综述与专论

表面等离子体激元共振与生物分子相互作用分析

汪　洛
(中国科学院动物研究所，生物膜与膜生物工程国家重点实验室，北京 100080)
陶祖莱
(中国科学院力学研究所，北京 100080)

摘要　对表面等离子体激元共振（surface plasmon resonance，SPR）的原理和在生物学研究方面的应用进行了综述．这种技术可以直接原位、实时地跟踪生物学实验研究系统，而不需要附加参数如进行标记等手段，具有高敏感性，也可以连续监测吸附或解吸附过程．目前有关的应用涉及到生物学结合分析、动力学及亲和力测定、免疫识别研究、结构与活性研究和核酸研究等多个领域．

关键词　表面等离子体共振，生物分子相互作用，实时分析，感应片表面

传统的生物学研究一般局限于体外实验或使用离体器官进行．但对于生物学家来说，最为理想的是能够实时、原位地对有关实验系统进行示踪，即不附加其他参数如进行标记来跟随实验过程．但传统的表面分析技术例如X射线光电子光谱（XPS）、俄歇电子能谱（AES）以及次级离子质谱（SIMS）缺点较多：费用比较昂贵；分析样品时需要高真空（显然这种条件不同于样品本身的自然环境）；XPS敏感度有限；而SIMS在最好的情况下，也只能进行半定量测定．同时因为生物学家的兴趣主要在于研究有关动力学过程，采用这些技术并不能满足这种要求．

最近几年发展了一些能够研究动力学过程的技术．包括傅立叶变换红外（FTIR）分光镜[1]、动力学接触角（DCA）分析[2]和表面等离子体激元共振（surface plasmon resonance，SPR）测定技术[3~5]，其中比较引人注目的是SPR测定技术．作为一种可以在表面上示踪生物分子特性以及相互作用的方法，它具有实时原位示踪动力学表面过程的能力，并且设备简单，不要求进行标记．本文综述了SPR技术的原理基础及其目前有关在生物分子相互作用实时分析上的初步应用．

1　表面等离子体激元共振原理

表面等离子体激元是一种沿着金属和介电层界面传布的横磁化电磁波（transverse magnetic electromagnetic wave）[6]．一般在棱镜（折射率为 n_1）上被覆一层金属银或金的薄膜（复合物折射率为 n_s），与另一种折射率为 n_2（$n_2 < n_1$）的介质相接触．波长为 λ 的光线经 p 偏振处理（即电向量组元与入射平面平行），照射进入棱镜，在金属-棱镜界面形成反射．在某一角度测定时，反射光强度达到最小．此时金属表面被激发产生一种传导电子的集团运动，即表面等离子体激元[7]．

根据麦克斯韦方程，对这种情况下在 n_s/n_2 界面上形成的损耗电场进行计算．其场强按 $\lambda/2$ 量级在 n_2 介质的一段特征性距离内

收稿日期：1996-01-23，修回日期：1996-04-01

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

呈指数衰减（图 1）[3].

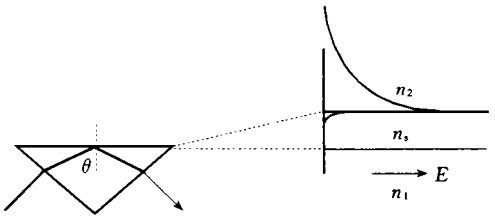

图 1 SPR 实验：金属界面上的场分布

Davies 在综述 SPR 技术及其在生物物质处理过程中的应用时，提出了一种更容易理解的原理. 当某一波长的光线照射到玻璃物质上面，其表面被反射的光线量随入射角角度改变增加，直至达到所谓临界角 θ_c. 处于或大于 θ_c 的光线完全从表面被反射，这种现象即完全内部反射. 当物质背面覆上薄层金属，将产生一种大于 θ_c 的角度. 此时光线不是被完全内部反射，而是“损耗”或“耦合”进入金属薄膜，导致被反射的光线强度达到最小（图 2）. 这种最小化发生时的角度称为 SPR 角（θ_{spr}）.

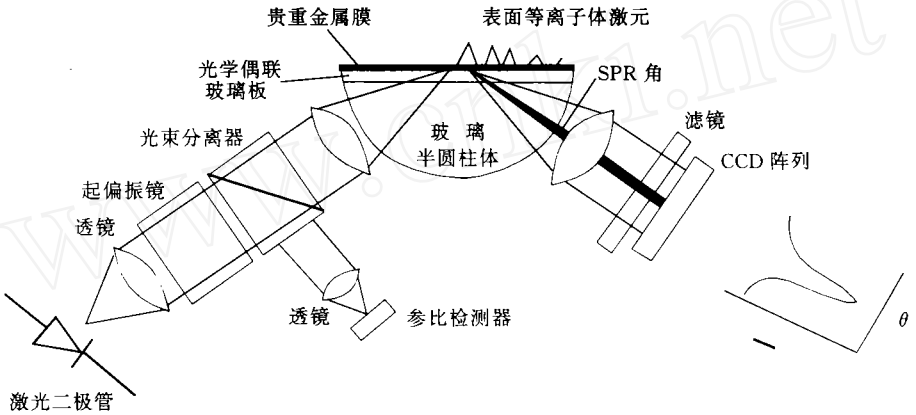

图 2 光线产生的 SPR

这种现象的原因在于金属膜边缘上电子的振荡作用. 金属可以简单地被想象成一种位于运动电子中的原子中心. 在边界层，这些运动的表面电子能够以分立或不连续频率发生振荡，并沿着金属边界层传播，构成表面等离子体波. 因此，当入射光的波向量与金属膜内表面电子（称为等离子体）的振荡频率相匹配时，光线即被“耦合”进入金属膜，引起电子发生共振——“SPR”一词即因此而得. 处于 θ_{spr} 的光线可以提供确切的能量，导致金属膜表面电子发生共振. 电子吸收该能量（随后由于耗散和辐射作用丢失在膜内被衰减），使被反射强度达到最小[8].

这种瞬息的共振场进入临近的介电介质. 等离子体波频率以及由此产生的 θ_{spr} 不仅极端依赖于金属边界层的物理性质，而且更为主要地依赖于直接接触金属膜的临近介质本身的介电特性，即频率随折射率 η 和临近介电层厚度 d 的改变而变化. 如果膜上接触的介质是空气（$\eta=1.000$），则 $\theta_{air}\approx42°$；如果接触介质为缓冲液（$\eta=1.334$），则 $\theta_{buff}\approx65°$；而某种蛋白质溶液（$\eta\approx1.45$）通过金属膜并吸附到表面时，θ_{spr} 的位移更大，其程度与被吸附蛋白质的表面范围成比例[8].

2 SPR 的有关应用

SPR 技术的应用十分广泛. 它不仅可以用于测量金属薄膜上 SPR 的光学特性，而且也能够研究表面被吸附膜与分子的构成和物理特性，例如 Langmuir-Blodgett（LB）膜、气体分子的吸附和蛋白质吸附等作用，同时还能够提供液相分子与表面固定的分子之间相互作

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用的动力学信息，如配体-受体相互作用、生物相容性研究等等.

目前最令人感兴趣的 SPR 应用可能在生物学研究方面. 如前所述，与传统技术相比，SPR 技术的优点极为明显. 不需要进行标记；表面生物分子的相互作用可以直接、实时、原位地进行监测；样品需要量少；可以监测吸附或解吸附过程的连续反应；可逆性程度也可以方便地进行监测. 典型的吸附侧面像 (adsorption profile) 简图见图 3. 结合速率 (斜率 s) 与研究系统的动力学有关；总的角度位移 Δ 则与被结合物质的总量、溶液中配体的浓度和随之发生的表面函数性质有关. 在吸附侧面像的起始 (C_b) 和终止 (C_e) 点，SPR 曲线的形状 (半宽值、最小位置、最小反射) 涉及到被吸附物质的物理特性如均匀性、折射率和厚度等. 通过这些参数，显然可以较为详尽地阐明有关的表面过程[8].

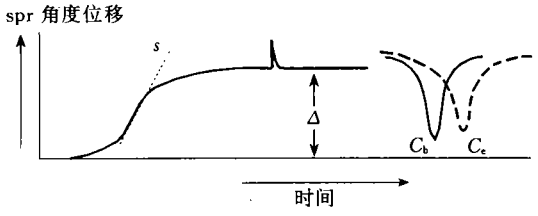

图 3　SPR 吸附侧面像原理图

3　生物分子相互作用的研究

生物分子的活性功能主要在溶液状态中通过分子之间的相互作用来体现，探测及研究这种相互作用的过程对于生命科学领域的研究，揭示生命发生发展的基本机制具有十分重要的意义，也因此蕴涵了某些极其广泛的应用可能.

生物分子相互作用分析 (biomolecular interaction analysis, BIA) 是利用生物传感技术 (biosensor technology) 将探针或配位体 (ligand) 固定在某种固相介质 (感应片) 的表面，被选择的探针或配位体能够专一性地确保与待检生物分子形成复合物进行直接分析，而不需预先采用某些处理. 这样生物分子的相互作用可在发生时即时 (真实时间内) 进行测量和分析.

可以从实时 BIA 研究中获得的信息包括：

a. 特异性/特性 (哪些分子发生了相互作用?)；b. 浓度 (有多少分子?)；c. 亲和性 (相互作用的程度有多大?)；d. 动力学 (相互作用的速率有多快?)；e. 协同作用 (是否存在任何异构效应?)；f. 相对结合模式 (结合模式与不同样品是否相对应?).

因此，实时 BIA 可以监测两个以上的分子如蛋白质-蛋白质、药物-蛋白质、核酸-蛋白质、核酸-核酸、受体-配体等分子之间相互作用的情形等等. 例如某一特定受体的结合部位、活性位点的数目以及结构上的改变对这些部位的影响 (BIA technology Handbook, Pharmacia Biosensor A B).

已经开展的有关研究涉及到生物学结合分析、动力学及亲和力测定、免疫识别研究、结构与活性研究和核酸研究等多个领域. 其中包括蛋白质-蛋白质[9~11]及蛋白质-核酸相互作用[12]、激素结构及功能结合结构域 (domain) 的比较分析[13]、有效活性分子的检测[14,15]、DNA 杂交动力学分析[16]、抗原决定簇表型的分型分析 (mapping)[17]、信号传导分子的研究[18]、蛋白质结构与功能分析[19]和蛋白质构象研究[20]等等.

Kelly 等[13]将 $p^{185HER2-ECD}$ 固定在感应片表面，研究了人源抗体 hu4D5 与这种抗原的结合作用. 他们采用同一个感应片在短短两周之内，连续三次测定了野生型抗体的结合动力学，并且同时筛选了一系列突变型抗体，结果证明这种固定化蛋白质 (抗原) 可以耐受 300 次以上的结合与再生过程. 显然这些实验表明，BIA 可以作为一种快速分析分子结合反应详细情况的强有力手段，这一方面的可能应用包括不同温度下同源二元和异源二元蛋白质之间各种结合参数的测定、多重结合平衡状况的解析以及结合平衡状况的测定.

许多文献报告可以通过 SPR 阐明抗原的

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

决定部位. Johne 等[21]采用 SPR、方格板(chequer board) ELISA 和集簇分析(cluster analysis),比较了 10 种 MAbs 的同型(isotype)测定结果. 数据表明 SPR 的速度更快、不需要标记,可以作为快速简便的抗体同型(isotype)分析方法. 此外,他们还认为 SPR 的应用不仅可以作为一种诊断工具,而且可以作为进一步理解蛋白质相互作用的一种手段,因此,一般说来有助于免疫分析技术的发展. Knilko 等[22]纯化出主要组织相容性复合物 I 型分子的基因工程相似物,评价了其对于固定化抗原多肽的结合. 他们采用 SPR 筛选了通过不同位置侧链偶联结合的多肽,来鉴定那些与结合作用严格相关的侧链以及溶剂中的有关侧链. 通过这种途径,他们认为有可能用于研究与 T-细胞受体的相互作用.

Grigham-Burke 等[23]在另一项新的应用中也采用了 SPR. 他们将一种 MAb 固定在传感器的表面,然后流过可溶性重组的人补体受体(HCR),来测定 HCR 与固定化抗体之间的相互作用. 为了评价溶剂破坏抗体-HCR 相互作用的能力,他们采用这种方法筛选了大量的洗脱溶剂. 实际上,他们把 SPR 用作为一种摸索免疫亲和层析最佳条件的快速方法.

Schuster 等[18]研究了趋化信号系统不同成分之间复合物的形成,以及信号底物和磷酸化条件对这些复合物的影响. 他们以大肠杆菌为研究模型,发现 CheA 可以磷酸化决定鞭毛旋转方向的调节子(regulator) CheY 和受体调制子(modulator) CheB,受体对 CheA 的调节要求偶联蛋白质 CheW 的存在,CheA 磷酸化 CheY 的两步骤机制涉及到 CheA 中一个组氨酸残基的自身磷酸化. 其结果为以前未发现的 CheA 及其底物之间的结合作用提供了证据. 很显然这种技术也可用于其他受体信号系统的研究,感应片表面上形成的多重成分信号传导复合物具有生物学活性,对于详细研究细胞内和细胞间通讯调节的特异性相互作用提供了一种全新的手段.

最新的研究报道来自 Nilsson 等[24],采用生物传感器技术实时监测 DNA 的操作过程,从而揭示出实时生物特异性相互作用分析技术在分子生物学中应用的潜力. 他们采用高亲和性的链酶抗生物素-生物素系统将 DNA 片段固定在生物传感器表面,然后用于分子生物学不同元件处理过程的监测,如 DNA 链的分离、DNA 杂交动力学包括杂交和 DNA 链分离以及酶学修饰如连接、核酸内切酶裂解及 DNA 合成. 使用由六寡核苷酸组成的模式系统,可以装配成一个69 bp的双链 DNA 片段. 使用这一系统,生物传感器方法即可用于分析多步骤固相的基因装配,和常规用于 DNA 合成与操作的各种酶作用以及 DNA 样品中单点突变的测定.

van der Merwe 等[25]采用 SPR 研究了细胞黏附分子(CAMs)的相互作用. 他们分析了类凝集素 CAMs 家族成员 CD_2 的亲和力和动力学常数,以及位点突变对结合位点的影响,结果表明这一技术具有常规结合分析方法所不能比拟的优点:样品体积少(仅需 7 μl)、清洗步骤不干扰平衡、被分析物不需要预先纯化. Stockley 等[26]则采用这一方法示踪了序列特异性 RNA 与蛋白质之间的相互作用.

Blikstad 等[27]在寡糖分离和特性研究中,检测了凝胶过滤洗脱液中未经修饰的寡糖. 他们将凝集素固定化后,特异地检测了末端的唾液酸和 β-半乳糖,以 N-唾液酸化寡糖检测的敏感度为 10～15 fmol. 他们的实验显然为采用常规生化分析比较难于进行的多糖研究开创了一种全新的手段. Herbai 等[28]采用 SPR 技术研究了脂膜的相互作用,包括原位脂膜形成及影响参数. 他们认为脂膜可以作为研究生物膜过程中涉及到结构和动态特性、以及配基-受体相互作用的模式系统,并且在他们的实验中已经得到了证明.

致谢 中国科学院生物物理研究所陈润生、清华大学赵南明、安徽大学孙大明、本室刘树森、丰美福、焦选茂教授对本文提出了宝贵的建设性修改意见;收集资料时,Pharmacia 公

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

司和本室有关人员提供了帮助，在此谨向他们致谢.

参 考 文 献

1 Knutson K, Lyman D J, In: Andrade J D ed. Surface and interfacial aspects of biomedical polymers. New York: Plenum Press, 1985; **1**: 197

2 Andrade J D, Smith L M, Gregonis D E. In: Andrade J D ed. Surface and interfacial aspects of biomedical polymers. New York: Plenum Press, 1985; **1**: 249

3 Kooyman R P H, de Bruijn H E, Eenink R G *et al*. J Mol Struct, 1990; **218**: 345

4 Jönsson U, Fägerstam L, Ivarsson B *et al*. Biotechniques, 1991; **11**: 620

5 Fägerstam L G, Karlsson Å F, Karlsson R *et al*. J Chromat, 1992; **597**: 397

6 Chao N M, Chu K U, Shen Y R. Mol Cryst Liq Cryst, 1981; **67**: 261

7 Raether H. Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. New York: Springer-Verlag, 1988: 1

8 John D. Nanobiology, 1994; **3**: 5

9 Calakos N, Bennett M K, Perterson K E *et al*. Science, 1994; **263**: 1146

10 van der Merwe P A, Barley A N. Trends Biochem Sci, 1994; **19**: 354

11 Kelley R F. Methods: A companion to methods in enzymology. 1994; **6**: 111

12 Stockley P G, Parsons I D, Wild C *et al*. Report from the fourth European BIA symposium. Germany: Heidelberg Pharmacia Biosensor AB, 1994: 136

13 Cunningham B C, Wells J A. J Mol Biol, 1993; **234**: 554

14 Karlsson P, Fägerstam L, Nilshans H *et al*. J Immunol Methods, 1993; **166**: 75

15 Nilsson P, Nygren P Å, Larsson A *et al*. Report from the fourth European BIAsymposium. Germany: Heidelberg, Pharmacia Biosensor AB, 1994: 127

16 Davis S. In: Gedrych B A eds. BIA Journal. Sweden: Uppsala, 1994; **1**: 27

17 Mañes S, Gómez-Mouton C, Kremer L *et al*. Report from the fourth European BIAsymposium. Germany: Heidelberg, Pharmacia Biosensor AB, 1994: 65

18 Schuster S C, Swanson R V, Alex L A *et al*. Nature, 1993; **365**: 343

19 End P, Gout I, Fry M *et al*. J Biol Chem, 1993; **268**: 10066

20 Schlatter D, Huber W, Steiner B *et al*. Report from the Fourth European BIAsymposium. Germany: Heidelberg, Pharmacia Biosensor AB, 1994: 47

21 Johne B, Gadnell M, Hansen K *et al*. J Immunol Methods, 1993; **160**: 191

22 Khilko S N, Corr M, Boyd I F *et al*. J Biol Chem, 1993; **268**: 15425

23 Grigham-Burke M, O'Shannessy D J. Chromatographia, 1993; **35**: 45

24 Nilsson P, Persson B, Uhlèn M *et al*. Anal Biochem, 1995; **224**: 400

25 Van der Merwe PA. Abstracts of fifth European BIAsymposium. Sweden: Stockholm, Pharmacia Biosensor AB, 1995: 16

26 Stockley P G, Farrow M A, Walsh A P *et al*. Abstracts of fifth European BIAsymposium. Sweden: Stockholm, Pharmacia Biosensor AB, 1995: 36

27 Blikstad I, Fägerstam L G, Bhikhabhai R *et al*. Abstracts of fifth European BIAsymposium. Sweden: Stockholm, Pharmacia Biosensor AB, 1995: 52

28 Herbai E, Hansson A, Löfos S *et al*. Abstracts of fifth European BIAsymposium. Sweden: Stockholm, Pharmacia Biosensor AB, 1995: 88

Surface Plasmon Resonance and Biomolecular Interaction Analysis.

Wang Luo (*State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing* 100080, China); Tao Zulai (*Laboratory of Biological Dynamics, Institute of Mechanics, Academia Sinica Beijing* 100080, China).

Abstract The principle of surface plasmon resonance and the applications of this theory, particularly in biological fields are reviewed. Using this technique, the experimental system can be directly probed and followed in real time and *in situ* without the requirement for additional parameters, such as labelled moleculars. With high sensitivity, the sequential reactions during adsorption or desorption can be monitored. So far, the applications are involved in biological binding analysis, kinetics, affinity measurement, immuno-distinguish, structure-activity study and nucleic acid research, etc.

Key Words surface plasmon resonance, biomolecular interaction, real time analysis, sensor chip surface

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net