

基于 SPR 的中药活性成分筛选

Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Surface Plasmon Resonance

张颖¹, 王晓飞¹, 戚敏钰¹, 胡馨儿², 顾佳钰³, 王冬尧¹, 吕狄亚¹, 曹岩^{1, *}

¹海军军医大学药理学系, 上海

²同济大学附属第一妇婴保健院, 上海

³上海理工大学健康科学与工程学院, 上海

*通讯作者邮箱: caoyan@smmu.edu.cn

摘要

本文以血管紧张素转换酶2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 为例, 介绍采用表面等离子体共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 技术筛选中药活性成分的一般过程。首先将ACE2偶联到CM5芯片上, 并对芯片的活性和特异性进行评价; 其次对6种中药进行提取和初步筛选, 发现葛根中存在潜在的结合成分; 进一步通过Biacore T200系统“进样和回收”程序对目标中药进行筛选和回收; 再利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-QTOF-MS) 分析鉴定回收成分为黄豆苷; 最后通过SPR亲和力实验测定黄豆苷与ACE2的解离平衡常数KD为5.18 μ M, 并通过生物学实验验证其发挥的作用。该方法结果准、效率高, 适合中药和其他复杂药物体系的筛选, 为中药药效物质和作用机制的研究提供了新方法, 也为活性先导化合物的发现和中药新药的开发拓展了新思路。

关键词: 中药, 活性成分, 筛选, 表面等离子共振

研究背景

表面等离子体共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 是一种生物传感分析技术, 可以用于研究中药活性成分与靶点在分子水平上的相互作用关系[1]。SPR技术凭借其出色的实时性、超高的灵敏度以及高专一性等特点, 成为了中药活性成分发现的有力工具。在中药活性成分的特征鉴定、分子靶标的筛选、候选药物分子的优化改造以及药物质量控制等多个环节中, 该技术均发挥着不可或缺的重要作用[2-6]。本试验方案以血管紧张素转换酶2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 为靶标蛋白, 利用BiacoreT200系统, 对6种中药进行活性成分筛选, 并利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-QTOF-MS) 对筛选出的化合物进行分析鉴定, 最终确定在葛根中筛选得到活性成分黄豆苷, 通过SPR亲和力测定以及酶联免疫吸附实验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 确证了其亲和力和生物活性。

材料与试剂

1. CM5 芯片 (Cytiva, catalog number: 29104988)
2. 氨基偶联试剂盒 (Cytiva, catalog number: BR100633)
3. 10 mM 醋酸钠缓冲液 pH 4.0~5.5 (Cytiva, catalog number: BR100349-52)
4. 50 mM NaOH 溶液 (Cytiva, catalog number: BR100358)
5. 10× HBS-EP+ (Cytiva, catalog number: BR100669)
6. 10× PBS buffer (Cytiva, catalog number: BR100672)
7. 三氟乙酸 (Adamas, catalog number: 81548K)
8. 碳酸氢铵 (Sigma-Aldrich, catalog number: 09830-500G)
9. XBridge BEH C18 色谱柱 (130Å, 2.5 μm, 2.1 mm × 100 mm) (Waters, catalog number: 186006031)
10. 质谱纯甲醇 (Supelco, catalog number: MX0490)
11. 质谱纯乙腈 (Sigma-Aldrich, catalog number: L010100)
12. 质谱纯甲酸 (Supelco, catalog number: FX0450)
13. 柴胡、甘草、葛根、桔梗、金银花、青连翘 (上海长海医院)
14. 血管紧张素转化酶 2 (Sino-Biological, 10108-H08H)
15. 重组人冠状病毒 SARS-CoV-2 刺突糖蛋白受体结合域 (Active) (abcam, catalog number: ab273065)
16. 重组抗 ACE2 中和抗体 (Sino-Biological, catalog number: 10108-MM37)
17. 黄豆苷 (Tauto-Biotech, catalog number: RM-0024)

引用格式: 张颖, 王晓飞, 戚敏钰, 胡馨儿, 顾佳钰, 王冬尧, 吕狄亚, 曹岩. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶
向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012. 2

How to cite: Zhang, Y., Wang, X. F., Qi, M. Y., Hu, X. E., Gu, J. Y., Wang, D. Y., Lv, D. Y. and Cao, Y. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012. (in Chinese)

18. ELISA 通用试剂盒 (Biodragon, catalog number: BF06126-2)

仪器设备

1. 相互作用分析仪 (Cytiva, model: BiacoreT200)
2. 液相色谱系统 (Agilent, model: Agilent 1290 Infinity LC)
3. 飞行时间质谱仪 (Agilent, model: Agilent 6538 UHD Q-TOF MS)
4. 超纯水制备系统 (Millipore, model: Milli-Q A10)

实验步骤

一、实验前准备

1. 配体溶液的制备:

将血管紧张素转化酶 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 纯化蛋白冻干粉末溶解在去离子水 (ddH₂O) 中, 制备成 1,000 µg/mL 的 ACE2 储备液, 置于 4 °C 备用。

注意: 如果长期不使用, 应及时分装并置于 -80 °C 保存, 避免反复冻融。

2. 中药材提取液的制备:

将葛根 (Puerariae Lobatae Radix, PLR)、甘草 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, GRR)、青连翘 (Forsythiae Fructus, FF)、柴胡 (Bupleuri Radix, BR)、桔梗 (Platycodonis Radix, PR)、金银花 (Lonicerae Japonicae Flos, LJF) 中药材分别处置: 首先应用磨粉机将中药材粉碎, 通过 40 目筛网。称取 1 g 中药材, 加入 10 mL 80%乙醇溶液, 超声提取 30 分钟后过滤, 将过滤液按照 12,000 r/min 离心 15 分钟, 所得上清液即为中药材提取液, 置于 4 °C 备用。

3. 运行缓冲液和其他溶液的制备:

HBS-EP+运行缓冲液: 量取 10× HBS-EP+溶液和 ddH₂O, 配制成 200 mL 1× HBS-EP+溶液;

PBS 稀释液: 量取 10× PBS 溶液和 ddH₂O, 配制成 1,000 mL 1.05× PBS 溶液;

含 5% DMSO 的 PBS 运行缓冲液: 量取 PBS 稀释液和 DMSO, 配制 500 mL 含 5% DMSO 的 PBS 溶液作为中药筛选和亲和力测定的运行缓冲液。

溶剂校正溶液: 用 PBS 稀释液和 DMSO 配制 4~8 个校正溶液, 以获得一组 DMSO 浓度范围为 4.5~5.8% 的校正溶液。

结合成分洗脱液: 量取 ddH₂O 和三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA), 配制 10 mL 0.5% TFA 溶液作

为结合成分洗脱液备用，用于回收结合成分；

结合成分溶解液：精密称取碳酸氢铵（ NH_4HCO_3 ）粉末，用 ddH₂O 溶解至浓度为 50 mM 作为结合成分溶解液备用，体积不少于 1 mL。

4. 化合物溶液的制备：

精密称取黄豆苷的标准品，用 DMSO 溶解至浓度为 10 mM，体积约为 100 μL ，作为化合物储备液，置于 4 °C 备用。

二、配体的偶联

1. 计算配体偶联水平：

对于中药筛选，活性成分以小分子化合物为主，分子量可按照 500 Da 估算。对于亲和力测定，根据分析物的分子量，计算出理论所需的偶联量。本例中 ACE2 分子量约为 85.1 kDa，根据公式计算得出理论偶联量为 25,530 RU。

2. 配体的预富集：

以 HBS-EP+ 为 BiacoreT200 系统的运行缓冲液。将配体 ACE2 储备液用不同 pH 值（4.0~5.5）的 10 mM 醋酸钠缓冲液稀释至终浓度约为 20~200 $\mu\text{g/mL}$ 。选择“Immobilization pH”程序，设置流速 10 $\mu\text{L/min}$ ，进样时间 60 秒，用 50 mM NaOH 溶液再生 60 秒。根据响应情况确定最佳偶联条件，包括缓冲液 pH 值和配体终浓度。

3. 配体的偶联：

采用氨基偶联法将配体偶联在 CM5 芯片表面。根据预富集得到的最佳偶联条件配制配体样品。选择“Immobilization”程序，使用氨基偶联试剂盒，根据计算得出的理论偶联量采用“固定偶联水平”或“固定偶联时间”方法偶联。对于“固定偶联时间”一般设置进样时间为 600 s。

三、芯片性能的考察

1. 活性的测定：

可以采用低、中、高 3 个浓度阳性样品快速表征活性，也可以采用亲和力测定法精确测定阳性样品的亲和力以表征活性。对于快速测定，将重组人冠状病毒 SARS-CoV-2 刺突糖蛋白受体结合域（Spike protein receptor binding domain, SRBD）蛋白储备液用 PBS 缓冲液分别稀释至 2、20 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 。由低浓度到高浓度依次进样，观察其响应值以判断芯片上的 ACE2 是否具有活性。

2. 特异性的测定：

以其他不与 ACE2 结合的蛋白作阴性对照，以稀释液作为空白对照，按上述方法稀释成相应浓度的样品溶液，由低浓度到高浓度的顺序依次进样，观察其在 ACE2 通道上响应值，若相同浓度下阴性对照、

空白对照均与 SRBD 有显著差异, 则判断芯片上 ACE2 蛋白具有特异性。

四、中药的初筛

将每种中药提取液使用 PBS 稀释 100~10,000 倍, 得到一系列不同浓度的样品。将每种中药材的稀释样品按照浓度从低到高的顺序依次注入到 Biacore T200 系统中, 记录响应值。根据响应值选取适合的分析浓度 (一般以 50~100 RU 为宜), 并比较分析不同中药材同一浓度下的响应值大小, 确定初筛结果以及中药筛选顺序。

五、中药的筛选和鉴定

1. 样品回收:

根据初筛结果, 使用最佳浓度的中药样品, 分别进行进样。采用 Biacore T200 系统的“Inject and recover”程序回收结合成分。根据初筛响应情况调整各参数, 结合时间 180 s, 流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 结合成分洗脱液 (Recovery solution) 默认为 0.5% TFA (三氟乙酸), 孵育时间 (Incubation time) 为 20~30 s。结合成分溶解液 (Deposition solution) 为 50 mM NH_4HCO_3 , 溶解液体积 (Deposition solution volume) 为 10 μL , 重复次数 (Number of repetitions) 为 5。一般循环回收 10~20 次以便收集到足够量的样品进行质谱检测, 最终按照中药种类将回收溶液合并。

2. UHPLC-QTOF-MS 分析:

首先, 对各中药的回收样品进行氮气干燥, 并将其溶解于 100 μL 乙腈中。将样品以 12,000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 并将其标记为中药回收溶液。同时, 将中药提取液用乙腈稀释至浓度为 10 mg/mL, 得到中药稀释液。随后, 使用 Agilent 1290 液相色谱系统对中药回收溶液和中药稀释液进行分析。设置样品体积 5 μL , 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A 相) 和乙腈 (B 相), 梯度洗脱程序为 5%B 相, 持续 0~2 min, 5~95%B 相持续 2~17 min, 95%B 相持续 17~19 min。流速为 3.5 mL/min。使用安捷伦 6538 UHD 质谱仪在全扫描模式下检测分离出的化合物。ESI 源条件如下: 离子检测范围为 100~10,000 m/z; 干燥气体流量为 10 L/min; 温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气体压力为 35 psig; 毛细管电压 4,000 V; 和 120 V 的碎片电压。使用安捷伦 MassHunter B.06.00 软件处理和分析色谱数据。

3. 回收成分鉴定:

从中医综合数据库 (TCMID) (<http://www.megabionet.org/tcmid/>) 和草药数据库 (HERB) (<http://herb.ac.cn/>) 中检索被筛选的中药, 收集该中药包含的所有已知中药单体的化学信息, 分别统计建立自定义中药数据库。对中药回收液和中药提取液的总离子流图谱进行分子式检索, 得到一系列化学分子式。从自定义数据库中检索与这些分子式对应的中药单体的化学信息。购买收集相同分子式的中药单体成分, 按照相同的色谱-质谱条件, 对中药单体对照品进行分析, 将对照品总离子流图谱与中药回收溶液和中药

提取液进行比对，检查保留时间和离子的质荷比是否一致，保留时间和质谱信号均相符的成分，可视作为筛选出的目标化合物。

六、结果验证

1. SPR 亲和力测定：

将目标化合物储备液用 PBS 稀释液稀释至浓度为 128 μM 溶液（含 5% DMSO）。然后，使用含 5% DMSO 的 PBS 运行缓冲液依次稀释至 12.8 μM 和 1.28 μM 。按照浓度由低到高的顺序依次注射样品溶液，并随注射溶剂校正溶液，估算记录各样品校正后的响应值。根据估算结果，选择合适浓度的样品进行亲和力测定，在合适的浓度范围内采用逐级梯度稀释（2 倍稀释）法分别设置 8~10 个不同浓度，以含 5% DMSO 的 PBS 进行梯度稀释，采用“Kinetics/Affinity”程序测定化合物的亲和力。

2. ELISA 试验：

采用 ELISA 通用试剂盒测定化合物对 SRBD 与 ACE2 结合的抑制作用。采用方阵滴定法，将 SRBD 蛋白从 2 $\mu\text{g/mL}$ 开始，用包被液 2 倍逐级稀释后进行包被，将 ACE2 蛋白从 1 $\mu\text{g/mL}$ 开始，用样品稀释液 3 倍逐级稀释，确定最佳包被浓度及 ACE2 饱和浓度。将黄豆苷对照品稀释为含 ACE2 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、4% DMSO（v/v）的不同浓度溶液（0.2、2 和 20 μM ）。在 SRBD 包被的 96 孔板中依次加入上述溶液 100 μL ，同时设置 ACE2 对照孔和空白对照孔，每个浓度设置 5 个复孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。洗板后每孔加入 100 μL 重组抗 ACE2 中和抗体（1 $\mu\text{g/mL}$ ），37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。洗板后每孔加入 100 μL 生物素标记二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。洗板后每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase, HRP）标记亲和素，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB）显色液，15 min 后终止反应。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值，计算化合物的抑制率。

实验注意要点

1. 配体选择：配体不能含有 Tris、甘油等影响检测的成分；配体储备液的浓度至少为 500 $\mu\text{g/mL}$ ，配体溶液稀释倍数应大于 10；当配体储备液浓度高于 1 mg/mL 时，可使用 ddH_2O 或 PBS 稀释至 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 或 500 $\mu\text{g/mL}$ 备用；
2. 最佳配体偶联条件的选择：由于“Immobilization pH”程序中蛋白在芯片中的富集不稳定，非特异性结合的蛋白会使响应偏高，并在“Immobilization”程序的封闭过程中洗脱下来，因此最好选择比计算水平高的预富集偶联值对应的缓冲液 pH 值和配体终浓度作为最佳偶联条件；
3. 中药材提取液的制备：中药材提取后应高速离心以去除不溶颗粒物，防止样品堵塞管道；进样前应将中药材提取液稀释 100~10,000 倍，并按照浓度由低到高的顺序依次进样，响应值达到 50~100 为宜，

引用格式：张颖，王晓飞，戚敏钰，胡馨儿，顾佳钰，王冬尧，吕狄亚，曹岩. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012.

How to cite: Zhang, Y., Wang, X. F., Qi, M. Y., Hu, X. E., Gu, J. Y., Wang, D. Y., Lv, D. Y. and Cao, Y. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012. (in Chinese)

防止样品浓度过高产生非特异性结合。

4. 洗脱液种类、浓度的选择:结合成分洗脱液(Recovery solution)一般默认为 0.5% TFA, 也可使用 0.2%~1% TFA、甲酸、乙酸或再生溶液等, 具体参数可在手动模式下逐一尝试以确定最佳条件。默认酸性洗脱液应搭配使用 50 mM NH_4HCO_3 作为结合成分溶解液(Deposition solution);若使用的是非酸性的洗脱液, 结合成分溶解液可以取消或用运行缓冲液代替;
5. 中药材提取液、目标化合物的进样顺序: 样品进样顺序需要根据拖尾情况、响应高低、种类数量等多种因素决定。一般情况下, 首先考虑将拖尾严重的样品安排在最后进样, 拖尾情况相近的样品中选择结合响应较高的后置进样。若样品种类数量较多(>10 个)或是需要再生时, 可考虑分批进样;
6. 回收循环数的选择: 推荐重复回收 10~20 个循环并合并回收液, 以便收集到足够量的样品进行质谱检测。

结果与数据分析

一、配体的偶联

预富集确定最佳 ACE2 偶联条件为 50 $\mu\text{g/mL}$ (pH 4.0), 最终偶联响应值为 15,166.4 RU, 满足中药筛选的要求。

二、芯片活性和特异性

SARS-CoV-2 表面的刺突蛋白是病毒表面的主要抗原成分, 其受体结合域 SRBD 可特异性结合 ACE2, 因此 SRBD 可作为阳性对照蛋白; 以 PBS 稀释液作为空白对照, 对芯片上 ACE2 的活性和特异性进行考察, 结果如图 1 所示。可以看出其对注入的不同浓度的 ACE2 蛋白响应与 PBS 几乎无明显差异(图 1A), 而对 SRBD 蛋白表现出明显结合, 且随 SRBD 浓度增高, 响应值增大(图 1B), 说明偶联在芯片上的 ACE2 蛋白具有特异性和活性。

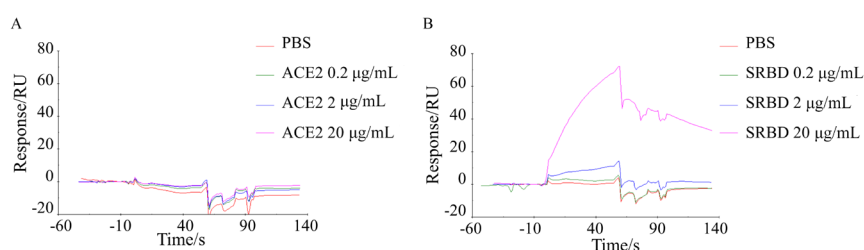


图 1 SPR 传感器中偶联蛋白 ACE2 的特异性与活性鉴定。A. 阴性对照 (ACE2); B. 阳性对照 (SRBD)。

引用格式: 张颖, 王晓飞, 戚敏钰, 胡馨儿, 顾佳钰, 王冬尧, 吕狄亚, 曹岩. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012.

How to cite: Zhang, Y., Wang, X. F., Qi, M. Y., Hu, X. E., Gu, J. Y., Wang, D. Y., Lv, D. Y. and Cao, Y. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012. (in Chinese)

三、中药的初筛

分别将 6 种中药提取液用 PBS 稀释 1000 倍后注入 SPR 传感器进行初步筛选，结果如图 2 所示。可以观察到 6 种中药在 ACE2 芯片上的响应值具有明显差异。柴胡 (BR)、甘草 (GRR)、青连翘 (FF) 和葛根 (PLR) 响应值较高，桔梗和金银花响应值较低。最终选择响应值相对较高的 4 种中药用于进一步结合成分的回收。

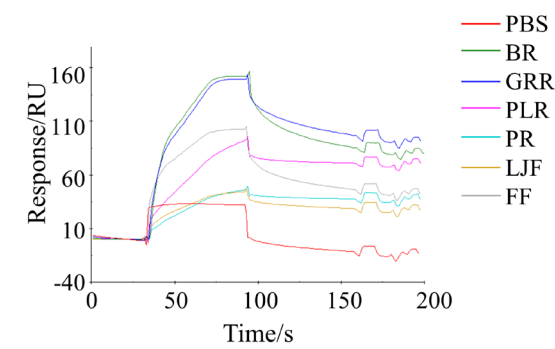


图 2 六种中药材 SPR 初筛结果响应值

四、目标化合物的确定

将回收液和中药提取液样品进行 UHPLC-QTOF-MS 分析，利用 Agilent Qualitative Analysis B.07.00 定性分析软件分析回收液与提取液中的共有成分，鉴定出回收液中结合成分的分子式为：C₂₁H₂₀O₉，如表 1 所示。根据建立的自定义库中的中药化学成分信息，初步确定中药提取液中的活性成分为黄豆苷 (C₂₁H₂₀O₉)。进一步采用对照品对鉴定结果进行确证，发现黄豆苷对照品的保留时间为 5.449 min，m/z 值为 418.1186 ([M+H]⁺)，与葛根提取液样品和葛根回收样品中检测到的离子信号一致，因此确定黄豆苷是回收到的结合成分。

表 1 UPLC-QTOF-MS 鉴定黄豆苷结果

分子式 (理论离子质荷比)	中药稀释液		中药回收溶液		化合物	中药材
	保留时间 (min)	离子质荷比	保留时间 (min)	离子质荷比		
C ₂₁ H ₂₀ O ₉	5.445	418.1195	5.571	417.1134	黄豆苷	葛根
418.1194 ([M+H] ⁺)		([M+H] ⁺)		([M+H] ⁺)		

引用格式：张颖，王晓飞，戚敏钰，胡馨儿，顾佳钰，王冬尧，吕狄亚，曹岩. (2024). 基于慢病毒载体偶联 SPR 技术的靶向膜蛋白中药活性成分的筛选. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012.

How to cite: Zhang, Y., Wang, X. F., Qi, M. Y., Hu, X. E., Gu, J. Y., Wang, D. Y., Lv, D. Y. and Cao, Y. (2024). Screening of Active Ingredients from Chinese Herbs Based on Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011012. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011012. (in Chinese)

五、目标化合物的活性验证

1. SPR 亲和力测定

为了验证筛选得到的成分是否具有结合活性，采用 SPR 测定黄豆苷与 ACE2 的亲和力，结果如图 3 所示。黄豆苷与 ACE2 结合符合特异性结合的趋势，采用动力学拟合方法计算其亲和力 K_D 为 $5.18 \mu\text{M}$ 。该结果表明 SPR 筛选和 UHPLC-TOF/MS 鉴定结果准确可信，证实黄豆苷是中药葛根中能够与 ACE2 特异性结合的成分。

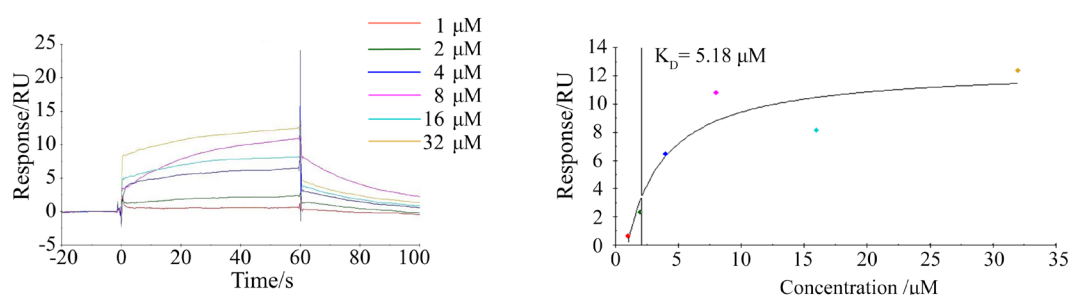


图 3 黄豆苷与 ACE2 的亲和力测定

2. ELISA 生物活性测定

为了进一步验证黄豆苷能否发挥药理作用，采用 ELISA 测定黄豆苷对 SRBD 与 ACE2 结合的影响，不同浓度黄豆苷干预后 SRBD 与 ACE2 的结合效率如图 4 所示。可见不同浓度的黄豆苷均对二者的结合有抑制作用， $2 \mu\text{M}$ 黄豆苷的抑制率为 37.9%， $20 \mu\text{M}$ 黄豆苷的抑制率为 38.6%。结果表明，黄豆苷能够抑制 SRBD 与 ACE2 的结合，且呈浓度依赖关系，黄豆苷具有抑制 SARS-CoV-2 进入宿主细胞的潜力。

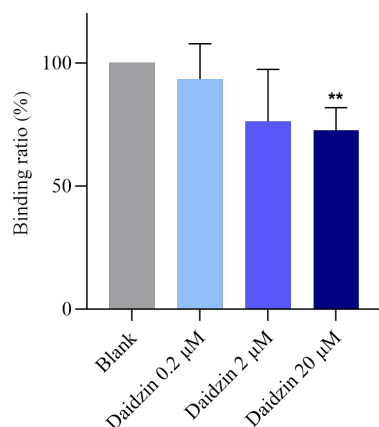


图 4 ELISA 测定黄豆苷对 SRBD-ACE2 结合的影响 (**P<0.05)

致谢

国家自然科学基金 (82174092), 上海市自然科学基金 (21ZR1483000、22ZR1476900), 上海市浦江人才计划 (21PJD083)。

参考文献

1. Lv, D., Xu, J., Qi, M., Wang, D., Xu, W., Qiu, L., Li, Y. and Cao, Y. (2022). A strategy of screening and binding analysis of bioactive components from traditional Chinese medicine based on surface plasmon resonance biosensor. *J Pharm Anal.* 12(3): 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.11.006>.
2. Cao, Y., Li, Y. H., Lv, D. Y., Chen, X. F., Chen, L. D., Zhu, Z. Y., Chai, Y. F. and Zhang, J. P. (2016). Identification of a ligand for tumor necrosis factor receptor from Chinese herbs by combination of surface plasmon resonance biosensor and UPLC-MS. *Anal Bioanal Chem.* 408(19): 5359–5367. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9633-6>.
3. Chen, L., Lv, D., Chen, X., Liu, M., Wang, D., Liu, Y., Hong, Z., Zhu, Z., Hu, X., Cao, Y., et al. (2018). Biosensor-Based Active Ingredients Recognition System for Screening STAT3 Ligands from Medical Herbs. *Anal Chem.* 90(15): 8936–8945. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01103>.
4. Chen, L., Lv, D., Wang, S., Wang, D., Chen, X., Liu, Y., Hong, Z., Zhu, Z., Cao, Y. and Chai, Y. (2020). Surface Plasmon Resonance-Based Membrane Protein-Targeted Active Ingredients Recognition Strategy: Construction and Implementation in Ligand Screening from Herbal Medicines. *Anal Chem.* 92(5): 3972–3980. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05479>.
5. Chen, L., Wang, D., Lv, D., Wang, X., Liu, Y., Chen, X., Zhang, H., Zhu, Z., Hong, Z., Cao, Y., et al. (2019). Identification of eupatilin and ginkgolide B as p38 ligands from medicinal herbs by surface plasmon resonance biosensor-based active ingredients recognition system. *J Pharm Biomed Anal.* 171: 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.029>.
6. Chen, X., Wu, Y., Chen, C., Gu, Y., Zhu, C., Wang, S., Chen, J., Zhang, L., Lv, L., Zhang, G., et al. (2021). Identifying potential anti-COVID-19 pharmacological components of traditional Chinese medicine Lianhuaqingwen capsule based on human exposure and ACE2 biochromatography screening. *Acta Pharm Sin. B.* 11(1): 222–236. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.002>.