

BIA的非标记技术在病毒研究中的应用

谭晶晶* 李泽琳* 曾毅*

BIA (Biomolecular Interaction Analysis) 技术是一种实时观察生物分子相互作用的技术, 主要利用生物传感技术对两个或两个以上的生物分子间的相互作用进行实时监测, 被测物范围广泛, 不受分子大小的限制, 涉及蛋白质、多肽、核酸、多糖、磷脂及小分子化合物等。

BIA技术基本原理

BIA 技术的基本原理是一物理光学现象——表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR), 通过监测传感芯片(sensor chip)表面与所结合生物分子质量成正比的液体折射率的变化来实时跟踪生物分子间的相互作用, 因而不需任何标记物。实验时只需先将一种生物分子(配体)固定在传感芯片表面, 再使与之相互作用的分子(分析物)溶液通过微射流盘卡(IFC)流过芯片表面, 检测器就能实时检测出芯片固定分子和溶液中分子之间有无相互作用、亲和和解离的快慢程度、结合的强度及位点等多方面的信息。

BIA 技术所采用的实验仪器(BIAcore 系列)主要由传感芯片、IFC以及基于SPR原理的生物检测系统这三个核心部分组成, 并附带一系列的计算机控制软件和结果评估软件。其中, 传感芯片包括CM5、SA、NTA、HPA 及L1 等, 其功能与用途见表1^[4]。

BIA 及其原理SPR在HIV研究中的应用进展

人类免疫缺陷病毒(HIV)是引起全球性艾滋病蔓延的主要病原体, 已成为全世界生物医药研究的焦点和热点, 以SPR为原理的BIA技术自发现以来已经广泛应用于HIV研究的各个方面, 本文拟就其在HIV研究中的应用进展进行简要综述。

(一) 对抗体进行研究

BIA技术的一个主要应用领域就是对目标分子的结合对象进行筛选和确认。目前为止, 世界各地的研究人员几乎已经对HIV各个结构和功能元件的抗体进行了相应研究, 以SPR为原理的BIA技术在这些研究中发挥着重要的作用。

1. 表位定位

早在1990年, 光学生物传感技术刚刚转向商业市场时, Fagerstam L G. 等就利用该技术对HIV壳蛋白的30个单克隆抗体进行了连接表位定位研究, 并发现其中有6个不同的单克隆抗体可同时与HIV的壳蛋白发生结合^[8]。在明确了该技术可应用于表位定位研究领域后, 研究人员又将目光转向了HIV的包膜蛋白^[9]、核衣壳^[10]及整合酶^[11]的表位定位研究。Sugiura等利用BIA 技术对HIV21寡聚包膜糖蛋白的25个构象依赖的单克隆抗体进行了表位定位研究, 共鉴定出7个独立的抗原决定簇^[9]。Tanchou等通过ELISA和实时BIA技术, 利用HIV核壳蛋白NCp7的单克隆抗体对NCp7及其前体NCp15之间的构象变化进行了探索, 发现在这·85·国际病毒学杂志2006年4月第13卷第2期International Journal of Virology, April 2006, Vol 13, No. 2些NCp7的单克隆抗体中, 绝大多数直接与构象决定簇相结合的抗体能够抑制NCp7与HIV21复制引物tRNA之间的反应; 而绝大多数直接与线性决定簇相结合的抗体对该反应无抑制作用, 从而为人们进一步认识HIV核壳蛋白的结构及功能提供了重要信息^[10]。还有一些学者通过该技术对HIV21整合酶C末端DNA连接区域的抗原表位进行了定位研究, 为抗HIV药物设计提供了新的潜在靶点^[11]。

表1. BIAcore设备的生物传感片种类及功能

传感片名称	表面偶联物质	主要功能与用途
传感片 CM5	葡聚糖	带有化学基团如-NH ₂ , -SH, -CHO, -OH, -COOH的生物分子可通过化学方式, 以共价键偶联的方式与葡聚糖上的羧基偶联, 从而使生物分子偶联到传感片表面。
传感片 SA	链霉素	主要用于DNA-DNA, RNA-DNA, RNA-蛋白质间的相互作用。
传感片 NTA	氨三乙酸	可通过镍组氨酸修饰离子螯和作用将带有末端组氨酸修饰的生物分子末端, 具有能够保持生物分子空间结构的优势。
传感片 HPA	疏水物质(脂质体)	是研究细胞膜受体在膜环境中与配体相互作用的理想芯片。
传感片 L1	亲脂的葡聚糖化合物	亲脂的葡聚糖化合物可研究位于膜内外或跨膜的蛋白和受体等, 是研究膜蛋白信号传导的理想芯片。

*作者单位: 100022, 北京, 北京工业大学生命科学与生物工程学院病毒药理室

2. 测定抗原-抗体反应的动力学、亲和性及热力学参数

由于BIA是一种实时分析技术,因此不仅可以从定性的角度从实验得到的传感图上看出生成结合反应,同时还能考察整个反应的动态信息,从而可进一步论证假设的反应机理是否正确。抗原-抗体结合反应的动力学参数以及亲和和解离常数可用于衡量和说明抗原-抗体复合物的形成过程及其稳定性。Karlsson等率先将BIA技术的动力学测定优势引入到HIV研究中,测定了HIV壳蛋白与其抗体之间的结合率和平衡常数^[12]。法国学者Velge-Roussel F.等将重组的可溶性CD4受体(rsCD4)固定在生物传感芯片上,加入CD4抗体,测定两者间反应的动力学和热力学参数,证明了即使在BIAcore设备所允许的有限的温度范围内,仍然可利用该技术对抗原-抗体反应的热力学性质进行定量分析^[13]。有德国学者通过实时BIA分析对HIV核心蛋白P24及抗体间反应的动力学性质进行了探讨,推测P24的构象在反应中可能会发生缓慢变化,并指出以SPR为原理的实时BIA分析技术对于在数秒至数分钟的时间范围内来研究抗原-抗体连接反应是一种非常有力的工具^[14]。此后,又有Roos等研究人员进行了深入研究,通过测定不同温度下抗原-抗体连接反应的键合常数来判定抗原-抗体复合物形成过程中 ΔH 和 ΔS 的变化以及反应过渡态的能量。由反应平衡态数据计算得到的热力学参数作为动力学数据的有力辅证,为研究人员进一步认识和了解抗原与抗体之间的相互作用提供了重要信息^[15]。

(二) FMDV及HIV为例的有关研究

BIA技术的另一个应用点为药物筛选,目前世界上著名的大制药公司几乎都有数台以上的BIA2 core设备在用于新药的研究和筛选。首先,BIA技术是从特定靶点筛选药物方面具有快速、准确、无需标记及高自动化的优势和特点;此外,由于该技术提供的信息量非常丰富,涉及动力学、亲和性及热力学方面的内容,可为深入研究有潜力药物的作用靶点提供重要的指标和依据,因此在抗HIV药物研发过程中也具有日益重要的作用。

1. 口蹄疫病毒(FMDV)

Gomes等学者利用BIA技术对口蹄疫病毒的单克隆抗体与抗原肽之间的相互作用进行了研究。通过对试验得到的动力学方面的数据进行分析,研究人员能够了解到FMDV主要抗原位点的结构^[16]。

2. 蛋白酶

Markgren Po等^[17]利用以SPR原理为基础的生物传感技术对58种结构不同的过渡态类似物与HIV21蛋白酶之间的相互作用进行了研究,测定了其结合和解离常数,以及相互作用的亲和力,并绘制了 k_{on} 、 k_{off} 、 k_D 图。试验结果发现,如果对线性先导化合物的P1PP1'或P2PP2'侧链进行修饰,其与蛋白酶之间的亲和和解离率就会具有较大差异。同样地,环脲类(cyclic urea)和环磺胺类(cyclic sulfamide)抑制剂的动力学性质也不同。两类化合物与蛋白酶的亲和力均受到高解离率的限制。从而提示我们,在药物与其靶点相互作用的过程中,亲和率和解离率都是非常重要的动力学性质,在筛选药物的过程中应注重寻找那些不仅具有高亲和力而且还具有较低的解离率的化合物。

3. 包膜蛋白gp120

HIV21 gp120与CD4受体之间的相互作用是高度特异性的,晶体衍射分析显示,两种蛋白的接触面积很小,近年来已经成为抗HIV药物筛选研究的新靶点。唾液凝集素(SAG)是一种高分子量的糖蛋白(340 KD),在先天性免疫方面具有重要作用。2002年Wu Z等^[18]利用SPR技术发现SAG可与从各种HIV21分离株中得到的重组包膜糖蛋白gp120发生相互作用, k_D 值的范围为 $10^{-7} \sim 10^{-10} M$,与gp120sCD4间的亲和力具有可比性。并且由于预先与gp120相连接的sCD4并不能阻断SAG与gp120的键合作用,从而表明SAG对于HIV21感染的抑制作用具有其独特的作用机制。Yang QE等^[19]利用BIA技术筛选出一个新型HIV21进入阻断剂的原型化合物——五价的含锑小分子化合物(NSC13778),该化合物能够阻断gp120sCD4受体之间的结合,并屏蔽gp120与CD4分子的连接位点,有效地阻断病毒进入细胞。

4. RT 酶

2005年Scott R. Budihas 等^[20]用自动检测仪器——BIAcore 2000对羟基化的环庚三烯酚酮类化合物与核酸底物的相互作用机理进行了鉴定和特性研究。研究表明,从数种刺柏(Cupressaceous)树中分离得到的天然产物 β 2侧柏酚(β 2thujaplicinol)和甘露醇(amanicol)可在亚微摩尔浓度抑制HIV21和HIV2 2 RT酶的RNase H活性,并且不影响两种RT酶DNA聚合酶的活性。该类天然产物中最具开发潜力的 β 2侧柏酚(β 2thujaplicinol)对于HIV21 RTPRNase H活性的抑制作用要比对人类RNase H的作用强30倍。

(三) 临床诊断

由于BIA技术可对粗制样品(例如血清和脑脊液)进行快速筛选,确定样品中的抗体,因此在临床诊断中具有广泛的应用前景。Richalet2Secordel等对gp120 V2loop的抗体进行了筛选,以判定V2loop的哪一段肽序列最适合作为HIV感染的诊断工具进行研发^[21]。De Haard等利用该技术研发出了一种抗HIV壳蛋白的重组单链抗体——scFvs,证实不仅在HIV感染的早期诊断中具有重要作用,还具有干扰病毒重组的功能^[22]。Hifumi E等研究人员还对该技术在HIV诊断中的应用进行了改进,消除了人类血清样本中抗HIV P24抗体检测过程中可能出现的成份效应,避免了由于血清中其它成份的干扰所造成的非特异性反应^[23]。

(四) 疫苗研究

VanCott等利用实时BIA技术对HIV21包膜糖蛋白候选疫苗进行了研究,确证了Env的高度变异性^[24]。Alam SM等利用SPR检测方法在HIV21可溶性重组gp120蛋白上找到了一个HR22肽的连接位点,为HIV疫苗的研发工作提供了重要的参考信息^[25]。

BIA技术在病毒研究中的优势

自从1990年以SPR为原理的BIA技术推出以来,这一创新技术已经广泛应用于生物科学的各个领域。在病毒研究中,BIA技术符合快速、高自动化、结果准确度高,重复性好的要求,并且其提供的信息量很大。与传统方法相比,具有如下优势:

(一) 检测过程方便、快捷、周期短

由于检测试验所需的大多数试验材料,如生物传感片等都可从商业渠道获得或只需要进行简单地溶液配制等工作,因此,与传统方法相比,可极大地节省人力、物力、财力,并且能够以最快的速度得到准确可重复地试验结果,适用于高通量筛选。

(二) 无需标记

由于试验过程中不需加入任何标记物,因此可避免标记物可能造成的对于生物分子结构以及天然活性的破坏。另一方面,由于很多标记物均为荧光染色剂及放射性同位素等有污染物质,避免加入此类物质可减少对生态环境的破坏和污染。

(三) 实时检测,信息量大

BIA技术最大的特点就在于其能够对被测物(候选化合物)和潜在靶点之间的相互作用进行实时检测,不仅缩短了试验周期,更为可取的是在判断有无相互作用的基础上还能进一步提供反应过程中的相关数据,如亲和常数和解离常数以及反应开始时的结合速率,为对候选化合物的综合判断和筛选提供了有用的信息。对于粗提物或混合物还能通过对样品的回收,结合MS等方法进一步确定有效组分。

(四) 检测灵敏度高

BIA技术的检测灵敏度非常之高,因此通常只需要极微量的样品就能进行测定,大大降低了候选化合物的提取和合成工作的压力。Dobrin Nedelkov等首次将BIAPMS联用技术应用于葡萄球菌肠毒素(Staphylococcus enterotoxin B, SEB)的检测方面,建立·06·国际病毒学杂志2006年4月第13卷第2期 International Journal of Virology, April 2006, Vol 13, No. 2立的分析方法灵敏度可达到1ngPml^[26]。

结语

近年来,随着以SPR为原理的BIA技术的不断改进,其发展十分迅猛,已经迅速渗透到病毒相关研究的各个方,涉及抗体确定、抗原表位定位、新药研发以及病毒感染的临床诊断等。只是由于目前商用仪器(如瑞典BiaCore公司BIAcore 3000)的价格较为昂贵,未能在各研究单位中普及使用。但笔者认为,随着芯片技术的不断发展、试验方法学以及数据处理技术的不断改进,该技术将进一步扩大其应用领域,必将成为一种强有力的分析手段。

参考文献

1. Duan YY, Liu DL. The Advantages of SPR biosensor and its application in biospecific interaction analysis. *Letters in Biotechnology*, 2002, Vol 13:72.
2. Wei GH, Chai XQ, Yin L P. BIA and its Applications in Protein Science Research. *Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)*, 2003, Vol. 24: 60.
3. CHEN Zhi zhong. Progress on the Applications of Surface Plasmon Resonance Technology in Research and Development of New Drugs. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2004, 11 (5):3362338.
4. www. biacore. com
5. Myska DG, Sweet RW, Hensley P, et al. Energetics of the HIV gp120CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 2000, 97 (16): 902629031.
6. Gorshkova II, Rausch JW, Le Grice SF, et al. HIV21 reverse transcriptase interaction with model RNA2DNA duplexes. *Anal Biochem*, 2001, 291 (2): 1982206.
7. Yoo S, Myska DG, Yeh C, et al. Molecular recognition in the HIV21 capsidPyclophilin A complex. *J Mol Biol*, 1997, 269 (5): 7802795.
8. Fagerstam L G, Frostell A, Karlsson R, et al. Detection of antigen2 antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *J Mol Recognit*, 1990, 3 (526): 2082214.
9. Sugiura W, Broder CC, Moss B, et al. Characterization of conformation2dependent anti2gp120 murine monoclonal antibodies produced by immunization with monomeric and oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins. *Virology*, 1999, 254 (2): 2572267.
10. Tanchou V, Delaunay T, Bodeus M, et al. Conformational changes between human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein NCp7 and its precursor NCp15 as detected by anti2NCp7 monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 1995, 76 (Pt 10): 245722466.
11. Yi J, Cheng H, Andrade MD, et al. Mapping the epitope of an inhibitory monoclonal antibody to the C2terminal DNA2binding domain of HIV21 integrase. *J Biol Chem*, 2002, 277 (14): 121642 12174.
12. Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L. Kinetic analysis of monoclonal antibody antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods*, 1991, 145 (122): 2292240.
14. Glaser RW, Hausdorf G. Binding kinetics of an antibody against HIV p24 core protein measured with real2time biomolecular interaction analysis suggest a slow conformational change in antigen p24. *J Immunol Methods*, 1996, 189 (1): 1214.
15. Roos H, Karlsson R, Nilshans H, et al. Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology. *J Mol Recognit*, 1998, 11 (126): 2042210.
16. Gomes P, Giralt E, Andreu D. Direct single2step surface plasmon resonance analysis of interactions between small peptides and immobilized monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 2000, 235 (12 2): 1012111.
17. Markgren PO, Schaal W, Hamalainen M, et al. Relationships between structure and interaction kinetics for HIV21 protease inhibitors. *J Med Chem*, 2002, 45 (25): 543025439.
18. Wu Z, Van Ryk D, Davis C, et al. Salivary agglutinin inhibits HIV type 1 infectivity through interaction with viral glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2003, 19 (3): 2012209.
19. Yang QE, Stephen AG, Adelsberger JW, et al. Discovery of small2molecule human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that target the gp120binding domain of CD4. *J Virol*, 2005, 79 (10): 612226133.
20. Budihas SR, Gorshkova I, Gaidamakov S, et al. Selective inhibition of HIV21 reverse transcriptase2associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (4): 124921256.
21. Richalet2Secordel PM, Zeder2Lutz G, Plae S, et al. Cross2reactivity of monoclonal antibodies to a chimeric V3 peptide of HIV21 with peptide analogues studied by biosensor technology and ELISA. *J Immunol Methods*, 1994, 176 (2): 2212234.
22. De Haard HJ, Kazemier B, Koolen MJ, et al. Selection of recombinant, library2derived antibody fragments against p24 for human immunodeficiency virus type 1 diagnostics. *Clin Diagn Virol*, 1998, 5 (5): 6362644.
23. Hifumi E, Kubota N, Niimi Y, et al. Elimination of ingredients effect to improve the detection of anti HIV21 p24 antibody in human serum using SPR apparatus. *Anal Sci*, 2002, 18 (8): 8632 867.
24. VanCott TC, Mascola JR, Kaminski RW, et al. Antibodies with Specificity to Native gp120 and Neutralization Activity against Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates Elicited by Immunization with Oligomeric gp160. *J Virol*, 1997, 71 (6): 431924330.
25. Alam SM, Paleas CA, Liao HX, et al. An inducible HIV type 1 gp41 HR22 peptide2binding site on HIV type 1 envelope gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004, 20 (8): 8362845.
26. Dobrin Nedelkov, Randall W. Nelson. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via Biomolecular Interaction Analysis Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (9): 521225215.

感谢北京工业大学谭晶晶 李泽琳 曾毅为本刊提供此文章