

基于 SPHD 及 FRET 技术的蛋白质传感器

郭素 廖玮 魏芳 钱民协 赵新生*

(北京分子科学国家实验室, 分子动态与稳态结构国家重点实验室,
北京大学化学与分子工程学院化学生物学系, 北京 100871)

摘要 蛋白质传感器作为一种分析蛋白质与其他分子之间作用力的有效手段已经越来越显示出其优点, 但是蛋白质在基底表面的变性问题对于研究者来说仍然是一个挑战. 作者介绍了一种具有高灵敏度的蛋白质传感器, 即利用 DNA 引导固定(DDI)方法, 将 DNA-蛋白质复合物通过 DNA 双链特异性杂交固定在硅基底表面, 从而有效保持了蛋白质的活性, 并且引入荧光共振能量传递(FRET)技术以及电势扫描发卡去杂交(SPHD)技术降低非特异性吸附带来的荧光信号. 这种蛋白质传感器在蛋白质识别以及 DNA 杂交方面具有显著区分不同体系荧光信号的能力.

关键词: 蛋白质, 传感器, FRET, 电位控制, SPHD, 微阵列

中图分类号: O647

Protein Biosensors Based on Scanning Potential Hairpin Denaturation and Fluorescence Resonance Energy Transfer

GUO, Su LIAO, Wei WEI, Fang QIAN, Min-Xie ZHAO, Xin-Sheng*

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable and Stable Species, and Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, P. R. China)

Abstract The ability of detecting multiple analytes simultaneously is an important advantage of protein sensors. But the denaturation of proteins on surfaces is still a challenge. In this paper, a protein biosensor providing high selectivity is introduced. This approach is based on DNA-Directed Immobilization (DDI) method, in which protein-DNA conjugates are immobilized on surface through DNA hybridization. Nonspecific binding is reduced by applying fluorescence resonance energy transfer (FRET) and scanning potential hairpin denaturation (SPHD) technologies. Excellent discrimination on different recognition patterns is obtained.

Keywords: Proteins, Biosensor, FRET, Potential control, SPHD, Microarray

阵列的蛋白质传感器能够为高通量地检测蛋白质相互作用提供有效的解决方法, 可以应用于抗原抗体检测、蛋白质组学分析以及药物筛选^[1-4]. 为实现上述应用, 很多小组开发了基于多种原理的, 包括 2D 凝胶^[5]、微孔板^[6]以及微珠^[7]的蛋白质微阵列. 然而制作蛋白质传感器需要将蛋白质固定到基底表面的同时保持其生物活性, 因此如何最大限度

避免蛋白质在表面因为疏水相互作用发生变性, 仍然是科学家们所面临的一个很大的挑战^[8].

为了从根本上减少表面变性, 人们提出了 DNA-directed immobilization(DDI)技术^[9-12], 即将 DNA 连接的蛋白质通过全匹配的 DNA 双链杂交固定到有单链 DNA 修饰的表面^[13-15]. 这种技术有个明显的优点, 就是抗原抗体之间的识别可以先在溶液中进行,

Received: April 24, 2006; Revised: May 29, 2006. *Correspondent, E-mail: zhaosx@pku.edu.cn; Tel: 010-62751727; Fax: 010-62751708.

国家基础研究重大项目计划(G1999075305)和国家自然科学基金(20333010, 20403001)资助项目

以免受到表面影响. 而且杂交形成的 DNA 双链可以在蛋白质和表面之间形成一段间隔, 从而进一步减少蛋白质变性. 不过, DDI 方法仍要面对由于错配的 DNA 序列杂交以及蛋白质非特异性识别带来的影响. 如果可以同时识别蛋白质相互作用和 DNA 的杂交, 就可以解决上述困难. 最近, 我们开发出利用扫描表面电位与发卡型探针设计结合 (scanning potential hairpin denaturation, SPHD) 的方法区分完全匹配和单点错配 DNA 双链的技术^[16-17]. 现在利用与 DNA 双链特异性结合的嵌入式染料可以与标记在目标蛋白上的染料发生荧光共振能量传递 (FRET) 作用, 同时确认 DNA 双链和抗原-抗体复合物是否均存在. 我们还期望通过引入 SPHD 技术, 能够扩大阳性信号和阴性信号之间的差别. 本文结果表明, 所选用的 SPHD-FRET 方法是可行的, 所制作的蛋白质传感器具有较高的特异性.

1 实验部分

1.1 表面预处理

经过特殊发卡型设计的 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 单链 DNA (ssDNA, Sangon, China) 首先被共价固定在有机单层膜覆盖的硅(111)表面^[18-19], 然后在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下利用 PBST (PBS(phosphate-buffered saline)与 0.5% Tween-20 V/V 混合溶液)洗涤. 具体过程是, 洁净的硅(111)面先被腐蚀成 H 终止, 然后滴加十一碳烯酸甲酯 (methyl undecylenate, MU), 在氮气保护下用汞灯 (125 W, 250~500 nm) 照射 1 h, 形成 $-\text{COOCH}_3$ 终止的致密有机膜. 酯基终止的表面再通过分别浸泡在叔丁醇钾的 DMSO 溶液和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液中 1 min 和 5 min 酸化成为羧基终止表面. 最后 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单链 DNA 在 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NHS (*N*-hydroxy succinimide, Acros, >98%) 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDAC (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimidehydrochloride, Acros, >98%) 的存在下通过酯化反应共价固定在上述表面上. 固定的发卡 DNA 序列如下: $5' \text{-CCCCGTTTCAGCCTGACTTCTTATTGGGGG-3'}$.

1.2 DNA-蛋白质复合物在基底表面的固定

本实验中的探针蛋白为抗原 (Sigma), 通过在 PBS 溶液中 (HyClone, pH 7.4) 酯化过夜来与寻址单链 DNA 连接. 即 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA、 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 未标记的抗原与 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDAC 以及 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NHS 混合且在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置过夜. 过量的 DNA 和小分子在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下利用离心管 (100 kD, Millipore) 离心

分离 (GS-15R 型离心机, Beckman) 10 min 去除, 离心速率为 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. 本实验中的目标蛋白为标记有 Alexa Fluor546 (AF) 的抗体 (Molecular Probes).

$5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA-蛋白质复合物以及 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 目标蛋白在 PBS 溶液中进行识别. 所得的生物分子复合物在加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ 的 PBS 溶液中通过 DNA 杂交固定到表面. 然后在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 利用 PBST 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min. 与蛋白连接的 DNA 序列有两种, 一种是完全匹配的 (PM), 另一种是错配的 (MM), 序列分别为

$5' \text{-AATAAGAAGTCAGGCTGAAAC-3'}$ (PM)

$5' \text{-GTTTCAGCCTGACTTCTTATT-3'}$ (MM).

形成 DNA-蛋白质复合物时所用的未标记抗原分别为小鼠 IgG 和兔 IgG, 标记有 AF 的目标抗体蛋白为羊抗鼠 IgG.

1.3 检测 FRET 信号

FRET 信号的检测过程如图 1 所示. 检测时, 硅表面浸泡于 TE ($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH=7.5) (Molecular Probes) 溶液中, 并加入 $1.6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PicoGreen (PG, Molecular Probes)、 $5 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA-蛋白质复合物以及 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标记的抗体, 在给体 PG 和受体 AF 之间形成 FRET 对. 通过 488 nm 激光激发 PG, 650 nm 到 490 nm 之间的 FRET 信号通过拉曼光谱仪进行检测 (Renishaw Raman-1000, UK with the microscope: Leica DMLP). 540 nm 以下的荧光信号被滤光片部分过滤掉.

1.4 检测 SPHD 信号

利用报导的实验装置^[17], 电压从 +0.5 V 扫描到 -1.5 V, 扫描速率为 $10 \text{ mV} \cdot \text{min}^{-1}$ (ZF-3 potentiostat, China). 电压读数为工作电极 (上述固定有生物分子

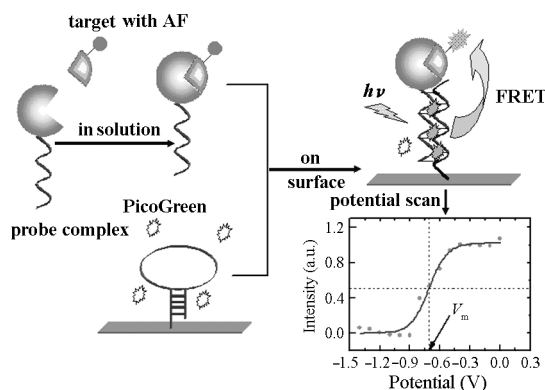


图 1 利用 FRET 以及 SPHD 技术制备和检测蛋白质传感器的示意图

Fig.1 The scheme of the experimental procedure

的硅片)和对电极(铂丝)之间的电压. 为了与标准氢电极对比, 应该在上述读数基础上加 0.49 V. 在这样的电压范围内, DNA 分子不会发生氧化还原反应^[19-21]. 在 575 ± 15 nm 处收集到的荧光信号被看作是电压的函数, 对绝对信号进行了归一化, 归一化后的信号介于 0 和 1 之间. 对信号进行 S 形拟合, 可以得到参考文献[17]中所提到的解链电位 V_m .

2 结果与讨论

2.1 FRET 检测

与 AF 标记的蛋白识别后的 DNA-蛋白质复合物通过 DNA 杂交固定到表面, 然后加入嵌入式染料, 收集不同体系中 AF 和 PG 之间的 FRET 信号. 当寻址 DNA 全匹配于表面固定的发卡型 DNA 时, DNA 双链形成, PG 嵌入到双链中, 在激光激发下产生荧光信号增强. 当寻址 DNA 错配于表面固定的发卡型 DNA 时, 由于 DNA 高选择性杂交, 双链不能形成. 而 PG 是特异性地与双链 DNA 结合, 因此在 MM DNA 序列中, FRET 信号被有效削弱. 同样地, 如果未识别的抗体存在于溶液中, 两种染料之间的距离不满足 FRET 发生的要求, FRET 信号也会被减弱.

设计并检测了 6 种不同体系的 FRET 信号, 结

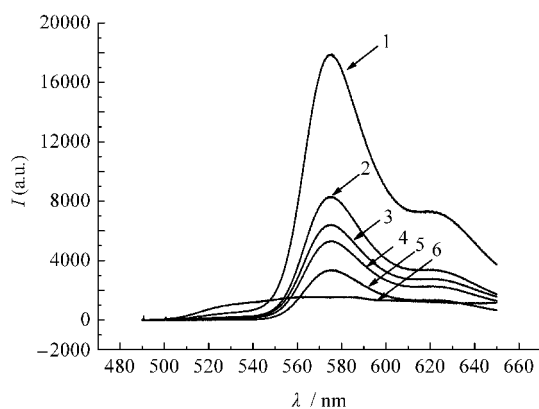


图 2 不同体系荧光信号的对比

Fig.2 The fluorescence intensities in different systems

1) perfectly matched DNA immobilized mouse IgG recognized with Alexa Fluor546-labeled goat-anti-mouse IgG (PM-mouse-GAM-AF); 2) PM-rabbit-GAM-AF; 3) MM-mouse-GAM-AF; 4) physically adsorbed conjugate of ssDNA-mouse IgG recognized with Alexa Fluor546-labeled goat-anti-mouse IgG; 5) the same condition as 1) except that PG is absent in solution; 6) the same condition as 1) except that GAM does not have the Alexa Fluor546 labeling.

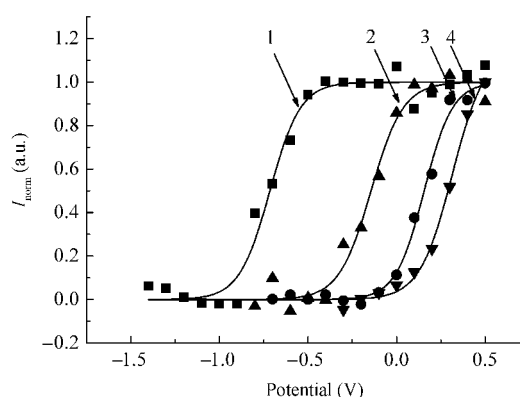


图 3 不同体系的 SPHD 曲线

Fig.3 The SPHD curves of different systems

I_{norm} is the normalized FRET intensity, and potential is the voltage reading between the working electrode (silicon) and the counter electrode (Pt wire). Curve 1, PM-mouse-GAM-AF; curve 2, PM-rabbit-GAM-AF; curve 3, MM-mouse-GAM-AF; curve 4, MM-rabbit-GAM-AF.

果如图 2 所示. 图中曲线 1 代表完全匹配识别体系 (PM-mouse-GAM-AF), 即 DNA 双链为完全匹配杂交, 抗原抗体之间为特异性识别. 同理, 曲线 2 代表完全匹配不识别体系 (PM-rabbit-GAM-AF), 曲线 3 代表错配识别体系 (MM-mouse-GAM-AF), 曲线 4 代表识别以后的复合物在 Si 表面的物理吸附信号, 曲线 5 和曲线 6 分别代表只有 AF 或者 PG 的背景信号. 从曲线 5 可以看出 AF 仍然可以被 488 nm 激光激发, 虽然强度比较弱. 结果显示, 两种染料的光谱有明显差别, 单一染料的信号都比较低. 在两种染料同时存在下, AF 的发射信号显著增强, 而且 PG 在 540 nm 以下的荧光信号减弱, 说明 FRET 已经发生. 与预期相同, DNA 双链匹配和抗原抗体正确识别的体系 (PM-mouse-GAM-AF) 有最强的 FRET 信号. 但是由于染料自身性质以及部分生物分子之间的交叉反应, 在对照实验中 FRET 信号同样可以检测到, 这就要寻找更有效的方法来区分不同体系之间的差别, 因此利用 SPHD 技术进行改善.

2.2 SPHD 检测

在 1.4 节实验中, 通过 SPHD 技术来控制生物分子在表面的行为, 从而提高检测的特异性^[16-17]. 所得 SPHD 曲线如图 3 所示. 首先值得注意的是, 除了错配不识别体系 MM-rabbit-GAM-AF 外, 所有曲线均呈“S”形. 利用解链电位作为判据, 所有体系都可以被明显区分开. 正电位下的荧光信号高于负电位下的信号, 表明生物分子复合物是带负电的. 几种体系中 V_m 从负电位到正电位顺序为: -0.72 ± 0.06 V

(PM-mouse-GAM-AF), -0.16 ± 0.09 V (PM-rabbit-GAM-AF), 0.01 ± 0.10 V (MM-mouse-GAM-AF), $0.29 \text{V} \pm 0.10$ V (MM-rabbit-GAM-AF), 与预期的生物分子稳定性相符. PM-mouse-GAM-AF 体系中 DNA 完全匹配蛋白质特异性识别, 因此是最稳定的体系; 而两方面都不具有特异性的 MM-rabbit-GAM-AF 体系是最不稳定的. 一个有趣的现象是, PM-rabbit-GAM-AF 体系介于 PM-mouse-GAM-AF 和 MM-mouse-GAM-AF 之间, 还不清楚为什么会有这样的现象, 其机理也有待进一步研究. 在 DNA 识别中^[7], 利用解链电位判断会更加稳定而且对浓度更不敏感, 因此会比用绝对荧光信号进行判断更加可信.

3 结 论

提出了一种新颖的制作高选择性蛋白质传感器的方法, SPHD 以及 FRET 技术被应用到这种 DDI 形式的蛋白质传感器制作中, 以便更好地区分全匹配以及错配识别. 在镶嵌式染料以及蛋白质上面标记的荧光染料之间的 FRET 信号可以有效地用来指示 DNA 双链和蛋白质-蛋白质之间识别的同时存在; 而 SPHD 技术可以排除绝对荧光信号强度波动带来的影响, 这些对于高效率的基于阵列的蛋白质检测来说具有可行性.

References

- 1 Zhu, H.; Snyder, M. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, *5*: 40
- 2 Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R. A.; Gerstein, M.; Snyder, M. *Science*, **2001**, *293*: 2101
- 3 Phizicky, E.; Bastiaens, P. I. H.; Zhu, H.; Snyder, M.; Fields, S. *Nature*, **2003**, *422*: 208
- 4 Harwanegg, C.; Hiller, R. *Expert. Rev. Mol. Diag.*, **2004**, *4*: 539
- 5 Hu, Y.; Huang, X.; Chen, G. Y. J.; Yao, S. Q. *Mol. Biotechnol.*, **2004**, *28*: 63
- 6 Angenendt, P.; Nyarsik, L.; Szaflarski, W.; Glokler, J.; Nierhaus, K. H.; Lehrach, H.; Cahill, D. J.; Lueking, A. *Anal. Chem.*, **2004**, *76*: 1844
- 7 Templin, M. F.; Stoll, D.; Bachmann, J.; Joos, T. O. *Comb. Chem. High. T. Scr.*, **2004**, *7*: 223
- 8 Brueggemeier, S. B.; Kron, S. J.; Palecek, S. P. *Anal. Biochem.*, **2004**, *329*: 180
- 9 Niemeyer, C. M.; Boldt, L.; Ceyhan, B.; Blohm, D. *Anal. Biochem.*, **1999**, *268*: 54
- 10 Niemeyer, C. M.; Ceyhan, B.; Gao, S.; Chi, L.; Peschel, S.; Simon, U. *Colloid. Polym. Sci.*, **2001**, *279*: 68
- 11 Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Gao, S.; Chi, L. F. *Bioconjugate. Chem.*, **2001**, *12*: 364
- 12 Boozer, J. L. C.; Chen, S. F.; Yu, Q. M.; Homola, J.; Jiang, S. Y. *Langmuir*, **2004**, *20*: 8090
- 13 Fan, C. H.; Li, G. X.; Zhu, J. Q.; Zhu, D. X. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *423*: 95
- 14 Zhang, W. J.; Li, G. X. *Anal. Sci.*, **2004**, *20*: 603
- 15 Liu, X. J.; Peng, W. L.; Xiao, H.; Li, G. X. *Electrochem. Commun.*, **2005**, *7*: 562
- 16 Wei, F.; Sun, B.; Liao, W.; Ouyang, J. H.; Zhao, X. S. *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, *18*: 1149
- 17 Wei, F.; Chen, C. L.; Zhai, L.; Zhang, N.; Zhao, X. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*: 5306
- 18 Wei, F.; Sun, B.; Guo, Y.; Zhao, X. S. *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, *18*: 1157
- 19 Liao, W.; Wei, F.; Qian, M. X.; Zhao, X. S. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **2004**, *101*: 361
- 20 Mbindyo, J.; Zhou, L. P.; Zhang, Z.; Stuart, J. D.; Rusling, J. F. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*: 2059
- 21 Palecek, E. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1992**, *28*: 71