

新技术讲座

生物传感技术的新应用
——生物分子相互作用分析技术 (BIA)

沈 平

(发玛西亚生物技术 (中国) 有限公司北京代表处, 北京 100086)

摘要 BIA 技术 (biomolecular interaction analysis) ——生物分子相互作用分析技术是利用生物传感技术发展的全新概念. 生物分子间的相互作用可在免标记的状态得到实时的追踪和分析. 文章简单介绍 BIA 的原理和应用范围. 在以后的几期杂志中, 还将介绍一系列应用实例. 结合已发表的近 400 篇应用文献, 读者可以看到此新技术应用范围之广, 得到的信息之多, 堪称开创了生物技术的新纪元.

关键词 生物传感, BIA 技术, 生物大分子相互作用, 无标记实时分析

生物分子相互作用是生命的基础. 而研究和分析生物分子相互作用的机理及分子结构与功能之间的关系, 对我们在分子水平上了解生物体系至关重要. 众所周知, 任何生物学方面的研究都可归结至生物分子相互作用的研究. 近年来, 在分子水平上的功能研究技术大量涌现, 其中是由 BIACORE 公司发展的生物分子相互作用实时分析 (BIA) 技术尤为引人注目.

生物分子相互作用分析是利用最新的生物传感技术对二个或二个以上的生物分子间作用进行实时监测. 可测定的生物分子包括蛋白质, 多肽、核酸、多糖、磷脂及小分子如信号传导物、药物等. 分析物无需纯化或溶于水相而可在粗抽提液及附着于磷脂囊、病毒、细菌或真核细胞表面得以测定^[1,2].

1 BIA 技术的基本原理

BIA 的测定原理是基于物理光学现象, 即表面等离子共振 (surface plasma resonance, SPR) 监测传感片表面液体的折射率变化, 而这一变化和传感片表面所结合生物分子的质量成正比 (图 1)^[3]. 因此可在非标记的情况下监测生物分子间的相互作用. 用这一技术可以

回答的问题包括: a. 在什么条件下, 哪些生物分子有相互作用; b. 它们结合和解离的快慢程度; c. 它们结合的强度; d. 样品中有效成分的浓度为多少; e. 结合位点分析; f. 效应基团、辅助因子、分子修饰等对结合的影响; g. 复合物中不同成分对结合的影响.

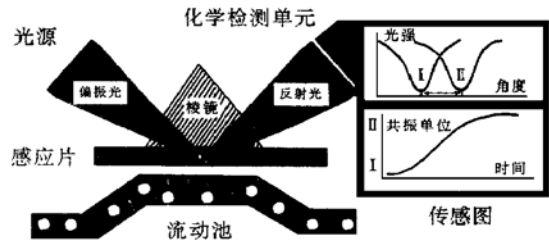


图 1 BIA 基本原理示意图
SPR 角度随传感片表面的蛋白质浓度的变化而改变, 从而产生感应信号.

整个仪器 (BIAcore 系列) 主要包括有: 传感片 (Sensor-Chip); 微射流卡盘 (IFC); SPR 检测器及一系列控制软件和结果评估软件.

当进行分子间相互作用分析时, 将其中一个反应物 (称为配体) 偶联在传感片上, 含有另一个反应物 (称作分析物) 的样品通过微

收稿日期: 1996-08-23, 修回日期: 1996-10-30

射流卡盘以恒定的流速通过传感片表面，分子间有结合反应而导致传感片表面分子浓度的变化将由 SPR 信号的改变而得到测定，并以共振单位 (RU) 作表达。

以时间对共振单位 (RU) 连续作图，得到的传感图记录了整个反应过程包括结合和解离过程 (图 2)。当一轮反应结束后，结合在传感片上的反应物可以用洗脱液洗脱，从而使传感片得到再生进行下一轮反应。

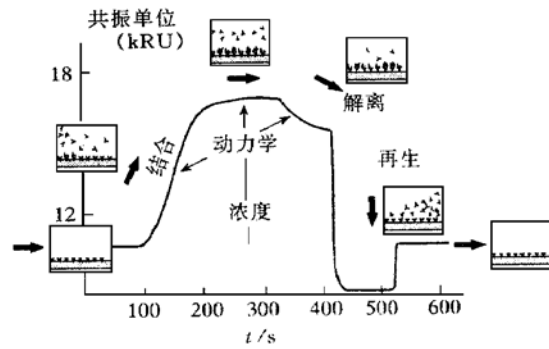


图 2 典型的感应图

加入的分析物与结合在传感片上的配体反应导致信号上升，记录了复合物的结合过程和平衡状态。当样品加完后分析物被缓冲液代替，此时信号的下降显示了解析过程。从结合的量可反映出样品的浓度。

BIA 技术相对于其他分子间相互作用技术

的优越性表现在：a. 通过控制配体的偶联，来调节各种不同样品，不同目的的研究；b. 无需任何标记（即无需同位素，酶标或荧光物的标记）表明了 BIA 可适用于研究任何形式的相互作用，甚至无需进行样品的纯化；c. 在一个多聚物结合反应中，每一步的相互作用都可分别记录下来，从而为研究反应机理提供新的空间；d. 实时分析以 0.1 s 的速度记录了整个反应的结合与解析过程，提供了反应的动态过程，这是其他技术无法比拟的。

如今 BIA 技术已广泛地用来分析生物分子相互作用的反应动力学、结合位点和反应物浓度等信息。对信号传导^[4-6]、免疫调节^[7,8]、蛋白工程^[9]、抗体定性^[10,11]、基因调控^[12,13]、核酸研究^[14]、及药物研制^[15]等方面的研究有很大的贡献。

2 制备生物特异表面

BIA 技术的反应特异性完全决定于偶联在传感片表面生物分子（称为配体）的特性。

标准的传感片表面含有一层甲羧基化葡聚糖，提供配体偶联基地及为生物反应提供亲水环境。根据配体性质和研究要求，可选择不同的化学方法进行偶联（图 3）。

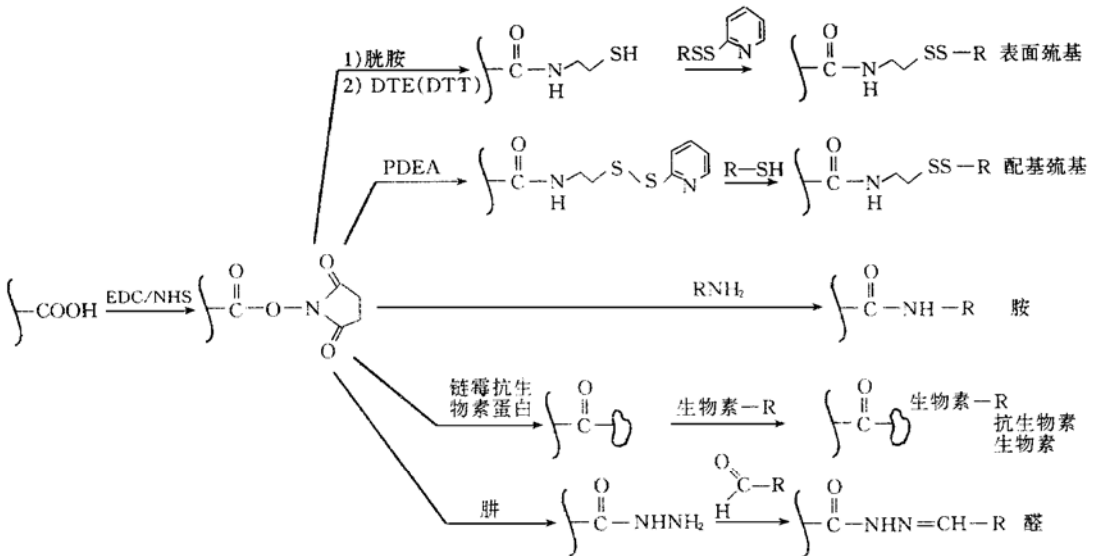


图 3 生物分子固定法

利用不同的化学方法可将各种生物分子偶联于传感片上，完成偶联后，一个感应片可重复使用。

最常用的为胺偶联法 (amine) 见图 3. 除了可将配体直接偶联于传感片上外, 也可通过配体捕获的方法, 即先偶联能捕获配体的分子如: 抗生物素或特殊的抗体从而可将含生物素的分子或含特殊的抗原的生物分子 (如 GST, His-Tag 等重组蛋白质) 结合在传感片上.

偶联方法的多样化成为 BIA 实验的设计提供了很大的自由度.

3 确认结合对象

BIA 技术的一个主要应用领域为筛选和确认你感兴趣分子的结合对象 (如: 从杂交瘤细胞培养液中鉴定单克隆抗体; 从天然物质粗提液或组合的物质文库中筛选新药物). 因为 BIA 技术可在无标记的条件下实时地测定分子间的结合反应, 所以很快就能从粗提液中将感兴趣的生物分子鉴定出来. 使用全自动型的 BIAcore 1000 或 BIAcore 2000 可连续分析多达 192 个样品, 节省大量的时间和劳力. 已有不少生物制药公司用 BIA 技术来进行药物筛选.

4 测定结合反应的动态参数

由于 BIA 是一实时分析技术, 得到的传感图不仅可以看出结合反应, 同时也记录了整个反应的动态信息. 反应的强弱和快慢通常可从传感图的曲线上看出. 配以合理的实验设计和数据分析方法, BIA 技术可测定反应的动态参数及亲和常数, 并以此来论证提出的反应机理是否正确.

生物分子相互作用实时分析仪配有一整套数据分析软件来分析得到的数据, 从而提供反应的途径和机理.

5 结构与功能关系分析

BIA 提供分子间相互作用的动态信息, 从而为生物分子的结构研究提供又一个极有价值的实验方法. 例如通过监测蛋白质中单个氨基酸的改变对此蛋白质与其他分子结合功能的影响, 可探查出此蛋白质的功能基团和其重要

性. 因为分子间的相互作用可在免标记及非纯化的条件下测定, 因此 BIA 非常适合于研究生物分子由于不同的修饰而导致的功能变化.

6 复合物相互作用的研究

BIA 具有可监测结合反应的每一步骤的特点, 从而为我们研究生物分子多聚物的形成提供了一个新的方法. 实验证明 BIA 对于多聚物的研究有着其他方法无可取代的价值. 例如 Schuster 等用 BIA 来证明细菌趋化性信号传导时相关的蛋白质必须形成四聚体才能发挥功能. 其他的例子包括有由 10 个亚基组成的 DNA 聚合酶的研究和 G 蛋白在光合细胞中的传导作用. Northup 找出并证明复合物中的一个亚基, 此亚基原来由于没有已知的酶活性来检测而一直未能被确定.

另外一个利用多点结合研究的应用领域是抗原决定簇的确定. 传统的方法如放免和酶标免疫法都需花大量时间并要求纯化标记的抗体. 然而利用 BIA 技术, 你无须标记并可直接用杂交瘤培养液来测定. 此外由于可以监测鉴定的每一步过程, BIA 还提供了用标记法无法提供的揭示整个反应过程极其有价值的信息.

7 结 语

自从 1990 年推出 BIA 技术以来, 这一创新技术受到学术界与工业界广大科学人员的青睐. 至 1995 底, 已有超过 500 台 BIAcore 系列仪器安装在全世界各地并发表近 400 篇应用文献. 相对于一些传统的方法, BIA 不仅能省样品而且能进行快速大量样品分析或筛选. BIA 技术的最大贡献表现在他能提供其他方法无法得到的信息, 研究并回答以前无法回答的问题.

参 考 文 献

- 1 Malmqvist M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature*, 1993, **361**: 186~ 187
- 2 Stockley P. Biomolecular interaction analysis. *Tibtech*, 1996, **14**: 39~ 413

- 3 Lofas S, Malmqvist M, Ronnberg I *et al.* Bioanalysis with surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators*, 1991, **B5**: 79~ 84
- 4 Bartley T D, Hunt R W, Welcher A A *et al.* B61 is a ligand for ECK receptor protein-tyrosine kinases. *Nature*, 1994, **368**: 558~ 560
- 5 Stitt T N, Conn G M, Lai B J *et al.* The anticoagulation factor protein S and its relative Gas6, are ligands for the Tyro3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 1995, **80**: 661~ 670
- 6 Marengere L E, Songyang Z, Gish G D *et al.* SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature*, 1994, **369**: 502~ 505
- 7 Seth A, Stern L J, Ottenhoff T H M *et al.* Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen *in vitro*. *Nature*, 1994, **369**: 324~ 327
- 8 Chatellier J, Rauffer B N, Van Regenmortel M H V *et al.* Comparative interaction kinetics of two recombinant Fabs and of the corresponding antibodies directed to the coat protein of tobacoomosaic virus. *J Molecular Recognition*, 1996, **9**: 39 ~ 51
- 9 Kolbinger F, Saldanha J, Hardman N *et al.* Humanization of a mouse anti-human IgE antibody: a potential therapeutic for IgE-mediated allergies. *Protein Engineering*, 1993, **6**: 971~ 980
- 10 Daiss J L, Scalice E R. Epitope mapping on BIAcore: Theoretical and practical consideration. *Methods*, 1994, **6**: 143~ 156
- 11 Ohlin M, Owman H, Mach M *et al.* Light chain shuffling of high affinity antibody results in a driftin epitope recognition. *Molecular Immunology*, 1996, **33**: 47~ 56
- 12 Barberis A, Pearlberg J, Simkovich N *et al.* Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell*, 1995, **81**: 359~ 368

- 13 Buckle M, Williams R M, Negroni B H. Real-time measurements of elongation by a reverse transcriptase using surface plasmon resonance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 889~ 89
- 14 Bates P J, Dosanjh H S, Kumar S *et al.* Detection and kinetic studies of triplex formation oligodeoxynucleotides using real-time biomolecular interaction analysis. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**: 3627~ 3632
- 15 Ciolkowski M. DNA aptamer interaction with protein. Poster presented at Science innovation, 1993, 93 Boston, MA

New Application for Biosensor: Biomolecular Interaction Analysis (BIA) Technology. SHEN Ping (*Pharmacia Biotech (China) Ltd. Beijing 100086, China*).

Abstract BIA technology (biomolecular interaction analysis) is a new concept by using newly developed biosensor technology. The interaction of biomolecular can be monitoring in real time and without the use of labels. The principles and application fields of this new technology are introduced. A series of application note for BIA technology in the next few journals will be published. Together with almost 400 publications in the scientific literature, the great value of BIA technology in research will be revealed.

Key words biosensor, BIA technology, biomolecular interaction, real time

(上接第 87 页, Continued from page 87)

and Genetic Engineering, Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China).

Abstract The first strand cDNA library rich in cytokine cDNAs has been prepared from mRNA derived from several groups of activated lymphocyte by reverse transcription. Several Chinese

derived cytokine cDNAs were cloned successfully by PCR. It is suggested that the first strand cDNA library could provide a good templet for PCR amplification.

Key words lymphocytes, activated, polymerase chain reaction