

SPR 实验中的噪声因素及其补偿方法研究^{*}

蔡浩原 崔大付^{**} 向四海 李亚亭 王于杰 陈翔
(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 在 SPR 实验中,SPR 的响应曲线会因为溶液间本体折射率差异的影响而受到很大的干扰。介绍一种惰性蛋白溶液折射率补偿法,巧妙地解决了单通道 SPR 仪难以消除溶液间本体折射率差异的问题。基于这种实验方法,成功地进行了金黄色葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 与其羊单克隆抗体 IgG 的浓度梯度反应,初步实验结果表明,SPR-2000 型生化分析仪对 SEB 的检测灵敏度为 1 μg/ml,相当于 3.5×10^{-8} mol/L。

关键词 表面等离子体谐振 折射率补偿法 金黄色葡萄球菌肠毒素 B

SPR 传感器检测方法主要用于检测金膜表面的生物分子相互作用^[1]。SPR 传感器检测到的总响应 ΔR 既包含了表面生物分子结合引起的局部折射率变化的贡献 $\Delta R_{binding}$,也包含了溶液本体折射率的贡献 ΔR_{buffer} 。不同溶液间往往存在折射率差异,特别是缓冲液和实际被测溶液之间,它们会给 SPR 检测表面结合响应带来噪声干扰。使用多通道方法可以消除溶液本体折射率变化的噪音后,获得只由表面结合引起响应变化 $\Delta R_{binding}$,它反映了金膜表面生物分子相互作用的结果。

对于单通道的 SPR 仪,我们提出了一种折射率补偿法,使得不同被测溶液的折射率保持了基本一致,消除了溶液切换引起的折射率变化,从而使 SPR 传感器的响应值 R 能够真实的反映金膜表面生物分子的相互作用。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

本实验采用自行研制开发的 SPR-2000 表面等离子体谐振生化分析仪^[2]。

SPR-2000 属于单通道角度扫描调制型仪器。外形图如图 1(a) 所示。图 1(b) 表示系统的结构,它由两大部分组成:光学扫描系统和流通系统。光学扫描系统循环扫描以获得反应引起的谐振角的

变化,对反应进行检测。在实验中,流速均为 100μl/min。进样阀为改装的 Pharmacia Valve V-7,通过它可以实现样品和缓冲液间的任意切换而且流路中不夹杂气泡。流通池用聚四氟乙烯加工而成,容积为 25μl。流通池与金膜表面通过一个小橡胶垫圈实现密封。

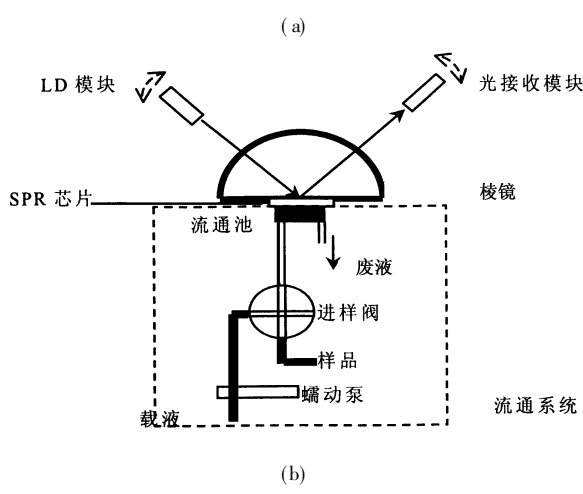


图 1 (a) SPR 2000 型生化分析系统的外形图片 (b) 系统结构

收稿日期: 2003-07-21 修回日期: 2003-07-31

^{*} 国家自然科学基金资助项目(3990570)
^{**} 通讯作者: 电子信箱: dfcui@mail.ie.ac.cn

本仪器的检测角度范围是 40~70 度,机械系

统对其分割精度是 2.5×10^{-4} 度, 平衡的基线波动在 1.0×10^{-3} 度以内; 谐振单元(resonance unit, RU)是仪器检测谐振角的基本单元, $1\text{RU} = 1.0 \times 10^{-3}$ 度。本仪器的温度系数为 $dR/dT = 2\text{RU}/^\circ\text{C}$ 。整个反应的温度控制在 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

由于本仪器属于单通道的 SPR 仪, 当进行溶液切换时, 不同溶液的折射率差异会使得 SPR 响应值发生很大的突变, 突变信号通常会淹没了金膜表面的生物分子相互作用的信号, 使得在 SPR 响应曲线上观察不到生物反应的动态过程。利用惰性蛋白溶液折射率补偿法, 消除溶液折射率差异带来的噪声信号, 保留了我们所需要的金膜表面的生物分子相互作用的信号, 从而提高了仪器的检测灵敏度。

1.2 实验材料

SEB 羊单克隆抗体 Immunoglobulin G (IgG) 和 SEB 毒素均由防化研究院第四研究所提供; Ethylene Dichloride (EDC)、N-hydroxy succinimide (NHS)、亚二巯基二乙酸由 Sigma 公司购买。其它试剂均为分析纯, 购于北京化学试剂公司。所有的溶液都是用去离子超纯水配制。

1.3 实验方法

Jonsson 等^[1]、Stenberg 等^[3] 及 Karlsson 等^[4] 通过实验证实, SPR 谐振角对金膜芯片表面附近的折射率变化十分敏感, 检测到的响应 ΔR 与表面的结合反应和溶液本体折射率都有关。它可以表示为两种响应的和:

$$\Delta R = \Delta R_{binding} + \Delta R_{buffer} \tag{1}$$

$\Delta R_{binding}$ 与 ΔR_{buffer} 均与芯片表面附近溶液折射率的变化 Δn 成正比, Δn 又与溶液中溶质的浓度变化 Δc 成正比, 有:

$$\Delta R = dR/dn \times \Delta n \tag{2}$$

$$\Delta n = \sum_{i=1}^n (\partial n / \partial c_i) \cdot \Delta c_i \tag{3}$$

i 代表被检测的多组分溶液中的各个成分。

Karlsson 等^[4] 的研究表明, 对于大部分蛋白质溶液, 在其他条件一样的情况下, 蛋白质溶液的本体折射率只与蛋白质总体质量浓度有关, 而受蛋白的种类影响很小。因此, 如果在实验中采用了一种惰性蛋白来补偿每一种溶液(包括缓冲液)中的总蛋白浓度, 使之保持统一的质量浓度, 那么他们将具有几乎相同的本体折射率。所谓惰性蛋白, 就是指几乎不与金膜表面固定的受体分子发生特异

性吸附的蛋白质。因此, 式(1)中的 ΔR_{buffer} 在溶液切换的过程中, 基本保持为零, SPR 仪检测到的响应值 ΔR 则代表了金膜表面的结合和解离的反应变化。

如图 2 所示, 分别制备得到惰性蛋白浓度为 C_0 的缓冲溶液和活性蛋白浓度为 C_0 的原始被测溶液, 然后根据实验的需要, 将总蛋白浓度同为 C_0 的原始被测溶液和缓冲溶液按照不同比例混合, 混合后的被测溶液活性蛋白浓度为所需的 C_1 , 而总蛋白浓度仍然保持为 C_0 。也就是说它的折射率与缓冲液的折射率一致。

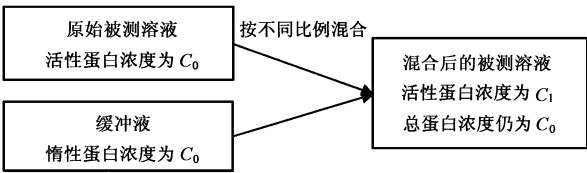


图 2 折射率补偿法制备所需浓度的活性蛋白溶液

经过这样的处理, 在整个检测中, 溶液本体折射率都是一样, SPR 响应的变化反映的将是蛋白分子在表面的结合与解离。我们将这种方法叫惰性蛋白本体折射率补偿法。利用这种方法对金黄色葡萄菌肠毒素 B 与其羊单克隆抗体 IgG 的免疫吸附反应进行了检测, 取得了较好的实验结果。

1.3.1 不同 SEB 浓度的样品制备 按照以上提到的被测溶液配制方法, 选用的活性蛋白为 SEB 毒素, 惰性蛋白为牛血清白蛋白 BSA。首先用 PBS 缓冲液配制了总蛋白浓度均为 $100\mu\text{g/ml}$ 的 BSA 缓冲液和 SEB 毒素初始溶液; 然后按不同的比例混合两种溶液可以形成所需浓度的 SEB 溶液。它们的总蛋白浓度均为 $100\mu\text{g/ml}$ 。

1.3.2 金膜表面活化 金膜表面采用非定向共价联接抗-SEB 的 IgG 的方法来活化。整个过程中流动系统的流速恒定在 $100\mu\text{l/min}$ 。具体过程为: 先通入 2m mol/L 的亚二巯基二乙酸水溶液, 反应 0.5h ; 将等体积混合的 EDC (0.4mol/L) 与 NHS (0.1mol/L) 溶液通入流动系统, 活化羧基基团 0.5h ; 然后通入 0.01mol/L PBS 缓冲液 2min ; 通入 $10\mu\text{g/ml}$ 的抗 SEB 的羊单克隆抗体 IgG, IgG 便会通过碱性氨基酸(Arg 和 Lys) 侧链上的氨基基团与活化的羧基反应, 从而被固定在金膜上, 在线监测反应过程至反应平衡(动态反应曲线饱和); 通入 1mol/L 乙醇胺水溶液封闭多余的活性酯基团; 最后

用缓冲液清洗备用。

1.3.3 检测抗原 SEB 与其羊单克隆抗体 IgG 的反应
活化以后的金膜便可以用来做 SEB 的检测, 整个检测过程都应用了牛血清白蛋白 (BSA) 本体折射率补偿法来消除本体折射率变化的影响, 所有蛋白溶液的总蛋白浓度为 $100\mu\text{g/ml}$ 。检测步骤如下:

- (1) $100\mu\text{g/ml}$ BSA 溶液以一定的流速在线清洗直到动态曲线平衡, 获得反应的基线;
- (2) 通入一定浓度的 SEB 样品溶液(用 BSA 补偿法配), 在线监测 IgG 与 SEB 的亲吸附反应; 反应一段时间以后再通入 $100\mu\text{g/ml}$ BSA 溶液, 检测固定于膜上的 IgG-SEB 复合物的解吸附过程;
- (3) 最后通入 0.2mol/L 甘氨酸金膜洗脱液, 这可以除去结合于 IgG 上的 SEB 而几乎不会清洗掉膜上的 IgG, 并对其活性影响较小。
- (4) 再生后的金膜可以用于下一个循环, 检测另一浓度的 SEB 样品。每个再生步骤能够除去

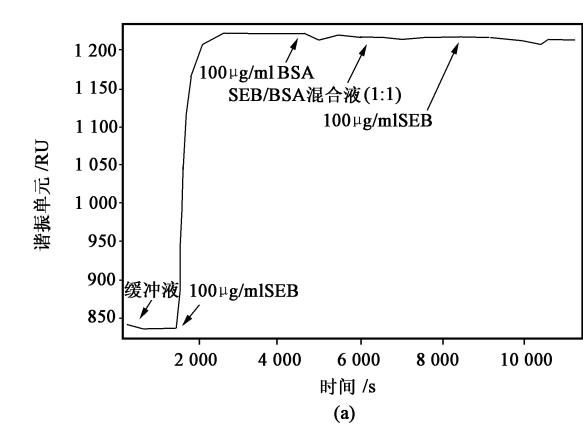


图 3 (a) 具有总蛋白浓度的溶液的 SPR 响应

2.2 不同蛋白浓度的溶液的折射率变化

我们还检测了不同蛋白浓度的溶液的折射率的变化。如图 3 (b) 所示, 依次分别通入 $100\mu\text{g/ml}$ 的 SEB 溶液、 $10\mu\text{g/ml}$ 的 SEB 溶液和 $100\mu\text{g/ml}$ 的 BSA 溶液、 $10\mu\text{g/ml}$ 的 BSA 溶液。对于蛋白浓度同为 $100\mu\text{g/ml}$ 的 SEB 溶液和 BSA 缓冲液, 它们有几乎相同的 SPR 响应值; 而对于蛋白浓度同为 $10\mu\text{g/ml}$ 的 SEB 溶液和 BSA 溶液亦然。

以上的实验表明, 当金膜表面没有发生生物分子的相互作用时, SPR 的响应 ΔR 主要表现为溶液本体折射率的变化, 而且溶液的本体折射率与溶液的总蛋白浓度相关; 而当被检测样品在金膜表面的

95% 以上的结合于金膜上的 SEB, 并且可以至少保证金膜重复利用 5 次后, 金膜表面的 IgG 活性保留在 75% 以上。整个过程中流动系统的流速恒定在 $100\mu\text{l/min}$ 。

2 结果与讨论

2.1 具有相同总蛋白浓度的不同溶液的本体折射率

采用牛血清白蛋白本体折射率补偿法, 消除溶液本体折射率变化, 实验结果见图 3。如图 3 (a) 所示: 在金膜用 NHS/EDC 活化以后, 先通入 PBS 缓冲液获得基线; 然后通入 $100\mu\text{g/ml}$ 的 SEB 溶液, 可以明显看到 SEB 共价固定于金膜上的信号; 然后依次加入总体蛋白浓度均为 $100\mu\text{g/ml}$ 的 BSA 溶液, SEB/BSA 的 1:1 混合液和 SEB 溶液。可以看出, 图 3 (a) 所示的几种蛋白的 SPR 响应值相当的一致。

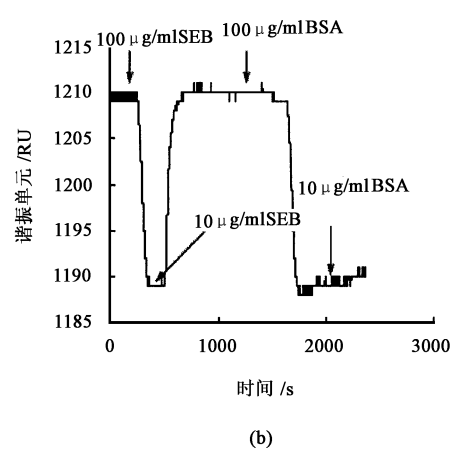


图 (b) 不同蛋白浓度的溶液对应的 SPR 响应图

结合或者解离时, SPR 响应将产生明显的上升或者下降, 因此这种检测方法能消除溶液本体折射率的变化带来的检测干扰, 从而准确且有效地检测到在金膜表面发生的免疫反应。

2.3 监测抗原 SEB 与其羊单克隆抗体 IgG 的反应

我们利用这种惰性蛋白溶液折射率补偿法, 对 SEB 肠毒素与它的羊单克隆抗体 IgG 的免疫反应进行了浓度梯度实验, 如图 4 所示。实验表明, 目前的 SPR-2000 生化分析仪检测 SEB 毒素的灵敏度为 $0.1\mu\text{g/ml}$ 。通过改进固定方法, 并优化固定和检测条件, 可能使检测灵敏度有较大提高。

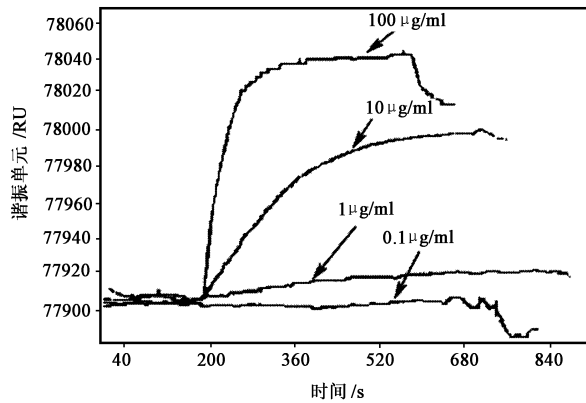


图 4 用 SPR 2000 分析检测不同浓度的 SEB 样品溶液

3 结 论

利用总蛋白浓度相同的溶液具有相同折射率的特点,巧妙地利用牛血清白蛋白作为惰性蛋白对溶液的折射率进行补偿,使得整个反应过程中溶液的本体折射率基本保持一致,解决了单通道 SPR 仪难以消除溶液间本体折射率差异的难题。

基于这种实验方法,成功地进行了抗原SEB

与其羊单克隆抗体 IgG 的浓度梯度反应,初步实验结果是,SPR-2000 型生化分析仪对 SEB 的检测灵敏度为 1μg/ml,相当于 3.5×10^{-8} mol/L。通过改进生化反应条件和检测手段,如改进生物膜的固定化方法,提高灵敏度,以使 SPR 传感器能够真正地应用于 SEB 肠毒素的检测。进一步的研究工作在继续。

参考文献

[1] Jonsson U, Fagerstam L, Ivarsson B, et al. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques*, 1991, 11: 620~ 627

[2] 崔大付, 李向明, 蔡浩原, 等. 表面等离子体谐振(SPR)生化分析仪的研制. *现代科学仪器*, 2001, 6: 34

[3] Stenberg E, Persson B, Roos H, et al. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radio labeled proteins. *J Colloid Interface Sci*, 1991, 143: 513 ~ 526

[4] Karlsson R. Real-time competitive kinetic analysis of interactions between low molecular weight ligands in solution and surface immobilized receptors. *Anal Biochem*, 1994, 221: 142~ 151

Research on the Noise Factor and Its Compensation Method
During SPR Detection

Cai Haoyuan Cui Dafu Xiang Sihai Li Yating Wang Yujie Chen Xiang
(Institute of Electronics Chinese Academy of Sciences State Key Laboratory of Transducer Technology Beijing 10080)

Abstract An experimental method to compensate bulk refractive index variations between different solutions is introduced. It eliminates the noise caused by different solutions flowing through, which normally exists in single-channel SPR instrument. Applying this method, the concentration-grade interaction between *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) and its surface-immobilized monoclonal antibody was detected. It shows that the home made SPR-2000 biosensor is able to detect 1μg/ml SEB in less than 10min, corresponding to 3.5×10^{-8} mol/L.

Key words Surface plasmon resonance(SPR) Bulk refractive index compensation *Staphylococcus aureus* enterotoxin B