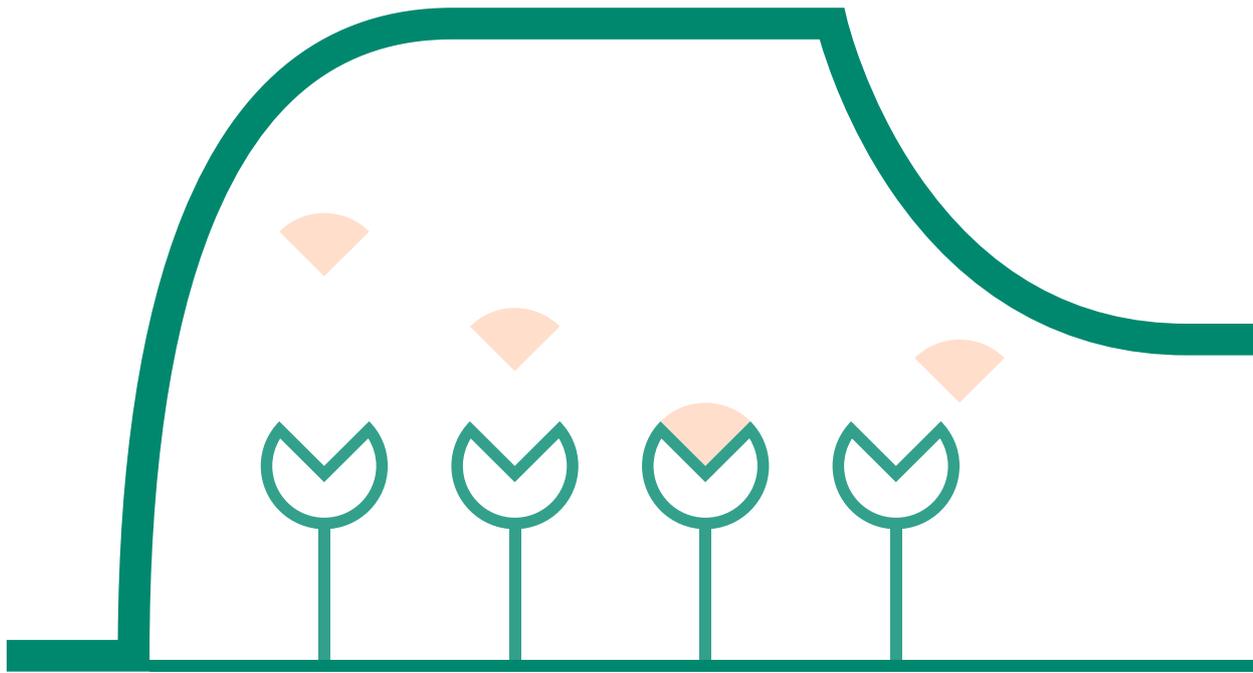


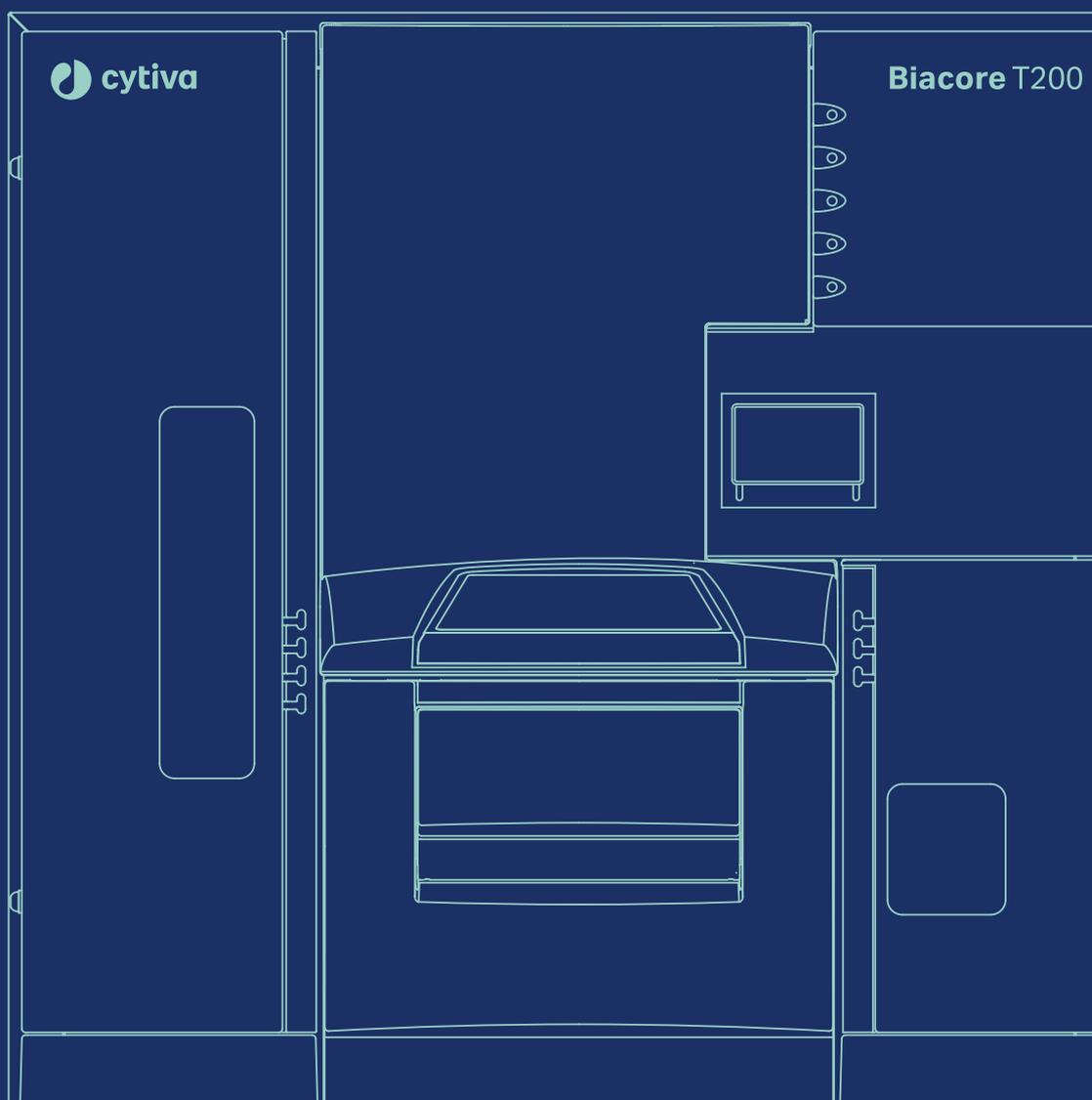
Easy Biacore:

T200 检测核酸与蛋白结合



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 NaCl 溶液，配制 200 μ L。
- Wash 缓冲液：含 50% 异丙醇、50 mM NaOH、1 M NaCl 溶液，配制 200 μ L。
- 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 μ g/mL，分装保存在 -20 $^{\circ}$ C。
- 蛋白 lac 1：母液浓度 > 0.2 mg/mL，蛋白总量至少 20 μ g。

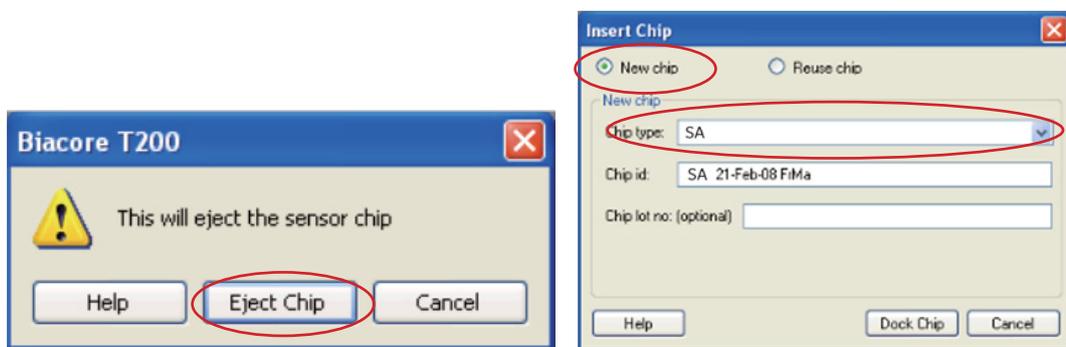


扫描二维码选择含上述所有耗材的套餐

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。



- 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。

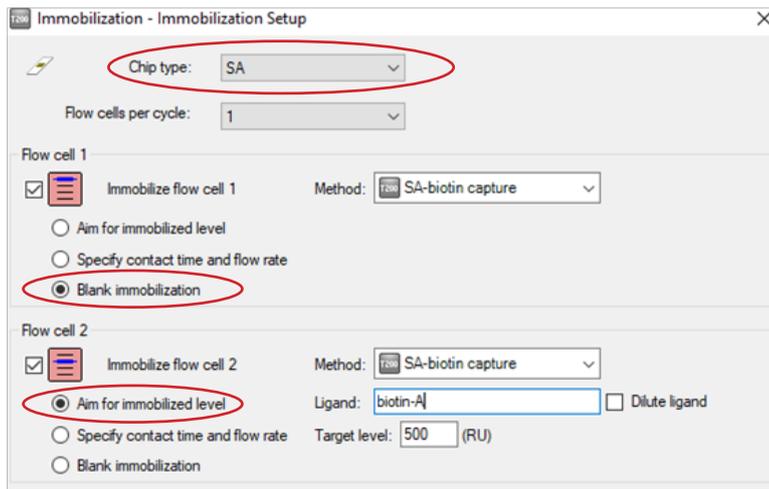


配体核酸的偶联

- 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 µg/mL		5 µg/mL



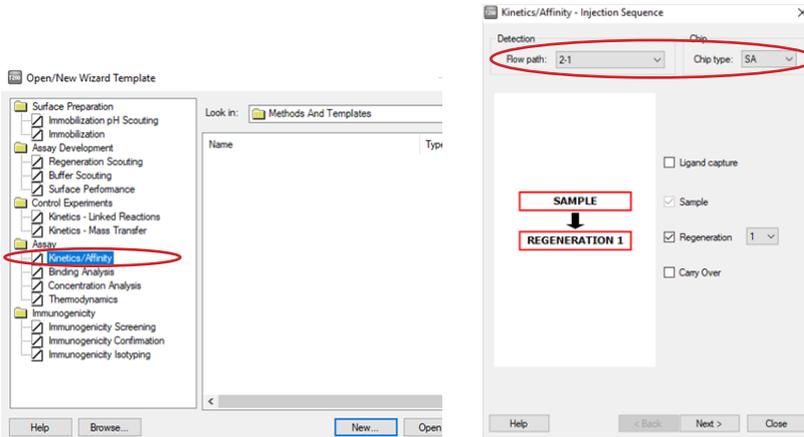
- 将 Reagent Rack 改为 Reagent Rack1，点开左下方 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial size 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。根据下图中样品名称及体积（大于该指定体积即可）进行样品准备。配体核酸用 1 × HBS-EP+ 缓冲液稀释至对应浓度（参考表一）。点击左下方 Eject Rack，取出样品架，将准备好的样品放到对应位置。盖上试管架盖子，将样品架送回样品舱。（注：所有 EP 管的盖子务必剪去）。

Position	Volume (µl)	Content	Type
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/1MNaCl	Immob Fc 2

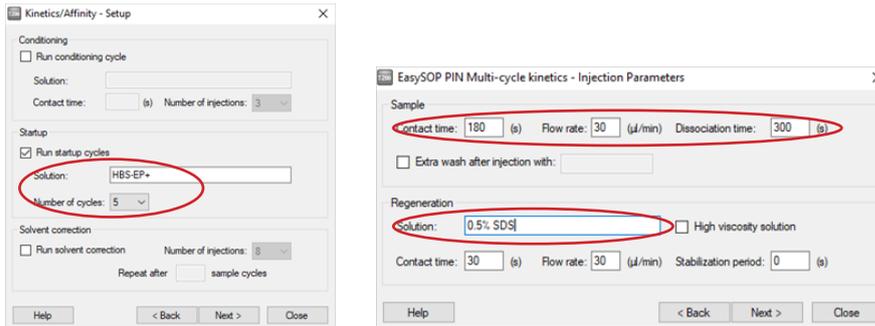
- 点击 Next，点击 start，保存 method 与 result 文件。系统将自动在芯片表面包被目标偶联量的配体核酸，并自动生成偶联报告。
- 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

多循环动力学检测

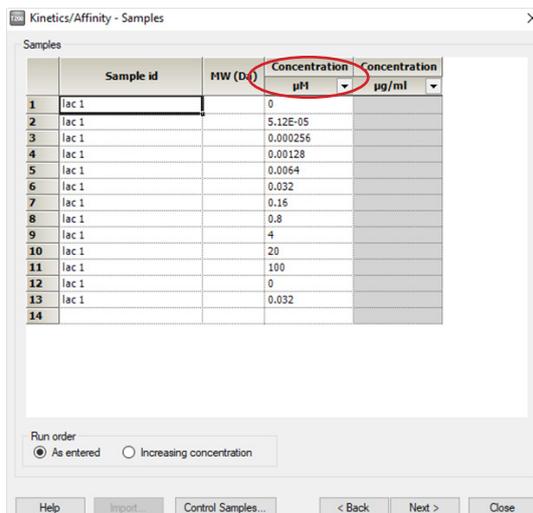
- 点击控制软件 File 下面的 Open/New wizard template，双击 Kinetics/Affinity。将 Flow path 点为 2-1 (如果核酸偶联在 flow cell 4，则选 4-3)，Chip type 选择 SA。点击 Next。



- 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/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：



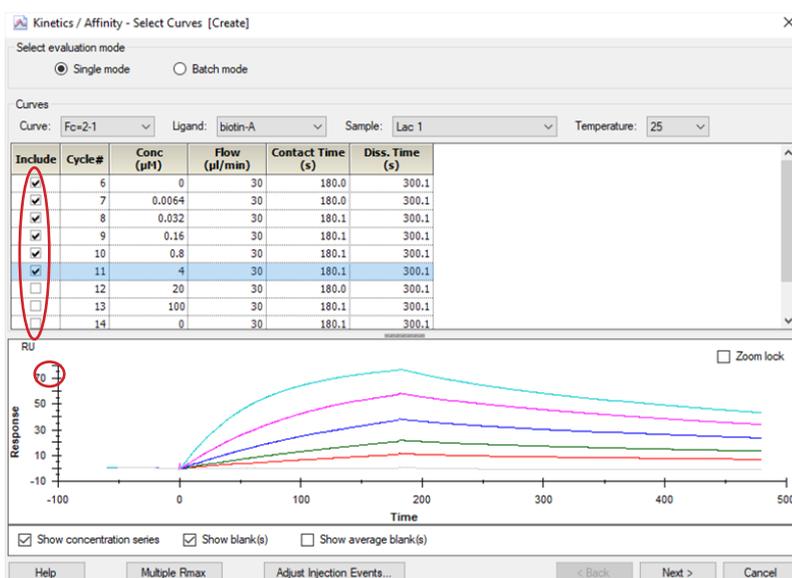
- 点击 2 次 Next，将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1（若需要用 96/384 孔板，则选择 Reagent Rack1 或 2，同时在下方 96 well microplate 中选择对应的孔板类型）。点开 Menu 后选 Automatic Positioning 进入下面界面后，Vial Size 根据需求进行调整，1.5 mL EP 管请选择 medium，pooling 选择 Yes（相同的样品会自动合并），点击 OK。根据下图样品名称及体积（大于该指定体积即可）进行样品准备。蛋白 Lac 1 母液先用左托盘中的运行缓冲液 1x HBS-EP+ 稀释至 100 μ M，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。

Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 Conc (µM)	Sample 1 MW (Da)
R1 D1	296	lac 1	Sample	0	
R1 D2	158	lac 1	Sample	5.12E-05	
R1 D3	158	lac 1	Sample	0.000256	
R1 D4	158	lac 1	Sample	0.00128	
R1 D5	158	lac 1	Sample	0.0064	
R1 D6	296	lac 1	Sample	0.032	
R1 D7	158	lac 1	Sample	0.16	
R1 D8	158	lac 1	Sample	0.8	
R1 D9	158	lac 1	Sample	4	
R1 D10	158	lac 1	Sample	20	
R1 D11	158	lac 1	Sample	100	
R1 D12	710	HBS-EP+	Startup		
R1 E1	866	0.5% SDS	Regeneration		

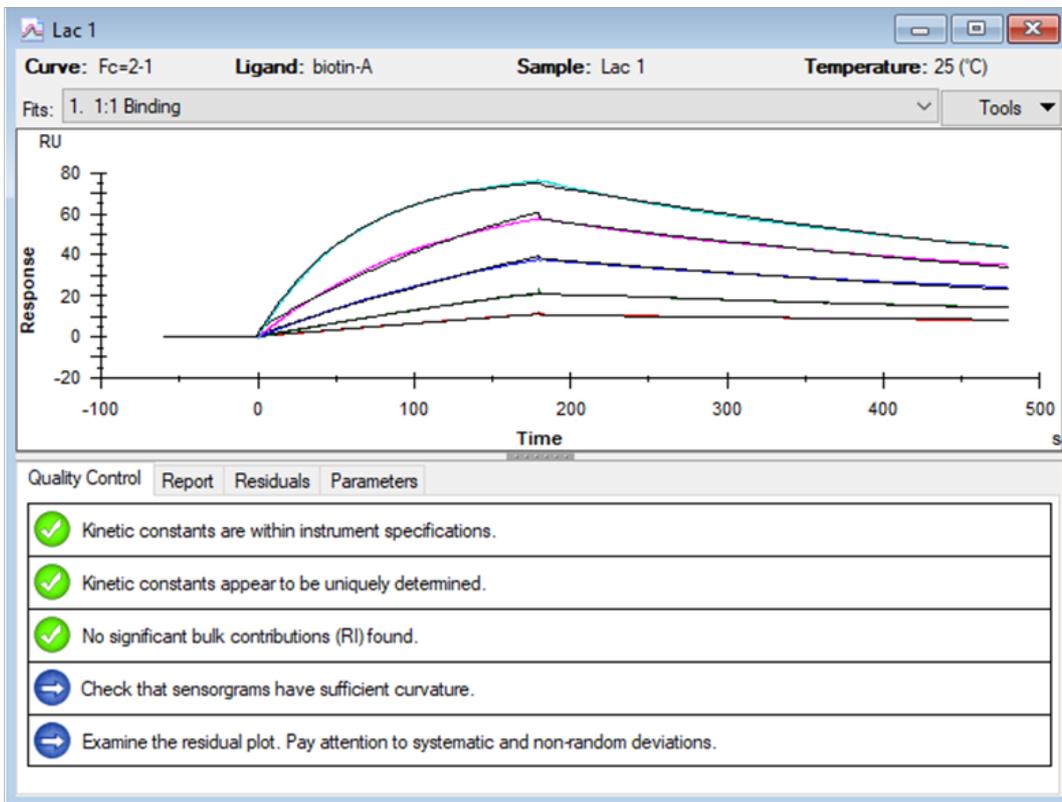
Region	Color	Orientation	Anchor	Rack	Vial Size	Pooling	First Sort By	Th
Sample	Cyan	Column	Bottom left	Sample	Medium	Yes	Content - Ascending	None
Startup	Crimson	Column	Bottom left	Sample	Medium	Yes	Content - Ascending	None
Regeneration	Brown	Column	Bottom left	Reagent	Medium	Yes	Content - Ascending	None

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%，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 k_a 、 k_d ，亲和力数据 KD 等。以本实验为例，动力学数据： $K_a = 3.672 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ， $K_d = 1.807 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ，亲和力： $KD = 4.921 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。
- 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)	Chi² (RU²)	U-value
	3672	0.001807	4.921E-7			5.442E+6				0.399	1
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

