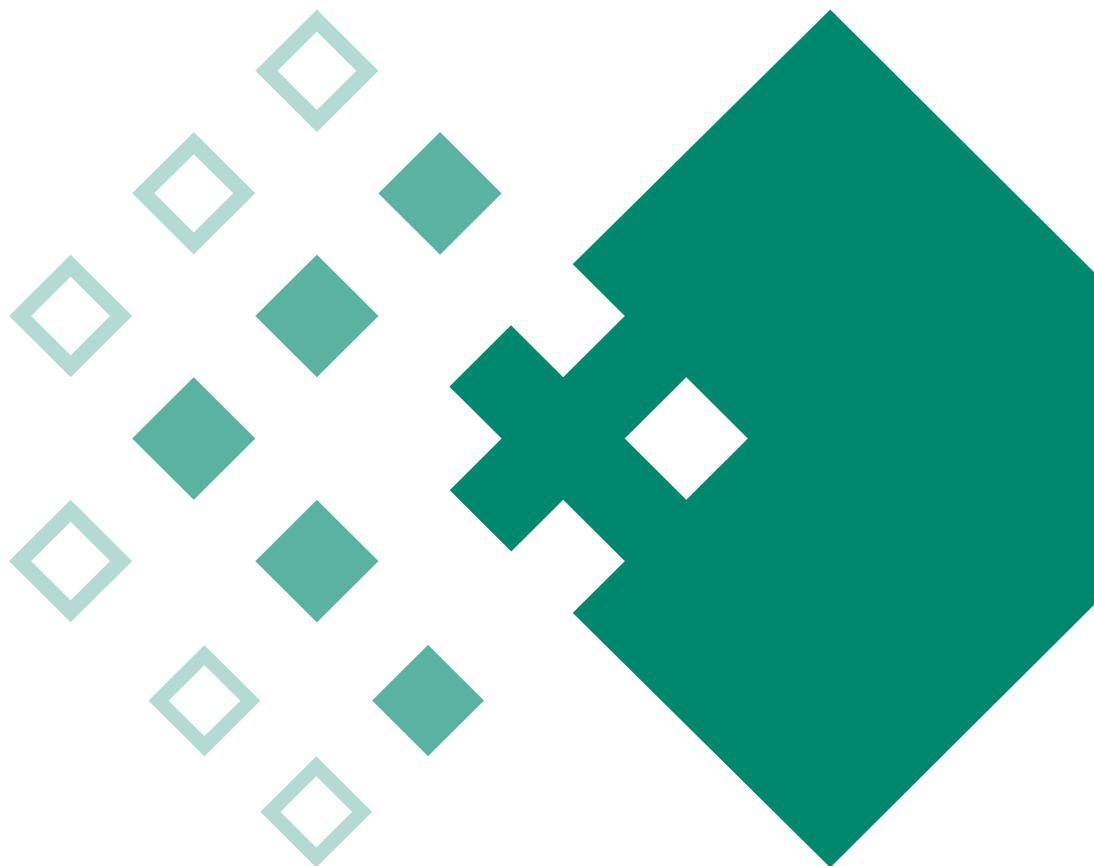


Biacore™ 8K 检测蛋白 与蛋白相互作用 (平行法)

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	13

Biacore™ 8K 检测蛋白与蛋白结合 (平行法) 操作指南

一、实验目的

利用 Biacore™ 8K 检测蛋白与蛋白结合的亲和力 K_D 与动力学数据 k_a , k_d 。本实验利用 S 系列 CM5 芯片直接偶联蛋白 A, 蛋白 B 作为分析物检测结合的亲和力与动力学。若要检测多个蛋白与不同蛋白的互作, 可根据配体蛋白 A 所带的 tag, 选择偶联相应的捕获分子如标签抗体等, 通过捕获法来进行检测, 具体操作可参考《Biacore™ 8K 捕获法检测抗体与抗原结合操作指南》。本指南所用蛋白 A 分子量为 24kD, 蛋白 B 分子量为 21kD。

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、偶联缓冲液: 10mM 醋酸钠 pH4.0 (货号: BR-1003-49), 10mM 醋酸钠 pH4.5 (货号: BR-1003-50), 10mM 醋酸钠 pH5.0 (货号: BR-1003-51), 10mM 醋酸钠 pH5.5 (货号: BR-1003-52), 厂家为 Cytiva。
- 5、缓冲液: 10 x HBS-EP+ (货号: BR-1006-69), 厂家为 Cytiva。
- 6、再生溶液 Glycine 1.5 (货号: BR-1003-54)。
(也可扫描右侧的二维码选择含上述 2/3/4/5/6 所有耗材的套餐)
- 7、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)。
- 8、96 孔微孔板 (250 μ l) (货号: BR100503), 厂家为 Cytiva。
- 9、配体蛋白 A: 尽量现制现用或现买现用, 如果为商业化蛋白粉末, 用缓冲液稀释到 $> 200 \mu$ g/ml, 并分装后 -20°C 保存。溶解液尽量不含 Tris 等带有伯氨基团的成分。
- 10、流动相蛋白 B: 母液浓度尽量大于 1μ M, 样品体积在 200 μ l 以上, 纯度 $>80\%$ 。



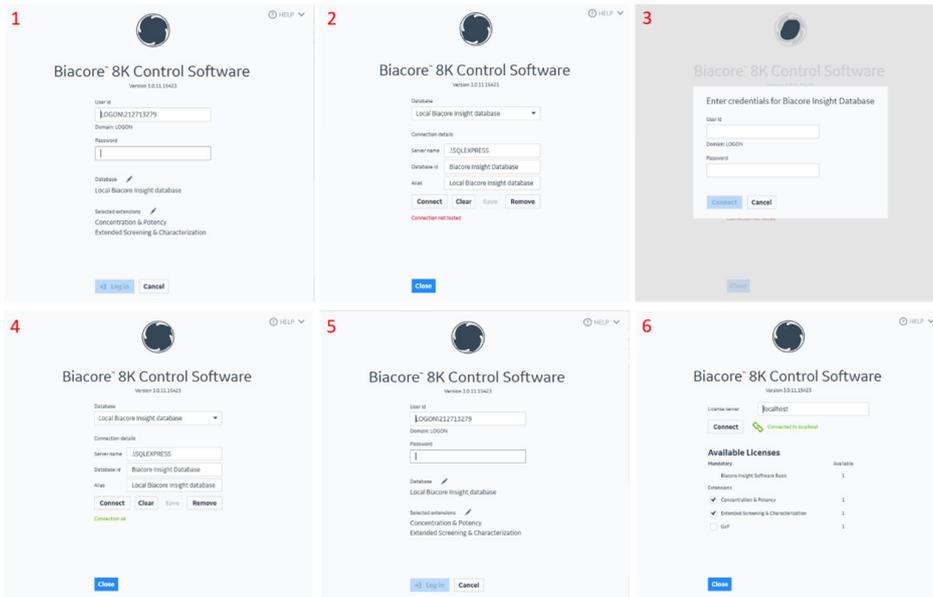
四、实验步骤

(一) 仪器准备

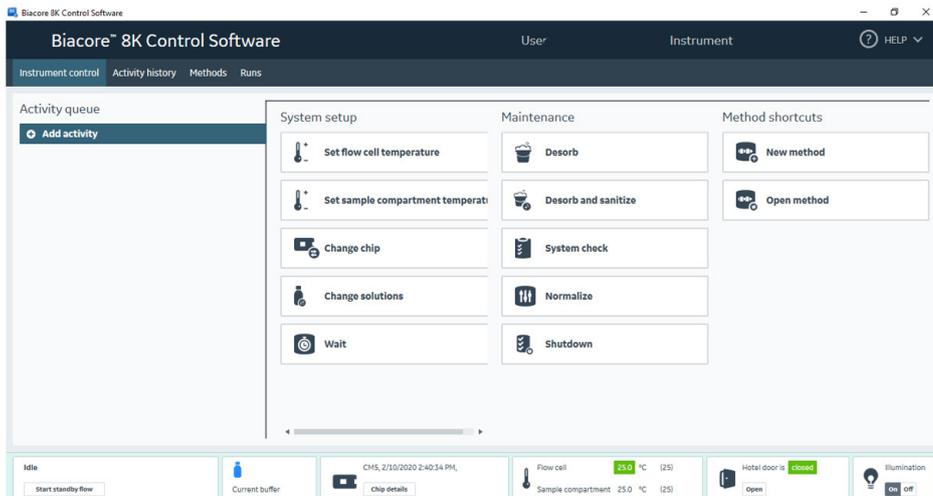
1、开机操作

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 100 mL 10 x HBS-EP+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。

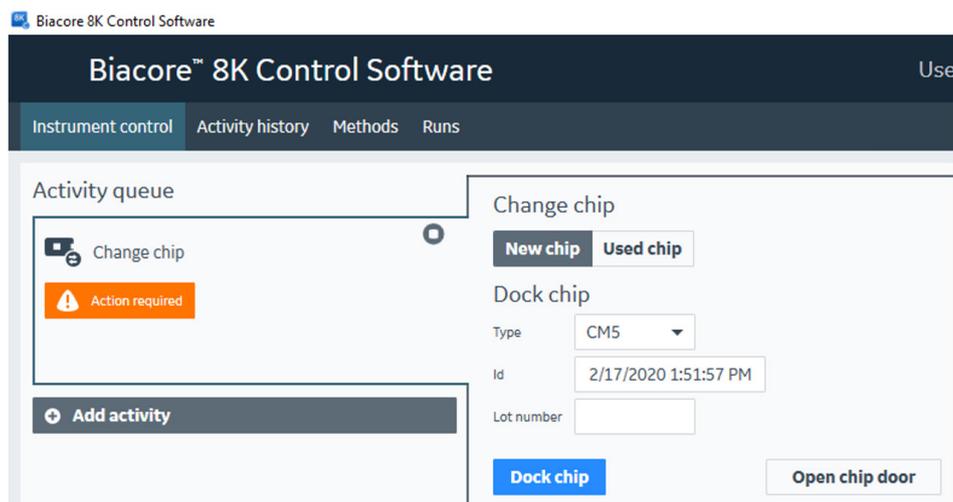
2) 取 2 L 去离子水装入 2 L 缓冲液瓶，同样放置在右侧桌面上，并将标注有 water 和 reagent 的进液管插入至纯水瓶底部，用于清洗进样针。（Reagent 管路用于实验中大量溶液进液，无需使用时放入纯水瓶）

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。

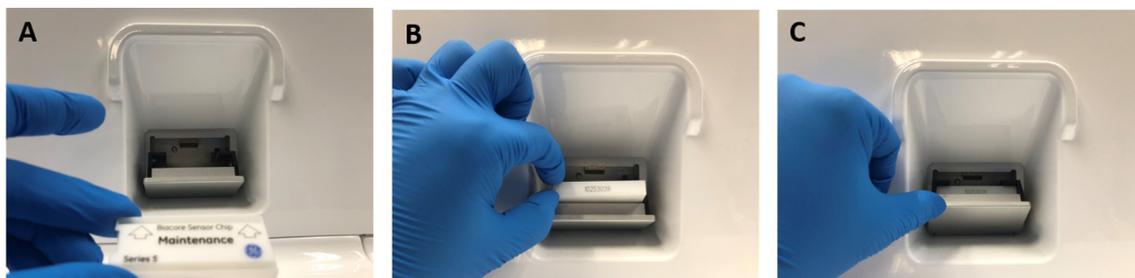
3、芯片的放置

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。



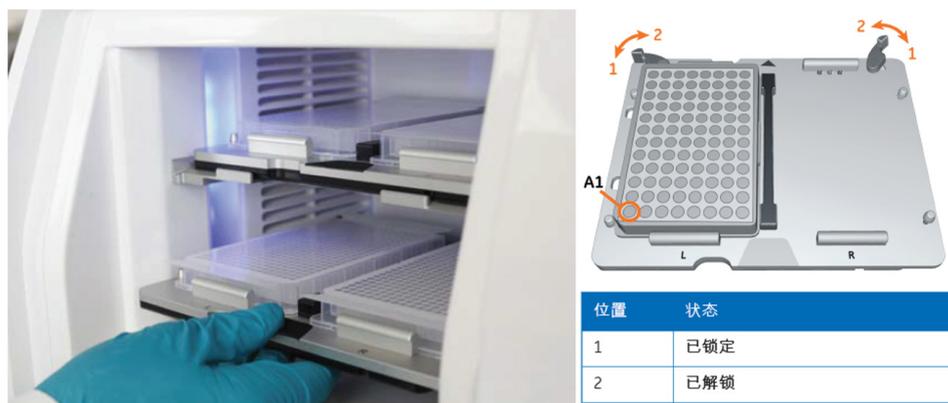
5) 点击 Dock Chip 按钮，芯片置入后系统将自动转入待机（Standby）状态。

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 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）配体偶联

1、偶联量计算

根据以下公式可计算目标偶联量

$$R_{max} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times R_L \times S_m$$

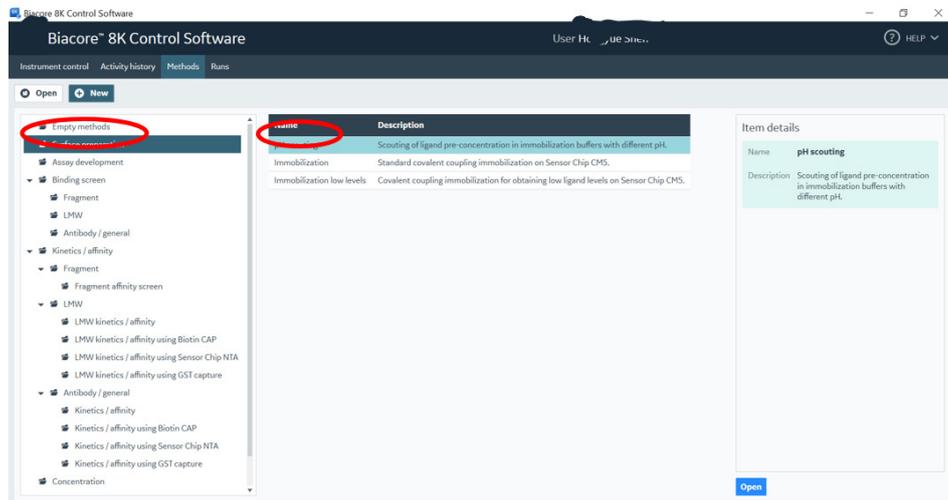
其中，Rmax 为芯片表面最大结合容量，在蛋白测试中通常代入 100 RU。analyte MW 和 ligand MW 分别为流动相蛋白 B 和配体蛋白 A 的分子量，Sm 为化学计量比，未知时默认为 1，RL 为配体偶联量。实验时实际偶联量为 3-5 倍的 RL。以本实验为例，蛋白 A 分子量为 24kD，蛋白 B 分子量为 21kD，则 RL 为 114RU，蛋白 A 的目标偶联量为 300-600 RU。

注：本实验选用了偶联蛋白 A 流过蛋白 B，客户也可以选择偶联蛋白 B 流过蛋白 A，多数情况下均可。部分情况下只能选用一种实验设计方式，如蛋白等电点过低等情况。（详情请参考 Biacore 培训手册）。

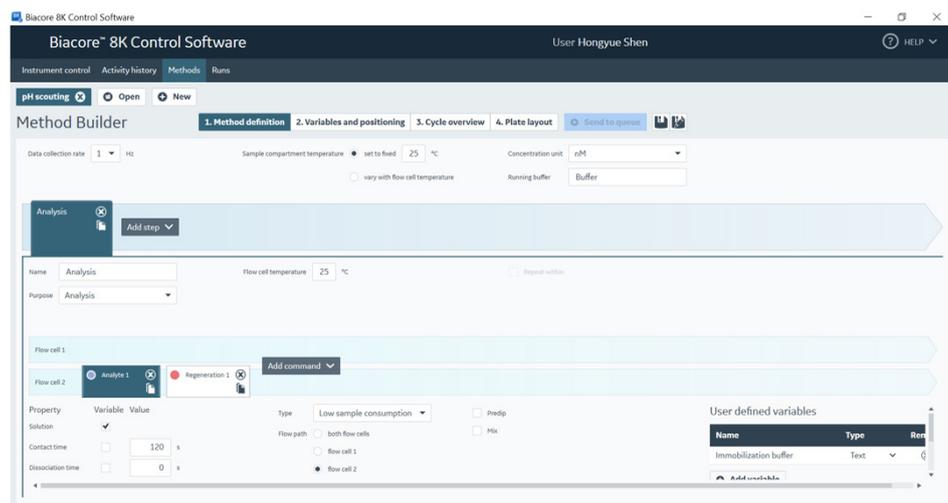
2、配体偶联预富集条件摸索

1) 蛋白 A 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，若偶联量大于 5000RU，可提高浓度到 20μg/ml 以上），各 100 μl 备用。

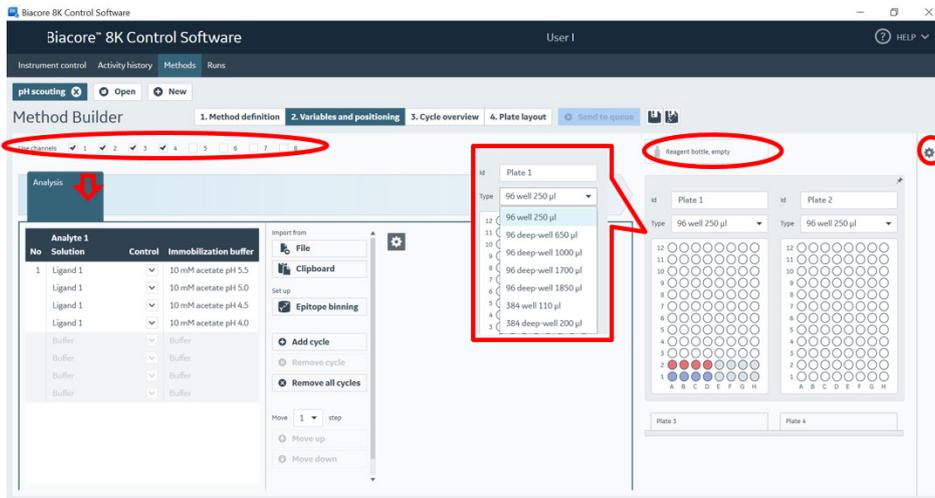
2) 在打开的 Biacore™ 8K Control Software 点击主界面右上方的 Methods，单击 ，选择 Surface preparation 菜单中的 pH Scouting 模板，双击打开。



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°C，浓度单位选择对应的单位。将 Contact time 由默认的 180s 或改为 120s，其余不变。



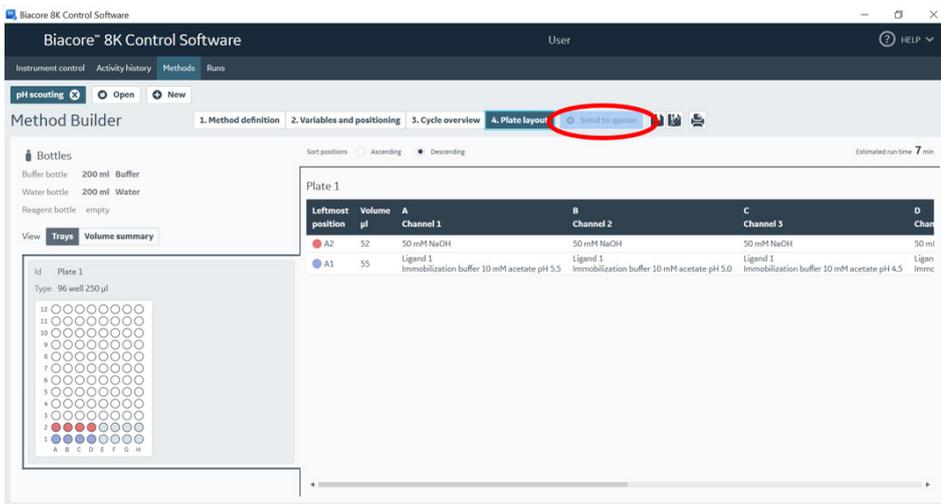
4) 在 2.Variables and positioning 界面中，在 Use Channels 中选择 1-4 进行勾选（本实验只有一个样品四个 pH，选择四个通道即可），在表格的 Solution 栏下填蛋白 A 的名称，在右方根据样品体积在 Type 中选择 96/384 孔板类型，并设置与更改样品位置。

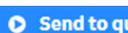
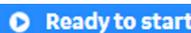


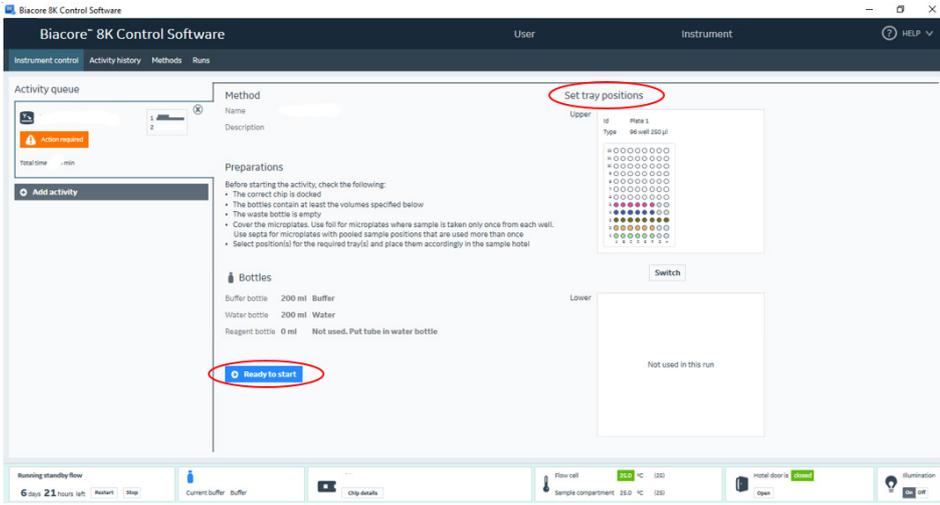
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的  图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。若需使用到大体积溶液可将其用鼠标拖动到 Reagent bottle。

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。

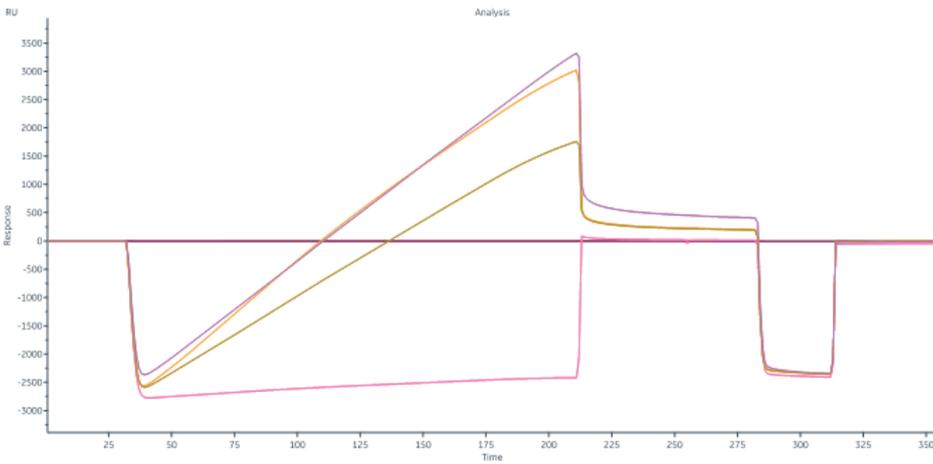
6) 在 4. Plate layout 界面中，将样品 A 使用不同 pH 醋酸钠进行稀释，根据屏幕显示准备样品并放置在相应位置（放入样品体积略大于显示体积即可，若实验设计中包含空孔，必须使用 buffer 以同样样品体积加满）。



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 位置和显示一致。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。



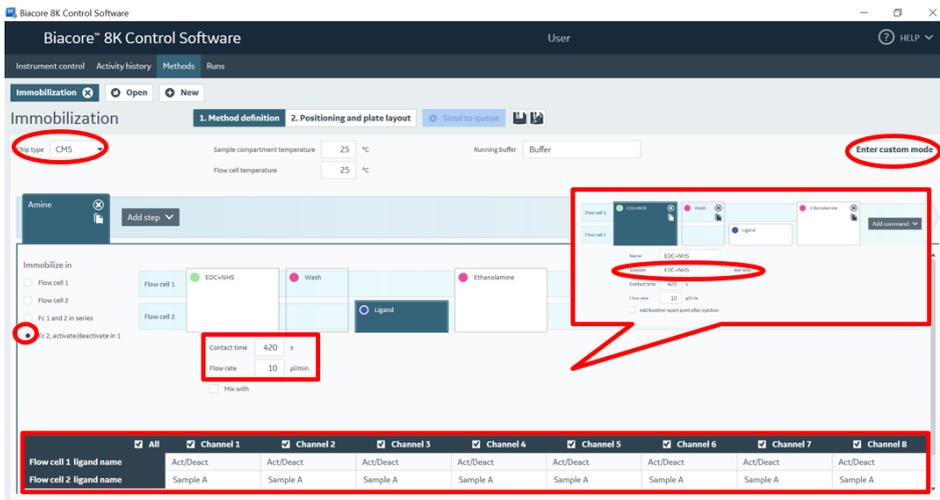
pH scouting 图

8) 本实验确定 pH5.0 作为最佳偶联条件，并且响应值远高于目标偶联量。故用 pH5.0 的醋酸钠将配体溶液稀释至 2 μg/ml，200 μL 进行配体偶联。

3、配体偶联

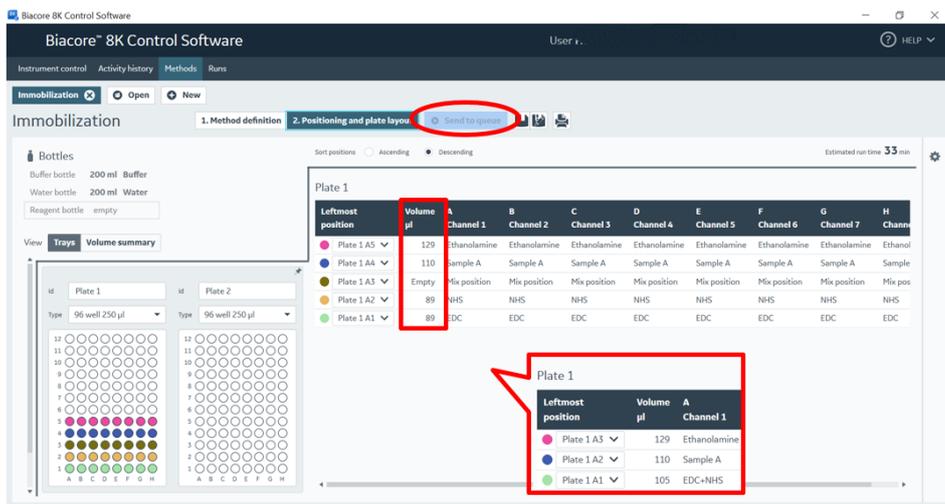
1) 打开 Biacore™ 8K Control Software，点击上方任务栏中的 Methods，单击 **New**，选择 Surface preparation 菜单中的 Immobilization 模板，双击打开。

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 420s（根据偶联量可对其进行调整），速度 10 μl/min。下方勾选所有通道，其中 Flow cell 2 ligand name 改为 Sample A。

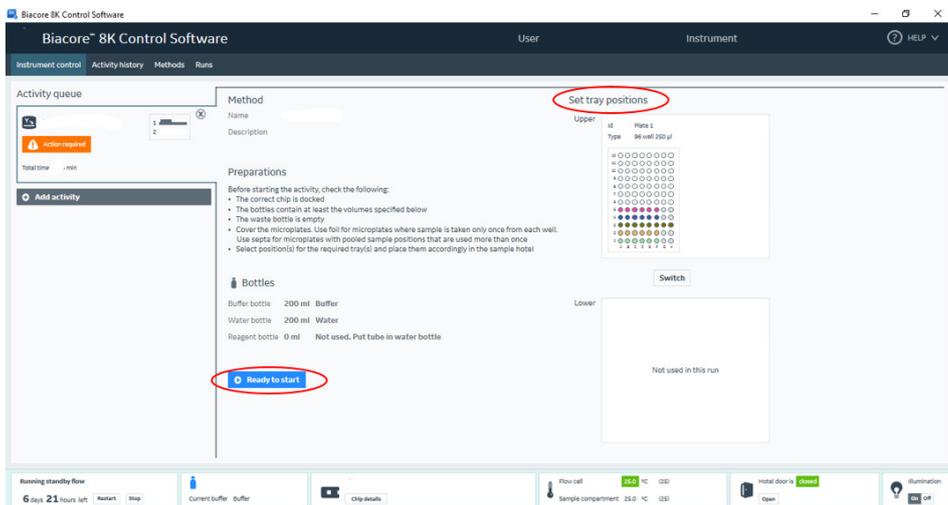


程序默认 EDC+NHS 通过仪器混合，但为了节省时间，我们可以设置手动预混。点击 Enter custom mode 进入个性化定制程序，在 EDC+NHS 选项卡中，去除 mix with 前方的勾选，并将 Solutin 名称改为 EDC+NHS，其余不变，即可在手动预混后进行实验。

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-H1，89 µl 的 NHS 放入 Plate1 A2-H2（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 乙醇胺放入 Plate1 A5-H5，110 µl 以 pH 5.0 醋酸钠稀释的样品 A 放入 Plate1 A4-H4，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。

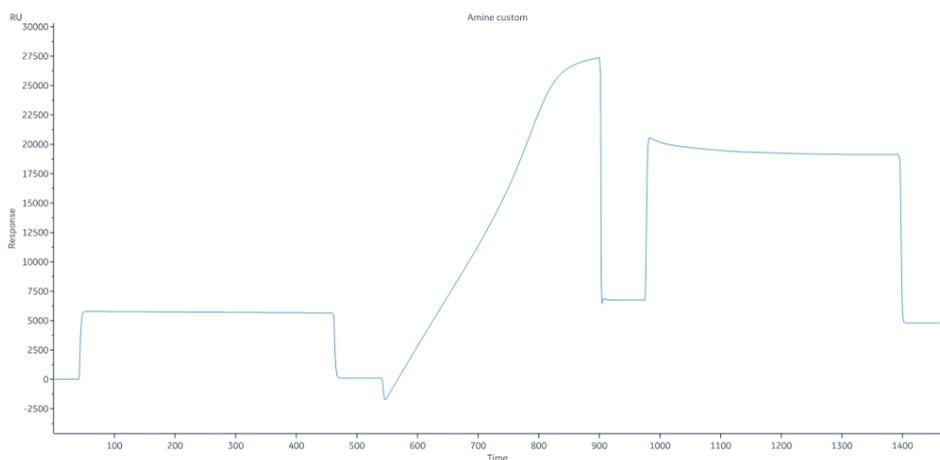


4) 点击右上方的文件保存图标，将方法文件保存在相应路径中，（这样系统会自动保存该文件，后续有类似操作时，可直接调用该文件）。再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置和显示一致。然后再点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行偶联程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）



5) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果。

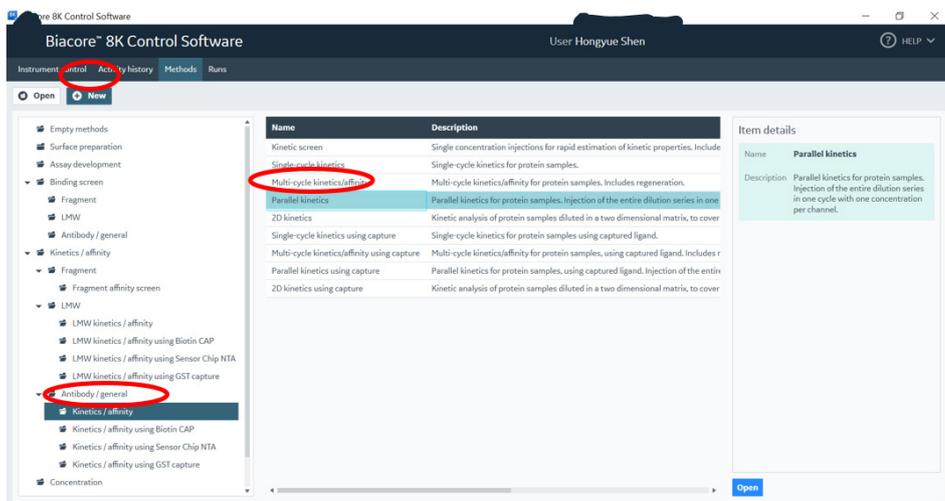
6) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。



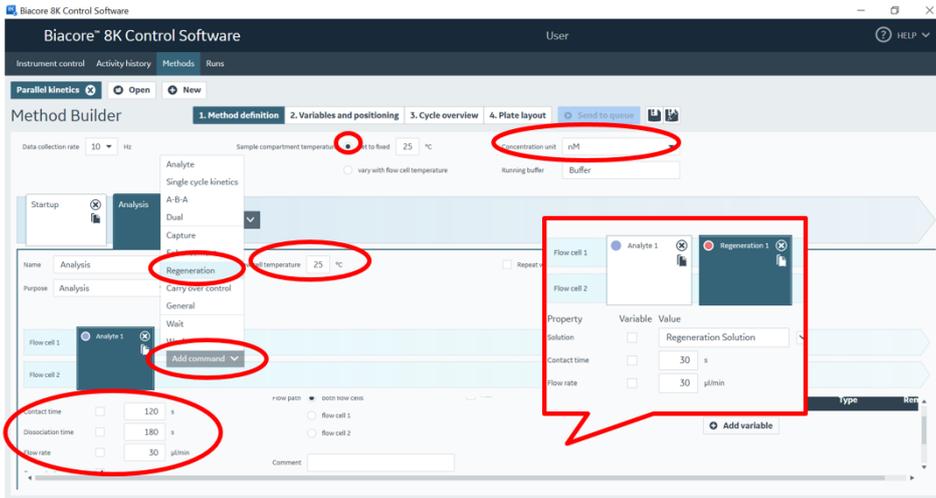
配体偶联示意图

(三) 样品检测过程

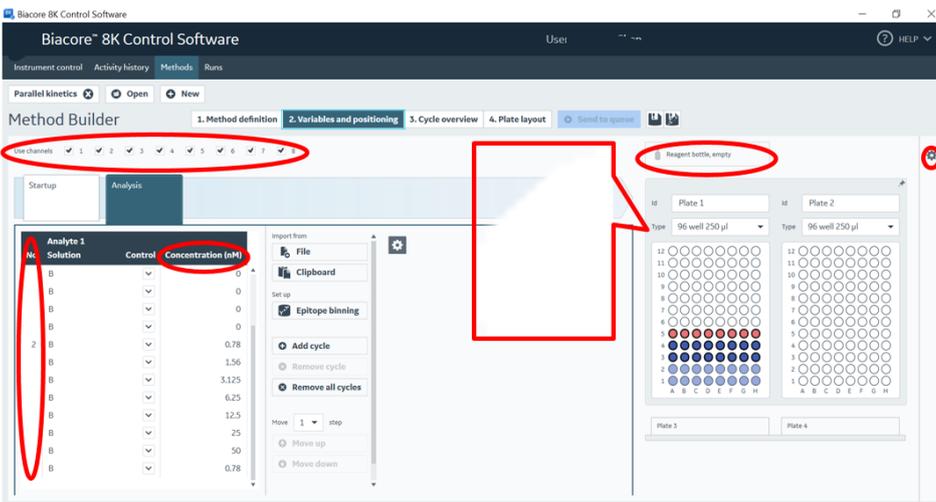
1、点击 Biacore™ 8K Control Software 的上方任务栏中的 Methods，单击 **New** ，选择 Kinetics /affinity>Antibody/general>Kinetics/affinity 菜单中的 Parallel kinetics 模板，双击打开。



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，分析温度填写默认的 25℃，Contact time 为 120s，Dissociation time 为 180s（可根据实际情况增减解离时间），Flow rate 为 30 μl /min。点击 Add command，选择 Regeneration，添加再生程序，设置 Solution 名称为 Regeneration solution 或者具体的再生液名称，Contact time 为 30s，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）。



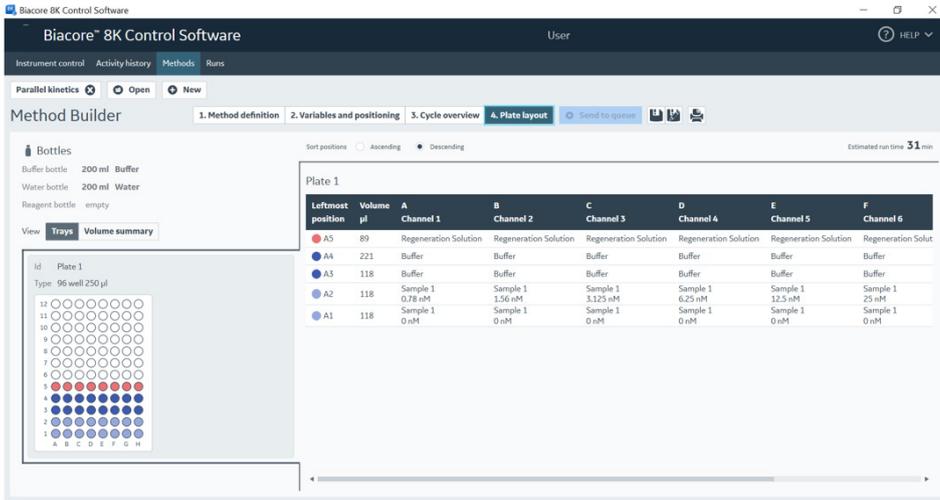
3、在 2. Variables and positioning 界面中，在 Use channels，使用所有 channels。保持 Startup 默认设置，在 Startup 选项卡 Add Cycle 增加至三个循环，在 Analysis 选项卡下，在跳出的表格的 solution 填写样品名称，第一个循环 Concentration 均为 0 nM，第二个循环从上至下依照样品浓度由低到高填写（注意要设置重复浓度），在右方根据样品体积在 Type 中选择 96/384 孔板类型，并设置与更改样品位置。具体填写如下：



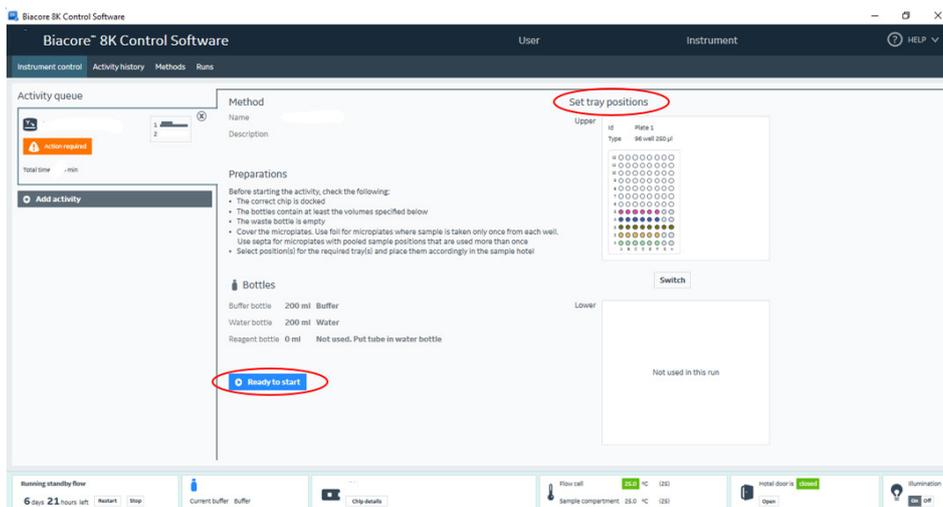
若需要合并相同的溶液或者将溶液合并到同一块 plate 上，可以点击屏幕最右侧的 ⚙️ 图标，勾选相应的 pooling 或用鼠标将溶液拖动到同一 plate 上。若需使用到大体积溶液可将其用鼠标拖动到 Reagent bottle。

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。

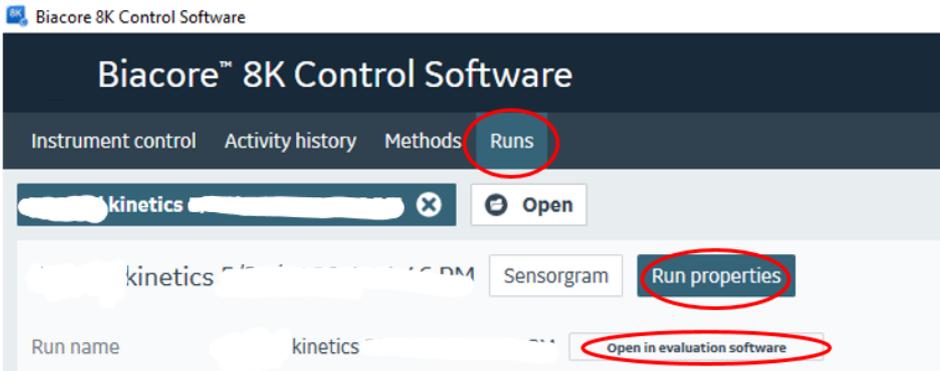


6、点击上方的文件保存图标，将方法文件保存在相应路径中，（这样系统会自动保存该文件，后续有类似操作时，可直接调用该文件）。再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置 and 显示一致。然后再点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）

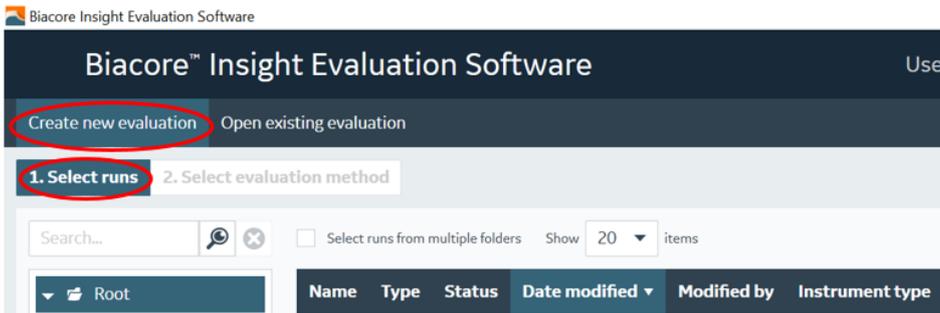


（四）实验结果分析

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），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。

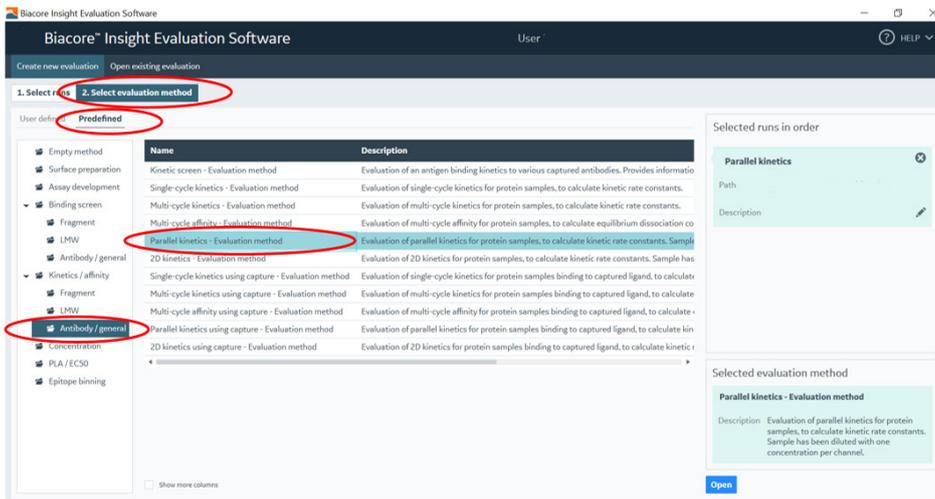


Biacore™ 8K Control 软件打开结果文件



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

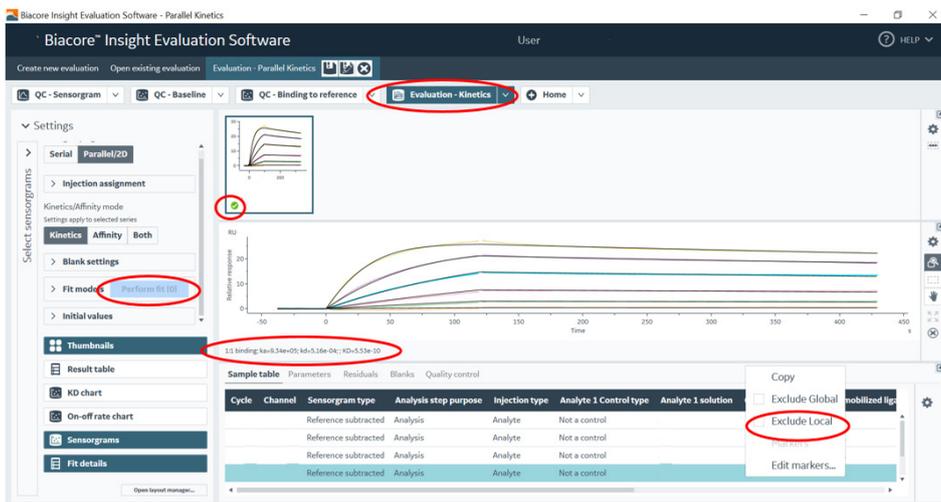
2) 选择 2. Select evaluation method (若从 Control 软件跳转过来, 直接进入该页面), 点击 Predefined, 再选择 Kinetics/affinity 下方的 Antibody/general, 选择右侧分析具体方法 Parallel kinetics-evaluation method (同实验方法对应), 双击, 分析软件自动进行拟合, 输出结果。



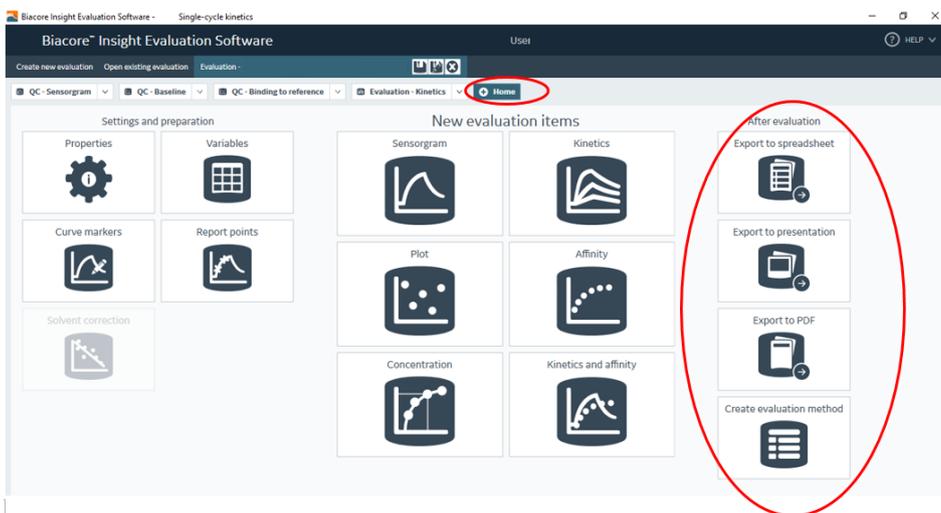
3) 点击上方 QC-Binding to reference, 检查各个点是否小于 Evaluation-kinetics 传感图中中对应响应值的 20%。如是, 直接跳到下一步。注: 若 Binding to reference 各个点的响应值大于 Evaluation-kinetics 传感图中对应响应值的 20%, 即存在非特异性结合。此时可尝试降低流动相样品浓度。



4) 点击 Evaluation-kinetics, 自动拟合后的传感图在中间显示, 亲和力 / 动力学数据在传感图下方显示, 观察上方缩略图中的红绿灯系统, 显示  则数据可靠 (显示  数据为可接受, 显示  则数据不可接受, 实验需进行优化), 具体情况可以在下方 Quality control 选项卡中查看。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。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。

CY42495-02Feb24-HB

