吸附直接影响细胞的粘附和生长、生物材料的血液相容性。胶原是胞外基质中含量最多的一种蛋白,常用于涂覆培养基底上以促进细胞在体外的生长。白蛋白作为血清和血浆中最丰富的蛋白之一,由其覆盖的生物材料表面能够明显地减小血浆蛋白质的吸附以及血小板黏附与聚集的程度^[27,28],从而提高材料的血液相容性。因此这两种蛋白的竞争吸附是生物材料设计所关注的有代表性的问题。但是如何观察二者

的竞争吸附一直是一个很难解决的问题。

椭圆偏光学生物传感器的应用之一就是研究了胶原和牛血清白蛋白 (bovine serum albumine, BSA) 在亲疏水表面的竞争吸附^[24]。结果表明在一定的浓度范围内,胶原优先吸附于亲水表面,而 BSA 则优先吸附于疏水表面。二者的具体竞争吸附过程是:胶原在亲水和疏水表面吸附后,将该吸附膜层继续放入胶原和 BSA 的混合溶液中,在亲水表面,膜层的面密度几乎不再增加或减少。而在疏水表面,膜层的面密度逐渐降低,直到相当于纯 BSA 吸附形成膜层的面密度。可以推出,即使预先吸附有胶原,BSA 仍可以将胶原取代下来,形成 BSA 膜层。

多对生物分子相互作用实时检测 生物分子间相互作用不仅控制着基因转录、细胞分裂和细胞增殖,同时还介导细胞坏死过程中的信号转导,致癌转化和凋亡等。定量分析生物分子的相互作用和相关的动态过程,对于揭示生物反应过程的分子机制和研究生命现象发生发展的基本规律具有十分重要的意义。

近来发展的全反射式椭圆偏光学生物传感器^[21],可以实时观测生物分子动态相互作用的全过程,并且不受溶液流动和混浊的影响,是一种高灵敏度和高通量检测技术。样品用量少(仅需几微升至几十微升)。其测量速度可以准确地追踪生物分子的动态相互作用过程,获得分子间反应的动态信息。自行设置测量时间周期,保证获得全部反应过程的信息。

在椭圆偏光学生物传感器技术发展和应用过程中,该技术在蛋白质相互作用和蛋白质组研究、医学检测和诊断、药物筛选和生物活性检测等领域表现出广泛的应用潜力。还可以提供一些其他方法尚无法获得的信息,因此有可能为一些尚无答案的生物医学问题提供解答。随着椭圆偏光学生物传感器相关技术的不断发展和完善,结合实际应用,有可能发展成为一项新的蛋白质检测和分析的实用化技术。

参 考 文 献

- 1 靳 刚,王战会.蛋白质芯片与其他生物芯片技术.见:马立人,蒋中华主编.生物芯片.第2版.北京:化学工业出版社,2002.210-300.
- 2 Jin G, Tengvall P, Lundström I, et al. A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interactions. *Analy Biochem*, 1995, 232(1):69-72.
- 3 Jin G, Roger J, Arwin H. Imaging ellipsometry revisited: de-

- velopment for visualization of thin transparent layers on silicon substrate. *Rev Sci Instrum*, 1996, 67(8):2930-2936.
- 4 Wang ZH, Jin G. A label-free multisensing immunosensor based on imaging ellipsometry. *Analy Chem*, 2003, 75(22):6119-6123.
 - 5 Wang ZH, Viana AS, Jin G, *et al.* Immunobiosensor interface based on physical and chemical immunoglobulin G adsorption onto mixed self-assembled monolayers. *Bioelectrochemistry*, 2006, 69(1):180-186.
 - 6 Wang ZH, Jin G. Silicon surface modification with a mixed silanes layer to immobilized proteins for biosensor with imaging ellipsometry. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces*, 2004, 34(3):173-177.
 - 7 Wang ZH, Jin G. Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. *J Immunol Meth*, 2004, 285(2):237-243.
 - 8 Kodadek T. Protein microarray: prospects and problems. *Chem Biol*, 2001, 8(2):105-115.
 - 9 Templin MF, Stoll D, Schrenk M, *et al.* Protein microarray technology. *Drug Discov Today*, 2002, 7(15):815-822.
 - 10 Hofmann O, Voirin G, Niedermann P, *et al.* Three-dimensional microfluidic confinement for efficient sample delivery to biosensor surfaces. Application to immunoassays on planar optical waveguides. *Anal Chem*, 2002, 74(20):5243-5250.
 - 11 靳刚, 孟永宏, 邢建华, 等. 生物分子吸附膜层的图像显示——光学椭圆偏显微成像技术应用之一. *测试技术学报*, 1998, 12(3):166-171.
 - 12 孟永宏, 靳刚. 倾斜镜面成像的自动调焦方法. *光电工程*; 2004, 31(12):34-37.
 - 13 陈涉, 孟永宏, 靳刚. 椭圆偏光显微成像系统聚焦评价函数的研究. *光学学报*, 2005, 25(7):923-929.
 - 14 Zhao ZY, Jin G, Wang ZH. Detection of somatotropin and corticosterone with imaging ellipsometry, in *Proc. 20th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. Hong Kong: IEEE, 1998. 269-272.
 - 15 王战会, 靳刚. 应用椭圆偏光显微成像对 IL-6 与其受体的相互作用的初步观察. *生物工程学报*, 2002, 18(1):99-101.
 - 16 Wang CL, Li HW, Fu PF, *et al.* Soluble angiopoietin receptor Tie-2 in patients with acute myocardial infarction and its detection by optical protein-chip. *Proteomics*, 2004, 10(9):15-20.
 - 17 Zhang HG, Qi C, Wang ZH, *et al.* Evaluation of a new CA15-3 protein assay method: optical protein-chip system for clinical application. *Clinical Chemistry*, 2005, 51(6):1038-1040.
 - 18 段金柱, 齐财, 韩伟, 等. 抗 SARS 人源单链抗体 H12 的表达及复性. *生物工程学报*, 2005, 21(5):692-697.
 - 19 Duan JZ, Ji X, Feng J, *et al.* A human neutralizing antibody against a conformational epitope shared by oligomeric SARS S1 protein. *Antiviral Therapy*, 2006, 11(1):117-123.
 - 20 Jin G, Zhao ZY, Wang ZH, *et al.* The development of biosensor with imaging ellipsometry, 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. San Francisco: IEEE, 2004. 1975-1978.
 - 21 Chen YY, Jin G. Biosensor based on total internal reflection imaging ellipsometry for kinetic process study of biomolecule interaction. *The Ninth World Congress on Biosensors*. Canada: Biosensors & Bioelectronics, 2006. 219.
 - 22 Ying PQ, Yu Y, Jin G, *et al.* Protein competitive adsorption studied by atomic force microscope and imaging ellipsometry. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces*, 2003, 32(1):1-10.
 - 23 Ying PQ, Jin G, Tao ZL. Competitive adsorption of collagen and bovine serum albumin — effect of the surface wettability. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces*, 2004, 33(3-4):259-263.
 - 24 Qi C, Duan JZ, Wang ZH, *et al.* Investigation of interactions between two neutralizing monoclonal antibodies and SARS virus using biosensor based on imaging ellipsometry. *Biomed Microdevices*, 2006, 8(3):186-192.
 - 25 Filipovic A. Relation between preoperative values of CA15-3 and duration of disease-free interval in patients with operable breast cancer. *Breast*, 2003, 12(S1):19
 - 26 Gion M, Mione R, Leon AE, *et al.* Comparison of the diagnostic accuracy of CA27-29 and CA15-3 in primary breast cancer. *Clin Chem*, 1999, 45(5):630-637.
 - 27 Fatma KD, Olgun G. Competitive adsorption of blood proteins on gamma-irradiated-polycarbonate films. *Biomater Sci Polymer Edn*, 2002, 13(2):127-139.
 - 28 Shen MC, Laura M, Wagner MS, *et al.* PEO-like plasma polymerized tetraglyme surface interactions with leukocytes and proteins; *in vitro* and *in vivo* studies. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 2002, 13(4):367-390.

(2006-03-01 收稿)