

Biacore - představení měřicího systému

Biacore varianty

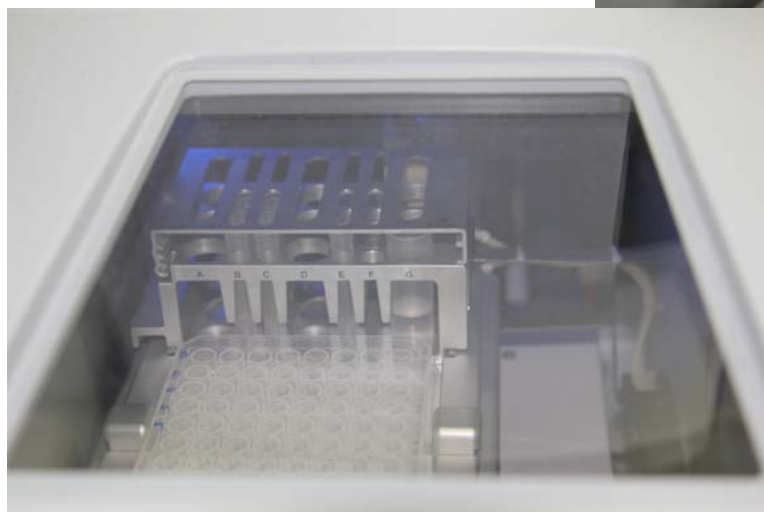
nyní (2010) dostupné:

- **4000** (A100) - nejvyšší produktivita, až 4800 interakcí/den
- **T100** - nejvyšší citlivost
- **X100** - osobní systém
- **C** - měření koncentrací, certifikovaný provoz
- **3000** - univerzální, citlivý, lze eluovat pro MALDI/MS
- **Q** - kvalita / kvantita v analýze potravin
- **J** - nejjednodušší jednokanálový systém

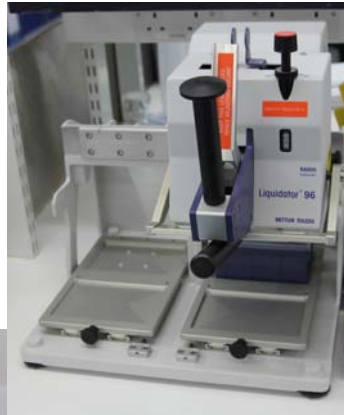
Porovnání systémů

Application/performance and technical specifications	Biacore T100 – Unmatched performance	Biacore A100 – Unmatched productivity	Biacore Flexchip – Array-based parallel kinetic profiling	Biacore X100 – Ready-to-run research system	Biacore 3000 – Interaction analysis with SPR-MALDI interface	Biacore C – Rapid and reliable protein quantification
						
Application						
Kinetic/affinity characterization	● ● ●	● ● ●	●	● ● ●	● ●	-
Kinetic/affinity screening and profiling	● ●	● ● ●	● ● ●	●	● ●	-
Single cycle kinetics	Yes	-	Yes	Plus Package	-	-
Concentration measurement	● ●	● ●	-	● ● Plus Package	●	● ● ●
Calibration-free concentration analysis	Yes	-	-	-	-	-
LMW interaction analysis	● ● ●	● ● ●	-	●	●	-
Thermodynamic characterization	● ● ●	●	-	● Plus Package	●	-
Sample recovery for MS	● ●	-	-	-	● ● ●	-
Performance and technical specifications						
Detection spots/sensor surface	4	20	400	2	4	4
Throughput	● ●	● ● ●	● ● ●	●	● ● ●	●
Unattended run capacity	● ●	● ● ●	●	●	● ●	● ●
Automated data evaluation	● ●	● ● ●	● ●	● ●	●	● ● ●
User guidance	● ●	● ●	● ●	● ● ●	● ●	● ●
Cooled sample storage	● ● ●	● ● ●	-	-	● ●	● ●
Analysis temperature (°C)	4-45 (in-line degasser)	4-40 (in-line degasser)	20-37 (in-line degasser)	25 4-40 with Plus Package, (including in-line degasser)	4-40	25
GxP compliance support	GxP Package	GxP Package	-	-	GxP Package	Yes

T100



4000



BIACore

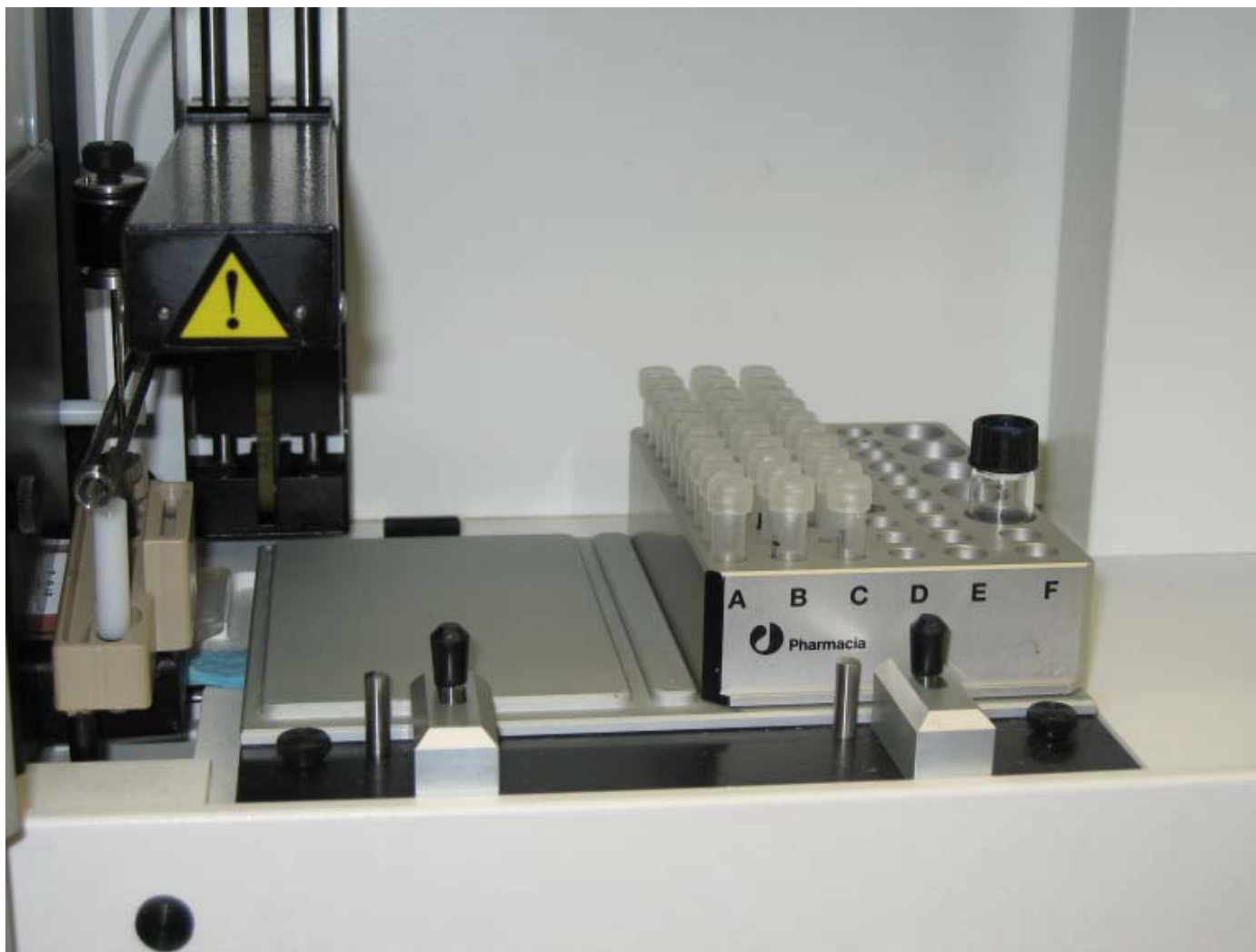


3000

2000

počátkem 90. let minulého století uvedla na trh švédská firma Pharmacia (později Biacore, ..., nyní součást GE Healthcare)

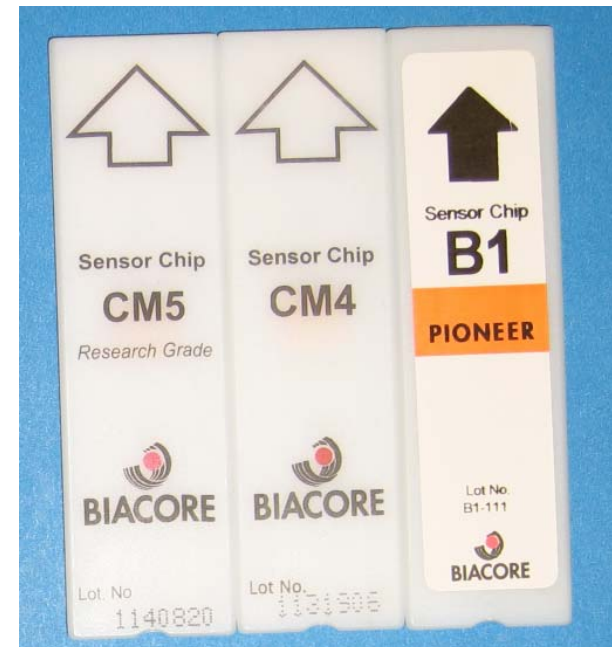
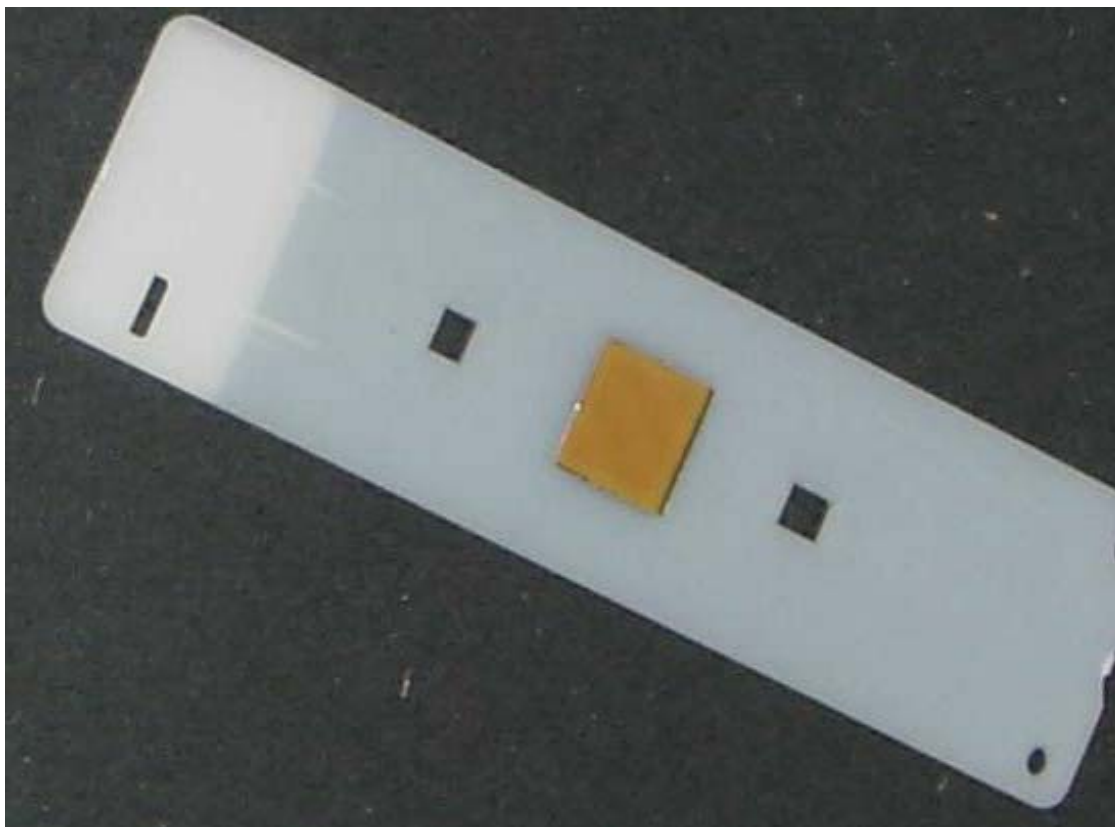
BIACore - automatizace



- dávkovač vzorků s pozicemi pro zásobníky

SPR biosensor

výměnný biosensor - „čip“ systému BIACORE



Rozměry

9 x 2.5 x 0.1 cm

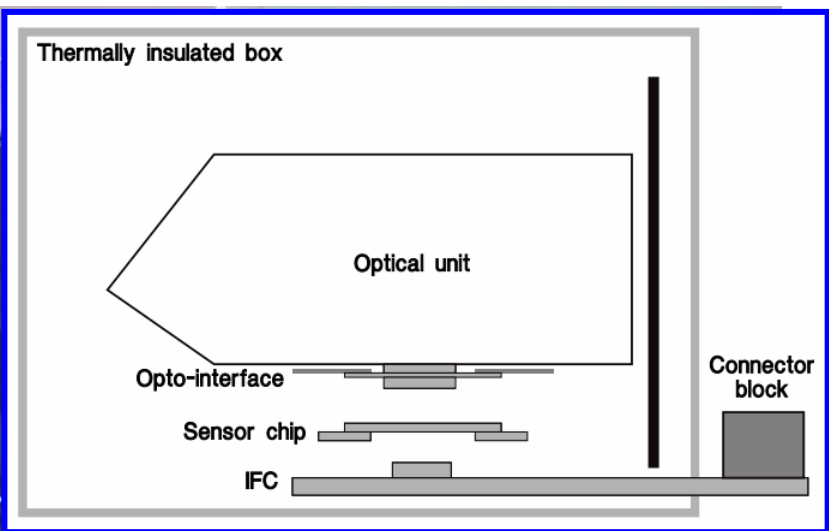
modifikace povrchu:

CM5 karboxymethyl-dextran, HPA hydrofobní,
SA streptavidinový, NTA komplexace kovů, ...

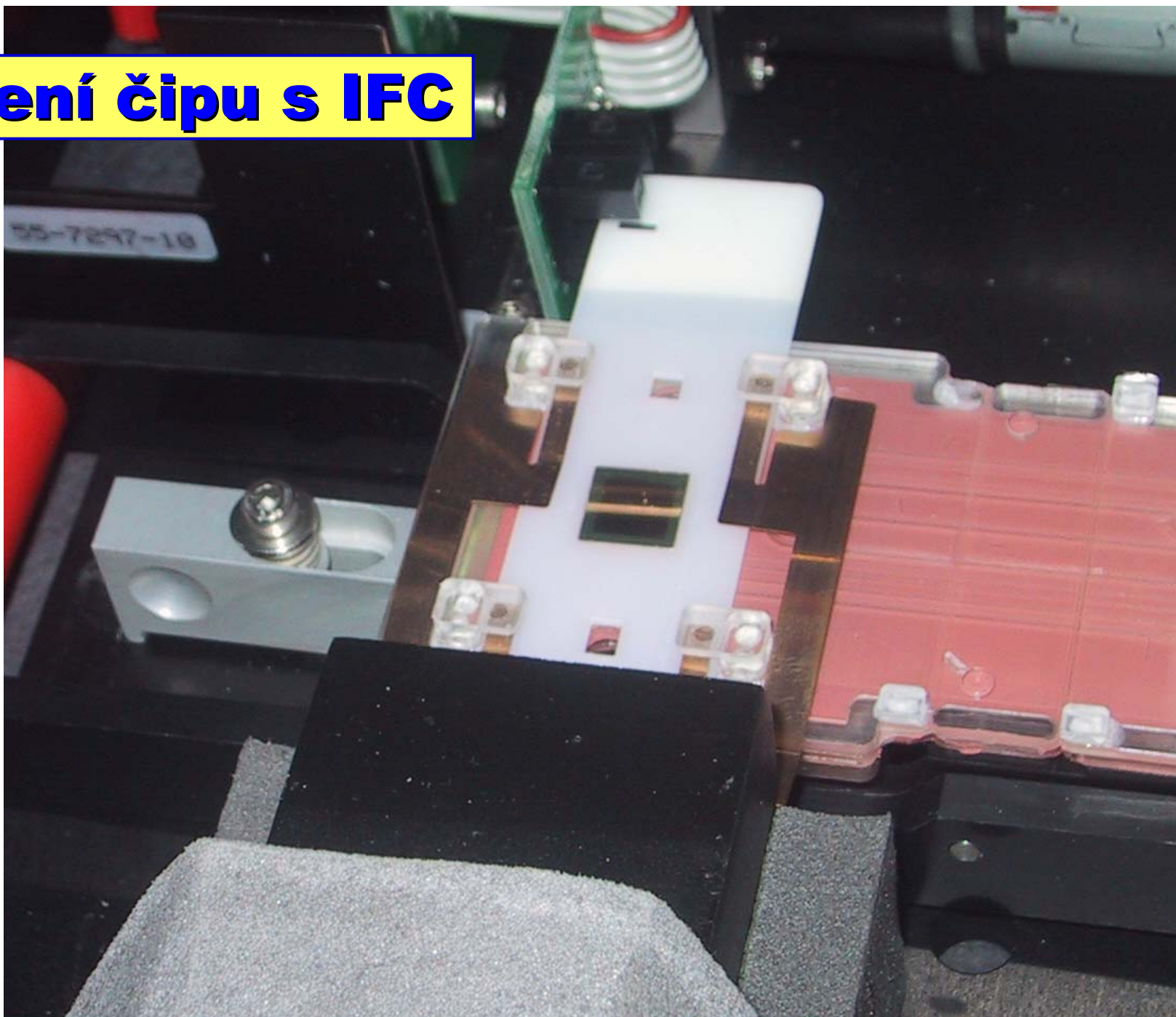
Zasunutí čipu



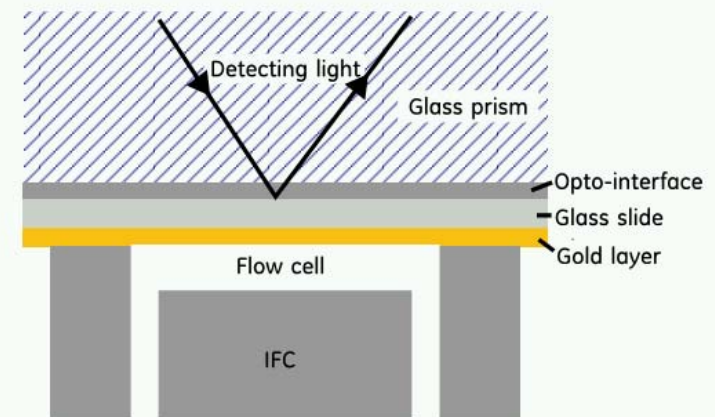
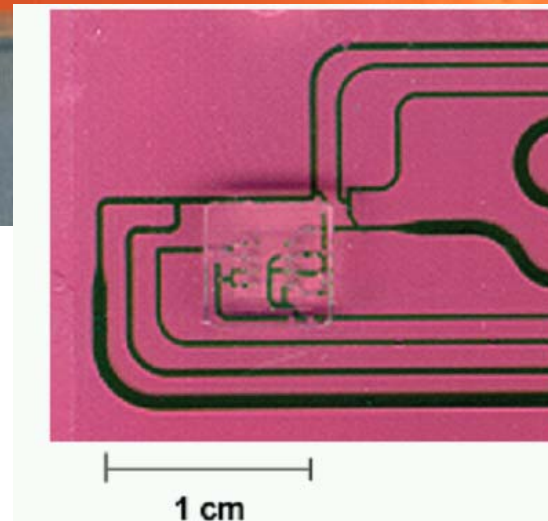
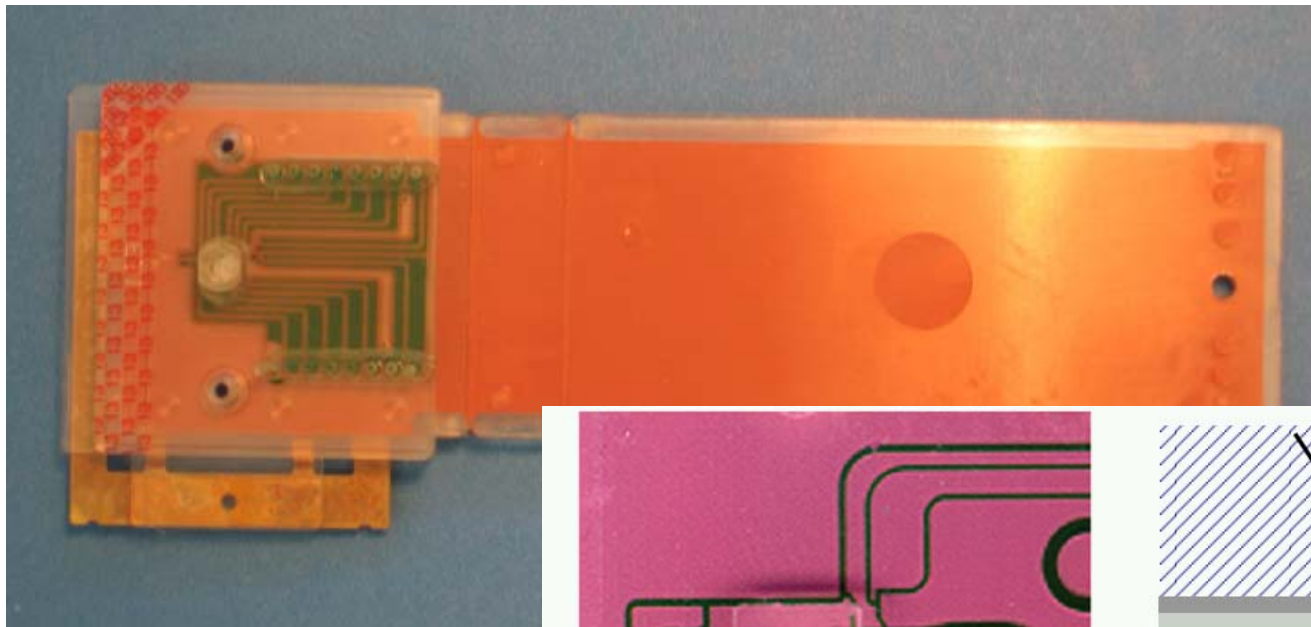
Pohled dovnitř



Spojení čipu s IFC



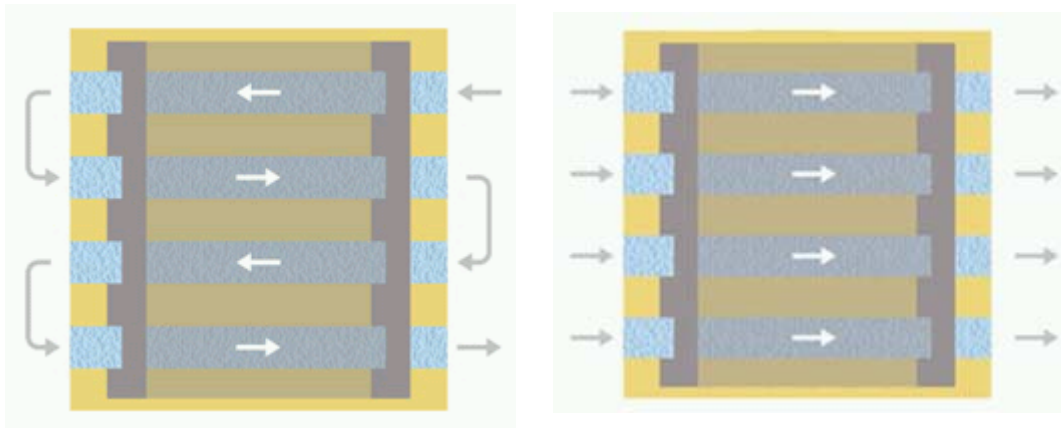
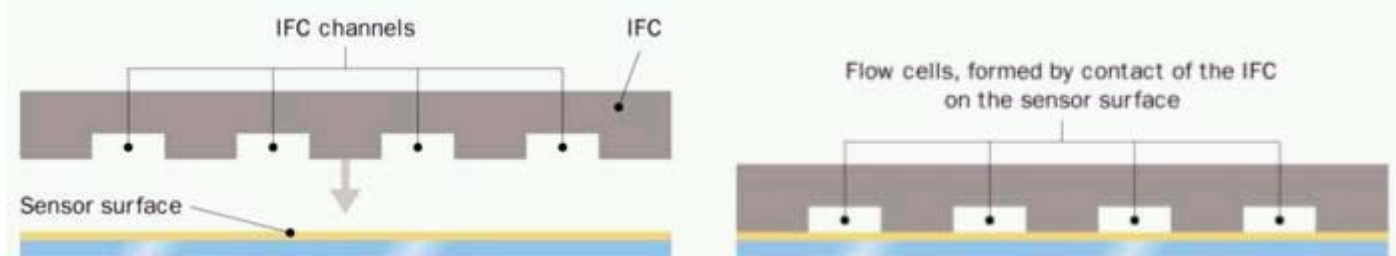
BlAcore - průtočný systém



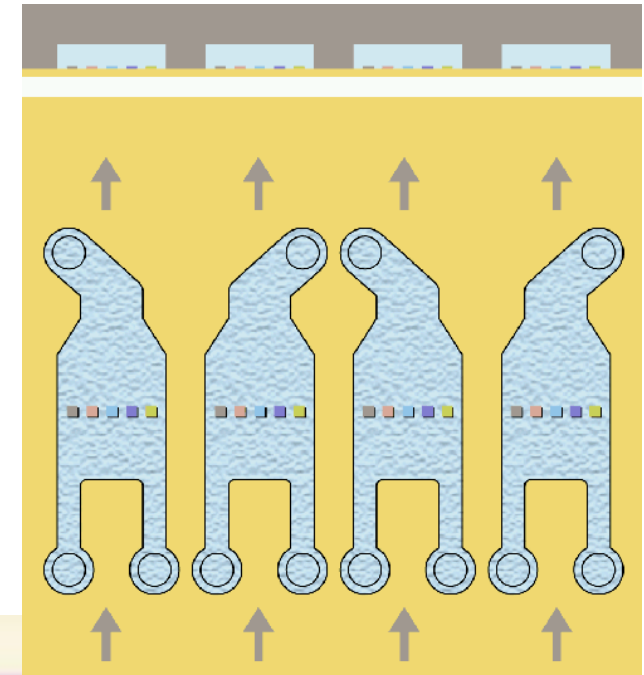
- microfluidics system IFC - miniaturní výměnný modul s pneumaticky ovládanými mikroventily, dávkovacími smyčkami a dráhami
- přívod pracovního pufu, reagensů a vzorků k jednotlivým kanálům
- variabilní nastavení měřící konfigurace průtočné cely - 1 až 4 kanálové měření

Průtočné cely

- klasický (2000, 3000)



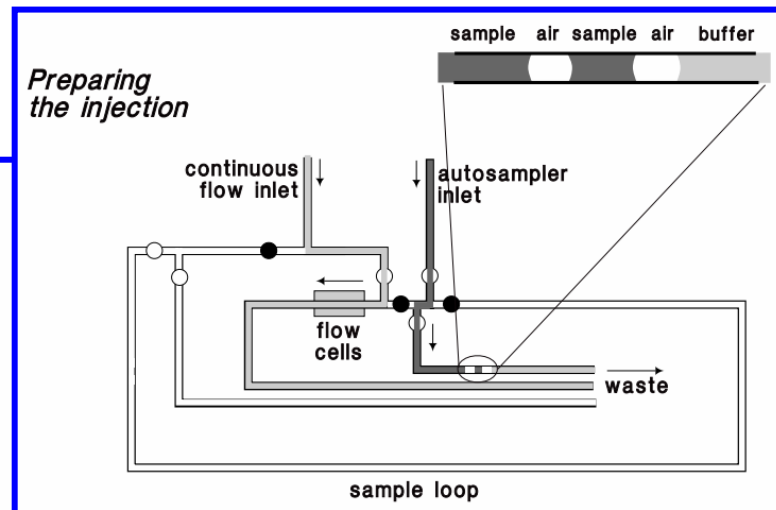
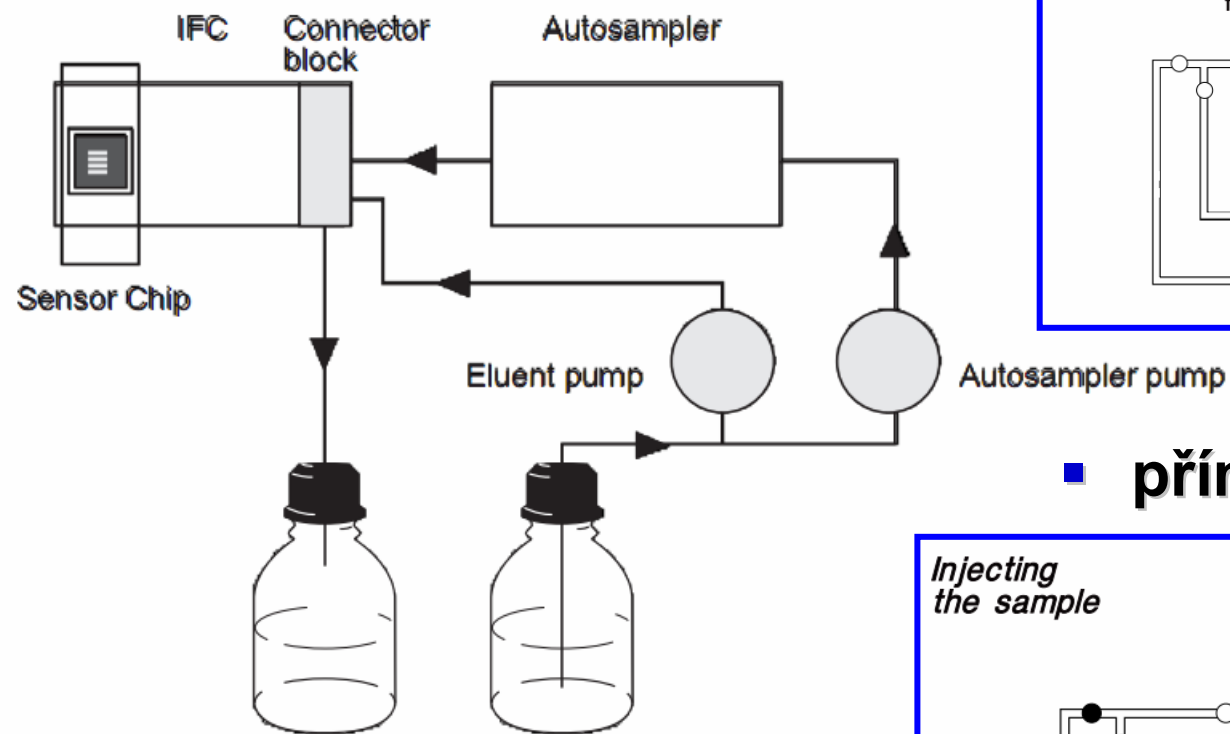
sekvenční / paralelní



- hydrodynamická adresace (A100)

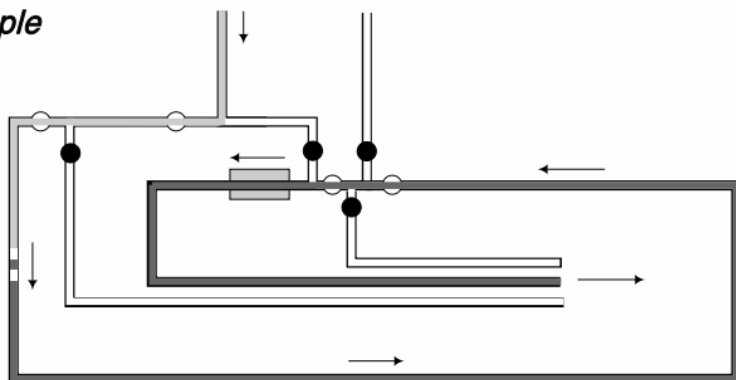


Průtočný systém

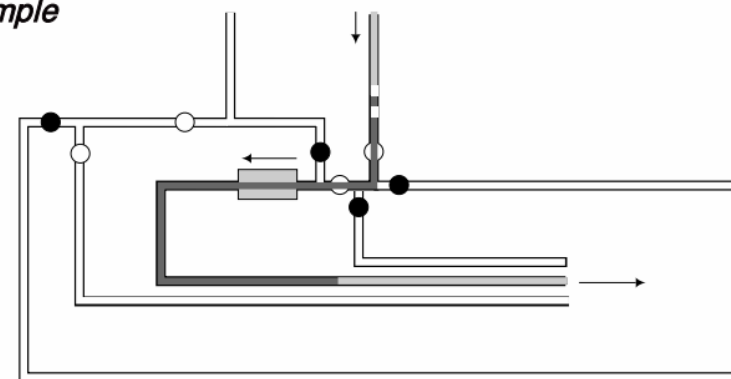


- přímý nástřik do cely

Injecting the sample



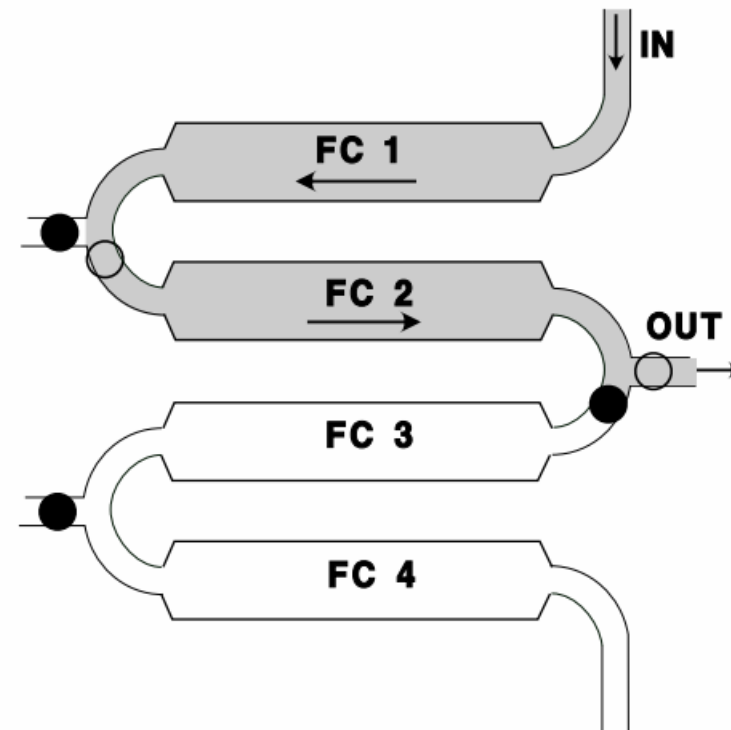
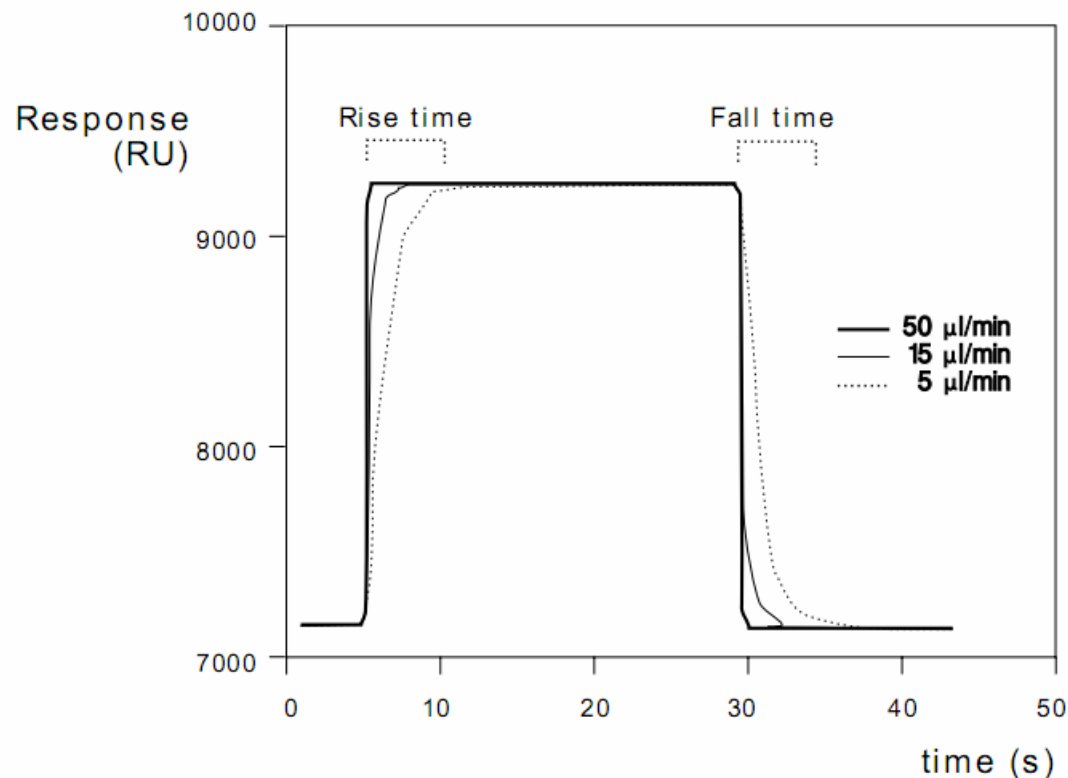
Injecting the sample



- nástřik přes smyčku

Detail toku v cele

- způsoby průtoku:
 - individuálním kanálem (FCi)
 - dvěma (FC1,2 nebo FC3,4)
 - třemi (FC1,2,3) nebo všemi
- vliv průtočné rychlosti na výměnu obsahu cely



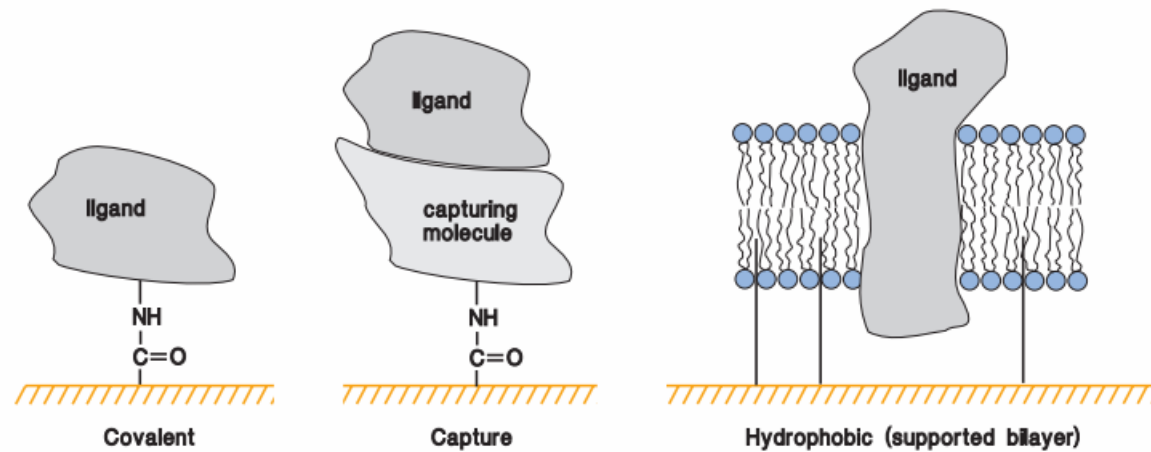
BIACore od firmy Pharmacia

- vše pro spokojenost uživatele

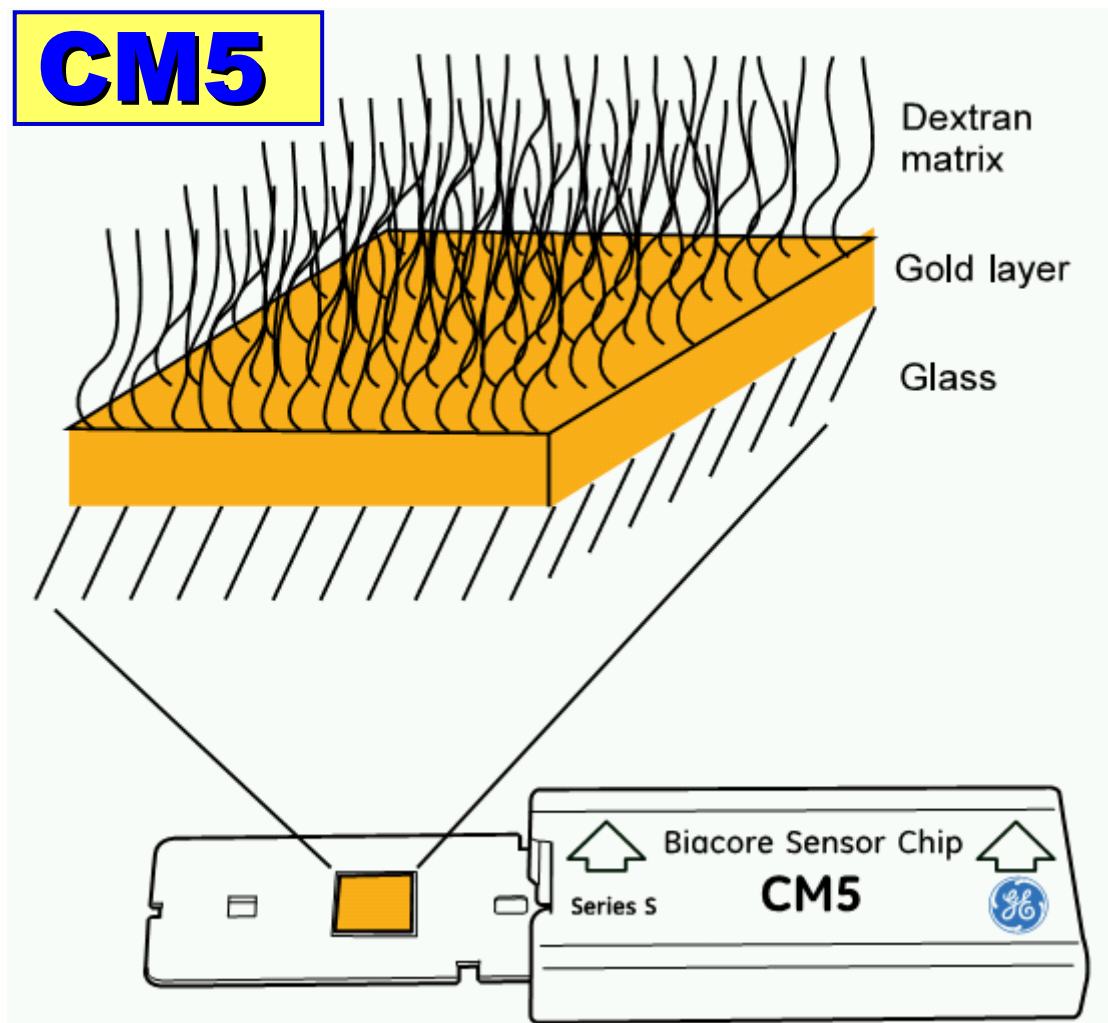


Imobilizace ligandů

- kovalentní vazba
- afinitní vazba
- hydrofobní interakce



CM5



- **nejběžnější volba**
- **dextran obsahující karboxymethylové skupiny (CM dextran)**
- **tloušťka vrstvy ~ 100 nm**

CM4

CM-dextran jako u CM5, ale pouze 30% CM skupin

- snížení vazebné kapacity pro ligand
- zmenšení záporného náboje matrice
 - výhodné pro snížení nespec. interakcí kladně nabitých molekul
 - pro měření s komplexními vzorky (buněčné extrakty, kultivační media)
- menší vazba ligandu je výhodná pro kinetické studie

CM3

CM-dextran jako u CM5, stejná hustota CM skupin jako u CM5, ale kratší dextranové řetězce - jen 30% vazebné kapacity CM5

- menší sterické zábrany pro vazbu velkých biomolekul (nad 1 MDa)
- vhodné i pro interakce virových částic a buněk
- nižší limitace transportu je výhodná pro kinetické studie

C1

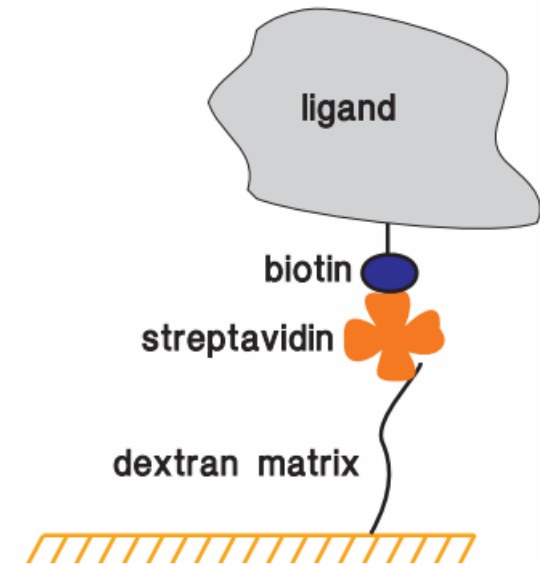
plochý karboxylovaný povrch bez dextranu, jen asi 10% vazebné kapacity CM5, imobilizační metody shodné

- imobilizované ligandy nejsou pohyblivé jako při vazbě přes dextran – omezení multivalentních interakcí (menší aviditní efekty)
- minimální sterické efekty – vhodné pro velké bioobjekty

SA

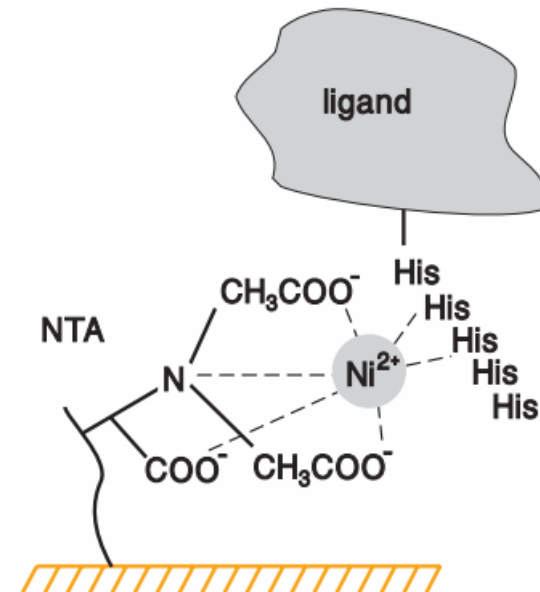
dextranová matrice s kovalentně navázaným streptavidinem

- univerzální - vazba biotinylovaných ligandů
- komplex streptavidin-biotin velmi pevný ($K_D \approx 10^{-15} \text{ M}$)

**NTA**

dextranová matrice s kovalentně vázanou kyselinou nitrilotrioctovou (NTA)

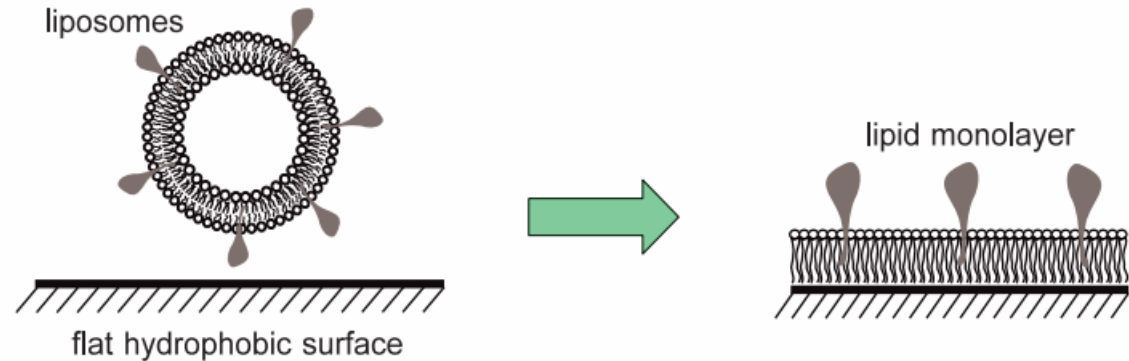
- vazba rekombinantních proteinů obsahujících oligohistidinový zbytek na konci (His-tag) prostřednictvím komplexu s Ni^{2+} (metaloafinitní interakce)
- stabilita takto imobilizovaného ligandu nemusí být vždy optimální
- regenerace možná EDTA, imidazolem, ...



HPA

plochý povrch

zlato modifikované
thiolem s dlouhým
alkanovým řetězcem
- hydrofobní

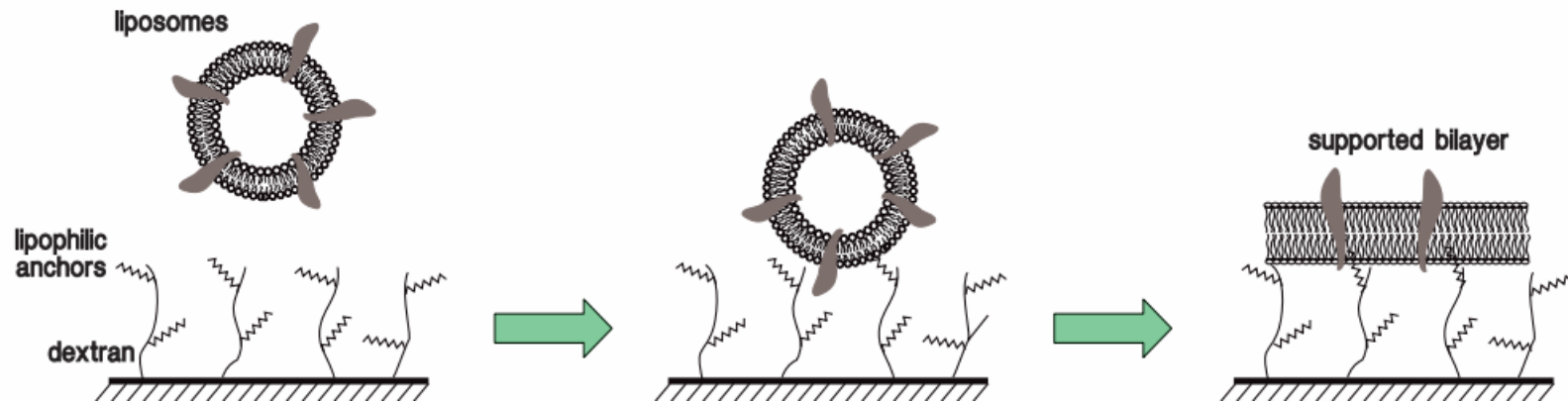


- pro membránové proteiny imobilizované prostřednictvím micel liposomů – vznikne lipidová monovrstva
- vhodné pro povrchově vázané nebo málo zanořené proteiny
- pokud jsou ale proteiny integrální součástí lipidové dvojvrstvy, je třeba zachovat její strukturu
- čip lze snadno regenerovat ethanolem (dlouhá životnost)

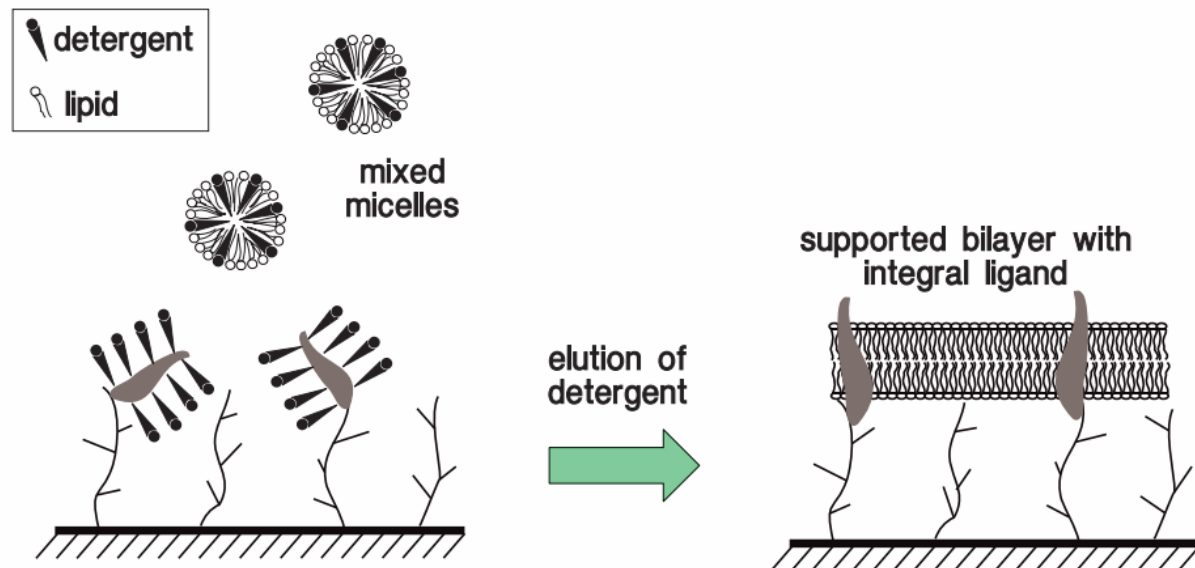
L1

na bázi CM5, na karboxyly kovalentně vázány lipofilní zbytky

- ty se mohou integrovat (vsunout) do lipidových membrán veziklů a nebo liposomů a tak je celé zachytit na povrchu



- alternativně lze membránové bílkoviny imobilizovat po solubilizaci v detergentu, pak jeho odstraněním a přidáním lipidů rekonstruovat dvojvrstvu

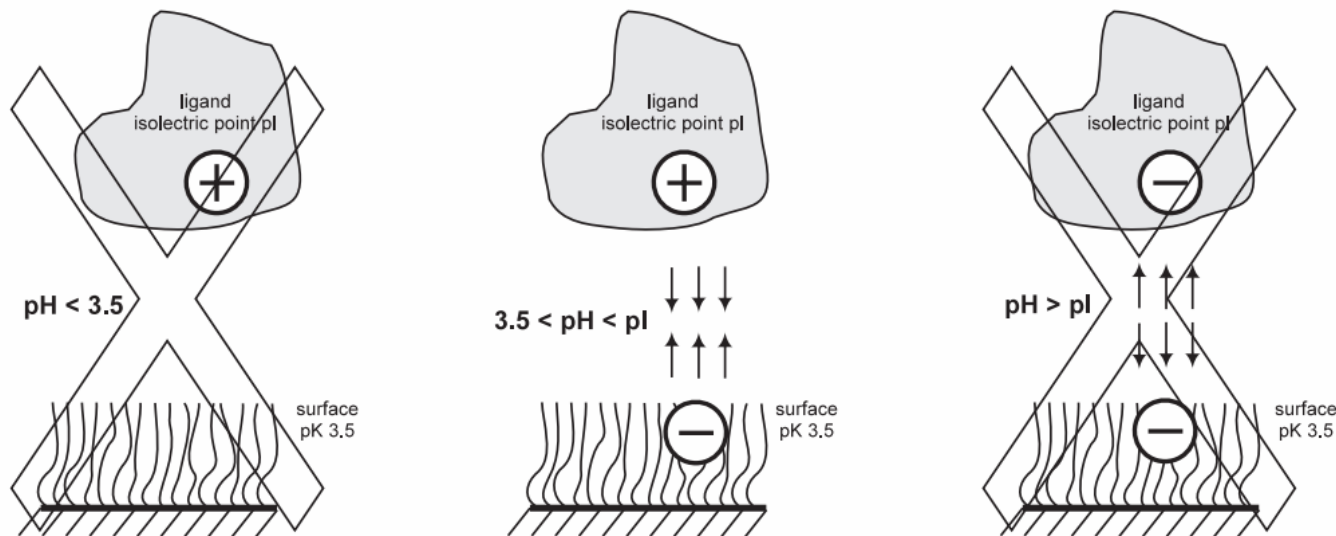


Au, SIA kit Au

- holý povrch zlata v plastovém držáku nebo pouze volné pozlacené sklíčko (unmounted) - pro drastické podmínky při imobilizaci, po níž se vlepí do držáku
- uživatelské fantazii se meze nekladou...

Imobilizace ... dextranová matrice

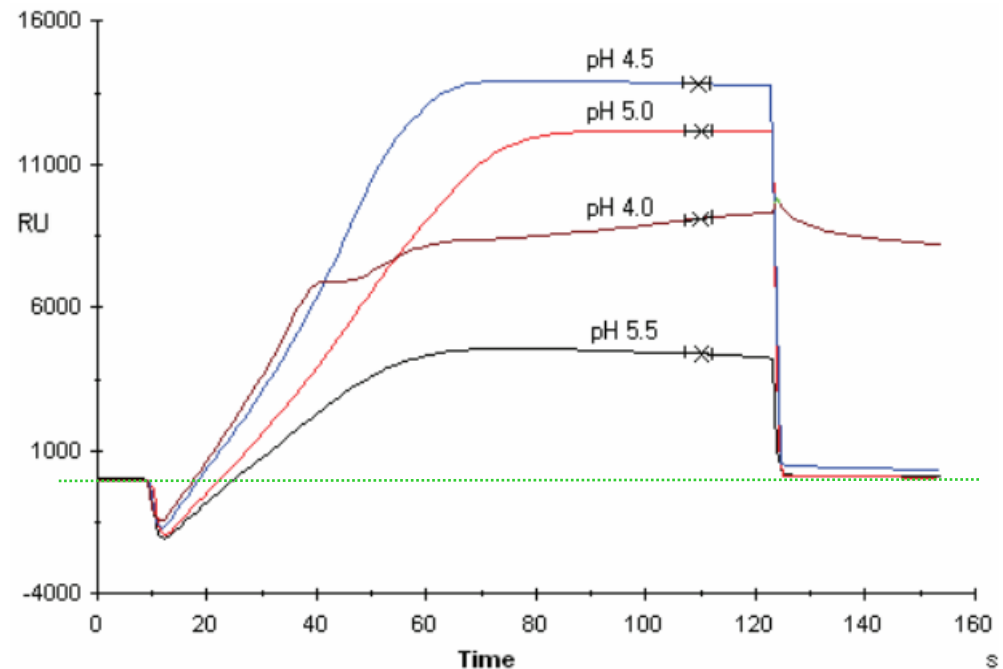
- díky karboxyskupinám může nést záporný náboj a tak prekoncentrovat kladně nabitě biomolekuly
- využití při imobilizacích k lokálnímu zvýšení koncentrace
- kritická může být volba pH pufru



- použití 10 – 50 $\mu\text{g/ml}$ roztoku ligandu typicky dá kolem 1000 RU, což typicky u proteinů $\approx 1 \text{ ng/mm}^2$, dostáváme při tloušťce dextranu 100 nm povrchovou koncentraci ligandu 10 mg/ml

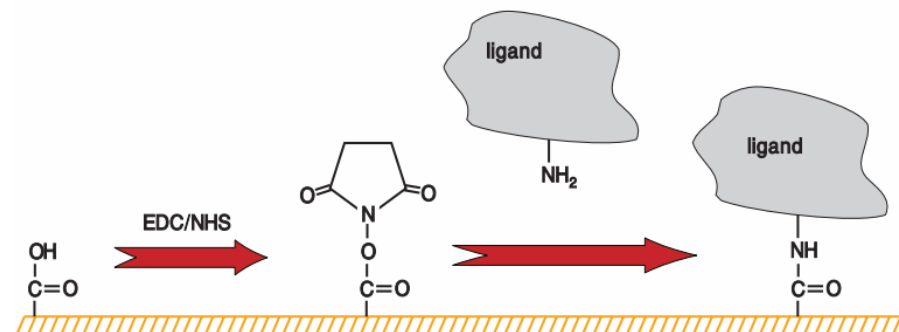
pH při imobilizaci - NH_2 skupina přes EDC/NHS

- pro bílkiny jako ligandy obvykle pH 5 funguje dobře
- používá se 10 mM acetátový pufr, elektrostat. prekoncentrace se vyzkouší 2 min při různých hodnotách pH (5.5, 5.0, 4.5, 4.0 pro „scouting“)
- prekoncentrace obecně lepší při nižším pH, ALE kovalentí vazba probíhá lépe při vyšších pH – kompromis...
- při nízkém pH také může nastat agregace bílkovin (viz obr.)

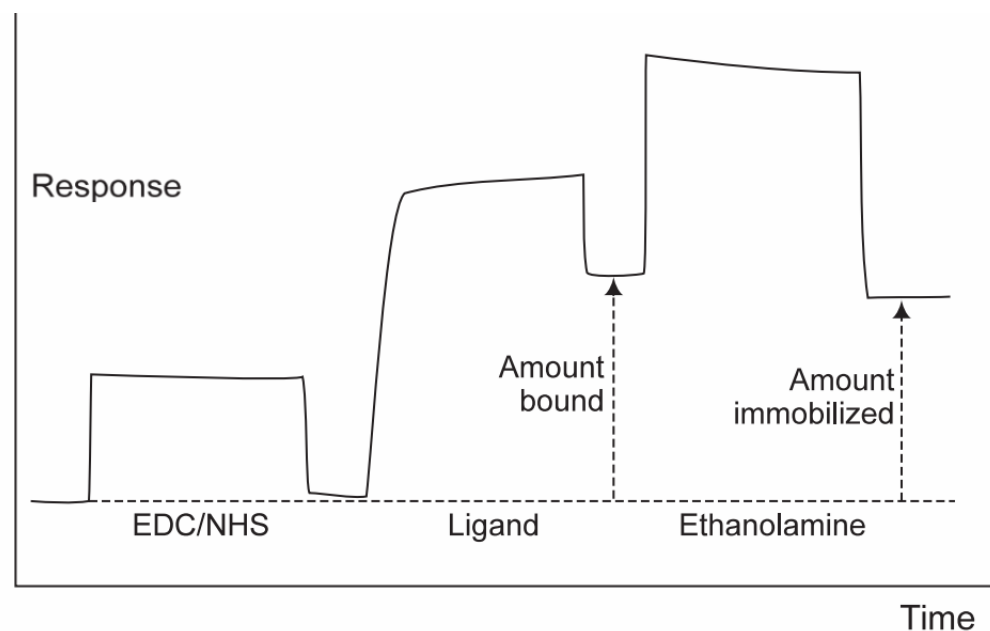


Vazba přes aminoskupinu ligandu

- EDC - 0.4 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid ve vodě
- NHS - 0.1 M N-hydroxysukcinimid ve vodě
 - EDC a NHS se smísí 1:1 před použitím
- ethanolamin 1 M pH 8.5
- ligand - typicky 10-50 µg/ml v imobilizačním pufru (10 mM acetát pH x)
- průtok 10 µl/min
- kontaktní doby asi 7 min

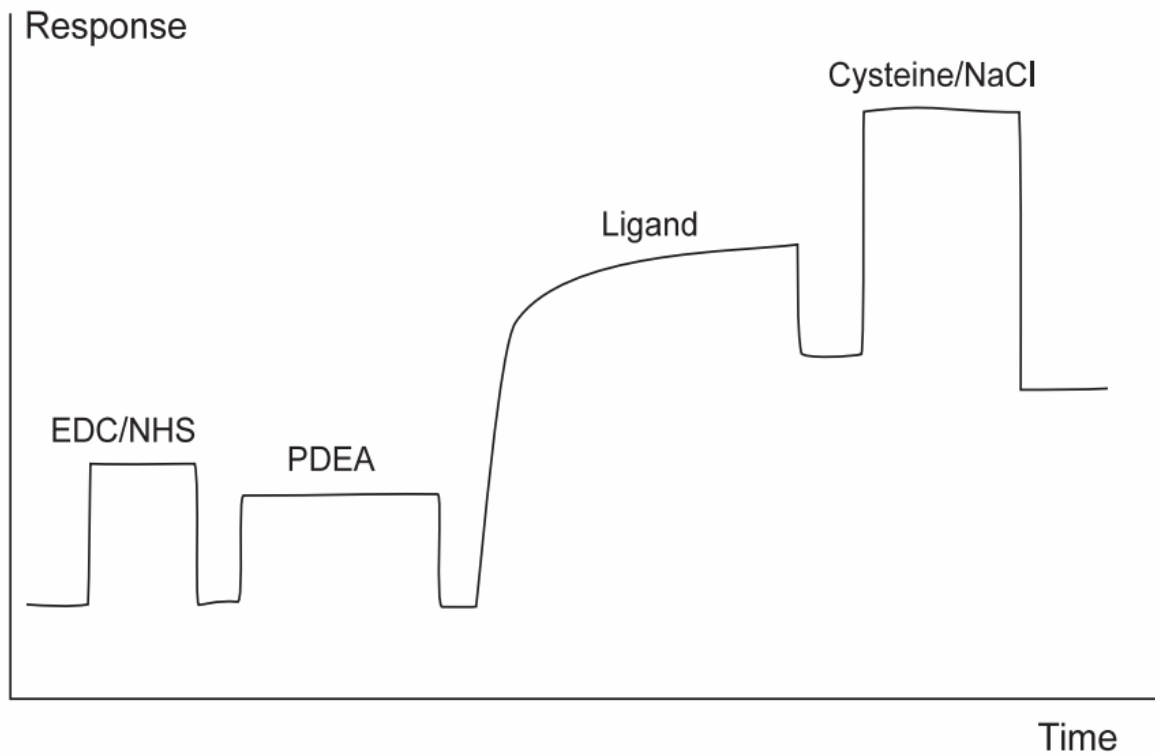
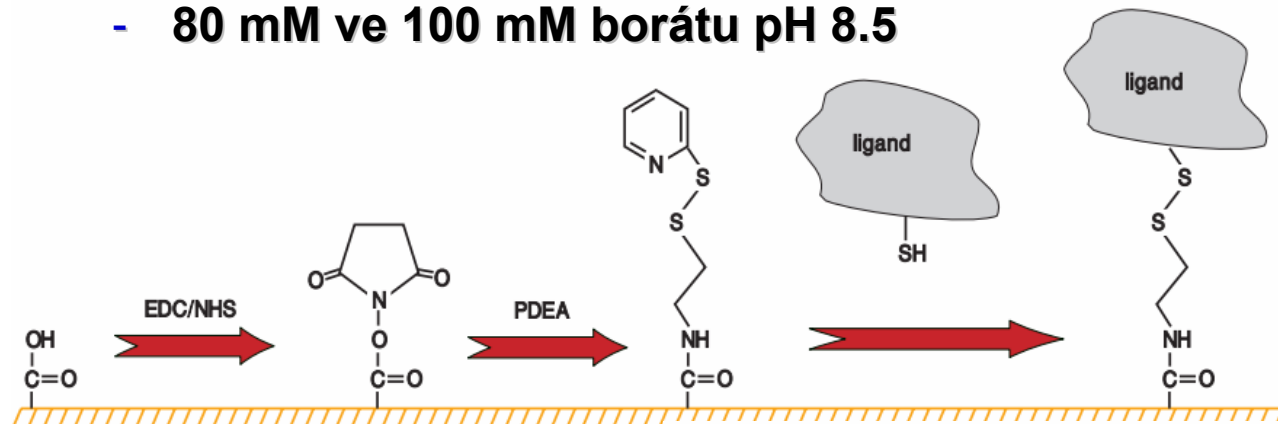
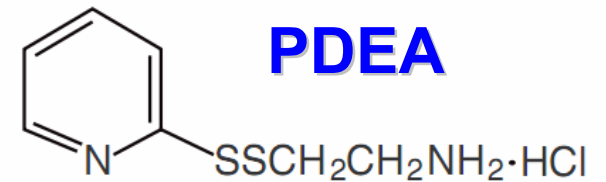


- výsledný průběh sensorgramu:

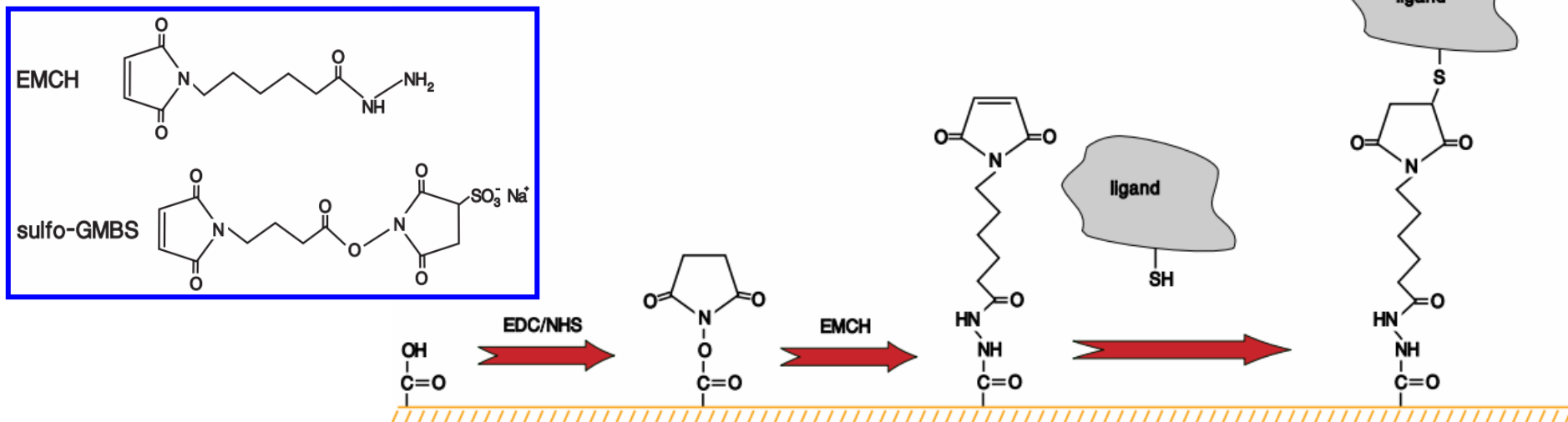


Vazba přes thiol (na povrchu)

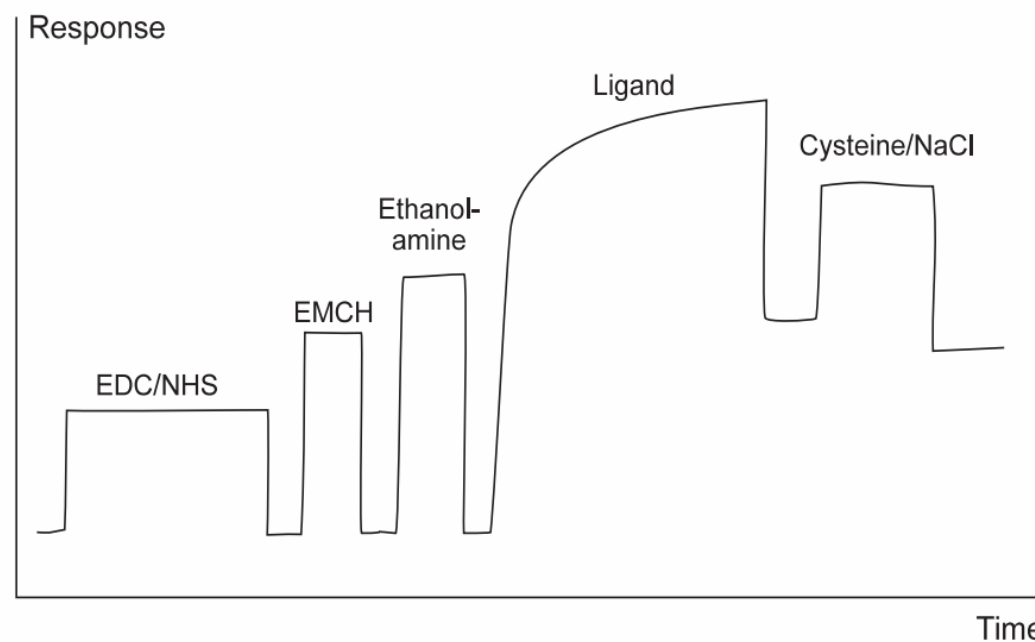
- 2-(2-pyridinyldithio)ethanamin hydrochlorid
 - 80 mM ve 100 mM borátu pH 8.5



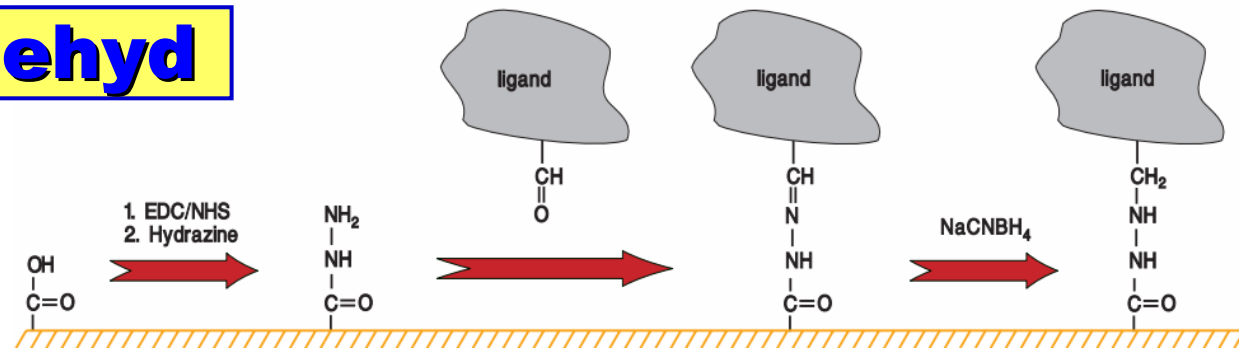
Maleimidová metoda



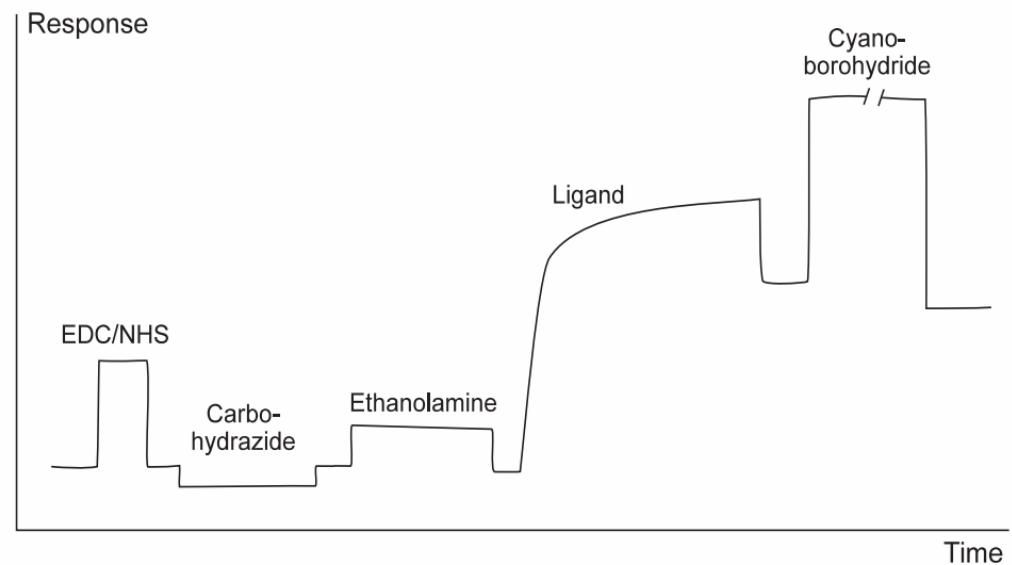
- vzniká stálá thioetherová vazba



Vazba přes aldehyd

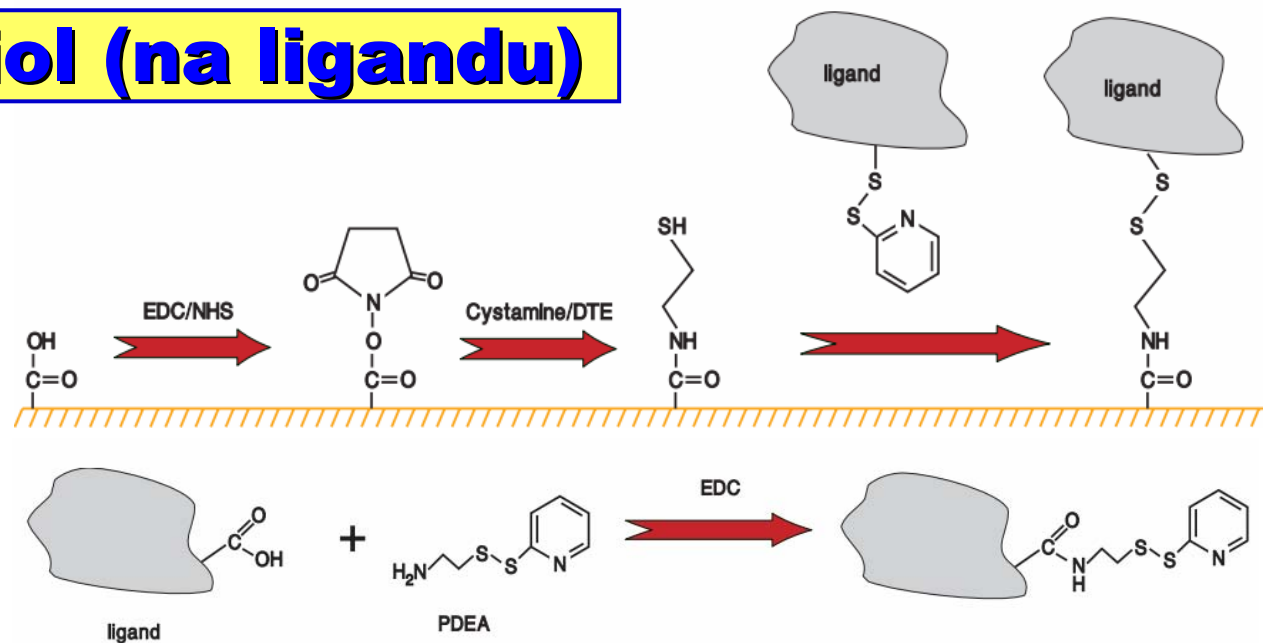


- aldehydová skupina se získá oxidací diolového uskupení pomocí jodistanum (1 mM, mírné podmínky)
- alternativně lze koncový galaktosylový zbytek zkusit oxidovat pomocí galaktosaoxidasy
- pro glykoprotein, oligosacharidy



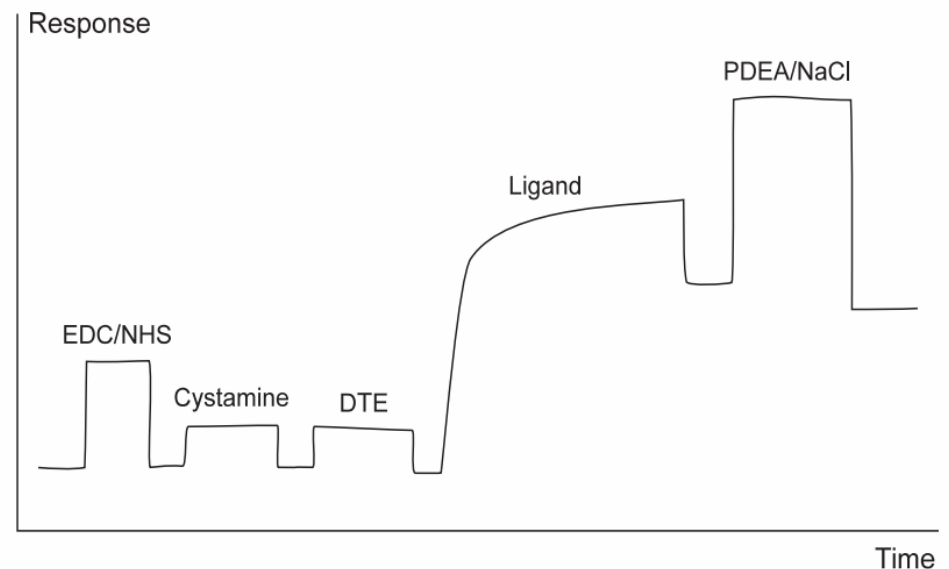
Vazba přes thiol (na ligandu)

- na povrch se vnese SH skupina
- ligand derivatizován PDEA, vznikne SS vazba (reverz.!!)

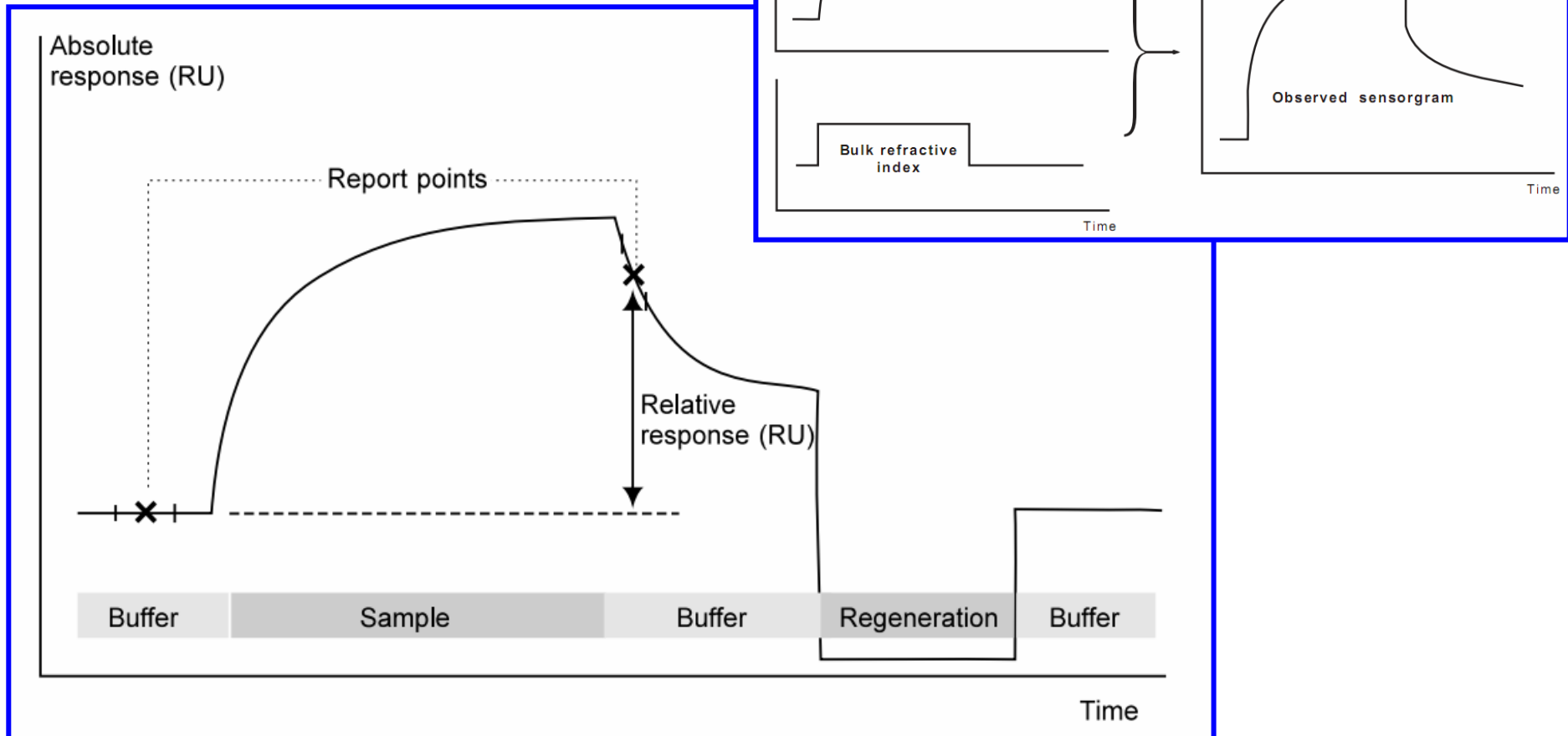


- alternativy pro derivatizaci ligandu:

N-sukcinimidyl-3-[2-pyridyldithio]-propionát SPDP
 4-sukcinimidyl-oxokarbonyl-methyl- α -[2-pyridyldithio]-toluen (SMPT), přes aminosk. ligandu
 pře aldehyd. skupinu (z oxidace diolu) lze užít
 N-[ϵ -maleimidokaproová kyselina]hydrazid (EMCH)



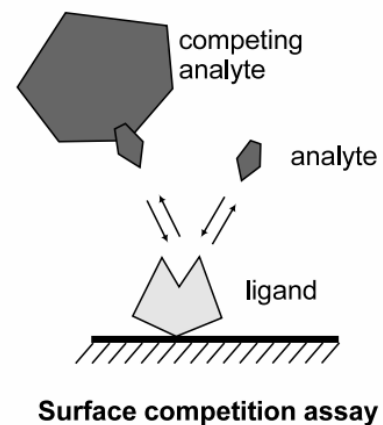
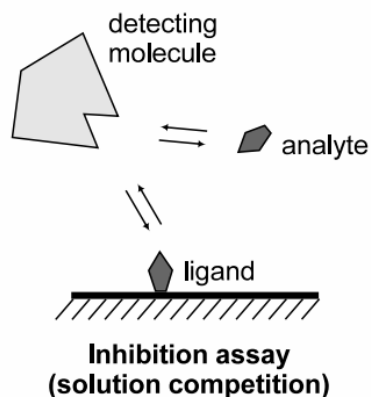
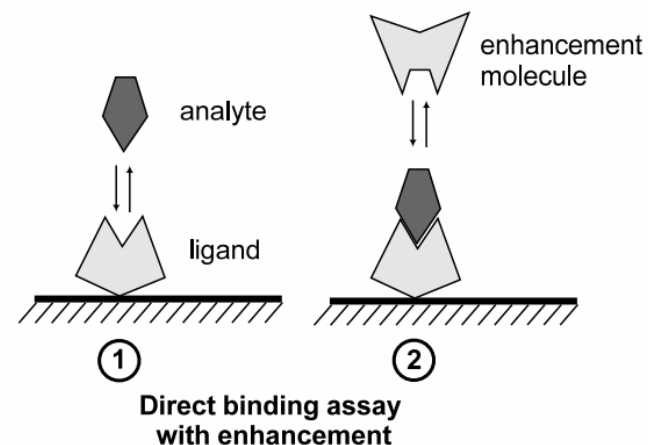
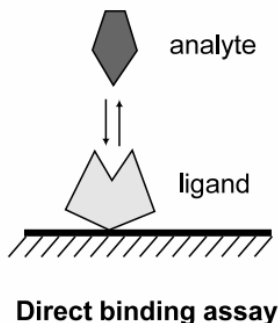
Sensorgram



- průběh typického vazebného experimentu
- signál v čase při vazbě biomolekuly na imobilizovaný ligand
- tvořen specifickou interakcí a změnou indexu lomu protékajícího roztoku

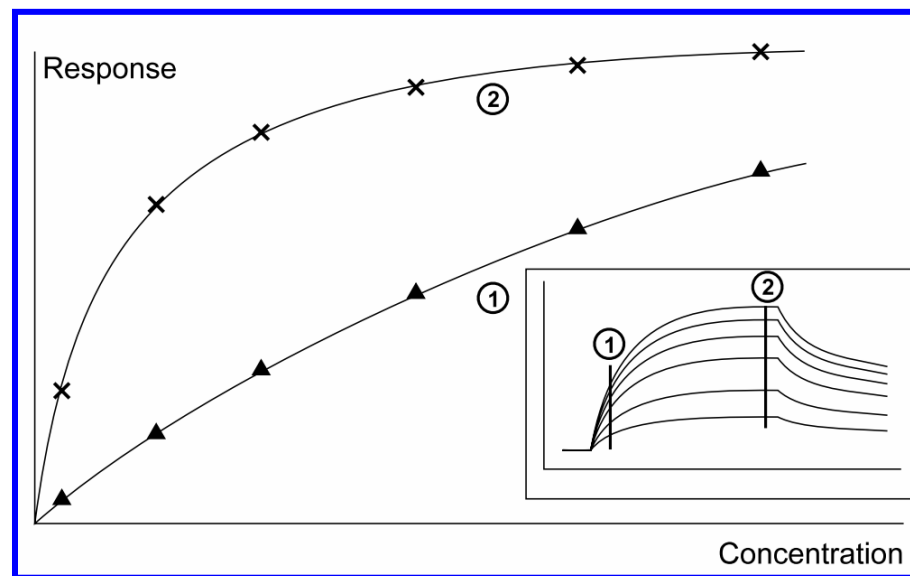
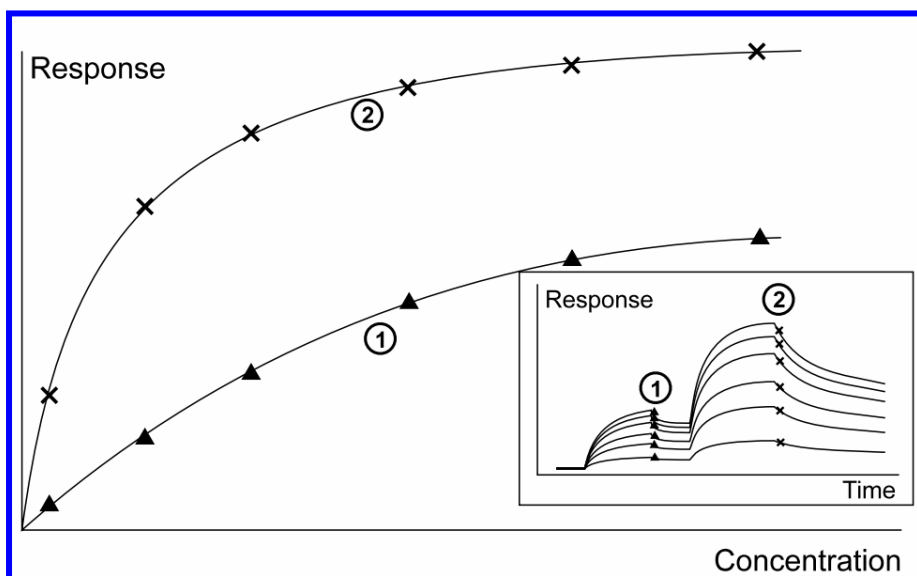
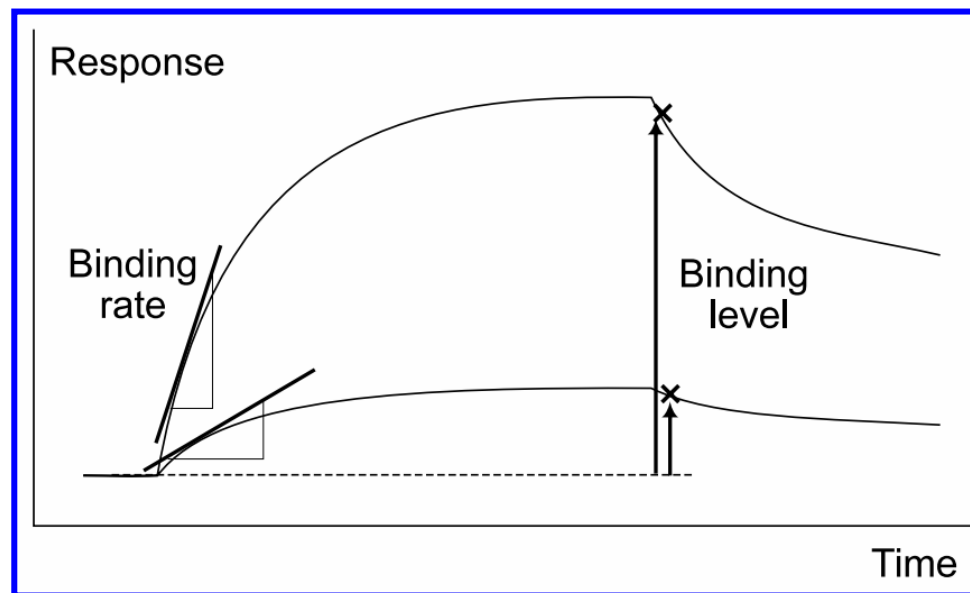
Stanovení koncentrace

- základní možnosti:
- **přímé měření
(se zesílením odezvy)**
- **inhibiční měření
(kompetice v roztoku)**
- **kompetice na povrchu
sensoru**



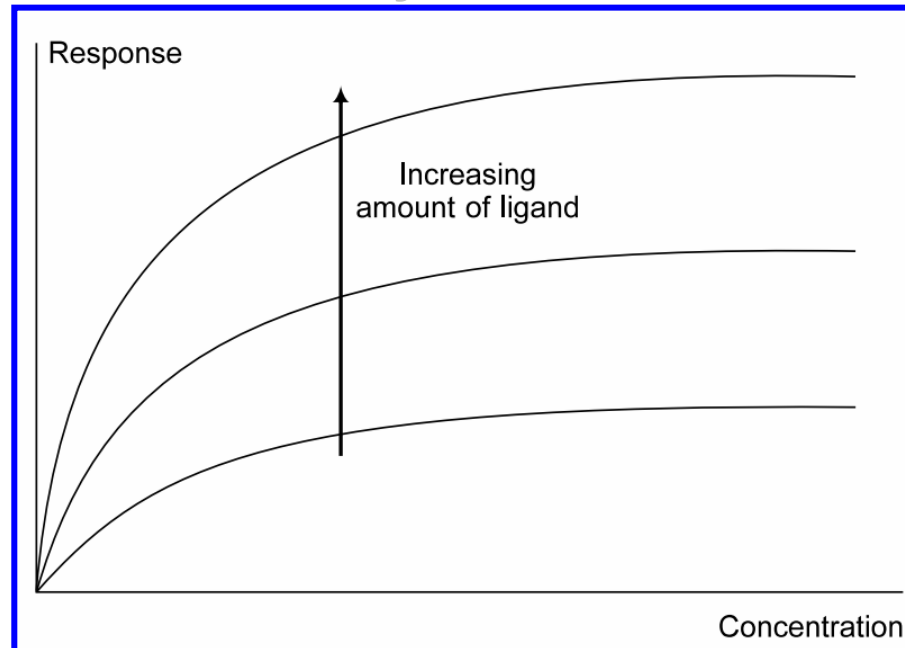
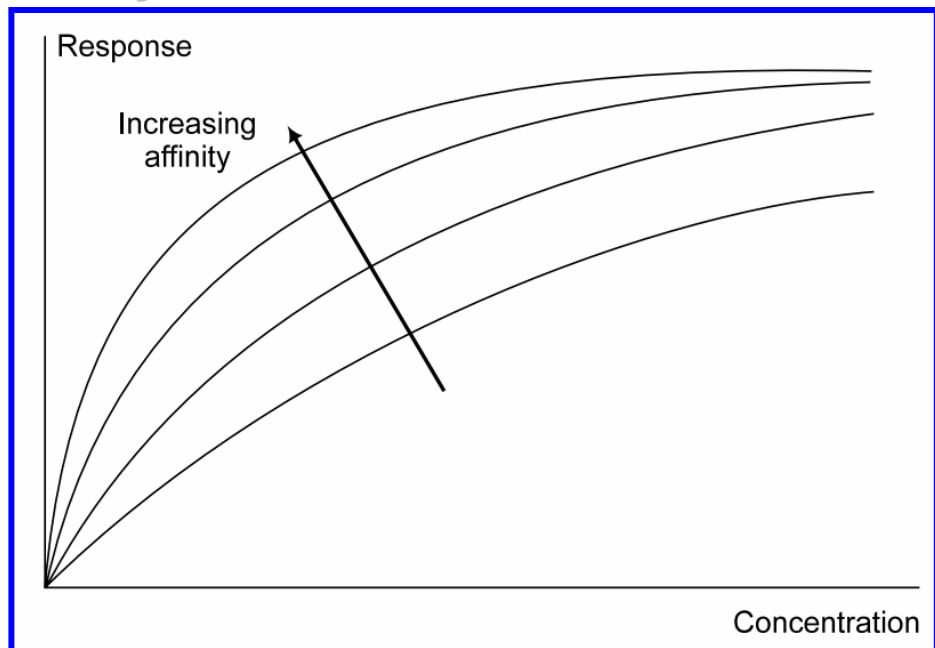
Přímé měření

- nejčastější způsob stanovení koncentrace analytu ve vzorku
- vyhodnocovat lze buď rychlost vazby v počátku, nebo změnu signálu po ustálení
- zvolený způsob měření ovlivní analytické parametry stanovení
- rychlost, citlivost, limit detekce
- vícevrstevný (sendvičový) komplex zlepšit citlivost (např. nanočástice)



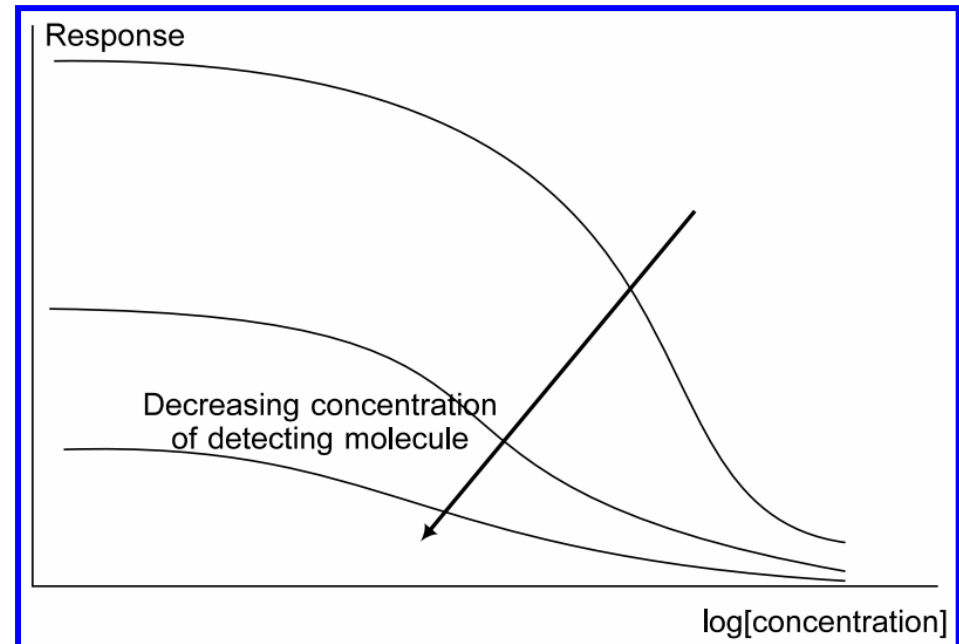
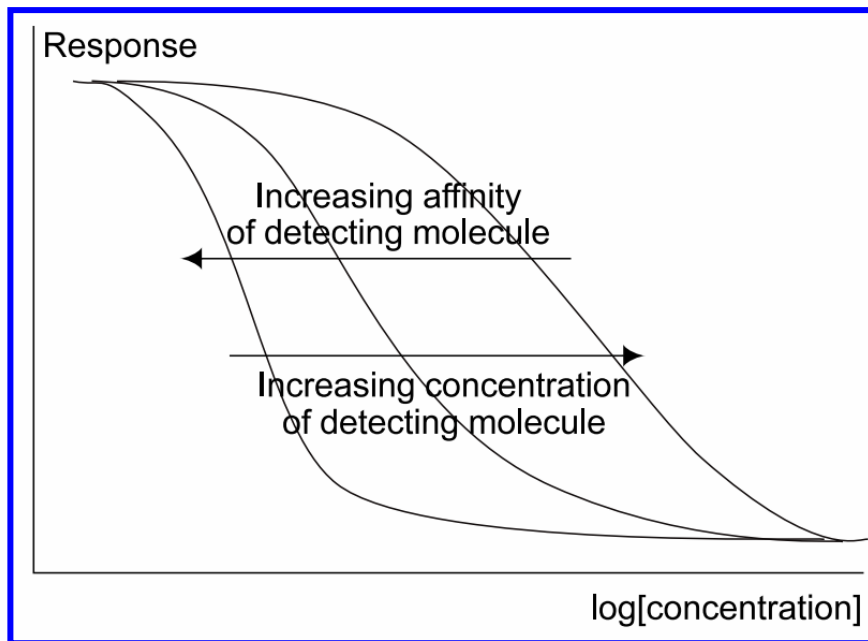
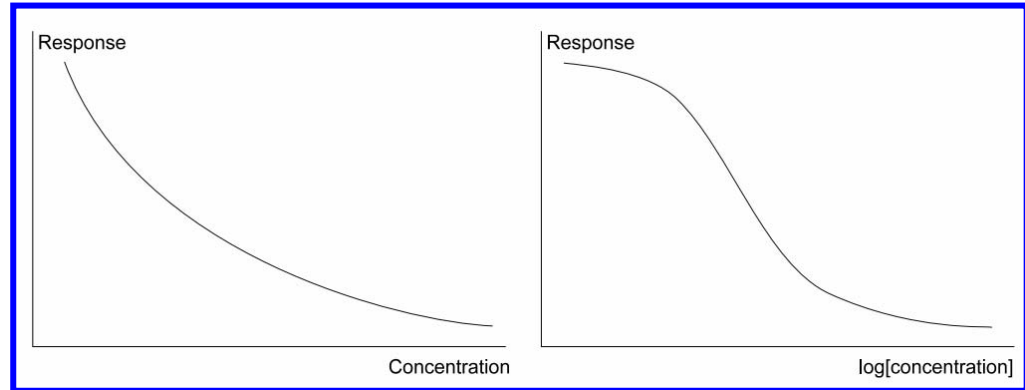
Vliv afinity a ligandu

- vyšší afinita umožní měřit nižší koncentrace analytu



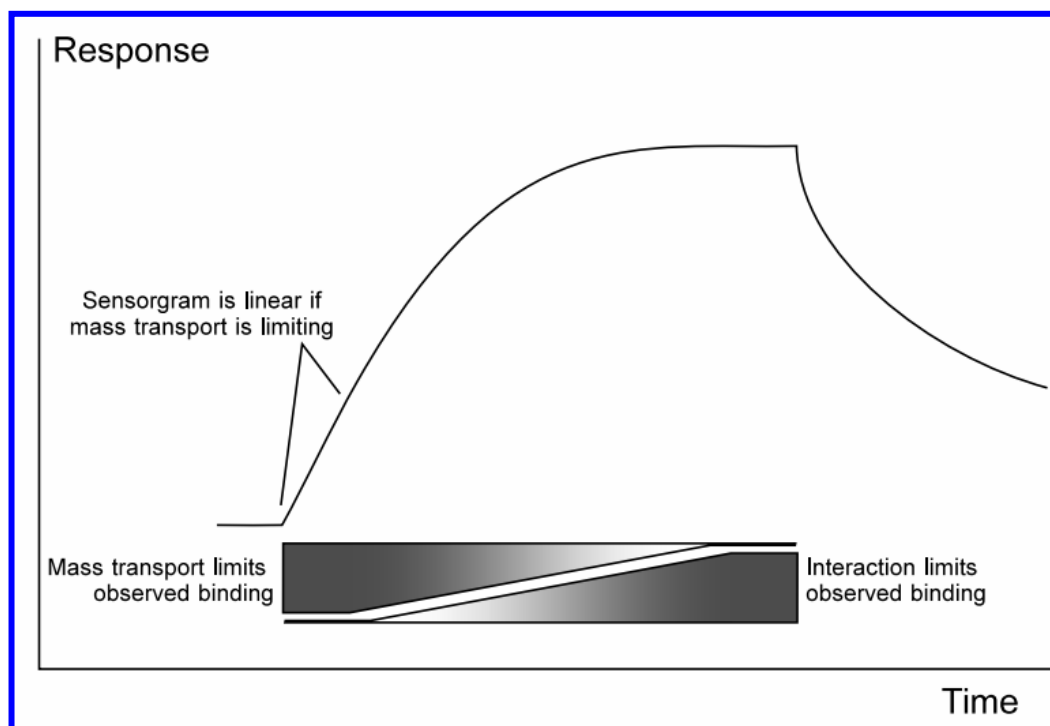
Inhibiční (kompetiční) stanovení

- pro malé molekuly, jejichž přímá vazba by poskytla nízký signál
- kalibrační závislosti v log závislosti pro osu x
- signál vyvolá vazba pomocné detekční molekuly; její afinita a koncentrace ovlivní výrazně průběh stanovení



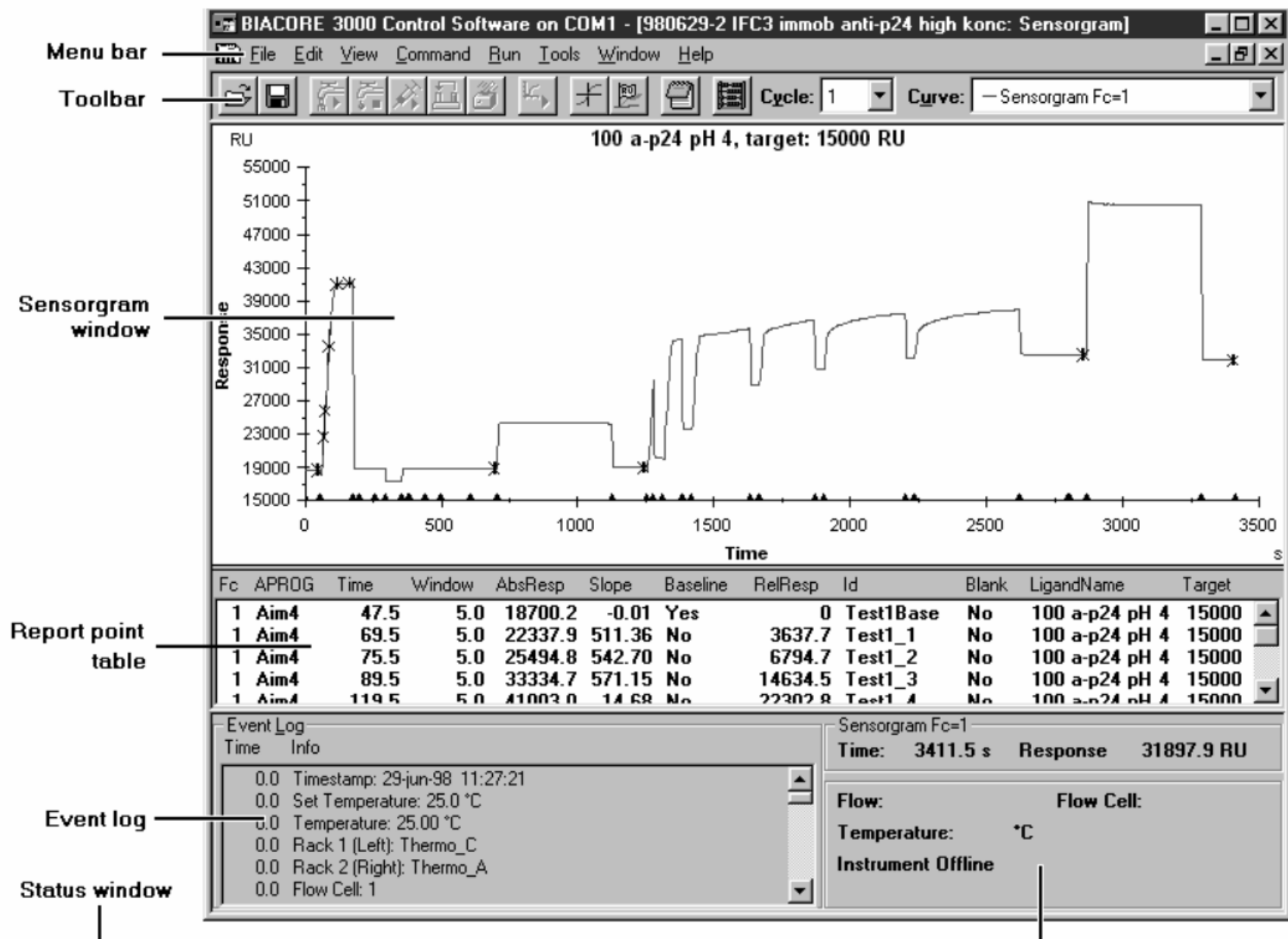
Přímé měření (bez kalibrace)

- pokud není k dispozici standard, lze za podmínek difúzní limitace určit koncentraci analytu z rychlosti vazby (lineární oblast) se znalostí (přibližnou) difúzního koeficientu analytu
- je potřeba vysoká hustota ligandu, dostatečná velikost analytu (přes 5 kDa) a přiměřená afinita interakce
- optimální je odezva 0.3–15 RU/s při 5 $\mu\text{l/min}$ aspoň 30 s, to odpovídá asi 0.05–5 $\mu\text{g/ml}$



BIAControl

- menu a toolbary pro manuální interaktivní ovládání
- application wizards pro standardní operace
- editor metod (skriptů) – programovatelný běh
- zobrazení sensorgramů v reálném čase
 - koordináty, čas, velikost signálů, teplota, průtok, stavové info
 - možnost zoomování, značení důležitých bodů (marks)
 - kurzor pro odečítání hodnot v lib. bodě sensorgramu
- plnění pump, proplachy
- tabulka důležitých událostí
 - automaticky vytvářena - nástřiky, změny operačních parametrů
- poznámkový blok
- uživatelské nástroje pro standardní operace a údržbu



Hlavní příkazy



Add Report Point



Reference Line



Inject/Stop Inject



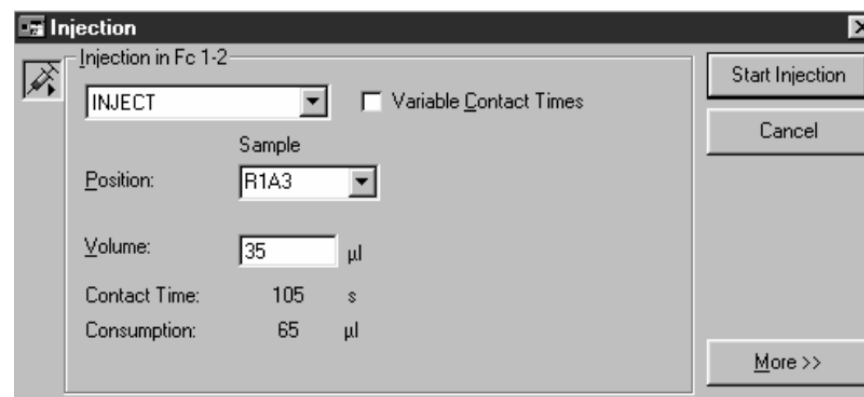
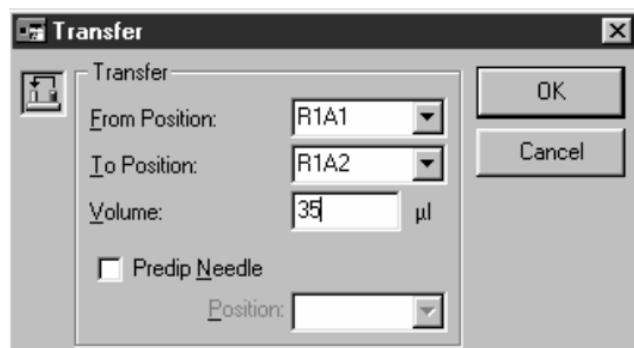
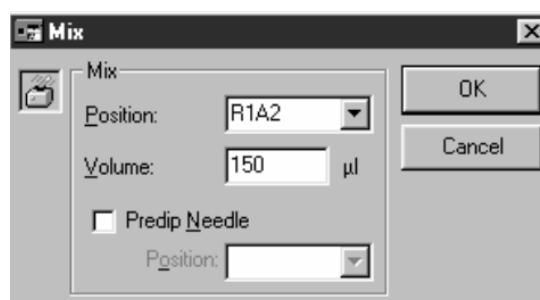
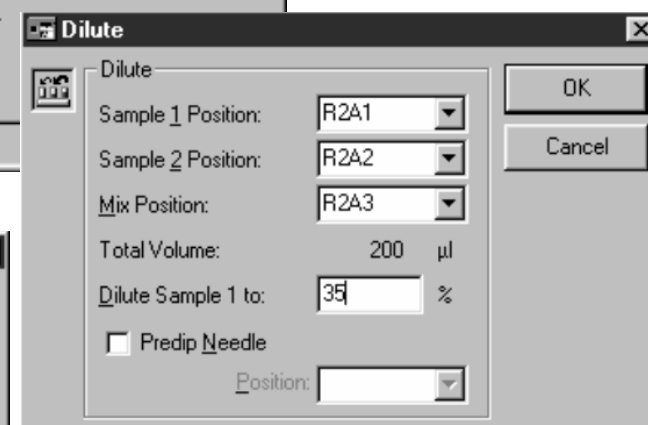
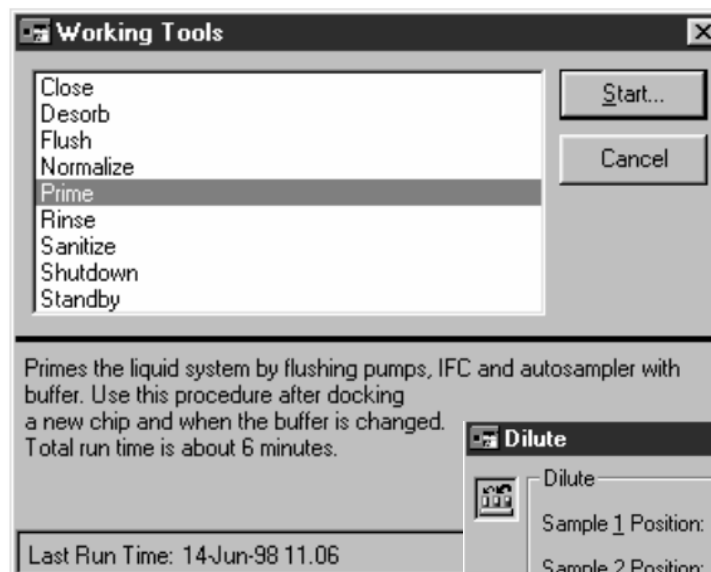
Transfer



Mix



Flow/Stop Flow



způsob nástřiku vzorku

<i>Command</i>	<i>Comments</i>	<i>Injected volume</i>	<i>Sample consumption</i>	<i>Max flow rate</i>
INJECT	General purpose inject.	5-325 µl	Injected vol +30 µl	100 µl/min
KINJECT	Low dispersion inject for kinetics and for samples sensitive to dilution with running buffer. Controlled dissociation time after sample injection.	10-250 µl	Injected vol +40 µl	100 µl/min
QUICKINJECT	Low sample consumption. Less preparation time than INJECT but more sample dispersion.	5-325 µl	Injected vol +10 µl	100 µl/min
COINJECT	Injection of second sample immediately following the first (e.g. for dissociation in the presence of ligand). Variable contact times for first sample only.	Sample 1: 10-100 µl Sample 2: 15-250 µl	Sample 1: injected vol +40 µl Sample 2: injected vol +40 µl	100 µl/min
BIGINJECT	Large volume inject. Direct inject up to 325 µl, sample loop between 326 and 425 µl, direct between 426 and 750 µl.	326-750 µl	Injected vol +52 µl	50 µl/min*
MANUAL INJECT	Manually controlled inject. See Section 4.3.9.	1-100 µl / loading	Loaded vol +30 µl	100 µl/min

regenerace

Roztok	Konc.	pH	Odolnost
acetonitril	20%	7.5	pulz
acetonitril / NaOH	20%/100 mM	10.4	pulz
HCl	100 mM	1.3	pulz
ethanol	25-75%		pulz
ethylenglykol	50%	10	pulz
kyselina mravenčí (leze do IFC)	70%		pulz
glycin.HCl	1.5 M	2.5-3.5	pulz
kyseline fosforečná	100 mM		pulz
uhličitan sodný	200 mM	11.5	pulz
NaCl	1 M		kont.
hydrogenuhličitan sodný	100 mM	9.2	kont.
NaOH	250 mM		pulz
NaOH / NaCl	100 mM / 3 M		pulz

BIAEvaluate

- vyhodnocování a porovnávání sensorgramů z různých běhů, vytváření grafů
- odečet rychlostí vazby (směrnice – koncentrační měření)
- jednoduché matematické operace se sensorgramy (posuny, rozdíly)
- výpočet (curve fitting) kinetických rychlostních konstant z asociačních a disociačních částí sensorgramů

BIASimulate

- kinetická analýza asociační a disociační fáze experimentu, možnost simulovat velikost šumu, ujíždění základní linie signálu (drift), limitaci látkovým transportem
- kinetická analýza interakce s heterogenním ligandem nebo analytem
- vícenásobné vazby, mapování epitopů, stanovení koncentrací
- důležitý výukový nástroj

Aplikační příklady

- **Cancer and Proteomics Booklet**
- **Neuroscience Booklet**
- **Immunology Booklet**
- **Biacore™ biosensor assays for quantitation of influenza virus and HCP**
- **Hit validation using Biacore™ and MicroCal™ analysis**
- **Unraveling the mechanisms of RNA-binding protein functions using SPR-based kinetic analysis**
- **Initial studies towards automated screening for enzyme inhibitors by SPR-MS**
- **Rapid development of a GMP-compliant assay for the determination of antibody concentration**
- **Validation of a concentration assay using Biacore C**
- **Optimizing SPR-MS for isolation and characterization of low level impurities in complex, protein pharmaceutical samples**
- **Development of immunotherapeutics and immunization regimes**
- **Transition state thermodynamic analysis using Biacore T100**
- **Selection of protein therapeutic candidates using Biacore T100**
- **A multi-protein panel approach for selectivity-based compound screening using Biacore A100**
- **Early kinetic screening of hybridomas for confident antibody selection using Biacore A100**
- **The integration of a protein interaction array into a fully automated selection and screening process**
- **Resolving a bottleneck in screening and characterization of recombinant antibody fragments using Biacore 4000-AA**
- **Analyte recovery in Biacore 3000: optimized functions for SPR-MS applications**
- **Label-free interaction analysis in real-time using surface plasmon resonance**
- **Developing a natural partnership for rapid, sensitive identification of binding partners**

You are here: [Biacore Life Sciences](#)

Interaction Analysis

- [» Introduction](#)
- [» LMV Drug discovery](#)
- [» Biotherapeutics](#)
- [» Research](#)

About Biacore Systems

- [» Introduction](#)
- [» Product Range](#)
- [» Technology](#)
- [» History](#)

Events & Press Room

- [» Events](#)
- [» Webinar Recordings](#)
- [» Press Room](#)

Support & Training

- [» Application Support](#)
- [» Training](#)
- [» Product Support & Service](#)

Web Services

- [» On-line Purchasing](#)
- [» Contact & Ordering](#)
- [» Request Information](#)
- [» My Account](#)

Website Destinations

- [» High Content Analysis](#)

Biacore

label-free interaction analysis –
from research through drug discovery
and development to QC



» Events

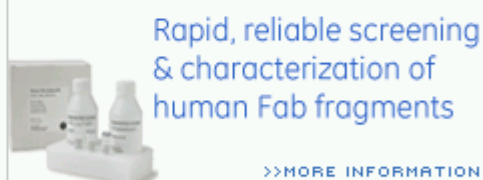
- Jul. 13-14, 2010
[BITC Workshop](#)
- Aug. 1-5, 2010
[Protein Society 2010](#)
- Aug. 8 - Jul. 14, 2010
[GRC Medicinal Chemistry](#)
- Sep. 5-9, 2010
[EFMC-ISMIC 2010](#)
- Sep. 19-23, 2010
[HUPO 2010](#)

» Login

Get access to valuable additional material, such as detailed product information, support tools and more.

- [» Sign-up](#)
- [» Benefits of signing-up](#)
- [» Login](#)

Human Fab Capture Kit



Biacore™ 4000



Visit our Training Portal!
A comprehensive range
of learning opportunities

[»MORE INFORMATION](#)



Developments in Protein Interaction
Analysis - Barcelona, October 2010
Early registration discount!

[»MORE INFORMATION](#)