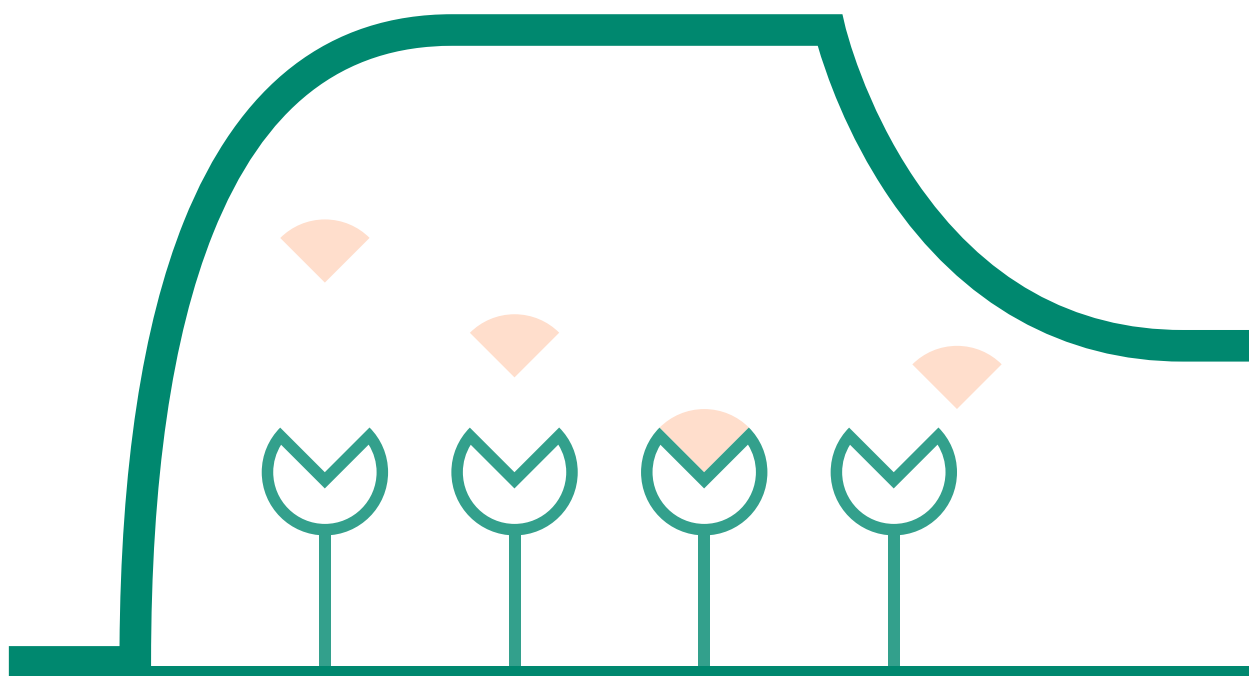


Biacore 检测抗体与 FcRn 相互作用 操作指南



目录

一、实验目的 ----- 3

二、注 释 ----- 3

三、实验使用机型、试剂和耗材 ----- 3

四、实验步骤 ----- 3

 (一) 仪器准备 ----- 3

 (二) 样品检测过程 ----- 6

 (三) 实验结果分析 ----- 10

五、CM5 直接固定 FcRn 检测 ----- 11

实验目的

利用 Biacore T200 检测抗体与 FcRn 结合的亲和力数据 KD。本实验利用 NTA 芯片 + NTA reagent kit (或使用 CM5 芯片偶联 anti-his 抗体, 具体操作参考《Biacore 捕获法检测抗体与 FcγR I 相互作用操作指南》), 捕获带 his-tag 的 FcRn, 抗体作为分析物检测亲和力。也可使用 Protein A/G 芯片 (货号分别为: 29-1275-55 和 29-1793-15) 或 CM5 + human antibody capture kit (货号: 29234600) 通过捕获法, 捕获抗体, FcRn 作为流动相进行检测, 具体操作可参考《Biacore 捕获法检测抗体与抗原相互作用操作指南》。若 FcRn 所带 tag 为 biotin, 也可用 SA 芯片 (货号: 29-1049-92) 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 捕获法检测蛋白与核酸相互作用操作指南》。

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。

实验使用机型、试剂和耗材

- 本实验所用的机型: Biacore T200, 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。
- S 系列 NTA 芯片。NTA 芯片货号: 28-9949-51 (一片装), BR-1005-32 (三片装), 厂家为 Cytiva。
- NTA reagent kit (货号: 28-9950-43), 包含 0.5 mM 50 ml NiCl₂ 和 350 mM 100 ml EDTA, 厂家为 Cytiva。(也可扫描右侧的二维码选择含上述所有耗材的套餐)
- 运行缓冲液: 10 x PBS-P+ (货号: 28-9950-84), 厂家为 Cytiva。稀释到 1 x PBS-P+ 后用 HCl 将 pH 调至 6.0。
- 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)。
- 无盖 1.5 mL EP 管 (货号: BR-1002-87), 厂家为 Cytiva。
- 带 His-tag 的 FcRn, 用去离子水溶解稀释至 1 μg/mL。



实验步骤

仪器准备

开机操作

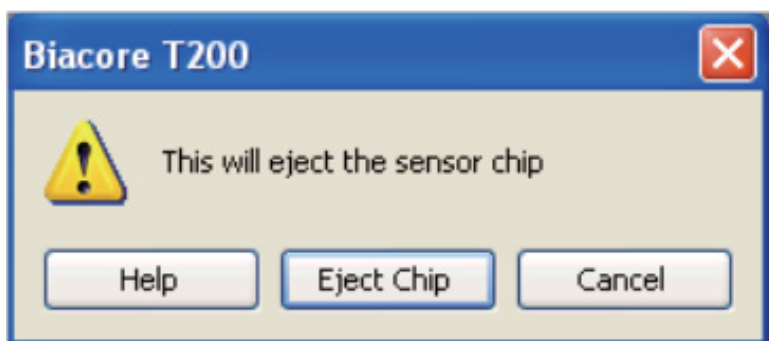
- 打开 Biacore T200 系统和电脑的电源开关。Biacore T200 的电源开关位于系统背面的右下角。开机自检通过后 (无红灯, 温度指示灯闪烁为正常, 待系统温度达到设定温度后, 面板上的温度指示灯会停止闪烁), 即可操作。
- 打开 Biacore T200 控制软件 (Biacore T200 control software), 运行后软件会自动和主机系统建立连接。
- 准备运行缓冲液。量取 50mL 10 x PBS-P+ buffer、450mL 去离子水 (已经 0.22 μm 膜过滤), 混匀后放入 500 mL 缓冲液瓶。
- 设备开机后, 即可使用, 无需等待。

缓冲液的放置

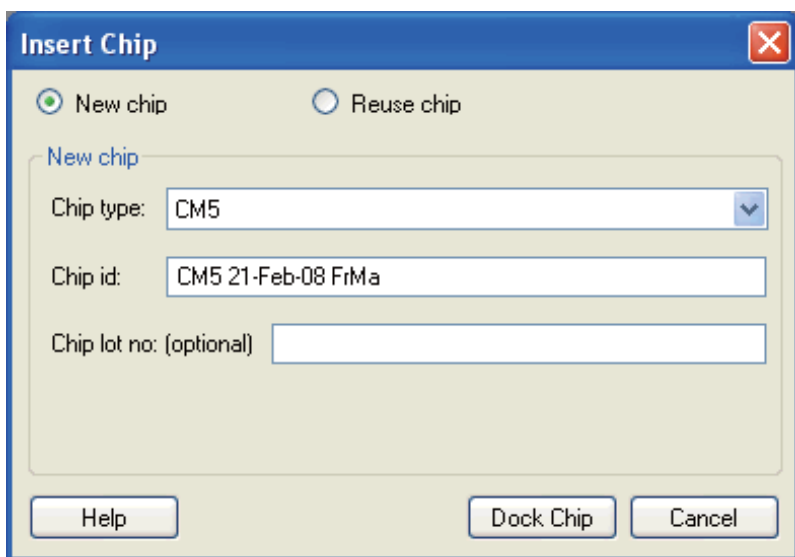
- 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore T200 系统左侧的托盘上。
- 将缓冲液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）不要动。
- 将 2L 的废液瓶放置在 Biacore T200 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。
- 取 500mL 去离子水装入 500mL 瓶中，放置在右侧托盘上，并将标有 water 标签的管子插入瓶中，用于清洗进样针。

芯片的放置

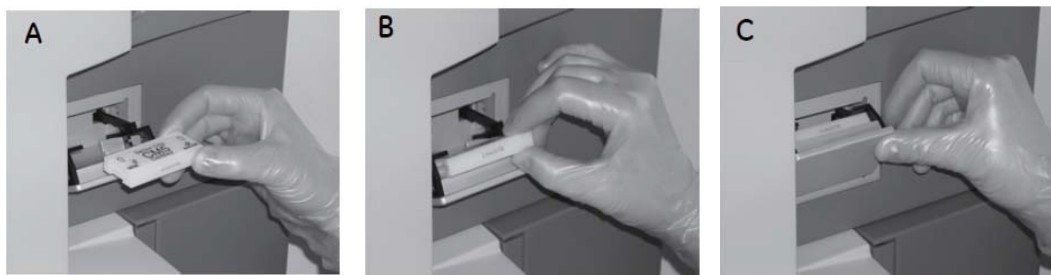
- 点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Insert Chip 选项，打开芯片舱门。
- 如果已经有芯片在芯片舱内，点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Eject Chip 选项。（若芯片舱中没有芯片，此步直接跳过）



- 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 NTA 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。



- 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。



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

放置样品架

- Biacore T200 有三种不同的样品架供用户使用：Reagent Rack 1、Reagent Rack 2（图 A）和 Sample and Reagent Rack1（图 B），见下图。

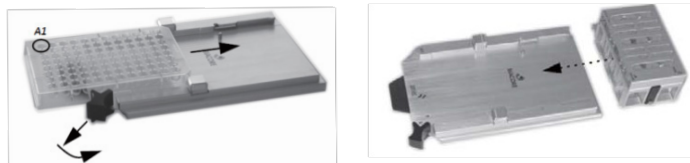


图 A: Reagent Rack 1&2 (左 1 右 2)



图 B: Sample and Reagent Rack1

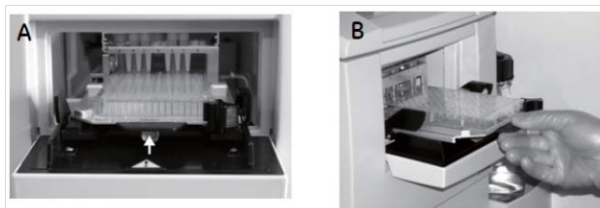
Reagent Rack 1&2 通常和 96/384 微孔板配合使用，加装在指定的样品架底座上。具体的组装方式参见下图。



Reagent Rack 1&2 和 96/384 微孔板安装方式

本次实验中使用 Sample and Reagent Rack1。（若待测样品数量多，可选择 Reagent Rack 1 or 2，并需要根据需要选择是否加 96/384 孔板）。

- 点击工具栏  按钮，或选择 Tool → Eject Rack，样品舱舱门会自动打开。
- 用手指将样品架底座下方的金属按键向里按（见下图中白色箭头），样品架将会解除锁定并弹出，然后可以轻轻抽出样品架。



样品架的取出方式

- 按住样品架右侧的黑色按钮，金属盖会自动弹开。放入相应的样品后，轻轻合上金属盖。听到“咔哒”声，表明金属盖已经处于锁定状态。
- 将样品架沿着卡槽轻轻推入样品舱，听到“咔哒”声，表明样品架已经处于正确位置并锁定。

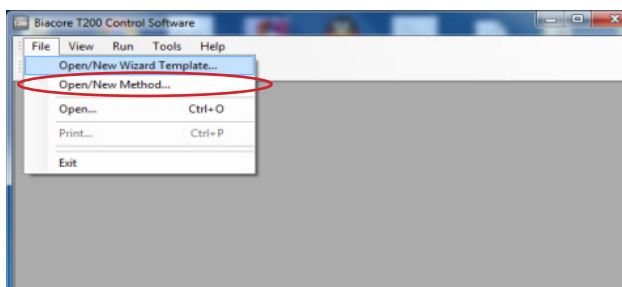


样品架的放入方式

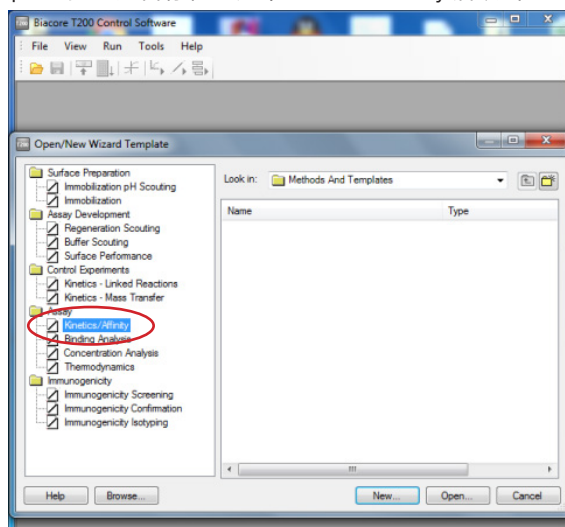
- 点击 Eject Rack Tray 对话框中的 OK，样品架会被自动送入样品舱，舱门也会自动关上。注意：样品舱舱门打开后会有时间限制，打开 60-90 秒后舱门将自动关上。最后 15 秒时，对话框中的倒计时时会显示为红色字体并闪烁。此时请不要强行将样品架放入，以免夹到手。可以等待舱门合上后，重新打开即可。

样品检测过程

- 在打开的 Biacore T200 Control Software 里点开 file 中的 Open/New Wizard Template。（若要捕获不同的 FcγRIIIa 或 FcRn，可改用 method，具体的操作参考《Biacore 检测抗体与 FcγRIIIa 相互作用操作指南》）



- 在 Open/New Wizard Template 的左边目标栏里选中 Kinetics/Affinity 后双击。



- 在 Kinetics/Affinity 界面中，将 Flow path 点为 2-1 或 4-3，Chip type 选择 NTA。接着点 Next。

Detection

Flow path: 4-3

Chip

Chip type: NTA

NICKEL

LIGAND CAPTURE

SAMPLE

REGENERATION 1

☒ Nickel

☒ Ligand capture

☒ Sample

☒ Regeneration 1

☐ Carry Over

- 在 Setup 界面里，Startup 底下的 Solution 一栏中填写 PBS-P+，并将 Number of cycles 改为 5，接着点 Next。

Kinetics/Affinity - Setup

Conditioning

☒ Run conditioning cycle

Solution: 0.35 M EDTA

Contact time: 60 (s) Number of injections: 1

Startup

☒ Run startup cycles

Solution: PBS-P+

Number of cycles: 5

Solvent correction

☐ Run solvent correction Number of injections: 8

Repeat after sample cycles

Help < Back Next > Close

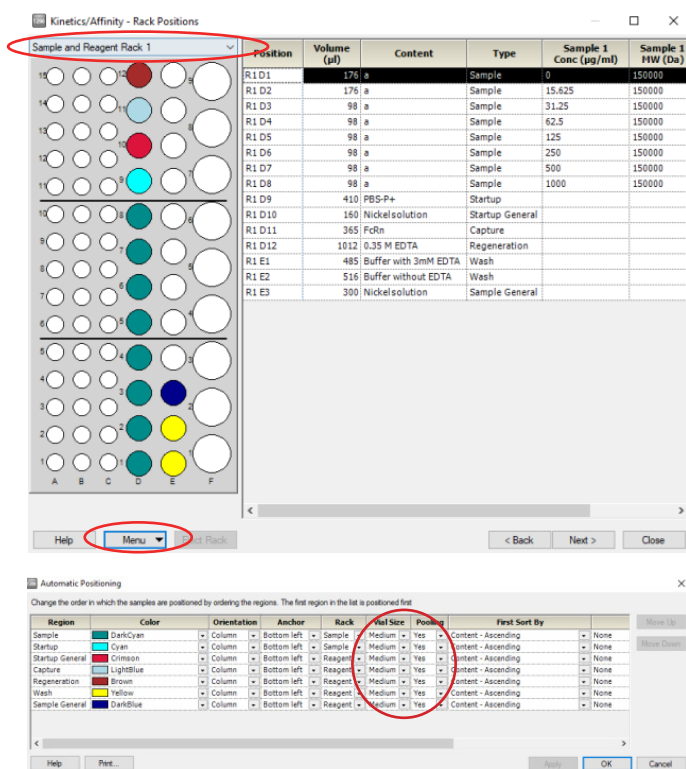
- 在 Kinetics/Affinity-injection Parameter 界面下：Ligand 填入 FcRn，contact time 为 30s（捕获量在 100 RU 左右），Flow rate 为 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。在 Sample 一栏中 Contact time 为 60s，Flow rate 为 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，Dissociation time 为 60s，再生条件为 0.35 M EDTA，再生时间 60s。

- 在 Kinetics/Affinity-Sample 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，第一个 Concentration 为质量浓度，第二个为摩尔浓度，样品浓度由低到高填写。注意要设置重复浓度和零浓度。具体填写如下：

	Sample id	MW (Da)	Concentration $\mu\text{g}/\text{ml}$	Concentration μM
1	a	150000	0	0.000
2	a	150000	15.625	0.1042
3	a	150000	31.25	0.2083
4	a	150000	62.5	0.4167
5	a	150000	125	0.8333
6	a	150000	250	1.667
7	a	150000	500	3.333
8	a	150000	1000	6.667
9	a	150000	0	0.000
10	a	150000	15.625	0.1042
11				

Run order
☒ As entered ☐ Increasing concentration

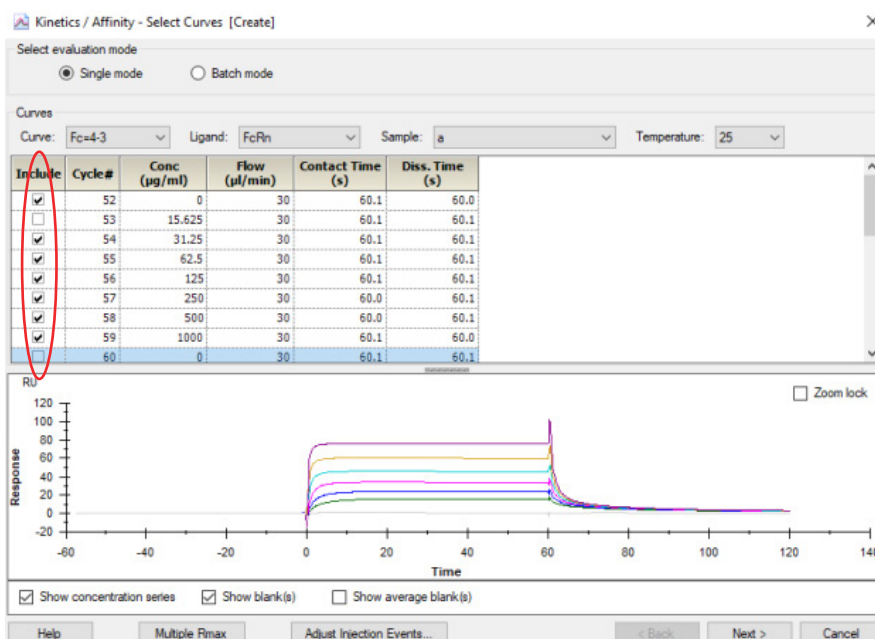
- 点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-System Preparations 界面，不做修改，再点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-Rack Position 界面，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1，点开 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。



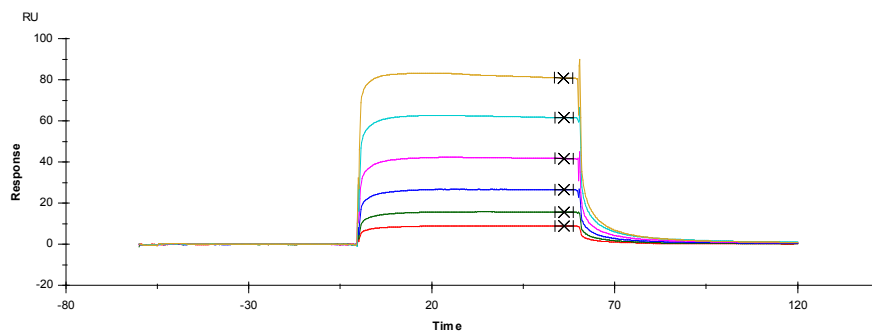
- 按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。样品 a 用 PH6.0 的运行缓冲液 PBS-P+ 进行倍比稀释。点击 Next，对方法进行保存，再对数据路径（可使用系统 默认的，也可自行指定，注意所保存的文件名及指定文件夹名均不能有中文字符）进行保存，仪器便会开始自动运行。

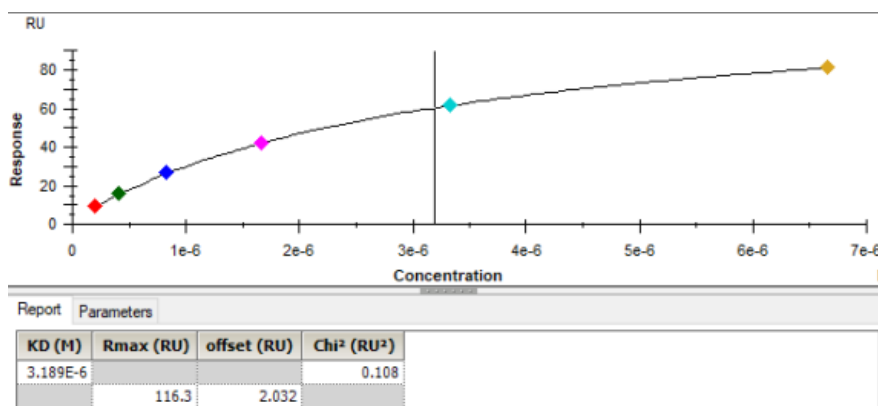
实验结果分析

- 打开 Biacore T200 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%。若 baseline 中各个点的响应值上飘, 可适当延长再生溶液的进样时间。
- 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 界面的 Select evaluation mode 下面选择 Single mode, (若为多组实验结果, 并想批量处理, 可选 batch mode)。在跳出的窗口中选择合适的、至少 5 个连续浓度进行拟合。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。



- 点击右下角 Next, 选择右下角 Affinity (当传感图为“时间依赖的动力学特征”时, 选 Kinetics), 点击 Next, Model 选择 Steady State Affinity, 点击左上角 Fit 进行数据拟合, 点击右下角 Finish 完成。经拟合, 抗体 a 与 FcRn 结合的亲和力 $KD=2.418 \times 10^{-6} M$ 。(对于亲和力拟合, KD 竖线最好落在样品浓度范围内, 并尽量小于最高浓度的一半位置, 若 KD 竖线 $>$ 最高浓度, 则可提高进样浓度梯度, 或在上一步选择更高浓度的、至少 5 个连续浓度的样品进行拟合。)

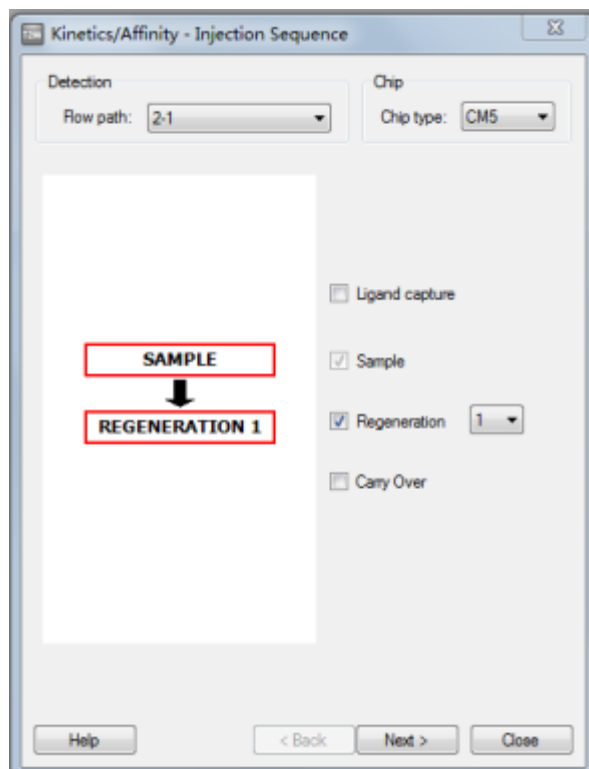




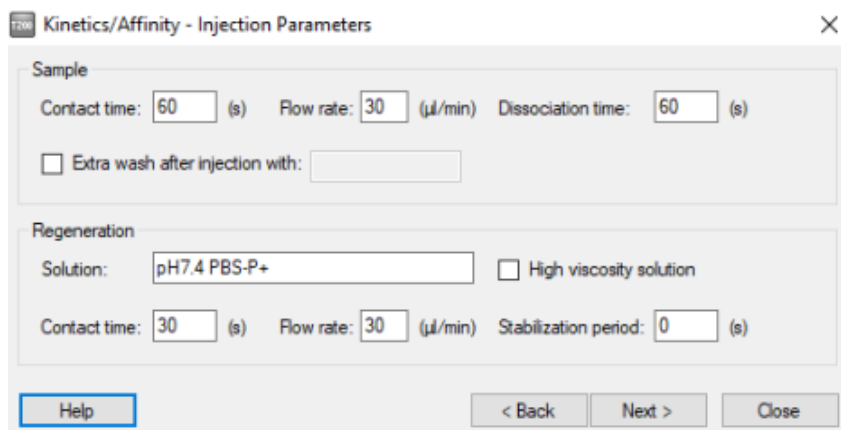
- 将鼠标放在图上，点击右键可以直接 copy graph (small, medium, large) 用于文章发表，也可以右键点击 export curve，导出 txt 文本后自行用第三方软件作图。

CM5 直接固定 FcRn 检测

- 将运行缓冲液换为 pH6.0 的 PBS-P+，进行 prime。
- FcRn 检测还可以选用 CM5 芯片对 FcRn 进行直接氨基固定，选用 pH5.0 的醋酸钠进行 FcRn 稀释，选择目标偶联 Aim for immobilized level，将目标偶联量设为 150 RU。（氨基固定的具体操作请参考《Biacore 检测蛋白与蛋白相互作用操作指南》）
- 在打开的 Biacore T200 Control Software 里点开 file 中的 Open/New Wizard Template，双击 Kinetics/Affinity。在 Kinetics/Affinity 界面中，将 Flow path 点为 2-1 或 4-3（具体视蛋白偶联的通道而定），Chip type 选择 CM5。接着点 NEXT。



- 在 Setup 界面里，Startup 底下的 Solution 一栏中填写 PBS-P+，并将 Number of cycles 改为 5，接着点 Next。在 Kinetics/Affinity-injection Parameter 界面下：在 Sample 一栏中 Contact time 为 60s，Flow rate 为 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，Dissociation time 为 60s。再生条件为 pH7.4 PBS-P+，再生时间 30s。



Kinetics/Affinity - Injection Parameters

Sample

Contact time: (s) Flow rate: ($\mu\text{l}/\text{min}$) Dissociation time: (s)

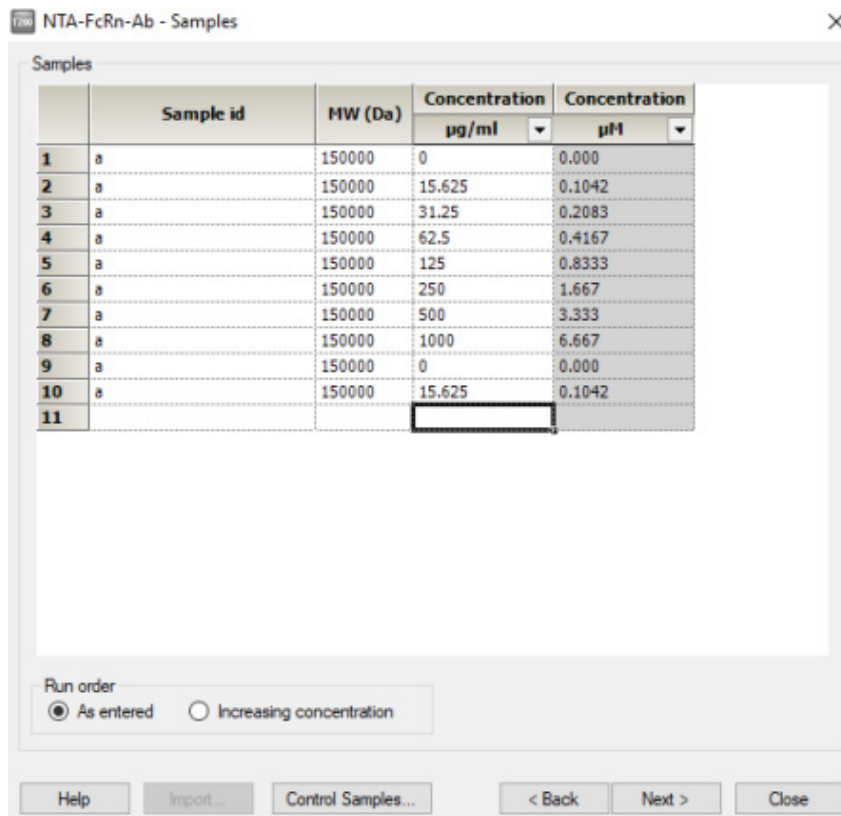
☐ Extra wash after injection with:

Regeneration

Solution: ☐ High viscosity solution

Contact time: (s) Flow rate: ($\mu\text{l}/\text{min}$) Stabilization period: (s)

- 在 Kinetics/Affinity-Sample 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，第一个 Concentration 为质量浓度，第二个为摩尔浓度，样品浓度由低到高填写。注意要设置重复浓度和零浓度。具体填写如下：



NTA-FcRn-Ab - Samples

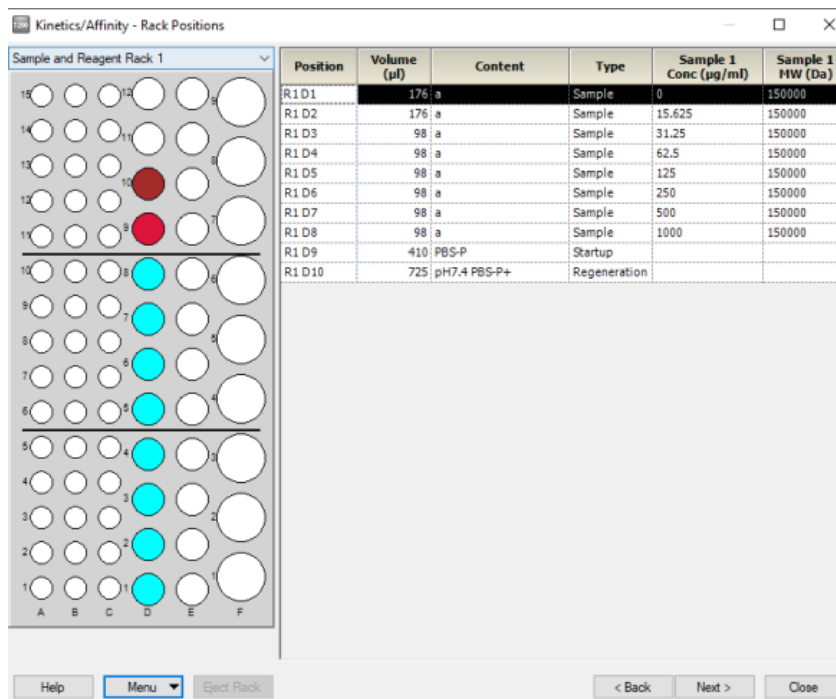
Samples

	Sample id	MW (Da)	Concentration $\mu\text{g}/\text{ml}$	Concentration μM
1	a	150000	0	0.000
2	a	150000	15.625	0.1042
3	a	150000	31.25	0.2083
4	a	150000	62.5	0.4167
5	a	150000	125	0.8333
6	a	150000	250	1.667
7	a	150000	500	3.333
8	a	150000	1000	6.667
9	a	150000	0	0.000
10	a	150000	15.625	0.1042
11				

Run order

☒ As entered ☐ Increasing concentration

- 点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-System Preparations 界面，不做修改，再点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-Rack Position 界面，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1，点开 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。



- 按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。样品 a 用 pH6.0 的运行缓冲液 PBS-P+ 进行倍比稀释。点 Next 后，对方法进行保存，再对数据路径进行保存，仪器便会开始自动运行。
- 后续数据分析同上。

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，在全球 40 余个国家和地区拥有 8000 名员工，致力于推进未见技术，加速非凡疗法。作为客户可信赖的合作伙伴，Cytiva 专注于生命科学和生物技术研究，用以开发创新型疫苗、生物药物以及新型细胞和基因疗法。通过提升药物研发和生物工艺的速度、效率和能力，为惠及全球患者开发和生产变革性药物和疗法。

请访问 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。Cytiva 版权所有商品和服务的销售需遵守在 Cytiva 企业中运营之供应商公司的销售条款与条件。可应要求提供这些条款与条件的副本。如需了解最新信息，请联系您当地的 Cytiva 代表。如需查看当地办公室的联系信息，请访问 cytiva.com.cn/contact。

CY23675-10Aug21-BR

