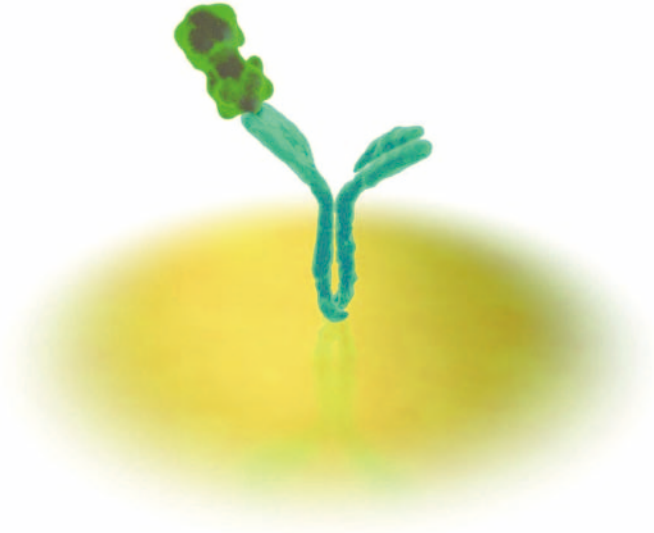


GE医疗中国

# Biacore

## 方法开发手册



GE梦想启动未来

healthymaginnation

# Biacore

## 方法开发手册

# 目录

---

<b>1 介绍</b>	<b>5</b>
1.1 Biacore™系统检测的对象	5
1.2 Biacore 系统应用范围	5
1.3 本手册内容	6
1.4 Biacore 机型介绍	6
1.5 Biacore 术语	7
<b>2 应用概述</b>	<b>10</b>
2.1 筛选和检测结合对象	10
2.2 动力学和亲和力测定	11
2.2.1 动力学分析	11
2.2.2 亲和力分析	13
2.3 浓度测定	15
2.3.1 采用标准曲线的浓度测定法	15
2.3.2 无需标准曲线的浓度测定 (CFCA)	16
2.4 确定结合位点 / 结合位点作图	16
<b>3 方法通论</b>	<b>18</b>
3.1 传感芯片表面	18
3.1.1 普遍属性	18
3.1.2 传感芯片类型	18
3.2 固定配体	20
3.2.1 共价偶联	20
3.2.2 高亲和力捕获	22
3.2.3 配体固定水平	23
3.3 缓冲液一般注意事项	24
3.3.1 缓冲成分	24
3.3.2 离子强度	25

# 目录

3.3.3 添加剂.....	25
3.3.4 缓冲液配制.....	27
<b>3.4 样品与运行缓冲液的折光率匹配.....</b>	<b>28</b>
3.4.1 匹配折光率.....	28
3.4.2 匹配缓冲液成分.....	29
3.4.3 实践中如何匹配折光率.....	29
<b>3.5 梯度稀释和样品重复.....</b>	<b>30</b>
3.5.1 梯度稀释.....	30
3.5.2 样品重复.....	31
<b>3.6 样品瓶和微孔板.....</b>	<b>32</b>
<b>4 筛选和检测结合对象.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 小分子筛选.....</b>	<b>34</b>
4.1.1 目的.....	34
4.1.2 配体的固定.....	34
4.1.3 样品制备.....	34
4.1.4 缓冲液.....	35
4.1.5 检测条件.....	35
4.1.6 分析结果.....	36
<b>4.2 抗体筛选.....</b>	<b>38</b>
4.2.1 目的.....	38
4.2.2 配体固定.....	38
4.2.3 样品制备.....	38
4.2.4 缓冲液.....	38
4.2.5 检测条件.....	39
4.2.6 分析结果.....	39
<b>4.3 免疫原性检测.....</b>	<b>40</b>
4.3.1 目的与难点.....	40
<b>5 动力学和亲和力测定.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 方法.....</b>	<b>41</b>

5.1.1 单循环和多循环动力学.....	41
5.1.2 二对二动力学 (2-over-2 kinetiss) .....	41
5.1.3 动力学和亲和力差别的估算.....	42
<b>5.2 固定配体.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 缓冲液.....</b>	<b>43</b>
<b>5.4 样品制备.....</b>	<b>44</b>
<b>5.5 样品浓度.....</b>	<b>44</b>
<b>6 抗原表位作图.....</b>	<b>48</b>
<b>6.1 配对结合检测.....</b>	<b>48</b>
6.1.1 原理.....	48
6.1.2 数据分析.....	49
<b>6.2 肽段抑制检测.....</b>	<b>51</b>
<b>7 疑问解答.....</b>	<b>52</b>
<b>7.1 解决配体固定中的问题.....</b>	<b>52</b>
7.1.1 共价固定的配体.....	52
7.1.2 配体的捕获.....	53
<b>7.2 解决分析物结合过程中的问题.....</b>	<b>54</b>
7.2.1 分析物结合容量太低.....	54
7.2.2 分析物结合太高.....	54
<b>7.3 解决非特异性的和干扰的结合.....</b>	<b>54</b>
7.3.1 非特异性结合.....	54
7.3.2 干扰的结合.....	55
<b>7.4 非正常的传感图曲线.....</b>	<b>56</b>
7.4.1 基线不稳定.....	57
7.4.2 低于基线的样品响应值.....	58
7.4.3 “驼峰状”传感图.....	58
7.4.4 在缓冲液流动期间的非正常信号.....	59
7.4.5 参比扣除传感图的尖峰.....	59
7.4.6 重复扰动.....	60

<b>附录 A 动力学分析与浓度测定</b>	<b>61</b>
<b>A.1 动力学和亲和力的基本原理</b>	<b>61</b>
A.1.1 动力学速率公式	61
A.1.2 稳态法亲和力公式	63
A.1.3 拟合过程	63
A.1.4 评估拟合	64
<b>A.2 动力学相互作用模型</b>	<b>67</b>
A.2.1 1:1 结合	67
A.2.2 1:1 解离	67
A.2.3 二价分析物结合	67
A.2.4 非均一的配体	68
A.2.5 亲和力相互作用模型	68
<b>A.3 浓度测定</b>	<b>69</b>
A.3.1 标准曲线的拟合	69
A.3.2 标准曲线趋势校正 (Calibration trends)	69
A.3.3 无需标准曲线的浓度测定	69
<b>附录 B 溶剂校正原理和实践</b>	<b>70</b>
<b>B.1 介绍</b>	<b>70</b>
<b>B.2 溶剂校正的要求</b>	<b>71</b>
<b>B.3 溶剂校正的原理</b>	<b>71</b>
<b>B.4 溶剂校正溶液的配制</b>	<b>72</b>
<b>B.5 评估溶剂校正</b>	<b>73</b>

# 1 介绍

---

## 1.1 Biacore™系统检测的对象

Biacore 系统采用不改变分子性质的非标记技术，记录分子结合和解离过程中传感芯片表面分子浓度发生的变化，从而实时地监测分子间的相互作用。Biacore 的检测原理基于表面等离子共振技术（SPR），能够灵敏地反映距离传感芯片表面约 150 nm 范围内折光率的变化。为了研究两个分子之间的相互作用，其中一个分子被固定到芯片表面上，而另一个分子以溶液的形式连续流过表面。SPR 响应值直接与芯片表面附近的质量浓度变化成正比。

Biacore 系统原则上可以用于研究任何种类分子间的相互作用：从候选的有机药物分子到蛋白质、核酸、糖、甚至是病毒和全细胞。因为响应值与质量浓度成正比，因此每摩尔浓度的结合分子产生的信号与其分子量成正比（较小的分子量产生较低的响应值）。现在分子量的实际检测下限约为 100 Da（注：Biacore T200 对有机分子无分子量下限）。

Biacore 的检测原理不需要对任何样品分子进行标记，既可以测定纯化的样品，也可以对复杂的混合物进行分析，比如细胞培养液上清，细胞裂解液。混合样品的结合过程受样品中结合反应物与固定在芯片表面的分子结合的特异性决定。SPR 检测技术无需改变分子性质，而且可检测澄清、有色或不透明的样品。

## 1.2 Biacore 系统应用范围

在以下应用领域，Biacore 系统都能够提供宝贵的信息：

- 特定分子的检测，例如在免疫原性研究中的抗药抗体的检测。
- 筛选结合伴侣分子并对结合能力进行排序，例如在药物开发和生物制药研发中的应用。

## 1 介绍

### 1.3 本手册内容

- 多重结合分析，例如单克隆抗体的抗原表位作图。
- 样品中目标分子的浓度定量，利用目标分子的结合属性，对不同条件下的目标分子活性浓度进行测定。
- 动力学和亲和力常数的测量。由于 Biacore 可以实时地跟踪结合过程，因此可以获得结合的动力学参数。

Biacore 系统主要用于药物开发、质量控制和基础生命科学研究。

### 1.3 本手册内容

本手册提供了多种基于 Biacore 技术的检测方法的开发流程，以及关于配体固定、样品制备和方法优化方面的建议和推荐。本手册也涵盖了帮助解决不理想结果的问题解决指南。

本手册的内容基于 Biacore 技术本身，而并不针对某一特定机型。阅读本手册的同时，请同时阅读与您的 Biacore 设备相应的说明书等文档，以了解如何从硬件和软件上实现检测方法的开发。

### 1.4 Biacore 机型介绍

所有的 Biacore 机型都利用相同的检测原理，并且基本都可以使用所有类型的传感芯片（见 3.1 节）。Biacore 采用可控的流路系统来把样品和试剂传送到传感芯片表面。各种系统在样品通量和自动化程度上不同，分别满足不同的实验室需求：

- 基础型机型如 Biacore X100, Biacore T200 具有一对或两对流动池（一对流动池中的一个用于检测相互作用，另一个在需要时用作参比通道），无需用户干预情况下就可以完成对一定数量样品的检测。
- 进阶型机型装配有多个检测点（例如在 Biacore 4000 中，4 个流动池进一步划分为 20 个检测点，可对多个样品进行平行分析）。能够在无人值守的条件下对 1500 个甚至更多样品自动分析。



尽管不同型号间在可以开发的方法种类上的和具体操作上可能会有所不同，但相同的普遍原理适用于所有型号。本手册将尽可能地重点介绍 Biacore 检测方法开发的普遍原理，并把针对于某个型号的信息控制在最低限度。

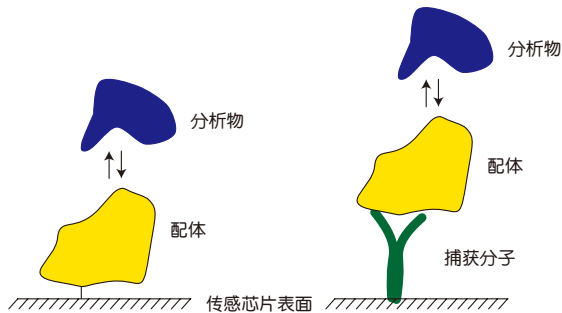
## 1.5 Biacore 术语

Biacore 系统检测两个分子间的相互作用，其中一个分子固定于传感芯片表面，而另一个分子在溶液中保持自由。下列术语在基于 Biacore 技术的检测方法开发中经常被使用：

- 固定到芯片表面的生物分子称为**配体**（图 1-1）。在药物发现和开发工作中，配体有时候被称为**靶点分子**。

**注释：**在这里使用的术语“配体”类似于亲和层析所使用的术语，注意与细胞受体的配体之间的区别。

- 配体可以通过化学偶联试剂共价地**固定于芯片表面**。也可以通过捕获的方法，利用高亲和力的结合固定于一个偶联在芯片表面的捕获分子上。
- **分析物**是以溶液形式流过配体的另一个相互作用分子（图 1-1）。



**图 1-1.** 配体是固定到传感芯片表面的生物分子。配体可以被直接固定在芯片表面上（左图）或通过结合到一个固定的捕获分子上而实现固定（右图）。分析物在溶液中保持自由，当流过配体时与之相互结合。

# 1 介绍

## 1.5 Biacore 术语

- 在间接的检测方法中，使用二级**检测分子**来检测分析物，二级检测分子既可以与溶液中的分析物结合又可以与传感芯片表面上的配体结合。所观察到的响应值来源于检测分子与配体的结合：由于样品中存在的分析物竞争了上述结合，所以响应值与分析物的含量呈负相关。
- 样品以精密可控的方式注射并流过芯片表面，从而实现互作分析。推动样品的持续流动的缓冲液称为**运行缓冲液**。
- 结合响应值的单位为**共振单位**（RU）。响应值直接与芯片表面上的生物分子浓度成正比。
- 结合响应值对时间作图就构成了**传感图**，它显示了相互作用的进程（图 1-2）。在分析过程中结合曲线可直接显示在电脑显示器上。
- **报告点**汇报了传感图上特定时间的响应值，通常取该时间点周围一个时间段的平均值，同时汇报该时间段内传感图的斜率。响应值可以是绝对值（相对于固定的检测器测量零点）或相对于另一个特定报告点的相对响应值（图 1-2）。

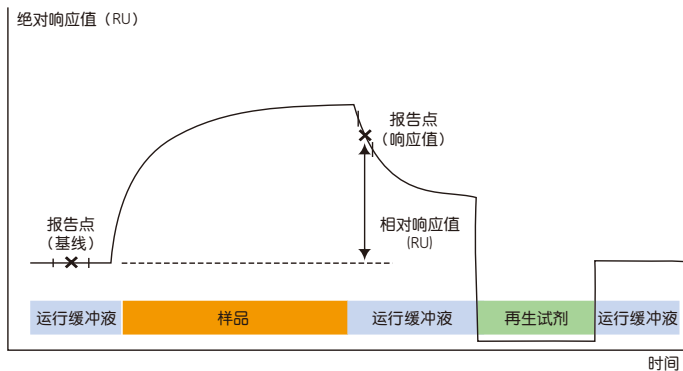


图 1-2. 传感图示意图。传感图曲线下方的条形指示流经传感芯片表面的溶液。

- **再生**是指在一个分析循环后从芯片表面上洗掉剩余的分析物的过程，同时还要保证不破坏配体，为下一个分析循环做好准备。对于被捕获而不是被共价偶联的配体，再生通常连配体一起洗掉而留下完整的捕获分子。
- SPR 技术监测靠近芯片表面的折光率变化，而运行缓冲液和分析样品本体之间折光率的差别将会在进样开始和结束时表现为响应值的快速上升和下降。这被称为**本体折光率效应或本体偏移**。
- 对动力学和亲和力常数的书写习惯在文献间有很大的不同。在本手册中(以及在其他Biacore文档中),速率常数被写为小写字母( $k_a$ 是结合速率常数,  $k_d$ 是解离速率常数),而平衡或亲和力常数以大写字母表示( $K_A$ 是结合平衡常数,  $K_D$ 是解离平衡常数)。

## 2 应用概述

---

本章概要介绍了 Biacore 系统的主要应用领域。分别是：

- 筛选结合对象，包括免疫原性测试
- 相互作用动力学常数和亲和力测定
- 浓度测定
- 确定结合位点 / 结合位点作图

随后的章节将详细地介绍筛选、动力学 / 亲和力和结合位点确定。浓度测定在单独的一本手册中进行讨论 (*Biacore 浓度分析手册*)。

### 2.1 筛选和检测结合对象

因为 Biacore 系统基于表面等离子体共振 (SPR)，这种无需标记的，通用的检测技术，特别适合在药物和生物制药开发以及免疫原性检测中筛选结合对象。

Biacore 系统中的响应值与芯片表面上的质量浓度变化直接相关，因此摩尔响应值（即单位数量的分子的响应值）与所检测的分子大小成正比。一定的响应值对于更小分子意味着更高的摩尔浓度；同样，如果分子量更小，相同数量的分子结合到芯片表面只能产生更低的响应值。对于蛋白质，无论它们的氨基酸组成和序列，响应值与芯片表面浓度之间的关系基本上是恒定的，对于大多数其他生物大分子也类似如此。

**注释：**在 *Biacore* 相关的早期文献中标明，1 RU 大约相当于芯片表面  $1 \text{ pg/mm}^2$  浓度的变化。这种关系大致只针对于在 *Sensor Chip CM5* 上的蛋白质的结合。对于非蛋白质分子和其他类型的传感芯片使用这种转换关系需注意。*Biacore* 系统的响应值应该始终以 RU 为单位，而不是以浓度为单位。

Biacore 可以对复杂的样品进行测量，例如细胞培养基或体液：结合响应值的特异性主要由固定在芯片表面的配体的选择性所决定。这在一些应用如抗体筛选和免疫原性检测中尤其有用：例如，在筛选中固定抗原作为配体将只检测相应的抗体，而如果所使用的配体能够结合于一类抗体的共同区域，将对这一类抗体都产生响应而非表现抗原的特异性。

## 2.2 动力学和亲和力测定

测定相互作用动力学可能是 Biacore 系统最有特色的应用。无标记、实时的检测手段使得分子间的相互作用能够被动态地、高分辨地记录下来。结果可以用某一相互作用机制相应的数学模型加以解释，以获得动力学参数（结合和解离速率常数）。亲和力常数反映结合强度而不是结合速率，它可以由速率常数获得，也可以从稳态时的结合水平推导出。动力学和亲和力分析的理论将在附录 A 中介绍。

注释：在本手册中使用的术语“动力学”是指相互作用动力学。其他过程的动力学如酶催化反应动力学通常不适合在 Biacore 系统中研究。

### 2.2.1 动力学分析

相互作用动力学是通过监测一系列浓度的分析物与配体发生相互作用的实时进程，然后用某一可以描述该相互作用的数学模型对整套数据进行拟合。结合阶段（在进样期间）同时发生结合和解离两个进程，而在解离阶段（在进样结束后，切换至缓冲液流让分析物自发解离）只发生解离这一个进程。

很值得注意的是动力学分析结果只有放在所选择的互作模型的背景中才具有意义。严格来讲不可能由获得的结合的特征来选择模型，尽管传感图的形状有时候能够为选择合适的模型提供线索。采用数学模型对数据拟合的效果并不能证明相互作用的机制（图 2-1）。

## 2 应用概述

### 2.2 动力学和亲和力测定

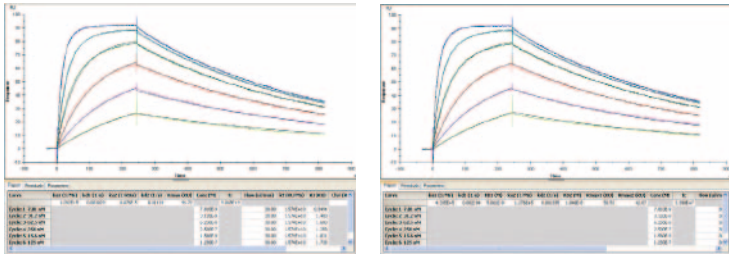


图 2-1. 用数学模型对实验数据拟合的效果并不能证明这个模型是否合适，相同的数据可能适合于多种模型。在这个例子中，拟合度高低并不能明确区分到底是二价分析物模型（bivalent）（左图）还是不均一配体模型（Heterogeneous Ligand）（右图）。

#### 动力学分析方法的建立

目前有两种建立动力学分析实验的方法（图 2-2）：

- 多循环动力学：进样一系列浓度的分析物，每个循环只分析一个浓度的样品，在每次进样后对芯片表面进行再生。在多循环动力学中对再生条件进行优化十分重要（更多信息见《Biacore 传感芯片表面手册》），以确保各个循环间的芯片表面性质一致。
- 单循环动力学：进样一系列浓度的分析物，但在一个循环中完成所有浓度的样品的进样和分析，两次样品进样之间不需要再生。当不能获得适当的再生条件时这种方法特别有用。但是由于一个循环的周期较长，因此对响应值漂移更加敏感。

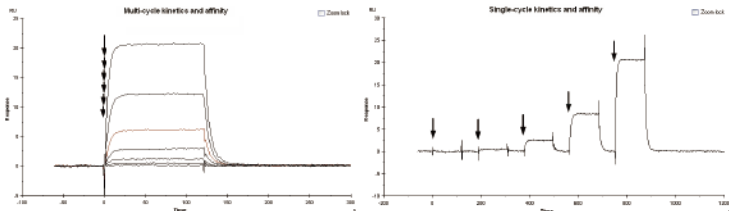


图 2-2. 在多循环动力学和亲和力测定中（左图），每个循环只进样一个样品。在分析软件中，一系列浓度的样品的结合曲线叠加显示，并且对进样起始位置也进行了调整统一。

在单循环测定中（右图），样品在同一个循环中被依次进样。插图中的箭头标记进样起始位置。

### 2.2.2 亲和力分析

在 Biacore 系统中可以通过三种不同的方法测定相互作用亲和力：通过动力学常数计算、测量稳态时的结合水平和溶液中取代的方法。

#### 由动力学常数计算亲和力

对于简单的 1:1 结合，亲和力常数等于速率常数的比值（结合平衡常数  $K_A = k_a/k_d$ ，解离平衡常数  $K_D = k_d/k_a$ ，见附录 A）。因此亲和力可以由动力学测定中计算获得。

请注意，这些数值如同速率常数，只是在用于拟合结合数据的模型的背景中才是有意义的。更复杂的结合机制并不能直接导出亲和力和动力学之间的关系。只有简单的相互作用模型获得的动力学常数才有可能导出亲和力常数。

#### 稳态方法获得亲和力

分析稳态（或平衡状态）下的结合水平与分析物的浓度之间的函数关系是许多测定相互作用亲和力的标准技术都采用的基本方法。相互作用反应物浓度与复合物的浓度，以及与亲和力之间的基本关系在附录 A 中进行了介绍。可以通过将实验结果转换为线性关系（例如 Scatchard 图，Biacore 软件支持）而获得亲和力常数，也可以通过以结合复合物的量对分析物浓度做图而直接拟合获得亲和力（图 2-3）。

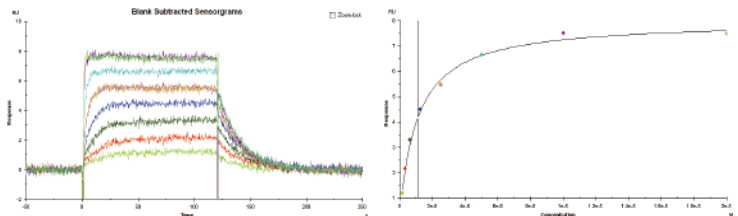


图 2-3. 传感图（左图）和对应的稳态响应值对分析物浓度作的图（右图），可用于结合亲和力的测定。在右图中的垂直直线表示所计算得到的解离平衡常数  $K_D$  的值（也就是亲和力常数）。

## 2 应用概述

### 2.2 动力学和亲和力测定

通过拟合稳态结合水平对浓度的曲线获得亲和力的方法只适用于 1:1 结合的情况。有的情况下会用到两个独立的配体位点分别 1:1 结合的模型，而更加复杂的模型还难以应用在实际的数据分析中。而利用经典的 Scatchard 分析对 Biacore 系统所获得的数据进行转换，有可能获得一些线索，了解到哪些原因造成了其与 1:1 结合行为的偏离。

可能会有人认为同一组的实验原则上既能够提供动力学数据，又能提供稳态结合数据，这样从一套数据中可以得到两个独立的亲和力数值。然而实践中，由于进样体积的限制（随之而来的分析物样品进样时间的限制）所测量的相互作用很少能够达到稳态，反之亦然。因此，通常只可以由动力学方法或稳态方法获得亲和力，很少由两种方法同时获得。

#### 取代法测量亲和力

在 Biacore 系统上利用取代方法测定亲和力的原理是混合已知浓度的相互作用反应物，然后利用 Biacore 测定溶液中游离的反应物的浓度（从而获得结合复合物的浓度），Biacore 实际完成的是浓度的测定。通常，固定相互作用物 A（或其类似物）于芯片表面，建立相互作用物 B 的标准曲线用于测定 B 的浓度。将一系列浓度 A 分别与固定浓度的 B 混合后孵育至达到平衡，然后测定混合物中游离的 B 的浓度。最后使用标准的模块对结果进行分析获得亲和力。这种方法的要求是只有游离的 B 能结合到固定在芯片上的 A，而复合物 AB 不能与 A 结合。

由于在分析中要使用标准曲线来测定分析物 B 的浓度使得这种方法有些繁琐。但这种方法的主要优点是如有必要，样品可以被孵育尽可能长时间以达到稳态。因此测量不受样品分析物进样时间的限制。



## 2.3 浓度测定

Biacore 系统可用于测定分析物的浓度，因为在适当条件下结合到芯片表面的分析物的量与样品中的分析物浓度相关。在**采用标准曲线的测定法**中，利用已知浓度的分析物标准品建立标准曲线，从而建立了结合响应值与分析物浓度之间的关系。这种方法类似于许多其他在用的浓度测定方法。无需标准曲线的浓度测定法（CFCA）是某些 Biacore 机型中所支持的另一方法，由所观察到的扩散限制的结合速率获得浓度，而不使用标准曲线。

利用 Biacore 系统的浓度检测法在 Biacore 浓度分析手册中进行了详细的介绍。

### 2.3.1 采用标准曲线的浓度测定法

采用标准曲线的浓度测定方法可以具体为**直接**或**间接**测定法。

- **直接测定法**测定与传感芯片上配体直接结合的分析物。这种方法适合大分子量的分析物（分子量 > 5000 道尔顿）：更小分子的也有可能直接测定，但这种测定法的有效范围在这些情况下通常有限。**响应信号增强**或**三明治**方法可以用于放大所获得的响应值和 / 或提高测定法的灵敏度。
- **间接或竞争检测法**提供一种间接的分析物浓度测定方法，而且对于低分子量分析物定量最为有用。间接检测法的最常见形式是**溶液内竞争**或**抑制**方法，即将一种已知量的相互作用伴侣（**检测分子**）与样品混合，然后测定保留在混合物中的游离的检测分子的数量。在**表面竞争法**中，分析物与高分子量类似物（通常是蛋白质复合物）竞争结合于传感芯片表面上的一个共同结合对象。在两种竞争检测法形式中，所获得的响应值与样品中的分析物浓度呈负相关。

在采用标准曲线的浓度测定法中，无论是直接或是间接，都依赖于能否使用已知浓度的标准品建立标准曲线。对于未知样品的结果始终要通过参考标准品获得，并且只有在标准浓度是可靠的情况下才

## 2 应用概述

### 2.4 确定结合位点 / 结合位点作图

能获得“真正的”浓度。更详细的讨论可以在 Biacore 浓度分析手册中获得。

#### 2.3.2 无需标准曲线的浓度测定 (CFCA)

无需标准曲线的浓度测定法是基于分析物的扩散性与分析物绝对浓度之间的关系。利用已知的分析物的扩散系数，通过测定在扩散速率部分限制条件下的结合速率能够计算获得分析物的浓度。当无法建立满意的分析物标准曲线时，或非常需要尽可能准确地测定分析物“真实的”浓度时，CFCA 的方法特别有用。无需标准曲线的浓度测定法始终基于直接结合的形式。

要求结合发生在扩散速率部分限制的条件下，限制了 CFCA 的动态范围，并且限制这种方法只能用于大分子的分析（分子量在 5000 Da 以上）。

### 2.4 确定结合位点 / 结合位点作图

通过测试多个结合分子结合于同一大分子时是单独结合还是彼此竞争结合，可以确定大分子上的结合位点（结合位点作图）。两个结合分子分别结合于大分子的不同结合位点将能够同时与该大分子结合，而两者的结合位点重叠或者干扰将在结合中互相竞争。这种分析在抗体特异性的研究中最常见（称为**抗原表位作图**，见图 2-4），尽管它在原则上可以被应用于所有大分子上多结合位点的研究。

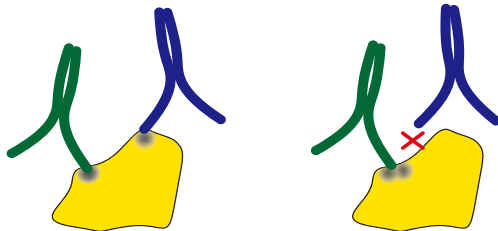


图 2-4. 不同的抗体可以同时结合于截然不同的和空间上彼此独立的抗原表位（左图），但无法同时结合于相同的或重叠的抗原表位（右图）。

可以采用两种完全不同的方法进行抗原表位作图：

- **配对结合检测：**检测一对抗体是否能够同时结合于相同抗原。能够同时结合清晰地表明两个抗体的抗原表位并不是同一个，而彼此干扰结合可能是由于结合到相同或相近的抗原表位，或例如，一个抗体的结合诱发抗原的构象改变造成另一个抗体的抗原表位无法被发现。
- **肽段抑制检测：**检测能代表抗原上特定区域的肽段能否抑制单个抗体与抗原的结合。能够阻断抗体结合的肽段可以代表该抗体的至少一部分物理性抗原表位。

## 3 方法通论

本章讨论 Biacore 系统实验操作方面的注意事项，对各类具体应用都有参考意义。

### 3.1 传感芯片表面

#### 3.1.1 普遍属性

在 Biacore 系统使用的传感芯片由玻璃片和其上涂的金膜组成。除此之外，为产生 SPR 信号还需要对接系统用于在光学系统中置放传感芯片。为研究的分子相互作用提供合适的环境，金膜上覆盖有连接层和经过修饰的葡聚糖基质(大多数传感器芯片类型上)(图 3-1)。

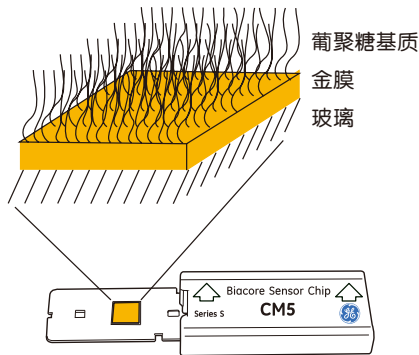


图 3-1. CM 系列芯片上的传感芯片表面的结构示意图。

正是表面上的基质决定了传感芯片在配体固定和分子相互作用方面的性质。

#### 3.1.2 传感芯片类型

GE Healthcare 提供一系列满足不同应用要求的传感芯片，如表 3-1 所列。有关传感芯片类型的详细介绍可以在《Biacore 传感芯片表面手册》和 [www.gelifesciences.com/biacore](http://www.gelifesciences.com/biacore) 上找到。

表 3-1. 传感芯片的特征和应用领域。

传感芯片	特征	用途
<b>CM系列传感芯片（羧甲基葡聚糖表面基质）</b>		
CM5	中等容量	通用
CM7	高容量	高固定量，适用于小分子量分析物分析（不适合蛋白质分析物或捕获应用）。
CM4	低容量（低取代密度）	低固定量，适合动力学研究。可以有助于减少来自混合样品的非特异性结合。
CM3	低容量 （更短的葡聚糖链）	适用于大粒径分析物（病毒或细胞）。 低固定量，适合动力学研究。可以有助于减少来自混合样品的非特异性结合。
C1	芯片表面无葡聚糖基质。芯片表面连接层直接连上羧基。所固定配体的自由度有限。	适用于大粒径分析物（病毒或细胞）。
<b>疏水性表面</b>		
HPA	无表面基质或连接的基团，疏水表面	直接吸附脂单分子层（镶嵌蛋白或纯脂相）。
L1	葡聚糖基质上基团取代为亲脂性残基	捕获完整的脂类颗粒（包括跨膜蛋白）。
<b>用于配体捕获的表面</b>		
SA	链霉亲和素共价连接到葡聚糖基质上	对生物素标记分子的永久捕获
CAP	寡聚核苷酸共价连接到葡聚糖基质上	对生物素标记配体的可逆捕获，由链霉亲和素上连接的互补寡核苷酸与芯片连接。

## 3 方法通论

### 3.2 固定配体

NTA	氨基三乙酸共价连接到葡聚糖基质上	带组氨酸标签配体的捕获
-----	------------------	-------------

## 3.2 固定配体

从广义上讲，有两种主要方法用于将大分子配体固定到传感芯片表面，分别是共价偶联和高亲和力捕获。对这些方法的详细信息可以在《Biacore 传感芯片表面手册》中找到。

### 3.2.1 共价偶联

共价偶联指配体通过化学反应不可逆地连接到芯片表面，一般是通过 CM 系列传感芯片上的羧甲基基团。配体在传感芯片的整个使用寿命中都保持在表面上，并且在每个分析循环后通过再生去除非共价结合的分析物分子。

共价偶联可以利用配体上的氨基、巯基（本身的或改造获得的）或醛基（通过顺二醇的氧化）等官能团。氨基偶联是最广泛使用的方法。

#### 固定配体的条件

在 Biacore 系统中固定于表面基质中用于分析的配体的浓度比一般的溶液本体中的配体浓度高许多倍（在 CM5 芯片上 100 RU 的蛋白固定水平大致相当于溶液本体中 1 mg/ml 的配体浓度，而用于固定的典型的蛋白浓度为 50-100  $\mu\text{g/ml}$ ）。在大多数固定方法中，配体通过**静电预富集**过程被富集在表面上。这要求配体溶液的 pH 低于配体的等电点，以便使配体带有净正电荷，但要高于芯片表面上的**羧基的 pK<sub>a</sub> (3.5)** 以便使芯片表面带负电荷。

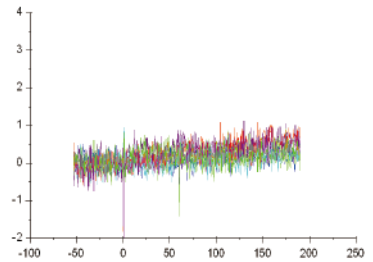
**低离子强度有利于静电相互作用**，一般推荐缓冲液带有 10-20 mM 的总阳离子浓度。

#### 固定配体的化学反应的选择

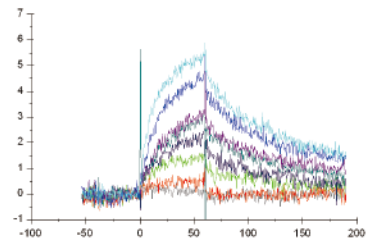
只要偶联化学反应所使用配体上的基团远离相互作用位点，多数的大分子可以作为配体固定于传感芯片表面上，并不会明显干扰所研

究的相互作用。化学反应如氨基偶联针对全部氨基，可能导致芯片表面上的配体分子以不同的偶联位点与芯片连接，形成样品的不均一性；在某些情况下，配体也可能由于偶联反应而造成结合活性的部分失活，但只要存在足够多的活性配体分子就并不会影响互作反应的分析。**特异性更好的化学反应如巯基偶联可以降低固定配体取向的不均一性**，甚至能够准确地确定分子如何被偶联（如果配体只含有唯一的目标基团用于偶联）。

氨基偶联固定水平：10000 RU  
结合活性：未检测到



巯基偶联固定水平：12000 RU  
结合活性：5%



组氨酸标签捕获固定水平：2000 RU  
结合活性：20%

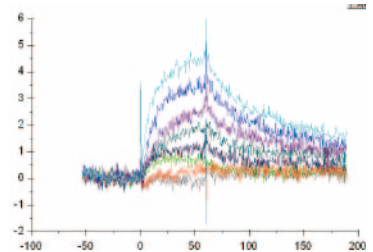


图 3-2. 氨基偶联是最常用的固定方法，但是在这个例子中（一种激素受体的固定）氨基偶联则完全破坏了配体的活性。利用高亲和力捕获获得最好的结合活性。

## 3 方法通论

### 3.2 固定配体

氨基偶联法一般适用于多数的蛋白质配体，也是最方便的固定方法。然而在很多重要实验中，测试一系列不同的偶联化学反应可以获得有价值的结果：图 3-2 阐述了固定一个激素受体的结果，其中氨基偶联获得了完全可接受的固定水平，但通过巯基偶联可以更好地保持配体的结合活性。而使用 NTA 芯片通过高亲和力捕获带组氨酸标签的受体，获得了最佳的结合活性（每固定水平 RU）的结果（通过激素结合测试）。

#### 3.2.2 高亲和力捕获

高亲和力捕获法是指偶联捕获分子，然后通过其与配体的高亲和力结合而固定配体的方法。相比较于共价偶联的方法，捕获方法在以下方面凸显出优点：

- 捕获法不需要对配体做任何化学修饰，且可以在生理缓冲液条件下进行。因此它可以应用于固定不适合使用共价方法偶联的配体。
- 通常对于捕获方法，芯片再生将捕获的配体连同其他结合分子一同去除，留下捕获分子准备用于下一循环去结合新鲜的配体。尽管这个方法增加了配体的消耗，但它避免了配体无法被再生而损坏的可能性，并可以在同一传感芯片上的不同循环间更换配体。
- 在捕获相互作用选择性足够的情况下，可以从混合的样品中捕获固定一个特定的配体。而使用共价偶联的方式固定配体则要求预先纯化。

配体捕获所需的条件取决于捕获相互作用的要求，**捕获通常采用与所研究的相互作用相同的缓冲条件**。然而，捕获相互作用在所采用的条件下足够的稳定至关重要，以便在样品分析过程配体不会发生明显解离。对捕获稳定性的要求根据不同的应用方向而不同，对于动力学和亲和力分析要求是最高的，**因为配体的丢失将导致响应值的下降和芯片表面的分析物结合能力的下降**。更简单的应用如检测和筛选能容许在进样期间的配体更显著的丢失。



### 3.2.3 配体固定水平

在具体应用中，传感芯片表面固定配体时面临的一个问题就是该固定多少配体。在配体固定过程中的所有步骤都被仪器实时监测，而配体的固定量原则上可以由相对于基线的响应值直接得出（图 3-3）。

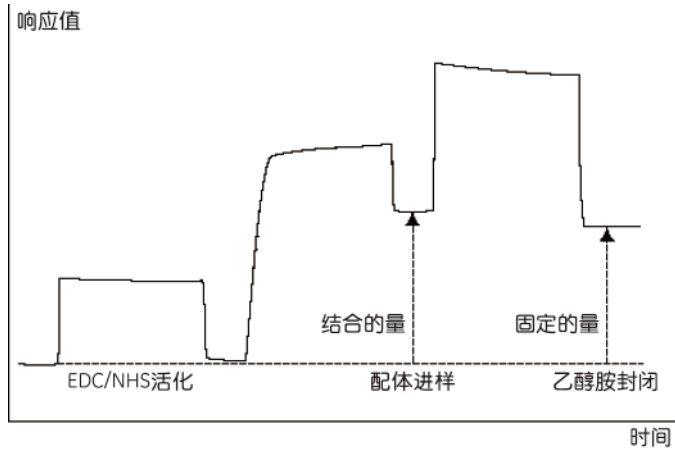


图 3-3. 典型的氨基偶联传感图，显示配体结合的和配体固定的量之间的区别。

**注释：**使用 EDC/NHS 的活化芯片表面可以引起可检测的微小响应值增加。当配体的固定响应值很低时，使用活化后基线值来计算配体固定水平比使用固定程序开始前的基线配体水平更加合理。

然而，在实验设计和表面准备中一个更有意义的参数是分析物结合容量（称为  $R_{\max}$ ，最大结合响应值），因为这将决定分析物样品预期的响应值范围。如果配体和分析物的相对大小已知，由配体在芯片上的固定量（相对响应值增加）可以得知该芯片表面上分析物理论最大结合容量。假设 1:1 结合反应化学计量关系：

$$R_{\max} = \frac{\text{分析物分子量}}{\text{配体分子量}} \times \text{配体固定水平 (RU)}$$

## 3 方法通论

### 3.2 固定配体

实际的分析物结合容量可以通过注射高浓度分析物饱和芯片表面获得（或者通过一系列浓度分析物的结合响应值外推获得）。通过比较理论和实际  $R_{\max}$  值可以计算固定的配体的活性。固定的蛋白质很少有 100% 保持活性的，对于通用的连接方法如氨基偶联，预计活性可以在 70% 左右或以上。

由配体固定过程的传感图形状可以指导选择合适的条件。**请牢记配体最终的固定量要比预富集过程的配体结合的量少。**大多数 Biacore 系统支持一种**目标式的氨基偶联模式，可以通过一针快速的预富集进样所获得的信息来指导固定过程以达到一个指定的固定水平。**

- 蛋白进样期间的传感图斜率和形状能够指示静电预富集的效率。尝试组合使用不同配体浓度与进样时间以便使结合的量达到平台。这将使固定过程更加有效。
- 表面封闭前后响应值水平的相对变化显示了通过静电结合的蛋白转变成共价偶联的效率。封闭过程冲洗掉非共价结合的分子：在封闭后可以观察到相对响应值的下降，但只要足够的配体被固定到表面，这种下降并不影响分析。

如果固定过程基本正常，但是所固定的配体量不适合检测，可调整一个或多个参数：配体浓度、固定 pH、配体进样时间和表面活化时间等。

## 3.3 缓冲液一般注意事项

### 3.3.1 缓冲成分

通常，Biacore 系统与大多数生物学研究中所使用的缓冲成分兼容。只是由于某些互作分子的特殊性质或者在一些情况下不能使用某种缓冲液成分（例如由于 Tris 中的伯氨基团，在氨基偶联固定配体的过程中不能使用 Tris）时存在例外。

HEPES (2- 羟乙基 -1- 哌嗪乙烷磺,  $pK_a$  7.55) 是一种适用于许多蛋白 - 蛋白相互作用的理想缓冲成分, 现有商品化的 10 mM HEPES 缓冲液与 Biacore 系统配套一起使用。

磷酸盐缓冲液通常更适合用于小分子分析物, 这是因为有机缓冲成分如 HEPES 能够与配体结合并干扰低分子量化合物的准确检测。

### 3.3.2 离子强度

推荐在缓冲液中包含生理水平的离子强度 (含有 0.15 M 单价阳离子), 除非所研究的相互作用有其他要求。降低离子强度将更有可能发生样品中分子与传感芯片表面间的非特异性静电结合。如果发生非特异性结合的问题, 则可能需要尝试更高的离子强度。

### 3.3.3 添加剂

#### 表面活性剂

推荐在所有缓冲液中包含非离子型表面活性剂 (0.05% 表面活性剂 P20、Tween™ 或类似物) 以尽量减少蛋白质和其他生物分子在流动系统中发生沉淀的可能。包含的表面活性剂浓度应该在临界胶束浓度 (CMC) 以上。表面活性剂在较低的浓度时, 其本身可以聚集在流动系统中, 随着它的释放可能导致不必要的响应影响。

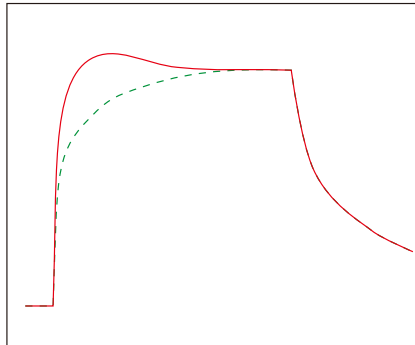


图 3-4. 使用浓度低于 CMC 的表面活性剂所导致的典型的“表面活性剂效应”示意图。作为比较虚线为未受干扰的传感图。

## 3 方法通论

### 3.3 缓冲液一般注意事项

一些应用需要缓冲液中不包含表面活性剂，特别是那些涉及脂类囊泡和/或疏水性蛋白的应用。在这种情况下，为了确保持续的高性能，必须使用系统所提供的适当的维护工具对流动系统进行定期地、仔细的清洗。不合格的仪器清洗能够产生难以解释的严重干扰的传感图。例子如图 3-5 所示。

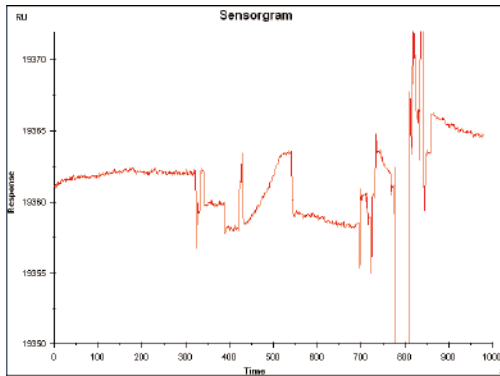


图 3-5. 仪器维护不当（清洁不够）所带来的严重后果。

#### EDTA

GE Healthcare 生产的 HBS-EP 和 HBS-EP+ 通用型缓冲液包含 3 mM EDTA 以去除可能存在于缓冲液中的微量游离二价金属离子。这是一个常规的预防措施而非 Biacore 系统特别要求。GE 也有提供未添加 EDTA 的缓冲液，如 HBS-N 缓冲液。

#### 非特异性吸附 (NSB) 弱化剂

在样品中添加 NSB 弱化剂（一种可溶性的羧甲基葡聚糖的制剂），一些情况下能够有助于降低样品组分与传感芯片表面上的葡聚糖基质间的非特异性结合。推荐的 NSB 弱化剂浓度是 1 mg/ml。只有当非特异性结合成为问题时才会采用 NSB 弱化剂（一般与混合样品一起使用，如血清或全细胞提取物）。

#### 有机溶剂

许多低分子量有机化合物，特别是制药研发工作中的化合物，在水

相缓冲液溶解性较低，因此需要添加有机溶剂促溶，一般使用二甲基亚砜（DMSO）。Biacore 系统可以使用含有最高达 10% DMSO 和 10% DMF 的缓冲液。然而，有机溶剂能够显著地改变样品和缓冲液的本体折光率：1% DMSO 大约会带来 1200 RU 的响应值水平。而通常需要有有机溶剂促溶的低分子量分析物的预期响应值可能低至 10-20 RU 或更低。因此，在测量结合响应的时候非常关键的就是准确地扣补掉样品中有机溶剂浓度的任何差异。扣补有机溶剂浓度差异对样品响应值的影响的过程被称为**溶剂校正**，这在附录 B 中进行了大致介绍，在支持溶剂校正的 Biacore 系统文件有详细介绍。

### 其他添加剂

避免使用能够影响固定配体的偶联反应的添加剂，例如叠氮钠影响氨基偶联反应。即使在低浓度下，叠氮钠也可以有效地阻止蛋白质的氨基偶联。

### 3.3.4 缓冲液配制

所有缓冲液在使用前都必须经过过滤和脱气（如果设备内置在线脱气可以不提前脱气，但必须过滤）。流经芯片表面的颗粒和微小气泡通常会在传感图上造成尖峰（Spike）。保留在表面上的气泡或颗粒能够导致响应值更长期的偏移（图 3-6）。

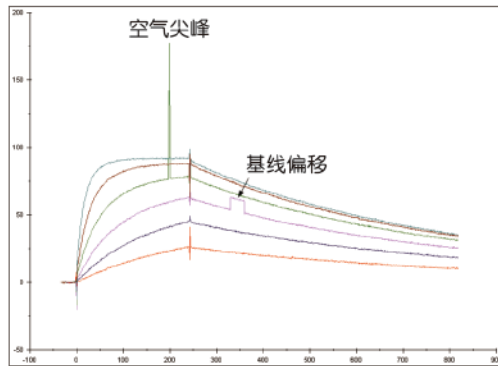


图 3-6. 空气尖峰和瞬时的基线偏移通常是由于运行缓冲液脱气不彻底造成。

### 3 方法通论

#### 3.4 样品与运行缓冲液的折光率匹配

##### 过滤

缓冲液应该通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤以去除颗粒。

血清或血浆样品应该通过离心或过滤以去除聚集的物质，特别是如果样品曾经被冷冻过。

##### 脱气

在使用前对运行缓冲液进行脱气，除非你使用配有在线脱气装置的 Biacore 系统。或者使用 GE Healthcare 的已经脱气的即用型缓冲液。

永远在加入表面活性剂前对缓冲液脱气以避免起泡泡。

### 3.4 样品与运行缓冲液的折光率匹配

#### 3.4.1 匹配折光率

样品与运行缓冲液之间的折光率的差别导致在进样开始和结束时传感图上发生所谓的本体偏移 (Bolk shift)。这种本体偏移根据折光率的差别可以是负的或是正的 (图 3-7)。

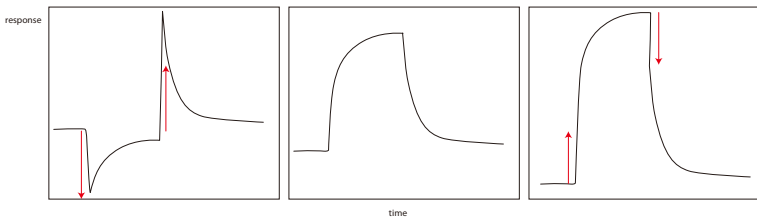


图 3-7. 本体偏移示意图：负的（左图）、零（中间）和正的（右图）。

一些应用如浓度测定和某些情况下的筛选依靠单点测定（报告点），可以将报告点放置在进样结束之后，避免本体偏移的影响，因此没必要对样品和运行缓冲液进行准确匹配（图 3-8）。

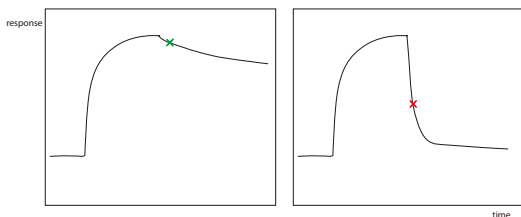


图 3-8. 如果解离足够缓慢，可以由放置于进样结束后不久的报告点评估结合水平（左图）。然而，如果解离很快（右图），在这个位置的报告点将不能可靠地反映结合水平。

相反，依靠测定样品进样阶段的响应值的应用需要解决本体响应值的问题。仔细地匹配样品和运行缓冲液的折光率可以有效地消除本体偏移，但仅依靠精确的匹配也不完全切合实际。假如本体偏移相对于所测定的分析物结合响应值相对较小，通过扣除参比通道的响应值通常就可以满意地解决本体偏移问题。然而，对于本体偏移很大而预计的结合响应值很小时则需要采用称为溶剂校正的专门措施（通常涉及低分子量有机分析物的检测，例如药物开发中筛选潜在的候选药物）。具体内容在附录 B 中进行了详细地介绍。

一些时候很难匹配样品和运行缓冲液的折光率，例如分析血清这样未纯化的样品时。在这种情况下一定要在样品进样结束后进行测定，以避免本体偏移效应。

### 3.4.2 匹配缓冲液成分

对于动力学分析来说即使不考虑本体响应值偏移的问题，匹配样品与运行缓冲液的溶液成分也十分重要，因为解离信息包含在样品进样过程和样品进样之后的传感图内。对于正确的动力学分析，非常有必要确保在进样过程的解离反应和进样之后的解离反应发生在相同的环境中。

### 3.4.3 实践中如何匹配折光率

根据原始样品的形式，可以采取多种方法匹配样品和运行缓冲液。

## 3 方法通论

### 3.5 梯度稀释和样品重复

- 样品浓缩为足够高浓度的母液，可以用运行缓冲液稀释以使母液中其他成分浓度稀释到可以忽略。最小的稀释倍数取决于母液中成分的情况以及对该分析中缓冲液匹配要求的严格程度。
- 缓冲液置换技术如脱盐柱或透析通常是最有效地匹配样品和运行缓冲液的方法。缓冲液置换对样品稀释倍数基本很小，而且市售的解决方案如微型离心层析柱可以快速制备小体积样品。
- 固体样品可以使用运行缓冲液稀释；如果有不溶物质残留的可能，则采用过滤或离心样品。不过你要了解到市售的固态的蛋白质样品包含了大量的盐或其他起稳定作用的介质。这时，用运行缓冲液溶解固态样品不能保证样品的成分或折光率与缓冲液会匹配。

### 3.5 梯度稀释和样品重复

本节中的建议基本都是实验室操作的标准要求，而罗列于此的目的是作为一种着重提醒，因为在不少情况下这些细节对于实验的成功至关重要。

梯度稀释在 Biacore 系统的许多应用领域中起重要作用：例如，动力学和亲和力测定需要对一系列浓度的分析物进行分析，而采用标准曲线的浓度测定方法通过梯度稀释建立标准曲线，并用于考察诸如平行性在内的一些性能指标。在许多情况下，测定重复样品来评估重复性是检测方法设计中应考虑到的一部分。如何操作和分析梯度稀释和样品重复会对结果产生重要影响。

#### 3.5.1 梯度稀释

在梯度稀释操作中可能会有不同的误差来源，哪种方法最好取决于可用的设备，样品的体积以及该实验对准确度要求程度。

可靠的移液器对于通过体积比来实现梯度稀释是非常必要的。在可能的情况下（尤其是对于小体积样品），始终采用等体积吸取样品来建立梯度稀释，可以避免由于不断改变可调型移液器的移液体积所带来的误差。



可以使用两种基本的方法：

- 连续稀释：每个浓度的稀释样品都作为下一步稀释的母液。
- 平行稀释：始终使用同一个浓度的样品母液，只是吸取不同体积的缓冲液与之混合。

使用固定的相同体积的移液器来吸取样品和缓冲液能够提供最佳的稀释准确度（虽然并不能保证绝对体积分的准确度）。如果使用具有不同移液误差的不同移液器，稀释误差在随着稀释倍数增加而累积，这时连续稀释将产生比平行稀释更加显著的误差。然而，连续稀释操作更加简单，采用固定体积的移液器可以减少操作，因此平行稀释更容易受到重复性误差的影响。

为了在梯度稀释时获得最佳的准确度，可以通过称重来确定样品和缓冲液的体积，并为不同样品计算各自的稀释比。这就避免了吸取体积的校正准确度和重复性方面的问题。

### 3.5.2 样品重复

测定重复样品以评估一种检测法的重复性应该是所有实验室操作中的一种标准步骤，但对于如何制备和测量重复样品才能提供最有用的信息并不总是很清楚。重复性检验可以覆盖从初始样品到最终结果评估的整个检测过程，或者它可以集中于一个或多个特定检测环节。不同的检测方法对如何检验重复有不同的要求。

应该根据下列普适性指导意见准备和检验重复样品，用以检测 Biacore 检测法的重复性：

- 在样品准备过程某一个明确的阶段采集重复样品，并要清楚要测试哪个参数的重复性。例如，从某个浓度样品的相同管中取出重复样品将评估检测方法本身的重复性，而由共用的母液制备多管同一浓度的样品将测试包括移液和稀释操作在内的整个实验的重复性。
- 检测时尽量将重复的样品放置在单独的小瓶或微孔板的单独孔，以使得每个取样位置只取一次样。不推荐从相同的进样位置进行

## 3 方法通论

### 3.6 样品瓶和微孔板

多次进样，因为已经取过样刺穿的小瓶或孔会发生蒸发，从而影响分析物浓度。

- 在检测中应当将重复样品保持一定合适的间隔（间隔几个循环），以评估检测性能随着时间的变化趋势。在许多检测方法中，可以通过重复测定对照样品来评估这种变化。然而，在某些情况下（例如动力学和亲和力分析），可以通过重复几个浓度的样品来实现这一目的。

### 3.6 样品瓶和微孔板

样品和试剂可以放置在样品架或微孔板中然后加载到 Biacore 仪器中（根据特定型号的具体要求）。通常在实验开始前将整个检测的所有样品全部加载。如果样品有随着时间而沉淀的趋势，需要注意排在最后分析的样品可能会在自动进样器中放置几个小时。

要小心使用随着时间可能会沉淀或聚集的样品（例如接近溶解度极限的低分子量有机化合物）。

样品准备好后要尽可能快地密闭样品，并且在检测期间要保持密闭以避免蒸发。要使用始终来自 GE Healthcare 为 Biacore 专用的瓶盖和微孔板薄膜来密闭样品。自动进样针可能不能很好地穿透来源于其他公司的瓶盖或铝箔，导致检测失败甚至损坏进样针。当用薄膜密封微孔板时，确保正确放置薄膜以便确保每个孔覆盖在无粘合剂的区域。如果薄膜被错误地放置，粘合剂可能会堆积在进样针上并引起堵塞。

## 4 筛选和检测结合对象

基于 Biacore 系统的筛选能够应用于两个不同领域，两者在实验难度和实验设计方面具有显著的差异：

- 小分子（Low molecular weight, LMW）筛选，其结合响应水平很低而且通常需要使用有机溶剂来保持分析物的溶解性。这些相互作用通常很快，且不需要再生。
- 生物药物（常见的是抗体）筛选，其结合响应水平更高，但是样品基质（细胞培养物上清或细胞抽提物）通常更复杂。这些相互作用通常更慢。如果使用捕获的方法则可以简化再生步骤。

随后的章节详细地介绍筛选、动力学 / 亲和力和结合位点确定。浓度测定在单独的一本手册中进行讨论（Biacore 浓度分析手册）。

表 4-1. 总结了用于 LMW 和抗体筛选的主要实验条件。

表 4-1. 用于 LMW 和抗体筛选的主要实验条件。

	LMW筛选	抗体筛选
缓冲液	磷酸盐	HEPES 缓冲液
添加剂： - DMSO - 表面活性剂	是（1 到 10%） <sup>1</sup> 是	无 是
流速	通常为 10 µl/min	通常为 10 µl/min
进样时间	15 到 30 秒	1 到 2 分钟
报告点	在样品进样结束前	在样品进样结束后
再生	通常不需要	通常需要

<sup>1</sup> 推荐 2%，除非需要更高浓度以保持物质的溶解性。

第三个相关的应用领域是免疫原性测试，包括测定血浆或血清样品中的抗药物抗体（ADAs）。这种情况下，样品中同时存在 ADAs 和药物对检测提出了特殊的要求。

## 4 筛选和检测结合对象

### 4.1 小分子筛选

#### 4.1 小分子筛选

##### 4.1.1 目的

在药物研发中小分子筛选的主要目的是根据候选药物与所选的靶分子之间的结合来发现能够适于进一步开发的药物分子结构。这个工作的第一阶段通常是筛选化合物库或片段库，以发现有希望的结合物用于进一步的开发和优化。Biacore 系统提供除了有 / 无结合以外多种有意义的数据，可以实现基于多类信息的筛选。这些信息包括比较与多个靶点的结合以发现无差别，杂乱结合（promiscuous binding）的候选化合物（对这种候选物并不感兴趣）。而对结合动力学和亲和力性质的评估信息随着候选化合物的不断优化而愈发重要。

##### 4.1.2 配体的固定

因为分子量较小，LMW 分析物从本质上只能产生很低的结合响应值。此外，LMW 分析物的结合亲和力通常很弱（尤其是对于片段筛选），这进一步降低了预期的结合响应值水平。为此，LMW 筛选实验通常进行高固定水平的配体固定（对于平均大小的蛋白质一般为 8000 到 10000 RU）。

准确地估算固定配体的活性需要进样高浓度的分析物以饱和结合表面，尤其是对于弱结合分子（片段一般为 0.1 到 2 mM，LMW 化合物一般为 0.05 到 2 mM）。如果有合适的的阳性对照样品，则需要通过检测阳性对照的结合响应来测试配体的结合活性，这一点非常重要。

##### 4.1.3 样品制备

在小分子筛选的第一阶段，通常将小分子溶于相同的缓冲液，并稀释到相同浓度进行分析。通常不需要优化浓度或缓冲条件。

许多有机小分子化合物在缓冲水溶液中溶解度较低，要求在缓冲液中添加有机溶剂（一般为 1% 到 3% 的 DMSO）以保证溶解性。DMSO 有高的折光率（1% DMSO 有大约 1200 RU 的响应值），因

此既需要对样品和运行缓冲液的 DMSO 含量仔细匹配，又需要对 DMSO 浓度的微小差异进行校正（见下文）。

#### 4.1.4 缓冲液

对于小分子一般推荐使用磷酸盐缓冲液。有机缓冲液如 HEPES 有可能结合于配体而干扰小分子有机化合物的准确检测。应该使用生理离子强度（150 mM 单价阳离子）以减少化合物与传感芯片表面的非特异性结合，而且通常添加表面活性剂（0.05% 表面活性剂 P20），以减少信号漂移和扰动，提高数据质量。

运行缓冲液和样品缓冲液的成分必须尽可能地匹配，特别是有机溶剂浓度的匹配。然而，由于挥发和吸水导致的样品之间 DMSO 含量的差异是难以避免的。校正样品间本体折光率差异的操作被称为**溶剂校正**，在附录 B 中进行介绍，在多数 Biacore 型号中都可以实现。

#### 4.1.5 检测条件

##### 流速

对于 LMW 筛选通常采用低流速（10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ）以节省样品。这类应用并不涉及物质迁移限制（第 A.1 节）和快速结合反应的分辨率这类问题。

##### 进样时间

大多数涉及小分子的相互作用都很快，只需要短的进样时间（30 到 60 秒），以提高筛选通量。

##### 再生

在 LMW 筛选中一般不需要再生，因为解离很快，通常在 1 分钟左右内完成。

##### 报告点

因为许多 LMW 化合物从靶点上解离非常迅速，用于筛选分析的报告点应该被放置在进样结束之前。LMW 化合物有时候快速结合到

## 4 筛选和检测结合对象

### 4.1 小分子筛选

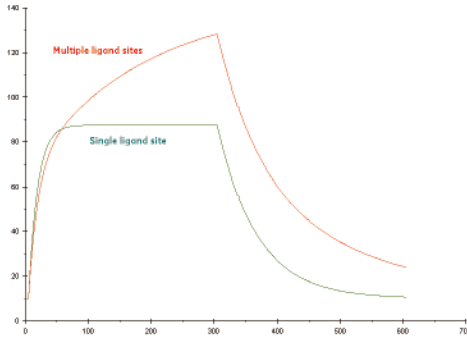


图 4-1. 模拟传感图说明 1:1 结合（深绿色），以及结合到一个特定位点，紧接着较缓慢和非特异的结合（红色）。

特定位点，紧接着是较为缓慢和非特异的结合（图 4-1）。将报告点放置在进样早期能够降低这种现象的影响，并且为小分子的特异性结合能力提供更加准确的信息。

#### 其他注意事项

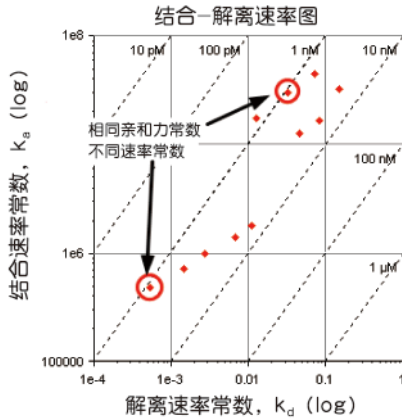
一些 LMW 化合物比较“粘”，很难从传感芯片表面被洗掉并冲出流路系统，导致化合物残留到下一个分析循环。是否残留可以通过每次进样后利用“残留物检测（Carry-over injection）”的操作，即快速流过缓冲液来判断：“粘性”化合物将被快速流过的缓冲液带走而产生响应值。在每个分析循环后包含一次利用 50% DMSO 冲洗流路系统（Extra wash）以尽可能减少粘性化合物带来的问题。如果筛选实验中一些化合物已知是粘性的，把它们安排在筛选的最后以避免干扰其他化合物或从实验中完全排除它们。

#### 4.1.6 分析结果

最基础的层面上，小分子筛选应该比较分子量校正过的结合响应值，并且设置界限值，高于这个值可视为显著的结合水平。可以通过已知的非结合物（阴性对照）的结合响应值来设定这个界限值，或根据结合水平的分布来设定这一界限值。

一种有效的比较动力学性质的方法是将结合速率常数对解离速率常

数作在同一张图上（对数坐标轴）。这个图中的对角线表示代表相同的亲和力，因此位于同一条对角线上但相互分开的化合物具有相同的亲和力，但有不同的动力学性质（图 4-2）。



**图 4-2.** 结合速率常数  $k_a$  对解离速率常数  $k_d$  作图（这里是对数轴），对角线代表相同的亲和力。位于同一条对角线上的化合物具有相同的亲和力，但动力学性质不同。

为了鉴定和表征感兴趣的片段，基于片段的筛选需要其他的实验设计和分析步骤。推荐的方法概括起来是：

- 清库筛选（Clean screen），目的是发现和排除持续地结合于芯片表面并可能干扰后续的分析循环的不良“粘性”化合物。
- 结合水平筛选（Binding level screen），旨在对化合物库的快速筛选，发现结合水平在界限值以上的化合物。
- 亲和力筛选（Affinity screen），目的验证结合并对片段的亲和力排序。

这些方法在支持片段筛选的 Biacore 系统的手册中进行了更详细地介绍。

## 4 筛选和检测结合对象

### 4.2 抗体筛选

## 4.2 抗体筛选

### 4.2.1 目的

抗体筛选的目的是发现能产生符合某种要求（通常是生物药物或生物化学工具）的抗体的细胞克隆。筛选速度要快以便使克隆在生长到不合适的细胞密度前就能被挑选出来。Biacore 的一个显著的优势就是在早期筛选中就能获得动力学信息。通常需要的信息包括：

- 哪些克隆能够产生具有合适的特异性的抗体
- 哪些抗体具有符合特定要求的动力学和 / 或亲和力性质
- 哪些克隆的抗体产量能够达到要求

### 4.2.2 配体固定

与小分子化合物筛选不同，在抗体筛选中预计的结合响应值可以是非常高的，因此配体无需高固定水平或捕获水平。通常使用通用的抗抗体如 anti-IgG (anti-Fc) 将抗体固定于传感芯片表面，这样检测条件（包括再生条件）无需再摸索。在捕获抗体后进样抗原来分析抗体的结合性质。也可以在芯片表面直接固定抗原作为配体，而对抗体进行直接的筛选，但这种方法通常需要额外的工作来摸索再生条件。

### 4.2.3 样品制备

用于抗体筛选的样品一般取自细胞培养物上清，而且未经纯化直接用于分析。在预实验中利用空白克隆来确定不存在与抗原发生的明显结合的非抗体组分，可以简化对结果的解释。

### 4.2.4 缓冲液

推荐使用 HBS-EP+（含有 0.3 mM EDTA 和 0.05% 表面活性剂 P20 的 Hepes 缓冲生理盐水，由 GE Healthcare 提供）或类似缓冲液作为运行缓冲液。如果需要，样品可以用相同的缓冲液进行稀释。样品与运行缓冲液的完全匹配对于筛选工作来说很难实现。



### 4.2.5 检测条件

#### 流速

如果样品消耗是个问题，采用捕获方法的抗体筛选可以以低流速运行（一般为 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ）。但在抗体 - 抗原结合表征中，无论是直接固定抗原还是采用捕获抗体的方法都应该以中等流速运行（一般为 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ ），以降低物质迁移限制（见第 A.1 部分）。

#### 进样时间

应该保证足够的进样时间以产生满足测量的响应值水平，同时不影响筛选通量。通常 1 到 2 分钟的进样时间就够了。

#### 再生条件

对于 GE Healthcare 的抗体筛选试剂盒，其再生条件在使用说明书中有详细说明。对于自己开发的抗体检测方法，通常低 pH 的再生条件（甘氨酸 -HCl，pH 1.5 到 3）是有效的。

#### 报告点

对于抗体筛选，把报告点放置在进样结束后不久的位置。这将避免样品和运行缓冲液之间的任何本体折光率差异。

基于复合物稳定性（解离速率）的抗体表征需要在抗体 - 抗原相互作用解离阶段的早期和晚期都放置报告点。

### 4.2.6 分析结果

使用捕获方法的筛选，第一步的捕获水平可以指示样品中抗体相对浓度（也取决于捕获分子的特异性）。由进样抗原获得的响应值反映了抗原的特异性和抗体的结合性质。然而请注意单独根据报告点并不能获得确切的信息：同一响应值可能是由于高浓度但慢结合的抗体，也可能是低浓度但快结合的抗体。通过观察传感图形状有可能区别这两种情况，但是如果结合和解离反应很快，两种情况都可能产生非常类似的传感图（见图 4-3）。

## 4 筛选和检测结合对象

### 4.3 免疫原性检测

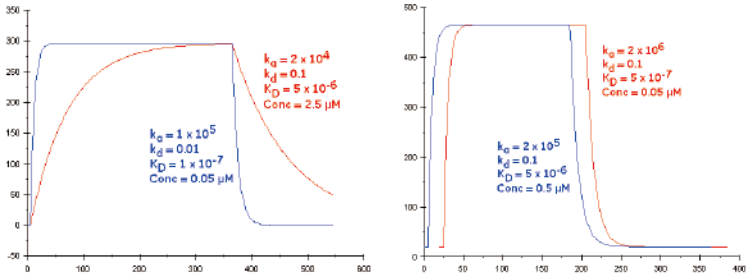


图 4-3. 在一些情况下，观察传感图形状能够区分弱和强结合物，即使由于浓度不同而达到相同响应值（左图）。另外的情况下，根据速率常数和浓度的相对大小，传感图形状可能是相同的。传感图通过模拟获得：右图中的传感图在时间轴上略有移位以便比较。

多数情况下，在抗体克隆筛选中最感兴趣的参数是抗体 - 抗原复合物的稳定性，它主要受解离速率的控制。通过比较解离阶段的早期和晚期的响应值能够提供快速获得相对解离速率的信息。

### 4.3 免疫原性检测

#### 4.3.1 目的与难点

免疫原性检测回答了所给的药物是否在接受者体内引起足以降低药效的免疫反应。在基础层面上，这个应用类似于在血清中筛选抗体。所以对筛选的建议也适用于免疫原性测试，只是在芯片上固定的是药物分子。然而，药物与血清中循环的抗药物抗体（ADAs）同时存在的事实造成了一个特殊的难题：ADAs 与药物形成复合物后将无法再与药物分子结合而被检测到。

在酸性条件下（pH1 到 2）ADAs 从药物复合物中释放。如果样品被中和后马上进行检测，ADAs 可以在复合物有机会重新完全形成之前被检测到。在一些配有免疫原性检测模块的 Biacore 型号中，使用专门设计的 IFC 可以在样品流过传感芯片表面后立即对酸化样品进行中和混合。这种方法在支持免疫原性检测的型号的手册中进行了详细介绍（例如 Biacore T200 免疫原性手册）。

## 5 动力学和亲和力测定

---

### 5.1 方法

动力学和亲和力的测定需要检测梯度浓度的分析物。利用相关描述相互作用机制的数学模型拟合所得到的传感图可以获得动力学（速率）常数；亲和力常数可由稳态时的结合水平获得，也可以由速率常数的比值计算获得。有关数据分析原理的详细信息可参见附录 A。

#### 5.1.1 单循环和多循环动力学

有两种方法可用于动力学和亲和力的测定，两种方法都是基于检测多浓度的分析物（一般为 5 个浓度）的结合数据（见图 2-2）：

- 多循环动力学：每个循环只分析一个浓度的样品，在两个循环间对芯片表面进行再生。由于需要整合分析所有浓度下的结合数据，在多循环动力学中对再生条件进行优化十分重要，以确保各个循环间的芯片表面性质一致。
- 单循环动力学：在一个循环中完成所有浓度的样品的进样和分析，两次样品进样之间不需要再生。

两种方法都已经在 Biacore 系统中进行测试表明能够获得相同的结果。而且只要样品进样时间足够长达到稳态，两种方法都可以被用于稳态亲和力测定。

单循环的方法完成一次分析需要更少的时间，而且具有不需要摸索优化再生条件的优点。这可以显著降低检测法开发上的要求，并能够用于无法找到合适再生条件时的相互作用动力学测定。然而，在单循环动力学测定中循环时间更长，因此这种方法对信号漂移（例如在捕获法中配体的解离）更加敏感。

#### 5.1.2 二对二动力学 (2-over-2 kineticiss)

如果配体状况在多浓度进样过程中没有变化的话，通常都是所有的分析物都流过同一传感芯片表面进行分析。然而在 Biacore A100 和

## 5 动力学和亲和力测定

### 5.2 固定配体

Biacore 4000 系统中，分析物样品可以平行流过每个流动池中的多个配体点，从而可以实现一种称为二对二 (2-over-2) 动力学的技术。这是指测定两个浓度的分析物与两个不同密度的配体的结合，在支持不同通道固定不同密度的配体的 Biacore 系统都可以用单循环方式来进行二对二动力学分析。

综合来自两个不同密度的配体的结合数据弥补了分析物浓度数量的缺少，而且这种方法可以使实验在保证适当高样品通量前提下同时获得可靠的动力学数据。

#### 5.1.3 动力学和亲和力差别的估算

对于一些应用只需要比较相互作用动力学的相对数值即可。简单来讲，只使用单一浓度的分析物，通过对样品进样阶段早期和晚期的响应值比率（结合速率）以及解离阶段早期和晚期的响应值比率（解离速率）作图就可实现。这种简化的方法有时候被用于基于多种信息的筛选工作中，这种情况下由于通量的原因进行详细完整的动力学和 / 或亲和力的测定很不现实。

### 5.2 固定配体

#### 配体固定水平

在动力学和亲和力常数的测定中，配体的浓度表达为共振单位 (RU)。因此配体的准确固定量不一定需要知道（见附录 A）。然而，固定水平对于结果的质量十分重要。

对于动力学分析，配体的固定量应该保持在较低水平，以使得分析物结合的最大响应值一般在 30 到 50 RU 甚至更低的范围。这主要有两个原因：

- 低配体固定水平有助于减少物质迁移的限制。物质迁移是指分析物分子从溶液本体向芯片表面的供应受到扩散速率的限制。如果迁移速率相对于结合速率很慢，则测量到的结合过程将只反映扩

散的过程，而不是分子相互作用的过程。物质迁移在附录 A 中进行了详细地讨论。

- 低配体固定水平也有助于尽可能减少由芯片表面分子拥挤造成的假象。拥挤效应难以定量描述，但能够造成不必要的复杂的结合行为。

对于稳态亲和力测定不需要考虑物质迁移限制，配体固定量可以高于动力学分析。

### 参比通道

动力学和亲和力测定应该始终使用扣减参照后的数据。参比通道可能是空白的、活化 - 封闭过的，或者用一种不具有结合活性的蛋白以模拟配体通道（Dummy Ligand，伪装配体）的物理性质。这些方法在 Biacore 传感芯片表面手册中进行了更详细地讨论。

## 5.3 缓冲液

样品和运行缓冲液必须使用相同的缓冲液，以便使结合（进样阶段）反应和解离反应（在进样结束后）发生在相同的环境中。此外，匹配样品和运行缓冲液之间的折光率，可以使进样开始和结束时的本体偏移保持在尽可能小的水平，让动力学的分析更加可靠。

缓冲液匹配对于稳态法亲和力测定没有动力学那么重要，因为数据分析只是基于进样期阶段测定的响应值。而溶液本体响应的影响将在稳态响应值对分析物浓度的散点图中体现为截距（图 5-1）。但有必要保证本体效应对各个样品的影响是一样的，以便使截距保持不变。

## 5 动力学和亲和力测定

### 5.4 样品制备

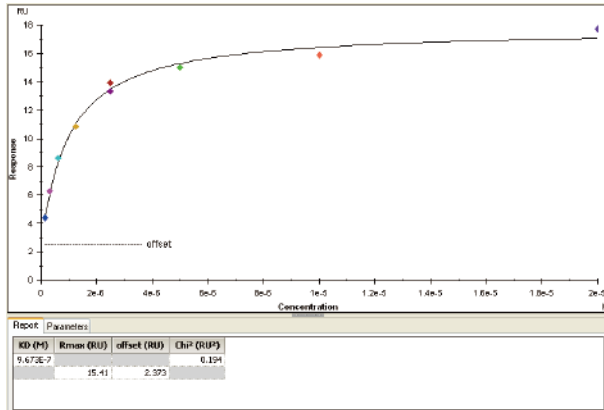


图 5-1. 稳态响应值对分析物浓度的散点图。截距反映了本体效应。

### 5.4 样品制备

样品的制备是影响动力学测定质量的一个关键因素。在理想情况下，配体和分析物两者都应该是高纯度的、性质均一的，以尽可能简化对结果的解释。使用捕获方法固定配体可以实现芯片上的在线纯化，然而必须小心确保捕获作用足够稳定，以便在样品分析期间配体不会由捕获分子上解离下来。样品组分与传感芯片间的非特异性结合应维持在最低限度。分析物必须保持均一且不产生聚集，因为不同大小的结合反应物将产生不同的响应值。应该利用非变性分析方法检测分析物的均一性。

分析物样品可以用运行缓冲液稀释母液的方法获得，但必须保证稀释倍数足够高，以使得残留的母液组分可以忽略不计。另外，可以使用缓冲液置换技术来制备样品。

### 5.5 样品浓度

从实验数据中分析获得结合速率常数和亲和力常数直接依赖于分析物浓度值（详情见下文）。出于这个原因，分析物浓度应采用尽可能

能准确的测定方法以获得正确的数值。理想情况下，这应该是能够与配体相互作用的活性分析物的浓度，可能与总浓度有差异（例如，分析物只有部分具有活性）。无需标准曲线的浓度测定方法（见 2.3.2 节）提供了一种直接测定能与配体结合的分析物的浓度的方法，推荐在高质量要求的测定中使用。如果对分析物浓度值的正确性存在疑问，则对于结合速率常数和亲和力常数的结果数值应该谨慎甄别，而解离速率常数并不依赖于分析物浓度。

### 分析物浓度范围

理论上，动力学常数可以通过对测定单一浓度的分析物获得，但实践中采用多个浓度的分析（对于多循环动力学需要 5 到 8 个浓度，对于单循环动力学需要 5 个浓度）为发现实验数据与最简单相互作用模型的偏离，以及为发现那些浓度依赖型的实验假象提供更好的依据（例如分析物随着浓度的提高发生聚集）。理想情况下，浓度应该覆盖解离平衡常数  $K_D$  上下较广的范围（例如，对于一个具有  $K_D = 10 \text{ nM}$  的相互作用，选择 1 到 100 nM 的浓度比较合适）。在实际中， $K_D$  值通常是未知的，而且浓度范围可能受到分析物的消耗量和溶解度的限制。通常，一个浓度范围如果能够让结果传感图具有合适的分布就足够了（图 5-2）。

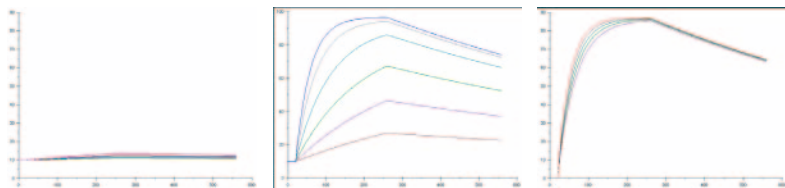


图 5-2. 在动力学分析中，分析物浓度应该覆盖较宽的范围（中间插图）。如果浓度范围集中于过低（左图）或过高的区间（右图）则传感图的分布将过于紧密以至于数据分析的稳健性降低。三幅模拟传感图的垂直刻度是相同的。

对于稳态法亲和力测定，每个浓度的分析物在实验数据图上只贡献一个点。而动力学分析则是记录每个浓度的分析物全部相互作用过程的响应值。因此，在稳态亲和力测定中使用足够数量的分析物浓

## 5 动力学和亲和力测定

### 5.5 样品浓度

度尤为重要（建议最少为 5 个浓度）。此外，浓度范围应该延伸至亲和力常数 ( $K_D$ ) 值的两倍以上。如果不能满足这些条件，在  $R_{eq}$  对  $C$  的散点图中将不能包含足够的点来获得可靠的结果。而且，如果结果  $K_D$  比最高分析物浓度的一半高的话，应该特别谨慎（图 5-3）。

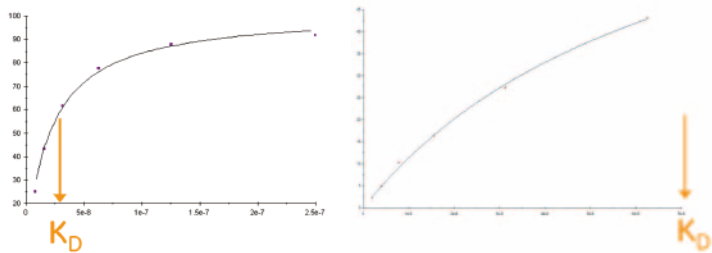


图 5-3. 对于稳态亲和力测定，分析物的浓度范围应该覆盖超过两倍的  $K_D$  值（左图）。不要相信高于最高分析物浓度一半值的亲和力常数结果（右图）。

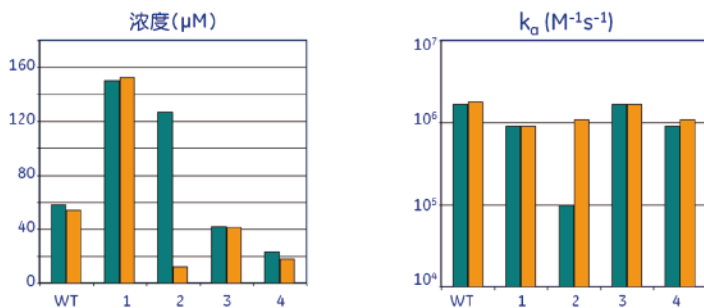
#### 分析物浓度的绝对值

对于简单的二元相互作用，其结合速率常数具有  $M^{-1}s^{-1}$  单位（见附录 A），而且必须由软件提供分析物的摩尔浓度来完成动力学分析。同样，稳态亲和力测定需要输入分析物浓度。如果要获得正确的速率常数，那么输入准确的分析物浓度至关重要。不正确的分析物浓度值将直接导致错误的结合速率常数  $k_{on}$ 。

动力学测定需要分析梯度浓度的分析物，通常是由母液通过连续稀释获得。使用精确校准的设备和采用仔细周详的样品制备步骤才有可能获得准确地浓度数值。

除了准确的样品制备外，正确的母液浓度值也十分重要。理想的值是指能够与固定的配体结合的分析物的浓度值，这可能与总分析物浓度并不相同。如果一半的分析物分子处于不能结合的构象状态，那么用于结合动力学分析的浓度值应该只是总浓度的一半。通过无需标准曲线的浓度测定方法 (CFCA) 恰恰可以提供这种理想的数值：它代表能够相互作用的浓度，并且不需要建立标准曲线。图 5-4 显示了使用正确的分析物浓度的重要性。





**图 5-4.** 使用正确的分析物浓度的重要性。实验比较了野生型和 4 种突变型木瓜蛋白酶抑制剂与木瓜蛋白酶的结合动力学。通过使用由 280 nm 测定所获得的浓度（绿条），突变体 2 号具有比野生型和其他突变型低一个数量级的结合速率常数。然而，通过使用由 CFCA 所获得的浓度（橙条），所获得的结合速率常数接近于所有的抑制剂突变体。

# 6 抗原表位作图

---

抗原表位作图是指确定目标分子或抗原上的结合位点的相对分布信息（一般针对抗体）。结合到不同的抗原表位的抗体能够同时与抗原结合，而与相同的或相互重叠（干扰）的抗原表位结合的抗体在结合时彼此排斥。

抗原表位作图的最常见方法是采用配对实验测试不同抗体同时结合的能力。在另一种方法中，测试能代表抗原结构表位的肽段对抗体与抗原间的结合的抑制作用。两种方法都可以在 Biacore 系统上开展。

## 6.1 配对结合检测

### 6.1.1 原理

在 Biacore 系统中采用配对结合的方法进行表位作图的原理很简单：在芯片表面固定一种抗体，将抗原结合到抗体上，然后流过第二种抗体测试其是否能够同时结合到抗原上。在实践中，配对结合检测方法的建立还包括其他步骤（见图 6-1）：

- 可以采用捕获的方法很方便的固定第一种抗体到传感芯片表面，例如可以使用免源的针对鼠抗的抗体来捕获鼠源抗体。这样就可以使用同一个传感芯片表面检测多个抗体对。不推荐采用不可逆固定（如共价偶联），因为这样，当需要更换抗体时就必须更换芯片。
- 确保芯片表面上没有多余的抗体捕获位点非常必要，否则第二种抗体进样时就会结合到捕获分子上。所以需要注射封闭抗体来封闭剩余的捕获位点（一种与待测抗原不结合的抗体）。
- 随后进样抗原，结合于第一种抗体。
- 抗原之后进样第二种抗体以检测这两种抗体是否能够同时结合。

- 对芯片表面进行再生去除所有组份，从而留下永久固定的捕获抗体用于测试下一个抗体对。

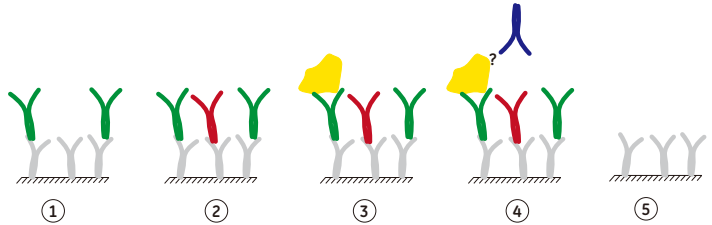


图 6-1. 在配对抗原表位作图中的主要步骤。

1. 捕获第一种抗体。
2. 封闭剩余的结合位点。
3. 进样抗原。
4. 进样第二种抗体与抗原结合。
5. 再生，准备测试下一个抗体对。

$n$  个抗体可组成  $n(n-1)/2$  种由不同抗体构成的抗体对（例如 5 种抗体组成 10 个抗体对）。建议采用配对实验测试所有组合：

- 通过使用相同的抗体作为第一抗体和第二抗体可以评估检测法的性能。如果观察到同时结合，这可能表示抗原含有多个相同的抗原表位，所以无法用配对方法进行抗原表位作图。
- 对调第一抗体和第二抗体可以检测抗原是否在结合后发生了构象变化而导致非预期的结果。在理想情况下，结果应该不依赖于抗体被测试的顺序，但实际情况中并不总是如此。

### 6.1.2 数据分析

在抗原表位作图方面，Biacore 系统提供的无标记检测相比基于标记的检测法具有很多优点，能够实现结合序列中的所有步骤都可以通过相同的技术被检测到。很容易通过抗原的结合水平推算第一抗体的水平，以及通过第二抗体的结合水平推算抗原的水平。这解决了数据分析解释方面的一个潜在问题：第二抗体结合的阴性结果可能是由于抗原表位之间的重叠干扰，也可能是由于抗原与第一抗

## 6 抗原表位作图

### 6.1 配对结合检测

体间的结合较差。如果使用不能直接检测到抗原结合的技术，你将无法区别这两种原因。

Biacore 4000 从控制软件到分析软件全面支持抗原表位作图，这部分内容在 Biacore 4000 软件手册中进行了详细介绍。数据分析分为五个不同的步骤，总结如下。相同的原理可以应用于其他 Biacore 型号的配对作图结果的分析。

对于每个分析步骤的报告点均被设置在每次进样结束后不久。

#### **第一抗体结合排序**

这步显示第一抗体的捕获法固定水平。第一抗体的固定量对于随后步骤中测定可能的结合水平具有基础性作用。不同抗体间的固定水平可能不同。可以设置界限值划定最低可接受的固定水平：低于这个水平，第一抗体捕获法固定的量可判断为太低，不适合用于随后的步骤中的可靠测定，而由这些第一抗体给出的数据应该排除在最终的分析之外。

#### **抗原结合排序**

即使第一抗体达到足够的捕获固定量，抗原的结合水平也可能不同。如果抗原的结合水平太低，将很难确定第二抗体结合水平。如同第一抗体结合排序，可以设置界限值以排除低于可接受下限的响应值。结合水平可以显示为相对响应值或与预期结合量的相对百分比（根据第一抗体的捕获法固定量以及抗体和抗原的相对分子量大小）。

#### **第二抗体结合排序**

第二抗体结合排序可以基于第二抗体的结合水平，或基于相对响应值，或基于与预期结合量的相对百分比（根据第一抗体捕获法固定的量以及抗体和抗原的相对分子量大小）。在这里再次设置界限值以区分阳性结合和阴性结合。

#### **解离阶段的拟合分析**

数据分析的另外一个部分是对第二抗体结合排序中阳性结合的抗体

的解离速率进行估算。尽管解离速率信息在判断临界结果的状态中是有用的，但它对于配对作图本身并非必需。然而，解离信息通常在用作免疫检测试剂的抗体开发中是有用的，并且你无需再进行其他 Biacore 实验就可以获得解离速率。

### 配对结果矩阵

可以利用结合值矩阵来显示配对抗原表位作图的结果，其中列和行分别为第一抗体和第二抗体。根据第二抗体结合排序的界限值，将待测抗体归类为阳性（即彼此独立的抗原表位）或阴性（相互重叠干扰的抗原表位），并标注于矩阵中。如果在第一抗体和抗原结合排序步骤中也谨慎地设置了界限值，则在矩阵中的归类中将排除那些在抗体捕获，抗原结合过程中存在问题的结合对。

## 6.2 肽段抑制检测

原理上讲基于肽段抑制检测的抗原表位作图是指代表某一抗原结构表位的肽段将抑制抗体直接与抗原上该表位的结合（图 6-2）。抑制程度可以是部分抑制或完全抑制，这取决于肽段与该抗原表位结构的相似性程度。

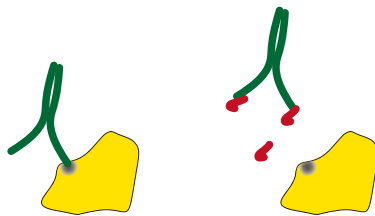


图 6-2. 肽段抑制的抗原表位作图原理。当不存在肽段时（左图），抗体能够结合于该抗原表位。加入的代表抗原表位的肽段阻断抗体结合于抗原（右图）。

这种检测法可以在芯片表面固定抗原或者固定抗体。抗原可以永久固定并采用再生，固定抗体通常采用捕获方法以便使用同一个传感芯片就可以完成多种抗体的研究。

# 7 疑问解答

---

本章讨论了开发 Biacore 检测方法时常见问题的原因和建议的解决措施。材料被分为 4 个部分：

- 配体固定
- 分析物结合
- 解决非特异性结合
- 非正常的传感图曲线

## 7.1 解决配体固定中的问题

这一节解决芯片表面上的配体固定量太低，以至于不能满足实验要求的问题。

### 7.1.1 共价固定的配体

图 3-3 显示了如何在 CM5 芯片上固定大分子配体。尽管由于化学反应和所固定特定分子不同，固定的流程上存在差异，但仍具有一些共同的特征能够帮助我们诊断在固定配体过程中出现的问题。

问题	原因	解决方法
配体进样期间响应值增加不够	配体样品缓冲液的 pH 值不适合	优化配体样品缓冲液的 pH 值
配体进样期间响应值增加不够	配体样品缓冲液中离子强度太高	使用低离子强度缓冲液（10 mM 一价阳离子）。如果配体保存在具有生理离子强度的母液中的，固定前应该至少稀释 10 倍，或采用脱盐手段。
配体进样期间响应值增加不够	配体浓度太低	尝试使用更高的配体浓度

配体进样期间响应值增加，但最终不能保留在芯片上	配体上并没有该固定化学反应可用的目标基团	尝试不同的化学反应或捕获法
配体进样期间响应值增加，但最终不能保留在芯片上	配体缓冲液和固定阶段运行缓冲液中包含 Tris, 叠氮化钠等成分，在固定反应中与配体发生竞争	确保配体缓冲液和固定阶段运行缓冲液的成分与该固定化学反应兼容。
固定水平低	使用 EDC/NHS 试剂太旧	使用新鲜的 EDC 和 NHS 试剂
即使重复进样配体也不能产生预期的响应值	溶液被放置在自动进样器中错误的位置	检查软件中的配体固定程序的架位信息。

### 7.1.2 配体的捕获

捕获法固定配体是指通过高亲和力结合将配体固定到芯片上已经偶联好的另外一个蛋白上，因此捕获法包括通过共价偶联将捕获分子固定到传感芯片表面，随后配体结合于捕获分子上。从这个角度看，第一步相当于固定配体，而第二步相当于结合分析物。

而对于一些即用型传感芯片，由于其所支持的捕获环境的差异性，存在个别针对性的配体固定问题。GE Healthcare 提供的实验室操作流程中推荐了一些捕获条件。

- 使用 SA 芯片或生物素捕获试剂盒捕获带生物素标签的配体要求从配体溶液中完全去除过量的生物素（可选择使用离心式凝胶过滤层析柱）。捕获过程中，溶液中残留的生物素将与配体竞争，降低捕获效率。推荐使用两次脱盐步骤去除残留的生物素。
- 使用 NTA 芯片通过金属螯合作用来捕获带组氨酸标签的配体要求缓冲液中无螯合剂（EDTA 推荐用于去除配体）。捕获的效率和稳定性很大程度上取决于配体分子的组氨酸标签的数量、长度和位置。但通常配体的固定水平越低捕获的效率和稳定性就越高。如果使用 NTA 芯片不能获得令人满意的捕获效果，你可尝试使用更长或多个组氨酸标签，或使用抗组氨酸标签抗体来捕获，代替 NTA 捕获组氨酸标签配体。

## 7 疑问解答

### 7.2 解决分析物结合过程中的问题

#### 7.2 解决分析物结合过程中的问题

##### 7.2.1 分析物结合容量太低

估算固定配体的结合活性可以通过实际测量的分析物结合容量与理论分析物结合容量的比值来表示（3.2.3 节）。如果分析物结合太低，有可能是配体在低离子强度、低 pH 的固定缓冲液中活性丧失、或由共价偶联化学反应造成失活、亦或是最初的配体试剂的样品就比较低。应尝试使用不同的固定化学反应或转为捕获法。

个别情况下，固定的化学反应可能会对结合位点直接修饰而造成配体失活。在这种情况下，可在配体固定时孵育与配体可逆结合的分子来保护活性位点，帮助保持活性。当然，添加的分子本身必须不能参与固定化学反应。在小分子分析物与靶点结合的分析中的这种方法已被证明可行。

##### 7.2.2 分析物结合太高

分析物实际结合容量超出理论最大值通常表明结合化学计量比超过预期（因为配体上有多个结合位点，或者因为分析物发生集聚），或者表明分析物无选择性地结合于配体（非专一位点结合）或芯片表面基质。在前者情况下，原则上有可能用足够高浓度的分析物饱和和表面，通过观察得到实际的化学计量比。在无选择性结合的情况下，表面通常不能被饱和，结合水平随着分析物浓度的升高而不断升高，即使用高浓度的分析物也无法达到饱和。

#### 7.3 解决非特异性的和干扰的结合

##### 7.3.1 非特异性结合

非特异性结合是指样品中的分析物或其他组分无选择性地结合到配体（非专一位点结合）或传感芯片表面基质上。非特异性结合能够在筛选检测中产生假阳性结果，并在浓度检测中造成错误的结果。在动力学和亲和力测定中，非特异性结合一般造成实验结果无法很



好地拟合到相互作用模型。通常情况下，分析物的非特异性结合产生的响应值水平随着样品浓度的增加而不断增加，而不是达到饱和平台。

通常参比通道上的结合响应值能够显示样品与传感芯片表面基质的非特异性结合。但扣减参比通道响应值并不足以消除非特异性结合，因为很难确定非特异性组分结合到参比通道与结合到配体通道的程度是相当的（高配体固定水平能够掩盖葡聚糖结合位点，并减少分析物样品与表面基质的非特异性结合）。这类非特异性结合通常可以通过向样品中添加可溶性葡聚糖以竞争性地抑制与传感芯片表面上的葡聚糖的非特异性结合。GE Healthcare 现提供用于此目的的可溶性葡聚糖作为 NSB 弱化剂。

与配体分子的非特异性结合不会在空白的参比通道上产生响应值，但通常表现为与配体通道的非饱和结合。混合样品中如细胞裂解物或血清中的非分析物组分也可能会与配体结合。尽量减少这类结合的一般原则是在样品和运行缓冲液中使用生理水平或更高的离子强度，而且如果表面活性剂不干扰分析则应添加表面活性剂。如果这些措施不够，则更换其它的配体（例如单克隆抗体配体的其他克隆）。

一些情况下，分析物会无选择性地结合到配体上（例如，许多低分子量化合物以低亲和力结合到血清白蛋白上的多个位点，在表现上类似于非特异性结合）。在这种情况下，从相对低浓度的分析物样品的传感图中有可能获得关于高亲和力结合位点的有用信息，因为在低浓度时样品中低亲和力结合并不显著。调整缓冲条件也有助于降低无选择性结合的影响。

### 7.3.2 干扰的结合

干扰的结合是指样品中非分析物组分与配体的特异结合，或分析物与芯片上非配体组分的结合（例如表面上的捕获分子）。这类干扰最好通过仔细的实验设计排除掉。例如，在血清检测中避免使用与补体因子结合的抗体亚型，或使用不包含补体结合位点的 Fab 片段。

## 7 疑问解答

### 7.4 非正常的传感图曲线

#### 7.4 非正常的传感图曲线

这一节着重解释非正常传感图的原因和对策。传感图曲线由于其相互作用本身的属性不同而始终具有个体差异，但只要本体折光率影响不大，下列一般特征是“在预期范围内的”：

- 基线在分析循环中应该是稳定的。在两个循环间轻微的基线漂移是可接受的。
- 响应值在进样阶段不能逐渐降低（除了由于折光率差别导致的本体偏移外）。
- 响应值在解离阶段不能逐渐升高（除了由于折光率差别导致的本体偏移外）。
- 在进样开始和结束时由于扣除参比响应值造成的信号峰很小。
- 解离阶段的响应值应该不低于基线水平。

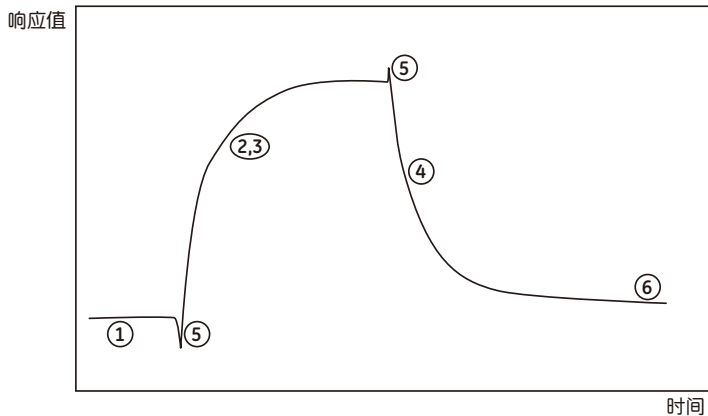


图 7-1. “预期”的传感图曲线（扣除参比后）的一般特征：

1. 稳定的基线。
2. 在进样阶段的正响应值。
3. 进样阶段的上升或稳定的响应值。
4. 解离阶段降低的响应值。
5. 在进样起始和结束时由于扣除参比而形成的信号峰较小。
6. 响应值不低于基线。

### 7.4.1 基线不稳定

在检测的前几个循环中发生基线漂移是正常的，推荐在分析物进样前运行 3 到 5 个预热循环（start-up）可提高随后检测的稳定性。经常检查参比和配体通道的传感图中的基线：虽然表面上来看基线漂移可以通过扣减参比而得以纠正，但基线漂移本身可能意味着检测方法需要进一步优化和数据结果很难解释。

应该区分一个循环内的基线漂移和两个循环间的基线响应值漂移。后者最常由再生的效果不佳引起的，但如果芯片表面上配体的结合能力不受影响则可以忽略不计（如间隔的对照样品之间的的结合水平保持一致）。

基线的不稳定性也可能是由于温度控制系统的故障引起。如果发生这种情况（屏幕上显示警告），那么请联系您的 GE Healthcare 售后人员。

#### 基线持续升高

- 确保运行缓冲液是使用干净的玻璃容器和使用高纯度的试剂配制，并且仪器的流路系统在前一个实验后被彻底地冲洗。这对于需要使用疏水表面的应用尤其重要（HPA 芯片和 L1 芯片）。

#### 基线持续降低

- 如果你使用捕获法来固定你的配体，则请检查捕获相互作用的稳定性。对于低分子量分析物，你可以在捕获后将配体交联到捕获分子上以稳定表面，当然这样的配体固定是永久性的。交联配体一般会降低配体对于蛋白质分析物的结合活性。
- 基线的向下漂移也可能是由于固定的配体是多聚体，而并非所有亚基都固定到芯片表面上。如果多聚体配体解离，亚基将被丢失，在大多数情况下还会造成配体对分析物的结合能力下降以及基线响应值的漂移。针对这个问题有时候可以在配体已经被固定到芯片表面后，用 EDC/NHS 交联配体，尽管配体对分析物的结合活性可能会有一定程度降低。

## 7 疑问解答

### 7.4 非正常的传感图曲线

#### 7.4.2 低于基线的样品响应值

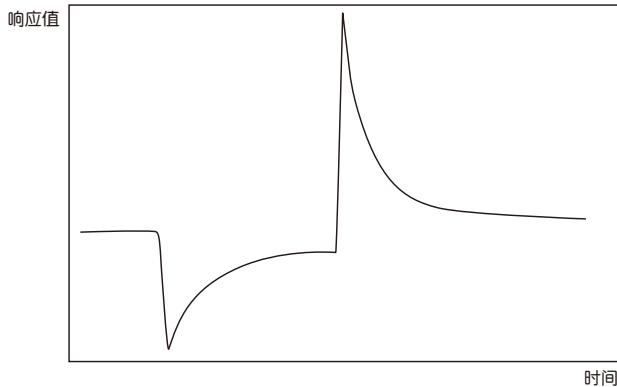


图 7-2. 低于基线的样品响应值通常是由于样品的本体折光率比运行缓冲液低的缘故。

如果样品折光率比运行缓冲液折光率低，则进样阶段响应值会由于负的本体折光率偏移而可能会低于基线。在这种情况下，在进样结束时应该有相应的正的偏移。在进样结束后测定的响应值水平将不受影响，仍然是可靠的。

由于样品在参比通道的相对结合响应值高于配体通道，也会造成在扣减过参比的传感图中信号低于基线。这通常是由样品与参比通道表面的非特异性结合造成的。

这两种情况通常可以通过分别检查配体和参比通道的传感图发现。

#### 7.4.3 “驼峰状”传感图

当运行缓冲液中的表面活性剂浓度低于临界胶束浓度（CMC）时，进样期间常有“驼峰状”的传感图（响应值达到最高后降低，见图 3-4）。推荐的表面活性剂 P20 浓度为 0.05%。这种表面活性剂影响通常较小，在大分子相互作用的实验中可能被忽略不计（响应值在几百 RU 或以上的水平）。

“驼峰状”传感图也可能有其他原因，例如最初与配体结合的分析

物质量较大，随后被更慢但更紧密结合的较小分子量的分子所取代。需要注意这种传感图的出现并不总是意味着检测有问题。

#### 7.4.4 在缓冲液流动期间的非正常信号

当只有缓冲液流过系统时出现的非正常信号包括向上的漂移和响应值低于基线水平，可能是由于流路系统被之前运行的样品所污染引起。确保按照仪器手册要求定期维护仪器。如果观察到这种非正常信号，按照仪器手册的说明彻底清洗流路系统，然后用低流速的运行缓冲液平衡仪器至少过夜。

#### 7.4.5 参比扣除传感图的尖峰

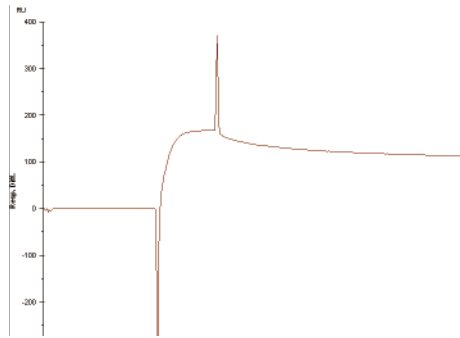


图 7-3. 进样空白样品（缓冲液），扣除了参比的传感图在进样开始和结束时出现尖峰。

扣除了参比后的传感图上在进样开始和结束时出现尖峰（向下或向上）是正常的，特别是对于 Biacore 这样采用连续排列的流动池设计的系统，参比通道信号和配体通道信号会出现轻微的时间差，同时还存在样品的本体折光率效应（图 7-3）。低流速时这种现象尤其明显。这应该不会影响超过约 1 秒范围的传感图。更加严重的尖峰可能表示进样系统的故障，需要通知您的 GE Healthcare 售后人员。

## 7 疑问解答

### 7.4 非正常的传感图曲线

#### 7.4.6 重复扰动

在每次循环的同一个时间点重复地发生每扰动（通常很小）（图 7-4）一般是由于泵的问题。

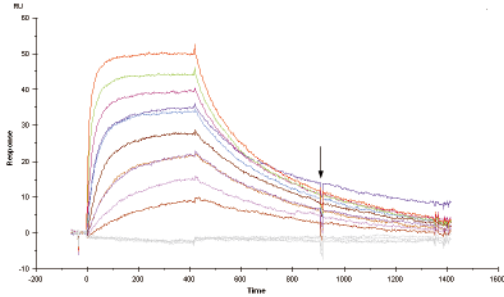


图 7-4. 发生于每个循环同一时间点的扰动是由于仪器硬件的原因，例如泵的问题。

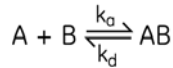
## 附录 A 动力学分析与浓度测定

### A.1 动力学和亲和力的基本原理

这一节介绍 1:1 相互作用的动力学和亲和力分析的基本原理。类似的原理适用于其他对公式做适当修改的相互作用模型。

#### A.1.1 动力学速率公式

动力学分析软件采用 1:1 相互作用模型对分析物 A 与配体 B 之间的结合实验数据加以拟合，从而获得分析物 A 和配体 B 之间的结合速率常数和解离速率常数：



其中： $k_o$  是结合速率常数 ( $M^{-1}s^{-1}$ )

而  $k_d$  是解离速率常数 ( $s^{-1}$ )

进样阶段复合物形成的净速率可由下面公式获得

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_o[A][B] - k_d[AB]$$

而进样结束后（解离阶段）的解离速率是

$$\frac{d[AB]}{dt} = -k_d[AB]$$

形成的复合物的浓度通过 SPR 响应测定，单位是 RU。如果总配体浓度（配体对分析物的最大结合容量） $[B]_0$  也以 RU 表示，则速率公式可以用响应值取代浓度：

$$\frac{dR}{dt} = k_o CR_{max} - (k_o C + k_d)R$$

因为相互作用发生在传感芯片表面，流动池中的分析物在与配体发生相互作用前必须由溶液本体横向转移到芯片表面。在

## 附录 A 动力学分析与浓度测定

### A.1 动力学和亲和力的基本原理

Biacore 这样一个微流控系统中，这种转移是受扩散速率限制的过程，被称为**物质迁移**，这个过程可以用明确的数学模型所描述。真正参与与配体的相互作用的分析物浓度是位于传感芯片表面  $A_{\text{surface}}$  的浓度，它与进样样品的浓度  $A_{\text{bulk}}$  具有以下关系：

$$A_{\text{bulk}} \xrightleftharpoons[k_m]{k_m} A_{\text{surface}}$$

其中  $k_m$  是**物质迁移系数 (Mass transfer coefficient)**，描述从溶液本体到芯片表面的受扩散速率限制的物质转移。这种转移特性对于到达表面的过程和离开表面的过程都是相同的，因此  $k_m$  适用于结合反应的两个方向。

物质迁移系数  $k_m$  是受流速、流动池尺寸以及分析物分子的扩散性质决定的函数：

$$k_m = 0.98 \left( \frac{D}{h} \right)^{2/3} \left( \frac{f}{0.3 \cdot w \cdot l} \right)^{1/3}$$

其中  $D$  是分析物的扩散系数 ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

$f$  是溶液流经流动池的体积流速 ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ )

$h, w, l$  是流动池尺寸 (高、宽、长，以  $\text{m}$  为单位)

为了尽可能减少动力学测定中的受物质迁移的限制，实验应该采用中等流速或高流速 (30  $\mu\text{l}/\text{min}$  或更高)。

物质迁移系数可以根据分析物分子量以及表面浓度与 RU 的转换关系加以校正，获得物质迁移常数  $k_t$ ：

$$k_t = k_m \times \text{MW} \times 10^9$$

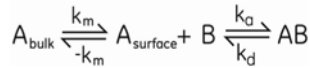
这种表示方法的进一步修正，获得不依赖于流速的物质迁移常数，称为  $t_c$ ：

$$t_c = \frac{k_t}{\sqrt[3]{f}}$$



对于分子量在 50,000 道尔顿数量级的球蛋白， $t_c$  的典型值达到  $10^8$   $\text{RU} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  数量级。结果中的  $t_c$  大于这个数值几个数量级（例如  $10^{12}$  或  $10^{14}$ ）可能表示参数对于拟合不具有显著性（即观察到的结合不受物质迁移的限制）。

可以通过修正芯片表面有效的配体浓度，从而在曲线拟合模型中整合进物质迁移过程：



### A.1.2 稳态法亲和力公式

在稳态时，复合物形成的净速率为零：

$$\frac{dR}{dt} = k_a CR_{\text{max}} - (k_a C + k_d)R = 0$$

因此

$$k_a CR_{\text{max}} = (k_a C + k_d)R$$

重排并设  $R=R_{\text{eq}}$  ( $R_{\text{eq}}$  是平衡状态响应水平) 得到：

$$R_{\text{eq}} \left( \frac{k_a}{k_d} C + 1 \right) = \frac{k_a}{k_d} CR_{\text{max}}$$

设置  $k_a/k_d=K_A$  (结合平衡常数) 得到：

$$R_{\text{eq}} = \frac{K_A CR_{\text{max}}}{K_A C + 1}$$

通过使用这个方程拟合  $R_{\text{eq}}$  对  $C$  的图可获得  $K_A$  的值。 $K_D$  等于  $K_A$  的倒数 ( $K_D=1/K_A$ )。

### A.1.3 拟合过程

用于从实验数据中获得速率常数的拟合过程采用具有迭代近似算法的数值积分法，以找到上面方程的最优解。卡方检验值可以帮助判断拟合的接近程度，它描述了实验数据和拟合曲线之间的偏差。

## 附录 A 动力学分析与浓度测定

### A.1 动力学和亲和力的基本原理

$$\text{卡方检验值} = \frac{\sum_1^n (r_f - r_x)^2}{n - p}$$

其中  $r_f$  是在给定点的拟合值

$r_x$  是在相同点的实验值

$n$  是数据点的数量

而  $p$  是被拟合参数的数量

拟合算法设法降低卡方检验值，当连续的迭代次数之间的卡方检验值差别足够小时可判断为拟合完成。

#### A.1.4 评估拟合

##### 动力学

动力学分析软件所获得的速率常数是通过 1:1 相互作用模型拟合获得的，所以需要注意这些数据只有在 1:1 结合的情况下才是有效的。如果相互作用机制不是简单的 1:1 结合，则拟合的曲线将在一定程度上偏离实验数据，所获得的动力学常数将无法真实描述这组相互作用。研究中，表观的 1:1 结合常数仍然可以被用于比较所观察到的结合速率，但重要的是需要标明这些数值是经验数值而不是机理常数。

有两种主要的工具用于评估结果中常数的显著性：拟合和实验曲线之间的拟合紧密度以及参数的统计学显著性。

##### 拟合的紧密度

比较实验数据和拟合数据的残差图可以帮助你直观地检查拟合的紧密度。在理想情况下，残差会在零的上下一定范围内（大约  $\pm 1$  到 2 RU）随机分散排布，反映了检测系统中的短期噪音。非理想的拟合表现为残差系统性有规律的变化，在残差图上形成非线性的趋势和形状。可以根据实验响应值尺度以及实验的目的来判断残差的大小和形状是否达到要求。

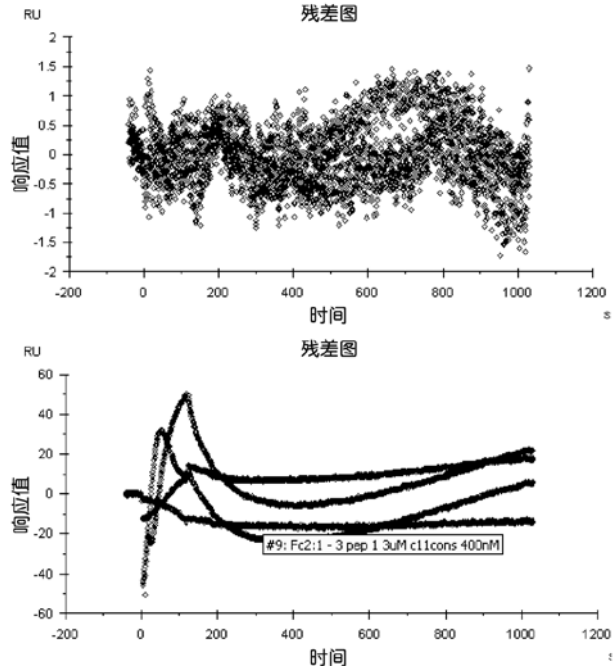


图 A.1. 满意的拟合（上图）和不满意的拟合（下图）的残差图。注意两个图中不同的响应值刻度（上图  $\pm 2$  RU，下图  $\pm 60$  RU）。

卡方检验值是判断拟合紧密度的依据，但很难为卡方检验值设定一个绝对的界限值：这个值需要根据实际实验并结合残差图形状进行综合考量（卡方检验值与整体残差值范围有关，但不受残差曲线形状的影响）。

### 参数的显著性

通过一个数学模型拟合实验数据将获得模型中所有参数值，但并不保证它们是否具有显著性。例如，受物质迁移速率完全限制的传感图即使实验数据中不包含任何动力学信息也将给出动力学速率常数。

通过拟合获得的参数值的显著性可由**标准差** (*standard error*) 或 **T 值检验** 指示，广义地讲这两个数值代表了参数值可以在多大程度

## 附录 A 动力学分析与浓度测定

### A.1 动力学和亲和力的基本原理

内变动而不显著影响拟合紧密度。T 值等于参数值除以标准差。高标准差 / 低 T 值表示拟合对参数值中的变化不敏感：换句话说，该参数的显著性较低。

因此非常有必要检查分析软件拟合出的参数值的显著性，以避免报告缺乏显著性的“常数”。在受物质迁移速率完全限制的相互作用的例子中，速率常数将有高的标准差（低的 T 值），因为不管参数值高低，都不会影响拟合的结果。

**注释：**即使参数的显著性很低以至于宽范围内的任何参数值都不会影响对实验数据的拟合效果，但只要从相同的起始数据开始拟合同一组数据，拟合算法都将产生相同的结果。不同拟合间结果的一致性并不代表显著性高低。

对于 1:1 结合模型，另外一个代表参数显著性的指标为 **U 值**。U 值代表所获得速率常数和  $R_{\max}$  的独特性（uniqueness），可以通过测试所选变量之间的关联变化对拟合的影响获得。U 值较低表示结果的可信度更高。较高的值（大约 25 以上）表示所获得的动力学常数不包含任何有用的信息。

#### 亲和力

为了对  $R_{\text{eq}}$  对 C 的图进行有效拟合以获得准确的亲和力数值，必须确保分析物浓度范围足够大以完全显示结合的“饱和”趋势。特别是如果最高浓度相较于获得的  $K_D$  值过低，即使拟合看起来很好而且卡方检验值很低，所获得的结果可靠性依然不高。

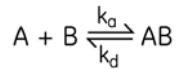
基本原则是只有分析物最高的浓度至少是所获得的  $K_D$  值的两倍，拟合才将是可靠的。如果分析物最高浓度低于 2 倍  $K_D$ ，那么你就应对获得的  $K_D$  值特别谨慎。

## A.2 动力学相互作用模型

这一节提供由 Biacore 系统提供的标准动力学相互作用模型的简要介绍。

### A.2.1 1:1 结合

这个相互作用模型介绍了分析物 A 的一个分子结合分析物 B 的一个分子：



其中  $k_o$  是结合速率常数

$k_d$  是解离速率常数

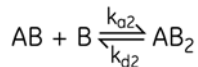
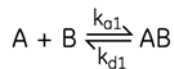
### A.2.2 1:1 解离

这个模型只是用指数方程拟合解离阶段的数据。解离速率不依赖于分析物浓度，因此可以在不知道浓度的情况下获得解离速率常数。

这个模型不考虑物质迁移系数。如果物质迁移限制显著，则解离的分析物将很难从表面上被冲走，解离速率常数将被低估。

### A.2.3 二价分析物结合

二价分析物结合模型描述了单价配体与携带两个相同且独立的结合位点的分析物分子间的相互作用。



其中  $k_{o1}$  和  $k_{d1}$  是第一个位点的结合和解离速率常数

而  $k_{o2}$  和  $k_{d2}$  是第二个位点的结合和解离速率常数

一旦分析物通过第一个位点与配体发生结合，分析物与配体的接近效应将加速第二个位点的结合。同样，通过两个位点与配体结合的

## 附录 A 动力学分析与浓度测定

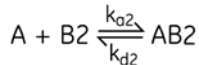
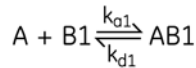
### A.2 动力学相互作用模型

分析物分子只有在两个位点上都发生解离后才会从表面上释放，因此所观察到的解离速率比在单个位点的结合低得多。这种增强的结合的结果通常称为**亲合力 (avidity)**，以区别于单点结合亲和力。

**注释：**第二个位点相互作用的结合速率常数以  $RU^{-1}s^{-1}$  为单位。这是因为此时配体和分析物都位于芯片表面上，其浓度都以  $RU$  为单位表示，而不是以真正的浓度单位。

#### A.2.4 非均一的配体

这个模型描述了同一个分析物与表面上两种独立的配体（或配体位点）之间的相互作用。所观察到的结合是分析物与两种配体相互作用的总和。



其中  $k_{o1}$  和  $k_{d1}$  是对于一种配体的结合和解离速率常数

而  $k_{o2}$  和  $k_{d2}$  是对于另一种配体的结合和解离速率常数

#### A.2.5 亲和力相互作用模型

1:1 稳态结合

在第 12 章介绍的**亲和力**分析方法利用如下公式拟合稳态响应值对浓度的散点图（A.1.2 节）

$$R_{eq} = \frac{K_A CR_{max}}{K_A C + 1} + \text{offset}$$

其中 **offset** 是拟合曲线在 Y 轴上的固定截距。如果没有这一项，则所拟合的曲线将强制通过图的原点。

参数  $K_A$ 、 $R_{max}$  和 **offset** 作为变量参与拟合。亲和力通常采用  $K_D$  值，它是  $K_A$  的倒数。如果所使用的分析物最高浓度是  $K_D$  值的两倍以上，则使用公式拟合可以获得可靠的结果。

## A.3 浓度测定

### A.3.1 标准曲线的拟合

通常采用线性拟合或四因素方程拟合浓度测定中的标准曲线。在一些 Biacore 系统中可以自定义拟合方程。

对于线性拟合，点被拟合到下面的方程中

$$y = \text{slope} * x + \text{intercept}$$

四因素拟合的方程是

$$y = R_{hi} - \frac{R_{hi} - R_{lo}}{1 + \left(\frac{x}{A_1}\right)^{A_2}}$$

其中  $y$  和  $x$  是图坐标

$R_{hi}$  和  $R_{lo}$  是分别对应于最高和最低响应水平的拟合参数

$A_1$  和  $A_2$  是附加的拟合参数

对于线性拟合拟合的紧密度采用  $R^2$  表示，对于四因素拟合采用卡方检验值。

### A.3.2 标准曲线趋势校正 (Calibration trends)

一些 Biacore 系统支持标准曲线趋势校正以纠正在整个分析过程中标准曲线的偏移。在这种方法中，在样品分析开始、结束以及期间间隔建立多条标准曲线，通过对两条标准曲线差值运算为两条标准曲线之间的每个样品建立专属的标准曲线。

### A.3.3 无需标准曲线的浓度测定

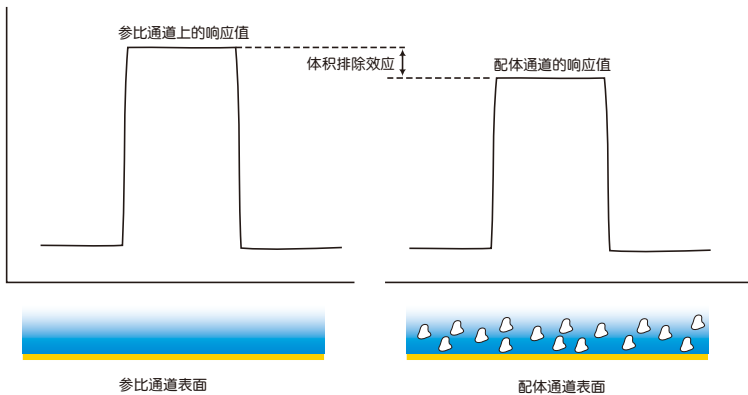
无需标准曲线的校准浓度测定需要用考虑了物质迁移系数（通过扩散系数和流动池特征的计算）的 1:1 相互作用模型拟合数据（见 A.1 节），同时将分析物浓度设为全局拟合的变量。这个模型所描述的相互作用与 1:1 动力学模型相同。

## 附录 B 溶剂校正原理和实践

### B.1 介绍

溶剂校正是指对受样品中有机溶剂浓度差异影响的响应值进行校正的方法。溶剂校正主要应用于小分子有机分析物相关的分析中，这些实验要求在缓冲液中添加有机溶剂（通常是二甲基亚砜，DMSO）以维持分析物溶解度。

当样品间的本体折光率差异与预期的分析物结合响应值处于同一（或更大）的数量级时，简单地扣除参比响应值很难获得准确地结果。原因之一是在参比通道和在配体通道，芯片表面附近可供样品接近芯片的溶液体积是不同的，除非两个通道连接有相同量的蛋白。在配体通道由于配体分子占用了一些体积（体积排除效应），所以其样品本体偏移效应也会相比于参比通道小一些（图 B-1）。



**图 B-1.** 在配体通道表面由于配体分子占据，本体溶液从芯片表面上被排除，因此本体溶液对相对响应值的贡献比在参比通道小。

在溶剂校正中，还有其他因素造成体积排除但并不在此次讨论范围之内。



## B.2 溶剂校正的要求

溶剂校正三种情况结合下是必需的，这三种情况通常在小分子分析物如候选药物的实验中较为常见：

- 预期的分析物结合响应值低。
- 配体是大分子，以高密度固定在芯片表面。
- 与测定的结合响应值相比，样品的溶剂本体响应值较高。

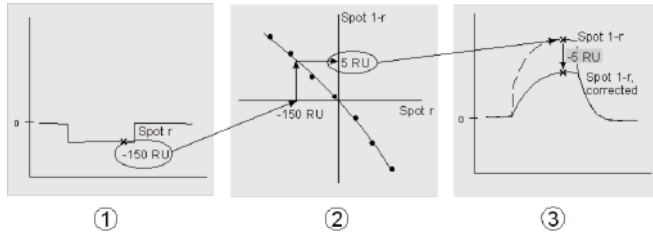
在药物发现和开发工作中分析物通常是小分子，相应只产生低的响应值（一般是 10-50 RU 或更低）。高的配体固定水平（几千 RU）用以获得高的分析物结合响应值，同时也加重了上文所述的体积排除效应。样品一般含有 DMSO 以保持溶解度，导致高的本体响应值。1% 的 DMSO 的浓度差异可以产生大约 1200 RU 的响应值差异。因此在样品制备中不可避免的 DMSO 浓度的微小变化很容易导致本体响应值差异达到与样品响应值相同的数量级。

## B.3 溶剂校正的原理

溶剂校正曲线可以通过如下方法获得：进样一系列梯度浓度的 DMSO 空白样品。用扣减参比的配体通道信号值对参比通道相对信号值作图就构成了一条校正曲线，称为溶剂校正曲线。溶剂校正曲线可以用来计算在参比通道上的相对响应值不同情况下溶剂本体对最终结果的影响，这样每个样品都可以通过其参比通道的相对响应值计算其中溶剂本体效应的大小，并对最终结果（扣减参比的配体通道响应值）加以校正（图 B-2）。

## 附录 B 溶剂校正原理和实践

### B.4 溶剂校正溶液的配制



**图 B-2. 溶剂校正原理。** 1. 因为样品和运行缓冲液折光率不完全匹配，参比通道的传感图显示在进样期间发生本体偏移（在图中为 -150 RU）。2. 根据溶剂校正曲线，在参比通道的 -150 RU 的偏移对应于在扣减参比的配体通道传感图中溶剂效应大小有 +5RU。3. 将溶剂效应贡献的 +5RU 从扣减参比的传感图中扣除。进样阶段的每个响应值点都将被溶剂校正。

仅进样阶段的响应值需要进行溶剂校正，因为溶剂校正处理了不同样品间本体响应值的差异。

### B.4 溶剂校正溶液的配制

应尽可能确保样品和运行缓冲液折光率保持匹配，以尽量减弱本体折光率效应并使溶剂校正正值保持很小。同时尽量确保样品间以及样品与运行缓冲液间具有完全相同的 DMSO 浓度。当准备用于溶剂校正的样品时，请记住下列内容：

- 使用可靠的缓冲液配制和样品稀释步骤以确保一致的 DMSO 浓度。溶于纯 DMSO 中的样品应该确保在稀释后，DMSO 的终浓度与运行缓冲液相同。
- 在样品制备后立即用铝箔纸覆盖样品板以避免由于挥发和从空气中吸收水分导致的 DMSO 浓度的变化。请记住 DMSO 是吸湿性的。
- 如果您使用实验室机器人制备样品，可以考虑测试一组空白样品以测试样品中 DMSO 浓度的变化范围。建立的溶剂校正曲线范围应该覆盖上述变化范围。

关于样品制备和溶剂校正方法的实验室操作说明可以在 [www.gelifesciences.com/biacore](http://www.gelifesciences.com/biacore) 上找到，或从 GE Healthcare 获得。

## B.5 评估溶剂校正

溶剂校正曲线通常是负斜率且具有轻微弯曲的曲线(图 B-3, 左图), 但是曲线的斜率和形状是无法预测的, 具有正斜率或在曲线中具有最大值或最小值的曲线是可以接受的。

然而, 溶剂校正曲线的拟合程度十分重要。如果曲线不能很好地拟合实验数据点(图 B-3, 中图)将在溶剂校正因子中带来不确定性, 甚至达到与因子本身相同的数量级。这可能为样品测定引入额外的误差。

位于溶剂校正曲线范围之外的样品响应值(图 B-3, 右图)将不能被校正, 而且将从最终经过溶剂校正的数据中被排除。软件可以通过外延溶剂校正曲线解决这个问题, 但由于溶剂校正曲线的不可预测性, 外延只能限制在较小的范围内(低于 10% 的测量范围)。

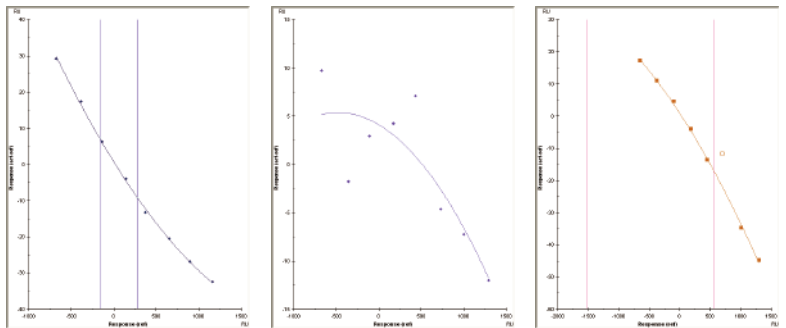


图 B-3. 一些溶剂校正曲线的实例。

左图: 可接受的曲线, 与实验点紧密拟合, 并很好地覆盖样品响应值范围。

中图: 实验点分散在拟合的溶剂校正曲线周围。应谨慎对待较差的拟合曲线。

右图: 溶剂校正曲线没有覆盖全部的样品响应值范围。超出曲线范围的样品响应值将不予以校正。

## 关于GE医疗集团

GE医疗集团通过提供革新性的医疗技术和服 务，开创医疗护理的新时代。我们在医学成像、信息技术、医疗诊断、患者监护系统、药物研发、生物制药技术、卓越运营和整体运营解决方案等领域拥有广泛的专业技术，能够帮助客户以更低的成本为全世界更多的人提供更优质的服务。此外，我们还和医疗行业领袖一道，正努力通过全球政策，打造成功的、可持续的医疗体系。

我们的“健康创想”愿景普及全球。我们不断通过创新在世界范围内推动降低医疗成本、增加医疗机会、提供医疗质量。GE医疗集团总部设在英国，是通用电气公司（纽约证券交易所：GE）下属的业务集团之一。GE医疗集团的员工分布于全球100多个国家和地区，致力于为医疗专业人士和患者服务。欲了解更多有关GE医疗集团信息，请访问公司网站[www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com)

咨询热线：800-810-9118

400-810-9118

## GE医疗中国

### 北京办公室

北京市经济技术开发区  
永昌北路1号  
邮政编码：100176  
电话：010-58068888  
传真：010-67873597

### 上海办公室

上海市浦东新区张江高科技  
园区  
华佗路1号  
邮政编码：201203  
电话：021-38777888  
传真：021-38777499

### 广州办公室

广州市天河区珠江新城花城大道  
87号  
通用电气大厦10楼  
邮政编码：510623  
电话：020-38157777  
传真：020-38157797

### 成都办公室

成都市高新西区西芯大道3  
号  
创智联邦3号楼  
邮政编码：611731  
电话：028-62722345  
传真：028-62722466



©2012-GE公司版权所有（第一次印刷于2012年12月）

GE公司有权在任何时候，在不另行通知的情况下，不负有任何义务地对上述规格和性能等进行更改，并有权终止该产品的供应。详情请与您当地的GE业务代表联系。

GE, GE Monogram, healthymagination, imagination at work, 健康创想以及GE梦想启动未来是GE公司的注册商标。

MyWorkshop No: DOC11111111.