

**PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN DE BLITZ  
PARA ENSAYOS DE INTERFEROMETRÍA  
CON UNIÓN A LÍPIDOS  
BIOSENSOR APS**

## ÍNDICE

### 1. OBJETO

### 2. ALCANCE

### 3. REFERENCIAS

### 4. GENERAL

- Descripción del equipo.
- Fundamento de la técnica.

### 5. MANEJO DEL EQUIPO

- Utilización para ensayos con *Basic Kinetics*.
- Análisis de datos.
  - Exportar datos a Excel.

### 6. ANEXOS

- ANEXO I: PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LÍPIDOS
- ANEXO II: PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS

## OBJETO

Este procedimiento tiene por objeto la descripción de las operaciones necesarias para la utilización de **BLitz** para ensayos de interferometría.

## ALCANCE

El procedimiento descrito se aplica para la realización de ensayos de interferometría con unión a lípidos utilizando un biosensor de aminopropilsilano (APS) con **BLitz**, así como las operaciones necesarias para su correcto mantenimiento.

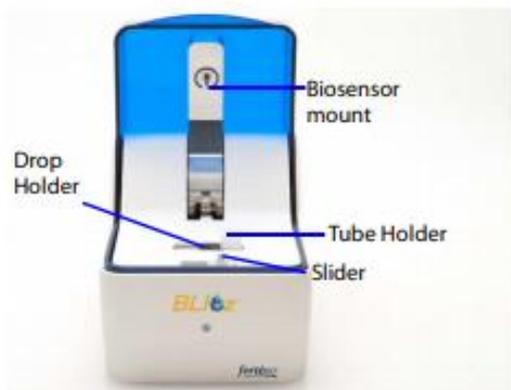
## REFERENCIAS

- Sultana, A., and Lee, J.E. 2015. Measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions by biolayer interferometry. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 79:19.25.1-19.25.26. Doi: 10.1002/0471140864.ps1925s79.
- BLitz System User Guide P/N 41-0178 Rev C Copyright © 2015 Pall ForteBio, Inc.

## GENERAL

### ❖ Descripción del equipo:

El sistema **BLitz** permite la cuantificación en tiempo real de analitos en solución o la caracterización cinética de interacciones moleculares.



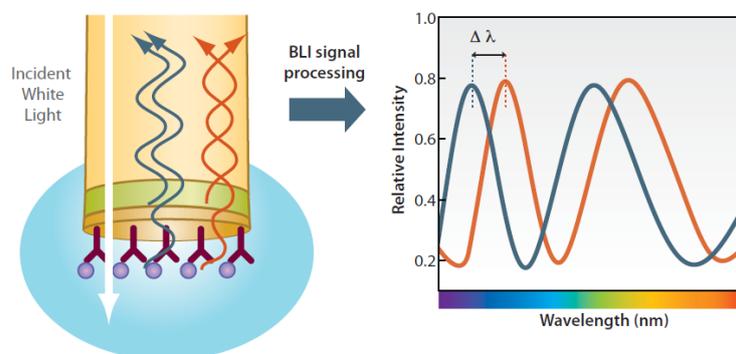
Estos ensayos de unión ocurren en un biosensor fabricado con una matriz biocompatible, uniforme, no desnaturante, y que minimiza las uniones inespecíficas. Siendo así detectadas únicamente las moléculas que se unen directamente a la superficie del sensor.

#### ❖ Fundamento de la técnica:

La interferometría de bicapa es un sistema de inmersión y lectura óptica que permite medir interacciones entre proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas y/o lípidos en tiempo real.

El sistema **BLITz** emite luz blanca a lo largo de un biosensor de fibra óptica y recoge la luz reflejada.

Se inmoviliza un ligando en una matriz con un grupo funcional determinado en la punta del sensor. La unión del ligando a una segunda molécula en solución analítica provoca un cambio en el grosor óptico en la punta, dando lugar a un desplazamiento en la longitud de onda proporcional a la unión.



Algunas longitudes de onda muestran interferencias constructivas, y otras destructivas. Estas interferencias son provocadas por el cambio en el número de moléculas unidas al biosensor, y son captadas por un espectrómetro, que las muestra en unidades de intensidad relativa (nm).

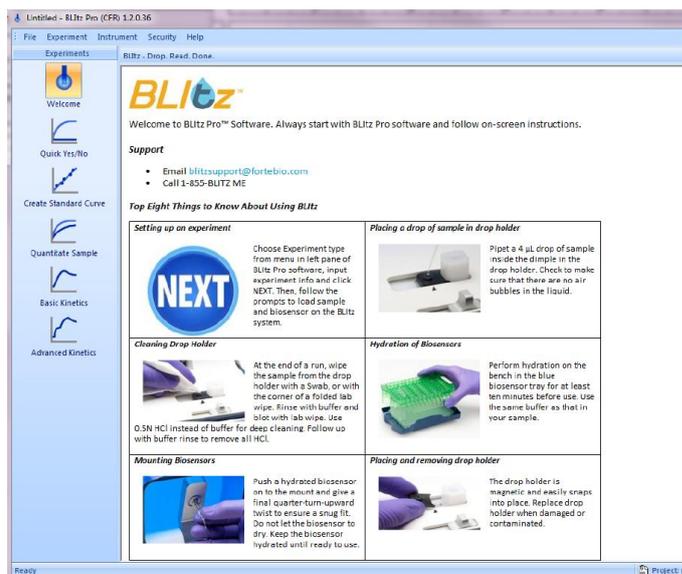
Esta técnica permite determinar afinidades de unión en equilibrio (KD), así como tasas de asociación y disociación ( $k_a/k_d$ ) de manera cuantitativa.

## MANEJO DEL EQUIPO

### ❖ Utilización para ensayos con *Basic Kinetics*:

Es necesario encender el equipo 30 minutos antes de su utilización.

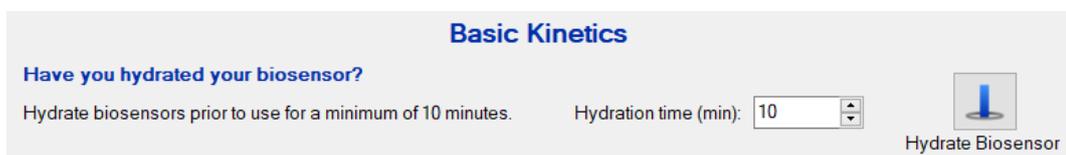
Para llevar a cabo experimentos de unión a lípidos se utiliza el programa **Blitz Pro 1.2**.



Abrir **Basic kinetics**, y en el apartado **File**, seleccionar **new** para abrir un experimento nuevo.

En primer lugar, se debe proceder a la **hidratación de las puntas**.

Para ello, utilizar una placa de 96 pocillos, en uno de ellos añadir 400 µl de buffer en el que se encuentran los lípidos (ej: SLB). Sobre el pocillo, colocar una caja de puntas en desuso, por encima la punta y seleccionar el botón **Hydrate biosensor**. (El tiempo normal de hidratación, establecido por defecto por el cronómetro del programa, es de 10 minutos.)



A continuación, rellenar los apartados para la identificación y descripción del experimento.

La muestra puede identificarse en el apartado **sample ID (puede editarse en cada run si cambia la muestra)**, y en el desplegable **Biosensor type** seleccionar la punta en función del experimento a realizar. En este caso debe seleccionarse la opción **APS (Aminopropilsilano)**.

Además, es posible introducir la concentración de la muestra, así como su peso molecular, y el propio *software* calcula su concentración molar.

El agitador debe estar activado para minimizar las uniones inespecíficas, para ello seleccionar *enable* en el desplegable de *shaker*.

The screenshot shows a software interface for setting up an experiment. It is divided into two main sections: 'Enter your Experiment Settings' and 'Enter your Run Settings'. In the first section, there are input fields for 'Experiment Name' and 'Description', and a 'New Experiment' button with a blue flame icon. The second section contains fields for 'Sample ID', 'Concentration' (with a unit dropdown set to µg/ml), 'Biosensor type' (a dropdown menu currently showing 'APS (Aminopropylsilane)'), 'Molecular Weight' (with a unit dropdown set to kD and a 'Calc' button), and 'Shaker' (a dropdown menu set to 'Enable'). There is also a 'Molar Concentration' field with a unit dropdown set to nM.

Finalmente diseñar el experimento en función de los tiempos requeridos para el equilibrado, la asociación y la disociación.

The screenshot shows a table with three columns: 'Step Type', 'Duration (s)', and 'Position'. The table contains three rows of data. To the right of the table, there is a 'Run duration: > 10:30' label and a 'NEXT Run 1' button with a blue circle icon.

	Step Type	Duration (s)	Position
1	Baseline	30	Tube
2	Association	300	Drop
3	Dissociation	300	Tube

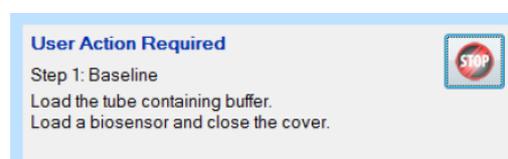
El tiempo de equilibrado suele establecerse en un intervalo comprendido entre 30 y 60 segundos, pero puede modificarse hasta el valor en el que la línea de equilibrado sea estable en el medio elegido para el experimento.

Del mismo modo, los tiempos de asociación y disociación pueden modificarse en función del tiempo que requiera la muestra para alcanzar un régimen estable.

Ejemplo:

Step Type	Duration (s)	Position
<b>Baseline</b>	30	Tube
<b>Association</b>	300	Drop
<b>Dissociation</b>	300	Tube

Una vez transcurrido el tiempo de hidratación, hacer *click* sobre el icono **Next** para comenzar el primer *run*. El propio programa va a ir indicando los pasos a seguir.



### **RUN 1 (Inmovilización de lípidos):**

1. Pipetear en un tubo *ependorf* de 0,5 ml 400  $\mu$ l de buffer en el que se encuentran los lípidos (ej: SLB) y colocarlo en el soporte.



2. Seguidamente colocar la punta, alineándola con el *slider* al *ependorf*, **cerrar la tapa del tirón para evitar que comience a medir antes de que la punta entre en contacto con la muestra.** Debe realizarse a la mayor brevedad posible para así evitar que la punta se seque.



3. Pasados los 30 segundos del equilibrado (*baseline*), el programa solicita poner la muestra.

4. Pipetear, sin llegar al segundo tope para evitar la aparición de burbujas, en el *drop holder* 4,5  $\mu$ l de la muestra (disolución de lípidos), deslizar el *slider* hacia la derecha, y cerrar de nuevo la tapa.



5. Finalizada la asociación, abrir la tapa y deslizar de nuevo el *slider* hacia la izquierda para iniciar la disociación, lavando así el exceso de lípidos con el buffer en el que se encuentran los lípidos (ej: SLB).

Una vez completada la inmovilización de lípidos, debe hacerse un segundo “run” para incorporar la proteína.

### **RUN 2 (Incorporación de la proteína):**

1. Pipetear en un nuevo tubo *ependorf* de 0,5 ml 400  $\mu$ l de buffer de la proteína de unión y colocarlo.



2. Mientras se realiza el equilibrado, sacar el *drop holder* para lavarlo y secarlo con papel sin pelusa.

Como se pasa de **una muestra de lípidos** a una de proteínas, el lavado del *drop holder* debe realizarse con **detergente** y un posterior enjuague con agua destilada. Cuando el cambio de muestra en el *drop holder* es solo un cambio de proteínas es suficiente con enjuagar con agua destilada.

3. De nuevo, pipetear, sin llegar al segundo tope para evitar la aparición de burbujas, en el *drop holder* 4,5  $\mu$ l de la muestra de proteína, deslizar el *slider* hacia la derecha, y cerrar de nuevo la tapa.
4. Pasado el tiempo de asociación, deslizar de nuevo el *slider* hacia la izquierda para iniciar la disociación, lavando así el exceso de proteína en el *ependorf* con el buffer en el que se encuentre la proteína.

## ❖ ANÁLISIS DE DATOS

El propio programa dispone de un botón (**Analyze**) con el que se calculan las constantes de asociación y disociación, corrigiendo la desalineación entre los dos pasos debido al sistema. Alineando así el paso de asociación con el de disociación o con la línea base.



### Step correction:

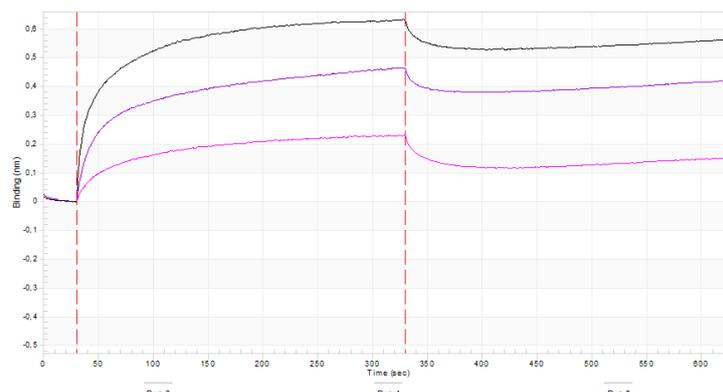
-**Start of association:** mueve el paso de asociación en el eje Y para alinear el inicio del paso de asociación con el final del paso de línea de base adyacente.

- **Start of dissociation:** mueve el paso de disociación en el eje Y para alinear el final del paso de asociación adyacente con el inicio del paso de disociación.

El **modelo Fitting 1:1** ajusta un analito en solución que se une a un sitio de unión en la superficie, y tiene dos modos distintos:

- **Fitting-Local:** Calcula las constantes cinéticas para cada curva, en función de los pasos que se analizan (solo asociación, solo disociación o ambos).
- **Fitting-Global:** El análisis incluye todos los datos de las curvas de unión del grupo y se generan constantes cinéticas comunes, en función del modelo seleccionado (solo asociación, solo disociación o ambos).

Seleccionar **Start of association, Start of dissociation y Fitting-Local** y pulsar **Analyze** y el programa nos devuelve una gráfica ya con la desalineación corregida.



En la tabla inferior aparecerán las constantes de afinidad, asociación y disociación con sus respectivos errores.

Index	Sample ID	Conc. (nM)	Información	KD (M)	ka (1/Ms)	ka Error	kd (1/s)	kd Error	Rmax	Rmax Error	Equilibrium
1	blank	0									
2	2.5 ug/mL	16.67		3.56e-9	1.235e5	3.467e2	4.398e-4	2.539e-6	4.46	0.01916	3.675
3	5 ug/mL	33.33		3.56e-9	1.235e5	3.467e2	4.398e-4	2.539e-6	4.577	0.01420	4.135
4	10 ug/mL	66.67		3.56e-9	1.235e5	3.467e2	4.398e-4	2.539e-6	4.622	0.007895	4.387
5	1.25 ug/mL	8.333		3.56e-9	1.235e5	3.467e2	4.398e-4	2.539e-6	4.128	0.02068	2.892

- **Exportar datos a Excel:**

1. Hacer *click* con el botón derecho del ratón sobre la gráfica de **Analysis Data** y seleccionar **export data**.

2. Se abre una ventana en la que hay que seleccionar:

- a. **Export: Text/Data**

- b. **Export destination: File/Browse.** (Para poner nombre al archivo y seleccionar la carpeta de destino).

3. **Export.**

4. En el apartado **select subsets and points** es posible seleccionar todos los datos, pero también los *runs* que se quiera analizar. Para seleccionar más de un run, se mantiene pulsado **ctrl** mientras se **seleccionan con el ratón**.

5. En el apartado **export what** seleccionar **data and labels**.

6. En el apartado **export style** seleccionar **table**.

- a. Seleccionar **points/subsets**.

7. En el apartado **numeric precision** seleccionar **current precision**.

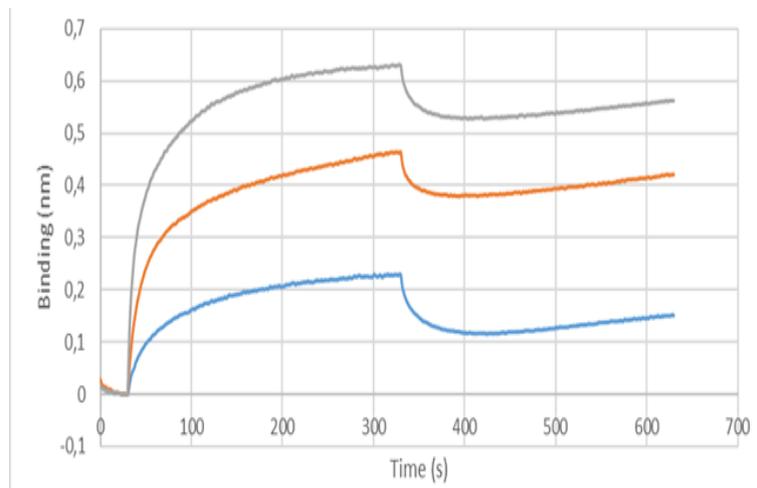
8. **Export.**

Estos datos quedarán guardados como archivo del **bloc de notas**.

El siguiente paso es abrir la aplicación bloc de notas, seleccionar todos los datos, copiarlos y pegarlos en un **Word**.

Una vez en Word, en la pestaña de inicio, seleccionar **mostrar todo**, lo que permite ver los signos de puntuación y espacios que separan las columnas. Seguidamente **seleccionar reemplazar**, en el apartado buscar se debe poner **coma y espacio (, )** y en reemplazar seleccionar **tabulador** con el siguiente código (**^t**) para que las columnas queden correctamente separadas después en Excel.

Finalmente copiar los datos del Word y transferirlos a Excel. Cada run ocupará dos columnas, la primera recoge los datos de tiempo en segundos y la segunda los datos de *binding* en nanómetros. Con ello ya es posible realizar una gráfica de dispersión de datos (para obtener unas gráficas similares a la del programa, seleccionar cambiar tipo de gráfico a dispersión con líneas suavizadas).



## **ANEXO I: PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LÍPIDOS**

Los lípidos que se inmovilizan en las puntas del biosensor de aminopropilsilano (APS) son vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) con una concentración de 0,5 g/L, que se preparan de la siguiente manera:

1.- Secar bajo corriente de nitrógeno la cantidad de lípidos necesaria para preparar 150  $\mu$ L de una solución final a una concentración de 4 g/L. Mantener la película lipídica seca a vacío durante 1h. Si se utiliza un *SpeedVac* para el secado, no es necesario el vacío.

2.- Añadir 150  $\mu$ L de buffer SLB filtrado.

3.- Agitar en el vórtex durante 5 minutos, la solución quedará de un color blanquecino.

4.- Sonicar la solución hasta que se torne transparente (utilizando un bajo nivel de agua se conseguirá una sonicación más potente).

5.- Si no va a utilizarse el mismo día, preparar alícuotas de 20 $\mu$ L y conservarlas a – 20°C hasta que se utilicen.

6.- Para su utilización para hacer la bicapa en la punta de aminopropilsilano (APS), se deben diluir a una concentración final de 0,5 g/L con buffer SLB. (Si se va a utilizar una alícuota congelada, sonicar de nuevo antes de diluir).

**El buffer que se utiliza para el equilibrado y lavado en la inmovilización de lípidos es el SLB:**

- **50mM Tris pH:7,5**
- **150mM KCL**
- **Extras requeridos para la preparación (ej.: CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O descalcificada...)**

## **ANEXO II: PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS**

La proteína para analizar se prepara para conseguir una concentración final de 0,5-5 $\mu$ M, en función de la proteína.

Es recomendable tener un stock de 10 $\mu$ M a partir del cual se prepararán las disoluciones necesarias según la concentración a la que se quiera ensayar.

El buffer que se utiliza en el equilibrado y lavado para proteínas es en el mismo con el que se realicen las disoluciones, adecuándose así a las condiciones específicas de estabilidad de cada proteína.