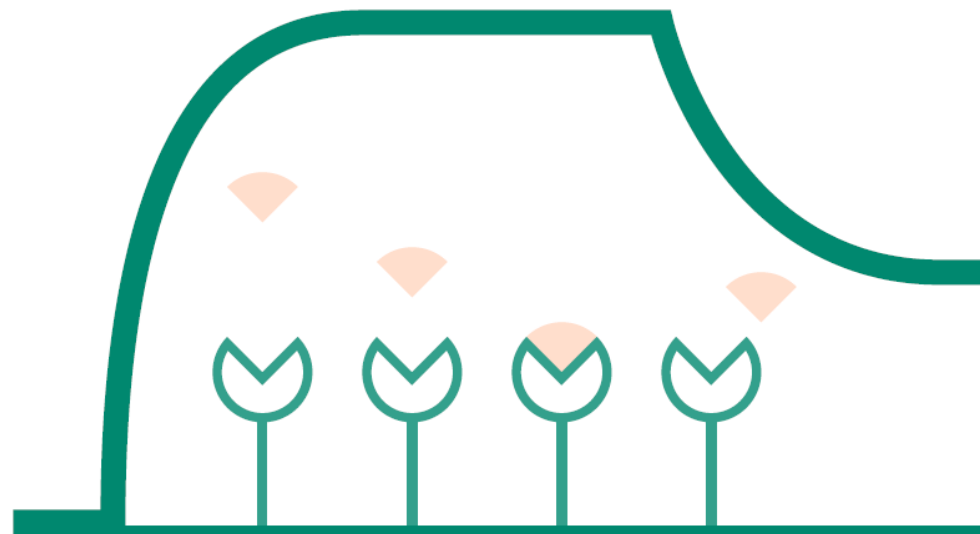




Biacore™ 8K 分子互作分析系统培训





Biacore™原理：表面等离子共振 (SPR) 技术

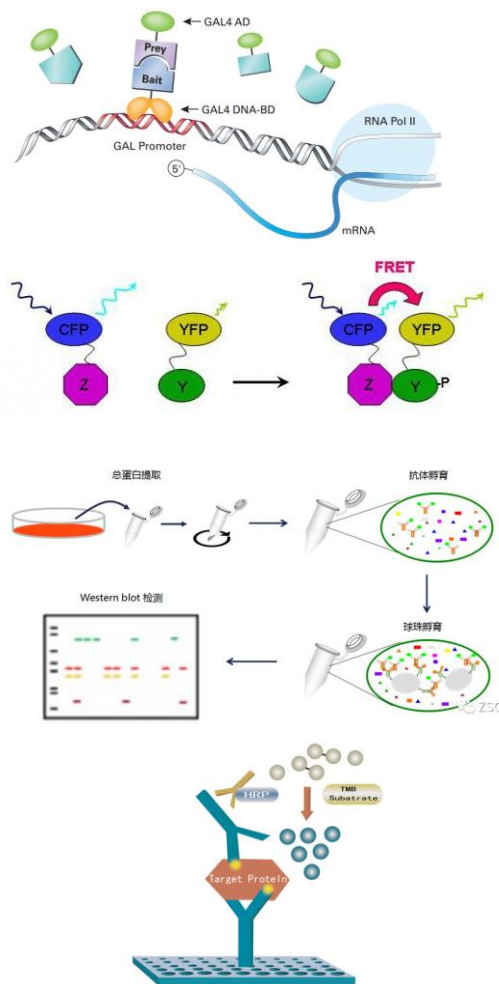
传统的互作技术及其特点

蛋白-蛋白质相互作用的研究

- 酵母双杂交 (Y2H)
- 荧光共振能量转移 (FRET)
- 免疫共沉淀 (Co-IP)
- pull-down
- 酶联免疫吸附分析 (ELISA)
- 质谱鉴定

蛋白-核酸相互作用的研究

- EMSA (凝胶迁移实验)
- ChIP (染色体免疫沉淀法)



传统互作技术的特点:

- 终点技术
- 互作信息少
- 需要标记
- 只能检测强亲和力的互作
- 耗时耗力
- 难以全自动&高通量

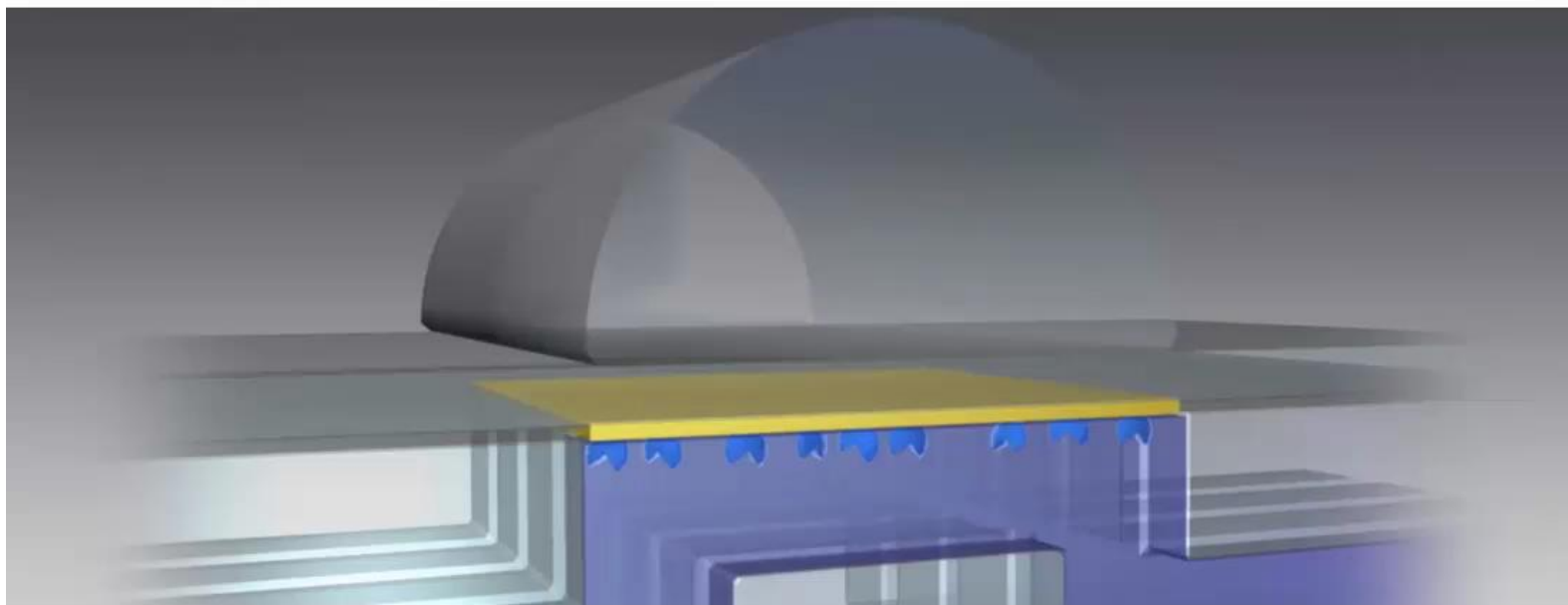
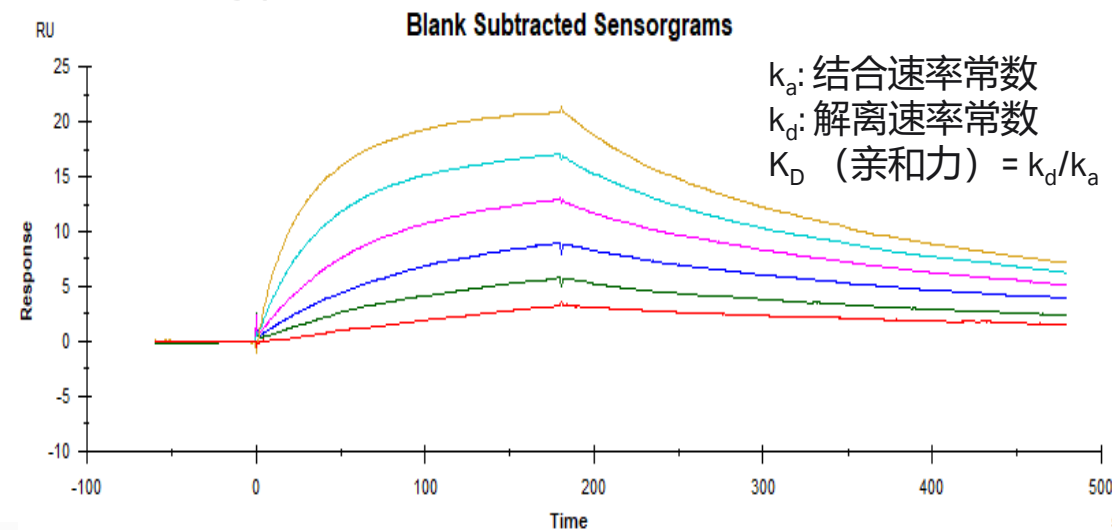
Biacore

(Bio-molecule interaction analysis core-technology)

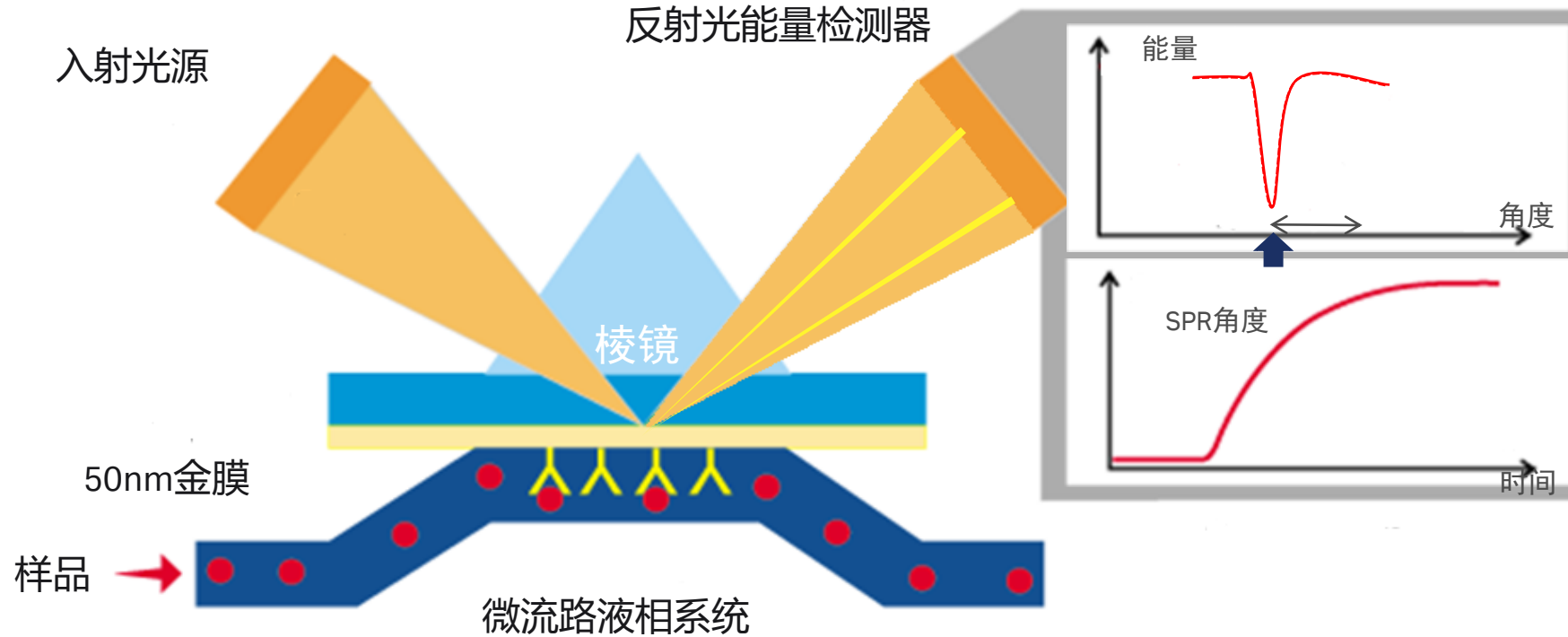
- 基于表面等离子共振原理 (SPR)
- 高分辨率、高灵敏度、高质量数据
- 无需添加任何标签
- 实时检测 (Real-time)
- 全面的互作信息:

Cytiva

特异性、亲和力、动力学.....



表面等离子共振原理 (SPR)



- 全内反射的条件下，入射光造成薄金层等离子体发生共振，导致反射光在某一特定角度（SPR角）能量低至几乎为零；
- SPR角对金膜溶液测100-200 nm范围内的折光率变化非常灵敏；
- 分子间可逆的结合/解离造成金膜附近折光率的实时变化，这一现象被Biacore实时记录。
- Biacore类似一个高精度的光学天平，通过SPR原理放大信号，能检测芯片表面1 pg/mm²的物质变化。

Biacore功能介绍

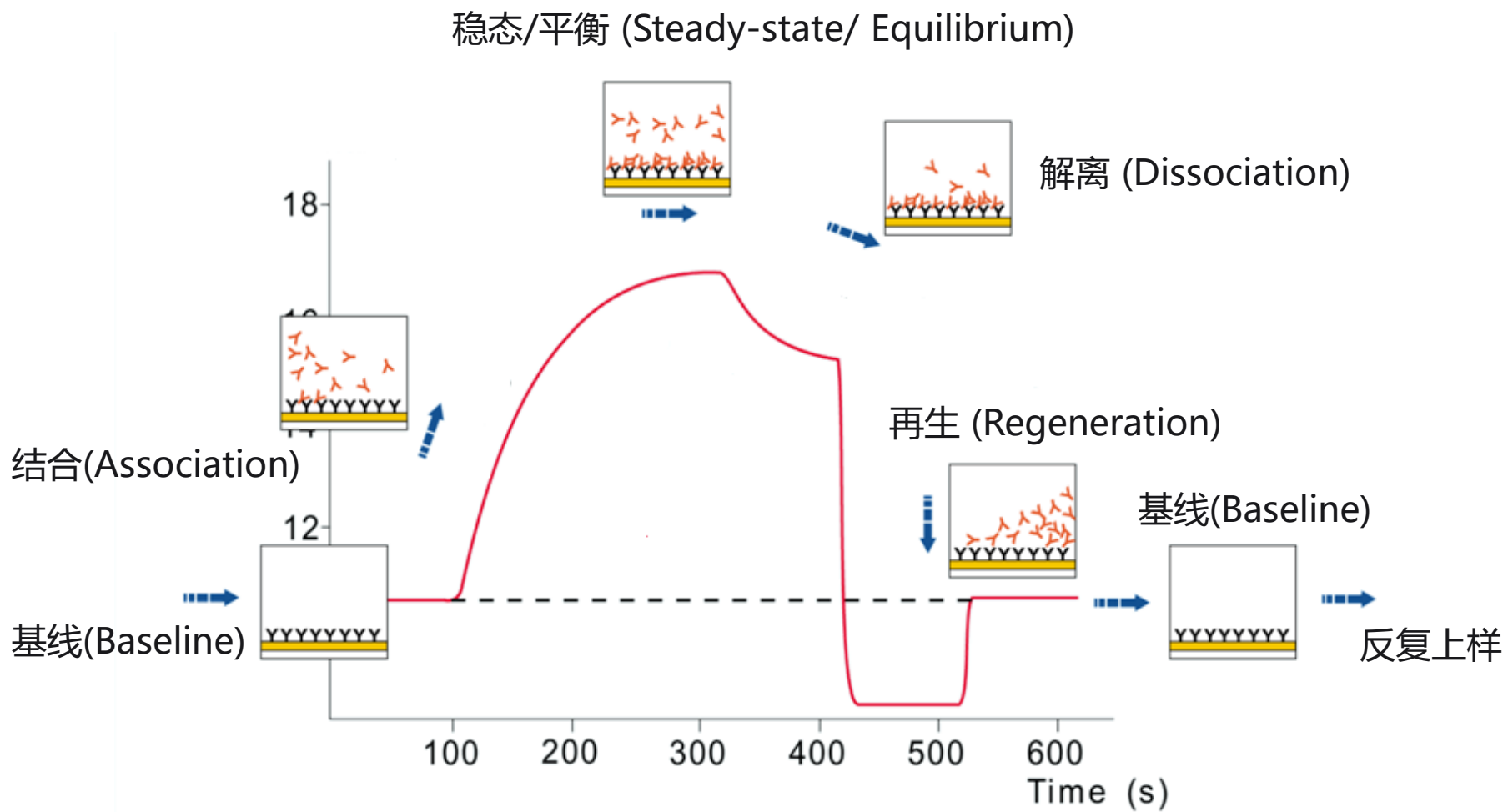
样本兼容性高:

- 蛋白、多肽
- 抗原、抗体
- 核酸
- 小分子化合物
- 脂类分子、GPCRs
- 多糖
- 中草药、名族药
- 纳米、高分子材料
- 病毒、细胞裂解液
- 腹水、血清

应用领域广:

- **疾病分子机制研究:**
入胞机制、药靶蛋白结合模式
- **结构生物学:**
复合体组装/筛选、结合domain/key aa
- **药物发现:**
高通量筛选、分级与结构优化
- **抗体筛选:**
鉴定、改造、表位作图
- **疫苗设计:**
抗原结构优化、抗体滴度、表位肽筛选

传感图 (The Sensorgram)

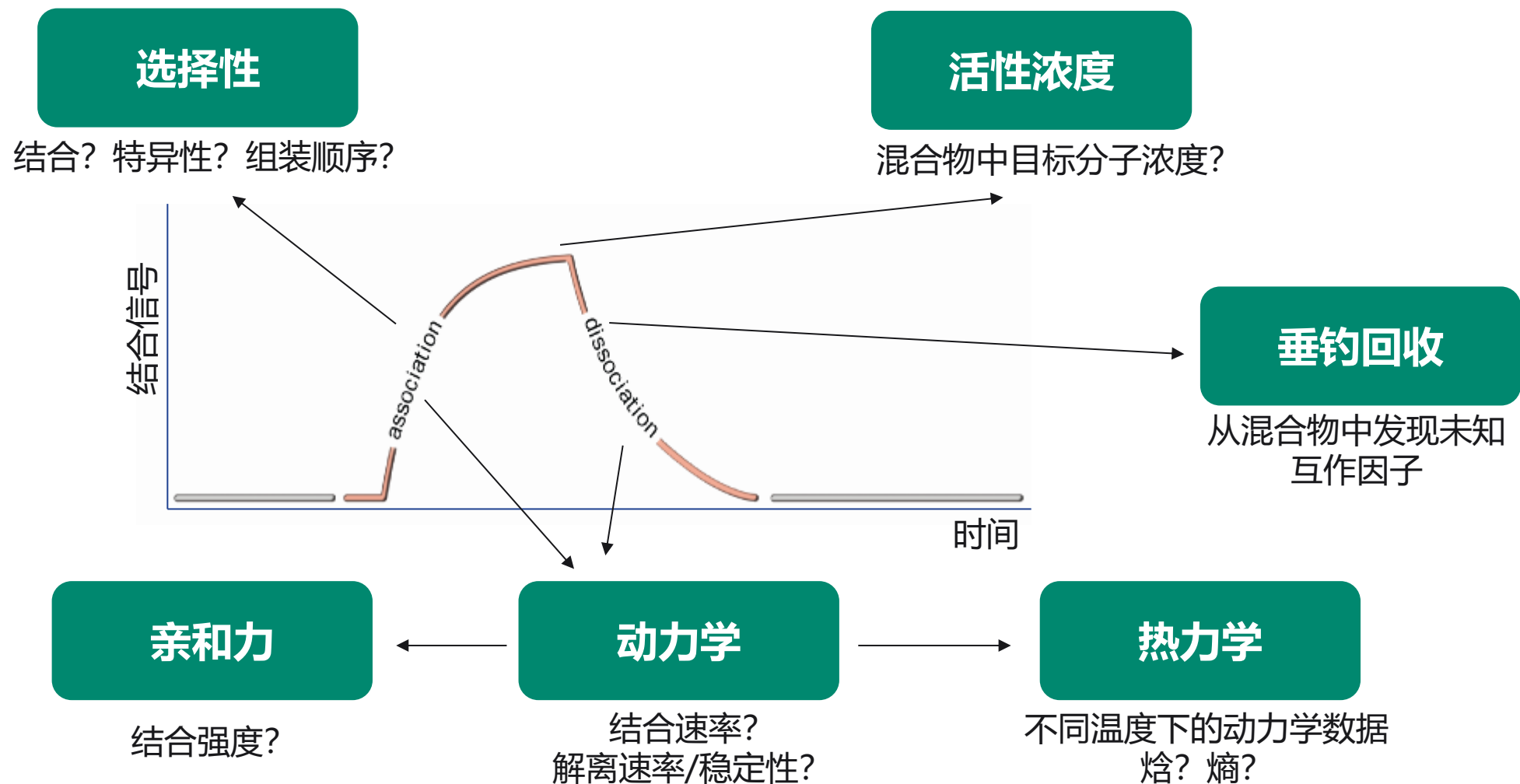


亲和力 (Affinity, KD)

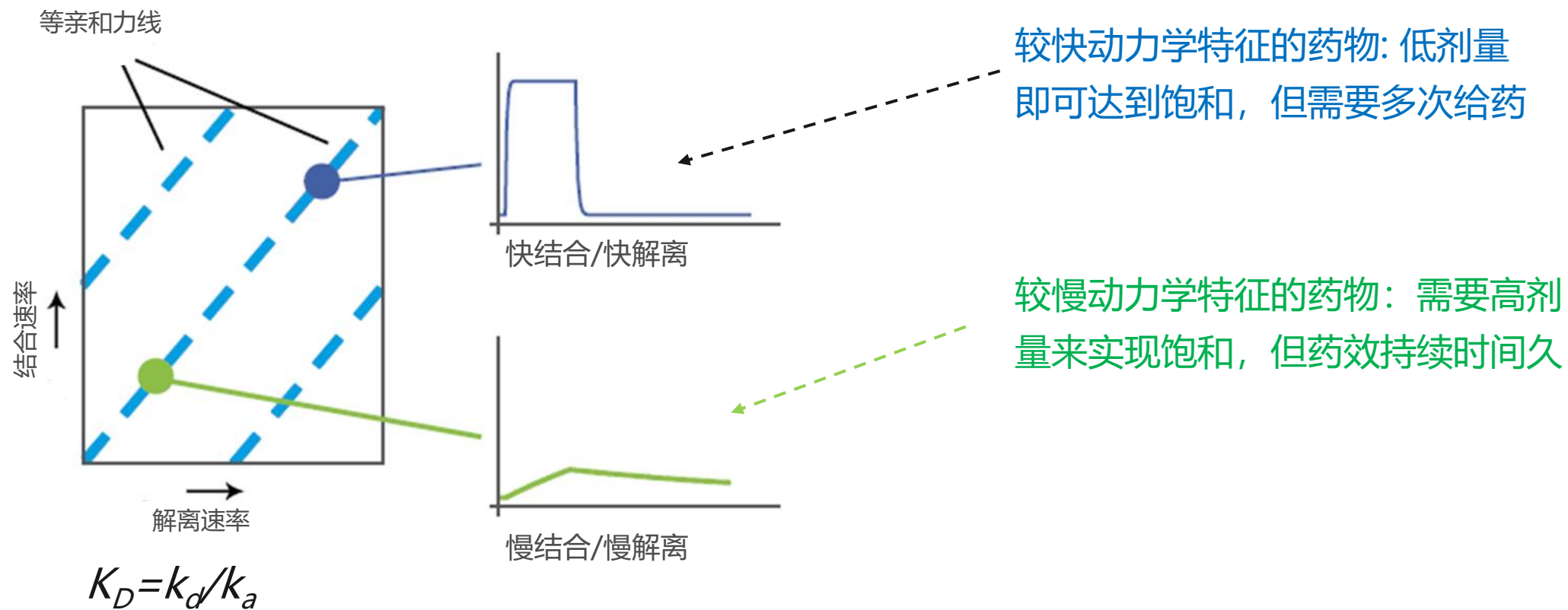


- 亲和素-生物素结合: 10^{-14} M
- 强的抗原-抗体结合: $10^{-8} \sim 10^{-10}$ M
- DNA与蛋白的结合: $10^{-8} \sim 10^{-10}$ M
- 较弱的抗原-抗体结合: $10^{-6} \sim 10^{-7}$ M
- 酶与底物结合: $10^{-4} \sim 10^{-10}$ M
- 蛋白与小分子结合: $10^{-3} \sim 10^{-6}$ M

Biacore提供全面的生物分子相互作用信息



相同的亲和力，不同的动力学，不同的功能



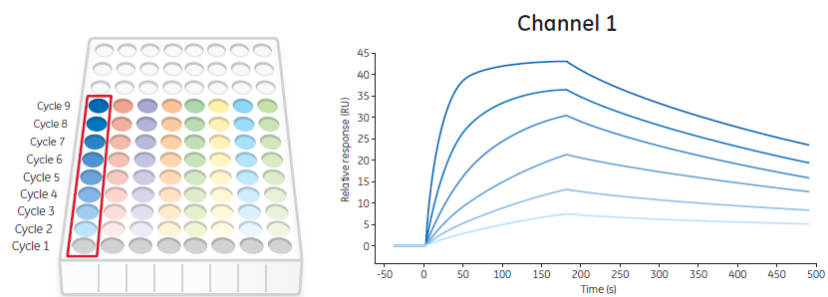
不同的结合与解离速率反映了不同的作用机制，也决定了分子不同的功能与结构特征。



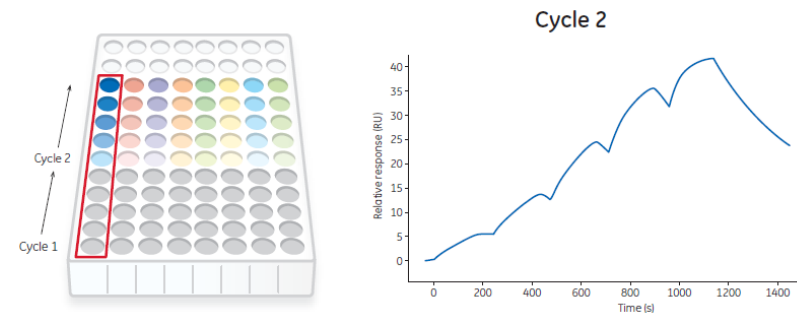
Biacore 1K 核心组件

灵活的动力学分析方法

Multi-cycle kinetics 适合不同样品配对平行比较



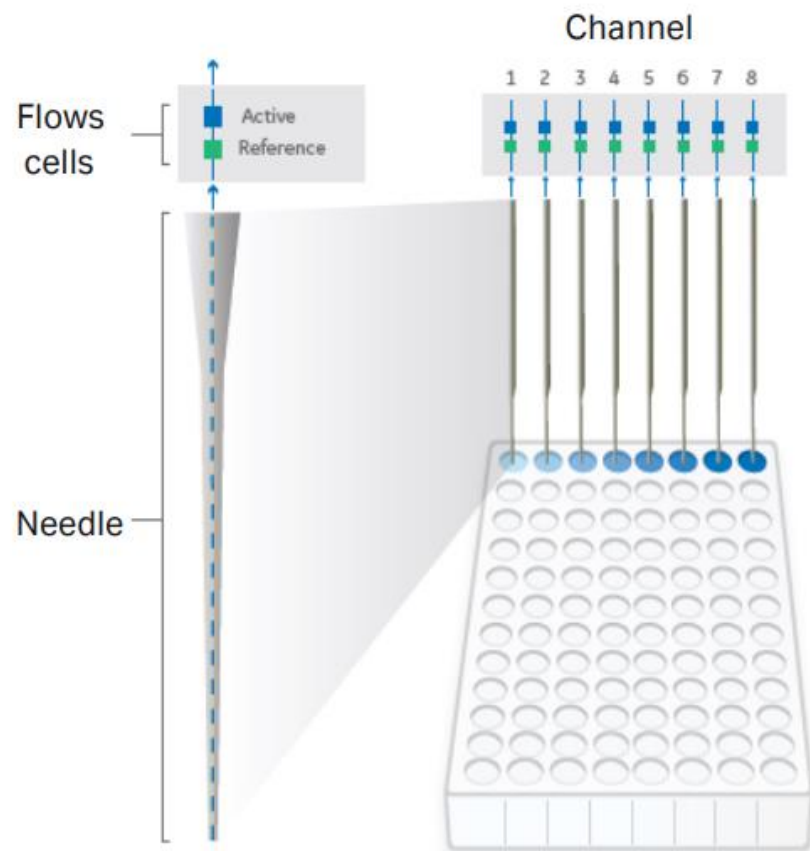
Single-cycle kinetics 快速动力学分析



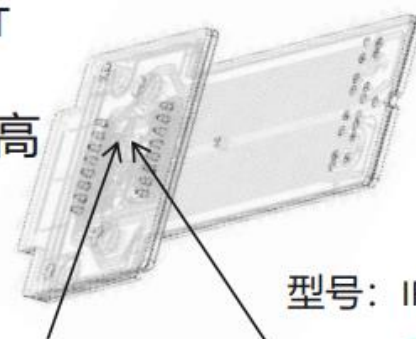
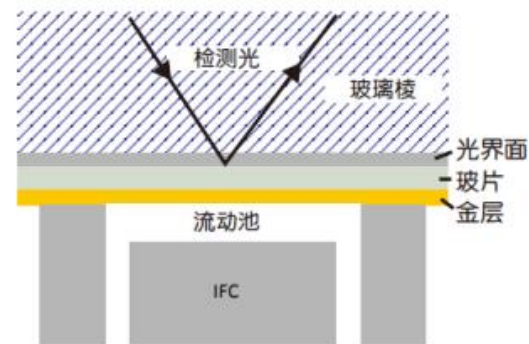
Biacore 8K系统



微流控系统(IFC)



- 8根进样针平行运行
- 16检测通道，样品-对照同时分析
- 全新的微流控技术，数据质量更高
- 血清、混合样品同样适用

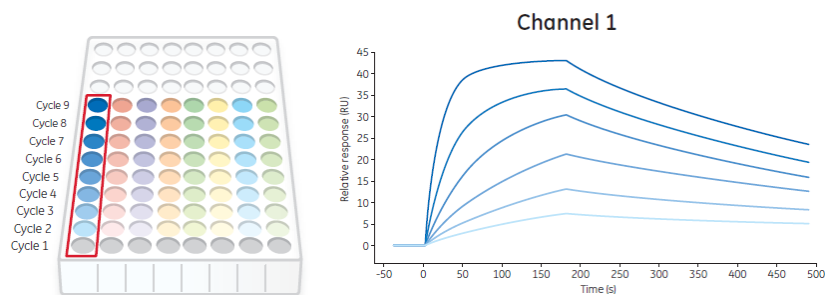


型号: IFC 112

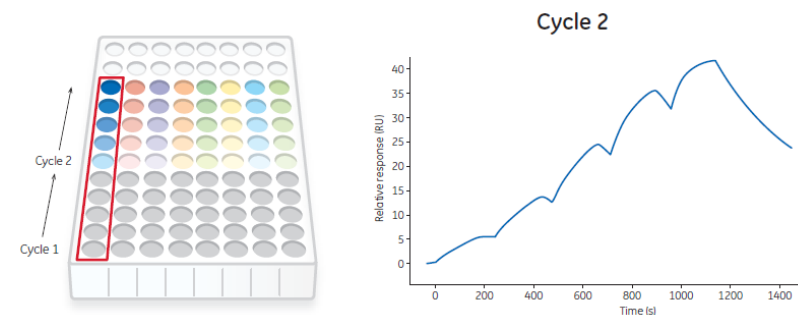
对照 样品

灵活的动力学分析方法

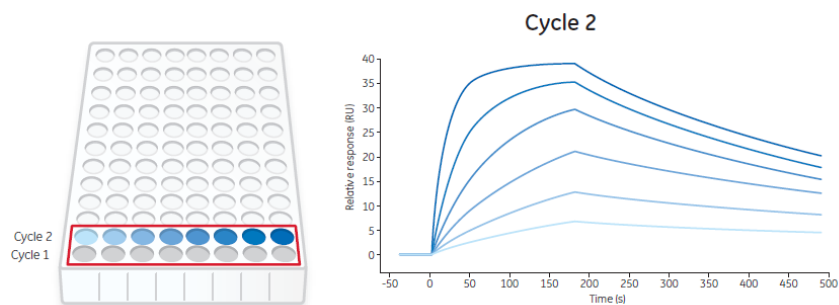
Multi-cycle kinetics 适合不同样品配对平行比较



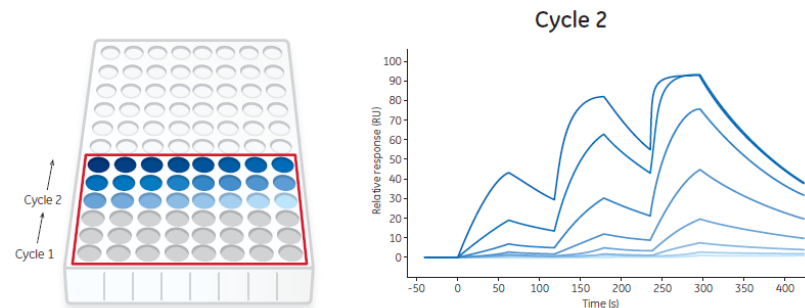
Single-cycle kinetics 快速动力学分析



Parallel kinetics 适合高亲和力、长解离时间样品检测



2D-kinetics 完成未知分子的动力学分析



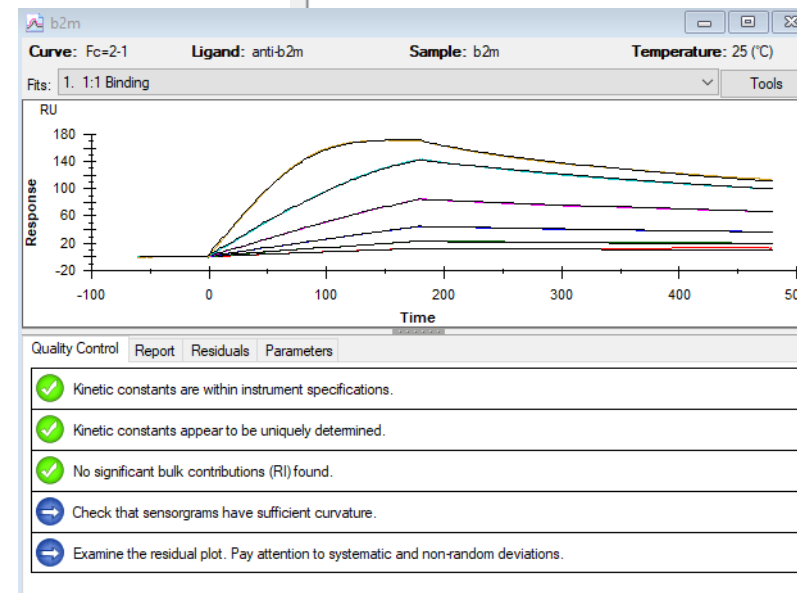
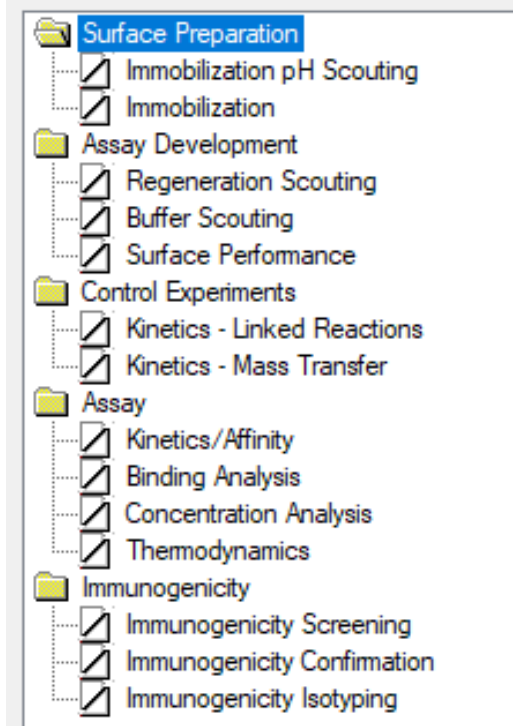
Biacore T200核心组件

如何检测数据呢？

实验的操作
分析要怎么办呢？

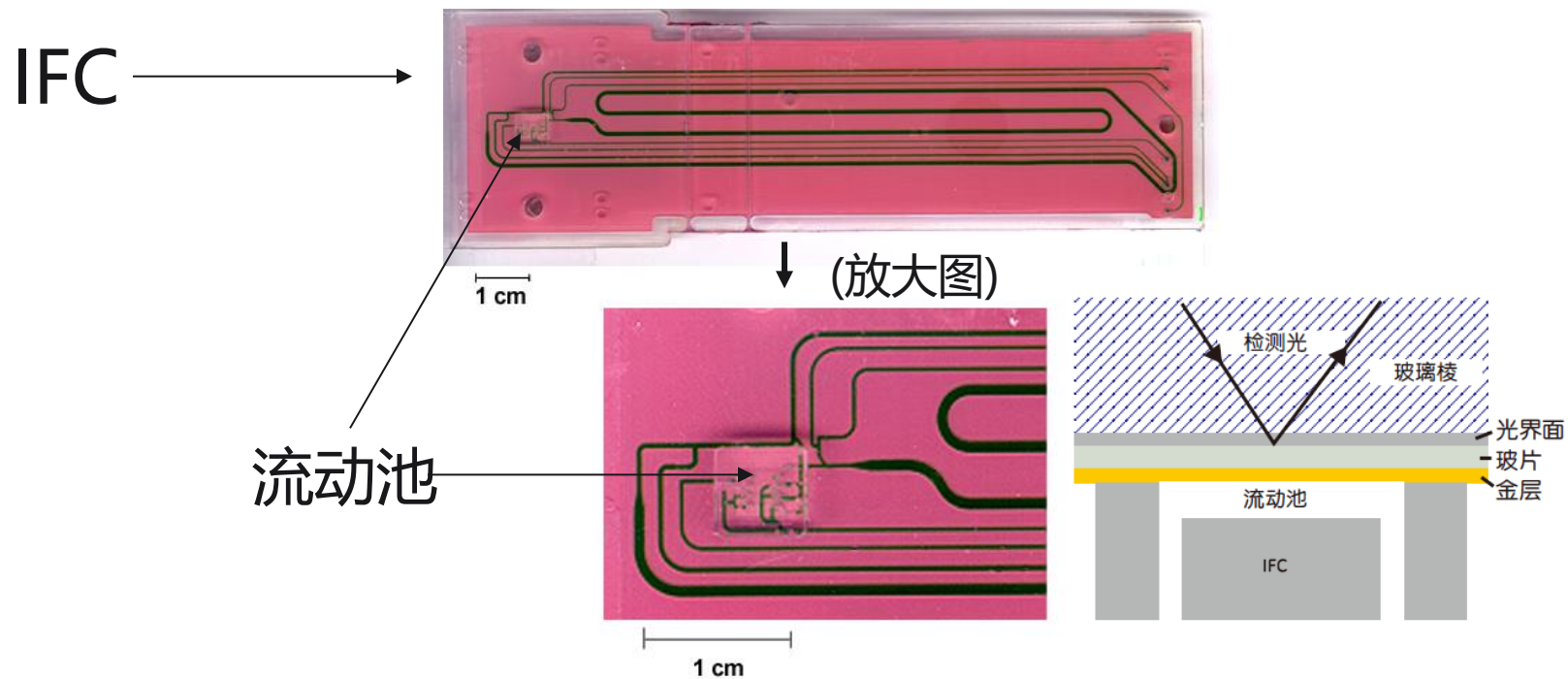
样品是如何
进样的呢？

实验在什么介
质上完成呢？



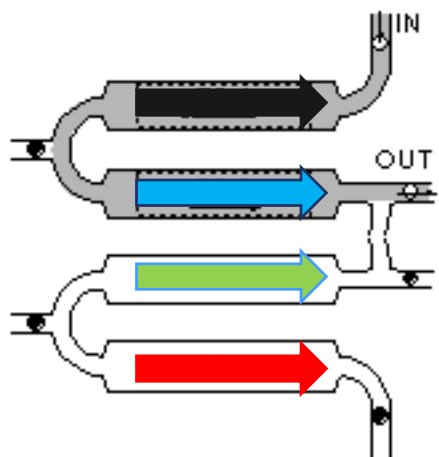
微流控系统(IFC)

- 集成化、自动化的微流路控制系统
- 样品消耗量低
- 为互作分析而设计优化



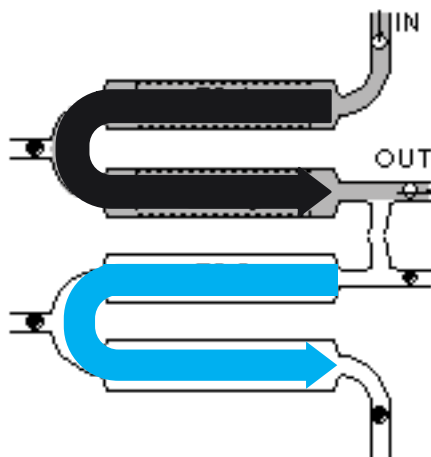
微流控系统(IFC)——流动池

- 4个流动池—位于IFC上 (FC的个数由IFC种类决定)
- 可选择单独、配对、串联使用。
- 流动池为配对使用进行了优化(FC1-FC2, FC3-FC4)



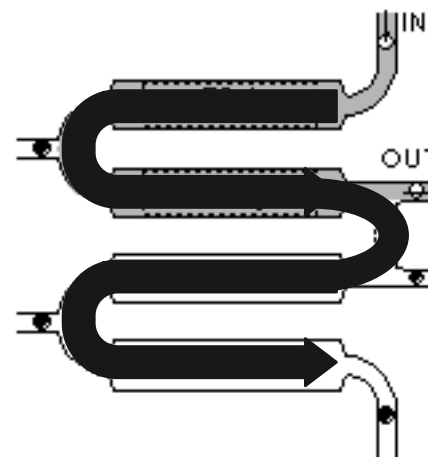
单独

○ Open valve
● Closed valve



配对

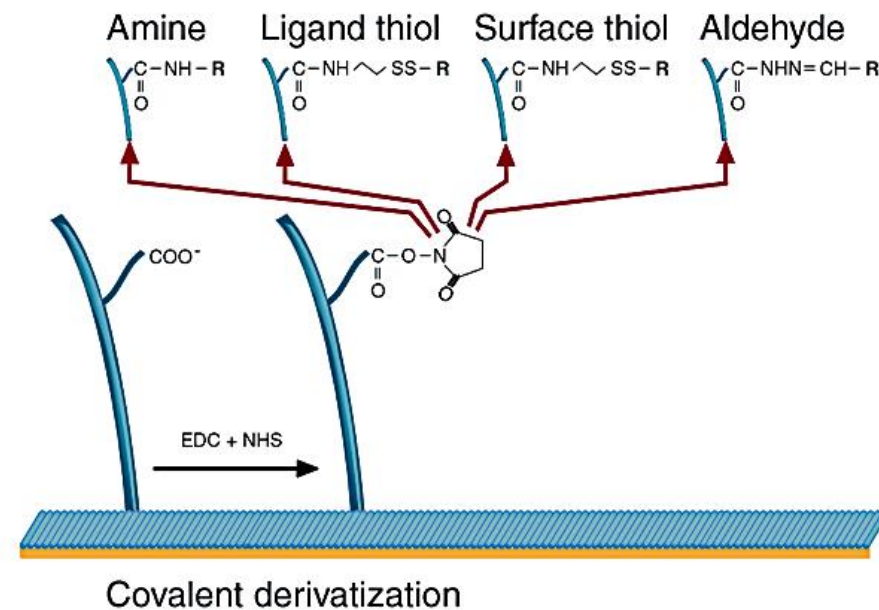
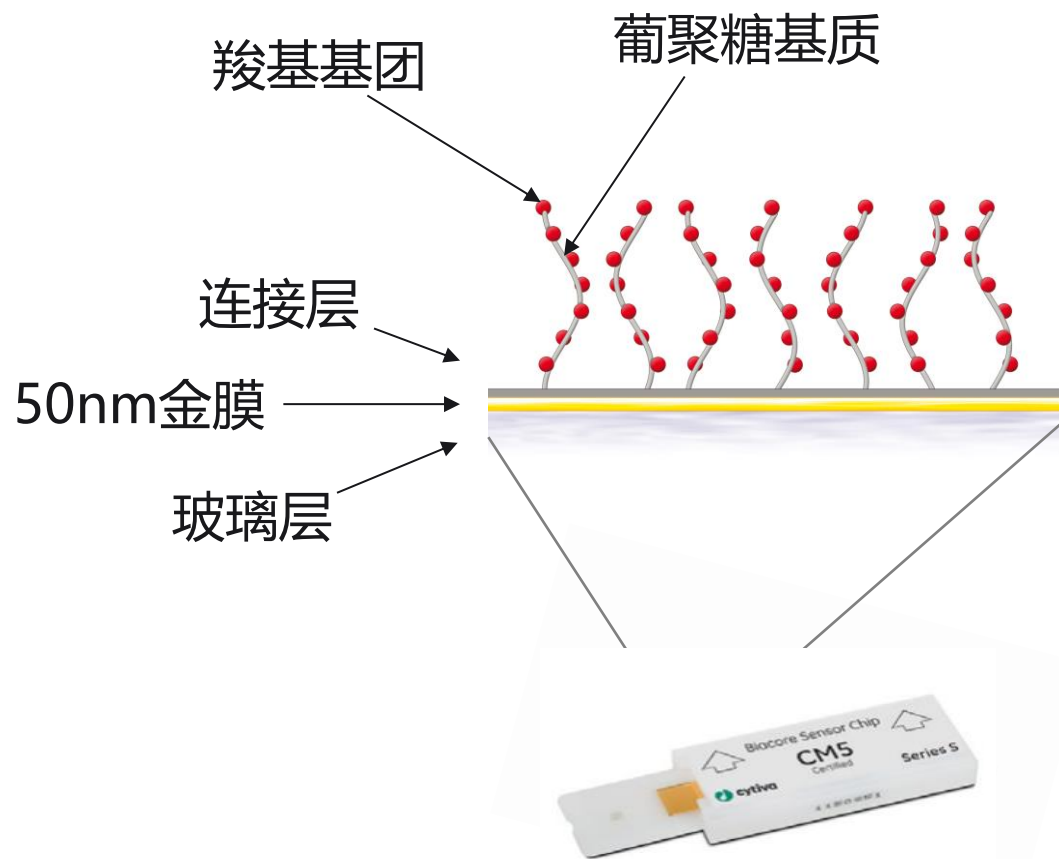
○ Open valve
● Closed valve



串联

○ Open valve
● Closed valve

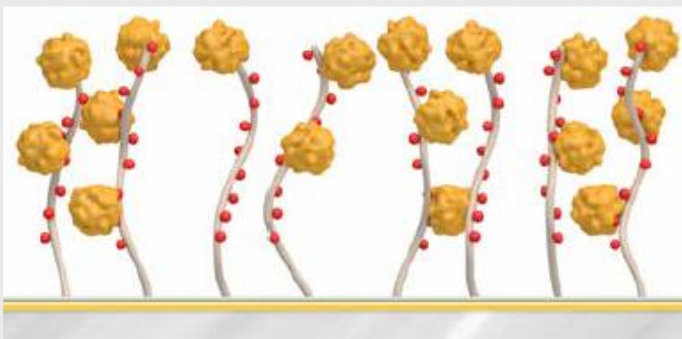
传感芯片-CM5



- 羧基化的葡聚糖表面
- 最常用的传感芯片
- 出色的化学稳定性决定了可靠的实验重复性

传感芯片 Protein A

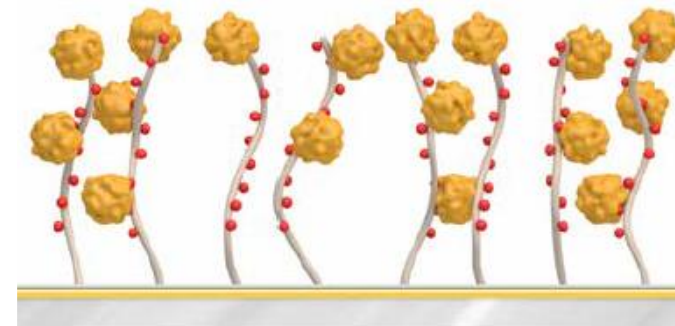
可捕获许多哺乳动物源的抗体，包括人源IgG1， IgG2， IgG4等



- 在羧基化的葡聚糖表面包被了一层重组Protein A蛋白
- 只结合抗体Fc段的重链，保证了抗体结合的定向性
- 不结合抗体Fab段



传感芯片 Protein A/G/L



Protein A

- 羧基化的葡聚糖表面共价偶联 Protein A蛋白
- 只结合抗体Fc区重链，保证了抗体结合的定向性
- 不结合抗体Fab段
- 捕获许多哺乳动物源的抗体，包括人源IgG1, IgG2, IgG4等

Protein G

- 羧基化的葡聚糖表面共价偶联 Protein G蛋白
- 只结合抗体Fc段的重链，保证了抗体结合的定向性
- 拥有更广泛的IgG结合能力，包括人（含IgG3），兔，大鼠，小鼠，山羊，绵羊等

Protein L

- 羧基化的葡聚糖表面共价偶联 Protein L蛋白
- 可结合抗体片段，如Fabs、scFv、dAbs，保证了抗体结合的定向性
- 抗体结合范围比Protein A/G更宽泛，包括IgG, IgM, IgA, IgD, IgE
- 不结合牛免疫球蛋白，适用于以牛血清为培养基表达产生的抗体或抗体片段的定量测定

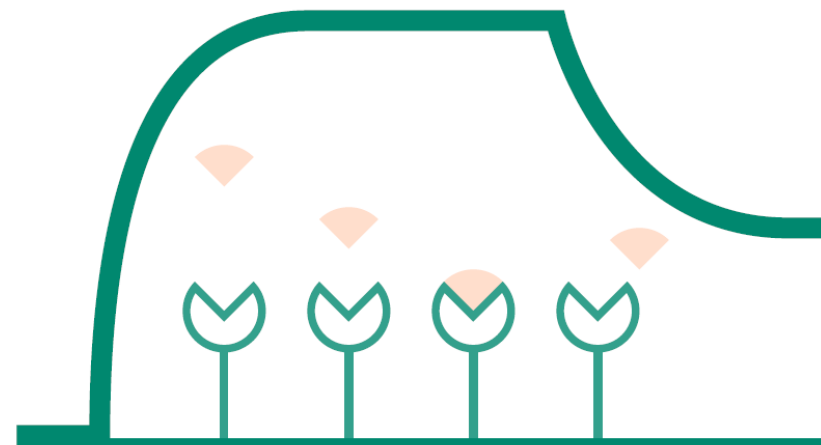
传感芯片的选择

18种不同的芯片类型

- CM5, CM4, CM3芯片：蛋白、肽段、小分子等
- CM7芯片：小分子化合物研究
- SA, NA芯片：生物素标记的分子，如核酸、糖类等
- 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
- Protein A, G, L, PrismA芯片
- 维护芯片，PEG芯片

30余种不同的试剂盒及缓冲液产品

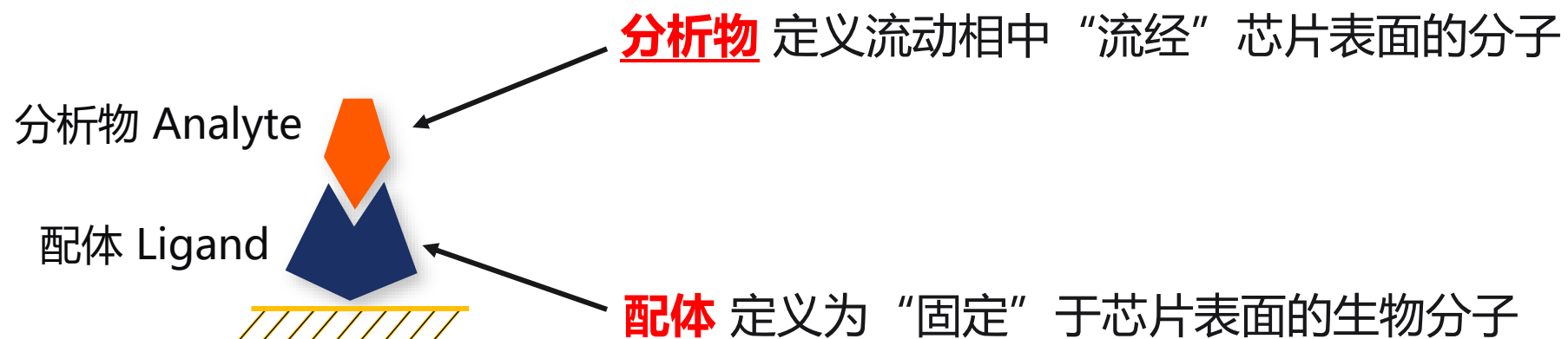
- 氨基偶联试剂盒、巯基偶联试剂盒；
- GST捕获试剂盒→GST重组蛋白分析；
- NTA捕获试剂盒 His 重组蛋白分析
-





Biacore分析的基本流程

分析物和配体的定义



亲和力

亲和力 = 解离平衡常数 (K_D)

描述配体和分析物分子之间的结合强度。

生物学意义：1:1结合，让50%A分子饱和时B分子的浓度。

浓度单位M，数值越小结合越强。

可以通过“稳态”或“动力学”两种方法获得。

Biacore实验的基本流程



固定配体

Biacore实验的基本流程

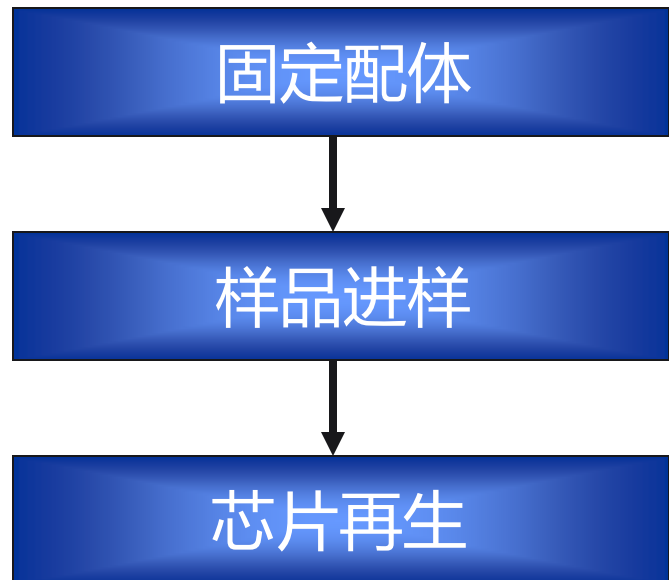


固定配体

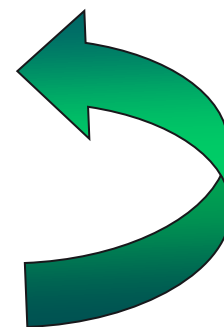
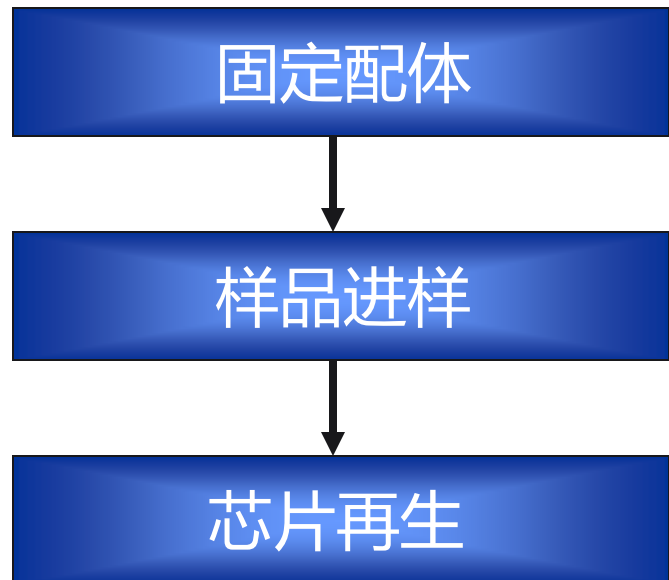


样品进样

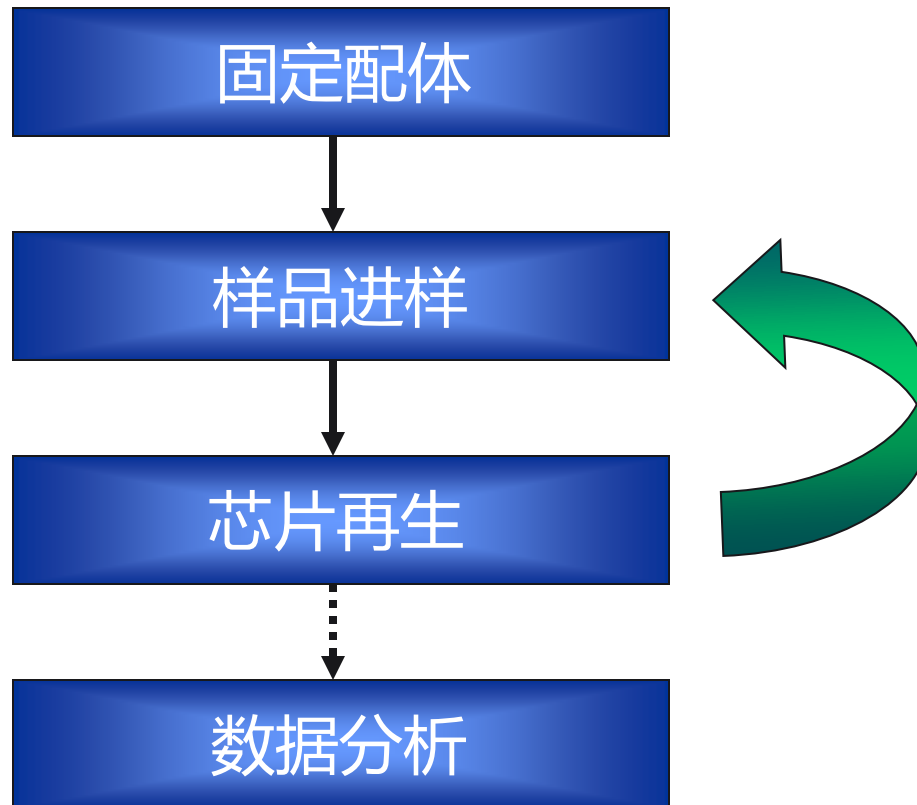
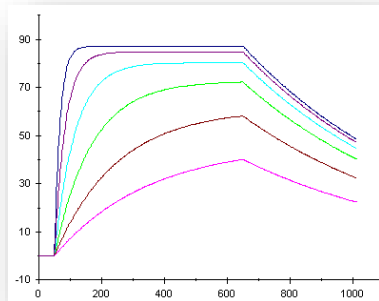
Biacore实验的基本流程



Biacore实验的基本流程

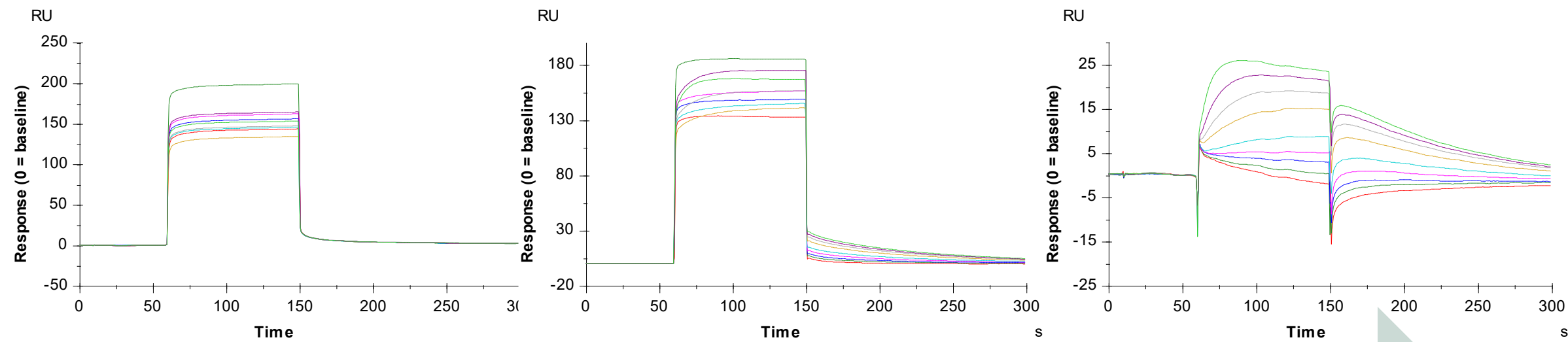


Biacore实验的基本流程



动力学分析: 第一步

背景扣减:



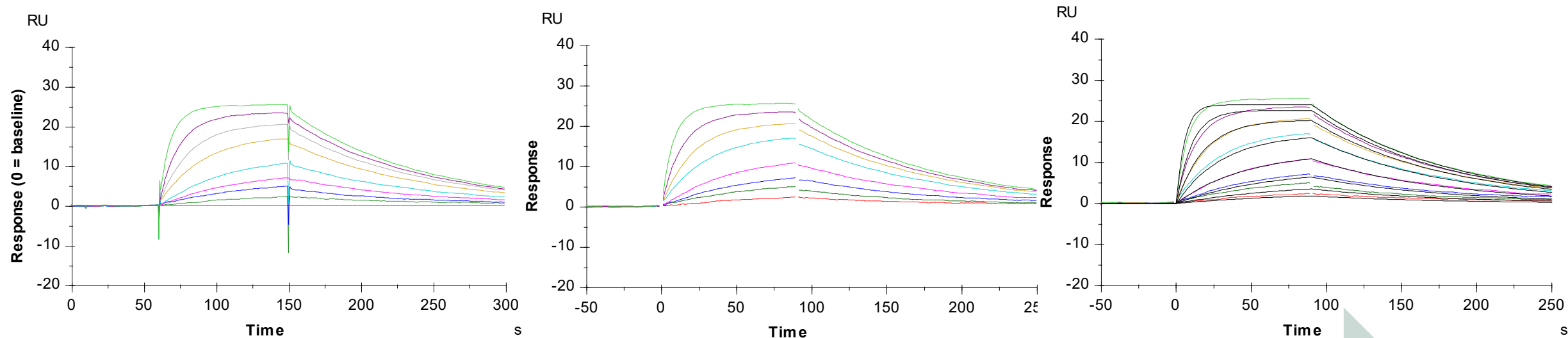
参比通道

实验通道

参比扣减后

动力学分析: 第二步

空白扣减能做到双背景扣除

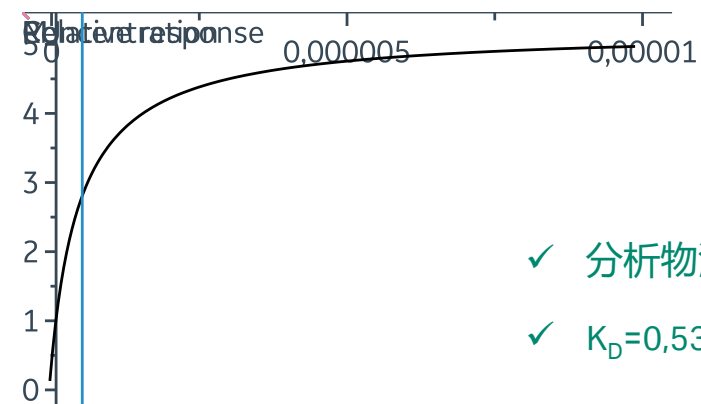
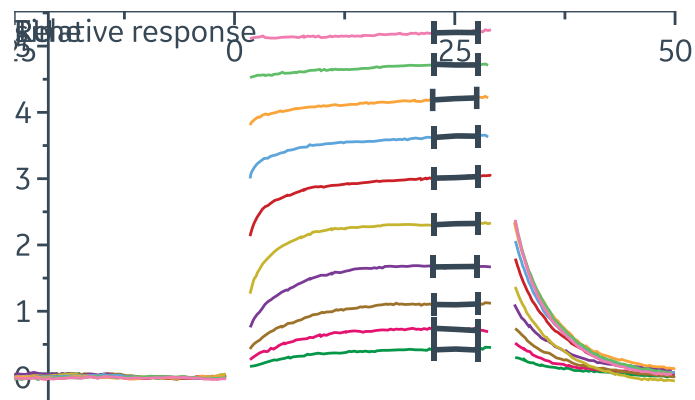


空白扣减

信号移出

数据拟合

稳态分析: 全览



- ✓ 分析物浓度梯度 0.02-10 μ M
- ✓ $K_D=0.53 \mu$ M

处理数据.

绘制稳态响应值与分析物浓度的关系图.

拟合数据.

确保分析物的最高浓度梯度
大于 $> 2 \times K_D$.

直接偶联 (Immobilization)和捕获 (Capture)

什么是偶联配体？

将配体**直接**或者**间接**地固定于芯片表面



- **直接偶联**
- 将配体共价偶联于芯片表面
- 常用氨基偶联的方法

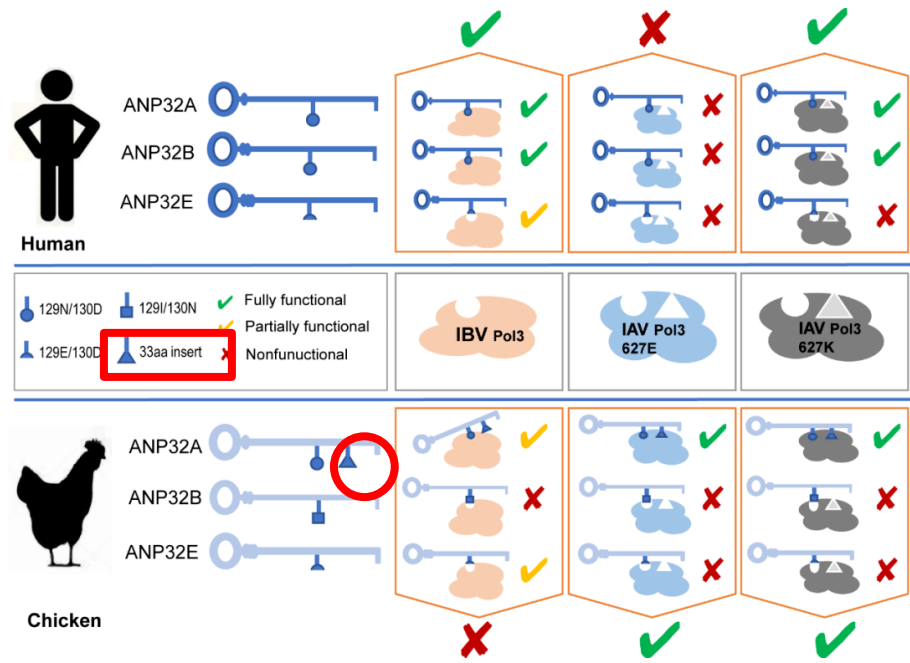


- 捕获的方式
- 将捕获分子共价偶联于芯片表面
- 捕获分子在每个循环过程中通过亲合作用偶联配体



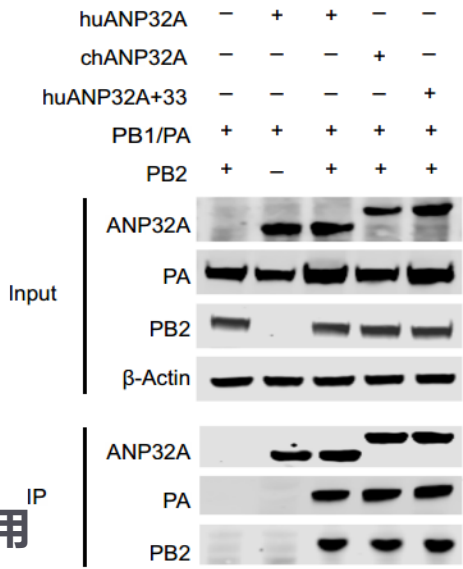
Biacore™在医药/基础研究中的应用

B型流感病毒感染种间限制机制



- 病毒RNA聚合酶活性的关键宿主因子——ANP32
- ANP32的物种差异决定了病毒RNA聚合酶的宿主范围

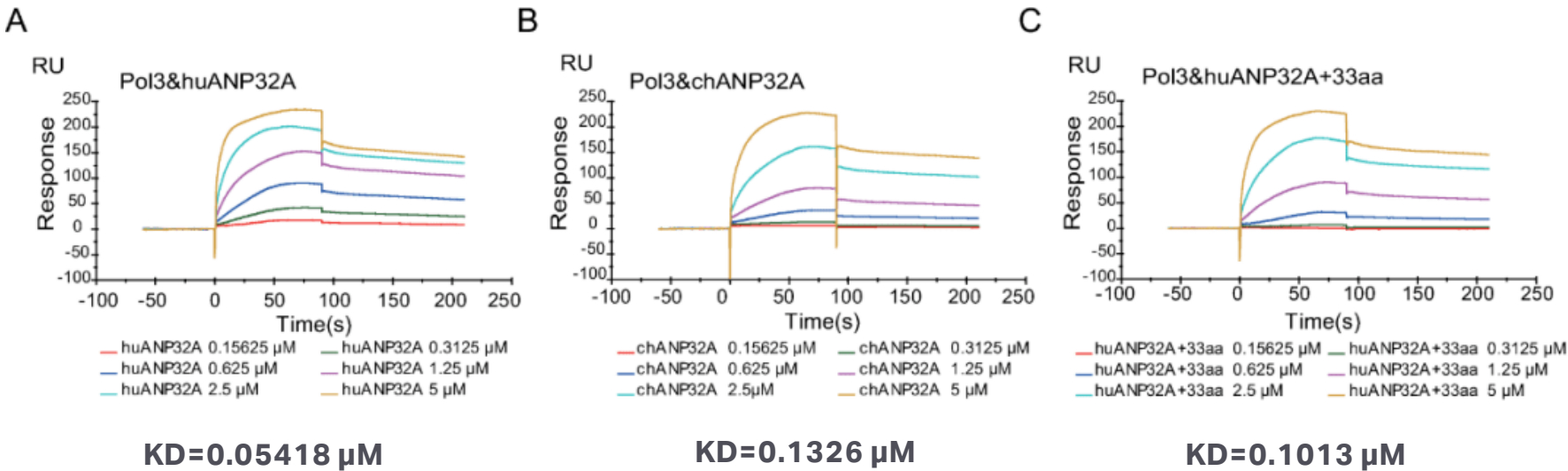
ANP32A中33个氨基酸的差异
是造成这种物种特异性的原因吗?



Co-IP结果显示
chANP32A/huANP32A/huA
NP32A₊₃₃均结合IBV聚合酶

酸性核磷蛋白32家族中的ANP32A对于IBV的复制起主要作用

Biacore™验证ANP32A与IBVRNA聚合酶的结合



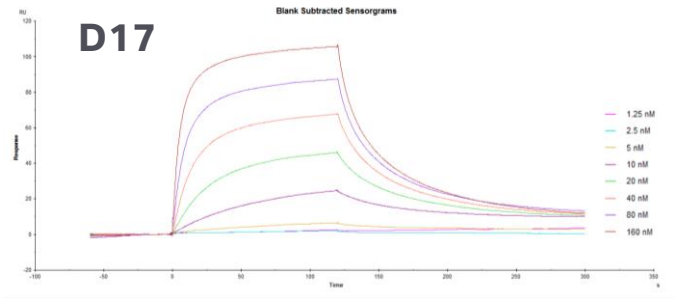
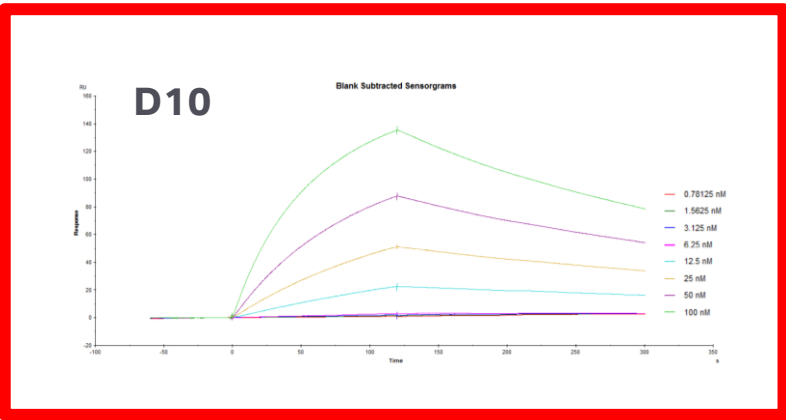
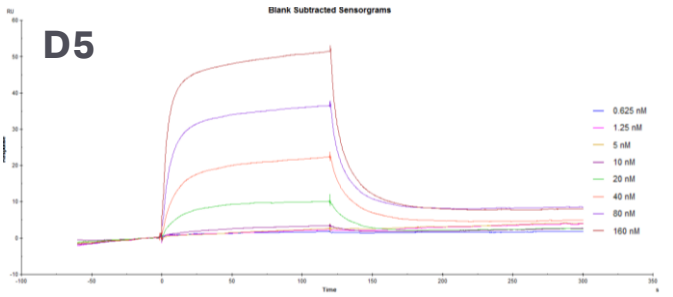
Biacore定量结果准确显示了不同物种ANP32A亲和力的差异

33个氨基酸的插入降低了ANP32A与IBV聚合酶的亲和力

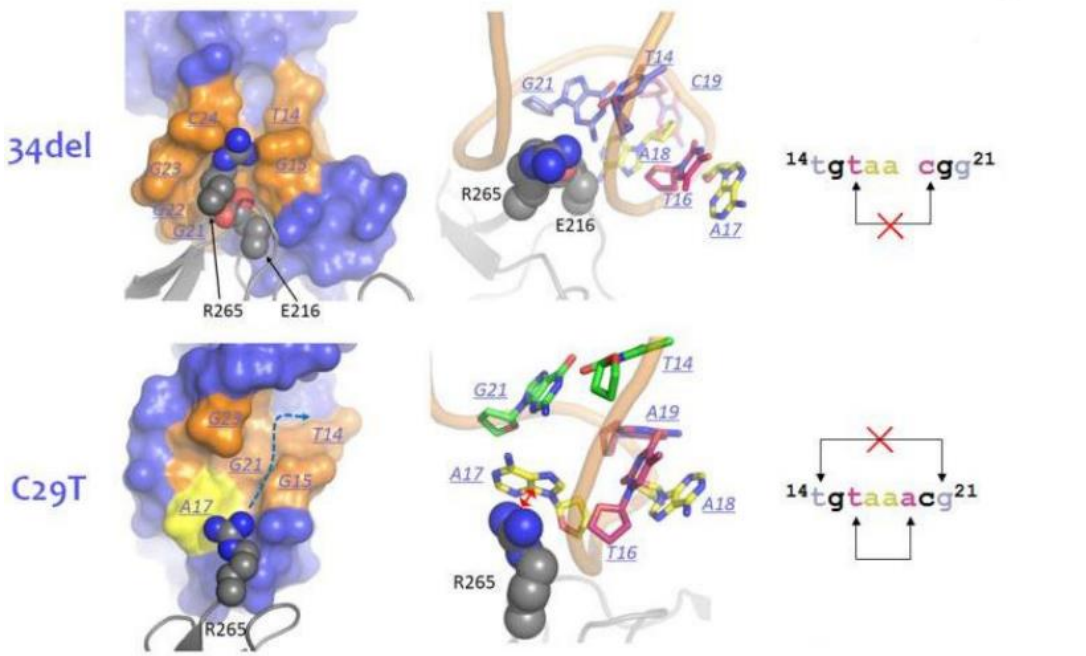
华山医院发现慢解离核酸适配体助力肝癌早筛

	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	$K_D(\text{nM})$
D5	2.349×10^6	0.02878	12.26
D10	1.150×10^5	0.004479	24.85
D17	1.466×10^6	0.03198	21.81

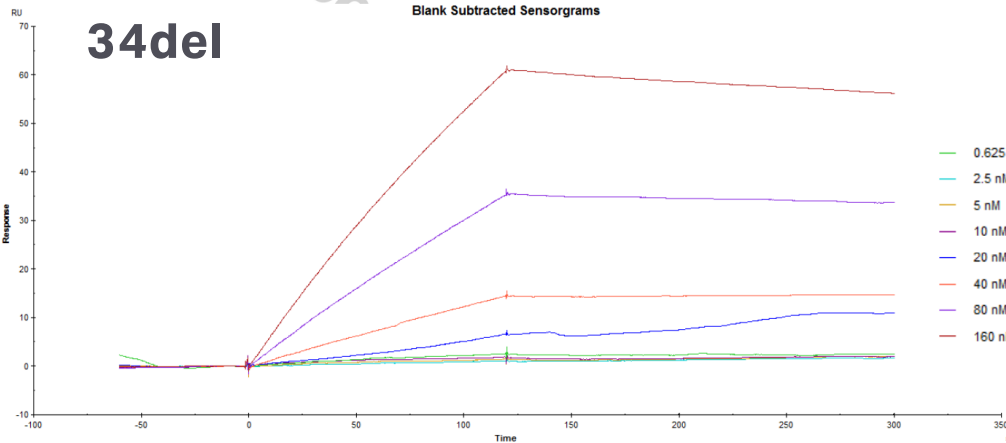
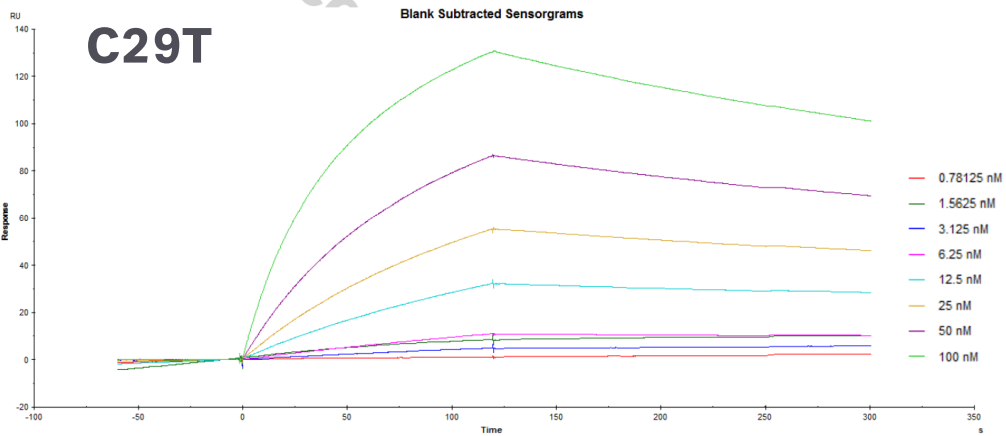
- Dickkopf-1 (DKK-1) 是HCC重要的早期筛查指标
- 针对Dickkopf-1筛选核酸适配体
- 开发核酸适配体-靶标-抗体的HCC早期筛查方法



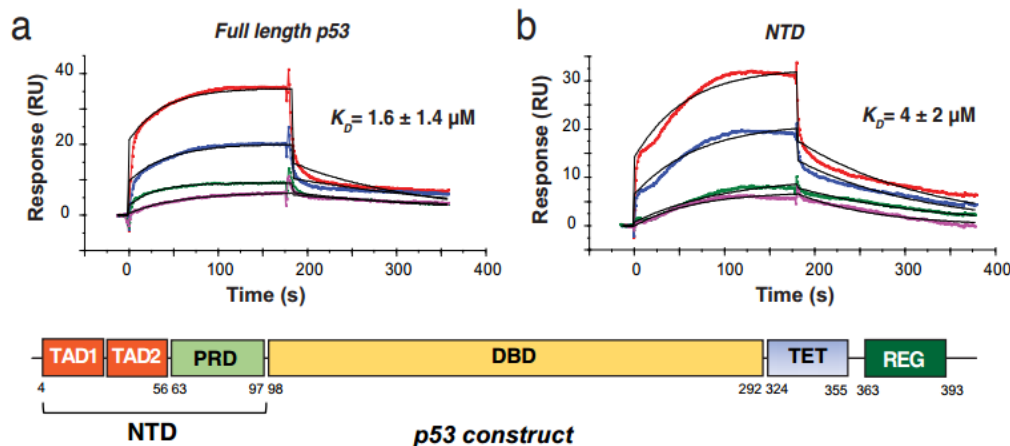
慢解离筛选获得的突变核酸适配体亲和力验证



	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(nM)$
D10	1.150×10^5	0.004479	24.85
C29T	1.524×10^5	0.001229	8.062
34del	2.320×10^5	0.00007374	0.3719

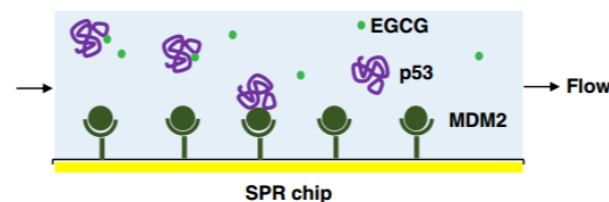
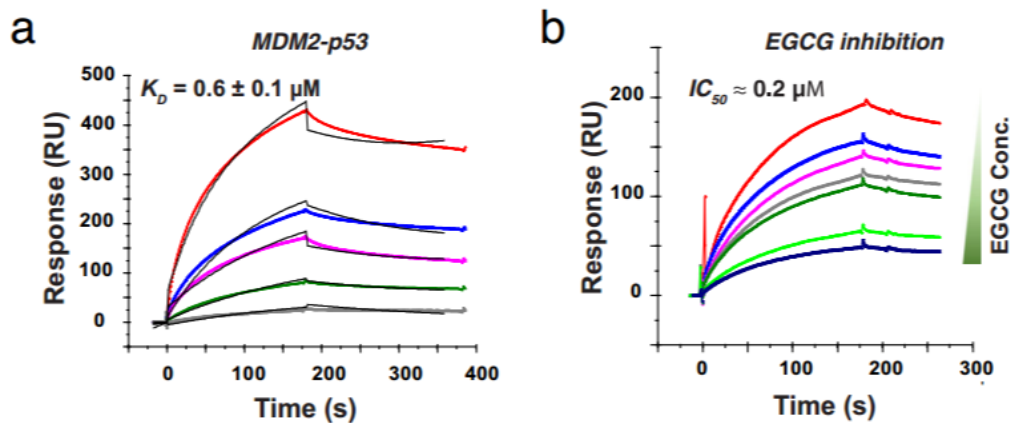


中国农大：绿茶来源的儿茶素EGCG抗癌的分子机制



- EGCG与抑癌因子p53之间 μM 的相互作用
- p53的N端结构域(NTD)被确定为主要的结合位点

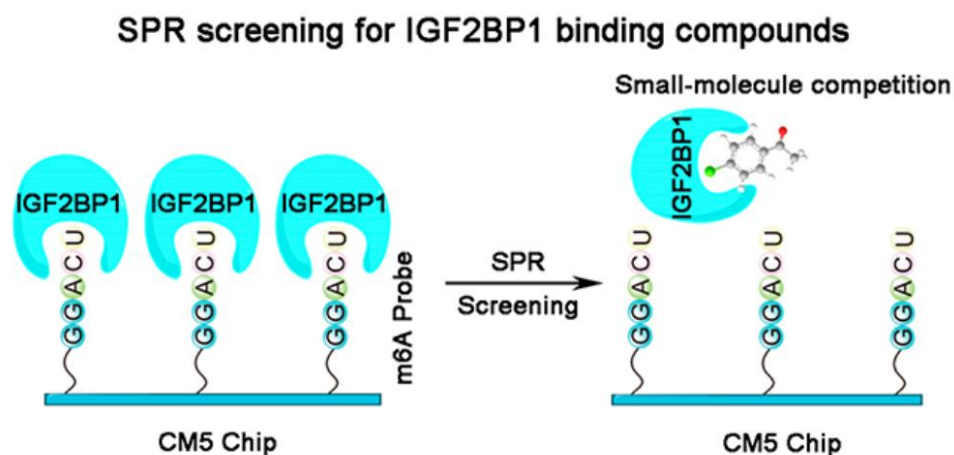
NTD也是MDM2的结合位点，EGCG与NTD的结合是否影响了MDM2调节的p53降解？



- EGCG破坏p53与其调节性E3连接酶MDM2的互作
- 抑制MDM2对p53的泛素化，稳定p53的抗肿瘤活性

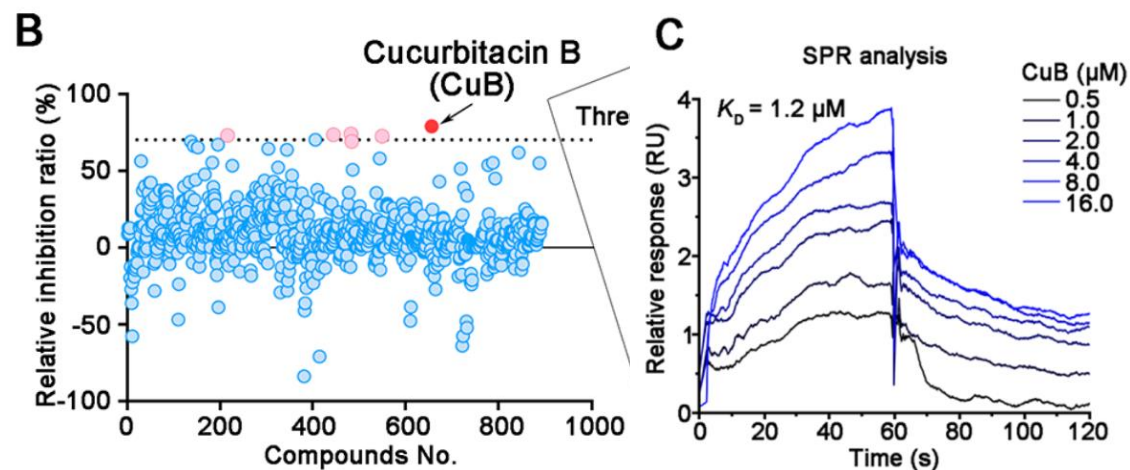
天然产物中抗肿瘤活性分子发现及作用机制阐释

2022中医药十大进展!



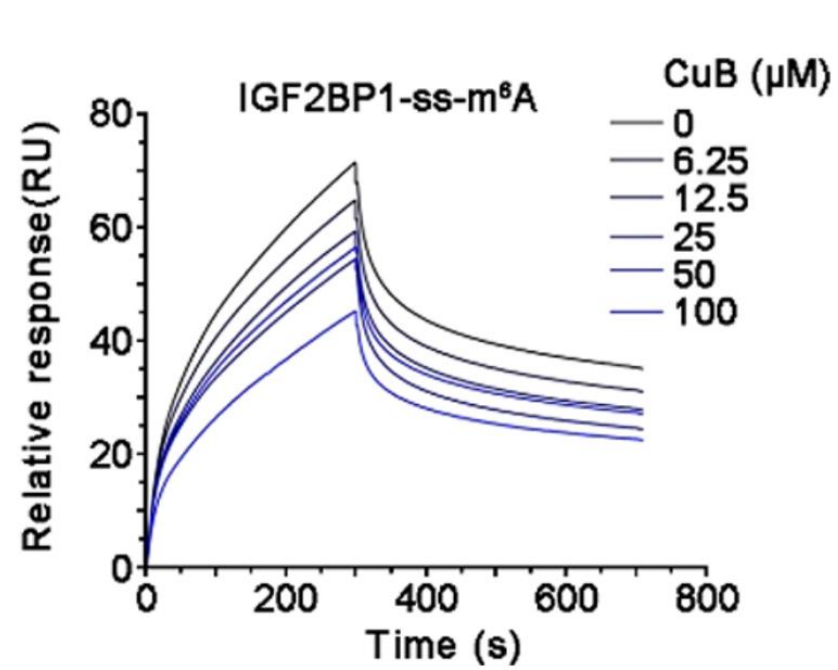
Biacore抑制剂筛选方法示意图

1. 固定RNA
2. 化合物固定浓度 (20uM) 与IGF2BP1预孵育
3. 检测与RNA的结合信号

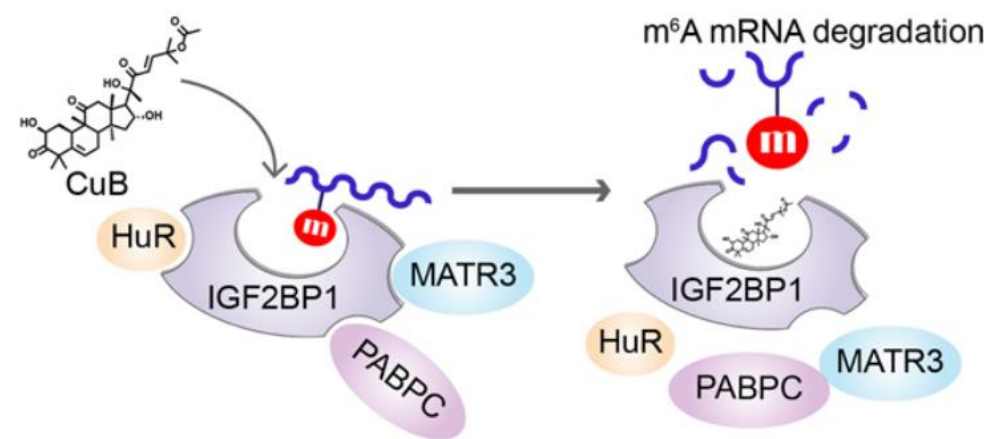


- 肿瘤免疫微环境调控因子IGF2BP1
- 筛选能抑制IGF2BP1与其m6A靶点的活性分子
- 葫芦素B (CuB) 具有最强的抑制效果

天然产物中抗肿瘤活性分子发现及作用机制阐释



Biacore阐释葫芦素B的作用机制

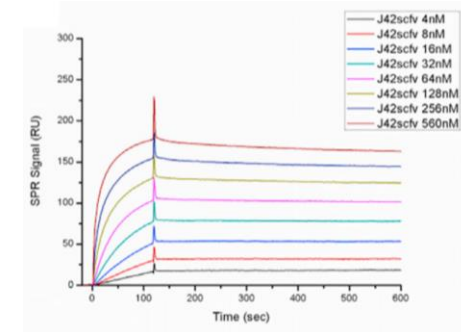
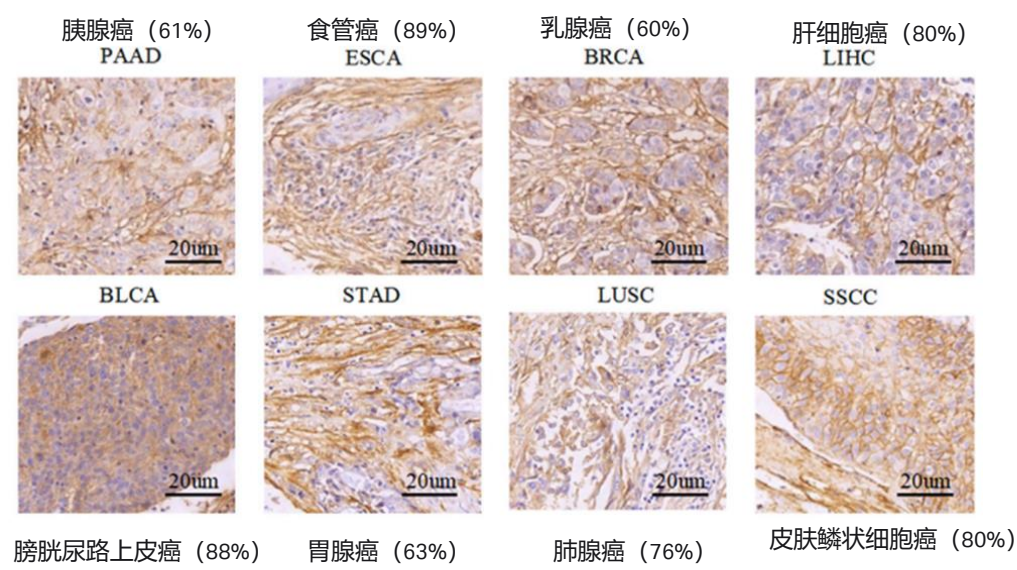


- 芯片表面固定m6A
- IGF2BP1与不同浓度的CuB预混后上样
- 随着葫芦素B的浓度逐渐提高，IGF2BP1与ss-m6A的结合信号越来越低

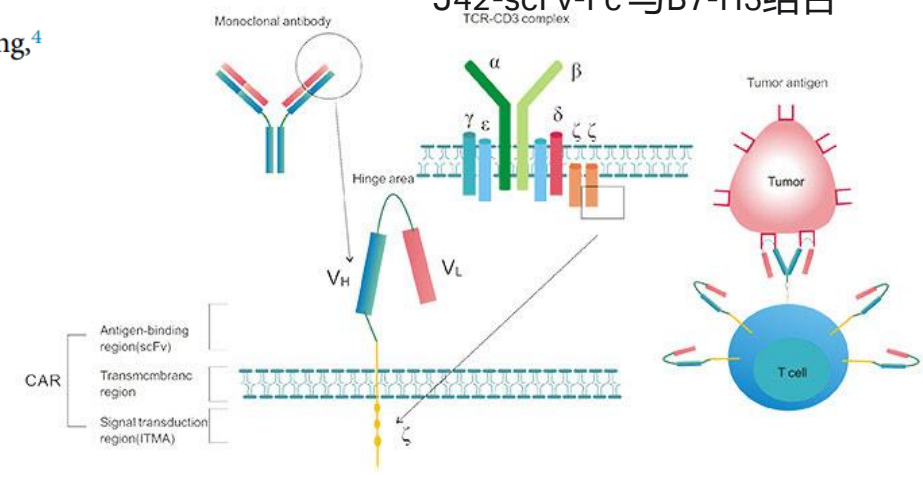
四川大学华西医院探究CAR-T实体瘤疗法

B7-H3-Targeted CAR-T Cells Exhibit Potent Antitumor Effects on Hematologic and Solid Tumors

Zongliang Zhang,^{1,5} Caiying Jiang,^{2,5} Zhiyong Liu,^{3,5} Meijia Yang,¹ Xin Tang,³ Yuelong Wang,³ Meijun Zheng,⁴ Jianhan Huang,³ Kunhong Zhong,¹ Shasha Zhao,¹ Mei Tang,¹ Tingyue Zhou,¹ Hui Yang,⁴ Gang Guo,¹ Liangxue Zhou,³ Jianguo Xu,³ and Aiping Tong¹



J42-scFv-Fc 与 B7-H3 结合

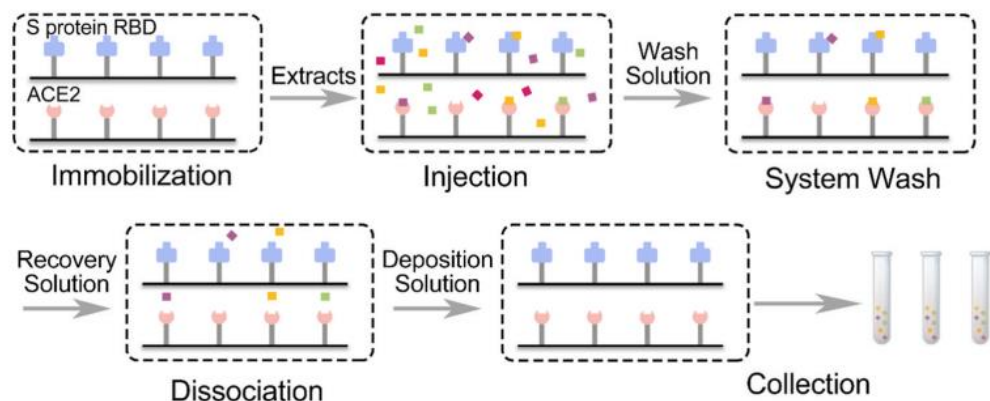


Antibody	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	K_D (pM)
mAb-J42	5.619×10^5	3.729×10^{-5}	66.36
J42-scFv-Fc	1.957×10^5	2.515×10^{-5}	128.5

Molecular therapy oncolytics vol. 17 180-189. 7 Apr. 2020

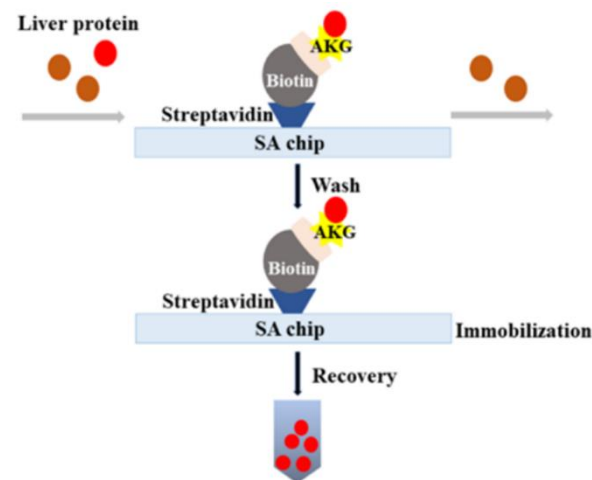
Biacore “垂钓” 助力复杂样品研究

第二军医大学，双靶点药物发现策略



1. 分别偶联S蛋白RBD和ACE2在不同通道
2. “垂钓” 中药提取物中的活性分子
3. 质谱鉴定
4. Biacore再次验证
5. 葛根中的葛根素对两个靶点均具有特异性亲和力

华南农业大学， α -酮戊二酸(AKG)降糖的新机制研究



1. AKG修饰生物素，偶联在SA芯片上
2. “垂钓” 肝脏提取总蛋白样品
3. 质谱鉴定得到P2RX4

Biacore助力基孔肯雅病毒入侵机制的破解

Please cite this article in press as: Song et al., Molecular Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope Protein, Cell (2019), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.008>

Article

Cell

Molecular Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope Protein

Hao Song,^{1,13} Zhennan Zhao,^{2,3,13} Yan Chai,^{2,13} Xiyue Jin,^{2,4} Changyao Li,⁵ Fei Yuan,² Sheng Liu,^{2,4} Zhengrong Gao,⁶ Haiyuan Wang,⁷ Jian Song,² Leonardo Vazquez,^{2,8} Yanfang Zhang,^{2,3} Shuguang Tan,² Carlos M. Morel,⁸ Jinghua Yan,² Yi Shi,^{2,3,9} Jianxun Qi,^{2,3} Feng Gao,^{10,11,*} and George F. Gao^{1,2,3,4,9,10,12,14,*}

Please cite this article in press as: Basore et al., Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor, Cell (2019), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.006>

Article

Cell

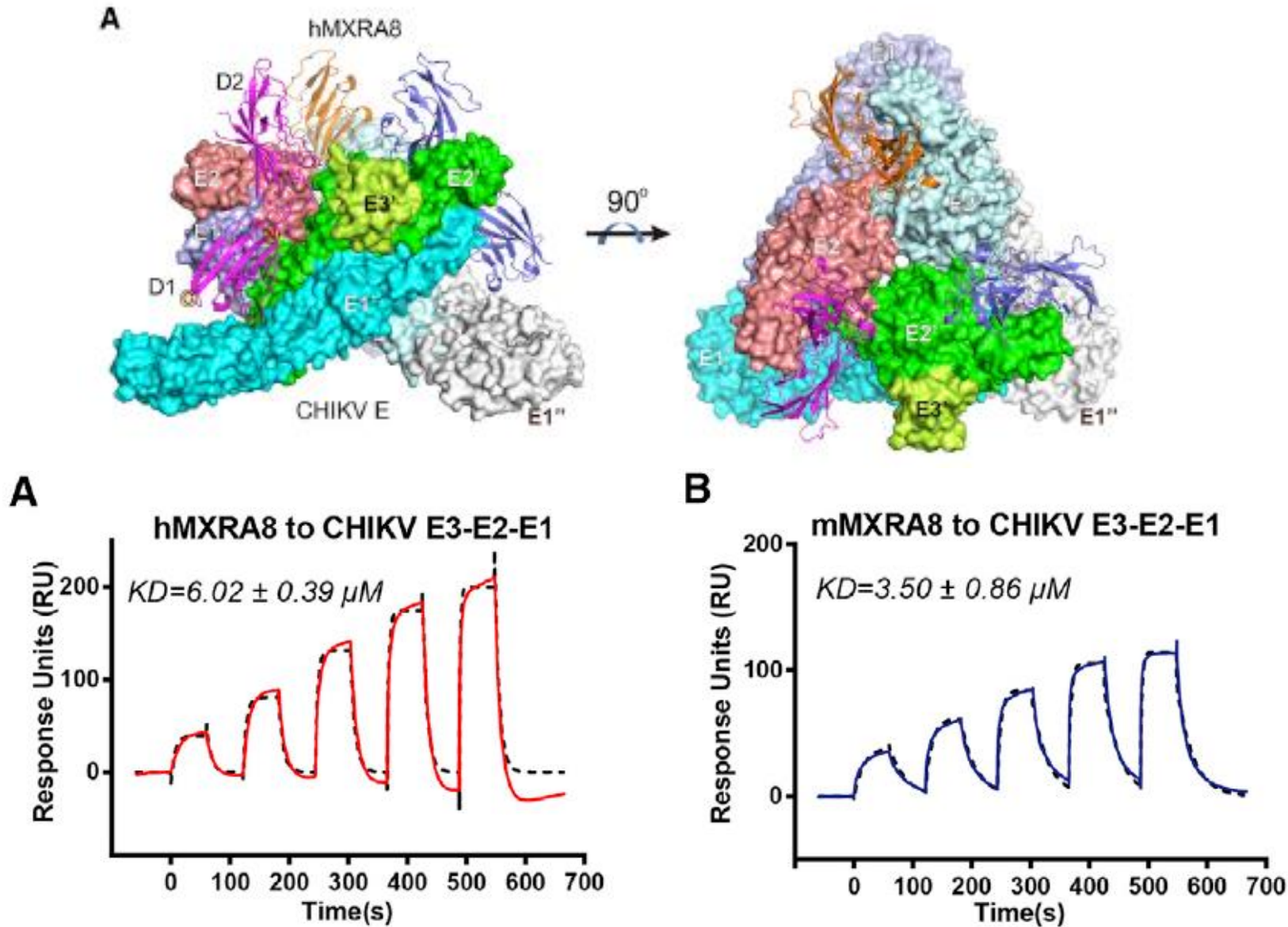
Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor

Katherine Basore,¹ Arthur S. Kim,^{1,2} Christopher A. Nelson,¹ Rong Zhang,² Brittany K. Smith,¹ Carla Uranga,⁶ Lo Vang,⁶ Ming Cheng,³ Michael L. Gross,³ Jonathan Smith,⁶ Michael S. Diamond,^{1,2,4,*} and Daved H. Fremont^{1,4,5,7,*}

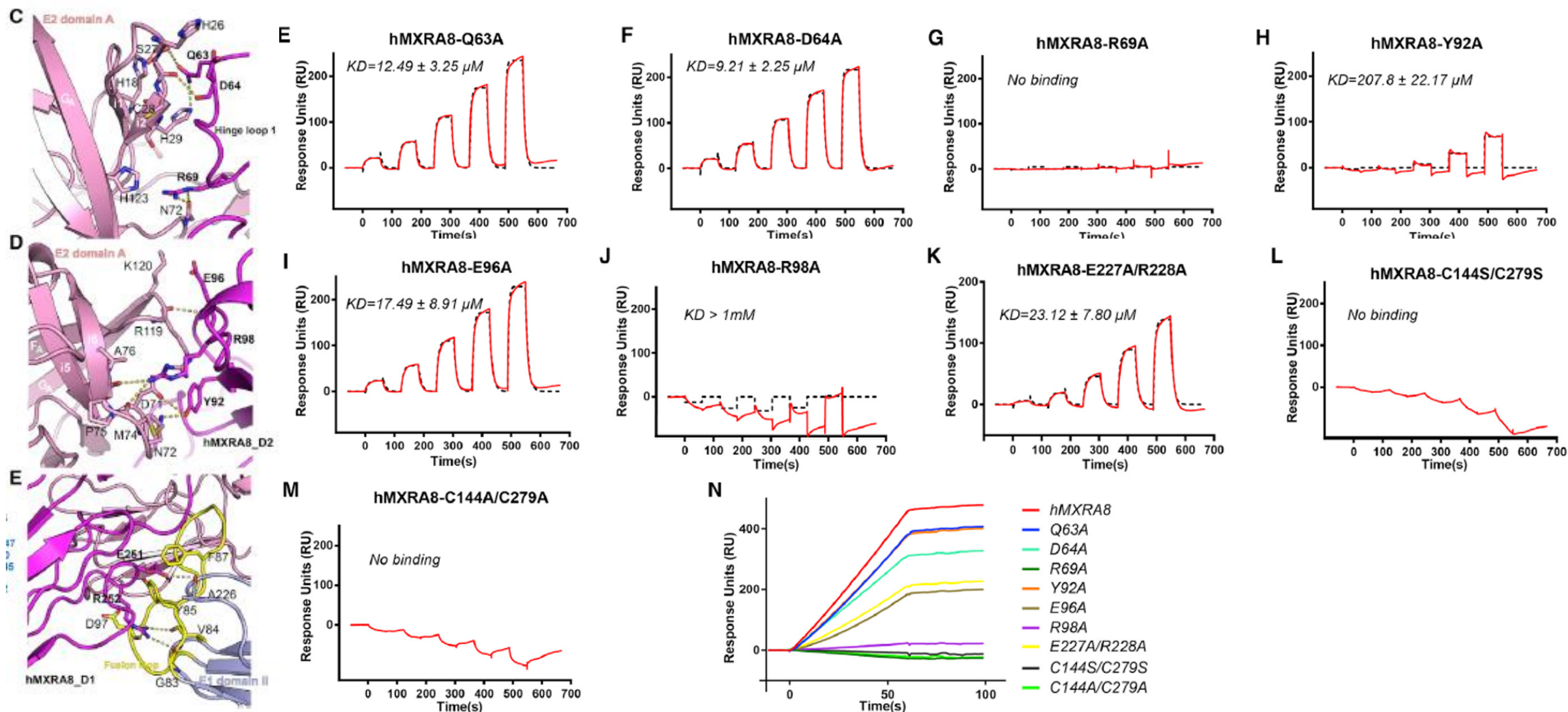
Cytiva

华盛顿大学医学院
Daved H. Fremont和
Michael S. Diamond团队

基孔肯雅病毒E蛋白与MXRA8受体结合



Biacore 验证MXRA8上与基孔肯雅病毒E蛋白结合的关键氨基酸





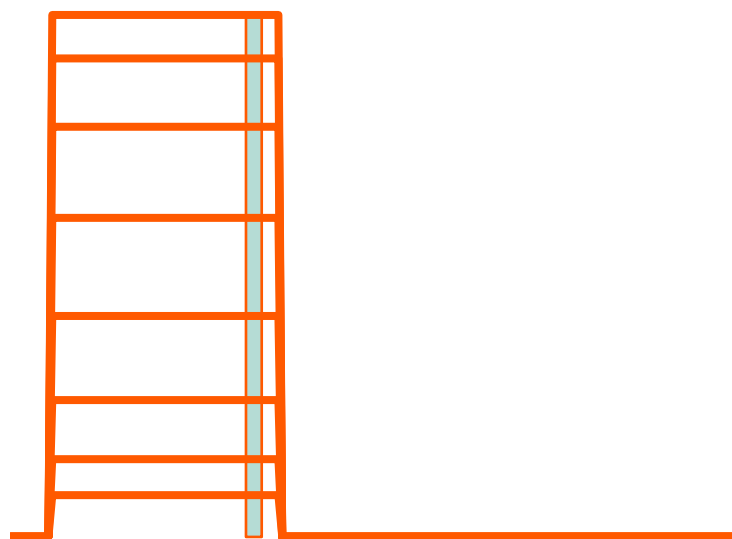
结果分析

选用什么方法？

只用稳态分析

所有浓度均达到稳态；

“快上快下” 无动力学信息；

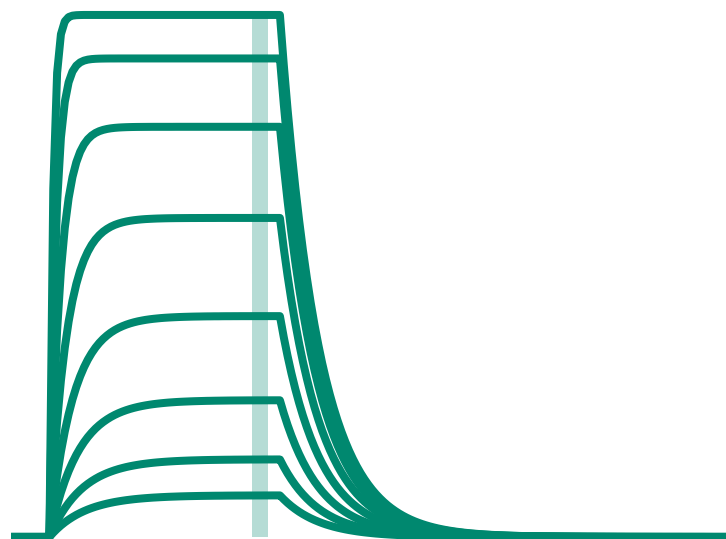


Affinity

稳态+动力学

所有浓度均达到稳态；

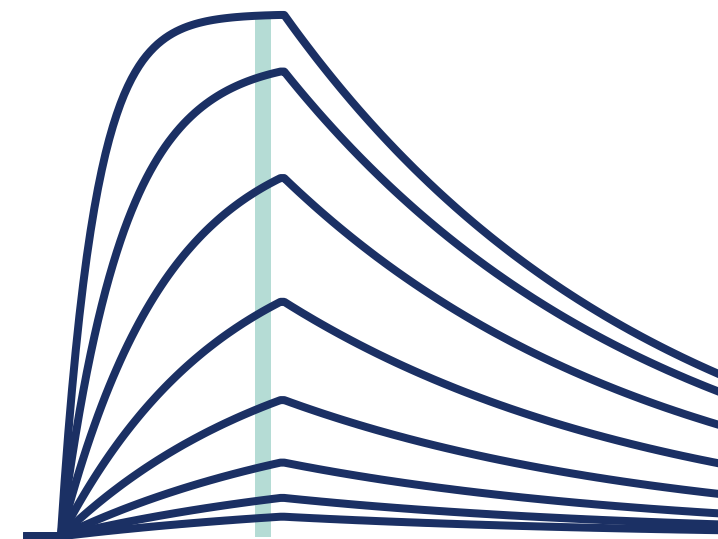
有结合和解离过程的动力学信息；



Both

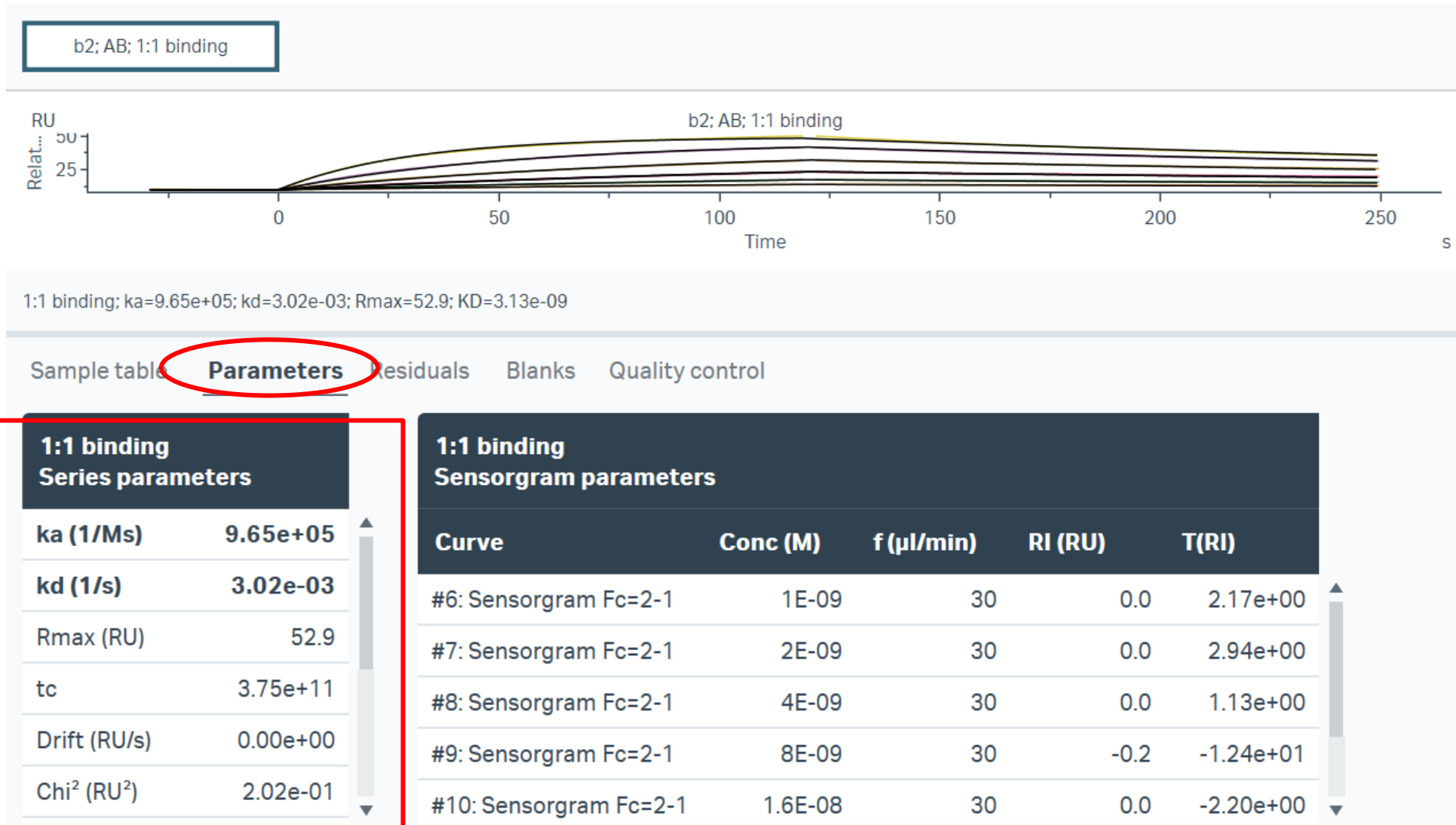
只用动力学

并非所有浓度都达到稳态



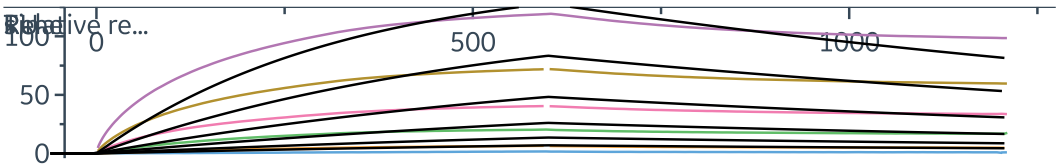
Kinetics

结果分析与可靠性

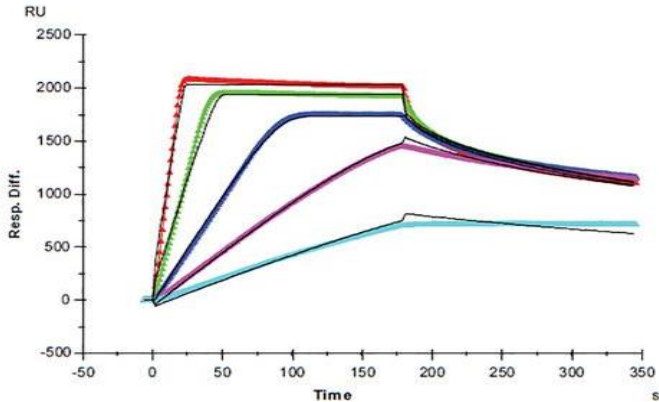


怎么样的统计学参数是好的参数？

参数	可接受的数值范围
Chi ²	拟合曲线与实际曲线的贴合度，Chi ² < 1/10R _{max}
Standard error(SE)	参数标准差，< 1 % 说明了数据的高可信度
T-value	T-value = 拟合值 / SE，> 100 说明数据高可信度
U-value	评估数据的唯一性，< 15
t _c	物质迁移系数，范围在10 ⁶ – 10 ²⁰ ，> 100倍 K _a 说明该数据不受物质迁移限制影响



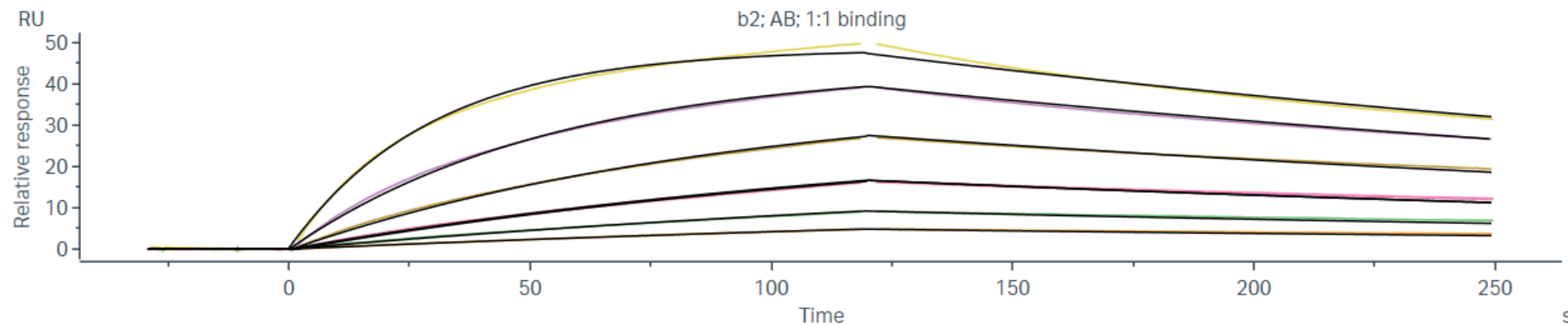
拟合曲线与实际曲线不够贴合



传质效应

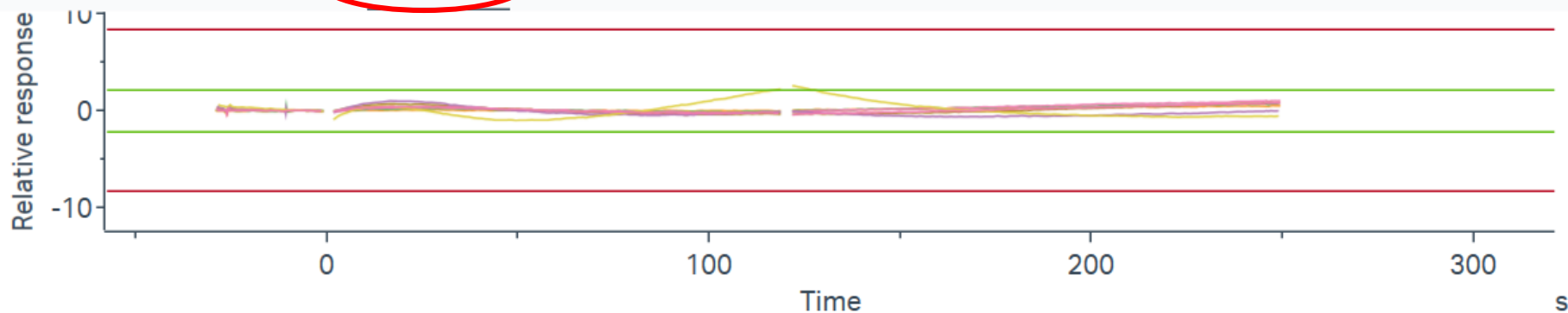
结果分析与可靠性

b2; AB; 1:1 binding



1:1 binding; $k_a=9.65e+05$; $k_d=3.02e-03$; $R_{max}=52.9$; $KD=3.13e-09$

Sample table Parameters **Residuals** Blanks Quality control

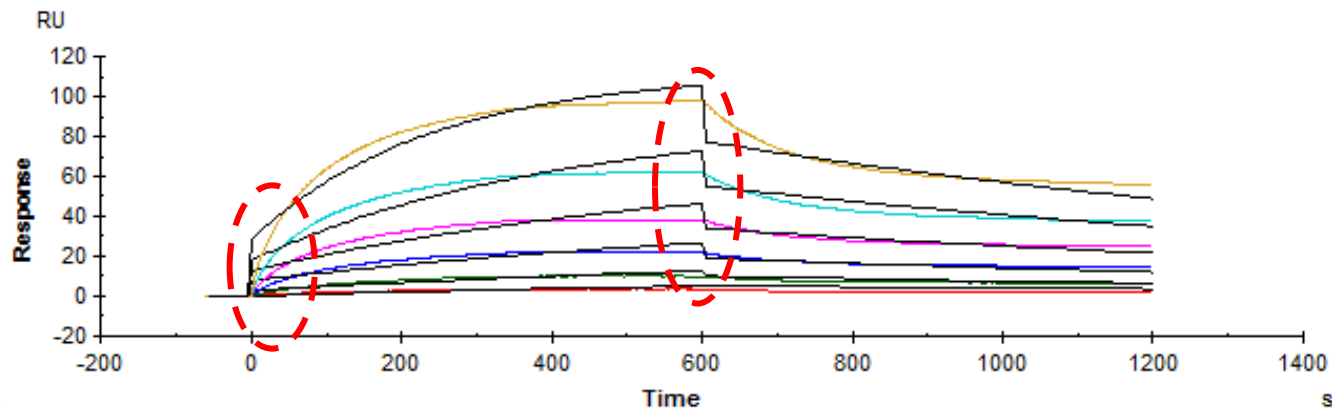


残差：实际结果相对于拟合结果的离散程度(χ^2)

结果分析与可靠性



b2; AB; 1:1 binding



1:1 binding; $k_a=9.58e+05$; $k_d=3.04e-03$; $R_{max}=53.1$; $KD=3.17e-09$

Sample table Parameters Residuals Blanks **Quality control**

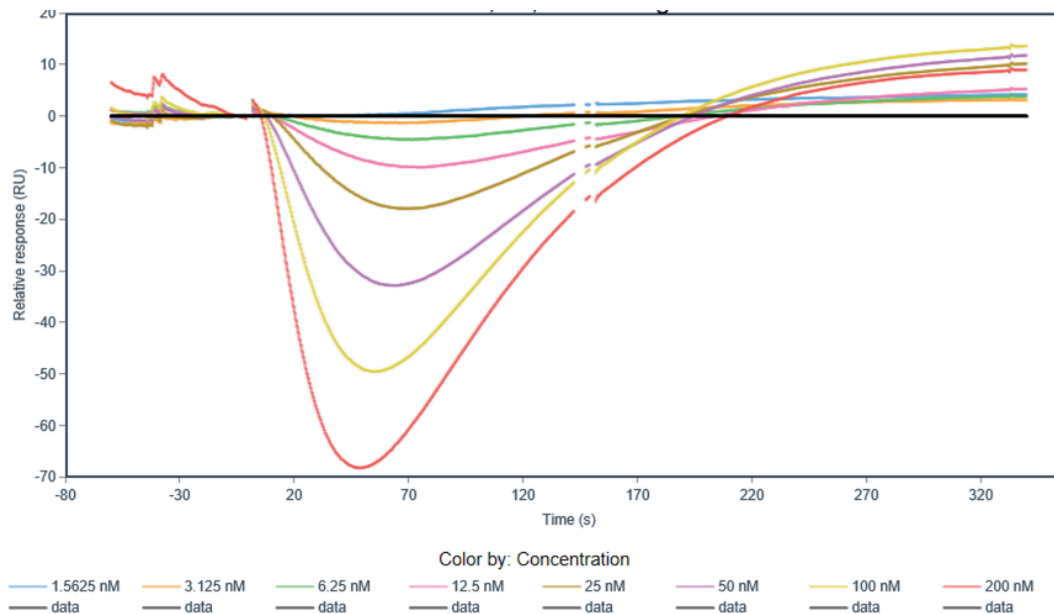
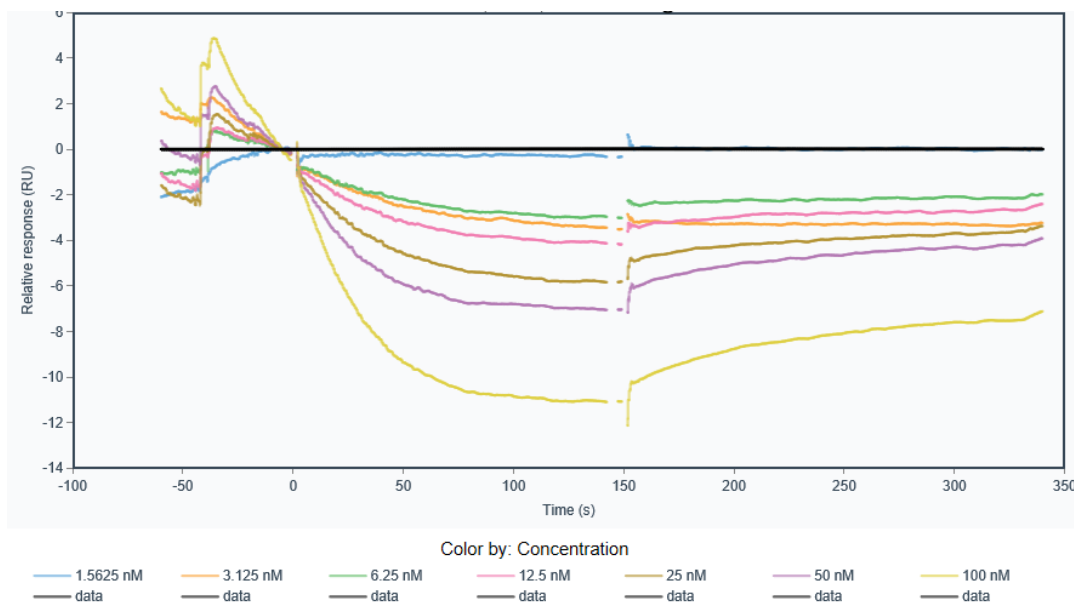
- ✓ Kinetic constants are within instrument specifications.
- ✓ Kinetic constants appear to be uniquely determined.
- i Bulk contributions (RI) were not evaluated. The RI parameter is set to constant.
- i Check that sensorgrams have sufficient curvature.
- i Examine the residual plot. Pay attention to systematic and non-random deviations.

检测范围 K_a : $1e^3-1e^9$, K_d : $1e^{-1}-1e^{-6}$

t_c , U-value, 降低分析物量或增加流速

样品缓冲液体系差异, RI fit local

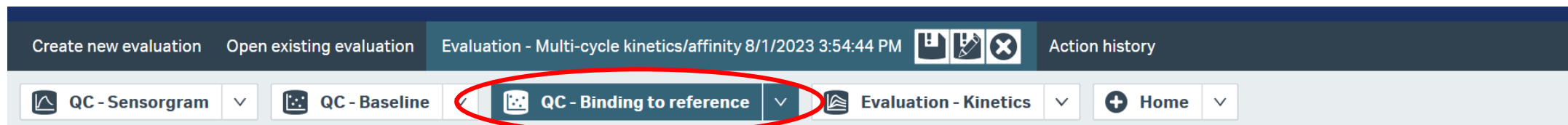
拟合曲线负值



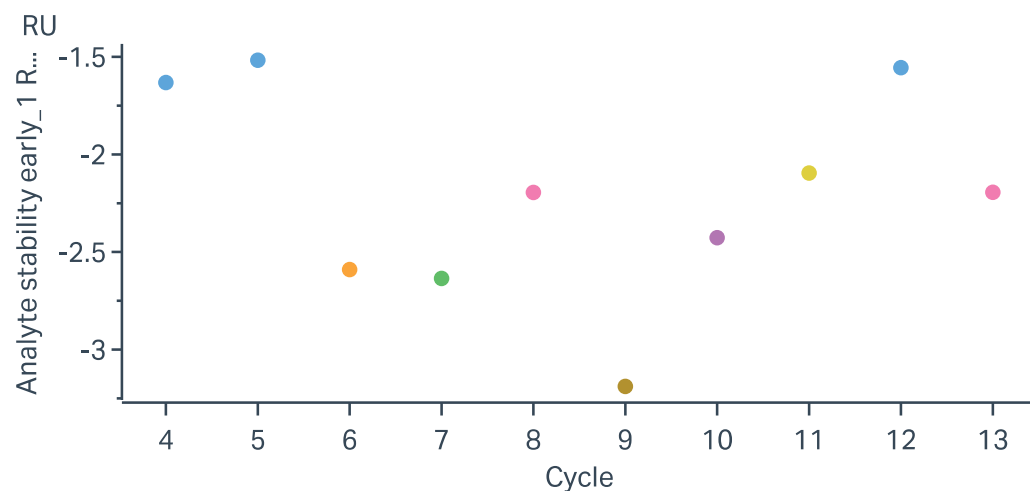
响应值随着样品浓度的增加变的更负，有浓度依赖性，证明有结合，这个结果可以翻转过来吗？

Really? ? ?

拟合曲线负值——非特异性吸附



Binding to reference



有非特异性吸附:

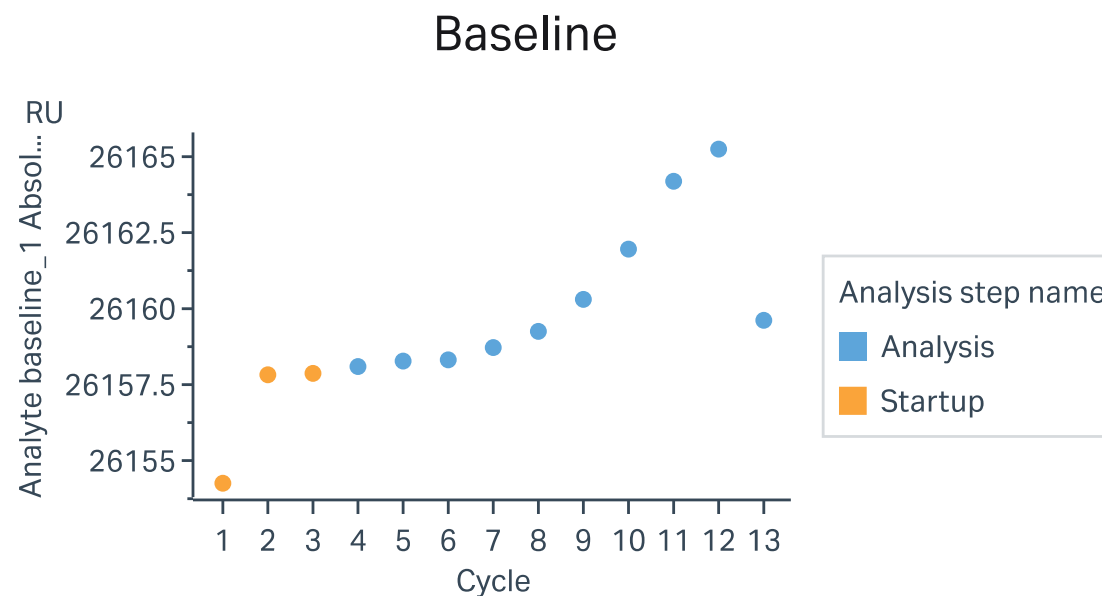
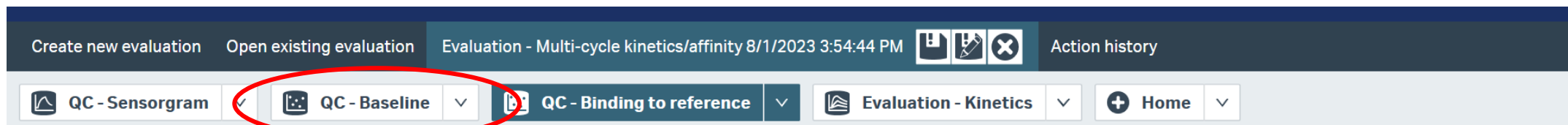
- Binding to reference > 20% Binding level
- 呈现浓度依赖
- 参比通道上完样Stability不接近于0
- Fc 2-1再生回不到基线

拟合曲线负值——非特异性吸附

解决方案:

- 改变芯片表面或者分析物的性质
 - (1) 调换配体与分析物的位置
 - (2) 改变参比通道的处理方法: 不作任何处理 / 进行活化与封闭
 - (3) 提高分析物的纯度
 - **改变缓冲液条件抑制吸附的发生**
 - (1) 在原运行缓冲液中额外添加盐 (至~300 mM甚至500 mM) , 更换buffer体系**
 - (2) 添加表面活性剂 (0.05% P20)**
 - 调整分析物的浓度范围
- 将非特异性吸附的信号控制在相对不显著的范围之内进行实验

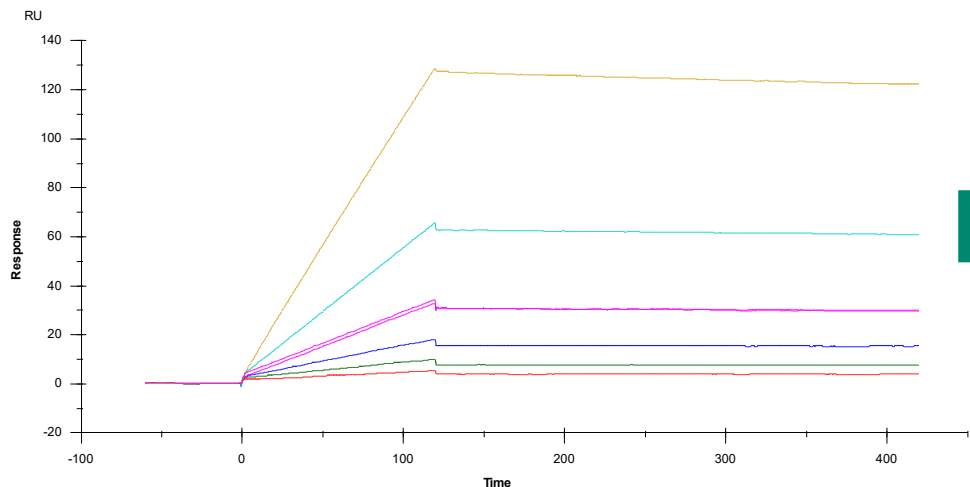
基线的稳定性



捕获水平差异/再生不好, **Rmax : Fit Local**, 调整再生条件

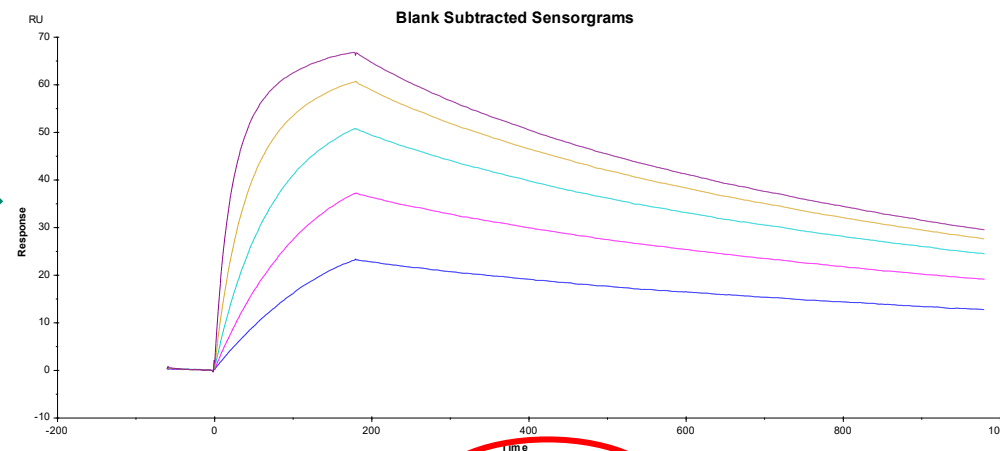
难解离互作

高亲和力互作 K_D 达到 $10^{-10} \sim 10^{-12}$, Eg: 抗原—抗体、VLP—抗体、小分子共价结合.....



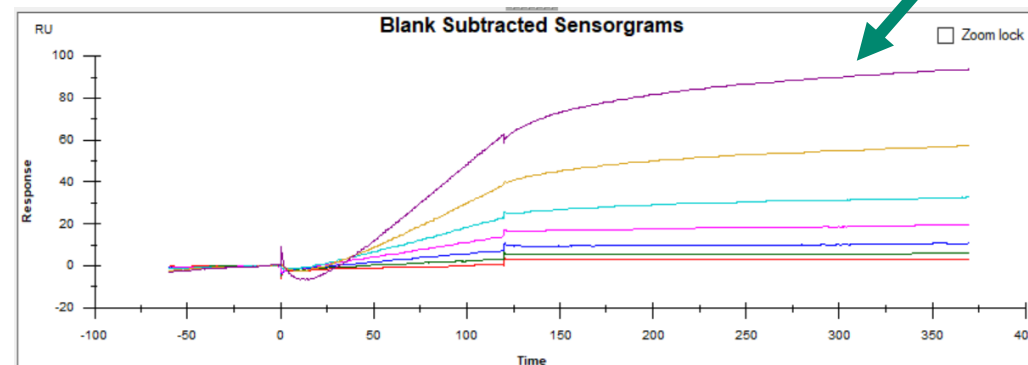
$R_{\max} = 6364 \text{ RU}$, $K_D = 62 \text{ pM}$

降低偶联量



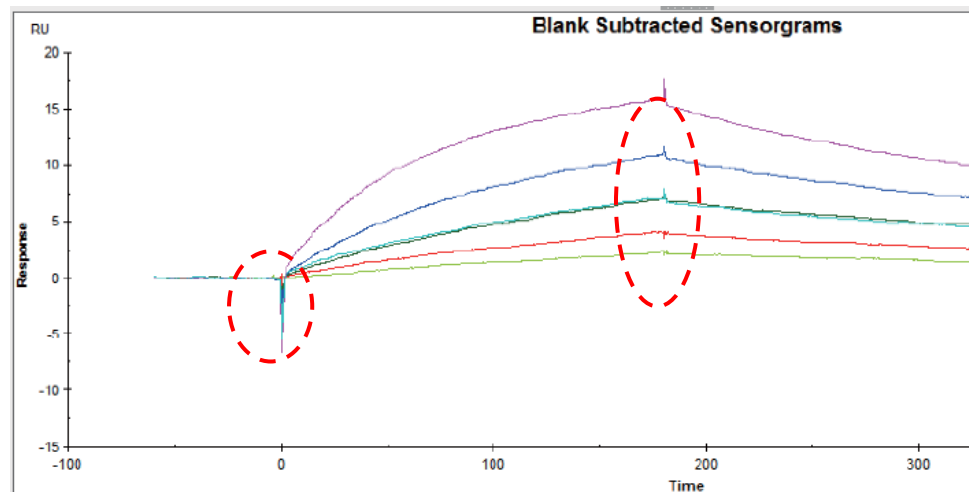
$R_{\max} = 75 \text{ RU}$, $K_D = 3 \text{ nM}$

- 降低分析物浓度, 延长解离时间
- 降低偶联量, $R_{\max} < 30 \text{ RU}$
- 选择合适的再生条件 (酸、碱、高盐、变性剂)
- 换单循环

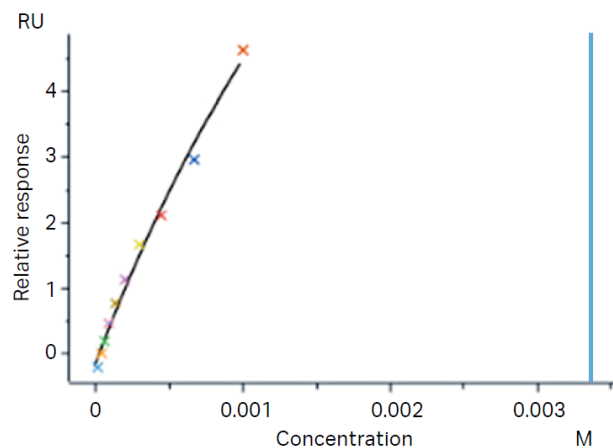


分析物解离速率 < 配体脱落速率

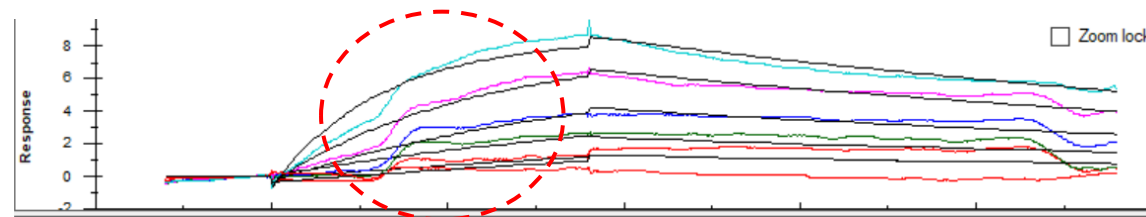
一些结果图



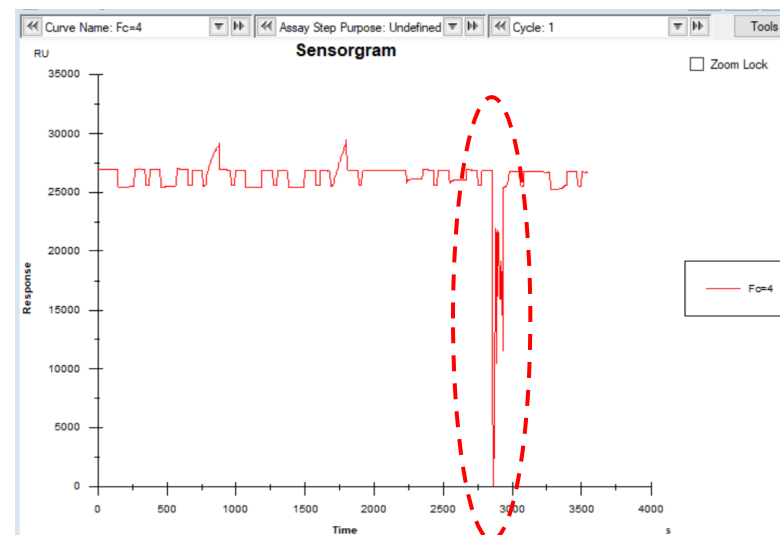
样品和运行缓冲体系差异大，Remove掉



浓度未饱和

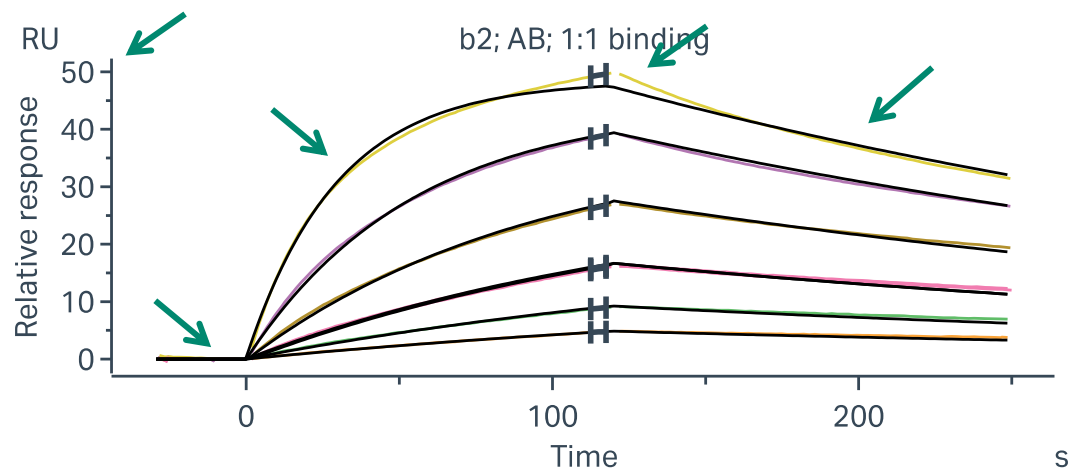


样品溶解度，有聚集

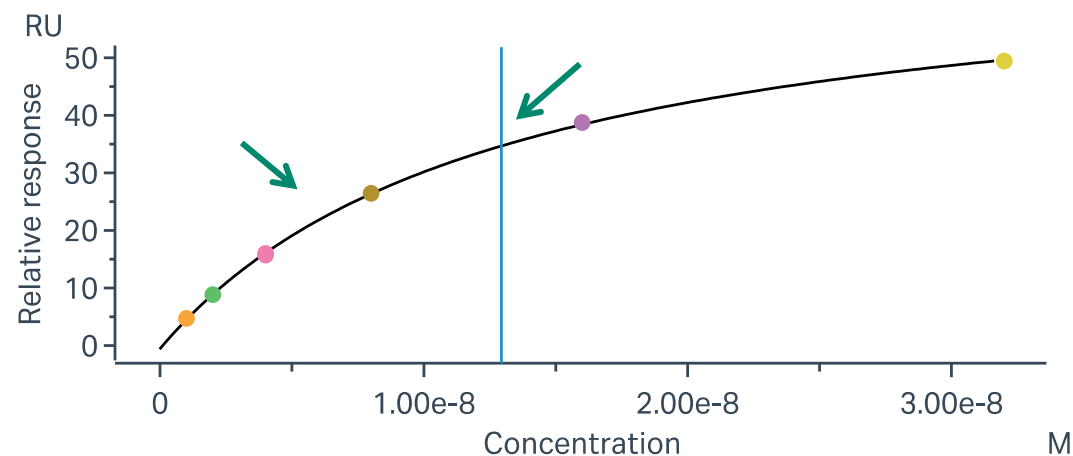


流路进空气，Prime

Kinetics



Affinity



基线稳定、浓度设置合理（浓度依赖性）、有饱和趋势、无Bulk、有明显解离、拟合良好、各项参数合理

Biacore 学习资源

Biacore 微站



Biacore视频

实验方法下载

应用程序指南

easy biacore 操作视频

纸质档SOP

线上产品课程

线上应用课程

线上专题课程

在Biacore™ X100中
编辑一个带溶剂校正的小分子亲和力实验

在Biacore X100中编辑一个带
溶剂校正的小分子亲和力实
验

cytiva
Biacore 助力中医药
现代化研究

Biacore助力中医药现代化研
究

cytiva
Biacore分子互作技术
理论基础与实验设计

Biacore分子互作技术理论基
础与实验设计

cytiva
加速你的
蛋白研究
解析在表观遗传学研究中的应用
6月26日 14:00-15:00

生物分子相互作用在结构生
物学中的应用：Biacore分子
互作系统在结构生物学研究...

<https://learning.cytivalifesciences.com.cn/biacore/>



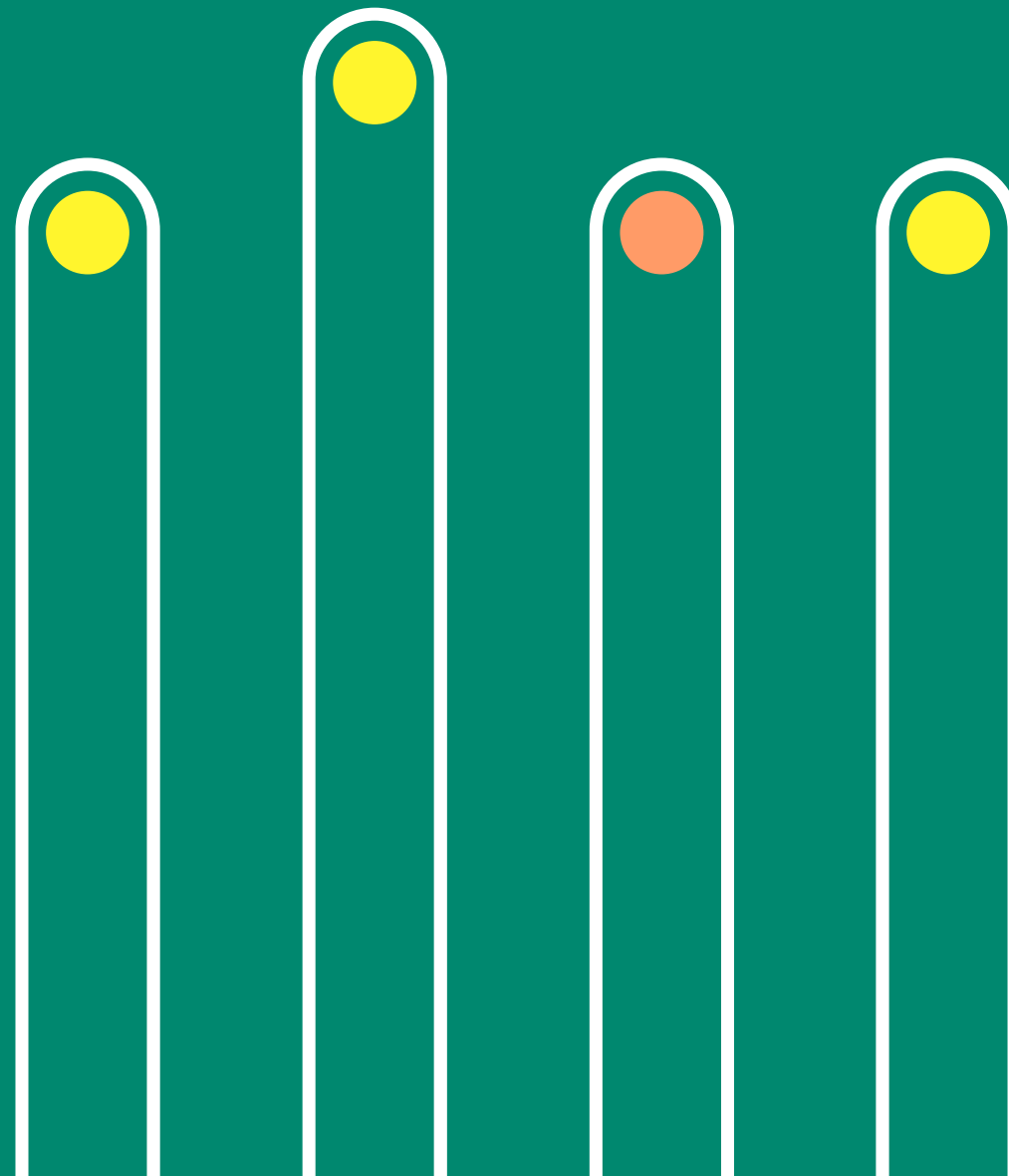
**Biacore,
For a better life**





数据分析

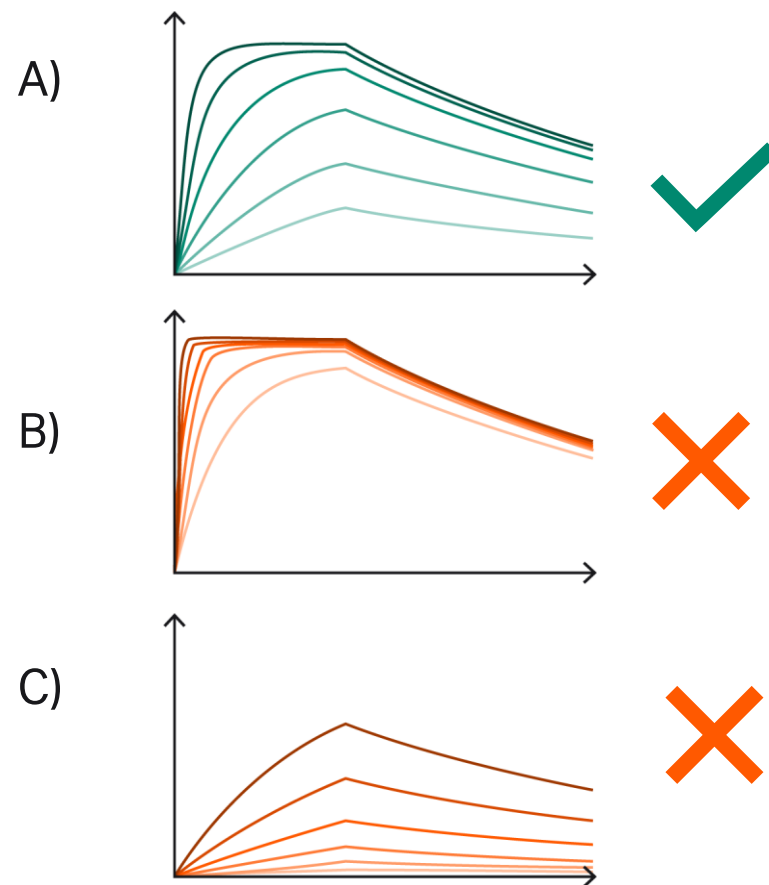
蛋白/CM5 芯片/动力学表征为例



重要的实验参数

分析物浓度范围

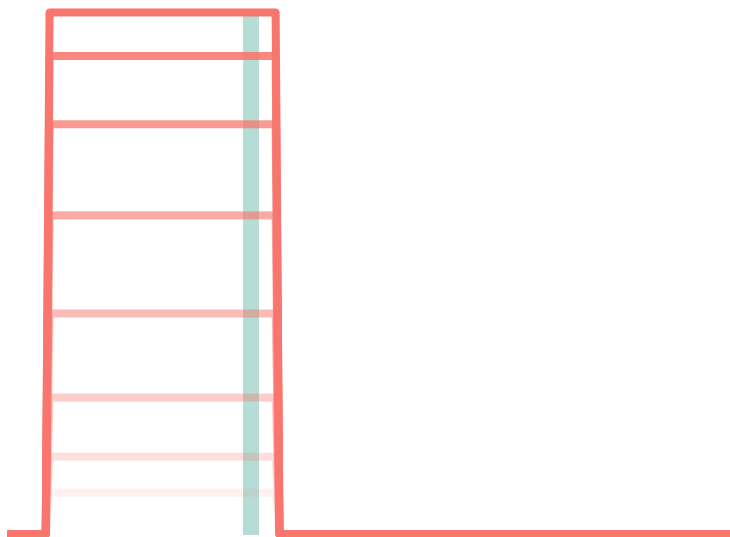
- 浓度应覆盖所有饱和度范围的结合曲线, 如顶部传感器图所示, 如图A
- 动力学分析, 建议的浓度范围是 $0.1-10 \times K_D$
- 稳态法分析, 建议的最大浓度值为 $2 \times K_D$
- 理想情况下, 最高浓度应该接近稳定状态的结合
- 至少5个浓度梯度
- 至少包括一个浓度梯度的重复
- 应该包括0浓度, 作为空白对照



亲和力、动力学分析

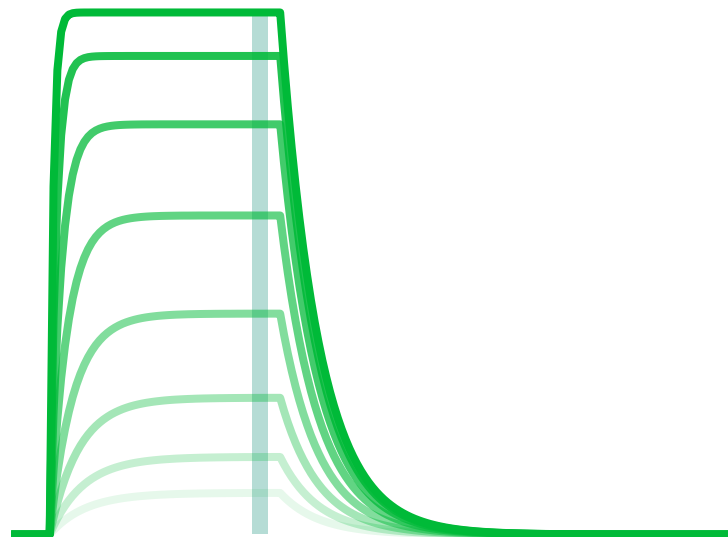
仅稳态

快速结合、无动力学信息；
所有浓度均处于稳态；



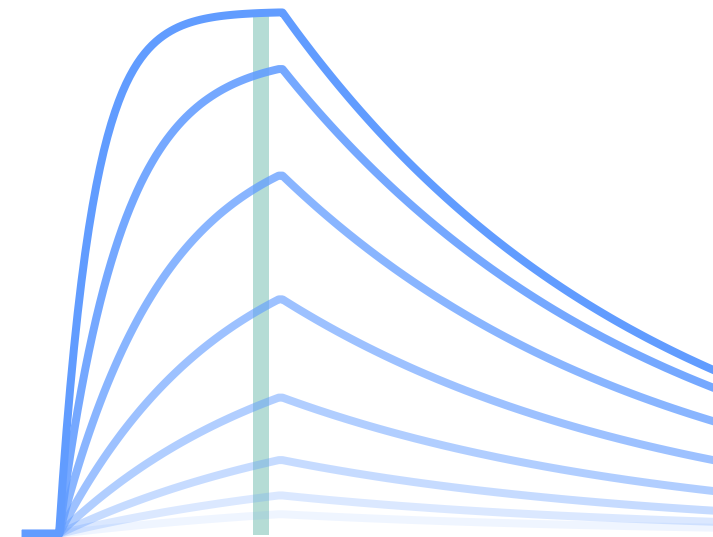
稳态和动力学并存

所有浓度均处于稳态；
具有动力学信息；



仅动力学

所有浓度均未达到稳态；



五步评估拟合结果



1. 特异性结合(针对实验通道而言)

2. 剂量依赖现象，观察到相对应的结合信号

3. 拟合曲线与实验曲线吻合：Chi²、residual plot

4. 生物学和实验相关的拟合参数

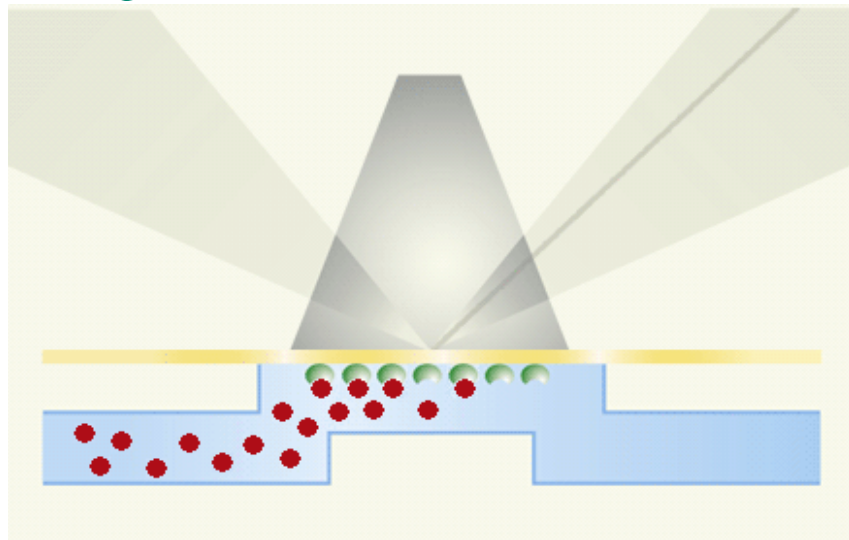
5. 良好的统计参数：T-value、U-value、SE

= 对数据保持信心

什么是好的统计学参数？

参数	可接受的数值范围
Chi ²	与结合信号关联来进行评估。 对应信号值来看，Chi ² 值较低是较好的拟合结果
Standard error	参数标准差< 1 % 说明了数据的高可信度
T-value	> 100 说明数据高可信度
U-value	< 15 = 不会被明显关联，数据可信 > 25 = 数据完全是互相关联的，数据不可信
t _c	如果t _c 值比k _a 高100倍，说明该数据不受物质迁移限制影响

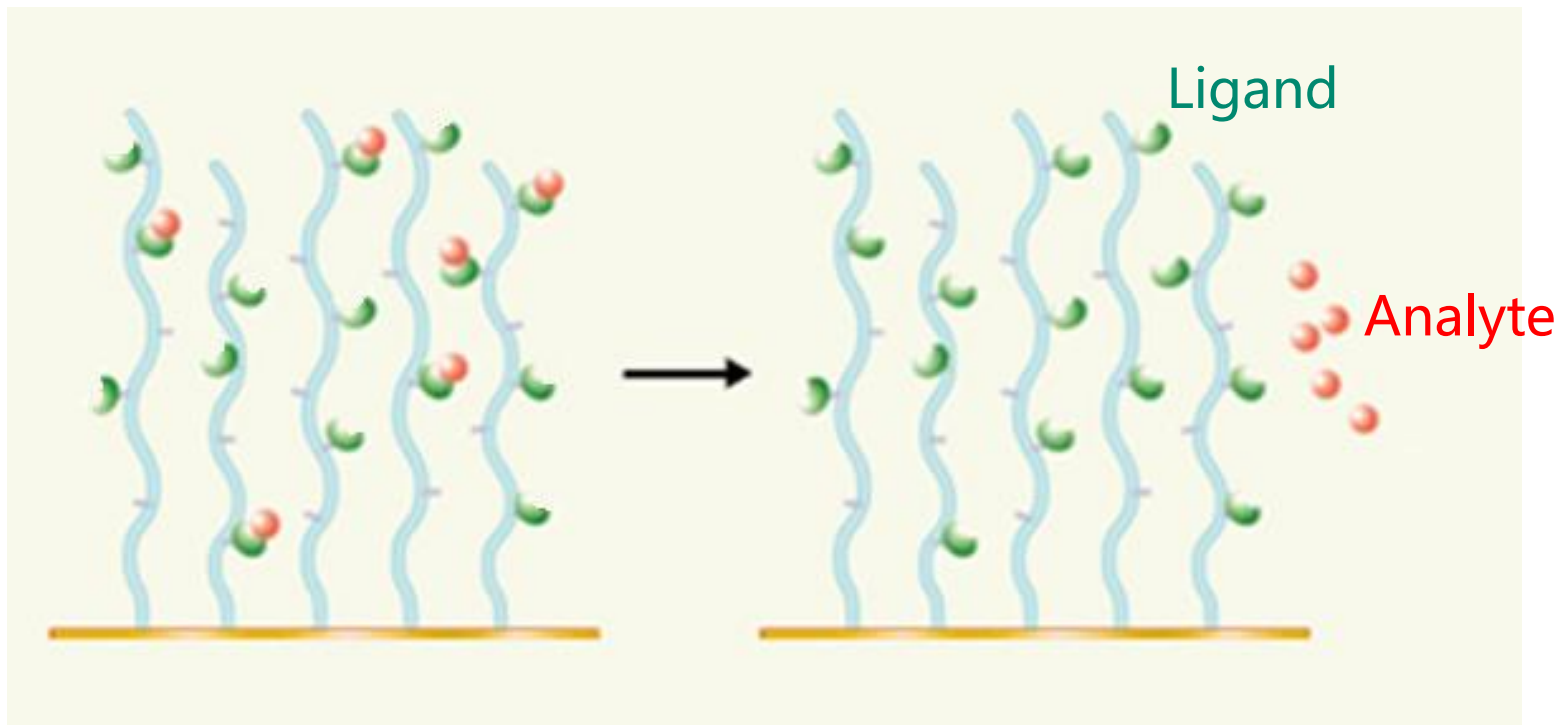
分析物检测 (Injection)



- 分析物 (Analyte)进样后，以恒定的流速和浓度流过芯片表面
- 样品中的待分析物与固定在芯片表面上的配体发生结合，芯片表面物质的**质量**发生改变，仪器记录下对应的响应值 (response) 的改变
- 进样结束后，切换缓冲液流过芯片表面，分析物由配体上**自发**解离解离的进程由响应值实时监控

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！

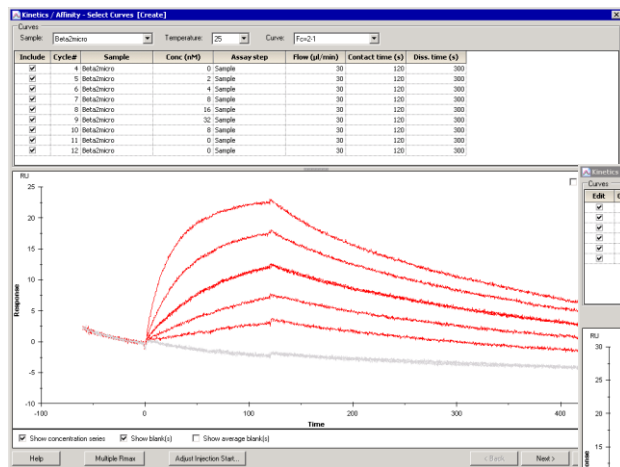




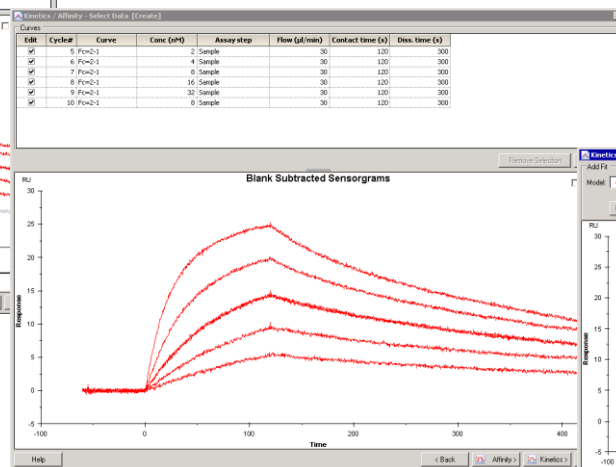
实验设计和程序化进样

-----以抗体-抗原/CM5芯片/亲和力动力学为例

动力学分析的数据拟合

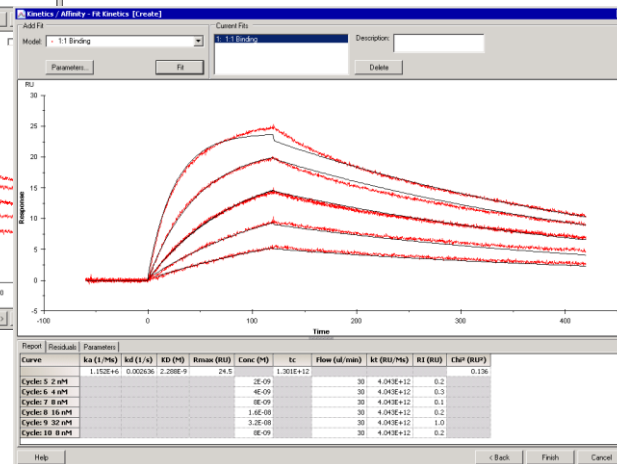


✓ 选择浓度范围和结合曲线



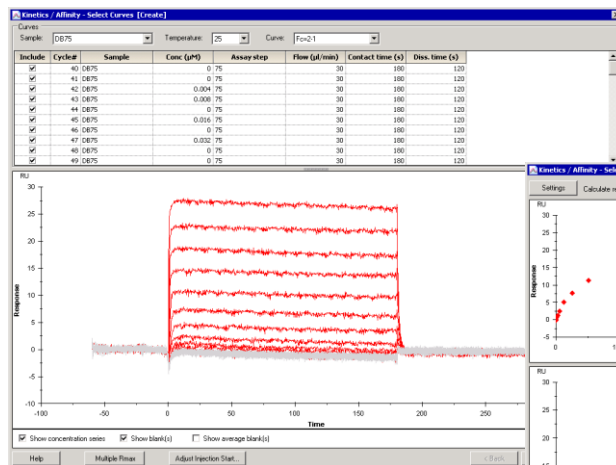
✓ 扣除零浓度

✓ Double Reference

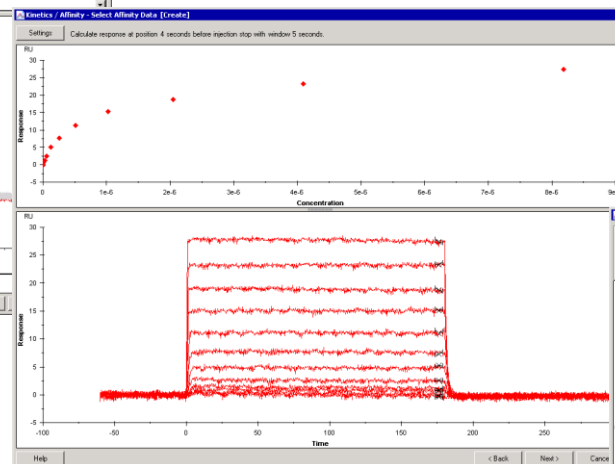


✓ 通过拟合所有曲线，获得动力学 k_a 、 k_d 和亲和力 K_D 。 $K_D = k_d / k_a$ 。

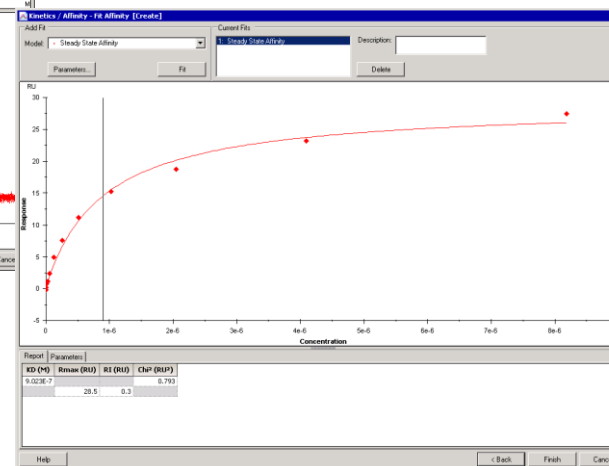
稳态分析的数据拟合



✓ 选择浓度梯度和曲线

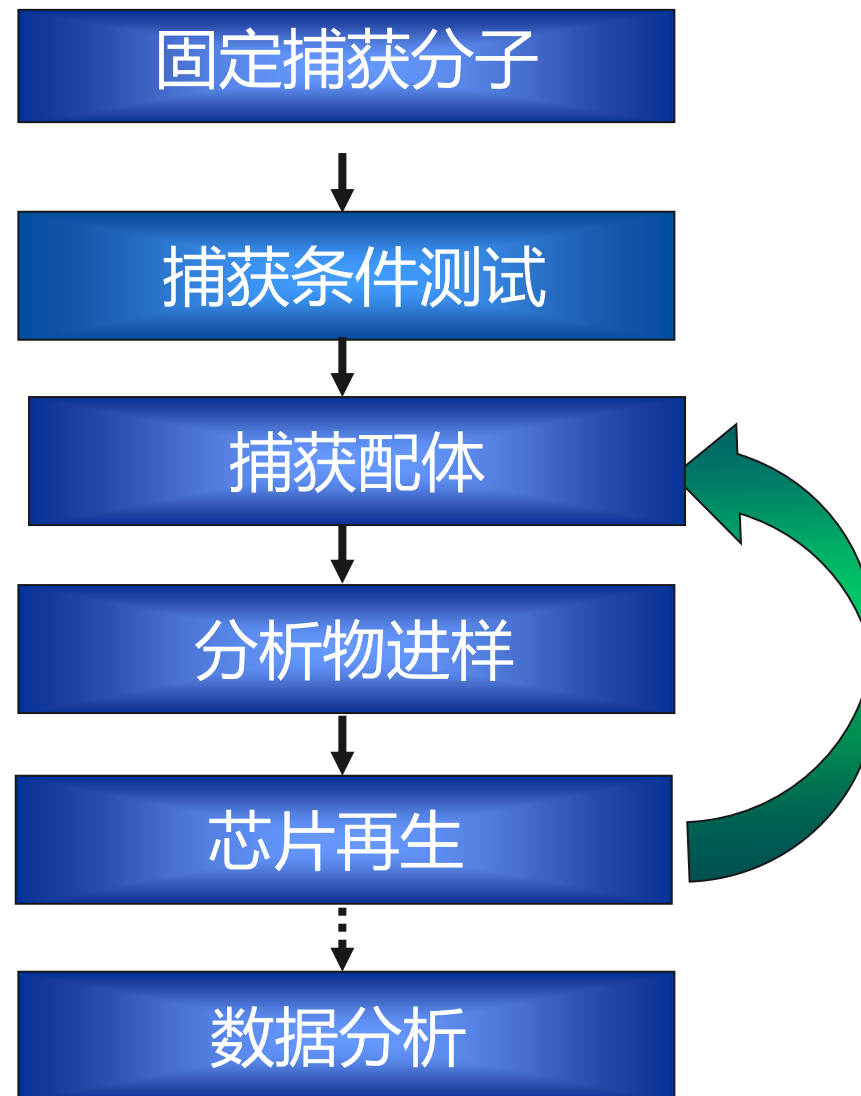
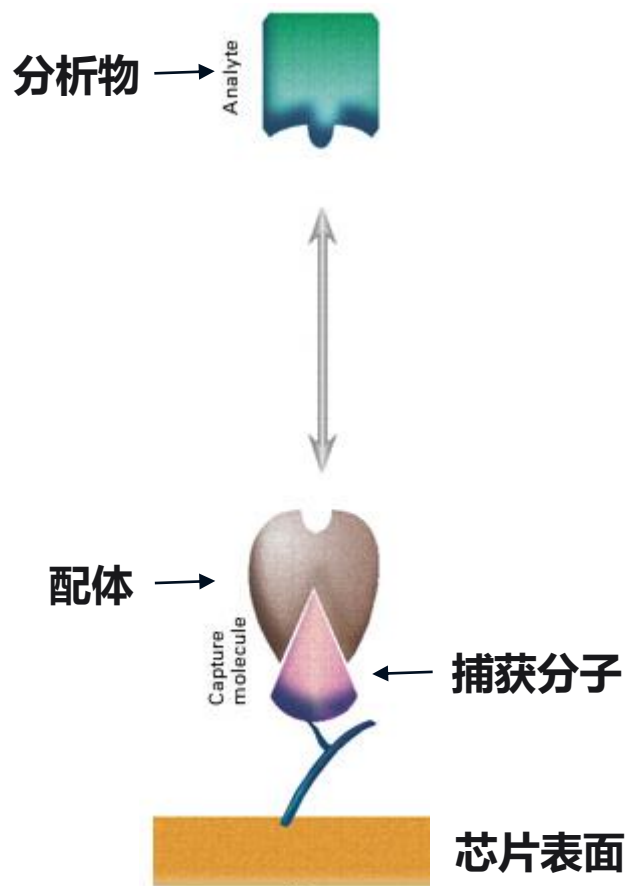


✓ 获得稳态时的响应值。



✓ 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 。

Biacore捕获方法的基本流程



Biacore 捕获方法的解决方案

捕获芯片

- **Protein A/G/L**: 所有哺乳类动物抗体
- **CAP 芯片**: 生物素标记的分子
- **NTA 芯片**: His标签融合蛋白

捕获试剂盒——共价偶联芯片改造为捕获芯片

- **GST 捕获试剂盒**: 制备捕获GST标签融合蛋白的芯片
- **His 捕获试剂盒**: 制备捕获His标签融合蛋白的芯片
- **鼠抗 捕获试剂盒**: 制备捕获鼠源抗体IgG、IgA和IgM的芯片
- **人抗 捕获试剂盒**: 制备捕获人源抗体IgG-Fc的芯片
- **人Fab 捕获试剂盒**: 制备捕获人抗Fab片段的芯片

确定捕获量

- 为了获得更接近真实的动力学参数，需要将偶联水平控制在较低水平
- 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，**实际偶联量 = 1.5 R_L**
- $R_{\max}$ 描述了芯片表面的最大结合容量，对于动力学 **$R_{\max} \leq 100$ RU**
- S_m = 化学计量比 (Analyte:Ligand, 未知时选择 $S_m = 1$)

优化的再生条件

捕获类型	再生条件
His捕获	Glycine-HCl, 10mM, pH 1.5 Flow rate-5~30µl/min; Contact time-60s
GST捕获	Glycine-HCl pH 2.0 Contact time-60s
鼠抗捕获	Glycine-HCl, 10mM, pH 1.7 Flow rate-20µl/min; Contact time-180s
人抗捕获	3 M MgCl ₂ Flow rate-20µl/min; Contact time-30s
NTA芯片	350 mM EDTA Flow rate-30µl/min; Contact time-60s
Biotin CAP芯片	6 M guanidine-HCl, 250 mM NaOH Flow rate-5~30 µL/min; Contact time-30s

课程小结

配体偶联

- 最适pH的选择（预富集）
- 偶联水平的确定

进样测试

- 参比通道的设置
- 结合和解离时间，预估 K_D

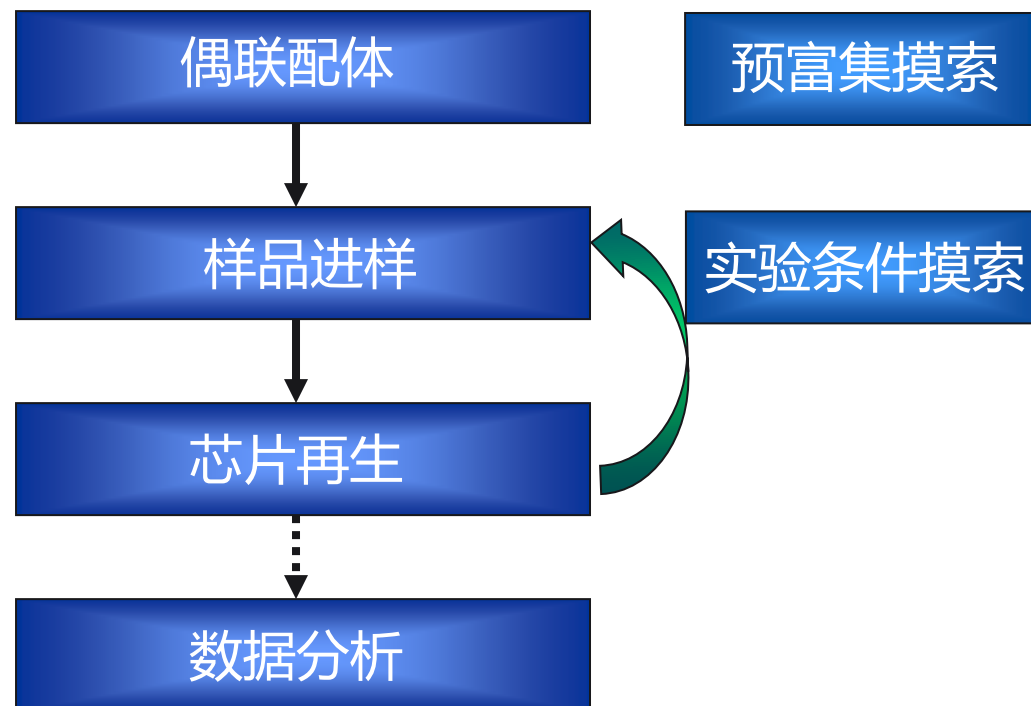
再生条件的选择（重要）

- 彻底洗净、保持活性

实验设计

- 动力学
- 稳态分析

捕获法





-----以蛋白-小分子/CM5芯片/动力学为例

小分子特点

分子量小 (< 1000 Da)

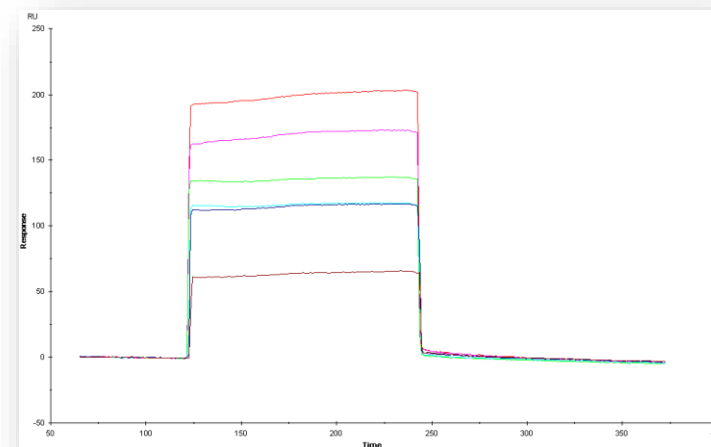
- 响应值极低
- 理论Rmax值极低
- 需要更高的偶联水平
- 需要高灵敏度的检测设备和
技术

结合能力弱 亲和力为 μM ~ mM

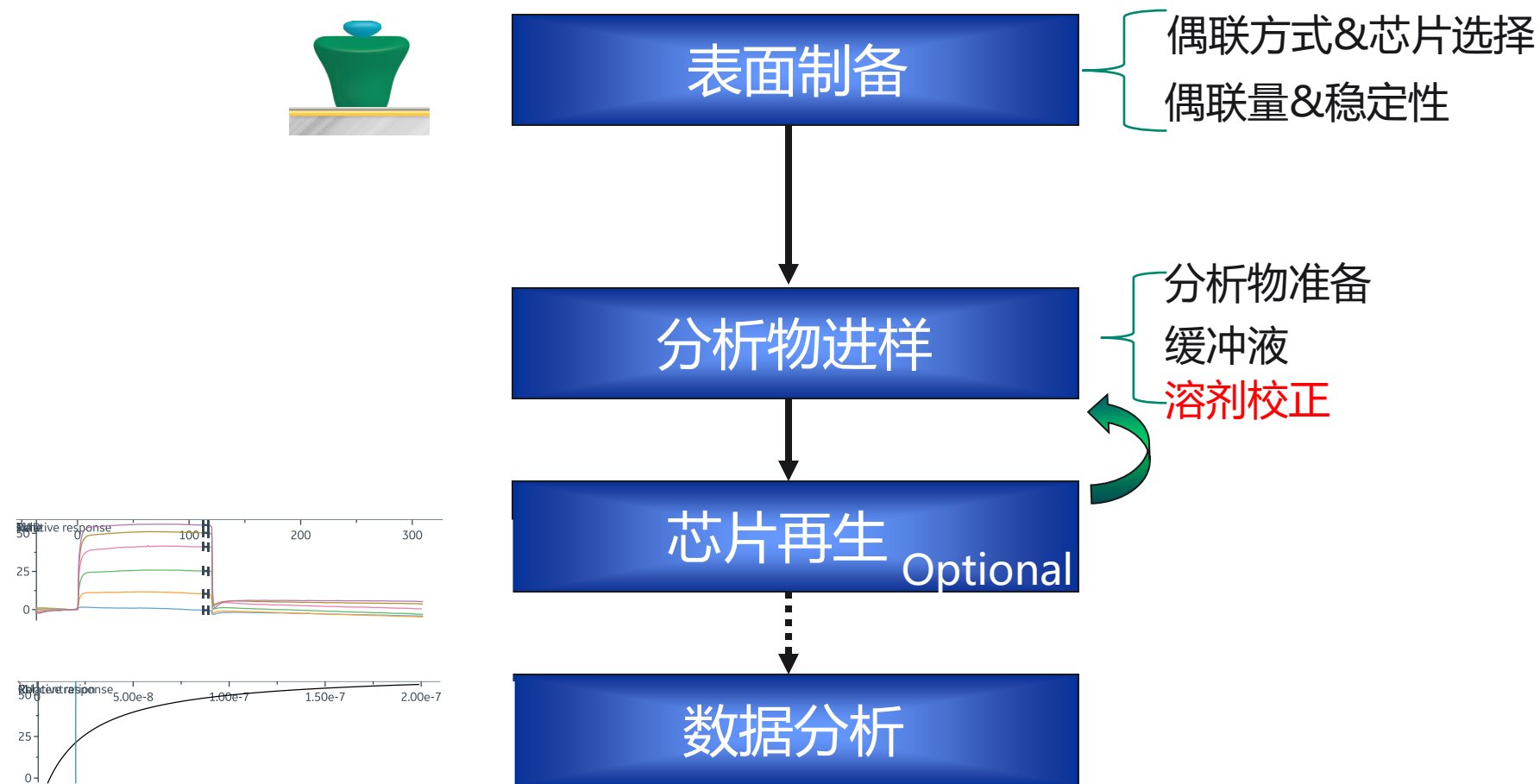
- 传感图大多数呈典型 “快上快下”
- 筛选时在进样初期测定，能更真实反映结合特点

水溶液中的溶解性低

- 容易沉淀析出、聚集，需要有机溶剂助溶 (如DMSO)
- 非特异黏附，易引入假阳性
- 超化学计量比结合：多位点结合，难以达到饱和



Biacore实验的基本流程



表面制备

考虑因素

- 通常是把大分子作为配体，小分子作为分析物，需要芯片表面有更高的配体偶联量 (~10000 RU)

$$\frac{R_{\max}}{R_L} = \frac{MW_A}{MW_L} \times S_m$$

$R_{\max}$: 芯片表面的最大结合容量; 假设为100RU

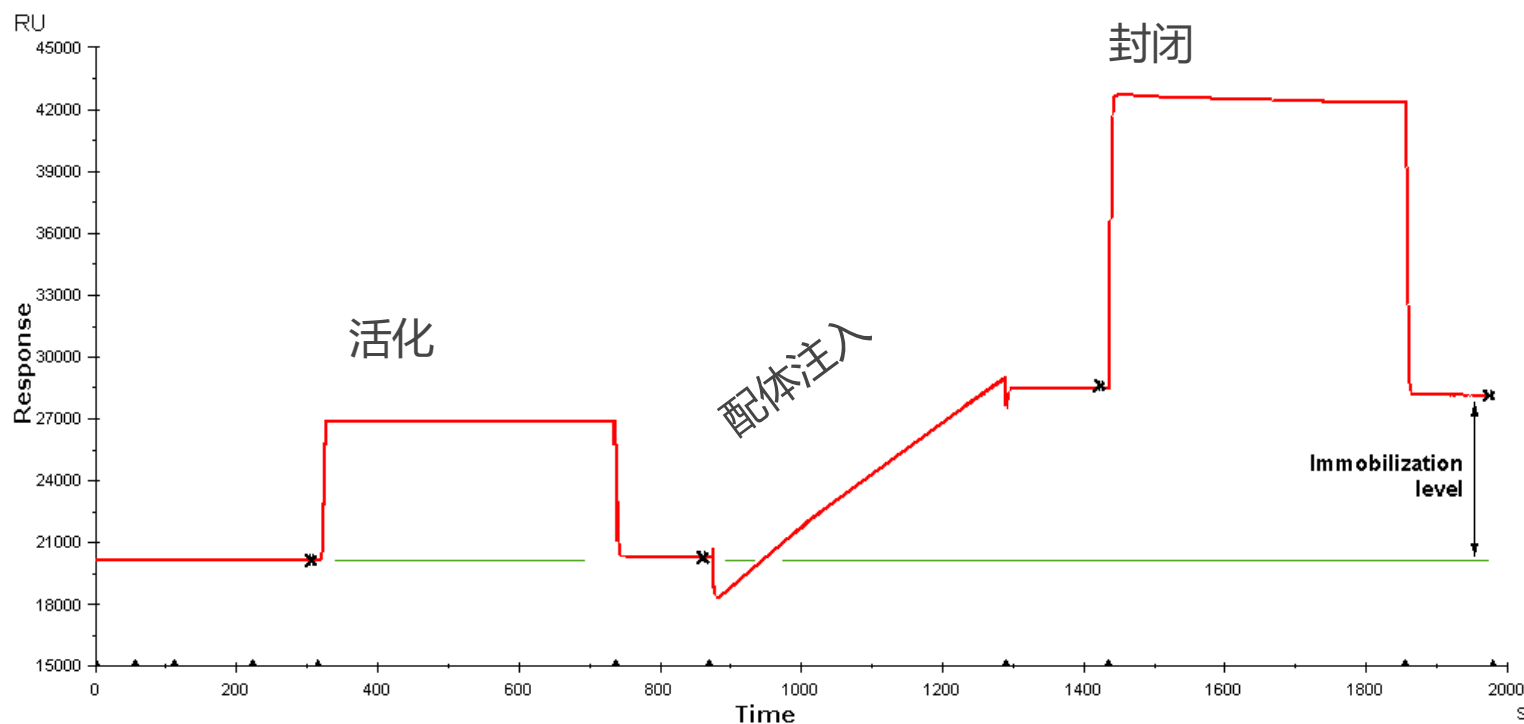
S_m : 化学计量比 (分析物 : 配体) ; 默认为1

Ligand/Protein: 150 KD; Analyte/Compound: 0.9 KD

$R_L \approx 17000$ RU, 实际偶联量需要更高

- 获得高偶联水平的方法
 - 提高配体浓度 (>100 ug/ml)
 - 增加配体的进样时间 (~10分钟)
 - 延长活化时间 (~10分钟)
 - 优化偶联缓冲液 (降低pH, 增强配体富集作用)
 - 选用CM7芯片

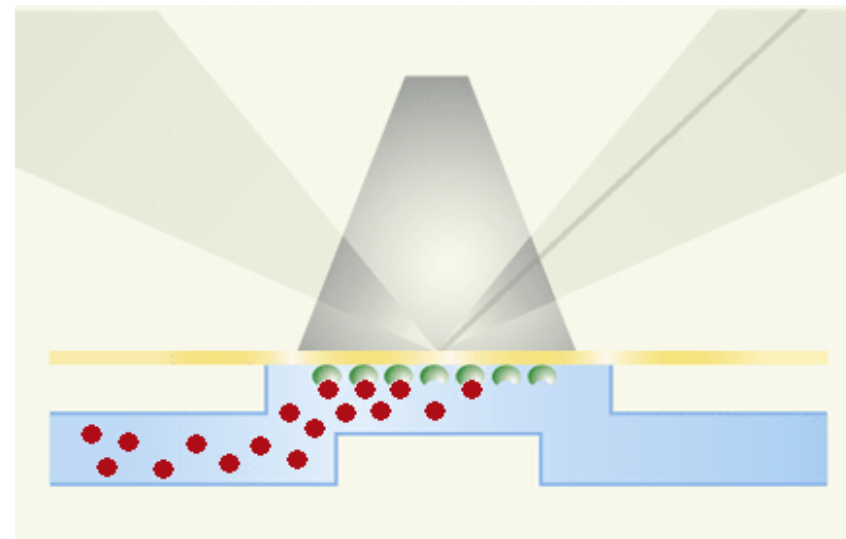
氨基偶联



- Activation 活化 = EDC/NHS 注入, 表面酯化
- Ligand contact 配体注入 = 与配体的氨基发生反应
- Blocking 封闭 = 用乙醇胺封闭芯片上多余的有活性的羧基

小分子

- 小分子的溶解度低
 - 容易沉淀
 - 出现聚集
- 保存在有机溶剂中
 - 有机溶剂起到助溶作用，如二甲基亚砜（DMSO）



DMSO的特点

- 高折光率 (1200 RU for 1% DMSO)
 - 溶液配制时要求浓度准确，保证每个样品以及Running Buffer的DMSO浓度相同
- DMSO 品质的多样
 - 使用高质量、高纯度的DMSO
 - 缓冲试剂和样品的准备使用同一批次的DMSO
- DMSO 具有吸水性
 - 切勿长时间敞开瓶口
 - 加样完成后尽快封膜、加盖

分析物制备——小分子

- 样品稀释前后，应置于室温，检查样品是否有沉淀现象（或离心后观察）
- 逐步稀释储液，可减少样品沉淀的可能
- 尽量确保样品与缓冲液的DMSO浓度一致
- 确定样品中没有气泡，充分混匀

缓冲液

推荐:

磷酸盐缓冲液 (PBS-P)

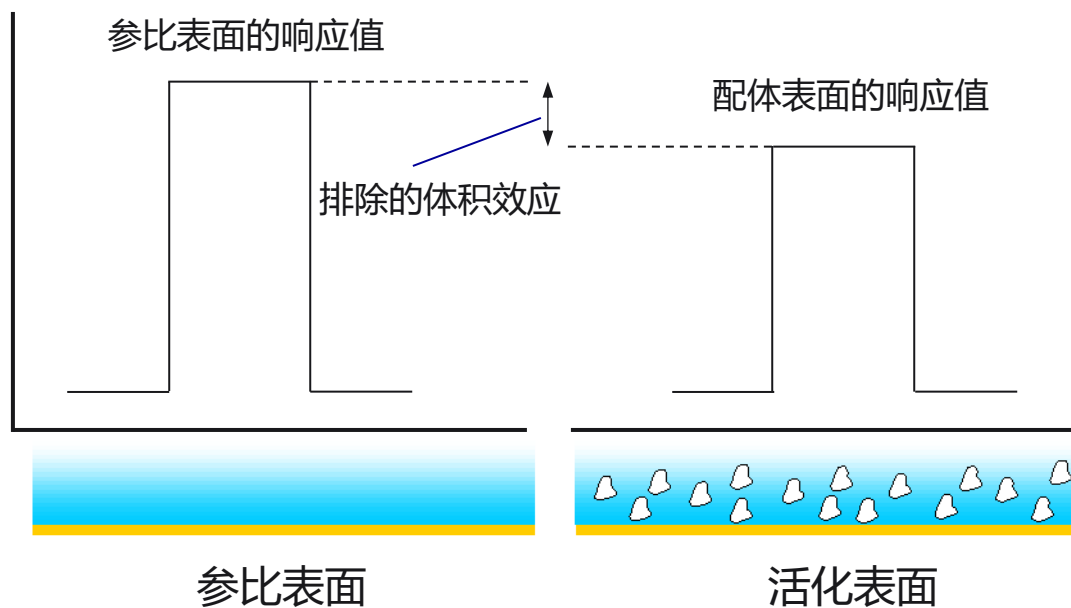
**10-50 mM 磷酸盐,
150 mM NaCl, pH 7.4,
0.05 % P20**

- 提高离子浓度或表面活性剂浓度，减少非特异吸附
- 可添加DMSO助溶 (1-10%)，但需与样品溶液一致
- 0.22 μm 滤膜过滤，过滤后再加DMSO

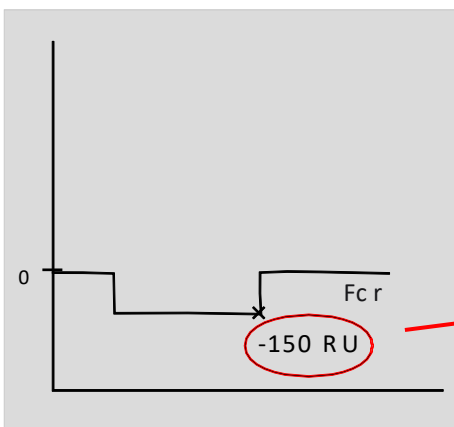
溶剂校正 – 为何要做？

参比通道与配体通道的响应值相差较大

- 参比表面比活化表面有更多空间容纳DMSO分子
- 0.1% 的 DMSO 浓度差异都能产生 100 RU 的响应值
- 不同样品中的 DMSO 浓度会略有不同，需要进行不同的参比扣减

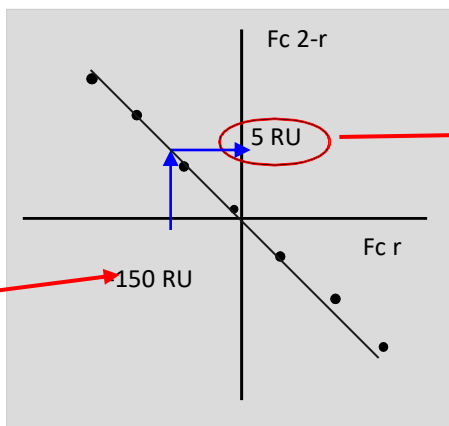


溶剂校正步骤



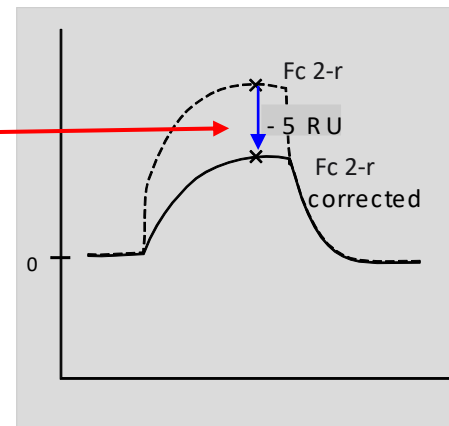
①

样品和缓冲液中DMSO浓度不一致，导致参比通道中出现150RU的移位



②

通过溶剂校正曲线，对应到参比扣减传感图中的5RU的溶剂偏差

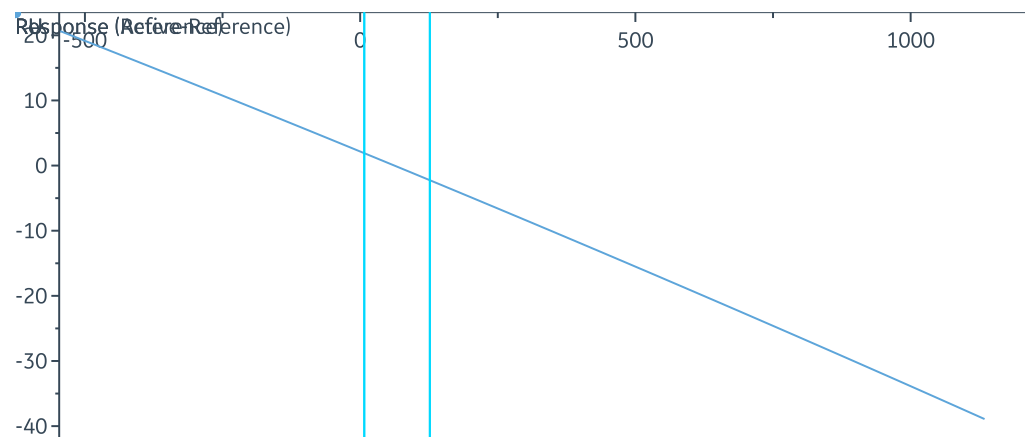
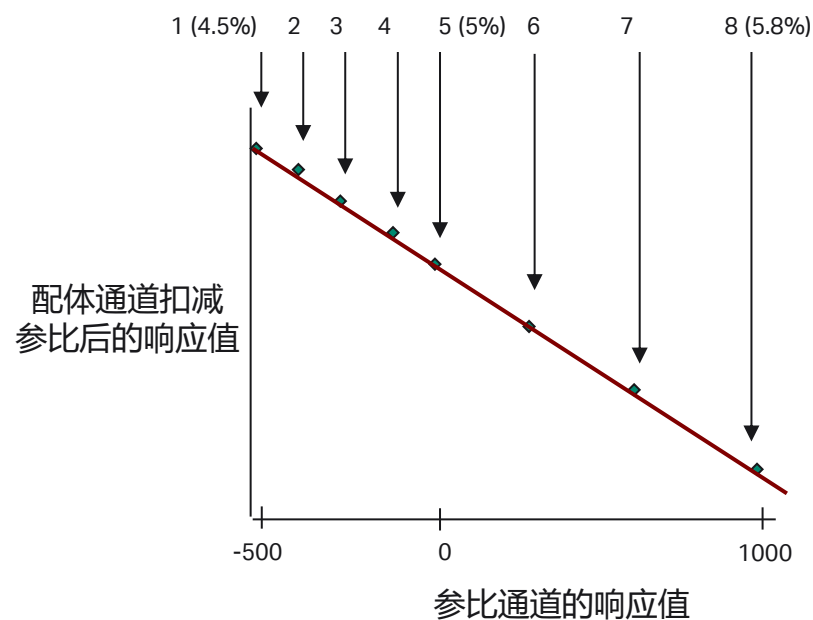


③

扣减溶剂偏差校正传感图

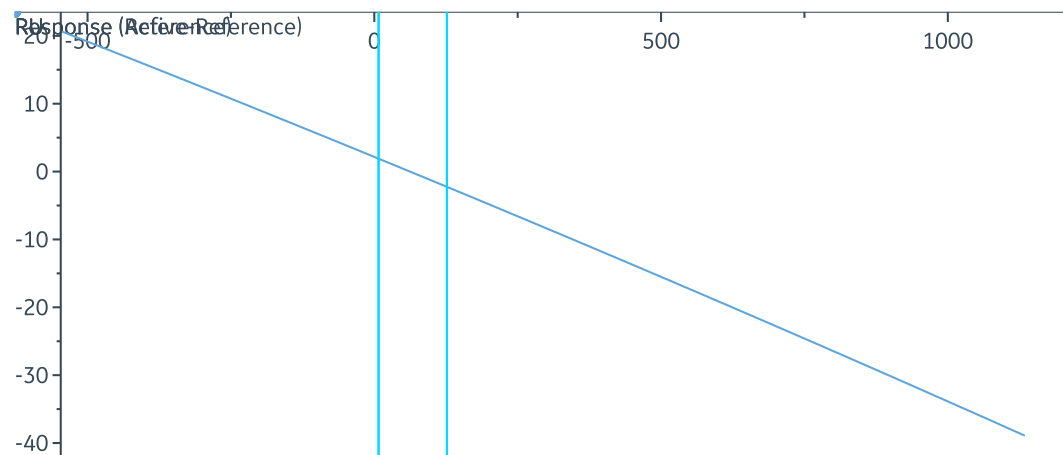
溶剂校正曲线

- 溶剂校正溶液：不同浓度的DMSO溶液
- 在参比表面和配体表面进样该校正溶液
- 配体通道扣减参比后的响应值 vs 参比通道的响应值作出溶剂校正曲线



溶剂校正的设置要求

- 溶剂校正点的数量
 - 推荐设置8个，不少于4个
- 溶剂校正的次数
 - 每20~30个样品运行一次校正循环
 - 实验首尾各运行一次校正循环
- 参比通道响应值在校正区间内
 - 如4.5~5.8 % DMSO，校正区间为 -500 至 1000 RU
- 相同方法制备样品和溶剂校正溶液
 - 用同一储液制备缓冲液、样品和溶剂校正溶液





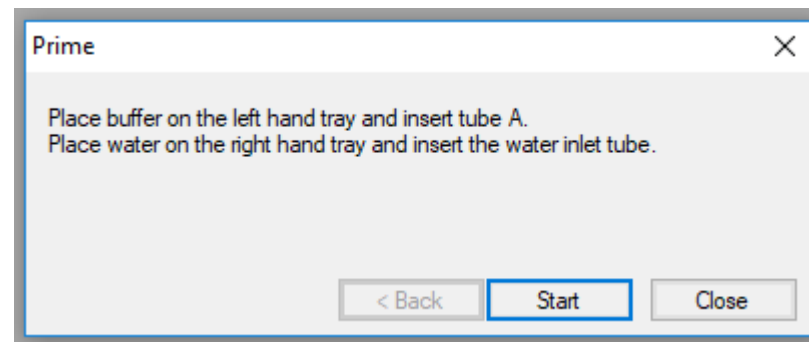
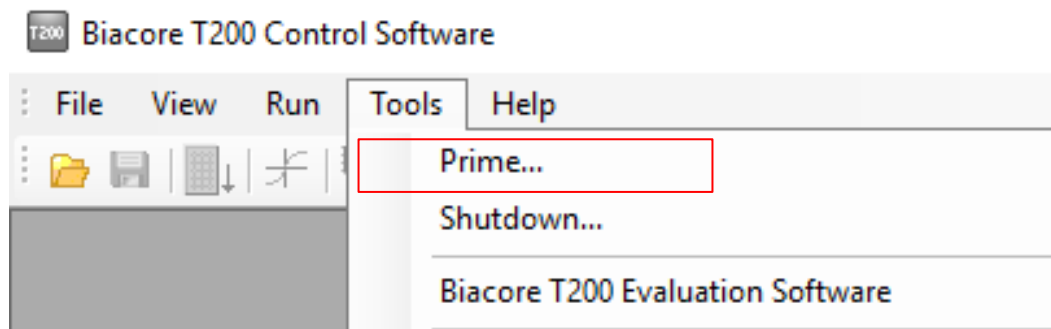
Biacore 设备维护

课程目标

- 了解Biacore维护的重要性
- 日常使用
- 每周维护
- 每月维护
- Standby和关机

日常使用

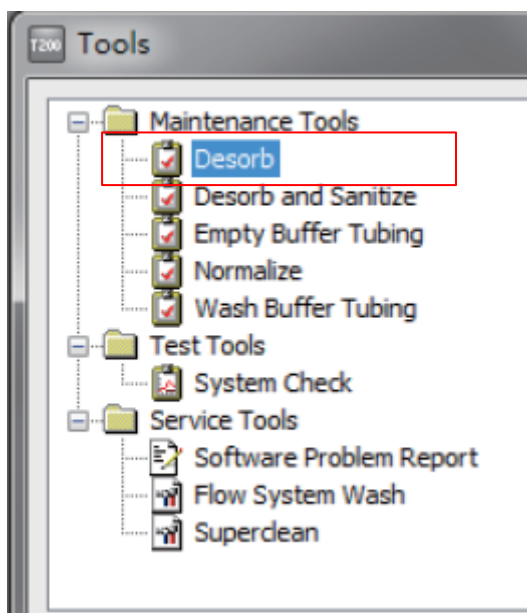
- 对缓冲液进行过滤 (filter) 和脱气 (degas) (T200具有在线脱气功能)
 - 即使是前一天使用的缓冲液也要进行重新过滤和脱气
 - 尽量使用新鲜的缓冲液
- 使用Prime对系统进行冲洗
 - 换芯片后要用原有的buffer或水prime冲洗系统，7分钟



每周维护

- 除盐

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

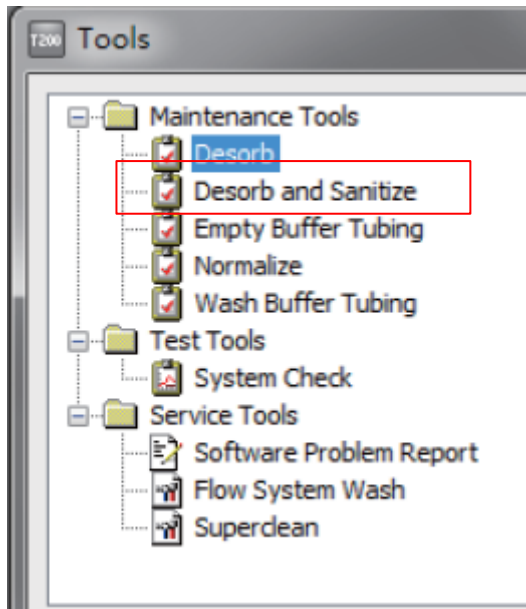


- 1) 将**维护芯片**放入系统!
- 2) 准备500ml去离子水，放置在左侧托架上。将缓冲液A管放入瓶中。
- 3) 选择工具栏中Tools->More tools。
- 4) 点击Maintenance目录下的Desorb，点击Start。

每月维护

- 除盐和除菌

- 主菜单Desorb & Sanitize程序
(SDS/甘氨酸, 以及稀释的次氯酸钠: 0.6%~1%次氯酸钠)



- 1) 将维护芯片放入系统!
- 2) 准备500ml去离子水, 放置在左侧托架上。将缓冲液A管放入瓶中。
- 3) 选择工具栏中Tools->More tools。
- 4) 点击Maintenance目录下的Desorb and Santiza, 点击Start。

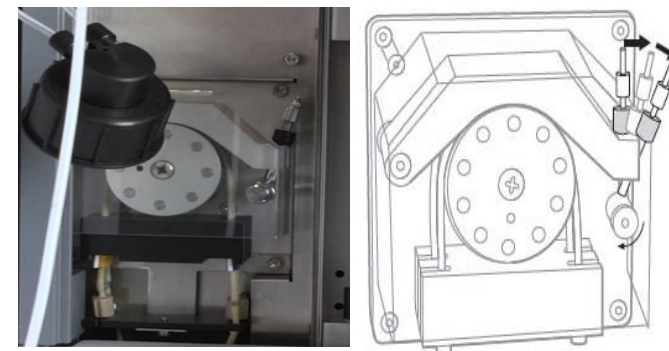
每次实验结束后，如何设置Biacore?

- 系统闲置如果小于7 天

- 自动Standby模式，使系统内存在稳定的缓冲液流
- 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70%乙醇和水，将4根进样管拔出悬空，排空系统内的残余液体
- 需在关机后将蠕动泵压盖拧松（下次使用前务必复位）
- 关闭系统电源，关闭Biacore 控制软件。
- 打开样品舱盖，擦洗进样针。倒掉废液瓶中的废液。



Biacore 学习资源

Biacore 微站



Biacore视频

实验方法下载

应用程序指南

easy biacore 操作视频

纸质档SOP

线上产品课程

线上应用课程

线上专题课程

在Biacore™ X100中
编辑一个带溶剂校正的小分子亲和力实验

在Biacore X100中编辑一个带溶剂校正的小分子亲和力实验

→

cytiva

Biacore 助力中医药现代化研究

Biacore助力中医药现代化研究

→

cytiva

Biacore分子互作技术理论基础与实验设计

Biacore分子互作技术理论基础与实验设计

→

cytiva

加速你的蛋白研究

解析在表观遗传学研究中的应用
6月26日 14:00-15:00

生物分子相互作用在结构生物学中的应用：Biacore分子互作系统在结构生物学研究...

→

<https://learning.cytivalifesciences.com.cn/biacore/>



**Biacore,
For a better life**

