

# Easy Biacore: T200 检测蛋白与小分子结合



cytiva.com

## 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 检测蛋白与小分子互作操作指南》。



## 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), 若蛋 白与小分子的分子量比大于 100, 换用 S 系列 CM7 芯片。(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 PBS-P+(货号: 28-9950-84)。
   (也可扫描下方的二维码选择含上述 1/2/3 或 1/2/3/4 所有耗材的套餐)



含 CM5 芯片套餐



含 CM7 芯片套餐

- 分析纯 DMSO,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)。
- 蛋白:浓度一般需大于 0.5 mg/ml。蛋白总量至少 20 µg 以上。
- 小分子 LMW: 母液浓度建议大于 20 mM,体积在 30 µL 以上,纯度 >90%,溶在 100% DMSO 里。
- 其他耗材:无盖 1.5 ml EP 管(货号: BR-1002-87),橡胶瓶盖 2 型(货号: BR-1004-11),96 孔板(货号: BR-1005-03),96 孔板封口膜(货号: 28-9758-16),购买地为 Cytiva。

### 实验步骤

#### 芯片的放置与缓冲液置换

- 将运行缓冲液 (200 mL 1×PBS Buffer 即可 ),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 <sup>→</sup> 或 <sup>→</sup> 点击 Eject Chip, 打开芯片舱门。选择 New Chip, 现在 Chip type 为 CM5。

	montemp
	New chip     New chip
Biacore T200 🛛 🔀	Chip type: CM5
	Chip id: CM5 21-Feb-08 FrMa
This will eject the sensor chip	Chip lot no: (optional)
Help Eject Chip Cancel	
	Help Dock Chip Cancel

• 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 (如 2 已用,可选择 4), method 选用 amine, Ligand 输入配体名称,选用 specify contact time and flow rate 实现高偶联,按下表输入 contact time,本次实验输入 900s。点击 2 次 Next。

表1. 偶联量与配体工作浓度参考表

分子量比 (蛋白 / 小分子)	≤50	50~100	>100
芯片类型	CI	M5	CM7
目标偶联量	~8000 RU	~15000 RU	>20000 RU
配体工作浓度	20µg/mL	40 µg/mL	50 ug/mL
contact time	600s	900s	900s

comp (ppc. cm)	V	
Flow cells per cycle: 1	~	
v cell 1	Method: Amine	
Aim for immobilized level	Ligand: Dilute ligand	
<ul> <li>Specify contact time and flow rate</li> </ul>	Contact time: 420 (s) Flow rate: 10 (µl/min)	
O Blank immobilization		
v cell 2		
Immobilize flow cell 2	Method: Amine	
O Aim for immobilized level	Ligand: pro Dilute ligand	
@ a		
Specify contact time and flow rate     Blank immobilization	Contact time: 900 (s) Flow rate: 10 (ul/min)	
specify contact time and flow rate     Blank immobilization     vell 3	Contact time: 900 (a) Row rate: 10 (µ/min)	
Specify contact time and flow rate     Blank immobilization     cell 3     Immobilize flow cell 3	Contact time: 900 (a) Row rate: 10 (u/min) Method: Amine	
specify contact time and flow rate     Blank immobilization     rell 3     Immobilize flow cell 3     Aim for immobilized level	Contact time: 900 (6) Row rate: 10 (d/min) Method: Amine	
Specify contact time and flow rate     Blank immobilization     rell 3     Immobilize flow cell 3     Am for immobilized level     Specify contact time and flow rate	Contact time: 900 (a) Row rate: 10 (u/min) Method: Arnine Ugand: Diute ligand Contact time: 420 (a) Row rate: 10 (u/min)	
Specify contact time and flow rate     Bark immobilization     real 3     Am for immobilize flow cell 3     Am for immobilized level     Specify contact time and flow rate     Bark immobilization	Contact time: 900 (a) Row rate: 10 (u/min) Method: Amine Ugand: Diute ligand Contact time: 420 (a) Row rate: 10 (u/min)	
Specify contact time and flow rate     Bark immobilization     Ident immobilized flow cell 3     Aim for immobilized level     Specify contact time and flow rate     Bark immobilization     cell 4     Immobilize flow cell 4	Contact time: 900 (a) Flow rate: 10 (d/min) Method: Amine Ligand: Contact time: 420 (a) Flow rate: 10 (d/min) Method: Amine	
Specify contact time and flow rate     Bark immobilization     If the immobilization     Immobilized level     Specify contact time and flow rate     Bark immobilization     real     Immobilization     real     Am for immobilized level	Contact time: 900 (a) Row rate: 10 (d/min) Method: Amine Ligand: Dilute ligand Contact time: 420 (a) Row rate: 10 (d/min) Method: Amine Ligand: Dilute ligand	
Specify contact time and flow rate     Bark immobilization     immobilize flow cell 3     Aim for immobilized level     Specify contact time and flow rate     Bark immobilization     real 4     Immobilize flow cell 4     Aim for immobilized level     Specify contact time and flow rate     Specify contact time and flow rate	Contact time: 900 (a) Row rate: 10 (d/min)  Method: Amine Ugand: Dilute ligand Contact time: 420 (a) Row rate: 10 (d/min)  Method: Amine Ugand: Dilute ligand Contact time: 420 (a) Row rate: 10 (d/min)	

 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到指定位置。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。其中配体蛋白用 pH4.0 的醋酸钠稀释至 50 µg/mL(或按上表配制相应浓度)。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)。

Immobilization - Rack Positions				– 🗆 X
Sample and Reagent Rack 1 ~	Position	Volume (µl)	Content	Туре
	R1 D1	99	EDC	Immob Fc 2
	R1 D2	99	NHS	Immob Fc 2
	R1 D3	Empty	EDC/NHS, min. capacity 124µl	Immob Fc 2
	R1 D4	139	Ethanolamine	Immob Fc 2
	R1 D5	188	pro	Immob Fc 2
00000				
4000				
A B C D E F				
Help Menu			< Back Nex	t > Close

- 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。

#### 运行缓冲液及样品配置

• 配置运行缓冲液和溶剂校正曲线

小分子样品的运行缓冲液选用含 5%DMSO 的 1×PBS-P+(视样品溶解性可调整 DMSO 含量,最高不 超过 10%)

取 105 mL 10×PBS-P+ 用去离子水稀释到 1L, 配成 1.05×PBS-P+。并按照下表, 加入 DMSO, 配置 5%DMSO 运行缓冲液和 4.5%、5.8% 溶剂校正母液 (running buffer 中 DMSO 浓度并非绝对 5%, 可 视小分子样品溶解度情况而定, 0-10% 均可。若 running buffer 中 DMSO 浓度变化,则溶剂校正母 液也相应变化,只要 cover running buffer 中 DMSO 浓度即可)。将系统左侧托盘中的原运行缓冲液 换成含 5%DMSO 的 1×PBS-P+, 并插入相应的进液管。

	4.5% DMSO	5.8% DMSO	5.0% DMSO running buffer
1.05 x PBS-P+	9.5ml	9.5ml	950 ml
100% DMSO	0.45ml	0.58 ml	50ml
Final volume	~ 10 ml	~ 10 ml	1000

按照下表混合 4.5% 和 5.8% 母液配置 5%DMSO 浓度校正曲线 (DMSO 标准液的数量并非一定要 8 个, 通常 4-8 个均可。总体积也并非一定要 1.4ml,这些均可根据实际情况自行调整)

Buffer/Vial	1	2	3	4	5	6	7	8
4.5% DMSO	0	200	400	600	800	1000	1200	1400
5.8% DMSO	1400	1200	1000	800	600	400	200	0

• 小分子样品准备

用不含 DMSO 的 1.05×PBS-P+ 缓冲液稀释 20 mM 小分子母液 20 倍,得到 1 mM 含 5%DMSO 的 1×PBS-P+ 中的小分子 400 μL,再用配好的含 5% DMSO 的 Running Buffer 将分析物向下三倍稀释 10 个浓度梯度 (各 200 μL),分别是 1000 μM, 333.3 μM, 111.1 μM, 37 μM, 12.3 μM, 4.1 μM, 1.37 μM, 0.46 μM, 0.15 μM, 0.05 μM。间隔设置一个重复浓度,增加一个 0 浓度。

#### 多循环动力学检测

- 点击控制软件 File 下面的 Open/New Method, 然后双击打开 Biacore Methods, 再双击 LMW kinetics。
- 在 General Settings 界面,将 Concentration unit 改为 μM, Detection 改为 Dual,若 flow cell 2,3,4 都 偶联了蛋白,Detection 下面可以选 Multi,后面对应的第 5 步可选 2-1,3-1,4-1,其他不做修改。

Method Builder - Ma	in			×
Overview	At start			
General Settings	Data collection rate	Detection Dual V	Sample compartment temperature           25         Vary with analysis temperature	
Cycle Types				
Variable Settings	Miscellaneous settings Concentration unit	Buffer settings		
Verification	μM ~	Position	Name	
		B		
Seture Dure		D		
Setup Hun				
	After run			
	Specify analysis te	emperature after run:		
Help	Save Save As.	- 4 m		Close

- 在 Assay Steps 界面,可以调整检测项目和重复次数。Startup 和 sample 的重复次数通常分别为 3 和 1, solvent correction 通常检测开始时一次,结束时一次,每隔 30cycle 一次。检测温度默认 25 度,也 可根据需要进行修改等。如无 control sample,可在此页面选择 control sample 后,点击左侧 Delete 按钮,将其删除。
- 在 Cycle Types 界 面,选择 LMW kinetics,点击下方 Sample1,将 Contact time改为 60s, Dissociation time 改为 120s。其他项无需修改。Extra wash 用 50%DMSO 清除管路中残留的小分子 (extra wash 不流经芯片表面,不会影响配体活性)。

Distant	Cycle types		Description of select	cted cycle type
	Solvent correction	🕂 New	This cycle is used	in startup, sample and control sample steps.
eral Settings	LMW kinetics	X Delete	An example of san	ns of sample and carry-over control (running burier). tple concentration series, suitable for assay development, i
say Steps		( Control	given in the Samp	le table.
		Сору		
cle Types >		🖃 Renam	ne	
ble Settings				
	Commands Report Points			
emication	Capture ~	Settings for Sample 1		
		Type: High perfor	mance V	Method Variables Evaluation Variables
	Pinsert Remove	Sample solution: Is variable		Set property as variable
etup Run	Sample 1	120		Sample solution
	Cany-over control 1	Contact time: 120 (s)		Contact time (s)
	A	Dissociation time: 120 (s)		Dissociation time (s)     Row rate (µ/min)
		Flow rate: 30 (u)	min)	Extra wash solution
		Bow path: Both	~	
		Predip		
		Mix with:		
		Fraction: 0 (%)	of mix solution	
		Stabilization perior	d after mix: 0 (s)	
		<ul> <li>Extra wash after injection with</li> </ul>	h: 50 % DMSO	
		Stabilization period:	0 (s)	

• 点击 Verification,如果方法有问题,在此页面会报错,并根据报错提示返回相应步骤进行修改。如 果无问题,点击 setup Run。在 detection 界面将 Flow path 点为 2-1 或 4-3(具体视蛋白偶联的通道 而定)。

🔤 Method Builder - D	etection		×
Detection			
Flow path: 2-1	~		
Help	< Back	Next >	Close

点击 next, 进入分析物信息填写。Startup中 Sample solution填写 PBS-P+, Sample 中 Sample solution填写样品名称, Conc填写分析物系列浓度(由低到高、三倍稀释)。注意要设置重复浓度和零浓度。推荐浓度如下:

LMW	/ sop - Variables		
Assay s	steps		
Startu	ip Ia		
Samp	lie		
Variable	e values for Assay Step	p Sample	
_	S	ample 1	
	Sample solution	Conc (µM)	MW (Da)
1	LMW	0.05	
2	LMW	0.05	
3	LMW	0.15	
4	LMW	0.46	
5	LMW	1.37	
6	LMW	4.1	
7	LMW	12.3	
8	LMW	37	
9	LMW	111.1	
10	LMW	333.3	
11	LMW	1000	
12	LMW	0	
13	LMW	111.1	
*			
Hel	p Import		

• 点击 3 次 Next, 进入 Rack Positions 界面,将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1(若需 要用 96/384 孔板,则选择 Reagent Rack1 或 2,同时在下方 96 well microplate 中选择对应的孔板类型)。 点开 Menu 后选 Automatic Positioning 进入下面界面后,Vial Size 根据需求进行调整,1.5 mL EP 管 请选择 medium,pooling 选择 Yes(相同的样品会自动合并),点击 OK。点击左下方 Eject Rack, 取出样品架。根据图示样品位置进行放置,放入样品体积略大于显示体积即可。注:所有 EP 管的 盖子务必剪去。盖好橡胶盖防止挥发,并按指定位置放置。盖上试管架盖子,将样品架送回样品舱。 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。



## 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,可加入再生步骤。
- 点击 solvent correction 进行溶剂校正分析。溶剂校正曲线一般要求落在 -500 到 +1000RU,两条竖 线落在矫正曲线范围内,拟合的 Chi2 小于 2。如果超出此范围较多,多由于 DMSO 浓度配置不准 确造成。最后,点击 OK。

## ⑦ Biacore T200 Evaluation Software 3.1 [Pro-LMW.bir] File View Evaluation Tools Window Help

📔 📕 😓 🐼 Solvent Correction) 🖂 Sensorgram 🗟 Plot 🔹 🗟 Bar Chart 🐼 Kinetics / Affinity 🖉 Concentration Analysis 🛛 🛃 Thermodynamics 🛛 📓 Immunogenicity 🔹 🐼 Screening 📼



• 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。 Curve 选择 FC=2-1corr (或 FC=4-3corr)。



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,所以本实验也可用 kinetic 拟合),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,小分子 LMW 与该蛋白 pro 的亲和力 KD=1.427x10-4 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

#### 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。

CY00000-00Mar00-BR

