

• 综 述 •

基于 SPR 技术的生物传感器研究进展*

徐 华 综述, 顾大勇 审核

(深圳出入境检验检疫局保健中心, 广东深圳 518033)

关键词: 表面等离子共振; 生物传感器; 检测技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)15-1993-03

生物传感器, 即生物来源的一切传感器识别物或者分析物^[1]。研究生物分子间的相互作用、细胞活性观察、特异性地检测体液中、生产过程中、环境样本中的分析物是生命科学、药物研究、医学诊断和保证食品安全的基础。目前, 检测技术的发展面临巨大挑战: (1) 虽然一些较大的生化分析物通过有染料或者荧光染料染色后都很容易观察到, 但由于一些处理方法很容易将待检组织破坏, 这样就要求研究同一样本的时间不宜过长。(2) 一些学者从事蛋白组学方面的研究时需要检测大量样本。这就要求某种实验方法能够同时检测多个样本, 即需要解决通量问题。(3) 基于标记技术的检测方法中使用的标记物会竞争性地与标记分子的活性位点结合, 从而阻碍待检物质与标记分子结合, 导致假阳性结果^[2]。因此, 需要一种更加高效、准确地实验方法。SPR 生物传感器作为免疫光学生物传感器, 可以检测抗原、抗体间的免疫亲和反应, 具有无需标记, 高通量, 可动态监测生物分子相互作用的全过程, 样品无需预处理等特点^[3]。本文就 SPR 生物传感器的发展及应用研究作如下综述。

1 SPR 生物传感器的工作原理及技术革新

通常情况下, SPR 仪主要由以下几个部分构成: 光源、检测器、金膜、棱镜、生物分子以及微流系统^[4]。当偏振光透过棱镜照射到镀有金属薄层的传感芯片上时, 偏振光将会被金属薄膜反射。改变入射角, 检测反射光的光强, 当反射光强达到最小值时即可激发表面等离子激元, 产生倏逝波。偏振光光子可与金属层表面的自由电子相互作用, 使自由电子发生震动, 而引起反射光强的减弱。此时, 引起发射光强达到最小值的入射角即被称作共振角或 SPR 角。由此可以看出, SPR 角完全取决于介质的光学特性, 例如折射率。当一些大分子物质吸附在芯片表面时就会引起传感器界面折射率的变化, 因此 SPR 角就会随着芯片表面结合物的多少而发生变化, 从而由信号变化可以间接反映芯片表面物质的结合量^[5]。

除了化学界面和生物功能分子部分, SPR 生物传感器是高度依赖于光学性能、电学性能和结构特点的仪器。大部分仪器设计方面的研究, 其目的都是使 SPP 波在各种实验条件下(包括激发波长、材料学、几何学和检测环境的不同)都能充分发挥效能。由于这些开拓工作, 基于 SPR 的生物传感器已经广泛应用在分析化学、修复、材料和表面科学。尤其是近十年来, 仪器的不断改进和再生、信号放大和 SPR 信号拟合等实验方法的不断改进, 使得 SPR 技术取得了更大突破。

椭圆光度法也是基于全反射的一种测量方法, 利用椭圆偏光术所发展出来的椭圆偏光仪, 是测量物质折射率、薄膜厚度

及准确度最佳的仪器之一。它与 SPR 结合在一起后, 监测和分析以半透明金属层和半透明薄膜为基质的免疫传感器结合/解离常数方面的效力更强。

Arwin 等^[6]应用全反射椭圆光度法检测生物分子的结合/解离常数, 结果证明全发射椭圆光度法较普通椭圆光度法具有更高的灵敏度。随后, Rispens 等^[7]利用椭圆光对称法评价抗白细胞介素(IL)-6 中的两种高亲和力抗体抗-IL6.16 和抗-IL6.8 的结合常数, 并与传统的 SPR 法进行比较。结果发现利用 PEIA 椭圆光对称法测量两种抗体的亲和力分别为 5 pmol/L 和 50 pmol/L。此方法较之 SPR 法更为简便且用时更短。

2 SPR 芯片表面化学

在传感芯片镀膜上固定生物分子的方法多种多样, 包括直接物理吸附法、共价偶联法、亲和素-生物素结合法、金属螯合法、LB 膜法及分子印迹法等^[8]。

物理吸附法可以使抗原和抗体简单地吸附在金属表面, 尽管这种技术有很大的潜力, 但依旧有一些缺陷。(1) 蛋白质直接吸附在金表面可以引起蛋白质变性从而不能形成稳定的吸附层。(2) SPR 技术是基于金属-溶液接触面的介电常数的, 另外也要把非特异性吸附降到最低。配体的非特异性吸附或者缓冲液的溶质和配体间发生交换都会影响 SPR 的信号值(不稳定的吸附/解离同时发生)。一般情况下, 最理想的条件是配体以共价结合的方式连接在金膜表面, 从而使芯片可重复利用; 并且使配体最大限度地暴露出来^[9]。

目前, 很多研究均使用共价偶联法连接抗原和抗体^[10]。一些双功能分子试剂都带有巯基可以与金膜发生化学反应, 还带有一个活性基团可以和蛋白中的氨基反应, 从而通过共价偶联原理将蛋白间接的连在金膜上。末端带有羧基的 SAM 试剂如果和末端带有羟基的 SAM 试剂一起使用的话, 与单独使用带有羧基的 SAM 试剂相比, 可以进一步减少非特异性吸附。有研究报道使用混合 SAM, 与单独使用各个 SAM 试剂的情况相比较, 前者能够有效减少非特异性吸附^[11]。但使用双功能分子试剂偶联抗原/抗体有一个最大的缺陷, 由于二维结构不能很好地使抗原抗体远离金属表面, 从而难以保证抗原抗体活性, 造成芯片储存困难。

使用水凝胶基质修饰金膜^[12]可以克服上述缺点, 并且, 以共价结合方式固定在金膜表面的蛋白和配体是可再生的。这种功能性表面可以广泛应用于各种生物分子, 尤其是生物特异性交互作用分析。这种基质是由羧甲基葡聚糖组成, 这种羧甲基葡聚糖基于离子浓缩法则, 可以为蛋白质或其他配体在较低浓度下提供结合位点, 主要应用于生物分子特异性交互作用

* 基金项目: 深圳市创新资源集聚计划项目(ZYB200907090128A); 国家自然科学基金资助项目(30972827, 81171667)。 作者简介: 徐华, 女, 医师, 主要从事生物芯片检测技术方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: wanhood@163.com。

分析。

目前,对于 SPR 新型表面化学材料的研究主要集中在以下两个方面:(1)新型表面材料要具有一般表面化学的独特优势;(2)新型表面材料还应具有更好的电场增强作用。其中最具有研究价值的就是超材料的应用,尤其是负折射率材料(NIM)(左手)材料^[13]。这些材料在已知范围内既能显示出负介电常数,又能显示出导磁系数。这种特性将明显提高 SPR 的深度成像和提高 SPR 在液相中折射率变化的敏感性。

3 基于 SPR 技术的传感芯片应用

基于 SPR 技术的生物传感器应用已经在很多综述中被广泛探讨^[14-16],本文着重介绍近年来应用方面的新成果。Berthier 等^[17]研制了基于 SPR 技术的特异性雌激素受体 DNA 芯片,用于雌激素初筛。这种 SPR 传感器能够实现无需标记,快速、实时、特异地检测雌激素受体;并且,通过观察雌激素受体之间的交互作用,研究雌激素二聚体如何通过雌激素原件之间的交互作用激发基因表达。另外, Vinogradova 等^[18]建立了一种基于 SPR 免疫生物传感器的实验方法来检测螺旋藻、水华束丝藻和蓝藻等食物添加剂中的微囊藻毒素。使用单克隆抗体建立免疫抑制型 SPR 生物传感器用于检测微囊藻毒素。通过对 20 份已知阴性蓝藻样本的检测,得出本方法的检测限为 0.561 mg/kg。对微囊藻毒素的检测限为小于或等于 0.85 mg/kg。该检测方法已经在爱尔兰市场上推广使用,并且基本实现自动化。

由于酶抑制剂的分子量很小,很难通过 SPR 直接检测出来。Milkani 等^[19]建立了一种无需竞争抑制或抗体结合而通过 SPR 直接检测 AChE 的方法,通过共价结合的方式将 AChE 固定在金膜上。通过分光光度分析确定固定蛋白活性和表面密度。两种结合的可逆抑制剂都可以通过 SPR 检测出来,无需进一步修饰或使用其他试剂。

由此可以看出,SPR 技术不仅在抗原/抗体结合动力学常数方面有广泛应用,近年来,SPR 技术在小分子物质、痕量物质的检测方面也取得了重大突破,为今后 SPR 技术的市场推广奠定了良好基础。

4 信号放大技术

SPR 生物传感器具有无需标记的特点^[20],但现在的 SPR 生物传感器对于蛋白质的检测限大约在 1~100 ng/mL 之间^[21-22],检测生物样本时,这样的检测灵敏度往往是不够的,因此需要提高传感器的敏感性。Tanaka 等^[23]利用三维水凝胶结构固定蛋白分子,可以大大提高 SPR 蛋白阵列的检测敏感性。Kim 等^[24]通过免疫夹心法用 HRP 催化沉淀反应结合在 SPR 传感器表面引发 SPR 的角度变化,从而达到增强 SPR 敏感性的目的,其敏感性可达到 0.01 至 100 ng/mL。Jungwoo 等^[25]在金膜上铺一层氧化硅(MP-SBA),氧化硅有多孔特征,具有较大的表面积和空隙溶剂,使得探针结合位点更多,起到信号放大作用。另外,也有学者采用葡萄球菌 A 蛋白(SPA)固定在芯片表面,它能与多种动物的 IgG Fc 端结合,这样既可达到定向固定抗体的目的,又可使得暴露出的结合位点更多,从而提高检测灵敏度。Huang 等^[26]将 RCA 和纳米金标记结合在一起,分析物杂交信号将被放大,其灵敏度大大提高。利用 5 nm 纳米金和 30 min RCA 时间,蛋白信号比起初始信号扩大了 60 倍。

5 展 望

表面等离子体共振的组合与互补分析技术已经越来越受到重视,研究重点主要集中在以下两个方面:(1)在同一仪器上结

合不同的物理现象以期达到更高的灵敏度和分辨率。(2)对同一种样品使用不同的仪器进行连续性分析。

近几年基于 SPR 生物传感器的研究,其挑战性主要集中在以下几个方面:(1)SPR 传感器可以达到连续检测样本的目标,可以同时检测多种物质,且兼容性良好;(2)同时注重 SPR 现象和 SPR 检测平台的开发,使传统光谱学技术与成像技术都得到发展,敏感性更高;(3)纳米技术的应用会大幅提高检测技术的敏感性,开启基于电磁波检测技术的新纪元;(4)微流体系统和生物微型系统的发展将使 SPR 生物传感器达到自动化分析的目标;(5)新型芯片的设计和光学平台的发展可以大大降低光学组件噪声;(6)在纳米水平上对表面等离子共振现象的基础研究将会继续推进光子学、光电学和能量学的研究进展,继而推动 SPR 技术革新。

参考文献

- [1] Cooper MA. Label-Free biosensors: techniques and applications [M]. Uk: Cambridge University Press, 2009.
- [2] Manera MG, Spadavecchia J, Leone A, et al. Surface plasmon resonance imaging technique for nucleic acid detection[J]. Sens Actuators B Chem, 2008, 130(1): 82-87.
- [3] 王于杰. SPR 生化分析系统在 SARS 病毒检测中的应用研究[D]. 北京:中国科学院电子学研究所, 2007: 1-91.
- [4] 张崇文, 马绥华, 刘乐, 等. 基于表面等离子共振扫描成像的 DNA 芯片的研究[J]. 生物物理学报, 2010 (6): 481-487.
- [5] 王海静. 应用 SPR 生物传感器快速检测 A 型流感病毒研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2008: 11-12.
- [6] Arwin H, Poksinski M, Johansen K. Total internal reflection ellipsometry: principles and applications[J]. Appl Opt, 2004, 43(15): 3028-3036.
- [7] Rispen T, Te Velthuis H, Hemker P, et al. Label-free assessment of high-affinity antibody-antigen binding constants. Comparison of bioassay, SPR, and PEIA-ellipsometry[J]. J Immunol Methods, 2011, 365(1-2): 50-57.
- [8] 欧慧超. 基于 SPR 技术的传感芯片的研制及应用[D]. 北京: 北京协和医学院研究生院, 2009: 11-14.
- [9] Jönsson U, Malmqvist M, Olofsson G, et al. Surface immobilization techniques in combination with ellipsometry[J]. Methods Enzymol, 1988, 137(1): 381-388.
- [10] Ladd J, Lu H, Taylor AD, et al. Direct detection of carcinoembryonic antigen autoantibodies in clinical human serum samples using a surface plasmon resonance sensor[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 70(1): 1-6.
- [11] Lahiri J, Isaacs L, Tien J, et al. A strategy for the Generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: a surface plasmon resonance study[J]. Anal Chem, 1999, 71(4): 777-790.
- [12] Löfås S, Johnsson B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands[J]. J Chem Soc Chem Commun, 1990 (21): 1526-1528.
- [13] Park K, Lee B J, Fu C, et al. Study of the surface and bulk polaritons with a negative index metamaterial[J]. JOSA B, 2005, 22 (5): 1016-1023.
- [14] Pattnaik P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2005, 126(2): 79-92.
- [15] Karlsson R. SPR for molecular interaction analysis: a review of e-

merging application areas[J]. J Mol Recognit, 2004, 17(3):151-161.

[16] McDonnell JM. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition [J]. Curr Opin Chem Biol, 2001, 5(5):572-577.

[17] Berthier A, Elie-Caille C, Lesniewska E, et al. Label-free sensing and atomic force spectroscopy for the characterization of protein-DNA and protein-protein interactions: application to estrogen receptors[J]. J Mol Recognit, 2011, 24(3):429-435.

[18] Vinogradova T, Danaher M, Baxter A, et al. Rapid surface plasmon resonance immunobiosensor assay for microcystin toxins in blue-green algae food supplements[J]. Talanta, 2011, 84(3):638-643.

[19] Milkani E, Lambert CR, McGimpsey WG. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor[J]. Anal Biochem, 2011, 408(2):212-219.

[20] Nice EC, Catimel B. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions[J]. Bioessays, 1999, 21(4):339-352.

[21] Pei RJ, Yang XR, Wang EK. Enhanced surface plasmon resonance immunoassay for human complement factor 4[J]. Anal Chim Acta, 2002, 453(2):173-179.

[22] Cui X, Yang F, Sha Y, et al. Real-time immunoassay of ferritin using surface plasmon resonance biosensor[J]. Talanta, 2003, 60(1):53-61.

[23] Tanaka H, Hanasaki M, Isojima T, et al. Enhancement of sensitivity of SPR protein microarray using a novel 3D protein immobilization[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 70(2):259-265.

[24] Kim MG, Shin YB, Jung JM, et al. Enhanced sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) immunoassays using a peroxidase-catalyzed precipitation reaction and its application to a protein microarray[J]. J Immunol Methods, 2005, 297(1-2):125-132.

[25] Jungwoo M, Taewook K, Surin H, et al. Enhancement of surface plasmon resonance (SPR) signals using organic functionalized mesoporous silica on a Gold film[J]. Sens and Actuat B: Chem, 2006, 114(2):1096-1099.

[26] Huang YY, Hsu HY, Huang CJ. A protein detection technique by using surface plasmon resonance (SPR) with rolling circle amplification (RCA) and nanogold-modified tags[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(6):980-985.

(收稿日期:2012-12-28)

• 综 述 •

血管性血友病因子裂解蛋白酶活性检测方法的研究新进展*

姚拾秀, 江 森 综述, 赵益明[△] 审校

(苏州大学附属第一医院江苏省血液研究所, 卫生部血栓与止血重点实验室, 江苏苏州 215006)

关键词: 血管性血友病因子裂解蛋白酶; 酶活性检测; 综述
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.036 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)15-1995-04

血管性血友病因子裂解蛋白酶(vWF-cp)的活性与血栓形成及出血、微血管病变、弥散性血管内凝血(DIC)、肿瘤浸润与转移、肝脏疾病、自身免疫性疾病以及血栓性血小板减少性紫癜(TTP)等疾病的发病密切相关,检测 ADAMTS-13 活性水平对诊治这些疾病有着极其重要的意义,目前 ADAMTS-13 活性的检测方法繁多,而且检测技术不断改进。Furlan 等^[1]和 Tsai^[2]同时报道了健康人血浆中存在能够裂解超大血管性血友病因子多聚体蛋白酶-vWF-cp 的存在。vWF-cp 是具凝血酶敏感蛋白结构的去整合素域和金属蛋白酶域蛋白家族成员之一,被命名为 ADAMTS-13。Zheng 等^[3]发现仅能在肝脏检出 ADAMTS-13,并对其 cDNA 进行测序,其序列长度为 4.6 kb。Uemura 等^[4]对肝脏内产生 ADAMTS-13 的细胞进行检测分析,用 ADAMTS-13 的两种单抗(A10 和 C7)对 C 型慢性肝炎冰冻肝组织切片行免疫组化染色,观察到杂交检出的树枝状 ADAMTS-13 mRNA 信号,并用共聚焦激光显微镜观察到 A10 单抗与标记活的肝星状细胞的 α 肌动蛋白抗体二重染色结果,这些说明 ADAMTS-13 可能主要由肝星状细胞(HSC)产生。血小板、巨核细胞、肾脏的足细胞和血管内皮细胞等均可产生 ADAMTS-13。

ADAMTS-13 基因位于 9 号染色体长臂,全长 37 kb,由

29 个外显子组成,cDNA 含 4 597bp 以及 1 个多聚腺苷酸尾,开放阅读框为 4 284bp,由 1 427 个氨基酸残基组成。血浆中 ADAMTS-13 在一定剪切力条件下,作用于 vWF 分子 A2 区 842 位酪氨酸与 843 位蛋氨酸之间的肽键,将 vWF 裂解为不具有黏附活性的两个片段。研究发现,ADAMTS-13 的活性与血栓形成及出血、微血管病变、DIC、肿瘤浸润与转移、肝脏疾病、自身免疫性疾病以及 TTP 等疾病的发病密切相关^[5-8]。这些疾病的共同特征是都涉及微血管改变,包括血管内皮改变,血小板活化等,这皆与血栓形成有关,而 ADAMTS-13 在这些疾病与血栓疾病之间起着桥梁性作用。此外,研究表明,内科危重症血小板减少相关性多器官功能衰竭(TAMOF)的发生主要是由于 ADAMTS-13 功能障碍所致^[9]。因此,ADAMTS-13 活性的检测对上述疾病的诊断和治疗意义重大。目前 ADAMTS-13 活性检测尚无统一标准,实验室检测存在操作步骤繁琐,耗时长,检测技术要求高等缺点,现将近年来 ADAMTS-13 活性的检测方法进行综述。

1 ADAMTS-13 活性检测方法特点

ADAMTS-13 的检测方法包括直接检测法和间接检测法,直接检测法是通过检测 vWF 裂解产物来测定 ADAMTS-13 的活性,间接检测法是通过检测残余底物或被消耗的底物来测

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971287,81100347);江苏省临床医学中心资助项目(ZX201102)。 作者简介:姚拾秀,女,硕士研究生在读,主要从事临床血液学与检验,血栓与止血方面的研究。 [△] 通讯作者, E-mail:Zhaoyimingbox@163.com。