

基于 Dual 进样模式的中药来源活性小分子与靶标互作的异位协同表征

Dual injection Mode-based Characterization of Allosteric Synergistic Interactions between Target and Bioactive Small Molecules from Traditional Chinese Medicine

杨宇章^{1, #}, 陈锡祥^{2, #}, 徐见容^{1, *}

¹ 中西医结合学院, 上海中医药大学, 上海

² 交叉科学研究院, 上海中医药大学, 上海

*通讯作者邮箱: janker.xu@gmail.com

#共同第一作者/同等贡献

摘要

目的: 通过表面等离子共振技术 (SPR) 的 Dual 进样模式表征中药来源活性小分子与靶标的异位协同作用。**方法:** 将靶标蛋白以氨基偶联的方式固定在 CM5 芯片上, 再利用 Dual 进样模式将分析物 A、分析物 B 和 AB 混合物以不同的进样顺序流过 CM5 芯片表面, 记录响应值的变化。**结果:** AB 混合物的相对响应值大于单独进样分析物 A 和分析物 B 的相对响应值以及两者之和; 进样分析物 A 或分析物 B 与靶标蛋白预结合, 可对分析物 A 与分析物 B 的协同作用产生影响。**结论:** 本文使用 Dual 进样模式以及两种活性分子的不同进样顺序与方式, 通过比较相对响应值并计算协同系数, 发现分析物 A 与分析物 B 之间存在协同互作。本实验方法可应用于判断活性小分子之间的协同互作关系, 与其他分子互作技术相比, 本文的实验方案具有实时、非标记、快速及互作信息更全面等多个优势。

关键词: SPR, 异位, 协同互作, Dual 进样模式

引用格式: 杨宇章, 陈锡祥, 徐见容. (2025). 基于 Dual 进样模式的中药来源活性小分子与靶标互作的异位协同表征. *Bio-101* e1011021. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011021.

How to cite: Yang, Y. Z., Chen, X. X. and Xu, J. R. (2025). Dual injection Mode-based Characterization of Allosteric Synergistic Interactions between Target and Bioactive Small Molecules from Traditional Chinese Medicine. *Bio-101* e1011021. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011021. (in Chinese)

Copyright: © 2025 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

材料与试剂

1. PBS (10×) 溶液 (Cytiva, 产品目录号: BR100672)
2. Tween-20 溶液 (泰坦生物, 产品目录号: G89190B)
3. DMSO (泰坦生物, 产品目录号: 79527O)
4. pH 5.5 醋酸钠缓冲液 (Cytiva, 产品目录号: BR100352)
5. 氨基偶联试剂盒 (Cytiva, 产品目录号: BR100050)
6. Series S CM5 芯片 (Cytiva, 产品目录号: 29149603)
7. 1.5 mL EP 管 (爱思进, 产品目录号: MCT-150-C)
8. 4 mL 玻璃管 (Thermo, 产品目录号: 4-SV)
9. 橡胶帽 (Cytiva, 产品目录号: BR100411)
10. 0.22 μm 孔径滤膜 (泰坦生物, 产品目录号: FPE204030)
11. 靶标蛋白偶联阶段选用的缓冲液为 PBST (见溶液配方)
12. 测试分析物阶段选用的缓冲液为 300 mL 含 1.4% DMSO 的 PBST (见溶液配方)
13. 溶剂校正溶液 (见溶液配方)

仪器设备

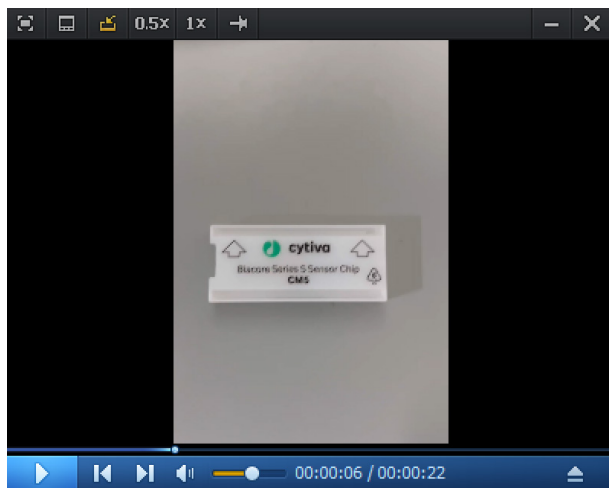
1. 分子互作分析仪 (Cytiva, 产品型号: Biacore T200)
2. 实验室水纯化系统 (Millipore, 产品型号: Direct-8)
3. 制冰机 (Panasonic, 产品型号: SIM-F149AY65-PC)
4. 过滤装置 (Thermo, 产品型号: Ds0320-5033)

实验步骤

一、实验准备

1. 仪器维护
 - a. 将仪器内芯片更换为维护芯片 (视频 1)。
 - b. 将缓冲液更换为 Milli-Q H₂O (MQ H₂O)。
 - c. 在操作界面选择 Tools, 再选择 Prime。

- d. 待 Prime 结束后，选择 Tools，点击 More Tools，选择 Desorb，按照程序设定准备需要的试剂，运行 Desorb 程序。



视频 1 芯片更换

2. 仪器准备

将缓冲液更换为含 0.05% Tween-20 的 1× PBS (PBST)，在操作界面选择 Change chip，将维护芯片更换为新的 CM5 实验芯片，填写芯片相关信息，点击 Dock chip，在操作界面选择 Tools，再选择 Prime。

二、配体的偶联

本实验采用 CM5 芯片，将偶联试剂盒中 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 混合为终浓度为 50 mM NHS 与 200 mM EDC 的活化试剂，将活化试剂注射 7 min 活化芯片表面的羧基。将靶标蛋白用 pH 5.5 的 10 mM 醋酸钠缓冲液，稀释至 30 μg/mL，30 μL/min 流速，持续时间为 700 s，固定在 CM5 芯片表面 [1]。最后用 1 M 乙醇胺 (pH 8.5) 封闭表面。最终偶联量为：15961.7 RU (图 1)。

注：可以通过 Biacore T200 Control Software 打开偶联结果 (blr 为后缀的文件)，选择偶联的 Cycle，右键选择 Copy Graph 导出偶联结果图 (如图 1)。

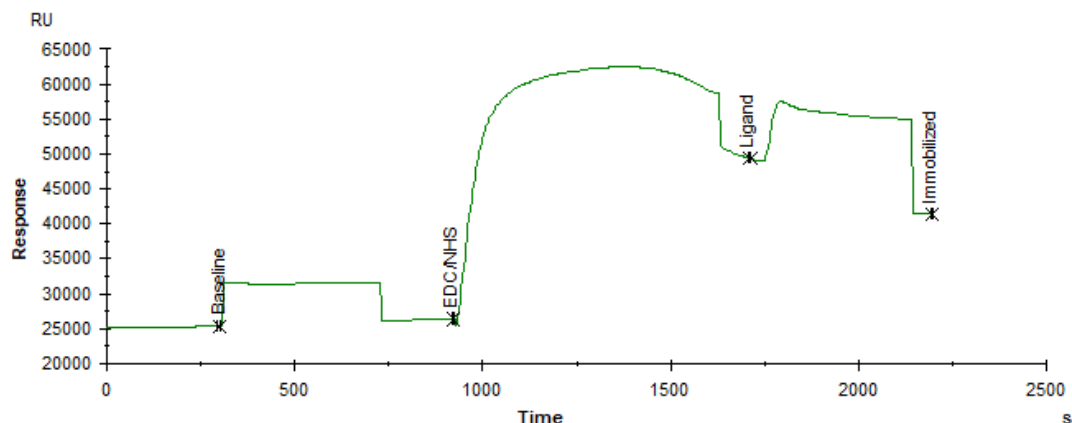


图 1 靶标蛋白偶联结果

三、实验方法的建立：协同互作测定的具体实验方法

1. 方法设置

- a. 软件控制界面选择 New Methods, 在方法编辑界面设置 General Settings (图 2), 填写缓冲液 (1.4% DMSO PBST) 信息, 本实验只在一个通道上偶联靶标蛋白, 因此检测通道选择 Dual。

注: 选择分析物浓度单位为 nM, 系统容易错误识别浓度单位 μM , 需要特别注意。DMSO 浓度可以根据不同实验调整。数据采样频率保持 10 Hz 不变, 样品舱温度根据样品实际情况确定, 一般保持在 25°C, 对于温度敏感样品, 可降低温度至 10 °C。

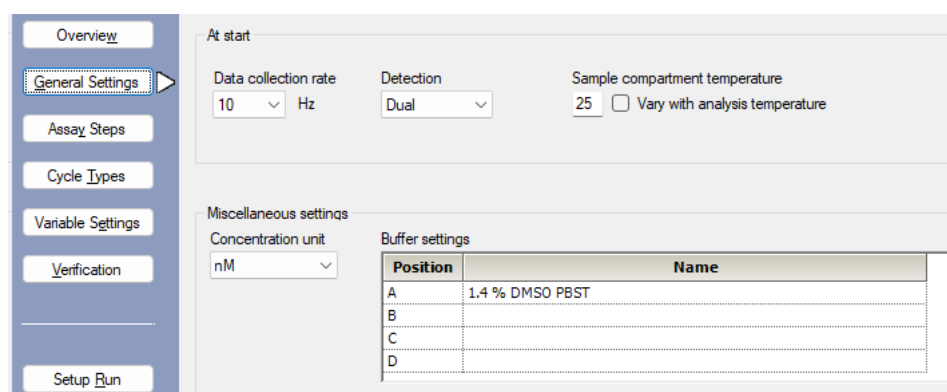


图 2 General Settings 的设置界面

- b. 选择 Assay Steps 点击 New 添加分析步骤 (图 3), 添加 Start up 步骤、Sample 步骤和 Solvent Correction 步骤, 将 Solvent Correction 步骤与 Sample 步骤进行关联。

注: 溶剂校正溶液配方见表 4。

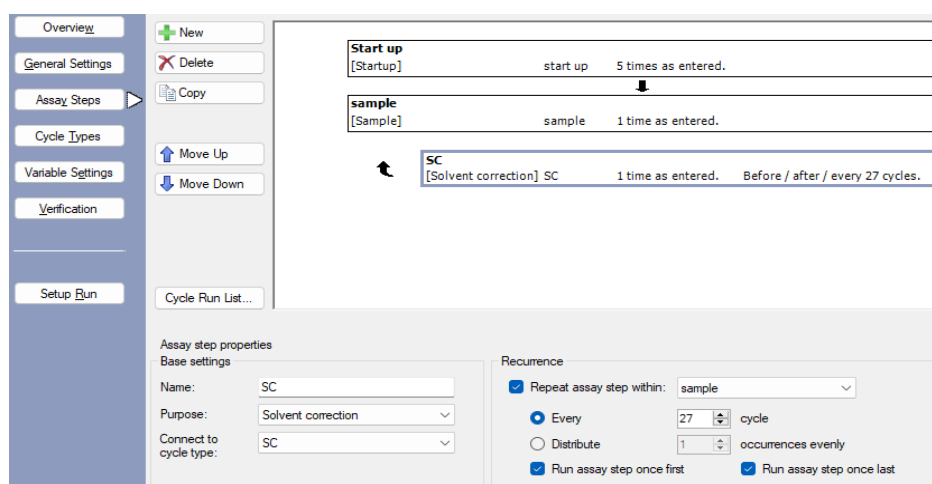


图 3 Assay Steps 的设置界面

- c. 在 Cycle Types 中点击 New 添加 Start up 循环、Sample 循环和 Solvent Correction 循环（图 4），在每个循环下点击 Insert 添加具体分析方法。

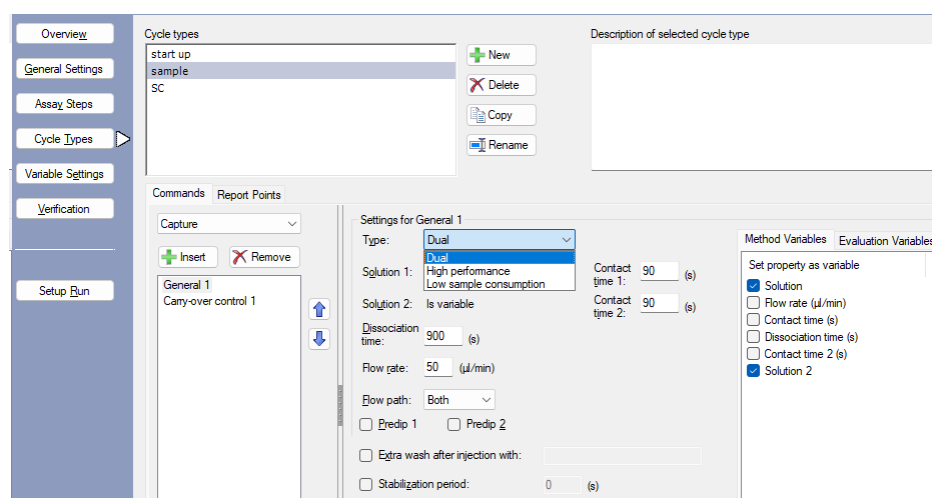


图 4 Cycle Types 与 Dual 进样模式的设置界面

- d. 在 Cycle Types 中将 Sample 循环的进样方式设定为 Dual（图 4），分别将 Solution 的结合时间设置为 90 s，Solution 2 的结合时间设置为 90 s，解离时间设置为 900 s，流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，流经通道选为 Both。
- e. 在 Variable Settings 中设置分析物的进样顺序（图 5），Solution 为先进样的分析物，Solution 2 为后进样的分析物。

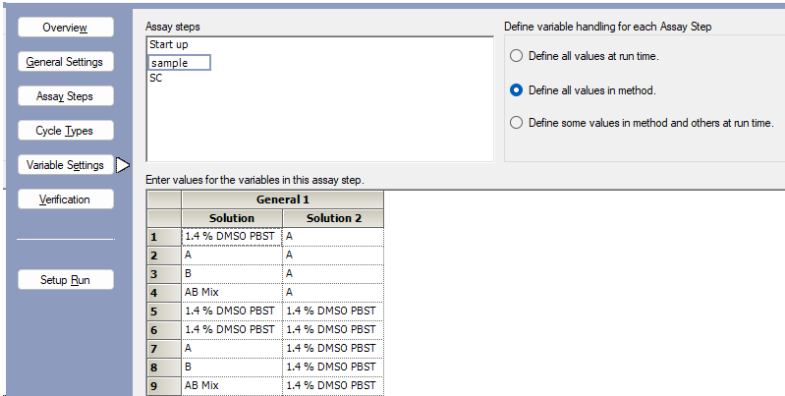


图 5 设置分析物的进样顺序

- f. 点击 Verification, 验证以上设置是否符合软件自检逻辑, 确定所有必要信息均已正确填写。
- g. 点击 Setup Run, 选择参比通道扣减活性通道, 点击 Next, 检查整个分析流程所需的全部分析物, 也可以点击 Overview 检查整个实验流程设置, 若需修改可以随时退回调整设置。
- h. 点击 Next, 选择 Prime before run。
2. 加样
- a. 按照 Rack Positions 所示 (图 6) 准备样品。

注: 为防止实验过程中样品中溶剂挥发影响 DMSO 浓度的一致性, 需要对所有的 EP 管以及玻璃管加盖橡胶帽。

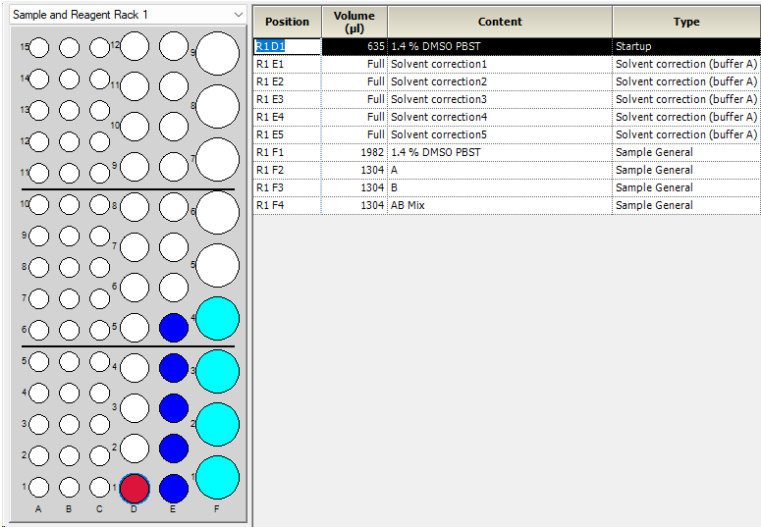


图 6 Rack Positions 的设置界面

- b. 确认所需 1.4% DMSO PBST 的体积, 确认所有分析物以及溶剂校正液都位于选定位置, 确认分析流程的时间。

3. 开始分析

再次确认各项无误后，点击 Start，保存分析文件，开始进行分析流程。

实验注意要点

1. 为了让整个仪器的流路控制进入稳定状态，应在正式实验开始前执行 Prime与Start up程序。
2. 在缓冲液含有 DMSO 等会对信号产生较大影响的有机溶剂时，为了避免 DMSO 浓度差异影响响应值进而带来误差，因此需要加入溶剂校正流程以扣除缓冲液中 DMSO 浓度差异带来的影响。
3. 所有溶液和样品都需要经过 0.22 μm 孔径的水系或有机系滤膜过滤。
4. 靶标蛋白应在冰上保存避免活性损失。

结果与数据分析

表面等离子共振技术（SPR）的原理基于表面等离子波的激发与折射率变化。当光束通过透明介质照射到金属薄膜表面时，特定角度的光会激发金属表面的电子，形成表面等离子波。当分析物与金属表面上固定的配体分子结合时，局部折射率发生变化，导致等离子共振角度发生偏移。这一变化可以通过反射光强度或共振角的变化来实时监测，从而反映分子相互作用的动力学信息，如结合速率、解离速率和亲和力等。本实验采用 Biacore T200 的 Dual 进样模式（图 7），即在一个循环两次进样的方式，对两种活性分子与靶标不同表位同时相互作用的协同效应进行分析[2,3]。根据不同样品以及不同进样顺序所得到的相对响应值进行定性分析并计算其协同系数，考察进样顺序等对协同作用的影响[4-6]。

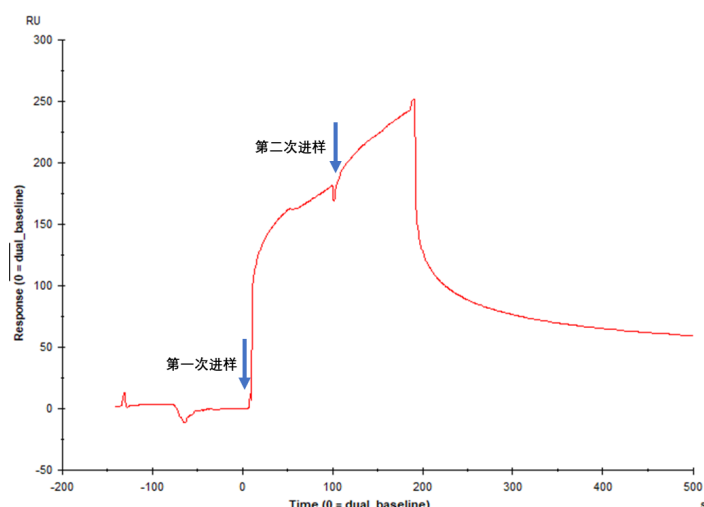


图 7 通过 Dual 进样模式表征协同作用结果示意图

引用格式：杨宇章，陈锡祥，徐见容. (2025). 基于 Dual 进样模式的中药来源活性小分子与靶标互作的异位协同表征. *Bio-101* e1011021. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011021.
 How to cite: Yang, Y. Z., Chen, X. X. and Xu, J. R. (2025). Dual injection Mode-based Characterization of Allosteric Synergistic Interactions between Target and Bioactive Small Molecules from Traditional Chinese Medicine. *Bio-101* e1011021. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011021. (in Chinese)

通过协同系数评价协同作用，协同系数的计算公式为：

协同系数(%) = $\frac{\text{RelResp}_{AB} - \text{RelResp}_A - \text{RelResp}_B}{\text{RelResp}_A + \text{RelResp}_B} \times 100$

以上 RelResp 均采用 Solution 2 进样分析物时的响应值扣减进样 1.4% DMSO PBST 时的响应值差值纳入计算，其中 RelResp_{AB} 为 AB 混合物的相对响应值；RelResp_A 为分析物 A 的相对响应值；RelResp_B 为分析物 B 的相对响应值。

1. 测试无预结合条件下分析物 A、分析物 B 与靶标的协同作用

本次分析先进样 1.4% DMSO PBST 再进样三组分析物：分析物 A、分析物 B、AB 混合物，分别考察三组分析物各自的相对响应值（图 8）。

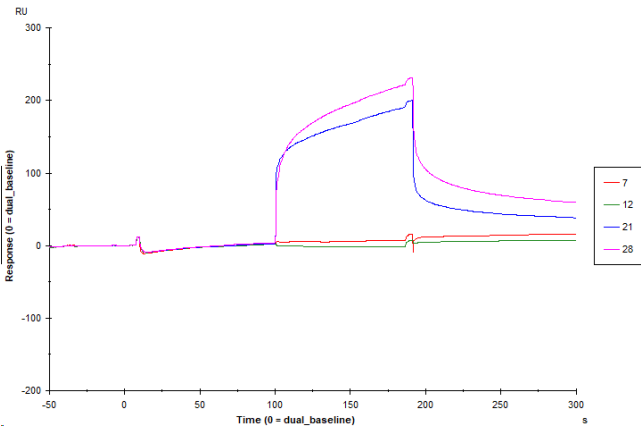


图 8 无预结合条件下各分析物的结合解离曲线图

结果测得分析物 A 的相对响应值为 6.5 RU，分析物 B 的相对响应值为 163.6 RU，AB 混合物的相对响应值为 219.7 RU（表 1），AB 混合物的响应值大于分析物 A 与分析物 B 响应值之和，所得结果提示分析物 A 与分析物 B 之间存在协同作用。根据协同系数的计算公式得到无预结合条件下分析物 A、分析物 B 与靶标蛋白互作的协同系数为 29.2%。

表 1 无预结合条件下各分析物的响应值

Cycle	Solution	Solution 2	Resp (RU)	RelResp (RU)
12	1.4% DMSO PBST	1.4% DMSO PBST	1.3	0
7	1.4% DMSO PBST	10 μM A	7.8	6.5
21	1.4% DMSO PBST	10 μM B	164.9	163.6
28	1.4% DMSO PBST	10 μM AB Mix	221.0	219.7

2. 测试分析物 A 预结合对分析物 A、分析物 B 与靶标协同作用的影响

为了探究分析物 A 与分析物 B 之间的协同作用是否受到分析物 A 预先结合靶标蛋白的影响，本次分析先进样分析物 A 与靶标蛋白预结合，通过 Dual 进样模式再进样三组分析物：分析物 A、分析物 B、AB 混合物，分别考察三组分析物各自的相对响应值（图 9）。

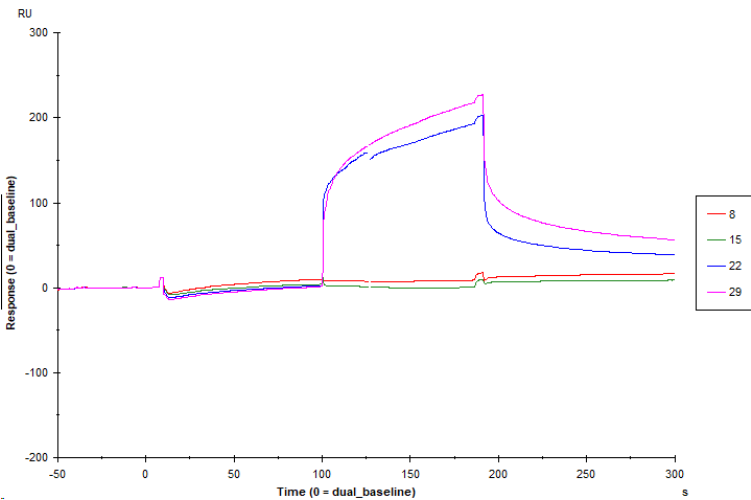


图 9 分析物 A 预结合后各分析物的结合解离曲线图

结果测得分析物 A 的相对响应值为 5.7 RU，分析物 B 的相对响应值为 189.0 RU，AB 混合物的响应值为 213.7 RU（表 2），AB 混合物的响应值大于分析物 A 与分析物 B 响应值之和，所得结果进一步证明分析物 A 与分析物 B 之间存在协同作用。根据协同系数的计算公式得到分析物 A 预结合条件下分析物 A、分析物 B 与靶标蛋白互作的协同系数为 9.8%，表明分析物 A 预先结合靶标蛋白使得分析物 A 与分析物 B 之间的协同作用下降。

表 2 分析物 A 预结合后各分析物的响应值

Cycle	Solution	Solution 2	Resp (RU)	RelResp (RU)
15	10 μ M A	1.4 % DMSO PBST	3.6	0
8	10 μ M A	10 μ M A	9.3	5.7
22	10 μ M A	10 μ M B	192.6	189.0
29	10 μ M A	10 μ M AB Mix	217.3	213.7

3. 测试分析物 B 预结合对分析物 A、分析物 B 与靶标协同作用的影响

为了探究分析物 A 与分析物 B 之间的协同作用是否受到分析物 B 与靶标蛋白预结合的影响，本次分析先进样分析物 B 与靶标蛋白预结合，通过 Dual 进样模式再进样三组分析物：分析物 A、分析物 B、AB 混合物，分别考察三组分析物各自的相对响应值（图 10）。

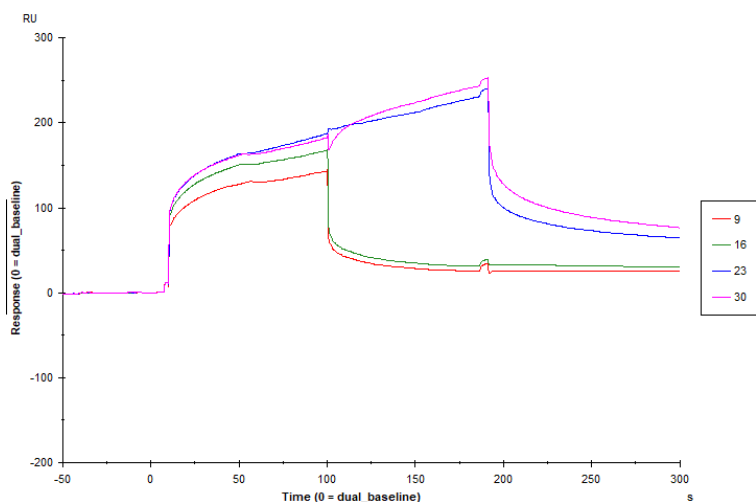


图 10 分析物 B 预结合后各分析物的结合解离曲线图

结果测得分析物 A 的相对响应值为-5.6 RU，分析物 B 的相对响应值为 198.7 RU，AB 混合物的相对响应值为 211.5 RU（表 3），AB 混合物的响应值大于分析物 A 与分析物 B 响应值之和，也提示分析物 A 与分析物 B 之间存在协同作用。但扣减缓冲液响应值后，分析物 A 的相对响应值为负值，推测分析物 A 可能可以加快分析物 B 的解离速率。进一步计算得到分析物 B 预结合条件下分析物 A、分析物 B 与靶标蛋白互作的协同系数为 9.5%，表明分析物 B 预先结合靶标蛋白也使得分析物 A 与分析物 B 之间的协同作用下降。

表 3 分析物 B 预结合后各分析物的响应值

Cycle	Solution	Solution 2	Resp (RU)	RelResp (RU)
16	10 μ M B	1.4 % DMSO PBST	31.6	0
9	10 μ M B	10 μ M A	26.0	-5.6
23	10 μ M B	10 μ M B	230.3	198.7
30	10 μ M B	10 μ M AB Mix	243.1	211.5

4. 结论

通过对分析物 A、分析物 B 和 AB 混合物的相对响应值进行分析，AB 混合物与靶标蛋白的相对响应值大于单独的分析物 A 与分析物 B 两者相对响应值之和，表明分析物 A 与分析物 B 二者混合后与靶标蛋白的结合更强，提示两者存在协同作用。二者的协同作用受到分析物本身与靶标蛋白预结合的影响，通过协同系数对协同作用的评价，在分析物 A 或分析物 B 与靶标蛋白预结合条件下所得到的协同系数比无预结合条件下所得到的协同系数低，提示预结合不利于分析物 A、分析物 B 与靶标的协同作用。我们推测分析物 A 或分析物 B 与靶标预结合后，可能诱导靶标蛋白构象发生相反方向的改变，不利于另一分析物的结合，但分析物 A、分析物 B 同时结合时可以诱导靶标蛋白产生不同于上述两种

构象的新的优势构象，进而发挥协同作用。实验结果表明通过 Dual 进样模式可以表征两种活性分子与靶标之间的协同作用，同时明确预结合对于协同作用的影响。本实验方法可应用于判断活性分子之间的协同互作关系，并做定量分析。

溶液配方

- 1. 本实验在靶标蛋白偶联阶段选用的缓冲液为 PBST，其配制方法为取容量为 1 L 的洁净玻璃瓶，加入 100 mL PBS (10×)，5 mL 10% Tween-20，加 MQ H₂O 补充至 1L，充分混匀后，将 PBST 通过 0.22 μm 孔径的水系滤膜过滤。
- 2. 本实验在测试分析物阶段选用的缓冲液为 300 mL 含 1.4% DMSO 的 PBST,其配制方法为取容量为 500 mL 的洁净玻璃瓶，加入 295.6 mL PBST，加入 4.2 mL 纯 DMSO，充分混匀后，将 1.4% DMSO PBST 通过 0.22 μm 孔径的有机系滤膜过滤。
- 3. 按照表 4 配制溶剂校正溶液

表 4 溶剂校正溶液配方

	1	2	3	4	5
DMSO 浓度	1.2%	1.3%	1.4%	1.5%	1.6%
纯 DMSO 体积 (μL)	0	0	0	1	2
1.4% DMSO PBST 体积 (μL)	860	930	1000	999	998
PBST 体积 (μL)	140	70	0	0	0

致谢

感谢国家自然科学基金（82173798）提供的经费支持。感谢上海中医药大学交叉科学研究院葛广波、朱广灏提供的两种中药来源的活性分子及靶标蛋白。

参考文献

1. Florinskaya, A., Ershov, P., Mezentsev, Y., Kaluzhskiy, L., Yablokov, E., Medvedev, A. and Ivanov, A. (2018). SPR Biosensors in Direct Molecular Fishing: Implications for Protein Interactomics. *Sensors*. 18(5): 1616. <https://doi.org/10.3390/s18051616>

2. Patching, S. G. (2014). Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. *Bba-biomembranes*. 1838(1): 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.028>

3. Xing, J., Tan, R., Huang, F. and Tian, N. (2024). Integrated analyses for identification of a three-gene signature associated with Chaihu Shugan San formula for hepatocellular carcinoma treatment. *J Cell Mol Med.* 28(8): e18211. <https://doi.org/10.1111/jcmm.18211>
4. Lee, J. J., Kong, M., Ayers, G. D. and Lotan, R. (2007). Interaction Index and Different Methods for Determining Drug Interaction in Combination Therapy. *J Biopharm Stat.* 17(3): 461–480. <https://doi.org/10.1080/10543400701199593>
5. Senapati, S., Biswas, S., Manna, S., Ros, R., Lindsay, S. and Zhang, P. (2018). A Y-Shaped Three-Arm Structure for Probing Bivalent Interactions between Protein Receptor–Ligand Using AFM and SPR. *Langmuir* 34(23): 6930–6940. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00735>
6. 陈凯歌, 何诣函, 杨美若, 王明花. (2023). 表面等离子体共振技术在癌症标志物检测中的应用进展. *化工新型材料* 51(S2): 135-140+149.