

小型光学椭偏成像仪应用于 无标记蛋白质芯片检测

罗一丹^{1,2} 牛宇^{1,2} 靳刚¹

(1 中国科学院力学研究所 北京 100190; 2 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 本文探索使用一种小型光学椭偏成像仪器进行无标记蛋白质芯片数据的采样和分析,同时阐述该设备的原理和结构,及成像显示条件和采样结果,进一步递推出蛋白质芯片表面膜层吸附和蛋白质分子之间相互作用的结果。说明简易的小型化设备能够有效地用于蛋白质芯片的检测,为蛋白质芯片向实用化普及、现场检测方向发展,提供了条件。

关键词 光学椭偏成像 小型化 无标记蛋白质芯片

中图分类号 TH74 **文献标识码** A **国家标准学科分类代码** 460.4035

A Label-free Protein Chip Screened with Compact Imaging Ellipsometer

Luo Yidan^{1,2} Niu Yu^{1,2} Jin Gang¹

(1 Institute of Mechanics, CAS, Beijing 100190, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract It is to investigate using a compact imaging ellipsometer to screen a label-free protein chip. The principle and structure of the instrument is presented, and the protein chip fabrication process is described. The experiment results show that the mono-layer of protein molecule and protein complexes due to protein interaction is quantitatively visualized with a high resolution, so that the compact instrument is able to effectively screen the label-free protein chip. The compact imaging ellipsometer has a potential for protein chip screening and practical applications.

Key words imaging ellipsometry compact instrument label-free protein chip

1 前言

对生物分子表面吸附、分子间相互作用的研究有助于理解许多生理过程和生物医学现象。而光学蛋白质芯片系统是近年来发展起来的一种分析和研究蛋白质分子相互作用的新技术[1]。此方法将高分辨率的光学椭偏成像技术和无标记蛋白质芯片相结合,发展形成了一种新型的并行、快速生物分子识别和检测技术[2,3],其原理是将生物分子作为感应分子(即配基),以阵列式集成在固体芯片表面或表面微单元上。利用生物分子间的特异结合的自然属性,待测分子与配基分子在芯片表面会形成生物分

子复合物,使膜层的厚度增加(或表面分子面密度提高)。以光学椭偏成像系统作为探测仪器,可以高分辨地观测到膜层的变化,达到对蛋白质探测和识别的目的[4]。

光学蛋白质芯片系统具有无需标记试剂,样品用量少,检测时间短,并且可以进行多元检测等优点[5],已能够进行一些细菌、病毒、疾病标志物的检测[6,7]。在向实用化发展的过程中,大型的探测仪器已经不能满足现场检测等需求。为了进一步拓展应用,对椭偏成像仪器提出了小型、经济型、简便、高精度、专用化的要求。目前,随着椭偏仪器的不断发展,已研制出了一种小型光学椭偏成像仪,本文即应用该仪器进行了蛋白质芯片检测方面的探

索, 验证它是否能应用于光学蛋白质芯片系统。

2 实验设计

为了评价小型光学椭圆偏振成像系统对蛋白质芯片检测的效果, 首先需要进行实验设计, 若实验能在以下几个方面得到良好的结果, 则说明仪器能够达到测量目的:

(1) 单分子膜层检测: 绝大部分蛋白质在固体表面上形成的单分子饱和吸附膜层几何厚度在10nm以下, 膜层薄而透明, 用显微镜等方法也难以观测[5]。对于这种纳米超薄膜, 要求仪器能够以图像的形式呈现, 并用灰度值反映膜层厚度的差别。

(2) 反映生物分子相互作用: 当芯片表面固定的蛋白质分子与待检溶液中的生物分子存在特异结合性时, 膜层厚度就会显著增加。仪器要能够在一定的厚度测量动态范围内, 高灵敏度、定量地显示出蛋白质分子反应前后的膜层变化。

(3) 大面积检测: 蛋白质芯片是一种高通量的检测手段, 芯片表面可以固定多种分子, 面积为平方厘米量级, 所以仪器需要具有大面积成像的功能, 能够实现同时检测多种靶标分子。

3 小型光学椭圆偏振成像仪

该仪器的基本测量原理是: 以椭圆偏振光波照射样品, 样品会对入射光波进行调制, 样品性质的

不同导致反射光的偏振态变化, 被探测器探测, 结果以灰度图像的形式保存下来, 通过图像处理程序进一步分析, 可以得到膜层厚度等样品信息。

结合蛋白质芯片上的蛋白单元的物理模型, 当外界条件固定时, 可以推出, 反射光强是膜层(光学)厚度的函数[1]。通过优化起偏器、补偿器和检偏器的方位角设置, 可以提高系统厚度分辨率, 而且在优化设置下, 光强与膜层厚度可简化为线性关系[8]。

图1为该小型光学椭圆偏振成像仪结构示意图。光源中心波长530nm, 半带宽40nm。光束入射角为75°, 接近蛋白质芯片硅基底的准布鲁斯特角, 可以优化芯片吸附膜层和基底之间的成像反差, 获得高分辨率。厚度分辨率达到0.1nm量级, 横向分辨率为微米量级, 测量面积可达180mm², 仅取决于光学成像系统的设置。图像传感器CCD将接收的图像数字化, 以0—255灰度级(8bit)记录在计算机中, 膜层越厚, 灰度值越大。数字图像也可以通过图像处理系统, 将灰度值转换成更直观的膜层厚度的立体分布。对于10⁵以上像素的图像, 取样速度可达每秒25帧以上。实际中, 还可以采用多幅图像平均的方法, 进一步提高信噪比。仪器体积仅为37×23×11(cm³), 检测时只需将芯片水平放在样品台上, 微调台面使样品准确定位, 操作简捷方便。

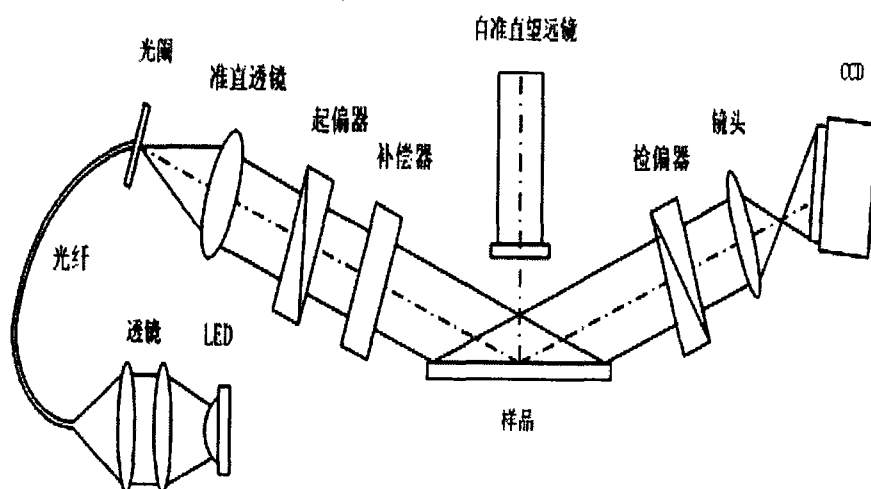


图1 小型光学椭圆偏振成像仪结构示意图

4 无标记蛋白质芯片制备

选用通过微流道蛋白质芯片系统制作的8单元蛋白质芯片作为样品, 制备方法如下:

(1) 基片处理: 把抛光硅片浸泡在体积比为

1:3 的过氧化氢 (H₂O₂) 和浓硫酸 (H₂SO₄) 混合液中, 置于摇床轻微振荡 30 分钟后, 用去离子水清洗 3 次, 再用无水乙醇清洗 3 次, 把硅片浸泡于体积比为 1:15 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷和无水乙醇混和液中反应 2 小时。再用无水乙醇清洗 3 次, 加入琥珀酸酐乙醇饱和溶液, 置于摇床轻微振荡过夜。最后再用无水乙醇洗净, 并保存于无水乙醇中待用。

(2) 蛋白质单元制备: 利用蛋白质与硅片上的羧基发生吸附反应, 在表面改性后的硅片表面上选取 8 个单元, 固定蛋白质样品。每个蛋白质单元的尺寸约为 2×0.5 (mm²), 每两个单元之间的间距为 1mm×1 mm。如表 1 所示, 在 A2、A3 单元固定生物素 Biotin, 浓度为 2.5mg/ml, 在 B 列的 3 个单元和 C 列的 3 个单元上分别固定人免疫 G 蛋白 (IgG) 和人纤维蛋白原 (Fib), 浓度为 0.1mg/ml, 反应 10~15min, 以形成饱和蛋白膜层。再选取 B2、B3 单元和 C2、C3 单元加对应的待检溶液, 即人免疫 G 蛋白抗体 (anti-IgG) 和人纤维蛋白原抗体 (anti-Fib), 检测反应时间为 10min, 使抗体有充分的机会捕捉到相应的抗原, 复合物以 IgG-AntiIgG、Fib-AntiFib 表示。

表 1 蛋白质芯片样品上各单元的名称

	A	B	C
1	空白对照	IgG	Fib
2	Biotin	IgG-AntiIgG	Fib-AntiFib
3			

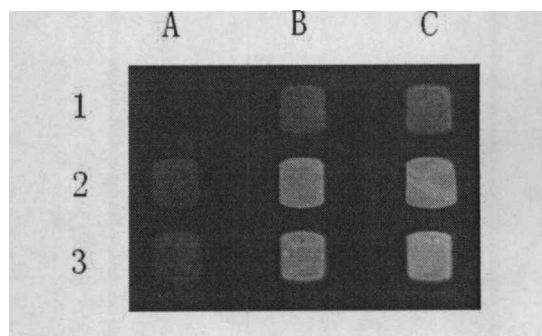
5 结果及分析

图2分别以灰度图和立体图的形式, 给出了小型光学椭圆成像仪检测蛋白质芯片的结果。表2为各单元的平均灰度值, 由于蛋白质分子的吸附不完全均匀, 每个单元上的灰度值会存在微小起伏, 这里取平均灰度以减小误差。

表2 蛋白质芯片各单元灰度值 (误差: ±2, 基底灰度80)

	A	B	C
1	/	117	133
2	94	169	194
3	95	168	198

小型光学椭圆成像系统的样品与成像系统的光轴有一夹角, 在水平和垂直的两个方向上, 样品成像时的垂轴放大率不同, 所以长方形的蛋白质单元在图像中呈近似的正方形, 由于各单元在制备时并不完全一致, 所以形状会有一定差别。由以上图表可以看出, 图像成像清晰, 亮暗对比明显, 各单元灰度值与基底明显不同, 说明各单元上都吸附了不同程度的蛋白质分子。A2、A3 和 B1、C1 单元上仅有一层饱和吸附的蛋白, 在饱和吸附的条件下, 分子量小的蛋白质质量面密度低, 灰度与基底差别小。其中 Biotin 的分子量仅有 244D, 经传统椭圆测量, 膜层厚度在 1nm 左右, 而图中 Biotin 单元与基底的灰度差为 15, 说明仪器的厚度分辨率可以达到 0.1nm 以下, 对于小分子量的蛋白膜层也能够分辨。



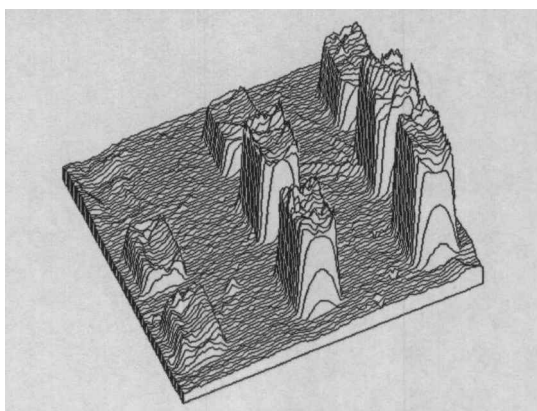


图2 蛋白质芯片的检测结果

与B1、C1单元相比，B2、B3和C2、C3单元上又结合了一层抗体分子，发生了抗原-抗体相互

作用，形成复合分子层，其质量面密度增大，膜层光学厚度增加，对应灰度值升高，说明仪器在测量范围内有效地探测到了这种生物分子的相互作用。为了保证测量的可靠性，每一列的2、3两行均作为对照单元，它们的反应结果基本相同，说明仪器能够高重复性地检测。图像上存在着一些局部像素灰度与其它明显不同，这是在样品制备过程中产生的局部污染，对于这些异常情况，通过图像可以清楚地辨别，这也体现了椭偏成像系统的优势。

以上图像和数据说明，仪器成像清楚，各膜层均能分辨和测量，不仅能对单分子膜层进行检测，还能够反映蛋白质相互作用后的膜层变化，具有对蛋白质芯片进行大面积显示和检测的能力，能有效应用于蛋白质芯片检测。

5 结论

本工作表明该简易的小型化设备能够有效地用于无标记蛋白质芯片的检测，它将有利于光学蛋白质芯片系统走向普及和实用化，在现场检测方面具有潜在的应用前景。

参考文献

- [1] G. Jin. Imaging ellipsometry revisited: Developments for visualization of thin transparent layers on silicon substrates [J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 1996, 67(8):2930-2936.
- [2] 靳刚. 光学蛋白质芯片技术及其应用 [J]. *现代科学仪器*, 2001(3):27-29.
- [3] 靳刚, 孟永宏. 生物分子吸附膜层的图像显示——光学椭偏显微成像技术应用之一 [J]. *测试技术学报*, 1998, 12(3): 166-170.
- [4] 靳刚, 应佩青. 纳米生物技术 [J]. *自然杂志*, 23(4): 211-214.
- [5] 王战会, 靳刚. 光学椭偏成像技术在生物分子研究中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(4): 429-432.
- [6] 李爱玲, 李宏伟, 张静, 等. 光学蛋白质芯片检测乳腺癌组织中胸苷磷酸化酶的临床初探 [J]. *中国微循环*, 2004, 8(4): 257-260.
- [7] 齐财, 冯静, 王战会, 等. 光学蛋白芯片技术在噬菌体M13K07检测中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(5): 856-860.
- [8] Y-Y. Chen, Y-H. Meng, and G. Jin. Optimization of off-null ellipsometry for air/solid interface [J]. *Appl. Opt.* 2007(46): 8475-8481.