

# Biacore™ 1K 分子互作分析系统

## 操作指南





# 目录

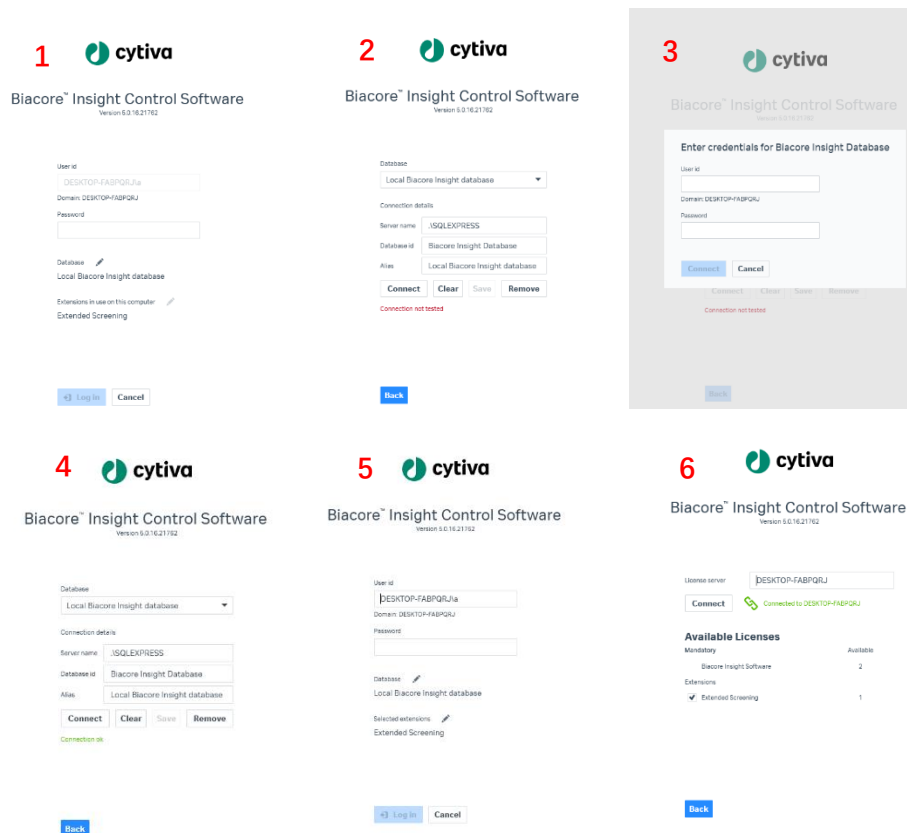
一 系统基本操作 .....	3
1.1 开机操作 .....	3
1.2 缓冲液的放置 .....	4
1.3 控制软件主界面简介 .....	4
1.4 芯片的放置 .....	5
1.5 微孔板的放置 .....	6
1.6 温度设置 .....	7
二 配体的偶联 .....	8
2.1 配体的预富集 .....	8
2.2 配体的偶联 .....	11
三 再生条件选择 .....	15
3.1 再生条件选择 .....	15
3.2 再生筛选的结果分析 .....	17
四 多循环动力学 (Multi-cycle) 检测亲和力和动力学 .....	18
五 数据分析 .....	21
5.1 数据导入 .....	21
5.2 亲和力和动力学数据分析 .....	22
5.3 数据检查 .....	23
5.4 数据导出 .....	24
六 小分子互作实验 .....	26
6.1 小分子亲和力检测 (LMW multi-cycle kinetics/affinity) .....	26
6.2 配置运行缓冲液和溶剂校正曲线 .....	29
6.3 小分子样品的准备 .....	30
6.4 小分子亲和力检测的数据分析 .....	30
七 设备维护 .....	31
7.1 芯片的保存 .....	31
7.2 Desorb 和 Sanitize .....	32
7.3 系统检测 System Check .....	34
7.4 关机程序 Shutdown .....	34

## 一 系统基本操作

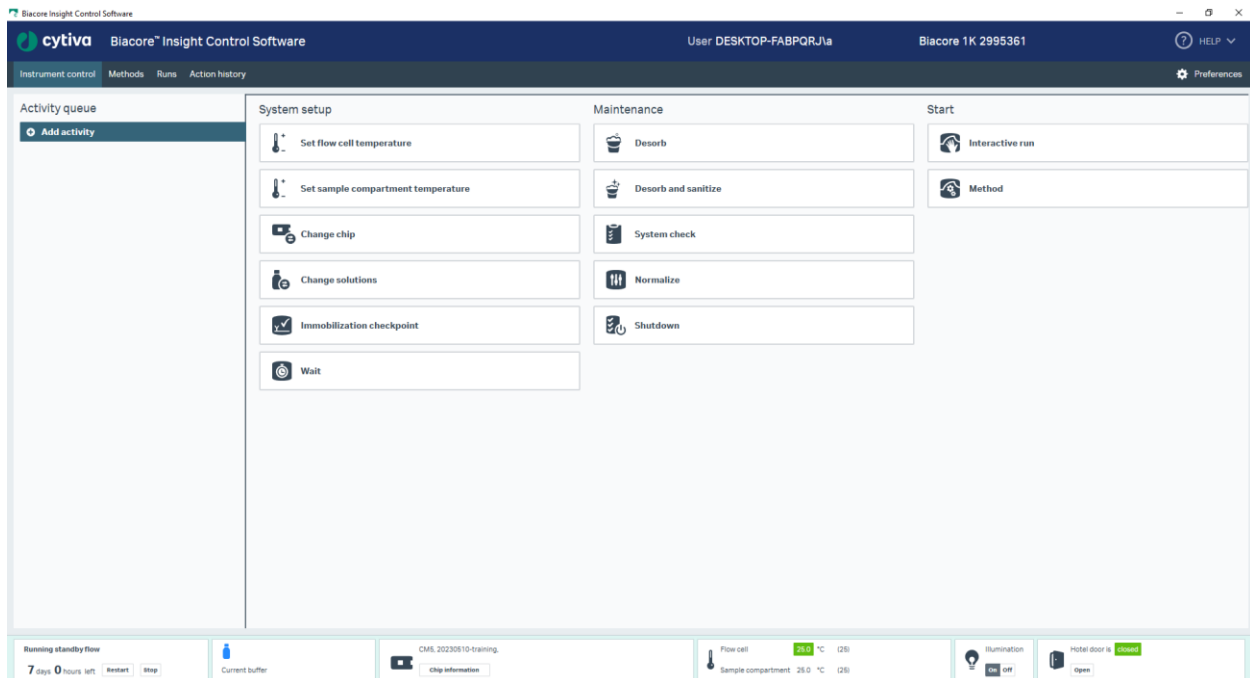
在本练习中，我们将学习如何开启设备、正确放置实验所需的试剂和缓冲液、放取芯片和样品架以及冲洗流路系统。当系统开机或更换缓冲液后，必须运行 Change Solution 程序。Change Solution 时，缓冲液会冲洗整个流路系统，为下一步的实验做好准备。

### 1.1 开机操作

- 1) 打开 Biacore 1K 系统和电脑的电源开关，Biacore 1K 的电源开关位于系统背面的左下角。
- 2) 打开 Biacore 1K 控制软件，先点击 Database 后的 ，再点击 Connect，输入用户名和密码（与电脑登录的用户名和密码一致），点击 Connect，确保 database 已经连接，点击 Back，回到登录主界面，点击 Selected extensions 后的 ，再点击 Connect，勾选下面的 extension module，点击 close，回到登录主界面，最后再输入密码，点击 Log in，运行后软件程序会自动和主机系统建立连接，显示控制软件主界面。



Biacore 1K Control Software 登录界面



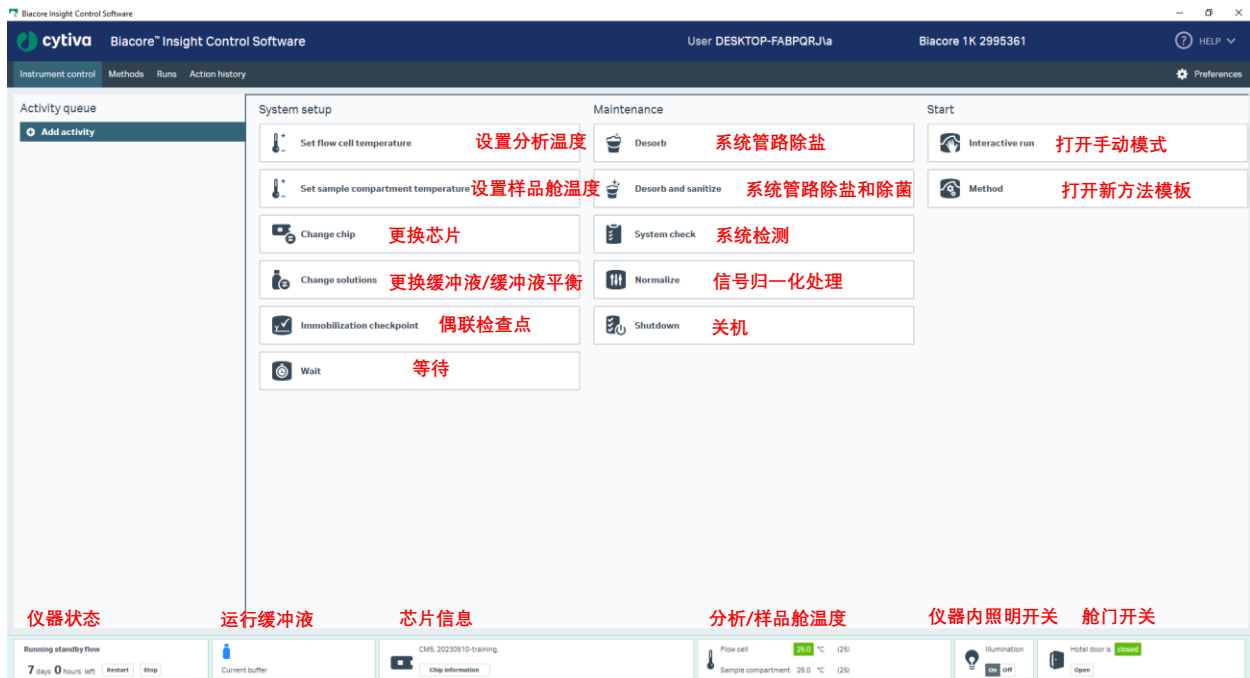
Biacore 1K Control Software 主界面

## 1.2 缓冲液的放置

- 1) 准备运行缓冲液。本练习采用 10XHBS-EP+缓冲液（已经 0.22 $\mu$ m 膜过滤）：量取 50mL 10XHBS-EP+缓冲液、450mL 去离子水，混匀后放入 500ml 的缓冲液瓶中。
- 2) 将已经配制好的缓冲液放在 Biacore 1K 系统右侧桌面上的托盘中，并将标记 BUFFER 的进液管插入至缓冲液瓶底部。（Biacore 1K+和 1S+支持 4 种缓冲液，只使用一种缓冲液时，进液管默认为 A 管，其余三根进液管 B、C 和 D 封好）
- 3) 取 500ml 去离子水装入 500ml 缓冲液瓶，同样放置在右侧桌面上的托盘中，并将标注有 WATER 的进液管插入至纯水瓶底部，用于清洗进样针。
- 4) 将废液瓶放置在 Biacore 1K 系统右侧，将废液管（WASTE）连接到废液瓶上。

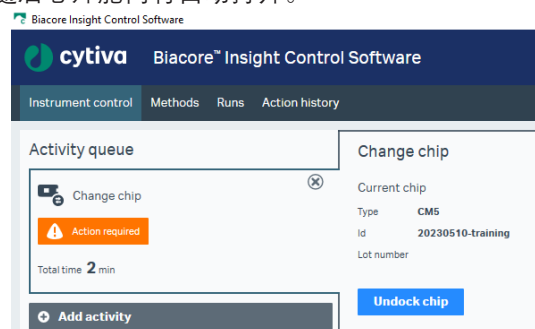
## 1.3 控制软件主界面简介

Biacore 1K 控制软件 Instrument control 界面包括三部分：System setup、Maintenance、Start，各个操作按钮功能如下图所示。

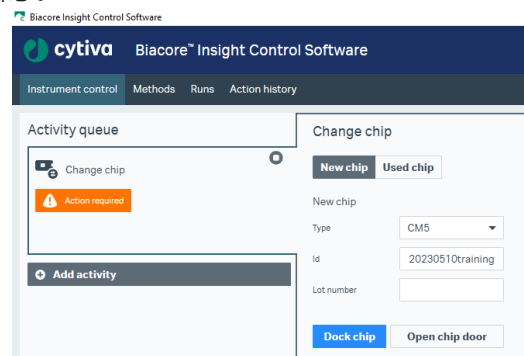


## 1.4 芯片的放置

- 1) 点击控制软件主界面第一列 System setup 中 Change chip 按钮，再点击 Undock chip 按钮，流动池中液体将被排空，随后芯片舱门将自动打开。



- 2) 如果使用的是新芯片，选择 New Chip。在 Type 的下拉菜单中选择对应的芯片种类，在 Id 中填入和芯片相关的实验信息，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 Used Chip，直接选择芯片信息。

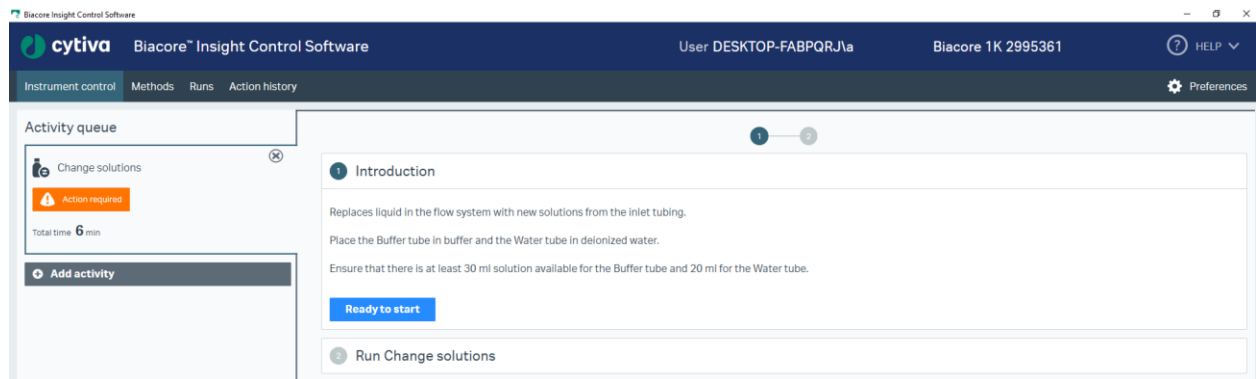


3) 手持芯片，有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向，将芯片轻轻推入卡槽，合上芯片舱的舱门。



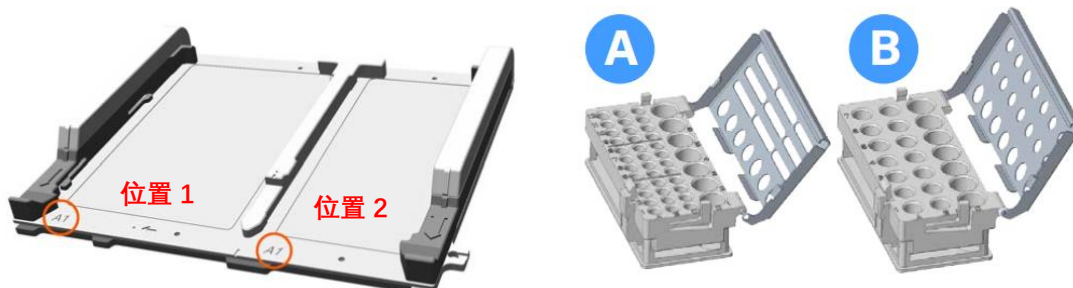
4) 点击 Dock Chip 按钮，芯片放入后系统将自动转入待机（Standby）状态。

5) 点击控制软件主界面第一列 System setup 中 Change solutions 按钮，点击 Ready to start。缓冲液会以较高的流速冲洗整个内部的流路系统，整个过程耗时约 6 分钟。结束后，系统自动转入待机（Standby）状态。



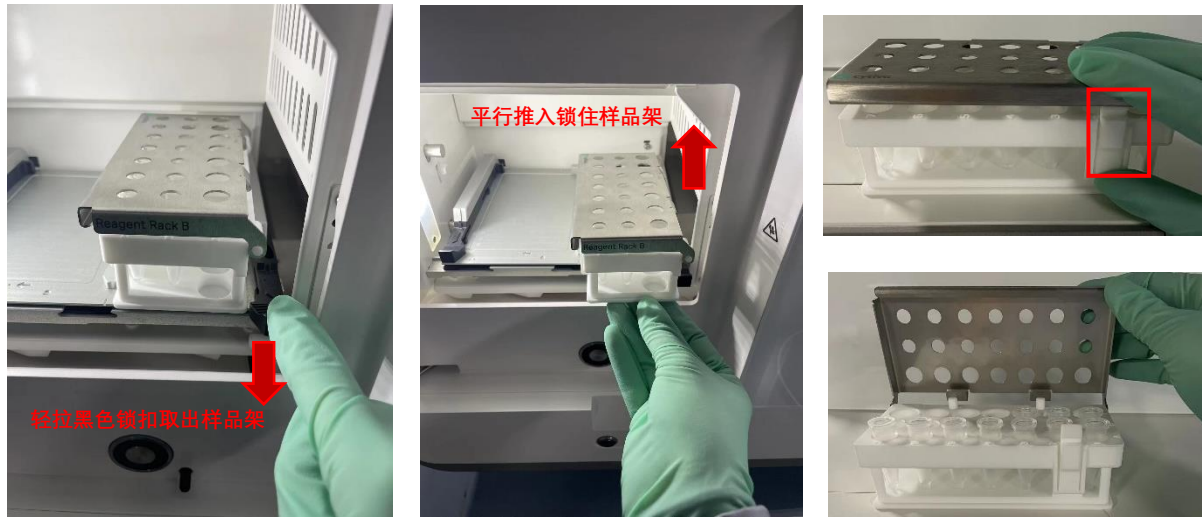
### 1.5 微孔板的放置

1) Biacore 1K 样品舱可同时放置微孔板（位置 1：96/384 孔板）和样品架（位置 2），Biacore 1K 提供 Reagent Rack A 和 B 两种样品架。



Biacore 1K 的样品架

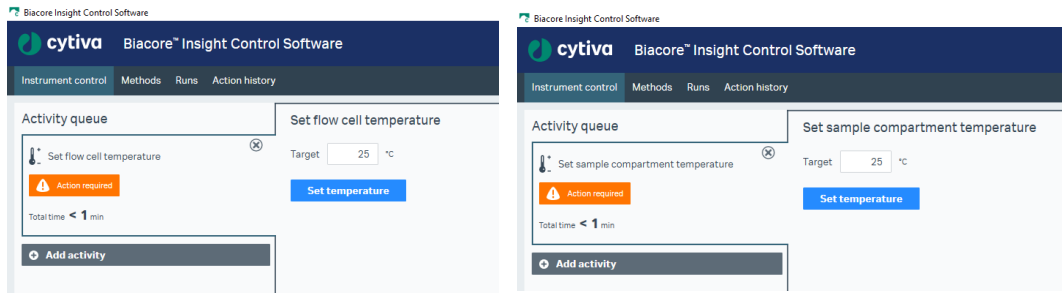
- 2) 点击控制软件主界面右下方 Hotel door 的 open 按钮，样品舱舱门会自动打开，或者可以直接按仪器主机样品舱的控制按钮打开舱门。
- 3) 如下图所示，水平轻拉黑色锁扣可以将样品架/微孔板取出，放置时只需将样品架/微孔板轻轻推入，听到“咔哒”一声锁住即可。取出样品架后，轻按白色突出部分可以将盖子打开取放样品。



Biacore 1K 样品架的取放

## 1.6 温度设置

- 1) 点击控制软件主界面第一列 System setup 中 Set flow cell temperature 按钮，可以对流动池中的样品检测温度/分析温度进行调整，温度范围 25-37°C。点击 Ready to start。需等待温度稳定后，才能继续实验。
- 2) 点击控制软件主界面第一列 System setup 中 Set sample compartment temperature 按钮，可以对样品舱温度进行调整，温度范围 4-37°C。



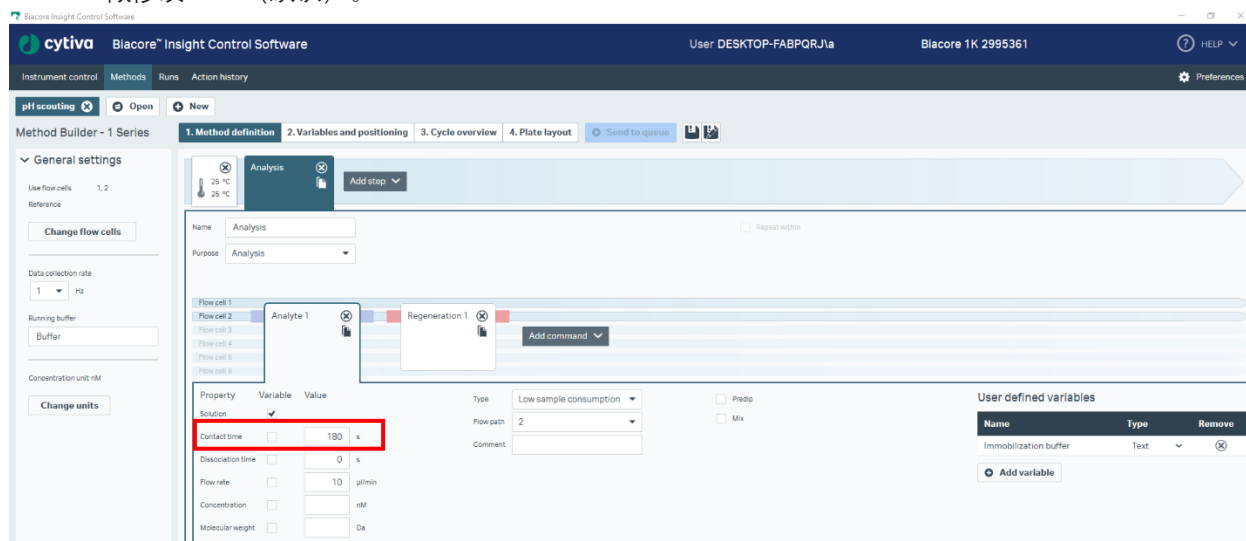
## 二 配体的偶联

在该部分中，我们将练习把配体（蛋白）偶联到 CM5 芯片上。正式偶联之前，需要进行配体的预富集，以确定最佳的偶联浓度和 pH 条件。本次练习中，使用的配体为 Monoclonal mouse-anti-human  $\beta$ 2-microglobulin antibody。

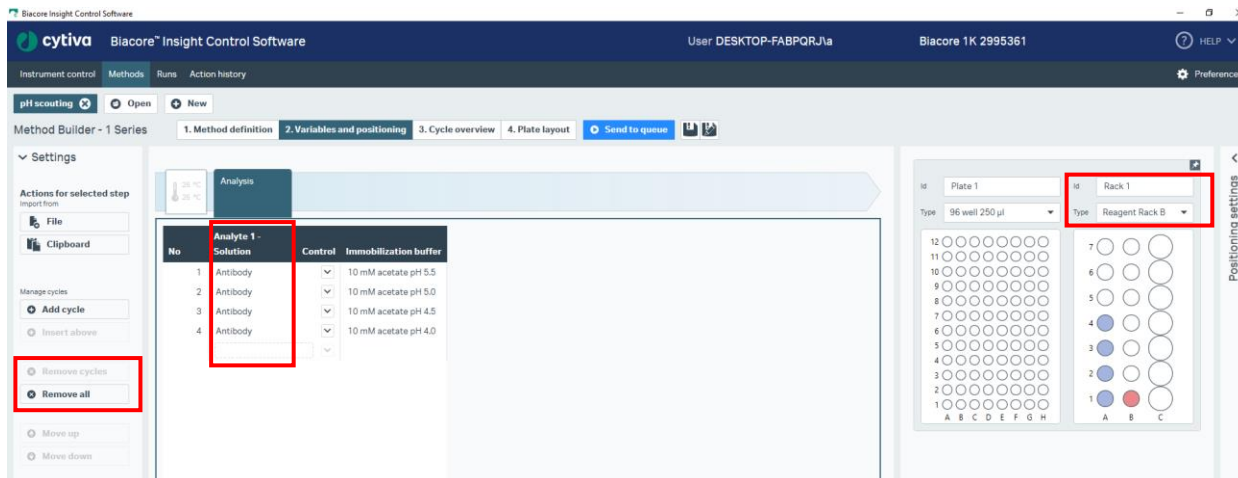
### 2.1 配体的预富集

将配体（蛋白或多肽）偶联到芯片上（CM 系列，羧基表面）时，需要把蛋白溶在 pH 低于其等电点 PI 的溶液中。此时，蛋白表面的净电荷为正，在流经芯片表面时，可以通过静电吸附作用结合到芯片表面的羧基（电荷为负）上。但是，过低的 pH 会影响蛋白的活性，因此我们应用 Biacore 1K Control Software 中的预富集实验（pH scouting），寻找最适合的 pH 条件。

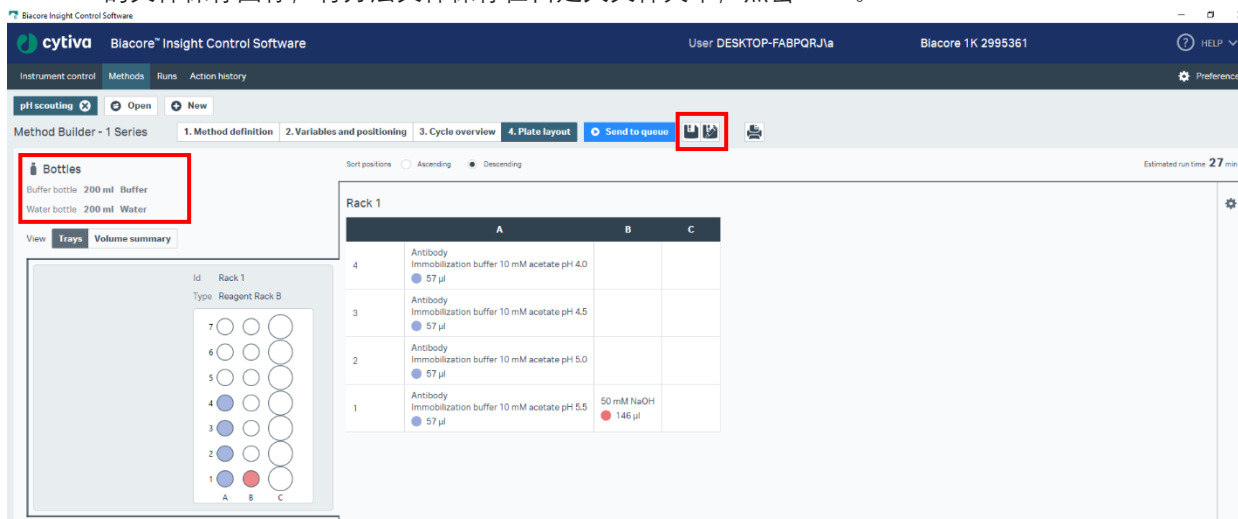
- 1) 样品准备。分别取 1 $\mu$ l 配体，加入到 99 $\mu$ l 不同 pH 的醋酸钠缓冲液中（10mM sodium acetate, pH5.5、5.0、4.5、4.0）充分混匀，配体的最终浓度约为 10 $\mu$ g/ml。如有气泡，可离心去除。
- 2) 按照“1.4 芯片的放置”步骤将 CM5 芯片 Dock 到设备。
- 3) 点击 Biacore 1K Control Software 中的 Methods，点击 New，点击 Surface preparation，选择 pH scouting，点击右下角 open 按钮，进入编辑界面。此界面可将样品的 contact time 修改为 120s 或不做修改 180s（默认）。



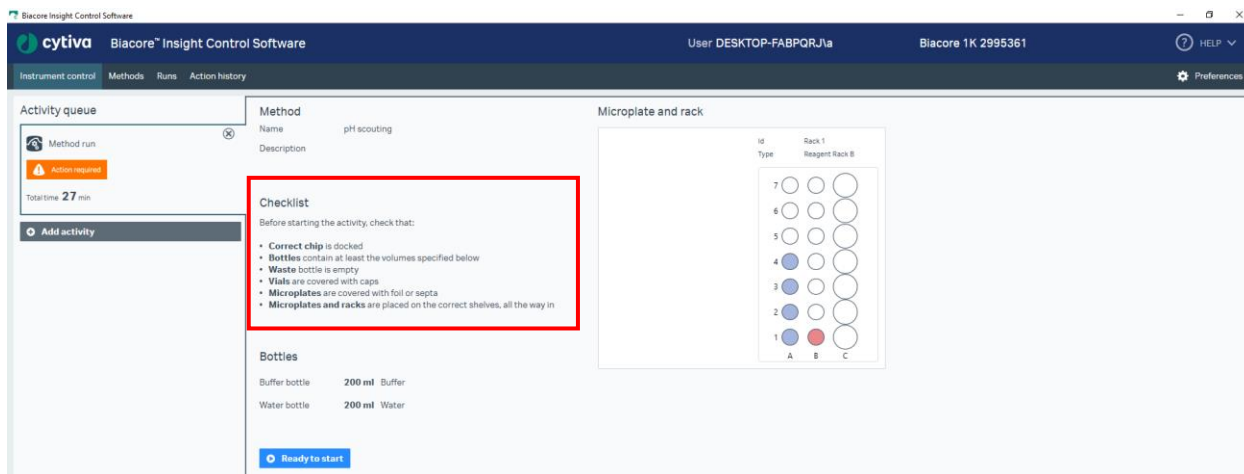
- 4) 点击上方 **2. Variables and positioning** 按钮，编辑样品名称与位置。在 Analyte1 solution 处，修改样品名称，本练习将样品名称改为 Antibody。若仅检测一个分子的静电吸附能力，可将 5-8 默认的 Ligand 2 删除，选中需要删除的 Cycle，通过界面左侧 Remove cycles 即可删除。在右侧，可以通过下拉菜单选择使用的微孔板或者样品架，本练习选择使用 Reagent Rack B，通过鼠标左键选择并长按的方式，拖拽样品至合适的孔板位置。



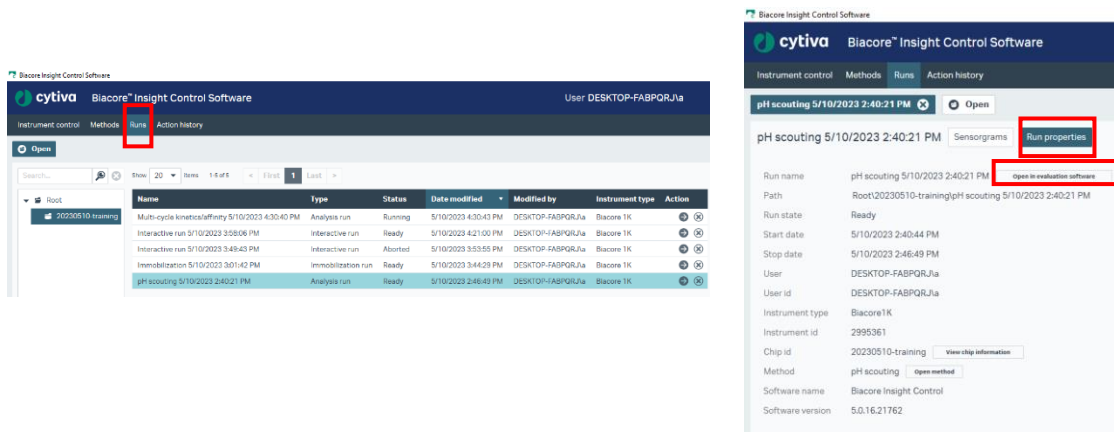
- 5) 点击上方 **4. Plate layout** 按钮，系统会跳转新的窗口，检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够，再按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品，并放入对应的位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。以下图为例，57 $\mu$ l 的分别稀释在 pH5.5、5.0、4.5、4.0 醋酸钠中的 Antibody，分别放在 Reagent Rack B 的 A1、A2、A3、A4，146 $\mu$ l 的氢氧化钠（50mM sodium hydroxide）放入 Reagent Rack B 的 B1。将 Reagent Rack B 放置在样品架上，合上舱门。点击右上方的文件保存图标，将方法文件保存在自定义文件夹中，点击 Save。



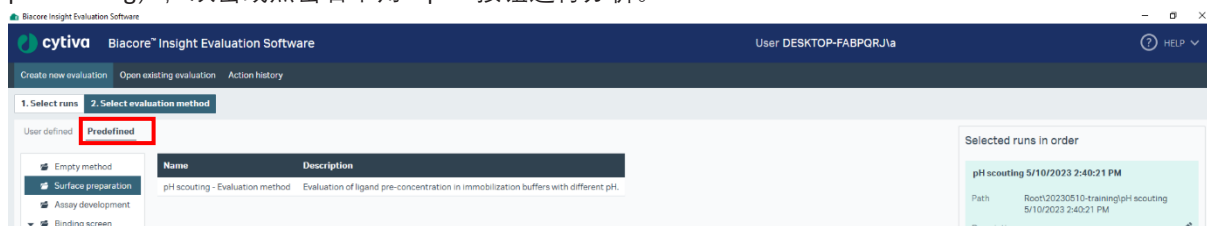
- 6) 点击Send to queue，系统会自动跳转到新的界面，检查Checklist中的各项是否正确完成，整个过程运行约27分钟。点击下方Ready to start。在跳出的窗口中保存result文件到对应文件夹中。系统正式自动运行pH scouting程序。



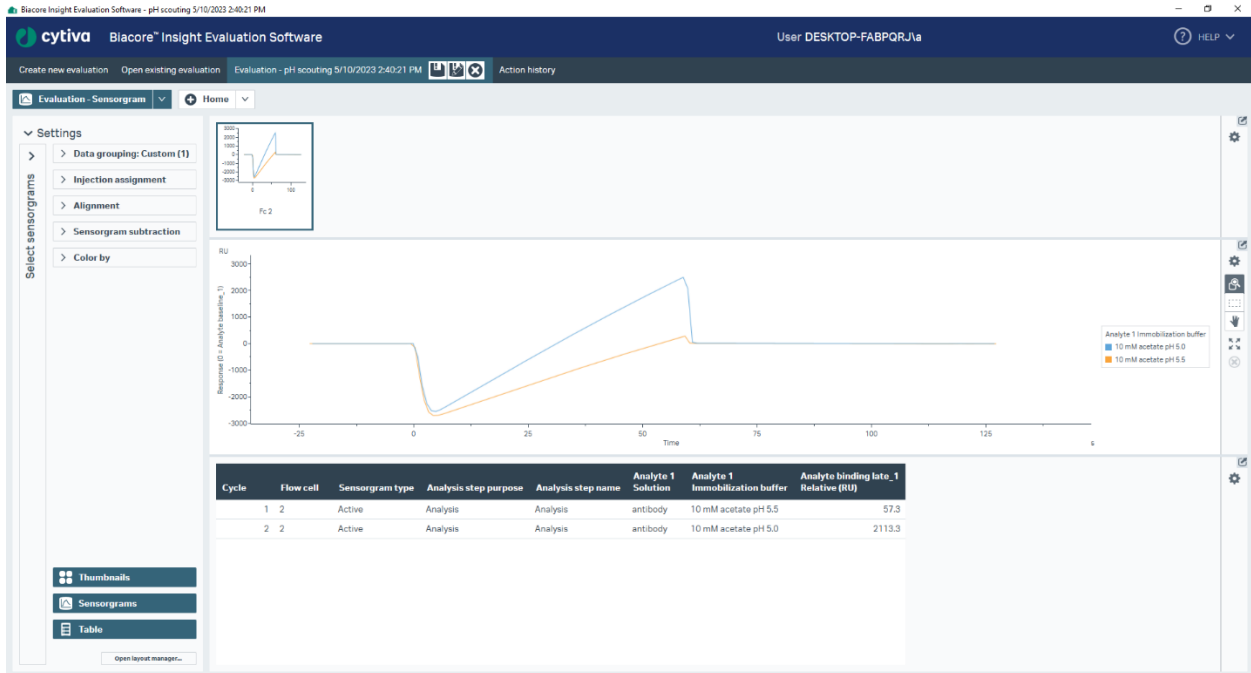
7) 预富集 (pH scouting) 程序运行结束后, 点击 Biacore 1K Control Software 主界面上方的 Runs, 找到结果文件, 双击或点击右下角 Open 按钮打开。然后, 选择 Run properties, 点击 Open in evaluation software 界面跳转到 Biacore Insight Evaluation Software。



8) 在 Biacore Insight Evaluation Software 中, 点击 Predefined 找到对应分析方法 (Surface preparation – pH scouting), 双击或点击右下角 Open 按钮进行分析。



9) 选择合适的 pH 条件的原则是, 选择响应值增加最快 (单位时间内响应值最高) 的 pH 条件。由下图可知, 该配体溶在 pH5.0 的醋酸钠溶液中静电吸附更强。所以, 选择 pH5.0 醋酸钠溶液作为最佳偶联条件。



在 Biacore Insight Evaluation Software 中查看预富集 (pH Scouting) 结果

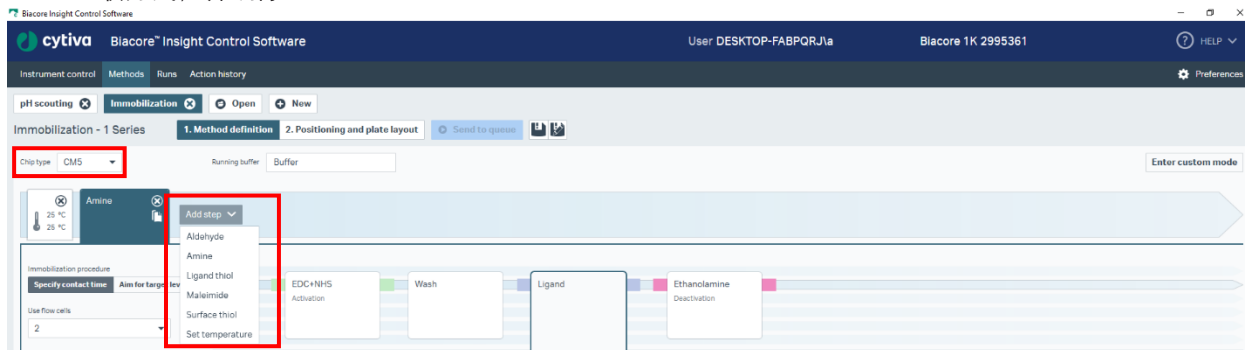
## 2.2 配体的偶联

偶联是指将配体固定到芯片上的过程。针对不同的芯片和配体，偶联方法各不相同。本实验将采用最典型最常用的偶联方法—氨基偶联法。通过之前的预富集实验，偶联实验中合适的配体浓度和 pH 条件已经确定。应用 Biacore 1K Control Software 中的偶联 (Immobilization) 程序，即可完成配体偶联。

- 1) 计算偶联量。在理论课中，我们介绍了如何计算所需的配体偶联量  $R_L$ 。本次实验中，配体 (Ligand) 的分子量是 150KD，分析物 (Analyte) 分子量是 11.8KD， $R_{max}$  设为 100RU。通过下面的公式进行配体偶联量  $R_L$  计算，配体偶联水平  $R_L \approx 1271RU$ ，本次练习实际偶联 2 倍  $R_L$  值，即  $2R_L \approx 2500RU$ 。

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

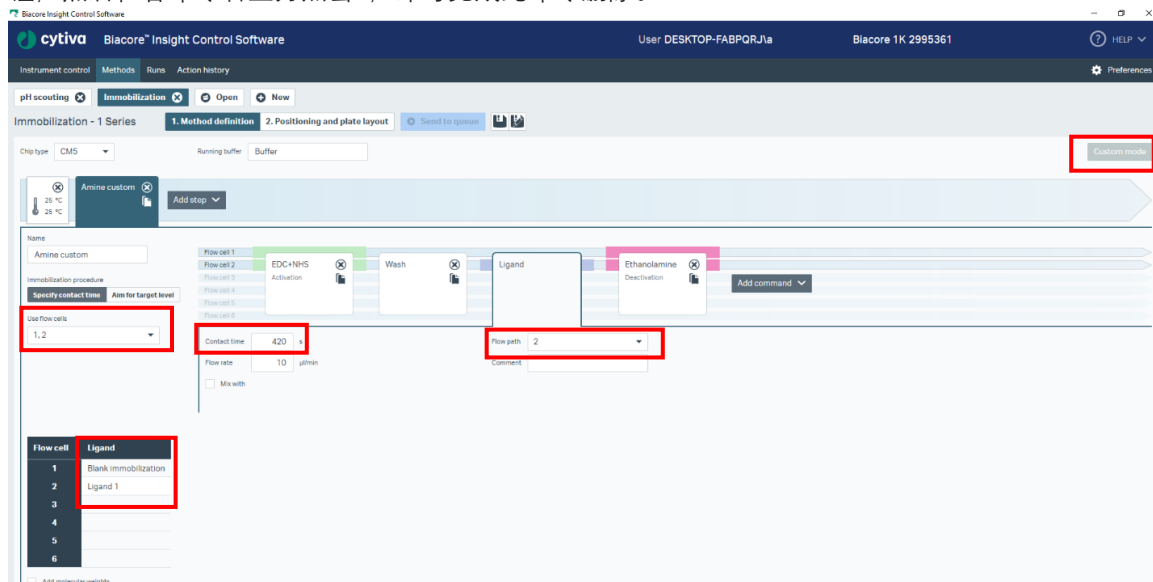
- 2) 点击 Biacore 1K Control Software 主界面中的 Methods，点击 New，点击 Surface preparation，选择 Immobilization，点击右下角 open 按钮，进入编辑界面。在 Chip type 下拉菜单中，选择 CM5。该程序默认的偶联方式为氨基偶联 (Amine)，如要进行其他方式偶联，可下拉 Add step 选择其他的偶联方式，并删除 Amine。



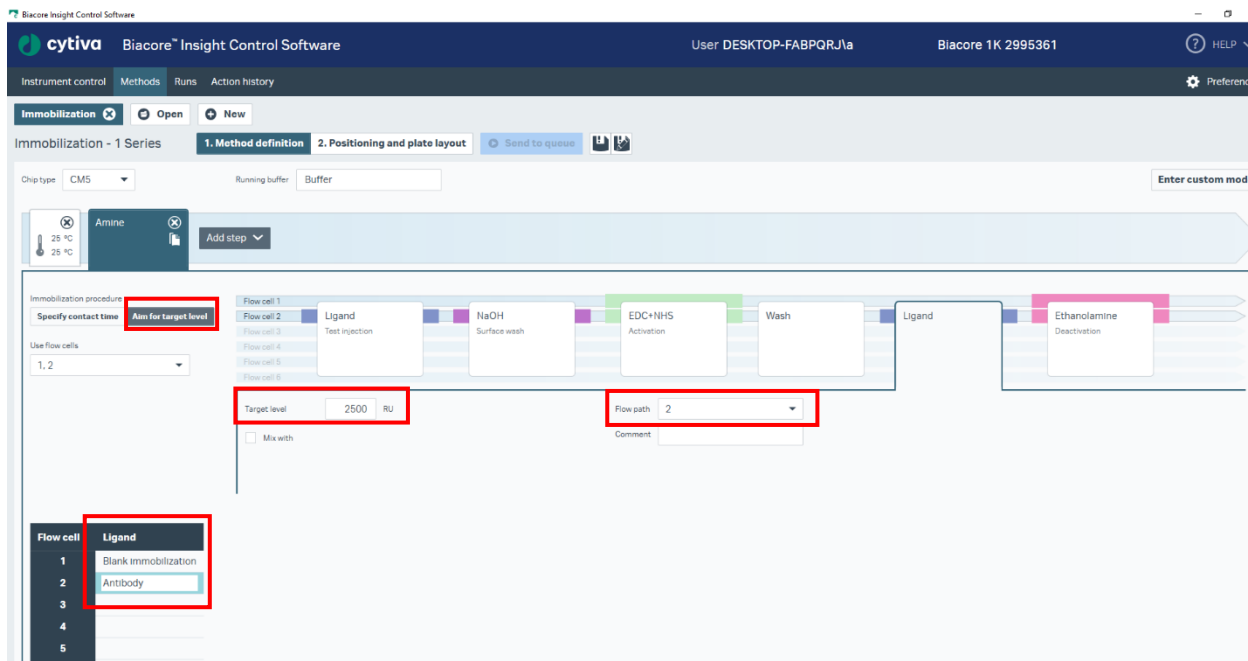
3) Biacore1K 提供两种偶联程序 Specify Contact time 和 Aim for target level。

- Specify contact time 通过设置配体进样时间，在该时间段内连续进样实现配体的高偶联，修改配体 (Ligand) 进样时间 (Contact time)，并修改配体名称 (Ligand1)，将 Use flow cells 选为 1,2，Ligand 中 Flow path 改为 2，此时在 Flow cell 1 (Fc1) 只做活化、封闭，不进行配体固定 (Blank immobilization)。

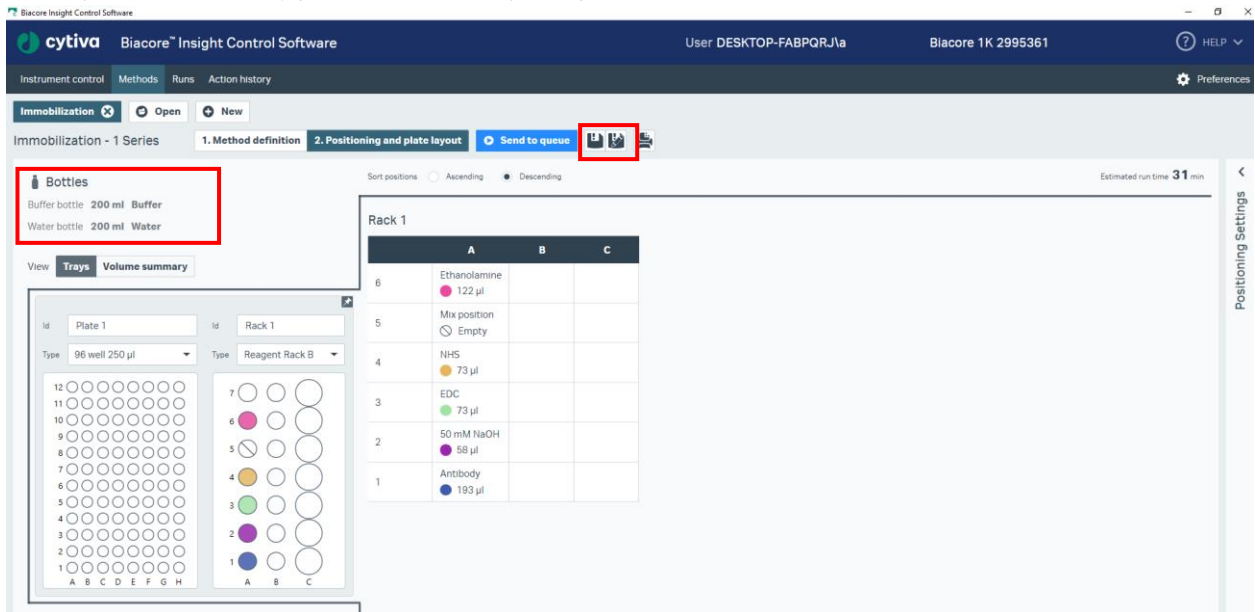
\*注：如需删除 Ethanolamine 封闭命令，以防偶联量不足，后续增加。点击右上方 Custom mode 按钮，然后在各命令右上方点击x，即可完成此命令删除。



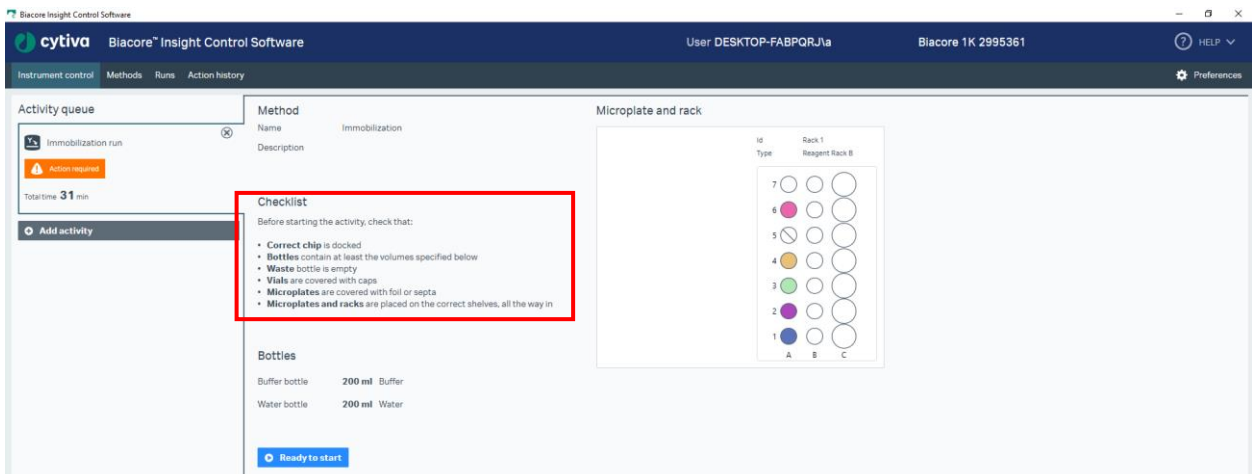
- Aim for target level 采用脉冲式的进样，将配体的偶联量控制在输入的 Target Level 值。本次实验采用 Aim for target level 将配体固定在 Flow cell 2 (Fc2) 上，目标值设定为 2500RU，修改配体名称为 Antibody，将 Ligand 中 Flow path 改为 2，此时在 Flow cell 1 (Fc1) 只做活化、封闭，不进行配体固定 (Blank immobilization)。



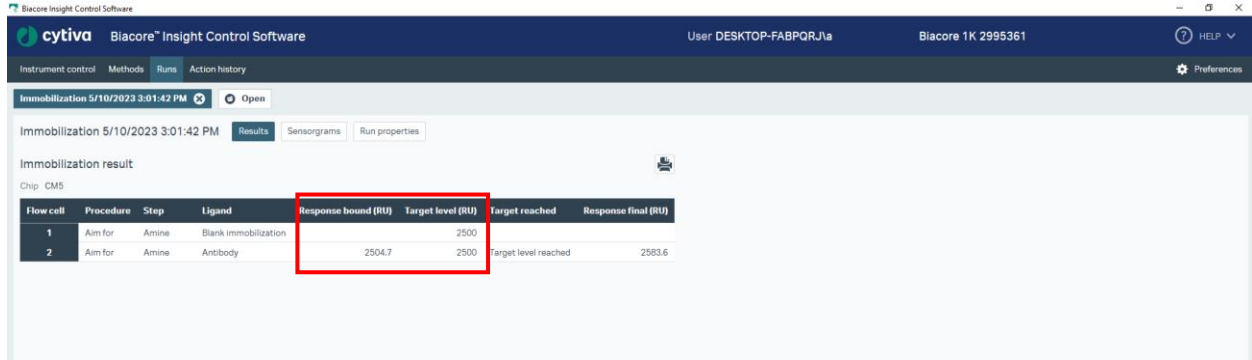
- 4) 点击上方 **2. Positioning and plate layout**，系统会跳转新的窗口，检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够，再按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品，并放入对应位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。可以通过鼠标左键选择并长按的方式，拖拽样品至合适的孔板位置。以下图为例，73 $\mu$ l 的 EDC 和 NHS 分别放在 Reagent Rack B 的 A3、A4，193 $\mu$ l 10 $\mu$ g/ml Antibody（溶在 pH5.0 的醋酸钠中）放在 A1，122 $\mu$ l Ethanolamine 放在 A6，氢氧化钠（50mM sodium hydroxide）放在 A2，A5 位置放一个空管。将 Reagent Rack B 放回样品舱，合上舱门。点击右上角的文件保存图标，将方法文件保存在自定义文件夹中，点击 Save。



- 5) 点击 Send to queue，系统会自动跳转到新的界面，检查 Checklist 中的各项是否正确完成，整个过程运行约 31 分钟。点击下方 Ready to start。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应文件夹中。系统正式自动运行 Immobilization 程序。



- 6) 偶联 (Immobilization) 程序运行结束后, 点击 Biacore 1K Control Software 主界面上方的 Runs, 找到结果文件, 双击或点击右下角 Open 按钮打开。Results 显示最终配体蛋白偶联量, 本实验 Flow cell 2 上的配体偶联量都达到了预期。点击 Sensorgrams 可查看偶联全过程。



The screenshot shows the Biacore Insight Control Software interface. The main window displays the results for an immobilization run on 5/10/2023 at 3:01:42 PM. The 'Results' tab is active, showing a table of immobilization results. The table has columns for Flow cell, Procedure, Step, Ligand, Response bound (RU), Target level (RU), Target reached, and Response final (RU). A red box highlights the 'Response bound (RU)' and 'Target level (RU)' columns for flow cell 2, showing values of 2504.7 and 2500 respectively. The 'Target reached' column for flow cell 2 is marked as 'Target level reached'.

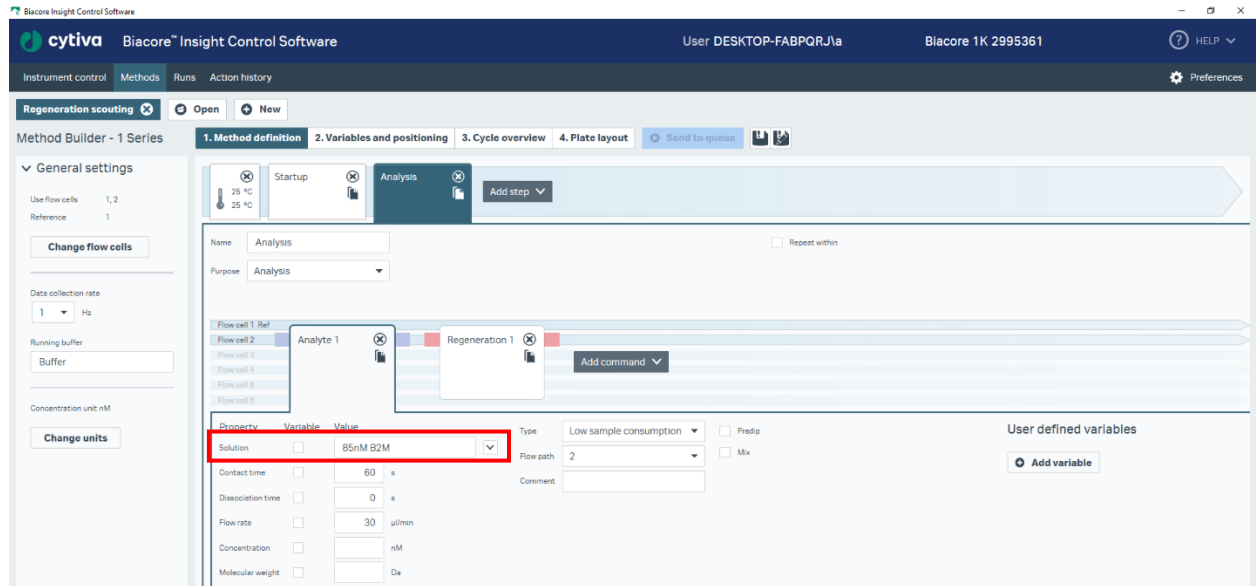
Flow cell	Procedure	Step	Ligand	Response bound (RU)	Target level (RU)	Target reached	Response final (RU)
1	Aim for	Amine	Blank immobilization		2500		
2	Aim for	Amine	Antibody	2504.7	2500	Target level reached	2583.6

## 三 再生条件选择

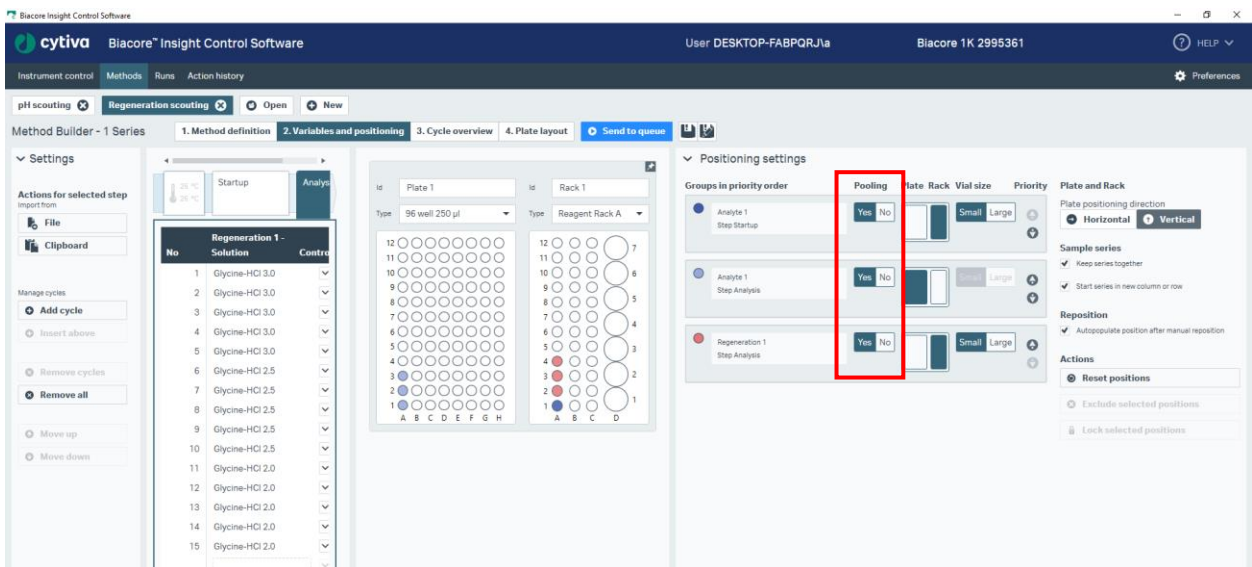
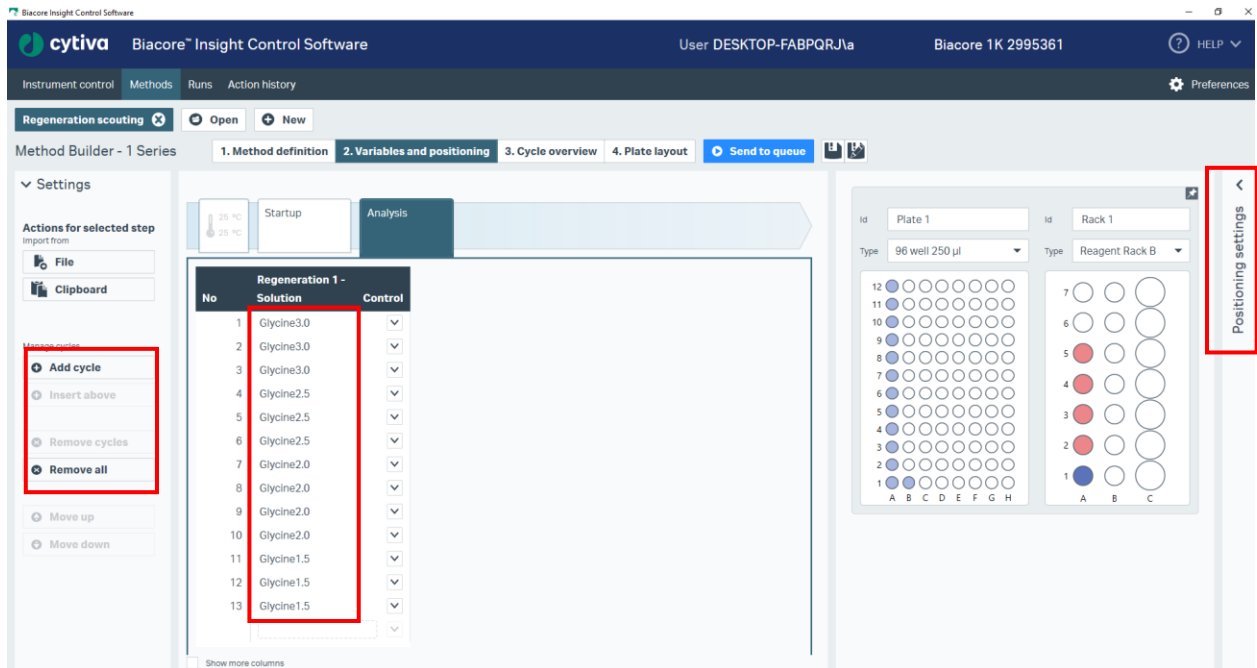
### 3.1 再生条件选择

再生条件的选择是整个实验中非常关键的步骤，直接关系到实验结果的重复性。再生条件的选择可以采用 Biacore 1K Control Software 中的 Regeneration scouting 程序，选取最优的再生条件。本次实验的分析物为 human  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2-微球蛋白)，筛选的再生条件为 Glycine 3.0、2.5、2.0 和 1.5。

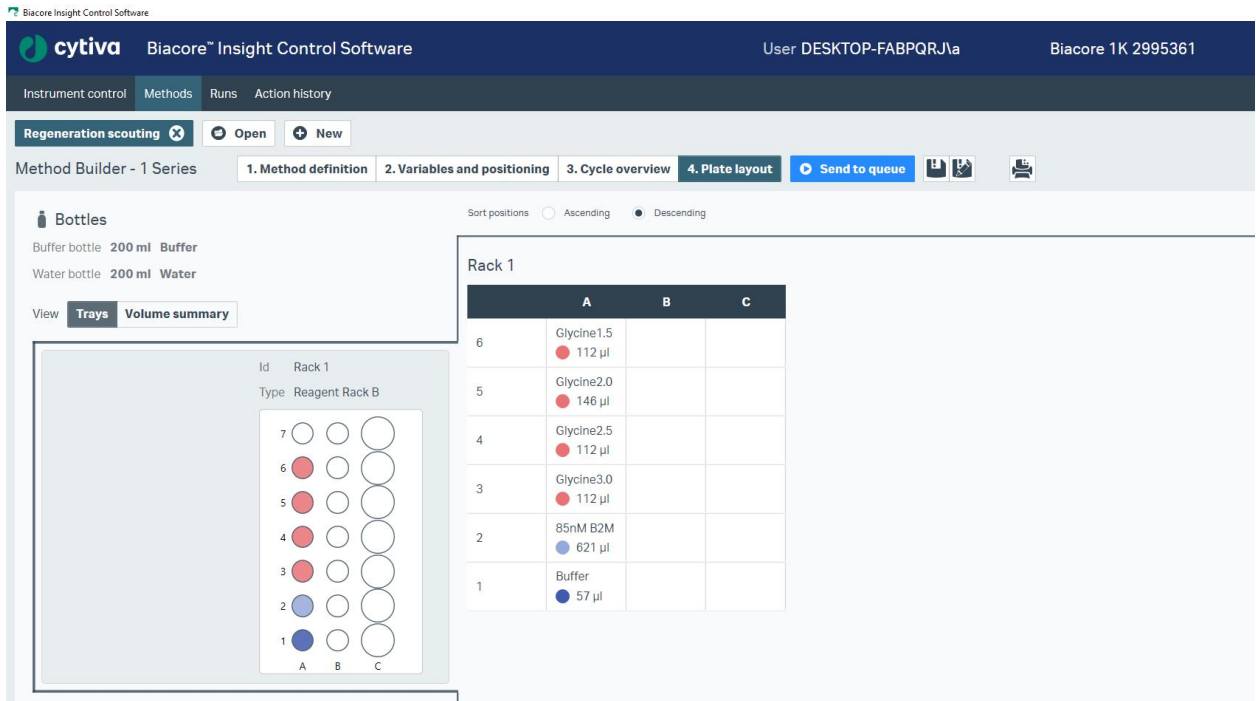
- 1) 点击 Biacore 1K Control Software 中的 Methods，点击 New，点击 Assay development，选择 Regeneration scouting，点击右下角 open 按钮，进入编辑界面。Analyte1 中 Solution 改为分析物名称 85nM B2M，Regeneration1 中 Solution 选择默认的 Variable。



- 2) 点击上方 **2. Variables and positioning**，进入新界面，点击 Analysis，在 Regeneration1 Solution 中填写再生液名称，通过点击左侧 Add cycle/Remove cycles 增减 Cycle，依次填写再生溶液名称。本练习测试四种不同的再生条件 (Glycine-HCl 5.5, 5.0, 4.5, 4.0)，每个条件重复 3 次 (可根据实际情况增减)。点击右侧 Positioning settings 按钮，将 Pooling 选择为 Yes，相同的样品或试剂立即完成合并。并且可以通过鼠标左键选择并长按的方式，拖拽样品至合适的孔板位置。



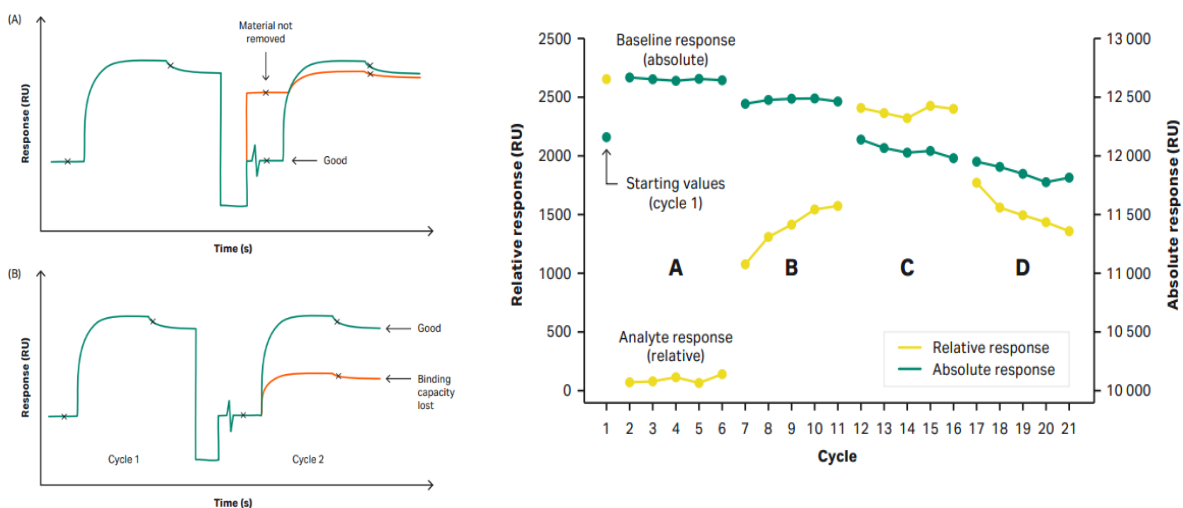
- 3) 点击上方 **4. Plate layout**，系统会跳转新的窗口，检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够，再按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品，放入指定位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。将样品架放回样品舱，合上舱门。点击右上方的文件保存图标，将方法文件保存在自定义文件夹中，点击 Save。



- 4) 点击 Send to queue, 系统会自动跳转到新的界面, 检查 Checklist 中的各项是否正确完成, 点击下方 Ready to start。在跳出的窗口中保存 result 文件到对应文件夹中。系统正式自动运行 Regeneration scouting 程序。

### 3.2 再生筛选的结果分析

理想的再生条件：有效的再生条件能够去除所有剩余的分析物分子 (再生后信号回到 Baseline)；重复多次进样和再生，结合水平都基本维持稳定，与第一次进样相比，结合水平的变化在 10%之内，维持了原有的活性 (Binding)。如下图所示，再生条件 C 较为合适，具有稳定的基线和分析物响应值。

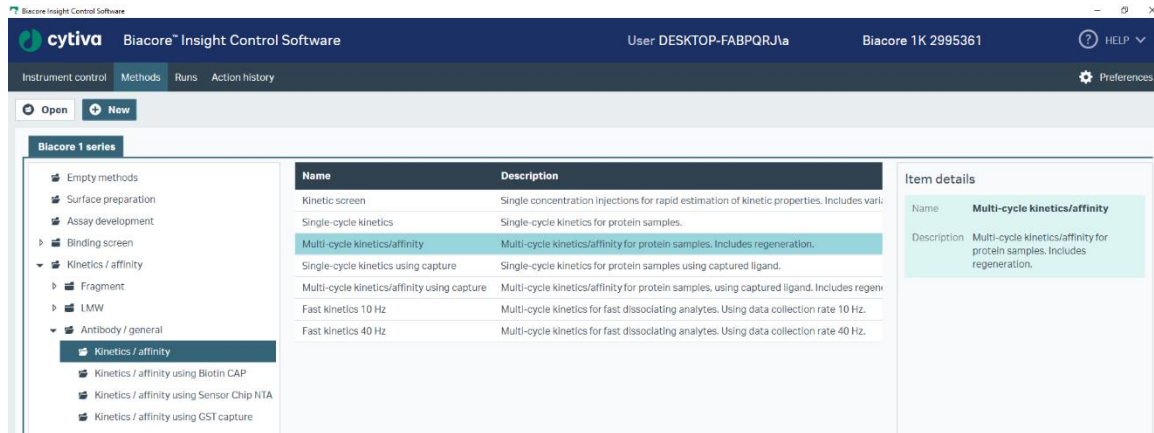


通过基线 (Baseline Response) 和结合响应值 (Analyte Response) 的变化判断再生条件是否合适

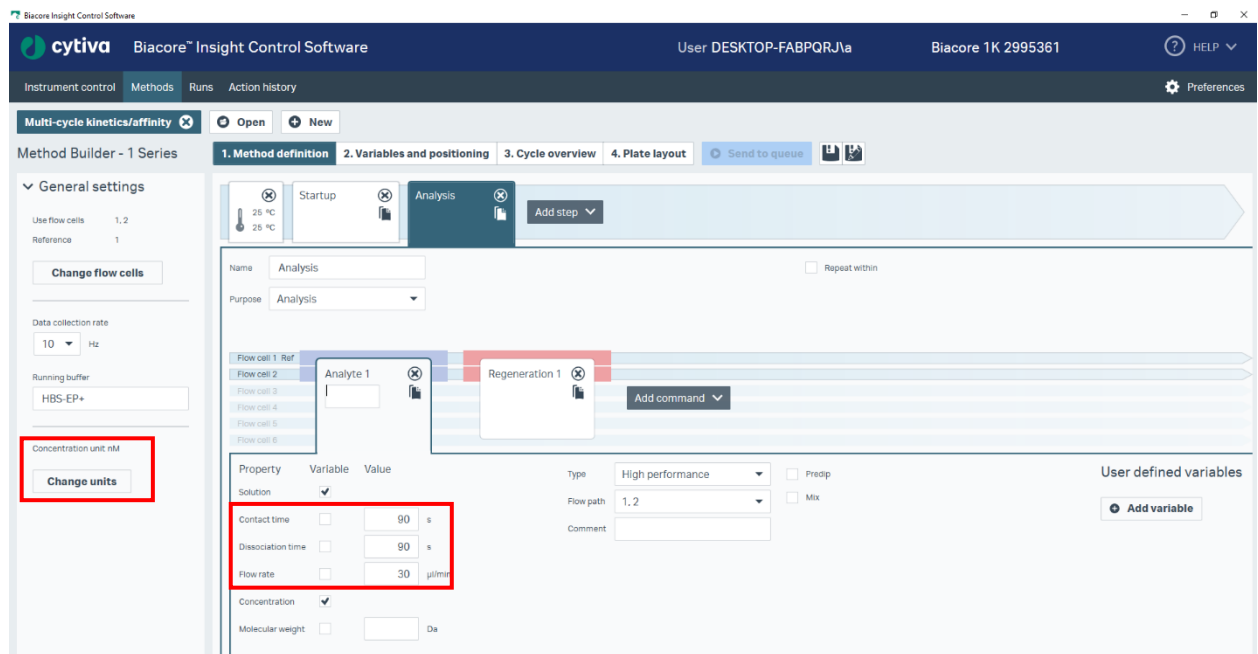
## 四 多循环动力学 (Multi-cycle) 检测亲和力和动力学

在第 2 章中，我们已经在芯片上偶联了配体 ( $\beta 2$ -microglobulin 抗体)。在第 3 章中，我们确定了分析物 ( $\beta 2$ -microglobulin) 的再生条件。在这一章节中，我们将应用 Biacore 1K Control Software 中的多循环动力学 (Multi-cycle kinetics/affinity) 程序，完成亲和力和动力学数据的检测。

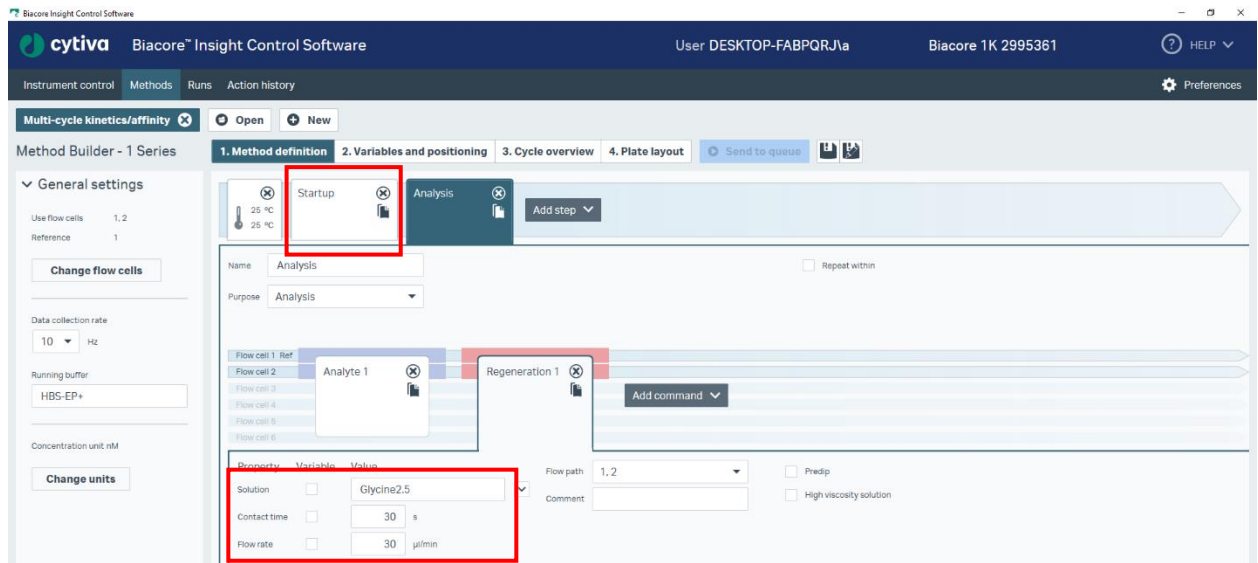
- 1) 点击 Biacore 1K Control Software 中的 Methods，点击 New，点击 Kinetics/affinity，选择 Antibody/general 中的 Kinetics/affinity，再双击右侧 Multi-cycle kinetics/affinity。



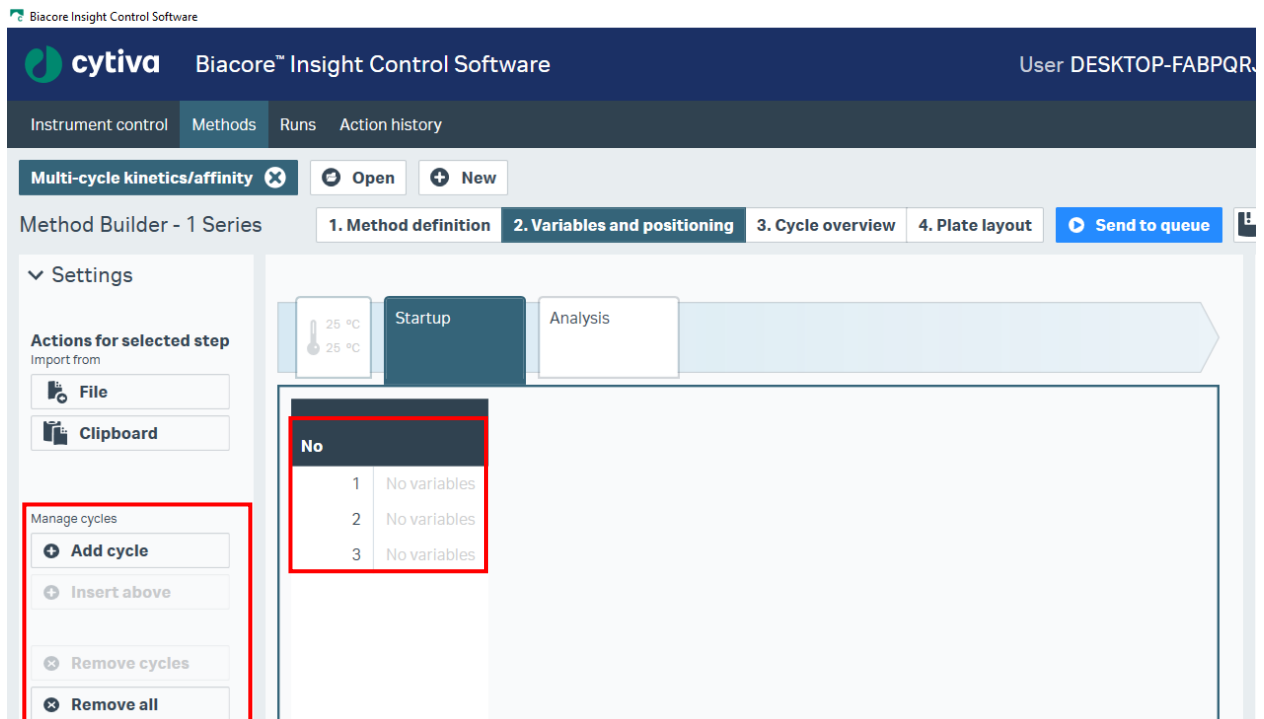
- 2) 在 Method definition 界面里，通过左侧 Change units 可以修改单位，本练习浓度单位选择 nM。在 Analysis 窗口中，可以修改进样 (Contact time) 和解离时间 (Dissociation time)，本练习中进样和解离时间均设置为 90s。Flow rate 为 30  $\mu$ l/min 保持不变。



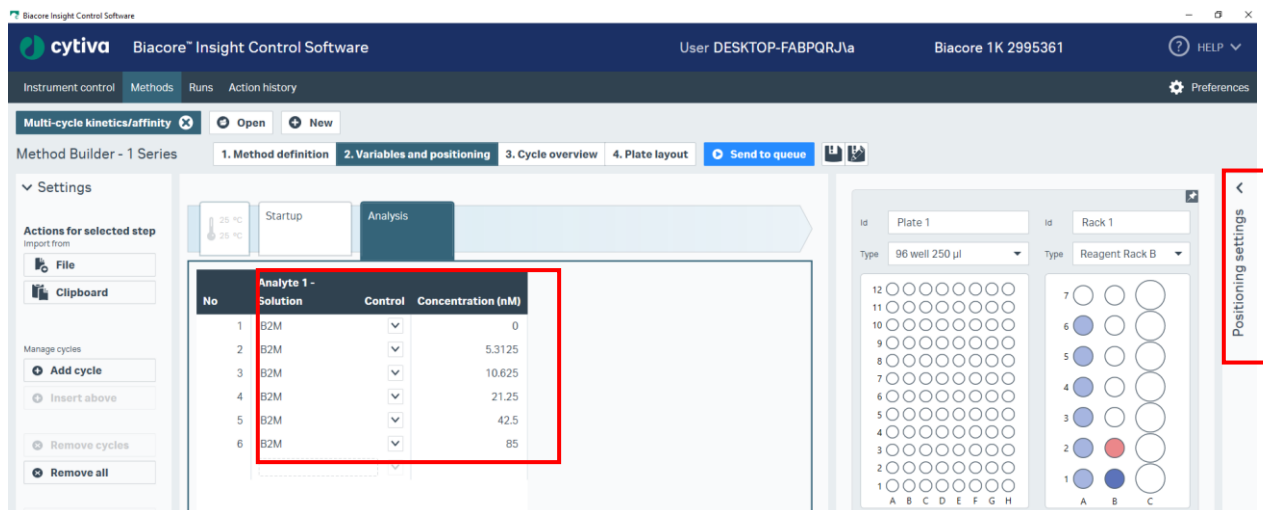
- 3) 在 Regeneration 窗口中可以修改再生溶液为 Glycine2.5，再生时间和流速保持不变。Startup 中的各项参数与 Analysis 窗口保持一致。



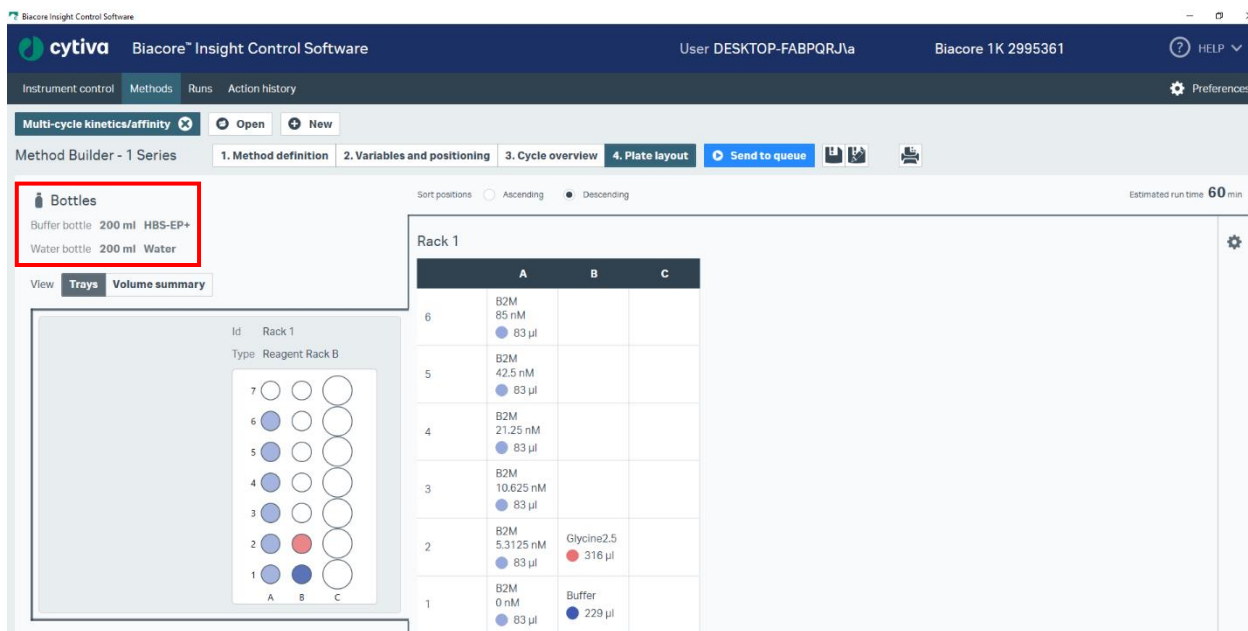
- 4) 点击上方 **2. Variables and positioning**，进入新界面，点击 Startup，通过左侧 Add cycle/Remove cycles 增减 Startup 次数，建议做 3-5 次 Startup 循环，让仪器达到一个更好的稳定状态。



- 5) 点击 Analysis, 在 Analyte1-Solution 填写样品名称, 设置样品浓度梯度, 需要至少设置 5 个浓度梯度和 1 个零浓度, 顺序为低浓度到高浓度进样。本练习设置 0nM, 5.3125nM, 10.625nM, 21.25nM, 42.5nM 和 85nM。点击右侧 Positioning settings 按钮, 将 Pooling 选择为 Yes, 相同的样品或试剂立即完成合并。并且可以通过鼠标左键选择并长按的方式, 拖拽样品至合适的孔板位置。



- 6) 点击上方 **4. Plate layout**, 系统会跳转新的窗口, 检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够, 再按照屏幕显示的样品位置信息, 准备足够体积的样品放入指定位置 (放入样品体积略大于显示体积即可)。以下图为例, 83 $\mu$ l 0 nM (即 Running Buffer : HBS-EP+), 5.3125nM, 10.625nM, 21.25nM, 42.5nM 和 85nM 分别放在样品架的 A1-A6 位置, 316 $\mu$ l Glycine 2.5 再生液放在 B2, 229  $\mu$ l Buffer (用于 Startup) 放在 B1, 样品放置完成后将样品架送回样品舱, 合上舱门。点击右上方的文件保存图标, 将方法文件保存在自定义文件夹中, 点击 Save。  
\*注意: 样品均采用 Running Buffer 进行稀释。



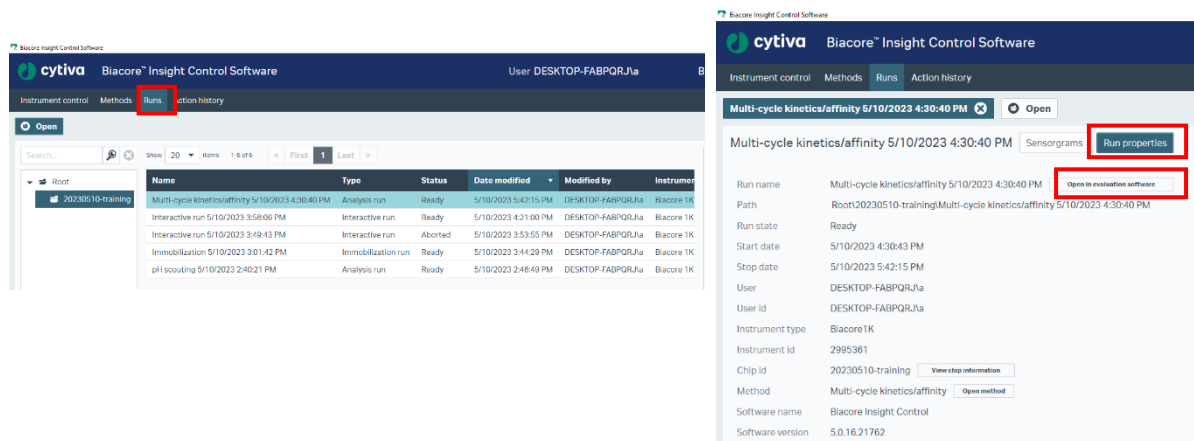
- 7) 点击Send to queue, 系统会自动跳转到新的界面, 检查Checklist中的各项是否正确完成。点击下方Ready to start, 在跳出的窗口中保存result文件到对应文件夹中。系统正式自动运行Multi-cycle kinetics/affinity程序。

## 五 数据分析

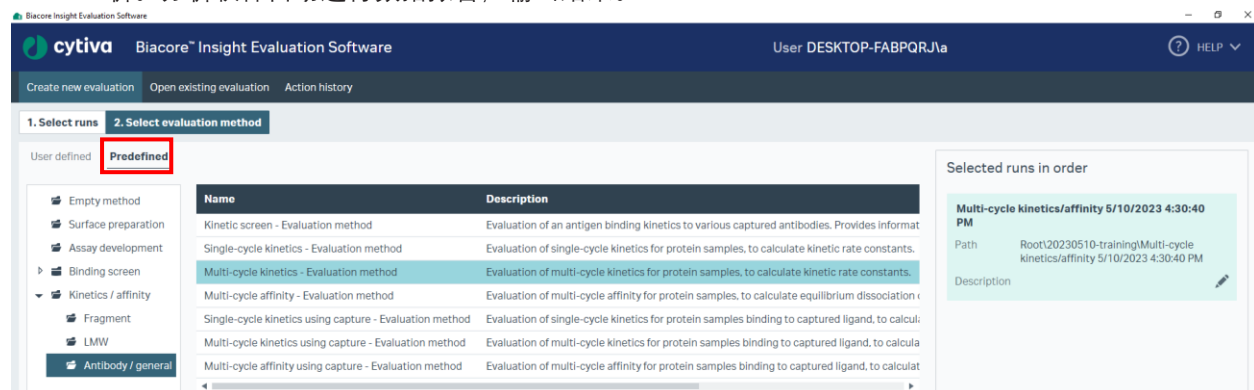
在本章节中, 我们将演示如何分析 Biacore 的实验结果。在第四章, 我们完成了基于氨基偶联的多循环动力学实验 (Multi-cycle kinetics/affinity)。现在, 我们将应用 Biacore Insight Evaluation Software 对实验结果进行分析。

### 5.1 数据导入

- 1) 点击 Biacore 1K Control Software 主界面上方的 Runs, 找到结果文件, 双击或点击右下角 Open 按钮打开。然后, 选择 Run properties, 点击 Open in evaluation software, 界面跳转到 Biacore Insight Evaluation Software。也可直接打开 Biacore Insight Evaluation Software, 打开方式如 Biacore Control Software 进行登录。

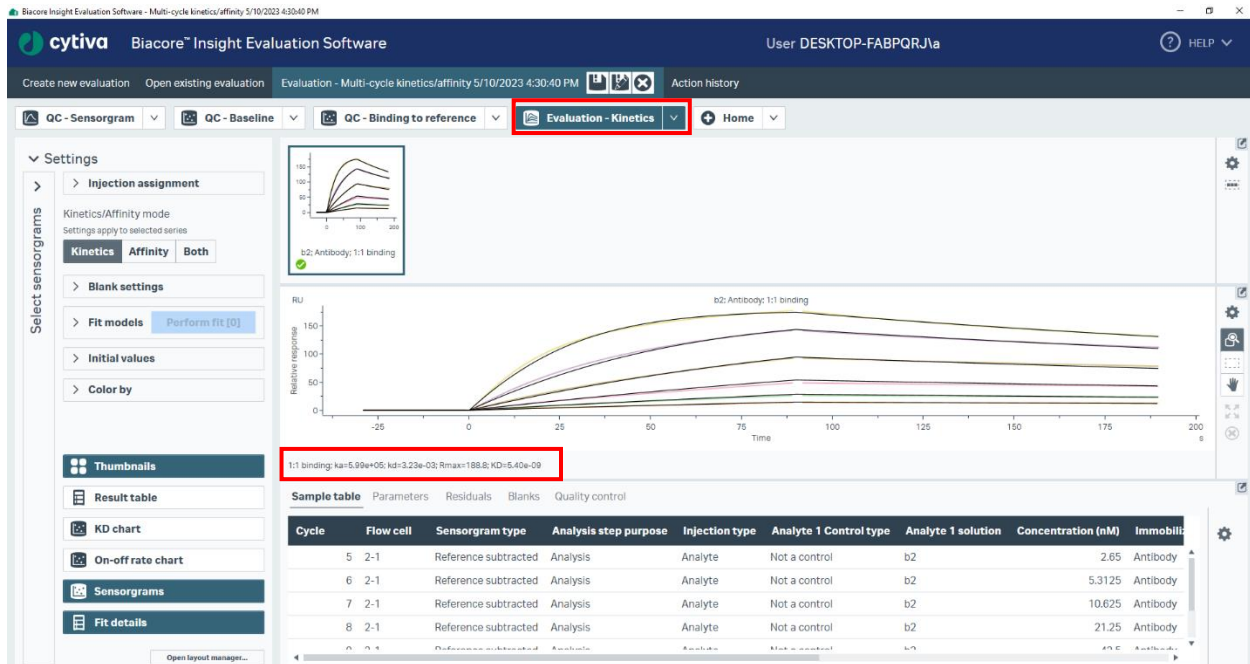


- 2) 在 Biacore Insight Evaluation Software 中, 点击 Predefined 找到对应分析方法 (Kinetics/affinity – Antibody/general – Multi-cycle kinetics) (同实验方法对应), 双击或点击右下角 Open 按钮进行分析。分析软件自动进行数据拟合, 输出结果。

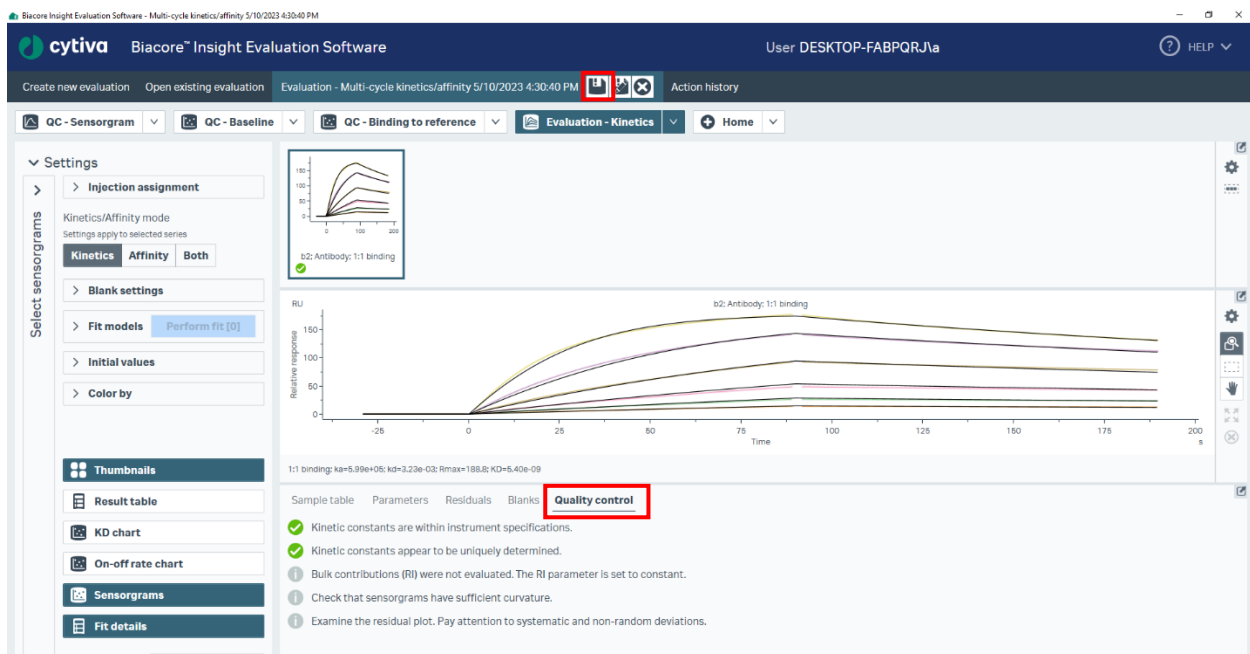


## 5.2 亲和力和动力学数据分析

- 1) 在 Evaluation-kinetics 界面，传感图下方显示，拟合模型 (1:1 binding)、结合速率常数 ( $K_a = 5.99 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )，解离速率常数 ( $K_d = 3.23 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )、亲和力 ( $K_D = 5.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ )。



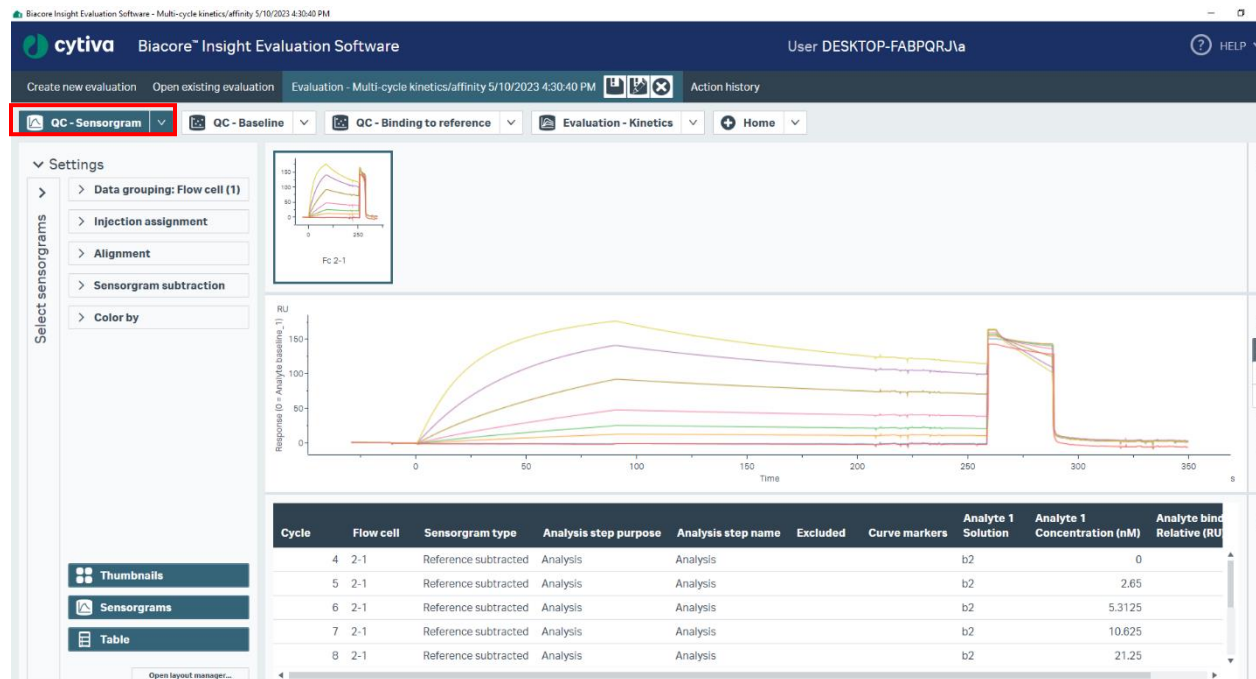
- 2) 点击传感图下方 Quality Control，即可呈现系统对数据拟合结果进行智能化评估的结果。绿色打勾图标表明结果符合模型要求，是高质量的数据结果。黄色惊叹号图标表明，部分结果比较接近模型预期的临界状态，需要进一步检查数据。红色惊叹号图标说明结果有不符合模型的地方，需要着重分析原因。本实验的 Quality Control 结果为绿色，表明本实验的结果为高质量的数据结果。



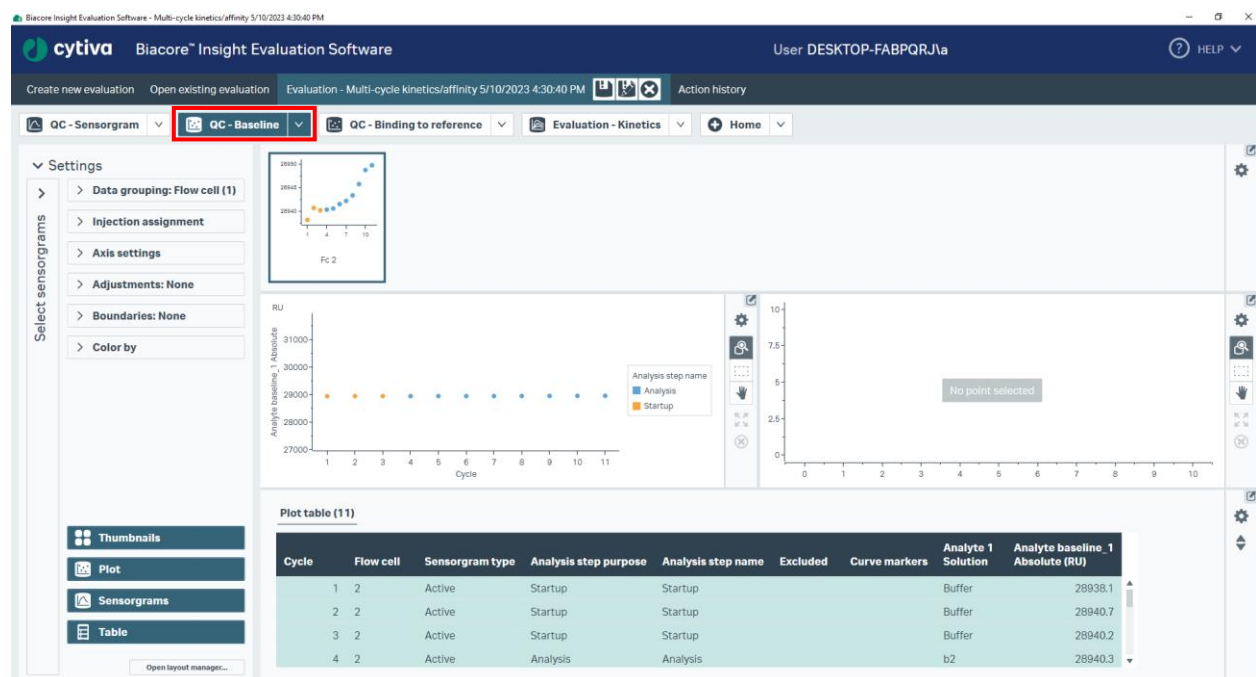
- 3) 点击右上方的文件保存图标，将分析结果保存在自定义文件夹中，点击 Save。再次查看时，仅需在分析软件上方的 Open existing evaluation 中直接打开查看即可，无需再次分析。

### 5.3 数据检查

- 1) 点击上方 QC-Sensorgram，可以查看原始传感图，检查数据是否存在异常，主要包括进样、解离和再生部分。

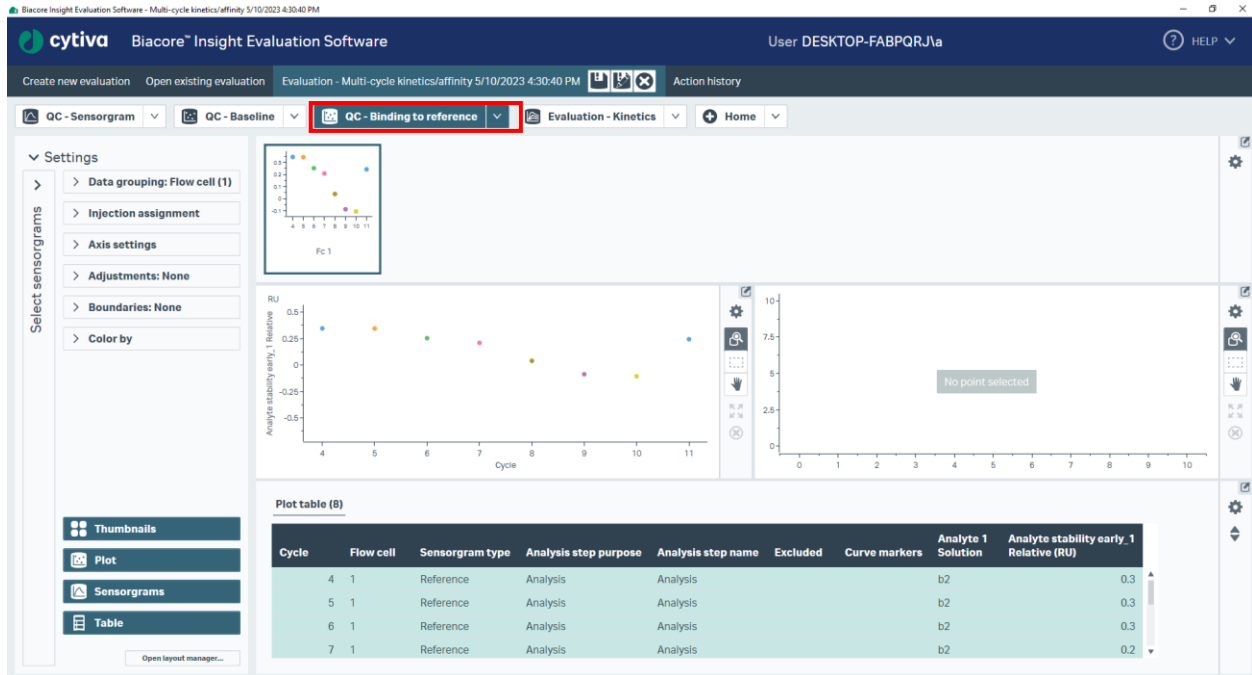


- 2) 点击上方 QC-Baseline，可以检查基线是否存在波动或漂移；若 baseline 中各个点的响应值上飘，可延长再生时间或优化再生条件。



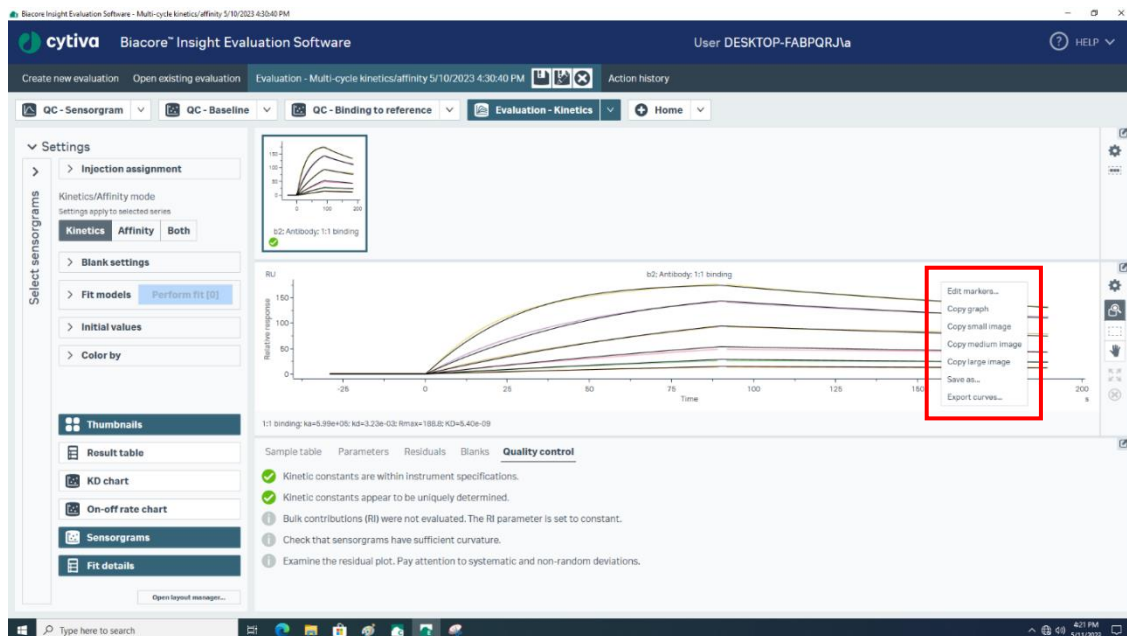
3) 点击上方 QC-Binding to reference, 检查各个点是否小于 Evaluation-kinetics 传感图中对响应值的 20%。如是, 直接跳到下一步。

\*注意: 若 Binding to reference 各个点的响应值大于 Evaluation-kinetics 传感图中对响应值的 20%, 且具有明显的浓度依赖性, 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) 的浓度 (不超过 1%), 或者调换配体与分析物。

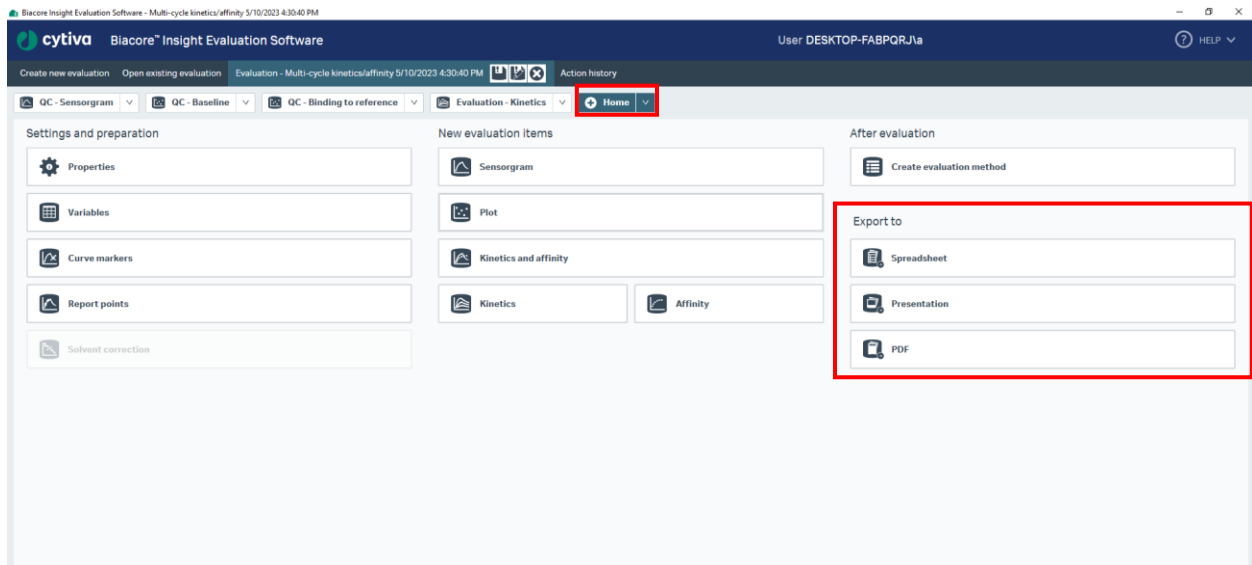


## 5.4 数据导出

1) 结果导出。将鼠标放在图上, 点击右键可以直接 copy graph (或者 copy small/ medium/ large image) 复制图片, 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。



2) 如果需要导出整个结果文件，点击右上方 Home 按钮，根据实际需要，选择主界面右侧结果输出模式（包括 Excel, PPT, PDF 格式）。

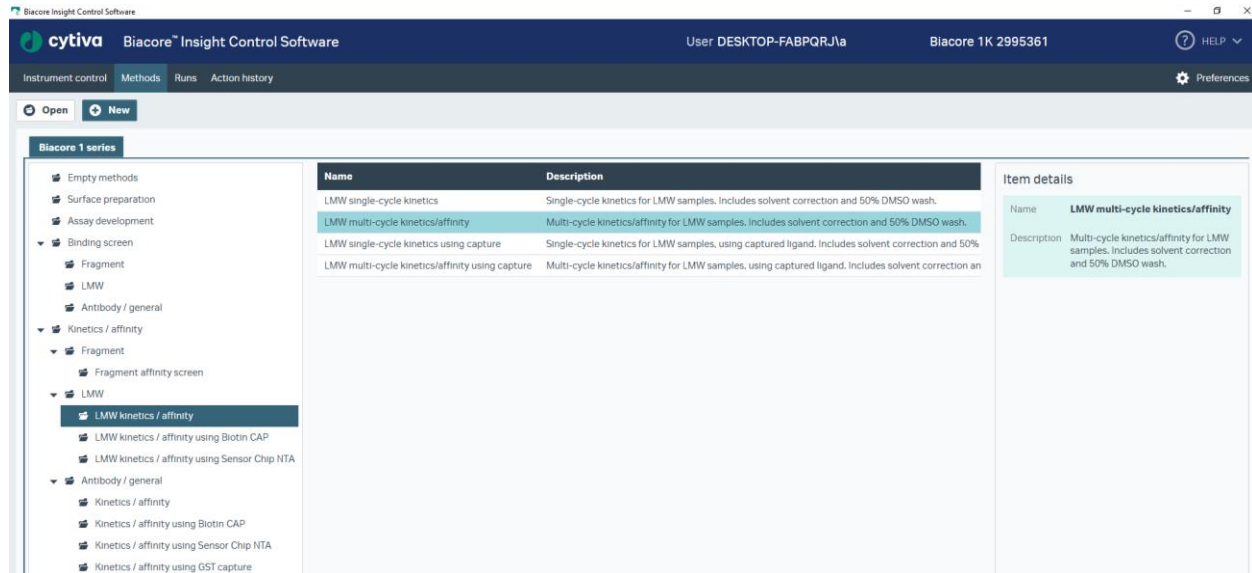


## 六 小分子互作实验

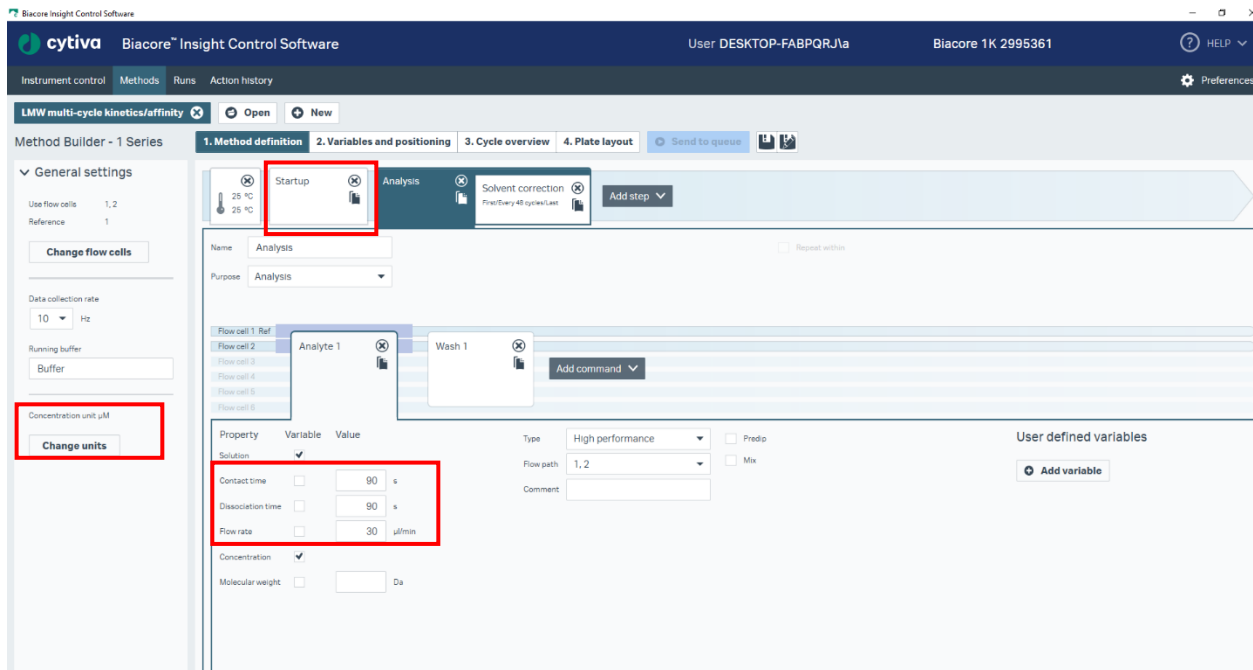
检测蛋白与小分子互作，一般将蛋白固定在芯片表面，可以参考本手册第 2 章配体的偶联，选用 Specify contact time 程序将蛋白偶联在芯片表面，然后可以应用 Biacore 1K Control Software 中的小分子多循环动力学 (LMW multi-cycle kinetics/affinity) 程序，检测蛋白与小分子的亲和力。

### 6.1 小分子亲和力检测 (LMW multi-cycle kinetics/affinity)

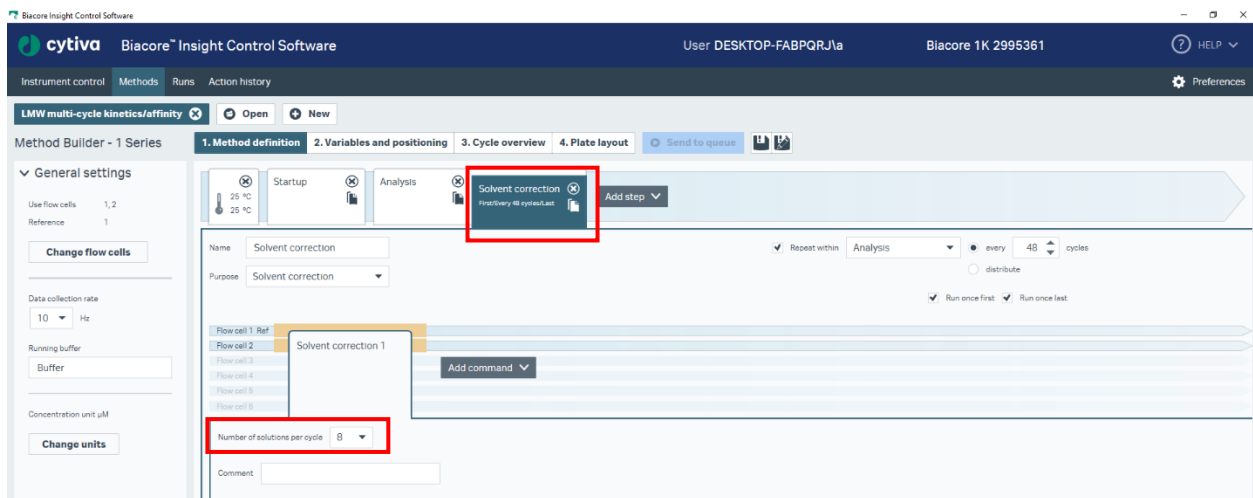
- 1) 点击 Biacore 1K Control Software 中的 Methods，点击 New，点击 Kinetics/affinity，选择 LMW 中的 LMW kinetics/affinity，再双击右侧 LMW multi-cycle kinetics/affinity。



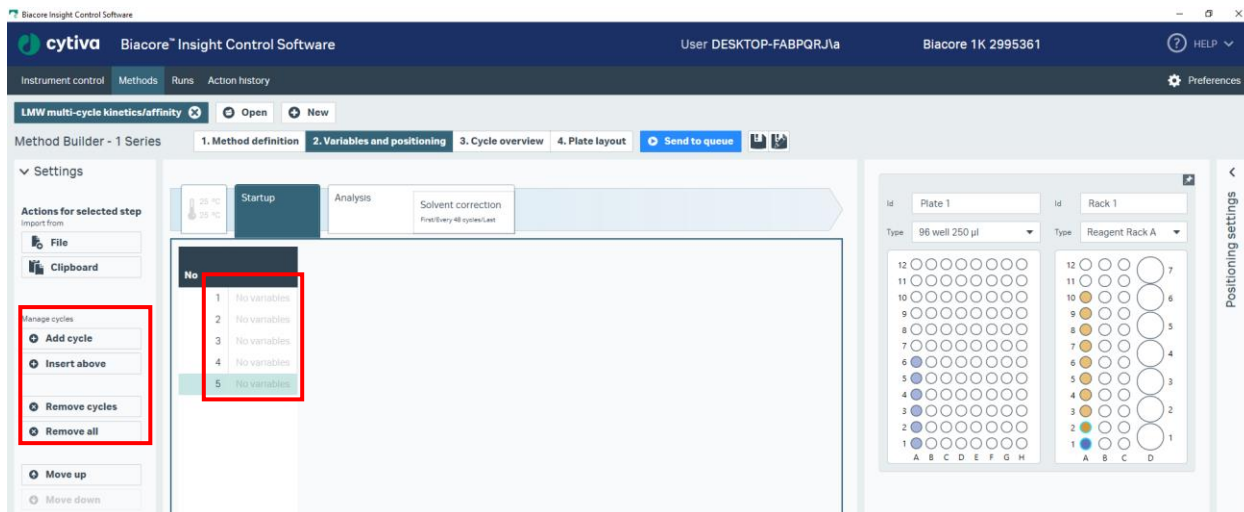
- 2) 在 Method definition 界面里，通过左侧 Change units 可以修改单位，可将浓度单位选择为  $\mu\text{M}$ 。在 Analysis 窗口中，可以修改进样 (Contact time) 和解离时间 (Dissociation time)，由于小分子的结合和解离时间较快，可将进样和解离时间均设置为 90s。Flow rate 为  $30 \mu\text{l}/\text{min}$  保持不变。Startup 中的各项参数与 Analysis 窗口保持一致。



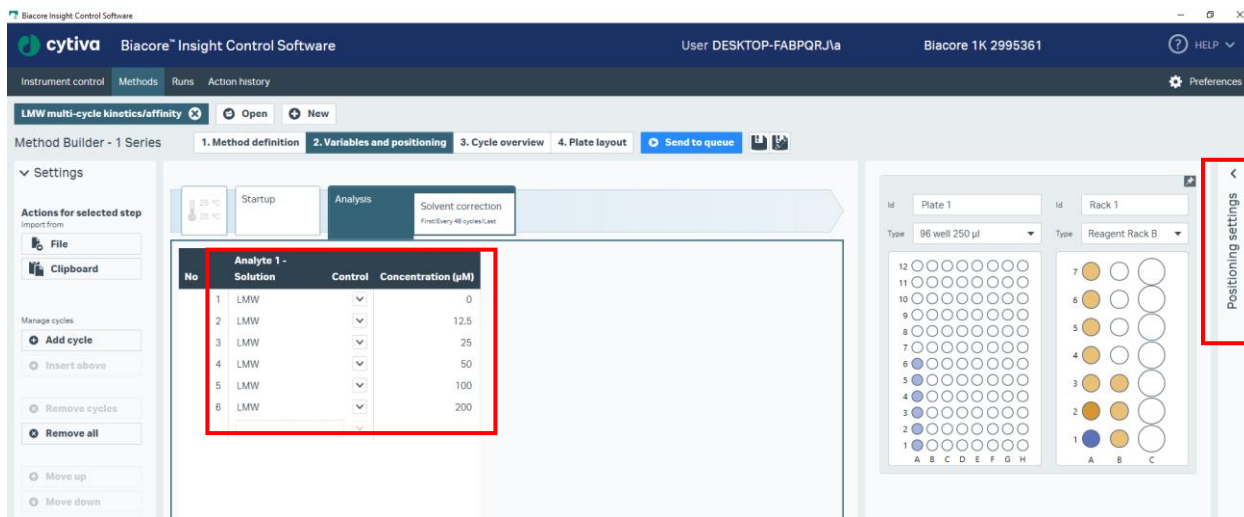
- 3) 点击 Solvent correction，仪器默认是做 4 个校正点，初学者可以调到 8 个，随着配液的熟练度准确度增加，再慢慢减少。



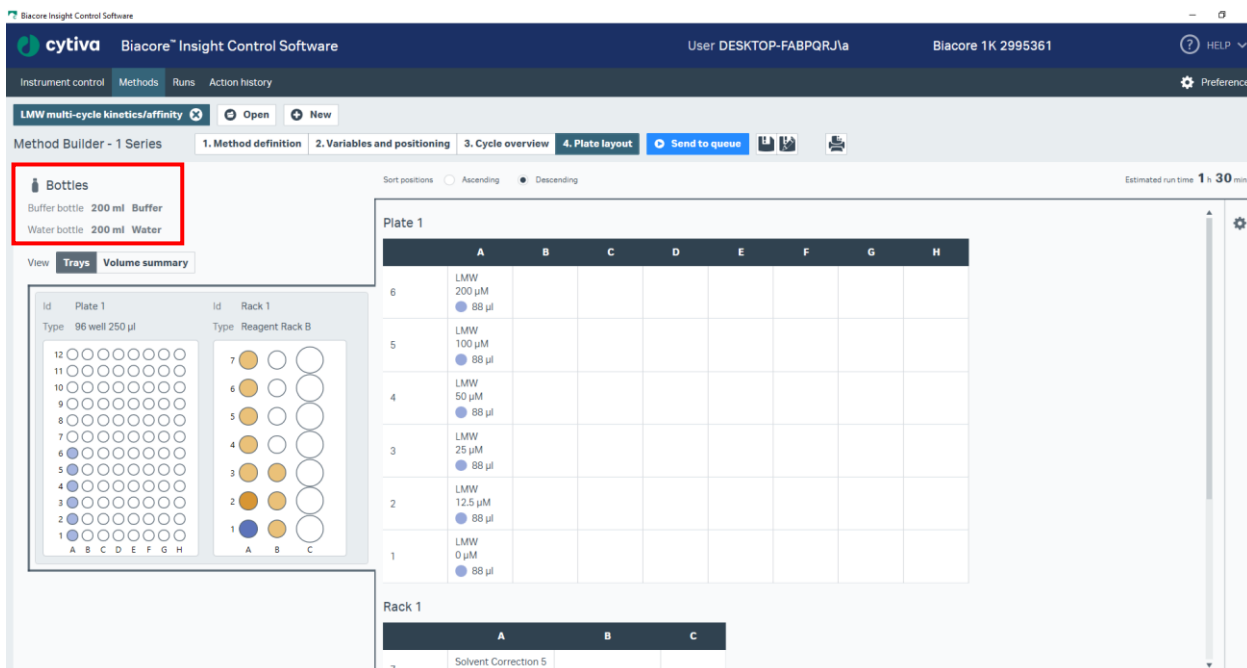
- 4) 点击上方 **2. Variables and positioning**，进入新界面，点击 Startup，通过左侧 Add cycle/Remove cycles 增减 Startup 次数，建议做 3-5 次 Startup 循环，让仪器达到一个更好的稳定状态。



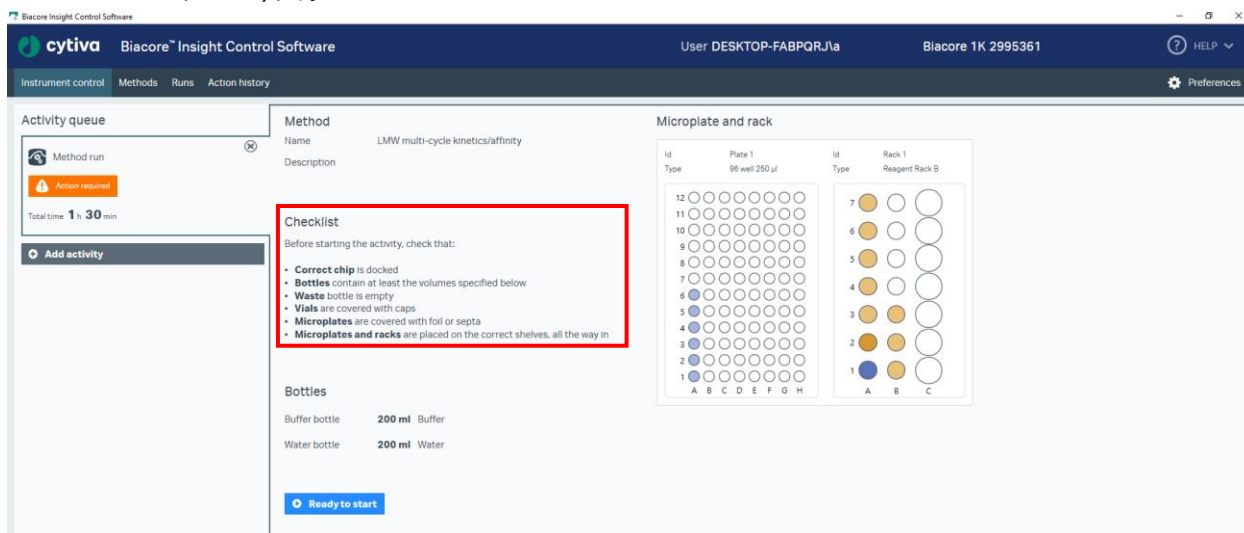
- 5) 点击 Analysis, 在 Analyte1-Solution 填写样品名称, 设置样品浓度梯度, 需要至少设置 5 个浓度梯度和 1 个零浓度, 顺序为低浓度到高浓度进样。本练习设置 0 $\mu$ M, 12.5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M 和 200 $\mu$ M。点击右侧 Positioning settings 按钮, 将 Pooling 选择为 Yes, 相同的样品或试剂即可完成合并。并且可以通过鼠标左键选择并长按的方式, 拖拽样品至合适的孔板位置。



- 6) 点击上方 **4. Plate layout**, 系统会跳转新的窗口, 检查屏幕上显示的 Bottles 中的溶液体积是否足够, 再按照屏幕显示的样品位置信息, 准备足够体积的样品放入指定位置 (放入样品体积略大于显示体积即可)。样品放置完成后将样品架送回样品舱, 合上舱门。点击右上方的文件保存图标, 将方法文件保存在自定义文件夹中, 点击 Save。



7) 点击Send to queue, 系统会自动跳转到新的界面, 检查Checklist中的各项是否正确完成。点击下方Ready to start, 在跳出的窗口中保存result文件到对应文件夹中。系统正式自动运行LMW multi-cycle kinetics/affinity程序。



## 6.2 配置运行缓冲液和溶剂校正曲线

- 1) 小分子样品的运行缓冲液选用含 5%DMSO 的 1×PBS-P+ (视样品溶解性可调整 DMSO 含量, 最高不超过 10%)
- 2) 取 105 mL 10×PBS-P+用去离子水稀释到 1L, 配成 1.05×PBS-P+。并按照下表, 加入 DMSO, 配置 5%DMSO 运行缓冲液和 4.5%、5.8%溶剂校正母液 (running buffer 中 DMSO 浓度并非绝对 5%, 可视小分子样品溶解度情况而定, 0-10%均可。若 running buffer 中 DMSO 浓度变化, 则溶剂校正母液也

相应变化，只要 cover running buffer 中 DMSO 浓度即可)。将系统右侧托盘中的原运行缓冲液换成含 5%DMSO 的 1×PBS-P+, 并插入 BUFFER 进液管。

	4.5% DMSO	5.8% DMSO	5.0% DMSO running buffer
1.05 x PBS-P+	9.5 ml	9.5 ml	950 ml
100 % DMSO	0.45 ml	0.58 ml	50 ml
Final volume	~10 ml	~10 ml	1000

- 3) 按照下表混合 4.5%和 5.8%母液配置 5%DMSO 浓度校正曲线 (DMSO 标准液的数量并非一定要 8 个, 通常 4-8 个均可。总体积也并非一定要 1.4ml, 这些均可根据实际情况自行调整)

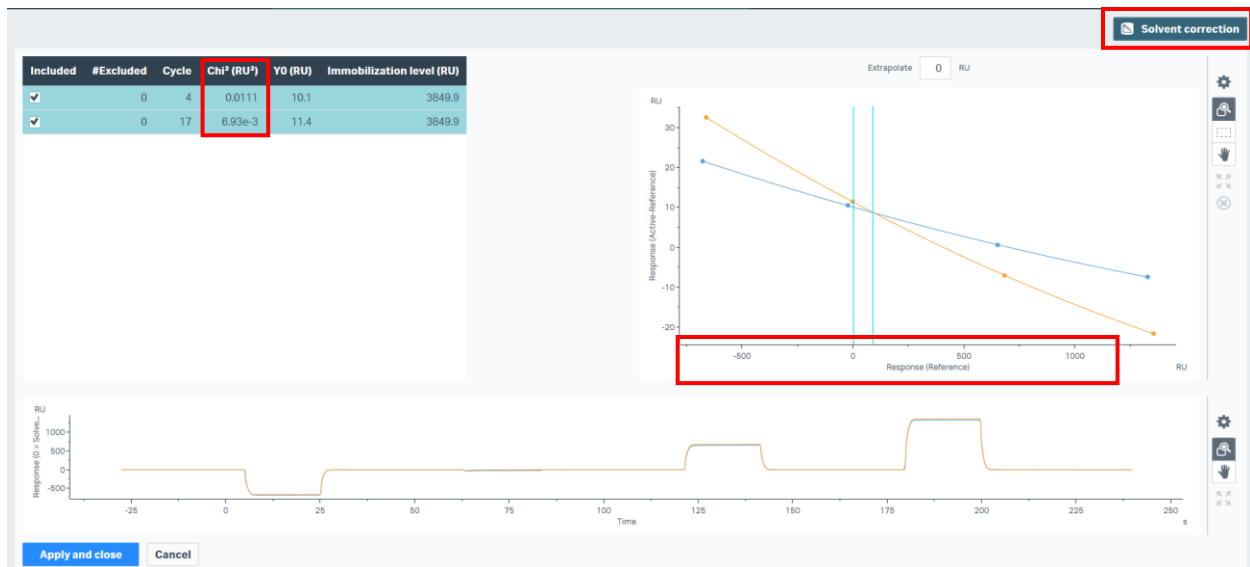
Buffer/Vial	1	2	3	4	5	6	7	8
4.5% DMSO	0	200	400	600	800	1000	1200	1400
5.8% DMSO	1400	1200	1000	800	600	400	200	0

### 6.3 小分子样品的准备

- 1) 用不含 DMSO 的 1.05×PBS-P+缓冲液稀释 10 mM 小分子母液 20 倍, 得到 500μM 含 5%DMSO 的 1×PBS-P+中的小分子溶液。
- 2) 再用配好的含 5% DMSO 的 Running Buffer 将分析物稀释为对应的上样浓度。

### 6.4 小分子亲和力检测的数据分析

- 1) 点击 Biacore 1K Control Software 主界面上方的 Runs, 找到结果文件, 双击或点击右下角 Open 按钮打开。然后, 选择 Run properties, 点击 Open in evaluation software, 界面跳转到 Biacore Insight Evaluation Software。也可直接打开 Biacore Insight Evaluation Software, 打开方式如 Biacore Control Software 进行登录。
- 2) 在 Biacore Insight Evaluation Software 中, 点击 Predefined 找到对应分析方法 (LMW multi-cycle kinetics/affinity) (同实验方法对应), 双击或点击右下角 Open 按钮进行分析。
- 3) 在 Solvent correction 溶剂校正界面, 检查溶剂校正曲线是否符合要求。一般要求溶剂校正曲线落在 -500 到 +1000RU 范围内, 且两条竖线落在校正曲线范围内, 拟合的 Chi2 小于 2。如果超出此范围较多, 多由于 DMSO 浓度配置不准确造成。最后, 点击 Apply and close。



4) 参考第五章节进行数据分析，数据检查及导出。

## 七 设备维护

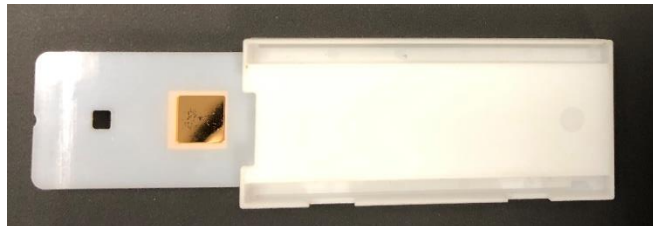
良好的日常维护可以保证设备处于稳定的运行状态，有助于获得可靠的数据结果。本章节将介绍一些常用的维护方法。

### 7.1 芯片的保存

有两种主要的芯片保存方法：半干法保存和湿法保存

- 半干法保存

1) 将芯片盒有字一面朝下放置，推出芯片内片。



2) 取大约 100μl 适合保存蛋白的缓冲液，滴到金膜上，完全覆盖金膜区域即可。

\*注意：枪头不要接触金膜！



3) 将内片推回芯片盒内，水平放入 50ml 离心管。拧紧离心管盖，4°C冰箱保存。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。

4) 再次使用芯片时，将芯片内片取出，甩干至金膜区域不残留任何液体。注意：不可接触或者水洗金膜区域！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。



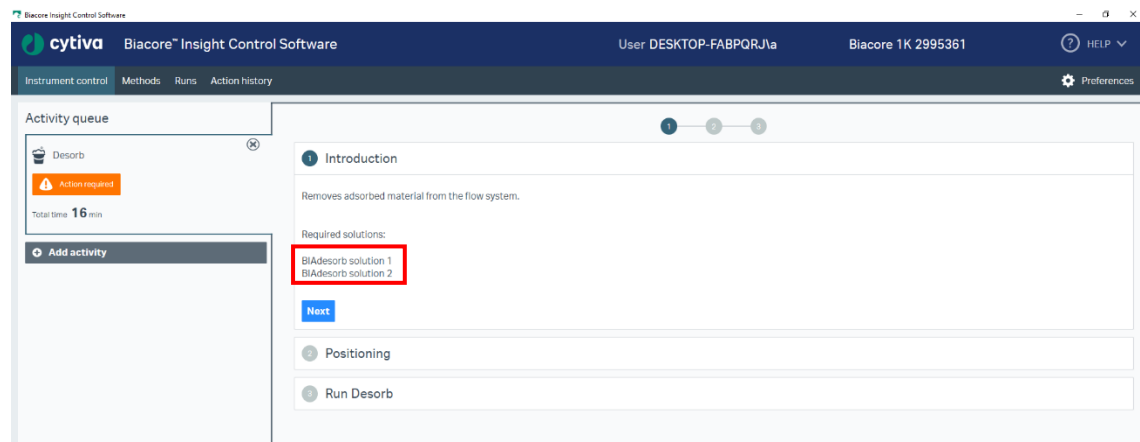
- 湿法保存
  - 1) 放入离心管的操作与半干法一致，不同之处在于，需要在离心管中加入适量缓冲液，确保芯片金膜浸在缓冲液中，4°C冰箱保存。
  - 2) 湿法保存的芯片，再次使用时尽量将液体弄干再放入设备使用。

## 7.2 Desorb 和 Sanitize

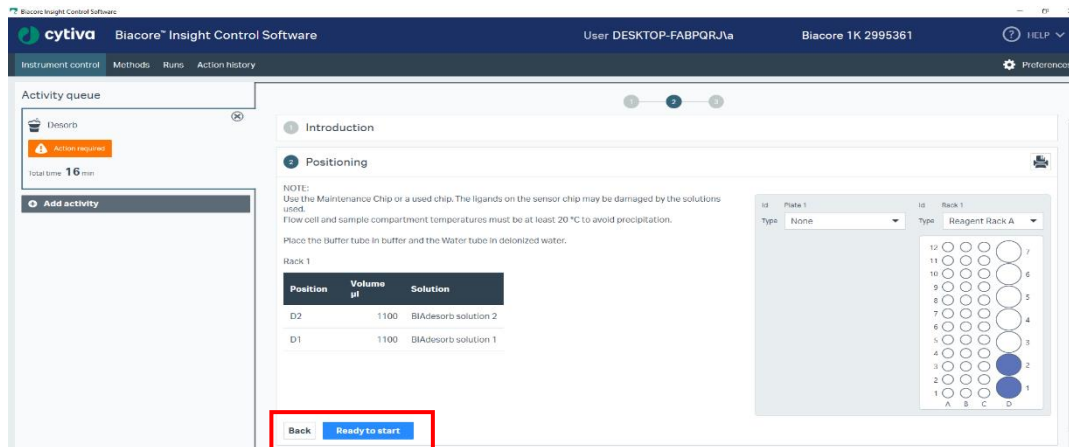
Desorb 程序主要目的是去除系统管路中残留的样品以及沉积的盐类。推荐每周一次，以确保管路的清洁。Sanitize 程序的目的是除菌，防止管路中微生物生长导致阻塞。一般每月一次即可。在本练习中，我们将详细介绍 Desorb 和 Sanitize 的方法。

- Desorb 程序
  - 1) 将维护芯片放入系统！
  - 2) 准备 500ml 去离子水，放置在右侧桌面上的托盘中。将 BUFFER 缓冲液入口管插入至该瓶底部。
  - 3) 执行 Change solution 操作。
  - 4) 点击控制软件 System control 界面 Maintenance 中 Desorb 按钮，跳转到新界面，按照要求准备 Desorb solution1、2，点击 Next。

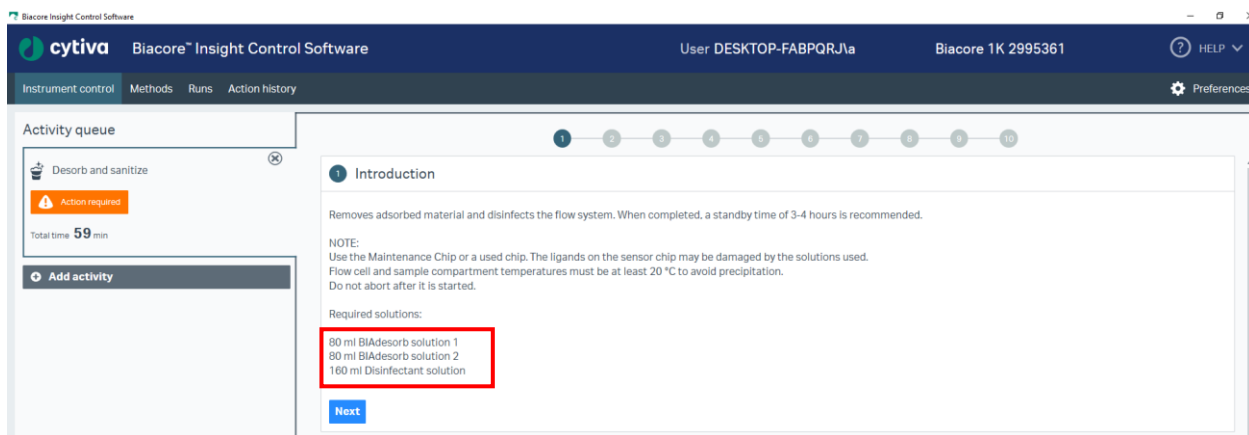
\*注意：Desorb solution 1 是 0.5% SDS，平时请不要放在冰箱中。使用前请确认是否有沉淀，若有沉淀会导致系统管路阻塞。如果室温过低造成沉淀，请在使用前放在水浴中化开。



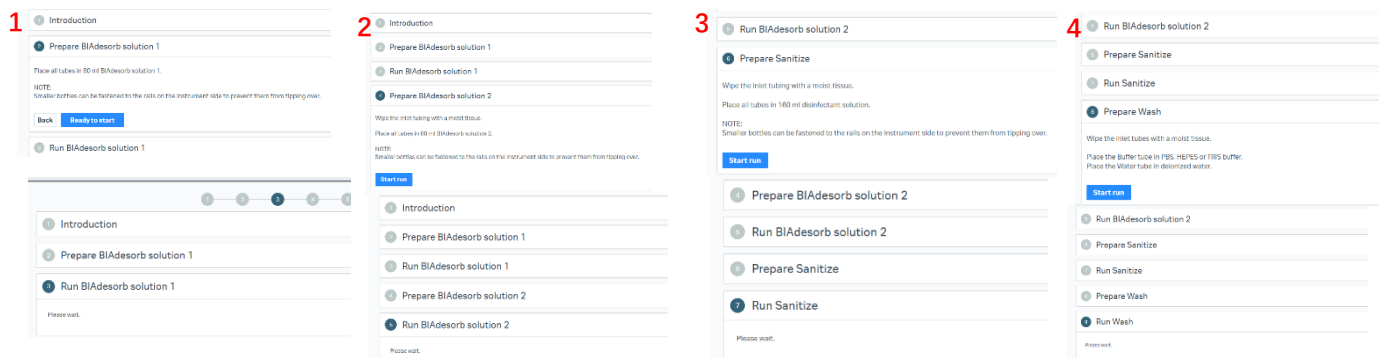
- 5) 按仪器要求准备足够体积的样品，并放入样品架的指定位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。  
 点击 Ready to strat, 系统自动进行除盐（Desorb）程序。



- Sanitize 程序
  - 将维护芯片放入系统！
  - 准备 500ml 去离子水，放置在右侧桌面上的托盘中。将 BUFFER 缓冲液入口管插入至该瓶底部。
  - 执行 Change solution 操作
  - 点击控制软件 System control 界面 Maintenance 中 Desorb and sanitize 按钮，跳转到新界面，按照要求准备 Desorb solution1、2 以及 Disinfectant solution（1%次氯酸钠），点击 Next。



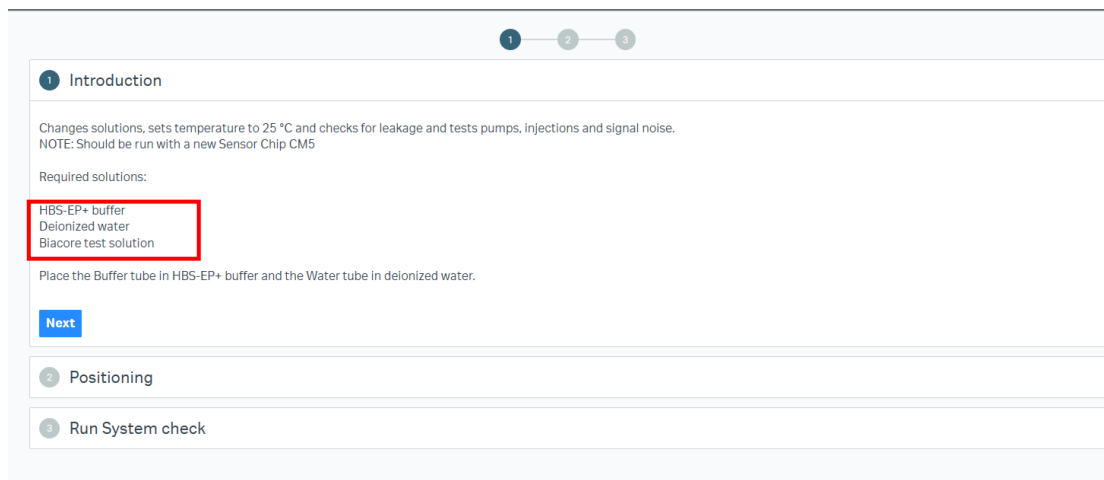
- 6) 按照程序提示依次将 BUFFER 及 WATER 管入口放入 Desorb1, Desorb2 及 Disinfectant solution（1%次氯酸钠）中，系统自动进行除菌（Desorb and sanitize）程序。  
 注：Desorb and sanitize 程序运行结束后，建议待机 3-4 小时后，再使用该设备进行检测。



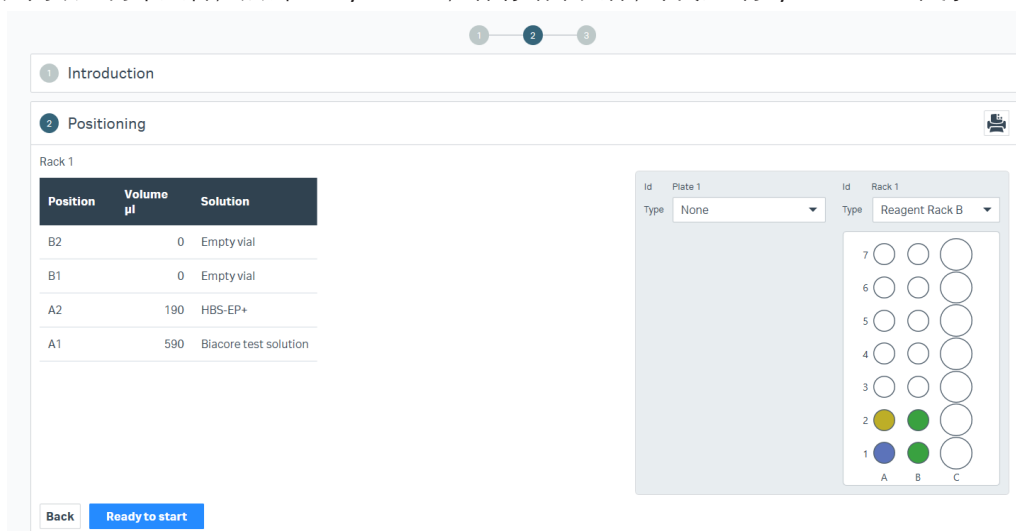
## 7.3 系统检测 System Check

当系统状态出现异常的时候，用户可以通过系统检测来确认。工程师可以通过系统检测的结果来判别人故障的种类和原因。系统检测的流程如下：

- 1) 将一块新的、干净的CM5芯片放入系统（系统检测不影响芯片的正常使用）。
- 2) BUFFER管入口放入HBS-EP+缓冲液中， WATER管入口放入ddH<sub>2</sub>O中， 点击Change solution。
- 3) 点击控制软件system control界面Maintenance中System check按钮， 跳转到新界面， 按照要求准备Biacore test solution（15% (w/w) sucrose in HBS-EP buffer， 包含于维护试剂盒中）， 点击Next。



- 4) 按照屏幕显示的样品位置信息，准备足够体积的样品，并放入对应的位置（放入样品体积略大于显示体积即可）。以下图为例，590 $\mu$ l的Biacore test solution放在A1，190 $\mu$ l的HBS-EP+放在A2，B1和B2分别放置两个空管，点击Ready to start，保存结果文件，自动运行System Check程序。

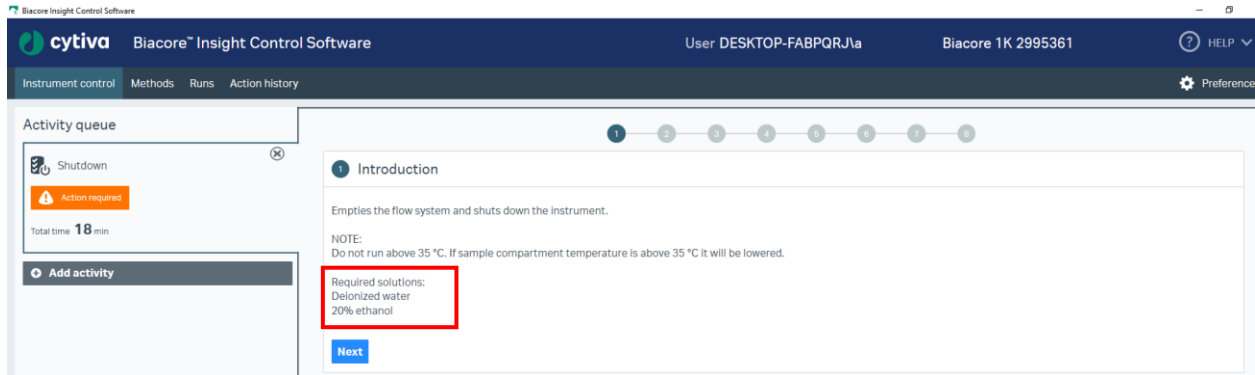


- 5) 系统检测完成后，会弹出系统检测报告。

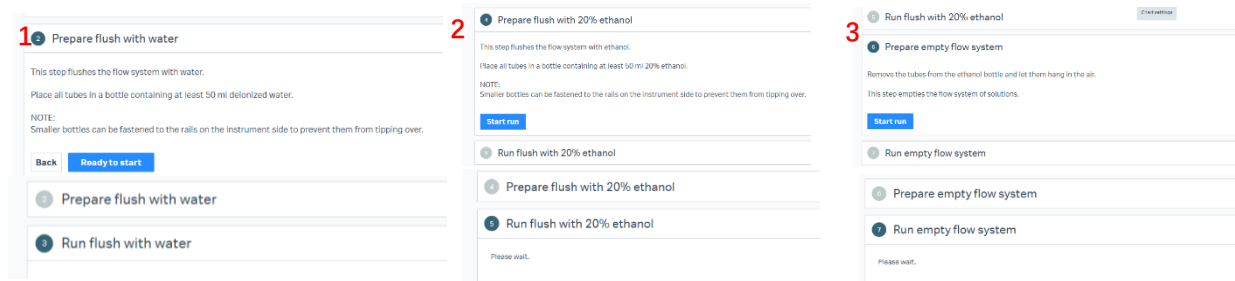
## 7.4 关机程序 Shutdown

Biacore 1K Standby的最长时间是7天。如果客户超过7天不使用设备且无法及时更换去离子水，我们建议将设备关机，关机的具体步骤如下：

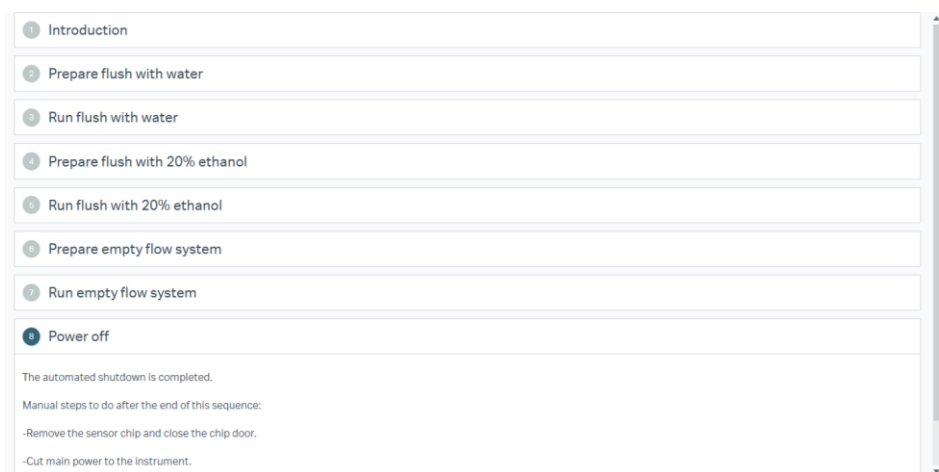
- 1) 将维护芯片放入系统！
- 2) 准备 500ml 去离子水，放置在右侧桌面上的托盘中。将 BUFFER 缓冲液入口管插入至该瓶底部。
- 3) 执行 Change solution 操作。
- 4) 点击控制软件 System control 界面 Maintenance 中 Shutdown 按钮，跳转到新界面，按照要求准备去离子水和 20%的乙醇，点击 Next。



- 5) 根据系统提示，按步骤进行操作。依序将BUFFER和WATER管口放入去离子水、20%乙醇以及悬空，排空系统内的残余液体。



- 6) 最后取出芯片，倒掉废液瓶中的废液，关闭Biacore1K主机电源（位于仪器左后方），关闭电脑电源，关机完成。



如有问题，请拨打免费技术热线 400-810-9118

欢迎关注 Cytiva 思拓凡公众号，及时订阅更多 Biacore 最新应用！

