

# 核酸适配体—靶标复合物解离常数测定方法 研究进展

刘继红<sup>1,2,3</sup>, 李淑芳<sup>1,2,3</sup>, 尹海燕<sup>1,2,3</sup>, 洪慧杰<sup>1,2,3</sup>, 张玲<sup>1,2,3</sup>, 王红旗<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 郑州 450002; 2. 河南省粮食质量安全与检测重点实验室, 郑州 450002; 3. 农业部农产品质量安全风险评估实验室, 郑州 450002)

**摘要:** 核酸适配体是通过体外指数富集配基系统进化技术筛选到的一小段单链 DNA 或 RNA 寡核苷酸片段, 能够与靶标高亲和力、高选择性地结合。为了在实际检测中应用核酸适配体, 必须深入了解核酸适配体—靶标的结合过程, 如测定复合物的解离常数。本文综述了近年来有关核酸适配体—靶标复合物解离常数测定的方法。这些方法大致上分为两大类: 一类是基于分离策略的测定方法, 如透析法、超滤法、凝胶电泳法、毛细管电泳法和高效液相色谱法; 另一类是基于均相策略的测定方法, 如荧光强度法、荧光各向异性法、紫外可见分光光度法、圆二色谱法以及表面等离子体共振法等。本文对每种方法的原理、应用范围和特性进行了概括和比较, 并对未来的发展趋势进行了展望。

**关键词:** 核酸适配体; 解离常数; 结合常数; 指数富集配基系统进化技术

## Research progress for measuring dissociation constant of aptamer-target complex

LIU Ji-Hong<sup>1,2,3</sup>, LI Shu-Fang<sup>1,2,3</sup>, YIN Hai-Yan<sup>1,2,3</sup>, HONG Hui-Jie<sup>1,2,3</sup>,  
ZHANG Ling<sup>1,2,3</sup>, WANG Hong-Qi<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Key Laboratory of Grain Quality and Safety and Testing, Zhengzhou 450002, China; 3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products (Zhengzhou), Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

**ABSTRACT:** Aptamers are single stranded DNA or RNA molecules, selected using *in vitro* techniques of systematic evolution of ligands by exponential enrichment, and can bind target molecules with high affinity and selectivity. In order to use aptamers in practical detection, it is necessary to make thorough understanding of aptamer-target binding, such as measuring dissociation constant of aptamer-target complex. This article reviewed methods for assessing aptamer-target binding in recent years. These methods were generally divided into two categories. One was separation based techniques such as dialysis, ultrafiltration, gel and capillary electrophoresis, and high performance liquid chromatography (HPLC); the other was mixture based techniques

基金项目: 国家公益性行业(农业)项目(201203094)、国家自然科学基金项目(21305031)、河南省农业科学院科技发展专项(20157813)

**Fund:** Supported by Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201203094), the National Natural Science Foundation of China (21305031) and the Research Development Special Fund of Henan Academy of Agricultural Sciences (20157813)

\*通讯作者: 王红旗, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术。E-mail: huda2000@126.com

\*Corresponding author: WANG Hong-Qi, Associate Researcher, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Henan Academy of Agricultural Science, No. 116, Huayuan Road, Jinshui District, Zhengzhou 450002, China. E-mail: huda2000@126.com

such as fluorescence intensity and anisotropy, UV-Vis absorption and circular dichroism, surface plasmon resonance, and so on. This paper summarized and compared the principle, range of application and important features of each method and give prospects of development trend in the future.

**KEY WORDS:** aptamer; dissociation constant; association constant; systematic evolution of ligands by exponential enrichment

## 1 引言

核酸适配体是一种能够与靶标高特异性、高选择性结合的单链 DNA 或 RNA 寡核苷酸片段, 通常是利用体外筛选技术—指数富集配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)获得的。自 1990 年 Tuerk 和 Ellington<sup>[1,2]</sup>分别独立地筛选到核酸适配体后, 现在已经获得几百种靶标的核酸适配体<sup>[3-5]</sup>。核酸适配体—靶标复合物的解离常数大小通常位于微摩尔到皮摩尔级<sup>[6]</sup>。核酸适配体在实际分析方面的应用前景非常广泛。2004 年 12 月美国食品和药物管理局批准通过了第一个 RNA 核酸适配体药物 Macugen(呱加他尼钠), 该药主要用

于延缓湿性老年黄斑病变患者的视力下降<sup>[7]</sup>。通过研究核酸适配体与靶标之间的相互作用, 有助于阐明其结合机制, 从而对核酸适配体的空间结构进行更加合理的设计与优化。本文总结概括了近几年测定核酸适配体结合常数的主要分析技术(见表 1)。考虑到绝大多数核酸适配体的应用都是针对单一靶标的情况, 因此我们重点综述了核酸适配体与单一靶标作用的解离常数的测定方法。

## 2 解离常数的计算

核酸适配体与靶标结合的最简单形式是按照化学计量比 1:1 的方式结合, 结合平衡表达式为:

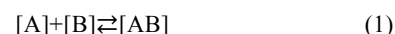


表 1 核酸适配体—靶标复合物解离常数测定技术比较  
Table 1 Comparison of different techniques used to measure aptamer-protein binding

技术类别	样品用量	实验时间和复杂性	$K_d$	实验设备
透析法	约 100 $\mu\text{L}$	约 48 h	$10^{-8}$ mol/L <sup>[8]</sup>	微平衡透析仪与荧光分光光度计
硝化纤维膜-过滤联用法	200~500 $\mu\text{L}$ <sup>[9,10]</sup>	约 5 min 需要进行放射性标记和闪烁计数	$10^{-11}$ ~ $10^{-12}$ mol/L <sup>[11]</sup>	过滤装置、离心机及闪烁计数器
凝胶电泳法	10~50 $\mu\text{L}$	约 3 h 需要制备凝胶、放射性标记、放射自显影、凝胶切割和计数	$10^{-13}$ mol/L <sup>[12]</sup>	凝胶电泳仪和放射自显影仪
毛细管电泳法	约 10 $\mu\text{L}$	注射一个样品需要约 10 min	$10^{-9}$ mol/L <sup>[13]</sup>	毛细管电泳仪及激光诱导荧光检测器
高效液相色谱法	100 $\mu\text{L}$ ~18 mL <sup>[14]</sup>	注射一个样品需要 10~30 min	$10^{-6}$ mol/L <sup>[15]</sup>	自动化高效液相色谱仪及紫外检测器
荧光强度法	约 150 $\mu\text{L}$ <sup>[16]</sup> 15~25 $\mu\text{L}$	每个样品约 10 min, 每次滴定后需等待约 10 min	$10^{-10}$ mol/L <sup>[17]</sup>	荧光分光光度计或酶标仪
荧光各向异性/偏振法	约 150 $\mu\text{L}$ <sup>[16,18]</sup> 15~25 $\mu\text{L}$	每个样品约 10 min, 每次滴定后需等待约 10 min	$10^{-9}$ mol/L <sup>[19]</sup>	带有偏振器的荧光分光光度计或酶标仪
紫外可见分光光度法	约 2.5 mL	每次滴定后需等待约 10 min	$10^{-6}$ mol/L <sup>[20]</sup>	紫外可见分光光度计
表面等离子体共振法	10~20 $\mu\text{L}$	每个样品约 20 min, 需要固定适配体	$10^{-12}$ mol/L <sup>[21]</sup>	Biacore 表面等离子体共振仪

其中[A]表示平衡状态下核酸适配体的浓度, [B]表示平衡状态下靶标的浓度, [AB]表示平衡状态下核酸适配体—靶标复合物的浓度。上述平衡可以用解离常数  $K_d$  (方程 2) 表示:

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad (2)$$

最常见的  $K_d$  值测定方法为: 核酸适配体的浓度保持不变, 逐渐加大靶标的浓度, 那么结合的核酸适配体所占的比例分数 ( $f_a$ ) 为:

$$f_a = \frac{[T]}{K_d + [T]} \quad (3)$$

方程 3 是位于第一象限的渐近线等于 1 的等轴双曲线的一般形式。 $K_d$  值可使用非线性回归分析直接从该曲线上得到。尽管各种解离常数测定技术采用的计算方程不尽相同, 但大都是方程 3 的变体形式。其他变形方程的详细讨论及应用详见 Larsson 的研究论文<sup>[22]</sup>。使用方程 3 的前提是要求核酸适配体的浓度远远小于  $K_d$  值。只有在满足这个假设条件下, 结合前后靶标浓度[B]的变化不大, 才可以忽略不计。图 1 是在一个较宽的浓度范围内, 用靶标滴定 RNA 核酸适配体的模拟图<sup>[23]</sup>。RNA 核酸适配体的  $K_d=10^{-8}$  mol/L, RNA—蛋白结合的化学计量比假设为 1:1, 实验过程中每条曲线所对应的[RNA]是固定的。当 RNA 核酸适配体的浓度低于  $K_d$  值(例如[RNA]= $10^{-10}$  mol/L 或  $10^{-9}$  mol/L)时, 滴定曲线不受 RNA 核酸适配体浓度的影响,  $0.5 F_B$  所对应的蛋白浓度即为  $K_d$  值。当 RNA 核酸适配体的浓度达到  $K_d$ ( $10^{-8}$  mol/L)或者更高时, 滴定曲线开始发生偏移, 横坐标指示的不再是平衡条件下游离蛋白质的浓度, 因此这种情况下曲线的  $0.5 F_B$  所对应的蛋白浓度不再指示  $K_d$  值。

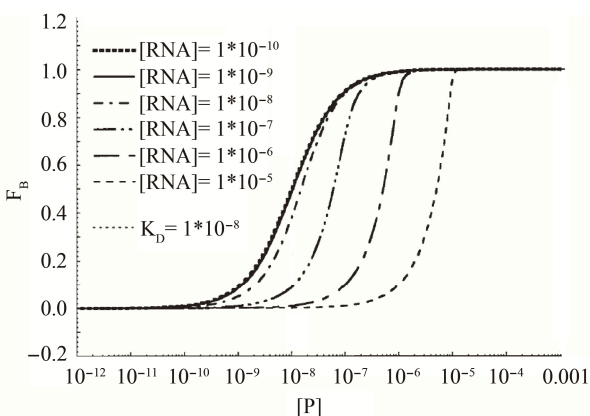


图 1 RNA—蛋白相互作用的半对数模拟曲线<sup>[23]</sup>

Fig. 1 Simulated semilogarithmic binding plots of an RNA-protein interaction<sup>[23]</sup>

在某些情况下要确定蛋白质靶标的平衡浓度是非常

困难的, 原因在于实验过程中可能出现一些无法避免的问题, 如重组蛋白在纯化过程中的变性, 制备过程中发生的表面吸附, 存储期间发生的降解或变性等。在这些情况下使用方程式 3, 就会低估亲和力。因此, 在测定核酸适配体与靶标的解离常数时, 最好选用两种以上的测定方法进行测定, 以便相互验证测定结果, 确保测定结果的准确性。

### 3 基于分离模式的测定方法

透析法、超离法和超滤法都是利用复合物大小的差异来分离游离核酸适配体与结合复合物。

#### 3.1 透析法

透析实验中半透膜将反应池分隔成两个相连而又独立的反应室 A 和 B。反应前, 反应室 A 内含有核酸适配体和靶标的混合溶液, 而反应室 B 内只有缓冲液。如果核酸适配体小于靶标和相应的复合物, 那么只有核酸适配体可以自由穿越半透膜到反应室 B。需要注意的是, 这种方法仅适用于靶标明显大于核酸适配体的情况。生化反应达到平衡后, 游离核酸适配体的浓度可以通过测定反应室 B 中的核酸适配体的浓度确定。这种测定方法尽管操作比较简单, 但是面临一些技术难题。当分析物的活性相等的时候, 平衡状态时两个反应室的化学势是平衡的, 但是这与分析物的浓度明显不同<sup>[24]</sup>。蛋白质靶标的净电荷通常被结合缓冲溶液中的  $H^+$  或  $OH^-$  所平衡, 从而产生 pH 梯度并导致半透膜两边的核酸适配体浓度不同<sup>[25]</sup>。另外, 靶标和复合物的抗渗性会产生渗透压梯度, 从而导致溶剂跨膜流动产生溶剂体积差<sup>[26]</sup>。透析测定中的其他问题还包括孵育时间较长<sup>[27]</sup>, 反应体积较大以及存在非特异性吸附<sup>[28]</sup>等。

#### 3.2 超滤法

超滤技术的原理类似于透析, 即只有游离的核酸适配体可以通过超滤膜。超滤过程中含有核酸适配体和蛋白质靶标的溶液在压力、真空或离心力的作用下通过超滤膜, 蛋白质以及蛋白质—核酸适配体复合物被截留到超滤膜上, 因此可以利用一系列不同浓度的蛋白质靶标溶液, 进行平衡状态下各组分的平衡分布评估, 从而计算核酸适配体的  $K_d$  值。应用最广泛的超滤膜材料是硝化纤维膜, 膜上的孔径允许核酸适配体通过, 但是能够利用疏水吸附作用将蛋白截留, 最小截留分子量为 2 kDa<sup>[29]</sup>。硝化纤维膜的使用有很多种形式, 斑点杂交最常用, 主要是考虑到其样品消耗量最小。首先将  $^{32}P$ —标记的核酸适配体与不同浓度的蛋白质靶标孵育, 然后真空抽滤<sup>[30]</sup>, 游离的蛋白质和核酸适配体—蛋白质复合物被截留在膜上。截留下来的蛋白质可以使用磷成像仪进行定量, 滤液中游离的核酸适配体可以用闪烁计数器进行定量。

超滤技术的广泛应用主要是由于其快速、高灵敏和低成本的特点。放射性同位素标记使得所使用的核酸适配体

浓度可以低至  $10^{-12}$  mol/L, 简化了  $K_d$  的测定, 误差在 pmol/L 级; 同时, 超滤法能够将透析法的平衡时间从几天缩短到几分钟。尽管超滤法有以上诸多优点, 但是并不意味着这种方法就是完美无缺的方法<sup>[31]</sup>。因为, 在某些情况下硝化纤维膜不能完全保留核酸适配体—蛋白质复合物, 从而导致过高估算  $K_d$  值。不完整的保留可能是由于核酸适配体和膜竞争蛋白质的同一个结合位点<sup>[32]</sup>, 或者核酸适配体干扰了蛋白质和膜上的非结构化的疏水区域间的相互作用<sup>[33]</sup>。另一个问题是硝化纤维膜对核酸的非特异性吸附。针对非特异性吸附问题需要做没有蛋白质的控制实验, 并在计算结合分数时扣除吸附量。还需要特别注意的是蛋白质浓度应低于  $10^{-5}$  mol/L, 以防止硝化纤维膜上结合位点被饱和<sup>[33]</sup>, 无法结合蛋白质—核酸适配体复合物。此外还遇到了核酸适配体可以结合多个蛋白质分子的问题<sup>[34]</sup>。虽然一些人提出超速离心法不是一个平衡的方法<sup>[33]</sup>, 但也有人声称只要靶标与复合物在方程 2 中的浓度比保持不变, 过滤就是一个平衡的过程<sup>[35]</sup>。由于放射性标记会导致安全及监管问题, 于是研究人员又研发了非放射性标记的方法<sup>[36,37]</sup>。

### 3.3 凝胶电泳法

在缓冲溶液中, 因核酸适配体磷酸骨架上带有很多负电荷, 因此电泳过程中具有较强的向正极移动的趋势, 而蛋白质靶标通常具有较低的电荷和较低的流动性。核酸适配体—蛋白质复合物的电泳迁移率介于核酸适配体和蛋白靶标之间, 这就使得溶液中复合物的分离变得较为简单。自从凝胶电泳法首次被 Fried 等<sup>[38]</sup>和 Garner 等<sup>[39]</sup>创建以来, 该方法已广泛应用于核酸—蛋白质结合平衡和动力学研究。将一批样品装入到非变性聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶中, 固定平衡体系中一个组分(即核酸适配体或蛋白质)的浓度不变, 另一组分的浓度不断增加。施加一个均匀电场, 未结合的核酸适配体迁移最快, 其次是复合物, 最后是游离的蛋白质靶标。核酸适配体或蛋白质的定量可以通过紫外吸收<sup>[39]</sup>,  $^{32}\text{P}$ —标记的核酸<sup>[38]</sup>, 考马斯亮蓝 R250 染色蛋白质<sup>[38]</sup>, 靶标和核酸适配体的双色荧光染色法<sup>[40]</sup>或分子印迹法<sup>[41]</sup>得到。

如图 2 所示, 核酸适配体的浓度固定为 3 nmol/L 不变, 链霉亲和素靶标的浓度不断增加, 游离态和复合态的核酸适配体通过放射性标记和荧光成像进行定量, 从而获得非线性结合曲线, 最终计算出的核酸适配体  $K_d$  值约为 7.0 nmol/L。

凝胶电泳分离需要耗时半小时甚至几小时, 因此想要获得准确清晰的电泳结果以及有效的平衡常数, 必须考虑核酸适配体—蛋白质复合物的结合速率和解离速率。理论上, 对于强的核酸适配体—蛋白质相互作用, 即解离速率常数很小, 复合物的半衰期明显长于分离时间的情况, 游离核酸适配体和复合物在凝胶上就会显示很清晰的条

带。反之, 如果复合物的半衰期接近或小于分离时间, 即使复合物能够观察到, 也会显示一个很模糊的条带。然而实际情况是, 解离过程通常比预测的要慢得多, 经常获得比较清晰的分离条带<sup>[43]</sup>。原因在于凝胶的交联结构在一定程度上限制了复合物的解离, 为解离后的核酸适配体和蛋白质在扩散过程中的重新结合提供了机会<sup>[44,45]</sup>。因此, 凭借分析结果的稳定性, 利用基于片段大小和迁移速率作为分离依据的高分辨凝胶电泳分离技术, 我们可以开展更加复杂、多化学计量比的平衡常数的测定<sup>[38]</sup>。高分辨凝胶电泳分离技术具有灵敏度较高、检测成本较低、检测方式较多等优点, 缺点是相对比较耗时, 特别是在凝胶制备、分离和成像处理方面。

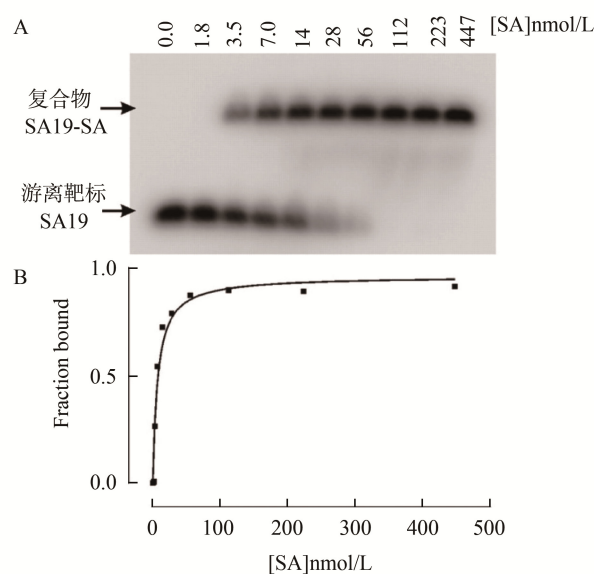


图 2 核酸适配体和链霉亲和素作用凝胶电泳图(A)和非线性结合曲线(B)<sup>[42]</sup>

Fig. 2 The gel pattern of aptamer and streptavidin (A) and nonlinear binding curve(B)<sup>[42]</sup>

### 3.4 毛细管电泳法

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是基于溶液中被分析物的质量大小和电荷多少实现对被分析物的分离。常用的分离毛细管内径只有 20~100  $\mu\text{m}$ , 因此需要的样品量非常少。同时, 毛细管内有限空间内产生的大量焦耳热有助于提高分离速度和效率<sup>[46]</sup>。目前, 研究人员已经开发了许多基于毛细管电泳的技术用来研究蛋白质与核酸的相互作用<sup>[47,48]</sup>, 如区带毛细管电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)、前沿分析法电泳(frontal analysis, FA)、Hummel—Dreyer 法电泳(HD), 亲和毛细管电泳(affinity CE, ACE), 空峰法电泳(vacancy peak, VP)和空峰—亲和毛细管电泳(vacancy affinity CE, VACE)<sup>[49]</sup>。这些分



析方法都比较相似,因为它们大都采用的是与高效液相色谱分析蛋白质—核酸相互作用相似的分析原理。下面主要介绍研究核酸适配体解离常数中最常用的区带毛细管电泳技术。

核酸适配体—蛋白质复合物的解离速率通常低于毛细管电泳 5~20 min 的分离时间。根据上文中的讨论,蛋白质、核酸适配体—蛋白质复合物比游离的核酸适配体迁移得要慢,因此会得到比较清晰的峰。如果用浓度递增的蛋白质溶液滴定一个荧光标记的核酸适配体,在电泳图上就会出现两个不同的峰,分别代表复合物和游离的核酸适配体。随着蛋白质浓度的不断增加,游离配体峰的强度不断降低,据此可以计算出结合分数,进而求出解离常数。如图 3 所示,随着免疫球蛋白 IgE 浓度的增加,游离核酸适配体的峰强度逐渐减小<sup>[50]</sup>。

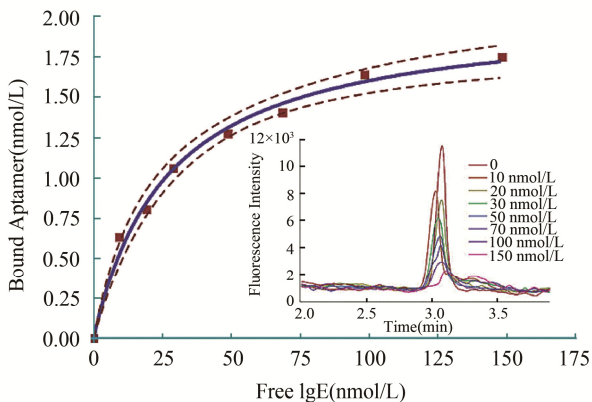


图3 免疫球蛋白 IgE 与其核酸适配体结合的毛细管电泳结合曲线<sup>[50]</sup>  
Fig. 3 Binding curve measured using CE for an aptamer selected to bind human IgE<sup>[50]</sup>

如果核酸适配体—蛋白质复合物的保持时间与分离时间相似,那么在分离过程中会发现复合物的峰形会因为复合物在分离过程中的解离而变形。这种变化会给峰保留时间的测定带来不便,但是能够提供除解离常数之外的其他动力学信息<sup>[51]</sup>。针对上述变形峰或重叠峰问题,最近开发了一种新型毛细管电泳测定技术,以涵盖整个荧光标记核酸适配体保留时间段作为参考时间,计算该时间段内全部有效峰的平均迁移速率,根据反应前后平均迁移速率的变化测定解离常数<sup>[52,53]</sup>。

### 3.5 高效液相色谱法(HPLC)

色谱法是基于被分析物与固定相的作用力彼此不同。游离核酸适配体、蛋白质靶标和核酸适配体—蛋白质复合物的区带分离可用于评价这些组分的平衡分布和估算  $K_d$  值,在某种程度上类似于上述电泳分离技术。色谱法的分离机制通常不像电泳一样直接,但是基于被分析物分子量或者体积大小的分离可以有很多种选择,包括体积排阻色

谱法(SEC)和内表面反相色谱法(ISRP)<sup>[54]</sup>。跟其他分离方法类似,色谱法也需要考虑解离速率和分离时间之间的关系,以便正确解释平衡混合物的色谱图。

前沿分析法(FA)也可以用于固定有核酸适配体的 HPLC 柱来研究解离常数<sup>[55-57]</sup>。小心控制固定过程,可使核酸适配体保持对蛋白质靶标的亲和力不变<sup>[58]</sup>。这些固定在毛细管整体柱中制备,可以大大减少样本用量<sup>[56]</sup>。与传统的 FA 不同,该方法采用了修饰有核酸适配体的固定相,同时要求核酸适配体和靶标的结合速率很快,且需要连续进样。

## 4 基于混合物模式的测定方法

### 4.1 荧光强度法

荧光检测技术在测定解离常数方面有诸多优势。荧光信号可以在核酸适配体和蛋白质靶标处于平衡状态时进行测定,这不仅避开了结合速率或解离速率的问题,同时允许在各种缓冲溶液中进行  $K_d$  值测定,这可能是其他基于分离模式的分析技术难于实现的<sup>[59]</sup>。例如,增加缓冲液的离子强度可能影响复合物与硝化纤维膜之间的吸附,也可能导致电泳毛细管内部的焦耳热急剧增加。通常情况下,荧光检测方法测定速度远远快于其他分离方法。目前可选的具有不同荧光寿命和激发/发射波长的荧光探针就有成百上千种,而且其标记过程已经研究得非常透彻,尤其是核酸的荧光标记过程<sup>[60-62]</sup>。

荧光标记核酸适配体在结合其蛋白质靶标之后荧光强度发生变化是很常见的现象。如果结合确实引起了核酸适配体荧光强度的变化,可以据此直接计算结合力。荧光染料周围的微环境在核酸适配体—蛋白质复合物中与游离溶液中大不相同,从而导致荧光量子产率差异显著。许多荧光染料对缓冲液极性的变化很敏感<sup>[63]</sup>。荧光共振能量转移也是常见的现象,即结合形成了荧光供体—受体复合物,从而导致荧光淬灭或荧光发射光谱的迁移<sup>[64]</sup>。因此,无论荧光增强还是荧光淬灭都可能是目前人们所研究的特殊体系引起的<sup>[65,66]</sup>。通过扣除游离核酸适配体和背景的荧光信号,可以获得荧光强度的变化并计算出结合分数。实际上,如果所加入的蛋白质缓冲液的组成与核酸适配体所用的缓冲溶液不同,必须加以特别注意,因为即使很小的 pH 值变化或添加剂如甘油或表面活性剂的变化就会导致荧光强度发生改变,随着加入的蛋白质溶液量的增加而产生一种伪“结合曲线”。另外一种解离常数荧光检测方法涉及到分子信标。分子信标上标记有荧光基团和淬灭基团,在发夹状态下二者之间的距离足够近,导致荧光淬灭<sup>[67]</sup>。当与靶标结合时,因核酸适配体构象的变化导致荧光基团和淬灭基团之间距离增加,进而引起荧光增强或恢复。此方法的应用前提是必须知道核酸适配体确切的二级结构,并且必须十分清楚构象变化后的确能够改变荧光基团与淬灭基团之

间的距离。与此相似, 如果淬灭基团是另外一种荧光基团, 而且这个荧光基团的激发波长与另一端标记的荧光基团的发射波长相互重叠, 那么我们就可以利用荧光共振能量转移方法监测结合反应过程<sup>[68, 69]</sup>。

#### 4.2 荧光各向异性/荧光偏振法

当偏振激发光照射到分析样品时, 只有与入射光偏振取向相同的荧光分子偶极子才能被激发。如果此时的荧光分子旋转比较慢, 入射光的偏振性能够较好地保持在荧光分子中。我们可以利用发射光的平行偏振光和垂直偏振光的荧光强度比计算荧光分子的偏振性。荧光分子的各向异性和偏振性的定义见方程 4 和 5:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4)$$

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (5)$$

$I_{\parallel}$  表示与入射偏振光平行的发射光强度,  $I_{\perp}$  表示与入射偏振光垂直的发射光强度。荧光各向异性和荧光偏振具有相似的物理意义并且在数学上是可以相互转换的。

实验过程中选择一个荧光寿命与其旋转速度相匹配的荧光染料是非常重要的。如果荧光寿命太短, 游离核酸适配体和核酸适配体—蛋白质复合物的偏振都很高, 难以观察到荧光偏振的变化。反之, 如果荧光寿命太长, 即使是分子量的荧光复合物也可能去极化, 从而无法与游离核酸适配体的荧光偏振区分。一般情况下, 荧光寿命为 4 ns 的荧光染料可用于分子量小于 100 kDa 的核酸适配体—蛋白质复合物的解离常数研究<sup>[70, 71]</sup>。荧光染料和核酸适配体之间的链接臂不易太长, 否则会增加荧光染料的活动自由度, 从而降低荧光标记分子偏振性的敏感度, 即核酸适配体与靶标蛋白质的结合对荧光分子偏振性的影响较小或没有影响。G 因子虽然只是一个仪器参数, 代表非偏振光的平行和垂直方向的荧光信号的强度比。理想情况下应该是 1, 如果不是 1 就需要进行校正<sup>[72]</sup>。另外, 需要注意的是, 结合后荧光增强或荧光淬灭会直接影响荧光染料的荧光寿命, 从而使解离常数的测定变得更加困难, 应尽量避免此种情况的出现。

#### 4.3 紫外可见分光光度法与圆二色谱法

紫外可见吸收光谱法具有简单, 成本低廉及无需标记等优点, 被广泛应用于核酸适配体—靶标相互作用的研究。众所周知 DNA 的最大吸收波长在 260 nm, 在 300 nm 以上几乎没有吸收<sup>[73]</sup>。如果靶标是蛋白质, 芳香残基的紫外吸收在近紫外区(250 nm~300 nm)比核酸弱得多; 在远紫外区(<250 nm)的吸收与 DNA 相当<sup>[74, 75]</sup>。因此, 根据核酸适配体或其蛋白质靶标的最大吸收波长的强度变化可以计算结合常数。如图 4 所示, 游离的核酸适配体、蛋白靶

标以及复合物的紫外吸收光谱清晰可见, 据此可以计算解离常数的大小<sup>[19]</sup>。

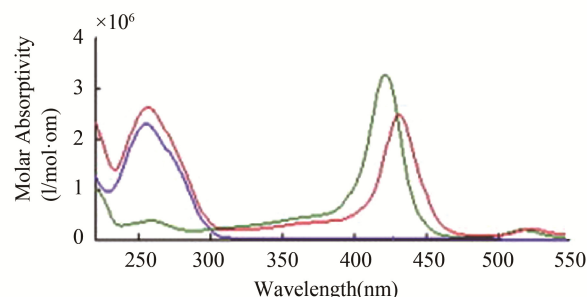


图 4 游离的凝血酶核酸适配体(蓝线)、凝血酶蛋白靶标(绿线)以及复合物(红线)的紫外吸收光谱<sup>[19]</sup>

Fig. 4 Pure resolved UV-Vis absorption spectra of aptamer (blue), TmPyP4 (green), and complex (red)<sup>[19]</sup>

圆二色谱法是紫外可见吸收光谱法的衍生方法, 主要用于生物分子二级结构的研究。由于氨基酸残基和糖中存在不对称碳原子, 因此蛋白质和核酸能够分别吸收左旋圆偏振光和右旋圆偏振光<sup>[76]</sup>, 这种差异可以用吸收率差值( $\Delta A$ ), 摩尔消光系数( $\Delta \epsilon$ )或椭圆率( $\theta$ )表示, 三者之间可以通过方程 6 相互转换:

$$CD = \Delta A = \Delta \epsilon CL = \frac{4\pi\theta(\text{deg})}{180\ln 10} = \frac{\theta(\text{mdeg})}{32982} \quad (6)$$

其中 C 是样品浓度, L 是吸收池的光程长度。只有形成了确切二级结构的蛋白靶标或核酸才能够产生唯一的 CD 光谱, 未能形成确切二级结构的蛋白靶标或核酸的自由旋转将彼此抵消椭圆偏振光, 不会产生 CD 特征光谱。 $\alpha$  螺旋和(反)平行  $\beta$  折叠蛋白质在 250 nm 以下有独特的 CD 光谱<sup>[77, 78]</sup>, 但是 DNA 的 CD 光谱主要在 250 nm 以上<sup>[79]</sup>。因此用浓度递增的蛋白质滴定 DNA 时可以从 250 nm 以上的 CD 信号计算结合分数, 但是要观察蛋白质结构的变化则要使用 250 nm 以下的 CD 信号。

#### 4.4 表面等离子体共振法

光在棱镜与金属膜表面上发生全反射现象时, 会形成消逝波进入到光疏介质中, 而在光疏介质(假设为金属介质)中又存在一定的等离子波。当两波相遇时可能会发生共振。当消逝波与表面等离子波发生共振时, 入射光的大部分能量被表面等离子波吸收, 使反射光的能量急剧减少。当光源和金属薄膜固定时, 反射角的变化只与金属膜附近的样品溶液的折射率有关。在较大的浓度范围内共振信号与被分析物的浓度线性相关<sup>[80, 81]</sup>。通常选择是将核酸适配体固定在金属表面, 因为蛋白质靶标分子量比较大, 结合后能够引起较大的折射率变化<sup>[82]</sup>。如图 5 所示, 注入的免疫球蛋白经过固定有核酸适配体的金属薄膜后, 两者

结合导致金属表面的折射率发生改变,从而引起共振信号的增加;结合过程达到稳定后,在900 s时加入变性缓冲液引发解离反应发生<sup>[83]</sup>。结合过程和解离过程都呈指数形式,通过结合曲线可以计算出结合速率和解离速率,据此可以进一步计算出解离常数<sup>[76]</sup>。SPR 技术具有诸多优点,无需标记,20 min 内可同时获得热力学和动力学信息。然而,使用该技术的前提是必须确保蛋白质结合的传质过程不是速控步骤,否则将会使观察到的结合速度变慢,导致  $K_d$  值估算过低<sup>[84]</sup>。这可以通过在不同的流动速率下估算结合常数来检测。运用更高的流速,更薄的流通池,更低的核酸适配体表面密度都可以加快传质过程。同时还需要优化固定方法并采用互补的方法计算  $K_d$ , 以确保核酸适配体固定到表面上时亲和力保持不变。

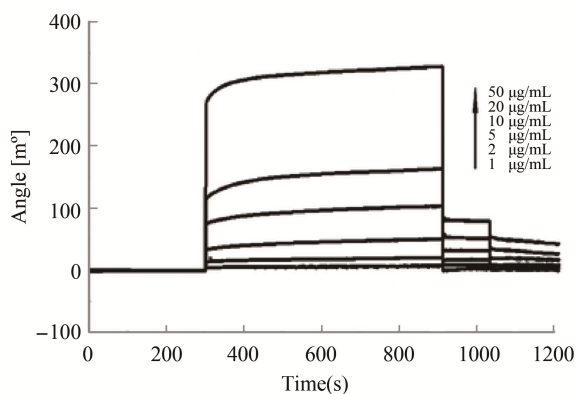


图5 核酸适配体与 IgE 相互作用的 SPR 光谱图<sup>[83]</sup>  
Fig. 5 SPR spectrogram of aptamer-IgE interaction<sup>[83]</sup>

## 5 结论和展望

目前已经有大量的检测技术与方法可以用来研究核酸适配体—蛋白质的结合过程。需要注意的是没有任何一种测定方法是完美无缺的,能够适合所有的测定情况,无论是方法的灵敏度、预期的  $K_d$  值范围、结合和解离动力学以及样品环境都需要仔细考虑。许多测定方法要求结合前后核酸适配体必须发生明显的结构变化,这在测定前是很难预测的。有些测定技术要求进行标记或固定,这有可能显著影响核酸适配体与靶标的结合,当然也可能不影响结合。另外,一些现实问题如样本或材料的用量、检测成本、分析时间也是很重要的。考虑到以上提到的所有这些因素和测定方法的复杂性,我们建议至少使用两种以上、互补的测定技术进行核酸适配体  $K_d$  值的测定,以便确保  $K_d$  值测定的准确性。

随着检测技术和制造技术的指数式发展,在减少样品用量的同时,  $K_d$  值的测定速度越来越快,多种测定技术

的联合应用往往效果更佳。比如可以将不同类型的检测器与分离仪器联用,特别是与 CE 联用。实时激光诱导荧光偏振检测技术(LIFP)已经被用于监控分离过程中标记物迁移率和荧光偏振的变化,而且检测结果可以相互印证,进一步确保了  $K_d$  值的准确性<sup>[85]</sup>。双光子荧光相关谱技术在灵敏度提高和不分离的情况下,可以依据迁移率的差异从未结合的核酸适配体中分解出结合的核酸适配体<sup>[86]</sup>。CE—UV 区域成像仪不仅可以同时测定两个点的信号,还可以同时测定结合常数和分析物的流体力学半径<sup>[73]</sup>。现代 SPR 成像技术可以测定多个核酸适配体对同一靶标的亲和力<sup>[87]</sup>。新一代检测器、微流控设备以及联用技术的出现,将促使核酸适配体—蛋白质结合过程的检测变得速度更快,样本消耗更低,灵敏度更高,样品通量更大。

## 参考文献

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249: 505–510.
- [2] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990, 346: 818–822.
- [3] Luan Y, Chen J, Li C, *et al.* Highly sensitive colorimetric detection of ochratoxin A by a label-free aptamer and gold nanoparticles [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7: 5377–5385.
- [4] Lee JW, Kim HJ, Heo K.. Therapeutic aptamers: developmental potential as anticancer drugs [J]. *BMB Rep*, 2015, 48: 234–237.
- [5] Mudili V, Makam SS, Sundararaj N, *et al.* A novel IgY-Aptamer hybrid system for cost-effective detection of SEB and its evaluation on food and clinical samples [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15151–15163.
- [6] Siddiqui MAA, Keating GM. Pegaptanib: in exudative age-related macular degeneration [J]. *Drugs*. 2005, 65: 1571–1577.
- [7] Ng EWM, Shima DT, Calias P, *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5:123–132.
- [8] De Girolamo A, Le L, Penner G, *et al.* Analytical performances of a DNA-ligand system using time-resolved fluorescence for the determination of ochratoxin A in wheat [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 2627–2634.
- [9] Cary PD, Kneale GG. *Methods in molecular biology* [M]. Totowa: Humana Press, Inc, 2009.
- [10] Temiz AN, Benos PV, Camacho CJ. Electrostatic hot spot on DNA-binding domains mediates phosphate desolvation and the pre-organization of specificity determinant side chains [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 2134–2144.
- [11] Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 95–115.
- [12] Gaillard C, Strauss F. Construction of DNA hemicatenanes from two small circular DNA molecules [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0119368–e0119384.
- [13] Dong L, Tan Q, Ye W, *et al.* Screening and identifying a novel ssDNA aptamer against alpha-fetoprotein using CE-SELEX [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15552–15562.
- [14] Li P, Fan Y, Wang Y, *et al.* Characterization of plasma protein binding

- dissociation with online SPE-HPLC [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14866–14876.
- [15] McKeague M, Derosa MC. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development [J]. *J Nucleic Acids*, 2012, 2012: 748913.
- [16] Chen Y, Nakamoto K, Niwa O, *et al.* On-chip synthesis of RNA aptamer microarrays for multiplexed protein biosensing with SPR imaging measurements [J]. *Langmuir*, 2012, 28: 8281–8285.
- [17] Yang TL, Lin L, Lou PJ, *et al.* Detection of cell carcinogenic transformation by a quadruplex DNA binding fluorescent probe [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e86143–e86153.
- [18] Potty AS1, Kourentzi K, Fang H, *et al.* Biophysical characterization of DNA aptamer interactions with vascular endothelial growth factor [J]. *Biopolymers*, 2009, 91: 145–156.
- [19] Janssen KP, Knez K, *et al.* Spasic D, Nucleic acids for ultra-sensitive protein detection [J]. *Sensors (Basel)*, 2013, 13: 1353–1384.
- [20] Del Toro M, Gargallo R, Eritija R, *et al.* Study of the interaction between the G-quadruplex-forming thrombin-binding aptamer and the porphyrin 5,10,15,20-tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylate [J]. *Anal Biochem*, 2008, 379: 8–15.
- [21] Chang AL, McKeague M, Liang JC, *et al.* Kinetic and equilibrium binding characterization of aptamers to small molecules using a label-free, sensitive, and scalable platform [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 3273–3278.
- [22] Larsson A. Regression analysis of simulated radio-ligand equilibrium experiments using seven different mathematical models [J]. *J Immunol Methods*, 1997, 206: 135–142.
- [23] Hall KB, Kranz JK. *Methods in molecular biology* [M]. Totowa: Humana Press, Inc, 1999.
- [24] Connors KA. *Binding constants* [M]. New York: John Wiley, 1987.
- [25] Jing M, Bowser MT. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 686: 9–18.
- [26] Banères-Roquet F, Gualtieri M, Villain-Guillot P, *et al.* Use of a surface plasmon resonance method to investigate antibiotic and plasma protein interactions [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 1528–1531.
- [27] Padoin C, Tod M, Perret G, *et al.* Analysis of the pharmacokinetic interaction between cephalixin and quinapril by a nonlinear mixed-effect model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 1463–1469.
- [28] Herforth C, Stone JA, Jayewardene AL, *et al.* Determination of nelfinavir free drug concentrations in plasma by equilibrium dialysis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry: important factors for method optimization [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 15: 185–195.
- [29] Ryan PC, Lu M, Draper DE. Recognition of the highly conserved GTPase center of 23 S ribosomal RNA by ribosomal protein L11 and the antibiotic thiostrepton [J]. *J Mol Biol*, 1991, 221: 1257–1268.
- [30] Wong I, Lohman TM. A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5428–5432.
- [31] Buenrostro JD, Araya CL, Chircus LM, *et al.* Quantitative analysis of RNA-protein interactions on a massively parallel array reveals biophysical and evolutionary landscapes [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 562–568.
- [32] Litwin TR, Solà M, Holt IJ, *et al.* A robust assay to measure DNA topology-dependent protein binding affinity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: e43.
- [33] Hall KK. RNA-protein interaction protocols: nitrocellulose filter binding for determination of dissociation constants [M]. New York: Humana Press, 1999.
- [34] Stockley P. DNA-Protein interactions Principles and Protocols: Filter-Binding Assays [M]. New York: Humana Press, 2009.
- [35] Sophianopoulos JA, Durham SJ, Sophianopoulos AJ, *et al.* Ultrafiltration is theoretically equivalent to equilibrium dialysis but much simpler to carry out [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1978, 187: 132–137.
- [36] Chang AL, McKeague M, Liang JC, *et al.* Kinetic and equilibrium binding characterization of aptamers to small molecules using a label-free, sensitive, and scalable platform [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 3273–3278.
- [37] Deng B, Lin Y, Wang C, *et al.* Aptamer binding assays for proteins: the thrombin example—a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 837: 1–15.
- [38] Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9: 6505–6525.
- [39] Garner MM, Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system [J]. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9: 3047–3060.
- [40] Hsiao C, Lenz TK, Peters JK, *et al.* Molecular paleontology: a biochemical model of the ancestral ribosome [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 3373–3385.
- [41] Hickey MJ, Westhorpe CL. Imaging inflammatory leukocyte recruitment in kidney, lung and liver—challenges to the multi-step paradigm [J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91: 281–289.
- [42] Tahiri-Alaoui A, Frigotto L, Manville N, *et al.* High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 45.
- [43] Gerstle JT, Fried MG. Measurement of binding kinetics using the gel electrophoresis mobility shift assay [J]. *Electrophoresis*, 1993, 14: 725–731.
- [44] Crothers DM. Gel-electrophoresis of protein DNA complexes [J]. *Nature*, 1987, 325: 464–465.
- [45] Cann JR. Theory and practice of gel electrophoresis of interacting macromolecules [J]. *Anal Biochem*, 1996, 237: 1–16.
- [46] Landers JP. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques: introduction to capillary electrophoresis* [M]. New York: Taylor & Francis Group, 2008.
- [47] Jiang C, Armstrong DW. Use of CE for the determination of binding constants [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31: 17–27.
- [48] Jonker N, Kool J, Irth H, *et al.* Recent developments in protein-ligand affinity mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 2669–2681.
- [49] Dvořák M, Svobodová J, Beneš M, *et al.* Applicability and limitations of affinity capillary electrophoresis and vacancy affinity capillary electrophoresis methods for determination of complexation constants [J]. *Electrophoresis*, 2013, 34: 761–7.
- [50] Mendonsa SD, Bowser MT. *In vitro* evolution of functional DNA using capillary electrophoresis [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 20–21.
- [51] Krylov SN. Kinetic CE: foundation for homogeneous kinetic affinity



- methods [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 69–88.
- [52] Rauch JN, Nie J, Buchholz TJ, *et al.* Development of a capillary electrophoresis platform for identifying inhibitors of protein-protein interactions [J]. *Anal Chem*, 2013, 85: 9824–9831.
- [53] Shimura K, Waki T, Okada M, *et al.* Analysis of protein-protein interactions with a multi-capillary electrophoresis instrument [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27: 1886–1894.
- [54] Wang C, Li M, Xu H, *et al.* Preparation of an internal surface reversed-phase restricted-access material for the analysis of hydrophobic molecules in biological matrices. [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1343: 195–199.
- [55] Jing M, Bowser MT. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: a review. [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 686: 9–18.
- [56] Zhao Q, Li XF, Le XC. Aptamer-modified monolithic capillary chromatography for protein separation and detection [J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 3915–3920.
- [57] Zhao Q, Li XF, Shao YH, Le XC. Aptamer-based affinity chromatographic assays for thrombin [J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 7586–7593.
- [58] Tombelli S, Mascini M, Brennan JD. Aptamers as molecular tools for bioanalytical methods. [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11:179–88.
- [59] Anderson BJ, Larkin C, Guja K, *et al.* Chapter 12 using fluorophore-labeled oligonucleotides to measure affinities of protein–DNA interactions [J]. *Meth Enzymol*, 2008, 450: 253–272.
- [60] Egetenmeyer S, Richert C. Synthesis of oligodeoxynucleotides with 5'-caps binding RNA targets [J]. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2012, 51:1–21.
- [61] Abramova T. Frontiers and approaches to chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides [J]. *Molecules*, 2013, 18: 1063–1075.
- [62] Vasilieva E, Song Y, Koeller KJ, *et al.* 134 Large antiviral polyamide-DNA interactions [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2015, 33:86–87.
- [63] Roy D, Piontek S, Walker RA. Surface induced changes in coumarin solvation and photochemistry at polar solid/liquid interfaces. [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13: 14758–14766.
- [64] Meng Z, Song R, Chen Y, *et al.* Rapid screening and identification of dominant B cell epitopes of HBV surface antigen by quantum dot-based fluorescence polarization assay [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8: 118.
- [65] De Tito S, Morvan F, Meyer A, *et al.* Fluorescence enhancement upon G-quadruplex folding: synthesis, structure, and biophysical characterization of a dansyl/cyclodextrin-tagged thrombin binding aptamer [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24: 1917–1927.
- [66] Wang HQ, Wu Z, Tang LJ, *et al.* Fluorescence protection assay: a novel homogeneous assay platform toward development of aptamer sensors for protein detection [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e122.
- [67] Ban K, Wile B, Kim S, *et al.* Purification of cardiomyocytes from differentiating pluripotent stem cells using molecular beacons that target cardiomyocyte-specific mRNA [J]. *Circulation*, 2013, 128: 1897–1909.
- [68] Lee W, Obubuafo A, Lee YI, *et al.* Single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) for the high sensitivity analysis of low-abundance proteins using aptamers as molecular recognition elements [J]. *J Fluoresc*, 2010, 20: 203–213.
- [69] Simková E, Staněk D. Probing nucleic acid interactions and pre-mRNA splicing by Förster Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 14929–14945.
- [70] Chen RF, Scott CH. Atlas of Fluorescence Spectra and Lifetimes of Dyes Attached to Protein [J]. *Anal Lett A-Chem Anal*, 1985, 18: 393–421.
- [71] Heyduk T, Ma YX, Tang H, *et al.* Fluorescence anisotropy: Rapid, quantitative assay for protein-DNA and protein-protein interaction [J]. *Meth Enzymol*, 1996, 274: 492–503.
- [72] Lakowicz JR, Gryczynski I, Gryczynski Z, *et al.* Anisotropy-based sensing with reference fluorophores [J]. *Anal Biochem*, 1999, 267: 397–405.
- [73] Jing M, Bowser MT. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review [J]. *Anal Chimica Acta*, 2011, 686: 9–18.
- [74] Donovan JW. *Phys. principles tech. protein chem* [M]. Cambridge: Academic Press, Inc. 1969.
- [75] Gasymov OK, Abduragimov AR, Glasgow BJ. Probing tertiary structure of proteins using single Trp mutations with circular dichroism at low temperature [J]. *J Phys Chem B*, 2014, 118: 986–995.
- [76] Moss T, Leblanc B. *DNA-protein interactions: principles and protocols* [M]. Totowa: Humana Press, Inc, 2009.
- [77] Ulrih NP. Analytical techniques for the study of polyphenol-protein interactions [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, DOI:10.1080/10408398.2015.1052040.
- [78] Dai P, Jiang N, Tan RX. Assignment of absolute stereostructures through quantum mechanics electronic and vibrational circular dichroism calculations [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18:72–91.
- [79] Scarlett G, Siligardi G, Kneale GG. Circular Dichroism for the Analysis of Protein-DNA Interactions [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1334:299–312.
- [80] Ghosh T, Xie Y, Mastrangelo C, *et al.* A droplet-based novel approach for viable and low volume consumption surface plasmon resonance bio-sensing inside a polydimethylsiloxane microchip [J]. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 044122–044131.
- [81] Feng F, Kepler TB. Bayesian Estimation of the Active Concentration and Affinity Constants Using Surface Plasmon Resonance Technology [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0130812–e0130829.
- [82] Mireille B, Kamal Kant S, Yves M, *et al.* Dissecting the oligonucleotide binding properties of a disordered chaperone protein using surface plasmon resonance [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 10414–10425.
- [83] Wang J, Lv R, Xu J, *et al.* Characterizing the interaction between aptamers and human IgE by use of surface plasmon resonance [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390: 1059–1065.
- [84] Schuck P, Minton AP. Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors [J]. *Anal Biochem*, 1996, 240: 262–272.
- [85] Pennacchio A, Varriale A, Scala A, *et al.* A novel fluorescence polarization assay for determination of penicillin G in milk [J]. *Food Chem*, 2016, 190: 381–385.
- [86] Fogarty K, McPhee JT, Scott E, *et al.* Probing the ionic atmosphere of single-stranded DNA using continuous flow capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 465–472.
- [87] Abdennour A, Linman MJ, Quan C. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 1815–1824.

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



刘继红, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术研究及农产品质量安全风险评估。  
E-mail: ljha3100@163.com



王红旗, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术。  
E-mail: huda2000@126.com