

A 蛋白定向固定抗体用于椭偏光学生物传感器免疫检测

孟艳丽 王战会 靳 刚

(中国科学院力学研究所 国家微重力实验室 北京 100080)

摘 要 椭偏光学生物传感器是在椭偏光学显微成像技术的基础上发展的一项生物传感技术。它能够直接观测固体表面上的生物分子面密度,毋需任何标记辅助,适合发展成为一种无标记免疫检测技术。研究了在硅片表面上通过 A 蛋白定向固定抗体分子用于椭偏光学生物传感器免疫检测的可能性。实验结果表明,通过 A 蛋白固定抗体得到的抗体膜层的均一性和固定量的重复性能够保证椭偏光学生物传感器免疫检测结果的质量。通过 A 蛋白定向固定的抗体的抗原结合位点趋向一致,显著提高了抗体与抗原结合的能力。此外,通过蛋白 A 固定的免疫球蛋白 G 分子能够结合更多的多克隆抗体分子说明通过 A 蛋白固定的蛋白质分子能够较好地保持其空间构象。

关键词 A 蛋白 椭偏光学生物传感器 无标记免疫检测技术

中图分类号 Q682 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0111-04

椭偏光学生物传感器是近几年发展起来的基于椭偏光学显微成像和生物分子特异亲和性的生物传感技术。关于它的光学原理已有详细的叙述^[1]。椭偏光学显微成像是一种灵敏的表面观测技术,适合于观测超薄膜。它能够以亚纳米的灵敏度对固体基底表面上的生物单分子膜层进行观测。研究表明,绝大部分蛋白质在固体表面上形成的单分子饱和吸附膜层厚度在 2~10nm 的范围内^[2]。由于生物分子间的特异性结合,如抗原抗体间的结合,而形成的复合膜层能导致表面上的生物分子膜层厚度的增加。通过椭偏光学生物传感器可以很容易地直接定量观测生物分子膜层厚度分布的变化,从而确定待测溶液中目标生物分子的存在与否,或更进一步进行定量分析。该传感器不同于酶联免疫和放射免疫法的优点是毋需对生物分子做任何标记,从而从方法上消除了标记操作带来的检测问题。此外,椭偏光学生物传感器是一种光学显微成像技术,它能够同时对样品表面进行大面积的成像^[3],因此通过该传感器能够实现生物分子的多元检测——蛋白质芯片。本文研究的就是适合于椭偏光学生物传感器检测的抗体芯片的表面改性技术。

抗体分子对目标抗原有着极高的特异选择性,它已被固定在各种各样的固体表面上用于蛋白质纯

化、免疫检测等^[4]。本文研究了抗体分子在硅片表面上的定向固定方法和传感器应用。抛光的硅片具有良好的光学表面和高光学折射率,十分适合于用作椭偏光学生物传感器检测的基底。研究发现直接固定在固体表面上的抗体分子的生物活性通常低于溶液中的抗体分子。生物活性降低的原因可能是固定在固体表面上的抗体分子的空间构象改变,空间位阻大,不利于抗体-抗原的自由结合^[5]。另外一个可能的原因是抗体分子的功能域在固相表面上趋向的随意性。我们通常采用疏水表面的硅片作为基底,来直接固定抗体,由于这种物理吸附的随意性,一些被固定的抗体分子的功能域被掩盖,失去同抗原分子结合的能力。而定向固定抗体分子的方法能够使抗体的功能域完全暴露在表面外,有效地改善抗体与抗原间的结合。A 蛋白是从金黄色葡萄球菌中提取的蛋白质,它能够同多种哺乳动物抗体分子的 Fc 片段特异性结合,经常被用来定向固定抗体分子^[6]。本文研究了通过 A 蛋白定向固定抗体分子用于椭偏光学生物传感器免疫检测的可能性。

1 材料和方法

1.1 试剂

人免疫球蛋白(α IgG),人免疫球蛋白 G 的抗体

(Anti-IgG) A 蛋白(Protein A),牛血清白蛋白(BSA) 购自美国 Sigma 公司。

1.2 硅片表面疏水化处理^{7]}

把切成 20mm × 5mm 大小的抛光硅片浸泡在体积比为 1:3 的过氧化氢(H₂O₂)和浓硫酸(H₂SO₄)混合液中 30min。纯水清洗 3 次,再用无水乙醇清洗 3 次后,把硅片浸泡于体积比为 1:10 的二氯二甲基硅烷[(CH₃)₂SiCl₂]和三氯乙烯(C₂HCl₃)混合液中 5min。轮换用无水乙醇和三氯乙烯清洗硅片 3 次。处理好的硅片浸泡在无水乙醇中待用。

1.3 在疏水表面上固定抗体结合抗原

把经过疏水化处理的硅片浸泡到磷酸缓冲液(PBS, pH 7.2)稀释的人免疫球蛋白 G 抗体溶液中(0.1mg/mL),大约用 30min,达到饱和吸附。纯水清洗去除未吸附的抗体分子后,用 1mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭表面 30min。再用纯水清洗后,放入 1mg/mL 的人免疫球蛋白 G 的溶液中浸泡 30min。纯水清洗,氮气吹干。

1.4 用 A 蛋白改性硅片表面固定抗体结合抗原

把经过疏水化处理的硅片浸泡到磷酸缓冲液(PBS, pH 7.2)稀释的 A 蛋白溶液(1mg/mL)中,达到饱和吸附,大约为 20min。纯水清洗后,用 1mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭表面 30min。纯水清洗后,浸泡到 0.1mg/mL 的人免疫球蛋白 G 抗体溶液中,结合反应达到饱和,大约为 30min。纯水清洗后,放入 1mg/mL 的人免疫球蛋白 G 的溶液中浸泡 30min。纯水清洗,氮气吹干。

1.5 椭偏光学生物传感器

椭偏光学生物传感器是近几年发展起来的基于椭偏光学显微成像技术和生物芯片技术的生物传感器技术。椭偏光学显微成像是传统的椭偏仪的基础上发展起来的一项光学成像技术^[8]。椭偏光学测量是用偏振光波为探测光照射样品,样品会对入射光波进行调制,使得反射光中载有样品的信息。在椭偏光学成像技术中,用一个扩展光束代替了传统的窄光束,CCD 摄像机代替了传统的光电倍增管或光电管等光探测器,扩大了样品表面的即时检测面积,可以对多元样品进行观测,而不再像传统的椭偏仪那样,只能做单点测量。椭偏光学显微成像技术在检测样品膜层的厚度分布时,同时应用消光椭偏和非消光椭偏原理,使得膜层的厚度正比于反射光强的平方根^[8]。膜层厚度的绝对值可以通过引入参考膜层或用消光椭偏法测量来得到。以抛光的硅片表面作为基底,椭偏光学显微成像技术能够以亚纳

米的厚度分辨率和微米级的横向分辨率来观测生物分子膜层^[1]。

2 实验结果和讨论

为了比较不同的抗体分子固定方式对生物活性的影响,疏水硅片表面和经过 A 蛋白改性的硅片表面被选定来固定抗体分子。在疏水硅片表面上,抗体分子主要是通过疏水相互作用驱动的物理吸附固定在表面上。在经过 A 蛋白改性的硅片表面上,抗体分子是通过其 Fc 片段与 A 蛋白的特异结合,使 Fab 片段都指向表面外侧,而定向固定在表面上。通过椭偏光学生物传感器观测,直接得到抗体膜层的灰度图。为直观地显示表面的膜层分布,根据椭偏光学成像原理可以把灰度图转换成膜层分布的三维图^[8]。图 1 所显示的就是抗体分子(Anti-IgG)在疏水硅片表面上(图 1A)和经过 A 蛋白改性的硅片表面上形成的饱和结合膜层的三维图(图 1B)。

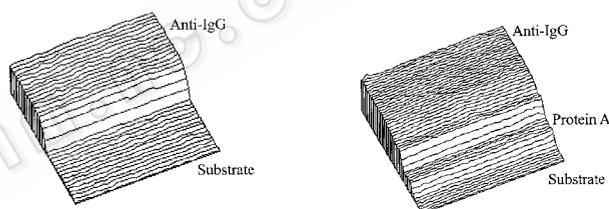


图 1 (A)疏水硅片表面上抗体分子的饱和吸附膜层和 (B)蛋白 A 改性后的硅片表面上抗体分子饱和结合膜层

Fig.1 (A) The saturated layer of anti-IgG formed by physical adsorption on the hydrophobic silicon surface (B) The saturated layer of anti-IgG formed by its affinity with the protein A on the silicon surface

从图中可以看出,抗体分子在经过 A 蛋白改性的硅片表面上的固定量,略少于直接在疏水硅片表面上的固定量。在经过 A 蛋白改性的硅片表面上的抗体膜层平均厚度是 3.6nm,疏水硅片表面上的膜层平均厚度是 4.1nm。为了评价经过 A 蛋白改性的硅片表面上形成的抗体膜层的均匀性,在膜层上随机选定 5 个区域测定膜层的厚度,得到的偏差小于 0.1nm。椭偏光学生物传感器是通过直接检测硅片表面上生物分子膜层的厚度来确定生物分子在表面上的结合量(即分子面密度),所以表面上生物分子膜层的均一性有利于得到高质量的检测结果,特别是定量检测。此外,抗体在硅片表面上结合量的重复性,对于获得稳定的高质量的检测结果同样是一个重要的影响因素。取 5 片经过 A 蛋白改性的

硅片,重复进行 5 次抗体分子的固定实验。通过椭圆偏光学生物传感器来检测抗体的结合量,得到的偏差小于 0.2nm。上述结果表明通过 A 蛋白来定向固定抗体分子能够保证椭圆偏光学生物传感器检测结果的重复性和稳定性。

把通过 A 蛋白固定人免疫球蛋白 G 抗体的硅片和人免疫球蛋白 G 抗体直接吸附于疏水表面的硅片同时浸泡在相同的人免疫球蛋白 G 溶液中,持续相同的时间。通过椭圆偏光学生物传感器检测得到的结果如图 2 所示。图 2A 展示的是疏水硅片表面上固定的抗体与抗原的结合结果,可以看出,仅有少量的人免疫球蛋白 G 与其抗体结合,抗体膜层厚度大约为 0.8nm。而图 2B 中通过 A 蛋白固定的抗体与抗原结合的结果显示有大量的人免疫球蛋白 G 与其抗体结合。定量分析结果表明人免疫球蛋白 G 与通过 A 蛋白定向固定的抗体结合量大约是与直接在疏水硅片表面上固定的抗体结合量的 5 倍。实验结果说明通过 A 蛋白定向固定在硅片表面上的抗体分子比直接固定在疏水硅片表面上的抗体分子持有更高的生物活性。

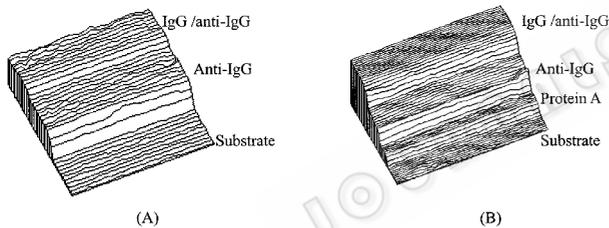


图 2 (A)人免疫球蛋白 G 与疏水硅片表面上固定的抗体结合 (B)人免疫球蛋白 G 与通过蛋白 A 定向固定的抗体结合

Fig.2 (A) Human IgG bound with anti-IgG immobilized by physical adsorption on silicon surface ;
(B) Human IgG bound with anti-IgG oriented protein A immobilization on silicon surface
More human IgG was bound on surface modified with protein A than that on hydrophobic surface

通过物理吸附在硅片表面上固定抗体分子是最简便的抗体固定方法,但会导致抗体的生物活性受到影响。原因可能是抗体分子与表面之间的相互作用改变了抗体分子的空间构象,导致抗原结合域受到破坏,失去与抗原的结合能力。抗体分子的定向固定能在一定程度上解决这些问题。通过 A 蛋白定向固定的抗体分子能够保持更高的生物活性,可能的原因一是 A 蛋白分子介于表面与抗体分子之间,有效地降低了抗体分子与表面间的相互作用,使

抗体分子能够在一定程度上维持其空间构象;二是 A 蛋白分子与抗体分子的 Fc 片段结合使 Fab 片段都有序地伸向表面外,降低了抗体与抗原结合的空间阻力。研究发现 A 蛋白分子具有 5 个能够特异性结合抗体分子 Fc 片段的功能域 (E, D, A, B 和 C),每个功能域含有 58 个氨基酸残基,并且都能独立同 Fc 片段结合^[9]。物理吸附使固定在硅片表面上的 A 蛋白分子部分功能域受到破坏,但具有多个功能域的优势使其总能够保持活性功能域的存在,供定向固定抗体分子使用。因此,通过 A 蛋白固定抗体分子是一项既简单又有效的定向固定技术。

为了进一步证明通过 A 蛋白固定抗体分子能够有效降低表面与抗体之间的相互作用,保持抗体分子的空间构象,我们又设计了通过 A 蛋白来固定人免疫球蛋白 G 与其多克隆抗体进行结合。图 3 中所显示的就是通过 A 蛋白来固定的以及直接固定在硅片表面上的人免疫球蛋白 G 与其多克隆抗体的结合结果。直接在硅片表面上固定的人免疫球蛋白 G 所结合的抗体膜层厚度为 3.5nm(图 3B),而通过 A 蛋白来固定的人免疫球蛋白 G 结合的抗体膜层厚度大约是直接在硅片表面上固定的人免疫球蛋白 G 结合的抗体膜层厚度的 3 倍。这表明通过 A 蛋白固定的人免疫球蛋白 G 能够较好地维持其空间构象,从而在分子上保持了更多的抗体结合位点。

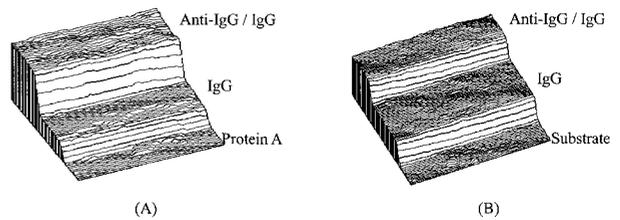


图 3 (A)抗体与通过 A 蛋白固定的人免疫球蛋白 G 结合 (B)抗体与疏水表面上固定的人免疫球蛋白 G 结合

Fig.3 (A) Anti-IgG bound with human IgG immobilized by protein A on silicon surface (B) Anti-IgG bound with human IgG immobilized by physical adsorption on silicon surface
The protein A immobilized silicon surface bound more anti-IgG than that on hydrophobic surface

致谢 此研究得到国家自然科学基金委和中国科学院等部门的资助,谨致谢意。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Jin G, Tengvall P, Lundstrom I, Arwin H. A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular inter-

- actions. *Analytical Biochemistry*, 1995, **232**: 69 – 72
- [2] Tengvall P, Lundstrom I, Liedberg B. Protein adsorption studies on model surfaces: An ellipsometric and infrared spectroscopic approach. *Biomaterials*, 1998, **19**: 407 – 422
- [3] Jin G (靳刚), Meng YH (孟永宏), Xing JH (邢建华), Zhao ZY (赵子彦). Visualization of adsorbed biomolecular layers. *Journal of Test and Measurement Technique* (测试技术学报), 1998, **12**(3): 166 – 171
- [4] Phillips TM, Queen WD, More NS, Thompson AM. Protein A coated glass beads universal support medium for high-performance immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography*, 1985, **327**: 213 – 219
- [5] Anderson GP, Jacoby MA, Ligler FS, King KD. Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 1997, **12**(4): 329 – 336
- [6] Jaroslaava T. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *Journal of Chromatography B*, 1999, **722**: 31 – 31
- [7] Wang ZH (王战会), Jin G (靳刚). Imaging ellipsometry in biomolecule research. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(4): 429 – 432
- [8] Jin G, Jansson R, Arwin H. Visualization of thin transparent organic films with imaging ellipsometry. *Rev Sci Instrum*, 1996, **67**: 2930 – 2936
- [9] Sohei K, Yasuko Y, Tetsuya H, Eiry K, Masuo A. Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization. *Journal of Biotechnology*, 2000, **76**: 207 – 214

Oriented Immobilization of Human IgG by Protein A on Imaging Ellipsometry Biosensor

MENG Yan-Li WANG Zhan-Hui JIN Gang*

(National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The biosensor based on optical imaging ellipsometry, can be used to detect directly, without labeling, the surface concentration of biomolecules on solid surface. The feasibility of using protein A to immobilize antibody on the silicon surface of the imaging ellipsometry biosensor was investigated in this study. The results showed that the anti-IgG immobilized by the protein A on silicon surface could bind effectively human IgG, and the human IgG immobilized on silicon surface by protein A bound more polyclonal antibody molecules than that immobilized on silicon surface directly, suggesting that protein A might block the surface to prevent the absorption of human IgG on surface directly, which might compromise its native configuration. The silicon surface modified with protein A is expected to be used to immobilize a variety of antibodies, as protein A can bind selectively the Fc regions of many mammalian IgG. The combination of imaging ellipsometry and the protein A surface modification has the potential to be developed into immunoassays of high sensitivity.

Key words protein A, imaging ellipsometry biosensor, label-free immunoassay

Received: 07-21-2003

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China and the Chinese Academy of Sciences (No. 90206029, No. 60178033).

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62631816; E-mail: gajin@imech.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>