

用斜入射光反射差法无标记实时监测不同浓度兔 IgG 和山羊抗兔 IgG 反应的动力学过程*

何立平¹⁾²⁾ 孙悦¹⁾²⁾ 戴俊²⁾ 王京义²⁾ 吕惠宾^{2)†} 王淑芳^{1)†}
金奎娟²⁾ 周岳亮²⁾ 杨国桢²⁾

1) (河北大学物理科学与技术学院, 保定 071002)

2) (中国科学院物理研究所北京凝聚态物理国家实验室, 北京 100190)

(2011 年 12 月 27 日收到; 2012 年 2 月 9 日收到修改稿)

用斜入射光反射差法无标记实时监测 1.25 mg/ml、2.50 mg/ml 和 5.00 mg/ml 三种不同浓度兔 IgG 和浓度为 0.02 mg/ml 山羊抗兔 IgG 反应的动态过程, 同时监测和获得三种不同浓度 IgG 反应的动力学曲线以及相应的反应时间. 实验结果表明, 斜入射光反射差法不仅能无标记地判别生物分子之间是否发生反应, 而且能无标记实时监测生物分子反应的动力学过程, 在生物分子相互作用的研究方面具有潜在和广泛的应用前景.

关键词: 斜入射光反射差法, 无标记和实时监测, 反应动力学过程

PACS: 07.60.Fs, 81.70.Fy, 87.80.Dj, 83.85.Ei

1 引言

实时监测生物分子之间的反应动态过程, 对于研究生物分子的反应动力学过程和获取其结合速率常数、解离速率常数和亲和力常数等动力学参数具有重要的意义. 到目前为止, 用于研究生物分子相互作用的方法主要还是基于如荧光、酶和放射元素等标记的方法^[1,2]. 随着研究工作的深入, 标记方法的不足逐渐显露出来, 标记的方法不仅过程复杂、费时费力成本高, 而且标记可能改变生物分子的结构和活性^[3,4]. 近年来, 如表面等离子态共振仪、椭偏仪、碳纳米管和半导体量子点等都用于无标记地研究生物分子的相互作用^[3-6]. 因为无标记的检测方法和技术不仅可以避免标记所产生的缺点, 而且能得到生物分子反应的本征特性, 所以发展高灵敏度和可靠的无标记检测方法和技术对于蛋白和蛋白的相互作用、药物开发和分析、生物分子的特性、临床诊断和环境探测等研究将产生革命性的影响^[4,7]. 斜入射光反射差法 (oblique-incidence reflectivity difference, OIRD)

作为一种无标记的检测技术, 已经用于无标记地检测生物芯片^[8,9], 我们也报道了用 OIRD 方法无标记检测生物芯片^[10-17]. 在这篇文章里, 我们将报道用 OIRD 方法无标记实时监测不同浓度兔 IgG 与同一浓度山羊抗兔 IgG 反应动力学过程的实验工作. 实验结果表明 OIRD 方法不仅可以判别生物分子之间是否发生了反应, 而且可以获得分子之间反应的动力学曲线.

2 实验

用于无标记实时监测蛋白质相互作用的实验装置如图 1 所示, 和我们先前报道的相似, 为了监测生物分子反应的动态过程, 把生物芯片反过来安放在一个小的反应室上, 探测光从芯片的反面进行探测^[16]. 如我们先前所述, 从 He-Ne 激光器输出的波长为 632.8 nm 的 p 偏振探测光, 通过光弹调制器、相移器和透镜, 以 60° 的入射角入射到印有蛋白质样品点的波片的表面. p 偏振的探测光通过光弹调制器后, 被调制为频率 50 kHz、p 和 s 偏振光

* 国家重点基础研究发展计划 (973 计划)(批准号: 2007CB935701) 资助的课题.

† E-mail: hblu@iphy.ac.cn; sfwang_researcher@yahoo.com.cn

来回振荡的探测光束. 反射光通过透镜和格兰棱镜后, 硅光电二极管把接收的光信号转变为电信号, 用两台锁相放大器分别检测反射光的基频和倍频两路信号. 在斜入射条件下, 探测表面对 p 和 s 偏振光的反射率是有所不同的, 我们定义 r_{p0} 和 r_{s0} 分别表示没有蛋白质样品点表面位置对 p 和 s 偏振光的反射率, r_p 和 r_s 分别表示蛋白质样品点对 p 和 s 偏振光的反射率, 有样品点和没有样品点表面对 s 和 p 偏振光反射的差值分别为 $\Delta p = (r_p - r_{p0})/r_{p0}$ 和 $\Delta s = (r_s - r_{s0})/r_{s0}$. 在这个实验里, 我们检测反射光的虚部信号 $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$.

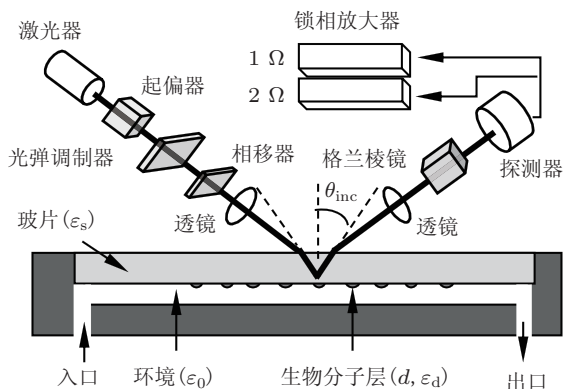


图 1 OIRD 实验装置示意图

由经典的三层模型, OIRD 的虚部信号可以用下面的公式 (1) 来表示 [18]

$$\begin{aligned} & \text{Im}\{\Delta p - \Delta s\} \\ &= - \left[\frac{4\pi\epsilon_s (\tan \theta_{\text{inc}})^2 \cos \theta_{\text{inc}}}{\epsilon_0^{1/2} (\epsilon_s - \epsilon_0) (\epsilon_s/\epsilon_0 - (\tan \theta_{\text{inc}})^2)} \right] \\ & \times \frac{(\epsilon_d - \epsilon_s) (\epsilon_d - \epsilon_0)}{\epsilon_d} \left(\frac{d_{\text{eff}}}{\lambda} \right), \end{aligned} \quad (1)$$

其中, θ_{inc} 表示入射角, ϵ_0 , ϵ_d 和 ϵ_s 分别表示探测环境、蛋白质分子层和玻片的光学介电常, d_{eff} 是蛋白质分子层的有效厚度, λ 是探测光波长. 由于在蛋白质反应过程中, ϵ_d 和 d_{eff} 随着蛋白质分子之间的结合而逐渐变化, $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 信号也随之变化, 反应结束后, ϵ_d , d_{eff} 和 $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 分别达到一个恒定值. 因此, 我们可以通过监测 $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 信号的变化, 实时检测生物分子反应的动态过程.

在此实验中, 我们用 OIRD 方法无标记实时监测了浓度分别为 5.0 mg/ml, 2.5 mg/ml 和 1.25 mg/ml 兔子 IgG 与浓度为 0.02 mg/ml 山羊抗兔 IgG 相互作用的动力学过程. 我们选取表面为环氧乙基活化层的玻片 (CEL Associates, TX 公司) 作为衬底, 不

同浓度的兔 IgG 作为靶分子, 山羊抗兔 IgG 作为探针分子 (所有蛋白质均购买自 KPL Inc, USA 公司). 蛋白质芯片按照传统的制作过程制备 [19], 分为四个步骤: 首先, 如图 2 所示, 用自动点样机 (Personal ArrayerTM 16, CapitalBio corporation CA) 把三种不同浓度的兔 IgG 点制在上述的玻片上, 每个浓度的样品制备两个样点; 为了对比测量, 我们还点制了两个样品点的磷酸盐缓冲液 1×PBS, 八个样品点沿一条直线分布, 样品点直径为 100 μm , 样品点中心间距为 500 μm ; 第二步, 将制备好的蛋白质芯片放置在 4 °C 环境下保持 12 h, 以免兔 IgG 分子能够充分地结合到玻片表面的环氧基团上; 第三步, 用缓冲液 1×PBS 和去离子水清洗玻片, 洗掉没有被环氧基团固定的残余 IgG 分子以及盐渍等. 然后把芯片封闭安装在图 1 所示的流体腔上, 并向腔中通入甘氨酸溶液 (1% 的甘氨酸溶于缓冲液 1×PBS), 将芯片表面没有结合 IgG 的环氧基团封闭. 第四步, 排出甘氨酸溶液, 用去离子水清洗腔体后, 向流体腔中注入浓度为 0.02 mg/ml 的山羊抗兔 IgG 溶液, 并同时开启扫描程序, 使探测光束在八个样品点的中心连线上来回扫描. 我们直接监测和 $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 成比例的反射光基频交流分量信号的强度.

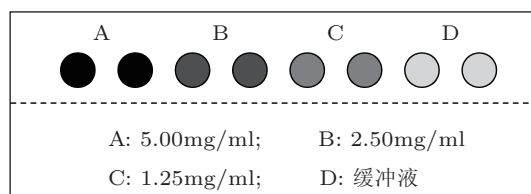


图 2 蛋白质芯片示意图

3 实验结果和讨论

图 3 是我们无标记实时监测不同浓度兔 IgG 和山羊抗兔 IgG 反应动态过程的实验结果, 图中 A, B, C, D 分别为浓度 5.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml 和 0 mg/ml (缓冲液) 的兔 IgG 与 0.02 mg/ml 山羊抗兔 IgG 反应的 OIRD $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 信号强度随时间变化曲线. 图 3(a) 中每一浓度的两条曲线对应于其两个相同样品点的探测结果, 图中的实线是对应监测曲线的拟合结果. 为了尽可能排除外界干扰信号和减小系统误差, 在图 3(a) 中, 我们把样品点信号的平均值减去样品点周围信号的平均值作为 $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 信号强度的值.

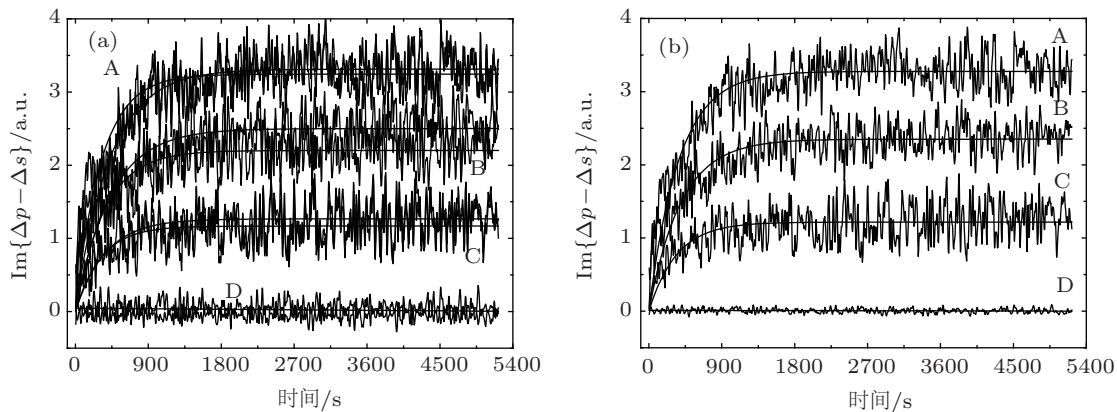


图3 用OIRD无标记实时监测不同浓度兔IgG和山羊抗兔IgG反应动态过程的实验结果 (a) $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 信号强度与反应时间的关系, 细线表示测量数据, 粗线表示细线的拟合结果; (b) 图(a)中两个相同浓度样品点拟合曲线的平均值. 曲线A, B, C, D分别对应浓度为5.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml和0 mg/ml(缓冲液)兔IgG与浓度为0.02 mg/ml山羊抗兔IgG反应的曲线

从图3(a)可以看出, 曲线A, B, C中信号强度随时间呈指数型变化, 对应于缓冲液样品点的两条曲线几乎重合且其值基本为零, 表明山羊抗兔IgG只与不同浓度的兔IgG反应, 而不与缓冲液反应. $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 信号强度的变化率和平衡值对应于兔IgG的浓度, IgG的浓度越高, $\text{Im}\{\Delta p - \Delta s\}$ 信号强度的变化率和平衡值越大. 从图3(a)还可以看出, 相同浓度的两个样品点的监测值还是有一定的离散性, 图3(b)的拟合曲线是图3(a)中两个相同浓度样品点拟合曲线的平均值. 从图3(b)的A、B和C三条拟合曲线可以得出, 从反应开始到反应达到平衡, 浓度分别为5.0 mg/ml, 2.5 mg/ml和1.25 mg/ml IgG的反应时间分别约为1575 s, 1350 s和1125 s.

4 结论

我们用OIRD方法无标记实时监测了三个不同浓度兔IgG和山羊抗兔IgG反应的动态过程, 得到不同浓度兔IgG和山羊抗兔IgG反应的动力学曲线和反应时间常数. 实验结果表明, OIRD方法不仅能无标记地判别生物分子之间是否发生反应, 而且能无标记实时监测生物分子反应的动力学过程, 在研究生物分子相互作用方面具有潜在和广泛的应用前景. 下一步的工作将通过研究生物分子的反应动态过程, 进一步研究和获取生物分子间反应的动力学和热学参数.

- [1] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Itchell T, Miller P, Dean R A, Gerstein M, Snyder M 2001 *Science* **293** 2101
- [2] Espina V, Woodhouse E C, Wulfkühle J, Asmussen H D, Petricoin E F, Liotta L A 2004 *J. Immunol. Methods* **290** 121
- [3] Yu X B, Xu D K, Cheng Q 2006 *Proteomics* **6** 5493
- [4] Ray S, Mehta G, Srivastava S 2010 *Proteomics* **10** 731
- [5] Han M, Gao X, Su J Z, Nie S 2001 *Nat. Biotechnol.* **19** 631
- [6] Gao X, Cui Y, Levenson R M, Chung L W K, Nie S M 2004 *Nat. Biotechnol.* **22** 969
- [7] Li P Y, Lin B, Gerstenmaier J, Cunningham B T 2004 *Sens. Actuat. B* **99** 6
- [8] Zhu X D, Landry J P, Sun Y S, Gregg J P, Lam K S, Guo X W 2007 *Appl. Opt.* **46** 1890
- [9] Fei Y Y, Landry J P, Sun Y S, Zhu X D, Luo J T, Wang X B, Lam K S 2008 *Rev. Sci. Instrum.* **79** 013708
- [10] Wang X, Yuan K, Lu H, Wen J, Lu H B, Jin K J, Zhou Y L, Yang G Z, Li W, Ruan K C 2010 *J. Appl. Phys.* **107** 063109
- [11] Wang X, Lu H, Wen J, Yuan K, Lu H B, Jin K J, Zhou Y L, Yang G Z 2010 *Chin. Phys. Lett.* **27** 107801
- [12] Lu H, Wen J, Wang X, Yuan K, Lu H B, Zhou Y L, Jin K J, Ruan K C, Yang G Z 2010 *J. Opt.* **12** 095301
- [13] Yuan K, Wang X, Lu H, Wen J, Lu H B, Zhou Y L, Jin K J, Yang G Z, Li W, Ruan K C 2010 *Sci. China Mech Astron* **53** 1434
- [14] Lu H, Wen J, Wang X, Yuan K, Lu H B, Zhou Y L, Jin K J, Yang G Z, Li W, Ruan K C 2010 *Sci. China Mech Astron* **53** 1230
- [15] Wen J, Lu H, Wang X, Yuan K, Lu H B, Zhou Y L, Jin K J, Yang G Z, Li W, Ruan K C 2010 *Sci. China Mech Astron* **53** 306
- [16] Wang X, Lu H, Dai J, Wen J, Yuan K, Lu H B, Jin K J, Zhou Y L, Yang G Z 2011 *Chin. Phys. B* **20** 010704
- [17] Zhang H Y, Lu H, Li W, Liang R Q, Jin K J, Zhou Y L, Ruan K C, Yang G Z, et al 2008 *Chin. Phys. B* **17** 2288
- [18] Zhu X D, Fei Y Y, Wang X, Lu H B, Yang G Z, 2007 *Phys. Rev. B* **75** 245434
- [19] Liang R Q, Tan C Y, Ruan K C 2004 *J. Immunol Methods* **285** 157

Label-free and real-time detection of interactional dynamic processes of rabbit IgG with different concentrations and goat anti-rabbit IgG by oblique-incidence reflectivity difference method*

He Li-Ping¹⁾²⁾ Sun Yue¹⁾²⁾ Dai Jun²⁾ Wang Jing-Yi²⁾ Lü Hui-Bin²⁾†
Wang Shu-Fang¹⁾† Jin Kui-Juan²⁾ Zhou Yue-Liang²⁾ Yang Guo-Zhen²⁾

1) (College of Physics Science and Technology, Hebei University, Baoding 071002, China)

2) (Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

(Received 27 December 2011; revised manuscript received 9 February 2012)

Abstract

We successfully label-free and real-time detecte the interactional dynamic processes of Rabbit IgG with different concentrations (1.25 mg/ml, 2.50 mg/ml and 5.00 mg/ml), and goat anti-rabbit IgG with a concentration of 0.02 mg/ml by the oblique-incidence reflectivity difference method (OIRD). The dynamic curves and times of interaction and response to concentration of rabbit IgG, are obtained. The experimental results demonstrate that the OIRD method can not only can distinguish the biomolecular interactions, but also real-time detect the interactional dynamic processes of biomolecules, indicating that the OIRD method has promising and extensive applications for the investigating of biomolecular interactions.

Keywords: oblique-incidence reflectivity difference method, label-free and real-time detection, interaction dynamic process

PACS: 07.60.Fs, 81.70.Fy, 87.80Dj, 83.85.Ei

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2007CB935701).

† E-mail: hblu@iphy.ac.cn; sfwang_researcher@yahoo.com.cn