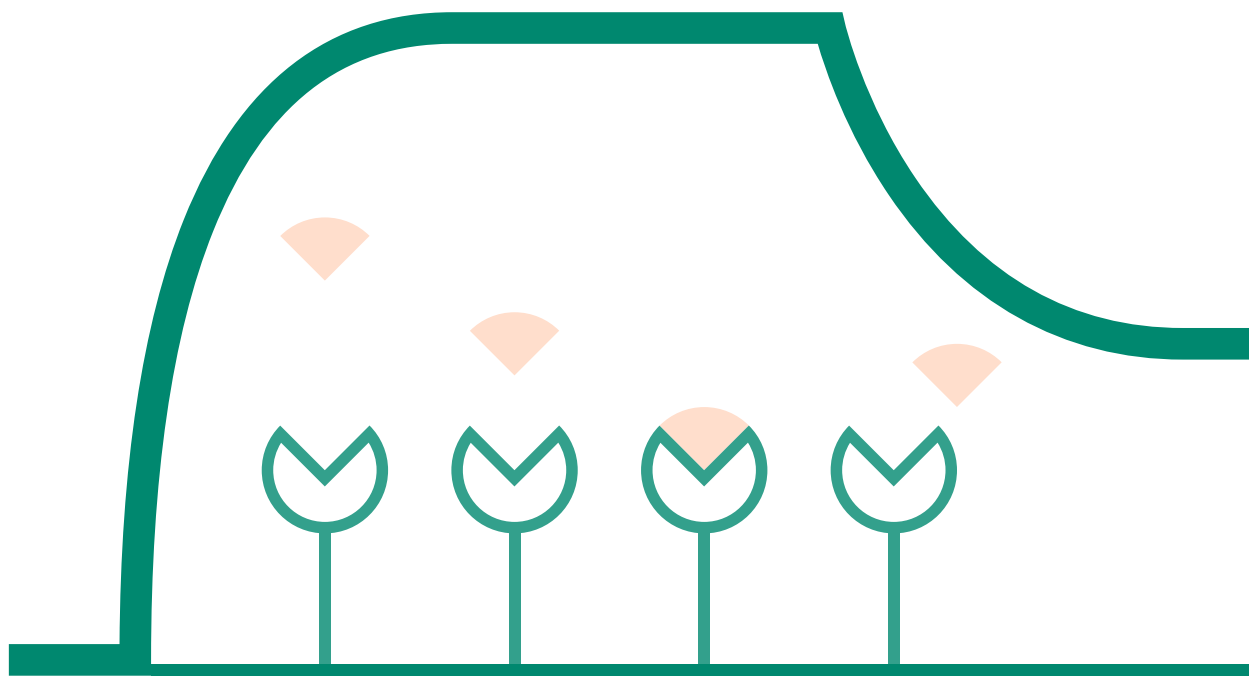


Biacore 检测抗体与 FcγR III b 相互作用 操作指南



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	11

实验目的

利用 Biacore T200 检测抗体与 FcγR III b 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 III b，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 III b 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 III b 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 III b，用去离子水溶解稀释至 0.5 μg/mL。



实验步骤

仪器准备

开机操作

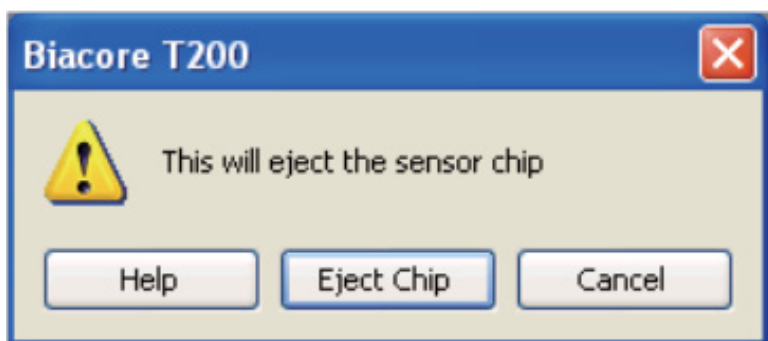
- 打开 Biacore T200 系统和电脑的电源开关。Biacore T200 的电源开关位于系统背面的右下角。开机自检通过后（无红灯，温度指示灯闪烁为正常，待系统温度达到设定温度后，面板上的温度指示灯会停止闪烁），即可操作。
- 打开 Biacore T200 控制软件（Biacore T200 control software），运行后软件会自动和主机系统建立连接。
- 准备运行缓冲液。量取 50mL 10 x HBS-EP+ buffer、450mL 去离子水（已经 0.22 μm 膜过滤），混匀后放入 500 mL 缓冲液瓶。
- 设备开机后，即可使用，无需等待。

缓冲液的放置

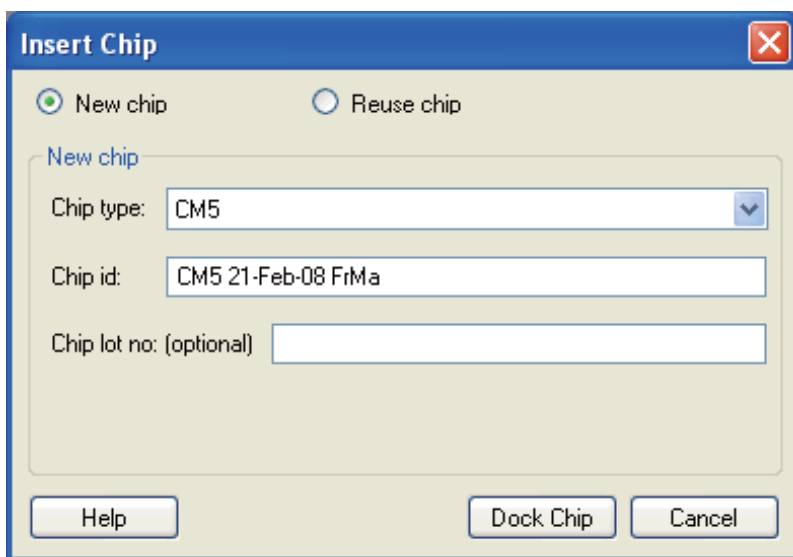
- 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore T200 系统左侧的托盘上。
- 将缓冲液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）不要动。
- 将 2L 的废液瓶放置在 Biacore T200 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。
- 取 500mL 去离子水装入 500mL 瓶中，放置在右侧托盘上，并将标有 water 标签的管子插入瓶中，用于清洗进样针。

芯片的放置

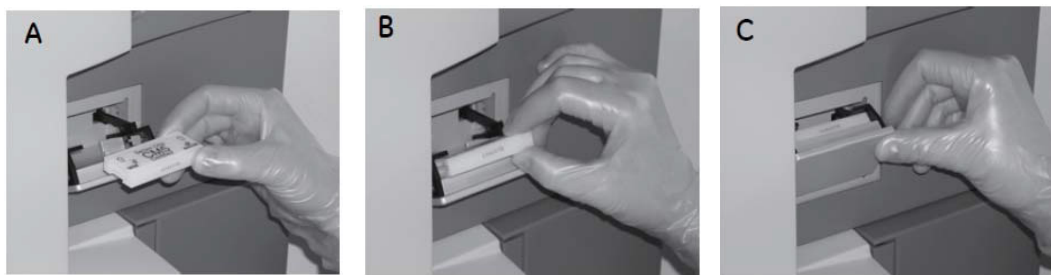
- 点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Insert Chip 选项，打开芯片舱门。
- 如果已经有芯片在芯片舱内，点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Eject Chip 选项。（若芯片舱中没有芯片，此步直接跳过）



- 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

- 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。

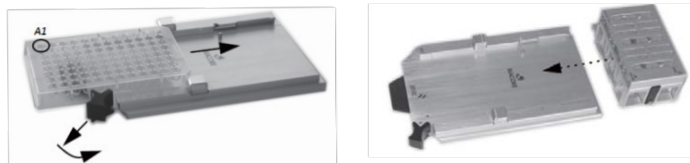


图 A: Reagent Rack 1&2 (左 1 右 2)



图 B: Sample and Reagent Rack1

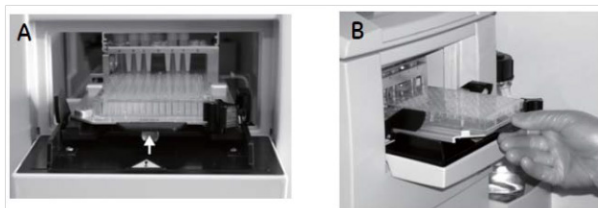
Reagent Rack 1&2 通常和 96/384 微孔板配合使用，加装在指定的样品架底座上。具体的组装方式参见下图。



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。

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°C。

Immobilization - Immobilization Setup

Chip type: CM5

Flow cells per cycle: 2

Flow cell 1,2

☒ Immobilize flow cell 1,2

Method: Amine

Ligand: anti-his antibody ☐ Dilute ligand

☒ Specify contact time and flow rate Contact time: 420 (s) Flow rate: 10 (µl/min)

☐ Blank immobilization

Flow cell 3,4

☐ Immobilize flow cell 3,4

Method: Amine

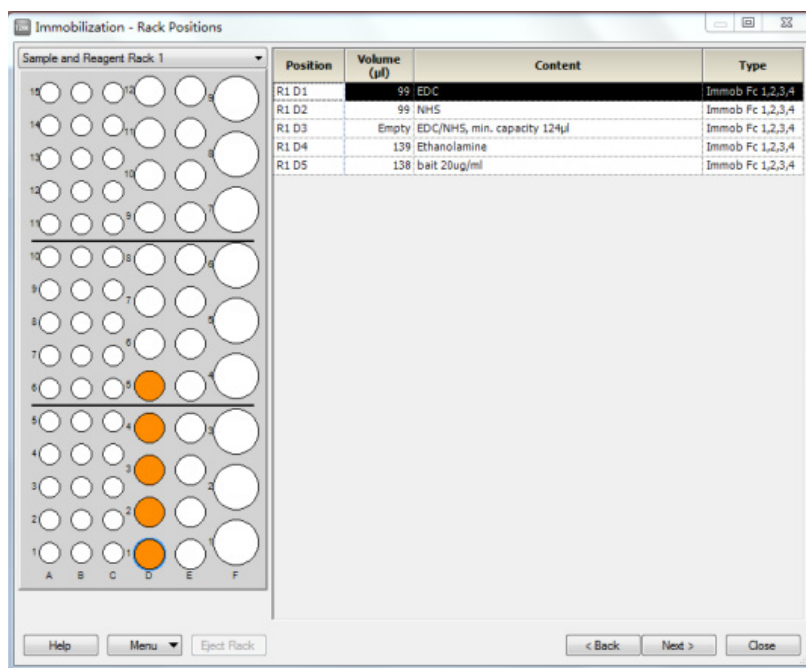
Ligand: ☐ Dilute ligand

☒ Specify contact time and flow rate Contact time: 420 (s) Flow rate: 10 (µl/min)

☐ Blank immobilization

Help Custom Methods... <Back Next> Close

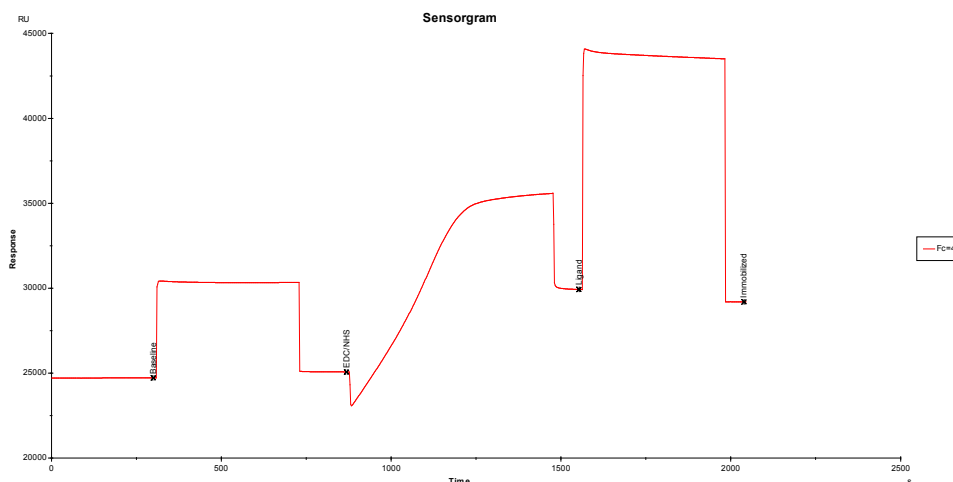
2) 在左侧下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1，在 Menu 里选 Automatic Positioning 自动排放样品位置或自行通过鼠标拖拽安排。根据屏幕显示，准备相应的样品，放入的样品体积略大于显示的体积即可，其中 anti-his antibody 用 pH4.5 的醋酸钠稀释至 20 $\mu\text{g/mL}$ 。然后，再按要求将不同样品放入样品架指定位置，如果使用的是带盖的 EP 管，所有盖子必须剪去。盖上样品架金属盖子，将样品架送回样品舱。



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。

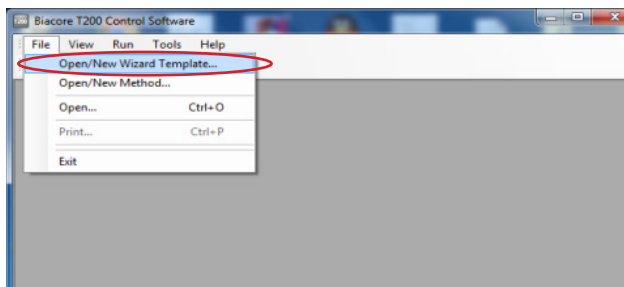
4) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果。本次实验 fc1 和 fc2 偶联量为 11000RU 左右（具体偶联量视样品实际情况略有差异，在 7000-14000RU 之间即可）。

5) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

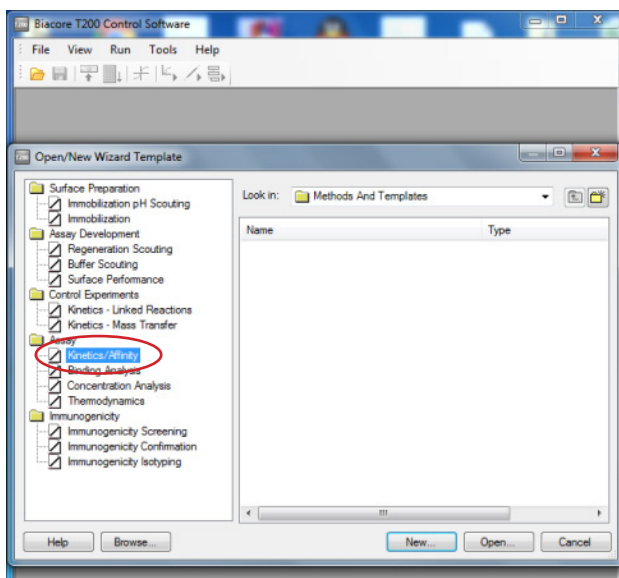


样品检测过程

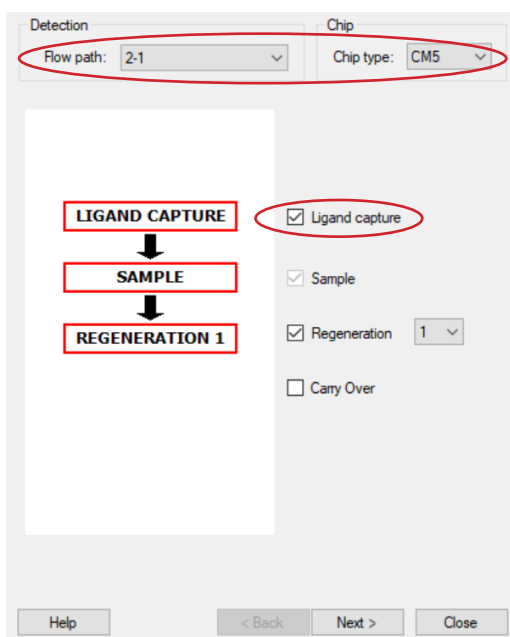
- 在打开的 Biacore T200 Control Software 里点开 file 中的 Open/New Wizard Template。（若要捕获不同的 FcγR，可改用 method，具体的操作参考 Biacore 检测抗体与 FcγRIIIa 相互作用操作指南）



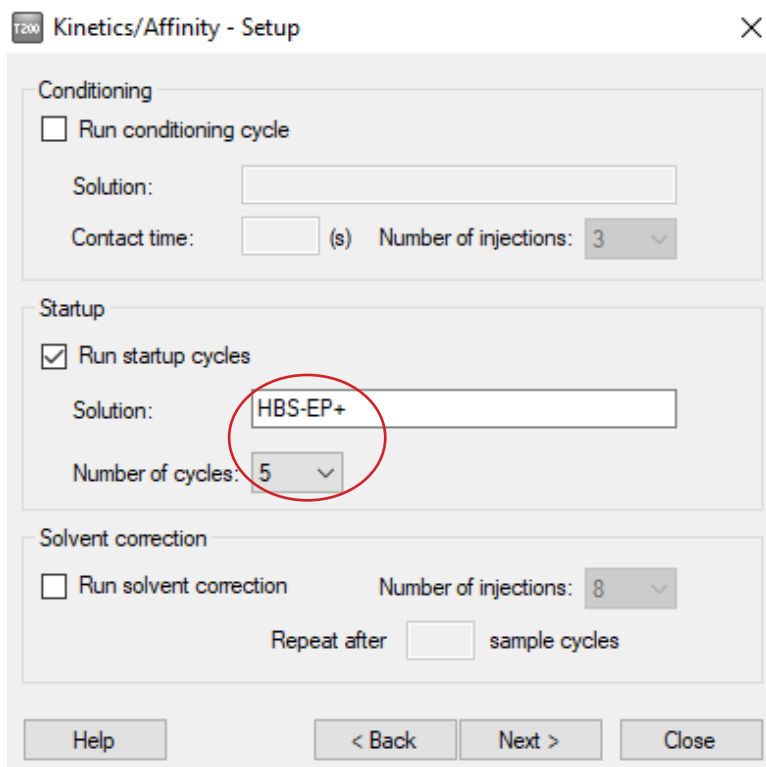
- 在 Open/New Wizard Template 的左边目标栏里选中 Kinetics/Affinity 后双击。



- 在 Kinetics/Affinity 界面中，将 Flow path 点为 2-1 或 4-3（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。



Kinetics/Affinity - Setup

Conditioning

☐ Run conditioning cycle

Solution:

Contact time: (s) Number of injections: 3

Startup

☒ Run startup cycles

Solution:

Number of cycles: 5

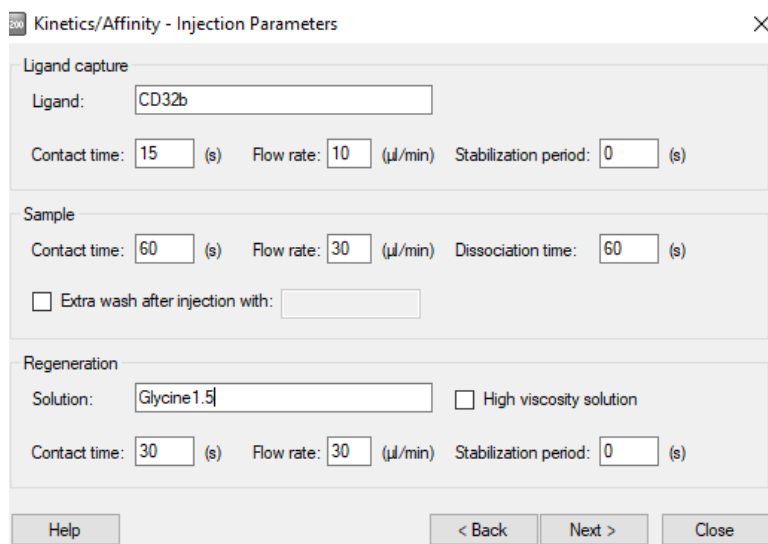
Solvent correction

☐ 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 CD16b，contact time 为 30s（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 55 RU 左右，若样品活性不高，可增加捕获量），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 Glycine 1.5，再生时间 30s。



Kinetics/Affinity - Injection Parameters

Ligand capture

Ligand:

Contact time: 15 (s) Flow rate: 10 ($\mu\text{l}/\text{min}$) Stabilization period: 0 (s)

Sample

Contact time: 60 (s) Flow rate: 30 ($\mu\text{l}/\text{min}$) Dissociation time: 60 (s)

☐ Extra wash after injection with:

Regeneration

Solution: ☐ High viscosity solution

Contact time: 30 (s) Flow rate: 30 ($\mu\text{l}/\text{min}$) Stabilization period: 0 (s)

Help < Back Next > Close

- 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：

Kinetics/Affinity - Samples

Samples

	Sample id	MW (Da)	Concentration µg/ml	Concentration nM
1	a	150000	0	0.000
2	a	150000	31.25	208.3
3	a	150000	62.5	416.7
4	a	150000	125	833.3
5	a	150000	250	1667
6	a	150000	500	3333
7	a	150000	1000	6667
8	a	150000	2000	1.333E+4
9	a	150000	0	0.000
10	a	150000	31.25	208.3
11				

Run order
☒ As entered ☐ Increasing concentration

Help Import... Control Samples... < Back Next > Close

- 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 size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。

Kinetics/Affinity - Rack Positions

Sample and Reagent Rack 1

Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 Conc (µg/ml)	Sample 1 MW (Da)
R1 D1	236	a	Sample	0	150000
R1 D2	236	a	Sample	3.125	150000
R1 D3	128	a	Sample	6.25	150000
R1 D4	128	a	Sample	12.5	150000
R1 D5	128	a	Sample	25	150000
R1 D6	128	a	Sample	50	150000
R1 D7	128	a	Sample	100	150000
R1 D8	560	HBS-EP+	Startup		
R1 D9	314	CD64	Capture		
R1 D10	678	Glycine1.5	Regeneration		

Help Menu... Exit Rack < Back Next > Close

Automatic Positioning

Change the order in which the samples are positioned by ordering the regions. The first region in the list is positioned first.

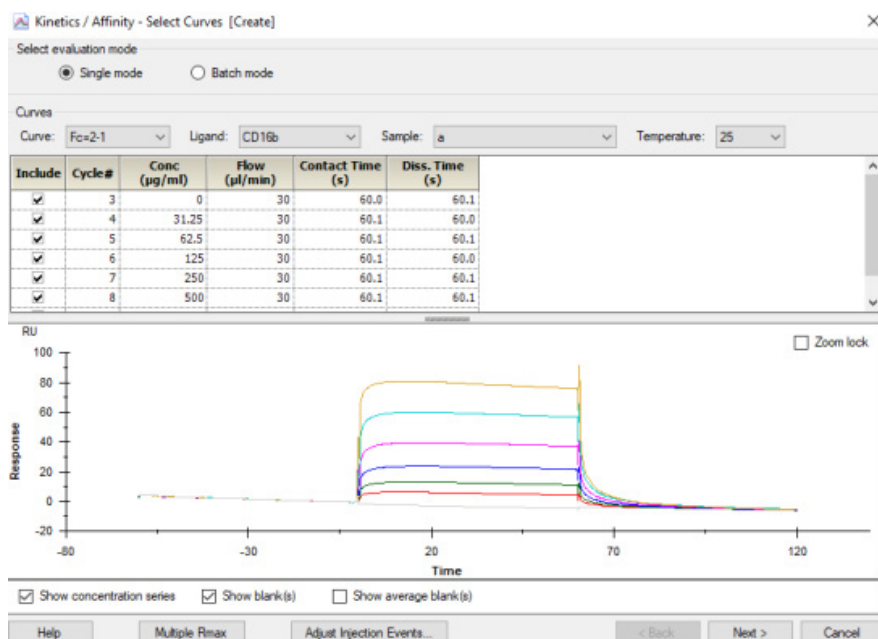
Region	Color	Orientation	Anchor	Rack	Vial Size	Pooling	First Sort By	Move Up	Move Down
Sample	LightBlue	Column	Bottom left	Sample	Medium	Yes	Content - Ascending		
Startup	Red	Column	Bottom left	Sample	Medium	Yes	Content - Ascending		
Capture	LightBlue	Column	Bottom left	Reagent	Medium	Yes	Content - Ascending		
Regeneration	Brown	Column	Bottom left	Reagent	Medium	Yes	Content - Ascending		

Help Print... Apply OK Cancel

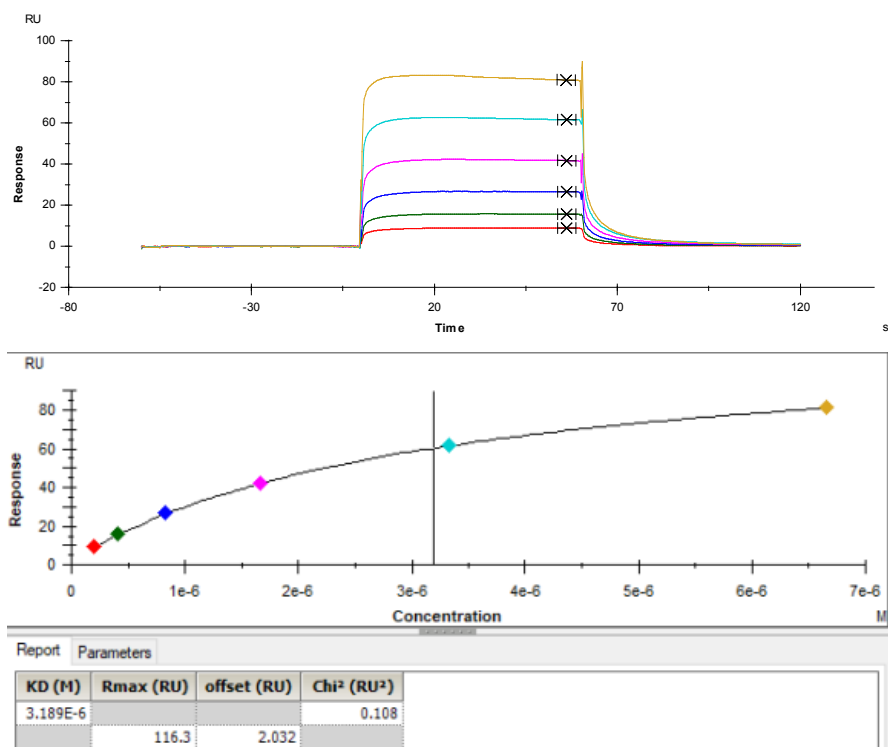
- 按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。样品 a 用运行缓冲液 HBS-EP+ 进行倍比稀释。点击 Next，对方法进行保存，再对数据路径（可使用系统默认的，也可自行指定，注意所保存的文件名及指定文件夹名均不能有中文字符）进行保存，仪器便会开始自动运行。

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 FcγR III b 结合的亲和力 $KD=3.189 \times 10^{-6}$ 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。

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。

CY23093-02Aug21-BR

