

(5112) 免疫試驗法—表面電漿共振

表面電漿共振(surface plasmon resonance, SPR)光學偵測為採用無標記分析(程序)研究生物分子交互作用一種有用之方法。市售 SPR 生物感測器(biosensor)整合這些分析，可從結合物件中收集即時與資訊豐富之數據。這些數據可被廣泛使用於基礎研究到藥物發現與開發，再到製造與品質管制(品管，quality control, QC)。SPR 可分析物件結合特性，檢品範圍從蛋白質、核酸及小分子到複雜混合物、脂囊泡、病毒、細菌及真核細胞。以 SPR 分析可釐清之典型品質與安全屬性包括：

- 交互作用專一性。
- 交互作用親和性。
- 動力結合參數。
- 熱力學參數。
- 分析物生物活性濃度。

本通則提供有關 SPR 原理與常見儀器構造所依據之物理學概述、可研究分子範圍，以及由分析目標決定之實驗設計的一般注意事項。生物膜干涉技術(biolayer interferometry, BLI)為另一種可用於研究生物分子交互作用之無標記分析光學技術，不在本通則範圍內。本通則所討論 SPR 之一般原則亦可能適用於 BLI。

1. 概論

1.1. 沿革

SPR 物理原理在 1900 年代早期首次被解釋，始於描述因表面電漿波激發所引起之繞射光柵光譜中非均勻分佈光；一系列具里程碑意義之實驗顯示在完全內反射條件下之表面電漿光學激發，且促進了 SPR 在化學與生物感知應用之詳細研究。從那時候開始，人們已認知到 SPR 對鑑別薄膜特徵與監測金屬界面相互作用之潛力，大量研究與開發也產生可定量評估大小分子結合交互作用之工具/儀器。

1.2. 物理學

SPR 為一種光學現象，當一導電薄膜被置入兩個具有不同折射率之介質間即會發生此現象。在許多市售工具/儀器中，兩種介質分別為玻璃與檢品溶液。儘管有其他導電金屬(例如：銀)被用在導電膜製備，目前覆加於玻璃之金屬層仍以金為優選金屬；此玻璃—金屬組件所形成固體支撐通稱為感測器(sensor)。

在完全內反射條件下，施加到玻璃上之光所產生電磁分量稱為衰減波(evanescent wave)。衰減波會穿透折射率較低之介質(常為檢品溶液)而不會損失淨能量。衰減波之振幅隨著距表面距離呈指數

衰減，大約入射光波長一半(例如：對於 760 nm 光源，衰減波穿透波長約為 300 nm)。

對一入射光之波長與角度之特定組合，被稱為電漿之電子電荷密度波會在金膜中被激發。隨著能量透過衰減波被吸收，可以觀察到特定角度(SPR 角)之反射光強度降低。分析人員可藉由固定波長與改變入射光之角度進行 SPR 實驗。

由兩個或多個分子間之結合交互作用引起之感測器表面質量增加導致局部折射率(refractive index, RI)變化，從而造成 SPR 反應，該反應可由 SPR 角度之變化觀察得知。透過監測 SPR 角度隨著時間所發生之變化，分析人員可製出感應圖(sensorgram)(圖 1)。折射率變化對於不同蛋白質非常相似，因此 SPR 測量主要取決於感測器表面質量變化，與被量測分子之性質相對無關。

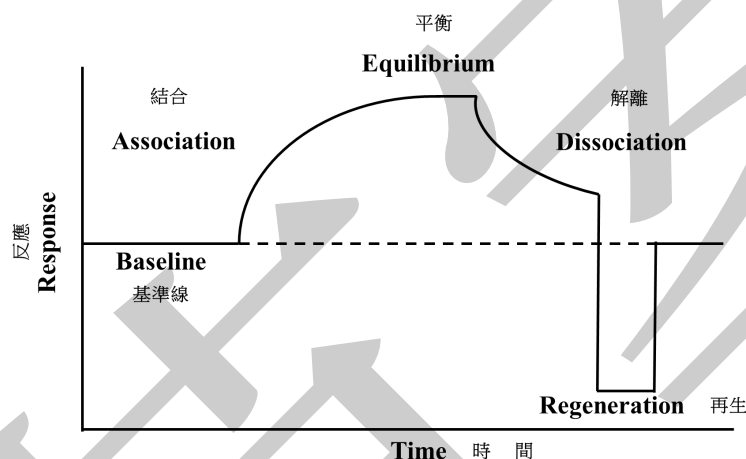


圖 1 感應圖

1.3. 儀器設備

市售 SPR 儀器主要組件包含(1)光源，通常為高效發光二極管；(2)光學檢測器，如二極管陣列或電荷耦合元件(charge-coupled device, CCD)照相機；(3)包含導電膜與用於附著分子之工具或裝置之固體支撐；(4)檢品傳送系統，通常為一種微流體裝置，能夠藉由一或多個針頭使用單一序列或並行注射以輸送檢品，以及(5)具有適當軟體電腦，用於儀器控制、數據收集及分析。

以稜鏡與繞射光柵為基礎之儀器設備系統已有市售品。大多數以稜鏡為基礎之系統皆遵循克列次曼組態(Kretschmann configuration)(圖 2)。光通過一個折射率與表面折射率相符之稜鏡聚焦到感測器表面(遠離檢品)，在這種組態/配置下，入射光不會穿透檢品溶液，從而可以對具異質性、混濁或不透明之檢品進行 SPR 測量。在使用繞射光柵系統中(圖 3)，分析物溶液被置放在已包覆金屬之塑料表面上。此塑料作為衰減之全內反射稜鏡，從

光柵反射之光在此被多次反射回到光柵表面。在這種組態/配置下，光穿過分析物檢品溶液，因此不適合測量混濁或不透明之檢品。繞射光柵確實允許更大表面積採樣，且適用於陣列之 SPR 測量。此類儀器設備相容於範圍廣泛之生物檢品、緩衝液及某些有機溶劑。

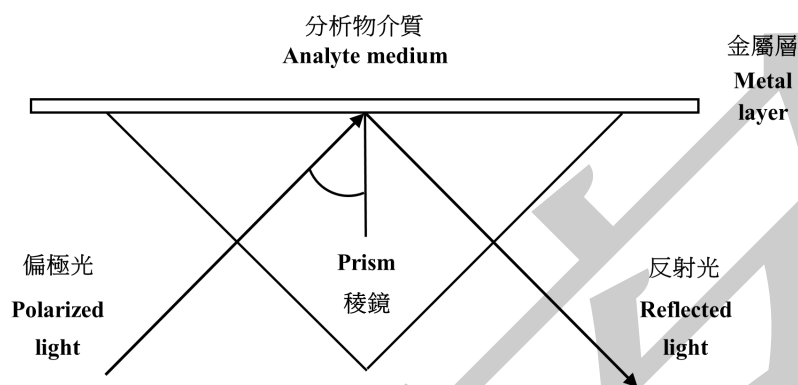


圖 2 克列次曼 SPR 組態

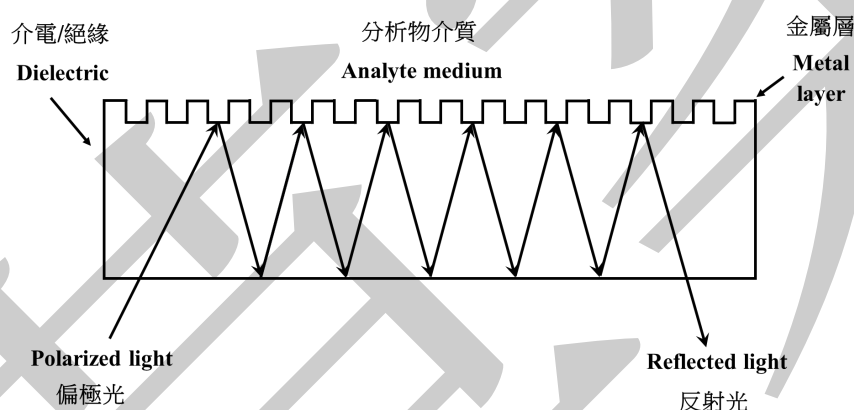


圖 3 繞射光柵 SPR 組態

1.4. 應用 SPR 分析以研究生物分子交互作用

使用 SPR 可研究各式各樣生物性個體(biological entities)，包括小分子(<100 Da)、蛋白質、核酸、脂質、細菌、病毒及整個細胞。大多數已發表之 SPR 研究涉及蛋白質-蛋白質交互作用，其中以抗體-抗原交互作用為主要系列代表。改進儀器靈敏度與實驗步驟也已協助分析人員運用 SPR 研究小分子、脂質及核酸。蛋白質與較大個體(例如：全細胞、某些細菌及病毒)之交互作用會受到上述衰減波指數衰減之限制。在實作中，這些大分子可被有效地研究，但是獲得之資訊可能僅限於定性或半定量(例如：相對排序)之數據。

1.5. 分析類型

某些類型之 SPR 分析極為有用，包括結合專一性、濃度分析、動

力學與親和性分析、以及熱力學。每種分析類型都會產出有助於分析生物分子之獨特資訊。SPR 也適用於定性研究以確認交互作用專一性。分析人員可監測依序結合物件，因為每個個別物件都會導致感測器晶片表面之質量增加，且結合過程所有階段都受到監測。實例包括抗原決定位圖譜(epitope mapping)、抗體分型(antibody isotyping)及免疫原性測量(immunogenicity measurements)。

大部分用於定量蛋白質之化學與光譜方法有以下共通點(1)測量總蛋白質含量；(2)不能區分活性分子與非活性分子；且(3)不能用於未純化之檢品。由於 SPR 為一種非侵入性方法(沒有光穿透檢品)，因此可測量來自複雜基質(例如：食品、血清或血漿以及細胞萃取物)之少量分析物；亦可能採用直接或間接(抑制或競爭性)形式來測量濃度。SPR 生物感測器特別適合從結合交互作用之即時測量中測量動力學之結合與解離速率常數。親和性可從已達平衡之交互作用或從解離與結合速率常數之比例中獲得；親和性測量之常見濃度作用範圍從 pM(10^{-12} M)到高 μ M(10^{-6} M)。可測得之結合速率常數通常在 $10^3 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之間，解離速率常數在 $10^{-5} \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$ 之間。透過研究速率與親和性常數之溫度依賴性，分析人員可以確定結合交互作用之熱力學參數，不僅可以確定與複合物形成相關之焓 (ΔH) 與熵 (ΔS) 變化之平衡值，且可以評估過渡態能量學。本通則後續介紹這些不同分析類型之具體細節。

2. SPR 分析

典型 SPR 分析包含五步驟：

- (1)檢品與緩衝液製備。
- (2)表面製備。
- (3)分析物結合。
- (4)表面再生。
- (5)數據分析與判讀。

謹慎詳細之實驗設計會產生高品質數據與結果。在 SPR 實驗中，質量傳遞對於在應用薄層流通槽(thin-layer flow-cell)系統儀器中所發生之結合交互作用至關重要。透過質量轉移將分析物分子從本體溶液轉移到結合表面，當快速結合動力學與高表面密度同時發生導致結合受到限制時，結合交互作用被認為是受限之質量轉移。在這種情況下，結合動力學與複合物之形成受到分析物分子可用性影響。質量轉移限制結合(mass-transport - limited binding)之優缺點在後續應用範例中討論。

2.1. 檢品與緩衝液製備

純化檢品與粗萃檢品皆可於多種基質中進行分析，包括血清、血

漿、細胞上清液及裂解細胞液。含有顆粒物(例如：細胞碎片或沉澱物)之粗萃檢品可能需要澄清化，以幫助減少不必要之結合與避免微流體通道阻塞；建議使用桌上型離心機進行短暫離心旋轉(30~60 秒)或使用低蛋白結合力之過濾器過濾(0.22~1.0 μm)。可分析之濃度範圍取決於實驗目的(是/否結合、濃度或動力學/親和力分析)以及交互作用分子之結合親和力。通常，檢品濃度在低於1/10 之平衡解離常數(K_D)時，仍可透過 SPR 測得濃度，但是準確濃度之決定受到分析物大小(大分子或小分子)、結合專一性及檢品整體生物活性影響。

大多數生物緩衝液與數種有機溶劑皆可應用於 SPR 實驗，在緩衝液中經常添加鹽與界面活性劑以穩定生物分子。緩衝液組成分應使用高品質等級(例如：分子生物等級或更高等級)。為簡化實驗，分析人員應僅添加對生物活性或功能絕對必要之成分。緩衝液應事先過濾與除氣處理。

2.2. 表面製備

表面製備涉及將結合夥伴(binding partners)之一附著到固體支撐物(表面)上。此過程一般稱之為固定化，生物分子附著之表面即為本實驗感測器。結合夥伴、固體支撐物及固定方法之選擇受到以下因素影響(1)此應用或實驗目的之性質與要求；(2)具不同性質(例如：電荷密度、疏水性或親水性)之表面可用性；(3)用於固定之生物分子的特性與供應；最重要是(4)維持生物活性、結合位點仍可與結合夥伴發生交互作用。取決於實驗目的，無論異質化(隨機方向)或均質化(特定方向)附著於固相支撐皆可執行。固定方法兩個主要類別為(1)直接固定，其中該分子為共價附於表面；與(2)間接或捕捉式固定，此為利用蛋白質或生物分子上之標記(tags)或天然基團(native groups)固定(表 1)。

表 1 表面製備技術

化學性質	固定方法	生物分子	註釋
胺	直接	蛋白質與肽	胺基端與離胺酸(Lys)殘基
硫醇基 (thiol-native)	直接	蛋白質與肽	半胱胺酸(Cys)殘基
外加硫醇基	直接	蛋白質與胜	羧基(carboxyl)衍生化
醛基(aldehyde)	直接	醣蛋白	需要順-二醇(<i>cis</i> - diol)

生物素捕捉 (biotin capture)	間接	生物素化肽、核酸 及蛋白質	穩定與不可逆之 捕捉
親和性標記	間接	蛋白質與肽	組胺酸(His)與麩 胱甘肽硫轉移酶 (glutathione S- transferase, GST)
蛋白質 A 與蛋白 質 G	間接	抗體與 IgG-標記 分子	取決於 IgG 種類
蛋白質 A 與蛋白 質 G	間接	具捕獲抗體專一 性之生物分子	單株或多株抗體 都可能試用，建議 預測試
疏水性吸附與膜 捕捉	間接	脂質、膜及膜關聯 蛋白質	可能單層或雙層 貼附

2.2.1. 直接固定

對於直接固定，數種化學方法可用於將蛋白質或其他生物分子附著到表面上。該表面特性決定了製備表面所需特定步驟順序與時間長度。許多市售取得之表面物質具有生物相容性層(例如：水凝膠)，其包含可用於固定之官能基(例如：羧基)。為了確保結合專一性，用於附著於表面之生物分子應有足夠純度，(例如：95%或更高)，且所需濃度應具備 1~1000 µg/mL 範圍。由於表面上生物分子之隨機方向，直接固定法之化學性質經常導致異質化表面。

藉由游離主要胺基團(例如：蛋白質中的離胺酸殘基、蛋白質或肽之胺基末端)將蛋白質附著於表面係為一種最普遍應用之共價化學。使用 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC)與 *N*-羥基琥珀醯亞胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)或磺基-*N*-羥基琥珀醯亞胺(sulfo-NHS, sNHS)之混合物將表面羧基轉化為反應性酯；使用高濃度(mg/mL)蛋白質或生物分子，以最大程度地提高胺偶聯(amine coupling)效率；最後，游離酯被乙醇胺阻斷。與表面接觸時間、蛋白質濃度或 EDC/NHS 濃度都可以改變以調整固定化程度。當胺偶聯干擾結合位點時，可以使用其他偶聯化學方法或高親和力捕捉法使生物分子附著。例如：對於具有游離硫醇基團生物分子，常見為半胱胺酸殘基(cysteine residue)，通常用 NHS 與 EDC 處理表面以引入雙硫基團用於附著 2-(2-吡啶基二硫代)乙胺(2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine, PDEA)。將生物分子添加到表面會導致硫醇基-雙硫基交換(thiol-disulfide exchange)，且過量 PDEA 基團活性會被半胱胺酸-鹽酸消除。如果生物分子缺少游

離硫醇基團，則可以將反應性雙硫基 (PDEA) 與羧基連接。隨後吡啶二硫醚基團 (pyridyldisulfide groups) 可被附著到透過注入 NHS 與 EDC 衍生之表面硫醇基，然後注入肱胺，接著用二硫赤蘚糖醇 (dithioerythritol, DTE) 或二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 進行還原。順丁烯二醯亞胺基團 (maleimide groups) 附著於表面使得經由硫醇基團固定化 (形成穩定硫醚鍵) 之另一種形式成為可能。使用此方法製備之表面具有承受鹼性酸鹼值 ($\text{pH} > 9.5$) 與還原劑 (例如： β -硫基乙醇與二硫蘇糖醇) 之能力。市售數種異質雙功能試劑可用於將活性馬來醯亞胺 (maleimido) 引入表面，包括磺基-MBS (間-馬來醯亞胺苯甲磺基-N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯)、磺基-SMCC (磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-羧酸酯)、GMBS (N-(γ -馬來醯亞胺基)磺基琥珀醯亞胺酯)、EMCH [N-(ϵ -馬來醯亞胺基己酸)-醯肼] 或 BMPH (N-(β -馬來醯亞胺基丙酸)-醯肼)。對於含有天然醛基或順式-二醇之生物分子，可經由溫和氧化反應轉化為醛，藉由腙鍵 (hydrazone bond) 進行表面附著亦為可行。感測器表面醯肼基與生物分子上之醛基反應形成穩定鍵結；透過醛基對醣接合物、醣蛋白質及多醣進行固定最為有用。

2.2.2. 間接 (高親和力捕捉) 固定化

間接或高親和力捕捉固定法使用常被用於蛋白質純化之標記。此技術透過事先以共價方式 (前文述及固定技術之一) 固定捕捉分子於生物分子上，開發出高親和力捕捉。間接固定與直接固定相較下，間接固定對生物分子純度要求較低，因為生物分子捕捉步驟亦可提供純化作用。間接固定通常會產生均質性表面，因為所有生物分子都通過標記具有導向 (oriented) 相似性。生物分子與其捕捉媒介間之親和力應足夠，以確保在分析週期之持續時間內幾乎未發生表面解離。

單株抗體經常被當作捕捉分子。例如：可以通過胺化學將抗 GST 抗體附著到感測器晶片表面，以捕捉帶有 GST 標記分子。與抗體結合使用時，蛋白質 A、蛋白質 G 及抗 IgG 抗體皆為有用之捕捉分子。

鏈黴卵白素 (streptavidin) 或其相關分子與生物素間之高親和力交互作用 ($K_D \approx 10^{-15}$ M) 使其成為捕捉生物素化分子 (例如：蛋白質、肽、核酸、膜及脂質體) 之有用系統。

通常生物素結合蛋白是以主要胺基團被附著於表面。由於交互作用之高親和力，生物素化分子被視為永久固定，對比於大多數其他捕捉方法，生物素化分子在不損壞表面情況下無法被移除。帶有組胺酸標記之重組蛋白可藉由鎳-NTA 化學或共價固定之抗

His 抗體而捕捉。

脂質與膜結合蛋白可以脂單層或脂雙層形式被捕捉到表面。來自微粒或脂質體之脂質吸附到疏水表面，形成脂單層，其中疏水性脂質端朝向固體支撐物，親水性端朝向水性檢品。該方法為與膜表面結合或部分插入膜之蛋白質提供穩定環境，但對於穿膜蛋白質而言卻不盡理想，因為穿膜蛋白導致表面僅呈現出一半膜結構可用於進行結合交互作用。可藉由製備具有特定抗原成分或生物素化脂質之脂質體來捕捉具有結合或嵌入蛋白質之完整膜結構（脂雙層），從而以固定化抗體或鏈黴卵白素分別捕捉上述特定抗原成分或生物素化脂質之脂質體。

2.2.3. 其他注意事項

使用直接或間接固定方法將生物分子附著到感測器後，分析人員應評估此新建表面之基準線穩定性。如果基準線降低（向下漂移），其最可能原因為存在未附著之生物分子，這可能源自分子本身之結合或聚集。如果基準線升高（向上漂移），可能為重新折疊（refolding）或重新定向（re-orientation）所造成。無論何種情況，皆應在使用前透過以下一或數種方法對新產生之表面條件化：(1) 注入多次具生物相容性之緩衝液；(2) 以緩衝液快速沖洗表面；(3) 注入多次高離子強度（例如：1 M NaCl）或界面活性劑（例如：20 mM CHAPS 或 0.05% 油酸聚醇山梨酯 20 (Polysorbate 20, P20)）溶液；(4) 重複進行分析物結合與再生注射。（註：建議(3)與(4)僅限生物分子之活性於這些試劑存在下已經過預先評估時使用。）藉由使用 EDC/NHS 進行交聯（cross-linking）步驟，可以克服由低親和力捕捉所造成之較大基準線漂移，但若生物分子活性位點本身涉及交聯，則可能損害生物分子活性。對每種生物分子-分析物系統，交聯對生物分子活性影響皆必須實際測試。通常，交聯應儘可能縮短；通常，15 秒不會損害生物分子活性且足夠達到可接受之基準線穩定性。

2.2.4. 固定多寡

須固定之生物分子數量取決於實驗目的。式 1 與式 2 可用於計算適當表面密度：

$$R_{max} = (MW_A/MW_L) \times R_L \times S_m \text{ (式1)}$$

$$R_L = R_{max} \times (I/S_m) \times (MW_L/MW_A) \text{ (式2)}$$

R_{max} ：理論上最大結合反應（假設該表面具有 100% 活性且 100% 與分析物結合）。

R_L ：被固定分子之反應。

MW_A ：分析物分子量。

MW_L ：被固定分子之分子量。

S_m ：莫耳結合化學計量。

對動力學實驗而言，低密度之固定化分子為首選，以避免立體阻礙(steric hindrance)、聚集及/或質量轉移限制之結合。低密度定義為 R_L ，其限制 R_{max} 於 5~50 反應單位。對其他應用，例如：需要進行質量轉移限制結合之濃度分析，只要不引起立體阻礙或聚集， R_{max} 可較前述動力學實驗高 100~200 倍。本通則應用範例中包括固定化密度之具體建議。

2.3. 分析物結合

使用 SPR 評估結合之檢品不需要與用於直接固定在表面上之生物分子有相同純度。由於 SPR 分析時光源不會穿透檢品，因此可用於混濁或不透明檢品。在可行情況下，應根據前述(檢品與緩衝液製備)中建議對檢品進行澄清化處理，並儘量減少緩衝液添加劑，僅包含生物活性所需數量。

原液與檢品緩衝液折射率間之差異可引起反應。對照表面與檢品之使用有助於證明在 SPR 中該分子結合專一性。對直接固定法，合適之對照表面可為(1)未經任何修飾或生物分子附著之感測器表面；(2)使用與含有生物分子之表面相同方式進行化學處理之表面；或(3)相關但已知未結合生物分子之表面。對於使用間接(捕捉)固定法製備之表面，應在帶標記之結合夥伴不存在之情況下，以捕捉分子做為對照表面。對照表面與活性表面之間反應差異可作為結合專一性初期指標。藉由將檢品與附著於表面之生物分子作用，測定濃度依賴性反應與結合抑制，可進一步建立結合專一性。若觀察到非專一性或非預期結合，分析人員應確定其來源。經常變更實驗中所用緩衝液之酸鹼值或離子強度可減少或消除非預期結合。減少非專一性結合之其他建議總結於表 2。

表 2 降低非專一性結合之建議措施

類別	措施
實驗設計	1. 優化操作緩衝液： — 提高鹽濃度。 — 添加界面活性劑。 — 檢品與操作緩衝液對應組成。 2. 改變配體固定化方法。 3. 評估配體品質。 4. 降低或提高偵測室溫度。
表面選擇	1. 改變感測器表面性質 — 降低靜電作用。 — 評估表面之疏水性與親水性特質。

	—考慮可用於對照表面之其他配體。 2. 預先固定 amino-PEG。 3. 改變阻斷分子（例如：乙二胺）。
檢品 添加	1. 檢品中加入可降低非專一性結合之物質 —提高檢品與操作緩衝液之離子濃度（例如：150～500 mM NaCl）。 —添加界面活性劑到檢品與操作緩衝液（0.001%～0.05% 界面活性劑 P20）。 —添加可溶性羧甲基聚葡萄糖（1～10 mg/mL，僅適用以聚葡萄糖為基底之表面）。 2. 簡化檢品緩衝液，僅包含生物活性所需之成分。 3. 評估分析物品質。

2.4. 表面再生

表面再生係指從表面去除原先結合之分析物，使表面可再用於後續結合交互作用。在某些情況下，複合物解離快速，僅需以緩衝液洗去結合之分析物，因此不需要再生。其他替代方式，儀器配置/組態可容許多個檢品依序或同時注射並通過多個固定化表面，從而減少再生之需求。不適當之表面再生可能會影響分析再現性，並對所得數據之整體品質形成負面影響。為了鑑定正確條件，分析人員應考慮特定交互作用之性質與實驗目的。例如：為尋求簡單之(是/否)答案時，輕微之基準線漂移不會影響結果，但是在濃度測定或動力學研究中，再生步驟之最適化則至關重要。

大多數生化交互作用涉及非共價鍵（例如：氫鍵、靜電、凡得瓦力及疏水鍵）。因為對大多數交互作用而言，負責結合之物理力組合與不會導致不可逆結構變化之再生條件仍不清楚，所以最終條件必須以實證評估。

再生之理想狀態為解離所有結合之物質，而不影響固定化生物分子之生物學特性。再生不完全或太過之狀態可能導致後續週期中分析物之結合能力降低，此乃因為未解離之分析物阻斷了結合位點或生物分子發生部分變性。再生緩衝液與溶液依其對交互作用影響可分為不同類別，緩衝液可任意組合使用。

再生緩衝液主要類別為：酸性、鹼性、離子/離散、界面活性劑、疏水/非極性及螯合（每種類別範例參見表 3）。分析人員應從溫和條件開始，然後逐步發展到較嚴苛條件。在許多情況下，尤其是使用抗體時，改變酸鹼值是最有效之表面再生法。與表面接觸時間對於有效再生很重要，當分析人員使用酸鹼值變化時，接觸時間應短，僅 1.5～2 分鐘。當分析人員使用高離子強度或離散劑時，通常需要較長接觸時間如 2～4 分鐘才有效。

表 3 再生緩衝液範例

酸	鹼	離子性/離散性	界面活性劑	疏水性/非極性	螯合型
1 ~ 100 mM 鹽酸	1 ~ 100 mM 氫氧化鈉	0.5~5 M 氯化鈉	0.02 ~ 0.5% SDS	25 ~ 100% 乙二醇	10 ~ 20 mM EDTA 或 EGTA
10 ~ 100 mM 甘胺酸, pH 1.3 ~ 3.0	10 ~ 100 mM 甘胺酸, pH 9.0 ~ 10.0	1~4 M 氯化鎂	40 mM 辛二醇 (octyleneglycol) + 20 mM CHAPS	5 ~ 50% DMSO	10 ~ 200 mM 咪唑 (imidazole)
10 ~ 100 mM 磷酸	1 M 乙醇胺鹽酸, pH ≥ 9.0	1 M 硫氰酸鉀	40 mM 辛烷基葡糖苷 (octylglucoside)	1 ~ 10% 乙腈	
0.1% 三氟乙酸 (TFA)	100 mM 碳酸鈉 + 1 M 氯化鈉, pH 9 ~ 11	2~6 M 鹽酸胍			
100 mM 甲酸	20 ~ 100 mM 氫氧化鈉 + 0.5% P20 或 0.05% SDS				

再生條件最佳化之目的是為了找到使複合物完全解離之最溫和可再生溶液。即使基準線稍有變化，分析人員也應在結合-再生週期中維持常態程度之活性。重複循環地進行分析物結合，然後再進行表面再生，將有助於深入了解表面之整體效能。理想情況下，應該採用在 SPR 實驗中會使用之相同循環次數評估表面效能。必須監測表面之累積現象(圖 4A)以及固定化配體之降解(圖 4B)。這可透過監測每個注射週期開始之基準線與品質管制檢品之結合訊號(斜率或結合反應)來達成。

具系統適用性之適當定義允收基準（例如：基準線漂移與品質管制效能）有助於監測在表面上固定化配體之完整性。

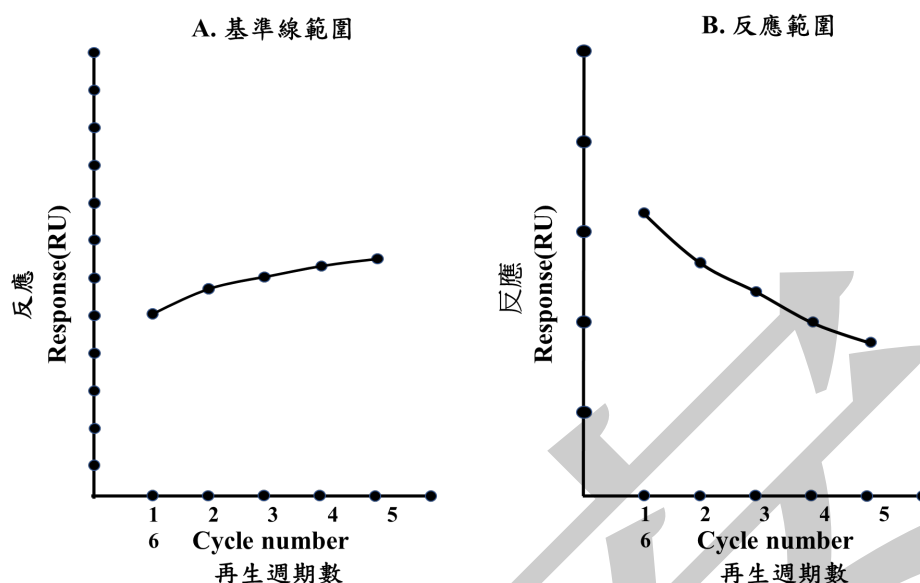


圖 4 評估表面效能 A. 表面之累積現象與 B. 固定化配體之降解

若結合反應緩慢降低，有兩種可能解釋：

- 如果基準線上升，分析物累積導致該表面結合能力降低，進而減少可結合到表面上之分析物數量。分析人員可以稍微提高再生溶液強度，亦可更改為同一類再生溶液中具相同強度之再生溶液，因再生溶液間對溶解分析物能力可能有所不同。
- 若原始數據感應圖基準線保持常態，但結合反應仍下降，則為再生條件導致生物分子發生不可逆變化，從而降低表面結合能力，導致減少可被結合於表面分析物數量。分析人員可稍微降低再生溶液強度，亦可更改為同一類再生溶液中具相同強度之再生溶液。

一旦確定了合適之再生溶液，應於一系列分析物結合與再生週期中對其進行測試。因為表面結合活性通常會隨時間與/或使用而降低，所以分析人員必須憑藉實驗確定結合反應閾值以及隨後該表面使用之週期數。以下提供決定結合閾值與週期數範例(參見 3. 應用範例 3.1.~3.3.)。

在某些情況下，基準線會下降或上升，與/或在達穩定前，前幾次注射中結合能力會有所下降。此乃由於靜電結合之生物分子從表面解離(取決於表面特性)或結合到表面上之高親和力不可再生部分所引起。因此，在收集定量數據前，對每個新固定化表面應藉由重複之分析物結合與再生週期進行條件化。當固定化之生物分子很難再生時，應評估其他固定化方法，如不同化學性質或間接捕捉法。

2.5. 數據分析與判讀

數據分析與判讀係為實驗目的所特有。現有數種數據分析程式用於幫助從 SPR 數據計算出動力學與親和力常數。結果有效性及品質與實驗設計直接相關。擬合過程(fitting process)為純粹數學，不考慮所獲得數值之生物學意義。

2.5.1. 數據分析演算

整體分析(global analysis)對實驗中用到之分析物所有濃度找出單一組動力學速率常數。使用數據擬合演算法(例如:Marquardt-Levenberg)，數據分析軟體從初始近似值開始進行一個反覆過程以找到最佳參數集，此參數集使實驗數據(感應圖)與計算所得之擬合數據達成一致。反覆過程持續進行直到實驗與計算(理論)曲線間差異最小化為止(以殘差平方和來衡量)。

2.5.2. 準備數據進行分析

在進行動力學分析之前，分析人員應檢視實驗數據中是否存在異常或假象，如基準線干擾或超出數據範圍(通常由於氣泡)持續出現一段預定時間(例如:4~8 秒)。應根據預先建立之標準將異常值從數據組中移除。

非必要數據(例如:捕捉或再生注射)，應從感應圖中移除，並應使用下述雙對照程序調整每一個分析物濃度下之數據。

在分析之前，原始數據應按以下方式處理：

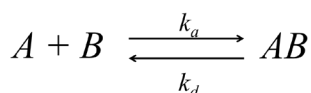
- 將所有濃度之進樣起始點與零點對齊，同時將參考與活性表面及緩衝液進樣點對齊。
- 將所有感應圖基準線對齊零反應。
- 從活性表面感應圖中減去參考表面感應圖，以新建校正後之數據組。
- 從不同濃度感應圖中減去校正後之緩衝液感應圖，以新建雙參照數據組。

雙參照程序可消除系統誤差(例如:儀器干擾)與低程度之非專一性結合(小於總結合反應 5%)；其不可用於校正重大之非專一性結合事件，因為可能導致錯誤測量結果。

在分析動力學資訊數據時，分析人員對同系列中所有濃度使用結合(進樣)與解離(緩衝液流動)相。對穩定態親和力分析，測量每個感應圖在平衡點 R_{eq} 反應(數據穩定區或反應對比時間未有變化)，以建立 R_{eq} 對比濃度之結合等溫線，以下述等式分析該等溫線。

2.5.3. 動力學與穩定態親和力模型

朗謬(Langmuir)動力學模型假設結合夥伴間存在 1:1 交互作用，因此



結合與解離速率常數定義如下：

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \times [A] \times [B]$$

$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_d \times [AB]$$

組合這兩個等式並定義 $[B_{\text{free}}] = [B_{\text{tot}} - AB]$ ，淨速率表達為

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \times [A_{\text{free}}] [B_{\text{tot}} - AB] - k_d \times [AB]$$

其可被轉譯為 SPR 實驗中之術語，如下所示：

$$\frac{dR}{dt} = k_a \times C \times (R_{\text{max}} - R) - k_d \times R$$

其中 R 是隨著感應圖任一點之結合反應， C 是已知分析物莫耳濃度。使用如前述之整體分析，應用以下所述速率公式從實驗數據中計算出 k_a 、 k_d 及 R_{max} ：

$$\text{結合：} \frac{dR}{dt} = k_a \times C \times (R_{\text{max}} - R) - k_d \times R$$

$$\text{解離：} \frac{dR}{dt} = -k_d \times R$$

由於解離過程中分析物濃度為零，因此解離速率等式僅取決於反應 R 與解離速率常數 k_d 。

應用複合物形成(結合)等於複合物衰減(解離)之平衡條件

$$k_a \times [A] \times [B] = k_d \times [AB]$$

產生接下來針對平衡解離常數之方程式

$$K_D = [A] \times [B] / [AB] = C(R_{\text{max}} - R_{\text{eq}}) / R_{\text{eq}}$$

其中 R_{eq} 係指平衡態之結合反應，為實驗中針對一給定分析物濃度 C 假設其於結合過程中未發生變化而測得，並以整體分析計算得 K_D 與 R_{max} 。

動力學結合模型可用於描述非 1:1 交互作用，例如：發生在以抗體為分析物時之二價交互作用；結合夥伴之異質性；結構變化；或更複雜之交互作用，(例如：協同結合(cooperative binding))。SPR 分析人員應注意不要使用更複雜之模型去評估數據，除非實驗設計已確認過。

2.5.4. 評估適合度 (fit)

可透過下列項目評估動力學數據適合度之品質與有效性：(1)基於儀器/設備操作範圍 k_a 與 k_d ；(2)目視檢查實驗與計算所得曲線間一致性；(3)殘差圖(residual plot)大小與形狀；(4)所得結果之生物學相關性；以及(5)統計參數，例如： χ^2 (Chi²，殘差平方之平均值)以及標準誤差(standard error, SE)、T 值或 U 因子(唯一性，

uniqueness factor)。對於實驗中每種濃度，最佳參數適合度應可與實驗數據曲線完全重疊。殘差圖可看出計算之數據與實驗數據間差異；殘差應為隨機分佈，沒有趨勢(波動或上下彎曲)；殘差圖之高度應可反映儀器干擾。此外，應將 χ^2 最小化以使其與數值具適合度，此與儀器背景值、數據點數量及整體結合反應有關。參數值應考慮其對生物學與實驗之相關性，例如：當已知交互作用較快時，計算所得之 k_a 值呈現慢；或是計算所得之 R_{max} 值高於使用式 1 與式 2 計算所得之值。參數重要性係根據 SE、T 值及 U 因子進行評估，重要參數改變必會影響適合度品質，所有標準皆應在可接受範圍內。

評估穩定態親和力數據之適合度可以使用一組類似標準，但由於數據點較少(全部 6~12 個，取決於所用濃度數量)，因此統計參數與殘差圖對適合度品質之預測能力較差。目視檢查實驗與計算所得之結合等溫線間一致性以及參數相關性都是用於評估適合度之良好工具；另外，根據濃度、 K_D 及 R_{max} 間之關係，當濃度等於 K_D 時， R_{eq} 將為 R_{max} 之 50%。確認被分析之數據遵循此關係亦提供另一個檢查計算結果之有效性方法。當同時使用動力學與穩定態分析方法計算 K_D 為可行時， K_D 值應落在實驗誤差範圍內。

2.5.5. 解決缺乏適合度問題

當數據適合度或參數值不合理時，通常可以通過系統方法解決問題，該方法考慮潛在偏差來源且測試每個假設。需要考慮項目包括試劑純度、固定化化學或表面密度、分析物濃度誤差、非專一性結合、配體活性喪失或質量轉移限制之結合。查看原始(未校正)數據有助於確定非專一性結合或濃度誤差來源。表 4 列出了偏離 1:1 結合之潛在來源與建議措施。

表 4 偏離 1:1 結合動力學之常見來源

偏移來源	建議措施
進樣前基準線未歸零	—反應歸零並重新分析。
不正確或未定義進樣開始/結束時間	—調整進樣開始/結束。 —移除感測圖假象，如進樣或氣泡造成之尖峰。
濃度投入錯誤	—確認濃度值並重新分析
本體 (bulk) 折射率太高	—開始分析前，使用雙參照法。 —RI 設為零。
質量轉移限制結合	—對單一濃度改變流速(從慢到快)，並重疊感測圖(對相同之結合與解離時間，感測圖應一致)。 —在符合模型中包含質量轉移條件 k_m 。 —降低表面密度。

非專一性結合	—改變固定化學 —改變感測器表面屬性 —緩衝液添加物-添加或減到最少 —試劑純度-重新純化檢品
結合夥伴失去活性	—改變固定化學。 —改變再生溶液。 —對 R_{max} 以局部代替整體參數符合性重新分析數據。
多價結合交互作用	—固定多價結合夥伴。 —選擇感測器表面(例如：平面)，以盡量減少多價結合。

相關數據分析建議將在本通則後續章節中介紹。

3. 應用範例

3.1. 免疫原性評估

SPR 已成為評估蛋白質治療製劑之免疫原性強大技術。用於偵測血清(或血漿)檢品中抗體，此平台優勢為基於質量之即時累積可容許無標記偵測，從而有可能偵測所有類別與次分類之低親和力抗體。此技術可用於篩選分析(第一級免疫分析)與特性分析。篩選分析用於偵測能夠結合蛋白質治療製劑抗體之存在；特性分析可用於定義生成可結合蛋白質之抗體，且包括分析抗體濃度，代表之同種型，相對結合親和力與結合專一性。SPR 亦有其應用之限制，不適合用於決定抗體中和能力，以細胞為基礎之生物分析為決定抗體中和能力最好方法。在設計與驗證用於免疫原性評估之 SPR 分析時，分析人員應考慮關鍵參數，包括蛋白質固定化，以確保免疫學反應性、固定化蛋白質穩定性及表面再生條件。

3.1.1. 蛋白質固定化

開發免疫原性評估分析法第一步為確定目標蛋白質固定化之最佳機制。在考慮用於固定化之目標密度時，分析人員通常建議使用高密度表面。高密度表面優勢在於其最大化地提高了抗治療製劑抗體遇到固定化配體機會。高密度表面亦提供優異之分析靈敏度。這些分析法重要面向在於為固定化而選擇之化學方法應提供隨機方向，而非特定位點取向，如此，該治療性蛋白質上所有可能之抗原決定位皆可用來結合抗治療製劑抗體。固定化之有效性係藉由評估陽性對照抗體結合固定化蛋白質能力而決定。在評估固定化之有效性時，分析人員應測試具有不同抗原決定位專一性之多種抗體。當皆具有結合能力之抗體組合涵蓋一系列親和力範圍且與目標蛋白質上不同抗原決定位結合時，則提供了可以偵測到臨床樣本中所含抗體之信心。若有任何陽性對照抗體未證明結

合，則表示固定未達最佳化，應予以修改。儘管 SPR 對偵測低親和力抗體已證明均有效，分析人員仍應確認所選用之固定方法對偵測低親和力與高親和力抗體為有效。

3.1.2. 固定後之蛋白質穩定性

一個分析結果可被接受前提是陽性對照抗體必須能與固定化蛋白質結合；此結合確認提供了信心，即當檢品中存在針對某一蛋白質抗體時，其將與感測器表面上固定之蛋白質結合。對多次分析而言，SPR 依賴重複使用此固定化蛋白質表面，因此需要一個再生方法(regeneration protocol)可以有效地移除與固定化蛋白質結合之任何物質。此再生程序(regeneration procedure)係指基於不損壞或移除固定化蛋白質情況下，可除去結合材料能力(參見 2.4. 表面再生)。再生後之穩定性應在分析開發過程中建立，並應在分析確效期間予以確認。為了在分析過程監測感測器效能，分析人員應於分析進行期間，定時/定期測試陽性對照檢品。如果陽性對照檢品效能顯示固定化蛋白質已受到破壞，則分析人員應對在分析效能低於可接受範圍後所得之測試檢品進行重新分析。固定化之接受參數可能因化合物而異，應針對每種分析方法建立。

3.1.3. 固定化後抗原決定位之可用性

當蛋白質被固定後，應確認多重抗原決定位可用性；理論上可透過測試具有不同抗原決定位專一性之陽性對照抗體結合來完成。測試抗原決定位可用性的方法之一係使用一組已知可識別蛋白質不同區域之單株抗體；如果蛋白質為隨機固定，則所有不同陽性對照抗體都應能結合。評估抗原決定位可用性原因乃為了防止在評估血清檢品時出現偽陰性結果。若固定化不為隨機，則其可能持續藉由一特定抗原決定位固定蛋白質，從而使該抗原決定位無法用於抗體結合；另一種可能性是為了促進蛋白質固定而進行之化學修飾改變了蛋白質構型。

3.1.4. 表面再生與後續蛋白質穩定性

根據先前指引，分析人員應監測表面上固定化配體之累積與降解現象，並在必要時停止使用。例如：當陽性對照抗體(以測試血清稀釋)結合能力降至初始結合力 80%以下時，不應使用該表面。

3.1.5. 決定分析切分點

當進行分析以確定一複雜檢品(例如：血清)是否含有針對蛋白質之抗體時，分析人員有時會觀察到結合之背景值，該結合背景值可根據固定化蛋白質性質以及所測試之患者群體而變化。為了確定測試檢品是否包含目標抗體，分析人員比較不含抗該蛋白質抗體之多種對照檢品之結合情況，由此可以建立一個切分點，該點定義了此分析反應程度，其中測試檢品被視為含有期望抗體

之陽性檢品。分析人員透過分析一系列不含可辨識固定化蛋白質之抗體之血清檢品，然後進行統計分析以確定此結合程度與不含抗體之檢品一致，從而確定此分析之切分點。建立切分點應使用與檢品分析相同之條件。儘管不同方法被用來決定切分點，一個常用方法為使用來自 50~100 個健康志願者之血清檢品結合數據來建立平均值，並將切分點設於 95%(也就是一常態分佈之 $\text{Mean} + 1.645 \text{ S.D.}$)。分析人員應從計算中移除統計異常值，因為將統計異常值包括在內可能導致高偏差且提高切分點；一個高切分點將導致含有針對固定化蛋白抗體之鑑定檢品數更少。經統計學評估之切分點是血清檢品必須超過之反應單位值，據此才能將其認定為陽性，即存在針對治療蛋白製劑之抗體。

決定切分點一個重要特徵為不同群患者，切分點可能有所不同。例如：與正常人群相比，患有發炎性疾病之患者可能表現出更高程度之非專一性反應。

較高程度之非專一性結合會導致檢品被鑑定為陽性，即使檢品中不含任何對該蛋白具有專一性之抗體。當這種情況出現，可使用來自具有較高非專一性結合程度患者之給藥前血清檢品，建立一個新患者群體特定之平均值與分析切分點。

3.1.6. 分析程序開發與確效

當確定固定化蛋白質之穩定性，再生程序已被決定且建立了切分點，抗體測試方法就可被開發與確效。用於分析檢品之條件應與用於建立分析切分點條件相同。要考慮之重要參數是血清檢品最佳稀釋度。增加稀釋因子會降低血清中蛋白質之非專一性結合，但也會降低整體靈敏度。大多數抗體評估程序使用 5~50% 血清。隨著所測試血清百分比降低，來自非專一性交互作用之結合訊號百分比也會降低，隨後由抗體結合固定化蛋白質之訊號百分比則會增加。除稀釋外，減少非專一性交互作用之其他方法包括在稀釋與電泳緩衝液中添加界面活性劑、增加鹽濃度、添加牛血清白蛋白(BSA)或馬血清白蛋白(HAS)，或添加感測器表面之可溶性支撐材料(例如：羧甲基聚葡萄糖或藻酸鹽(alginate))。

其餘需要最佳化之重要變因包括流速與檢品體積。流速與檢品體積之組合決定接觸時間，即給定檢品與固定化蛋白質接觸時間長度。檢品與固定化蛋白質接觸時間越長，抗體結合機率越大。下一個須考慮之重要面向為驗證初始結合是抗體而非其他血清成分結果，此部分可藉由添加抗人體免疫球蛋白試劑並監測後續結合來完成。若所觀察到之初始結合係為抗蛋白抗體所引起，則該抗人體免疫球蛋白試劑將與該抗蛋白抗體結合(抗蛋白抗體仍與固定化蛋白質結合)。當治療性單株抗體是固定化蛋白質時，須

篩選並驗證該確認試劑未直接結合到固定化之治療性單株抗體。此情況之一種選擇是固定 Fab' 片段，而非完整之治療性單株抗體。確認試劑之專一性必須通過驗證。當所有參數完成最佳化，便可對該分析進行確效。確效參數包括通常與免疫原性分析(精密度、專一性、靈敏度及耐變性)相關之參數，以及特定對 SPR 分析之參數(蛋白質固定化、固定化表面之穩定性及再生週期數)。

3.1.7. 血清成分干擾

取決於固定化蛋白質，除了針對該固定化蛋白質特定抗體外，血清成分可能可結合到固定化表面；血清成分亦可能存在阻斷抗體與固定化蛋白質結合之能力。上述情況皆可藉由血清結合測試評估：目標族群為已知不包含針對固定化蛋白質之抗體，以此血清檢品進行結合測試，然後進行監測以確定是否發生任何結合。若檢測出非專一性結合，則可採取步驟以減少或去除之；該步驟可包括檢品預處理以去除非專一性反應物、添加界面活性劑，或改變檢品緩衝液中的鹽濃度，以減少非專一性結合。

分析人員應驗證血清檢品中不含能夠抑制抗體與固定化蛋白質結合之成分(這些成分可包括固定化蛋白質之可溶形式或可與固定化蛋白質結合並阻斷抗體與固定化蛋白質結合之可溶性受體蛋白)。分析人員可將陽性對照抗體添加到目標血清檢品中並評估結合。若與正常人血清檢品結合相比，目標血清檢品之結合受到抑制，則可採取步驟以去除抑制成分。無法識別目標血清干擾可能導致偽陽性或偽陰性結果。

3.1.8. 多重分析執行

當治療用蛋白質為來自原始治療用蛋白質修飾之第二代產品(例如：通過聚乙二醇化或增加糖基化作用)時，對原始或第二代產品抗體之存在應同時評估；可透過將每種蛋白質固定在微流裝置之獨立通道上，並使血清檢品依序或平行與兩種固定化蛋白質結合而完成。對原始與修飾後治療性蛋白質二者結合測試，其基本原理係針對修飾後蛋白質所產生之抗體對原始蛋白質亦具有結合專一性。作為免疫反應特性分析一部分，分析人員必須了解第一代與第二代產品之抗體專一性。如果可能，透過將內源性對應蛋白質固定在獨立流通槽或通道上，亦可測試與此內源性蛋白質之結合。

3.1.9. 抗治療性蛋白質抗體之特性分析

當針對治療性蛋白質之抗體透過與固定化治療性蛋白質結合而被捕捉時，即可對這些抗體進行特性分析。可研究抗治療性蛋白質抗體之重要特性分析包括相對結合親和力、血清檢品中存在之抗體量、檢品中存在之抗體同種型及結合專一性。

藉由監測完成檢品添加到感測器後反應單位降低之速率，分析人員可決定抗體之相對親和力。高解離速率為低親和力抗體之特性，而緩慢解離速率則為高親和力抗體之存在。將解離速率與陽性對照抗體（通常是高親和力抗體製劑）以及一組已知結合親和力之單株抗體進行比較亦為一實用方式。

檢品中存在之抗體相對活性濃度估算可透過將其結合訊號與來自陽性對照品系列稀釋所產生之訊號進行比較而得。分析人員可根據標準品生成標準曲線，並將檢品中抗體活性濃度與該標準曲線進行比對。因為陽性對照品不能完全模擬檢品中所含之抗體混合物，實際上，陽性對照品通常來自高免疫動物，（例如：兔子）其濃度值乃相對於標準品所得，該值僅近似於人體抗體實際濃度。由於可以在整個臨床開發過程中使用相同陽性對照品，因此分析人員可以使用此策略以比較來自不同受試者所得抗體數量。因為儀器訊號與結合到感測器上的質量成正比，故該類分析可提供數值。分析人員應考慮 IgM 抗體質量是 IgG 抗體之 5 倍。本通則之章節濃度分析部分介紹了另一種決定抗體濃度方法（見應用範例 2）。

被捕捉抗體之同種型可透過監測其與依序添加同種型試劑相關之結合而輕鬆確定。例如：若存在 IgM 抗體並已與固定化蛋白質結合，則添加抗人類 IgM 試劑將產生額外訊號。可以找到對 IgM、IgG、IgE、IgA、IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 具有專一性之同種型試劑。由於立體阻礙，可能需要分析人員以不同順序重複進行同種型分析，以確保先前結合之同種型試劑之存在不會阻礙後續分析。例如：假設檢品中同時含有針對某蛋白質之 IgG1 與 IgG4 抗體，且此 2 種抗體都可與固定化蛋白質結合。由於抗 IgG1 同種型試劑已與 IgG1 抗體結合，這些已結合同種型試劑可能會阻止後續添加之抗 IgG4 試劑與 IgG4 結合，致使不會發現 IgG4 存在。

分析人員將因此得出結論僅存在 IgG1 抗體，但是如果將同種型試劑之添加順序顛倒，則會發現 IgG4 抗體。該例強調對同種型結果進行仔細解讀之重要性。若僅藉由前一個週期同種型試劑添加所觀察到之結合進行後續分析，則會是一個問題。同種型試劑專一性應於使用前予以確認，例如：分析人員應驗證抗人類 IgG 試劑僅與人類 IgG 結合且不會與人類 IgM 發生交叉反應。

可被抗體識別之治療性蛋白質區域，有時可藉由被固定化不同形式之該蛋白質決定（例如：被截斷、具點突變或僅包含該蛋白質片段）。

若抗體不能結合變化形式之蛋白質，則表示該抗體所針對之抗原

決定位受到該變化影響。應記住，點突變與截斷不僅影響蛋白質一級序列，且亦影響蛋白質三級結構(例如：折疊與構型)；再者，受試者可能針對多種抗原決定位產生具有不同專一性之抗體群。儘管存在這些顧慮，前述策略對鑑定蛋白質上抗體結合區域仍證明有效。

3.2. 濃度分析

SPR 可用於決定已知組成緩衝液系統中之生物製劑濃度，例如：來自純化管柱之析出物、配方緩衝液及複雜混合物(例如：血清、發酵液、粗製細胞萃取物及細胞懸浮液)。藉由分析物與其特定配體結合或其他可與該分析物任何部分發生交互作用之分子結合測量其濃度。分析物濃度可在固定分析物專一性配體或分析物專一性捕捉試劑於表面上決定。在決定結合速率或已結合分析物的質量後，分析物濃度可使用純化且清楚鑑定參考物質之系列濃度所得標準曲線，或藉由根據分析物擴散特性與絕對分析物濃度間之免校正分析計算而得。

3.2.1. 配體固定化

為了確定濃度，配體以共價或非共價方式固定在表面上。分析人員選擇適當之偶聯機制與化學方法，以確保配體功能完整性。為了提供有利於動力學參數部分或全部獨立性條件，配體之高表面密度有其必要。

一個高密度表面允許分析物在限制質量轉移條件下與配體結合。分析物與配體間之交互作用可由以下兩步驟過程描述：



在此 A 是檢品中分析物濃度， A_{surface} 是感測器表面分析物濃度， k_m 是質量轉移係數，B 是固定化配體，AB 是分析物-配體複合物， k_a 與 k_d 是 A 與 B 間之反應速率常數。質量轉移係數 k_m 取決於流速、流通槽尺寸及分析物之擴散係數。首先必須將分析物從主體轉移到感測器表面以便與固定化配體分子發生反應。如果分析物之質量轉移比配體與分析物間之結合步驟快得多，則整體觀察到之結合將由 A(分析物)與 B(固定化配體)動力學速率常數驅動，為準確決定動力學參數前提。如果分析物質量轉移比結合步驟慢得多，則結合將受到質量轉移過程限制，且將難以取得 A 與 B 間特定交互作用之動力學參數；然而，這些對決定分析物之活性濃度係為需要條件。感測器表面配體密度高且流速慢則有利於限制質量轉移。在這兩個極端之間，整體結合力係由質量轉移與交互作用動力學所共同決定，對於具較低結合速率常數(例如： $k_a = 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)之交互作用濃度分析，可能無法達到質量轉移之限制

條件。

配體與分析物之參考物質應具有足夠純度，並特別注意是否存在聚集物質。分析物聚集體可結合多個結合位點，因此可干擾配體表面再生。參考物質必須與測試檢品具有可比性(例如：分子量與動力學參數)。在特定條件下，係基於分析物擴散特性與絕對分析物濃度間之關係，可使用免校正程序決定未知檢品中之活性濃度。以下分別描述這兩種方法。

3.2.2. 使用參考標準曲線進行濃度測定

典型濃度測定分析中，分析物濃度為根據標準曲線計算而得，而該標準曲線則是注入選定濃度之參考物質而得。利用參考標準校正曲線，有三種不同方法可用於測量濃度。

3.2.3. 直接結合測定法

在任意固定之檢品注入時間後決定被結合之分析物數量。三明治法可用來作為單一步驟直接結合法之延伸，以提高分析靈敏度。

3.2.4. 結合率測定

確定檢品初始結合率，而非結含量。在質量轉移受限之結合條件下，結合速率與分析物濃度成正比，且與結合動力學無關。這使得分析人員可以測量可能具有不同結合特性之相關分子濃度。

3.2.5. 抑制或競爭分析

當分析物作用機制為與可溶性配體結合從而破壞配體與受體交互作用時，則可使用抑制分析。在抑制分析中，受體以共價鍵附著到感測器表面，藉由將固定濃度之配體與不同濃度分析物混合，然後將此配體-分析物之混合物注入固定化受體表面，間接測量分析物與可溶性配體間之交互作用。競爭方法也可用於溶液中之大分子與顆粒(例如：病毒)以及低直接反應之小分析物。在平行系統中，可以設計分析方法使標準品與未知檢品被平行進樣。該方法對難以再生之配體尤其有用。

分析人員可將參考物質標準品之訊號(結含量或結合率)相對於濃度製圖，然後以適當數學模型，例如：線性或四參數邏輯式曲線擬合而生成標準曲線。檢品可以單一或多個稀釋濃度進樣。若已證明檢品與參考標準之間存在線性關係，則可以使用較少個稀釋濃度。未知檢品濃度則為來自標準曲線反推計算而得；或者若其係以與參考標準曲線相同目標濃度下進行分析，則可以由比較曲線擬合參數而得。

可影響分析效能與結果參數包括(但不限於)流速、表面配體密度、檢品純度、檢品基質及表面再生之再現性。該參數須在分析評鑑或確效期間進行評估。藉由鹽、界面活性劑或感測器表面支撐材料，可將分析物結合到固定化配體之干擾最小化。常用感測器表

面由羧甲基聚葡萄糖組成，因此在檢品稀釋緩衝液中添加聚葡萄糖可以將非專一性交互作用最小化。表面上陰性對照進樣亦可用於將來自陽性表面上所得數據，純數學地減去非專一性結合數據。合格或確效之濃度測定 SPR 分析應包括品管檢品；這些檢品可作為決定標準曲線準確性之判斷，該標準曲線已預先製備好用以分析含未知分析物濃度之檢品。其可以方便地被大批量製備使用，且目標濃度具備分析證明書，且以小等分劑量於適當儲存條件下保存。

每次分析物進樣後，配體表面都會再生，並去除所有結合之分析物。這種再生必須足夠有力以去除所有結合之分析物，但同時仍必須保持固定化配體完整，以便可以再進樣進行比較。

3.2.6. 免校正濃度測定

免校正濃度分析係基於分析物擴散特性與分析物絕對濃度間之關係。若已知分析物之具體特性與分析環境，分析人員可以藉由測量初始結合率而得出分析物濃度。此方法在尚無滿意之參考標準時可能有用。

分析人員使用初始結合速率與分析物濃度間之關係，以確定檢品分析物濃度。在固定化程度高之感測器表面，初始結合速率(斜率)可以描述為分子量、質量轉移係數 k_m 及分析物濃度之函數。在分析檢品前，分析人員必須確定質量轉移係數，其取決於擴散係數 D 、流速及流通槽尺寸，如下述公式：

$$k_m = 0.98 \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times f}{0.3 \times h^2 \times w \times l}}$$

其中 D 為擴散係數， f 為流速， h 、 w 及 l 分別是流通槽之高度、寬度及長度。對於一給定儀器，流速與流通槽尺寸通常為已知，且擴散係數係由分子之大小與形狀決定。分子之大小與形狀則來自該儀器專用工具、參考文獻或實驗(例如：藉由分析型超高速離心或光散射)。

在典型實驗設置中，評估需要兩個流速。透過使用來自兩個相距很遠之流速測量值，分析人員可評估流速對結合率之影響。藉由擬合兩種不同流速下獲得之數據，可提高此分析之耐變性；此兩種流速分別對應兩個不同 k_m 值(因 k_m 取決於流速)擬合到對分析物濃度具總體變數(global variables)模型中，故此模型被約束以找到同時最符合兩條曲線之單一濃度值。

免校正濃度分析僅適用於分子量大於或等於 5000 Da 之蛋白質，其需要快速之分析物-配體結合($ka > 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)，且不能處理具有不同擴散特性之分析物混合物。該方法動態範圍約為 0.05~5

μg/mL。

3.3. 動力學與親和力分析

由於 SPR 具有即時偵測結合交互作用之能力，因此可在複合物形成與解離之動力學方面提供有價值資訊。SPR 儀器可用於決定結合交互作用之結合速率常數與解離速率常數，且該數值後續可用在計算解離平衡常數 ($K_D = k_d/k_a$)。當結合交互作用於 SPR 結合實驗之合適時間範圍內未達到平衡時，由 k_a 與 k_d 之比值取得 K_D 是有用的。對於在分鐘內(相對於小時)達到平衡之結合交互作用(複合物形成速率等於複合物衰減速率)， K_D 可以直接由穩定態結合反應確定。達到平衡所需時間長度受解離速率影響，因此快速解離之複合物(例如： $k_d = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$)將比緩慢解離之複合物(例如： $k_d = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)更快地達到平衡。軟體程式能夠模擬 1:1 結合動力學對預測達到平衡所需時間長度為有用工具。使用市售 SPR 儀器進行親和力測量常用工作範圍是 $10^{-12} \text{ M (pM)} \sim 10^{-4} \text{ M (μM)}$ 。適當實驗設計對準確測量 k_a 、 k_d 及 K_D 為必須。設計動力學分析或穩定態親和力實驗時，必須考慮幾個問題，包括：

- 應該固定哪個結合夥伴？
- 分析人員將如何固定其中一個結合夥伴？
- 應該使用哪種類型參考表面？
- 應固定多少結合夥伴？
- 結合夥伴在固定後是否保持活性？
- 與固定結合夥伴之結合具專一性嗎？
- 必要時應採用什麼再生條件？

在選擇要固定哪一個結合夥伴以用於大多數蛋白質-蛋白質交互作用時，分析人員必須考慮幾項因素：(1)蛋白質之純度與可用性；(2)存在標記或官能基以協助固定化；(3)保持生物活性；以及(4)結合價(例如：單價與多價結合)。

所有詳細動力學與親和力分析實驗都需要參考表面。若使用直接固定，則使用同樣固定方法建立該參考表面，在偶聯步驟中省略蛋白質。或者，可使用修飾結合位點之突變形式蛋白質。用於高親和力捕捉之參考表面通常由捕捉分子與無結合夥伴組成，或使用非相關分子於模擬捕捉表面。對於抗體-抗原交互作用之特定情況，非相關之單株抗體通常用來做為參考表面上之捕捉試劑。

在確定固定方法後，分析人員必須決定要固定多少結合夥伴。對於動力學分析，主要考慮因素為表面密度最小化，以避免分析物分子與固定化結合夥伴發生質量轉移限制之結合。在進行穩定態親和力分析時，分析人員還須考慮固定化程度，因為高固定化程度可能導致空間阻礙或誘導二級效應，諸如非專一性結合或聚集

等。

在進行動力學實驗或穩定態親和力分析之前，分析人員須透過以單一濃度注入分析物分子來評估表面活性。濃度應夠高，以使平衡結合反應提供與實驗最大反應(R_{max})接近之近似值；當目標分子濃度較結合交互作用之 K_D 高出至少 10 倍時，通常符合此條件。對於 K_D 值為 100 pM 之蛋白質交互作用，其意味著目標分子之進樣濃度應至少為 1 nM。使用 R_{max} 等式(式 1 與式 2)，分析人員可以根據固定或捕捉之結合夥伴數量來計算理論 R_{max} 。若實驗 R_{max} 超過理論 R_{max} ，則分析物分子大於預期值或分析物以比預期更高階之結構存在(例如：聚集或以多聚體形式存在)。如果實驗 R_{max} 顯著低於(<50%)理論 R_{max} ，則表明固定化程序已損害結合位點，應研究另一種固定程序。使用高親和力捕捉而非直接偶聯，其優勢為表面活性通常保持接近 100%，前提是固定化結合夥伴之特定活性在捕捉前為 100%。

整個參考表面之目標分子進樣亦可以快速評估感測器表面上存在之非專一性結合數量。透過在檢品稀釋緩衝液與電泳緩衝液中添加鹽(例如：0.5~1.0 M NaCl)或使用電荷密度低之感測器表面，可以消除或減少本質為靜電之非專一性結合。透過於檢品稀釋緩衝液與電泳緩衝液中添加界面活性劑(例如：0.05%聚山梨酯 20 或 10 mM CHAPS)，可以最小化或消除由疏水性交互作用引起之非專一性結合。在使用緩衝液添加劑之前，分析人員應測試特定之結交互作用或結合活性是否受到影響。亦可以透過轉換不同捕捉分子來解決與捕捉分子之非專一性結合。降低表面密度也可以消除非專一性結合。

許多蛋白質間之交互作用為緩慢解離($k_d = 10^{-3} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)，複合物半衰期($t_{1/2}$)超過 2 小時。對於這些類型之結合交互作用，再生步驟很重要。

在某些蛋白質-蛋白質交互作用中，由於分子間之高親和力結合交互作用，可能無法進行表面再生。若發生這種情況，分析人員可考慮進行滴定動力學實驗或使用可以執行分析物平行進樣之儀器。在動力學滴定中，濃度不斷增加之目標分子連續注入整個固定化表面，並使用滴定動力學模型分析所得數據。在平行儀器中，只需一步驟就可以注入一系列分析物濃度，從而排除了再生需要。對於穩定態親和力實驗，通常不執行表面再生，因為此種類型實驗中，結合交互作用之 k_d 值在 $10^{-2} \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$ 範圍內，因此 $t_{1/2}$ 值 < 2 分鐘。當緩衝液流經表面時，結合之分析物會從表面解離，因此不需要再生。

分析人員應有準確之分析物濃度以進行動力學分析，因為 k_a 計算

取決於分析物莫耳濃度。通常使用波長在 280 nm (A_{280}) 之吸光值，但分析人員應記住 A_{280} 值反映溶液中之總蛋白量，而非反映能夠結合之蛋白質實際濃度(即有效濃度)。

對動力學與穩定態親和力實驗，檢品稀釋劑進樣應多重複，以便在數據評估過程中可以移除由於儀器或檢品稀釋劑引起之非專一性反應。

對於交互作用，建議之分析物濃度是 K_D 上下 10 倍範圍。藉由保持低表面密度($R_{max} = 5 \sim 50$ RU)並延長結合時間，分析人員應能以足夠之曲率收集數據以準確定義 k_a 與 k_d 值。當交互作用親和力高時($K_D =$ 低 nM 到 pM)，可能需要較高分析物濃度才能建立具有足夠曲率之動力學曲線以完成動力學分析。增加分析物濃度不應是更改其他實驗設計參數(例如：表面密度與接觸時間)之取代。儘管希望使用接近 R_{max} 之分析物濃度，然而異常高之濃度可能會導致溶液中分析物聚集或與表面非專一性結合。

在分析物濃度系列內，應使用重複檢品評估表面活性。另外，每個濃度系列應使用不同表面進行 3~5 次測試，以建立所得動力學與親和力常數之信賴區間。

在動力學或穩定態親和力實驗期間收集之數據量直接影響結果準確性。對牽涉到具有慢 k_d 值之結合交互作用之動力學實驗，分析人員應收集足夠解離數據，以便獲得可測量之解離反應(相對於儀器背景值)。例如：治療性單株抗體與其目標分子(k_d 為 10^{-5} s^{-1})間之結合交互作用可能需要收集至少 4 小時的解離數據。分析人員無需對所有分析物濃度收集如此多之解離數據，而是對將要進樣之最高濃度分析物使用較長離解時間，對所有其他分析物濃度則可以使用較短離解時間(2~5 分鐘)。

使用平行進樣儀器，則可以收集所有濃度之長時間解離數據。為了進行數據評估，分析人員應收集檢品稀釋劑進樣之長與短時間解離數據。對於穩定態親和力實驗，分析物進樣時間應足夠長，以允許所有被測試之分析物濃度皆產生穩定態結合反應。對於穩定態親和力實驗，不必收集解離數據，因為在此類實驗評估中不會用到解離數據，但是在開始下一次進樣之前，必須將分析物完全解離。

4. SPR 之使用規範環境

當 SPR 分析用於批次釋放與穩定性測試時，該分析必須發生在受管制環境中，以便決定產品在臨床或市場上使用之方式。SPR 儀器(包括軟體)應符合規定，並應接受確效。例如：在任何規範應用中，使用此儀器之前都應進行安裝與操作資格評鑑。這些要求非常重要，因為有助於確保數據採集與數據評估以及關鍵儀器硬體效能完整性。

除了使用符合法規要求之 SPR 儀器外，分析人員還應為 SPR 分析建立系統適用性標準。在 SPR 分析中包含這些標準可確保對測試檢品所得結果係為在操作參數範圍內執行分析所生成。評估系統適用性參數討論不在本通則範圍內，但可參考物測定之設計與分析(通則 7022)生與生物測定分析(通則 4041)進行更詳細討論。SPR 分析之系統適用性參數範例包括：

- 配體固定化密度。
- 曲線擬合模型中之參數(例如：四參數邏輯式曲線擬合)。
- 參考標準曲線與陽性品管曲線之 EC_{50} 值。
- 參考標準曲線與陽性品管曲線之有效漸近線(反應範圍)。
- 參考標準曲線與陽性品管曲線之 R^2 值。
- 參考標準曲線與陽性品管曲線間之平行性
- 陽性品管相對生物活性(參考標準與陽性對照之 EC_{50} 比例)。
- 陽性品管計算濃度(單點陽性品管測量)。
- 陰性品管(非專一性分析物或稀釋劑)結合反應。

應使用大量配體、分析物、偶聯劑及感測器表面以建立可反映正常分析條件之分析系統適用性標準。應隨時追蹤參考標準品與品管檢品之分析結果；對數據應進行定期趨勢分析，以顯示 SPR 分析是否在所需生命週期內維持管制狀態。若數據觀察到趨勢，則可以主動執行補救措施，以防止分析失敗。

對用於批次放行試驗之 SPR 分析，建立檢品允收基準也很重要。這些標準用於接受或拒絕檢品數據，其中包括：

- 測試檢品相對生物活性。
- 檢品複製變異係數 (coefficient of variation, CV)。
- 參考標準曲線與陽性品管曲線間之平行性。

上述關於系統與檢品適用性標準主要應用於 SPR 濃度分析或典型效價分析。對於 SPR 親和力與動力學分析形式，應使用其他標準來接受或拒絕分析或檢品數據。建議使用以下其他參數進行 SPR 親和力與動力學分析：

- R_{max}
- 1:1 擬合模型之參數。
- $Chi^2 \leq R_{max}$ 之 10%。
- 在定義範圍內之 K_D 親和常數。
- 在定義範圍內之 k_a 與 k_d 速率常數。

在管制環境中 SPR 分析應考慮之另一點為非關鍵試劑與關鍵試劑識別。非關鍵試劑通常包括偶聯緩衝液、再生緩衝液及連續流動(操作)緩衝液。關鍵試劑通常包括用於直接結合分析之配體與分析物，以及在抑制結合測定中之配體，分析物與競爭分子。關鍵試劑應按常

規進行評鑑/再評鑑，以確保其適用於 SPR 共振分析。關鍵試劑特性分析之最佳實踐不在本通則範圍內，因此請參考當前法規進行此類討論。分析人員在管制實驗室中驗證 SPR 分析時，應參考當前法規文件，例如：ICH 準則 Q2(R1)分析程序確效；生物測定之確效指引(通則 5034)與分析方法確效指引(通則 3068)。