

实时光学蛋白质芯片生物传感器^{*}

陈艳艳^{1,2}, 靳 刚¹

(1.中国科学院力学研究所, 北京 100080)

(2.中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 基于全内反射椭偏光学成像系统, 提出了一种实时光学蛋白质芯片生物传感器, 用于同时检测多种蛋白质分子的动态相互作用过程。叙述了该传感器的有关原理、技术及其应用实例。

关键词: 生物传感器; 椭偏光学成像; 全内反射

Real-time Optical Protein Micro-array Biosensor

CHEN Yan-yan^{1,2}, JIN Gang¹

(1. Institute of Mechanics, CAS, Beijing 100080, China)

(2. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

Abstract: In order to monitor multiple protein reaction processes simultaneously, a biosensor based on imaging ellipsometry operated in the total internal reflection mode was proposed. Its principle and detailed techniques as well as a demonstration for its applications were presented here.

Keywords: biosensor; imaging ellipsometry; total internal reflection

中图分类号: TP212 文献标识码: A 文章编号: 1812-1918(2006)06-0033-04

0 引言

生物分子相互作用是一种基本的生命现象,也是现代生命科学的重要科学问题之一。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。目前,研究生物分子动态相互作用的方法有很多,总体可分为标记与无标记方法两类。标记方法会降低生物分子活性干扰结果的分析,并且操作烦琐,因而目前的研究大多倾向于无标记方法。无标记方法大多是光学方法,如椭偏方法、光谱方法、干涉方法和表面等离子体共振(SPR)方法等。SPR是获得实用的技术,在静态研究方面可实现高通量、

高灵敏度检测^[1-3],但在研究动态相互作用方面只能实现低通量测量^[4]。

椭偏术也是很早就用于分析生物分子之间相互作用的光学技术。以偏振光波为探测光照射待测样品,反射光波的偏振态受样品表面调制会发生变化,椭偏技术正是通过测量这一变化来得到样品的信息(如,折射率和厚度)。当反射界面上存在生物分子薄膜时,光波的偏振态会发生显著的变化,这是由于椭偏对光波相位变化极其灵敏,因而同SPR这类反射技术相比,椭偏技术更适合于单分子薄膜的检测,而生物分子膜层大都在纳米尺度。基于椭偏光学成像技术^[5-7],48单元蛋白质芯片生物传感器已经实现。该生物传感器技术是一种高灵敏度光学无接触、无扰动、无标记的多元生物分子检测技术,能使蛋白质溶液运输、蛋白质芯片的制备与蛋白质相互作用均在同一蛋白质反应器系统内实现。在静态检测方面,能够实现多达

收稿日期: 2006-08-16

* 基金项目: 国家自然科学基金(90206029)与中国科学院知识创新工程重大项目(KJCX1-SW-07)

48单元的蛋白质芯片制作及蛋白质相互作用,具有分子反应快,样品消耗少(约10微升量级),检测灵敏度高等优点。然而,在动态检测方面,由于将芯片全部浸入样品溶液,使得样品消耗在毫升量级,并且只能对单一溶液样本内的分子进行检测、检测结果受溶液透明度和流体扰动影响。因此,本文提出全内反射椭偏成像系统,基于此系统,开发一种实时光学蛋白质芯片生物传感器。

1 实时光学蛋白质芯片生物传感器

基于全内反射椭偏光学成像(TIRIE)系统,本文提出一种新型微阵列蛋白质芯片生物传感器,用于实时检测生物分子动态相互作用。图1显示的TIRIE系统是椭偏光学成像系统、玻璃棱镜和微流道系统的有机组合。该系统继承了椭偏光学成像系统的优点,如具有高空间分辨率、无扰动、快速检测、直观显示,可实现无标记生物分子静态或动态相互作用的自动化检测及定性和定量测量等等,有关技术细节在文献[5]~[7]中有详细描述。

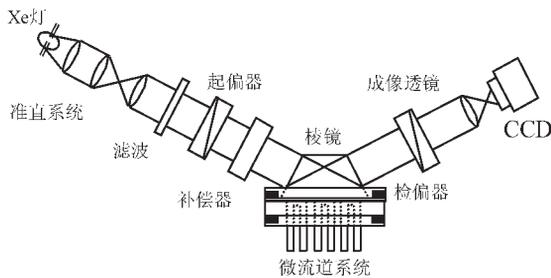


图1 TIRIE生物传感系统结构示意图

为使系统工作在全内反射条件下,选用光学性质相同的玻璃棱镜与玻璃片共同作为光密介质,玻璃片一侧通过涂有光学性质相近的液体,与棱镜紧密接触,另一侧镀有金膜层作为反射介质,同时也是传感器的基底,用于固定探针生物分子,并与含有目标分子的待测溶液接触。在全内反射条件下^[9],入射光经起偏器和补偿器垂直入射到玻璃棱镜中,到达金属薄膜表面发生全反射,此时,金膜表面存在倏逝波。生物分子在基底表面吸附的同时对倏逝波进行调制,使得反射光的偏振态发生变化。椭偏对光波相位变化极其灵敏,可据此变化检测到生物分子膜层的信息。此外,倏逝波检测不受溶液流动扰动和溶液混浊的影响。反射光

经检偏器、成像透镜入射到CCD摄像机上,结果以数字图像(8比特,0-255灰度级)形式记录在计算机中。对于105以上像元的图像,采样时间可达0.08S/帧,可以进行生物分子动态相互作用检测。

1.1 工作原理

基于TIRIE系统的光学蛋白质芯片生物传感器,其基本测量原理是:将具有生物活性的生物分子作为感应分子(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。当感应表面与含有目标分子的溶液接触时,如果溶液中的目标分子与探针上的配基之间发生特异性结合,就会生成生物分子复合物,固体表面生物分子面密度发生变化。此变化可以通过全内反射椭偏光学成像系统观测到。根据该变化就可判定溶液中是否含有能够与配基分子发生特异性结合的目标分子,反应的整个动态过程也同时被记录下来,用于进一步分析生物分子相互作用的动态参数。生物活性探针的结构、检测以及动态测量曲线结果如图2所示。多元蛋白质芯片实质上就是根据芯片设计和配基的定向装配,将多个不同的生物活性探针以阵列式集成在同一基底上,每一个蛋白质阵列微单元对应一种生物活性探针。

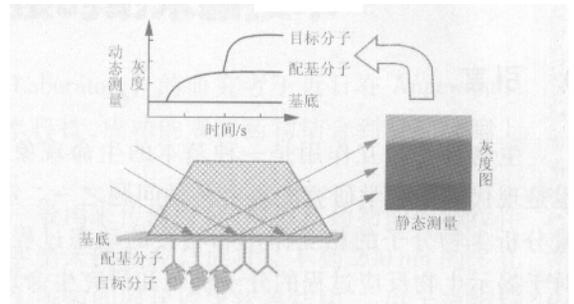


图2 实时光学蛋白质芯片生物传感器的基本测量原理

1.2 微流道反应器系统

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。为此,设计实现了微流道(8×6阵列单元,单元体积在50nL~1mL范围内)微阵列反应器^[9],兼有分子传输和分子反应器功能。采用微流道系统,可以将多种不同探针分子溶液分别输送到各自微阵列单元中,同时在

基底表面固定。一种待测溶液可以以串行方式输运到每一单元或多种待测溶液以并行方式同时输运到各个微阵列单元中。它可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。

1.3 量化测量

椭圆偏光学成像系统采用的是起偏器-补偿器-样品-检偏器的结构设置(图 1)。根据椭圆偏原理^[10],探测器探测光强与系统设置、样品属性的关系如式(1)所示:

$$I=K(|R_s|^2/2)\{[1+\cos 2C\cos 2(P-C)]\cos^2 A\sin^2 +[1-\cos 2C\cos 2(P-C)]\sin^2 A +[\sin 2C\cos 2(P-C)\cos -\sin 2(P-C)\sin]\sin 2A\sin \}$$
 (1)

式中: I 表示探测光强;

K 是常数,与系统各器件的性质有关;

P, C, A 分别代表起偏器、补偿器与检偏器的方位角;

R_s , 与系统设置、样品的光学属性(如折射率、厚度等)相关。

这样,通过式(1),在系统设置固定的情况下,探测光强的变化就只与样品的变化有关。

椭圆偏光学成像系统以一个光强均匀分布的扩展光束作为探测光束, CCD 摄像机作为光探测器,就可以实现一个大面积样品的检测。对于蛋白质芯片这种样品,不同的单元上固定着不同的蛋白质分子,以及反应后形成不同的复合分子层,导致各单元上的膜层厚度的差异。不同的膜层厚度引起不同的偏振状态的变化,因此芯片表面上的各单元的探测光强不同。在系统设置固定的前提下,样品膜层厚度 d 与探测光强 I 之间存在函数关系:

$$d=f(I) \quad (2)$$

式中: f() 表示函数关系。

进一步地,蛋白质膜层的表面面密度(surface concentration,)和厚度之间存在如下关系:

$$(\mu\text{g}/\text{cm}^2) \quad k \times d(\text{nm}) \quad (3)$$

式中: k 为常数^[11]。

这样通过探测样品的光强,即可得到蛋白质

膜层的表面面密度情况。

测量过程中分辨率的高低是一个关键因素。全内反射椭圆偏成像系统中,影响测量分辨率的因素主要有:起偏器、补偿器、检偏器、波长、入射角度以及金属膜层厚度等的设置。测量时,必须综合考虑这些因素进行系统设置,以实现生物分子相互作用的有效测量。此外,通过基底表面改性技术,实现探针分子在检测单元表面的有效固定、活性保持、稳定性和表面探针分子面密度控制,有利于优化生物分子动态相互作用分析条件。

2 应用

利用全内反射椭圆偏光学成像系统,对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)与其抗体(HBsAb)的动态相互作用进行了实时检测。实验中采用 SF10 玻璃,入射角度 59°;波长 632.8 nm。整个检测过程包括 HBsAb 在金膜表面的吸附、磷酸盐缓冲液(PBS: 100 mmol/L 磷酸盐, 100 mmol/L 氯化钠, pH=7.4)清洗,牛血清白蛋白(BSA)的封闭,以及 5 种不同浓度的 HBsAg 与 HBsAb 的相互作用过程。利用微流道系统,首先将溶液浓度 0.1 mg/mL 的 HBsAb 分别输送到 5 个独立的单元中,流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。10 min 后,注入 PBS 缓冲液,清洗 10 min,然后将 10 mg/mL 的 BSA 注入各单元中封闭 10 min,再用 PBS 缓冲液清洗 10 min,最后将五种不同浓度(分别为 80、60、36、24 和 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 HBsAg 溶液以相同流速流经 5 个单元,使得抗原抗体发生相互作用。5 个单元反应的全部过程经全内反射椭圆偏成像系统探测并记录下来,结果见图 3。可见利用该系统,多样本、多过程反应可同时被检测。

3 结语

全内反射椭圆偏光学成像技术不需对生物分子进行标记,不破坏生物分子,同时具有视场大的优点,为发展高通量生物传感器提供了可能。利用微流道技术,使得蛋白质芯片微阵列的制作、生物分子溶液的输运和生物分子的相互作用在同一微系统中实现,在实现高通量检测的同时,大大降低了样品消耗。倏逝波检测避免了溶液扰动和溶液透明度的影响,位相响应提供了高探测灵敏度等。这些都为光学蛋白质芯片生物传感器的潜在应用

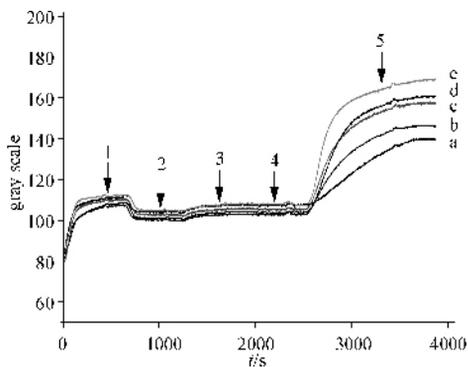


图3 曲线 a-e 分别表示五种不同浓度的乙肝表面抗原 (HBsAg) 与其抗体 (HBsAb) 相互作用的全过程。区域 1 是 HBsAb 在基底表面的固定 (浓度 0.1 mg/mL) 过程; 区域 2 对应 PBS 溶液的清洗过程; 区域 3 是牛血清白蛋白 (浓度 10 mg/mL) 进行封闭的过程; 区域 4 仍然是 PBS 溶液的清洗过程; 区域 5 是 HBsAb 与 HBsAg 相互作用过程, 其中曲线 a-e 对应的 HBsAg 浓度依次为: 80, 60, 36, 24 和 12 $\mu\text{g/mL}$ 。

提供了可能。

参考文献

[1] Yuk J.S., Kim H.S., Jung J.W., et al. Analysis of Protein Interactions on Protein Arrays by a Novel Spectral Surface Plasmon Resonance Imaging [J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21: 1521- 1528.

[2] Huang H.W. Chen Y., Label-free Reading of Microarray-based Proteins with High Throughput Surface Plasmon Resonance Imaging[J]. Biosens Bioelectron, 2006.

[3] Wu C.M., Jian Z.C., Joe S.H. et al. High-sensitivity Sensor Based on Surface Plasmon Resonance and Heterodyne Interferometry [J]. Sensors and Actua. B:Chem., 2003,92:133- 136.

[4] Par Safsten, Scott L.K., Andrew W.D. et al. Screening Antibody- antigen Interactions in Parallel Using Biacore A100[J]. Analytical Biochemistry: 2006.

[5] JIN G, Tengvall P., Lundström I. et al. A Biosensor Concept Based on Imaging Ellipsometry for Visualization of Biomolecular Interactions [J]. Anal. Biochem. 1995,232: 69- 72.

[6] Wang Z.H., Jin G. A Label-free Multisensing Immunosensor Based on Imaging Ellipsometry [J]. Anal. Chem. 2003,75(22): 6119- 6123.

[7] Jin G, Jansson Roger, Arwin H. Imaging Ellipsometry Revisited: Development for Visualization of Thin Transparent Layers on Silicon Substrate [J]. Rev Sci Instrum, 1996, 67(8):2930- 2936.

[8] Arwin, H, Poksinski, M, Johansen, K. Total Internal Reflection Ellipsometry: Principles and Applications[J]. Appl. Opt. 2004, 43: 3028- 3036.

[9] Jin G., Wang Z.H., Qi C., et al. A microfluidic System for Microarray Fabrication and Biomolecule Interaction [A]. EMBEC'05, 3rd European Medical & Biological Engineering Conference, Prague, Czech Republic [C]. 20- 25.

[10] Azzam R M A, Bashara N M. Ellipsometry and Polarized Light, North-Holland, Amsterdam, 1987.

[11] Stenberg M. Nygren H. The Use of the Isoscope Ellipsometer in the Study of Adsorbed Proteins and Biospecificbinding Reactions [J]. J. Phys. 1983,33:83- 86.

作者简介

陈艳艳(1976-),女,吉林省人,中国科学院力学研究所博士研究生。主要研究纳米尺度薄膜表征和椭圆技术。

靳刚(1957-),男,研究员,博士生导师。法国巴黎皮埃尔居里大学理学博士。现任中国科学院基础研究重点发展战略规划专家(纳米材料和纳米器件);中国科学院纳米科技中心学术委员会委员;中国科学院知识创新“十五”重大项目首席科学家;中国医学科学院微循环所特聘研究员,生物芯片实验室主任,学术委员会副主任委员。完成国家自然科学基金项目和中科院重点项目多项。已经发展了研究生物分子特性的光学生物传感器和光学生物分子芯片技术等。主要研究方向为纳米生物工程,包括生物分子材料科学,三维纳米生物构造,蛋白质芯片技术和生物分子光学检测技术等。

硅粒子可激发蛋白质活力

瑞典林雪平大学的科学家说,他们设计了一种带正电荷的缩氨酸,并将这种缩氨酸与直径约9纳米的球状硅粒子溶液混合。当缩氨酸从溶液中释放出来处于游离状态时,它不具备任何结构,但当缩氨酸与带负电荷的硅粒子相碰撞并发生化合反应时,缩氨酸呈现出螺旋状结构,最终形成一种硅粒子与功能性蛋白质的化合物。当科学家给缩氨酸添加氨基酸时,这种化合物会呈现出催化剂的特性,其功能类似细胞中酶的功能。科学家认为,这一研究成果可望应用于多个领域,如识别有机分子和精确控制化学反应的催化等。此外,这一成果还有助于人们认识生命的起源。

摘自《科技日报》