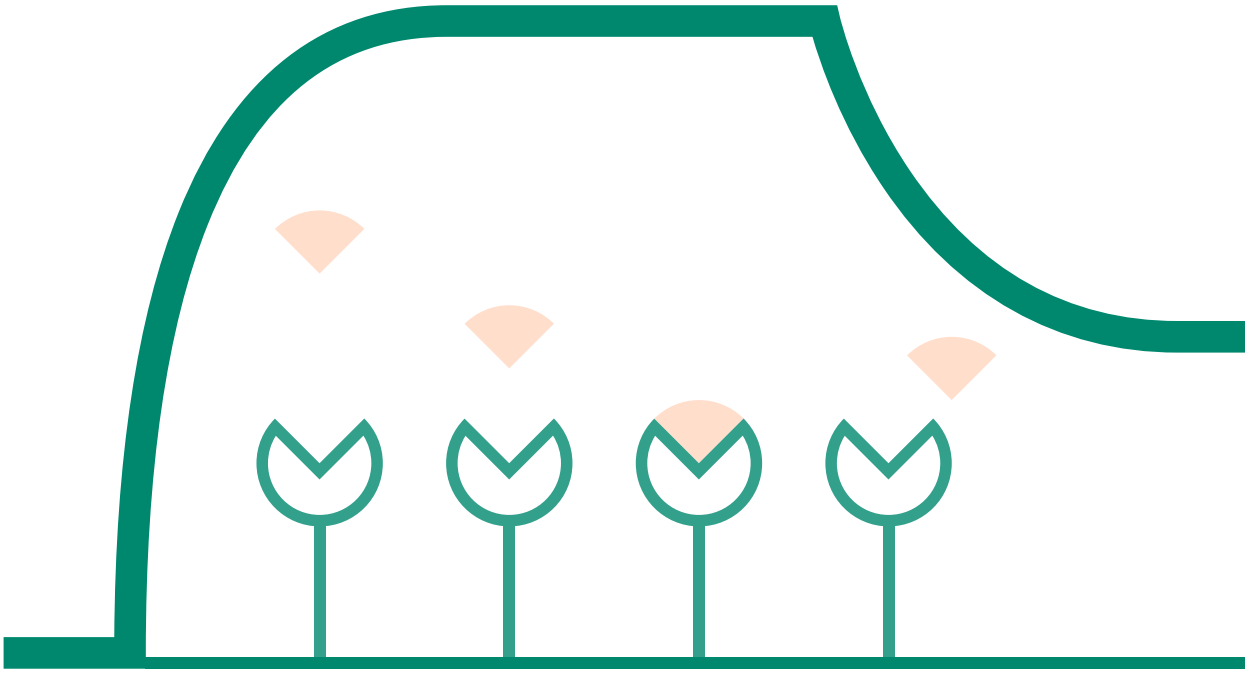
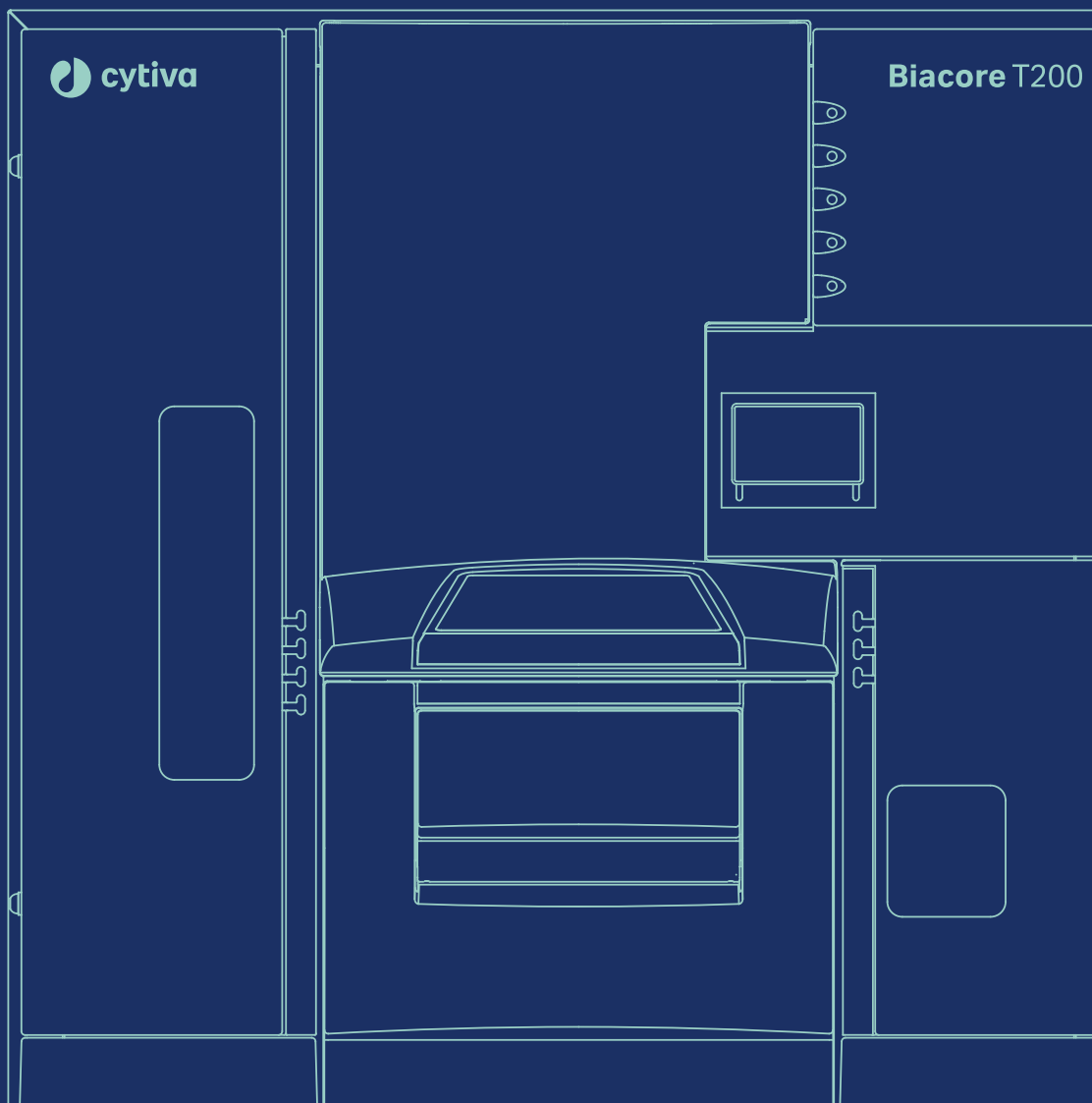
cytiva

Easy Biacore:
利用Biacore T200检测蛋白与蛋白结合——多循环动力学方式



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 检测蛋白与蛋白结合操作指南》。



实验前准备

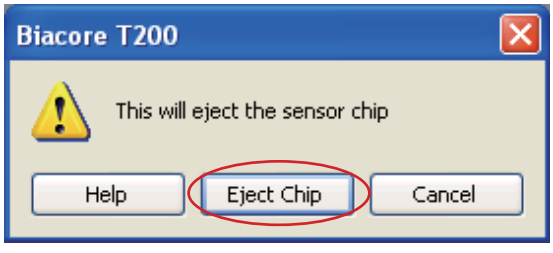
- S 系列 CM5 芯片，货号：29-1049-88 (一片装)、BR-1005-30 (三片装)、29-1496-03 (十片装)，(注：每张芯片若一次性使用，可检测三对不同的互作，若再生后重复使用，只要 蛋白一直有活性，就可一直使用)。
- 氨基偶联试剂盒 (货号：BR-1000-50),(注：里面 的 EDC 和 NHS，溶解后，200ul 每管分装，-20℃冻存，后续实验前，各取一管融化后使用即可)。
- 偶联 Buffer：10mM 醋酸钠 pH4.0 (货号：BR-1003-49)，或 10mM 醋酸钠 pH4.5 (货号：BR-1003-50)。
- 缓冲液：10 x HBS-EP+ (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。
- 再生溶液 Glycine 1.5 (货号：BR-1003-54)。
- 无盖 1.5 ml EP 管 (货号：BR-1002-87)。
- 蛋白 A 和蛋白 B：母液浓度 > 0.2 mg/mL，蛋白总量至少各 20 μg。

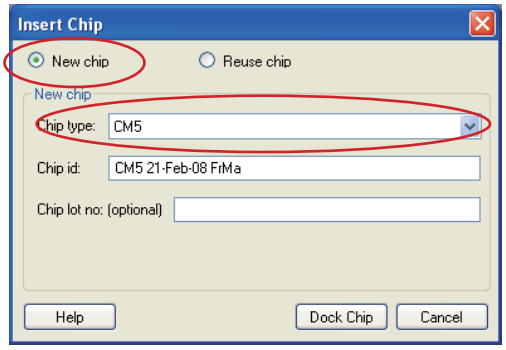
扫描二维码选择含上述所有耗材的套餐

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，现在 Chip type 为 CM5。





以本实验为例

- 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。

以本实验为例

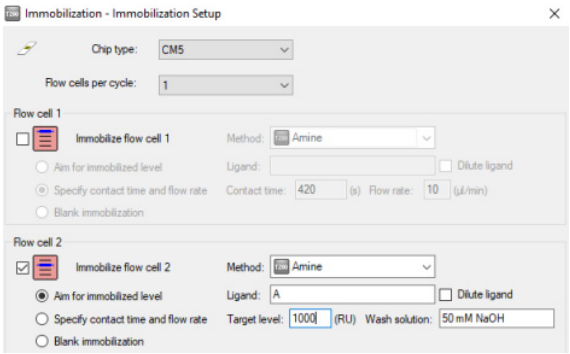
- 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，将芯片轻轻推入卡槽，最后合上芯片舱的舱门。点击 Dock Chip。结束后，选择 Tools → Prime 命令，点击 Start。结束后，点击 Close，系统自动转入待机 (Standby) 状态。

蛋白 A 偶联

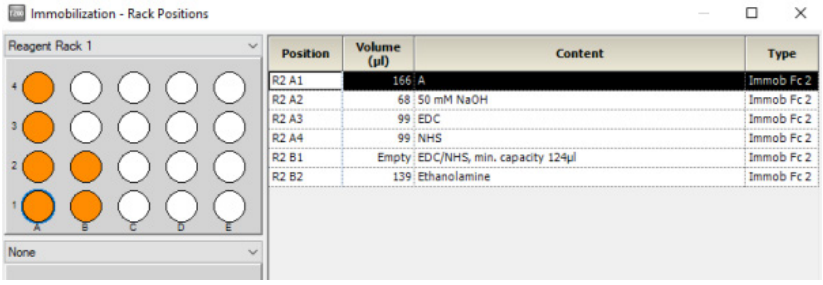
- 点击控制软件 File 下面的 Open/New wizard template，选择 immobilization，双击。在 Chip type 中选 CM5，在 Flow cells per cycle 选 1。勾选 Flow cell 2，method 选用 amine，Ligand 输入配体名称 (本实验为 A)，选用 aim for immobilized level，Target level 输入配体目标偶联量 (参考表一)。点击 2 次 Next。

表 1. 偶联量与配体工作浓度参考表

分子量比 (配体 A/ 分析物 B)	≤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	2 μg/mL	10 μg/mL	20 μg/mL		50 μg/mL



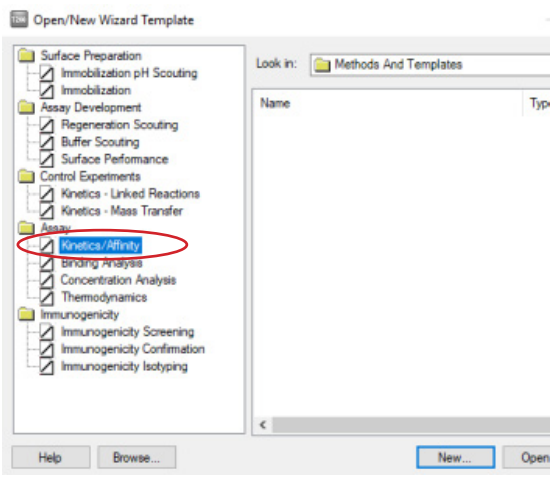
- 将 Reagent Rack 改为 Reagent Rack1，点开左下方 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial siza 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。根据下图中样品名称及体积 (大于该指定体积即可) 进行样品准备。配体蛋白用 pH4.0 的醋酸钠溶液稀释至对应浓度 (参考表一)。点击左下方 Eject Rack，取出样品架，将准备好的样品放到对应位置。盖上试管架盖子，将样品架送回样品舱。(**注：所有 EP 管的盖子务必剪去**)。



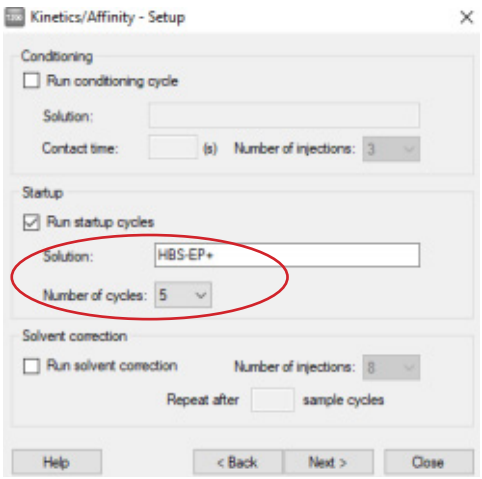
- 点击 Next，点击 start，保存 method 与 result 文件。系统将自动在芯片表面包被目标偶联量的配体蛋白，并自动生成偶联报告。
- 偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

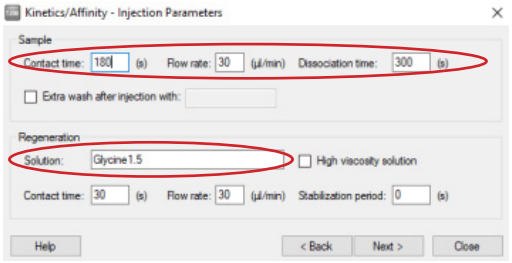
多循环动力学检测

- 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（如果蛋白偶联在 flow cell 4，则选 4-3），Chip type 选择 CM5。点击 Next。

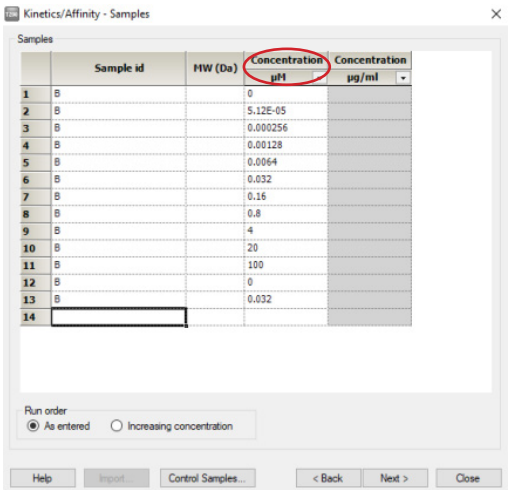


- Startup 中 Solution 填 HBS-EP+，Number of cycle 改为 5，点击 Next。Sample 中 Contact time 为 180s（或 120s），Dissociation time 为 300s，Regeneration 中 solution 为 Glycine 1.5。点击 Next。

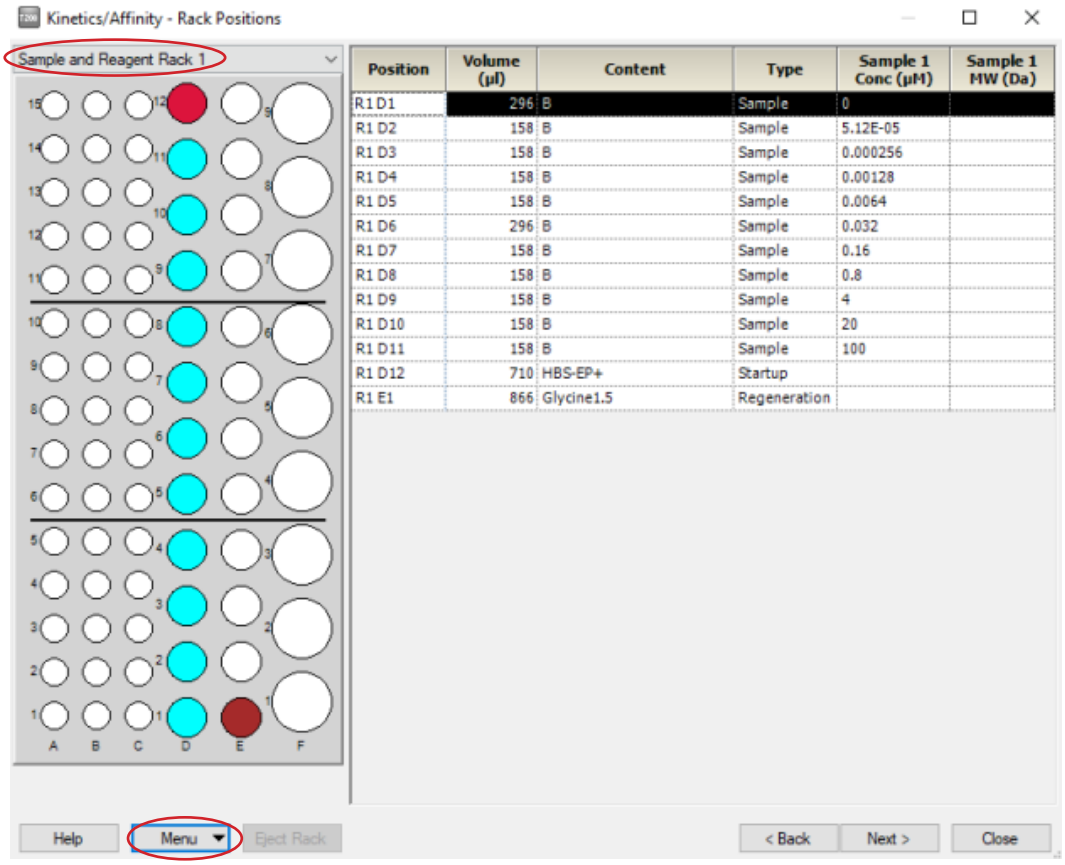




- Kinetics/Affinity-Sample 界面，填写分析物信息：Sample id 填写样品名称，Concentration 填写分析物系列浓度（由低到高、五倍稀释），注意浓度单位选择，推荐浓度如下：偶联结束后，即可进入下一步实验，无需等待基线平衡。

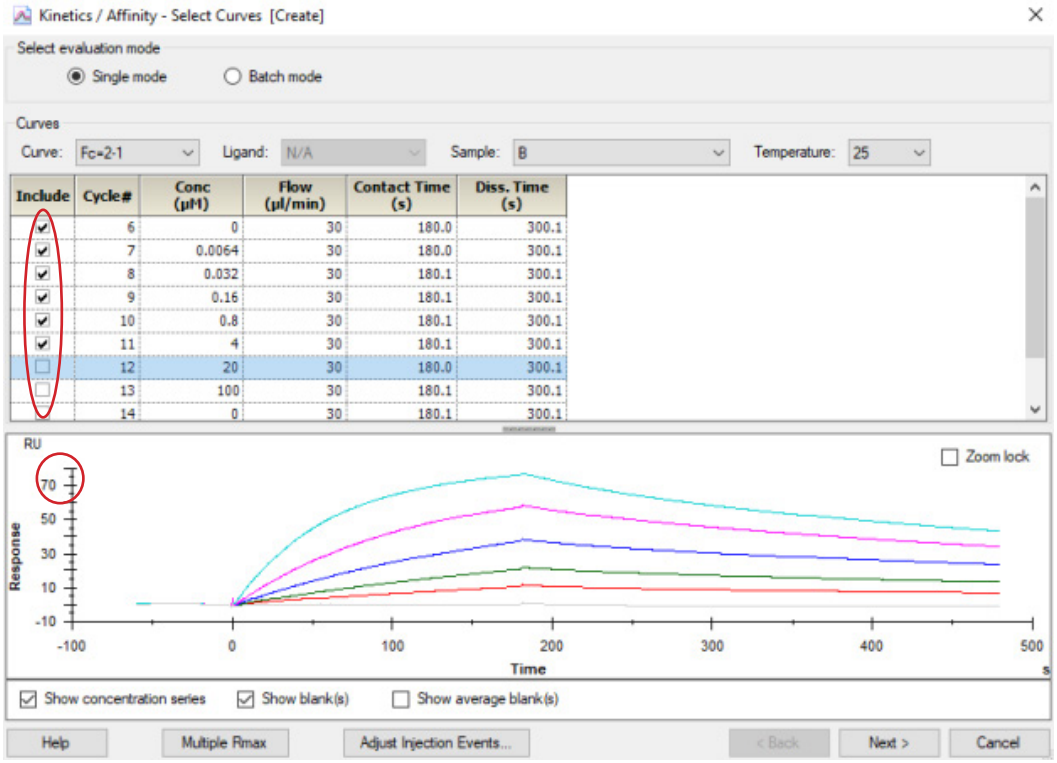


- 点击 2 次 Next。将 Reagent Rack 改为 Sample and Reagent Rack1(或根据样品数量选择其他 rack 或 96/384 孔板)，再点开左下方 Menu 后选 Automatic Positioning，Vial siza 选项选择 Medium，若要合并相同样品，pooling 选项选择 yes，点击 OK。根据下图样品名称及体积 (大于该指定体积即可) 进行样品准备。蛋白 B 母液先用左托盘中的运行缓冲液 1x HBS-EP+ 稀释至 100μM，再用 1x HBS-EP+ 进行 5 倍稀释。点击左下方 Eject Rack，取出样品架。根据图示样品位置进行放置，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。

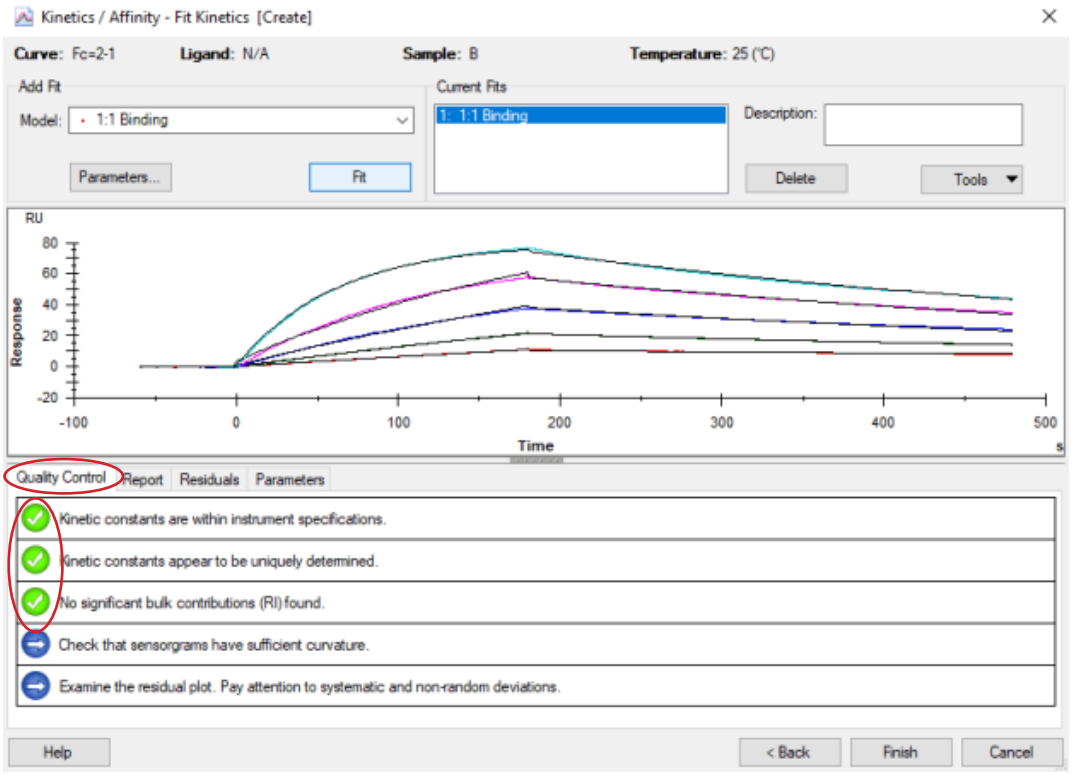


结果分析

- 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 B 偶联在芯片上，将 A 作为分析物。若 baseline 中各个点的响应值上飘，可适当延长 glycine 1.5 溶液的进样时间。
- 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 = 3672 $M^{-1}s^{-1}$，Kd = 0.001807 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。



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。

CY19514-26Feb21-BR