

利用 SPR 技术研究蛋白与小分子化合物相互作用的方法和解决方案

Strategy and Solution for the Studying of Protein-small Molecule Interaction by SPR Technology

曹忠莲, 杨萍*

仪器测试中心, 药学院, 复旦大学, 上海

*通讯作者邮箱: yangping@fudan.edu.cn

摘要

蛋白与小分子相互作用的研究方法多样, 但利用基于表面等离子共振 (SPR) 技术的 Biacore T200 进行互作研究的方法报道甚少。本文以人血清白蛋白 (Human Serum Albumin, 简称 HSA) 和小分子法华林 (Warfarin) 的相互作用为例, 详细描述了分子间相互作用的整个实验流程, 包括实验前芯片、缓冲液的准备、HSA 蛋白最佳偶联 pH 值的筛选、偶联过程、分析物 Warfarin 的芯片表面测试和再生条件的选择、HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用时多循环动力学测试、数据分析、实验结束后仪器的处理; 同时, 还对实验中出现的各种常见问题进行了剖析并提出相应的解决方案, 包括仪器状态、传感芯片的选择、对偶联蛋白以及偶联量的要求、缓冲液的选择、非特异吸附的问题、再生试剂的选择以及再生效果的要求、数据拟合质量评价等。本文可为使用 SPR 技术研究蛋白与小分子化合物相互作用提供详实的参考。

关键词: 表面等离子共振技术、蛋白与小分子化合物的相互作用、人血清白蛋白、法华林、方法和解决方案

材料与试剂

1. 人血清白蛋白 (Human Serum Albumin, HSA) (Sigma-Aldrich, 产品目录号: MFCD00081418)
2. Warfarin (MedChemExpress, 产品目录号: HY-B0687)
3. Series S CM5 芯片 (Cytiva, 产品目录号: BR-1005-30)
4. 氨基偶联试剂盒 (Cytiva, 产品目录号: BR-1000-50)
5. 10× HBS-EP+缓冲液 (Cytiva, 产品目录号: BR-1006-69)
6. 醋酸钠缓冲液 (Cytiva, Acetate 4.0, 产品目录号: BR100349; Cytiva, Acetate 4.5, 产品目录号: BR100350; Acetate 5.0, 产品目录号: BR100351; Acetate 5.5, 产品目录号: BR100352)
7. 50 mM NaOH 溶液 (Cytiva, 产品目录号: BR100358)
8. 二甲基亚砜 (Sigma, 产品目录号: D-8418-50ML)
9. 10× HBS-N 缓冲液 (Cytiva, 产品目录号: BR-1006-70)
10. BIAtest Solution with HBS-N (Cytiva, 产品目录号: 210310)
11. 1.5 mL 离心管 (赛默飞 QSP, 产品目录号: 509-GRD-Q)

仪器设备

1. 表面等离子共振仪 (Cytiva, Biacore T200)
2. Milli-Q 纯水仪 (Millipore, Milli-Q Integral Integral)

软件

1. 运行软件: T200 Control Software (Cytiva, Version 3.2)
2. 数据处理软件: Evaluation Software (Cytiva, Version 3.2)

实验步骤

一、实验前准备

芯片的准备：选择 Tools 菜单中 Eject Chip，芯片舱门打开，将维护芯片（Maintenance Chip）取出，将 CM5 芯片按箭头方向放入卡槽，合上舱门；在 Chip Type 下拉菜单中选择对应的芯片种类，在 Chip ID 中填入和芯片相关的信息，如果是已经使用过的芯片，选择 Reuse Chip，并在 Chip ID 下拉菜单中找到与之相对应的芯片信息；点击 Dock Chip 按钮，芯片装载后系统将自动进入 Standby 状态（图 1）。

缓冲液的准备：将 10× HBS-EP⁺ Buffer 用超纯水稀释至 1× HBS-EP⁺，放置于仪器托盘左侧，右侧放超纯水。芯片、缓冲液准备完成后，点击 tools、more tools、执行 Prime 功能（图 2）。

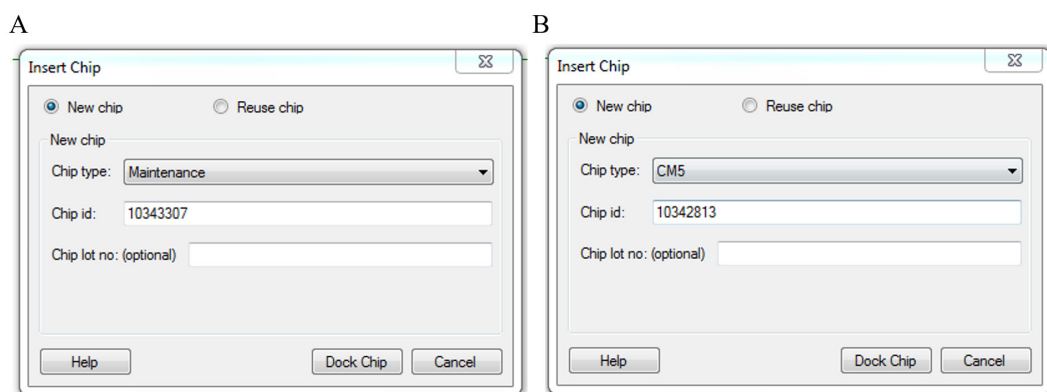


图 1 将维护芯片换为 CM5 芯片。

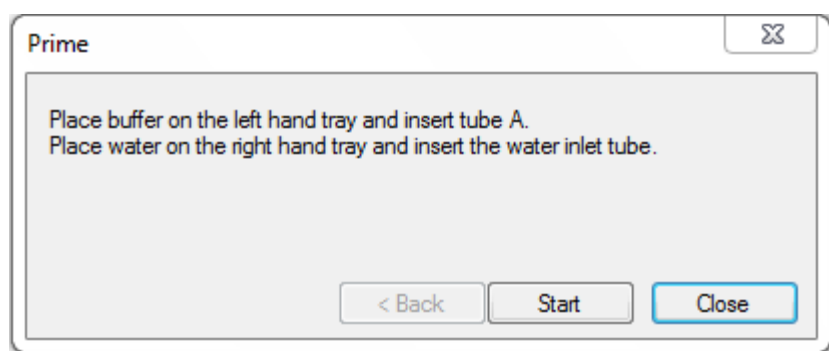


图 2 换芯片、缓冲液后对仪器进行 Prime。

二、实验流程

1. HSA 蛋白偶联 pH 值的筛选

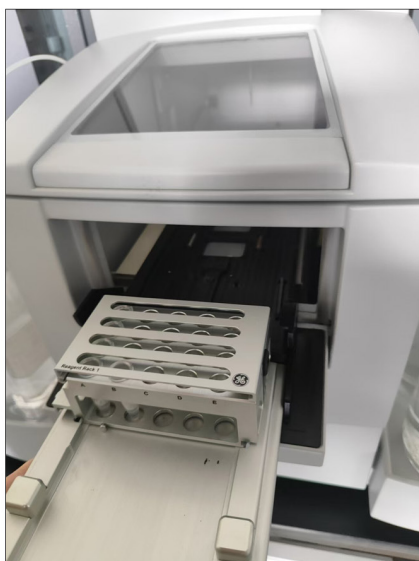
引用格式：曹忠莲，杨萍. (2025). 利用 SPR 技术研究蛋白与小分子化合物相互作用的方法和解决方案. *Bio-101* e1011018.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1011018.

How to cite: Cao, Z. L. and Yang, P. (2025). Strategy and Solution for the Studying of Protein-small Molecule Interaction by SPR Technology. *Bio-101* e1011018. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011018. (in Chinese)

选用不同 pH 的醋酸钠缓冲液 (10 mM sodium acetate, pH5.5、5.0、4.5、4.0), 将 HSA 蛋白溶液稀释为 20 $\mu\text{g/mL}$ 、体积为 100 μL , 分别放在 Regent Rack1 试管架的 A1、A2、A3、A4; 另取一管加入 200 μL NaOH (50 mM sodium hydroxide) 作为再生液, 放置在 B1, 将试管架放置于样品舱 (见图 1)。点击工具条中 Run, 选择 Manual Run, 进入界面后在 Flow rate 中输入 10 $\mu\text{L/mL}$ (注: 除动力学测定外, 流速一般设为 10 $\mu\text{L/min}$), 选择偶联通道, 本实验将把蛋白偶联在 Fc2 上, 所以选择 Flow path 2; 在右上方的下拉菜单中选择试管架, 本实验选用 Regent Rack1, 点击 Start, 在 Save Results As 对话框中, 把文件保存为 pH scouting, 点击 Save。点击注射命令图标 (Sample injection, 红色), 选择 Vail/Well position 旁的下拉菜单, 在样品位置图中点击 A1 位置, 设定进样时间 (Contact time) 为 120 秒 (注意对话框底部显示的最小样品体积, 确认试管中的样品体积满足要求), 点击“OK”; 点击再生命令图标 (Regeneration injection, 蓝色), 在 Vail/Well position 选择 B1 位置, 进样时间为 30 秒, 点击“OK”。重复点击进样和再生命令, 分别进样 A2、A3 和 A4, 时间为 120 秒, 每次进样后再再生 30 秒, 所有命令都完成后, 点击结束命令图标 (Stop run), 上述操作详见图 3A 表示样品放置位置, 3B 为上样顺序 (pH5.5、5.0、4.5、4.0)、时间和再生时间。

A



B

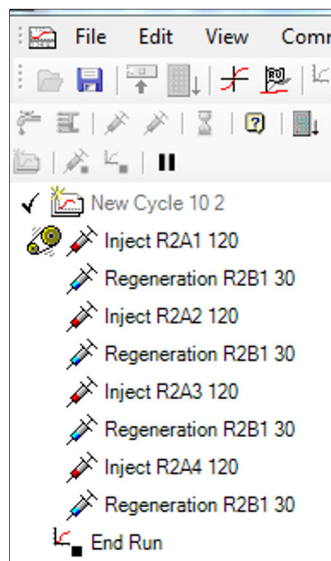


图 3 HSA 蛋白偶联 pH 值的筛选。A. 样品放置; B. 上样顺序 (pH 5.5~4.0)、进样时间和再生。

2. 偶联 HSA 蛋白

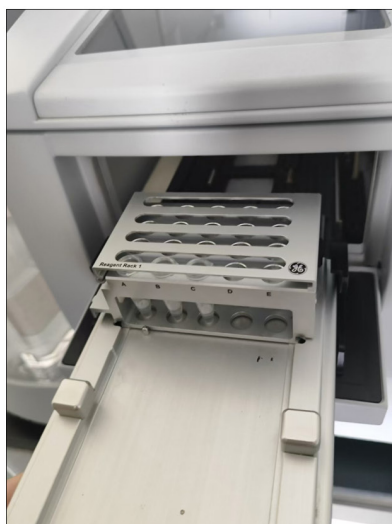
偶联是指将蛋白固定到芯片上的过程, 针对不同的芯片和蛋白, 偶联方法各不相同。实验采用的芯片类型和偶联方式由多种因素决定, 如配体蛋白的分子量、纯度、标签类型、蛋白母液成分、分析物分子量大小等。如果配体蛋白和分析物分子量差异非常大时, 建议使用氨基偶联方法将配体蛋白偶联至

CM5 芯片；当偶联的配体蛋白不稳定或纯度稍低或偶联量要求不高时，可根据标签类型采用相应的捕获方法，如配体有 His 标签，先将 anti-His 蛋白偶联至 CM5 芯片表面，然后捕获带有 His 标签的蛋白；如果配体有 Fc 标签，可以采用 Protein A、Protein G 芯片；分析物与配体结合后再生困难的情况时也可以采用捕获法。本实验将采用最常用的氨基偶联法进行蛋白偶联。

在偶联时，实际偶联量建议接近理论偶量。蛋白偶联量 RL 的计算： $R_{max} = MW_{\text{analyte}}/MW_{\text{ligand}} * RL * S_m$ ，其中 $R_{max} = 100RU$ ， $S_m = 1$ ，理论偶联量 = $1.5RL$ ， R_{max} 、RL 的值都用 Resonance Unit (RU) 表示， MW_{analyte} 表示小分子化合物法华林的分子量 308.33Da， MW_{ligand} 表示 HSA 蛋白的分子量 66,471.53Da。本实验计算所得 $RL = 21,558.6$ ， $1.5RL = 32,337.9$ 。

先将分装冻存的 100 μL EDC 和 NHS 解冻并混匀，然后放置在 Regent Rack1 试管架的 A1、将配制好的 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 HSA 蛋白放置在 B1、将 1.0 M (pH8.5) 乙醇胺放置在 C1，将试管架放置于样品舱。点击工具条中的 Run，选择 Manual Run，点击注射命令图标 (Sample injection, 红色)，选择 Vail/Well position 旁的下拉菜单，在样品位置图中点击 A1 位置，设定 Contact time (活化芯片表面时间)，使芯片表面发生酯化；点击注射命令，选择 B1，设定 Contact time (蛋白偶联时间)，与蛋白的氨基发生反应；点击注射命令，选择 C1，设定 Contact time (封闭时间)，用乙醇胺封闭芯片上多余的有活性羧基，所有命令都完成后，点击结束命令图标 (Stop run)，具体操作如图 4 所示。(注意：偶联时间的长短需要根据所偶联蛋白的浓度以及理论偶联量决定，封闭时间一般和使用 EDC、NHS 活化芯片表面的时间一致。)

A



B

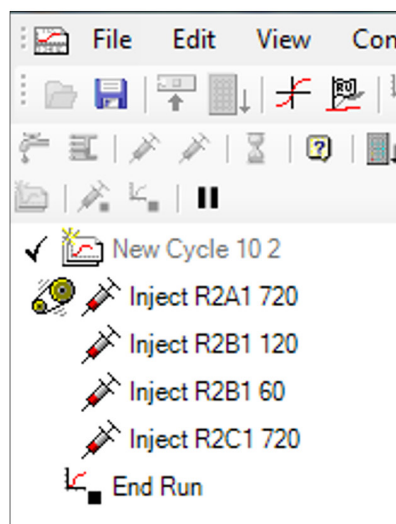


图 4 HSA 蛋白偶联过程。 A. 偶联试剂和样品放置；B. EDC/NHS 活化、HSA 偶联、乙醇胺封闭进样顺序和时间。

3. 小分子化合物 Warfarin 与 HSA 蛋白相互作用时测试条件摸索

该实验步骤的目的有：(1) 确定化合物与蛋白是否有特异性结合；(2) 分析化合物与芯片表面是否存在非特异性结合；(3) 化合物选择多少浓度进行动力学分析；(4) 结合时间和解离时间分别设置多少秒。

使用 100% 的 DMSO 将 Warfarin 配制成 50 mM 母液；用上样缓冲液 HBS-EP+ 稀释 Warfarin 样品至 50 μ M、5 μ M、0.5 μ M，点击图标 (Eject rack tray) 退出试管架，分别将 0.5 μ M、5 μ M、50 μ M 的样品放在 A1、A2、A3，将上样缓冲液 HBS-EP+ 放在 B1。将试管架放回样品舱，点击 sample injection 图标，选择 A1 样品，进样时间设为 30 s，点击 ok；点击 wait 图标，设为 30 s，点击 ok；点击 Regeneration injection 图标，选择 B1，进样时间设为 30 s，点击 OK。另外两个样品重复上述操作。

4. 小分子化合物 Warfarin 的多循环动力学分析

经过上述摸索进样条件，初步了解到 HSA 和 Warfarin 结合解离性质以及亲和力大小。用上样缓冲液 HBS-EP+ 稀释 Warfarin 样品，使其浓度分别为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125、0 μ M。应用向导程序设置多循环实验，进行动力学测试。打开 New Wizard template，在 Assay 中选择 Kinetics/Affinity，点击 New；在 Injection Sequence 对话框中，Flow path 选择 2-1，Chip type 选择 CM5，点击 Next，进入下一步；在 Setup 对话框中，设置 Startup。在样品上样前，一般设置 Startup 循环，使系统和基线稳定，一般用上样缓冲液，在 Solution 中输入 HBS-EP+，Number of Cycles 设为 3（通常为 3~5 次），点击 Next，进入下一步；在 Sample 中，Contact time 是指分析物的进样时间，本次实验为 30 s，亲和力实验的 Flow rate 必须大于 30 μ L/min，此处设为 30 μ L/min；Dissociation time 是指解离时间，需根据样品的情况设置，此处设为 30 s；在 Regeneration 中，选用上述摸索的再生试剂，本实验根据解离情况选择使用 HBS-EP+，Contact time 设为 30 s，Flow rate 设为 30 μ L/min。在 Samples 对话框中填写样品名称和浓度信息，如果是同一样品，即使浓度不同，其名称也需保持一致。设置 Warfarin 浓度，分别为 0、0.78125、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50 μ M，点击 Next 进入下一步，去掉 prime before run 前的打勾，点击 Cycle run list，确认实验运行中所有的循环是否正确，点击 Next，进入下一步，将准备好的样品放置于样品架中的指定位置（图 5），点击 Next，检查各孔放置是否正确，点击 Start，保存文件 Kinetics data.blr，实验程序开始运行。

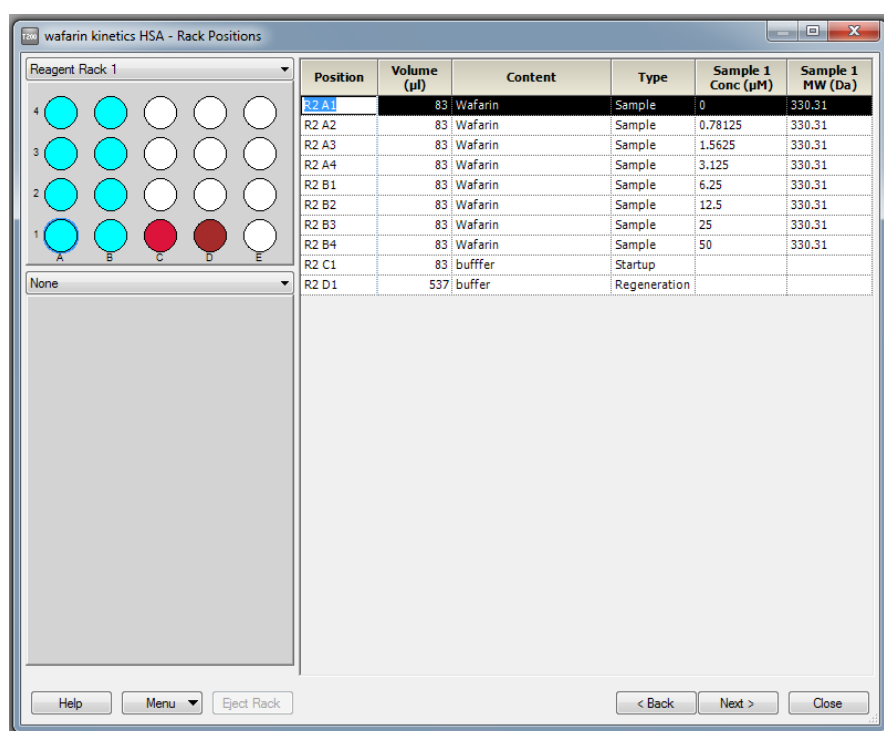


图 5 HSA 蛋白与 Warfarin 的多循环动力学样品的放置。

5. 数据拟合

完成多循环动力学进样后，使用 Biacore Evaluation Software 3.2 对实验结果进行分析，主要步骤如图 6 所示，选择 Kinetics/Affinity 下的 Surface bound 选项，进入分析界面，在 Select Curves 界面中选取要分析的数据；在 Select Data 界面中，所有曲线都需扣减掉零浓度曲线，如果不需要分析传感图上的部分数据段，可点击鼠标右键，使用 Remove selection 功能将其去除；界面的右下方有两个模式：Affinity 和 Kinetics，如果传感图是快上快下型（fast-on、fast-off，常见于小分子分析物），请选择 Affinity，应用稳态模型 Steady State 进行分析；如果传感图呈动力学性质，选择 Kinetics 进行分析。本实验中，选择 Kinetics，结合模式选择 1: 1，点击 fit 对数据进行拟合，获得结合速率常数 (K_a)、解离速率常数 (K_d)、亲和力 (KD)。

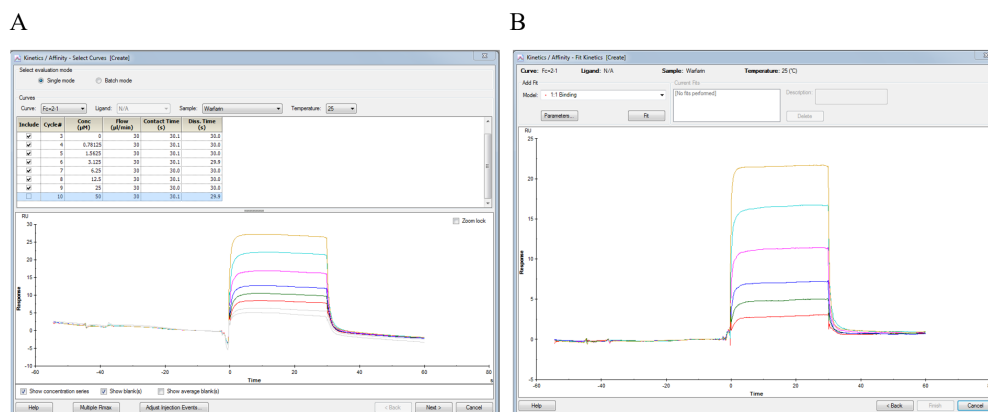


图 6 HSA 蛋白与 Warfarin 的多循环动力学拟合过程。A. 扣减零浓度前的传感图；B. 扣减零浓度后的传感图。

实验结束后的操作

实验结束后，将芯片取出，装入维护芯片，将托盘左侧的上样缓冲液和右侧的上样针清洗缓冲液都换为超纯水，将右侧废液瓶倒掉、清洗后复位，然后执行 desorb 功能，先将 desorb1 和 desorb2 放置于上样仓，点击 Tools、More Tools、Desorb；结束后折行 Prime 功能，最后使仪器处于 stand by 待机状态（图 7）。

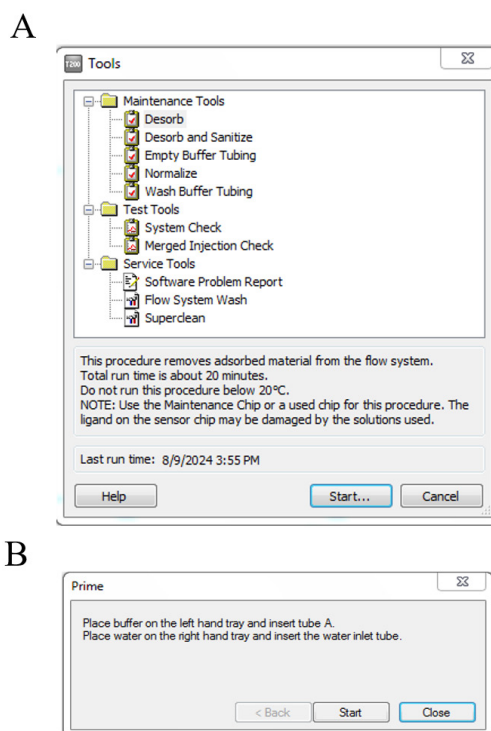


图 7 实验操作结束后执行 Desorb (A) 和 Prime (B) 功能。

结果与数据分析

1. HSA 蛋白的 pH 筛选结果图

为保证 HSA 蛋白在 Fc2 通道上的偶联量，进行了不同 pH 值稀释的样品的预富集筛选，如图 8 所示，从左至右分别为 pH 5.5、5.0、4.5、4.0，结果显示，pH 5.0 条件下，蛋白在芯片上的预富集水平最高，下面实验将选择 pH 5.0 的醋酸钠稀释蛋白进行偶联。

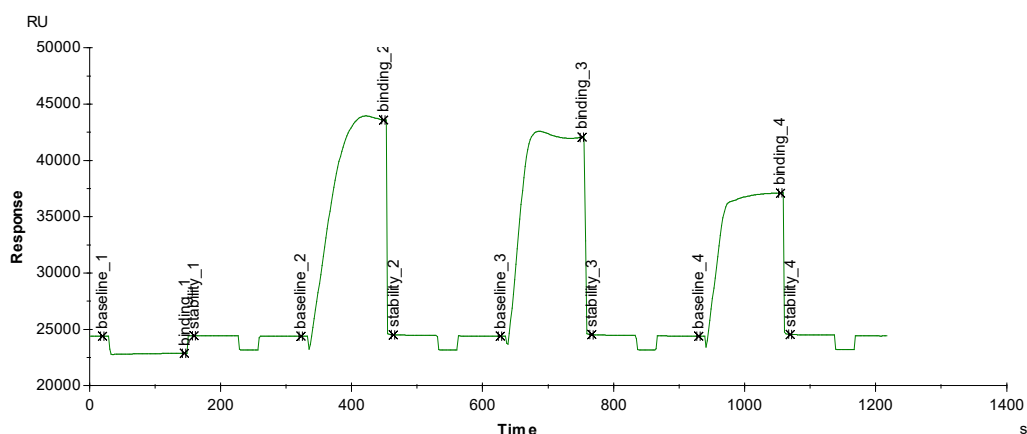


图 8 HSA 蛋白在 pH 5.5、5.0、4.5、4.0 条件下的预富集结果。

2. HSA 蛋白的氨基偶联结果

采用手动偶联法，将 HSA 偶联至 Fc2 通道上，偶联过程如图 9 所示，先将各 100 μ L 的 EDC 和 NHS 混匀后活化芯片表面 720 s，然后先使用 pH5.0 的 HSA 偶联 120 s，考虑到偶联量不足的情况下，又继续偶联 60 s，最后用乙醇胺封闭芯片表面 720 s，偶联过程结束。

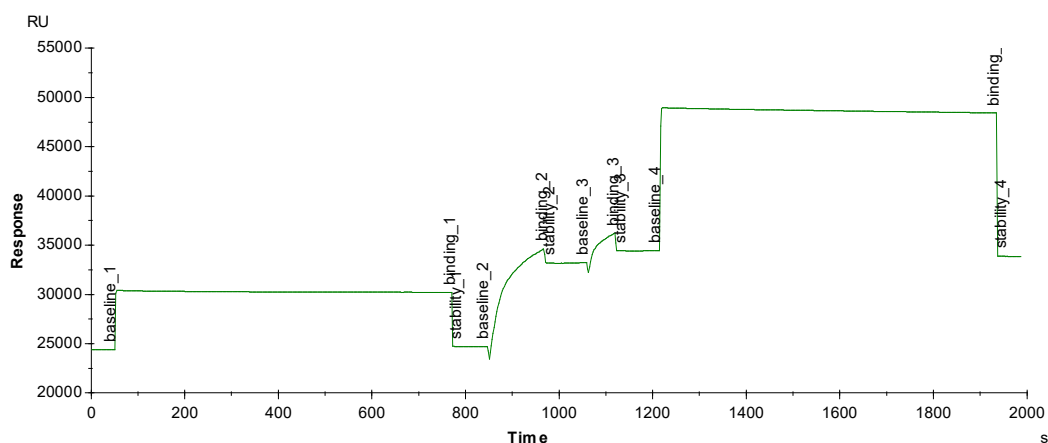


图 9 HSA 蛋白在 pH 5.0 条件下的偶联结果图

3. HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用的分析结果

本实验使用 Biacore T200 进行了 HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用的动力学分析, 其结合、解离的传感图如图 10 所示, Warfarin 流经芯片表面与 HSA 蛋白结合并很快达到饱和, 进样结束后快速解离, 其各浓度梯度间具有依赖性, 取 0、0.78125、1.5625、3.125、6.25、12.5、25 μ M, 使用 Kinetics, 1:1 binding 模式进行拟合分析, 其结果如图 11A 所示, 原始传感图与每个浓度拟合的黑色线条组成的图基本重合。数据拟合后图 11B 可观察到“Quality Control”中“Kinetic constants are within instrument specifications”指标显示绿色, 表示动力学常数在仪器检测范围内, 结果符合模型要求; “Kinetic constants appear to be uniquely determined”指标显示绿色, 表示动力学常数可以拟合出; “High bulk contributions (RI) found”指标显示黄色, 表示存在一定的容积效应, 但上述所有参数没有红色报警提示, 说明获得的数据质量控制通过。图 11C 和表 1 所示, 结合常数 $4.682\text{E}+4$ (1/Ms), 解离常数为 0.07800 (1/s), 亲和力 KD 为 $1.666\text{E}-6\text{M}$ 。Rmax 为 3.422, 远低于 100RU; Chi^2 (RU)² 值为 0.294, 小于 Rmax 的十分之一; U-Value 值为 12, 小于 15; Tc 表示物质迁移系数, 其值为 $9.423\text{E}+10$, 大于 Ka 值; 上述都符合要求, 说明该数据质量达标。

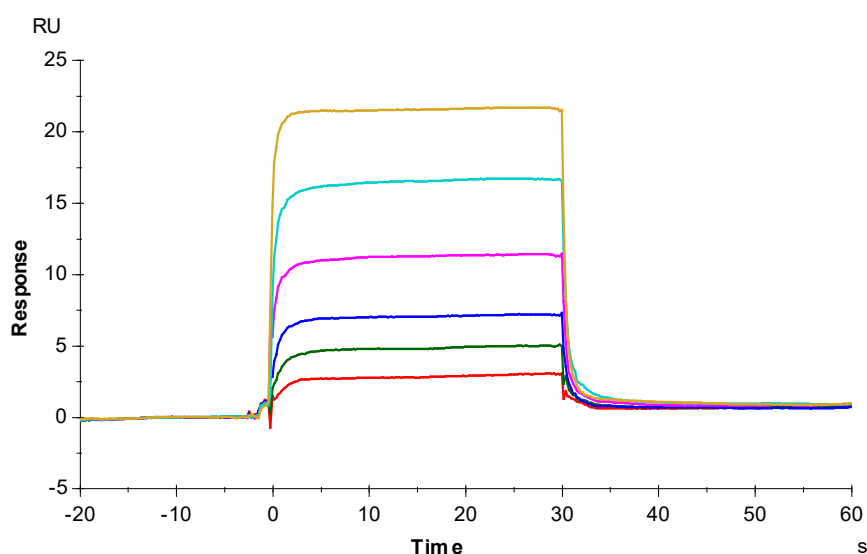


图 10 HAS 蛋白与 Warfarin (0~25 μ M) 相互作用的信号传感图 (拟合前)

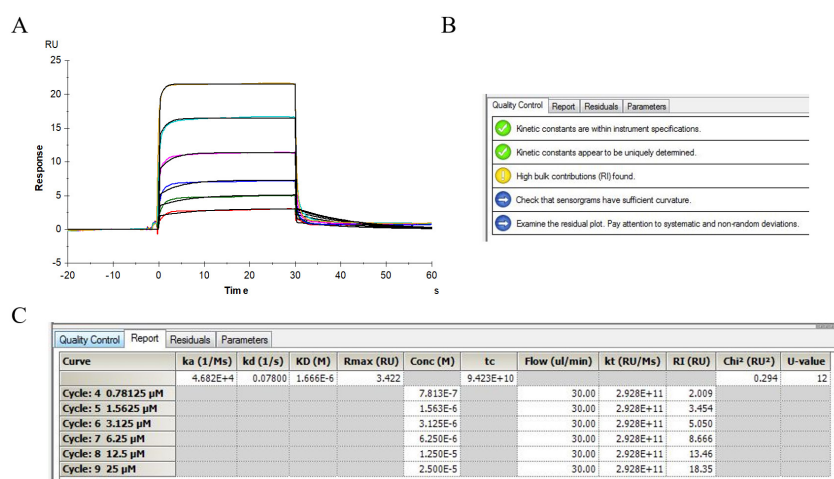


图 11 HSA 蛋白与 Warfarin (0~25 μM) 相互作用拟合后的传感图以及动力学参数。A. HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用的信号传感图 (Kinetics, 1: 1 binding 拟合后); B. 数据拟合后进行评估的 Quality Control 结果; C. 数据拟合后的 Report 结果。

表 1 HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用的动力学常数

样品	结合常数 Ka (1/Ms)	解离常数 Kd (1/s)	亲和力 KD (M)
Warfarin	4.682E+4	0.07800	1.666E-6

实验注意要点

1. 实验前保证仪器状态正常

为保证仪器状态正常，需要执行 System Check，确保各项参数都处于“Pass”状态（并不是每次实验前都需执行该程序，如果遇到异常情况时执行该功能判断仪器是否正常）。

2. 如何选择合适的传感芯片？

根据实验需求选择合适的芯片，芯片种类如下：

(1) 直接共价固定的芯片

CM5：最常用的传感芯片，大多数的分子间相互作用分析使用该芯片；

CM4：芯片表面葡聚糖量低于 CM5，可用于蛋白偶联水平要求较低的研究；

CM3：芯片表面葡聚糖量低于 CM4，大分子、病毒或细胞类的研究可用该芯片；

CM7：芯片表面葡聚糖量低于 CM5，可用于蛋白偶联水平要求较低的研究；

C1：适用于小型分子颗粒如细胞、病毒以及一些不需葡聚糖的研究的应用；

(2) 间接捕获固定的芯片

NTA：适用于带有 His 标签的分子；

SA：生物素标记的分子，可使用不可逆性捕获的 SA 芯片；

Biotin CAP：生物素标记的分子，可使用可逆性捕获的 CAP 芯片；

Protein A、Protein G、Protein L：捕获抗体；

(3) 疏水吸附固定的芯片

L1：研究脂质体分子时，可使用 L1 芯片直接捕获该分子进行研究（双分子层膜）；

HPA：分析与膜系统相关的研究可以使用 HPA 芯片（单分子层膜）；

(4) 特殊定制的芯片

裸金 Au 芯片：芯片表面材料定制（材料、高分子）的芯片。

3. 对所偶联的蛋白有什么要求？

蛋白尽量保存在 PBS 缓冲液中；纯度建议高于 95%；浓度建议大于 0.5 mg/mL，总量至少 20 μ g；保证蛋白具有活性；为避免干扰信号或影响偶联，建议缓冲液中不含甘油、蔗糖、甘露糖、甘露醇、海藻糖、咪唑等；如果使用氨基偶联法时，蛋白不能含有 Tris、NaN₃、甘氨酸等含伯氨基的成分。

4. 对蛋白的偶联量有什么要求？

首先根据公式计算出 R_L ，然后乘以 1.5，得到蛋白的理论偶联量。如果在实际检测中，信号过低，可以补充偶联量，但如果已经达到芯片的饱和偶联量还达不到偶联要求，建议尝试使用 CM7 芯片。判断信号过低需要根据分子间相互作用的性质、分析物的浓度、产生的信号值大小以及结合前期实验结果或文献报道的亲和力值确定，如检测靶蛋白和小分子化合物之间的亲和力时，分析物浓度为 50 μ M 时响应值的信号在 0~5 RU 之间，而文献报道或前期结果亲和力大约为 0~10 μ M 之间，那么此时需要考虑偶联在芯片上的蛋白是否具有活性或分析物是否稳定。

5. 实验时使用何种缓冲液？

大多数缓冲液可用，但需要根据分子间的结合性质、非特异性干扰、有无辅助因子参与等因素选择和配制合适的缓冲液，如参比通道非特异性吸附明显，需要使用 HEPS-EP+缓冲液；如果蛋白和小分子结合时容积效应干扰大，需要在上样缓冲液（Running Buffer）中加微量的溶解小分子的溶剂；如果研究酶和底物的相互作用时，必要时在缓冲液中加辅助因子等。注意：上述缓冲液必须经 0.22 μ m 滤膜过滤，并且建议现配现用。

6. 对化合物进行浓度梯度稀释时，用什么缓冲液以及如何确定浓度的上限和下限？

使用上样缓冲液对化合物进行梯度稀释，其上限浓度根据实验前摸索的浓度设定，一般浓度范围是亲和力值的 0.1~100 倍，然后倍半稀释至少 5 个浓度梯度，另外还需设置零浓度样品，所测得的亲和力值必须在浓度梯度范围内。

7. 小分子化合物作为分析物时参比通道通有非特异性吸附，如何解决？

建议使用 EP+缓冲液（含有表面活性剂 P20）作为上样缓冲液，如果还存在，稍提高 EP+ Buffer 中 P20

的浓度，但不建议过高，否则会影响分子间相互作用。

8. 为什么进样过程出现扣除参比通道的信号值呈现负值或降低趋势，如何解决？

将问题聚焦为分析物：缓冲液的 pH 是否偏低？分析物是否带正电荷？

(1) 上样缓冲液 pH 过低，导致阳离子含量增高，容易非特异性吸附在芯片表面，而未偶联蛋白的参比通道吸附性更强，完全掩盖了偶联靶标蛋白通道上的特异性信号，导致靶标蛋白通道信号扣除参比通道的信号为负值，如图 12 所示。解决方案：将缓冲液 pH 调整为 7.4。

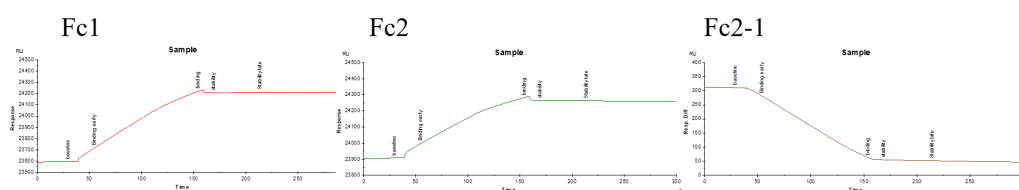


图 12 酸性的缓冲体系导致 Fc1 非特异性强吸附而使 Fc2-1 呈现负值。

(2) 分析物本身带正电荷，容易吸附在带有负电荷的芯片表面，并且与参比通道表面的吸附性更强，导致靶标蛋白通道信号扣除参比通道的信号呈现降低趋势，如图 13 所示。解决方案：可以将不与分析物结合的蛋白（Dummy Ligand，伪装配体）偶联至参比通道，以减少芯片表面携带的负电荷，降低非特异性吸附。

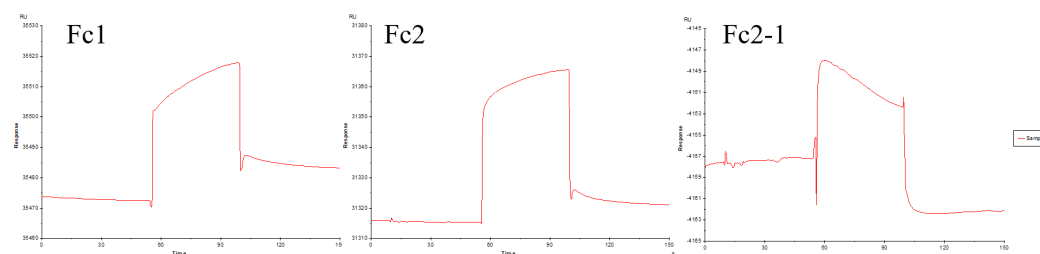


图 13 分析物带正电荷导致 Fc1 非特异性强吸附而使 Fc2-1 呈现降低趋势。

9. 蛋白或化合物不稳定时如何开展实验？

如果蛋白即使偶联在 CM5 芯片上也不稳定，可以通过捕获蛋白的方法进行分析；如果化合物不稳定，建议现配现用。

10. 蛋白和分析物没有结合信号时如何解决？

这种情况一般要分析是蛋白的原因还是分析物的问题。判断是否是蛋白的问题，先通过设置阳性化合物，如果公认的阳性化合物和蛋白结合时没有信号，一般是蛋白的问题，要么是偶联量低或是蛋白没有活性；如果阳性化合物和蛋白结合有信号，那可能是分析物浓度低或不稳定的问题，采取调高浓度

或现配现用的方式解决该问题。

11. 在做蛋白与小分子相互作用分析时，如何解决化合物溶解性低、而与靶蛋白亲和力又弱的问题？

在进行蛋白与小分子相互作用分析时，会遇到化合物溶解性低且与靶蛋白亲和力又弱的情况。首先将化合物用 100% DMSO 溶解，将母液配制为 10~20 mM，取 1 μ L 加入到 99 μ L EP+ 缓冲液中，将 900 μ L EP+ 缓冲液加入上述试管中，用热吹风机吹管底，促进其溶解，然后以此为母液进行梯度稀释，为了溶解彻底，将每管涡旋并用吹风机也加热促溶，配制完成后迅速上样测定其亲和力，如果还存在较大的容积效应时，做溶剂校正曲线。

12. 进样时，参比通道的 RU 值呈上升或下降趋势，为什么？

RU 呈上升趋势时，说明分析物与参比通道有非特异性吸附；RU 呈下降趋势时，说明缓冲液有干扰，如果对结果影响明显，需要更换缓冲体系。

13. 为什么进样瞬间有一个或高或低的信号峰？

该现象说明样品与上样缓冲液折光率差异较大，要使所测数据准确、峰图漂亮，必须保证样品与上样缓冲液折光率一致，可以通过使用上样缓冲液配制和稀释样品；如果是 DMSO 配制的样品，可通过提高母液浓度而增加上样缓冲液的稀释样品倍数而解决。

14. 进样结束后，一般选择什么样的试剂对芯片表面进行再生？

对于结合后容易解离的分子间相互作用，只需用上样缓冲液再生芯片表面即可；如果分子间结合后不易解离，需要逐步尝试从温和至强烈的不同 pH 的醋酸钠（3.0、2.5、2.0、1.5）再生，以及尝试使用 NaOH（1~100 mM）、MgCl₂（1~4 M）再生芯片表面。

15. 进样结束后，解离到什么程度可对芯片表面进行再生？什么时候结束？

进样结束后，先使上样缓冲液流过芯片表面，使结合的化合物和蛋白自行解离，当 RU 降到最高浓度产生信号的 10% 后进行再生，信号基本回归到基线水平时结束再生。

16. 进样结束后，分析物高浓度产生的信号不呈现梯度依赖性，而低浓度有，为什么？

这种现象说明该化合物溶解性低，高浓度时没有彻底溶解，产生的信号比实际低；低浓度时彻底溶解了，产生的信号与实际相符，因此呈现浓度依赖性。

17. 蛋白与分子间进行多循环动力学分析时，浓度梯度与信号值为什么呈现反向依赖性？

这种情况并不是操作时将样品顺序放反了，而是因为化合物溶解性差，高浓度的化合物比低浓度下溶解的分子少，产生的信号低，因此导致浓度梯度与信号值呈现反向依赖性。

18. 对获得的数据进行拟合时，参比通道和零浓度的信号如何处理？

为了获得准确、客观的结果，拟合的数据需要采用双扣减，即扣减参比通道的信号和零浓度产生的信号。

19. 蛋白与小分子化合物拟合时，为什么有的用 kinetics 拟合，有的用 Affinity 拟合？

当蛋白与小分子化合物结合后，解离较慢或稍快时，如果有解离曲线稍有弧度出现，用 Kinetics 拟合，

可获得结合常数 (K_a)、解离常数 (K_d)、亲和力值 (K_D)；当解离非常快时，即快上快下时，即稳态分析 (Steady State)，用 Affinity 拟合，此时没法计算出结合解离常数，只能求出亲和力。

20. 如何评价数据拟合质量？

进行 Kinetics 拟合时，结合模式选择 1: 1，拟合后，首先确保 Quality control 没有红色报警项显示，说明拟合数据质控通过，然后观察 Report 栏中列出的结合速率常数 (K_a)、解离速率常数 (K_d)、亲和力 (K_D)、 R_{max} 、 χ^2 (RU^2) 等重要数据， R_{max} 值要低于 100RU，且 χ^2 (RU^2) 值越小越好，最大值要小于 R_{max} 的十分之一；U-Value 值小于 15；Tc 值表示物质迁移系数，其值越大越好，最小值要大于 K_a 值；如果上述都符合，说明该数据质量达标。

进行 Affinity 拟合时，因为是稳态分析即 Steady State，结合解离性质呈现快上快下型，无法计算结合常数和解离常数，只能拟合出亲和力值，判断该值质控是否通过，可以观察亲和力值所对应的竖线是否落在各浓度形成的曲线内，并且 χ^2 (RU^2) 值越小越好，其上限值要小于 R_{max} (RU) 的十分之一。

21. 数据拟合时，所设的浓度梯度都需要采用吗？如何取舍？

实验设置浓度梯度时需要宽泛一些，以方便数据拟合时获得更为客观、准确的结果，根据拟合后 Quality Control 的评价、Report 里的参数对其进行取舍，图 14 为本实验利用所有浓度 (0~50 μM) 进行拟合后的结果，发现与图 11 利用 0~25 μM 浓度进行拟合后的结果有差别，然后从 Quality Control、 χ^2 (RU^2)、U-Value 等各项参数进行比较分析 (见表 2)，结果表明采用 0~25 μM 浓度梯度的传感图拟合效果优于 0~50 μM 的拟合效果，因此，HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用的动力学参数采用通过 0~25 μM 浓度梯度拟合的结果。

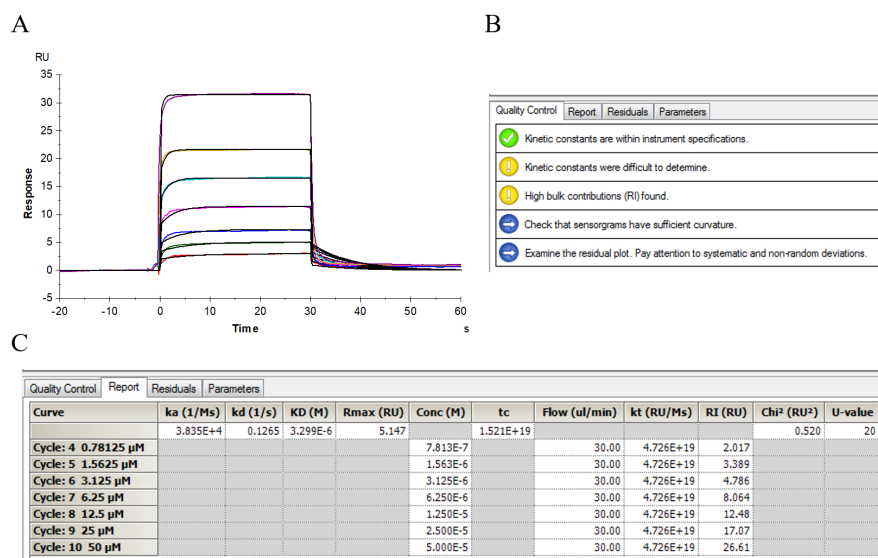


图 14 HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用拟合后的传感图以及动力学参数。A. HSA 蛋白与 Warfarin

相互作用的传感图拟合后的结果；B. 数据拟合后进行评估的 Quality Control 结果；C. 数据拟合后的 Report 结果

表 2 HSA 蛋白与 Warfarin 相互作用时不同浓度拟合后的数据比较

Warfarin Concentration	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Quality Control	Rmax	Chi ² (RU ²)	U-Value	tc
0~25 μ M	4.682E+4	0.07800	1.666E-6	GGY	3.422	0.294	12	9.423E+10
0~50 μ M	3.835E+4	0.1265	3.299E-6	GYG	5.147	0.520	20	1.521E+19

注：G 表示 Green, Y 表示 Yellow

溶液配方

1. HBS-EP+缓冲液

取 50 mL 购置的 10 $\times$ HBS-EP+缓冲液，加入到 450 mL 超纯水中，配制为 1 $\times$ HBS-EP+的缓冲液，建议现配现用。

2. HBS-N 缓冲液

取 20 mL 购置的 10 $\times$ HBS-N 缓冲液，加入到 180 mL 超纯水中，配制为 1 $\times$ HBS-N 的缓冲液，建议现配现用。

3. 待测化合物的配制

将化合物用 100% DMSO 溶解，用 1 $\times$ HBS-EP+的缓冲液稀释至所需浓度。

致谢

本实验数据由复旦大学药学院仪器测试中心的 Biacore T200 设备产生，是为复旦大学药学院药剂学系蒋晨教授的文章[2]建立的分析测试方法。本论文只用来提供 Biacore 方法学参考，不涉及利益冲突，在此表示感谢！涉及的问题解决方案是本作者在该领域内方法学的拓展和延伸。

参考文献

1. Biacore™ T200 Instrument Handbook, GE Healthcare Life Science, USA.
2. Zhang, Y., Guo, Z., Cao, Z., Zhou, W., Zhang, Y., Chen, Q., Lu, Y., Chen, X., Guo, Q., Li, C., et al. (2018). Endogenous albumin-mediated delivery of redox-responsive paclitaxel-loaded micelles for targeted cancer therapy. *Biomaterials*. 183: 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.002>