

Biacore X100 con software plus package



Biacore X100 è un sistema automatizzato basato sul fenomeno della Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) che permette analisi di interazioni tra biomolecole in tempo reale e senza la necessità che queste siano marcate. La Risonanza Plasmonica di Superficie si osserva quando un fascio di luce polarizzata monocromatica colpisce un film di metallo in condizioni di totale riflessione interna all'interfaccia di due mezzi ad indice di rifrazione diversa l'uno dall'altro. Un'onda evanescente causata dalla riflessione interna interagisce con gli elettroni superficiali della lamina d'oro determinando una caduta dell'intensità della luce riflessa. Il valore dell'angolo di risonanza al quale avviene questo fenomeno è costantemente monitorato nei sistemi Biacore e dipende dalle variazioni di indice di rifrazione alla superficie del biosensore; nel sistema Biacore X100 il biosensore è denominato sensor chip ed è costituito da una supporto di vetro coperta da una lamina d'oro a cui è legato covalentemente uno strato di destrano.

Uno degli interagenti (ligando) viene immobilizzato sulla superficie di destrano e l'altro interagente (analita) viene fatto fluire sulla superficie. Quando vi è interazione fra ligando e analita, la massa alla superficie del sensor chip aumenta provocando una variazione dell'indice di rifrazione che viene rilevata dallo strumento come variazione dell'angolo di risonanza. Il segnale SPR misurato in funzione del tempo viene riportato in un sensorgramma dove si può osservare il cambiamento di indice di rifrazione mentre l'analita interagisce con il ligando e successivamente si dissocia dalla superficie. L'analisi dei sensorgrammi ad opera di un software dedicato (Biacore X100 evaluation software) fornisce misurazioni dirette di costanti cinetiche di associazione e dissociazione, della costante di affinità e concentrazione attiva.

Il sistema fornisce informazioni riguardanti le interazioni tra biomolecole tra cui:

- Legame/non legame
- Selettività di legame
- Affinità di legame
- Cinetiche di legame
- Concentrazione Attiva

Il sistema presenta una grande flessibilità nello studio di interazioni biomolecolari che coinvolgono:

- Proteine
- Peptidi
- Librerie chimiche di frammenti

- Piccole Molecole di interesse terapeutico/farmacologico
- Carboidrati
- Acidi Nucleici
- Lipidi
- Cellule
- Virus
- Batteri

Biacore x100 è controllato da un software denominato Biacore X100 control software che gestisce tutte le funzionalità del sistema ivi comprese la dispensazione dei campioni nelle celle di flusso del sensor chip dove viene misurata l'interazione. I campioni (15 al massimo per ogni esperimento) vengono alloggiati in un compartimento aperto e accessibile all'utilizzatore dove un autocampionatore controllato dal software è in grado di prelevare la quantità richiesta di campione durante le varie fasi dell'esperimento decise dall'utilizzatore. Il volume di iniezione è compreso tra 5 e 90 μ l che significa che il volume di campione necessario è solo di 20-30 μ l.

Il sistema Biacore X100 permette di rilevare molecole a basso peso molecolare (al di sotto di 100Da) poiché il livello del rumore (noise level) è tipicamente $<0,1$ RU con deriva della linea di base (baseline drift) $<0,3$ RU/min.

Il sistema Biacore X100 può lavorare per 24 ore senza la necessità di essere monitorato.

Tale software è facile all'uso ed intuitivo in quanto dotato non solo di Wizard già pronti ma anche di un sistema assistito di approccio sperimentale definito "workflow". Attraverso la creazione guidata di workflow l'utilizzatore è messo nella possibilità di scegliere le migliori condizioni operative che riguardano: a) quale chip usare, b) quale tecnica di coupling scegliere, c) se legare direttamente il ligando al chip o utilizzare i kit di cattura ed in questo caso quale kit di cattura, d) quali tamponi scegliere durante l'esperimento e la rigenerazione, e) come e quanto a lungo iniettare i campioni, f) come accedere al software di valutazione dei dati, Biacore X100 evaluation software.

Il sistema inoltre utilizza un database per conservare i file relativi agli esperimenti che fanno parte di un workflow. Inoltre è sempre presente una finestra di aiuto che permette di consultare in ogni momento le risorse del software e le risorse web che Biacore mette a disposizione attraverso dei collegamenti presenti nel pannello di navigazione. Tale interfaccia dinamica permette di avere un supporto applicativo 24h/7gg e permette di accedere a dei web training per il Biacore X100 disponibili in qualsiasi momento.

Il sistema Biacore X 100 permette l'approccio analitico denominato "Single Cycle Kinetics (SCK)" supportato dal software, alternativo alla tecnica dell'analisi cinetica tradizionale multiciclica. Con l'approccio tradizionale concentrazioni diverse di analita vengono iniettate sul ligando ma tra una iniezione e l'altra è necessario rimuovere tutto ciò che non è legato covalentemente sul chip mediante soluzioni a pH estremi, o ad elevata forza ionica o con detergenti (rigenerazione). Nella tecnica SCK vengono iniettate concentrazioni crescenti di campione, una dopo l'altra nello stesso ciclo senza rigenerazione tra una iniezione e l'altra. Questo metodo è pertanto di grande utilità quando non è agevole ottenere buone condizioni di rigenerazione tra una iniezione di campione e l'altra. La tecnica permette altri vantaggi, tra cui riduzione dei tempi di analisi, riduzione del consumo di ligando e disegno

sperimentale semplificato. Il software dispone di un metodo predefinito per il calcolo delle costanti cinetiche mediante SCK.

Biacore X 100 plus package include le seguenti componenti in aggiunta al Biacore X100:

- **Degasatore in linea: (Degasser online)**: degasatore in linea necessario quando si lavora a temperature superiori ai 25°C poiché la formazione di bolle è più frequente. Le bolle generano problemi nell'ottenimento di dati di qualità impedendo una corretta ed accurata interpretazione dei sensorgrammi.
- Controllo della temperatura di analisi: da 4°C a 40°C.
- Custom assay Wizard per metodi definiti dall'utilizzatore
- Custom immobilisation per metodi di immobilizzazione definiti dall'utilizzatore.
- Modelli definiti dall'utilizzatore per cinetica ed affinità
- **Calibration Free Concentration Analysis (CFCA)** supportato dal software. Il sistema permette calcoli accurati di concentrazione attiva di proteine oltre che con un metodo tradizionale che prevede la creazione di una curva standard di campione, attraverso la tecnica denominata CFCA (Calibration Free Concentration Analysis). Tale metodo prevede l'iniezione dell'analita di cui si vuole misurare la concentrazione attiva a due o più velocità di flusso per sfruttare il fenomeno della limitazione del trasporto di massa a causa del quale la velocità di associazione dell'analita al ligando varia al variare della velocità di flusso. Le velocità di associazione dipendono dalla concentrazione dell'analita e dal suo peso molecolare, dal flusso, dalla dimensione della cella di lettura e dal coefficiente di diffusione della proteina in esame. L'unico parametro incognito è la concentrazione dato che velocità di flusso, peso molecolare dell'analita, dimensioni della cella sono noti mentre il coefficiente di diffusione è un dato o disponibile in letteratura o misurabile sperimentalmente o calcolabile attraverso il "Biacore Diffusion Coefficient Calculator tool" presente nel sito web www.biacore.com. Il software dispone di un metodo predefinito per il calcolo della concentrazione attiva mediante "Calibration Free Concentration Analysis".
- **Solvent correction supportato dal software**. Il sistema Biacore X100 plus package permette di studiare l'interazione di molecole a basso peso molecolare (MW >100 D). Il sistema presenta un metodo predefinito che permette di minimizzare l'influenza di solventi con alto indice di rifrazione (i.e. DMSO) che sono spesso usati per sciogliere piccole molecole organiche. L'variazione dell'indice di rifrazione dovuta alla presenza di tali solventi viene corretta dal software attraverso la costruzione di una curva di calibrazione permettendo una valutazione accurata dei dati reali di interazione tra ligando e analita.

Il sistema Biacore X100 permette l'utilizzo di tutti i Sensor Chip prodotti dalla tecnologia Biacore: CM7, CM5, CM4, CM3 e C1 con gruppi attivi carbossimetilati e di utilizzo generale; SA per ligandi biotinilati; NTA per proteine con His Tag; HPA per creare un monostrato lipidico; L1 per creare un doppio strato lipidico; AU per attivare direttamente i ligandi su lamina d'oro e infine CAP per la cattura reversibile di ligandi biotinilati.

Biacore ha più di 30 anni di esperienza nello sviluppo e nel supporto di sistemi SPR.

Biacore è una tecnologia comprovata. Ci sono più di 10.000 (diecimila) pubblicazioni in molti campi differenti come oncologia, neurobiologia, immunologia, malattie infettive, proteomica funzionale, cell signaling, vaccini, selezione e caratterizzazione di reagenti di legame, drug discovery, etc.

Potete trovare le pubblicazioni al sito www.biacore.com >Application support>Publications

Scheda Tecnica Biacore X 100 con X100 Plus package

Tecnologia applicata	Biosensore SPR (Risonanza Plasmonica di Superficie)
Informazioni fornite	Cinetiche tradizionali e Single Cycle Kinetics, Affinità (ka, kd, KD) Specificità, Selettività, Analisi di composti a basso peso molecolare (LMW) con Solvent Correction Tool
	Analisi di Concentrazione tradizionale e Calibration Free Concentration Analysis (CFCA)
Automazione	Massimo 15 campioni, fino a 24 ore in automatico
Detection di Peso Molecolare	Limite <100 Da, in diversi ambienti del campione
Numero di celle di flusso	2
Volume di Campione	Volume di iniezione + 20-30 µl (dipendente dall'applicazione)
Volume di iniezione	5-90 µl
Velocità di flusso	1-100 µl/min
Intervallo dell'indice di rifrazione del campione	1,33-1,40
Intervallo di unità di rifrazione (RU)	1-70.000 RU
Temperatura di analisi	4-40 °C (massimo 10°C sotto la temperatura ambiente)
Degasaggio del campione "in line"	incluso
Tipologia di campioni	Da "drug candidates" a basso peso molecolare fino a proteine ad alto peso molecolare in vari ambienti di campione es. tamponi, plasma, siero
Tempo di analisi per ciclo	2-15 minutes per sample
Volume della cella di flusso	0.06 µl
Sottrazione "in-line" della reference	Automatica
Presentazione dei dati	Monitoraggio in tempo reale delle interazioni, tavole dei risultati, grafici dei risultati
Disturbo linea di base (noise level)	Usualmente < 0.1 RU (RMS)
Deriva della linea di base	Usualmente < 0.3 RU/min
Dimensione (escluso computer)	596 x 593 x 563 mm
Voltaggio Elettrico utilizzabile	100-120 V; 220-240 V
Consumo di Potenza Elettrica	Processing Unit: massimo 6.3 A (a 100 Vac)

	System Controller: massimo 7.2 A (at 100 Vac)
Peso netto	Totale: 47 kg
Trattamento e conservazione dei dati.	Microsoft windows XP, database storage.
Tipici intervalli di lavoro	
Cinetiche	
Costante di Velocità di Associazione (k_a):	$10^3 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Costante di Velocità di Dissociazione (k_d):	$10^{-5} - 0.1 \text{ s}^{-1}$
Costante di dissociazione (KD-Affinità)	100 μM to 1 pM
Concentrazione	> 1×10^{-10} M per analiti >10kDa > 1×10^{-9} M per analiti <10kDa