

关键字或短语:

Octet®、生物层干涉、BLI、非标记、生物传感器、生物分子相互作用分析、亲和力、动力学表征、结合动力学、实时动力学、检测开发和优化

使用 Octet® 平台 进行分子间结合动力学分析

问题咨询请发送电子邮件至 CNbioa.support@sartorius.com。

摘要

检测和定量分子间的相互作用对于发现和选择生物治疗先导药物至关重要。Octet® 分子相互作用分析系统采用非标记的生物层干涉 (BLI) 技术，可提供一种快速而直接的方法，用于准确测定结合特异性、亲和力和动力学，对于从早期发现到生产质控的整个生物制药开发过程都有极大帮助。本应用指南介绍了 Octet® 系统在治疗药物开发和生命科学研究中进行非标记的结合检测的技术原理、功能和优势。同时，本指南还提供了实验方法的开发、优化、数据分析和结果报告等方面的指导和最佳实践。

了解更多：www.sartorius.com.cn

目录

简介.....	3	■ 基线步骤.....	15
Octet® 系统.....	3	■ 结合步骤.....	16
“浸入即读”生物传感器.....	4	■ 解离步骤.....	17
生物层干涉技术.....	8	■ 非特异性结合.....	17
非标记分析的优势.....	8	■ 生物传感器再生.....	18
结合动力学 - 基本原理.....	9	如何运行结合动力学检测.....	21
■ 结合动力学实验.....	9	结合动力学数据分析.....	22
■ 术语定义.....	10	■ 识别非典型的结合.....	22
■ R_{eq} 、 R_{max} 和 KD 的关系.....	11	■ 处理参数.....	24
如何设计结合动力学实验.....	11	■ 选择曲线拟合模型.....	24
■ 选择合适的生物传感器.....	12	■ 1:1 结合模型.....	25
■ 用于动力学分析的链霉亲和素生物传感器.....	12	■ 2:1 非均质配体模型.....	25
■ 基于捕获的方法.....	12	■ 物质迁移模型.....	26
■ 检测顺序.....	12	■ 1:2 双价分析物模型.....	26
■ 配体固化：将生物素化蛋白固化在链霉亲和素生物传感器上.....	13	■ Local Fitting: Full vs. Partial Fit.....	27
■ 使用第二代氨基偶联传感器 (AR2G) 的固化.....	13	■ Global Fit.....	27
■ 优化配体固化密度.....	14	■ 评估拟合质量.....	28
■ 检测缓冲液.....	15	结论.....	28

简介

直接测量生物分子间相互作用对于生物治疗药物的发现和开发极为重要。对此，赛多利斯 Octet® 平台的非标记分析技术提供了一种强大的方法，可用于获取有关生物分子复合物形成速率和复合物稳定性的准确信息，从而帮助研究人员通过这些关键信息了解药物 - 靶标相互作用。相互作用的亲和力和直接影响力直接影响生物制剂的有效剂量，因此了解结合机制对于候选药物的有效性和可取性具有重要意义。因此特异性、亲和力和动力学等相互作用的实时数据对于生物制药行业从早期研发到生产质控的各个阶段都是非常重要的（图 1）。

在药物开发的早期，有效选择候选治疗药物有助于节省时间和资源并避免后期失败。例如，借助于高通量的解离速率排序，我们能够在粗样品的初步检测中筛选出亲和力最高的克隆。在开发过程中，通过将实时动力学分析与亲和力成熟等优化技术相结合，可以获取有关先导候选药物的亲和力和结合机制的宝贵信息。

下游生产过程中则需要根据药物在不同的生长条件或缓冲液环境下的特异性、选择性、稳定性和结合率等详细数据，做出更明智的流程决策。

非标记技术对于分子相互作用的动力学分析具有明显的价值，可以解决生物样品的生产一致性，高质量的动力学结合

活性等很多实际问题。

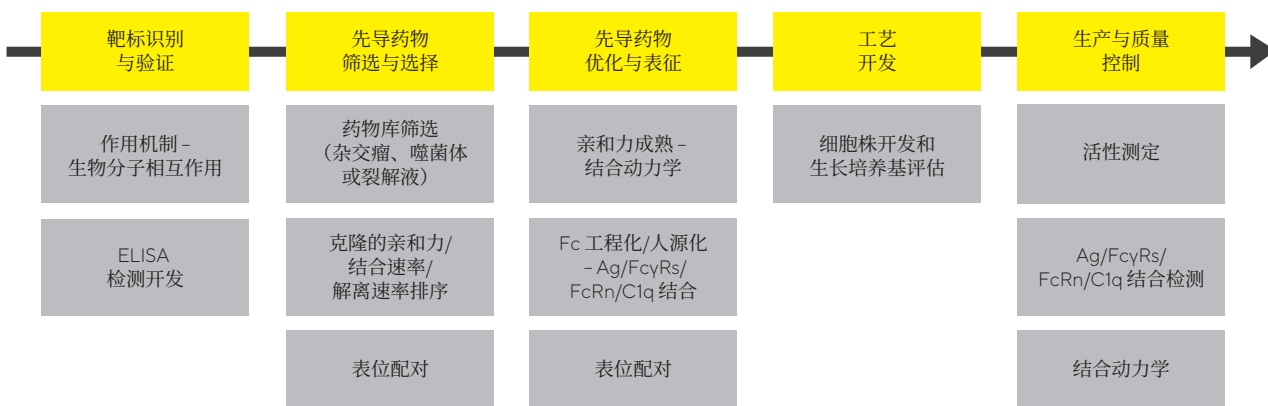
本文介绍了赛多利斯 Octet® 生物层干涉技术平台，并对其技术原理、性能、动力学实验的设计和运行以及相关的注意事项进行讨论分析。

Octet® 系统

赛多利斯已推出一系列的 Octet® 多功能仪器平台，通过非标记技术实时检测、定量和动态分析生物分子间的相互作用。Octet® 系统采用标准微孔板格式，可在 96 孔和 384 孔微孔板中进行全自动化的高通量亲和力检测，不仅极大地减轻了仪器维护负担，还能实现灵活的实验设计。

仪器种类多样，用户可结合其灵敏度和通量要求进行选择。Octet® R2、R4、R8、RH16 和 RH96 系统具有出色的定量和动力学分析性能，同时兼具广泛的动态范围和出众的灵敏度。Octet® RH16 和 RH96 系统均为双板位配置，可在 96 孔或 384 孔微孔板中同时分析最多 16 个样品和 96 个样品。在相同的应用领域下，与可以运行 2 个样品的 Octet® R2 系统和可在 96 孔微孔板中并行运行最多 8 个样品的 Octet® R8 和最多 4 个样品的 Octet® R4 系统相比，通量和速度都更胜一筹。Octet® RH16 和 RH96 系统对样品量的要求也降低了，当使用 384 孔斜底板时，样品量低至 40 μL /孔。表 1 介绍了各个 Octet® 系统及其动态检测的动态范围。

图 1: Octet® 系统在生物制药研究和开发过程中的动力学应用。



“浸入即读”生物传感器

Octet® 系统使用的生物传感器的是玻璃光纤材质，其尖端表面涂有专利的生物相容性基质，以尽可能地减少与表面分子的非特异性结合。这层基质在不同种类的生物传感器上又被涂上不同的化学物质，可用于高度特异性地结合样品中的目标分子。动力学应用中相关的生物传感器类型见表 2。

与其他非标记技术相比，Octet® 平台与“浸入即读”生物传感器的组合具有多项优势。微孔板内的样品不会因分析而

消耗或破坏，并且可在检测完成后进行回收。由于每组生物传感器在微孔板中的样品之间平行移动，因此与基于流路的 SPR 系统相比，检测时间显著缩短。没有流路系统，也就不存在仪器污染的问题，使用粗样品、未纯化的样品时也不会有堵塞的风险。除此之外，还省去了仪器维护、灭菌、缓冲液脱气、疏通和冲洗管路等程序。在成本方面，Octet® 平台使用的生物传感器成本很低；而 SPR 和其他平台的耗材则成本相对高昂。生物传感器是可以再生重复使用的，从而进一步降低每次检测的成本。

表 1. Octet® 系统的部分性能参数。

技术参数	Octet® R2	Octet® R4	Octet® R8	Octet® R8e	Octet® RH16	Octet® RH96
通道数量	2	4	8	8	16	96
结合速率 (ka) 范围 (M ⁻¹ s ⁻¹)	10 ¹ - 10 ⁷	10 ¹ - 10 ⁷	10 ¹ - 10 ⁷	10 ¹ - 10 ⁷	10 ¹ - 10 ⁷	10 ¹ - 10 ⁷
解离速率 (kd) 范围 (s ⁻¹)	10 ⁻⁶ - 10 ⁻¹	10 ⁻⁶ - 10 ⁻¹	10 ⁻⁶ - 10 ⁻¹	10 ⁻⁶ - 10 ⁻¹	10 ⁻⁶ - 10 ⁻¹	10 ⁻⁶ - 10 ⁻¹
亲和力 (KD) 范围	mM-pM	mM-pM	mM-pM	mM-pM	mM-pM	mM-pM
所需样品量低至	200 µL	200 µL	200 µL	40 µL*	40 µL*	40 µL*
数据采集频率 (Hz)	2, 5, 10	2, 5, 10	2, 5, 10	1, 2, 5, 10, 40	2, 5, 10	0.3, 0.6, 2, 5, 10
光谱仪数量	2	4	8	8	16	16
温度控制	15-40 °C	15-40 °C	15-40 °C	15-40 °C	环境温度+4-40 °C	环境温度+4-40 °C
微孔板位置	1×96 孔	1×96 孔	1×96 孔	1×96 或 384 孔	2×96 或 384 孔	2×96 或 384 孔
集成自动化	否	否	否	否	是	是
高×宽×深 (cm)	49×56×46	49×56×46	49×56×46	49×56×46	77×80×80	77×80×80
重量 (kg)	32.7	32.7	32.7	32.7	68.2	90.7

* 在 384 孔斜底板中 (赛多利斯, 货号: 18-5080)

表 2. 在 Octet® 系统上进行动力学检测时可以使用的生物传感器。

生物传感器	描述
病毒滴度检测传感器	<p>抗 AAV 腺相关病毒传感器 (AAVX, Adeno-Associated Virus)</p> <p>用途描述: 固化有生物素抗 AAVX 偶联物, 快速测定不同血清型 AAV (AAV1 至 AAV9, 以及 AAVrh10) 的滴度。</p> <p>适用配体: AAV1-9 和 AAVrh10</p> <p>应用: 浓度测定 (Q)</p> <p>货号: 18-5160</p>
通用传感器	<p>氨基丙基硅烷传感器 (APS, Aminopropylsilane)</p> <p>用途描述: 利用蛋白或膜片段上的疏水基团吸附到传感器表面, 适用于动力学筛选和亲和力表征分析 (k_{on}, k_{off}, KD)。</p> <p>适用配体: 蛋白, 膜蛋白, 脂类等</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5045</p>
	<p>第二代氨基偶联传感器 (AR2G, Amine Reactive 2nd Generation)</p> <p>用途描述: 蛋白样品可以以共价键的形式固定在传感器表面。通过 EDC/NHS 的酯化反应, 使得蛋白上的氨基基团和传感器表面的羧基基团形成酰胺键。第二代氨基偶联传感器增加了结合密度, 固化条件也更为稳定, 同时大幅降低了非特异性结合。该传感器适用于蛋白和抗体的动力学筛选, 亲和力表征分析 (k_{on}, k_{off}, KD) 以及先导物验证。</p> <p>适用配体: 蛋白, 抗体或多肽等含有氨基基团样品</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5092</p>
	<p>链霉亲和素传感器 (SA, Streptavidin)</p> <p>用途描述: 传感器表面包被有链霉亲和素, 用以偶联生物素标记的抗体、蛋白、多肽或核酸等样品。适用于配体结合分析、亲和力筛选、hit 的验证, 表位配对以及动力学表征 (k_{on}, k_{off}, KD) 等分析测定。</p> <p>适用配体: 生物素化的抗体、蛋白、多肽或核酸等</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5019</p>
	<p>高精度链霉亲和素传感器 (SAX, High Precision Streptavidin)</p> <p>用途描述: 传感器表面包被有链霉亲和素, 经专门开发和生产, 适用于对数据结果的精确性和重复性有着严格要求的药品研发和质量控制实验室使用。严格的 QC 检测确保产品间的 CV<4% (实际性能可能会有不同、需根据客户的实验条件而定)。</p> <p>适用配体: 生物素化的抗体、蛋白、多肽或核酸等</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5117</p>
	<p>高精度链霉亲和素传感器 (SAX 2.0, High Precision Streptavidin) 高精度链霉亲和素传感器 (SAX 2.0, High Precision Streptavidin)</p> <p>用途描述: 固化生物素化分子, 适用于高精度、高重复性动力学表征和浓度测定。</p> <p>适用配体: 生物素化的抗体、蛋白、多肽或核酸等</p> <p>应用: 浓度测定 (Q), 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5136</p>
	<p>超级链霉亲和素传感器 (SSA, Super Streptavidin)</p> <p>用途描述: 传感器表面包被有超高密度链霉亲和素, 用以标记的抗体、蛋白、多肽或核酸样品。特别适用于小分子化合物结合分析实验和化合物片段筛选。</p> <p>适用配体: 生物素化的抗体、蛋白、多肽或核酸等</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5057</p>
抗体传感器	<p>第二代抗鼠 Fab 传感器 (AMC2, Anti-Murine Fab 2nd Generation)</p> <p>用途描述: 特异性结合大鼠或小鼠 IgG 抗体的 Fab 区域, 适用于鼠源 Fab 和 IgG 的定量检测和动力学分析, 并在配体固化能力、灵敏度、定量动态范围以及可再生性方面进行优化。</p> <p>适用配体: 鼠源 IgG 抗体</p> <p>应用: 浓度测定 (Q), 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5163</p>
	<p>抗人 Fc- 捕获传感器 (AHC, Anti-Human Fc Capture)</p> <p>用途描述: 利用特异性结合人源抗体 Fc 区域, 将人 IgG 或其他人 Fc 融合蛋白固化于传感器之上。主要应用于动力学测定, 包括蛋白和抗体的筛选、亲和力表征 (k_a, k_d, KD), 抗原表位配对以及 hit 的验证。</p> <p>适用配体: 人源 IgG 抗体 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5060</p>

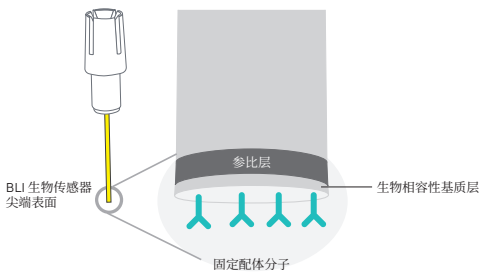
生物传感器	描述
抗体传感器	<p>第二代抗人 Fc- 捕获传感器 (AHC2,Anti-Human Fc Capture 2nd Generation)</p> <p>用途描述: 利用特异性结合人源抗体 Fc 区域, 将人 IgG 或其他人 Fc 融合蛋白固定于传感器之上。主要应用于动力学测定, 包括蛋白和抗体的筛选、亲和力表征 (k_a, k_d, KD), 抗原表位配对以及 hit 的验证。具备比第一代更稳定的性能表现, 可再生次数更多, 定量的浓度范围更宽。</p> <p>适用配体: 人源 IgG 抗体 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5142</p>
	<p>抗人 Fc- 定量传感器 (AHQ,Anti-Human IgG Quantitation)</p> <p>用途描述: 特异性结合人源抗体 Fc 区域或人 Fc 融合蛋白。主要用于在细胞培养、克隆选择、生产工艺优化以及产品质量控等各个环节中, 定量检测人 IgG 浓度。</p> <p>适用配体: 人源 IgG 抗体</p> <p>应用: 浓度测定 (Q)</p> <p>货号: 18-5001</p>
	<p>抗鼠 Fc- 捕获传感器 (AMC,Anti-Mouse Fc Capture)</p> <p>用途描述: 利用捕获的方法, 特异性结合鼠源抗体的 Fc 区域。主要应用于抗体 - 抗原亲和力分析 (k_a, k_d, KD) 以及基于解离速率的抗体筛选。</p> <p>适用配体: 鼠源 IgG 抗体 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3)</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5088</p>
	<p>抗鼠 Fc- 定量传感器 (AMQ,Anti-Murine IgG Quantitation)</p> <p>用途描述: 特异性结合大鼠或小鼠 IgG 抗体的 Fv(ab')₂ 区域。主要用于在细胞培养、克隆选择、生产工艺优化以及产品质量控等各个环节中, 定量检测大鼠或小鼠 IgG 浓度。</p> <p>适用配体: 鼠源 IgG 抗体</p> <p>应用: 浓度测定 (Q)</p> <p>货号: 18-5022</p>
	<p>第二代抗人 Fab 传感器 (FAB2G,Anti-Human Fab-CH1 2nd Generation)</p> <p>用途描述: 特异性结合人 IgG 抗体的 CH1 区域, 适用于人源 Fab 和 IgG 的定量检测和动力学表征分析。与自由轻链不存在结合。</p> <p>适用配体: 人源 IgG 抗体</p> <p>应用: 浓度测定 (Q), 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5125</p>
	<p>Protein A 传感器 (ProA,Protein A)</p> <p>用途描述: Protein A 可高亲和力结合人 IgG 的 Fc 区域, 与鼠或兔众多的 IgG 亚型有较强结合。适用于细胞系开发、克隆筛选、过程优化以及产品监控等诸多应用中的 IgG 定量测定。</p> <p>适用配体: IgG 抗体 (人、鼠、兔等)</p> <p>应用: 浓度测定 (Q)</p> <p>货号: 18-5010</p>
	<p>Protein G 传感器 (ProG,Protein G)</p> <p>用途描述: Protein G 可高亲和力结合大小鼠、山羊或牛 IgG, 与不同亚型的人 IgG 有较强结合。适用于细胞系开发、克隆筛选、过程优化以及产品监控等诸多应用中的 IgG 定量测定。</p> <p>适用配体: IgG 抗体 (人、大鼠、小鼠、山羊、牛等)</p> <p>应用: 浓度测定 (Q)</p> <p>货号: 18-5082</p>
	<p>Protein L 传感器 (ProL,Protein L)</p> <p>用途描述: Protein L 可高亲和力结合大部分大鼠、小鼠以及人的免疫球蛋白中的 kappa 轻链。不与山羊、牛、兔以及绵羊的 IgG 结合。适用于定量测定血清培养基中 IgG 或 Fab 片段。</p> <p>适用配体: IgG 抗体或 Fab 片段 (人、大鼠、小鼠等)</p> <p>应用: 浓度测定 (Q)</p> <p>货号: 18-5085</p>
	<p>抗兔 Fc- 捕获传感器 (ARC,Anti-Rabbit IgG Capture)</p> <p>用途描述: 利用捕获的方法, 特异性结合兔源抗体的 Fc 区域。主要应用于抗体 - 抗原亲和力分析及兔 IgG 浓度的定量。</p> <p>适用配体: 兔源 IgG 抗体</p> <p>应用: 浓度测定 (Q) 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5168</p>

生物传感器	描述
标签融合蛋白类传感器	<p>抗 GST 传感器 (GST,Anti-GST)</p> <p>用途描述: 通过高亲和力的抗 GST 抗体, 既可以直接对 GST 融合蛋白进行快速定量; 也可以稳定地捕获 GST 融合蛋白用于动力学分析。</p> <p>适用配体: 含有 GST 标签的重组蛋白</p> <p>应用: 浓度测定 (Q) 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5096</p>
	<p>抗六价 HIS 传感器 (HIS1K,Anti-Penta-HIS)</p> <p>用途描述: 通过 Qiagen 公司的六价 His 抗体, 特异性、高亲和力的捕获带有 His 标签的重组蛋白, 适用于定量检测和动力学分析。</p> <p>适用配体: 含有 HIS 标签的重组蛋白</p> <p>应用: 浓度测定 (Q) 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5120</p>
	<p>抗 HIS 传感器 (HIS2,Anti-HIS)</p> <p>用途描述: 通过包被在传感器表面的抗 His 单克隆抗体, 直接捕获和检测带有 His 标签的重组蛋白, 适用于定量检测。</p> <p>适用配体: 含有 HIS 标签的重组蛋白</p> <p>应用: 浓度测定 (Q)</p> <p>货号: 18-5114</p>
	<p>NTA 传感器 (NTA,Ni-NTA)</p> <p>用途描述: 带有 His 标签的重组蛋白可通过镍离子介导, 与传感器表面的 NTA 紧密结合, 适用于定量检测和动力学分析。</p> <p>适用配体: 含有 HIS 标签的重组蛋白</p> <p>应用: 浓度测定 (Q) 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5101</p>
Dip and Read™ 检测试剂盒	<p>抗 CHO 宿主细胞蛋白检测试剂盒 (Anti-CHO HCP Detection Kit)</p> <p>用途描述: Anti-CHO HCP 检测试剂盒是由 Octet® 和 Cygnus 公司联合开发, 用于定量检测产品中的 CHO 细胞宿主细胞蛋白 (HCP) 残留。利用快速、高通量的 Octet 分析平台, 结合 Cygnus 3G anti-CHO HCP 抗体的宽识别度和高灵敏度特性, 使得 HCP 检测两全其美。(更多信息, 可在 Octet® 网站下载 Technical Note 41: CHO Host Cell Protein Detection)</p> <p>产品特点: 全自动 HCP 检测; 一小时完成整个 96 孔板分析; 检测灵敏度低至 0.5 ng/mL; 检测精度高, CV 范围 5-10%</p> <p>货号: 18-5081</p>
	<p>蛋白 A 残留检测试剂盒 (Residual Protein A Detection Kit)</p> <p>用途描述: Protein A 残留对于抗体药物生产质量是一个重要的指标。Protein A 残留检测试剂盒包含特制的生物传感器和所需试剂, 用于检测抗体产品中 Protein A 或 MabSelect SuRe 等填料残留量。(更多信息, 可在 Octet® 网站下载 Technical Note 18: Dip and Read Residual Protein A Detection Kit)</p> <p>产品特点: 定量检测 Protein A 或 MabSelect SuRe 残留; 检测方法灵敏且精确; 操作简便、易于使用; 自动检测, 手工操作大幅减少</p> <p>货号: 18-5075</p>
	<p>GlyS 唾液酸化筛选检测试剂盒 (Sialic Acid Kit)</p> <p>用途描述: 用于细胞上清液粗样品或纯样品中唾液酸的相对定量。(更多信息, 可在 Octet® 网站下载 Technical Note: Sialic Acid Kit User Guide)</p> <p>产品特点: 不需要将样品纯化或消化处理, 可节省多达 3 个小时的样品准备时间; 综合滴度结果与唾液酸化数据, 尽早选择理想的表达株</p> <p>货号: 18-5135</p>
	<p>GlyM 甘露糖筛选检测试剂盒 (Manose Kit)</p> <p>用途描述: 用于细胞上清液粗样品或纯样品中甘露糖的相对定量。(更多信息, 可在 Octet® 网站下载 Technical Note: Octet GlyM Kit For High-Throughput Mannose Glycans Screening of Crude and Purified mAb and Non-mAb Protein Samples)</p> <p>产品特点: 不需要将样品纯化或消化处理, 在研发筛选的阶段即可综合滴度结果与甘露糖水平的数据, 尽早选择理想的表达株。</p> <p>货号: 18-5139</p>
	<p>第二代氨基偶联试剂盒 (Amine Coupling 2nd Generation Kit)</p> <p>用途描述: 通过 EDC/NHS 的酯化反应, 将含有末端氨基基团的分子固化在氨基偶联传感器上, 适用于蛋白和抗体的动力学筛选, 亲和力表征分析 (kon, koff, KD) 以及先导物验证。包含: 10X 动力学缓冲液 -50 ml; 磺基 NHS-573 mg; 醋酸钠 -200 ml (10 mM, pH 4.0), 醋酸钠 -200 ml (10 mM pH 5.0), 醋酸钠 -200 ml (10 mM, pH 6.0), 乙醇胺 -200 ml (1M, pH 8.5), PBS-500 ml (10 mM, pH7.4)。</p> <p>产品特点: 快速固定蛋白和多肽以进行动力学分析。适用的 pH 及缓冲液条件范围广, 具有更高的结合特异性及检测灵敏度。</p> <p>应用: 动力学 (K)</p> <p>货号: 18-5095</p>

生物层干涉技术

生物层干涉 (Biolayer Interferometry, BLI) 技术是一种测量干涉光谱光学分析技术。可见光 (白光) 沿着光纤生物传感器向下照射到由光纤尖端的生物层隔开的两个界面: 尖端表面的生物相容性基质层和内部参比层 (图2)。光在这两个界面均发生反射, 相同波长的反射光形成干涉, 不同波长的干涉光可形成连续的干涉光谱。这种干涉光谱通过光谱仪进行检测。

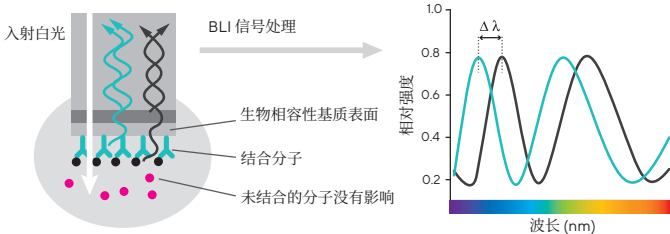
图2: “浸入即读”生物传感器。



注: 示意图展示了生物传感器尖端的两个光学界面: 内部参比层和固定配体分子的生物相容性基质层。

如果将生物传感器的尖端浸入 96 孔板中的样品, 目标分子会与表面修饰分子结合。二者结合后会形成一个分子层, 随着越来越多的目标分子结合到表面, 分子层的厚度和密度会增加。随着尖端厚度和密度的增加, 两个反射层之间的有效距离也随之增加, 从而导致反射光的干涉光谱发生变化 (图3)。因此, 干涉光谱图会根据分子层的厚度和密度变化而发生位移, 这种变化与生物传感器表面相结合的分子数量正相关。检测器可以对该光谱位移进行监测, 并在传感图上以波长变化 (nm 位移) 的形式显示。实时监测干涉光谱可提供有关分子相互作用的动力学数据。

图3: BLI 技术。



注: BLI 是一种光学分析技术, 可分析可见光从两个界面反射得到的干涉光谱。

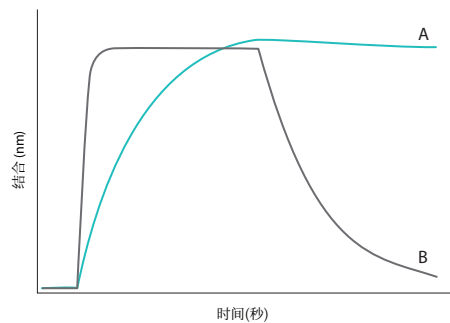
非标记分析的优势

使用 Octet® 系统进行动力学表征可以补充或替代依赖标记的方法, 例如 ELISA 或 TR-FRET, 因为这些方法在分析分子相互作用时不仅效率低, 而且信息量不足。制备标记生物分子不仅耗费时间和材料, 还可能产生不确定的结果, 例如改变蛋白质活性或增加结合位点的空间位阻。实时、非标记分析可以快速、灵敏、准确地测量复合物形成的动力学、亲和力和活性, 而不会产生传统技术的相关问题。

与终点法检测相比, 使用 Octet® 系统可以获取有关分子间相互作用机制的详细信息。平衡结合试验可以确定亲和力常数 KD , 但不能提供有关结合速率的信息。虽然在最佳条件下, IC_{50} 值可以接近 KD , 但是实际结合特性可能有很大差异, 因为不同的结合速率和解离速率组合能够产生相同的亲和力常数。图4展示了具有相同亲和力常数 KD 的两个结合对的结合解离曲线。结合特性显示, 相互作用A的结合速率和解离速率比相互作用B慢得多。通过此示例, 我们可以了解如何通过实时动力学获取亲和力和结合速率数据, 从而更全面地了解相互作用。

借助实时动力学分析, 我们可以了解结合是否表现出简单的1:1化学计量关系或者是否发生更复杂的相互作用。通过获取有关结合相互作用性质的信息, 我们可以在流程的早期阶段快速排除具有高亲和力但结合行为不理想的蛋白质, 不再将其作为主要候选药物。此外, 实时动力学还可以对毫摩尔 (mM) 级别的亲和力进行高灵敏度测量, 从而避免ELISA或免疫沉淀测定等技术中因为洗涤导致弱结合分子丢失的问题。

图4: 结合解离曲线。



注: 两种具有相似亲和力常数但不同结合特性的相互作用结合解离曲线。

结合动力学 - 基本原理

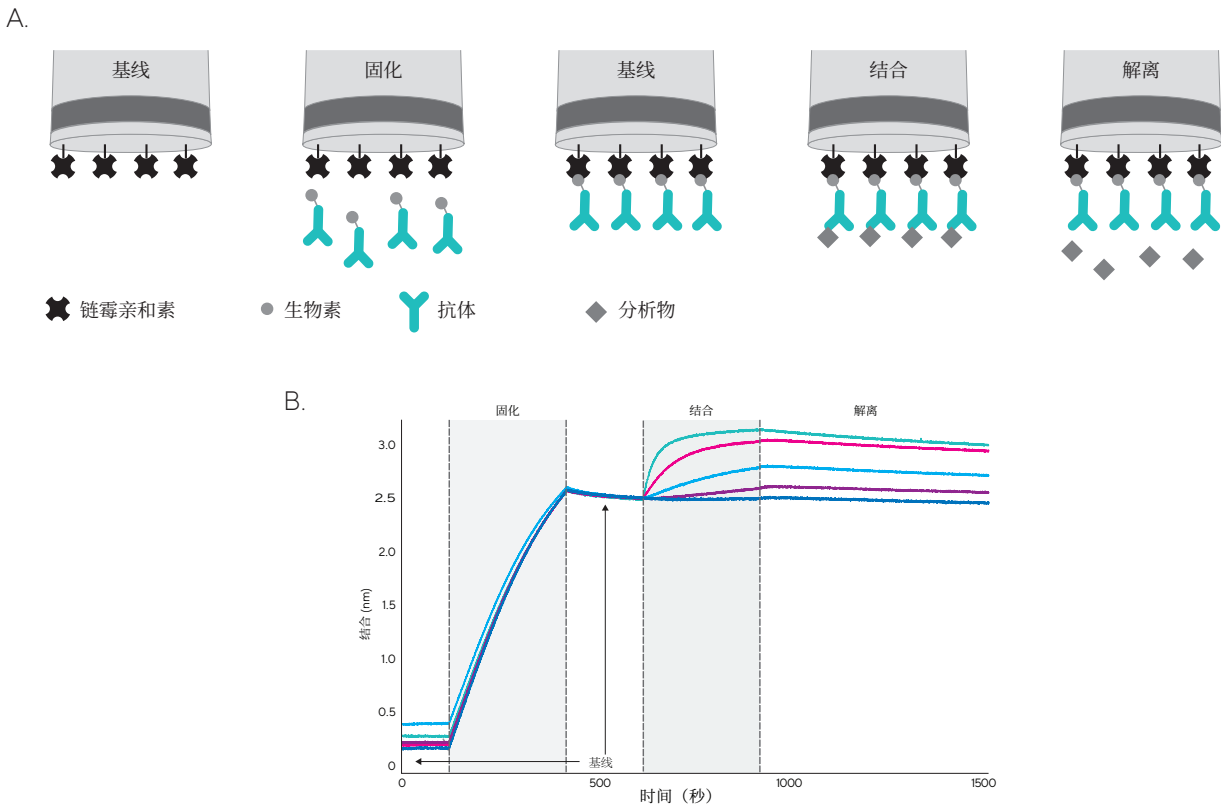
动力学分析用于确定相互作用的亲和力并测量可逆非共价结合的结合和解离速率常数。非共价结合通常包括离子 / 静电相互作用、氢键、范德华力和疏水效应的结合。抗体和其他蛋白质对生物分子的特异性识别和结合是许多生物学过程的基础。

结合动力学实验

基于生物传感器的分析，需要将一种相互作用分子固定在生物传感器的表面上（配体），另一种则留在溶液中（分析物）。在 Octet® 平台上使用“浸入即读”生物传感器进行典型的结合动力学实验，如图 5A 所示。检测从使用检测缓冲液的

初始基线或平衡步骤开始。接下来，将配体分子（例如抗体）固定在生物传感器的表面上（固化），可以通过直接固化或基于捕获的方法。配体固化后，将生物传感器浸入缓冲溶液中进行基线步骤，以评估分析漂移并确定配体的固化水平。基线步骤之后，将生物传感器浸入含有分析物（结合物）的溶液中。在此步骤中，测量分析物与固化配体的结合相互作用。分析物结合后，将生物传感器浸入不含分析物的缓冲溶液中，使结合的分析物脱离配体（解离）。对几种浓度的分析物进行平行测定（Octet® R8 系统上最多可同时进行 8 次测量，以及 Octet® RH16 系统上最多可同时进行 16 次测量）。然后，在新的或再生的生物传感器上，对每个待测分析物重复一系列的检测步骤。每个结合反应都会被测量，并实时地通过结合解离曲线进行显示。单个样品的典型结合解离曲线如图 5B 所示。

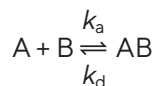
图 5：使用链霉亲和素生物传感器进行结合动力学实验的典型示例。



注：A) 在缓冲液中完成初始基线步骤后，将生物传感器浸入含有生物素化配体的溶液中。在这个例子中，配体分子是抗体。执行第二个基线步骤，然后进行溶液中分析物分子的结合和解离。B) 原始数据结合解离曲线显示动态检测每个步骤的实时数据采集。

术语定义

动力学是指相互作用发生的速度。结合衡量一个分子与另一个分子结合的速度，而解离衡量复合物解体的速度。经过一段时间后，将进入平衡状态，此时复合物的结合速率和解离速率相同，因此结合和未结合分子的数量保持不变。亲和力衡量复合物的强度，具体来说，衡量当结合达到平衡时会形成多少复合物。用于描述两种生物分子之间相互作用的最简单模型由以下方程表示：



其中 A 代表固化在生物传感器表面的配体分子，B 代表溶液中的分析物。该结合模型假设简单的 1:1 相互作用，其中一个配体分子与一个分析物分子相互作用，并且所有结合位点的结合都是独立的且强度相同。在这种情况下，复合物的形成遵循拟一级动力学。复合物 (AB) 的形成速率取决于结合速率常数以及游离配体和分析物的浓度。用于拟合结合过程的方程源自微分方程的积分，该式表明：随着分析物结合的发生，游离配体分子浓度逐渐降低，结合速率正是这一浓度变量的函数：

$$Y = Y_0 + A(1 - e^{-k_{obs}t})$$

其中 Y = 结合水平， Y_0 = 结合的初始水平，A 是常数，t = 时间。 k_{obs} 是表观速率常数。在形成 AB 复合物的同时，它也会衰变成 A 和 B。术语 k_{obs} 反映了包含结合和解离的总体速率。

将生物传感器浸入不含分析物的缓冲溶液时，复合物开始解离，其解离速率是解离速率常数和配体 - 分析物复合物浓度的函数。用于拟合解离的方程如下所示：

$$Y = Y_0 + Ae^{-k_d t}$$

其中 Y_0 是解离的初始水平，并且 k_d 是解离速率常数。该方程反映了随着表面结合复合物浓度的降低，解离速率随时间递减的规律。术语 k_d 用于衡量复合物的稳定性，或每秒解离的复合物的比例，以 s^{-1} 为单位表示。通过求解上述方程 k_{obs} 和 k_d ，则结合速率常数 k_a 可由下式计算：

$$k_a = \frac{k_{obs} - k_d}{[Analyte]}$$

结合速率常数 k_a 表示每秒 1 摩尔 A 和 B 形成 AB 复合物的数量。术语 k_a 以 $M^{-1} s^{-1}$ ($M^{-1} s^{-1}$) 表示。

KD 是亲和力常数或平衡解离常数，它衡量配体与其分析物的结合紧密程度。它表示结合速率与解离速率的比率，可以使用 k_a 和 k_d 进行计算：

$$KD = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_d}{k_a}$$

KD 以摩尔浓度 (M) 表示。KD 对应于平衡状态下 50% 配体结合位点被占据的分析物浓度，或与分析物结合的配体分子数等于未结合分析物的配体分子数的浓度。KD 和亲和力之间存在反比关系 - 亲和力常数越小，表示相互作用越强，或者分析物与配体的亲和力越大。

在计算 K_D 和 k_d 之前，我们必须知道分析物的浓度。然而， k_d 与浓度无关。 k_d 越大，解离发生得越快。表 3 显示了 k_d 值和结合复合物半衰期之间的关系。

因为我们可以分析物含量未知的情况下确定 k_d ，因此该参数对于筛选应用很有用，例如对复合物基质中未纯化的粗样品组进行排序。

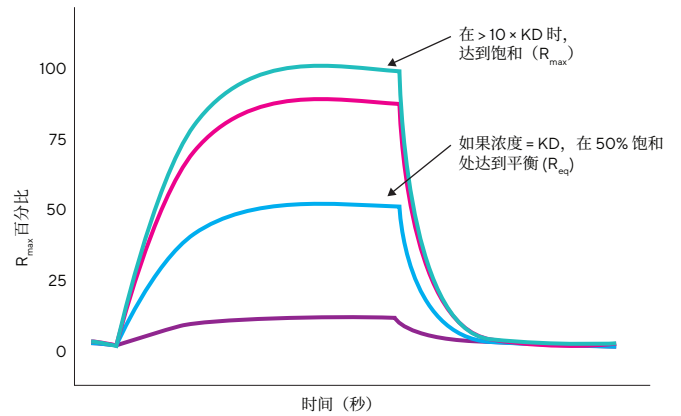
表 3. 解离速率 (k_d) 和结合配体-分析物复合物半衰期之间的关系。

k_d	每秒解离速率 (%)	达到 50% 解离的时间
1	100	0.69 秒
0.1	10	6.93 秒
1×10^{-2}	1	69.3 秒
1×10^{-3}	0.1	11.55 分钟
1×10^{-4}	0.01	1.93 小时
1×10^{-5}	0.001	19.25 小时
1×10^{-6}	0.0001	8 天

R_{eq} 、 R_{max} 和 K_D 的关系

如果分析物结合阶段持续足够长的时间，最终结合相互作用将达到结合和解离速率相等的状态。此时曲线趋于平缓，达到平衡结合信号，即 R_{eq} 。由于生物传感器表面的配体量是固定的，因此能够结合的分析物也存在上限。如果分析物结合达到了其上限，此时认为达到最大结合信号，或 R_{max} 。 R_{eq} 相对于 R_{max} 的值取决于分析物浓度相对于 K_D 的值。例如，如果分析物浓度等于 K_D ， R_{eq} 将发生在 50% R_{max} 处。通常情况下，如果分析物浓度大于 $10 \times K_D$ ，将达到 R_{max} (图 6)。

图 6: 在理想的相互作用下， R_{eq} 、 R_{max} 和 K_D 的关系图。



注：最上方的曲线表明检测饱和，通常发生在 $10 \times K_D$ 以上。即使分析物浓度增加，数据曲线的平衡部分也会开始堆叠在一起，因为所有可用的配体分子都已结合。 K_D 是在 50% 饱和时达到平衡的浓度。

如何设计结合动力学实验

使用 Octet® 平台可简单、直接地建立动力学检测，而选择合适的生物传感器和使用优化的实验条件对于确定准确的亲和力和动力学常数至关重要。合适的检测方法和条件优化以及使用高质量的活性样品和试剂是从结合动力学实验中获取准确数据的关键。使用不稳定或无活性的蛋白质、特性不正确的试剂或不适当的缓冲条件都会对结果产生负面影响。在活性高且稳定的配体表面进行相互作用分析有助于生成可靠的数据。下文介绍了开发各种形式的动力学检测的注意事项，并提出了设计有效检测、优化每个步骤和尽量减少非特异性结合的建议。

选择合适的生物传感器

生物分子相互作用分析的第一步是将配体固化在生物传感器的表面。生物传感器可通过表明修饰的结合分子（如链霉亲和素和氨基活性基团）实现蛋白质的不可逆结合，从本质上创建定制的生物传感器表面。另外，利用捕获类分子（例如抗小鼠 IgG Fc 捕获或 Ni-NTA），可以实现高度特异性的结合目标抗体或未纯化的重组蛋白。在选择生物传感器时，最重要的考虑因素是如何最大程度上保持固化配体的结构和活性。

我们可以通过氨基偶联传感器 (AR2G) 与游离赖氨酸残基形成共价键，或者通过链霉亲和素生物传感器与生物素的相互作用，将目标蛋白质直接固化到生物传感器上。直接固化可使分子与生物传感器稳定、不可逆地偶联，且尽可能减少分子从生物传感器的解离。该方法与大多数蛋白质兼容，能够用几乎任何蛋白质创建“定制”生物传感器表面，并且通常可再生至固化配体的水平。直接固化需要纯化蛋白质并建立共价键，直接与表面或生物素键合。共价键或空间位阻可能导致蛋白质活性丧失，尤其是在生物传感器表面过度饱和的情况下。使用氨基偶联传感器直接偶联时，需要先活化表面传感器的羧基，然后蛋白质在低 pH 值（如 pH 5.5）下暴露于活化的表面羧基。我们很难控制这种反应并确保蛋白质不受影响。如果过多的赖氨酸连接到表面，或者分析物结合位点附近的游离赖氨酸被连接，蛋白质可能会失去活性。

用于动力学分析的链霉亲和素(SA, Streptavidin) 生物传感器

链霉亲和素传感器用来固化生物素标记的配体。链霉亲和素和生物素之间的相互作用是非共价的，但具有快速、稳定且基本上不可逆的优点。使用链霉亲和素生物传感器替代氨基共价偶联具有一些显著的优势。生物素 - 链霉亲和素偶联方法可在生物传感器表面形成与共价偶联相似的稳定的键，只需极少的优化。生物素化操作简单，对蛋白质温和，且在中性 pH 值下进行。通过调节每个目标蛋白质添加到反应中的生物素分子数量，可以轻松控制反应，从而防止由于过度修饰而导致活性丧失。

应将长链接头包含到生物素标签中以尽量减少空间位阻效应，特别是在固化较小分子（如肽）的情况下。生物素化的配体可以分批制备并储存以供多个实验使用，而氨基反应过程涉及多个步骤，并且每次固化时都必须新鲜制备试剂。

基于捕获的方法

使用定点或基于捕获的生物传感器能够尽可能提升表面配体的活性。捕获生物传感器预先固定有高亲和力捕获抗体或蛋白质，该抗体或蛋白质通过已知基序或标签与蛋白质配体结合，从而能更好地定向到表面并提高均匀性。例如，抗人和抗小鼠 IgG Fc 捕获表面通过 Fc 区结合相应的抗体，并固化捕获的抗体，使得 Fv 区易于与分析物结合。Octet® 平台上有几种定向捕获生物传感器可供使用（见表 2）。由于这些相互作用具有高度特异性，因此可以直接从培养基等粗样品中捕获配体蛋白，而无需纯化。基于捕获的生物传感器仅需最小程度的检测优化，并且它们通常可以再生到原始捕获表面的水平。几种捕获生物传感器都是基于抗体的，有时候可能观察到固化配体后有一定程度的解离。为了计算准确的动力学常数，必须使用无分析物参比孔减去该背景解离（有关参比扣减的信息，请参阅数据分析部分）。

测试顺序

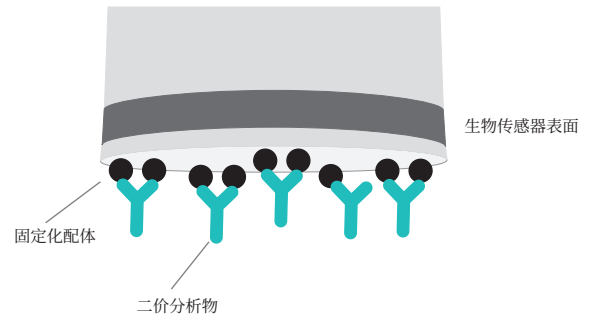
在确定结合对中哪个固化，哪个分析时，必须进行一些考虑。在选择方向时，蛋白质的稳定性、大小和化合价是主要考虑因素。对于敏感性较高的蛋白质而言，氨基偶联反应性表面固定可能会形成难以耐受的苛刻条件。在这种情况下，应固定该结合对中不太敏感分子。或者，也可以选择其他的生物传感器，例如链霉亲和素传感器。由于分子越小，产生的信号越小，在决定固化哪种分子时，可行的做法是将较小的分子（例如肽）固化到生物传感器上，再与溶液中的较大分子结合，以增强检测信号。虽然分子对其结合分子的亲和力被定义为一个配体结合位点与一个分析物结合位点之间的非共价结合强度，但分子的亲和力是由两个分子之间可能存在的所有结合的总强度决定。例如，抗体是二价的，可以结合一个以上的抗原。亲和力是动力学实验中的一个重要考虑因素，因为它会影响 KD 的整体计算。应尽可能将抗体等二价分子固化在生物传感器表面，以避免亲合效应。因为，如果固化抗原，则溶液中的二价抗体可能与表面上的两个抗原分子同时进行相互作用（图 7）。

亲合效应可能产生非典型的结合特性，并导致人为的高亲和力值。无论什么实验，适当的检测方向优化对于使用任何系统获取可靠的动力学数据都是必要的。

配体固化：将生物素化蛋白固化在链霉亲和素生物传感器上

在将配体固化到链霉亲和素生物传感器上之前，必须首先对其进行生物素化。建议采用体内靶点特异性生物素化方法，将一个链霉亲和素结合位点放置在配体上一个精心选择的位置。然而，如果选择在实验室中进行生物素化，应遵循以下建议。待生物素化的蛋白质必须经过纯化、不含载体蛋白且缓冲液中不含有伯胺，例如 Tris 或甘氨酸。目前市场上有多种针对不同功能团的生物素化试剂，可以简单有效地将生物素固定到抗体、蛋白质或肽上。最常用的是生物素的 NHS 酯，其目标是伯胺，例如蛋白质或肽中游离赖氨酸残基的胺基。可以使用不同长度的 linker，这对于减少空间位阻和有效捕获生物素化分子是必需的。我们推荐使用 EZ-Link NHS-PEG4-生物素 (Thermo Scientific, 货号 21362)、NHS-PEG12-生物素 (Thermo Scientific, 货号 21313) 或 Sulfo-NHS-LC-LC-生物素 (Thermo Scientific, 货号 21338) 等试剂。可以使用带有长 linker 的生物素来合成肽。生物素试剂:配体的最佳比例是 1:1 摩尔比 (MCR)。过度生物素化不能提高生物传感器的固化水平，并且有可能增加生物素掺入结合位点的风险，从而导致蛋白质活性的降低。

图 7：动态检测中的亲合效应。



注：溶液中与固化配体结合的二价分析物有可能同时与两个配体分子结合。这可能会人为导致解离速率过低。可以通过调换检测方向或降低生物传感器上的配体密度来规避。

如果原料蛋白浓度低于 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，则可能需要更高的 MCR，在这种情况下可以使用 3:1 或 5:1 的比例。生物素化后，应去除多余的未结合生物素。未结合的生物素可能会竞争链霉亲和素结合位点，并且减少标记配体在生物传感器上的固化。因此，生物素化以后，需要使用脱盐柱脱盐，去除未结合的生物素。也可使用适当分子量截留膜或滤芯将其透析到 PBS 缓冲液中，此举可用于针对更敏感的蛋白质完成温和的缓冲液更换（对于抗体使用 100 kDa MW 截留）。一旦蛋白质被生物素化并脱盐到中性 pH 缓冲液中，就可以进行配体固化优化实验以确定最佳固化浓度。有关用于链霉亲和素生物传感器的蛋白质配体的生物素化的详细方案，请参阅赛多利斯技术说明 28 《通过生物素化将蛋白质固定于链霉亲和素生物传感器上》。

使用第二代氨基偶联传感器 (AR2G) 的固化

在 AR2G 生物传感器上固化蛋白质的方法是，使用标准 EDC 催化形成酰胺键，在蛋白质上的氨基与生物传感器表面修饰的羧基之间形成共价键。固化过程分为以下步骤：1) 首先通过与 EDC (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐) 和磺基-NHS (N-羟基磺基琥珀酰亚胺) 反应激活表面上的羧酸基团，生成高反应性的 NHS 酯。2) 酯类在偶联步骤中与配体生物分子的伯胺迅速发生反应，形成高度稳定的酰胺键。3) 用乙醇胺封闭过量的磺基-NHS 酯(图 8)。

在生物传感器表面对配体进行预富集对于在动力学检测中实现有效固化和最佳信噪比至关重要。在预富集中，配体在共价偶联之前通过静电吸附集中在表面。发生这些静电相互作用的前提条件是，偶联缓冲液的pH值必须高于生物传感器表面的pKa，但略低于配体的等电点。缓冲液还必须具有低离子强度。对于许多蛋白质来说，在4.5-5的pH值下用10 mM 乙酸盐缓冲液稀释的效果很好，但建议进行优化或pH探索，以确定进行固化的最佳缓冲液。选择三到四种pH梯度(0.5或1个pH单位)的缓冲液进行摸索，例如10 mM 乙酸钠pH4、5和6。使用高浓度的分析物(10-20 ×KD) 执行固化方案和分析物结合步骤。选择在分析物结合步骤中产生最高信号的缓冲条件用于检测，然后优化固化浓度。有关AR2G生物传感器固化的详细方案，请参阅赛多利斯技术说明26《“浸入即读”第二代氨基偶联传感器(AR2G)》。

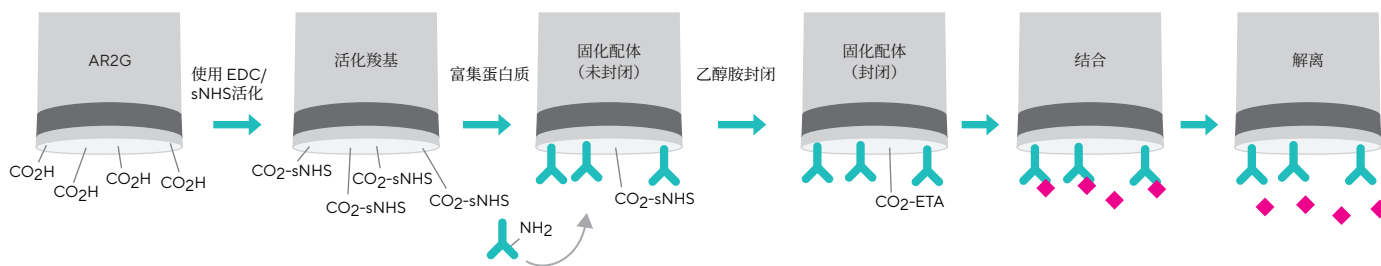
优化配体固化密度

要想获得高质量的动力学数据，在生物传感器表面固化最佳密度的配体就显得尤为重要。然而，仅凭尽可能增加配体的量来提高信号也不可取。如果有过量的配体与生物传感器结合，可能会因拥挤、空间位阻和表面聚集而导致数据偏差。生物传感器的过度饱和也可能会在较高分析物浓

度下产生较弱的非特异性相互作用，或者在较低分析物浓度下产生分析物“walking”或“rebinding”效应。这些偏差可能会显著影响结合动力学观察结果。然而，如果固化的配体不够，分析物结合步骤中的信号可能低于检测水平。在动力学检测中进行固化步骤时，缓慢固化优于快速配体固化。理想情况下，固化步骤中的结合曲线将显示信号逐渐增加，并且不应达到饱和。信号的急剧升高、快速的初始增加可能会导致不均匀的固化和分析偏差。配体分子的典型固化浓度为50-100 nM。如果配体浓度较低，例如低于50 nM，可能需要更长的固化时间才能获得足够的固化信号。配体溶液中过夜孵育也可在4° C下进行。如果使用捕获生物传感器从稀释上清液或细胞培养样品中捕获配体分子，过夜孵育可大大改善结果。

确定配体的理想的固化浓度需要试验摸索。最好设计一个实验对配体浓度进行测试。在Octet®平台上使用微孔板可以同时快速测试多个实验参数，大幅减少检测开发所花费的时间。我们将几种浓度的配体固化到生物传感器上，从而进行了固化优化实验。使用高浓度的分析物(10-20 ×KD)对每个配体浓度进行结合步骤。还应使用不固化配体的生物传感器作为参比对照，以确定分析物是否与生物传感器存在非特异性地结合。

图8：使用AR2G生物传感器进行动力学检测的工作流程。



注：配体分子共价附着于活化的羧基表面。活化、固化和封闭后，检测固化配体和分析物之间的结合和解离动力学。

在选择检测的固化浓度时，该浓度应在分析物结合步骤中产生可接受信号的最低固化配体浓度。图 9A 显示了配体固化优化实验的原始数据曲线。在固化步骤中，较高浓度的配体迅速使结合位点饱和，这一点通过 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品中的结合曲线趋于平稳得到证实，而最低浓度并未达到饱和。通过处理数据让分析物结合步骤与基线对齐时（图 9B），可以清晰地观察到每个相应的配体浓度下分析物结合的相对信号。在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (67 nM) 时，我们观察到理想的固化曲线特性（显著的固化信号，初始结合相当缓慢，不会达到饱和状态），并且结合步骤中达到了高信号水平。应选择该浓度作为本示例的最佳固化浓度。

检测缓冲液

Octet® 系统的“浸入即读”方式与 SPR 等平台相比，在选择检测缓冲液时具有更大的灵活性。由于生物传感器基于 BLI 技术，因此只有与生物传感器表面结合或解离的分子才能改变反射光的干涉图谱并产生响应。未结合的分子或周围溶液折射率的变化不会影响干涉图谱，从而可以在粗样品或复杂样品（如细胞裂解物或培养上清液）以及含有高折射率

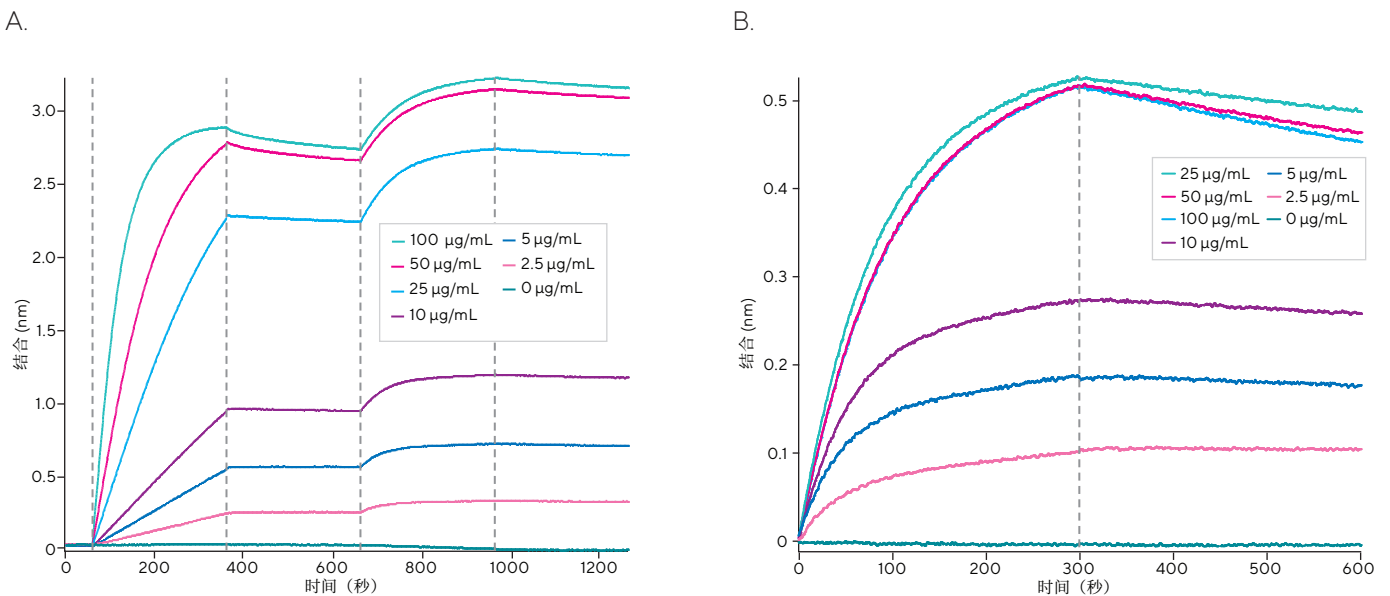
成分（如甘油或 DMSO）的溶液中进行测量。

尽管 Octet® 系统在检测和样品基质的选择上提供了很大的灵活性，但仍需要注意选择适合实验系统的检测缓冲液，并在整个检测过程中使用相同的溶液。例如，如果分析物在培养基中，则在相同培养基中对分析物进行稀释，并将该培养基用于基线和解离步骤。对于使用纯化样品的动态检测，我们建议使用赛多利斯的动力学缓冲液作为样品缓冲液，该缓冲液以 10 \times 溶液形式提供。该缓冲液含有牛血清白蛋白 (BSA) 和表面活性剂 (Tween-20)，可抑制与表面和其他蛋白质的非特异性结合。

基线步骤

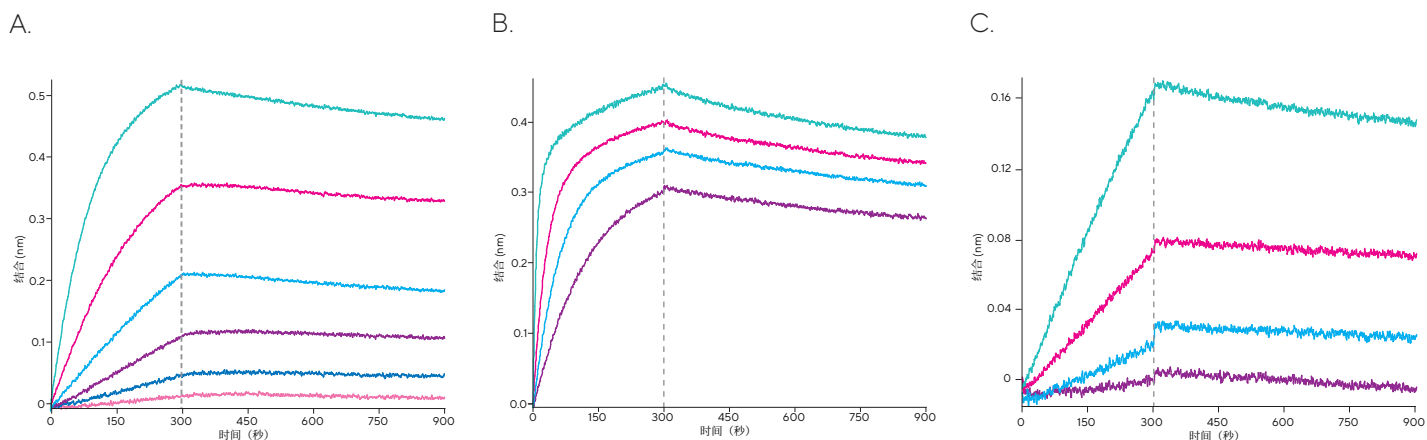
在分析物结合之前必须执行基线步骤，以从生物传感器中去除未结合的配体，并评估由非特异性结合、聚集或缓冲液效应引起的信号漂移。基线在缓冲液（或介质）中运行，该缓冲液必须与用于结合和解离步骤的缓冲液相匹配。在许多情况下，该溶液与配体固化步骤中使用的溶液不同。

图 9：描述配体固化优化的动力学数据。



注：A) Octet® 系统上配体固化优化实验的原始动力学数据。将在 1 \times 动力学缓冲液（赛多利斯）中的几种浓度的生物素化抗 PSA 抗体 (Fitzgerald) 固化到链霉亲和素生物传感器上。基线步骤后，PSA 抗原 (Fitzgerald) 以 200 nM 的浓度与固化配体结合，然后在 1 \times 动力学缓冲液中进行解离步骤。B) 显示结合和解离步骤的对齐的结合解离曲线。数据对齐后，可以轻松观察到每个配体浓度下的分析物信号的差异。

图 10: 显示不同分析物浓度范围的结合解离数据。



注: A) 动力学实验的理想分析物浓度范围, 信号涵盖分析的动态范围。使用此类数据生成的曲线拟合后得出可靠的动力学数据。B) 使用的分析物浓度范围太高。请注意, 曲线非常接近, 并且表现出异质性, 很可能是由于非特异性结合造成的。未显示较低的浓度范围。C) 此处的分析物浓度范围太低, 并且数据受到物质迁移效应的影响。

切换到不同的缓冲溶液可能会产生基质效应, 这是由于新缓冲成分的非特异性结合或配体分子与表面解离的漂移(尤其是对于捕获生物传感器)造成的, 这对于平衡是必须条件。在进行结合步骤之前, 建立具有最小信号漂移的稳定基线非常重要。不稳定的基线将影响解离阶段的测量, 尤其是当基线漂移相对于解离速率较高或以非线性方式漂移时。基线漂移也会影响最大结合信号, 即 R_{max} 。 R_{max} 是计算速率常数的一个因素, KD 是动力学和平衡分析中的一个因素, 因此 R_{max} 有必要在结合和解离阶段保持不变。

结合步骤

在结合步骤中, 测量分析物与固化配体的结合相互作用。对于筛选目的或定性分析来说, 测量单一分析物浓度的结合曲线通常就足够了。然而, 如果需要可靠、准确的动力学常数, 应在结合步骤中至少有四个分析物浓度进行检测。浓度梯度范围应该从 $10\sim 20\times KD$ (高浓度) 到约 $0.1\times KD$ (低浓度), 按 2 倍或 3 倍稀释。由于 KD 定义为占据生物传感器表面 50% 可用结合位点的平衡分析物浓度, 该范围将确保检测范围从约 $90\% R_{max}$ 到低至检测限。分析多个浓度也将揭示结合模型在 KD 附近浓度范围内的拟合度。如果无法通过实

验或文献获知相互作用的 KD , 则建议进行初步的分析物浓度摸索步骤。在这种情况下, 应使用浓度范围很广的几个分析物进行检测, 以在进行全面表征之前大致估计 KD 。

图 10A 显示了使用最佳分析物浓度范围的实验的动力学数据。结合信号覆盖了检测的动态范围, 从接近检测限到略低于饱和度。结合曲线之间的均匀间距表明生物传感器上的配体尚未结合饱和的分析物。如果动力学检测中测试的分析物浓度过高, 配体结合位点可能会饱和, 从而增加非特异性结合或聚集, 增加非典型结合导致的拟合误差(图 10B)。过低分析物浓度范围也是不可取的, 尽管这是产生最准确数据的范围。然而, 如果分析物浓度太低, 信号可能很弱和/或产生的结合速率不准确(图 10C)。

在实践中, 分析物浓度接近或低于 KD 值时结合信号可能过低。例如, 对于在低浓度下运行的高亲和力分子, 实测结合速率将非常低。这种低速率将影响在一个 5 或 10 分钟结合步骤中可观察到的结合量。如果结合信号低于 KD 无法测量, 最好从 $100\times KD$ 开始运行一系列的 2 倍或 3 倍稀释进行检测, 直到没有可测量的信号。

表 4.生物传感器上的分子解离对于缓冲溶液浓度变化的影响。

解离程度	# 分子进入溶液	进入溶液的摩尔数	体积 / 孔 (μL)	溶液摩尔浓度 (M)	解离结束时的 pM
100% 解离 (除非相互作用非常弱, 否则不太可能)	1.00x10 ⁹	1.66x10 ⁻¹⁵	200	8.30x10 ⁻¹²	8.3
10% 解离	1.00x10 ⁸	1.66x10 ⁻¹⁶	200	8.30x10 ⁻¹³	0.83
1% 解离	1.00x10 ⁷	1.66x10 ⁻¹⁷	200	8.30x10 ⁻¹⁴	0.083

注: 即使在解离步骤中使用同一个孔来处理多个样品, 从生物传感器上脱落的分子数量也是可以忽略不计的。

该策略将能够在一系列浓度内进行测试, 并且通过这种方式测量的动力学和结合常数仍然有效。

结合步骤应运行足够长的时间以便于查看数据曲线中的速率, 但时间不应太长, 否则曲线会因为时间过长而变平。一般来说, 建议进行 5 到 10 分钟的结合步骤。对于快速结合分子, 通常 1-2 分钟的结合时间就足够了。然而, 对于较慢的反应, 结合步骤所需的时间可能更长。避免运行结合步骤太长时间, 还应避免结合曲线达到平衡, 因为这可能会导致较弱的非特异性相互作用。

在运行具有几种分析物浓度的完整动力学曲线时, 通过使用同一组速率常数同时拟合几种分析物浓度的结合和解离阶段, 对数据进行整体分析。对广范围浓度的分析物进行整体分析可提供稳健的分析和准确的结合常数估计。了解正确的分析物浓度至关重要, 因为该值也会对计算常数产生直接影响。

解离步骤

在解离步骤中, 将生物传感器浸入不含分析物的缓冲溶液中。不存在分析物的情况下, 溶液中分析物的游离浓度降至零, 并且生物传感器表面的结合复合物发生解离。建议每个样品的解离步骤和基线步骤使用相同的微孔板孔。在相同的孔中使用相同的缓冲液运行这两个步骤可避免由于缓冲液、体积或孔形状的细微差异而导致的步骤偏差。虽然这些偏差可以被纠正, 但为了进行准确的数据分析, 最好尽量控制到最小程度。

在同一项检测中, 只要每个样品的缓冲液基质相同, 就可以在同一个孔中对同一样品进行解离步骤。因此, 对于每块分析物样品板, 只需要保留一列微孔板, 用于解离缓冲液。这为并行分析更多样品留出了空间, 有助于提高通量和效率。每次解离步骤都可以浸入同一孔缓冲液中, 因为即使生物传感器已饱和且解离速率很高, 从生物传感器表面脱落的分子数量也可以忽略不计, 如表 4 所示。如果解离速率极快且分子完全从生物传感器解离, 使用单独的孔来解离每个样品可能会有所帮助。

解离步骤的运行时长应足以观察结合信号的衰减, 这意味着解离步骤的长度将取决于相互作用的亲和力。如果测量解离曲线的时间太短, 则高亲和力相互作用可能难以分析。理想情况下, 要实现稳健的分析, 应有至少 5% 的复合物解离。(参考表 3 了解亲和力和复合物半衰期之间的关系)。使用 Octet® 系统用于动力学测量的一个重要优点是可以同时对多个分析物浓度进行长解离步骤, 而不是一次对一个样品进行解离, 从而大大缩短了实验运行时间。

非特异性结合

生物分子有与生物传感器表面产生相互作用的倾向; 因此, 非特异性结合是任何条件下任何检测都需要关注的问题。发生非特异性结合的原因可能包括多种因素, 例如细胞培养基成分、BSA 或血清蛋白, 或样品或缓冲液中的带电物质。虽然生物传感器上的生物相容性层极大地减轻了非特异性结合, 我们仍然必须采取一些措施以尽量减少此效应。

在检测之前，需要对生物传感器进行预湿。通过与相应样品相匹配的培养基或缓冲液中进行至少10分钟的预湿，非特异性结合的问题可以得到极大改善。确保在检测过程中，对基线、结合和解离步骤使用相同的缓冲液。

如果发生了非特异性结合，适当进行检测优化，以及选择合适的缓冲液能够尽可能地减少其影响。改良分析缓冲液可以减少这种结合。在大多数测量蛋白质-蛋白质相互作用的检测中，可以添加封闭蛋白如BSA（最多1-2%）和/或表面活性剂如Tween-20（最多0.09%）。也可使用其他封闭试剂（如酪蛋白、PEG或明胶）替代。还可以改良盐浓度。将盐浓度提高到150-500 mM（生理浓度及更高）可以提高检测的严格性，从而减少非特异性结合。

每次动力学实验都应包含一个参比品，以便减去背景信号和检测漂移。使用固化配体的生物传感器在结合步骤中运行参比品，参比品是不含分析物的缓冲液。如果存在背景信号的问题，或者小分子结合分析中的信噪比非常低，可以使用参比品和参比生物传感器进行双重扣减。参比生物传感器通常固化与配体相似的非活性蛋白质（如果很难找到这种阴性蛋白，可以用不固化配体的传感器），并使用与固化配体的生物传感器相同的分析物样品进行检测。参比生物传感器用于减去分析物与生物传感器的非特异性结合。

生物传感器再生

很多种类的生物传感器都是可以再生重复使用的。在某些情况下，特别是在动力学筛选中，使用相同的配体包被生物传感器测定多个样品可能会有利。这种做法可以节省一些生物传感器的成本。

对于动力学应用，链霉亲和素和AR2G生物传感器可以通过在破坏条件下去除结合的分析物再生至固化配体的水平。

有效再生需要去除结合的分析物而不影响配体活性。然而，有效破坏配体-分析物结合的条件依赖于蛋白质。类似地，固化配体在再生后保留活性的能力也存在很大差异。我们必须通过实验确定特定配体-分析物蛋白质对的适当再生方案。大多数抗体-蛋白质相互作用可以通过在低pH缓冲液（pH 1-4）（例如10 mM甘氨酸（pH 1.5-2.0））中一系列短暂孵育，然后在检测缓冲液中中和来破坏。然而，如果生物传感器表面不能用低pH值缓冲液有效再生，则可以测试其他条件，例如高盐浓度、去污剂或高pH值缓冲液。不同的配体-分析物对之间存在不同的相互作用模式，例如疏水作用、范德华力和离子结合。要制定有效的再生方案，我们有必要了解相关蛋白质的性质和主导相互作用的非共价力的类型。

成功再生必须满足以下条件：

- 生物传感器表面化学物质在再生条件下稳定。
- 固化配体在再生条件下必须稳定，并在多个再生循环中保持活性。
- 配体-分析物蛋白质相互作用在再生过程中完全解离。

配体能够承受的再生循环次数和再生效率也很大程度上取决于被破坏的蛋白质。一些配体可以再生十次或更多次循环，而其他配体只能承受更少的循环或根本无法再生。生物传感器兼容的再生缓冲液建议如表5所示。Octet®平台的高通量模式为结合再生的检测以及再生条件的有效筛选提供了灵活的平台。

我们可以通过多种方法配置再生条件的筛选。该配体可以固化在八个生物传感器上，以同时筛选多达八种再生溶液，从而发挥Octet®平台的通量优势。使用浓度至少为10×KD的分析物以及多达十个再生循环进行检测(图11)。一般来说，相比于单次长时间暴露，在一个循环中多次短时间暴露于(例如每次5秒，共3至5次)再生缓冲液中的效果更好。

表 5.与生物传感器兼容的再生缓冲液推荐。

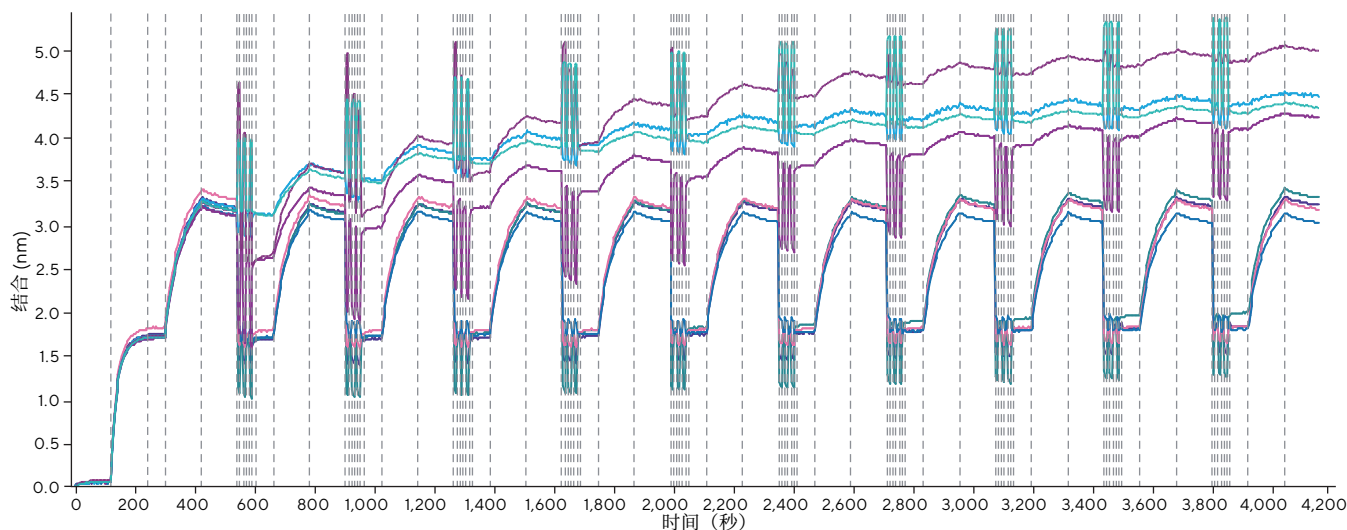
生物传感器	再生缓冲液	建议最大暴露时间
链霉亲和素	HCl pH 0.5-1.5	15 分钟
链霉亲和素	NaOH pH 10-11	15 分钟
链霉亲和素	10 mM 甘氨酸 (pH 1-3)	15 分钟
链霉亲和素, AR2G	NaCl, 1-5 M	15 分钟
链霉亲和素	MgCl ₂ , 0.1-1 M	15 分钟
链霉亲和素	Tween 20, 0.1-0.5%	15 分钟
链霉亲和素	SDS, 0.005-0.01%	15 分钟
链霉亲和素	磷酸, 50-500 mM	15 分钟
链霉亲和素	EDTA, 25-100 mM	15 分钟
链霉亲和素	Triton X-100, 0.1-0.5%	15 分钟
AR2G	醋酸盐缓冲液, 10-100 mM (pH 0.5-3)	15 分钟
AR2G	柠檬酸缓冲液, pH 2	15 分钟
AR2G	KOH, pH 9-11	15 分钟
AR2G	磷酸, pH 2	15 分钟
AR2G	SDS, 最高可达 0.5%	15 分钟
AR2G	MgCl ₂ , 最高可达 4 M	15 分钟
AR2G	HCl, 1 mM	15 分钟
AR2G	乙二醇 25% 或 50%	15 分钟
AR2G	0.15 M 草酸、0.15 M H ₃ PO ₄ 、0.15 M 甲酸和 0.15 M 丙二酸*	15 分钟
AR2G	0.2 M 乙醇胺、0.2 M Na ₃ PO ₄ 、0.2 M 哌嗪和 0.2 M 甘氨酸**	5 分钟
AR2G	0.46 M KSCN、1.83 M MgCl ₂ 、0.92 M 尿素和 1.83 M 盐酸胍	5 分钟
AR2G	CHAPS、两性洗涤剂 3-12、Tween 80、Tween 20 和 Triton X-100 的混合物, 浓度均为 0.3%, 20 mM EDTA	5 分钟

如果再生成功，则与早期的结合循环相比，每个循环的分析物结合曲线将重叠，并且结合信号的变化非常小(图 12B)。

图 12A 显示每个再生步骤之后分析物结合的信号响应重叠。随着再生循环逐次增加，信号急剧减弱。图 12B 显示了理想再生条件下分析物结合的重叠，此时信号未随着再生循

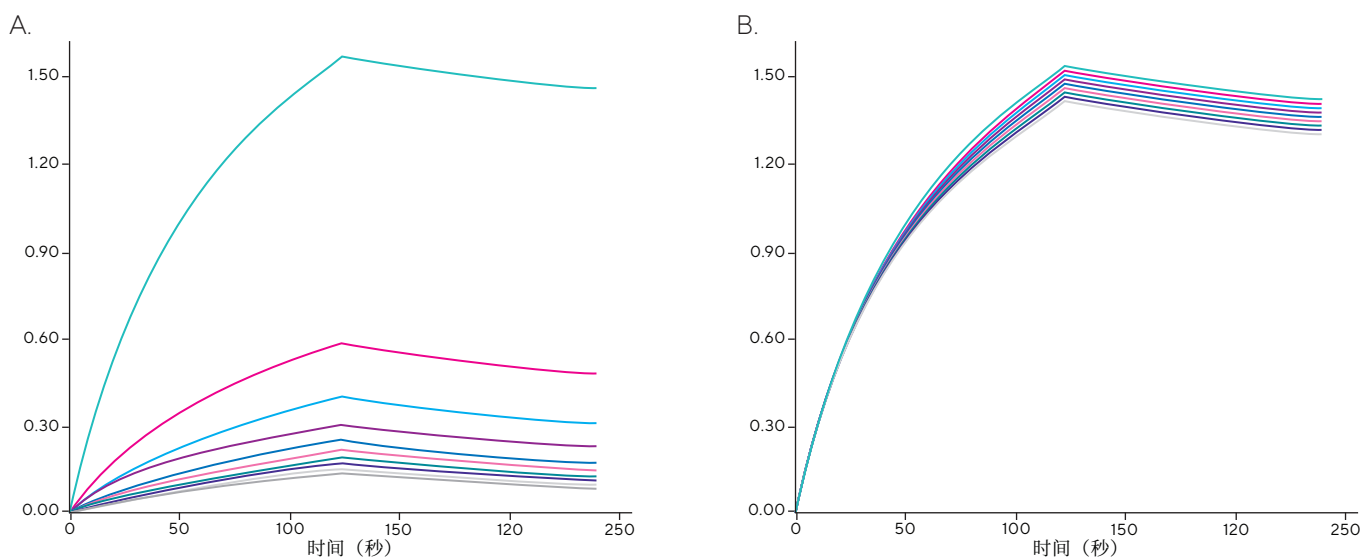
环次数增加而减弱。在某些情况下，结合信号可能在第一次再生循环期间降低，但在后续循环中保持稳定。这种下降可能是由多种因素造成的，包括第一次暴露于再生缓冲液期间少量固化蛋白质的损失。为了尽量减少这种初始变化对最终数据的影响，通常的做法是在检测之前运行预处理步骤，即执行一个再生循环。

图 11: 在 Octet® R8系统上运行的再生摸索和验证实验的实时结果。



注: 显示的数据来自八个链霉亲和素生物传感器 (A1-H1)，每个传感器对应不同的再生溶液。固化生物素-蛋白 A，然后进行 11 次与人 IgG 结合并再生的循环。

图 12: 使用图 11 中的数据分析再生循环的示例。



注: 图 11 中对齐的动力学曲线显示了实验中测试的八种再生条件中的两种的结合和解离步骤。图表 A 显示了非最佳再生试剂 (NaOH, pH 11) 的数据，其中结合信号随着每个后续再生循环而下降。图 B 显示了最佳再生条件 (10 mM 甘氨酸, pH 2)，其中配体的结合活性在所有再生循环中得以保持。

对于基于捕获的生物传感器，例如抗人 IgG Fc 捕获或抗小鼠 Fc 捕获，表面可以再生到原始表面化学物质的水平。捕获的配体和分析物在再生过程中都会被去除，再生通常使用 10 mM 甘氨酸 (pH 1.7) 再生缓冲液进行。进行三到五个循环，包括在再生缓冲液中孵育 5 秒，然后在检测缓冲液中孵育 5 秒。然后将配体重新固化到生物传感器上，以进行新的动力学检测。然而，根据捕获的蛋白质，再生缓冲液配方可能需要优化。有关特定基于捕获的生物传感器的推荐再生条件，请参阅赛多利斯网站上相应的技术说明。

如何运行结合动力学检测

使用 Octet® Discovery 软件和微孔板可以简单直接地完成动力学检测的准备步骤。Octet® 系统在动力学检测设计方面提供了极大的灵活性。使用 Octet® Discovery 软件设置检测的详细说明可以在 Octet® Discovery 软件用户指南中找到。

典型的检测方案如下：

1. 准备缓冲液、再生溶液、配体和分析物样品。
2. 将生物传感器预湿至少 10 分钟。预湿缓冲液应与整个检测过程中使用的缓冲液尽可能匹配。
3. 准备检测板，用缓冲液、再生溶液、配体和相互作用的蛋

白质样品填充孔列。

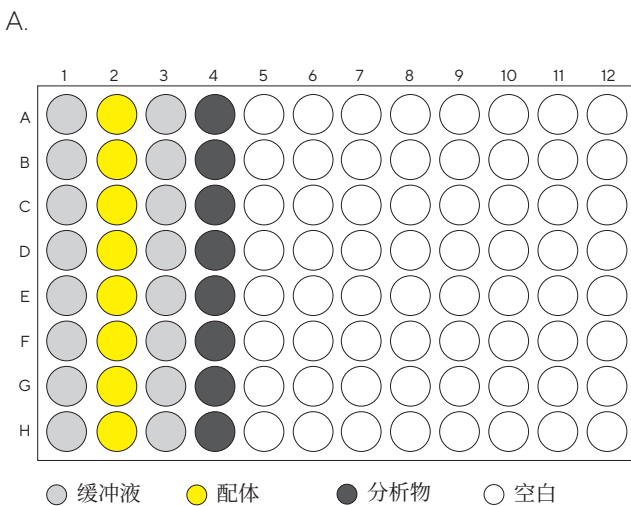
4. 在 Octet® Discovery 软件中设置检测：定义板布局、定义检测步骤并分配生物传感器。
5. 将预湿的生物传感器和检测板在 Octet® 系统上平衡 10 分钟。平衡可以使生物传感器充分预湿，并且使检测板达到稳定的温度。
6. 运行检测。
7. 数据处理和分析。

典型的样品板布局和检测摘要如图 13 所示。

对于典型的大分子动力学检测，建议采用列模式，其中样品稀释按着微孔板的列进行。在每列中同时测量样品，以便并行测量样品稀释度。在测试不同的分析物之间，生物传感器会发生替换或再生。在行模式中，样品稀释是在微孔板行中进行的。这种形式通常用于小分子动力学检测，因为通常小分子亲和力较低且解离快速而完全，不需要在样品浓度梯度之间进行生物传感器再生。图 13B 显示了典型的动力学检测设置和推荐的步骤时间。请注意，基线和解离步骤应使用同一列缓冲液。

基线、结合和解离步骤必须按顺序运行。可以根据相互作用的强度和速度改变振荡速度和检测步骤时长。增加振荡速度将增加检测的灵敏度，在弱结合或低浓度样时建议高速振荡。

图 13: A) 标准动力学检测的孔板布局图。 B) 标准动力学检测及建议步骤时间总结。



B.

步骤编号	步骤名称	时间 (秒)	转速 (rpm)	样品板列
1	平衡	60	1000	1
2	固化	300-600	1000	2
3	基线	180-600	1000	3
4	结合	300-600	1000	4
5	解离	300-3600	1000	3

如果相互作用非常迅速，或者使用的样品浓度很高，则建议采用较慢的振荡速度，即 400 rpm。对于缓慢的相互作用或弱结合，可以增加结合步骤的时间来增强结合信号。对于高亲和力样品，则应该增加解离步骤时间。一般来说，基线步骤时间 1 分钟、结合步骤时间 5 分钟、解离步骤时间 10 分钟是一个很好的起点，但可能需要进行一些优化。为了准确计算结合与亲和力常数，至少 5% 的复合物必须解离。高亲和力结合对，例如 $KD < 1\text{nM}$ ，可能需要更长的解离时间，即 30 分钟或更长。总体运行时间不应超过 3 小时，因为微孔板孔中的样品蒸发可能会开始影响结果。然而，Octet® R8 平台能够利用防蒸发盖，实现长达 12 小时的无人值守运行时间。

进行动力学检测时需要记住一些重要注意事项：

- 用于生物传感器预湿、基线和解离步骤的缓冲液必须尽可能与分析物样品的基质匹配。
- 配体固化浓度应在不使生物传感器饱和的同时提供强分析物信号。理想情况下，对于 150 kDa 抗体，固化步骤中的信号应在固化 10 分钟后达到约 1.0nm。
- 对至少四种浓度的分析物运行 2 倍或 3 倍梯度稀释，最高浓度至少为 10 倍的 KD。
- 基线和解离步骤应使用相同的缓冲液孔。这将使得误差尽可能小，并能够使用 Octet® Analysis Studio 软件中的步骤间校正功能。
- 运行参比对照，仅由缓冲液组成，不含分析物。
- 在继续结合步骤之前，请确保基线稳定（具有很平信号且向下漂移足够小）。

为了获得最佳结果，建议在 30 °C 下进行检测，因为生物传感器的结合对温度波动很敏感。通过在高于环境温度几度的环境下进行工作，可以在整个检测过程中保持一致的温度。对于 Octet® R 系列产品，设备均带降温功能，样品舱的温度控制为 15~40 °C，检测温度通常可设置为 25 °C。

结合动力学数据分析

结合动力学曲线图包含大量描述分子间相互作用的信息。曲线图不仅能回答有关分子间是否存在结合相互作用的简单问题，还能进行全面表征相互作用并提取结合速率和平衡结合常数的复杂分析。Octet® Analysis Studio 软件是一款功能强大且易于使用的动力学数据分析软件。在本节中，我们将描述该数据分析软件的特点、分析数据的步骤以及解释结果的注意事项。

该软件可以基于相互作用的数学模型来解释动力学数据，并可根据结合和解离速率来计算动力学和平衡结合常数。对于单个分析物浓度的动力学参数可以进行 Local 分析，而对于所有的分析物浓度同时得到一个常数则进行 Global 分析。或者，可以通过稳态分析，利用每个可用分析物浓度的平衡信号来确定平衡解离常数 (KD)

进行动力学数据分析的一般步骤如下：

1. 将获取的数据加载到 Octet® Analysis Studio 软件中。在“Processing”（处理）窗口中，可以通过指定参比扣减、Y 轴对齐、inter-step 校正和 Savitzky-Golay 滤波的方法来处理数据。
2. 在“Analysis”（分析）窗口中，可以通过指定分析步骤、选择曲线拟合模型、拟合方法（Local 或 Global）和其他来分析数据。
3. 点击“Save Report”（保存报告）导出分析的数据，在 Microsoft® Excel® 中生成详细报告。

识别非典型的结合

应在数据分析之前检查实时动力学曲线，因为它们揭示了有关相互作用性质以及数据质量的信息。理想情况下，只有研究中的相互作用才会对结合曲线产生影响，但是，其他因素也会影响动力学曲线上结合曲线的形状。当生物传感器上发生多种类型的相互作用而出现复杂、不理想的结合时，得到的动力学曲线将显示偏离典型 1:1 双分子相互作用的特征。图 14 显示了典型（同质）和非典型（异质）结合曲线的示例。黑色异质曲线的结合阶段明显为双相，首先急剧上升，然后继续以较慢的速度上升，而 1:1 相互作用预计会在平滑的单相结合曲线中达到平衡。黑色曲线的双相性质也反映在解离步骤中，其中初始解离快速，随后在步骤后期解离较慢。在某些不理想结合的情况下（图中未显示），解离曲线信号稳定在结合前基线信号之上。这些结合曲线特征表明存在复杂的结合事件，会影响可靠的曲线拟合和数据分析。

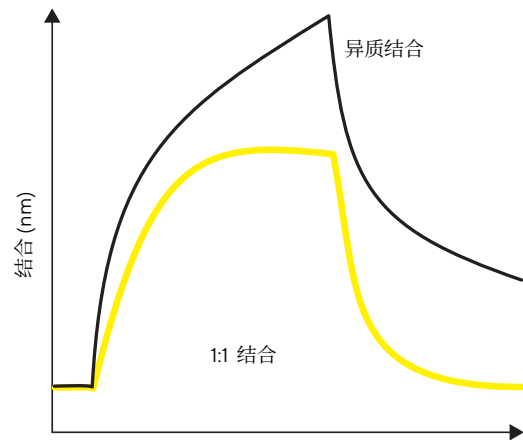
虽然可以使用更复杂的结合模型（例如 2:1 或 1:2 结合）轻松拟合表现出非典型行为的相互作用，但最好不要在没有充分理由的情况下选择更复杂的曲线拟合模型。除非已知相互作用很复杂，否则最好的方法是优化检测条件，直到曲线显示出 1:1 的结合特性。

在动力学检测中，复杂、不理想的结合曲线可能由多种因素造成。适当的检测优化通常可以减轻明显的异质性并使相互作用恢复到其预期的结合行为。复杂结合行为的主要组成之一可能是与生物传感器的非特异性结合。“如何设计动力学实验”部分讨论了减少此类结合的技术。如果分析物浓度远高于 KD ，和 / 或表面配体密度较高，此时，较弱的非特异性相互作用往往会发挥作用。通过降低检测中的分析物浓度范围或从分析中去除较高浓度的数据曲线，可以让相互作用更接近理想的曲线拟合。降低表面配体密度（通过降低固化期间的配体浓度或减少固化步骤时间）可以产生类似的效果。

纠正复杂结合行为的策略

- 使用基于捕获的方法。
- 降低配体密度。
- 降低分析物浓度。
- 检查试剂的稳定性和质量。
- 通过添加封闭剂、表面活性剂来改良检测缓冲液。
- 缩短结合步骤时间。

图 14：非最佳结合将导致传感图具有偏离典型 1:1 相互作用的特征。



注：异质结合的特征在于双相曲线，其在结合步骤中无法达到平衡，并且在解离步骤中通常不会恢复到基线信号。

配体或分析物的结构异质性（无论是存在于原始样品还是检测中人为引入）都可能导致复杂的结合曲线。配体或分析物样品的质量不佳会导致异质结合效应。部分活性或非活性蛋白质和聚集体的存在将影响动力学曲线，导致非最佳结合。始终建议使用经过妥善储存和稳定性经过测试的新鲜、高质量试剂。固化方法选择不当也可能产生导致配体异质性的物理效应。例如，在氨基偶联传感器上进行共价固化时，结合位点附近的氨基可能导致具有不同结合特性的配体亚群。使用基于捕获的固化策略可以防止这种影响，因为该策略中配体位于表面上（参见“如何设计动力学实验”部分）。

如果表面的配体密度非常高和 / 或相互作用的结合速率很快，在解离阶段可能会发生分析物的重新结合。这一效应常见于所有涉及配体与固体支持物结合的生物传感器技术。当分析物分子从一个配体分子上解离出来并立即与表面上的相邻分子结合时，就会发生重新结合。这种效应有时被称为分析物“walking”效应，可能导致复杂的结合动力学和无法得到解离速率。最好的解决方案是通过降低固化步骤配体的浓度或缩短固化步骤时间，从而降低生物传感器上的配体密度。

如果结合对表现出复杂的结合行为，即使预期是 1:1 的相互作用，选择适合的分析方法和认真设计实验通常可以消除误差，得到与 1:1 结合动力学一致的结果。处理参数获取数据并将其加载到数据分析软件后，必须在“Processing”（处理）窗口中进行处理。该窗口提供了结合曲线的校正工具，包括使用各种参比扣减和对齐选项。在数据处理步骤中，将指定如何引用数据并生成最终的结合曲线。

- 在分析的这个阶段执行参比扣减。可以在“Sensor Selection”（传感器选择）窗口中选择参比品和 / 或生物传感器，并在“Raw Data”（原始数据）界面中选择扣减方法。
- 为确保正确拟合曲线，必须将其与 Y 轴上的共同参比点对齐：
 - 由于所有生物传感器的平行运动，在检测过程中实现了沿 X 轴的对齐。
 - 通过指定执行对齐的步骤和时间，可以使用“Align Y Axis”（对齐 Y 轴）功能实现沿 Y 轴的对齐。
 - 指定步骤的时间范围将用于计算平均值，然后将该平均值设置为 $y=0$ 。

例如，为了与基线对齐，选择“Baseline”（基线）并指定基线步骤内的时间以设置为平均 $y=0$ 。通常，Y 轴与基线步骤的最后 5 秒对齐，因为此时信号很稳定。

- “Inter-step Correction”（步骤间校正）功能可校正由分析误差导致的两个步骤之间的任何错位。
 - “Align to Dissociation”（与解离对齐）- 在 Y 轴上移动结合步骤，将结合步骤的结束与相邻解离步骤的开始对齐。
 - “Align to Baseline”（与基线对齐）- 在 Y 轴上移动结合步骤，将结合步骤的开始与相邻基线步骤的结束对齐。

为了最有效地进行步骤间校正，在检测过程中，基线步骤和解离步骤必须在同一微孔板孔中运行。

- Savitzky-Golay 滤波可消除数据中的高频噪声。此功能为可选功能，然而，我们建议使用标准采集速率收集的数据。

选择曲线拟合模型

在“Analysis”（分析）窗口中，可以通过拟合可用的曲线拟合模型之一来分析处理后的数据。在将实验数据拟合到模型时，需要考虑到一些因素。许多研究的相互作用并不符合简单的 1:1 结合模型。如果偏离该模型是相互作用类型所致，而不是实验误差，可以使用 Octet[®] Analysis Studio 软件中额外提供的其他曲线拟合模型：

- 2:1 模型（非均质模型）。
- 1:2 模型（双价分析物）。
- 物质迁移效应 Mass Transport。

虽然 1:1 结合模型假设配体和分析物之间的相互作用遵循拟一级动力学，但可以使用其他模型来计算更复杂相互作用的结合常数。应根据对相互作用和所涉及的分子、化合价和预测的结合化学计量或估计的结合常数的了解，选择适当的相互作用动力学结合模型。为了获得一个最佳的实验数据可以人为的去选择一个对应的模型拟合。更复杂的模型具有更多的变量和自由度，并且往往在统计上提供更好的拟合。然而，除非已知相互作用更为复杂，或者目标是尝试了解相互作用的机制，否则应该使用 1:1 模型。如果拟合度较差，则可能是非源自感兴趣相互作用的成分影响了数据。由非特异性结合、生物传感器过载、试剂质量差、检测步骤时间不适当或基线不稳定引起的检测误差都会影响结合曲线。必须通过进一步优化实验设计来消除这些变量，然后才能实现精确的曲线拟合。

1:1 结合模型

在 1:1 双分子相互作用中，结合阶段和解离阶段均显示由单个指数函数描述的时间分辨信号。分析物分子以相同的速率与每个配体结合位点结合。结合曲线遵循特征性的双曲线结合，信号呈指数增加，并在结合达到平衡后趋于平稳。解离曲线遵循信号单指数衰减，信号最终恢复到基线。1:1 结合的完整拟合方案为：

结合阶段：

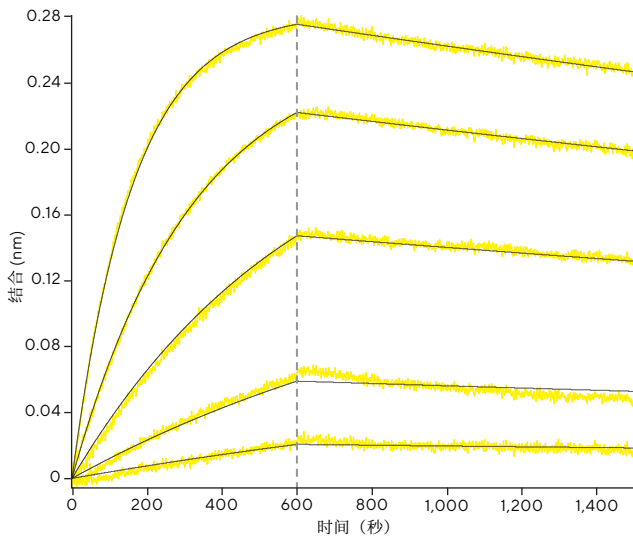
$$y = R_{\max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a * [\text{Analyte}]}} (1 - e^{-(k_a * [\text{Analyte}] + k_d)x})$$

解离阶段：

$$y = y_0 e^{-k_d(x-x_0)}$$
$$y_0 = R_{\max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a * [\text{Analyte}]}} (1 - e^{-(k_a * [\text{Analyte}] + k_d)x_0})$$

1:1 相互作用后的动力学数据示例如图 15 所示。

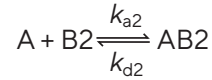
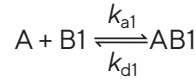
图 15：1:1 结合相互作用的分析数据示意图。



注：黑线代表数据迹线，曲线拟合为黄色。

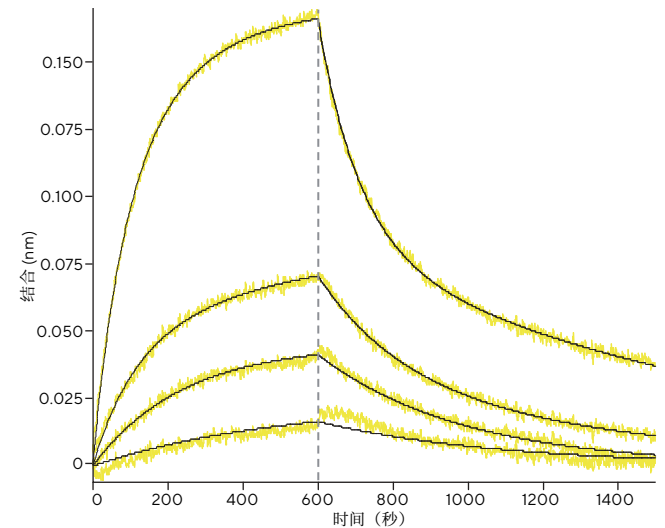
2:1 非均质配体模型

2:1 非均质配体结合模型假设分析物在两个独立的配体位点结合。每个配体位点以不同的速率常数独立地与分析物结合。此处给出了两组速率常数，每个相互作用一组：



其中 A 代表分析物，B 代表固化配体。从数学上讲，用于拟合 2:1 结合相互作用的方程是两个 1:1 曲线拟合的组合，并带有一个附加参数来对应每次相互作用所贡献的结合百分比。图 16 显示使用 2:1 非均质结合模型拟合数据的示例。注意结合曲线和解离曲线的双相性质。在结合阶段，最初的快速结合速率随后会变慢，信号会持续增加而不是达到平衡。在解离阶段，最初快速解离，随后解离速率减慢，较高浓度曲线无法恢复到基线。

图 16：使用 2:1 非均质结合模型进行数据拟合分析。



注：曲线是双相的，表明发生了多种相互作用。

物质迁移模型

在基于流体的系统中，样品经由层流通过生物传感器表面，其中来自管壁侧面和生物传感器表面的摩擦力减慢了靠近表面液体的速度。在这样的系统中，生物传感器附近流速的降低会抑制分析物分子从表面到本体溶液的有效交换。在低浓度下，生物传感器表面附近的分析物分子与配体的结合速率比它们在周围溶液中的交换速度更快。在这种情况下，结合速率取决于分析物分子的供应，而不是相互作用的实际动力学。结合曲线的形状将由分析物扩散到表面的速率决定，并将随着流速而变化。随着流速的增加，表观结合速率也会增加，因为可供结合的分析物分子的供应量会增加。



通常，物质迁移模型曲线的陡度往往低于预期，并且可能视觉上近似直线（见图 10C）。

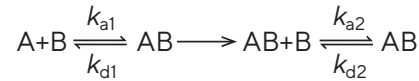
可以使用物质迁移结合模型来拟合物质迁移结合的数据，该模型将拟合分析物的结合，而这通过考虑以下两个步骤来实现：1) 分析物从本体溶液到表面的传输速率 (k_m)；2) 分析物与配体的相互作用。如果 k_m 远小于 $k_a [B]$ ，则会发生扩散限制。

$$\frac{dR}{dt} = \frac{k_a * [\text{Analyte}]}{1 + \frac{k_a}{k_m} (R_{\text{max}} - R)} (R_{\text{max}} - R) - \frac{k_d}{1 + \frac{k_a}{k_m} (R_{\text{max}} - R)} R$$

在“浸入即读”模式下搅动样品板会在生物传感器上产生湍流，该湍流不受层流力的影响，并且能够高效地交换靠近生物传感器表面的体积。如果存在物质迁移效应的问题，那么必须有效地增加分析物向表面的供应。这可以通过降低固化配体的水平，或增加检测过程中的振荡速度来增加流速来实现。

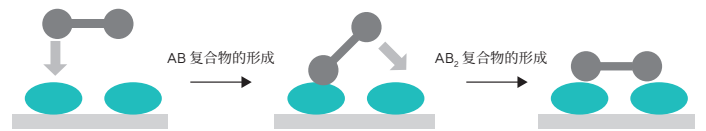
1:2 双价分析物模型

1:2 双价分析物模型适合一种二价分析物与单体固化配体的结合。计算两种相互作用的动力学参数 (k_{a1} 、 k_{a2} 、 k_{d1} 、 k_{d2} 、 K_{D1} 和 K_{D2})。



该模型假设由于表面上两个相邻结合位点之间的距离有限，二价分析物可以形成桥接复合物（图 17）。这种相互作用是连锁的，也就是说， AB_2 复合物的形成不能发生在 AB 形成之前，并且 AB 不能在 AB_2 解离之前解离。如果相互作用遵循 1:1 结合模型，这种亲合效应会导致表观解离速率低于预期。

图 17: 双价分析物结合示意图。



注：由于生物传感器表面相邻配体分子之间的距离有限，二价分析物可以形成桥接复合物。这种效应导致表观解离速率低于预期。双价分析物结合模型在计算结合速率和解离速率时考虑了亲合力。

两组速率常数和 KD 值均使用 1:2 二价分析物模型进行显示。第一组值反映了由于相互作用的亲和力而产生的结合。第二组值代表由于亲合效应而形成的结合。使用三个方程来拟合二价分析物曲线，第一个方程描述 A 与 B 的结合，第二个方程描述 AB 与 B 的结合，第三个方程描述 AB_2 复合物的解离。

$$\frac{dB}{dt} = -(2k_{a1} * [A] * B - k_{d1} * AB) - (k_{a2} * AB * B - 2k_{d2} * AB_2)$$

$$\frac{dAB}{dt} = (2k_{a1} * [A] * [B] - k_{d1} * [AB]) - (k_{a2} * [AB] * [B] - 2k_{d2} * [AB_2])$$

$$\frac{dAB_2}{dt} = (k_{a2} * AB * B - 2k_{d2} * AB_2)$$

检测形式和条件的改变可以降低结合相互作用中的亲合效应。对此，一种方法是通过降低配体浓度或减少固化步骤时间从而降低固化配体的密度。配体密度的降低将有效增加表面分子之间的距离，从而尽可能降低结合分析物到达相邻分子的可能性。这种方法可能需要一些优化，因为降低配体密度会降低检测信号。另一种方法是，反转检测方向，将二价分子固化在表面上，这将排除分析物桥接的可能性。

Local Fitting: Full vs. Partial Fit

Octet® Analysis Studio 软件在 Local 拟合下提供了全部或部分拟合选项。Local 拟合将针对每个分析物浓度单独推导出动力学参数。Full 拟合选项假设相互作用是完全可逆的，因此当解离步骤时间接近无穷大时，所有与配体结合的分析物都会解离。由于解离曲线最终将达到结合前基线，因此解离速率会被外推直至达到 Y 轴上的零信号。对于解离速率非常低的数据，建议使用完全解离选项。

Partial 拟合时，解离信号不会达到结合前的基线水平。即使步骤时间接近无穷大，也只有一部分分析物结合会解离，并且解离速率仅拟合测量数据。部分解离可用于拟合具有显著或双相解离的数据曲线部分，但是部分拟合可能倾向于给出更高的 k_d 值。曲线拟合假设不包括降低到零的解离信号。

Global Fitting

使用几种分析物浓度进行 Global 拟合时，可以获得最准确的动力学和亲和力常数。Global 拟合分析使用完整拟合选项，将组内所有结合曲线数据都包括在内。将多条曲线拟合到一组结果中可以得到更为稳健和可靠的曲线拟合。动力学常数的计算取决于所选择的结合模型。如果对每个分析物浓度使用单独的生物传感器， R_{max} 应该保持与生物传感器不关联。如果 R_{max} 相关联，假设生物传感器之间的结合载量相等，就可以计算出理论最大响应。不同生物传感器的表面容量会略有差异。如果对系列中的每个分析物浓度使用相同的生物传感器，则 R_{max} 可以相关联。该策略通常用于小分子分析，其解离快速而彻底，并且能够对新的样品浓度重复使用相同的生物传感器。在标准大分子动力学检测中，每个样品都在新的或再生的生物传感器上运行， R_{max} 应该无关联，以便计算每个样品单独的 R_{max} 。

稳态分析 (steady state analysis)

如果无法或不需要进行完整的动力学分析，此时可以进行稳态或平衡分析。稳态选项对于分析亲和力较低或结合速率非常快的相互作用非常有用（仪器动态范围见表 1）。如果结合曲线的初始斜率很陡，软件就很难进行精确的曲线拟合。稳态分析通常用于蛋白质 - 小分子相互作用，其结合和解离速率往往非常快而信号水平相当低。为了获得准确的稳态分析结果，结合曲线必须达到每个分析物浓度的平衡信号。在大分子试验的低浓度分析物甚至可能需要将结合步骤时间延长 30 至 60 分钟才能达到平衡结合。这种方法仅适用于表现出 1:1 结合动力学。如果在 Octet® Analysis Studio 软件中选择“Response”（响应）选项，将根据指定的检测时间内的平均信号响应 (nm) 计算结合速率和亲和力常数。如果选择“Requilibrium”选项，则将根据理论 R_{eq} 并基于曲线拟合计算结合速率和亲和力常数。如果所有曲线都达到平衡，这两组值应该匹配。

评估拟合质量

一旦完成曲线拟合，就需要评估拟合的质量和计算出的结合和亲和力常数的可靠性。为了评估拟合曲线与实验数据的吻合程度，请参考下面列出的一般准则。

- 目视检查数据并确定拟合线是否与数据曲线吻合。如果拟合线与实际数据相差甚远，则表明拟合不理想。
- 查看分析物的最高浓度和最低浓度。这一条或两条曲线的行为是否与其他浓度不同？如果（一个或多个）最高浓度在拟合中表现出较大的偏差，则可能将其排除在分析之外。同样，如果最低浓度显示出很小或很弱的响应，这些数据也可能被排除。
- 确认动力学常数与基于文献或过往实验的相互作用常识的预期一致。
- 在结果表中提供残差计算结果并在“Analysis”（分析）窗口的数据曲线下方绘图，从而进行检查以验证拟合度。残差值不应大于拟合曲线最大响应的 $\pm 10\%$ 。残差图的形状与拟合曲线和实验数据之间的差异相对应，并且应显示出在平均值上下均匀分布的信号。值越高表明拟合越不准确。
- R^2 值表示拟合度与实验数据的相关程度。一般来说， R^2 值高于 0.95 视为拟合良好。
- 检查完整 χ^2 值。 χ^2 是偏差平方和，一般应低于 3。 χ^2 反映了实验数据和拟合线之间的误差。 χ^2 越小，表明拟合越好。

结论

本文介绍了在 Octet® 平台上进行分子动力学检测的关键要素，并讨论了生成高质量动力学数据的策略。Octet® 系统提供多种生物传感器供您选择，在检测设计方面十分灵活。合理的实验设计对于检测成功以及确保相互作用符合 1:1 结合模型至关重要。固化方法、测试顺序和缓冲液的选择等因素都会影响结果。配体固化密度的优化是每个新的结合分子都应执行的关键步骤，因为过量的配体会导致数据中的结合误差。应确保选择适当的分析物浓度范围，并采取措施尽量减少数据中的非特异性结合异质性。通过适当的实验设计，使用 Octet® 系统进行动力学分析将持续产生准确、可重复的数据和可靠的动力学和亲和力常数。

联系我们

更多联系信息，请访问

www.sartorius.com.cn

赛多利斯莱珀思（上海）贸易有限公司

邮箱 leadscn@sartorius.com

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889

