

# 生物素-亲和素偶联探针蛋白芯片检测技术

于晓波, 赵天明, 孙志丹, 袁宏坤, 何为, 许丹科

蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组新技术研究室 北京 102206;  
军事医学科学院放射与辐射医学研究所 生物化学研究室 北京 100850

**摘要:** 自行制备一种新型生物素-亲和素偶联探针分子并用于反相蛋白芯片的检测。首先, 将生物素-羊抗鼠 IgG 与亲和素按照不同比例混合后与鼠 IgG 蛋白芯片反应, 观察荧光信号的放大情况; 然后以鼠 IgG-羊抗鼠 IgG 体系为研究模式, 对反相蛋白芯片的制备条件进行了考察和优化, 包括荧光分子的非特异性吸附、点样缓冲液的选择以及蛋白的活性等。最后, 采用此偶联探针对抗相蛋白芯片进行了检测。结果表明, BSA 缓冲液制备的反相蛋白芯片可以防止非特异性吸附, 并有利于保持固定蛋白活性和提高检测限; 另外, 与传统的与生物素-亲和素检测技术相比, 采用生物素-亲和素偶联探针对抗相芯片的检测限可以提高 4 倍左右。表明亲和素-生物素偶联探针成本低、易于合成、并可以与其它的信号放大技术联用进一步提高检测的灵敏度, 有望用于蛋白质芯片的检测。

**关键词:** 生物素-亲和素系统, 信号放大, 反相蛋白芯片

## A Novel Protein Microarray Detection Technique Based on Biotin-Avidin Conjugation Probe

Xiaobo Yu, Tianming Zhao, Zhidan Sun, Hongkun Yuan, Wei He, and Danke Xu

State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center Department of New Proteomic Technology Beijing 102206, China; Beijing Institute of Radiation Medicine, Department of Biochemistry, Beijing 100850, China

**Abstract:** In this experiment, a novel biotin-avidin conjugation probe was synthesized and employed in the detection of reverse-phase protein microarray. Firstly, the proportion of the biotin-avidin conjugation probe was optimized. Then the rat IgG and goat anti-rat IgG system was served as a model to optimize the fabrication conditions of reverse-phase protein microarray, including the non-specific absorption of streptavidin-Cy3 molecules, spotting buffer as well as protein activities. At last, the biotin-avidin conjugation probe was applied to the detection of the reverse-phase protein microarray. The results show that the protein microarray prepared by using BSA spotting buffer could prevent non-specific absorptions of fluorescent molecules and improve the sensitivity, effectively. In addition, compared with traditional biotin-avidin system, the detection limit could be improved four times using the biotin-avidin conjugation probe. In conclusion, the biotin-avidin conjugation probe has its merits of easy synthesis, low price and could be further conjugated with other signal amplification techniques, which is promising to be used in the detection of protein microarray.

**Keywords:** biotin-avidin system, signal amplification, reverse-phase protein microarray

**Received:** June 19, 2007; **Accepted:** August 20, 2007

**Supported by:** the National Basic Research Program of China (No. 2006CB910803).

**Corresponding author:** Danke Xu. Tel: +86-10-80705199, Fax: +86-10-80705155, E-mail: Xudk@nic.bmi.ac.cn

国家科技部 973 项目资助 (No. 2006CB910803)。

最近几年在蛋白质组学的推动下,蛋白质芯片技术发展很快。它具有高通量、高灵敏度和自动化等特点,在生物学研究中得到广泛的应用,如蛋白表达谱、蛋白质-蛋白质相互作用、临床诊断研究和抗体筛选等<sup>[1-6]</sup>。蛋白芯片的检测主要基于免疫学原理,其中生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin System BAS)常用于蛋白芯片的检测中<sup>[7-9]</sup>。它具有高亲和力、高特异性等特点。另外,通过对靶标蛋白或检测探针标记生物素,将亲和素与纳米金、酶、核酸链等纳米或生物材料结合,进而与其它检测技术联用,如酪胺信号放大技术、滚环扩增技术和银增强技术等<sup>[2, 9, 10]</sup>。在传统的免疫学检测中, BAS 用于检测的基本方法可分为三大类。第一类是对检测探针或样品标记亲和素,称标记亲和素生物素法(LAB)。这是常规的生物素-亲和素检测方法;第二类以亲和素两端分别连接检测探针或样品和标记生物素,称为 BAB 法,或桥联亲和素-生物素法(BRAB)。这种检测方法放大效果不明显因而并不常用。第三类是将亲和素与酶标生物素反应形成亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,再与生物素化的抗体接触时,将抗原-抗体反应体系与 ABC 标记体系连成一体,称为 ABC 法,这种方法主要适用于酶标检测。由于这种方法无法包埋荧光分子,并且操作较为繁琐,因而不适用于荧光分子的检测。

本研究合成了一种新型生物素-亲和素偶联检测探针分子,并以反相蛋白芯片为研究模式来考察合成探针的检测效果。在实验中,首先对反相蛋白芯片的制备条件进行了优化,包括点样缓冲液的选择、固定蛋白的活性等。最后,将生物素-亲和素偶联探针用于反相蛋白芯片的检测,得到较好的检测效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

醛基玻片购自美国 CEL Associates, Inc., 鼠 IgG(Rat IgG, RIgG)和生物素-羊抗鼠 IgG(Biotin-Goat anti-RatIgG, B-GAR)均购自北京天来生物医学科技有限公司,亲和素和链亲和素-Cy3 购自美国 Sigma 公司,牛血清白蛋白购自北京拜尔迪生物公司,去离子水为美国 Pall 公司纯水仪制备,其他试剂均为分析纯级。

SmartArrayer48 生物芯片点样仪和晶芯

LuxScan-10K/A 微阵列扫描仪均购自北京博奥生物芯片有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物素-亲和素偶联探针(Biotin-Avidin Goat Anti-Rat IgG, BA-GAR)的制备

将亲和素(1 mg/mL)溶液缓缓加入到生物素-羊抗鼠 IgG 溶液中,按一定比例混合反应 2 h,每隔 20 min 振荡 1 次,然后放入 4℃ 反应 12 h,最后将制备好的生物素-亲和素偶联探针 4℃ 下保存。

#### 1.2.2 反相蛋白芯片的制备

取醛基玻片,在表面粘贴芯片围栏;然后采用生物芯片点样仪将不同浓度鼠 IgG 按照微阵列形式点在醛基玻片表面,点直径 150 μm,点间距 700 μm,然后将制备好的芯片放在 4℃ 下过夜进行蛋白的固定;待蛋白固定完成后,在芯片表面加入 BSA(10 mg/ml)溶液反应 1 h 以封闭芯片表面蛋白的非特异性结合位点;然后用 PBST 洗液(pH 7.4, 0.5% Tween 20)清洗芯片 3 次,每次 15 min,氮气吹干;最后,将制备好的蛋白芯片放在湿盒中,4℃ 保存;

#### 1.2.3 反相蛋白芯片的检测

在芯片表面加入生物素-羊抗鼠 IgG(稀释比例为 1:100)或者生物素-亲和素偶联检测探针 20 μL,室温反应 1 h;清洗芯片之后,加入链亲和素-Cy3 20 μL,室温避光反应 1 h,目的是减小光对荧光分子的漂白作用;洗片后,采用生物芯片扫描仪读取图像,扫描波长为 532 nm;然后用扫描仪配套软件提取相应的数据。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物素-亲和素偶联探针检测技术的原理

生物素-亲和素偶联探针检测的原理为每个亲和素具有 4 个生物素结合位点,可以结合 4 个生物素-抗体分子。另外,每个抗体蛋白表面具有多个氨基,可以标记多个生物素基团。因此当亲和素与生物素-抗体结合后,与未偶联的生物素-抗体相比每个偶联探针分子上就连上 4 倍以上的生物素基团,进而结合更多的亲和素-Cy3 荧光分子,导致荧光信号得到放大。如图 1 所示,当固定鼠 IgG 的蛋白芯片与生物素-亲和素偶联探针反应后,由于生物素-亲和素偶联探针携带有更多的生物素分子,因而可以结合更多的亲和素-Cy3 荧光分子,从而使得检测信号得到增强,灵敏度得到提高。

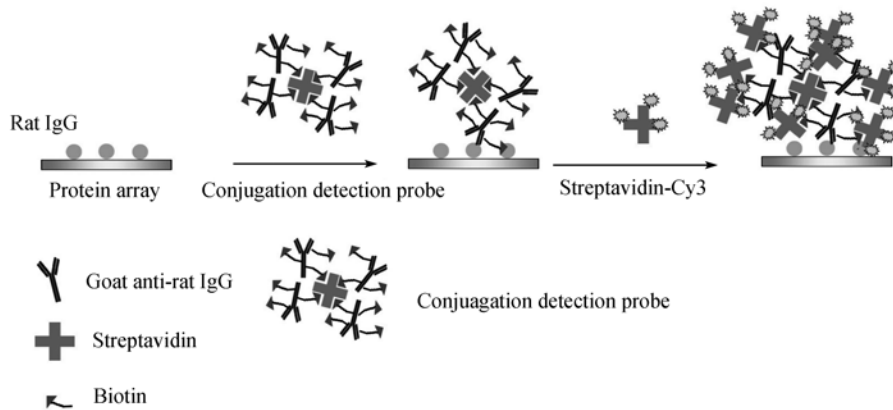


图 1 生物素-亲和素偶联探针检测原理图

Fig. 1 Schematic illustration of protein microarray detection process using biotin-avidin conjugation detection probe

表 1 制备生物素-亲和素偶联探针采用的生物素-羊抗鼠和亲和素的体积

Table 1 The volume of B-GAR and avidin used to prepare the biotin-avidin conjugation probe

Tube	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-GAR (1:1)/ $\mu\text{L}$	0.1	0.1	0.1	0.21	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2
Avidin (1 mg/mL)/ $\mu\text{L}$	0	0.36	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18

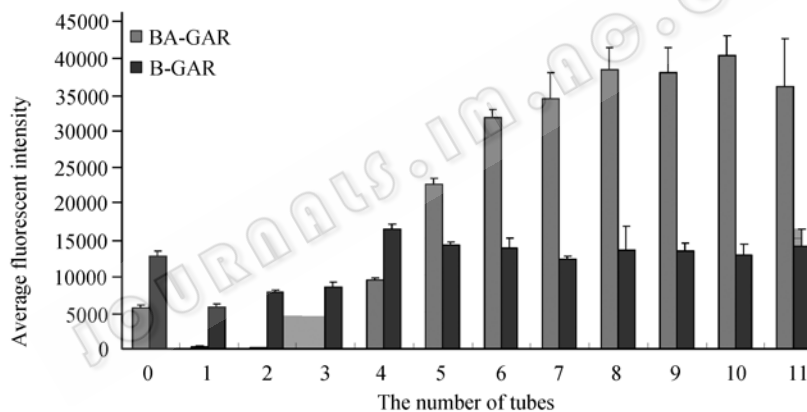


图 2 生物素-亲和素偶联探针组分比例的优化

Fig. 2 Optimization of the proportion of biotin to avidin molecules during the synthesis of biotin-avidin conjugation probe

按照表 1 将生物素-羊抗鼠 IgG 与亲和素按不同比例进行混合, 然后与鼠 IgG(1 mg/mL)芯片反应, 以观察不同生物素/亲和素比例与检测信号强度之间的关系。从图 2 中可以看出, 随着生物素-亲和素比例的增加, 荧光值逐渐升高。当亲和素浓度为 0 时, 生物素-羊抗鼠 IgG 结合到芯片表面产生荧光信号。而当生物素-亲和素比例从小变大的初始阶段, 荧光信号出现减弱甚至消失, 这说明溶液中少量的生物素-羊抗鼠 IgG 与过量亲和素结合失去活性。当生物素-羊抗鼠 IgG 的量增加到 0.4  $\mu\text{L}$  时, 荧光值信号并开始不断增加, 这说明溶液中开始形成生物素-亲和素偶联探针的数量越来越多, 从而可以结合越来越多的荧光素-Cy3 荧光分子。当生物素-羊抗鼠 IgG 和亲和素的用量分别达到 2.8  $\mu\text{L}$  和 0.18  $\mu\text{L}$  时,

信号值达到最大, 为单独采用生物素-羊抗鼠产生信号值的 8 倍左右。而再增加生物素-亲和素比例, 荧光值出现减小, 原因可能为生物素-羊抗鼠 IgG 开始过量, 与生物素-亲和素偶联分子竞争结合芯片表面的靶标分子有关。因此生物素-羊抗鼠 IgG 和亲和素的用量在 2.8  $\mu\text{L}$  和 0.18  $\mu\text{L}$  时为最佳, 此用量用作生物素-亲和素偶联探针分子的合成。另外, 以上结果也证明合成的生物素-亲和素偶联探针可以显著提高信号强度, 从而能够提高检测的灵敏度。

## 2.2 反相蛋白芯片制备条件优化

### 2.2.1 点样缓冲液的优化

为了验证生物素-亲和素偶联探针的检测效果, 以反相蛋白芯片为研究模式。其中点样是芯片制备的第一步, 而点样缓冲液是决定样品点形状、防止

非特异性吸附和保持固定蛋白活性的重要因素。因此在本实验中,对点样缓冲液进行了系统的优化,将不同浓度的鼠 IgG 分别用 PBS 和 BSA 点样缓冲液稀释后固定在芯片表面制备蛋白芯片,对两种点样缓冲液制备芯片的非特异性吸附和检测效果进行比较以进而选出较好的点样缓冲液。

图 3A 为分别用 BSA 和 PBS 点样缓冲液(含 20% 甘油)制备反相蛋白质芯片对亲和素-Cy3 非特异性吸附比较的结果图。本实验先在芯片上固定鼠 IgG,浓度分别为 0、0.98、1.95、3.91、7.82、15.63、31.25、62.5、125、250、500  $\mu\text{g/mL}$ ,最后一行为阳性对照生物素-羊抗鼠 IgG(稀释比例为 1:10),芯片直接和链亲和素-Cy3 反应。从图中可以看出,与 PBS 制备的芯片相比,BSA 缓冲液制备的芯片微阵列点的荧光信号明显减弱。另外,数据分析结果如图 3B 所示,随着鼠 IgG 浓度的增加,非特异性吸附的链亲和素-Cy3 分子不断增加,导致荧光值不断增加。值得注意的是,在鼠 IgG 浓度为 0 时,荧光值出现升高,出现假阳性,如图 3B,而 BSA 制备蛋白芯片却没有出现这种情况,这可能为每个样品点的疏水性和亲水性不同决定的。另外,BSA 点样缓冲液的蛋白芯片上荧光值明显小于 PBS 点样缓冲液制备蛋白芯片,这表明以 BSA 作为点样缓冲液可以减小生物分子的非特异性吸附。

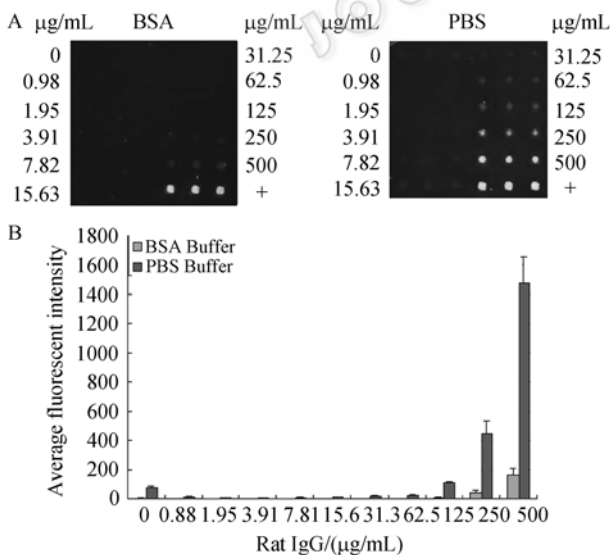


图 3 BSA 和 PBS 点样缓冲液制备反相蛋白芯片对链亲和素-Cy3 的非特异性吸附比较

Fig. 3 Comparison of non-specific adsorbed Streptavidin-Cy3 molecules on the protein microarray prepared by BSA and PBS buffer

(A) The fluorescent image of non-specific adsorbed Streptavidin-Cy3 molecules; (B) The average fluorescent intensity of non-specific adsorbed Streptavidin-Cy3 molecules

## 2.2.2 对不同点样缓冲液制备蛋白芯片的检测

接下来进一步对这两种缓冲液制备的芯片进行了检测。芯片上分别固定 BSA 和 PBS 稀释的鼠 IgG,浓度分别为 0、0.98、1.95、3.91、7.82、15.63、31.25、62.5、125、250、500  $\mu\text{g/mL}$  的鼠 IgG,然后分别与生物素-羊抗鼠 IgG 和链亲和素-Cy3 作用,最后用扫描仪检测。

如图 4A 所示,用 BSA 点样缓冲液制备芯片的微阵列点形状明显优于用 PBS 点样缓冲液(含 20% 甘油)的微阵列点。图 4A 右图为 PBS 点样缓冲液制备芯片图,可以看出随着鼠 IgG 浓度逐渐减小,荧光信号逐渐减弱。另外由于溶液中的蛋白浓度减少并且甘油性质比较粘稠,点在芯片表面的蛋白因甘油的作用自动积聚使得点的形状逐渐缩小。当鼠 IgG 浓度下降到 15.63  $\mu\text{g/mL}$  时,每个点的荧光信号不再明显。然而在鼠 IgG 浓度为 0 时,仍然出现微弱的假阳性信号,这与图 3 的结果一致。图 4A 左图为 BSA 点样缓冲液制备的芯片,可以看出随着鼠 IgG 浓度的降低,荧光信号逐渐减弱。然而与 PBS 点样缓冲液制备不同的是,每个点的形状并没有明显的变化。这可能是由于 BSA 的介质作用,使得 IgG 分子分散开并均匀固定在每个点的表面。当鼠 IgG 浓度下降到 1.95  $\mu\text{g/mL}$  时,仍然可以观察到荧光信号,并且鼠 IgG 浓度为 0 时,没有出现假阳性信号。

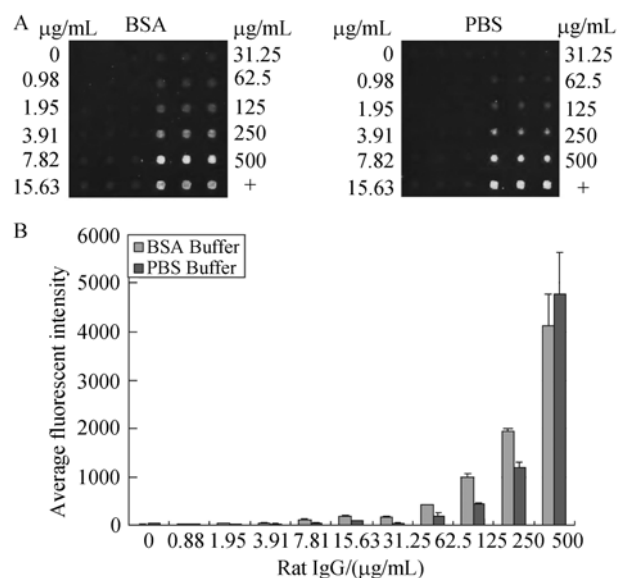


图 4 BSA 和 PBS 制备反相蛋白芯片的检测灵敏度比较  
Fig. 4 Comparison of detection sensitivity of the protein microarray prepared by BSA and PBS buffer

(A) Fluorescent images of protein microarray prepared by BSA and PBS buffer; (B) The average fluorescent intensity of protein microarray prepared by BSA and PBS buffer

从图 4B 中可知, 随着鼠 IgG 浓度的降低, BSA 点样缓冲液制备的微阵列点荧光值减小比较缓慢, 其结果提高了检测限, 为  $1.95 \mu\text{g/mL}$ , 而 PBS 点样缓冲液制备蛋白芯片的检测限只有  $15.63 \mu\text{g/mL}$ 。以上结果说明用 BSA 点样缓冲液有利于 IgG 分子均匀分布和保持固定蛋白的活性, 同时均匀分布的结果可以保证 IgG 分子能够被结合更多的检测探针分子, 从而提高检测限。另外, 良好的微阵列点形状不仅便于进行数据处理, 而且提高数据的可信性。然而以含有甘油的 PBS 作为点样稀释液, 聚集的蛋白分子减小固定面积, 导致出现空间位阻, 因而限制其与检测探针分子的结合能力。

综上, 用 BSA 做点样缓冲液具有以下优点: 减小非特异性吸附、有利于保持微阵列点形状和蛋白的活性并提高检测限。因此在以后的实验中均采用 BSA 作为点样稀释缓冲液进行蛋白芯片的制备。

### 2.2.3 生物素-亲和素偶联探针对反相蛋白芯片的检测

从图 5A 中可以看出, 随着鼠 IgG 浓度的增加, 荧光信号强度逐渐增强, 而采用生物素-亲和素偶联探针的检测信号强度要明显高于生物素-羊抗鼠 IgG 的检测信号强度。但是生物素-亲和素探针检测的问题是背景相对较高, 原因可能为非特异性吸附到芯片表面的生物素-亲和素偶联探针同样会结合更多的亲和素-Cy3 荧光分子。接下来对数据进行进一步处理, 如图 5B 所示。与生物素-羊抗鼠 IgG 检测结果相比, 生物素-亲和素偶联探针分子的检测信号值明显得到升高, 并且数据具有较好的一致性,  $CV < 12\%$ , 检测限可以达到  $0.125 \mu\text{g/mL}$ , 而采用生物素-羊抗鼠 IgG 的检测限为  $0.49 \mu\text{g/mL}$ 。然而与图 2 中信号强度最大可以提高 8 倍相比, 在本实验中检测限只提高 4 倍, 其原因是非特异性吸附的生物素-亲和素偶联探针分子导致背景升高、信噪比降低, 这也是所有信号放大技术提高灵敏度所共同遇到的问题, 因此如何在提高信号强度的同时保证较低的背景是今后发展高灵敏度蛋白质芯片检测技术急需解决的一个问题。

## 3 结论

本研究结果表明 BSA 点样缓冲液具有减小非特异性吸附、有利于保持微阵列点形状和蛋白活性等

优点, 适用于反相蛋白芯片的制备。另外, 合成的新型生物素-亲和素偶联探针具有合成简单、价格便宜等优点, 它还可以很方便地与银增强技术、酪胺信号放大技术和滚环放大技术等信号放大技术联用, 进一步提高检测的灵敏度, 有望成为一种新型蛋白芯片免疫学测定方法。

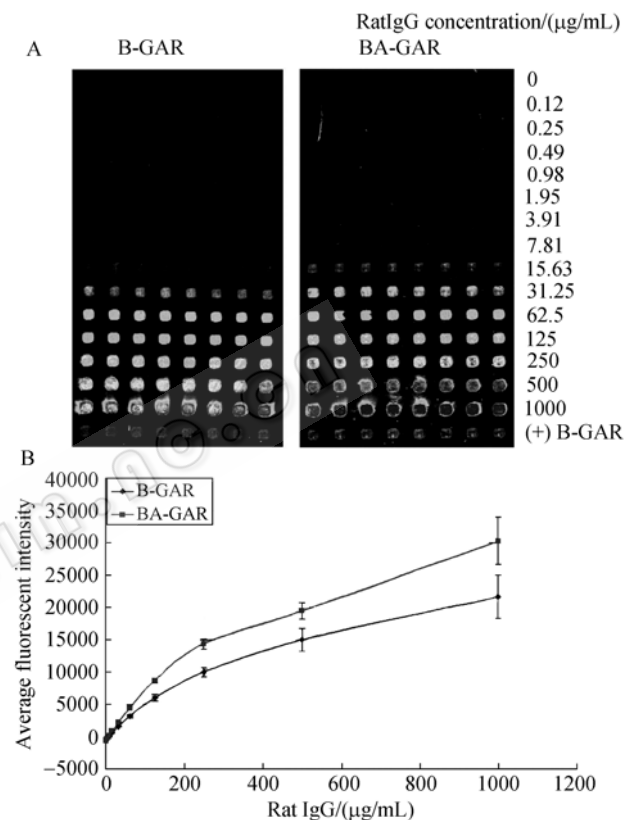


图 5 生物素-亲和素偶联探针对不同浓度鼠 IgG 的检测

### Fig. 5 Detection of different concentrations of rat IgG using biotin-avidin conjugation probe

(A) The fluorescent detection images of Rat IgG using biotin-avidin conjugation probe; (B) The linear relationship between the average fluorescent intensity and rat IgG concentrations

## REFERENCES

- [1] Kung LA, Snyder M. Proteome chips for whole-organism assays. *Nature*, 2006, 7: 617–622.
- [2] Kingsmore SF. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(4): 310–320.
- [3] Gulmann C, Sheehan KM, Kay EW, *et al.* Array-based proteomics: mapping of protein circuitries for diagnostics, prognostics, and therapy guidance in cancer. *J Pathol*, 2006, 208(5): 595–606.
- [4] Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, *et al.* Differential

- binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(11): 4730–4735.
- [5] Yu X, Xu D, Cheng Q. Label-free detection methods for protein microarrays. *Proteomics*, 2006, **6**: 5493–5503.
- [6] Yu X, Xu D, Xu D, *et al.* An impedance array biosensor for label-free detection of multiple antigen-antibody binding reactions. *Frontiers in Bioscience*, 2006, **11**: 983–990.
- [7] Wang Z, Lee J, Cossins AR, *et al.* Microarray-based detection of protein binding and functionality by gold nanoparticle probes. *Anal Chem*, 2005, **77**(17): 5770–5774.
- [8] Liu ZH, He W, Han X, *et al.* Preparation of agarose Film-protein microarray and its application in detection of Hepatitis B virus antigens. *China Journal of Analytical Chemistry*, 2007, **35**(5): 162–165.
- 刘志红, 何为, 韩旭, 等. 琼脂糖凝胶蛋白芯片基的制备及应用. *分析化学*, 2007, **35**(5): 162–165.
- [9] Zhou SP, Wang XR, Qin SY, *et al.* Preparation and application of gel chip. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, **19**(5): 577–580.
- 周升平, 王欣荣, 秦胜营, 等. 凝胶基片的制备与应用研究. *生物工程学报*, 2003, **19**(5): 577–580.
- [10] Sheehan KM, Calvert VS, Kay EW, *et al.* Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(4): 346–355.

## 生物炼制技术及其应用于生物能源开发

生物炼制技术(Biorefinery techniques)涉及面很广,既有传统性,又有现代性,应用面非常广泛,传统的生物制酒、制酱油、制豆腐乳等在我国已有悠久的历史。现代的生物炼制技术这些年有较快的发展,如经基因技术改造或重组的“运动发酵单胞菌”用于生产乙醇;又如经基因工程技术重组受体菌即“工程毕赤酵母”高效生产某些酶制剂产品用于发展饲料产业、乳品产业等;或建构新型“生物反应器”生产所需要的产品如各种酶制剂等。80年代初在国际上首次提出“生物炼制”(Biorefinery)的概念之后,引起国际上科技人士重视,并召开相关方面的国际学术会议,2007年在我国(北京)举行首届生物炼制国际学术讨论会,下一届将在美国举办。此技术有一个共同点就是利用农业各类废弃物以及淀粉类、纤维素类为原料生产各类产品如燃料乙醇等。日本、加拿大、巴西等国家要大力发展生物炼制产业;美国能源部总结过去用粮食主要是玉米为原料发展生物能源,如燃料乙醇等,因涉及粮食短缺而产生种种负面效应,在国际上引起种种争战,特别是粮食安全受到巨大的影响。为此,目标必须转移,即重点是利用非食用物质生产纤维素乙醇作为下一代燃料乙醇,如作物秸秆等农业废弃物、锯末等工业废弃物以及柳枝稷等特殊能源作物,已决定在四年内投资1.14亿美元建立四个小规模纤维素乙醇工厂,将为建造大规模商业化生产纤维素乙醇工厂做准备,如果目标实现的话,则可达到再不与汽车争粮;然而,纤维素降解问题仍是一个必须突破的难关,如何有效提高纤维素酶(Cellulase)的降解活性呢?有待做进一步的深入研究。

发展纤维素乙醇的关键在于纤维素酶的高效降解活性。美国加州理工学院化工和生化系研究人员正在设计制造更有效的纤维素分解酶。按美国能源安全法案,2029年美国每年至少生产360亿加仑可再生燃料,纤维生物液态燃料要占到160亿加仑,这计划需要高效、低廉的分解纤维素酶,尽管有难点,但正在朝这个方向努力。

我国一直对生物质能源的开发和应用颇为重视。其中燃料乙醇生产能力已达到102万t/年,其他如乳酸、谷氨酸、柠檬酸等产品的生产规模均有所扩大,表明生物炼制技术应用的扩大。在河北省,研究人员通过研究实践找到了年产3000t秸秆纤维乙醇的关键技术,从秸秆中获取单糖,得率由40%提高到43%(按吨计);酶成本大为降低1500元/吨乙醇;建构了木糖生产乙醇的“工程菌”,发酵生产乙醇由原来的4%提高到6%以上;糖醇转化率水平已达91%,处于国际先进水平;中国科学院微生物研究所正在与美国华盛顿州立大学生物产品及生物能源研究中心合作运用生物炼制技术开发纤维素乙醇产品将取得新进展。

总之,生物炼制技术生产生物能源如燃料乙醇在我国处于国际先进水平,表明生物炼制技术将为服务我国“替代能源”,又不与人争粮、不与粮争地做出重要贡献。

(柯为)