

# Easy Biacore: T200 检测核酸与蛋白结合



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。该指南可用于单/双链 DNA、RNA、MicroRNA 等样品的检测,但具体参数设置仅供类似实验参考,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 检测蛋白与核酸互作操作指南》。



## 实验前准备

- S 系列 SA 芯片, 货号: 29-1049-92(一片装)、BR-1005-31(三片装),若有大量带 biotin 标签的 样品待检测,可选择 Biotin CAPture Kit, Series S(货号: 28-9202-34)来进行检测。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)。
- 缓冲液: 10 × 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。
- Condition 缓冲液:含 50 mM NaOH 和 1M NaCI 溶液,配制 200 μL。
- Wash 缓冲液:含 50% 异丙醇、50 mM NaOH、1 M NaCl 溶液,配制 200 μL。
- 再生溶液: 0.5% SDS。
- 无盖 1.5 ml EP 管(货号: BR-1002-87)。
- 生物素化修饰的核酸 A:商业化合成的粉末,用去离子水稀释到 100 µg/mL,分装保存在 -20℃。
- 蛋白 lac 1: 母液浓度 > 0.2 mg/mL, 蛋白总量至少 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,选择 Chip type 为 SA。

	Insert Chip	$\mathbf{X}$
	New chip     O Reuse chip	
	New chip	
Biacore T200 🛛 🔀	Chip type: SA	~
	Chip id: SA 21-Feb-08 FiMa	
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。



#### 配体核酸的偶联

点击控制软件 File 下面的 Open/New wizard template,选择 immobilization,双击。在 Chip type 中选 SA,在 Flow cells per cycle 选 1。勾选 Flow cell 1,将该通道设置为 Blank immobilization;再勾选 Flow cell 2, Method 选用默认的 SA-biotin capture, Ligand 输入配体名称(本实验为 biotin-A),选用 aim for immobilized level, Target level 输入配体目标偶联量(参考表一)。(如 Flow cell 1、2 已用,可选用 3、4),点击 2 次 Next。

#### 表1. 偶联量与配体工作浓度参考表

分子量比 (配体核酸 / 分析物蛋白)	≤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	0.5 µg/mL	1 µg/mL	2 uç	j/mL	5 ug/mL

Immobilization - Immobilization Setu	p S
Chip type: SA	~
Flow cells per cycle: 1	~
Flow cell 1	
Immobilize flow cell 1	Method: SA-biotin capture
<ul> <li>Aim for immobilized level</li> </ul>	
O Specify contact time and flow rate	
Blank immobilization	
Flow cell 2	
Immobilize flow cell 2	Method: 🔤 SA-biotin capture 🗸
Aim for immobilized level	Ligand: biotin-A Dilute ligand
O Specify contact time and flow rate	Target level: 500 (RU)
O Blank immobilization	

将 Reagent Rack 改为 Reagent Rack1,点开左下方 Menu 后选 Automatic Positioning, Vial siza 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。配体核酸用 1 × HBS-EP+缓冲液稀释至对应浓度(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)。

Immobilization - Rack Positions				— 🗆 X
Reagent Rack 1	Position	Volume (µl)	Content	Туре
	R2 A1	104	1M NaCl, 50mM NaOH	Immob Fc 1
	R2 A2	51	50%Isopropanol/50mMNaOH/1MNaCl	Immob Fc 1
	R2 B1	104	1M NaCl, 50mM NaOH	Immob Fc 2
	R2 B2	138	biotin-A	Immob Fc 2
	) R2 B3	51	50%Isopropanol/50mMNaOH/1MNaO	Immob Fc 2
None	~			

- 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 核酸,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。

#### 多循环动力学检测

• 点击控制软件 File 下面的 Open/New wizard template,双击 Kinetics/Affinity。将 Flow path 点为 2-1 (如 果核酸偶联在 flow cell 4,则选 4-3 ), Chip type 选择 SA。点击 Next。

			Kinetics/Affinity - Injection Seq	uence	×
🔤 Open/New Wizard Template			Row path: 2-1	Chip V Chip type: SA V	D
Sufface Preparation Sufface Preparation Immobilization pH Souting Immobilization pH Souting Immobilization Assay Development Immobilization Souting Sufface Performance Control Experiments Immobilization Immunoperioty Confirmation Immunoperioty Confirmation Immunoperioty Confirmation Immunoperioty Isotyping Immunoperi	Look In: Methods And Templates           Name           <	Тури	SAMPLE	Ligand capture     Sample     Regeneration     Cany Over	
Help Browse	New	Open	Help	Back Next > Close	

• Startup 中 Solution 填 HBS-EP+, Number of cycles,选择 5,点击 Next。Sample 中 Contact time 为 180s, Dissociation time 为 300s, Regeneration 中 solution 为 0.5% SDS。点击 Next。

Kinetics/Aminity - Setup	~		
Conditioning Plun conditioning cycle Solution:		EasySOP PIN Multi-cycle kinetics - Injection Parameters	×
Contact time: (s) Number of injections: 3 $\checkmark$		Sample	
Startup		Contact time: 180 (s) Flow rate: 30 (µl/min) Dissociation time: 300 (s)	
Run startup cycles		Extra wash after injection with:	
Solution: HBS-EP+			
Number of cycles: 5 ~		Regeneration	
Solvent correction		Colution: 0.5% SDS	
Run solvent correction     Number of injections:     Repeat after     sample cycles		Contact time: 30 (s) Row rate: 30 (µJ/min) Stabilization period: 0 (s)	
Help < Back Next > Close	e	Help < Back Next > Clo	se

Kinetics/Affinity-Sample 界面,填写分析物信息:Sample id 填写样品名称,Concentration 填写分析物系列浓度(由低到高、五倍稀释),注意浓度单位选择。注意要设置重复浓度和零浓度。推荐浓度如下:

			Concentra	tion	Concentration	
	Sample id	MW (Da)	μM		yg/ml 👻	1
1	lac 1		0	_		1
2	lac 1		5.12E-05			
3	lac 1		0.000256			
4	lac 1		0.00128			
5	lac 1		0.0064			
6	lac 1		0.032			
7	lac 1		0.16			
8	lac 1		0.8			
9	lac 1		4			
10	lac 1		20			
11	lac 1		100			
12	lac 1		0			
13	lac 1		0.032			
14						1
Run	order					

• 点击 2 次 Next,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。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 Lac 1 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。



Automatic	Positioning									×
Change the orde	er in which the samples are p	positioned	d by ordering the	regions. The first r	egion in the li	ist is positioned firs	t			
Region	Color		Orientation	Anchor	Rack	Vial Size	Pooling	First Sort By	Th	Move Up
Sample	Cyan		Column 👻	Bottom left 💌	Sample .	Medium 💌 Y	es 💌	Content - Ascending	None	
Startup	Crimson		Column 👻	Bottom left 👻	Sample	Medium 👻 Y	es 👻	Content - Ascending	None	Move Down
Regeneration	Brown		Column 👻	Bottom left 💌	Reagent -	Medium - Y	es 🖌	Content - Ascending	None	
<									>	
Help	Print							Apply	OK	Cancel

## 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%, 或者调换配体与分析物,将蛋白偶联在 CM5 芯片上,将核酸 A 作为分析物。若 baseline 中各个点 的响应值上飘,可适当延长再生溶液 0.5% SDS 的进样时间。
- 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,选最低的 5 个浓度分析,如果最高浓度响应值小于 50 RU,选最高的 5 个浓度进行数据分析,介于两者中间,随意选 5 个连续的浓度进行分析。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,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 ka、kd,亲和力数据 KD 等。以本实验为例,动力学数据: Ka = 3.672 × 103 M-1s-1, Kd = 1.807×10-3 s-1,亲和力: KD = 4.921×10-7 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。



Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	U-value
	3672	0.001807	4.921E-7			5.442E+6				0.399	)
Cycle: 7 0.0064 µM				6384	6.400E-9		30.00	1.691E+7	0.5383		
Cycle: 8 0.032 µM				1515	3.200E-8		30.00	1.691E+7	0.3630		
Cycle: 9 0.16 µM				481.0	1.600E-7		30.00	1.691E+7	1.140		
Cycle: 10 0.8 µM				165.0	8.000E-7		30.00	1.691E+7	3.317		
Cycle: 11 4 µM				88.25	4.000E-6		30.00	1.691E+7	1.002		

## 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。

CY20898-22Apr21-BR

