

利用一种光反射差法同时监测两种蛋白的结合反应

王旭^{1,2} 孔艳¹ 朱焯炜¹

¹江南大学理学院, 江苏 无锡 214122

²加州大学戴维斯分校物理系, 美国 加利福尼亚州 95616

摘要 在检测未知样品中是否含有某种病毒或细菌时,通常可以利用该病毒或细菌的已知特异性探针来检测未知病毒或细菌的抗原成分。但通常单一样品中也会有多种病毒或细菌,利用各种已知探针逐个检测样品效率较低,有必要发展新的检测方式提高检测通量。这里进行了利用两种探针混合液同时检测同一样品中两种蛋白的实验。实验中利用一种光反射差方法实时监测样品点与混合探针的反应曲线,通过对曲线的分析拟合,可以确认样品中有两类蛋白存在。实验结果证实,利用该反射差法结合混合探针能更高效地检测含有病毒或细菌的样品,可能是提高检测通量的一种方式。

关键词 表面光学; 反射差法; 反应曲线; 实时监测

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.122402

Real-Time Binding Reactions Detected by Optical Reflectivity Difference from Blended Protein Samples

Wang Xu^{1,2} Kong Yan¹ Zhu Zhuowei¹

¹School of Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

²Department of Physics, University of California at Davis, Davis, CA 95616, USA

Abstract Most methods used in virus and bacterium detection are based on confirmation of reactions between unknown samples and known probes. Since several bacterium species can survive in one sample, these methods have to be used to perform detections one by one with different probes, which are with low efficiency. An experiment using mixed probes to detect two blended proteins at the same time is designed. By monitoring the binding curves of these two probe-target reactions with an optical reflectivity difference method, it is explicit whether there are two different proteins in the sample. The demonstration experiments show potentials of this method for higher throughput detection of viruses or bacteria.

Key words optics at surfaces; reflectivity difference method; binding reaction curves; real-time monitoring

OCIS codes 240.2130; 240.6645; 240.6648

1 引言

病毒和细菌的检测吸引了大量科研工作者的兴趣。目前已经发展了多种手段用于病毒或细菌的检测,包括聚合酶链反应法^[1-2],酶联免疫吸附法^[3-4]以及表面等离子体共振(SPR)法^[5-7]等。这些方法通常利用只与对应靶分子发生特异性结合的蛋白抗体或脱氧核糖核酸作为探针。观察者通过确认探针和靶分子的反应来判断样品中是否含有危险病毒或细菌。当同一样品中可能有多种细菌或病毒时,需逐一利用不同探针来检测。这样的检测方式效率较低,可使用多通道样品平台作为改进方式^[8],即将样品等分为几份,同时与不同探针进行反应,提高检测通量。目前多通道 SPR 技术^[9]已较为成熟,但通道数目十分有限,而且上述几种检测方法的多通道样品平台均费用不菲。

在过去的数十年中,分子尺度研究蛋白与蛋白、核酸与核酸等相互作用的检测需求巨大。斜入射光反射差法正是在这样的环境下发展起来的^[10]。该方法通过探测表面物质光学性质的改变引起的相对反射率差

收稿日期: 2014-08-18; 收到修改稿日期: 2014-09-09; 网络出版日期: 2014-10-31

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20130116, SBK201341359)

作者简介: 王旭(1980—),男,博士,讲师,主要从事表面光学检测等方面的研究。E-mail: wangxu9802@hotmail.com

变化来监测表面。发展初期,该方法通过一维平移台和扫描振镜实现生物芯片的无标记二维扫描,检测结果与荧光标记检测法基本相符。之后通过设计一个流体腔,将功能芯片作为该腔的一个组成部分,进一步将反射差法的应用拓展至无标记实时监测生物分子反应。该方法在实时检测生物分子反应方面的灵敏度可媲美SPR^[11]。与SPR相比,该反射差法可以利用各类光学平整基片(SPR只能从金属薄膜表面^[12-13])获得生物分子间如探针分子与靶分子反应的实时监测曲线。生物实验中经常使用的基于功能化玻璃基片的生物微阵列可以与该反射差法很好地结合。因此,利用生物微阵列技术,结合该反射差法,即有可能实现多样品多探针的同时检测。本文利用斜入射光反射差法同时检测混合样品中的两种蛋白。结果表明,利用这样的检测方式可以有效地同时检测同一样品中的多个靶分子。

2 实验内容

带有流体腔的斜入射光反射差实验装置如图1所示^[10],利用一束线偏振氦氖激光(633 nm)作为探测光,经过光弹调制器调制后聚焦入射至功能芯片表面分子层,利用检偏器和光电二极管收集反射光在不同偏振和调制频率的强度。使用功能化基片作为平台,将样品通过点样仪点样在基片表面形成微阵列靶。微阵列表面的反射差($\Delta_p - \Delta_s$)信号被实时采集^[14]。定义 $\text{Im}\{\Delta_p - \Delta_s\}$ 作为反射差信号强度值。在反应过程中,当生物微阵列中样点处的生物分子平均厚度 d 远小于探测光波长 λ 时,Zhu等^[15]证实 $\text{Im}\{\Delta_p - \Delta_s\}$ 的表达式为

$$\text{Im}\{\Delta_p - \Delta_s\} \cong \frac{\alpha(\varepsilon_d - \varepsilon_s)(\varepsilon_d - \varepsilon_0)}{\varepsilon_d} \left(\frac{d}{\lambda} \right), \quad \alpha = \frac{-4\pi \tan^2 \theta_{\text{inc}} \cos \theta_{\text{inc}}}{\sqrt{\varepsilon_0} (\varepsilon_s - \varepsilon_0) (\varepsilon_s / \varepsilon_0 - \tan^2 \theta_{\text{inc}})}, \quad (1)$$

式中 θ_{inc} 为入射角的大小,通常取为 60° 。 ε_0 、 ε_d 和 ε_s 分别为功能基片、微阵列中生物分子以及流体腔中溶液的光学介电常数。

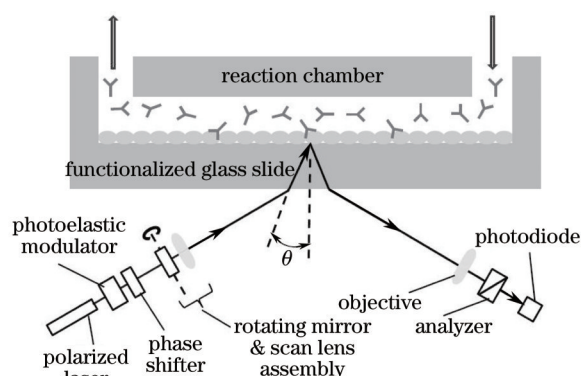


图1 结合流体腔的斜入射光反射差实验装置图。图中示意某探针分子与靶分子在流体腔中的功能玻片表面结合

Fig.1 Experimental setup of the optical reflectivity difference method assembled with a flow cell. It shows a reaction on the functionalized glass surface between a pair of probe and target molecules

样品为两种蛋白的混合物溶液。一种蛋白是内化蛋白A(InIA),这是单增李斯特菌的一种重要的表面蛋白。经常通过辨别InIA的存在才可确认单增李斯特菌的存在。这种蛋白在单增李斯特菌吸附并侵入人类宿主肠细胞时起了关键的作用^[16],其分子质量约为 80×10^4 u,可看作一个拉长的镰刀状分子,长度约为10.8 nm,直径约为2.7 nm^[17]。实验中所用抗体为利用小鼠培养的针对InIA的一种单克隆抗体(subclass IgG2a)^[18],命名为anti-InIA。另一种蛋白是常见的生物素修饰牛血清蛋白(BBSA)。牛血清蛋白(BSA)分子质量约为 6.6×10^5 u,可以看成是一个 $4.0 \text{ nm} \times 4.0 \text{ nm} \times 14.0 \text{ nm}$ 的椭球体。生物素分子量很小,因此修饰后的牛血清蛋白仍然可以看作同样大小的椭球体。BBSA的抗体采用纯化的IgG小鼠单克隆抗体,简称为anti-biotin。

在环氧乙基功能基片上通过点样仪点出如图2中print标识下所示 4×4 点阵。此图为反射差扫描图。阵列中共有4排样品,分别是InIA, InIA与BBSA的混合样品(InIA+BBSA), BSA以及BBSA。每个点之间的距离为 $400 \mu\text{m}$ 。作为技术性重复,每一行有4个点。InIA, BSA以及BBSA点样浓度分别为8.75, 3.8, $3.8 \mu\text{mol/L}$ 。而对于InIA与BBSA混合样点,二者浓度分别为 $8.75 \mu\text{mol/L}$ 和 $3.8 \mu\text{mol/L}$ 。点样之后的芯片在 4°C 环境下静置24 h,以确保这些蛋白靶分子与环氧基团的有效结合。

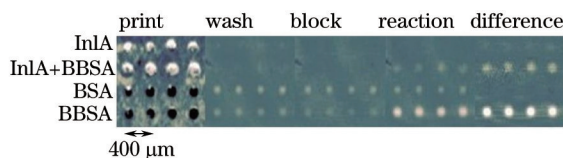


图2 微阵列整个反应过程对应的反射差扫描图

Fig.2 Scan image of the microarray during the whole process of the slide

图3从上至下显示了微阵列中的InLA与BBSA混合样品点从点样形成至反应结束的步骤。刚刚点样时基片表面聚集了多层蛋白分子。清洗后表面只会保留与环氧基团结合的单层蛋白分子,未能与环氧基团结合或结合不紧密的靶分子均被清洗掉。在流体腔中以5 mL/min的流速注入1×PBS缓冲液可实现清洗。随后在流体腔中注入BSA(浓度为7.6 μmol/L,溶剂为1×PBS)且保持近10 min以实现封闭,可以将非样品点区域的环氧基团以及样品点区少数未反应的环氧基团消耗掉,以避免下一步反应过程中不必要的蛋白探针消耗以及背景噪声增加。室温下流体腔中注入anti-InLA和anti-biotin的混合溶液来实现反应。两探针浓度分别为400 nM和100 nM,溶剂仍然是1×PBS。由于探针的特异性,最终结果如图3所示,探针会结合特定靶分子。为获得实时反应曲线,反应过程开始时应以5 mL/min的速度向流体腔中冲入探针溶液,随后保持0.01 mL/min的流速直至反应结束。图2中的反射差扫描图是利用反应后反射差扫描图减去反应前(即封闭后)的扫描图获得的,可以看到BBSA,InLA以及InLA+BBSA样点处均发生反应,BBSA则未发生反应。

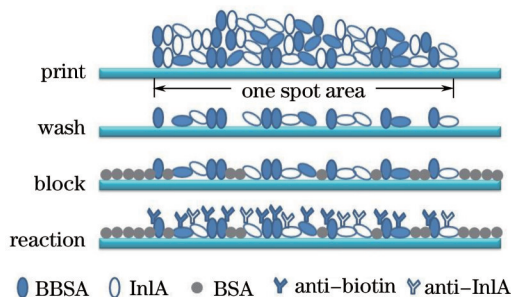


图3 在混合蛋白样点位置整个反应过程的示意图

Fig.3 Sketch of the whole reaction from printing to reaction at mixed sample position

3 结果与分析

除去未发生反应的BSA样点,从其余三种不同样点获得了实时反应曲线。图4所示为InLA与BBSA+InLA样点处的反应曲线。图5所示为BBSA与BBSA+InLA样点处的反应曲线。两图中BBSA+InLA样点处反应曲线为同一条曲线。

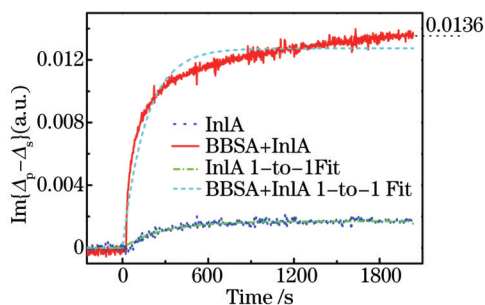


图4 InLA与BBSA+InLA样点处的反应曲线以及对应的利用一对一模型的拟合结果

Fig.4 Binding reaction curves at InLA spots and BBSA+InLA spots and corresponding fitting results using 1-to-1 model

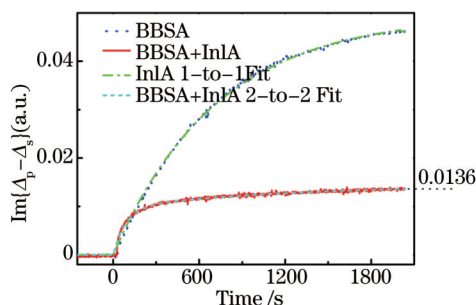


图5 BBSA与BBSA+InLA样点处的反应曲线以及拟合结果。BBSA利用一对一模型拟合,BBSA+InLA利用二对二模型拟合

Fig.5 Binding reaction curves at BBSA spots and BBSA+InLA spots and corresponding fitting results using 1-to-1 model for BBSA and 2-to-2 model for BBSA+InLA

从这些反应曲线可以获取反应常数。(1)式可改写为

$$\text{Im}\{\Delta_p - \Delta_s\} \cong \frac{\alpha(\varepsilon_{\text{probe}} - \varepsilon_s)(\varepsilon_{\text{probe}} - \varepsilon_0)}{\varepsilon_{\text{probe}}} \cdot \frac{\Gamma_{\text{probe}}}{\rho_{\text{probe}} \lambda}, \quad (2)$$

式中单层探针表面质量密度定义为 $\Gamma_{\text{probe}} = d_{\text{probe}} \rho_{\text{probe}}^{[14]}$, ρ_{probe} 为探针的体质量密度, d_{probe} 为吸附在表面的探针的平均厚度(随着吸附的开始,从零开始增加), $\varepsilon_{\text{probe}}$ 为探针分子的光学介电常数。(2)式表明, Γ_{probe} 与 $\text{Im}\{\Delta_p - \Delta_s\}$ 成正比,即反射差所监测信号正比于与表面固定靶分子反应的探针分子的表面质量密度。

分子间反应曲线通常利用朗缪尔吸附反应动力学^[19]来拟合。在这个动力学过程中,假定结合速率与探针浓度 c 成正比,用 $k_{\text{on}}[c]$ 表示,解离速率即 k_{off} 与探针浓度无关。该动力学最常见的即为一对一(1-to-1)模型,即单克隆抗体仅与表面靶分子的某一特定部位发生反应。假设 $N^{(0)}$ 为表面初始可提供给探针结合的分子数, N 为已经结合到靶分子的探针数,两者随时间 t 的关系可以表达为

$$N(t) = \frac{N^{(0)} k_{\text{on}}[c]}{k_{\text{on}}[c] + k_{\text{off}}} \{1 - \exp[-(k_{\text{on}}[c] + k_{\text{off}})t]\}. \quad (3)$$

显然(2)式中的 Γ_{probe} 与已经结合的探针数目 $N(t)$ 有正比关系。通过(2)式和(3)式可知, $\text{Im}\{\Delta_p - \Delta_s\}$ 最终也正比于 $N(t)$ 。

利用 1-to-1 模型对图 4 与图 5 中的实验曲线进行拟合。图 4 中的点划线即为对 In1A 与 anti-In1A 反应曲线的拟合结果,吻合较好。图 5 中的点划线为对 BBSA 与 anti-biotin 反应曲线的拟合结果,吻合也较好。但可以看到,图 4 中的虚线并不能较好地吻合 BBSA+In1A 混合样点处的反应曲线。这其实不难理解,因为此时的反应是两种探针与两种蛋白的反应,应使用二对二(2-to-2)模型来模拟。

在 2-to-2 模型中,设定 $N_i^{(0)}$ ($i=1, 2$) 是表面初始可提供给探针结合的分子数, N_i ($i=1, 2$) 为已经反应结合的各类探针分子数,则总的反应的探针数可表示为

$$N(t) = N_1(t) + N_2(t),$$

$$N_i(t) = \frac{N_i^{(0)} k_{\text{on}i}[c_i]}{k_{\text{on}i}[c_i] + k_{\text{off}i}} \{1 - \exp[-(k_{\text{on}i}[c_i] + k_{\text{off}i})t]\}. \quad (4)$$

此时各类探针的表面质量密度 $\Gamma_{\text{anti-In1A}}$ 以及 $\Gamma_{\text{anti-biotin}}$ 分别正比于 $N_1(t)$ 和 $N_2(t)$ 。因此,反射差信号 $\text{Im}\{\Delta_p - \Delta_s\} \sim \beta_1 N_1(t) + \beta_2 N_2(t)$, β_i 为固定值的比例系数,可由(1)~(4)式推导得出。图 5 中 BBSA+In1A 混合样点处的反应曲线再次被画出,并利用上述 2-to-2 的模型来拟合。可以看到,这次的拟合曲线与实验曲线吻合很好。

图 4 和图 5 中实验和拟合结果的对比表明,当两种探针的混合液与两种对应蛋白的混合样品反应时,实时反应曲线确实可以判断是否为 2-to-2 的反应。

4 结 论

多数无标记检测方法不能同时检测多种靶分子的主要原因是因为检测方式属于末态检测。在本文的实验中,如果仅利用图 2 的扫描结果并不能确认混合样点处究竟有一种还是两种蛋白靶分子。而反射差法则实时跟踪反应过程,获得反应曲线从而获得更多信息。对反应曲线的拟合结果表明,该方法可以利用混合探针同时检测同一个样品中的多个靶分子。需要说明的是,探针种类也不能随意增加。若由于探针分子之间相互影响造成空间位阻、构象异构等现象,会影响生物分子间反应。目前的实验主要还停留在吸附结合阶段,进一步开展脱附曲线的测量可以获得完整的反应曲线,并最终有效地获得不同探针和靶分子反应之间的反应常数,探索混合探针组合模式。

参 考 文 献

- 1 D Rip, P A Gouws. Development of an internal amplification control using multiplex PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products[J]. Food Anal Methods, 2009, 2(3): 190-196.
- 2 A Garrido, M J Chapela, B Roman, et al.. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples[J]. Food Control, 2013, 30(1): 76-85.
- 3 H J Kim, J C Cho. Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* using a PCR-enzyme linked immunosorbent assay[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(11): 1858-1861.

- 4 J A Mattingly, B T Butman, M C Plank, *et al.*. Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent-assay for detection of *Listeria* in food-products[J]. *J AOAC Int*, 1988, 71(3): 679-681.
- 5 K Y Chen, X Feng, Y D Huang. Surface plasmon-enhanced amorphous-silicon-nitride light emission with single layer gold waveguides[J]. *Chin Opt Lett*, 2013, 11(2): 022401.
- 6 X Y Wang, F Liu, A Liu, *et al.*. Optical fiber sensor based on the short-range surface plasmon polariton mode[J]. *Chin Opt Lett*, 2014, 12(1): 010602.
- 7 S Q Li, L X Gao, S G Liu, *et al.*. Design of transverse magnetic-reflected polarizing film[J]. *Chin Opt Lett*, 2014, 12(5): 053102.
- 8 C E H Berger, T A M Beumer, R P H Kooyman, *et al.*. Surface plasmon resonance multisensing[J]. *Anal Chem*, 1998, 70(4): 703-706.
- 9 J Dostalek, H Caisocherova, J Homola, *et al.*. Multichannel surface plasmon resonance biosensor with wavelength division multiplexing[J]. *Sens Actuators B*, 2005, 108(1-2): 758-764.
- 10 X D Zhu, J P Landry, Y S Sun, *et al.*. Oblique incidence reflectivity difference microscope for label-free high-throughput detection of biochemical reactions in a microarray format[J]. *Appl Opt*, 2007, 46(10): 1890-1895.
- 11 R Sandipan, M Gunjan, S Sanjeeva. Label-free detection techniques for protein microarrays: Prospects, merits and challenges[J]. *Proteomics*, 2010, 10(4): 731-748.
- 12 W H Tsai, K C Lin, S M Yang, *et al.*. Fiber-optic surface plasmon resonance-based sensor with AZO/Au bilayered sensing layer[J]. *Chin Opt Lett*, 2014, 12(4): 042801.
- 13 D J Feng, G X Liu, M S Zhang, *et al.*. D-shaped fiber optic SPR biosensors based on a metal-graphene structure[J]. *Chin Opt Lett*, 2013, 11(11): 110607.
- 14 J P Landry, Y Y Fei, X D Zhu. Simultaneous measurement of 10,000 protein-ligand affinity constants using microarray-based kinetic constant assays[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2012, 10(3): 250-259.
- 15 X D Zhu, Y Y Fei, X Wang, *et al.*. General theory of optical reflection from a thin film on a solid and its application to heteroepitaxy[J]. *Phys Rev B*, 2007, 75(24): 245434.
- 16 H Bierne, P Cossart. *Listeria monocytogenes* surface proteins: From genome predictions to function[J]. *Mol Biol Rev*, 2007, 71(2): 377-397.
- 17 M Bonazzi, M Lecuit, P Cossart. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: From bench to bedside[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009, 1(4): a003087.
- 18 M Mendonca, N L Conrad, F R Conceical, *et al.*. Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 275.
- 19 I Langmuir. The constitution and fundamental properties of solids and liquids · Part I · Solids[J]. *J Am Chem Soc*, 1916, 38: 2221-2295.