应用椭偏光学显微成像对 IL-6 与其受体的相互应用的初步观察

王战会 靳 刚*
(中国科学院力学研究所, 北京 100080)

关键词 椭偏光学显微成像, 白细胞介素 6, 白细胞介素 6 受体
中图分类号 Q819 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0099-03

白细胞介素 6(IL-6)是一种具有复杂生物功能的细胞因子,可由多种淋巴类和非淋巴类细胞产生。它对机体多种组织及细胞均有不同程度的作用[1~3]。近年来发现,临床上免疫异常性疾病,如发热、淋巴结肿大、血沉增快、急性期蛋白增高、高 γ 球蛋白血症、自身抗体阳性等症状都与 IL-6 的异常表达密切相关。IL-6 的生物活性是通过细胞膜表面特异性受体介导的[4]。研究 IL-6 与其受体的相互作用对于揭示某些疾病的发病机制,监测疾病进程以及指导临床治疗等均具有重要意义。

用于研究 IL-6 与其受体相互作用的方法主要有 IL-6 依赖株细胞增殖反应测定法,B 细胞协同刺激分化反应 Ig 测定法,B 淋巴细胞株分化反应测定法,α_1-抗糜蛋白酶测定法,ELISA,放射免疫分析法等。这些方法的测定周期都较长,实验步骤繁琐,有的对环境还有一定的影响,如放射免疫分析法。本文介绍一种新的研究方法——椭偏光学显微成像技术。该技术同生物分子芯片技术结合后就可以用于研究生物分子之间的相互作用[5]。该方法不需要对研究样品做任何标记,测定周期短,实验操作简便。

1 材料和方法

1.1 生物试剂

人白细胞介素 6(IL-6),由大肠杆菌基因工程菌株表达,再经抗体亲和层析纯化。人白细胞介素 6 受体(IL-6R),由工程菌分泌表达,再经过颜料亲和层析及疏水层析两步纯化得到纯品。含有白细胞介素 6 受体(IL-6R)的细胞培养上清液。上述 3 种试剂均由中国医学科学院医药生物技术研究所提供。

1.2 基片处理

本文采用光学抛光的硅片为研究样品的基底。硅片表面经过二氯二甲基硅烷处理后,表面呈疏水性[6]。

1.3 椭偏光学显微成像技术

椭偏光学显微成像技术是近几年发展起来的一项用于超薄膜检测的技术[5]。该技术的特点是厚度分辨率极高,能够达到 0.1nm。研究表明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[7],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[8]。而椭偏光学显微成像技术厚度高分辨率的特点能够观测如此薄的膜层[5]。椭偏光学显微成像技术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,使得反射光中载有样品的信息。在基底消光条件下,基片表面的生物分子膜层的厚度(或表面密度)同反射光强的平方根成正比。光强用灰度值表示,膜层的厚度(或表面密度)愈大,灰度值愈高。

1.4 生物分子芯片

生物分子芯片就是将具有生物活性的生物分子[6],装配于固相表面上,形成单分子膜层,即感应表面。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。通过椭偏光学显微成像技术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。

2 结果与讨论

椭偏光学显微成像技术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。它已成功地用于多种生物分子间相互作用研究[6,9]。

在处理过的硅片疏水表面上分别滴加白细胞介素 6 和其受体溶液(0.1mg/mL),静置 30min,把白细胞介素 6 和其受体分子装配在基片表面上,形成饱和单分子层。然后,用去离子水冲洗硅片表面,清除掉没有被装配到表面上的生物分子,再用氮气吹干。把制作好的生物分子膜层放到椭偏光学显微成像系统中,就可以直观地观察到白细胞介素 6 和其受体的单分子膜层,如图 1A,B 所示。

收稿日期:2001-06-22,修回日期:2001-08-15。

* 通讯作者。Tel:86-10-62631816;Fax:86-10-62631816;E-mail:gajin@imech.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

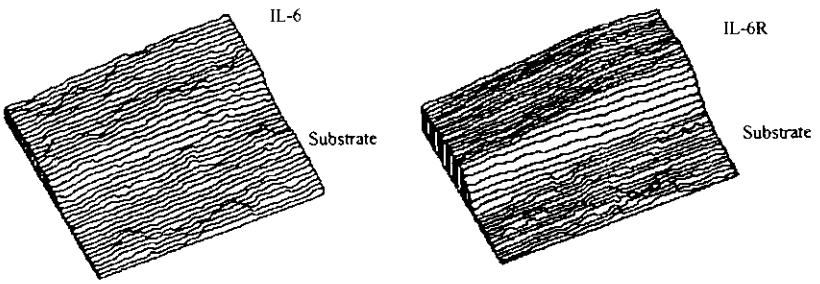

图1 IL-6单分子膜层(A)和IL-6R单分子膜层(B)

Fig.1 Mono-layers of IL-6 (A) and IL-6R (B)

通过椭偏光学显微成像系统得到的是生物分子膜层的灰度图。为了更加直观地显示生物分子膜层,根据膜层厚度同图像灰度值之间的比例关系,把灰度图转换成三维图像。图1A和B就分别是白细胞介素6和其受体分子膜层的三维图像。两者的膜层厚度差别较大,这可能是两者的分子量差别较大引起的。白细胞介素6的分子量是21kD,而其受体的分子量是80kD。

把白细胞介素6分子膜层浸泡在2%的牛血清白蛋白溶液中30min,封闭表面。再把封闭好的白细胞介素6分子膜层的部分区域浸泡到含有其受体的细胞培养上清液中,30min后,用去离子水冲洗干净,氮气吹干。通过椭偏光学显微成像系统观测就得到如图2所示的图像。

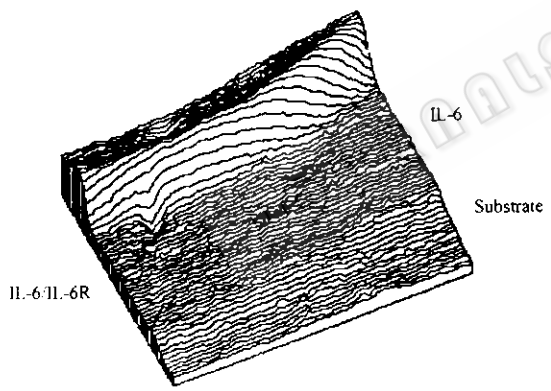

图2 IL-6膜层及IL-6与其受体的复合膜层

Fig.2 IL-6 mono-layer and IL-6/IL-6R binding layer

通过图2可以明显看出浸泡在上清液中的白细胞介素6分子膜层的厚度发生了显著的变化。图中最厚的膜层就是白细胞介素6与其受体特异性结合形成的复合物膜层。因此,根据图2就能够判定上清液中含有受体分子。如果上清液中不含有白细胞介素6受体分子,复合物膜层就不会出现。

从上述实验过程中可以看出,使用椭偏光学显微成像技术检测白细胞介素6与其受体的相互作用,不需要象酶联免疫或放射免疫那样对生物分子进行标记,能够较好地保持生物分子的活性。实验周期明显短于在引言中提到的方法,如ELISA,通常需要过夜。椭偏光学显微成像技术的检测灵敏度也很高,可以达到40fmol/mL,同放射免疫法相当。实验操作十分简便。如果使用白细胞介素6或其受体的标准品绘制出标准曲线,还能够方便地进行定量测量。

3 结 论

椭偏光学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象荧光免疫法、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以及其他的影响,并大大地简化了实验操作。另外,通过椭偏光学显微成像技术得到的是生物分子的生物活性浓度,直接反映了生物分子的生物功能,而不象酶法检测得到的是催化活性浓度、免疫检测法得到的是同抗体结合的活性浓度。

到目前为止,该技术已经在生物领域尝试了许多应用方面。随着该技术的进一步完善,有希望在细胞生物学、分子生物学、生物化学、医学和药物学等学科的研究以及临床诊断方面得到更广泛应用。

REFERENCES(参考文献)

[1] Takai Y, Wong G G, Clark S C, Burakoff S J *et al*. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 1988, **140**(2): 508 ~ 512

[2] Luger T A, Krutmann J, Kirnbauer R *et al*. IFN-beta 2/IL-6 augments the activity of human natural killer cells. *J Immunol*, 1989, **143**(4): 1206 ~ 1209

[3] Satoh T, Nakamura S, Taga T, matsuda T *et al*. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol* 1988, **8**(8): 3546 ~ 3549

[4] YANG G Z(杨贵贞). *Immunological bioengineering compendium and techniques* (免疫生物工程纲要与技术), Changchun: Jilin Science Press, 1991

[5] Jin G, Tengvall P, Lundstrom I, Arwin H. A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interactions. *Anal Biochem*, 1995, **232**(1): 69 ~ 72

[6] WANG Z H(王战会), JIN G(靳刚). Imaging ellipsometry in biomolecule research. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(4): 429 ~ 432

[7] Pentti Tengvall, Ingemar Lundstrom, Bo Liedberg. Protein adsorption studies on model organic surfaces: an ellipsometric and infrared spectroscopic approach. *Biomaterials*. 1998, **19**(4 ~ 5): 407 ~ 422

[8] JIN G(靳刚), MENG Y H(孟永宏), XING J H(邢建华), ZHAO

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Z Y(赵子彦). Visualization of Adsorbed Biomolecular Layers. *J Test and Measurement Technique*(测试技术学报), 1998, **12**(3): 166 ~ 171

[9] Zi-Yan Zhao, Gang Jin, Zhan-Hui Wang. Detection of Somatropin and Corticosterone with Imaging Ellipsometry. Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. HongKong: IEEE, Inc. Press, 1998, Vol 20, Part (2/6): 590 ~ 593

Visualization of the Interaction Between IL-6 and IL-6R by Imaging Ellipsometry

WANG Zhan-Hui JIN Gang*

(*Institute of mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)

Abstract Imaging Ellipsometry is one of recently developed optical surface-sensitive methods for the investigation of various aspects of biomolecules adsorption on solid surfaces and biomolecules interactions. It has advantages of high sensitivity to layer-thickness, big area of view, high sampling speed, and high lateral resolution. 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. In this report, the mono-layers of IL-6 and IL-6 receptor were visualized as well as their interaction.

Key words imaging ellipsometry, IL-6, IL-6R

Received: 06-22-2001

* Corresponding author. Tel: 86-10-62631816; Fax: 86-10-62631816; E-mail: gajin@imech.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn