蛋白质芯片技术及生物医学应用*

靳 刚

(力学研究所 北京 100080)

摘要 蛋白质芯片技术是一种新型蛋白质分析技术。文章介绍了研究它的目的和意义,重点介绍它的研制过程和研究内容以及生物医学应用。

关键词 蛋白质芯片,蛋白质分析,椭偏成像,表面改性

1 研究背景和意义

生物芯片技术具有并行、快速和自动化分析的特点和广泛的应用前景,成为21世纪生物医学工程的研究热点。生物芯片技术包括:基因芯片即DNA芯片、蛋白质芯片(亦称作生物分子芯片)、细胞芯片和组织芯片以及药物芯片、生物电子芯片、仿神经网络等。

蛋白质是构成生命体的最小活性单位,按目前的认识,人体中存在着10万种以上的蛋白质,在肌体中恪尽职守,功能各异。随着人类对蛋白质认识的深入,越来越多地需要通过识别和检测蛋白质,来了解人体的健康状况、诊断和治疗,并认识其生理功能。蛋白质的组成具有多样性和可变性。蛋白质的表达受着多种因素的调控,在生命发育不同阶段的蛋白质的种类和构成是不一样的,不同的组织中细胞表达的蛋白质也有很大的差异,在病理或治疗过程中,细胞蛋白质的组成及其变化与正常过程中的也不同。因此,蛋白质研究是在一个更深入和更贴近生命本质的层面上,去探讨和发现生命活动的规律,揭示重要生理、病理现象的本质。

蛋白质芯片在疾病相关分子的发现、疾病分子的诊断、基因功能的研究及新药开发等领域将有无可比拟的优越性。因此,它具有强烈的社会需求。同DNA相比,蛋白质种类繁多,具有复杂的空间结构和可变性,无法用聚合酶链式反应(PCR)技术扩增,使得蛋白质芯片研究非常困难,是生物芯片领域的挑战。迄今为止,达到实用水平的蛋白质芯片系统仅有美国基于质谱技术的SELDI(Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization),瑞典基于表面等离子体共振技术的Biacore SPR和我们的光学蛋白质芯片技术。我们在蛋白质芯片领域找到一个新的切入点,并拥有自己的专利。光学蛋白质芯片是将表面增强亲和力捕获的蛋白质芯片与高通量高分辨的光学成像和微观图像处理相结合,所形成的新型多元蛋白质分析技术。与Biacore SPR技术和SELDI质谱技术相比,具有多元同时分析、非标记、无扰动和排除伪信号能力等更优越的特点。经中国科学院专家组鉴定,其性能指标达到国际领先水平。

蛋白质芯片是一种蕴含多学科知识的系统工程,为蛋白质分析和检测提供新型技术平台。它不仅局限于蛋白质检测,还可用于蛋白质识别、特意位点研究、药物筛选以及蛋白纯化等。可根据用途进行蛋白质芯片的设计。以疾病相关蛋白质的检测为例,在诊断乙型肝炎时,国际公认的检测指标为5项(HBsAg乙肝表面抗原,anti-HBsAg乙肝表面抗原抗体,HBeAg乙肝e抗原,anti- HBeAg乙肝e抗原抗体和anti-HBcAg乙肝核心抗原抗体),通常在医院的化验室里需要2—7天的时间,用常规免疫检测的方法逐项进行。采用蛋白质芯片来检测,可以在1片乙肝诊断芯片上装配检测该5项的配体,即可在30分钟内同时完成5项检测。

2 研究方法、主要内容及研制过程

光学蛋白质芯片系统是探测和研究蛋白质的新技术。该方法将高分辨率的光学显微成像技术和集成化多元蛋白质芯片技术相结合,形成了新型的并行、快速生物分子识别和检测技术。它不需要任何添加剂,对生物活性无影响,还可以检测生物分子反应的动力学参数,从而获得很多传统技术所难以

* 收稿日期:2003年7月26日

提供的信息，而且还可以广泛地用于生物医学研究、健康预测、临床诊断、新药筛选和鉴定以及生物工业流程中的活性监测等。

该技术的原始思想，即椭偏光学生物传感器新概念，是靳刚于 1995 年在瑞典工作时首次在国际上提出的[1,2]。1996 年归国后，以此发展的光学蛋白质芯片是将固体芯片表面的光学反射特性格式化，结合二维纳米生物活性材料和蛋白质的特异结合性，根据芯片设计和配基的定向装配，在芯片表面形成具有各种生物活性的微单元，形成多元阵列蛋白质芯片。当芯片表面接触待测的蛋白质溶液样品时(如：血清、尿液、细胞裂解液等)，如果溶液中的某些蛋白质或生物分子与芯片表面上对应微单元内的配基分子发生特异性结合，就会生成生物分子复合物，使微单元内的分子面密度发生变化，改变微单元内的分子膜层的形貌。此变化通过高通量高分辨的椭偏光学显微成像显示，结合微观图像处理，形成新型多元蛋白质分析技术。

蛋白质芯片技术主要包括：

(1)芯片设计。在检测对象确定以后，芯片设计中的一个重要环节就是确立特异性生物学系统，即具有生物特异结合性的分子对或分子组合，如，配体-受体，蛋白-蛋白，抗原-抗体，病毒-受体等，并优选配基。以此为基础实现配基和待测生物分子在芯片表面上的特异性复合。

(2)配基装配。随着分子生物学和生物化学的发展，人们已经认识到生物分子是一些空间结构非常复杂的有机大分子，而生物活性则仅仅表现在某些特定位点上。配基的使用，实际上是配基分子上活性位点的利用。蛋白质芯片是由多个表面生物探针组合而成，配基固定于表面上。由于生物分子与芯片基底表面的相互作用，通常会造成生物分子在表面的变形和变性，使生物活性减弱甚至消失。为了充分保持配基在芯片表面上的生物活性，需要设计芯片表面的蛋白质活性装配，它涉及到基底的选择，生物相容性、表明化学性质、光学特性。为此，进行表面改性，包括物理、化学、生物化学及其组合表面改性，以适合配基的装配。为了获得高灵敏的检测，配基的来源、装配点、活性位点、表面位阻、非特意性阻隔、特异活性维持等诸问题，都经过统筹考虑和解决。

(3)芯片反应器。一个典型的蛋白质检测芯片是一个组合多种生物活性探针的微小表面，表面积可以从平方毫米到平方厘米量级，视需要而定。当检测时，活性表面要与待测的生物分子溶液接触，即需要芯片反应器。分子表面相互作用、分子间相互作用、多面元独立处理和样品检测的串、并行、反应条件、结合速率、试剂用量、清洗、均一性等问题将在微小的芯片反应器中得到体现。

(4)芯片信号采样和处理。在芯片的不同区域内，所装配的各种配体与待测溶液中所对应的生物分子发生特异性结合，生成生物分子复合物，就会改变芯片表面的形貌。此变化可通过芯片检测系统来获得芯片数据的采集和处理。该芯片检测系统是一种具有高空间分辨率的光机电组合的非接触型光学显微成像系统，它的控制、设置、调试、稳定性、噪声、时空分辨率、均一性、校对、信号采集、多元信息处理以及人机对话等均由计算机自动化操控。

(5)芯片数据库。由于蛋白质的种类繁多，仅人体内就超过 10 万种，蛋白质芯片数据库将为用户提供：蛋白质种类、配基，试验条件，定、动态检测结果等参考和各种应用的积累结果。

3　蛋白质芯片的特点

(1) 直接测量非纯化分析物。在进行生物分子的特异性结合研究时，可直接测量非纯化分析物。

(2) 多元样品同时检测。由于观测的样品面积大，所以能够用于多元样品观察，在同一表面上可以同时观察几个、几十个、上百个以至更多样品单元。该技术可以同时检测体液中的多种蛋白质，并可以同时测量多对生物分子，包括蛋白质、核酸、多糖、磷脂、甚至生物小分子以及候选药物的分子间相互作用的情况。它提供了同时分析多元分子溶液综合信息和多样品检测的技术手段。

(3) 样品用量少。采用了可以达到次单分子膜层分辨能力的光学成像技术和集成蛋白质芯片技术，样品用量仅在 10 微升量级。

(4) 样品无需任何标记物。直接测量生物分子的特异性结合所形成的生物分子复合物，并不需要象酶联免疫或放射免疫法那样对生物分子作标记，不会对待测生物分子活性造成任何扰动和损伤。

(5) 实时检测生物分子相互作用的动态过程

可以实时测量多对生物分子的分子间相互作用过程,如分子间是否存在特异性结合、结合的强度和速度、解离的快慢以及结合部位的分析,可以获得生物分子反应的动力学信息。

(6) 具有分辨和排除干扰信号能力。面阵式芯片测量具有分辨和排除干扰信号能力。

(7) 检测速度快。电子图像采样具有快速摄取图像的能力,为生物分子动力学研究提供了可能。

(8) 结果直观。检测结果均以数字图像形式输出,可以进行定性和定量测量。

4 生物医学应用及发展前景

利用蛋白质芯片已开展了一些生物医学应用。如,乙型肝炎表面抗原的检测;研究了配体和受体的特异结合(白介素 6);进行了内分泌激素的测定尝试;实验多种抗原-抗体相互作用研究;鉴定治疗肝癌的单克隆抗体药物,其中所测量的肝癌细胞裂解液成分复杂, 是其它免疫学方法所不能测量的;以及蛋白质的竞争吸附和细胞黏附的研究等[3—5]。

此成果为医学诊断、药物筛选和分子生物学的研究和发展,开辟了新的途径。由此获得其它方法无法提供的信息,为一些尚无答案的生物医学理论问题提供解答[6]。

其主要应用领域:蛋白质的结构功能研究;医学诊断和医疗;新药开发;生物工业等。

该测量方法已引起卫生部中国医药生物技术协会的重视,建议在医药界推广应用,并希望建立起可以服务于医药界的国家检测中心。目前,中国科学院已经和天津经济技术开发区“国家纳米产业化基地”及社会投资成立了 BIOCHINOUP 股份有限公司,进行产业化开发。开发的主要产品包括:(1)光机电一体化芯片检测系统;(2) 根据需求供应针对各种分析和检测对象所设计制造的光学蛋白质芯片;(3)低样品消耗和快速的芯片反应器系统,以及特定用途的专家系统。

致谢 此项工作得到国家自然科学基金委员会、中国科学院、科技部的支持,特此致谢!

主要参考文献

1 G Jin, P Tengvall, I Lundstršm et al. A Biosensor Concept BasedonImaging Ellipsometry for Visualization of Biomolecular Interactions. Analytical BiochemistryI, 1995, (232):69–72.

2 G Jin, R Jansson, H Arwin, ImagingEllipsometry Revisited : Developments for Visualization of Thin Transparent Layers on Silicon Substrates. Rev. Sci. Instrum.,1996(67): 2 930-2 936.

3 G Jin, Z Y Zhao, Y H Meng et al .Visualization of Molecule Interaction between Antigen-Antibody ——one of Ellipsometric Imaging Applications.Proceedings of SPIE - Biomedical Optics and Laser:Diagnositics and Treatment, 1998(3 548):131-135.

4 G Jin, Z H Wang, P Q Ying et al. Analysis of Antibody-Antigen Reaction with Real-Time Imaging Ellipsometry World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. 2000, Chicago, U.S.A. 23-27.

5 G Jin, Z H Wang, Y H Meng et al. Optical ProteinChip as Microarrays for Protein Interaction Determination 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Oct, 2001, Istanbul, Turkey..25-28.

6 靳刚,王战会. 光学蛋白质芯片.自然, 2001, 23(5): 2001, 286-289.

Protein Chip Technique and Its Bio–medical Applications

Jin Gang

(Institute of Mechanics, CAS, 100080 Beijing)

Based on the biosensor concept with imaging ellipsometry, the proteinchip was developed as a new technique for protein analysis. The chip in micro-array was patterned with multi-bioactivity of proteins. The chip could be used for protein detection, identification and purification as well as protein interaction with only a little sample consumption and labeling free. It's able directly to test raw

(转 361 页)