

SPR 数据分析综述

Overview of SPR Data Analysis

江竞雷^{1, #}, 刘伟², 杨晶晶^{1, *}

¹ 维亚生物科技（上海）有限公司：早期药物发现技术平台，SPR 组，上海市

² 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心，化学生物学技术平台，上海市

*通讯作者邮箱：jingjing.yang@vivabiotech.com

#共同第一作者/同等贡献

摘要

生物分子间的相互作用是生命活动的基石，分子间结合的特异性、强弱、快慢等都是生命科学研究的重要内容。表面等离子共振（SPR）是经典的光学物理现象，从发现并被运用到生物医药领域已有数十年时间。作为分子互作的金标准，表面等离子共振技术目前已先后被美国药典、日本药典及中国药典纳入。基于表面等离子共振原理，Cytiva 公司开发了包含 T200、S200、8K/8K+等一系列机型的 Biacore™ 平台，满足不同实验需求的同时，提供特异性结合、动力学、亲和力等丰富的互作信息。相对于其他分子互作检测平台而言，Biacore 系统具有高灵敏度、高通量、样品使用量低以及无需标记即可实时监测各类型分子间相互作用的优势。其检测信号将通过传感图呈现出来，那么如何解读传感图则是重中之重。本文将详细介绍传感图的分析方式。

关键词：Biacore，SPR，传感图，动力学，稳态

一、传感曲线

对表面等离子共振（SPR）数据进行准确分析的关键是对传感图有深刻的理解。传感图是什么样的？最简单的单一指数相互作用曲线如图 1 所示[1]，包含了基线，结合阶段，平衡部分，以及解离阶段。该图组成来自分子间互作在不同阶段 α 角的变化，通过 Biacore 系统将其可视化显现。

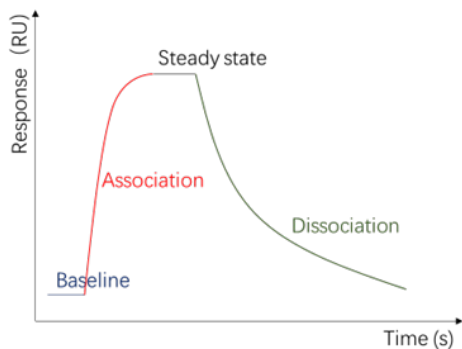


图 1 传感图

1. 基线

由于生物传感芯片表面带有不同的生物基质，缓冲液在流经芯片表面过程中依旧会产生背景信号，该组信号我们称之为基线，互作分析也是从基线开始测定的。基线稳定对数据准确至关重要。

2. 结合

结合阶段是分析物流经生物传感芯片表面上配体表面产生结合信号的过程，在分析物注射结束之前，该阶段的曲线应遵循单一指数并且至少具有一些曲率。如果该阶段曲线是线性的，则表示分析物可能存在物质迁移限制或潜在的非特异性结合现象。复合物的形成速率取决于结合速率常数、分析物浓度以及配体上可结合位点的数量。

3. 稳态

当分析物注射时间足够长，结合到配体的分析物数量与从配体上解离下来的数量是相等的，此时曲线应该逐渐趋于平衡，即达到稳态；所谓的稳态是一个相对动态平衡状态。

4. 解离

解离阶段也应该遵循单一指数。解离阶段只与解离速率常数有关，如果分析物和配体的之间的相互作用特别强，那么解离曲线可能是一条水平的曲线。理论上，只要是分子间的非共价结合，只要解离阶段时间足够长，解离曲线最终是可以回归到相互作用前的基线的。

5. 响应值

引用格式：江竞雷，刘伟，杨晶晶. (2025). SPR 数据分析综述. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022.

How to cite: Jang, J. L., Liu, W. and Yang, J. J. (2025). Overview of SPR Data Analysis. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022. (in Chinese)

响应值是分析物与配体结合产生的曲线信号水平数字化体现，用 RU（Response Unit）表示。1 RU 的定义相当于 1 pg/mm² 的表面浓度变化。

二、曲线示例

对于固定的分析物和配体，速率常数 k_a 和 k_d 应该是客观存在的固定值，但是速率常数与缓冲液成分、pH 以及温度等都有关；因此想要获得始终如一的数据，保持实验条件的稳定很重要。换句话说， K_a 和 K_d 只是在某一个客观固定条件下存在的分子互作常数，具有一定的客观性，可变性和局限性。

1. 指数曲线

受不同分子间互作的表现形式及亲和力强弱影响，可以展现不同的分子互作形态。如传感图显示结合阶段相对较快，有明显曲率，解离之前有浓度曲线可以达到平衡；解离相对较快，分析物可以完全从配体上解离干净，基线可以回归；RU 值相对较低。尽管结合和解离速率不同，图 2 是指数曲线的例子[2]。

指数曲线往往是在具有时间依赖性的分子互作中体现，即可提供有效的 K_a 及 K_d 。

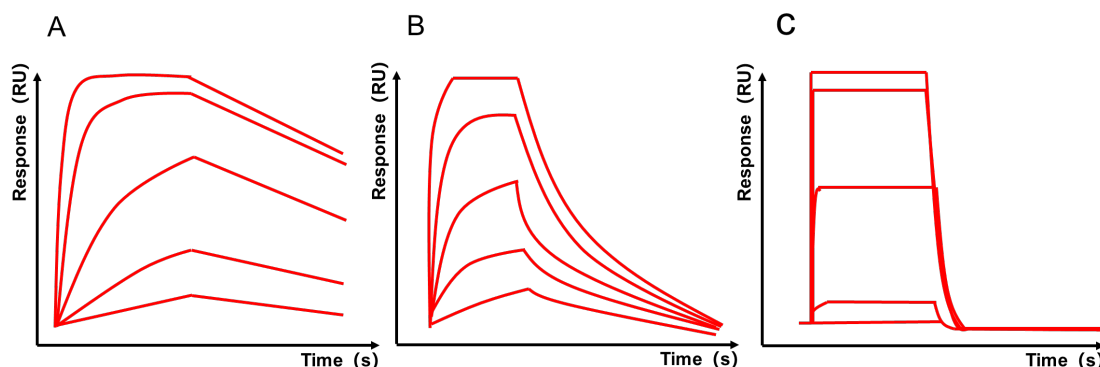


图 2 指数曲线。 A. 分子间互作亲和力较强，可以观测到传感图上的结合曲率，且分析物较难从配体分子上洗脱；B. 亲和力相对较弱，分析物可以从配体分子上有效洗脱；C. 为非时间依赖性的分子间互作，指数曲线难以观测，但可直观目测到稳态的形成。

2. 物质迁移限制曲线

物质迁移限制往往发生在分子互作的结合阶段，主要是对 K_a 值的判断有较大影响。在解离阶段引起的主要现象是在于样品在解离阶段的 rebinding 现象。具体表现为曲线在结合阶段呈线性上升，如图 3 [3]，这是分子在结合过程中受到物质迁移限制影响的 1:1 结合(该模型下假设一个配体分子上只能结合一个分析物分子)。当结合阶段存在物质迁移限制，解离阶段一般也会出现；因为如果分析物不能被快速的从配体表面冲走，可能会重新结合到配体上，这时测出来的解离速率比实际的解离要慢。降低配体偶联量，或者提高分析物的进样流速可以有效避免物质迁移限制。

引用格式：江竞雷，刘伟，杨晶晶. (2025). SPR 数据分析综述. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022.

How to cite: Jang, J. L., Liu, W. and Yang, J. J. (2025). Overview of SPR Data Analysis. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022. (in Chinese)

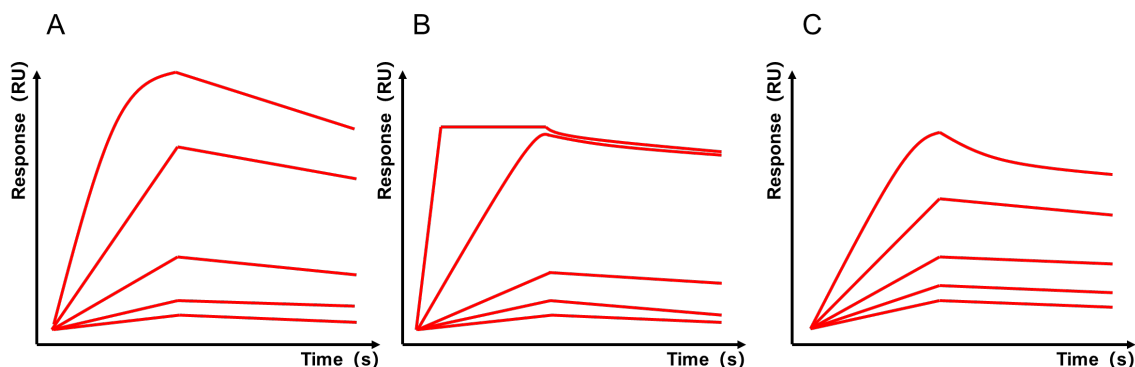


图 3 物质迁移限制曲线。A-C 展现不同形态的物质迁移效应传感图。

3. 双相曲线

非典型的 1:1 结合模型中往往会出现较为异常的曲线形态，需根据具体实验情况进行对应分析。当曲线图 4 所示[3]，可能存在双相结合，大多由于配体不纯或有多种不同结合位点造成，这种曲线不适合用 1:1 结合模型拟合。

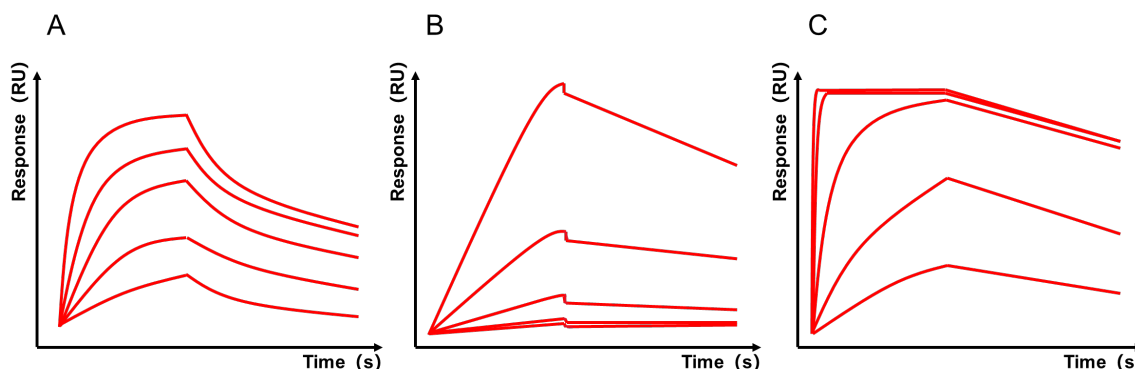


图 4 双相曲线。A-C 展现不同形态的非典型 1:1 结合模型下的生物传感图谱。

4. 异常曲线

经典的 SPR 生物传感图往往是连续且圆润的。当出现图 5 所示曲线时[4,5]，表明仪器需要清洁。实验人员需要考虑样品的溶解度问题，同时需要选择高质量的试剂并过滤缓冲液，使用新鲜配制的样品或缓冲液，定期进行 system check 和清洗维护。

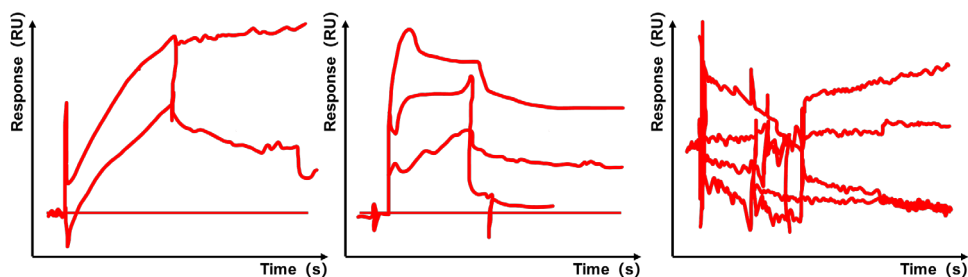


图 5 异常曲线

匀质状态的流动相对 SPR 而言非常重要。如图 6 [5], 样品在进样阶段结合曲线有下降趋势, 说明分析物在进样过程中浓度降低, 需要充分混合样品, 确保样品的均一性。

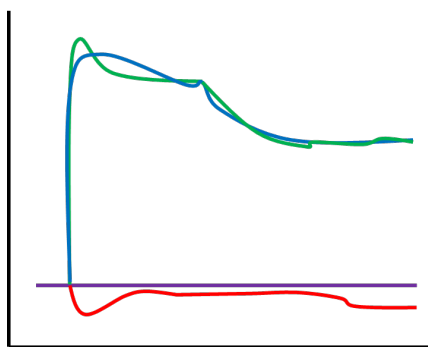


图 6 分析物均一性不好

如前所述, SPR 对于基线的要求相对严格, 稳定的基线是博取高质量 SPR 数据的基础。对基线的稳定性要求不只是集中在缓冲液的背景信号, 同时也要求固定相固载之后的基线较为稳定。如图 7 多表明基线漂移 [3], 一般是配体表面没有达到平衡所致; 有必要在固定完配体之后, 用缓冲液冲洗芯片表面直到平衡。

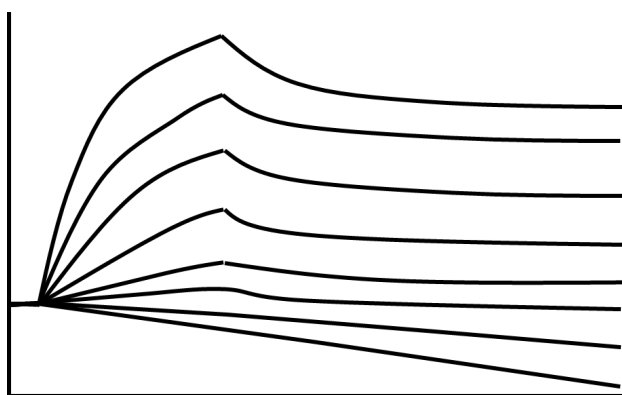


图 7 基线漂移

图 8 我们可以判定固定相与流动相之间的分子发生了互作[3], 但如此异常的生物传感图通常是由于分析物聚集/沉淀, 或者仪器不干净导致的。

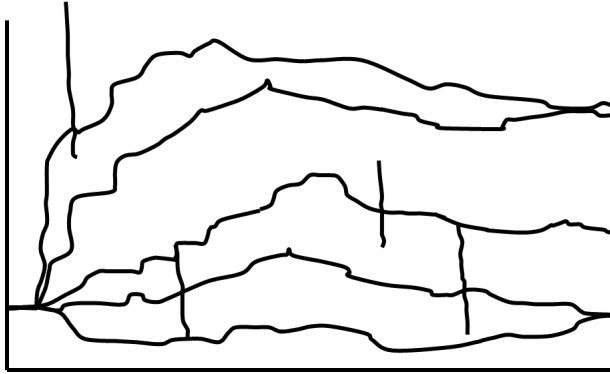


图 8 分析物聚集/沉淀, 机器需清洁

三、动力学和稳态分析原则

1. 拟合

动力学和亲和力参数是通过迭代过程从实验数据中提取的, 该过程找到了描述相互作用的一组方程的最佳拟合。拟合过程从方程中参数的初始值开始, 并根据最小化方差平方和的算法优化参数值。所有的表面等离子共振实验应基于 1:1 分子互作设定, 故对实验数据分析时往往只能使用 1:1 binding 模型。

a. local 和 global 参数

使用 Biacore 系统分析软件时拟合参数类型有 local variables、global variables、constants 之分。当传感图包含多条曲线, 可以进行 local 或 global 拟合。稳态亲和力分析结果只有一条浓度点呈现的曲线, 因此不存在 local 和 global 之分。

Local 参数对每条曲线指定独立的值, global 参数对整个传感图曲线指定同一值。

用 local 参数对实验数据进行拟合无疑会得到与实验曲线更贴合的拟合线, 但用 global 速率常数评估动力学将会得到更有说服力的速率常数值。这是因为 local 拟合允许从不同曲线获得常数之间的变化: 当对常数进行 global 拟合时, 这种变化出现在拟合的接近度上, 而不是报告的值上。Biacore 系统分析软件默认的拟合参数设置是 global。

通常, 速率常数应用 global 参数拟合, 折射率应用 local 参数拟合。表面的分析物结合总量 R_{max} 通常设置为 global, 但如果有理由相信表面容量发生了变化, 则可以作为 local 参数进行评估。

b. 统计参数

实验分析过程中，Biacore 系统软件会提供各种统计参数，实验员需要对其有较全面且深刻的理解，以此来判断实验数据的真实性、可靠性及可重复性等。表 1 中的统计参数可以表明实验数据和拟合曲线之间的拟合接近程度。

表 1 统计参数

参数	描述
Chi ²	拟合接近度的度量，根据平均残留平方计算（实验数据和拟合曲线之间的差）。
Standard error (SE)	参数显著性的度量，每个参数单独报告。参数显著性表示参数值的变化对拟合接近度的影响程度。显著性低的参数具有不影响拟合的广泛值范围。
T-value	参数值除以标准误差。这可以更容易地比较绝对值差异很大的参数的显著性。速率常数和 Rmax 计算值的唯一性的评估。对于相关参数，拟合过程可以确定它们的相对值，但不能确定绝对值。例如，知道亲和性可以得到比率，但不能得到速率常数的值。U 值是通过测试拟合对参数对的相关变化的依赖性来确定的，并作为整个拟合的单个值报告。高于约 25U 值表示两个或多个参数（速率常数和 Rmax）为相关并且不能确定绝对值。如果 U 值低于约 15，则参数值没有显著相关性。
Uniqueness (U-value)	

2. 动力学拟合模型

针对典型的具有时间依赖性的分子互作模型，我们需要优先考虑使用动力学拟合模型进行数据分析处理，且于实验时我们需要考虑样品于缓冲液体系之间的匹配度问题，以及有有机试剂介入的 SPR 实验（如小分子/蛋白的互作实验）需要进行有效、准确的溶剂校正。

a. 动力学模型中的物质迁移

流动相分子必须到达传感器表面才能与配体相互作用。游离分析物在表面通过与配体的相互作用而被耗尽，并通过从本体溶液的扩散驱动转移而被补充。如果分析物与配体的结合相比转移要快，则转移过程将至少部分地限制观察到的结合速率。除 1:1 解离外，所有动力学模型都包括分析物的传质项，允许从部分传质有限的中提取速率常数。

b. 1:1 binding

这是最简单的动力学评估模型，也是绝大多数表面等离子共振实验设计的最基础模型。除非有充分的实验理由选择不同的模型，否则建议默认使用。该模型描述了表面 1:1 的相互作用。

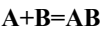


表 2 1:1 binding 模型的默认初始值

参数	描述	拟合	值
ka	结合速率常数(M ⁻¹ S ⁻¹)	Global	1e5
kd	解离速率常数(s ⁻¹)	Global	1e-3
Rmax	表面的分析物结合能力(RU)	Global	Ymax
tc	Flow rate-independent component of the mass transfer constant	Global	1e8
RI	Bulk refractive index contribution	Constant	0

c. 1:1 dissociation

该模型将传感图的解离阶段拟合为指数衰减方程，表示均匀 1:1 复合物的解离。拟合与分析物浓度无关。该方程包括一个偏移项，以允许在完成解离后残余响应非零。

$$R = R_0 e^{-k_d(t-t_0)} + \text{offset}$$

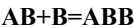
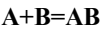
需要注意的是，该模型不能处理由 bulk refractive index contribution 引起的初始响应变化。如果传感图显示 bulk contributions，请删除那个范围，然后在 bulk change 之后开始拟合。另外，该模型不考虑物质迁移限制的影响。除此之外，该模型的应用与初始参数设置有很大关联；如果不能得到明显合理解离数据的良好拟合，请尝试调整初始值，使其更符合预期结果。

表 3 1:1 dissociation 模型的默认初始值

参数	描述	拟合	值
kd	解离速率常数(s ⁻¹)	Global	1e-3
offset	完全解离后高于基线的残余响应(RU)	Local	0

d. Bivalent analyte

这个模型描述了二价分析物与配体的结合，流动相分子可以结合一到两个配体分子。这两个分析物位点被认为是等效的。这个模型与信号分子和细胞表面受体结合(受体的二聚体化很常见)的研究以及使用抗体和固定化抗原的研究相关。与 1:1 binding 相比，这种结合整体更强，因为一个分析物分子结合了两个配体位点。这种作用通常被称为亲合力(avidity)。



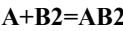
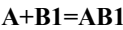
注意，当分析物结合了配体的第一个位点以后，再与第二个位点作用时，将不会继续产生 SPR 响应。由于这个原因，第二作用的结合速率常数以 RU⁻¹s⁻¹ 为单位报告，而且只有 RU 和 M 之间的转换可靠时，才能以 M⁻¹S⁻¹ 获得。处于相同的原因，无法得到整体亲和力(affinity)或亲合力(avidity)。

表 4 Bivalent analyte 模型的默认初始值

参数	描述	拟合	值
ka1	第一个位点的结合速率常数($M^{-1}S^{-1}$)	Global	1e5
kd1	第一个位点的解离速率常数(s^{-1})	Global	1e-3
ka2	第二个位点的结合速率常数 $RU^{-1}S^{-1}$)	Global	1e-3
kd2	第二个位点的解离速率常数(s^{-1})	Global	1e-3
Rmax	表面的分析物结合能力(RU)	Global	Ymax
tc	Flow rate-independent component of the mass transfer constant	Global	1e8
RI	Bulk refractive index contribution	Constant	0

e. Heterogeneous ligand

这个模型描述了一个流动相分子和两种独立配体之间的相互作用。得到的结合曲线是两个独立反应的总和。不需要事先知道两种配体的相对量。



注意：该模型仅限于两个配体，因为拟合算法往往随着组分的增加而变得不稳定，并且三个或三个以上的配体种类无法可靠地求解。

表 5 Heterogeneous ligand 模型的默认初始值

参数	描述	拟合	值
ka1	第一种配体的结合速率常数($M^{-1}S^{-1}$)	Global	1e5
kd1	第一种配体的解离速率常数(s^{-1})	Global	1e-3
ka2	第二种配体的结合速率常数($M^{-1}S^{-1}$)	Global	1e5
kd2	第二种配体的解离速率常数(s^{-1})	Global	1e-3
Rmax1	第一种配体的表面的分析物结合能力(RU)	Global	Ymax
Rmax2	第二种配体的表面的分析物结合能力(RU)	Global	Ymax
tc	Flow rate-independent component of the mass transfer constant	Global	1e8
RI	Bulk refractive index contribution	Constant	0

f. Two state reaction

这个模型描述了分析物与配体先 1:1 binding，随后发生构象或其他变化而使复合物稳定。为了使这个模型通俗易懂，假设改变后的复合物只能通过逆转构象变化而解离。



注意：配体或复合物的构象变化通常不会产生响应。这种模型的良好拟合数据应该被视为使用其他技术(如光谱学或 NMR)研究构象性质的指示，而不是构象正在发生的直接证据。

表 6 Two state reaction 模型的默认初始值

参数	描述	拟合	值
ka1	分析物结合的结合速率常数(M ⁻¹ S ⁻¹)	Global	1e5
kd1	复合物的解离速率常数(s ⁻¹)	Global	1e-2
ka2	稳定变化的转化速率常数(S ⁻¹)	Global	1e-3
kd2	稳定变化的反向转化速率常数(s ⁻¹)	Global	1e-3
Rmax	第一种配体的表面的分析物结合能力(RU)	Global	Ymax
tc	Flow rate-independent component of the mass transfer constant	Global	1e8
RI	Bulk refractive index contribution	Constant	0

3. 亲和力拟合模型

a. Steady state affinity

这个模型更多的应用在非时间依赖性的分子互作模型当中。根据稳态结合水平(Req)与分析物浓度(C)的关系图计算 1:1 相互作用的平衡解离常数 KD。

$$R_{eq} = \frac{CR_{max}}{K_D + C} + \text{offset}$$

注意：如果报告的 KD 值高于所用最高分析物浓度的一半，应谨慎处理。如果由于浓度不够高导致对应的浓度响应图没有变平，其 KD 报告值也不可信。

表 7 Steady state affinity 模型的默认初始值

参数	描述	拟合	值
KD	平衡速率常数	Global	Xmax
Rmax	表面的分析物结合能力(RU)	Global	Ymax
offset	分析物 0 浓度的响应值	Global	Ymax/5

b. Steady state affinity (constant Rmax)

该模型使用与简单的稳态亲和力模型相同的方程，但将 Rmax 参数设置为常数。可以使用重复的对照样品根据分析漂移调整该值。

$$R_{max_{analyte}} = R_{max_{control}} \times \frac{MW_{analyte}}{MW_{control}}$$

c. Steady state affinity (constant Rmax and multi-site)

引用格式：江竞雷，刘伟，杨晶晶. (2025). SPR 数据分析综述. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022.

How to cite: Jang, J. L., Liu, W. and Yang, J. J. (2025). Overview of SPR Data Analysis. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022. (in Chinese)

该模型适用于表现出与多个位点结合的相互作用的数据。模型中考虑到两个位点。
该模型使用一个位点的 Rmax 值来定义预期化学计量，另一个位点使用拟合值来给出未定义化学计量。

$$R_{eq} = \frac{CR_{max1}}{K_{D1} + C} + \frac{CR_{max2}}{K_{D2} + C} + offset$$

表 8 Steady state affinity (constant Rmax a nd multi-site)模型的默认初始值

参数	描述	拟合	值
KD	主要(强)结合的平衡解离常数(M)	Global	Xmax
KD2	次要(弱)结合的平衡解离常数(M)	Global	100*Xmax
Rmax	主要结合的分析物结合能力(RU)	Constant	(Input) ¹
Rmax2	次要结合的分析物结合能力(RU)	Global	Ymax
offset	分析物 0 浓度的响应值	Global	Ymax/5

¹ 如果没有输入 Rmax 值，则默认初始值设置为 Constant=Ymax。

d. 动力学拟合标准

动力学拟合应满足以下要求：1、曲线应是有曲率的特异性结合曲线；2、结合呈浓度依赖型，且接近饱和（图 9 [6]）；3、拟合线和实验曲线匹配度高；4、residual plot 范围窄（图 10^[1]）；5、拟合参数应具有生物相关性和实验相关性；6、统计参数值合理。

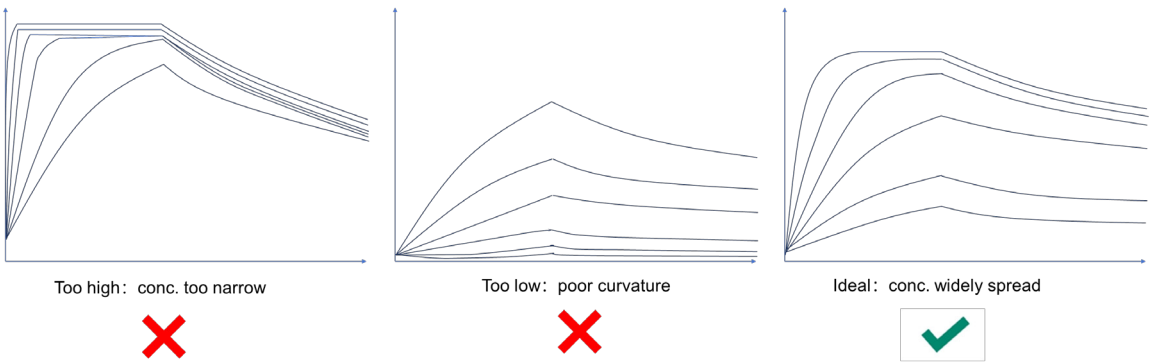


图 9 动力学拟合示例

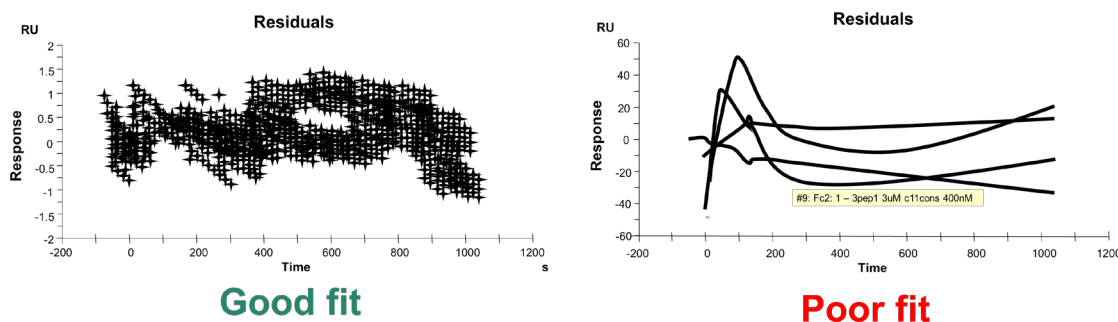


图 10 residual plot 范围

f. 亲和力拟合标准

稳态亲和力拟合应满足以下条件：1、结合曲线达到稳态（图 11 [6]）；2、拟合线有曲率；最高浓度点应趋于平坦，拟合 K_D 值应比最高浓度点的一半浓度小，拟合 R_{max} 值应与 TR_{max} 接近（图 12 [6]）；3、offset 值应接近于零。

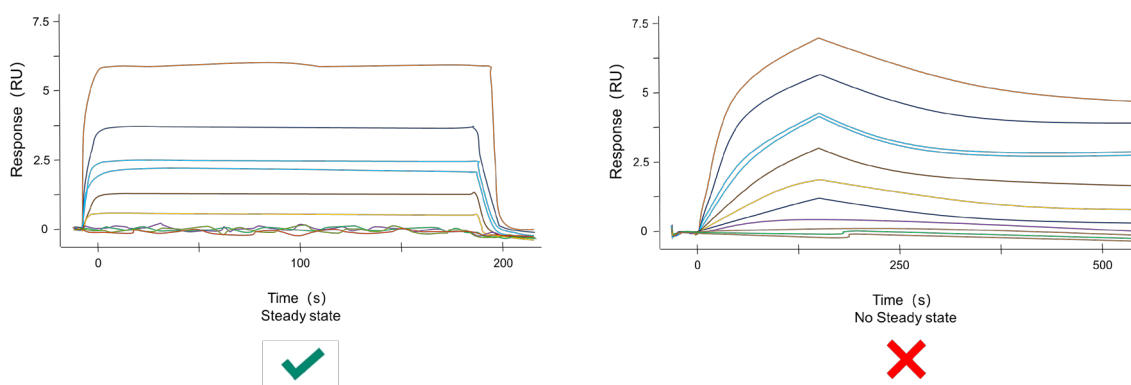


图 11 结合曲线

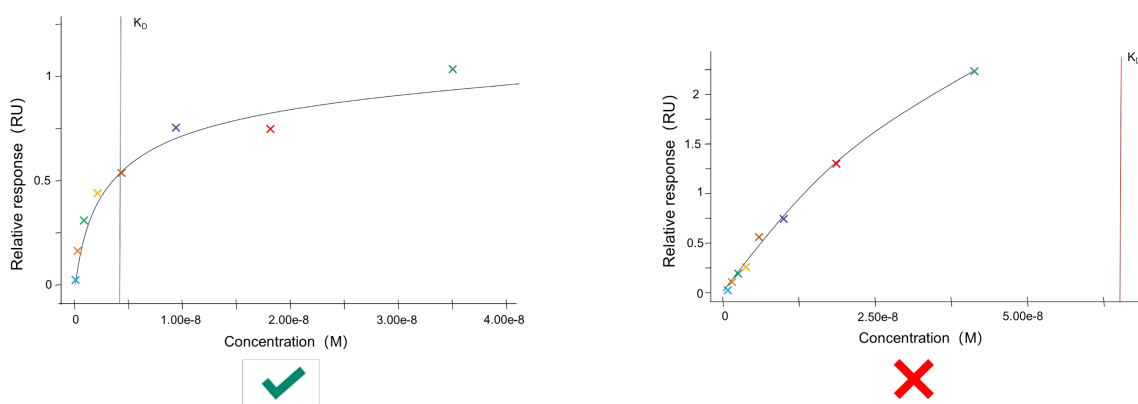


图 12 拟合曲线

引用格式：江竞雷，刘伟，杨晶晶. (2025). SPR 数据分析综述. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022.

How to cite: Jang, J. L., Liu, W. and Yang, J. J. (2025). Overview of SPR Data Analysis. *Bio-101* e1011022. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011022. (in Chinese)

致谢

感谢 Richard B. M. Schasfoort, 感谢 Rebecca L. Rich 和 David G. Mysaka 等; 感谢 Cytiva 公司在 SPR 技术运用上的巨大贡献; 感谢维亚生物科技(上海)有限公司提供的平台; 感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台兰姝珏博士以及刘伟的支持与帮助, 所有这些使得我们可以顺利完成此综述的编写。

参考文献

1. Richard B. M. Schasfoort. (2017). Handbook of Surface Plasmon Resonance, 2nd Edition. *The Royal Society of Chemistry*. 106–147.
2. Rich, R. L. and Myszkka, D. G. (2003). A survey of the year 2002 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*. 16(6): 351–382. <https://doi.org/10.1002/jmr.649>
3. Rich, R. L. and Myszkka, D. G. (2008). Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*. 21(6): 355–400. <https://doi.org/10.1002/jmr.928>
4. Rich, R. L. and Myszkka, D. G. (2006). Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*. 19(6): 478–534. <https://doi.org/10.1002/jmr.808>
5. Rich, R. L. and Myszkka, D. G. (2005). Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*. 18(6): 431–478. <https://doi.org/10.1002/jmr.753>
6. Rich, R. L. and Myszkka, D. G. (2011). Survey of the 2009 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*. 24(6): 892–914. <https://doi.org/10.1002/jmr.1138>