

文章编号: 0253-2239(2010)s100413

基于光反射干涉成像的免疫球蛋白结合的高通量非标记检测

李 强^{1,2} 甘五鹏² 黄国亮^{1,2} 陈圣伊^{1,2} 黎 新^{1,2}

(¹ 清华大学生物医学工程系, 北京 100084
² 国家工程中心北京生物芯片研究中心, 北京 102206)

摘要 光反射干涉检测技术因其具有非标记、可实时检测等优点,近年来被广泛应用于生物分子相互作用检测、食品安全以及药物筛选等领域。蛋白质芯片能够在一次实验中对微量样本中的多种目的蛋白质同时进行检测,具有潜在的临床应用价值。设计并搭建完成了基于光反射干涉成像的高通量、非标记检测平台,可检测由基座上生物分子结合引起的光相位的改变,实现纳米水平的厚度变化测量。利用该系统,对人 IgG 和山羊抗人 IgG 的结合进行了高通量、非标记检测,检测结果具有良好的特异性,二氧化硅膜厚度优化后的蛋白芯片具有较高的信号对比度。在此基础上,又引入了免疫微珠对芯片表面结合抗体的信号进行放大。实验结果表明该方法有效地增强了信号强度,所得结果具有更好特异性和更高的灵敏度。

关键词 生物光学;非标记检测;蛋白芯片;免疫微珠

中图分类号 Q334 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/AOS201030.s100413

High-Throughput and Label-Free Detection of Immunoglobulin G Interactions based on Reflectometric Interference Imaging System

Li Qiang^{1,2} Gan Wupeng² Huang Guoliang^{1,2} Chen Shengyi^{1,2} Li Xing^{1,2}

(¹ Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)
² National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China)

Abstract Recently, reflectometry interference technology has been widely used in detections of biomolecular interaction, food security and drug screening due to its advantages in label-free and dynamic detection. Protein microarray, providing an opportunity to monitor multiple biomolecular interactions simultaneously, has a potential to be used in clinical diagnosis. In this study, we have designed and constructed a label-free, real-time reflectometry interference imaging system that detects interactions of proteins according to optical phase differences from the accumulation of biological material on solid substrates, which can perform the measurement of the change of thickness in nm level. The specific binding between human IgG and anti-human IgG is performed and continuously detected by using this label-free and real-time interference imaging platform. The thickness of SiO₂ is optimized so that the interference image with high signal contrast is achieved. In addition, streptavidin coupled microsphere solution is introduced to enlarge detection signal of the biotin-linked antibody. The experimental results show that the microsphere efficiently increases the intensity of binding sites and improves the sensitivity of detection.

Key words biotechnology; label-free detection; protein microarray; microsphere

OCIS codes 170.3890; 170.3880; 110.1650

收稿日期: 2010-08-20; **收到修改稿日期:** 2010-10-28

基金项目: 国家自然科学基金(60978064)、国家 863 计划(2006AA020803)和国家 973 计划(2006CB705700)资助课题。

作者简介: 李 强(1986—),男,硕士研究生,主要从事生物芯片光学检测方面的研究。

E-mail: liqiang09@mails. tsinghua. edu. cn

导师简介: 黄国亮(1966—),男,博士,副教授,主要从事生物医学光学检测方面的研究。

E-mail: tshgl@mail. tsinghua. edu. cn(通信联系人)

1 引 言

微阵列芯片技术的发展始于 20 世纪 90 年代^[1]。微阵列芯片技术的含义是:将多种不同的生物分子或组织固定在面积不大的固相基质上,形成有序的、可寻址的密集阵列,可实现对少量生物样品的快速、高通量分析。经过多年的研究与发展,微阵列芯片技术已进入实用化阶段,多种针对不同检测对象的芯片被开发出来,并广泛应用到生命科学研究、农业研究、药物研发、临床诊断和食品安全等诸多领域,形成了一个发展迅速、前景广阔的新兴产业^[2]。

检测生物分子间的相互作用对于认识和理解细胞内生命活动和分子水平的疾病发病机理具有重要意义。目前,利用微阵列芯片检测分子间相互作用一般采用荧光检测技术。首先在基质上固定探针分子,然后引入荧光标记的靶标生物分子进行生化反应。最终使用荧光扫描仪读取标记在靶标生物分子上的荧光染料发出的信号,从而实现对生物分子间的相互作用进行检测^[3,4]。但它需要对目标蛋白质分子进行荧光标记,不仅会增加实验难度与成本,而且对蛋白质的活性也有一定的影响。20 世纪 90 年代以来,与微阵列技术相结合的非标记生物传感器被越来越多的应用到生物分子相互作用的分析中^[5,6]。表面等离子共振 (SPR) 生物传感器以及光反射干涉成像生物传感器因具有灵敏度高、无需标记、可实现实时监测等优点而倍受医学、生物和化学研究者的关注。有关生物传感器的研究论文数量逐年增加,相关的商品化的产品也陆续推出^[7]。非标记生物传感器在检测抗原-抗体、受体-配体和病毒-细胞以及蛋白质分子与 DNA 的特异性结合方面具有独特优势,不会破坏生物分子的天然状况。通过对测试表面进行修饰,还可为生物大分子提供模拟的体内环境,因而有可能发展成为一种灵敏的高通量蛋白质组学研究检测工具。

1997 年, H. S. Bernard 等^[8]报道了在波导管表面检测到了人绒毛膜促性腺素 (HCG) 与其对应抗体间的免疫反应,验证了基于相位的干涉检测技术对蛋白检测的有效性。2000 年, Piehler 与 B. H. Schreiber^[9]将抗体固定在玻璃片上,利用分光干涉法检测到了抗原与探针间的特异性结合实现了高灵敏度的检测;2005 年, P. I. Nikitin 等^[10]开发了一种能够实时检测微阵列芯片反应的干涉成像技术,利用该技术动态检测生物芯片表面发生的生化反应;2008 年, E. Ozkumur 等^[11]搭建了一种基于干涉成

像的,可对生化反应进行实时检测的平台。

本文设计并搭建完成了基于光反射干涉成像的高通量、非标记检测平台,与其他研究小组的工作相比,该平台不仅成功地检测了二氧化硅膜上免疫球蛋白的特异性结合,还成功地引入了干涉信号放大环节,即利用免疫微珠特异性地增强信号,最终得到了良好的结果。

2 光反射干涉成像系统原理与结构

2.1 光反射干涉成像系统基本原理

采用抛光的单晶硅片作为反射基底,然后在此基面上热氧化生成一层特定厚度的二氧化硅薄膜作为干涉层。该层薄膜平整度高(表面粗糙度小于 10 nm),且化学组成稳定,易于修饰固定蛋白分子。

如图 1(a)所示,当光源发出的光入射到二氧化硅薄膜上,光束在薄膜两内表面会多次反射,因而产生一组反射光束和一组投射光束,当表面反射系数不高时或者入射角度小于全反射的临界角时,可以只考虑两束光的作用,忽略反射两次以上的光束,把多光束干涉简化成双光束干涉来处理。具体地,一部分入射光在界面 1 上反射,另一部分透过界面 1,在界面 2 上反射,然后再透射从 1 面射出,由于和界面 1 的反射光存在光程差而形成干涉。

由菲涅耳定理可知,两束相干光的光程差为

$$\delta = 2n_2d \cos \theta_2, \quad (1)$$

由此引起的相位差为

$$\varphi = \frac{2\pi\delta}{\lambda} = \frac{4\pi n_2d \cos \theta_2}{\lambda}, \quad (2)$$

这样就可以得到单层二氧化硅的反射比为

$$R = |r|^2 = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2r_1r_2 \cos(2\varphi)}{1 + r_1^2r_2^2 + 2r_1r_2 \cos(2\varphi)}, \quad (3)$$

式中 r_1 与 r_2 分别为界面 1 与界面 2 的菲涅耳反射因子, n_2 为二氧化硅折射率。为了简化模型,可将表面蛋白分子层的折射率与二氧化硅层的折射率视作相等^[11]。

如图 1(b)所示,对二氧化硅表面进行硅烷化修饰后(方法详见 3.2 节),可将抗原探针固定在其表面上。那么在探针处,必然会引起 Δd 的厚度变化,进而引起 $\Delta\varphi$ 的相位差。由(3)式可知,该相位差会导致该处反射比发生变化进而使反射光强发生变化。同理,当发生抗原-抗体特异性结合反应后,探针表面厚度将再次发生变化从而导致特定位置反射光强的变化。这样,对二氧化硅基质上微阵列点阵进行实时干涉成像,再利用(1)~(3)式就可以反推

得到其表面各个区域处厚度的变化,实现对抗原-抗体特异性结合的检测。

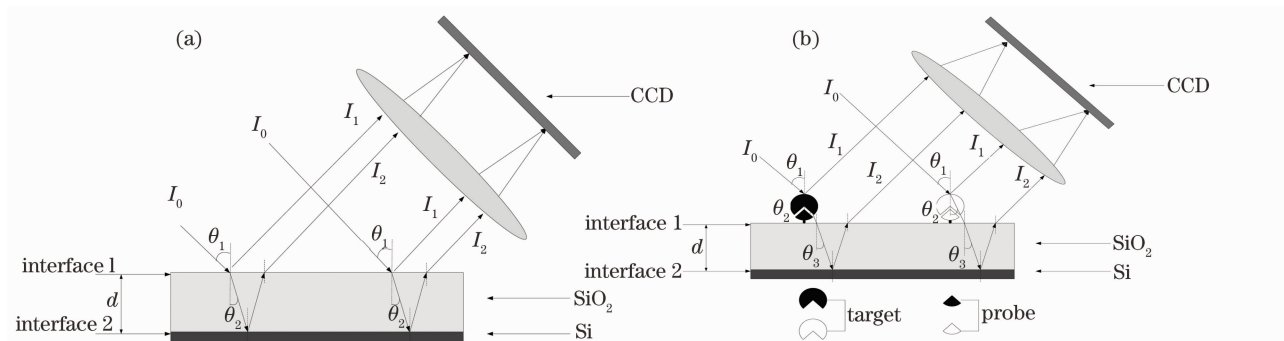


图1 反射式干涉成像平台的基本原理

Fig.1 A schematic showing the basic principle of reflectometry interference imaging system

2.2 成像系统结构

如图2所示,成像系统主要由光学系统、传感系统和光电转换以及信号采集处理系统组成。光源采用中心波长为680 nm的发光二极管(LED)。利用分束镜分离入射光与反射光。以电荷耦合器件CCD作为光电转换器件,所得到的图像信号通过电脑采集并进行表面厚度分析。

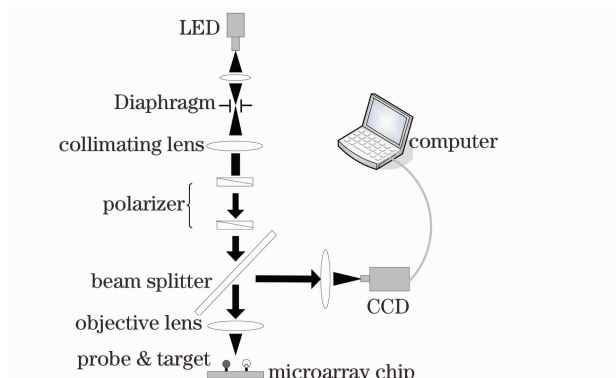


图2 反射式干涉成像系统光路

Fig.2 Optical setup of the reflectometry interference imaging system

在光学系统中,LED发出的发散光束经过一短焦透镜会聚,再通过1 mm直径的孔径光阑,即可得到近似点光源。该点光源经过准直透镜扩束、偏振片调节强度后,得到准直入射的光束。再利用分光镜分离入射光束与反射光束,将芯片表面反射光通过成像透镜投影至CCD传感器表面。即可获得二氧化硅层表面各个位置的反射光强度,检测其光强变化,进而反推获得表面厚度变化。

传感单元由带有二氧化硅膜的硅片构成,经过硅烷化处理后表面修饰有探针分子。通过干涉成像的方法可检测由基质上生物分子堆积引起的光相位改变。

信号采集通过自行编写的上位机软件实现,通

过USB接口对CCD相机进行读写操作,并且可自行设置采样频率以及曝光时间等。能够自动完成对图像的灰度分析并实现对特定区域的实时检测。

3 材料与方法

3.1 试剂

牛血清蛋白(BSA, MW66200)以及生物素化免疫球蛋白(IgG)均是从Zsbio公司(北京)购买。链霉亲和素包被的微珠(粒径40 nm)购买自Invitrogen公司(北京)。磷酸盐缓冲液(PBS)由博奥生物有限公司(北京)提供。所用的水溶液均使用去离子水配制,并且所有实验均是在室温条件下进行。

3.2 表面化学修饰与探针固定

所使用微阵列芯片均采用环氧基团修饰,其表面活性很强,不仅可以与氨基反应,还可以与蛋白质表面其他基团如羟基、巯基和羧基等反应^[12]。

硅片首先被切成75 mm×25 mm的矩形,在丙酮中用超声波降解法清洗,而后在甲醇中冲洗,最后用去离子水冲洗芯片。然后,将芯片放入浓度为10%的NaOH溶液中10 min,再用去离子水清洗,并用氮气吹干。

然后将芯片置于体积分数为3%的3-缩水甘油氧基丙基甲基二乙氧基硅烷的甲苯溶液3 min,再用甲苯冲洗5 min。芯片用氮气吹干,密封并置于真空干燥箱中,使用前在-4℃下贮存24 h。使用博奥生物有限公司(北京)生产的点样仪对表面活化过的芯片点样(室温,湿度40%~55%)。

点阵设计以及点样浓度如图3所示,每一列为同种蛋白。其中BSA点样质量浓度为5 mg/ml,人IgG与鼠IgG点样质量浓度为3 mg/ml。

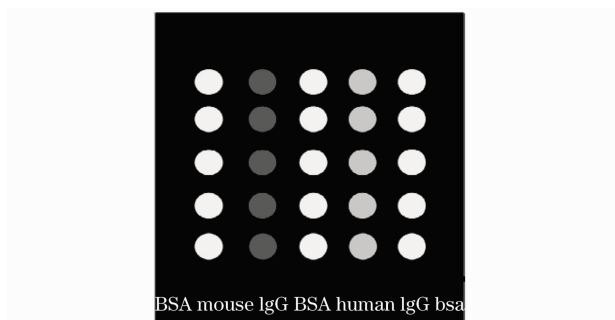


图 3 蛋白芯片点阵

Fig. 3 Protein microarray pattern

3.3 二氧化硅膜的热氧化生成及其厚度优化

首先,在高温条件下(高于 900 ℃),使氧气与硅片表面发生反应,生成二氧化硅。通过控制温度和时间可以控制氧化膜的厚度。

对于成像检测系统而言,成像对比度(即样点与背景信号比, S/B)是衡量成像质量的关键指标。由(1)~(3)式可得到双光束干涉强度为

$$I = I_1 + I_2 + 2 \sqrt{I_1 I_2} \cos \frac{4\pi n_2 d \cos \theta_2}{\lambda}, \quad (4)$$

式中 I_1 为界面 1 反射光, I_2 为界面 2 反射光, d 为二氧化硅膜厚度, θ_2 为折射角, λ 为入射光波长。反射干涉光强与入射光波长倒数存在余弦关系,与入射光波长存在类余弦关系,并且其峰位与光学厚度密切相关。随着二氧化硅膜厚度变化,双光束干涉

强度会周期性变化。

为了得到较高的对比度,利用(4)式可计算得到最佳膜厚,使得背景反射光干涉相消或者增强,以期得到最佳的样点与背景对比度。

由干涉理论和(2)式可得到反射光强取得极大值的相位条件为

$$\varphi = \frac{4\pi n_2 d \cos \theta_2}{\lambda} = 2k\pi \quad (k = 0, 1, 2, \dots), \quad (5)$$

取得极小值的相位条件为

$$\varphi = \frac{4\pi n_2 d \cos \theta_2}{\lambda} = (2k + 1)\pi \quad (k = 0, 1, 2, \dots), \quad (6)$$

利用 Matlab7.1 对双光束干涉强度进行理论仿真,结果如图 4 所示。其中图 4(a)表示膜厚在 100~300 nm 之间的反射光谱;图 4(b)表示膜厚在 220~420 nm 之间的反射光谱。可见反射光强随着膜厚变化周期性变化。

图 4(a)表明在 100~300 nm 的区间内,220 nm 厚度可取得干涉背景极大值,图 4(b)表明在 220~420 nm 区间内,320 nm 厚度可取得干涉背景极小值。所以本文选取了两种优化的膜厚进行加工,即 320 nm(背景干涉相消)以及 220 nm(背景干涉增强)。微加工完成后,使用椭圆偏振仪对其厚度进行测量。经过多点测量,两种芯片的实际厚度分别为 308.63 nm 和 190.03 nm,相对误差分别为 3.55% 和 13.6%。

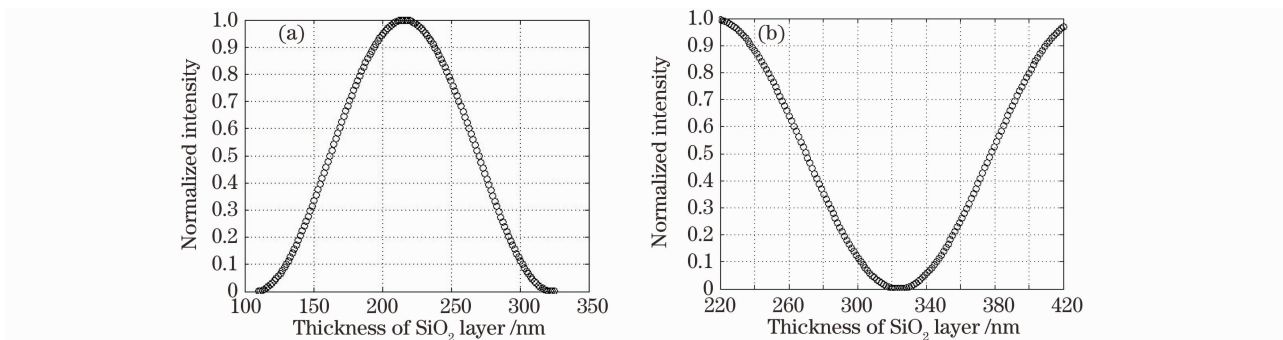


图 4 反射光强随膜厚变化的仿真结果

Fig. 4 Intensity simulation result of light reflected off a single SiO_2 film with different thickness

3.4 实验步骤

1) 点样后芯片在室温下用 0.1% BSA 溶液封闭 15 min;

2) 封闭后,将芯片置于 PBST 溶液(含 0.02% Tween 的 PBS 溶液)中,摇床清洗 10 min。氮气吹干后,使用光反射干涉成像平台对芯片表面成像;

3) 室温下与一定浓度的山羊抗人 IgG 溶液反应 15 min;

4) 反应后,将芯片置于 PBST 溶液中,摇床清洗 10 min。氮气吹干后,使用光反射干涉成像平台对芯片表面成像;如需微珠增强反应信号,则再加入体积分数为 0.1% 微珠悬浊液反应 10 min, PBST 溶液摇床清洗 10 min 后吹干并成像;

5) 分析反应前后所得到的芯片表面干涉图像,获得表面各样点厚度变化值。

4 实验结果与讨论

4.1 二氧化硅膜厚度优化后信号背景比的比较

在 3.3 节中,完成了二氧化硅膜厚度的理论计算仿真,并得到了对应明场和暗场成像的两个最佳二氧化硅膜厚度。为了验证其具有相对高的信号背景比,分别比较了两个最佳厚度与其他两个不同厚度的信号背景比。分别加工了二氧化硅膜厚度为 266.15 nm 和 378.33 nm 厚度芯片。按照 3.3 中理论预测曲线,266.15 nm 厚度芯片背景干涉增强但

小于光强极大值;而 378.33 nm 厚度芯片背景干涉减弱但大于光强极小值。将 190.03 nm 厚度芯片与 266.15 nm 厚度芯片作为 A 组,308.63 nm 厚度芯片与 378.33 nm 厚度芯片作为 B 组,对 A、B 两组 4 张芯片点样后(点阵设计如图 3 所示),分别进行干涉成像,比较各组内部两芯片信号背景比。结果见图 5 所示。其中(a)图表示 A 组 S/B 值对比结果;图 5(b)表示 B 组 S/B 值对比结果。

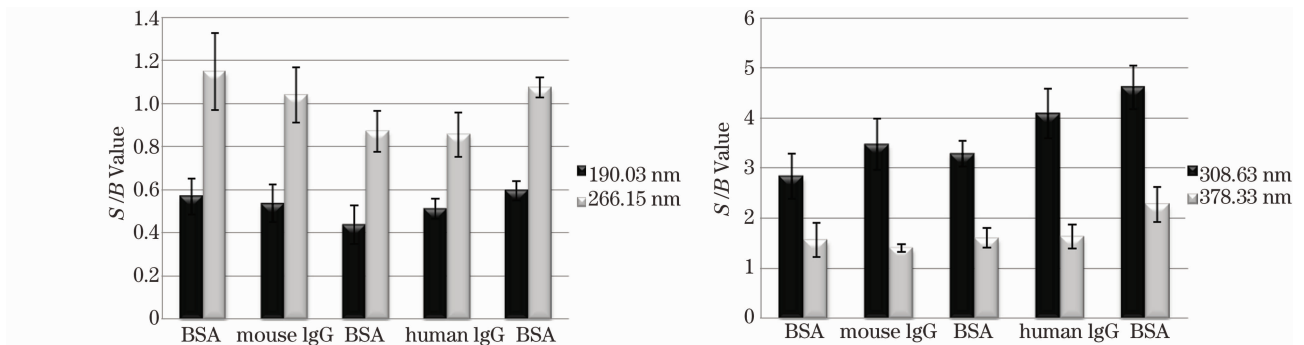


图 5 不同厚度二氧化硅膜信号背景比的比较

Fig. 5 S/B values of two chips with different SiO₂ thickness

对于明场成像芯片而言,S/B 越小表示信号与背景区分越好。由图 5(a)可见,190.93 nm 厚度芯片 S/B 值均明显小于 266.15 nm 厚度芯片。而对于暗场成像,S/B 越大则表示信号与背景区分越好。由图 5(b)可见,308.63 nm 厚度芯片 S/B 均明显大于 378.33 nm 厚度芯片。且每组中两种厚度芯片间的 S/B 值存在显著性差异,即 P 值均小于 0.05,具有统计学意义。

4.2 基于不同膜厚芯片检测免疫球蛋白的特异性结合

如图 6(a),(b)为使用 190.03 nm 膜厚芯片得到的图像。图 6(a)图为原始点阵封闭后所得到的干涉图像;图 6(b)图表示加入 20 μg/ml 的山羊抗人 IgG 溶液,室温反应 15 min 后获得的干涉图像;图 6(c)图为各样点反应前后表面平均厚度变化。图 6(d)~(e)两图为使用 308.63 nm 膜厚芯片得到的图像。图 6(d)图为利用 0.1% BSA 对原始点阵进行封闭后所得到的干涉图像;图 6(e)图表示加入 20 μg/ml 的山羊抗人 IgG,室温反应 15 min 后的干涉图像;图 6(f)图为各个样点反应前后表面平均厚度变化。

观察发现,使用 190.03 nm 膜厚芯片,背景干涉增强,与理论预测结果吻合。由于样点本身存在

附加光程差,其灰度低于背景。人 IgG 样点灰度变化明显,而其他样点变化微弱。对点阵中各个样点灰度变化进行统计计算,由于人 IgG 与山羊抗人 IgG 发生特异性结合,导致人 IgG 样点表面厚度有明显增加,约 12 nm,而其他样点表面厚度基本保持不变。而对于 308.63nm 厚度芯片,可以发现所得到的图像背景干涉相消,而样点灰度高于背景,亦得到了较高的样点与背景信号对比。同样,人 IgG 样点信号变化明显,而其他样点变化微弱。人 IgG 样点表面结合了抗体使得厚度有明显增加,大约 14 nm 左右,而其他样点表面厚度基本保持不变。

实验结果表明,山羊抗人 IgG 与固定在二氧化硅表面的人 IgG 发生了特异性的结合,导致人 IgG 样点表面厚度明显增加。而其他样点未发生结合,表面厚度基本不变或变化微弱。而且在相同浓度的山羊抗人 IgG 溶液的作用下,两种芯片表面厚度变化基本相同,符合干涉理论,故均可用于光反射干涉成像检测。

搭建的光反射式干涉检测平台成功地对蛋白芯片进行了高通量、非标记检测,检测结果具有良好的特异性,经过厚度优化后的芯片具有较高信号背景比。

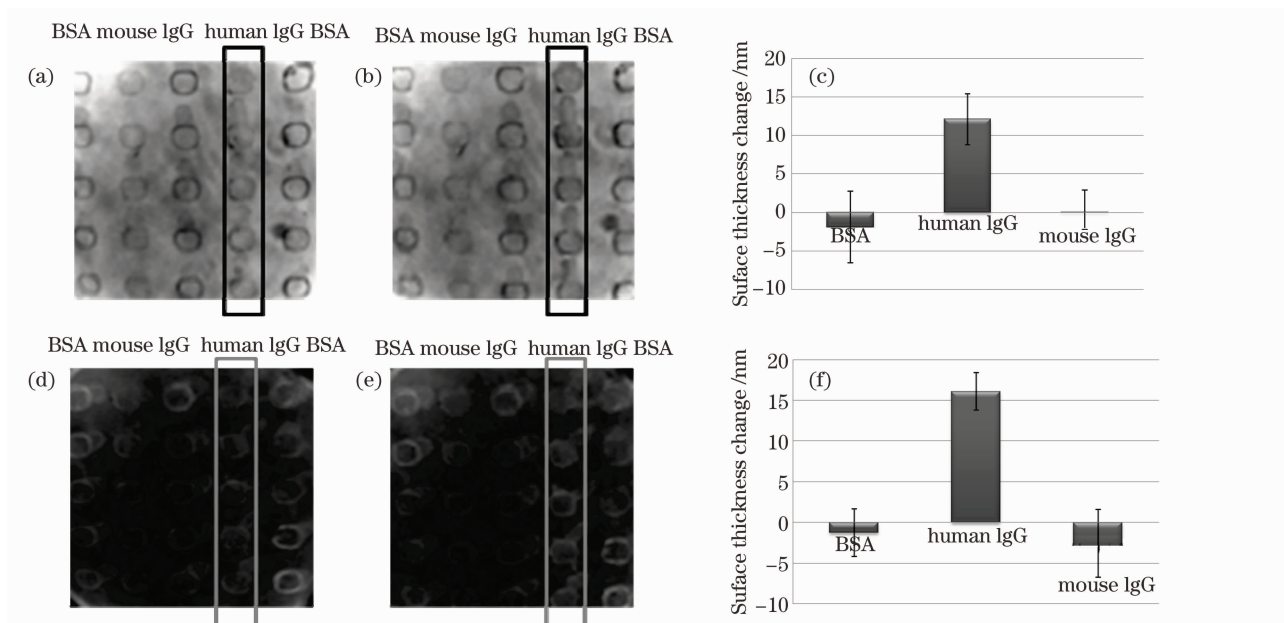


图 6 抗原-抗体相互作用与相应的表面厚度变化图

Fig. 6 Antibody-antigen interactions and the corresponding change of surface thickness

4.3 基于微珠增强的免疫球蛋白特异性结合

通过检测芯片表面厚度变化,检测了微阵列芯片上免疫球蛋白的特异性结合。如果能够对反应前后样点表面的厚度差异进行放大,那么将大大降低光反射干涉成像系统的检测限,提高灵敏度。基于此思路,使用 308.63 nm 膜厚芯片,在免疫球蛋白特异性结合后加入链霉亲和素包被的微珠,它可以与生物素化的山羊抗人 IgG 特异性的结合。这样就可以放大大 IgG 样点表面厚度差异,实验具体步

骤见 3.4 节。

实验结果如图 7 所示,图 7(a)为利用 0.1% BSA 封闭点阵后的图像;图 7(b)为加入 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的山羊抗人 IgG,室温反应 15 min 后的图像;图 7(c)为抗原-抗体结合反应后,再加入 0.1% 微珠悬浊液,室温反应 15 min 后的图像;图 7(d)对应两次反应前后各蛋白样点表面厚度变化平均值。深色条带表示加入山羊抗人 IgG 后各样点厚度变化平均值,浅色条带表示加入免疫微珠后各样点厚度变化平均值。

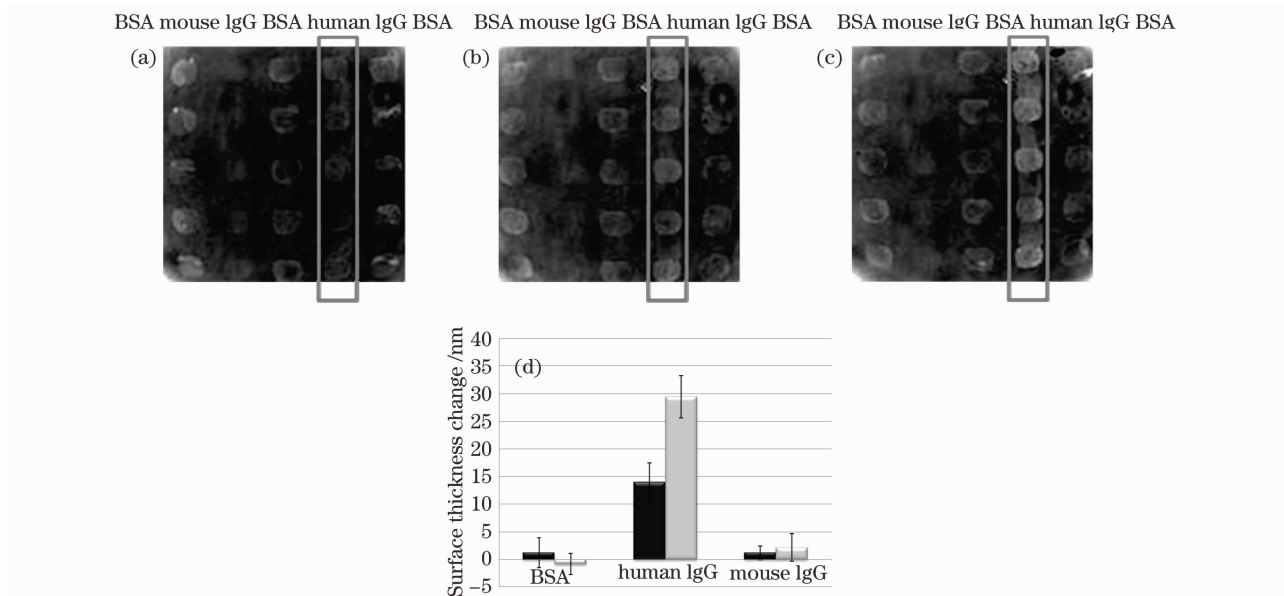


图 7 抗原-抗体、抗体-微珠相互作用与相应的表面厚度变化图

Fig. 7 Antibody-antigen and antibody-microsphere interactions and the corresponding change of surface thickness

可以发现,免疫微珠可以对抗原-抗体结合进行特异性信号放大,表面厚度变化约为原来的 2 倍,从 14 nm 增大到 29 nm 左右。可以观察到,在人 IgG 表面厚度变化被放大的同时,其他样点表面厚度基本不变,证明该方法具有很好的特异性。优化反应条件后,检测系统对山羊抗人 IgG 检测限完全可降至 ng/ml 甚至更低的检测灵敏度水平。

5 结 论

本文搭建了光反射干涉成像平台,优化了微阵列芯片表面二氧化硅干涉层的厚度,提高了样点与背景的信号比,可以实现纳米水平的厚度变化测量。利用免疫特异性结合的生物学方法,实现对免疫球蛋白结合的高通量非标记检测。通过引入免疫微珠,优化反应条件,系统检测限可降低至 ng/ml 水平。该平台可应用于临床、食品卫生以及环境检测等诸多领域。

参 考 文 献

- 1 M. Barinaga. Will "DNA Chip" speed genome initiative? [J]. *Science*, 1991, **253**(5027): 1489~1489
- 2 D. Gershon. Microarray technology-An array of opportunities [J]. *Nature*, 2002, **416**(4883): 885~891
- 3 Deng Cheng. Development of microarray chips based on surface plasmon resonance imaging detection technology [D]. Beijing: Tsinghua University, 2008. 1~2
邓 橙. 基于表面等离子共振成像检测技术的微阵列芯片开发 [D]. 北京: 清华大学, 2008. 1~2
- 4 Huang Guoliang, Deng Cheng, Xu Shukuan *et al.*. Novel detection system of microbe chip and its application [J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, **21**(1): 499~504
黄国亮, 邓 程, 徐书宽 等. 先进的微生物芯片检测系统及其应用 [J]. *光学学报*, 2001, **21**(1): 499~504
- 5 J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz. Surface plasmon resonance sensors: review [J]. *Sensor. Actuat. B*, 1999, **54**(1-2): 3~15
- 6 Gu Zhengtian, Feng Shimin, Liang Peihui *et al.*. Sol-gel filmsensor based on surface plasmon resonance [J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, **21**(1): 83~87
顾铮天, 冯仕猛, 梁培辉 等. 表面等离子体激元共振溶胶-凝胶薄膜传感器 [J]. *光学学报*, 2001, **21**(1): 83~87
- 7 R. L. Rich, D. G. Myszka. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis Curr [J]. *Carr. Opin. Biotech*, 2000, **11**(1): 54~61
- 8 H. S. Bernard, J. S. Edwards, N. F. Hartman. Hartman interferometer: versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens [J]. *Clinical Chemistry*, 1997, **43**(9): 1757~1763
- 9 B. H. Schneider, E. L. Dickinson, M. D. Vach *et al.*. Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, **15**(1-2): 13~22
- 10 P. I. Nikitin, B. G. Gorshkov, E. P. Nikitin *et al.*. Picoscope, a new label-free biosensor [J]. *Sensors and Actuators B*, 2005, **111-112**(11): 500~504
- 11 E. Ozkumur, J. W. Needham, D. A. Bergstein *et al.*. Label-free and dynamic detection of biomolecular interactions for high-throughput microarray applications [J]. *PNAS*, 2008, **105**(23): 7988~7992
- 12 Jin Shihui, Liu Bicheng, Tang Zuming *et al.*. Protein microarray substrates and their surface modifications [J]. *Biomedical Engineering Foreign Medical Sciences*, 2005, **28**(4): 209~213
金士辉, 刘必成, 唐祖名 等. 蛋白质微阵列载体的选择及表面修饰方法 [J]. *国外医学生物医学分册*, 2005, **28**(4): 209~213