

光学蛋白芯片技术在噬菌体 M13KO7 检测中的应用

Application of Optical Proteinchip in Detecting Phage M13KO7

齐 财^{1,3} 冯 静² 王战会¹ 孟永宏¹ 阎锡蕴² 靳 刚^{1,2*}

QI Cai^{1,3}, FENG Jing², WANG Zhan-Hui¹, MENG Yong-Hong¹, YAN Xi-Yun² and JIN Gang^{1,2*}

1 中国科学院力学研究所国家微重力实验室,北京 100080

2 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室,北京 100101

3 中国科学院研究生院,北京 100049

1 *Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*

2 *Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

3 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*

摘 要 将亲和素共价固定在表面改性后的硅片上,通过亲和素与生物素相互作用将生物素标记的噬菌体抗体 GP3 固定在亲和素膜层表面,当含有 M13KO7 噬菌体的样品经过抗体表面时,通过噬菌体与抗体之间的相互作用噬菌体就会被抗体捕获,生物学信号可以通过芯片上的膜层厚度变化表现出来,这种膜层厚度变化可以被椭圆偏振生物传感器技术识别。结果表明,GP3 抗体在芯片表面形成了饱和的抗体膜层,厚度为 6.9nm, M13KO7 噬菌体与芯片上固定的抗体会发生特异性相互作用,噬菌体被抗体捕获后形成的复合物膜层厚度为 17.5nm,并且随着噬菌体浓度升高膜层厚度增加,检测含有 M13KO7 噬菌体的样品灵敏度为 10^9 pfu/mL。与其它研究病毒与抗体相互作用方法相比光学蛋白芯片技术具有简便快捷、无需标记待检样品和结果直观等优点,为研究病毒与其抗体相互作用以及疾病早期临床诊断提供了一个新的方法。

关键词 蛋白质芯片,生物传感器,噬菌体,GP3 抗体

中图分类号 Q33 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0856-05

Abstract Avidin layer was bound on the substrate surface of Silicon wafer modified with aldehyde. The interaction between avidin and biotin was adopted for the immobilization of mouse monoclonal biotin-anti-M13 (antibody GP3)-labeled biotin. The surface was incubated in a solution containing phage M13KO7, which was trapped by the antibody GP3 with the interaction between phage M13KO7 and antibody GP3, resulting in a variation of layer thickness that was detected by imaging ellipsometry. The results showed a saturated layer of antibody GP3 with a thickness about 6.9 nm on the surface of the silicon wafer. The specific interaction between phage M13KO7 and antibody GP3 resulted in a variation of the layer thickness. The layer of phage M13KO7 bound with antibody GP3 was 17.5 nm in the concentration of 1.1×10^{10} pfu/mL. Each variation of layer thickness corresponded to a concentration of phage M13KO7 in the range of $0.1 \times 10^{10} \sim 2.5 \times 10^{10}$ pfu/mL, with the sensitivity of 10^9 pfu/mL. Compared with other methods, the optical protein-chip requires only short measurement time, is label free, is a quantitative test, and can be visualized. This study could be significant on the investigation of interactions between the antibody and virus, and shows potential in the early diagnosis of virosis.

Key words optical protein chip, imaging ellipsometry, phage M13KO7, antibody GP3

Received: April 19, 2006; Accepted: May 23, 2006.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 90206029).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62621297; Fax: 86-10-62561284; E-mail: gajin@imech.ac.cn

国家自然科学基金项目(No. 90206029)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

病毒是介于生命与非生命形式之间的一类非细胞形态生物,给动物、植物和人类带来了极大危害。据统计,每年由于植物病毒病危害,全世界粮食损失 200 亿美元。艾滋病和 SARS 流行更使人类健康遭到了严重威胁。深入理解抗体与病毒之间的多样性和特异性相互作用对于早期诊断、药物疗效评价及药物靶点识别、治愈指标确定和阐明疾病生物学机制等都有极为重要的意义。目前病毒检测方法大致有三类:细胞培养法、PCR 方法和免疫学法。最早发展的细胞培养法是传统实验室一些病毒诊断的“金标准”,可是这种方法操作技术要求高,所需时间长,对设备要求也高,不适合直接检测病毒。PCR 方法十分灵敏,但容易污染。免疫学方法中酶联免疫和免疫荧光对蛋白进行标记易破坏蛋白样品活性和造成假阳性结果。表面等离子共振(SPR)技术成本较高,石英晶体感受器方法操作技术要求高,试验条件要求严格。2003 年 Saju R 等提出应用原子力显微镜(AFM)方法检测病毒,这种方法可以直接提供相互作用图像,但价格昂贵和扫描速度慢很难应用^[1]。蛋白质芯片技术是免疫学方法中一种新型蛋白质分析技术,具有快速自动化检测、识别或纯化蛋白质的功能,现在应用越来越广泛,如研究抗原-抗体相互作用、抗体鉴定、受体-配体特异结合以及内分泌激素测定等^[2-7]。光学蛋白芯片技术是将高分辨的椭圆生物传感器技术和集成化多元蛋白质芯片技术相结合发展形成的生物分子识别和检测技术^[8,9]。原理是对基片进行表面改性使基片表面固定合适浓度的化学集团,然后将蛋白质有序地共价固定在基片上。装配蛋白质的基片表面成为感应表面,利用固定在基片上的蛋白质与目标分子之间特异性相互作用达到测定蛋白质功能的目的。通过计算机以图像形式显示和用分析软件处理得到的检测结果,可以对蛋白质、病毒、细菌甚至真核细胞作直接分析。该技术优点是无需标记待检样品,无需预处理直接检测非纯化分析物,样品用量少,检测时间短并且可以进行多元检测^[10]。2005 年 Bae YM 等用椭圆生物传感器技术检测了鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)^[11],灵敏度达 3.2×10^6 CFU/mL,显示出了该技术在检测细菌方面的优越性,用光学蛋白质芯片技术直接检测病毒还未见报道。

M13KO7 噬菌体是一种以大肠杆菌为宿主的病毒,对人和动物不致病,它的尺寸、结构及免疫机理与人类致病病毒相似,因此以检测这种噬菌体为模式既可以保障试验人员的安全又可以探索蛋白质芯

片技术在直接检测病毒方面的可行性,这对于病毒性疾病早期临床诊断和阐明病毒性疾病生物学机制新工具开发方面也有重要意义。亲和素-生物素系统在 ELISA、RT-PCR 和生物传感器等许多技术中是常规的抗体固定方法^[12-15],本试验首次将该方法应用于光学蛋白质芯片固定抗体,将亲和素共价固定在醛基表面改性后的硅片表面,利用亲和素与生物素相互作用固定生物素标记的噬菌体抗体,当样品中含有与硅片上固定的抗体特异结合的目标物质(噬菌体)时就会在硅片表面形成复合物使膜层厚度发生改变,应用椭圆生物传感器技术检测膜层的厚度变化达到检测 M13KO7 噬菌体的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

硅片购自洛阳单晶硅厂,3-氨基丙基三乙氧基硅烷购自 ACROS 公司, H_2O_2 (30%)、 H_2SO_4 (浓)和无水乙醇购自北京北化精细化学品有限责任公司,吐温 20、亲和素和戊二醛购自 SIGMA 公司,PBS 缓冲液(10mmol/L 磷酸盐,0.1mmol/L NaCl pH7.2),去离子水(自制,电阻率 18.3M Ω cm,Millipore, Bedford, MA),生物素标记的 GP3 抗体购自 Exalpha Biologicals 公司(Mouse Monoclonal anti-M13),大肠杆菌菌液上清(噬菌体样品)由中国科学院生物物理研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 基片处理:把切成 20mm \times 5mm 大小的抛光硅片浸泡在体积比为 1:3 的过氧化氢(H_2O_2)和浓硫酸(H_2SO_4)混合液中,摇床轻微振荡 30min。去离子水清洗 3 次,再用无水乙醇清洗 3 次,把硅片浸泡于体积比为 1:15 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷和无水乙醇混和液中,摇床轻微振荡 2h。无水乙醇清洗 3 次,再用 PBS 清洗 3 次,把硅片浸泡于体积比为 1:10 的戊二醛和 PBS 混和液中,摇床轻微振荡 1h。PBS 清洗 3 次,最后用大量 PBS 保存。

1.2.2 抗体固定:利用亲和素上的氨基与硅片上醛基发生席夫碱反应在表面改性后的硅片上固定亲和素,在表面上选取四个单元,在每个单元上固定亲和素,使其装配在基片表面形成饱和亲和素膜层,同时封闭基片。亲和素浓度为 0.5mg/mL,反应 10 ~ 15min。通过亲和素和生物素相互作用将生物素标记 GP3 抗体固定在亲和素膜层上,抗体浓度为 0.1mg/mL,反应 10min,使抗体充分固定在亲和素膜层上成为检测用芯片。

1.2.3 检测 M13KO7 噬菌体 检测样品中噬菌体时选取检测用芯片上两个单元加待检测菌液,另外两个作为对照,加样品 $50\mu\text{L}$,反应 40min,使 GP3 抗体有充分的机会捕捉到 M13KO7 噬菌体。用去离子水清洗硅片单元表面,清除掉没有被抗体固定的噬菌体和其它没有被固定物质,氮气吹干后用椭圆生物传感器分析结果。

1.2.4 椭圆生物传感器技术 椭圆生物传感器技术是近几年发展起来的一种新型超薄膜及表面显示技术,特点是具有极高的分辨率,能够观测超薄而且透明的相位体,横向分辨率为 $3\mu\text{m}$,纵向分辨率达 10^{-10}m 。原理是用偏振光波为探测光照射样品,样品对入射光波进行调制,使得反射或透射光波中载有样品的信息,例如:蛋白膜层厚度等。膜层厚度正比于反射光强的平方根,椭圆生物传感器检测样品膜层厚度时反射光强数值用灰度值来表示。蛋白膜层厚度变化引起灰度值变化(反射光强变化),在 $0\sim 30\text{nm}$ 膜层厚度范围内,假设膜层的折射率不变,灰度值与蛋白吸附膜层的厚度值的平方成正比, $I = Kd^2$, I 代表光强, d 为膜层厚度^[16]。因此试验结果

得到的灰度值直接反映蛋白芯片固定蛋白或病毒膜层厚度,蛋白或病毒膜层越厚,灰度值越高。试验结果也可以将灰度值变化转化成膜层厚度的立体分布示意图,直观显示蛋白吸附膜层。

2 结果

2.1 抗体在芯片表面的固定

生物素和亲和素之间可发生特异性的结合,亲和常数为 10^{15}L/mol ,且每个亲和素分子有 4 个生物素结合位点,当生物素结合了大分子量的分子后,仍可被亲和素识别并结合,在许多研究中应用亲和素与生物素相互作用实现蛋白质的固定。图 1(A)是固定 GP3 抗体示意图,亲和素与硅片表面改性后形成的醛基发生反应在芯片表面形成亲和素膜层,亲和素与生物素相互作用可将生物素标记的 GP3 抗体固定在亲和素膜层表面形成抗体膜层,如图 1(B)所示,从椭圆生物传感器光学显微成像图可以看出抗体在芯片表面已经形成饱和的蛋白质膜层,封闭了整个单元表面,膜层厚度为 6.9nm 。

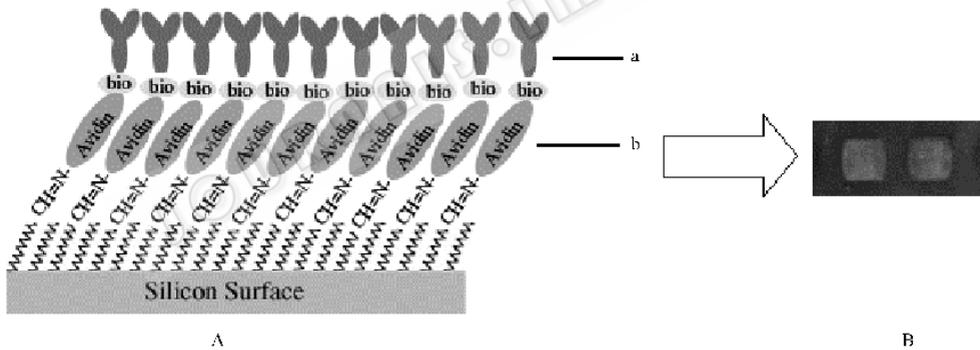


图 1 芯片表面固定 GP3 抗体示意图及固定后的抗体膜层

Fig.1 Schematic illustration and layer of antibody immobilized on the surface of silicon wafer

A: schematic illustration of antibody GP3 immobilized on the surface of silicon wafer. a is anti-M13 layer b is avidin layer.

B: layer of anti-M13 was formed on surface of silicon wafer.

2.2 检测 M13KO7 噬菌体

当含有 M13KO7 噬菌体的样品经过抗体膜层表面,GP3 抗体能够与 M13KO7 噬菌体头部次要外壳蛋白 p III 发生特异结合^[17],利用这种特异性将噬菌体捕捉到抗体膜层表面形成复合物,它们之间的特异性相互作用可以通过膜层厚度变化表现出来,利用椭圆生物传感器可以检测膜层厚度的微小变化。图 2 是椭圆生物传感器直接观察的结果,图 2(A)是灰度图,图 2(B)是转化成膜层厚度的立体分布图, M13KO7 噬菌体与 GP3 抗体发生特异性相互作用形成复合物后膜层厚度为 17.5nm ,比抗体膜层厚度增

加 10.6nm ,右侧立体图更加形象地显示了蛋白膜层厚度的显著增加。

为了验证 GP3 抗体与噬菌体相互作用的特异性,同时在一块芯片上检测了含有 M13KO7 噬菌体的样品和其它几种样品:人免疫球蛋白 IgG、乙肝表面抗原、含 M13KO7 噬菌体样品(低浓度、高浓度)和正常人血清,如图 3 所示。结果表明只有含 M13KO7 噬菌体样品(低浓度、高浓度)厚度会发生变化,其它几种样品经过抗体表面膜层厚度不发生变化或变化很小,这证明了即使含有较低浓度噬菌体的样品其中的噬菌体也会与 GP3 抗体发生特异

性相互作用,在抗体表面形成复合物,导致膜层增厚。

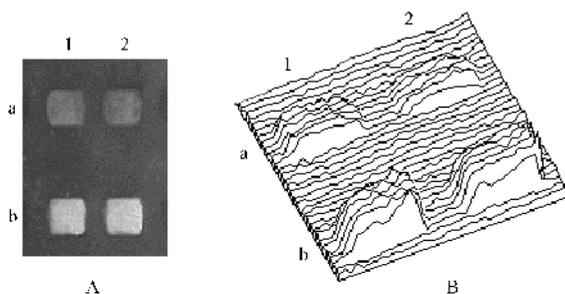


图2 M13KO7 噬菌体的检测

Fig.2 Detection of phage M13KO7

A: the image in grayscale of the microarray biosensor with biotin-anti-M13 and phage M13KO7 complex unit on silicon substrate obtained by imaging ellipsometry; B: thickness distribution of the image A in three dimension. a1 and a2 are biotin-anti-M13 layer as a control. The thickness of the biotin-anti-M13 layer is 6.93nm. b1 and b2 spots contain phage M13KO7 complex layer. The thickness of the phage M13KO7 layer is 17.47nm.

检测到),在一定浓度范围内样品中的噬菌体浓度与膜层厚度成近似线性的变化。

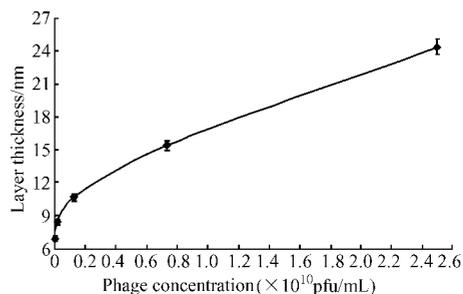


图4 检测不同浓度 M13KO7 噬菌体

Fig.4 Detection of different concentration of phage M13KO7 solution

3 讨论

无标记方法能减少对样品的破坏,应用于检测噬菌体展示了无标记光学蛋白芯片技术的优越性。与其它无标记方法如 AFM、SPR、石英晶体感受器方法等相比样品用量少、时间短、成本低、易操作、并且可以做到多元检测更直观的对比分析。检测 M13KO7 噬菌体的灵敏度为 10^9 pfu/mL,与其它方法相比具有较高的灵敏度。无标记光学蛋白芯片方法分辨率依赖于椭圆偏振生物传感器对蛋白膜层厚度分辨率,椭圆偏振生物传感器对蛋白膜层厚度分辨率能达到 10^{-10} m,因此检测 M13KO7 噬菌体的分辨率能达到 0.7×10^9 pfu/mL。在一定检测范围内随着样品中噬菌体浓度的增加反应后的膜层厚度增加,将噬菌体稀释成不同浓度梯度制作标准曲线标定椭圆偏振光学显微成像仪还可以实现定量检测。通过改变反应流速研究抗体与噬菌体相互作用的快慢还可以做进一步的实时分析试验,获取更多的抗体与噬菌体相互作用方面的信息。因此,无标记光学蛋白芯片技术能够方便快速的检测噬菌体,在病毒性疾病早期临床诊断和阐明疾病生物学机制等方面有应用前景。

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] Nettikadan SR, Johnson JC, Mosher C *et al.* Virus particle detection by solid phase immunocapture and atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **311**(2): 540 - 545
- [2] Wang ZH (王战会), Jin X (靳刚). Visualization of the interaction between IL-6 and IL-6R by imaging ellipsometry. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程技术报) 2002, **18**(1): 99 - 100.

2.3 检测不同浓度噬菌体样品

从 2.2 结果看出即使含有较低浓度噬菌体的样品其中的噬菌体也会被芯片上的 GP3 抗体捕获,因此将 M13KO7 噬菌体培养液稀释成不同的浓度梯度,目的是研究用光学蛋白芯片技术检测噬菌体的灵敏度和分辨率。结果如图 4 所示,检测 M13KO7 噬菌体的灵敏度为 10^9 pfu/mL,分辨率是 0.7×10^9 pfu/mL (在最低检测浓度以上变化 0.7×10^9 pfu/mL 可以被

- [3] Jin X(靳刚), Wang ZH(王战会). Optical protein chip. *Ziran Zazhi(自然杂志)*, 2001, **23**(5): 286-289
- [4] Duan JZ(段金柱), Qi X(齐财), Han W(韩伟) *et al.* Expression and renaturation of a novel human single-chain Fv antibody against SARS-CoV. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2005, **21**(5): 692-697
- [5] Zhang HG, Qi C, Wang ZH *et al.* Evaluation of a new CA15-3 protein assay method: optical protein-chip system for clinical application. *Clinical Chemistry*, 2005, **51**(6): 1038-1040
- [6] Qi C, Duan JZ, Wang ZH *et al.* Investigation of Interaction between two neutralizing monoclonal antibodies and SARS virus using biosensor based on Imaging Ellipsometry. *Biomedical Microdevices*, 2006, In press
- [7] Duan JZ, Ji X, Feng J *et al.* A human neutralizing antibody against a conformational epitope shared by oligomeric SARS S1 protein. *Antiviral Therapy*, 2006, **11**(1): 117-123
- [8] Jin G, Tengval P, Lundstrom I, Arwin H. A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interactions. *Analytical Biochemistry*, 1995, **232**(1): 69-72
- [9] Meng YH(孟永宏), Jin X(靳刚). Technique of image grabbing and processing in ellipsometric imaging system. *Optical and Precision Engineering(光学精密工程)*, 2000, **8**(4): 316-320
- [10] 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
- [11] Bae YM, Park KW, Oh BK *et al.* Immunosensor for detection of Salmonella typhimurium based on imaging ellipsometry. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2005, **257**~**258**: 19-23
- [12] Zacco E, Pividori MI, Alegret S. Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, **21**(7): 1291-1301
- [13] Viveros L, Paliwal S, McCrae D *et al.* A fluorescence-based biosensor for the detection of organophosphate pesticides and chemical warfare agents. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, In press
- [14] Hu J(胡江), Wang ZH(王战会), Tao ZL(陶祖莱). Micropatterning of biotin-avidin layers and cell location. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(5): 619-621
- [15] Gao ZX(高志贤), Chao FH(晁福寰), Wang HY(王红勇) *et al.* The Studies on biotin-avidin indirect conjugated technology for piezoelectric DNA sensor. *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 2002, **29**(3): 454-459
- [16] Arwin H, Stefan WK, Roger J. Off-null ellipsometry revisited: basic considerations for measuring surface concentrations at solid/liquid interfaces. *J Colloid Interface Sci*, 1993, **156**(2): 377-382
- [17] Van Wezenbeek P, Schoenmakers JG. Nucleotide sequence of the genes III, VI and I of bacteriophage M13. *Nucleic Acids Research*, 1979, **6**(8): 2799-2818

治理放射性污染物的微生物技术

核燃料铀的生物治理与回收在本刊(2005, 21(2) 369)曾作过报道,这里再做些补充。放射性核聚变燃料如铀、钚等若发生泄漏而不能及时得到治理,则必然造成环境污染,使人的生命安全受到威胁,生态遭到严重破坏。因战争和核事故而造成核污染的事件在国际上已有先例,其危害几年甚至几十年都消除不了,应引起高度重视。生物学家,也一直在关注此问题。

科学家们发现,某些微生物对铀这类放射性污染物有一定的吸附作用。有一种地质细菌(如 *Geobacter sulfurreducans*)更有这种功能,非常可能将其研制成“生物吸附剂”用于清除地下水中放射性铀污染物。该菌有很强的代谢活力,不仅于静止期有厌氧活动,而且在非静止期行好氧活动,这两种代谢活动的结合使这种兼性“生物吸附剂”在清除放射性铀方面发挥重要作用。还有采用细胞固定化技术途径,如绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)固定化可去除放射性钚,处理 12h,去除率达 75%~80%;用固定化柠檬杆菌(*C. trobacter* sp.)可使放射性铀清除率达 99%(±0.2%);此外,将其用于有害金属物铅的治理也获得类似结果。值得一提的是,还有一种强抗辐射性,且有自我 DNA 修复能力的地衣(*Trepelia ivoluta*),亦很有实用价值。可惜它生长缓慢,如何能使其真正应用于治理铀污染,还有待进一步研究。

目前,在应用微生物技术治理放射性核聚变燃料钚方面有了一些新进展。日本原子能开发研究机构与茨城大学研究人员在世界上首次报道了这方面的研究成果,他们从森林土壤中找到两种对氢氧化能力很强的微生物,即 *Kitasatospora* sp. 和 *Streptomyces* sp. 在常温下对环境中的氢氧化,并转换为水,而氧化氢的性质正好与钚的性质相近,这样,使清除环境中钚的放射性污染成为可能。经试验研究证明,此微生物方法与以往催化剂方法清除钚的方式效果和速度大致相同。这样,前者用于治理钚的污染将成为现实。这两株菌在低温条件下保存一年之后,经活化的菌株对钚的放射性清除效果仍能保持 70% 的水平,其使用成本低,运送方便,不产生废弃物等特点,都显示了微生物技术治理钚污染的优越性。

总之,使用微生物技术对有害放射性污染物进行清除,是一项非常值得深入研究的课题,相信会有更多的发现值得期待。