SPR 生物传感器在生命科学及在航天医学中的应用*

王春艳　李莹辉　熊江辉　谭映军　聂捷琳　刘学勇

(航天医学工程研究所　北京 100094)

摘　要　表面等离子体共振生物传感器在分析生物分子相互作用方面，具有灵敏度高、实时在线、简单快捷和抗干扰能力强等优点，被广泛应用于临床检验、药物筛选等研究领域；因其能满足空间特殊环境下的使用要求，在航天医学领域具有广阔的应用前景．本文综述了表面等离子体共振生物传感器的原理、特点、在生命科学研究中的应用及在航天医学中的应用前景．

关键词　表面等离子体共振；生物传感器；航天医学

中图法分类号　V7

Applications of Surface Plasmon Resonance Biosensor in Life Science and Space Medicine

WANG Chunyan　LI Yinghui　XIONG Jianghui　TAN Yingjun　NIE Jielin　LIU Xueyong

(*Institute of Space Medico-Engineering, Beijing* 100094)

Abstract　The use of Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensors in analyzing biomolecular interactions is increasing significantly in recent years, since it has various advantages including real-time measurement of biomolecular interactions without labeling, high-throughput analysis of multiple proteins and the simple optical system for the device. Applications in life science include clinical assay, disease diagnosis, drug screening and so on. In this technique, one of the interacting partners is immobilized on a sensor chip and the binding of the other is followed by the increase in refractive index caused by the mass of bound species. Developments of related theories and technologies have accelerated performance of SPR biosensor greatly. For its high sensitivity, facility, expeditiousness and stable ability in weightlessness, SPR biosensor has a strong potential for on-line analyzing biochemical markers in astronauts' body fluids which are highly related to some kinds of diseases, and this is a practical method used as the health early alarm and medical care system for astronauts. This article is focused on the principle and advantages of SPR-based biosensor and its applications in life science. The future uses in space medicine are also discussed.

Key words　Surface plasmon resonance, Biosensor, Space medicine

---

* 载人航天工程应用项目资助

2004-11-15 收到原稿，　2005-03-15 收到修定稿

1983 年, 瑞典科学家 Liedberg 首次将表面等离子体共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 技术应用于 IgG 抗体-抗原相互作用的测定, 由此产生了世界上第一个 SPR 生物传感器. 此后, SPR 生物传感器被迅速运用于临床检验和疾病诊断、药物筛选和防护机理研究等多个领域. 因其具有的灵敏度高、实时在线、简单快捷、抗干扰能力强等优点, 在航天医学研究中具有诱人的应用前景. 本文综述了 SPR 生物传感器的原理、特点、在生命科学研究中的应用及在航天医学研究中的应用前景.

1 工作原理

SPR 是一种物理光学现象. 一束平面单色偏振光以一定范围的入射角照射在玻璃 — 金属界面时, 可发生全内反射. 若入射光的波向量与金属膜 (通常是金或银) 内表面电子的振荡频率相匹配, 入射光被耦合入表面等离子体内, 引起电子发生共振, 电子吸收该能量使界面反射光的强度急剧下降. 其中反射光强度最小的入射角称共振角, 它与结合在金属膜表面样品的折射率有关. 附着在金属膜表面上的电介质不同或同种电介质的质量不同, 则共振角不同. 以棱镜耦合 SPR 传感器为例, 其结构包括镀膜棱镜、入射光源、样品进口、样品出口、反应池和检测器, 其结构见图 1. 根据上述原理, SPR 生物传感器通常将已知的生物分子 (如抗体) 固定在几十纳米厚的金属膜表面, 加入与其互补的目标生物分子 (如目标抗原), 两者结合或解离将使金属膜溶液界面的折射率发生变化, 据此反映生物分子间的相互作用.

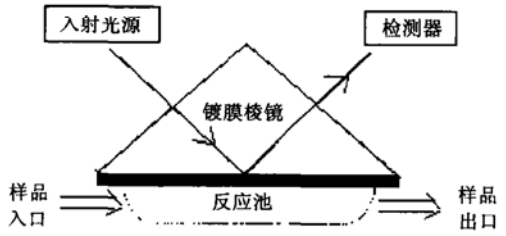


图 1 SPR 传感器结构示意图

Fig.1. Schematic representation of the SPR sensor

2 特点

SPR 生物传感器在问世的短短 20 年间, 已成为分析生物分子间相互作用的重要手段, 并成为传感器领域令人瞩目的研究热点, 主要由于其具有如下显著特点.

(1) 检测灵敏度高. 分子量为 20 Kd 的大分子物质, 其检测限大约为 1—10 nmol/L. Miura 等 [1] 用竞争法测定苯并芘, 检测区间可达到 $(0.01—1000)\times10^{-6}$, 而同种方法 ELISA 的检测最低限为 2×10^{-6}. 本实验室利用抑制检测法, 对小分子 2, 4-二硝基苯肼的检测范围为 10 nM—5 μM, 其检测范围与 ELISA 结果基本相同 (已接收). 该技术与质谱 (MS) 技术联用, 生物分子的检测极限可达到 fmol 级甚至更低. 在 1 μl 含 600 pmol 人血清白蛋白溶液中, 能分离鉴定到 120 fmol 的人肌球蛋白, 而单纯使用 MS, 由于高浓度的白蛋白的干扰, 检测不到人肌球蛋白的质谱峰 [2]. 如此高的检测灵敏度使之适用于体液中的少量激素浓度测定及环境中微量微生物的检测.

(2) 可用于样品的实时在线检测, 同时完成各种生物分子的功能分析, 在分析多种生物分子逐步作用时更具有优势. 加入影响反应的调节因子, 还能实时观察以确定其在哪个环节发挥作用. 这是 ELISA 、放射免疫等传统免疫分析技术所不具备的优点. Hide 等 [3] 利用该技术, 实时监测 IgE 介导的肥大细胞超敏反应的早期, 部分揭示了细胞内参与反应的各种迅速且复杂的信号分子相互作用.

(3) 抗干扰能力强. SPR 传感器通过光学信号的变化来反映分子间的相互作用, 不会受到电、磁、力的干扰, 明显优于电化学免疫传感器. 尤其是在空间环境中, 其信号不会因失重受影响, 明显优于压电传感器.

(4) 样品无需预处理. 所用生物分子无需酶、荧光或同位素标记, 操作简单; 信号不受样品颜色、浊度的影响, 可直接检测血液等体液标本. 该技术已实现全血凝血素时间 (PT) 的测定 [4]. 若将此技术用于空间飞行中航天员的体液标本检测, 实验人员经简单的培训即可掌握操作程序, 大大提高了工作效率和可操作性; 同时无需样品预处理设备, 节约了飞船内宝贵空间.

(5) 快速、高通量分析. SPR 生物传感器单通道检测一个样品需要 2—10 min. 以 Biacore Q 传感器为例, 它有 4 个反应池, 可以同时在线检测 4 个样品或进行 4 个独立的实验. 既可用于高通量自动化分析, 也可以进行实时动态对照, 并保证其他条

件完全一致. 利用 Biacore 传感器技术, 筛选 400 个抗体的配体需要不到 5 天, 而传统的筛选方法则需要耗时数月 [5].

(6) 试剂和样品用量少, 适用于珍贵样品的检测. 牟颖等 [6] 实验证明经亲和素-生物素系统连接到金膜表面的抗体可反复使用 50 次左右. 检测牛奶中的 IgG 含量 [7] 和食物中的真菌霉素 [8] 的 SPR 传感器的重复使用次数更是分别达到了 200 次和 500 次. 空间飞行中, 根据检测要求, 携带不同传感器芯片, 可实现航天员微量血液、尿液、唾液等标本在线检测. 既满足多指标分析需求, 又避免大量取样及样品预处理所需的复杂、耗时操作.

随着近年来相关理论和方法学的完善, SPR 生物传感器在生命科学研究中发挥出越来越重要的作用, 广泛应用于临床检验及疾病机理研究、新药研发等研究领域.

3 临床检验和疾病机理研究中的应用

SPR 传感器能够准确、灵敏、快速、简便地检测多种生化指标, 并实时监测生物分子间的相互作用及影响因素的作用环节, 可作为疾病诊断和机理研究的有效工具. 该技术证明系统性红斑狼疮 (SLE) 患者血浆中含有 C4bBP, 它与 PS 结合并阻断后者的抗凝血作用, 揭示了 SLE 患者常伴有血栓发生的机理 [9]. SPR 传感器技术从肿瘤相关抗体的选择、血管的形成、细胞周期的调控、肿瘤免疫机理等多个方面, 对癌症进行了研究, 加深了人类对肿瘤发生机理的认识及诊治技术的提高. 同时, 该技术在生化指标的检测方面得到了广泛应用. 用其测定糖尿病肾病患者尿样中的蛋白含量, 灵敏度和精确度比现行临床方法都有很大提高 [10], 为疾病的早期诊断及治疗提供了依据. 如果能利用该技术, 实时监测航天员体液中与机体的健康状态密切相关的生化指标, 就可以对生理功能的异常与损伤提供预警, 为在空间实施相应的防护治疗措施提供医学参考.

4 在药物研发中的应用

SPR 生物传感器能实时、平行性地分析核酸、蛋白质、多肽和细胞间的相互作用, 研究药物的作用机理, 筛选并优化合成药物中的有效成分, 已成为药物研发中的有效技术. 如对硫酸寡糖在骨关节炎发生中的抑制机理研究 [11]、双效 DNA 插入剂抗癌效果的优化研究 [12]、新霉素 B 及相关的氨基糖苷类药物治疗 HIV 的作用机理研究 [13] 等领域, 降低了研究费用, 加快了相关新药的进一步开发. 资料证实, 中药能有效对抗空间飞行导致的心肌收缩力下降、骨质疏松等问题, 但其成分复杂, 仍需对其有效成分做进一步的分离纯化与鉴定. 如能将 SPR 生物传感器应用于其防护机理与相关新药的开发研究, 必将大大推动空间防护医学的发展.

5 在航天医学中的应用前景

我国目前制定的载人航天计划分为三个发展步骤. 第一步是实现载人航天飞行, 开展空间应用实验; 第二步是突破载人飞船和空间飞行器的交会对接技术, 发射一个空间实验室; 第三步是建造一个长期有人照料的空间站. 以 "神舟" 五号飞船成功返回地球为标志, 我国的载人航天事业已圆满完成第一步. 随着载人航天事业向二步迈进, 我国的航天医学研究也面临着巨大的挑战.

随着中国载人航天事业向着二步迈进, 我国的航天医学研究也面临着巨大的挑战. 研究已经证实, 空间飞行中失重、辐射、活动空间狭小、精神紧张等复合因素, 会对航天员健康产生不良影响. 如何评价航天员中长期空间飞行过程中的健康状况, 保障乘员安全, 对于顺利完成航天任务具有重要意义. 已知某些生化指标在体液中的水平同健康状态密切相关, 如能建立一种便携、灵敏、操作简便的生化指标分析系统, 对其进行在轨监测, 则能实现对航天员健康状态的前瞻性、预警性监控, 并根据监测结果采取积极措施, 更好地保障航天员飞行安全.

SPR 生物传感器检测灵敏度高, 能满足血液、尿液、唾液等体液标本中含量极低的生物分子的检测要求; 检测结果可转化为电信号, 与航天员的生理信息一同实时传输给地面医监人员, 以便对航天员身体健康状况进行实时监控, 指导航天员采取积极有效的应对措施; 该检测所需样品少、样品无需预处理, 降低了空间采样的难度, 避免了样品分离、标记等繁琐步骤, 整个操作过程简便且易于实现自动化, 极大地提高了实验人员的工作效率; SPR 传感器根据光学信号的变化来反映分子间相互作用,

不会受电、磁、力的干扰，适用于空间失重条件，也保证了其在空间环境中的正常应用.

除此之外，基于地面已经建立的应用技术，SPR 传感器还可以用于坐舱密闭环境中的微生物监测、空间防护药物的作用机理研究，以及相关新药的进一步开发.

综上所述，SPR 生物传感器由于其检测非重力依赖性特点，能够满足空间失重条件下的使用要求，从而有望应用于航天员体液生化指标的在线检测与监测，用于评估长期空间飞行的危险性，保障乘员安全. 该技术要实现天基应用，在仪器的微型化、自动化和集成化及检测技术的改进等方面，仍有一些问题有待解决，但我们相信，随着其相关理论及方法的不断完善和我国载人航天事业的发展，SPR 传感器必将在航天医学研究领域得到广泛应用.

参考文献

[1] Miura N *et al.* Highly sensitive and selective surface plasmon resonance sensor for detection of sub-ppb levels of benzo[a]pyrene by indirect competitive immunoreaction method. *Bios. Bioelec.*, 2003, **18**(7):953—959

[2] Carston P *et al.* Combining MALDI mass spectrometry and biomolecular interaction analysis using a biomolecular interaction analysis instrument. *Ana. Chem.*, 1998, **70**(13):2731—2739

[3] Hide Michihiro *et al.* Real-time analysis of ligand-induced cell surface and intracellular reactions of living mast cells using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Ana. Biochem.*, 2002, **302**(1):28—37

[4] Hansson K M *et al.* Comparative studies with surface plasmon resonance and free oscillation rheometry on the inhibition of platelets with cytochalasin E and monoclonal antibodies towards GPIIb/IIIa. *Bios. Bioelec.*, 2002, **17**(9):761—771

[5] Natsume Tohru *et al.* Combination of biomolecular interaction analysis and mass spectrometric Amino Acid Sequencing. *Ana. Chem.*, 2000, **72**(17):4193—4198

[6] Mu Ying *et al.* An optical immunosensor on surface plasmon for determination of B factor. *Chem. J. Internet*, 2000, **2**(1)

[7] Indyk H E, Filonzi E L. Determination of immunoglobulin G in bovine colostrum and milk by direct biosensor SPR-immunoassay. *J. AOAC Int.*, 2003, **86**(2):386—393

[8] Tudos A J *et al.* Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**(20):5843—5848

[9] Guermazi S *et al.* Further evidence for the presence of anti-protein S autoantibodies in patients with systemic lupus eythematosus. *Blood Coag. Fib.*, 2000, **11**(5):491—498

[10] Wei Jingyan *et al.* Preparation of anti-cardiac troponin I monoclonal antibodies and their characterization with surface plasmon resonance biosensor. *Chem. Res. Chin. U.*, 2003, **19**(2):111—117

[11] Shen B *et al.* Biosensor analysis of the molecular interactions of pentosan polysulfate and of sulfated glycosaminoglycans with immobilized elastase, hyaluronidase and lysozyme using surface plasmon resonance (SPR) technology. *J. Pharm. Biomed. Ana.*, 2003, **31**(1):83—93

[12] Carrasco C *et al.* DNA sequence recognition by bispyrazinonaphthalimides antitumor agents. *Biochem.*, 2003, **42**(40):11 751—11 761

[13] Hendrix M *et al.* Direct observation of a aminoglycoside-RNA interaction by surface plasmon resonance. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1997, **246**(1):34—44