

Biacore基础课程之一

# 表面等离子共振 (SPR) 技术与 Biacore原理

韩佩韦

产品经理

通用电气公司生命科学部

13911728591

peiwei.han@ge.com



imagination at work

## 课程目标

- **Biacore**技术原理
  - 表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)
  - 传感图
  - **Biacore**提供的分子相互作用的信息
- **Biacore**设备核心组件
  - SPR检测器
  - 微流控系统 (IFC)
  - 传感芯片
- **Biacore**分析的基本流程
  - 固定
  - 进样
  - 再生



imagination at work

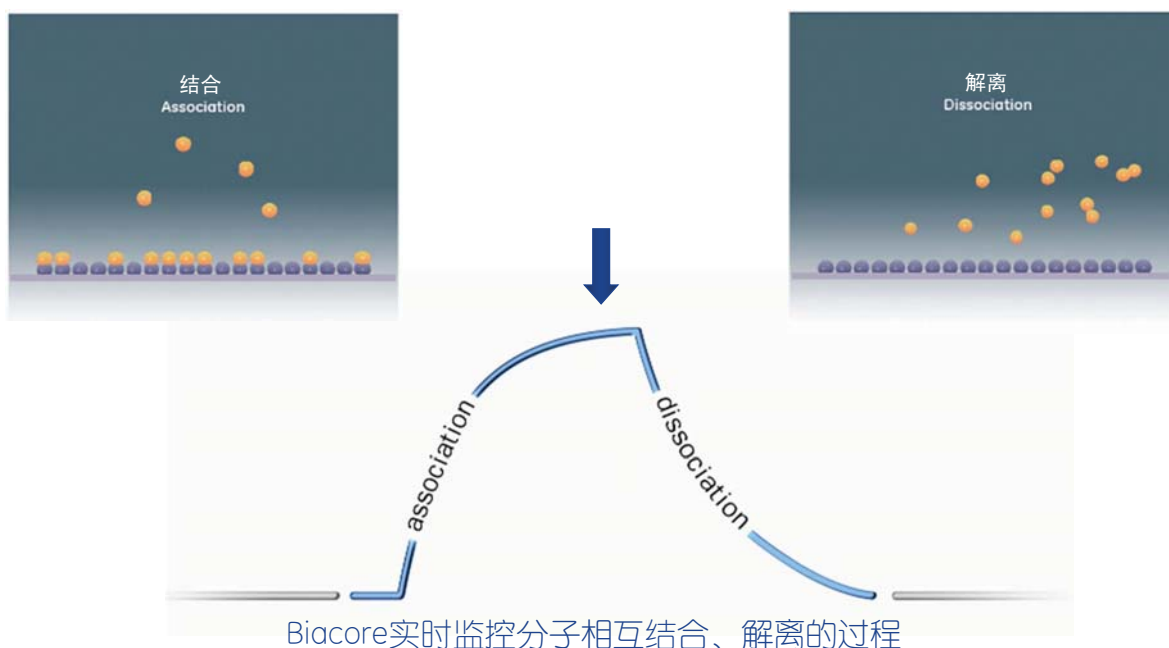


Biacore™ T200

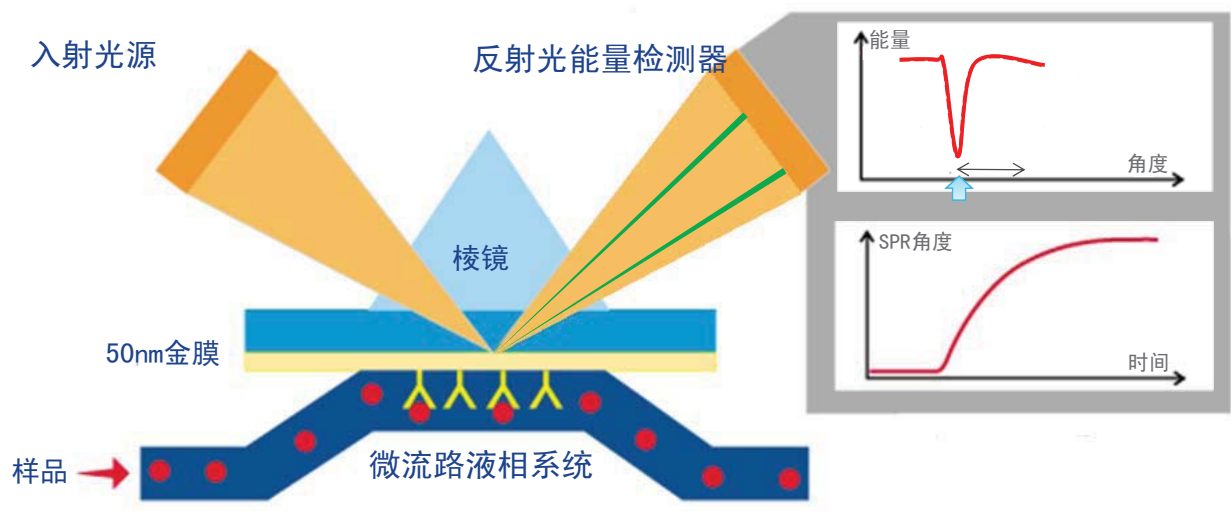
# Biacore技术原理



## Biacore: 实时、无标记、活性分子互作分析



# 表面等离子共振原理 (SPR)



# 表面等离子共振原理 (SPR)

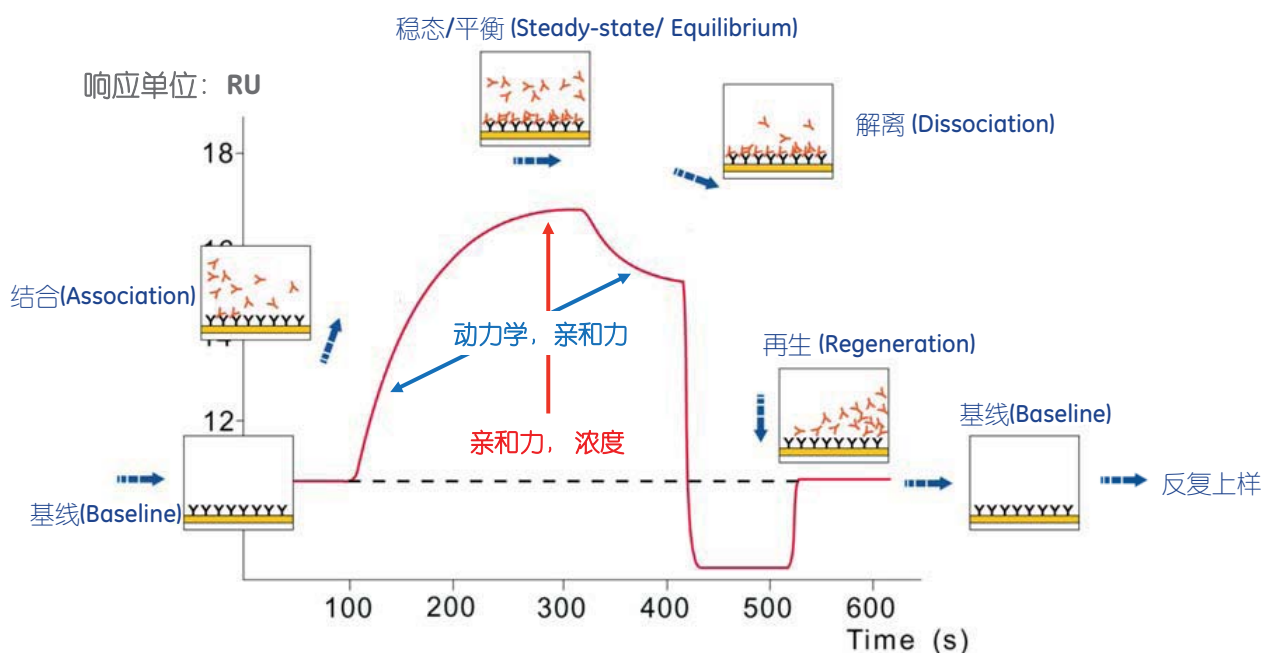


# 表面等离子共振原理 (SPR)

- SPR 是一种折光率传感器，其响应值反映了SPR角度的改变
- 响应信号依赖于芯片表面分子的浓度和温度
- 1 RU 的响应值大致上相当于芯片表面结合物质的浓度改变了1 pg/mm<sup>2</sup> (蛋白结合与CM5芯片)



## 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)



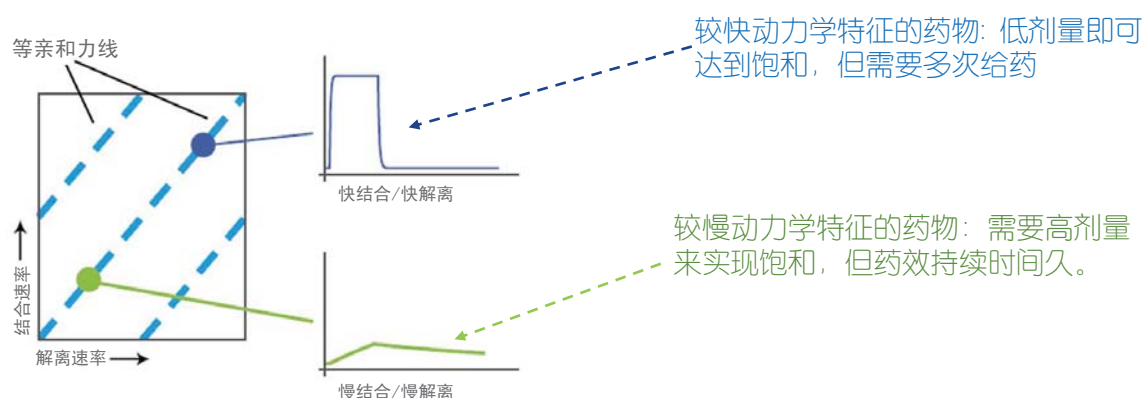
## 亲和力 (Affinity, $K_D$ )



- 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

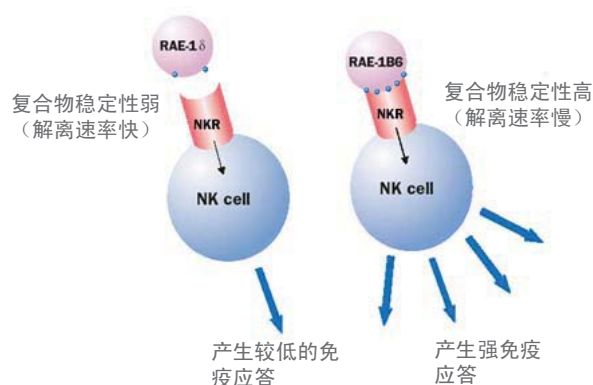


不同的结合与解离速率反映了不同的作用机制，也决定了分子不同的功能与结构特征。



## 动力学特征决定分子的功能

- 生命系统是动态的。
- 动力学数据能够
  - 将分子的结构与功能关联起来 (**SAR**)
  - 更深刻地认识生命活动的机制

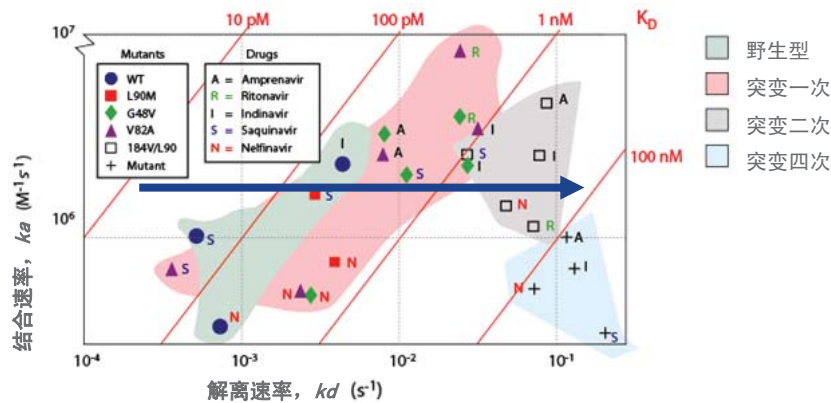


Carayannopoulos et al (2001) *Eur J Immunol*, 32, 597-605



# 动力学帮助认识HIV病毒的抗药机理

- 由病毒快速突变造成的抗药性极大制约了HIV蛋白酶抑制剂类药物的开发
- HIV蛋白酶突变与抗药性具体如何关联？



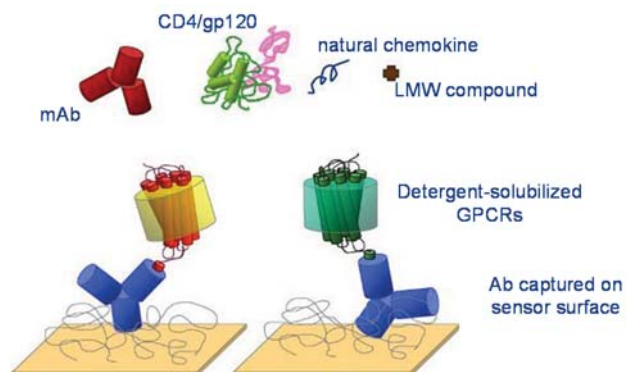
实验结论：氨基酸突变造成解离速率加快，导致HIV蛋白酶与抑制剂的亲和力下降。



Shuman et al., Antiviral Research 58: 235-42 (2003)

## 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



# Biacore™ 超过15000篇文献发表量

Biacore应用领域包括：

- 肿瘤研究
- 神经科学
- 免疫科学
- 传染性疾病
- 功能蛋白质组
- 细胞信号传导与基因调控
- 疫苗开发
- 结合分子的筛选和表征
- 新药开发



## Biacore核心组件

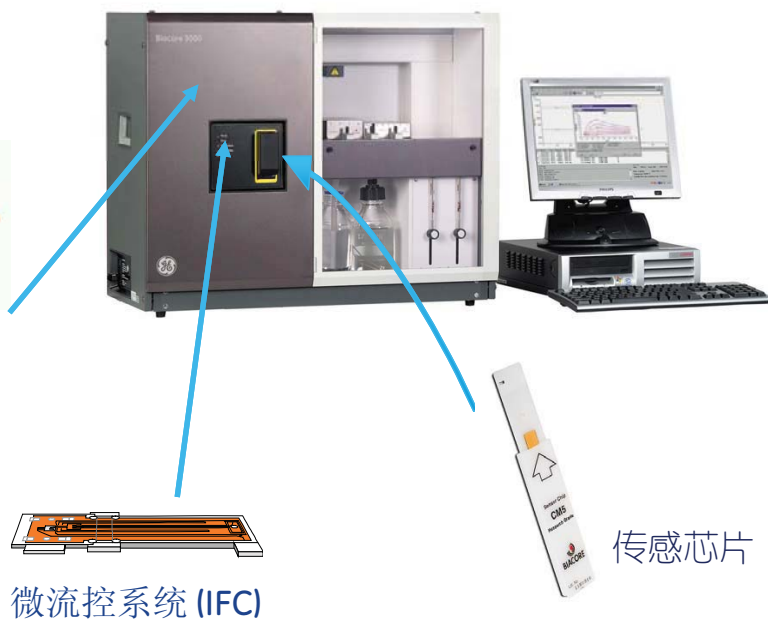




# Biacore核心组件



# Biacore核心组件

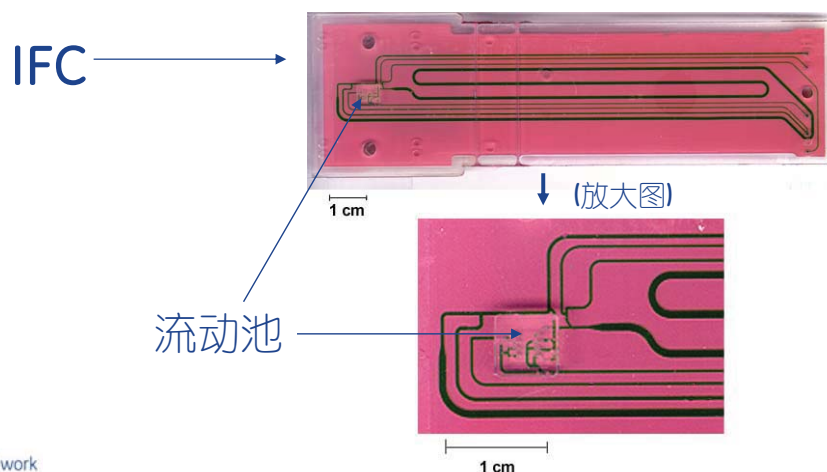


# Biacore核心组件



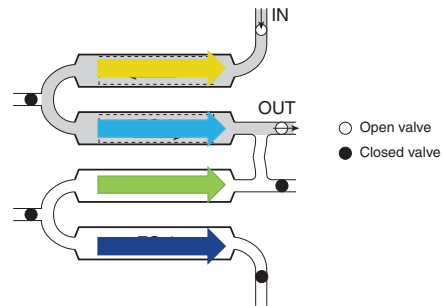
## 微流控系统(IFC)

- 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



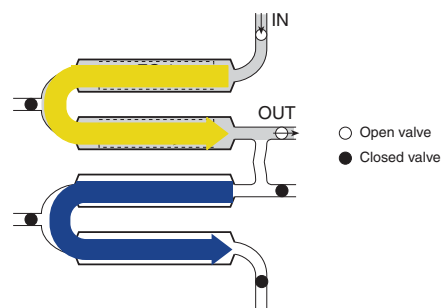
# 微流控系统 (IFC)-流动池

- 4个流动池 - 位于IFC上
- 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)



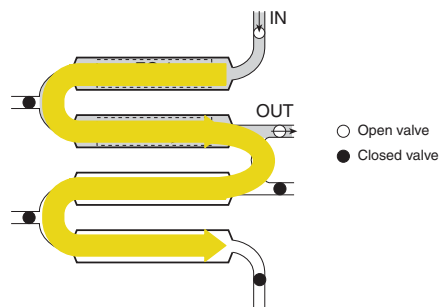
# 微流控系统 (IFC)-流动池

- 4个流动池 - 位于IFC上
- 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)

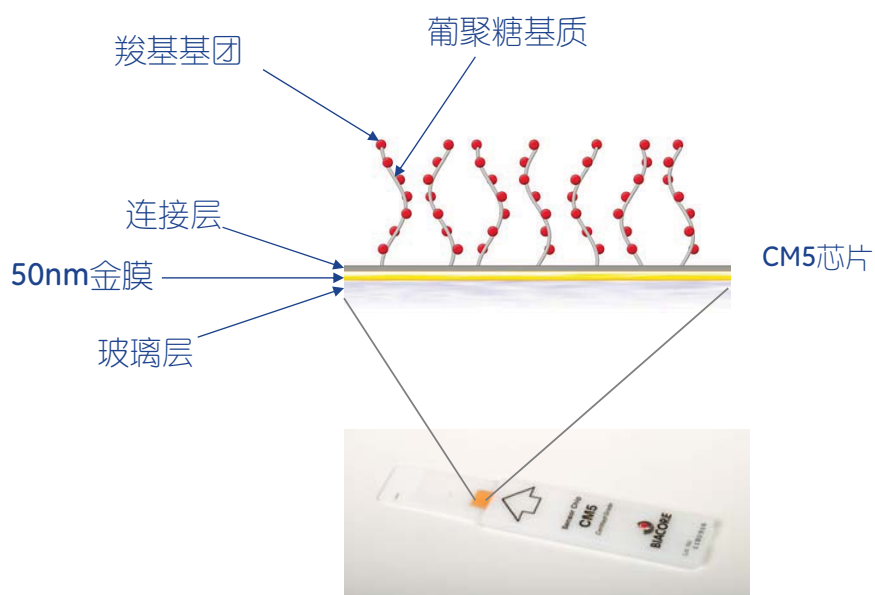


# 微流控系统 (IFC)-流动池

- 4个流动池 - 位于IFC上
- 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

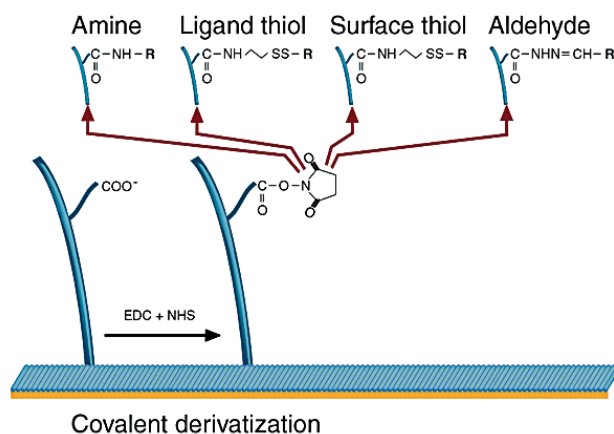


# 葡聚糖基质的重要性

- 亲水性，和2%浓度的葡聚糖水溶液环境相似
- 非特异性吸附极低
- 高结合容量
- 实现多种共价结合方式
- 出色的化学稳定性



## 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



# 传感芯片的选择

## 11种不同的芯片种类

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)

## 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;

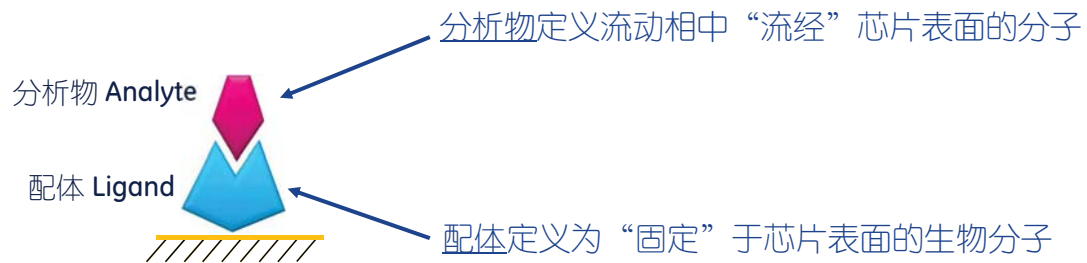
NTA捕获试剂盒 His 重组蛋白分析;



# Biacore分析的基本流程



# 分析物和配体的定义



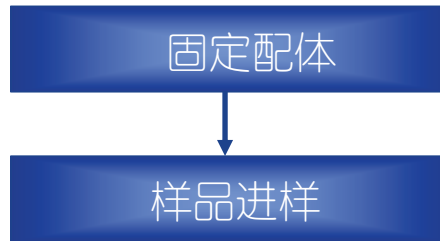
## Biacore实验的基本流程



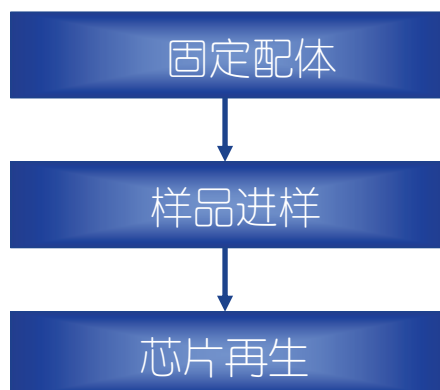
固定配体



# Biacore实验的基本流程

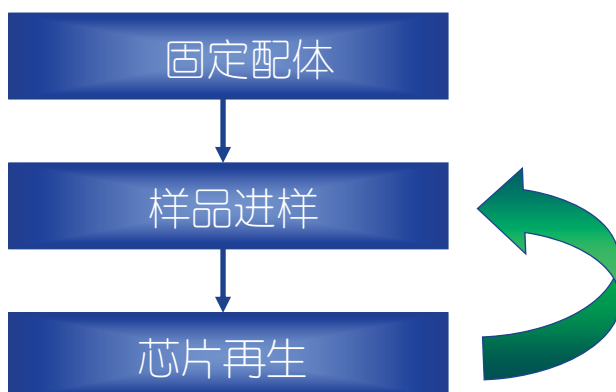


# Biacore实验的基本流程

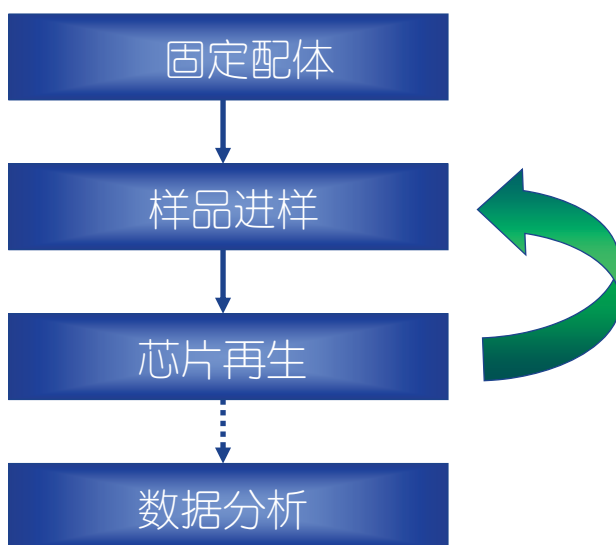
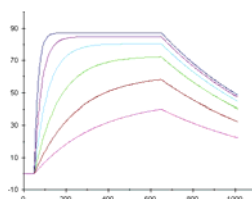




# Biacore实验的基本流程



# Biacore实验的基本流程



# 固定配体 (Immobilization)

- 什么是固定配体？
- 将配体直接（共价）或者间接地（通过捕获分子）固定于芯片表面



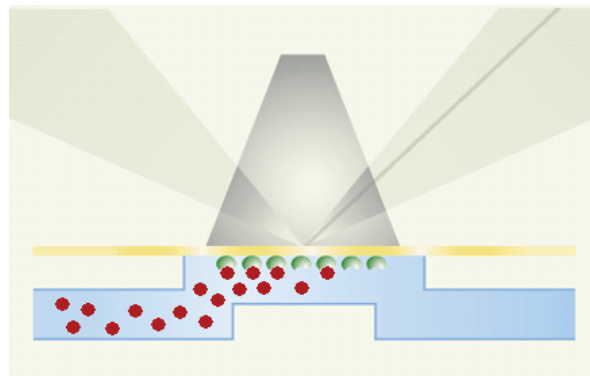
- 直接固定（也称为“偶联”）
- 将配体共价偶联于芯片表面



- 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固定配体



# 样品进样 (Injection)

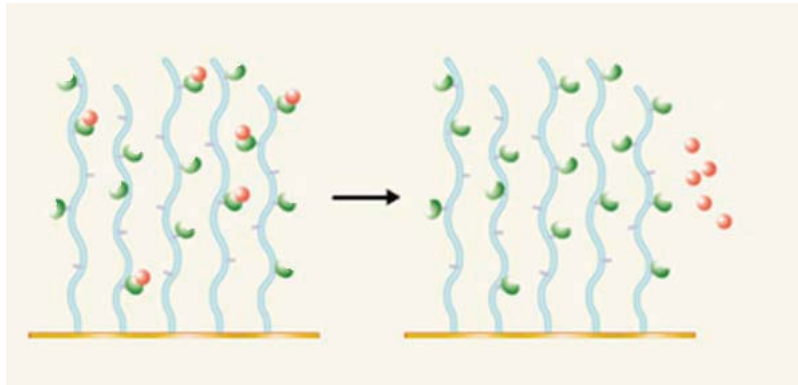


- 分析物 (Analyte)进样后，以恒定的流速和浓度流过芯片表面
- 样品中的待分析物与固定在芯片表面上的配体发生结合，芯片表面物质的质量发生改变，仪器记录下对应的响应值 (response) 的改变
- 进样结束后，切换缓冲液流过芯片表面，分析物由配体上自发解离，解离的进程由响应值实时监控。



# 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



## 课程小结

### Biacore 技术组成

- SPR
- 传感芯片
- 微射流卡盘



提供实时的，信息丰富的相互作用数据

### Biacore 的主要分析步骤

- 固定 (配体)
- 进样 (分析物)
- 再生
- 数据分析



提供解释生物分子功能和结构的多项信息

### Biacore 提供的数据

- 特异性，亲和力，动力学，浓度



实验设计方法灵活，用以检测多种分子和反应种类





## Biacore基础课程之二

# Biacore的应用类型与实例

韩佩韦  
产品经理  
通用电气公司生命科学部  
13911728591  
[peiwei.han@ge.com](mailto:peiwei.han@ge.com)



# 课程目标

- **Biacore** 的应用类型
  - 特异性
  - 多重结合
  - 亲和力测定
  - 动力学测定
  - 浓度测定
  - 热力学测定
- **Biacore**应用实例
  - 蛋白-蛋白结合
  - 蛋白-核酸结合
  - 小分子与蛋白结合



Biacore™ X100



## Biacore的应用类型



# 你关心什么信息？

- 在**Biacore**实验设计和检测之前，你必须明确你关心哪种类型的数据？
- 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？
- 多重结合分析
  - 哪些分子参与了复合体的形成？顺序是什么？
- 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？
- 浓度测定
  - 样品中的目标分子浓度高低？
- 热力学分析
  - 结合强弱、快慢的结构机理是什么？



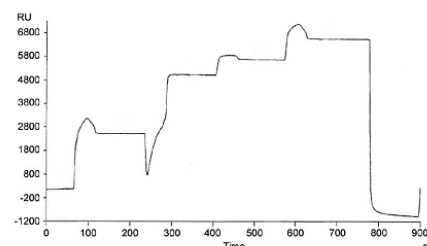
# 特异性分析

- 目标分子与靶分子之间是否发生结合？
  - **Biacore**的微流控系统 (IFC)和全自动进样系统 (**Auto Sampler**), 为实验设计带来了极大的灵活性, 能够很轻松地发现一个分子与另一个分子 (或另一组分子) 间能否发生结合
- 实例
  - 抑制剂是否可以特异地结合到细胞膜上某个受体?
  - 药物靶点受体与哪个药物分子可以特异性的结合?
  - 抗体能够识别抗原的多种类似物吗?



# 多重结合分析

- 分析复合物形成的过程和顺序
- 实例
  - 将多个蛋白顺序流过芯片决定形成复合物的参与分子和顺序。
  - 通过将多个抗体顺序流过固定的抗原进行抗原表位作图。
  - 确认混合物中是否存在与某种分子结合的蛋白或其亚型。

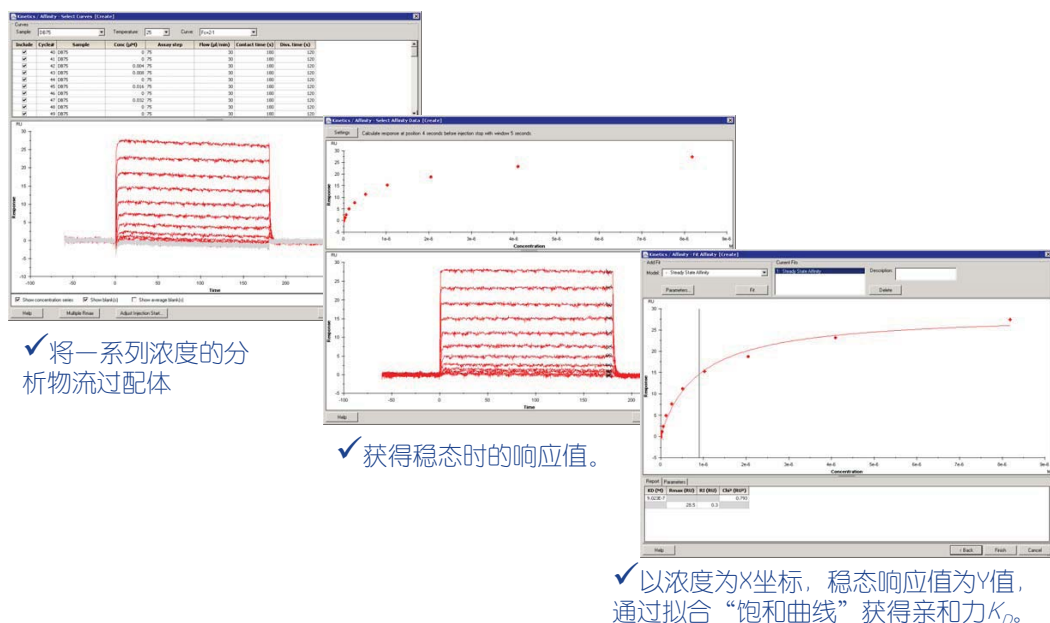


# 亲和力

- 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



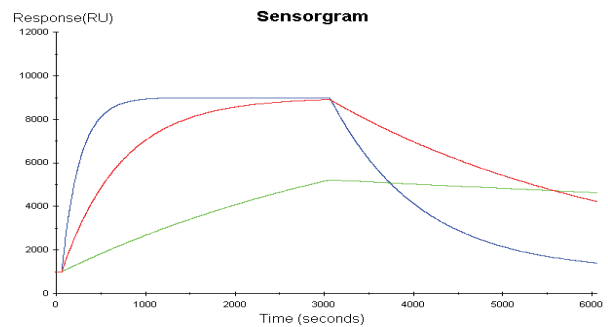
稳态的方法用在“快上快下”的结合模式下获得亲和力。





# 动力学分析

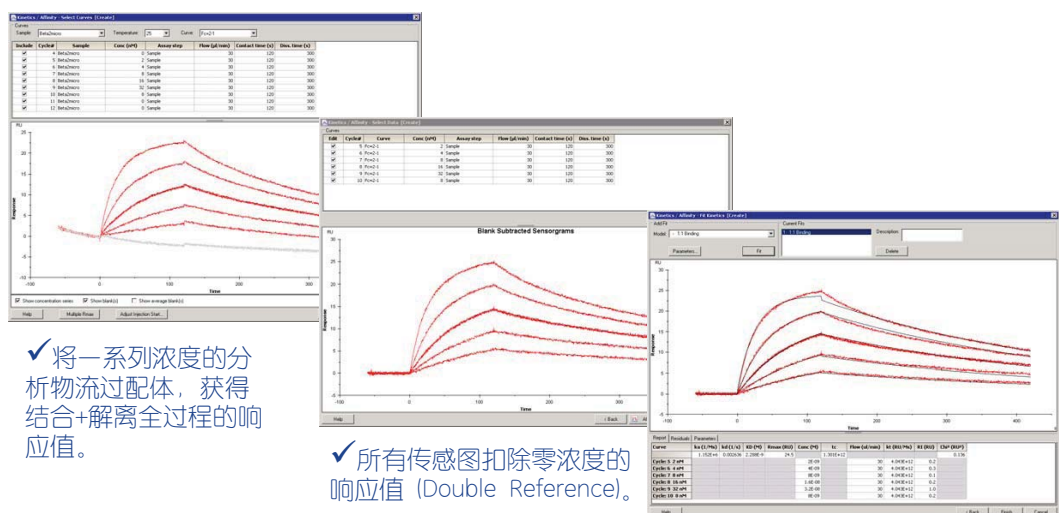
- 描述分析物与配体之间结合的速率 $k_a$ 和解离的速率 $k_d$ 。
  - 动力学常数是亲和力之外，表征分子结合/复合物稳定性的重要信息。
- 相同的亲和力有可能具有完全不同的动力学特征。



亲和力相同，但动力学特征完全不同！



# 动力学分析



亲和力 $K_D$ 可以由动力学常数 $k_a$ ,  $k_d$ 获得，其反映了结合和解离两个过程的综合结果。



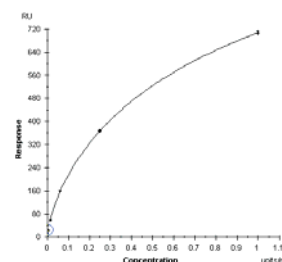
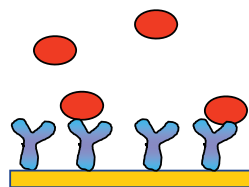
# 浓度测定

- 样品中的目标分子浓度有多高?
- 实例
  - 血清中IgG及其亚型的浓度
  - 产品批次间质量控制
  - 构效关系分析中待分析物的活性浓度



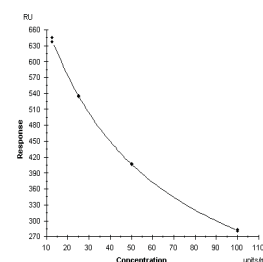
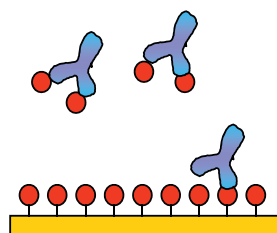
## 浓度测定的不同方法

### -直接检测



标准曲线

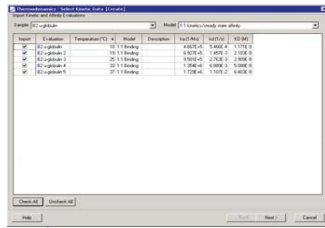
### -竞争法



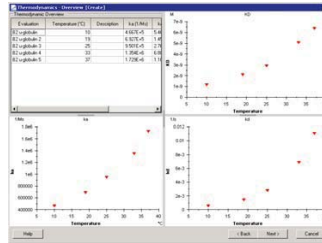
标准曲线



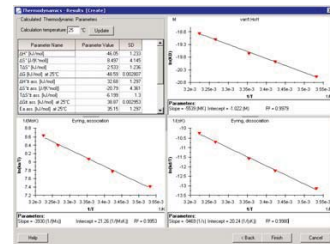
# 热力学分析



✓ 在不同温度下进行动力学分析



✓ 获得动力学常数和亲和力与温度的关系



✓ 拟合数据获得结果

热力学分析能够获得范德霍夫和艾林图(Eyring plot), 以及相关热力学常数。



## Biacore的应用实例



# HIV病毒萌芽机制研究



## 阐明艾滋病毒HIV的萌芽机制



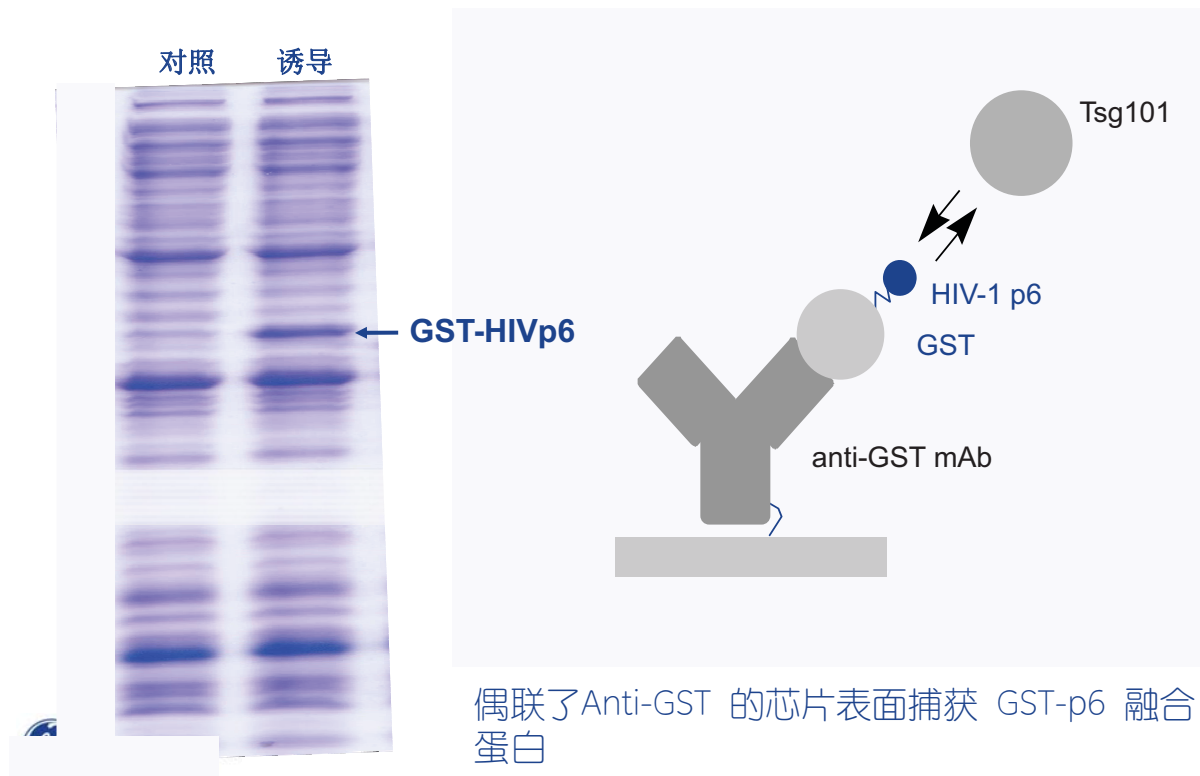
HIV-1  
Gag

- HIV 蛋白 p6 对于病毒颗粒在细胞中的萌芽是必须的
- 酵母双杂交表明人类蛋白Tsg101 可能是p6的结合伴侣蛋白
- 曾有报道Tsg101 和液泡蛋白分选 (vacuolar protein sorting)有关

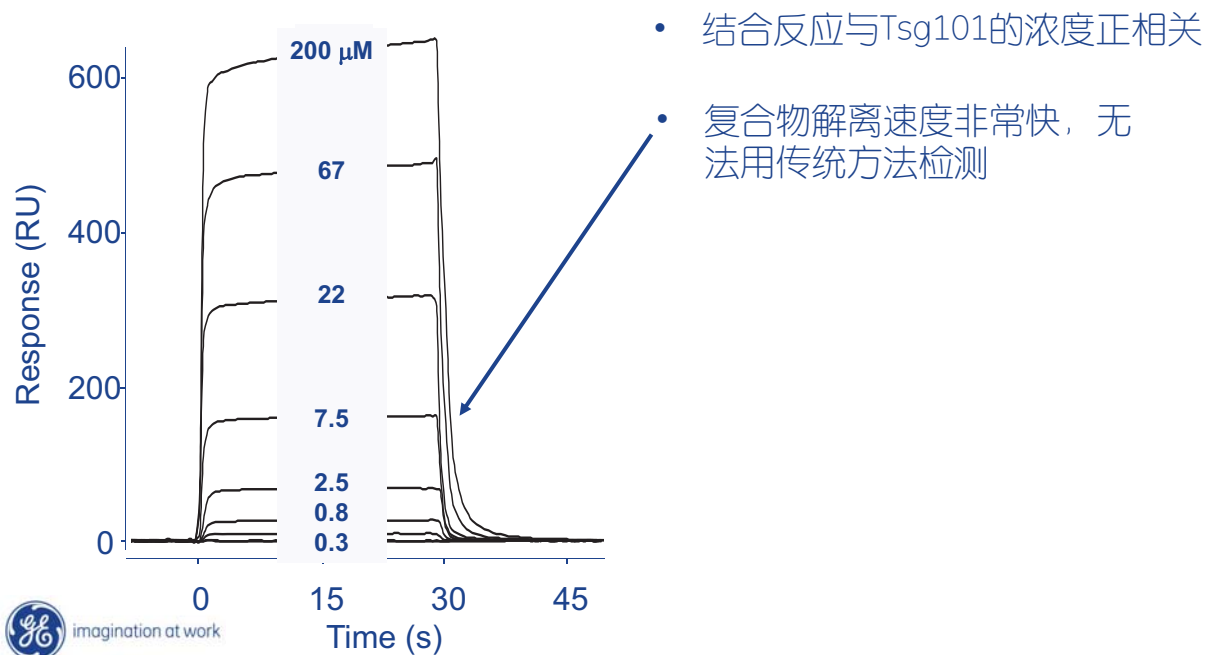


HIV-1 芽殖细胞 (Cell)

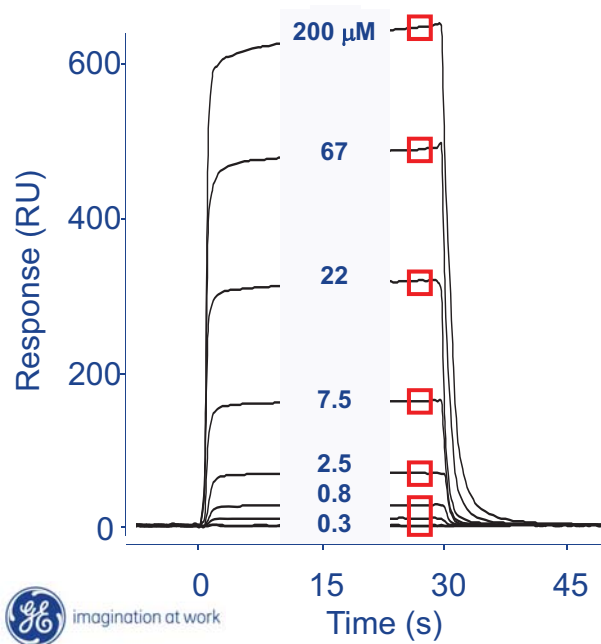
# 用Biacore分析 p6/Tsg101的相互作用



## 稳态分析p6/Tsg101结合

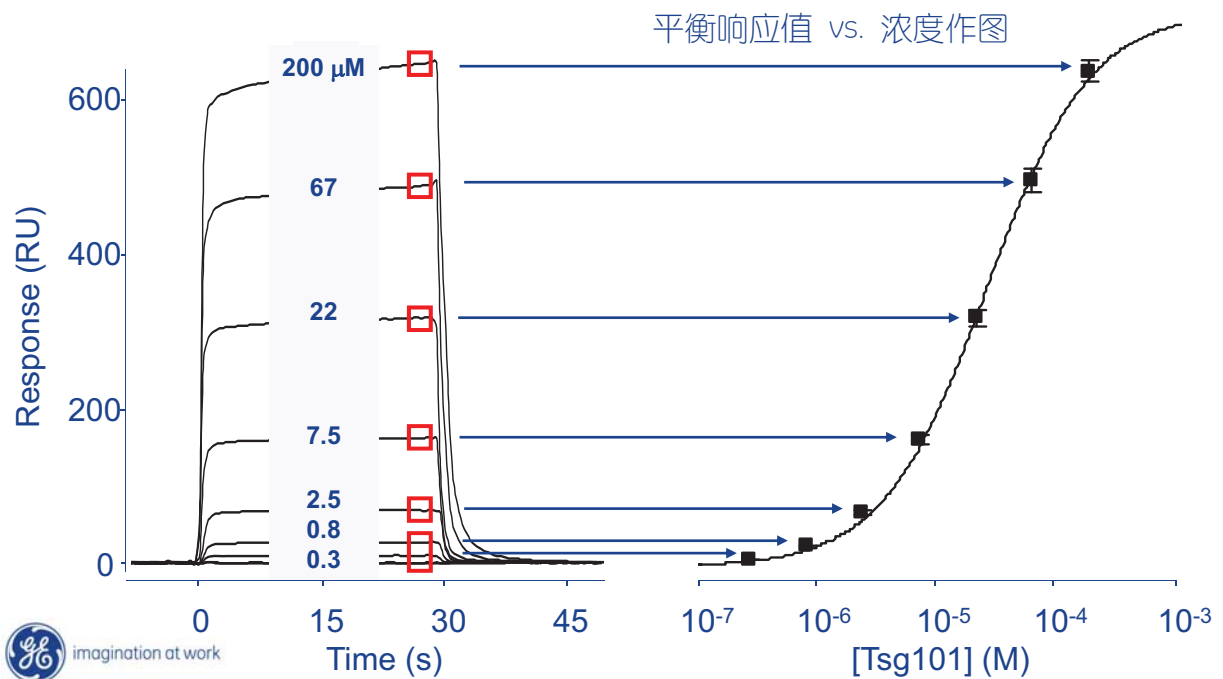


## 稳态分析p6/Tsg101结合

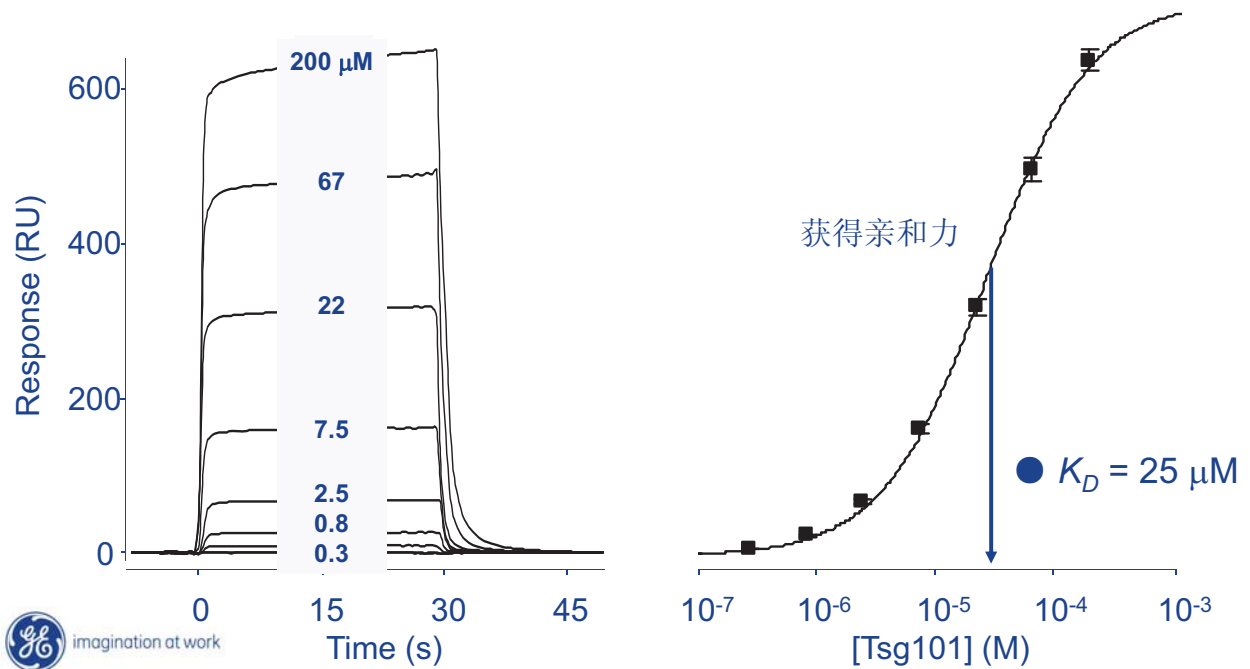


- 所有的反应都达到了稳态，可直接用软件分析反应的平衡常数

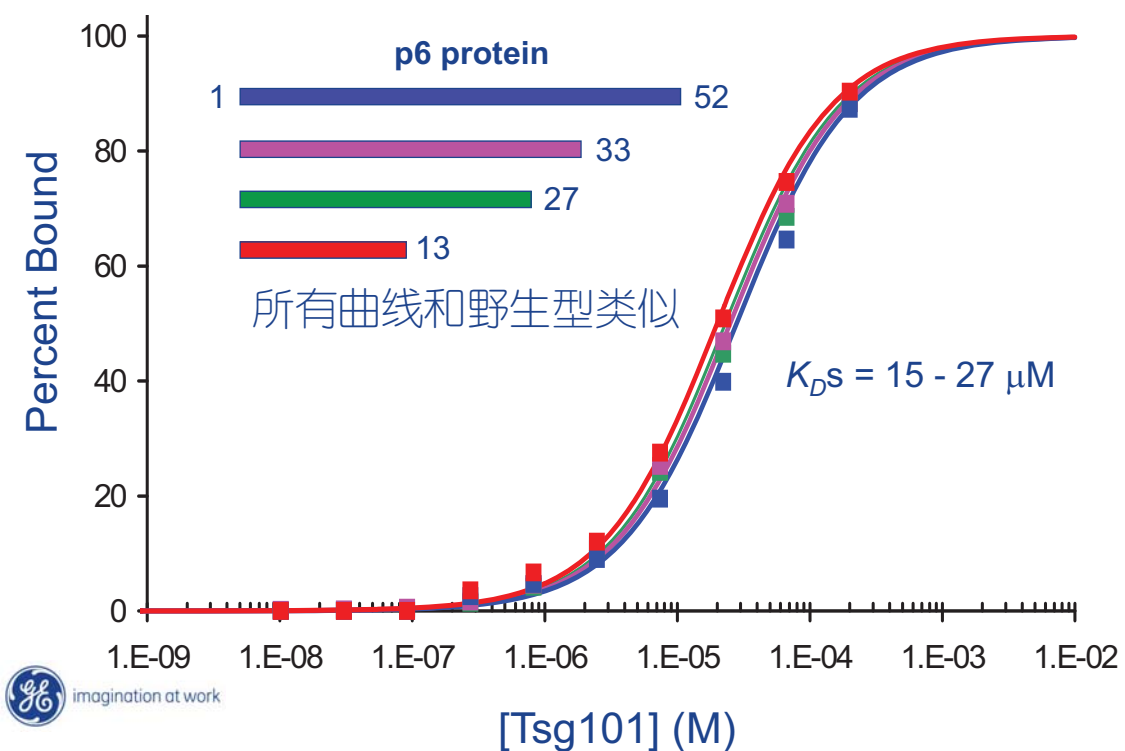
## 稳态分析p6/Tsg101结合



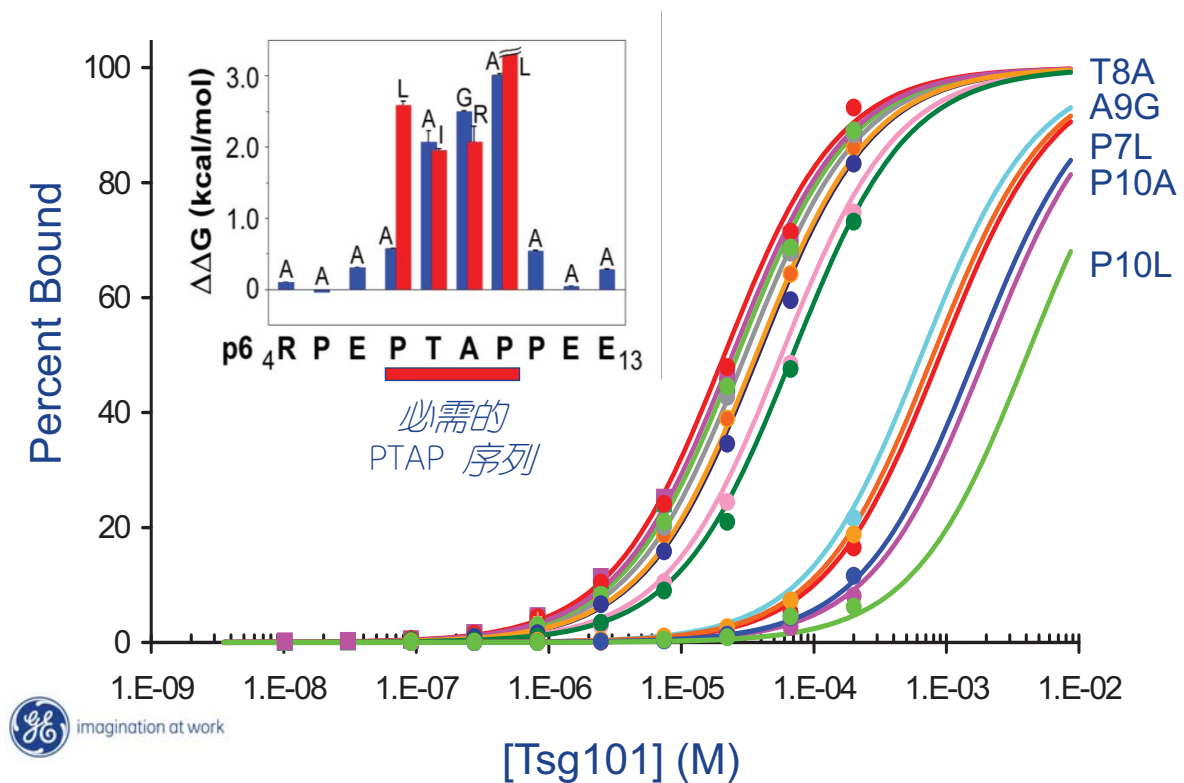
## 稳态分析p6/Tsg101结合



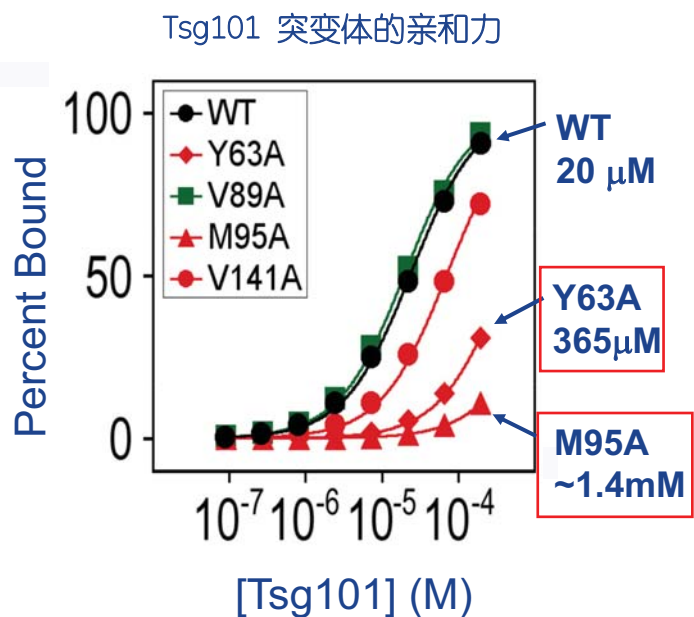
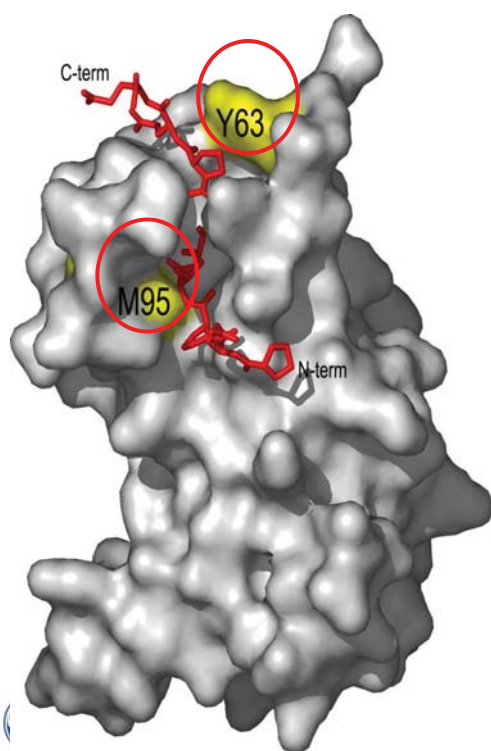
## 对p6进行剪切，逐渐缩短结合位点



# 通过突变寻找p6上确切的结合位点



## p6 /Tsg101片段的结合位点



Pornillos, O., et al. (2002) *EMBO J*, **21**, 2397.  
 Pornillos, O., et al. (2002) *Nat Struct Biol.* **9**, 812-7.



# p6/Tsg101互作研究的结论

- Biacore 确认p6/Tsg101之间的相互作用
- 传统方法很难检测到p6/Tsg101之间的弱相互作用
- Biacore通过亲和力的差异确认了准确的结合位点
- Biacore可以快速从细胞裂解液中捕获目标物质



## 利用动力学的速率常数( $k_a$ , $k_d$ )研究生物分子动态的相互作用

### 揭示蛋白质-RNA互作的新视角

Acknowledgements to Dr. Ite Laird-Offringa, USC, LA, USA

Park S. et al, (2000), Moll Cell Biol 20: 4765-72

Katsamba et al, (2001), Biol Chem 276: 21476 -81



# 背景信息

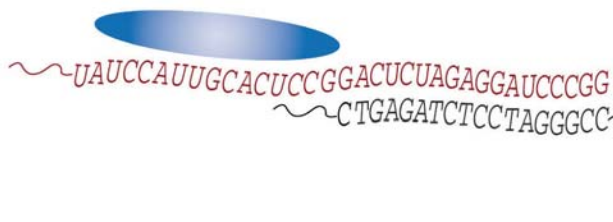
- RNA发挥功能极大地依赖其与不同RNA结合蛋白(RBPs)
  - RNA与蛋白的结合发生在转录、转录后剪切以及翻译等各个过程中
- RNA与蛋白的结合过程高度动态化
  - 动力学数据对于认识RNA和RBP蛋白的功能至关重要
- Ite Laird-Offringas 课题组(USC, Los Angeles) 利用Biacore深入研究RNA结合蛋白的功能。



## 蛋白质-RNA相互作用

### 两种固定核酸的策略

#### 1. 通过生物素直接固定RNA



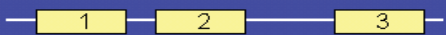
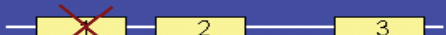


#### 2. 通过互补RNA链进行捕获

- 固定的量: 25-125 RU 适用于动力学分析
- 再生条件: 2M NaCl at 20  $\mu$ l/min , 1 min



# 蛋白质-RNA相互作用结果

HuD 蛋白(一种神经元特异性RNA结合蛋白, 其作用是对RNA进行神经元特异性的转录中及转录后修饰, 涉及RNA稳定性)。HuD包括了3个保守的RNA识别结构域(RRM1-RRM3), 可以结合短链的富含AU的靶RNA寡核苷酸序列。

Mutations of HuD RRMs	Affinity	Association	Dissociation
	wt	wt	wt
	↓ 2000 x	↓ 20 x	↑ 100 x
	↓ 13.5 x	↑ 2.5 x	↑ 35 x
	↓ 3.5 x	↑ 4 x	↑ 14 x

动力学数据结论: RRM2和RRM3, 特别是RRM3, 虽然对整体反应的亲和力没有决定性的影响, 但其动力学常数(解离速率常数)却提示我们: HuD的RRM1、RRM2和RRM3都是RNA结合蛋白在体内执行功能的重要组成部分, 这是传统方法无法比拟的优势。



## 认识蛋白-RNA结合机制

- **U1A蛋白** 与其靶RNA结合机制的研究
  - U1A: 剪切体蛋白, 与环状RNA--U1hpII发生结合
  - U1A 蛋白包含一个功能性RRM, 但其与U1hpII RNA结合的机制尚不明确。
- 对一系列**U1A** 突变体和 **RNA** 突变体之间的结合进行动力学研究
  - 一些突变特异性地导致结合速率的降低, 表明这些氨基酸残基涉及离子相互作用。
  - 另外一些突变导致解离速率的增加, 表明这些氨基酸残基涉及碱基的堆叠效应和氢键的形成。



## 突变第20， 22， 50位赖氨酸残基

protein	affinity	association rate	dissociation rate
wt U1A	$K_D = 32 \text{ pM}$	$k_a = 1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_d = 3.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Lys20,22Ala	↓ 39 ×	↓ 9.8 ×	↑ 3.9 ×
Lys50Ala	↓ 16 ×	↓ 10 ×	↑ 1.5 ×

突变特异性地导致结合速率的降低，表明这些氨基酸残基涉及离子相互作用。



imagination at work

## 离子强度对突变体结合的影响

protein	affinity (500 mM NaCl)	association rate (500 mM NaCl)	dissociation rate (500 mM NaCl)
wt U1A	↓ 132 ×	↓ 59 ×	↑ 2.2 ×
Lys20,22Ala	↓ 108 ×	↓ 14 ×	↑ 7.6 ×
Lys50Ala	↓ 136 ×	↓ 19 ×	↑ 7.3 ×



imagination at work

# 突变第56位苯丙氨酸残基和RNA上G4碱基

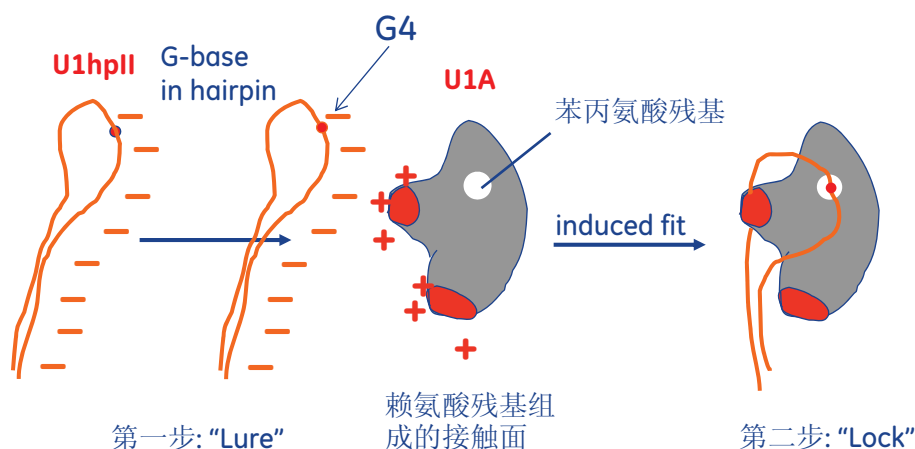
mutation	affinity	association rate	dissociation rate
Phe56Ala	↓ 6600 ×	↓ 4.7 ×	↑ 1400 ×
U1hplIG4C	↓ 8700 ×	↓ 3.5 ×	↑ 2500 ×

突变导致解离速率的增加，表明这些氨基酸残基涉及碱基的堆叠效应和氢键的形成。

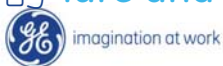


## U1A-U1hplI 结合模型

- 作者由动力学数据提出“两步法”结合模型



由Biacore获得的精细的动力学分析为作者提出RNA-protein结合的“lure and lock”的两步法模型提供了重要的支持。



# Biacore: 认识蛋白-RNA结合的新视角

- 传统的基于稳态数据的技术难以描述动态的结合过程。
- 全面了解RNA-蛋白间的结合，关键在于测定动力学结合速率和解离速率。
- 基于Biacore数据的定点突变结果，帮助科学家更加客观、深刻地认识分子结构-功能关系。



## 利用Biacore进行基于靶蛋白结合的小分子药物的筛选

Acknowledgements to Avidex LTD



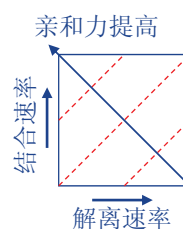
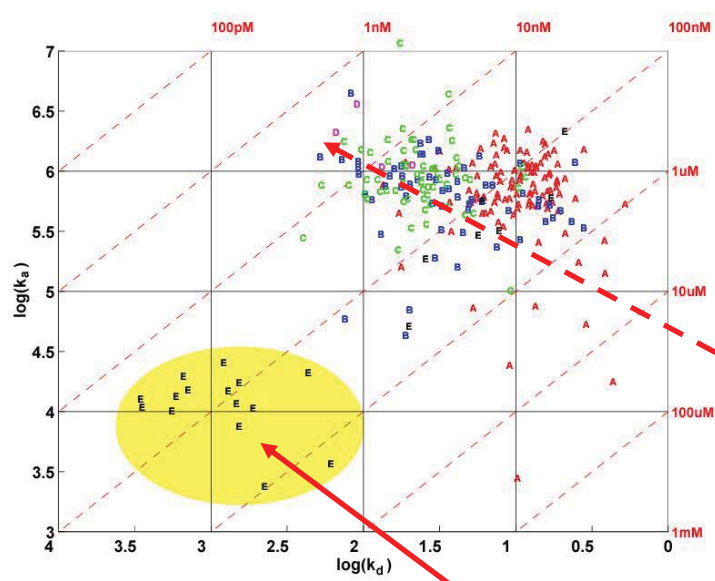
# 动力学数据筛选CD80抑制剂先导化合物中的重要作用

- Avidex Ltd 在类风湿性关节炎的项目中获得5个系列的 先导化合物
- T细胞激活过程中CD80/CD28 信号传递的抑制剂  
(靶分子 = CD80)
  - 按照结构特点将259个化合物分为 A-E 共5个系列
  - 利用Biacore对259 个化合物分子进行动力学分析
- 所有化合物的动力学数据都标记在on/off 图上
  - 全面掌握每个系列化合物的整体动力学特征
  - 能够发现一些特殊的化合物



Data courtesy of Avidex Ltd

## 基于动力学特征对化合物进行有效筛选



- 从A到D系列亲和力不断提高

- 动力学数据显示: 尽管E系列的亲和力中等强度, 但其解离速率非常慢。



Data courtesy of Avidex Ltd

# 动力学数据挽救了更具潜力的化合物

- 从与CD80的亲合力上看，E系列并不比A-D系列更具优势。
    - 基于亲合力Avidex 将放弃E系列化合物
  - 但动力学数据显示E系列具有更低的解离速率
    - 从药代PD角度：具有更低的解离速率的化合物更具潜力
    - 对E系列进一步结构优化可以集中在提高结合速率 on-rate
- E系列化合物由于其特别的动力学特征而被保留于进一步研发。

*"The SPR analysis provided crucial kinetic information that enabled a much more informed assessment of the lead series compounds than would have otherwise been possible"*

Phillip Debnam, Avidex



Data courtesy of Avidex Ltd

## 课程小结

Biacore 提供的数据类型

- 特异性分析
- 多重结合
- 亲合力
- 动力学分析
- 浓度测定
- 热力学分析

亲和力的定义

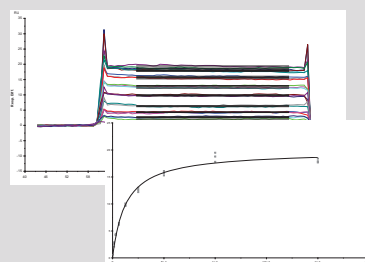
- $K_D$  (浓度单位)
- 可通过稳态或动力学两种方法获得

动力学分析

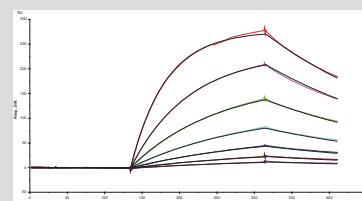
- $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_D$
- 动力学特征与分子结构、功能和生物学意义紧密关联。



稳态分析可以获得亲合力 $K_D$



动力学分析可以获得 $k_a$ ,  $k_d$ , 和亲合力 $K_D$







Biacore基础课程之三

# Biacore的实验设计与方法

韩佩韦  
产品经理  
通用电气公司生命科学部  
13911728591  
[peiwei.han@ge.com](mailto:peiwei.han@ge.com)



# 课程目标

- **Biacore**实验流程
- 固定配体
  - 预富集
  - 固定配体
  - 参比通道的设置
- 表面测试与再生条件的选择（重要）
- 分析物进样和实验设计
- 其他检测方法和固定方法
  - 稳态分析
  - 捕获法
  - 生物素化标记



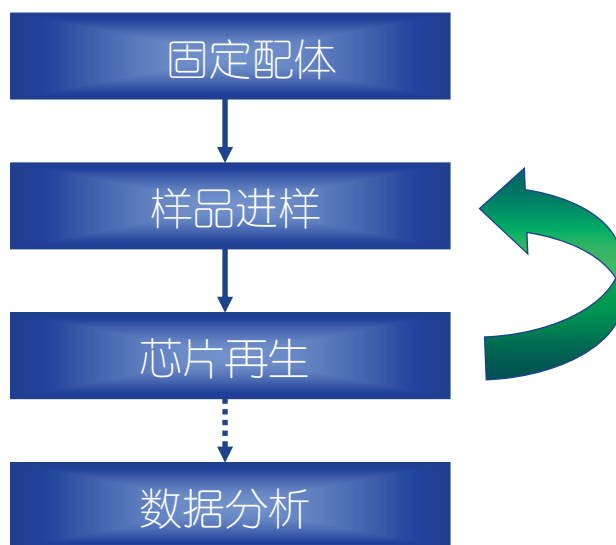
Biacore™ 4000



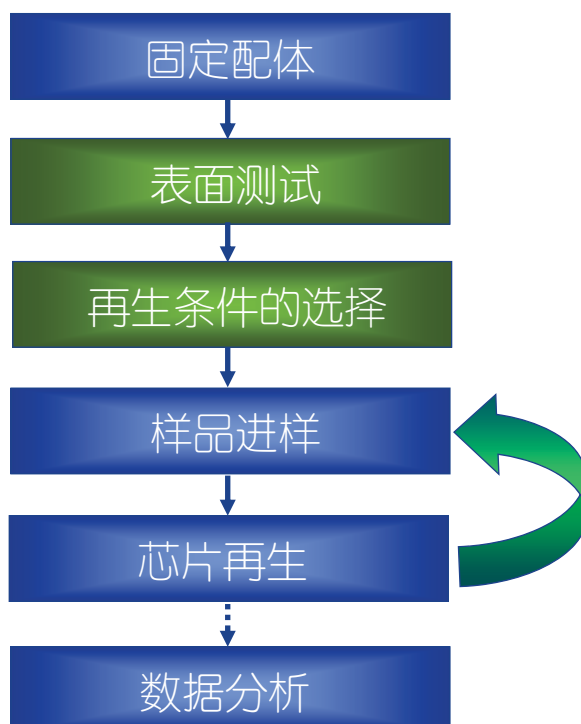
## Biacore的实验流程



# Biacore实验的基本流程



# Biacore实验的实际流程



# 实验之前：你所关心的信息？

- 在**Biacore**实验设计和检测之前，你必须明确你关心哪种类型的数据？
- 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。



## 实验之前：选择芯片

- CM5：蛋白（ $PI > 4$ ）、多肽
- CM4：蛋白、蛋白复合体或细胞裂解液
- CM3：病毒、细胞
- C1：病毒、细胞或血清等复杂成分
- CM7：小分子化合物
- SA：带生物素标签的核酸、多肽或蛋白等
- CAP：带生物素标签的核酸、多肽或蛋白等
- NTA：含有组氨酸标签（**His-tag**）的蛋白样品
- HPA：膜脂、膜蛋白（单分子层膜）
- L1：膜脂、膜蛋白（双分子层膜）



# 固定配体 (Immobilization)

## --蛋白/CM5芯片/动力学为例



# 固定配体 (Immobilization)

- 什么是固定配体？
- 将配体直接或者间接地固定于芯片表面



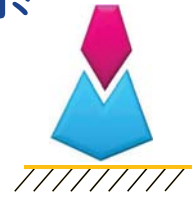
- 直接固定（也称为“偶联”）
- 将配体共价偶联于芯片表面
- 常用氨基偶联的方法



- 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固定配体



# 直接固定配体时需要考虑的因素



- 预富集（只针对CM系列芯片）
- 配体固定水平
- 固定配体的操作
- 其他考虑的因素：
  - 分子量
  - 蛋白纯度
  - 等电点
  - **Buffer**
  - 结合价
  - 功能团和化学反应的选择
  - 纯化标签
  - 活性的保持



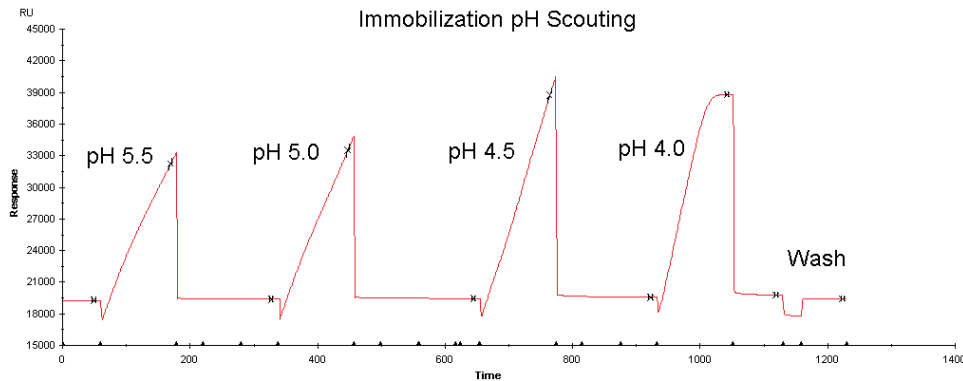
## 预富集 (Pre-concentration)

- 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。



# 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



# 配体固定水平的计算

- 配体固定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：固定水平尽量高
  - 动力学分析：低固定水平
- 配体固定水平的计算:

$$R_L = \frac{R_{\max}}{S_m} \cdot \frac{\text{LigandMW}}{\text{AnalyteMW}}$$

$R_L$  = 配体固定水平

$R_{\max}$  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  $S_m=1$ )

实际固定量 =  **$1.5 R_L$**



## 练习 - 计算 $R_L$

$$R_L = \frac{R_{\max}}{S_m} \cdot \frac{\text{LigandMW}}{\text{AnalyteMW}}$$

如果期望 $R_{\max}$ 是100 RU，应该在芯片上固定多少配体？

Analyte MW = 25,000 Da

Ligand MW = 150,000 Da

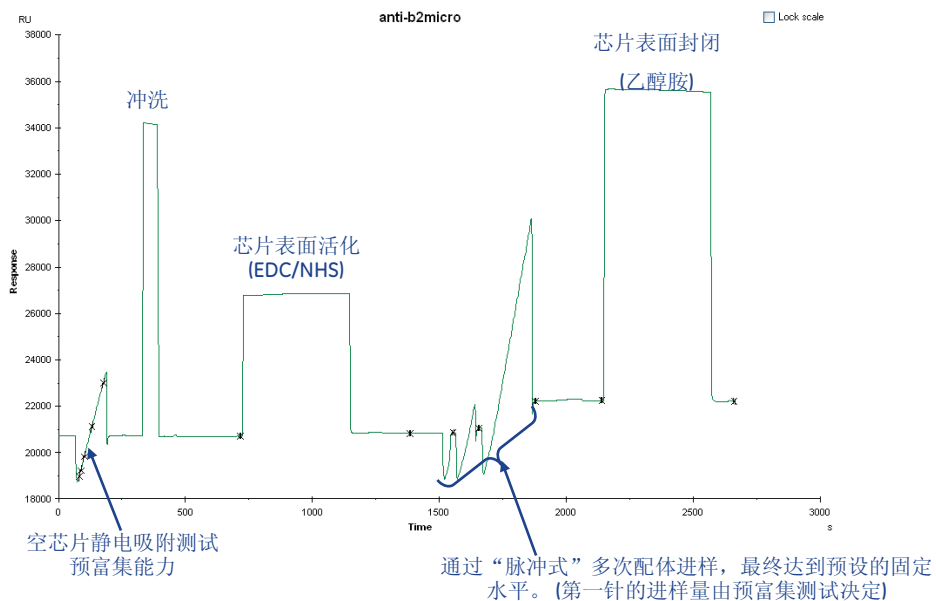
$S_m = 1$

$R_{\max} = 100$  RU

$R_L = ?$



## 使用Target程序自动控制固定水平





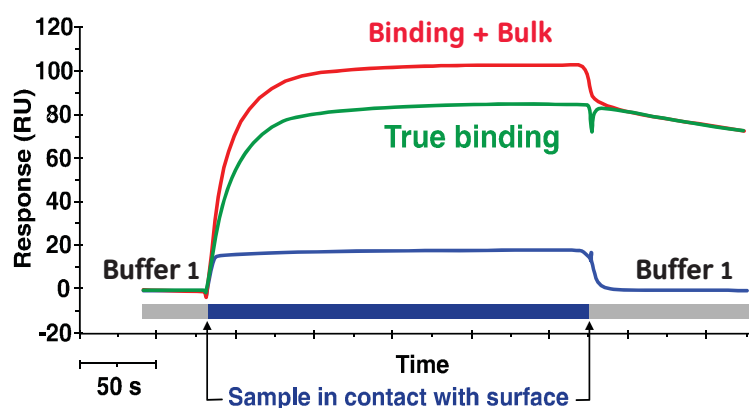
# 固定配体时需要考虑的其他因素



- 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CM系列以外的芯片
- Buffer
  - 固定阶段，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）
  - 将多价分子固定于芯片上，比如抗体IgG。
- 功能团和化学反应的选择
- 纯化标签：His-tag，可选择NTA芯片或Anti-His试剂盒。
- 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



## 参比通道与容积效应 (Bulk Effects)

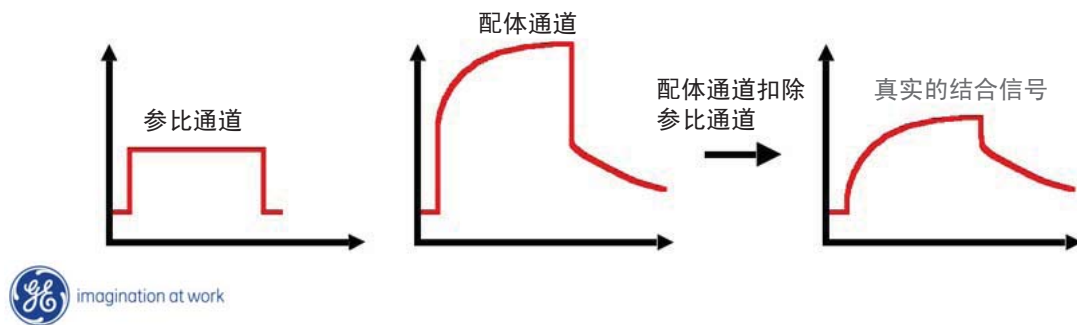
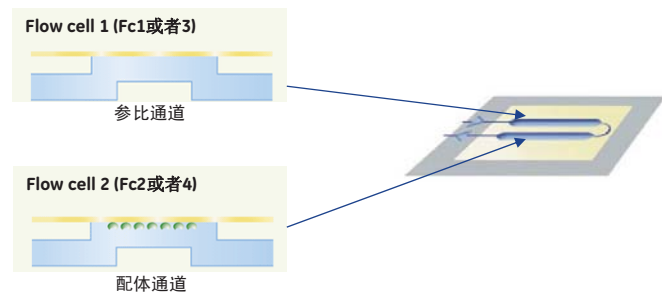


- 容积效应 (Bulk effect)是由于样品溶液与运行缓冲液折射率的差异而产生。
- 容积效应并不反映真实的生物分子结合。
- 容积效应需要通过设置参比通道来扣除。



# 参比通道 (Reference surface)

- 参比通道应该设置在配体通道的上游
- 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，但不固定配体

减少了芯片表面携带的负电荷，从而减少非特异性结合

### • 固定了伪装配体 (**dummy ligand**) 的通道

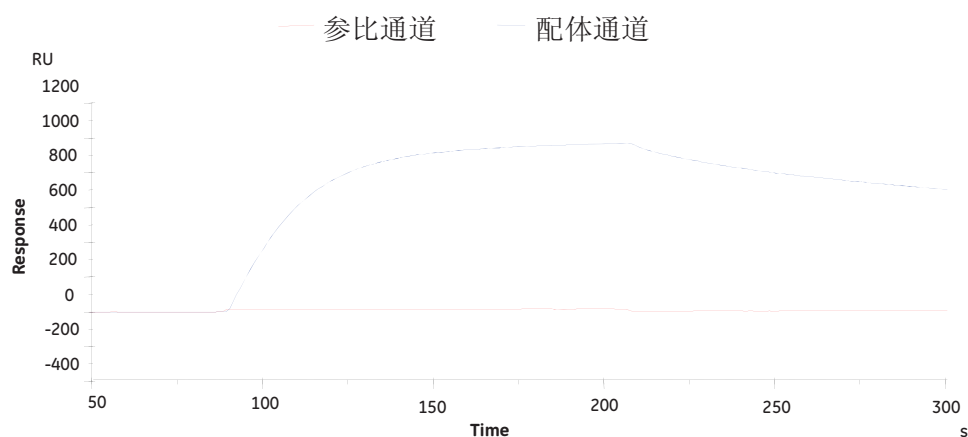
将一种不与分析物结合的蛋白固定于芯片上，而且与真实配体的固定水平相同

# 表面测试和再生条件的选择

## --蛋白/CM5芯片/动力学为例



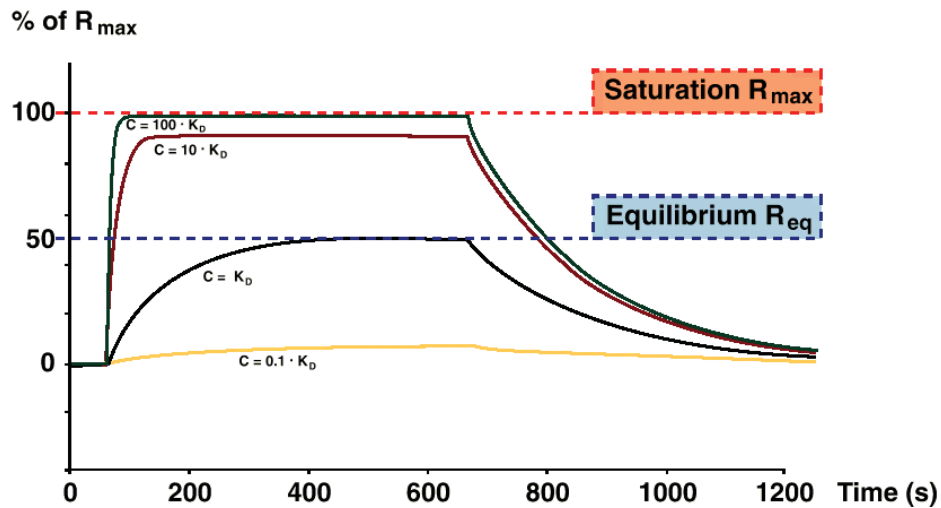
### 芯片表面测试



- 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（使用运行缓冲液稀释）
- 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、估算大致 $KD$
- 用来评估对照表面上的非特异性吸附的结合水平



# $K_D$ 的预估

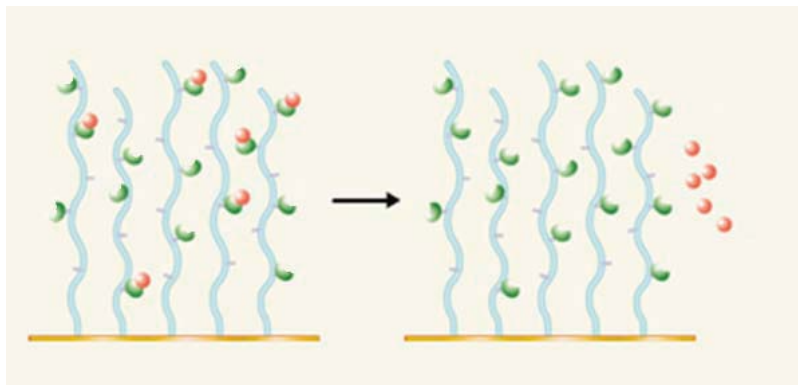


- 预估 $K_D$
- 动力学分析中，通过预估的 $K_D$ 设计浓度梯度
- 获得的 $K_D$ 必须落在实验浓度范围内。

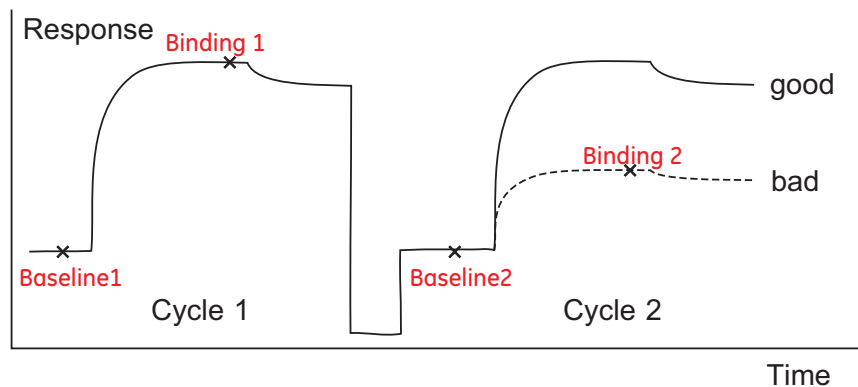


## 再生条件的选择

- 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！



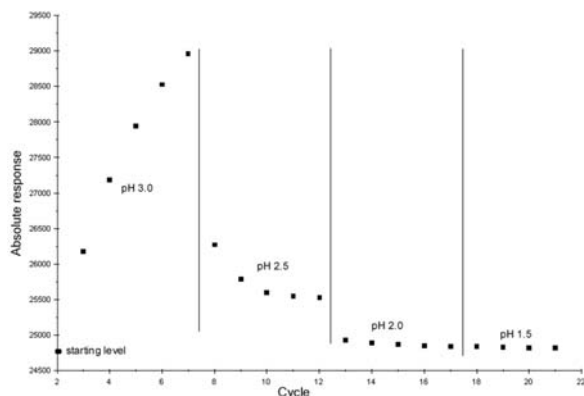
# 再生条件的选择-测试



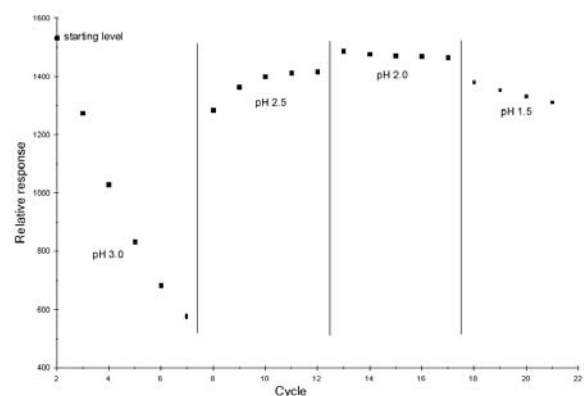
- 有效的再生条件能够去除所有剩余的分析物分子 (Baseline)
- 分析物重复一次进样，以检测是否配体维持了原有的活性 (Binding)
- 重复多次进样和再生，充分确保所选择的再生条件的有效性



## 再生条件的选择



基线的变化



结合水平的变化



# 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, 基线维持稳定或逐渐降低



## 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
- 当配体分子是蛋白质时, 建议可选择的再生起始测试条件:
  - 低 pH (10 mM glycine-HCl, 从 pH 3 至 pH 1.5)
  - 乙二醇 (Ethylene glycol, 50%, 75% 和 100%)
  - 高 pH (1-50mM NaOH)
  - $MgCl_2$  (1-4 M)
  - 参考文献和再生条件筛选试剂盒
  - **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



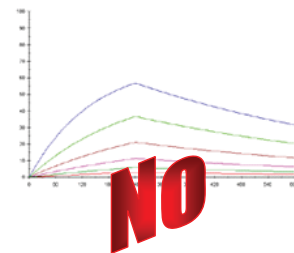
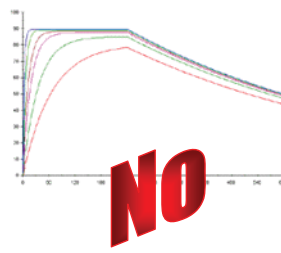
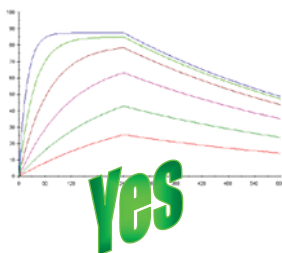
# 分析物进样和实验设计

## --蛋白/CM5芯片/动力学为例

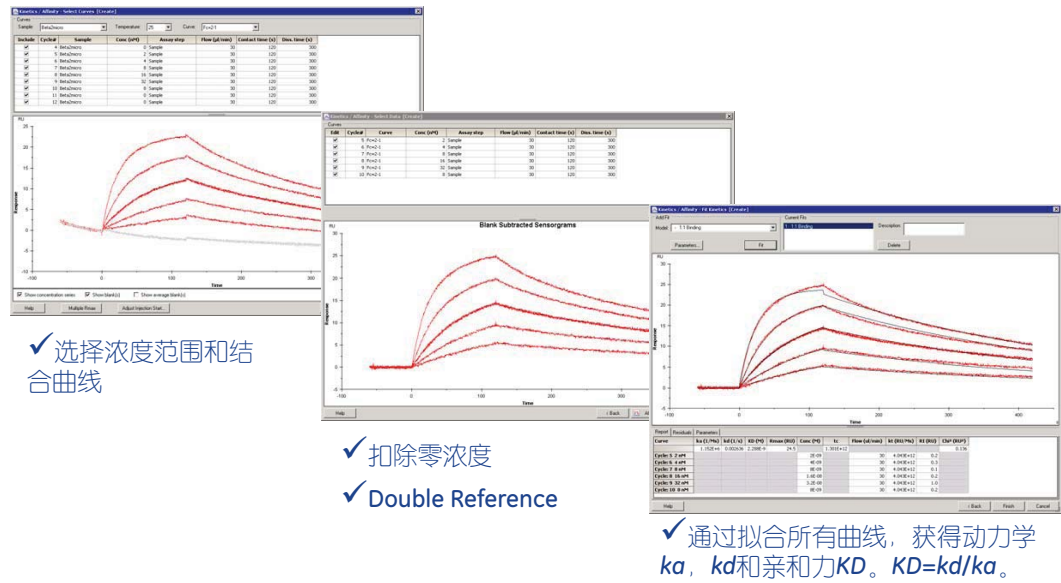


## 动力学分析实验设计

- 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



## 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？
- 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）
- 样品是否容易发生聚合？
- 是否存在非特异性结合？（检查参比通道）





# 对缓冲液的要求

- 必须经 0.2  $\mu\text{m}$  膜过滤并抽气 (第二天使用须重新过滤脱气)
- 大多数常用的缓冲液都适用于 **Biacore**，须根据结合活性来选择最适buffer
- 如果可能的话，在仪器运行缓冲液中加入表面活性剂P20
- 该研究分子是否需要特殊的添加剂？
- 样品是否需有机溶剂处理以增加溶解度，比如DMSO
- 有机溶剂和**Biacore**的兼容性请参阅仪器手册

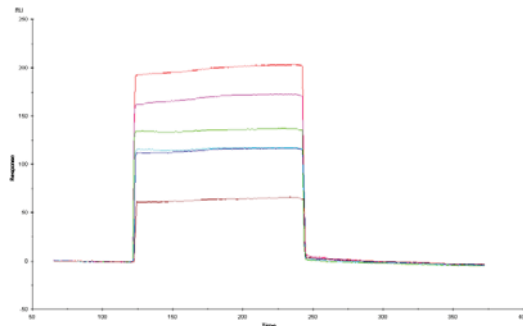


## 其他分析方法和固定方法

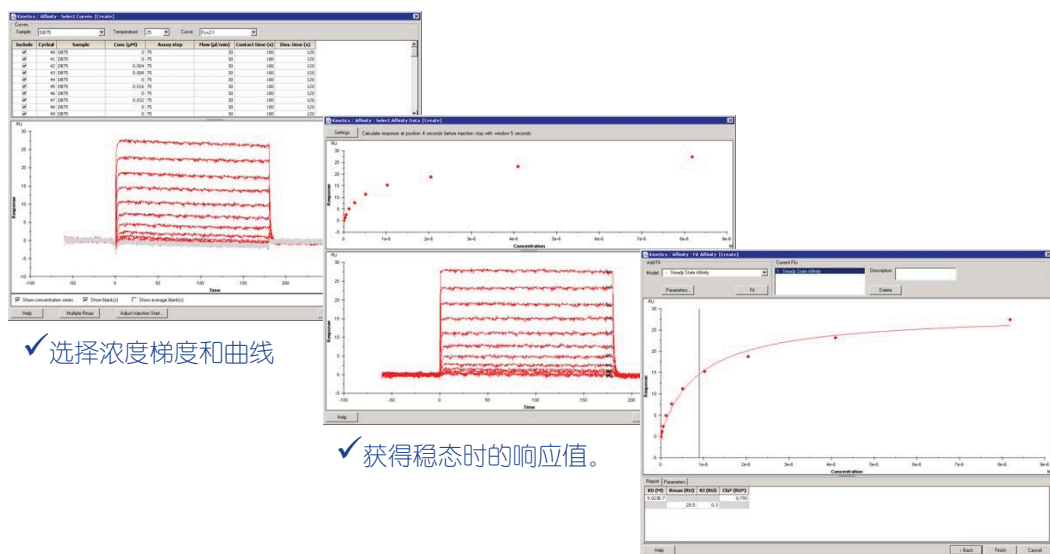


# 稳态分析

- 将梯度浓度分析物流经配体，测量**达到稳态时**响应值
- **高配体固定水平**（高配体浓度、固定流速、固定上样时间）
- 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



✓ 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KD。



# 通过捕获固定配体

## 直接固定/偶联

- 共价反应
- 造成配体定向不均一性
- 固定量高



### 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
- 固定量相对较低



### Examples

- Streptavidin - Biotin
- Anti-mouse Ig - MAb
- Anti-GST - GST
- NTA - 6His
- Anti-His - 6His
- Anti-FLAG - FLAG



# 共价偶联？ 捕获？

稳定性差的配体 → 捕获

纯度低的配体 → 捕获

共价结合后发现活性丢失 → 尝试其他官能团 (e.g. 巯基) 或捕获

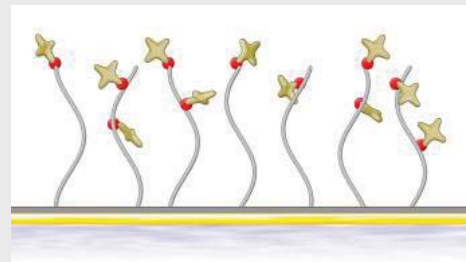
酸性配体 → 捕获

再生困难 → 捕获/单循环动力学



# 生物素化标签

- 将分子加上生物素标签。
- 使用**SA**芯片不可逆地固定生物素化分子。
- 使用**CAP**芯片可逆地固定生物素化分子
- 糖类、肽段，蛋白质，**DNA**



- **SA**芯片：在羧基化的葡聚糖表面覆盖了一层链霉生物素（streptavidin）
- 非常适合用于捕获生物素标记的**DNA**大片段，进行核酸之间的相互作用研究
- 可捕获生物素标记的配体，如**糖类、肽段、蛋白质、DNA**等
- 不需要考虑预富集，因此可以固定酸性蛋白

## 课程小结

### 配体固定

- 最适**pH**的选择（预富集）
- 固定水平的确定
- 参比通道的设置

表面测试：结合和解离时间，预估**KD**

再生条件的选择（重要）：

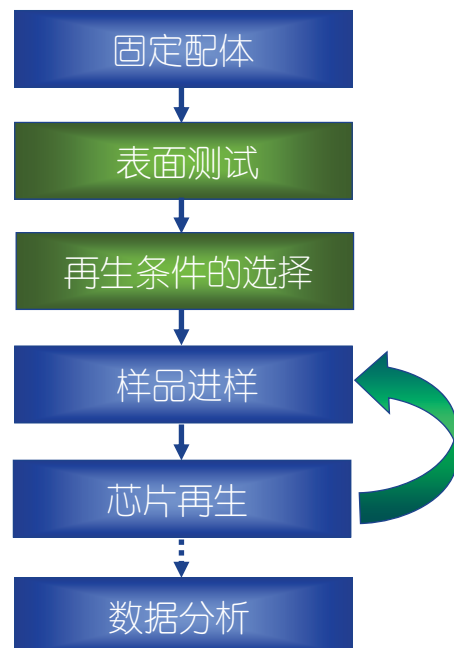
- 彻底洗净
- 保持活性

### 动力学分析

- 设置浓度梯度

### 其他分析和固定方法

- 稳态分析
- 捕获法固定
- 生物素化标签



# 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)

关于GE公司及产品的任何疑问，  
都欢迎拨打800或400热线。



# 动力学基础

韩佩韦

产品经理

通用电气公司生命科学部

13911728591

[peiwei.han@ge.com](mailto:peiwei.han@ge.com)



## 课程目标

- 亲和力与动力学回顾
  - 亲和力与动力学常数的意义
  - 获得亲和力和动力学的方法
- 动力学分析的理论基础
  - 1: 1模型
  - 稳态与平衡常数 $KD$
  - 动态与动力学常数 $k_a$ ,  $k_d$
  - 物质迁移限制 (MTL)
- 实验设计
  - 稳态分析
  - 动力学分析



Biacore™ 3000



# 亲和力与动力学的回顾



## 什么是亲和力和动力学?

### 亲和力

- 分子间结合的**强度?** - 与时间无关
- 亲和力关心当结合反应达到稳态时（结合与解离相平衡）复合物形成的量。

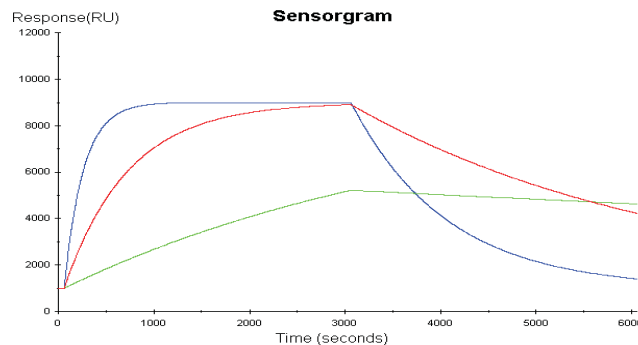
### 动力学

- 结合反应发生的**速率?** - 与时间相关
- 结合 - 分子间结合的速率,  $k_a$
- 解离 - 复合物解离的速率,  $k_d$
- 动力学关心在一定时间内, 复合物形成或解离的进度



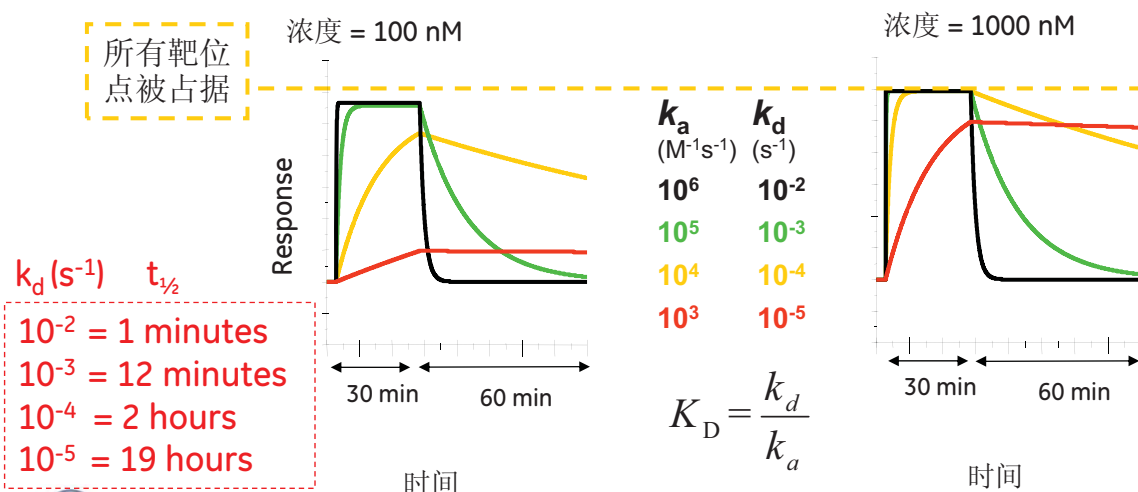
# 了解动力学的重要性

- 细胞本身就是一个动态系统 - 极少处在平衡状态
- 同样的亲和力，可能具有不同动力学数据
- 动力学分析提供关于结合的更丰富的信息



## 同样的亲和力，不同的动力学

- 所有4个化合物的亲和力数据相同  $K_D = 10 \text{ nM} = 10^{-8} \text{ M}$
- 结合动力学常数间有数量级的差异





# 获得亲和力和动力学常数的3种方法

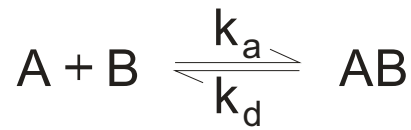
- 动力学分析  
亲和力 **Yes**      动力学 **Yes**
- 稳态分析  
亲和力 **Yes**      动力学 **NO**
- 溶液内竞争法  
亲和力 **Yes**      动力学 **NO**



## 动力学分析的理论基础



# 1:1 动力学模型的速率公式



Association:  $\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B]$

Dissociation:  $\frac{-d[AB]}{dt} = k_d \cdot [AB]$

Net rate equation:

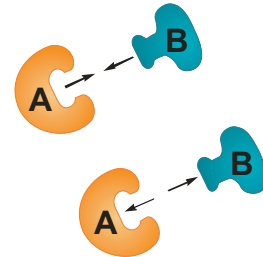
$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB]$$

$M/s$ 
 $M^{-1}s^{-1}$ 
 $M$ 
 $M$ 
 $s^{-1}$ 
 $M$

where

$k_a$  = association rate constant [ $M^{-1}s^{-1}$ ] 结合速率常数

$k_d$  = dissociation rate constant [ $s^{-1}$ ] 解离速率常数



## 平衡常数

At equilibrium:

Association = Dissociation

$$k_a \cdot [A] \cdot [B] = k_d \cdot [AB]$$

$M^{-1}s^{-1}$ 
 $M$ 
 $M$ 
 $s^{-1}$ 
 $M$

The equilibrium constants:

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]}$$

the equilibrium association constant [ $M^{-1}$ ]

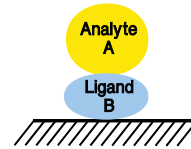
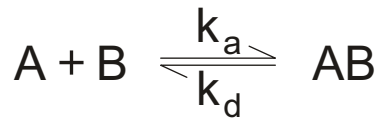
$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$$

the equilibrium dissociation constant [ $M$ ]

$K_D$ , 解离平衡常数



# 动力学分析



$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB]$$

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot [R_{\max} - R] - k_d \cdot R$$

$\text{RU/s} \quad \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad \text{M} \quad \text{RU} \quad \text{s}^{-1} \quad \text{RU}$

A 是溶液中的分析物(analyte)

-游离A通过流动系统不断供给，其浓度**已知**。

AB 是结合复合物

-AB的浓度可通过相对于基线的响应值获得，表示为**R**

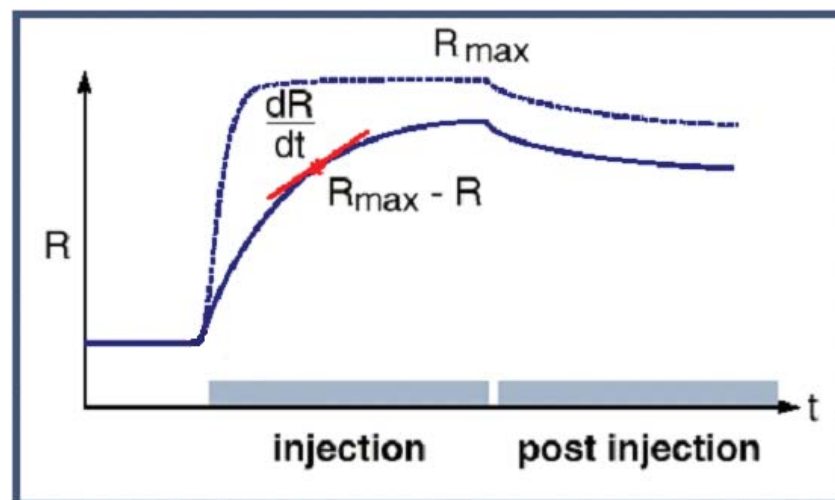
B 是固定在传感芯片上的配体分子 (ligand)

-B的总浓度可用最大理论结合容量**R<sub>max</sub>**表示

-游离B的浓度即 **R<sub>max</sub>-R**



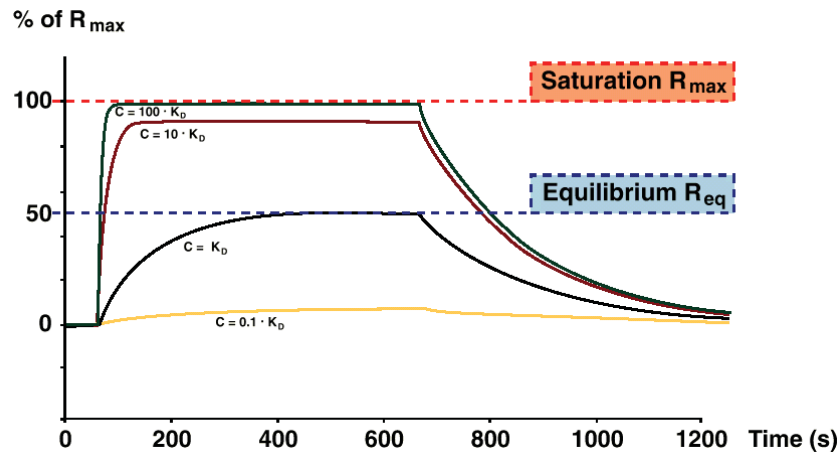
## 传感图中的变量



我们只要知道分析物的浓度，而无需知道复合物和配体的实际浓度！



# $R_{\max}$ , $R_{eq}$ 和 $K_D$ 的关系



- 拟合获得的 $K_D$ 必须落在实验浓度范围内。
- 预估 $K_D$



## 物质迁移现象 (Mass Transport)

在Biacore动力学分析中必须考虑的一种物理现象

- 描述分子由溶液向芯片表面转移的过程
- 与生物分子间的相互作用无关

但是，Biacore所获得的反应速率是物质迁移现象和分子间的相互结合作用的综合结果

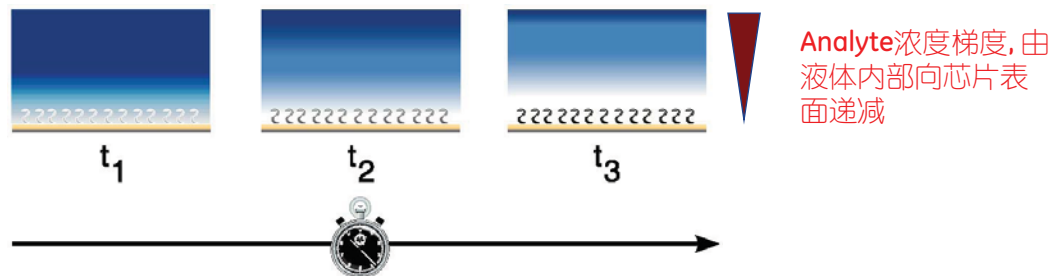
- 通过采用合适的条件，质量转移限制对动力学结果影响能够被最大程度控制。



# 什么是物质迁移?

分子扩散的物质迁移

- 在静态的体系中



- 经过一定的时间, 靠近芯片表面的分析物的浓度将会逐渐降低, 并逐渐在溶液中形成一个分析物浓度梯度



## 如何降低物质迁移限制

- 低  $R_{\max}$  (低ligand密度, 降低analyte消耗)
- 高流速 ( $>30\text{ul/min}$ )
  - 高流速有效减少了扩散距离
  - 高速可以有效补充analyte浓度
- 可选的预设分析模式中已考虑了物质迁移限制  
(需结合 $R_{\max}$ 和流速控制来降低物质迁移限制)

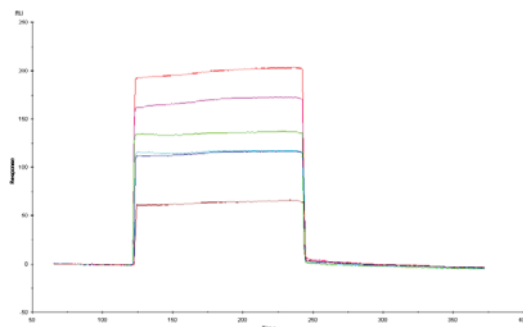


# 实验设计



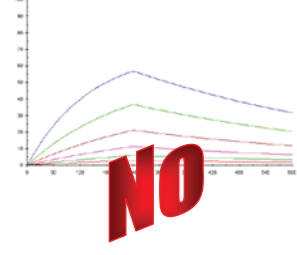
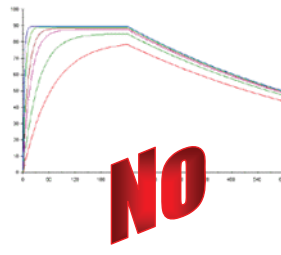
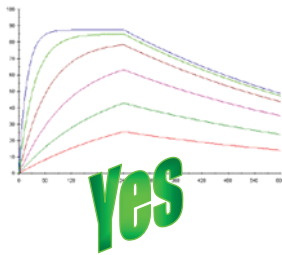
## 稳态分析

- 将梯度浓度分析物流经配体，测量达到稳态时响应值
- 高配体固定水平
- 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
- 设置零浓度样品(Running buffer)。



# 动力学分析

- 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
- 设置零浓度样品



## 课程小结

### 亲和力与动力学常数

- 亲和力与时间无关
- 动力学与时间有关
- 相同的亲和力，不同的动力学

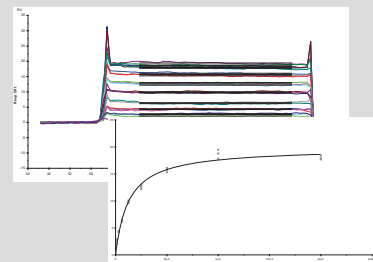
### 动力学分析的理论基础

- 1:1模型
- $K_D = k_d / k_a$
- $R_{max}$ ,  $R_{eq}$ 和浓度的关系
- 物质迁移限制 (MTL)和对策

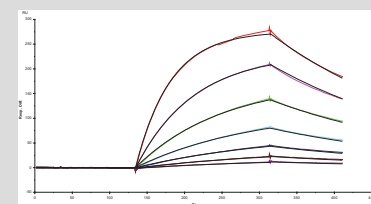
### 实验设计

- 稳态分析
- 动力学分析

稳态分析可以获得亲和力 $K_D$



动力学分析可以获得 $k_a$ ,  $k_d$ , 和亲和力 $K_D$





Biacore基础课程之五

# Biacore设备维护

韩佩韦

产品经理

通用电气公司生命科学部

13911728591

[peiwei.han@ge.com](mailto:peiwei.han@ge.com)





# 课程目标

- 了解Biacore维护的重要性
- 每日维护
- 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!**



# 每日维护

- 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
  - 尽量使用新鲜的缓冲液
- 使用Prime对系统进行冲洗
  - 换芯片前要用原有的buffer或水prime冲洗系统
- 在每次实验间隙，将系统设定于Standby模式



4

# 每周维护

- 去吸附
  - 从主菜单Tools->Working Tools中选择运行Desorb程序 (SDS/甘氨酸)
  - SDS必须放置室温下
- 去除残余的盐离子 (Biacore 3000)
  - 用去离子水在位清洗connector block和injection port
  - 用软布擦拭进样针和样品沉积槽
- 检查进样泵
  - 检查末端看是否有渗漏
  - 检查末端看是否有污染
  - 如果必须要进行清洗步骤，按照以下步骤 Tools ->



Service Tools -> Syringe/Tip

5

# 每月维护

- 去吸附和除菌
  - 从主菜单**Tools->Working Tools**中选择运行**Desorb**程序
  - 从主菜单**Tools->Working Tools**中选择运行**Sanitize**程序（稀释的次氯酸钠）
- 测试系统性能
  - 从主菜单**Tools-> Test Tools**中选择运行**System Check**  
(使用新的 **CM5**芯片/标准测试溶液/  
标准**HBS-EP buffer for Biacore 3000**, **HBS-N for Biacore T100/T200**)



6

# 每次实验结束后， 如何设置Biacore?

- 如果预计下次实验在**4天**以内
  - 系统换到水中并选择**Standby**模式， 以确保在进行下次实验前， 系统内存在稳定的液流。
  - 每日检查液体体积， 并更换新鲜液体
- 如果预计下次实验在**4天**以后
  - 执行关机程序(**Shutdown**)， 按照指令分步使用水和70%乙醇。
  - **Biacore 3000**关机过程中， 按照指令卸下**Connector block**
  - **Biacore X100**和**T200**， 需在关机后将蠕动泵压盖拧松



7

