



doi: 10.12452/j.fxcxb.250517365

基于超表面等离子共振生物传感器的亲和力 评价平台开发

李裕鸿¹, 周翰霖^{2,3}, 刘 钢^{1,4}, 黄丽萍^{2*}

(1. 华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074; 2. 南京师范大学 食品与制药工程学院, 江苏 南京 210000; 3. 牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157011;
4. 量准(武汉)生命科技有限公司, 湖北 武汉 430070)

摘要: 该文基于超表面等离子共振(MetaSPR)生物传感器构建了一种新的亲和力检测评价方法, 利用高灵敏的MetaSPR芯片, 同时构建高精度微流控流路式和高通量微孔板无管路式亲和力检测平台, 弥补了现有亲和力检测方法的不足。研究制备了具有纳米孔阵列结构的MetaSPR芯片, 并通过扫描电子显微镜和酶标仪对其物理结构与光学特性进行表征。通过采用不同折射率的甘油溶液对SPR芯片进行测试, 结果显示该芯片对折射率变化具有极高的灵敏度, 响应信号与折射率变化之间呈现出良好的相关关系($r^2=0.995$)。利用WeSPR系列检测仪, 无需复杂光学元件, 对多种分子对进行亲和力检测, 成功获得了结合速率常数(K_a)、解离速率常数(K_d)和解离平衡常数(K_b)等动力学参数, 且与已有报道数据一致。结果表明, 该研究构建的两种检测平台均能够高灵敏、实时、无标记地监测分子间的结合与解离过程, 具有优异的准确性、稳定性与普适性, 为生物分子相互作用研究提供了一种高效、灵敏、便携且低成本的技术手段, 在生命科学、药物研发与筛选等领域具有广阔的应用前景。

关键词: 超表面等离子共振; 生物芯片; 亲和力; 分子相互作用; 药物筛选

中图分类号: O646.9; S951.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)01-0001-11

Development of a Metasurface Plasmon Resonance Biosensor Platform for Affinity Evaluation

LI Yu-hong¹, ZHOU Han-lin^{2,3}, LIU Gang^{1,4}, HUANG Li-ping^{2*}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 2. School of Food and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210000, China;
3. College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011, China;
4. Liangzhun(Wuhan) Life Technology Co. Ltd., Wuhan 430070, China)

Abstract: In this study, a new affinity detection and evaluation method is constructed based on the metasurface plasmon resonance (MetaSPR) biosensor, which utilizes a highly sensitive MetaSPR chip and simultaneously constructs a high-precision microfluidic flow-through and high-throughput microtiter plate pipeless affinity detection platform, which makes up for the shortcomings of the existing affinity detection methods. In the study, MetaSPR chips with nanopore array structure were prepared and characterized by scanning electron microscope and enzyme marker for their physical structure and optical properties. The SPR chip was tested by using glycerol solutions with different refractive indexes, and the results showed that the chip was extremely sensitive to changes in refractive index, and a good correlation was presented between the response signal and the change in refractive index ($r^2=0.995$). The kinetic parameters such as binding rate constant (K_a), dissociation rate constant (K_d) and dissociation equilibrium constant (K_b) were successfully obtained using the WeSPR series of detector for affinity detection of a variety of molecular pairs without the need for complex optical components and were in agreement with the previously reported data. The results show that both assay plat-

收稿日期: 2025-05-17; 修回日期: 2025-06-18

基金项目: 国家自然科学基金(32471472); 广州国家实验室专项项目(GZNL2023A03006)

* 通讯作者: 黄丽萍, 博士, 副教授, 研究方向: 生物传感检测技术与器件研发, E-mail: lphuang@njnu.edu.cn

网络首发日期: 2025-11-11

forms constructed in this study are capable of monitoring the intermolecular binding and dissociation processes in a highly sensitive, real-time and label-free manner, with excellent accuracy, stability and universality, providing an efficient, sensitive, portable and low-cost technological means for the study of biomolecular interactions, which is of broad application prospects in the fields of life sciences, drug discovery and screening.

Key words: metasurface plasmon resonance; biochip; affinity; molecular interactions; drug screening

在生物化学和分子生物学领域,亲和力(Affinity)用于描述两个或多个分子间的结合强度,通常反映了配体(Ligand,如药物、激素、抗体等)与受体(Receptor,如蛋白质、核酸、糖分子等)的结合程度^[1-2]。作为衡量生物分子之间相互作用强度的关键参数,亲和力在理解生物系统的功能、疾病发生机制以及药物研发方面具有至关重要的意义。亲和力评价已成为药物设计、筛选与优化、药物疗效预测、药物动力学研究等的关键步骤^[1,3-4]。因此,实现快速、准确、稳定、无干扰的数据测定,对生物医学研究和药物开发等都具有重要意义。

目前,常用的亲和力检测方法主要分为两类,一是传统的标记检测法,二是以物理原理为主的无标记方法。传统生化分析方法主要包括:酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫共沉淀法(Co-IP)、染色质免疫共沉淀(ChIP)、凝胶迁移(EMSA)、酵母双杂交(Y2H)和其他荧光光谱学方法等。这些传统方法如ELISA和荧光标记法均需对检测物质进行标记,一定程度上会破坏其生理结构,有一定的生物毒性;且如ELISA采用终点法实验,能提供实验过程中的实时动力学数据,步骤繁多、耗时长^[5]。生物分子互作实时无标记(RT-LF)技术,是一种新兴的分析技术,主要包括:表面等离子共振(SPR)、局域表面等离子体共振(LSPR)、超表面等离子共振(MetaSPR)技术、生物层干涉技术(BLI)、石英晶体微量天平(QCM)等。SPR技术和BLI技术均基于光学检测原理,通过监测生物分子相互作用过程中引起的光学信号变化,精准反映生物分子在传感器表面的结合与解离过程,为研究分子间相互作用的动力学特征提供了高效且灵敏的检测手段。其中SPR是一种基于物理光学现象的检测技术,当平面偏振光以大于临界角的角度入射到沉积在高折射率(RI)全内反射棱镜底座上的半透明薄金属膜(通常为金或银)时,入射光在金属膜表面发生全反射,同时其能量被金属表面吸收,激发金属表面的自由电子,形成表面等离子体极化波^[6-7]。由于不同样品在金属表面具有不同的折射率,这会导致共振条件发生变化,进而引起共振角度的偏移。通过精确测量这种角度偏移,可以实现对折射率变化的高灵敏度检测,从而可用于分子间相互作用监测^[6,8]。目前,SPR技术凭借其无标记、实时监测、高灵敏等优势被认为是分子互作分析的金标准方法,为研究分子间相互作用的动力学特征提供了高效且灵敏的检测手段。但传统的SPR技术,需要高精密的光学检测系统和光学耦合元件,设备昂贵、操作复杂,且在灵敏度和实验效率上仍有不足。LSPR是一种由金属纳米结构中的自由电子在特定频率的光激发下产生的局域电磁场增强效应^[9-10]。LSPR的共振频率可通过纳米颗粒的尺寸、形状、材料及周围介质的折射率进行调节,展现出高度的可调谐性^[10-11]。然而,LSPR制备工艺复杂,信号稳定性易受纳米颗粒聚集或表面污染影响,且定量分析难度较大,限制了其大规模应用^[12]。

MetaSPR技术是一种基于表面等离子共振现象发展而来的新型技术,在MetaSPR生物传感器中,传统的平面被高深宽比的三维纳米孔阵列超表面结构所取代,可以在更复杂的水平上利用和操纵光。MetaSPR技术同时结合了SPR与LSPR的共振模式,展现出奇特的反常光学透射(EOT)现象,可实现更高的检测灵敏度和检测通量^[13-14]。当生物分子在芯片表面发生相互作用时,会诱导等离子体共振透射光谱发生变化,表现为两个特定波长处透射光强度的显著改变^[15]。MetaSPR技术简化了光学设计,可直接通过检测透射或反射模式下的光强变化来记录分子相互作用过程,无需复杂的光学元件。这不仅缩小了设备体积,便于现场携带和使用,也显著降低了检测成本。此外,通过精心设计纳米杯、纳米柱、纳米锥等特殊纳米结构,MetaSPR芯片在检测灵敏度和样本兼容性方面均实现了显著提升^[15]。该技术已被证实可在食品检测^[16-18]、生物医药^[7,19-23]、环境监测^[24]等多个领域具有良好的应用潜力。

尽管SPR技术已在亲和力检测领域获得了广泛应用,其主流实现方式仍依赖于传统二维金属薄膜的激发,且需借助复杂的光学元件与高昂的检测仪器。这一现状在很大程度上制约了该技术在基层及

资源受限场景中的推广与应用。相比之下,新一代MetaSPR芯片技术凭借其三维纳米阵列结构,仅需配备简易光学系统的检测设备,即可高效实现高精度的亲和力测定,显著降低了技术门槛与应用成本,为拓展SPR技术的应用范围提供了有力支持。因此,建立一套科学、系统且标准化的MetaSPR亲和力评价体系至关重要。

基于上述背景,本研究依托MetaSPR生物传感平台,旨在解决当前传统SPR技术所面临的局限性。研究内容涵盖分子亲和力测定及相互作用动态监测,通过实时追踪分子结合与解离过程,系统分析不同类型、不同亲和力分子样本的相互作用动力学特性。在此基础上,本研究提出并优化了一套完整的MetaSPR亲和力评价流程,涵盖样本制备、数据采集与数据分析等关键环节,确保评价结果的准确性与可靠性。本研究旨在为MetaSPR技术在亲和力检测领域的应用提供坚实的理论基础与标准化方法学支持,进而推动该技术在更广泛领域的应用与发展。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

扫描电子显微镜(SEM,德国ZEISS GeminiSEM 300); EPOCH酶标仪(美国Biotek); WeSPR™ 100X多功能分子检测仪、WeSPR™ HT8多功能分子检测仪、WeSPR™ One Auto生物分子相互作用仪(量准(武汉)生命科技有限公司)。

乙醇胺、磷酸盐缓冲液(PBS)、1-乙基-3-(二甲基氨基丙基)碳二酰亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)、槲皮素(Cat. Q4951)和甘油均购自Sigma-Aldrich(中国上海)。碳酸盐缓冲液(CBS, pH 9.6)、2-吗啉乙磺酸缓冲液(MES)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲溶液(HBS-ET)、含吐温-20的磷酸盐缓冲液(PBST)均购自量准(武汉)生命科技有限公司。SARS-CoV-2核蛋白/NP抗原(N蛋白)(Cat. RM1033)购自北京春雷杰创生物科技有限公司; SARS-CoV-2核蛋白/NP抗体(N抗体)7B9购自OriGene。蛋白A(Cat. No. 10600-P07E)、SARS-CoV-2核蛋白/NP抗体(N抗体)M08、重组人TGF- β RI蛋白购自Sino Biological。Immunoglobulin Antigen(Human IgG, Cat. No. SP001)购自Solarbio。新生儿Fc受体(Human FcRn)和人免疫球蛋白G1(Human IgG 1)购自ACROBiosystems; SAA抗体(SAA-06)、SAA抗原(SAA-Ag)和Gly再生液购自FaponBiotech。试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 芯片的制备与表征 芯片制备参照本实验室已发表文献方法进行^[25-26]。具体流程如下:首先,采用激光干涉光刻与反应离子刻蚀技术制备具有锥形纳米柱阵列的硅模具。随后,将模具置于含己基硅烷的真空干燥器中进行12 h疏水处理。接着,在模具表面旋涂聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)预聚体,经紫外光照固化3 min后剥离,获得带有反转纳米孔阵列结构的PET基板。最后,在该PET纳米孔阵列表面依次沉积15 nm钛(Ti)粘附层、70 nm银(Ag)层和20 nm金(Au)保护层,制得最终的MetaSPR金属芯片。

将金属芯片切割成96孔检测板大小并将其固定在标准开底96孔板上得到实验所用微孔板,建立高通量微孔板无管路式检测平台。本实验所用芯片和无底孔板组装成的96孔检测板尺寸和ELISA方法所使用的检测板一致,因此可以适应普通酶标仪进行检测。

将MetaSPR芯片与微流控技术相结合,通过在芯片表面精确构建微流控流道,建立了高精度微流控流路式检测平台。首先将MetaSPR芯片贴在已经制备好的双通道芯片卡槽,再在表面贴上100 μ m的微流控通道,最后贴上玻璃盖板,确保贴合紧密。

使用相机、扫描电子显微镜和光学检测仪记录MetaSPR芯片及96孔检测板和微流控芯片卡的物理和光学特性。采用0%~24%的甘油溶液(折射率范围为 $28\ 800 \times 10^{-6}$ RIU,间隔为 $1\ 200 \times 10^{-6}$ RIU)验证芯片对表面物质变化的响应灵敏度^[27]。在检测孔中分别加入50 μ L超纯水与梯度浓度的甘油溶液,扫描500~700 nm的全光谱,绘制 $OD_{590\text{ nm}} - OD_{575\text{ nm}}$ 对应不同折射率溶液的柱状图与标准曲线图。

1.2.2 芯片的表面功能化 对MetaSPR芯片进行表面羧基化修饰,首先采用50 mmol/L NaOH溶液、50 mmol/L HCl溶液、50%乙醇溶液和超纯水依次对芯片进行彻底清洁。清洁后,利用高纯度氮气将芯片表面吹干,以消除水分残留。随后,对芯片表面进行化学修饰,在每孔中加入50 μ L浓度为1 nmol/L

的硫代乙醇酸溶液,并在 37 °C 条件下孵育 2 h,以促进硫代乙醇酸与芯片表面的共价结合。反应完成后,使用 75% 的酒精和超纯水交替洗涤芯片板,去除未反应的硫代乙醇酸和可能的污染物,最后将芯片板拍干。

按照上述操作,在贴合微流控通道前对 MetaSPR 芯片进行处理,将芯片在 37 °C 条件下,用 10 μ L 浓度为 1 nmol/L 的硫代乙醇酸溶液处理 2 h。处理后组合微流控芯片卡,并置于 4 °C 的环境中保存,以保持其表面修饰的稳定性和活性,为后续的分析工作做好准备。

1.2.3 芯片表面配体修饰 固定在芯片表面的具有特定功能的分子,通常被称为配体(Ligand);而存在于溶液中的、待与配体相互作用的分子,则被称作分析物(Analyte)。检测中对不同的分子对利用不同方法对芯片表面进行修饰用于配体固定。在配体固定前先将芯片用超纯水和乙醇交替冲洗两次,放入 37 °C 的烘箱烘干。固定 M08 或 7B9 检测 N 蛋白,固定 FcRn 测定 IgG 1,固定 Protein A 测定 IgG,选择高吸附性能的 MetaSPR 芯片,直接将稀释好的配体(一般使用 CBS 缓冲液稀释原溶液至 25 μ g/mL)点样在烘干后的芯片孔中央后放入 4 °C 冰箱过夜。过夜后加入封闭液反应 1 h,甩干,放入 4 °C 冰箱备用。固定 榲皮素测定重组人 TGF- β RI 蛋白,选择按照上述“1.2.2”羧基化修饰处理的芯片,加入 EDC 溶液(50 mmol/L, pH 6.0 MES)和 NHS 溶液(50 mmol/L, pH 6.0 MES)体积比为 1:1 的混合溶液活化后,再将配体点样在芯片上放入 4 °C 冰箱过夜。过夜后同样进行封闭操作以占据多余位点。固定 SAA-Ag 测定 SAA-06 采用已经羧基化修饰的微流控芯片卡利用 WeSPR™ One Auto 生物分子相互作用仪进行在线活化、配体固定和封闭。

1.2.4 不同分子的亲和力检测 固定 M08 或 7B9 抗体检测新冠病毒 N 蛋白(0~296 nmol/L, 两倍稀释,稀释液均为 HBS-ET),固定 FcRn 测定 IgG 1(0~533 nmol/L, 两倍稀释,稀释液为 PBST),固定 Protein A 测定 IgG(0~107 nmol/L, 两倍稀释,稀释液为 HBS-ET)均采用无管路微孔芯片板进行实验。提前配制好梯度检测溶液加入普通微孔板备用,按照仪器操作步骤进行操作,即:在已经固定好对应配体的芯片板中每孔加入 50 μ L PBST 缓冲液检测基线,基线平衡后,分别加入 50 μ L 不同浓度的样本分析液,结合动力学曲线检测结束后,将未结合的液体替换为 150 μ L PBST 缓冲溶液,进行解离动力学曲线监测。

固定 榲皮素测定重组人 TGF- β RI 蛋白(0~210 nmol/L, 两倍稀释,稀释液为 HBS-ET)和固定 SAA-Ag 测定 SAA-06(0~107 nmol/L, 两倍稀释,稀释液为 PBST)均使用 MetaSPR 微流控芯片卡配合 WeSPR™ One Auto 生物分子相互作用仪进行亲和力检测。使用固定 榲皮素检测 TGF- β RI 蛋白时,先将 榲皮素使用光交联方法提前固定在芯片表面,制备好微流控芯片卡放入仪器中检测。将不同浓度的检测溶液和再生溶液加入标准微孔板,放入检测仪器中。空白缓冲液用于基线校正,流速设定为 40 μ L/min,分别进行 100 s 的结合期曲线和 200 s 的解离曲线测定,动力学数据分析采用 WeSPR™ One Auto 软件(Version 5.3.0)完成。

2 结果与讨论

2.1 芯片的表征

图 1A 右展示的是手机拍摄的 MetaSPR 芯片照片。由于纳米孔阵列结构等因素的影响,光线在芯片表面产生复杂的干涉现象,从而呈现出绚丽的彩虹效果;左图为芯片 SEM 表征图像,显示芯片表面为均一的纳米孔阵列结构,微纳米孔直径约为 200 nm。这种高度一致的纳米阵列结构,可确保检验过程能够稳定、可靠地开展,极大程度上减少了因结构差异导致的误差与波动;利用电子显微镜观察芯片表面,未加水与加水后因折射率的不同呈现出不同的颜色。图 1B 是 MetaSPR 的芯片及其组装的无管路的 96 孔芯片微孔板和制作的微流控芯片卡,芯片微孔板可适用多种不同的仪器,且可以同时实现多达 96 个样本的高通量检测,微流控芯片卡则能够实现微量样本的检测,且能够精准捕捉到分子结合和解离的动力学数据。

通过测定不同浓度甘油溶液的吸收光谱评估芯片基于 SPR 效应对界面折射率变化的响应灵敏度。从甘油吸收的全光谱图(图 1C、D、E)可以看出,随着甘油浓度和折射率的升高,吸收光谱逐渐红移。以超纯水为基准(起点),测得甘油溶液的全光谱图(图 1F),可以看出随着甘油浓度的增大,波峰逐渐

升高,波峰波谷的差值逐渐增大。测量3组,平行计算图中光密度变化值最大的590 nm与575 nm处的差值,以此作相应浓度甘油溶液的柱状图(图1G)。结果显示,甘油折射率与光密度的相关系数达到0.995(图1H),说明该芯片对折射率的变化有非常灵敏的响应。

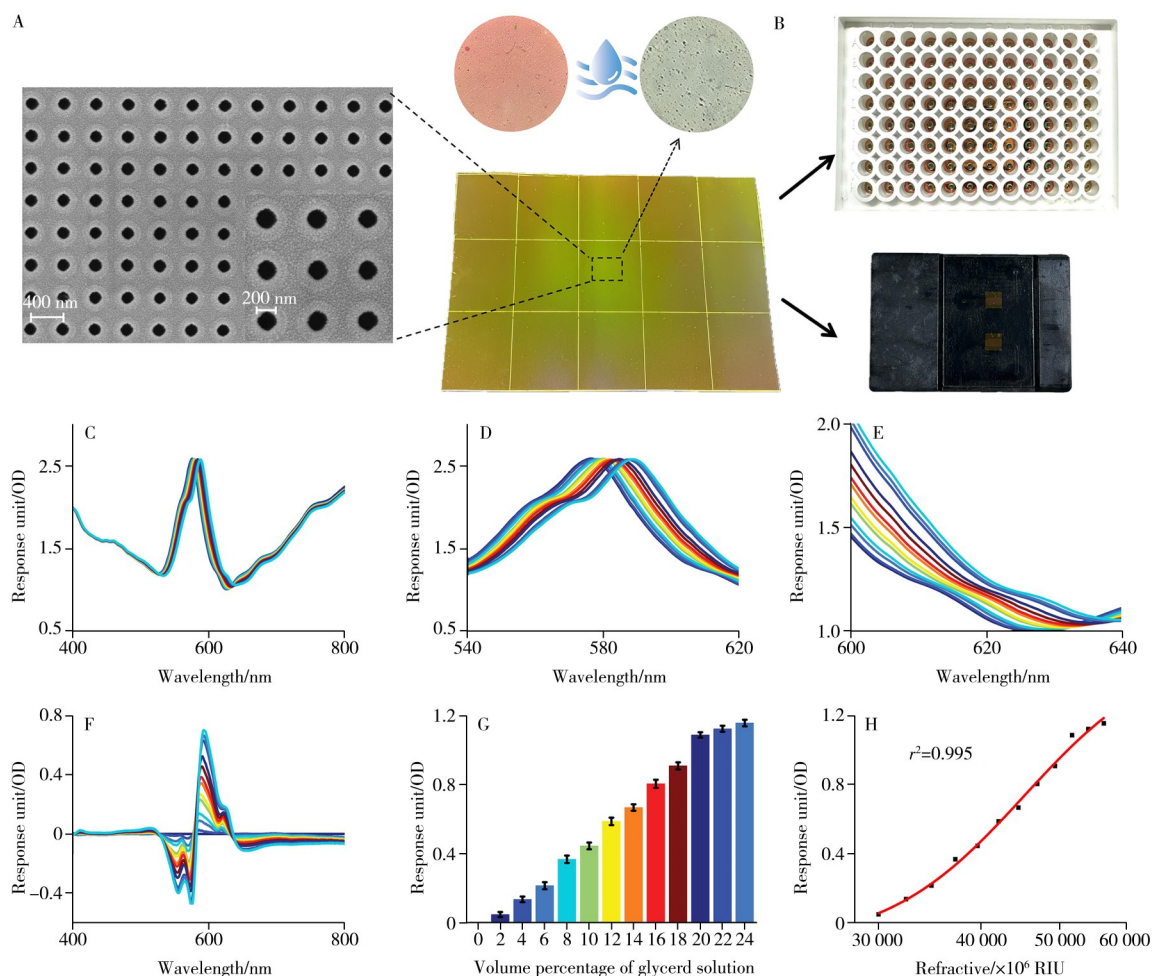


图1 芯片SEM扫描电镜图和手机拍摄的MetaSPR芯片照片(A)(中上右为芯片在空气中的显微照片,左为加水后的显微照片,芯片呈现不同的颜色);集成高通量96孔板的芯片微孔板和微流控芯片卡(B);梯度甘油溶液(浓度范围0%~24%,折射率范围为 28.800×10^{-6} RIU,间隔为 1.200×10^{-6} RIU)的全光谱吸收图(C);图A中540~620 nm的放大视图(D);图A中600~640 nm的放大视图(E);甘油溶液相较于超纯水的光密度变化图谱(F);甘油溶液对应的图D中波峰与波谷光密度的差值柱状图($OD_{590 \text{ nm}} - OD_{575 \text{ nm}}$)(G);溶液折射率(RIU)与光密度差值的相关系数(H)

Fig. 1 SEM scanning electron microscope image of the chip and the photo of MetaSPR chip taken by cell phone(A)(the upper middle right is the micrograph of the chip in air, the left is the micrograph after adding water, the chip shows different colors); High-throughput 96-well plate and microfluidic chip card composed of chips(B); Full-spectrum absorption graph of gradient glycerol solution(concentration range 0%~24%, refractive index range 28.800×10^{-6} RIU, interval 1.200×10^{-6} RIU)(C); Enlarged view of 540~620 nm in Fig. A(D); Enlarged view of 600~640 nm in Fig. A(E); Optical density change graph of glycerol solution compared to ultrapure water(F); The bar chart of the difference in optical density between peaks and troughs($OD_{590 \text{ nm}} - OD_{575 \text{ nm}}$) corresponding to the glycerol solution in Fig. D(G); The correlation between solution refractive index(RIU) and optical density difference(H)

2.2 基于MetaSPR生物传感器的亲和力评价

2.2.1 MetaSPR技术的检测原理

MetaSPR通过在金属表面构建高深宽比的三维纳米结构(如纳米杯阵列),替代传统平面基底,以显著增强局部电磁场效应,当入射光照射到表面光学金属纳米阵列结构(比如玻璃/PET等表面的金或银镀层)时,可引起金属自由电子的共振,由于电子共振致使光的二次发射,从而形成特定的透射、反射或吸收光谱(图2A、B)。当分子吸附到金属表面时,会引起折射率变化,进而导致共振波长位移。通过监测这种位移或者特定波长的光强变化,可实时、无标记地检测分子相互作用或浓度变化。在MetaSPR芯片检测过程中,芯片表面发生共振后,共振峰(或谷)发生位移,导致在某一固定检测波长处的光强显著降低,而在另一波长处的光强则可能显著上升。因此可以通过

获取生物反应过程中两波长的光强变化, 得到生物分子之间相互作用的特异性信号(图 2C), 以时间对光强作图, 可记录分子互作的动态全过程(结合、解离和再生)(图 2D)^[28-29]。

本研究基于 MetaSPR 技术的上述检测原理, 分别采用无管路式的芯片微孔板和流路式的微流控芯片卡测定了多种分子对间的亲和力结果, 并获得了 SPR 光谱图及相关动力学参数, 揭示了不同类型分子对的亲和力结合特性。

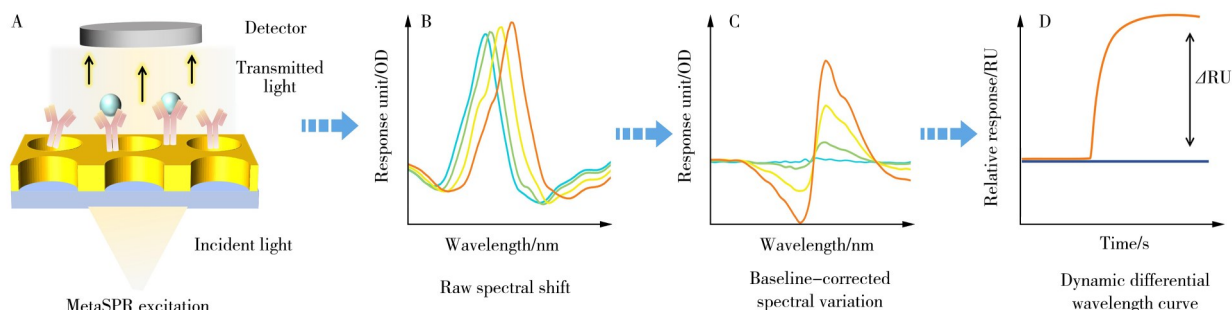


图 2 MetaSPR 芯片激发原理示意图(A); 不同浓度检测物对应的原始吸收光谱位移(B); 对原始光谱进行归零后显示特定两波长的强度变化(C); 以时间对光强作图得到分子互作结合与解离典型动力学拟合曲线图(D)

Fig. 2 Schematic diagram of the excitation principle of MetaSPR chip(A); Shifts of the raw absorption spectra corresponding to different concentrations of the detectors(B); Zeroing of the raw spectra to show the intensity changes at specific two wavelengths(C); Typical kinetic fitting curves of the molecular interactions binding and dissociation obtained by plots of the time against the light intensity(D)

2.2.2 高亲和力分子对 利用 WeSPR™ 100X 仪器检测 SARS-CoV-2 核蛋白(NP 抗原(N 蛋白)与 SARS-CoV-2 核蛋白(NP 抗体(N 抗体)的亲和力数据, 采用 Version 5.3.0 将采集的结合和解离数据进行拟合, 通过结合和解离曲线来确定 K_a 和 K_d 的值, 通过 K_d/K_a 获得 K_D 值以评估配体与分析物的结合能力^[23], K_D 值越小, 则分析物和配体之间的结合力越强。图 3A 为固定抗体检测蛋白的原理示意图。N 蛋白与单克隆抗体 7B9、M08 的亲和力参数显示: 7B9 抗体与 N 蛋白的 K_a 为 $6.41 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, K_d 为 $5.51 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 其 K_D 达 $8.60 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ (nmol/L 级别), 如图 3B, 在评价体系中属于高亲和力等级; 而 M08 抗体展现出更强的亲和力, 如图 3E, 其 K_a 值 ($1.32 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 与极低 K_d 值 ($2.38 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) 共同驱动 K_D 值低至 $1.80 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 同样小于 1 nmol/L, 在评价体系中属于高亲和力体系。两种抗体的 K_D 值均与报道的一般 SARS-CoV-2 N 蛋白-抗体亲和力数据(同数量级)一致, 验证了实验结果的准确性^[30-31]。

为突出特定波长的光强度变化, 对 7B9 与 M08 与 N 蛋白的吸收光谱进行归一化, 得到全光谱(图 3C、F); 同时将两波长光密度的差值 ($\text{OD}_{590 \text{ nm}} - \text{OD}_{575 \text{ nm}}$) 作柱状图(图 3D、G), 光密度差值与浓度表现出良好的正相关性, 证明该系统可以进一步用于抗体定量检测。

在亲和力评价体系中, 这两对分子是高亲和力的典型代表。这种结合类型在实际应用中具有重要意义, 在病毒感染早期阶段, 宿主细胞内 N 蛋白表达量处于低丰度状态, 而相关的抗体凭借其快速结合能力, 能够在复杂的细胞内环境中高效识别并捕获 N 蛋白, 且形成的抗原-抗体复合物稳定性足以抵御检测过程中的干扰因素, 保障了检测信号的持续性与准确性, 其特性为评估其他抗体-抗原对亲和力提供了参考, 为病毒学基础研究以及相关疾病的早期诊断与精准医疗提供了坚实的分子作用机制依据。

2.2.3 低亲和力分子对 抗体药物的半衰期是评估其药代动力学特性的重要参数之一, 直接影响药物的疗效和给药频率。其中, 抗体 Fc 片段与新生儿 Fc 受体(FcRn)的亲和力是决定其抗体半衰期的关键因素^[32-33]。抗体与 FcRn 的亲和力评价在抗体药物研发及应用中意义重大, 通过评估亲和力预测抗体药物的体内半衰期, 不仅可为优化临床给药方案(如减少给药频率、降低治疗成本)提供依据, 还能指导抗体工程改造与药物设计(如定向优化亲和力、设计双特异性抗体及融合蛋白)^[34], 同时有助于评估药物疗效与安全性(平衡疗效与蓄积风险), 推动候选药物筛选与商业化竞争, 更能深化对 FcRn 作用机制的基础研究, 为构建数学模型预测抗体药代动力学特性提供支撑, 是连接抗体结构、药代动力学与临床疗效的核心环节。

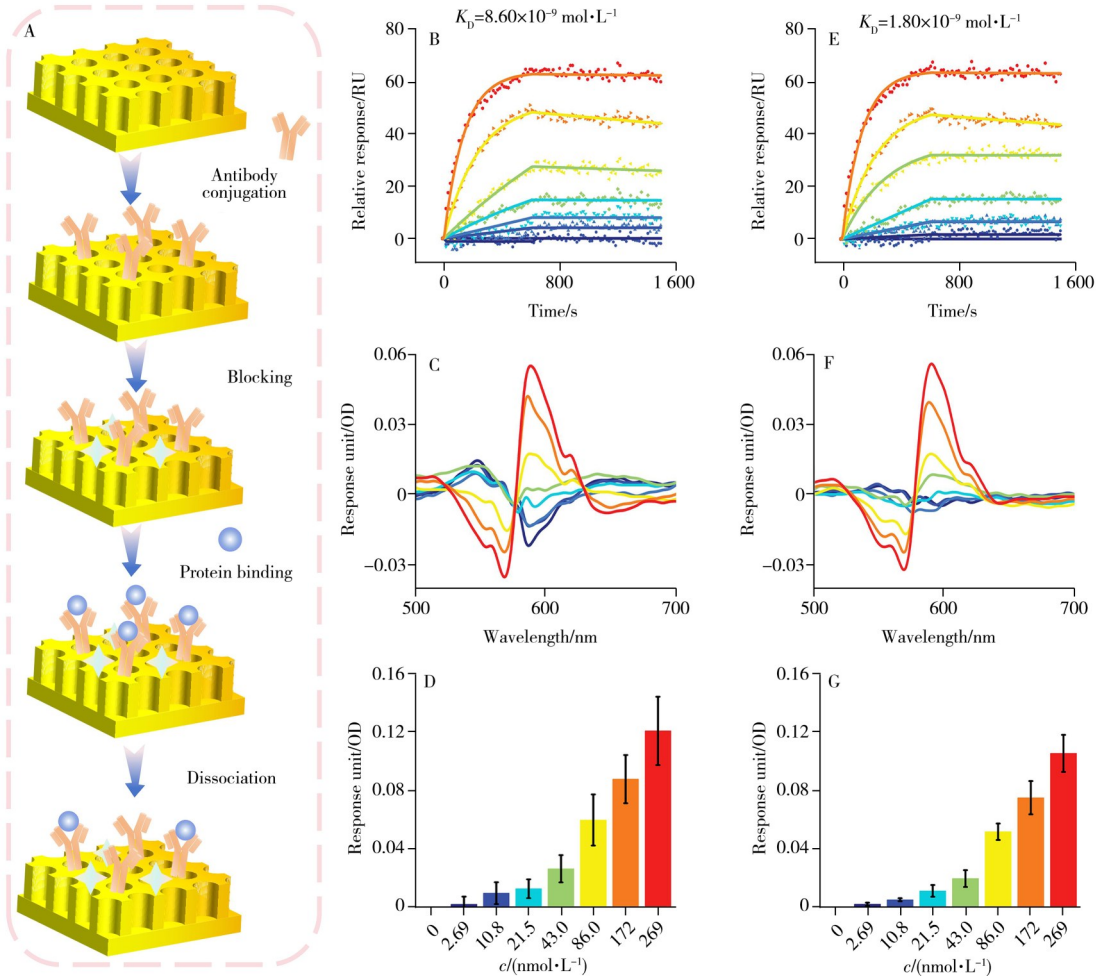


图3 固定抗体检测蛋白的原理示意图(A); 7B9与N蛋白(0~296 nmol/L)的结合与解离典型动力学拟合曲线图(B); 7B9与N蛋白结合的全光谱差(C); 7B9检测不同浓度N蛋白的光密度差值($\text{OD}_{590 \text{ nm}} - \text{OD}_{575 \text{ nm}}$)(D); M08与N蛋白(0~296 nmol/L)的结合与解离典型动力学拟合曲线图(E); M08与N蛋白结合的全光谱差(F); M08检测不同浓度N蛋白的光密度差值($\text{OD}_{590 \text{ nm}} - \text{OD}_{575 \text{ nm}}$)(G)

Fig. 3 Schematic diagram of the principle for fixed antibody detection of proteins(A); Typical kinetic fitting curves of 7B9 binding to and dissociating from the N protein(0~296 nmol/L)(B); Full spectral difference of 7B9 binding to the N protein(C); Optical density difference($\text{OD}_{590 \text{ nm}} - \text{OD}_{575 \text{ nm}}$) of 7B9 detecting N protein at different concentrations(D); Typical kinetic fitting curves of M08 binding to and dissociating from the N protein(0~296 nmol/L)(E); Full spectral difference of M08 binding to the N protein(F); Optical density difference($\text{OD}_{590 \text{ nm}} - \text{OD}_{575 \text{ nm}}$) of M08 detecting N protein at different concentrations(G)

采用全自动高通量的 WeSPR™ HT8 仪器首先测定了 FcRn 蛋白与不同浓度 IgG 1 的亲和力, 采用固定蛋白检测抗体的方法进行测定。具体操作如图 4A 所示, 首先利用物理吸附固定蛋白后, 对芯片进行封闭处理, 以避免抗体的非特异性吸附, 然后进行抗体结合与解离检测。图 4B 展示了该分子对的亲和力和动力学曲线, 曲线在短时间内快速上升, 展现出快结合特性, 表明分子间能够快速识别并结合, 反应速率较高。该分子对的 K_a 为 $5.31 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, K_d 为 $7.19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, K_D 为 $1.35 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。 K_D 数值未达到 nmol/L 级别, 处于中低亲和力范围内。该检测结果与早期文献报道一致, 即大多数人类 FcRn 与小鼠 IgG 1 的结合都非常弱^[35]。

本研究测定的 FcRn-IgG 相互作用为低亲和力分子对的典型代表, 其动力学参数清晰展现了低亲和力相互作用的特征: 具有适中的结合速率和较高的解离速率, 可确保分子识别效率; 平衡常数 K_D 在 $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$ 范围, 说明此类分子的相互作用既具有特异性又保持可逆性。该结果进一步证明, MetaSPR 技术平台可用于抗体 Fc 片段与 FcRn 受体这类分子的亲和力的评估, 进而预测抗体的半衰期, 为治疗性抗体的开发提供了重要的理论依据和技术支持。

此外, 本研究中的分子对 槲皮素与人 TGF- β RI 蛋白 ($K_a = 2.94 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $K_d = 4.80 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1.63 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$) 是典型的低亲和力相互作用体系, 如图 4C 所示, 其较高的平衡解离常数 ($K_D = 1.63 \times$

10^{-8} mol/L), 表明相互结合强度较弱, 需依赖高浓度配体才能有效占据靶点, 这一特征在天然多酚类化合物(如槲皮素)与多靶点调控受体中较为普遍。在解离前段, 由于结合段溶液中含有样本分子, 折射率较高, 而解离溶液的折射率较低, 因此换液后会引信号的急剧变化, 这属于高灵敏SPR分析中常见的溶积效应(Bulk effect)。低亲和力分子对通常呈现以下特性: (1) 剂量依赖性显著, 需通过提升浓度来增强效应, 由图4C可以看出, 高浓度的蛋白与槲皮素反应的响应程度更为明显; (2) 动态平衡高度依赖微环境, 其结合易受pH值、氧化应激等因素影响, 可能增强或削弱生物学效应。

2.2.4 快结合分子对 Protein A能特异性与IgG的Fc段结合(图5A), 基于该分子对的独特结合方式, 选择固定蛋白检测抗体的方法进行实验, 以保证IgG的Fc段与蛋白有效结合。

针对快结合分子对, 采用WeSPR™ One Auto仪器, 该设备具备先进的自动进样检测功能, 能够高效精准地获取亲和力结果, 为后续研究提供可靠数据。利用该仪器对分子对进行全自动检测, 以避免人工实验加样时带来的延迟, 及时检测结合瞬间的响应数据。利用微流控芯片卡进行检测, 通过仪器在线将Protein A固定在芯片传感器表面并进行封闭操作, 将不同浓度的IgG(0~107 nmol/L)以二倍梯度稀释后添加到普通96孔样本稀释板中, 随后按仪器指示顺序对应加入甘氨酸再生液。实时采集测定亲和力的相关数据, 并计算亲和力结果。通过拟合及计算得到Protein A与IgG的结合参数, 其中 K_a 为 $4.81 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, K_d 为 $3.05 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, K_D 为 $6.33 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 。该结果与之前报道的结论一致, 证明了实验结果的准确性^[15]。

Protein A与IgG的相互作用表现出典型的快结合分子对特征, 其 $K_a \geq 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 在评价体系中属于快结合范围, 表明两者能在毫秒至秒级时间内高效结合(图5B)。一般快结合分子对的 K_a 理想范围 $\geq 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 但 $10^4 \sim 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 也属于快结合的可接受范围内。该分子对的极低 K_D 反映了其高亲和力特征, 但这一亲和力主要由快速结合而非缓慢解离驱动, 区别于慢结合分子对。在分子相互作用动力学研究中, Protein A与IgG的相互作用体系凭借其“快速结合”的显著特征, 成为其他抗体-抗原相互作用快结合特征判断的典范模型。且该分子对的响应值与其浓度呈正相关(图5C、D)。证明了MetaSPR微流控检测平台在实际应用中也可用于生物相互作用的定量检测。该体系不仅为分子识别动力学研究确立了重要的评价基准, 更在免疫治疗药物研发、高灵敏度诊断试剂开发、蛋白质设计等前沿领域展现出关键的指导价值, 有力推动了精准医疗和生物工程技术的发展与创新。

2.2.5 快解离分子对 针对快速解离的分子对, 为了精准捕捉解离瞬间的数据, 以WeSPR™ One Auto为主要检测设备, 使用羧基修饰的芯片对关键分子对SAA-Ag和SAA-06进行亲和力测定(图6A)。首先按上述“1.2.2”方法在芯片上修饰羧基, 以在芯片表面形成牢固的共价键, 再通过仪器在线将SAA-Ag结合在羧基上, 使蛋白在检测过程中不会轻易脱落; 对芯片进行封闭处理后进行亲和力评价。

固定SAA-Ag检测不同浓度的SAA-06, 亲和力曲线图呈现出对应的梯度(图6B)。对该分子对结合的吸收谱进行检测得到光谱差, 发现不同浓度的SAA-06同样呈现正确的梯度(图6C)。对全光谱图中突出波长光密度的差值($\text{OD}_{590 \text{ nm}} - \text{OD}_{575 \text{ nm}}$)作柱状图(图6D)。

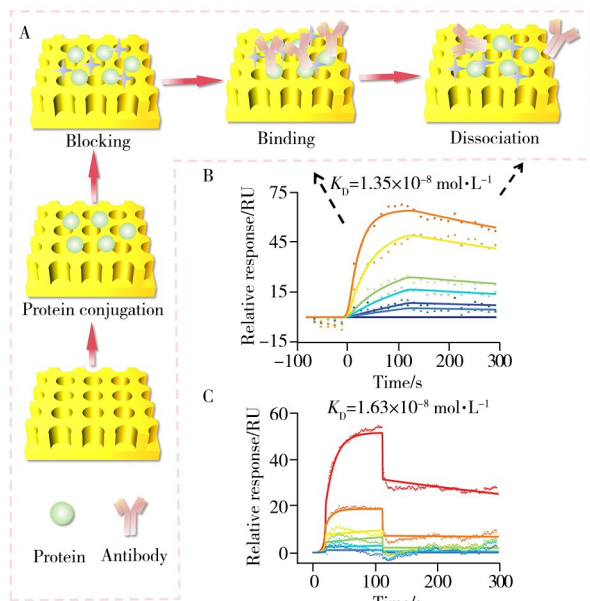


图4 芯片表面固定抗原蛋白检测抗体的示意图(A); FnRn与IgG 1(0~533 nmol/L)的结合与解离曲线图(B); 槲皮素与人TGF-β RI蛋白(0~210 nmol/L)的结合与解离曲线图(C)

Fig. 4 Schematic diagram of detecting antibodies with antigen proteins immobilized on the chip surface (A); Binding and dissociation curves of FnRn with IgG 1 (0~533 nmol/L) (B); Binding and dissociation curves of quercetin with human TGF-β RI protein (0~210 nmol/L) (C)

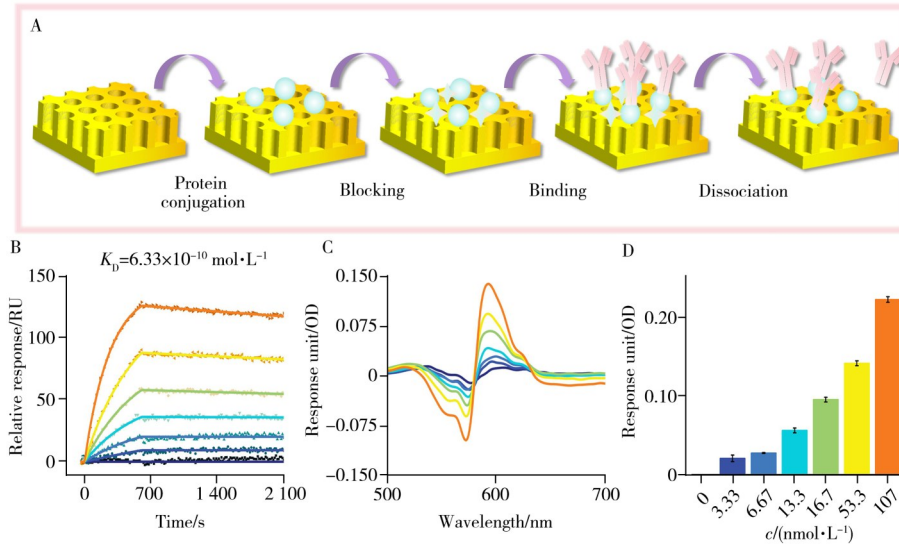


图5 固定Protein A测IgG的原理示意图(A)；Protein A与不同浓度IgG(0~107 nmol/L)的动力学曲线图(B)；固定Protein A测不同浓度IgG的全光谱图(0~107 nmol/L)(C)；不同浓度IgG的光密度差值($OD_{590\text{ nm}} - OD_{575\text{ nm}}$)(D)

Fig. 5 Schematic diagram of the principle for measuring IgG using immobilized Protein A (A) ; Kinetic curves of Protein A with different concentrations of IgG (0~107 nmol/L) (B) ; Full spectra of immobilized Protein A measuring different concentrations of IgG (0~107 nmol/L) (C) ; Optical density difference ($OD_{590\text{ nm}} - OD_{575\text{ nm}}$) for different concentrations of IgG (D)

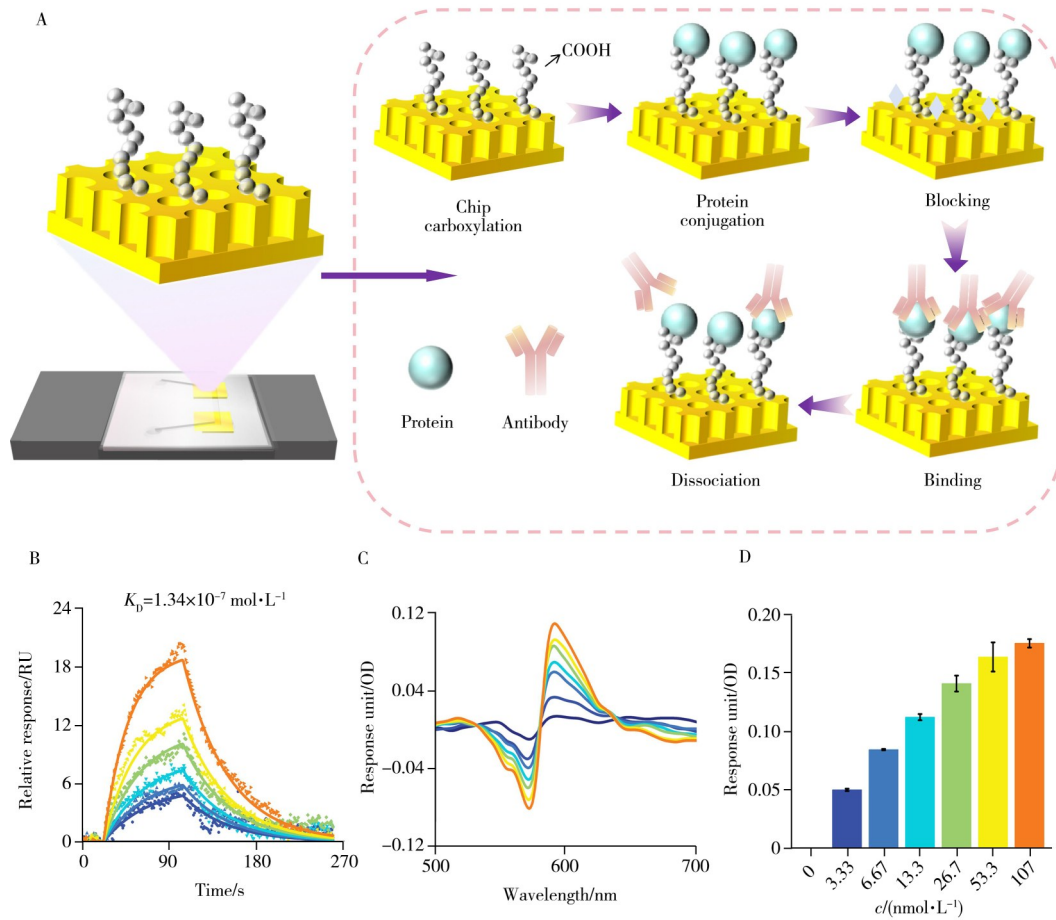


图6 芯片羧基化后固定蛋白测抗体的示意图(A)；SAA-Ag测SAA-06的结合解离曲线图(B)；SAA-Ag测SAA-06的全光谱图(C)；SAA-Ag与不同浓度SAA-06结合的光密度差值($OD_{590\text{ nm}} - OD_{575\text{ nm}}$)(D)

Fig. 6 Schematic diagram of antibody detection by protein immobilization after chip carboxylation (A) ; Binding and dissociation curve of SAA-Ag measuring SAA-06 (B) ; Full spectra of SAA-Ag measuring SAA-06 (C) ; Optical density difference ($OD_{590\text{ nm}} - OD_{575\text{ nm}}$) of SAA-Ag binding with different concentrations of SAA-06 (D)

观察该分子对的动力学曲线图, SAA-Ag 与 SAA-06 的结合过程缓慢, 起始阶段反应速率平缓, 随着时间推移结合程度虽有增加, 但整体进程明显慢于高亲和力分子对。解离阶段信号则在短时间内直线式迅速下降。为量化分析亲和力数据, 经拟合计算, 该分子对的 K_a 为 $1.62 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, K_d 为 $2.17 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, K_D 为 $1.34 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。该分子对 $K_d \leq 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 具有显著的快解离特征, 且 K_D 值相对较大, 表明 SAA-Ag 与 SAA-06 之间亲和力较弱。综上, SAA-Ag 与 SAA-06 分子间结合较快、解离快, 整体呈现较低的亲和力, 且低亲和力由快解离驱动, 是典型的快解离分子对。

3 结 论

本研究基于 MetaSPR 技术的两种平台, 并搭配系列 WeSPR 分子互作仪器, 测定了不同类型的分子对间分子相互作用的亲和力动力学参数, 揭示了分子对结合和解离的差异, 并为分子间相互作用的动态机制提供了实验依据。MetaSPR 生物传感器在分子间亲和力测定中表现出高准确性和稳定性, 能实时监测分子结合与解离过程, 获取关键动力学参数, 为分子对提供详细的亲和力信息, 检测结果准确稳定, 可为生物化学和生物物理研究提供数据支持。

MetaSPR 技术的独特优势使其在药物设计、食品工程和环境检测等领域展现出巨大的潜力, 能快速评估药物与蛋白的亲和力, 检测食品中的小分子, 以及实现对污染物或病原体的快速、精准检测。未来, MetaSPR 平台将有望继续向便携化和智能化发展, 集成微流控技术和新型材料, 实现小型化和掌上检测。结合人工智能, MetaSPR 平台将成为信息化、智能化的检测系统, 实时处理高通量数据, 提高检测效率, 为科研和工业应用提供高效、精准的解决方案。

参考文献:

- [1] Oostindie S C, Lazar G A, Schuurman J, Parren P W H I. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2022**, 21(10): 715–735.
- [2] Lupu L M, Wiegand P, Holdschick D, Mihoc D, Maeser S, Rawer S, Völklein F, Malek E, Barka F, Knauer S, Uth C, Hennermann J, Kleinekofort W, Hahn A, Barka G, Przybylski M. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22(23): 12832.
- [3] Xu S, Shen L, Zhang M, Jiang C, Zhang X, Xu Y, Liu J, Liu X. *Bioinformatics*, **2024**, 40(7): btac413.
- [4] Zhu W, Wang Y, Lv L, Wang H, Shi W, Liu Z, Zhou M, Zhu J, Lu H. *Acta Pharm. Sin. B*, **2023**, 13(5): 2071–2085.
- [5] Tabatabaei M S, Ahmed M. *Methods Mol. Biol.*, **2022**, 2508: 115–134.
- [6] Capelli D, Scognamiglio V, Montanari R. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2023**, 163: 117079.
- [7] Zhou J, Wang Y, Zhang G J. *Coord. Chem. Rev.*, **2024**, 520: 216149.
- [8] Yang Y, Dai Z, Zou X Y. *J. Instrum. Anal.* (杨彦, 戴宗, 邹小勇. 分析测试学报), **2009**, (11): 1344–1350.
- [9] Ashrafi S M T, Mohanty G. *Plasmonics*, **2025**, 20(8): 1–21.
- [10] Petryayeva E, Krull U J. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 706(1): 8–24.
- [11] Meoyi M P, Mpofu K T, Sekhwama M, Mthunzi K P. *Plasmonics*, **2024**, 20(7): 1–40.
- [12] Gupta B D, Kant R. *Opt. Laser Technol.*, **2018**, 101: 144–161.
- [13] Fan H, Li R, Chen Y, Da Q, Xiong C, Zhang Y, Qin Z, Liu G L, Huang L. *Chem. Eng. J.*, **2024**, 501: 157495.
- [14] Wijaya E, Lenaerts C, Maricot S, Hastanin J, Habraken S, Vilecot J P, Boukherroub R, Szunerits S. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **2011**, 15(5): 208–224.
- [15] Chen Y, Fan H, Li R, Zhang H, Zhou R, Liu G L, Sun C, Huang L. *Adv. Sci.*, **2024**, 11(46): 2404559.
- [16] Yao T, Li T F, Qin Y C, Wang J, Zhao Z, Gu X, She Y X. *J. Instrum. Anal.* (姚婷, 李腾飞, 秦玉昌, 王静, 赵祯, 谷旭, 余永新. 分析测试学报), **2015**, 34(2): 237–244.
- [17] Fan H, Li R, Chen Y, Zhang H, Zeng S, Ji W, Hu W, Yin S, Li Y, Liu G L, Huang L. *Biosens. Bioelectron.*, **2024**, 248: 115974.
- [18] Zhou T, Ji W, Fan H, Zhang L, Wan X, Fan Z, Liu G L, Peng Q, Huang L. *Biosensors*, **2023**, 13(7): 681.
- [19] Chen M, Xie Y, Li M. *Nano Lett.*, **2024**, 24(37): 11520–11528.
- [20] Li R, Fan H, Zhou H, Chen Y, Yu Q, Hu W, Liu G L, Huang L. *Adv. Sci.*, **2023**, 10(24): 2301658.
- [21] Li R, Fan H, Chen Y, Yin S, Liu G L, Li Y, Huang L. *Adv. Sci.*, **2025**, 12(4): 2410376.
- [22] Zhao Y, Li R, Liu Z, Zhou H, Yang J, Zhang S, Huang L, Liu G L, Zhang Q, Jin M. *Transbound. Emerg. Dis.*, **2024**, 2024(1): 9350822.
- [23] Fan H, Huang L, Li R, Chen M, Huang J, Xu H, Hu W, Liu G L. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(46): 2203635.
- [24] Wekalao J, Patel S K, Balamurugan A M, Al Zahrani F A. *Plasmonics*, **2024**, 20(7): 1–22.
- [25] Zhang W, Dang T, Li Y, Liang J, Xu H, Liu G L, Hu W. *Sens. Actuators B*, **2021**, 348: 130711.
- [26] Dang T, Hu W, Zhang W, Song Z, Wang Y, Chen M, Xu H, Liu G L. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 142: 111494.

- [27] Song L, Wang Z, Zhou D, Nand A, Li S, Guo B, Wang Y, Cheng Z, Zhou W, Zheng Z, Zhu J. *Sens. Actuators B*, **2013**, 181: 652–660.
- [28] Li R, Zhou Y, Chen Y, Zhou L, Yang Y, Xiao J, Liu G L, Wang J, Huang L, Li Y. *ACS Nano*, **2025**, 19(12): 12007–12020.
- [29] Huang L, Ding L, Zhou J, Chen S, Chen F, Zhao C, Xu J, Hu W, Ji J, Xu H. *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 171: 112685.
- [30] Kang S, Yang M, He S, Wang Y, Chen X, Chen Y Q, Hong Z, Liu J, Jiang G, Chen Q, Zhou Z, Zhou Z, Huang Z, Huang X, He H, Zheng W, Liao H X, Xiao F, Shan H, Chen S. *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1): 2697.
- [31] Wang Z, Hu N, Zhou Y, Shi N, Shen B, Luo L, Feng J. *Sci. Rep.*, **2022**, 12(1): 8469.
- [32] Ye Y M, Cho Y S, Lee S Y, Park J W, Choi J H, Kim S H, Lee S Y, Shim Y, Song E, Sim S, Pak K C, Cho H J, Kim S K, Jang M H, Park H S. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2025**, 155(2): AB212.
- [33] Hu M S, Wei S L, Zhou W Y, Wang P L. *J. Zhejiang Univ.: Med. Sci.* (胡茫莎, 韦树丽, 周武源, 王萃莉. 浙江大学学报: 医学版), **2021**, 50(4): 537–544.
- [34] Mandrup O A, Ong S C, Lykkemark S, Dinesen A, Rudnik-Jansen I, Dagnæs-Hansen N F, Andersen J T, Alvarez-Vallina L, Howard K A. *Commun. Biol.*, **2021**, 4(1): 310.
- [35] Zhou J, Johnson J E, Ghetie V, Ober R J, Sally Ward E. *J. Mol. Biol.*, **2003**, 332(4): 901–913.

(责任编辑: 盛文彦)