技术方法

文章编号:1000-5404(2005)08-0802-02

单克隆抗体修饰玻璃表面制备蛋白质芯片的初步研究

Surface modification of glass slides by monoclonal antibody for protein microarray fabrication

江凌晓[1],郭兆彪[2],陈泽良[2],王 津[2],王红霞[2],俞守义[1],杨瑞馥[2] ([1]南方医科大学预防系流行病学教研室,广州 510515;[2]军事医学科学院微生物流行病研究所,北京 100071)

提 要:目的 探讨应用单克隆抗体修饰玻璃表面制备蛋白质芯片的方法。**方法** 用不同浓度的抗6X His单克隆抗体修饰玻璃表面,从蛋白质固定效率和固定蛋白质的反应活性两个方面,对修饰效果进行评价。**结果** 初步观察到单克隆抗体修饰玻片对蛋白质的固定量较醛基化修饰的玻片没有明显增加,但其固定蛋白质中有反应活性的蛋白质的比例较高。**结论** 单克隆抗体修饰的玻片也适合于制备蛋白质芯片。

蛋白质芯片技术是一种高通量、高灵敏度、微型化、自动化的蛋白质分析技术,可用于蛋白质表达谱分析、抗原抗体筛选、药物靶标筛选、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白与小分子之间的相互作用等许多领域[1]。该技术包括4大技术环节,其中蛋白质芯片的制备是最基础的起始环节。而固相载体的选择和修饰方法是这个基础环节中的基础,是制备高质量蛋白质芯片的关键问题[2]。本研究旨在探讨应用单克隆抗体修饰玻璃表面的方法对蛋白质的固定量和反应活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

醛基化玻片为CEL公司产品,Cy5标记试剂盒为Amersham-Pharmacia Biotech公司产品,纯化的蛋白质样品C1、P1、P2、P3、P4及其免疫兔血清由本室保存(C1为不含6X His标记的融合蛋白,P1、P2、P3、P4为含6X His标记的融合蛋白)。Anti-6X His单克隆抗体,羊抗兔IgG为R&D公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 玻片的修饰 在醛基化玻片的表面分别覆盖浓度为2 μg/ml(S_1)、4 μg/ml(S_2)、8 μg/ml(S_3)、10 μg/ml(S_4)、20 μg/ml(S_5)的抗6X His单克隆抗体,室温2 h,洗净,吹干,存4 ℃备用。

1.2.2 蛋白质的荧光标记 蛋白质C1、P1及羊抗兔IgG的荧光标记依标记试剂盒操作手册进行(amersham pharmacia biotech)。

1.2.3 蛋白质的固定量之比较 将荧光标记蛋白质C1、P1用含40%甘油的PBS溶液稀释为10、20、40、80、100、200、400、800 μg/ml等浓度。取醛基化玻片(S_0)和不同浓度单克隆抗体修饰的玻片S_1(2 μg/ml)、S_2(4 μg/ml)、S_3(8 μg/ml)、S_4(10 μg/ml)、S_5(20 μg/ml)各1片,按上述浓度依次点样,每一样品重复8个点,室温避光干燥1 h后,4 ℃ 24 h。漂洗,吹干,扫描。

1.2.4 玻片上蛋白质的生物学活性比较 P1、P2、P3、P4和C1分别用含40%甘油的PBS溶液稀释为100 μg/ml。取醛基化玻片和不同浓度单克隆抗体修饰的玻片S_1(2 μg/ml)、S_2(4 μg/ml)、S_3(8 μg/ml)、S_4(10 μg/ml)、S_5(20 μg/ml)各1片,依次点样,每一样品重复8个点,在室温干燥1 h,4 ℃ 24 h。漂洗,3% BSA封闭1 h,漂洗,加第一抗体(免疫兔血清1∶500),室温孵育1 h,漂洗,加第二抗体(荧光标记的羊抗兔IgG 1∶1 000)室温避光孵育1 h后,漂洗,吹干,扫描。

2 结果

2.1 蛋白质的固定效率之比较

直接将一定量的荧光标记的蛋白质样品点在不同的玻片上时,如果蛋白质在某种玻片上的固定效率较高,则获取的荧光信号的强度也就较高。经扫描仪扫描,图像分析软件分析后发现,对同一张玻片而言,蛋白质点样浓度增加(即点样量增加),其所对应点的荧光信号强度也相应增加(表1)。蛋白质是否含6X His标记,它在6种玻片(抗6X His单克隆抗体处理或未处理)上的固定效率差别很小(表1)。

2.2 修饰玻片上蛋白质的生物学活性比较

直接将一定量的蛋白质点加在玻片上,再经过一定程序的生物学反应后,其获取的荧光信号的强度除受蛋白质固定量的影响外,还受固定蛋白质活性的影响。当固定在玻片上的蛋白质的量相同时,固定蛋白质中具有活性的蛋白质的分子数越

基金项目:国家"863"计划资助项目(2001AA223061)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2001AA223061)

作者简介:江凌晓(1972-),女,湖南省常德市人,博士研究生,讲师,主要从事微生物蛋白质芯片方面的研究。电话:(020)61648311
通讯作者:俞守义,电话:(020)61645312

收稿日期:2004-01-05;修回日期:2004-04-02

多，则获取的荧光信号的强度也就越高。由图 1 可知对含 6X His 标记的蛋白质而言，用 2 μg/ml 抗 6X His 单克隆抗体修饰的玻片与没有用抗 6X His 单克隆抗体修饰的醛基化玻片相比其相应蛋白质点的测量荧光值约高出 15%，且随着修饰玻片用单克隆抗体浓度的增加，玻片上相应点的荧光值有上升的趋势，但对不同的蛋白质而言其上升趋势不同。对不含 6X His 标记的蛋白质，玻片是否经抗 6X His 单克隆抗体修饰对其相应蛋白质点的测量荧光值的影响不大。

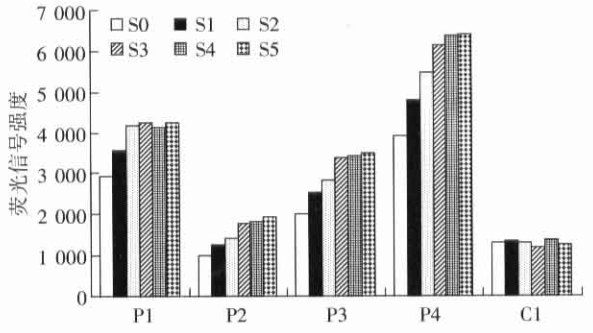


图 1　蛋白质活性比较

表 1　玻片对蛋白质固定量的影响

蛋白种类	玻片类型	蛋白质点样浓度(μg/ml)							
		10	20	40	80	100	200	400	800
C1	S_0	376	658	1138	2259	3529	6027	10323	18893
	S_1	352	689	1159	2148	3423	5737	10752	18319
	S_2	379	692	1148	2371	3679	6231	11050	19722
	S_3	358	566	1220	2497	3489	5516	12042	19338
	S_4	319	587	1204	2393	3327	6123	10696	18585
	S_5	345	565	1187	2296	3458	5747	12727	18960
P1	S0	308	596	1115	2213	2993	5831	11952	19045
	S_1	256	555	969	2034	2832	5694	11073	19352
	S_2	291	601	1126	2208	2967	5899	10992	19737
	S_3	357	664	1192	2307	3159	5979	10986	19333
	S_4	332	623	1133	2096	3264	5992	11382	18950
	S_5	294	572	1164	2281	3005	5844	12033	19942

3　讨论

蛋白质主要通过两种方式被固定在玻片上[4]：①物理吸附作用：即通过范德华力、疏水作用、氢键等吸附在玻片上。这种固定方式容易影响蛋白质的结构和活性，且大量蛋白质固定的不牢固；②化学键合作用：即通过各种化学方法处理玻片，从而在玻片表面形成不同的活性基团，再键合蛋白质上的相应配基。这种方式固定蛋白质的量较大且较牢固。但通过化学键固定在玻片上的蛋白质是方向各异的。因此有一部分蛋白质由于没有游离的反应域而在后继的处理过程中不与待测样品中的相应组分发生生物学反应。

对玻片表面的修饰不仅是为了使蛋白质样品能固定于玻片表面，同时还要使所固定蛋白保持其良好的生物学活性，这对于利用蛋白质芯片分析蛋白质的功能尤为重要。Zhu 等[5]就注意到了这一点，他们将蛋白质点加在经镍处理过的玻片上，通过融合蛋白质上的 6X His 结构与玻片上镍离子间的螯合作用使蛋白质以一定的方向固定在玻片上，从而大大提高了固定蛋白质中有活性的蛋白质分子的数量，增加了检测的灵敏度。其他学者也进行过类似的研究[6]。

玻片经抗 6X His 单克隆抗体修饰后，再点加带 6X His 标记的蛋白质，那么蛋白质的融合标记部分就将与玻片表面发生相互作用。由于此种抗原抗体反应是具有空间构象特异性的，因此通过抗原抗体反应固定在玻片表面的分子取向是较一致的，都是融合蛋白的融合标记部分与玻片表面发生相互作用，而反应域部分大多能游离出来，参与后继的生物学反应，即固定蛋白质中具有反应活性的蛋白质的分子数较多，故而相应蛋白质点的测量荧光值较高。应用上述原理还可将带有 GST 标记的融合蛋白固定在经抗 GST 单克隆抗体处理的玻片上。

在本研究中还提示经抗 6X His 单克隆抗体修饰玻片的荧光背景较高，因此应用此种修饰原理进行玻片修饰时，其修饰条件还有待进一步改进。

关键词：蛋白质芯片；单克隆抗体；表面修饰

中图法分类号：R394－33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Lee Y S, Mrksich M. Protein chips: from concept to practice[J]. Trends Biotechnol, 2002 20(12 Suppl): S14－S18.

[2] 马立人，蒋中华. 生物芯片[M]. 第 2 版. 北京：化学工业出版社，2002. 27－30.

[3] Afanassiev V, Hanemann V, Wolfl S. Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E66.

[4] Wilson D S, Nock S. Functional protein microarrays[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(1): 81－85.

[5] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, *et al*. Global analysis of protein activities using proteome chips[J]. Science, 2001, 293(5537): 2101－2105.

[6] Seong S Y. Microimmunoassay using a protein chip: optimizing conditions for protein immobilization[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(4): 927－930.

（编辑　龙　亮）