

NIBS-Qi

---

---

# Surface Plasmon Resonance (SPR)

Li Jiaojiao  
2018-8-7



# 主要内容

---

1

**SPR的发展历程**

2

**SPR的传感原理**

3

**SPR技术的应用**

4

**SPRi技术的应用**

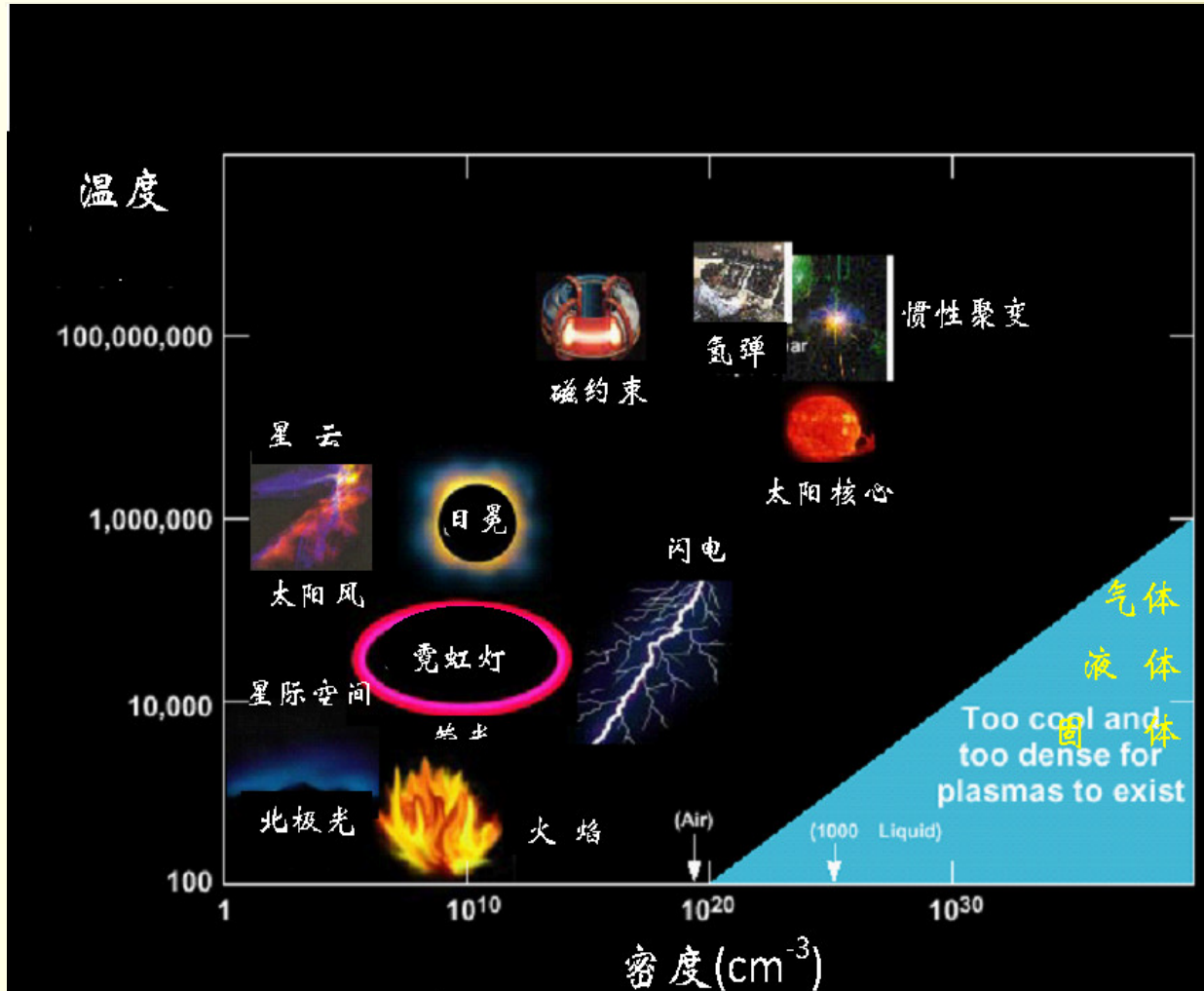
# 发展历程

- 1902——R. W. Wood 在实验中发现了SPR现象（金属光栅的**衍射异常现象**）。
- 1941——U. Fano 对现象进行了解释，认为衍射谱的峰(谷)实际上衍射模式和金属表面的**表面等离子体**耦合作用的结果。
- 1971——Kretschmann 设计的**棱镜结构**简便易得，为SPR传感器结构奠定了基础。
- 1983——Liedberg 构建了一种基于SPR现象的**生物传感器**，对H-IgG和Anti-IgG间的相互作用进行了成功检测，将SPR应用到生物大分子检测方面。
- 1988——Knoll 等人开始了**SPR成像技术**的研究。
- 1990——瑞典Biacore公司开发出首台商品化SPR仪器
- 2016——SPR技术被正式收录到**美国**和**日本药典**。

[1] 美国药典USP39 General Information/(1105)Immunological Test Methods- Surface Plasmon Resonance。

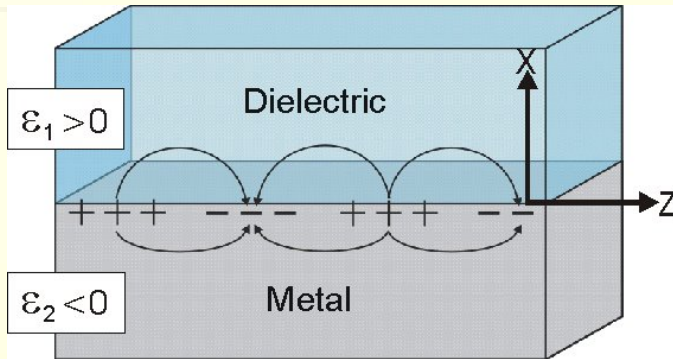
[2] 日本药典2016版JP17 General Information/ Biotechnological/Biological Products- Surface Plasmon Resonance, Page2474-2478。

# Plasma



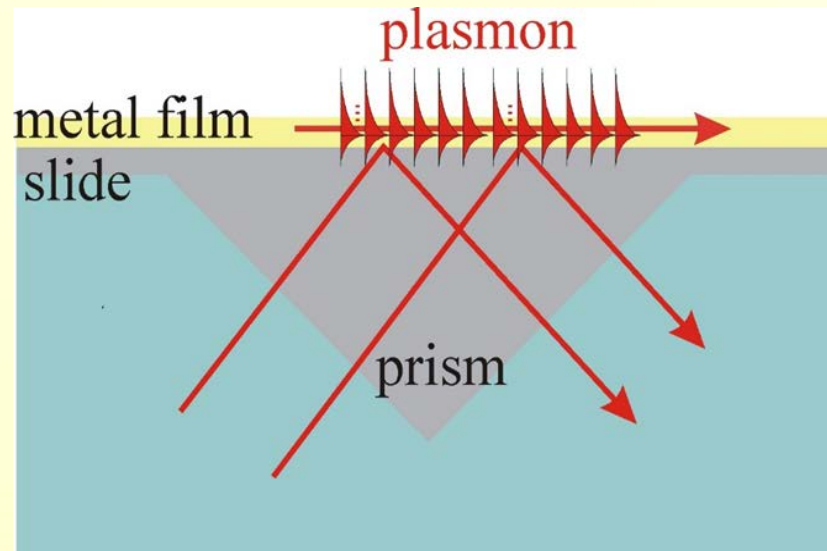
等离子体 (Plasma) 是一种离子化气体状物质, 常被视为是物质的第四态, 被称为等离子态, 或者“超气态”, 也称“电浆体”。正负电荷总量相等, 电中性, 所以叫**等离子体**。

# Surface Plasmons (SPs)



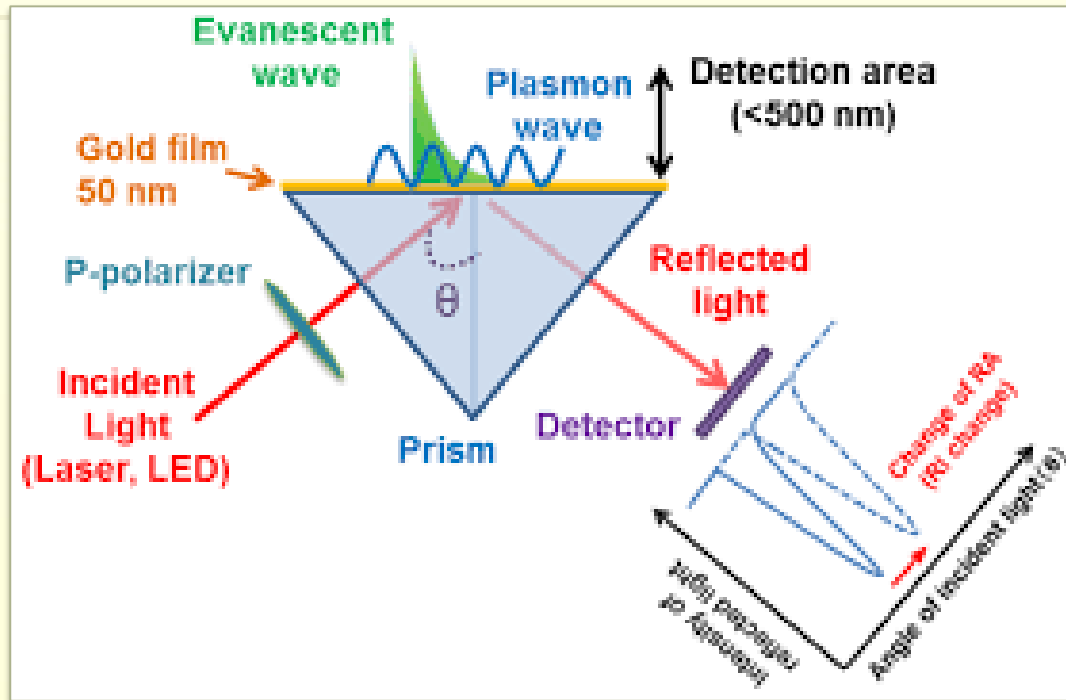
表面等离子体 (Surface Plasmons) 是指在金属表面存在的自由振动的电子与光子相互作用产生的沿着金属表面传播的电子疏密波。

**Kretschmann结构**: 金属薄膜直接镀在棱镜面上, 入射光在金属-棱镜界面处会发生**全反射**, 所谓的**消逝波**可能实现与表面等离子体的波矢量匹配, 光的能量便能有效的传递给表面等离子体, 从而激发出**表面等离子体波**



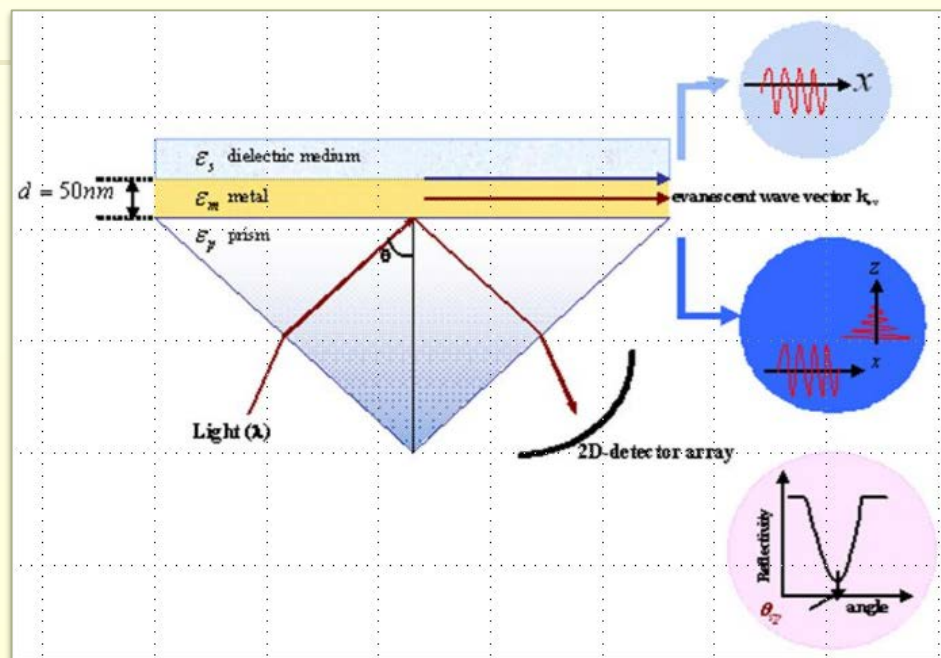
<http://www.biochem.mpg.de/oesterhelt/xlab/spfs.html>

# Surface Plasmon Resonance ( SPR)



光源的P偏振光以**一定的角度**入射到棱镜端面，发生全反射时，沿着临界面平行的方向会产生光波，振幅随着距离的增大而呈现指数级减小，称为**消逝波**，或**表面波**。消逝波会与金属膜的**表面等离子波**相遇，引起金属膜内自由电子产生共振，即**表面等离子共振**。

# SPR 原理

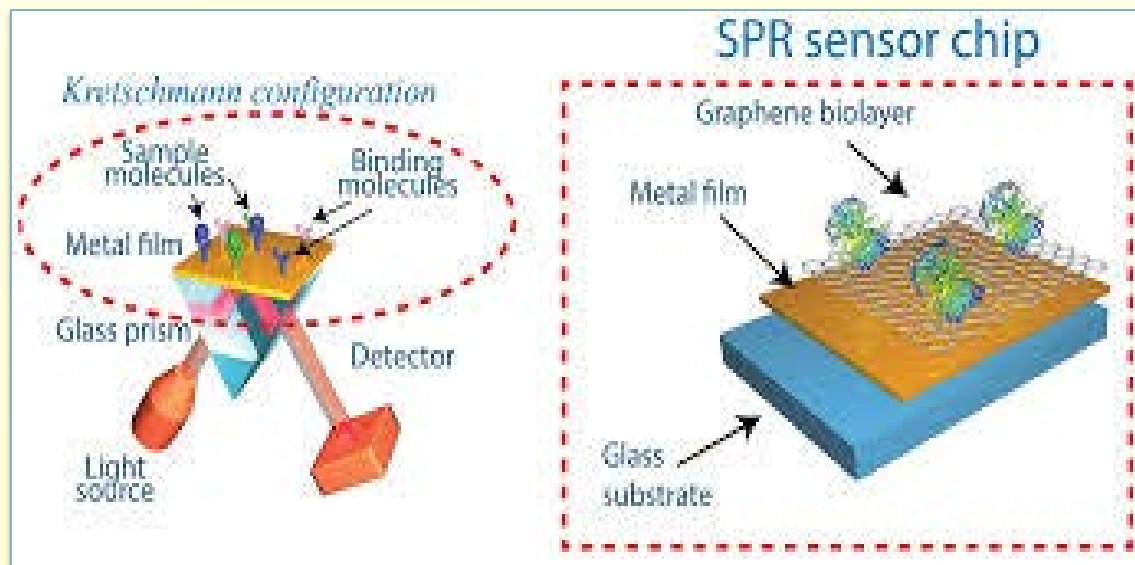


共振使金属表面的自由电子吸收了光能量，从而使反射光在一定角度内大大减弱，产生**最小反射率**。其中，使反射光完全消失的入射角称为**衰减全反射** (Attenuated Total Reflection, ATR)角，也称为**SPR角**。SPR角随表面**折射率**变化，而折射率的变化又和结合在金属表面的**生物分子质量**成正比。因此可通过**SPR角**的动态变化，得到生物分子之间相互作用的特异性信号，进而间接检测配体与分析物的**结合情况**。

# SPR技术的应用

## SPR分析特点

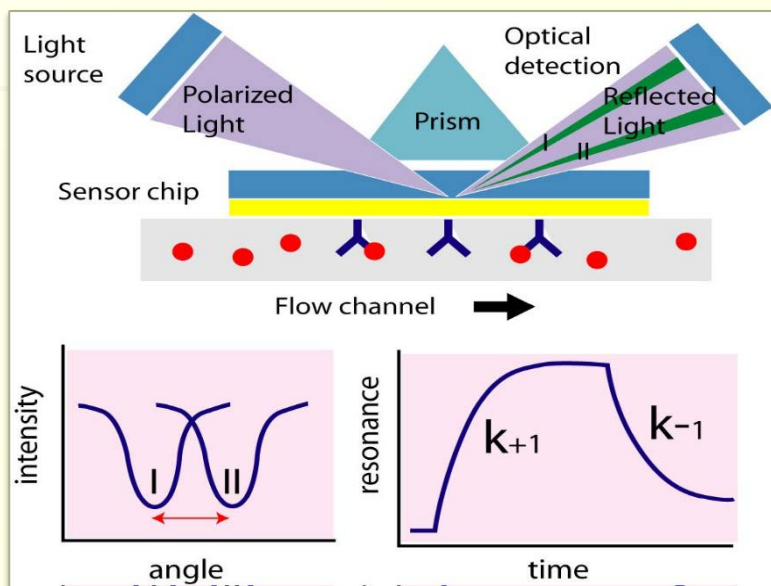
- \* 高灵敏度
- \* 无标记检测
- \* 实时动力学分析
- \* 无需纯化样品



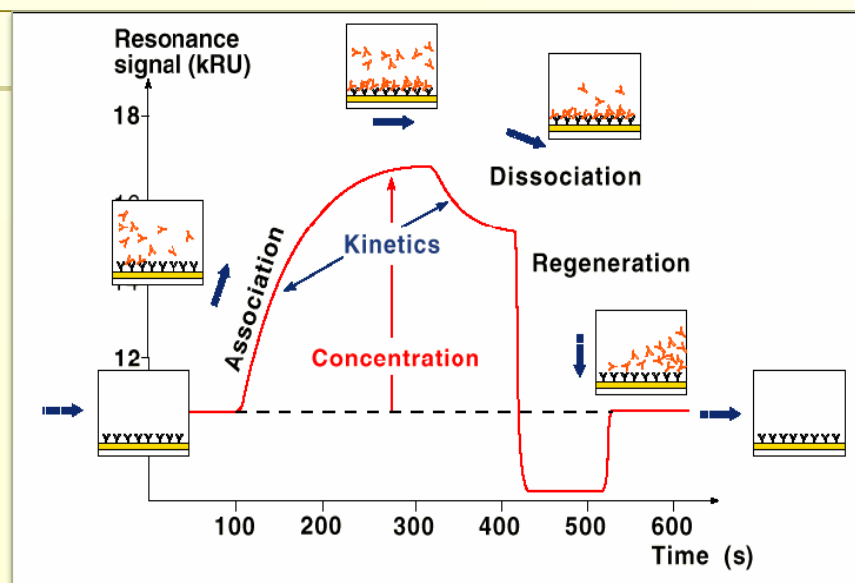
SPR技术可用于生物分子间结合特异性的分析、浓度定量、结合动力学和亲和力分析以及热力学分析，能够实时检测DNA与蛋白质之间、蛋白质分子之间、药物与蛋白之间、核酸与核酸之间、抗原与抗体之间以及受体与配体等生物分子之间的相互作用。



# SPR 生物传感器



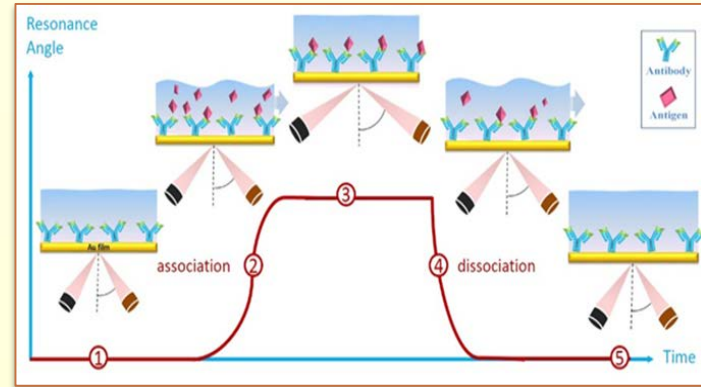
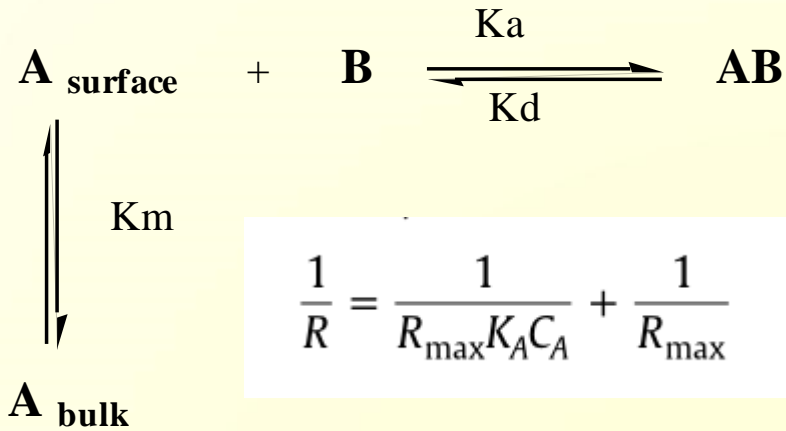
Adapted from Biacore web site ([www.biacore.com](http://www.biacore.com)).



共振单位RU (Resonance Units) 随时间变化的曲线

生物传感分析时，先将**靶分子**键合在芯片表面，再将含有分析物的溶液注入并流经芯片表面。若样品中有能够与芯片表面的生物分子相互作用的分子，分子间的结合引起传感器**表面质量**的增加，会引起**表面折射率**变化，最终导致**SPR角**变化，通过检测**SPR角度**变化，获得被分析物的**浓度**、**亲和力**、**动力学常数**和**特异性**等信息。生物分子间反应的变化即被实时动态观察到。

# SPR: 动力学分析

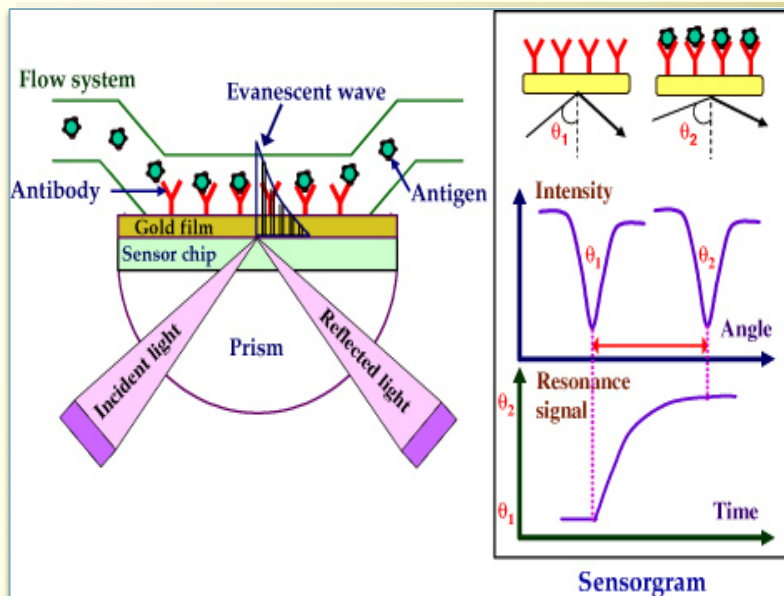


kinetic constant ( $K_a$   $K_d$ )

动力学分析模式不仅可以判断配体-分析物间结合力**有无/强弱**，更可以判断两者**结合速度快慢以及解离快慢**，在**药物筛选**领域具有重要的意义。

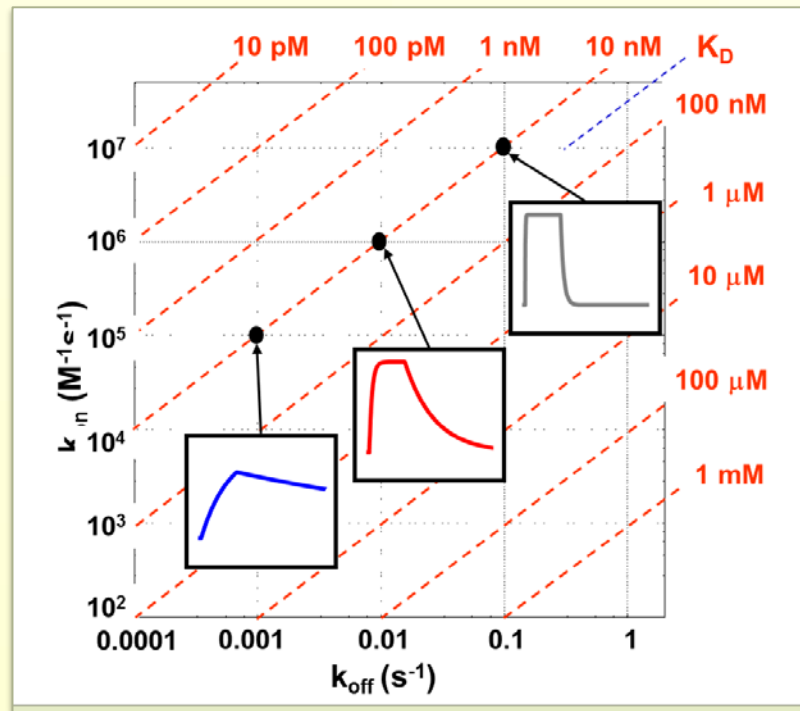
- 如果两种药物小分子都能够与靶标产生相互作用，并且作用强度相当，那么只有结合速率常数**K<sub>a</sub>**大，结合速率快的药物小分子才有可能成为更容易治疗疾病的新药。
- 通过对配体-分析物解离过程**K<sub>d</sub>**值的比较，可以实现药物筛选条件的进一步优化，从而寻找更能有效治愈疾病的新药。

# SPR: 动力学分析



## Affinity constant ( $K_D$ )

通过对配体-分析物间结合解离过程的动态检测，可以实现动力学数据分析，从而为先导化合物的确认提供更完善、详实的信息。



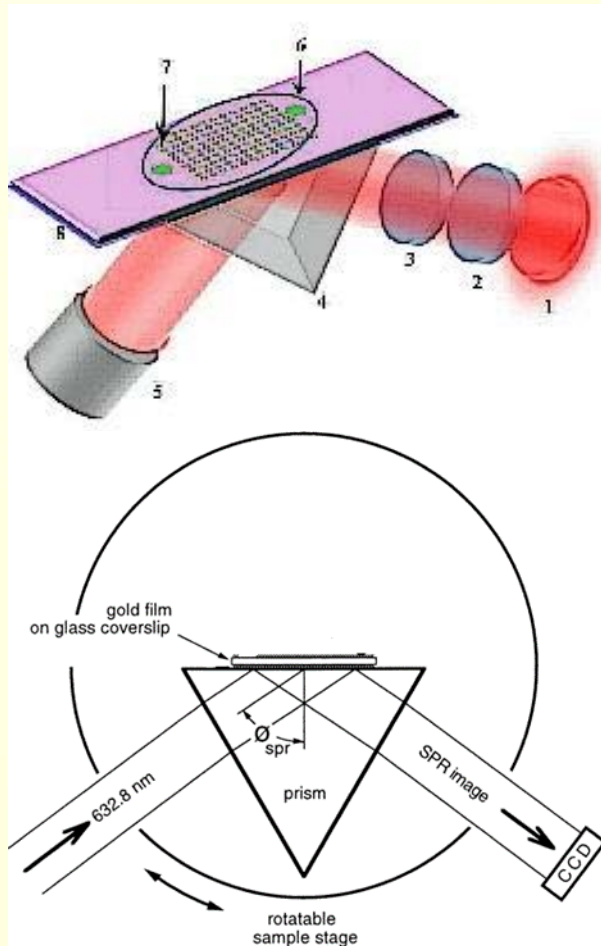
识别能力



结合稳定性



# Surface plasmon resonance imaging (SPRi)



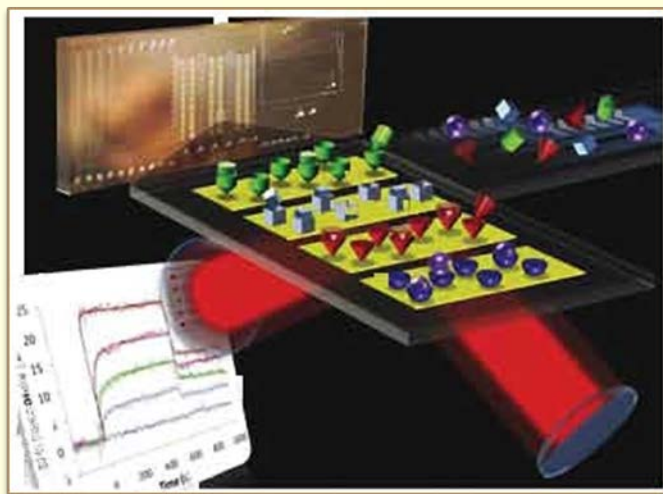
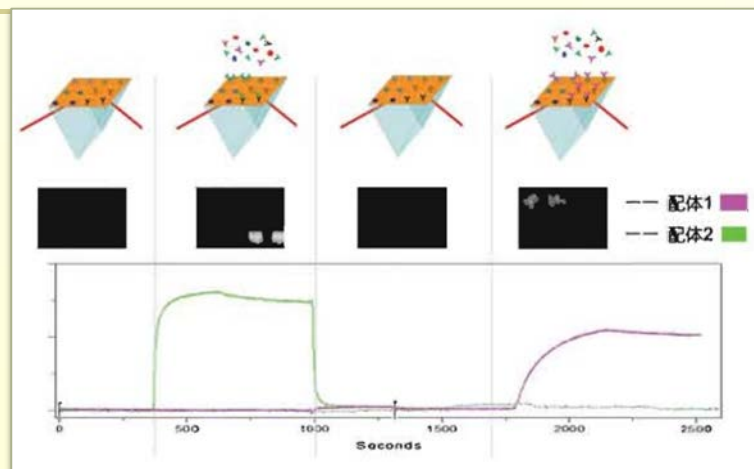
SPRi在SPR的基础上与成像技术相结合，采用电荷耦合器件 (Charge-coupled Device, CCD)对芯片表面进行拍摄，通过对影像明暗变化的检测，计算出多个位点**折射率的变化**，进而得出生物分子相互作用的信息。

SPRi生物传感器在样品表面以相同入射角摄入一定面积的平行p偏振光，进而激发表面上的等离子共振。由于不同配体位点对**分析物的相互作用**不同，因此每个位点的**折射率变化**不同，每个位点的**反射光光强变化**不同。

A.J. Thiel et. al., *Anal. Chem.* **69** (1997), pp. 4948–4956.

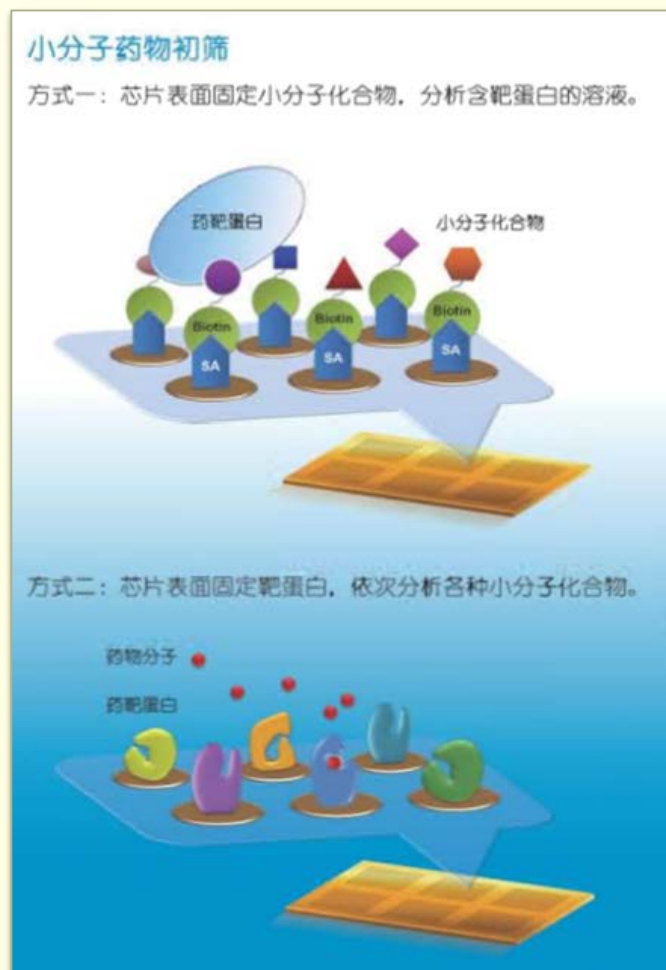
# SPRi 技术

通过CCD对不同位点光强信号来高通量地实时地收集及处理，进而转化为电信号响应值，得到不同作用位点上**响应信号随时间的变化关系**，再根据langmuir 动力学吸附方程进行**拟合**，就可以得到不同位点上结合过程的**Ka**值与解离过程的**Kd**值。



对不同的结合曲线进行**动力学拟合分析**，可以更加细致地区分不同配体-分析物间的相互作用情况，这为**研究配体-分析物间的相互作用机理**和**先导化合物确立**提供更加丰富的数据信息。

# SPRi 技术的应用



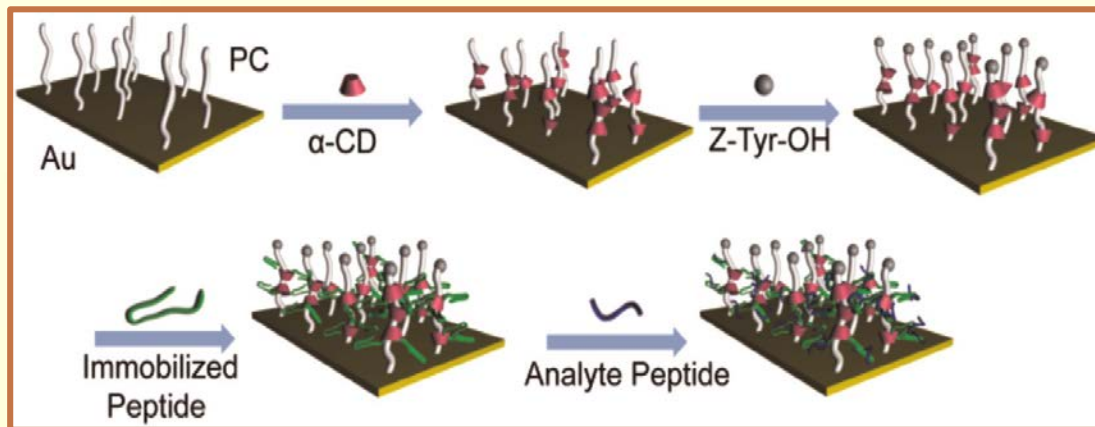
SPRi技术可以进行无标记、高灵敏、动力学分析，与**微阵列技术**相结合在高通量药物筛选领域具有重大的应用前景。

- ✓ SPRi是一项**免标记的检测手段**，为药物筛选省去繁琐的标记步骤，消除由于标记所造成的部分先导化合物的功能失活。
- ✓ SPRi的最大优势在于**高通量的动力学相互作用分析**。动力学分析为研究生物大分子靶标与小分子药物间相互作用提供更丰富的信息，有助于了解两者结合解离过程的具体情况，从而为筛选出更可靠的先导化合物提供必要条件。



## SPRi determination of inter-peptide interaction by using 3D supramolecular co-assembly polyrotaxane film

Yanmei Wang<sup>a,1</sup>, Chenxuan Wang<sup>a,b,1</sup>, Zhiqiang Cheng<sup>a,b</sup>, Dongdong Zhang<sup>a</sup>, Shaopeng Li<sup>a</sup>, Lusheng Song<sup>a</sup>, Wenfei Zhou<sup>a</sup>, Mo Yang<sup>a</sup>, Zhiyou Wang<sup>a</sup>, Zheng Zheng<sup>c</sup>, Baohang Han<sup>a</sup>, Chen Wang<sup>a,\*</sup>, Yanlian Yang<sup>a,\*</sup>, Jinsong Zhu<sup>a,\*</sup>



The scheme of the PRX chip surface fabrication and the detection of inter-peptide interactions by SPRi.



ELSEVIER

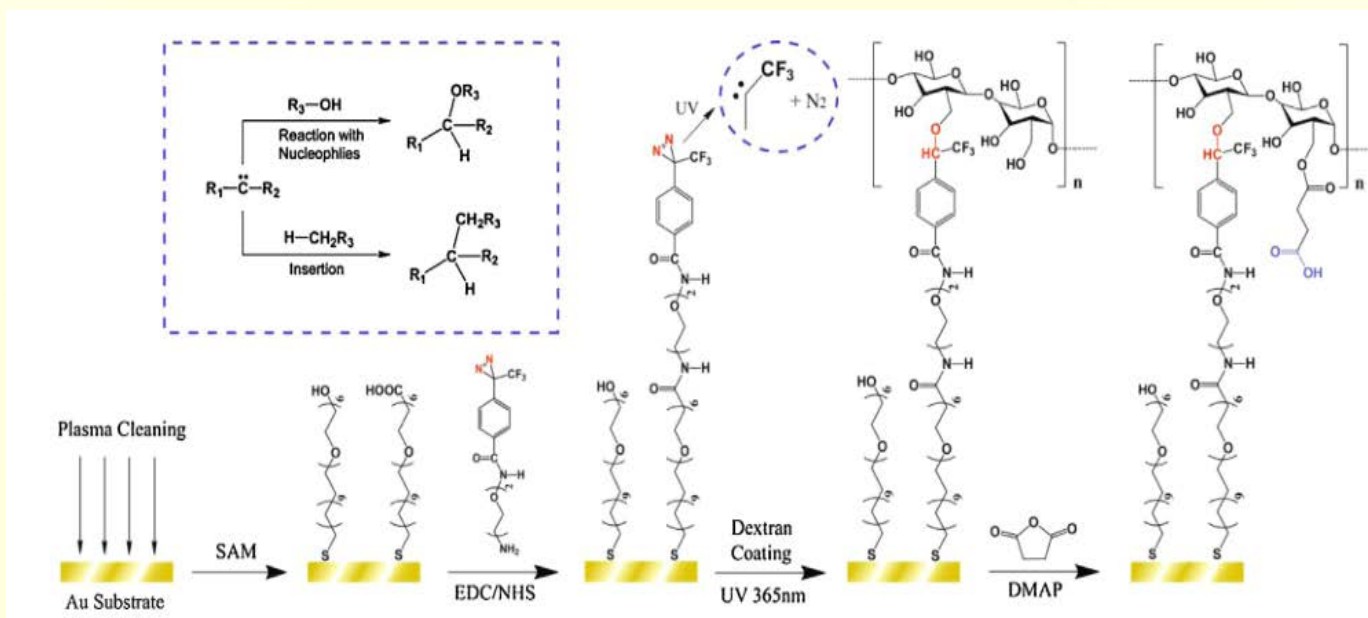
Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/apsusc](http://www.elsevier.com/locate/apsusc)

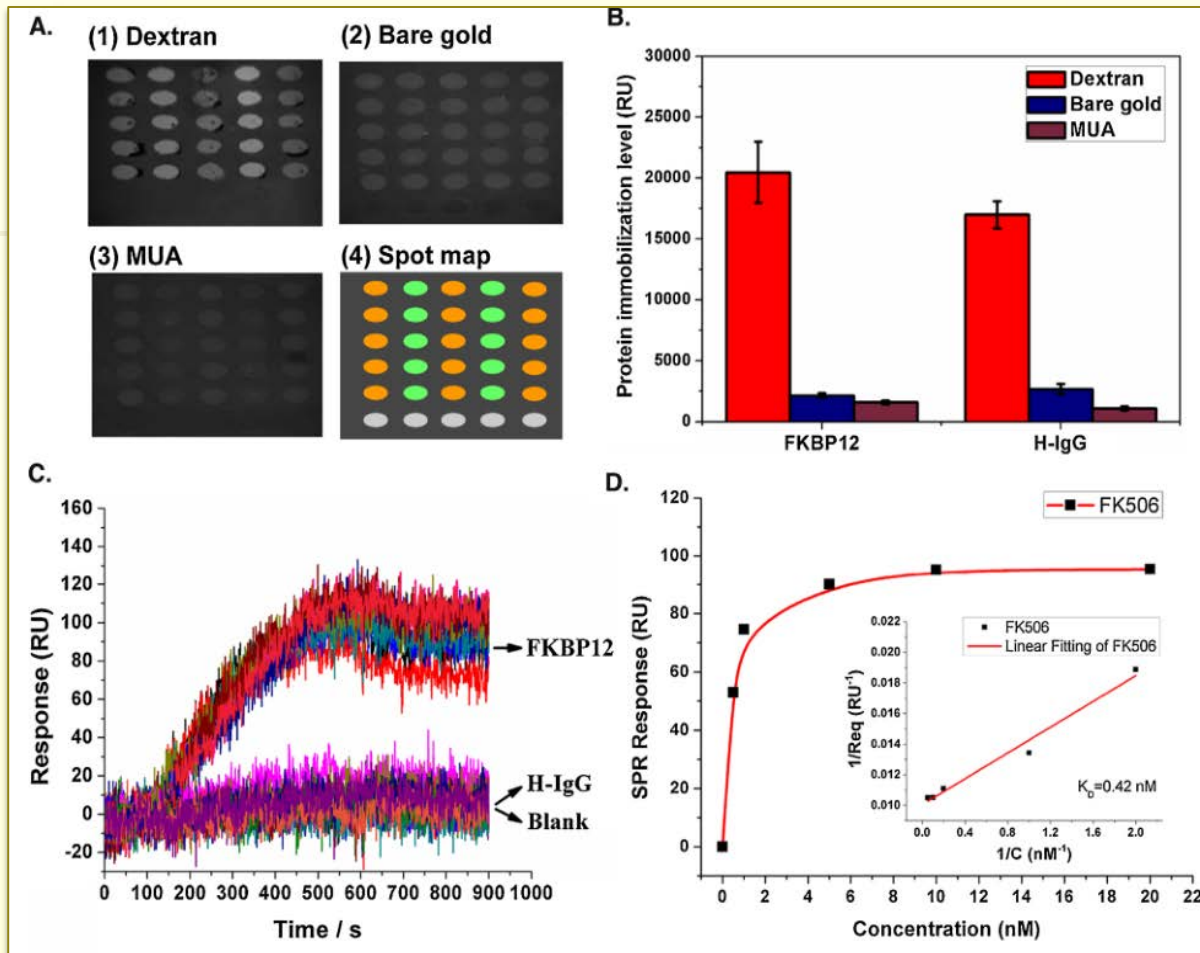
Letter to the Editor

**Dextran hydrogel coated surface plasmon resonance imaging (SPRI) sensor for sensitive and label-free detection of small molecule drugs**



Scheme of the dextran hydrogel surface preparation procedure. The inset illustrates typical reactions of carbenes with the dextran polymer.



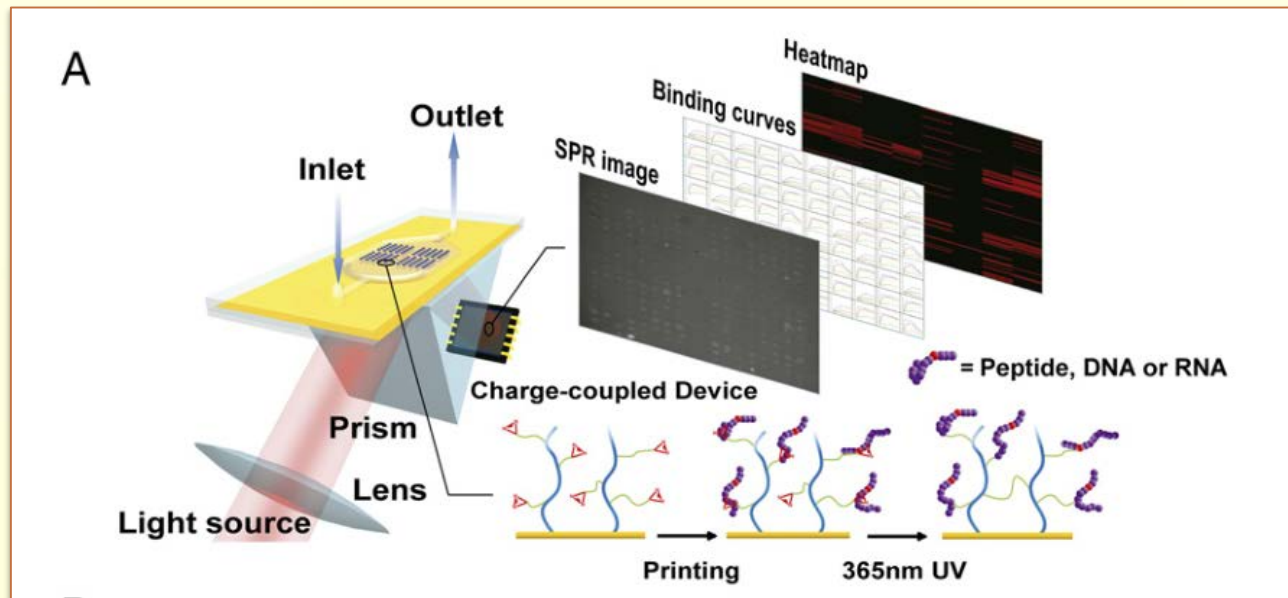


(A) SPR images of protein arrays on dextran, bare gold and MUA surfaces. The orange, green and gray spots in the spot map stand for H-IgG, FKBP12 and blank spots, respectively; (B) protein immobilization level of protein array spots on dextran, bare gold and MUA surfaces; (C) global screening of FK506 binding protein on the dextran surface; and (D) affinity fitting using the steady-state calculation method

# Kinetic and high-throughput profiling of epigenetic interactions by 3D-carbene chip-based surface plasmon resonance imaging technology

Shuai Zhao<sup>a,b,1</sup>, Mo Yang<sup>c,d,1</sup>, Wenfei Zhou<sup>c,d</sup>, Baichao Zhang<sup>a,b</sup>, Zhiqiang Cheng<sup>c,d</sup>, Jiaxin Huang<sup>a,b</sup>, Min Zhang<sup>a,b</sup>, Zhiyou Wang<sup>c,d</sup>, Rui Wang<sup>c,d</sup>, Zhonglei Chen<sup>a,b</sup>, Jinsong Zhu<sup>c,d,2</sup>, and Haitao Li<sup>a,b,2</sup>

<sup>a</sup>Ministry of Education Key Laboratory of Protein Sciences, Beijing Advanced Innovation Center for Structural Biology, Department of Basic Medical Sciences, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China; <sup>b</sup>Tsinghua-Peking Joint Center for Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; <sup>c</sup>Chinese Academy of Sciences Center for Excellence in Nanoscience, Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Nanosystem and Hierarchical



Surface design and characterization of 3D-carbene-based SPRi technology. (A) Scheme of high-throughput and label-free detection of biomolecular interactions on a 3D-carbene chip using SPRi instrument. The SPRi chip surface is grafted by brush-like polymer, which contains carbon backbones (blue), PEG branches (green), and diazirine-derived terminals (red). Biomolecules are randomly and covalently immobilized onto the terminals by carbene-based reaction under 365-nm UV light treatment.

**THE END**

**THANKS**

---

**Any questions?**

