

**PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN DE BLITZ
PARA ENSAYOS DE INTERFEROMETRÍA
CON BIOSENSORES NI-NTA**

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 PROTEÍNAS.
- ANEXO II: REGENERACIÓN DE BIOSENSORES NI-NTA.

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 Blitz, así como las operaciones necesarias para su correcto mantenimiento.

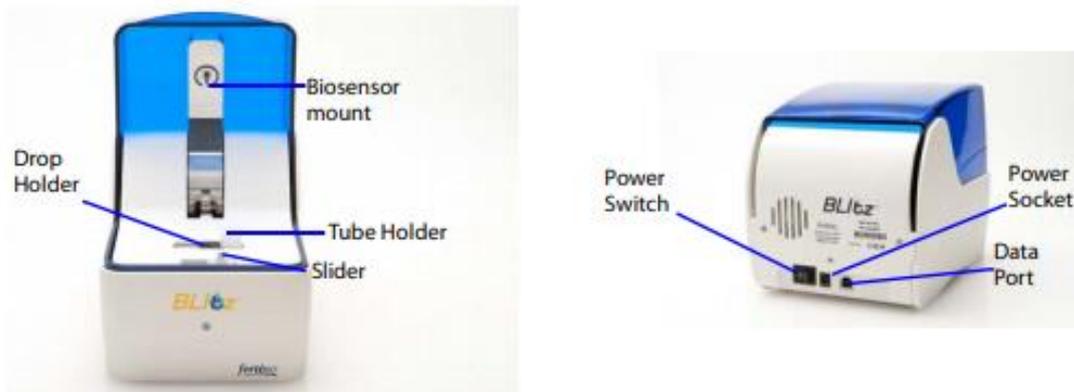
REFERENCIAS

- Sultana, A., and Lee, J.E. 2015. Measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions by bilayer 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.
- Ni-NTA biosensor kinetic assays technical note.
- BLitz Getting Started. Center for macromolecule interactions. https://cmi.hms.harvard.edu/files/cmi/files/cmi_blitz_getting_started.pdf

GENERAL

❖ Descripción del equipo:

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



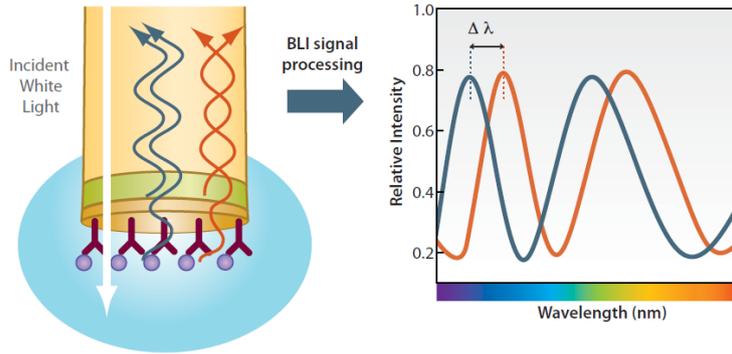
Estos ensayos de unión ocurren en un biosensor fabricado con una matriz biocompatible, uniforme, no desnaturizante, y que minimiza las uniones inespecíficas. Siendo así detectadas únicamente las moléculas que se unen directamente a la superficie del sensor.

❖ 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).

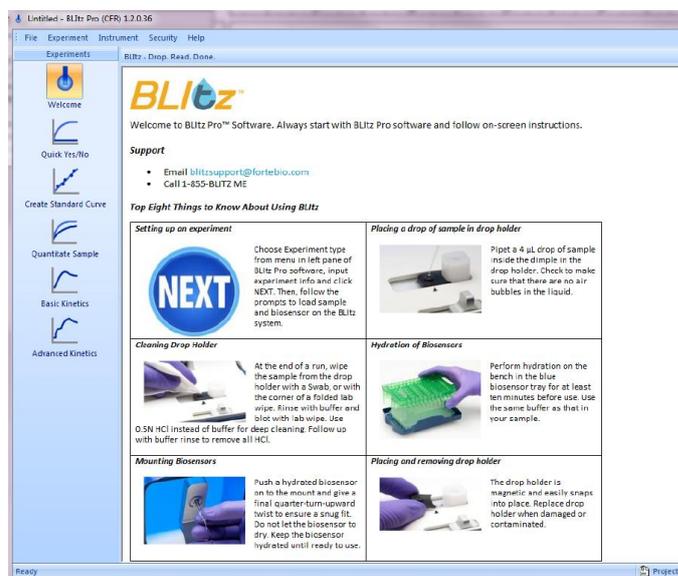
Esta técnica permite determinar afinidades de unión en equilibrio (K_D), así como tasas de asociación y disociación (k_a/k_d) de manera cuantitativa.

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 encuentra la proteína. 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.)



Basic Kinetics

Have you hydrated your biosensor?

Hydrate biosensors prior to use for a minimum of 10 minutes. Hydration time (min):

 Hydrate Biosensor

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.

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*.

Enter your Experiment Settings

Experiment Name:

Description:

 New Experiment

Enter your Run Settings

Sample ID: <input type="text"/>	Concentration: <input type="text"/> µg/ml
Biosensor type: APS (Aminopropylsilane) ▾	Molecular Weight: <input type="text"/> kD <input type="button" value="Calc"/>
Shaker: Enable ▾	Molar Concentration: <input type="text"/> nM

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

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

Run duration:
> 10:30

NEXT
Run 1

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
Baseline	30	Tube
Association	300	Drop
Dissociation	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.

User Action Required

Step 1: Baseline
Open the cover.



User Action Required

Step 1: Baseline
Load the tube containing buffer.
Load a biosensor and close the cover.

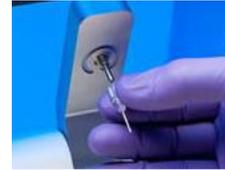


RUN 1 (Inmovilización de proteína):

1. Pipetear en un tubo *ependorf* de 0,5 ml 400 µl de buffer en el que se encuentra la proteína 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 μ l de la muestra (proteína), 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 proteína con el mismo *buffer* utilizado para el equilibrado.

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

RUN 2 (Incorporación del ligando):

1. Pipetear en un nuevo tubo *ependorf* de 0,5 ml 400 μ l de *buffer* en el que se encuentre el ligando.



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

El lavado del *drop holder* puede realizarse con **detergente** y un posterior enjuague con agua destilada, o simplemente con agua destilada, en función del experimento.

3. De nuevo, pipetear, sin llegar al segundo tope para evitar la aparición de burbujas, en el *drop holder* 4,5 μ l de la muestra de ligando, 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 en el *eppendorf* con el mismo buffer con el que se ha realizado el equilibrado.

❖ 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:

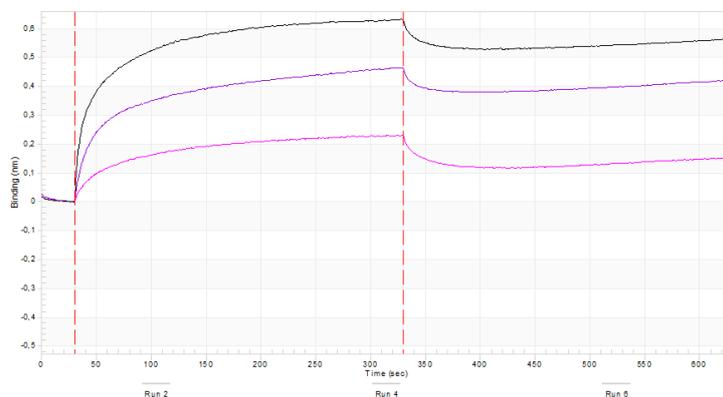
-**Start of association:** mueve el paso de asociación en el eje Y para alinear el inicio del paso de asociación con el final del paso de línea de base adyacente.

- **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**.

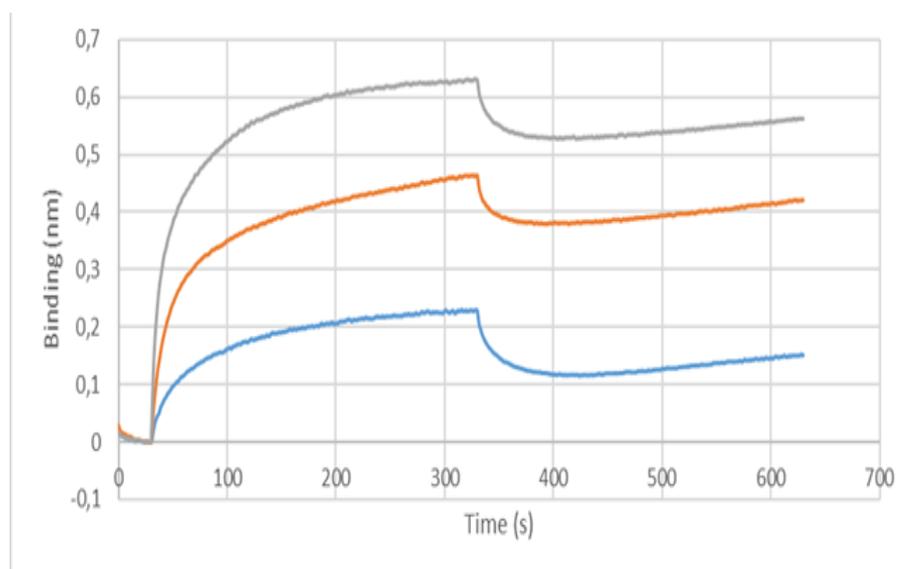
8. **Export**.

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 PROTEÍNAS

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

Es recomendable tener un stock de 10 μ 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.

ANEXO II: REGENERACIÓN DE BIOSENSORES NI-NTA

- Buffers necesarios:

- BUFFER 1 “REGENERACIÓN”: Glicina 10 mM pH 1,7.
- BUFFER 2 “NEUTRALIZACIÓN”: PBS 1X + 0,02% Tween20 + 0,1%BSA+ 0,05% Azida. pH 7,4.
- BUFFER 3 “RECARGA Ni²⁺”: NiCl₂ 10 Mm.

Los buffer se encuentran en refrigeración, ya alicuotados. Para la regeneración de las puntas, tomar un tubo eppendorf con cada buffer y seguir las instrucciones que se indican a continuación:

- Procedimiento:

1. Introducir biosensor en tubo *Eppendorf* con Buffer 1 durante 5 segundos.
2. Introducir biosensor en tubo *Eppendorf* con Buffer 2 durante 5 segundos.

Repetir los pasos 1 y 2 tres veces.

3. Introducir biosensor en tubo *Eppendorf* con Buffer 3 durante 1 minuto.
4. Dejar secar.