双偏振干涉技术(DPI): 生物分子相互作用研究的新工具

王双^{1,2}, 黄建设¹, 杨秀荣^{1*}

1. 中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室, 长春 130022

2. 中国科学技术大学, 合肥 230026

*通讯作者, E-mail: xryang@ciac.ac.cn

收稿日期: 2018-03-31; 接受日期: 2018-04-23; 网络版发表日期: 2018-07-12

国家自然科学基金(编号: 21435005, 21627808)和中国科学院前沿科学重点研究项目(编号: QYZDY-SSW-SLH019)资助项目

摘要 双偏振干涉(dual polarization interferometry, DPI)技术是近年来发展起来的一种免标记、实时、高灵敏和高分辨率的表面分析技术. 它能够精确测量分子相互作用界面层的密度、厚度和质量的绝对值, 可实时获取分子相互作用过程的动力学和结构信息. 本文简单介绍了DPI的测量原理、仪器组成并对其与相关检测技术的对比进行了简要的概述; 着重介绍了近10年来DPI技术在生物分子相互作用研究方面的应用进展, 主要包括蛋白质之间以及与其他分子的相互作用, DNA与各种分子之间的相互作用, 生物膜与其他分子的相互作用, 蛋白质的吸脱附、聚集和结晶过程监测等; 并对DPI技术未来的发展进行了展望. 随着技术的不断发展, DPI将会在生物分析、纳米材料表征、能源相关表/界面研究等方面得到广泛应用.

关键词 双偏振干涉, 相互作用, 蛋白质, DNA, 生物膜

1 引言

分子相互作用是生命科学基础研究、药物研发、表/界面研究等领域的重要组成部分. 例如, 研究生物分子的相互作用及其作用过程中构象的变化是深入理解生物分子功能和生物过程的基础. 为了获得分子相互作用过程的结合动力学参数和结构信息, 已发展了多种先进的分析和测量技术, 其中圆二色谱(CD)、核磁共振(NMR)、中子反射(NR)、电子显微镜(EM)和X射线晶体衍射(XRD)等技术可以提供精确的分子结构信息; 而石英晶体微天平(QCM)、表面等离子体共振

(SPR)、微量热法以及荧光共振能量转移(FRET)等已成为获取分子相互作用过程动力学数据的有力工具. 然而, 发展实时、免标记、可同时获得分子相互作用过程中的动力学和结构信息的分析技术仍面临巨大的挑战.

双偏振干涉技术(dual-polarization interferometry, DPI)是近年来发展起来的一种实时、定量研究分子相互作用的新方法. 该集成光学传感技术是由英国的Freeman和Cross^[1]于1998年首先提出了概念并申请了相关专利. 随着仪器的发展, 2003年该方法被用于蛋白质的吸附过程研究^[2]. 此后, 由于其高灵敏度、免标记

引用格式: Wang S, Huang J, Yang X. Dual polarization interferometry (DPI): a new tool in studying the biomolecular interaction. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 852–865, doi: 10.1360/N032018-00073

以及可实时获取分子识别的动力学和结构信息等优点, 该检测方法在众多领域得到了广泛应用. 早期, 包括本课题组在内的多个课题组也对DPI技术的发展和在不同领域的应用进行了评述^[3-7]. 本文首先对DPI技术的原理及其与相关检测技术的对比进行了简要的概述, 然后重点总结了近10年来该技术在不同领域的应用进展, 主要包括蛋白质之间以及与其他分子的相互作用, DNA与各种分子之间的相互作用, 生物膜与其他分子相互作用, 蛋白质的吸脱附、聚集和结晶过程监测; 最后, 基于本课题组在该领域多年研究的经验, 对DPI技术未来的发展提出了我们的见解, 期望本文可以为相关领域研究人员提供一定的参考.

2 DPI的检测原理、仪器设备以及与其他技术的对比

2.1 检测原理

DPI是基于光的Thomas Young干涉现象检测的仪器. DPI使用的芯片是其重要的检测元件, 如图1所示^[8], 从下往上, 第二层为参比波导, 第四层为传感波导, 参比波导和传感波导层的折射率高于相邻的覆盖层, 以保证入射的激光在波导内形成全反射. 传感片的表面覆盖层开有两个窗口, 将传感波导的表面暴露出来作为反应池. 偏振光在芯片的一端入射, 经过两个波导片传播后出射并发生干涉, 在远场形成明暗相间的干涉条纹. 干涉条纹的位置和强度与偏振光在波导片里的传播速度和光强有关. DPI同SPR一样, 都是基于消逝波的光学技术. 偏振光在波导片里传播时, 界面处会产生消散场, 约渗透至界面外100 nm. 当传感波导表面固定上(或者解离开)分子或者溶液里的分子与波导表面固定的分子发生相互作用时, 就会影响消散场, 从而使得偏振光在传感波导片里的传播速率或者光强发生改变; 而参比波导的表面由于是密闭的, 其中的偏振光一直保持不变. 因此, 光由两个波导片出射在远场形成的干涉条纹将发生变化, 根据Maxwell方程, 将干涉条纹信号进行数学转换得到传感波导表面的变化信息, 如表面厚度、质量及折射率的变化.

2.2 仪器设备

DPI仪器设备主要包括氦-氖激光光源、偏振转换控制器、干涉信号采集装置、微流控系统和温控系

图1 DPI传感芯片构成及检测原理^[8] (网络版彩图)

Figure 1 The composition of sensing chip and detection principle of DPI ^[8] (color online).

统. 微流控系统主要由注射泵、六通阀和定量环组成. 缓冲溶液在注射泵的作用下均匀连续地注入流通体系, 并携带定量环中待测样品进入传感波导片; 同时偏振光以50 Hz的变换频率交替照射传感片, 产生的干涉条纹被实时记录并经过计算机软件处理得到TM和TE的相位变化; 温控系统使得体系温度保持在20℃.

2.3 DPI与其他常用表面分析技术的对比

DPI是一种无标记、定量传感技术, 并且能够实时获取芯片表面分子层变化的动态结构信息. 作为一种光学传感器, DPI (<50 Da)比SPR展现出更高的灵敏度, 弥补了SPR只能得到厚度与折射率的综合变化, 不能得到各自变化的缺点; 作为质量检测技术, DPI (0.1 pg/mm²)要比建立完善的QCM技术(50 pg/mm²)的灵敏度更高, 且补充了表面密度和厚度的变化信息; NR、原子力显微镜(AFM)、NMR和XRD等表面分析技术只能用于静态表面结构的测量, 不能实时记录动态的结构变化. 各种分析技术的对比见表1.

3 DPI技术的应用

3.1 蛋白质之间以及与其他分子的相互作用

蛋白质是生理功能的执行者和生命现象的体现者, 在生命机体的新陈代谢、生长发育、行为举止等方面扮演着至关重要的角色, 因此研究蛋白质的结构及蛋白质与分子之间相互作用对于理解蛋白质的功能至关重要. DPI作为一种有潜力的检测工具, 可以对蛋白质之间或与其他分子之间的相互作用进行实时动态

表 1 几种常用表面分析技术比较

Table 1 Comparisons of surface-analytical techniques

技术	定量测量	精度	实时测量	是否接近体内测量	结构信息
NR	是	非常高	否	是	高
SE ^{a)}	是	高	是	是	低
SPR	是	—	是	是	低
QCM	是	高	是	是	中等
AFM	是	非常高	否	否	很高
XRD	是	高	否	否	很高
DPI	是	非常高	是	是	中等

a) SE: 椭圆光度法(spectroscopic ellipsometry)

检测, 是研究蛋白质结构及功能关系的有力工具.

3.1.1 蛋白质之间的相互作用

由于蛋白质-蛋白质相互作用是细胞行为或者信号传导的基础, 也是治疗疾病的靶点, 所以这一研究方向引起了大量研究人员的关注. Lin等^[9]对多价抗原-抗体之间相互作用的动力学进行了研究. 通过DPI得出解离常数及结合计量比, 结果与传统的酶联免疫法(ELISA)一致, 这一研究体现了DPI在生物传感应用中的优势. Zhao等^[10]利用DPI、NR和SE研究了抗体在界面的组装及其与抗原的结合过程. 通过优化抗体的取向及浓度, 研究了抗原-抗体之间结合效率的问题, 发现抗原以插入的方式与抗体结合而不是在上方形成新的吸附层. Giménez-Romero等^[11]通过DPI技术测量抗原-抗体相互作用的动力学参数和结构变化, 并建立了数学模型. 利用该方法可分辨生物分子识别的机制: 诱导契合和构象选择且在不利用XRD的情况下, 可以定位抗原-抗体结合的确切位点.

Haudenschild等^[12]利用DPI技术研究了软骨低聚基质蛋白(COMP)与生长因子TGF- β 1之间的相互作用. 他们发现成熟的COMP蛋白能够与几个TGF- β 1结合, 并且在微酸性pH条件下结合达到顶峰, 而且结合COMP的TGF- β 1生物活性也有所提高. Thibault等^[13]利用DPI表征了 λ 噬菌体蛋白O (λ O)与ClpX锌结合位点(ZBD2)之间的亲和作用. λ O和ClpX辅因子(SspB)的结合位点在ZBD2区域有重合, 而且发现ZBD上的突变能够增强 λ O的降解. Feng等^[14]采用DPI和SPR分析酶和辅酶之间的相互作用, 检测到硫辛酰胺脱氢酶(DP)和乳酸脱氢酶(LDH)对辅酶的氧化态(NAD^+)及还原态

(NADH)有不同的结合选择性和倾向性, 因此, 这两种酶可作为指示酶用于分辨NAD(H). Balhara等^[15]结合DPI、等温滴定量热法(ITC)、动态光散射(DLS)和荧光光谱探索了烯醇酶和血纤维蛋白溶酶原形成稳定复合物的关键条件.

最近, 我们也利用DPI技术实时探究了三种不同形态的A β 蛋白(单体A β (1-42)、寡聚体A β (1-42)、高聚体A β (1-42))与ED1D2L受体(白细胞免疫球蛋白样B2的胞外结构域)间的相互作用(图2)^[16]. 通过获取相互作用过程中的参数, 如层质量、厚度、密度的变化, 精确测定了不同形态A β (1-42)和ED1D2L受体间的结合速率和解离速率, 发现高聚体A β (1-42)与ED1D2L受体具有很强的亲和力且停留在ED1D2L受体上的时间较长, 可能引起下游信号传导异常, 进而导致一系列神经毒性效应. 根据测定的动力学参数, 可以帮助我们从动力学角度深入了解高聚体A β (1-42)是如何在阿尔兹海默症(AD)中引起毒性效应的, 并且上述信息有可能为未来药物的发现和筛选提供帮助.

其他研究人员也利用DPI技术研究了药物蛋白与目标蛋白质的相互作用, 以明确药物对疾病的作用机制, 并为蛋白质药物的研发提供了新的分析检测技术^[17-19].

3.1.2 蛋白质与金属离子的相互作用

DPI技术也被广泛应用于研究蛋白质与金属离子的相互作用. Karim等^[20]研究了谷氨酰胺转移酶与 Ca^{2+} 的相互作用, 测得两者的亲和常数为 $0.95 \pm 0.2 \text{ mM}$, 与文献报道的结果相吻合; Thompson等^[21]研究了阮蛋白与 Cu^{2+} 的相互作用, 并且可鉴定出作用时阮蛋白结构

图2 DPI实时研究Aβ(1-42)与ED1D2L受体作用示意图(a)以及对不同分子固定时的实时响应曲线(b) (黑色: 质量, 红色: 厚度, 蓝色: 密度)^[16] (网络版彩图)

Figure 2 (a) Schematic representation of real-time study the interaction of Aβ(1-42) and ED1D2L by DPI. (b) DPI-based real-time measurements of mass (black), thickness (red), and density (blue) for the whole immobilization process of different molecules^[16] (color online).

的微小变化; Coan等^[22]利用DPI技术实时研究了肌钙蛋白与Ca²⁺相互作用时的构象变化; Grøftehaug等^[23]结合热迁移分析(TSA)和DPI探究了蛋白质与不同金属离子的相互作用模式。

3.1.3 蛋白质与其他分子的相互作用

DPI技术也被用于蛋白质与糖^[24-29]、蛋白质与多肽^[25,27,28]、蛋白质与表面活性剂^[30-33]等的相互作用研究, 这些研究为功能化表面的构筑及全面理解疾病过程中的信号传导机制打下了良好的基础。

3.2 DNA与各种分子之间的相互作用

脱氧核糖核酸(DNA)作为遗传信息的主要携带者, 为基因表达提供了物质基础, 其序列变异、缺失或错配与疾病的发生等有着密切的关系^[34,35]。而且DNA

具有廉价、易合成、高度有序、可预期等优点, 被广泛应用于生物分子逻辑线路等的设计和构筑。此外, DNA之间以及DNA与其他分子之间的相互作用越来越受到研究人员的重视, 尤其在药物筛选、药物传递等多个领域具有重要的意义。因此, 利用DPI深入探索DNA探针的表面固定、DNA与小分子相互作用, 在DNA生物传感器的构建和疾病诊断等领域发挥重要的作用。

3.2.1 DNA与DNA的相互作用

2005年, Berney等^[36]利用DPI技术研究了DNA的相互作用, 对DNA探针的不同固定方式进行了对比, 并研究了探针浓度对杂交效率的影响; 同时他们发现, 电解质浓度的增加会导致吸附的DNA探针的量减少, 而通过亲和素-生物素交联固定的探针量比共价交联法固定的探针量低4倍。Lillis等^[34]利用DPI表征硅烷化表面上单链DNA的共价固定(直接共价交联和双功能交联分子共价交联), 并对目标DNA进行检测。在单次实验中可以实时获得探针固定过程不同阶段探针的取向以及表面探针覆盖度。通过测量杂交过程中探针层的厚度和密度变化, 阐明了探针的灵活性对杂交效率的影响。

在一系列DNA与不同芯片界面研究工作基础上, Lee等^[35]结合DPI、QCM和流式细胞仪研究了DNA层层组装多层膜的盐和热稳定性。他们发现长度至少10个碱基互补的DNA链才能够形成DNA多层膜, 并且寡核苷酸链越长, 形成的DNA多层膜越稳定。随着DNA嵌段的长度由20增加到60个碱基, DNA多层膜的熔融温度(T_m)由38.5℃升高至60℃, 并且以AG配对结尾的DNA多层膜的熔融温度高于TC配对的多层膜。Kato等^[37]也对不同长度和序列的寡核苷酸链层层组装多层膜的生长和盐稳定性进行了研究, 并且对此过程进行数学建模。

Liang课题组^[38]利用DPI技术对DNA链在表面的吸附行为以及DNA杂交反应进行了广泛研究。例如, 他们对DNA/Ca²⁺、DNA/Cu²⁺和DNA/Co(NH₃)₆³⁺复合物在氨基化和二氧化硅芯片上的吸附行为进行了探索, 研究了聚乙烯亚胺(PEI)在氮氧化硅芯片表面的吸附以及之后与DNA的相互作用^[39]。他们还利用DPI技术研究了固液界面DNA链取代反应, 探讨了取代DNA的浓度及DNA toehold的长度对取代效率的影响, 发现

随着取代DNA浓度和toehold长度的增加, 取代效率增加^[40]. 他们还利用DPI芯片表面的DNA toehold交换反应(toehold exchange reaction)发展了一种单核苷酸多态性的分析方法^[41], 在DNA浓度为0.8 nM~1 μ M范围内, 此方法能够清楚地识别任何位置单碱基的插入和删除(图3(a)). 同时, 他们对固液界面DNA杂交链增长反应(HCR)过程及DNA链在芯片表面的取向进行了实时监测(图3(b))^[42], 研究了不同浓度的盐溶液对后续杂交链增长反应的影响, 发现增加盐的浓度能够促进HCR效率和反应速率; 同时5'端固定的触发DNA其HCR效率要比3'端固定时高. 另外, 他们发展了一种光控DNA杂交链增长反应制备图案化DNA聚合物刷的方法, 利用DPI技术对整个过程进行实时监测^[43].

3.2.2 DNA与小分子的相互作用

本课题组^[44]开展了DPI技术用于DNA与小分子相互作用的研究. 最初, 我们研究了表面固定的双链DNA与小分子(溴化乙锭(EtBr)和精胺)作用时结构的变化. 发现与变性的DNA相比, 天然的DNA在PEI覆盖的芯片上形成了疏松且较厚的吸附层; 当EtBr与天然DNA结合时, 诱导吸附层厚度显著减小、密度增加, 而与变性的DNA结合则会导致厚度和密度的微小增加. 以静电引力作用结合的精胺使得两种DNA吸附层均发生厚度增大和密度减小; 而且具有疏松结构的天然DNA层更易于结合精胺, 结合量和厚度增加量均大于变性的DNA. 我们也利用DPI技术监测了DNA与米托蒽醌(MTX)和甲基蓝(MB)的相互作用(图4)^[45]. 由于MTX和MB均具有一定程度的光吸收性质, 当和表面固定的DNA作用时, 吸收激光引起消光现象, 根据消光程度能够实时监控DNA与小分子的结合和解离, 并得到MTX-DNA和MB-DNA的结合常数分别为 1.8×10^5 和 4.2×10^4 M^{-1} . 根据干涉条纹相变测得的结果不仅反映了小分子的结合量, 也反映了相互作用时DNA结构的变化, 发现MTX和MB通过嵌插作用与双链DNA结合, 使DNA结构变得紧密.

DPI技术也被我们用于研究富含腺嘌呤的单链DNA与柯南因的特异性结合, 实现了对DNA结构变化的在线监测, 并发展了高灵敏度和特异性地检测柯南因的生物传感器^[46]. 实验测得柯南因和A₄₈的结合速率常数、解离速率常数和结合常数分别为 4.95×10^3 $M^{-1} s^{-1}$ 、 $0.031 s^{-1}$ 和 1.6×10^5 M^{-1} . 利用质量、厚度、折

图3 (a) DPI芯片上利用toehold交换反应进行单碱基变化的识别^[41]; (b) DPI监测杂交链增长反应过程中注入触发DNA、H1和H2后厚度(黑线)、质量(红线)和密度(蓝线)的变化^[42] (网络版彩图)

Figure 3 (a) Discriminating single-base changes on a DPI chip surface by employing DNA toehold exchange reaction^[41]. (b) Real-time monitoring the thickness (black line), mass (red line) and density (blue line) changes after introducing initiator ssDNA, H1, and H2^[42] (color online).

图4 甲基蓝诱导PEI和DNA/PEI层的实时消光和相位变化(插图)曲线^[45] (网络版彩图)

Figure 4 The optical extinction and phase changes (the inset) when methylene blue interacted with PEI and DNA/PEI layers^[45] (color online).

射率变化得到的检测限分别为0.22、0.14和0.32 μM . DPI技术也被用于三磷酸腺苷(ATP)与其适配体间的相互作用研究,并测得了两者之间的结合速率常数、解离速率常数及结合常数^[47].最近,Su等^[48]利用DPI技术发展了一种双酚A适配体生物传感器,其检测线性范围为1~20 μM ,并对识别过程中适配体构象的变化进行了研究.

3.2.3 DNA与金属离子的相互作用

本课题组还利用金属离子与DNA特异性的相互作用发展了一系列高灵敏度和高选择性的金属离子DPI传感器.例如,利用 Hg^{2+} 离子与T-T错配碱基对之间的强特异性结合,构建了 Hg^{2+} 生物传感器(图5(a))^[49],获得了 Hg^{2+} /T-T的结合速率常数和解离速率常数分别为 $1.92 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 0.014 s^{-1} ,结合常数为 $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, Hg^{2+} 传感器的检测限达到27 nM.利用DPI技术实时研究了多胞嘧啶单链DNA与 Ag^+ 的相互作用^[50]. Ag^+ 可以与多胞嘧啶单链DNA中的胞嘧啶碱基(C)作用,形成C- Ag^+ -C碱基错配,诱导DNA由自由卷曲链折叠成刚性的双链结构,圆二色谱表征证明了这一构象变化.通过实时监测芯片表面质量、密度和厚度的变化,构建了高灵敏度和选择性的银离子DPI传感器(图5(b)).另外,半胱氨酸可以特异性地将银离子从C- Ag^+ -C复合物中捕获出来,基于此设计了半胱氨酸传感器.最近,我们对富含鸟嘌呤的单链DNA与 Pb^{2+} 形成四链体的过程进行了详细的研究,并构建了 Pb^{2+} 与EDTA生物传感器^[51].为了解决固-液界面上探针的可获得性问题,将三维DNA四面体纳米结构用于DNA探针在DPI芯片表面的固定,提高了检测的灵敏度(图5(c)).这一研究不仅为四链体有关药物和病原体的构象动力学研究提供了基础,并且通过结合纳米材料和界面分析技术丰富了生物传感的工具.

3.2.4 DNA与蛋白质的相互作用

Zheng等^[52]使用BSA和聚乙二醇(PEG)对链霉亲和素修饰的DPI芯片表面进行封闭来构建抗污染表面,通过链霉亲和素和生物素之间的强特异性相互作用将生物素修饰的凝血酶适配体固定于芯片表面,利用DPI技术实时研究了所构建的抗污染表面的抗非特异性吸附能力和适配体与目标分子之间的特异性结合情况,在此基础上构建了凝血酶DPI传感器.Song等^[53]也

图5 DPI技术用于研究DNA与金属离子 Hg^{2+} ^[49] (a), Ag^+ ^[50] (b)和 Pb^{2+} ^[51] (c)的相互作用(网络版彩图)

Figure 5 The interaction of DNA with metal ions, Hg^{2+} [49] (a), Ag^+ [50] (b) and Pb^{2+} [51] (c) by DPI (color online).

运用DPI技术表征了生物素修饰的传感表面上亲和素、适配体和凝血酶的层层组装过程. González-Lucas等^[54]将生物素标记的DNA分子信标固定在芯片表面,利用DPI技术研究了分子信标对链霉亲和素的识别以及随后的杂交过程,发现由于蛋白质的存在,杂交后双链DNA采用更直立的构象,其在芯片表面的倾角比没有蛋白质存在时更大.

3.3 生物膜与其他分子的相互作用

生物膜是一个具有特殊结构和功能的选择性透膜,参与能量转换、物质运送、信息识别与传递,是生命对环境的天然屏障.此外,生物膜作为一种界面,为蛋白质、聚多糖和脂质等的相互作用提供了平台.近年来,研究人员制备了多种脂双分子层作为生物膜的模型,对生物膜的结构、功能及与其他分子的作用进行了深入研究.

早期,Terry等^[55]利用DPI技术研究了杂化双层膜的形成过程.Khan等^[56]研究了由磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸两种组分组成的囊泡在二氧化钛表面的吸附,实验表明,超过20%的磷脂酰丝氨酸主要面向二氧化钛表面形成支撑双分子层,验证了囊泡在吸附时的确发生脂质的重新分配.这些研究表明单次DPI测量所提供的质量、厚度和折射率等信息可用于解析模拟生物膜的结构.

DPI作为一种表面分析技术,可方便地用于研究脂质体或生物膜与其他分子的相互作用,评价这些外源分子对生物膜结构的扰动.例如,Popplewell等^[57,58]

利用DPI监控蜂毒素诱导脂质体破裂过程, 并研究脂质体组成成分(磷脂酰丙三醇和磷脂酰丝氨酸)与蜂毒素水解的关系. DPI通过直接测得脂质体维度和质量的变化获得了蜂毒素结合脂质体的初始阶段的信息.

近年来, 抗菌肽作为一种潜在的抗菌药物受到广泛的关注, 大量科研工作者以抗菌肽为研究对象, 利用DPI技术深入地研究其与脂质膜相互作用的具体位点及作用机理(图6)^[59-69]. 例如, Lee等^[59]利用DPI和SPR比较了两种抗菌肽HPA3和HPA3P与脂质膜的结合, 发现抗菌肽的结合导致脂质膜有序度降低, 并且不同抗菌肽引起膜紊乱的速度不一样; 这一工作也为研究抗菌肽作用模式提供了新的分析方法. Fernandez等^[62,63]结合DPI、NR和NMR等方法研究了抗菌肽maculatin 1.1与磷脂双层膜的相互作用, 发现脯氨酸在抗菌肽扰乱脂质膜结构的过程中起着至关重要的作用.

为了进一步理解磷脂酰肌醇转移蛋白对脂分子的转移机制, Baptist等^[70]通过DPI技术研究磷脂酰肌醇转移蛋白与膜的相互作用. 对于脂质膜参与 α -突触核蛋白的功能和病理过程, Ouberal等^[71]的研究结果提供了更为易懂的证据, 他们发现突触核蛋白能够感知脂质堆积缺陷, 并且能够诱导膜的重塑, 通过脂质的横向膨胀实现运输囊泡的功能. 最近, Heider等^[72]结合DPI和QCM-D实时研究了一系列蛋白质与脂质双层膜之间的相互作用, 探索膜蛋白对生物膜功能的影响. Lee等^[6]对DPI技术在蛋白质/肽与生物膜相互作用研究方面的进展进行了综述.

图6 DPI监控多肽与生物膜的作用机制^[68] (网络版彩图)
Figure 6 Monitoring the interaction mechanism of polypeptide and biomembrane by DPI^[68] (color online).

DPI技术也被用于研究外界环境及膜自身组成对膜结构的影响, 如水^[73]、离子^[74,75]、糖^[76,77]、蛋白质^[70,78,79]和纳米材料^[80]等.

3.4 蛋白质的吸脱附、聚集和结晶过程监测

3.4.1 蛋白质的吸附/脱附过程研究

蛋白质在表面的吸附是一种普遍现象, 但是由于吸附过程受到众多外界因素、蛋白质和表面性质的影响, 对该过程的研究则面临巨大的挑战. 另外, 蛋白质在表/界面的吸附通常会引起构象改变, 从而影响其功能^[81]. 因此, 蛋白质的吸附脱附行为与生物传感器的构建、生物相容性材料及医药器械的研制等密切相关.

在DPI技术发展的初期, 该方法就被用于研究蛋白质的吸附行为^[2,24,81,82], 并且其测量结果与其他方法所得的结果一致^[81,83], 证明了该方法的可靠性. 近年来, DPI技术已成为研究蛋白质吸脱附行为的常规方法(表2). 例如, Sonesson等^[84]研究了嗜热真菌脂酶(TLL)在疏水和亲水表面的吸附和活性, 发现TLL对疏水表面具有较高的亲和性, 而在亲水表面上则具有更高的活性, 说明有更多脂酶以活性位点朝着溶液的取向进行吸附. Lundin等^[85]利用DPI和其他多种测试方法研究了牛血清白蛋白(BSA)污染的牛颌下腺黏蛋白(BSM)在亲水表面(云母、二氧化硅)的吸附动力学、吸附量以及吸附层的结构. 研究发现, 购买的BSM中约含有9 wt%的BSA杂质, 其在表面形成的吸附厚度和黏弹性与纯化的BSM完全不同, 因此样品中杂质的存在会严重影响BSM分子的结构和功能.

DPI技术也被用于研究 β -乳球蛋白(β -Lg)和 α -乳清蛋白(α -La)在油-水界面吸附时构象的变化^[30,31]. 结果表明, 在裸的氮氧化硅表面, β -Lg保持其原始三级结构, 形成厚且疏松的吸附层; 而在C18修饰表面则形成薄且致密的吸附层, 表明 β -Lg由球状结构转变成了平面结构. 结合同步辐射圆二色谱(SRCD)和前表面荧光光谱(FFTF)进一步证明, β -乳球蛋白在油-水界面吸附时会失去其球状三级结构, 经由 β -折叠转变成 α -螺旋结构. 他们进一步研究了温度和盐浓度对 β -Lg微乳液稳定性的影响. 将同样的方法用于 α -La在油-水界面的吸附研究, 发现了相似的蛋白质去折叠行为^[31].

Cowsill等^[86]利用DPI技术研究了BSA在硅/水界面的吸附过程, 发现在蛋白质浓度低于 0.5 mg mL^{-1} 时, 吸附遵循Langmuir动力学模型, 而在浓度大于

表 2 DPI技术用于蛋白质吸附/脱附过程研究

Table 2 The application of DPI for monitoring protein adsorption/desorption process

目标蛋白	基底表面性质	辅助测试方法	文献
Fibrinogen	亲水	Ellipsometry, NR	[24]
Lysozyme	亲水	NR	[81]
BSA	亲水	NR	[82]
Lipase	亲水, 疏水	SPR	[83]
Lipase	亲水, 疏水	Confocal microscopy	[84]
BSM, BSA	亲水	QCM-D	[85]
β -lactoglobulin	疏水	SRCD, FFTF	[30]
α -lactalbumin	疏水	SRCD, FFTF	[31]
BSA	亲水	NR	[86]
anti -hCG, BSA	亲水	—	[87]
Mefp-1	亲水	—	[88]
Mefp-1	亲水	—	[89]
Hydrophobins HFBI, HFBII	亲水, 疏水	—	[90]
BSA	亲水, 疏水	AFM	[91]
Lysozyme	亲水	QCM-D	[92]
α -synuclein, Lysozyme, BSA	亲水, 疏水	QCM-D	[93]
Fibronectin, BSA	亲水, 疏水	—	[94]
Bilirubin oxidase	亲水	E-QCM-D	[95]
Hepatitis B virus surface antigen	亲水	—	[96]
Fibrinogen	亲水, 疏水	QCM-D	[97]

0.5 mg mL⁻¹时, 吸附过程则按随机顺序吸附模型进行, 并对DPI和NR两种技术测量的蛋白质层厚度进行了对比. 他们还利用DPI技术详细研究了免疫分析中抗体固定、非特异位点封闭和抗原结合过程(图7)^[87]. 以妊娠试纸测试中常用的anti-hCG和hCG免疫反应为例, 发现抗体的吸附速率和饱和吸附量依赖于抗体溶液浓度, 并遵循Langmuir吸附模型; 在BSA封闭步骤中则发现BSA在抗体修饰表面的吸附速率显著大于在空白表面的吸附速率, 该现象可能与预吸附的抗体在表面的聚集作用有关; 对抗体/BSA复合膜中BSA脱附过程的研究表明其脱附经历了起始阶段的快速脱附和随后的慢速脱附两个阶段. 对整个免疫分析过程的研究发现BSA是嵌插到抗体之间的空隙中, 从而减少抗原的非特异性吸附, 并且在较低抗体表面覆盖度时, 抗原的结合量恒定为0.15 mg m⁻², 而在高抗体覆盖度时, 抗原/抗体结合摩尔比显著降低.

Krivosheeva等^[88]详细研究了溶液pH对贻贝黏着蛋白Mefp-1在DPI芯片表面的吸附动力学、吸附量和

形成的吸附层结构的影响. 他们还研究了溶液离子强度和pH诱导的Mefp-1的脱附行为^[89], 表明与携带相似电荷密度的阳离子聚电解质相比, Mefp-1吸附层受溶液离子强度和pH变化的影响较小. 最近, 他们也将DPI技术用于二类疏水蛋白HFBI和HFBII在氮氧化硅芯片上的吸脱附平衡和动力学研究^[90]. 结果表明, 两种蛋白质在芯片表面均形成了不完整的单分子层, 但是HFBII的吸附量明显大于HFBI, 并且二者的吸附动力学也完全不同.

Xu等^[92]利用DPI和QCM-D技术研究了溶菌酶的吸附机制. 其中DPI只对蛋白质干重作出响应, 而QCM-D测量的则是湿重, 因此两种技术可以作为互补更详细地研究蛋白质的吸附过程. 通过对吸附层的质量、厚度、密度和折射率的测量, 推导出了溶菌酶吸附过程中分子取向的变化模型. 该研究也证明了联合运用DPI和其他技术可以获得更详细的蛋白质吸附过程信息, 为蛋白质吸附研究提供了新的手段. 随后, 他们将同样的方法研究不同尺寸和结构的蛋白质(溶菌

图7 DPI测量的anti-hCG/BSA/hCG顺序吸附时表面覆盖度(虚线)、厚度(黑实线)和密度(蓝实线)随时间变化曲线^[87](网络版彩图)

Figure 7 Real-time the coverage (dashed), thickness (black plain), and density (blue plain) changes when successive multilayers anti-hCG/BSA/hCG adsorbed onto the surface ^[87] (color online).

酶、 α -突触核蛋白、BSA)在不同极性表面的吸附过程^[93]。结果表明蛋白质吸附层结构主要与蛋白质结构的内在稳定性以及蛋白质与表面的相互作用有关。McArdle等^[95]利用DPI和电化学石英晶体微天平(E-QCM-D)技术研究了胆红素氧化酶(BOx)的吸附及其电催化活性。E-QCM-D用于获得单位质量酶催化活性。DPI则被用于研究不同浓度的蛋白质溶液形成的吸附层结构。该研究表明在优化浓度下,当蛋白质的吸附、取向和去折叠速率达到平衡时,才可以保持酶的最高活性。该研究对酶的固定化和生物传感界面的构建具有一定的指导意义。

另外, Delivopoulos等^[94]利用DPI技术研究了纤黏蛋白(Fn)和BSA在parylene-C/二氧化硅基底上的吸附,为新型材料在生物工程研究中的应用提供指导。马洪梅等^[91]分别用含不同功能基团的硅烷对DPI芯片进行修饰,研究了界面上配基种类对BSA吸附行为的影响。Yang等^[96]采用DPI技术研究了乙型肝炎病毒表面抗原病毒样颗粒(HB-VLPs)在色谱分离过程中失活的原因。DPI测量获得的蛋白质构象变化的实时信息为深入理解离子交换色谱分离过程提供了第一手资料。最近, Hu等^[97]利用DPI和QCM-D技术研究了纤维蛋白原(Fib)在不同表面的吸附行为。

3.4.2 蛋白质聚集的研究

蛋白质的聚集被证明是一系列神经退行性疾病,

包括帕金森病、阿尔兹海默症等的重要诱因^[3]。DPI技术可以通过测量蛋白质层的厚度、密度和质量,从而揭示蛋白质的聚集状态。Rekas等^[98]利用DPI技术实时监测 α -晶状体蛋白对 α -突触核蛋白和 κ -酪蛋白纤维状团聚的抑制作用。当没有 α -晶状体蛋白存在时,在4 h的连续监测过程中蛋白质层的厚度和质量稳步增加,而密度则连续下降;当有 2.5 mg mL^{-1} α -晶状体蛋白存在时,整个过程中蛋白质层的厚度、质量和密度均没有实质性变化。表明 α -晶状体蛋白可与 α -突触核蛋白迅速结合,从而阻止原纤维核的形成和纤维状团聚的发生。 β 淀粉样蛋白($A\beta$)纤维状团聚被认为与阿尔兹海默症的发病和进展密切相关。Zhai等^[99]利用DPI技术研究了 $A\beta$ 蛋白团聚的早期过程。在裸DPI芯片表面, $A\beta 40$ 和 $A\beta 42$ 在24~48 h内均没有发生明显的聚集,而在疏水的C18芯片表面,蛋白质吸附层密度逐渐减小,并且厚度和质量在临界点后迅速增加,表明蛋白质发生了典型的团聚现象。根据蛋白质溶液浓度的不同,在C18芯片表面测得的蛋白质层厚度为1~5 nm,与原子力显微镜测量结果一致,验证了 $A\beta$ 蛋白纤维状团聚由初始成核介导的外延纤维状生长机制。

3.4.3 蛋白质结晶过程的研究

XRD是获取生物分子三维结构的最常用的方法,获得高质量的蛋白质晶体是进行蛋白质结构表征的基础。在常规蛋白结构研究中,需要大量费时费力的工作优化结晶过程,从而获得可用的蛋白质晶体。DPI技术具有样品用量小和对芯片表面变化的高灵敏度等特点,使得该方法尤其适合用于蛋白质结晶过程的研究^[100]。常规DPI测量主要依赖于干涉条纹的相位变化,从而获得折射率、密度、质量等参数;而在蛋白质结晶研究中,特别是晶体形成的初期阶段不仅引起了相位变化,而且条纹的对比度(contrast)也会发生显著变化,可能是早期形成的蛋白质簇对光的吸收或散射等作用导致了芯片中光的损失^[100,101]。利用该原理,DPI技术可用于蛋白质结晶研究,优化结晶条件。Boudjemline等^[101]最先用DPI技术研究了溶菌酶结晶过程,同时该方法可用于区分蛋白质晶体、蛋白聚集体和盐晶。他们已对该结晶测定方法申请了专利^[102]。随后,他们又将DPI和渗析设备相连,用于优化5种蛋白质(溶菌酶、过氧化氢酶、甜蛋白、大鼠发动蛋白和木聚糖

图 8 (a) DPI-渗析联用研究蛋白质结晶过程流通池的结构图; (b) 蛋白质结晶和渗析不同阶段干涉条纹相位和对比度变化曲线^[103] (网络版彩图)

Figure 8 (a) Diagram of the fluidic cell for studying protein crystallization combining DPI and the dialysis technique. (b) The phase and contrast changes at different stages of the dialysis and protein crystallization ^[103] (color online).

酶)的结晶条件^[100]. 通过利用不同浓度的NaCl溶液进行渗析, 该方法可以监测蛋白质在传感芯片上的初始吸附、盐溶、团聚、成核、沉淀, 直到晶体形成的整个过程; 利用伴随着相移的条纹对比度变化作为标志, 可以清楚地分辨成核-结晶和无定型团聚两种现象. 在最近的一篇文献报道中, 多个国家的实验室联合成立了OptiCryst联盟, 致力于联合多种技术解决获取高质量晶体的瓶颈问题^[103]. 其中, DPI-渗析技术被用于检测蛋白质晶体的成核过程(图8), 成功应用于溶菌酶、过氧化氢酶和甜蛋白的结晶研究.

4 结论与展望

DPI技术具有免标记、实时、精确测量界面层折射率、厚度、密度和质量绝对值等优点, 其检测具有高分辨率(0.1 Å)和高灵敏度(10^{-7} 折射率单位和 0.1 pg mm^{-2}). 通过对获得的光几何参数的分析, 可获得生物分子的结构和取向等信息. 与传统结构分析和相互作用研究工具相比, 具有无可比拟的优越性. DPI

技术经过20多年的发展, 在实际应用中已验证了其检测结果的可靠性. 其应用范围也由最初的蛋白质吸附研究, 拓展到了生物大分子之间或与小分子的相互作用、生物膜与分子相互作用以及聚合物在表/界面的组装等领域, 已成为分子相互作用研究中的一种有力工具. 同时, 与其他技术的联合运用, 可以获得单一技术无法获取的信息, 如DPI和QCM-D技术一起可以对蛋白质的水合状态进行研究^[92], DPI和微渗析联用研究蛋白质结晶过程^[100]等.

目前, 多数分析仪器正向着高灵敏度、高通量和多功能方向发展, DPI技术在这些方面也有巨大的发展空间. (1) DPI作为一种集成光波导传感技术, 其灵敏度理论上主要与波导芯片结构和材料有关^[104], 通过优化芯片设计和选择合适的波导材料, 可进一步提高其检测灵敏度. 例如, Schmitt等^[105]设计的Young干涉分析仪其灵敏度可达到 9×10^{-9} 折射率单位, 质量灵敏度约为 13 fg mm^{-2} . (2) 在疾病诊断和药物筛选等领域中, 对高通量分析技术的需求越来越大. 而目前商品化的DPI分析仪最主要的缺点是只有两个通道, 严重限制了其分析能力. 因此, 发展微流控系统和多通道传感芯片, 提高DPI仪器的集成度和高通量分析能力将是DPI技术未来的主要发展方向之一. 半导体领域中普遍采用的微加工技术可用于DPI芯片的加工, 目前已有类似的多通道波导芯片的报道^[106,107]. (3) DPI技术和其他方法的联合应用已显示了单一技术无法比拟的分析能力, 如若将DPI和其他仪器联用发展多功能分析仪器, 将在提高仪器多功能性、减少试剂消耗等方面发挥优势. 例如, 电化学反应一般都是固/液界面过程, 而DPI技术也主要是检测界面处的变化, 因此, 两种方法联用将为深入研究能源相关的界面电化学反应以及电调制的生物分子结构与功能等提供新的研究手段. 事实上, 已有集成电化学的波导传感技术的报道^[108,109]. 另外, Escorihuela等^[5]提到的DPI-质谱、DPI-荧光等技术的联用也将在分子相互作用研究中发挥优势.

总之, DPI作为一种实时、免标记、高灵敏度的测量技术, 已在各种生物分子相互作用研究中显示了强大的分析能力. 我们相信随着技术的不断发展以及与其他技术的联用, DPI技术的应用范围也将进一步扩展, 将会在生物分析、纳米材料表征、能源相关表/界面研究等方面得到广泛应用.

参考文献

- 1 Cross G, Freeman NJ. A chemical sensor. International Patent, WO9822807, 1998-05-28
- 2 Cross GH, Reeves AA, Brand S, Popplewell JF, Peel LL, Swann MJ, Freeman NJ. *Biosens Bioelectron*, 2003, 19: 383–390
- 3 Wang J, Yang X. *Anal Chem*, 2008, 36: 1293–1299 (in Chinese) [王娟, 杨秀荣. 分析化学, 2008, 36: 1293–1299]
- 4 Kozma P, Kehl F, Ehrentreich-Förster E, Stamm C, Bier FF. *Biosens Bioelectron*, 2014, 58: 287–307
- 5 Escorihuela J, González-Martínez MÁ, López-Paz JL, Puchades R, Maquieira Á, Gimenez-Romero D. *Chem Rev*, 2015, 115: 265–294
- 6 Lee TH, Hirst DJ, Aguilar MI. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848: 1868–1885
- 7 Liang Y, Duan M, Wang H, Fang S. *Chem Ind Eng Prog*, 2013, 32: 2549–2554 (in Chinese) [梁莹, 段明, 王虎, 方申文. 化工进展, 2013, 32: 2549–2554]
- 8 Daghestani HN, Day BW. *Sensors*, 2010, 10: 9630–9646
- 9 Lin S, Lee CK, Lin YH, Lee SY, Sheu BC, Tsai JC, Hsu SM. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22: 715–721
- 10 Zhao X, Pan F, Cowsill B, Lu JR, Garcia-Gancedo L, Flewitt AJ, Ashley GM, Luo J. *Langmuir*, 2011, 27: 7654–7662
- 11 Giménez-Romero D, González-Martínez MA, Bañuls MJ, Monzó IS, Puchades R, Maquieira Á. *J Phys Chem B*, 2012, 116: 5679–5688
- 12 Haudenschild DR, Hong E, Yik JHN, Chromy B, Mörgelin M, Snow KD, Acharya C, Takada Y, Di Cesare PE. *J Biol Chem*, 2011, 286: 43250–43258
- 13 Thibault G, Houry WA. *J Phys Chem B*, 2012, 116: 6717–6724
- 14 Feng X, Gao F, Qin P, Ma G, Su Z, Ge J, Wang P, Zhang S. *Anal Chem*, 2013, 85: 2370–2376
- 15 Balhara V, Deshmukh SS, Kálmán L, Kornblatt JA. *PLoS One*, 2014, 9: e88395
- 16 Hu T, Wang S, Chen C, Sun J, Yang X. *Anal Chem*, 2017, 89: 2606–2612
- 17 Olaby RA, Azzazy HM, Harris R, Chromy B, Vielmetter J, Balhorn R. *J Comput Aided Mol Des*, 2013, 27: 337–346
- 18 Qian C, Li M, Sui J, Ren T, Li Z, Zhang L, Zhou L, Cheng Y, Wang D. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 485
- 19 Sui J, Li M, Qian C, Wang S, Cheng Y, Chen BPC, Wang D. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 9: 2147
- 20 Karim K, Taylor JD, Cullen DC, Swann MJ, Freeman NJ. *Anal Chem*, 2007, 79: 3023–3031
- 21 Thompsett AR, Brown DR. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774: 920–927
- 22 Coan KED, Swann MJ, Otl J. *Anal Chem*, 2012, 84: 1586–1591
- 23 Grøftehaug MK, Hajizadeh NR, Swann MJ, Pohl E. *Acta Crystlogr D Biol Crystlogr*, 2015, 71: 36–44
- 24 Armstrong J, Salacinski HJ, Mu Q, Seifalian AM, Peel L, Freeman N, Holt CM, Lu JR. *J Phys-Condens Matter*, 2004, 16: S2483–S2491
- 25 Johnson S, Evans D, Laurensen S, Paul D, Davies AG, Ko Ferrigno P, Wälti C. *Anal Chem*, 2008, 80: 978–983
- 26 Popplewell JF, Swann MJ, Ahmed Y, Turnbull JE, Fernig DG. *ChemBioChem*, 2009, 10: 1218–1226
- 27 Lee TH, Aguilar MI. *Aust J Chem*, 2011, 64: 844–845
- 28 Singh S, Kalle M, Papareddy P, Schmidtchen A, Malmsten M. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 1482–1492
- 29 Singh S, Papareddy P, Kalle M, Schmidtchen A, Malmsten M. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828: 2709–2719
- 30 Zhai J, Wooster TJ, Hoffmann SV, Lee TH, Augustin MA, Aguilar MI. *Langmuir*, 2011, 27: 9227–9236
- 31 Zhai J, Hoffmann SV, Day L, Lee TH, Augustin MA, Aguilar MI, Wooster TJ. *Langmuir*, 2012, 28: 2357–2367
- 32 Wang Y, Jiang X, Zhou L, Yang L, Xia G, Chen Z, Duan M. *Colloids Surfs A*, 2013, 436: 1159–1169
- 33 Wu G, Jiang X, Zhou L, Yang L, Wang Y, Xia G, Chen Z, Duan M. *J Mol Struct*, 2013, 1045: 47–54
- 34 Lillis B, Manning M, Berney H, Hurley E, Mathewson A, Sheehan MM. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21: 1459–1467
- 35 Lee L, Johnston APR, Caruso F. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 3070–3078
- 36 Berney H, Oliver K. *Biosens Bioelectron*, 2005, 21: 618–626
- 37 Kato N, Lee L, Chandrawati R, Johnston APR, Caruso F. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 21185–21195
- 38 Huang F, Liang H. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5: 5025–5033
- 39 Xu H, Huang F, Liang H. *RSC Adv*, 2014, 4: 44700–44705
- 40 Xu P, Huang F, Liang H. *Biosens Bioelectron*, 2013, 41: 505–510

- 41 Xu H, Deng W, Huang F, Xiao S, Liu G, Liang H. *Chem Commun*, 2014, 50: 14171–14174
- 42 Huang F, Xu P, Liang H. *Biosens Bioelectron*, 2014, 51: 317–323
- 43 Huang F, Zhou X, Yao D, Xiao S, Liang H. *Small*, 2015, 11: 5800–5806
- 44 Wang J, Xu X, Zhang Z, Yang F, Yang X. *Anal Chem*, 2009, 81: 4914–4921
- 45 Wang J, Coffey PD, Swann MJ, Yang F, Lu JR, Yang X. *Anal Chem*, 2010, 82: 5455–5462
- 46 Wang Y, Wang J, Yang F, Yang X. *Anal Chem*, 2012, 84: 924–930
- 47 Hu T, Yang F, Yang XR. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45: 944–950
- 48 Su Y, Xu H, Chen Y, Qi J, Zhou X, Ge R, Lin Z. *New J Chem*, 2018, 42: 2850–2856
- 49 Wang Y, Zheng Y, Yang F, Yang X. *Chem Commun*, 2012, 48: 2873–2875
- 50 Zheng Y, Yang C, Yang F, Yang X. *Anal Chem*, 2014, 86: 3849–3855
- 51 Wang S, Lu S, Zhao J, Huang J, Yang X. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 41568–41576
- 52 Zheng Y, Hu T, Chen C, Yang F, Yang X. *Chem Commun*, 2015, 51: 5645–5648
- 53 Song HY, Wong TI, Guo S, Deng J, Tan C, Gorelik S, Zhou X. *Sens Actuators B-Chem*, 2015, 221: 207–216
- 54 González-Lucas D, Bañuls MJ, García-Rupérez J, Maquieira Á. *Microchim Acta*, 2017, 184: 3231–3238
- 55 Terry CJ, Popplewell JF, Swann MJ, Freeman NJ, Fernig DG. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22: 627–632
- 56 Khan TR, Grandin HM, Mashaghi A, Textor M, Reimhult E, Reviakine I. *Biointerphases*, 2008, 3: FA90–FA95
- 57 Popplewell J, Freeman N, Carrington S, Ronan G, McDonnell C, Ford RC. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 931–933
- 58 Popplewell JF, Swann MJ, Freeman NJ, McDonnell C, Ford RC. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768: 13–20
- 59 Lee TH, Hall KN, Swann MJ, Popplewell JF, Unabia S, Park Y, Hahn KS, Aguilar MI. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798: 544–557
- 60 Nielsen SB, Otzen DE. *J Colloid Interface Sci*, 2010, 345: 248–256
- 61 Balhara V, Schmidt R, Gorr SU, Dewolf C. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828: 2193–2203
- 62 Fernandez DI, Le Brun AP, Lee TH, Bansal P, Aguilar MI, James M, Separovic F. *Eur Biophys J*, 2013, 42: 47–59
- 63 Fernandez DI, Lee TH, Sani MA, Aguilar MI, Separovic F. *Biophys J*, 2013, 104: 1495–1507
- 64 Forbes S, McBain AJ, Felton-Smith S, Jowitt TA, Birchenough HL, Dobson CB. *Biomaterials*, 2013, 34: 5453–5464
- 65 Hall K, Lee TH, Mechler AI, Swann MJ, Aguilar MI. *Sci Rep*, 2014, 4: 5479
- 66 Lee TH, Heng C, Separovic F, Aguilar MI. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838: 2205–2215
- 67 Sani MA, Lee TH, Aguilar MI, Separovic F. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848: 2277–2289
- 68 Tzong-Hsien L, Kristopher NH, Marie-Isabel A. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 25–39
- 69 Lee TH, Sani MA, Overall S, Separovic F, Aguilar MI. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1860: 300–309
- 70 Baptist M, Panagabko C, Cockcroft S, Atkinson J. *Biochem Cell Biol*, 2016, 94: 528–533
- 71 Ouberaï MM, Wang J, Swann MJ, Galvagnion C, Williams T, Dobson CM, Welland ME. *J Biol Chem*, 2013, 288: 20883–20895
- 72 Heider S, Reimhult E, Metzner C. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1860: 319–328
- 73 Zwang TJ, Fletcher WR, Lane TJ, Johal MS. *Langmuir*, 2010, 26: 4598–4601
- 74 Ash A, Ridout MJ, Parker R, Mackie AR, Burnett GR, Wilde PJ. *Colloids Surfs B*, 2013, 102: 546–553
- 75 Wayment-Steele HK, Jing Y, Swann MJ, Johnson LE, Agnarsson B, Svedhem S, Johal MS, Kunze A. *Langmuir*, 2016, 32: 1771–1781
- 76 Singh S, Kasetty G, Schmidtchen A, Malmsten M. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818: 2244–2251
- 77 Frenkel N, Makky A, Sudji IR, Wink M, Tanaka M. *J Phys Chem B*, 2014, 118: 14632–14639
- 78 Ho JA, Kuo TY, Yu LG. *Anal Chim Acta*, 2012, 714: 127–133
- 79 Hirst DJ, Lee TH, Pattenden LK, Thomas WG, Aguilar MI. *Sci Rep*, 2015, 5: 9972
- 80 Frost R, Jönsson GE, Chakarov D, Svedhem S, Kasemo B. *Nano Lett*, 2012, 12: 3356–3362
- 81 Lu JR, Swann MJ, Peel LL, Freeman NJ. *Langmuir*, 2004, 20: 1827–1832
- 82 Freeman NJ, Peel LL, Swann MJ, Cross GH, Reeves A, Brand S, Lu JR. *J Phys-Condens Matter*, 2004, 16: S2493–S2496
- 83 Sonesson AW, Callisen TH, Brismar H, Elofsson UM. *Colloids Surfs B*, 2007, 54: 236–240
- 84 Sonesson AW, Callisen TH, Brismar H, Elofsson UM. *Colloids Surfs B*, 2008, 61: 208–215
- 85 Lundin M, Sandberg T, Caldwell KD, Blomberg E. *J Colloid Interface Sci*, 2009, 336: 30–39
- 86 Cowsill BJ, Coffey PD, Yaseen M, Waigh TA, Freeman NJ, Lu JR. *Soft Matter*, 2011, 7: 7223–7230

- 87 Cowsill BJ, Waigh TA, Eapen S, Davies R, Lu JR. *Soft Matter*, 2012, 8: 9847–9854
- 88 Krivosheeva O, Dédinaite A, Claesson PM. *J Colloid Interface Sci*, 2012, 379: 107–113
- 89 Krivosheeva O, Dédinaite A, Claesson PM. *J Colloid Interface Sci*, 2013, 408: 82–86
- 90 Krivosheeva O, Dédinaite A, Linder MB, Tilton RD, Claesson PM. *Langmuir*, 2013, 29: 2683–2691
- 91 Ma H, Zhang G, Li C, Kong Y, Gao F, Hu T, Ma G, Su Z. *China Biotechnol*, 2012, 32: 53–59 (in Chinese) [马洪梅, 张贵锋, 李春, 孔英俊, 高飞, 胡涛, 马光辉, 苏志国. 中国生物工程杂志, 2012, 32: 53–59]
- 92 Xu K, Ouberaï MM, Welland ME. *Biomaterials*, 2013, 34: 1461–1470
- 93 Ouberaï MM, Xu K, Welland ME. *Biomaterials*, 2014, 35: 6157–6163
- 94 Delivopoulos E, Ouberaï MM, Coffey PD, Swann MJ, Shakesheff KM, Welland ME. *Colloids Surfs B*, 2015, 126: 169–177
- 95 McArdle T, McNamara TP, Fei F, Singh K, Blanford CF. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 25270–25280
- 96 Yang Y, Mengran Yu Y, Zhang S, Ma G, Su Z. *J Chromatogr A*, 2015, 1408: 161–168
- 97 Hu Y, Jin J, Liang H, Ji X, Yin J, Jiang W. *Langmuir*, 2016, 32: 4086–4094
- 98 Rekas A, Jankova L, Thorn DC, Cappai R, Carver JA. *FEBS J*, 2007, 274: 6290–6304
- 99 Zhai J, Lee TH, Small DH, Aguilar MI. *Biochemistry*, 2012, 51: 1070–1078
- 100 Boudjemline A, Saridakis E, Swann MJ, Govada L, Mavridis IM, Chayen NE. *Anal Chem*, 2011, 83: 7881–7887
- 101 Boudjemline A, Clarke DT, Freeman NJ, Nicholson JM, Jones GR. *J Appl Crystlogr*, 2008, 41: 523–530
- 102 Jones G, Freeman NJ, Ronan GA, Swann M, Boudjemline A. Method of determining crystallization. US Patent, 7232485 B2, 2007-06-19
- 103 Garcia-Caballero A, Gavira JA, Pineda-Molina E, Chayen NE, Govada L, Khurshid S, Saridakis E, Boudjemline A, Swann MJ, Shaw Stewart P, Briggs RA, Kolek SA, Oberthuer D, Dierks K, Betzel C, Santana M, Hobbs JR, Thaw P, Savill TJ, Mesters JR, Hilgenfeld R, Bonander N, Bill RM. *Cryst Growth Des*, 2011, 11: 2112–2121
- 104 Lukosz W, Tiefenthaler K. *Sens Actuat*, 1988, 15: 273–284
- 105 Schmitt K, Schirmer B, Hoffmann C, Brandenburg A, Meyrueis P. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 2591–2597
- 106 Ymeti A, Greve J, Lambeck PV, Wink T, van Hövell SWFM, Beumer TAM, Wijn RR, Heideman RG, Subramaniam V, Kanger JS. *Nano Lett*, 2007, 7: 394–397
- 107 Psarouli A, Salapatias A, Botsialas A, Petrou PS, Raptis I, Makarona E, Jobst G, Tukkinen K, Sopanen M, Stoffer R, Kakabakos SE, Misiakos K. *Sci Rep*, 2015, 5: 17600
- 108 Dunphy DR, Mendes SB, Saavedra SS, Armstrong NR. *Anal Chem*, 1997, 69: 3086–3094
- 109 Ramos BL, Nagy G, Choquette SJ. *Electroanalysis*, 2000, 12: 140–146

Dual polarization interferometry (DPI): a new tool in studying the biomolecular interaction

Shuang Wang^{1,2}, Jianshe Huang¹, Xiurong Yang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun 130022, China

² University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

*Corresponding author (email: xryang@ciac.ac.cn)

Abstract: Dual polarization interferometry (DPI) is a newly developed label-free, real-time, sensitive and high-resolution surface analysis technique. It allows to accurately determine the layer thickness, mass and density, and to gain the kinetics and structural information during the molecular interaction process. In this review, we first briefly introduce the basic principle of DPI technique, the components of DPI apparatus, and the comparison of DPI with other analysis techniques. Then the applications of DPI in studying the biomolecular interaction are discussed, including the interaction of protein-protein and protein-other molecules, the interaction of DNA with other molecules, the interaction of biomembrane with other molecules, as well as the monitoring of protein adsorption/desorption, aggregation and crystallization processes. The summary and future perspectives are also given in the conclusion.

Keywords: dual polarization interferometry, interaction, protein, DNA, biomembrane

doi: [10.1360/N032018-00073](https://doi.org/10.1360/N032018-00073)