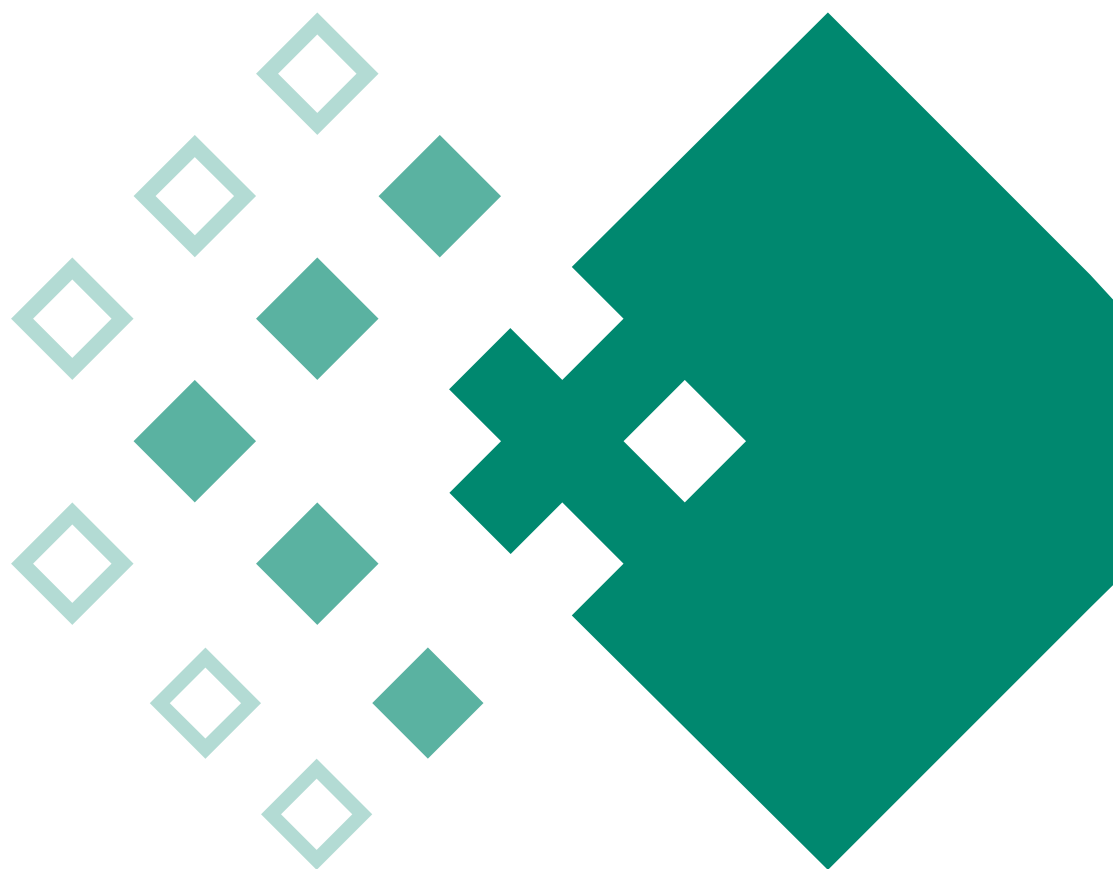


Biacore™ X100 检测蛋白 与核酸相互作用

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）核酸偶联	07
	（三）样品检测过程	08
	（四）实验结果分析	13

Biacore™ X100 检测蛋白与核酸结合操作指南

一、实验目的

利用 Biacore™ X100 与 SA 芯片检测蛋白与核酸结合的动力学数据 k_a 、 k_d 和亲和力数据 K_D 。若有大量检测带 biotin 标签的样品待检测，可选择 Biotin CAPture Kit, Series S (货号: 28-9202-34) 来进行检测。本实验使用的核酸为 Lac O1 (乳糖操纵序列 O1)，由 23 对互补碱基构成的双链 DNA，DNA 的 5' 端带有生物素化标签，分子量约为 14.5 KD；蛋白为 Lac 1 (乳糖操纵阻抑蛋白)，分子量为 39.4 KD。本实验利用 SA 芯片固定生物素化修饰的 Lac O1 双链 DNA，Lac 1 蛋白作为分析物检测其结合的动力学和亲和力数据。

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。该指南可用于单/双链 DNA、RNA、MicroRNA 等样品的检测，但具体参数设置仅供类似实验参考，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™ X100，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、SA 芯片，货号：BR100398 (一片装)、BR100032 (三片装)，厂家为 Cytiva。

3、缓冲液：10 x HBS-EP+ (货号：BR-1006-69)，购买地为 Cytiva。

(也可扫描右侧的二维码选择含上述 2/3 所有耗材的套餐)



4、Condition 缓冲液：含 50 mM NaOH 和 1 M NaCl 溶液，配制 200 μ L。

5、Wash 缓冲液：含 50% 异丙醇、50 mM NaOH、1 M NaCl 溶液，配制 200 μ L。

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、无盖 1.5 ml EP 管 (货号：BR-1002-87)，厂家为 Cytiva。

8、生物素化修饰的核酸：商业化合成的粉末，用去离子水稀释到 100 μ g/mL，分装保存在 -20℃。

9、蛋白 lac 1：母液浓度尽量大于 1 μ M，样品体积在 200 μ L 以上，纯度 >80%。(蛋白需要量可能因亲和力高低而异)。

10、再生溶液：0.5% SDS。

四、实验步骤

（一）仪器准备

1、开机操作

1) 打开 Biacore™ X100 系统和电脑的电源开关。Biacore™ X100 的电源开关位于系统背面的中心。初始化过程中前面板上的指示灯将全部亮起，当初始化准备就绪时，Power 指示灯处于亮起状态，Temperature 指示灯处于亮起或闪烁状态，Sensor chip 指示灯处于熄灭或闪烁状态，Run 指示灯处于熄灭状态。

2) 打开Biacore™ X100 控制软件（Biacore™ X100 control software），在登录对话框中，输入用户名和密码并单击 OK。运行后软件会自动和主机系统建立连接。



3) 准备运行缓冲液。量取 50mL 10 x 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™ X100 系统左侧的托盘上。

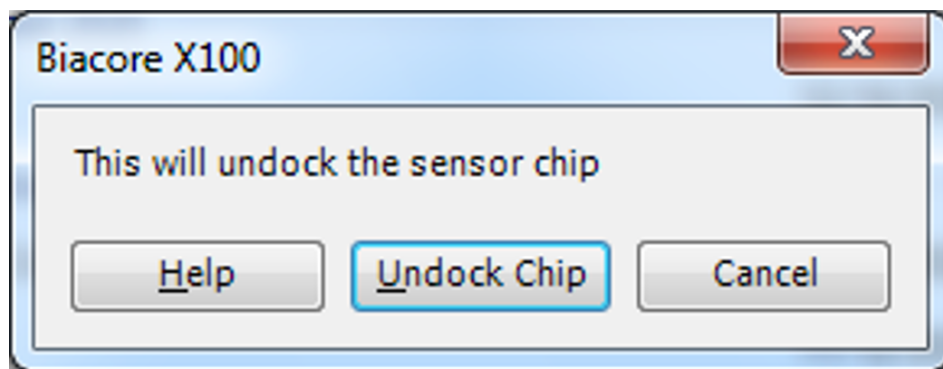
2) 将两根缓冲液进液管插入至缓冲液瓶底部，并拧上专用的盖子。

3) 将 500mL 的废液瓶放置在 Biacore™ X100 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。

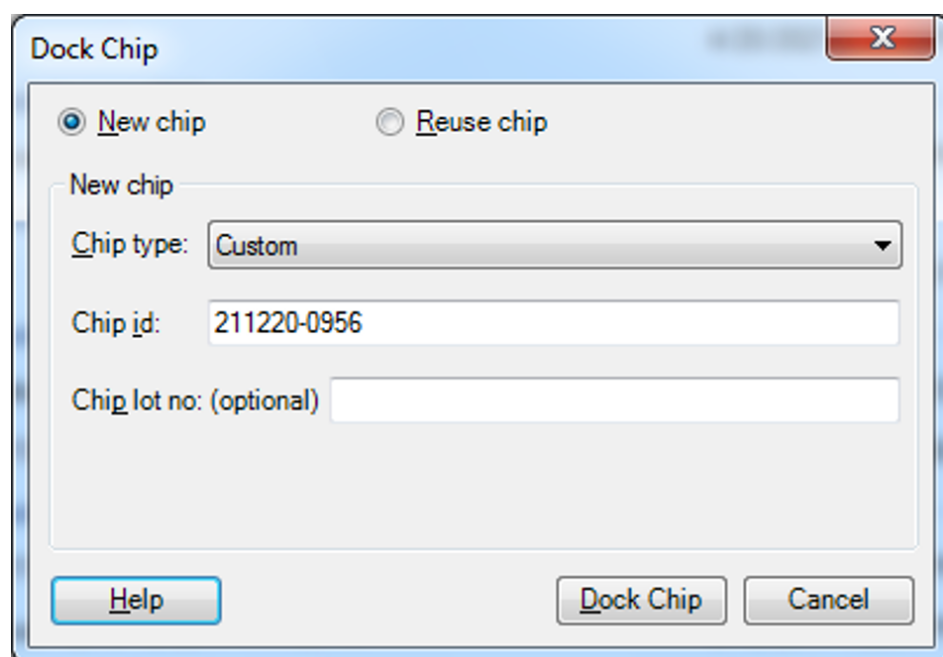
3、芯片的放置

1) 打开仪器前面板上部的芯片舱门，点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Undock Chip 选项，打开芯片舱门。

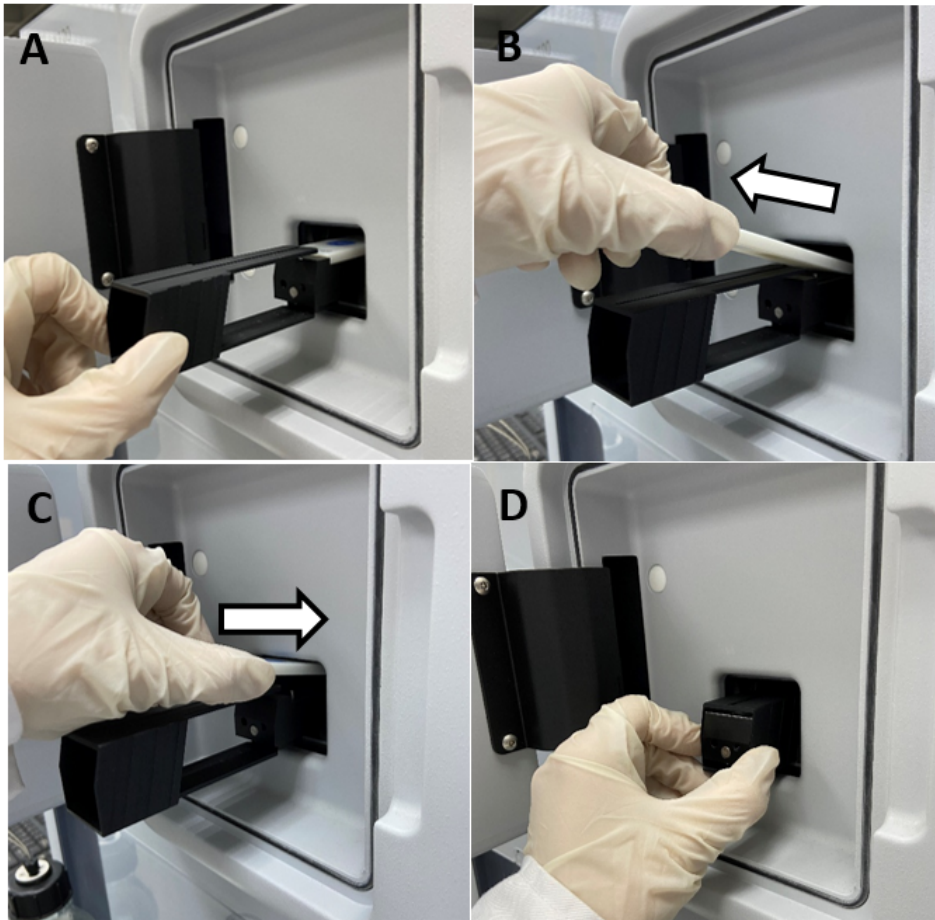
2) 如果已经有芯片在芯片舱内，点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Undock Chip 选项，完成芯片卸载后会显示 Dock Chip 对话框，同时仪器前面板的传感芯片指示灯会闪烁。拉出芯片推杆，取出旧的芯片。（若芯片舱中没有芯片，此步直接跳过）



3) 如果使用的是新芯片，选择 New Chip。在 Chip Type 的下拉菜单中选择对应的芯片种类（此实验为 CM5 芯片），在 Chip Id 中填入和芯片相关的实验信息，Chip 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 Reuse Chip，并在 Chip Id 下拉菜单中找到与之相对应的芯片信息。



4) 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，插入芯片，最后推入芯片推杆，关闭芯片舱门，点击 Dock Chip 完成芯片装载。

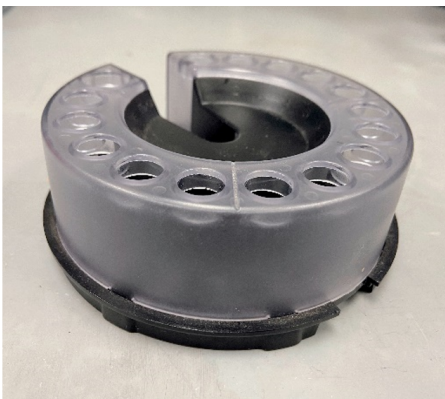


5) 点击 Dock Chip 按钮，芯片置入后系统将自动转入待机（Standby）状态。

6) 选择 Tools→Prime 命令，点击 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，点击 Close，系统自动转入待机（Standby）状态。注意：当系统开机或更换缓冲液后，必须运行 Prime 程序。Prime 时缓冲液会冲洗整个流路系统，为下一步的实验做好准备。

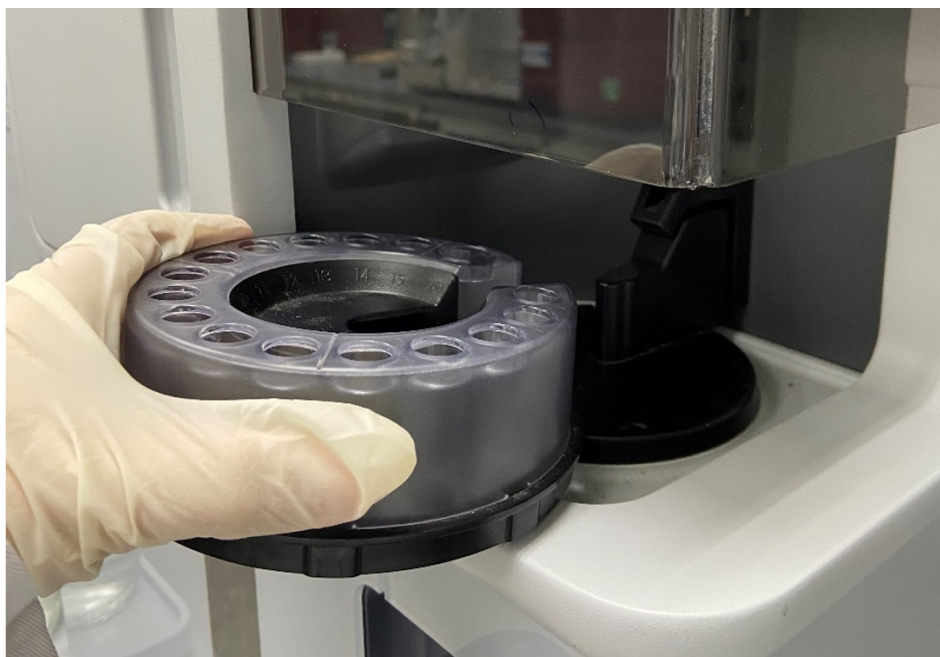
4、放置样品架

1) Biacore™ X100 的样品架为 Reagent Rack，如下图所示。



Reagent Rack

2) 点击工具栏  按钮，或选择 Tool→Eject Rack，等待 Rack Locked 指示灯熄灭，取出样品架。



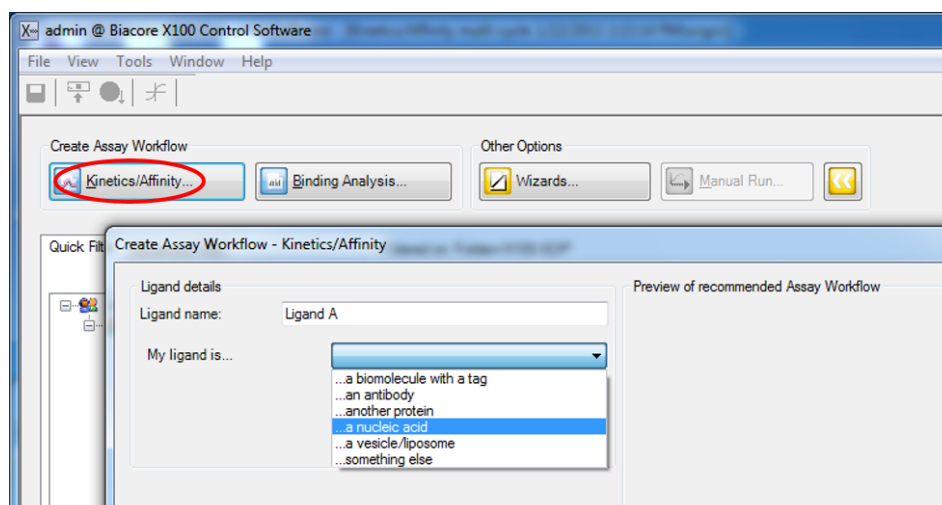
样品架的取出 / 放入方式

3) 将样品架对准卡槽放入样品舱，并确保其与样品架基座贴合良好，表明样品架已经处于正确位置并锁定。

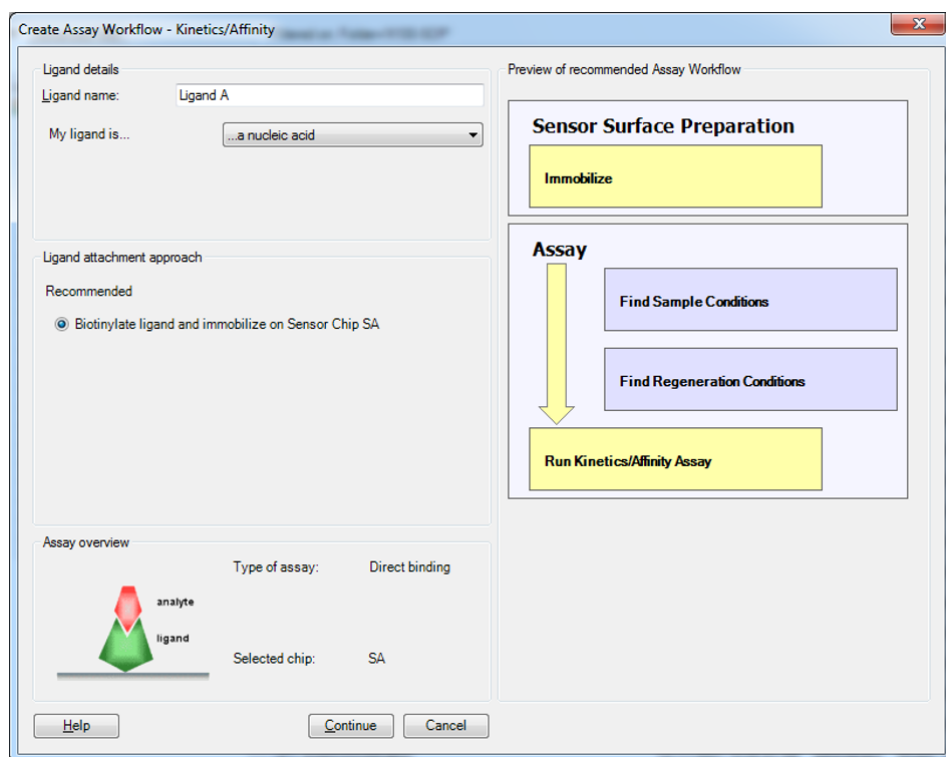
4) 点击 Load Samples 对话框中的 OK，完成样品舱装载

(二) 实验 Workflow 设置

1) 点击 Create Assay Workflow 下方的 Kinetics/Affinity，点击打开。在全新窗口，填写配体名称 Ligand name，选择配体类型，本实验选择 nucleic acid。



2) 选择配体类型后，在出现的 Ligand attachment approach 界面，选择推荐的实验方式，本次实验选择 Biotinylate ligand and Immobilize on Sensor Chip SA，通过生物素标签将配体捕获至 SA 芯片进行实验（该捕获为不可逆捕获）。



3) 下方的 Assay overview 与右侧的 Preview of recommended Assay Workflow，清晰展现了配体与分析物的实验方式与实验流程。点击 continue，输入名称点击 Save 保存实验 Workflow 至文件夹。（名称自行指定，注意本指南中所有要保存的指定文件夹与文件名不可有中文字符）。

（三）核酸偶联

1、偶联量计算

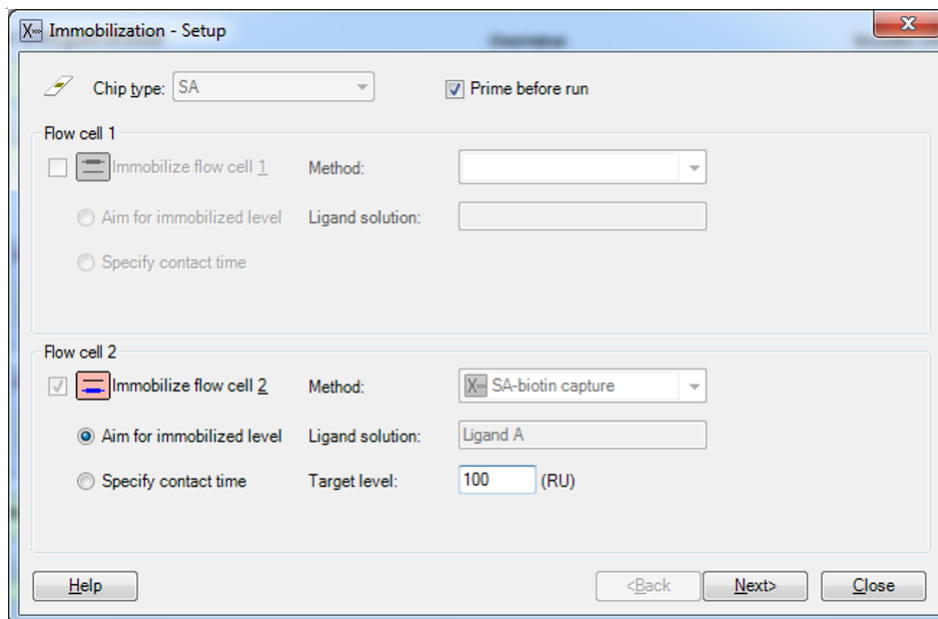
根据以下公式可计算目标偶联量

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

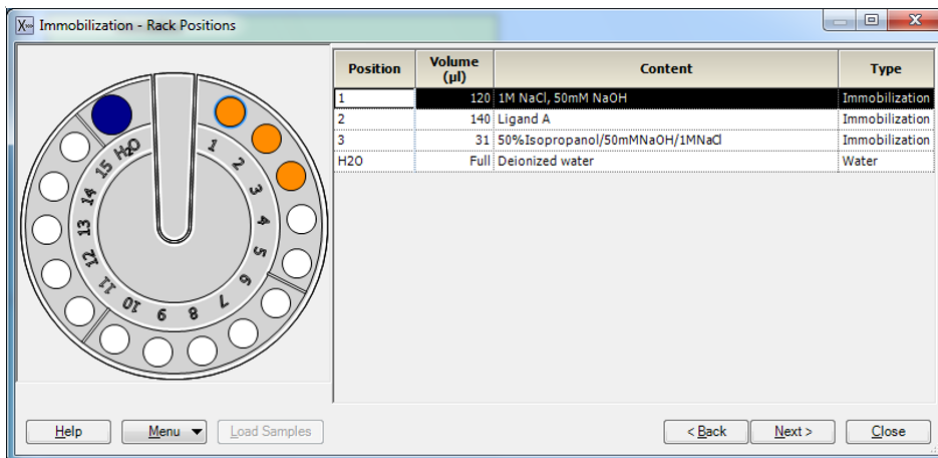
其中，Rmax 为芯片表面最大结合容量，在蛋白测试中通常代入 100 RU。analyte MW 和 ligand MW 分别为流动相蛋白和配体核酸的分子量，Sm 为化学计量比，未知时默认为 1，RL 为配体偶联量。实验时实际偶联量为 3-5 倍的 RL。以本实验为例，蛋白分子量为 39.4 kD，核酸分子量为 14.5 kD，则 RL 为 36.8 RU，核酸的目标偶联量为 100-200 RU。

3、配体偶联

1) 根据 Assay Workflow 界面的内容，点击 Immobilization 下 Run，打开配体偶连程序。在跳出的对话框中，将 prime before run 前的“√”去掉，在 Flow cell 2 中，method 默认 SA-biotin capture，核对 ligand 配体名称，选用 Aim for immobilized level，Target level 输入配体目标偶联量，为 100 RU，点击 Next。



2) 在 Rack Positions 界面，保持样品默认位置或自行通过鼠标拖拽到指定位置。点击 Load Samples，取出样品架，按图所示放入相应的样品和试剂，体积略大于图示体积即可。放入样品架，点击 next，保存方法和结果文件后，点击 start。保存 method 与 result 文件到文件夹（可默认或自行指定，注意本指南中所有要保存的指定文件夹与文件名不可有中文字符）。系统正式自动运行 Immobilization 程序。



3) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果，确定偶联量后，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、根据 Assay Workflow 界面的内容，点击 Run Kinetics/Affinity Assay 下 Run，打开样品检测程序。在跳出的对话框中，Kinetics type 选择 Multi-cycle，点击 Next。

Kinetics/Affinity - Injection Sequence

Detection
 Flow cell: 1,2 ☒ Reference subtraction

Chip
 Chip type: SA

Kinetics type
☐ Single-cycle ☒ Multi-cycle

Injections in analysis cycle

Flow Cell 1	Flow Cell 2
Sample	
↓	
Regeneration	

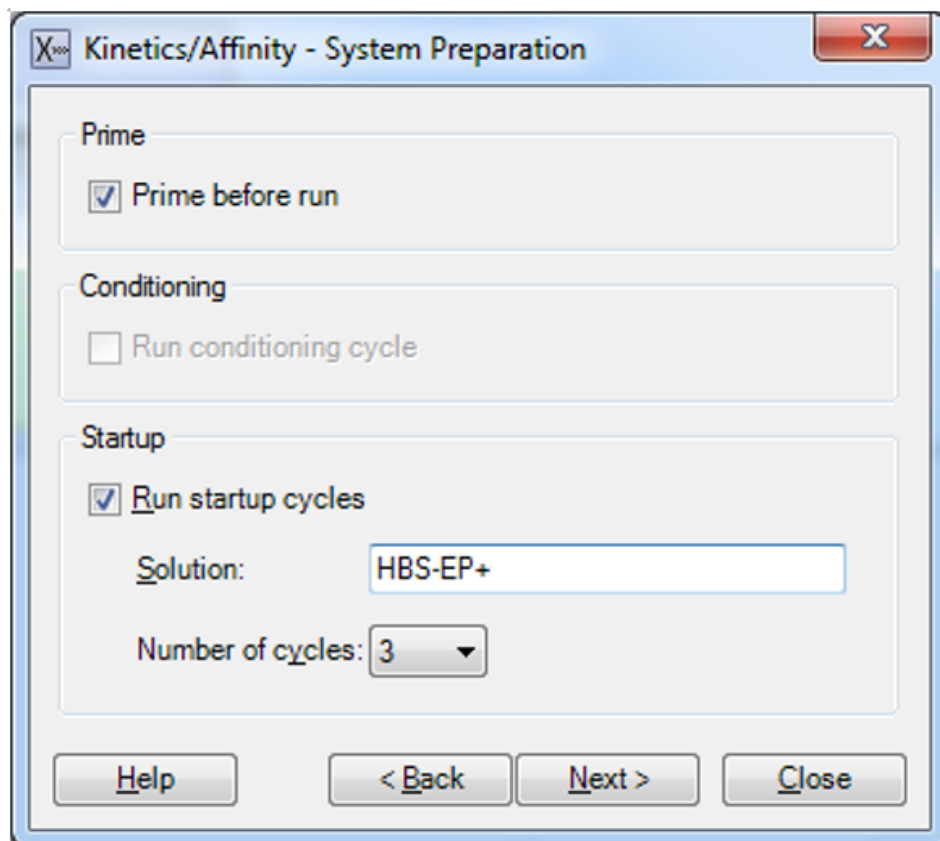
☐ Ligand capture

☒ Sample

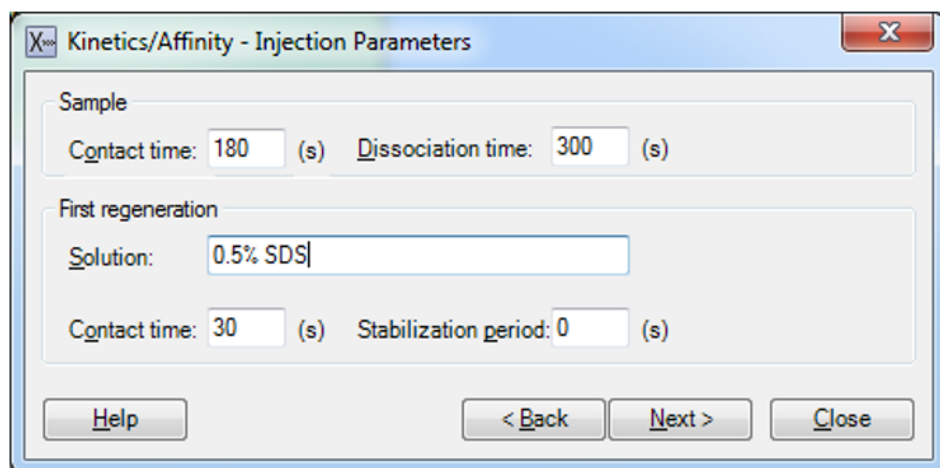
☒ Regeneration 1

Help < Back Next > Close

2、在 System Preparation 对话框中，将 prime before run 前的 “√” 去掉，Startup 部分中 Solution 名称填 HBS-EP+，其余不变，点击 Next。



3、在 Kinetics/Affinity-Injection Parameters 界面下，在 Sample 一栏中 Contact time 为 180s，Dissociation time 为 300s，Regeneration 中 solution 为 0.5% SDS，Contact time 为 30s。点击 Next。



4、在 Kinetics/Affinity-Samples 界面中，填写分析物信息：Sample id 填写样品名称，MW(Da) 填写分子量，一个 Concentration 为质量浓度，另一个 Concentration 为摩尔浓度，样品浓度由低到高填写（质量浓度或摩尔浓度填一种即可，另一种系统会自动计算）。注意要设置重复浓度和零浓度。具体填写如下：

Kinetics/Affinity - Samples

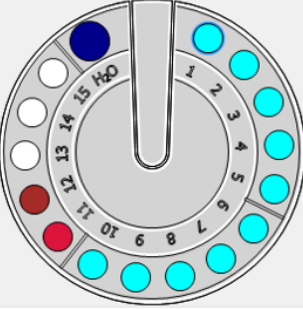
Samples

	Sample id	MW (Da)	Concentration	
			nM	µg/ml
1	Lac1		0	
2	Lac1		0.78125	
3	Lac1		1.5625	
4	Lac1		3.125	
5	Lac1		6.25	
6	Lac1		12.5	
7	Lac1		25	
8	Lac1		50	
9	Lac1		100	
10	Lac1		200	
11	Lac1		0	
12	Lac1		3.125	
13	Lac1		0	
14				

Help < Back Next > Close

5、点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-Rack Position 界面，保持默认位置或自行通过鼠标拖拽到指定位置。若要合并相同样品，点开 Menu 后选 Automatic Positioning，pooling 选项选择 yes，点击 OK。

Kinetics/Affinity - Rack Positions



Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 MW (Da)	Sample 1 Conc (nM)
1	375	Lac1	Sample		0
2	135	Lac1	Sample		0.78125
3	135	Lac1	Sample		1.5625
4	255	Lac1	Sample		3.125
5	135	Lac1	Sample		6.25
6	135	Lac1	Sample		12.5
7	135	Lac1	Sample		25
8	135	Lac1	Sample		50
9	135	Lac1	Sample		100
10	135	Lac1	Sample		200
11	375	HBS-EP+	Startup		
12	495	0.5% SDS	Regeneration		
H2O		Full Deionized water	Water		

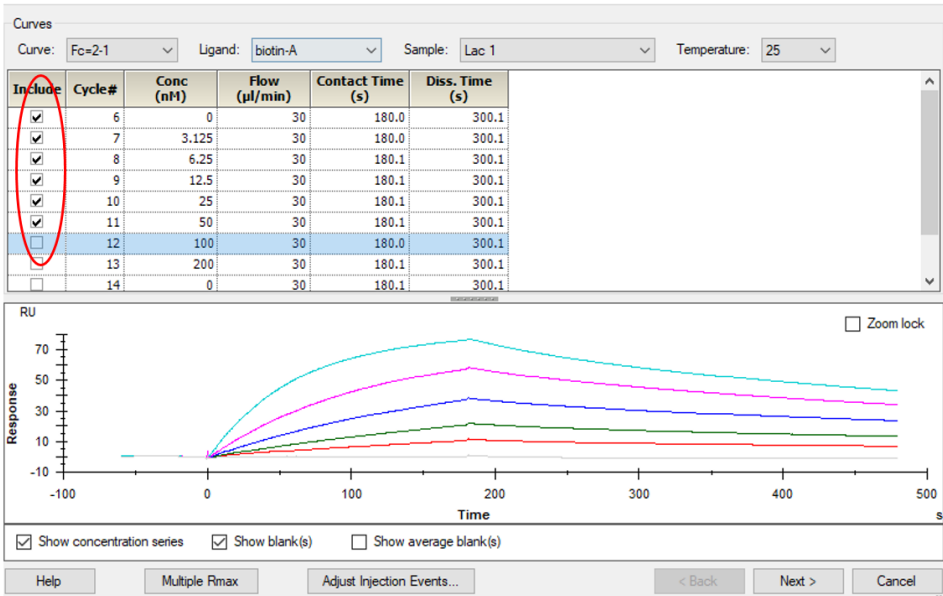
Help Menu Load Samples < Back Next > Close

6、点击 Load Samples，取出样品架，按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。蛋白 B 用运行缓冲液 HBS-EP+ 进行倍比稀释。放入样品架，点 Next 后，对方法进行保存，再对数据进行保存。点击 start，仪器便会开始自动运行。

(四) 实验结果分析

1) 打开 Biacore™ X100 Evaluation Software，点击 ，找到保存的结果文件。点击左侧 Plot 中的 Binding to reference，检查各个点是否趋于一致或小于 binding level 中对应响应值的 20%，检查 binding level 各个点的响应值是否存在明显的浓度依赖。如是，直接跳到下一步。注：若 Binding to reference 各个点的响应值也存在浓度依赖且大于 binding level 中对应响应值的 20%，即存在非特异性结合。此时可尝试提高运行缓冲液中盐离子浓度或提高 P20（货号：BR-1000-54）浓度不超过 1%，或者调换配体与分析物，将蛋白偶联在 CM5 芯片上，将核酸作为分析物。若 baseline 中各个点的响应值上飘，可适当延长再生溶液 0.5% SDS 的进样时间。

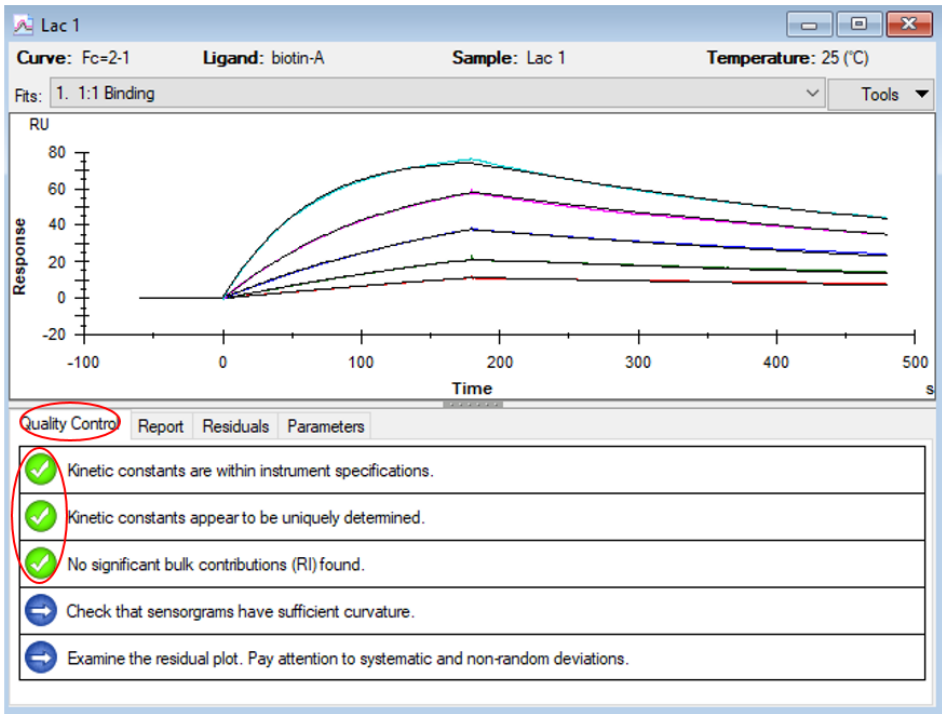
2) 点击上方中间位置的 Kinetics/Affinity，在下拉栏里点击 Surface bound，在跳出的窗口中选择不同的浓度进行拟合。选择标准为：如果最高浓度响应值大于 500 RU，选最低的 5-6 个浓度进行分析，如果最高浓度响应值小于 50 RU，选最高的 5-6 个浓度进行数据分析，介于两者中间，随意选 5-6 个连续的浓度进行分析。不需要的浓度，可在样品浓度表格中将此浓度前的对号去掉即可。



3) 点击右下角 Next，再点击右下角 Kinetics（当传感图为“快上快下”时，选 Affinity），点击左上角 Fit 进行数据拟合，点击右下角 Finish 完成。

4) 在下方数据显示栏里，Quality Control 的前三项都亮绿灯表示检测数据好；如果亮黄灯，表示数据能接受；如果亮红灯，表示数据不能接受，需要优化实验。数据显示栏的 Report 中显示具体的分析数据，包括动力学数据 k_a 、 k_d ，亲和力数据 K_D 等。以本实验为例，动力学数据： $k_a = 3.947 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ， $k_d = 1.984 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ，亲和力： $K_D = 5.025 \times 10^{-9} \text{ M}$ 。

5) 将鼠标放在图上，点击右键可以直接 copy graph 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。



Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value
	3.947E+5	0.001984	5.025E-9	84.38		2.951E+7				0.298	1
Cycle: 7 3.125 nM					3.125E-9		30.00	9.171E+7	-0.1137		
Cycle: 8 6.25 nM					6.250E-9		30.00	9.171E+7	-0.1906		
Cycle: 9 12.5 nM					1.250E-8		30.00	9.171E+7	0.04952		
Cycle: 10 25 nM					2.500E-8		30.00	9.171E+7	-0.3960		
Cycle: 11 50 nM					5.000E-8		30.00	9.171E+7	0.4268		

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。

CY42497-02Feb24-HB

