

# POUŽITÍ OPTICKÉHO BIOSENSORU BIACORE PRO STUDIUM INTERAKCE PROTILÁTKY S ANTIGENEM

## Úvod

SPR biosensor Biacore 3000 bude použit ke studiu kinetiky interakce protilátky imobilizované jako ligand na povrchu sensoru s antigenem. Využije se monoklonální protilátka AL-01, imunoglobulin G specifický vůči lidskému sérovému albuminu (HSA). V první části úlohy se protilátka imobilizuje jako ligand na SPR čip CM5 tak, aby se dosáhli různé hustoty navázaného ligandu. Poté bude sledována interakce s různými koncentracemi antigenu HSA, zaznamenány vazebné křivky a následně vyhodnoceny v dalších aktivitách kurzu.

## Materiál a chemikálie

Bude použit systém Biacore 3000 s ovládacím programem BiaControl, měřicím čipem bude CM5. Pracovní pufr bude HBS-P (HEPES s NaCl a detergentem Tween-20), regenerace bude prováděna 100 mM HCl. Aktivace bude provedena pomocí standardního kitu EDC/NHS. Imobilizačním puffrem bude 10 mM acetát pH 5.0, inaktivačním roztokem 1 M ethanolamin pH 8.5. Protilátku AL-01 dodala firma Exbio Praha, HSA firma Sigma. Připravované roztoky budou před použitím přefiltrovány přes 0.2  $\mu$ m mikrofiltr.

## Imobilizace protilátky

Pro názornost bude imobilizace prováděna postupně v kanálech FC4, FC3 a FC2; v praxi by šlo aktivační a inaktivační kroky samozřejmě spojit. Následující postup bude tedy opakován pro jednotlivé kanály.

Roztok EDC (400 mM) bude v množství 100  $\mu$ l v plastové vialce umístěn do držáku vzorků, spolu s dalšími vialkami obsahujícími NHS (100 mM), ethanolamin, protilátku AL-01 v imobilizačním puffru, tři vialky - koncentrace proteinu 1, 5 a 20  $\mu$ g/ml. Pracovní pufr bude HBS-P. Navíc bude v držáku umístěna prázdná skleněná vialka.

Po spuštění sensorgramu, výběru pracovního kanálu, nastavení teploty 25 °C a průtočné rychlosti 5  $\mu$ l/min a krátkém zaznamenání výchozí linie bude připravena směs EDC a NHS 1:1 (příkazy TRANSFER a MIX) a nastříknuta do systému v objemu 50  $\mu$ l, tj. kontaktní čas 10 min. Po propláchnutí pracovním puffrem bude do systému nastříknuto malé množství (např. 20  $\mu$ l) roztoku protilátky o zvolené koncentraci. Nástřik bude případně opakován, tak, aby se dosáhlo žádaného imobilizovaného množství (asi 30-50 RU, asi 200 RU, přes 2000 RU). Poté bude systémem puštěna krátká zóna pracovního puffru pro zaznamenání vázaného množství protilátky, následovat bude 50  $\mu$ l roztoku ethanolaminu a poté pracovní pufr pro opláchnutí čipu. V kanálu FC1 bude po aktivaci vynechána protilátka a bude rovnou navázán ethanolamin, kanál bude sloužit jako referenční. Po skončení imobilizace bude čip vyjmut ze systému a uložen v suchém stavu.

## **Studium kinetiky interakce**

S připraveným senzorem s imobilizovanou protilátkou AL-01 proveďte předběžná měření interakce s HSA o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  při různých průtočných rychlostech (5, 15 a 50  $\mu\text{l/min}$ ). Na základě výsledků pak určete přiměřenou rychlost průtoku média.

Ověřte možnost regenerace povrchu čipu pomocí 20 mM kyseliny chlorovodíkové, případně upravte dobu regenerace (ne více než 3 minuty!).

S nalezenými interakčními podmínkami pak proveďte studium kinetiky interakce protilátky AL-01 s HSA antigenem, jeho koncentrace nařed'ete na 0.5, 1, 2, 5, 10 a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Vzorek HSA vždy nanášejte procedurou KINJECT, doba asociace 5 min (zvolte odpovídající velikost objemu), doba disociace 5 min. Pořadí koncentrací volte náhodně a sekvenčně. Proměřte interakce i za jiných parametrů (doby asociace a disociace, metoda kinetické titrace). Získané soubory vyhodno'te pomocí programů Biaevaluate a Scrubber2, pokuste se určit hodnoty kinetických rychlostních konstant pro danou imunoreakci.