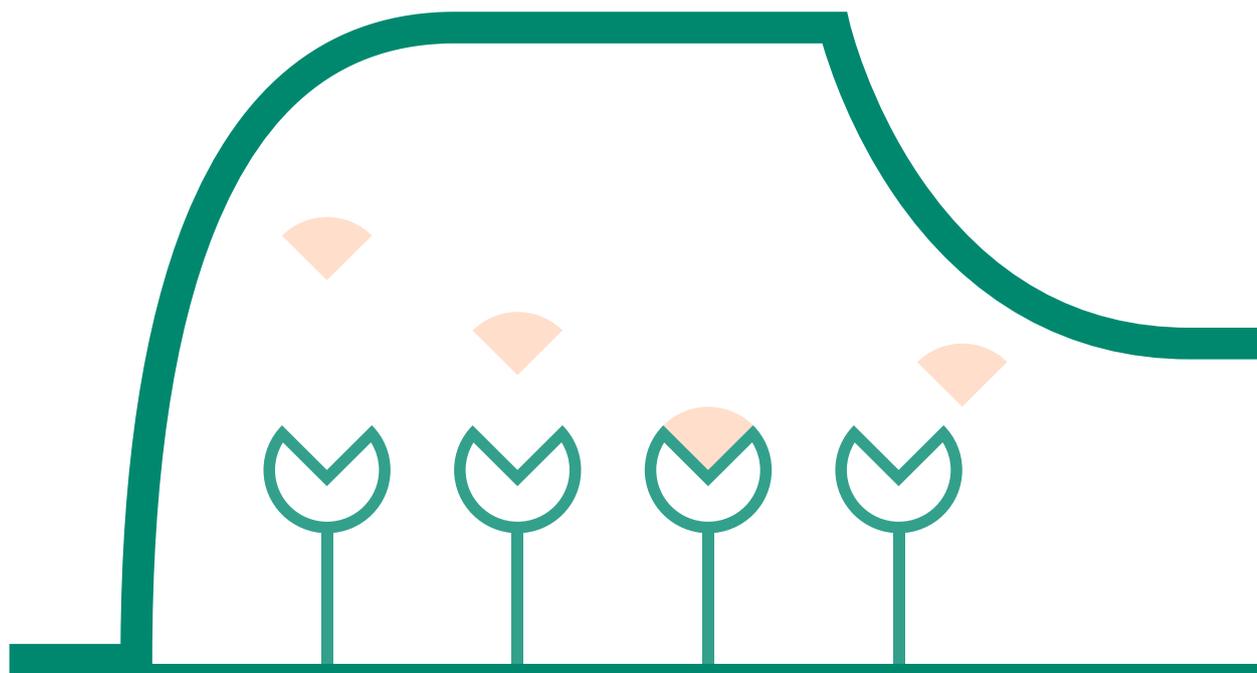


Easy Biacore:

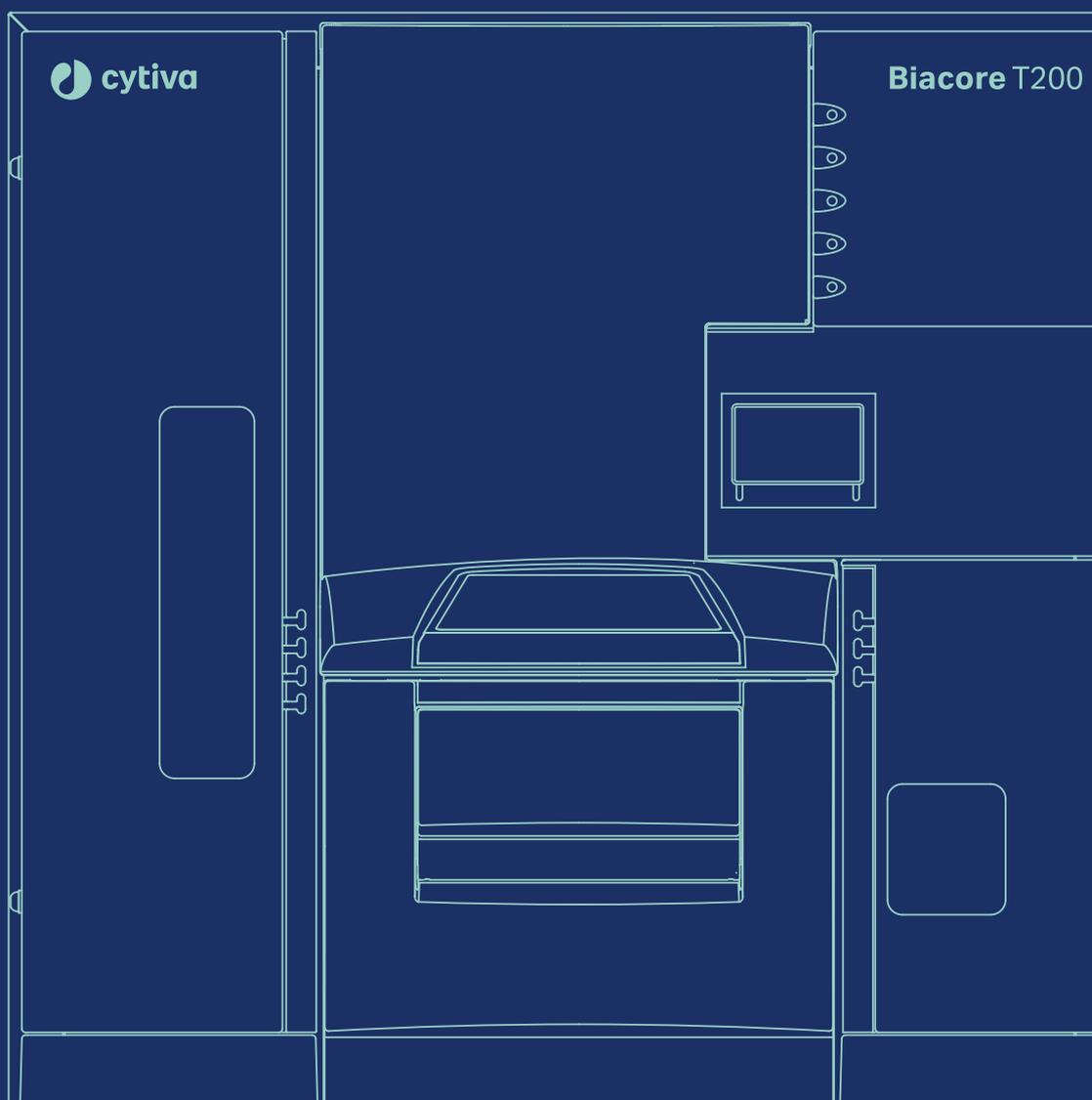
利用Biacore T200检测蛋白与蛋白结合 ——单循环动力学方式

(适用于样品量少，且再生条件未知时选用)



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°C 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)。
- 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。

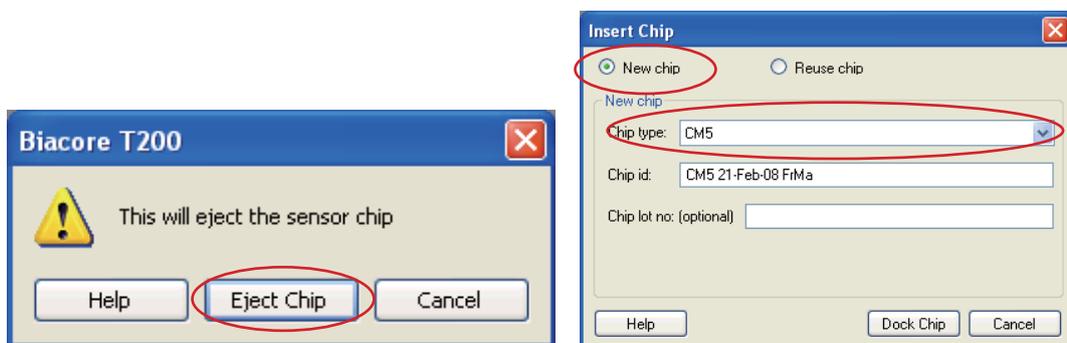


扫描二维码选择含上述所有耗材的套餐

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。



- 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。

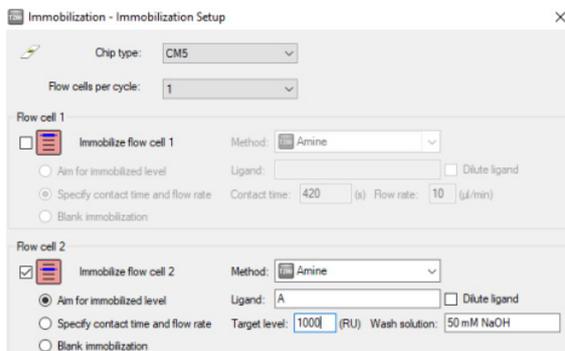


蛋白 A 偶联

- 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



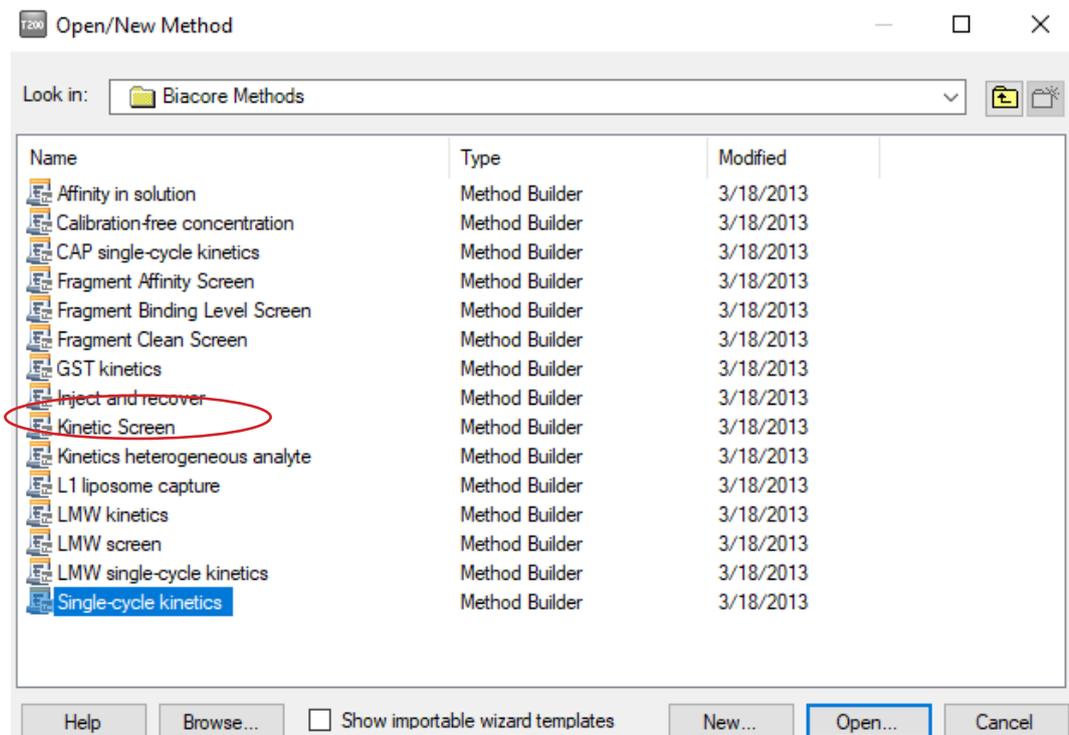
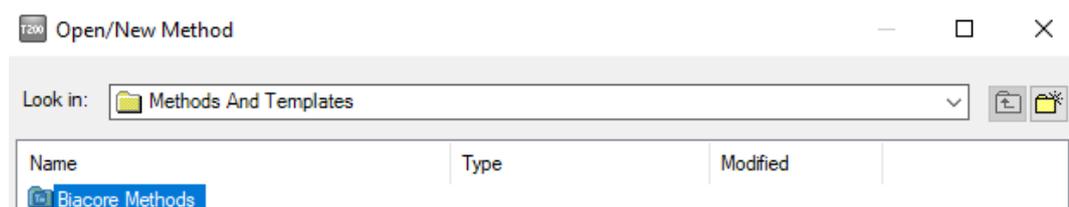
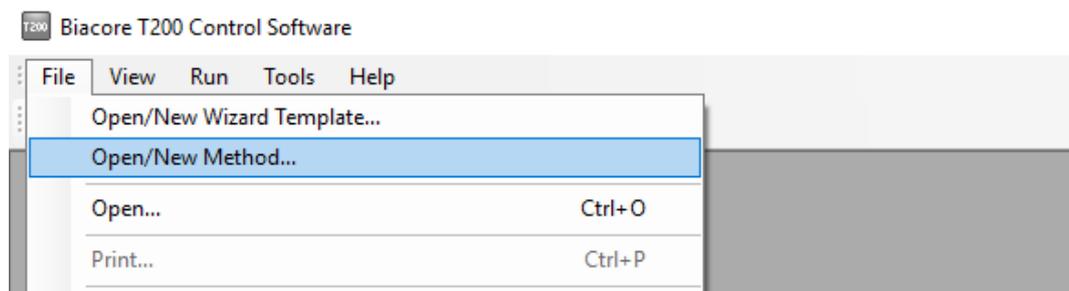
- 将 Reagent Rack 改为 Reagent Rack1，点开左下方 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。根据下图中样品名称及体积 (大于该指定体积即可) 进行样品准备。配体蛋白用 pH4.0 的醋酸钠溶液稀释至对应浓度 (参考表一)。点击左下方 Eject Rack，取出样品架，将准备好的样品放到对应位置。盖上试管架盖子，将样品架送回样品舱。(注：所有 EP 管的盖子务必剪去)。

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

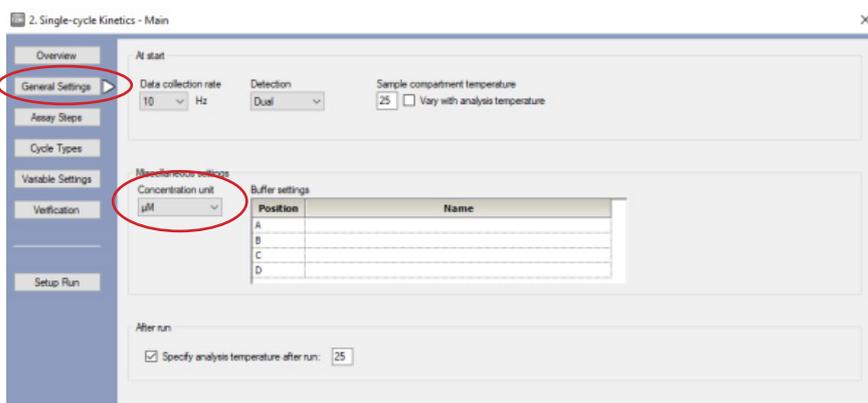
- 点击 Next，点击 start，保存 method 与 result 文件。系统将自动在芯片表面包被目标偶联量的配体蛋白，并自动生成偶联报告。
- 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

单循环动力学检测

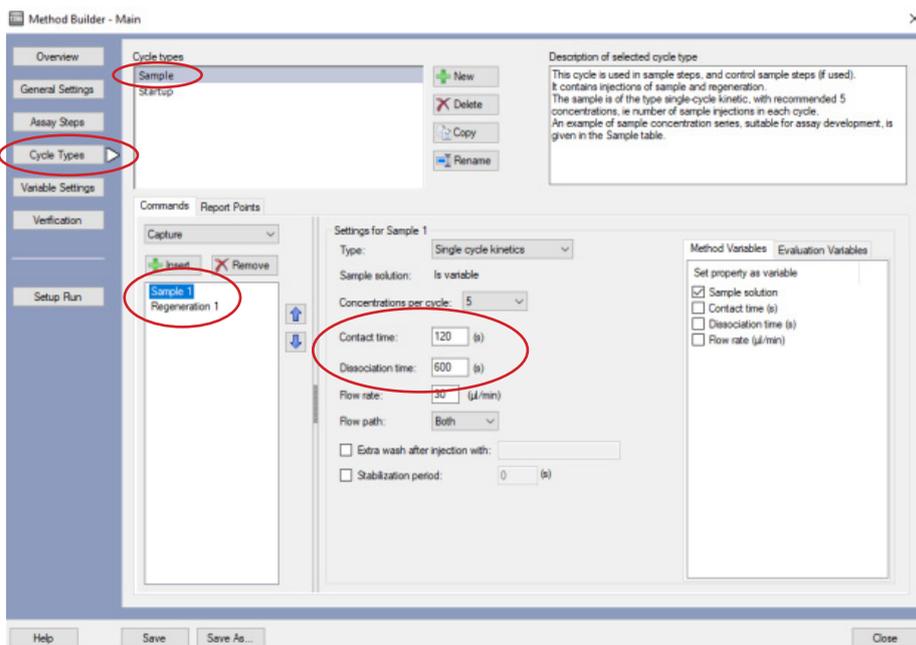
- 点击控制软件 File 中的 Open/New Method，然后双击打开 Biacore Methods，双击 Single-cycle kinetics。



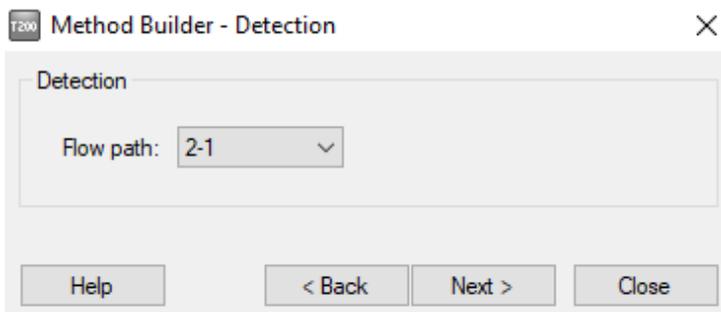
- 在 General Settings 界面，可以修改分析物浓度单位、样品仓温度、数据采集频率等条件。若 flow cell 2,3,4 都偶联了蛋白，Detection 下面可以选 Multi，后面对应的第 4 步可选 2-1,3-1,4-1。



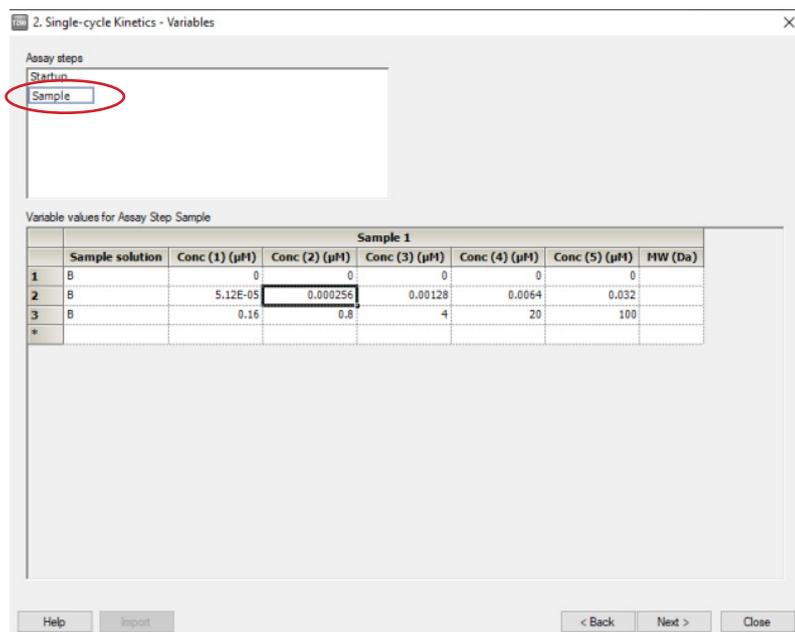
- 在 Cycle Types 界面下，左上方选择 sample，然后在下方 commands 中选择 Sample1，Contact time 为 120s，Dissociation time 为 600s。选择 commands 中的 Regeneration1，右侧 Regeneration solution 改为 Glycine1.5。再点击左上方的 Startup，对应的下方的内容与 sample 完全一致。



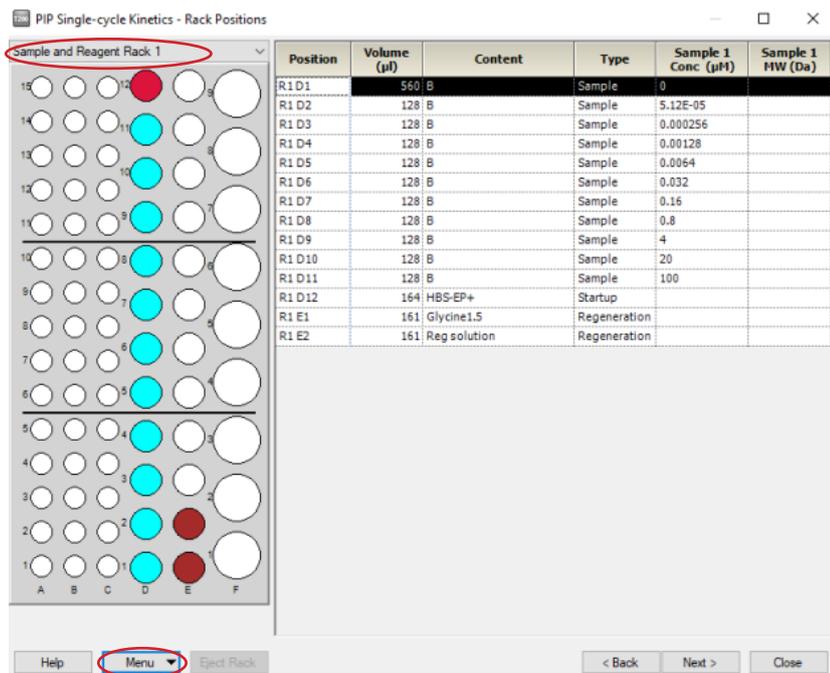
- 点击 Verification，如果方法有问题在这个页面会报错，并根据报错提示返回相应步骤进行修改。如果没问题，点击 setup Run。在 detection 界面选择要使用的 Flow path，这里选用 2-1（如果蛋白偶联在 flow cell 4，则选 4-3）。



- 点击 next。Startup 填写 HBS-EP+ 即可，选择 Sample，在 sample solution 中填写样品名称 B，Conc 填写分析物系列浓度（由低到高、五倍稀释）。推荐浓度如下：

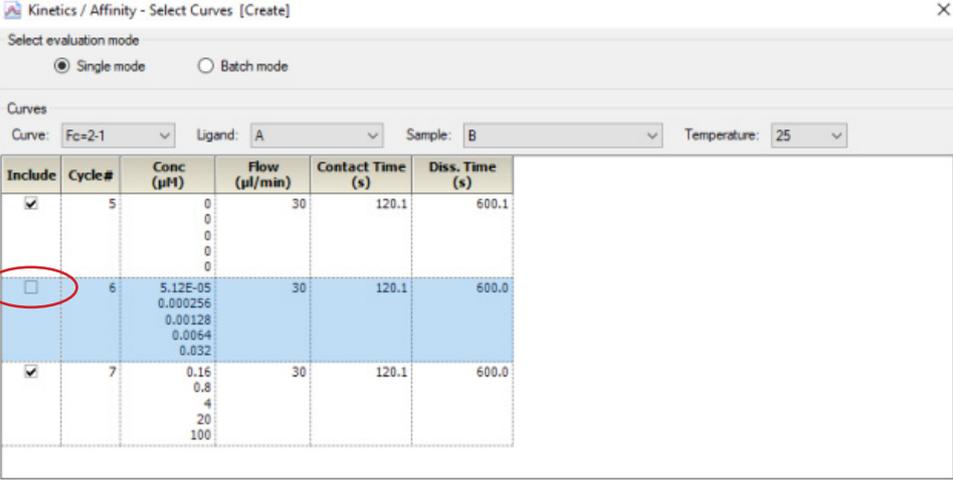


- 点击 3 次 Next 进入 Rack Positions 界面，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1（若需要用 96/384 孔板，则选择 Reagent Rack1 或 2，同时在下方的 96 well microplate 中选择对应的孔板类型）。点开左下方 Menu 后选 Automatic Positioning 进入下面界面后，Vial Size 根据需求进行调整，1.5 mL EP 管请选择 medium，pooling 选择 Yes（相同的样品会自动合并），点击 OK。根据下图样品名称及体积（大于该指定体积即可）进行样品准备。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。



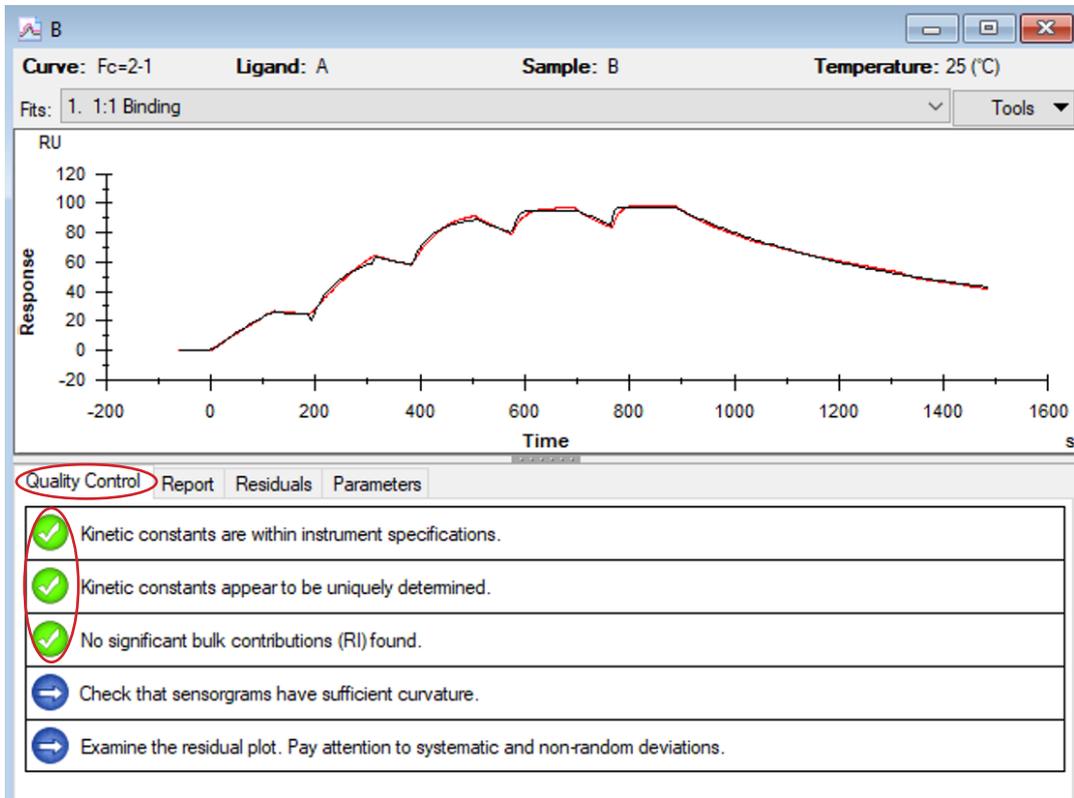
结果分析

- 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, 检查各个点是否小于 binding level 中对应响应值的 20%。如是, 直接跳到下一步。
注: 若 Binding to reference 各个点的响应值大于 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%, 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。
- 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, 选择低浓度组; 如果最高浓度响应值小于 100 RU, 选择高浓度组。介于两者中间, 随意选一组浓度进行分析。不需要的浓度组, 可在样品浓度表格中将此浓度组前的对号去掉即可。



Include	Cycle#	Conc (µM)	Flow (µl/min)	Contact Time (s)	Diss. Time (s)
<input checked="" type="checkbox"/>	5	0 0 0 0 0	30	120.1	600.1
<input type="checkbox"/>	6	5.12E-05 0.000256 0.00128 0.0064 0.032	30	120.1	600.0
<input checked="" type="checkbox"/>	7	0.16 0.8 4 20 100	30	120.1	600.0

- 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 KD 等。以本实验为例, 动力学数据: $K_a = 1.333 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_d = 0.001343 \text{ s}^{-1}$, 亲和力: $KD = 1.008 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。
- 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。



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)	Chi
	1.333E+4	0.001343	1.008E-7	89.89		4.079E+16				
Cycle: 7					1.600E-7		30.00	1.267E+17	3.873	
					8.000E-7				-0.7967	
					4.000E-6				-4.521	
					2.000E-5				2.457	
					1.000E-4				4.197	

如有问题，请拨打免费技术热线
 请拨 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。

CY19803-11Mar21-HB

