



# 分子交互作用分析系統

## 中文操作說明



## 儀器操作說明：

### 一、實驗前需自備的工具

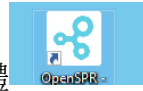
- \* OpenSPR 奈米金晶片 (GST, Protein A, Carboxyl, Amine, NTA, Streptavidin, Biotin, Liposome binding, Hydrophobic, Thio)
- \* Sample : ligand (固定在晶片上的樣品，濃度 20~50ug/ml)，analyte (待測物，倍數稀釋成 3~5 個濃度待用)。  
注意：analyte 的 stock solution 請務必於 running buffer 一致(例如 PBS)，並以 running buffer 為稀釋溶液。否則會造成 bulk effect 效應，影響實驗結果正確性
- \* OpenSPR 塑膠針筒數支，依使用的 buffer 種類，每種各一支，分開使用
- \* 拭鏡紙
- \* 超純水 100cc
- \* Running buffer 100cc，degassed 以及 0.2um filter 過濾
- \* Regeneration buffer
- \* 80% Isopropanol 50cc
- \* 吹球(儀器已附贈)
- \* 鑷子(儀器已附贈)

### 二、將實驗要用的 buffer 及超純水裝入 buffer 瓶以及超純水瓶，並確認管路確實浸泡在液體中



### 三、若使用 High sensitivity 奈米金晶片，則需更換 Warm Light LED 光源。機器預先內建 LED 光源為 Cool light。





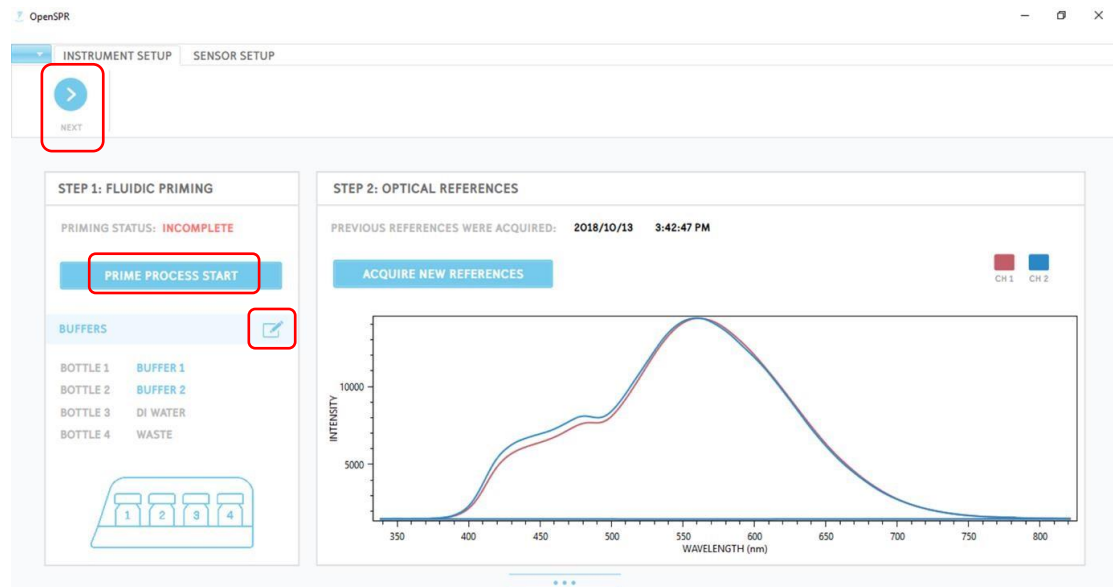
四、開啟筆記型電腦→開啟主機電源→開啟電腦桌面之操控軟體

五、進入主畫面，按照軟體指示依序完成 STEP 1~STEP 4 等四個實驗前置設定。

### STEP 1：FLUIDIC PRIMING (使液體填充於管路)

先確認要使用的 buffer 確實裝在 BUFFER 1 或 BUFFER 2 的位置(可點選鉛筆按鈕進入 BUFFERS 設定畫面，更改要使用的 BUFFER 位置或者註記本次使用的 BUFFER 名稱)，然後執行 PRIME PROCESS START。

此步驟執行需要 20 分鐘。



圖一

### STEP 2：OPTICAL REFERENCES (光源校正)

有下列三種情形才需要作光源校正，一般可省略此步驟。

1. 距離上次校正時間已超過一個月
2. 更換新的 LED 燈泡
3. 使用新的晶片時得不到明顯的訊號

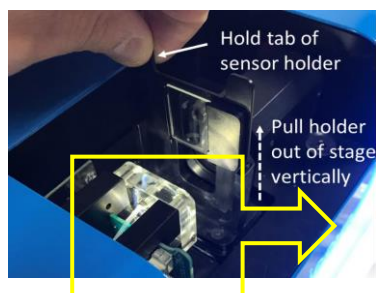
按圖一左上角的 NEXT 鍵至下一個頁面，執行下一個步驟。



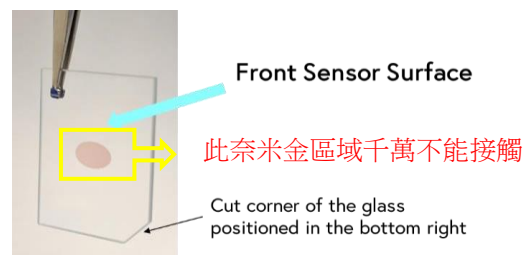
### STEP 3: INSTALL SENSOR CHIP (安裝實驗用奈米金晶片)

點選 **LOAD SENSOR**，按照軟體指示操作，將晶片載架向上抽出，將空白晶片小心倒出妥善保存，並放入本次實驗用的奈米金晶片。

- \*請確實執行軟體指示，在晶片載架抽出後以拭鏡紙沾取 isopropanol 擦拭 **flow cell** 表面。
- \*請確實執行軟體指示，將實驗用奈米金晶片先以超純水 **rinse**(正反面各 **1cc**)後，以儀器所附之吹球吹乾或自然晾乾後再裝入晶片載架。
- \*請以儀器所附之鑷子夾取實驗用之奈米金晶片，切記一定由側邊夾取，請勿碰觸到晶片中央之奈米金區域。
- \*晶片具方向性，請辨別晶片缺口位置於右下角後再放置於載架中。
- \*空白晶片需於實驗結束後放回晶片載架，再收回儀器內。

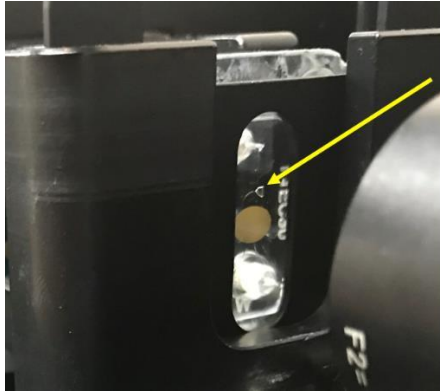


**Flow cell**



#### STEP 4 : REMOVE AND PREVENT BUBBLES (消除氣泡)

點選 BUBBLE REMOVAL，並按照軟體指示，以針筒注入至少 150ul 的 80% isopropanol。當程序執行完畢後，掀開機器上蓋，目視檢查是否仍有氣泡殘留於 flow cell 中。



Bubble present in flow cell channel

六、執行完上述前置步驟後，點選左上方工具列的 Next，輸入本次的實驗名稱 (Test Name)後，進入實驗主畫面，如下圖。

實驗結果存於電腦路徑 Documents\OpenSPR\TestResults\

#### 七、實驗主畫面



① 由下拉式選單，可調整 flow cell 的冷卻溫度，軟體內建冷卻溫度為攝氏 20 度 C。

- ② 由此可進入將 **ligand** 固定在晶片上的實驗流程。
- ③ 由此可切換第二種 **running buffer**。
- ④ 由此可調整液體流速。補充敘述如下：  
 原廠 **protocol** 中，針對各個實驗步驟皆有建議的流速。實驗者可也可依照 **protocol** 再自行微調。

#### 一般建議流速

Injection Type / Scenario	Recommended Typical Flow Rate
Baseline equilibration	200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Surface Conditioning	150 $\mu\text{L}/\text{min}$
Surface Activation/Blocking	20 $\mu\text{L}/\text{min}$
Ligand Immobilization	5 – 20 $\mu\text{L}/\text{min}$
Analyte	20 – 50 $\mu\text{L}/\text{min}$
Regeneration	100 – 200 $\mu\text{L}/\text{min}$

- ⑤ 點選 **INJECT** 可將注入於管路的樣品導入至晶片 **channel**，並可選擇樣品經過雙通道(**CH1+CH2**)或單通道(**CH2**)。關於 **INJECT**，補充敘述如下：

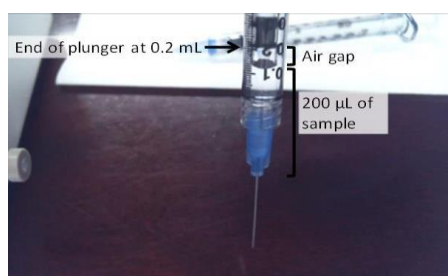
原廠具備二種針筒，玻璃針筒及塑膠針筒。

玻璃針筒適合用來注入 **ligand** 以及 **analyte**，在注入不同 **sample** 時請務必用 **running buffer** 重複清洗數次再吸取新的 **sample**。

塑膠針筒用來注射 **buffer**，包含 **running buffer**，**80% Isopropanol**，**regeneration buffer** 等。請注意 **DMSO** 並不適用塑膠針筒，另外每一種 **buffer** 都要獨立一支針筒，不可混用針筒避免造成交叉污染。

標準樣品管路容量為 **100ul**，但建議最小注射量為 **150ul** 以上。

使用塑膠針筒注射時要盡量避免氣泡進入，建議先吸一小段空氣再吸取樣品，並多吸取 **50~100ul**。如下圖所示，保留空氣及多吸取的 **50~100ul** 在針筒，不要注入儀器即可避免氣泡的產生。若有氣泡進入 **channel** 造成訊號跳動不穩定，可稍待片刻待訊號回穩，或注入 **80% Isopropanol** 驅趕氣泡。



注射標準流程如下：

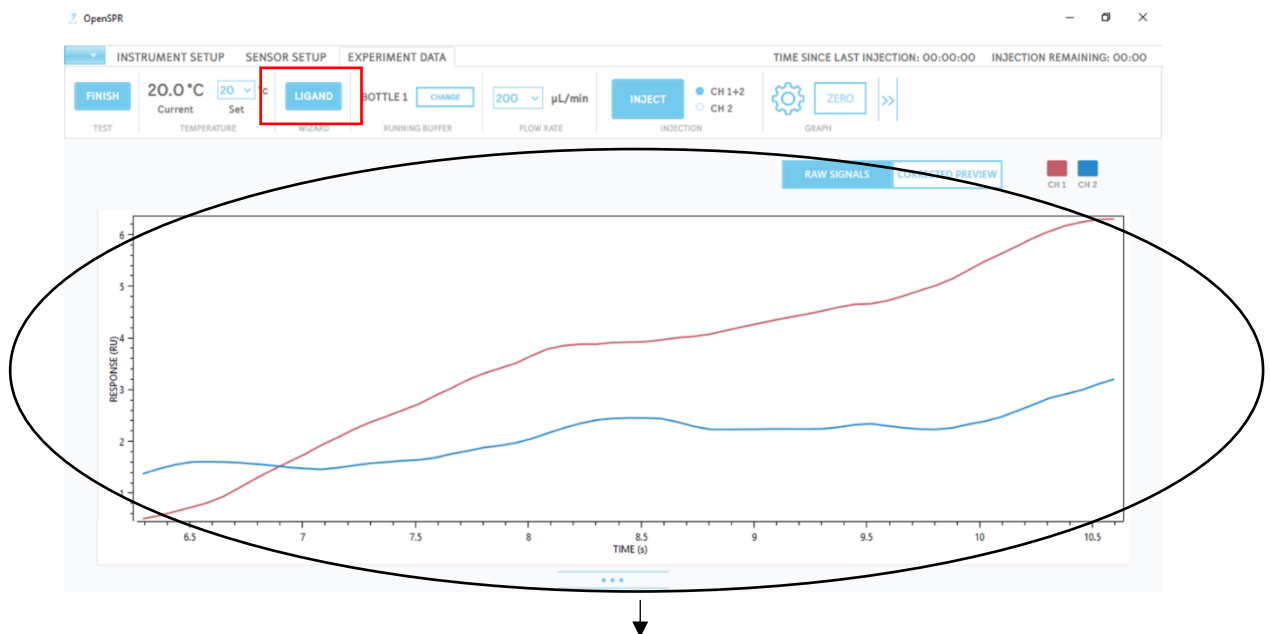
- 在每次樣品注入後，以 **running buffer** 重複數次 **rinse** 樣品注入口以及管路。每次 **rinse** 量約為 **0.5ml**。



- **Rinse** 結束後以同一支針筒用空氣 **purge** 樣品注入口，將管路殘留的液體排空。

- ⑥ 將之前的實驗曲線歸零(**normalize**)，但之前的實驗數據都會存入資料夾中，不會隨著歸零而消失。可以藉此比較序列注射的訊號值。

八、實驗開始後，約 **30 秒** 時間，畫面出現二條曲線，分別為 **CH1 紅色曲線** 的 **reference channel(negative control)** 以及 **CH2 藍色曲線** 的 **sample channel**。點選上方工具列的 **LIGAND**，進行將 **ligand** 固定到晶片上的流程。



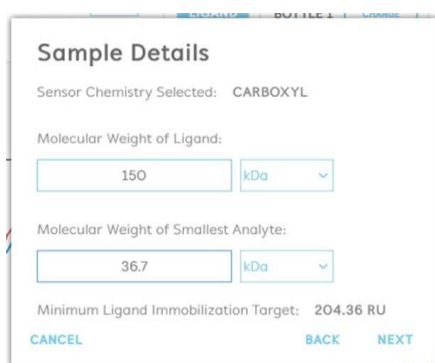
可利用滑鼠滾輪來微觀或巨觀察看樣品訊號變化

九、點選 **Ligand** 後，軟體會根據您所使用的晶片種類來依序指引將 **ligand** 固定到晶片上的動作。

如下圖，選擇好您要使用的晶片後按 **start**。

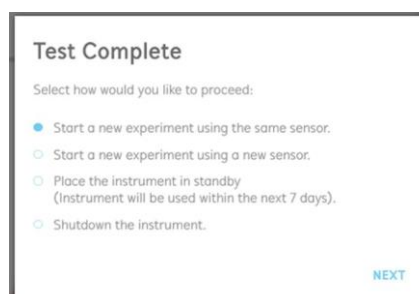
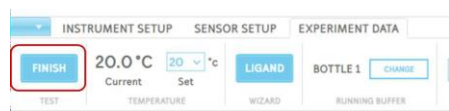


如果知道 **ligand** 及 **analyte** 的分子量，可輸入，軟體會依此計算 **ligand** 固定及 **analyte** 與 **ligand** 結合的有效訊號值。



依序執行軟體指引之步驟，**ligand** 固定完成後，軟體自動回到主畫面。此時可執行 **ZERO**，將基準線歸零後執行 **analyte** 注射之動作。

十、當實驗結束後，點選 **FINISH**。您可選擇要進行下一個實驗、暫停或關閉機器。



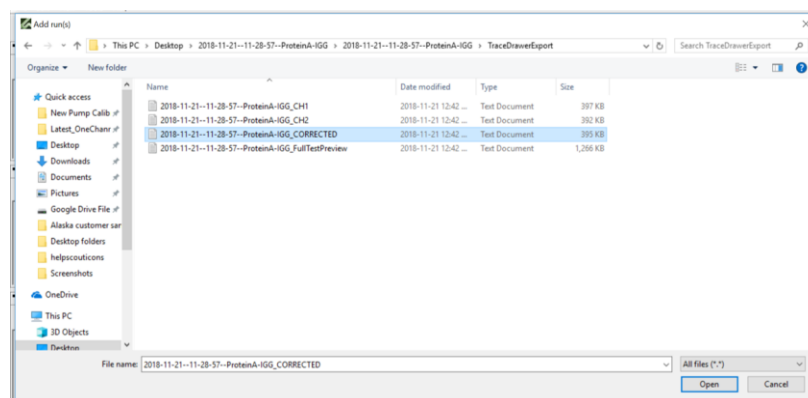
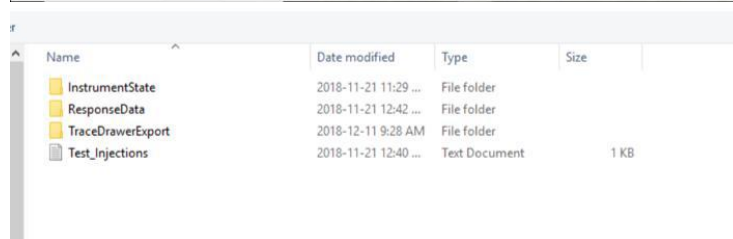
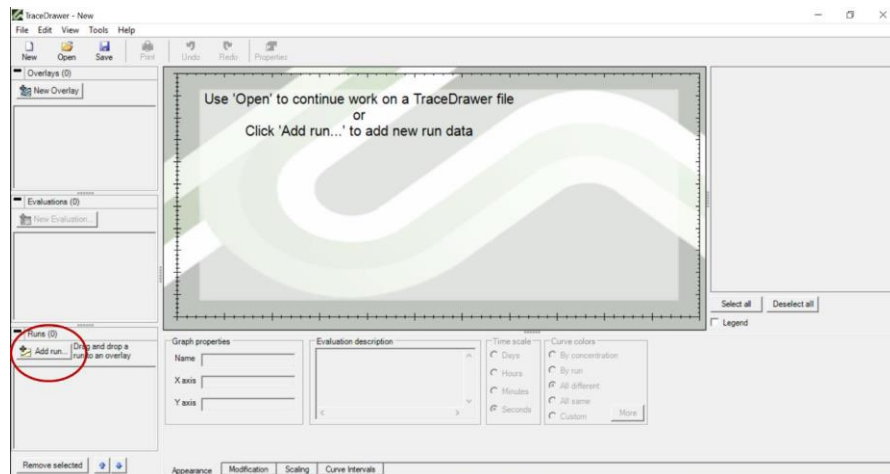
若要關閉機器，請務必確實按照軟體提示步驟執行超純水以及 **80% Isopropanol** 的清洗以及最後排空。所有流程約需 **90** 分鐘。完整結束後再關閉軟體、機器及電腦。



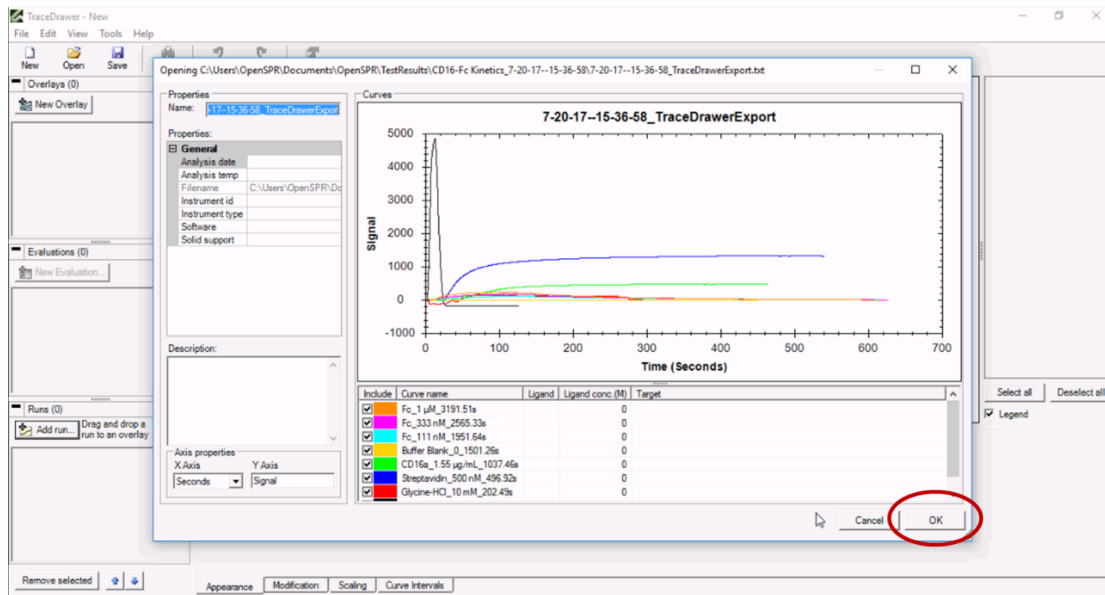
## 分析軟體說明：

一、開啟電腦桌面 TraceDrawer 軟體進行分析。

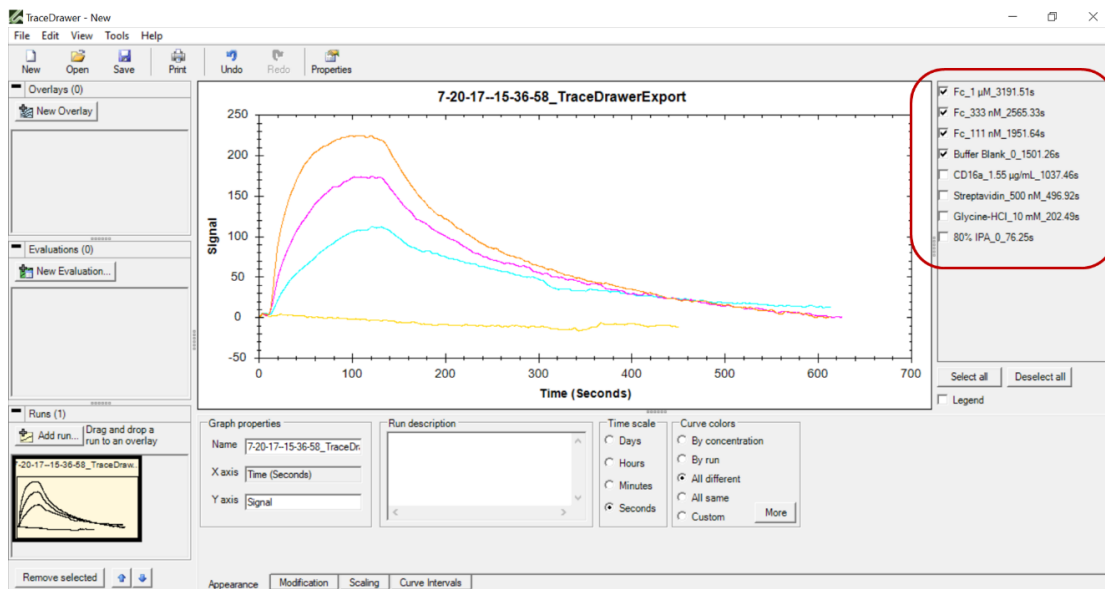
點選Add run，至您本次實驗的TraceDrawerExport資料夾中選擇您要分析的檔案，請選擇檔名以CORRECTED結尾，此為扣除背景值後的檔案。注意副檔名要選擇All files(\*.\*)方可顯示所有檔案。



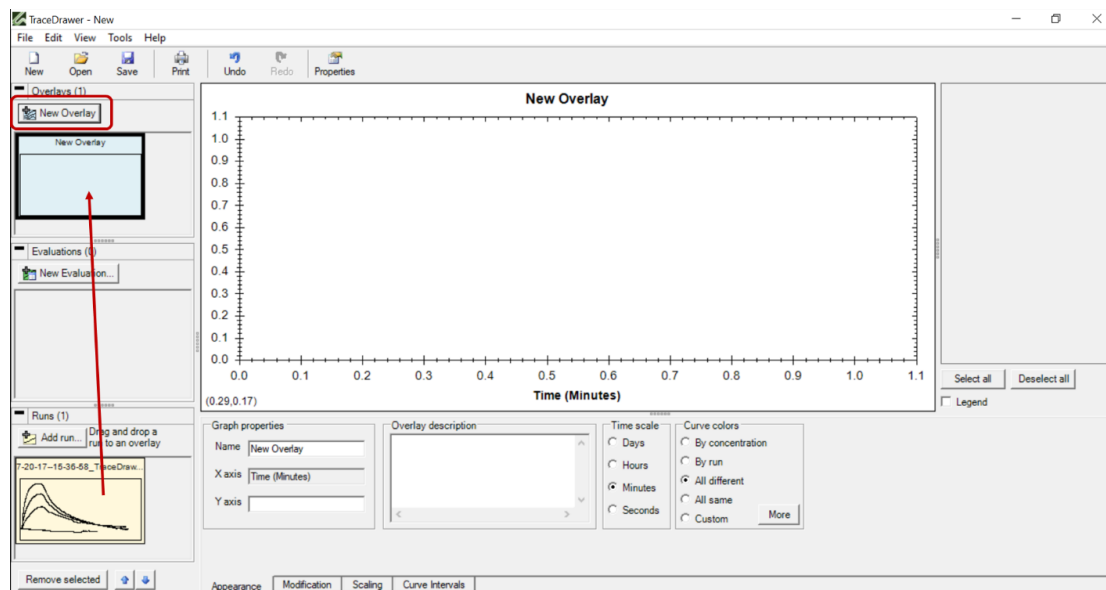
二、檔案開啟後呈現如下圖畫面，直接按 OK 即可。



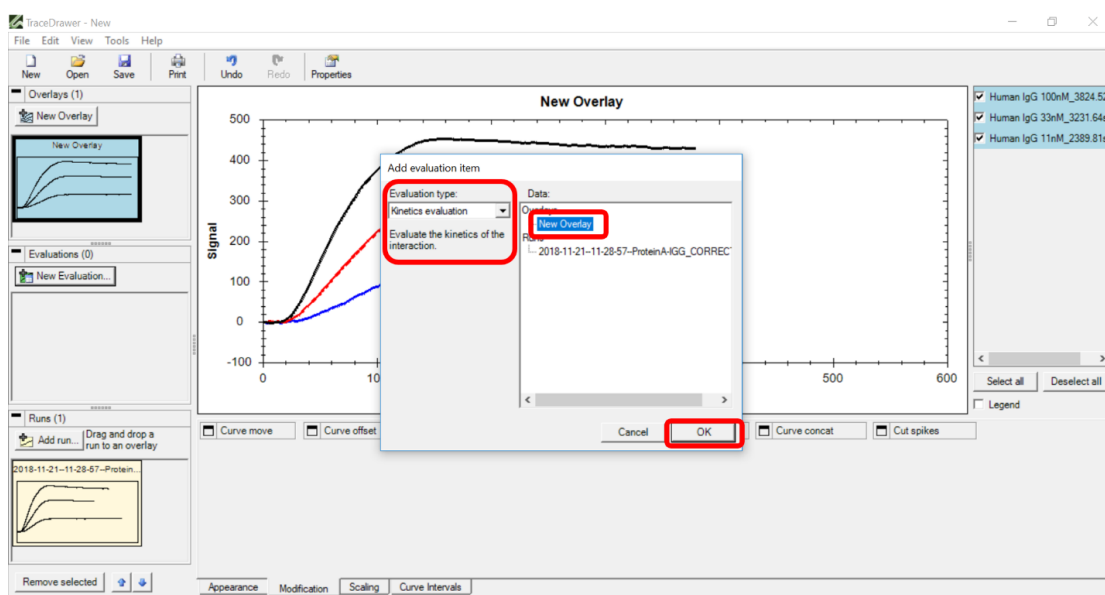
三、TraceDrawerExport 的作圖會顯示出實驗過程中所有注射的樣品或 reagent 的訊號曲線，我們只需保留要分析的 analyte 的曲線即可，其餘勾選的部份請去除掉。



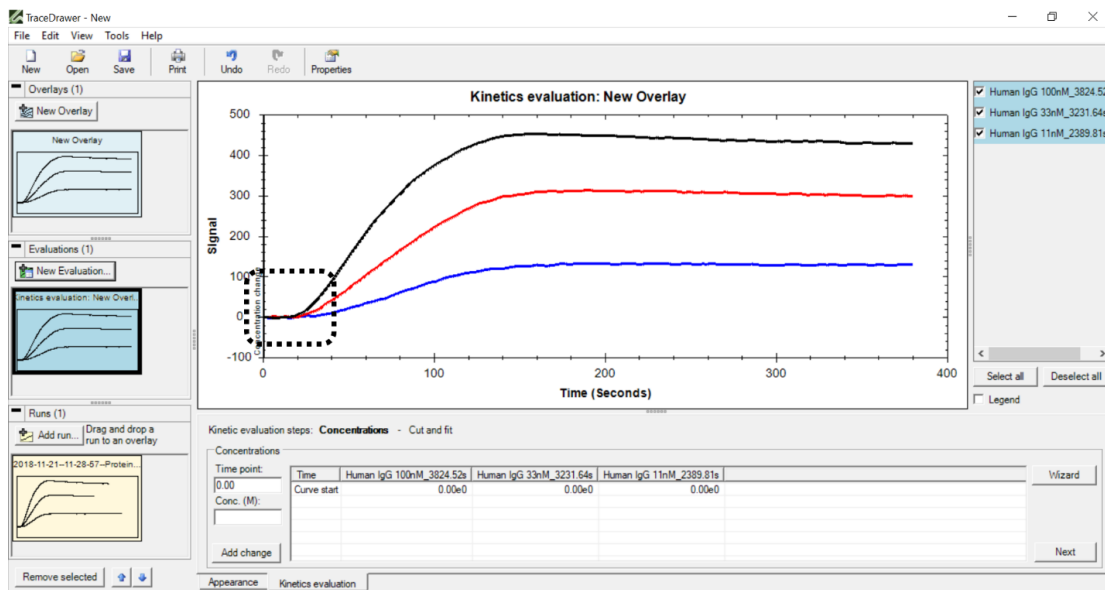
四、點選 **New Overlay**，用滑鼠左鍵將 **Add run** 下面的圖形拖曳至 **New Overlay** 下方的空白圖區。



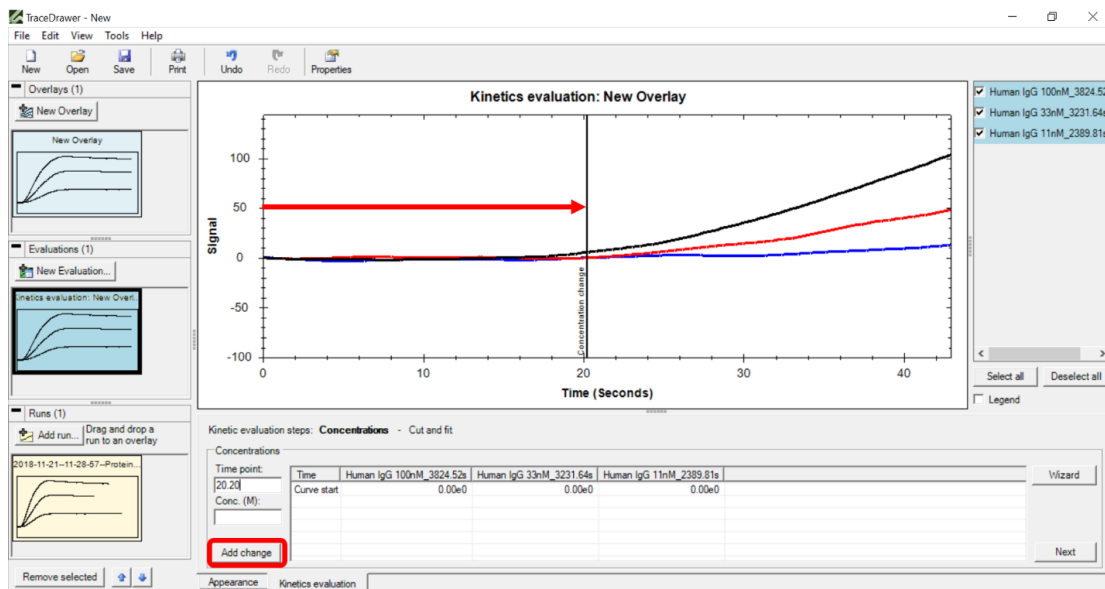
五、點選 **New Evaluation...**，確認 **Evaluation** 選項為 **Kinetics Evaluation** 後按 **OK**。



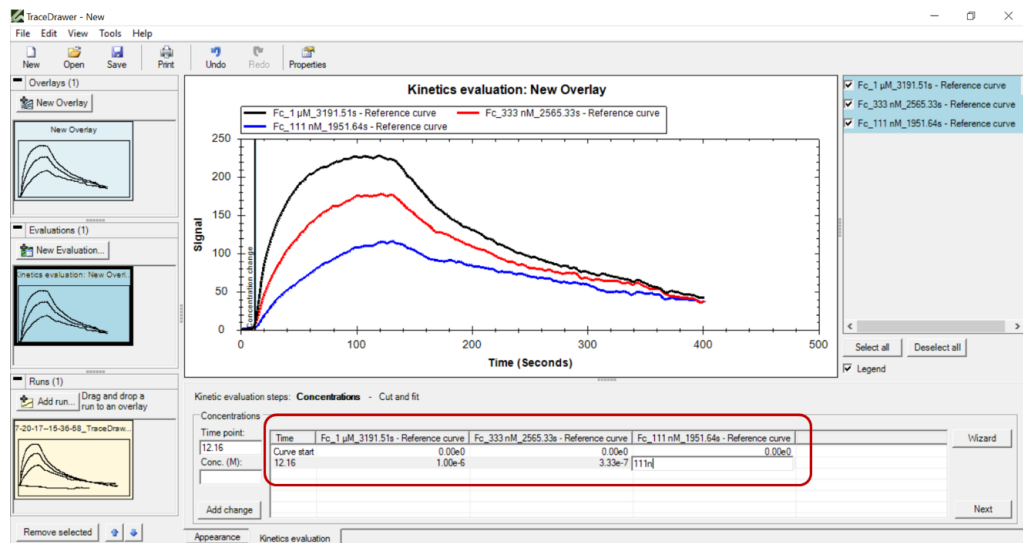
六、在分析前我們需要定義二個時間點，analyte 與 lagand 結合(association)的起始點以及結束。為清楚判斷結合的起始位置，我們利用滑鼠放大局部區域來觀察。



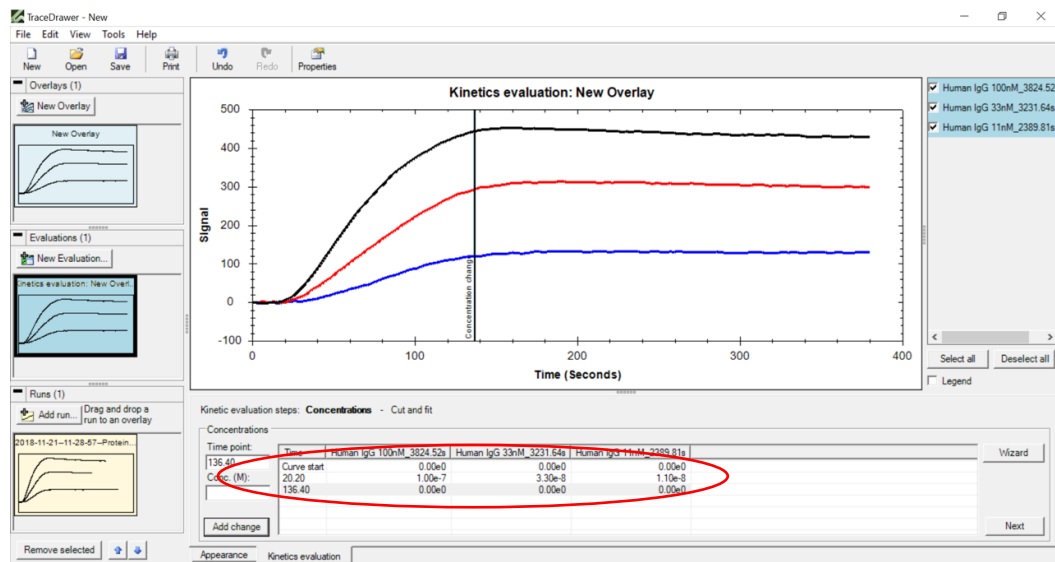
七、從 Y 軸將 Concentration Change bar 拉至結合起始位置，然後點選 Add Change。



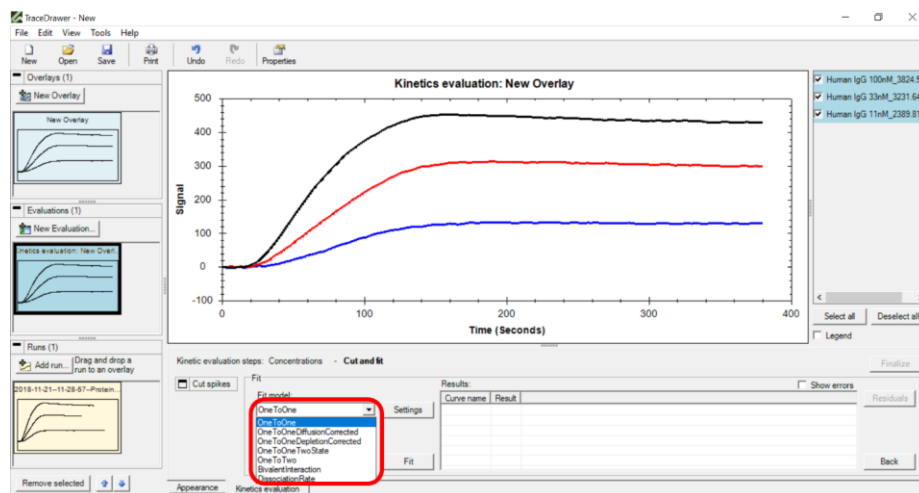
八、下方的表格會新增一列“結合起始位置時間點”的欄位。請將 analyte 的各個濃度 key in 至欄位中。記住，務必使用莫耳濃度(M)。舉例來說，若濃度為 6.5nM，則只需 key in 6.5n 即可；若濃度為 7.2uM，同樣只需 key in 7.2u。



九、結合起始位置設定完成後，再將 Concentration Change bar 拉至結合作用結束的位置，然後再次點選 Add Change，這邊不需要 key in 濃度，數值保持在 0 即可。這時下方 Concentrations 區塊應該有三列時間定義：curve start 以及我們剛剛定義的結合起始與結束。確認後按 Next 進行下一步。



十、點選 Fit model，選擇 One To One 分析模式，接著點選 Fit 來進行分析。



十一、分析結果  $K_a$ (結合效率)、 $K_d$ (解離效率)、 $KD$ (親和力)等數值呈現於右下方 Results 欄位。

