

## Biacore8K 操作指南 (小分子)



**Brief:** 使用 CM5 芯片，氨基高偶联目标蛋白，做小分子的初筛（单浓度）和亲和力测定（多浓度）

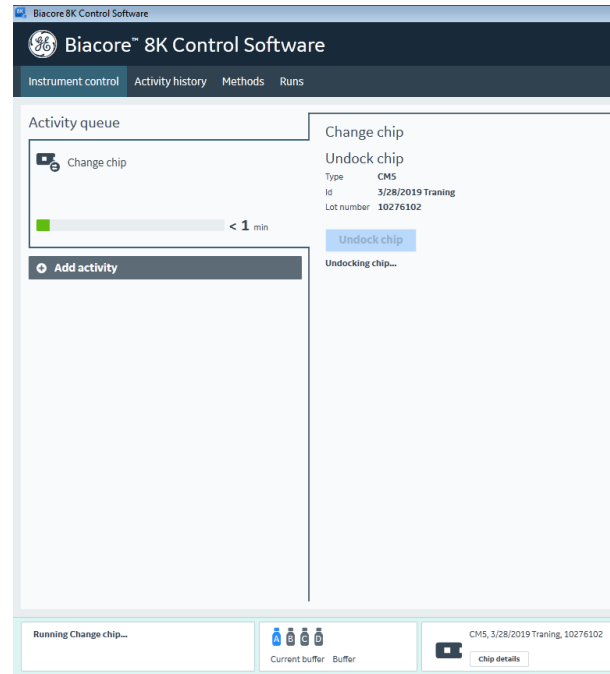
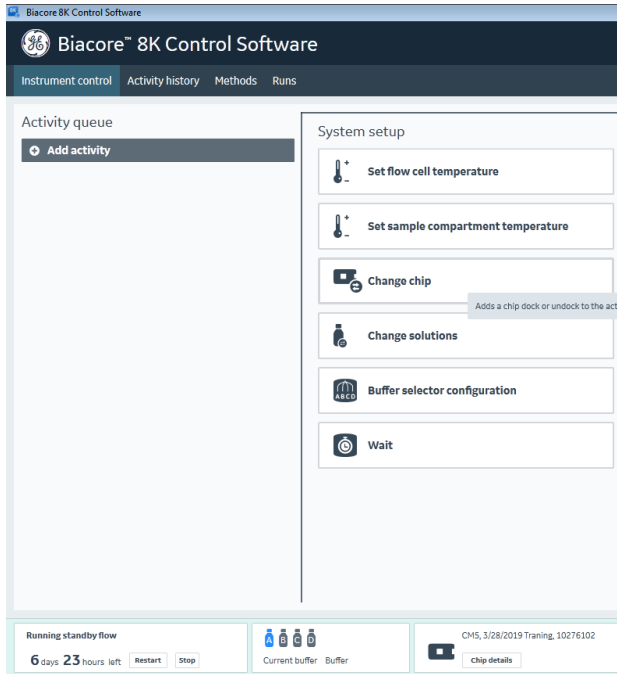
### 0. 准备工作

0-1. 准备蛋白。如果是购买的，请确定 formulation 里不含 Tris（含少量甘露糖，海藻糖等可以），建议比建议的溶解浓度高（比如建议溶解到 0.1-0.25mg/mL，最好能溶解到 0.5-1mg/mL）。如果是自行纯化的，请尽量用 PBS 作最后一步纯化，浓度 0.5-1mg/mL。

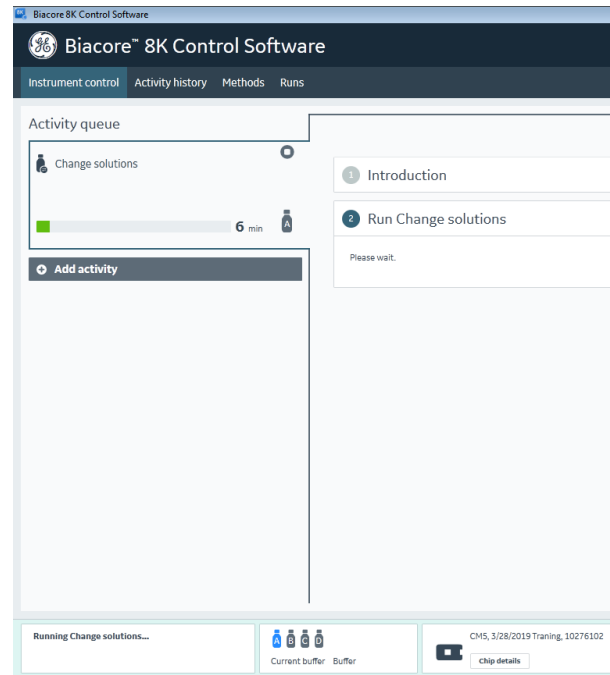
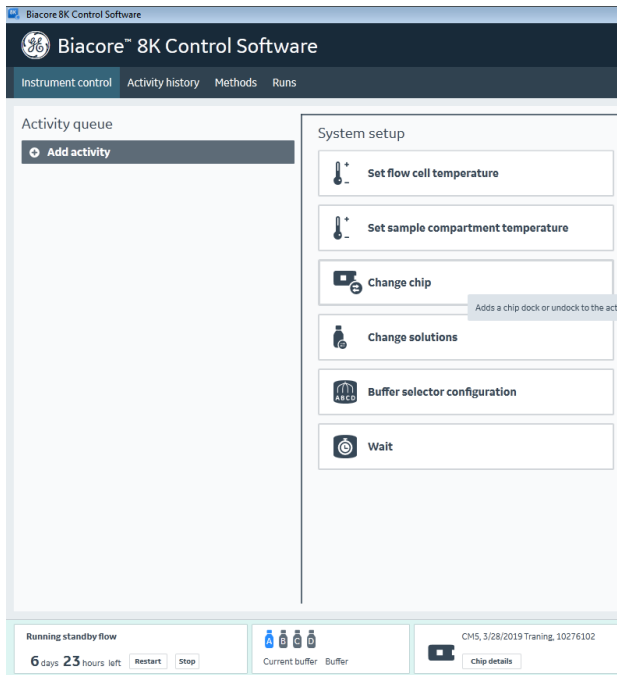
0-2. 准备小分子。请预先小量测试小分子在 PBS+5% DMSO buffer 中的溶解度，如果终浓度达不到 50  $\mu$ M，不建议优先筛选。

注：Biacore 的进样系统可长时间流过最高 10% DMSO，但考虑蛋白的活性保持，建议做 5% DMSO 或 2% DMSO。

0-3. 在控制软件中选择 change chip，将一块新的 CM5 芯片插入仪器，输入名字后 dock chip。

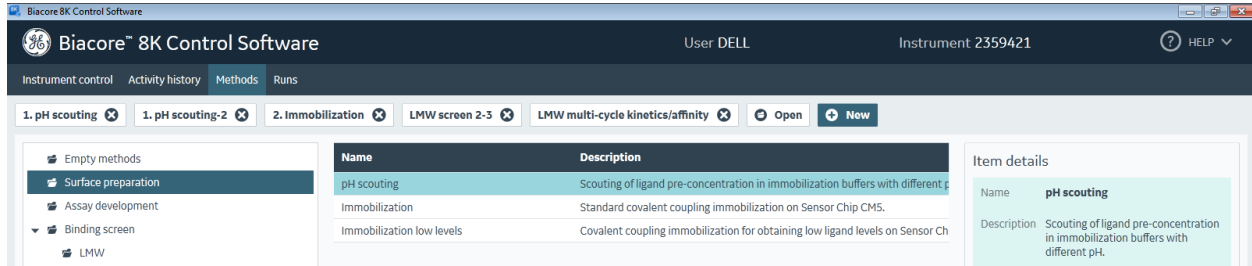


0-4. 将 buffer 管（或 buffer A 管）插入配好的 PBS（1-2L）中，选择 change solutions。如果有用到 reagent（比如 50% DMSO），将 reagent 管插入 reagent 瓶，选择 buffer+water+reagent。如果不用 reagent，选择 buffer+water 即可。

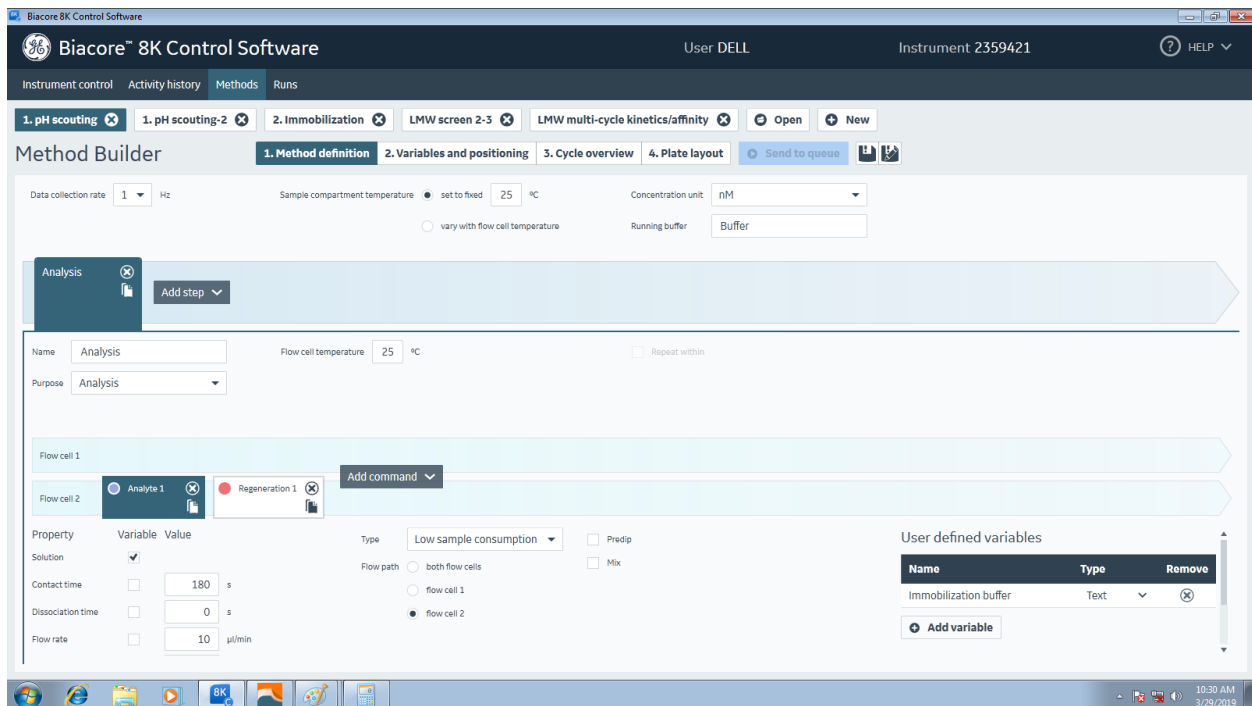


## 1. 蛋白偶联条件摸索

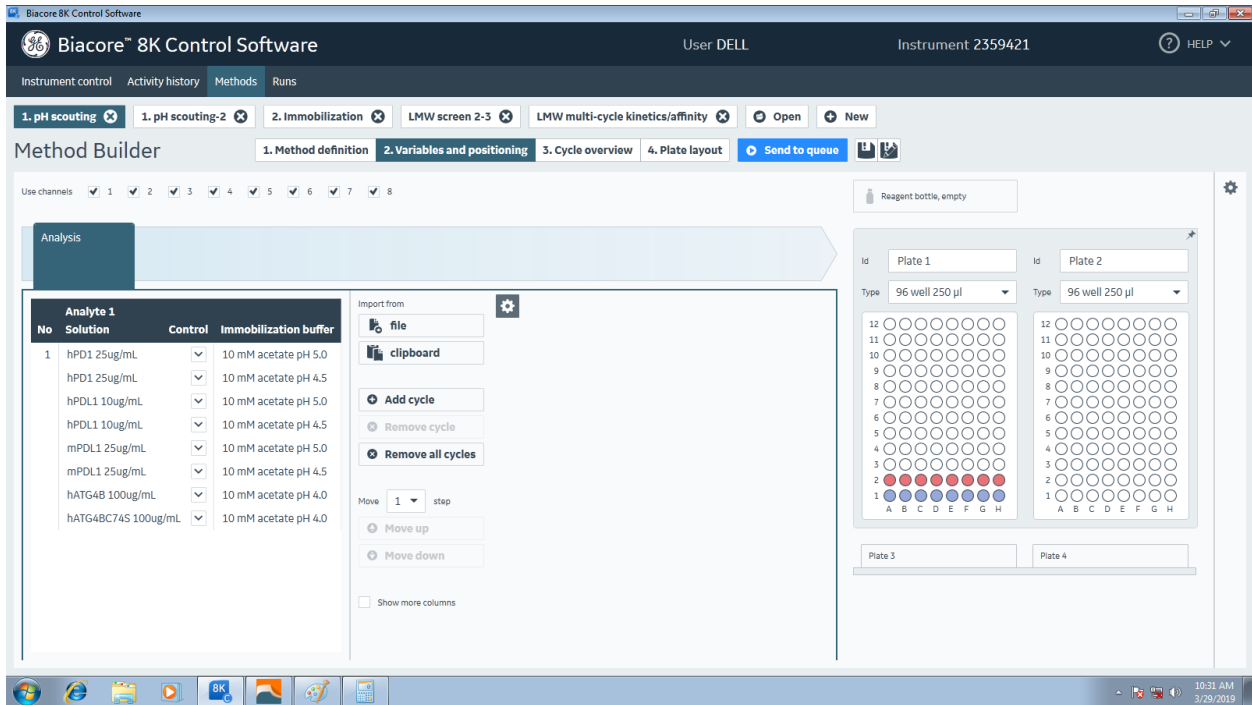
1-1. 选择 method, +new, 在 surface preparation 中选择 pH scouting。



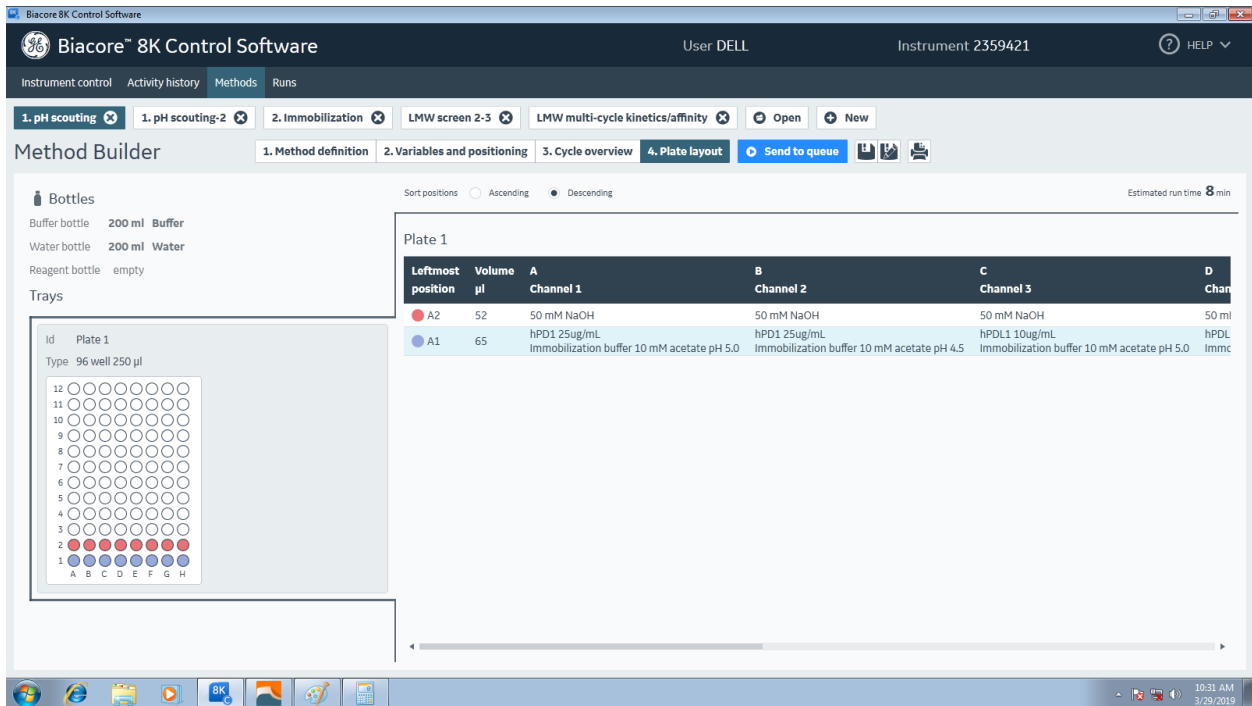
1-2. method definition 无需更改。



1-3. 在 Variables and positioning 中, 输入不同蛋白的不同 pH 稀释, 最多可同时做 8 种条件。如果不需要, 把 use channels 中的勾点掉即可。



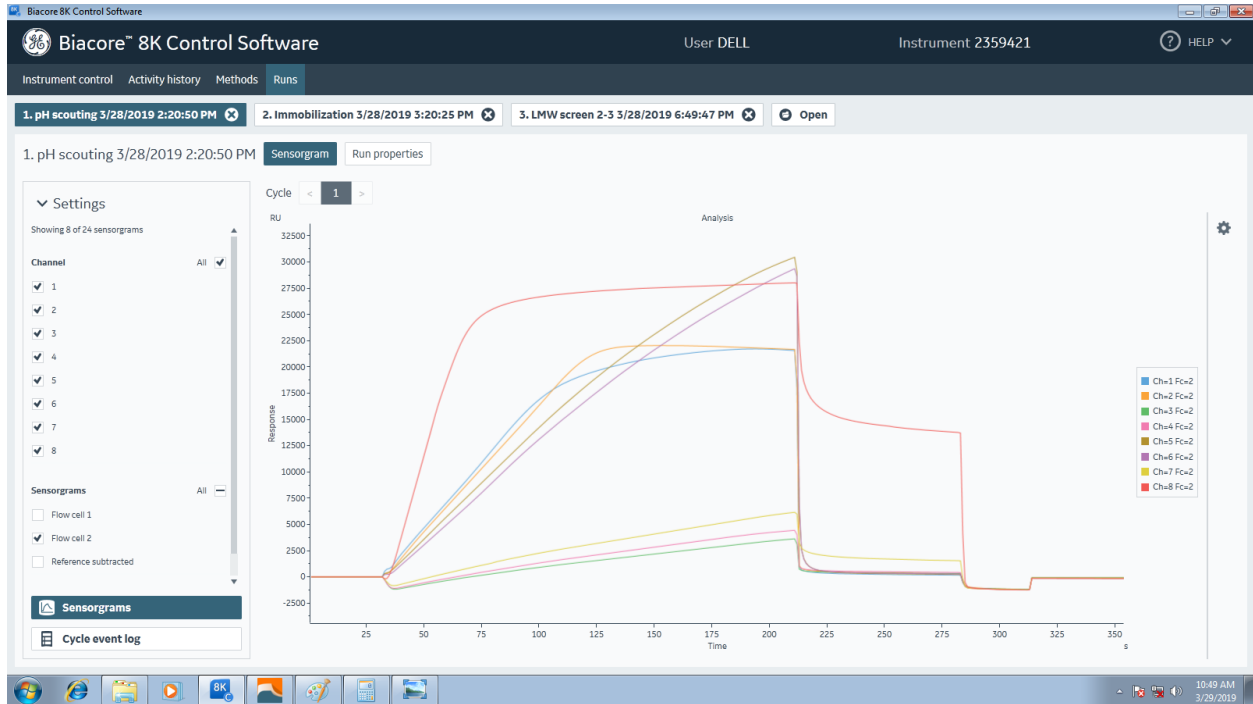
1-4. 在 plate layout 中，按照图示将不同 pH 稀释的不同蛋白加入孔板相应位置即可。提示的体积已计算过死体积，为防止移液枪不准，建议比提示体积多加 5-10 $\mu$ L。



1-5. 另存方法到自己文件夹下后，点击 send to queue，存结果到自己文件夹下（一般结果和方法的名字类似，也可自己修改）。

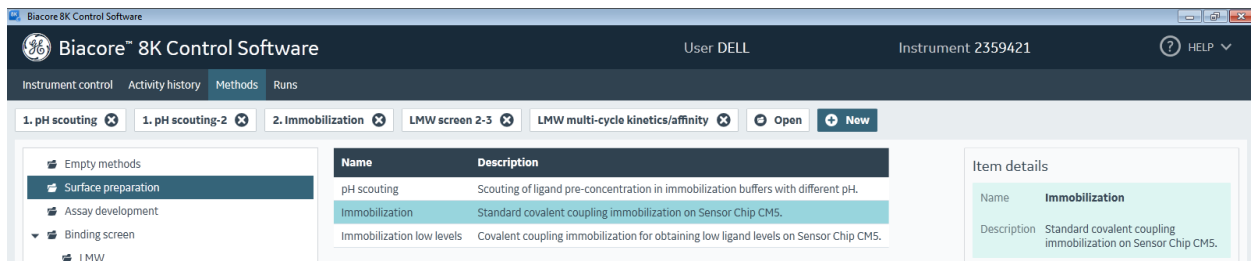
1-6. 运行时，可在 instrument control 界面实时观察。运行完后，可在 runs 中打开相应结果。

如下图所示，如富集高度在 20000RU 左右，表面富集条件合适。如果富集高度不到 5000RU，而又期望做高偶联，可以尝试优化条件：降低 pH，提高蛋白浓度。



## 2. 蛋白偶联

2-1. 选择 method, +new, 在 surface preparation 中选择 immobilization。



2-2. 在 method definition 中，勾选想偶联的 channel，以及每个 channel 的偶联方法。选择 Fc2, activate/deactivate in 1，这样每个 channel 的 Fc1 会活化封闭，Fc2 会偶联蛋白后封闭。



2-4. 同样可在 runs 里查看结果，Results 显示最终偶联了多少蛋白，高偶联最后封闭时会冲掉一些蛋白，一般以 Response final 为准。偶联大分子做小分子，偶联量在 10000RU 为佳，8000RU 也可以接受。在 Sensorgram 中查看偶联全过程。

Biacore 8K Control Software

User DELL Instrument 2359421

Instrument control Activity history Methods Runs

1. pH scouting 3/28/2019 2:20:50 PM 2. Immobilization 3/28/2019 3:20:25 PM 3. LMW screen 2-3 3/28/2019 6:49:47 PM Open

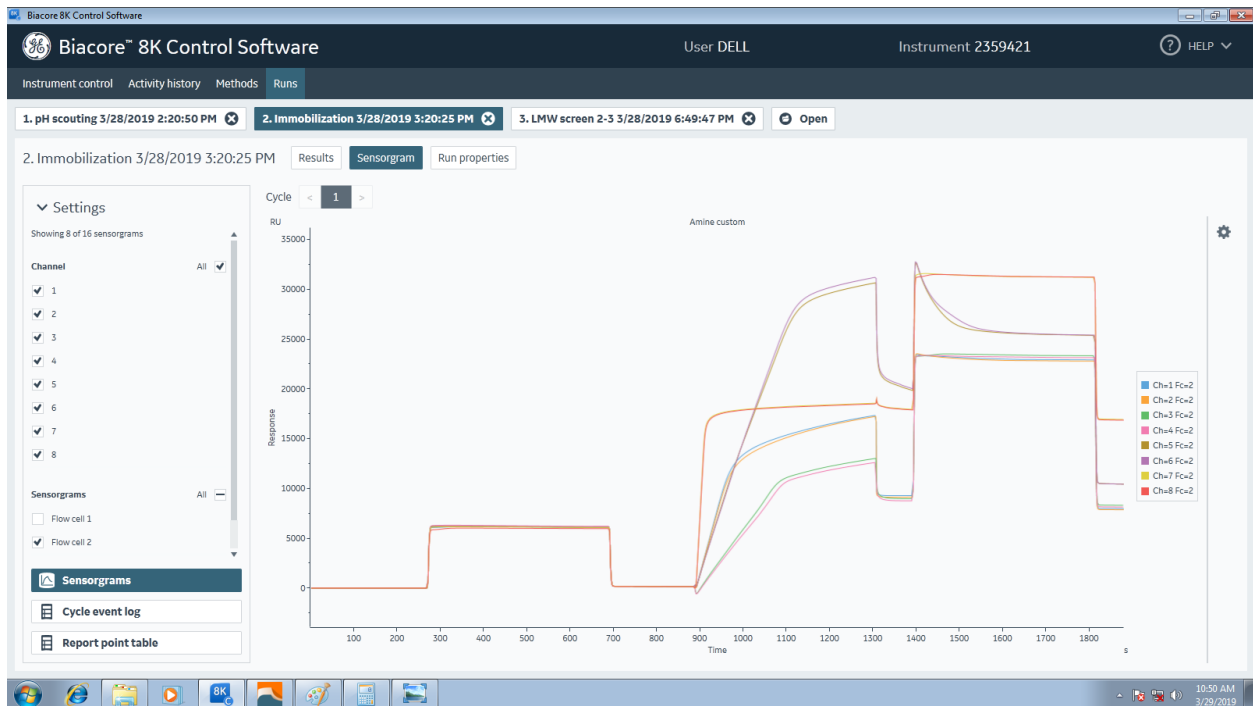
2. Immobilization 3/28/2019 3:20:25 PM Results Sensorgram Run properties

Immobilization result

Chip CM5

Date	Channel	Flow Cell	Chemistry	Method	Ligand	Response Bound (RU)	Response Final (RU)	Molecular Weight
3/28/2019 3:20:30 PM	1	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	1	2	Amine custom	2. Immobilization	hPD1	9130.2	7980.6	
3/28/2019 3:20:30 PM	2	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	2	2	Amine custom	2. Immobilization	hPD1	8983.4	7860.6	
3/28/2019 3:20:30 PM	3	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	3	2	Amine custom	2. Immobilization	hPDL1	8818.5	8307.9	
3/28/2019 3:20:30 PM	4	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	4	2	Amine custom	2. Immobilization	hPDL1	8605.0	8132.8	
3/28/2019 3:20:30 PM	5	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	5	2	Amine custom	2. Immobilization	mPDL1	19802.6	10449.2	
3/28/2019 3:20:30 PM	6	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	6	2	Amine custom	2. Immobilization	mPDL1	19983.1	10439.8	
3/28/2019 3:20:30 PM	7	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	7	2	Amine custom	2. Immobilization	hATG4BC74S	17814.9	16942.3	
3/28/2019 3:20:30 PM	8	1	Amine custom	2. Immobilization	Activation/Deactivation			
3/28/2019 3:20:30 PM	8	2	Amine custom	2. Immobilization	hATG4BC74S	17763.3	16859.4	

10:50 AM 3/29/2019

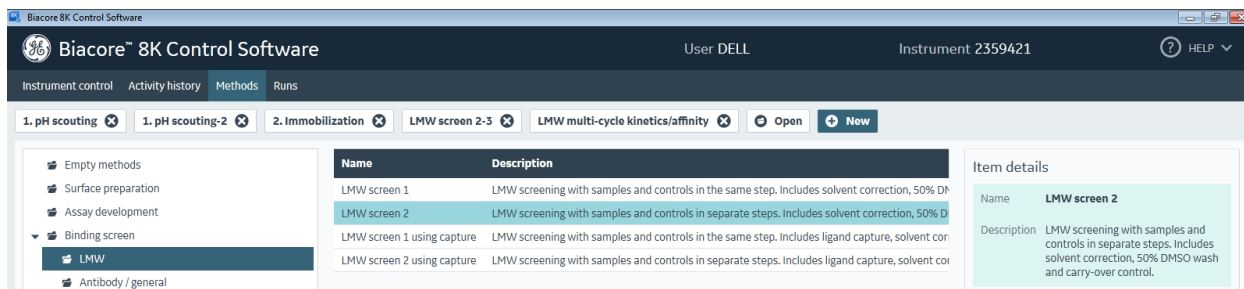


3. 小分子初筛 (5% DMSO)

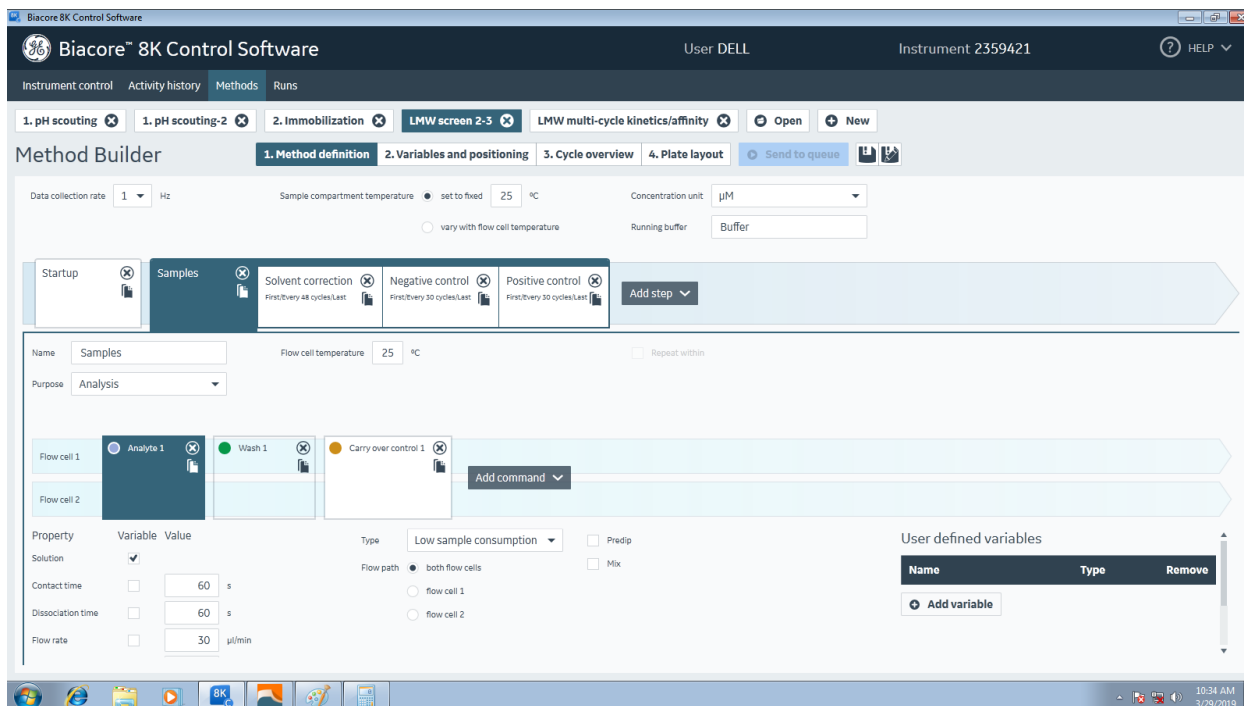
3-0. 在 PBS 中加入 5% DMSO， change solution 置换 buffer。小分子均稀释到 PBS+5% DMSO 中，浓度 20-50  $\mu\text{M}$ 。比如：母液为 10mM，100% DMSO，取 1  $\mu\text{L}$ ，加入 19  $\mu\text{L}$  PBS，再加入 180  $\mu\text{L}$  PBS+5% DMSO，即配成了 50  $\mu\text{M}$  在 PBS+5% DMSO 中。

3-1. 选择 method， +new， 在 Binding Screen 下选 LMW， 选择 LMW Screen 2。

注：LMW Screen 2 每个 channel 都有标准的阳参，阴参设置，每隔若干循环重复；LMW Screen 1 的阳参和阴参手动输入。

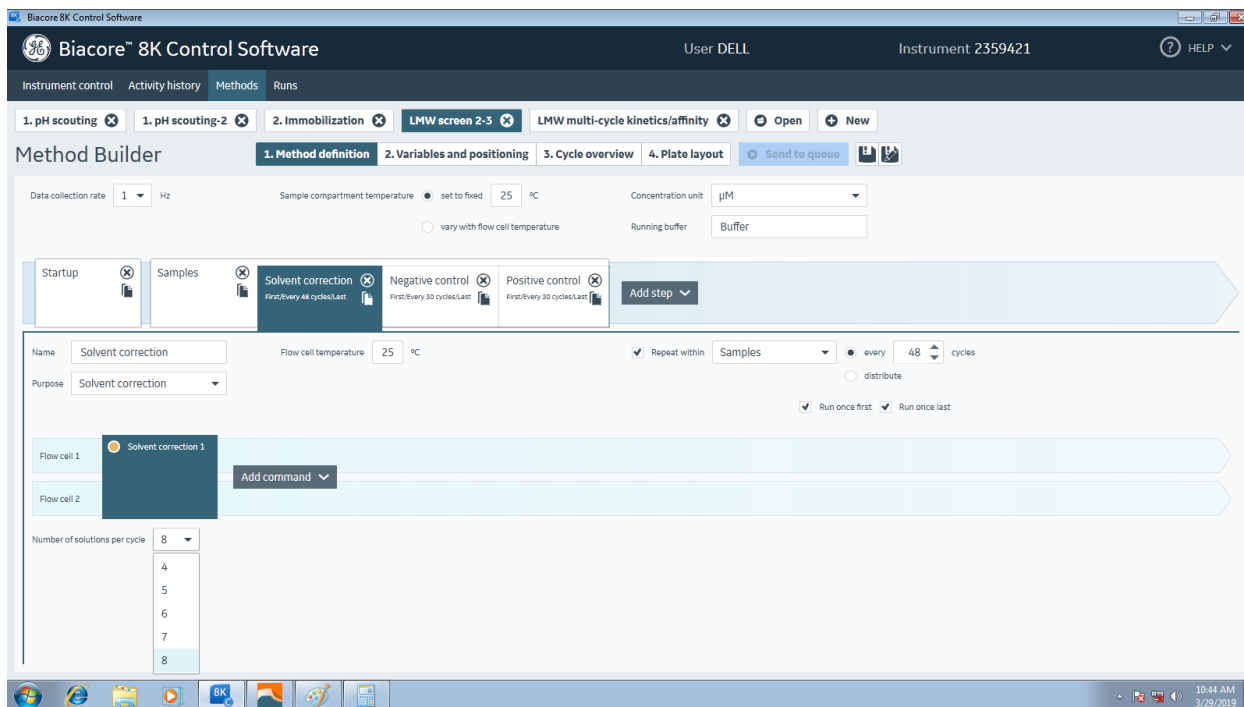


3-2. 在 method definition 中，可以看到 solvent correction， negative control， positive control 都是嵌套在 samples 里面，即每隔若干次进样，就运行一次溶剂校正，阴参，阳参，可以根据样品数量调整频率。

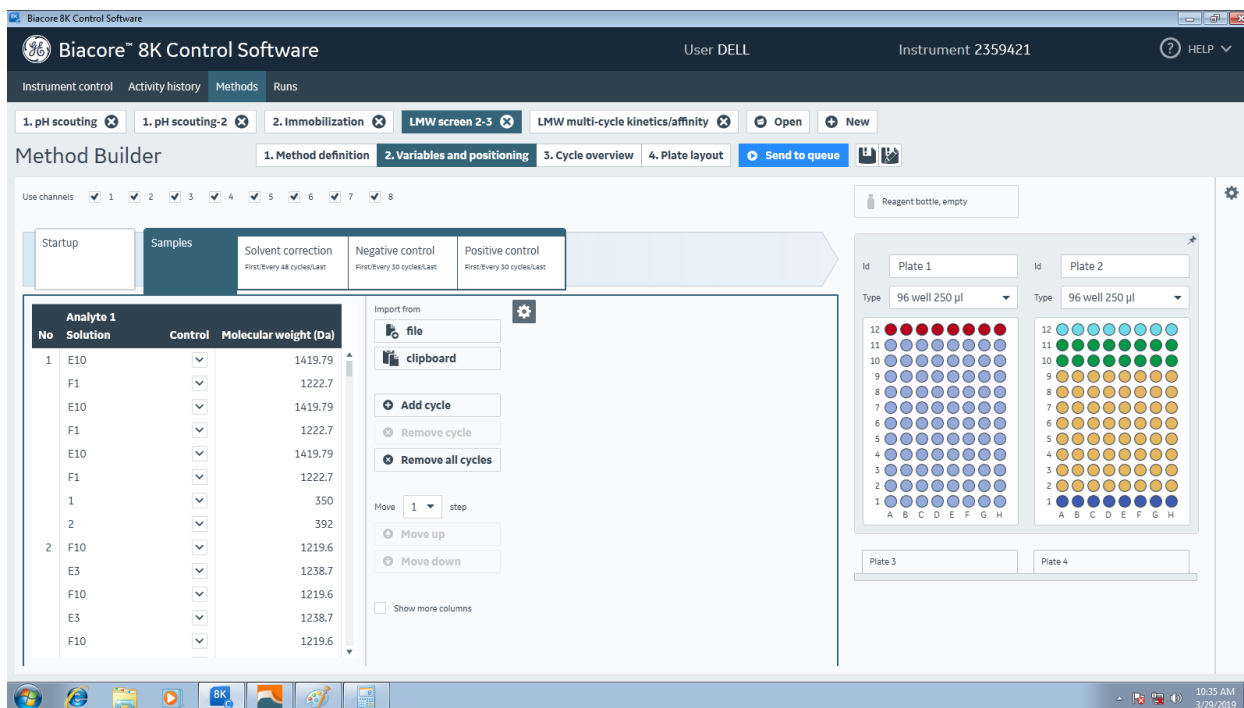


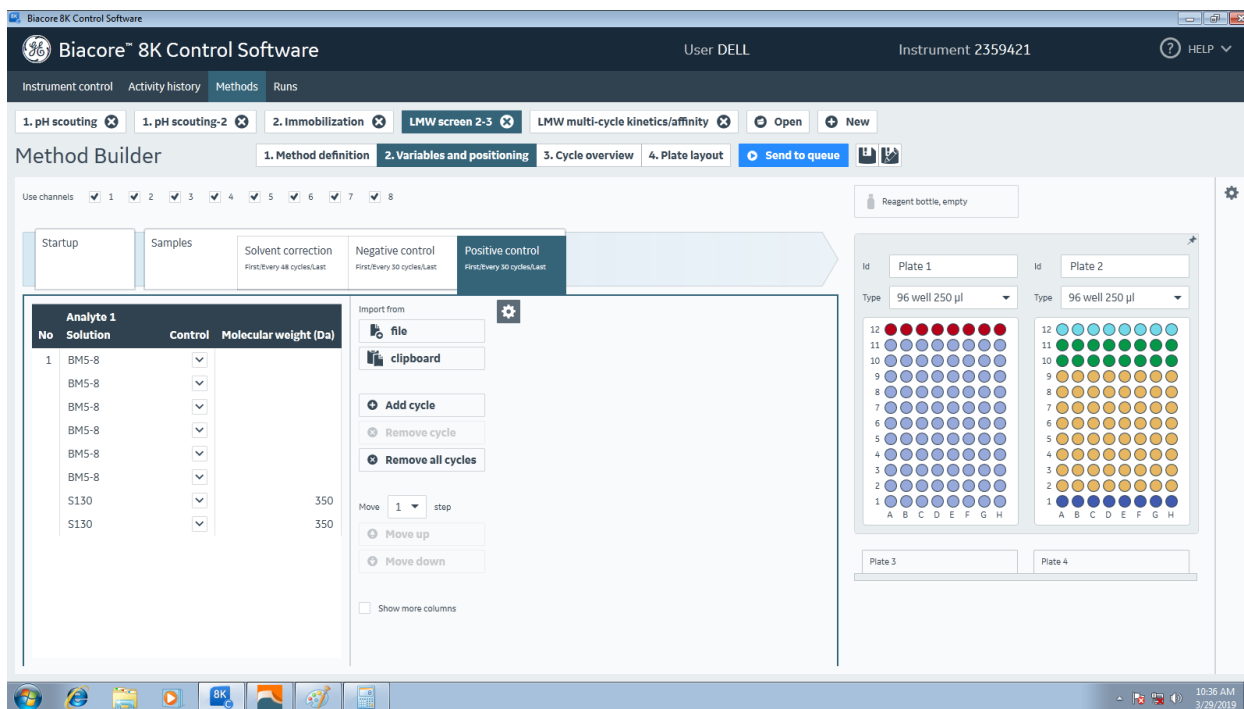
3-3. 点开 solvent correction， default 是做 4 个校正点，初学者可以调到 8 个，随着配液的熟练度准确度增加，再慢慢减少。



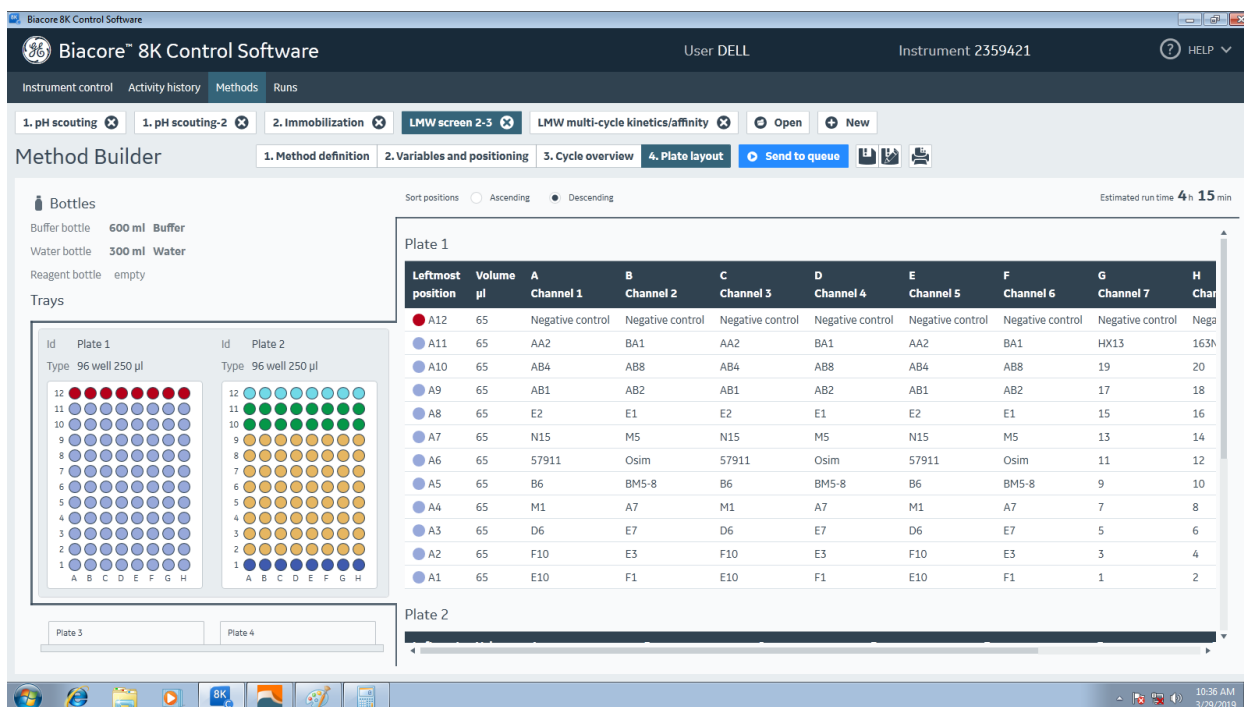


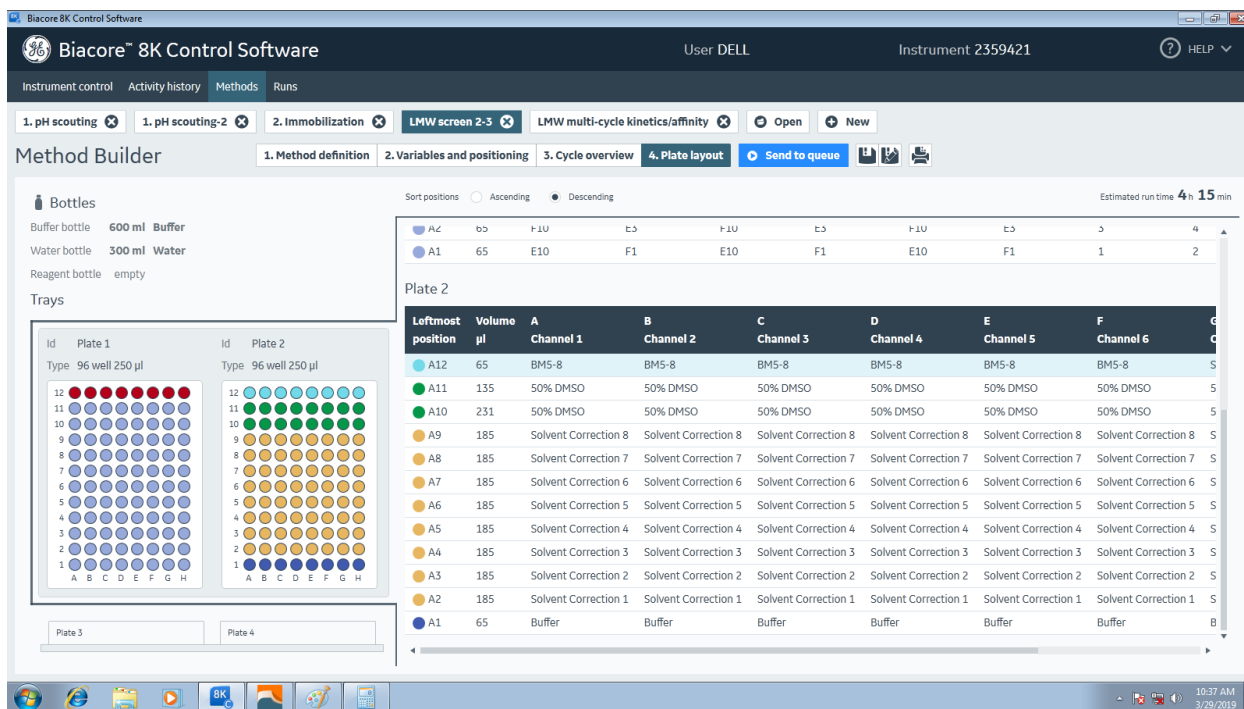
3-4. 在 variables and positioning 中，填写样品的名字，分子量（重要，之后要根据分子量对响应值有一个归一化校正）。在 positive control 里填入阳参名字，分子量，negative control 一般为 running buffer（含 DMSO 的 PBS）。



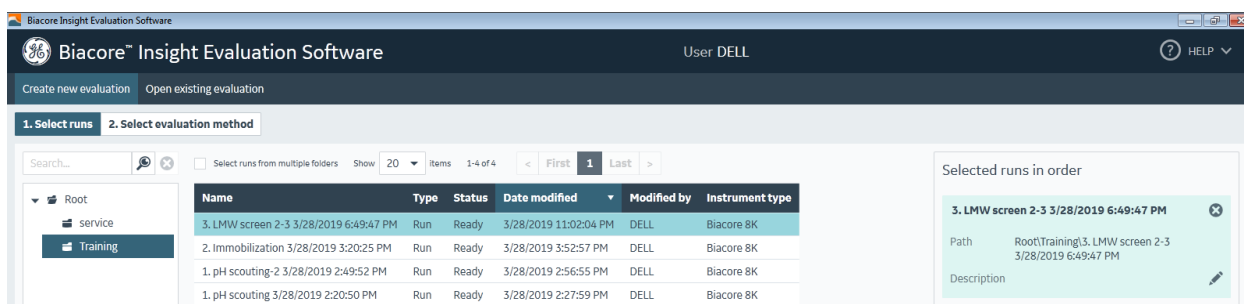


3-5. 在 plate layout 中，即可看到每一板的排布，配制相应的样品。





3-6. 运行完后，使用 evaluation 软件打开文件。



芯片保存可用干法、湿法或者半干法保存。干法即直接取出芯片后 4 度保存，湿法是将芯片浸入缓冲液（PBS）中 4 度保存，放入仪器之前需用超纯水滴瓶冲洗后晾干，半干法也即下图中演示的方法，只在金膜区域滴加溶液，4 度保存即可。

