

# 光学椭偏成像技术在生物分子研究中的应用

王战会 靳 刚

(中国科学院力学研究所 北京 100080)

**摘 要** 光学椭偏显微成像是一种新型超薄膜及表面显示技术,是研究生物分子与固体表面吸附以及生物分子之间相互作用的一种简单、快速和可靠的手段。它不仅能够大面积精确显示超薄膜的厚度分布,而且能够用于表面实时吸附的动力学研究。在抗原-抗体检测分析方面,它不需要像酶联免疫法、荧光免疫法和放射免疫法那样对待测物作标记,也不会对待测生物分子活性造成任何扰动和损伤,操作简单,费用低廉。另外,它还弥补了传统的椭偏法的不足之处,能够有效地区分非特异性吸附、脱吸附或表面污染带来的干扰。

**关键词** 光学椭偏显微成像,生物分子吸附膜层,免疫分析

中图分类号 Q819 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0429-04

对生物分子在固体表面吸附的研究有助于理解许多生化过程和生物医学现象。蛋白质分离纯化,生物材料的生物相容性,细胞粘附,血液在固体或膜表面上的凝结,固相免疫检测<sup>[1]</sup>,血栓症<sup>[2]</sup>,补体激活<sup>[3]</sup>,炎症反应<sup>[4]</sup>,细胞粘附和感染<sup>[5]</sup>都与生物分子在固体表面的吸附有紧密联系。

生物分子识别的检测是研究生物分子相互作用的关键。传统的检测方法(如荧光标记、同位素标记和酶标记等)都需要对待检测物做标记处理。这些处理不可避免地要对分子间的相互作用产生影响。近来,又有一些新的技术被用来研究生物分子间的相互作用,如原子力显微镜,它能对单个生物分子进行研究。但该方法的应用范围较窄,本身有许多不足之处。例如在探测样品的过程中,很容易破坏被测物的结构,并且对样品的要求很高,待测物不但与表面的吸附要很牢,而且要有一定的硬度<sup>[1]</sup>。另外,上述方法都很难对生物分子与表面的吸附以及分子间的相互作用进行实时观察。

大多数生物单分子薄膜的几何厚度仅有零点几纳米至几十纳米厚,例如,绝大部分蛋白质在固体表面上形成的单分子饱和吸附膜层几何厚度在 2~10nm 的范围内<sup>[6]</sup>,膜层是薄而透明的,在物理上,属于超薄相位体。由于相位体不引起探测光波的幅值变化,即使用显微镜也难以观测<sup>[7]</sup>。近几年发展起来的光学椭偏显微成像十分适合于观测如此薄的

膜层<sup>[8-10]</sup>。该技术不但能够直观地显示各种生物分子在固体表面上的单分子吸附膜层,而且与生物芯片技术组合后,还能够观察生物分子间的特异性结合现象。光学椭偏显微成像系统的快速检测能力,使它能够被有效地用于生物分子与表面的吸附以及分子间的相互作用过程的实时观察。在检测过程中,不需要对待测物做任何标记,也不会对待测物造成任何扰动和损伤。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 生物试剂

人血清白蛋白(HSA),人血清白蛋白抗体(anti-HSA),牛血清白蛋白(BSA),牛血清白蛋白抗体(antiBSA),人血免疫球蛋白 G 抗体(antiIgG),人血纤维蛋白原抗体(antiFib)都购自美国 SIGMA 公司。

### 1.2 基片处理

在该实验中,用的是切成大小为(15×25)mm<sup>2</sup>的抛光硅片。把硅片先后放入 TL1 溶液[H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%):NH<sub>4</sub>OH(25%)=5:1:1(V/V)]和 TL2 溶液[H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%):HCl(37%)]=6:1:1(V/V)]中,在 80℃ 下分别清洗 5min,然后用去离子水清洗 3 次,再用无水乙醇清洗 3 次。把清洗好的硅片放入二甲基二氯硅烷的三氯乙烯溶液[二甲基二氯硅烷:三氯乙烯=1:4(V/V)]中浸泡 5min

后 轮换用无水乙醇和三氯乙烯清洗硅片 6 次 ,最后 ,把硅片放入无水乙醇中保存。

### 1.3 光学椭偏显微成像系统

光学椭偏显微成像系统是在传统的椭偏仪基础上发展起来的<sup>[7]</sup>。光学椭偏测量是用偏振光波为探测光照射样品 ,样品会对入射光波进行调制 ,使得反射或透射光中载有样品的信息。在光学椭偏显微成像系统中 ,用一个扩展光束代替了传统的窄光束 ;Xe 灯加上一个 633nm 滤光片 ,与一个光学准直系统结合 ,形成光强均匀分布的探测光束 ;CCD 摄像机代替了传统的光电倍增管和光电管等光探测器 ,使该系统的检测面积大大增大 ,可以对多元样品进行观测 ,而不再像传统的椭偏仪那样只能做单点测量。

### 1.4 生物分子芯片

所谓生物分子芯片就是将具有生物活性的生物分子 ,制备于固相表面上 ,形成单分子膜层 ,即感应表面 ,如图 1A 所示。把感应表面的一部分插入到含有生物分子的溶液中 ,如果溶液中的生物分子与芯片上的生物分子之间存在特异结合性的话 ,就会在芯片上形成复合分子。与溶液接触的部分膜层厚度就会显著增加 ,如抗原-抗体特异性结合的复合物膜层 ,如图 1B 所示。通过光学椭偏显微成像系统可以高分辨地观察到基片上膜层厚度的变化 ,从而可以判定溶液中是否含有能够与感应表面上的生物分子发生特异性结合的生物分子。

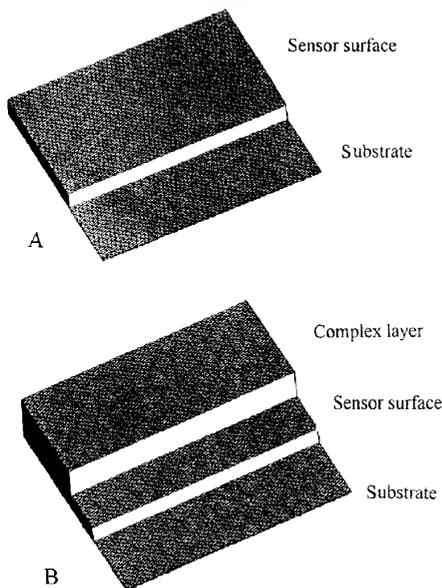


图 1 反应前(A)反应后(B)的生物分子芯片模型  
Fig.1 The model of biochip before reactor(A) , after reaction(B)

## 2 实验结果与讨论

光学椭偏显微成像系统是研究分子与固体表面吸附以及分子识别研究的一种简单、快速和可靠的工具。它是在传统的椭偏仪基础上发展起来的。椭偏仪是一种被普遍应用的观察超薄膜的仪器<sup>[11]</sup>。光学椭偏显微成像系统不但具有椭偏仪的优点<sup>[6]</sup> ,而且有了很大的提高。它的检测面积很大 ,可以对多元样品进行观测 ,能够同时显示几个至几十个样品点。多元样品观察不但能够节约实验时间 ,而且能减少试剂用量 ,降低实验费用。

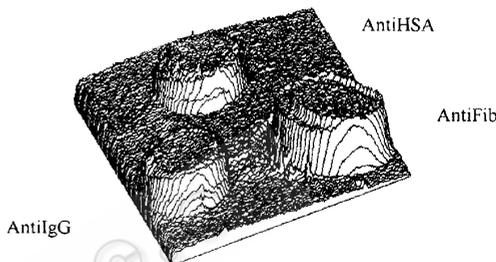


图 2 抗 Fib、抗 HSA 和抗 IgG 的单分子吸附膜层  
Fig.2 Adsorption mono-layers of AntiFib , AntiHSA and AntiIgG

图 2 是一幅含有 3 种蛋白分子吸附膜层的椭偏图像立体图。膜层的厚度与所拍摄的椭偏图像中的光强分布平方根成比例<sup>[7]</sup>。在处理过的硅片疏水表面的不同区域分别吸附人血纤维蛋白原抗体( antiFib)、人血免疫球蛋白 G 抗体( antiIgG)和人血清白蛋白抗体( antiHSA)。在饱和吸附的条件下 ,吸附膜层的厚度取决于蛋白分子的几何尺寸<sup>[7]</sup>。从图中可明显看出 ,人血纤维蛋白原抗体膜层比人血免疫球蛋白 G 抗体膜层厚 ,人血免疫球蛋白 G 抗体膜层又比人血清白蛋白抗体膜层厚。根据以往的厚度校对 ,人血纤维蛋白原抗体膜层厚度是 6nm ,人血免疫球蛋白 G 抗体膜层厚度是 4.7nm ,人血清白蛋白抗体膜层厚度是 3.8nm 左右。这么薄的膜层用其它显微技术是难以观测到的。

在吸附过程中不破坏抗原(或抗体)特异性结合位点的情况下 ,光学椭偏显微成像系统能够通过检测抗原-抗体复合膜层检测到任何抗体(或抗原)<sup>[12]</sup>。并且在检测过程中 ,不需要对生物分子做任何标记 ,这就意味着待测生物分子可以保持最高的生物活性。如果用目前普遍应用的酶联免疫法(ELISA)或放射免疫法(RIA)检测抗原(或抗体) ,都需要对待测物进行标记 ,这势必影响生物分子的

生物活性<sup>[6]</sup>,也直接降低了检测结果的可靠性。图3就是利用生物分子芯片技术得到的检测结果。

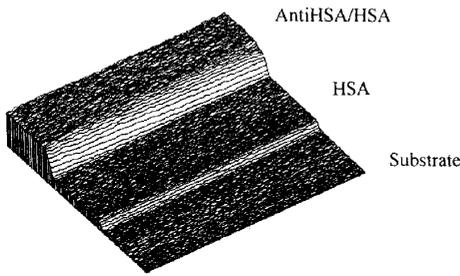


图3 HSA 和 HSA 及其抗体的复合分子吸附膜层

Fig. 3 HSA mono-layer, and HSA-AntiHSA binding layer

这里的人血清白蛋白的吸附膜层就是具有生物活性的感应表面。将该膜层的一部分插入含有人血清白蛋白抗体的溶液中(浓度约 $0.1\text{mg/mL}$ ),浸泡30min以上,使溶液中的抗体分子与感应表面上的人血清白蛋白结合。图中显示出浸入人血清白蛋白抗体溶液中的原人血清白蛋白的吸附膜层厚度明显地上升了。反映出在此形成了人血清白蛋白和其抗体的复合物,在图中呈现出一个新的厚度阶梯。如果感应表面浸入一种不含有血清白蛋白抗体的溶液,而仅含有其它蛋白成分,由于不发生特异性结合,新的厚度阶梯就不会出现。这就是蛋白芯片的特异识别性。

实际上光学椭圆偏振显微成像系统能够用于研究各种各样的立体特异性结合的反应。例如,抗原-抗体特异性结合、小分子药物与受体结合、肿瘤标记物与其抗体特异性结合、人体激素与其抗体特异性结合<sup>[13]</sup>和细胞因子白介素6与受体特异性结合等。

同传统的椭圆偏仪相比,光学椭圆偏振显微成像系统能够十分简单地排除非特异性结合、脱吸附以及表面污染带来的干扰。上述现象在抗原(或抗体)检测过程中经常被观察到<sup>[6,12]</sup>。在这些情况下,用椭圆偏仪进行检测,就会得出相反的结果。例如,把在局部的非特异性物理吸附的物质判定为特异性结合物;把因感应表面出现脱吸附而导致抗原-抗体复合物减少判定为溶液中不含或含有稀少的抗原(或抗体)分子。由于光学椭圆偏振显微成像系统的测量结果可以大面积的以图像形式直观地显示,所以能够清楚地观察到膜层厚度的分布,剔除吸附表面的不均匀区域,减小或排除这方面的实验误差。

光学椭圆偏振显微成像系统的检测灵敏度很高,几

乎能同放射免疫法相媲美。图4是牛血清白蛋白与它的抗体特异性结合的复合膜层。首先在硅基地上吸附一层牛血清白蛋白,形成感应表面。再把部分感应表面插入到牛血清白蛋白抗体溶液(浓度为 $200\text{ng/mL}$ )中浸泡,使牛血清白蛋白与抗体发生特异性结合。

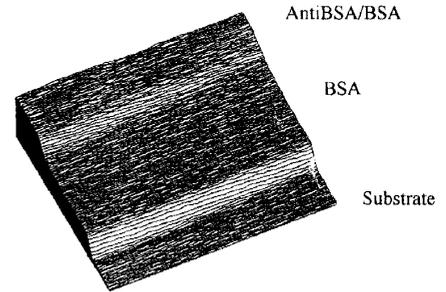


图4 BSA 和 BSA 及其抗体的复合分子吸附膜层

Fig. 4 BSA mono-layer, and BSA AntiBSA binding layer

从图中可看出,抗原-抗体复合膜层清晰可见。通过优化条件,减少生物分子与感应表面之外的表面吸附,加快生物分子的运动速度,检测灵敏度可以进一步提高。

光学椭圆偏振显微成像系统快速摄取图像能力使它能够用于实时观察抗原-抗体特异性结合过程。在 $8\text{mm}\times 20\text{mm}$ 的疏水硅片表面上制备一层人血清白蛋白的单分子吸附膜层作为感应膜层,制备方法同图3中的感应膜层。把该感应膜层插入到已盛有2mL Hanks缓冲液的样品池中。调整光路至合适状态后,加入人血清白蛋白抗体溶液,启动计算机开始拍摄图像。当复合膜层的灰度值趋于稳定时,就可以终止拍摄图像。以反应时间为横坐标,复合膜层的灰度值为纵坐标描绘整个结合过程就得到图5所示的人血清白蛋白与对应的抗体特异性结合实时曲线。

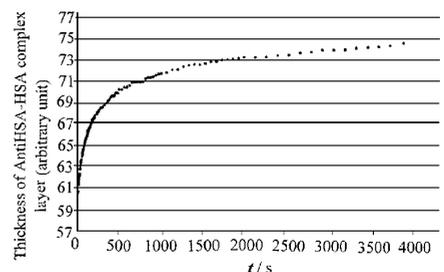


图5 HSA 与其抗体特异性实时结合曲线

Fig. 5 HSA AntiHSA real-time binding curve

从图中的曲线可看出,膜层灰度值同反应时间呈指数关系。实时观察抗原-抗体特异性结合过程对于分子间相互作用的动力学研究是十分有意义的,有助于揭示分子间相互作用的基本规律。

### 3 结论

光学椭偏显微成像技术是一种用于生物分子与固相表面吸附以及分子之间相互作用研究的有效方法。它的最大的优点是不需要像荧光免疫法、酶联

免疫法和放射免疫法那样对所研究的生物分子做标记,这样也就消除了因标记所带来的实验误差。另外,它弥补了传统的椭偏仪的不足之处,能够十分方便地剔除非特异性吸附和脱吸附带来的干扰。

椭偏光学显微成像技术与其它新兴技术一样正处于发展之中。随着该技术的逐步推广使用,可以预见它极有可能与荧光免疫技术、酶联免疫技术和放射免疫技术形成互补,有效地用于细胞生物学、生物化学、医学和药理学等学科的研究以及临床诊断。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Laura T Mazzola, Stephen P A Fodor. *Biophysical Journal*. 1995, **68**:1653~1660
- [ 2 ] Lestelius M. *J Biomed Mater Res*. 1994, **28**:871~880
- [ 3 ] Jahns G, Haefner-Cavaillon N, Nydegger U E, Kazatchkine MD. *Clin Mater*. 1993, **14**:303~336
- [ 4 ] Tang L, Eaton J W. *J Exp Med*. 1993, **178**:2147~2156
- [ 5 ] Desgranges P, Tardieu M, Loisançe D, Barritault D. *Int J Artif Organs*. 1992, **15**:722~726
- [ 6 ] Pentti Tengvall, Ingemar Lundstrom, Bo Liedberg. *Biomaterials*. 1998, **19**:407~422
- [ 7 ] 靳 刚, 孟永宏, 邢建华, 赵子彦. *测试技术学报*, 1998, **12**(3):166~171
- [ 8 ] Cohn R F, Wagner J W. United States Patent, 1991, No. 5 076 696
- [ 9 ] Brinker C J, Hurd A J, Frye G C *et al.* *J Non-Cryst Solid*. 1990, **121**:294~299
- [ 10 ] Jin G, Jansson R, Arwin H. *Rev Sci Instrum*. 1996, **67**:2930~2936
- [ 11 ] Hans Arwin, Stefan Welin-Klintstrom, Roger Jansson. *J Colloid Interface Sci*. 1993, **156**:377~382
- [ 12 ] Hans Elwing. *Biomaterials*. 1998, **19**:397~406
- [ 13 ] Zhao Zi-Yan, Jin Gang, Wang Zhan-Hui. *Proceedings of the 20<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 1998, **20**(2):590~593

## Imaging Ellipsometry in Biomolecule Research

WANG Zhan-Hui JIN Gang

( Institute of Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080 )

**Abstract** Imaging Ellipsometry is an optical surface-sensitive method for the investigation of various aspects of biomolecules adsorbing mainly at reflecting metal surfaces and silicon surface. It has advantages of high sensitivity to layer-thickness, big area of view, high sampling speed and high lateral resolution. It can be used for studying adsorption kinetics of biomolecules and detecting complex layer of antigen-antibody when antibody ( or antigen ) combined with antigen ( or antibody ) coated on solid surfaces. Compared with other solid phase methods such as enzyme linked immunosorbent assay, immunofluorescence and radioimmunoassay, imaging ellipsometry has the advantage of not involving any labelling of reactants and it is a relatively inexpensive method and easy to handle. Compared with traditional ellipsometer, imaging ellipsometry shows an advantage of distinguishing both affinity and non-specific binding in different area on the surfaces.

**Key words** Imaging ellipsometry, adsorbed biomolecular layers, immunoassay