



# 表面等离子共振 (SPR) 技术与 Biacore原理

# Agenda



Biacore™ T200

日期	时间	内容
7月4日	9:00-11:30	Biacore 原理与仪器应用介绍 (理论培训)
	13:00-14:00	Biacore 基本操作介绍 (上机培训)
	14:00-17:00	直接法检测蛋白-蛋白动力学/亲和力 (上机培训)
7月5日	9:30-10:00	数据分析 (上机培训)
	10:00-15:30	捕获法实验或其他实验安排 (上机培训)



# 课程目标

- **Biacore技术原理**

- 表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR)
- 传感图 Sensorgram
- Biacore提供的分子相互作用信息

- **Biacore设备核心组件**

- SPR检测器
- 微流控系统 (IFC)
- 传感芯片 Sensor Chip

- **Biacore分析的基本流程**

- 偶联 Immobilization
- 进样 Sample Injection
- 再生 Regeneration

- **Biacore 在基础科研中的应用**



Biacore™ T200



# BIAcore技术原理

Biomolecule Interaction Analysis core technique



# 常用的分子互作技术

## 对于涉及蛋白质相互作用的研究

- 酵母双杂交
- 酶联免疫吸附分析 (ELISA)
- 荧光共振能量转移 (FRET)
- 免疫共沉淀 (Co-IP)
- 免疫印记 (Western, Far-Western)
- 质谱技术 (Mass Spectrometry)

## 对于涉及核酸相互作用的研究

- EMSA
- ChIP (染色体免疫沉淀法, Co-IP的类似技术)

- **终点技术 (End-point Tech)**

酵母双杂, ELISA, Co-IP, ChIP, Western, MassSpec.

- **需要标记 (Require Labeling)**

酵母双杂, ELISA, FRET, Co-IP, ChIP

- **检测强亲和力的相互作用**

ELISA, Co-IP, ChIP, Western, MassSpec, EMSA

- **耗时费力 (Laborious)、步骤繁琐费时长**

ELISA, Western, EMSA

- **非活性或半活性互作 (Inactive OR Semi-active Tech)**

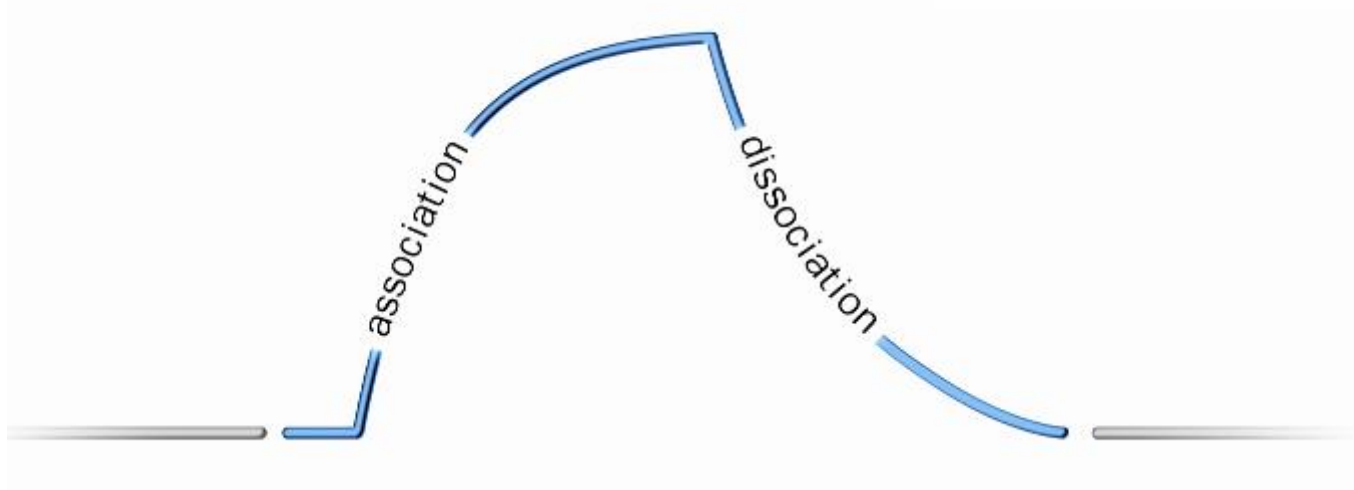
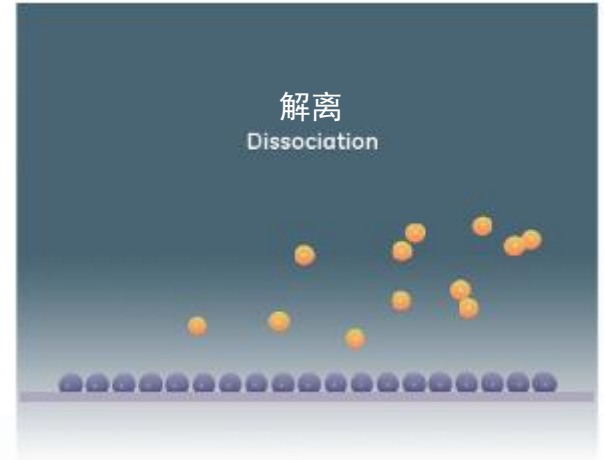
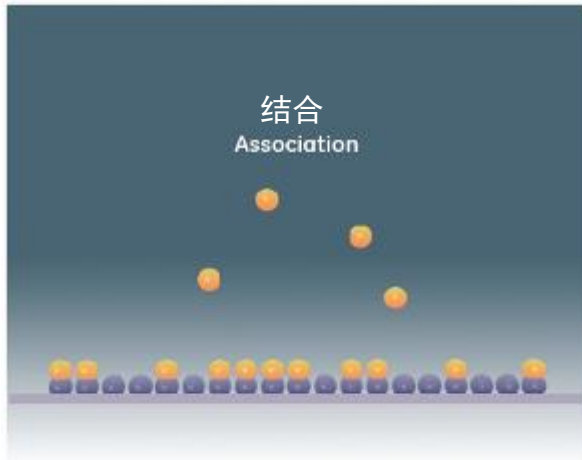
ELISA, Western, MassSpec, EMSA

- **信息量较少**

有/无信息, 以及ELISA的亲和力信息



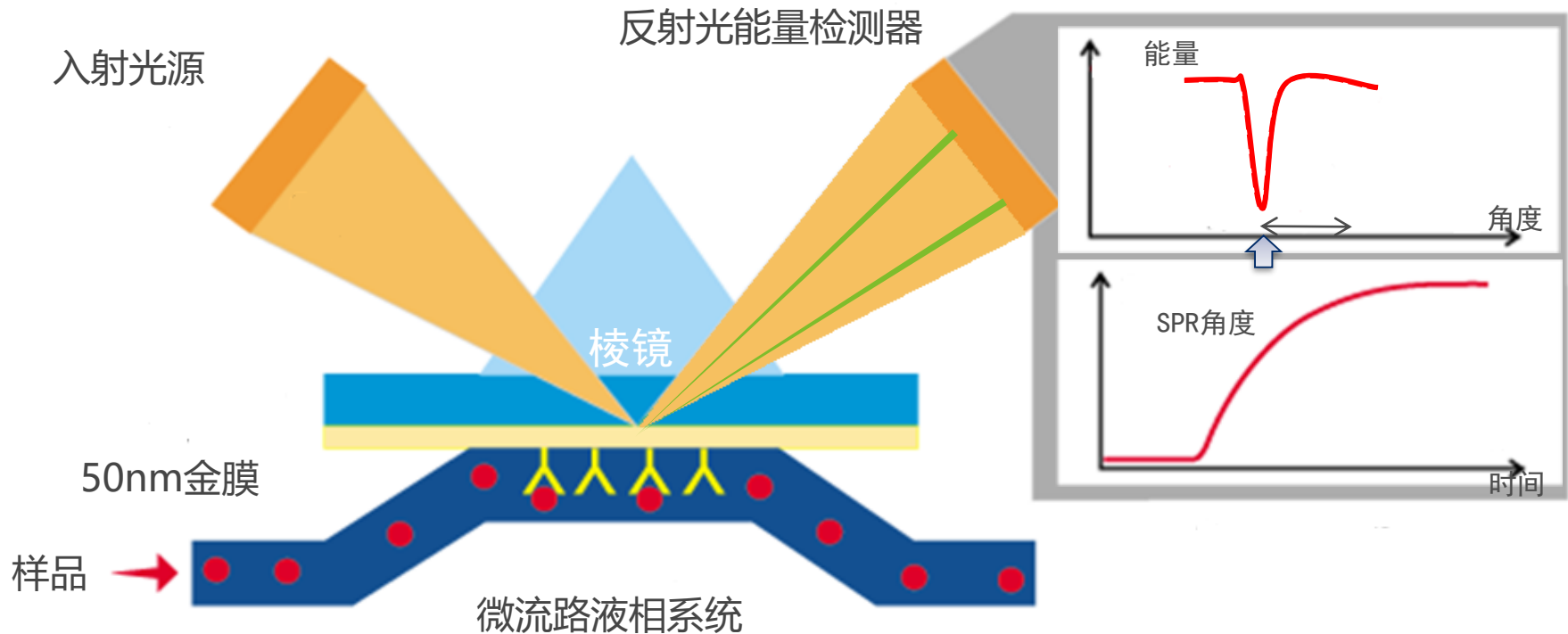
# Biacore: 实时、无标记、活性分子互作分析



Biacore实时监控分子相互结合、解离的过程



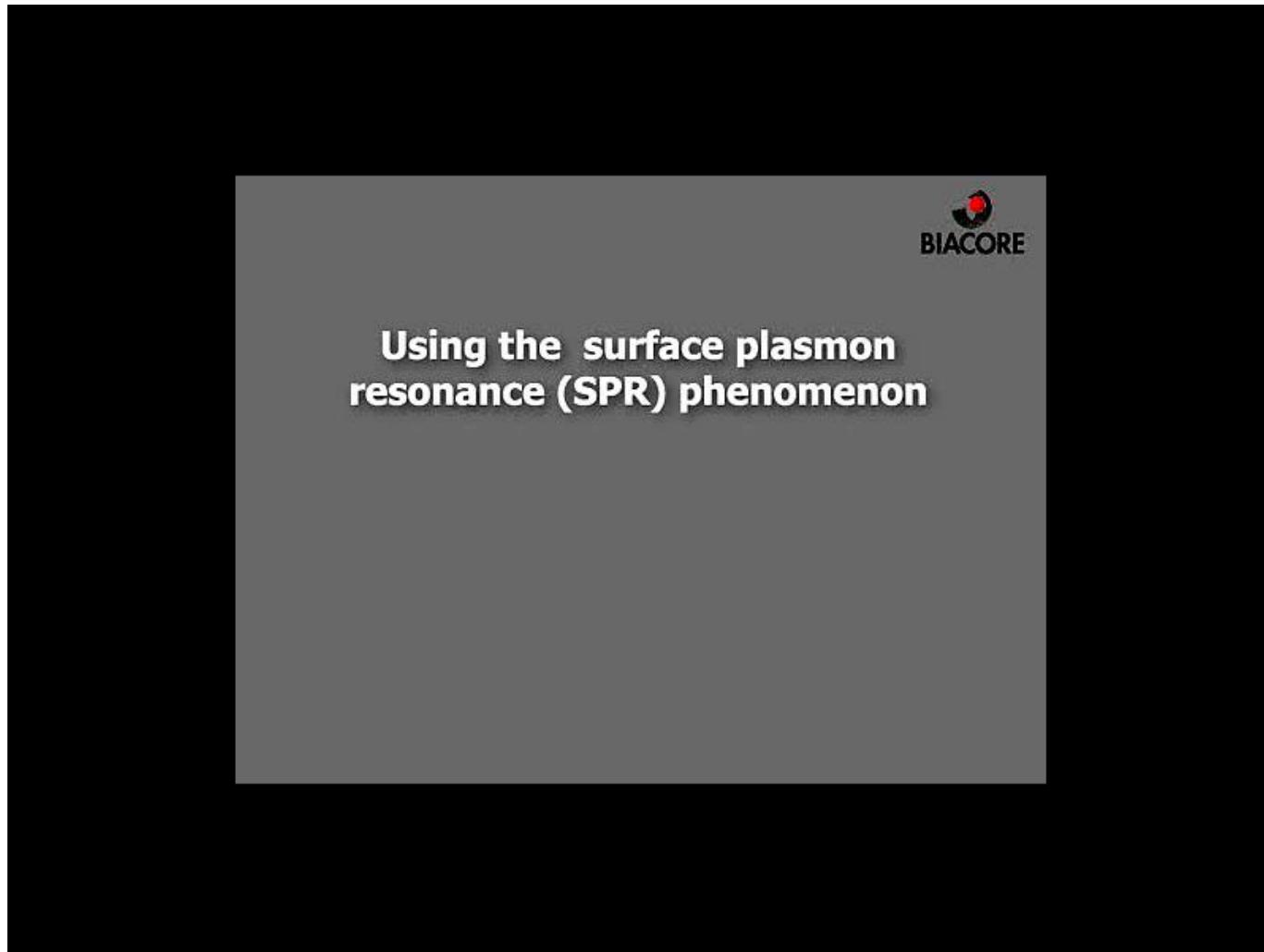
# 表面等离子共振原理 (SPR)



- 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/mm<sup>2</sup> 的物质变化。



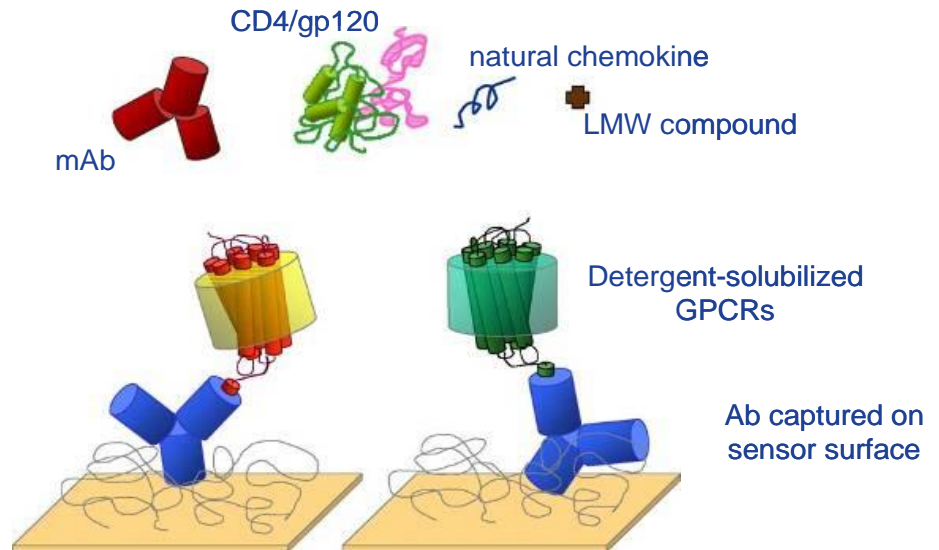
# 表面等离子共振原理 (SPR)





# Biacore可研究的生物分子范围

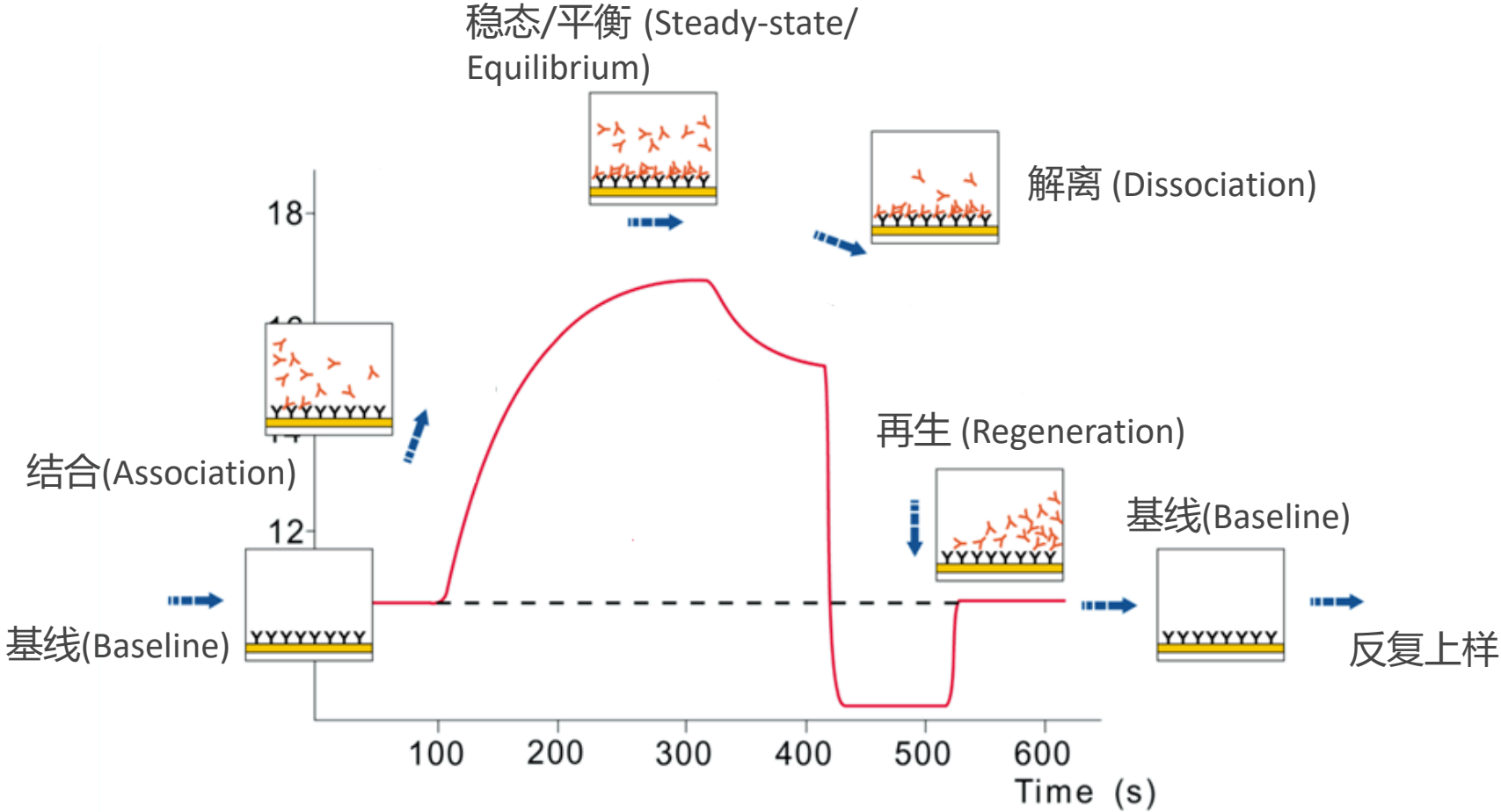
- 蛋白质
- DNA/RNA
- 脂类 /脂质体/ 生物膜
- 多糖
- 多肽
- 小分子
- 全细胞/病毒/微生物



Tips: 应用



# 传感图 (The Sensorgram)



# Biacore提供的生物分子相互作用信息

- 有无结合 (Yes or No)
- 结合的特异性和选择性 (Specificity)
- 两种分子的结合强度 --亲和力 (Affinity)
- 结合和解离的快慢和复合体的稳定性 --动力学 (Kinetics)
- 功能复合体形成的参与者、协同者和组装顺序 (Mechanism)
- 分子结合的温度与热力学特征 (Thermodynamics)
- 目标分子活性含量的检测 (Concentration)



# 亲和力 (Affinity, KD)

弱结合

中等强度

强结合



mM  
 $10^{-3}$

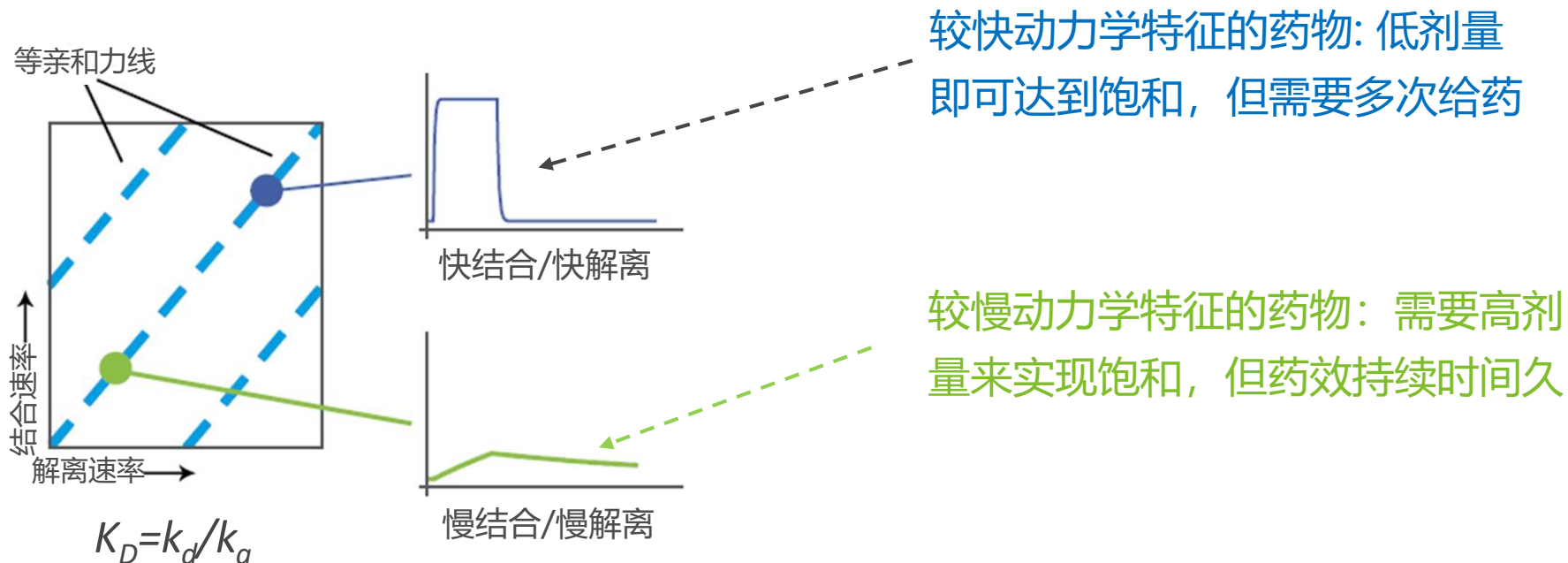
$\mu$ M  
 $10^{-6}$

nM  
 $10^{-9}$

- 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



# 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核心组件

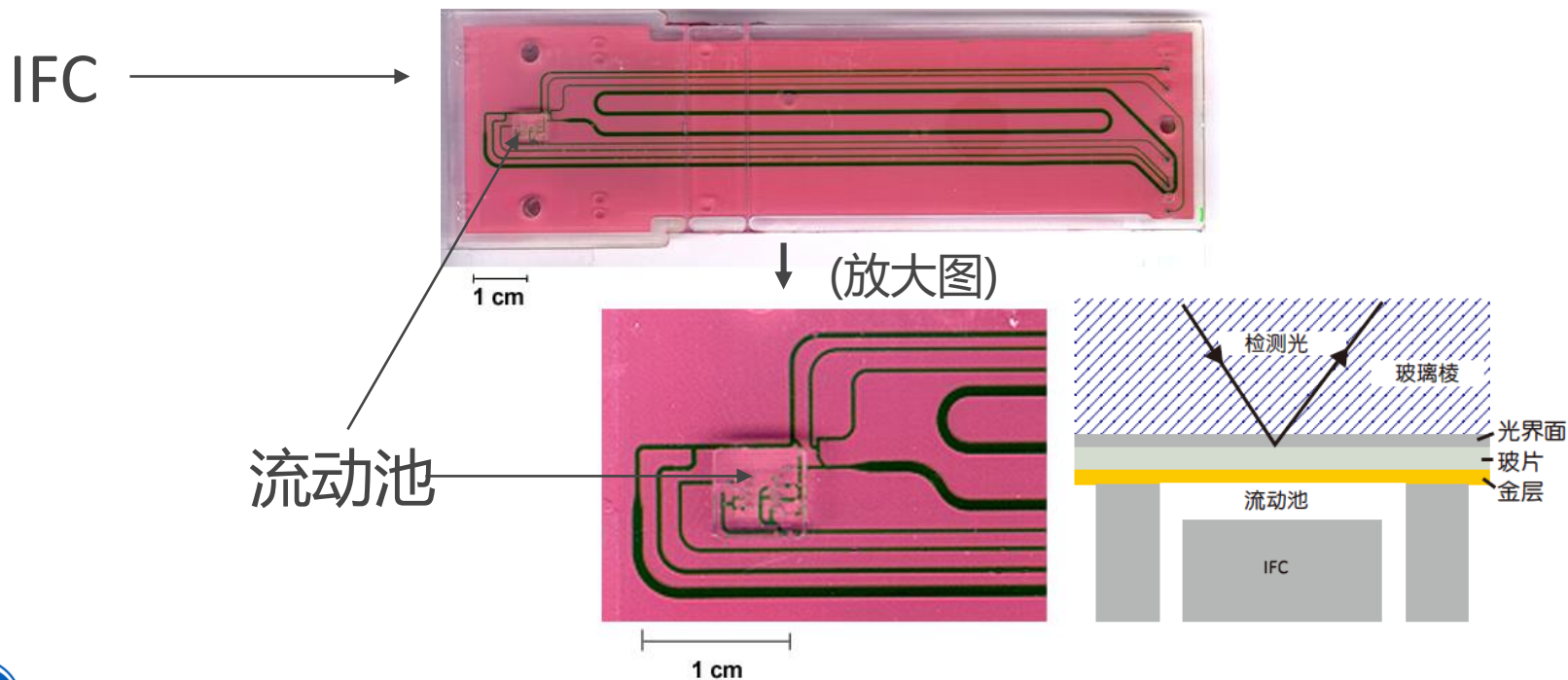


# Biacore T200核心组件



# 微流控系统(IFC)

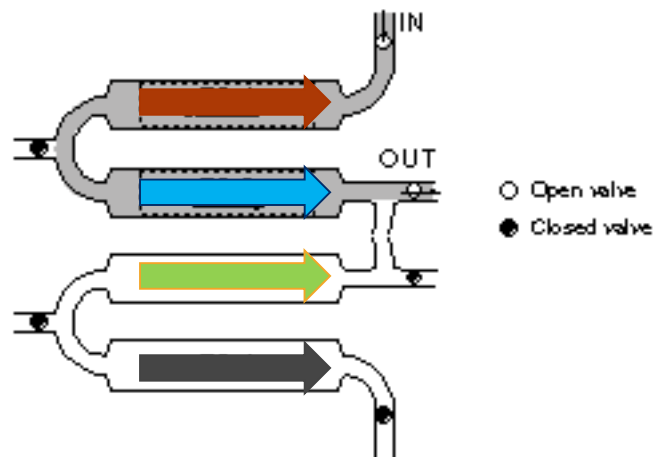
- 集成化、自动化的微流路控制系统
- 样品消耗量低
- 为互作分析而设计优化





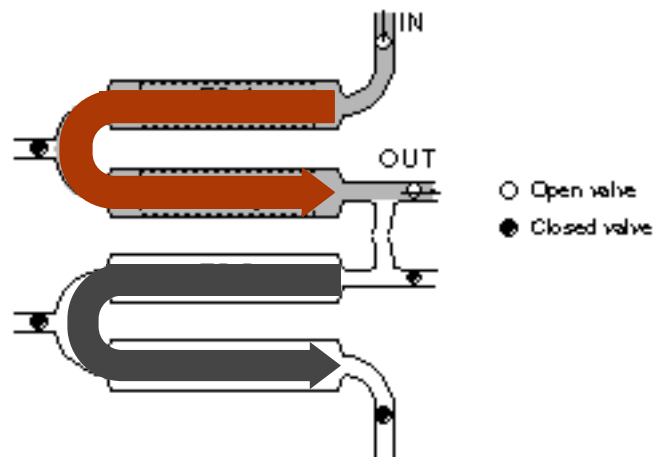
# 微流控系统 (IFC)-流动池

- 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)



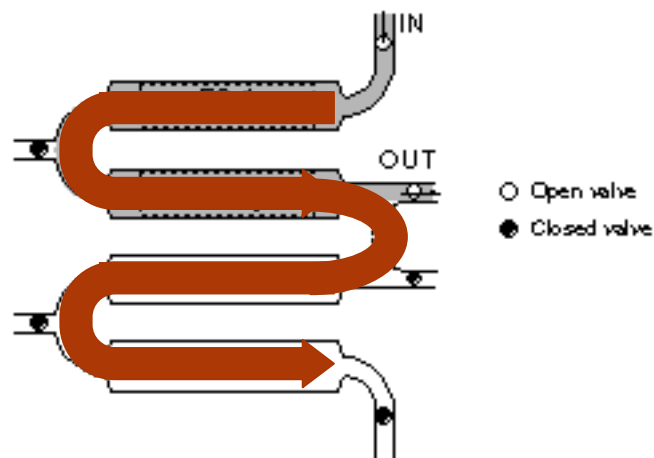
# 微流控系统 (IFC)-流动池

- 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)

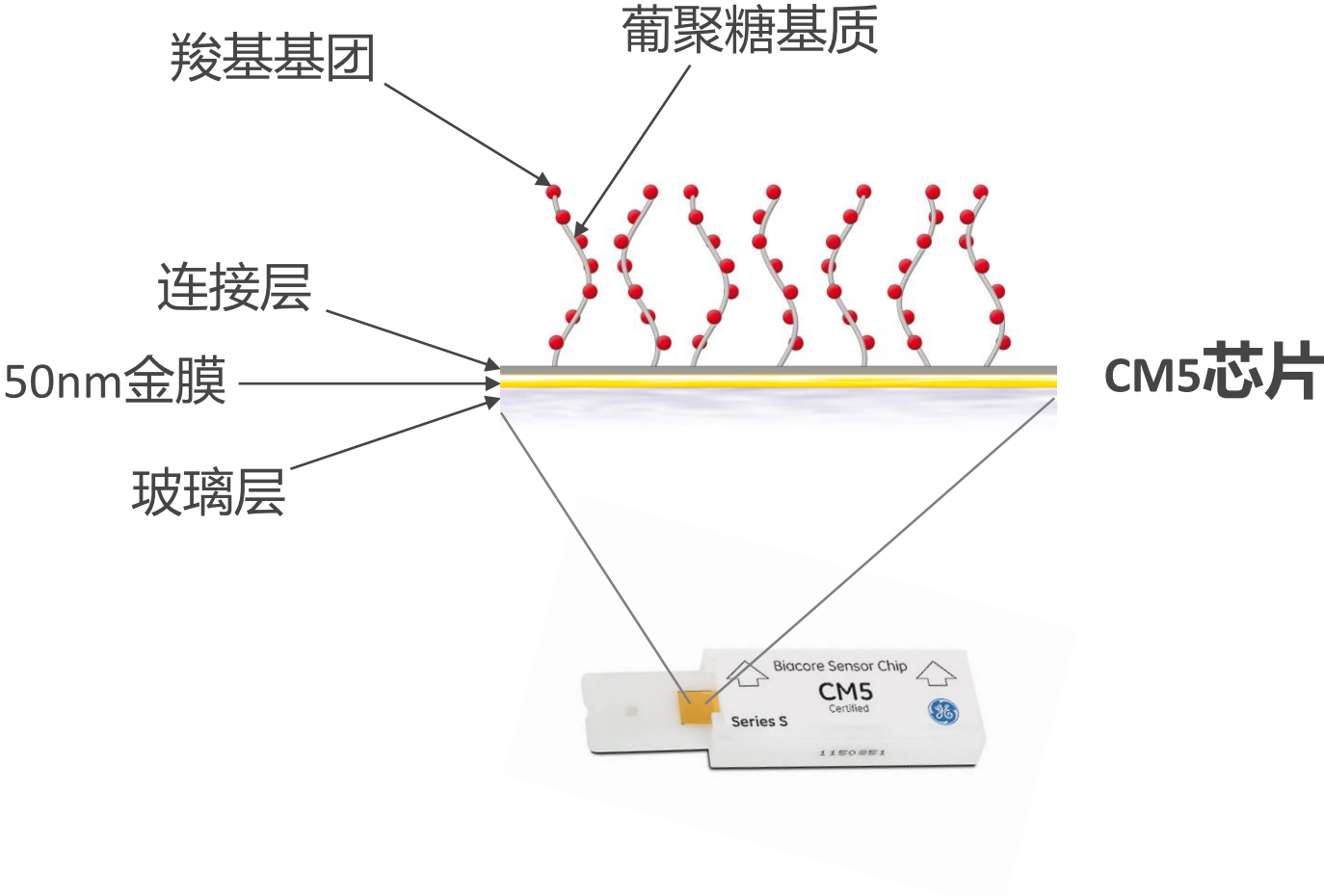


# 微流控系统 (IFC)-流动池

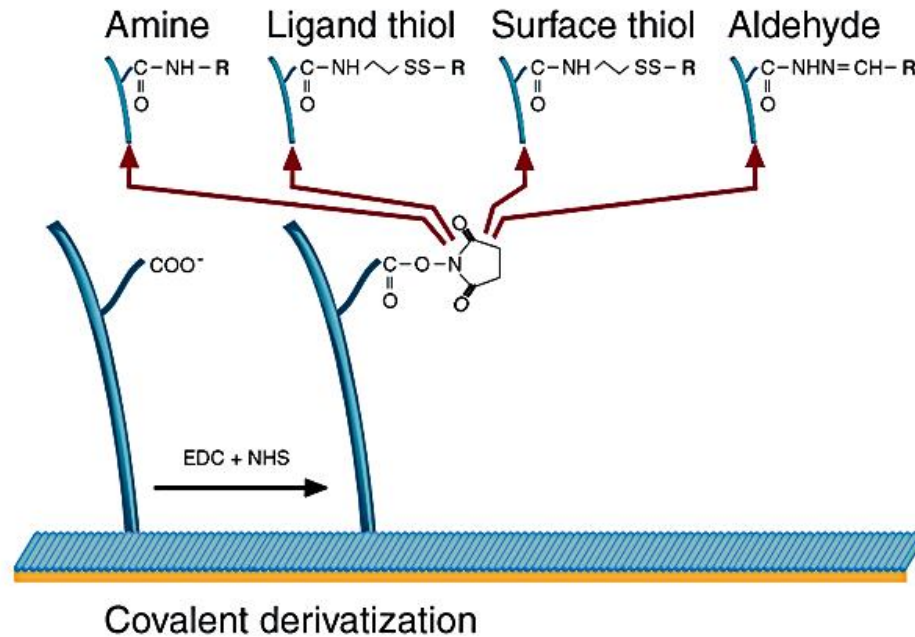
- 4个流动池-位于IFC上 (FC的个数由IFC种类决定)
- 可选择单独、配对、串联使用。
- 流动池为配对使用进行了优化(FC1-FC2, FC3-FC4)



# 传感芯片



# CM5传感芯片

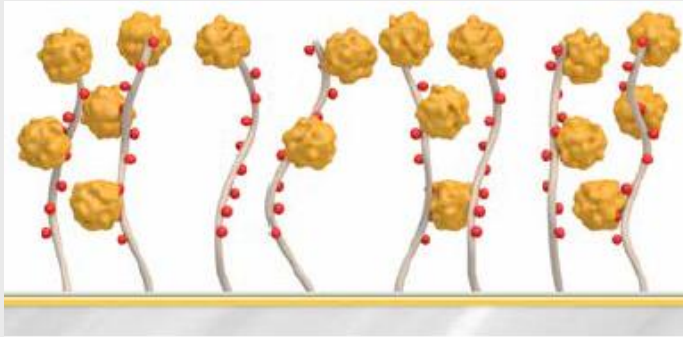


- 羧基化的葡聚糖表面
- 最常用的传感芯片
- 出色的化学稳定性决定了可靠的实验重复性



# 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

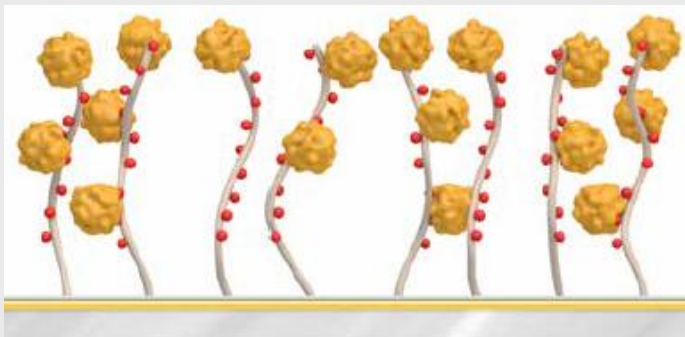


- 在羧基化的葡聚糖表面包被了一层重组Protein A蛋白
- 只结合抗体Fc段的重链，保证了抗体结合的定向性
- 不结合抗体Fab段



# 传感芯片 Protein G

- 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



- 在羧基化的葡聚糖表面包被了一层重组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



# 传感芯片的选择

## 15种不同的芯片类型

- CM5, CM4, CM3: 芯片→蛋白、肽段、小分子等
- CM7: 小分子化合物研究
- SA芯片: 生物素标记的分子, 如核酸、糖类等
- 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
- Au裸金芯片: 客户定制表面 (材料、高分子等)
- ProteinA, G, L芯片
- 维护芯片

## 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
- ... ..

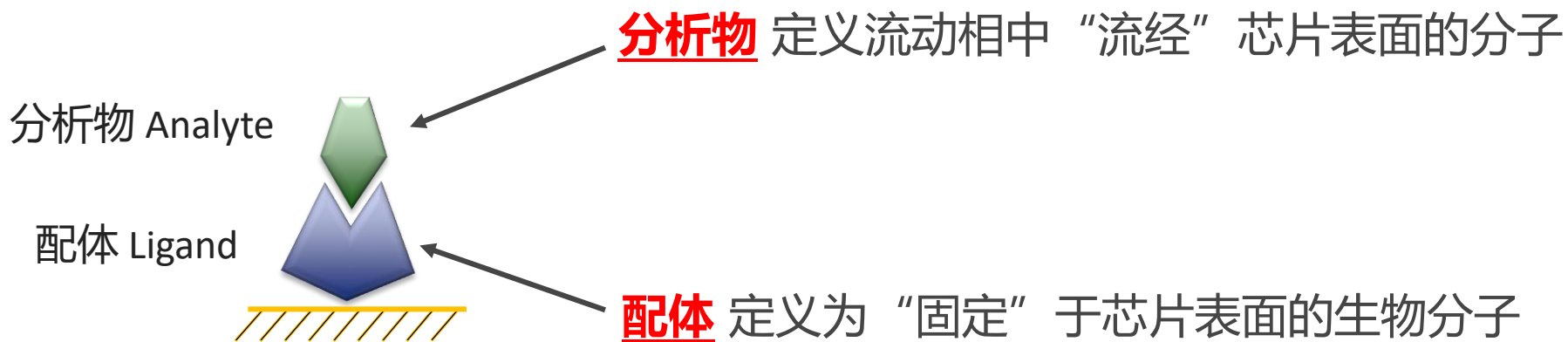




# Biacore分析的基本流程



# 分析物和配体的定义



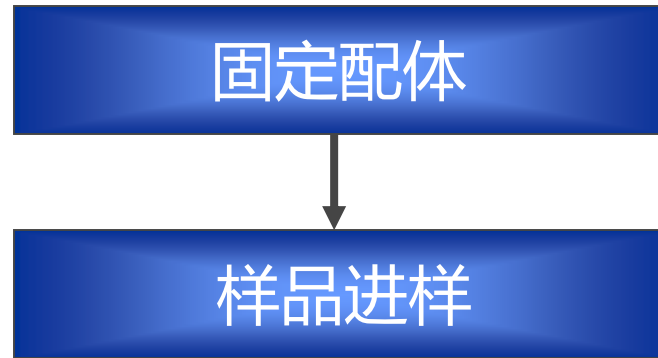
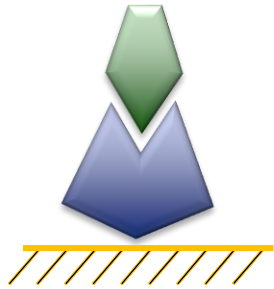
# Biacore实验的基本流程



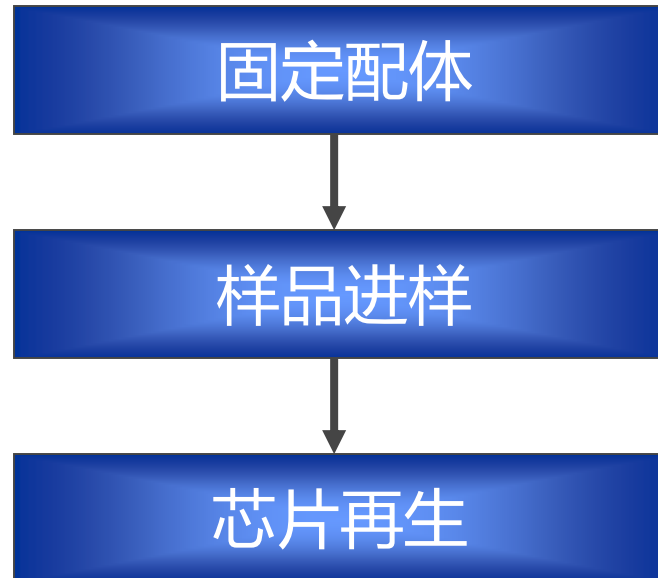
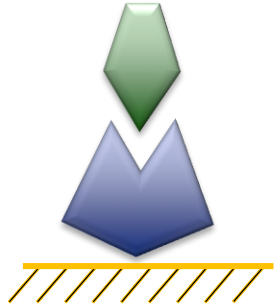
固定配体



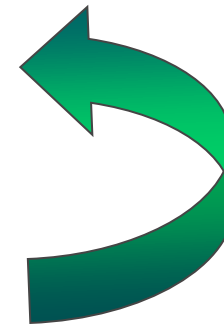
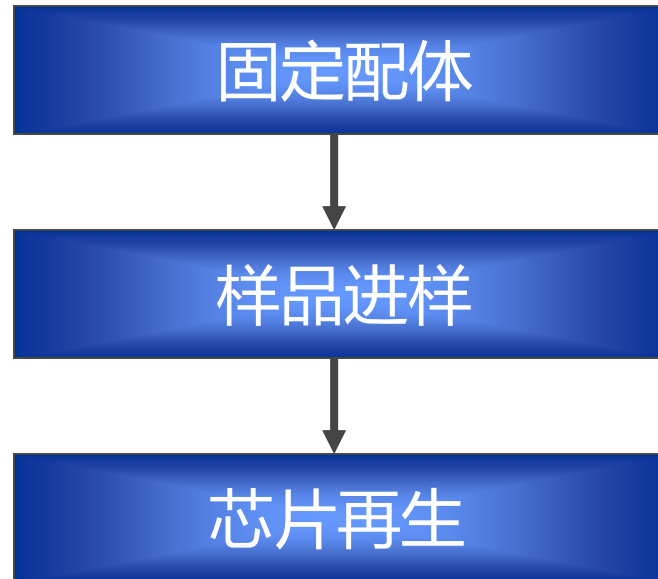
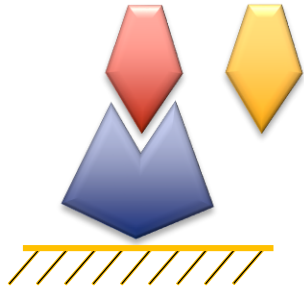
# Biacore实验的基本流程



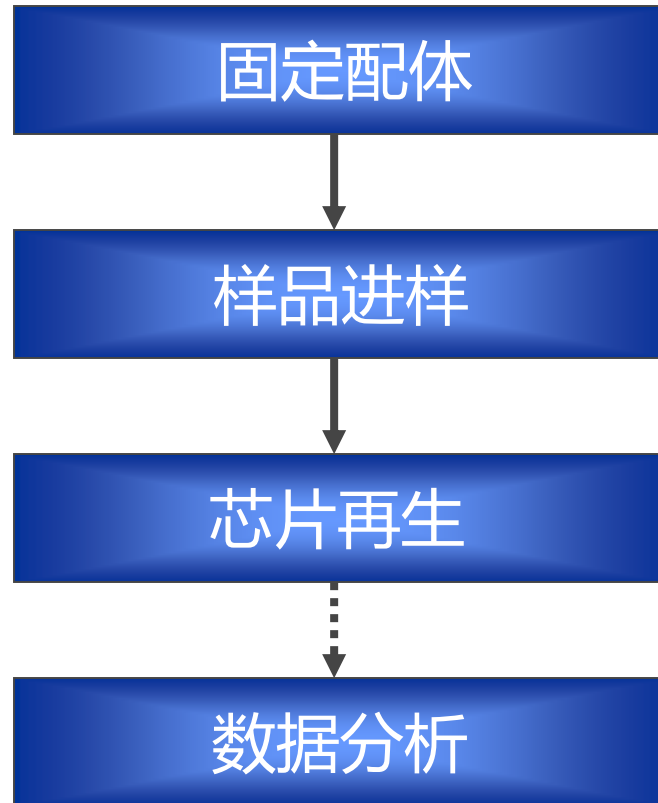
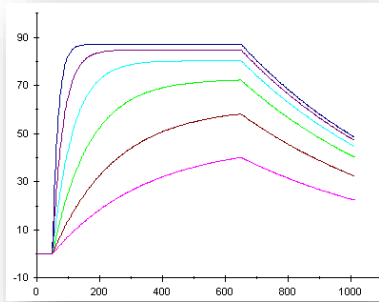
# Biacore实验的基本流程



# Biacore实验的基本流程



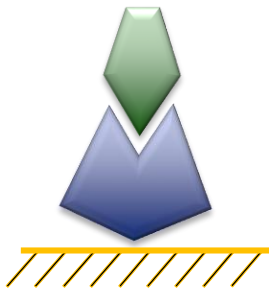
# Biacore实验的基本流程



# 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



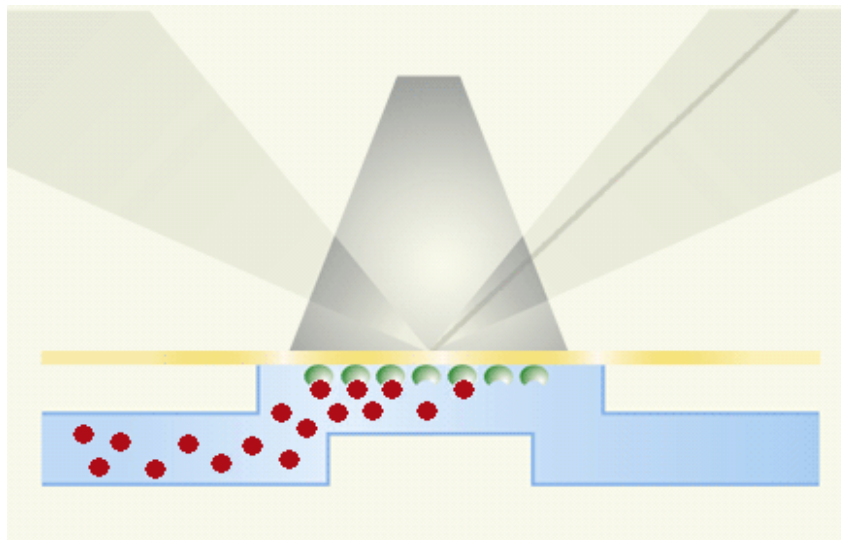
捕获分子 Capturing molecule

- 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





# 样品进样 (Injection)

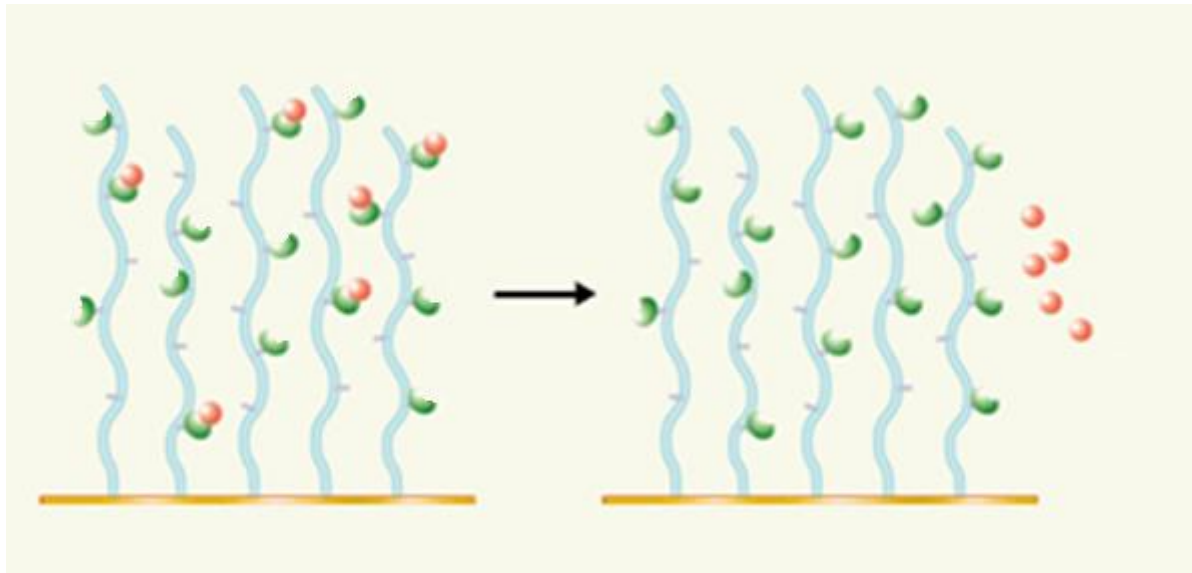


- 分析物 (Analyte)进样后，以恒定的流速和浓度流过芯片表面
- 样品中的待分析物与固定在芯片表面上的配体发生结合，芯片表面物质的**质量**发生改变，仪器记录下对应的响应值 (response) 的改变
- 进样结束后，切换缓冲液流过芯片表面，分析物由配体上**自发**解离解离的进程由响应值实时监控



# 芯片再生 (Regeneration)

- 将自发解离后仍然结合于配体的分析物彻底洗掉。
- 配体的结合活性必须保留



# Biacore应用实例



# 互作“金标准”，发表文献多

近三万篇文章使用了Biacore(SPR)

NCBI Resources How To

PMC Search

Surface Plasmon Resonance

Search results

Items: 1 to 20 of 29017

1. [Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications](#)  
Hoang Hiep Nguyen, Jeho Park, Sebyung Kang, Moonil Kim  
Sensors (Basel) 2015 May; 15(5): 10481-10510. Published online 2015 May 5. doi: 10.3390/s150510481  
PMCID: PMC4481982  
[Article](#) [PubReader](#) [PDF-3.1M](#) [Citation](#)

2. [Microfluidic Surface Plasmon Resonance Sensors: From Principles to Point-of-Care Applications](#)  
Da-Shin Wang, Shih-Kang Fan  
Sensors (Basel) 2016 Aug; 16(8): 1175. Published online 2016 Jul 27. doi: 10.3390/s16081175  
PMCID: PMC5017341  
[Article](#) [PubReader](#) [PDF-2.7M](#) [Citation](#)

3. [Surface Plasmon Resonance Sensors on Raman and Fluorescence Spectroscopy](#)  
Jiancai Wang, Weihua Lin, En Cao, Xuefeng Xu, Wenjie Liang, Xiaofang Zhang  
Sensors (Basel) 2017 Dec; 17(12): 2719. Published online 2017 Nov 24. doi: 10.3390/s17122719  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481982/>

中国区的发表量近五千篇

NCBI Resources How To

PMC Search

Surface Plasmon Resonance & China

Search results

Items: 1 to 20 of 4804

1. [Surface Plasmon Resonance Sensors on Raman and Fluorescence Spectroscopy](#)  
Jiancai Wang, Weihua Lin, En Cao, Xuefeng Xu, Wenjie Liang, Xiaofang Zhang  
Sensors (Basel) 2017 Dec; 17(12): 2719. Published online 2017 Nov 24. doi: 10.3390/s17122719  
PMCID: PMC5751530  
[Article](#) [PubReader](#) [PDF-5.8M](#) [Citation](#)

2. [Phase-Sensitive Surface Plasmon Resonance Sensors: Recent Progress and Future Prospects](#)  
Shijie Deng, Peng Wang, Xinglong Yu  
Sensors (Basel) 2017 Dec; 17(12): 2819. Published online 2017 Dec 5. doi: 10.3390/s17122819  
PMCID: PMC5751602  
[Article](#) [PubReader](#) [PDF-1.3M](#) [Citation](#)

3. [In situ targeting TEM8 via immune response and polypeptide recognition by wavelength-modulated surface plasmon resonance biosensor](#)  
Yimin Wang, Zewei Luo, Kunbina Liu, Jie Wang, Yixiana Duan



# 蛋白-蛋白



# Biacore助力基孔肯雅病毒入侵机制的破解



中科院院士  
高福 教授  
中国疾病预防控制中心主任

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

上个月刚刚发表的CELL文章

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

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

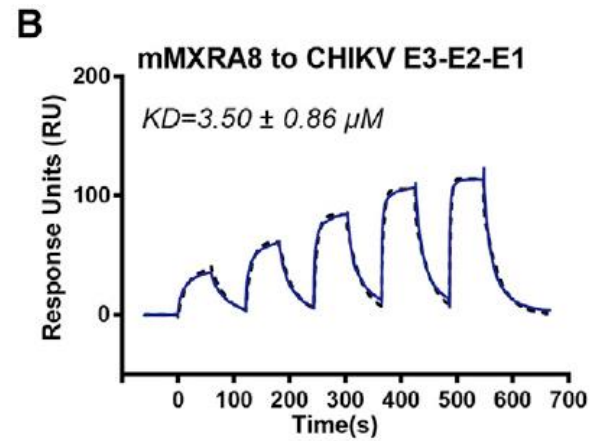
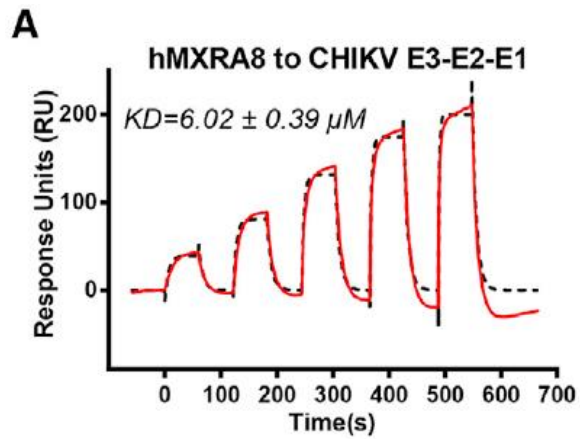
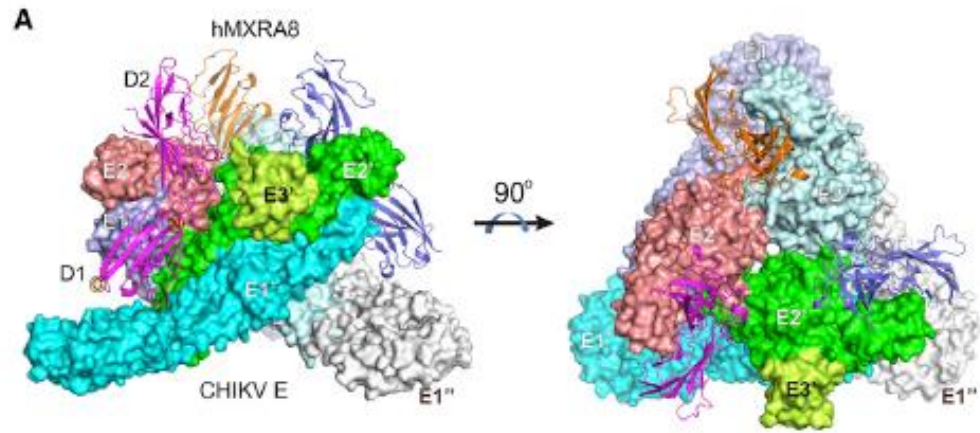
### Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor

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

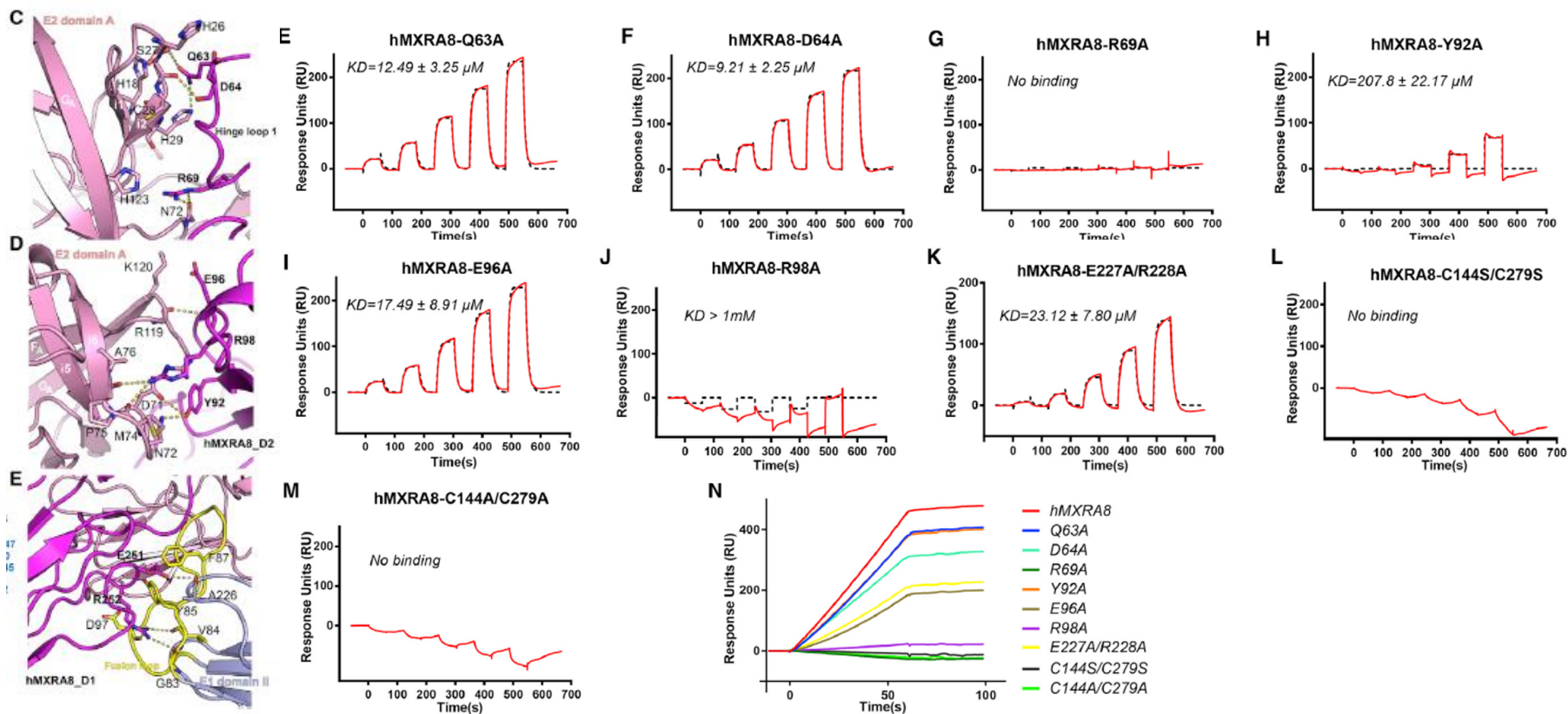
Katherine Basore,<sup>1</sup> Arthur S. Kim,<sup>1,2</sup> Christopher A. Nelson,<sup>1</sup> Rong Zhang,<sup>2</sup> Brittany K. Smith,<sup>1</sup> Carla Uranga,<sup>6</sup> Lo Vang,<sup>6</sup> Ming Cheng,<sup>3</sup> Michael L. Gross,<sup>3</sup> Jonathan Smith,<sup>6</sup> Michael S. Diamond,<sup>1,2,4,\*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



# 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





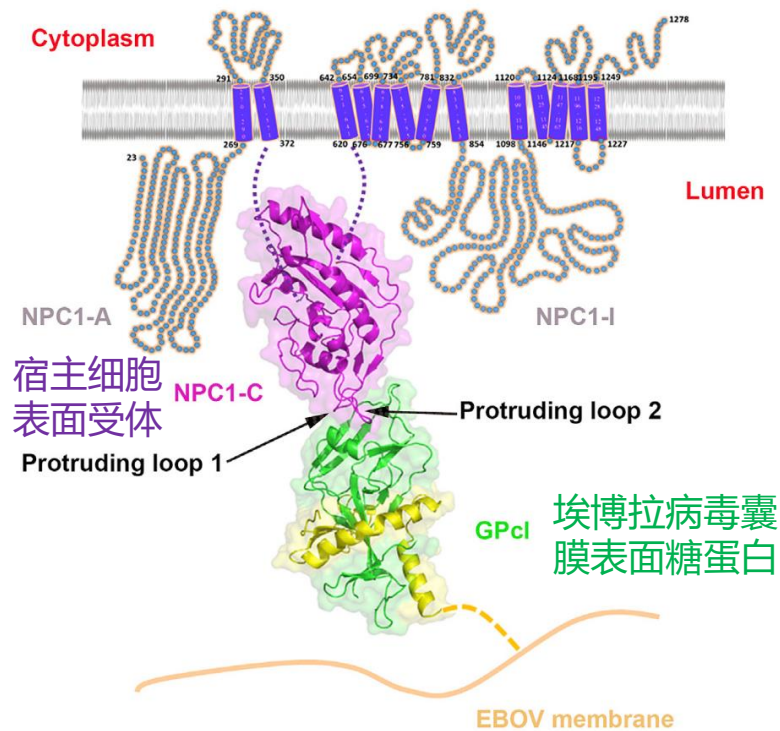
# 科研应用：埃博拉病毒入侵新机制研究

## Cell

### Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1



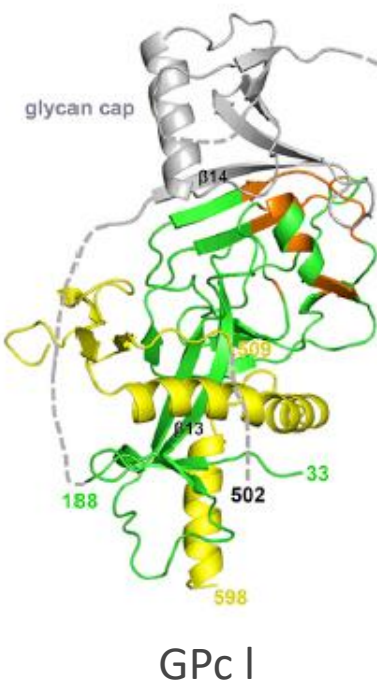
中科院院士  
高福 教授



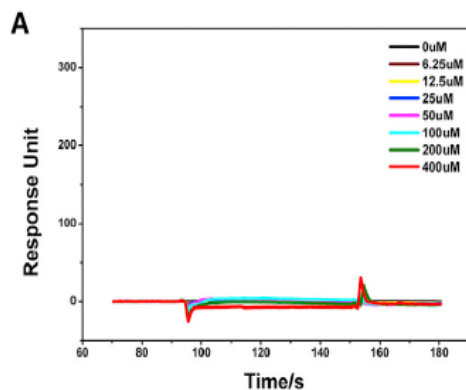
- NPC1负责胆固醇转运的多次跨膜蛋白。
- NPC1是埃博拉病毒入侵所必须的。但是NPC1分子如何介导病毒入侵却一直是个未解之谜。



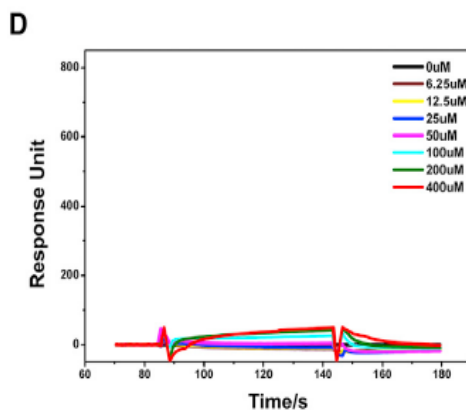
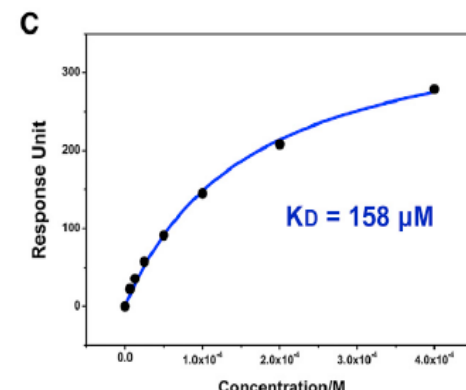
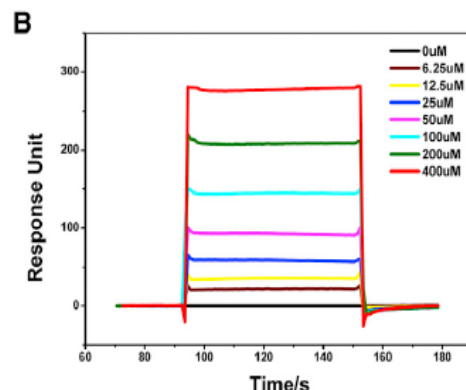
# 埃博拉病毒糖蛋白GPc I直接与宿主受体NPC1-C结合



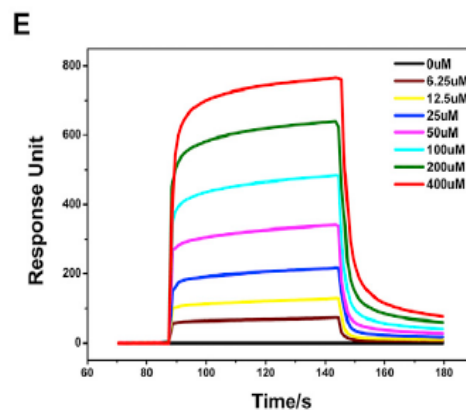
GP-ectoΔmucin +NPC1



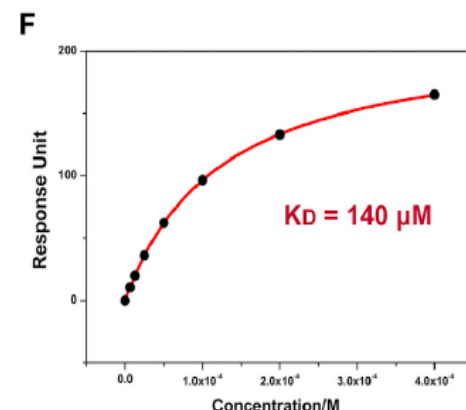
GPcI +NPC1



GP-ectoΔmucin +G-NPC1



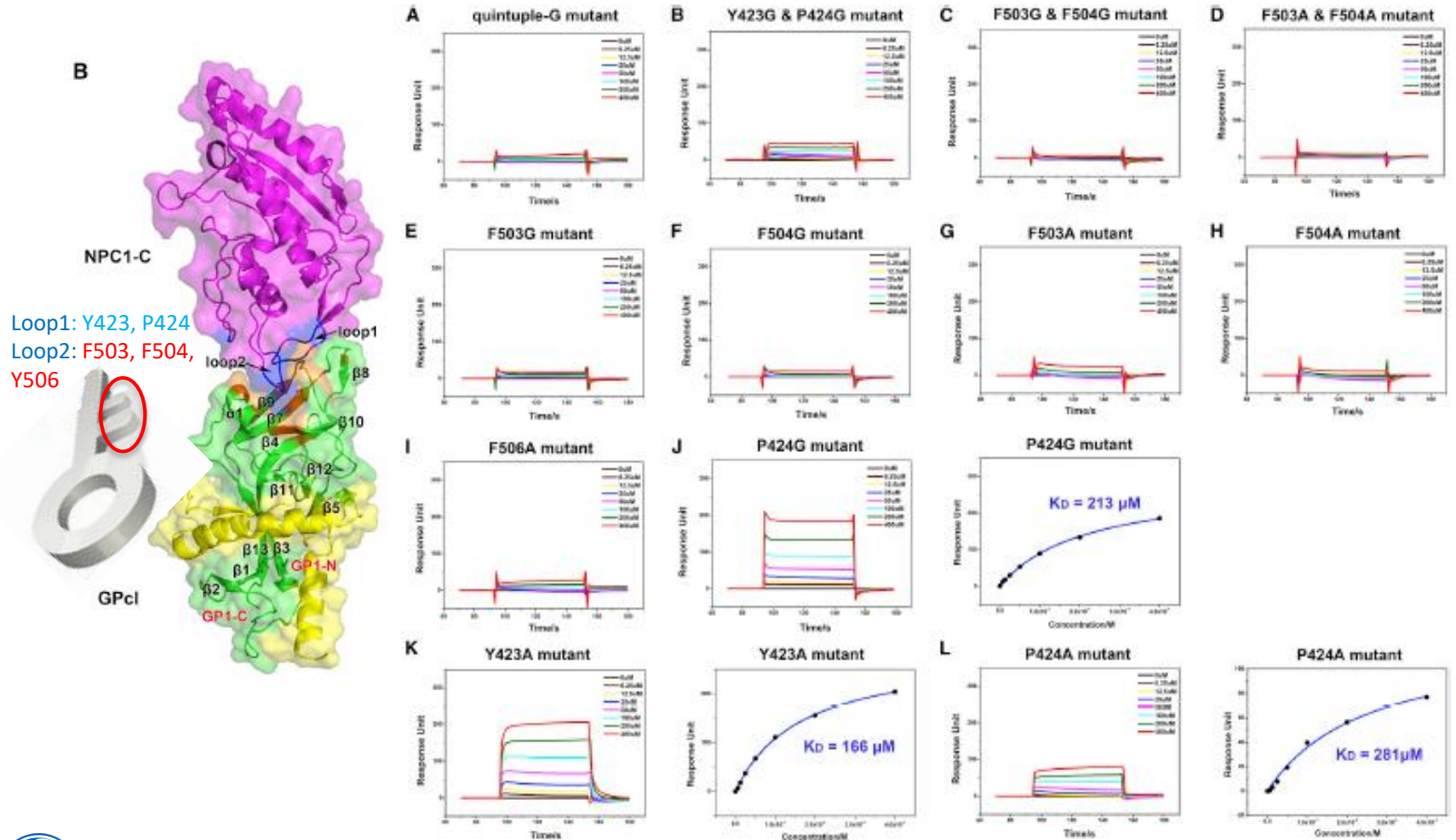
GPcI +G-NPC1



糖基化



# NPC1-C上与埃博拉病毒糖蛋白GP<sub>CI</sub>的结合氨基酸



两个Loop区可以用于设计“假钥匙”来堵住锁孔。



# GPC I与NPC1-C亲和力与PH密切相关

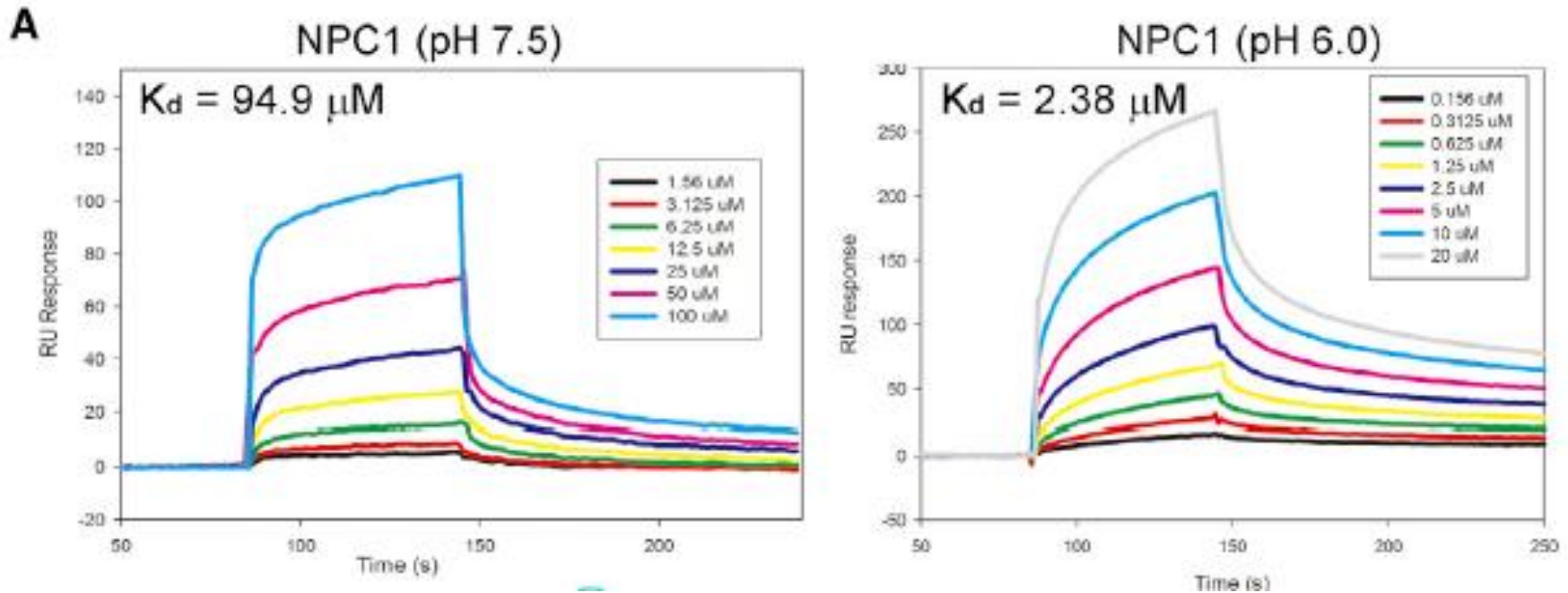
## Cell

### Structural Insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1) Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection

Article



清华大学  
颜宁教授



# 蛋白-小分子化合物



# 科研应用：小分子抗癌药物的研究

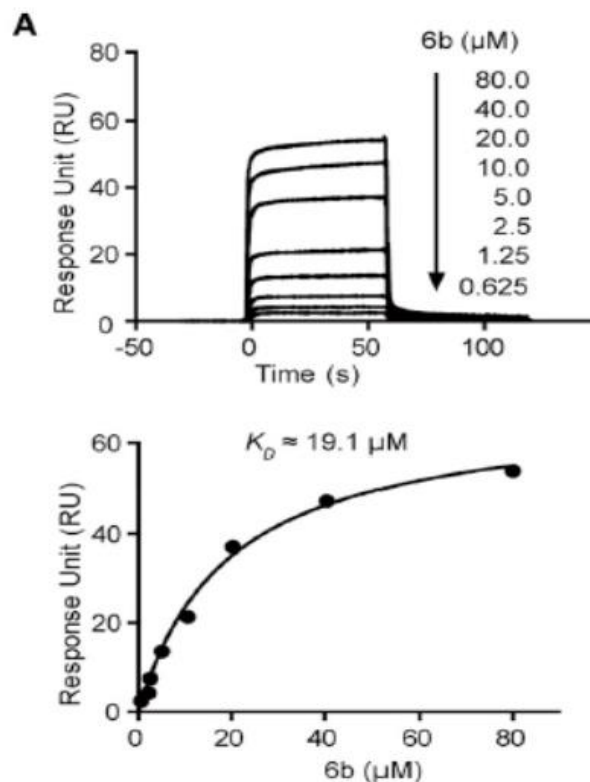
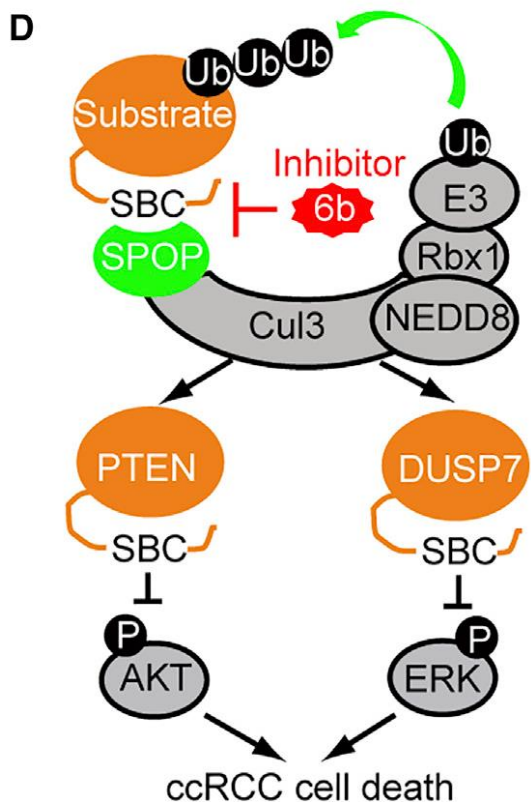


中科院院士  
上海药物所  
蒋华良 研究员

## Cancer Cell

### Small-Molecule Targeting of E3 Ligase Adaptor SPOP in Kidney Cancer

肾癌靶点



# 小分子天然产物新靶点研究



北京大学  
屠鹏飞教授

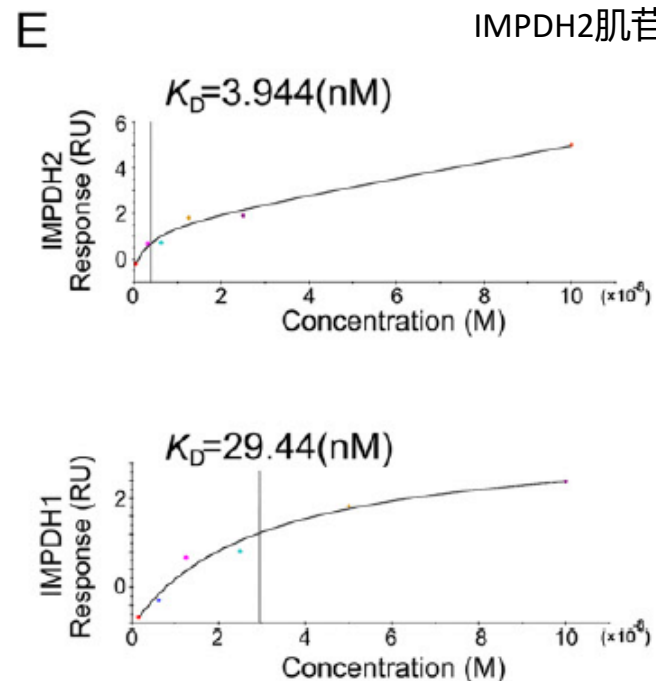
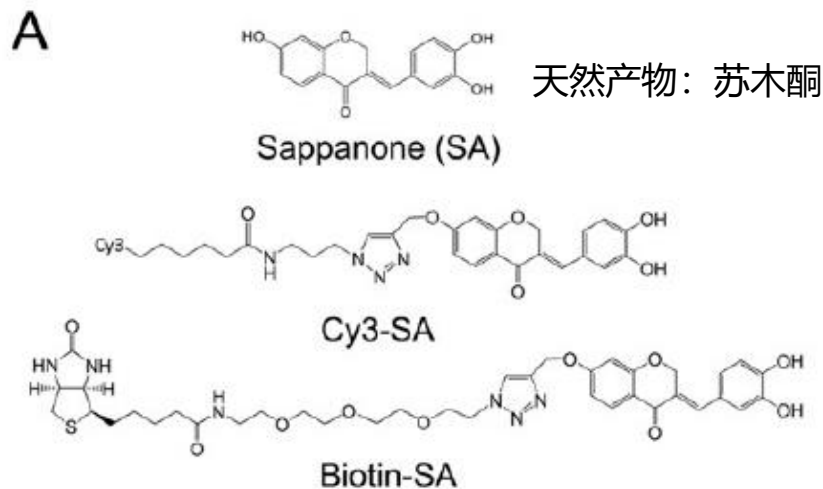


PNAS PLUS

## Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy

Li-Xi Liao<sup>a,1</sup>, Xiao-Min Song<sup>a,1</sup>, Li-Chao Wang<sup>a,b,1</sup>, Hai-Ning Lv<sup>a</sup>, Jin-Feng Chen<sup>a</sup>, Dan Liu<sup>c</sup>, Ge Fu<sup>a</sup>, Ming-Bo Zhao<sup>a</sup>, Yong Jiang<sup>a</sup>, Ke-Wu Zeng<sup>a,2</sup>, and Peng-Fei Tu<sup>a,2</sup>

抗神经炎症新靶：点  
IMPDH2肌苷单体脱氢酶



# 蛋白-核酸









# 蛋白-多糖

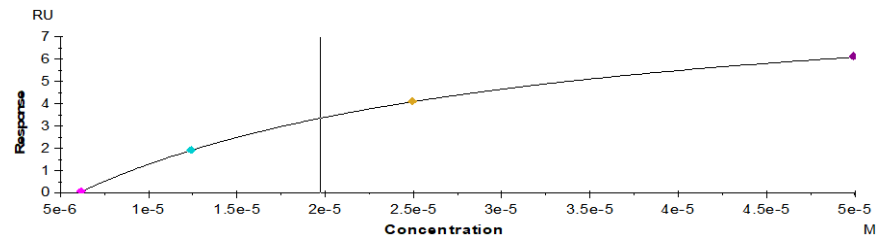
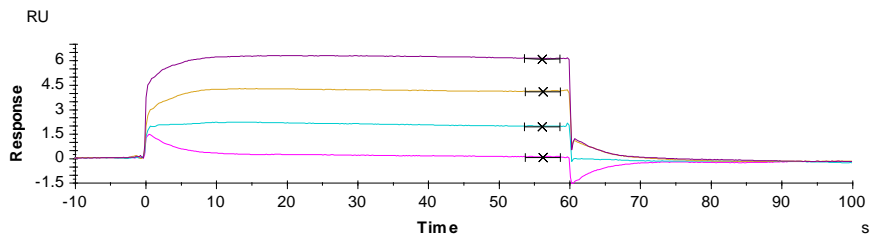
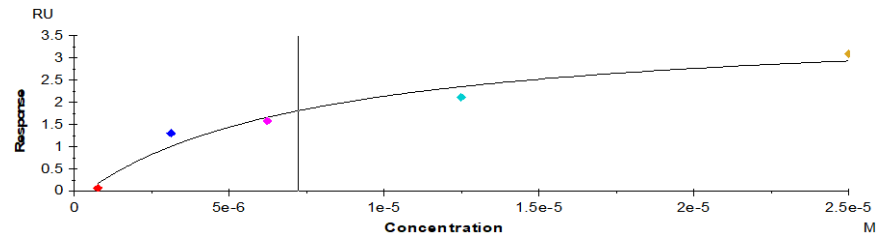
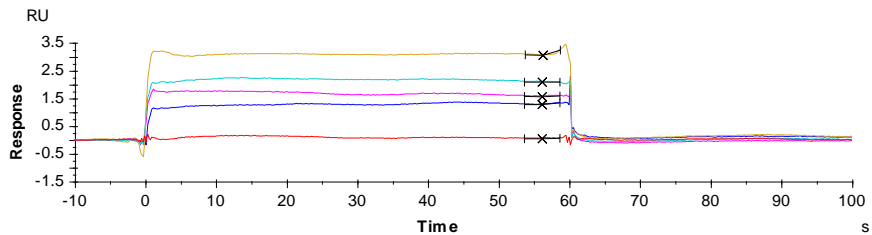
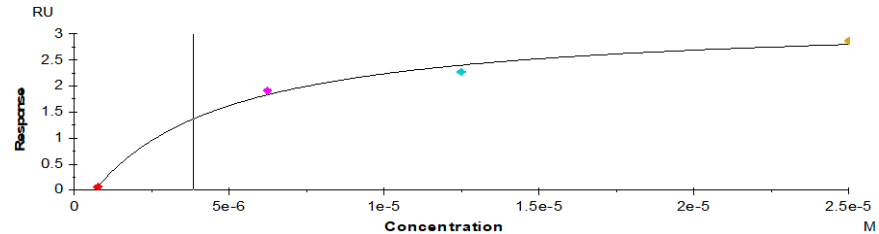
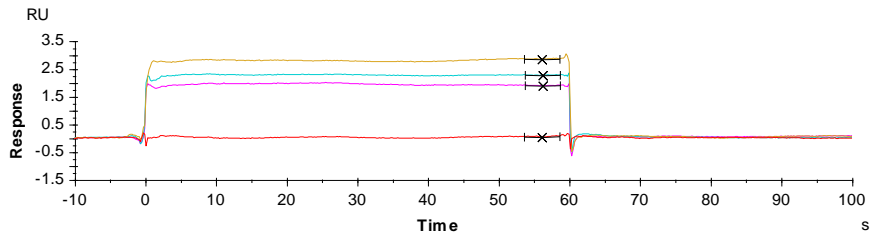
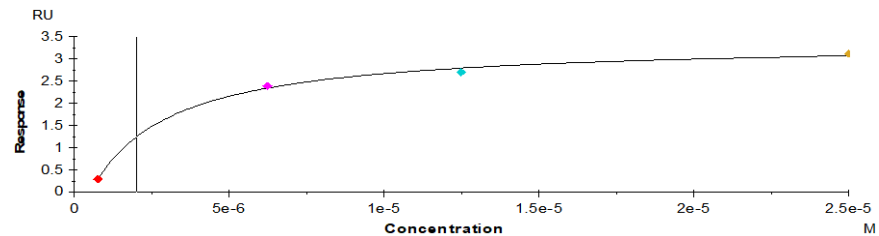
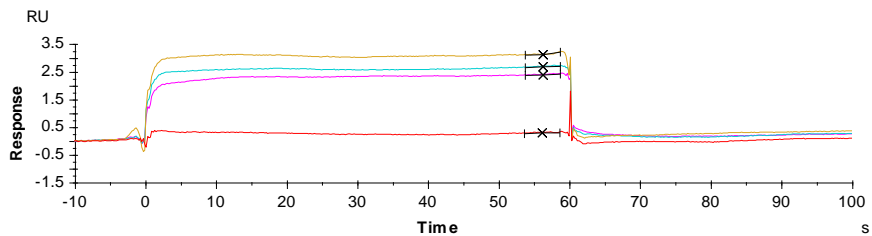


# 科研应用：老年痴呆—不同糖类抑制A $\beta$ 聚集分子机制究

- 阿尔茨海默病（AD），俗称老年痴呆，是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病，病因迄今未明；
- AD病人大脑神经毒性损伤中常见 $\beta$ -淀粉样蛋白（A $\beta$ ）的聚集；
- 研究发现，不同的糖类能够抑制A $\beta$ 聚集，但其分子机制未知。



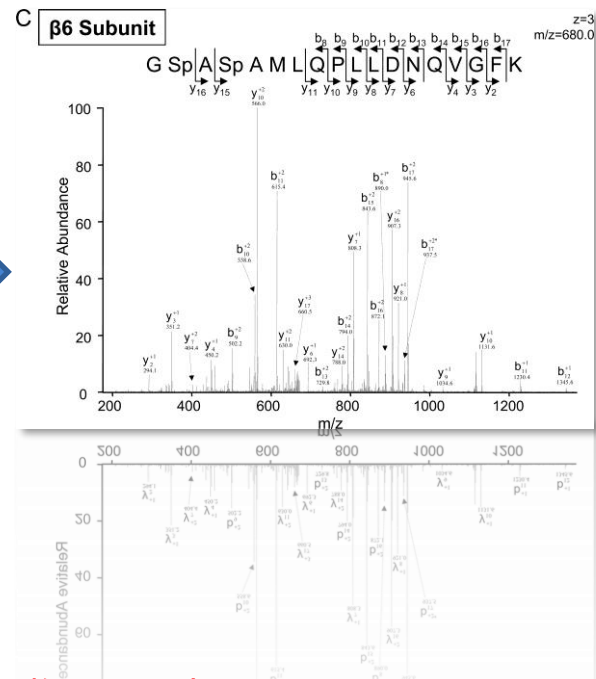
# 利用biacore检测不同糖类与A $\beta$ 的结合



# 未知互作因子的发现及中药活性成分的鉴定



垂钓  
回收



## 部分Biacore垂钓发表文献

1. Pan Y, et al. *Cell Communication and Signaling*, 2019, 17:54
2. Cao Y, et al. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(19):5359-5367.
3. Zhang Y, et al. *Journal of Chromatography*, 2013, 1293: 92-99.
4. Madeira A, et al. *Nature Protocols*, 2009, 4(7):1023-37.
5. Stigter E C A, et al. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 45(4):107-120.
6. Ivanov A S, et al. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, 42(1):14-21.
7. Peng M, et al. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2013, 940C(6):86.

已知药物，找靶点  
已知靶点，找活性分子



# Biacore助力中药有效成分的鉴定

Anal Bioanal Chem  
DOI 10.1007/s00216-016-9633-6



RESEARCH PAPER



第二军医大学  
张俊平 教授

## Identification of a ligand for tumor necrosis factor receptor from Chinese herbs by combination of surface plasmon resonance biosensor and UPLC-MS

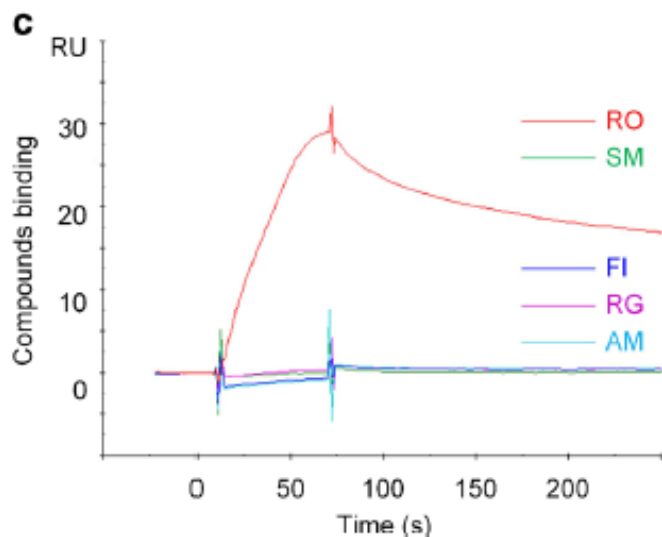
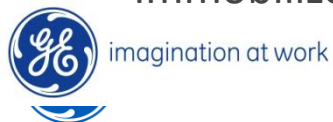


Table 1 Quantitative determination results of representative component from each herb

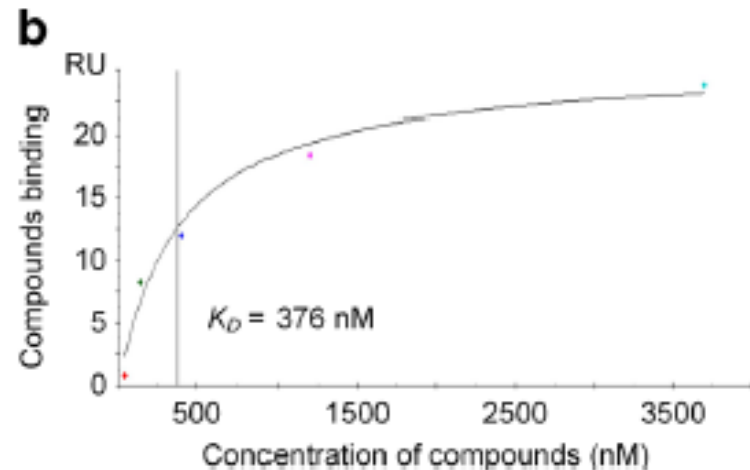
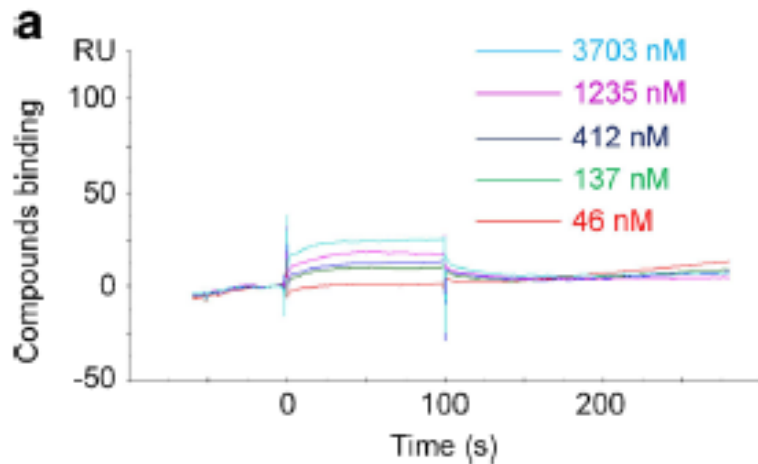
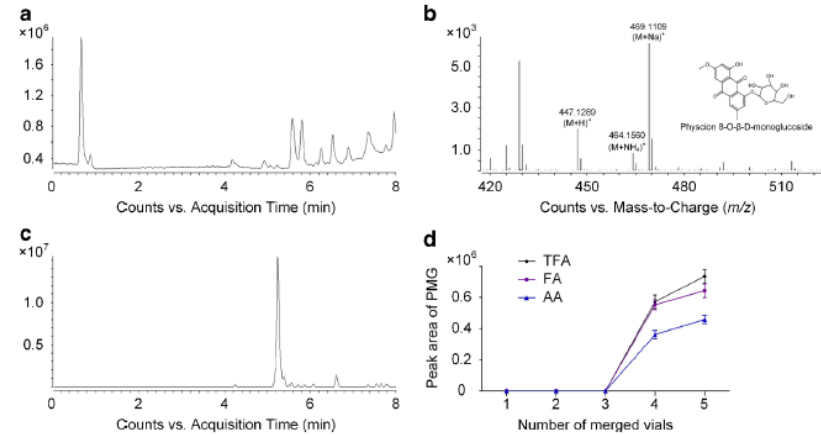
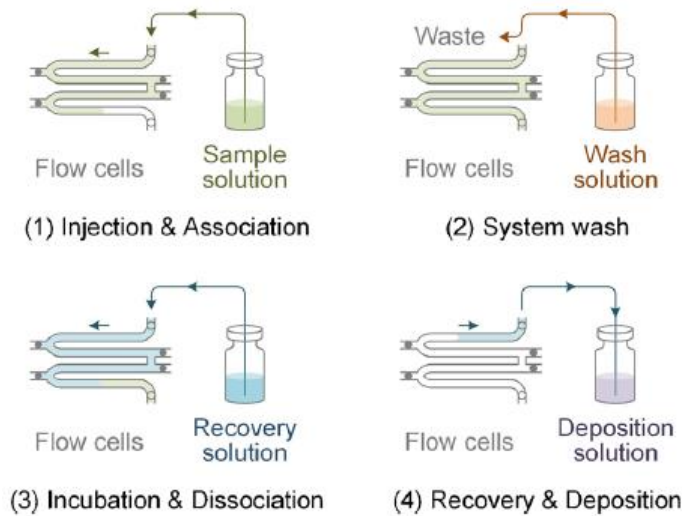
Number	Component name	Sample name	Concentration ( $\mu\text{M}$ )
1 大黄	Chrysophanol	RO	587.13
2 丹参	Tanshinone IIA	SM	425.30
3 大青叶	Indirubin	FI	139.98
4 甘草	Liquiritin	RG	3164.66
5 黄芪	Calycosin-7-glucoside	AM	256.81

PMG

Immobilized TNF-R1



# 大黄有效活性成分是PMG，直接与TNF-R1结合



PMG



# 课程小结

## Biacore 技术组成

- SPR
- 传感芯片
- 微流控系统



提供实时的，信息丰富的互作  
分析数据

## Biacore 主要分析步骤

- 固定 (配体)
- 进样 (分析物)
- 再生
- 数据分析



实验设计方法灵活，用以检测  
多种分子和反应种类

## Biacore 提供的数据

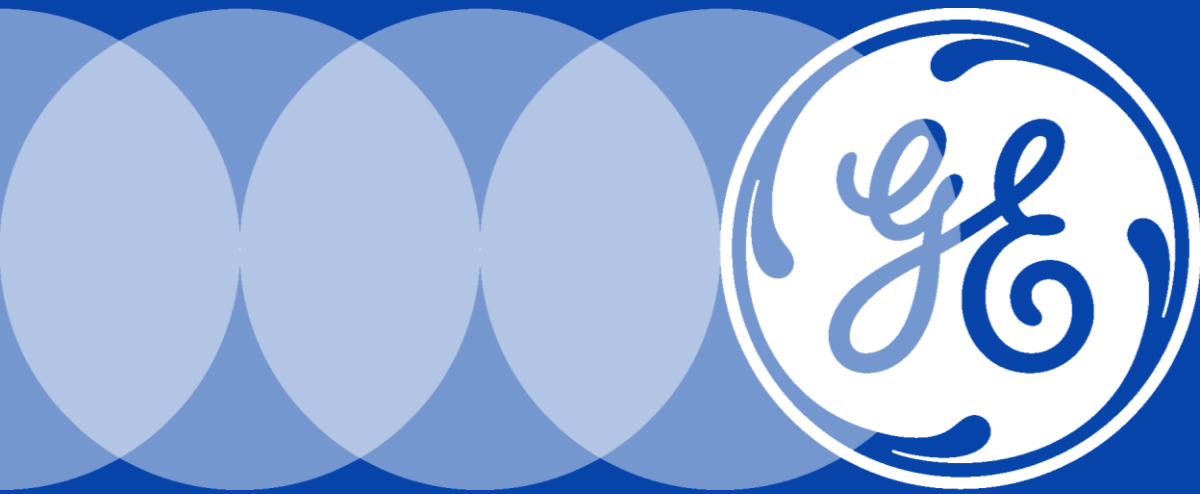
- 特异性，亲和力，动力学，浓度



提供解释生物分子功能和结构  
的多项信息

## Biacore 在基础科研中的应用







# Biacore的实验设计与方法

Imagination at work.

# 课程目标

- **Biacore应用类型**
- **Biacore实验流程**
- **偶联配体**
  - 预富集
  - 偶联配体
- **表面测试与再生条件的选择 (重要)**
- **实验设计和程序化进样**
  - 动力学
  - 稳态
- **捕获法**
- **生物素标记**



Biacore™ T200



# Biacore的应用类型



# 你关心什么信息？

- 在Biacore实验设计和检测之前，你必须明确你所关心哪种类别的数据？
- 所关心的数据类型不同，相应的实验设计和流程不同，数据的分析方法也不同。



# Biacore典型的数据类型

- **特异性分析**

- 目标分子与靶分子之间是否发生结合？特异性如何？

- **亲和力测定**

- 配体与分析物之间的结合强弱？

- **动力学分析**

- 两分子结合和解离的速率快慢？

- **多重结合分析**

- 哪些分子参与了复合体的形成？顺序是什么？

- **浓度测定**

- 样品中的目标分子浓度高低？

- **热动力学**



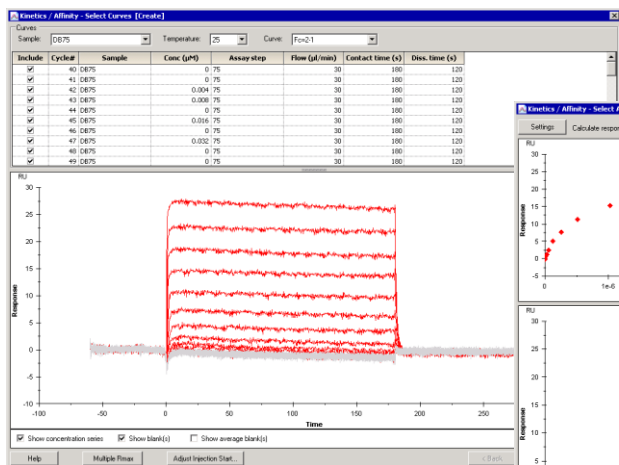
# 亲和力

- 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。**
- **实例**
  - 单抗与抗原表位之间的结合亲和力。
  - T细胞受体与II型MHC之间的结合强度。
  - 药物与靶受体之间的结合亲和力。
  - 分子诊断试剂与待测分子之间的结合强度。

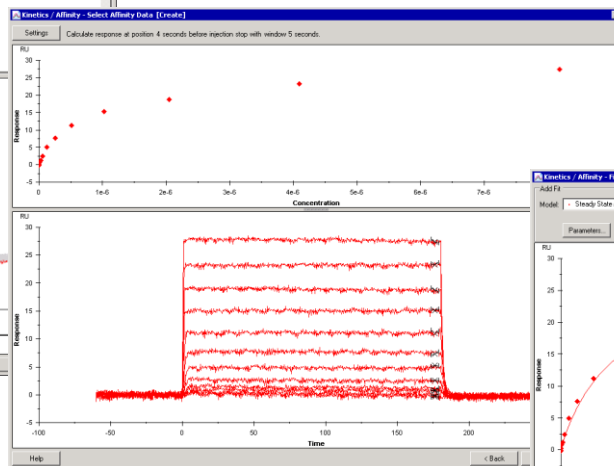




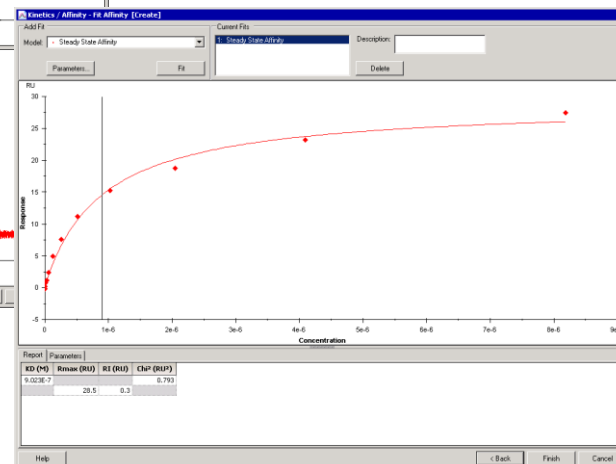
# 可以通过稳态方法的获得亲和力



✓ 将一系列浓度的分析物流过配体



✓ 获得稳态时的响应值



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

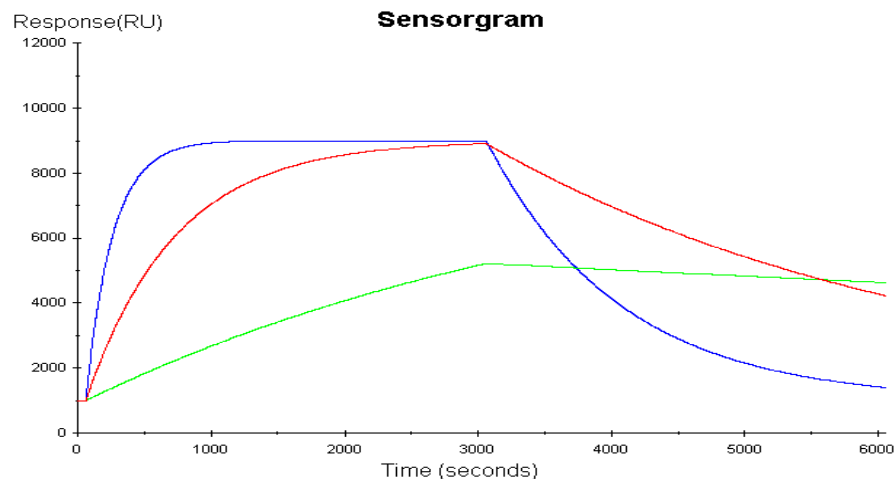
稳态的方法用在“快上快下”的结合模式下获得亲和力。



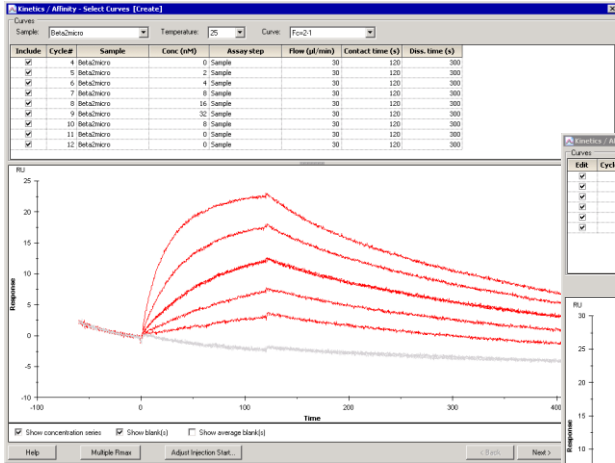
# 动力学分析

- 描述分析物与配体之间结合的速率 $k_a$ 和解离的速率 $k_d$ 。
- 动力学常数是亲和力之外，表征分子结合/复合物稳定性的重要信息。
- 相同的亲和力有可能具有完全不同的动力学特征。

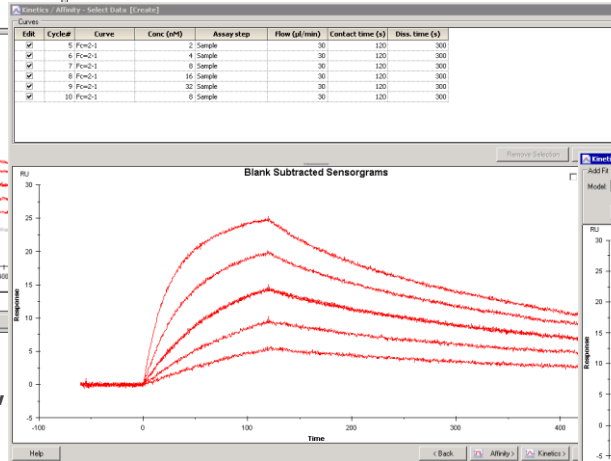
$$K_D = k_d / k_a$$



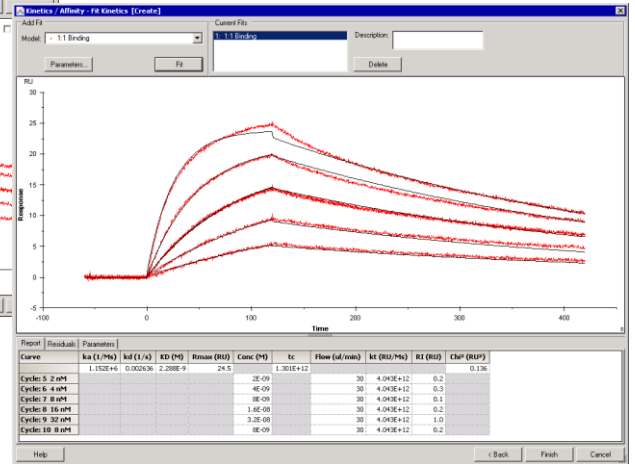
# 动力学分析



✓ 一系列浓度的分析物流过配体，获得结合+解离全过程的响应值。



✓ 所有传感图扣除零浓度的响应值 (Double Reference)。



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

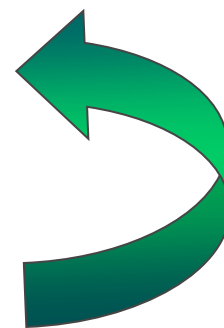
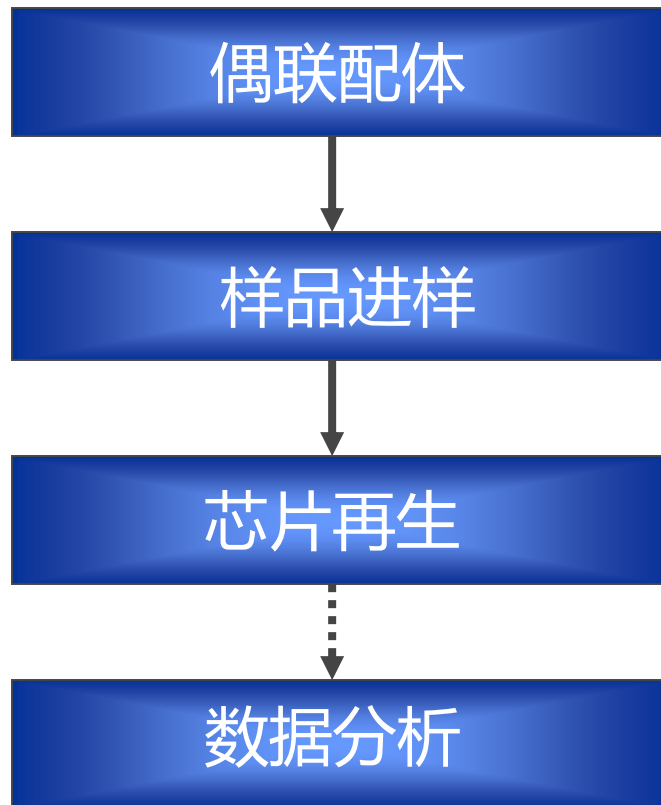
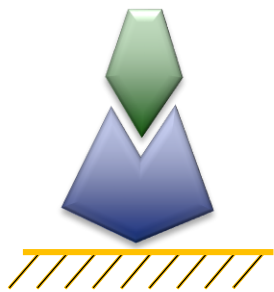
亲和力  $K_D$  由动力学常数  $k_a$ 、 $k_d$  获得，是结合和解离两个过程的综合结果。



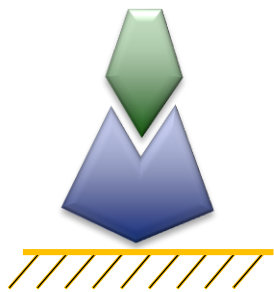
# Biacore的实验流程



# Biacore实验的基本流程



# Biacore实验的基本流程



偶联配体

样品进样

芯片再生

数据分析

预富集摸索

实验条件摸索



# 偶联配体 (Immobilization)

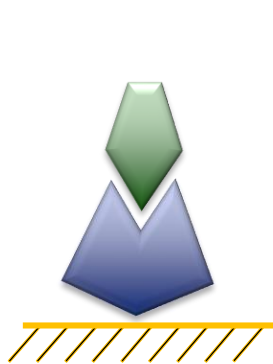
--蛋白/CM5芯片/动力学为例



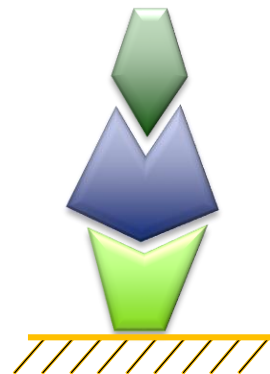
# 偶联 (Immobilization)和捕获 (capture)

## —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



捕获分子 Capturing molecule

- 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





# 直接偶联配体时需要考虑的因素

- 预富集（只针对CM系列芯片）
- 配体偶联水平
- 偶联配体的模式
- 其他考虑的因素：
  - 分子量
  - 蛋白纯度与状态
  - 等电点 pI
  - Buffer

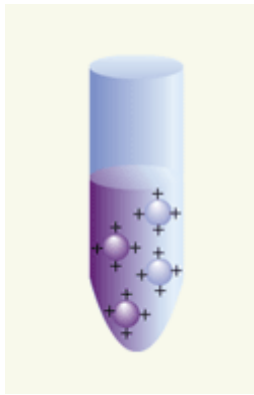


# 预富集 (Pre-concentration)

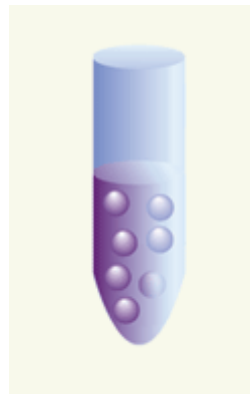
- 预富集的目的：在化学偶联过程，通过静电作用吸附并提高芯片表面附近的配体浓度，从而提高偶联的效率和减少配体消耗。

## 蛋白质等电点(pI)

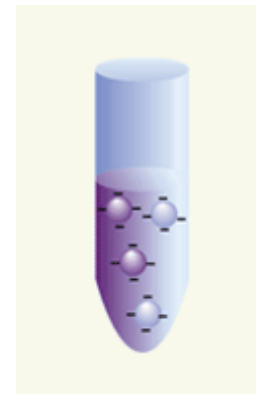
- 在某个pH时，蛋白质所带电荷的净值为零



$\text{pH} < \text{pI}$   
净电荷为正值



$\text{pH} = \text{pI}$   
净电荷为零



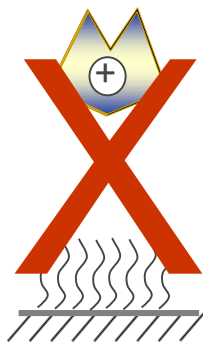
$\text{pH} > \text{pI}$   
净电荷为负值



# 预富集 (Pre-concentration)

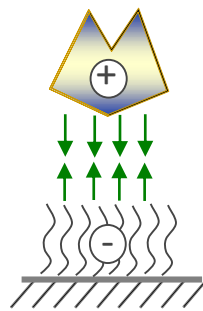
- 预富集的目的：在化学偶联过程，通过静电作用吸附并提高芯片表面附近的配体浓度，从而提高偶联的效率和减少配体消耗。

pH < 3.5



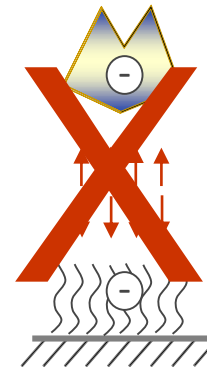
pH太低时，葡聚糖不带电，无法富集

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



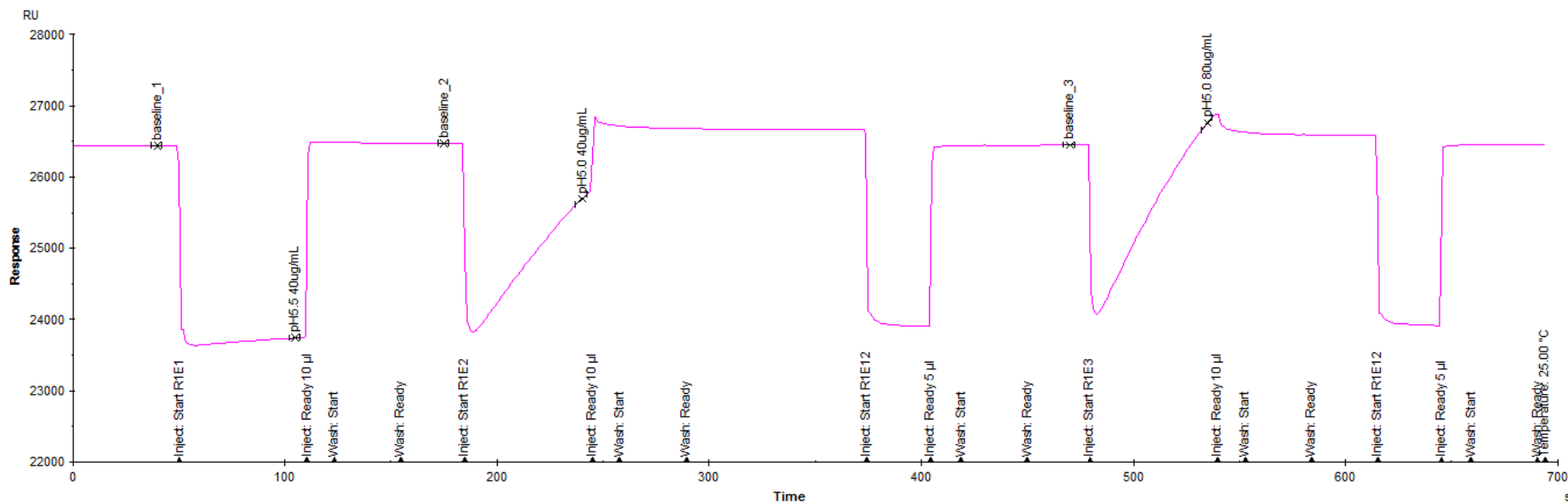
# 偶联pH的选择

- 通过实验步骤寻找合适的偶联pH
- 当  $\text{pH} > 3.5$  时，芯片表面葡聚糖基质携带负电荷
- 偶连缓冲液的pH应该高于3.5, 但低于配体蛋白的等电点
- 对于许多蛋白质, 10 mM 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 较为适合
- 蛋白配体的浓度一般介于10–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 初始可尝试20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 当无法获得理想预偶联效果时, 请检查样品的pH



# 最适预富集pH的选择

- 将配体稀释于不同pH的10mM醋酸钠缓冲液中，流经空白的芯片表面，测试静电吸附的效果。



- 够用原则
- 尽量温和



# 配体偶联水平的计算

- 配体偶联水平决定了芯片表面与分析物间的结合容量
- 不同分析方法所需的偶联水平也不同
  - 稳态分析、浓度测试、特异性：偶联水平尽量高
  - 动力学分析：低偶联水平

## 配体偶联水平的计算:

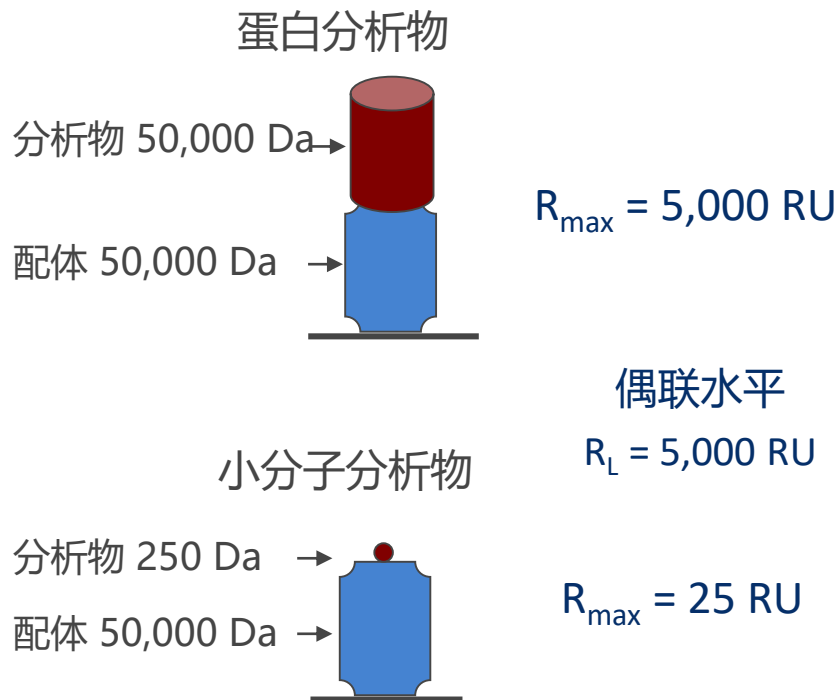
$$R_{\max} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times R_L \times S_m$$

$R_L$  = 配体偶联水平

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

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

**实际偶联量 = 1.5  $R_L$**



## 练习-计算 $R_L$

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

如果期望  $R_{\max}$  是 100 RU，应该在芯片上偶联多少配体？

Analyte MW = 25,000 Da

Ligand MW = 150,000 Da

$S_m = 1$

$R_{\max} = 100$  RU

$R_L = ?$



# 偶联wizad程序设置

**Immobilization - Immobilization Setup**

Chip type: **CM5**

Flow cells per cycle: **1**

**Flow cell 1**

Immobilize flow cell 1    Method: **Amine**

Aim for immobilized level    Ligand:      Dilute ligand

Specify contact time and flow rate    Contact time: **420** (s)    Flow rate: **10** (μl/min)

Blank immobilization

**Flow cell 2**

Immobilize flow cell 2    Method: **Amine**

Aim for immobilized level    Ligand:      Dilute ligand

Specify contact time and flow rate    Target level: **10000** (RU)    Wash solution: **50 mM NaOH**

Blank immobilization

**Flow cell 3**

Immobilize flow cell 3    Method: **Amine**

Aim for immobilized level    Ligand:      Dilute ligand

Specify contact time and flow rate    Contact time: **420** (s)    Flow rate: **10** (μl/min)

Blank immobilization

**Flow cell 4**

Immobilize flow cell 4    Method: **Amine**

Aim for immobilized level    Ligand:      Dilute ligand

Specify contact time and flow rate    Contact time: **420** (s)    Flow rate: **10** (μl/min)

Blank immobilization

Help    Custom Methods...    <Back    Next>    Close

**Immobilization - Rack Positions**

Sample and Reagent Rack 1

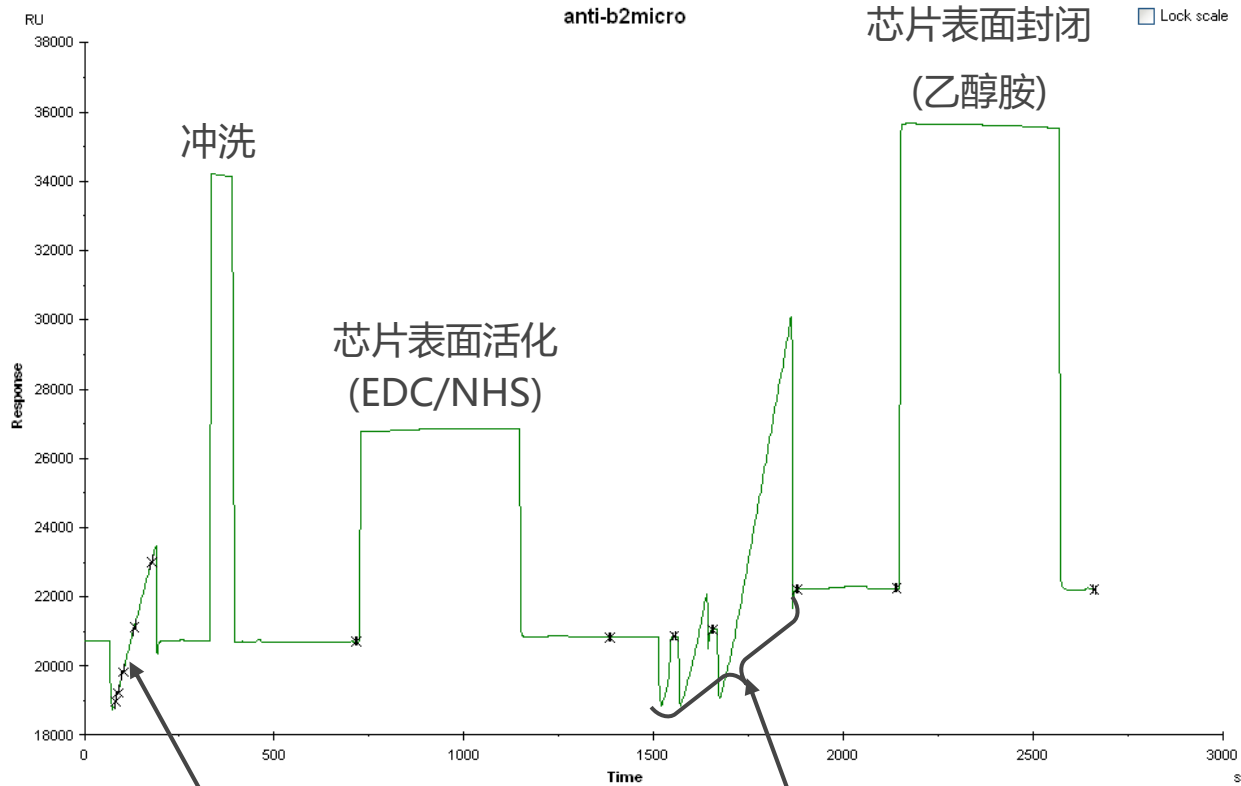
Position	Volume (μl)	Content	Type
R1 D1	166	ligand	Immob Fc 2
R1 D2	68	50 mM NaOH	Immob Fc 2
R1 D3	99	EDC	Immob Fc 2
R1 D4	99	NHS	Immob Fc 2
R1 D5	Empty	EDC/NHS, min. capacity 124μl	Immob Fc 2
R1 D6	139	Ethanolamine	Immob Fc 2

Help    Menu    Eject Rack    < Back    Next >    Close





# 使用Target程序自动控制偶联水平

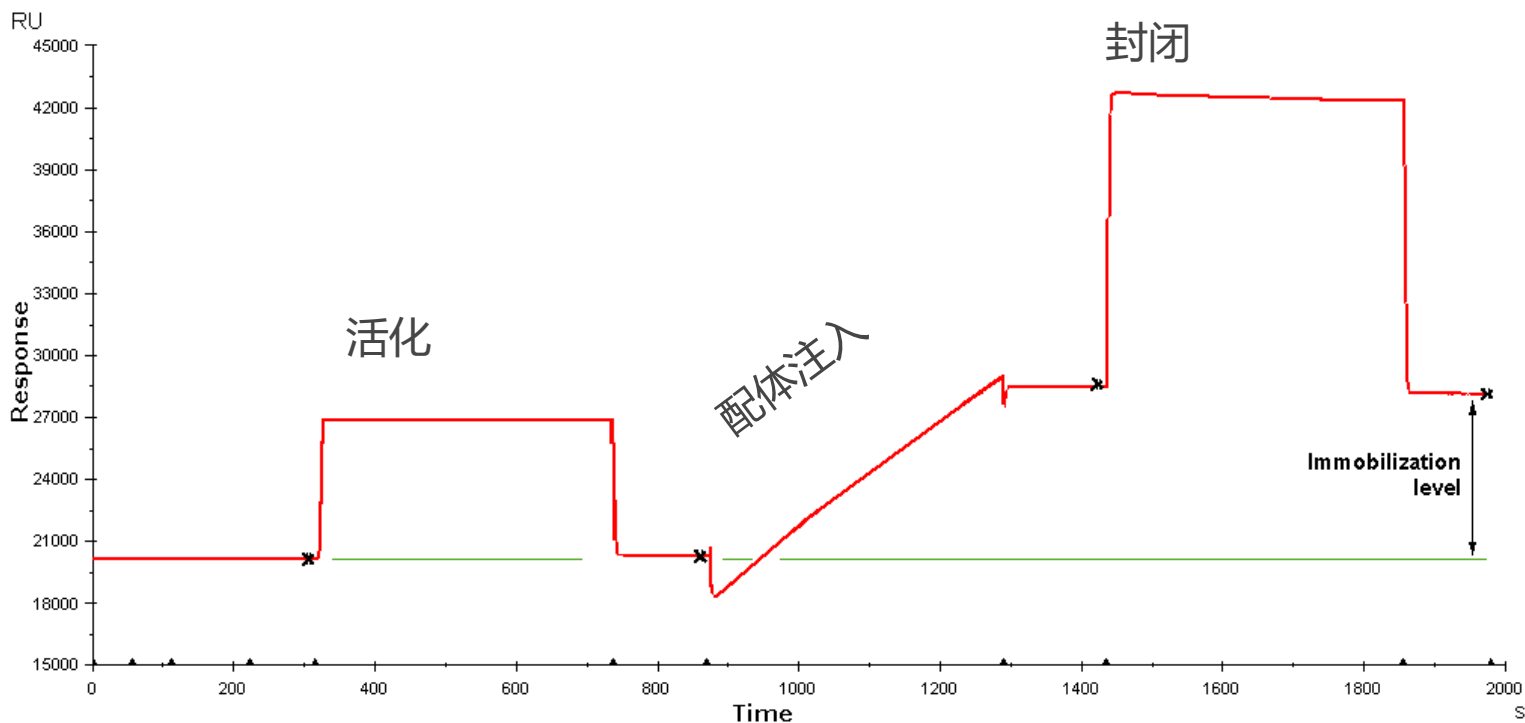


空芯片静电吸附  
测试预富集能力

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



# 使用Contact Time程序实现高偶联水平



- 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



# 偶联配体时需要考虑的其他因素

- **分子量**
  - 小分子不宜做配体
- **蛋白纯度 (>90%)**
- **等电点**
  - 酸性蛋白可以采用别的芯片或者偶联方式
- **Buffer**
  - 偶联阶段，不能选用Tris等含有伯胺基的缓冲液
  - 尤其注意商品化配体的缓冲液
- **结合价 (结合位点数)**
  - 将多价分子偶联于芯片上，比如抗体IgG
- **利用其它功能团进行偶联 (巯基、醛基等)**
- **蛋白活性的保持**
  - 使用新鲜的，具有活性的样品；偶联后，需保持蛋白活性



# 进样测试和再生条件的选择

--蛋白/CM5芯片/动力学为例

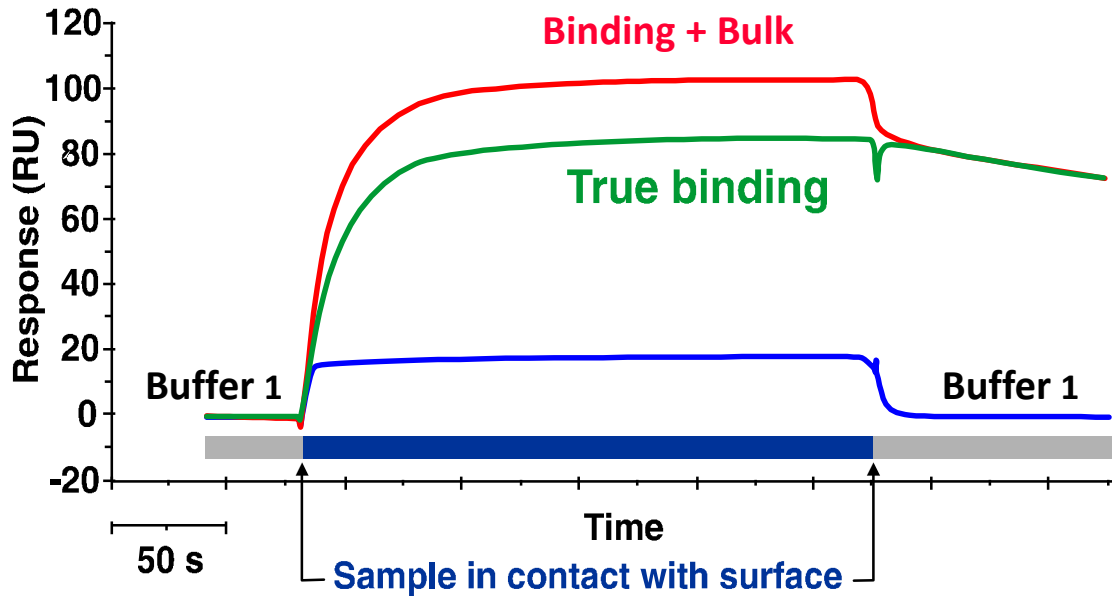


# 分析物样品注意事项

- **样品是否均一?**
  - 多聚物, 异构体
- **样品中是否有高折光率物质?**
  - 甘油, 蔗糖, 咪唑等
- **分析物的纯度如何?**
  - 动力学/亲和力测定: 纯度 > 90%
  - 特异性/浓度测定: 细胞裂解液、血清等混合样品
- **分析物是否有活性? (新鲜, 有活性)**
- **是否存在非特异性结合? (检查参比通道)**
- **使用运行缓冲液稀释**



# 参比通道与容积效应 (Bulk Effects)

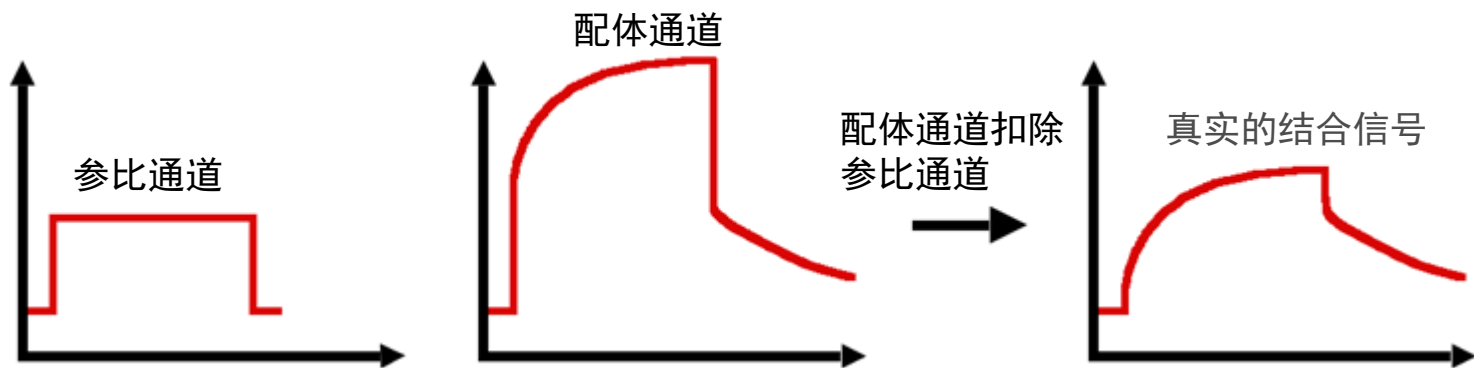
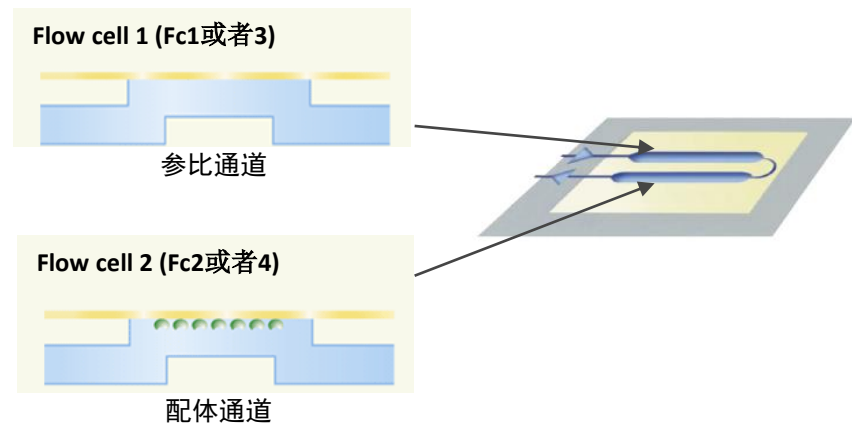


- 容积效应 (Bulk effect)是由于样品溶液与运行缓冲液折射率的差异。
- 容积效应并不反映真实的生物分子结合。
- 容积效应需要通过设置参比通道来扣除。



# 参比通道 (Reference surface)

- 参比通道应该设置在配体通道上游
- 测量进样阶段结合信号的时候，扣除参比通道信号对检测结果非常重要
- 尽可能保证样品与运行缓冲液折光率一致。



# 参比通道的设计

- **空白通道**

适用于大多数实验

检查和葡聚糖表面相关的非特异性结合

- **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

减少了芯片表面携带的负电荷，从而减少非特异性结合

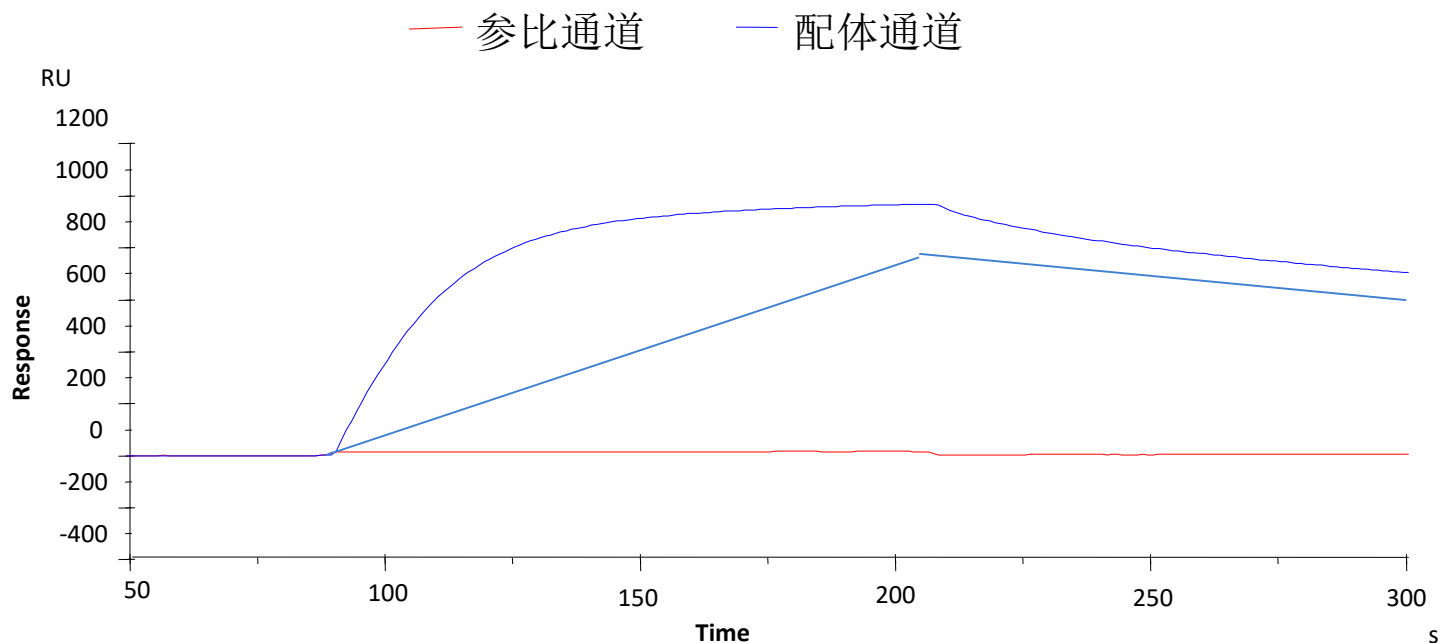
- **偶联了伪装配体 (dummy ligand) 的通道**

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。





# 芯片进样测试 (surface test)

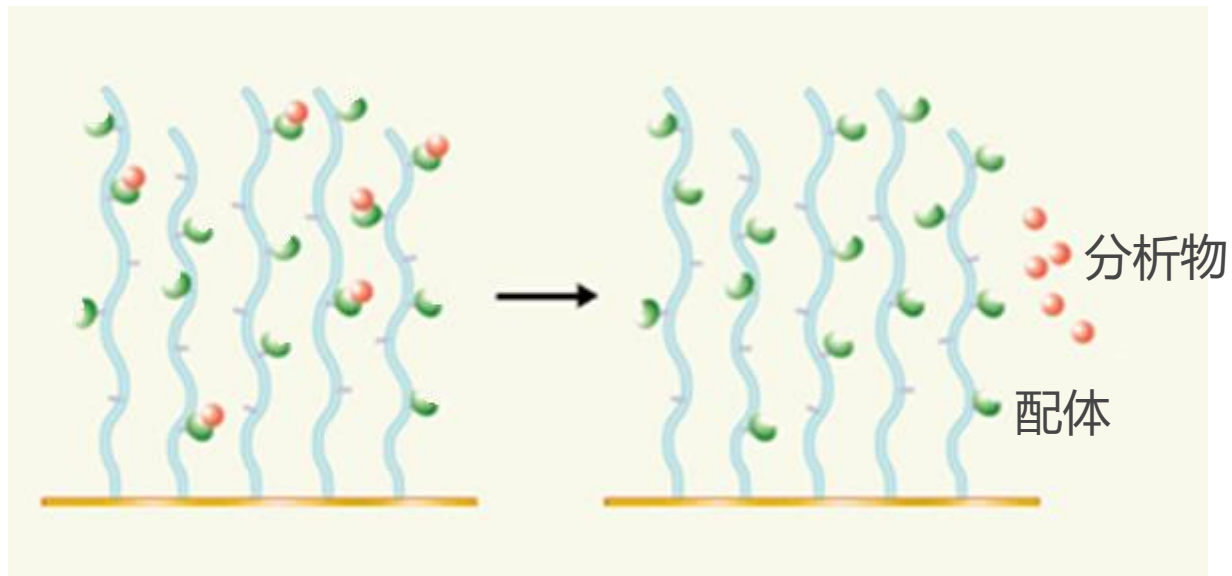


- 在实际分析开始前, 进行一次进样操作
- 使用常规的分析物浓度  
蛋白-蛋白/核酸 (10nM-100nM-1000nM)  
蛋白-小分子/多肽 (10 $\mu$ M-100 $\mu$ M-1000 $\mu$ M)
- 传感图能提供有用的分子相互作用信息 (结合时间、解离时间)
- 用来评估对照表面上的非特异性吸附的结合水平

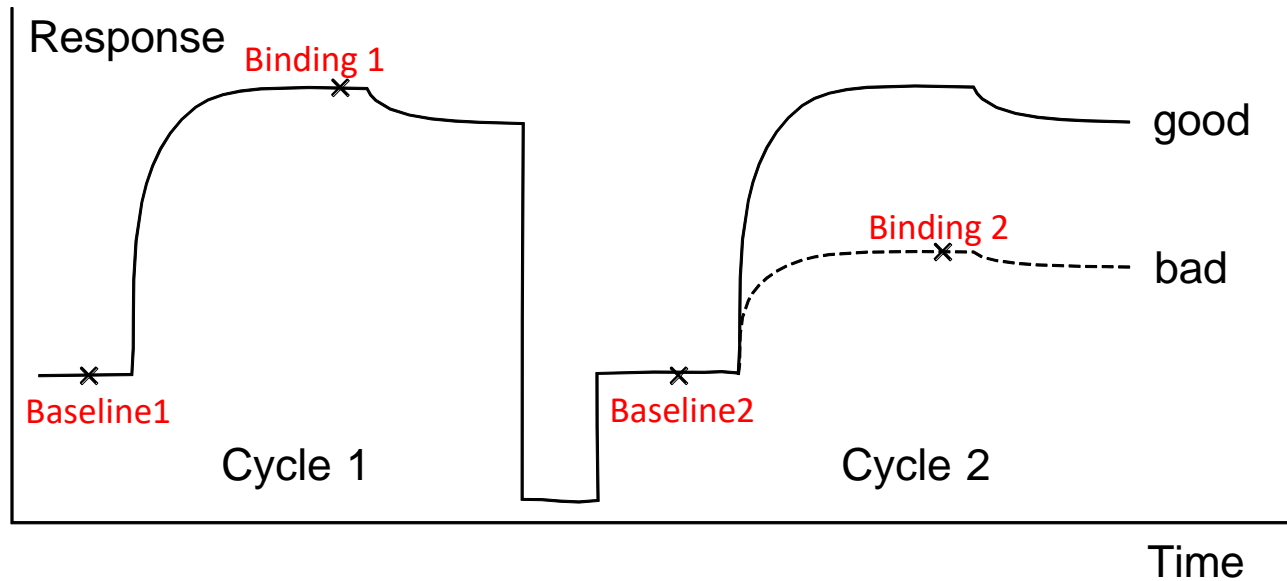


# 再生条件的选择

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



# 再生条件的选择-测试



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



# 再生条件的选择-小结

- **理想的再生**

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

- **过于温和的环境**

结合水平逐渐降低，基线值逐渐增高

- **过于苛刻的环境**

结合水平逐渐降低，基线维持稳定



# 常用的再生条件

- 最适的再生环境内因样品和组合不同而不同
- 相对于可检测的分子的广泛性，再生条件可选择的范围相对较小

样品类型	推荐再生条件
抗体	10 mM glycine-HCl ( pH 3-pH 1.5)
非抗体类蛋白	10 mM glycine-HCl ( pH 3-pH 1.5) MgCl <sub>2</sub> (1-4 M) NaOH (1-50 mM)
核酸	双链: 1mM HCl 单链: 1-50mM NaOH
小分子	一般无需再生
脂单层	10-100mM NaOH或HCl
脂双层	异丙醇:50mM NaOH (体积比2: 3)
NTA芯片	EDTA

- 参考文献

- Biacore网站的再生数据库

 **注意再生试剂与运行缓冲液的兼容性**



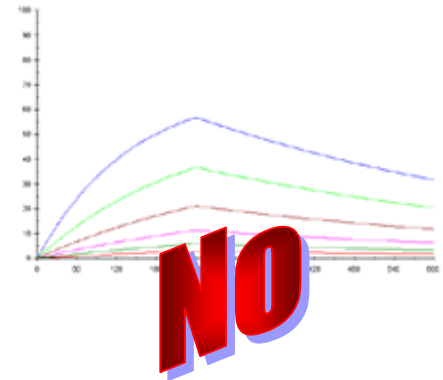
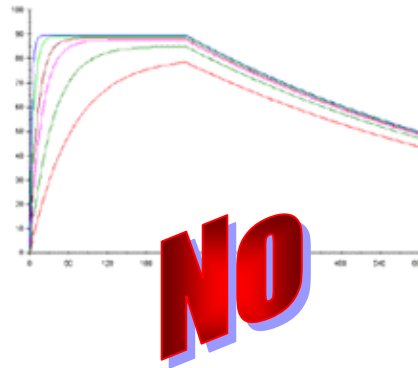
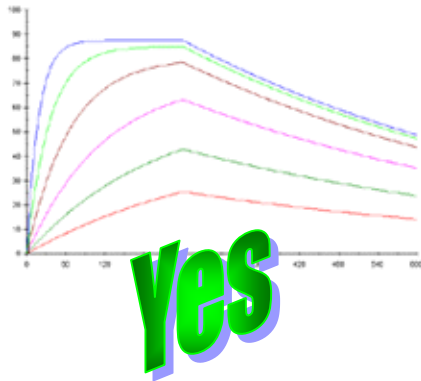
# 实验设计和程序化进样

--蛋白/CM5芯片/动力学为例

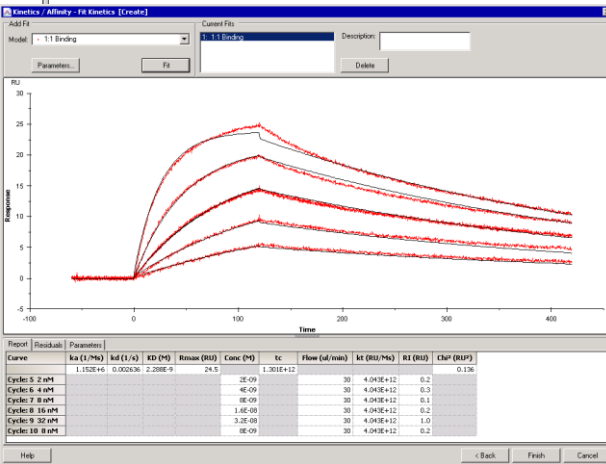
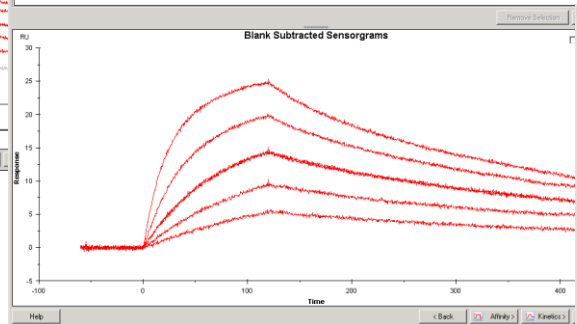
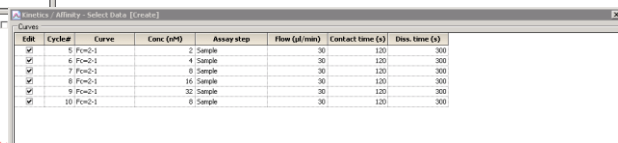
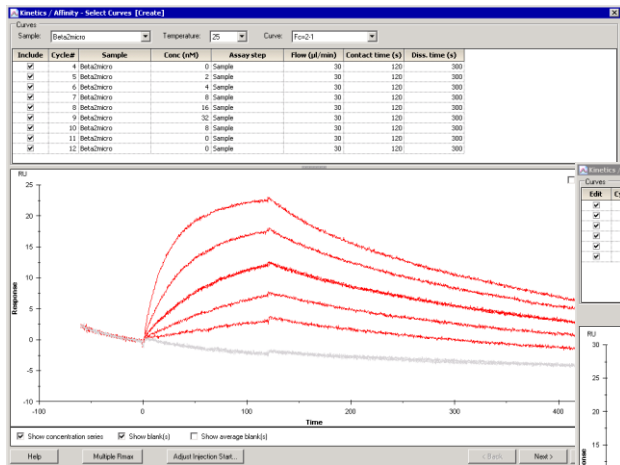


# 动力学分析实验设计

- 至少5个浓度梯度
- 低偶联、高流速
- 亲和力 $K_D$ 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

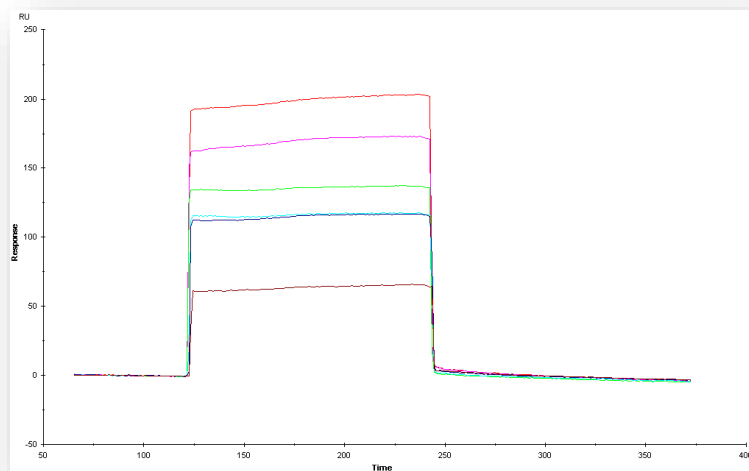
✓ 通过拟合所有曲线，获得动力学  $k_a$ 、 $k_d$  和亲和力  $K_D$ 。  $K_D = k_d/k_a$ 。



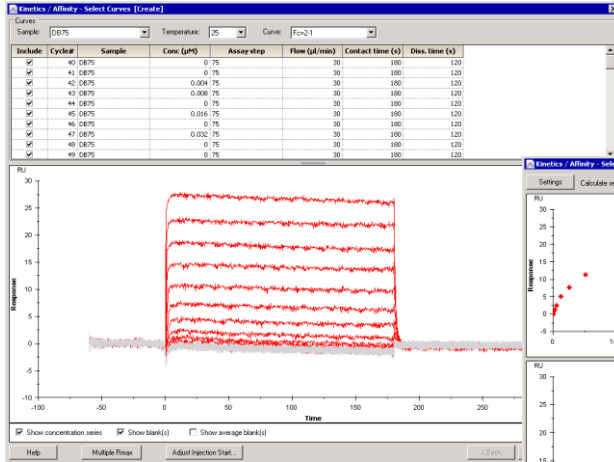


# 稳态分析

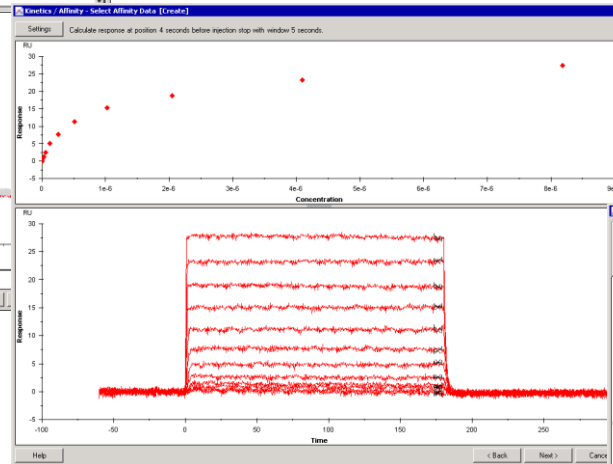
- 将梯度浓度分析物流经配体，测量**达到稳态时**响应值
- **高配体偶联水平**（高配体浓度、偶联流速、偶联上样时间）
- 浓度范围至少能够达到 20-80% 的饱和度(Rmax)
- 设置参比通道
- 设置至少一个浓度的样品重复（间隔完成）
- 设置零浓度样品



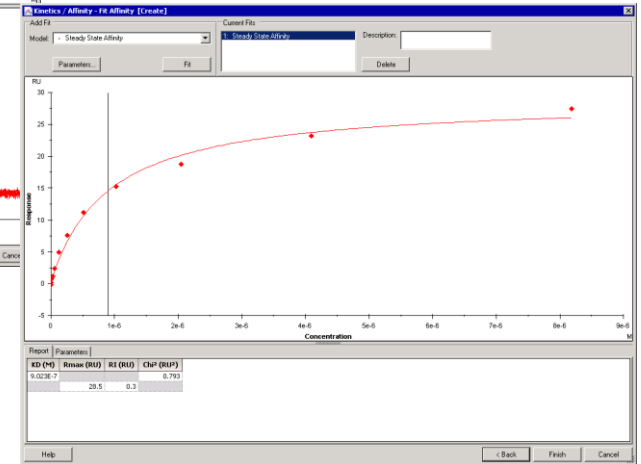
# 稳态分析的数据拟合



✓ 选择浓度梯度和曲线



✓ 获得稳态时的响应值。



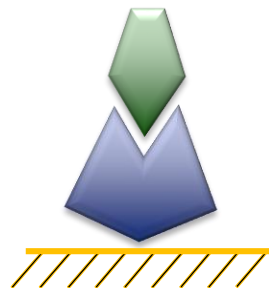
✓ 以浓度为x坐标，稳态响应值为Y值，通过拟合“饱和曲线”获得亲和力 $K_D$ 。



# 捕获法

## 直接偶联/偶联

- 共价反应
- 造成配体定向不均一性
- 偶联量高



### Examples

- Amine coupling
- Ligand thiol coupling
- Surface thiol coupling
- Maleimide coupling
- Aldehyde coupling

## 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

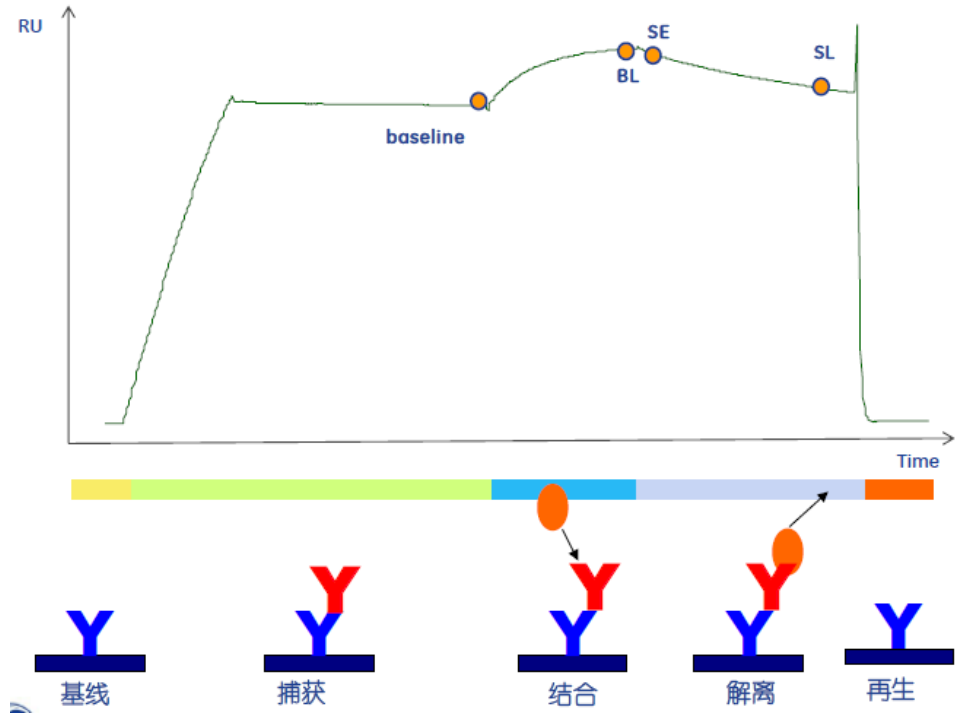
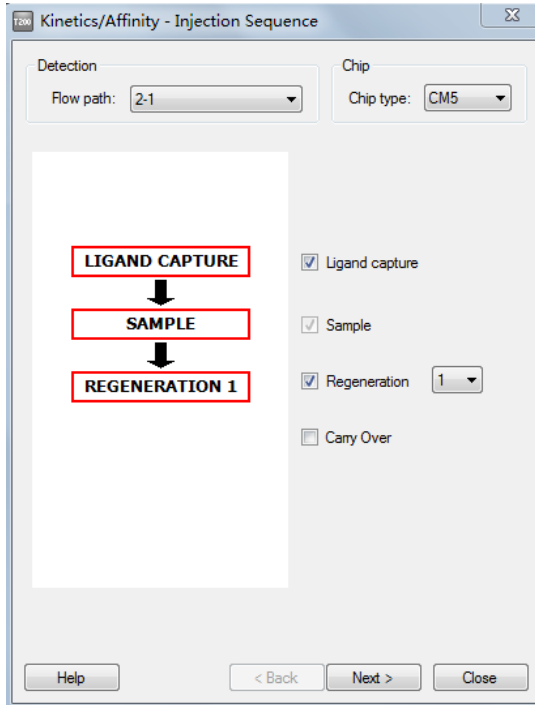


### Examples

- Anti-mouse Ig – MAb
- Anti-GST - GST
- NTA – 6His
- Anti-His – 6His
- Anti-FLAG – FLAG



# 捕获法



## 捕获法优点

- 操作简便，SOP操作无须方法开发
- 检测速度快，5分钟完成一个样
- 芯片反复使用、运行成本更低



# 共价偶联? 捕获?

配体稳定性差



捕获

配体的纯度低



捕获

共价结合后活性丢失



尝试其他官能团或捕获

酸性配体



捕获

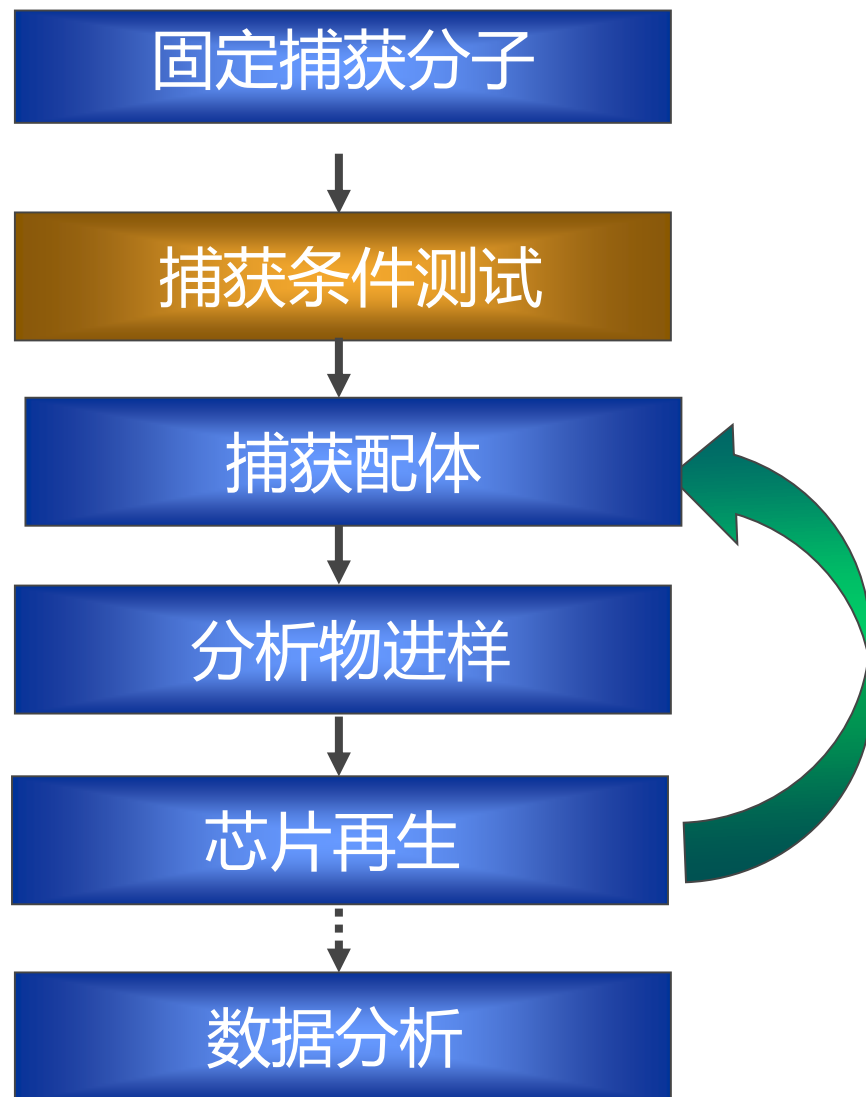
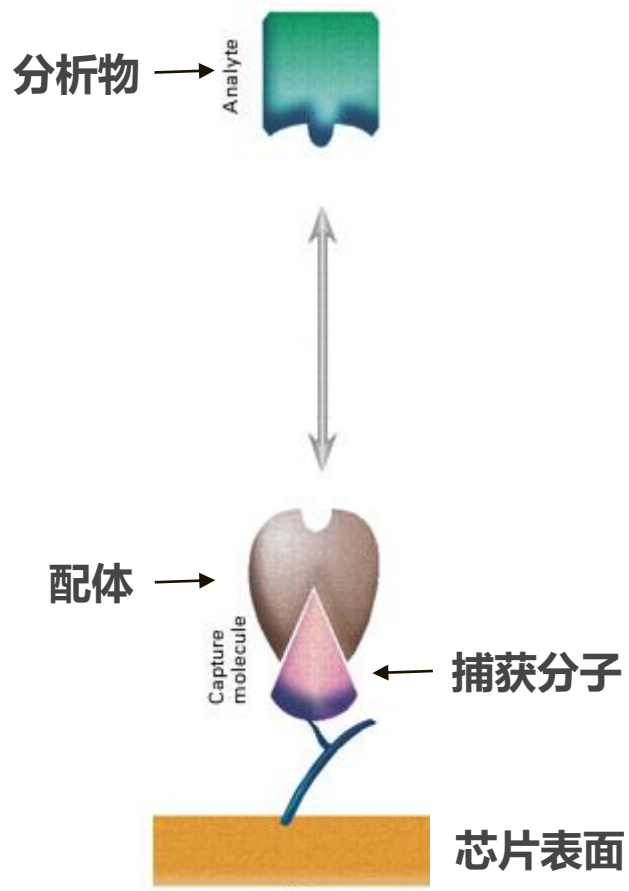
再生困难



捕获/单循环动力学



# Biacore捕获方法的基本流程



# Biacore 捕获方法的解决方案

## 捕获芯片

- **SA 芯片**：生物素标记的分子，如核酸、糖类等（不可逆性捕获）
- **CAP 芯片**：生物素标记的分子（可逆性捕获）
- **Protein A/G/L**：所有哺乳类动物抗体
- **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

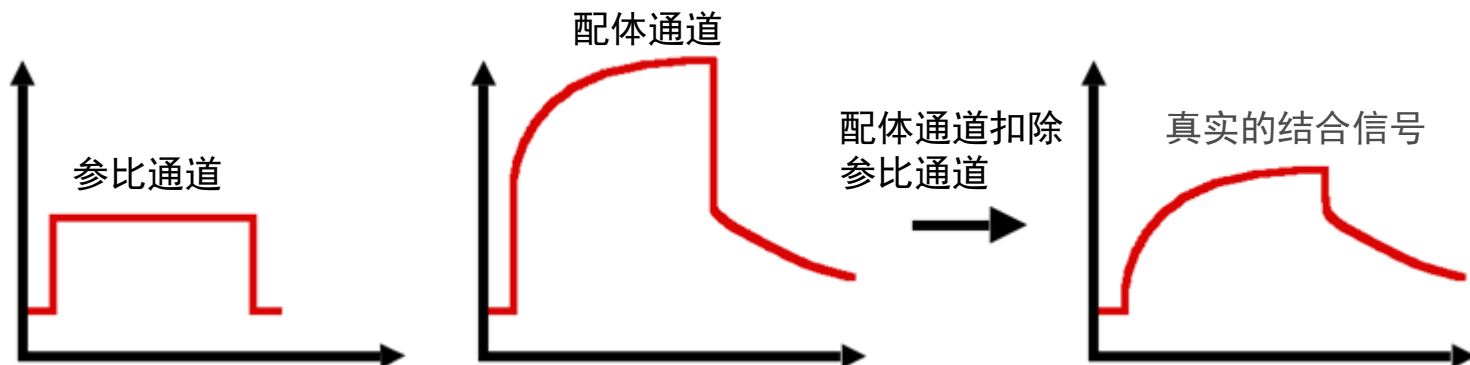
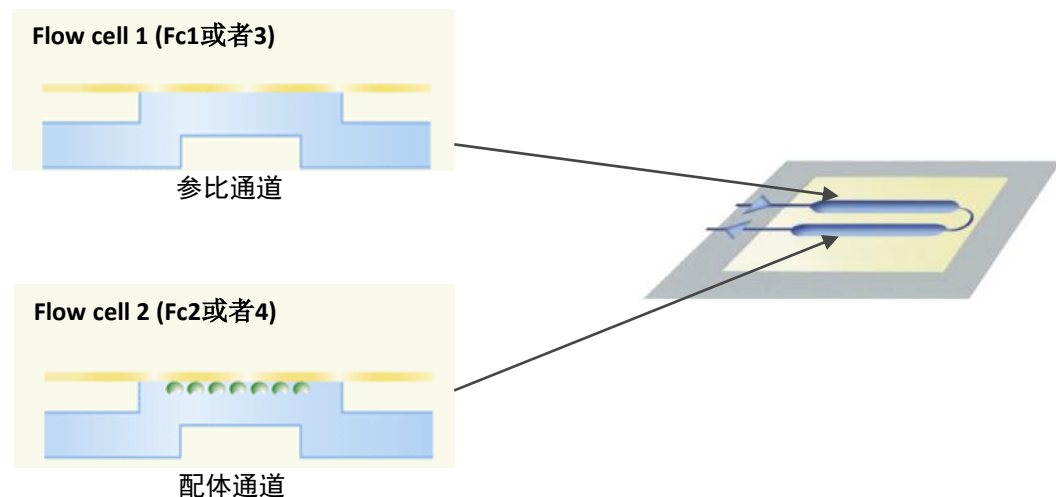
- **GST 捕获试剂盒**：制备捕获GST标签融合蛋白的芯片
- **His 捕获试剂盒**：制备捕获His标签融合蛋白的芯片
- **鼠抗 捕获试剂盒**：制备捕获鼠源抗体IgG、IgA和IgM的芯片
- **人抗 捕获试剂盒**：制备捕获人源抗体IgG-Fc的芯片
- **人Fab 捕获试剂盒**：制备捕获人抗Fab片段的芯片



# 参比通道设计

固定捕获分子

- 参比通道应该设置在配体通道的上游（1或3通道）
- 参比通道和配体通道全部固定捕获分子
- 扣除分析物与捕获分子发生的非特异性结合





- 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  **$R_{\max} \leq 50$  RU**
- $S_m$  = 化学计量比 (Analyte:Ligand, 未知时选择  $S_m = 1$ )



- 准备0.1、0.5ug/ml两个浓度的抗体
- 准备30-100nM的抗原。
- 捕获：在配体通道上进样抗体30s（或60s）

抗体浓度(ug/ml)	进样时间 (s)	
0.1	30	60
0.5	30	60

- 结合：在参比+配体通道上进样抗原2min，解离5min
- 确定捕获量：如果Binding Level ~50RU，以此**捕获时间**和**捕获浓度**为合适的捕获条件。



# 配体与分析物准备注意事项

捕获配体

分析物进样

- 配体可以是纯化的蛋白或者抗体，也可以为杂交瘤上清、腹水、血清等混合样品
- 混合样品需经0.22 $\mu$ M过滤或者离心
- 分析物的纯度 > 90%
- 分析物中不含有高折光率物质：蔗糖、甘油、咪唑
- 配体和分析物都必须具有活性（尽量新鲜，没有变性失活）



捕获类型	再生条件
His捕获	Glycine-HCl, 10mM, pH 1.5 Flow rate-5~30 $\mu$ l/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-20 $\mu$ l/min; Contact time-180s
人抗捕获	3 M MgCl <sub>2</sub> Flow rate-20 $\mu$ l/min; Contact time-30s
NTA芯片	350 mM EDTA Flow rate-30 $\mu$ l/min; Contact time-60s
Biotin CAP芯片	6 M guanidine-HCl, 250 mM NaOH Flow rate-5~30 $\mu$ L/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 $K_D$

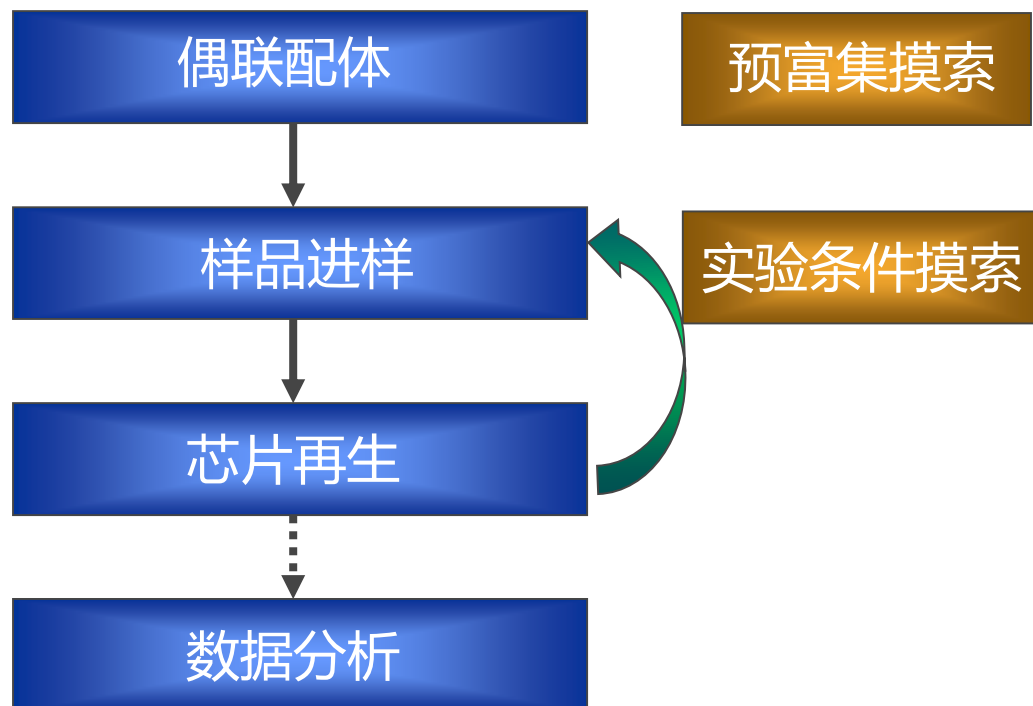
## 再生条件的选择（重要）

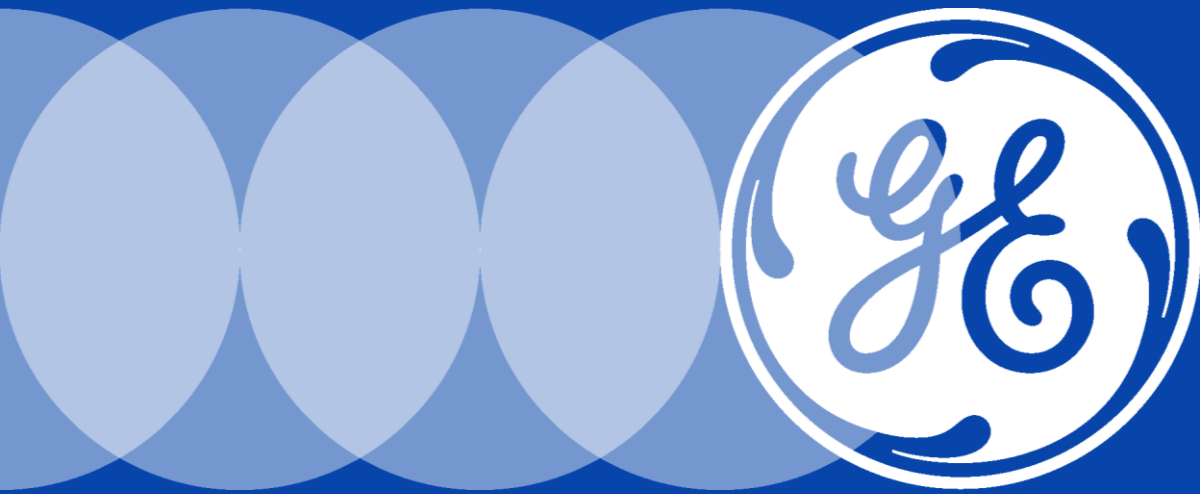
- 彻底洗净、保持活性

## 实验设计

- 动力学
- 稳态分析

## 捕获法







# Biacore 设备维护

**Imagination at work.**

See tutorial regarding  
confidentiality disclosures.

# 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





# 为什么要做维护?

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

**请遵循推荐的系统维护流程!**



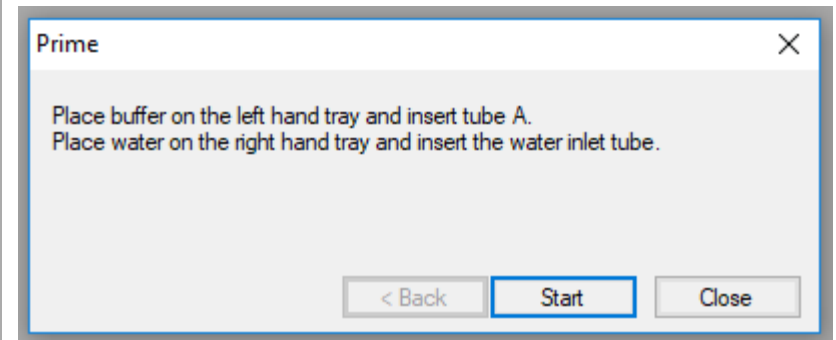
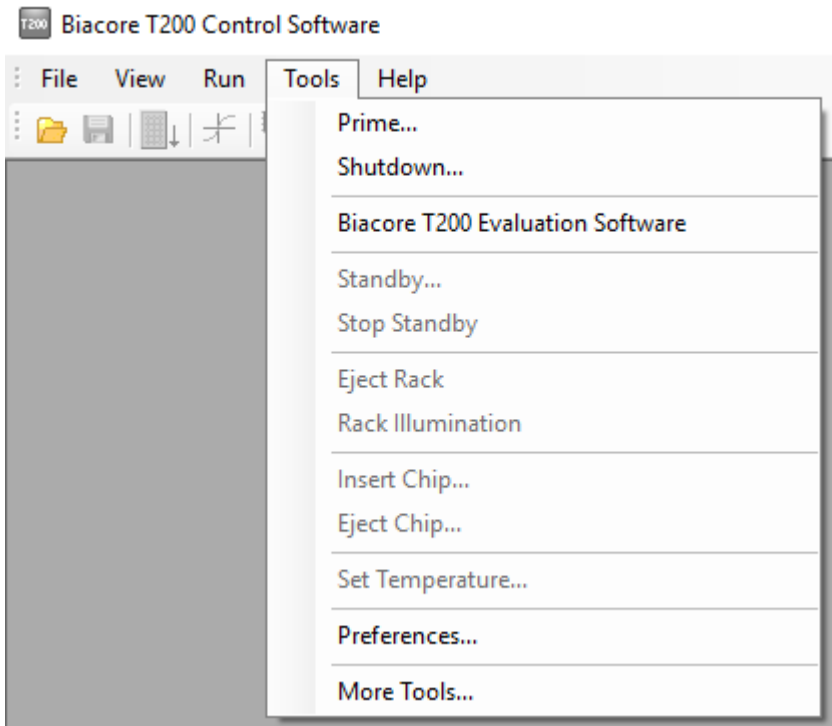
# 日常使用

- 对缓冲液进行过滤 (filter) 和脱气 (degas)\*
  - 即使是前一天使用的缓冲液也要进行重新过滤和脱气  
(仅针对无Online degas功能的Biacore系统, X100 plus以上机型  
含degas功能)
  - 尽量使用新鲜的缓冲液



# 日常使用

- 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
  - 主菜单Tools->Prime 运行Prime程序 7 min



# 每周维护

- 除盐 (Desorb)

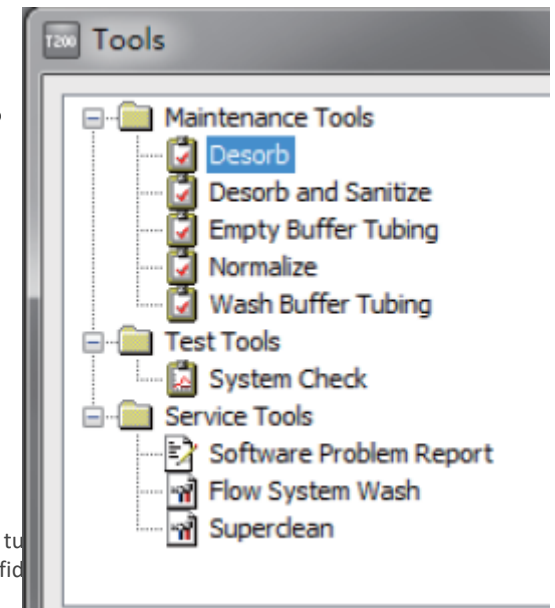
- 主菜单Tools->More Tools运行Desorb程序 (SDS/甘氨酸)
- **SDS必须放置室温下**

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

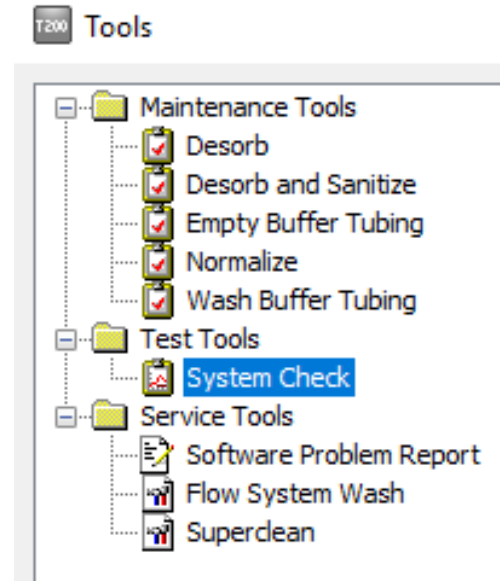
## • 除盐和除菌

- 主菜单Tools->More Tools运行Desorb & Sanitize程序  
(稀释的次氯酸钠)

## • 测试系统性能

- 主菜单Tools-> Test Tools中选择运行System Check

- 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) 缓冲液换成HBS-N。
- 3) 选择工具栏中Tools-> More tools。
- 4) 点击Test tools目录下的System Check, 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



# 每次实验结束后，如何设置Biacore?

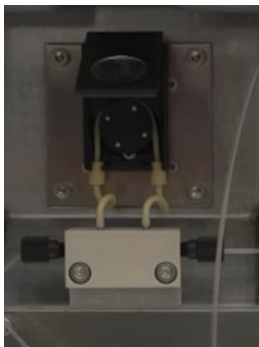
- **系统闲置如果超过7 天**

- 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

- Biacore X100和T200，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。

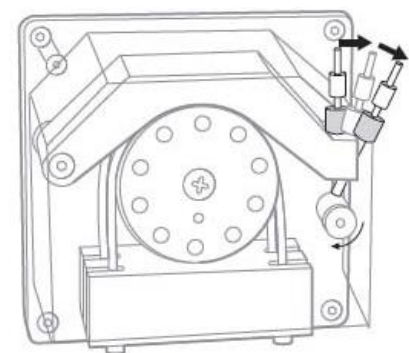
- 打开样品舱盖，擦洗进样针。倒掉废液瓶中的废液。



Biacore X100



Biacore T200



# 800免费技术热线

固话请拨 800-810-9118 (免费)

手机请拨 400-810-9118 (收取市话费)



耗材购买平台或  
联系我们销售

关于GE公司及产品的任何疑问,  
都欢迎拨打800或400热线





