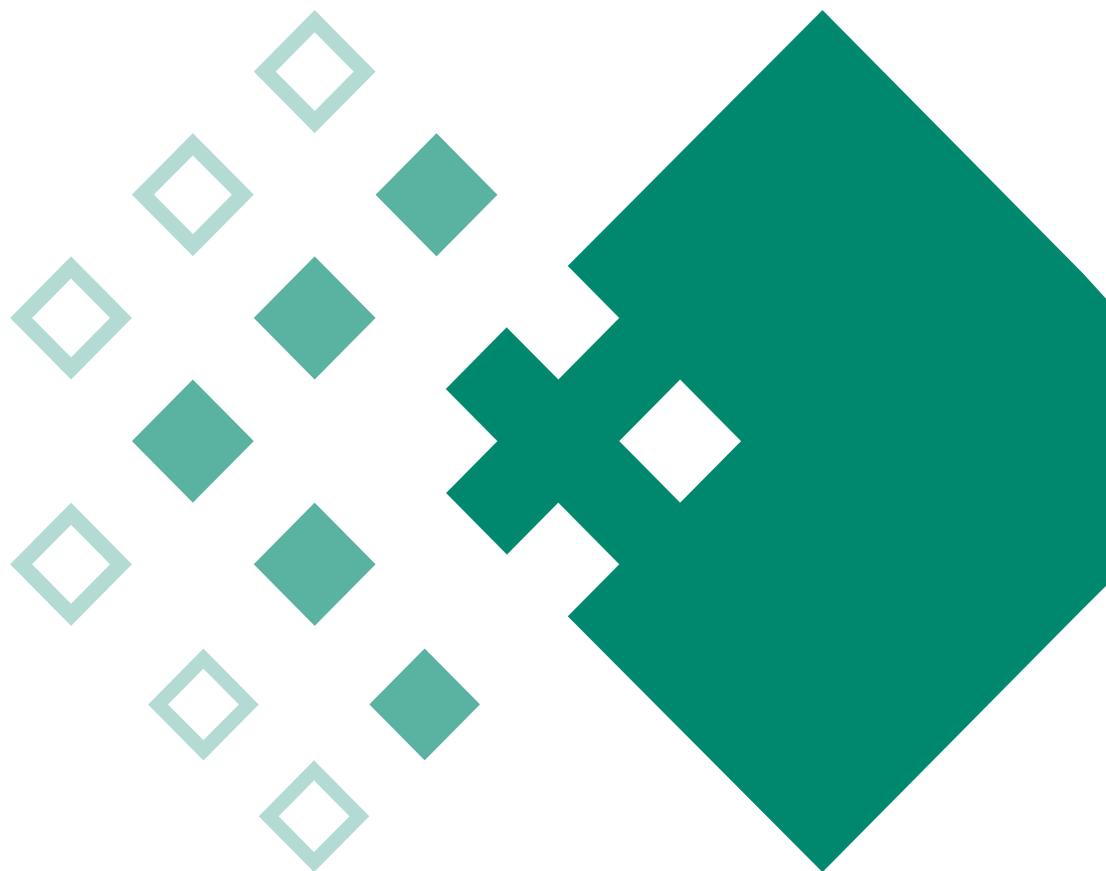


Biacore™ X100 检测蛋白 与蛋白相互作用

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) 实验 Workflow 设置	07
	(三) 配体偶联	08
	(四) 样品检测过程	13
	(五) 实验结果分析	16

Biacore™ X100 检测蛋白与蛋白结合操作指南

一、实验目的

利用 Biacore™ X100 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 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。若要检测多个蛋白与不同蛋白的互作, 可根据蛋白所带的 tag, 选择偶联相应的捕获分子如 tag 标签抗体等, 通过捕获法来进行检测, 具体操作可参考《Biacore 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。

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、CM5 传感芯片。CM5 芯片货号: BR100399 (一片装), BR100012 (三片装), 29149604 (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、无盖 1.5 ml EP 管 (货号: BR-1002-87), 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 1 μ 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™ 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。

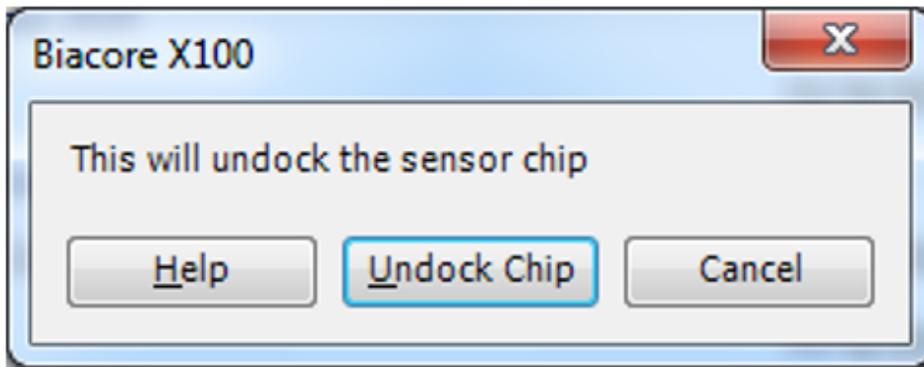
2) 将两根缓冲液进液管插入至缓冲液瓶底部，并拧上专用的盖子。

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。

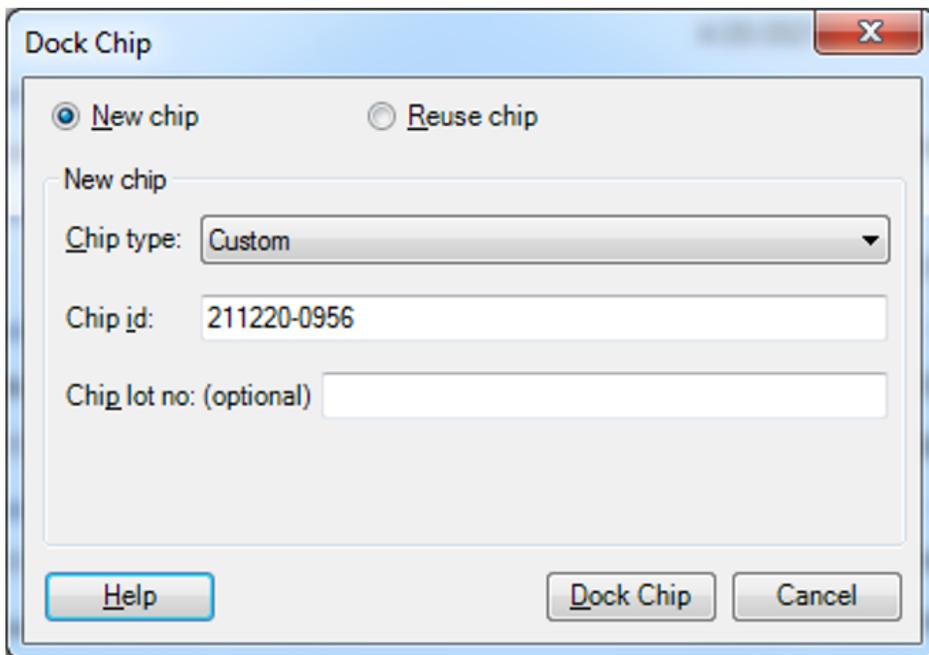
3、芯片的放置

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。

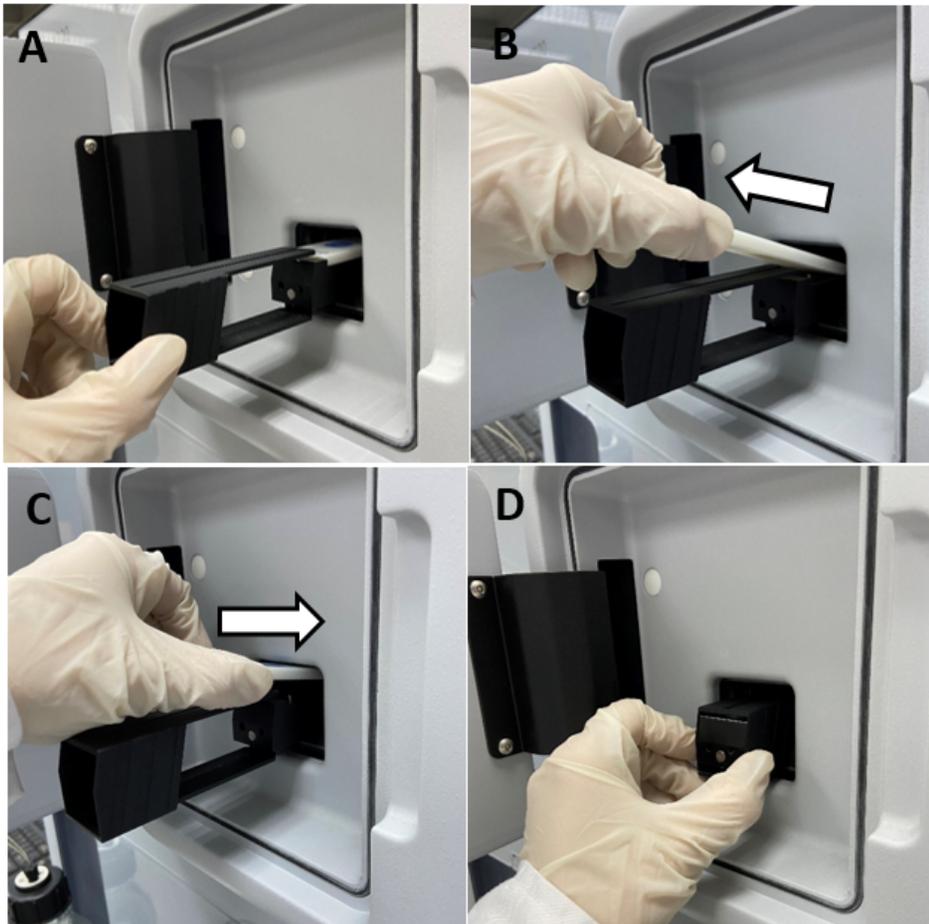
2) 如果已经有芯片在芯片舱内，点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Undock Chip 选项，完成芯片卸载后会显示 Dock Chip 对话框，同时仪器前面板的传感芯片指示灯会闪烁。拉出芯片推杆，取出旧的芯片。（若芯片舱中没有芯片，此步直接跳过）



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，芯片有字的一面朝上，箭头朝里，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。

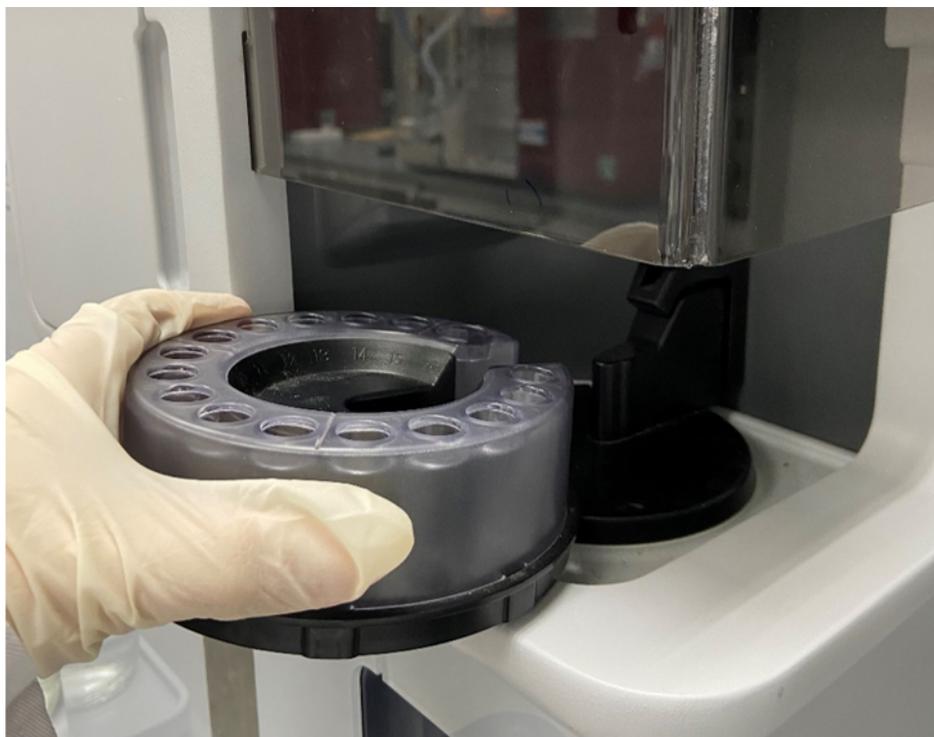
4、放置样品架

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

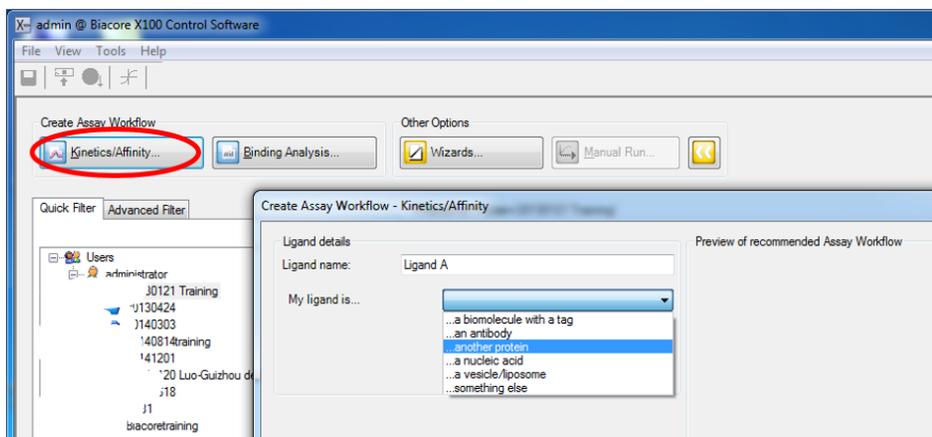
3) 将样品架对准卡槽放入样品舱，并确保其与样品架基座贴合良好，表明样品架已经处于正确位置并锁定。

4) 点击 Load Samples 对话框中的 OK，完成样品舱装载。

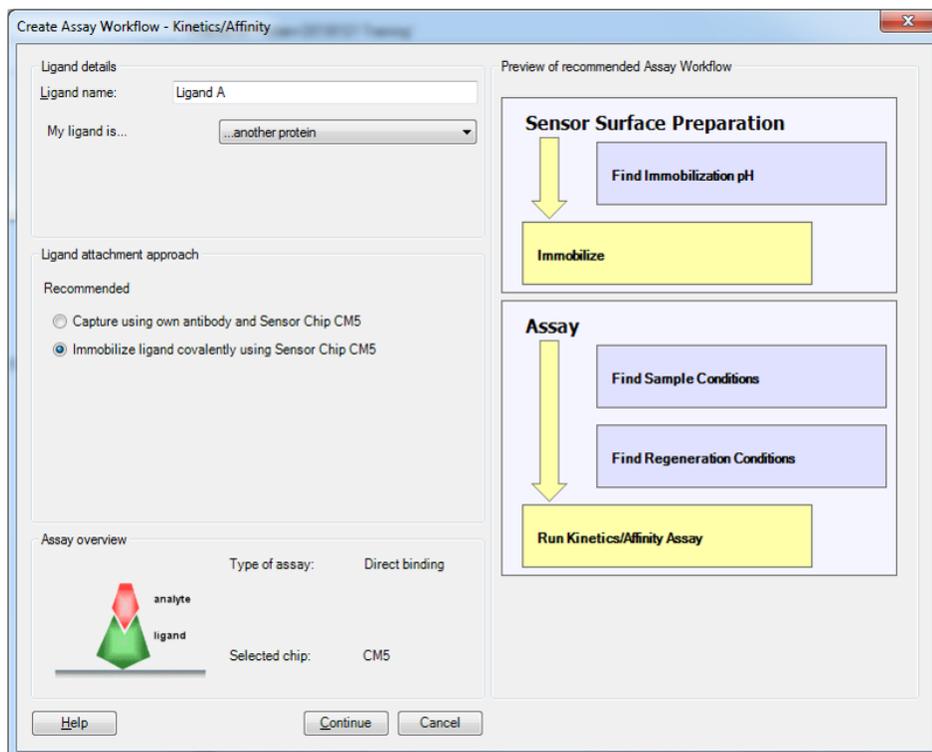
(二) 实验 Workflow 设置

1、开机操作

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 another protein。



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，包括 Capture using own antibody and Sensor Chip CM5、Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5，本次实验选择 Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5，通过将配体直接偶联 CM5 芯片进行实验。



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) 配体偶联

1、偶联量计算

根据以下公式可计算目标偶联量

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

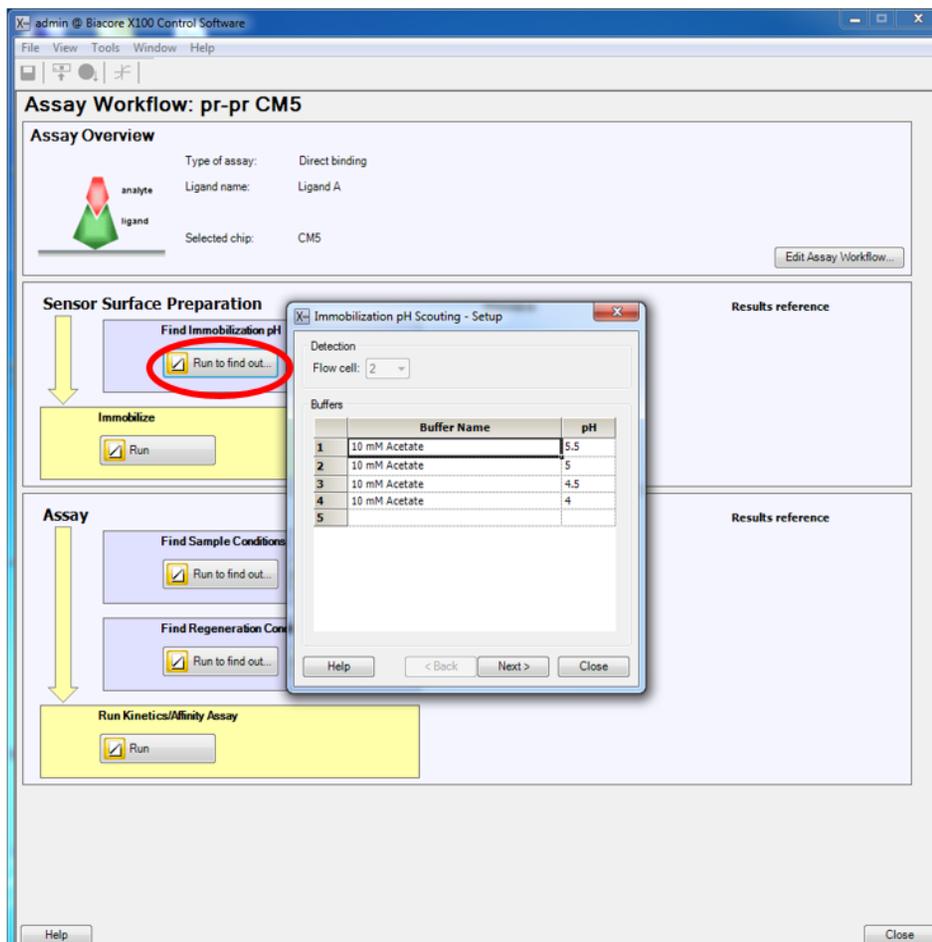
其中，Rmax 为芯片表面最大结合容量，在蛋白测试中通常代入100 RU。analyte MW 和 ligand MW 分别为流动相蛋白B和配体蛋白 A 的分子量，Sm 为化学计量比，未知时默认为 1，RL 为配体偶联量。实验时实际偶联量为3-5 倍的 RL。以本实验为例，蛋白 A 分子量为 24kD，蛋白B分子量为 21kD，则RL为 114RU，蛋白A的目标偶联量为 300-600 RU。

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）。

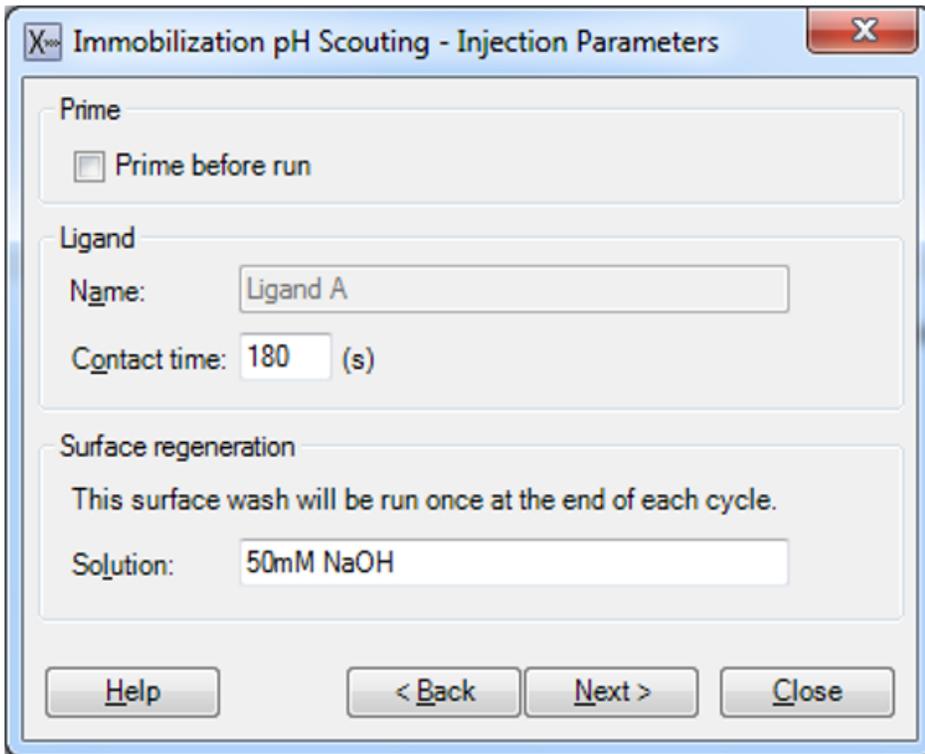
2、配体偶联预富集条件摸索

1) 蛋白 A 用 pH5.5, 5.0, 4.5, 4.0 的醋酸钠分别稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (至少 5 倍稀释比, 若偶联量大于 5000RU, 可提高浓度到 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上), 各 100 μL 备用。

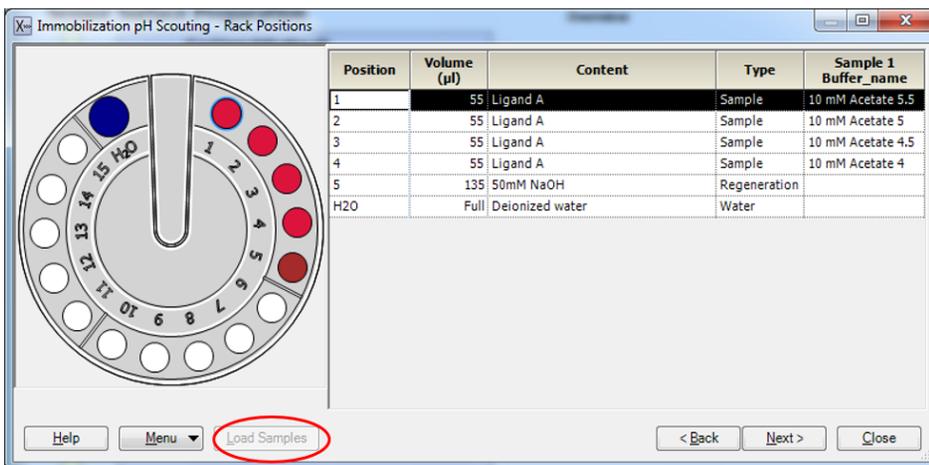
2) 根据 Assay Workflow 界面的内容, 点击 Find Immobilization pH 中的 Run to find out, 打开预富集程序。根据在跳出的对话框的内容, 一一对应上述配好的四个溶液, 点 next。



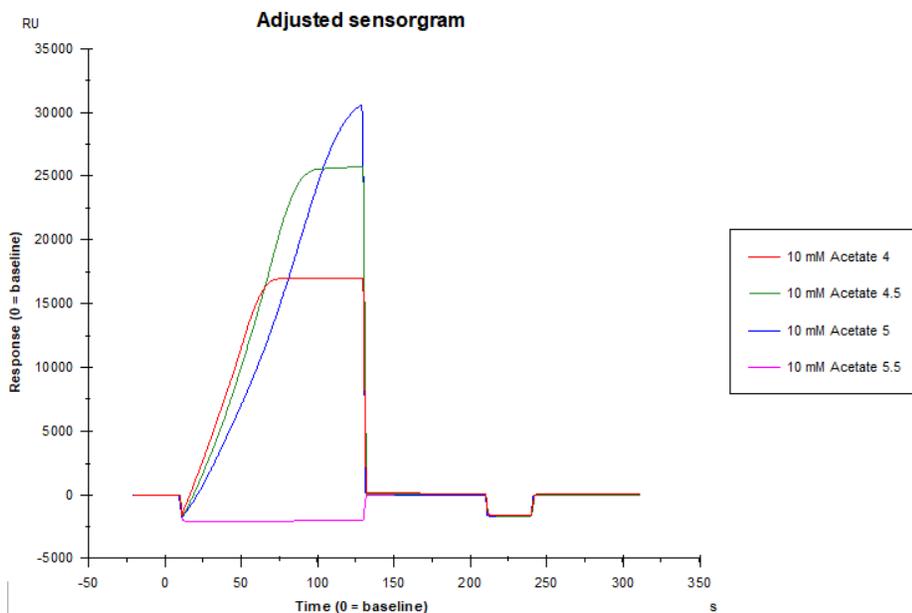
3) 在跳出的对话框中, 将 prime before run 前的“√”去掉, Contact 时间填默认的 180s 或改为 120s, 其余不变。下方的 50mM NaOH 是为洗脱粘附在芯片上的蛋白, 此时蛋白尚未偶联到芯片上, 不用担心蛋白变性。点击 next。



4) 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。放好后，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 pH scouting 程序。



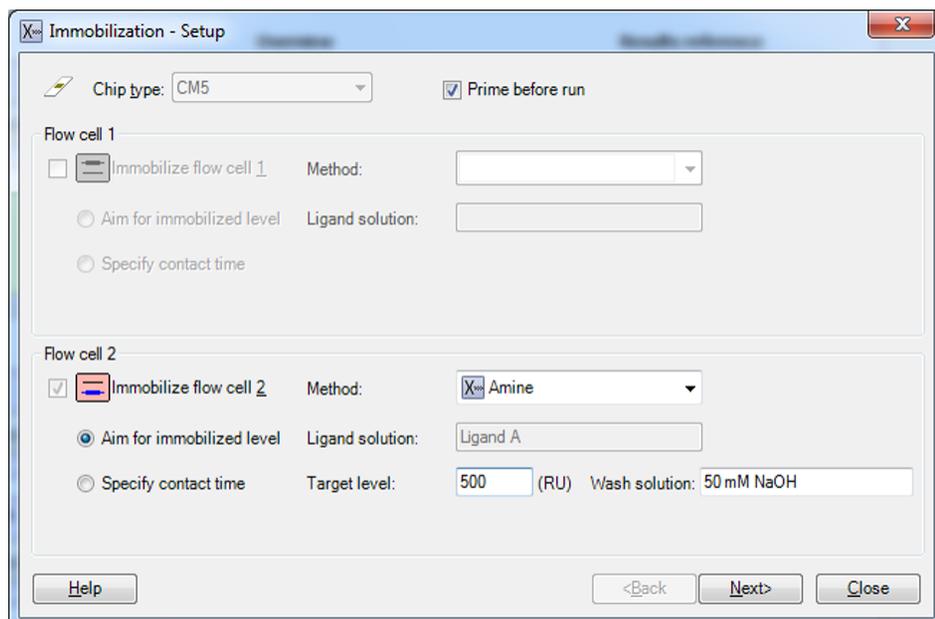
5) 运行结束后，用 Biacore™ X100 evaluation Software 打开运行结果文件（如下图），选择能达到目标偶联量，并且条件最温和的那个 pH 的醋酸钠进行后续偶联。



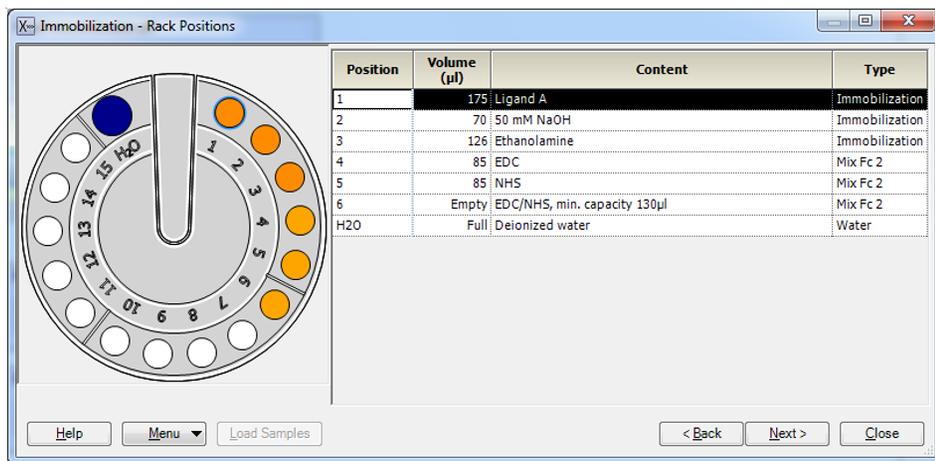
6) 本实验确定 pH5.0 作为最佳偶联条件，并且响应值远高于目标偶联量。故用 pH5.0 的醋酸钠将配体溶液稀释至 2 μg/ml，200 uL 进行配体偶联。

3、配体偶联

1) 根据 Assay Workflow 界面的内容，点击 Immobilization 下方的 Run，打开配体偶联程序。在跳出的对话框中，将 prime before run 前的“√”去掉，在 Flow cell 2 中，method 选用 Amine 氨基偶联，核对 ligand 配体名称，选用 Aim for immobilize level，Target level 输入配体目标偶联量，为 500 RU，点击 Next。

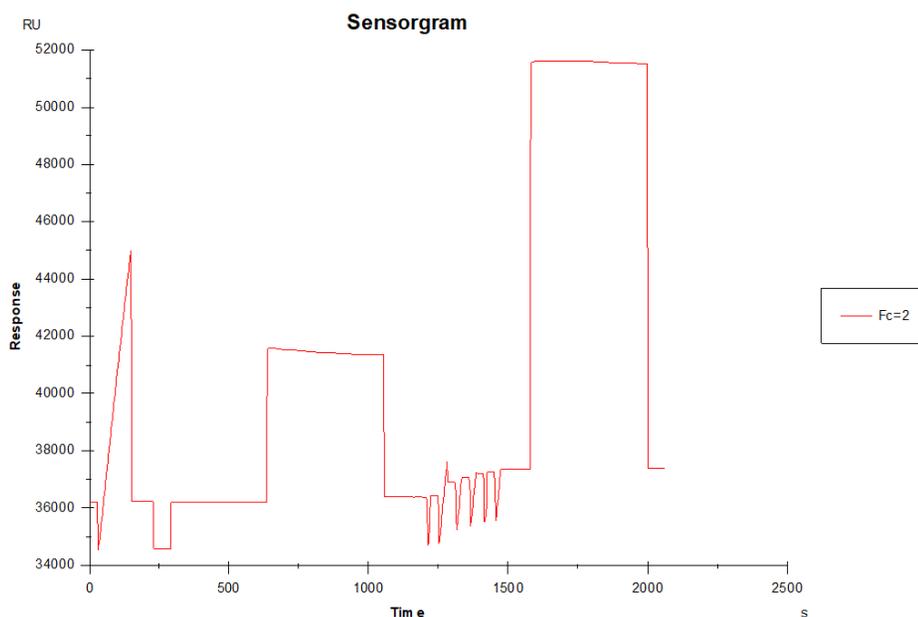


2) 在 Rack Positions 界面，保持样品默认位置或自行通过鼠标拖拽到指定位置。点击 Load Samples，取出样品架，按图所示放入相应的样品和试剂，体积略大于图示体积即可。放入样品架，点击 next，保存方法和结果文件后，点击 start。保存 method 与 result 文件到文件夹（可默认或自行指定，注意本指南中所有要保存的指定文件夹与文件名不可有中文字符）。系统正式自动运行 Immobilization 程序。



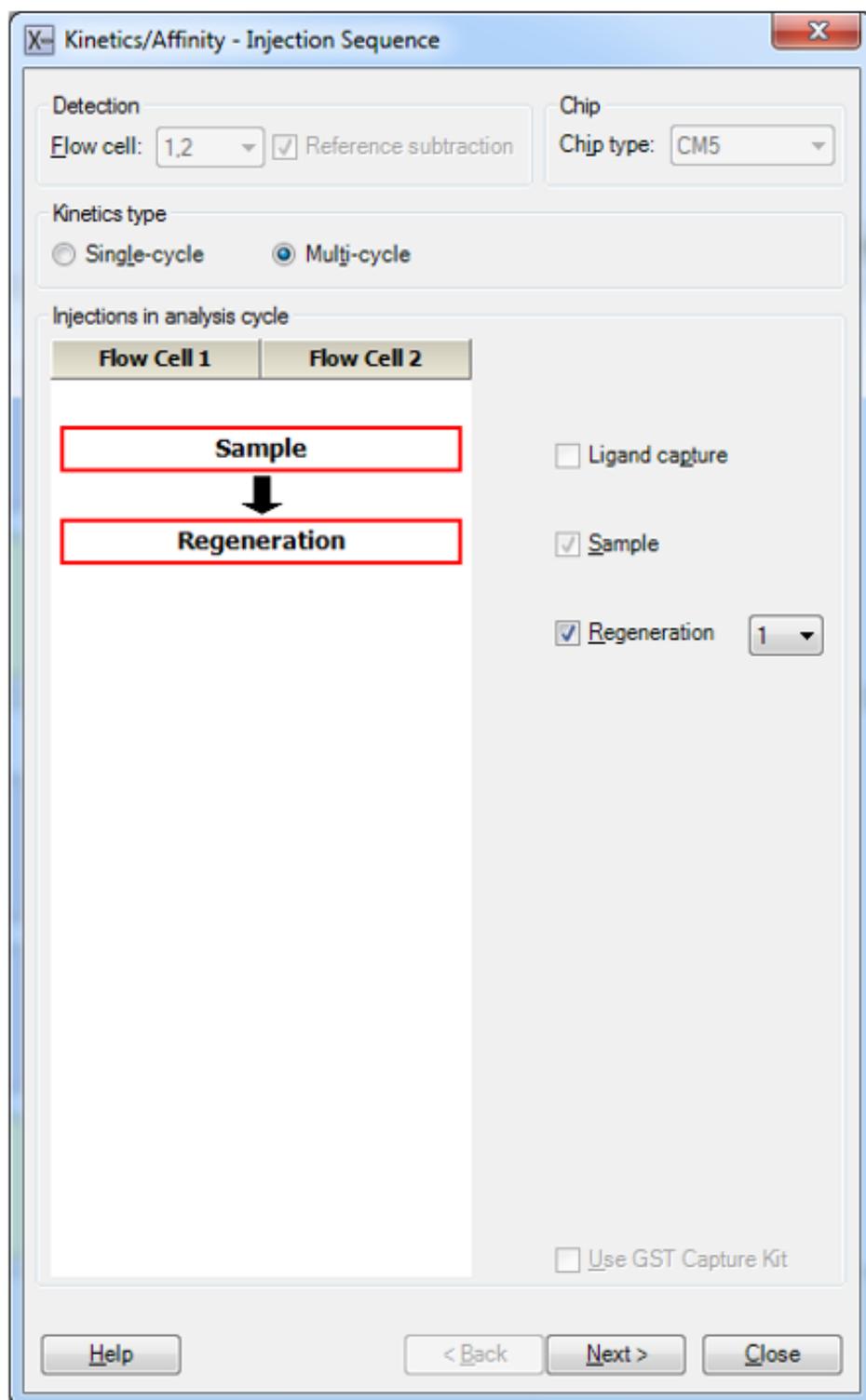
3) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果，本次实验偶联量为 500 RU（具体偶联量视实际样品而定）。

4) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

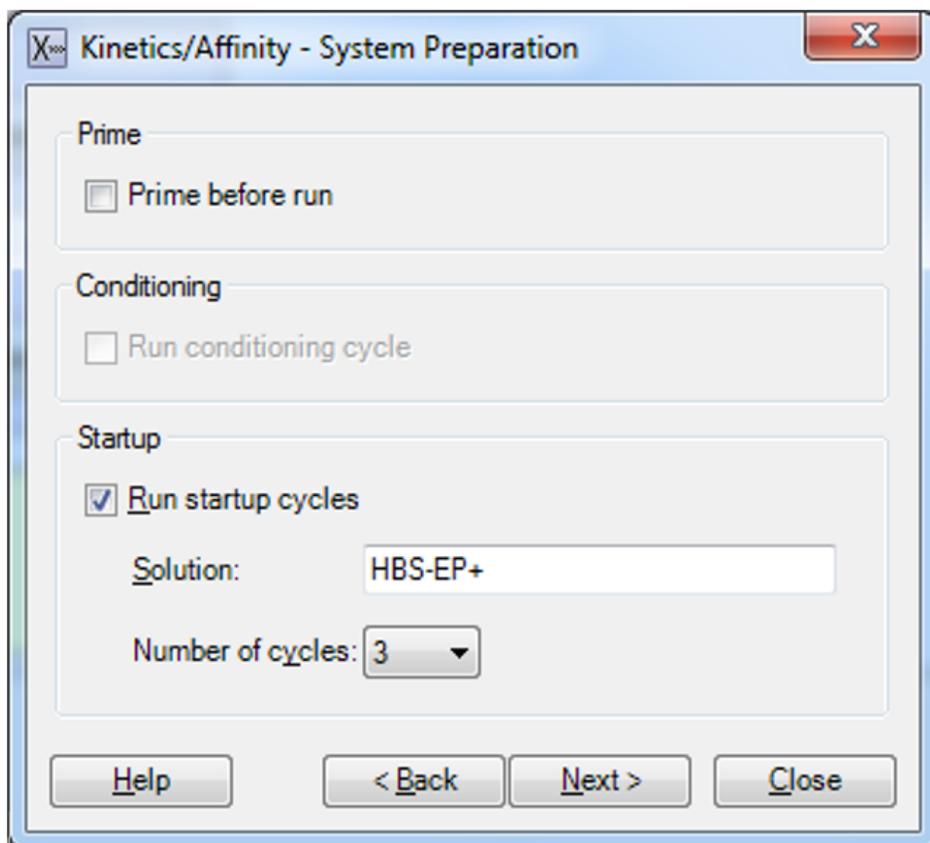


(四) 样品检测过程

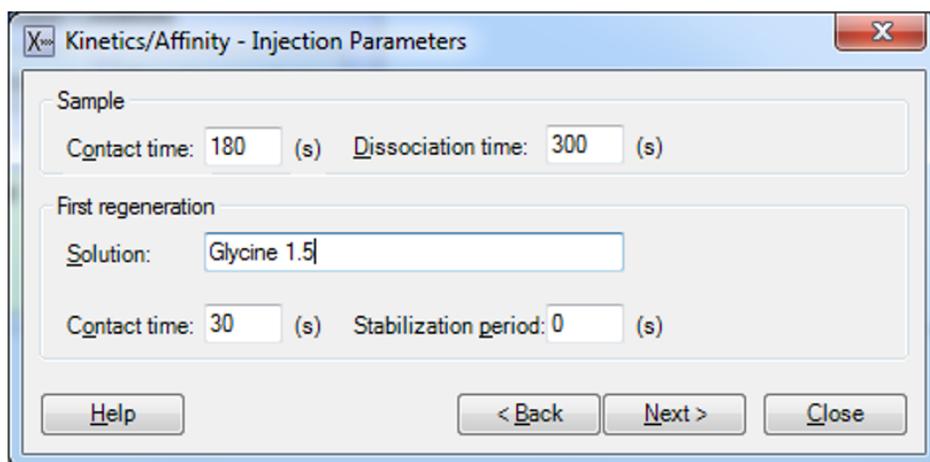
1、根据 Assay Workflow 界面的内容，点击 Run Kinetics/Affinity Assay 下 Run，打开样品检测程序。在跳出的对话框中，Kinetics type 选择 Multi-cycle，点击 Next。



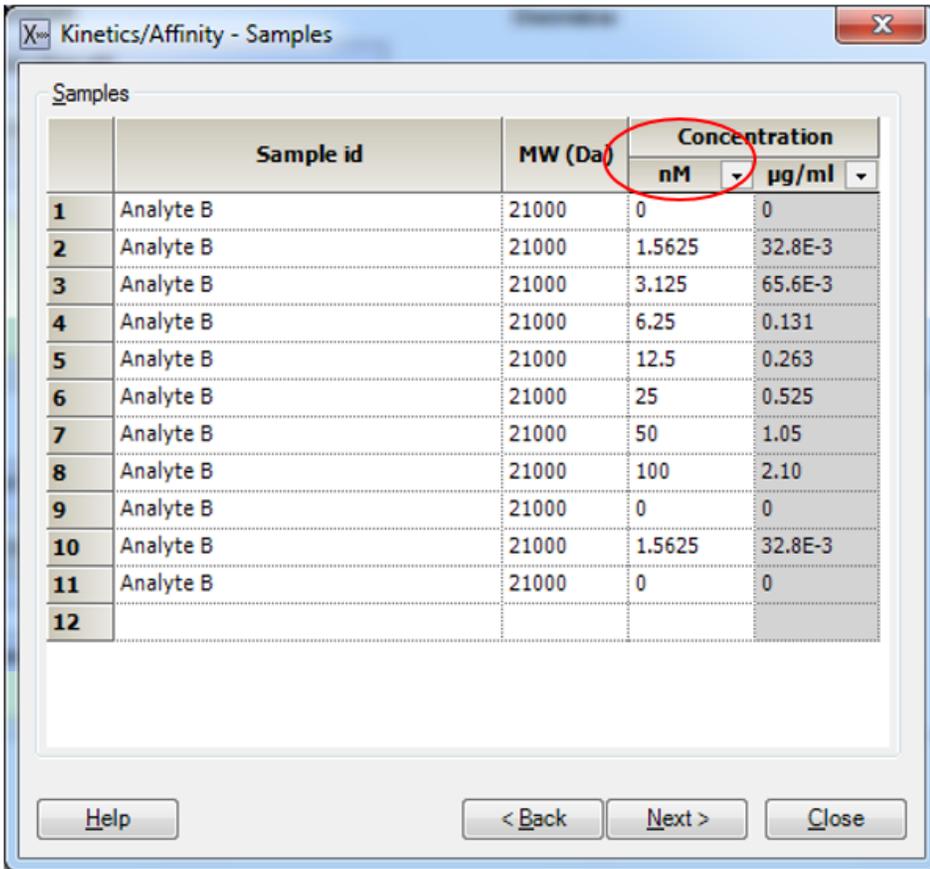
2、在 System Preparation 对话框中，将 prime before run 前的“√”去掉，Startup 部分中 Solution 名称填 HBS-EP+，其余不变，点击 Next。



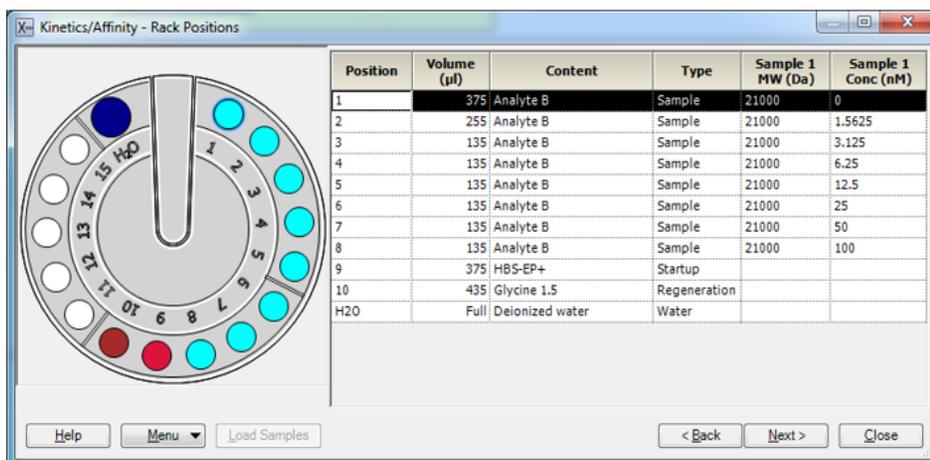
3、在 Kinetics/Affinity-Injection Parameters 界面下，在 Sample 一栏中 Contact time 为 180s，Dissociation time 为 300s，Regeneration 中 solution 为 Glycine 1.5，Contact time 为 30s。点击 ext。



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：



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。

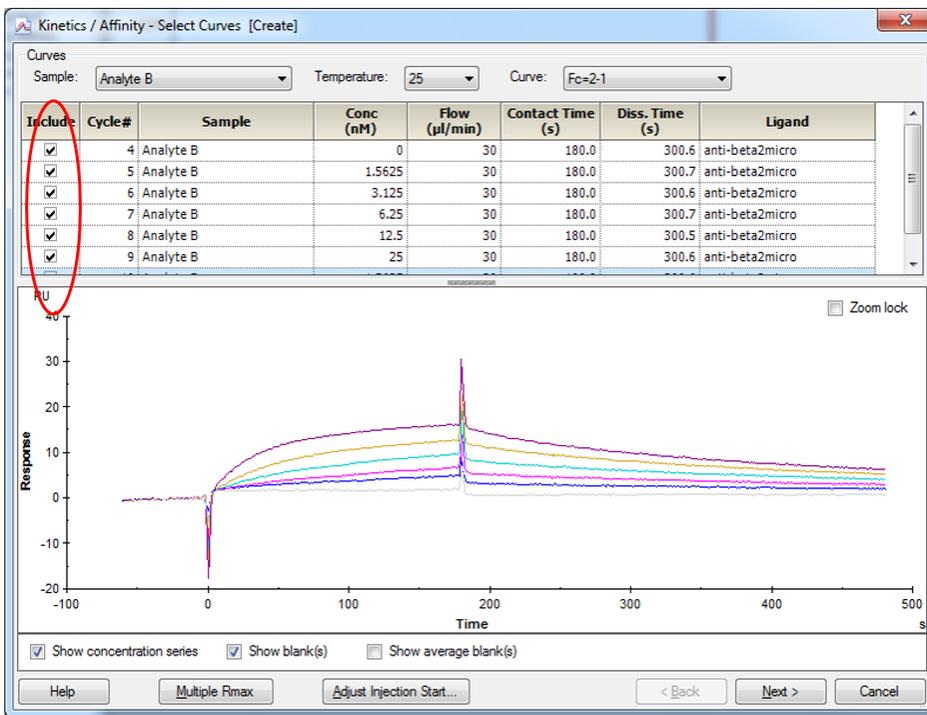


6、点击 Load Samples，取出样品架，按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。蛋白 B 用运行缓冲液 HBS-EP+ 进行倍比稀释。放入样品架，点 Next 后，对方法进行保存，再对数据进行保存。点击 start，仪器便会开始自动运行。

(五) 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%，再检查 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 B 固定在芯片上，将蛋白 A 作为分析物。若 baseline 中各个点的响应值上飘，可延长再生时间。

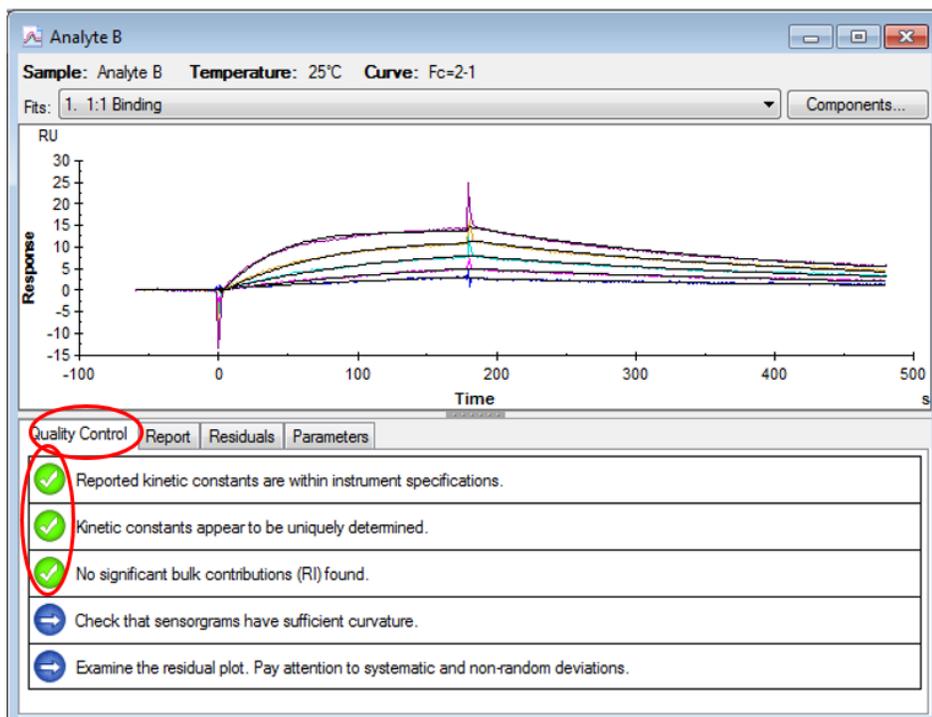
2) 点击上方中间位置的 Kinetics/Affinity，在下拉栏里点击 Surface bound。在 Kinetics/Affinity-Select Curves 界面，选择合适的、至少 5 个连续浓度进行拟合。选择标准为：如果最高浓度响应值大于 500 RU，选最低的 5-6 个浓度分析，如果最高浓度响应值小于 50 RU，选最高的 5-6 个浓度进行数据分析，介于两者中间，随意选 5-6 个连续的浓度进行分析。不需要的浓度，可在样品浓度表格中将此浓度前的对号去掉即可。



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： $k_a = 1.389 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ， $k_d = 0.004409 \text{ s}^{-1}$ ，亲和力： $K_D = 3.175 \times 10^{-9} \text{ M}$ 。

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。



Quality Control Report Residuals Parameters

Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt
	1.389E+6	0.004409	3.175E-9			1.046E+7		
Cycle: 5 1.5625 nM				15.97	1.563E-9		30.00	
Cycle: 6 3.125 nM				15.72	3.125E-9		30.00	
Cycle: 7 6.25 nM				14.89	6.250E-9		30.00	
Cycle: 8 12.5 nM				15.16	1.250E-8		30.00	
Cycle: 9 25 nM				16.55	2.500E-8		30.00	

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。

CY42498-02Feb24-HB

