DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230749



基于光学检测的分子间相互作用表征技术研究进展

封加栋,陆 峰^{*} 海军军医大学(第二军医大学)药学系药物分析学教研室,上海 200433

[摘要] 分子间相互作用的表征技术是阐明细胞生物学事件、了解疾病发生机制、辅助药物研发的有力手段。 近年来,分子间相互作用的表征技术发展迅速,不断向着高灵敏度、高通量、极短时间、极低检测限的方向发展。本 文对表面等离子体共振、生物膜干涉、背向散射干涉以及微量热泳动这4种常见的、基于光学检测的分子间相互作 用表征技术的原理、特点及最新应用进展进行了综述与比较,为分子间相互作用表征技术的选择提供参考。

[关键词] 分子间相互作用; 表面等离子体共振; 生物膜干涉; 背向散射干涉; 微量热泳动

[引用本文] 封加栋,陆峰.基于光学检测的分子间相互作用表征技术研究进展[J].海军军医大学学报,2024,45(7): 872-879. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230749.

Optical detection-based characterization techniques of molecular interactions: research progress

FENG Jiadong, LU Feng*

Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] Characterization techniques of molecular interactions are powerful methods to elucidate cell biological events, understand the pathogenesis of diseases, and assist drug development. In recent years, the characterization techniques of molecular interactions have been developing rapidly and have been constantly moving toward high sensitivity, high throughput, extremely short time, and extremely low detection limits. This review summarizes the principles, characteristics, and latest application progress of 4 common optical detection-based characterization techniques of molecular interactions, including surface plasmon resonance, biolayer interferometry, back-scattering interferometry, and microscale thermophoresis, so as to provide a reference for the selection of characterization techniques of molecular interactions.

[Key words] molecular interactions; surface plasmon resonance; biolayer interferometry; back-scattering interferometry; microscale thermophoresis

[**Citation**] FENG J, LU F. Optical detection-based characterization techniques of molecular interactions: research progress[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(7): 872-879. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230749.

蛋白质与核酸都是重要的生物大分子,它们可 以与很多外源性的小分子、离子发生相互作用。从 分子层面探讨生物大分子之间以及生物大分子与小 分子之间的相互作用,对于认识生物分子的基本构 造与功用、指导药物结构设计等都具有十分重要的 意义。

传统的分子相互作用研究方法有很多,比如酶 联免疫吸附、荧光共振能量转移、质谱等检测蛋 白质相互作用的研究技术,染色体免疫共沉淀等检 测核酸相互作用的技术。然而,多数技术都属于终 点标记的方法,并且只能定性检测有无相互作用, 不能反映结合力的强弱。随着研究的不断深入, 基于光学检测的分析方法逐渐进入公众的视野,其 具有超高的灵敏度、较少的样品量、可定量检测 结合力及原位的检测方法等优势,这对于生命科学 的研究大有裨益。主流的基于光学检测的相互作 用分析技术有表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术、生物 膜干 涉(biolayer interferometry, BLI)技术、背向散射干涉(backscattering interferometry, BSI)技术、微量热泳动

[[]收稿日期] 2023-12-19 [接受日期] 2024-03-15

[[]基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82273894). Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (82273894).

[[]作者简介] 封加栋,硕士生. E-mail: jiadongfeng@smmu.edu.cn

^{*}通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871260, E-mail: fenglu@smmu.edu.cn

(microscale thermophoresis, MST)技术,本文对 这4种分子相互作用表征技术的原理、优缺点及应 用进行综述与比较,为分子间相互作用表征技术的 选择提供参考。

1 SPR 技术

1.1 SPR 的技术原理与方法特点 SPR 技术是利 用光在不同介质中产生消逝波后与等离子波产生 共振,进而构建分子间相互作用的生物传感分析技 术。1902年,Wood^[1]首先发现了衍射光栅上的一 种反常衍射现象,这是由于表面等离子体波激发导 致。1957年,Ritchie^[2]从理论上证实了金属表面 等离子体激发的存在,SPR 假说取得重大进展。 1982年,Nylander等^[3]证明了 SPR 在气体检测和 生物传感器中的应用,为进一步测量生物分子间相 互作用奠定了基础^[46]。

SPR 技术的检测原理如图 1A 所示, 平面偏振 光在全内反射条件下撞击金属芯片,导致金属中的 自由电子产生表面等离子体激元。如图 1B 所示, SPR 检测过程主要分为6个步骤,首先配体即生物 分子通过偶联反应被固定在生物传感芯片表面,获 得初始基线: 而后分析物被注入并流过传感器芯片 的表面,分子间相互作用的发生引起芯片表面质量 浓度的变化进而导致光折射率的变化,这种变化可 以通过共振单位(response unit, RU)进行量化和 表征, RU 增大对应着结合事件的发生; 当结合和 解离达到平衡时, RU 也维持在一个稳定值; 接着 停止注入分析物, 解离阶段开始, 分析物在缓冲液 的冲洗下从配体的结合位点逐步解离,此步骤对应 着RU的逐渐降低;再生步骤就是将分析物完全从 配体结合位点去除,随后再次校正,使RU回到基 线水平,为新的检测周期做好准备。



图 1 表面等离子体共振(SPR)技术的检测原理(A)及表征方法(B)

SPR 在检测时响应速度很快, 且样品量比较 少, 待分析物也无需标记, 通过实时、动态监测 RU 的变化, 从结合、解离反应中得到分子间的 结合常数 (association constant, K_a)、解离常数 (dissociation constant, K_d)以及平衡解离常数 (dissociation equilibrium constant, KD),反映分 子间作用力的大小及特异性等信息。SPR 具有高通 量检测的能力, 检测浓度可低至 pmol/L。

1.2 SPR 技术在分子间相互作用检测中的应用 近年 来 SPR 已发展成为行业内的金标准,在分子间相互 作用领域发挥了举足轻重的作用。

1.2.1 检测同源分子间的相互作用 如Nan等^[7]利用 SPR 技术揭示 1 型跨膜蛋白 CD147 直接与 Ran 结合蛋白 1 (Ran-binding protein 1, RanBP1)发生 相互作用,证据显示 CD147 能够调节癌细胞的迁

移^[8]。而 CD147 与 RanBP1 的结合导致了紫杉醇 治疗癌症时的耐药性,表明 CD147 是紫杉醇敏感 性的关键调节因子,对癌症化疗具有重要意义。又 如 Jarczewska 等^[9]利用 SPR 技术测定了单链脱氧 核糖核酸(single-stranded deoxyribonucleic acid, ssDNA)和肽核酸(peptide-nucleic acid, PNA) 探针与 miRNA 的相互作用。感染部位的巨噬细胞 被认为是预防脓毒症发展的潜在治疗靶点,而 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1/核因子 E2 相关因子 2 (Kelch-like epoxy chloropropane-associated protein 1/ nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Keap1/Nrf2) 系统是巨噬细胞抗菌活性的关键调节剂,Wang 等^[10]利用 SPR 技术验证了一种独特的七次甲基染 料 IR-61 能够直接抑制 Keap1/Nrf2 蛋白质间相互作 用并激活 Nrf2,从而增强巨噬细胞的抗菌功能。 1.2.2 检测异源分子间的相互作用 贺毅等^[11]首 先利用分子对接对 3 000 多种化合物与白细胞介 素 15 受体α(interleukin 15 receptor α, IL-15Rα) 进行模拟对接,并根据其特异性结合情况予以打 分。在此基础上,再利用 SPR 技术测量化合物与 IL-15Rα 重组蛋白的亲和力,最终筛选出分子量为 556.6 的甘西鼠尾新酮 A(neoprzewaquinone A, Neo)与IL-15Rα的特异性结合亲和力最高,结果 表明 Neo 可能是一种新的以 IL-15Rα 为靶点的潜在 活性药。Zhou 等^[12]利用 SPR 技术测定了加热过程 中的肌原纤维蛋白(myofibrillar protein, MP)和 β-胡萝卜素(beta-carotene, β-C)之间的相互作用, 结果表明,在 37 ℃左右 MP 和 β-C 之间的相互作 用从范德华力变为了疏水相互作用,为β-C 输运系 统合适温度的选择提供了重要依据。

作为 SPR 的核心部件,其传感器针对不同检测 目的采取了不同的设计,如半导体、金属薄膜、纳 米材料等组成的无机界面传感器,硫醇、聚乙二醇 等涂覆的有机界面传感器,以及核酸、抗体等构成 的生物界面传感器等。这些设计有助于提高检测的 灵敏度和选择性,在用于复杂体系检测时可以最大 限度减少样品在等离子体表面的污染现象^[13]。

2 BLI 技术

2.1 BLI的技术原理与方法特点 BLI技术是一种实时的光学生物传感技术,同 SPR 技术一样,用于检测无标记生物分子间的相互作用^[14]。该方法基于光干涉的原理,使用光纤生物传感器来收集信号。这些信号随着分子间相互作用的发生,实时反映传感器层光学厚度的变化。在此系统中,分析物与固定在传感器表面的配体相互作用形成单分子层,这会导致反射光的干涉谱按一定比例移动。

BLI技术的检测过程主要分为5个步骤,如 图2所示,首先是将生物传感器浸入到缓冲液中进 行平衡;接着将传感器浸入到已知浓度的固化溶液 中,溶液中经修饰的生物分子结合到生物传感器的 表面,使其表面膜层厚度增加;接着将固化完已知 浓度生物分子的生物传感器浸入缓冲液中做基线; 然后再将该生物传感器浸入到含有待测分析物的样 品溶液中,由于待测分析物与生物分子的特异性结 合而导致膜层厚度增加;最后将结合分析物的生物 传感器浸入到缓冲液中进行解离,分析物从生物传 感器表面脱落导致膜层厚度减少^[15]。



图 2 生物膜干涉(BLI)技术的检测原理及表征方法^[15] A:检测步骤;B:分析物承载台;C:检测结果表征

BLI通过对光干涉信号的实时监测即可得到待 测样品的K_a、K_d、KD等信息,具有操作简单、检 测时间短、样品消耗量少、无需标记等优点,广泛 应用于生物分子间相互作用的分析和快速检测,检 测浓度可低至 pmol/L。

2.2 BLI技术在分子间相互作用检测中的应用 自2006年 产业化以来,BLI技术已广泛应用于各类生物体系 的测定,可以实现无标记分子间相互作用分析的实 时检测。

2.2.1 检测同源分子间的相互作用 Dubrow 等^[16] 以甲型流感病毒的 NS1 和磷酸肌醇 3 激酶为模型 蛋白,利用在 BLI 中加入蔗糖等糖类作为阻滞剂,

测量蛋白质之间的弱相互作用。BLI 在定量分析蛋 白质之间的相互作用时,有时会存在分析物和生物 传感器之间的非特异性结合(nonspecific binding,

NSB),特别是在测量弱相互作用时,NSB对BLI的准确性影响较大,糖类尤其是蔗糖是优秀的NSB阻滞剂。Neira等^[17]利用BLI测量了组氨酸磷酸载体蛋白(histidine phosphocarrier protein,HPr)前38个N端残基(HPr38)、前58个N端残基(HPr58)及前70个N端残基(HPr70)这3种蛋白质与天蓝色链球菌的N端结构域等蛋白质的相互作用,其结果与完整的HPr和同种蛋白质的结合常数处于一个量级。

2.2.2 检测异源分子间的相互作用 Guo 等^[18]利 用BLI技术证实了用于治疗炎症性疾病的传统中药 配方二妙散中的活性化合物槲皮素、汉黄芩素和 芸香碱与影响风湿性关节炎的核心靶蛋白 TNF-α、

IL-6及IL-1β存在相互作用,进而证明二妙散通过抑制炎症细胞因子在抗炎中发挥重要作用。金黄色葡萄球菌被认为是一种常见的食源性病原微生物,通常会引起食物中毒和各种传染病^[19]。C54A 突变体LysGH15能够特异性地识别和结合金黄色葡萄球菌, Liu 等^[20]利用LysGH15作为受体结合BLI建立了 一种检测金黄色葡萄球菌的新方法,可以直接、快速、准确、高特异性地检测金黄色葡萄球菌,为食品安全及相关领域提供了高效、可靠的诊断工具。

BLI技术可应用于蛋白质与蛋白质的相互作用 分析、抗体筛选、核酸与蛋白相互作用分析、抗体 与小分子药物相互作用分析等多个方面^[21-24]。相 较于传统的检测技术,BLI技术无需荧光标记或发 光基团即可直接检测,能最大程度保证实验的真实 性^[25];相较于 SPR 技术,BLI 技术具有高通量、 成本低、易维护等优点。

3 BSI 技术

3.1 BSI的技术原理与方法特点 BSI技术是通过 监测通道内光折射率的变化测定分子间相互作用的 技术。He-Ne激光照射到含有待测物质的微流体通 道上,在通道的内外界面会产生多角度的反射和折 射,在环绕管轴 360°的范围内产生干涉条纹,称之 为BSI。当通道内液体的折射率改变时,干涉条纹 会相对于初始位置产生移动,移位的大小可用于确 定分子间相互作用。

BSI技术的检测过程如图 3 所示,激光器发出 的激光经镜面反射后射入到通有待测溶液的石英 毛细管中,激光在毛细管内外界面发生多次反射、 折射,其中一部分的反射和折射光再经过镜面发射 到电荷耦合器件(charged-coupled device, CCD) 线阵处,这些反射和折射的光在 CCD 处发生干涉 并产生干涉条纹。当毛细管内的液体发生相互作 用时,其折射率会发生改变,CCD 处的干涉条纹也 会随之发生改变,获取条纹移动对应的相位值的变 化,进而获得一系列的曲线,从而确定分子相互作 用的相关信息^[26]。

BSI技术是目前唯一可以以无标记方式确定结 合亲和力的技术,它不依赖于热变化或表面内固 定,可以用于包括有机溶剂在内的许多不同介质 中,此外,BSI技术的检测下限明显低于其他自由 溶液技术(可低至pmol/L),可以在生理浓度范围 内进行检测。然而,BSI对实验条件要求苛刻,易 受温、湿度等的影响,目前为止还没有实现仪器的 商业化。

3.2 BSI技术在分子间相互作用检测中的应用 BSI 技术可在生理相关条件下进行无标记和无固定的相 互作用分析,灵敏度高且体积小。

3.2.1 检测同源分子间的相互作用 Abbas 等^[27]利用 BSI 技术测量神经元钙传感器恢复素与其目标 G 蛋白偶联受体激酶 1 (G protein-coupled receptor kinase 1, GRK1)的相互作用,得到的结果与等温量热滴定法及圆二色谱法获得的结果一致。Jepsen 等^[28]建立了 BSI 系统来测量蛋白 A 和 IgG 之间的相互作用,证明 BSI 具有一定的温度和时间稳定性。



图 3 BSI 技术的检测原理(**A**)及表征方法(**B**)^[26] BSI:背向散射干涉;CCD:电荷耦合器件;PDMS:聚二甲基硅氧烷.

3.2.2 检测异源分子间的相互作用 Haddad 等^[29]利 用BSI技术测量乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)与几种已知的新型抑制剂之间的相互作 用,结果发现,在没有底物的情况下即可量化 AChE与抑制剂之间的相互作用;通过BSI的结合 数据与IC₅₀进行比较,可以区分竞争性、非竞争性 等不同类型的抑制剂。传统检测 AChE 相互作用的 方法侧重于底物水解的间接测量,且需要探针和繁 琐的程序,而 BSI 技术可实现简单、无标记的直接 测量。除此以外, Baksh 等^[30]利用 BSI 技术测量了 多种物质的结合相互作用,包括胰蛋白酶-抗胰蛋 白酶、胰蛋白酶-对氨基苯甲脒、抗凝血酶-肝素 以及蛋白 A-IgG,所得的结合曲线与K_d值及其他 经典方法得到的结果一致。

BSI 技术虽然尚未商用,但可以相对容易地用标准光学部件自行搭建,且可用于包括有机溶剂在内的许多不同介质中。BSI 技术采用了特殊设计的微流体通道,而当前药物发现和优化的重点也已从传统方法转向快速微流体筛选^[31],BSI 作为量化分子间相互作用的生物传感平台,将在药物发现中发挥重要作用。

4 MST 技术

4.1 MST 的技术原理与方法特点 MST 技术是一种利用荧光实时监测在温度梯度的环境中分子在 毛细管内定向泳动,进而检测分子间相互作用的技术。1856年,Ludwig首次发现了热泳动现象,又称 为 Soret 效应^[32],它描述了分子在温度梯度内诱导 产生的热量和定向运动。2010年,德国 NanoTemper Technologies 公司开发出第1台商用微量热泳 动仪^[33]。

MST 技术的检测过程如图 4 所示,在初始状态下红外激光是关闭的,荧光分子在整个毛细管中均匀分布,在这个阶段采集到的稳定荧光信号称为初始荧光。当红外激光器被打开时毛细管的局部区域立即被加热,在热电导入之前荧光强度会剧烈下降,这种现象被称为温度跃迁(temperature jump,T-Jump)。随后,荧光分子发生热泳运动,热区的荧光信号会减弱,直到在质量扩散效应的反作用下达到稳定状态。这一过程通常持续 30 s,被称为热浸。最后,红外激光器关闭,荧光分子就会扩散回来,荧光强度又会增加,形成典型的 MST 曲线。不同浓度的配体对荧光分子的热电泳性有不同的影响,从而产生一系列 MST 特性曲线,T-Jump 和热泳信号可以分别拟合以获得结合亲和力值^[34]。

MST 主要通过监测在微观温度梯度下配体结 合过程中由于大小、表面电荷和水化层的微小变化 而引起的荧光分子的热电性变化,定量地分析生物 分子间的相互作用。通过将荧光检测的精确性和热 泳动的灵敏性结合起来,MST 技术提供了一种灵 活、稳定、快速的检测方法,不受分子大小、种类 的影响,可检测低至 pmol/L 浓度的分子间相互作 用。MST 技术是目前应用于分子间相互作用分析 的一项最新的超灵敏技术。

4.2 MST 技术在分子间相互作用检测中的应用 MST 技术是一种能够灵敏、高通量、快速地定量分析分子间相互作用的新兴技术,是近 10 年来研究分子 间相互作用强有力的工具。



图 4 微量热泳动(MST)的检测原理(A)及表征方法(B)^[34]

4.2.1 检测同源分子间的相互作用 Zhang 等^[35] 将 5(6)-羧基荧光素标记到活化T细胞核因子 c1 (nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1)、 Na⁺/H⁺交换器1(Na⁺/H⁺ exchanger 1, NHE1)、 非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV) 编码的蛋白抑制剂 A238L 和钙调磷酸酶调节蛋 白1(regulator of calcineurin 1, RCAN1)短肽的 N末端,而后利用 MST 技术详细测量被标记的多 肽与钙调磷酸酶之间的相互作用,并得到很好的 结果,对于了解生命活动的调节具有重要意义。 又 如 Jordan 等^[36] 以 小 RNA41(small RNA41, sRNA41)及其天然靶标 mRNA-MM2089 为例,用 MST 表征其结合亲和力,结果显示 MST 技术可以 快速、准确地表征 RNA 之间的相互作用。

4.2.2 检测异源分子间的相互作用 Huang 等^[37]利用 MST 技术研究了牛乳铁蛋白与二氢杨梅素、杨梅素 2 种黄酮化合物的结合作用,发现杨梅素对于牛乳铁蛋白有更强的亲和力,可以诱导牛乳铁蛋白更多的构象变化。Yu 等^[38]以镉离子和黄曲霉素 B1 适配体为研究对象,比较在适配体上修饰不同的荧光基团以及将荧光基团修饰在适配体的不同位置,导致 2 个相同的异源分子在同一条件下的 MST 出现不同的测量结果,为合理设计 MST 方法提供了基础。

近年来, MST 技术被成功地用于分析各种生物分子相互作用, 从蛋白质与蛋白质之间的相互作用、蛋白质与多肽、核酸、小分子之间的相互作用, 到小分子之间的相互作用等^[3943]。MST 根据 是否需要荧光基团标记分为 2 种类型, 一种类型的 MST 需要用荧光基团标记,另一种系统依赖于紫 外范围内芳香族氨基酸的固有荧光。这 2 个系统 都通过红外激光的热效应来检测分子的运动,各有 其优点和缺点,无标记的 MST 可以使用未标记的 天然蛋白质,然而许多分析物在紫外线范围内发出 的荧光可能会干扰 KD 值的准确测定;相比之下, 标记的 MST 允许使用荧光标记的探针连接到配体 上,在可见光范围内具有可测量的光密度而不是紫 外线,从而避免了来自分析物的信号干扰。

5 小 结

本文介绍了 SPR、BLI、BSI、MST 这 4 种常 用的基于光学检测的分子间相互作用表征技术。其 中 SPR、BLI 及 BSI 技术都是直接检测分子间相互 作用后引起的光学效应的变化,MST 则是应用荧 光作为检测手段来监测局部分子间发生相互作用时 的热运动。相较于前 3 种技术,MST 技术可以测 量天然状态环境中的分子相互作用,结合毛细管的 使用大大降低了样品的消耗量,实现了高通量、短 时间的测定。这 4 种技术在检测原理上大相径庭, 各具特点,可以提供多维度的数据信息,也都存在 着优点与不足。

SPR 技术可以实时、动态、免标记地完成对 分析物的检测,检测浓度可低至 pmol/L,由于其生 物传感器具有高特异性,可以检测其他技术难以研 究的高度动态的复合物,但获得一个样品的亲和力 值需要 1~2 h,且对于低浓度和存在非特异性结合 的样品检测准确度不高。BLI 技术对分析物的纯度 要求不高,可以检测多个浓度样品的结合信息,它 获得一个样品的亲和力值同样需要 1~2 h,适合大 量样品的筛选,对 SPR 技术起到了非常好的补充作 用,但其检测范围有限,试剂消耗量较大,对于弱 相互作用检测准确度不高。BSI 技术所需的样品量 少,有极高的灵敏度,只是其极易受温度变化的影 响,有的待测物质产生的光热效应会引起折射率的 变化,进而影响测量结果的准确性。MST 技术对 待测分子的大小和分子量无任何限制,且可以在血 浆、细胞裂解液等几乎任何缓冲液中进行检测,同 时其分析物的用量少(仅需要几微升),约 20 min 即可获得亲和力值,检测浓度可低至 pmol/L,比较 适合微量样品的表征分析,但其检测成本较高,仪 器造价昂贵。

综上所述,在研究不同的目标分子时选择一种 或几种适宜的分子间相互作用检测技术进行交叉验 证,多维度地去表征分子间相互作用,有助于了解 药物转运和代谢过程,为药物设计和筛选提供有价 值的信息,进而指导药物设计,推动医药研究发展。

[参考文献]

- WOOD R W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum[J].
 Proc Phys Soc London, 1902, 18(1): 269-275. DOI: 10.1088/1478-7814/18/1/325.
- [2] RITCHIE R H. Plasma losses by fast electrons in thin films[J]. Phys Rev, 1957, 106(5): 874-881. DOI: 10.1103/physrev.106.874.
- [3] NYLANDER C, LIEDBERG B, LIND T. Gas detection by means of surface plasmon resonance[J]. Sens Actuat, 1982, 3: 79-88. DOI: 10.1016/0250-6874(82)80008-5.
- [4] LIEDBERG B, NYLANDER C, LUNSTRÖM I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing[J]. Sens Actuat, 1983, 4: 299-304. DOI: 10.1016/0250-6874(83)85036-7.
- LIEDBERG B, NYLANDER C, LUNDSTRÖM I. Biosensing with surface plasmon resonance: how it all started[J]. Biosens Bioelectron, 1995, 10(8): i-ix. DOI: 10.1016/0956-5663(95)96965-2.
- [6] HOMOLA J, YEE S S, GAUGLITZ G. Surface plasmon resonance sensors: review[J]. Sens Actuat B Chem, 1999, 54(1/2): 3-15. DOI: 10.1016/s0925-4005(98)00321-9.
- [7] NAN G, ZHAO S H, WANG T, et al. CD147 supports paclitaxel resistance via interacting with RanBP1 [J]. Oncogene, 2022, 41(7): 983-996. DOI: 10.1038/s41388-021-02143-3.
- [8] CUI H Y, WANG S J, MIAO J Y, et al. CD147 regulates cancer migration via direct interaction with Annexin

A2 and DOCK3- β -catenin-WAVE2 signaling[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 5613-5629. DOI: 10.18632/ oncotarget.6723.

- [9] JARCZEWSKA M, BOJARSKI W, MAJEWSKA A, et al. Studies on the application of single-stranded DNA and PNA probes for electrochemical detection of miRNA 141 [J]. Bioelectrochemistry, 2023, 150: 108363. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108363.
- [10] WANG Y, TANG B, LI H, et al. A small-molecule inhibitor of Keap1-Nrf2 interaction attenuates sepsis by selectively augmenting the antibacterial defence of macrophages at infection sites[J]. Ebio Medicine, 2023, 90: 104480. DOI: 10.1016/J.EBIOM.2023.104480.
- [11] 贺毅,王海霞,刘敏,等.基于分子对接和表面等离子体共振技术筛选IL-15Rα小分子抑制剂[J].生理学报,2023,75(5):623-628. DOI: 10.13294/j.aps.2023. 0064.
- [12] ZHOU T, LIU H, DIAO X, et al. Molecular interaction between myofibrillar protein and beta-carotene during heating[J]. Food Chem, 2024, 435: 137588. DOI: 10.1016/ j.foodchem.2023.137588.
- [13] D'AGATA R, BELLASSAI N, SPOTO G. Exploiting the design of surface plasmon resonance interfaces for better diagnostics: a perspective review[J]. Talanta, 2024, 266: 125033. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.125033.
- [14] CONCEPCION J, WITTE K, WARTCHOW C, et al. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2009, 12(8): 791-800. DOI: 10.2174/138620709789104915.
- [15] 张艳,姜丽艳,张晓光,等.生物膜干涉技术在生物 分子间相互作用检测中的应用[J].生命科学仪器, 2019,17(2):49-52,42. DOI: 10.11967/2019170408.
- [16] DUBROW A, ZUNIGA B, TOPO E, et al. Suppressing nonspecific binding in biolayer interferometry experiments for weak ligand-analyte interactions[J]. ACS Omega, 2022, 7(11): 9206-9211. DOI: 10.1021/ acsomega.1c05659.
- [17] NEIRA J L, PALOMINO-SCHÄTZLEIN M. Folding of the nascent polypeptide chain of a histidine phosphocarrier protein *in vitro*[J]. Arch Biochem Biophys, 2023, 736: 109538. DOI: 10.1016/j.abb.2023.109538.
- [18] GUO B, ZHAO C, ZHANG C, et al. Elucidation of the anti-inflammatory mechanism of Er Miao San by integrative approach of network pharmacology and experimental verification[J]. Pharmacol Res, 2022, 175: 106000. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.106000.
- [19] HUANG Z, YU X, YANG Q, et al. Aptasensors for *Staphylococcus aureus* risk assessment in food[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 714265. DOI: 10.3389/fmicb. 2021.714265.
- [20] LIU X, HUANG C, QIU C, et al. Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* using biolayer

interferometry technology combined with phage lysin LysGH15[J]. Biosens Bioelectron, 2022, 198: 113799. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113799.

- JUNG V, ROGER K, CHHUON C, et al. BLI-MS: combining biolayer interferometry and mass spectrometry[J]. Proteomics, 2022, 22(9): E2100031.
 DOI: 10.1002/PMIC.202100031.
- [22] NIKKHOI S K, LI G, ELEYA S, et al. Bispecific killer cell engager with high affinity and specificity toward CD16a on NK cells for cancer immunotherapy[J]. Front Immunol, 2023, 13: 1039969. DOI: 10.3389/fimmu. 2022.1039969.
- [23] EL-KAMAND S, DU PLESSIS M D, BREEN N, et al. A distinct ssDNA/RNA binding interface in the Nsp9 protein from SARS-CoV-2 [J]. Proteins, 2022, 90(1): 176-185. DOI: 10.1002/prot.26205.
- [24] ZHANG D, HAMDOUN S, CHEN R, et al. Identification of natural compounds as SARS-CoV-2 entry inhibitors by molecular docking-based virtual screening with bio-layer interferometry[J]. Pharmacol Res, 2021, 172: 105820. DOI: 10.1016/j.phrs.2021. 105820.
- [25] SANDERS M, MCPARTLIN D, MORAN K, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, surface plasmon resonance and biolayer interferometry for screening of deoxynivalenol in wheat and wheat dust[J]. Toxins, 2016, 8(4): 103. DOI: 10.3390/ toxins8040103.
- [26] BORNHOP D J, LATHAM J C, KUSSROW A, et al. Free-solution, label-free molecular interactions studied by back-scattering interferometry[J]. Science, 2007, 317(5845): 1732-1736. DOI: 10.1126/science.1146559.
- [27] ABBAS S, KOCH K W. Label-free quantification of direct protein-protein interactions with backscattering interferometry[J]. Bio Protoc, 2021, 11(24): e4256.
 DOI: 10.21769/BioProtoc.4256.
- [28] JEPSEN S T, JØRGENSEN T M, ZONG W, et al. Evaluation of back scatter interferometry, a method for detecting protein binding in solution[J]. Analyst, 2015, 140(3): 895-901. DOI: 10.1039/c4an01129e.
- [29] HADDAD G L, YOUNG S C, HEINDEL N D, et al. Back-scattering interferometry: an ultrasensitive method for the unperturbed detection of acetylcholinesteraseinhibitor interactions[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2012, 51(44): 11126-11130. DOI: 10.1002/anie.201203640.
- BAKSH M M, FINN M G. An experimental check of backscattering interferometry[J]. Sens Actuators B Chem, 2017, 243: 977-981. DOI: 10.1016/j.snb.2016. 12.055.
- [31] 梁怡萧,潘建章,方群.基于微流控技术的细胞水平 高通量药物筛选系统的研究进展[J].色谱,2021,39 (6):567-577.DOI:10.3724/SP.J.1123.2020.07014.
- [32] DUHR S, BRAUN D. Why molecules move along a

temperature gradient[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(52):19678-19682. DOI: 10.1073/pnas.0603873103.

- [33] WIENKEN C J, BAASKE P, ROTHBAUER U, et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis[J]. Nat Commun, 2010, 1: 100. DOI: 10.1038/ncomms1093.
- [34] BREITSPRECHER D, SCHLINCK N, WITTE D, et al. Aptamer binding studies using MicroScale thermophoresis[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1380: 99-111. DOI: 10.1007/978-1-4939-3197-2_8.
- [35] ZHANG N, LIU Y, SHI X, et al. Microscale thermophoresis and fluorescence polarization assays of calcineurin-peptide interactions[J]. Anal Biochem, 2022, 646: 114626. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114626.
- [36] JORDAN B, NICKEL L, SCHMITZ R A. Microscale thermophoresis to study RNA-RNA binding affinity[J]. Methods Mol Biol, 2022, 2516: 291-303. DOI: 10.1007/978-1-0716-2413-5_15.
- [37] HUANG J, HE Z, CHENG R, et al. Assessment of binding interaction dihydromyricetin and myricetin with bovine lactoferrin and effects on antioxidant activity[J].
 Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrose, 2020, 243: 118731. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118731.
- [38] YU H, ZHAO Q. Profiling additional effects of aptamer fluorophore modification on microscale thermophoresis characterization of aptamer-target binding[J]. Anal Chem, 2023, 95(46): 17011-17019. DOI: 10.1021/acs. analchem.3c03603.
- [39] AL-JUBAIR T, STEFFEN J H, MISSEL J W, et al. Characterization of human aquaporin protein-protein interactions using microscale thermophoresis (MST)[J]. STAR Protoc, 2022, 3(2): 101316. DOI: 10.1016/ j.xpro.2022.101316.
- [40] JIANG H, COLE P A. N-terminal protein labeling with N-hydroxysuccinimide esters and microscale thermophoresis measurements of protein-protein interactions using labeled protein[J]. Curr Protoc, 2021, 1(1): e14. DOI: 10.1002/cpz1.14.
- [41] EL ATAB O, SCHNEITER R. Measuring the interaction of sterols and steroids with proteins by microscale thermophoresis[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2704: 173-181. DOI: 10.1007/978-1-0716-3385-4_10.
- [42] JI C H, LEE M J, KIM S B, et al. Analyzing the interaction of arginylated proteins and Nt-Argmimicking chemical compounds to N-recognins[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2620: 253-262. DOI: 10.1007/ 978-1-0716-2942-0_27.
- [43] BERWANGER A, STEIN S C, KANY A M, et al. Disrupting Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) latent replication with a small molecule inhibitor[J]. J Med Chem, 2023, 66(15): 10782-10790. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c00990.

[本文编辑] 尹 茶