

横向塞曼激光器在生物分子检测中的应用研究*

余兴龙 蒋 弘 王浩娟 殷纯永
(清华大学精密系,北京,100084)

赵乐群 朱圣庚
(北京大学生命科学学院,北京,100871)

摘要: 首先简述了表面等离子体共振原理、激发表面等离子体共振的条件和产生共振时反射光的相位变化,再对横向塞曼激光器的应用进行了分析。接着,基于相位检测,以横向塞曼激光器为光源,建立了生物分子相互作用检测实验装置,并以蓖麻毒素和羊抗小鼠抗体为样本进行了实验。实验表明:检测灵敏度高;在整个光路中,P光与S光完全重合,满足共光路原则,对空气折射率和其它各种扰动具有很好的自适应性,检测稳定性好;激光稳频精度可达 3.5×10^{-10} ,与光强检测法相比,检测可靠性更高。横向塞曼激光器是基于 SPR 原理的生物分子相互作用相位检测的理想光源。

关键词: 横向塞曼激光器 等离子体共振(SPR) 相位检测 生物分子相互作用

Study on the application of transverse Zeeman laser in detection of biomolecular interaction

Yu Xinglong, Jiang Hong, Wang Haojuan, Yin Chunyong

(Department of Precision Instrument and Mechanology, Tsinghua University, Beijing, 100084)

Zhao Lequn, Zhu Shenggen

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract: The principle of SPR (Surface Plasmon Resonance), the energisation condition of SPR phenomenon and the phase variation of the reflected light in SPR are briefly presented. The application of transverse Zeeman laser is also analyzed. The equipment based on transverse Zeeman laser is set up to detect the phase variation in biomolecular interaction and a lot of experiments are made upon the interaction of ricin and its antibody. The experiments show that the optical path of P light coincides with that of S light, which is self-adaptive to the disturbance of the air index or any others and has high stability. The phase detection has higher reliability than the intensity detection, with the precision of laser frequency stability up to 3.5×10^{-10} . Transverse Zeeman laser is the ideal light source of phase detection in biomolecular interaction based on SPR principle.

Key words: Zeeman laser surface plasmon resonance (SPR) phase detection biomolecular interaction

引 言

生命科学研究已经深入到了分子水平,并正从研究单个生物分子发展到研究生物分子相互作用,从研究生物分子的静态结构发展到研究动态变化,例如蛋白-蛋白、核酸-蛋白、药物-蛋白、核酸-核酸和抗原-抗体等。探测和分析生物分子间的相互作用,不仅对研究生命发生发展的基本机制,揭示有关生命现象,而且对研究疾病的发生发展机理,寻找新的治疗途径和新的

* 国家自然科学基金资助。

特效药都具有十分重要的意义,成为生物技术的关键之一。

传统的 X 射线光电子光谱仪(XPS)、俄歇电子能谱仪(AES)和次级离子质谱仪(SIMS)不仅费用昂贵,而且样品需置于高真空环境下,难以满足要求。后来发展起来的傅里叶变换红外分光仪(FTIR)和动力学接触角检测仪(DCA),尽管可以用作为一种检测分析工具,但是受到测量过程中的有关限制,也难以完全满足要求。80 年代末,出现了一种运用表面等离子体谐振原理检测生物分子相互作用的技术,其设备简单,样品无需进行荧光或同位素标记,可实时监测,倍受青睐,得到迅速发展^[1]。我们首次使用了塞曼双频激光器和共光路干涉仪系统进行这项研究,提高了测量灵敏度和可靠性,有很好的应用开发前景。

1 基本原理

2.1 激发 SPR 的条件

存在于金属或半导体表面的自由电子的行为类似自由电子气,表面等离子体共振就出现在其表面,表现为被边界上的外来电场所激发的表面电荷的量子振动,与声波类似,是一种纵波^[2],故又称其为表面等离子波(Surface Plasma Wave)。图 1 所示为激发等离子体波的 3 层系统模型^[3],其中,金膜厚度 d 为 30nm ~ 50nm,远远小于光波长,激发源通常选用激光。激发非辐射表面等离子体波的条件是:

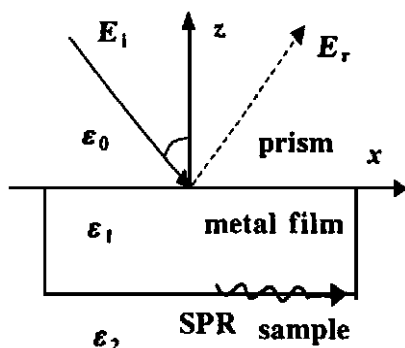


Fig. 1 Three-layers model of exciting plasma waves

$$K_x > \sqrt{\epsilon_0} / c \tag{1}$$

式中, ϵ_0 为介质 0 的介电常数, ω 为入射光频率, c 为光速, K_x 为 x 方向的光波波矢。

在半无限金属表面上,对于所有的 K_x 值,都有对应的非辐射等离子体色散关系:

$$K_x = (\epsilon_0 / c) [\epsilon_0 / (\epsilon_0 + \epsilon_1)]^{1/2} \tag{2}$$

图 2 所示的是不同介质界面上的等离子体“薄板”的色散曲线。由图可见,无论是在介质 0/1 的界面上,还是在 1/2 的界面上,所有频率下的等离子体的色散曲线只出现在相应光波色散曲线的右侧,即光波矢始终小于等离子体波矢,不能满足(1)式,入射光不能激发非辐射表面

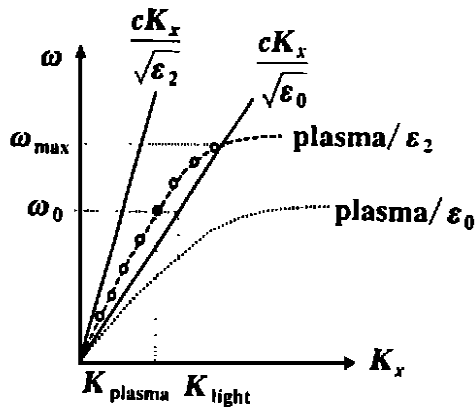


Fig. 2 Dispersion curves of nonradiative plasma waves for both boundaries

等离子体波。但是当 $\epsilon_2 < \epsilon_0$ 并满足 $\epsilon_0 < \epsilon_{max}$ 时,介质 1/2 界面上的表面等离子体波色散曲线的一部分出现在介质 0 中光波色散曲线的左侧,即光波矢大于等离子体波矢,满足(1)式,入射光可以在 1/2 界面上激发等离子体波。激发表面等离子体共振的实质在于将光波以倏逝波的形式从 0/1 界面传播到 1/2 界面,入射光的能量转移成表面等离子体的共振,反射光的强度、相位均发生改变。

在特定的入射角 θ 下,光波完全以倏逝波的形式转移成等离子体共振波,该角度称为共振角,记作 θ_{SPR} 。这时,反射光的光强和相位均发生剧烈变化,相位变化的灵敏度更高^[4]。对

于简单的单层膜模型, P 偏振光反射率为:
$$r_P = \frac{r_{01}^P + r_{12}^P e^{2ik_{1z}d}}{1 + r_{01}^P r_{12}^P e^{2ik_{1z}d}} \quad (3)$$

式中, r_{01}^P, r_{12}^P 分别为 0/1 和 1/2 界面的反射率。

其中, $r_{j,j+1}^P = \frac{x_j^P - x_{j+1}^P}{x_j^P + x_{j+1}^P} \quad (j = 0,1); \quad x_j^P = \frac{j}{k_{jz}} \quad (j = 0,1,2); \quad k_{jz} = \sqrt{(n_j/c)^2 - k_{0x}^2}$

$(j = 0,1,2); \quad k_{0x} = k_0 \sin \theta_0 / c; \quad \theta_0$ 为入射角度。

上述公式计算出的反射率为复数,其幅值的平方表示了反射光的相对光强,其相角则代表了反射光的相位变化。

1.2 横向塞曼激光器用作光源激发 SPR

横向塞曼激光器能直接输出正交偏振态、低频差的线偏振光^[5],即发出的同一光束中包含纵向线偏振光(又称 P 偏振光)和横向线偏振光(又称 S 偏振光)两个分量。由于表面等离子波是一种纵波,所以在满足一定条件下,只有 P 偏振光能激起等离子体共振,即激发表面等离子体波,而 S 偏振光不能激发表面等离子体波。同时, P, S 偏振光的频差可在几十到几百千赫范围内调节。选用低频差的激光器有利于相位细分,提高分辨率(见实验装置部分)。因此,在基于 SPR 相位检测法中,横向塞曼激光器是十分理想的光源。

2 实验装置

如图 3 所示,基于 SPR 的生物分子相互作用相位检测系统由横向塞曼激光器 1,传感棱镜 2,样品槽 6,检偏器 7,13,光电接受器 8,12,前置放大器 9,11,数字相位计 10 和计算机 14 组成。传感棱镜的底面镀金膜 3 的厚度为 30nm ~ 50nm,金膜上覆盖葡聚糖耦联层,其上“挂接”配体(如蛋白、核酸、抗原等),这层称为传感层 4。

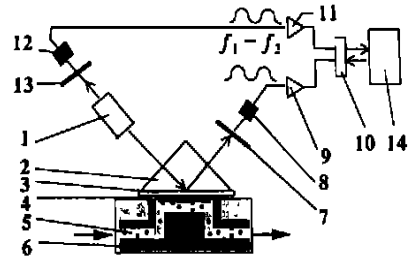


Fig. 3 Scheme of phase detection of biomolecular interaction

激光器射出的“尾光”通过检偏器 13 后,有固定频差的 S, P 偏振光拍频转换成电信号,经放大后输入相位计 10。这路信号没有相位变化,作为参考信号。由激光器输出端射出的光透过传感棱镜 2 射到与金膜 3 的界面上,光波以倏逝波的形式传播到金膜与传感层 4 的界面上,激发等离子体共振。共振发生时, P 偏振光的相位变化,而 S 偏振光几乎不变,两分量之间产生相位差。样本 5 中的生物分子与传感层上的分子结合时,反射光的相位随之变化。结合强度和速率不一样,相位变化也不一样。这路 S, P 偏振光经过与“尾光”相同的处理,输入相位计,即为测量信号。

设激光器发出的 P, S 偏振光为:

$$U_P = A_P \cos(\omega_P t + \varphi_P) \text{ 和 } U_S = A_S \cos(\omega_S t + \varphi_S) \quad (4)$$

又设测量光路中经反射后 P, S 偏振光为:

$$U_P = A_P \cos(\omega_P t + \varphi_P + \Delta\varphi_P) \text{ 和 } U_S = A_S \cos(\omega_S t + \varphi_S + \Delta\varphi_S) \quad (5)$$

式中, $\Delta\varphi_P$ 和 $\Delta\varphi_S$ 分别为 P, S 偏振光的相位变化。那么,拍频后的参考信号和测量信号分别为:

$$U_{ref} = A_{ref} \cos[(\omega_P - \omega_S)t + (\varphi_P - \varphi_S)] \text{ 和 } U_{mea} = A_{mea} \cos[(\omega_P - \omega_S)t + (\varphi_P - \varphi_S) + (\Delta\varphi_P - \Delta\varphi_S)] \quad (6)$$

两路信号同时被送入相位计处理,可得到相位差($\phi_p - \phi_s$)。由于 S 偏振光不能激发等离子体共振, ϕ_s 近似为 0,所以,实际相位差为 ϕ_p 。检测出反射光的相位变化,就可以了解生物分子相互作用的情形,从中获取生物信息。

3 实验研究

实验样品为蓖麻毒素(一种核糖体失活蛋白,有很强的毒性作用,用其构建的免疫毒素可用于杀伤肿瘤细胞,抗蓖麻毒素单抗可作蛋白中毒的解毒剂。)与其单克隆抗体——单抗小鼠抗体(简称“抗体”)。实验前将蓖麻毒素“挂”到传感棱镜的耦联层上,构成传感层;把抗体稀释成 1:20 溶液。实验时,先把 PBS 缓冲液缓缓注入样本池,清洗样本池和传感面;再将抗体溶液注入,使其速率均匀地流过样本池。当样本注入完后,紧接着注入缓冲液,而后注入洗脱液,使抗体与蓖麻毒素解离。在溶液流动过程中,抗体与传感面上的蓖麻毒素结合或解离,相位计实时将反射光的相位变化鉴别出来,计算机同步读入处理。该过程可持续进行,结果见图 4。

从图中可以看出,当蓖麻毒素与单抗小鼠抗体结合时,传感面上的折射率不断增加,对应的相位变化随之显著增加,直到平衡。这段曲线呈指数上升,从中可以得出结合时间常数为 25s。加入缓冲液后,传感面上没有变化,曲线不变。当加入洗脱液后,结合分子被解离,传感面上的折射率变化,随之相位也变化,曲线按负指数变化,解离时间小于结合时间。生物学家根据这些变化,在大量实验研究的基础上就可以获取相关信息对生命现象作出解释,也可根据药物与蛋白的作用过程进行药物筛选和开发新药。

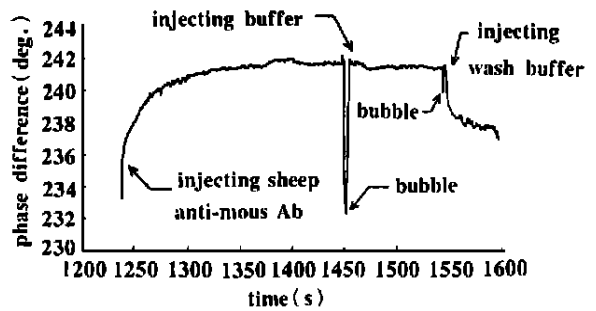


Fig. 4 Interaction curve between ricin and its antibody

加入缓冲液后,传感面上没有变化,曲线不变。当加入洗脱液后,结合分子被解离,传感面上的折射率变化,随之相位也变化,曲线按负指数变化,解离时间小于结合时间。生物学家根据这些变化,在大量实验研究的基础上就可以获取相关信息对生命现象作出解释,也可根据药物与蛋白的作用过程进行药物筛选和开发新药。

4 结 论

实验得出:(1) 在整个光路中,P 光与 S 光完全重合,满足了共光路原则,对空气折射率和其它扰动具有很好的自适应性,提高了测量精度。(2) 横向塞曼激光器的稳频程度很高,可达 3.5×10^{-10} ,相比较光强波动较大,至少在 1% 左右,显然相位检测法比光强检测法可靠性更高。因此,横向塞曼激光器是基于 SPR 原理的生物分子相互作用相位检测的理想光源。

参 考 文 献

- 1 Davies J. Nanobiology,1994;3:5 ~ 16
- 2 Raether H. Surface Plasmon Oscillation and There Applications. Physics of thin films. New York:Academic Press,1977: 145 ~ 261
- 3 Nelson S G,Johnston K S, Yee S S. Sensors and Actuators B,1996;35 ~ 36:187 ~ 191
- 4 郭继华,刘 通,神 帅. 光学学报,1996;16(9):1322 ~ 1325
- 5 施 展,郭彦珍. 华东工业大学学报,1995;17(4):101 ~ 105

* * *

作者简介:余兴龙,男,1948 年 2 月出生。副教授。主要从事激光技术在生物医学中的应用研究和生物医学仪器的研究开发。