

蛋白质微阵列 SPR 实时相位检测*

余兴龙 魏星 王鼎新 定翔 廖玮¹ 赵新生¹

(清华大学精密仪器与机械学系, 精密测试技术及仪器国家重点实验室, 北京 100084;

¹北京大学化学与分子工程学院化学生物学系, 分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 将表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)与空间相位调制检测结合, 用一束准直的平行光照射传感芯片, 在反射光路中引入渥拉斯顿棱镜, 使光束中的 p 光和 s 光产生偏振光干涉形成条纹, 生化反应的有关信息从干涉条纹的相位变化中得出. 选择金膜厚度为 30 nm 和 40 nm 的两种芯片, 分别用浓度为 50% 和 20% 的酒精-水溶液进行实验, 得到 SPR 阵列图谱; 选择金膜厚度为 30 nm, 兔 IgG 作为阳性对照, 牛血清白蛋白(BSA)作为阴性对照, 与 0.2 mL 的羊抗兔 IgG、1.8 mL 水的混合溶液反应, 得到阵列反应图谱. 实验结果表明, 这种方法具有抗干扰能力强, 灵敏度高, 无需标记和可实时检测等优点, 能满足蛋白质芯片检测的要求.

关键词: 蛋白质微阵列, SPR, 相位检测, 偏振光干涉

中图分类号: O647, R197.39

蛋白质研究一直是以二维凝胶电泳的分离和质谱分析为基础, 质谱分析仅能得到蛋白质的结构信息, 却难以实现高通量测量. 最近, 荧光标记的蛋白质阵列检测发展较快^[1], 但它需要对目标蛋白质进行荧光标记, 不仅会增加实验难度, 而且对蛋白质的活性也有一定的影响. 因此, 人们希望寻找一种非标记、简单、实时的高通量检测方法, 基于表面等离子体共振(SPR)的蛋白质阵列检测法就应运而生^[2].

SPR 生物传感器的检测方法分为两大类: 一类是以检测反射光的强度为基础, 包括角度扫描法^[3], 波长扫描法^[4]和固定角度与波长的光强检测法^[5]; 另一类是以检测反射光的相位为基础, 包括剪切干涉测量法^[6]、椭偏法^[7]、马赫-曾德干涉仪法^[8]和外差干涉法^[9]. 前一类检测方法的原理和结构比较简单, 但灵敏度较低; 后一类检测方法灵敏度较高, 但剪切干涉测量法不能定量分析, 椭偏法测量时间长, 马赫-曾德干涉仪法非共光路噪音较大, 外差干涉法接收器件成本较高. 为此, 本文提出了一种新型的高灵敏度共光路SPR实时阵列检测方法, 它以相位检测为基础, 使反射光中的2种偏振光在通过渥拉斯顿棱镜和偏振片后发生干涉, 由CCD(charge coupled device)记录下干涉条纹图像, 经计算机处理得到相位变化

信息.

1 理论基础

1.1 系统原理

在发生 SPR 时, 激发 SPR 的 p 偏振光的相位变化剧烈, 而 s 偏振光相位基本不变. 因此, 在 SPR 相位检测中, 把 p 光和 s 光分别作为测量光和参考光.

SPR 成像干涉系统原理如图 1 所示. 在激发 SPR 后, 由传感芯片反射的光在通过渥拉斯顿棱镜(W)后分成两束偏振光 o 光(s 偏振光)和 e 光(p 偏振光), 二者的光矢量 E_o 和 E_p 分别表示为

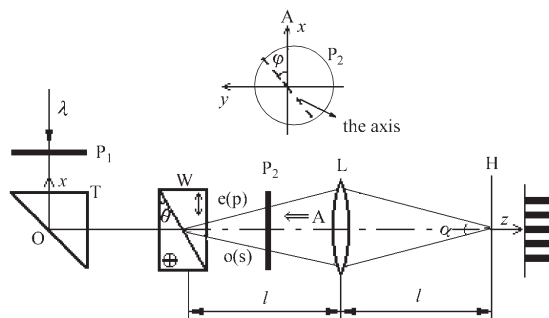


图 1 SPR 成像干涉系统原理图

Fig.1 Schematic diagram of the SPR imaging interferometry

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_s &= \mathbf{A}_s \cos(\omega t - \mathbf{k}_s \cdot \mathbf{r} + \phi_{0s}) \\ \mathbf{E}_p &= \mathbf{A}_p \cos(\omega t - \mathbf{k}_p \cdot \mathbf{r} + \phi_{0p}) \end{aligned} \tag{1}$$

式中, \mathbf{A}_s 、 \mathbf{A}_p 分别为 s 光和 p 光的振幅矢量, ω 为角频率, \mathbf{r} 为位矢(坐标系如图 1), ϕ_{0s} 和 ϕ_{0p} 分别为 s 光和 p 光在 $t=0, \mathbf{r}=0$ 时的初始相位; \mathbf{k}_s 、 \mathbf{k}_p 分别为 s 光和 p 光的波矢量. 经过偏振片 P_2 后, p 光和 s 光的振动方向变得一致. 此时, 两者的光矢量 \mathbf{E}_s' 和 \mathbf{E}_p' 为

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_s' &= \mathbf{A}_s \sin\varphi \cdot \cos(\omega t - \mathbf{k}_s \cdot \mathbf{r} + \phi_{0s}) \\ \mathbf{E}_p' &= \mathbf{A}_p \cos\varphi \cdot \cos(\omega t - \mathbf{k}_p \cdot \mathbf{r} + \phi_{0p}) \end{aligned} \tag{2}$$

式中, φ 为偏振片 P_2 的光轴与 x 轴的夹角. 设屏 H 上的某点位矢为 \mathbf{r}_0 , 其光强为

$$\begin{aligned} I &= \langle (\mathbf{E}_s + \mathbf{E}_p) \cdot (\mathbf{E}_s + \mathbf{E}_p) \rangle \\ &= I_s' + I_p' + I_{sp}' \\ &= (A_s \sin\varphi)^2 + (A_p \cos\varphi)^2 + \\ &\quad 2A_s A_p \sin\varphi \cos\varphi \cos[(\mathbf{k}_s - \mathbf{k}_p) \cdot \mathbf{r}_0 - \phi_0] \\ &= (A_s \sin\varphi)^2 + (A_p \cos\varphi)^2 + \\ &\quad 2A_s A_p \sin\varphi \cos\varphi \cos(2k \sin \frac{\alpha}{2} \cdot x_0 - \phi_0) \\ &= (A_s \sin\varphi)^2 + (A_p \cos\varphi)^2 + \\ &\quad 2A_s A_p \sin\varphi \cos\varphi \cos(2 \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \sin \frac{\alpha}{2} \cdot x_0 - \phi_0) \end{aligned} \tag{3}$$

式中, ϕ_0 为 s 光与 p 光的相位差, $\phi_0 = \phi_{0s} - \phi_{0p}$; k 为波数 $k = 2\pi/\lambda$, λ 为波长; α 为渥拉斯顿棱镜的分束角, $\alpha = 2(n_o - n_e)\tan\theta$; θ 为渥拉斯顿棱镜角度; n_o 和 n_e 分别为 o 和 e 光的折射率.

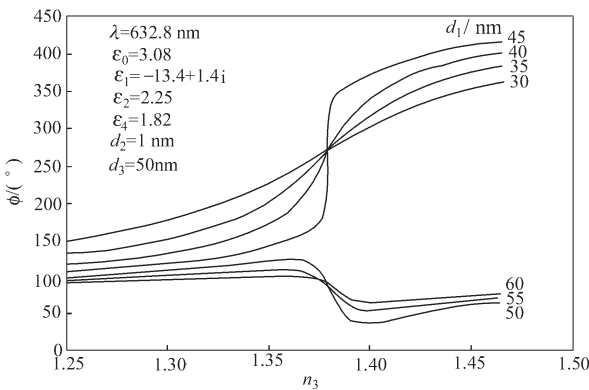


图 2 相位检测中金膜厚度对相位-折射率曲线的影响
Fig.2 The effect of gold film thickness on the phase-sample refractive index curves in the phase detection

The light wavelength is 632.8 nm. The dielectric constants of the prism, Au film, linker layer and buffer are 3.08, $-13.4+1.4i$, 2.25 and 1.82 respectively. The linker layer thickness is 1 nm, and the sample layer's is 50 nm. The thickness of the Au film changes from 30 nm to 60 nm. The interval is 5 nm.

由(3)式可知, 屏 H 上的光强分布呈条纹状, 其空间频率 $f_0 = 2 \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \sin(\frac{\alpha}{2}/2\pi) \approx (2(n_o - n_e)\tan\theta)/\lambda$, SPR 的相位变化可通过检测 ϕ_0 得到.

1.2 金膜厚度选择

金膜厚度不仅影响 SPR 的激发, 而且直接决定相位检测的范围与分辨率. 我们采用Kretschmann的 SPR 五层结构模型进行理论计算^[9], 结果如图2所示. 从图中可见, 膜厚 30 nm 与 40 nm 相比, 前者线性变化区域大, 对应的折射率范围为 1.30~1.45, 相位变化了大约 200°, 但相位灵敏度较低; 后者的折射率仅在 1.35~1.40 区域基本是线性, 线性变化区域较小, 相位变化量却与前者基本相同, 从而相位灵敏度大大提高了.

2 实验系统

2.1 实验装置

SPR 干涉测量系统结构如图 3 所示. 氦氖激光器(1)发出的激光通过小孔(2)滤波及扩束系统(3)后成准直光, 光强分布均匀. 偏振片4、5的作用是调整入射光的偏振方向, 并使 p 光和 s 光的强度比合适. 光束通过矩形光阑 (6) 后, 光斑成矩形, 投射到 Kretschmann 的 SPR 传感芯片(8)上, 激发表面等离子体波. 微阵列芯片(8)上发生的生化反应通过反射光中 p 光的相位变化表现出来. 反射光中 p 光和 s 光经过一维扩束系统(10)、渥拉斯顿棱镜(11)和检偏器(12)后产生空间干涉, 干涉图像通过成像透镜(13)后由 CCD(14)记录, 经处理后通过计算机(15)解算得出相位变化结果. 解算相位使用傅立叶变换法, 干涉图像的时间分辨率为 0.2 s, 微阵列芯片上任何一

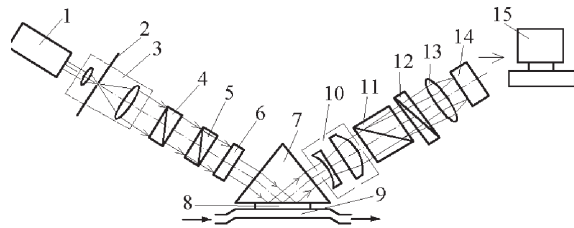


图 3 SPR 干涉测量系统结构图
Fig.3 The configuration of the experimental SPR interferometric system

- 1) He-Ne laser, 2) pinhole, 3) collimator, 4,5) polarizers,
- 6) rectangular diaphragm, 7) triangle prism, 8) micro-array sensing chip, 9) flow cell, 10) beam expander,
- 11) Wollaston prism, 12) polarizer, 13) imaging lens,
- 14) CCD camera, 15) computer

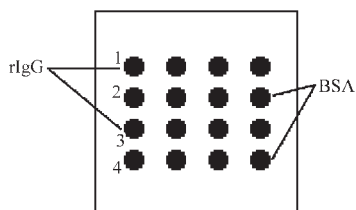


图4 微阵列芯片结构示意图

Fig.4 The configuration of micro-array sensor chip

The first and third lines are rIgG spots, and the second and forth lines are BSA spots.

点的相位变化都可以得到.

2.2 微阵列芯片制备

(1) 金表面自组装成膜

表面镀有金膜的基片,先进行超声洗涤,丙酮5 min两次,甲醇5 min两次.基片浸入超纯水中,空气中吹干.然后,将其置于Piranha溶液(H_2SO_4 与30% H_2O_2 体积比为7:3)95 °C下氧化15 min.超纯水洗净后,浸泡于 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MUA(巯基十一碳酸)的乙醇溶液中24 h进行自组装.组装完成后,基片经PBS(磷酸缓冲液)洗涤三次后吹干.

(2)蛋白质阵列的制备

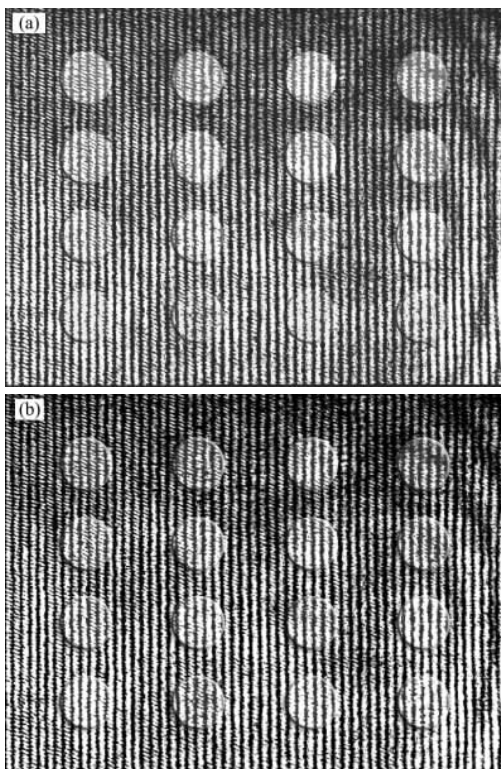


图5 干涉图样

Fig.5 Interference patterns

(a) interference pattern at 0 s (deionized water)
(b) interference pattern at 30 s (50% alcohol solution)

点样中用到的蛋白溶液先用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDC(碳二亚胺)和 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NHS(N-乙酰琥珀碱)进行活化,利用表面的羧基与蛋白表面的氨基进行肽键缩合.实验中使用2种蛋白来制备点阵,一种是兔IgG(rIgG)作为阳性对照,一种是牛血清白蛋白(BSA)作为阴性对照.利用点样仪MicroCASTer(S&S, Germany),制备了总共16个点的蛋白点阵,其中8个IgG点都被BSA点围绕,如图4所示.每个点的直径约为 $500\text{ }\mu\text{m}$,点间距约为 $500\sim 1000\text{ }\mu\text{m}$.点样后基片置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 反应24 h,然后浸入PBS中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min洗涤两次.基片浸泡于PBSM(PBS+1%(w))脱脂牛奶)中进行封闭,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下封闭60 min后,马上浸入PBS中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min洗涤两次.反应好的蛋白阵列表面保存于室温下PBS溶液中,避免表面变干.

3 实验研究

3.1 酒精溶液检测

本实验选用的金膜厚度为30 nm,传感面积为 $8\text{ mm}\times 8\text{ mm}$,检测阵列为 4×4 .实验前,将入射角调整到接近共振角的位置,样本池与传感面用去离子水清洗干净.实验时,先连续向样本池中注入去离子水10 s,再注入50%的酒精溶液35 s,最后注入去离子水15 s.整个实验过程持续一分钟,计算机实时地记录实验过程中干涉图像的变化(图5).相位变化的结果如图6所示.随后,又进行了40 nm金膜的实验,操作方法相同,实验结果如图7所示.

3.2 抗原-抗体亲和力检测

本实验使用2.2节中制备的微阵列蛋白质芯片,芯片上的金膜厚度为30 nm.实验时,前18 s内使用缓冲液PBS清洗传感面,再将0.2 mL的goat-anti-rabbit IgG、1.8 mL去离子水的混合溶液缓慢地注入样品池,持续了80 s,最后连续注入洗脱液22 s,实验结果如图8所示.与图4相对应,曲线1和3是rIgG与goat-anti-rabbit IgG溶液的反应结果,相位变化了大约 $20^\circ\sim 25^\circ$;曲线2和4是BSA与goat-anti-rabbit IgG溶液的反应结果,相位仅变化了大约 10° .

4 讨论

比较图6与图7,可发现两次实验曲线的突变位置均与各自的溶液改变时间相对应,说明系统实时性好.但是,变化的大小不相同,前者约为 10° ,后者约为 40° ,这说明金膜的厚度不同,灵敏度随之不同,且40 nm厚金膜的分辨率及灵敏度均优于30

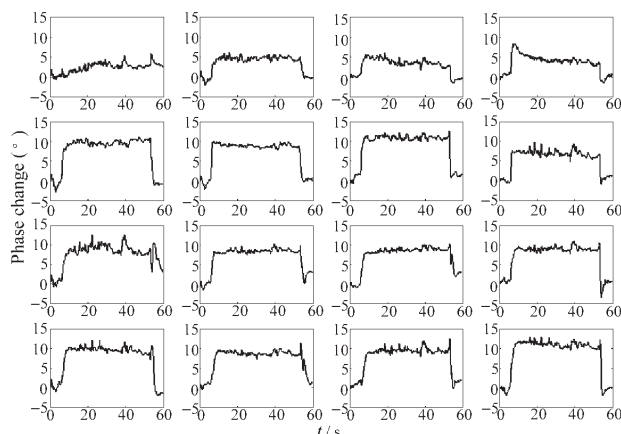


图6 实验过程中各阵列点的相位变化

Fig.6 Detection results of phase changes during the process

The input starts from deionized water, switches to 50% alcohol solution, and then goes back to deionized water. 30 nm gold-film is used. The entrance and exit of the flow cell are on the same side.

nm 的, 与理论模拟的结果一致. 在实际使用过程中, 则需要根据相位检测的特点优化金膜厚度.

还可看出, 图7曲线的一致性比图6好. 图6的样本池入口与出口是在芯片的同一侧, 即不在同一轴线上, 且方向相反; 图7的样本池入口与出口在同一轴线上, 方向相同. 这说明由于样本池进、出口在同一侧, 样本在样本池中产生紊流, 容易在边角上流速降低, 使反应速度降低, 造成变化差异; 样本池进、出口在同一轴线上且方向相同, 能较好保证样本匀速地流过样本池, 使反应速度一致, 获得的结果也一致. 因此, 样本池的设计, 尤其是进、出口的设计, 是

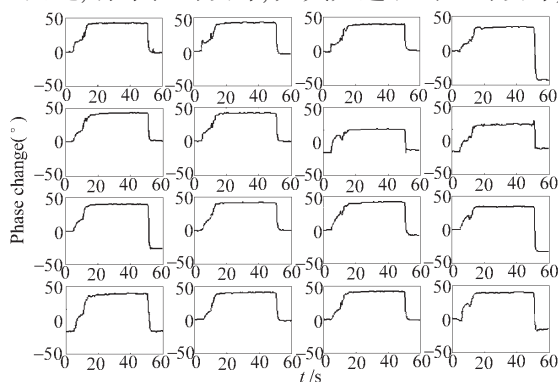


图7 实验过程中各阵列点的相位变化

Fig.7 Detection results of phase changes during the process

The input starts from deionized water, switches to 20% alcohol solution, and then goes back to deionized water. 40 nm gold-film is used. The entrance and exit of the flow cell are on different sides, but on the same axis.

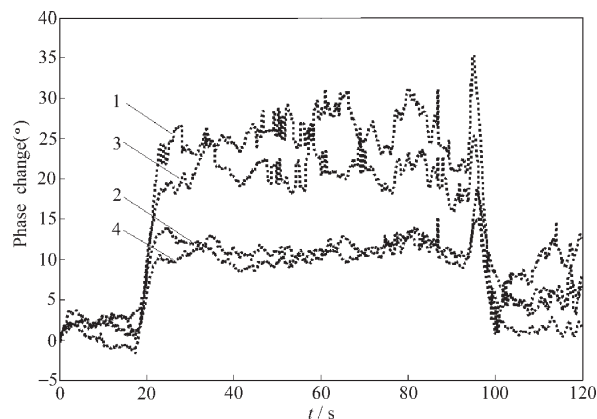


图8 抗原-抗体结合与解离的相位检测结果

Fig.8 Detection results of antigen-antibody binding and dissociation

Corresponding to Fig.4, curves 1 and 3 are the results of the targets rIgG. Curves 2 and 4 are the results of the reference BSA.

阵列检测的关键之一, 必须采取数值模拟和实验相结合的方法, 经过优化设计来得到满意的样本池.

从图8可以看出, 检测点与参考点的差异很明显, 相位相差 10° 以上, 说明这种方法是适合蛋白质与蛋白质相互作用阵列检测的. 但是, 检测点1和3的相位变化稍有不同, 相差大约 5° 左右, 除了上面提及的样本池设计问题外, 还可能是由于手动点样仪点样不规范所导致. 因此, 今后需采用自动化点样仪, 并进一步改进芯片制备的技术和规范检测条件.

综合上述讨论可以得出, 这种方法无需标记, 灵敏度高, 可实时获取反应信息, 有可能满足蛋白质组学研究的要求.

References

- Mitchell, P. *Nature Biotechnology*, **2002**, *20*:225
- Cai, Q.; Li, X.; Chen, Y. Q. *Biomedical Engineering Foreign Medical Science*, **1999**, *22*(2):65 [蔡强, 李翔, 陈裕泉. 国外医学生物医学工程分册(*Guowai Yixue Shengwu Yixue Gongcheng Fence*), **1999**, *22*(2):65]
- Homola, J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, *377*:528
- Jordan, E. C.; Frutos, G. A.; Fhiel, J. A.; Corn, M. R. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*:4939
- Yu, X. L.; Wang, D. S.; Wang, D. X.; Ouyang, J. H.; Yan, Z. B.; Dong, Y. G.; Liao, W.; Zhao, X. S. *Sens. Actuators B*, **2003**, *91*:133
- Kruchinin, A. A.; Vlasov, Y. G. *Sens. Actuators B*, **1996**, *30*:77
- Nikitin, P. I.; Beloglazov, A. A.; Valeiko, V. E.; Ksenevich, T. I. *Sens. Actuators B*, **1999**, *54*:43
- Ho, H. P.; Law, W. W. *Sens. Actuators B*, **2003**, *96*:554

- 9 Yu, X. L.; Zhao, L. Q.; Jiang, H.; Wang, H. J.; Yin, C. Y.; Zhu, S. *G. Sens. Actuators B*, **2001**, *76*: 199
- 10 Yu, X. L.; Wang, D. X.; Yan, Z. B. *Sens. Actuators B*, **2003**, *91*: 285

Real-time SPR Phase Detection for Protein Micro-array*

YU, Xing-Long WEI, Xing WANG, Ding-Xin DING, Xiang LIAO, Wei¹ ZHAO, Xin-Sheng¹
(State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instrument, Department of Precision Instruments and Mechanology, Tsinghua University, Beijing 100084; ¹State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable and Stable Species, Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Combining surface plasmon resonance (SPR) and spatial phase modulation, a real-time SPR sensing chip was illuminated with a collimated parallel light beam. A Wollaston prism was introduced into the detection light path, causing the p- and s-polarization components to interfere with each other. The information of biochemical reactions could be obtained by extracting the phase change from the interference patterns. The sensor chips, on which the Au film was 30 nm and 40 nm, experimented with 50% and 20% alcohol solutions respectively to obtain SPR array graph. Subsequently, two proteins, rabbit IgG as positive sample and Bovine Serum Albumin (BSA) as negative control, reacted with the mixed solution of 0.2 mL goat-anti-rabbit IgG sample and 1.8 mL deionized water, using Au film of 30 nm. The reaction diagram was also attained. The experimental results indicated that, with the merits of high noise resistance, high sensitivity, unlabelled and real-time detection, this SPR method could meet the requirement of protein micro-array detection.

Keywords: Protein micro-array, SPR, Phase detection, Interference of polarized light