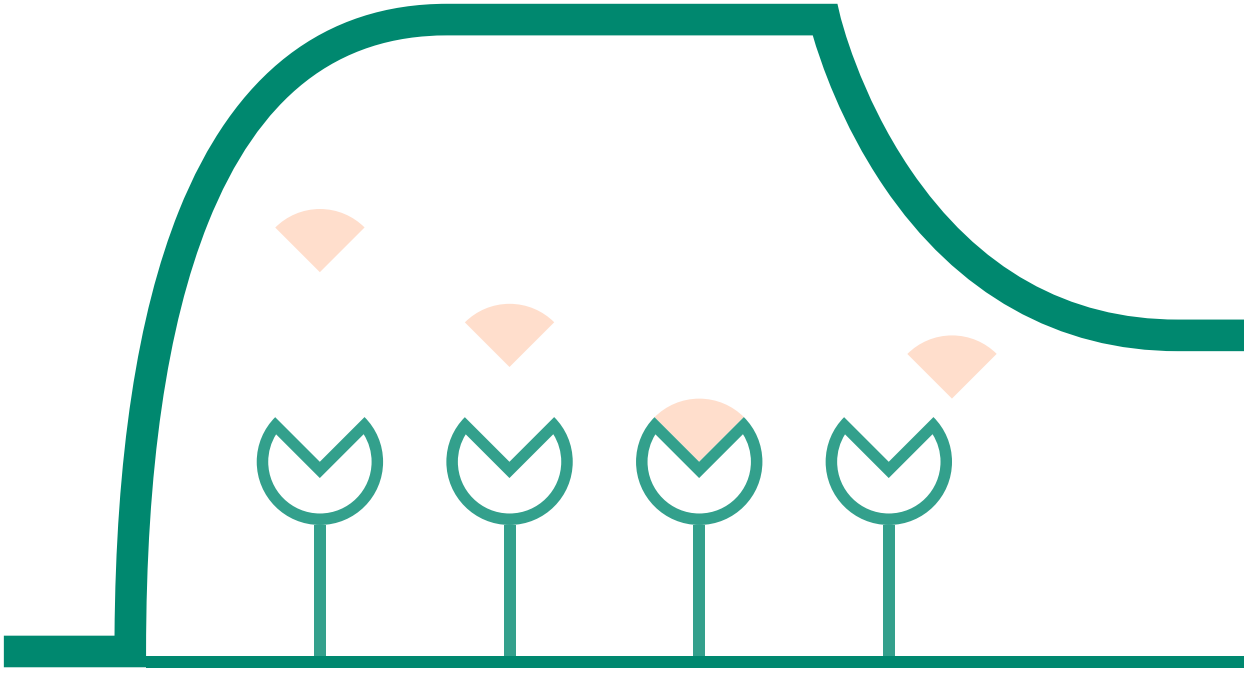
cytiva

Biacore 检测抗体与 FcγR Ⅰ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）捕获芯片制备 ---------- 6

（三）样品检测过程 ---------- 8

（四）实验结果分析 ---------- 10

实验目的

利用 Biacore T200 检测抗体与 FcγR Ⅰ结合的亲和力数据 KD。本实验利用 CM5 芯片偶联 anti-his 抗体（或使用 NTA 芯片 + NTA reagent kit，具体操作参考《Biacore 捕获法检测抗体与 FcRn 相互作用操作指南》），捕获带 his-tag 的 FcγR Ⅰ，抗体作为分析物检测亲和力。也可使用 Protein A/G 芯片（Protein A 芯片货号：29-1275-55，Protein G 芯片货号：29-1793-15）或 CM5 + human antibody capture kit（货号：29234600）通过捕获法捕获抗体，FcγR Ⅰ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 FcγR Ⅰ所带 tag 为 biotin，也可用 SA 芯片（货号：BR-1003-98）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 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 CM5 芯片。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。
- 氨基偶联试剂盒（货号：BR-1000-50），厂家为 Cytiva。
- His 捕获试剂盒（货号：28-9950-56），包含 50 µL 1mg/mL anti-his antibody, 1.2 mL Acetate 4.5，100 mL Glycine 1.5，厂家为 Cytiva。
- 缓冲液：10 x HBS-EP+（货号：BR-1006-69），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）
- 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 FcγR Ⅰ，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

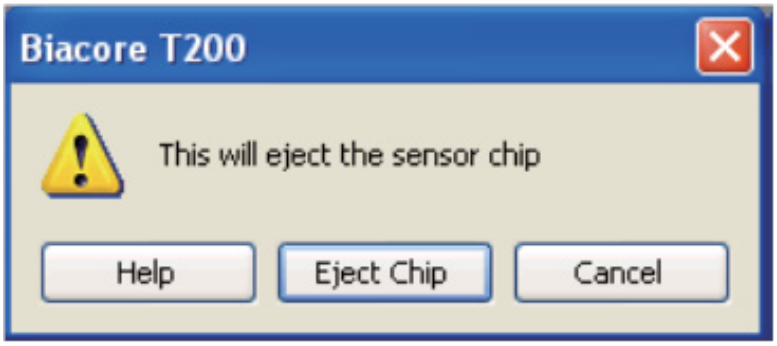
- 打开 Biacore T200 系统和电脑的电源开关。Biacore T200 的电源开关位于系统背面的右下角。开机自检通过后（无红灯，温度指示灯闪烁为正常，待系统温度达到设定温度后，面板上的温度指示灯会停止闪烁），即可操作。
- 打开 Biacore T200 控制软件（Biacore T200 control software），运行后软件会自动和主机系统建立连接。
- 准备运行缓冲液。量取 50mL 10 x HBS-EP+ buffer、450mL 去离子水（已经 0.22 µm 膜过滤），混匀后放入 500 mL 缓冲液瓶。
- 设备开机后，即可使用，无需等待。

缓冲液的放置

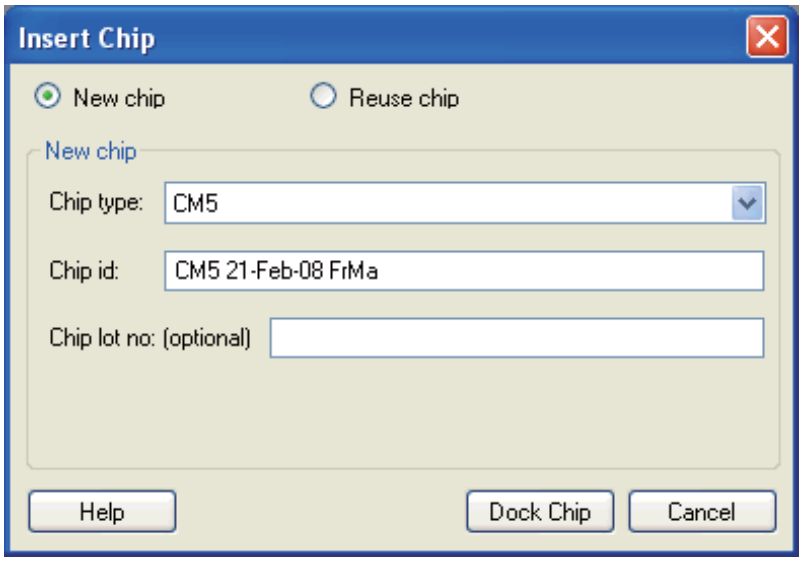
- 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore T200 系统左侧的托盘上。
- 将缓冲液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）不要动。
- 将 2L 的废液瓶放置在 Biacore T200 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。
- 取 500mL 去离子水装入 500mL 瓶中，放置在右侧托盘上，并将标有 water 标签的管子插入瓶中，用于清洗进样针。

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 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。



- 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

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。

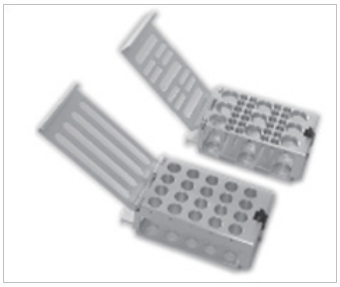
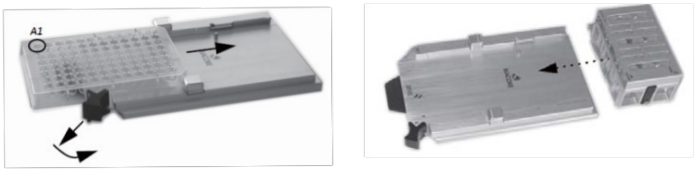


图 A: Reagent Rack 1&2（左 1 右 2）

图 B: Sample and Reagent Rack1

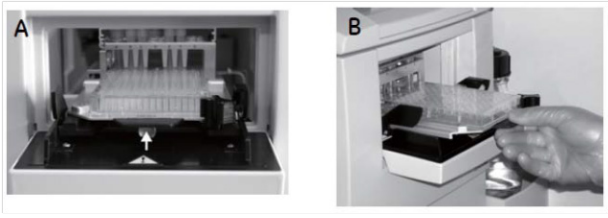
Reagent Rack 1&2 通常和 96/384 微孔板配合使用，加装在指定的样品架底座上。具体的组装方式参见下图。



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

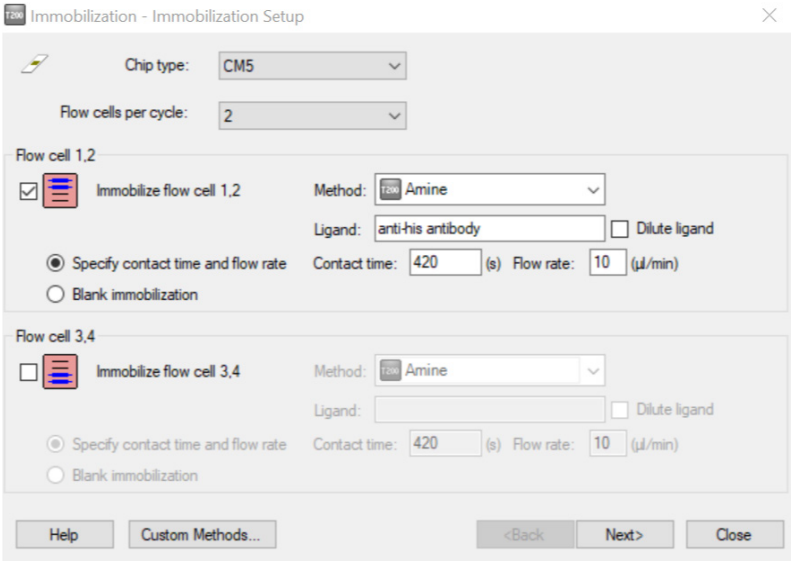
- 点击 Eject Rack Tray 对话框中的 OK，样品架会被自动送入样品舱，舱门也会自动合上。注意：样品舱舱门打开后会有时间限制，打开 60-90 秒后舱门将自动合上。最后 15 秒时，对话框中的倒数计时会显示为红色字体并闪烁。此时请不要强行将样品架放入，以免夹到手。可以等待舱门合上后，重新打开即可。

捕获芯片制备

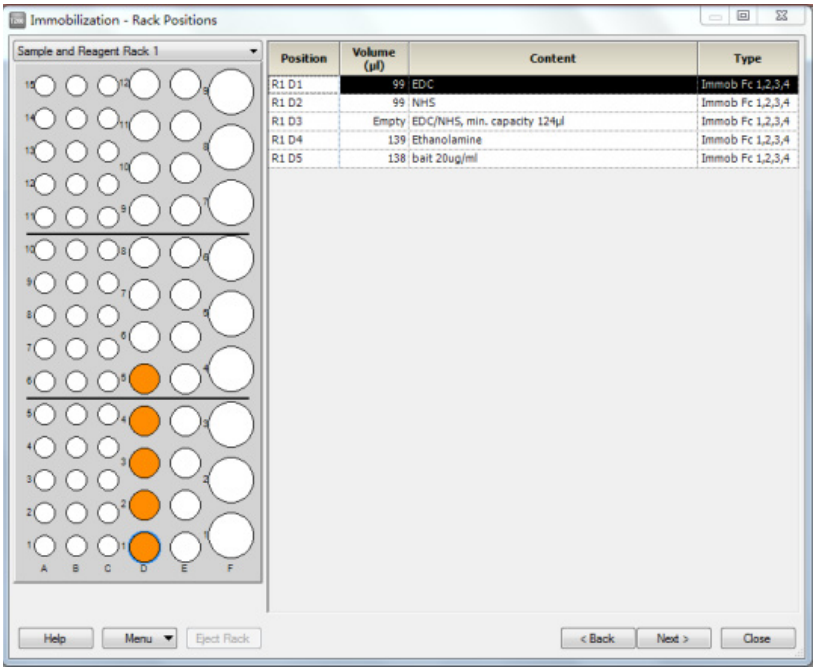
1、偶联缓冲液：1×HBS-EP+。

2、Anti-his antibody 偶联（具体操作参考 His capture kit 说明书）

1) 打开 Biacore T200 Control Software, 点击 File 下面的 Open/New wizard template，选择 immobilization。对话框中，Chip type 选 CM5，在 Flow cells per cycle 选 2。勾选 Flow cell 1,2（如 1,2 已用，可选择 3,4），method 选用 amine 氨基偶联，ligand 输入 anti-his antibody，选用 Specify contact time and flow rate，contact time 为 420s。接着点 Next，选择实验温度，一般默认 25℃。



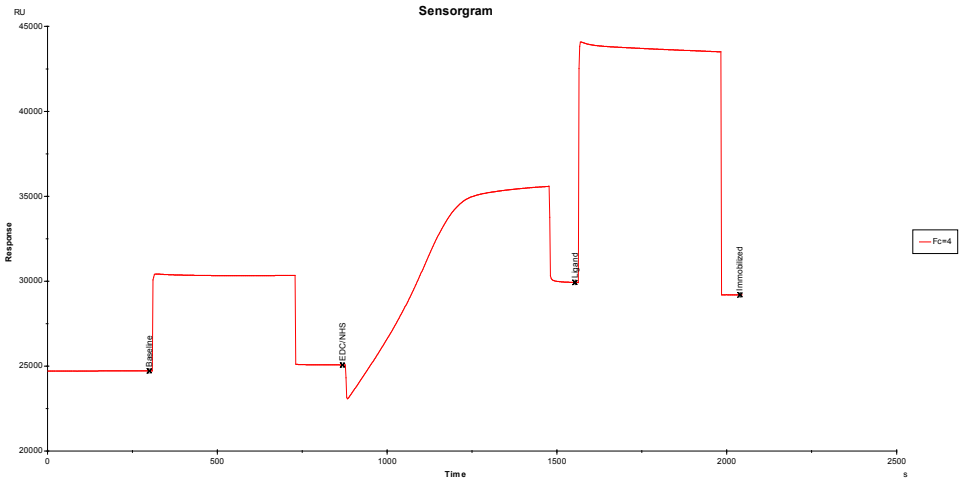
2) 在左侧下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1，在 Menu 里选 Automatic Positioning 自动排放样品位置或自行通过鼠标拖拽安排。根据屏幕显示，准备相应的样品，放入的样品体积略大于显示的体积即可，其中 anti-his antibody 用 pH4.5 的醋酸钠稀释至 20 μg/mL。然后，再按要求将不同样品放入样品架指定位置，如果使用的是带盖的 EP 管，所有盖子必须剪去。盖上样品架金属盖子，将样品架送回样品舱。



3) 点击 Next，弹出 Prepare Run Protocol 对话框，确认各项均符合要求后，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）。系统正式自动运行偶联程序。

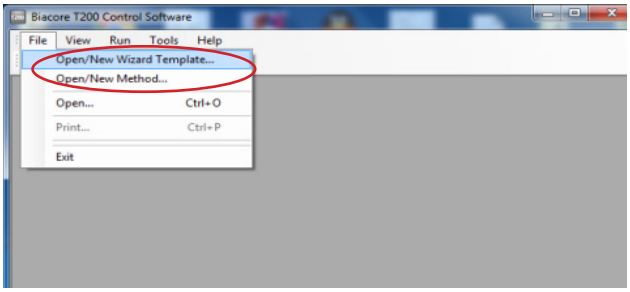
4) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果。本次实验 fc1 和 fc2 偶联量为 11000RU 左右（具体偶联量视样品实际情况略有差异，在 7000-14000RU 之间即可）。

5) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

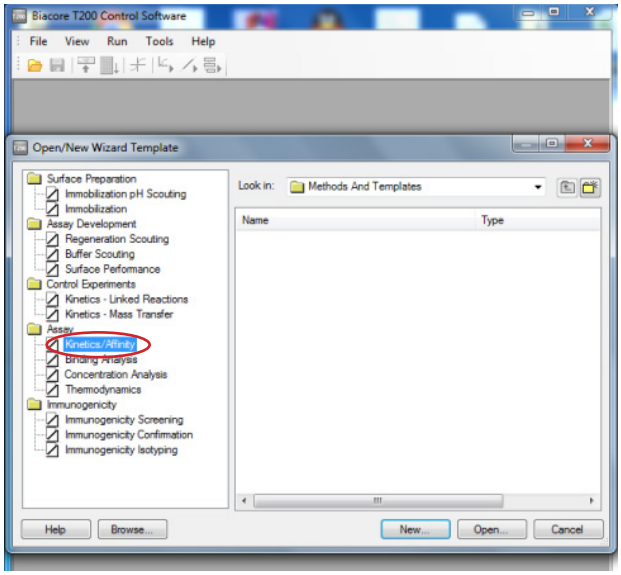


样品检测过程

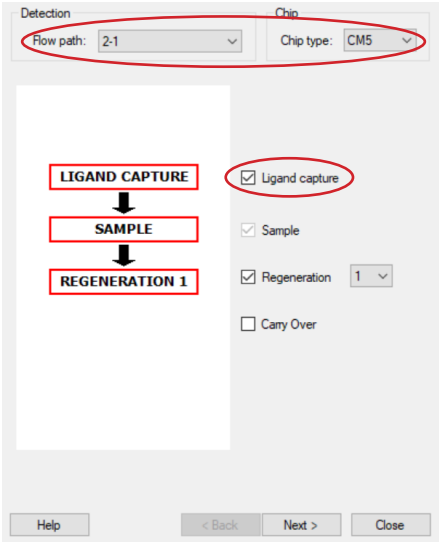
- 在打开的 Biacore T200 Control Software 里点开 file 中的 Open/New Wizard Template。（若要捕获不同的 FcγR，可改用 method，具体的操作参考 Biacore 检测抗体与 FcγRIIa 相互作用操作指南）



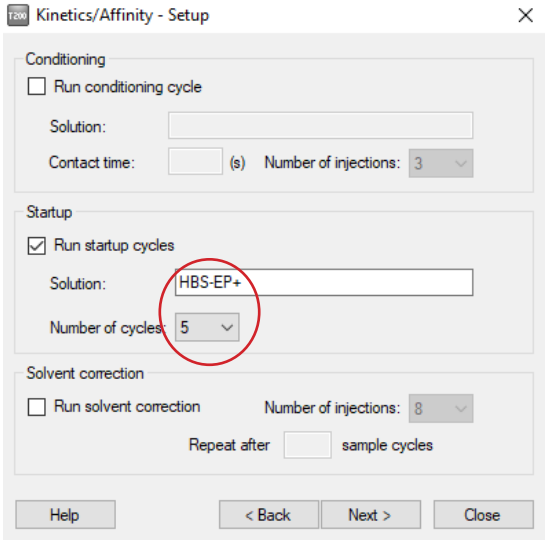
- 在 Open/New Wizard Template 的左边目标栏里点中 Kinetics/Affinity 后双击。



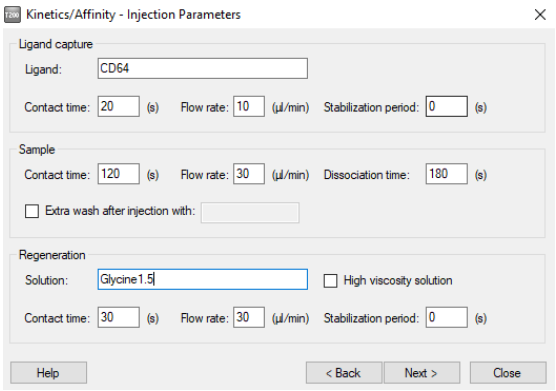
- 在 Kinetics/Affinity 界面中，将 Flow path 点为 2-1 或 4-3（具体视 Anti-His antibody 偶联的通道而定），Chip type 选择 CM5，在 Ligand capture 前打钩。接着点 Next。



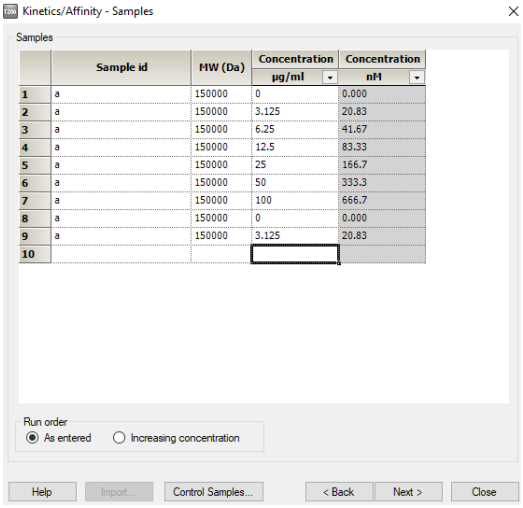
- 在 Setup 界面里，Startup 底下的 Solution 一栏中填写 HBS-EP+，并将 Number of cycles 改为 5，接着点 Next。



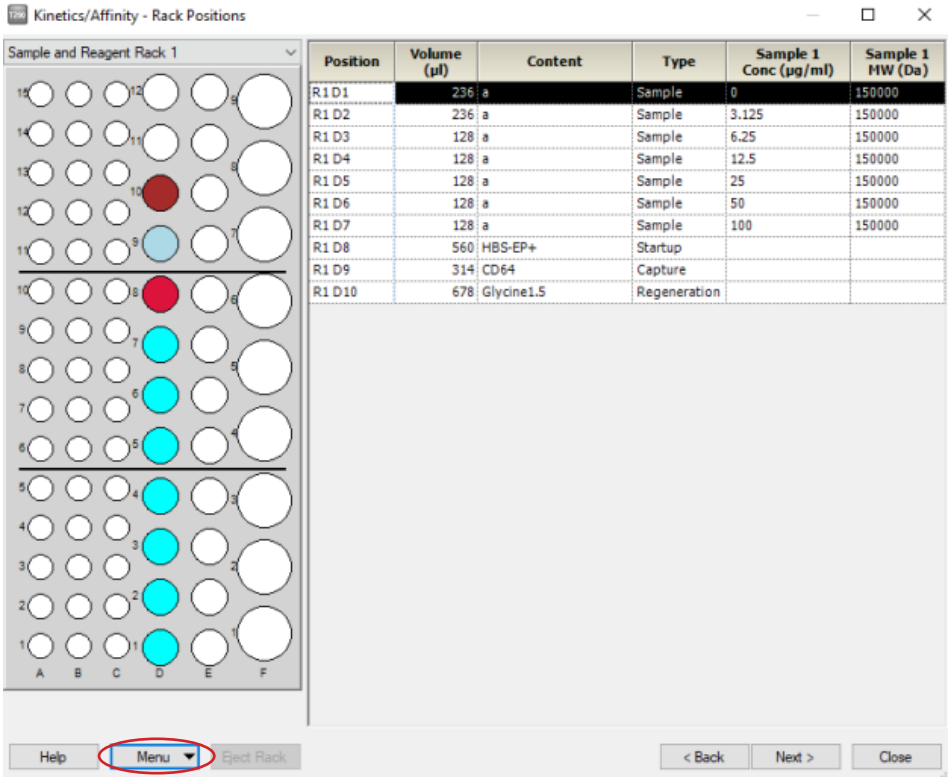
- 在 Kinetics/Affinity-injection Parameter 界面下：Ligand 填入 CD64， contact time 为 20s（具体时间视样品活性进行调整，以达到捕获量为准。捕获量通常在 50 RU 左右，若样品活性不高，可增加捕获量），Flow rate 为 10 μl/min。在 Sample 一栏中 Contact time 为 120s，Flow rate 为 30 μl/min，Dissociation time 为 180s，再生条件为 Glycine 1.5，再生时间 30s。



- 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。注意要设置重复浓度和零浓度。具体填写如下：



- 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（或根据样品数量选择其他 rack 或 96/384 孔板），点开 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial siza 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。

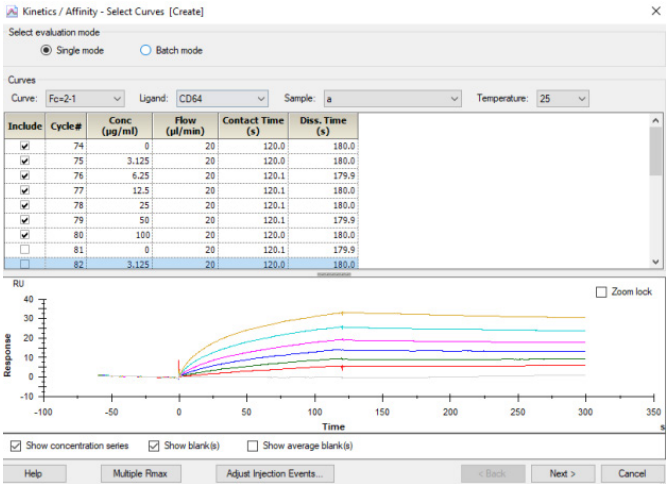


- 按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。样品 a 用运行缓冲液 HBS-EP+ 进行倍比稀释。点击 Next，对方法进行保存，再对数据路径（可使用系统默认的，也可自行指定，注意所保存的文件名及指定文件夹名均不能有中文字符）进行保存，仪器便会开始自动运行。

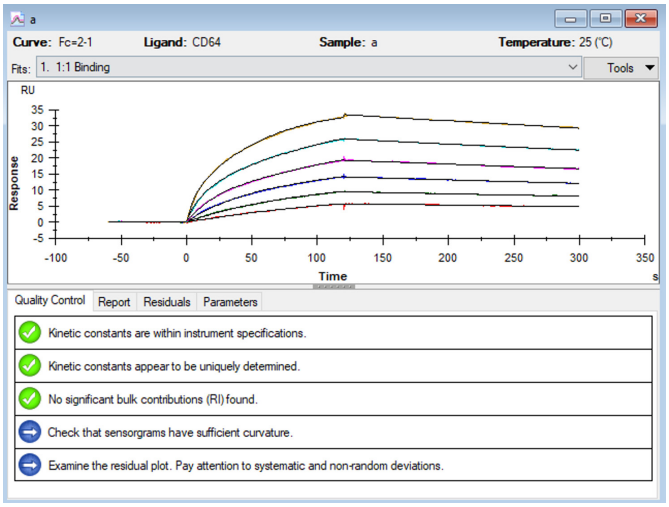
实验结果分析

- 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%。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。



- 点击 Next，在接下来的界面中点 Kinetics。Model 选择 1:1 Binding，接着点击 Fit 进行数据拟合，点击右下角 Finish 完成。
- 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 ka、kd，亲和力数据 KD 等。以本实验为例，动力学数据：Ka = 4.781×10^{4} $M^{-1}s^{-1}$，Kd = 6.488×10^{-4} s^{-1}，亲和力：KD = 1.357×10^{-8} M。
- 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。



Quality Control | Report | Residuals | Parameters

Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/
	5.209E+4	6.723E-4	1.291E-8	32.65		4.942E+14	
Cycle: 75 3.125 µg/ml					2.083E-8		
Cycle: 76 6.25 µg/ml					4.167E-8		
Cycle: 77 12.5 µg/ml					8.333E-8		
Cycle: 78 25 µg/ml					1.667E-7		
Cycle: 79 50 µg/ml					3.333E-7		
Cycle: 80 100 µg/ml					6.667E-7		

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 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。Cytiva 致力于推进和加速治疗。作为客户可信赖的合作伙伴，Cytiva 专注于生物研究、开发创新疫苗、生物药物以及新型细胞和基因疗法等领域，提升了药物研究和生物工艺的速度、效率和能力，为惠及全球患者开发、制造和交付变革性药物。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/contact。

CY21920-02Aug21-BR

cytiva