

剪切流动法研究表面固定化配基与目标分子的相互作用力^{*}

高波^{1,2)} 靳刚^{1)**}

(¹⁾中国科学院力学研究所, 国家微重力实验室, 北京 100080; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 基于剪切流动腔技术, 以微球作为受力载体, 设计了一套可用于研究表面固定化配基与目标分子特异性相互作用力的实验和分析方法, 并以人免疫球蛋白 G (human IgG) 和羊抗人免疫球蛋白 G (goat anti-human IgG) 分别作为模型配基和模型目标分子进行了研究. 基于平面 *Poiseuille* 层流模型设计了流场参数, 以数值计算结果验证了设计的合理性. 使用牛血清白蛋白 (BSA) 作为非特异性对照, 判断微球与基片表面的结合力来自配基和目标分子的生物特异性相互作用, 并由进一步的目标分子灭活对比实验确认了这一结论. 实验观察到微球与基片表面的结合力受到配基面密度的影响, 说明发生结合的是多对而非单对蛋白质分子. 将 95% 的微球被剥离时对应的壁面剪切率设定为临界剪切率, 由大量实验结果拟合得到了临界剪切率与配基面密度间的定量关系. 在受力分析模型中, 考虑到多分子的结合, 以及分子键位置不同造成的力臂长度的差异, 最终计算得到单对配基与目标分子的平均结合力约为 342 pN.

关键词 固定化蛋白质, 生物分子相互作用力, 流动腔, 分子键, 键强度

学科分类号 Q66

表面固定化配基与目标分子的特异性相互作用是各类固相蛋白质分析技术中的一个重要问题^[1]. 特定分析中这一相互作用的强弱直接关系到检测的灵敏度甚至成败. 虽然人们很早就认识到蛋白质分子的特异性结合是高度的几何和化学匹配下的静电力、范德华力、疏水作用等多种物理力学作用的结果, 但长期以来对于生物分子相互作用程度的评价却多是基于一种“化学式”的描述. 例如, 最常用到的一个量“亲和力”(affinity), 实际上是由正逆反应的速率常数来定义的, 这实质上只是对结合强度的一种间接和唯象的描述, 而并未涉及到分子相互作用时的物理和力学信息. 这里所谓的“亲和力”(其单位为 L/mol) 也并不具有真正力的量纲.

直至近 10 年来, 随着学科交叉的广泛深入以及原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)^[2]、光镊(optical tweezer, OT)^[3]、表面力测试仪(surface force apparatus, SFA)^[4]、微吸管(micropipette)^[5]、流动腔(flow chamber)^[6]等一批实验技术的发展, 直接基于物理(或力学)方式对生物分子相互作用力的测量和研究才逐渐成为可能, 人们得以从更本质的层面上理解和认识这一问题.

剪切流动腔技术最早被用于细胞粘附的研究, 后来其研究对象逐渐被扩展到亚细胞和分子水

平^[7,8]. 同其他实验技术相比, 剪切流动腔技术具有加载范围大(相比于 OT)、单次测量可获得具有统计意义的结果(相比于 AFM、micropipette)、实验操作相对简便等优点. 本文基于流动腔技术, 引入载体微球作为载荷放大器, 以人免疫球蛋白 G (human IgG, IgG) 和羊抗人免疫球蛋白 G (goat anti-human IgG, anti-IgG) 分别作为固定于基片表面的模型配基和承载于微球表面的模型目标分子, 对二者的作用力进行了实验研究, 并由模型分析计算得到了单对配基与目标分子的平均结合力.

1 加载系统的设计

本文的平行板剪切流动腔基于平面 *Poiseuille* 流动模型^[9]设计, 这一模型要求流动处于层流状态(即雷诺数 Re 小于 2 000). 在此要求下, 通常流动腔所能产生的最大壁面剪切率约为 10^6 s^{-1} 量级, 对尺寸仅有纳米量级的蛋白质分子而言, 相应的剪切力约在 10^{-13} N 量级. 而已有研究显示生物分子间的特

^{*}国家自然科学基金资助项目(90206029), 中国科学院知识创新工程“十五”重大项目(KJ CX1-SW-07).

^{**} 通讯联系人.

Tel/Fax: 010-62631816, E-mail: gajin@imech.ac.cn

收稿日期: 2005-04-27, 接受日期: 2005-05-31

异性相互作用力至少在 pN (10^{-12} N) 量级以上^[10, 11]. 所以, 直接通过剪切流对蛋白质分子施载并不可行, 而需要设法将载荷放大.

据低雷诺数流动理论^[12], 微观物体在靠近壁面的剪切流场中受到的作用力与其特征尺度的平方成正比. 故为放大加载, 可采用引入载体微球的办法: 将目标蛋白质分子通过一定方式包被在尺度更大的载体微球上, 使微球与基片表面通过目标分子和配基的作用而发生结合. 然后利用剪切流对载体微球施载, 使微球从基片表面脱离 (配基与目标分子的结合断开), 以此来研究配基和目标分子的结合强度.

除了放大载荷的功能, 引入微球作为载体也使直接通过光学显微镜观察结合情况成为可能. 另外, 由于微球可视为刚性球体 (层流加载下, 聚苯乙烯材料的形变可以忽略), 可以获得高准确度的量化计算结果. 引入载体微球带来的另一个影响是可能产生多对分子的结合. 这又有两点需要考虑: a. 得到的计算结果将是多对结合的统计平均值; b. 多分子结合会使得微球与基片表面的结合力增大, 于是需要更大的实验加载. 第一点其实是一个有利因素. 近年来研究认识到, 由于热运动, 单对分子间的相互作用行为, 在微观上具有随机偶然性^[13]. 对单对分子结合的强度、寿命等参数的单次测量结果表现出随机性, 从而需要进行大量重复实验才能获得具有统计规律的结果 (如 micropipette 方法通常需要重复测量几十到上百次). 剪切流动法的一个优点就在于单次实验即可获得具有统计意义的结果, 这也是本文选择此方法的原因之一. 对于第二点, 由后文的分析可以看到, 发生结合的分子数量同微球半径的一次方成正比, 而微球受到的剪切流作用力同其半径的平方成正比. 因此, 引入微球放大载荷是可行的.

这样, 在加载系统的设计中应考虑流场的几何尺寸、层流条件对于流量的限制、微球大小的选择等主要问题及其相互协调.

1.1 流动腔结构

图 1 为本文流动腔装置的结构示意图. 实验段流场由内盖板的长方形凹槽形成. 基片可置于流场中央底部. 精密柱塞泵用作流体驱动源, 并在腔体入口处设有排气泡旁路. 流场高度 H 可通过使用不同槽深的内盖板改变. 腔体由聚酯玻璃加工制成, 可由体式显微镜实时观察并记录基片上微球的结合及解离情况.

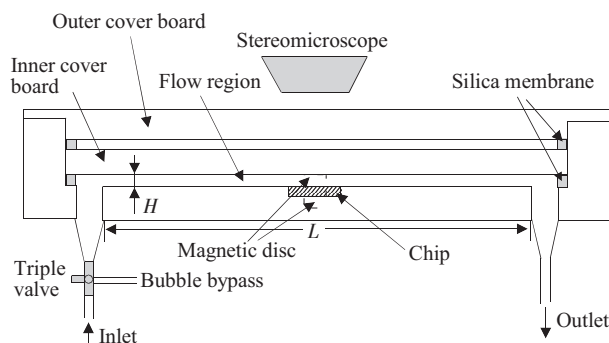


Fig.1 Schematic diagram of the flow chamber apparatus

1.2 流场尺寸设计

为使实际流动接近平面 *Poiseuille* 理论模型 (无限大平板模型), 需使流场长度 L 和宽度 W 远大于高度 H . 在这样的关系下, 流动腔底面的壁面剪切率 G 与体积流量 Q 间存在如下关系:

$$G = \frac{6Q}{WH^2} \quad (1)$$

由(1)可见, 为获得尽可能大的壁面剪切率 G , 流场高度 H 应尽量小. 但 H 又须在量级上大于微球尺寸及机械加工误差. 因此选择 H 在 mm 量级, 并制作了槽深为 $0.45 \sim 1.30 \text{ mm}$ 不等的若干块内盖板.

此外, 为降低进出口不规则流动对于中部流场 (基片所在位置) 的干扰, 需使流场长度 L 远大于宽度 W . 这样, 在 $L \gg W \gg H$ 的要求下, 设计 $W = 15 \text{ mm}$, $L = 230 \text{ mm}$.

基于上述尺寸, 对流动腔内的流场进行了数值模拟计算. 图 2 为流动腔底面的壁面剪切率分布情况. 计算结果显示, 在流动腔底面的大部分区域内, 壁面剪切率 G 保持恒定. 除靠近四周边界处外, 流场与(1)的理想公式符合很好 (误差小于 2%). 图 2 算例中 $H = 1 \text{ mm}$, $Q = 450 \text{ ml/min}$.

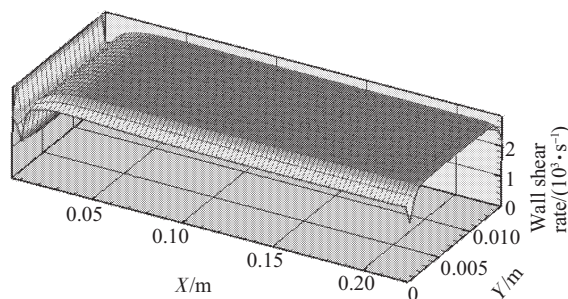


Fig.2 Numerical simulation result of wall shear rate on the chamber bottom

1.3 流量的限制

(1)成立的前提是实验段流动处于层流状态, 这要求雷诺数 $R_e < 2000$. 经推导可得体积流量 Q 与雷诺数 R_e 的关系:

$$Q = \frac{1}{3} R_e W v \quad (2)$$

若取流体运动学粘性系数 $\nu = 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$, 则有: $Q < 600 \text{ ml/min}$. 再由(1)即得到壁面剪切率的范围: $G < 16\,000 \text{ /s}$ ($H = 0.5 \text{ mm}$).

1.4 载体微球尺寸的选择

据 Goldman 等^[4]对于剪切流中静止在无限大平板上的孤立刚性球体的理论分析, 球体受到一个力 F_x 和一个力矩 T_y 的共同作用:

$$\begin{aligned} F_x &= 1.7005 \times 6\pi\mu a^2 G, \\ T_y &= 0.9444 \times 4\pi\mu a^3 G \end{aligned} \quad (3)$$

式中 a 和 μ 分别为球体半径和液体的动力学粘性系数 (对于水, 约为 $10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$). 虽然由于杠杆效应, 实际作用于微球与基片间蛋白质分子键的力要大于 F_x (详见 4.2 节分析), 但不妨以 F_x 作为保守估计. 生物分子的特异性结合力一般在 pN 至 nN 之间^[1], 由(3)计算可知, 为产生这样量级的作用力, 载体微球的半径至少应在 μm 量级. 本文选择 $a = 5 \mu\text{m}$ 的微球作为目标分子载体. 这样当 $G = 16\,000 \text{ s}^{-1}$ 时, 微球受载已可达 10 nN 以上.

2 材料和方法

2.1 生物分子

本文选用人免疫球蛋白 G 作为固定于基片表面的配基, 羊抗人免疫球蛋白 G 作为目标分子, 牛血清白蛋白用作封闭剂. 以上产品均购自美国 Sigma 公司. anti-IgG 为多克隆抗体, 在使用前经过亲和层析纯化处理, 所用纯化仪为瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司的 AKTA explorer 产品.

2.2 流动介质

磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS; 8 mmol/L $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.68 mmol/L KCl, 1.14 mmol/L KH_2PO_4 , 137 mmol/L NaCl; pH 7.2) 用作实验流动介质.

2.3 基片表面改性及配基固定

原子级单晶硅片 (洛阳单晶硅厂) 切成 $10 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$ 长方形. 在清洗液 (30% H_2O_2 : 98% $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1 : 3$) 中浸泡 30 min, 继以去离子水和无水乙醇清洗. 再浸于 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 溶

液 (5% APTES, 95% 无水乙醇) 中 2 h, 无水乙醇清洗. 然后浸于饱和丁二酸酐的乙醇溶液中过夜, 无水乙醇清洗并保存. 经过上述处理的基片表面已修饰有羧基官能团, 经活化后可与配基分子的氨基共价连接.

固定配基时, 将表面带有羧基的基片浸于 0.05 mol/L N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和 0.2 mol/L 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 溶液中 15 min, 继以去离子水清洗, 然后浸泡于以不同比例混合的 IgG (0.5 g/L) 和 BSA (20 g/L) 的蛋白质溶液中, 在 4℃ 下过夜, 从而制成具有不同 IgG 面密度的活性基片表面.

2.4 微球包被

直径 10 μm 的羧基修饰乳胶微球 (carboxylate modified latex microspheres) 购自美国 Interfacial Dynamics Corporation 公司. 微球本身为聚苯乙烯材料, 在本实验的层流加载下, 微球的形变完全可以忽略, 即可按刚性球体进行受力分析.

依产品操作说明, 微球先以 EDC 溶液活化 15 min, 离心清洗后与 anti-IgG 溶液 (约 260 mg/L) 在 4℃ 下孵育过夜. 清洗后在 4℃ 下保存于含 0.1% NaN_3 和 2% BSA 的 PBS 中, 一个月内使用.

其他蛋白质 (BSA、灭活 anti-IgG) 的包被与上述方法类似.

2.5 配基及目标分子有效面密度的测定

实验中配基和目标分子分别通过其氨基与基片和微球上的羧基共价结合. 由于共价键的强度远大于分子特异性结合的强度^[15], 这就保证了断裂发生在配基与目标分子的结合节点, 而不是配基与基片或目标分子与微球的结合节点. 此外, 同物理吸附的蛋白质固定方式相比, 共价结合也有利于更好地保持蛋白质的活性^[16].

但是, 与固相表面的结合仍会导致蛋白质活性一定程度的丧失. 因此, 被固定蛋白质的有效面密度 N_e 可由总面密度 N_t 乘以一个小于 1 的有效系数 k_e 来表示.

实验中, 微球上目标分子 anti-IgG 的总面密度 N_{t0} 可根据物质守恒原理测定: 测量包被微球前后 anti-IgG 溶液浓度的变化, 并结合被包被微球的总表面积进行计算. 蛋白质溶液的浓度由荧光分光光度计 (fluorescence spectrophotometer, TOSHIBA F-4500) 测量; 被包被微球的总表面积根据微球尺寸和用量计算.

基片表面配基 IgG 的面密度不宜用上法测量, 原因在于基片的表面积较小, 能够结合的 IgG 总量也较少, 蛋白质溶液在包被基片前后浓度差异太小. 为此, 我们使用椭偏仪 (ellipsometer, SENTECH) 测量基片表面蛋白质膜层的光学厚度, 进而得到基片上蛋白质的面密度^[17].

为得到 anti-IgG 共价固定于羧基表面后的有效系数 k_{eo} , 我们分别测量了羧基基片上饱和 anti-IgG 膜层的面密度, 以及这一活性表面与 IgG 溶液反应后的面密度增加量, 后者与前者的比值即为 k_{eo} . 由于羧基基片与羧基微球具有较为相似的表面性质, 即以上述结果作为微球表面 anti-IgG 的有效系数 k_{eo} . 尽管这一类比不十分精确, 但由后文的分析方法可以看到, 实验设计中仅要求目标分子相对配基过量即可, 所以这一类比的误差不会对分析结果产生实际影响. 基片表面 IgG 的有效面密度 N_{el} 可以更为方便地直接测量: 将待测基片活性表面与 anti-IgG 溶液反应, 测得蛋白质面密度的增加量, 即为配基的有效面密度 N_{el} .

这里需要说明一个问题. 由于抗体的多克隆性质, 一个 IgG 分子能够通过自身的不同部位与多个 anti-IgG 分子发生结合, 这些结合部位称作“结合位点”. 因此, 在计算结合的总数量时, 真正有意义的并不是分子本身的个数(或面密度), 而应是“结合位点”的个数(或面密度). 在以上对基片表面配基数量(或面密度)的测量中, 得到的是其能够结合目标分子的总数量(或面密度), 实际上也正是有效“结合位点”的总数量(或面密度). 对于微球也有类似情况. 因此, 这样的测量方法是和计算分析方法对应并且有效的. 后文中所有对于配基或目标分子的有关数量的提法, 也都是指配基或目标分子的“结合位点”.

由上述方法测量得到, 微球表面 anti-IgG 的总面密度 N_{to} 约为 $9.0 \times 10^4 / \mu\text{m}^2$, 有效系数 k_{eo} 约 24%, 于是有效面密度 $N_{eo} = N_{to} \times k_{eo} \approx 2.7 \times 10^4 / \mu\text{m}^2$; 实验范围内基片表面 IgG 的有效面密度 N_{el} 从 $6.7 \times 10^2 / \mu\text{m}^2$ 至 $9.0 \times 10^3 / \mu\text{m}^2$ 不等.

2.6 实验操作

在以一定比例混合的 BSA 和 IgG 溶液中浸泡过的基片表面用去离子水清洗, 并以氮气吹干. 然后, 将 $2 \mu\text{l}$ 包被有 anti-IgG 微球的悬浊液用加样枪小心加至基片表面中心位置. 密封条件下静置

30 min 以使配基与目标分子充分接触、结合并稳定构象, 然后将基片放入流动腔底部凹槽内. 加盖并关闭流动腔, 启动剪切流进行实验.

为降低流动启动时对基片上微球的非定常冲击, 各实验中均以很低的流量启动剪切流(对应壁面剪切率约为 4.2 s^{-1}). 对下述实验 3.1、3.2、3.3, 流动启动后保持该剪切率直至实验结束, 对于实验 3.4, 待液体缓慢浸没基片及微球后, 逐渐提升流量及剪切率以考察微球的脱离情况. 各剪切率下剩余微球情况在基本趋于稳定时拍照记录. 后续分析时, 对各照片上的微球进行计数统计, 以作量化. 各参数条件下的实验均进行复片或 3 片重复. 所有剪切流动实验均在室温下进行.

3 结果与分析

3.1 定性对照实验

分别以 BSA (20 g/L) 和 IgG (0.5 g/L) 溶液包被基片, 以 BSA (20 g/L) 和 anti-IgG (260 mg/L) 包被微球, 然后分别考察两组基片和两组微球间的相互作用. 图 3 所示为 $G = 4.2 \text{ s}^{-1}$ 的低剪切率流动作用下, 上述 4 种基片-微球相互作用时最终剩余的微球占实验前的百分比. 可以看到, 只有 IgG 基片-anti-IgG 微球之间存在明显的强结合, 而 IgG 基片-BSA 微球、BSA 基片-anti-IgG 微球、BSA 基片-BSA 微球之间都只有很弱的作用, 在剪切流作用下微球几乎被冲净.

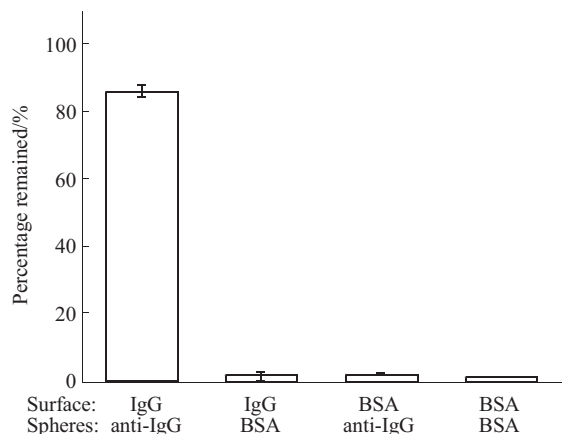


Fig.3 Qualitative comparison of different microspheres-chip interactions

Microspheres coated with BSA and anti-IgG interacted with chips coated with BSA and IgG. The percentages of remained microspheres in the four spheres-chip interactions after a low shear rate flow ($G = 4.2 \text{ s}^{-1}$) are shown.

3.2 目标分子灭活对比

通过 3.1 的实验结果, 可推测 IgG 基片与 anti-IgG 微球之间的强结合来自 IgG 与 anti-IgG 间的生物特异性相互作用. 为进一步证实这一作为后续分析基础的重要推测, 我们进行了如下“目标分子灭活对比”实验: 将同一批经亲和层析纯化的 anti-IgG 分作两份, 一份直接包被微球, 另一份预先在 70℃ 水浴中加热 3 h 以使蛋白质部分失活, 再以同样的方法包被微球. 两组微球分别与 IgG 基片作用, 并以 $G=4.2 \text{ s}^{-1}$ 的低剪切率流动考察微球与基片的结合强度. 图 4 为两组微球剩余百分比的对比, 可以看到, 经过灭活的 anti-IgG 包被的微球与 IgG 基片的结合力明显减弱. 这样, 便确认了基片与微球的结合的确缘于配基与目标分子间的生物特异性相互作用. 于是便可以通过分析微球的受力情况获知更为微观的生物分子间的作用力信息.

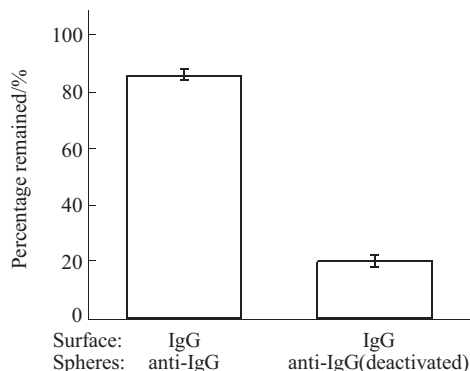


Fig.4 Deactivation comparison

Microspheres coated with anti-IgG (normal) and anti-IgG (deactivated) interacted with chips coated with IgG. The percentages of remained microspheres in the two conditions after a low shear rate flow ($G=4.2 \text{ s}^{-1}$) are shown.

3.3 配基面密度改变对微球与基片结合力的影响

将 IgG (0.5 g/L) 和 BSA (20 g/L) 溶液以不同比例 (1:0, 1:20, 1:100, 1:500, 0:1) 混合用作基片的包被液, 从而制成不同配基面密度的活性基片表面. 然后以 $G=4.2 \text{ s}^{-1}$ 的低剪切率流动考察 anti-IgG 微球与这些基片的结合强度. 图 5 为各基片上剩余微球的百分比. 可以看出, 随着基片表面配基面密度的下降, 微球与基片的结合强度也逐渐减弱.

图 5 同时说明了另一个重要问题: 微球与基片的结合并不是单对配基与目标分子的作用结果. 因为微球与基片的结合力明显受到配基面密度的影响, 且二者正相关, 所以可以确定, 微球与基片的

结合并不只是单对配基与目标分子“单点式”的作用结果, 而是在一定大小的接触面积内, 同时存在着多对配基与目标分子的相互作用. 只有这样, 微球与基片的总体结合力才可能受到基片表面配基面密度的显著影响.

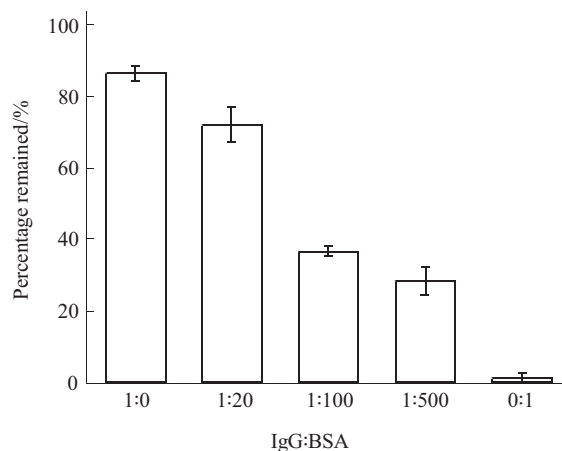


Fig.5 Effect of ligand surface concentration on interaction force between microspheres and chip surface

Microspheres coated with anti-IgG interacted with chips coated with a mixed solution of BSA (20 g/L) and IgG (0.5 g/L) in different proportions. The percentages of remained microspheres after a low shear rate flow ($G=4.2 \text{ s}^{-1}$) are shown.

3.4 以临界壁面剪切率量化微球与基片表面的结合强度

对于微球与一定配基面密度的基片结合, 随着流动剪切率的逐渐升高, 基片上的微球会逐渐脱落. 图 6 为一次实验中 ($N_{cl} \approx 1.3 \times 10^3 / \mu\text{m}^2$) 不同剪切率下, 基片表面微球剩余情况的照片; 统计该实验中各照片上的微球数量, 并计算出每一剪切率下剩余微球数量占起始时的百分比, 得到剩余微球百分比随剪切率的变化过程 (图 7). 由图 7 可以看出, 剩余微球数量与剪切率之间宏观上呈现出连续变化的趋势.

由于微球从基片表面的脱离过程在宏观上表现出连续性, 为对结合强度进行量化, 需要人为设定临界参数. 本文将 5% 设定为微球的临界剩余百分比, 即当基片上剩余微球数量下降到 5% 时, 认为微球总体上已在剪切流作用下从基片表面脱离. 此时对应的壁面剪切率, 即设定为剥离微球所需的临界壁面剪切率.

与一些细胞粘附研究中使用的 50%、20% 等临界剩余百分比相比, 本文的临界值选取较小, 主

要有两点原因: a. 微球的脱落之所以表现出先后次序, 其原因在于每个微球与基片表面实际发生结合的蛋白质分子数量并不相同. 于是, 蛋白质结合数量少的微球将在较低的剪切率下被剥离, 蛋白质结合数量多的微球则需在较高的剪切率下才会被剥离, 而最后被剥离的微球则可认为与基片表面发生了最大数量的蛋白质结合. 在下文的量化分析中, 模型计算的情况是微球与基片间发生了最大可能数量的蛋白质结合(对应于 4.1 的第 2 条假设). 因此, 为与计算情况对应, 实验中应当选取尽量小的临界

剩余百分比. 但又不宜设为 0, 因为这样临界剪切率将仅取决于最后一个微球的行为而失去统计机制, 得到的实验结果会产生很大误差. b. 为使实验情况尽量接近 Goldman 单球受力模型, 应使临界参数下微球的分布尽量稀疏. 当基片上仅剩余占加载前数量 5% 的微球时, 微球与微球间的平均距离已大于微球直径的 10 倍, 这时微球之间对于流动屏蔽的影响已可忽略, 因此便可按照单球受力模型进行分析.

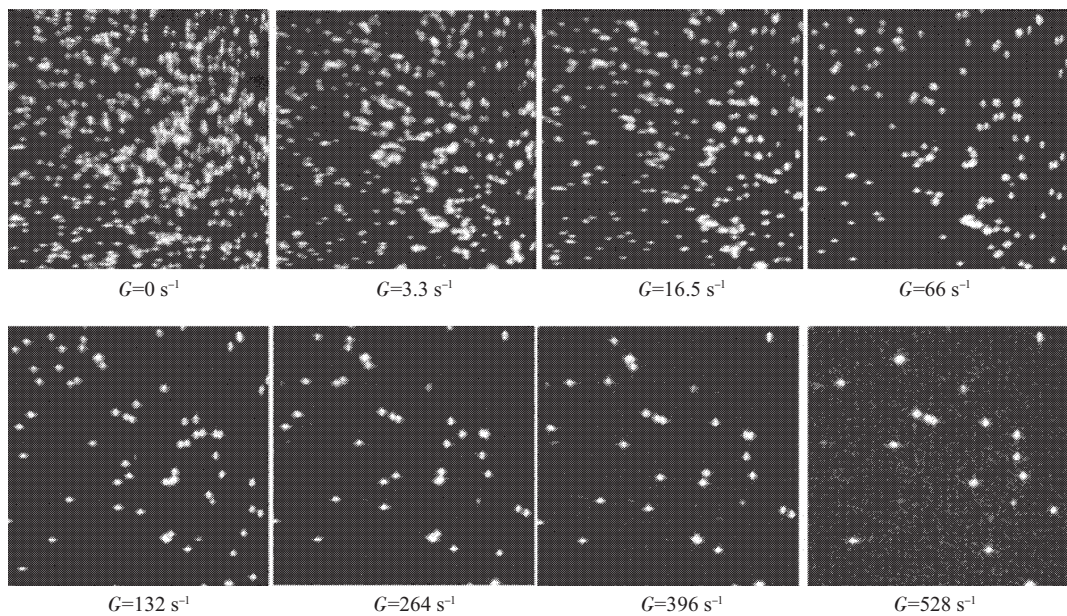


Fig.6 Pictures of remained microspheres at different wall shear rates in an experiment
 $N_{cl} \approx 1.3 \times 10^3 / \mu m^2$.

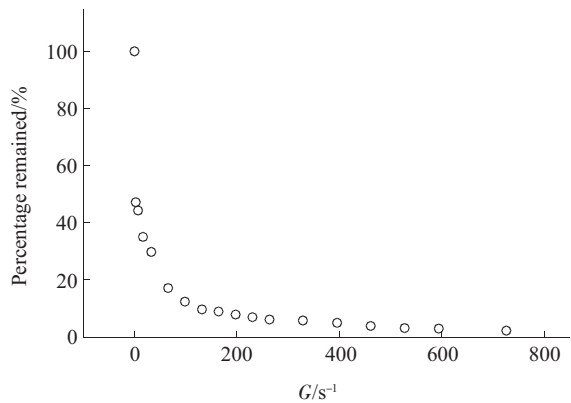


Fig.7 Relationship between percentage of remained microspheres and wall shear rate in the experiment of Fig.6
Obtained by counting the number of remained microspheres in every picture.

按照以上临界参数的设定, 由大量实验得到了将 anti-IgG 微球从不同 IgG 面密度的基片表面剥离所需要的临界剪切率, 结果绘于图 8. 从图 8 中可看到, 剥离微球所需的临界剪切率随基片表面配基面密度的增加而提高. 将图 8 中数据点线性拟合. 拟合直线近似通过坐标原点, 这与图 3 中非特异性作用明显弱于特异性作用的表现相吻合. 拟合直线斜率约为 $0.38 \mu m^2/s$.

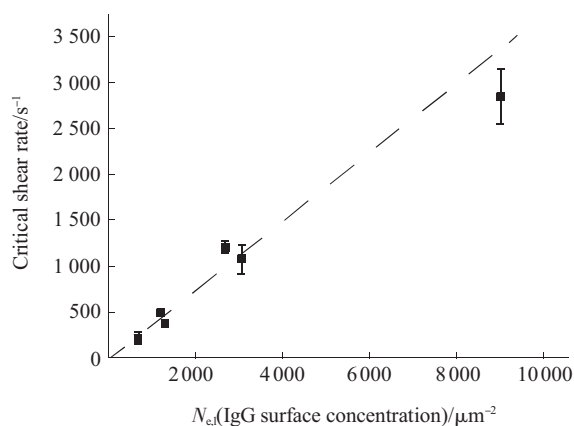


Fig.8 Relationship between critical wall shear rate and ligand surface concentration

Critical wall shear rate is set the shear rate value at which 95% microspheres are removed from the chip surface. The experimental points are fitted linearly.

4 配基与目标分子相互作用力的量化模型计算

4.1 分析和假设

由 3 分析可知, 临界参数下的微球受力可按 Goldman 单球模型近似处理, 剪切流作用于微球的力和力矩由公式(3)给出. 但对于如何将微球受力同蛋白质分子间的作用力联系起来, 以往文献中的处理较为粗糙. Pierres 等^[8]的分析模型中假设只有位于微球与表面接触区域末端的一对分子发生结合并对平衡微球受力起作用. 这一模型中配基的面密度变化不会对结果产生影响, 这显然与图 5 和图 8 的现象不符. Cozens-Roberts 等^[18]及 Kuo 等^[19]考虑到了蛋白质面密度变化对于微球受力的影响, 认为对平衡微球受力有贡献的是微球与平面接触区域内的全部分子, 其数目等于分子面密度乘以接触面积. Kuo 还提到了只有接触区域的外圆周上的分子结合键对平衡微球受力有作用的想法. 然而, 两位作者都未能进行更为深入和细致的处理, 一个重要方面即是未考虑接触面积内分子位置的不同及由此造成的力臂长度的差异.

本文认为更为合理的计算模型应包含以下几点要素: a. 应体现出配基面密度变化对于微球与基片结合力的正相关影响. b. 仅有位于微球与基片接触区域的外圆周(这里称之为“接触圆周”, 参见图 9)上的分子结合键对平衡微球受力起作用. 这是因为微球在剪切流的作用下具有滚动趋势, 而位于“接触圆周”上的分子键处于最大拉伸状态, 所以在阻止微球滚动时最先起作用的将是这些分子(更准确

地讲只有后半圆周上的分子). 由于分子键的可伸长性有限^[20], 所以可认为只有当“接触圆周”上的分子键被拉断而微球产生滚动位移后, 圆周内部的分子才会被拉伸受力. c. 接触圆周上的分子, 由于位置不同, 在产生力矩时各自的力臂长度也不同.

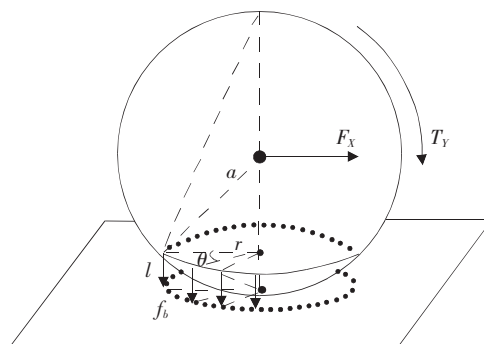


Fig.9 Mechanical analysis of the sphere and the molecular bonds

另外, 在计算模型中引入以下几点简化假设: a. 非特异性作用可忽略. 图 3 中特异性与非特异性作用的显著差异, 以及图 8 中拟合直线近似通过坐标原点的事实, 是这一简化合理的基础. b. 在考虑配基与目标分子的作用时, 忽略空间位阻的影响. 这样, 当目标分子的数量(面密度)远大于配基的数量(面密度)时, 可近似认为每一个配基分子在其空间活动范围内都有机会遇到目标分子, 并结合成键. 在实验中为匹配这一条件, 对微球表面的目标分子采用饱和和包被, 而对基片表面的配基采用稀疏包被的方式. 这样目标分子的有效面密度 N_{el} (约为 $2.17 \times 10^4 / \mu\text{m}^2$) 可远大于配基的有效面密度 N_{cl} ($10^2 \sim 10^3 / \mu\text{m}^2$ 量级). c. 所有结合键强度一致. 应当指出, 由于抗体的多克隆特点以及蛋白质分子相互作用行为在微观上固有的随机性表现, 这一假设具有统计意义. 而本文的实验设计正是一种基于统计效果的反映, 因此这一假设是适用的.

4.2 模型计算

根据上述分析和假设, 可由微球的力矩平衡(图 9)得到下式:

$$T_y + F_x a = 2 \int_0^{90^\circ} N_b r w \cdot f_b \cdot r \cos \theta \cdot d\theta = 2 N_b f_b w r^2 \quad (4)$$

式中 r 是微球与基片接触区域的半径, f_b 是单对配基与目标分子的结合力, N_b 是配基 - 目标分子结合键的面密度(在第 2 条假设下可近似认为与 N_{cl} 相

等), w 是“接触圆周”的宽度(与分子直径同量级), 图 9 中 l 是分子键的长度.

公式(4)体现了模型分析中提到的全部三点要素: 对于平衡微球受力起作用的是“接触圆周”上的分子; 受力与分子键面密度 N_b 正相关; 不同位置的分子键的力臂长度不同($r\cos\theta$). 当 F_x 和 T_y 的合力矩逐渐增大至超过后半“接触圆周”上所有分子键的合力矩时, 这些分子键被拉断, 微球发生滚动, 并继续拉断新形成的“接触圆周”上的分子键, 直至最终与基片表面完全脱离.

将(3)代入(4)得到:

$$f_b \approx \frac{(0.9444 \times 4 + 1.7005 \times 6) \pi \mu a^3 G}{2r^2 w N_{e,l}} \quad (5)$$

图 9 中 $\frac{2a-l}{r} = \frac{r}{l}$, 因 $l \ll a$, 有 $r \approx \sqrt{2al}$. IgG 分子的几何尺寸约为 $4.4 \text{ nm} \times 4.4 \text{ nm} \times 24 \text{ nm}^{[21]}$, IgG 与 anti-IgG (分子形态与 IgG 类似) 形成的结合键的长度 l 可做以下估算: 抗体 anti-IgG 的长度(约 24 nm)与抗原 IgG 的平均直径($\sqrt[3]{4.4 \times 4.4 \times 24} \approx 8 \text{ nm}$)相加, 再减去结合位点的深度(约为 $1 \sim 2 \text{ nm}$). 所以这里取 $l \approx 30 \text{ nm}$. w 参考 IgG 分子的平均直径取为 10 nm . $G/N_{e,l}$ 的值即为图 8 中拟合直线的斜率 $0.38 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

于是, 带入各参数后由公式(5)计算得到单对配基与目标分子之间的结合力:

$$f_b \approx 342 \text{ pN}$$

4.3 结果与讨论

a. 由于实验和分析方法的不同以及研究对象本身的复杂性, 目前关于生物分子相互作用力的不同研究结果间往往存在较大差异, 但多数报道集中在 pN 至 nN 的量级范围内. 本文得到的配基与目标分子间的结合力约为 342 pN , 这一数值与其他实验方法(如 AFM)测量抗原-抗体相互作用力的结果十分接近^[22,23], 这从一方面证明了本文实验和分析方法的有效性.

b. 实验中发生结合的蛋白质分子数目的估计. 按照 4.2 的分析, 微球与基片表面的接触面积 $\pi r^2 = 2\pi al \approx 0.9 \mu\text{m}^2$. 对于不同配基面密度的基片, 估算出接触面积内发生相互作用的分子数目约为 $600 \sim 8000$, “接触圆周”的周长为 $2\pi r \approx 3.4 \mu\text{m}$, 结合 w 计算出圆周区域的面积约为 $0.034 \mu\text{m}^2$, 这一面积内结合形成的分子键数目约为 $25 \sim 300$, 平衡微球所受剪切力的正是“接触圆周”上的这几十到几百对分子.

c. 计算过程中的非实验测量值. l 和 w 是整个计算过程中仅有的两个非实验测量值. 虽然二者均为基于分子几何尺寸的估计值, 但不会有量级上的差错. 而在分析模型中, f_b 仅与 w 或 l 的一次方成反比, 所以 f_b 也不会有量级上的错误.

d. 可能影响计算结果的其他因素. 在模型分析的第 2 条简化中, 忽略了空间位阻的影响并假设所有配基均有机会与目标分子结合成键. 但实际的成键数可能仍会低于理论值, 这一影响的结果是计算值可能比真实值偏小. 另一方面, 在分析中忽略了分子键的伸长, 这样得到的计算值应该比真实值略大. 对于这两点复杂问题的更深入研究, 将会使计算的结果更为准确.

5 结 语

本文基于剪切流动腔技术, 引入微球作为承载目标分子的载荷放大器, 设计了一套相对简便的可用于研究表面固定化配基与目标分子相互作用力的实验和分析方法. 通过定性和定量实验, 以及改进后的分析模型得到单对 IgG 与 anti-IgG 的结合力约为 342 pN . 本文的实验和分析方法已显示出有效性, 并可应用于更多生物技术领域中表面固定化蛋白质相互作用力的研究.

参 考 文 献

- 1 马立人, 蒋中华. 生物芯片. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 2002. 212~242
Ma L R, Jiang Z H. Biochips. 2nd. Beijing: Chemical Industry Press, 2002. 212~242
- 2 Florin E L, Moy V T, Gaub H E. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 1994, **264** (5157): 415~417
- 3 Stout A L. Detection and characterization of individual intermolecular bonds using optical tweezers. *Biophys J*, 2001, **80** (6): 2976~2986
- 4 Leckband D E, Kuhl T L, Wang H K, *et al.* Force probe measurements of antibody-antigen interactions. *Methods*, 2000, **20** (3): 329~340
- 5 Shao J Y, Xu G, Guo P. Quantifying cell-adhesion strength with micropipette manipulation: Principle and application. *Frontiers in Bioscience*, 2004, **9** (Suppl): 2183~2191
- 6 Zhao H, Zhuang F Y, Stoltz J F, *et al.* Comparative studies of LFA-1/ICAM-1 interaction by micropipette and flow chamber techniques. *Biorheology*, 2003, **40** (1~3): 179~187
- 7 Vitte J, Pierres A, Benoliel A, *et al.* Direct quantification of the modulation of interaction between cell- or surface-bound LFA-1 and ICAM-1. *J Leukoc Biol*, 2004, **76** (3): 594~602
- 8 Pierres A, Touchard D, Benoliel A M, *et al.* Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. *Biophys J*, 2002, **82** (6): 3214~3223
- 9 庄礼贤, 尹协远, 马晖扬. 流体力学. 合肥: 中国科技大学出版社,

1991. 135~137
- Zhuang L X, Yin X Y, Ma H Y. Fluid Mechanics. Hefei: Press of University of Science and Technology of China, 1991. 135~137
- 10 Bao G. Mechanics of biomolecules. J Mechanics and Physics of Solids, 2002, **50** (11): 2237~2274
- 11 Leckband D. Measuring the forces that control protein interactions. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000, **29**: 1~26
- 12 严宗毅. 低雷诺数流理论. 北京: 北京大学出版社, 2002. 93~103
- Yan Z Y. Theory of Low Reynolds Number Flow. Beijing: Beijing University Press, 2002. 93~103
- 13 Cheng Z. Kinetics and mechanics of cell adhesion. J Biomechanics, 2000, **33** (1): 23~33
- 14 Goldman A J, Cox R G, Brenner H. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-II, coquette flow. Chem Eng Sci, 1967, **22** (4): 653~660
- 15 Grandbois M, Beyer M, Rief M, *et al.* How strong is a covalent bond?. Science, 1999, **283** (5408): 1727~1730
- 16 Wang Z H, Jin G. Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. J Immunological Methods, 2004, **285** (2): 237~243
- 17 Stenberg M, Nygren H. The use of the isoscope ellipsometer in the study of adsorbed proteins and biospecific binding reactions. J Phys, 1983, **44**: 83~86
- 18 Cozens-Roberts C, Quinn J A, Lauffenberger D A. Receptor-mediated adhesion phenomena. Model studies with the radical-flow detachment assay. Biophys J, 1990, **58** (1): 107~125
- 19 Kuo S C, Lauffenberger D A. Relation between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength, Biophys J, 1993, **65** (5): 2191~2200
- 20 Bayas M V, Schulten K, Leckband D. Forced detachment of the CD2-CD58 complex. Biophys J, 2003, **84** (4): 2223~2233
- 21 Quash G A, Rodwell J D. Covalently Modified Antigens and Antibodies in Diagnosis and Therapy. New York: Marcel Dekker Inc, 1989. 156
- 22 Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber H J, *et al.* Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (8): 3477~3481
- 23 Chtcheglova L A, Shubeita G T, Sekatskii S K, *et al.* Force spectroscopy with a small dithering of AFM tip: a method of direct and continuous measurement of the spring constant of single molecules and molecular complexes. Biophys J, 2004, **86** (2): 1177~1184

Investigation of Interaction Force Between Surface Immobilized Ligand and Objective Molecule Using Shear Flow Chamber*

GAO Bo^{1,2)}, JIN Gang²⁾**

⁽¹⁾National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽²⁾Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Based on flow chamber technique and using carrier microspheres as force magnifiers, an investigation of the interaction force between surface immobilized ligand and objective molecule was carried out. Human immunoglobulin G (IgG) and goat anti-human IgG (anti-IgG) were employed as model ligand and model objective molecule respectively. The parameters of the flow field were designed based on Plane *Poiseuille* Flow and the design was validated by a numerical simulation. Using bovine serum albumin (BSA) as negative control, it was concluded that the adhesion force between the microspheres and the chip surface came from the specific interaction between the ligand and the objective molecule. And this conclusion was confirmed by an anti-IgG deactivation comparison. It was found that the adhesion force between the spheres and the chip surface was affected by the ligand surface concentration. The wall shear rate at which 95% microspheres were removed from the chip surface was set as the critical value, and the relationship between the critical shear rate and the ligand surface concentration was obtained. A mechanical analysis model considering both the ligand surface concentration and the difference of molecular bonds' position was proposed, which finally gave the result that the average interaction force between a single pair of ligand and objective molecule was about 342pN.

Key words immobilized protein, biomolecular interaction force, flow chamber, molecular bond, bond strength

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (90206029) and The Chinese Academy of Sciences (KJCX1-SW-07).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62631816, E-mail: gajin@imech.ac.cn

Received: April 27, 2005 Accepted: May 31, 2005