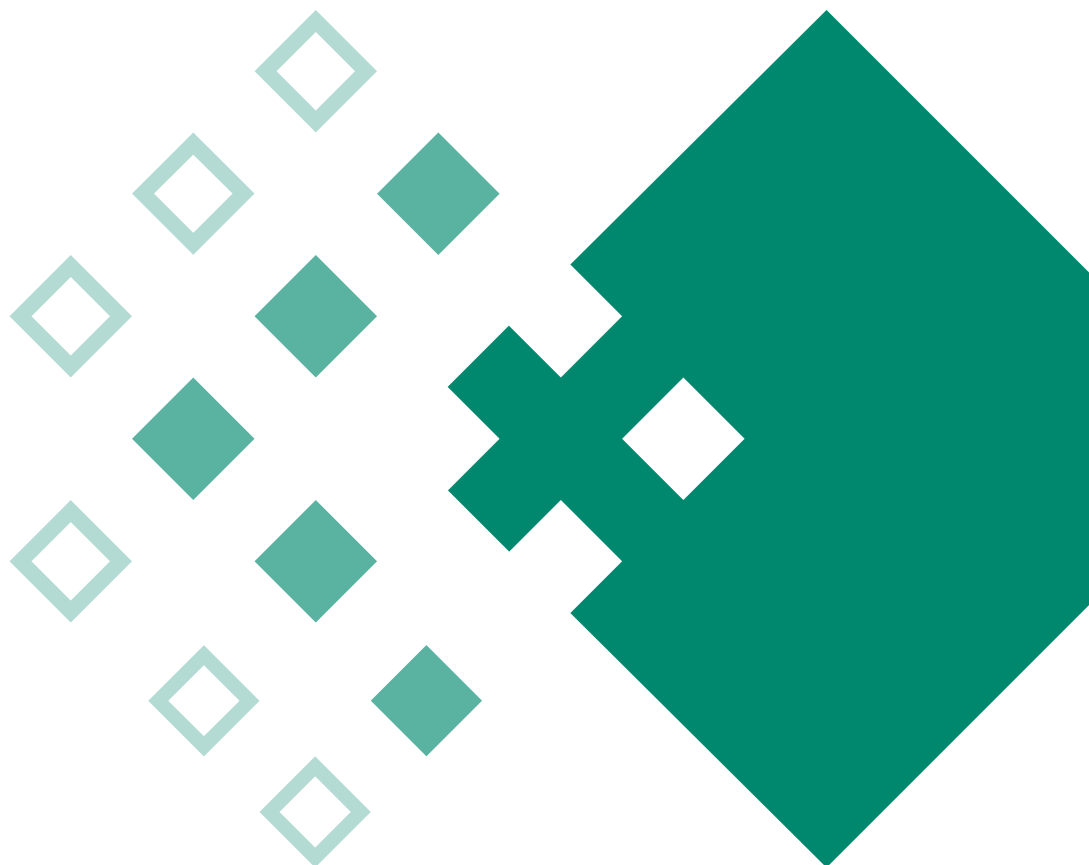


Biacore™ 8K 检测完整 细胞与抗体相互作用

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）细胞偶联	06
	（三）样品检测过程	08
	（四）实验结果分析	10

Biacore™ 8K 检测细胞与抗体结合操作指南

一、实验目的

利用 Biacore™ 8K 检测完整细胞与抗体结合的亲和力数据 K_D 。本实验利用 S 系列 CM5 芯片偶联细胞，抗体作为分析物检测亲和力。

二、注释

注意事项：实验前请详细阅读该指南，并准备好相应实验用品。该指南是按照 Jurkat T 细胞系开发，仅供类似实验参考。对于细胞与蛋白的互作也可参考本指南。但对于其他细胞类型，用户须根据实际样品种类、来源、条件、目的等调整各项实验参数，必要时可先咨询 Biacore 产品专家。

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 CM5 芯片。S 系列 CM5 芯片货号：29-1049-88（一片装），BR-1005-30（三片装），29-1496-03（十片装），厂家为 Cytiva。
- 3、氨基偶联试剂盒（货号：BR-1000-50），厂家为 Cytiva。
- 4、偶联缓冲液：10mM 醋酸钠 pH4.0（货号：BR-1003-49），厂家为 Cytiva。
- 5、缓冲液：10 x PBS（货号：BR-1006-72），厂家为 Cytiva，注意 buffer 中不能含有 P20、Tween-20 或其他去垢剂。
- 6、去离子水（0.22 μ m膜过滤，若纯水仪已含该滤芯，可无需再次过滤直接使用）。
- 7、标准 96 孔板（货号：BR-1005-03），厂家为 Cytiva。
- 8、40 μ m 细胞滤网。
- 9、Jurkat 细胞：培养 Jurkat 细胞至细胞浓度高于 $E6 \text{ cell/mL}$ ，体积为 10 mL。
- 10、待检测抗体：母液浓度 $\geq 1 \text{ mg/mL}$ ，体积 $\geq 50 \mu\text{L}$ 。

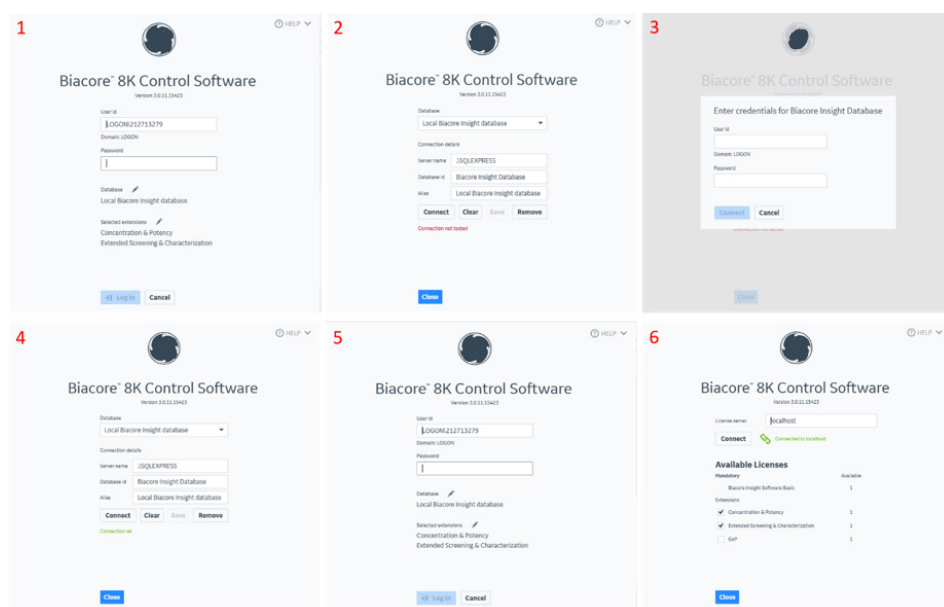
四、实验步骤

（一）仪器准备

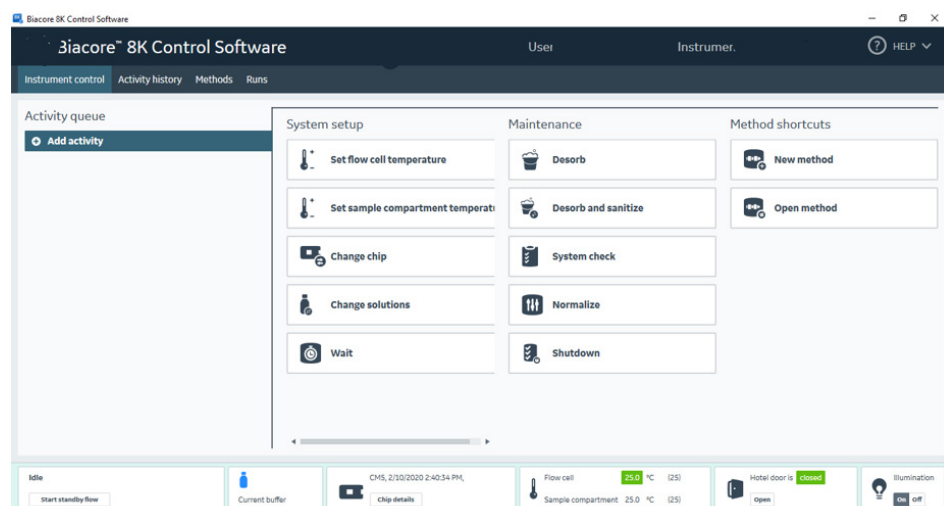
1、开机操作

1) 打开 Biacore™ 8K 系统和电脑的电源开关。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 100 mL 10 x PBS buffer、900 mL 去离子水（已经 0.22 μm 膜过滤），混匀后放入 1000 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。

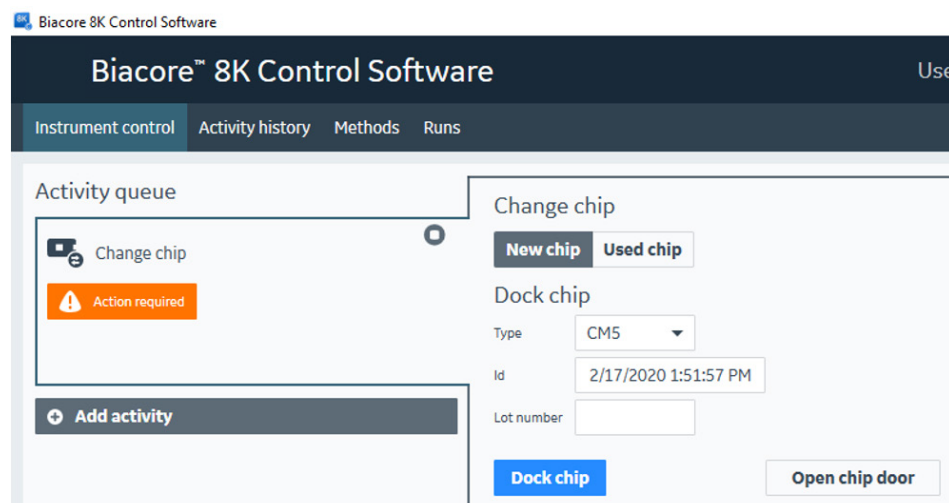
2) 取 2 L 去离子水装入 2 L 缓冲液瓶，同样放置在右侧桌面上，并将标注有 water 和 reagent 的进液管插入至纯水瓶底部，用于清洗进样针。（Reagent 管路用于实验中大量溶液进液，无需使用时放入纯水瓶）

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。

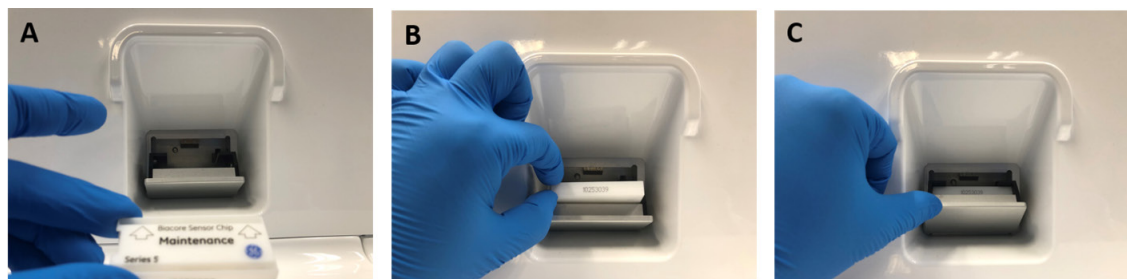
3、芯片的放置

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 的 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+ 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）细胞偶联

1、缓冲液：PBS。

2、Jurkat 细胞前处理

1) 经复苏、培养后的 Jurkat 细胞，400g 离心 5 min，倒去上清。

2) 加入 10 mL PBS，混匀，400g 离心 5 min，倒去上清；反复 3 次。加入适量的 PBS，重新悬起细胞。

3) 40 μm 细胞滤网，滤掉聚集的细胞（无需离心）。

4) 加入 pH4.0 的醋酸钠，将滤后的细胞稀释至密度为 4E4 cell/mL。

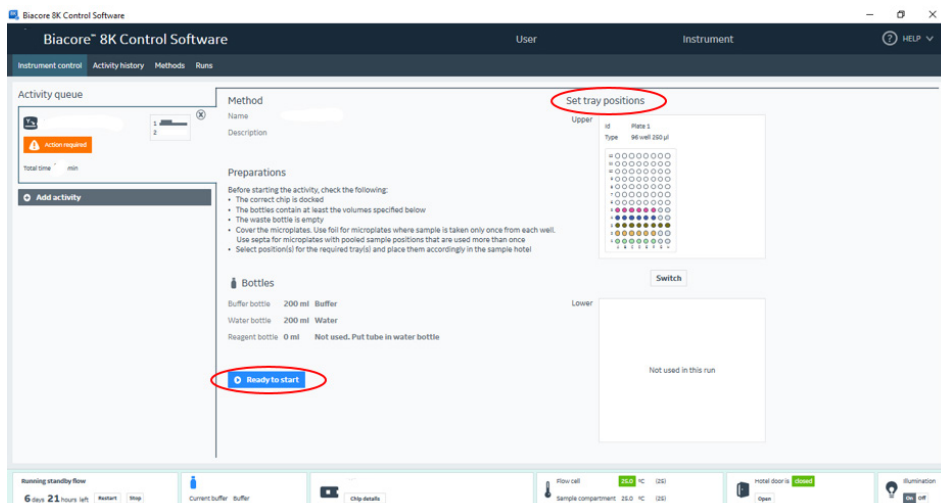
3、Jurkat 细胞偶联

1) 打开 Biacore™ 8K Control Software，点击主界面右上方的 New method，点击 Surface preparation，选择 immobilization。如下图设置好参数，偶联方式（flow cell1 只做活化-封闭，flow cell 2 通道做活化-偶联细胞-封闭，如图红圈标注。若只偶联 flow cell1 或 2，或同时偶联两个 flow cell，则选择红圈上面的对应选项）。偶联时间 1800 s，速度 5 μl/min。去掉 channel2-7 前面的勾（如图蓝色椭圆形标注，此时只需要 1/8 片芯片，即可完成检测）；Channel 1 中 Flow cell 2 ligand name 改为 Jurkat（如图黄色长方形标注）。其他参数不做修改。

2) 点击屏幕中间偏上的 2. Positioning and plate layout 图标，系统会跳转新的窗口，检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够，再按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品，并放入对应 Trays 的 Plate 上的指定位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。以下图为例，100 µl 的 EDC 放入 Plate1 A1，100 µl 的 NHS 放入 Plate1 A2，140 µl 乙醇胺放入 Plate1 A5，200 µl 细胞密度为 4E4 的 Jurkat 细胞（用 pH4.0 的醋酸钠稀释）放入 Plate1 A4，其他显示 Buffer 的区域用 PBS 补齐。将 96 孔板放置在对应该样品的指定 Plate 位置上并锁定，再送回样品舱，合上舱门。

Leftmost position	Volume µl	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6
Plate 1 A5	129	Ethanolamine	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
Plate 1 A4	190	Jurkat	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
Plate 1 A3	Empty	Mix position	Mix position	Mix position	Mix position	Mix position	Mix position
Plate 1 A2	89	NHS	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
Plate 1 A1	89	EDC	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

3) 点击右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。系统正式自动运行偶联程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）

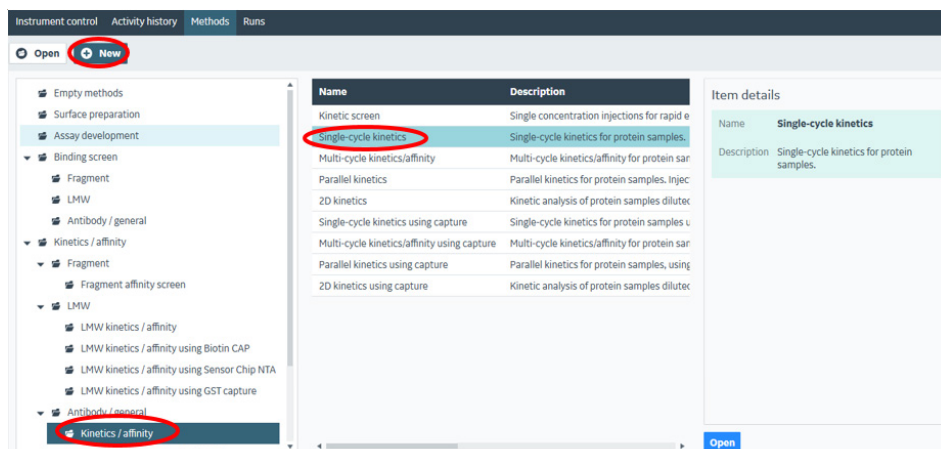


4) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果，本次约偶联 10000RU。

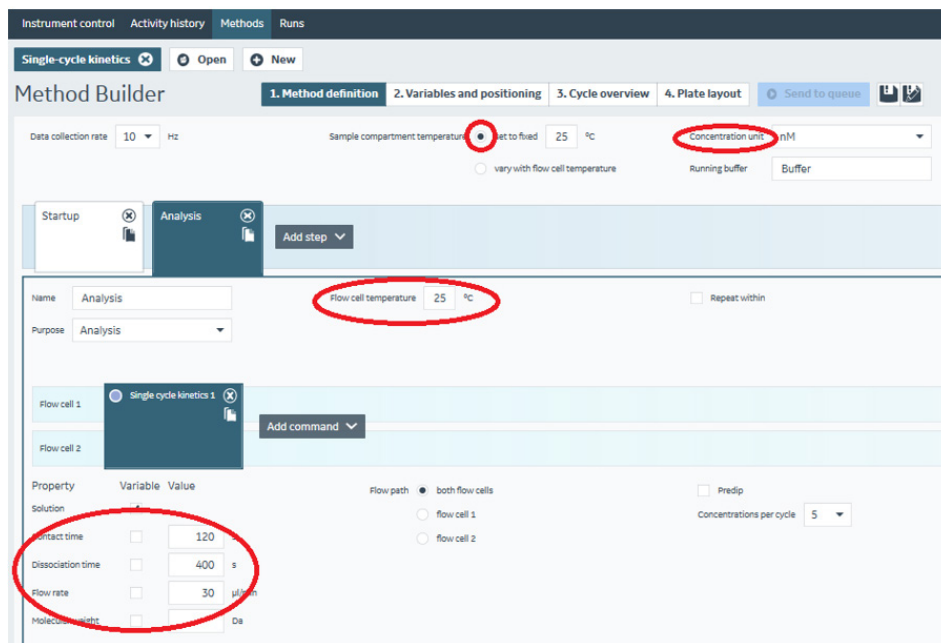
5) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

(三) 样品检测过程

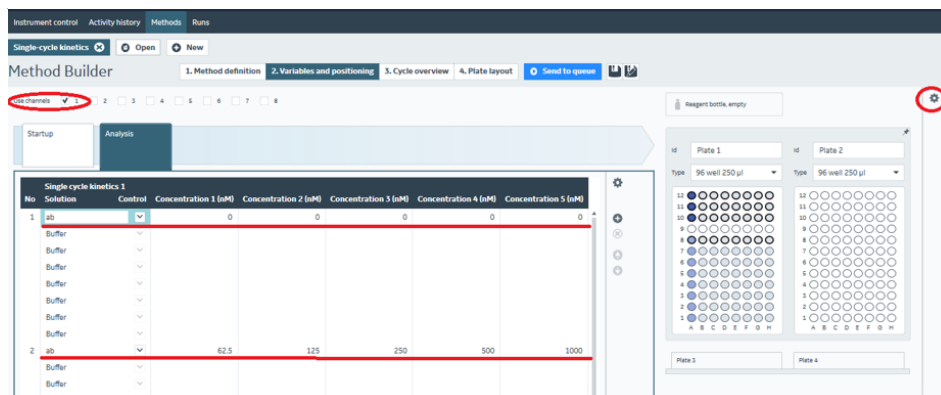
1) 在打开的 Biacore™ 8K Control Software 点击主界面右上方的 New method (或点击 Methods 窗口，再点击 +NEW)，点击 Antibody/general，选择 Kinetics/affinity，再双击右侧 Single-cycle Kinetics (也可选 Multi-cycle Kinetics/Affinity)。



2) 在 1. Method definition 界面里，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 120s，Dissociation time 为 400s (可根据实际情况增减解离时间)，Flow rate 为 30 µl/min。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)。



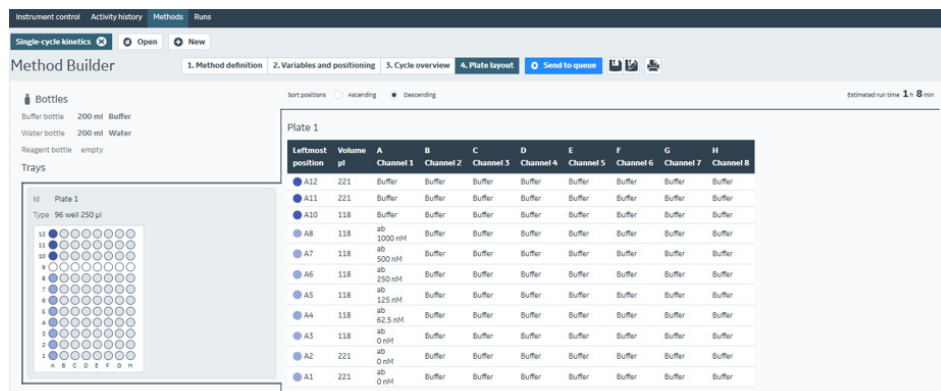
3) 点击屏幕中间的 2. Variables and positioning，系统会跳转到新的界面，在 Use Channels，只选择 1（2-7 未偶联细胞，本次实验不使用），点击 Startup，在跳出的窗口中点击 Add cycle，直到左侧 NO 显示为 5。点击 Analysis，在跳出的表格的 solution 填写样品名称，第一个循环 Concentration 为 5 个 0 nM，第二个循环样品 Concentration 从左到右，按照由低到高填写。填写如下：



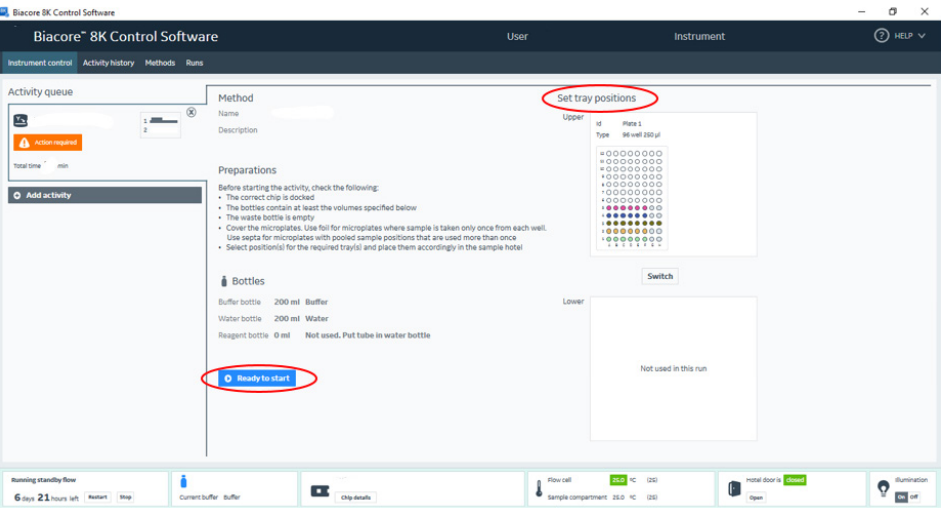
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的 ⚙️ 图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。

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) 点击 4. Plate layout，根据屏幕显示准备样品并放置在相应位置。ab 用运行缓冲液 1x PBS 进行倍比稀释。

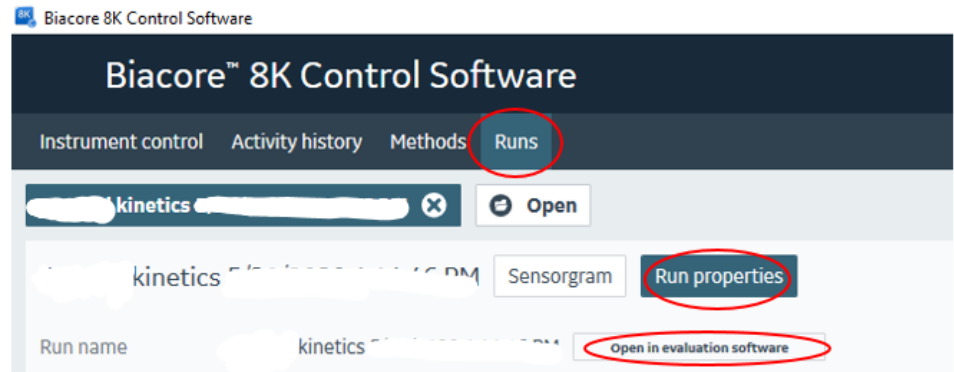


6) 点击上方的文件保存图标，将方法文件保存在相应路径中，（这样系统会自动保存该文件，后续有类似操作时，可直接调用该文件）。再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置和显示一致。然后再次点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）

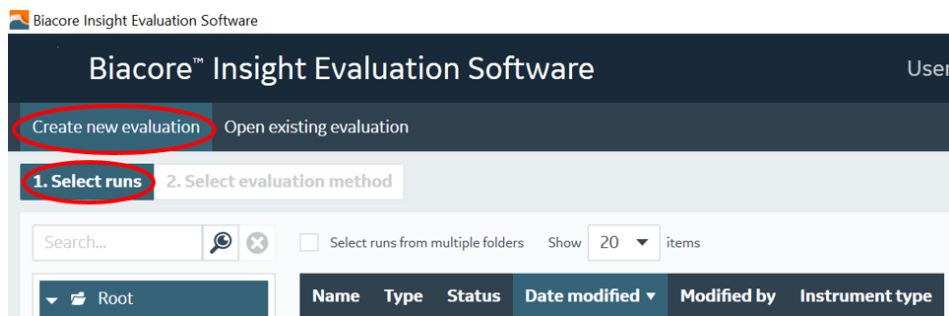


（四）实验结果分析

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。

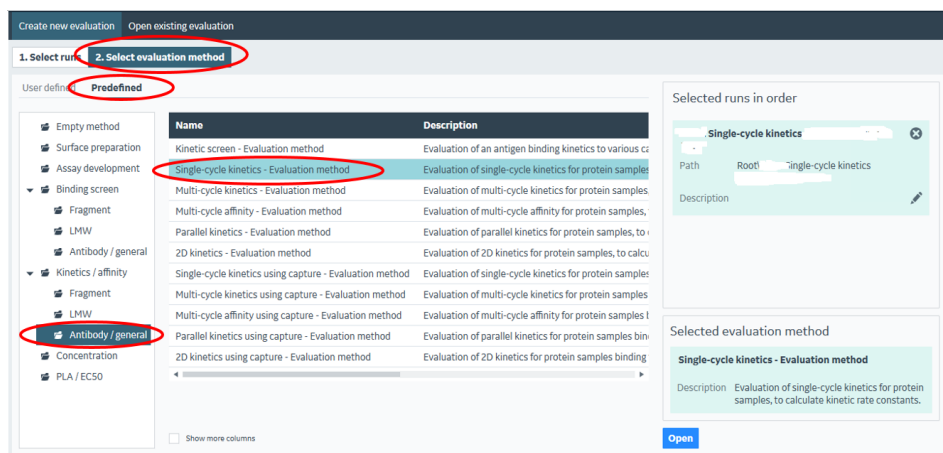


Biacore™ 8K Control 软件打开结果文件

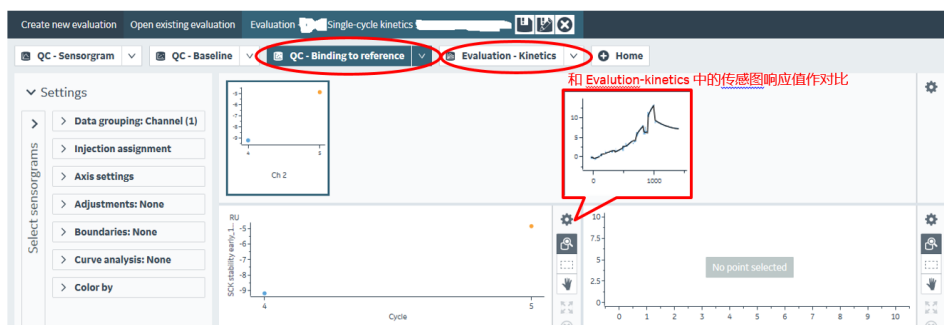


Biacore™ 8K Insight Evaluation 软件打开结果文件

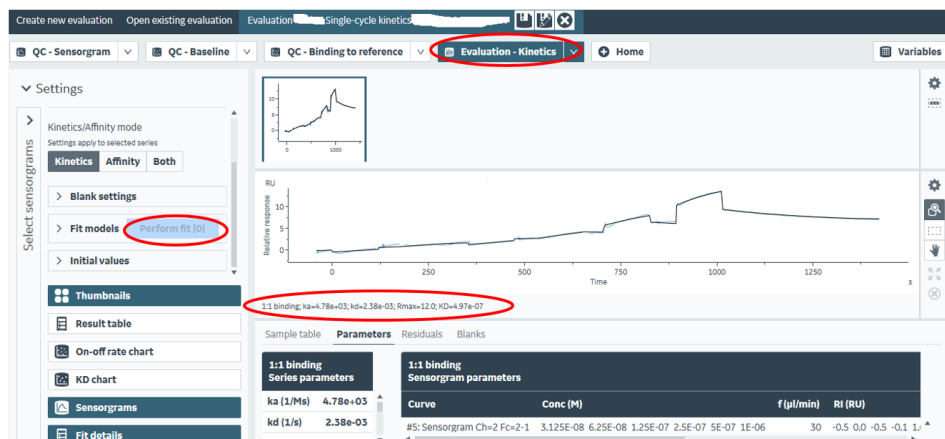
2) 选择 2. Select evaluation method (若从 Control 软件跳转过来, 直接进入该页面), 点击 Predefined, 再选择 Kinetics/affinity 下方的 Antibody/general, 选择右侧分析具体方法 Single-cycle Kinetics-evaluation method (同实验方法对应), 双击, 分析软件自动进行拟合, 输出结果。



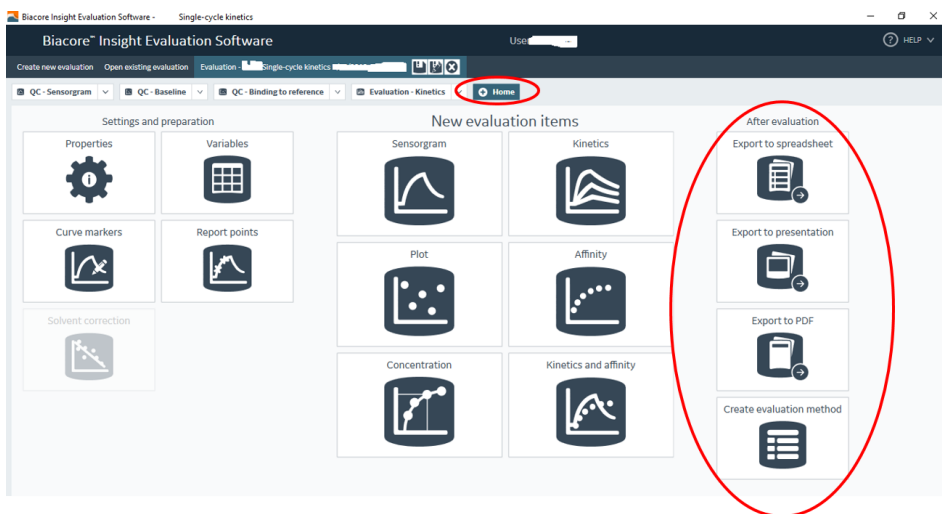
3) 点击上方 QC-Binding to reference, 检查各个点是否小于 Evaluation-kinetics 传感图中中对应响应值的 20%。如是, 直接跳到下一步。注: 若 Binding to reference 各个点的响应值大于 Evaluation-kinetics 传感图中对应响应值的 20%, 即存在非特异性结合。此时可尝试降低流动相样品浓度。



4) 点击 Evaluation-kinetics, 自动拟合后的传感图下方显示, 动力学数据: $k_a = 4.78 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 2.38 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 亲和力: $K_D = 4.97 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。点击下方 Sample table, 选择对应浓度组, 右击鼠标选择 Exclude local, 删除不需要的浓度组。选择标准为: 如果高浓度组响应值小于 500 RU, 选择高浓度组; 如果低浓度组响应值大于 10 RU, 选择低浓度组。(注: 图示实验仅做了一个浓度组)。删除后, 需重新点击左侧 Perform fit 按钮, 得到拟合数据。



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）。



如有问题，请拨打免费技术热线
请拨 400-810-9118

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。

CY42490-02Feb24-HB

