

表面等离子共振法 (SPR) 测定抗体亲和力

表面等离子共振技术 (surface plamon resonace technology , SPR) 是上个世纪 80 年代发展起来的以生物传感芯片 (biosensor chip) 为中心的一种新技术。此后人们开始研究用各种方法改进 SPR 的性能、简化仪器系统, 并试图用 SPR 技术测量不同的生物物质, 测试范围包括:

DNA-DNA 间的生物特异性相互作用

蛋白质折叠机制的研究

微生物细胞的检测

抗体 - 抗原分子亲和力测定

本文对于表面等离子共振技术的原理和其在测定抗体亲和力作了简要的概述。

全内反射是一种普遍存在的光学现象。考虑一束平面光波从介质 1 表面进入到介质 2 中。入射光在介质 1 表面上的一部分发生反射, 另一部分则透射进介质 2。入射角和透射角之间满足关系式:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

这里 n_1 是介质 1 的折射率, n_2 是介质 2 的折射率。当入射角增大, 增大到临界角 θ_c 时, 这时的透射角为 90° ; 当入射角继续增大到大于临界角时, 光不再透射进介质 2, 也就是发生了全反射。由 snell 定律可知:

$$\theta_2 = 90^\circ$$

$$\theta_c = \arcsin(n_2/n_1)$$

由上式可知, 当 $n_2 < n_1$ 时, 全反射就可能发生。从几何光学的角度来看, 当光发生全反射时, 光会在介质 1 界面上完全反射而不进入介质 2 中。实际上, 由于波动效应, 有一部分光的能量会穿过界面渗透到介质 2 中, 平行于界面传播。这部分光场就是所谓的消失波。一般情况下隐失波在折射率小的介质中传播一段距离, 再回到折射率大的介质, 使光的全部能量都回到第一介质中。如果隐失波的频率与金属表面振荡的自由电子 (即等离子) 频率一致, 则金属表面的等离子就吸收光能发生共振 (surface plasmon resonance , SPR), 使反射光强度减弱, 这时的入

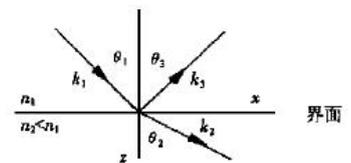
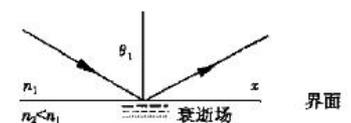


图1 消失波的产生原理

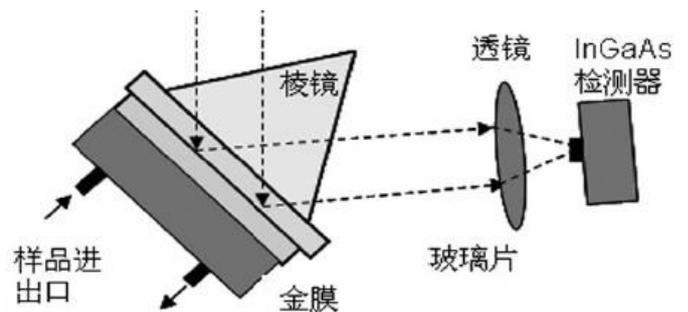


射角为共振角 (SPR 角)。SPR 随金属表面的折射率变化而变化,而折射率的变化又和结合在金属表面的生物分子质量成正比,因而可通过对生物反应过程中 SPR 角的动态变化获取生物分子相互作用的特异信号。

BIACORE 表面等离子共振仪的构成与工作原理

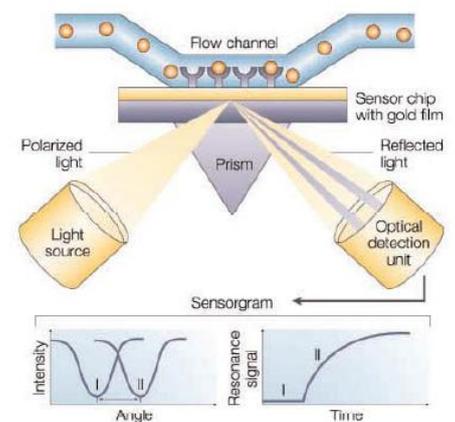
BIACORE 表面等离子共振仪基于 SPR 原理的新型生物传感分析技术,它在不需使用荧光或同位素标记甚至无须纯化各种生物组分的天然条件下,通过传感器芯片实时监测各类生物分子如多肽、蛋白质、寡核苷酸、寡聚糖、类脂甚至全病毒、细胞之间相互作用的整个过程,并通过分析软件获取生物分子结合、解离、亲和性、特异性、协同、拮抗、反应速率、浓度变化等互作动力学参数。

表面等离子共振仪主要由五部分组成:芯片、光学系统、液体处理系统、控温系统和计算机软件。其工作原理是基于 SPR 技术来实时追踪生物分子间的相互作用。实验时先将一种生物分子固定在传感器芯片表面,再通过微射流卡盘将含有相互作用的分子溶液传送至传感器芯片表面,SPR 光学检测系统则跟踪检测溶液与芯片表面的分子结合和解离的全过程。数据分析软件处理实验过程中获取的各种特异性信号,并将其整合成最终的实验结果。由于其高度的自动化和灵敏特异性且具常规仪器方法难以比拟的实时,动态监测优点,所以被广泛地应用于各种生命现象分子机理研究。



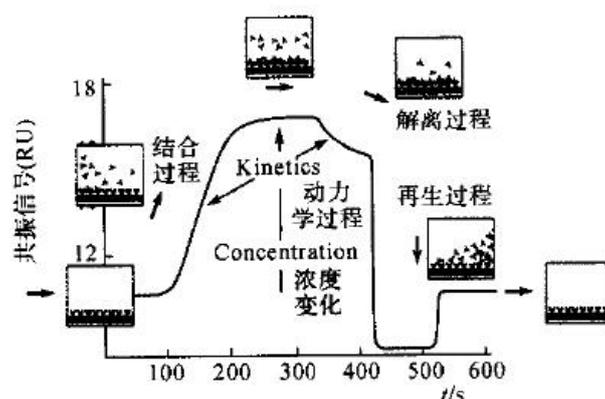
表面等离子共振仪芯片结构

在表面等离子共振仪中,最核心的结构是芯片。芯片的玻璃表面附有一层金膜,一种待检分子 (ligand) 连在金膜上,入射光在金和玻璃表面发生全反射,并产生 SPR,这时的入射角为 I。当有一种分子 analyte 与 ligand 相互作用时,使金箔的折射率发生变化,这时以原来的入射角 (I) 入射就不能发生 SPR,而以入射角 (II) 入射才能发生 SPR。用楔形的入射光入射保证了入射角在一定范围内,并能实时检测。在 analyte 与 ligand 相互作用后,以缓冲液流过芯片表面,使 analyte 和 ligand 相分离,从而芯片得到再生,可以重复使用。



SPR 用于抗体亲和力相互作用的研究

SPR 技术在抗体 - 抗原结合动力学及抗原表位 - 抗体对位的鉴定中有重要的应用,在无需纯化和标记抗体 - 抗原的天然条件下,能实时动态反映抗体 - 抗原互动时的结合/解离速率和亲和力常数。若测定的样品为 MAbs 时,可直接用杂交瘤细胞培养的上清液进行。其操作过程大致包括:首先将待测 MAbs 所识别的抗原偶联在传感芯片表面,然后注入待测 MAbs,通过芯片表面直接监测抗体 - 抗原结合过程,通过结合曲线能够快速半定量不同抗体的动力学参数。样品注入后,出现的脉冲有明显的开始和结束,在脉冲的前后端皆是连续的缓冲液在流动。从传感图上可以看到抗体 - 抗原复合物的结合过程和平衡状态。当样品注射完毕后,抗体被缓冲液代替时,可观察到复合物的解离状态,从结合量可以反映出抗体的浓度及结合的亲和力,利用分析软件能提供反应动力学常数及亲和力等数据。以洗脱液(如稀酸或碱)再生传感芯片后可进行下一轮分析。



与常规的亲和力检测方法(竞争 ELISA, 电泳条迁移等)相比,SPR 具有以下优势:

- 实时(real-time)监测反应的动态过程,即在生物大分子相互作用过程中其有关的变化可时时刻刻的记录在仪器上,而且其实验结果的重现性无可比拟。
- 检测每对生物大分子相互作用的时间大约为 10min 左右,分析快速,而且全自动化进行,故其工作效率高,在短时间内可完成大量标本的检测。
- 在仪器上记录的结果不能随意更改,这不仅减少了主观因素的影响,增加了客观性,而且其结果重复性好。
- 检测溶液中的最低浓度为 10-12mol/L,因此用样量少,敏感性高。并可测其浓度、反应亲和力、反应特异性及反应速度(动态参数)等。
- 在检测中的任何分子均无需纯化和标记,故简单易行。目前,这一类仪器的价格还比较昂贵,因此其推广使用受到限制。而且,对仪器的操作一般需由专门受过培训的人员进行。尽管如此,但由于该仪器具有明显优势,并且可以提供许多传统技术所不能提供的资料,因此该技术的出现为科学界、医学界及药理学的发展和拓展了新的空间。

相关阅读

[竞争 ELISA 法测定抗体亲和力](#)

