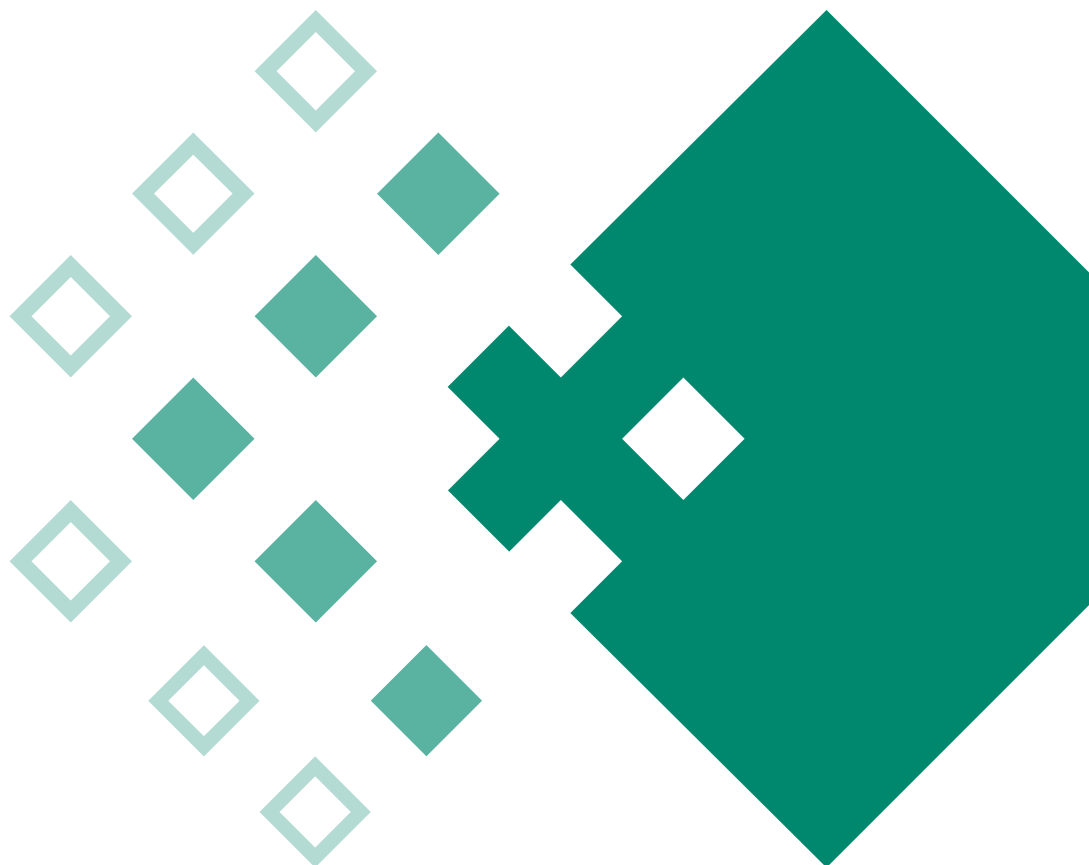


Biacore™ 8K 检测蛋白 与小分子相互作用

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）配体偶联	06
	（三）样品检测过程	11
	（四）实验结果分析	15

Biacore™ 8K 检测蛋白与小分子结合操作指南

一、实验目的

利用 Biacore™ 8K 系统和 S 系列 CM5 芯片检测小分子与蛋白结合的动力学和亲和力数据。本实验使用的小分子分子量为 400 Da，蛋白分子量为 20kD。若蛋白与小分子的分子量比大于 100 kD，换用 S 系列 CM7 芯片。

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。对于水溶性好的小分子，无需按照本指南进行溶剂校正操作。

三、实验使用机型、试剂和耗材

- 1、本实验所用机型：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。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），或 10mM 醋酸钠 pH4.5（货号：BR-1003-50），厂家为 Cytiva。
 - 5、缓冲液：10 x PBS-P+（货号：28-9950-84），厂家为 Cytiva。
- （也可扫描下方二维码选择含上述 2/3/4 或 2/3/4/5 所有耗材的套餐）



含 S 系列 CM5 芯片套餐



含 S 系列 CM7 芯片套餐

- 6、分析纯 DMSO，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、蛋白：尽量现制现用或现买现用，浓度一般需大于 500 μg/ml。溶解液尽量不含 Tris 等带有伯氨基团的成分。
- 8、小分子 LMW：母液浓度建议大于 10 mM，体积在 50 μl 以上，纯度>90%，溶在 100%DMSO 里。溶液中不要含有咪唑、蔗糖、甘油等高折光率物质。
- 9、其他耗材：96 孔微孔板（250μl）（货号：BR100503），96 孔板封口膜（货号：28975816），厂家为 Cytiva。

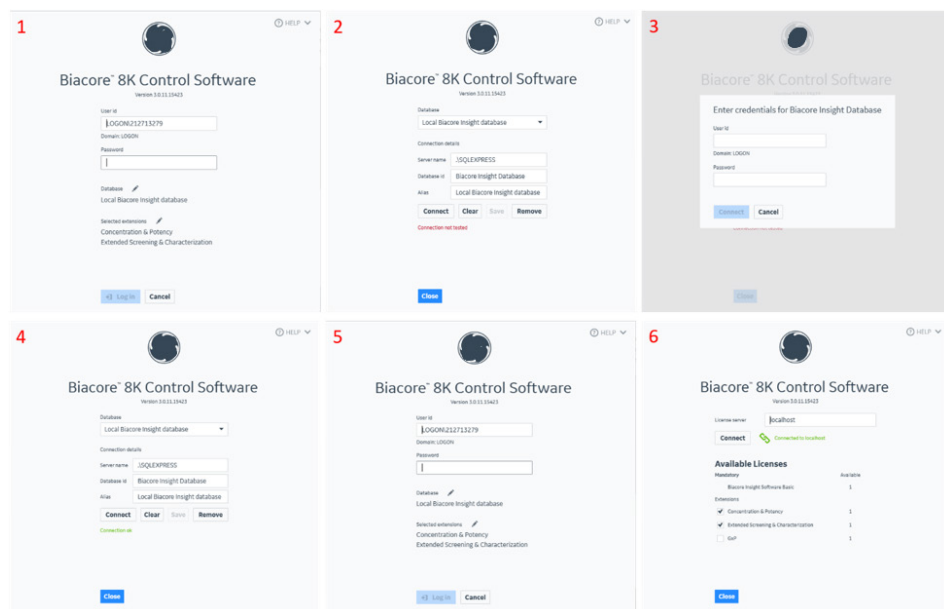
四、实验步骤

（一）仪器准备

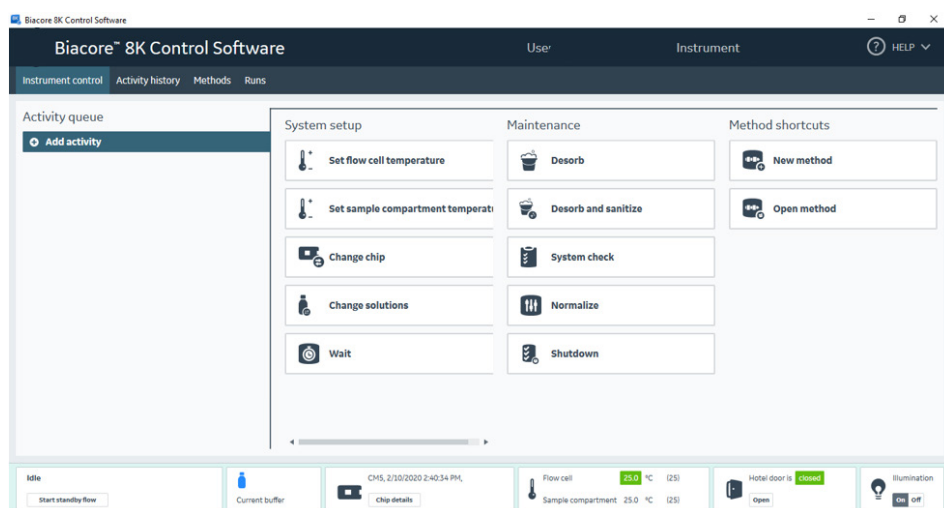
1、开机操作

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-P+buffer、900 mL 去离子水（已经 0.22 μ m 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。

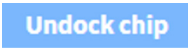
2、缓冲液的放置

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。

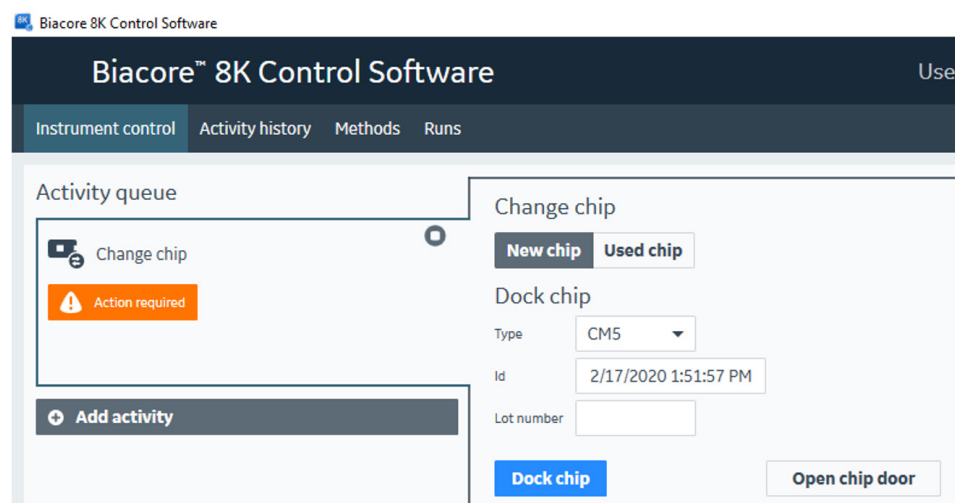
2) 取 2 L 去离子水装入 2 L 缓冲液瓶，同样放置在右侧桌面上，并将标注有 Water 和 Reagent 的进液管插入至纯水瓶底部，用于清洗进样针。（Reagent 管路用于实验中大量溶液进液，无需使用时放入纯水瓶）

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。

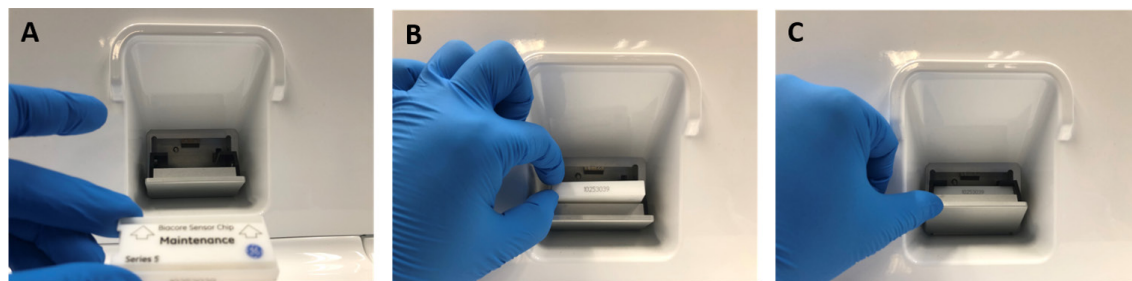
3、芯片的放置

1) 点击控制软件主界面第一列的  **Change chip**，再  点击，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。



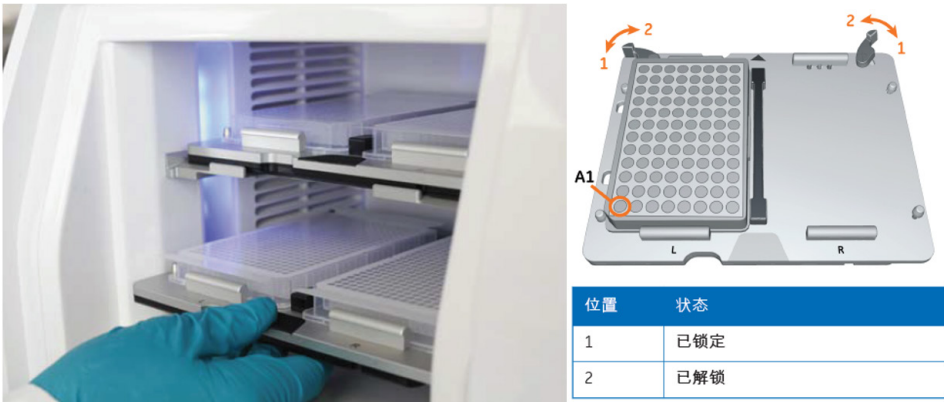
4) 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，将芯片轻轻推入卡槽，最后合上芯片舱的舱门。



- 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），然后再放入样品盘，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）

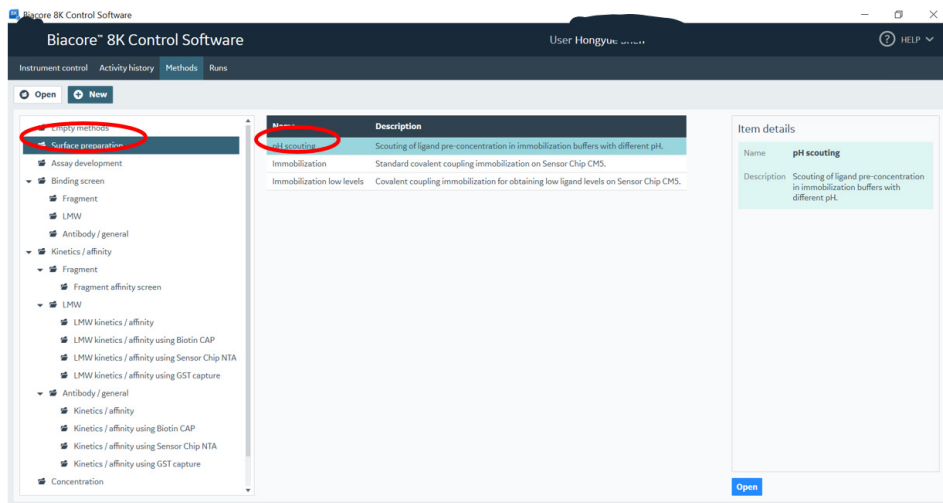


样品架的取出方式

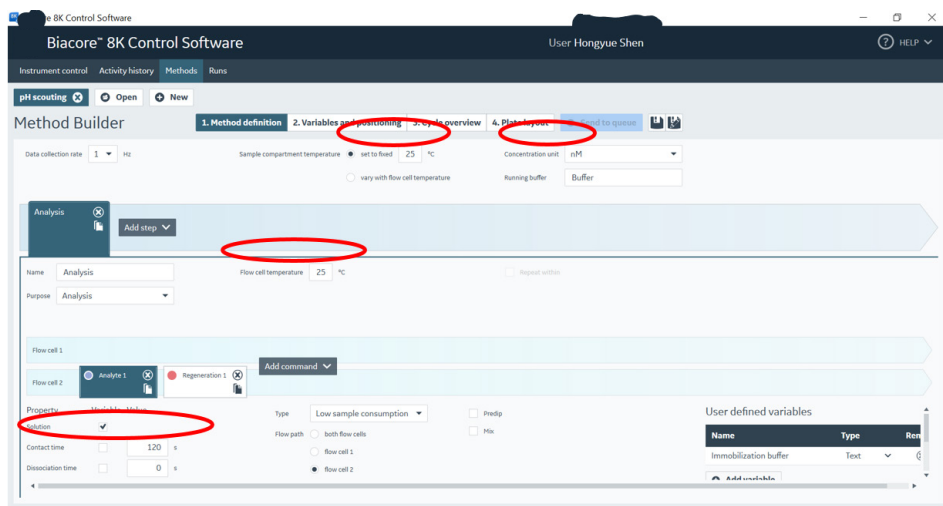
（二）配体偶联

1、配体偶联预富集条件摸索

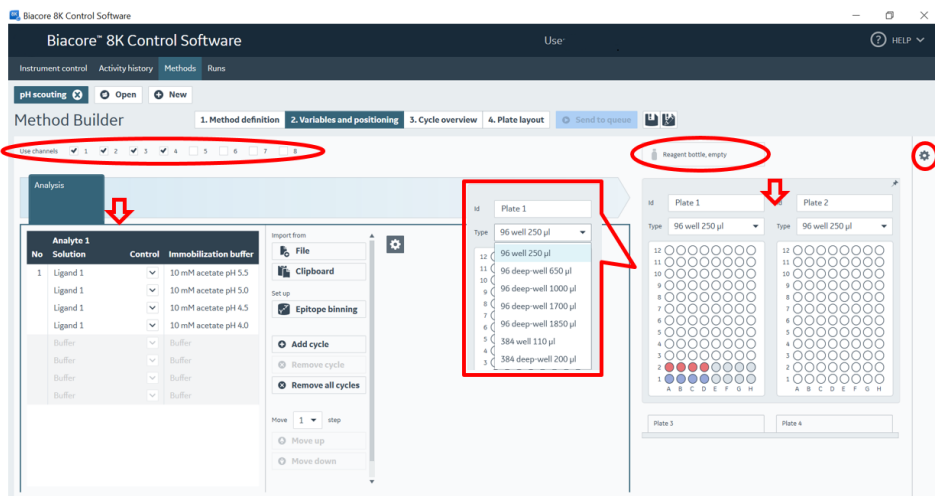
- 1) 蛋白用 pH5.5，5.0，4.5，4.0 的醋酸钠分别稀释至10 µg/ml（至少 5 倍稀释比），各100 µL 备用。
- 2) 在打开的 Biacore™ 8K Control Software 点击主界面右上方的 Methods，单击  **New** ，选择 Surface preparation 菜单中的 pH Scouting 模板，双击打开。



3) 在全新的模板界面上，在 1.Method definition 选项卡中，样品舱温度选择为 set to fixed 25℃，浓度单位选择对应的单位。将 Contact time 保持默认的 180s 或改为 120s，其余不变。



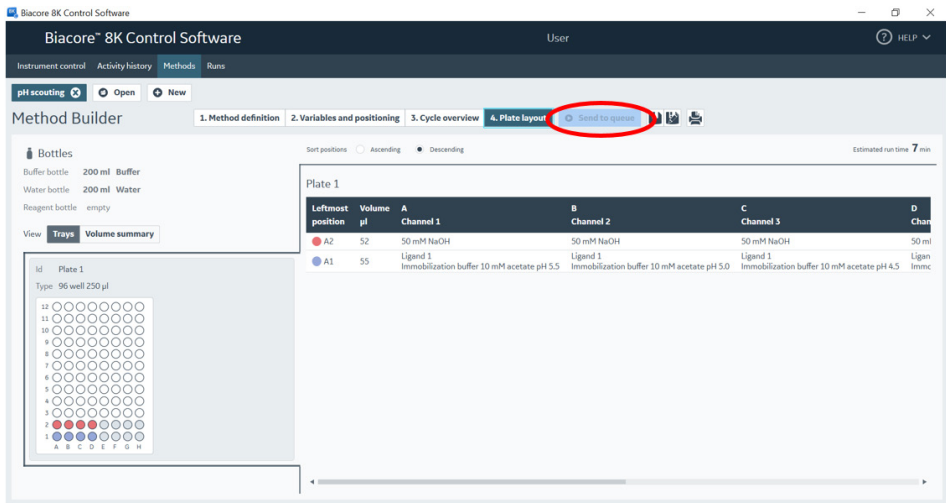
4) 在 2.Variables and positioning 界面中，在 Use Channels 中选择 1-4 进行勾选（本实验只有一个样品四个 pH，选择四个通道即可），在表格的 Solution 栏下填蛋白的名称，在右方根据样品体积在 Type 中选择 96/384 孔板类型，并设置与更改样品位置。

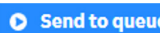
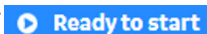


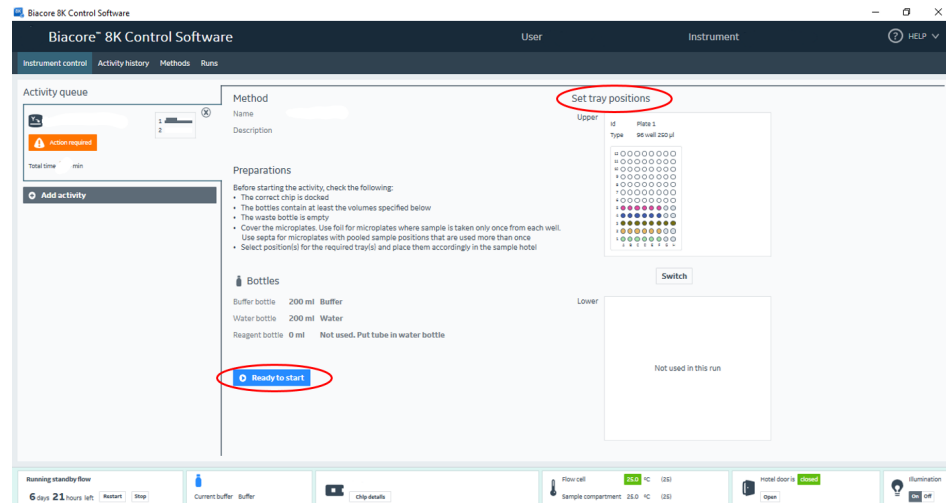
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的  图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。若需使用到大体积溶液可将其用鼠标拖动到 Reagent bottle。

5) 在 3.Cycle overview 界面中，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 界面中，将蛋白样品使用不同pH 醋酸钠进行稀释，根据屏幕显示准备样品并放置在相应位置（放入样品体积略大于显示体积即可，若实验设计中包含空孔，必须使用buffer以相同样品体积加满）。



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 ，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 。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）

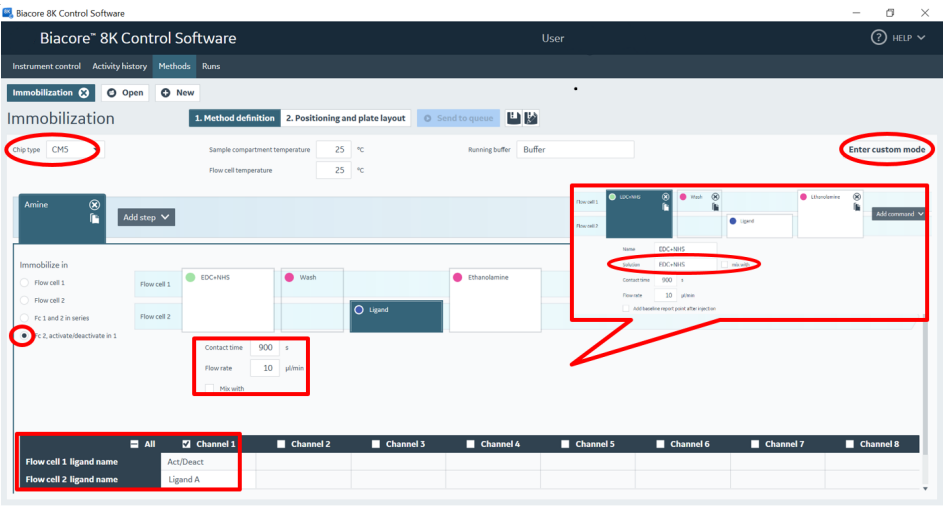


8) 运行结束后，用 Biacore™ 8K evaluation Software 打开运行结果文件（如下图），选择能达到目标偶联量，并且条件最温和的那个 pH 的醋酸钠进行后续偶联。

2、配体偶联

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）。偶联时间根据样品情况所定（小分子实验尽量选择饱和偶联），速度 10μl/min。下方只勾选实验通道 Channel 1（若 Channel 1 已用，可使用其他任意 Channel）；Channel 1 中 Flow cell 2 ligand name 改为 Ligand A。

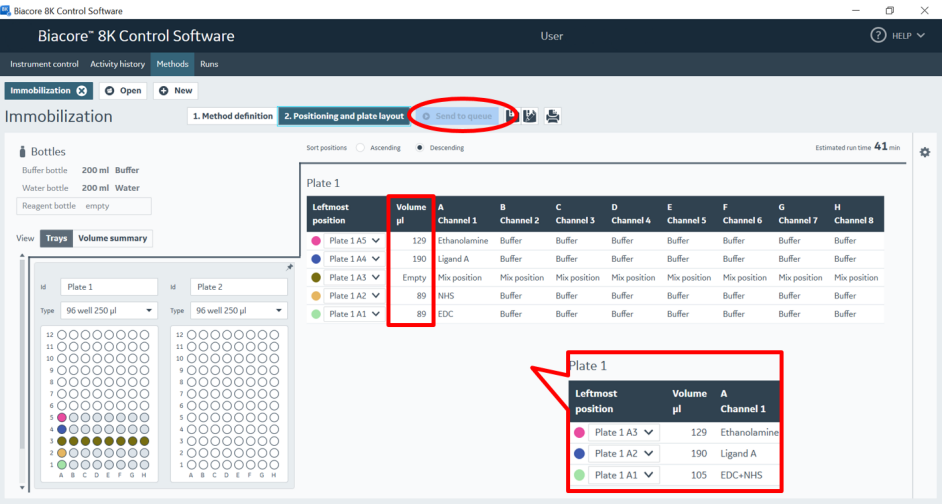


程序默认 EDC+NHS 通过仪器混合，但为了节省时间，我们可以设置手动预混。点击 Enter custom mode 进入个性化定制程序，在 EDC+NHS 选项卡中，去除 mix with 前方的勾选，并将 Solutin 名称改为 EDC+NHS，其余不变，即可在手动预混后进行实验。

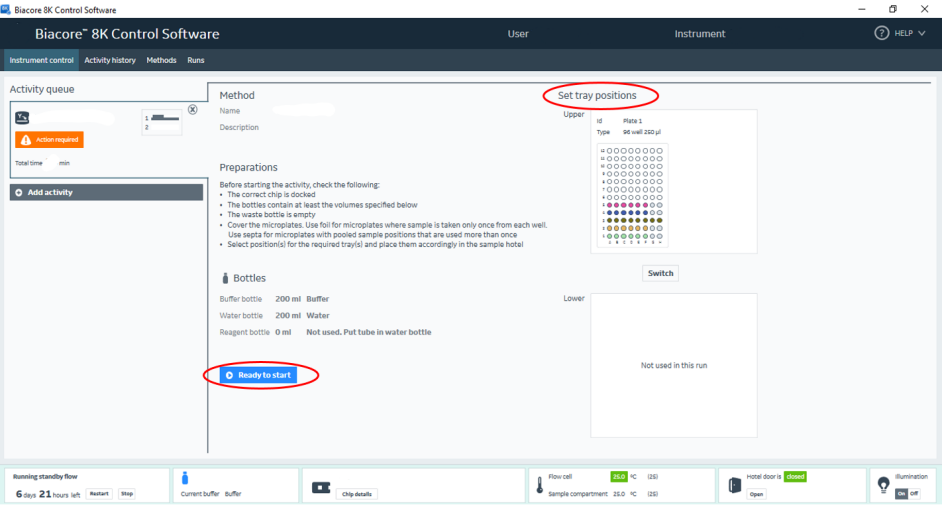
表一 偶联量与配体工作浓度、进样时间及芯片类型对照表

分子量比 (蛋白/小分子)	≤50	50~100	> 100
芯片类型	S series CM5		S series CM7
目标偶联量	~8000 RU	~15000 RU	>20000 RU
配体工作浓度	20μg/mL	40 μg/mL	50 μg/mL
contact time	600s	900s	900s

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 μ l 的EDC放入 Plate1 A1, 89 μ l 的NHS 放入 Plate1 A2 (若选择手动预混则如右下图所示, 将105 μ l手动预混后的 EDC+NHS放入相应板位) 129 μ l 乙醇胺放入 Plate1 A5, 190 μ l以pH4.0 的醋酸钠稀释至 50 μ g/mL 的样品 (或按上表配制相应浓度) 放入 Plate1 A4, 其他显示 Buffer 的区域用 1 x PBS-P+/PBS-P +5%DMSO buffer 补齐。将 96 孔板放置在对样品的指定 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。

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、配置运行缓冲液和溶剂校正曲线

小分子样品的运行缓冲液选用含 5%DMSO 的 1×PBS-P+ (视样品溶解性可调整 DMSO 含量, 最高不超过 10%)

取 105 mL 10×PBS-P+ 用去离子水稀释到 1L, 配成 1.05×PBS-P+。并按照下表, 加入 DMSO, 配置 5%DMSO 运行缓冲液和 4.5%、5.8% 溶剂校正母液 (running buffer 中 DMSO 浓度并非绝对 5%, 可视小分子样品溶解度情况而定, 0-10% 均可。若 running buffer 中 DMSO 浓度变化, 则溶剂校正母液也相应变化, 只要 cover running buffer 中 DMSO 浓度即可)。

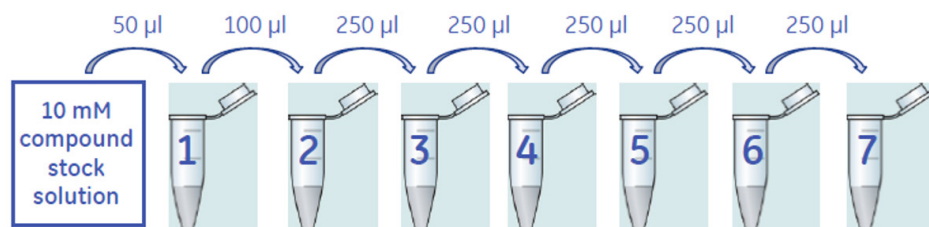
	4.5% DMSO	5.8% DMSO	5.0% DMSO running buffer
1.05 × PBS-P+	9.5 ml	9.5 ml	950 ml
100 % DMSO	0.45 ml	0.58 ml	50 ml
Final volume	~10 ml	~10 ml	1000

按照下表混合 4.5% 和 5.8% 母液配置 5%DMSO 浓度校正曲线 (DMSO 标准液的数量并非一定要 8 个, 通常 4-8 个均可。总体积也并非一定要 1.4ml, 这些均可根据实际情况自行调整)

Buffer/Vial	1	2	3	4	5	6	7	8
4.5% DMSO	0	200	400	600	800	1000	1200	1400
5.8% DMSO	1400	1200	1000	800	600	400	200	0

2、小分子样品准备

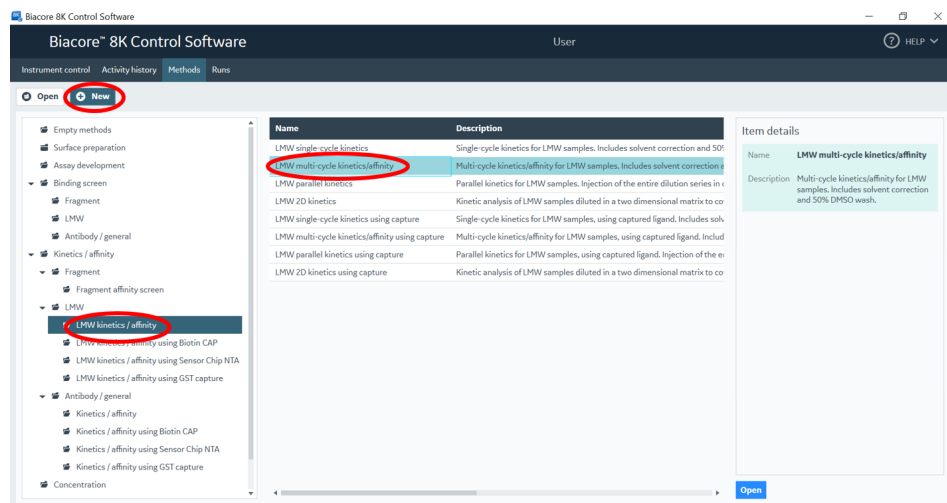
用不含 DMSO 的 1.05×PBS-P+ 缓冲液稀释 10 mM 小分子母液 20 倍, 得到 500 μM 含 5% DMSO 的 1×PBS-P+ 中的小分子, 再用配好的含 5% DMSO 的 Running Buffer 将分析物浓度稀释到 100 μM 作为最高进样浓度, 向下对半稀释至少 5 个浓度梯度, 例如 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM, 6.25 μM, 3.125 μM (根据实际样品亲和力强弱进行浓度梯度调整)。间隔设置一个重复浓度, 增加一个 0 浓度。



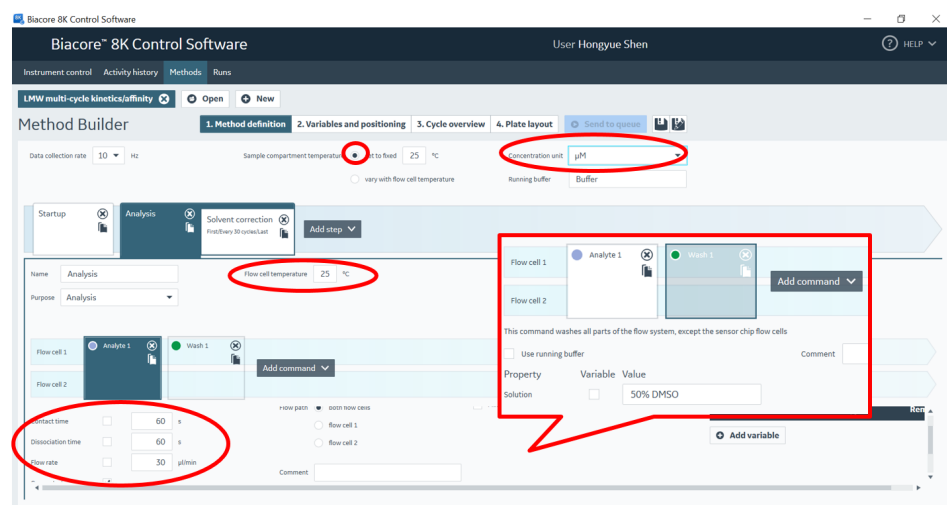
1.05×PBS-P+ buffer	950 μl	-	-	-	-	-	-
Running buffer	-	400 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Compound conc. (μM)	500	100	50	25	12.5	6.25	3.12

(注意: 图中 1.05×PBS-P+ buffer 不含 DMSO, running buffer 含 5% DMSO)

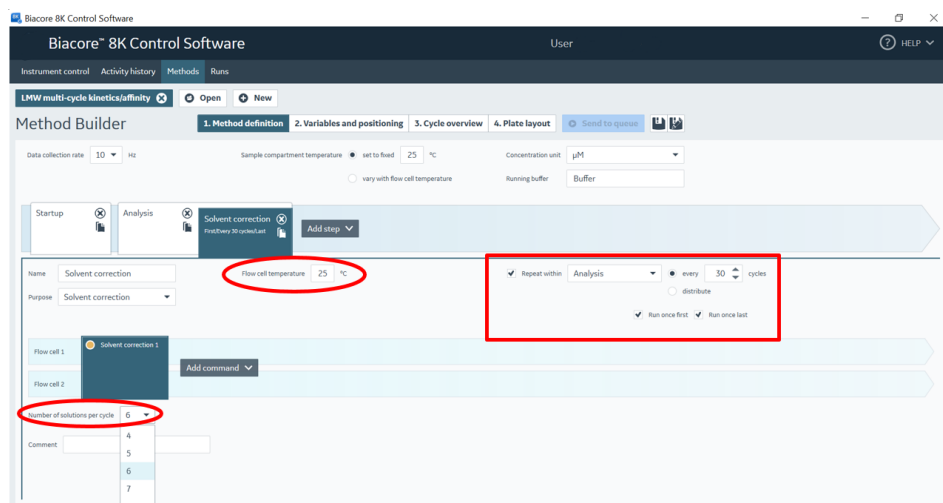
3、点击 Biacore™ 8K Control Software 的上方任务栏中的 Methods，单击 **+ New**，选择 Kinetics /affinity>LMW >LMW kinetics/affinity 菜单中的 LMW multi-cycle kinetics/affinity 模板，双击打开。



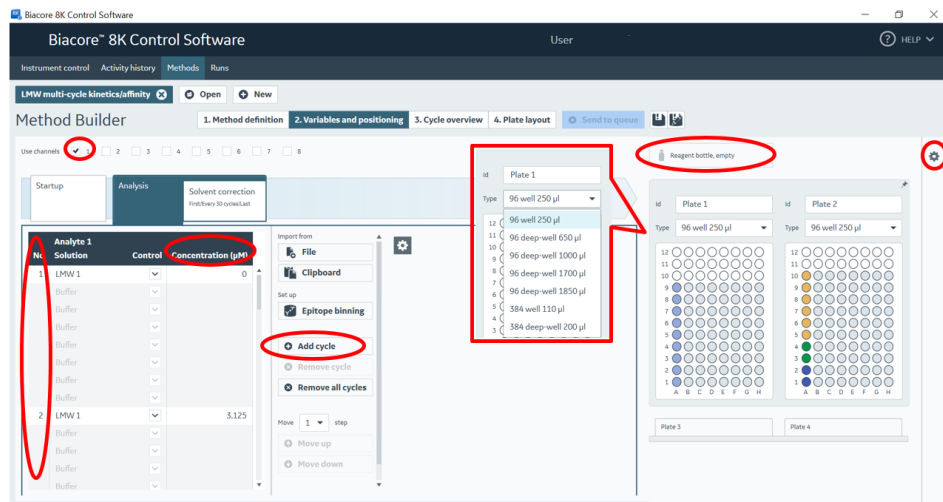
4、在 1.Method definition 界面中，样品舱温度选择为 set to fixed 25℃，浓度单位选择对应的单位，其他不变。下面的 Analysis 窗口中，分析温度填写默认的 25℃，Contact time 为 60s，Dissociation time 为 60s（小分子通常无需再生），Flow rate 为 30 μl/min。在 Startup 中的各项填上与 Analysis 窗口一样的数字（或者按照系统默认的值不变）。（注意，无论是 Startup 或者 Analysis 选项卡中 Wash 选项均使用 50%DMSO）



5、在 1.Method definition 界面中，选择 Solvent correction 选项卡，调整溶剂校正参数。通常设置检测开始时一次，结束时一次，每隔 30 cycle 一次。检测温度默认 25℃，也可根据需要进行修改。根据配置的标准溶液浓度数量，在 Number of solutions per cycle 设置 4-8 个浓度进行溶剂校正。



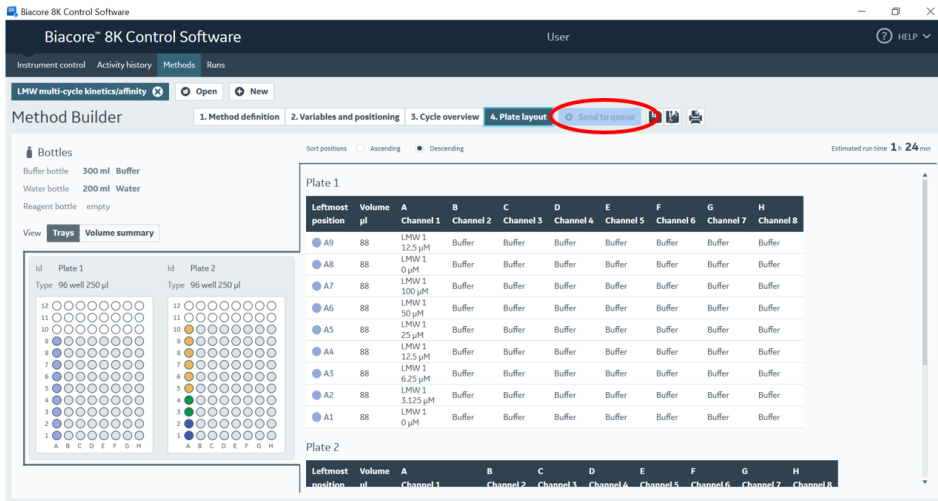
6、在 2. Variables and positioning 界面中，在 Use channels，只对 1 进行勾选（2-7 未偶联配体，本次实验不使用）。在 Startup 选项卡 Add Cycle 增加至三个循环，在 Analysis 选项卡，在跳出的表格的 solution 填写样品名称，点击 Add Cycle 增加至九个循环，第一个循环 Concentration 为 0 nM，样品浓度由低到高填写（注意要设置重复浓度和零浓度），在右方根据样品体积在 Type 中选择 96/384 孔板类型，并设置与更改样品位置。具体填写如下：



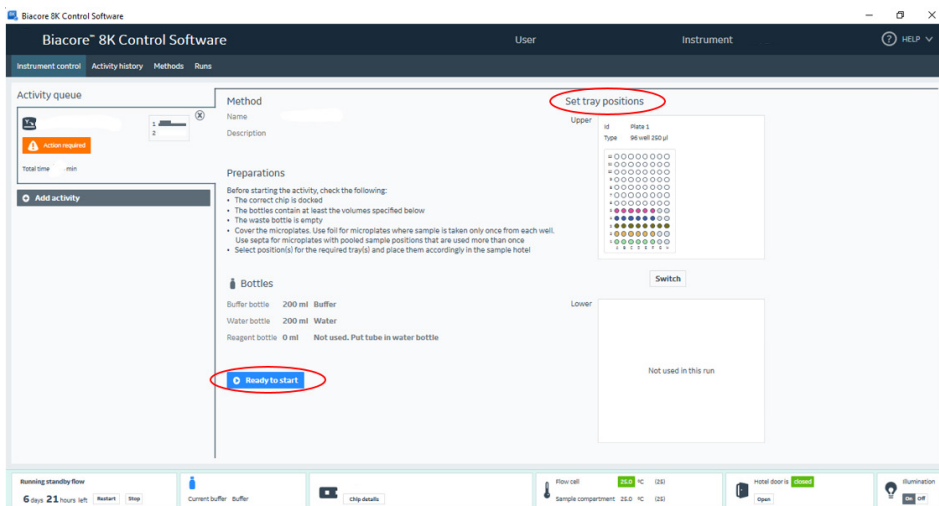
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的 ⚙️ 图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。若需使用到大体积溶液可将其用鼠标拖动到 Reagent bottle。

7、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。

8、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/1 x PBS-P+5%DMSO buffer 稀释），并按照左边96孔板指示位置，将样品加入其中（该实验中推荐先使用 buffer 将其他空格补足，再进行加样），随即使用 96 孔板封板膜将 96 孔板封闭。将 96 孔板置于样品架并锁定后，送入样品舱。

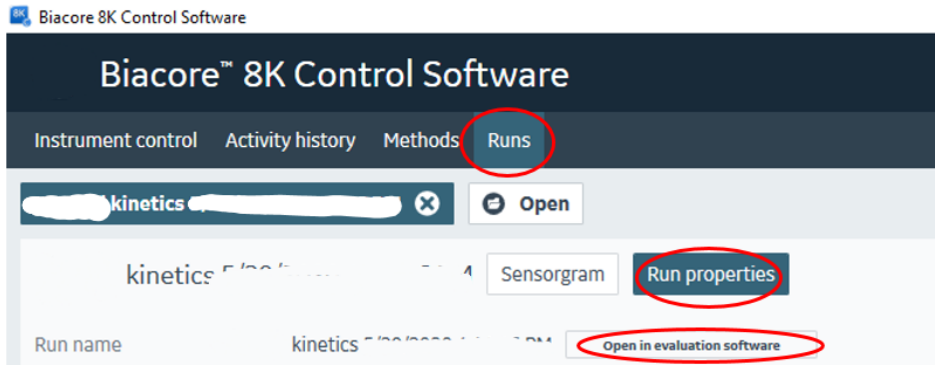


9、点击上方的文件保存图标，将方法文件保存在相应路径中，（这样系统会自动保存该文件，后续有类似操作时，可直接调用该文件）。再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置和显示一致。然后再点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）

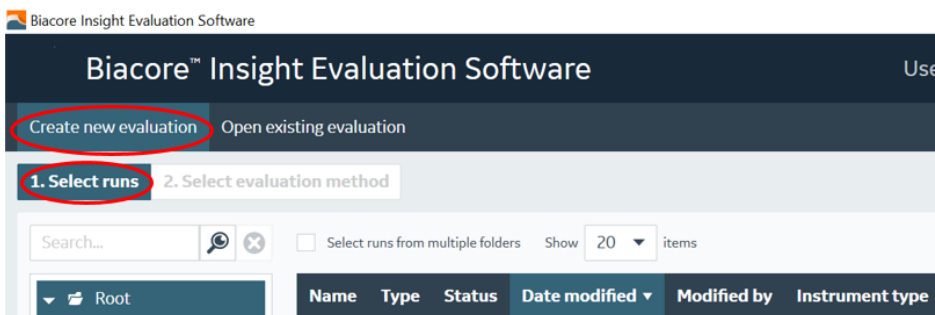


(四) 实验结果分析

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。或打开打开数据分析软件 Biacore™ 8K Insight Evaluation，打开方式如 Biacore Control Software 进行登录。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。

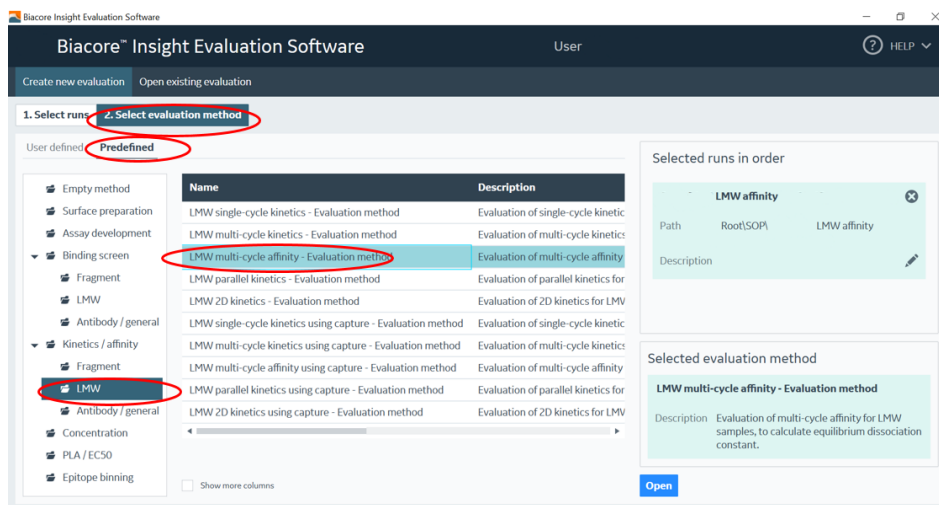


Biacore™ 8K Control软件打开结果文件

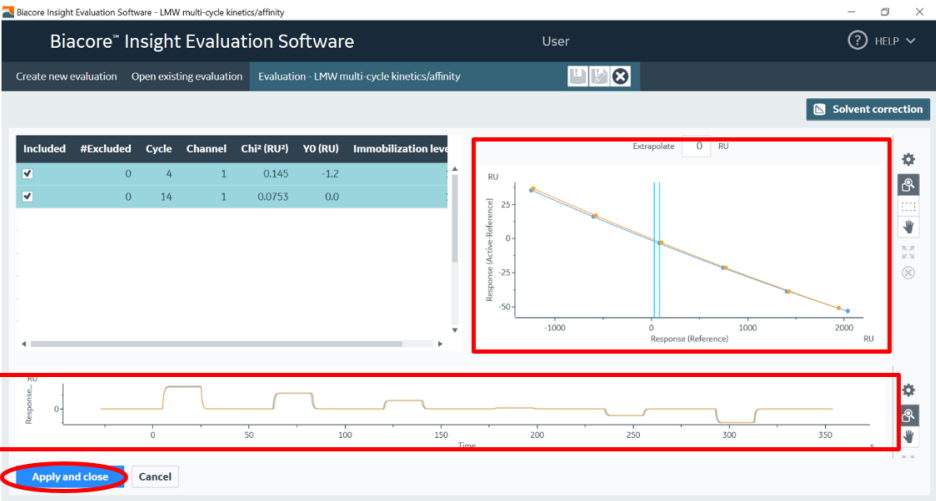


Biacore™ 8K Insight Evaluation软件打开结果文件

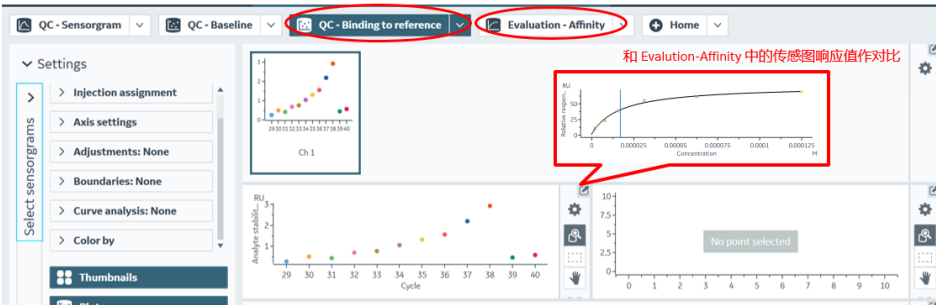
2) 选择 2. Select evaluation method（若从 Control 软件跳转过来，直接进入该页面），点击 Predefined，再选择 Kinetics/affinity 下方的 LMW，选择右侧分析具体方法 LMW multi-cycle affinity- Evaluation method（同实验方法对应），双击，分析软件自动进行拟合，输出结果。



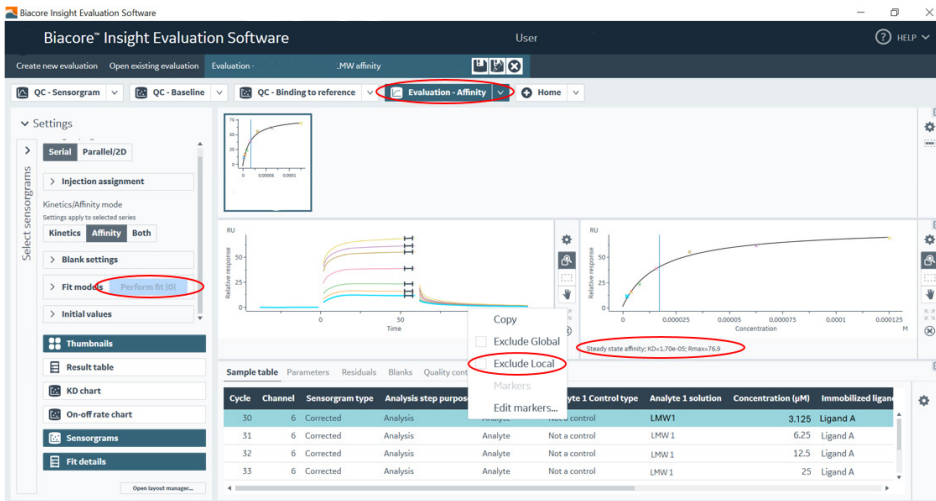
3) 在 Solvent correction 界面，观察溶剂校正结果。溶剂校正曲线一般要求落在 -500 到+1000RU，拟合的 Chi2 小于 2。观察并确定所有竖线均落在校正曲线范围内，确保所有数据有正有负，即可点击 Apply and close，接受溶剂校正结果。



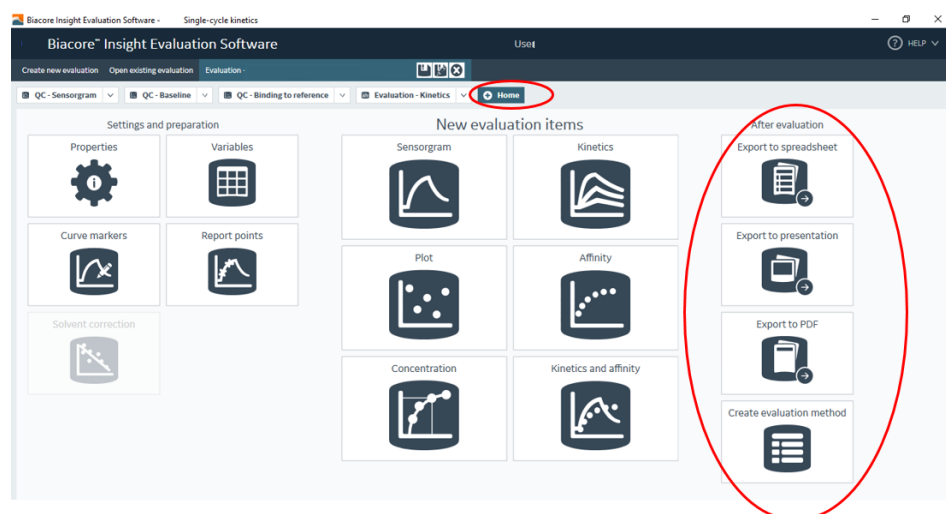
4) 点击上方 QC-Binding to reference，检查各个点是否小于 Evaluation-affinity 传感图中中对应响应值的 20%。如是，直接跳到下一步。注：若 Binding to reference 各个点的响应值大于 Evaluation-Affinity 传感图中对应响应值的 20%，即存在非特异性结合。此时可尝试降低流动相样品浓度。



4) 点击 Evaluation-Affinity，自动拟合后的传感图下方显示，亲和力：KD = 1.70×10⁻⁵ M。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，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

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。

CY42492-02Feb24-HB

