

高通量、多组分表面等离子体谐振生化分析系统研究*

崔大付** 梁金庆 蔡浩原 王军波 李亚亭 王于杰 刘长春 郑自攀

中国科学院电子学研究所, 传感技术国家重点实验室, 北京 100080

摘要 基于表面等离子体谐振(surface plasmon resonance, SPR)原理, 利用图像分析技术和自动进样技术, 研制成一种新型高通量、多组分图像 SPR 生化分析系统; 对微阵列 SPR 敏感芯片进行动态检测, 实现高通量、多参数、多组分快速检测和定量分析. 以 15 单元的阵列芯片为例, 对兔 IgG 和人 IgG 分别与羊抗兔 IgG 和羊抗人 IgG 的免疫结合反应进行了实验检测. 结果表明, 该分析系统可进行实时高通量、多参数检测, 具有灵敏度高、免标记等优点, 而且阵列芯片中所设置的参比单元可以消除溶液本体折射率和温度变化的影响, 提高了测量精度和准确性; 另外芯片可以再生重复使用, 降低了测试成本.

关键词 SPR 高通量 多通道 微阵列

生物分子之间的相互作用是各种复杂生命现象的基础, 研究生物分子之间相互作用和如何有机协调地工作是当前生物学研究的重要内容和发展方向. SPR 生化传感技术是近十年迅速发展起来的全新的检测分析技术, 具有免标记、实时动态检测和快速、灵敏、无损伤等特点, 特别是能测定生物大分子相互反应过程中反应动力学常数和特性, 是常规生化分析技术所无法比拟的^[1].

SPR 生化分析仪已经被广泛应用于研究生物分子之间如蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸、药物-蛋白质、核酸-核酸的相互作用, 应用于研究分子生物学中复制、转录、核酸杂交及基因药物等诸多方面, 已成为生命科学、分子电子学、疾病诊断、药物筛选、环境检测和食品安全等不同学科和领域中的新兴的、有力的分析工具.

在国外, 单通道、双通道最多是四通道 SPR 生化分析仪已经商品化并广泛使用; 在国内, 我们研制成 SPR-2000 型单通道或单通道双参数 SPR 生化

分析仪^[2-4], 已在几家科研单位使用, 都给予很高评价. 近年来, SPR 生化分析技术正向着高通量、多通道检测的方向发展^[5-11], 现有的几通道系统已经不能满足高通量、多组分检测需求, 但目前国内外尚没有产品.

最近我们研制成一种新型的高通量、多组分图像 SPR 生化分析系统, 采用机器人自动进样和高精度面阵 CCD 图像检测以及阵列化多单元 SPR 敏感芯片, 可高通量、实时检测多种生物分子之间的相互作用, 而且芯片上的一部分阵列单元制作为参比单元, 以消除不同缓冲液本体折射率及温度变化带来的影响, 使测量结果更准确可信. 该系统还可选用固定角度测量, 避免角度扫描时机械系统引入的误差, 使系统具有很高的精确度和更快的检测速度.

1 SPR 原理

基于棱镜耦合方式实现 SPR 现象的原理如图 1 所示. 敏感芯片为表面溅射了一层厚度 50 nm 的金

2006-05-25 收稿, 2006-07-13 收修改稿

* 国家自然科学基金重点项目(批准号: 60427001)和中国科学院仪器研制项目(批准号: Y2004005)资助

** E-mail: dfcui@mail.ie.ac.cn

膜的薄玻璃片,一束入射光通过棱镜照射到芯片上,光束被金膜反射进入检测器,记录反射光光强.金膜表面存在自由电子.表面等离子体波(SPW)是指金属中体积电子密度的一种纵向波动.当入射光的波矢与表面等离子体波的波矢相等时,表面等离子体与光子发生共振,导致一部分光的能量被等离子体所吸收,这就是表面等离子体共振(SPR)现象.

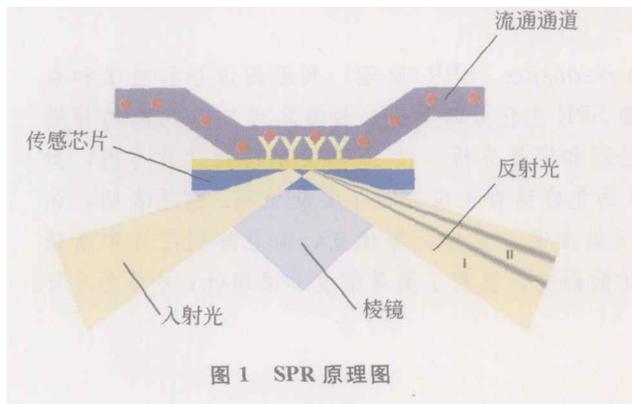


图1 SPR原理图

根据 Maxwell 方程可以推导出表面等离子体波的波 k_{sp}

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_M \epsilon_a}{\epsilon_M + \epsilon_a} \right)^{1/2} \quad (1)$$

式中 ω 为入射光波的角频率, c 为入射光波在真空中的波速, ϵ_a 是被测物的介电常数, ϵ_M 为金属材料的介电常数.

当水平偏振(电场方向平行于入射面、磁场方向垂直于入射表面)的入射光照射到金属表面时,入射光波矢 k 在 x 方向上的投影 k_x

$$k_x = \sqrt{\epsilon_p} \frac{\omega}{c} \sin\theta \quad (2)$$

式中 θ 为入射角, ϵ_p 是相对于被测物金属膜另一面物质的介电常数,如图2所示.

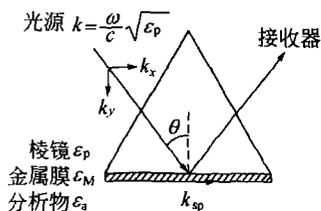


图2 入射光激发SPR现象

如果入射光波矢 k 在 x 方向上的投影 k_x 等于SPW波矢 k_{sp} ,即满足

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_M \epsilon_a}{\epsilon_M + \epsilon_a} \right)^{1/2} = \sqrt{\epsilon_p} \frac{\omega}{c} \sin\theta \quad (3)$$

这时就发生表面等离子体谐振(SPR)现象.

通常采用 ATR 方式的 Kretschmann 结构并采用谐振角调制来实现 SPR 要求. 如果改变入射光的角度,同时记录反射光强的变化,可以得到一条 SPR 曲线. 在曲线上的某个特定角度处,光吸收达到最大值,反射光的光强达到最小值,这称为 SPR 谐振峰,谐振峰对应的角度称为谐振角.

金膜上固定了某种生物大分子,该生物大分子可以与流通通道中的目标分子反应并结合,从而捕获目标分子,使传感芯片金膜上的介质层折射率发生改变,进而促使 SPR 曲线谐振峰移动. 通过检测谐振峰的移动就可以检测生物大分子之间的反应. 值得注意的是,生物大分子的反应会引起谐振峰的移动,同时由于不同溶液的本体折射率不一样,在切换不同溶液的时候也会引起谐振峰的移动,环境温度的变化也会对其造成一定影响. 因此我们在实验中必须把生物大分子反应引起的变化与其他干扰因素引起的变化区分开,才能获得可信的结果.

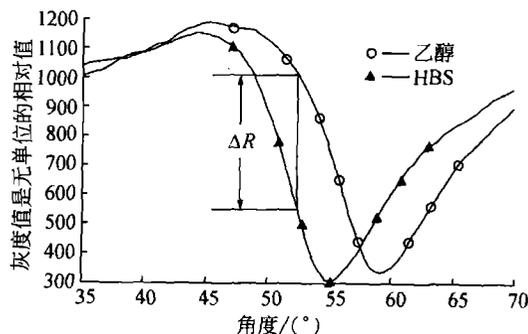


图3 HBS和乙醇溶液的SPR曲线

图3所示为利用SPR分析仪,在裸金膜芯片上改变入射角获得的HBS缓冲液、乙醇溶液的SPR扫描曲线. 由于乙醇溶液的折射率比HBS缓冲液的折射率大,所以乙醇的SPR曲线谐振峰向右移动. 如果我们把入射角固定在53°附近,先通入HBS缓冲液,再通入乙醇溶液,那么光强必然增大,变化量为 ΔR ,可以通过测定角光强检测推知谐振峰位置的

变化,此种测量方法称为固定角度光强检测.固定角度光强检测可以避免由于角度机械扫描机构引入的误差,比角度扫描测量方式具有更高的精度.因此,这里使用固定角度光强检测的方法进行实验.

2 实验系统

2.1 SPR 生化分析仪结构

SPR 生化分析仪的结构如图 4(a)所示,半导体激光器 1 发出的波长为 650 nm 的光束,经过准直和扩束系统 2,进入三棱镜 3,照射在敏感芯片 7 上,光束被反射进入高分辨率 CCD4 进行光强检测,并通过计算机记录其结果.激光器 1,准直和扩束系统 2 都安装在一个以芯片 8 为中心的旋转臂上,高分辨率 CCD 安装在另外一个旋转臂上,棱镜、敏感芯片和流通池安置在旋转中心的固定平台上,两个旋转臂都由计算机通过步进电机和编码器系统来控制.当改变激光器的入射角,进行角度扫描时就可以获得 SPR 谐振曲线;同时也可以将旋转臂固定在特定角度上,进行固定角度的光强变化检测.6 为全自动进样系统,它可以接收计算机指令,控制机械手和注射泵,把不同的样品自动注入到流通系统内.图 4(b)为所研制的高通量、多组分图像 SPR 生化

分析仪及自动进样系统外形图 4(b)所示.

2.2 实验试剂

实验试剂:兔 IgG、人 IgG 以及纯化的羊抗兔 IgG、羊抗人 IgG 均由北京欣经科生物技术有限公司生产;EDC, NHS, HEPES 均为 SIGMA 公司产品;其他化学试剂均为北京化学试剂公司产品.

2.3 芯片制作

利用尺寸为 20 mm×20 mm 的玻璃片作为衬底,清洗干净后在上面溅射厚度为 50 nm 的 3×5 金膜阵列,每个金膜阵列单元大小为 1.2 mm×0.8 mm,利用特定的化学修饰方法,在每个阵列单元表面上固定一层羧基化的葡聚糖膜.

然后使用含有 EDC(0.2 mol/L)及 NHS(0.05 mol/L)的水溶液将葡聚糖膜的羧基活化为 N-羟基琥珀酰亚胺酯,接着在第一和第二列的阵列单元上分别点体积为 0.5 μL 浓度为 1 mg/mL 的兔 IgG 溶液,在第四和第五列的阵列单元上分别点体积为 0.5 μL 浓度为 1 mg/mL 的人 IgG 溶液,中间第三列阵列单元上没有点任何溶液,作为参比阵列单元,如图 5 所示.

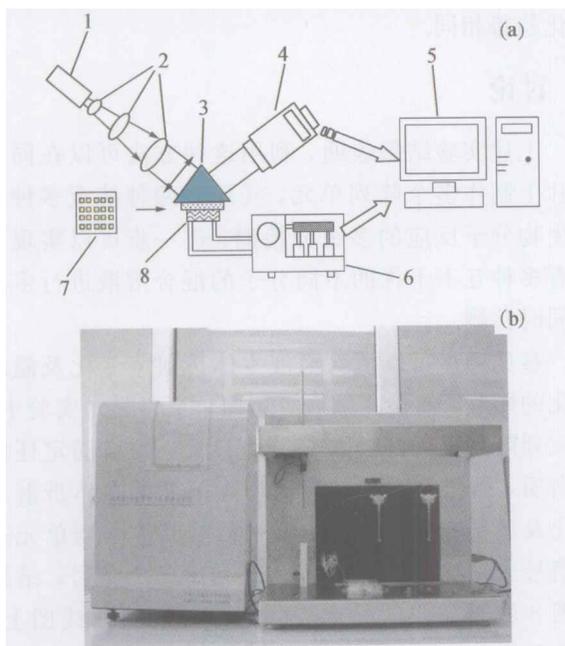


图 4 高通量、多组分图像 SPR 生化分析系统
(a) 结构示意图; (b) 外形照片图

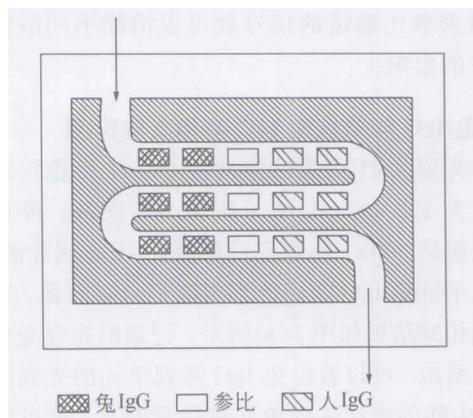


图 5 蛋白质阵列芯片和流通池

点样完毕之后,让兔 IgG、人 IgG 与活化的葡聚糖反应 10 min,使其充分固定到芯片上.然后使用 1 mol/L 的乙醇胺盐酸盐溶液浸泡芯片进行灭活,同时去除结合不牢的蛋白.处理完毕后的芯片使用去离子水浸泡,洗去残留的盐溶液,然后与聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 流通池贴合形成流通管路,以进行下一步的检测实验.

3 实验

实验使用的 3×5 阵列芯片如上所述：第一列和第二列固定兔 IgG，第四列和第五列固定人 IgG，第三列为纯葡聚糖阵列单元，作为参比通道。实验之前利用计算机控制旋转臂的入射角度处于谐振角附近，记录该固定角度下各阵列点在通入不同溶液时的光强值变化。为防止在溶液切换时发生液体混合，通过自动进样系统在不同溶液之间间隔一段空气，整个检测操作步骤按设定程序连续、自动完成。

值得注意的是，芯片上的兔 IgG、人 IgG 与抗体的结合均会引起光强的变化，由于不同溶液的本身折射率不一样，也会引起光强的变化。因此实验中必须要排除不同溶液本身折射率的影响才能获得正确的结果。消除溶液本身折射率影响的方法有两种，一种是反应前后通入的缓冲液均为同一种溶液，其折射率一样，在同一种缓冲液中进行比较，可以消除溶液本身折射率的影响；另外一种则可以利用参比通道进行消除，参比通道不参加反应，仅仅反映了溶液本身折射率的变化，其他参与反应的通道信号减去参比通道的信号就可以消除不同溶液折射率带来的影响。

3.1 兔 IgG 与羊抗兔 IgG 亲和反应检测

首先通入 HBS 缓冲液冲洗 200 s，待稳定之后通入浓度为 1.2 mg/mL 的羊抗兔 IgG 溶液，停止流动让其反应约 300 s，待稳定后再通入 HBS 缓冲液冲洗。在通入羊抗兔 IgG 前后分别拍摄了一幅图像，前后两幅图像相减结果如图 6(a) 所示，记录的光强变化曲线如图 7 所示。可以看出兔 IgG 阵列单元的光强明显地增大，中间的参比阵列单元有微量升高，这可能是兔 IgG 点样污染所致，人 IgG 阵列点没有变化，并且相邻两行固定相同的 IgG 的单元变化趋势相同。

3.2 人 IgG 与羊抗人 IgG 亲和反应检测

在羊抗兔 IgG 反应完毕并且利用 HBS 缓冲液冲洗稳定之后，通入浓度为 0.5 mg/mL 的羊抗人 IgG 溶液，停止流动让其反应约 300 s，待稳定之后通入 HBS 溶液冲洗稳定。在通入羊抗人 IgG 前后分别拍摄了一幅图像，前后两幅图像相减结果如图 6(b) 所示，记录的光强变化曲线如图 7 所示，可以

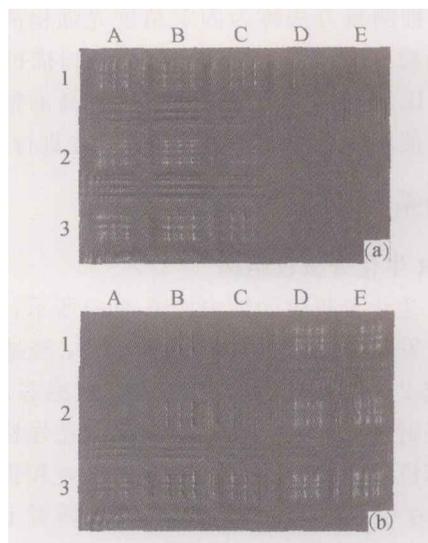


图 6 高通量、多组分图像 SPR 实验图像

(a) 通入羊抗兔 IgG 前后图像相减；(b) 通入羊抗人 IgG 前后图像相减
A, B 列：固定兔 IgG 敏感生物膜的单元；
C 列：未固定生物膜的参考单元；
D, E 列：固定人 IgG 敏感生物膜的单元

看出人 IgG 阵列单元有明显的变化，兔 IgG 阵列单元有微量上升，可能为交叉反应所致，参考单元没有明显变化，并且相邻两行固定相同的 IgG 的单元变化趋势相同。

4 讨论

上述实验结果表明，利用这种方法可以在同一芯片上制作多个阵列单元，实现对两种甚至多种不同生物分子反应的多组分检测；进一步可以实现对含有多种互不干扰的不同分子的混合溶液进行多参数同时检测。

参比通道可以消除溶液本身折射率变化及温度变化的影响，使检测结果更精确、更可靠。实验中，第三列阵列点为纯葡聚糖阵列单元，没有固定任何蛋白质，因此它的信号变化均为溶液的本体折射率变化及温度变化所引起，第一行的其他阵列单元光强信号分别减去该行第三列阵列单元的信号，结果如图 8 所示。可以看出，经过修正后的曲线上，通入羊抗兔 IgG 溶液时，人 IgG 阵列点 D 和 E 的信号保持为一直线，说明参比通道可以消除溶液本身折射率变化。

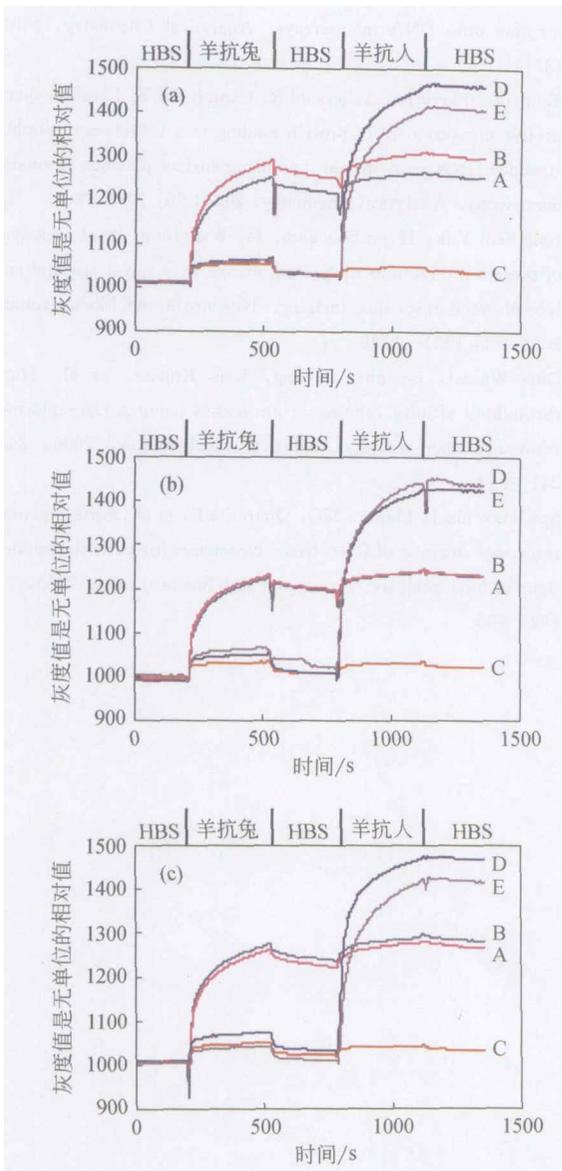


图 7 图像 SPR 曲线图

- (a) 对应图 6 中第一行阵列单元;
- (b) 对应图 6 中第二行阵列单元;
- (c) 对应图 6 中第三行阵列单元;

A, B: 固定兔 IgG 敏感生物膜的单元的动态曲线;
 C: 参考单元的动态曲线;
 D, E: 固定人 IgG 敏感生物膜的单元动态曲线

在图 8 所示的曲线上, 通入羊抗兔 IgG 溶液的时候, A, B 列的兔 IgG 阵列点光强变大, 反应稳定时的光强值比反应前分别增加了 223 和 190 个单位, 而 D, E 列的人 IgG 阵列点没有明显变化. 在通入羊抗人 IgG 溶液的时候, D, E 列的人 IgG 阵

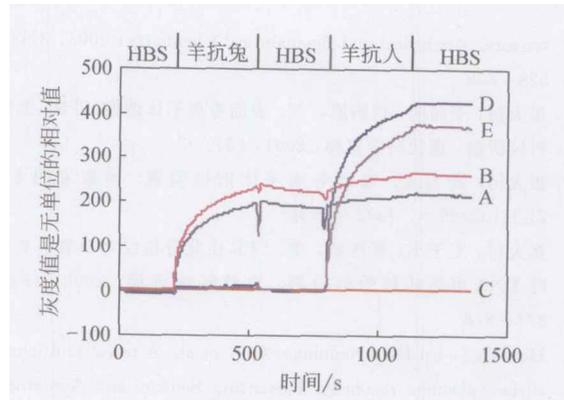


图 8 减去参考信号的图像 SPR 曲线图 (第一行阵列点)

列点光强变大, 反应稳定时的光强值比反应前分别增加了 425 和 371 个单位, 而 A, B 列的兔 IgG 阵列点光强分别增大 25 和 42 个单位, 说明兔 IgG 与羊抗人 IgG 溶液有微量的交叉反应.

芯片可以再生实现多次重复利用. 羊抗兔 IgG 和羊抗人 IgG 被结合到芯片上之后, 通入 0.1 mol/L 的 HCl 溶液, 可以把羊抗兔 IgG 和羊抗人 IgG 完全从芯片上洗脱, 芯片的再生十分彻底, 芯片可以多次重复利用.

实验使用的样品量仅 μL 级, 并且可以长时间连续、自动运用, 实现高通量检测, 这是一种非常有前途的检测方法.

5 结论

利用所研制的高通量、多组分 SPR 图像生化分析系统和检测方法可以在同一芯片上实现高通量、多参数检测; 并且可以利用参比通道消除不同溶液本体折射率和温度的干扰, 使实验结果更为准确可信; 芯片可以再生重复利用, 并且无需标记, 灵敏度高, 所需样品量少, 是一种有效的、也是很有前途的生化分析检测技术.

本实验仅采用了 15 单元阵列芯片进行试验, 进一步试验正在进行, 不仅增加芯片的阵列单元, 进行 48, 96 和 144 阵列单元芯片的研究, 还要进一步提高其检测灵敏度, 相关的试验结果将在后续论文中叙述.

参 考 文 献

1 Homola J. Present and future of surface plasmon resonance bio-

- sensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377(3): 528—539
- 2 崔大付, 李向明, 蔡浩原, 等. 表面等离子体谐振(SPR)生化分析仪研制. *现代科学仪器*, 2001, (6): 33
- 3 崔大付, 周力夫. 表面等离子体谐振装置. 国家发明专利, ZL98102366.5, 2002年8月
- 4 崔大付, 王于杰, 蔡浩原, 等. SPR生化分析仪对6-氧甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶的检测. *自然科学进展*, 2003, 13(8): 874—876
- 5 Homola J, Lu HB, Nenninger GG, et al. A novel multichannel surface plasmon resonance biosensor. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2001, 76(1—3): 403—410
- 6 Homola J, Lu HB, Yee SS. Dual-channel surface plasmon resonance sensor with spectral discrimination of sensing channels using dielectric overlayer. *Electronics Letters*, 1999, 35(13): 1105—1106
- 7 Bryce PN, Timothy EG, Mark RL, et al. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(1): 1—7
- 8 Shumaker-Parry JS, Aebersold R, Campbell CT. Parallel, quantitative measurement of protein binding to a 120-element double-stranded DNA array in real time using surface plasmon resonance microscopy. *Analytical Chemistry*, 2004, 76: 2071—2082
- 9 Jong Seol Yuk, Hyun-Soo Kim, Jae-Wan Jung, et al. Analysis of protein interactions on protein arrays by a novel spectral surface plasmon resonance imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21: 1521—1528
- 10 Dina Wassaf, Guannan Kuang, Kris Kopacz, et al. High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays. *Analytical Biochemistry*, 2006, 351: 241—253
- 11 Spadavecchia J, Manera MG, Quaranta F, et al. Surface plasmon resonance imaging of DNA based biosensors for potential applications in food analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21: 894—900