

荧光自相关光谱技术检测抗原抗体亲和力

骆亚梅¹, 蹇林¹, 罗浩奇², 黄科赢², 张沃伦², 王柱楼¹, 张会芝¹, 肖茜^{1**}, 黄韶辉^{1,3*}¹中国科学院生物物理研究所交叉科学实验室, 北京 100101;²广东中科奥辉科技有限公司, 广东 中山 528400;³中国科学院大学, 北京 100049

摘要 本文对荧光自相关光谱(FACS)技术作为免疫分析技术的具体实现和潜在应用进行探究。实验分别以 Alexa Fluor647 荧光分子和绿色荧光蛋白抗原与抗体相互作用为模型,利用一款桌面式荧光相关光谱仪分别采集荧光分子抗原与不同浓度抗体混合液的荧光自相关数据。将传统 FACS 技术与最大熵值法相结合,我们可以对抗原-抗体结合程度进行定量和定性评估。使用自主开发的数据分析软件对采集的荧光自相关数据进行分析以获取抗原-抗体解离常数。实验结果表明,FACS 技术应用于抗原-抗体亲和力检测,具有简便、快速、灵敏的特点;检测限在皮摩尔和纳摩尔之间;模块化的数据分析软件可标准化操作流程、提高数据分析准确性和可重复性。

关键词 光谱学; 荧光自相关光谱; 最大熵值法; 荧光免疫分析技术; 解离常数; Alexa Fluor647; 绿色荧光蛋白
中图分类号 Q631 文献标志码 A doi: 10.3788/AOS202141.1730004

Fluorescence Auto-Correlation Spectroscopy Quantitatively Measures Antigen-Antibody Binding Affinity

Luo Yamei¹, Jian Lin¹, Luo Haoqi², Huang Keying², Zhang Wolun²,
Wang Zhulou¹, Zhang Huizhi¹, Xiao Qian^{1**}, Huang Shaohui^{1,3*}¹Laboratory of Interdisciplinary Research, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;²LightEdge Technologies Ltd., Zhongshan, Guangdong 528400, China;³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract This article explores implementation and application of fluorescence auto-correlation spectroscopy (FACS) as a quantitative immunoassay method. Using the binding interaction between Alexa Fluor647 fluorophore/green fluorescent protein antigen and its monoclonal antibody as a model system, we used a benchtop fluorescence correlation spectrometer to collect fluorescence autocorrelation data of solution samples of the antigen mixed with various concentrations of its antibody. Combining the classic FACS technique with the maximum entropy method, we can respectively evaluate antigen-antibody binding quantitatively and qualitatively. By analyzing the collected FACS data, the self-developed data analysis software can determine the dissociation constant of the antigen-antibody binding reaction. Experimental results show that FACS is a simple, rapid, and sensitive method for quantitatively determining antigen-antibody binding affinity, suitable for measuring dissociation constant values in the pM to nM range. The modular software standardizes the data analysis procedure while improving accuracy and reproducibility of analysis results.

Key words spectroscopy; fluorescence auto-correlation spectroscopy; maximum entropy method; fluorescence immunoassay; dissociation constant; Alexa fluor647; green fluorescent protein

OCIS codes 300.6390; 160.2540; 200.3050

收稿日期: 2021-01-24; 修回日期: 2021-03-22; 录用日期: 2021-03-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21874147)

通信作者: *shaohuih@ibp.ac.cn; **qianxiao@ibp.ac.cn

1 引言

免疫分析法是以抗原-抗体特异性结合生成免疫复合物为理论基础的一种检测方法,主要用于检测生物样品中是否有活性物质和特定物质的含量^[1]。目前免疫分析法在生物学、临床医学以及环境分析、食品、药理学等领域得到非常广泛的应用^[2-3]。传统的免疫分析方法为非均相免疫分析,它需要在检测前将免疫反应混合体系中抗原-抗体结合的标记物和未结合的标记物进行分离,因此整个过程操作繁琐、分析耗时长且检测通量低,不能满足快速检测和诊断的要求。近些年不断发展出多种均相免疫分析方法,检测时不需要将受测样品中的抗原-抗体结合和未结合的标记物进行分离,且检测速度快,检测通量高。常用的方法有荧光偏振免疫分析法^[4]、荧光共振能量转移^[5]和表面等离子共振技术^[6-7]、太赫兹光谱技术^[8-9]等分析技术。然而,这些分析方法或者受背景荧光和光散射的干扰导致信号的信噪比较低^[4],或者对样品制备有特殊的要求:包括样品标记^[5]、传感器芯片和样品量^[6]、分析算法限制等,以上因素导致产品推广受到很大限制。在实际应用中,随着对低丰度分析样品的检测需求逐渐增多,发展高灵敏且操作简便的快速免疫分析技术成为免疫分析方法的主要发展方向。

荧光相关光谱(FCS)^[10-11]是一种极具潜力的均相免疫分析方法^[12]。它具有灵敏度高(检测精度可以达到纳摩尔级别^[13])、所需样本少(几十微升)和检测时间短(几十秒到数分钟)等优点。通过检测溶液样品中一个极小的微观体积(数个飞升,1 fL = 10^{-15} L;约一个细菌大小)内的荧光信号波动,FCS技术可以提供受测荧光分子的多项水动力学特性,例如微观体积内平均荧光分子个数,以及受测分子的特征扩散相关时间等。传统 FCS 技术分析抗原-抗体亲和力是计算抗原-抗体的解离常数,解离常数越小,说明抗原和抗体之间的结合强度越大。具体计算方法是使用荧光相关光谱仪采集不同抗体(或抗原)浓度下受测分子的荧光自相关曲线,对采集的荧光自相关曲线分别进行拟合得到不同抗体浓度下微观体积内荧光标记的结合抗原(或抗体)和总抗原(或总抗体)分子个数的比值(F_0),通过对不同抗体(或抗原)浓度下 F_0 值进行拟合可以得到抗原-抗体的解离常数^[14]。

在抗原-抗体亲和力检测的过程中,抗体(或抗原)浓度的增加会同时影响到抗原和抗体结合比例(F_0)和受测分子的特征扩散相关时间。特征扩散相关时间反映的是受测分子在溶液中的动态(翻滚、

平移等)体积。假设混合溶液中荧光标记的抗原分子的总数固定,随着抗体浓度的增加,更多游离抗原和抗体结合形成质量(体积)更大的抗原-抗体结合物即结合态抗原。当受测分子因布朗运动通过微观检测体积时,结合态抗原的质量(体积)比游离抗原越大,它的扩散速度就越慢,在检测体积内的停留时间也越长,特征扩散相关时间的值也会越大。因此,受测分子的特征扩散相关时间反映了受测荧光分子的状态(游离态、结合态)和抗原-抗体结合程度,但这种方法并未普遍用于抗原抗体亲和力检测。

本文在传统 FCS 技术的基础上提出一种新的检测抗原抗体亲和力的方法,实验分别以 Alexa Fluor647 荧光分子抗原(分子量为 1250)和 Cy5 抗体(分子量为 150 kDa,1 Da = 1 u),绿色荧光蛋白(GFP)抗原(分子量为 27 kDa)和抗体(分子量为 150 kDa)为研究对象。利用荧光相关光谱仪^[15]采集不同抗体浓度下抗原分子的荧光自相关信号,将传统 FCS 技术结合最大熵方法(MEM)对采集的自相关信号进行分析。利用传统 FCS 技术计算抗原抗体解离常数;利用 MEM 方法计算不同抗体浓度下混合溶液中荧光标记抗原分子的特征扩散时间的分布曲线。通过比较特征扩散时间分布曲线随抗体浓度的变化可以对抗原抗体结合程度进行评估。实验结果证实,FCS 技术结合 MEM 方法可以实现对抗原抗体亲和力的简便、快速、灵敏检测;自主开发的模块化数据分析软件简化操作流程,进一步提高数据分析的准确性和可重复性。

2 基本原理

2.1 FCS 技术的基本原理

FCS 技术具有较高的检测灵敏度。FCS 技术在溶液样品中分离出一个很小的荧光激发和检测体积,通常包含几个至几百个基于布朗运动而自由扩散的荧光分子或经过荧光标记的分子。受测溶液的浓度越低(pM),微观体积内的荧光分子越少。因此,当微观体积内荧光分子或荧光标记的分子因布朗运动或者化学反应通过检测体积时,荧光信号会出现随时间涨落的现象。FCS 技术就是通过分析荧光信号涨落的相关函数而获取溶液中受测分子的分子大小、浓度等。

荧光自相关光谱是最早开发的 FCS 技术。它通过计算荧光信号 $F(t)$ 与自身在相关时间 τ 的时滞信号 $F(t+\tau)$ 之间的重叠程度,即自相关幅度 $G(\tau)$,进而获得受测分子水动力学特性的方法。自

相关幅度 $G(\tau)$ 定义为

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (1)$$

式中: $\delta F(t)$ 反映荧光信号 $F(t)$ 随时间的波动; $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$, 尖括号代表时间平均值。当相关时间 $\tau = 0$ 时, 自相关幅度 $G(0)$ 为最大值且 $G(0) = 1/N$, N 是微观体积内平均荧光分子个数; 当相关时间 $\tau > 0$ 时, 两组信号 $F(t)$ 与 $F(t + \tau)$ 之间的重叠区域 $\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle$ 随 τ 值的增加而减少, 自相关幅度 $G(\tau)$ 下降; 当相关时间 $\tau \rightarrow \infty$ 时, 两组信号之间无重叠区域, 自相关幅度 $G(\infty) = 0$ 。因此, 随相关时间 τ 增长, 自相关幅度 $G(\tau)$ 逐渐衰减。

运用特定数学模型对荧光自相关数据 $G(\tau)$ 进行拟合, 可获得受测荧光分子的多项水动力学特性, 其中较为重要的参数包括微观体积内平均荧光分子个数 (N)、平均分子荧光亮度 (λ) 和受测分子的特征扩散相关时间 (τ_D)。荧光信号的波动幅度受检测体积内平均荧光分子个数和平均分子荧光亮度的影响。特征扩散相关时间 (τ_D) 受检测体积内受测荧光分子的质量/体积的影响, 质量/体积越大的受测分子在检测体积内扩散时间越长。

2.2 FCS 技术计算抗原抗体解离常数

传统 FCS 技术计算抗原抗体解离常数, 首先需要分别检测和分析抗原溶液、抗原抗体完全结合溶液 (无游离抗原), 以获取游离抗原和抗原抗体复合物的特征扩散相关时间和平均分子荧光亮度; 然后检测不同浓度比例的抗原与抗体混合液, 分别计算不同抗体浓度下结合抗原与总抗原分子个数的比值 (F_b); 最后, 对不同抗体浓度下 F_b 值进行拟合获得抗原抗体解离参数。

2.2.1 设备校准

在正式实验之前, 首先需要使用已知扩散系数的标准荧光分子溶液对 FCS 设备进行校准, 以确定当前状态下设备的检测体积的形状参数 (S)。 $S = z_0/r_0$, 假设检测体积中心处激发光的光强为 I_0 , z_0 和 r_0 是检测体积内激发光强度为 I_0/e 处分别沿 Z 轴或 $X(Y)$ 轴距离检测体积中心点的距离, e 为自然常数。对 FCS 设备采集的标准荧光分子的自相关曲线进行拟合可获取 S 值。

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \times \frac{1 - T + T \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right)}{1 - T} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \times \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D S^2}}}, \quad (2)$$

式中: $N = 1/G(0)$; T 为检测体积内处于三重态的荧光分子 (弛豫时间为 τ_T) 的比例。

根据 (2) 式拟合得到的参数 N 、 τ_D 和 S 值, 可以计算出仪器的聚焦体积 V 。

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}, \quad (3)$$

$$z_0 = S r_0, \quad (4)$$

$$V = \pi^{3/2} r_0^2 z_0. \quad (5)$$

根据 S 和 V 值可以确定设备当前的工作状态, 其中 D 为受测分子的扩散系数。参数 S 的理论值为 2~3 左右, 若 FCS 设备的荧光激发和检测光路工作良好, S 的实际测量值应该小于 10; 另外, S 值的测量可重复性反映仪器工作状态的稳定性。参数 V 的实际测量值一般在 1~2 fL, 说明设备聚焦状态较好。在后续实验的数据分析中, 参数 S 值和 V 值固定。

2.2.2 分析游离抗原溶液、抗原抗体完全结合溶液

无论是游离抗原溶液还是抗原抗体完全结合溶液, 受测样品中荧光分子只存在一种状态 (单组分)。游离抗原溶液中不存在抗原抗体结合物, 只存在游离的抗原分子; 而抗原抗体完全结合溶液中只有结合态抗原。通过 (2) 式分别对上述两种溶液的自相关曲线进行拟合, 可以得到游离抗原和抗原抗体结合物的特征扩散相关时间 (τ_L 和 τ_{LS}), 以及它们各自的平均分子荧光亮度 (λ_L 和 λ_{LS})。平均分子荧光亮度 (λ) 是每个受测荧光分子每秒发射的光子数, 即平均荧光强度 $\langle F(t) \rangle$ 与检测体积内平均荧光分子个数 N 的比值。

2.2.3 分析不同浓度比例的抗原抗体混合溶液

不同浓度比例的抗原和抗体混合溶液中荧光分子存在两种状态 (多组分), 分别是荧光标记的游离抗原和结合态的抗原抗体结合物。利用下式对不同抗体浓度 (M) 下的抗原抗体混合液的自相关曲线 $G^M(\tau)$ 进行拟合, 称为多组分 FCS 分析。

$$G^M(\tau) = \frac{1 - T^M + T^M \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T^M}\right)}{1 - T^M} \times \left[F_L^M \times \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_L}\right) \times \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_L S^2}}} + F_{LS}^M \times \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{LS}}\right) \times \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{LS} S^2}}} \right], \quad (6)$$

式中:游离抗原和抗原抗体结合物的特征扩散相关时间(τ_L 和 τ_{LS})和荧光亮度(λ_L 和 λ_{LS})已经通过检测抗原溶液和抗原抗体完全结合溶液获取。利用(6)式分别对不同抗体浓度下的抗原抗体混合溶液的自相关曲线进行拟合得到参数 F_L^M 和 F_{LS}^M ^[16]。它们分别对应当前抗体浓度(M)下,混合溶液中游离抗原和结合抗原的粒子亮度加权后的波动幅度。参数 T^M 是检测体积内弛豫时间为 τ_T^M 的三重态荧光分子的比例。其他参数的定义等同于(2)式。

通过下式可得出不同抗体浓度(M)下,混合溶液中结合抗原分子个数(N_{LS}^M)与总抗原分子个数($N_L^M + N_{LS}^M$)的比值 F_b^M ,其中参数 N_L^M 为游离抗原的分子个数^[14]。

$$\frac{N_L^M}{N_{LS}^M} = \left(\frac{\lambda_{LS}}{\lambda_L}\right)^2 \times \frac{F_L^M}{F_{LS}^M}, \quad (7)$$

$$F_b^M = \frac{N_{LS}^M}{N_L^M + N_{LS}^M}. \quad (8)$$

2.2.4 计算抗原抗体的解离常数

对抗原抗体混合溶液,不同抗体浓度(M)下的 F_b^M 进行拟合可得到受测抗原与抗体的解离常数

(K_D)^[16]。

$$F_b^M = \frac{p \times M}{K_D + M} + B, \quad (9)$$

式中: B 为常数; p 为比例因子。

2.3 MEM 方法分析混合溶液中抗原抗体结合

在抗原和抗体混合溶液中,抗体浓度越高,处于结合态的荧光标记物越多,而游离态分子越少。这种变化会直接影响到受测分子 τ_D 值的分布,因为抗原结合抗体后,受测荧光标记物的质量(体积)增大,在检测体积内的扩散速度变慢会使 τ_D 值增加。因此,利用 MEM 方法拟合不同抗体浓度(M)下的荧光自相关曲线 $G^M(\tau)$ 可以得到受测分子 τ_D 值的分布曲线,进而获得当前溶液中抗原分子的状态,以及抗原和抗体的结合程度。

与传统 FCS 方法不同,MEM 分析无需预先了解溶液组成成份和荧光分子的状态。假设待测溶液中有 m 种不存在相互作用的荧光标记的分子,每种荧光分子的三重态相同,而扩散系数不同。因此,FCS 拟合公式转变为

$$G^M(\tau) = \left[\frac{1 - T^M + T^M \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T^M}\right)}{1 - T^M} \right] \sum_{i=1}^m F_i^M \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}^M}} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}^M s^2}}} \right), \quad (10)$$

式中:每种受测分子的特征扩散相关时间为 τ_{Di}^M ($i = 1, 2, \dots, m$),为简化多组分数学模型的拟合过程,假设不同荧光分子的质量(体积)之间存在数量级的差异, τ_{Di}^M ($i = 1, 2, \dots, m$)之间为对数间隔;参数 F_i^M 代表第 i 种特征扩散相关时间为 τ_{Di}^M 的受测分子对溶液自相关曲线 $G^M(\tau)$ 的贡献;其他参数的定义等同于(6)式。

模型函数计算的拟合曲线与实验测得的自相关曲线的误差 χ_M^2 定义为

$$\chi_M^2 = \frac{1}{L} \sum_{j=1}^L \frac{[G_c^M(\tau_j^M) - G_e^M(\tau_j^M)]^2}{\sigma_j^M}, \quad (11)$$

式中: $G_c^M(\tau)$ 和 $G_e^M(\tau)$ 分别代表实验所得自相关曲线和根据模型函数计算得到的自相关拟合曲线,每条自相关曲线均包括 L 个时间点; τ_j^M 代表其中第 j 个相关时间; σ_j^M 代表相关时间在 τ_j^M 时的残差权重,即自相关曲线在每个时间点的标准差。

使用 MEM 方法控制拟合过程,熵 H^M 定义为

$$H^M = \sum_{i=1}^L -p_i^M \log p_i^M, \quad (12)$$

$$p_i^M = \frac{F_i^M}{\sum_{i=1}^L F_i^M}. \quad (13)$$

为同时保证拟合误差 χ_M^2 最小,且熵 H^M 最大,定义新的拟合函数 J^M 表示为

$$J^M = \chi_M^2 - \alpha^M H^M, \quad (14)$$

式中:参数 α^M 是正则化因子,用于调整 χ_M^2 和 H^M 之间的权重关系。若能够最小化 J^M 值,则拟合得到的 F_i^M 分布能够最大限度地还原待拟合曲线 $G_c^M(\tau)$ 所反映的真实情况。在迭代起始阶段,拟合曲线与原始曲线有很大偏差,因此 χ_M^2 值很大,需要用较大的 α^M 值确保 H^M 朝最大化的方向迭代,每迭代一次, α^M 都除以一个略大于 1 的迭代速率常数。随着迭代的进行, χ_M^2 逐渐减小并趋于稳定, α^M 值也随之逐渐减小,直到满足边界判断条件(通常设为 $J_M < 1 \times 10^{-5}$)则终止迭代。

实验中正则系数 α^M 设置初始值为 20000, τ_D 的拟合区间为 0.01 ~ 5 ms,共设置 51 ~ 150 个 τ_D 采样点,每个采样点之间取均一的对数间隔。MEM

拟合完成后,为对比不同抗体浓度(M)下受测分子的 τ_{Di}^M 分布曲线($i=1,2,\dots,m$),对拟合参数 F_i^M 进行标准化后获得 F_i^{M*} 。

$$F_i^{M*} = \frac{F_i^M}{\max F_i^M}, \quad (15)$$

式中: $\max F_i^M$ 是 τ_{Di}^M 分布曲线中拟合参数 F_i^M 的最大值。

3 实 验

3.1 FCS 仪器

实验使用 CorTector™ SX100(广东中科奥辉科技有限公司)采集 FCS 数据。设备的光路结构如图 1 所示,488 nm/638 nm 激光器产生一束激光,经激发二向色镜(DM)反射后入显微镜水浸物镜(Objective:UplanApo,60×NA1.2,奥林巴斯,日本),由物镜在溶液样品内形成聚焦体积。样品经激光激发产生荧光,部分荧光被同一物镜收集并以准直光从物镜后瞳射出,再经激发二向色镜过滤掉激发光。过滤后的荧光再次经滤光片(F)过滤后,通过透镜(TL)聚焦到 50 μm 共聚焦针孔(P),最后由单光子雪崩光电二极管(SPAD,SPCM-AQRH-14-FC,Excelitas Technologies,美国)接收。通过软件控制共聚焦针孔实现在三维空间内的全自动校准和高精确定位。FCS 相关计算卡以 90 ns 的时间分辨率,对随时间波动的荧光信号进行相关计算,并实时输出荧光自相关数据至计算机的数据采集软件,最后由数据分析软件进行分析。

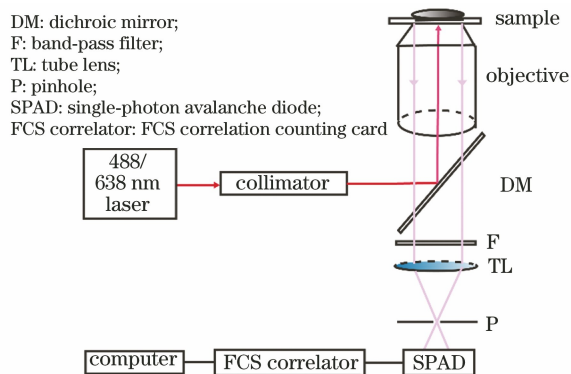


图 1 桌面式 FCS 系统光路结构图

Fig. 1 Schematic of optical pathway of benchtop FCS system

3.2 样品制备

抗原抗体亲和力实验所用样品包括 Alexa Fluor647 carboxylic acid(Thermo Fisher,美国),小鼠抗 Cy5 单克隆抗体(C1117, Sigma-Aldrich,美国),GFP 荧光蛋白抗原抗体亲和力实验所用样品

包括 Recombinant eGFP(P7410, Beyotime, 中国),兔抗 GFP 单克隆抗体(AF1483, Beyotime, 中国)。10 nM(1 nM=1 nmol/L)的 ATTO655(AD655-21, ATTO-TEC GmbH, 德国)和 5 nM 的 ATTO488(AD488-21, ATTO-TEC GmbH, 德国)用于实验开始前的 FCS 设备的光路校准。所有样品购买后均在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,待使用时取出在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 融化并按照需求进行稀释。除 ATTO488 和 ATTO655 使用超纯水(HPLC grade, 187553, 百灵威, 中国)稀释外,其他样品稀释和配制抗原-抗体混合溶液均使用 100 mM PBS 缓冲液(pH 7.4)。抗原-抗体解离常数的检测要求抗体的浓度在荧光抗原浓度的 $10^{-3} \sim 10^4$ 倍数内变化^[10,16-18]。Alexa Fluor647 抗原溶液(100 pM)与不同浓度的鼠抗 Cy5 单克隆抗体(10 pM~300 nM)混合,4 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 使抗原抗体充分结合反应后,直接在 FCS 设备上检测。混合溶液中抗体浓度设置为 13 组,分别为 0, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 160 nM, 200 nM, 250 nM 和 300 nM。GFP 抗原溶液(200 pM)与不同浓度的兔抗 GFP 单克隆抗体(230 pM 到 920 nM)充分混合后检测。混合溶液中抗体浓度设置为 15 组,分别为 0, 230 pM, 460 pM, 690 pM, 2.3 nM, 6.9 nM, 11.5 nM, 23 nM, 69 nM, 115 nM, 189 nM, 230 nM, 460 nM, 690 nM 和 920 nM。

3.3 数据采集

本文使用已知扩散系数的 5 nM ATTO488 溶液和 10 nM ATTO655 溶液为标准品对 488 nm 和 638 nm 光路进行校准,通过对采集的数据进行拟合[(2)式]确定当前状态下激发体积(V)和形状参数(S)。利用 FCS 数据采集软件采集每个受测样品的荧光自相关数据,重复检测 10 次,每次采样时间为 10 s。

3.4 抗原抗体亲和力和数据分析流程

为规范化和简便化利用 FCS 设备分析抗原抗体亲和力,我们自主开发一款基于荧光相关光谱技术进行分子间相互作用的数据分析软件(Molecular Interaction)。按照软件的分析流程导入样品的实验数据,完成以下五步即可得到抗原-抗体解离常数 K_D 。具体过程是:1)导入标准荧光分子的 FCS 自相关数据,计算参数。2)将采集到的以下三种溶液的 FCS 自相关数据依次导入,分别是游离抗原溶液、抗原-抗体完全结合的溶液和抗原-抗体按不同比例混合的溶液。软件按照上述分析流程分别计算不同抗体浓度(M)下抗原-抗体结合比例 F_b^M ,通过

对得到的 F_b^M 值进行拟合,即可得出抗原-抗体解离常数 K_D 的数值以及拟合误差。正文中若无特别说明,计算所得的结果均是平均值 \pm 均方根误差 (RMSE)。分析软件的具体流程示意图如图 2 所示。

明,计算所得的结果均是平均值 \pm 均方根误差 (RMSE)。分析软件的具体流程示意图如图 2 所示。

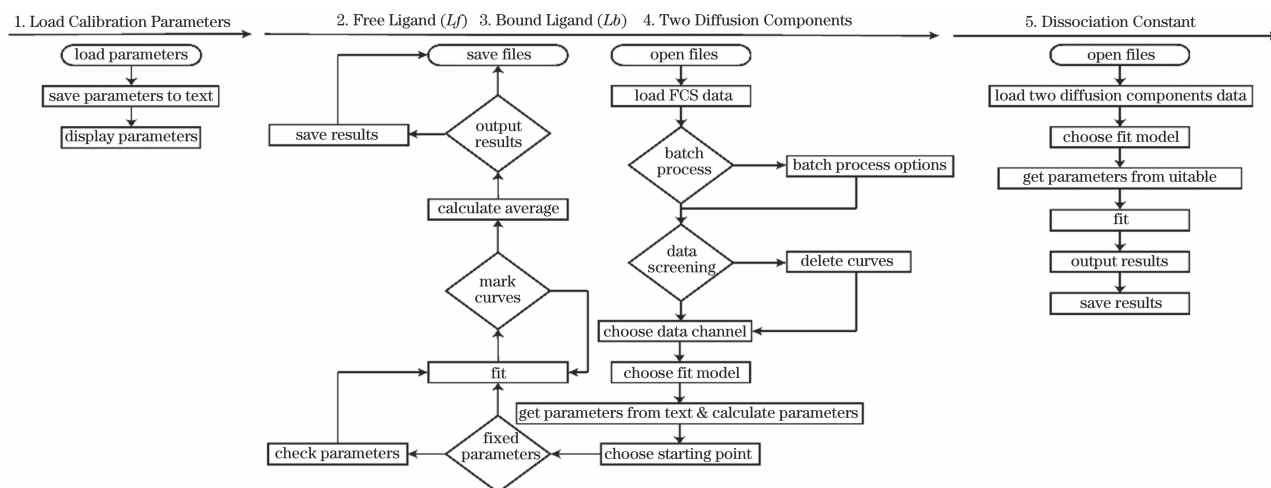


图 2 抗原抗体亲和力分析软件的流程示意图

Fig. 2 Flow chart of the data analysis software for determining antigen-antibody binding affinity

4 结果与讨论

4.1 分析 Alexa Fluor647 荧光分子抗原与抗体亲和力

4.1.1 设备校准

在正式实验开始前,首先需要使用已知扩散系数的标准荧光分子溶液(10 nM ATTO655)对 FCS 设备进行校准,以确定当前状态下 FCS 设备聚焦体的形状参数(S)和体积(V)。拟合 ATTO655 的自相关曲线[图 3(a)]得到当前状态下 FCS 设备的形状参数(S)为 6.52 ± 0.2 。已知 ATTO655 扩散系数($D = 4.26 \times 10^{-6} \pm 0.08 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [19]),可得聚焦体积为 $1.46 \text{ fL} \pm 0.09 \text{ fL}$ [(3)式~(5)式]。

4.1.2 分析游离抗原溶液、抗原抗体完全结合溶液

对游离抗原溶液[100 pM,图 3(a)]和抗原-抗体完全结合的混合溶液[抗原浓度:100 pM,抗体浓度:300 nM,图 3(a)]的自相关曲线进行拟合,分别得到两种荧光分子的特征扩散相关时间(游离抗原: $\tau_L = 99.6 \mu\text{s} \pm 1 \mu\text{s}$,结合态抗原: $\tau_{LS} = 614.6 \mu\text{s} \pm 1.1 \mu\text{s}$)。此外,不加入抗体时,游离抗原 Alexa Fluor647 荧光分子的平均亮度 $\lambda_L = 8.4 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$,当加入抗体直到抗原-抗体结合达到完全饱和时(300 nM),抗原-抗体结合物荧光分子的平均亮度(λ_{LS})显著增加为 $1.77 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$ 。

4.1.3 分析不同浓度比例的抗原-抗体混合溶液

随着混合溶液中抗体浓度从 0~300 nM 不断改变,抗原和不同浓度抗体的混合溶液的归一化自相关

曲线随着抗体浓度增加而逐渐右移,受测荧光分子的特征扩散相关时间(τ_D)也逐渐增大[图 3(b)]。实验结果表明随着抗体浓度增加,更多的游离抗原和抗体结合形成抗原-抗体结合物。结合态抗原(分子量为 151 kDa)相比于游离态抗原(分子量为 1250)的质量/体积显著增加,导致样品中荧光分子的扩散速度降低。当抗体浓度逐渐增加到 10 nM 时,即使再增加抗体浓度,混合溶液的自相关曲线已无显著变化,说明抗原和抗体结合趋向于饱和。

为获取溶液中荧光标记的抗原分子的特征扩散相关时间(τ_D)分布曲线,我们用 MEM 方法分别拟合不同抗体浓度($M:0 \sim 300 \text{ nM}$)下采集的 13 条自相关曲线。分析结果如图 3(c)所示,当抗体浓度为 0 时混合溶液中只有游离抗原, τ_D 分布曲线显示溶液中仅有一个组分, τ_D 峰值位置为 0.1 ms。MEM 分析结果与传统 FCS 方法拟合抗原溶液得到的游离抗原分子的特征扩散相关时间相同。当抗体浓度增加到 0.1 nM 时, τ_D 分布曲线从单一峰逐渐出现两个相互独立的峰。实验结果说明随着抗体浓度的增加,混合溶液中出现两种分子量有较大差异的组分,且它们的 τ_D 峰值分别在 94 μs 和 0.68 ms。两种组分的 τ_D 峰值位置与传统 FCS 方法分别分析游离抗原溶液和抗原-抗体完全结合溶液后得到的游离抗原和结合态抗原的 τ_D 值相同。因此,第一种组分应该为游离抗原,第二种组分应该为结合态抗原。继续增加抗体浓度到 10 nM 时, τ_D 分布曲线仅有一个峰(0.604 ms 处),说明溶液中几乎没有游离抗原,大多数抗原都和抗体结合以结合态抗原的形式

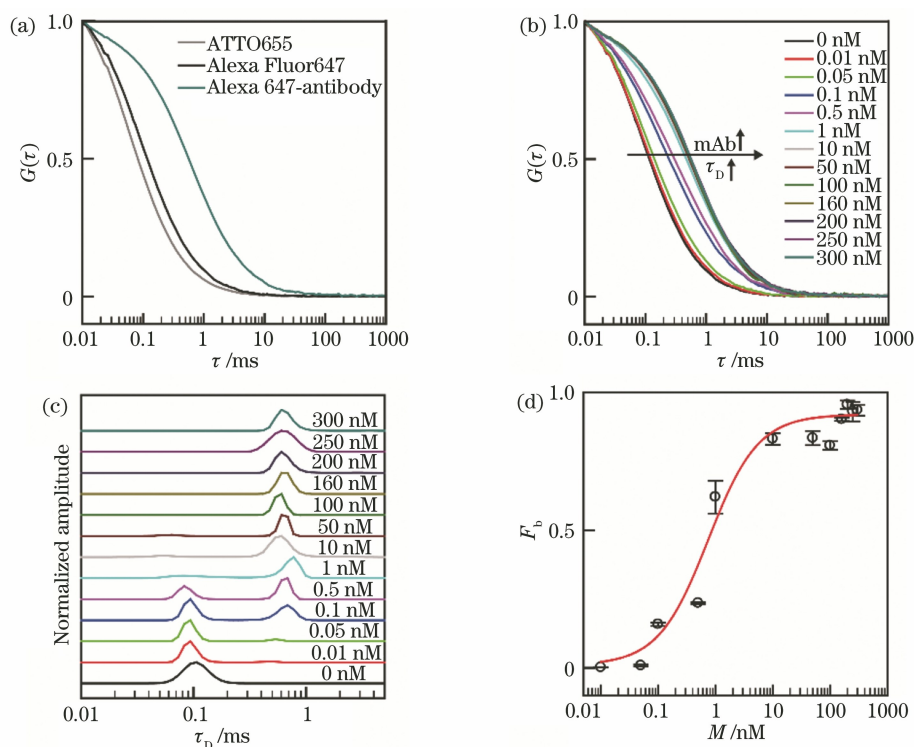


图 3 FCS 和 MEM 方法分析 Alex647 荧光分子抗原抗体亲和力。(a)标准荧光分子溶液、游离 Alexa Fluor647 抗原溶液以及饱和抗原-抗体混合溶液的归一化自相关曲线；(b)Alexa Fluor647 抗原和不同浓度抗体混合溶液的归一化自相关曲线；(c)利用 MEM 方法对采集的 13 组游离抗原和抗原抗体混合溶液的自相关曲线进行分析，得到溶液中抗原的特征扩散相关时间分布曲线；(d)对不同抗体浓度下抗原-抗体结合比例进行非线性最小二乘拟合得到抗原抗体的解离常数

Fig. 3 Analyze the affinity of Alex647 fluorescent molecule antigen and antibody using FCS and MEM methods. (a) Normalized fluorescence auto-correlation curves of a standard fluorescent molecule sample, a free Alexa Fluor647 antigen sample, and a bound antigen sample; (b) normalized fluorescence auto-correlation curves of Alexa Fluor647 mixed with different concentrations of monoclonal antibody; (c) distribution curves of diffusion correlation time of the free and bound Alexa Fluor647 obtained by MEM analyses of the 13 antigen-antibody samples; (d) antigen-antibody dissociation constant was obtained by non-linear least squares fitting of the bound antigen fractions data with different concentrations of antibody

存在。再逐步增加抗体浓度到 300 nM 的过程中， τ_D 分布曲线都只有一个峰(0.604 ms 处)，说明抗体浓度达到 10 nM 以后抗原-抗体结合基本接近饱和。

4.1.4 计算抗原抗体解离常数

对不同抗体浓度(M :0.01~300 nM)下结合抗原与总抗原分子比值(F_b)进行拟合可以得到溶液中抗原抗体的解离常数 K_D 为 $0.746 \text{ nM} \pm 0.037 \text{ nM}$ [(9)式]。拟合结果如图 3(d)所示，随着混合溶液中抗体浓度(M)的增加，结合比值 F_b 值逐渐增加然后达到平台期。当抗体浓度为 0.01 nM 时，结合比值 $F_b = 0.002 \pm 0.0004$ ，此时混合溶液中抗原处于游离态；结合比值 F_b 值跟随抗体浓度的增加而增大，当抗体浓度达到 10 nM，结合比值 F_b 值增大到 0.831 ± 0.021 。此时，抗原-抗体结合基本达到饱和，即使再增加抗体浓度， F_b 值增加缓

慢^[7,20]。在抗体浓度为 200 nM 时，抗原-抗体的结合程度已经达到完全饱和($F_b = 0.955 \pm 0.015$)。

4.2 分析 GFP 荧光蛋白抗原与抗体亲和力

4.2.1 设备校准

在正式实验开始前，首先需要使用已知扩散系数的标准荧光分子溶液(5 nM ATTO488)对 FCS 设备进行校准，以确定当前状态下 FCS 设备聚焦体积的形状参数(S)和体积(V)。拟合 ATTO488 的自相关曲线[图 4(a)]得到当前状态下 FCS 设备的形状参数(S)为 7.23 ± 0.23 。已知 ATTO488 扩散系数($D = 4.0 \times 10^{-6} \pm 0.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [21])，可得聚焦体积为 $1.109 \text{ fL} \pm 0.006 \text{ fL}$ [(3)式~(5)式]。

4.2.2 分析不同浓度比例的抗原抗体混合溶液

对游离抗原溶液[200 pM,图 4(a)]和抗原-抗体

完全结合的混合溶液[抗原浓度:200 pM, 抗体浓度:920 nM, 图 4(a)]的自相关曲线进行拟合, 分别得到两种荧光分子的特征扩散相关时间(游离抗原: $\tau_{L} = 125.4 \mu\text{s} \pm 0.88 \mu\text{s}$, 结合态抗原: $\tau_{LS} = 331.5 \mu\text{s} \pm 3.5 \mu\text{s}$)。游离抗原 GFP 荧光蛋白的平均亮度(λ_L)为 $5.21 \times 10^4 \pm 0.19 \times 10^4 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$, 结合态抗原的平均亮度(λ_{LS})为 $2.173 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^{-3} \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$ 。

4.2.3 分析不同浓度比例的抗原-抗体混合溶液

随着抗体浓度逐渐增加(0~920 nM), GFP 抗原(200 pM)和不同浓度抗体混合液的归一化自相关曲线逐渐右移, 受测荧光分子的特征扩散相关时间(τ_D)也逐渐增大[图 4(b)]。使用 MEM 方法拟合不同抗体浓度下采集的 FCS 自相关曲线。如图 4(c)所示, 当抗体浓度为 0 时, 溶液中只有游离

GFP 一个组分, τ_D 峰值在 125 μs 处。当抗体浓度较低时(230 pM~2.3 nM), 溶液中主要组分仍然为游离态 GFP。当抗体浓度增加到 11.5 nM 时, τ_D 分布曲线显示两个相互独立的峰, 说明混合溶液中出现两种分子量有较大差异的组分。 τ_D 主要分布在 100~130 μs 和 400~450 μs 区间内, 与传统 FCS 方法分别分析游离抗原溶液和抗原-抗体完全结合溶液后得到的游离抗原和结合态抗原的 τ_D 值相接近。因此, 第一种组分应该为游离抗原, 第二种组分应该为结合态抗原。当抗体浓度达到 690 nM 以上时, τ_D 分布曲线仅有一个峰(约为 360 μs 处), 说明受测溶液中抗原-抗体结合达到饱和, 多数抗原与抗体结合以结合态抗原的形式存在。

4.2.4 计算抗原抗体解离常数

如图 4(d)所示, 结合抗原与总抗原分子比值

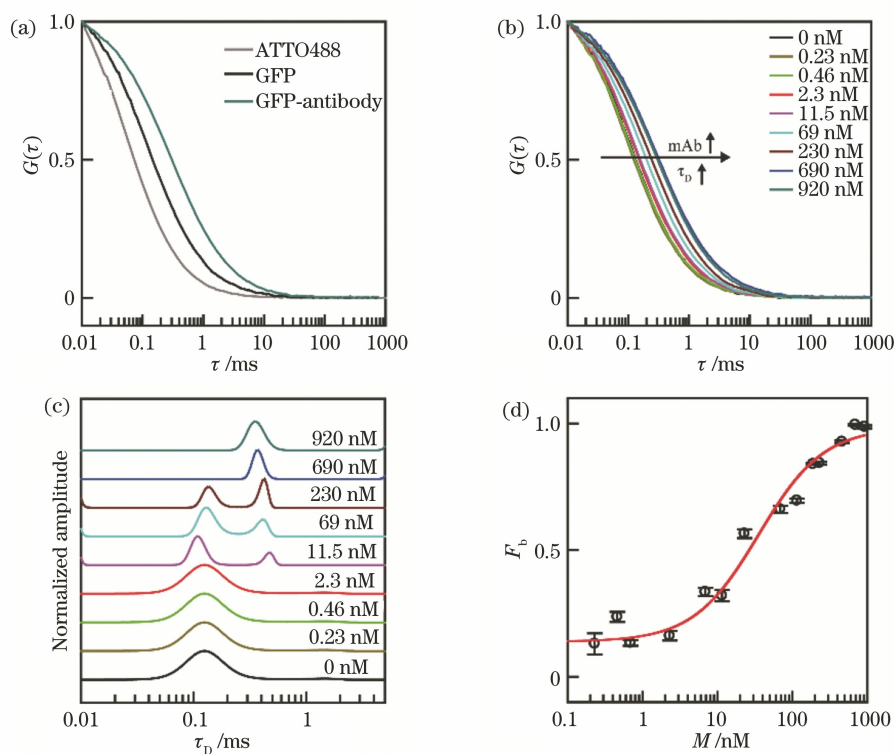


图 4 FCS 和 MEM 分析 GFP 荧光蛋白抗原和抗体亲和力。(a)标准荧光分子溶液、游离 GFP 抗原溶液以及饱和抗原-抗体混合溶液的归一化自相关曲线;(b)GFP 抗原和不同浓度抗体混合溶液的归一化自相关曲线;(c)利用 MEM 方法对采集的游离抗原和抗原-抗体混合溶液的自相关曲线进行分析,得到溶液中抗原的特征扩散相关时间分布曲线;(d)对不同抗体浓度下抗原抗体结合比例进行非线性最小二乘拟合得到抗原-抗体的解离常数

Fig. 4 FCS and MEM Analyses of GFP antigen-antibody binding affinity. (a) Normalized fluorescence auto-correlation curves of a standard fluorescent molecule sample, a free GFP antigen sample, and a bound antigen sample; (b) normalized fluorescence auto-correlation curves of samples composed of GFP mixed with different concentrations of monoclonal antibody; (c) distribution curves of diffusion correlation time of the free and bound GFP obtained by MEM analyses of the antigen-antibody samples; (d) antigen-antibody dissociation constant was obtained by non-linear least squares fitting of the bound antigen fractions data with different concentrations of antibody

(F_b)随着混合溶液中抗体浓度(M)的增加而逐渐增加直到达到平台期。当抗体浓度较低(230 pM)时,混合溶液中抗原主要处于游离态, F_b 值为 0.13 ± 0.04 ;当抗体浓度达到 189 nM 时,结合比值 F_b 值增大到 0.839 ± 0.004 。此时,即使再增加抗体浓度, F_b 值增加缓慢,说明抗原-抗体结合基本达到饱和。在抗体浓度为 920 nM 时,抗原-抗体的结合程度已经达到完全饱和($F_b = 0.987 \pm 0.006$)。对不同抗体浓度(M :230 pM~920 nM)下得到的结合比例 F_b 值进行拟合,可以得到溶液中抗原抗体

的解离常数 $K_D = 35.52 \pm 8.49$ nM。

4.3 FCS 与其他生物分子亲和力检测技术对比

初步实验结果表明,FCS 是一种简单、高效的研究免疫反应的工具,具有样品用量小,背景噪声低等优势。模块化设计的相互作用分析软件保证抗原抗体亲和力检测的快速、灵敏和可重复性。将 FCS 与生物医学领域中常用的研究生物分子亲和力的技术(等温滴定量热法(ITC)、表面等离子共振技术(SPR)和微量热涌动技术(MST)进行对比(表 1)。

表 1 FCS 与其他生物分子亲和力检测技术对比

Table 1 Comparison of FCS with other technologies for quantitatively determining antigen-antibody binding affinity

| Technology | Theory | Characteristics | Sensitivity |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Isothermal Titration Calorimetry (ITC) ^[22-23] | By detecting the dynamic heat changes during the reaction process of antibody ligand binding, ITC calculates the binding thermodynamic and kinetic parameters | No need to label the sample. Antibody concentration is 15–50 μ M. The ligand concentration is 15 times that of the antibody. Sample amount is a few microliters Each test takes 2–2.5 h The small heat change lower than 0.4 μ J in the reaction process cannot be tested The affinity of the antigen and antibody can be detected in the natural binding state | Antigen-antibody affinity test with K_D value at 10^{-9} – 10^{-2} M |
| Surface Plasmon Resonance (SPR) ^[24-26] | When the ligand flows through the antibody fixed on the chip surface at a certain speed and binds to it, SPR calculates the affinity value by fitting the weight changes of the chip during the binding process | Sample is fixed on the chip. The sample preparation has to be careful to avoid the damage of the active structure of the sample and produce non-characteristic binding. The detection limit is on the order of 10 pg/mL. Sample amount is micrograms to sub-micrograms Each test takes several minutes Get reaction information of binding kinetics and concentration change during binding | Antigen-antibody affinity test with K_D value at 10^{-9} – 10^{-3} M |
| Microscale Thermophoresis (MST) ^[22] | A temperature gradient is induced by an infrared laser. By combining the precise fluorescence detection and sensitive thermophoresis, MST detects the molecular interactions | No need to fix the sample, but the sample has to be fluorescent labeled. Sample amount is a few microliters at nanomolar concentration. The ligand concentration is a few mg/mL Each test takes several minutes Energetic detection of affinity. The affinity of the antigen and antibody can be detected in the natural binding state | Antigen-antibody affinity test with K_D value below 10^{-9} M |
| Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) ^[14,27] | By applying the autocorrelation analysis to the fluorescence signal fluctuations during the binding reaction, FCS calculates intermolecular affinity | No need to fix the sample, but the sample has to be fluorescent labeled. Sample concentration is pM-nM. Sample amount is tens of microliters Each test takes several seconds The affinity of the antigen and antibody can be detected in the natural binding state | Antigen-antibody affinity test with K_D value at 10^{-12} – 10^{-7} M |

除 ITC 外,其他三种均属于光学检测技术,其中基于荧光技术的 MST 和 FCS 的灵敏度最高。虽然四种技术均可以用于检测生物分子亲和力,以及分子结合反应的解离常数和热力学/动力学常数,但是在样品制备、检测时间等方面存在差异。

1) 样品制备。ITC 无需对受测分子进行化学修饰或荧光标记,但需要大量纯化样品且对抗体浓度要求也最高;但仪器和耗材费用较低。SPR 需要检测相互作用分子对的一方通过化学修饰固定在纳米金膜或玻璃表面,且仪器和耗材价格较高。FCS 和 MST 均需要对受测分子进行特异性荧光标记,因此荧光分子溶液、细胞裂解液等复杂生物溶液均可作为检测的反应体系。但是 MST 要求样品在检测过程中尽量不出现聚集,而 FCS 对此没有要求,FCS 通过样品的荧光亮度和特征扩散系数,可以对样品中受测分子的聚集状态进行分析。

2) 样品用量。ITC 样品用量最高,FCS 用量最少仅需要几十微升。

3) 检测时间。ITC 检测时间最长 2~2.5 h,而其他三种方法均可在几十秒到几分钟完成抗原抗体亲和力检测。

4) 灵敏度。SPR 不适用于小分子的相互作用研究,因为无法产生足够大的折光系数变化。FCS 对样品浓度要求最低,可以检测 pM~nM 浓度的样品,且检测灵敏度最高($\sim 10^{-12}$ M)。FCS 可以定量分析受测分子的绝对浓度和流体动力学半径,根据单个分子的荧光变化情况计算样品浓度,以及荧光标记的生物分子大小等信息。但 MST 无法检测单个分子的荧光变化情况。

综合以上对比,FCS 技术在生物检测、生物与医学研究、药物研发、临床诊断、食品以及环境分析等方面具有广阔的应用前景。

本实验也证明 FCS 可以方便地用于抗原与免疫复合物的鉴别,实现抗原抗体之间亲和力的简便快速检测,但是也存在局限性。在 FCS 分析中为了区分受测溶液中处于结合态(结合抗原)和未结合态(游离抗原)荧光标记物,理论上要求这两种组分的扩散系数需相差至少 1.6 倍,即分子量比要大于 4,才能使检测这两种组分的自相关曲线有明显差异^[27]。因此,为验证算法性能,我们选择两种结合态和游离态抗原的分子量之比相差较大的样品。其中,Alexa 647 抗原结合态和游离态的分子量之比为 120(151 kDa/1250),GFP 抗原结合态和游离态的分子量之比仅为 6.5(177 kDa/27 kDa)。对两种

样品的数据分析结果显示当抗原浓度固定,随着抗体浓度的增加,抗原-抗体的结合比例也逐渐增加,导致抗原的 τ_D 值增大,FCS 自相关曲线逐渐右移直至抗原-抗体的结合达到饱和。对不同抗体浓度下得到的抗原抗体结合比值进行拟合,可以得到溶液中抗原抗体免疫反应的解离常数。MEM 拟合得到的抗原分子的 τ_D 分布曲线也反映出抗原-抗体结合程度随抗体浓度的变化。而在实际应用中,天然抗原分子量通常大于 200 kDa,而一般抗体分子量为 150 kDa。因此,当抗原抗体分子量比值不高于理论值(<4)时,FCS 自相关技术无法有效测出抗原-抗体亲和力。下一步我们会继续探讨在这种情况下,如何对抗原和抗体间亲和力进行定性和定量检测,例如开展荧光互相关技术(FCCS)在此领域的应用^[15];同时我们会进一步优化 MEM 分析算法的性能。

5 结 论

本文在荧光相关光谱技术的基础上,实现对抗原抗体之间亲和力的简便快速检测。以 Alexa647 荧光分子和 GFP 荧光蛋白抗原及抗体反应为研究对象,对测得的自相关数据进行数学模型的拟合得出解离常数,继而对抗原抗体亲和力强弱进行评估;使用 MEM 方法对抗原抗体混合溶液的自相关曲线进行分析,可以获取不同抗体浓度下混合溶液中不同组分(游离抗原和结合抗原)的特征扩散相关时间分布,实现对溶液中抗原抗体结合过程的评估。针对实验分析过程中遇到的问题,例如数据导入、数学模型拟合等,我们自主设计开发一款简便使用的软件(Molecular Interaction)以提高数据分析的准确性和可重复性。在现有工作的基础上,下阶段将着重解决在抗原与抗体分子量相当的情况下,如何检测抗原抗体亲和力。

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Tian Y P. Status and development of immunolabeling technology[J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2013, 7(8): 3536-3539.
刘瑶, 田亚平. 免疫标记技术的现状和发展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(8): 3536-3539.
- [2] Wang C, Wu J, Zong C, et al. Chemiluminescent immunoassay and its application[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(1): 3-10.
汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法与应

- 用进展[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 3-10.
- [3] Xue P, Zhang Z J, Zhang X M. Chemiluminescent analysis of carcinoembryonic antigen in serum samples [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(1): 95-98.
薛盼, 章竹君, 张晓明. 化学发光免疫分析检测人血清中的癌胚抗原[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 95-98.
- [4] Zhang P, Zhou Y C, Cheng Y N, et al. Advances in the application of fluorescence polarization immunoassay in pathogen detection[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2019, 41(2): 96-99.
张萍, 周玉成, 程悦宁, 等. 荧光偏振免疫分析技术在病原检测中的应用研究进展[J]. 特产研究, 2019, 41(2): 96-99.
- [5] Wei Y N, Li Y Z, Chang W B, et al. Application of fluorescence resonance energy transfer technique in bioanalysis [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1998, 26(4): 477-484.
魏亦男, 李元宗, 常文保, 等. 荧光共振能量转移技术在生物分析中的应用[J]. 分析化学, 1998, 26(4): 477-484.
- [6] Liu P, Xin X L, Geng M Y. Application of surface plasmon resonance technology on immunology territory[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(9): 1749-1752.
刘萍, 辛现良, 耿美玉. SPR技术在免疫学研究中的应用[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(9): 1749-1752.
- [7] Shuai Y H, Qi P, Li Y, et al. Detection of interaction between peach-gum polysaccharides and galectin-3 via surface plasmon resonance imaging[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2019, 56(9): 092402.
帅玉环, 齐攀, 李莹, 等. 表面等离子体共振成像检测桃胶多糖与半乳糖凝集素-3的相互作用[J]. 激光与光电子学进展, 2019, 56(9): 092402.
- [8] Peng Y, Shi C J, Zhu Y M, et al. Qualitative and quantitative analysis algorithms based on terahertz spectroscopy for biomedical detection [J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46(6): 0614002.
彭滢, 施辰君, 朱亦鸣, 等. 太赫兹光谱技术在生物医学检测中的定性定量分析算法[J]. 中国激光, 2019, 46(6): 0614002.
- [9] Zhu Y M, Shi C J, Wu X, et al. Terahertz spectroscopy algorithms for biomedical detection[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(1): 0130001.
朱亦鸣, 施辰君, 吴旭, 等. 生物医学检测中太赫兹光谱技术的算法研究[J]. 光学学报, 2021, 41(1): 0130001.
- [10] Tetin S Y, Swift K M, Matayoshi E D. Measuring antibody affinity and performing immunoassay at the single molecule level [J]. Analytical Biochemistry, 2002, 307(1): 84-91.
- [11] Dong C Q, Zhang P D, Bi R, et al. Characterization of solution-phase DNA hybridization by fluorescence correlation spectroscopy: rapid genotyping of C677T from methylenetetrahydrofolate reductase gene [J]. Talanta, 2007, 71(3): 1192-1197.
- [12] Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, et al. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy [J]. Analytical Biochemistry, 2007, 370(2): 131-141.
- [13] Hazlett T L, Ruan Q Q, Tetin S Y. Application of fluorescence correlation spectroscopy to hapten-antibody binding[M]//Nienhaus G U. Protein-ligand interactions. Methods in molecular biologyTM. New York: Humana Press, 2005, 305: 415-438.
- [14] Tetin S Y, Ruan Q, Skinner J P. Studying antibody-antigen interactions with fluorescence fluctuation spectroscopy [J]. Methods in Enzymology, 2013, 519: 139-166.
- [15] Wang Z L, Kang N, Liang Y Q, et al. CorTectorTM SX100: principles and applications of a bench-top fluorescence correlation spectrometer[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2018, 45(11): 1166-1180.
王柱楼, 康宁, 梁艳琴, 等. CorTectorTM SX100: 一款桌面式荧光相关光谱仪的原理和应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2018, 45(11): 1166-1180.
- [16] Davis L M, Williams P E, Ball D A, et al. Data reduction methods for application of fluorescence correlation spectroscopy to pharmaceutical drug discovery[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2003, 4(6): 451-462.
- [17] Xie C, Dong C Q, Ren J C. Study on homogeneous competitive immune reaction by fluorescence correlation spectroscopy: using synthetic peptide as antigen[J]. Talanta, 2009, 79(3): 971-974.
- [18] Hess S T, Huang S H, Heikal A A, et al. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review [J]. Biochemistry, 2002, 41(3): 697-705.
- [19] Dertinger T, Pacheco V, von der Hocht I, et al. Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements[J]. Chem Phys Chem, 2007, 8(3): 433-443.
- [20] Tetin S Y, Ruan Q, Saldana S C, et al. Interactions

- of two monoclonal antibodies with BNP: high resolution epitope mapping using fluorescence correlation spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(47): 14155-14165.
- [21] Kapusta P. Absolute diffusion coefficients: compilation of reference data for FCS calibration[EB/OL]. (2010-07) [2010-07]. <https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/dual-focus-fluorescence-correlation-spectroscopy-2ffcs>.
- [22] Jerabek-Willemsen M, Wienken C J, Braun D, et al. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis[J]. *Assay and Drug Development Technologies*, 2011, 9(4): 342-353.
- [23] Velazquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 186-191.
- [24] Wang J, Wang Q, Song S X. Research progress of surface plasmon resonance technology in drug discovery[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2020, 29(7): 504-513.
- [25] Zhou M, Li Q, Wang R X. Current experimental methods for characterizing protein-protein interactions[J]. *ChemMedChem*, 2016, 11(8): 738-756.
- [26] Nguyen H H, Park J, Kang S, et al. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications[J]. *Sensors*, 2015, 15(5): 10481-10510.
- [27] Bacia K, Kim S A, Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy in living cells[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(2): 83-89.