

BIAcore-生物分子相互作用分析仪原理和操作注意事项

BIA (Biomolecular Interaction Analysis) 提供了实时观察生物分子间相互作用的技术。通过它能观察两种分子结合的特异性,能知道两种分子的结合有多强,还能了解生物分子的结合过程共有多少个协同者和参与者。BIA 可以让得到用其他技术方法难以得到的结果,因为它可以实时反映分子结合过程中每一秒变化的情况。无需借助标记物进行分析使 BIA 广泛应用于各类生物体系的测定,从各类小分子化合物、多肽、蛋白质、寡核苷酸和寡聚糖直至类脂、噬菌体、病毒和细胞。BIA 就是利用金属薄膜表面的折射率的改变,引起共振角的变化,来推断金属薄膜表面的变化。实验时先将一种生物分子固定在传感器芯片表面,将与之相互作用的分子溶于溶液流过芯片表面。检测器能跟踪检测溶液中的分子与芯片表面分子的结合、解离整个过程的变化。

BIA 技术是基于一种表面等离子共振 (SPR) 的物理光学现象的生物传感分析技术。不必使用荧光标记和同位素标记,从而保持了生物分子的天然活性。当入射光以临界角入射到两种不同透明介质的界面时将产生全反射,且反射光强度在各个角度上都应相同,但若在介质表面镀上一层金属薄膜后,由于入射光可以引起金属中自由电子的共振,从而导致反射光在一定的角度内大大减弱,其中使反射光完全消失的角度称为共振角。共振角会随金属薄膜表面通过的液相的折射率的改变而改变,折射率的变化 (RU) 又和结合在金属表面的大分子质量成正比。因此, BIA 技术可以通过对反应全过程中各种分子反射光的吸收获得初始的数据,并经相关处理获得结果—传感图。

一 各种传感片的理化特性及用途

传感器芯片是实时信号传导的载体。芯片结构是在玻璃片上覆盖了一层金膜,各种类型的芯片在金膜表面连有不同的多聚物以形成不同的表面环境,利于固定不同性质的生物分子。实验时先将一种生物分子固定在传感器芯片表面,将与之相互作用的分子溶于溶液流过芯片表面。检测器能跟踪检测溶液中的分子与芯片表面的分子结合、解离整个过程的变化。

目前传感器芯片的种类有十余种。根据传感器芯片表面的物理化学特性适合耦联不同的蛋白质或其它生物大分子。

一张传感器芯片固定耦联同一种蛋白质或其它生物大分子，可反复使用十次以上。传感器芯片耦联细胞时则需要保证细胞的数量和结构的完整。目前平台备有 **CM5**、**SA**、**NTA** 现货，可供大家使用。

1. 传感片 CM5——用途最广的芯片

传感片 CM5 表面覆盖了一层葡聚糖。带有化学基团如 $-NH_2$ ， $-SH$ ， $-CHO$ ， $-OH$ ， $-COOH$ 的生物分子 (Ligand) 可通过化学反应，以共价键耦联的方式与葡聚糖上的羧基耦联。从而使生物分子耦联到传感片表面。

2. 传感片 SA——捕获生物素标记的肽片段、蛋白质、DNA

传感片 SA 表面覆盖了一层链霉抗生物素 (Streptavidin)，能与被生物素标记的分子量大小各异的肽片段、蛋白质、DNA 结合。是研究 DNA-DNA，RNA-DNA，RNA-蛋白质间相互作用的理想芯片。

3. 传感片 NTA——通过金属螯合作用捕获生物分子 (Ligands)

传感片 NTA 表面耦联了氨三乙酸 (NTA)，通过镍组氨酸修饰离子螯合作用将末端组氨酸修饰的生物分子 (Ligands) 连接到芯片表面。类似组氨酸修饰的亲层析，组氨酸修饰在生物分子的末端，因此用此法将生物分子连接到芯片，可以很好地保持生物分子的空间结构。

4. 传感片 HPA——构建细胞膜研究模型

传感片 HPA 提供了一个疏水表面，研究者可方便地在芯片表面铺上脂质体。要研究的受体就嵌在磷脂分子层中，因此 HPA 芯片是研究细胞膜受体在膜环境中与配体相互作用的理想芯片。

5. 传感片 L1——直接抓住细胞的芯片

传感片 L1 表面由亲脂的葡聚糖化合物组成，该化合物能直接插入磷脂双分子层将脂质体或细胞捕获到芯片表面。可研究位于与膜内外或跨膜的蛋白、受体等，是研究膜蛋白信号传导的理想芯片。

二 样本的要求

1. 通过等电聚焦或者使用软件预测，确定待分析蛋白的等电点。对等电点高于 7 或者小于 3 的蛋白一般不推荐进行 **Biacore** 分析，特殊需求可与相关技术人员进行个例商讨。

2. 固定于传感片上的靶蛋白（例如：受体蛋白）和待分析蛋白，纯度要达到95%以上。
3. 用 PBS（或者用户蛋白所需的特殊缓冲液）对蛋白溶液进行透析，然后浓缩至 200ug/ml~1mg/ml 的浓度。
4. 化合物溶解在含 1% DMSO 的 HBS 缓冲液中，并稀释成 10^{-5} M 和 10^{-6} M 两种浓度进行初步分析；初步分析呈阳性的化合物再用含 1% DMSO 的缓冲液稀释成 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 2×10^{-6} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-7} M 和 1×10^{-7} M 的浓度梯度进行动力学常数分析。
5. 如果化合物无法溶解在含 1% DMSO 的 HBS 缓冲液中，则可以提高 DMSO 的浓度，最高可至 1% 的浓度。同时配制相应浓度的 DMSO 缓冲液作为对照进行实验。

HBS:

HBS-EP缓冲液（有现货）：常用的缓冲溶液，0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20

HBS-P缓冲溶液：0.01M HEPES, pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005% v/v Surfactant P20

HBS-N缓冲溶液：0.01M HEPES, pH7.4, 0.15M NaCl

PBS 10X缓冲溶液：pH 7.4 的PBS, 5%DMSO（二甲基亚砷），适合小分子化合物的分析

三 操作流程

1. 样品准备 样品包括耦联到芯片表面的分子（ligand）和在溶液中流过的样品，称作 analyte。如果 ligand 是小分子，要检查该分子结构上是否有可供耦联的氨基基团，如果没有需要考虑对分子进行修饰。
2. 缓冲液准备 该实验要求所有缓冲液都经过过滤和脱气处理。如果缓冲液能够耐受高温的话，可以对缓冲液进行灭菌处理。这样灭菌有脱气的效果，同时也能保存更长的时间。
3. 耦联 参照耦联的具体方法。

由于芯片表面带有负电，因此要耦联到芯片上的分子必须带上正电，才有利于分子吸附到芯片表面，以利于共价耦联反应的完成。预结合实验就是将样品

溶解在不同 PH 值的缓冲液中，使其带上不同量的电荷。然后，将样品流过芯片表面，观察它与芯片的结合曲线，就可判断出合适的条件。

4. 测试 将分析物用合适的缓冲液稀释处理，上样。要尽可能让样品缓冲液与系统载流缓冲液一致。
5. 再生 再生是指将结合到芯片表面的分析物洗脱，以便芯片的重复使用。

日常维护

1. 每周和每次实验后要进行一次 DESORB
2. 缓冲液要每天检查，脱气处理；