

光学蛋白质芯片技术及其应用

靳 刚

(中国科学院力学研究所 北京 100080)

E-mail: gajin@imech.ac.cn

摘 要 本文介绍一种新型光学蛋白质芯片技术和在生物医学领域的应用。通过固体基底表面的微格式化、表面改性和生物配基固定等技术,制备多元生物活性感应表面;利用生物分子操作、蛋白质的特异结合性和高分辨率的生物光学椭圆偏显微成像技术,达到识别、检测和纯化蛋白质的目的。它是一种非标记的多元蛋白质定量分析方法,并且能够对蛋白质之间的相互作用过程进行实时测量,获得反应速率及反应条件等生物分子反应的动力学参数。

关键词 蛋白质芯片;生物分子相互作用;椭圆偏成像

中图分类号 Q819

Optical Protein Chip and Its Applications

Jin Gang

(Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, P. R. China)

Abstract One kind of optical ProteinChip, and a ProteinChip analysis system, as well as some applications are introduced in this paper. The chip is prepared with surface patterning, surface modification, ligand immobilization to form a sensing surface with multi-bioactivity. The affinity between proteins, and the optical imaging ellipsometry with high spatial resolution are used to realize non-labeling micro-assays for protein identifications and protein interactions. It is not only a qualitative, but also a quantitative way for protein interaction determination. It is able to obtain dynamic data of protein interaction process, such as interaction rates and conditions, with real time detection.

Key words ProteinChip; bio-molecular interaction; imaging ellipsometry

1 蛋白质芯片的意义

为了揭示生命活动的规律,后基因组(post-genome)的研究,即蛋白质研究是必然的发展方向,以揭示基因的功能和在生命活动中的作用。

在面对复杂的、动态的、多因素的生命活动或重大疾病时,基因组(genome)和蛋白质组(proteome)的提出,使人类第一次有可能从生物大分子整体活动的角度来认识生命。

生物芯片技术具有集成、并行、快速和自动化分析的优势,它是融生物学、物理、化学和信息科学以及微制造技术为一体的交叉新科技,具有广泛的应用前景。生物芯片技术包括:基因芯片即DNA芯片、蛋白

质芯片或叫做生物分子芯片、细胞芯片和组织芯片等技术。蛋白质芯片的发展将会为“蛋白质组研究”提供强有力的工具,推动疾病诊断、药物筛选和个性化的药物运输等革新。

蛋白质是构成生命体的最小活性单位。按目前的认识,人体中存在着十万种以上的蛋白质,它们在肌体中分别承担不同任务,发挥着各自的作用。为了了解人体的健康状况,诊断和治疗,就需要认识其生理功能,识别和检测蛋白质,这是非常艰巨和繁重的工作。

蛋白质的组成具有多样性和可变性。蛋白质的表达受着多种因素的调控,在生命发育不同阶段的蛋白质的种类和构成是不一样的,不同的组织中细胞表

收稿日期:2001-05-10

基金资助:本项目曾获得多项中国科学院重点项目支持和国家自然科学基金委的资助。

作者简介:靳刚,男,1957年生于北京,法国巴黎皮埃尔·玛丽·居里大学物理博士,现任中国科学院力学所研究员,博士生导师;从事纳米生物技术和蛋白质芯片研究,和光学椭圆偏法及其应用技术研究;发表科技论文60余篇,并拥有两项蛋白质芯片发明专利。

达的蛋白质也有很大的差异,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不同,因此,蛋白质研究是在一个更加深入、在贴近生命本质的层次上去探讨和发现生命活动的规律和重要生理、病理现象的本质^[1]。

光学蛋白质芯片系统是分析和研究蛋白质的新技术^[2]。此方法将高分辨率的生物光学显微成像技术和集成化多元蛋白质芯片技术相结合,发展形成了新型的并行、快速生物分子识别和检测技术^[3]。它不需要任何添加剂,对生物活性无影响,还能够对蛋白质之间的相互作用过程进行实时测量,获得反应速率及反应条件等生物分子反应的动力学参数^[4]。为一些尚无答案的生物医学理论问题提供解答。其应用还不仅仅局限于科学研究,也可直接为医学诊断提供一种常规检查的新手段,使以往难以观察的生物分子相互作用过程以直观的图像显示出来,为识别和检测生物分子,即时地观察生物分子之间的相互作用和认识生物分子功能提供了可能性,从而获得很多传统技术所难以提供的信息,而且还可以广泛地用于生物医学研究、健康预测、临床诊断、新药的筛选和鉴定以及生物工业流程中的活性监测等。

2 光学蛋白质芯片性能特点

蛋白质芯片技术所包括的内容可以简单地概括成如下几个方面:

- 1) 芯片设计:根据待测对象,进行芯片的设计和加工;
- 2) 蛋白质活性装配:按照设计,在芯片上的相应位置进行配基的安装,并保持生物活性;形成生物活性的感应表面;
- 3) 芯片反应器:芯片的感应表面与待测物发生相互作用的反应器;
- 4) 数据采集和处理:芯片信息的信号转化、数字化和记录,以及信息处理和量化;
- 5) 蛋白质数据库:提供已知蛋白质的数据,供参照和分析。

蛋白质芯片的结构和功能是根据分析对象而设计制造的。常用的分为两类,即生物活性探针和多元生物分子芯片,它们能够分别对单一生物活性和多种生物活性进行分析和检测。

图1展示的是生物活性探针的一个应用结果。一个阶梯形厚度分布的蛋白分子膜层,从低到高的各层依次是基底表面、免疫G蛋白(IgG)的饱和和吸附膜层(3.5nm)和免疫G蛋白与它的抗体(AntiIgG)特异

性结合形成的复合分子膜层(7nm),这里的免疫G蛋白的饱和和吸附膜层就是具有特异敏感性的感应表面,将该膜层的一部分插入含有免疫G蛋白抗体的血清中(浓度约0.1mg/ml),使溶液中的抗体分子与感应表面上的免疫G蛋白结合形成复合分子。图中显示出免疫G蛋白与抗体分子结合所形成的复合分子导致膜层厚度明显地上升。由此可见,该探针是一种研究抗原-抗体特异性结合的十分方便的方法。

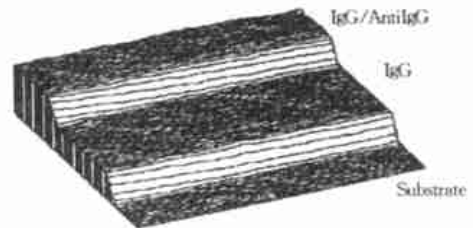


图1 IgG和IgG及其抗体的复合分子吸附膜层

多元蛋白质芯片的不同区域内,固定上不同的生物活性探针(配体),当此芯片浸入含有多元分析物的溶液时,如果分析物与芯片上的配体之间发生结合,就会形成生物分子复合物,改变芯片表面的形貌。

图2(A)是蛋白质芯片表面的三维成像,含有十个单元。其中,两两成对的单元分别制备了人血清白蛋白(HSA)、免疫G蛋白(IgG)、纤维蛋白原(Fib)和牛血清白蛋白(BSA),另有两个基底单元作为对照;将该芯片插入含有免疫G蛋白抗体的血清中(浓度约0.1mg/ml),浸泡30分钟以上,即得到图2(B)。与图2(A)对比,可以看到含有IgG的两个单元的膜层厚度明显地提高了,而其它单元的膜层厚度保持不变。

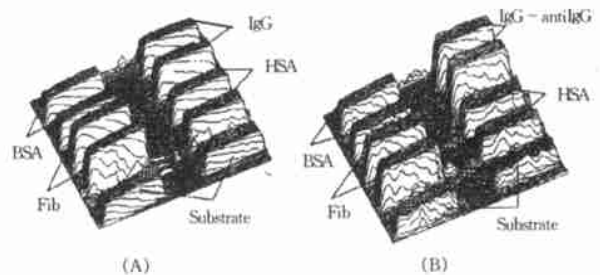


图2 多元蛋白质芯片成像

此变化可以由光学显微成像观察出来,通过计算机以图像的形式显示和处理,并与数据库进行信息交换,以提供进一步的定量分析。配体的专一性可以保证分析物在混合物中(如:血清、组织培养液、细胞或细胞膜抽提液),甚至可以结合在磷脂囊、病毒、细菌和真核细胞表面作直接分析,而不需要预先处理或纯化。

电子摄像机的快速摄取图像能力,为生物分子动

力学研究提供了可能,甚至多元分子之间的相互作用过程也可实时地显示出来,并获得生物分子反应动力学参数。图3是芯片实验获得的IgG和它的抗体反应,所引起的感应膜层的相对厚度随时间的变化,其中显现出三个线性段,分别对应时间在100秒以下、100秒至1000秒之间和1000秒以上,分别反映了抗

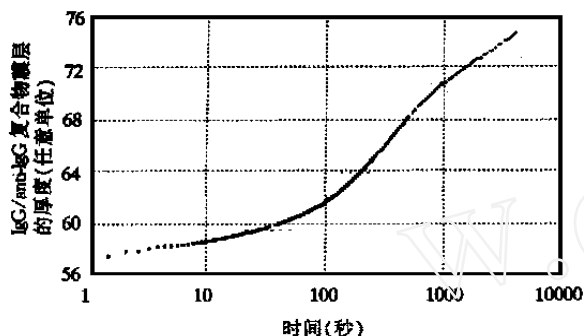


图3 IgG与其抗体特异性结合过程

体分子在溶液中的扩散速率,IgG和抗体的反应速率,和表面大部分分子已经结合形成复合分子后,反应速率的下降。进一步的理论分析将获得分子反应的动力学数据。几小时内所获得的信息,可能是多种传统技术同时工作数天,甚至更长时间的分子复合物综合分析。此技术的操作简便和可重复性,大大降低了试剂的用量、测试时间和劳动强度。

此系统的技术特点如下:

(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

由于观测的样品面积大,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,可以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的手段。

(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微升量级。

(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 and 定量测量。

3 应用和前景

利用此芯片系统已经开展了一些生物医学应用。如:多种抗原-抗体相互作用研究;鉴定治疗肝癌的单克隆抗体药物,其中所测量的肝癌细胞裂解液成分复杂,是其它免疫学方法所不能测量的;研究了配体和受体的特异结合(白介素6);进行了内分泌激素的测定尝试^[5];乙型肝炎表面抗原的检测实验;以及蛋白质的竞争吸附和细胞黏附的研究,均取得了良好的结果。蛋白质芯片还可以用来研究生物分子相互作用,并获得生物分子反应动力学参数。

此蛋白质芯片系统为蛋白质组研究、医学诊断、药物筛选和生物工业等应用开辟了新的途径。由此获得其它方法无法提供的信息,有望为一些尚无答案的生物医学理论问题提供解答。其衍生的药选、诊断和蛋白质分析的实用化专家系统,将进一步造福于社会。

参考文献

[1] 王志珍,邹承鲁. 光学蛋白质芯片技术及其应用. 生物化学与生物物理学报. 1998(30):533~36

[2] Jin G, Jansson R, Arwin H. Imaging Ellipsometry Revisited: Developments for Visualization of Thin Transparent Layers on Silicon Substrates. Rev Sci Instrum. 1996,67:2930~36

[3] 靳刚,孟永宏,邢建华,赵子彦. 生物分子吸附膜层的图象显示. 测试技术学报. 1998,12(3):166~71

[4] 王战会,靳刚. 光学椭圆偏振成像技术在生物分子研究中的应用. 生物工程学报. 2000,16(4):429~32

[5] Zhao Zi-Yan, Jin Gang, Wang Zhan-Hui. Detection of Somatropin and Corticosterone with Imaging Ellipsometry. Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 1998,20(2):590~93