

基于表面等离子体共振（SPR）传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法的建立

Establishment of Nanoantibody/ Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor

宗鑫¹, 张筠², 李艺芳^{2, #, *}

¹ 生命科学学院基因工程国家重点实验室, 复旦大学, 上海

² 极瞳生命科技(苏州)有限公司, 苏州

*通讯作者邮箱: yifang.li@polariton.life

#共同第一作者/同等贡献

摘要

金黄色葡萄球菌分泌的葡萄球菌肠毒素 B (Staphylococcal enterotoxin type B, SEB) 具有显著致病性, 会引发免疫反应失调, 最终导致食物中毒、急性损伤、中毒性休克等人类疾病。纳米抗体 (nanoantibody, Nb) 具备亲和力高、可穿过血脑屏障、易表达、稳定性强的优势, 拓宽了针对 SEB 的免疫疗法的应用场景。SPR (Surface Plasmon Resonance, 表面等离子体共振) 技术是一种用于实时监测分子间相互作用的高灵敏度光学分析方法。与经典的酶联免疫法 (ELISA)、免疫共沉淀法 (co-IP) 等终点法相比, SPR 技术具备实时性、非标记性、高灵敏度、样品消耗低等优势, 广泛应用于生物分子相互作用研究、药物筛选、免疫分析、蛋白质组学等领域, 是生命科学研究和药物开发中的重要工具。

引用格式: 宗鑫, 张筠, 李艺芳. (2025). 基于表面等离子体共振 (SPR) 传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法的建立. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025.

How to cite: Zong, X., Zhang, Y. and Li, Y. F. (2025). Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025. (in Chinese)

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

本工作通过 SPR 技术检测 Nb/SEB 的相互作用，可获得复合物结合与解离过程中的动力学信息，为后续 Nb/SEB 结合机制的研究及对应免疫疗法的开发提供线索与佐证。

关键词：纳米抗体，SEB，表面等离子共振，S-CLASS

实验背景

实验通过氨基偶联在芯片表面固定 SEB 作为配体，流经 Nb 浓度梯度作为分析物，通过表面等离子体共振（SPR）技术检测 Nb/SEB 的相互作用，可获得结合与解离过程中的动力学信息，为后续 Nb/SEB 结合机制的研究提供线索与佐证。

在表面等离子体共振（SPR）实验中，配体密度是一个至关重要的参数，直接影响实验的灵敏度和结果的可重复性。配体密度过高可能导致空间位阻效应，阻碍分析物与配体的有效结合，甚至引发非特异性吸附，干扰数据解读；而密度过低则会降低信号强度，影响检测限和动态范围。因此，优化配体密度是确保 SPR 实验成功的关键步骤。通过精确控制配体在传感器芯片表面的固定量，可以实现分析物与配体之间相互作用的准确测量，从而获得可靠的动力学和亲和力数据。

在本次工作中，分别在 Biacore 8K（cytiva）和 S-CLASS（极瞳生命）两台 SPR 设备上测试同一配体高、中、低密度下的亲和力信息，对比研究不同配体密度下的互作行为。

材料与试剂

1. SEB 及纳米抗体，由 Genewiz 公司在 Escherichia coli strain BL21 (DE3)内表达，蛋白表达纯化方法参见文献 1。SEB 分子量 29 KD，纳米抗体分子量 14 KD，新鲜纯化浓缩，浓度为 5 mg/mL，储存在 PBS 缓冲液中。
2. Polariton CD5 芯片（极瞳生命，产品目录号：CR1013）
3. 氨基偶联试剂盒（cytiva，产品目录号：BR100050）
4. 缓冲液：10× HBS-P+（cytiva，产品目录号：BR100671）
5. Polariton C5 芯片（极瞳生命，产品目录号：PR1011）
6. 10 mM pH4.5 醋酸钠缓冲液（极瞳生命，产品目录号：PR2033）
7. 氨基偶联试剂盒（极瞳生命，产品目录号：PR3002）
8. 缓冲液：10× HBS-T（极瞳生命，产品目录号：PR2012）
9. 再生试剂：10 mM pH 2.5 Glycine-HCl（极瞳生命，产品目录号：PR2042）
10. 其他耗材：1.5 mL EP 管，1 mL、200 μ L、10 μ L 枪头均为 Axygen 公司产品。

引用格式：宗鑫，张筠，李艺芳. (2025). 基于表面等离子体共振（SPR）传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法建立. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025.

How to cite: Zong, X., Zhang, Y. and Li, Y. F. (2025). Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025. (in Chinese)

仪器设备

1. SPR 分子互作系统 (cytiva, 仪器型号: Biacore 8K)
2. Biacore Insight 评估软件 4.08 (cytiva)
3. BIAevaluation 软件 (cytiva)
4. SPR 分子互作系统 (极瞳生命, 仪器型号: S-CLASS)
5. Polariton SPR Workstation (极瞳生命, SW1001)

实验步骤

一、Biacore 8K 搭载 CD5 芯片测试纳米抗体/SEB 相互作用

1. CD5 芯片前处理

Polariton CD5 芯片表面由羧甲基葡聚糖共价修饰, 可用于氨基偶联固定样品, Biacore 8K 机型可兼容使用 (图 1)。芯片拆封上机后, 设定 flow cell 1-2, flow rate 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, contact time 60 s, 连续进样 3 次 50 mM NaOH, 令表面充分水化后进行后续实验。



图 1 Polariton CD5 芯片

2. 配体偶联

用 10 mM 醋酸-醋酸钠 (pH 4.5) 缓冲液稀释 SEB 至 0.2 mg/mL, 通过氨基偶联将 SEB 固定在传感芯片 CD5 上 (Polariton Life) :

设定 Fc = 1-2, 使用偶联试剂 (EDC + NHS) 活化芯片表面 420 s;

设定 Fc =2, 偶联 SEB 蛋白 420 s;

引用格式: 宗鑫, 张筠, 李艺芳. (2025). 基于表面等离子体共振 (SPR) 传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法建立. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025.

How to cite: Zong, X., Zhang, Y. and Li, Y. F. (2025). Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025. (in Chinese)

设定 $F_c = 1-2$ ，用 1M 乙醇胺封闭芯片表面多余活化位点 420 s。

芯片表面 SEB 偶联密度约 6,500 RU。

3. 分析物测试方法

用 1×HBS-P 缓冲液中将不同纳米抗体稀释至 7.8125 nM、15.625 nM、31.25 nM、62.5 nM、125 nM、250 nM、500 nM 的浓度。流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，contact time 120 s，dissociation 300 s。以 single-cycle kinetics 模式进行测试，不同样品间以 10 mM citrate buffer (pH 2.5) 进行芯片表面再生。

4. 数据处理

得到的传感器图符合 single-cycle kinetics 1:1 binding 模型或 heterogeneous ligand 模型，使用 BIAevaluation 软件 (cytiva) 进行拟合分析。

二、S-CLASS 搭载 C5 芯片测试纳米抗体/SEB 相互作用

1. S-CLASS 仪器介绍

S-CLASS 由极瞳生命科技 (苏州) 有限公司自主研发制造，是一款 8 进样针 (16 检测通道) 的高通量、高灵敏度的 SPR 分析系统，可根据实验目的搭载不同类型的传感芯片进行分子互作测试分析。仪器构造如图 2：



- 1 内置微流控系统、光学元件
- 2 显示屏
- 3 芯片舱
- 4 样品舱
- 5 泵组

图 2 S-CLASS 分子互作分析系统

2. 中、低密度配体的偶联

引用格式：宗鑫，张筠，李艺芳. (2025). 基于表面等离子体共振 (SPR) 传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法建立. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025.

How to cite: Zong, X., Zhang, Y. and Li, Y. F. (2025). Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025. (in Chinese)

用 10 mM 醋酸-醋酸钠 (pH 4.5) 缓冲液稀释 SEB 至 1、5 $\mu\text{g/mL}$ ，通过氨基偶联将 SEB 固定在 C5 芯片上 (Polariton Life)：

设定 $F_c = A-B$ ，使用偶联试剂 (EDC+NHS) 活化芯片表面 420 s；

设定 $F_c = B$ ，偶联 SEB 蛋白 420 s；

设定 $F_c = A-B$ ，用 1 M 乙醇胺封闭芯片表面多余活化位点 420 s。

偶联量分别为 820、3,000 RU (图 3)。

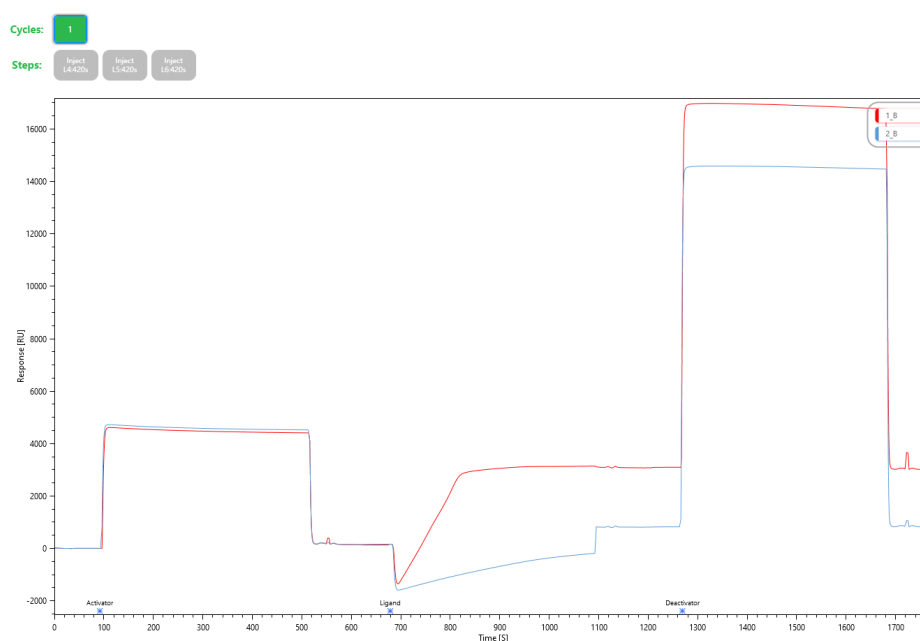


图 3 SEB 氨基偶联 sensorgram

3. 分析物测试方法

a. 方法设置

在 Polariton SPR Workstation 内依次点击 Auto Experiment → Kinetics/Affinity → Multi-cycle Kinetics/Affinity。填写实验名称、操作者信息，Conc. Unit 选择 nM，点击右上角 ☺。

左键拖拽 **Analyte** 到分析 cycle 下，在弹窗内设置 inject 参数，injection mode 选择 High，flow cell 选择 AB，设定 flow rate 30 $\mu\text{L/min}$ ，contact time 100s，Dissociation 300 s (图 3)。

勾选 Name 右侧方框 (不同通道运行不同样品)，在右侧表格依次填写样品名称。勾选 Conc. 右侧方框 (不同 cycle 运行不同浓度)，稀释比例 Dilution 填 2，右侧表格内填写样品最高摩尔浓度后，向左拖动选择计算区域，单击 ，系统将自动计算和填写完整浓度梯度 15.6~500 nM。可在样品浓度梯度前设置 1~3 个 0 浓度，作为 Blank (图 4)。

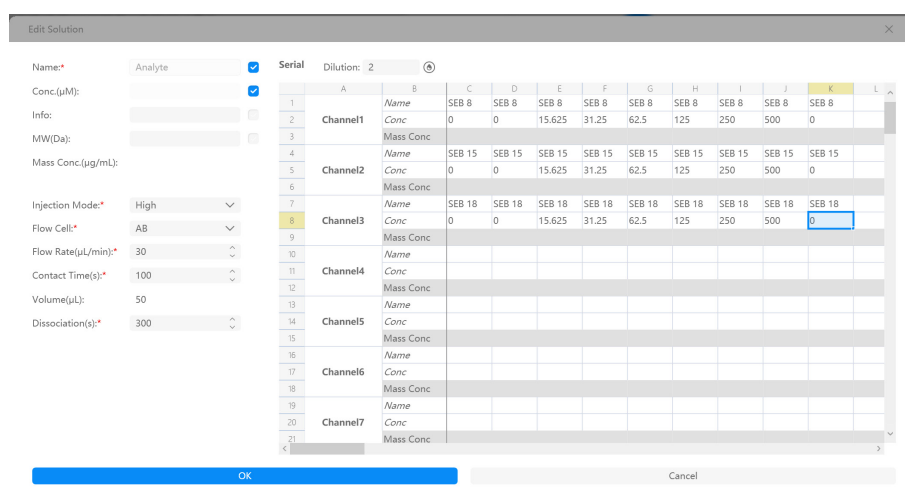


图 4 Analyte 注射参数的设置界面

按同样的方法设置再生。左键拖拽 **Regeneration** 到分析 cycle 下，在弹窗内设置 inject 参数，injection mode 选择 Normal，flow cell 选择 AB，设定 flow rate 10 μL/min，contact time 30 s。

设置完成后，点击 OK 保存。单击上方的 **Check**，进入样品放置步骤。

b. 样品准备

软件自动将样品排布在微孔板内（可通过鼠标右键拖拽重新安排）。按照屏幕显示，不同的纳米抗体样品用运行缓冲液 HBS-T 进行倍比稀释，准备足够体积的样品（如下图，左侧孔板 raw1 每孔溶液至少应为 270 μL）。（图 5）

将 96 孔板放置在样品盘的指定位置上并锁定，将样品盘送回样品舱，点击 close door 将自动合上舱门。

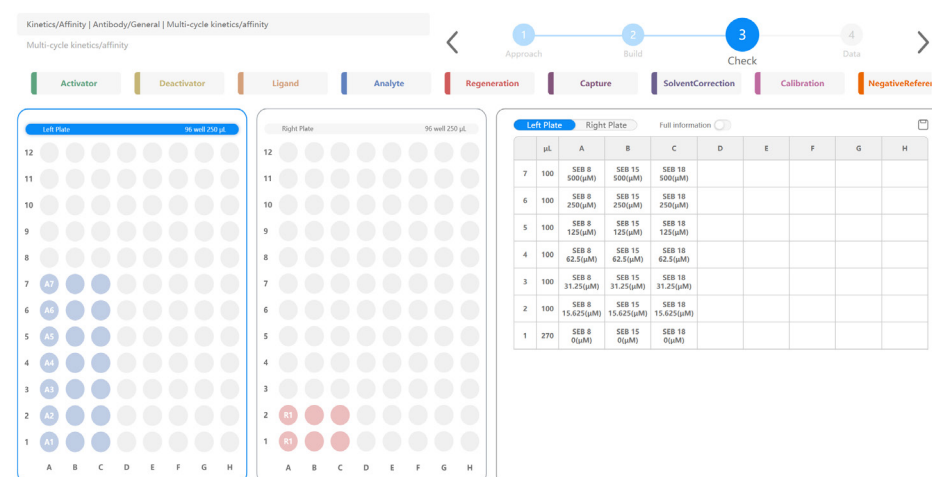


图 5 溶液排布界面

c. 运行实验

鼠标点击上方的 4 Data，确认运行缓冲液大于系统的最低要求，点击 START。系统将正式运行动力学分析程序，整个过程耗时约 1h 47min。（图 6）

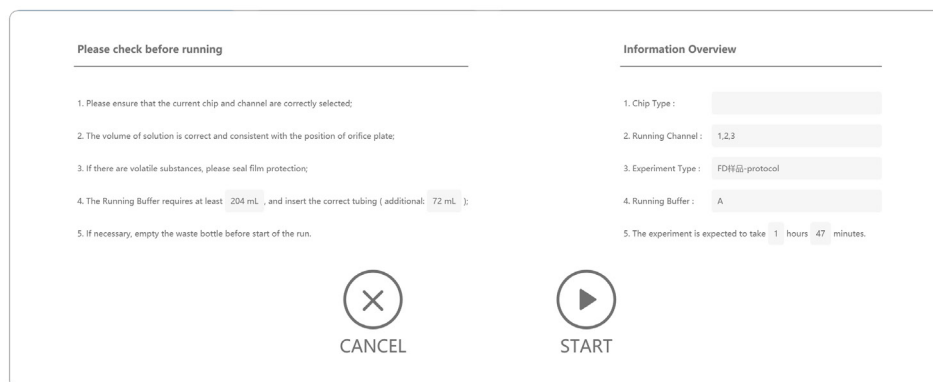


图 6 实验开始界面

4. 数据处理

- 在 Polariton SPR Workstation 中，点击 Evaluation 进入数据分析模块，点 create new evaluation 找到文件，双击打开。软件操作以 SEB-Nb8 互作为例。
- 软件界面默认显示已经扣减过 0 浓度的 sensorgram，可在这个界面完成数据的基本检查。在 Thumbnail 区域可选择待分析的样品数据，如果哪个浓度的样品检测结果不合适，可以在下方 Sample Table 中取消此浓度前的 ☒，以删除异常浓度。（图 7）
- 在页面左侧 Kinetic/Affinity mode 中，选择 kinetic。Fit models 选择 1:1 binding。点击 Fit，即可完成拟合。（图 7）

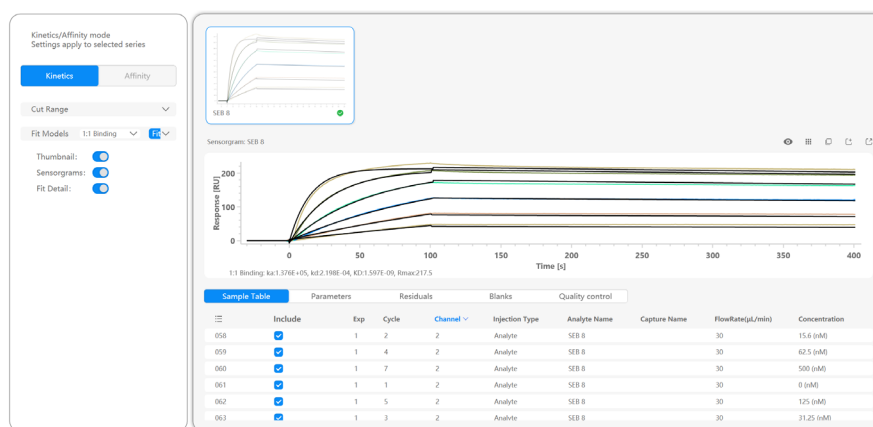


图 7 数据拟合界面

引用格式：宗鑫，张筠，李艺芳. (2025). 基于表面等离子体共振（SPR）传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法建立. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025.

How to cite: Zong, X., Zhang, Y. and Li, Y. F. (2025). Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025. (in Chinese)

三、结果与数据分析

对比两台 SPR 仪器检测得到的 Nb/SEB 互作传感图（图 8），可看到结合解离趋势基本一致，且同浓度 Nb 结合信号的高低与 SEB 的固定密度呈直接正相关。这证明了 SEB 有效活性比例在实验中相对固定且检测方法重复性良好。

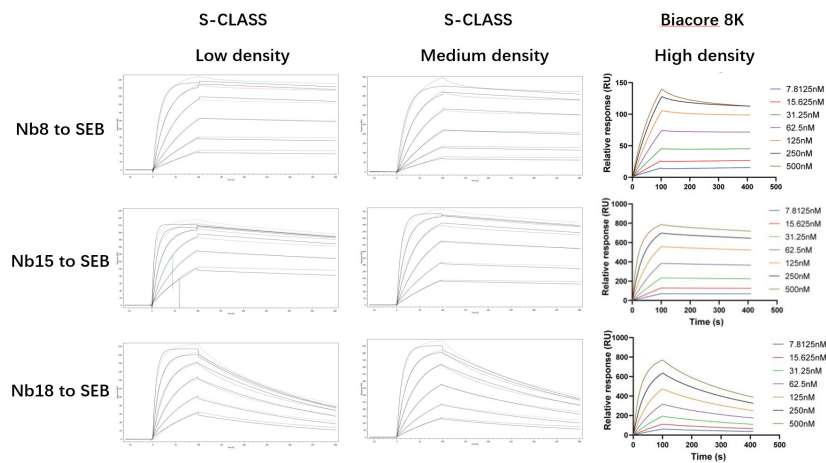


图 8 Nb 与 SEB 相互作用的 SPR 传感图

使用 1:1 binding 模型拟合得到 Nb/SEB 互作动力学参数如表 1。相比高密度配体，中、低密度配体水平测得的结合速率 (k_a) 要更快，这是因为降低配体密度有助于减少芯片表面物质迁移效应的限制和分子拥挤效应，令测量到的结合过程更多地反馈分子相互作用过程而非扩散过程。解离速率 (k_d) 一定程度上反映出 Nb/SEB 复合物的稳定性，高密度配体在芯片表面易引起解离阶段的微观重结合行为，进而导致测得的 k_d 略慢。综上，在动力学分析中，配体固定密度应尽量保持在较低水平，得到更为可靠的动力学数据。

表 1 SPR 法测定 Nb 与 SEB 的结合动力学参数

Group	Ligand density (RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
Nb8 to SEB	820	1.376E+05	2.198E-04	1.597E-09
	3000	1.108E+05	2.743E-04	2.475E-09
	6500	3.62E+04	2.4E-04	6.64E-09
Nb15 to SEB	820	3.804E+05	5.066E-04	1.332E-09
	3000	2.001E+05	4.329E-04	2.163E-09
	6500	1.12E+05	1.57E-04	1.41E-09
Nb18 to SEB	820	2.478E+05	3.224E-03	1.301E-08
	3000	1.677E+05	2.735E-03	1.631E-08
	6500	9.47E+04	2.11E-03	2.24E-08
注:	S-CLASS 数据		Biacore 8K 数据	

引用格式：宗鑫，张筠，李艺芳. (2025). 基于表面等离子体共振（SPR）传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法建立. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025.

How to cite: Zong, X., Zhang, Y. and Li, Y. F. (2025). Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025. (in Chinese)

溶液配方

1. 1× HBS-T

量取 100 mL 10× HBS-T (100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.5% v/v Tween 20) 加入 900 mL 去离子水 H₂O 配制 1× HBS-T 溶液

实验注意要点

1. 氨基偶联过程有一定风险会影响配体蛋白活性，因此在实际测试中，可根据预富集结果，设计不同固定密度的配体进行互作分析。根据结合信号反向考察不同密度下配体蛋白的活性比例，进而得到更为可靠的分析结果；
2. 蛋白/蛋白互作的体系中，质量传输的限制应被充分考虑。因此，应在满足正常分析的前提下，尽可能降低配体固定密度。

致谢

感谢复旦大学丁颖团队在测试样品制备、Biacore 8K 测试数据收集分析、研究成果整理撰写方面提供的技术支持和帮助。

使用本实验方案的研究成果“*Structural insights into the binding of nanobodies to the Staphylococcal enterotoxin B*”已发表在 International Journal of Biological Macromolecules。

参考文献

1. Hughes, A. C., Kirkland, M., Du, W., Rasooly, R., Hernlem, B., Tam, C., Zhang, Y. and He, X. (2023). Development of Thermally Stable Nanobodies for Detection and Neutralization of Staphylococcal Enterotoxin B. *Toxins (Basel)*. 15(6): 400. <https://doi.org/10.3390/toxins15060400>
2. Zong, X., Liu, P., Wang, Z., Zhu, H., Zhong, C., Zhong, P., Jiang, H., Liu, J., Ma, Z., Liu, X., Liu, R. and Ding, Y. (2024). Structural insights into the binding of nanobodies to the Staphylococcal enterotoxin B. *Int J Biol Macromol.* 276(Pt 2), 133957. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133957>

引用格式：宗鑫，张筠，李艺芳. (2025). 基于表面等离子体共振（SPR）传感器的纳米抗体/葡萄球菌肠毒素 B 相互作用检测方法建立. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025.

How to cite: Zong, X., Zhang, Y. and Li, Y. F. (2025). Staphylococcal Enterotoxin B Interaction Detection Method Based on Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor. *Bio-101* e1011025. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011025. (in Chinese)