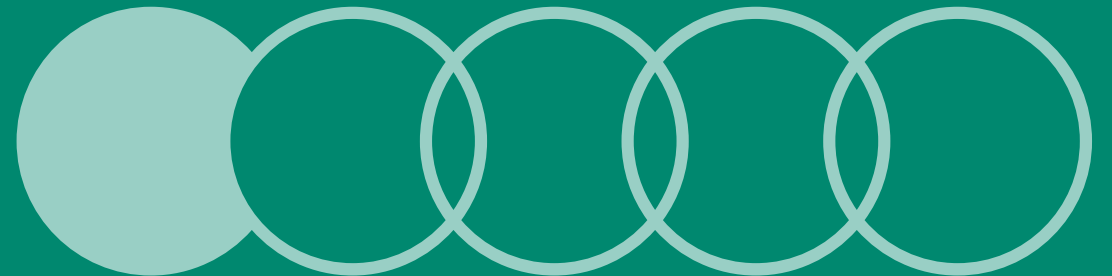
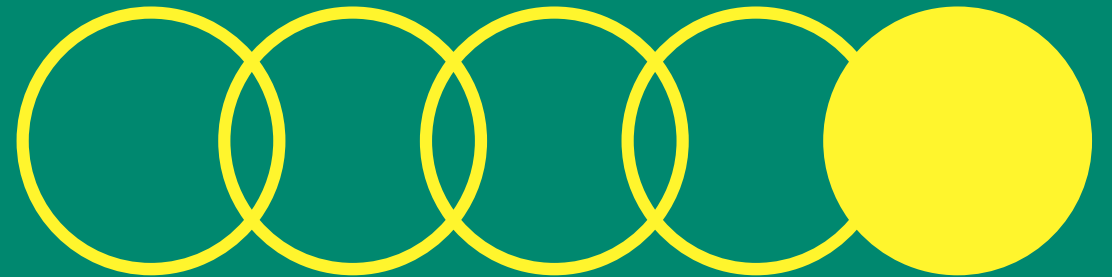
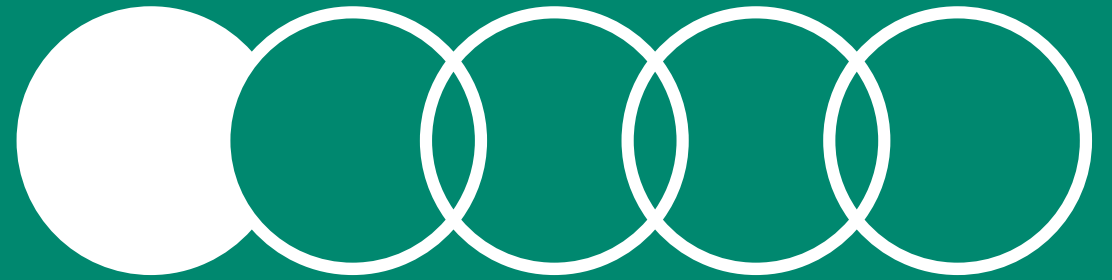


# Cytiva Webinar

まもなく開始します。  
もうしばらくお待ちください。

※開始時刻から30秒ほど遅れての配信となります。

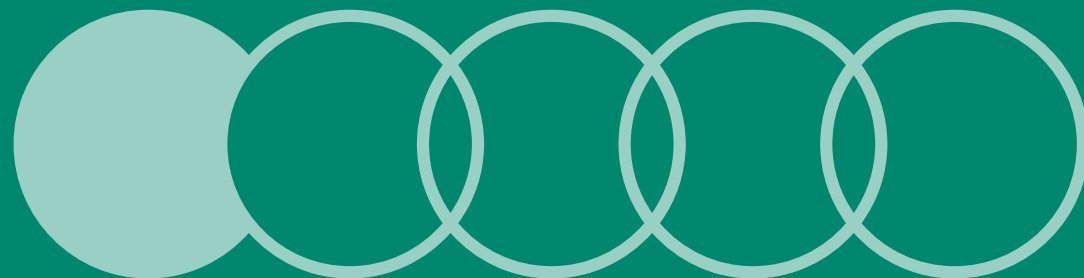
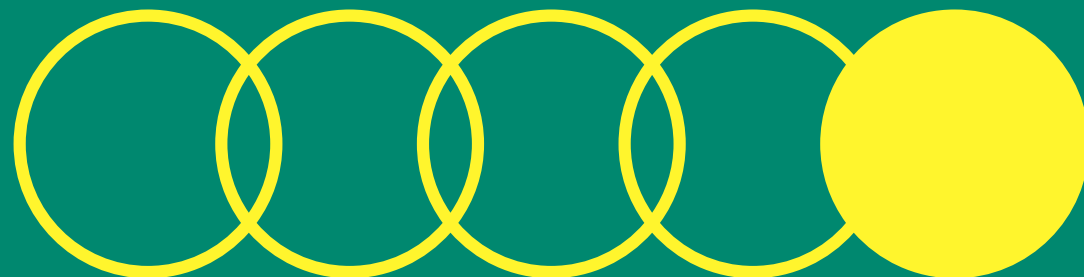
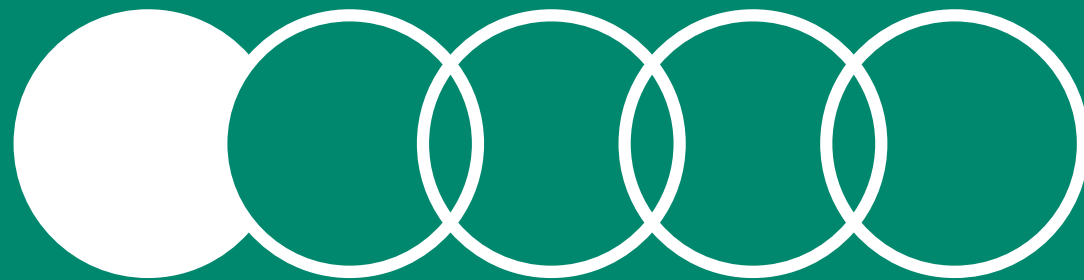


## 音声につきまして

- 視聴者の皆様の音声は講師、他の参加者には届きません。

## ご質問につきまして

- 画面右上のはてなマークをクリックして現れる画面に質問内容を入力してください。
- 講演後まとめて講師より回答いたします。
- 入力いただいたご質問内容、質問者のお名前は、主催者にのみ公開されます。





# Cytiva Webinar

Biacore フィットリング計算の基礎と勘所①

Gen Takata  
May 28 2021





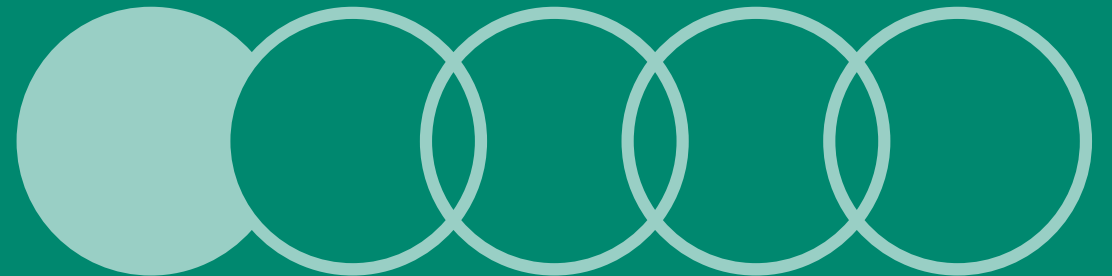
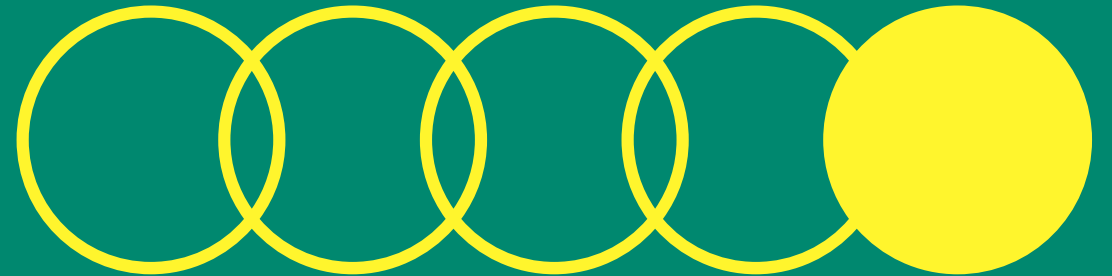
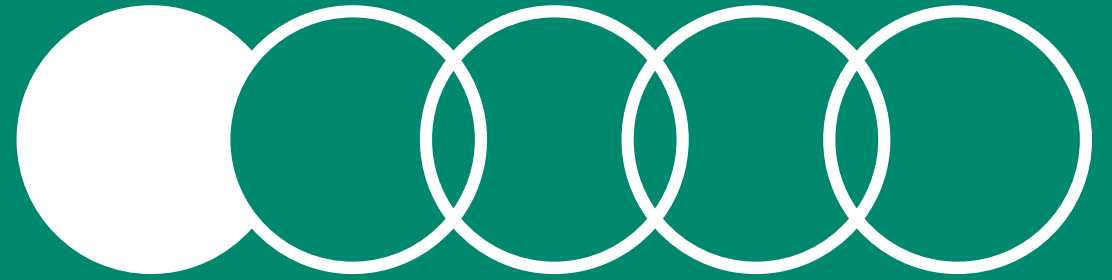
## ①本日の内容

1. Fittingって何やっているの？
2. Fittingに適切なデータとは
3. Fitting設定の勘所

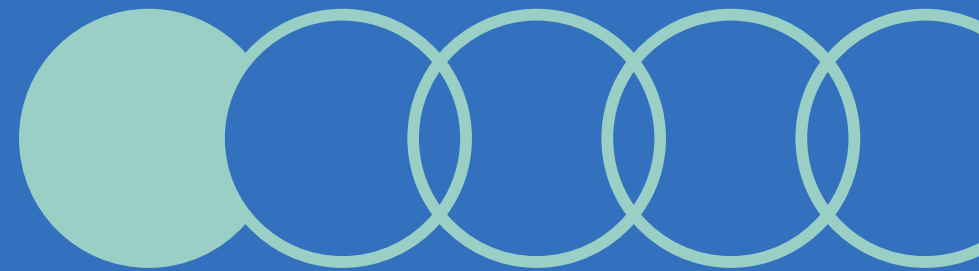
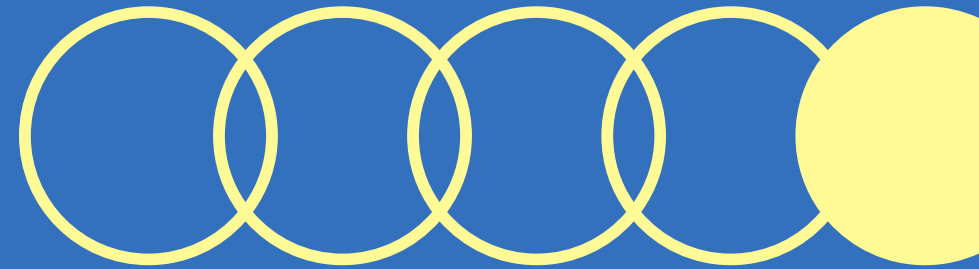
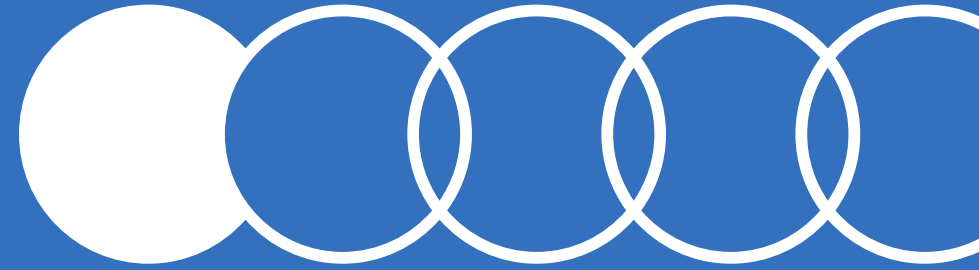
## ②次回の内容

4. Fitting結果の信頼性評価
5. あるあるケーススタディ
6. フィッティングに関する応用編TIPs

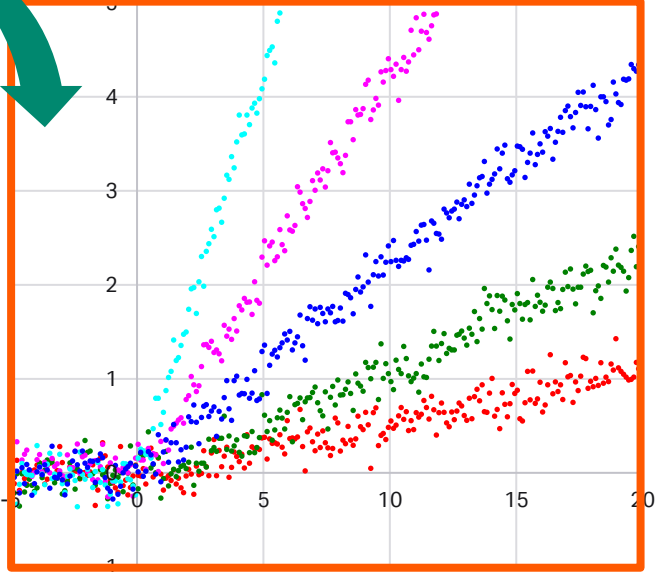
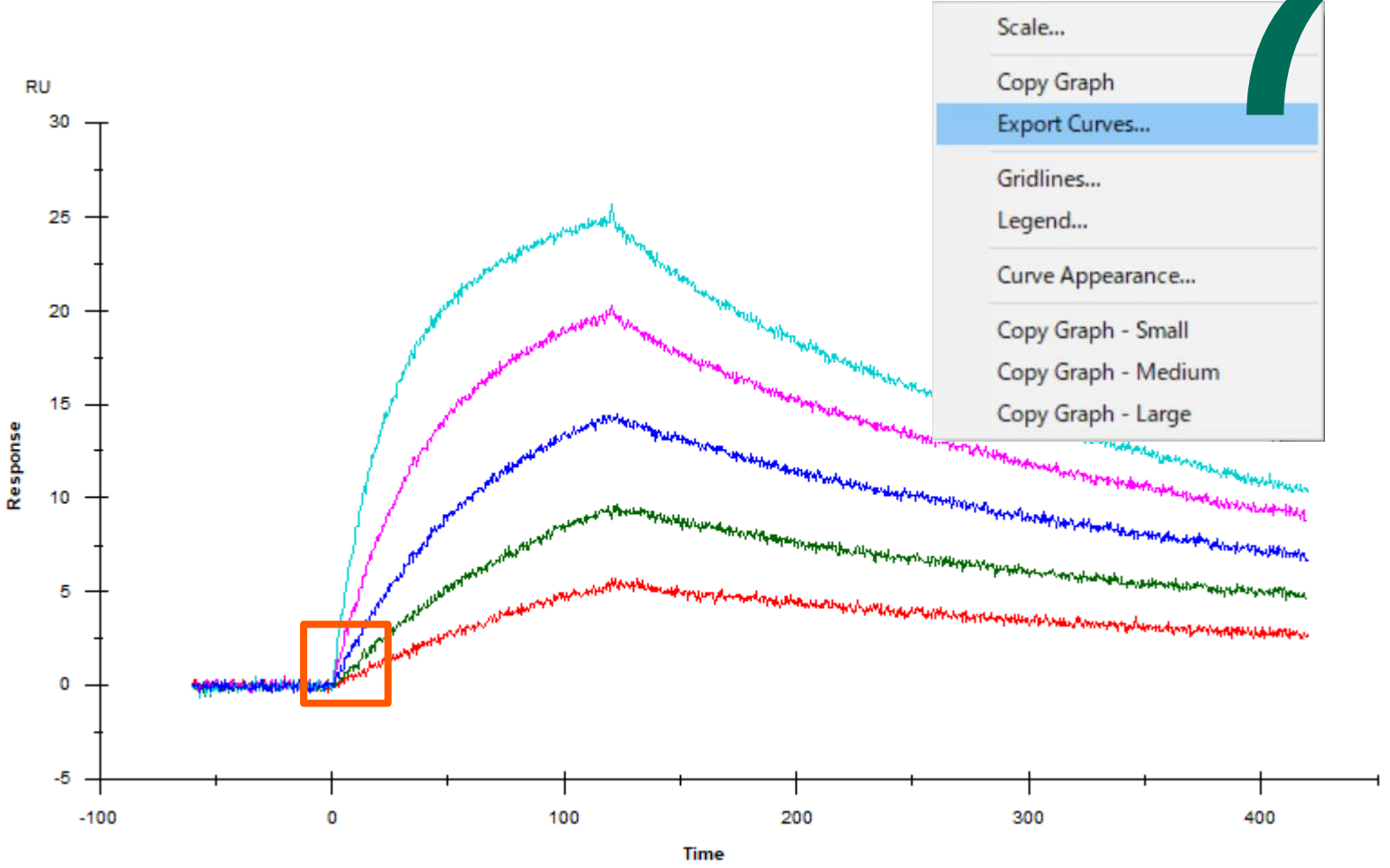
# 1. Fittingって何やっているの？



# Fitting 実演

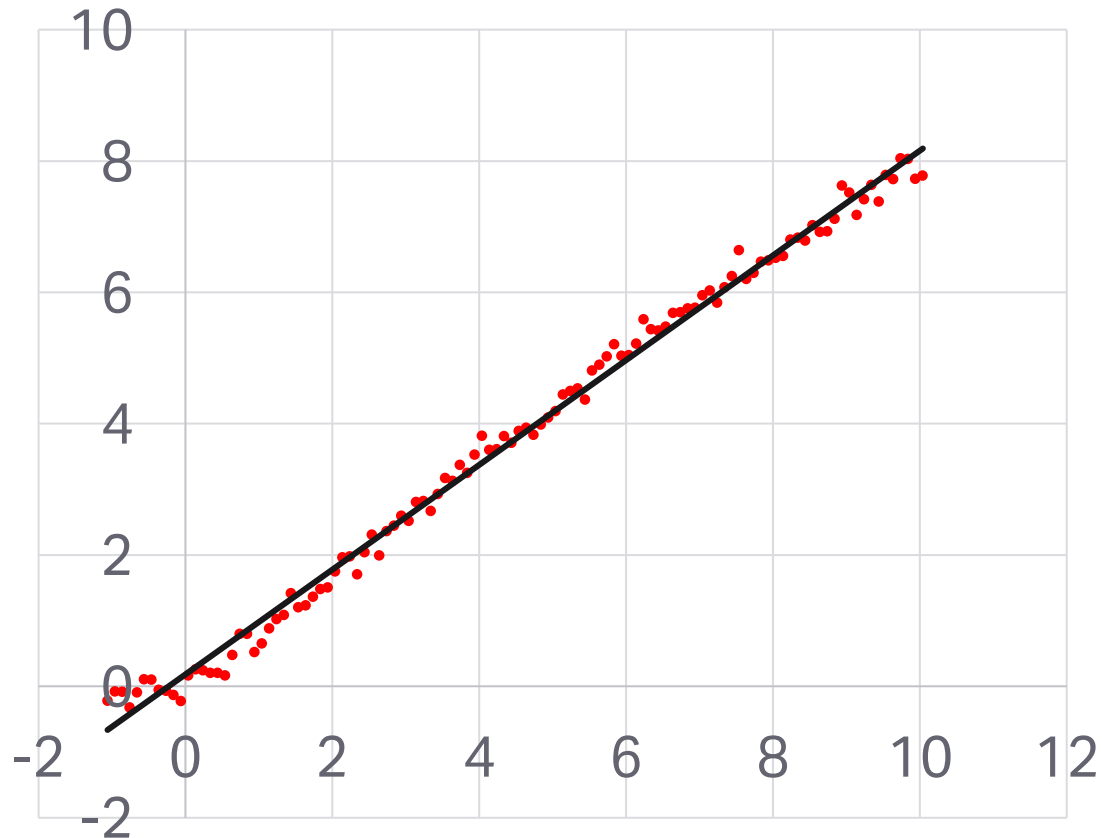


# センサーグラムは1～10Hzのデータの集まり



ExcelのScatter Plot  
による再描画

# BiacoreのFittingの前に、最小二乗近似法とは？

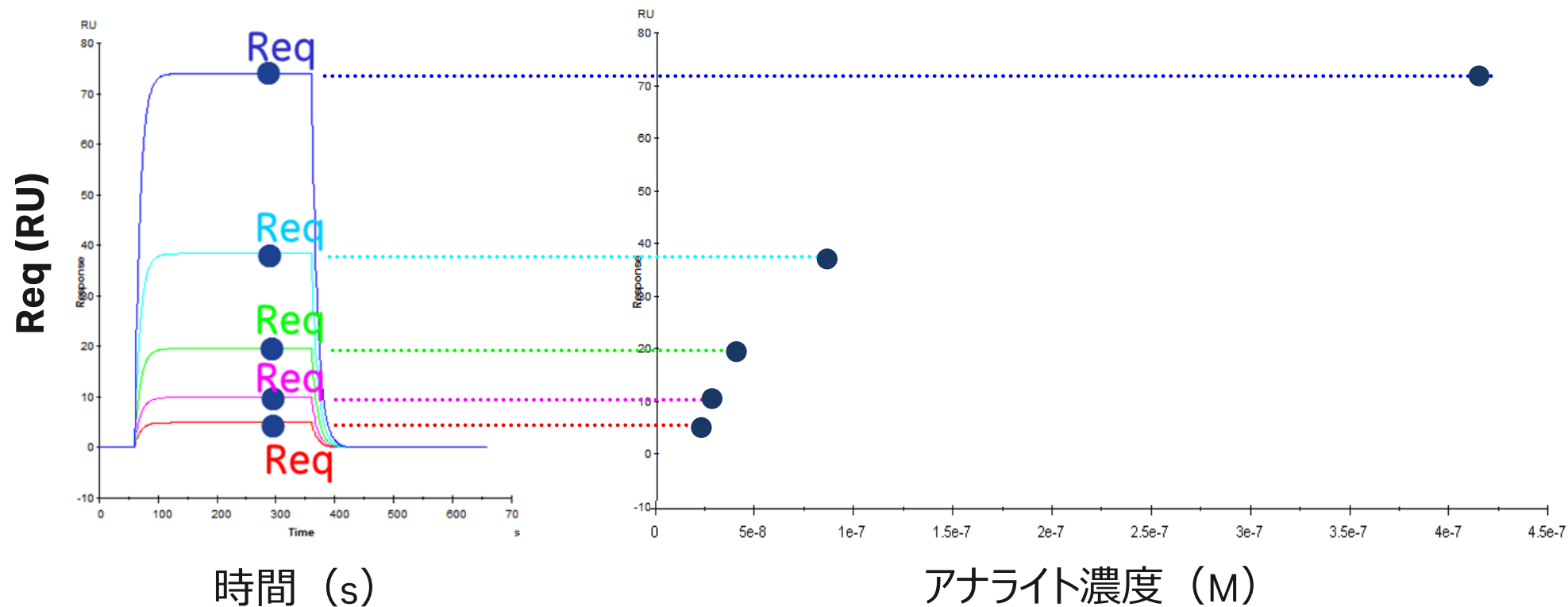


1次関数： $y=ax+b$ の場合

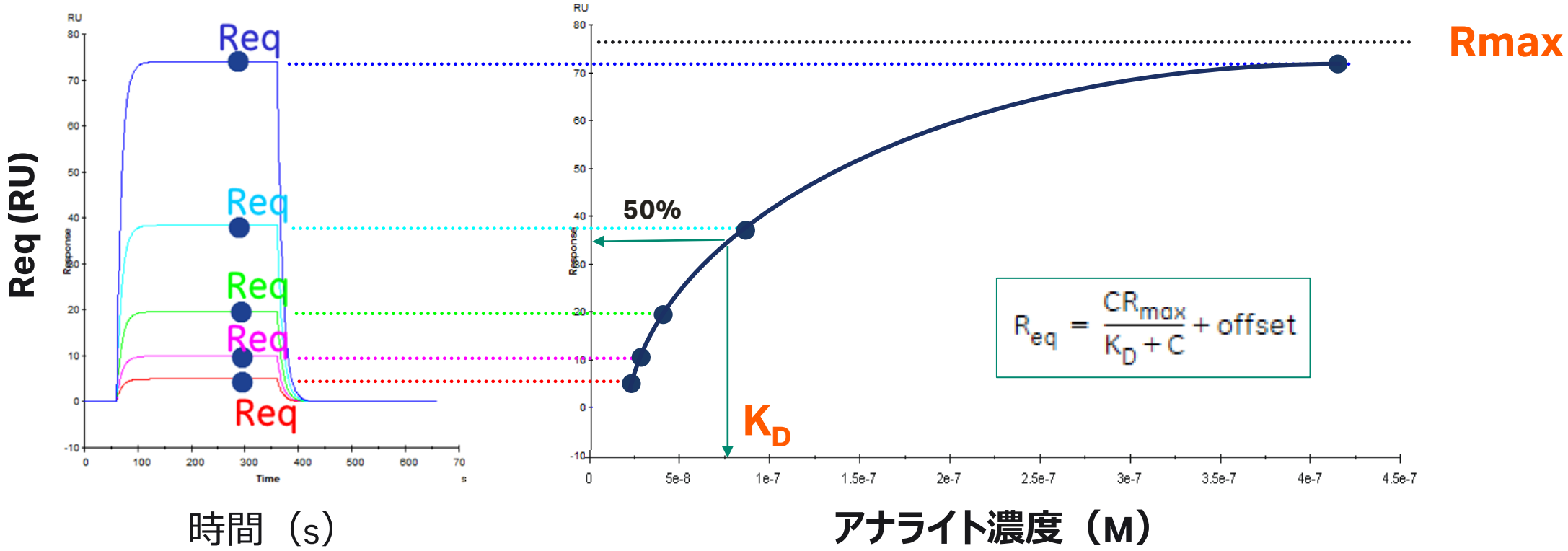
残差の二乗和  
(● と / の距離の総和)  
が最小になる変数 (a,b)  
を決定する方法。



# Affinity解析におけるFitting解析

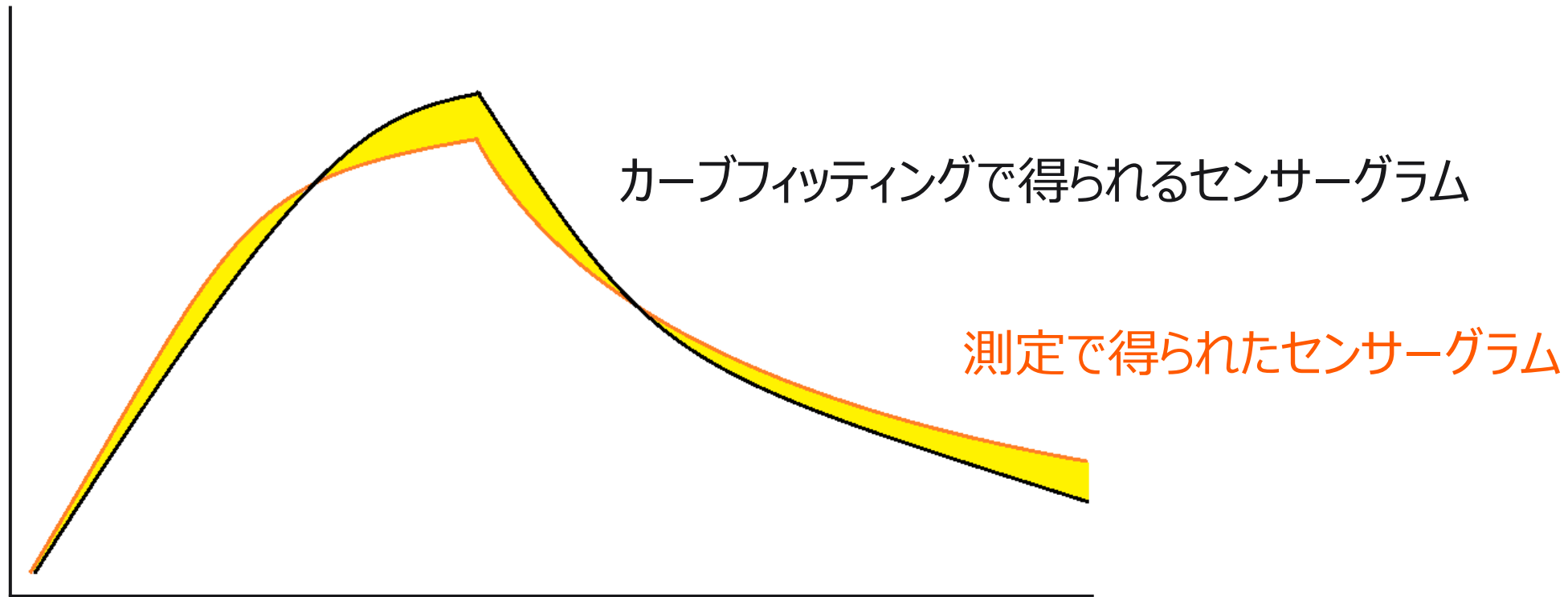


# Affinity解析におけるFitting解析（非線形最小二乗近似法）



**K<sub>D</sub> : 1/2 Rmax (RU)となるアナライต์濃度に相当**

# Kinetics解析におけるFitting解析（非線形最小二乗近似法）

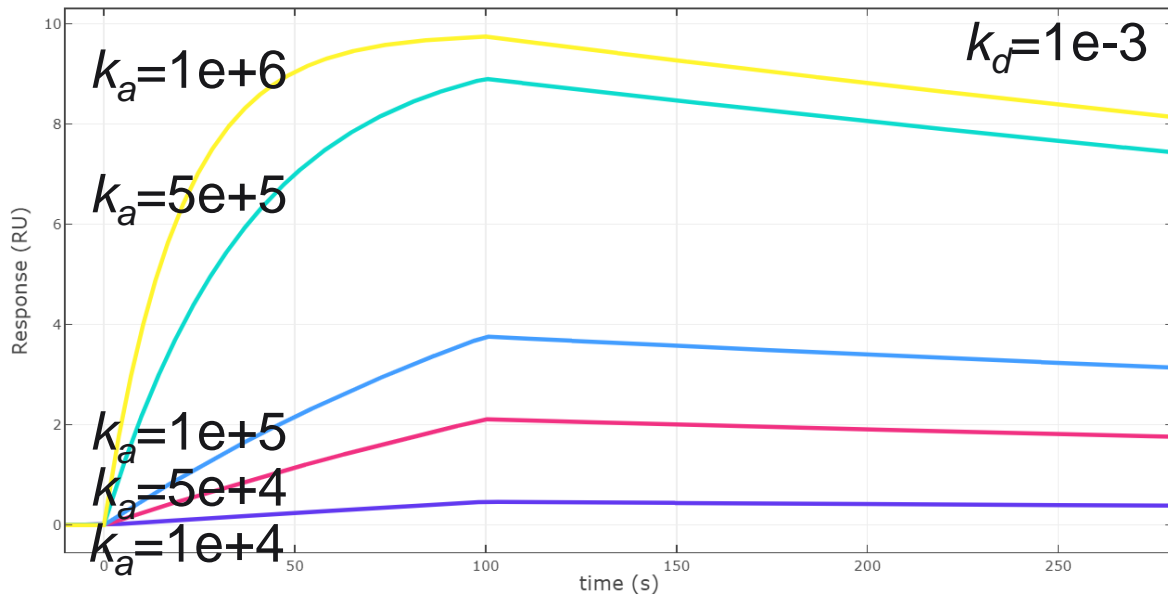


ずれの総和（残差の平方和） ⇒ 最も小さくなるように計算する

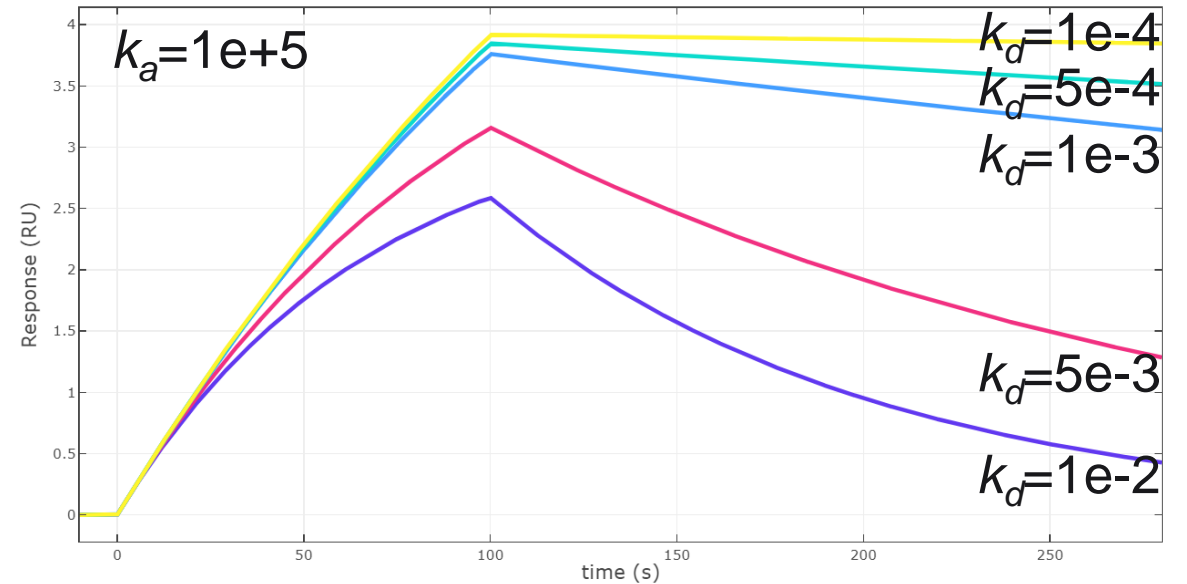
# Kinetics解析におけるFitting解析（非線形最小二乗近似法）

$$dR/dt = f(k_a, k_d, R_{max}, \text{conc}, \dots)$$

$k_a$  を変化させると



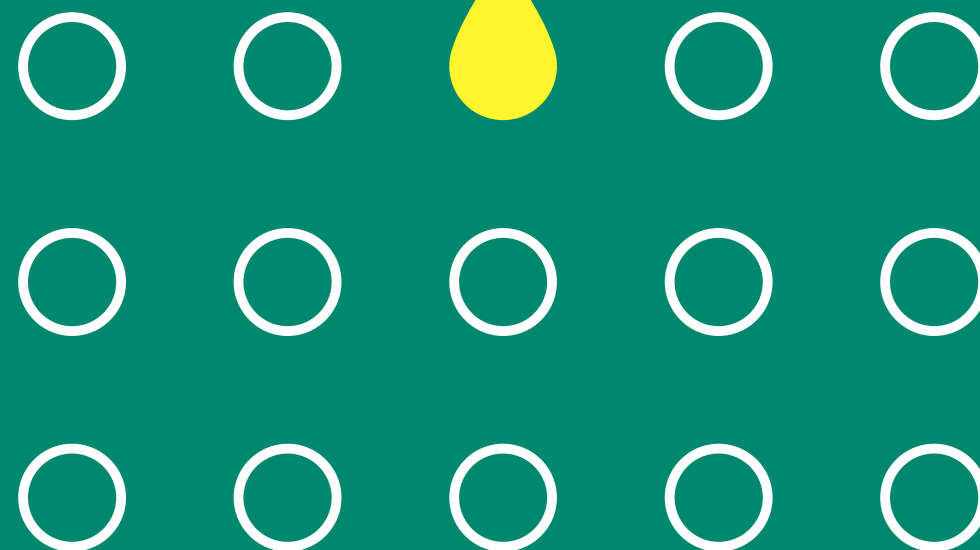
$k_d$  を変化させると



非線形最小二乗近似法を用いた解析

変数を代入してきながらセンサーグラムにFittingをさせる。

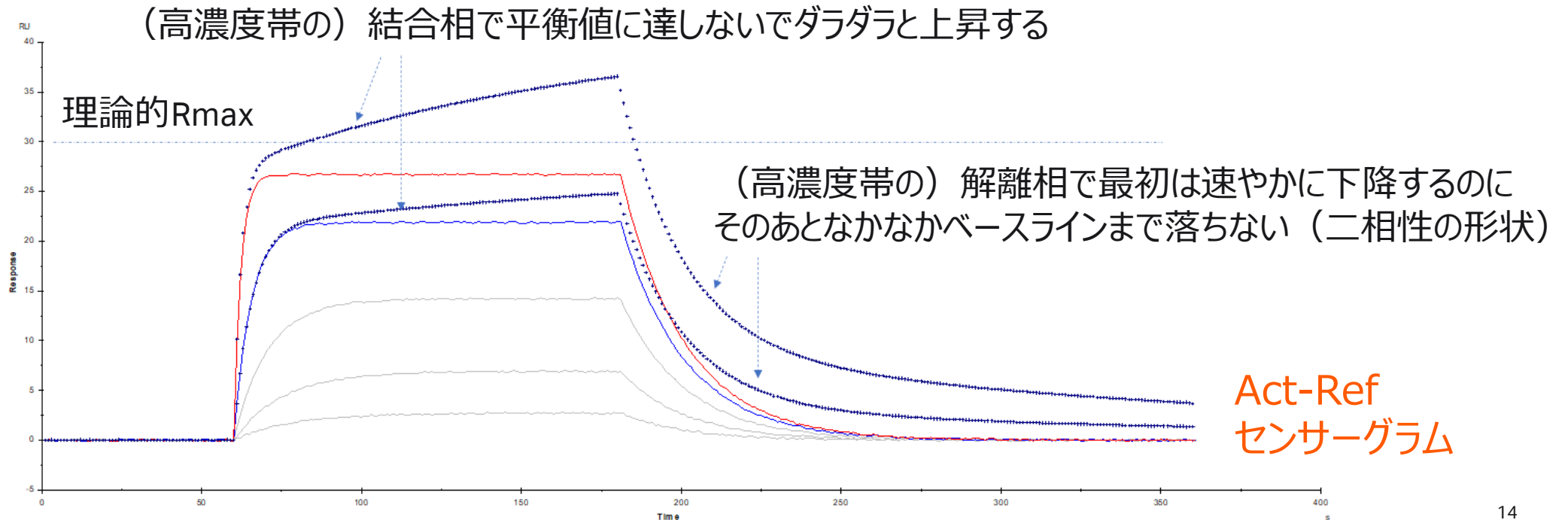
## 2. Fittingに適切なデータとは



# 【重要】Fitting計算をする前に... 最も重要な基本的条件

取得したセンサーグラムが“結合部位特異的”な相互作用を反映したものであること。

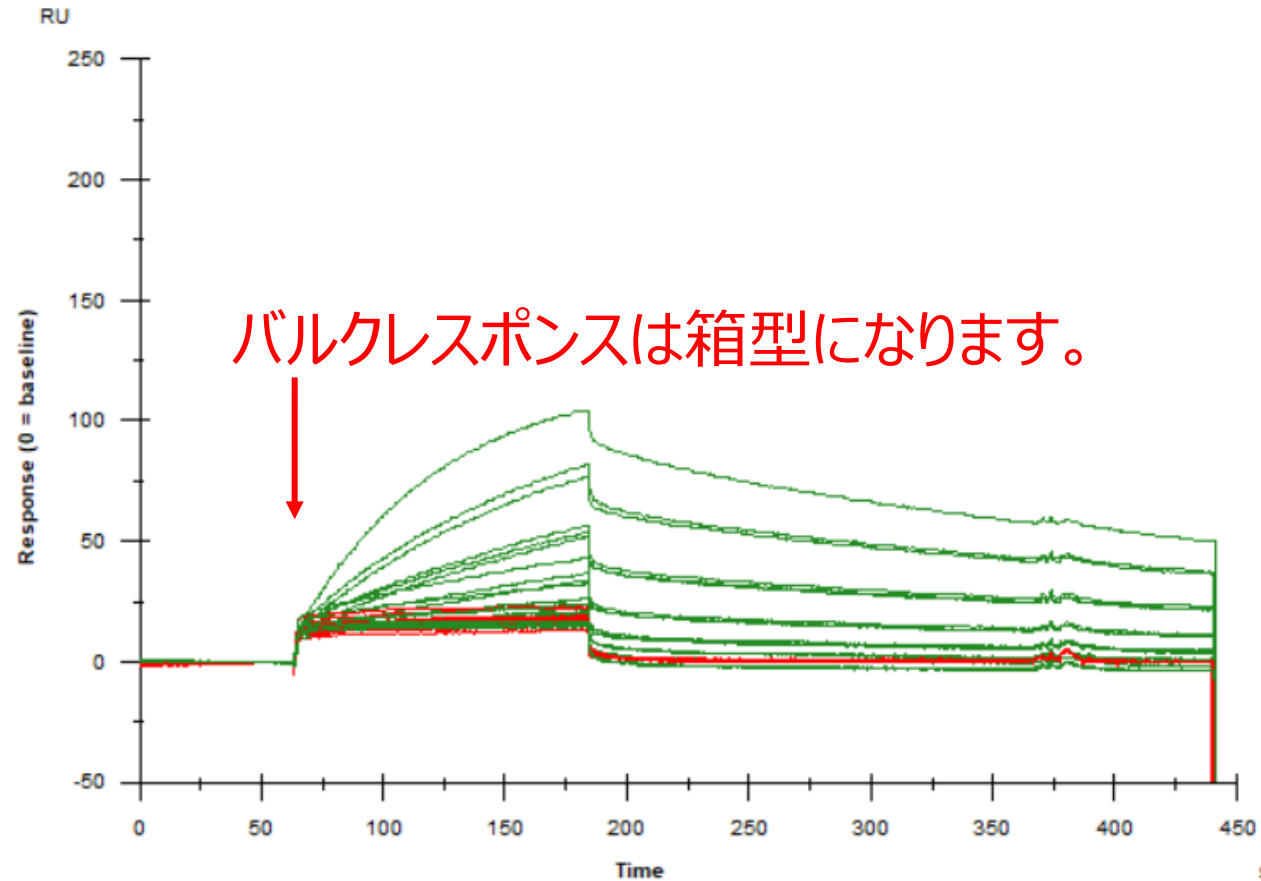
特異的結合と非特異的結合をセンサーグラム形状から直感的に見るコツ



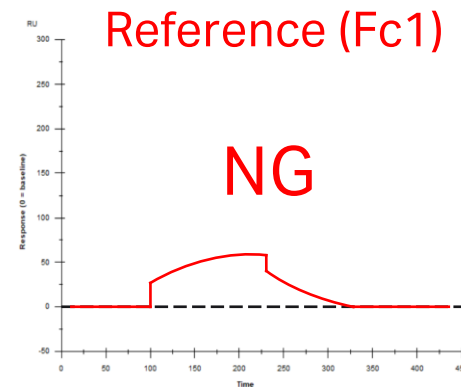
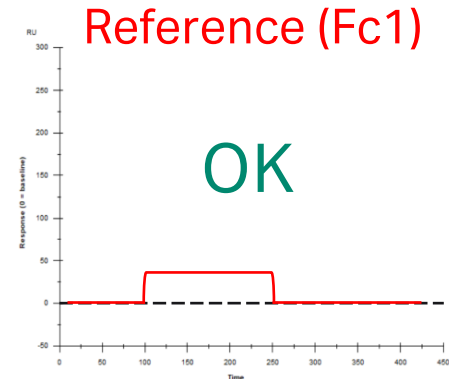
# 【重要】特異的結合の確認

最初にリファレンスセルに非特異的結合がないことを確認しましょう。

\* ) リファレンスセルの非特異的結合は正確に差し引くことはできない。

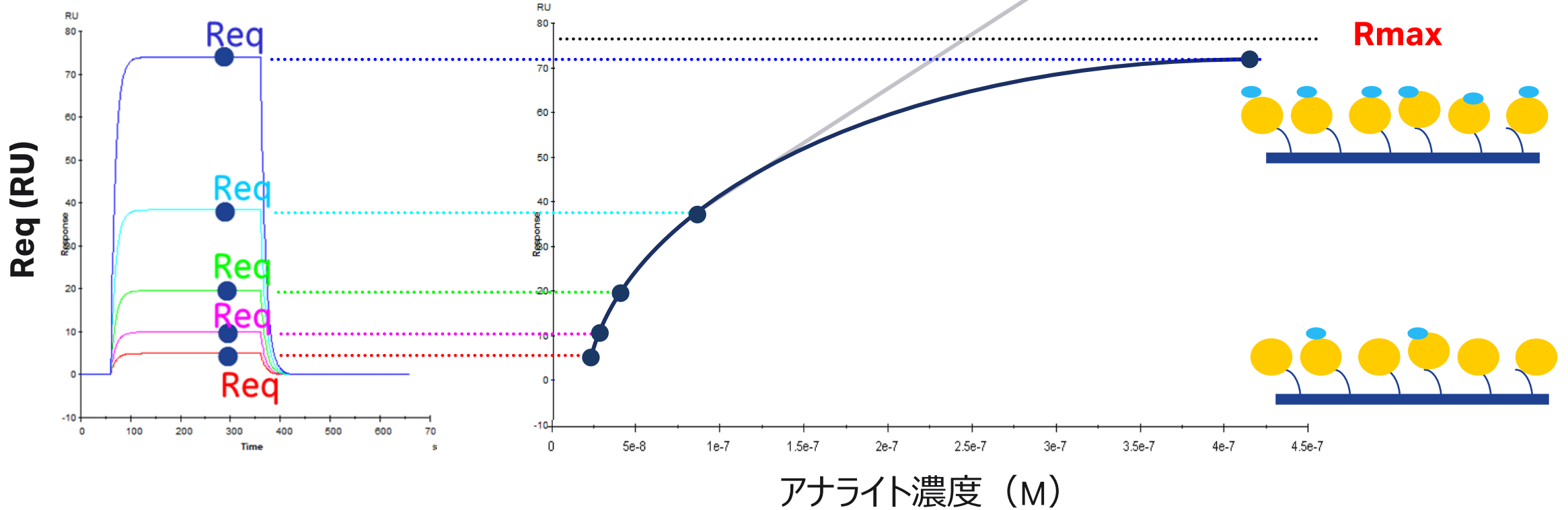


Reference (Fc1) / Active (Fc2)



# 【重要】結合部位特異的結合の確認

アナライต์濃度を上げていき、理論的Rmax以下でResponseが飽和することを確認。  
実測 Rmax  $\leq$  理論的 Rmax





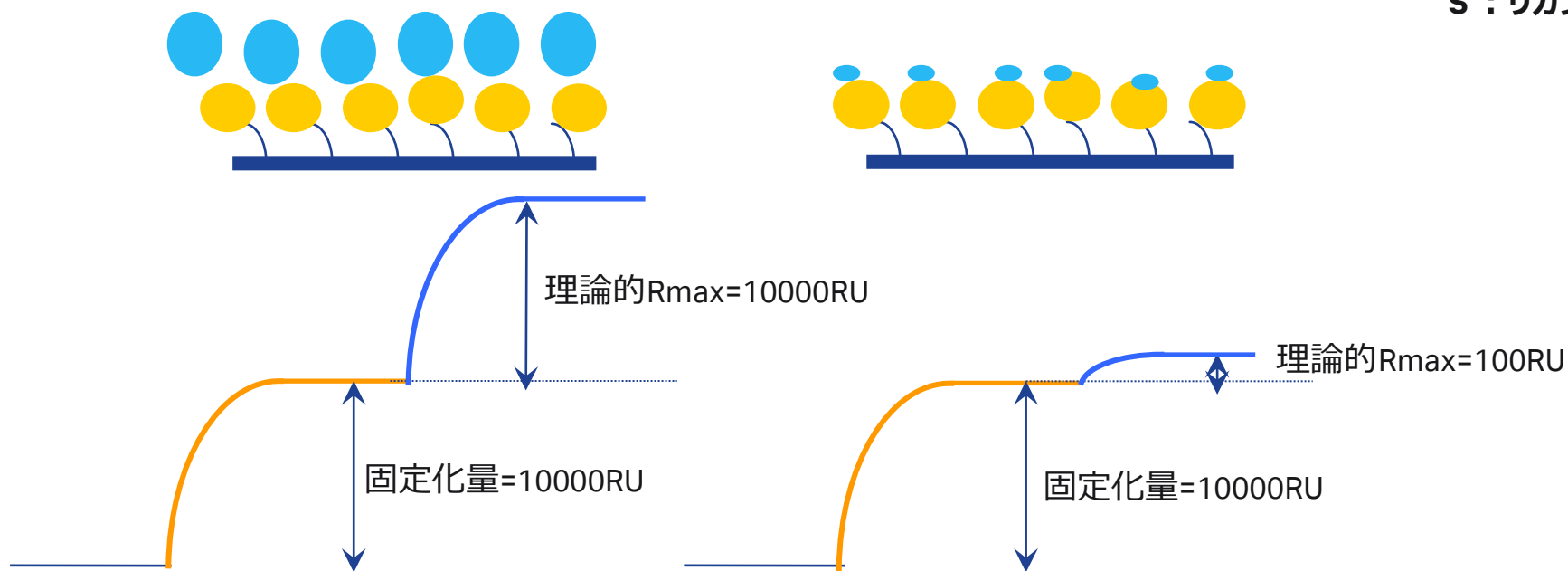
# 【Tips】Rmaxの算出方法

理論的Rmax : 固定化したリガンド分子にアナライトが全て結合した時に得られる理論上最大のレスポンス(RU)

実測Rmax : 実際にアナライトを添加した時、結合量が飽和するレスポンス(RU)

$$\text{最大結合量(Rmax)} = \frac{\text{アナライトの分子量(Da)}}{\text{リガンドの分子量(Da)}} \times \text{リガンドの固定化量(RU)} \times s$$

s : リガンドの価数



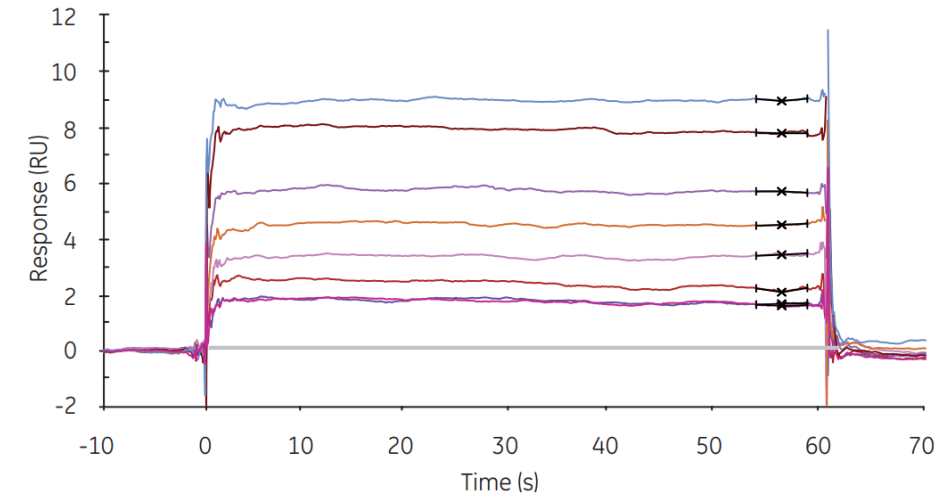
# Affinity解析に必要な情報およびセンサーグラム

## 【絶対】

1. 各濃度のセンサーグラムが平衡に達していること
2. 0濃度 (blank) を必ず測定

## 【理想】

1. Rmax近くからベースライン付近まで、センサーグラムを幅広く取得すること  
\* 濃度で調整
2. アナライト濃度は8段階以上ふる
3. 結合様式が1:1 bindingであると分かっていること
4. 解離時間を長く取る必要はない



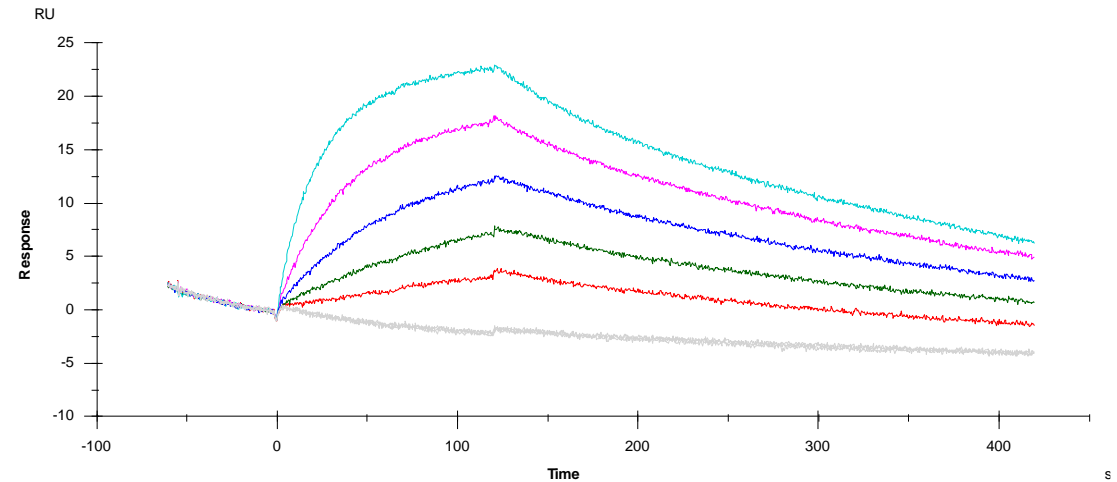
# Kinetics解析に必要な情報およびセンサーグラム

## 【絶対】

1. 結合様式が明らかであること
2. 0濃度（blank）を必ず測定
3. リガンド固定化量を下げて、アナライトを高流速で流すこと（30  $\mu\text{l}/\text{min}.$ ）

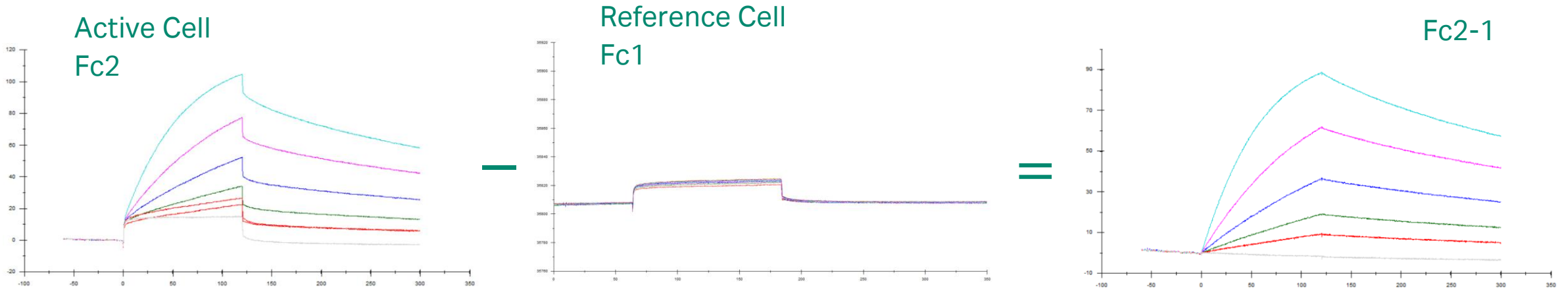
## 【理想】

1. Rmax近くからベースライン付近まで、センサーグラムを幅広く取得すること  
\* 濃度と添加時間で調整
2. アナライト濃度は5段階以上ふる
3. 解離はトップから10～15%程度は落ちるように解離時間を設定
4. 結合相（少なくとも高濃度帯では）では丸みを帯びた形状を示すこと  
\* 絶対の 3. を守ることで丸み帯びた形状が得られます

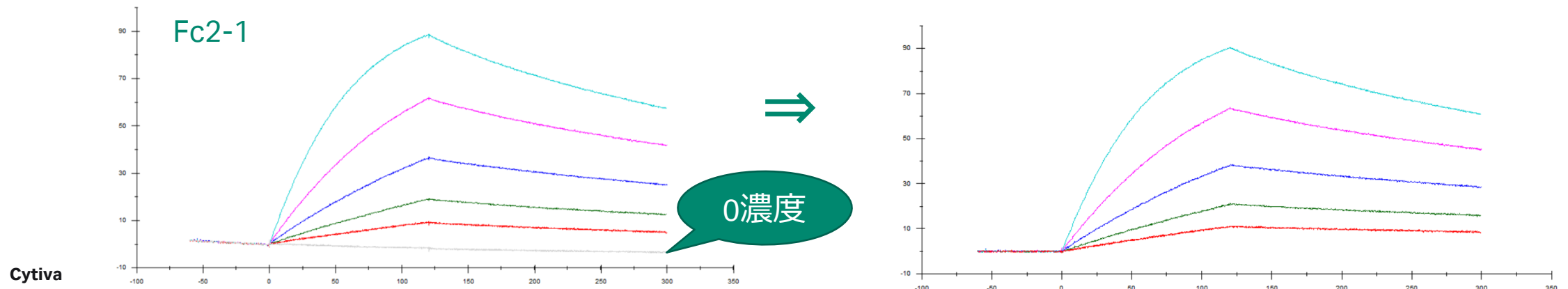


# 生データから解析対象データへの変換 -ダブルサブトラクションの考え方-

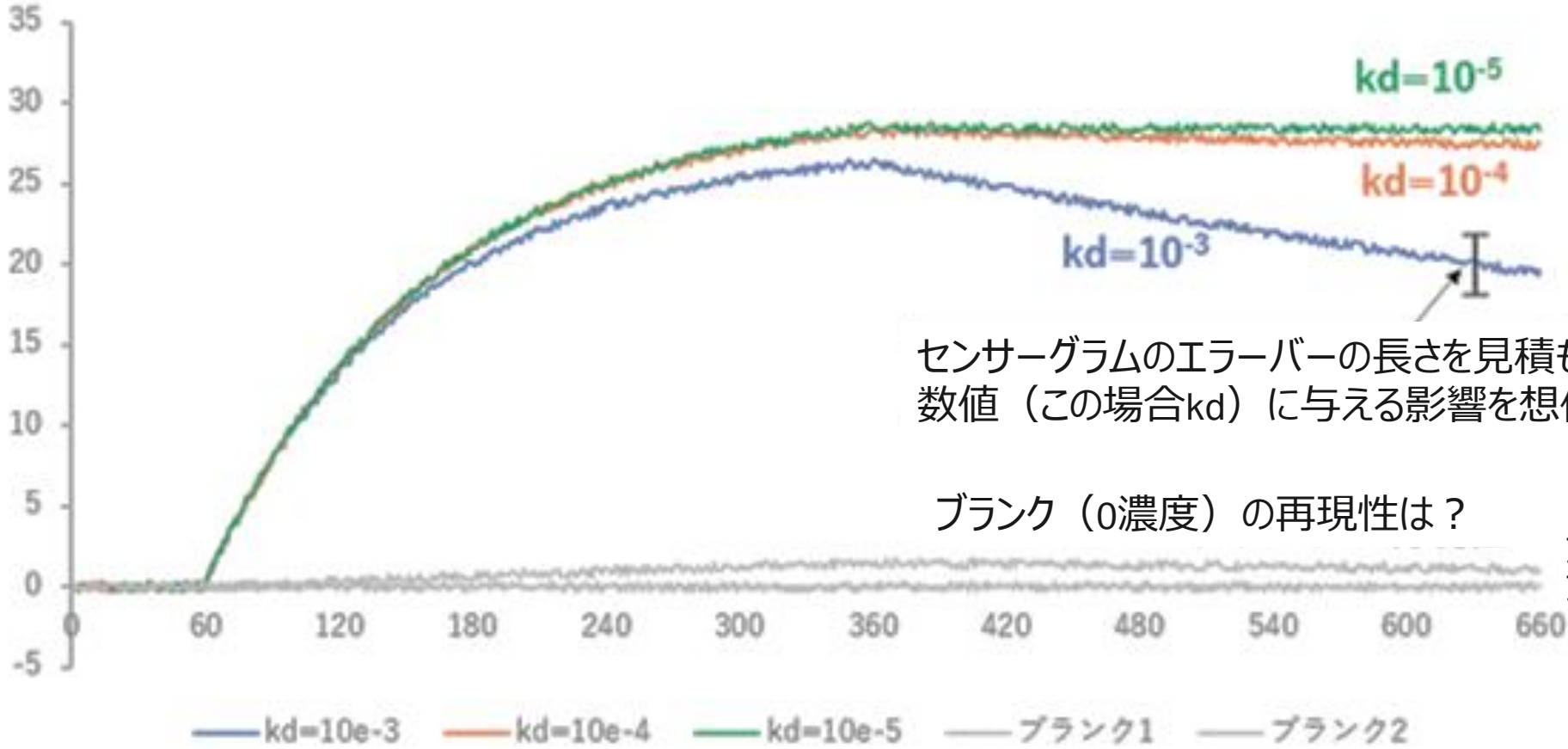
① リガンドをキャプチャー（固定化していない）セルによる溶液効果の補正。



② アナライト 0 濃度によるドリフトの補正



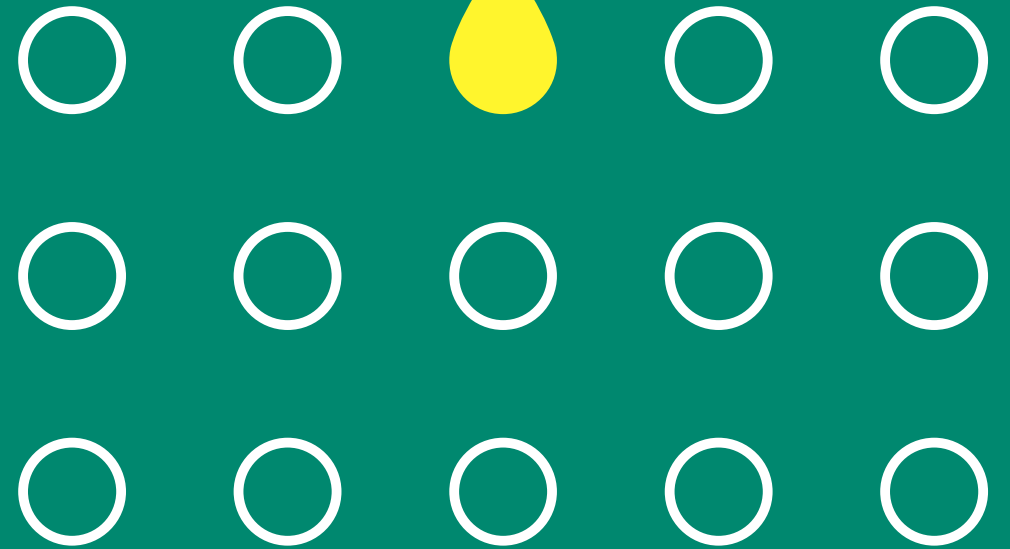
# ブランクデータやn=2でとっているデータの再現性確認と ka、kd値に与える誤差



センサーグラムのエラーバーの長さを見積もって、  
数値（この場合kd）に与える影響を想像してみる

ブランク（0濃度）の再現性は？

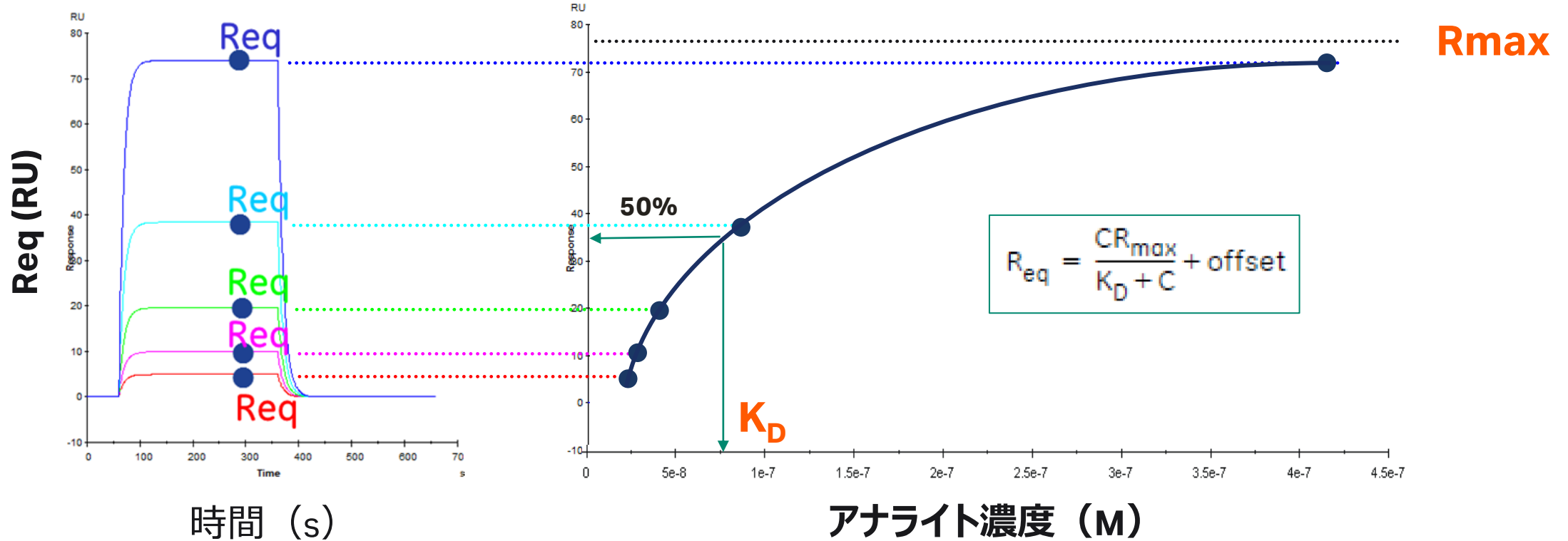
### 3. Fitting設定の勘所



# Affinity解析の反応モデル

## Steady State Affinity

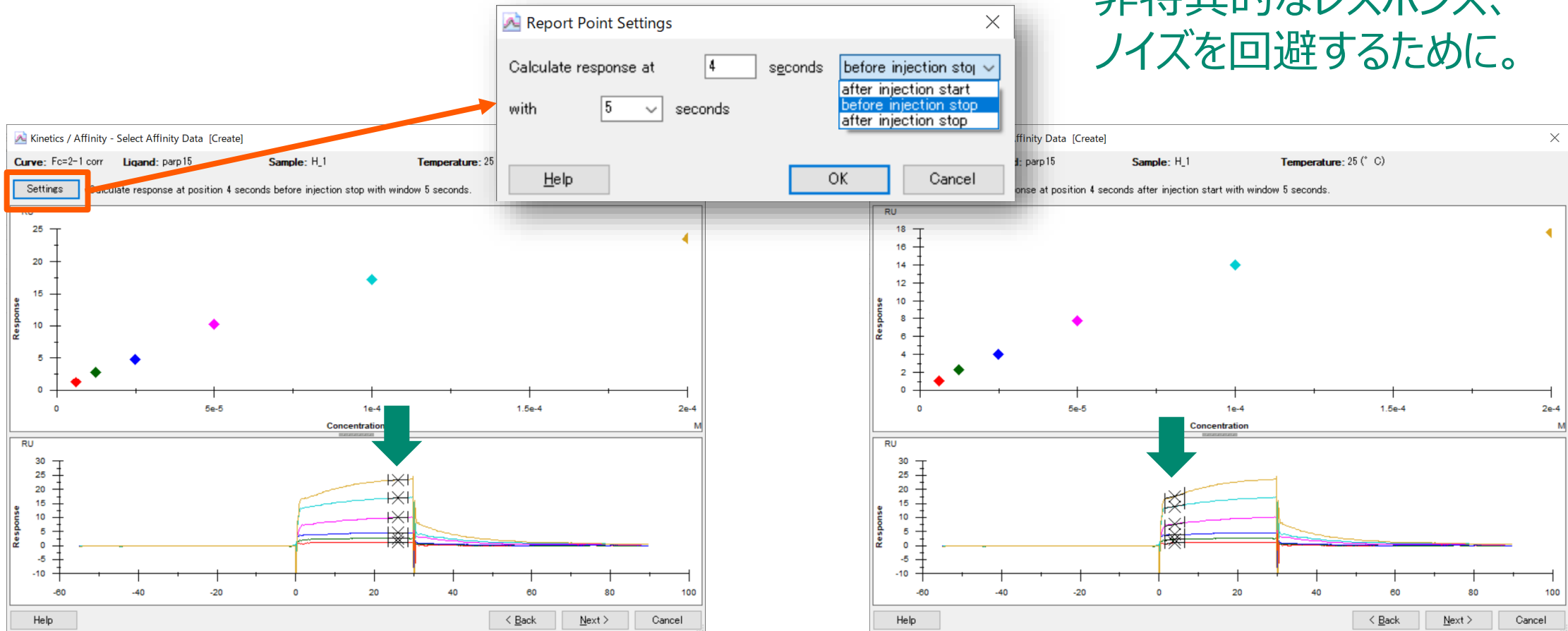
Fit to model  $A + B \rightleftharpoons AB$  at steady state



$K_D$ : 1/2 Rmax (RU)となるアナライต์濃度に相当

# Affinity解析におけるレポートポイントの取り方

非特異的なレスポンス、  
ノイズを回避するために。



Biacore T200/S200/X100 Evaluation Software



# Kinetics解析の反応モデル

## 1:1 Binding



リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。

## Bivalent Analyte



アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。

## Heterogeneous Analyte



競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

## Heterogeneous Ligand



アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

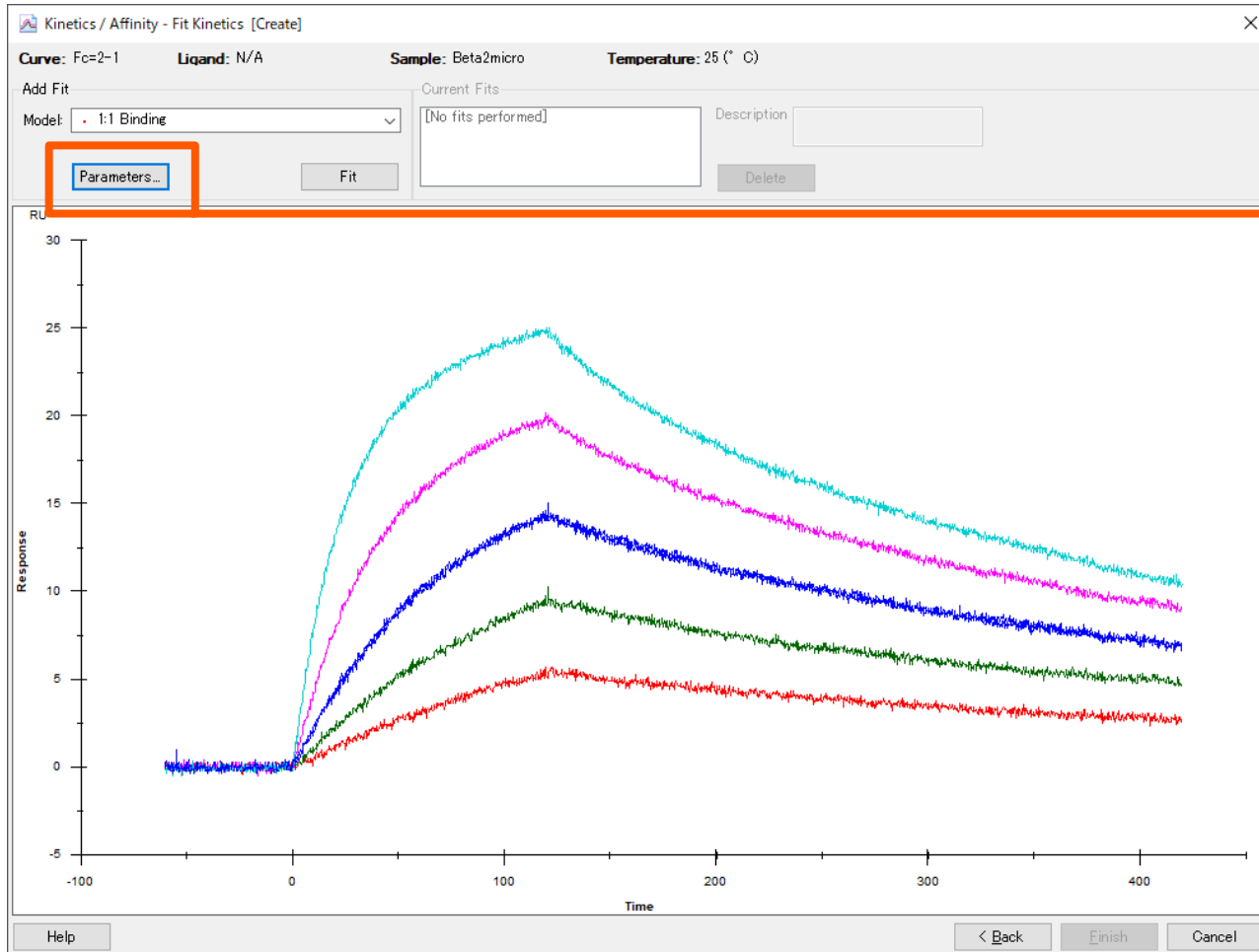
## Two state Reaction



リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

\* 可能な限り **1:1 Binding** のアッセイ系を構築する。

# Kinetics解析におけるFit Local/Global、Initial Valueとは？



1:1 Binding			
Name	Fit	Initial value	
ka	Fit global	1e5	Default
kd	Fit global	1e-3	Default
Rmax	Fit global	YMax	Default
tc	Fit global	1e8	Default
RI	Fit local	YMax/5	Default

Buttons: Help, OK, Cancel

1:1 bindingにおけるデフォルトの Parameter Settings

Biacore T200/S200/X100 Evaluation Software

# Kinetics解析における Fit Local/Global

Fit Local  
Fit Global



Parameter Settings

1:1 Binding			
Name	Fit	Initial value	
ka	Fit global	1e5	Default
kd	Fit global	1e-3	Default
Rmax	Fit local	YMax	Default
tc	Fit global	1e8	Default
RI	Fit local	YMax/5	Default

Help OK Cancel

Kinetics / Affinity - Fit Kinetics [Create]

Curve: Fc=2-1    Ligand: N/A    Sample: Beta2micro    Temperature: ...

Add Fit: Model: 1:1 Binding    Current Fits: 1: 1:1 Binding

Parameters...    Fit

ka、kd、Rmaxは、アナライト濃度に依存しない固有のパラメータであり、Global fittingで求めるべき数値  
一例として、再生が不十分でサイクルごとにRmaxが変わる場合、RmaxのみFit Localを使用するケースがある。

Quality Control    Report    Residuals    Parameters

Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	U-value
	1.409E+6	0.003094	2.196E-9			2.919E+7				0.0598	1
Cycle: 5 2 nM				27.73	2.000E-9		30.00	9.071E+7	0.1206		
Cycle: 6 4 nM				26.71	4.000E-9		30.00	9.071E+7	0.2708		
Cycle: 7 8 nM				24.01	8.000E-9		30.00	9.071E+7	0.5363		
Cycle: 8 16 nM				23.65	1.600E-8		30.00	9.071E+7	0.7171		
Cycle: 9 32 nM				25.22	3.200E-8		30.00	9.071E+7	0.3965		
Cycle: 10 8 nM				24.25	8.000E-9		30.00	9.071E+7	0.5606		

Help    < Back    Finish    Cancel

# Kinetics解析における Initial Value

箱型に近いなどセンサーグラム形状によっては実際のレスポンスをRIとして計算してしまうことがあるため、Constant 0にしたほうが良い場合があります。Insight Evaluation Softwareでは、デフォルトのRIがConstant 0です。

Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	U-value
	1.155E+6	0.002757	2.386E-9	25.06		2.500E+19				0.163	1
Cycle: 5 2 nM					2.000E-9		30.00	7.768E+19	0.000		
Cycle: 6 4 nM					4.000E-9		30.00	7.768E+19	0.000		
Cycle: 7 8 nM					8.000E-9		30.00	7.768E+19	0.000		
Cycle: 8 16 nM					1.600E-8		30.00	7.768E+19	0.000		
Cycle: 9 32 nM					3.200E-8		30.00	7.768E+19	0.000		
Cycle: 10 8 nM					8.000E-9		30.00	7.768E+19	0.000		

Parameter Settings

Name	Fit	Initial value	
ka	Fit global	1e5	Default
kd	Fit global	1e-3	Default
Rmax	Fit local	YMax	Default
tc	Fit global	1e8	Default
RI	Fit local	YMax/5	Default

Parameter Settings

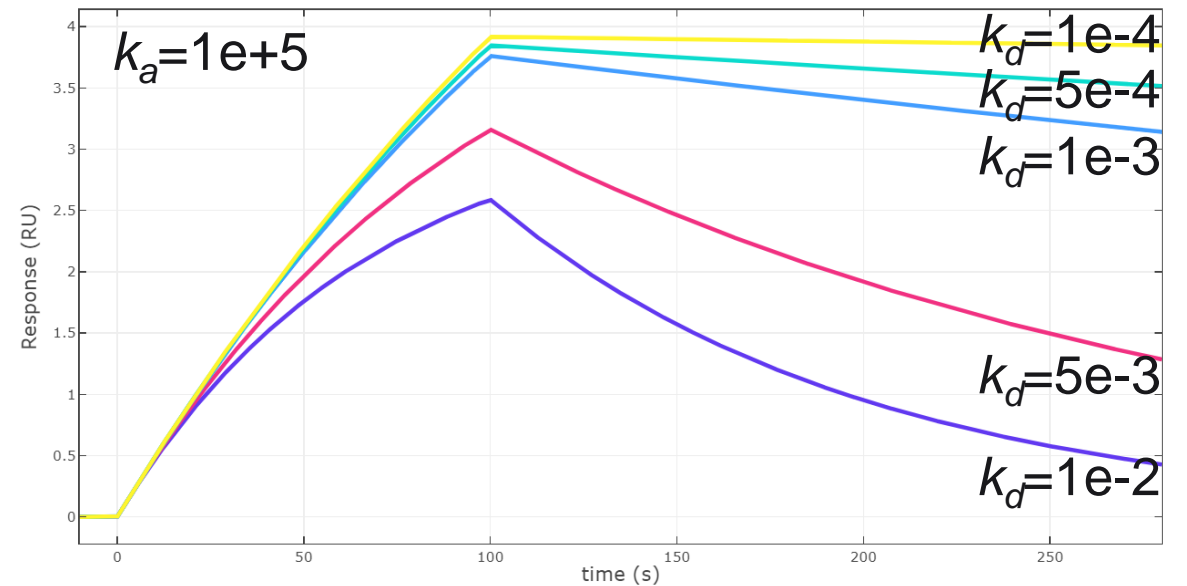
Name	Fit	Initial value	
ka	Fit global	1e5	Default
kd	Fit global	1e-3	Default
Rmax	Fit global	YMax	Default
tc	Fit global	1e8	Default
RI	Constant	0	Default

# Biacore™ Simul8 – SPR sensorgram simulation tool



<https://apps.cytivalifesciences.com/spr/>

Basic kinetics >> Menu>>Open example



Impact of changes in  $k_d$  when  $k_a$  is constant at identical concentrations

# Biacore フィットング計算の基礎と勘所① ここがポイント

- ✓ フィットングとはセンサーグラムを最もよく表すパラメーターを見つける数学的手法
- ✓ 使い方を間違えると生物学的な意味を持たない数値になる
- ✓ センサーグラムに非特異結合の成分が混ざっていないこと
- ✓ 理想的なセンサーグラム形状、濃度レンジ、解離時間であるか確認
- ✓ 結合様式が明らかであることが必要⇒結合様式に応じたモデル式を選択する
- ✓ 必要に応じて設定変更（Report point、Fit Global/Local、Initial Value）
- ✓ 各パラメータから考えられるセンサーグラム形状を確認するには、Biacore™ Simul8



## ①本日の内容

1. Fittingって何やってるの？
2. Fittingに適切なデータとは
3. Fitting設定の勘所

## ②次回の内容

4. Fitting結果の信頼性評価
5. あるあるケーススタディ
6. フィッティングに関する応用編TIPs

次回、6/25（金）予定



**Thank you**










## Diagnostic virtual summit in Japan 2021

### Live Webinar : 磁性ビーズを手軽に使ってみよう！

#### ～Sera-Mag/Sera-Xtractaのご紹介

Cytiva Asia Diagnostic Design-in Scientist 谷家 貴之

 [Register](#)  2021年6月16日  14:00～14:40  40min

#### CONTENTS

Sera-Magシリーズは、ビーズの表面がカリフラワー状の構造を取っているため従来の平滑表面に比べて表面積が増え、目的の核酸やタンパク質の結合量が増大することが期待されます。

Sera-Xtractaシリーズはシリカコート超常磁性粒子を用いた核酸抽出キットです。ゲノムDNA、cfDNA、RNAウイルス等対象となるサンプルに対応したReady-To-Useのキットです。

本Live Webinarでは磁性ビーズの特徴やビーズ選択のTips、具体的な使用例についてお話いたします。



## 【お問合せ先】

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

バイオダイレクトライン 内線#2をご選択ください

TEL: 03-5331-9336 / FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

[www.cytivalifesciences.co.jp](http://www.cytivalifesciences.co.jp)

本資料の使用については、お客様施設内での使用に限ります。他社への転送、譲渡等は禁じます。本資料の著作権その他の知的財産権は、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社に帰属します。無断転載、無断コピー、改ざん、二次利用を禁じます。

掲載されている価格は2020年10月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

弊社は、資料の掲載内容の正確性を記すべく、情報を随時更新しておりますが全ての情報が最新であることを保証するものではありません。

したがって、当資料上の掲載内容に誤りがあった場合でも弊社は責任を負いかねます。