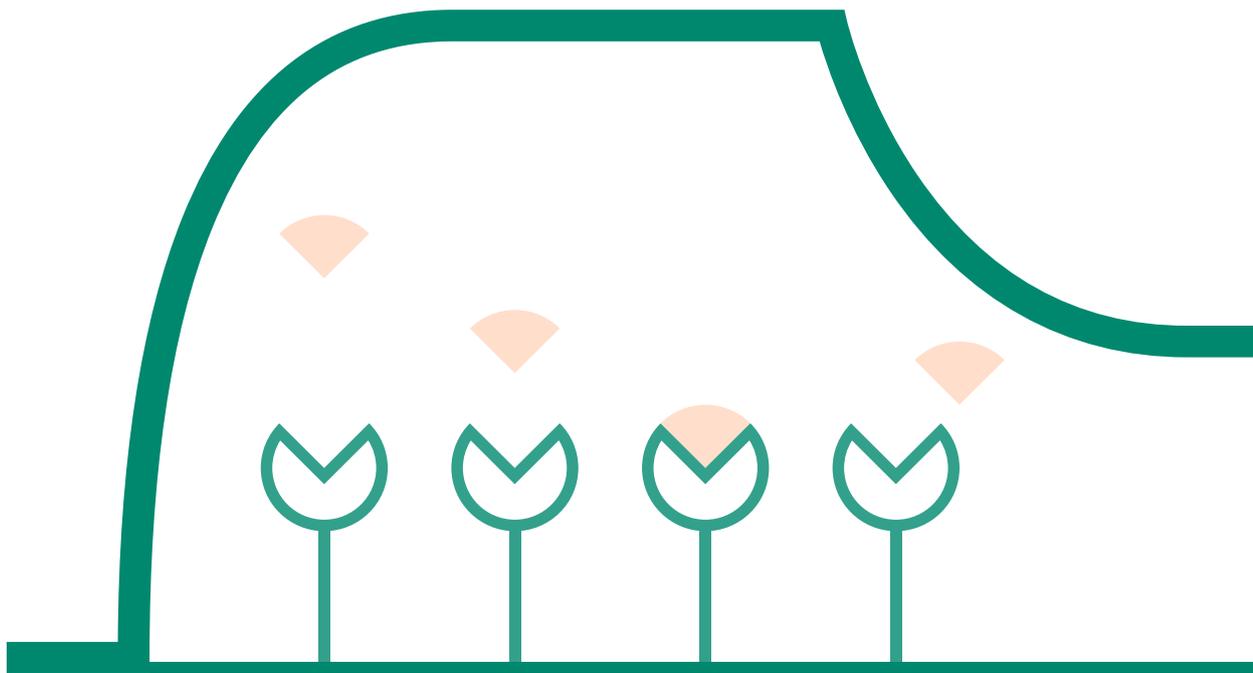


Biacore 检测蛋白与离子相互作用 操作指南



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	11

实验目的

利用 Biacore T200 系统和 CM5 芯片检测离子与蛋白结合的动力学和亲和力数据。本实验使用的离子为 Zn^{2+} ，蛋白分子量为 20 kD。若蛋白与离子的分子量比大于 100，换用 CM7 芯片。

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。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），或 10mM 醋酸钠 pH4.5（货号：BR-1003-50），厂家为 Cytiva。
- 缓冲液：10 x PBS（货号：BR-1006-72），厂家为 Cytiva。（也可扫描下方二维码选择含上述耗材的套餐）



含 CM5 芯片套餐



含 CM7 芯片套餐

- 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）。
- 蛋白：浓度一般需大于 500 μ g/ml。客户需确定蛋白活性，确保不含 Tris 等带有伯氨基团的成分。如需脱盐，可选择 Cytiva 的 PD MiniTrapTM G-25（货号：28-9180-07）或 PD-10 Desalting（货号：17-0851-01）。
- Zn^{2+} ：母液浓度建议大于 10 mM，体积在 50 μ L 以上，溶在去离子水或缓冲液中。溶液中不要含有咪唑、蔗糖、甘油等高折光率物质。
- 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），厂家为 Cytiva。

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。

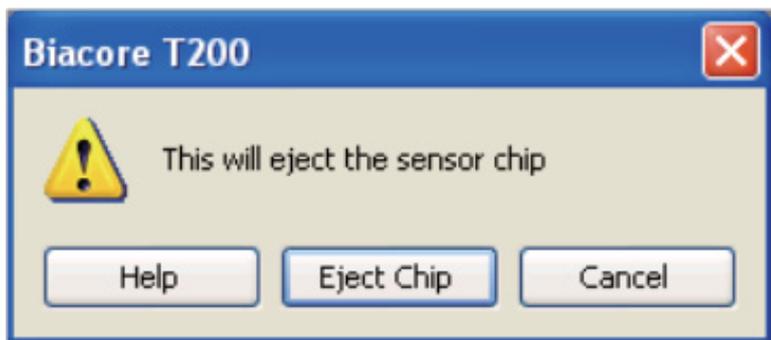
- 准备运行缓冲液。量取 50mL 10 x PBS buffer、450mL 去离子水（已经 0.22 μm 膜过滤），混匀后放入缓冲液瓶。
- 设备开机后，即可使用，无需等待。

缓冲液的放置

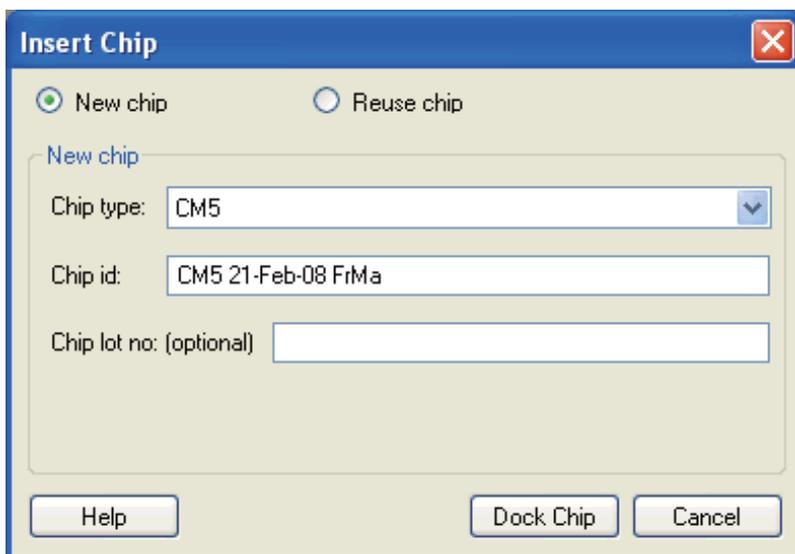
- 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore T200 系统左侧的托盘上。
- 将缓冲液进液管 A（注意软管上的蓝色标签）插入至缓冲液瓶底部。其余三根进液管（B、C 和 D）不要动。
- 将 2L 的废液瓶放置在 Biacore T200 系统右侧的托盘上，并拧上专用的盖子。
- 取 500mL 去离子水装入 500mL 瓶中，放置在右侧托盘上，并将标有 water 标签的管子插入瓶中，用于清洗进样针。

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。



图 A: Reagent Rack 1&2 (左 1 右 2)



图 B: Sample and Reagent Rack1

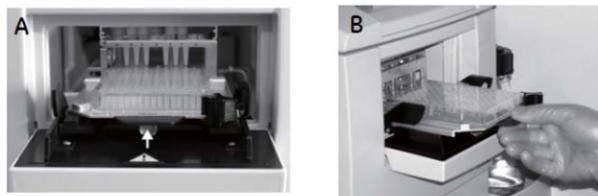
Reagent Rack 1&2 通常和 96/384 微孔板配合使用, 加装在指定的样品架底座上。具体的组装方式参见下图。



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。(若待测样品数量多, 可选择 Reagent Rack 1 or 2, 并根据需要选择是否加 96/384 孔板)。

- 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。



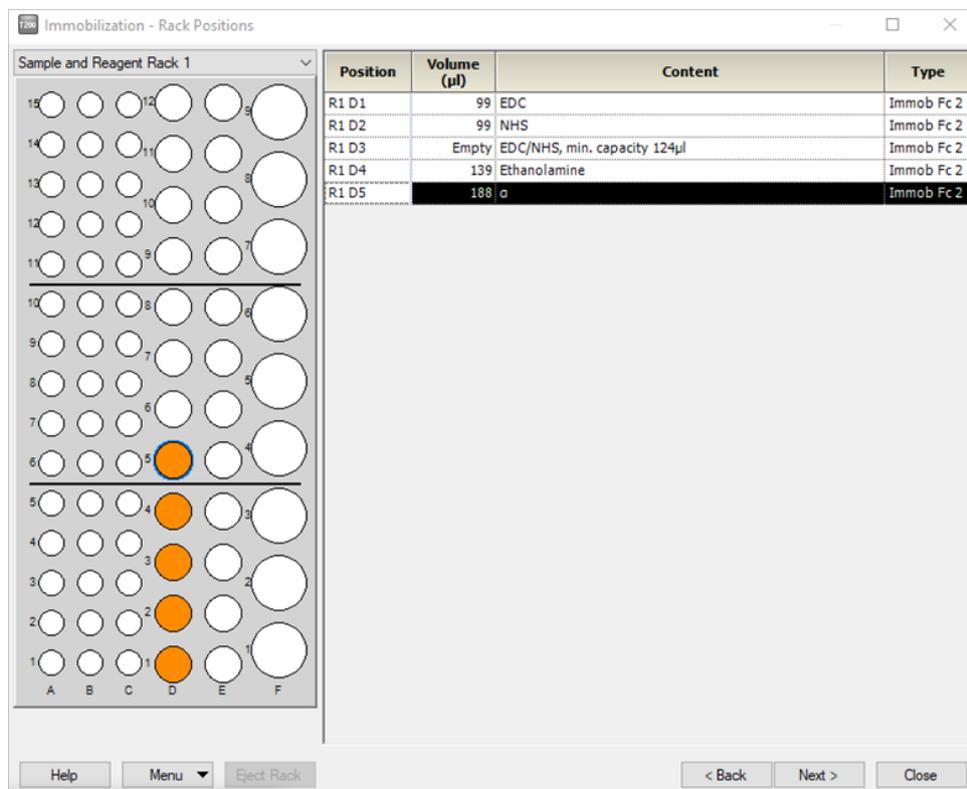
样品架的放入方式

- 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

- 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 1。勾选 Flow cell 2（如 2 已用，可选择 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 实现高偶联，contact time 输入 900s。接着点 Next，选择实验温度，一般默认 25°C。

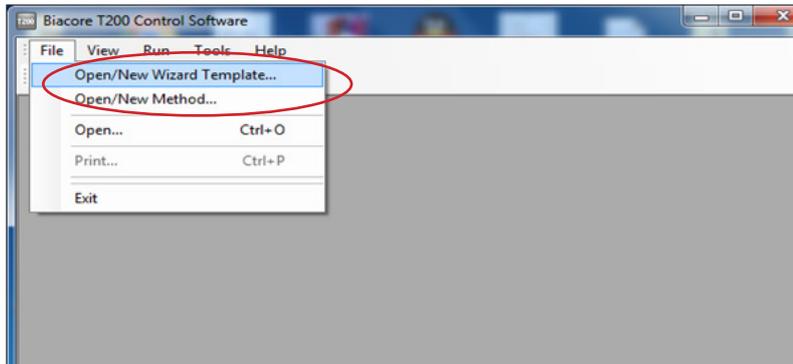
- 在左侧下拉菜单中选用 Sample and Reagent Rack 1，在 Menu 里选 Automatic Positioning 自动排放样品位置或自行通过鼠标拖拽到指定位置。根据屏幕显示，准备相应的样品，放入的样品体积略大于显示的体积即可，其中配体蛋白用 pH4.0 的醋酸钠稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后，再按要求将不同样品放入样品架指定位置，如果使用的是带盖的 EP 管，所有盖子必须剪去。盖上样品架金属盖子，将样品架送回样品舱。



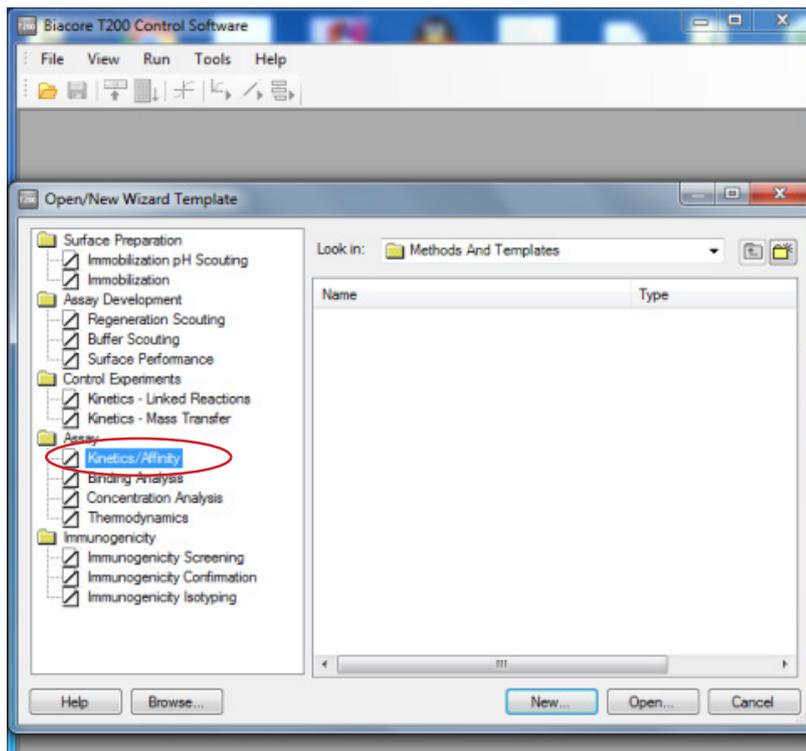
- 点击 Next，弹出 Prepare Run Protocol 对话框，确认各项均符合要求后，点击 start。保存 method 与 result 文件到文件夹（可默认或自行指定，注意本指南中所有要保存的指定文件夹与文件名不可有中文字符）。系统正式自动运行偶联程序。
- 偶联结束后，软件自动生成并显示偶联结果。
- 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

样品检测过程

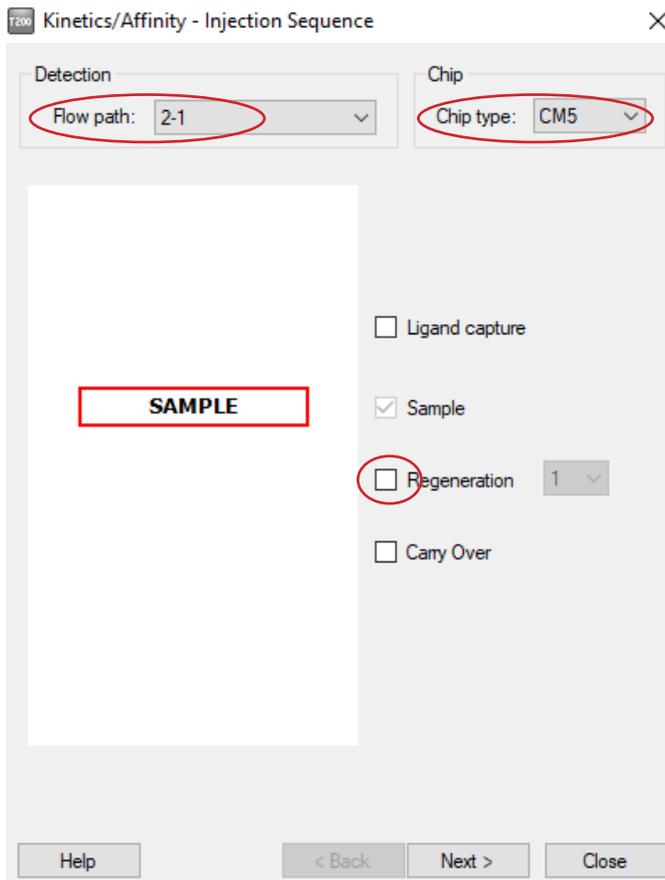
- 在打开的 Biacore T200 Control Software 里点开 file 中的 Open/New Wizard Template。



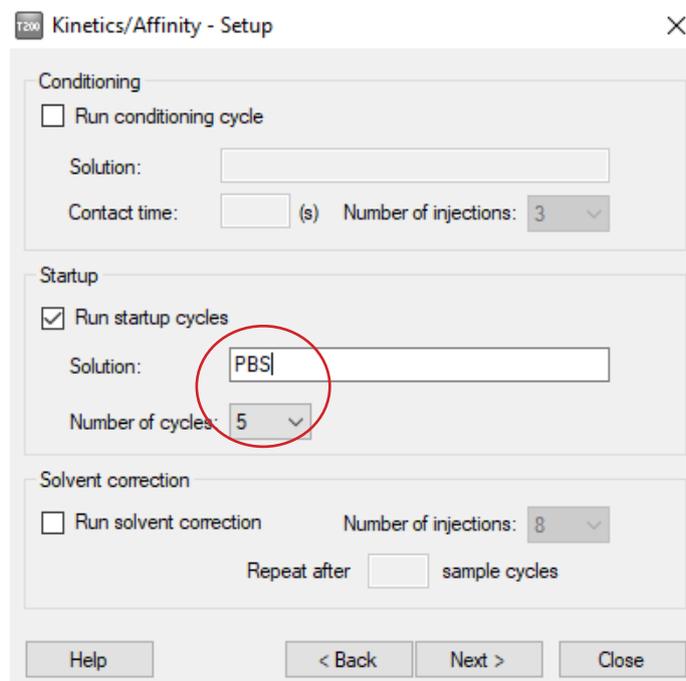
- 在 Open/New Wizard Template 的左边目标栏里选中 Kinetics/Affinity 后双击。



- 在 Kinetics/Affinity 界面中，将 Flow path 点为 2-1 或 4-3（具体视蛋白偶联的通道而定），Chip type 选择 CM5。离子与蛋白的结合一般不需要再生，去掉 Regeneration 前的对勾。接着点 NEXT。



- 在 Setup 界面里，Startup 底下的 Solution 一栏中填写 PBS，并将 Number of cycles 改为 5，接着点 Next。



- 在 Kinetics/Affinity-Injection Parameter 界面下：在 Sample 一栏中 Contact time 为 120s，Flow rate 为 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，Dissociation time 为 120s。

Kinetics/Affinity - Injection Parameters

Sample

Contact time: (s) Flow rate: ($\mu\text{l}/\text{min}$) Dissociation time: (s)

Extra wash after injection with: Stabilization period: (s)

Help < Back Next > Close

- 在 Kinetics/Affinity-Sample 界面中，填写分析物信息：Sample id 填写样品名称，MW(Da) 填写分子量，一个 Concentration 为质量浓度，另一个为摩尔浓度，样品浓度由低到高填写（质量浓度或摩尔浓度填一种即可，另一种系统会自动计算）。注意要设置重复浓度和零浓度。具体填写如下：

Kinetics/Affinity - Samples

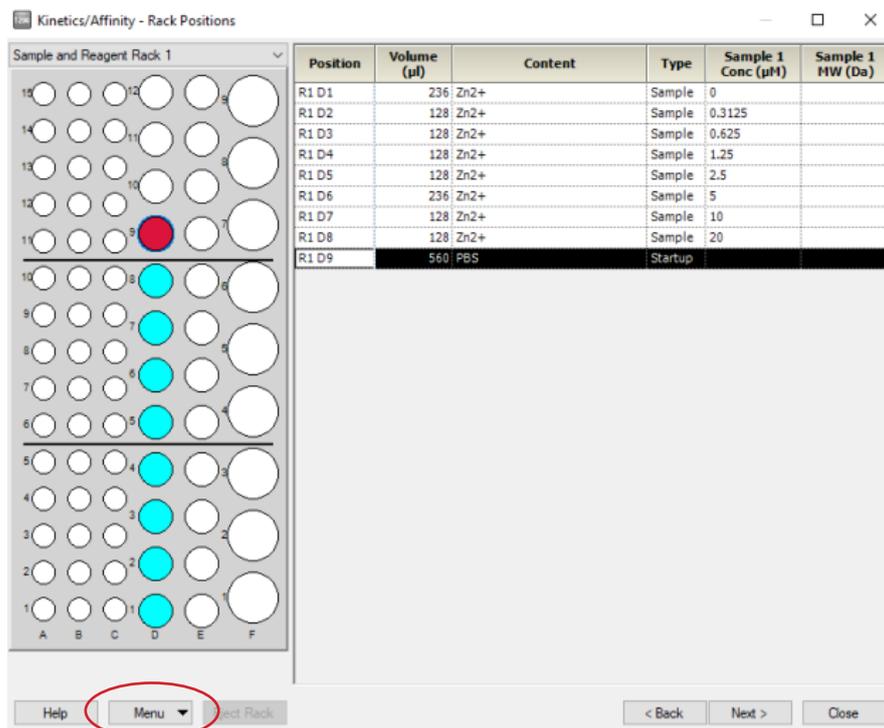
Samples

	Sample id	MW (Da)	Concentration	
			μM	$\mu\text{g}/\text{ml}$
1	Zn2+		0	
2	Zn2+		0.3125	
3	Zn2+		0.625	
4	Zn2+		1.25	
5	Zn2+		2.5	
6	Zn2+		5	
7	Zn2+		10	
8	Zn2+		20	
9	Zn2+		0	
10	Zn2+		5	
11				

Run order
 As entered Increasing concentration

Help Import... Control Samples... < Back Next > Close

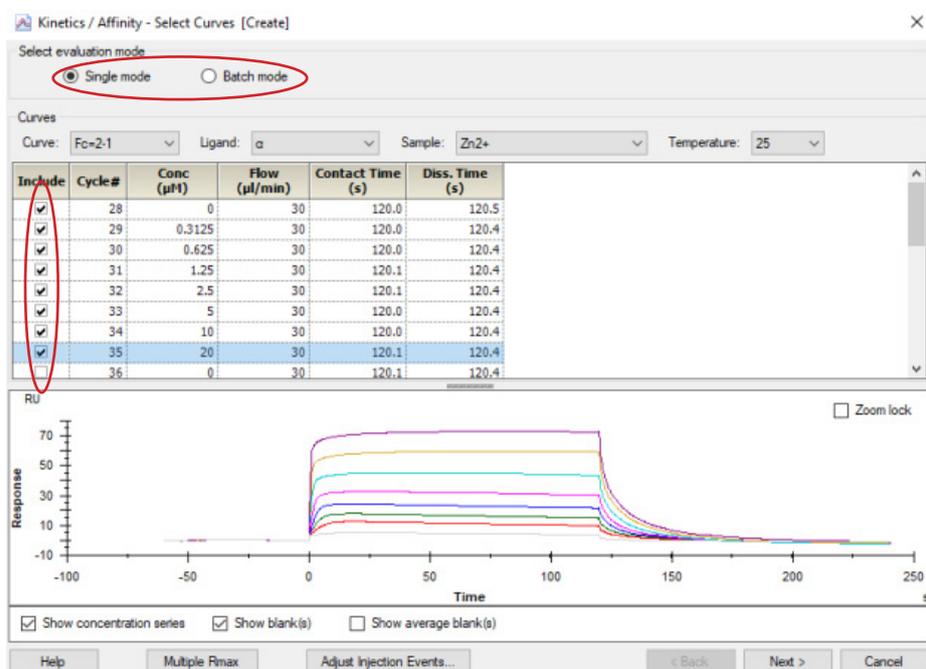
- 点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-System Preparations 界面，不做修改，再点击 Next 进入 Kinetics/Affinity-Rack Position 界面，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1（或根据样品数量选择其他 rack 或 96/384 孔板），点开 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。



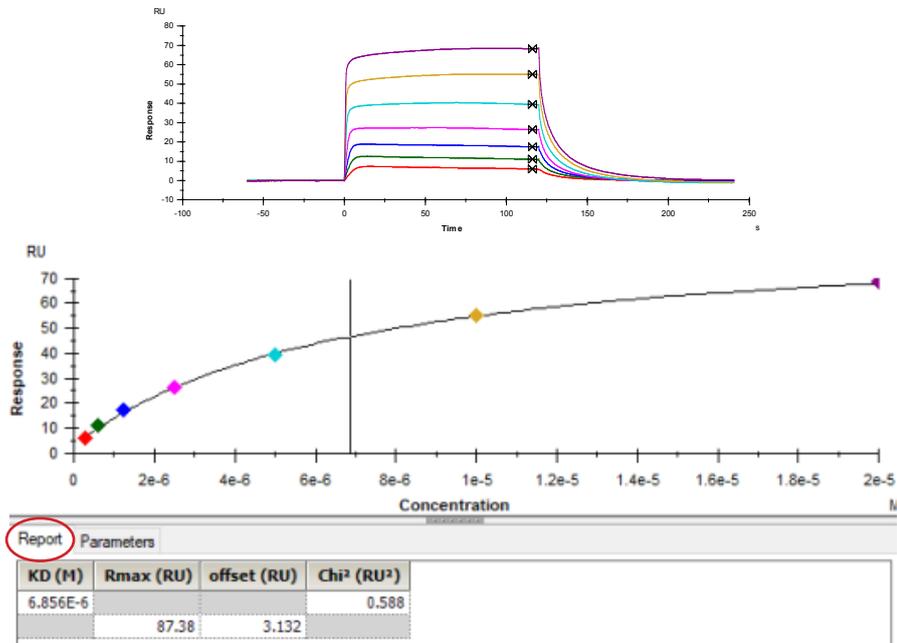
- 按照屏幕显示准备相应样品，并按指定位置放置。样品用运行缓冲液 PBS 进行倍比稀释。点 Next 后，对方法进行保存，再对数据路径进行保存，仪器便会开始自动运行。

实验结果分析

- 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%。若 baseline 中各个点的响应值上飘，可加入再生步骤。
- 点击上方中间位置的 Kinetics/Affinity，在下拉栏里点击 Surface bound。在 Kinetics/Affinity-Select Curves 界面的 Select evaluation mode 下面选择 Single mode，(若为多组实验结果，并想批量处理，可选 batch mode)。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。



- 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），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， Zn^{2+} 与蛋白 α 的亲合力 $KD=6.856 \times 10^{-6}$ 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

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的研发，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。

CY24371-13Sep21-BR

