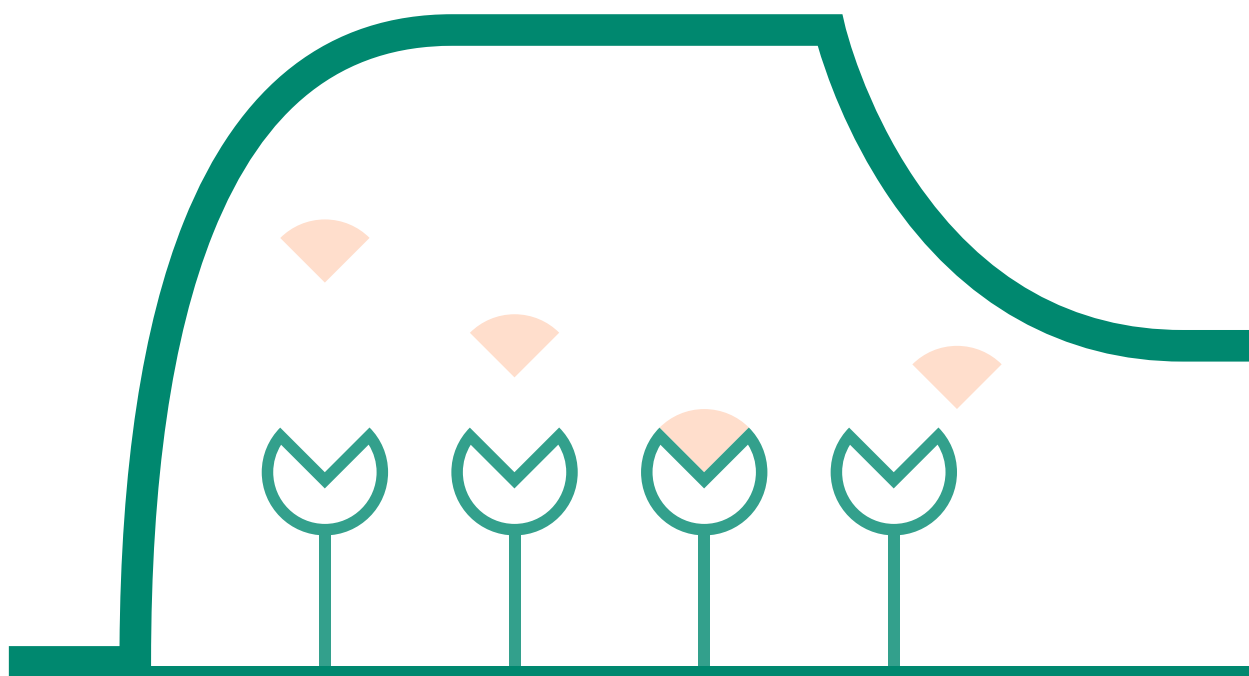


Biacore™ 1K 检测蛋白与蛋白 相互作用操作指南



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) 配体偶联	6
(三) 样品检测过程	10
(四) 实验结果分析	12

一、实验目的

利用 Biacore™ 1K 的设备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 S 系列 CM5 芯片直接偶联蛋白 A, 蛋白 B 作为分析物检测亲和力与动力学常数。若要检测多个蛋白与不同蛋白的互作, 可根据配体蛋白 A 所带的 tag, 选择偶联相应的捕获分子如标签抗体等, 通过捕获法来进行检测。本指南所用蛋白 A 分子量为 24kD, 蛋白 B 分子量为 21kD。

二、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、目的适当调整各项实验参数。

三、实验使用机型、试剂和耗材

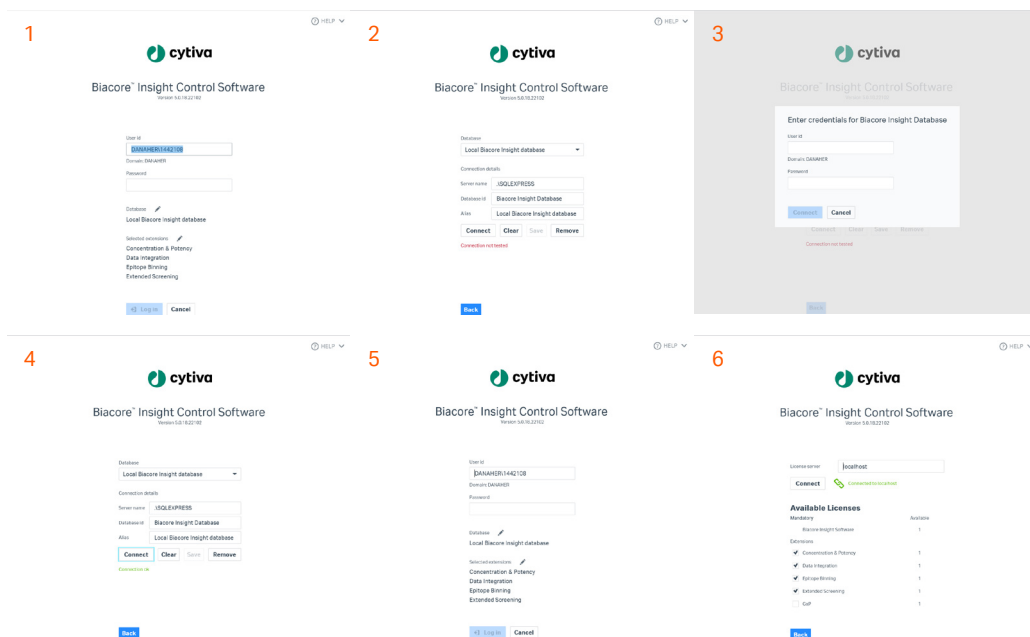
- 本实验所用的机型: Biacore 1K, 若为其他机型, 请按照对应机型的操作说明进行调整, 或咨询 Biacore 产品专家。
- S 系列 CM5 芯片。S 系列 CM5 芯片货号: 29-1049-88(一片装), BR-1005-30(三片装), 29-1496-03(十片装)。厂家为 Cytiva。
- 氨基偶联试剂盒 (货号: BR-1000-50), 厂家为 Cytiva。
- 偶联缓冲液: 10mM 醋酸钠 pH4.0(货号: BR-1003-49), 10mM 醋酸钠 pH4.5(货号: BR-1003-50), 10mM 醋酸钠 pH5.0(货号: BR-1003-51), 10mM 醋酸钠 pH5.5(货号: BR-1003-52), 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), 厂家为 Cytiva。
- 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)。
- 96 孔微孔板 (250 μ l)(货号: BR100503), 厂家为 Cytiva。
- 配体蛋白 A: 尽量现制现用或现买现用, 如果为商业化蛋白粉末, 用缓冲液稀释到 ≥ 1 mg/ml, 并分装后 -20°C 保存。
- 流动相蛋白 B: 母液浓度尽量 ≥ 10 μ M, 样品体积在 200 μ l 以上, 纯度 $>80\%$ 。

四、实验步骤

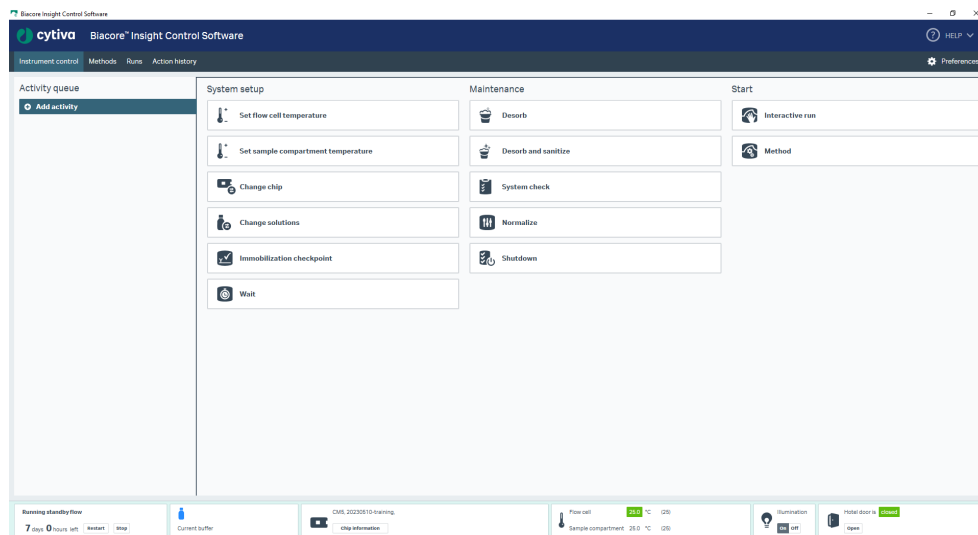
(一) 仪器准备

1. 开机操作

- 打开 Biacore 1K 系统和电脑的电源开关。Biacore 1K 的电源开关位于系统背面的左下角。开机自检通过后, 即可操作。
- 打开 Biacore 1K 控制软件, 先点击 Database 后的 , 再点击 Connect, 输入用户名和密码 (与电脑登录的用户名和密码一致), 点击 Connect, 确保 database 已经连接, 点击 close, 回到登录主界面, 点击 Selected extensions 后的 , 再点击 Connect, 勾选下面的 extension module, 点击 close, 回到登录主界面, 最后再输入密码, 点击 Log in, 运行后软件程序会自动和主机系统建立连接, 显示控制软件主界面。



Biacore 1K Control Software 登录界面



Biacore 1K control software 操作主界面

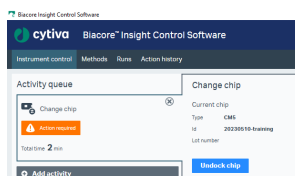
- 准备运行缓冲液。量取 50 mL 10 x HBS-EP+buffer、450 mL 去离子水 (已经 0.22 μm 膜过滤)，混匀后放入 500 mL 缓冲液瓶，取出 30-50 mL 1x 缓冲液于 50 mL 离心管中备用。
- 设备开机后，即可使用，无需等待。

2. 缓冲液的放置

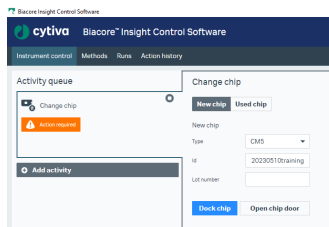
- 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore 1K 系统右侧的桌面上，并将标记 buffer 的进液管 A 插入至缓冲液瓶底部。
- 取 1 L 去离子水装入 1 L 缓冲液瓶，同样放置在右侧桌面上，并将标注有 Water 的进液管插入至纯水瓶底部，用于清洗进样针。
- 确认废液瓶内已清空废液。

3. 芯片的放置

- 点击控制软件主界面第一列的  Change chip，再点击 **Undock chip**，稍等 1 分钟，自动打开芯片舱门。



- 如果使用的是新芯片，选择 New chip。在 Type 的下拉菜单中选择对应的芯片种类，在 Id 中填入和芯片相关的实验信息，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 Used chip，直接选择芯片信息。



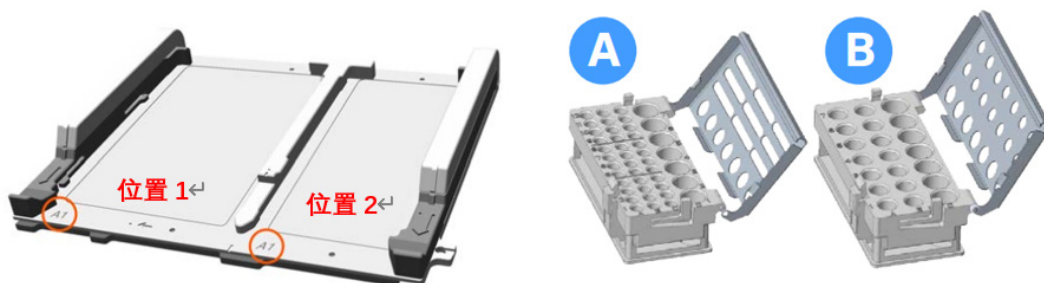
- 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，将芯片轻轻推入卡槽，最后合上芯片舱的舱门。



- 点击 Dock Chip 按钮，芯片置入后，系统将自动转入待机 (Standby) 状态。
- 点击控制软件主界面第一列的  Change solutions 命令，点击 Ready to 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，系统自动转入待机 (Standby) 状态。注意：当系统更换缓冲液后，必须运行 Change solutions 程序。Change solutions 时，缓冲液会冲洗整个流路系统，为下一步的实验做好准备。

4. 放置样品盘

- 点击控制软件主界面右下方  Hotel door is **close** 的 open 按钮，样品舱舱门会自动打开，此时主界面右下方显示变为  Hotel door is **open**，注意 open 和 close 的颜色变化。也可以直接按机器样品仓下方的按钮，弹开样品仓门。
- 如下图所示，Biacore 1K 样品舱可同时放置微孔板（位置 1：96/384 孔板）和样品架（位置 2），Biacore 1K 提供 Reagent Rack A 和 B 两种样品架。



Biacore 1K 的样品架

(二) 配体偶联

1. 偶联量计算

根据以下公式可计算目标偶联量

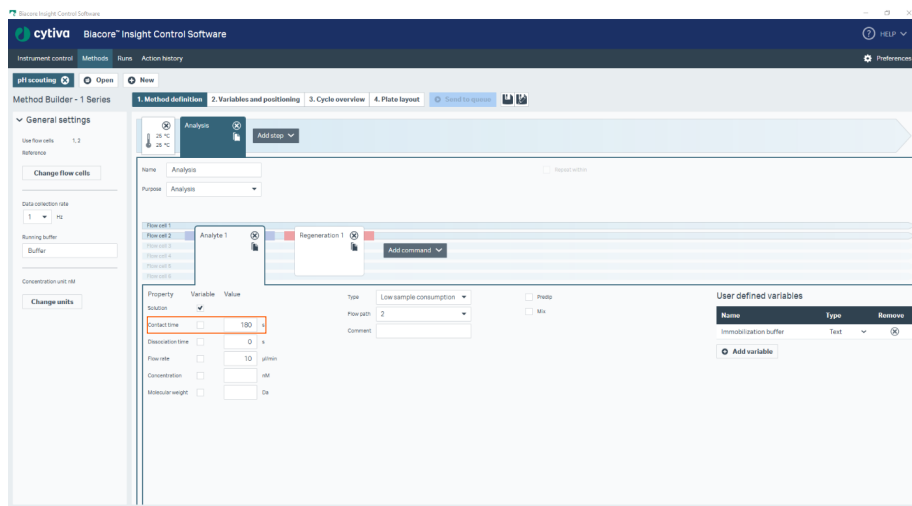
$$R_{max} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times R_L \times S_m$$

其中，R_{max} 为芯片表面最大结合容量，在蛋白测试中通常代入 100 RU。analyte MW 和 ligand MW 分别为流动相蛋白 B 和配体蛋白 A 的分子量，S_m 为化学计量比，未知时默认为 1，R_L 为配体偶联量。实验时，实际偶联量为 3-5 倍的 R_L。以本实验为例，蛋白 A 分子量为 24kD，蛋白 B 分子量为 21kD，则 R_L 为 114RU，蛋白 A 的目标偶联量为 300-600 RU。

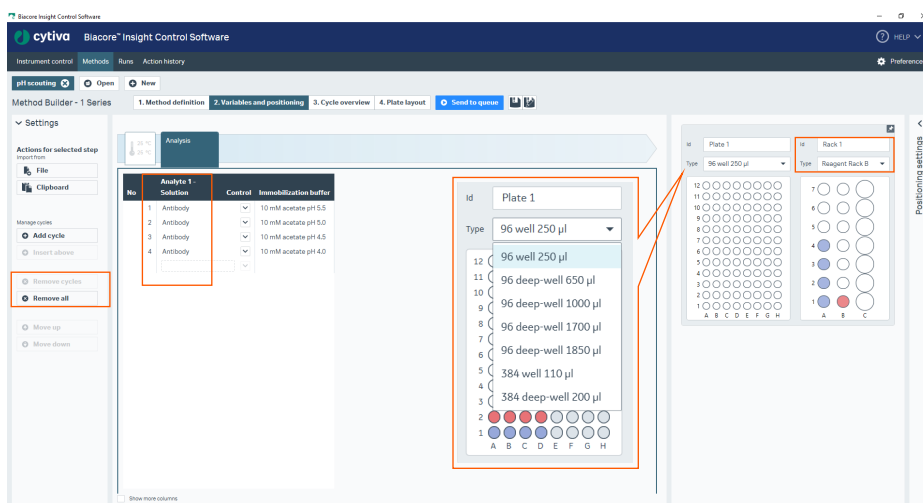
注：本实验选用了偶联蛋白 A 流过蛋白 B，客户也可以选择偶联蛋白 B 流过蛋白 A，多数情况下均可。部分情况下只能选用一种实验设计方式，如蛋白等电点过低等情况。

2. 配体偶联预富集条件摸索

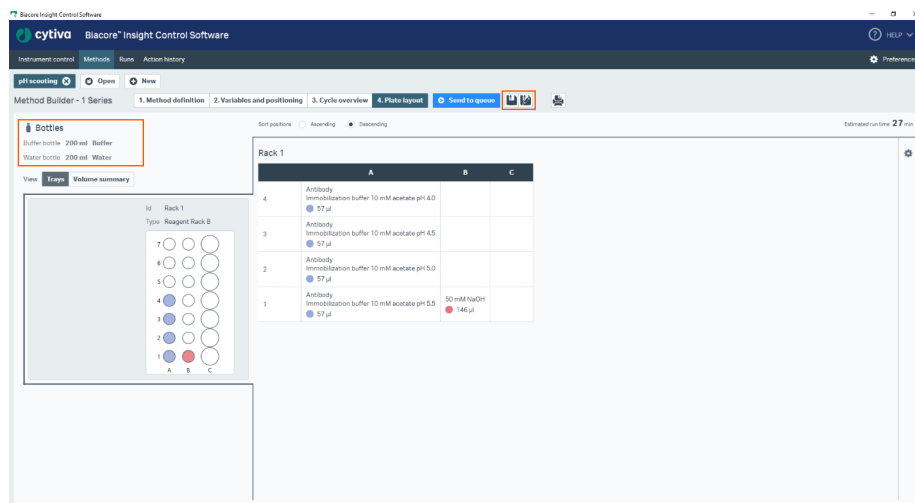
- 蛋白 A 用 pH5.5, 5.0, 4.5, 4.0 的醋酸钠分别稀释至 10 µg/ml(至少 20 倍稀释比，若偶联量大于 5000RU，可提高浓度到 20 µg/ml 以上)，各 100 µl 备用。
- 点击 Biacore 1K Control Software 中的 Methods，点击 New，点击 Surface preparation，选择 pH scouting，点击右下角 open 按钮，进入编辑界面。此界面可将样品的 contact time 修改为 120s 或不做修改 180s(默认)。



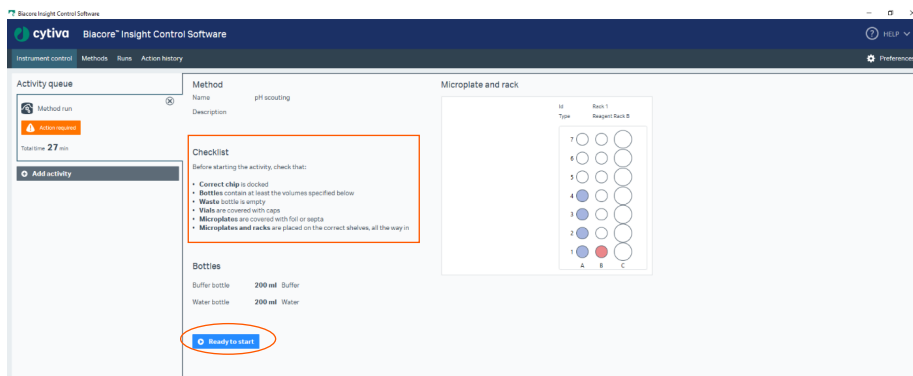
- 点击上方 **2. Variables and positioning** 按钮，编辑样品名称与位置。在 Analyte1 solution 处，修改样品名称，本练习将样品名称改为 Antibody。若仅检测一个分子的静电吸附能力，可将 5-8 默认的 Ligand 2 删除，选中需要删除的 Cycle，通过界面左侧 Remove cycles 即可删除。在右侧，可以通过下拉菜单选择使用的微孔板或者样品架，本练习选择使用 Reagent Rack B，通过鼠标左键选择并长按的方式，拖拽样品至合适的孔板位置。



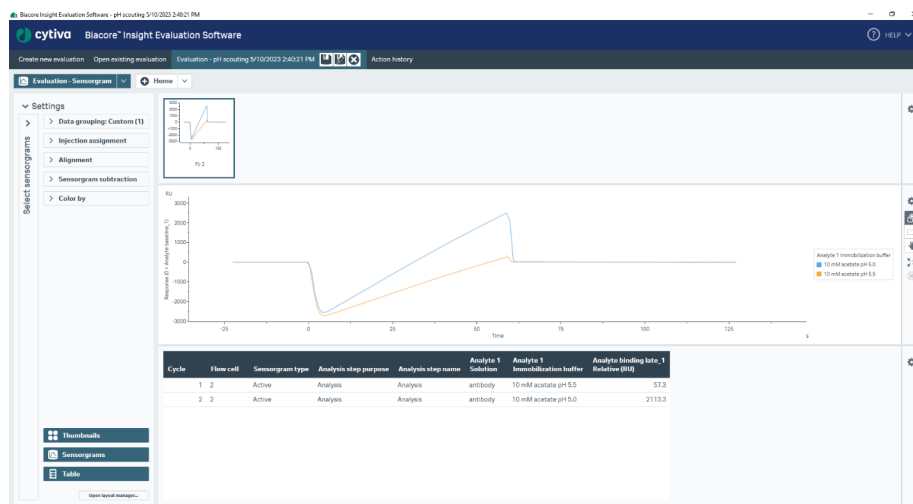
- 在 3.Cycle overview 界面中，检测各项是否填写错误或漏填，若漏填，系统会在相应位置红色提醒。
- 点击上方 **4. Plate layout** 按钮，系统会跳转新的窗口，检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够，再按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品，并放入对应的位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。以下图为例，57µl 的分别稀释在 pH5.5、5.0、4.5、4.0 醋酸钠中的 Antibody，分别放在 Reagent Rack B 的 A1、A2、A3、A4，146µl 的氢氧化钠 (50mM sodium hydroxide) 放入 Reagent Rack B 的 B1。将 Reagent Rack B 放置在样品架上，合上舱门。点击右上角的文件保存图标，将方法文件保存在自定义文件夹中，点击 Save。



- 再点击 **Send to queue**，系统会自动跳转到新的界面，确认屏幕显示各项是否放置正确，确保 tray 和 plate 位置和显示一致。然后再点击下方 **Ready to start**。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应路径。系统正式自动运行程序。（Method 及 result 文件名均需要保持英文，且字符数不宜过长）。



- 运行结束后，用 Biacore 1K evaluation Software 打开运行结果文件 (或点击 Biacore 1K Control Software 主界面上方的 Runs，找到结果文件，双击或点击右下角 Open 按钮打开。然后，选择 Run properties，点击 Open in evaluation software 界面跳转到 Biacore Insight Evaluation Software。)，选择能达到目标偶联量，并且条件最温和的醋酸钠 pH 进行后续偶联。

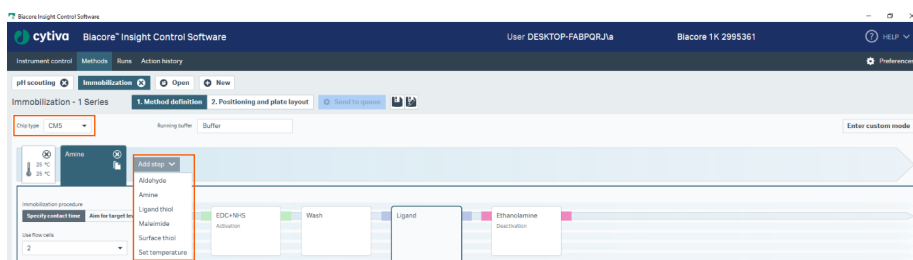


pH scouting 结果示意图

- 本实验确定 pH5.0 作为最佳偶联条件，并且响应值远高于目标偶联量。故用 pH5.0 的醋酸钠将配体溶液稀释至 10 $\mu\text{g/ml}$ ，200 μl 进行配体偶联。

3. 配体偶联

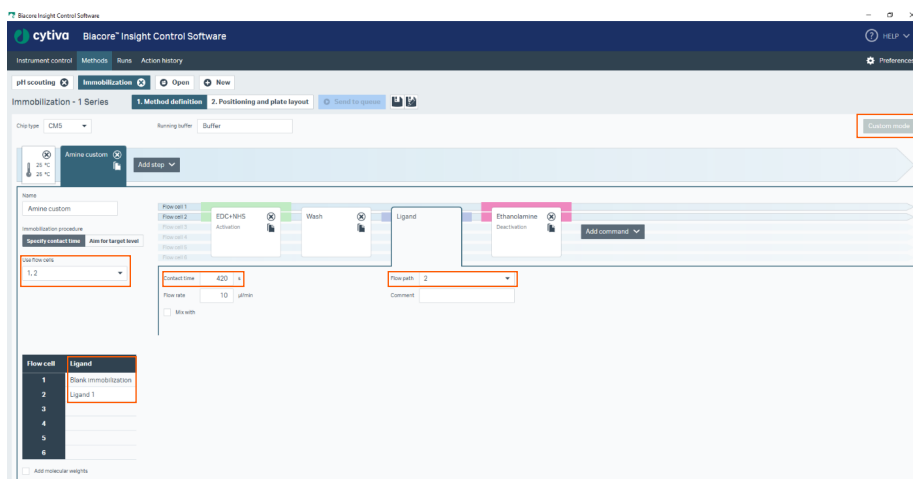
- 点击 Biacore 1K Control Software 主界面中的 Methods，点击 New，点击 Surface preparation，选择 Immobilization，点击右下角 open 按钮，进入编辑界面。在 Chip type 下拉菜单中，选择 CM5。该程序默认的偶联方式为氨基偶联 (Amine)，如要进行其他方式偶联，可下拉 Add step 选择其他的偶联方式，并删除 Amine。



- Biacore1K 提供两种偶联程序 Specify contact time 和 Aim for target level。

Specify contact time 通过设置配体进样时间，在该时间段内连续进样实现配体的高偶联，修改配体 (Ligand) 进样时间 (Contact time)，并修改配体名称 (Ligand1)，将 Use flow cells 选为 1,2，Ligand 中 Flow path 改为 2，此时在 Flow cell 1(Fc1) 只做活化、封闭，不进行配体固定 (Blank immobilization)。

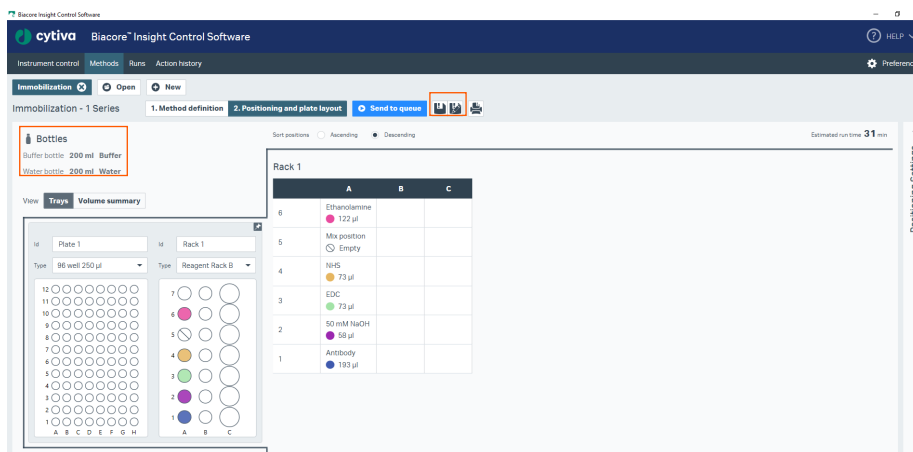
* 注：如需删除 Ethanolamine 封闭命令，以防偶联量不足，后续增加。点击右上方 Custom mode 按钮，然后在各命令右上方点击 ×，即可完成此命令删除。



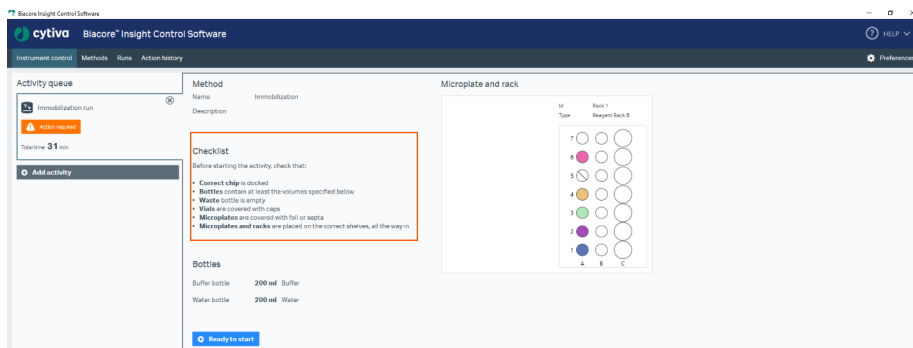
Aim for target level 采用脉冲式的进样，将配体的偶联量控制在输入的 Target Level 值。本次实验如若采用 Aim for target level 将配体固定在 Flow cell 2(Fc2) 上，目标值即设定为 600RU，修改配体名称为 Antibody，将 Ligand 中 Flow path 改为 2，此时在 Flow cell 1(Fc1) 只做活化、封闭，不进行配体固定 (Blank immobilization)。

注：可以按实际需要，更换实验通道为 Fc3-4 或者 Fc5-6；操作与 Fc1-2 一致。

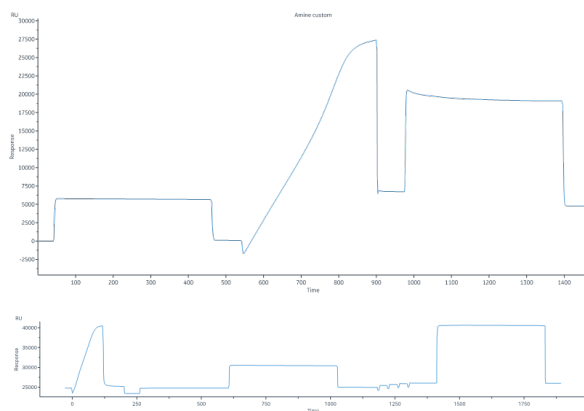
- 点击上方 **2. Positioning and plate layout**，系统会跳转新的窗口，检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够，再按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品，并放入对应位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。可以通过鼠标左键选择并长按的方式，拖拽样品至合适的孔板位置。以下图为例，73μl 的 EDC 和 NHS 分别放在 Reagent Rack B 的 A3、A4，193μl 10μg/ml Antibody(溶在 pH5.0 的醋酸钠中) 放在 A1，122μl Ethanolamine 放在 A6，氢氧化钠 (50mM sodium hydroxide) 放在 A2，A5 位置放一个空管。将 Reagent Rack B 放回样品舱，合上舱门。点击右上方的文件保存图标，将方法文件保存在自定义文件夹中，点击 Save。



- 点击 Send to queue，系统会自动跳转到新的界面，检查 Checklist 中的各项是否正确完成，整个过程运行约 31 分钟。点击下方 Ready to start。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应文件夹中。系统正式自动运行 Immobilization 程序。



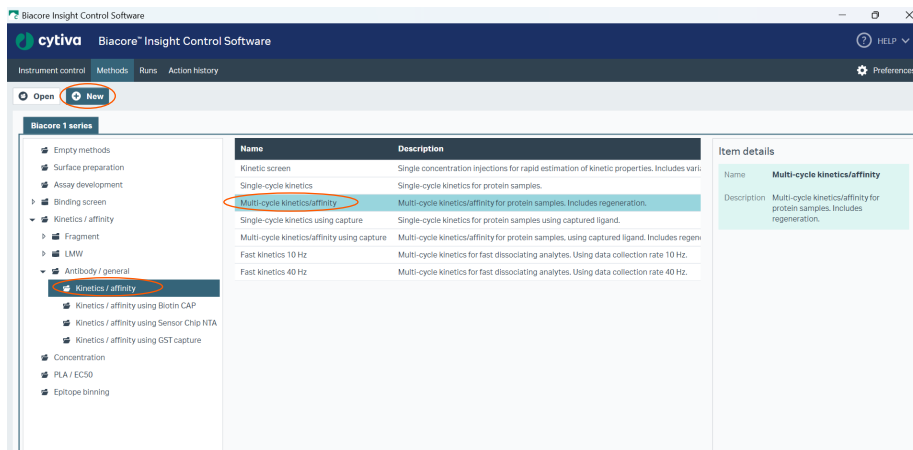
- 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果。
- 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。



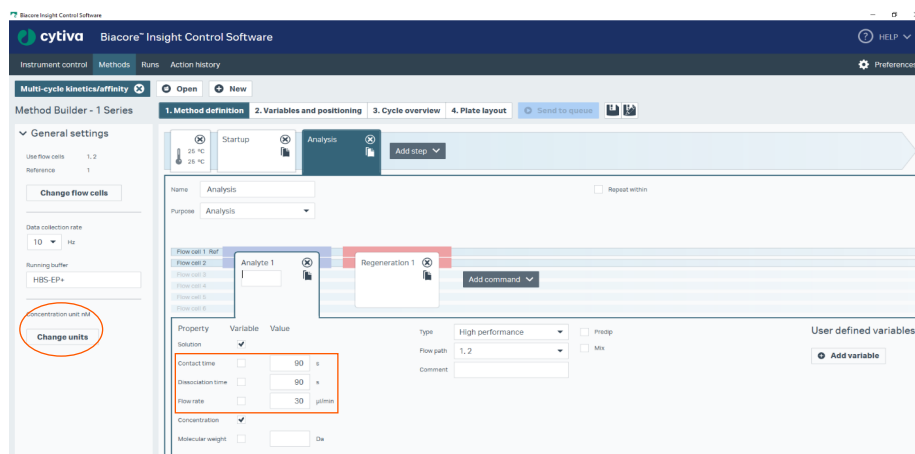
配体偶联示意图

(三) 样品检测过程

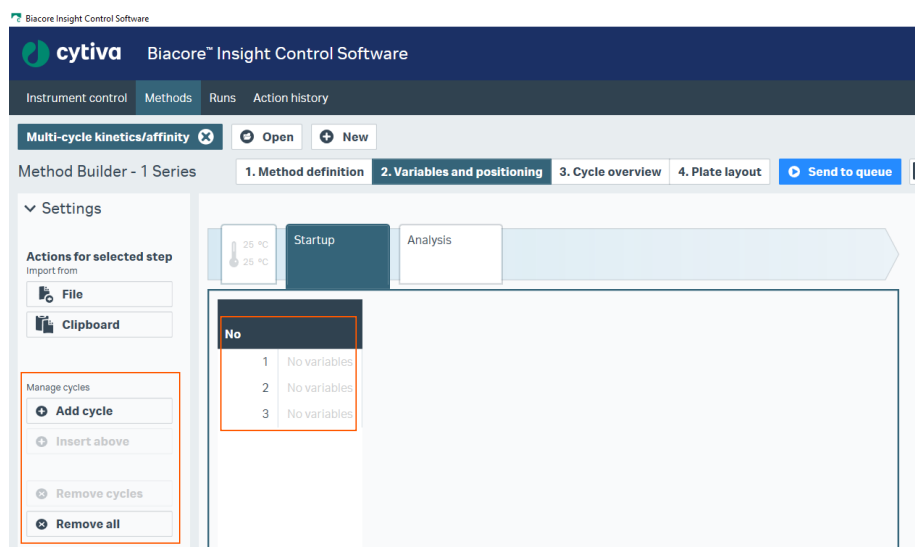
- 点击 Biacore 1K Control Software 中的 Methods，点击 New，点击 Kinetics/affinity，选择 Antibody/general 中的 Kinetics/affinity，再双击右侧 Multi-cycle kinetics/affinity。



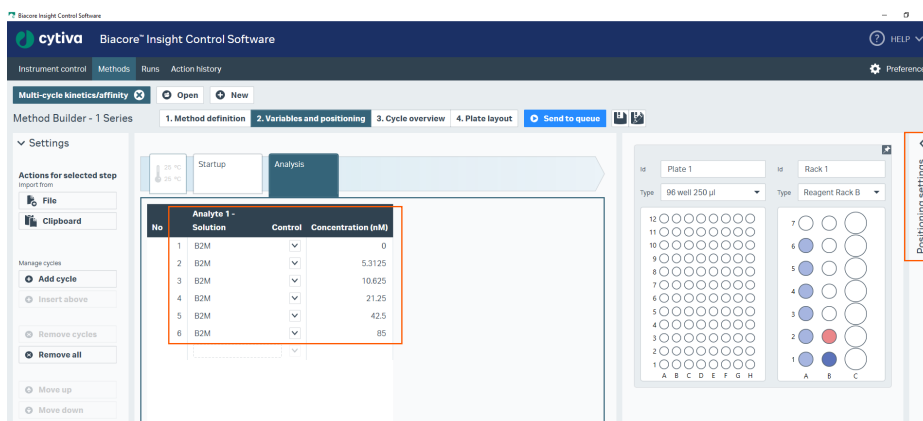
- 在 1.Method definition 界面中，通过左侧 Change units 可以修改单位，本练习浓度单位选择 nM。在 Analysis 窗口中，可以修改进样 (Contact time) 和解离时间 (Dissociation time)，本练习中进样和解离时间均设置为 90s。Flow rate 为 30 μ l/min 保持不变。在 Startup 中的各项填上与 Analysis 窗口一样的数字 (或者按照系统默认的值不变)。在 Regeneration 窗口中可以修改再生溶液为 Glycine2.5，再生时间和流速保持不变。



- 点击上方 **2. Variables and positioning**，进入新界面，点击 Startup，通过左侧 Add cycle/Remove cycles 增减 Startup 次数，建议做 3-5 次 Startup 循环，让仪器达到一个更好的稳定状态。

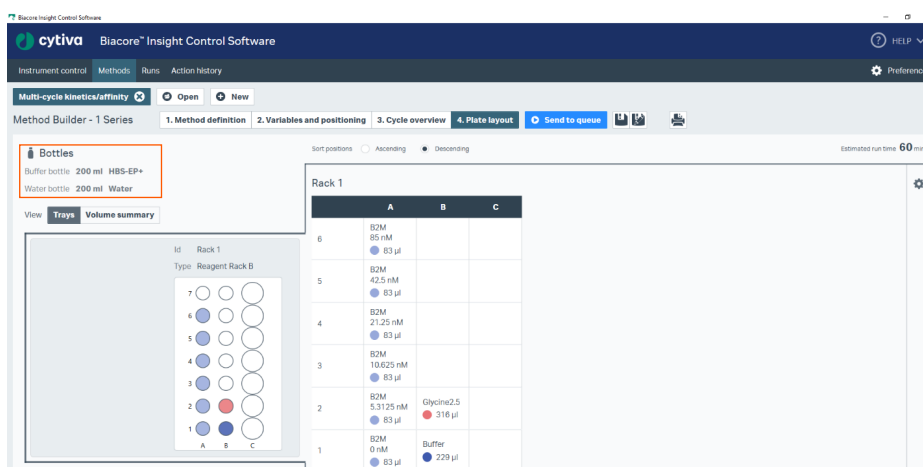


- 点击 Analysis，在 Analyte1-Solution 填写样品名称，设置样品浓度梯度，需要至少设置 5 个浓度梯度和 1 个零浓度，顺序为低浓度到高浓度进样。本练习设置 0nM，5.3125nM，10.625nM，21.25nM，42.5nM 和 85nM。点击右侧 Positioning settings 按钮，将 Pooling 选择为 Yes，相同的样品或试剂立即完成合并。并且可以通过鼠标左键选择并长按的方式，拖拽样品至合适的孔板位置。



- 点击上方 **4. Plate layout**，系统会跳转新的窗口，检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够，再按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品放入指定位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。以下图为例，83μl 0 nM（即 Running Buffer: HBS-EP+），5.3125nM，10.625nM，21.25nM，42.5nM 和 85nM 分别放在样品架的 A1-A6 位置，316μl Glycine 2.5 再生液放在 B2，229 μl Buffer（用于 Startup）放在 B1，样品放置完成后将样品架送回样品舱，合上舱门。点击右上方的文件保存图标，将方法文件保存在自定义文件夹中，点击 Save。

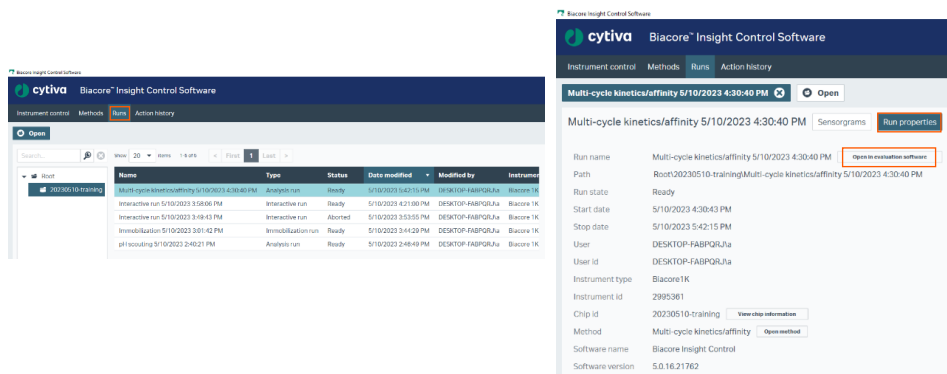
* 注意：样品均采用 Running Buffer 进行稀释。



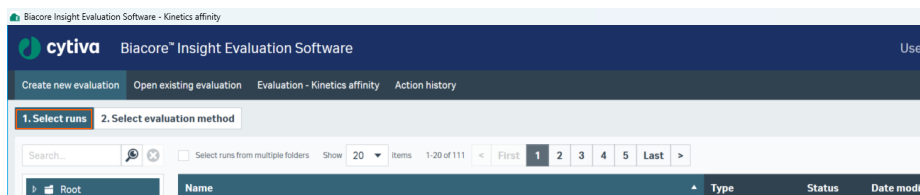
- 点击 Send to queue，系统会自动跳转到新的界面，检查 Checklist 中的各项是否正确完成。点击下方 Ready to start，在跳出的窗口中保存 result 文件到对应文件夹中。系统正式自动运行 Multi-cycle kinetics/affinity 程序。

（四）实验结果分析

- 点击 Biacore 1K Control Software 主界面上方的 Runs，找到结果文件，双击打开。然后，选择 Run properties，点击 Open in evaluation software，界面跳转到 Biacore Insight Evaluation Software。或打开数据分析软件 Biacore 1K Insight Evaluation（先点击 local database 确保 database 已经连接，再勾选下面的 extension module，最后再输入密码，同控制软件），选择 Create new evaluation（如果是以前分析好的数据，选择 open existing method，直接打开即可），点击 1. Select runs，找到结果文件，双击打开。

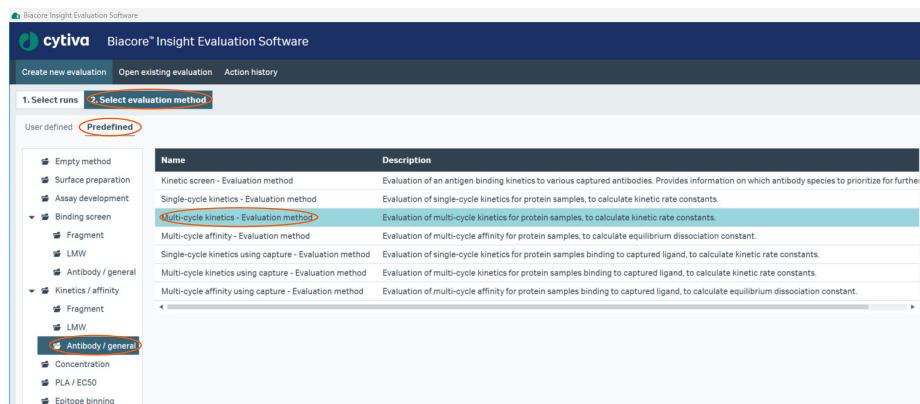


Biacore 1K Control 软件打开结果文件

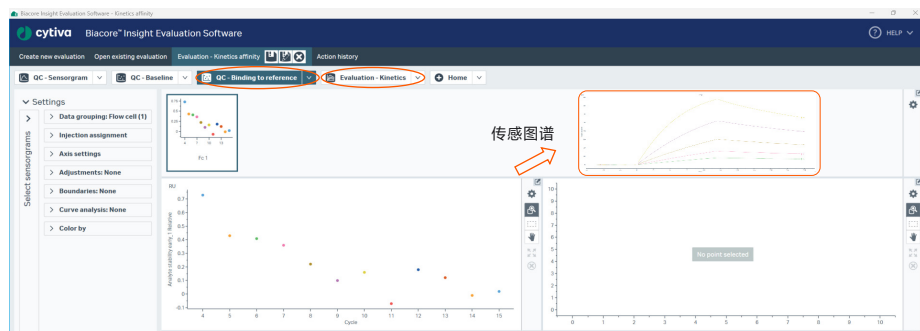


Biacore 1K Insight Evaluation 软件打开结果文件

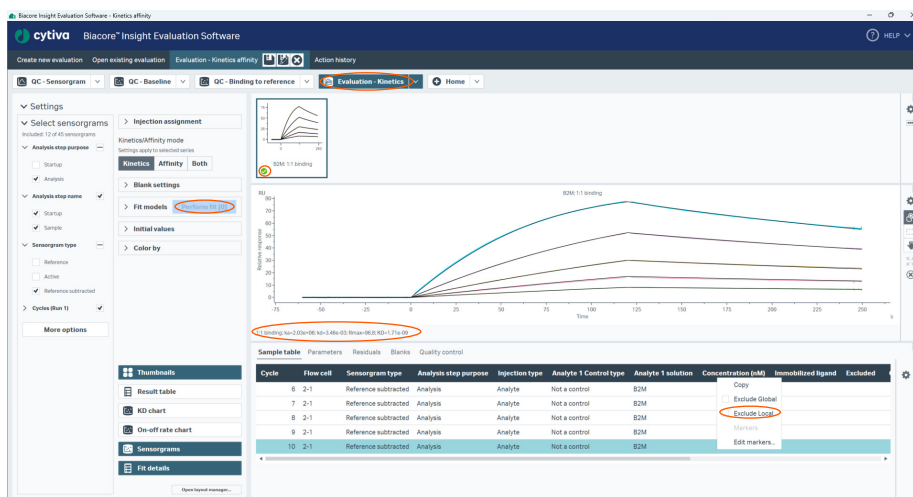
- 选择 2. Select evaluation method(若从 Control 软件跳转过来, 直接进入该页面), 点击 Predefined, 再选择 Kinetics/affinity 下方的 Antibody/general, 选择右侧具体的分析方法 Multi-cycle kinetics-Evaluation method(同实验方法对应), 双击, 分析软件自动进行拟合, 输出结果。



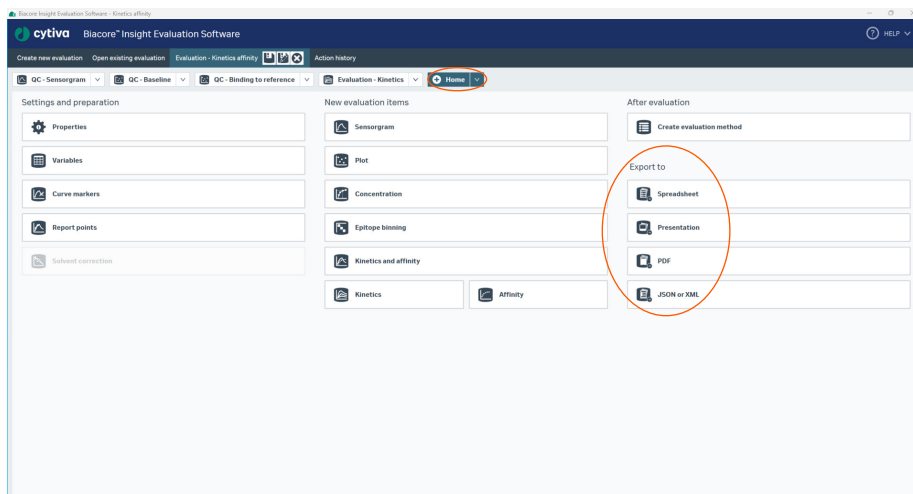
- 点击上方 QC-Binding to reference, 检查 cycles 数之间, 引起的 ΔRU 是否小于 Evaluation-kinetics 传感图中对响应值的 20%。如是, 直接跳到下一步。注: 若 Binding to reference 的 ΔRU 大于 Evaluation-kinetics 传感图中对响应值的 20%, 即存在非特异性结合。此时可尝试降低流动相样品浓度或者更改运行缓冲液环境。



- 点击 Evaluation-kinetics，自动拟合后的传感图在中间显示，亲和力 / 动力学数据在传感图下方显示，观察上方缩略图中的红绿灯系统，显示  则数据可靠（显示  数据为可接受，显示  则数据不可接受，实验需进行优化），具体情况可以在下方 Quality control 选项卡中查看。点击下方 Sample table，选择对应浓度组，右击鼠标选择 Exclude local，删除不需要的浓度组。删除数据后，需重新点击左侧 Perform fit 按钮，得到拟合数据。



- 将鼠标放在图上，点击右键可以直接 copy graph 或者 copy small/ medium/ large image 用于文章发表，也可以右键点击 export curves，导出 txt 文本后自行用第三方软件作图。或者，点击右上方 Home 按钮，根据实际需要，选择主界面右侧结果输出模式（包括 Excel，PPT，PDF，JSON 格式）。



如有问题，请拨打免费技术热线

请拨 400-810-9118



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/contact。

CY51957-20Mar25-BR

