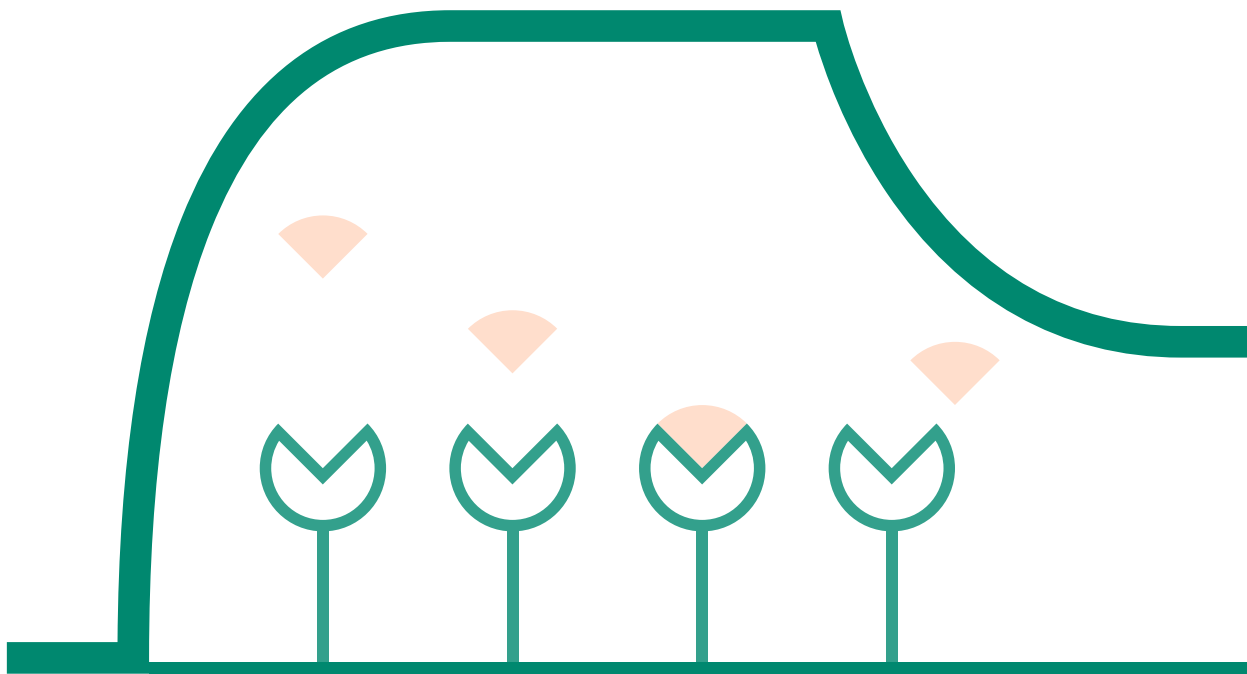


Biacore 垂钓实验操作指南



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	8
(四) 实验结果分析	10

实验目的

利用 Biacore T200 系统，以 bait 蛋白为“诱饵”，在混合样品中垂钓与之结合的分子，并利用质谱对回收到的样品进行鉴定，从而发现与 bait 蛋白相互作用的分子。

注释

注意事项：实验前请仔细阅读该指南，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 CM5 芯片。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），或 10mM 醋酸钠 pH4.5（货号：BR-1003-50），厂家为 Cytiva。
- 缓冲液：10 x HBS-EP+（货号：BR-1006-69），厂家为 Cytiva。（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 μm 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），4.0 mL 玻璃瓶（货号：BR-1002-09），橡胶瓶盖 2 型（货号：BR-1004-11），厂家为 Cytiva。
- Bait 蛋白：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 > 200 μg/ml。溶解液尽量不含 Tris 等带有伯氨基团的成分。
- Wash / Recovery solution：0.5% TFA（三氟乙酸）。
- Deposition solution：50mM NH₄HCO₃。



实验步骤

仪器准备

开机操作



- 打开 Biacore T200 系统和电脑电源开关。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 μm 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。

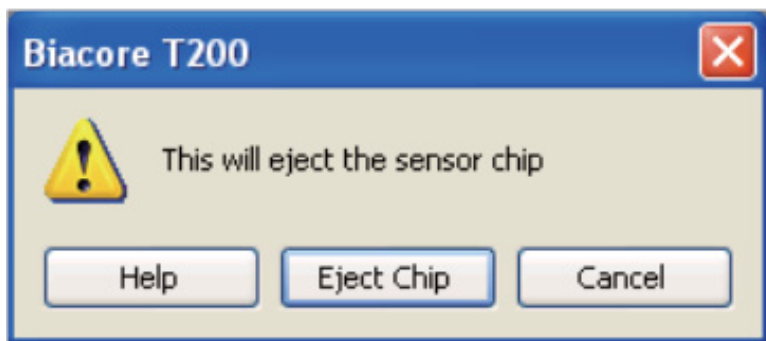
缓冲液的放置

- 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore T200 系统左侧的托盘上。

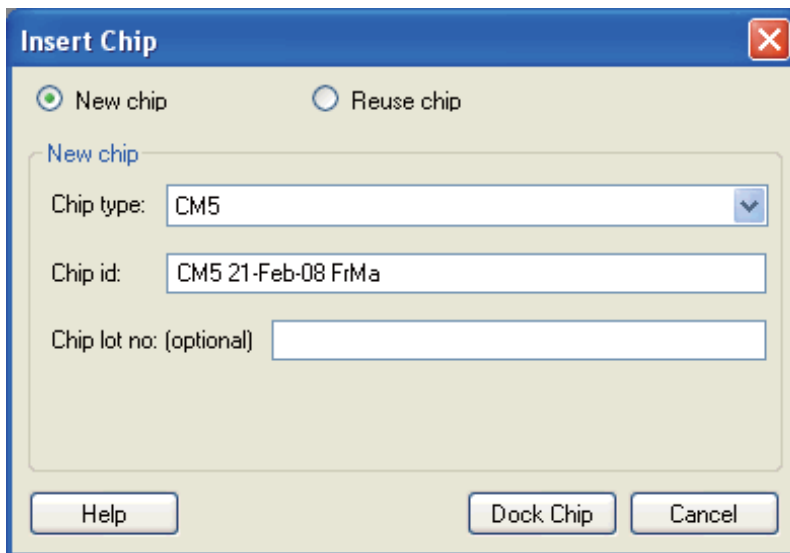
- 将缓冲液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）不要动。
- 将 2L 的废液瓶放置在 Biacore T200 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。
- 取 500mL 去离子水装入 500mL 瓶中，放置在右侧托盘上，并将标有 water 标签的管子插入瓶中，用于清洗进样针。

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 CM5 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。

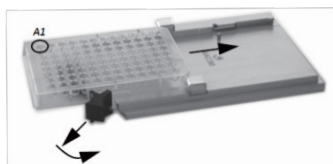


A: Reagent Rack 1&2 (左 1 右 2)




B: Sample and Reagent Rack1

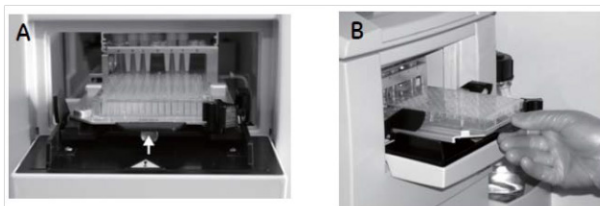
Reagent Rack 1&2 通常和 96/384 微孔板配合使用, 加装在指定的样品架底座上。具体的组装方式参见下图。



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。

- 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，舱门也会自动关上。注意：样品舱舱门打开后会有时间限制，打开 60-90 秒后舱门将自动关上。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。

配体偶联

1、运行缓冲液：1×HBS-EP+。

2、bait 蛋白偶联

1) 点击 T200 Control Software 的 File 下面的 Open/New wizard template，选择 immobilization。对话框中，Chip type 选 CM5，Flow cells per cycle 选 4，仪器一次偶联 4 个通道。勾选 Flow cell 1,2,3,4，method 选用 amine 氨基偶联，ligand 输入配体蛋白名称，选用 specify contact time and flow rate，contact time 输入 600s（垂钓实验偶联量在 7000-10000RU 为宜，可延长进样时间提高偶联量）。接着点 Next，选择实验温度，一般默认 25°C。点击 Next。

Immobilization - Immobilization Setup

Chip type: CM5

Flow cells per cycle: 4

Flow cell 1,2,3,4

Immobilize flow cell 1,2,3,4

Method: Amine

Ligand: 20 ug/mL bait Dilute ligand

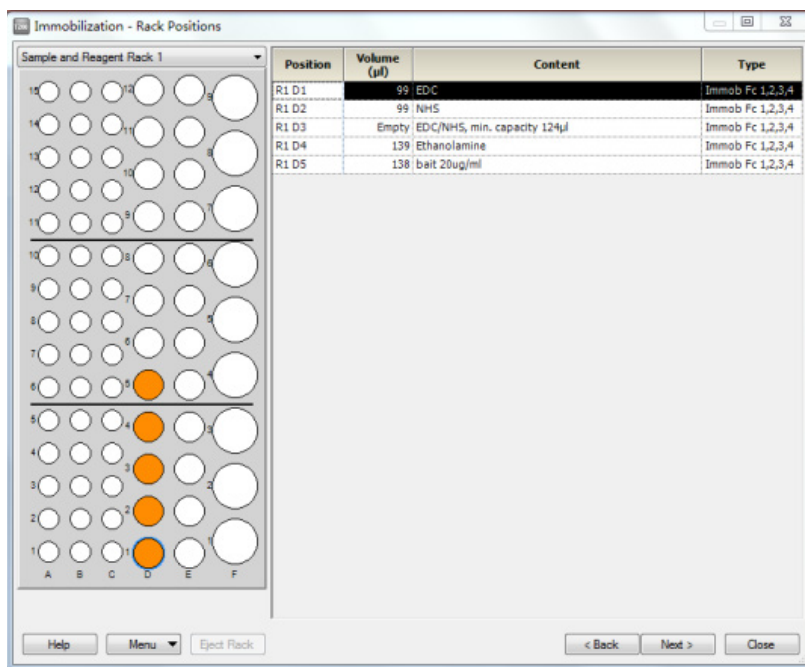
Specify contact time and flow rate

Contact time: 900 (s) Flow rate: 10 (µl/min)

Blank immobilization

Help Custom Methods... <Back Next> Close

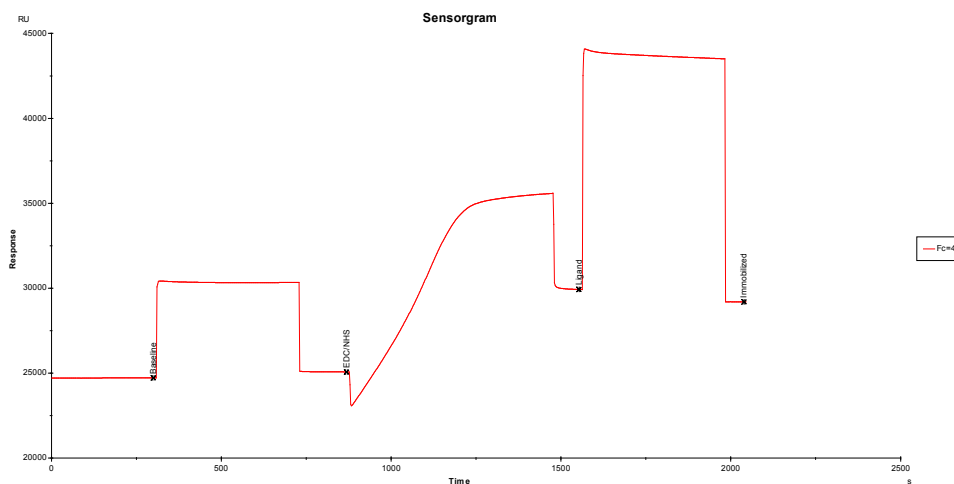
2) 在左上方下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1，在 Menu 里选 Automatic Positioning 自动排放样品位置或自行通过鼠标拖拽到指定位置。根据屏幕显示，准备相应的样品，放入的样品体积略大于显示的体积即可，其中配体蛋白用 pH4.0 的醋酸钠稀释至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后，再按要求将不同样品放入样品架指定位置，如果使用的是带盖的 EP 管，所有盖子必须剪去。盖上样品架金属盖子，将样品架送回样品舱。



3) 点击 Next，弹出 Prepare Run Protocol 对话框，确认各项均符合要求后，点击 start。保存 method 与 result 文件到文件夹（可默认或自行指定，注意本指南中所有要保存的指定文件夹与文件名不可有中文字符）。系统正式自动运行偶联程序，整个过程耗时约 30min。

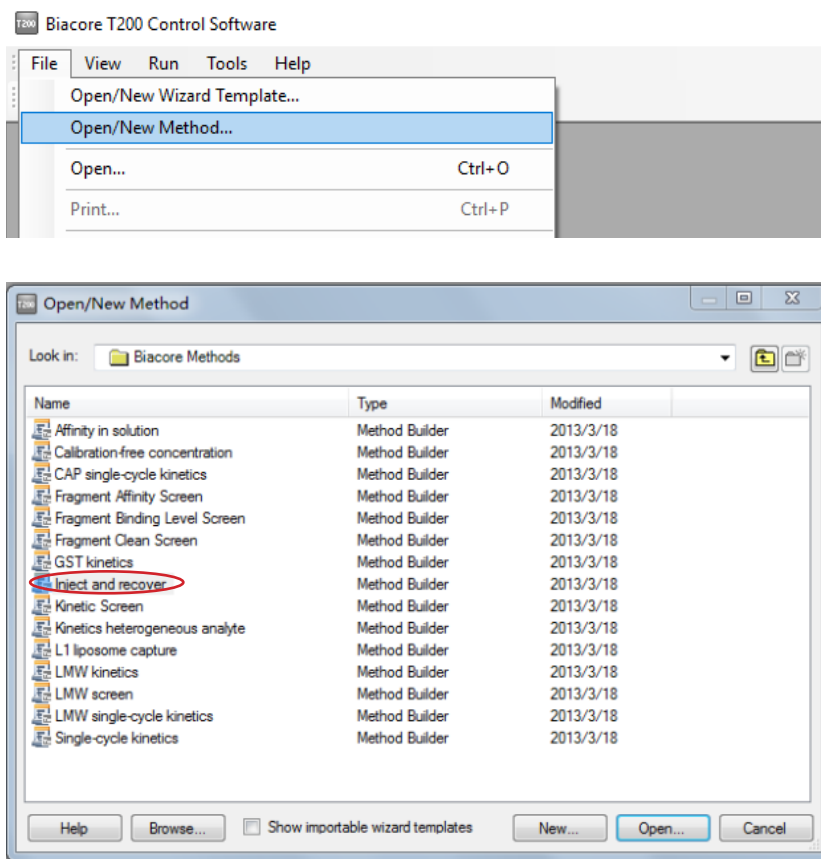
4) 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果（类似下图）。建议偶联量 7000-10000 RU。

5) 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

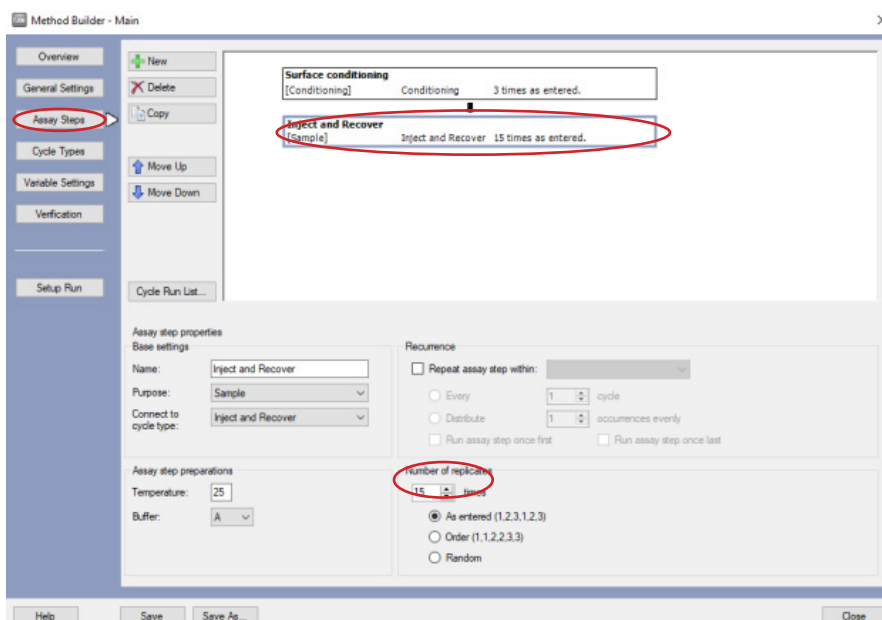


垂钓回收过程

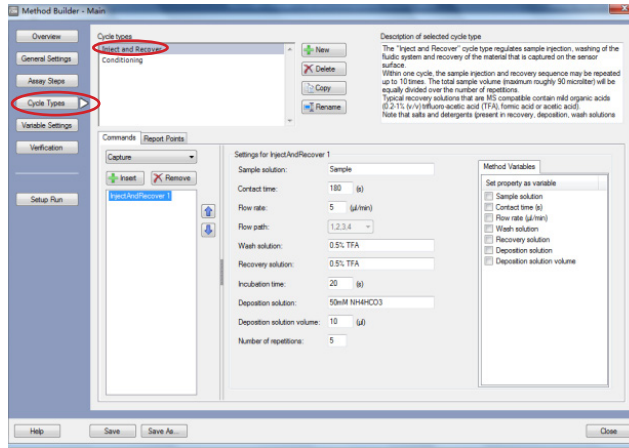
- 点击控制软件 File 中的 Open/New Method，然后双击打开 Biacore Methods，双击 Inject and recover。



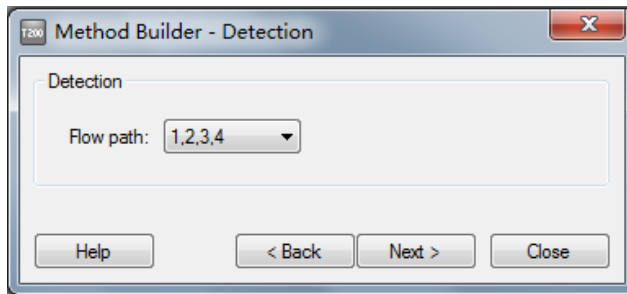
- 在 Overview 和 General Setting 界面，无需修改，点击 Assay Steps 里的 Inject and Recover，修改 Number of replicates，推荐 10-20 次以便收集到足够量的样品进行质谱检测。



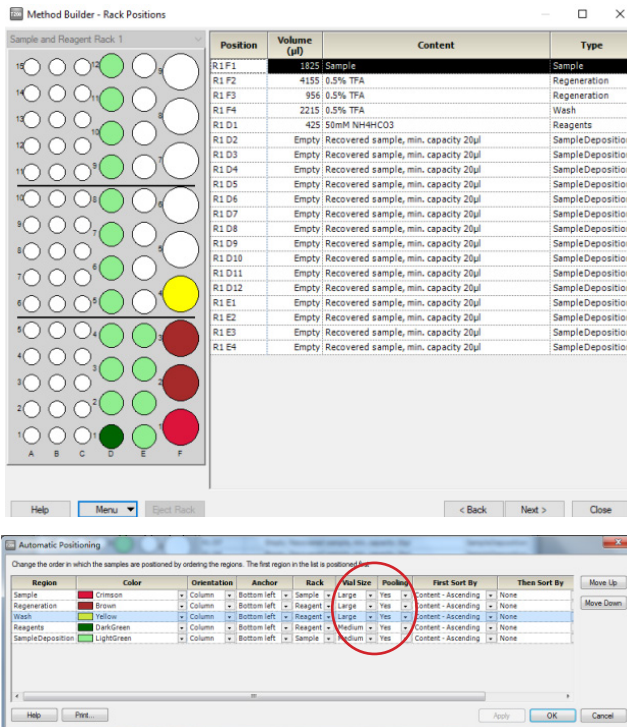
- 在 Cycle Types 界面，点击 Inject and Recover，推荐使用默认参数，contact time 为 180s，flow rate 为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，Wash solution 和 Recovery solution 默认为 0.5% TFA（三氟乙酸），也可使用 0.2%-1% TFA、甲酸、乙酸或再生溶液等，Incubation time 为 20s（或 30s）。Deposition solution 为 50mM NH_4HCO_3 ，若使用的是非酸性 Wash solution，Deposition solution 可以取消或用 Running buffer 代替。Deposition solution volume 为 10 μL ，Number of repetitions 为 5。




- 点击 verification，检测所编辑方法是否报错，如果有报错，根据提示返回到对应位置修改，如果没有报错，直接点击 Setup Run，Flow path 选择 1,2,3,4，点击 3 次 Next。



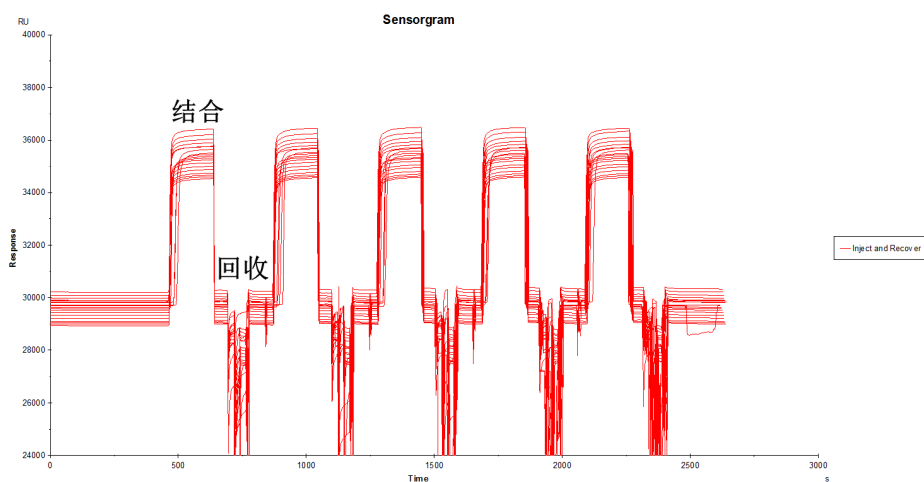
- 在 Rack Position 界面，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1，点开 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium 或 Large，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。



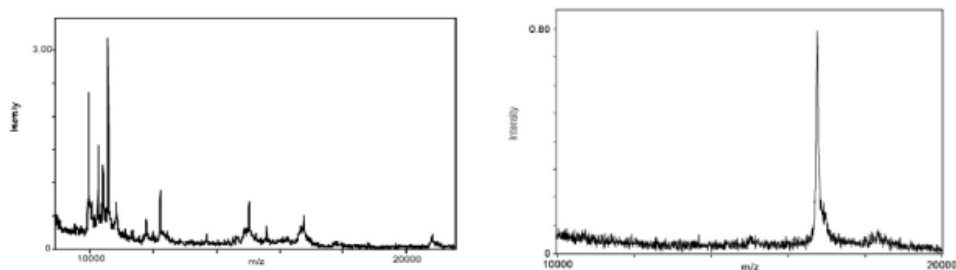
- 按照屏幕显示准备相应样品与空 EP 管(用于垂钓回收得到的互作样品,管子上要加盖 2 型橡胶瓶盖,以防回收到的样品挥发),并按指定位置放置。点 Next 后,对方法进行保存,再对数据进行保存,仪器便会开始自动运行。
- 垂钓结束后,取出样品架,合并所有 EP 管中回收到的样品(每管约 20ul),用于质谱检测。
- 对照组实验:点击工具条中的  按钮或选择 Tools 菜单中的 Eject Chip 选项,取出用过的芯片,放入一张新的 CM5 芯片,不做配体偶联,直接在空白 CM5 芯片上进行 Inject and recover,具体的操作直接 copy 上述垂钓回收过程,或者直接打开上次保存的方法文件进行运行。空芯片垂钓回收到的样品作为 negative control,进行质谱检测,用于后续质谱分析中作为背景对照进行比对。

实验结果分析

- 打开数据分析软件 Biacore T200 Evaluation Software,点击 File,选择 open,找到结果文件,双击打开。点击 All sensorgrams,共 15 个 cycle(与 method 设置一致),每个 cycle 重复 5 次(与 method 设置一致),每次均做一次结合与回收,得到 candidate。



- 质谱结果,实验组扣除空白芯片对照组的结果,即可获得与 bait 蛋白特异性结合的 candidate。



**如有问题,请拨打免费技术热线
请拨 400-810-9118**

关于 Cytiva 思拓凡

Cytiva 思拓凡是全球生命科学领域的先行者，在全球 40 余个国家和地区拥有 8000 名员工，致力于推进未见技术，加速非凡疗法。作为客户可信赖的合作伙伴，Cytiva 专注于生命科学和生物技术研究，用以开发创新型疫苗、生物药物以及新型细胞和基因疗法。通过提升药物研发和生物工艺的速度、效率和能力，为惠及全球患者开发和生产变革性药物和疗法。

请访问 cytiva.com.cn 获取更多信息。

智荟专线：400 810 9118

官微订阅号：Cytiva

官微服务号：CytivaChina

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.cn/contact。

CY21615-20May21-BR

