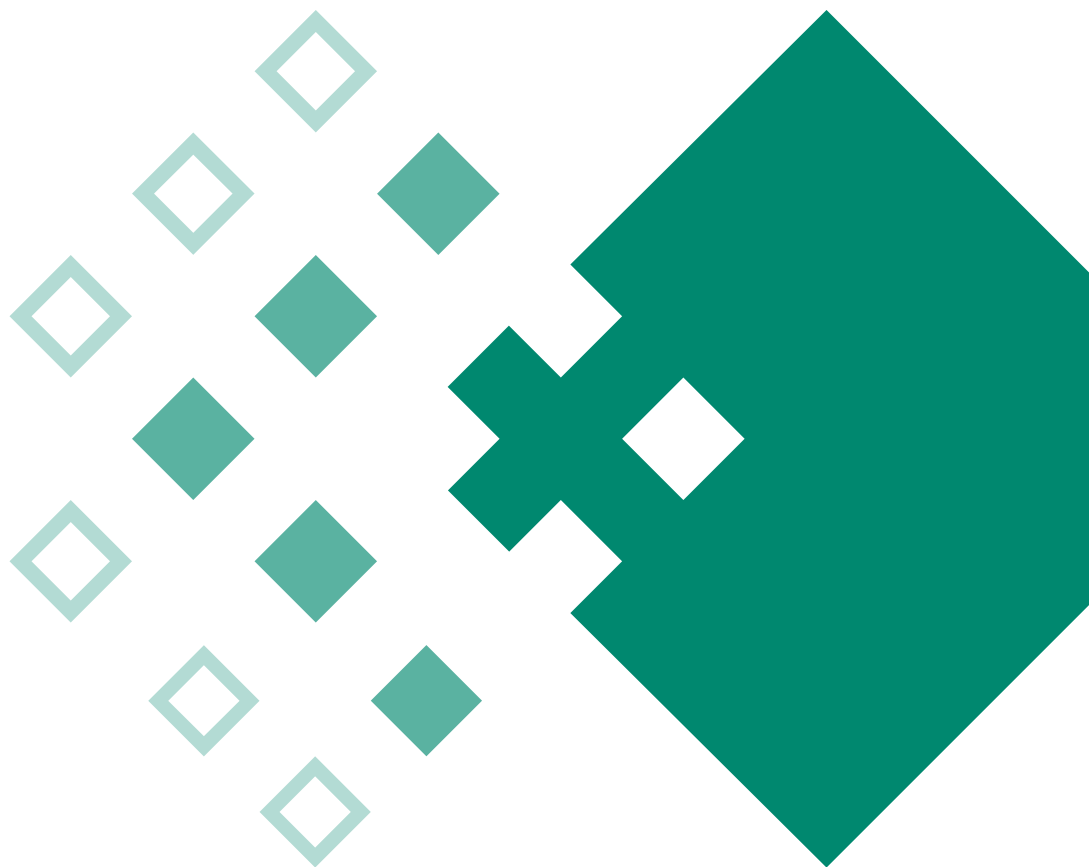


Biacore™ 8K 检测抗体与 FcγR 相互作用

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）捕获芯片制备	06
	（三）样品检测过程	08
	（四）实验结果分析	11

Biacore™ 8K 检测抗体与 FcγR 结合操作指南

一、实验目的

利用 Biacore T200 检测抗体与 FcγR 结合的亲和力数据 KD。本实验利用 S 系列 CM5 芯片偶联 anti-his 抗体（或 S 系列使用 NTA 芯片 + NTA reagent kit，具体操作参考《Biacore™ 8K 捕获法检测抗体与 FcRn 相互作用操作指南》），捕获带 his-tag 的 FcγR，抗体作为分析物检测亲和力。也可使用 Protein A/G 芯片（Protein A 芯片货号：29-1275-55，Protein G 芯片货号：29-1793-15）或 S 系列 CM5 + human antibody capture kit（货号：29234600）通过捕获法捕获抗体，FcγR 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 FcγR 所带 tag 为 biotin，也可用 SA 芯片（货号：BR-1003-98）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 检测蛋白与核酸相互作用操作指南》。

二、注释

注意事项：实验前请详细阅读该指南，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 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、His 捕获试剂盒（货号：28-9950-56），包含 50 μL 1mg/mL anti-his antibody, 1.2 mL Acetate 4.5, 100 mL Glycine 1.5，厂家为 Cytiva。
- 5、缓冲液：10 x HBS-EP+（货号：BR-1006-69），厂家为 Cytiva。
(也可扫描右侧的二维码选择含上述 2/3/4/5 所有耗材的套餐)
- 6、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）。
- 7、96 孔微孔板（250 μl）（货号：BR100503），厂家为 Cytiva。
- 8、带 His-tag 的 FcγR，用去离子水溶解稀释至 1 μg/mL。



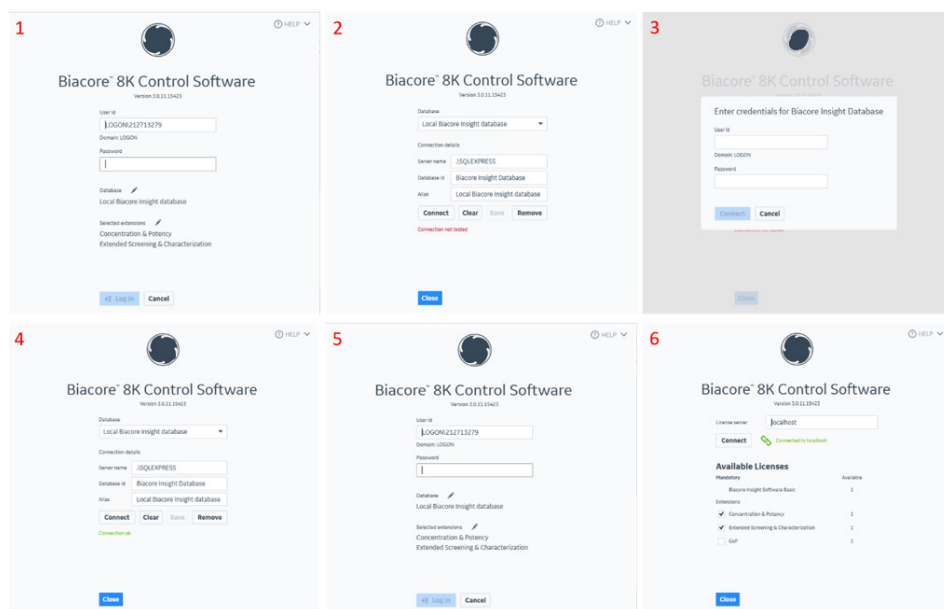
四、实验步骤

（一）仪器准备

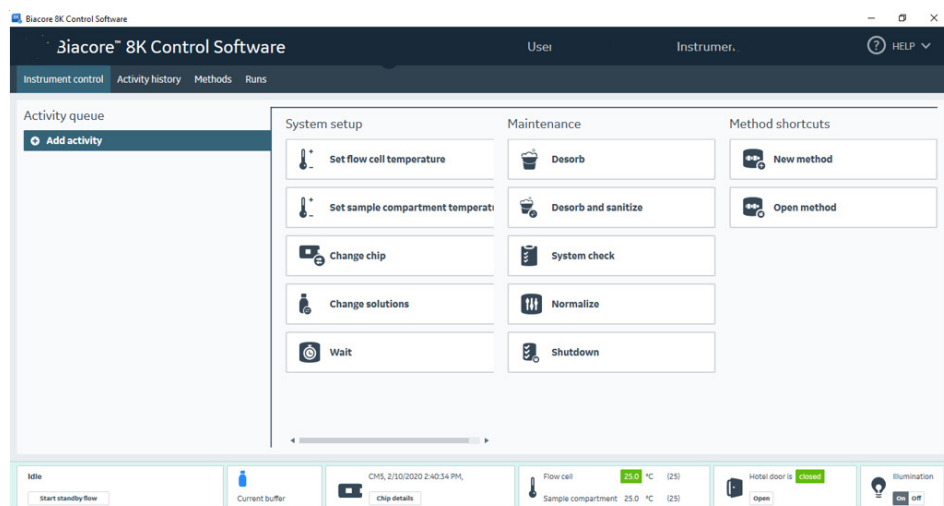
1、开机操作

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 × HBS-EP+ 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。

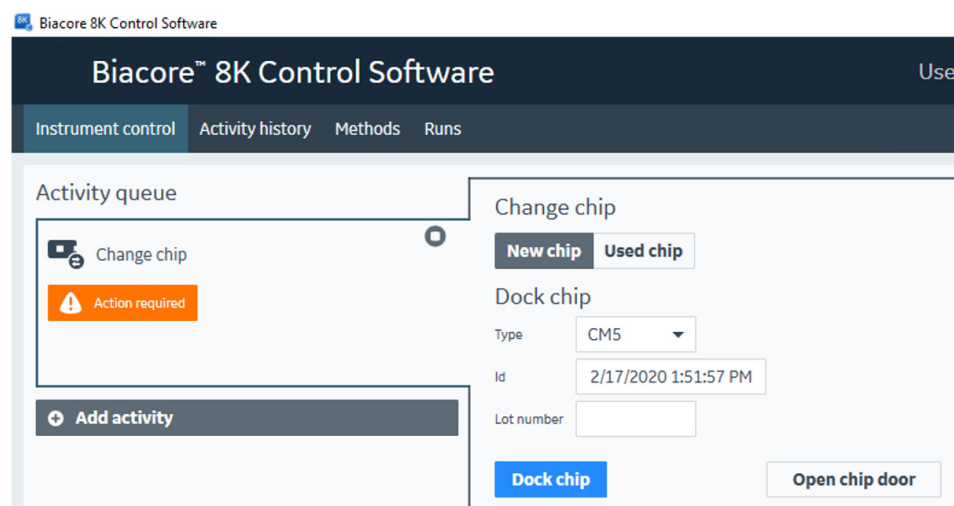
2) 取 2 L 去离子水装入 2 L 缓冲液瓶，同样放置在右侧桌面上，并将标注有 water 和 reagent 的进液管插入至纯水瓶底部，用于清洗进样针。（Reagent 管路用于实验中大量溶液进液，无需使用时放入纯水瓶）

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。

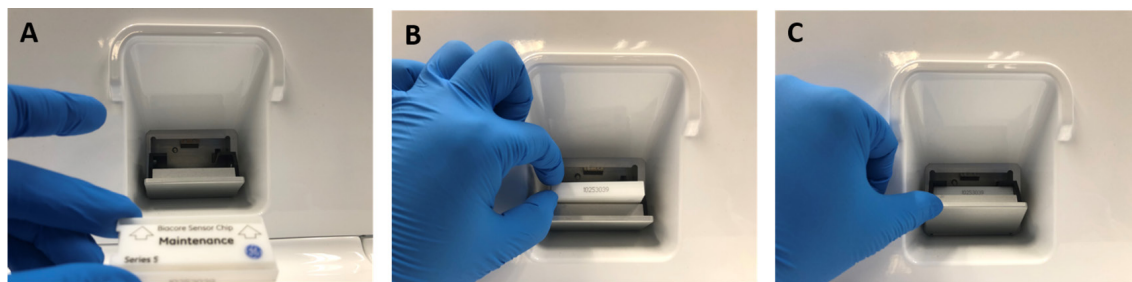
3、芯片的放置

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。



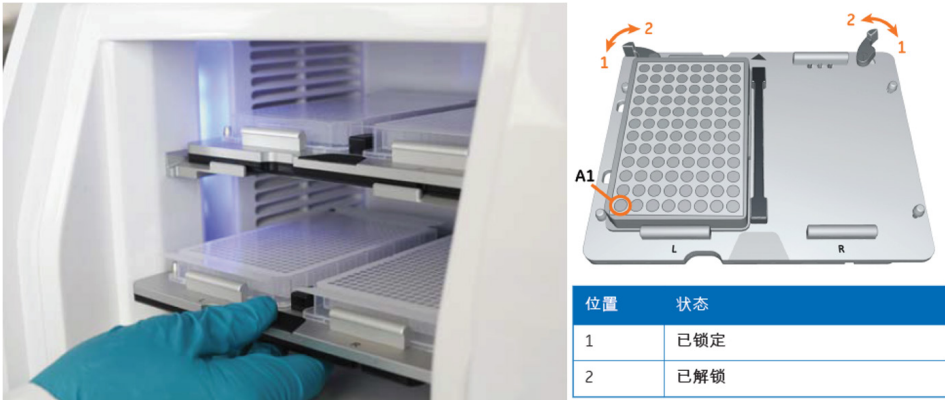
4) 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，将芯片轻轻推入卡槽，最后合上芯片舱的舱门。



- 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

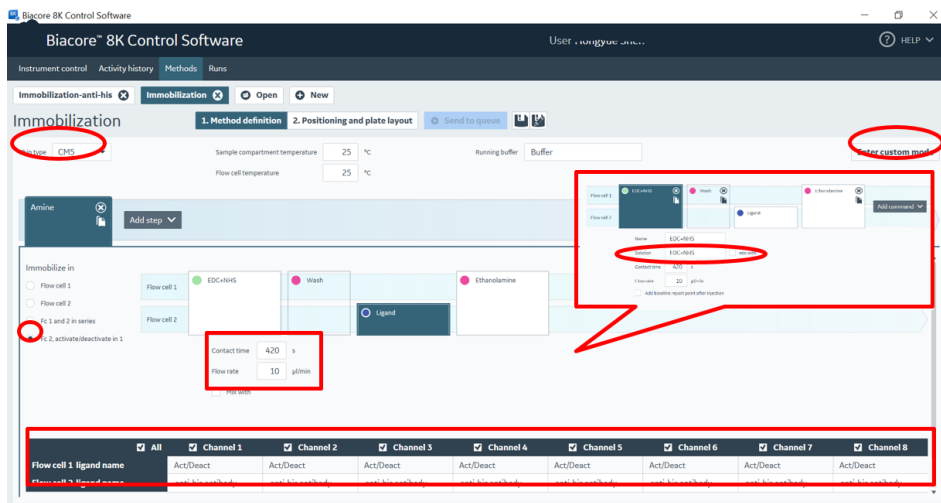
- 1) 点击控制软件主界面右下方  **Hotel door is closed** 的 open 按钮，样品舱舱门会自动打开，此时主界面右下方显示变为  **Hotel door is open**，注意 open 和 close 的颜色变化。
- 2) 如下图所示，取放样品盘和 96/384 孔板，解锁孔板（1→2），并放入新配置的 96/384 孔板，锁定（2→1），然后再放入样品舱，注意样品盘要正确放入对应卡槽中，关上舱门，此时主界面右下方显示变为  **Hotel door is closed**，表明舱门已关。（注意，Biacore™ 8K 配有 2 块样品盘，Biacore™ 8K 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

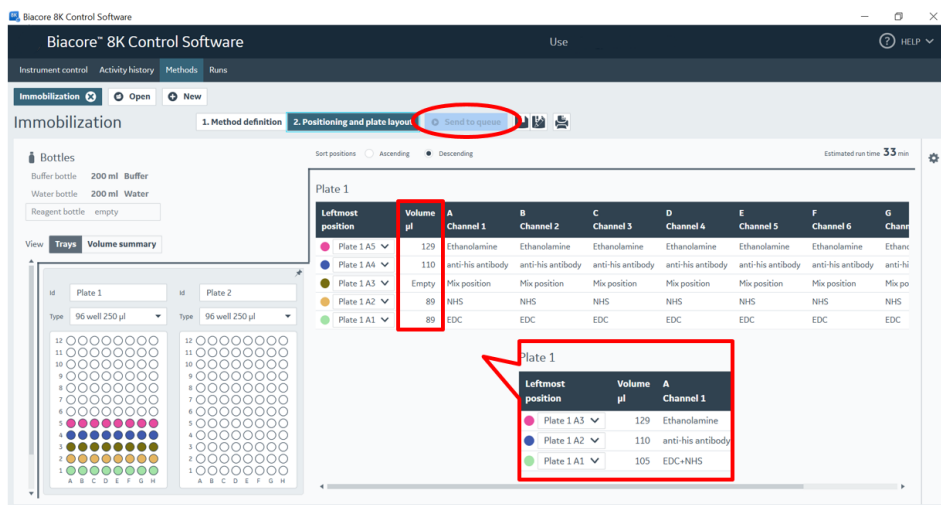
（二）捕获芯片制备

- 1、偶联缓冲液为：1×HBS-EP+。
- 2、Anti-his antibody 偶联（具体操作参考 His capture kit 说明书）
- 1）打开 Biacore™ 8K Control Software，点击上方任务栏中的 Methods，单击  **New**，选择 Surface preparation 菜单中的 Immobilization 模板，双击打开。
- 2）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-偶联蛋白-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 420s，速度 10 μ l/min。下方勾选所有实验通道，Flow cell 2 ligand name 改为 anti-his antibody。

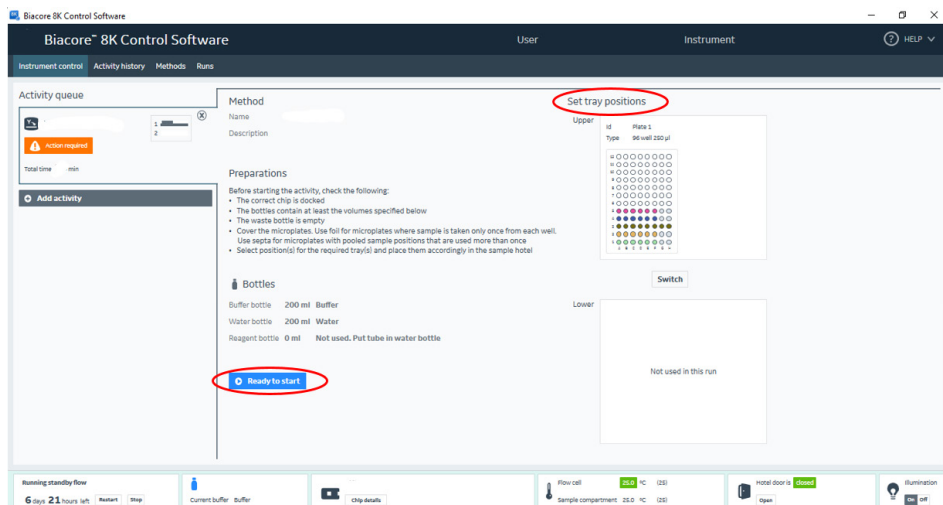


程序默认 EDC+NHS 通过仪器混合，但为了节省时间，我们可以设置手动预混。点击 Enter custom mode 进入个性化定制程序，在 EDC+NHS 选项卡中，去除 mix with 前方的勾选，并将 Solutin 名称改为 EDC+NHS，其余不变，即可在手动预混后进行实验。

3) 在 2.Positioning and plate layout 界面中，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，89 µl 的 EDC 放入 Plate1 A1，89 µl 的 NHS 放入 Plate1 A2（若选择手动预混则如右下图所示，将 105µl 手动预混后的 EDC+NHS 放入相应板位），129 µl 乙醇胺放 6 入 Plate1 A5，110 µl 用 pH4.5 的醋酸钠稀释的 anti-his antibody 放入 Plate1 A4，其他显示 Buffer 的区域用 HBS-EP+ buffer 补齐。将 96 孔板放置在对应样品的指定 Plate 位置上并锁定，再送回样品舱，合上舱门。



4) 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）

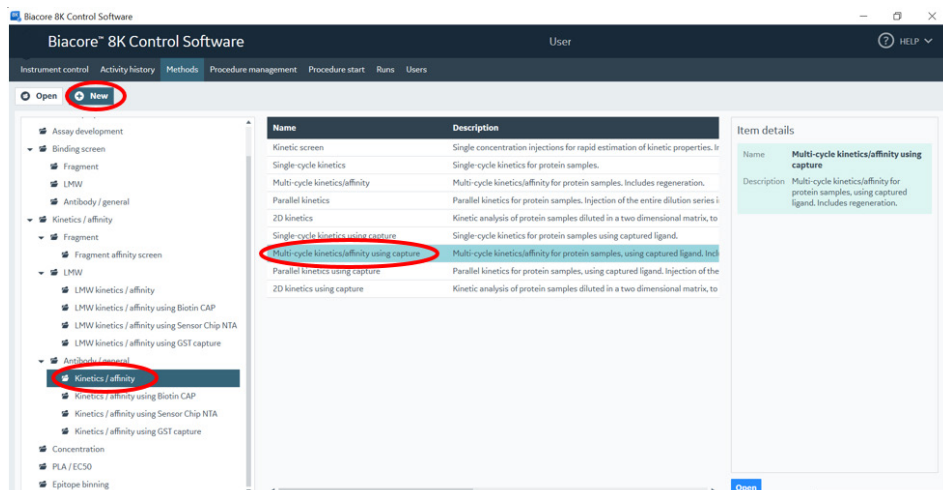


5) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果（具体偶联量视样品实际情况略有差异，在 7000 -14000RU 之间即可）。

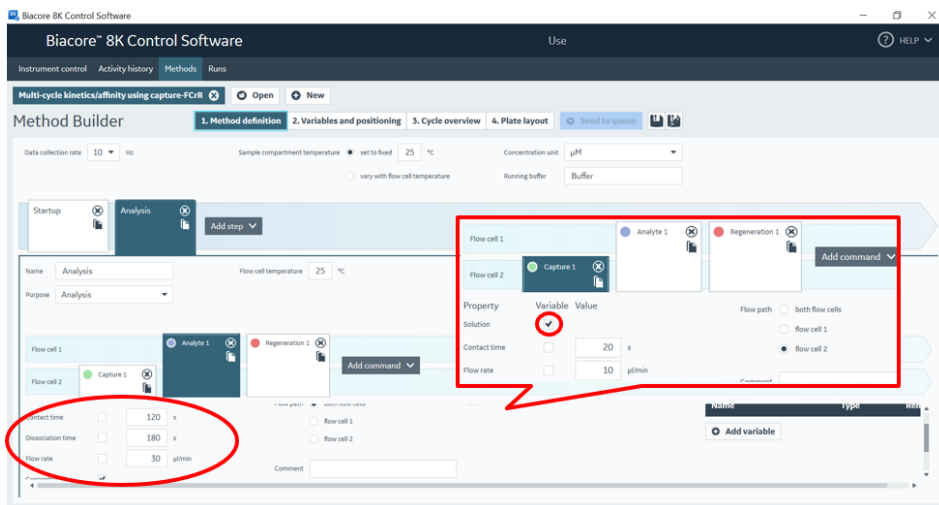
6) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

（三）样品检测过程

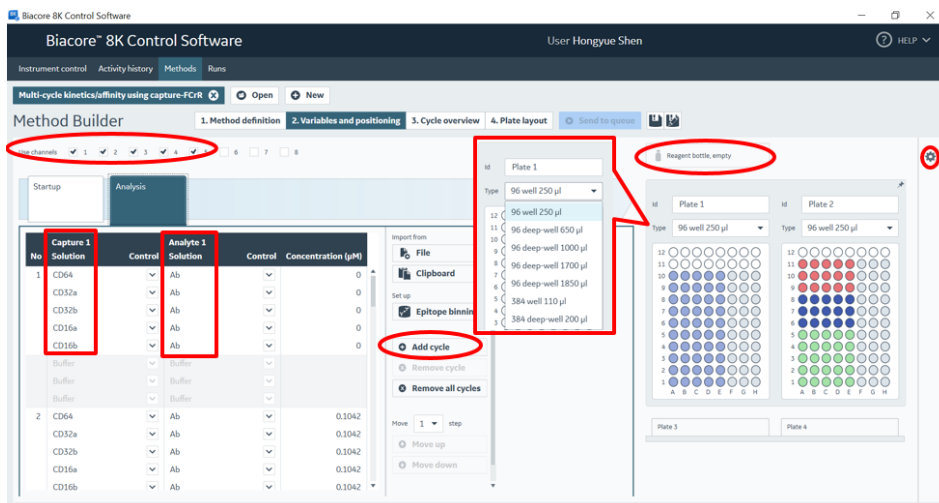
1、点击 8K Control Software 的上方任务栏中的 Methods，单击 **+ New**，选择 Kinetics/affinity >Antibody/general>Kinetics/affinity 菜单中的 Multi-cycle kinetics/affinity using capture 模板，双击打开。



2、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，Analyte 选项卡下，分析温度填写默认的 25℃，Contact time 为 120s，Dissociation time 为 180S（若为慢解离样品可设为 300s 及更长时间），Flow rate 为 30 μ l/min；Capture 选项卡下，将 Solution 后的 Variable 勾选上，Contact time 为 20s（具体时间视样品活性进行调整，以达到捕获量为准；再生条件为 Glycine 1.5，再生时间 30s。捕获量通常在 50 RU 左右，若样品活性不高，可增加捕获量），Flow rate 为 10 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）。



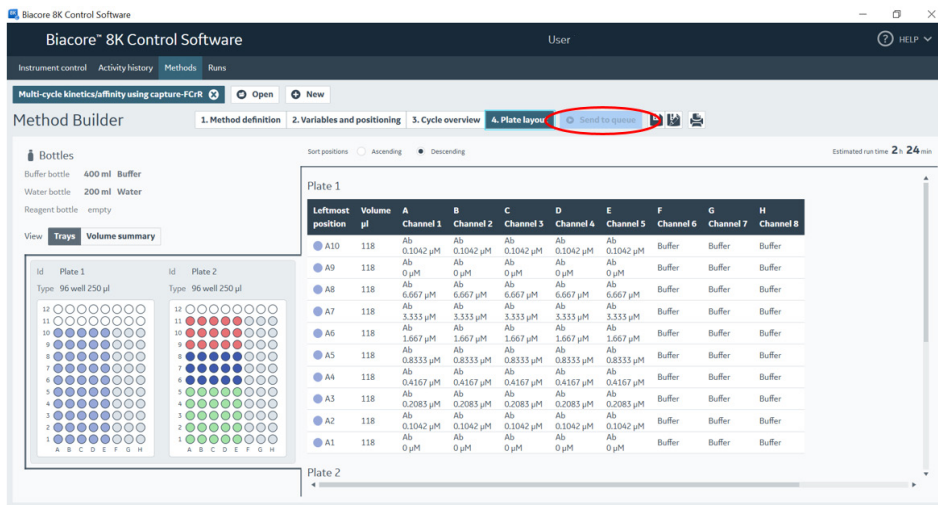
3、在 2. Variables and positioning 界面中，在 Use channels，勾选 Chnanel 1-5。在 Startup 选项卡 Add Cycle 增加至五个循环，点击 Analysis 选项卡，在跳出的表格的 Capture 1 solution 填写配体名称在同一个循环中设置五个不同 FcγR，在 Analyte 1 solution 填写分析物名称，点击 Add Cycle 增加至十个循环，第一个循环 Concentration 为 0 nM，将上述所有浓度由低到高填写（注意要设置重复浓度和零浓度），在右方根据样品体积在 Type 中选择 96/384 孔板类型，并设置与更改样品位置。具体填写如下：



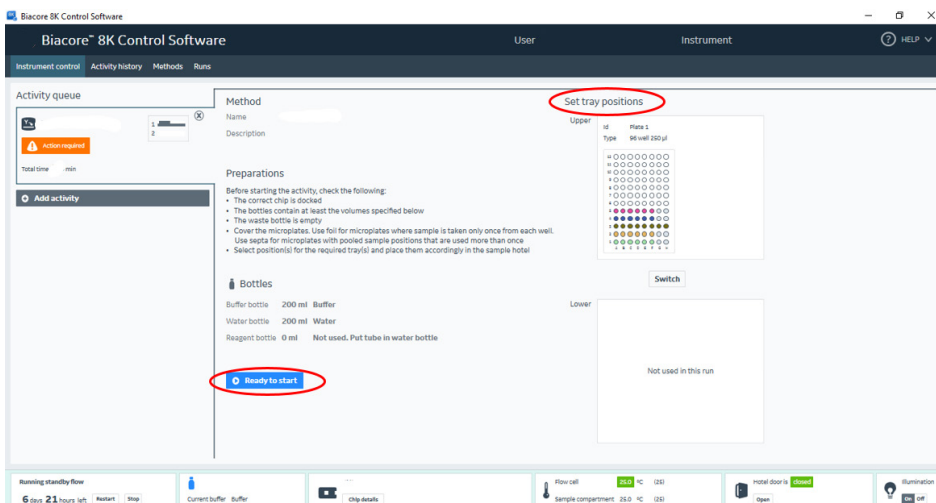
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的 图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。若需使用到大体积溶液可将其用鼠标拖动到 Reagent bottle。

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 HBS-EP+ 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。

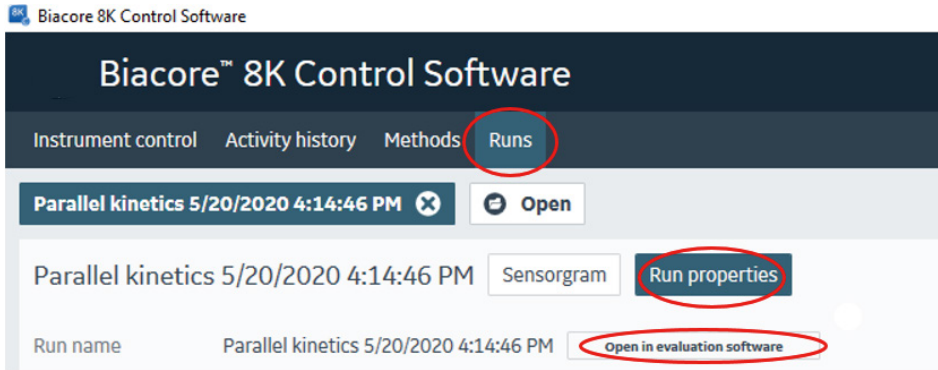


6、点击上方的文件保存图标，将方法文件保存在相应路径中，（这样系统会自动保存该文件，后续有类似操作时，可直接调用该文件）。再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置 and 显示一致。然后再点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）

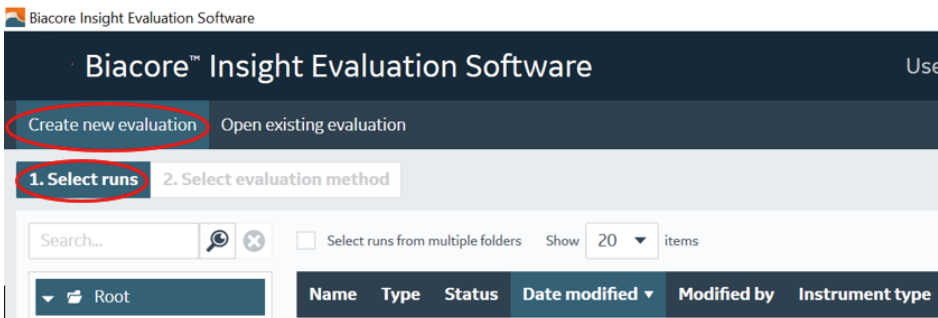


(四) 实验结果分析

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。

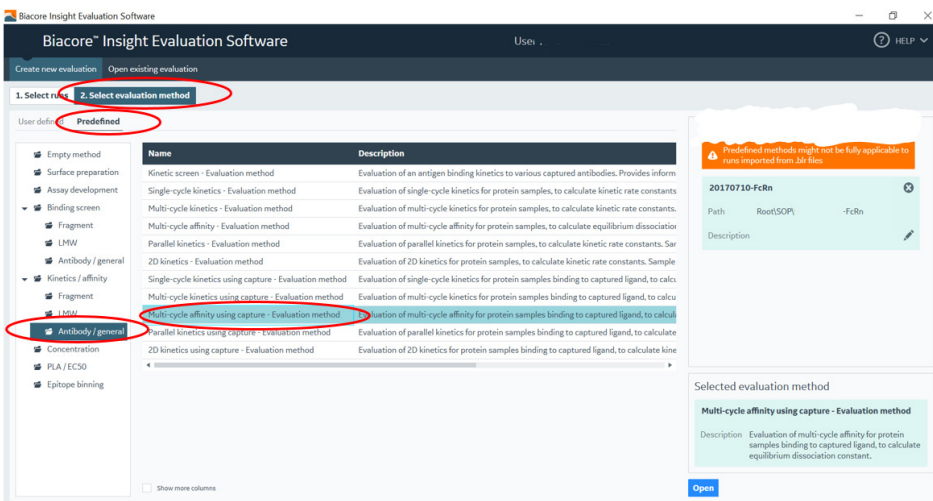


Biacore™ 8K Control 软件打开结果文件

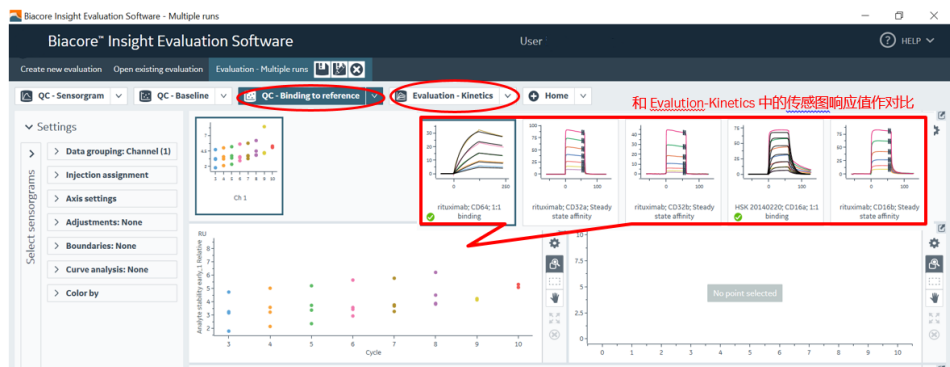


Biacore™ 8K Insight Evaluation 软件打开结果文件

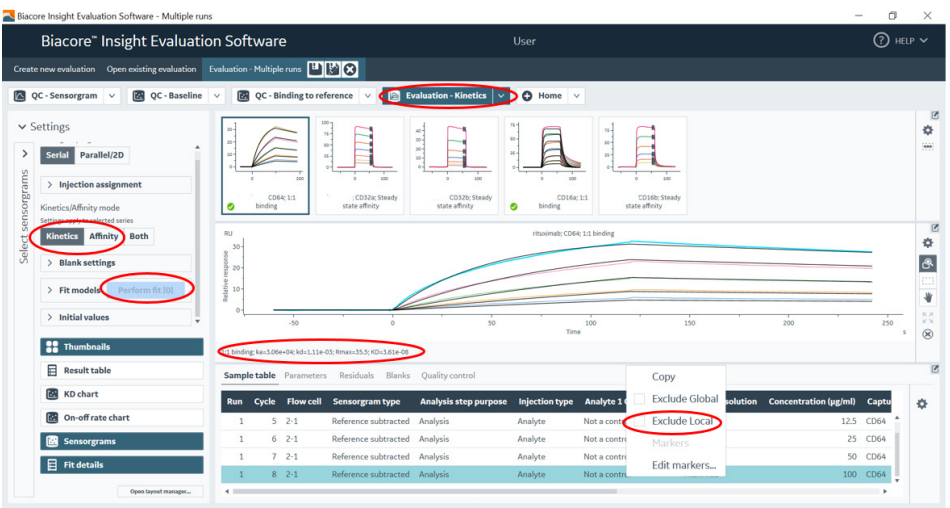
2) 选择 2. Select evaluation method (若从 Control 软件跳转过来，直接进入该页面)，点击 Predefined，再选择 Kinetics/affinity 下方的 Antibody/general，选择右侧分析具体方法 Multi-cycle Affinity using capture - evaluation method (同实验方法对应)，双击，分析软件自动进行拟合，输出结果。



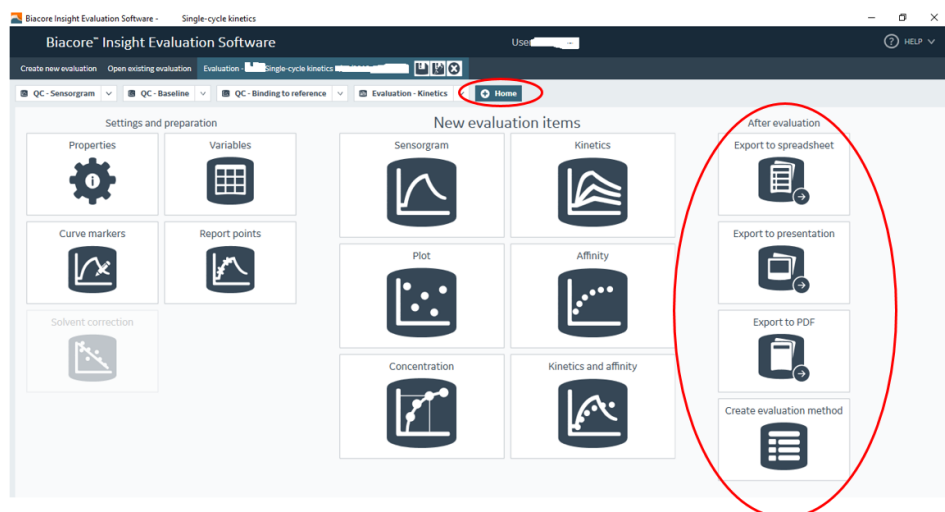
3) 点击上方 QC-Binding to reference，检查各个点是否小于 Evaluation-kinetics 传感图中对应响应值的 20%。如是，直接跳到下一步。注：若 Binding to reference 各个点的响应值大于 Evaluation-Affinity 传感图中对应响应值的 20%，即存在非特异性结合。此时可尝试降低流动相样品浓度。



4) 点击 Evaluation-Kinetics，自动拟合后的传感图下方显示。点击下方 Sample table，选择对应浓度组，右击鼠标选择 Exclude local，删除异常或不需要的浓度组。删除数据后，根据图像情况选择 Kinetics/Affinity 确定动力学或稳态分析，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

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。

CY42491-02Feb24-HB

