

多肽与蛋白亲和力验证报告

1. 实验目的

测定配体蛋白和多肽分析物之间的相互作用情况。

2. 样品信息

表 1 SPR 分析中用到的样品及信息

项目 样本	分子量	描述	浓度	储存缓冲液
PROTEIN	70 kDa	配体	4.70 mg/mL	PBS
多肽	600 Da	分析物	1.00 mg/mL	ddH2O

3. 实验内容

本实验严格参照 SPR 相关标准流程开展实验，实验方法设计及所涉及的参数见表 2：

表 2 实验方法设计及参数

项目详情	
配体	PROTEIN
分析物	多肽
流动相	PBS (pH 7.4)
再生溶液	10 mM Glycine-HCl, pH 1.5
结合和解离流速	Association 180 s, 30 μ L/min; Dissociation 300 s, 30 μ L/min
温度	25 $^{\circ}$ C
芯片	Sensor Chip CM5
仪器	Biacore T200 TM

3.1 实验方法

(1) 按照 Biacore T200™ 仪器标准操作程序安装 CM5 芯片。

(2) 利用不同 pH 值的 10mM NaAc 缓冲溶液 (pH 4.0、4.5、5.0、5.5) 与配体蛋白稀释至 20 μg/mL 后分别与芯片预富集, pH 为 5.0 时偶联量最大, 则选择 pH 5.0 10 mM NaAc 作为稀释配体蛋白的缓冲溶液。

(3) 计算预估配体固定量为 12000 RU, 上样 EDC/NHS (1:1) 溶液激活芯片后, 接着上样用 10 mM NaAc (pH 5.0) 稀释的配体蛋白 (浓度为 20 μg/mL), 运用定量固定模式固定配体蛋白于芯片上, 最后加入乙醇胺封闭芯片, 最终固定量为 7159.2 RU。

(4) 使用 PBS 缓冲溶液稀释多肽分析物至 10 μM, 依次测试在不同 pH 值的 10 mM Glycine-HCl 溶液 (pH 1.5、2.0、2.5、3.0) 下芯片的再生效果, 选择结合能力高且平稳的 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) 作为再生缓冲溶液。

(5) 多肽分析物都使用 PBS 缓冲溶液稀释, 稀释浓度为 500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.90625、1.953125、0.9765625、0 μM。并以 30 μL/min 上样, 分析物与配体蛋白结合时间为 180 s; 自然解离 300 s。

(6) 本次实验结果所使用分析软件为: Biacore T200 Evaluation Software 3.2.1, 分析方法是 Kinetics 分析模型。

3.2 样品稀释

配体蛋白用 10mM NaAc, pH 5.0 稀释;

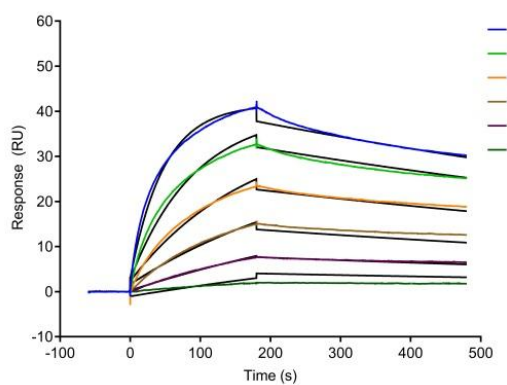
分析物用 PBS (pH 7.4) 稀释。

4.结果

表 4-1 多肽分析物与蛋白实验方法设计及参数

参数	释义	结果
ka(1/(M*s))	结合速率常数	40.99
kd (1/s)	解离速率常数	0.008176
KD (M)	解离平衡常数, 也叫亲和力常数	2.00E-04

Chi ²	越接近 0 越好	1.05
U-value	小于 15 即为可靠，大于 15 表示拟合的结果不可靠、实验结果不存在最优解	12



4.1 配体蛋白与多肽分析物的浓度梯度结合曲线

5.结论

在 SPR 实验中，通过 CM5 芯片结合配体蛋白与多肽分析物结合与解离过程分析：

- (1) 配体蛋白能与多肽结合，亲和力常数