

PRAVILA ZA DELO Z APARATOM BIACORE X



1. REZERVACIJA APARATA

Aparat lahko rezervirate pri Vesni Hodnik po telefonu (01/320-34-33; interna št. 3433) ali e-pošti (vesna.hodnik@bf.uni-lj.si). Koledar z rezervacijami aparata najdete na spletni strani Centra (<http://www.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/index.html>). Odgovor o uspešnosti rezervacije boste prejeli po e-pošti v roku 48 ur, rezervacija pa bo zabeležena na spletnem koledarju. Dobro preberite spodnja osnovna navodila. **Pred pričetkom dela podpišite Izjavo o seznanjenosti z delovanjem in vzdrževanjem aparature Biacore X!** Podrobnejše informacije dobite v knjigah in priročnikih, shranjenih na polici nad aparatom. Po koncu dela trajanje uporabe instrumenta vpišite v seznam, shranjen na polici nad aparatom.

2. DELO Z APARATOM

2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

- Raztopine proizvajalca Biacore so »ready-to-use«. Puffer HPS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% surfaktant P20) priporočajo za večino aplikacij (tega pufra ne uporabljajte za delo z lipidi ali liposomi, ker vsebuje detergent). Nekaj paketkov je v hladilniku na 4°C.
- Lahko pripravite svoje raztopine (pufre in reagente), ki jih morate vedno **PREFILTRIRATI** skozi 0.22 µm filter in **ODZRAČITI**. Pred vsakim pričetkom dela raztopine obvezno odzračite, še posebej, če delate pri višjih temperaturah (35-40°C). Med odzračevanjem naj bodo pufri za delo pri višjih temperaturah segreti, da ne pride do nastanka mehurčkov, ko puffer ekvilibirate na sobno temperaturo.
- Vse raztopine naj vsebujejo 0.005% surfaktant P20 (v hladilniku na 4°C), ki preprečuje nespecifično adsorpcijo na stene mikrotekočinskega sistema.
- Raztopine shranjujte v hladilniku, da preprečite rast mikroorganizmov. Pred ponovno uporabo vsakokrat preverite, da v pufri ni precipitiranih snovi.



2.2 PRIČETEK DELA

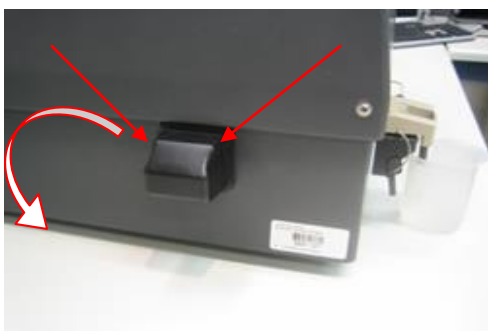
- RAČUNALNIK IN BIACORE STA PRIŽGANA, TEČE PROCEDURA CONTINUE-v programu ustavite proceduro Continue (klikni *Stop*). Vstavite cevko iz MilliQ vode v svoj pufer. **Vedno, ko menjate pufre, cevko previdno obrišite z omočenim robčkom!** Odstranite čip v aparatu z *Undock*, vstavite svoj čip (glej prilogo: Menjava čipov) in zaženite *Dock*. Poženite **dvakrat Prime**. Lahko pričnete z delom.

Čipi so shranjeni v originalnih vrečkah v dušikovi atmosferi v hladilniku na 4°C. Pazite, da **ne** uporabite čipov z oznako **Series S** (delani za Biacore T100). Ko vrečko odprete, čip čimprej uporabite. Porabo čipov in ostalih kemikalij obvezno vpisujte v seznam na omarici nad aparatom.

- MENJAVA ČIPA

1. Pojdite na *Command* → *Undock*. Počakaj slabo minuto, da sistem pripravi čip.

2. Odprite pokrovček tako, da ga primete na zgornji strani (rdeči puščici) in ga previdno povlečete proč od aparata (Slika 1 → Slika 2)



Slika 1



Slika 2

3. Nato primite pokrovček in potegnite vodilo ven (Slika 3). Tako ste potegnili čip iz merilnega dela v aparatu v kaseto.

4. Primite čip, ga dvignite navpično za cca. 2 mm in potegnite iz aparata (Slika 4). Obvezno preverite, če je čip v kaseti in ni ostal v aparatu.



Slika 3



Slika 4

5. Na prazno vodilo (Slika 5) vstavite nov čip. **Čip vstavite v aparat v obrnjenem vrstnem redu. Pazite, da se odprtina na čipu prilega kovinskemu batku na vodilu (označen z rdečo puščico) in da se čip lepo usede nanj.** Ko je nov čip v aparatu, zaprite pokrovček in v softwaru klikni *Dock*. Zaženite dvakrat *Prime* in pričnite z delom.



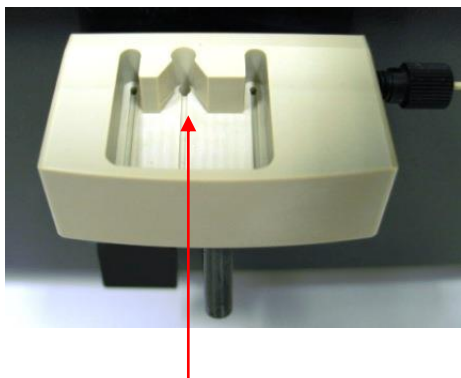
Slika 5

Po potrebi nastavite želeno temperaturo (20-40 °C) v programu (*Command* → *Temperature*). Ko je aparat ekvilibriran, neha utripati oranžna lučka na sprednji strani aparata poleg brizge. Ostale nastavitve (pretok, celice, kako se pipetira...) si pogledajte v *Biacore Instrument Handbook*, poglavje 4 (str. 4-7 – 4-35).

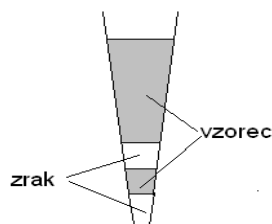
Če delate meritve, ki zahtevajo veliko natančnost ali če ste spremenili temperaturo, poženite *Normalize* in *Signal Quality Check* (*Tools* → *Test Tools* → *Signal Quality Check*).

- **IMOBILIZACIJA LIGANDOV:** za imobilizacijo ligandov na CM5 čip lahko uporabite **Amine Coupling Kit**, ki veže ligande na površino čipa preko aaminskih -NH₂ skupin. Uporabite alikvotirane DHC, NHS in etanolamin. DHC in NHS sta alikvotirana na -20°C (zamrzovalnik), etanolamin na 4°C (hladilnik). Vsakič, ko odtajate alikvot, narišite gor piko. Ne uporabljajte več kot trikrat odtajanih (tri pike) alikvotov. Za imobilizacijo ligandov preko tiolnih -SH skupin uporabite **Thiol Coupling Kit**. Reagenti so shranjeni v hladilniku na 4°C.
 - *Biacore Sensor Surface Handbook*, 4. poglavje, p.31-57 (imobilizacija ligandov, različni pristopi)
 - *Biacore Instrument Handbook*, p.5-1 – 5.6 (imobilizacija ligandov preko aaminskih skupin)

- INJICIRANJE VZORCA



mesto injiciranja vzorca



»Air bubble technique«

Za zmanjšanje disperzije vzorca odpipetirajte vzorec z »Air bubble technique«: odpipetirajte priporočen volumen vzorca, nato 3-5 μl zraka, nato 5 μl vzorca in nazadnje še 3-5 μl zraka. S tako tehniko boste preprečili mešanje vzorca s pufrom, prisotnem v IFC.

2.3 KONEC DELA

- ZAMENJAJTE svoj senzorski čip z Maintenance čipom (*Command* \rightarrow *Dock* \rightarrow *Undock*) Vstavite cevko v MilliQ vodo in zaženite *Prime* (*Tools* \rightarrow *Working Tools* \rightarrow *Prime*). V primeru, da ste na začetku spremenili temperaturo, jo nastavite nazaj na **25 °C**. **Trajanje \approx 5 min.**

- DESORB (*Tools* \rightarrow *Working Tools* \rightarrow *Desorb*) Nato zaženite postopek *Desorb* (**Desorb solution 1** je v omari nad aparatom, **Desorb solution 2** je v hladilniku na 4°C). Postopek Desorb očisti mikrotekočinski sistem (IFC) in jo izvajajte **dnevno**, po opravljenem delu. Postopek lahko poškoduje vezane ligande, zato je zelo pomembno, da predhodno vstavite v aparat Maintenance čip. **Trajanje \approx 20 min.**

- CONTINUE (*Tools* \rightarrow *Working Tools* \rightarrow *Continue*) Postopek *Continue* spiraa sistem z MilliQ vodo tri dni. Preverite, če imate še dovolj MilliQ vode, poraba je 0.8 mL/h.

Po koncu dela **trajanje uporabe aparata** in **opravljene postopke** (Desorb, Superdesorb, Sanitize, Unclogging) vpišite v dnevnik pri aparatu!

- Biacore Instrument Handbook, p.4-34 (zapiranje sistema) in 6-1 – 6-8 (vzdrževanja aparata)

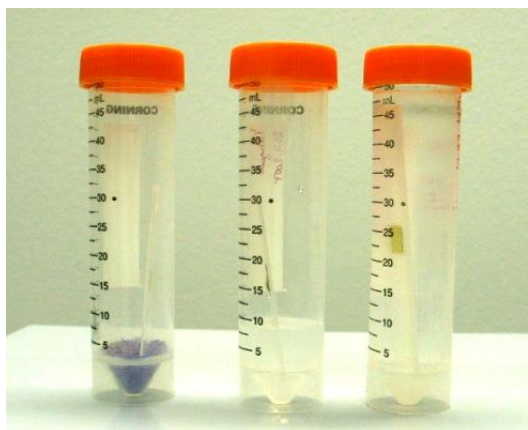
2.4 SHRANJEVANJE RABLJENIH ČIPOV

- SHRANJEVANJE V ATMOSFERI, NASIČENI Z VLAGO (tak način shranjevanja priporočajo pri Biacoru): poženite *Undock* in vzemite čip iz aparata. Odstranite čip iz kasete s pomočjo pincete. Vstavite ploščico s čipom v 50 ml Falcon epruveto, v katero ste pred tem nalili nekaj mililitrov pufra. Epruveto zaprite in spravite v hladilnik na 4°C v stojalo z rabljenimi čipi. Pred ponovno uporabo čipa ga ekvilibrirajte na sobno temperaturo, vstavite v kaseto in nato v instrument z *Dock*.

- VLAŽNO SHRANJEVANJE: postopek je enak kot v prejšnjem odstavku, le da nalijete

pufer do vrha epruvete.

- **SUHO SHRANJEVANJE:** poženite *Undock* in vzemite čip iz aparata. Odstranite čip iz kasete s pomočjo pincete. Odstranite odvečno tekočino s tresenjem ali previdno posušite čip s stisnjenim zrakom. Vstavite ploščico s čipom v 50 ml Falcon epruveto, v katero ste na dno dali 5g silika gela. Spravite epruveto v hladilnik na 4°C v stojalo z rabljenimi čipi. Pred ponovno uporabo čipa ga ekvilibrirajte na sobno temperaturo, vstavite čip v kaseto in nato v instrument z *Dock*.
 - Biacore Sensor Surface Handbook, 8. poglavje, p.87-89 (shranjevanje in ponovna uporaba čipov)



Primeri shranjevanja čipov: suho, shranjevanje v atmosferi, nasičeni z vlago, mokro shranjevanje

3. VZDRŽEVANJE APARATA –v aparatu obvezno Maintenance čip!

3.1 DNEVNO

DESORB (*Tools* → *Working Tools* → *Desorb*)

Za postopek Desorb potrebujete raztopini **Desorb solution 1** (v omari nad aparatom) in **Desorb solution 2** (v hladilniku na 4°C). Postopek Desorb očisti mikrotekočinski sistem (IFC) in jo izvajajte **dnevno**, po opravljenem delu! Postopek lahko poškoduje vezane ligande, zato je zelo pomembno, da predhodno vstavite v aparat Maintenance čip. **Trajanje ≈ 20 min.**

3.2 TEDENSKO

Če delate kot zadnji v tednu (petek), pred proceduro Continue zaženite *Unclogging* (*Tools* → *Service Tools* → *Unclogging*). Procedura traja 3 min in spere IFC pri visokem pretoku ter odstrani potencialne prašne delce. Nato poženite postopek Continue. **Continue traja točno 72 ur (3 dni)**. Po 72 urah se procedura ustavi in jo je potrebno ponovno zagnati, drugače se sistem ne spira in se lahko izsuši!

3.3 NA 14 DNI DO 1 MESEC

SUPERDESORB (*Tools* → *Working Tools* → *Prime*)

Superdesorb omogoča temeljito čiščenje mikrotekočinskega sistema (IFC). Izvedite jo enkrat mesečno ali na 14 dni, če je aparat pogosto v uporabi, po postopku Desorb. Uporabljajte protokol po Myszki, s tem, da sperete sistem z 0,5 % SDS 3x (namesto 1x). V dnevnik obvezno vpišite, kdaj in kateri protokol je bil opravljen! Bistvo postopka je, da proceduro Prime izvedete zaporedoma z različnimi raztopinami (v omari nad aparatom)-

vzemite cevko iz pufra ali MilliQ vode, jo obrišite in vstavite v raztopino. Poženite Prime. V aparatu mora biti Maintenance čip, ker postopek poškoduje vezane ligande! **Trajanje ≈ 30-45 min.**

Superdesorb – Protokol po D.G.Myszki		
Raztopina	Procedura	Število operacij
0.5 % SDS	Prime	1 (3x)
6 M Urea	Prime	1
1 % Ocetna kislina (C ₂ H ₄ O ₂)	Prime	1
0.2 M NaHCO ₃	Prime	1
milliQ voda (40-50 °C)	Prime	3

3.4 MESEČNO

SANITIZE (*Tools* → *Working Tools* → *Sanitize*)

S proceduro **Sanitize** preprečite rast mikroorganizmov. Poženite jo enkrat mesečno takoj za procedurama **Desorb** in **Superdesorb**. Cevko vstavi v **BIAdesinfectant solution** (v hladilniku na 4 °C), ki jo predhodno ekvilibirate na sobno temperaturo. V aparatu mora biti vstavljen Maintenance čip. **Trajanje ≈ 30 min**

Na list na omarici vpišite, kdaj ste opravili postopke Desorb, Superdesorb in Sanitize.