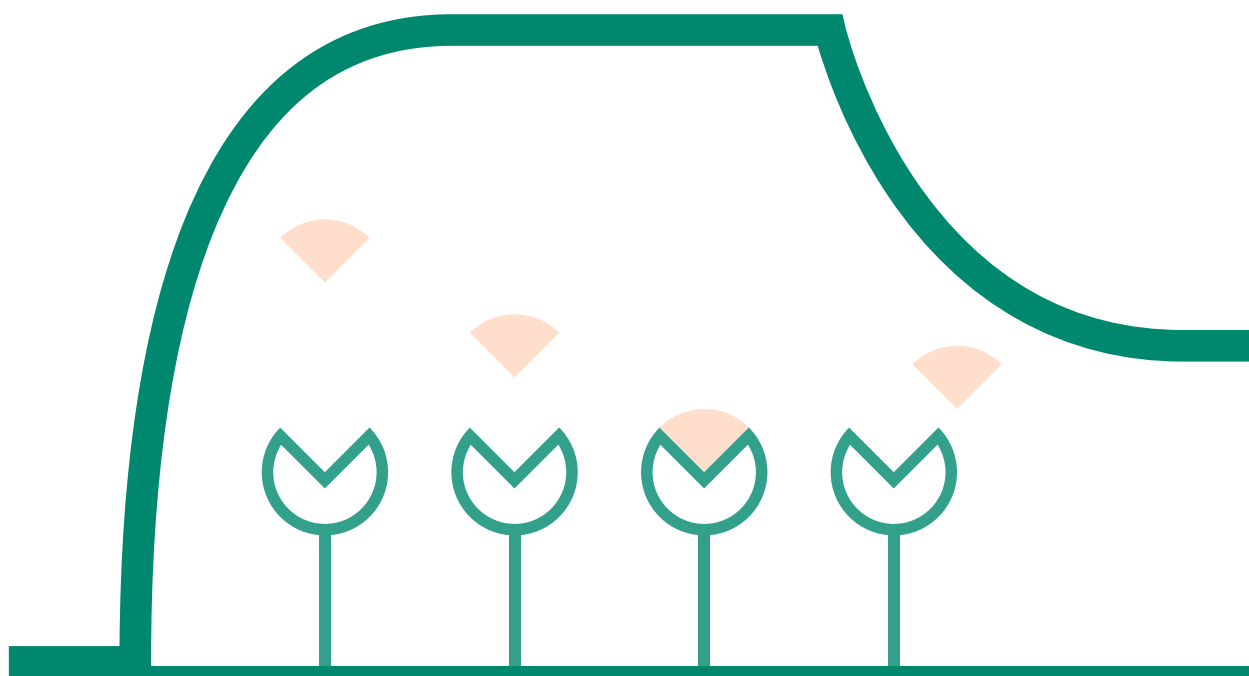


Biacore 捕获法

检测抗原与抗体相互作用操作指南



目录

一、实验目的	3
二、注 释	3
三、实验试剂和耗材	3
四、实验步骤	3
(一) 仪器准备	3
(二) 配体偶联	6
(三) 样品检测过程	6
(四) 实验结果分析	9

实验目的

利用 Biacore T200 检测蛋白与蛋白结合的亲和力 KD 与动力学数据 k_a , k_d 。本实验利用 Protein A 芯片, 捕获偶联抗体 A, 抗原 B 作为分析物, 检测结合的亲和力与动力学。也可使用 CM5 + Human Antibody Capture Kit (货号: 29234600) / Mouse Antibody Capture Kit (货号: 29215281) 进行捕获法捕获抗体 A, 抗原 B 作为流动相进行检测。本指南所用抗体 A, 分子量为 150kD, 抗原 B 分子量为 12.5 kD。

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 Protein A 芯片。Protein A 芯片货号: 29-1275-55 (一片装), 29-1275-56 (三片装)。厂家为 Cytiva。
- 缓冲液: 10 x HBS-EP+ (货号: BR-1006-69), 厂家为 Cytiva。
- 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所有耗材的套餐)
- 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)。
- 无盖 1.5 ml EP 管 (货号: BR-1002-87), 厂家为 Cytiva。
- 抗体 A: 浓度 > 200 μ g/ml。
- 抗原 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%。



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, 面板上黄色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 μ m 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。

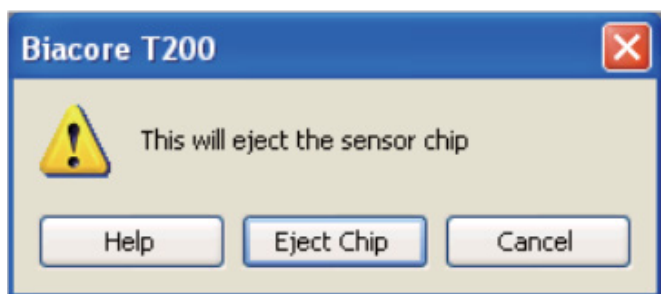
缓冲液的放置

- 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。

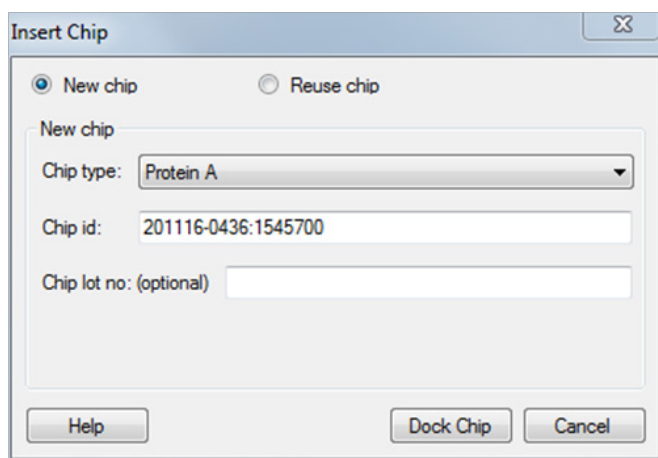
- 将 2L 的废液瓶放置在 Biacore T200 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。
- 取 500mL 去离子水装入 500mL 瓶中，放置在右侧托盘上，并将标有 water 标签的管子插入瓶中，用于清洗进样针。

芯片的放置

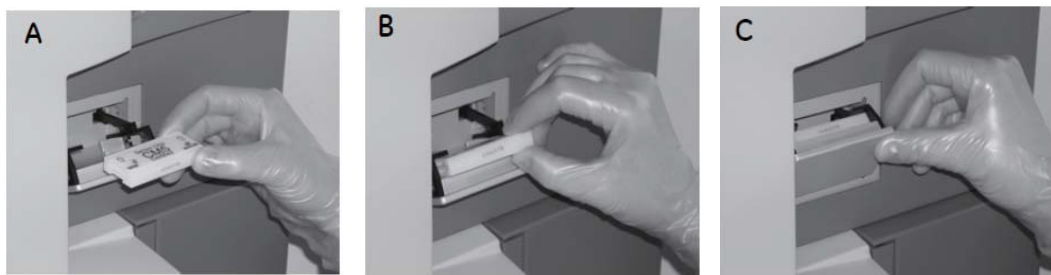
- 点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Insert Chip 选项，打开芯片舱门。
- 如果已经有芯片在芯片舱内，点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Eject Chip 选项。（若芯片舱中没有芯片，此步直接跳过）



- 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 Protein A 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。

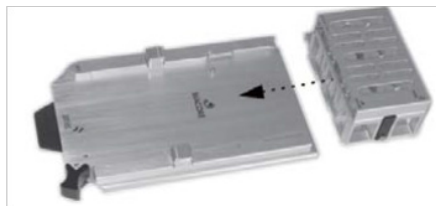
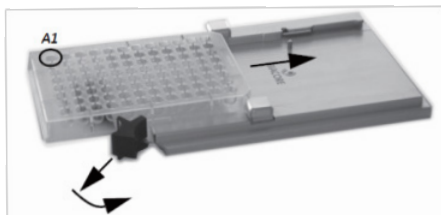


A: Reagent Rack 1&2 (左 1 右 2)



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

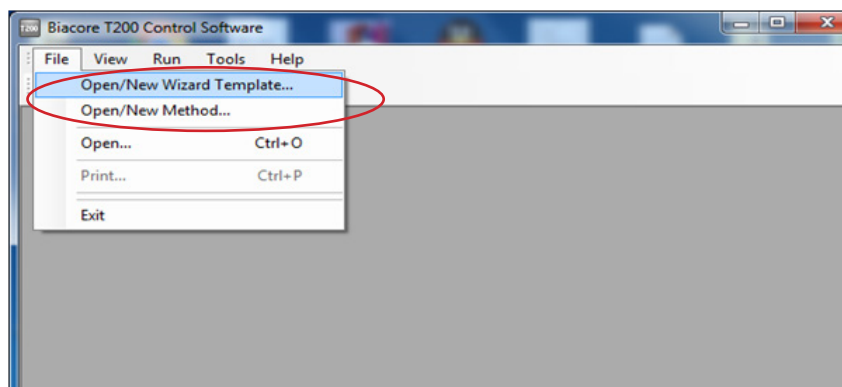
- 点击 Eject Rack Tray 对话框中的 OK，样品架会被自动送入样品舱，舱门也会自动合上。注意：样品舱舱门打开后会有时间限制，打开 60-90 秒后舱门将自动合上。最后 15 秒时，对话框中的倒计时会显示为红色字体并闪烁。此时请不要强行将样品架放入，以免夹到手。可以等待舱门合上后，重新打开即可。

样品稀释

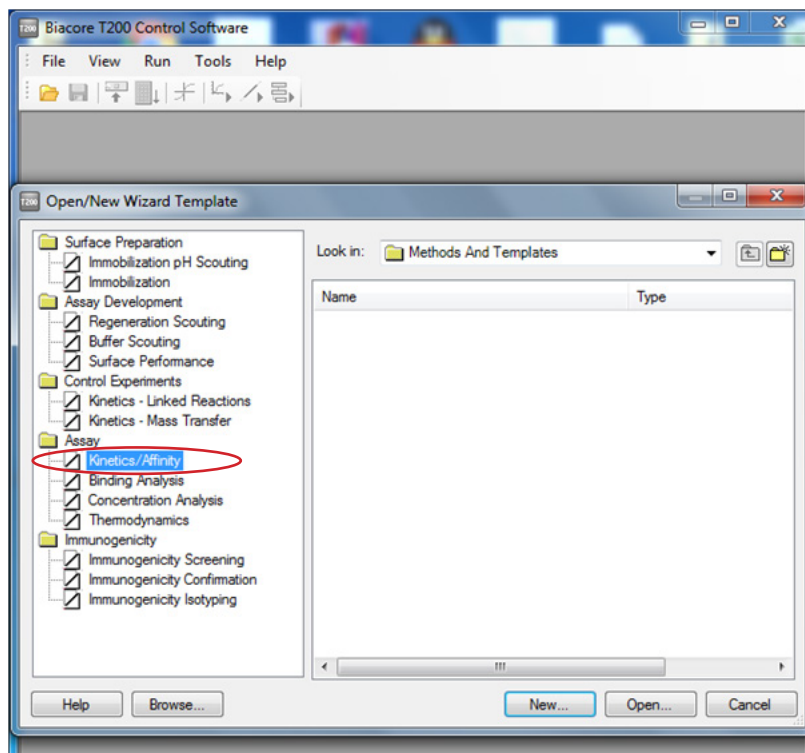
- 配体（抗体 A）浓度：用缓冲液 1 x HBS-EP+ 将抗体稀释至 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 或 1 $\mu\text{g/mL}$ ，400 μL 。
- 分析物（抗原 B）浓度：用缓冲液 1 x HBS-EP+ 将抗体稀释至 0, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 nM。

样品检测过程

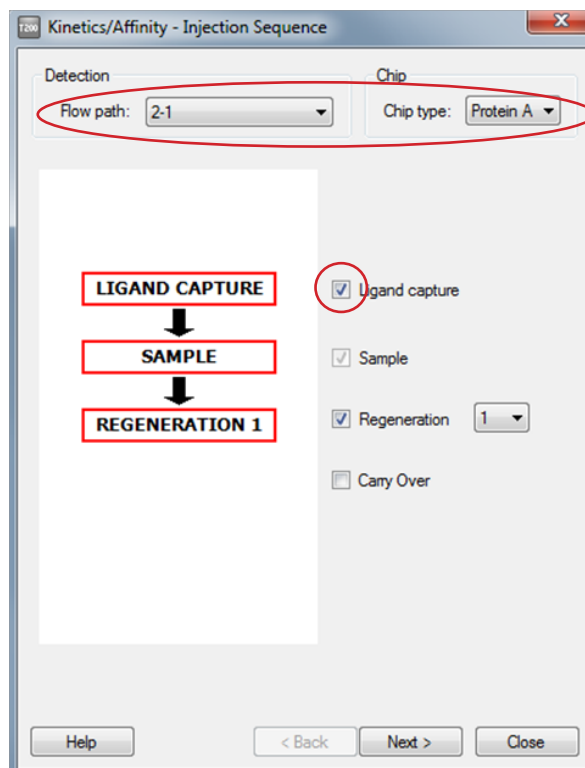
- 在打开的 Biacore T200 Control Software 里点开 file 中的 Open/New Wizard Template。



- 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 选为 2-1（如果蛋白偶联在 flow cell 4，则选 4-3），Chip type 选择 Protein A，勾选 Ligand capture。点击 Next。



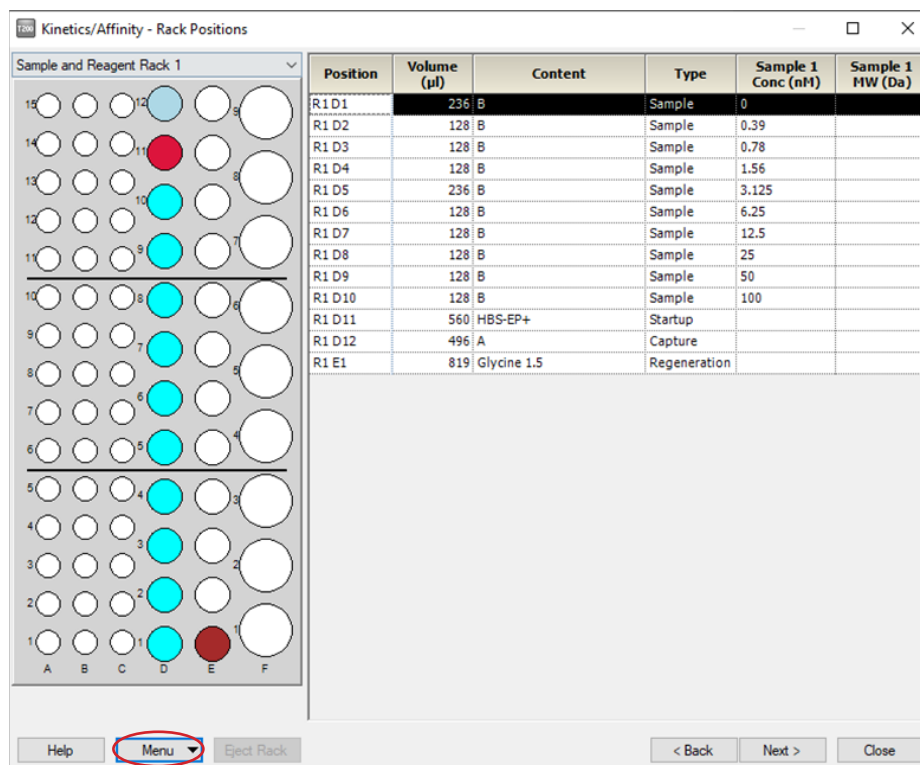
- 在 Setup 界面里，Startup 底下的 Solution 一栏中填写 HBS-EP+，并将 Number of cycles 改为 5。点击 Next。

- 在 Kinetics/Affinity-Injection Parameters 界面下，在 Ligand capture 一栏中 Ligand 为 A，Contact time 为 60s，在 Sample 一栏中 Contact time 为 120s，Flow rate 为 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，Dissociation time 为 300s，Regeneration 中 solution 为 Glycine 1.5，Contact time 为 30s。点击 Next。

- 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，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：

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

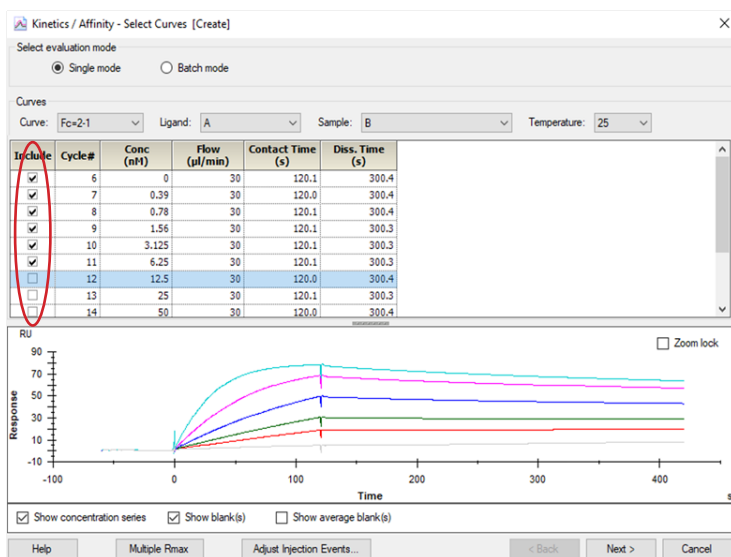
- 点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-System Preparations 界面，不做修改，再点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-Rack Position 界面，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1（或根据样品数量选择其他 rack 或 96/384 孔板），点开 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。



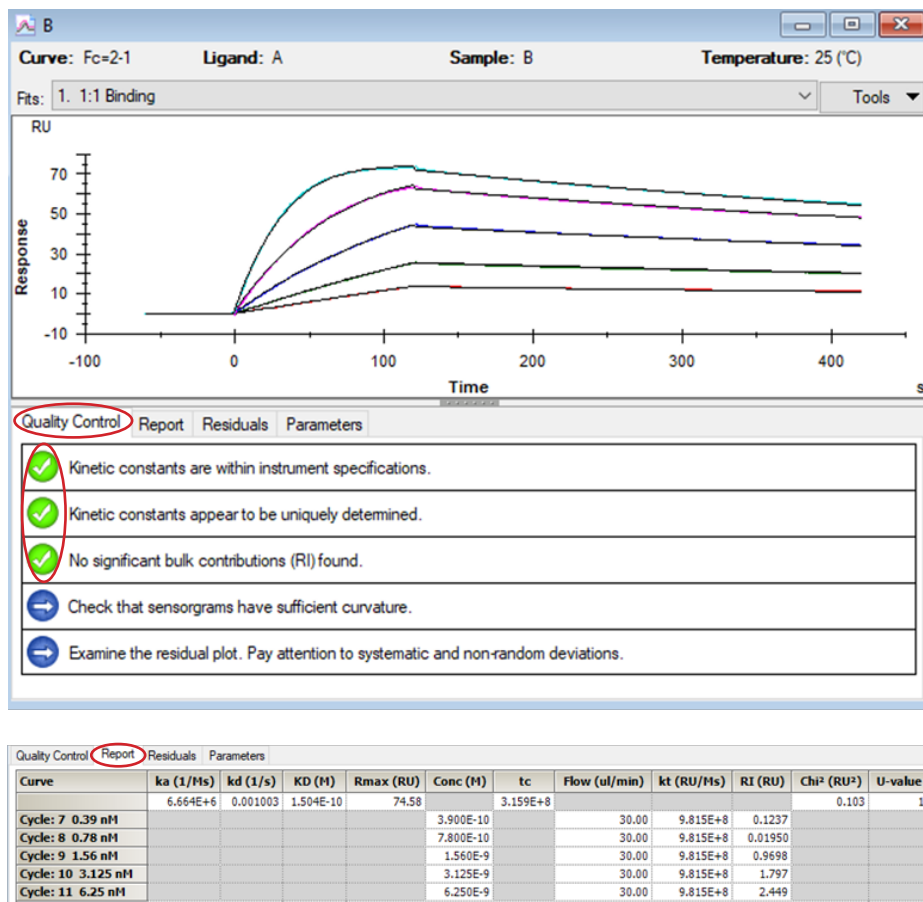
- 按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。抗原 B 用运行缓冲液 HBS-EP+ 进行倍比稀释。点 Next 后，对方法进行保存，再对数据进行保存，仪器便会开始自动运行。

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，可延长再生时间。
- 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。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。
- 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： $K_a = 6.664 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ， $K_d = 0.001003 \text{ s}^{-1}$ ，亲和力： $K_D = 1.504 \times 10^{-10} \text{ M}$ 。
- 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。



关于 Cytiva (思拓凡)

作为全球生命科学行业的先行者，Cytiva 致力于促进与加速全球医疗的发展。Cytiva 年销售额超过 33 亿美元，并在全球 40 多个国家拥有近 7000 名员工。作为值得信赖的合作伙伴，Cytiva 全面助力客户提升研究与生产流程中的速度、效率与能力，赋能创新型药物的发展和生产，惠及全球患者。

智荟专线：400-810-9118

官微订阅号：Cytiva

官微服务号：CytivaChina

cytiva.com

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。

CY21134-30Apr21-BR

