



T200生物分子相互作用分析系统 使用培训

欧惠超

ohc@ustc.edu.cn

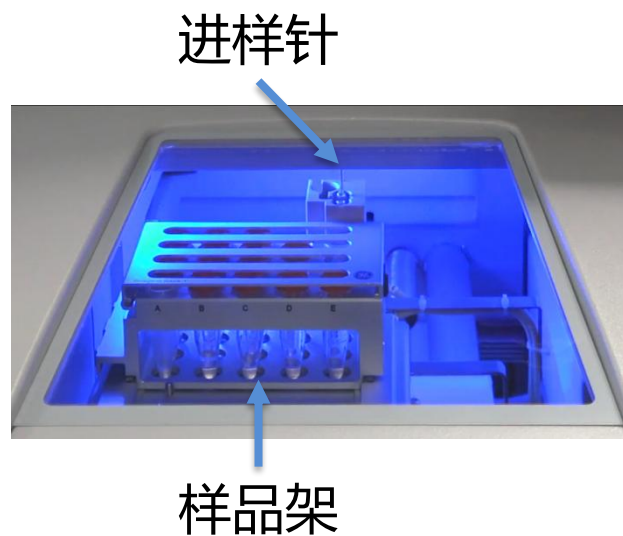
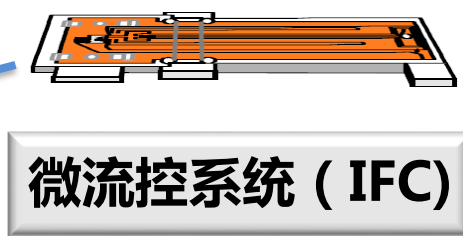
中国科学技术大学生命科学实验中心

<http://biotech.ustc.edu.cn>





Biacore T200仪器简介

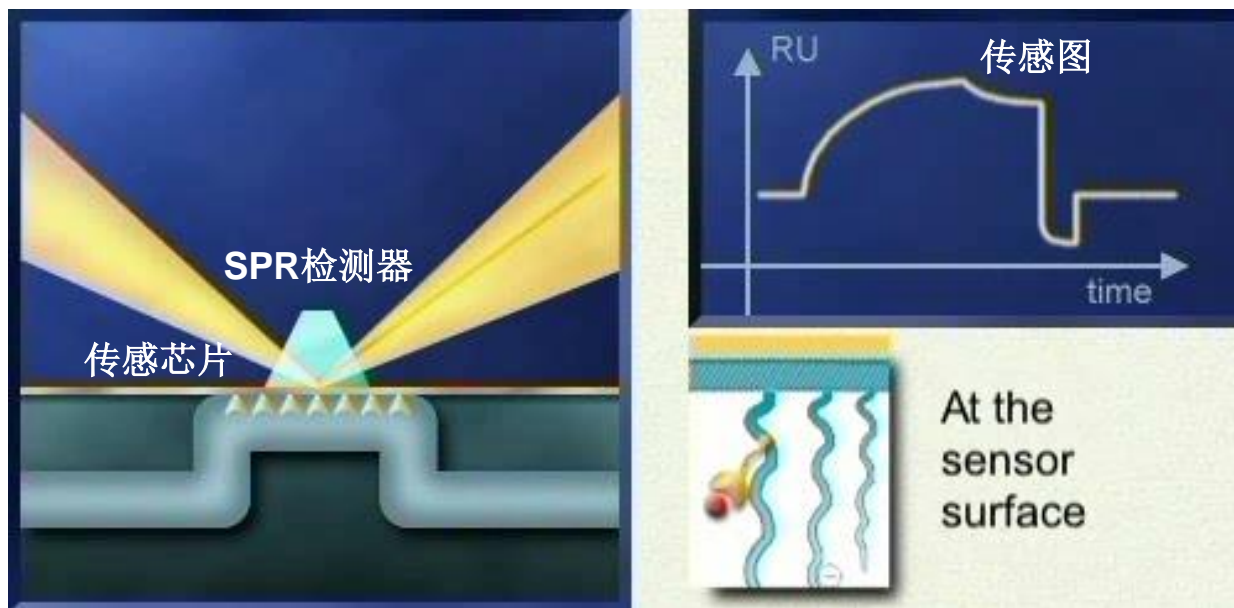


缓冲液 样品架舱门 超纯水 废液



工作原理

- 基于表面等离子共振（**SPR, Surface Plasmon Resonance**）技术
- **SPR**检测芯片表面液体的折射率变化（与结合分子的质量成正比）



最突出特点

1. 无需标记

2. 实时检测



SPR技术提供的信息

特异性

有没有结合？

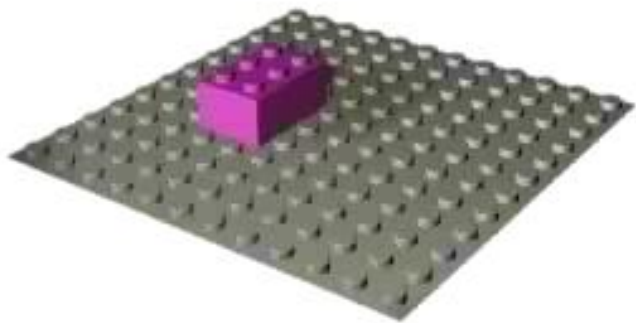
动力学

结合的速度有多快？

亲和力

结合的能力有多强？

浓度

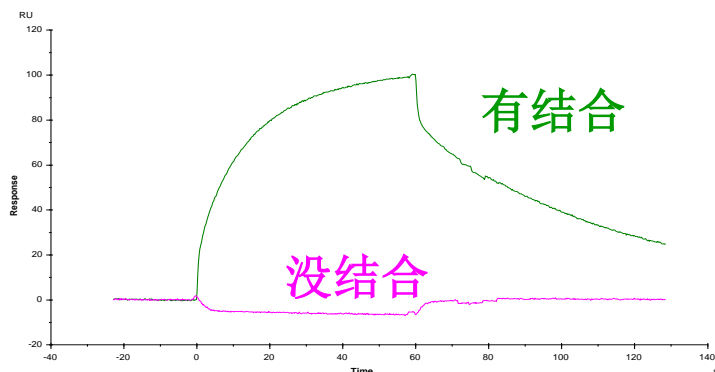


几乎可以检测所有的生物分子，如蛋白质、多肽、DNA、多糖、脂质体、小分子化合物，甚至噬菌体、细胞等

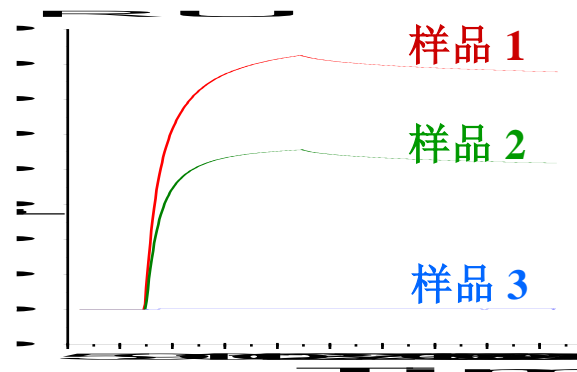


SPR技术提供的信息

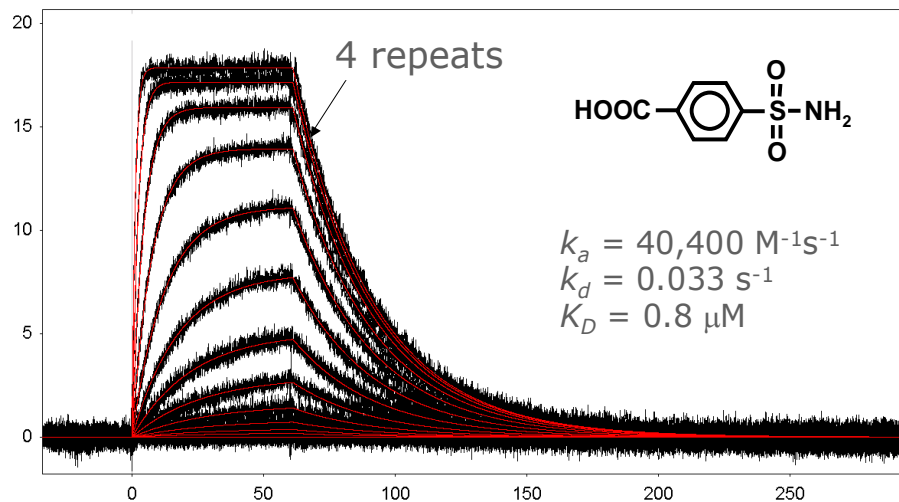
有/没有结合



定性比较

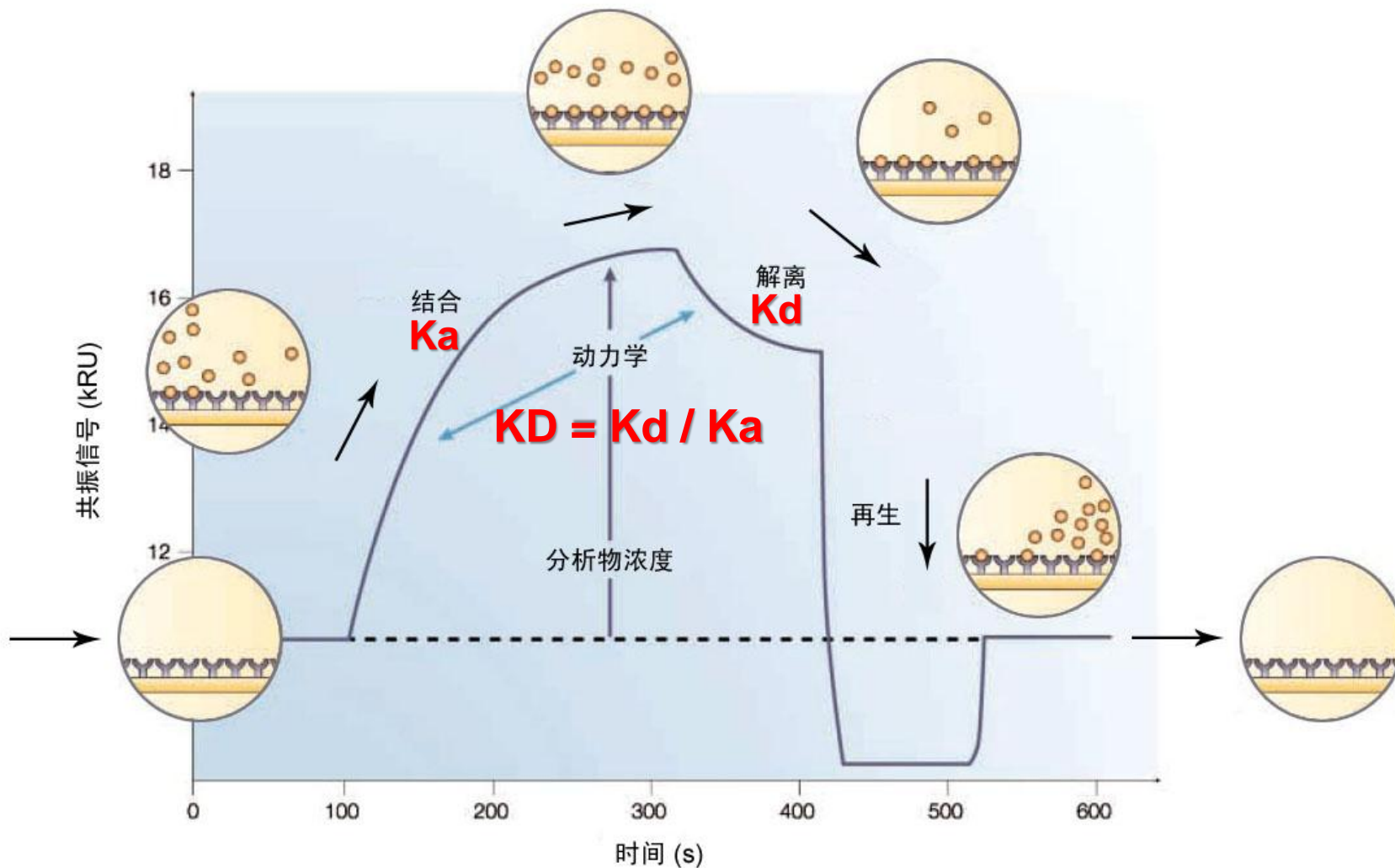


动力学和亲和力计算

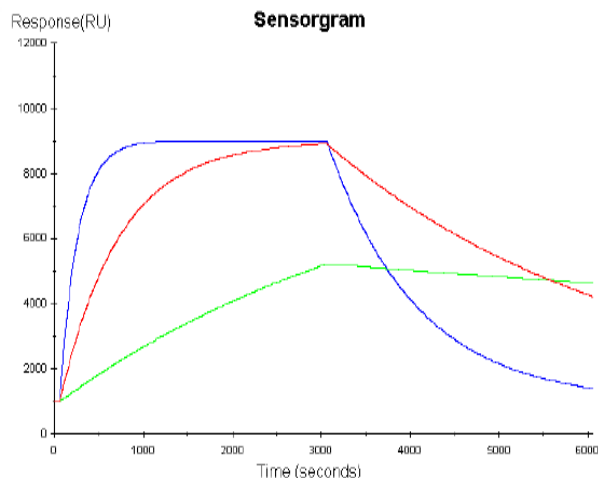




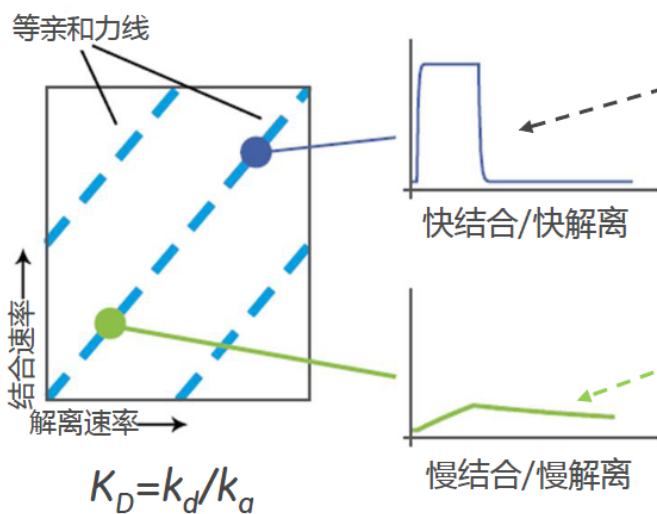
SPR定量方法



同样的亲和力，不同的动力学



不同的结合与解离速率反映了不同的作用机制，也决定了分子不同的功能与结构特征。



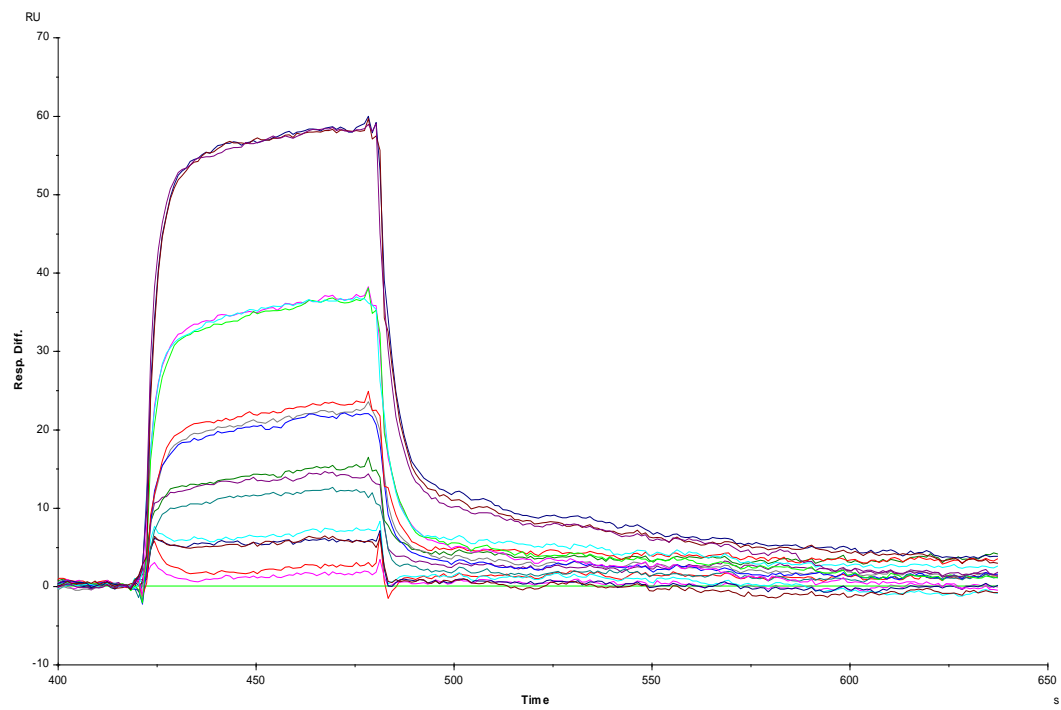
较快动力学特征的药物：低剂量即可达到饱和，但需要多次给药

较慢动力学特征的药物：需要高剂量来实现饱和，但药效持续时间久

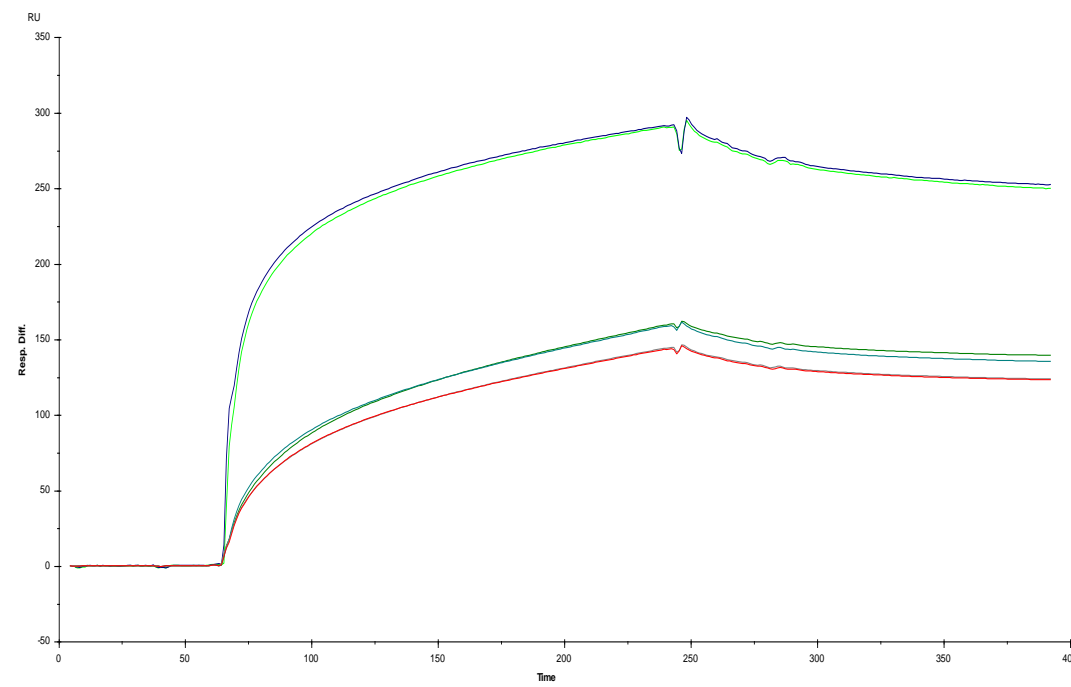


应用举例

蛋白质-肽亲和力测试



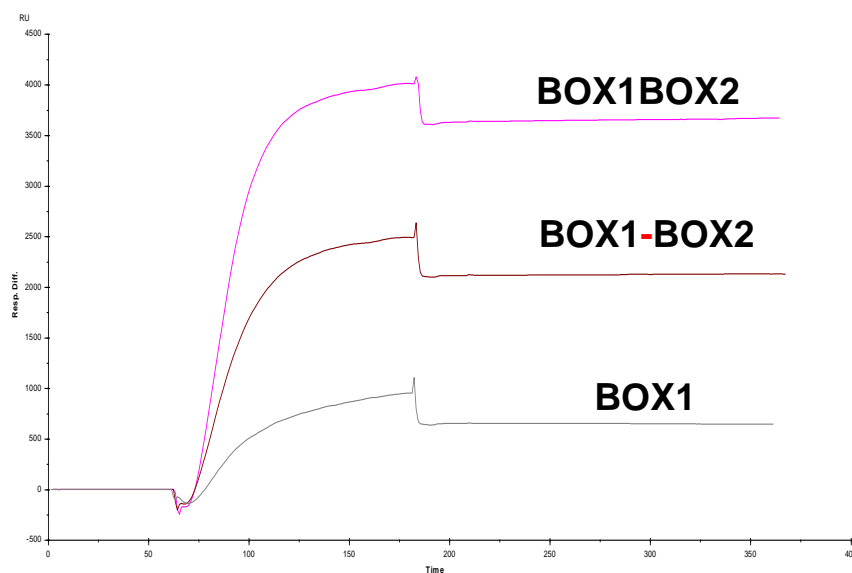
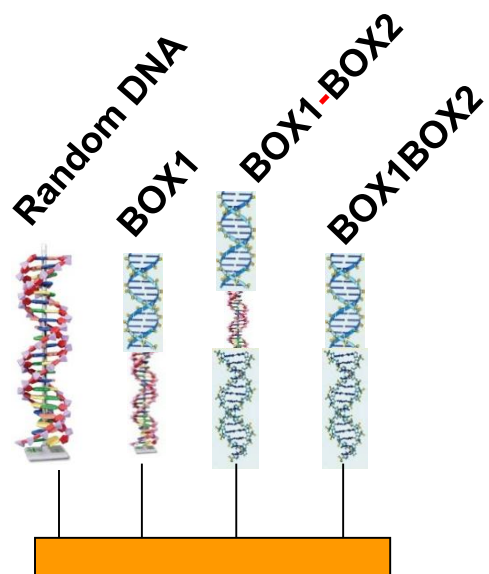
脂质体-蛋白质相互作用



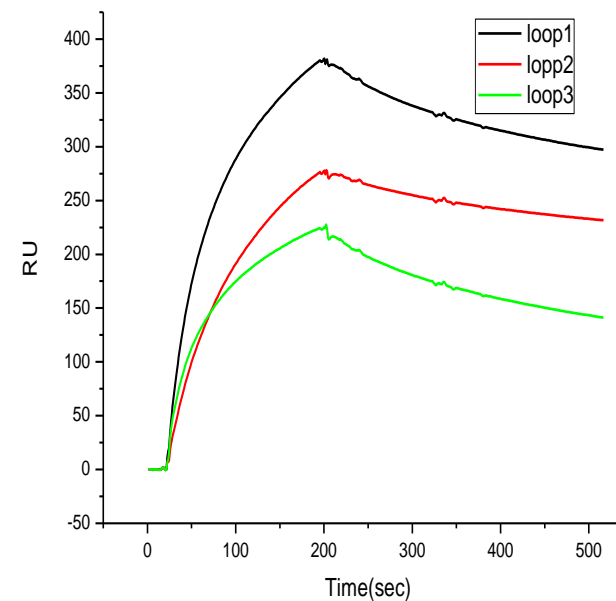


应用举例

Protein-DNA不同序列的相互作用



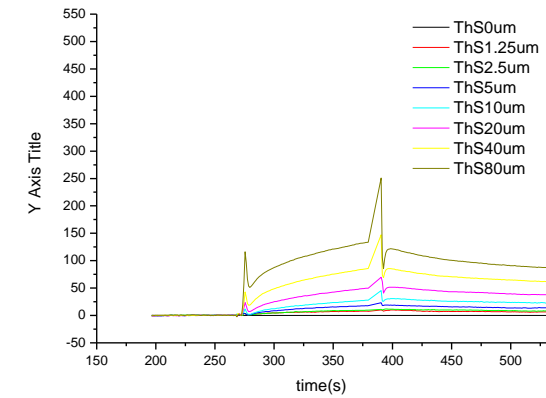
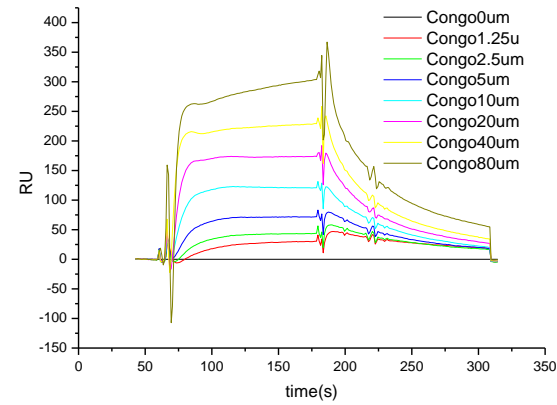
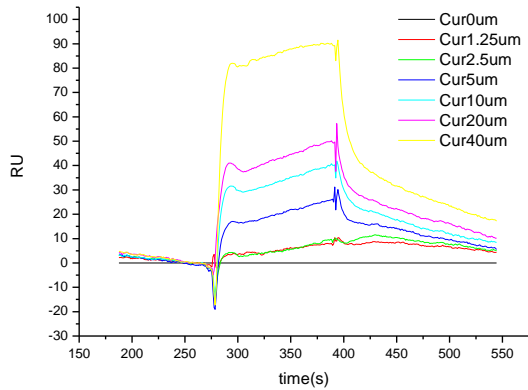
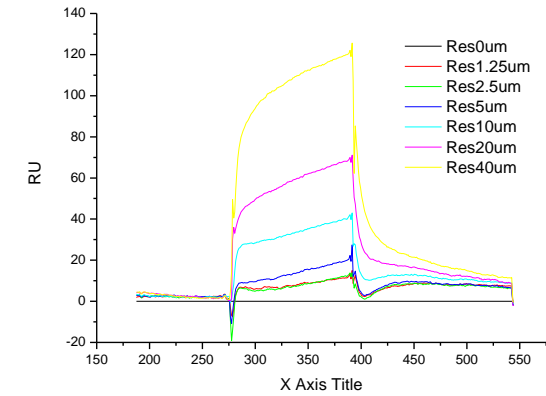
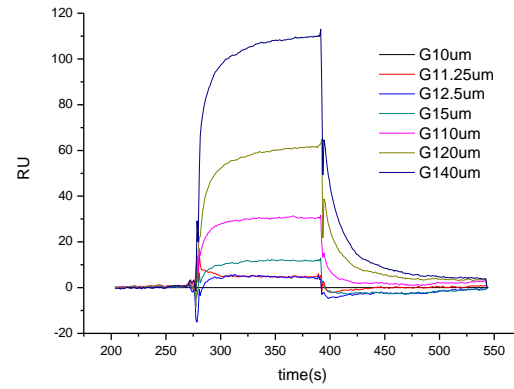
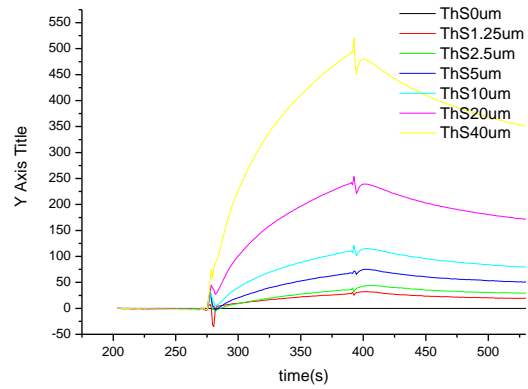
Aptamer筛选





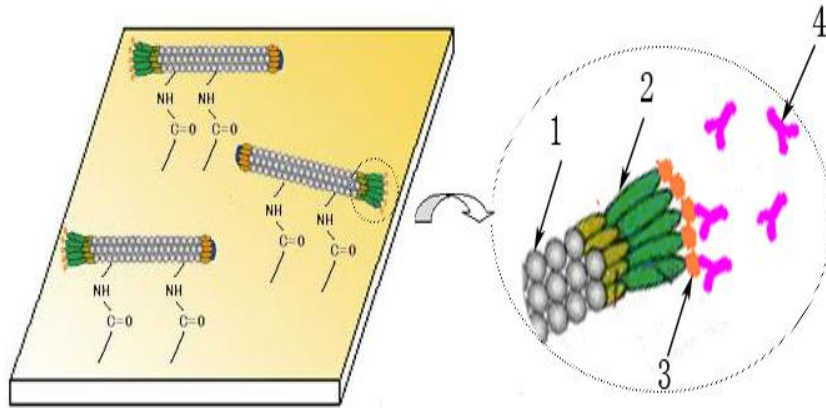
应用举例

药物筛选

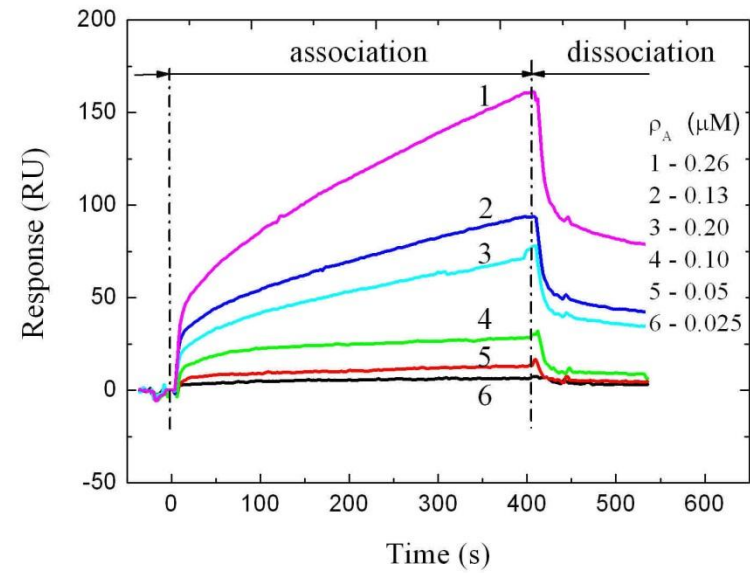


应用举例

噬菌体展示



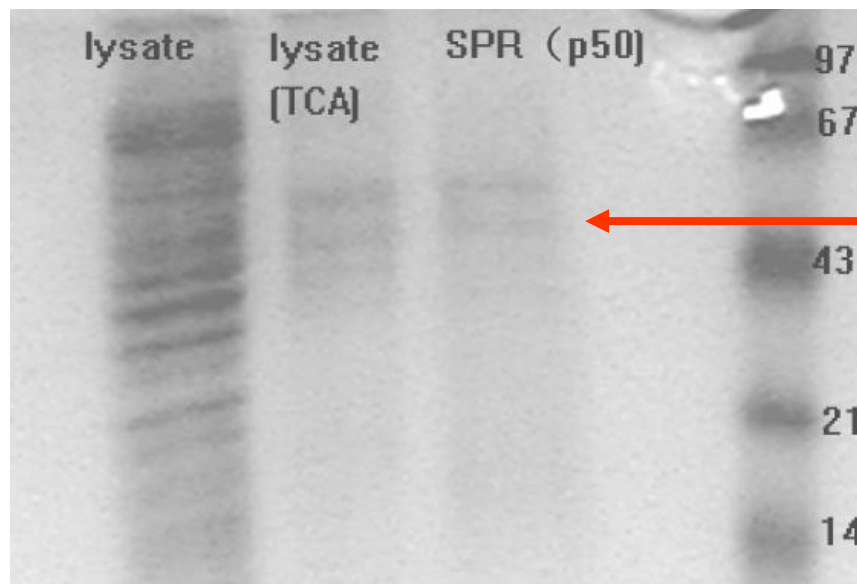
- 1. pVIII of M13
- 2. pIII of M13
- 3. 12-amino acid peptide
- 4. specific antibody





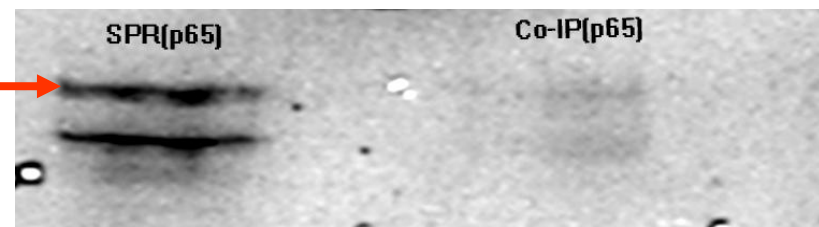
应用举例

SPR 样品回收



从芯片上回收的样品
经SDS电泳

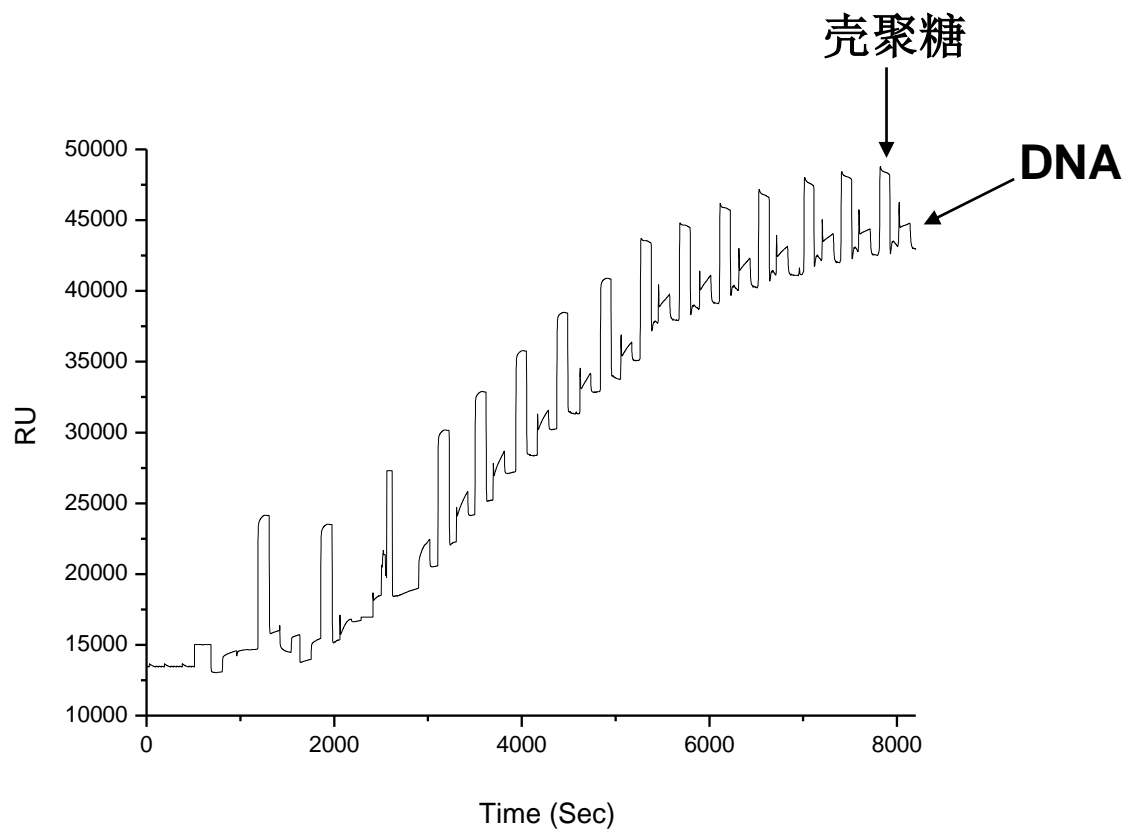
Western – blotting结果



应用举例

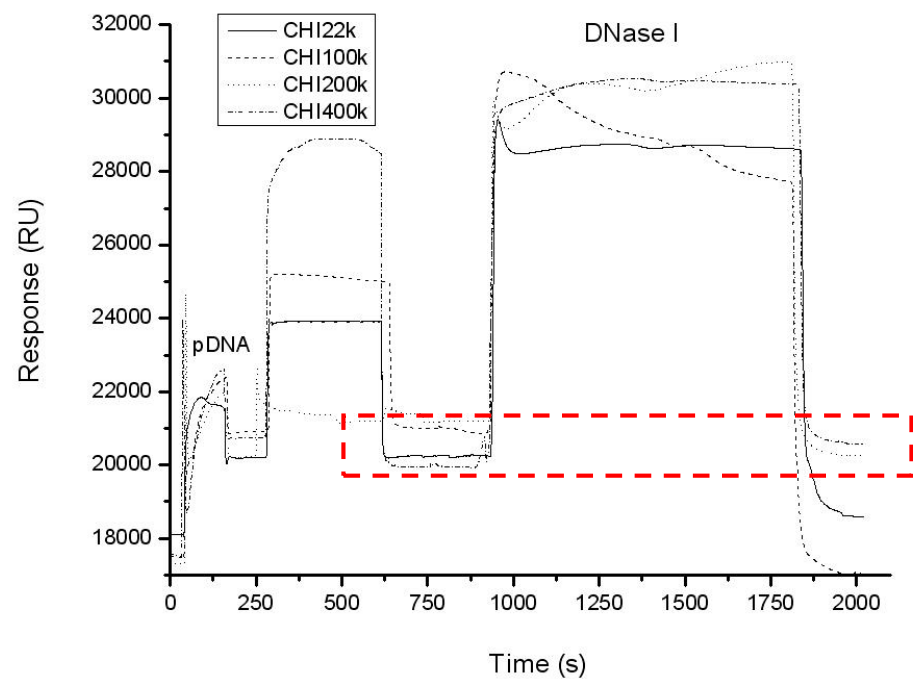
壳聚糖-DNA多层结合的测试

(模拟载基因血管支架表面)



壳聚糖对质粒DNA的保护作用

◆ 当分子量 $>200\text{kDa}$ 时，壳聚糖对质粒DNA具有保护作用



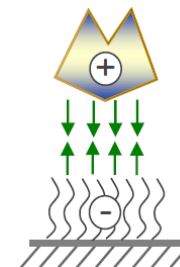
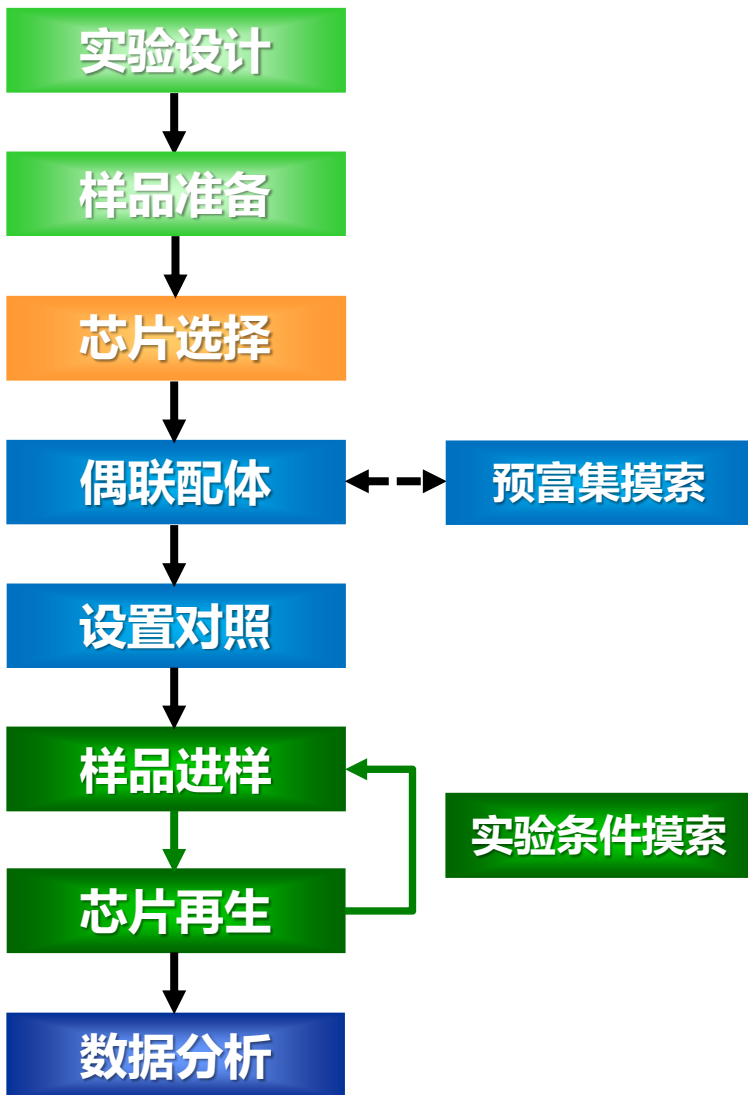
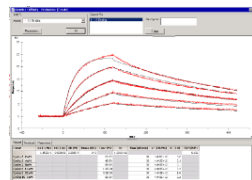
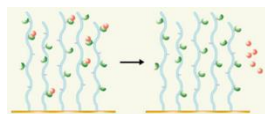


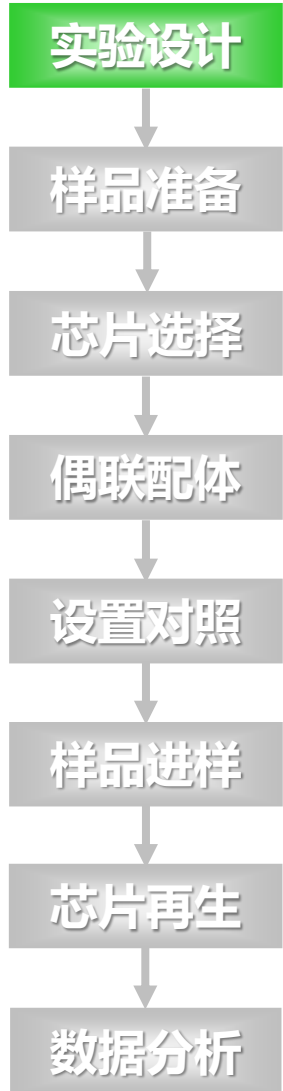
SPR实验怎么做？





一般实验流程





直接偶联

- 共价反应
- 配体不定向
- 偶联量高

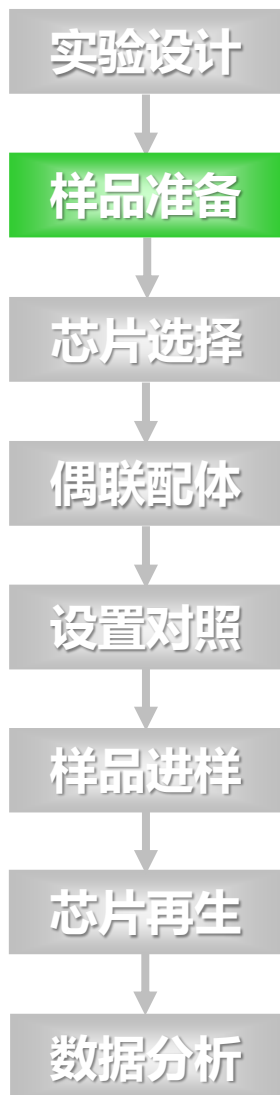


捕获法

- 可以更换配体
- 配体定向性强
- 从粗样品中捕获配体
- 偶联量相对较低

哪个分子作为配体？怎么固定？

- 小分子不适合固定：缺少活性基团、结合位点易受影响
- 活性越稳定的更适合固定，配体稳定性差的可以考虑捕获法
- 纯度高的分子更适合固定，纯度低的可以考虑捕获法
- 1个对多个分子的互作分析，优先考虑固定那1个
- 酸性分子 (PI < 4) 可以考虑捕获法
- 多价分子适合固定，比如抗体IgG
- 带Biotin、6xHis等标签的分子更容易固定，适合捕获法
- 再生困难的可以考虑捕获法或单循环动力学



1. 相互作用的样品

蛋白样品一般建议：

母液浓度： $> 1\text{mg/mL}$

纯度： $> 90\%$ （动力学分析）

配体： $> 10\text{uL}$ （进样浓度一般为 $10\text{-}100\text{ug/mL}$ ，大多实验仅需 $1\text{-}2\text{uL}$ ）

-直接偶联：不含其它杂蛋白、Tris等带伯胺基的分子

-捕获法：不含游离标签和其它带相同标签的分子

分析物： $> 100\text{uL}$ （进样浓度一般为 $0.1\text{-}10\text{ug/mL}$ ）

2. 仪器用的缓冲液

需要准备 500mL 以上， $\leq 0.22\text{uM}$ 滤膜过滤，脱气后检查确认没有悬浮物

如使用CM5芯片，偶联时不能使用Tris等含有伯胺基的缓冲液

分析物所用缓冲液与仪器所用缓冲液尽可能完全一致，尽量不含有有机溶剂





实验设计

样品准备

芯片选择

偶联配体

设置对照

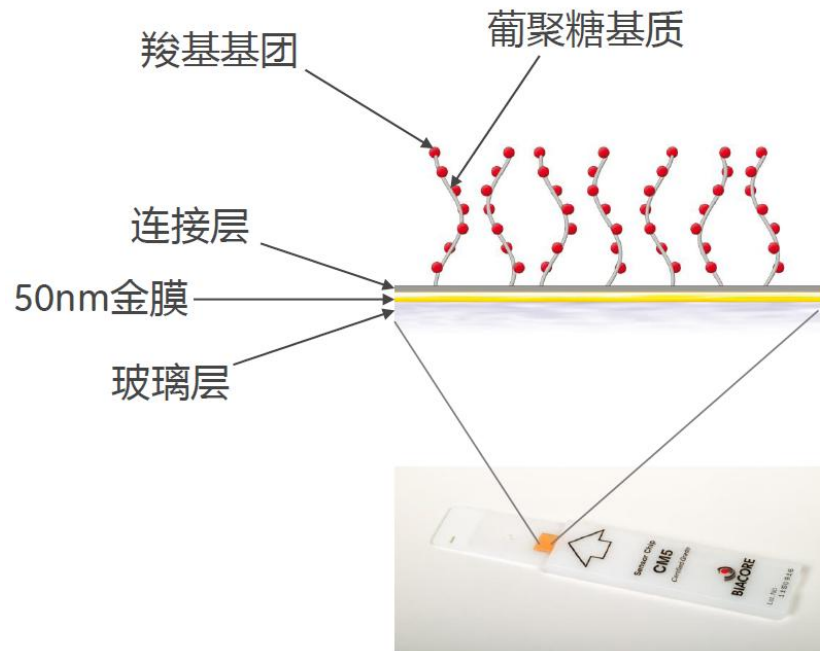
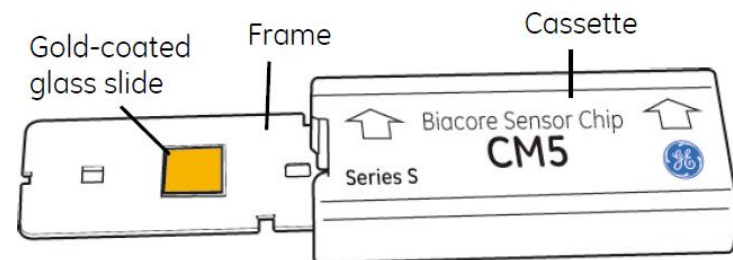
样品进样

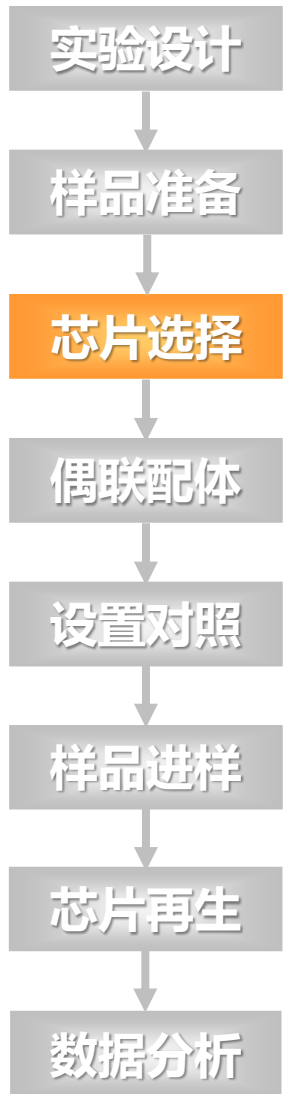
芯片再生

数据分析

传感芯片CM5

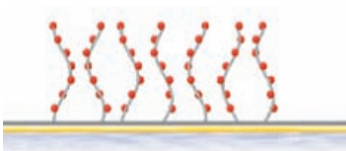
- 最通用的芯片
- 亲水表面，非特异性结合低
- 较高结合载量
- 容易通过共价反应偶联配体
 - 氨基偶联Amine coupling
 - 表面巯基偶联Surface thiol coupling
 - 配体巯基偶联Ligand thiol coupling
 - 马来酰亚胺偶联Maleimide coupling
 - 醛基偶联Aldehyde coupling



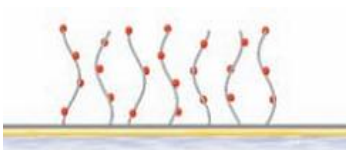


CM7
更长链的葡聚糖

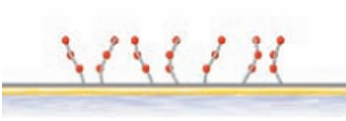
偶联量是CM5的3倍
适用于小分子化合物分析



CM5
羧基化的葡聚糖



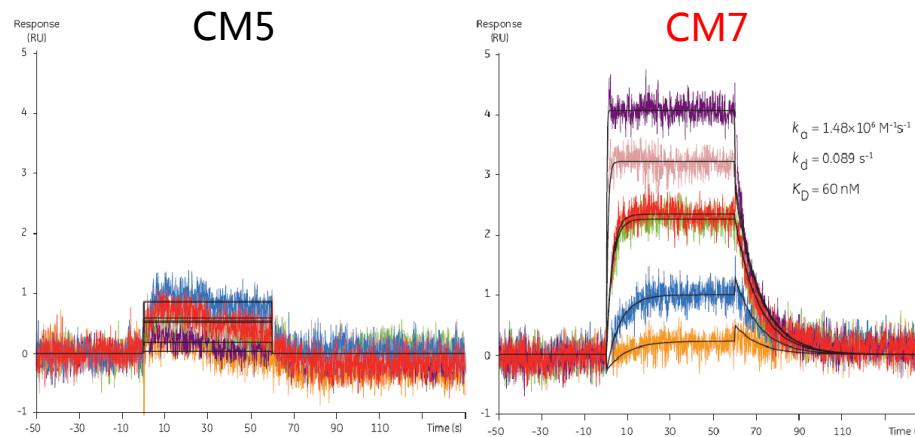
CM4
带负电荷较低的葡聚糖



CM3
短链葡聚糖



C1
羧基表面 (没有葡聚糖)

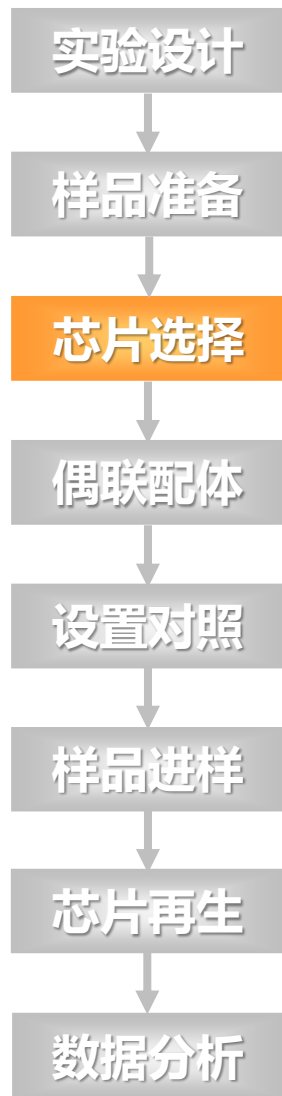


获取较低的R_{max}，降低对带正电荷蛋白的非特异性结合

获得较低的偶联量，适用于细胞、病毒和其他分子量较大的分析物

适用于细胞和颗粒物以及一些不需葡聚糖的研究



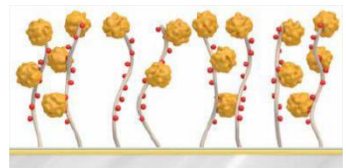


SA
连有SA蛋白的葡聚糖



捕获生物素标记的配体（糖类、肽段，蛋白质，DNA等）

Protein A/G/L
连有Protein A/G/L蛋白的葡聚糖



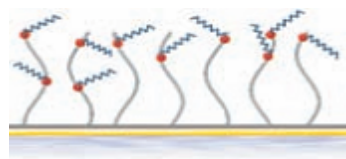
捕获多种抗体，免去偶联和再生条件的摸索过程

NTA
连有 NTA的葡聚糖



捕获带有组氨酸标签（ His-tagged ）的分子

L1
带有亲脂物质的葡聚糖



适用于在保持磷脂双分子层结构的同时捕获脂质体分子

HPA
疏水表面



适用于脂质单分子层和膜结合蛋白的相互作用分析

J1/Au
裸金表面

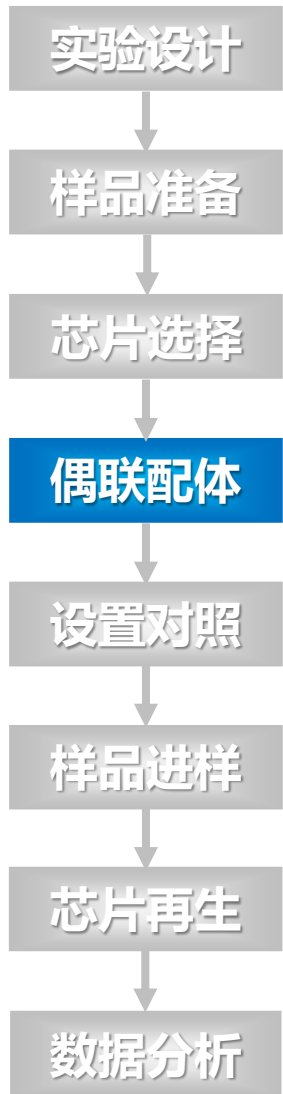


适合偶联带巯基的分子，用于自定义化学/物理修饰





仪器控制软件



快捷操控

查看分段数据和不同通道的数据



仪器状态





仪器控制软件



The screenshot shows the Biacore T200 Control Software interface. The main window displays a list of operations on the left and a graph on the right. The graph plots Response (RU) on the y-axis (ranging from 30000 to 38000) against time. A menu is open, showing options like Prime..., Shutdown..., and Eject Rack.

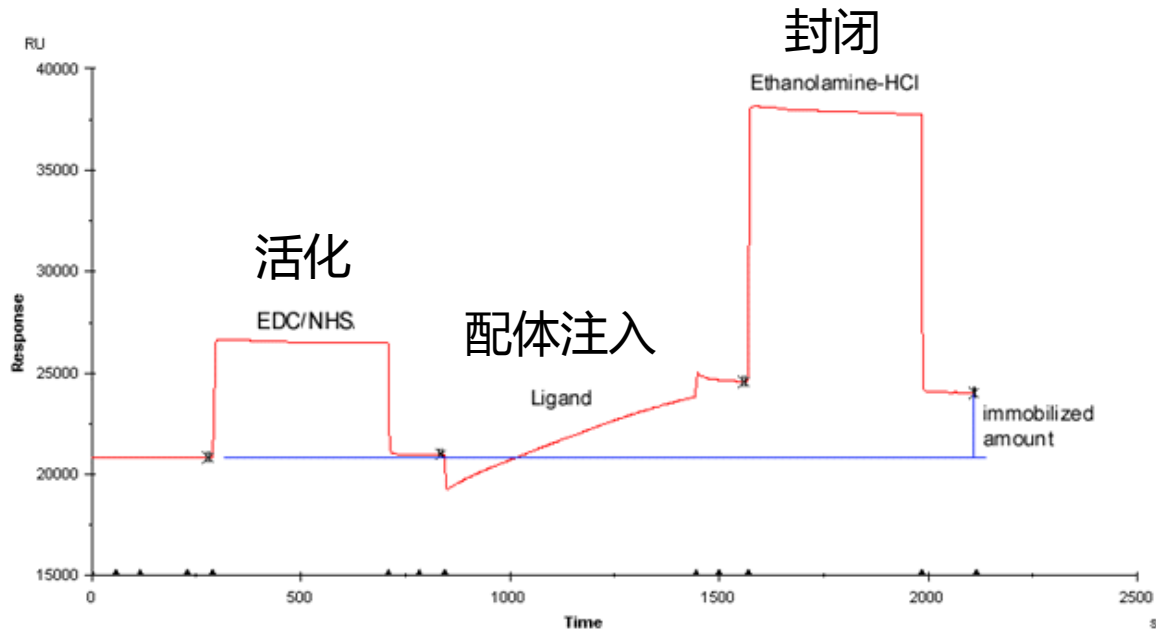
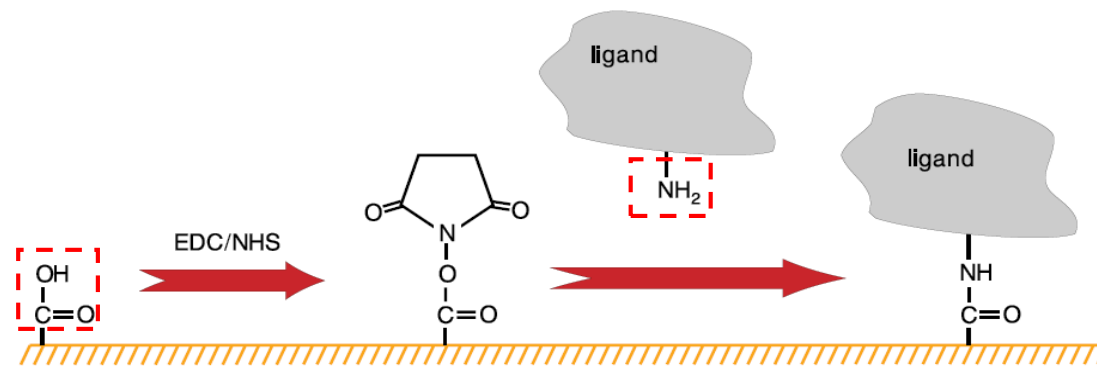
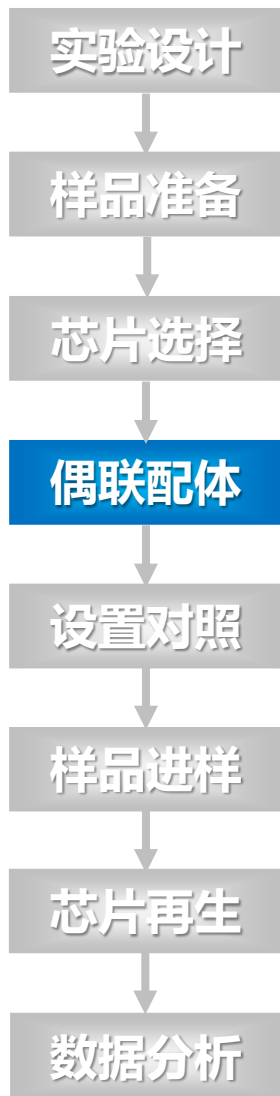
Annotations and their corresponding actions in the software:

- 更换芯片** (Change Chip): Points to the 'Insert Chip...' and 'Eject Chip...' menu items.
- 显示参考线** (Show Reference Line): Points to the 'Prime...' menu item.
- 样品进样** (Sample Injection): Points to the 'Inject R2E4 30' and 'Inject R2A1 850' items.
- 再生液进样** (Regeneration Solution Injection): Points to the 'Inject R2A2 600' and 'Inject R2A2 500' items.
- 弹出样品架** (Eject Sample Rack): Points to the 'Eject Rack' menu item.
- 切换通道** (Switch Channel): Points to the 'Flowpath 4' and 'Flowpath 3' items.
- 调整流速** (Adjust Flow Rate): Points to the 'Flow 5' item.
- 停止进样** (Stop Injection): Points to the 'Inject R2E4 30' and 'Inject R2A1 850' items.
- 停止检测** (Stop Detection): Points to the 'Wait 60' items.
- 已完成** (Completed): Points to the 'Flowpath 4' and 'Flow 5' items.
- 进行中** (In Progress): Points to the 'Inject R2A3 600' item.
- 系统初始化** (System Initialization): Points to the 'Prime...' menu item, with a note: (实验前Prime 2次以上) (Prime 2 or more times before the experiment).



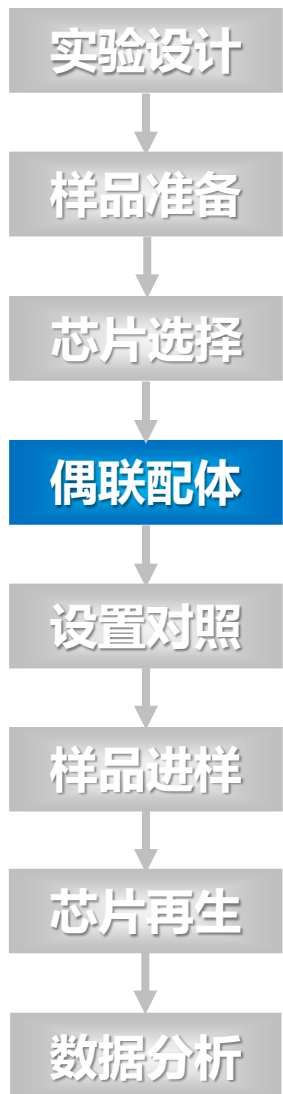


最常用的偶联方法——氨基偶联

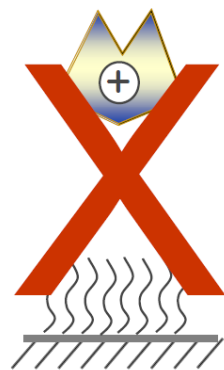




预富集摸索-选择合适的pH值

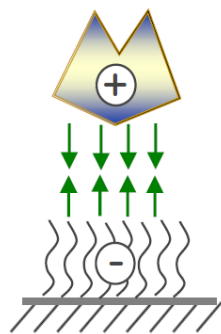


pH < 3.5



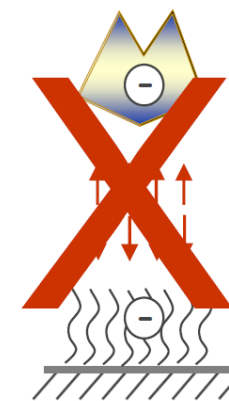
pH太低时，葡聚糖不带电，无法富集

3.5 < pH < pI



蛋白带正电，葡聚糖带负电。通过静电吸附可以富集配体。

pH > pI



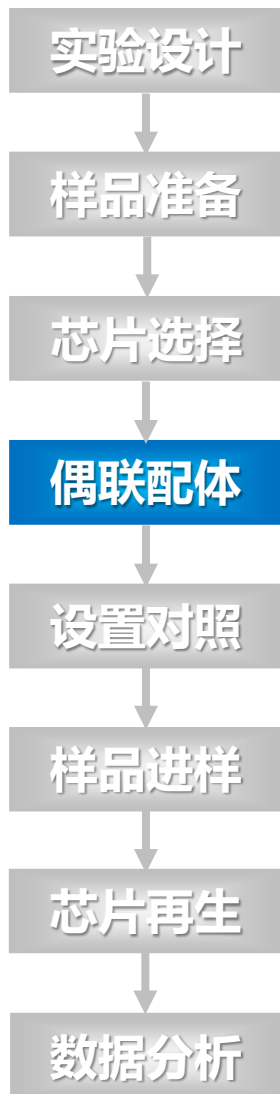
蛋白和葡聚糖带相同负电，无法富集

一般选择pH比蛋白等电点(PI)低0.5-1的醋酸钠缓冲液，作为蛋白偶联时的缓冲液





配体偶联量的计算



- 配体偶联量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量也不同
 - 稳态分析、浓度测试、特异性：偶联量尽量高
 - 动力学分析：低偶联量

配体偶联量的计算

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

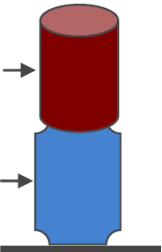
R_L = 配体偶联量

R_{max} = 芯片表面的最大结合容量，对于动力学分析，一般 $R_{max} \leq 100$

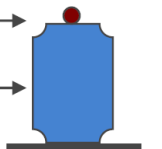
S_m = 化学计量比 (Analyte:Ligand，未知时选择 $S_m = 1$)

实际偶联量 = $1.5R_L$

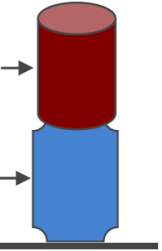
假如偶联量均为 $R_L = 5000$

分析物 150kDa →  $R_{max} = 15000$

配体 50kDa →

分析物 250 Da →  $R_{max} = 25$

配体 50kDa →

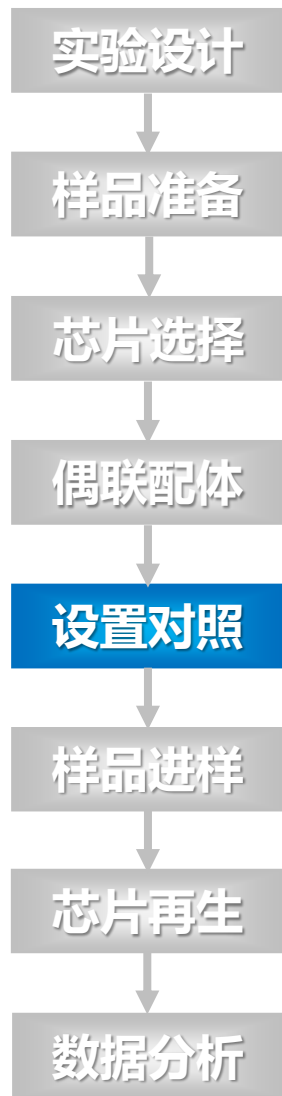
分析物 150kDa →  $R_{max} \leq 100$

配体 50kDa → **实际偶联量 = ?**

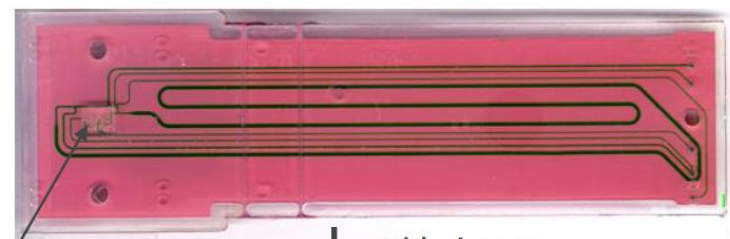




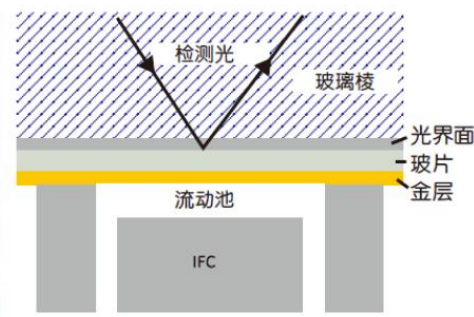
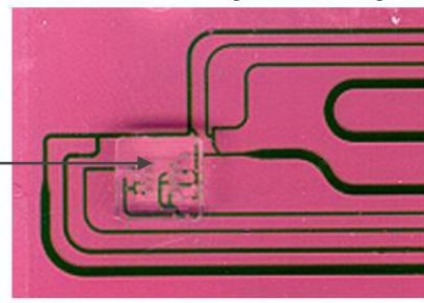
通道选择



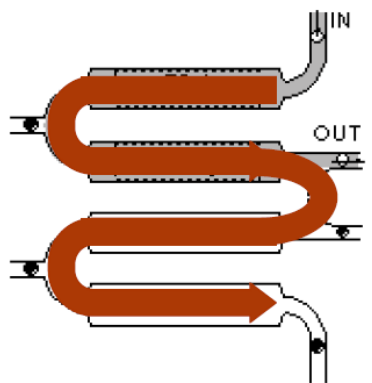
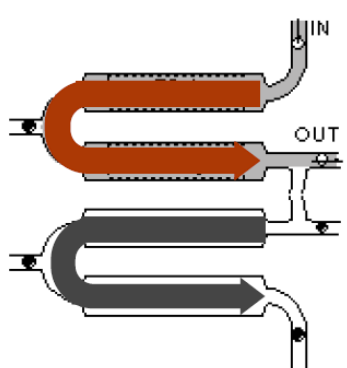
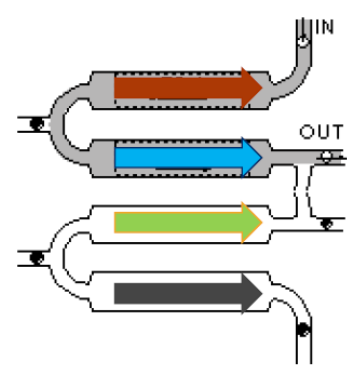
微流控系统 (IFC)



(放大图)



流动池

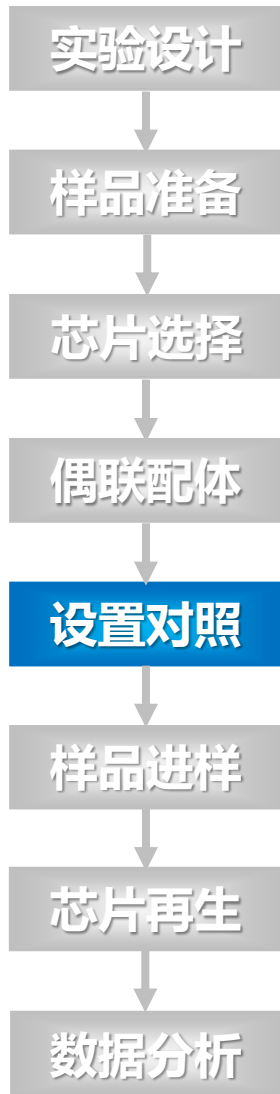


做动力学测试时，一般一张芯片固定两种分子

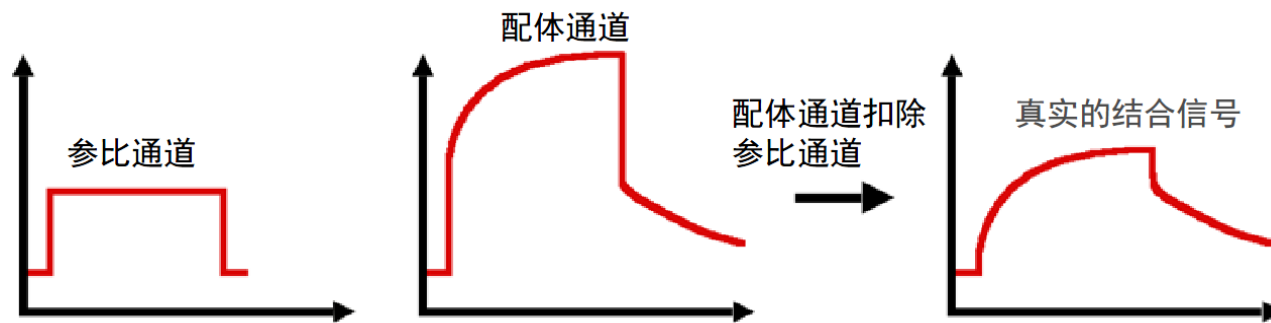
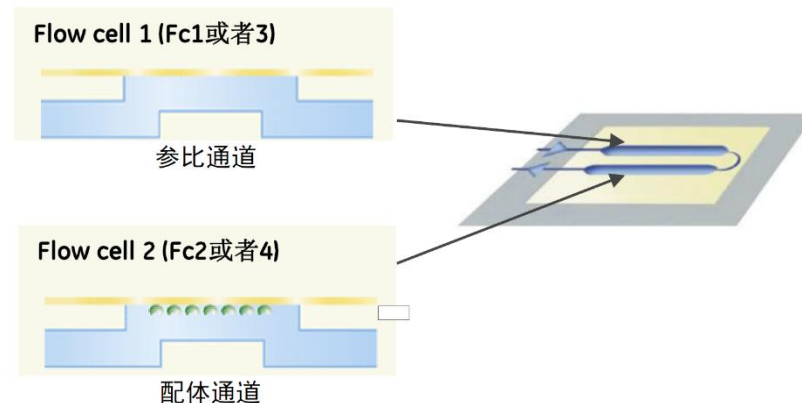




参比通道与容积效应



- 参比通道应设置在配体通道上游
- 尽可能保证样品与运行缓冲液折光率一致。尽可能不含甘油，蔗糖，咪唑等

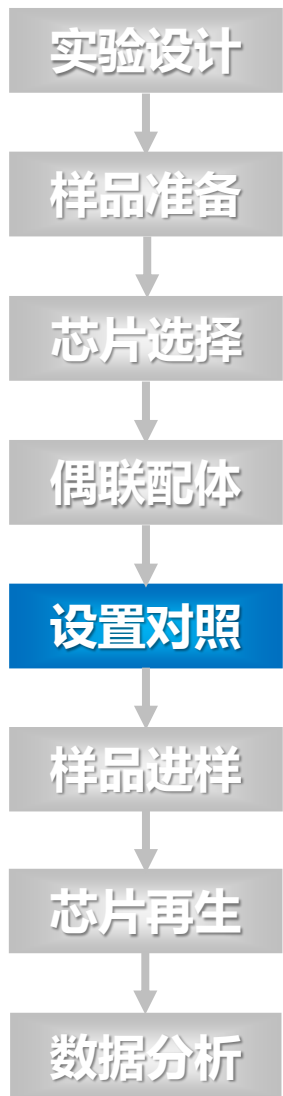


- 容积效应 (Bulk effect)是由于样品溶液与运行缓冲液折射率的差异
- 容积效应并不反映真实的生物分子结合
- 容积效应需要通过设置参比通道来扣除





参比通道的设计



◆ 空白通道

适用于大多数实验
注意检查分析物和葡聚糖表面是否存在非特异性结合

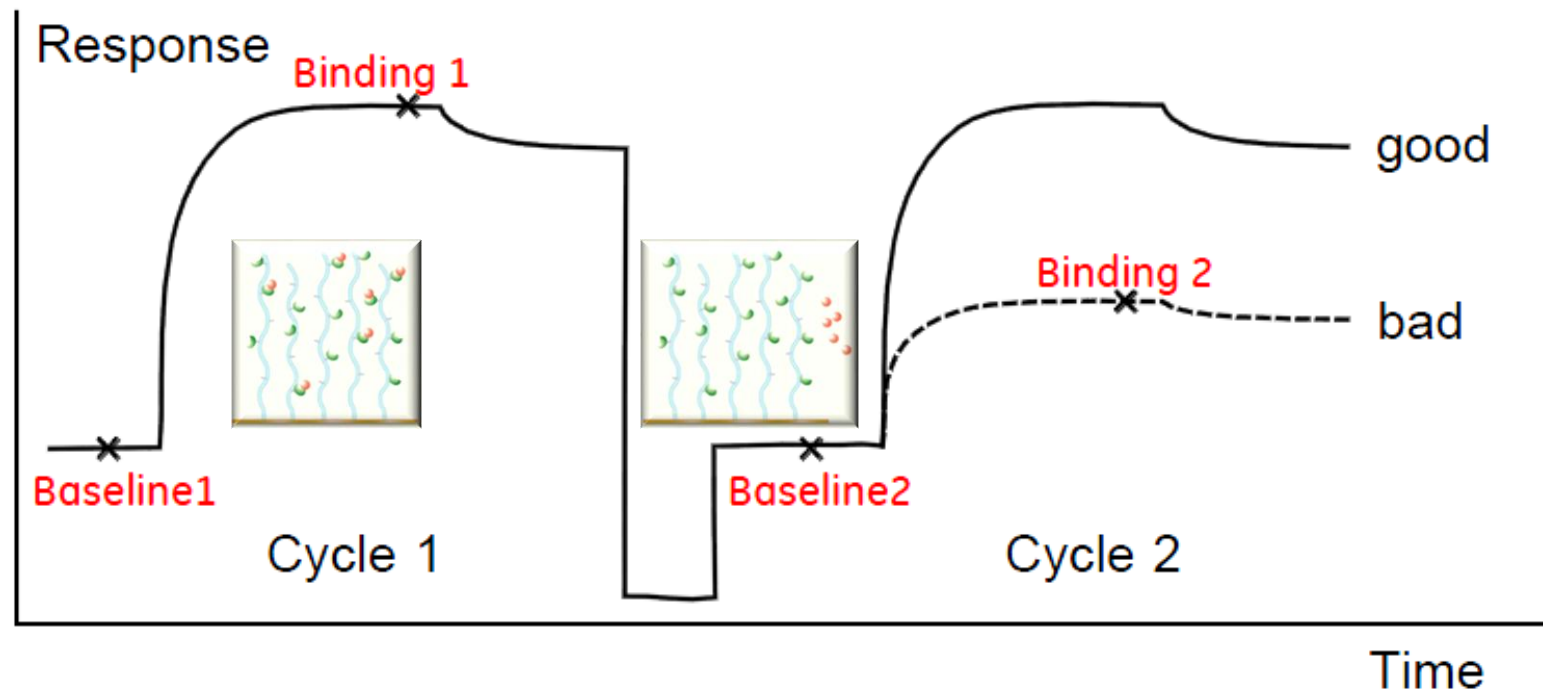
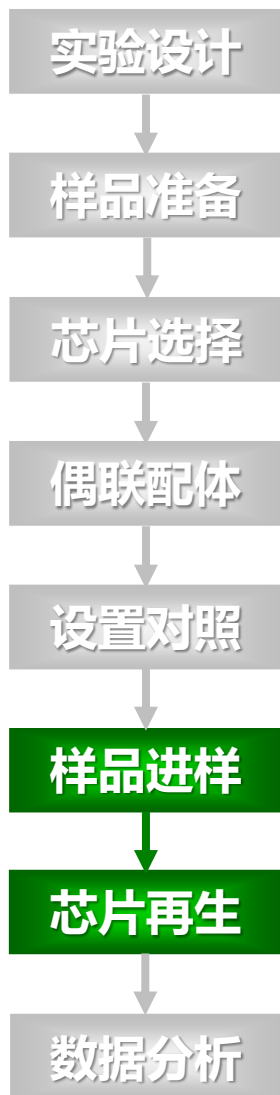
◆ 经活化-封闭处理的通道

按照偶联的步骤处理芯片，但不偶联配体
降低了芯片表面的负电荷，从而**减少非特异性结合**

◆ 偶联伪装配体 (dummy ligand) 的通道

将一种不与分析物结合的蛋白偶联于芯片上，而且与真实配体的偶联水平相同
有利于进一步**减少非特异性结合**





理想的再生：彻底洗脱，保持活性。通过多次的进样，结合水平维持稳定和第一次进样相比，结合水平的变化在10%之内。

最常用再生条件：10 mM glycine-HCl (pH3.0-pH1.5)、NaOH(1-50mM)

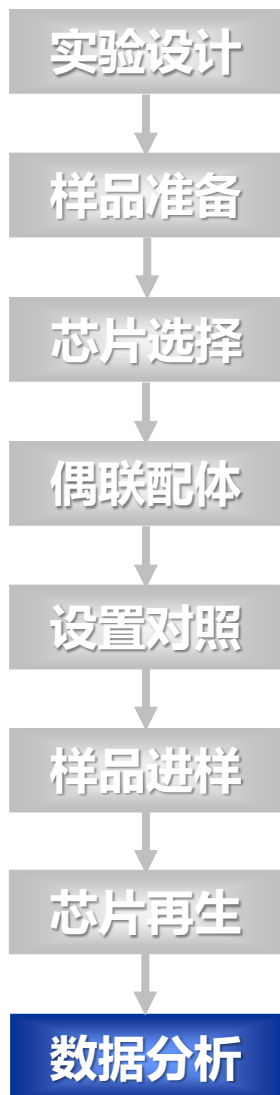
再生条件的选择：

- ✓ 分析物进样后能自行解离完全就可以不用再生液
- ✓ 尽量短时间、低浓度、少次数

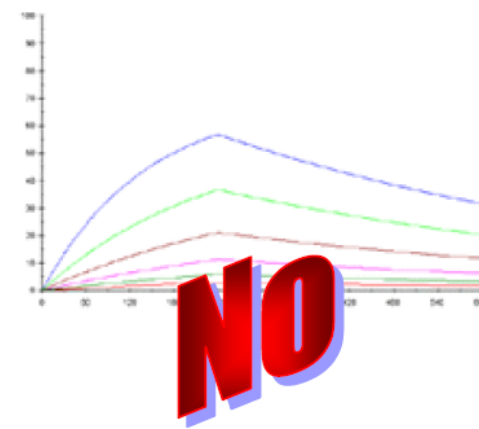
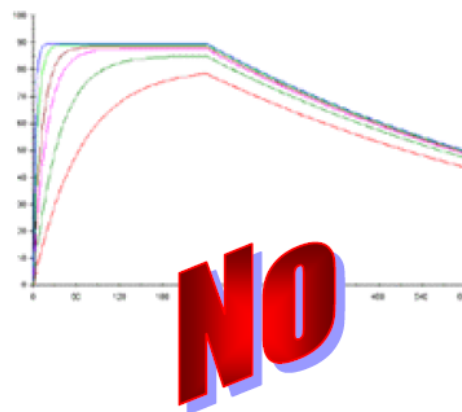
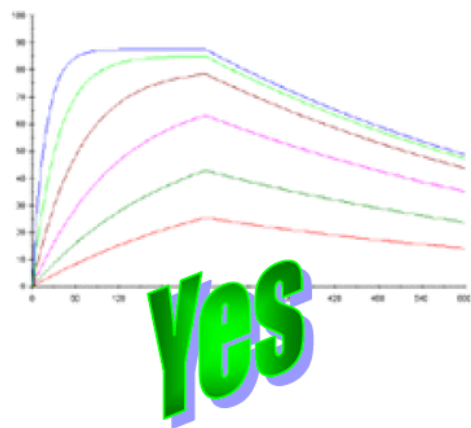




动力学分析-实验设计

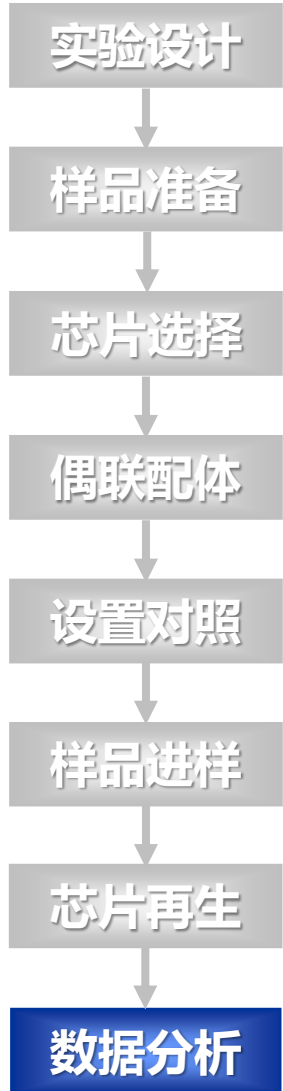


- 至少5个浓度梯度
- 低偶联、高流速 ($\geq 30\text{ul/min}$)
- 亲和力KD数值一定要落在浓度范围内
- 设置至少一个浓度的样品重复 (间隔完成)
- 设置零浓度样品



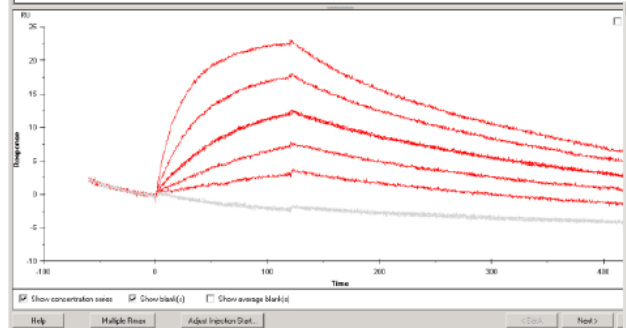


动力学分析-数据拟合



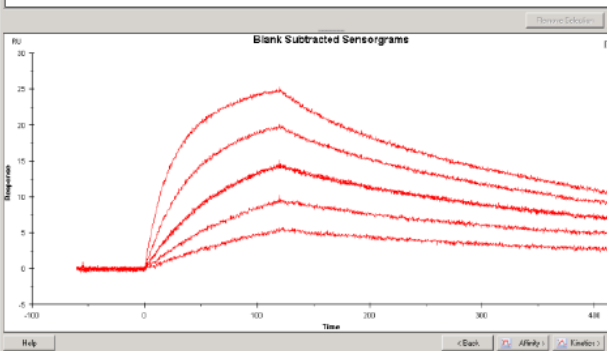
Control - Affinity - Select Curves [Results]

Include	Cycle#	Sample	Conc (pM)	Assay step	Flow (µl/min)	Contact time (s)	Exch. time (s)
<input checked="" type="checkbox"/>	4	Blank	0	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	5	Blank	2	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	6	Blank	4	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	7	Blank	6	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	8	Blank	8	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	9	Blank	10	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	10	Blank	12	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	11	Blank	14	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	12	Blank	16	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	13	Blank	18	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	14	Blank	20	Sample	30	120	300



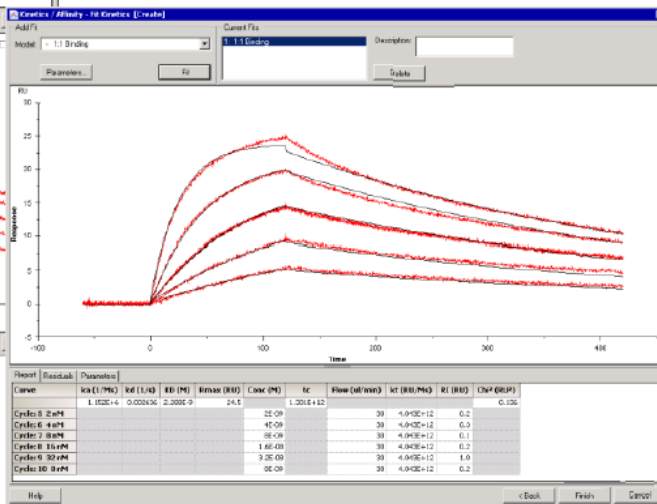
Control - Affinity - Select Data [Results]

File	Cycle#	Curve	Conc (pM)	Assay step	Flow (µl/min)	Contact time (s)	Exch. time (s)
<input checked="" type="checkbox"/>	5	Fit=2-1	2	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	6	Fit=2-1	4	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	7	Fit=2-1	6	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	8	Fit=2-1	8	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	9	Fit=2-1	10	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	10	Fit=2-1	12	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	11	Fit=2-1	14	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	12	Fit=2-1	16	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	13	Fit=2-1	18	Sample	30	120	300
<input checked="" type="checkbox"/>	14	Fit=2-1	20	Sample	30	120	300



✓ 扣除零浓度

✓ Double Reference

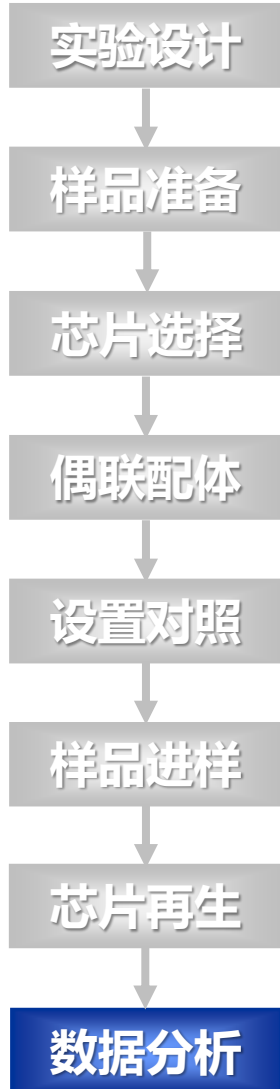


✓ 通过拟合所有曲线，获得动力学 k_a ， k_d 和亲和力 K_D 。 $K_D=k_d/k_a$ 。

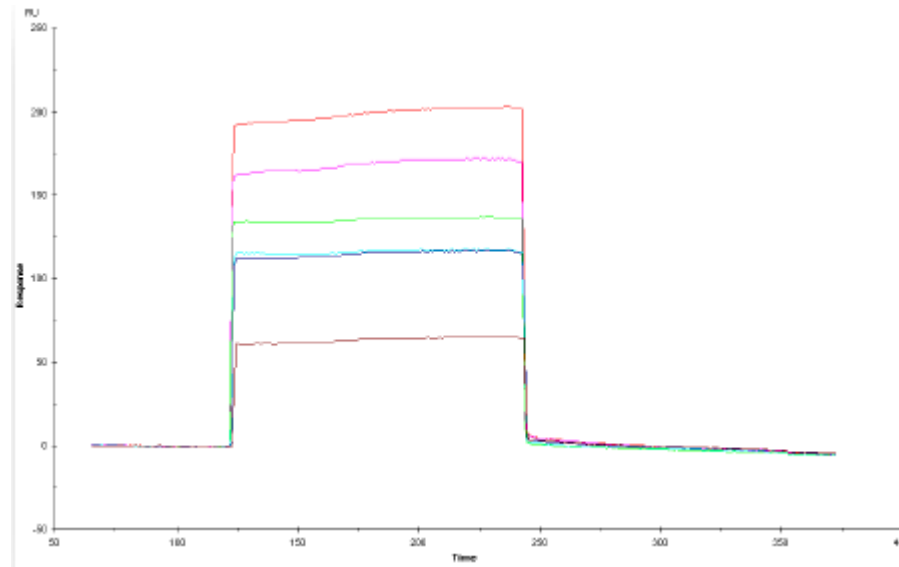




稳态分析-实验设计

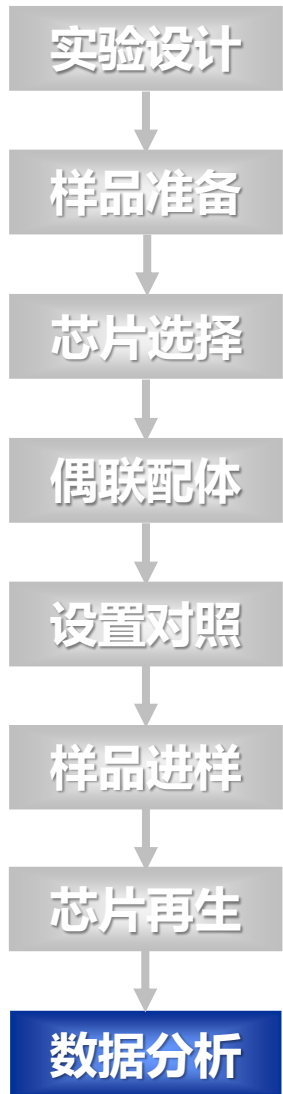


- 将梯度浓度分析物流经配体，测量达到稳态时响应值
- 高配体偶联水平
- 浓度范围至少能够达到20-80%的饱和度 (Rmax)
- 设置至少一个浓度的样品重复 (间隔完成)
- 设置零浓度样品

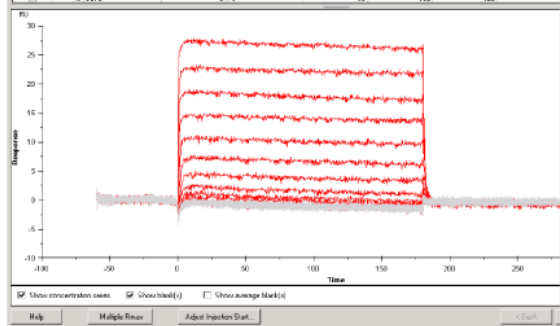




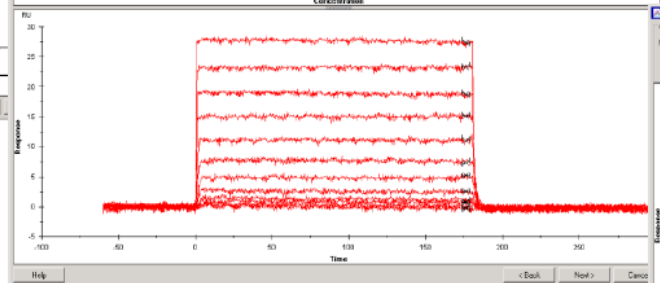
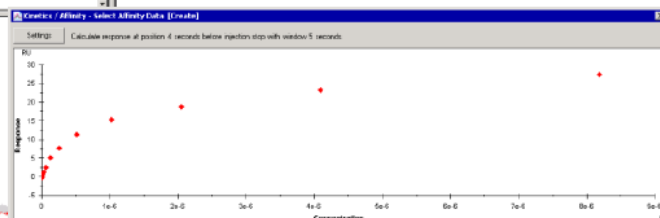
稳态分析-数据拟合



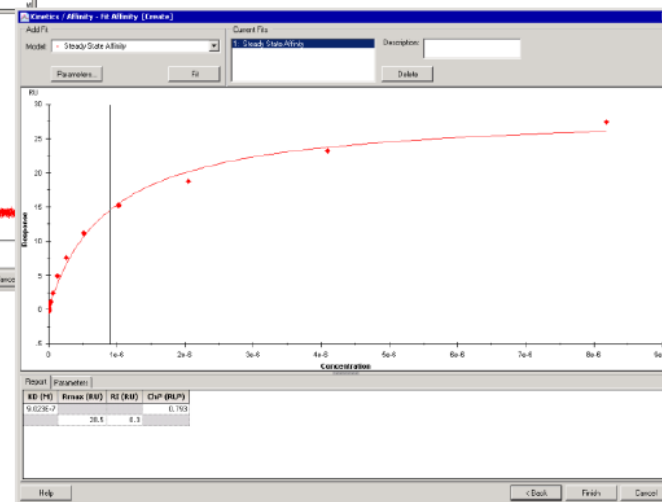
Injection	Cycle	Sample	Conc (µM)	Assay step	Flow (µl/min)	Inject time (s)	Disc. time (s)
35	40	0.75	0.75		30	100	120
35	41	0.75	0.75		30	100	120
35	42	0.75	0.00475		30	100	120
35	43	0.75	0.0095		30	100	120
35	44	0.75	0.75		30	100	120
35	45	0.75	0.00475		30	100	120
35	46	0.75	0.75		30	100	120
35	47	0.75	0.0095		30	100	120
35	48	0.75	0.75		30	100	120
35	49	0.75	0.75		30	100	120



✓ 选择浓度梯度和曲线



✓ 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 。





小结 1 – 实验关键步骤

配体偶联

- 选择最适pH (预富集)
- 确定偶联水平

进样测试

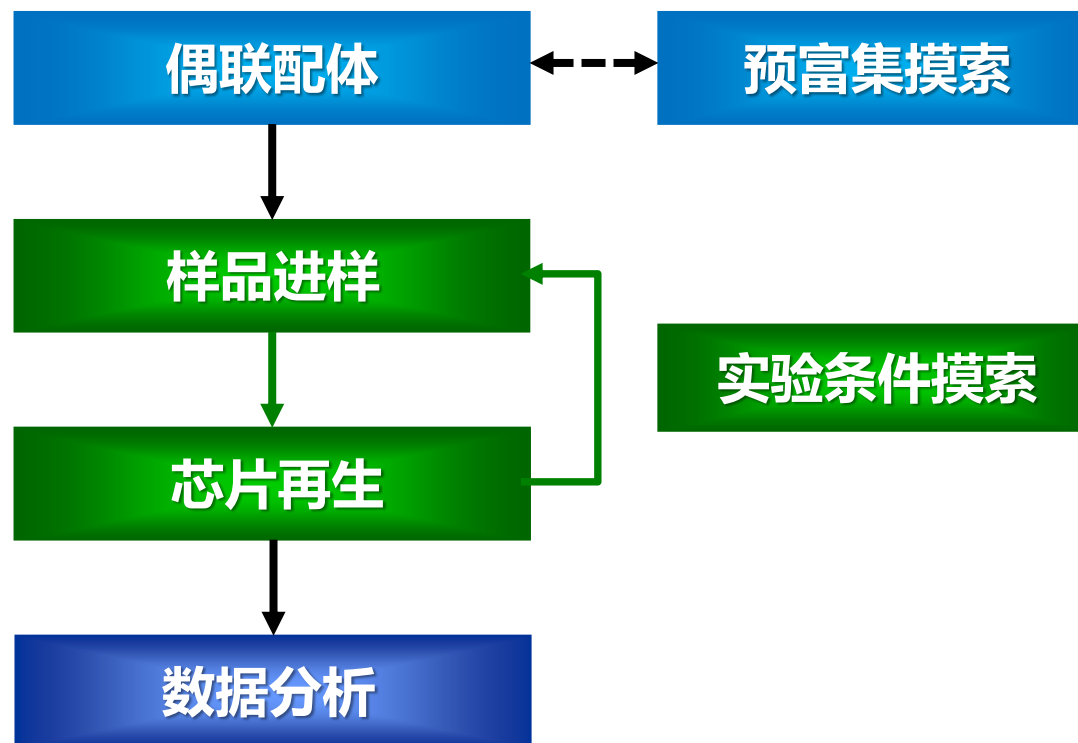
- 注意参比通道的设置
- 确定结合和解离时间, 预估KD

再生条件的选择 (重要)

- 彻底洗净、保持活性

实验设计

- 动力学分析
- 稳态分析





小结 2 – 重点注意事项

1. 自配缓冲液使用前要用 $\leq 0.22\mu\text{m}$ 的滤膜进行过滤，存放或使用超过24h需重新过滤
2. 仪器更换芯片或更换缓冲液后，一般建议**Prime 2次**或以上
3. 样品要**高速离心**处理后才能进样（如12000rpm，3-5min）
4. 样品配制于EP管一定要**剪去盖子**后才能放入样品架
5. 实验结束后取出的芯片应放置于4°C，**长时间待机时**需要更换维护芯片，**缓冲液换成超纯水**





更多内容我们在上机操作时进行交流

谢谢！

