

- [51] GUO Y C, ZHOU Y F, ZHANG X E, et al. Phage display mediated immuno-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: e62
- [52] GUO Y, LIANG X, ZHOU Y, et al. Construction of bifunctional phage display for biological analysis and immunoassay [J]. *Anal Chem*, 2010, 396: 155-157.
- [53] CELLO J, PAUL A V, WMMER E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template [J]. *Science*, 2002, 297: 1016-1018
- [54] SMITH H O, HUTCHISON CA 3rd, PFANNKUCH C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly phage X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15440-15445.

(本文编辑: 颜焕敏)

• 综 述 •

## 无标记椭圆成像蛋白质芯片生物传感器及其生物医学应用

陈涉, 靳刚

(中国科学院力学研究所 国家微重力实验室, 北京 100190)

**[摘要]** 无标记椭圆成像蛋白质芯片生物传感器系统是椭圆成像光学检测技术结合微流道反应阵列技术建立起来的一种新型的生物传感器系统。该系统广泛用于生物医学领域, 包括抗体筛查、乙肝标志物检测、肿瘤标志物谱和病毒检测等。为了进一步改进传感器的性能和提升检测指标, 使其能够满足生物医学应用的进一步需求, 作者在原有技术系统的基础上引入了全内反射模式、光谱光源、低噪声科学 CCD, 对偏振器件的相位角进行了优化设置。与原系统对比, 传感器的检测灵敏度提高了一个量级, 检测极限提高了 50 倍, 同时系统具有 48 个独立通道, 时间分辨率为 0.04 s。

**[关键词]** 无标记; 椭圆成像; 蛋白质芯片; 生物传感器; 全内反射; 文献综述

**[中图分类号]** R318.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-6264(2011)01-0099-06

doi:10.3969/j.issn.1671-6264.2011.01.018

蛋白质芯片技术是一种新型蛋白质分析技术, 基于椭圆成像技术提出的光学生物传感器的概念<sup>[1-2]</sup> 已经有 15 年的历史, 这项技术可以在很小的固体表面上, 通过表面格式化和表面改性, 以阵列方式集成多种蛋白质活性, 利用生物分子的特异结合性和高分辨的光学椭圆成像相结合, 仅需微量生理或生物采样, 即可以同时检测、识别或纯化不同的生物分子, 研究分子之间的相互作用; 不需要样品预处理和特殊标记, 就可以直接测量血浆(或血清)、尿液、唾液、淋巴液和细胞裂解液等生理样品。其高空间分辨能力及高通量的特点, 可以同时完成多元目标物或多样本的同时分析。

蛋白质芯片技术可用于快速蛋白质检测、药物筛选和蛋白质功能分析等。

文献<sup>[3]</sup>报道了基于椭圆成像技术的亲和力生物芯片(Affinity Biochip), 完成了针对 900 个目标的探测工作, 说明椭圆生物传感器具有高通量检测能力。自动化椭圆生物传感器以及微流道系统的研发, 已经完成了蛋白质膜层厚度分布和溶液中蛋白质浓度的定量检测<sup>[4-6]</sup>。微流道反应器阵列结合全内反射椭圆成像(TIRIE)技术使系统进一步具有实时检测生物分子相互作用的能力<sup>[7-8]</sup>。零椭圆以及非零椭圆优化方法的引入, 使得样品膜层厚度的分辨能力得到了进一步

**[收稿日期]** 2010-11-10 **[修回日期]** 2010-12-06

**[基金项目]** 中科院知识创新方向性项目(KJCX2-YW-M03); 中科院知识创新方向性项目(KJCX2-YW-M04); 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2009CB320300); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA02Z419); 国家自然科学基金项目(20805053)

**[作者简介]** 陈涉(1971-), 男, 浙江宁海人, 理学硕士, 助理研究员。E-mail: schen@imech.ac.cn

**[通信作者]** 靳刚 E-mail: gajin@imech.ac.cn

提高<sup>[9-10]</sup>。

在椭圆成像传感器的基础上已经发展成一个集蛋白质分析, 无标记、定量、高通量和实时分析蛋白质相互作用过程的技术平台。它的原理、方法和相关技术单元已经在另外的文章中进行了报道<sup>[5-6]</sup>。

最近几年的工作中, 针对原有技术系统进行了全面的升级改造<sup>[11]</sup>, 包括作为采样单元的椭圆成像系统, 作为生物分子反应单元的微流道反应阵列, 以及包含了生物学应用的生物传感器检测信息的数据库系统。

## 1 无标记蛋白质芯片的目的和意义

生物芯片技术具有并行、快速和自动化分析的特点, 应用前景引人注目, 已成为现今生物医学工程的重要组成部分。生物芯片技术包括: 基因芯片即 DNA 芯片、蛋白质芯片或叫生物分子芯片、细胞芯片和组织芯片以及药物芯片、生物电子芯片等技术。

蛋白质是一切生命的物质基础, 到目前为止, 已知的人体中存在的蛋白质种类达数十万种之多, 其功能各异, 在机体中各行其职。蛋白质的组成具有多样性和可变性, 蛋白质的表达受多种因素的调控。在生命发育的不同阶段, 蛋白质的种类和构成都是不一样的, 不同组织中细胞表达的蛋白质有很大的差异; 在病理或治疗过程中, 细胞蛋白质的组成及其变化与正常过程中的也有不同。因此, 蛋白质的研究是在一个更加深入、更贴近生命本质层面上去探讨和发现生命活动的规律, 揭示生理和病理现象的本质。随着人类对于蛋白质的认识, 为了解人体的健康状况, 进一步诊断和治疗疾病, 识别和检测蛋白质是一种非常重要的技术手段。

国际上绝大多数蛋白质芯片技术采用了标记方法(包括荧光标记法、酶标记法等)。标记方法的优势非常明确, 但是也存在一定的不足, 比如: (1) 蛋白质分子不具有均一的化学性质, 使得标记方法很难成为定量分析方法; (2) 被标记蛋白质分子生物活性受到一定的影响; (3) 对已知的数十万种蛋白质分子进行化学标记所消耗的财力、物力难以想象。因此无标记蛋白质芯片检测技术(如表面等离子体共振技术及其衍生技术、反射干涉光谱技术、椭圆光学成像技术等)应运而生, 这些技术的优势在于采用单一无标记试剂即可检测溶液中的靶分子, 很好地避免了标记所带来的问题。

光学蛋白质芯片系统是探测和研究蛋白质的新技术。此方法将高分辨率的光学显微成像技术和集成化多元蛋白质芯片技术相结合, 形成了新型并行、快速生物分子识别和检测技术。它无需预处理和标记样品, 对生物活性影响小, 还可以检测生物分子反应的动力

学参数, 从而获得很多传统技术所难以提供的信息, 有望用于生物医学研究、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。

## 2 蛋白质芯片研究的主要内容及研制过程

概括地讲, 蛋白质芯片技术(图1)主要包括以下5部分内容: (1) 芯片设计。根据待测分析物及靶分子设计芯片的结构和操作流程。(2) 配基装配。将具有生物特异性识别的配基分子有效组装在芯片的既定位置, 并保持其生物活性。(3) 芯片反应器。是配基分子与待测物反应的空间环境, 可以对反应条件进行调控。(4) 芯片信号采样和处理。将分子相互作用的结果读出, 并转化成可视物理信号, 由此反推出待测物的信息。(5) 芯片数据库。提供芯片的历史数据和基本参数, 供对比和参考。

蛋白质芯片是一种蕴含多学科知识的系统工程, 为蛋白质的分析和检测提供了一种新型技术平台。它的应用不仅仅局限于蛋白质检测, 还可以用于蛋白质识别、特异位点研究、药物筛选以及蛋白纯化等等。根据应用目标的不同, 蛋白质芯片需要进行特殊设计。以疾病相关的蛋白质检测为例, 在诊断乙型肝炎时, 国际公认的检测指标为5项[乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗原抗体(antiHBsAg)、乙肝e抗原(HBeAg)、乙肝e抗体(antiHBeAg)和乙肝核心抗原抗体(antiHbcAg)]。这5项指标通常需要在医院化验室里经过1d或者更长的时间, 用常规免疫检测方法逐项进行。如果采用蛋白质芯片来检测, 可以在一片乙肝诊断芯片上分别装配针对5项检测的配体, 在1h内即可同时完成5项检测, 且只需要几十微升血液即可完成所有的检测, 显著地降低了样品消耗<sup>[12]</sup>。

在检测对象确定以后, 芯片设计的一个重要环节就是确立特异性生物学系统, 即具有生物特异结合性的分子对或分子组合, 如配体-受体、蛋白-蛋白、抗原-抗体、病毒-受体等等, 并优选配基, 以此为基础实现配基和待测生物分子在芯片表面上的特异性结合。

随着分子生物学和生物化学的发展, 人们已经认识到生物分子是一些空间结构非常复杂的有机大分子, 而生物活性则仅表现在某些特定的位点上, 配基的使用实际上是配基分子上活性位点的利用。蛋白质芯片是由装配在芯片表面上的多个表面生物探针组合而成。通常情况下, 由于生物分子和芯片基底的相互作用, 会造成生物分子在表面的变形和变性, 使生物活性减弱甚至消失。为了充分保持配基在芯片表面上的生物活性, 需要研究和设计芯片表面的蛋白质活性装配,

这涉及基底的选择及生物相容性、表面化学性质、光学特性。为此进行表面改性, 包括物理、化学、生物化学及其组合表面的改性, 以适合配基的装配。为了获得高灵敏的检测, 配基的来源、装配点、活性位点、表面位阻、非特异性阻隔、特异活性维持等诸多问题, 都需要进行统筹考虑并逐一解决<sup>[5]</sup>。

一个典型的蛋白质检测芯片是一个组合了多种生物活性探针的表面阵列, 表面积可以从平方毫米到平方厘米量级, 这视需要而定。检测时, 活性表面需要与待测的生物分子溶液相接触, 这需要芯片反应器。分子表面相互作用、分子间相互作用、多面元独立处理和样品检测的串并行、反应条件、结合速率、试剂用量、清洗、均一性等问题将在微小的芯片反应器中得到体现<sup>[13]</sup>。

在芯片的不同区域, 所装配的各种配体与待测溶

液中所对应的生物分子发生特异性结合, 生成生物分子复合物, 就会改变芯片表面的分子面密度。这种变化可以通过芯片检测系统读出, 获得芯片的阵列数据, 以作进一步处理。此芯片检测系统是一种具有高空间分辨率的光机电组合的非接触型光学显微成像系统, 它的控制、设置、调试、稳定性、噪声、时空分辨率、均一性、校对、信号采集、多元信息处理以及人机对话等均由计算机自动化操控<sup>[4]</sup>。

由于蛋白质的种类繁多, 仅人体内就超过十多万种, 蛋白质芯片数据库将为用户提供: 蛋白质种类、配基、试验条件、静态、动态检测结果等, 包括了蛋白质芯片的历史数据, 供对比和参考。

针对蛋白质芯片技术实际的物理系统包括以下 4 个部分 (图 1): (1) 全自动微流道蛋白质微阵列芯片

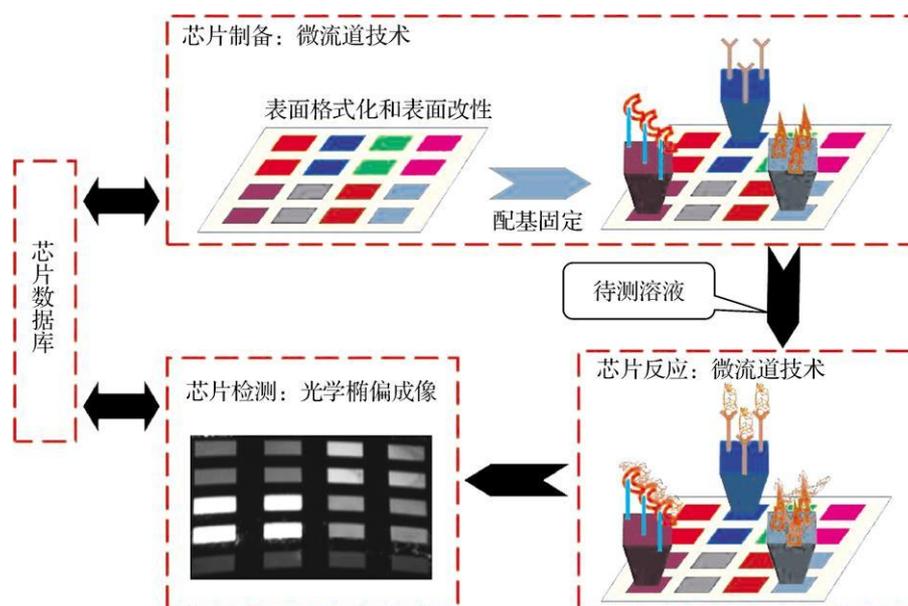


图 1 蛋白质芯片生物传感器系统结构示意图

Fig 1 Schematic of protein chip biosensor system

反应器。反应器集溶液运输、配基组装、表面封闭、分子反应、清洗等自动流程, 可重复使用, 使得芯片的制作成本极大地降低; 主动式反应模式使生物分子间的相互作用时间缩短到分钟量级; 微反应单元使得试剂和样本的消耗仅微升量级; 同时得以实现优于  $\text{ng} \cdot \text{m}^{-1}$  量级的检测灵敏度。(2) 全自动蛋白质芯片检测系统 (图 2 3)。检测系统以数字图像的方式实现芯片读数采样、存储和分析及结果输出等功能。(3) 蛋白质芯片系统软件 (图 4)。系统软件涵盖全部技术系统的自动控制、操作、管理及分析等。(4) 蛋白质芯片数据库 (图 5) 为用户和研究人员提供历史数据和技术支撑。



图 2 全内反射椭圆偏成像生物传感器实验系统

Fig 2 Practical system of the total internal reflection ellipsometry imaging system

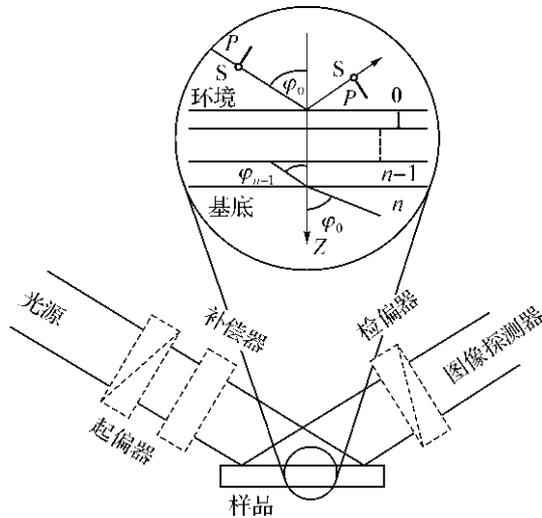


图 3 全内反射椭圆偏成像系统结构示意图

Fig 3 Schematic of the total internal reflection ellipsometry imaging biosensor

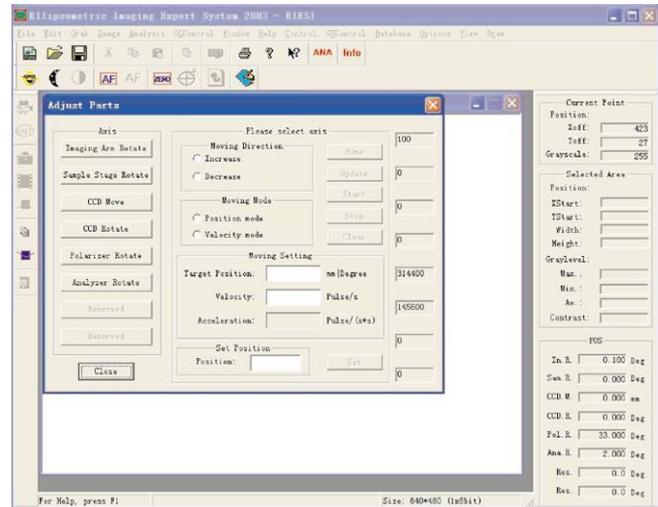


图 4 蛋白质芯片系统软件

Fig 4 Software of protein chip biosensor system

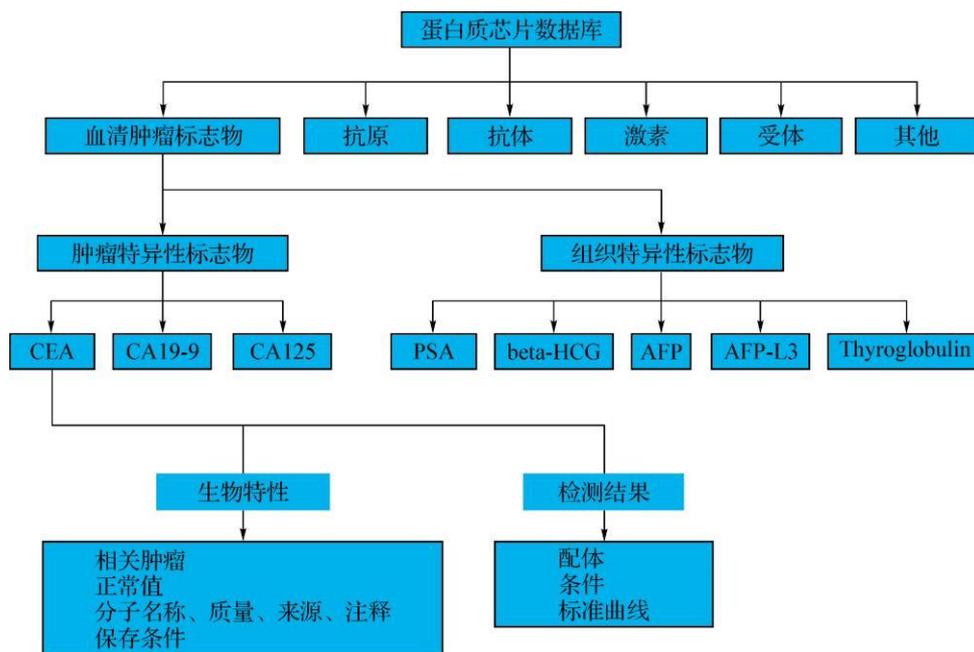


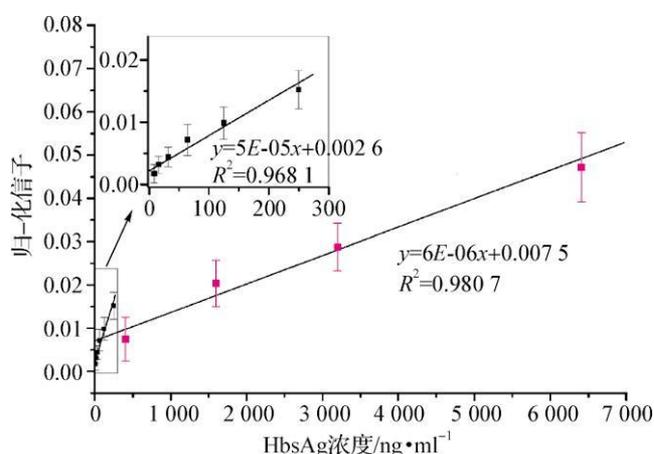
图 5 蛋白质芯片数据库

Fig 5 Database of the biosensor

为了进一步提升技术系统的检测极限并使其具有实时动态检测的能力,最近的研究在原有的系统中引入了全内反射模式,同时应用光谱技术,实现了传感器系统的光谱检测,检测范围为 400~700 nm,获得了更高的检测灵敏度。在传感器系统中应用低噪声成像技术,有效地提升了传感器的动态范围和信噪比<sup>[11]</sup>。

相关研究的技术内容主要包括以下几个方面:  
(1) 提升传感器光学采样系统的构成和设置,在传感器系统中实现光谱检测、偏振态优化以及低噪声成像

技术;(2) 完成了微流道实时反应器系统的工程化设计、加工以及与光学采样系统的耦合,在此基础上,优化了流速和表面改性等实验条件;(3) 实现了系统的自动化操作和控制。利用改进后的传感器系统对乙肝表面抗原进行检测(图 6),检测灵敏度提高了 1 个量级,检测极限提升 50 倍,达  $8 \text{ ng mL}^{-1}$ 。由于引入全内反射模式和自动加样系统,实现了反应过程的动态监测,时间分辨率达 0.04 s。



图中放大部分为优化系统获得的数据点

图 6 乙肝表面抗原的浓度与传感信号的关系

The zoom is the data obtained by the biosensor with optimization

Fig 6 The normalized transduction signal versus the concentration of HbsAg

### 3 蛋白质芯片的特点<sup>[6]</sup>

蛋白质芯片具有以下特点。

(1) 直接测量非纯化分析物。在进行生物分子的特异性结合研究时, 可以直接测量非纯化分析物。  
 (2) 多元样品同时检测。由于用于观测样品的面积大, 所以能够用于多元样品观察, 在同一表面上可以同时观察几个、几十个、上百个以至更多样品单元。此技术可以同时检测体液中的多种蛋白质, 同时测量多对生物分子, 包括蛋白质、核酸、多糖、磷脂、甚至生物小分子, 以及候选药物的分子间相互作用的情况。它提供了同时分析多元分子溶液综合信息和多样品检测的技术手段。  
 (3) 样品用量少。采用了可以达到次单分子膜层分辨能力的光学成像技术和集成蛋白质芯片技术, 样品用量仅在 10 μl 量级。  
 (4) 样品无需任何标记物。直接测量生物分子的特异性结合所形成的生物分子复合物, 并不需要象酶联免疫或放射免疫法那样对生物分子作标记, 不会对待测生物分子活性造成任何扰动和损伤。  
 (5) 实时检测生物分子相互作用的动态过程。可以实时测量多对生物分子的分子间相互作用过程, 如分子间是否存在特异性结合、结合的强度和速度、解离的快慢以及结合部位的分析, 可以获得生物分子反应的动力学信息。  
 (6) 具有分辨和排除干扰信号能力。面阵式芯片测量具有分辨和排除干扰信号能力。  
 (7) 检测速度快。电子图像采样具有快速摄取图像的能力, 为生物分子动力学研究提供了可能。  
 (8) 结果直观。检测结果均以数字图像形式输出, 可以进行定性和定量测量。

### 4 生物学应用

最近几年利用无标记蛋白质芯片开展了一系列生物学应用。如肿瘤标志物 CD 146 的定量检测、蓖麻毒素的抗体筛查、乙型肝炎 5 项指标同时检测<sup>[12]</sup>, 各种病毒检测<sup>[14-15]</sup>, 以及最近开展的针对肿瘤标志物的检测工作。其中针对 CD 146 (该标志物最初被鉴定为恶性黑色素瘤的标志物, 后来发现在乳腺癌、卵巢上皮细胞癌患者中其含量也异常升高) 的血清样本进行定量检测 (图 7-a), 结果发现与酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测 (图 7-b) 具有很好的相关性, 检测灵敏度达到了 ng ml<sup>-1</sup>。

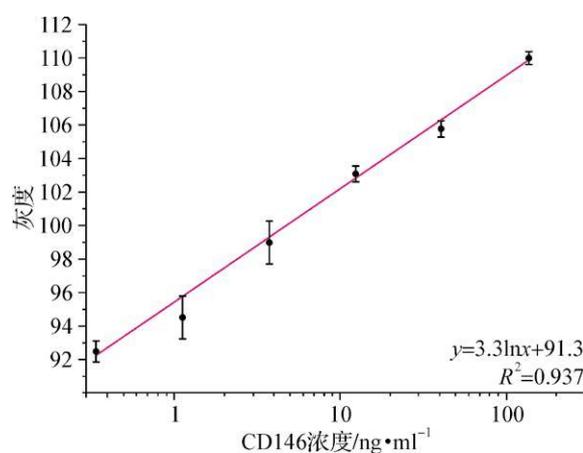


图 7-a CD146 定量检测标准曲线

Fig 7-a The calibration curve for quantitative detection of CD146

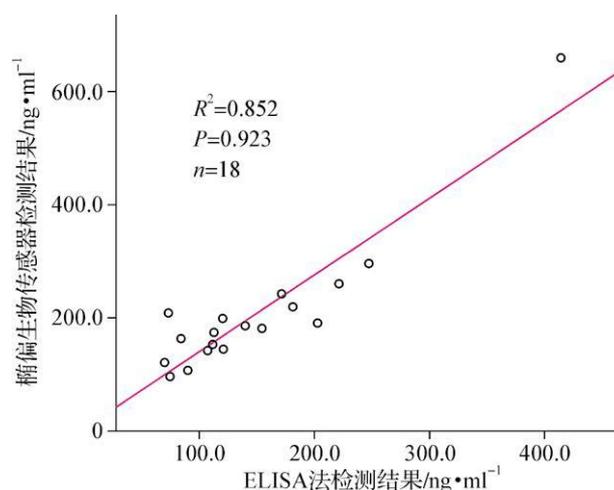


图 7-b 椭圆偏生物传感器和 ELISA 检测结果比较

Fig7-b Comparison between BIE and ELISA for CD146 detection of 18 patient sera

无标记蛋白质芯片所获得的检测结果为医学诊断、药物筛选和分子生物学的研究与发展提供了全新的技术平台。由此获得其他方法无法提供的信息, 为

一些尚无答案的生物医学理论问题提供解答, 为病毒检测和识别提供了便捷的手段。

到目前为止, 这项技术已经在以下领域进行了应用尝试: (1) 蛋白质组学研究; (2) 优化免疫测定; (3) 筛选、鉴定受体或配体; (4) 免疫特异识别机制的研究; (5) 内分泌激素检测; (6) 血检指标控制; (7) 蛋白活性筛选; (8) 流行病病原体监控; (9) 蛋白类药物鉴定; (10) 常规门诊指标检查等。

此技术已经引起生物医学界一些研究者的关注, 并尝试在医药界进行推广应用, 希望进一步建立起开放检测中心。技术的产业化已着手开展, 主要开发的产品包括: (1) 光机电一体化芯片检测系统(全内反射单元和实时加样系统可选); (2) 根据需求供应针对各种分析和检测对象所设计制造的光学蛋白质芯片; (3) 低样品消耗和快速的芯片反应器系统, 以及特定用途的专家系统。

#### [参考文献]

- [1] JIN G, TENGVALL P, LUNDSTRM I et al A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interactions[J]. *Anal Biochem*, 1995, 232(1): 69-72
- [2] JIN G, JANSSON R, ARWIN H. Imaging ellipsometry revisited: developments for visualization of thin transparent layers on silicon substrates[J]. *Rev Sci Instrum*, 1996, 67(8): 2930-2936
- [3] GERWEN P V, LAUREYN W, CAMPITELLIA, et al Cost effective realization of nanoscaled interdigitated electrodes [J]. *J Microelectromechanics* 2000, 10(3): N1
- [4] JIN G. Development of biosensor based on imaging ellipsometry[J]. *Physica Status Solidi A*, 2008, 205(4): 810-816
- [5] WANG Z H, JIN G. A label free multisensing immunosensor based on imaging ellipsometry[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(22): 6119-6123
- [6] 陈涉, 靳刚. 无标记椭圆成像蛋白质芯片生物传感器[J]. *世界医疗器械*, 2009, 15(9): 22-26
- [7] CHEN Y Y, WANG Z H, MENG Y H, et al Biosensor with total internal reflection imaging ellipsometry[J]. *Int J Nanotechnol* 2007, 4(1-2): 171-178
- [8] ARWIN H, POKSINSKIM, JOHANSEN K. Total internal reflection ellipsometry principles and applications[J]. *Appl Opt* 2004, 43(15): 3028-3036
- [9] CHEN Y, MENG Y, JIN G. Optimization of off null ellipsometry for air/solid interfaces[J]. *Appl Opt* 2007, 46(35): 8475-8481
- [10] MENG Y, CHEN S, JIN G. Spectroscopic imaging ellipsometry for characterization of nanofilm pattern on Si substrate [J]. *Chinese Optics Letters*, 2010, 8(s1): 114-118
- [11] LIU L, NIU Y, CHEN S et al Optimization of evanescent wave imaging for the visualization of protein adsorption layers [J]. *Science China Physics Mechanics & Astronomy* 2010, 53(10): 1805-1810
- [12] QI C, ZHU W, NIU Y, et al Detection of hepatitis B virus markers using a biosensor based on imaging ellipsometry[J]. *J Viral Hepatitis* 2009, 16(11): 822-832
- [13] WANG Z H, MENG Y H, YING P Q, et al A label free protein microfluidic array for parallel immunoassays [J]. *Electrophoresis* 2006, 27(20): 4078-4085
- [14] QI C, TIAN X-S, CHEN S et al Detection of avian influenza virus subtype H5 using a biosensor based on imaging ellipsometry[J]. *Biosensors and Bioelectronics* 2010, 25(6): 1530-1534
- [15] QI C, LIN Y, FENG J et al Phage M13KO7 detection with biosensor based on imaging ellipsometry and AFM microscopic confirmation[J]. *Virus Res* 2009, 140(1-2): 79-84

(本文编辑: 颜焕敏)

本刊唯一投稿网址: [www.ddxbyxb.cn](http://www.ddxbyxb.cn)