

表面等离子体共振谱仪用于糖蛋白检测研究

王金美, 于清旭*

(大连理工大学 物理与光电工程学院, 辽宁 大连 116024)

摘要:介绍了一种表面等离子体共振(SPR)生化分析仪,采用角度扫描与强度调制相结合的方法来实现对糖蛋白的实时监测.在糖蛋白的检测实验中,对不同 pH 的再生液进行对比, pH=3 的再生能力达到 97%,选择该 pH 的溶液作为再生液;对同一浓度的糖蛋白进行 5 次测量,得出相对标准偏差(RSD)为 3.83%;通过非糖蛋白与糖蛋白的对比实验,说明本实验方法可以对糖蛋白进行特异性检测;最后对浓度在 0.01~1 mg/mL 的糖蛋白进行检测,并进行了线性拟合和多项式拟合,通过残差分析和相关系数的比较得出 RNase B 的浓度与归一化光强的关系更符合多项式拟合,因此以多项式拟合曲线作为其标准曲线.实验结果表明该 SPR 谱仪可以对糖蛋白进行特异性检测,该技术将会在医学方面得到广泛应用.

关键词:表面等离子体共振(SPR);实时监测;糖蛋白;硼酸

中图分类号:TP212

文献标识码:A

doi:10.7511/dllgxb201701003

0 引言

蛋白质的糖基化修饰广泛地存在于生物体内,对自身免疫、老化、癌细胞异常增殖及转移、病原体感染等过程起着重要作用^[1-2].糖蛋白翻译后加工修饰异常与疾病密切相关,因此对于异常糖蛋白检测可以使疾病在早期发生时即可做出诊断^[3-4].目前糖蛋白的检测主要有亲和层析技术、质谱等,但是这些方法有一定不足,不能在短时间内获得检测结果,需要标记^[5-6].表面等离子体共振(SPR)技术由于具有能实时监测反应动态过程,分析样品无须纯化、无须标记,反应灵敏度高,无背景干扰^[7-9],尤其是在研究动力学系数方面的突出优点^[10],成为近几年的研究热点^[11-13],目前已经被广泛应用到生物、化学、医学、环境及食品安全等领域^[14-15],因此本文采用 SPR 技术检测糖蛋白.

SPR 是利用金属薄膜耦合产生的一种物理光学现象.1902 年,Wood 在光学实验中首次发现了 SPR 现象^[16];1968 年 Kretschmann 等建立了 Kretschmann 结构,为 SPR 研究奠定了基础^[17];1983 年, Liedberg 等首次提出将 SPR 技术运用

到生化大分子检测方面^[18];1990 年, BiacoreAB 公司生产出第一台商业化 SPR 生化分析仪,此后 SPR 技术得到迅速发展.

实验室已搭建的系统^[19]采用角度扫描结构,该调制方法具有测量灵敏度高、简单直观、易观测等优点,但实时性较差.本文提出角度扫描与强度调制相结合的检测方法,以实现 SPR 谱仪对被测物的实时在线监测.由于光强检测法容易受光源功率稳定性的影响,引入参考通道的方法来提高系统的稳定性.

1 原理

1.1 SPR 生物传感原理

SPR 利用了衰减全反射的原理,当入射光的平行偏振分量从棱镜等光密介质入射到金属等光疏介质的分界面处发生全反射现象时,将会产生消逝波,它将进入金属薄膜内并激发金属中的自由电子产生表面等离子体波.当表面等离子体波和消逝波沿界面方向的分量相同时,反射光的能量急剧衰减,这种现象就称为表面等离子体共振^[20],发生表面等离子体共振时的入射角称为 SPR 共振角.

SPR 对被测物的折射率非常敏感,但是无修饰的 SPR 传感器只与被测物的折射率有关,而与样品种类无关^[21]. SPR 生物传感器是先在金属薄膜表面修饰一层自组装单分子层,这层分子具有特异性识别的功能,只能吸附特定物质,这样就实现了特异性检测.

角度调制采用固定入射波长来进行角度扫描,通过扫描曲线得出共振角,此方法具有测量灵敏度高、易观测等优点,因此被广泛应用.在金属薄膜上修饰了自组装单分子层后的扫描曲线如图 1 中的曲线 1;被测物与修饰上的分子特异性结合

引起金属界面折射率的变化,从而引起共振角的变化,如图 1 中的曲线 2. 角度扫描式检测方法通过扫描曲线得出共振角,因此检测速度较慢,不能很好地监测曲线的动态过程,实时性较差.强度调制是固定入射波长和入射角来进行光强监测的,因此检测速度快,本文采用角度扫描与强度调制相结合的方法进行检测,即固定入射角后检测反射光强.固定入射角后定点监测是先利用角度调制的方法扫描出修饰了自组装单分子层的曲线 1,找出曲线共振峰左侧斜率最大值,以此角度为入射角进行定点监测,得出动态曲线.

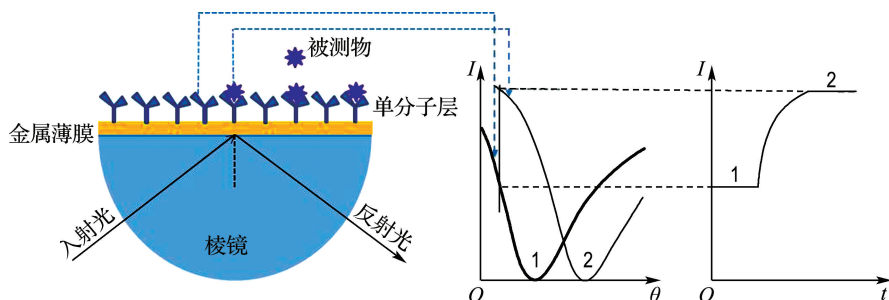


图 1 SPR 检测原理

Fig. 1 Principle of SPR detection

1.2 糖蛋白检测原理

在水溶液中,硼酸分子可以与含有顺式二醇类的分子共价结合,形成五元环或六元环硼酸酯,如图 2 所示.因此硼酸分子被广泛应用于葡萄糖、糖蛋白等含有顺式二醇类生物分子的识别中.硼酸分子与顺式二醇类分子共价结合具有在碱性环境中稳定,而在酸性条件下可逆解离的特点.因此改变 pH 可以实现硼酸物质对含有顺式二醇类生物分子可逆的解离^[22].

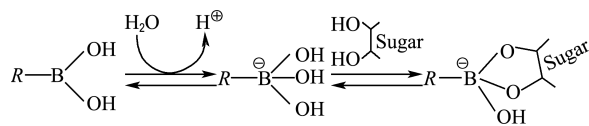


图 2 硼酸分子与顺式二醇类化合物相互作用

Fig. 2 The interaction between boronic acids and cis-diol compounds

利用以上性质,采用 SPR 技术检测糖蛋白核糖核酸酶 B(RNase B). 首先,含巯基的 11-巯基十一烷酸(MA)与硼酸分子 3-氨基苯硼酸(APB)利用羧基与氨基的缩合反应生成 11-巯基十一烷酸-3-氨基苯硼酸(MA-APB). 利用金与末端含硫

基的分子可以形成牢固 Au—S 键的性质^[23],镀有金膜的传感芯片在 MA-APB 溶液中浸泡 12 h,就可以在金膜表面形成一层稳定的自组装单分子层.这样金膜末端连接了能特异性识别 RNase B 的 APB 分子,再将糖蛋白 RNase B 溶液通过流通系统通入传感芯片,RNase B 与 APB 特异性结合,SPR 信号响应增强,实现实时快速检测.

2 糖蛋白检测实验

2.1 实验装置

实验装置如图 3 所示. He-Ne 激光器发出激光,首先经过斩波器调制成某一特定频率的方波,再经过反射镜 1 进入分光棱镜分成两路,一路作为补偿光路进入探测器 2,一路通过反射镜 2 进入圆柱棱镜系统,产生 SPR 现象后的反射光进入探测器 1. 斩波器将调制的方波作为参考信号,信号通道和补偿通道都经过探测器后作为两个信号通道进入双通道锁相放大器,最后通过串口发送给计算机,利用 LabVIEW 上位机软件显示并保存数据.

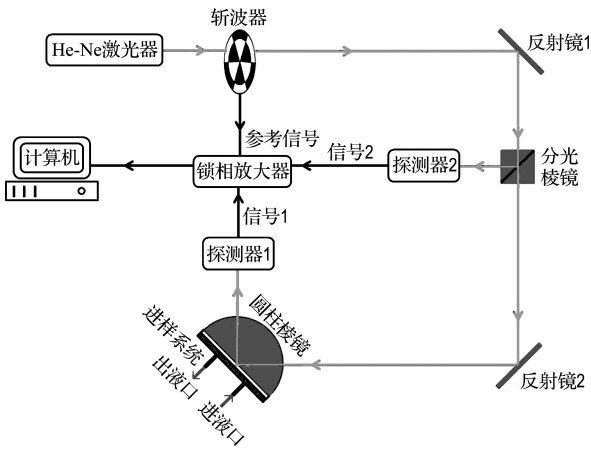


图 3 SPR 谱仪系统简图

Fig. 3 SPR spectrometer system diagram

进样系统的主要部分是流通池,待测液从流通池的进液口进入,通过蠕动泵的输送,从出液口排出到废液缸中。

补偿通道是通过加入分光棱镜,再分出一路光直接连接到探测器 2,实时测量激光器的功率,将信号通道与参考通道作比值,这样就可以消除光源不稳定性对实验结果的影响。

2.2 实验药品

糖蛋白检测实验所需配制的溶液如下。

磷酸盐(PBS)缓冲液:8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄ 加去离子水至 800 mL,再用盐酸或 NaOH 溶液调 pH 至 7.4,用去离子水定容至 1 L。

MA-APB 溶液:用体积比为 1 : 1 的甲醇和二氯甲烷混合液配制 1 mg/mL 的 MA-APB 溶液。

牛血清白蛋白(BSA)溶液:用 PBS 溶液配制 5 mg/mL 的 BSA 溶液。

再生液:乙醇与 PBS 溶液体积比为 3 : 1, pH=3。

不同浓度的 RNase B 溶液:用 PBS 溶液配制不同浓度的 RNase B 溶液。

2.3 实验方法

(1)传感芯片表面金膜的修饰:将镀好金膜的传感芯片浸泡在 MA-APB 溶液中 12 h,利用 Au—S 共价键稳定结合的性质使 MA-APB 分子紧密结合在金膜表面,形成一层自组装单分子层。

(2)通入 PBS 溶液,先角度调制扫描出一条 SPR 谱线,得出共振峰左侧斜率最大值,以此角度为入射角进行定点监测。

(3)BSA 封端:MA-APB 溶液中还含有少量

的 MA 和 APB,那么在金膜表面就会有 MA-APB 和 MA,用 BSA 封闭少量的 MA 中的羧基,以免对后续实验产生干扰。如图 4 所示。

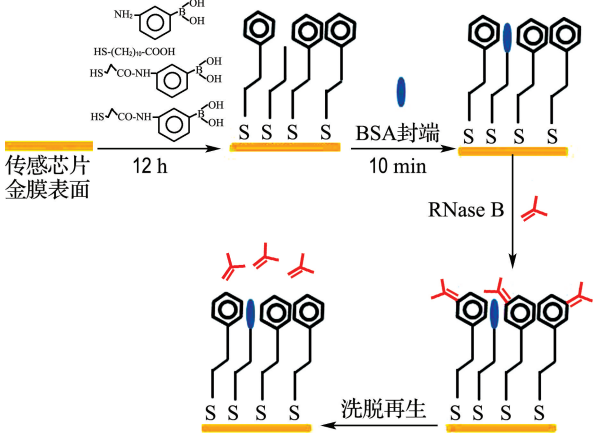


图 4 APB 固定及其与 RNase B 结合、再生过程示意图

Fig. 4 APB fixed and combination with RNase B, regeneration process diagram

(4)RNase B 检测实验(如图 5 所示):①通 PBS 缓冲液 10 min 左右至基线平稳。PBS 缓冲液的作用是模拟生理环境,为生化反应提供一个稳定的环境。②通入 RNase B 样品 15 min,使 RNase B 与 APB 特异性结合,得到生长曲线,将最高点作为响应值。③再通入 PBS 缓冲液 10 min 左右,可以看出曲线有一段回落,这是由于清洗掉物理吸附上去的 RNase B,但回落很少,说明 RNase B 与 APB 结合牢固。④通入再生液,将 RNase B 洗脱掉,使传感芯片表面再生,以便进行重复性测试。⑤最后再通入 PBS 缓冲液回到基线,完成一个循环。

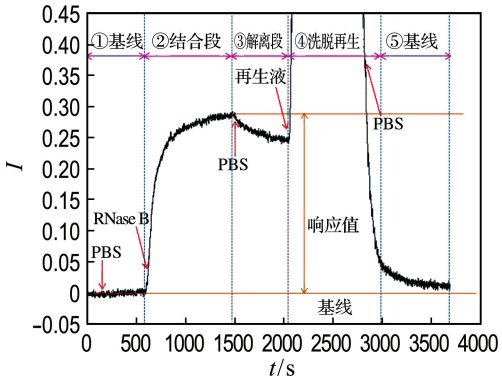
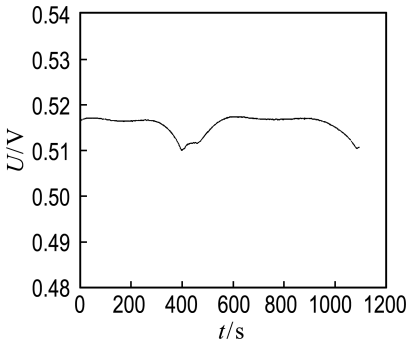


图 5 RNase B 在线监测过程图

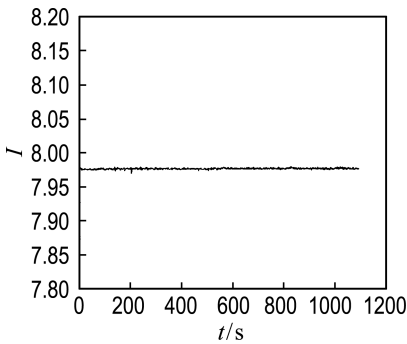
Fig. 5 Diagram of RNase B online monitoring process

2.4 实验结果及讨论

2.4.1 稳定性测试 图 6 为激光器的稳定性测试和加入参考通道后系统的稳定性测试,测试时间为 45 min,稳定性可用 $(P_{\max} - P_{\min})/P_{\text{avg}}$ 来计算.



(a) 激光器稳定性测试



(b) 加入参考通道后系统稳定性测试

图 6 稳定性测试
Fig. 6 Stability test

通过测试得出,激光器稳定性为 1.44%,加入参考通道后系统的稳定性为 0.136%。由此可见,加入参考通道后的系统稳定性比未优化系统的稳定性提高了一个数量级,因此系统测量精度也会有所提高.

2.4.2 再生条件探究 洗脱再生对于检测的准确性、检测时间以及传感元件的使用寿命都有很大的影响. 本文比较再生液为乙醇与 PBS 溶液体积比为 3 : 1, pH 分别为 5、4、3 的洗脱再生效果,如图 7 所示.

再生能力是用后面不同 pH 的响应值与开始 pH=3 的响应值之比来表示. 表 1 为不同 pH 的再生液再生能力对比.

从表中可以直观地看出, pH 越小再生效果越好. 由于 pH=3 的再生能力达到 97%, 已经满足实验要求了, 所以没有再配制 pH 更小的溶液, 以 pH=3 的溶液作为再生液.

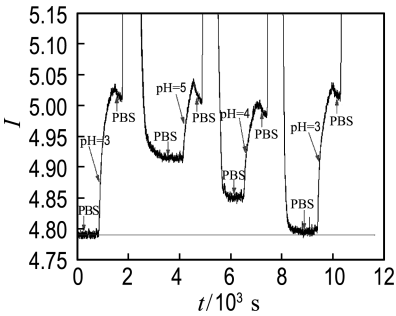


图 7 再生曲线
Fig. 7 Curve of regeneration

表 1 不同 pH 的再生液再生能力对比表
Tab. 1 Regeneration contrast table of different pH renewable solution

再生液 pH	再生能力 / %
5	41
4	61
3	97

2.4.3 重复性 重复性^[24]是指多次测量某一量时,测定值的离散程度. 它反映分析方法或测量系统存在随机误差的大小,也是检验一台仪器是否合格的关键参数. 在相同实验条件下,进行 5 次实验,如图 8(a)所示. 将 5 次的响应值做成柱状图,如图 8(b)所示.

数据分析得出 5 组响应值的标准差为 0.010 72,均值为 0. 279 9,相对标准偏差(RSD)=标准差/均值=3. 83 % < 10 %,说明该测试方法具有较好的可重复性和稳定性.

2.4.4 特异性检测 传感芯片表面的非特异性吸附是影响 SPR 传感器检测准确性的一个重要因素. 由于 RNase A 与 RNase B 的结构相似, 本文选择 RNase A 来做特异性对比实验,如图 9 所示.

从图中可以看出, RNase A 在芯片表面无明显吸附,而 RNase B 响应非常明显,说明固定有 3-氨基苯硼酸的芯片对于非特异性吸附非常小,能够实现对 RNase B 的特异性检测.

2.4.5 不同浓度 RNase B 的检测 从低到高进行不同浓度 RNase B 的检测,得出如图 10 的响应曲线图.

取各曲线的响应值,做线性拟合及残差分析. 因为在通不含 RNase B 的 PBS 溶液时传感器几乎没有响应,所以应设置拟合曲线过原点,如图 11 所示.

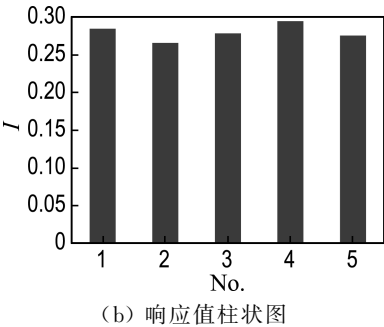
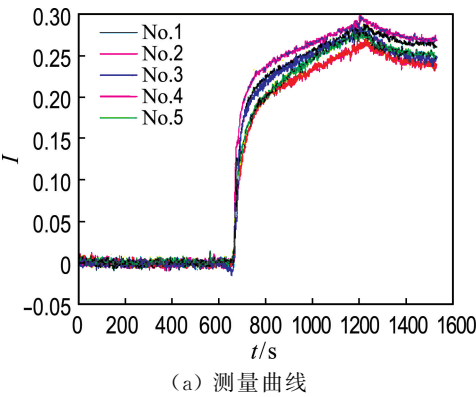


图 8 重复性实验

Fig. 8 Reproducibility experiment

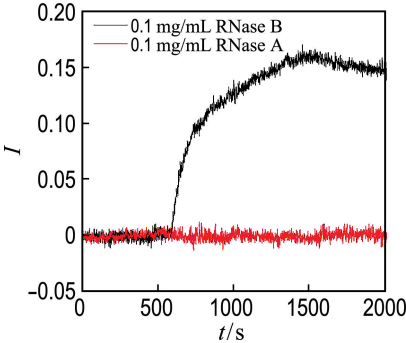


Fig. 9 Specificity experiment

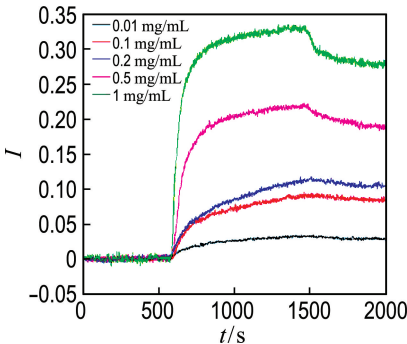


Fig. 10 Response diagram of different concentration RNase B

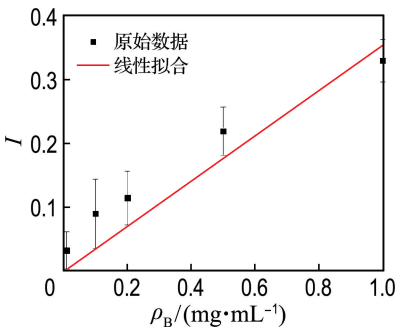


Fig. 11 Linear fitting and residual analysis

线性拟合关系式为

$$y=0.354\ 09x \tag{1}$$

相关系数 $R^2=0.957\ 29$.

做多项式拟合及残差分析,同样设置拟合曲线过原点,如图 12 所示.

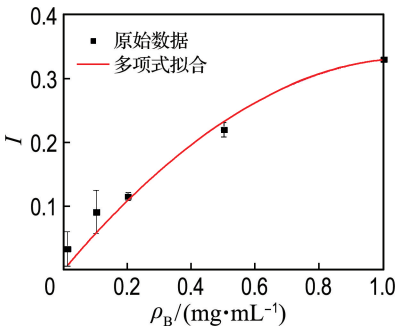


Fig. 12 Polynomial fitting and residual analysis

多项式拟合关系式为

$$y=-0.268\ 89x^2+0.598\ 83x \tag{2}$$

相关系数 $R^2=0.999\ 8$.

从残差分析和相关系数结果可知,浓度与归一化光强更符合多项式拟合,因此以多项式拟合曲线作为 RNase B 检测的标准曲线.

3 结 语

本文采用改进的 SPR 谱仪对糖蛋白进行了特异性检测,对不同浓度的 RNase B 进行线性拟合和多项式拟合,说明了浓度与归一化光强更符合多项式拟合.以多项式拟合曲线作为其标准曲线,也证明了该 SPR 谱仪使用方便、检测速度快、结果准确,因此对于生化实验的分析是一种比较好的仪器.糖蛋白对人体健康具有重要意义,SPR

技术对于糖蛋白的检测具有无须标记、检测速度快、灵敏度高优点,将会在医学方面得到广泛应用。

参考文献:

- [1] PEREZ S, MOUHOUS-RIOU N, NIFANT'EV N E, *et al.* Crystal and molecular structure of a histo-blood group antigen involved in cell adhesion: the Lewis x trisaccharide [J]. **Glycobiology**, 1996, **6**(5):537-542.
- [2] WANG Xiaoqi, SUN Ping, AL-QAMARI A, *et al.* Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin α_5 modulates $\alpha_5\beta_1$ function [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2001, **276**(11):8436-8444.
- [3] ORNTOFT T F, VESTERGAARD E M. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer [J]. **Electrophoresis**, 1999, **20**(2):362-371.
- [4] LIU Jentsai, CHEN Liangyu, SHIH Muchin, *et al.* The investigation of recognition interaction between phenylboronate monolayer and glycosylated hemoglobin using surface plasmon resonance [J]. **Analytical Biochemistry**, 2008, **375**(1):90-96.
- [5] LOVE K R, SEEBERGER P H. Carbohydrate arrays as tools for glycomics [J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2002, **41**(19):3583-3586.
- [6] ADAMS E W, RATNER D M, BOKESCH H R, *et al.* Oligosaccharide and glycoprotein microarrays as tools in HIV glycobiology: glycan-dependent gp120/protein interactions [J]. **Cell Chemistry Biology**, 2004, **11**(6):875-881.
- [7] 王 佳,周 健. SPR 生物传感器的应用现状与发展趋势[J]. 传感器与微系统, 2011, **30**(4):1-4.
WANG Jia, ZHOU Jian. Status in quo of application and development trend of SPR biosensors [J]. **Transducer and Microsystem Technologies**, 2011, **30**(4):1-4. (in Chinese)
- [8] 张颖颖. SPR 技术用于吸收介质的折射率虚部检测[J]. 激光与光电子学进展, 2013, **50**(10):102802.
ZHANG Yingying. SPR technology in detecting the imaginary part of refractive index of absorptive medium [J]. **Laser & Optoelectronics Progress**, 2013, **50**(10):102802. (in Chinese)
- [9] 刘 畅,邹正峰,陈淑芬,等. 基于光盘光栅的表面等离子体共振传感器[J]. 中国激光, 2012, **39**(3):0314001.
- LIU Chang, ZOU Zhengfeng, CHEN Shufen, *et al.* Surface plasmon resonance sensor based on compact disk grating [J]. **Chinese Journal of Lasers**, 2012, **39**(3):0314001. (in Chinese)
- [10] HOMOLA J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors [J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2003, **377**(3):528-539.
- [11] SCHASFOORT R B M, TUDOS A J. **Handbook of Surface Plasmon Resonance** [M]. London: Royal Society of Chemistry, 2008.
- [12] ESPIRITU R A, MATSUMORI N, MURATA M, *et al.* Interaction between the marine sponge cyclic peptide theonellamide A and sterols in lipid bilayers as viewed by surface plasmon resonance and solid-state ^2H nuclear magnetic resonance [J]. **Biochemistry**, 2013, **52**(14):2410-2418.
- [13] 陈强华,罗会甫,王素梅,等. 基于表面等离子体共振和双频激光干涉相位测量的空气折射率测量[J]. 中国激光, 2013, **40**(1):0108001.
CHEN Qianghua, LUO Huifu, WANG Sumei, *et al.* Measurement of air refractive index based on surface plasmon resonance and phase detection by dual-frequency laser interferometry [J]. **Chinese Journal of Lasers**, 2013, **40**(1):0108001. (in Chinese)
- [14] 王弋嘉,张崇磊,王 蓉,等. 表面等离子体共振成像系统相位提取[J]. 光学学报, 2013, **33**(5):0524001.
WANG Yijia, ZHANG Chonglei, WANG Rong, *et al.* Extracting phase information of surface plasmon resonance imaging system [J]. **Acta Optica Sinica**, 2013, **33**(5):0524001. (in Chinese)
- [15] 王康妮,郑继红,桂 坤,等. 纳米银掺杂的液晶/聚合物全息光栅中的表面等离子体共振[J]. 激光与光电子学进展, 2014, **51**(2):021603.
WANG Kangni, ZHENG Jihong, GUI Kun, *et al.* Surface plasmon resonance of holographic polymer dispersed liquid crystal grating doped with nano-Ag [J]. **Laser & Optoelectronics Progress**, 2014, **51**(2):021603. (in Chinese)
- [16] WOOD R W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum [J]. **Philosophical Magazine Series 6**,

- 1902, **4**(21):396-402.
- [17] KRETSCHMANN E, RAETHER H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light [J]. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 1968, **23A**:2135-2136.
- [18] LIEBERG B, NYLANDER C, LUNDSTROM I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing[J]. *Sensors and Actuators*, 1983, **4**:299-304.
- [19] 黄 浩. 角度调制型表面等离子共振谱仪的设计[D]. 大连:大连理工大学, 2013.
HUANG Hao. Design of angle modulated surface plasmon resonance spectrometer [D]. Dalian:Dalian University of Technology, 2013. (in Chinese)
- [20] 隋森芳,肖才德,杨 军. 表面等离子体激元共振生物传感器[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008.
SUI Senfang, XIAO Caide, YANG Jun. *Surface Plasmon Resonance Biosensor* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2008. (in Chinese)
- [21] 曾 捷,梁大开,曹振新. 光纤 SPR 传感器测量液体折射率的研究[J]. 压电与声光, 2005, **27**(1):18-20.
- ZENG Jie, LIANG Dakai, CAO Zhenxin. Study on liquid refractive index measured by the optic fiber surface plasmon wave sensor [J]. *Piezoelectrics & Acoustooptics*, 2005, **27**(1):18-20. (in Chinese)
- [22] WEITH H L, WIEBERS J L, GILHAM P T. Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components [J]. *Biochemistry*, 1970, **9**(22):4396-4401.
- [23] BERTILSSON L, LIEBERG B. Infrared study of thiol monolayer assemblies on gold: Preparation, characterization, and functionalization of mixed monolayers [J]. *Langmuir*, 1993, **9**(1):141-149.
- [24] 朱 岩. 离子色谱原理及其应用[M]. 杭州:浙江大学出版社, 2002.
ZHU Yan. *The Principle of Ion Chromatography and Its Application* [M]. Hangzhou:Zhejiang University Press, 2002. (in Chinese)

Research on detection of glycoprotein by surface plasmon resonance spectrometer

WANG Jinmei, YU Qingxu*

(School of Physics and Optoelectronic Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: A surface plasmon resonance (SPR) biochemical analyzer is introduced. The method of combining angle scanning with intensity modulation is adopted to realize the real-time monitoring of glycoprotein. In the experiments of glycoprotein detection, the renewable solution of pH=3 is chosen because the regenerative capacity of the solution reaches 97% in the renewable solution of different pH comparison. Relative standard deviation (RSD) is 3.83% in the five measurements of the same concentration glycoprotein. The experimental method can detect the specificity of glycoprotein in the comparative experiments of non-glycoprotein and glycoprotein. Finally, the glycoprotein concentration between 0.01 mg/mL and 1 mg/mL is detected. The relationship between the concentration of RNase B and the normalized light intensity is more consistent with polynomial fitting by comparing the residual analysis and correlation coefficients of linear fitting and polynomial fitting, and polynomial fitting curve is used as standard curve. The experimental results show that the SPR spectrometer can detect the specificity of glycoprotein, while will be widely used in medical field.

Key words: surface plasmon resonance (SPR); real-time monitoring; glycoprotein; boronic acids