

GE Healthcare
Life Sciences

Biacore

现场培训教程

培训内容

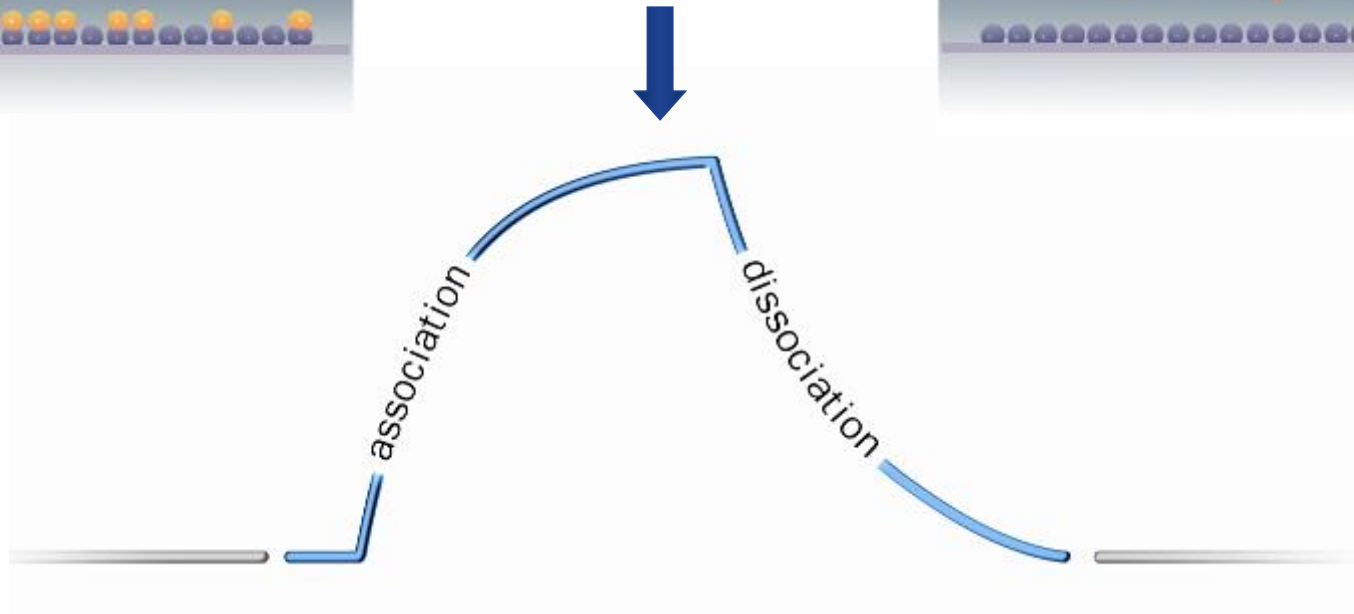
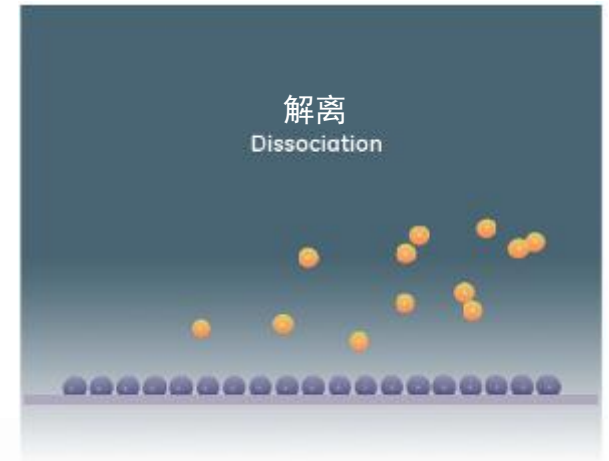
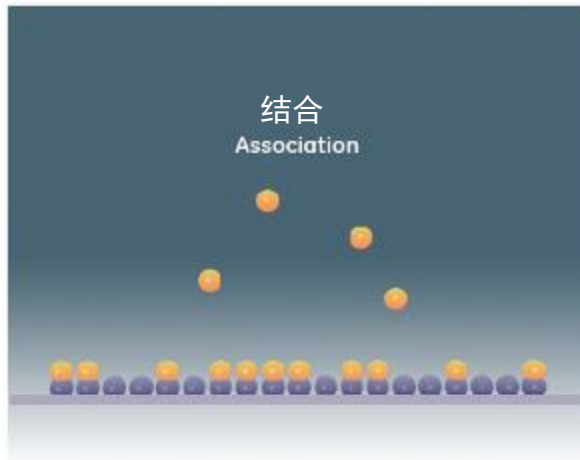
- Biacore的原理与应用
- Biacore的基本实验流程
- DEMO实验
- 数据分析
- 维护保养

Biacore的原理与应用



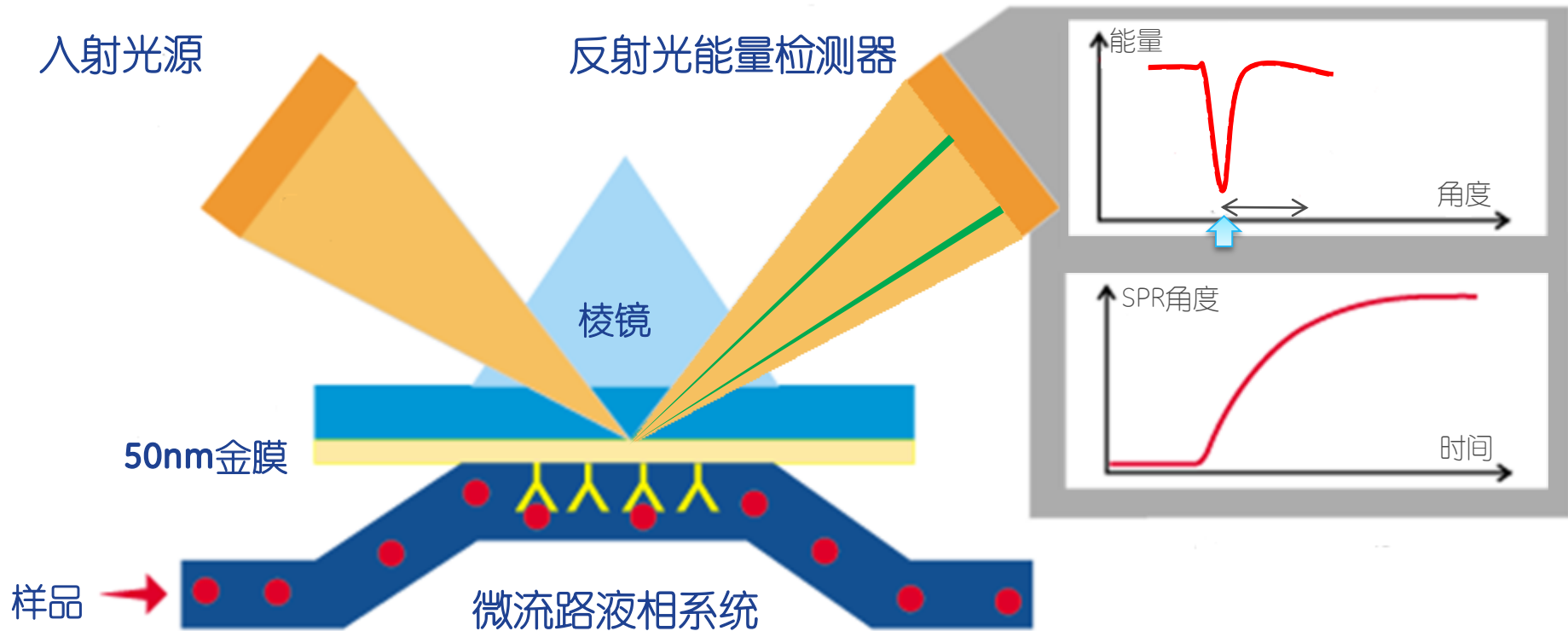
imagination at work

Biacore: 实时、无标记、活性分子互作分析



Biacore实时监控分子相互结合、解离的过程

表面等离子共振原理 (SPR)



SPR 是一种折光率传感器

✓响应值反映了SPR角度的改变

✓响应信号依赖于芯片表面分子的浓度和温度

✓1RU的响应值大致上相当于芯片表面结合物质的浓度改变了 $1\text{pg}/\text{mm}^2$ (蛋白结合与CM5芯片)

Biacore核心组件



通过表面等离子共振技术(SPR)测定结合

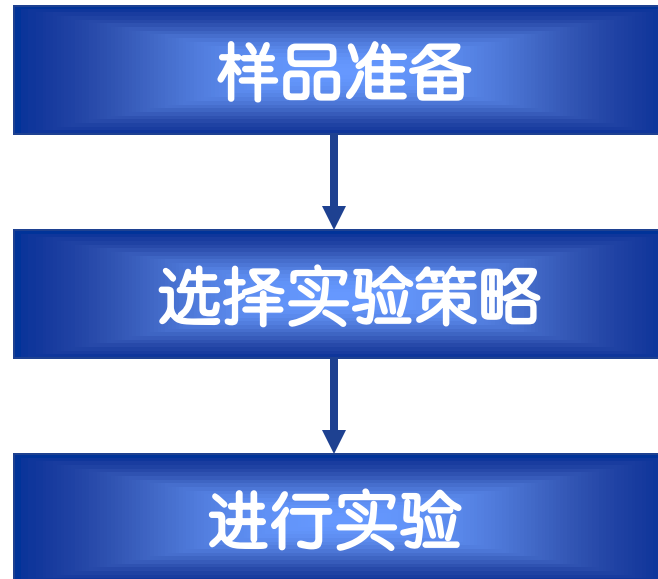


Biacore的典型应用

- 特异性分析
 - 目标分子与靶分子之间是否发生结合？特异性如何？
- 多重结合分析
 - 哪些分子参与了复合体的形成？顺序是什么？
- 亲和力测定
 - 配体与分析物之间的结合强弱？
- 动力学分析
 - 两分子结合和解离的速率快慢？
- 浓度测定
 - 样品中的目标分子浓度高低？
- 热力学分析
 - 结合强弱、快慢的结构机理是什么？

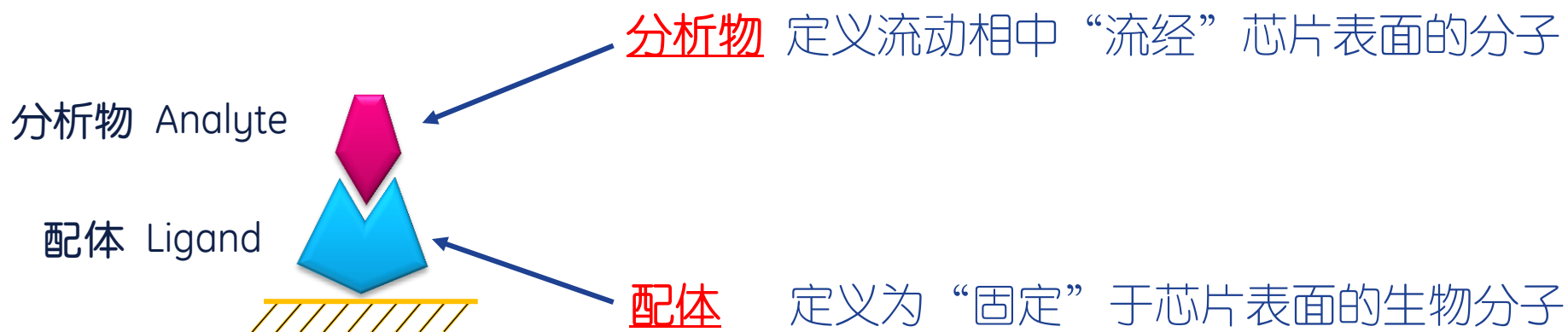
Biacore的基本实验流程

Biacore的基本实验流程



1.样品准备

分析物和配体的定义



1.样品准备

样品的注意点

- 样品的均一性
 - 确保样品充分水溶，样品中没有任何沉淀、颗粒
 - 保持样品处于均一的、不聚集的状态
- 蛋白纯度 (>90%)
- 准确定量样品浓度
- 了解蛋白样品的等电点/分子量信息
- 了解样品成分
 - 分析物中不能含有甘油、蔗糖、咪唑

1.样品准备

缓冲液的选择

- 大多数常用的缓冲液都适用于 **Biacore**，须根据结合活性和真实情况来选择最适 **buffer**，添加剂，辅助因子
- 建议在运行缓冲液中保持一定盐离子强度，加入表面活性剂 **P20(0.05%)**，以降低非特异性吸附
- 避免添加蔗糖、甘油、咪唑等高折光率物质
- 必须经 **0.22 μm**膜过滤并抽气（隔日使用需冲洗过滤脱气）
- 如使用有机溶剂，如 **DMSO**，请参考兼容试剂表和小分子手册

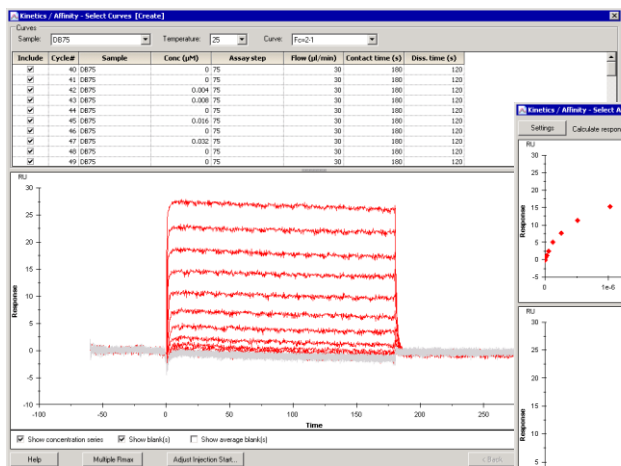
1.样品准备

氨基偶联的考虑

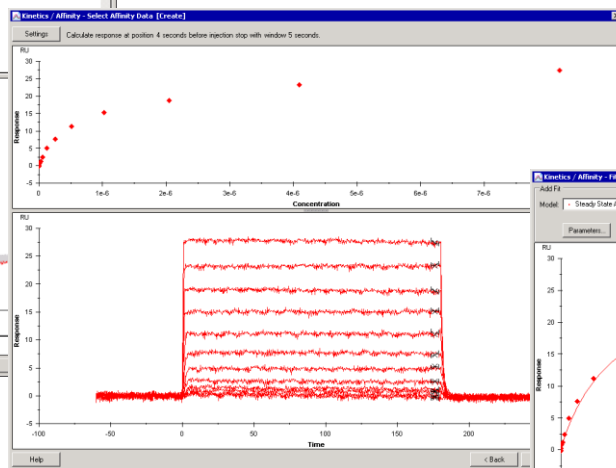
- 若进行氨基偶联：
 - 氨基偶联时，配体不能含有**Tris**，**NaN₃**，甘氨酸等含伯氨基成分
 - 极酸性蛋白不能固定于**CM**系列的芯片，可选择其它芯片或者捕获方法固定

2.选择实验策略

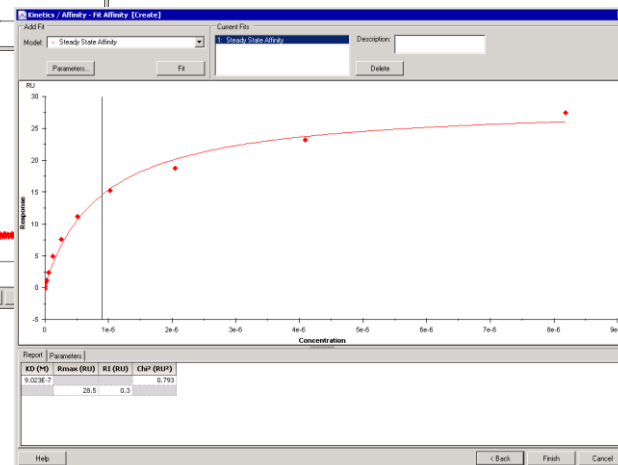
通过稳态分析获得亲和力



✓ 将一系列浓度的分析物流过配体



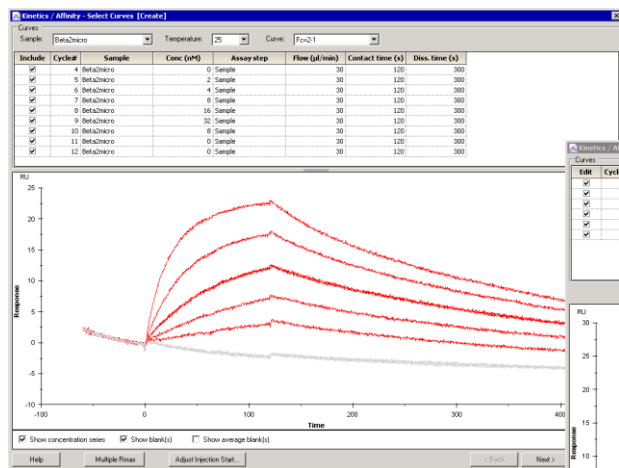
✓ 获得稳态时的响应值



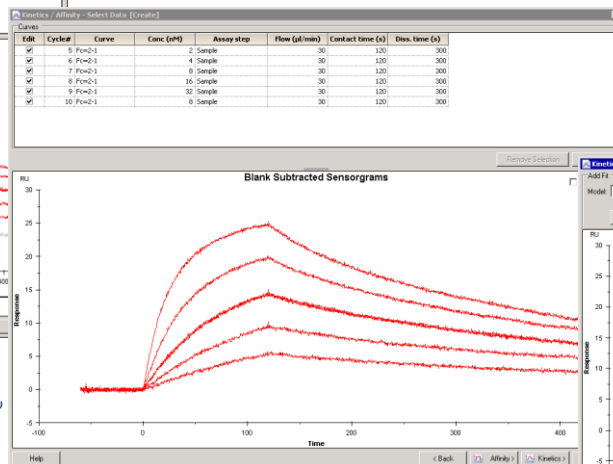
✓ 以浓度为X坐标，稳态响应值为Y值，通过拟合“饱和曲线”获得亲和力 K_D

2.选择实验策略

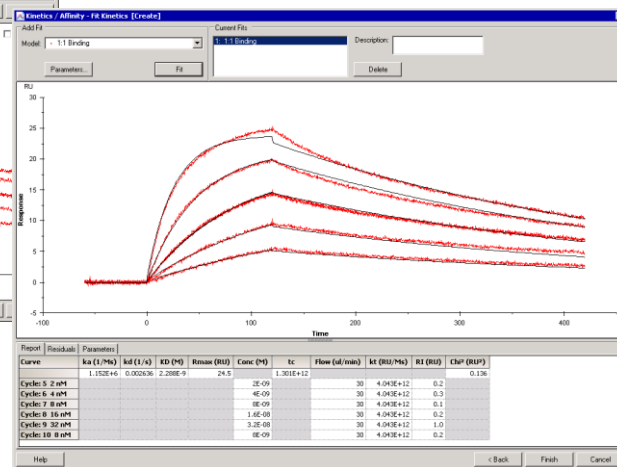
通过动力学方法获得亲和力



✓ 一系列浓度的分析物流过配体，获得结合+解离全过程的响应值。



✓ 所有传感图扣除零浓度的响应值 (Double Reference)。



✓ 通过拟合所有曲线，获得动力学 k_a , k_d 和亲和力 K_D 。 $K_D = k_d/k_a$ 。

亲和力 K_D 由动力学常数 k_a , k_d 获得，是结合和解离两个过程的综合结果。

2.选择实验策略

传感芯片的选择

11种不同的芯片类型

CM5, CM4, CM3: 芯片 → 蛋白、肽段、小分子等

CM7: 小分子化合物研究

SA芯片: 生物素标记的分子, 如核酸、糖类

Biotin CAP芯片: 可逆性生物素捕获芯片

NTA芯片: His重组蛋白

L1 芯片: 模拟脂质双分子层环境

HPA芯片: 实现膜系统相关的互作分析

C1芯片: 研究细胞、病毒等大颗粒分子

Au裸金芯片: 客户定制表面 (材料、高分子等)



30余种不同的试剂盒及缓冲液产品

氨基偶联试剂盒、巯基偶联试剂盒;

GST捕获试剂盒 → GST重组蛋白分析;

 NTA捕获试剂盒 His 重组蛋白分析
imagination at work

3.实验过程

固定配体



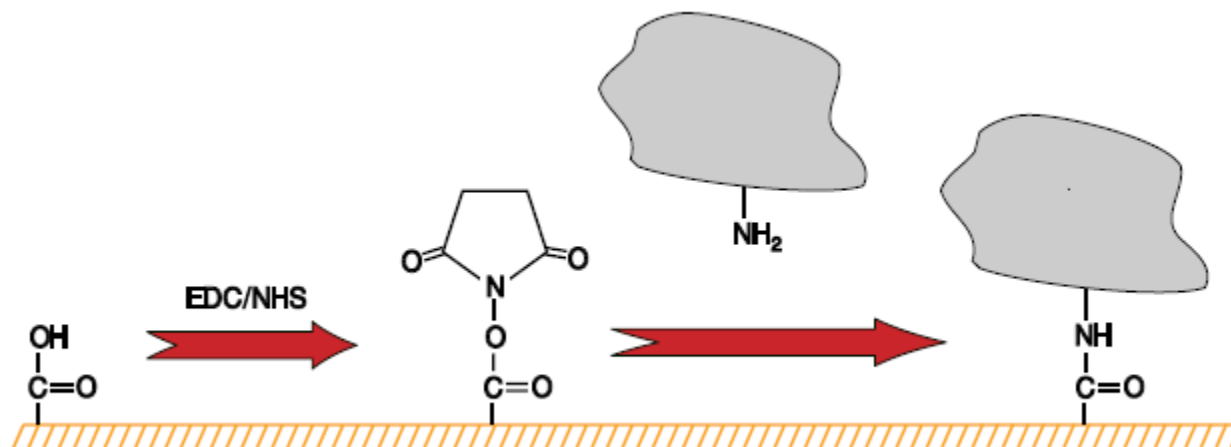
固定配体

3.实验过程

固定配体



固定配体



- 活化：EDC/NHS注入，发生表面酯化
- 配体偶联：与配体蛋白的氨基发生反应
- 封闭：用乙醇胺封闭芯片上多余的有活性羧基

3.实验过程

固定配体：偶联pH的选择

- 通过实验步骤寻找合适的偶联pH
- 当 $\text{pH} > 3.5$ 时，芯片表面葡聚糖基质携带负电荷
- 偶联缓冲液的pH应该高于3.5, 但低于配体蛋白的等电点
- 对于许多蛋白质, 10 mM醋酸钠缓冲液($\text{pH } 4.5$)较为适合
- 蛋白配体的浓度一般介于 $10\text{-}100\mu\text{g/ml}$ ，初始可尝试 $20\mu\text{g/ml}$
- 当无法获得理想预偶联效果时，请检查样品的pH

3.实验过程

固定配体：偶联pH的选择

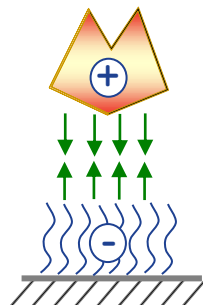
- 预富集的目的：在化学偶联过程，通过静电作用吸附并提高芯片表面附近的配体浓度，从而提高偶联的效率和减少配体消耗。

$\text{pH} < 3.5$



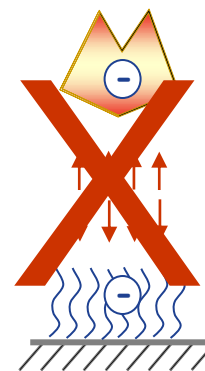
pH太低时，葡聚糖不带电，无法富集

$3.5 < \text{pH} < \text{pI}$



蛋白带正电，葡聚糖带负电。通过静电吸附可以富集配体。

$\text{pH} > \text{pI}$



蛋白和葡聚糖带相同负电，无法富集

- 够用原则
- 尽量温和

3.实验过程

固定配体：配体偶联水平的计算

- 配体偶联水平决定了芯片表面与分析物间的结合容量
- 不同分析方法所需的偶联水平也不同

--稳态分析、浓度测试、特异性：偶联水平尽量高

--动力学分析：低偶联水平

- 配体偶联水平的计算:

$$R_{\max} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times R_L \times S_m$$

R_L = 配体偶联水平

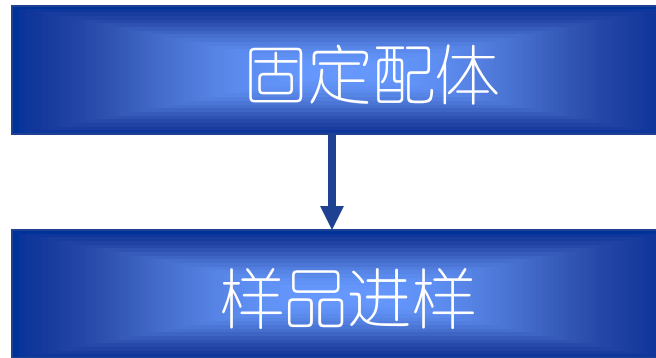
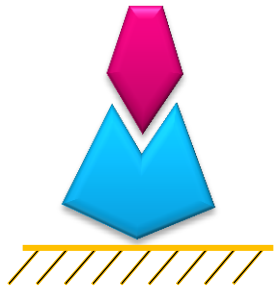
$R_{\max}$ 描述了芯片表面的最大结合容量，对于动力学低偶联需要 $R_{\max} \leq 100$

S_m = 化学计量比 (Analyte:Ligand, 未知时选择 $S_m=1$)

实际偶联量 = $1.5 R_L$

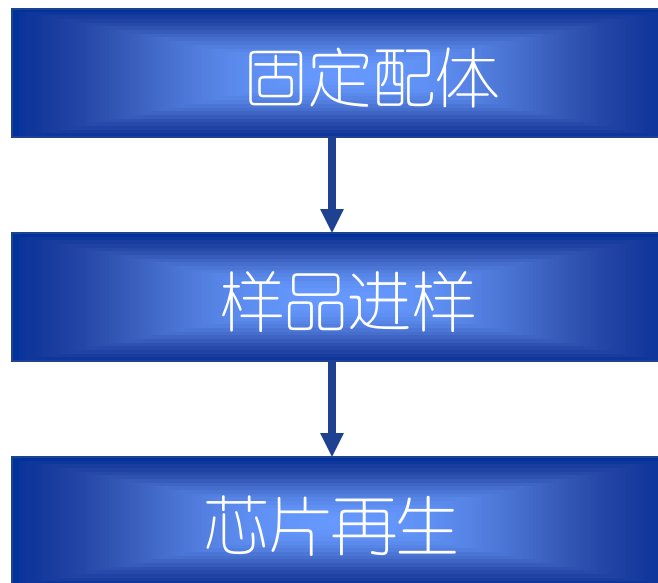
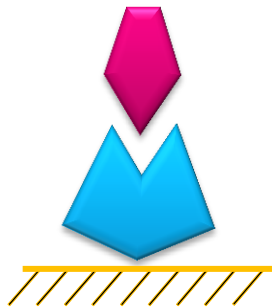
3.实验过程

样品进样



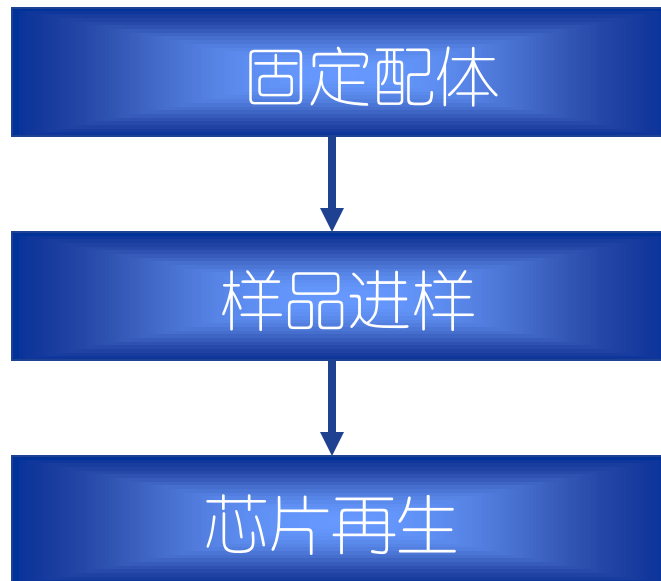
3.实验过程

芯片再生



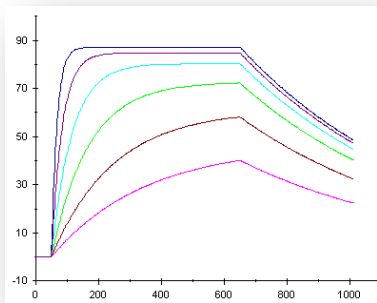
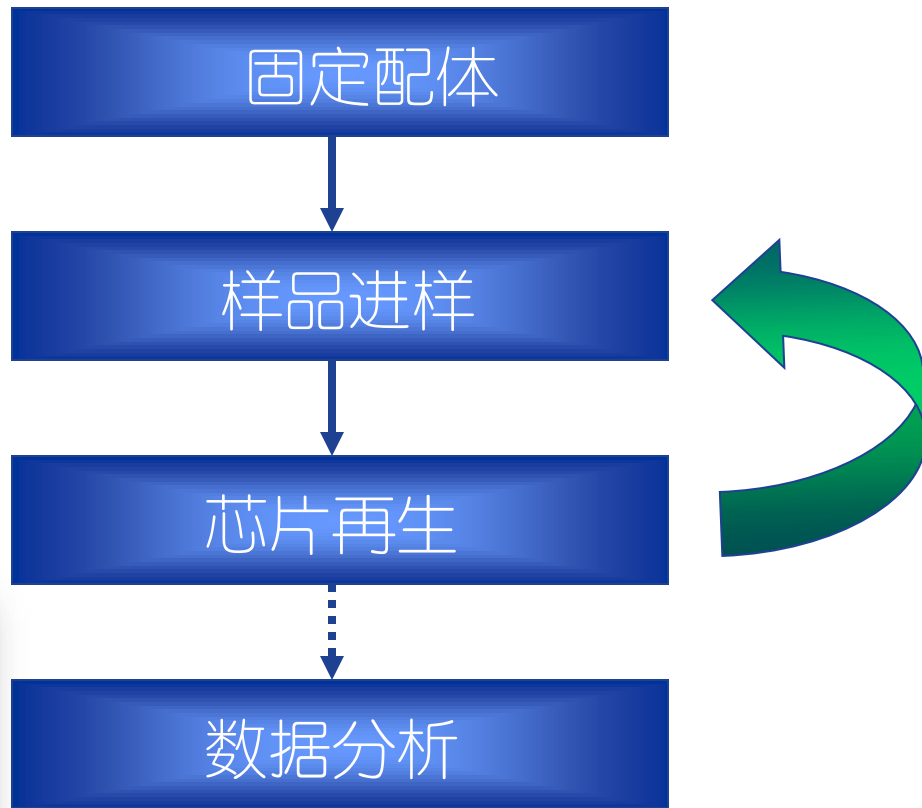
3.实验过程

循环进样



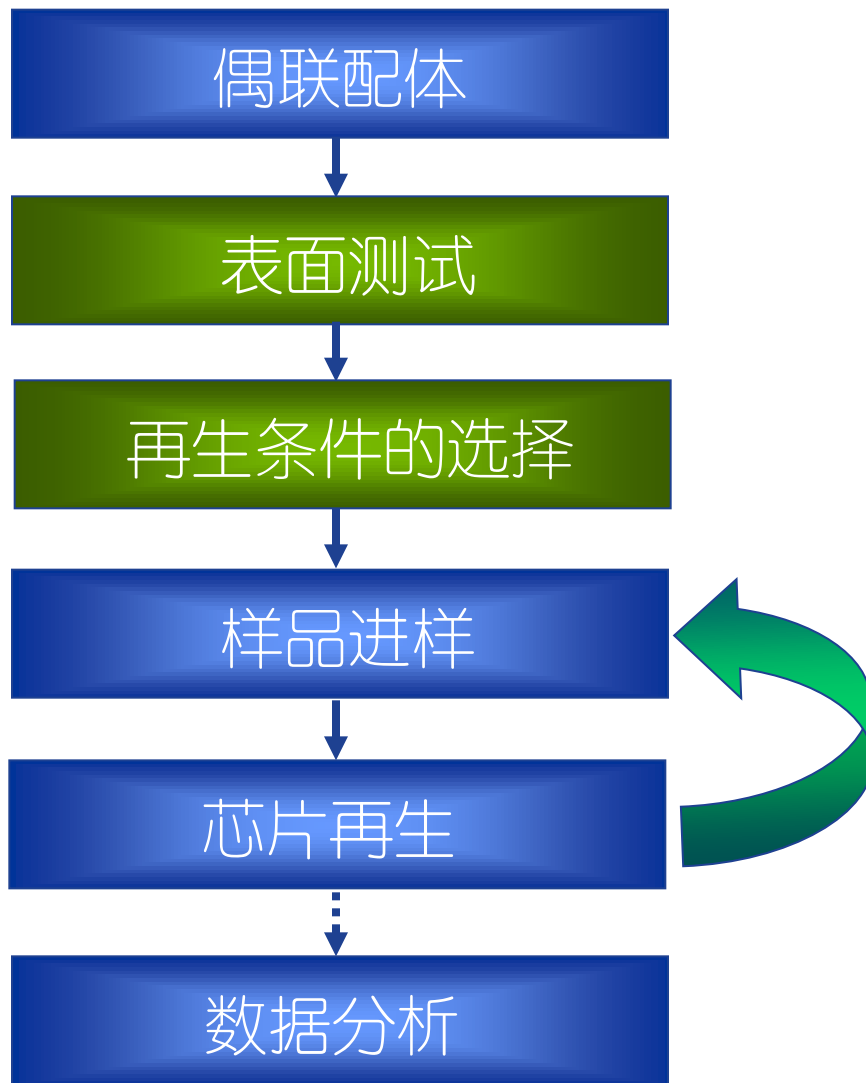
3.实验过程

数据分析

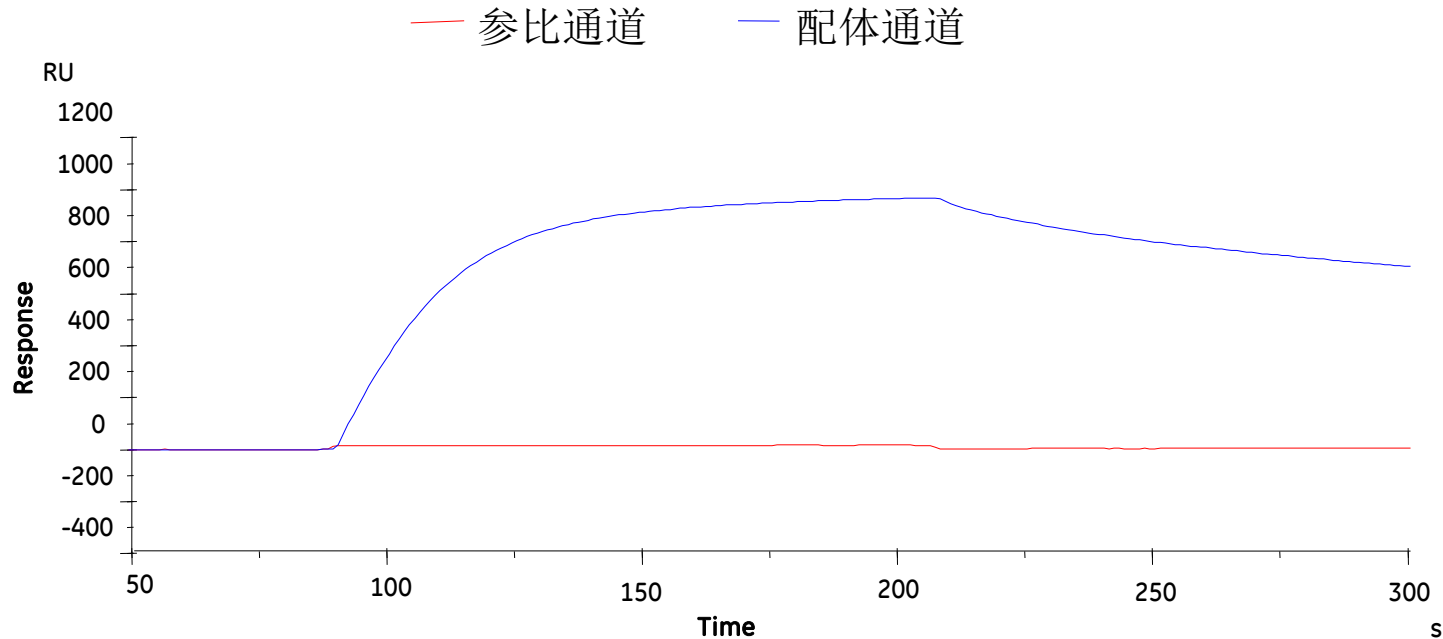


3.实验过程

实际实验中的额外考量

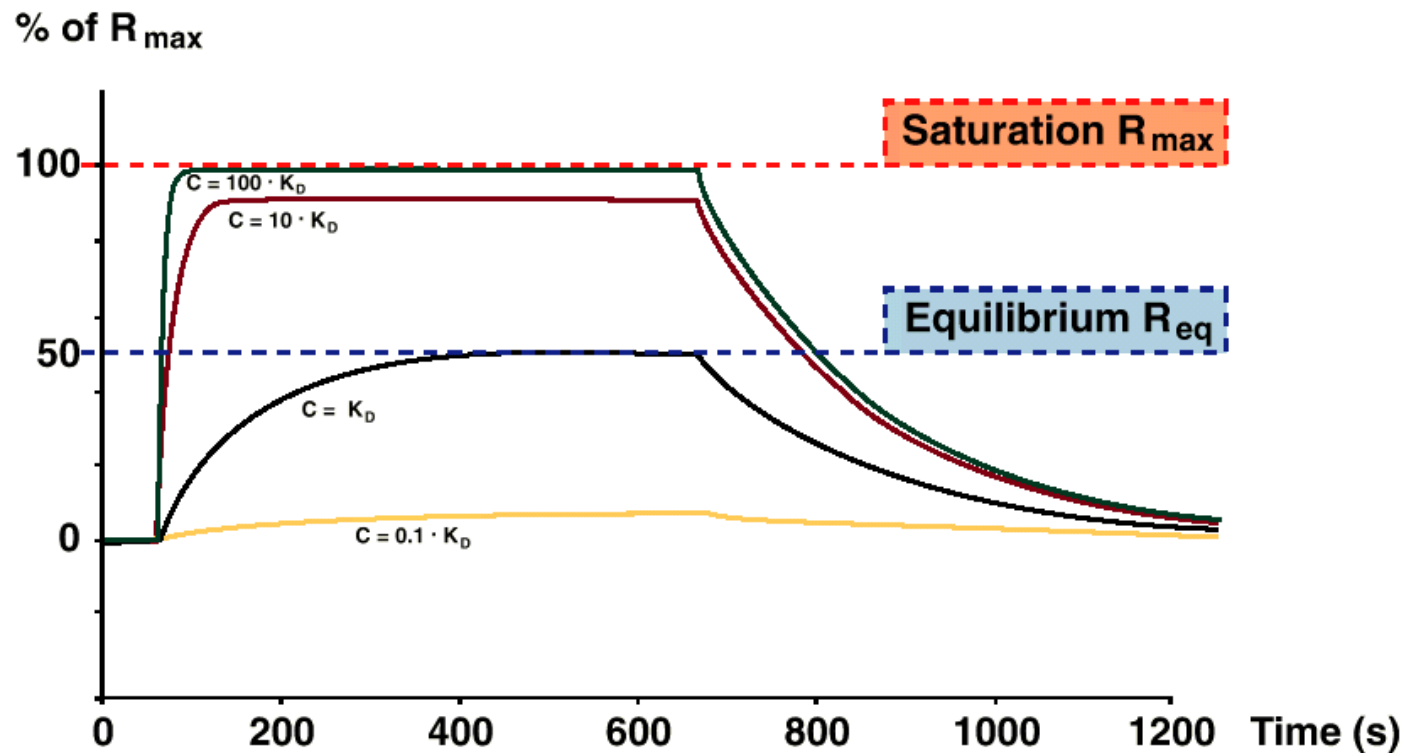


芯片表面测试



- 在实际分析开始前，进行一次进样操作
- 使用常规的分析物浓度
- 传感图能提供有用的分子相互作用信息
结合时间、解离时间、估算大致 K_D
- 用来评估对照表面上的非特异性吸附的结合水平

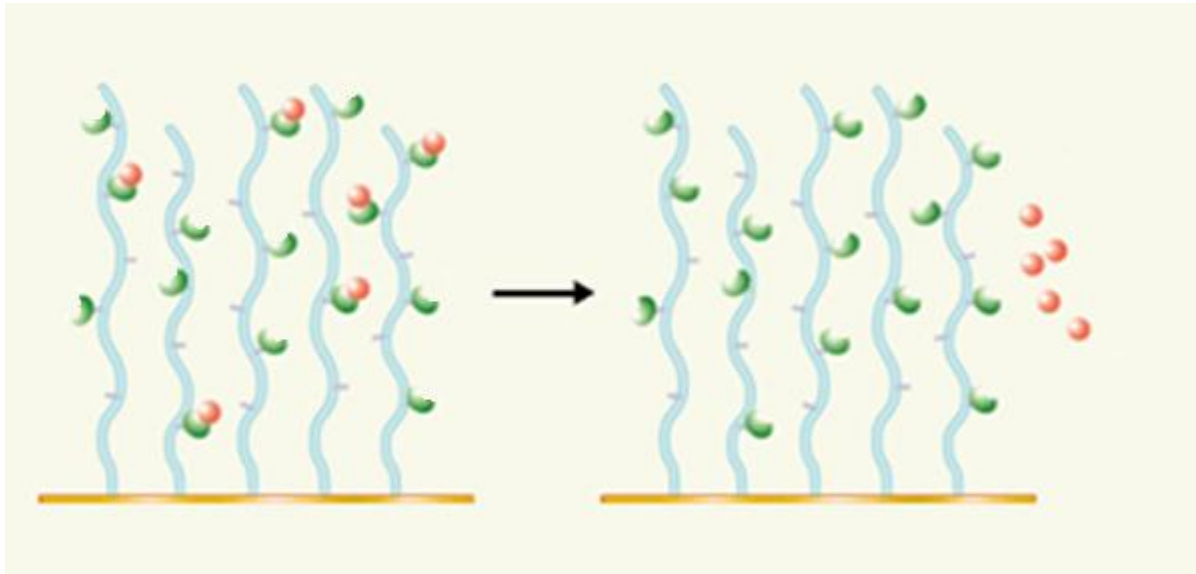
K_D 的预估



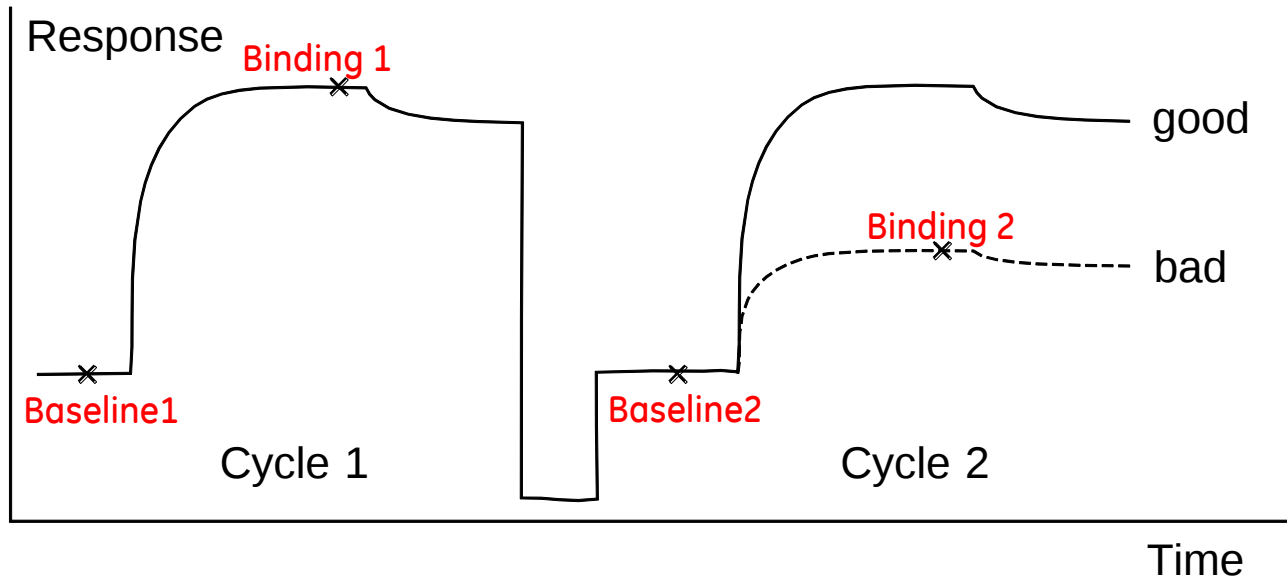
- 预估 K_D
- 动力学分析中，通过预估的 K_D 设计浓度梯度
- 获得的 K_D 必须落在实验浓度范围内

再生条件的选择

- 将与配体结合的残留的分析物分子从芯片表面彻底除去
- 必须保持芯片上配体分子的活性
- 有效的再生对获得高质量的分析数据至关重要！

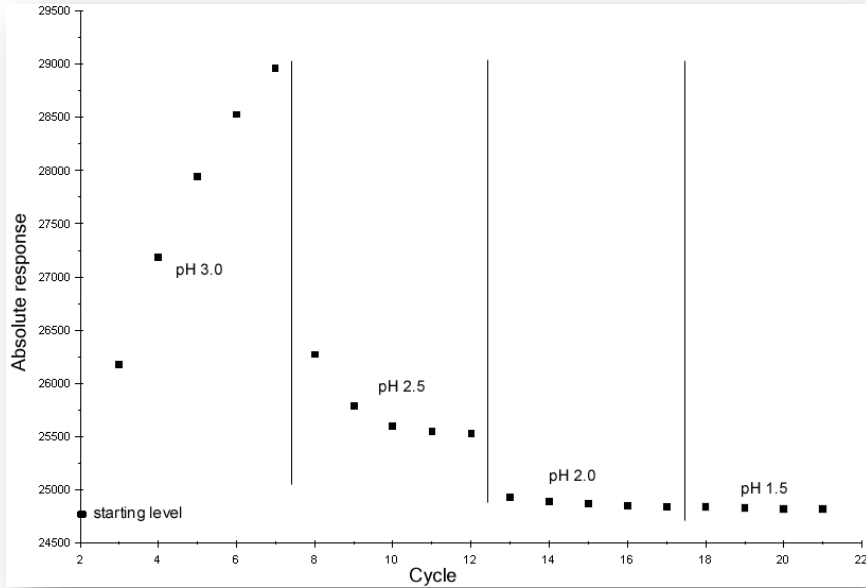


再生条件的选择-测试

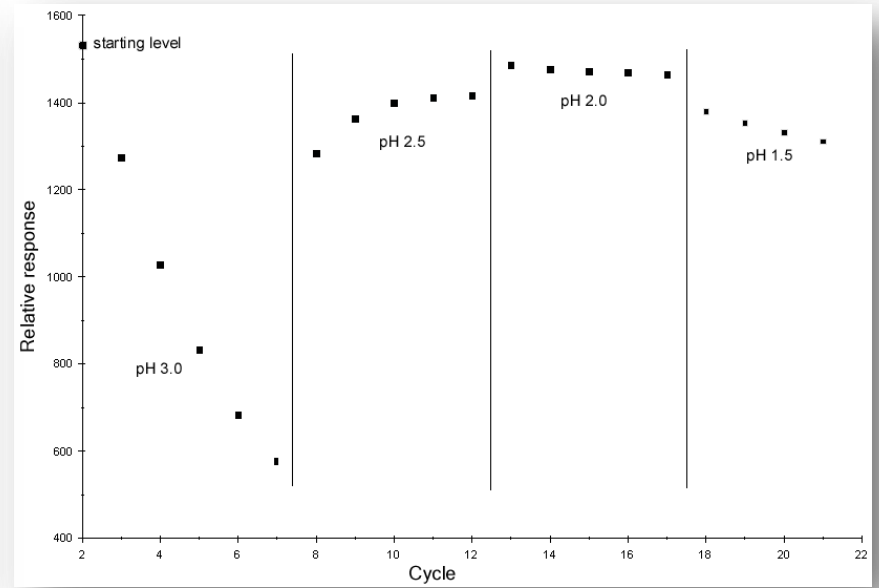


- 有效的再生条件能够去除所有剩余的分析物分子 (**Baseline**)
- 分析物重复一次进样，以检测是否配体维持了原有的活性 (**Binding**)
- 重复多次进样和再生，充分确保所选择的再生条件的有效性

再生条件的选择



基线的变化



结合水平的变化

再生条件的选择-小结

- 理想的再生

通过多次的进样，结合水平都基本维持稳定。和第一次进样相比，结合水平的变化在**10%**之内

- 过于温和的环境

结合水平逐渐降低，基线值逐渐增高

- 过于苛刻的环境

结合水平逐渐降低，基线维持稳定或逐渐降低

常用的再生条件

- 最适的再生环境内因样品和组合不同而不同
- 相对于可检测的分子的广泛性，再生条件可选择的范围相对较小
- 当配体分子是蛋白质时，建议可选择的再生起始测试条件
 - 低 pH (10 mM glycine-HCl, 从 pH 3 至 pH 1.5)
 - 乙烯乙二醇 (Ethylene glycol, 50%, 75% 和 100%)
 - 高 pH (1-50mM NaOH)
 - $MgCl_2$ (1-4 M)
 - 参考文献和再生条件筛选试剂盒
 - Biacore网站的再生数据库
- 注意再生试剂与运行缓冲液的兼容性



DEMO实验



目标

上手实验

获得抗体anti- β 2 μ -globulin IgG与抗原 β 2 μ -globulin蛋白结合的动力学常数 (k_a , k_d , K_D)

- 配体: IgG, 150KDa
- 分析物: β 2 μ -globulin, 11.8KDa
- 芯片: CM5
- 配体固定方法: 氨基共价偶联
- 运行缓冲液: HBS-EP+ buffer
(0.01M HEPES, pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% (v:v)表面活性剂P20)

DEMO实验

1. 装入芯片

1. 从冰箱取出**CM5**芯片包装，恢复至室温(~**15**分钟)
2. 执行软件命令(**Undock chip/Eject chip**)，取出原有芯片
3. 从包装中取出芯片，按照芯片上的方向指示放入芯片
4. 将芯片舱门推上
5. 使用软件命令装入新芯片(**Dock chip**)
6. 缓冲液入口管插入到新的运行缓冲液中
7. 使用**Prime**快速更换缓冲液

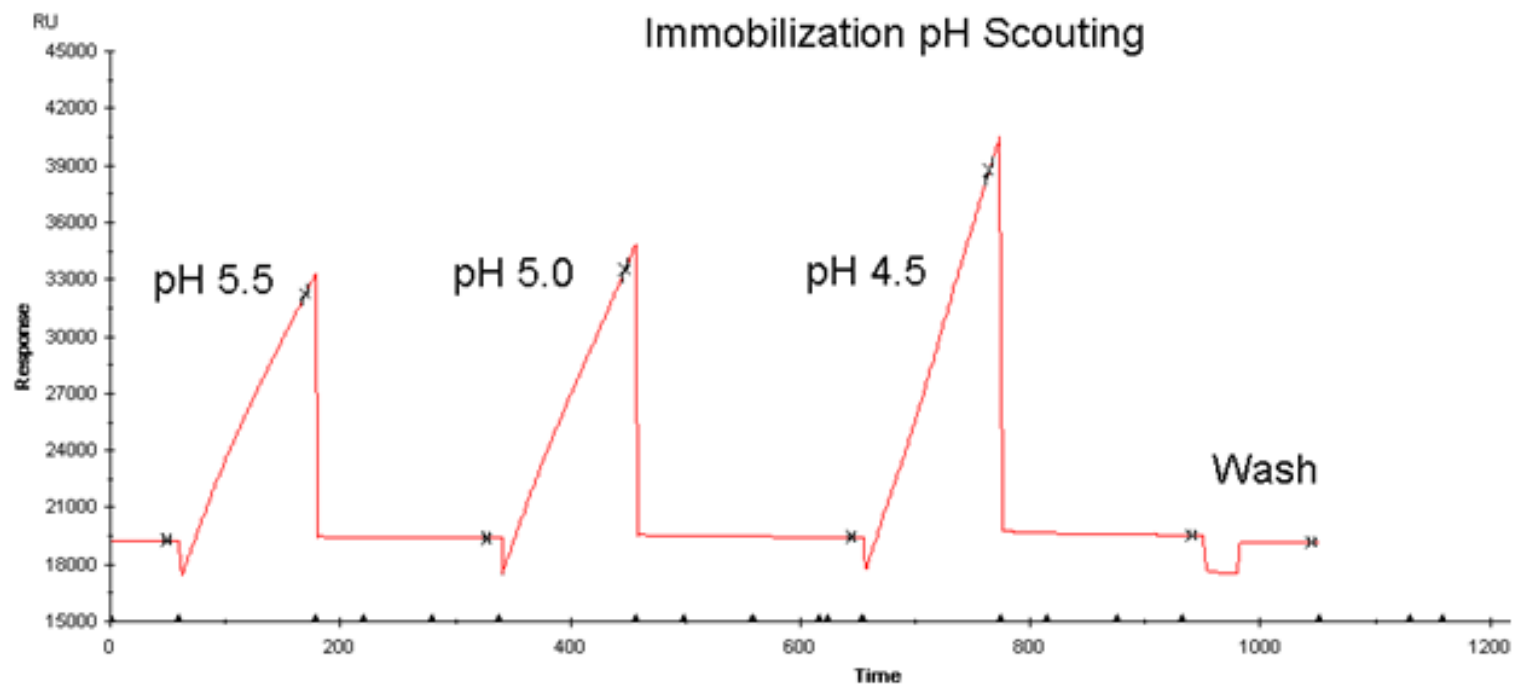
DEMO实验

2. 预富集

配体	Anti- β 2 μ -globulin IgG
配体稀释	分别将3 μ l配体+97 μ l 10 mM NaAc (pH4.5, pH5.0, pH5.5)稀释
运行模式	手动模式
Flowcell	FC2
流速	10 μ l/min
进样	120 s
再生	50 mM NaOH 30 s

DEMO实验

2. 预富集：预计结果



DEMO实验

本仪器具体操作步骤参考另一文件《Biacore X100 简易操作指南》，但基本原理及步骤相同。

3. 芯片偶联：Wizard模式

Immobilization - Immobilization Setup

Chip type: **CM5**

Flow cell 1

☐ Immobilize flow cell 1

Method: **Amine**

☐ Aim for immobilized level

Ligand:

☐ Dilute ligand

☒ Specify contact time and flow rate

Contact time: **420** (s) Flow rate: **10** (μL/min)

☐ Blank immobilization

Flow cell 2

☒ Immobilize flow cell 2

Method: **Amine**

☒ Aim for immobilized level

Ligand: **anti-beta2micro**

☐ Dilute ligand

☐ Specify contact time and flow rate

Target level: **1000** (RU) Wash solution: **50 mM NaOH**

☐ Blank immobilization

Flow cell 3

☐ Immobilize flow cell 3

Method: **Amine**

☐ Aim for immobilized level

Ligand:

☐ Dilute ligand

☒ Specify contact time and flow rate

Contact time: **420** (s) Flow rate: **10** (μL/min)

☐ Blank immobilization

Flow cell 4

☐ Immobilize flow cell 4

Method: **Amine**

☐ Aim for immobilized level

Ligand:

☐ Dilute ligand

☒ Specify contact time and flow rate

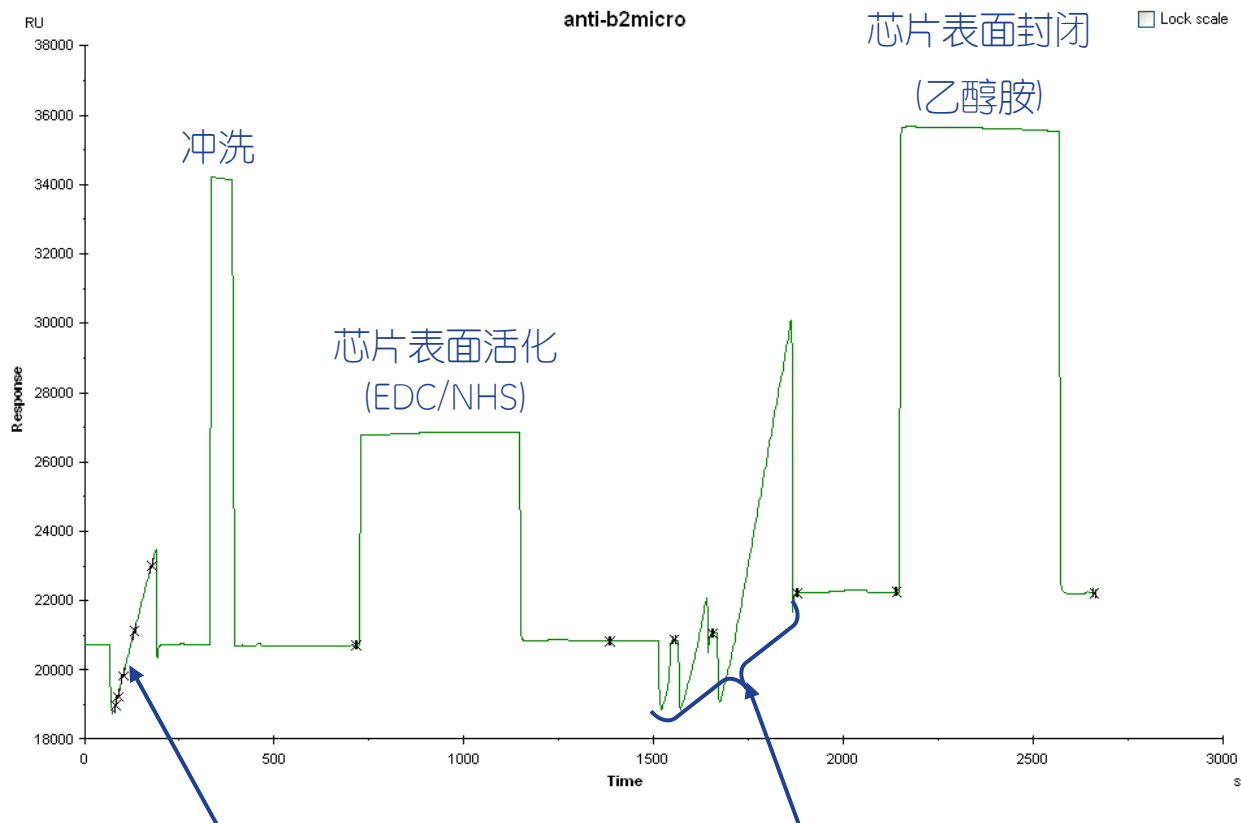
Contact time: **420** (s) Flow rate: **10** (μL/min)

☐ Blank immobilization

Help **Custom Methods...** **<Back** **Next>** **Close**

DEMO实验

3. 芯片偶联：预计结果



空芯片静电吸附
测试预富集能力

通过“脉冲式”多次配体进样，最终达到预设的
偶联水平。（第一针的进样量由预富集测试决定）

DEMO实验

4. 多循环动力学实验

Kinetics/Affinity - Injection Sequence

Detection
Flow path: 2-1

Chip
Chip type: CMS

SAMPLE
↓
REGENERATION 1

☐ Ligand capture

☒ Sample

☒ Regeneration 1

☐ Carry Over

Help < Back Next > Close

Kinetics/Affinity - Setup

Conditioning

☐ Run conditioning cycle

Solution:

Contact time: (s) Number of injections: 3

Startup

☒ Run startup cycles

Solution: Buffer

Number of cycles: 3

Solvent correction

☐ Run solvent correction Number of injections: 8

Repeat after sample cycles

Help < Back Next > Close

DEMO实验

4. 多循环动力学实验

Kinetics/Affinity - Injection Parameters

Sample

Contact time: 180 (s) Flow rate: 30 (μl/min) Dissociation time: 300 (s)

☐ Extra wash after injection with:

Regeneration

Solution: Glycine-HCl 2.5 ☐ High viscosity solution

Contact time: 30 (s) Flow rate: 30 (μl/min) Stabilization period: 0 (s)

Help < Back Next >

Kinetics/Affinity - Samples

Samples

	Sample id	MW (Da)	Concentration nM	Concentration μg/ml
1	beta2micro	11800	0	0.000
2	beta2micro	11800	2	0.02360
3	beta2micro	11800	4	0.04720
4	beta2micro	11800	8	0.09440
5	beta2micro	11800	16	0.1888
6	beta2micro	11800	32	0.3776
7	beta2micro	11800	8	0.09440
8				

Run order

☒ As entered ☐ Increasing concentration

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

DEMO实验

4. 多循环动力学实验

7200 Kinetics/Affinity - Rack Positions

Sample and Reagent Rack 1

Position	Volume (μl)	Content	Type	Sample 1 Conc (nM)	Sample 1 MW (Da)
R1 D1	158	beta2micro	Sample	0	11800
R1 D2	158	beta2micro	Sample	2	11800
R1 D3	158	beta2micro	Sample	4	11800
R1 D4	296	beta2micro	Sample	8	11800
R1 D5	158	beta2micro	Sample	16	11800
R1 D6	158	beta2micro	Sample	32	11800
R1 D7	434	Buffer	Startup		
R1 D8	490	Glycine-HCl 2.5	Regeneration		

Help Menu Eject Rack < Back Next > Close

数据分析

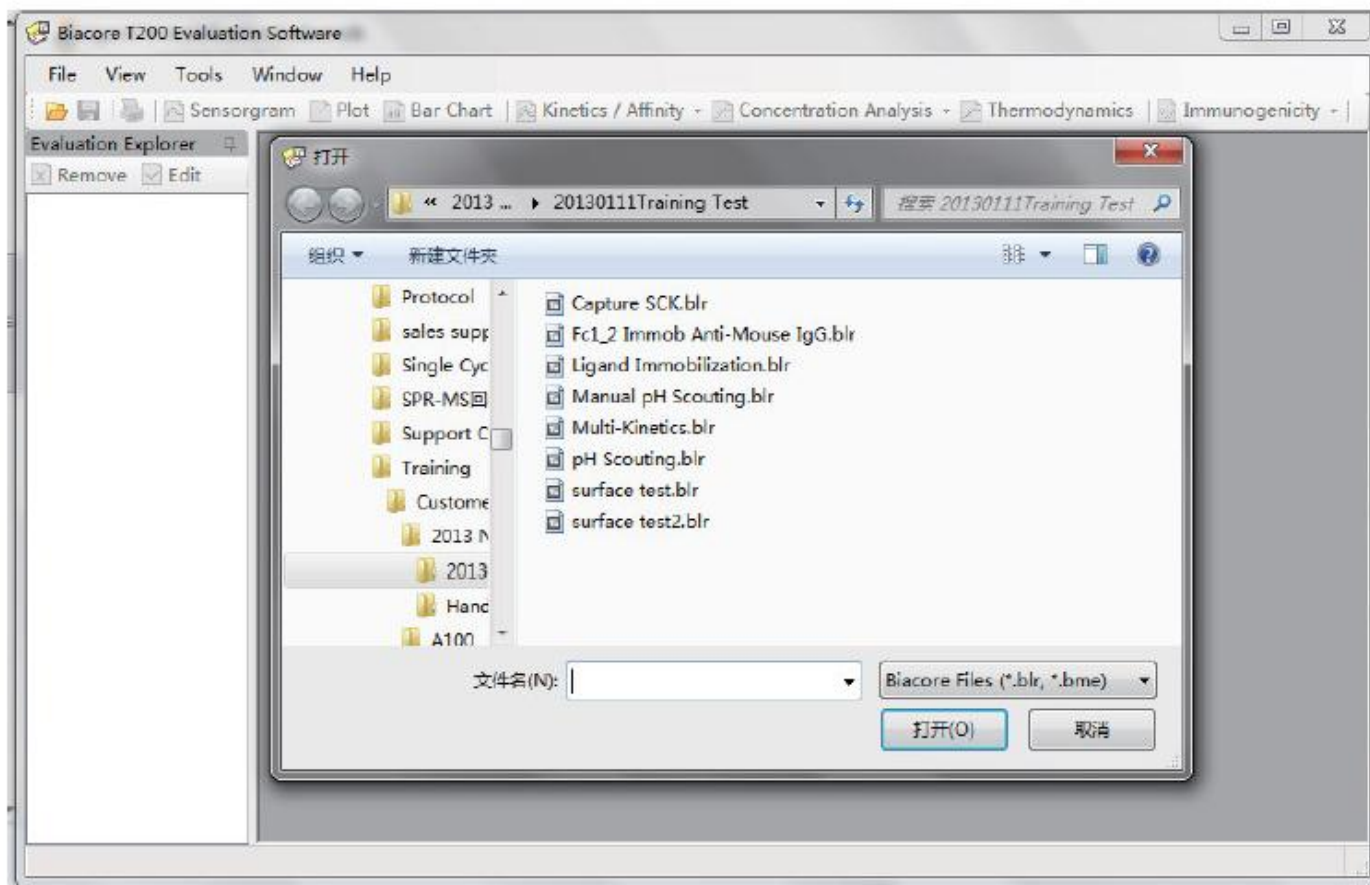


imagination at work

数据分析

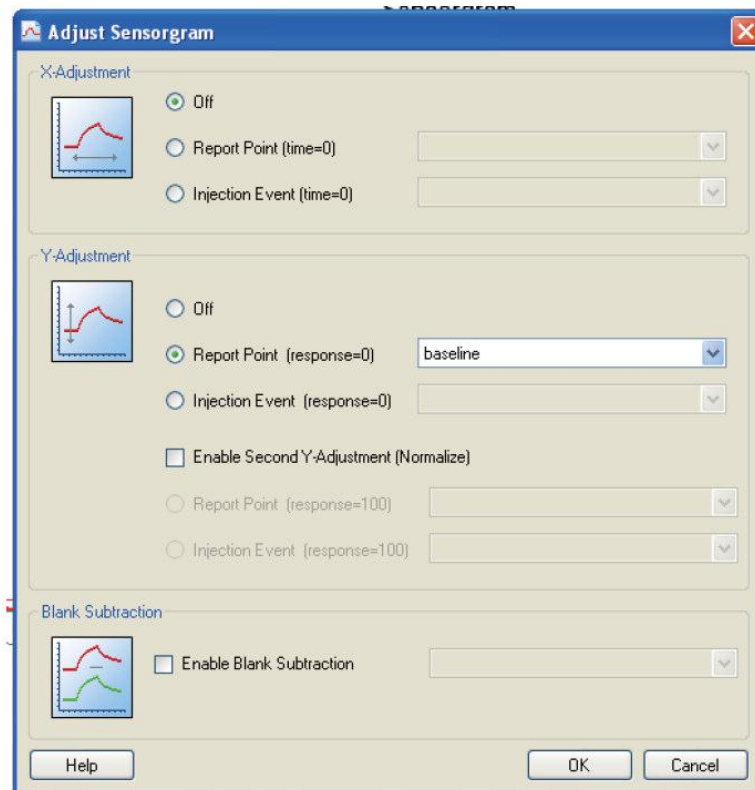
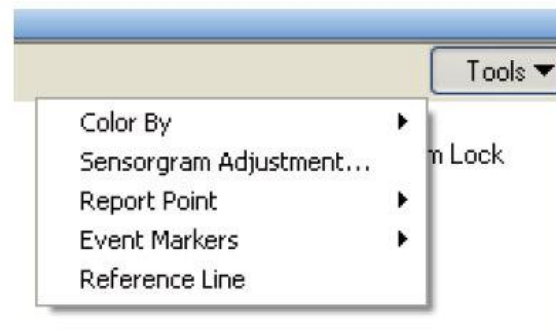
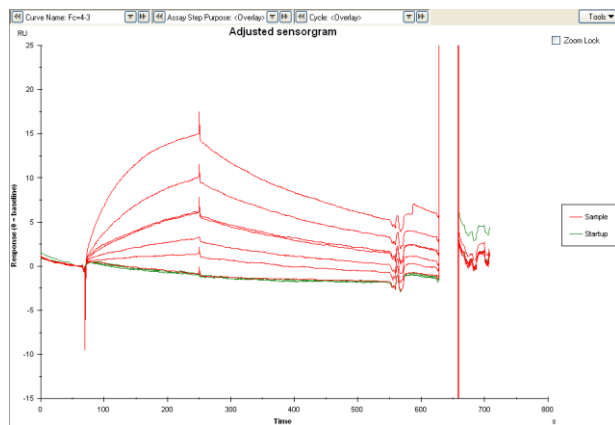
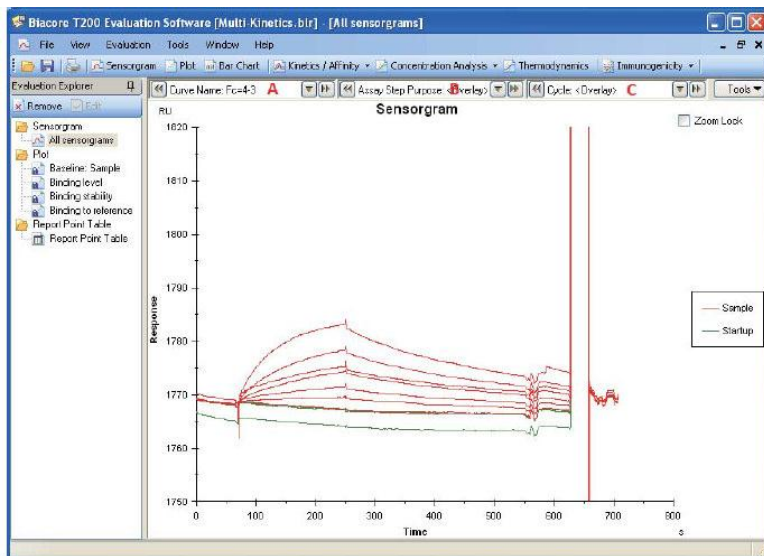
导入数据

1. 打开Biacore Evaluation Software程序 (Start->Program->Biacore->Biacore T200 Evaluation Software)
2. 选择File->Open, 打开实验数据结果文件



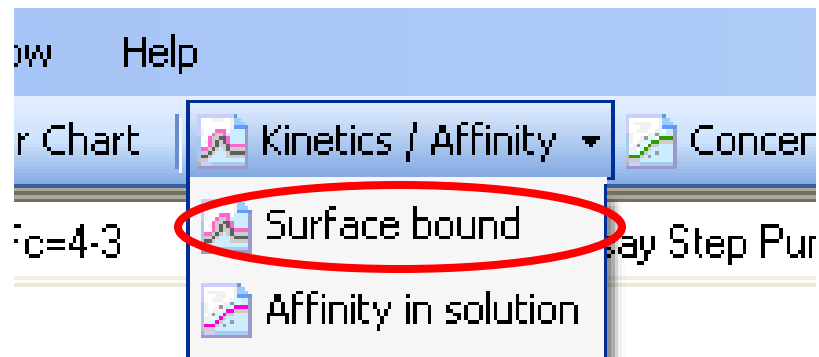
数据分析

调整导入的数据：将Baseline对齐且归零



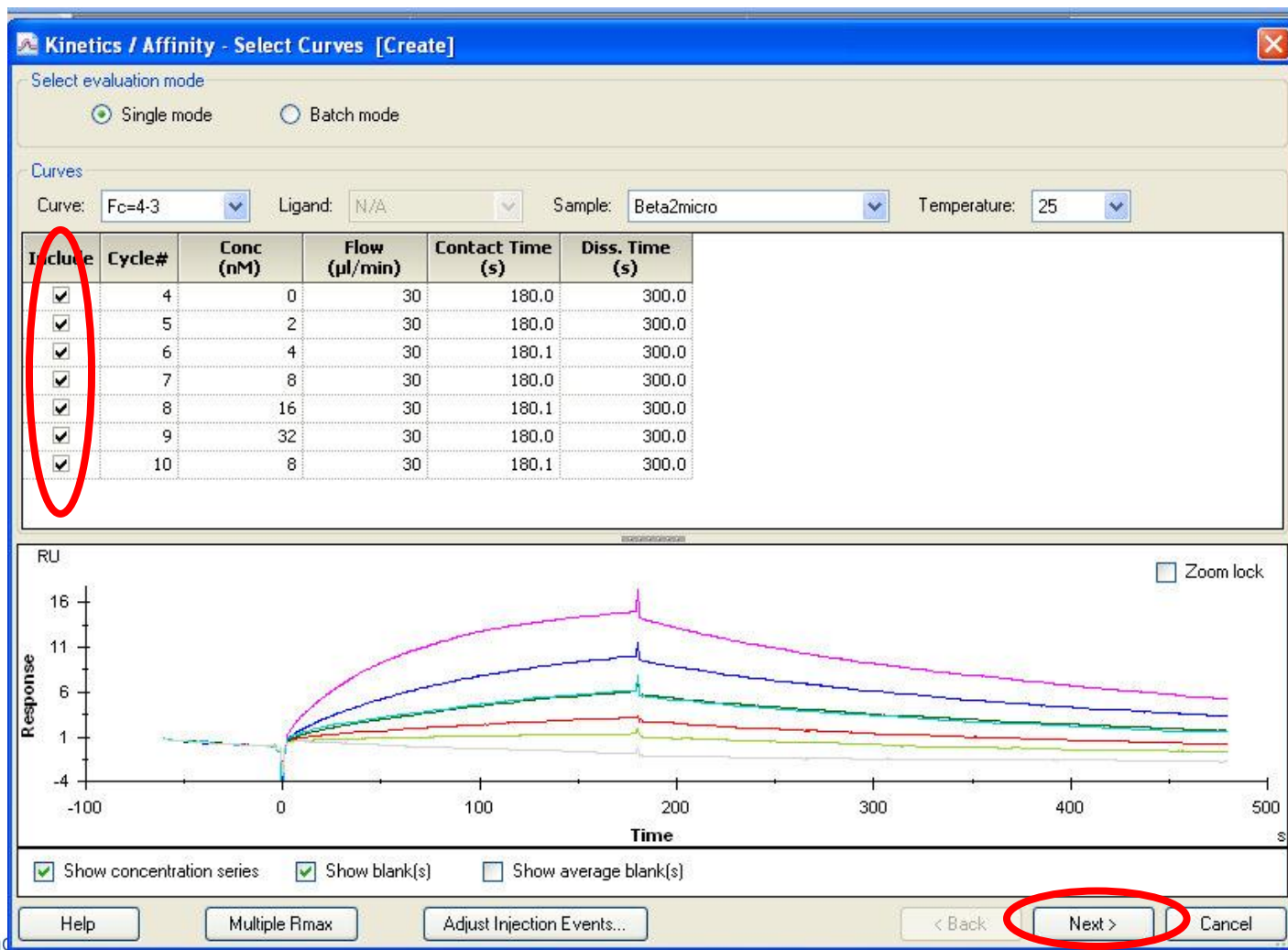
数据分析

选择分析模式



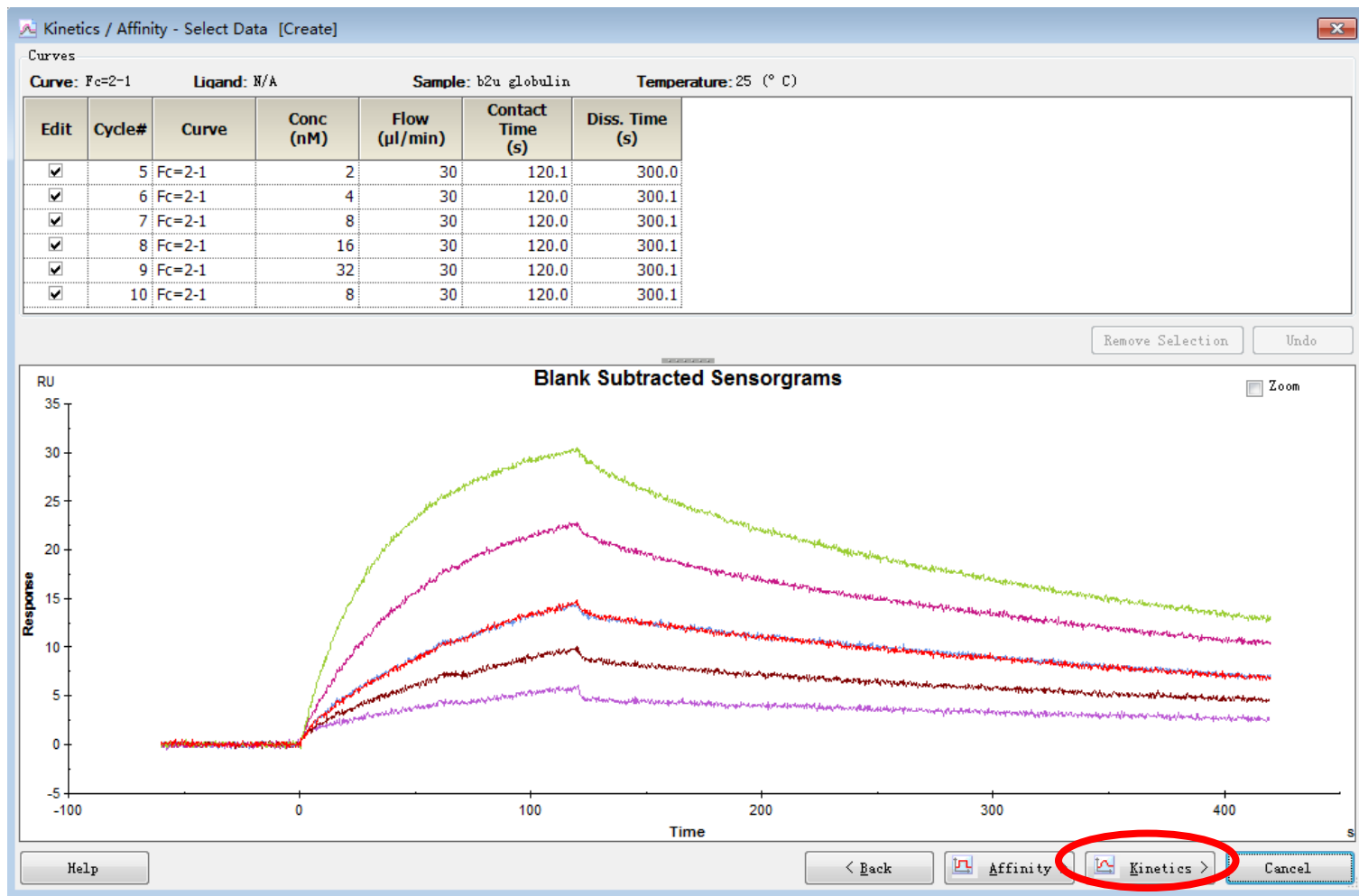
数据分析

选择需要的曲线，扣除零浓度曲线



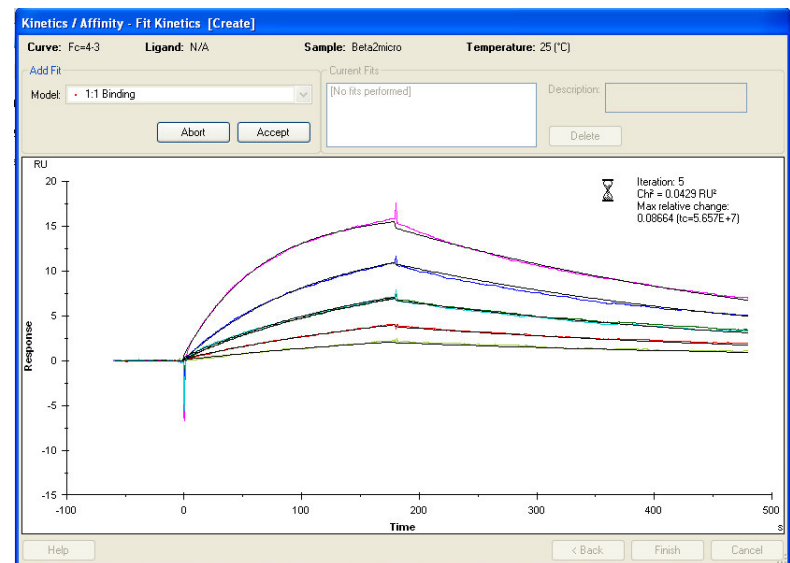
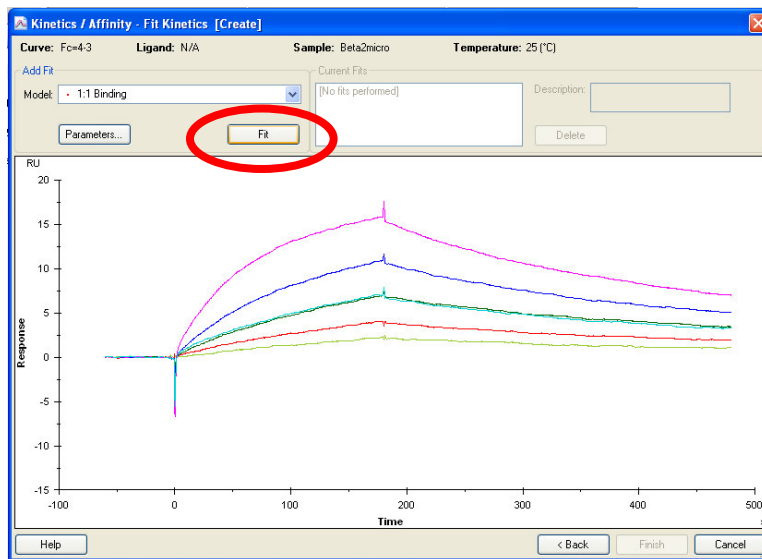
数据分析

动力学分析



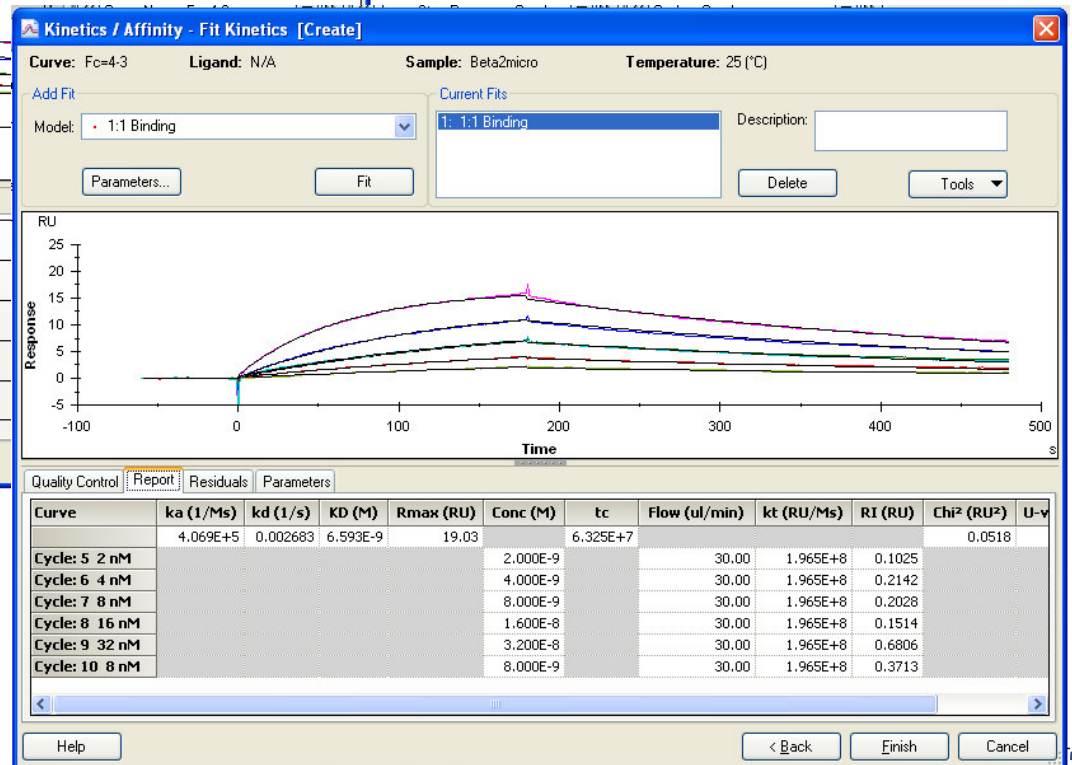
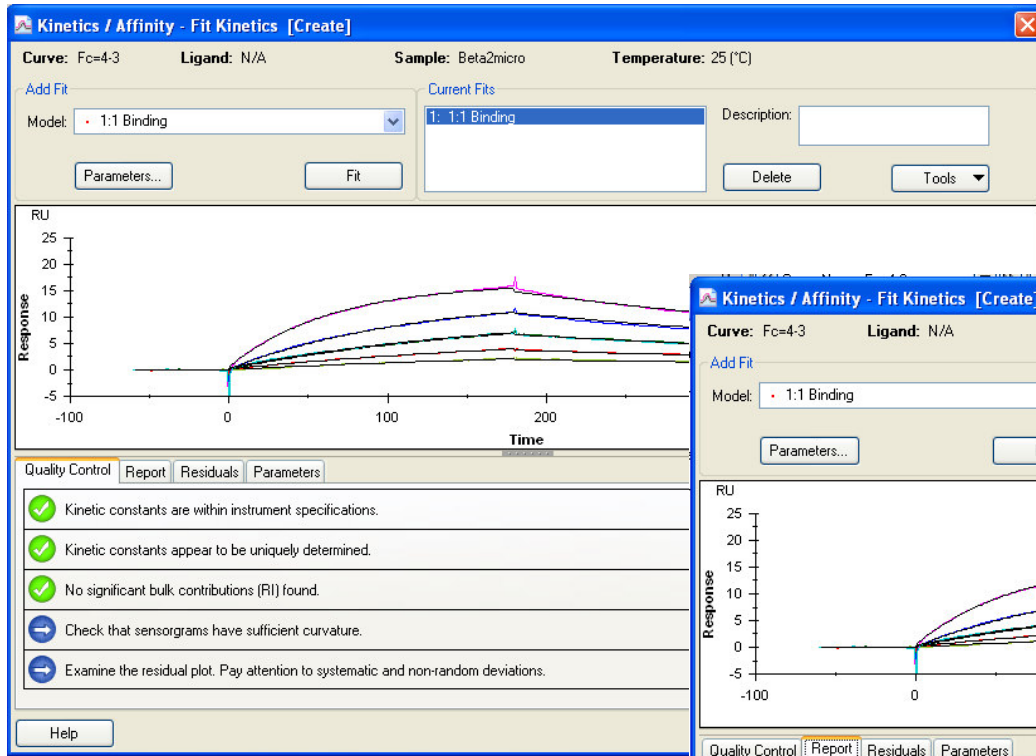
数据分析

拟合



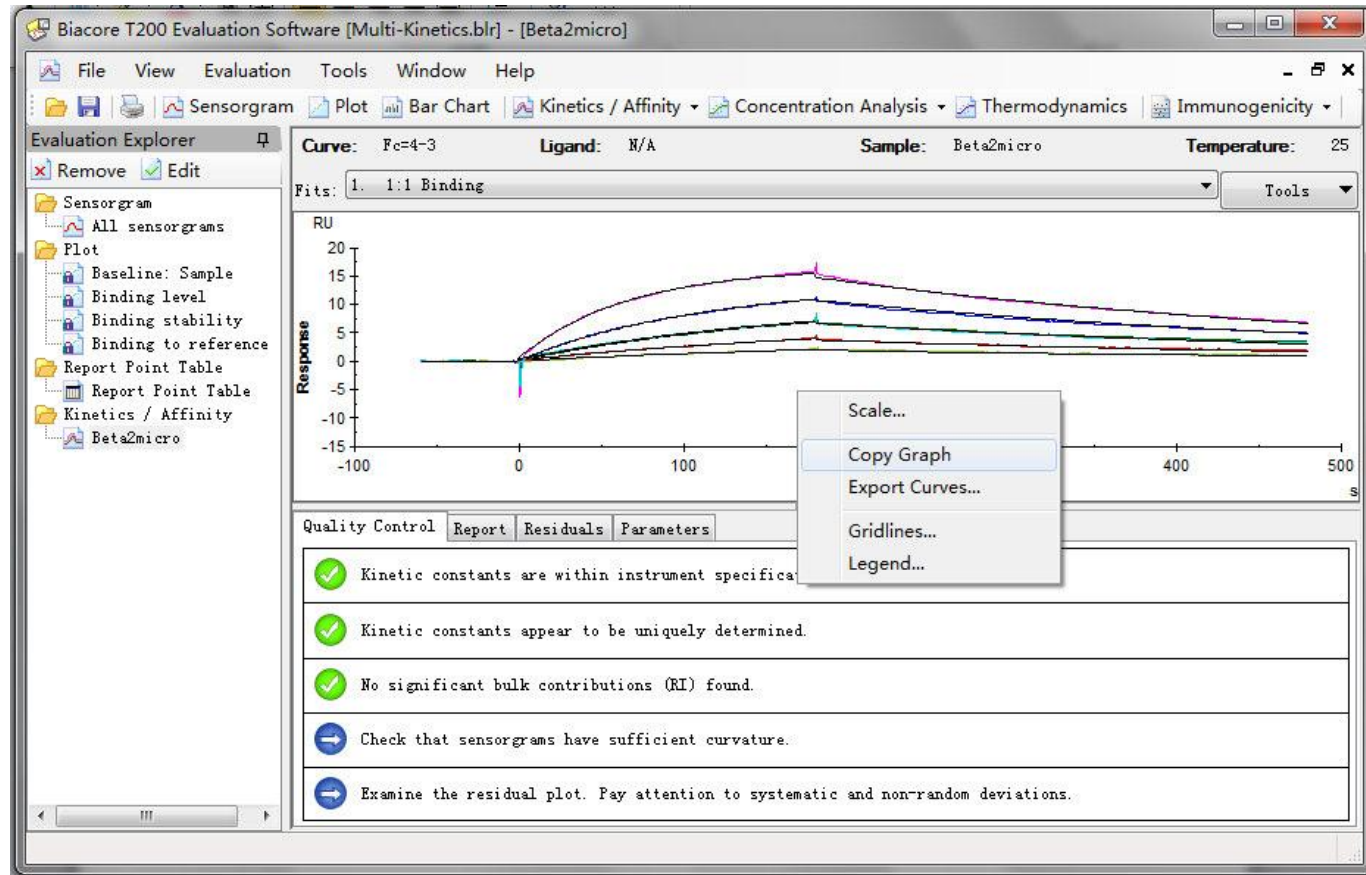
数据分析

动力学分析：拟合后的结果



数据分析

导出结果



可以在File->Export导出多种格式的数据

如果要选择图形输出，可以在图片上点击右键，选择Copy Graph，然后直接粘贴到Windows画图工具或Word、PPT软件中

设备维护

课程目标

- 了解Biacore维护的重要性
- 每日维护
- 每周维护
- 每月维护
- Standby和关机

为什么要做维护？

- 日常仔细、彻底的维护对于保持Biacore的性能和获得高质量数据极为重要!
- 许多报告的“故障”都是由于未做好维护工作而造成的
- 维护工作不到位可能会影响实验的重复性

请遵循推荐的系统维护流程!

每日维护

- 对缓冲液进行过滤(filter)
 - 即使是前一天使用的缓冲液也要进行重新过滤
 - 尽量使用新鲜的缓冲液
- 使用**Prime**对系统进行冲洗
 - 换芯片后要用原有的buffer或水prime冲洗系统
- 在每次实验间隙，将系统设定于**Standby**模式

每周维护

- 去吸附

- 主菜单Tools->More Tools运行Desorb程序（SDS/甘氨酸）
- **SDS**必须放置室温下

- 检查进样泵

- 检查末端看是否有渗漏
- 检查末端看是否有污染
- 如果必须进行清洗步骤， Tools -> Service Tools -> Syringe/Tip

每月维护

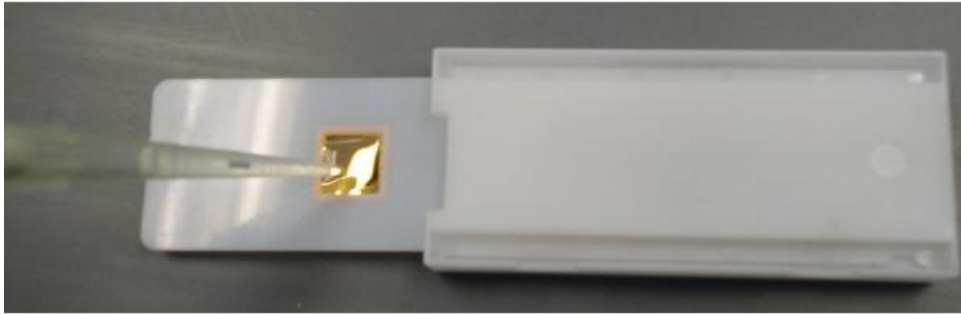
- 去吸附和除菌
 - 主菜单Tools->More Tools运行Desorb程序
 - 主菜单Tools->More Tools运行Sanitize程序
(稀释的次氯酸钠)
- 测试系统性能
 - 主菜单Tools-> Test Tools中选择运行System Check
(使用新的 CM5芯片/标准测试溶液/HBS-N buffer)

每次实验结束后， 如何设置Biacore?

- 系统闲置如果小于7天
 - 选择Standby模式，使系统内存在稳定的去离子水流
 - 经常更换新鲜的去离子水
- 系统闲置如果超过7天
 - 执行关机程序(Shutdown)，按照指令分步使用水和70%乙醇
 - 在关机后将蠕动泵压盖拧松

芯片的保存

- 半干法保存:



将芯片盒有字一面朝下放置，推出芯片内片，取大约**100 μ l**合适储存蛋白的缓冲液，滴到金膜上，至完全覆盖金膜区域即可。注意：枪头不要接触金膜！将内皮推回芯片盒内，一起装入一只**50ml**离心管。拧紧离心管盖，放置于**4**摄氏度冰箱。可选择水平放置，不要剧烈晃动，以免液滴脱落。此方法实际的可存放时间，主要取决于固定的生物分子的性质。

再次使用芯片时，将芯片内片取出，甩干至金膜区域无残留任何液体。注意：不可接触或用水洗金膜区域！检查确保芯片所有区域（包括芯片盒、内片、金膜）没有残留液体、盐析出。将芯片内片推回，即可使用。

800免费技术热线

固话请拨 800-810-9118 (免费)

手机请拨 400-810-9118 (收取市话费)

关于GE公司及产品的任何疑问，
都欢迎拨打800或400热线。

