

利用 Alto LSPR 检测蛋白配体与受体相互作用亲和力

The Binding Affinity Analysis of Protein Ligand Interacting with Receptor by Alto LSPR

刘俊华^{1, 3, #}, 常卿^{1, 2, 3, #}, 李文奇^{1, 2, 3, *}

¹ 蛋白质研究技术中心, 清华大学, 北京

² 北京生物结构前沿研究中心, 清华大学, 北京

³ 生命科学学院, 清华大学, 北京

*通讯作者邮箱: liwenqi@mail.tsinghua.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

摘要

表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR) 技术已经广泛用于抗体开发、细胞治疗和疫苗开发等领域。Alto™ 局域表面等离子共振仪(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 通过集成 SPR 技术和数字微流控(Digital Microfluidic, DMF) 技术, 无系统管路, 最大程度地减少样品消耗及人工操作时间来表征生物分子间相互作用。本方法详细介绍了利用 Alto 检测生物大分子间相互作用的实验步骤, 以免疫球蛋白 Fc 区受体(FcγR) IIb (又称 CD32) 和免疫球蛋白 IgG 的 Fc 片段的相互作用为例, 将重组表达的 CD32 的胞外区片段通过氨基偶联方法固定在生物传感芯片上, 通过数字微流控设定不同浓度梯度的分析物 Fc, 仪器实时监测金属纳米颗粒上吸光度位置波长的微小变化, 以提供蛋白-蛋白相互作用亲和力信息。

关键词: 局域表面等离子共振, 数字微流控技术, Alto™, 相互作用表征

引用格式: 刘俊华, 常卿, 李文奇. (2025). 利用 Alto LSPR 检测蛋白配体与受体相互作用亲和力. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027.

How to cite: Liu, J. H., Chang, Q. and Li, W. Q. (2024). The Binding Affinity Analysis of Protein Ligand Interacting with Receptor by Alto LSPR. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027. (in Chinese)

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

材料与试剂

1. 羧基芯片卡盒 (Nicoya, KIN-CART-CBX-16)
2. 羧基芯片实验试剂组合套装 (Nicoya, ALTO-R-CBX-OPT)
3. 10× PBS (Cytiva, catalog number: 28995084)
4. PBST 缓冲液成分 (见溶液配方)

仪器设备

1. 全自动高通量分子相互作用分析仪 Alto (Nicoya, ALTO16)
2. 仪器控制和数据分析软件 (Nicoya, ALTO-NICO-LM)
3. 数据处理工作站 (成就 3910)

Alto LSPR 仪器及原理

一、仪器组成及原理

1. 仪器组成

仪器包括一个显示触摸屏，用于通过用户界面访问仪器。该仪器承载一个芯片卡盒进行 SPR 实验，该卡盒可以插入仪器的卡盒装载舱中进行分析测试。

2. 基本原理

Alto 将 LSPR 传感器集成到数字微流控 (DMF) 卡盒中，创建了 16 个独立检测通道。其原理和特点如下：

LSPR 是指当光线入射到由贵金属构成的纳米颗粒上时，如果入射光子频率与贵金属纳米颗粒或金属传导电子的整体振动频率相匹配时，纳米颗粒或金属会对光子能量产生很强的吸收作用，就会发生局域表面等离子体共振的现象，这时会在光谱上出现一个强的共振吸收峰，当有配体结合或分析物结合时，吸光度位置波长发生微小变化，其原理如图 1 所示（图源 <https://nicoyalife.com/resources/what-is-spr/lspr-vs-spr-2/>）。

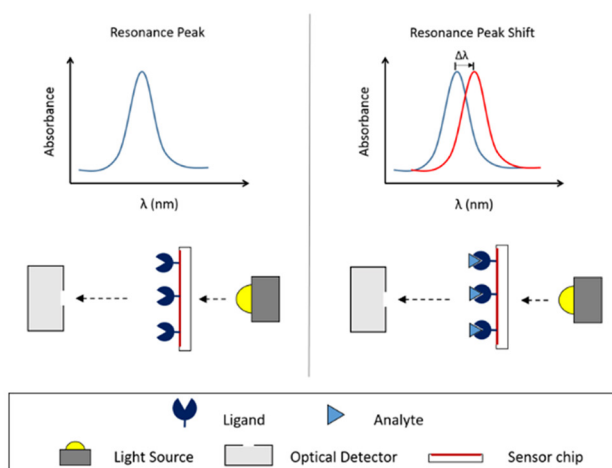


图 1 LSPR 基本原理

DMF 是一种通过电压精准控制和操纵电极上的离散纳米液滴移动的液体驱动技术。通过使用与标准孔板形状兼容的低成本、一次性卡盒，不需要任何物理泵、阀门或管道，解决了传统 SPR 流路系统带来的相关问题，同时提高了对复杂样本（如血清，细胞裂解液上清，大的病毒颗粒等）的兼容性。DMF 卓越的液体处理能力能精准控制最小 350 nL 液滴，通过软件控制可以实现精确的全自动样品浓度梯度稀释，仅需 2 μ L 样品即可获得一组完整的动力学和亲和力数据，比传统 SPR 样本体积低 500 倍。Alto 是世界上第一个实现 LSPR 与 DMF 技术整合的桌面型 SPR 系统，相比于传统 SPR 大大减少了实验步骤，如图 2 所示。

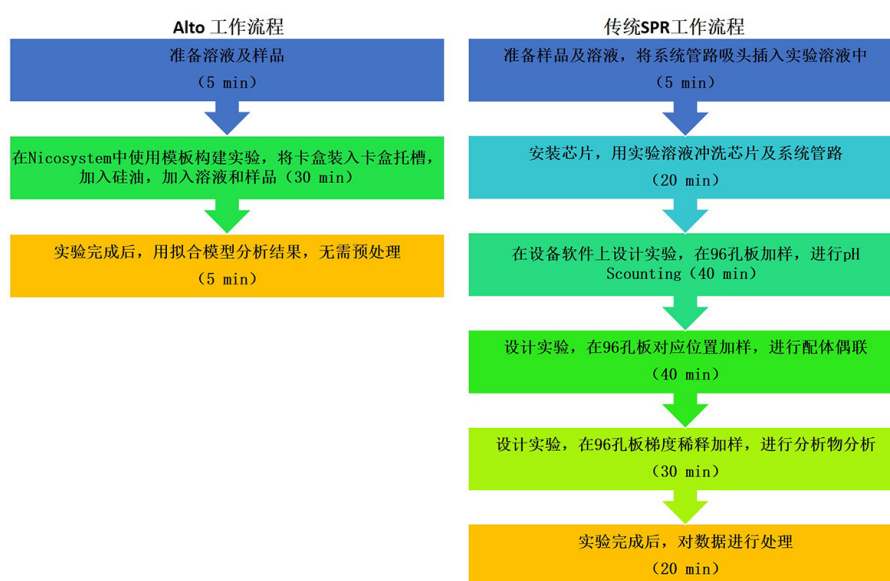


图 2 Alto 与传统 SPR 工作流程对比

二、应用及优势

Alto 的应用范围：适用于蛋白、抗体、核酸、小分子化合物、碳水化合物、脂质体、细胞、病毒和纳米颗粒等多种样品。该仪器具有以下特点和优势：

1. 高通量：一次可检测 8 个配体，48 个分析物，实现 24 小时无间断运行。
2. 低样本量：仅需 2 μL 样本获得 5 条曲线，得到完整的动力学和亲和力数据，比传统 SPR 样本体积用量低近 500 倍。
3. 自动化操作：基于 DMF 技术，自动进行 5 个浓度的梯度稀释，减少人为误差，高重现性，无扩散及质传效应影响。
4. 易操作：软件指导式操作，自动报错提示及优化指导，无需清洗流路，发生机械故障可能性极低。

实验步骤

一、样品及缓冲液准备

此实验选用氨基偶联的固定方法，配体和分析物在对应孔中只需要加 2 μL 体积，相比传统 SPR 技术大大减少了样品使用量，为珍贵样品或难以获得样品提供了体外互作研究的机会，另外配体和分析物同步加入到卡盒，实现配体偶联和分析物分析不间断检测。

1. 样品准备：Alto 实验推荐的配体实验浓度为 25~50 $\mu\text{g/mL}$ ，且至少用醋酸钠溶液稀释 20 倍，一般用于稀释配体的醋酸钠 pH 为 4.5 或 5.0，对于特殊配体需要进行预实验，通过检查偶联量以确定醋酸钠的 pH；分析物在微流控板上以三倍梯度自动稀释成五个浓度进行测试，最高测试浓度设为亲和力的 10 倍，而加样浓度为最高测试浓度的 3 倍。若在亲和力未知的情况下，应预估亲和力范围，在该范围内设置对应浓度进行测试。

配体的准备：取 1 μL 1 mg/mL 的 CD32，加入 19 μL 10 mM pH 4.5 的醋酸钠溶液后混匀，配体 CD32 被稀释至 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

分析物的准备：将分析物 Fc 初始上样浓度设为 619 μM ，体积 40 μL ，Buffer 为 PBS 缓冲液。

2. PBST 缓冲液准备：PBST 作为卡盒运行缓冲液，取 1 mL 10 $\times$ PBS 用纯净水稀释 10 倍至 10 mL，加入终浓度为 0.1% 的 Tween-20，0.22 μm 滤膜过滤。

二、软件程序设置

1. 打开控制软件，输入用户名及密码，点击“LOGIN”(图 3)，进入主页面(图 4)，点击“Design an experiment”进入程序设置页面(图 5)，选择“Binding Kinetics”和“Direct Kinetics”，直接动力学应用于将配体直接

引用格式：刘俊华，常卿，李文奇. (2025). 利用 Alto LSPR 检测蛋白配体与受体相互作用亲和力. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027.

How to cite: Liu, J. H., Chang, Q. and Li, W. Q. (2024). The Binding Affinity Analysis of Protein Ligand Interacting with Receptor by Alto LSPR. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027. (in Chinese)

固定到传感器上，然后引入分析物以研究系统的结合动力学。

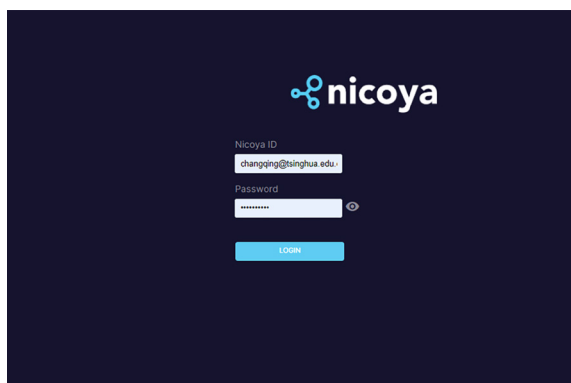


图 3 Alto 登陆页面

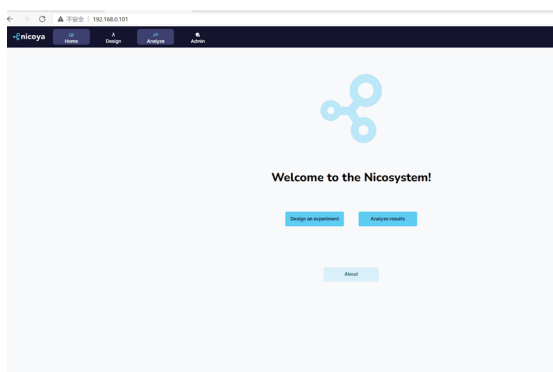


图 4 Alto 主页布局

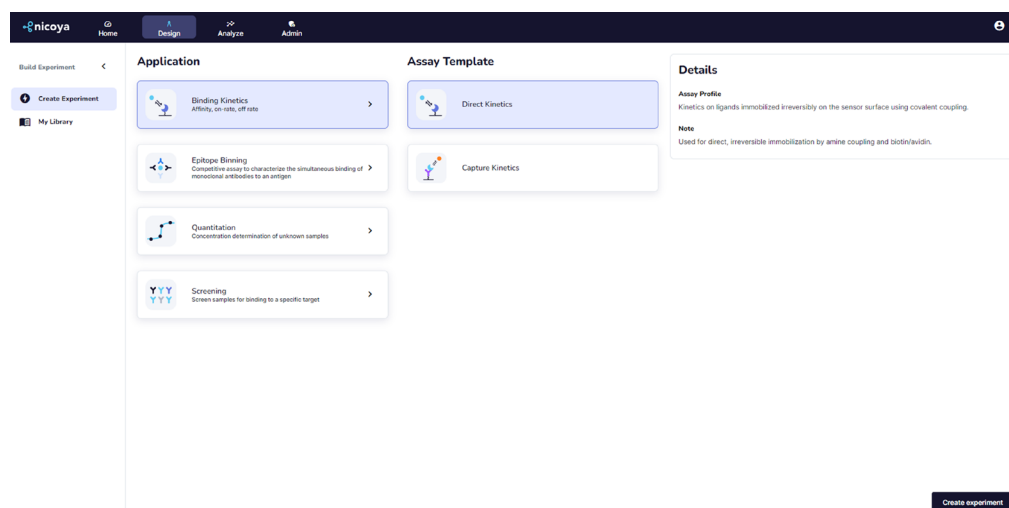


图 5 程序设计页面

- 在图 3 中点击页面右下角“Create experiment”，在创建新实验界面输入测试信息包括项目、实验名称和实验描述（图 6），点击“Design an experiment”进入动力学实验设计页面（图 7），在 DIRECT KINETICS OPTIONS 选项卡下选择多循环动力学“Standard (Multi-Cycle)”，在 SURFACE 选项卡下选择 Sensor Chemistry 为 Carboxyl-PEG(KC-CBX-PEG-16)，在 INTERACTIONS 选项卡下勾选“Use auxiliary buffer”以实现缓冲液交换，设置分析物数量“Unique Analytes”为 16，传感器(sensors)区域的温度设置为 25 °C，Reagents 温度选择 15 °C，执行的稀释次数（Concentrations per Analyte）为默认固定值 5 次，不能修改；稀释倍数（Dilution Ratio）为默认固定值 3 倍梯度稀释。

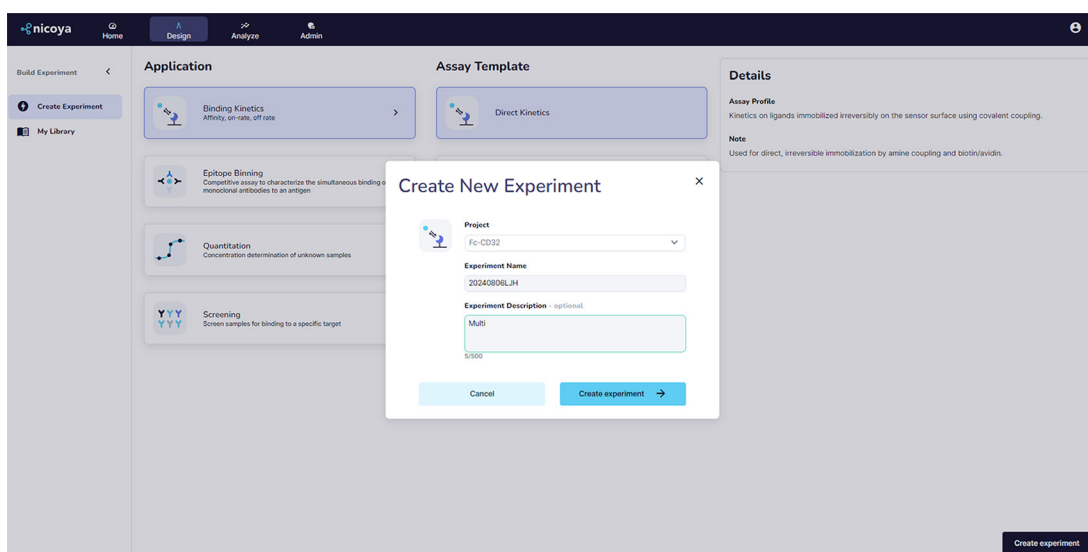


图 6 定义参数以创建新实验

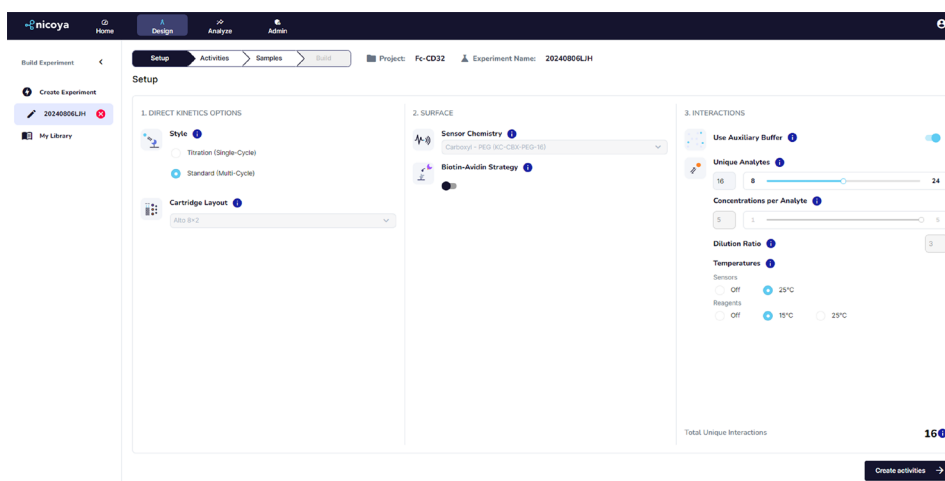


图 7 动力学实验设置页面

- 点击“Create activities”，进入互动时间设置页面（图 8）。互动实验流程（图 8~图 11）中各个液滴“Drop”

引用格式：刘俊华，常卿，李文奇. (2025). 利用 Alto LSPR 检测蛋白配体与受体相互作用亲和力. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027.

How to cite: Liu, J. H., Chang, Q. and Li, W. Q. (2024). The Binding Affinity Analysis of Protein Ligand Interacting with Receptor by Alto LSPR. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027. (in Chinese)

的释义见表 1。如图 8 所示，点击“Normalize”，此步骤为在任何样品到达传感器之前，用两种标准化溶液检测传感器，以检查每个传感器的灵敏度。每个液滴流过时间采取如图所示默认值；点击“Clean”，此步骤利用 10 mM 盐酸在传感器激活或配体固定之前冲洗传感器（图 9）；点击“Bulid Surface”，此步骤里包含用溶剂冲平基线、用 EDC-NHS 活化芯片、在传感器上偶联配体、用乙醇胺进行芯片封闭，最后基线冲平，时间采取图 10 默认值；点击“Direct Single Cycle Kinetics”，此步骤用于将分析物液滴引入配体表面以测量结合动力学，分析物浓度应为实际测试浓度的三倍，结合时间设为 180 s，解离时间设为 600 s，其余时间采取图 11 默认

表 1 互作分析中各液滴对应释义

项目\液滴	液滴 1	液滴 2	液滴 3	液滴 4	液滴 5	液滴 6	液滴 7	液滴 8	液滴 9	液滴 10
	Drop1	Drop2	Drop3	Drop4	Drop5	Drop6	Drop7	Drop8	Drop9	Drop10
芯片校准 (Normalize)	基线	用校准溶液 1 对传感器进行 低响应的线性 校准	基线	用校准溶液 2 对传感器进行 高响应的线性 校准	基线	-	-	-	-	-
清洁 (Clean)	用清洁试 剂调节传 感器	基线	-	-	-	-	-	-	-	-
偶联 (Build Surface)	基线	活化传感器	配体偶 联	基线	用封闭溶液 将任何剩余 的结合位点 失活	基线	-	-	-	-
直接多循环动 力学 (Direct muilt cycle kinetics)	基线	基线	每个浓度的分析物（浓度从低到高）分析时间，建议所有浓 度都使用相同的分析时间。					分析物 解离时 间	再生接 触时间	基线

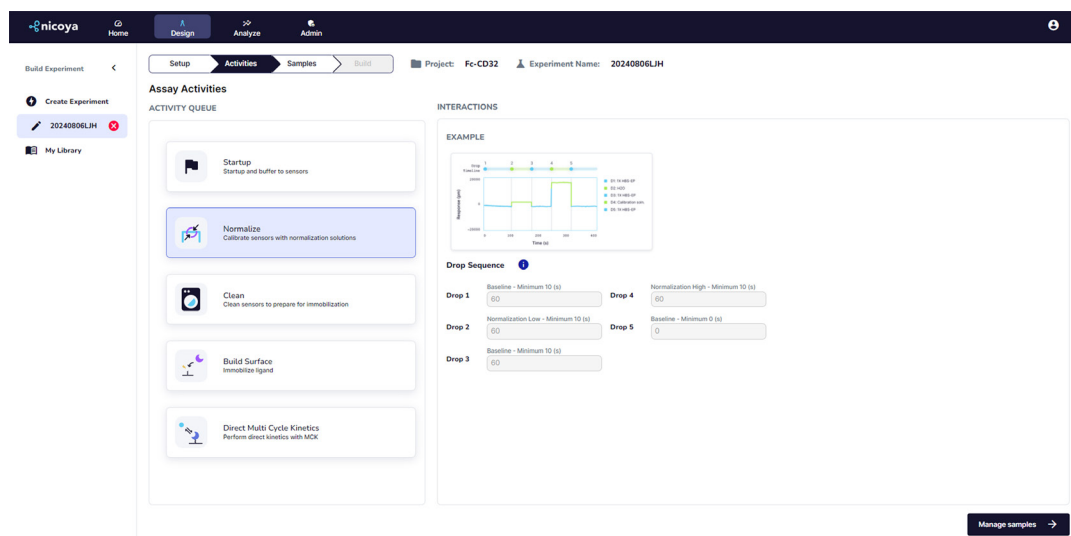


图 8 溶液校准的液滴顺序

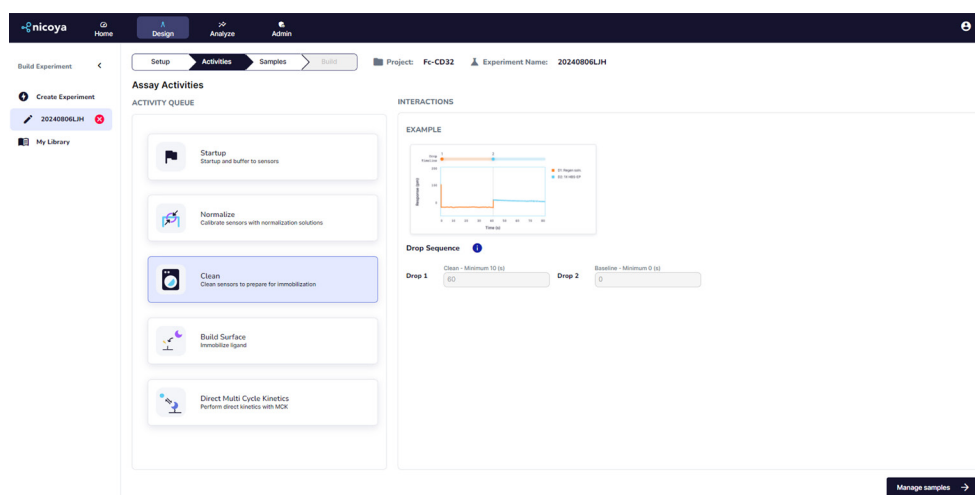


图 9 清洗芯片的液滴顺序

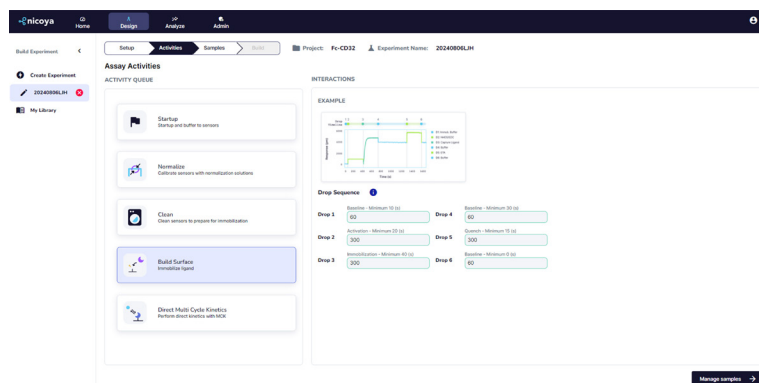


图 10 配体偶联液滴顺序

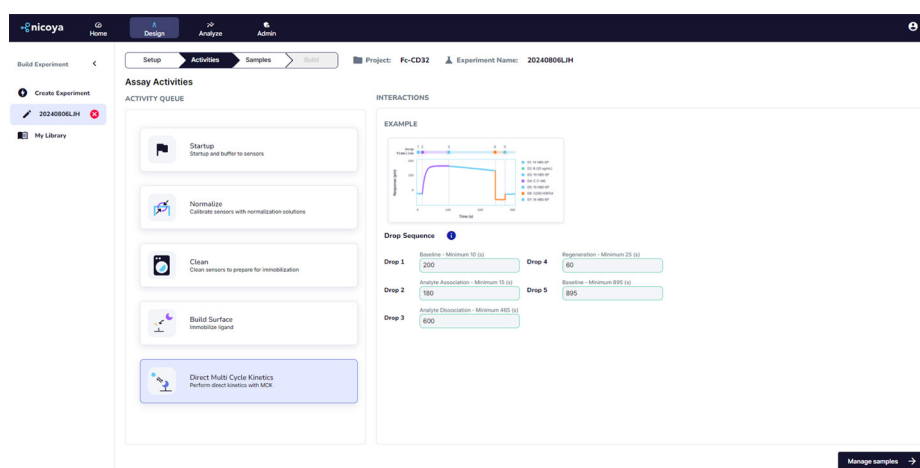


图 11 分析物与配体互作时间设置

4. 点击“Manage samples”进入样品信息设置卡，根据卡盒加样位置对应填好样品名称及浓度，分析物浓度为必填项，配体放在 C 行, 分析物样品放在 D 行和 E 行, 卡盒加样信息设置如图 12 所示, 点击“Build”，该方法将自动发送给检测仪器 Alto。

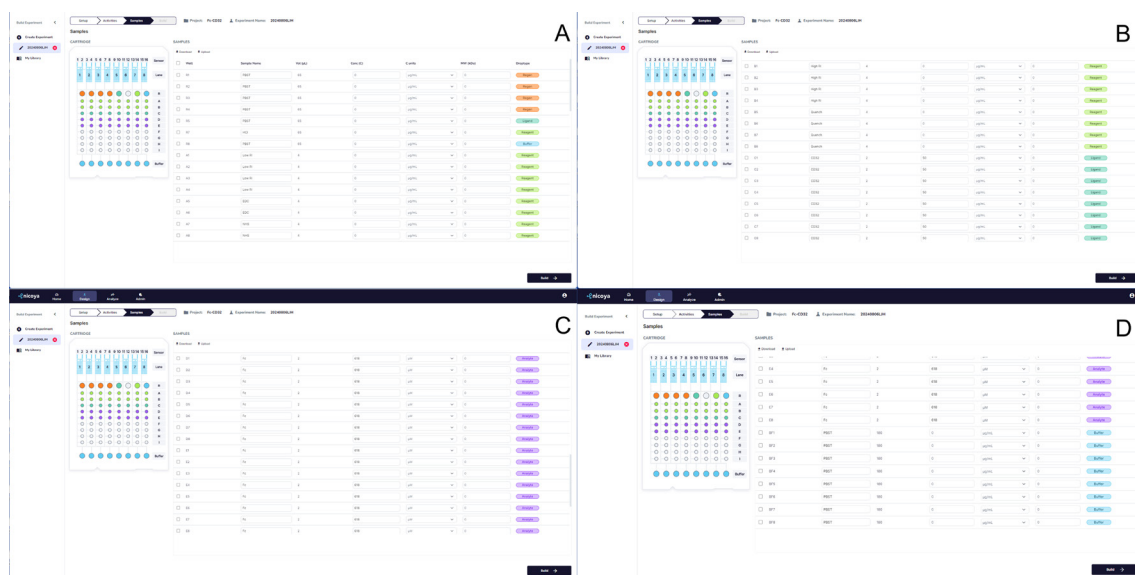


图 12 样品信息。A. 卡盒 R 行和 A 行加样名称设置；B. 卡盒的 B 和 C 行加样名称和浓度设置；C. 卡盒 D 和 E 行加样名称和浓度设置；D. 卡盒 BF 行加样设置。

三、启动仪器，放置卡盒

1. 打开仪器侧方电源，等待仪器启动，仪器启动后，Alto 控制软件将自动加载。
2. 登录后如图 13，点击“Run an experiment”，选中上述建立的方法（图 14），点击“Run”。

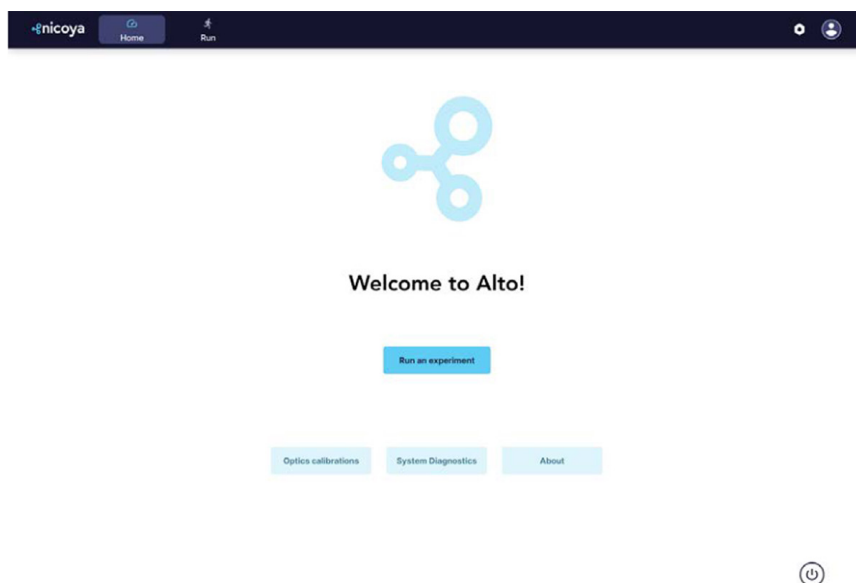


图 13 Alto 设备的主屏幕

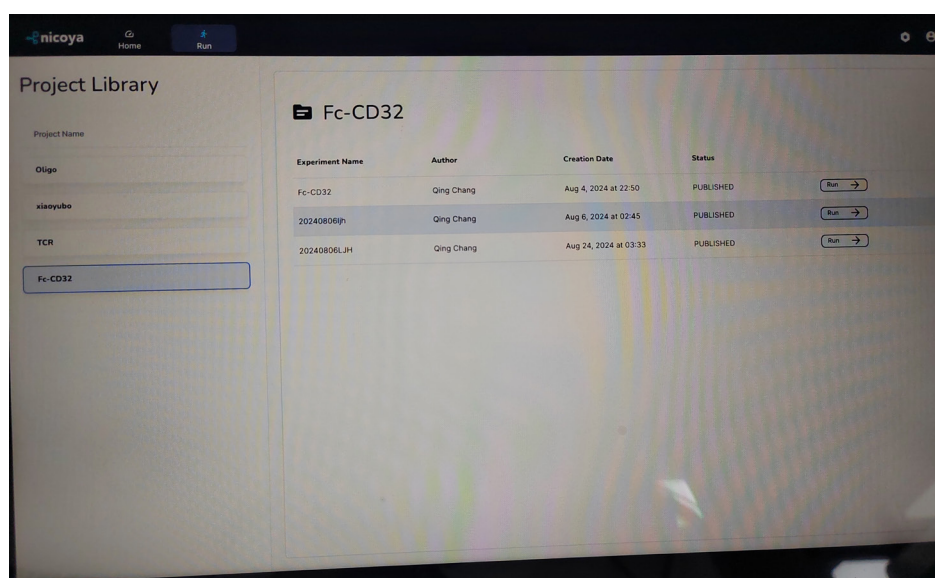


图 14 选择方法

3. 拆开羧基芯片卡盒的密封包装，抓住卡盒边缘，注意将卡盒和卡盒托架的凹凸处对准后，如图 15A 红圈处，将卡盒水平放置。卡盒托架内的触发器用于仪器检测到卡盒。将含有硅油的注射器对准硅油孔，如图 15B，待溶液完全注射进卡盒中，此过程需要 1~3 min，小心提起注射器，应避免任何硅油的溢出和喷溅。

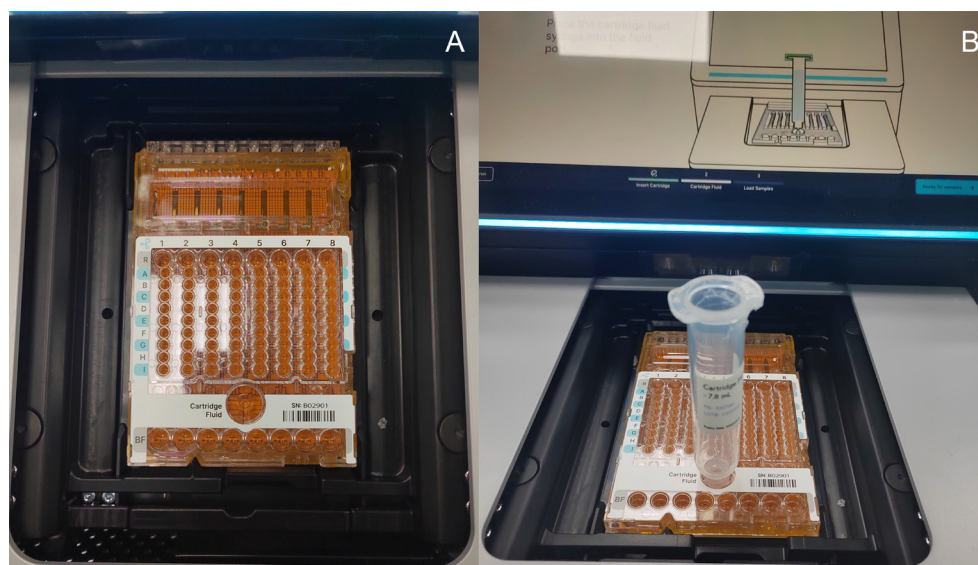


图 15 卡盒放置与注射硅油。A. 卡盒放在托槽里；B. 将硅油注射进卡盒。

- 单击软件右下角的“Ready for samples”按钮，如图 16 所示，按照软件屏幕上的样品位置和体积信息，从卡盒顶部开始，依次向下一行将样品加载到卡盒对应的孔中，在屏幕上勾选加过样的孔以跟踪进度。加样时应使用反向移液技术，即用移液器时采用二挡位吸液一挡位打液的移液方式，将枪头尖端浸入硅油中，但不要接触底板，缓慢打出样品，以免产生气泡。加载完所有的样品后，点击“Run Experiment”。

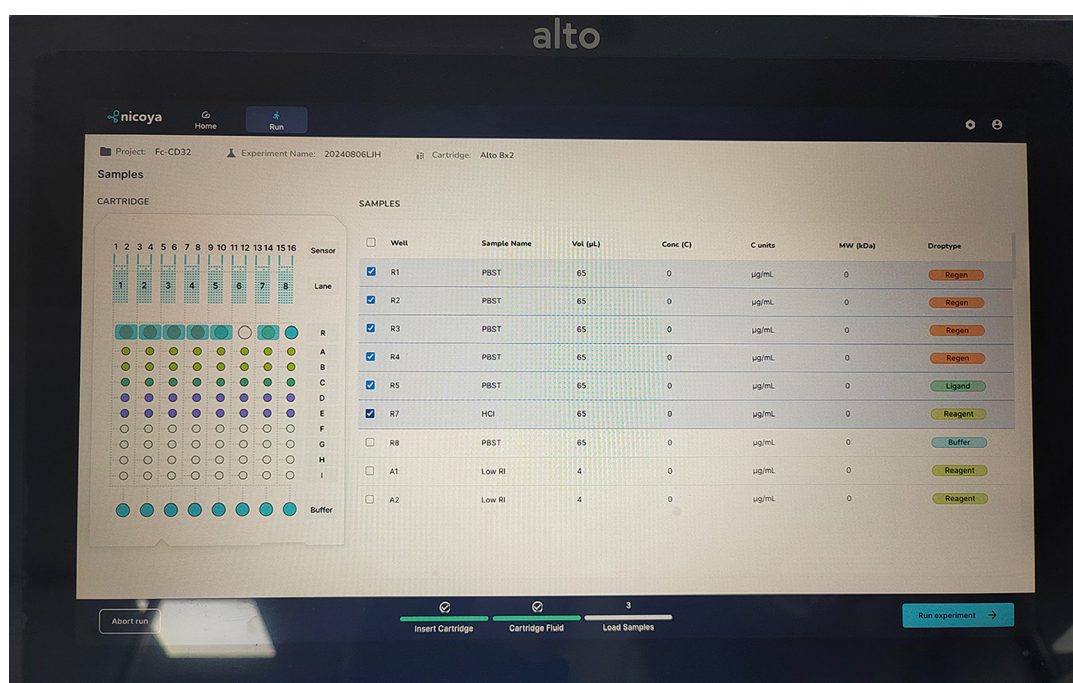


图 16 卡盒各孔对应样品分布

引用格式：刘俊华，常卿，李文奇. (2025). 利用 Alto LSPR 检测蛋白配体与受体相互作用亲和力. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027.

How to cite: Liu, J. H., Chang, Q. and Li, W. Q. (2024). The Binding Affinity Analysis of Protein Ligand Interacting with Receptor by Alto LSPR. *Bio-101* e1011027. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011027. (in Chinese)

5. 本实验进行 16 组实验，用时约 7 小时，实验结束后，及时取出卡盒，关闭仪器。

四、实验结果与数据分析

1. 实验完成后，数据将自动上传到控制软件主页上。单击导航栏中的“Analyze results”图 4 所示。从结果库中找到要分析的实验。将鼠标悬停在实验上，然后单击实验右侧的“View”，如图 17 所示。此时会弹出一个窗口，其中包含实验概述，如图 18 所示。

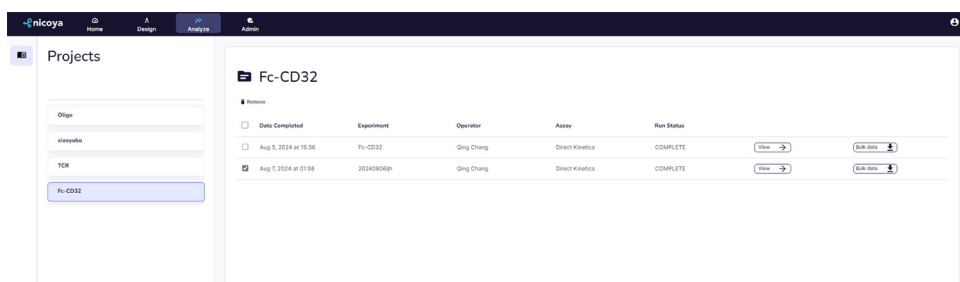


图 17 实验结果位置

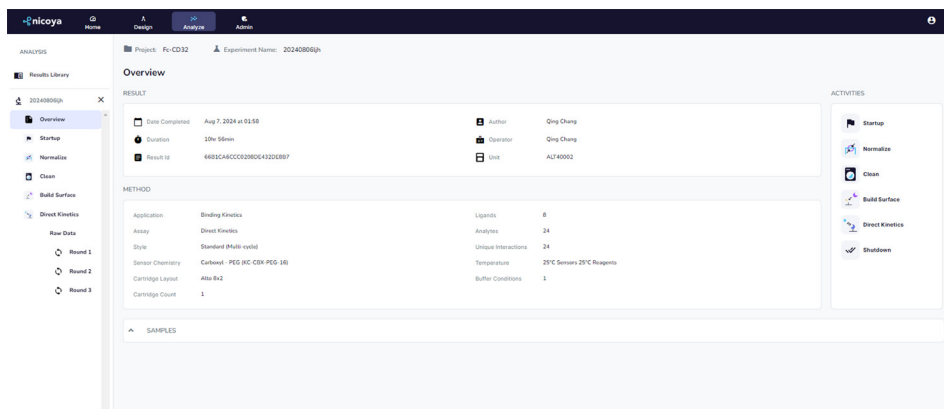


图 18 实验结果概述

2. 点击左侧栏中的“Normalization”查看两种标准化溶液的传感器灵敏度校准结果，如图 19 所示，Drop2 信号低于 Drop4，说明传感器灵敏度良好。



图 19 传感器灵敏度校准结果

3. 点击左侧栏中的“Build Surface”查看配体偶联结果（图 20），八个通道都成功偶联上配体 CD32，偶联量具有一致性，最高的响应值达 2,000RU。



图 20 CD32 偶联结果

4. 点击左侧栏中的“Direct Kinetics”，等待 1~5 min，可直接得到多循环动力学曲线和相互作用信息，互动数据术语的释义见表 2。点击页面右上角设置图标，如图 21A，在 Analysis 选项卡下，选择第二个分析模型“1: 1 Langmuir Kinetic With Mass Transport Limitation (MTL) (K_a , K_d , R_{max} , K_t)”，此模型是 1: 1 结合模型，当分析物扩散到配体的速率比分析物与配体结合的速率慢时会对拟合结果产生影响，MTL 模型可以矫正这一影响，适用于分析物与配体快速结合的曲线拟合。 R_{max} Value 选择 Local, K_a , K_d , K_t 选择 Global，点击“Apply changes”。如图 21B，在 Clean up 选项卡下，勾选 Despik 以消除突然急剧增加或减少的局部噪音；勾选“Averaging”降低传感器图中的噪声，提高数据的可视化，减少拟合误差；勾选“Trim baseline”，将结合曲线前的基线缩短，使曲线更流畅；“Baseline Drift Correction”对结合前基线时间大于 200 s 的基线进行矫正，此处不做勾选，点击“Apply changes”。拟合后的一组数据页面

如图 22 所示, 左侧显示出 CD32 与 Fc 相互作用的重要参数, K_D 为 $18.4\ \mu\text{M}$, 点击右上角第六个图标, 实验结果曲线图可直接导出为用于文章发表的矢量图 (图 23)。

表 2 相关术语及释义

术语	释义
K_a	结合速率
K_d	解离速率
K_D	亲和力、 k_d/k_a 或平衡常数
R_{max}	计算出的最大结合反应, 是试剂活性、表面反应物量和分子量的函数
Chi^2	Chi^2 表示拟合的优度
K_t	质量传递系数, 分子从体向表面转移的扩散速率

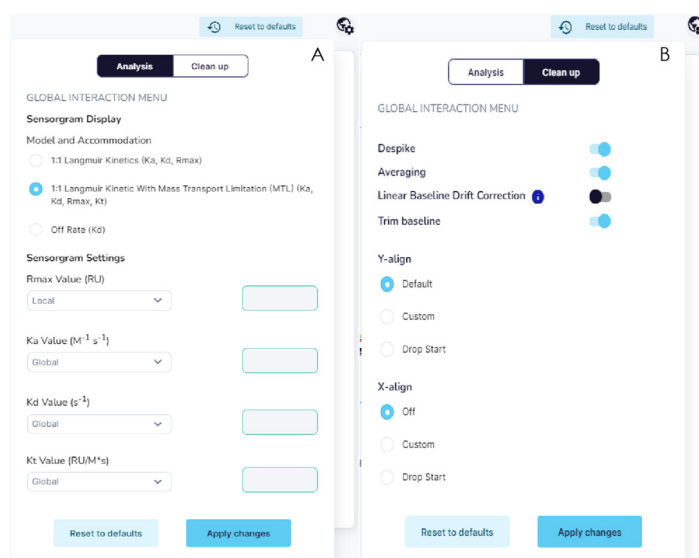


图 21 数据拟合选项。A. 数据分析选择模型页面; B. 调整拟合曲线页面。

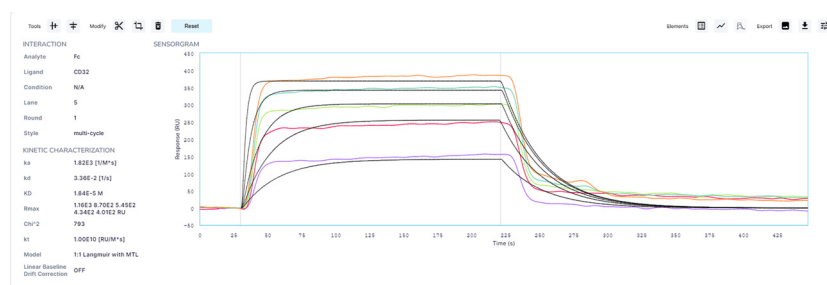


图 22 动力学拟合结果页面

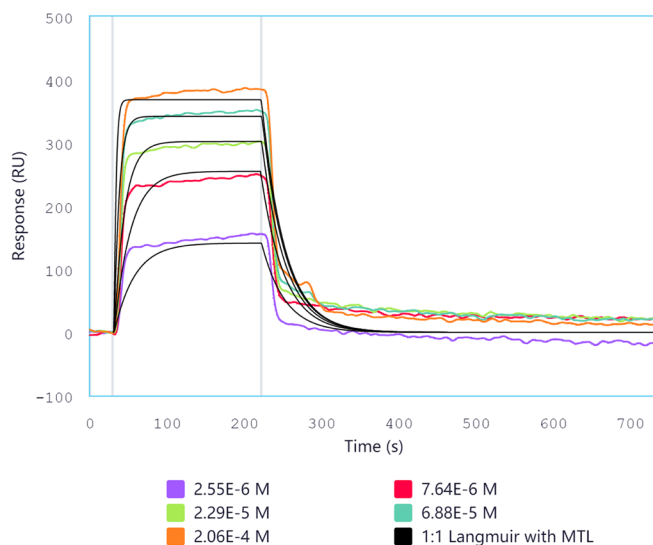


图 23 可用于发表文章的矢量结果图

实验注意要点

1. 本实验中在拆开卡盒的真空包装后一定要在 30 min 内加入硅油，否则长时间暴露在空气中将对卡盒芯片产生不利影响；卡盒为一次性使用耗材。
2. 一般来说，对于良好的拟合， χ^2 的平方根与测量的噪声大小相同， χ^2 的数值应当越小，数据质量越好。另一个参考标准是 χ^2 与 $R_{\max}$ 的比值在 10% 以内。
3. 本文介绍实验为一对一相互作用研究，且不需要芯片再生步骤。对于一对多的筛选实验，每个通道最多可以对应 6 个分析物，一个卡盒最多进行 48 个分析物的研究，但是也要考虑芯片是否需要再生，芯片再生后可能会造成配体活性下降，从而降低分析物分析个数。
4. DMF 技术利用油包水的特性，在电极下推动液滴进行检测，所以凡是破坏硅油形成疏水表面的有机溶剂，都不能使用。

溶液配方

1. PBST 缓冲液成分

NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Na_2HPO_4 0.01 M, KH_2PO_4 0.0018 M, 0.1% Tween-20。

致谢

本实验方案得到高校国家重大科技基础设施开放共享和运行维护经费项目（61100600123）和生命结构前沿研究中心资助项目（997019045）的经费支持。

感谢北京拓澳生物有限公司让文亮工程师在实验操作方面给与的帮助。

参考文献

1. APPLICATION NOTE: [Characterization of Fc Gamma Receptor and IgG Interactions using Alto™: Comparison to BLI](#).
2. Junker F, Gordon J, Qureshi O. (2020). [Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation](#). *Front Immunol.* 11:1393.
3. Zou G, Ochiai H, Huang W, et al. (2011). [Chemoenzymatic Synthesis and Fcγ Receptor Binding of Homogeneous Glycoforms of Antibody Fc Domain. Presence of a Bisecting Sugar Moiety Enhances the Affinity of Fc to FcγIIIa Receptor](#). *J Am Chem Soc.* 133(46):18975.