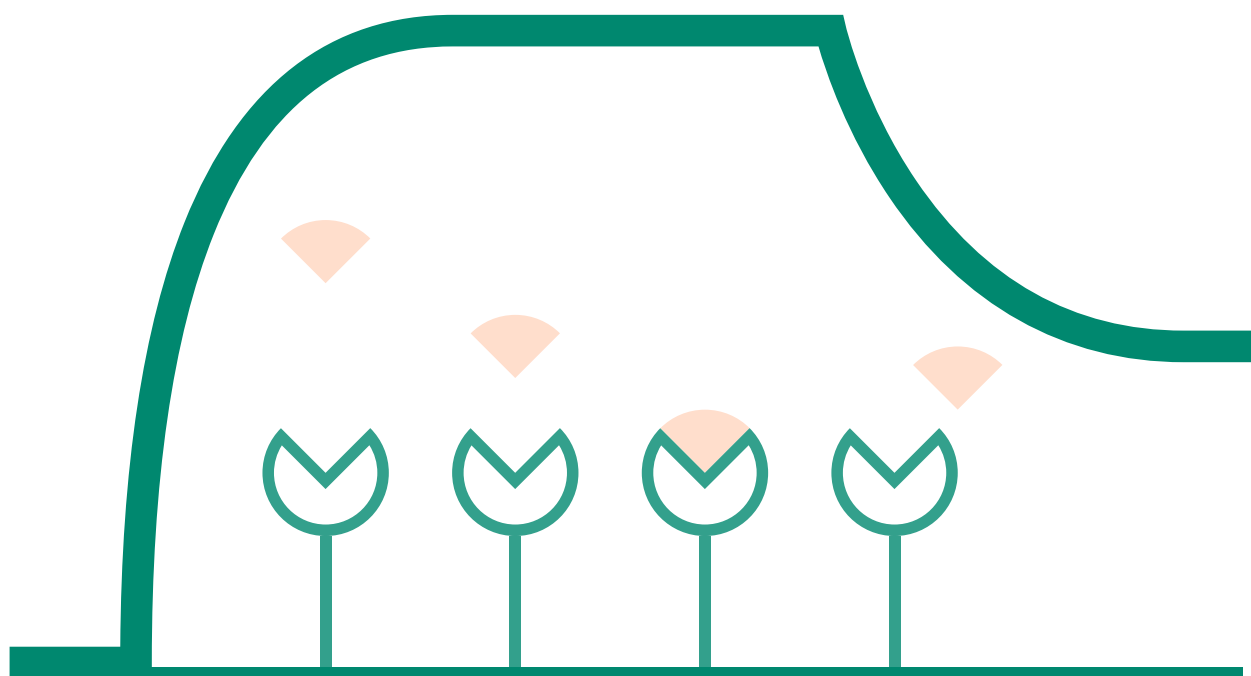


Easy Biacore:

利用Biacore T200检测蛋白与蛋白结合 ——多循环动力学方式

说明：

- 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。
- 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。
- 本文为简易版操作指南，用于初学者快速完成检测并获得数据。若想了解更多细节，可参考《Biacore 检测蛋白与蛋白结合操作指南》。



实验前准备

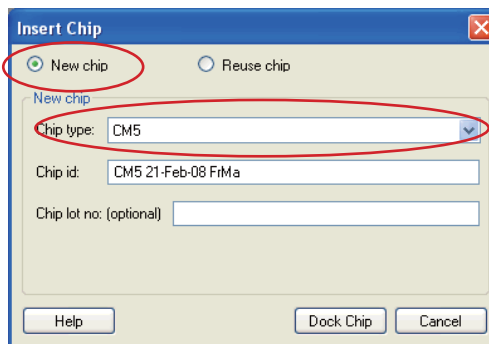
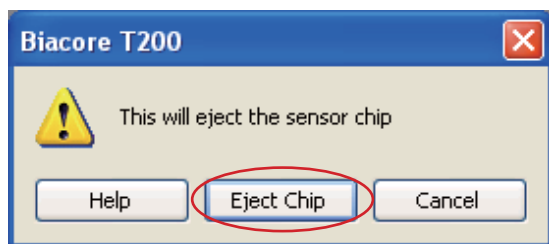
- S 系列 CM5 芯片, 货号: 29-1049-88 (一片装)、BR-1005-30 (三片装)、29-1496-03 (十片装), (注: 每张芯片若一次性使用, 可检测三对不同的互作, 若再生后重复使用, 只要蛋白一直有活性, 就可一直使用)。
- 氨基偶联试剂盒 (货号: BR-1000-50), (注: 里面的 EDC 和 NHS, 溶解后, 200ul 每管分装, -20℃ 冻存, 后续实验前, 各取一管融化后使用即可)。
- 偶联 Buffer: 10mM 醋酸钠 pH4.0 (货号: BR-1003-49), 或 10mM 醋酸钠 pH4.5 (货号: BR-1003-50)。
- 缓冲液: 10 x HBS-EP+ (货号: BR-1006-69), 用去离子水稀释 10 倍, 配置 500 mL, 置于 T200 系统左侧托架上, 将缓冲液进液管 A 插入瓶中。
- 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)
- 无盖 1.5 ml EP 管 (货号: BR-1002-87)。
- 蛋白 A 和蛋白 B: 母液浓度 > 0.2 mg/mL, 蛋白总量至少各 20 µg。



实验步骤

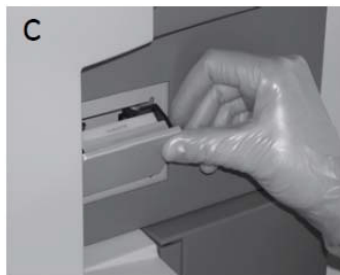
芯片的放置与缓冲液置换

- 将运行缓冲液, 水瓶, 废液瓶分别放置在左右托盘中, 并插入相应的进液管。
- 点击 Biacore T200 Control Software 工具条中的  或 , 点击 Eject Chip, 打开芯片舱门。选择 New Chip, 现在 Chip type 为 CM5。



以本实验为例

- 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。结束后, 选择 Tools → Prime 命令, 点击 Start。结束后, 点击 Close, 系统自动转入待机 (Standby) 状态。

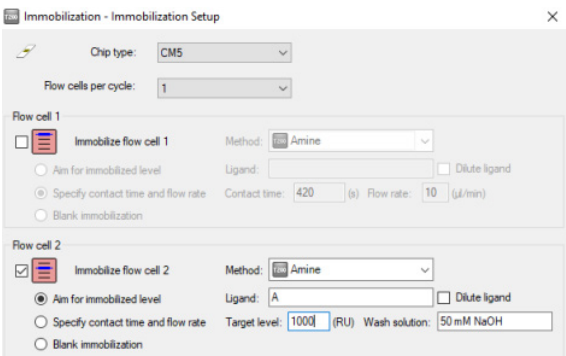


蛋白 A 偶联

- 点击控制软件 File 下面的 Open/New wizard template，选择 immobilization，双击。在 Chip type 中选 CM5，在 Flow cells per cycle 选 1。勾选 Flow cell 2，method 选用 amine，Ligand 输入配体名称（本实验为 A），选用 aim for immobilized level，Target level 输入配体目标偶联量（参考表一）。点击 2 次 Next。

表 1. 偶联量与配体工作浓度参考表

分子量比 (配体 A/ 分析物 B)	≤1	1~5	5~10	10~50	>50
目标偶联量	500 RU	1000 RU	2000 RU	5000 RU	>10000 RU
配体工作浓度	2 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL		50 µg/mL



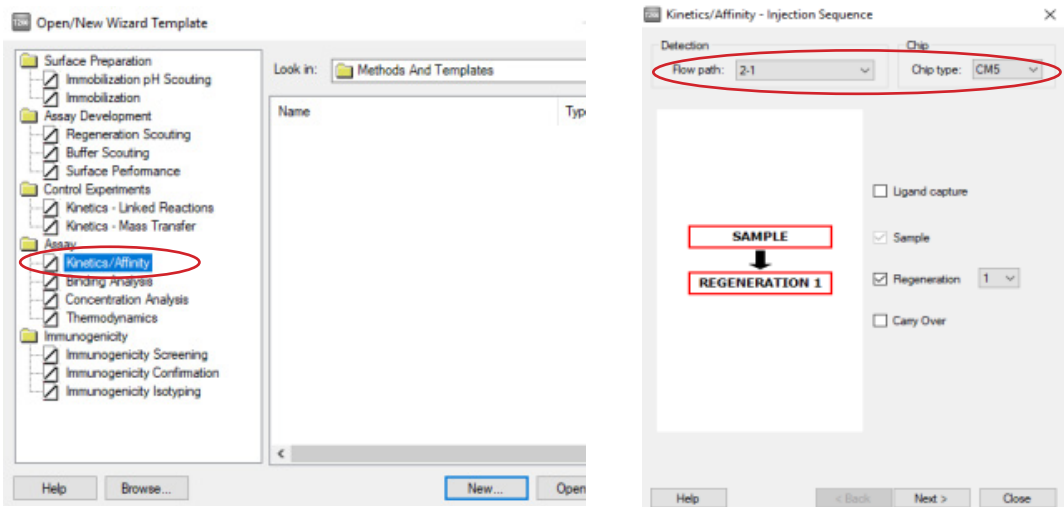
- 将 Reagent Rack 改为 Reagent Rack1，点开左下方 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。根据下图中样品名称及体积（大于该指定体积即可）进行样品准备。配体蛋白用 pH4.0 的醋酸钠溶液稀释至对应浓度（参考表一）。点击左下方 Eject Rack，取出样品架，将准备好的样品放到对应位置。盖上试管架盖子，将样品架送回样品舱。
(注：所有 EP 管的盖子务必剪去)。

Position	Volume (µl)	Content	Type
R2 A1	166	A	Immob Fc 2
R2 A2	68	50 mM NaOH	Immob Fc 2
R2 A3	99	EDC	Immob Fc 2
R2 A4	99	NHS	Immob Fc 2
R2 B1		Empty EDC/NHS, min. capacity 124µl	Immob Fc 2
R2 B2	139	Ethanolamine	Immob Fc 2

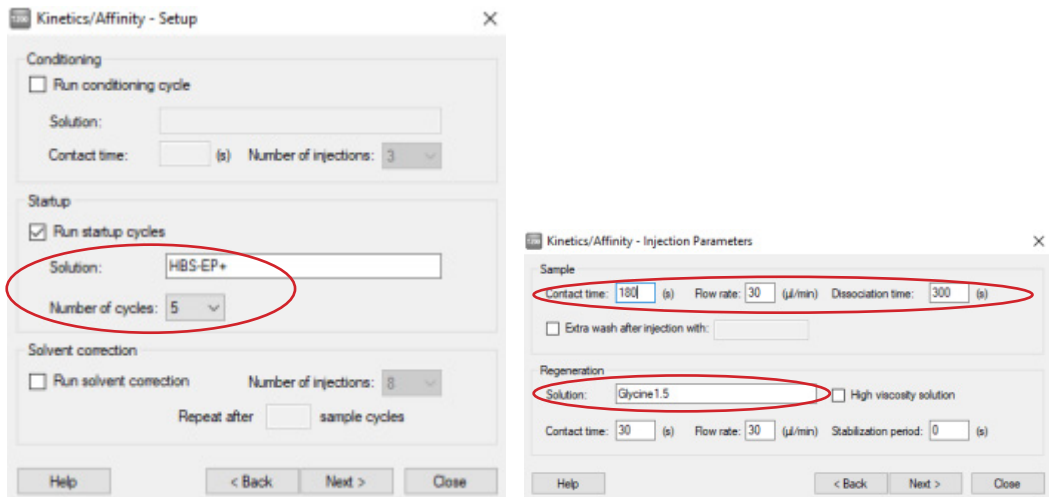
- 点击 Next，点击 start，保存 method 与 result 文件。系统将自动在芯片表面包被目标偶联量的配体蛋白，并自动生成偶联报告。
- 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

多循环动力学检测

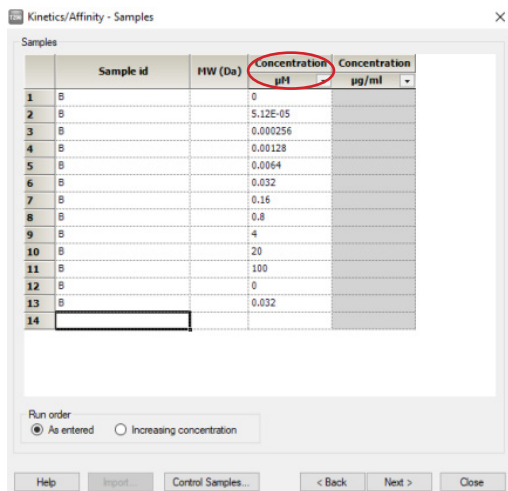
- 点击控制软件 File 下面的 Open/New wizard template，双击 Kinetics/Affinity。将 Flow path 点为 2-1 (如果蛋白偶联在 flow cell 4，则选 4-3)，Chip type 选择 CM5。点击 Next。



- Startup 中 Solution 填 HBS-EP+，Number of cycle 改为 5，点击 Next。Sample 中 Contact time 为 180s (或 120s)，Dissociation time 为 300s，Regeneration 中 solution 为 Glycine 1.5。点击 Next。



- Kinetics/Affinity-Sample 界面，填写分析物信息：Sample id 填写样品名称，Concentration 填写分析物系列浓度 (由低到高、五倍稀释)，注意浓度单位选择，推荐浓度如下：偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。



- 点击 2 次 Next。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)，再点击左下方 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。根据下图样品名称及体积 (大于该指定体积即可) 进行样品准备。蛋白 B 母液先用左托盘中的运行缓冲液 1x HBS-EP+ 稀释至 100μM，再用 1x HBS-EP+ 进行 5 倍稀释。点击左下方 Eject Rack，取出样品架。根据图示样品位置进行放置，盖上试管架盖子，将样品架送回样品舱。(注：所有 EP 管的盖子务必剪去)。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。

Kinetics/Affinity - Rack Positions

Sample and Reagent Rack 1

Position	Volume (μl)	Content	Type	Sample 1 Conc (μM)	Sample 1 MW (Da)
R1 D1	296	B	Sample	0	
R1 D2	158	B	Sample	5.12E-05	
R1 D3	158	B	Sample	0.000256	
R1 D4	158	B	Sample	0.00128	
R1 D5	158	B	Sample	0.0064	
R1 D6	296	B	Sample	0.032	
R1 D7	158	B	Sample	0.16	
R1 D8	158	B	Sample	0.8	
R1 D9	158	B	Sample	4	
R1 D10	158	B	Sample	20	
R1 D11	158	B	Sample	100	
R1 D12	710	HBS-EP+	Startup		
R1 E1	866	Glycine1.5	Regeneration		

Help

Menu

Eject Rack

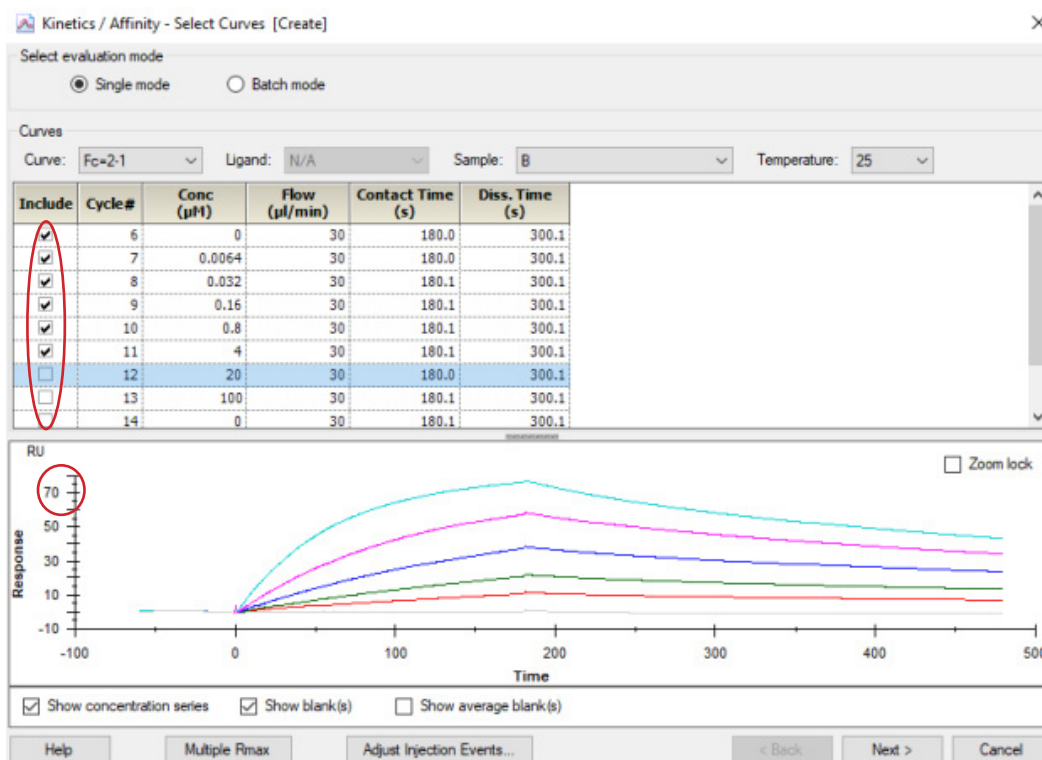
< Back

Next >

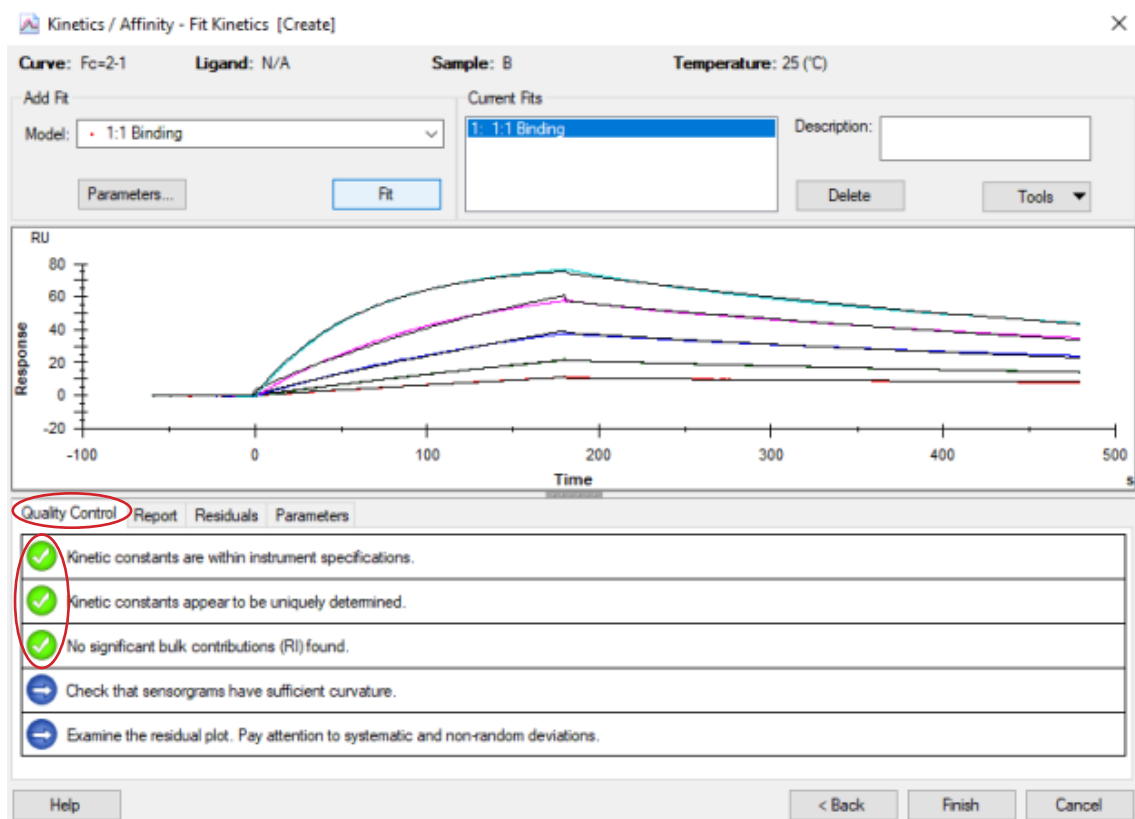
Close

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%, 或者调换配体与分析物, 将 B 偶联在芯片上, 将 A 作为分析物。若 baseline 中各个点的响应值上飘, 可适当延长 glycine 1.5 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 个浓度分析, 如果最高浓度响应值小于 50 RU, 选最高的 5 个浓度进行数据分析, 介于两者中间, 随意选 5 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。
- 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: $k_a = 3672 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 0.001807 \text{ s}^{-1}$, 亲和力: $K_D = 4.921 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。
- 5) 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/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value
	3672	0.001807	4.921E-7			5.442E+6				0.399	1
Cycle: 7 0.0064 µM				6384	6.400E-9		30.00	1.691E+7	0.5383		
Cycle: 8 0.032 µM				1515	3.200E-8		30.00	1.691E+7	0.3630		
Cycle: 9 0.16 µM				481.0	1.600E-7		30.00	1.691E+7	1.140		
Cycle: 10 0.8 µM				165.0	8.000E-7		30.00	1.691E+7	3.317		
Cycle: 11 4 µM				88.25	4.000E-6		30.00	1.691E+7	1.002		

如有问题，请拨打免费技术热线

请拨打 400-810-9118

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。

CY19514-26Feb21-BR

