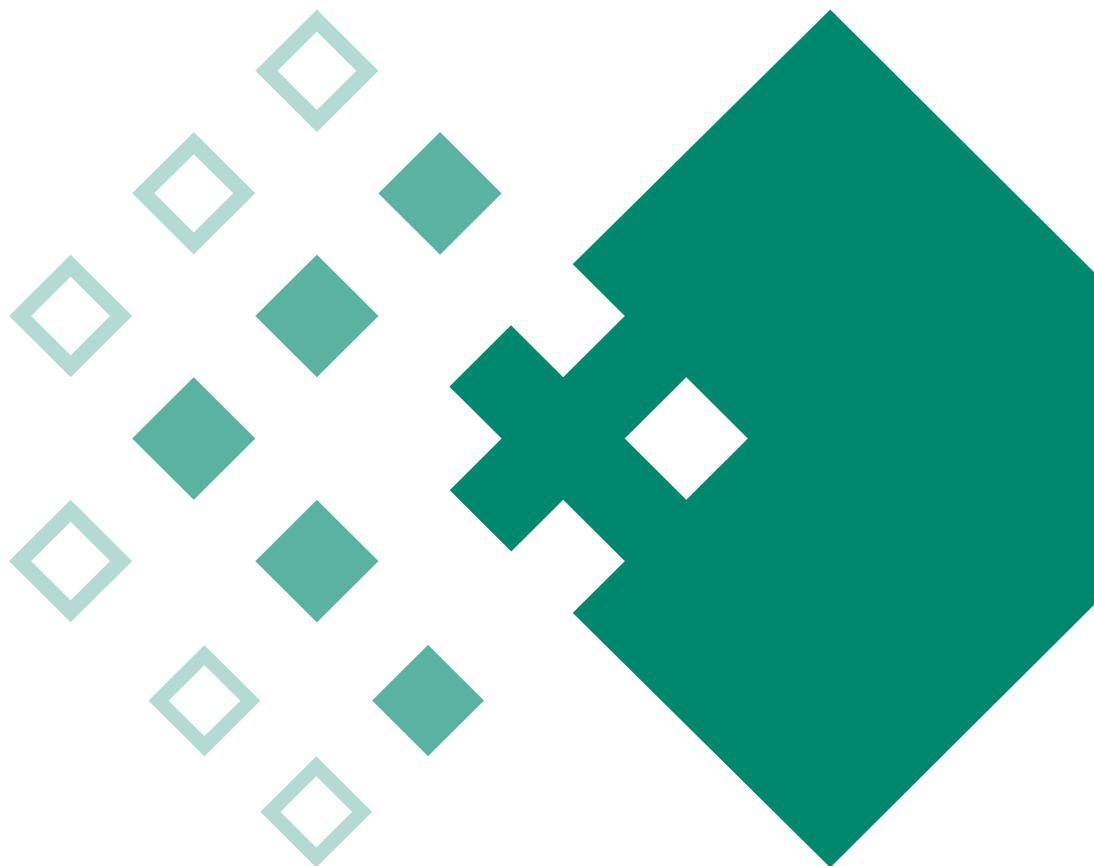


Biacore™ 8K 捕获法检测 抗体与 FcRn 相互作用

操作指南



目录

01	实验目的	03
02	注释	03
03	实验使用机型、试剂和耗材	03
04	实验步骤	04
	(一) 仪器准备	04
	(二) 样品检测过程	06
	(三) 实验结果分析	09
05	CM5直接固定FcRn检测	11

Biacore™ 8K 捕获法检测抗体与 FcRn 结合操作指南

一、实验目的

利用 Biacore™ 8K 检测抗体与 FcRn 结合的亲和力数据 K_D 。本实验利用 S 系列 NTA 芯片 + NTA reagent kit (或使用 S 系列 CM5 芯片偶联 anti-his 抗体, 具体操作参考《Biacore™ 8K 捕获法检测抗体与 FcγR 相互作用操作指南》), 捕获带 his-tag 的 FcRn, 抗体作为分析物检测亲和力。也可使用 S 系列 Protein A/G 芯片 (货号分别为: 29-1275-55 和 29-1793-15) 或 S 系列 CM5 + human antibody capture kit (货号: 29234600) 通过捕获法, 捕获抗体, FcRn 作为流动相进行检测, 具体操作可参考《Biacore™ 8K 捕获法检测抗体与抗原相互作用操作指南》。若 FcRn 所带 tag 为 biotin, 也可用 S 系列 SA 芯片 (货号: 29-1049-92) 或选择 Biotin CAPture Kit, Series S 货号: 28-9202-34) 来进行检测, 具体操作可参考《Biacore™ 8K 捕获法检测蛋白与核酸相互作用操作指南》。

二、注释

注意事项: 实验前请仔细阅读该指南, 并准备好相应实验用品。该指南仅供类似实验参考, 用户须根据实际样品来源、条件、目的调整各项实验参数。

三、实验使用机型、试剂和耗材

1、本实验所用的机型: Biacore™ 8K, 若为其他机型, 请按照对应机型的操作说明进行调整, 或咨询 Biacore 产品专家。

2、S 系列 NTA 芯片。S 系列 NTA 芯片货号: 28-9949-51 (一片装), BR-1005-32 (三片装), 厂家为 Cytiva。

3、NTA reagent kit (货号: 28-9950-43), 包含 0.5 mM 50 ml NiCl_2 和 350 mM 100 ml EDTA, 厂家为 Cytiva。

(也可扫描右侧的二维码选择含上述2和3所有耗材的套餐)



4、运行缓冲液: 10 x PBS-P+ (货号: 28-9950-84), 厂家为 Cytiva。稀释到 1 x PBS-P+ 后用 HCl 将 pH 调至 6.0。

5、去离子水 (0.22 μm 膜过滤, 若纯水仪已含该滤芯, 可无需再次过滤直接使用)。

6、96 孔微孔板 (250 μl) (货号: BR100503), 厂家为 Cytiva。

7、带 His-tag 的 FcRn, 用去离子水溶解稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

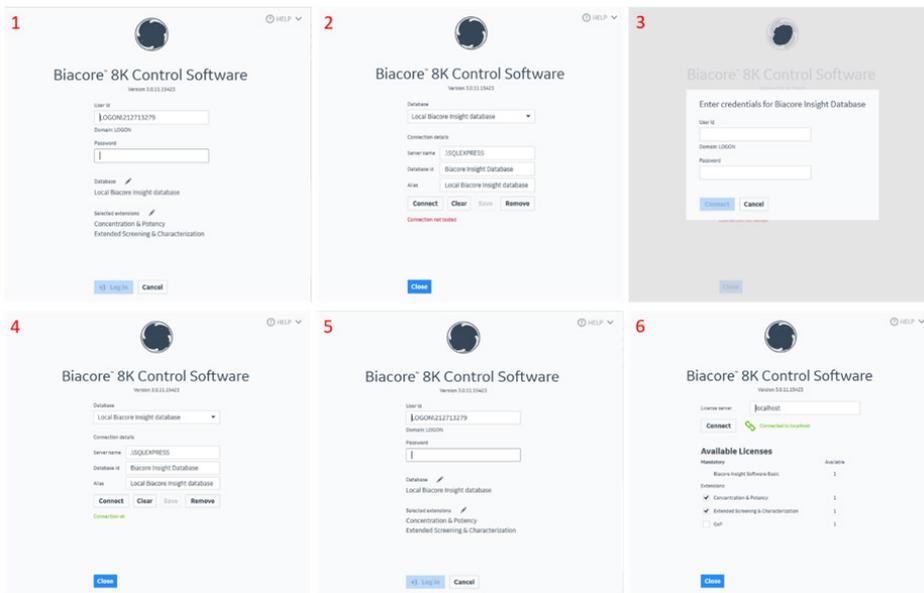
四、实验步骤

(一) 仪器准备

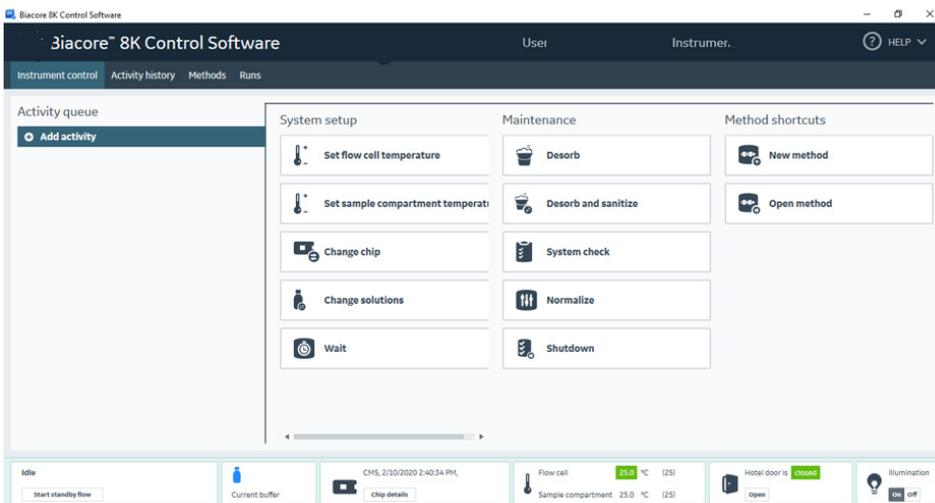
1、开机操作

1) 打开 Biacore™ 8K 系统和电脑电源开关。Biacore™ 8K 的电源开关位于系统背面的左下角。开机自检通过后，即可操作。

2) 打开 Biacore™ 8K 控制软件，先点击 Database 后的 ，再点击 Connect，输入用户名和密码（与电脑登录的用户名和密码一致），点击 Connect，确保 database 已经连接，点击 close，回到登录主界面，点击 Selected extensions 后的 ，再点击 Connect，勾选下面的 extension module，点击 close，回到登录主界面，最后再输入密码，点击 Log in），运行后软件程序会自动和主机系统建立连接，显示控制软件主界面。



Biacore™ 8K Control Software 登录界面



Biacore™ 8K Control Software 主界面

3) 准备运行缓冲液。量取 50mL 10 x PBS-P+ buffer、450mL 去离子水(已经 0.22 μm 膜过滤), 混匀后放入 500 mL 缓冲液瓶。

4) 设备开机后, 即可使用, 无需等待。

2、缓冲液的放置

1) 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore™ 8K 系统右侧的桌面上, 并将标记 buffer 的进液管 A 插入至缓冲液瓶底部。

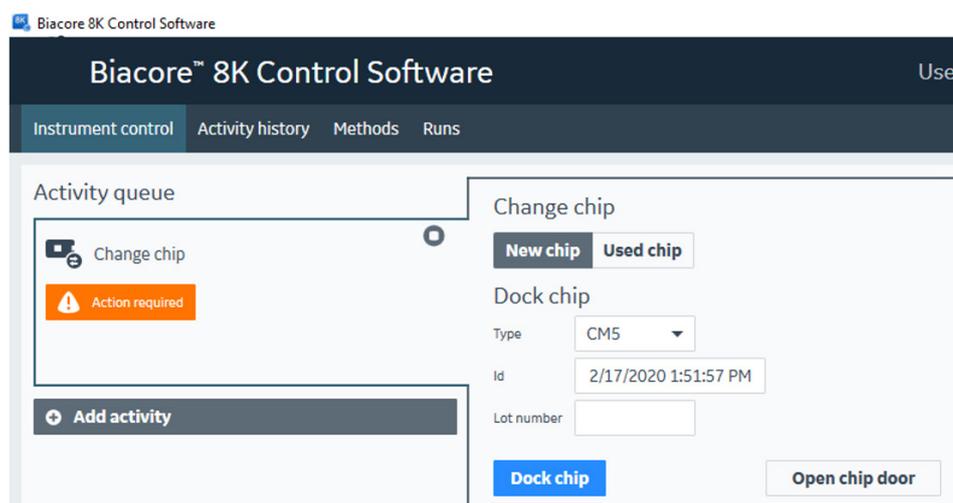
2) 取 2 L 去离子水装入 2 L 缓冲液瓶, 同样放置在右侧桌面上, 并将标注有 water 和 reagent 的进液管插入至纯水瓶底部, 用于清洗进样针。(Reagent 管路用于实验中大量溶液进液, 无需使用时放入纯水瓶)

3) 将废液桶放置在 Biacore™ 8K 系统下方, 将废液管连接到废液桶上。

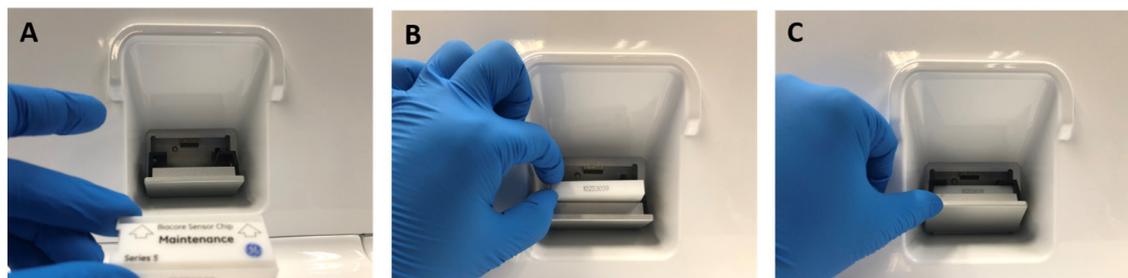
3、芯片的放置

1) 点击控制软件主界面第一列的  **Change chip**, 再点击 **Undock chip** 稍等 1 分钟, 自动打开芯片舱门。

2) 如果使用的是新芯片, 选择 New Chip。在 Type 的下拉菜单中选择对应的芯片种类, 在 Id 中填入和芯片相关的实验信息, Lot No. 中可填入芯片批号(选填)。如果是已经使用过的芯片, 请选择 Used Chip, 直接选择芯片信息。



4) 手持芯片, 有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向, 将芯片轻轻推入卡槽, 最后合上芯片舱的舱门。



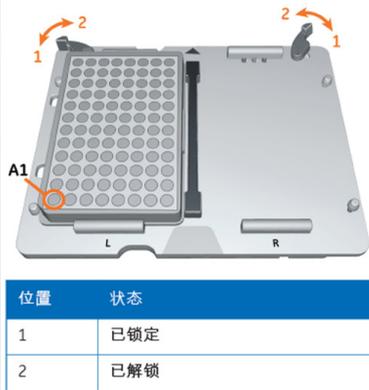
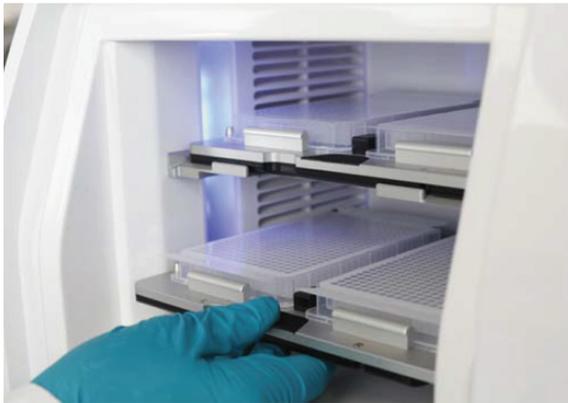
5) 点击 Dock Chip 按钮，芯片置入后系统将自动转入待机（Standby）状态。

6) 点击控制软件主界面第一列的  **Change solutions** 命令，点击 Ready to start。缓冲液会以较高的流速冲洗整个内部的流路系统，整个过程耗时 6-7 分钟。结束后，系统自动转入待机（Standby）状态。注意：当系统更换缓冲液后，必须运行 Change solutions 程序。Change solutions 时缓冲液会冲洗整个流路系统，为下一步的实验做好准备。

4、放置样品盘

1) 点击控制软件主界面右下方  Hotel door is closed open 按钮，样品舱舱门会自动打开，此时主界面右下方显示变为  Hotel door is open，注意 open 和 close 的颜色变化。

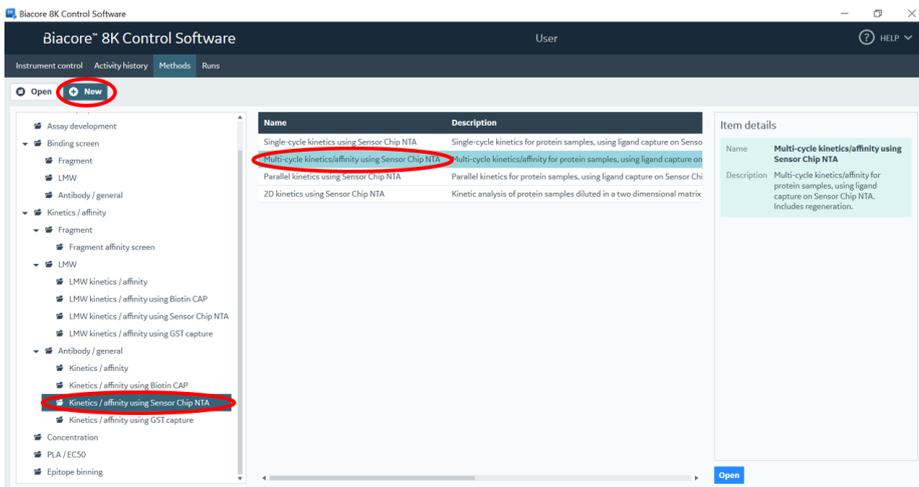
2) 如下图所示，取放样品盘和 96/384 孔板，解锁孔板（1→2），并放入新配置的 96/384 孔板，锁定（2→1），然后再放入样品舱，注意样品盘要正确放入对应卡槽中，关上舱门，此时主界面右下方显示变为  Hotel door is closed，表明舱门已关。（注意，Biacore™ 8K 配有 2 块样品盘，Biacore™ 8K plus 配有 6 块样品盘，实验中取放其他样品盘，可照此操作）



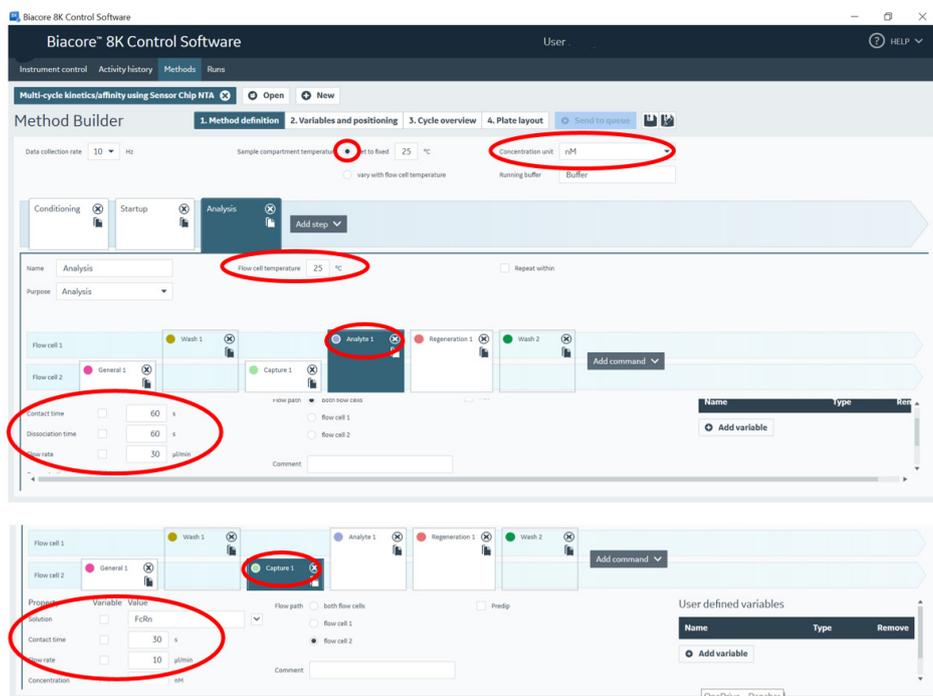
样品架的取出方式

（二）样品检测过程

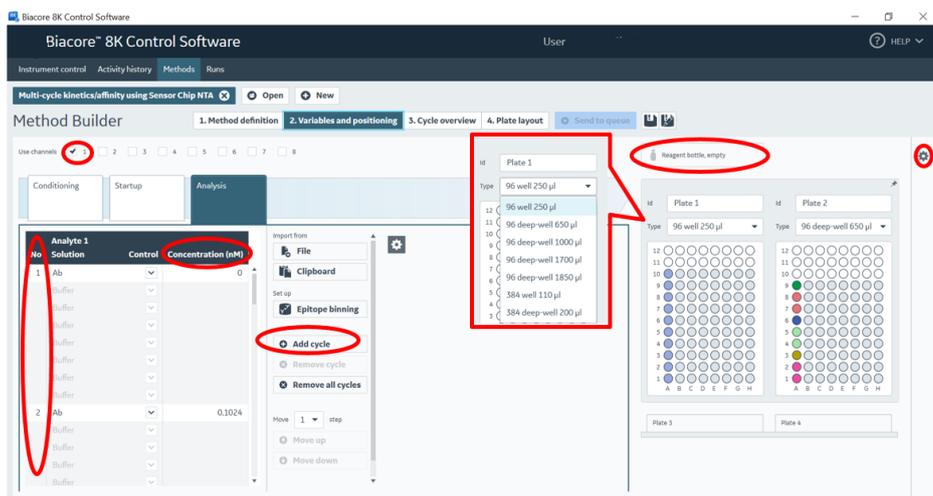
1、点击 Biacore™ 8K Control Software 的上方任务栏中的 Methods，单击  **New**，选择 Kinetics /affinity>Antibody/general>Kinetics/affinity using Sensor Chip NTA 菜单中的 Multi-cycle kinetics/affinity using Sensor Chip NTA 模板，双击打开。（若要捕获不同的 FcγR 或 FcRn，可改用其他 method，具体的操作参考《Biacore™ 8K 检测抗体与不同 FcγR 相互作用操作指南》）



2、在 1.Method definition 界面中，样品舱温度选择为 set to fixed 25°C，浓度单位选择对应的单位，其他不变。下面的 Analysis 窗口中，分析温度填写默认的 25°C。在 Analyte 1 选项卡中，Contact time 为60s，Dissociation time 为60s，Flow rate 为30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。在 Capture 1 选项卡中，Solution 填入 FcRn，contact time 为 30s（捕获量在100 RU左右），Flow rate 为10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。其余选项卡保持默认选项。在 Startup 中的各项填上与 Analysis 窗口一样的数字（或者按照系统默认的值不变）。



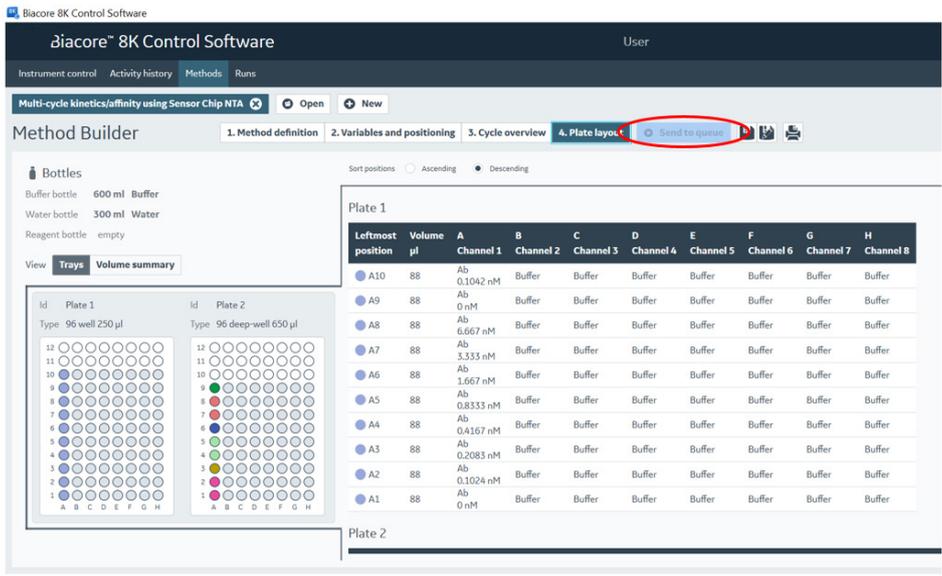
3、在 2. Variables and positioning 界面中，在 Use channels，只对 1 进行勾选（Channel 2-7 本次实验不使用）。在 Startup 选项卡 Add Cycle 增加至五个循环，点击 Analysis 选项卡，在跳出的表格的 solution 填写样品名称，点击 Add Cycle 增加至十个循环，第一个循环 Concentration 为 0 nM，将所有浓度由低到高填写（注意要设置重复浓度和零浓度），在右方根据样品体积在 Type 中选择 96/384 孔板类型，并设置与更改样品位置。具体填写如下：



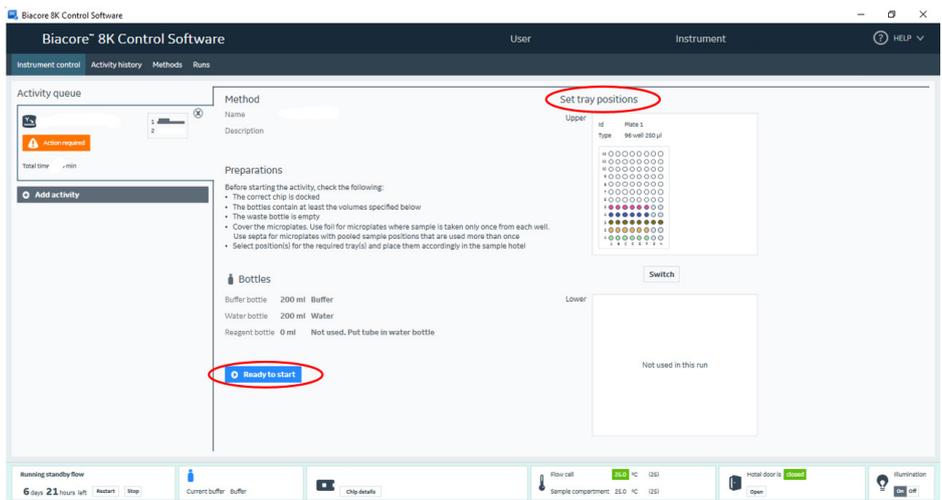
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的 ⚙️ 图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。若需使用到大体积溶液可将其用鼠标拖动到 Reagent bottle。

4、点击 3. Cycle overview，检测各项是否填写错误或漏填，若漏填，系统会在相应位置红色提醒。

5、在 4. Plate layout 界面，按照右边表格所示准备相当体积的样品（样品B使用 1 x PBS-P+ buffer 稀释），并按照左边 96 孔板指示位置，将样品加入其中。（实验所进行的行中其他空格必须使用buffer补足相应体积）将96孔板置于样品架并锁定后，送入样品舱。

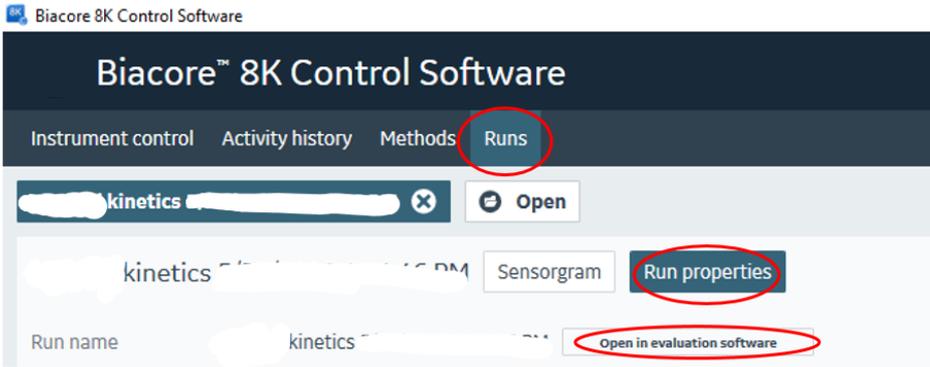


6、点击上方的文件保存图标，将方法文件保存在相应路径中，（这样系统会自动保存该文件，后续有类似操作时，可直接调用该文件）。再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置和显示一致。然后再点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行程序。（Method及result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）

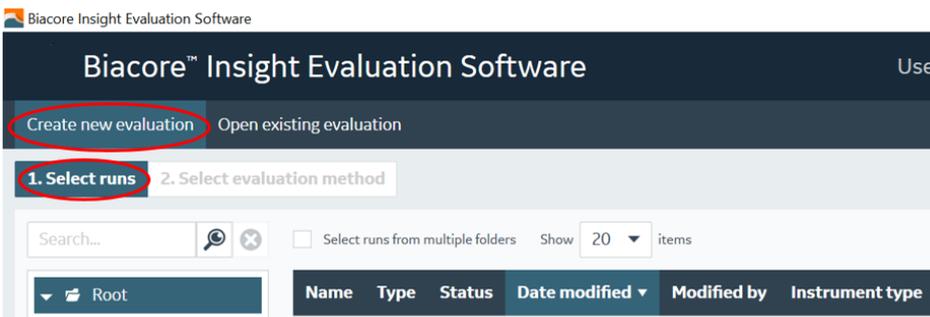


(三) 实验结果分析

1) 点击 Biacore™ 8K Control Software 主界面上方的 Runs，找到结果文件，双击打开。然后，选择 Run properties，点击 Open in evaluation software，界面跳转到 Biacore Insight Evaluation Software。或打开数据分析软件 Biacore™ 8K Insight Evaluation（先点击 local database 确保 database 已经连接，再勾选下面的 extension module，最后再输入密码，同控制软件），选择 Create new evaluation（如果是以前分析好的数据，选择 open existing method，直接打开即可），点击 1. Select runs，找到结果文件，双击打开。

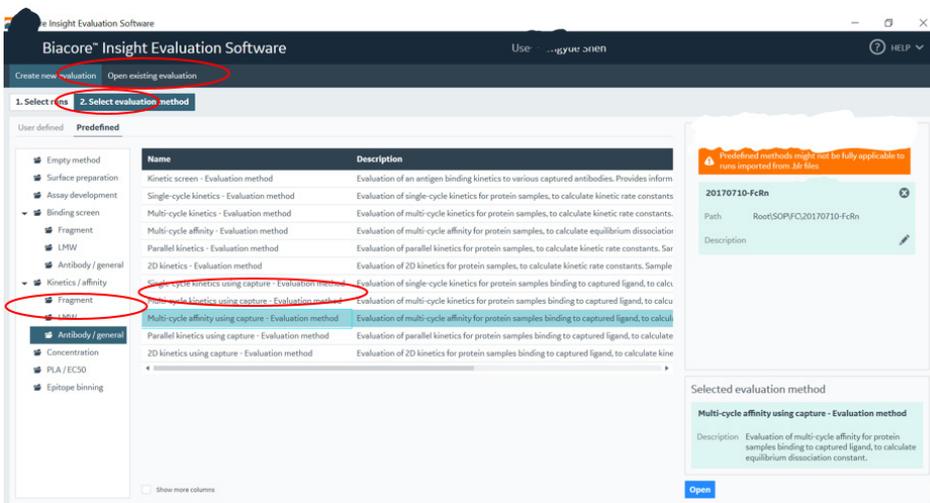


Biacore™ 8K Control 软件打开结果文件

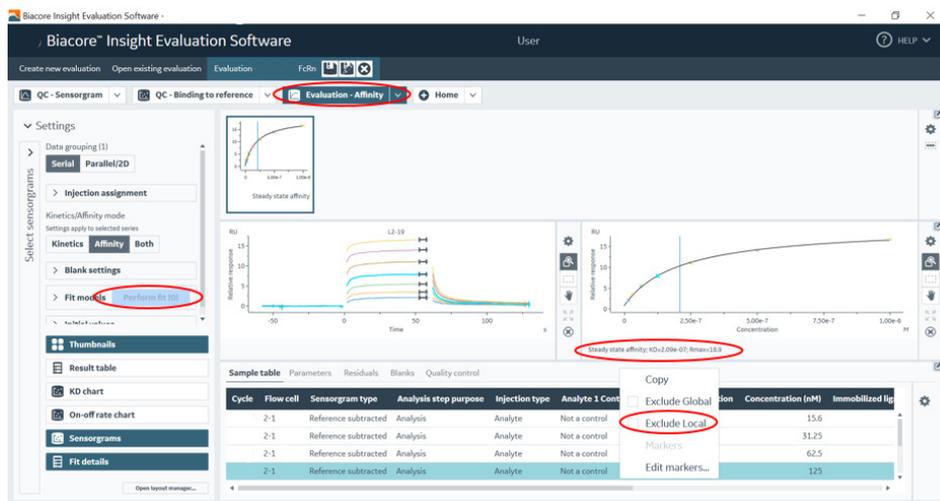


Biacore™ 8K Insight Evaluation 软件打开结果文件

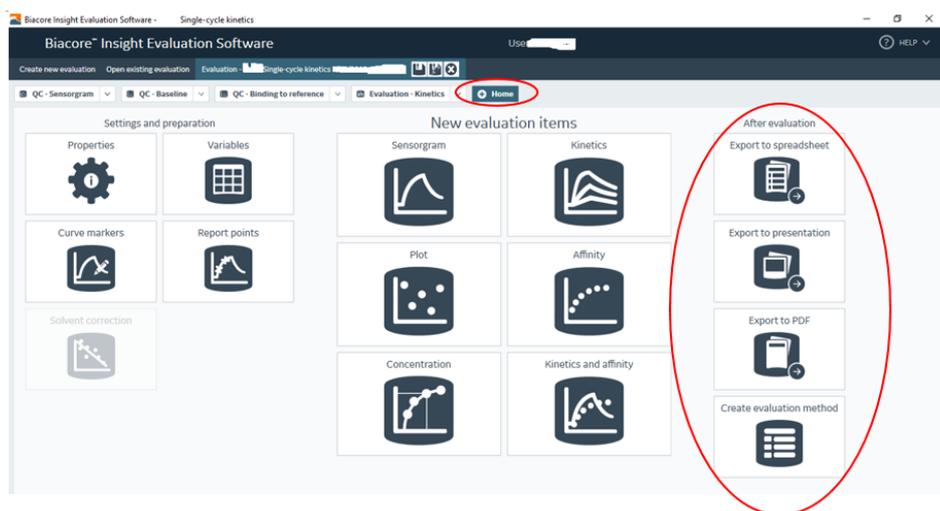
2) 选择 2. Select evaluation method（若从 Control 软件跳转过来，直接进入该页面），点击 Predefined，再选择 Kinetics/affinity 下方的 Antibody/general，选择右侧分析具体方法 Multi-cycle Affinity using capture - evaluation method（同实验方法对应），双击，分析软件自动进行拟合，输出结果。



3) 点击上方 QC-Binding to reference，检查各个点是否小于 Evaluation-kinetics 传感图中对响应值的 20%。如是，直接跳到下一步。注：若 Binding to reference 各个点的响应值大于 Evaluation-Affinity 传感图中对响应值的 20%，即存在非特异性结合。此时可尝试降低流动相样品浓度。



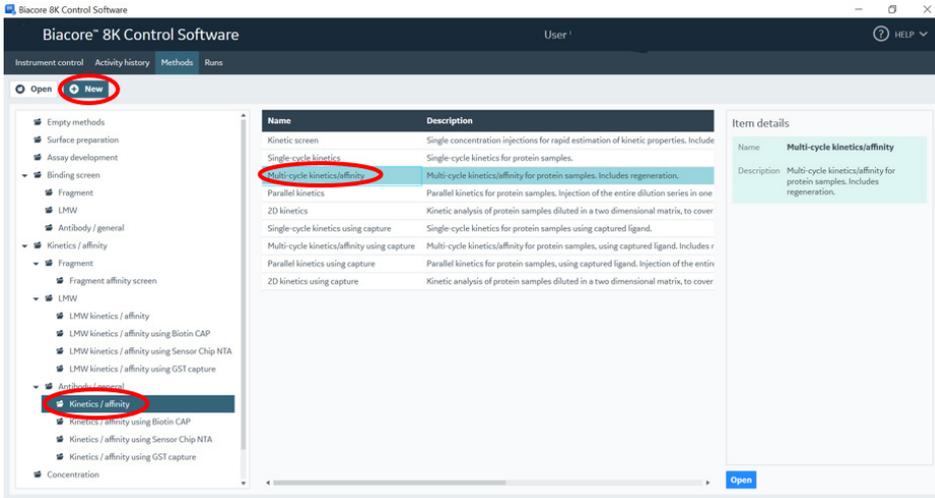
5) 将鼠标放在图上，点击右键可以直接 copy graph 或者 copy small/ medium/ large image) 用于文章发表，也可以右键点击 export curve，导出 txt 文本后自行用第三方软件作图。或者，点击右上方 Home 按钮，根据实际需要，选择主界面右侧结果输出模式（包括 Excel, PPT, PDF 格式）。



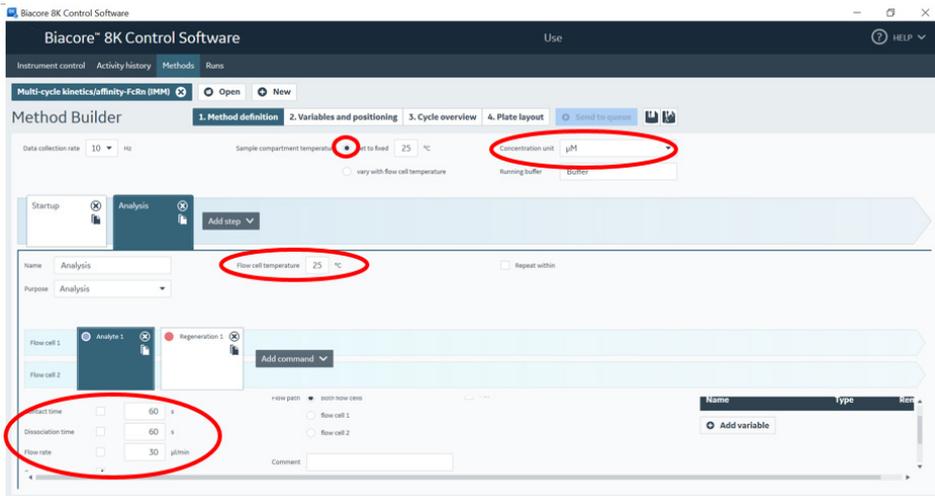
五、CM5 直接固定 FcRn 检测

1、FcRn 检测还可以选用 CM5 芯片对 FcRn 进行直接氨基固定。将运行缓冲液换为 pH6.0 的 PBS-P+, 经配体预富集后, 选用 pH5.0 的醋酸钠进行 FcRn 稀释, 使用 Immobilization 程序进行配体偶联。(具体操作请参考《Biacore™ 8K 检测蛋白与蛋白相互作用操作指南》)

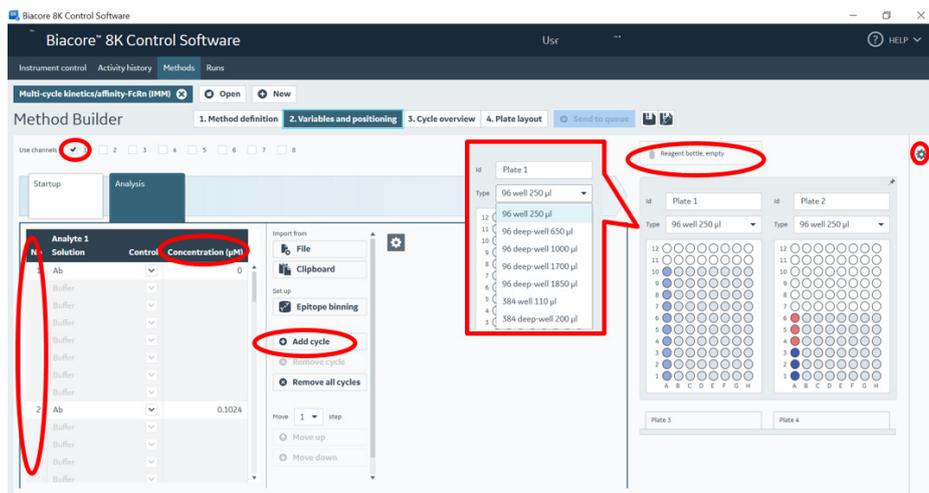
2、点击 Biacore™ 8K Control Software 的上方任务栏中的 Methods, 单击 **+ New**, 选择 Kinetics /affinity >Antibody/general>Kinetics/affinity 菜单中的 Multi-cycle kinetics/affinity 模板, 双击打开。



3、在 1.Method definition 界面中, 样品舱温度选择为 set to fixed 25℃, 浓度单位选择对应的单位, 其他不变。下面的 Analysis 窗口中, 分析温度填写默认的 25℃, Contact time 为 60s, Dissociation time 为 60s, Flow rate 为 30 μ l/min。在 Startup 中的各项填上与 Analysis 窗口一样的数字 (或者按照系统默认的值不变)。



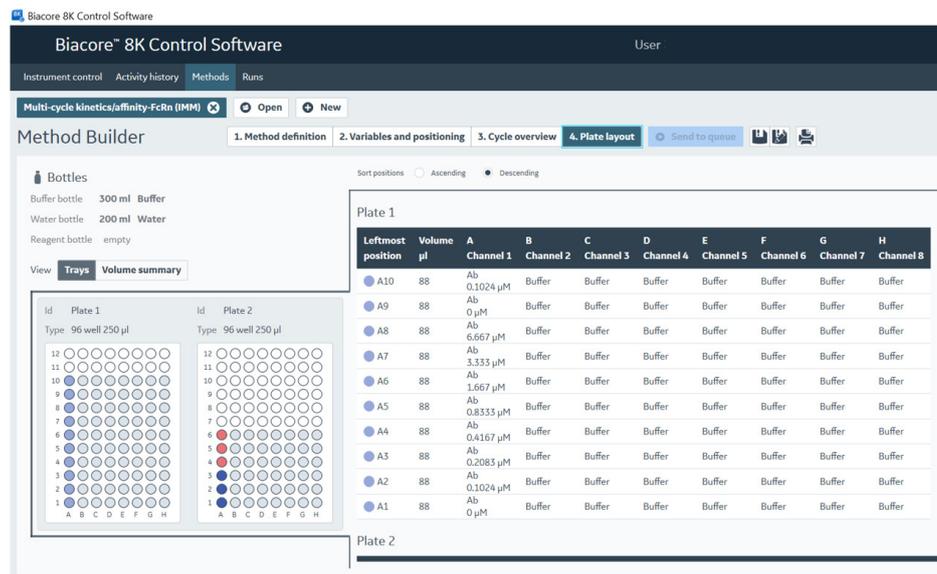
4、在 2. Variables and positioning 界面中，在 Use channels，只对 1 进行勾选（Channel 2-7 未偶联配体，本次实验不使用）。保持 Startup 默认设置，点击 Analysis，在跳出的表格的 solution 填写样品名称，点击 **Add cycle** 添加循环至十个循环，第一个循环 Concentration 为 0 nM，将上述所有浓度由低到高填写（注意要设置重复浓度和零浓度），在右方根据样品体积在 Type 中选择 96/384 孔板类型，并设置与更改样品位置。具体填写如下：



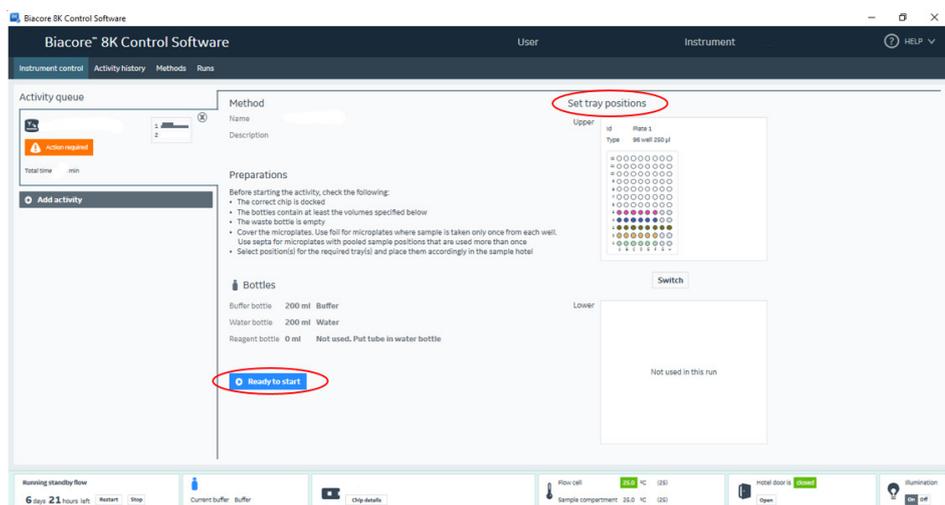
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的 图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。若需使用到大体积溶液可将其用鼠标拖动到 Reagent bottle。

5、点击 3. Cycle overview, 检测各项是否填写错误或漏填，若漏填，系统会在相应位置红色提醒。

6、在 4. Plate layout 界面，按照右边表格所示准备相当体积的样品（样品 B 使用 1 x PBS-P+ buffer 稀释），使用的 Regeneration Solution 为 350 mM EDTA，并按照左边 96 孔板指示位置，将样品加入其中。（实验所进行的行中其他空格必须使用 buffer 补足相应体积）将 96 孔板置于样品架并锁定后，送入样品舱。



7、点击上方的文件保存图标，将方法文件保存在相应路径中，（这样系统会自动保存该文件，后续有类似操作时，可直接调用该文件）。再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置和显示一致。然后再点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）



8、后续数据分析请参考《Biacore™ 8K 检测蛋白与蛋白相互作用操作指南》。

如有问题，请拨打免费技术热线

请拨打 400-810-9118

关于 Cytiva 思拓凡

Cytiva (思拓凡) 是全球生命科学领域的先行者，是 Danaher (丹纳赫集团) 旗下独立运营公司。作为值得信赖的合作伙伴，Cytiva 积极携手学术及转化医学领域的研究人员、生物技术开发者和制造商，专注于生物药物、细胞与基因疗法以及以 mRNA 为代表的一系列创新技术的研究，通过提升药物研发和生物工艺的能力、速度、效率和灵活性，为惠及全球患者开发和生产变革性药物和疗法。欢迎访问 cytiva.com.cn 获取更多信息。

智荟专线：400-810-9118

官微订阅号：Cytiva

官微服务号：CytivaChina

cytiva.com.cn

Cytiva 和 Drop 标识是 Global Life Sciences IP Holdco LLC 或其附属公司的注册商标。

© 2023 Cytiva

所有商品和服务的销售需遵守在 Cytiva 运营之供应商公司的销售条款和条件。

如需查看当地办公室的联系信息，请访问：cytiva.com.cn/contact。

CY42431-31Jan24-HB

