

性能媲美进口主流品牌的国产 SPR 仪

——分子互作分析应用举例

艾润娜

(北京英柏生物科技有限公司, 北京 10000)

摘要: 研究蛋白功能离不开对蛋白相互作用的分析。表面等离子共振 (SPR) 仪器由于其免标记、实时记录数据等优势, 不仅可以测定亲和力, 还可以测定动力学常数, 因此 90 年代以来逐渐成为生物分子相互作用的主流工具。但是 SPR 仪器和芯片长期被进口品牌垄断, 缺乏国产供应商。2022 年, 北京英柏生物科技有限公司的新一代 SPR 仪器 MI-S200D 研发成功。为了验证该仪器测定动力学常数的准确性, 研究者用 MI-S200D 测定了 ACE2 和野生型 SARS-CoV2-Spike RBD 的动力学常数, 其结果与文献中使用 Biacore S200 测定的结果基本一致。实验结果提示, 英柏的 MI-S200D SPR 仪器可以用来测定生物分子相互作用的动力学常数, 结果稳定可信。

关键词: 国产 SPR 仪; 生物分子相互作用; 蛋白相互作用

1 蛋白相互作用研究的重要性

蛋白质是生命活动的主要承担者。无论是 DNA 的复制、mRNA 的转录、蛋白质的翻译, 还是能量代谢、物质转运、信号的识别和传导, 所有细胞层面的生命活动都离不开各种不同功能的蛋白以及它们之间的相互作用。

蛋白通过相互作用行使它们的功能。有一些相互作用使得不同蛋白 (或相同蛋白) 形成一个稳定的多亚基复合体, 比如血红蛋白。还有一些相互作用是瞬时的, 例如, 跨膜蛋白 EGFR 在其受体结合结构域与 EGF 结合后, 会发生一系列级联反应 (二聚化、激酶结构域激活、自身磷酸化、募集多种胞浆蛋白), 从而引起下游通路的活化。上世纪 90 年代以前, 蛋白功能分析的研究主要聚焦于单一的蛋白。但是由于绝大多数蛋白通过相互作用来行使其功能, 研究者越来越意识到, 只有在相互作用的背景下, 蛋白的功能才能被正确地描述和诠释。

2 SPR—分子相互作用分析的主要手段

从 1991 年以来, 表面等离子共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 仪器逐渐成为生物分子相互作用的主流分析工具。SPR 相对其它传统结合试验 (如 Co-IP, ELISA, 放射免疫试验, 以及基于荧光的试验等) 具有免标记、实时记录数据、蛋白用量低等优势。SPR 可以实现结合速率常数和解离速率常数测定。在某些情况下, 单独的亲和力不足以阐明问题, 尤其是在解释生物学作用机制、筛选治疗性抗体或评价蛋白-药物复合物的稳定性的时候。

2.1 SPR 的工作原理

SPR 技术是基于光反射原理的技术。入射光波长确定的情况下，当入射光以临界角照射到两种具有不同折射率的介质界面时，金属介质内的自由电子发生共振并吸收光能量，使得反射光在一定角度内大大减弱；使反射光在一定角度内完全消失的入射角称为 SPR 角。SPR 角随金属薄膜表面折射率变化而变化，而折射率的变化主要与金表面结合的分子质量成正比。因此，通过对生物反应过程中 SPR 角的动态监测可以获取生物分子之间相互作用的特异信号。

在一个典型的 SPR 实验中，相互作用分子对中的一方被固定在镀金的传感器芯片表面（配体），另一方流过芯片（分析物，分子量范围从小分子到整个细胞），通过实时收集传感器表面的质量变化，结合和解离过程被全程记录下来，收集到的数据可以回答很多生命科学问题，如结合特异性，活性浓度，动力学，亲和力及热力学等。

2.2 SPR 仪器和芯片一直被进口品牌垄断，缺乏国产供应商

基于 SPR 技术的仪器和配套生物芯片价格昂贵，运行维护成本较高。目前国内外市场上 SPR 仪器和芯片供应一直被进口品牌垄断。北京英柏生物科技有限公司自主研发最新推出的 MI-S200D SPR 分子互作分析仪，配有自主研发的芯片和分析软件，可以准确表征蛋白互作的动力学数据。高端 SPR 设备和相关耗材的国产化大大降低了分子互作用户的仪器购置和使用成本。此外，英柏生物芯片制备具有研发灵活性为不同研究需求中芯片的个性化定制提供了可能。

Inter-Bio MI-S200D 应用案例

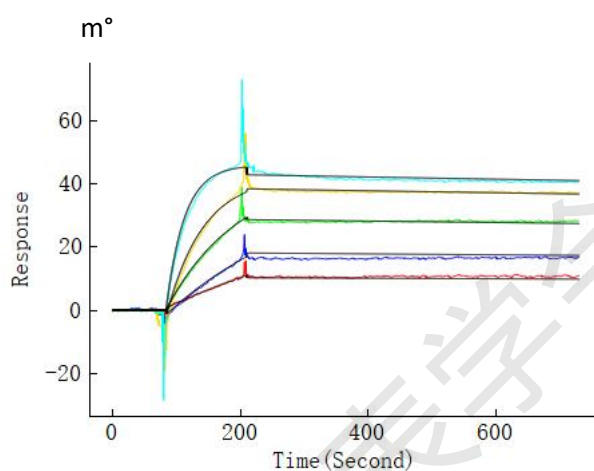
冠状病毒刺突蛋白（Spike Protein）通过受体结合结构域（RBD）识别宿主细胞受体 ACE2 并介导病毒与细胞膜的融合，在病毒感染中起关键作用。RBD 结构域的氨基酸改变会影响病毒与受体细胞的结合，并改变病毒的侵染特点。因此了解冠状病毒刺突蛋白 RBD 与细胞 ACE2 受体的结合机制，对于阐明冠状病毒侵染机制和开发特异性药物具有非常重要的意义。

在全球新冠病毒（COVID-19）疫情爆发期间，SPR 仪器作为分子互作的有力工具得到广泛应用。不同型号 SPR 仪器测定的 SARS-CoV-2 Spike RBD 与细胞受体 ACE2 的动力学常数也被报道。为了验证 Inter-Bio MI-S200D SPR 测定动力学常数的准确性，研究者在 Inter-Bio MI-S200D SPR 上用捕获法测定了 ACE2 与 SARS-CoV-2 Spike RBD（野生型）的动力学常数，并与文献中的采用的 Biacore S200 检测数据结果进行了比较，两者测定结果基本一致。详细实验数据阐述如下。

参照文献报道的 Biacore 测试过程，在 Inter-Bio MI-S200D SPR 上使用基本相同的实验条件，以 ACE2-his 作为配体（捕获法），RBD-mFc 作为分析物。首先用氨基偶联法将 anti-His 抗体饱和和偶联到 CM5 芯片上，偶联水平 2000-3000 m²，再生条件为 10 mM gly-HCl（pH 1.5），多次重复配体捕获结果证明，ACE2-His 捕获水平稳定（捕获水平 90m²，变异

系数 1.76%)。使用运行缓冲液采用倍比稀释法稀释 RBD-mFc 溶液，得到浓度为 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM 系列分析物溶液，运行缓冲液作为 0nM 溶液。每个循环测试一个浓度的分析物，分析物结合时间 120s，解离时间 550s。

实验数据采用英柏 Inter-Bio 自主研发的 SPR 分析软件分析，使用 1:1 动力学模型进行全局拟合。拟合结果见图 1。拟合 R_{max} 为 43.6 m° ，根据捕获水平计算得到的理论 R_{max} 为 54.5 m° ，两者差异在可接受范围内。



$k_a(1/(M*s))$	$k_d(1/s)$	$KD(M)$
$3.46E+05$	$8.44E-05$	$2.44E-10$

图1 ACE2 与 RBD 的 SPR 结果, Inter-Bio MI-S200D

文献报道：研究者使用 Biacore S200 仪器，同样采用捕获法测定 ACE2-His 与 SARS-CoV2-RBD 的 SPR 结果如图 2 所示。文献报道二者的亲和力为 0.37 nM，与上述研究者使用 Inter-Bio MI-S200D 测定的结果 0.244 nM，差异不超过 2 倍。

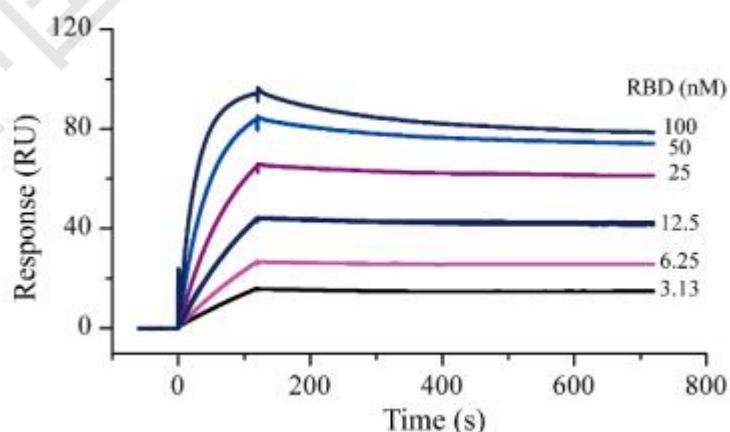


图2 ACE2 与 RBD 的 SPR 结果, Biacore S200

(文献出处: *Molecules* 2021, 26 (1) ,57; <https://doi.org/10.3390/molecules26010057>)

上述实验结果显示，使用 Inter-Bio MI-S200D 可以测定 ACE2 与 RBD 的动力学常数，数据结果与文献报道的使用 Biacore S200 测定得到的结果基本一致。

中国仪器仪表表学会