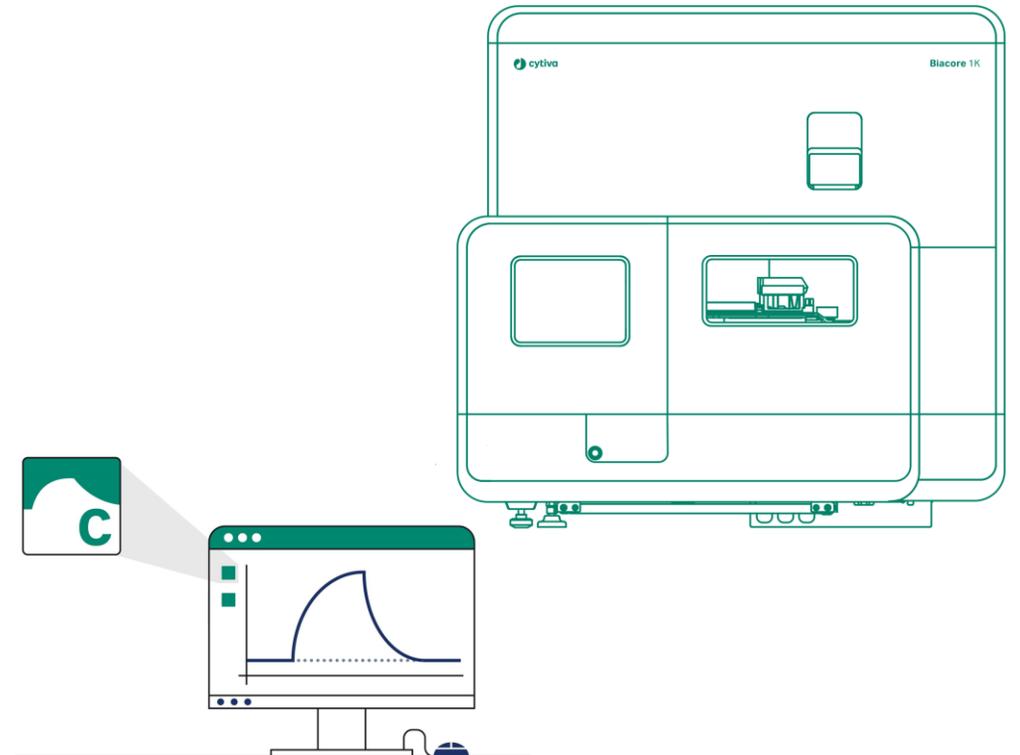




Biacore 1 series

アプリケーション別操作手順書
抗体編

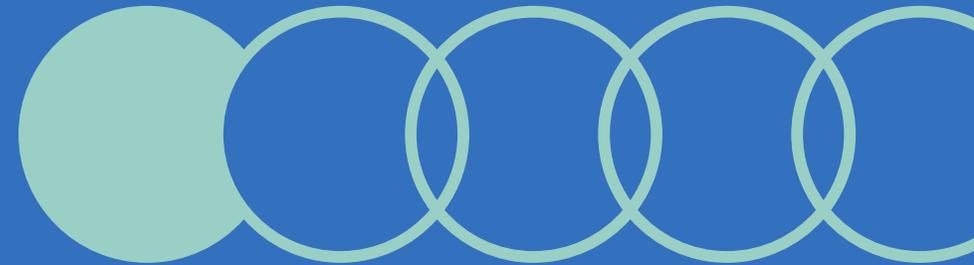
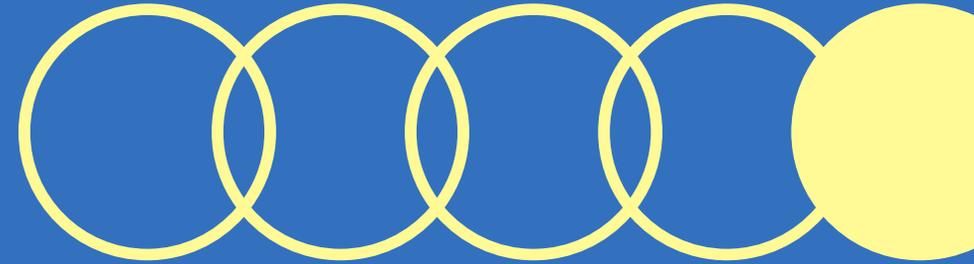
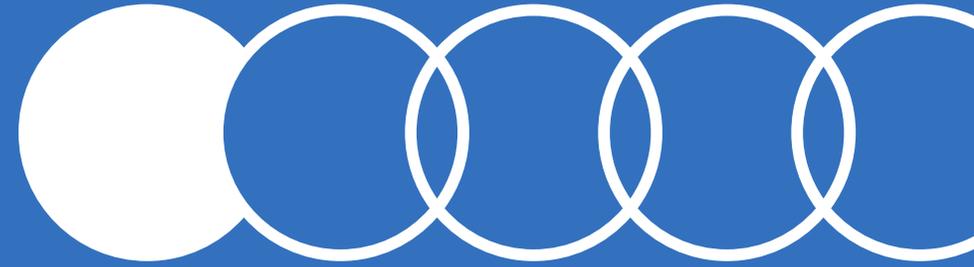
Version 1.1
2023/09



もくじ

1.	<u>実験をはじめる前に</u>	・・・	3
2.	<u>Amine Couplingによるキャプチャー用抗体の固定化</u>	・・・	21
3.	<u>抗体のBinding screen</u>	・・・	28
4.	<u>抗体のKinetics screen</u>	・・・	42
5.	<u>キャプチャー法によるKinetics/Affinity解析</u>	・・・	55
6.	<u>各種メンテナンスおよび測定後の管理方法</u>	・・・	77
7.	<u>サポート情報</u>	・・・	81

1. 実験をはじめる前に



1. 本章の内容

1-1. システムの起動

- ・Biacoreシステムの起動手順について

1-2. システムの概観

- ・本体および主要パーツについて

1-3. Biacore Insight Control Software

- ・本体制御ソフトウェアの概要について

1-4. チップのドック～バッファ置換

- ・測定をはじめる最初のステップであるセンサーチップのドック～バッファ置換について
- ・センサーチップの取り扱い、フローセルと機種別使用方法について
- ・当社取扱いのランニングバッファについて

1-5. 温度設定

- ・温度設定・変更方法について

1-6. サンプルラックの取り扱い

- ・サンプルトレイへのアクセスおよびラックについて
- ・使用するプレート、シール、バイアル、キャップについて

1-7. 各種Methodへのアクセス

- ・プリセットされたMethodへのアクセス方法について

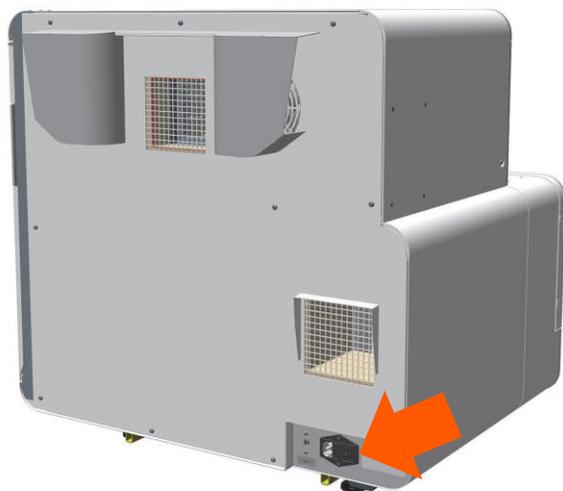
1-8. Method 作成画面の基本構造

- ・Control Softwareの基本構造（タブ区切り階層構造）について

1-1. システムの起動

使用する1時間前には電源を入れて温度を安定にさせます。使用する Sensor chip も室温に戻します。

1. 本体背面 電源ON



2. PC起動、Windowログイン

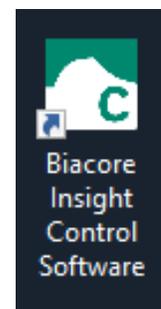
納品設置時 Biacore 1K/1K+

ユーザー名 : Biacore1K、パスワード : Biacore1K

納品設置時 Biacore 1S+

ユーザー名 : Biacore1S、パスワード : Biacore1S

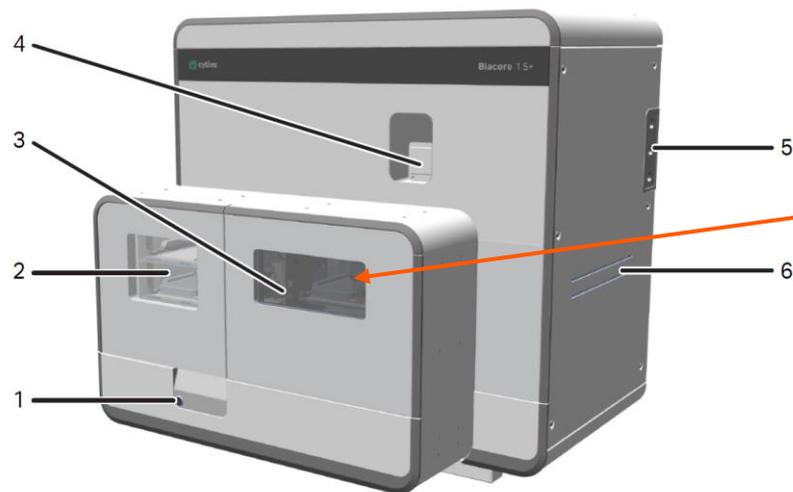
3. Insight Control Softwareの起動・ログイン

A screenshot of the Biacore Insight Control Software login interface. The screen displays the Cytiva logo, the software name 'Biacore™ Insight Control Software', and the version 'Version 5.0.16.21762'. There are input fields for 'User id' (containing 'XXXXXX / 12345'), 'Domain: XXXXX', and 'Password'. Below these are options for 'Database' (set to 'Local Biacore Insight database') and 'Selected extensions' (listing 'Biacore Intelligent Analysis™', 'Concentration & Potency', 'Data Integration', 'Epitope Binning', and 'Extended Screening'). At the bottom, there are 'Log in' and 'Cancel' buttons.

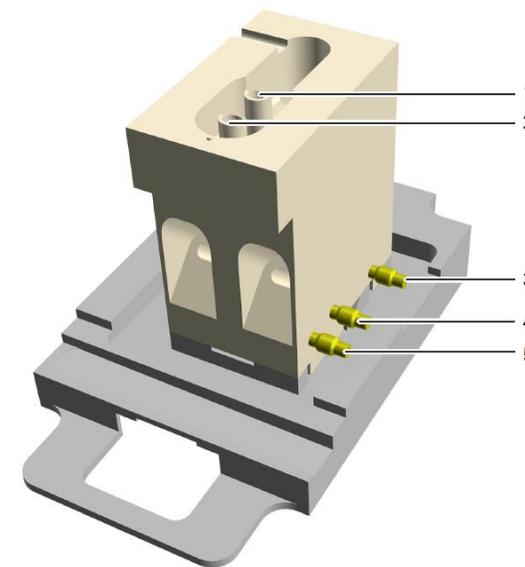
納品設置時はWindowsログインと共通（変更可）

1-2. システムの概観

本体の概観



リキッドサプライブロック
IFCへバッファー供給
ニードルの洗浄
廃液の処理



	名称	備考
1	Hotel door release button	ホテルドアを開けます
2	Sample hotel door with window	サンプルラックをセットします
3	Sample compartment with window	ニードル、リキッドサプライブロック、サンプルラックの動作が確認できます
4	Sensor chip port	センサーチップをセットします（手動）
5	Tubing panel	バッファーや超純水のボトルに挿入されたチューブは内部のポンプで送液されます
6	Rail for accessory holders	ボトル用のホルダなどを取り付けます

	名称	備考
1	Buffer supply	筒からランニング緩衝液があふれており、適宜ニードルが挿入・吸引しています
2	Water supply	筒から超純水があふれており、適宜ニードルが挿入・吸引しています
3	Waste outlet port	1,2からあふれた溶液をペリスタポンプで廃液ボトルへ送液しています
4	Buffer inlet port	バッファーチューブからバッファーが供給されます
5	Water inlet port	超純水チューブから超純水が供給されます

1-3. Biacore Insight Control Software

Instrument control画面

The screenshot shows the Biacore Insight Control Software interface. The top navigation bar includes the Cytiva logo, software name, user name, and system name. Below the navigation bar are tabs for 'Instrument control', 'Methods', 'Runs', and 'Action history'. The main content area is divided into four panels, each highlighted with an orange border:

- Activity queue:** Contains 'Change solutions' (6 min) and 'Interactive run' buttons, with an 'Add activity' button at the bottom.
- System setup:** Lists tasks like 'Set flow cell temperature', 'Set sample compartment temperature', 'Change chip', 'Change solutions', 'Immobilization checkpoint', and 'Wait'.
- Maintenance:** Lists tasks like 'Desorb', 'Desorb and sanitize', 'System check', 'Normalize', and 'Shutdown'.
- Start:** Contains 'Interactive run' and 'Method' buttons.

Below the panels, there are four descriptive labels in Japanese:

- Activity queue:** 各種コマンドの予約 (Reservation of various commands)
- System setup:** 温度設定 (Temperature setting), センサーチップのドック (Sensor chip docking), バッファ置換など (Buffer replacement, etc.)
- Maintenance:** Desorb (週一) (Desorb (weekly)), Desorb and Sanitize (月一) (Desorb and Sanitize (monthly)), System Check (適宜) (System Check (as appropriate))
- Instrument states:** システムの状態 (System status)

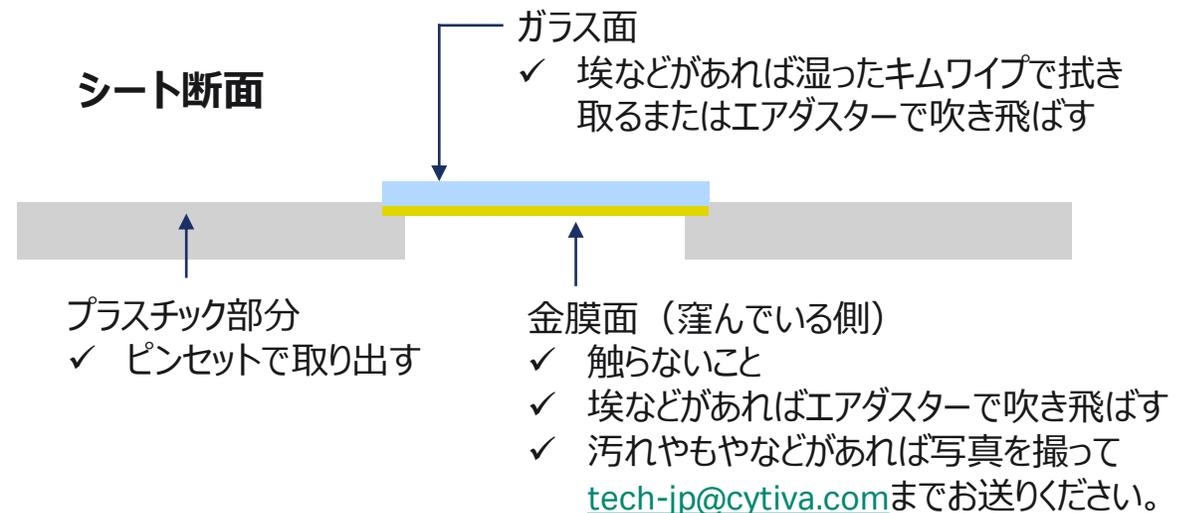
The bottom status bar shows: 'Running Change solutions...', 'Current buffer Buffer', 'CAP: 3/3/2023 6:09:55 PM', 'chip information', 'Flow cell 25.0 °C (25)', 'Sample compartment 25.0 °C (25)', 'Illumination on/off', and 'Hotel door is closed'.

1-4.チップのドック～バッファー置換

1. 使用するチップは1時間前には室温に戻します
2. 使用するバッファーボトルにバッファータubeをセット
tubeがボトルの底についていることを目視確認
3. チップは新品であってもカバーからシートをを引き出して
ほこりや白いもやなどがないか確認します



4. 以下をご注意いただきながら、金膜を目視確認します



1-4.チップのドック～バッファー置換

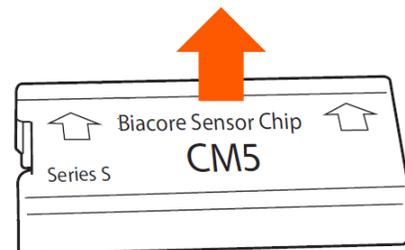
1. Change chipからOpen chip doorでポートを開ける



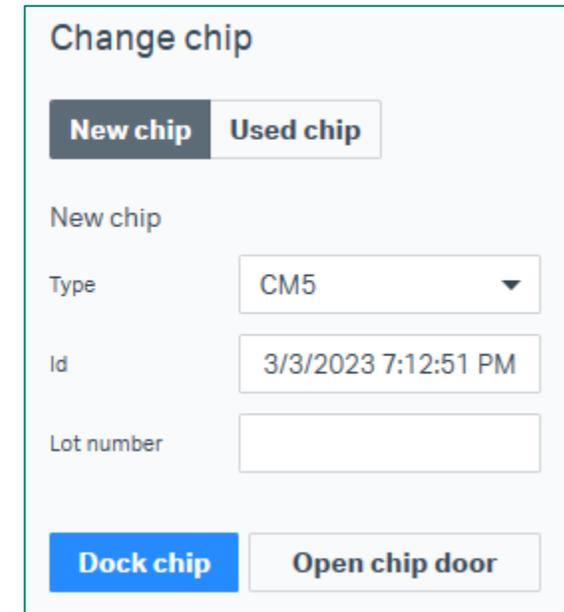
2. センサーチップをポートにセット



矢印の向きにカバーごとセットします



3. Typeを選択し、Dock chip



4. Change solutionsからReady to start



1-4.チップのドック～バッファー置換

Flow cellの構成

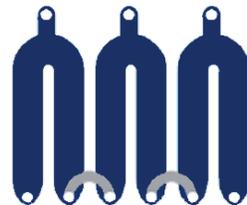
センサーチップの金膜部分は平面の一枚板

IFC channelsによってFlow cellが構成されます

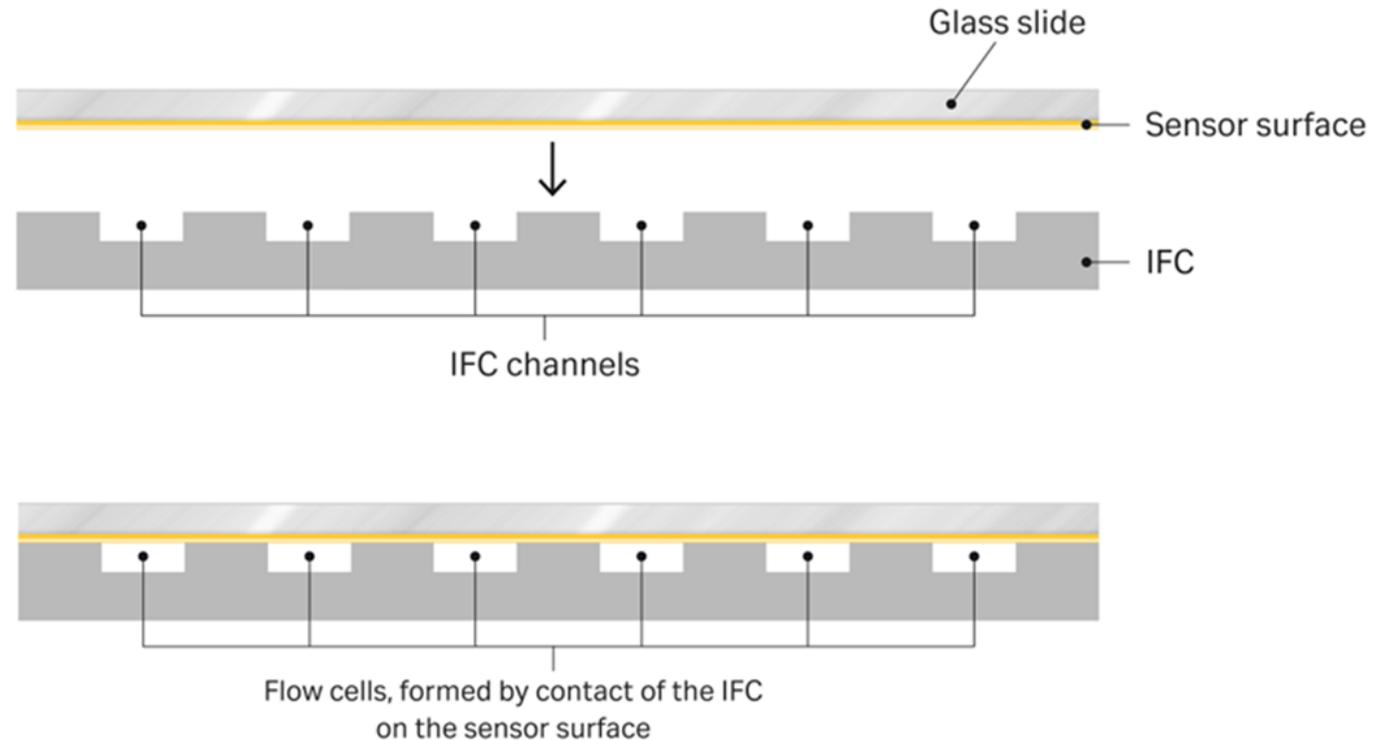
* 1 seriesのFlow cellは6つあります



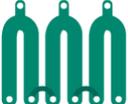
1K/1K+/1S+
(Pairwise)



1K+/1S+
(Serial)



1-4.チップのドック～バッファー置換

		Flow path	Reference flow cell (水色)	Biacore™ 1K	Biacore™ 1K+ and Biacore™ 1S+
	Single	1		✓	✓
		2		✓	✓
	In pairs	3		✓	✓
		4		✓	✓
		5		✓	✓
	6		✓	✓	
	1, 2		✓	✓	
	3, 4		✓	✓	
5, 6		✓	✓		
	In quadruples	1, 2, 3, 4		-	✓
		3, 4, 5, 6		-	✓
	All together	1, 2, 3, 4, 5, 6		-	✓

1-4. チップのドック～バッファー置換



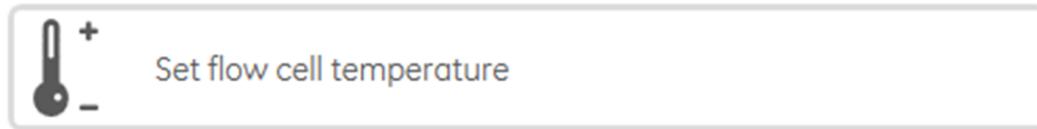
ランニングバッファーの取り扱い

Product	Package	Code	Contents * 10倍希釈時濃度
HBS-EP+ 10X	1×1,000 ml	BR100669	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.05% v/v Surfactant P20 (Tween 20) pH 7.4
HBS-EP+ 10X	4×50 ml	BR100826	
HBS-P+ 10X	1×1,000 ml	BR100671	10 mM HEPES, 150 mM NaCl and 0.05% v/v Surfactant P20 (Tween 20) pH 7.4
HBS-P+ 10X	4×50 ml	BR100827	
HBS-N 10X	1×1,000 ml	BR100670	10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4
HBS-N 10X	4×50 ml	BR100828	
PBS 10X	1×1,000 ml	BR100672	10 mM phosphate buffer with 2.7 mM KCl and 137 mM NaCl pH 7.4
PBS-P+ 10X	1×1,000 ml	28995084	20 mM phosphate buffer with 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl and 0.05% Surfactant P20 (Tween 20) pH 7.4

* バッファーを自作する場合、0.22 μmフィルターでろ過してください。

1-5. 温度設定

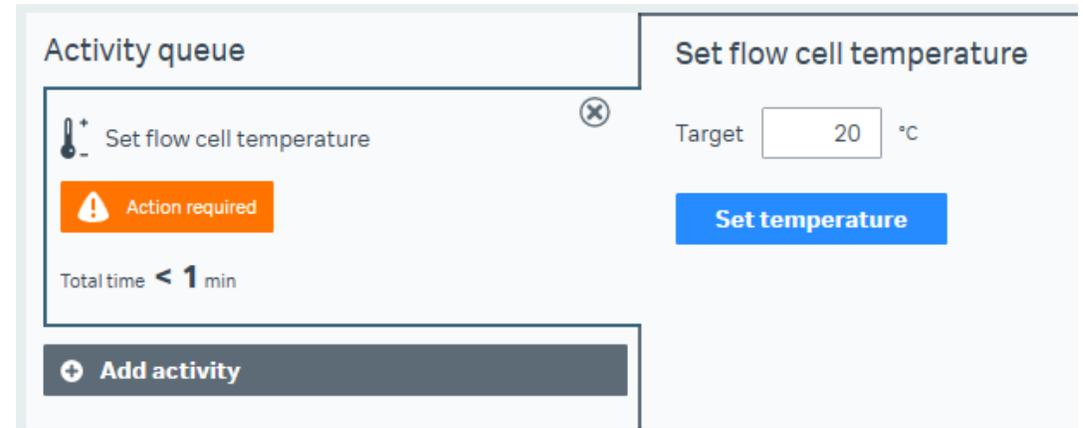
1. Flow cellの温度変更はこちらから



2. Sample compartmentの温度変更はこちらから



3. 設定温度を入力してSet temperatureをクリック。



設定可能温度	Flow cell temperature	Sample compartment temperature
Biacore 1K / 1K+	25~37°C	4~37°C * 室温の18°C以下まで
Biacore 1S+	4~40°C * 室温の20°C以下まで	4~40°C * 室温の18°C以下まで

1-6. サンプルラックの取り扱い

サンプルトレイ

ホテルドアは本体のボタンで開きます。

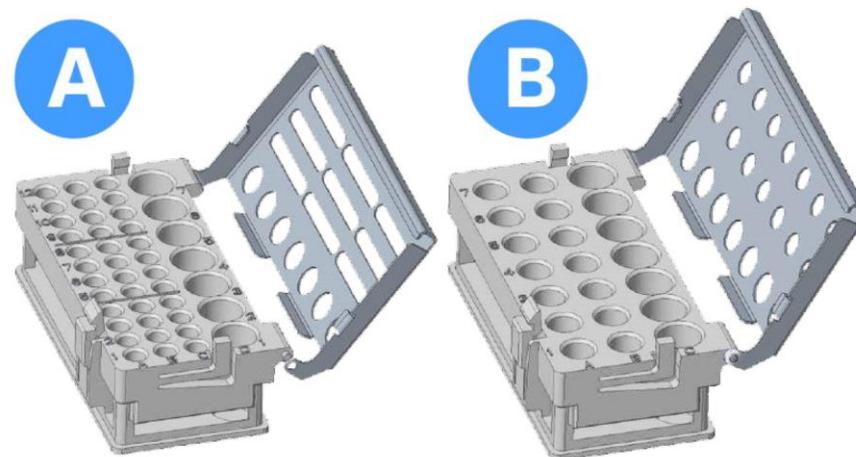


左に96/384プレート、右にサンプルラックをセットします

* A1ポジションが左手前になるようにセット

サンプルラック

二種類のサンプルラックがあります



	Vial 種類	本数
A	Φ 7 mm Vial	36 本
	Φ 15 mm Vial	7 本
B	Φ 11 mm Vial	14 本
	Φ 15 mm Vial	7 本

1-6. サンプルラックの取り扱い

対応プレート

Microplate	Working volume, μL	Foil/Septa	Plate height, mm
96-well, U-bottom, PS, Cytiva, BR100503	250	A/C	14
96-well, U-bottom, PP, Greiner, 650201	250	A/C	15
96-well, deep-well, V-bottom, PP, 0.5 mL, Greiner, 786201	650	A/C	27
96-well, deep-well, U-bottom, PP, 1 mL, Greiner, 780201	1000	A/C	42
96-well, deep-well, U-bottom, PP, 2 mL, Porvair, 219020MB	1850	A/C	45
96-well, deep-well, U-bottom, PP, 2 mL, Thermo Fisher, 278752	1700	A/C	44
384-well, V-bottom, PP, Greiner, 781280	110	B	14
384-well, deep-well, V-bottom, PP, Greiner, 781270	200	B	22

Foil/Septa

- A Microplate foil (96-well), 28975816, Cytiva, 100-pack, plastic foil
B Microplate foil (384-well), BR100577, Cytiva, 100-pack, plastic foil
C Microplate septa (96-well), 29192561, Cytiva, 10-pack, plastic/elastomer cover



Foil : 各ウェルから1回しか分取しない場合

Septa : 各ウェルから複数回分取する場合

* Poolingする際に使用するゴム製シール

必ず専用のシールをご使用ください。

1-6. サンプルラックの取り扱い

対応バイアルおよびキャップ



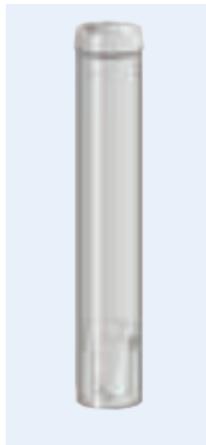
Rubber caps,
type 3
BR100502



Rubber caps,
type 2
BR100411



Rubber caps,
type 5
BR100655



Plastic Vials,
7 mm
BR100212
0.8 ml
ø 7 mm



Plastic Vials,
1.5 ml, 11 mm
BR100287
1.5 ml
ø 11 mm



Plastic Vials,
15 mm
29266981
4.0 ml
ø 15 mm

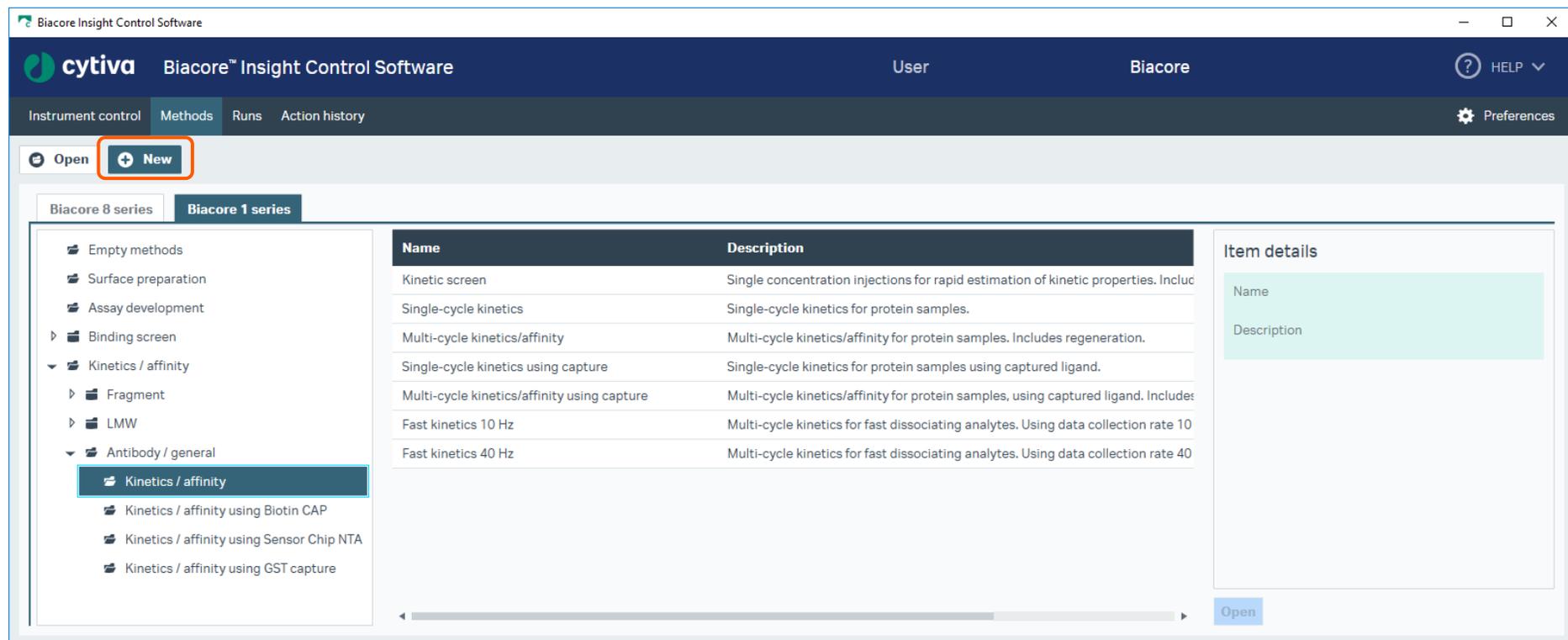
必ず専用のバイアルとキャップをご使用ください。

1-7. 各種Methodへのアクセス

1. Instrument controlタブよりMethodをクリック



2. Methodタブ画面へ移ります。Newからプリセットされた各種メソッドテンプレート選択が可能。



The screenshot shows the Biacore Insight Control Software interface. The top navigation bar includes the Cytiva logo, the software name, and user information. Below this, a secondary navigation bar contains tabs for "Instrument control", "Methods", "Runs", and "Action history". The "Methods" tab is active. In the "Methods" section, there are two buttons: "Open" and "New", with "New" highlighted by a red box. Below the buttons, there are two tabs for "Biacore 8 series" and "Biacore 1 series". The "Biacore 1 series" tab is selected, showing a list of method templates. The list has two columns: "Name" and "Description".

Name	Description
Kinetic screen	Single concentration injections for rapid estimation of kinetic properties. Includes...
Single-cycle kinetics	Single-cycle kinetics for protein samples.
Multi-cycle kinetics/affinity	Multi-cycle kinetics/affinity for protein samples. Includes regeneration.
Single-cycle kinetics using capture	Single-cycle kinetics for protein samples using captured ligand.
Multi-cycle kinetics/affinity using capture	Multi-cycle kinetics/affinity for protein samples, using captured ligand. Includes...
Fast kinetics 10 Hz	Multi-cycle kinetics for fast dissociating analytes. Using data collection rate 10
Fast kinetics 40 Hz	Multi-cycle kinetics for fast dissociating analytes. Using data collection rate 40

On the right side of the interface, there is an "Item details" panel with fields for "Name" and "Description". At the bottom right, there is an "Open" button.

1-8. Method作成画面の基本構造

測定設定の手順
Method作成をすすめるための最も大まかな4ステップのタブ

Method definitionにおけるフロー
Method definitionステップ内の各Assay stepのタブ

Analysisにおける各コマンド
各Assay step（この場合"Analysis"）内の追加条件などの設定

Property	Variable	Value	Flow path	Predip
Solution	<input type="checkbox"/>	Capture solution	2	<input checked="" type="checkbox"/>
Contact time	<input type="checkbox"/>	60 s		
Flow rate	<input type="checkbox"/>	10 µl/min		
Concentration	<input type="checkbox"/>	nM		
Molecular weight	<input type="checkbox"/>	Da		

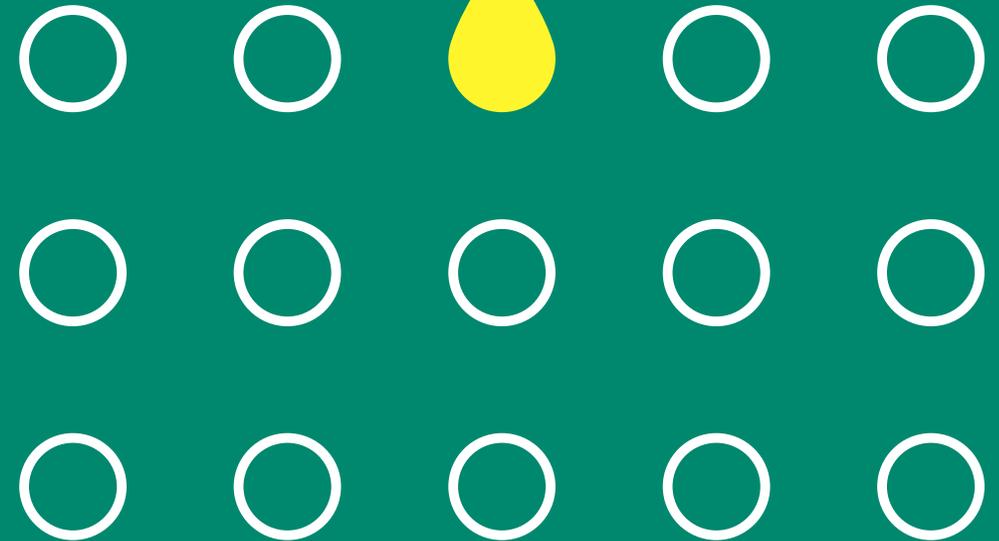
以降、抗原-抗体の相互作用解析について、
4点の手順を説明します。

2.
Amine couplingによる
キャプチャー用抗体の固定化

3.
抗体のBinding screen

4.
抗体のKinetics screen

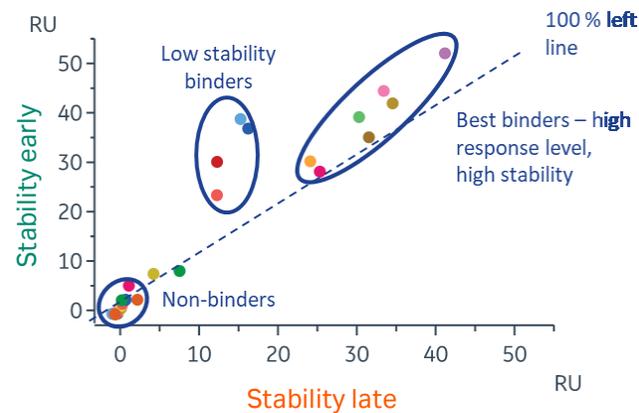
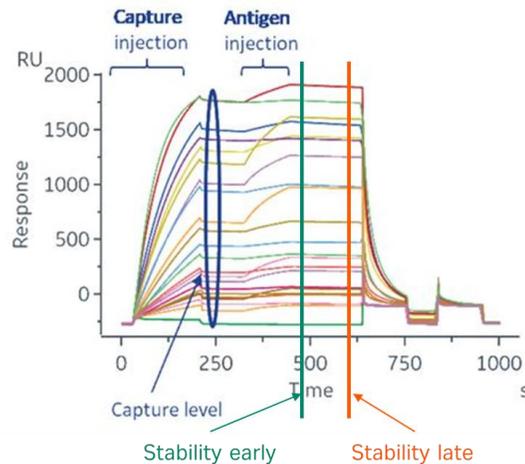
5.
キャプチャー法による
Kinetics/Affinity解析



抗体スクリーニングに関して

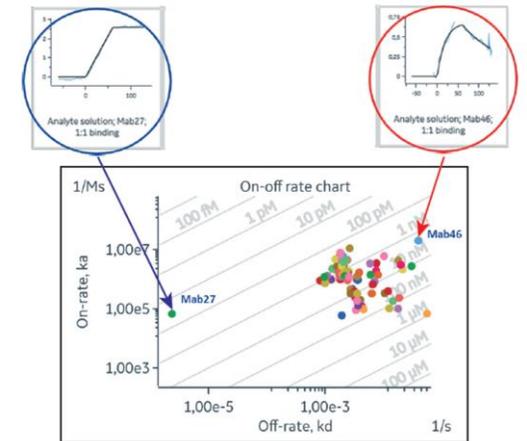
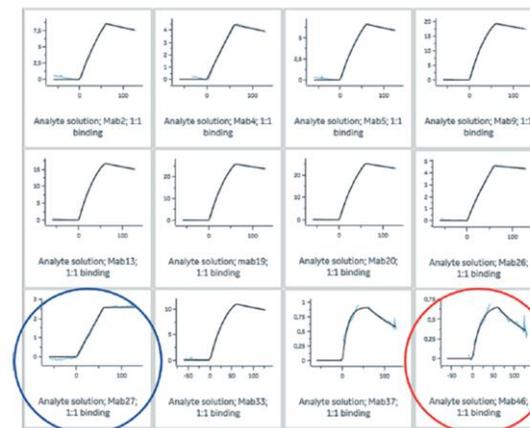
1. Binding screen

- ✓ Blank(0濃度)サイクル不要、濃度 1 点
- ✓ Report point-based screening
- ✓ Stability early、Stability lateなどRU値で評価
- ✓ Extended Screening Extensionが必要

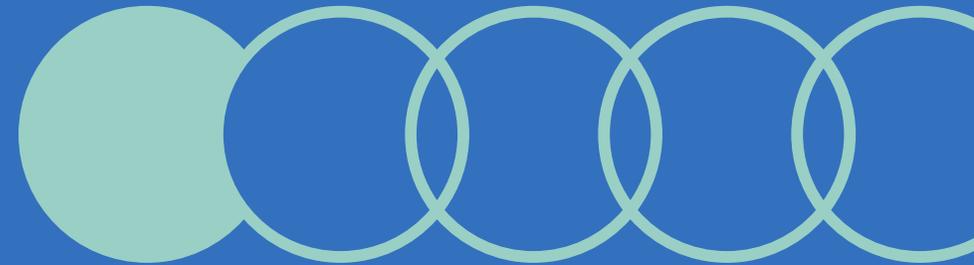
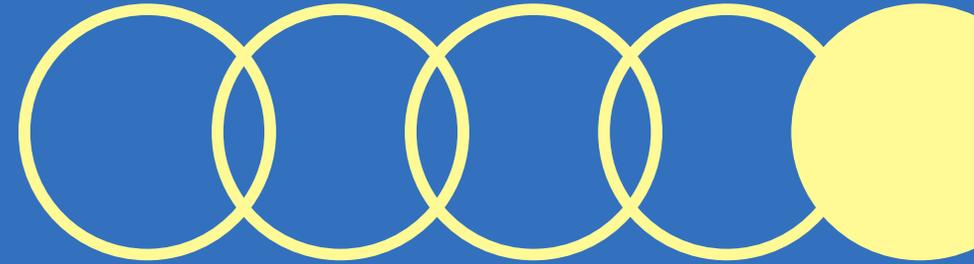
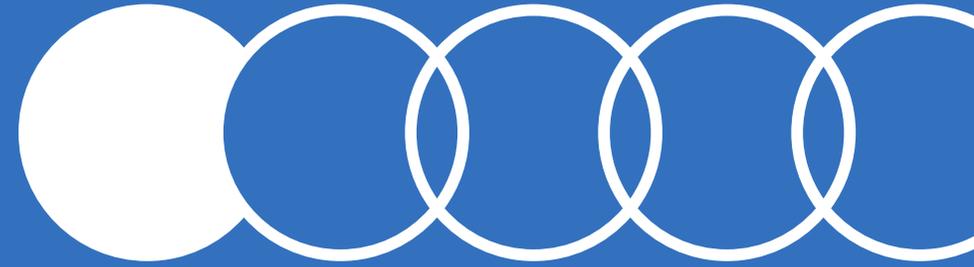


2. Kinetics screen

- ✓ Blank (0濃度)サイクル必要、濃度 1 点
- ✓ Sensorgram-based screening
- ✓ k_a 、 k_d 、 K_D などの解析パラメータで評価
- ✓ Insight Software 基本機能で実施可能



2. Amine coupling による キャプチャー用抗体の 固定化



2. 本章の内容

2-1. 各種抗体用キャプチャーキット

- ・抗体をリガンドとしてキャプチャーさせるキットについて

2-2. Amine Coupling Kit

- ・キャプチャー用抗体をセンサーチップに固定化するキットについて

2-3. 固定化

- ・アミンカップリング法でキャプチャー用抗体を固定化手順について

2-1. 各種抗体用キャプチャーキット

使用するキット、センサーチップのIFU（Instruction For Use）は必ずご確認ください。

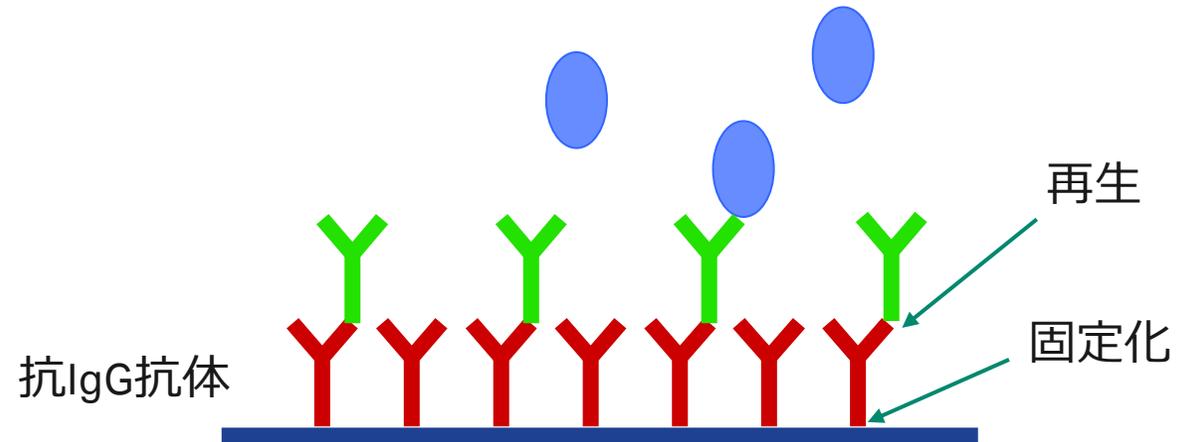
Human Antibody Capture Kit (BR100839)

Mouse Antibody Capture Kit (BR100838)

Human Fab Capture Kit (28958325)

✓ 抗IgG抗体、固定化バッファー、再生溶液のセット

✓ pH scoutingの必要なし。



2-2. Amine Coupling Kit

使用するキット、センサーチップのIFU（Instruction For Use）は必ずご確認ください。

Amine Coupling Kit (BR100050)



NHS, EDC, Ethanol Amineのセット

NHSおよびEDCは10 mlの超純水に溶解後、凍結保存します。100 μ l程度バイアルに小分けにすることをお勧めします。



Cytiva

主にSensor Chip CM5と併用します。



プレコンセントレーション（チップ近傍ヘリガンド濃縮）の条件が不明な場合、pH scoutingを行います。

* 当社キャプチャーキットは固定化用バッファーが付属

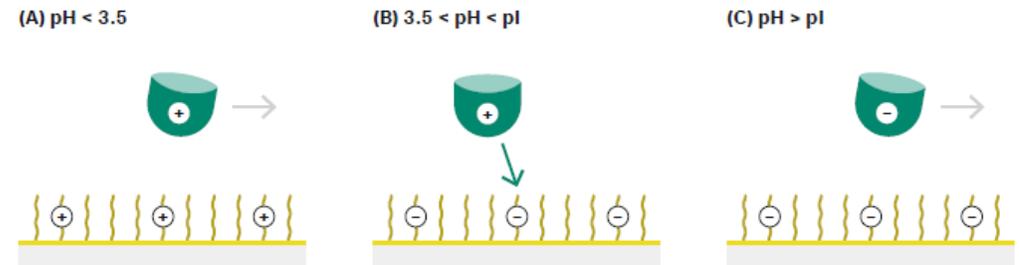


Fig 4.1. Ligand is concentrated on the surface through electrostatic attraction when the pH lies between the isoelectric point of the ligand and the pK_a of the surface. If the pH is too low or too high, ligand will not be concentrated on the surface.

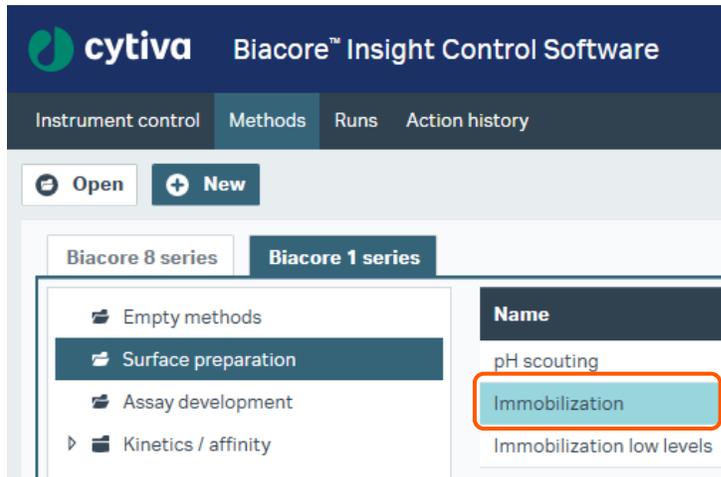
2-3. 固定化

	項目	説明
①	Immobilization procedure	Specify contact time : 通常コンタクト時間で指定
②	Use flow cells	固定化したいFlow Cellの指定 キャプチャー用抗体は使用する全てのFc固定化する
③	Ligand	各Fcに固定化する分子の名称を入力
④	リガンド添加時間・流速	各キットのIFUに従って入力

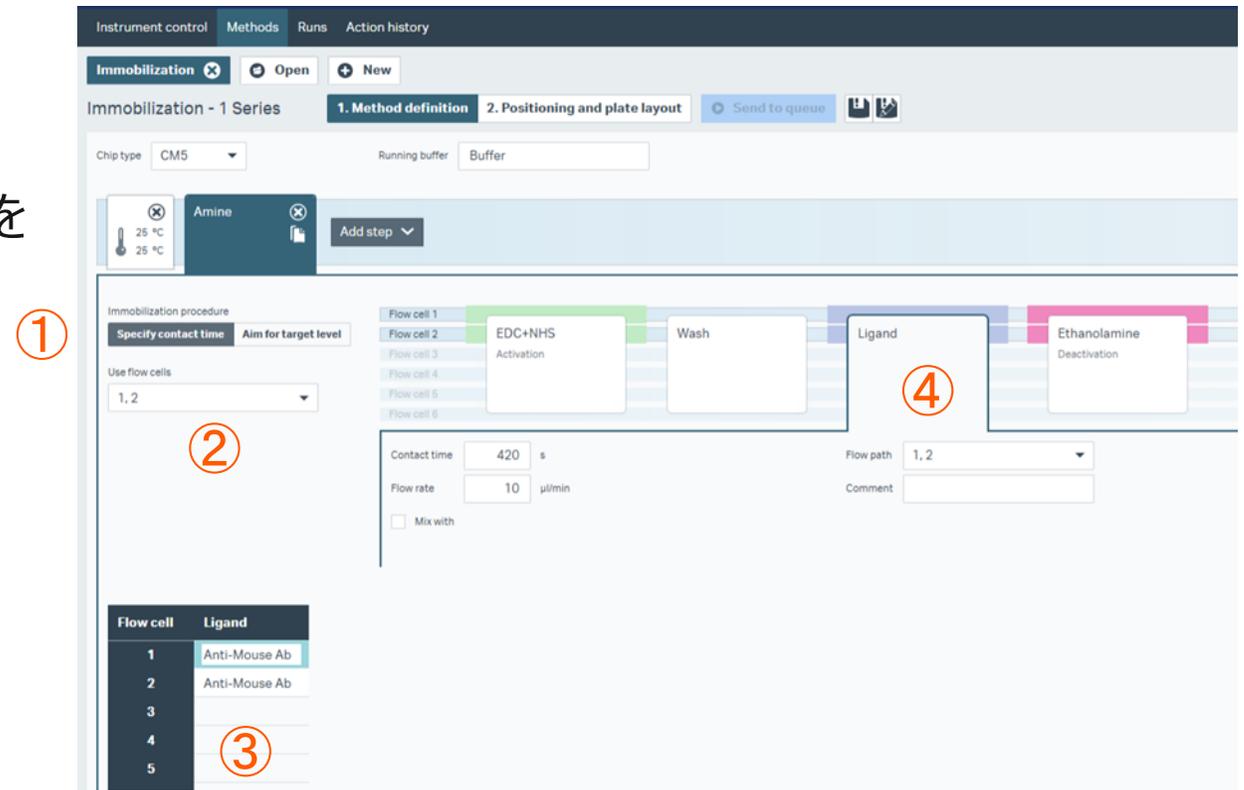
1. Methodをクリック



2. New>Surface preparation>Immobilizationを選択してOpen



3. Method definitionの設定



2-3. 固定化

	項目	説明
①	Trays	各溶液のポジションおよび液量の表示
①	Volume summary	各溶液のトータルの必要量を表示
②	配置／液量	表示に従って準備
③	Send to queue	データのファイル名・保存先を指定して、固定化開始

1. Positioning and plate layoutに従って準備

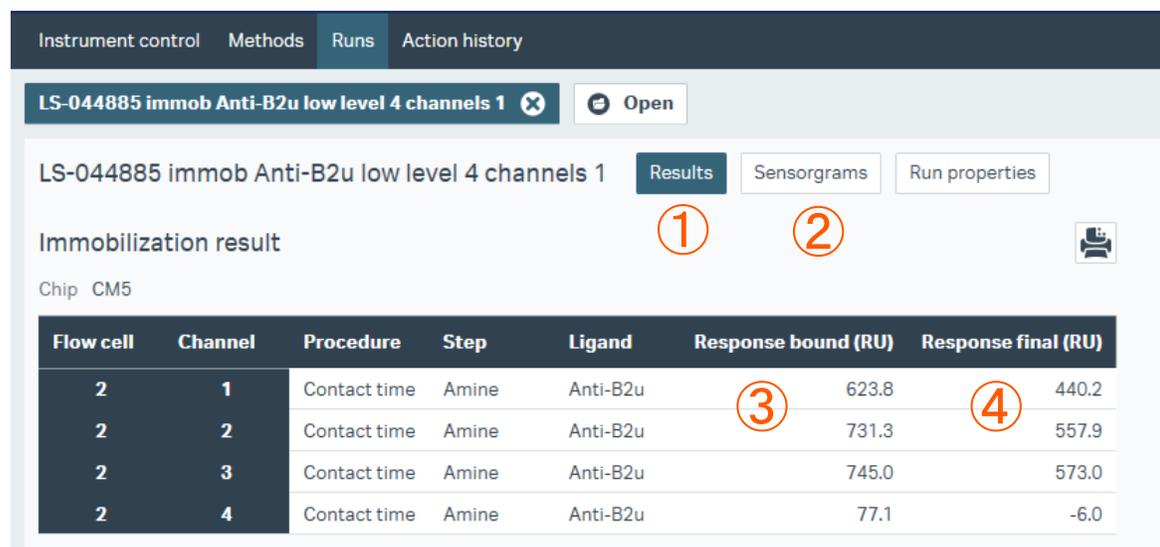
2. Send to queueで固定化開始

The screenshot shows the software interface for immobilization. The top navigation bar includes 'Instrument control', 'Methods', 'Runs', and 'Action history'. The main area is titled 'Immobilization - 1 Series' and has three tabs: '1. Method definition', '2. Positioning and plate layout', and 'Send to queue'. The '2. Positioning and plate layout' tab is active and highlighted with an orange box. Below the tabs, there are buttons for 'Bottles', 'View', and 'Compatibility'. The 'View' section has two tabs: 'Trays' and 'Volume summary'. The 'Trays' tab is active and highlighted with a circled 1. It shows a 96-well plate layout with columns A-H and rows 1-12. The 'Volume summary' tab is also visible. The 'Rack 1' view is shown on the right, with columns A-D and rows 1-5. It contains a table of reagents and their volumes. The 'Send to queue' button is highlighted with a circled 3. The 'Positioning Settings' sidebar is visible on the right.

	A	B	C	D
5	Ethanolamine 122 µl			
4	Anti-Mouse Ab 101 µl			
3	Mix position Empty			
2	NHS 73 µl			
1	EDC 73 µl			

2-3. 固定化

1. 固定化が終わるとResultが表示されます。



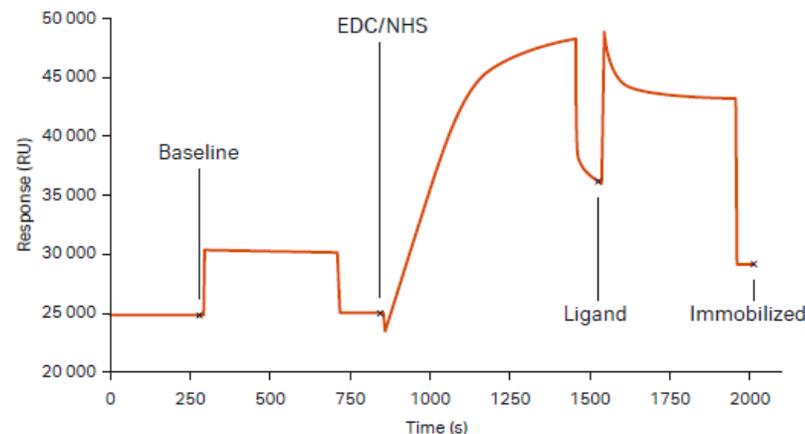
	項目	説明
①	Result	固定化量の確認
②	Sensorgram	固定化センサーグラムの確認
③	Response bound	右図LigandとEDC/NHS差分
④	Response final	右図ImmobilizedとBaseline差分

レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

リガンドが凝集している場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、FinalのレスポンスはBoundより小さくなる。

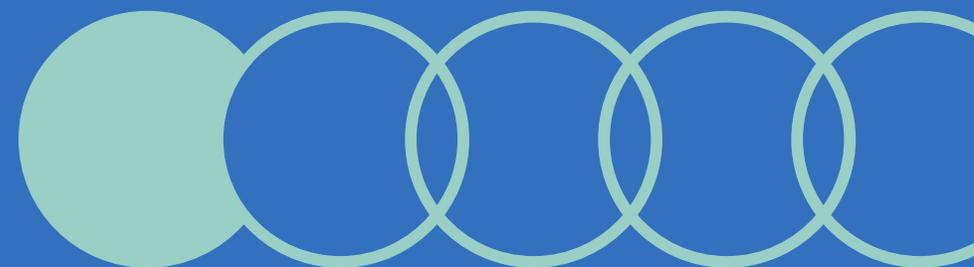
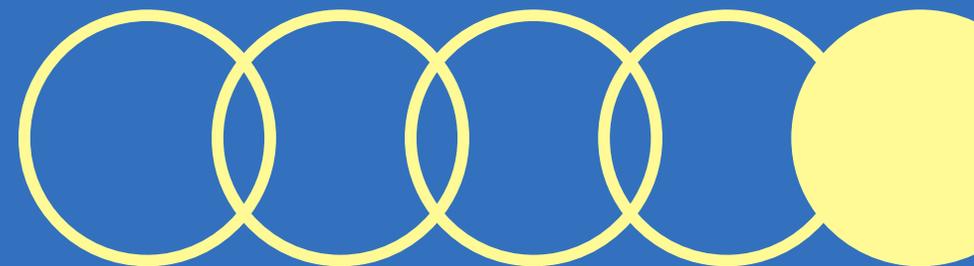
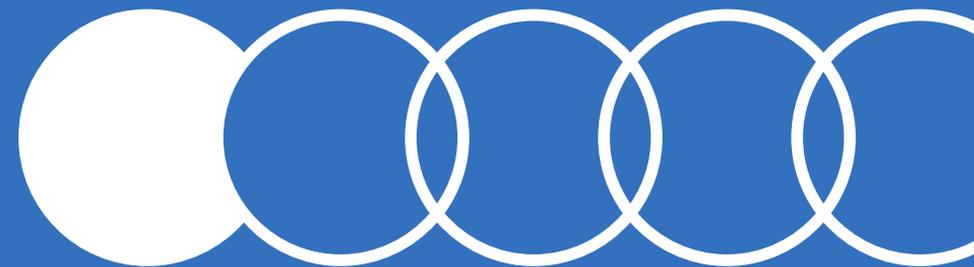
また、極めて固定化量が少ない場合は、NHS化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されている）エタノールアミンが導入されるため、FinalのレスポンスはBoundより大きくなることもある。

いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。



3. 抗体のBinding screen

* Biacore™ Insight Extended
Screening Extensionが必要です。



3. 本章の内容

3-1. 抗体のBinding screen測定

- ・測定Methodの作成手順について

3-2. 抗体のBinding screen解析

- ・抗体スクリーニングにおけるデータプロセッシングについて

3-3. データエクスポート

- ・解析結果のエクスポート手順について

3-4. そのほかHome画面でできること

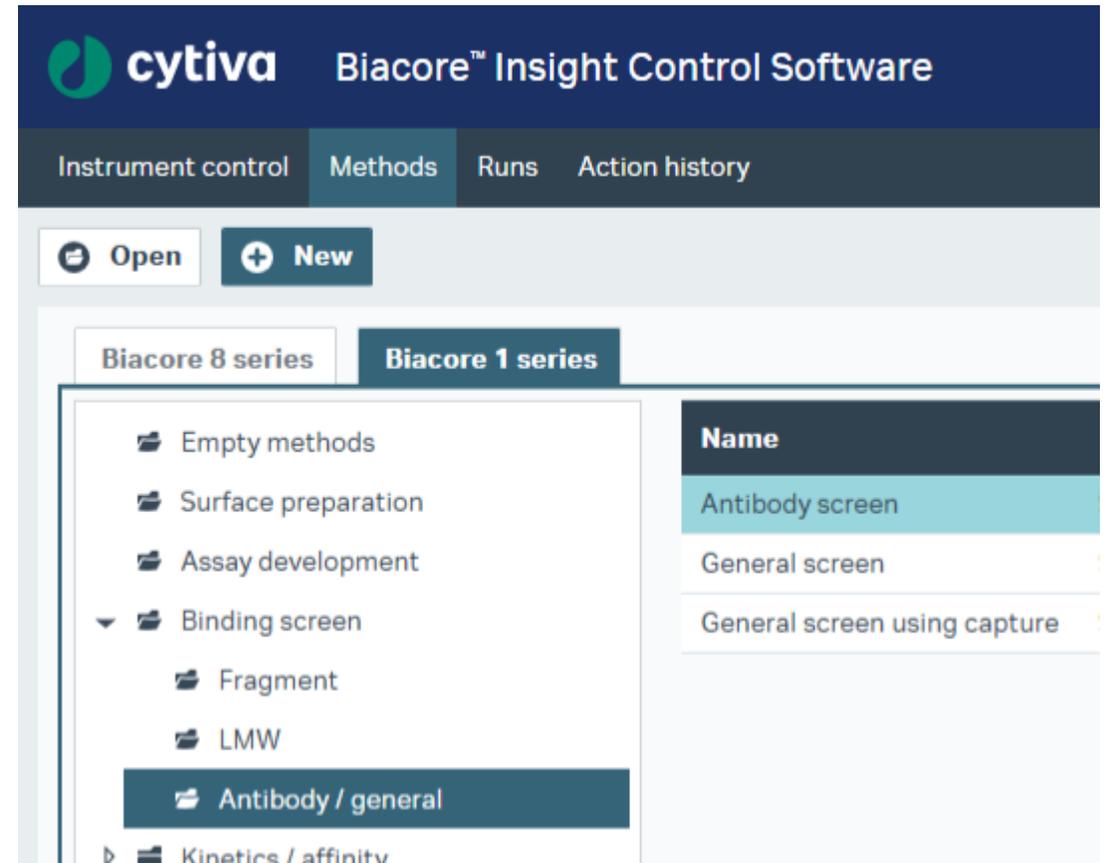
- ・Home画面から実施できることに関する補足

3-1. 抗体のBinding screen測定

1. Methodをクリック



2. Newをクリック
3. Binding screenフォルダをクリック
4. Binding screenのAntibody / generalから Antibody screen を選択
5. Open



3-1. 抗体のBinding screen測定

Control Softwareの構造～Method definitions

測定設定の手順
1→2→3→4と進み、Queueへ送ります。

Method definitionにおけるフロー
温度設定、Startup、Analysis

Analysisにおける各コマンド

項目	説明
① Capture	抗体添加 (Active Cellのみ) Contact Time : 60-180秒 / Flow late : 10 µl/min.
② Analyte	抗原添加 Contact Time : 60秒 / Dissociation time : 120秒 / Flow late : 30 µl/min.以上
③ Regeneration	再生、各KitやSensor ChipのIFU参照

3-1. 抗体のBinding screen測定

Variables and positioning

	項目	説明
①	Capture1 - Solution	抗体名入力
②	Positioning	マウス操作で配置変更
③	Positioning settings	配置ルール変更 (次項)

3-1. 抗体のBinding screen測定

Positioning settings

	項目	説明
①	Positioning settings	配置ルール変更
②	Pooling	複数回添加する同一溶液を少数のバイアル/ウェルにまとめるか
③	Plate/Rack	Plate/Rackのどちらに分注するか
④	Vial size	使用するバイアルの種類
⑤	Priority	より上段に配置された溶液が優先される

	項目	説明
⑥	Plate and Rack	Plateの溶液配置方向の指定 Horizontal(水平)/Vertical(垂直)
⑦	Sample series	全ての順番 or サンプル毎に別の列/行へ並べる
⑧	Reposition	Positioning settingsの変更を自動で反映
⑨	Action	マニュアル配置のリセット、指定したPositionを使用しない、指定した溶液は設定を反映しない

3-1. 抗体のBinding screen測定

1. Plate layoutに従って分注

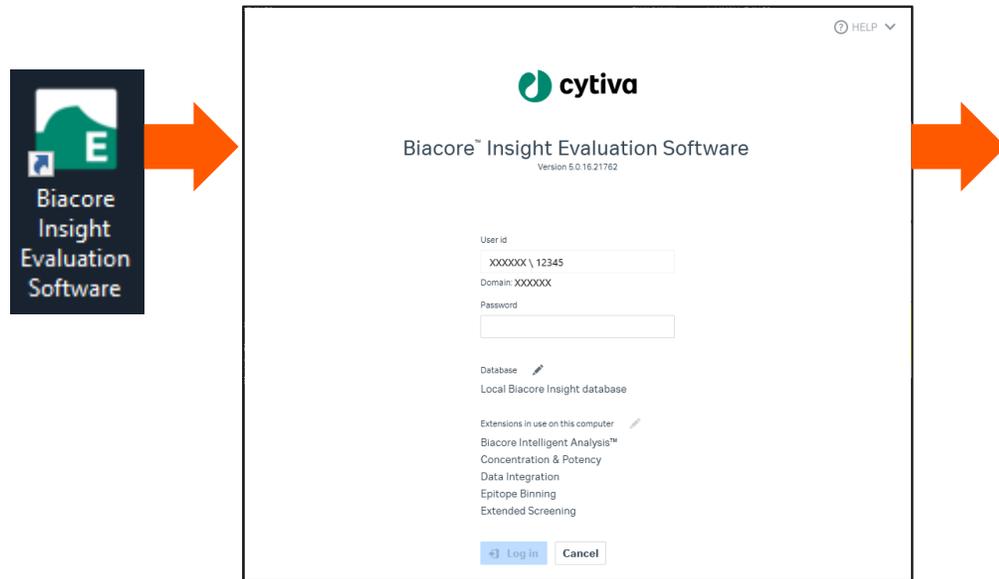
2. Send to queueで測定開始

The screenshot shows the 'Method Builder - 1 Series' interface. The '4. Plate layout' step is active, showing a grid of wells for 'Plate 1'. The 'Send to queue' button is highlighted. A table on the right provides a legend for the interface elements:

項目	説明
Trays	各溶液のポジションおよび液量の表示
Volume summary	各溶液のトータルの必要量を表示
配置/液量	表示に従って準備
Send to queue	データのファイル名・保存先を指定して、測定開始

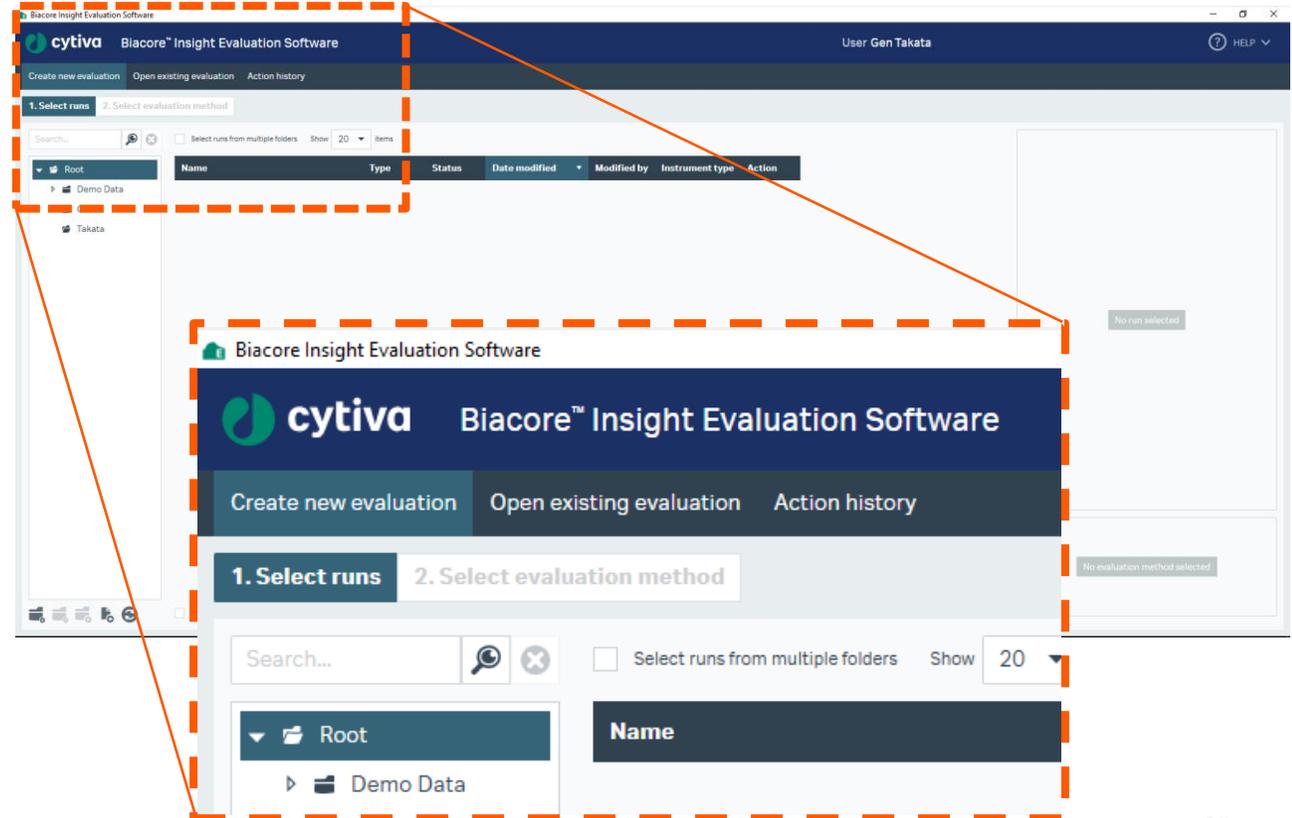
3-2. 抗体のBinding screen解析

1. Insight Evaluation Softwareの起動・ログイン



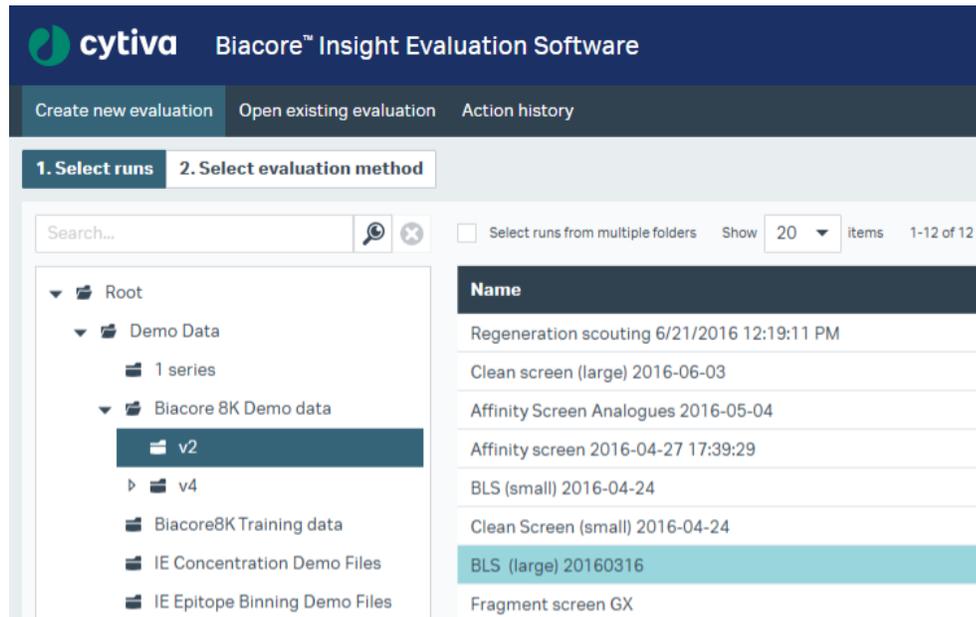
* User id、Passwordは、Insight Control Softwareログインと共通

2. Create new evaluationタブ／Select runsタブ画面で起動



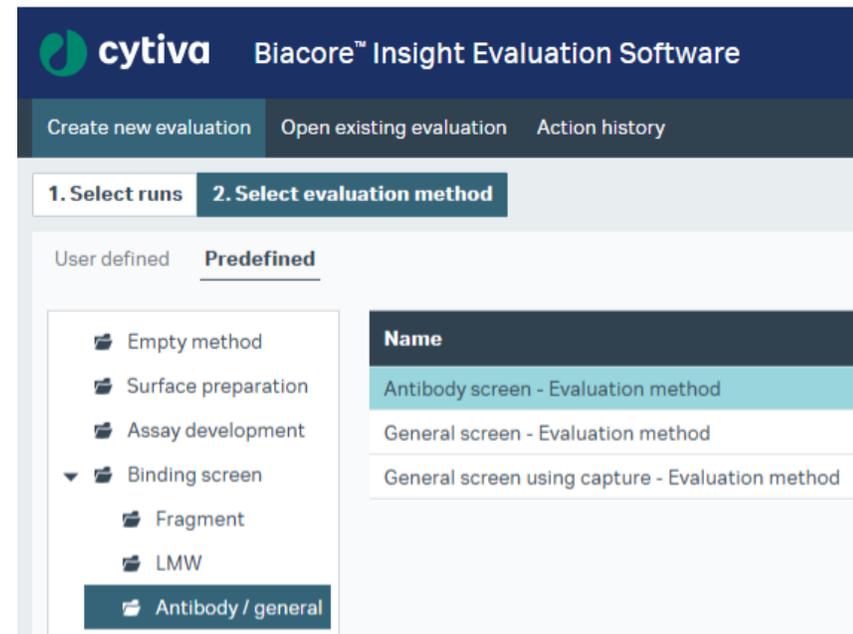
3-2. 抗体のBinding screen解析

1. Select runsタブから解析したいデータを選択して、Select evaluation methodをクリック



Select evaluation method

2. Predefinedタブから、Antibody screenのMethodを選択してOpen



Open

3-2. 抗体のBinding screen解析

Evaluation - Binding 画面 (解析結果)

Settings
解析方法の詳細
39ページ

Plot: Stability early vs Cycle
各サンプルの結合レスポンス

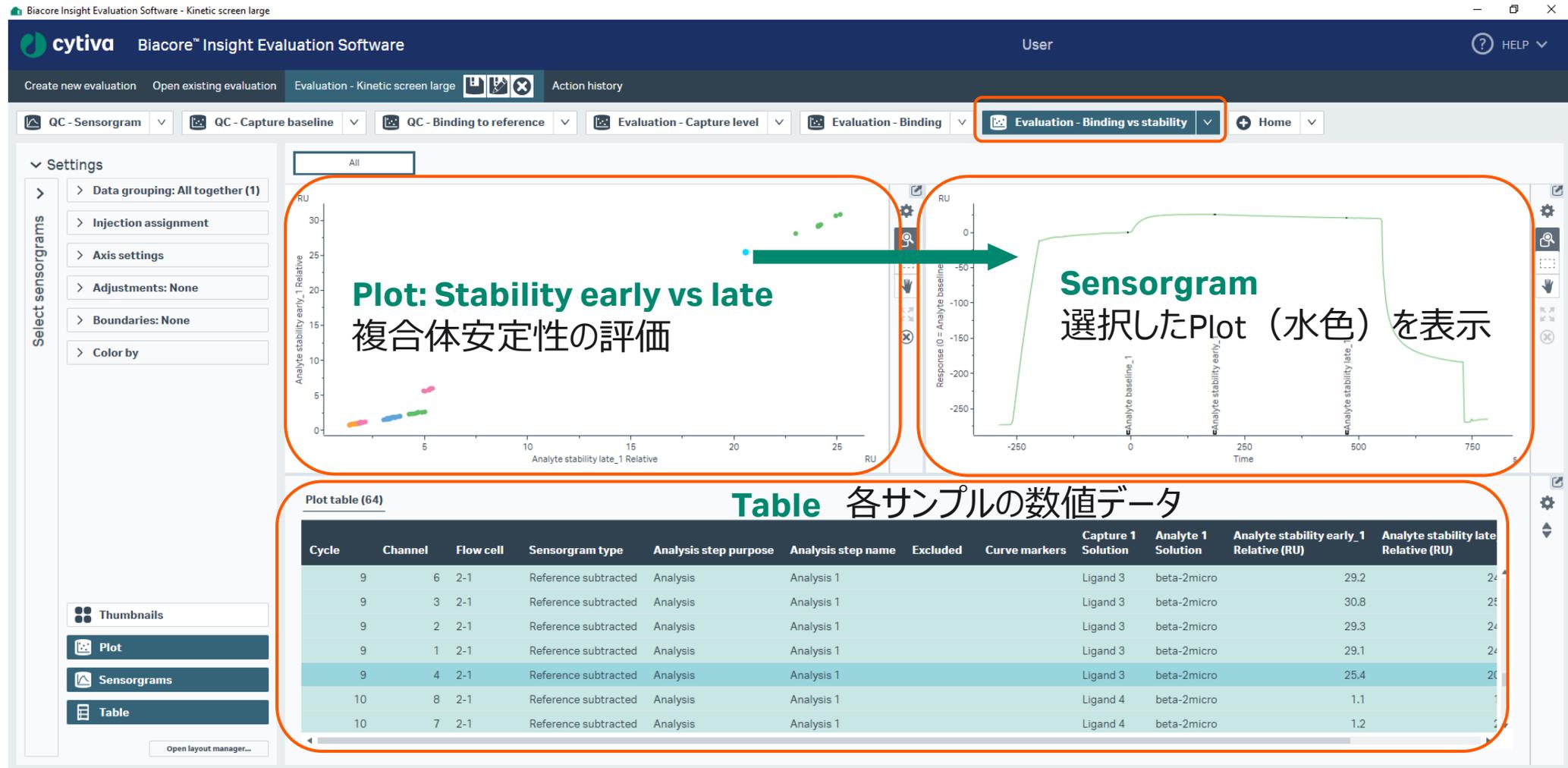
Sensorgram
選択したPlot (水色) を表示

Table 各サンプルの数値データ

Cycle	Channel	Flow cell	Sensorgram type	Analysis step purpose	Analysis step name	Excluded	Curve markers	Capture 1 Solution	Analyte 1 Solution	Analyte stability early_1 Relative (RU)
8	5	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	2.4
8	6	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	2.6
8	7	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	2.6
8	8	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	2.3
9	8	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	30.7
9	7	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	29.4
9	5	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	28.1
9	6	2-1	Reference subtracted	Analysis	Analysis 1			Ligand 3	beta-2micro	28.2

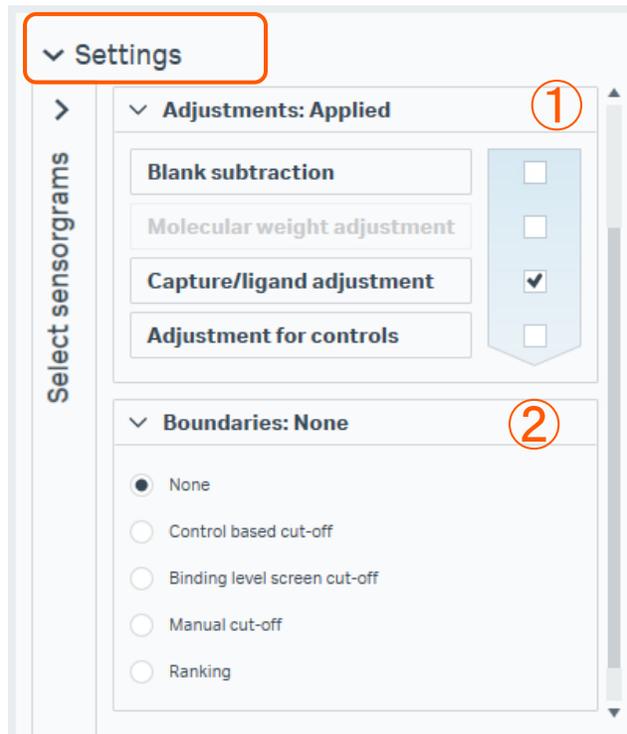
3-2. 抗体のBinding screen解析

Evaluation - Binding vs stability 画面 (解析結果)



3-2. 抗体のBinding screen解析

1. Adjustmentsで各種データ補正
2. Boundariesでヒットの閾値設定

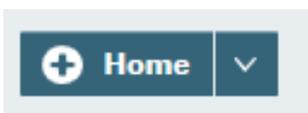


① Adjustments項目	説明
Blank subtraction	ブランク (0濃度) レスポンスの差し引き。 抗体のBinding screenでは通常使用しない。
Molecular weight adjustment	各プロットレスポンスを分子量でノーマライズ $100 \times \text{レスポンス (RU)} / \text{分子量 (Da)}$ 抗体スクリーニングでは抗原が同一のため通常実施しない。
Capture/ligand adjustment	各プロットレスポンスをキャプチャー量でノーマライズ。 抗体スクリーニングでよく使用する。
Adjustment for controls	リガンドをセンサーチップに直接固定している場合、のサイクル (時間) 経過による結合活性の低下 (レスポンスの下降) をノーマライズ 抗体スクリーニングでは通常キャプチャー法のため実施しない。
② Boundaries項目	説明
Cut-Off	単一のThresholdを設定。各ランキングを属するデータを返す。 Table中にabove/belowを表示。
Ranking	複数のThresholdを設定。各ランキングに属するデータを返す。 Table中にRanking valueを表示。

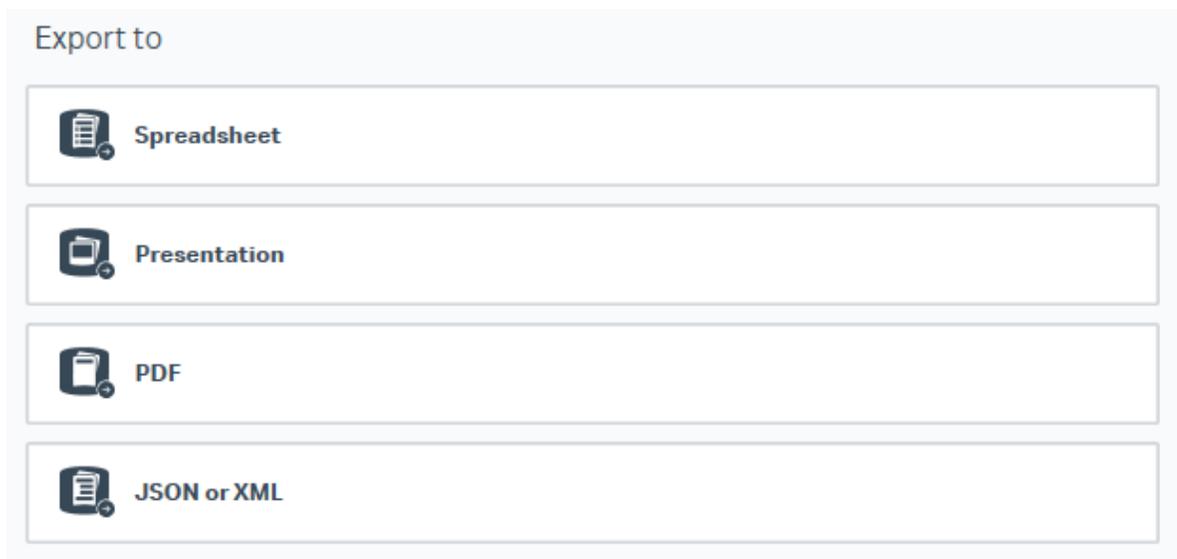
Boundariesは主にEvaluation – Bindingで使用する。

3-3. データエクスポート

1. 解析後、Homeをクリック



2. Export toより任意の形式で保存。



Spreadsheet

Excel workbook (*.xlsx) : エクセル形式

Presentation

PowerPoint presentation (*.pptx) : パワーポイント形式。エクスポート後、パワーポイントで各グラフのスケール、センサーグラムの色や太さなど編集が可能。

PDF

Portable document format (*.pdf) : PDF形式

JSON or XML (オプション)

JSON file (*.json)、XML file (*.xml) : 電子実験ノート (ELN) 形式

3-4. そのほかHome画面でできること

Settings and preparation

- Properties
- Variables
- Curve markers
- Report points
- Solvent correction

New evaluation items

- Sensorgram
- Plot
- Kinetics and affinity
- Kinetics
- Affinity

解析Methodの別名保存

After evaluation

- Create evaluation method

Export to

- Spreadsheet
- Presentation
- PDF

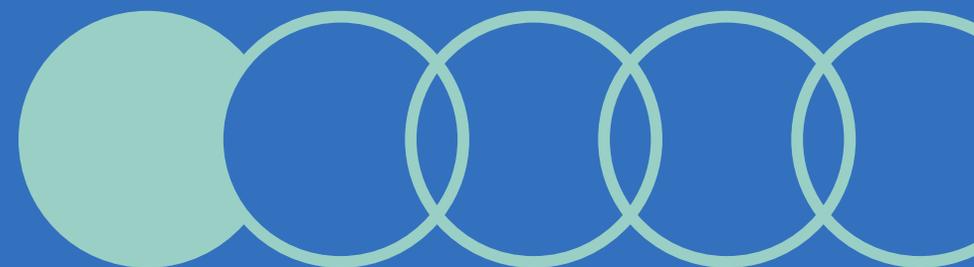
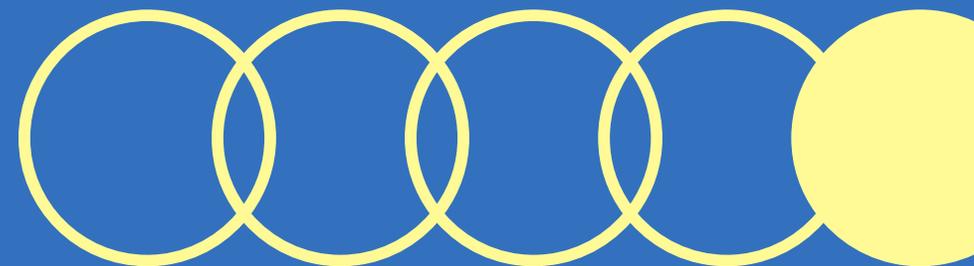
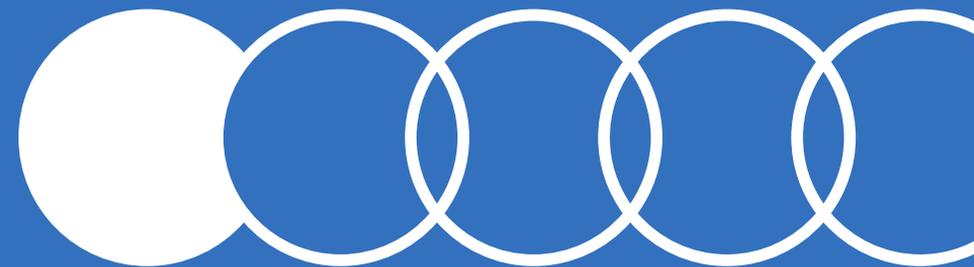
Settings and preparation

- **Properties** : データのプロパティやリガンド固定化量などの確認
- **Variables** : サンプル名、濃度値、Blank、Controlの設定などVariable項目の修正
- **Curve markers** : データにフラグを立てる場合、そのフラグの作成・編集
- **Report point** : レポートポイントの追加・削除・編集
- **Solvent Correction** : 溶媒補正の実行

各種Evaluation実行

各種Export

4. 抗体のKinetics screen



4. 本章の内容

4-1. 抗体のKinetics scree測定

- ・測定Methodの作成手順について

4-2. 抗体のKinetics screen解析

- ・抗体スクリーニングにおけるデータプロセッシングについて

4-3. データエクスポート

- ・解析結果のエクスポート手順について

4-4. そのほかHome画面でできること

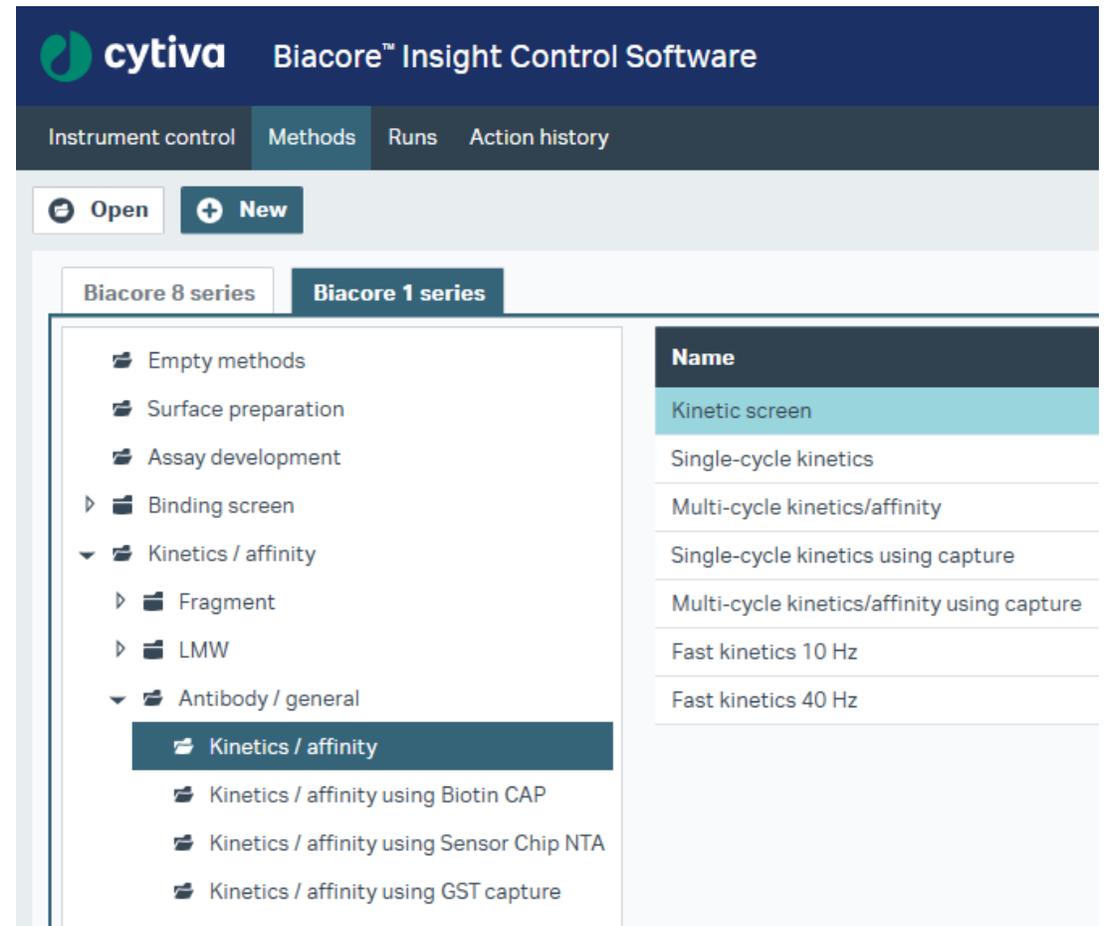
- ・Home画面から実施できることに関する補足

4-1. 抗体のKinetics screen測定

1. Methodをクリック



2. Newをクリック
3. Kinetics /affinityフォルダをクリック
4. Antibody / generalのKinetics /affinityから Kinetics screen を選択
5. Open



4-1. 抗体のKinetics screen測定

Control Softwareの構造～Method definitions

The screenshot displays the 'Method Builder - 1 Series' interface. At the top, a navigation bar includes '1. Method definition', '2. Variables and positioning', '3. Cycle overview', and '4. Plate layout'. A 'Send to queue' button is also visible. Below this, a 'Startup' and 'Analysis' step sequence is shown, with 'Analysis' being the active step. The 'Analysis' step configuration includes a 'Name' field (Analysis), 'Purpose' (Analysis), and a 'Repeat within' checkbox. A timeline below shows three steps: 'Capture 1' (marked with ①), 'Analyte 1' (marked with ②), and 'Regeneration 1' (marked with ③). The 'Analysis' configuration panel includes fields for 'Solution' (Analyte solution), 'Type' (High performance), 'Flow path' (1, 2), 'Contact time' (120 s), 'Dissociation time' (180 s), 'Flow rate' (30 µl/min), 'Concentration' (checked), and 'Molecular weight'. A 'User defined variables' section with an 'Add variable' button is also present.

測定設定の手順

1→2→3→4と進み、Queueへ送ります。

Method definitionにおけるフロー

温度設定、Startup、Analysis

Analysisにおける各コマンド

	項目	説明
①	Capture	抗体添加 (Active Cellのみ) Contact Time : 60-180秒 / Flow late : 10 µl/min.
②	Analyte	抗原添加 Contact Time : 60-120秒 / Dissociation time : 180秒 / Flow late : 30 µl/min.以上 / Concentration : Variable
③	Regeneration	再生、各KitやSensor ChipのIFU参照

4-1. 抗体のKinetics screen測定

Variables and positioning

The screenshot shows the 'Method Builder - 1 Series' interface. The '2. Variables and positioning' step is active. The table below shows the configuration for 17 samples. The 'Capture 1 - Solution' column (1) and 'Analyte 1 - Concentration' column (2) are highlighted. The well plate layout (3) and 'Positioning settings' sidebar (4) are also highlighted.

No	Capture 1 - Solution	Control	Analyte 1 - Concentration (nM)
1	Sample 1	▼	0
2	Sample 1	▼	1
3	Sample 2	▼	0
4	Sample 2	▼	1
5	Sample 3	▼	0
6	Sample 3	▼	1
7	Sample 4	▼	0
8	Sample 4	▼	1
9	Sample 5	▼	0
10	Sample 5	▼	1
11	Sample 6	▼	0
12	Sample 6	▼	1
13	Sample 7	▼	0
14	Sample 7	▼	1
15	Sample 8	▼	0
16	Sample 8	▼	1
17	Sample 9	▼	0

	項目	説明
①	Capture1 – Solution	抗体名入力
②	Analyte 1 - Concentration	各抗体について、0濃度と濃度1点
③	Positioning	マウス操作で配置変更
④	Positioning settings	配置ルール変更 (次項)

4-1. 抗体のKinetics screen測定

Positioning settings

項目	説明
①	Positioning settings 配置ルール変更
②	Pooling 複数回添加する同一溶液を少数のバイアル/ウェルにまとめるか
③	Plate/Rack Plate/Rackのどちらに分注するか
④	Vial size 使用するバイアルの種類
⑤	Priority より上段に配置された溶液が優先される

項目	説明
⑥	Plate and Rack Plateの溶液配置方向の指定 Horizontal(水平)/Vertical(垂直)
⑦	Sample series 全ての順番 or サンプル毎に別の列/行へ並べる
⑧	Reposition Positioning settingsの変更を自動で反映
⑨	Action マニュアル配置のリセット、指定したPositionを使用しない、指定した溶液は設定を反映しない

4-1. 抗体のKinetics screen測定

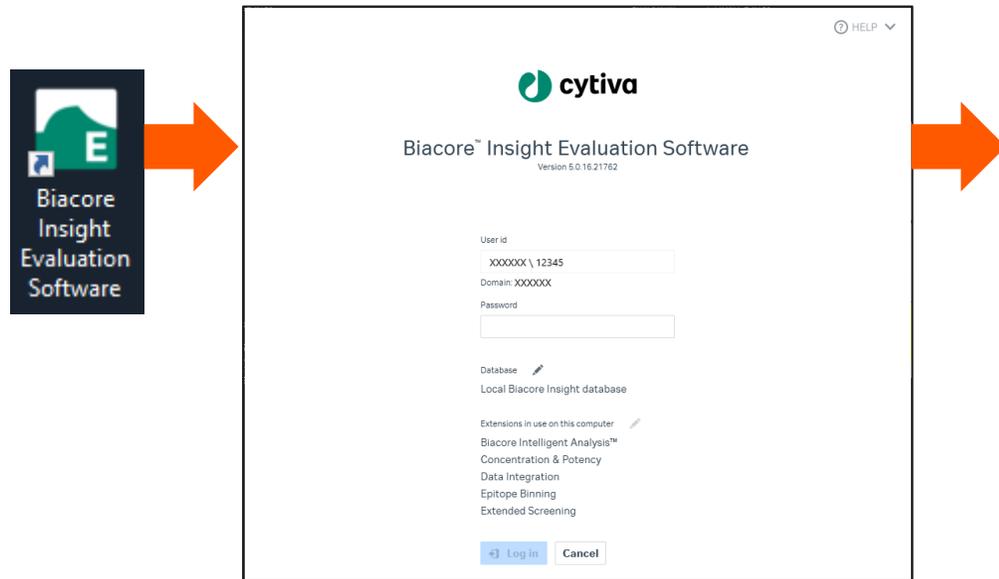
1. Plate layoutに従って分注

2. Send to queueで測定開始

項目	説明
① Trays	各溶液のポジションおよび液量の表示
① Volume summary	各溶液のトータルの必要量を表示
② 配置/液量	表示に従って準備
③ Send to queue	データのファイル名・保存先を指定して、測定開始

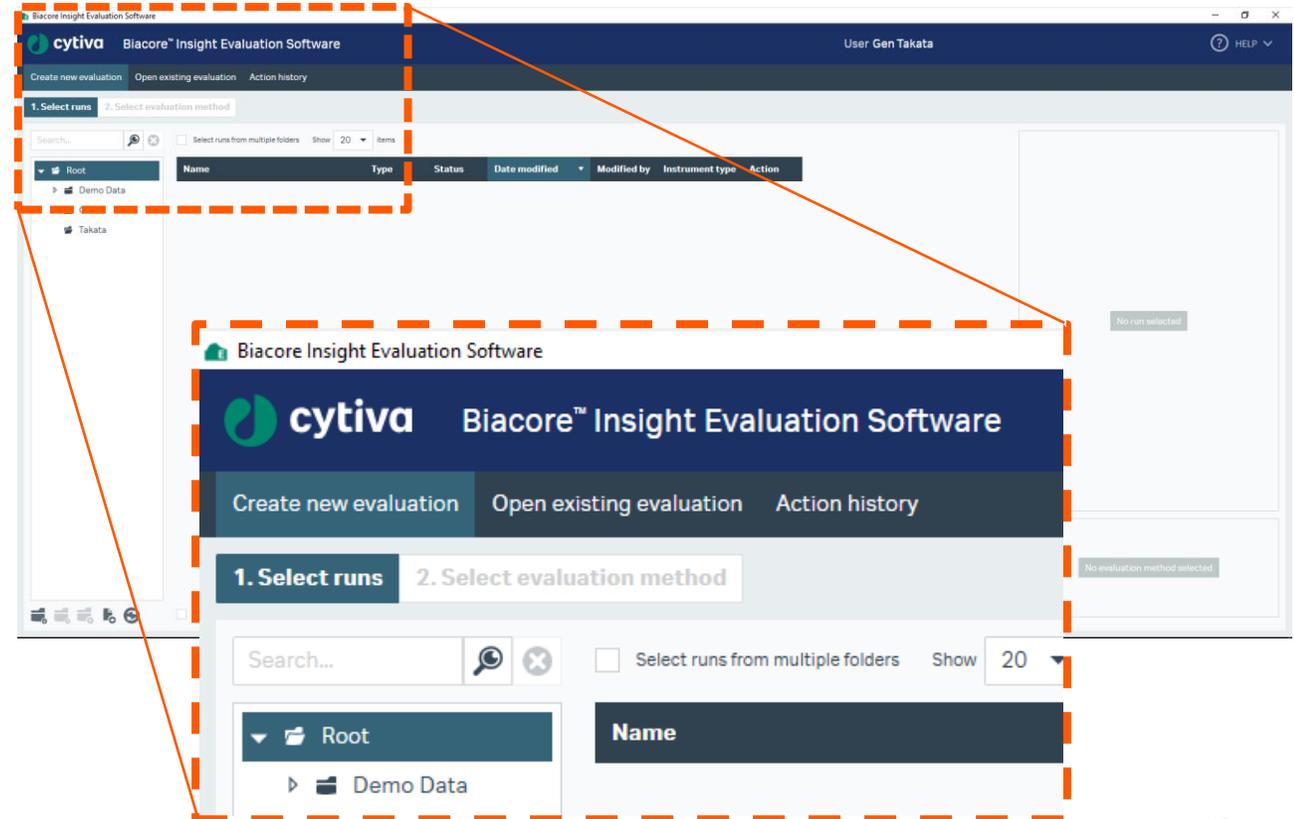
4-2. 抗体のKinetics screen解析

1. Insight Evaluation Softwareの起動・ログイン



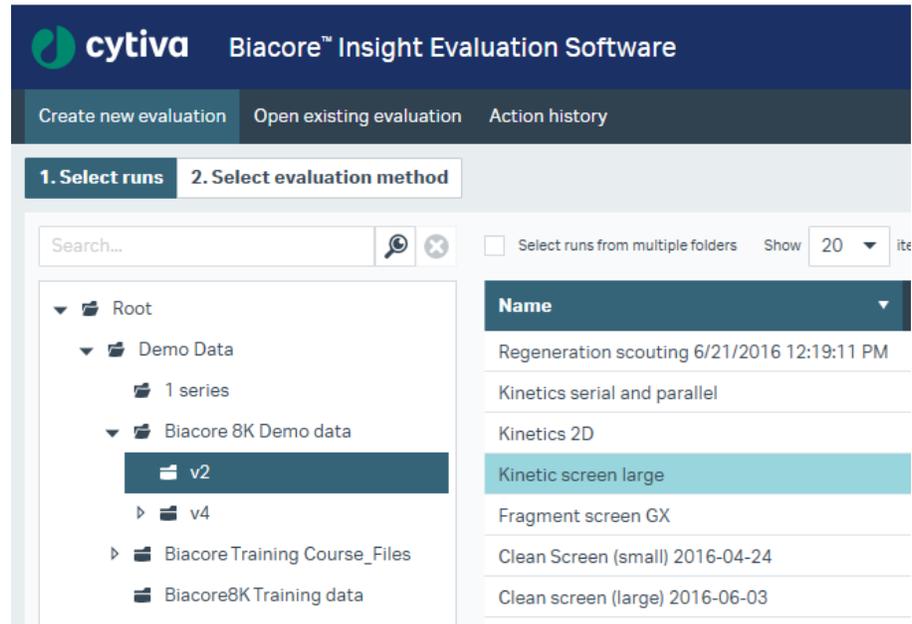
* User id、Passwordは、Insight Control Softwareログインと共通

2. Create new evaluationタブ／Select runsタブ画面で起動



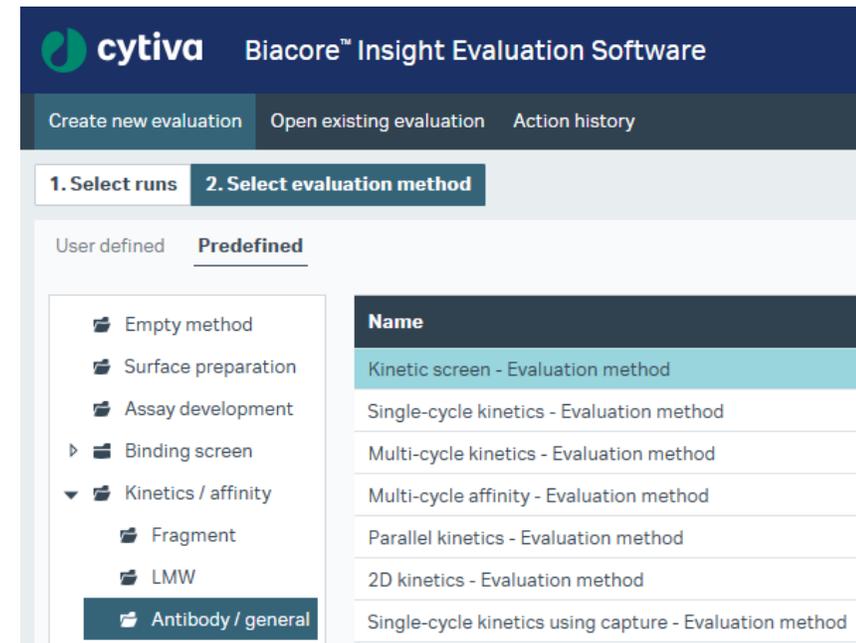
4-2. 抗体のKinetics screen解析

1. Select runsタブから解析したいデータを選択して、Select evaluation methodをクリック



Select evaluation method

2. Predefinedタブから、Kinetics screenのMethodを選択してOpen



Open

4-2. 抗体のKinetics screen解析

Evaluation – Kinetics screen デフォルト画面

The screenshot displays the Biacore Insight Evaluation Software interface. The main window shows a 'Kinetics screen' with a 'Thumbnails' section containing 10 small plots. The third thumbnail, labeled 'beta-2micro, Ligand 3, 1:1 binding', is selected and highlighted with a green arrow. Below the thumbnails, a large 'Sensorgram' plot shows 'Relative response' vs 'Time' for the selected binding event. The plot is annotated with the text 'Sensorgram 選択したThumbnailを表示'. Below the sensorgram, the 'Fit details' section is visible, showing '1:1 binding' parameters. The parameters are displayed in two columns: 'Series parameters' and 'Sensorgram parameters'. The 'Sensorgram parameters' table includes 'Curve', 'Conc (M)', and 'f (µl/min)'. The 'Fit details' section is annotated with the text 'Fit details Parameterタブで各解析パラメータを表示'.

Sensorgram
選択したThumbnailを表示

Fit details Parameterタブで各解析パラメータを表示

1:1 binding Series parameters	
ka (1/Ms)	1.37e+06
kd (1/s)	1.11e-03
Rmax (RU)	27.0
tc	8.88e+12
RI (RU)	0.0
Shift (DU/µl)	0.00e+00

1:1 binding Sensorgram parameters		
Curve	Conc (M)	f (µl/min)
#9: Sensorgram Ch=1 Fc=2-1	3.2E-08	30

4-2. 抗体のKinetics screen解析

Evaluation – Kinetics screen レイアウト変更

The screenshot shows the Biacore Insight Evaluation Software interface. The top navigation bar includes 'QC - Sensorgram', 'QC - Capture baseline', 'QC - Binding to reference', 'Evaluation - Capture level', and 'Evaluation - Kinetic screen' (highlighted with a red box). The left sidebar contains 'Settings' and 'Select sensorgrams' sections. The main area displays a 'Result table' (highlighted with a red box) and an 'On-off rate chart' (highlighted with a red box). The 'Result table' contains the following data:

Injection variables	Analyte 1 Solution	Quality Kinetics Chi ² (RU ²)	1:1 binding ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax
Ligand 4	beta-2micro	2.32e-03	1.60e+06	1.31e-03	8.16e-10	
Ligand 3	beta-2micro	2.19e-02	1.37e+06	1.11e-03	8.08e-10	
Ligand 2	beta-2micro	1.70e-03	8.06e+05	7.92e-08	9.83e-14	
Ligand 1	beta-2micro	3.87e-03	2.24e+04	9.67e-06	4.32e-10	
Ligand 4	beta-2micro	2.52e-03	1.52e+06	1.24e-03	8.12e-10	
Ligand 3	beta-2micro	2.48e-02	1.35e+06	1.09e-03	8.07e-10	

The 'On-off rate chart' is a log-log plot showing On-rate, ka (1/Ms) on the y-axis and Off-rate, kd (1/s) on the x-axis. The plot includes data points for various channels and ligands, with a legend on the right. The chart is annotated with 'X軸=kd、Y軸=ka、斜線=KD'.

Annotations in the image include:

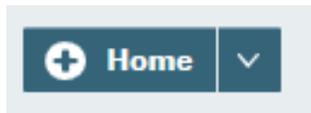
- Red box around the 'Evaluation - Kinetic screen' menu item.
- Red box around the 'Result table' and 'On-off rate chart'.
- Red box around the 'Select sensorgrams' sidebar, with a red circle '1' next to it.
- Red box around the 'Open layout manager...' button, with a red circle '2' next to it.

At the bottom of the screenshot, there is a 'Relative response' plot showing a binding curve for 'beta-2micro; Ligand 3; 1:1 binding'.

	項目	説明
①	Show/hide	表示したいTable、Chart、Sensorgramの選択
②	Open layout manager	各Table、Chart、Sensorgramの配置変更

4-3. データエクスポート

1. 解析後、Homeをクリック



2. Export toより任意の形式で保存。



Spreadsheet

Excel workbook (*.xlsx) : エクセル形式

Presentation

PowerPoint presentation (*.pptx) : パワーポイント形式。エクスポート後、パワーポイントで各グラフのスケール、センサーグラムの色や太さなど編集が可能。

PDF

Portable document format (*.pdf) : PDF形式

JSON or XML (オプション)

JSON file (*.json)、XML file (*.xml) : 電子実験ノート (ELN) 形式

4-4. そのほかHome画面でできること

Settings and preparation

- Properties
- Variables
- Curve markers
- Report points
- Solvent correction

New evaluation items

- Sensorgram
- Plot
- Kinetics and affinity
- Kinetics
- Affinity

解析Methodの別名保存

After evaluation

- Create evaluation method

Export to

- Spreadsheet
- Presentation
- PDF

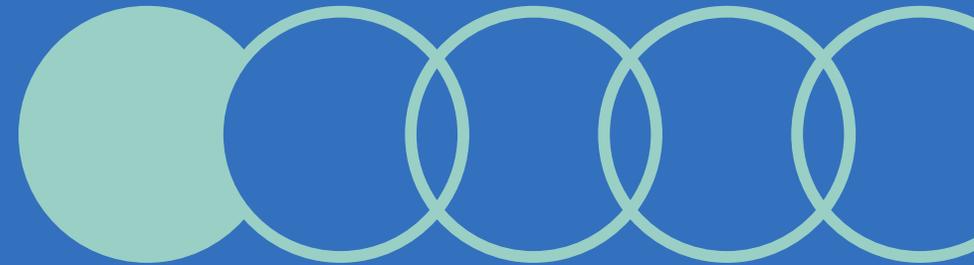
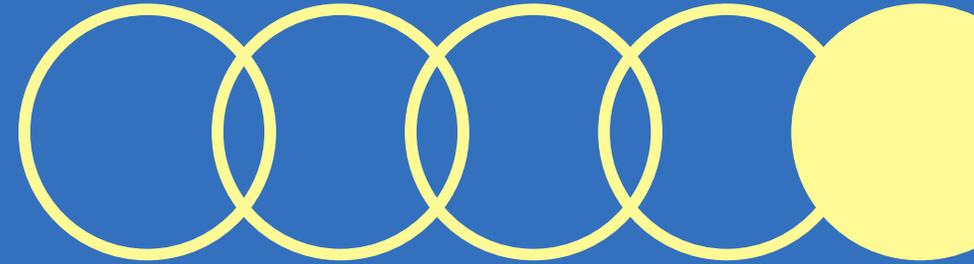
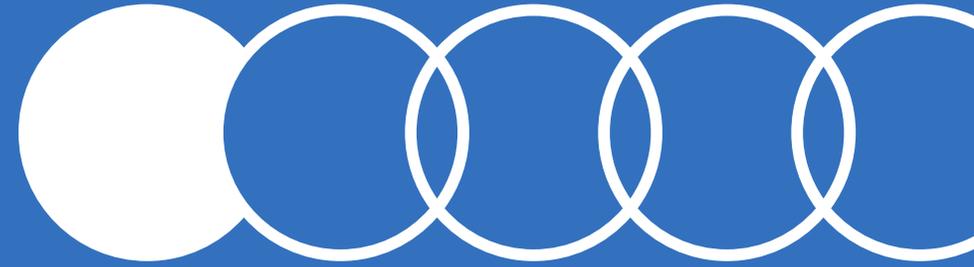
Settings and preparation

- **Properties** : データのプロパティやリガンド固定化量などの確認
- **Variables** : サンプル名、濃度値、Blank、Controlの設定などVariable項目の修正
- **Curve markers** : データにフラグを立てる場合、そのフラグの作成・編集
- **Report point** : レポートポイントの追加・削除・編集
- **Solvent Correction** : 溶媒補正の実行

各種Evaluation実行

各種Export

5. キャプチャー法による Kinetics/Affinity解析



5. 本章の内容

5-1. 測定条件の設定

- ・抗原-抗体の添加、再生条件などを確認するインタラクティブランについて

5-2. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)測定

- ・測定Methodの作成手順について

5-3. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)解析

- ・分子間相互作用解析の手順について

5-4. Kinetics (K_D , k_a , k_d)解析の詳細

- ・解析時のモデル式の選択およびInitial Valueについて
- ・解析結果の評価に関して

5-5. Affinity (K_D)解析の詳細

- ・解析時のモデル式の選択およびInitial Valueについて
- ・解析結果の評価に関して

5-6. データエクスポート

- ・解析結果のエクスポート手順について

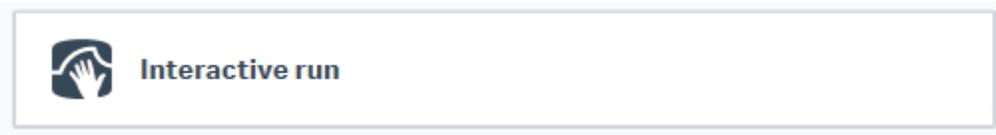
5-7. そのほかHome画面でできること

- ・Home画面から実施できることに関する補足

5-1. 測定条件の設定

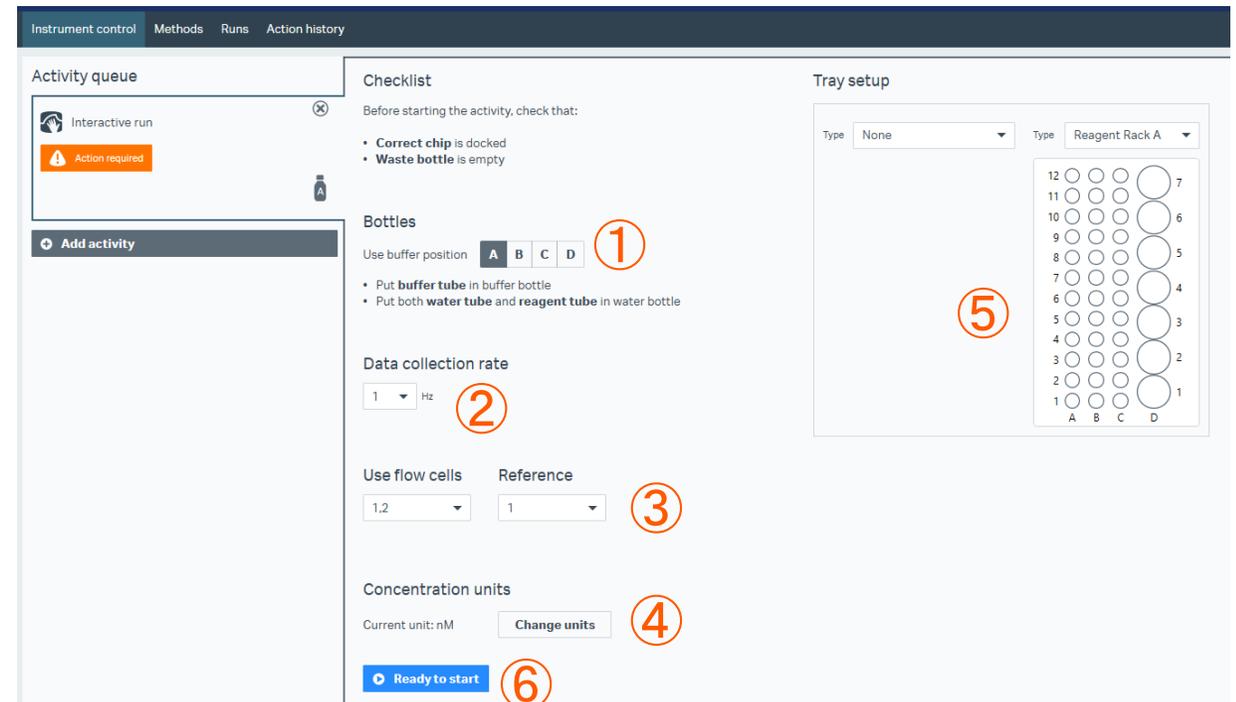
固定化が終わった後、結合の特異性、再生条件、アナライト添加濃度などを検討する必要があります。その検討にはInteractive runが便利です。

1. Interactive runをクリック



2. 使用するFlow cell、ラック、濃度単位などを選択してReady to Start

	項目	説明
①	Use buffer position	バッファチューブの選択。* 1K+/1S+のみ
②	Data correction rate	チェック目的ならば1 HzでもOK。
③	Use flow cells / Reference	使用するフローセルとリファレンスセルの選択
④	Concentration Unit	添加するアナライトの濃度単位
⑤	Tray setup	使用するプレート、サンプルラックの選択
⑥	Ready to start	Interactive Runの開始。 ファイル名、保存先の指定。

A screenshot of the software interface for 'Interactive run'. The interface is divided into several sections: 'Activity queue' on the left, 'Checklist' in the center, and 'Tray setup' on the right. The 'Checklist' section includes a warning 'Action required' and a list of items to check: 'Correct chip is docked' and 'Waste bottle is empty'. Below the checklist are settings for 'Bottles' (Use buffer position: A, B, C, D), 'Data collection rate' (1 Hz), 'Use flow cells / Reference' (1,2 / 1), and 'Concentration units' (Current unit: nM). The 'Tray setup' section shows a grid of wells (12x4) and a 'Ready to start' button. Red circles with numbers 1 through 6 are overlaid on the interface to highlight specific elements: 1 on the buffer position buttons, 2 on the data collection rate dropdown, 3 on the flow cell and reference dropdowns, 4 on the concentration units 'Change units' button, 5 on the tray setup grid, and 6 on the 'Ready to start' button.

5-1. 測定条件の設定

任意にサンプルインジェクションを行います。

	項目	説明
①	Add Command	実行したいコマンドの選択 *詳細下記
②	Sensorgrams	表示したいフローセルをチェック
③	Add cycle	Cycleの追加・切り替え
④	End run	実行中、ペンディング中のコマンドを実行後に終了
④	Abort run	実行中、ペンディング中のコマンドを止めて終了

Add command ▾ の各項目

項目	説明
Analyte	Analyteの添加（抗原の添加）
Capture	キャプチャー法におけるLigandの添加（抗体の添加）
Enhancement	Analyteに結合する分子で増感させたい場合
Regeneration	再生溶液の添加
General	Biotin CAPture Reagent、NTAチップにおけるNiなど
Wash	センサーチップ上を除く流路の洗浄
Eject tray	サンプルラックやプレートの取り出し

5-1. 測定条件の設定

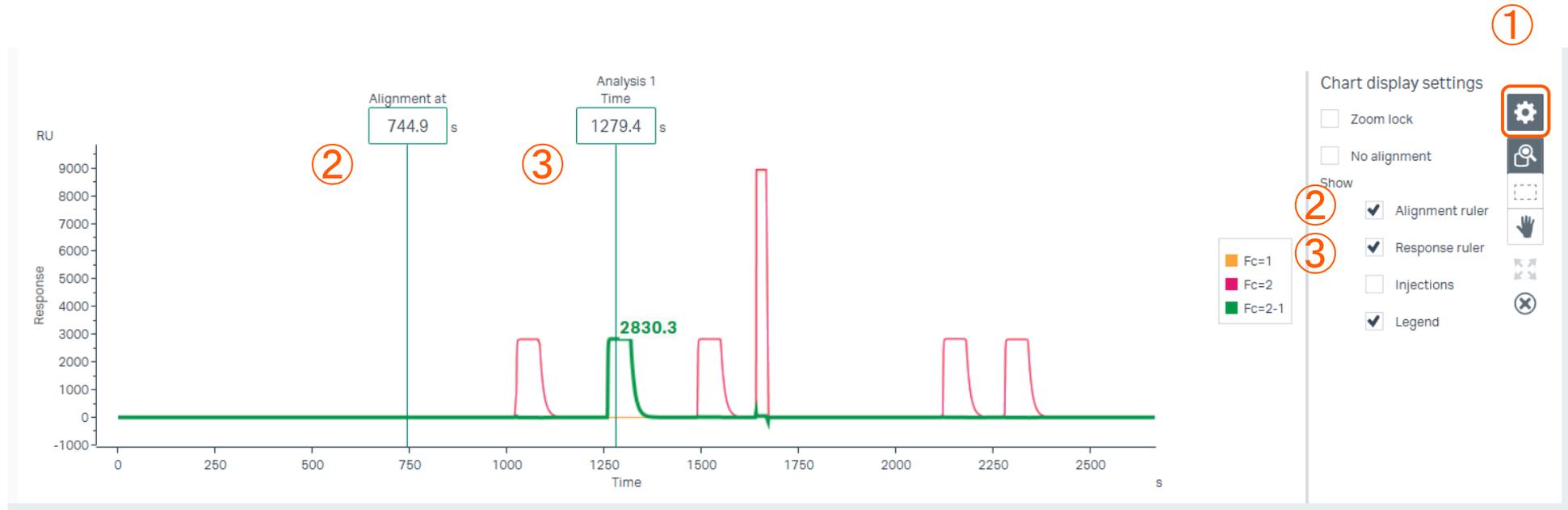
1. 各コマンドを選択したら添加条件を入力します。

	項目	説明
①	More	より詳細な指定・情報入力ができます。
②	Contact time	添加時間 Flow rate*Contact time/60 ≤ 1-400で設定
③	Flow rate	流速 1~100 µl/min.で設定
④	Dissociation time	解離時間の設定
⑤	Solutionなど	溶液名、濃度、分子量、希釈率の入力
⑥	Flow path	添加するフローセル。 Fc1,2の場合、Analyte、Regenerationなどは1,2、Captureは1のみ。
⑦	Type	a) High performance：解析まで行いたい場合 b) Low sample consumption：レスポンスの確認 c) Fast injection：インジェクション間の待機時間が短い *b)c)は溶液の消費量が同等に低い。
⑧	Comment	コメント欄
⑨	Position	・使用するプレート、バイアルの選択 ・サンプル配置の指定
⑩	**µl Solution is needed	添加時間と流速から算出される必要液量の確認
⑪	Ready to start	添加開始

5-1. 測定条件の設定

1. Reference lineの活用

	項目	説明
①	Chart display settings	⚙️ より、センサーグラム表示の詳細設定
②	Alignment ruler	ベースライン (0 RU) にする時間を指定します。 * 対象のセンサーグラムをクリックします。
③	Response ruler	Alignment rulerで指定したベースラインに対するResponseが表示されます。 * 対象のセンサーグラムをクリックします。

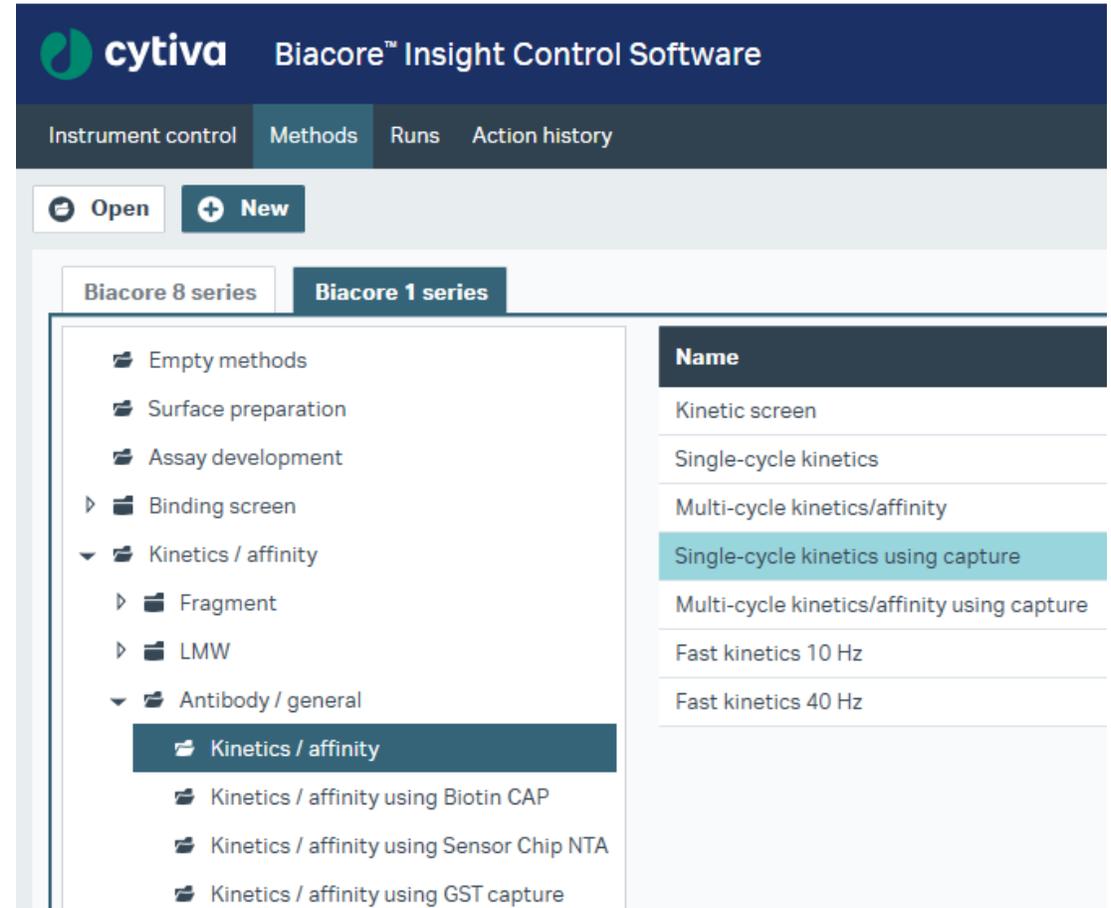


5-2. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)測定

1. Methodをクリック



2. Newをクリック
3. Kinetics /Affinityフォルダをクリック
4. 抗原-抗体の相互作用であれば、Antibody / generalを選択
5. キャプチャー法であれば、Single-cycle kinetics using captureをお勧め
6. Methodを選択してOpen



5-2. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)測定

Instrument control Methods Runs Action history Preferences

Single-cycle kinetics using capture Open New

Method Builder - 1 Series

1. Method definition 2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate layout Send to queue

測定設定の手順
1→2→3→4と進み、Queueへ送ります。

General settings

Use flow cells 1, 2
Reference 1

Change flow cells

Data collection rate 10 Hz

Running buffer Buffer

Concentration unit nM

Change units ④

Method definitionにおけるフロー
温度設定、Startup、Analysis

Analysisにおける各コマンド

項目	説明
① Capture	抗体のキャプチャー時間を設定、デフォルトの流速10 μ l/min。抗原が複数ある場合、SolutionのVariableにチェック。
② Single cycle kinetics	抗原濃度点数、コンタクト時間、解離時間を設定。デフォルトの流速30 μ l/min。変数にしたい項目はVariableにチェック
③ Regeneration	再生用試薬、添加時間など * キットに使用時はIFU参照
④ Change units	コマンド毎に使用したい濃度単位を変更

Command type Concentration unit

Analyte nM

Single cycle kinetics nM

A-B-A nM

Dual nM

Capture nM

Enhancement nM

General nM

Poly nM

Apply and close Close

Property Variable Value

Solution Variable

Contact time 120 s

Dissociation time 600 s

Flow rate 30 μ l/min

Molecular weight Da

Flow path 1, 2

Concentrations per cycle 5

User defined variables

Add variable

5-2. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)測定

Variables and positioning

The screenshot shows the 'Method Builder' interface for 'Single-cycle kinetics using capture'. The '2. Variables and positioning' tab is active. The table below shows the experimental conditions for 'Capture 1 - Single cycle kinetics 1'.

No	Solution	Control	Solution	Control	Concentration 1 (nM)	Concentration 2 (nM)	Concentration 3 (nM)	Concentration 4 (nM)	
1	Ab1	▼	Ag1	▼	0	0	0		
2	Ab1	▼	Ag1	▼	2.4	12	60		30
3	Ab1	▼	Ag2	▼	0	0	0		
4	Ab1	①	Ag2	▼	2.4	12	60		30
5	Ab2	▼	Ag1	▼	0	0	0		
6	Ab2	▼	Ag1	▼	2.4	12	60		30
7	Ab2	▼	Ag2	▼	0	0	0		
8	Ab2	▼	Ag2	▼	2.4	12	60		30

The 'Positioning settings' panel on the right shows a grid for 'Plate 1' (96 well 250 µl) and 'Rack 1' (Reagent Rack A). The grid is numbered 1-12 for rows and A-H for columns. A 'Positioning settings' sidebar is also visible.

	項目	説明
①	Solution	抗原-抗体がVariableの場合はサンプル名称入力
②	Concentration	0濃度および各濃度
③	Positioning	マウス操作で配置変更
④	Positioning settings	配置ルール変更 (次項)

5-2. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)測定

Positioning settings

	項目	説明		項目	説明
	① Positioning settings	配置ルール変更		⑥ Plate and Rack	Plateの溶液配置方向の指定 Horizontal(水平)/Vertical(垂直)
	② Pooling	複数回添加する同一溶液を少数の バイアル/ウェルにまとめるか		⑦ Sample series	全ての順番 or サンプル毎に別の列/行へ並べる
	③ Plate/Rack	Plate/Rackのどちらに分注するか		⑧ Reposition	Positioning settingsの変更を自動で反映
	④ Vial size	使用するバイアルの種類		⑨ Action	マニュアル配置のリセット、指定したPositionを使用しない、指定した溶液は設定を反映しない
	⑤ Priority	より上段に配置された溶液が優先される			

5-2. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)測定

1. Plate layoutに従って準備

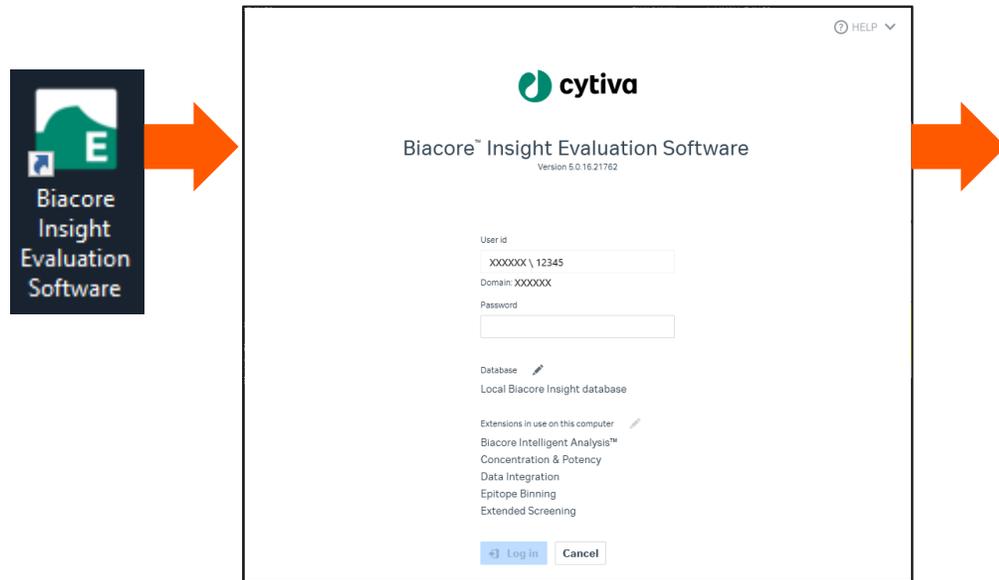
2. Send to queueで測定開始

The screenshot shows the 'Method Builder - 1 Series' interface. The '4. Plate layout' step is active. The 'Bottles' section shows 'Buffer bottle 200 ml Buffer' and 'Water bottle 200 ml Water'. The 'Plate 1' grid shows a 12x8 layout with columns A-H and rows 1-12. The 'Send to queue' button is highlighted with a red circle 3. The 'Trays' and 'Volume summary' tabs are highlighted with a red circle 1. The 'Plate 1' grid is highlighted with a red circle 2.

項目	説明
① Trays	各溶液のポジションおよび液量の表示
① Volume summary	各溶液のトータルの必要量を表示
② 配置/液量	表示に従って準備
③ Send to queue	データのファイル名・保存先を指定して、測定開始

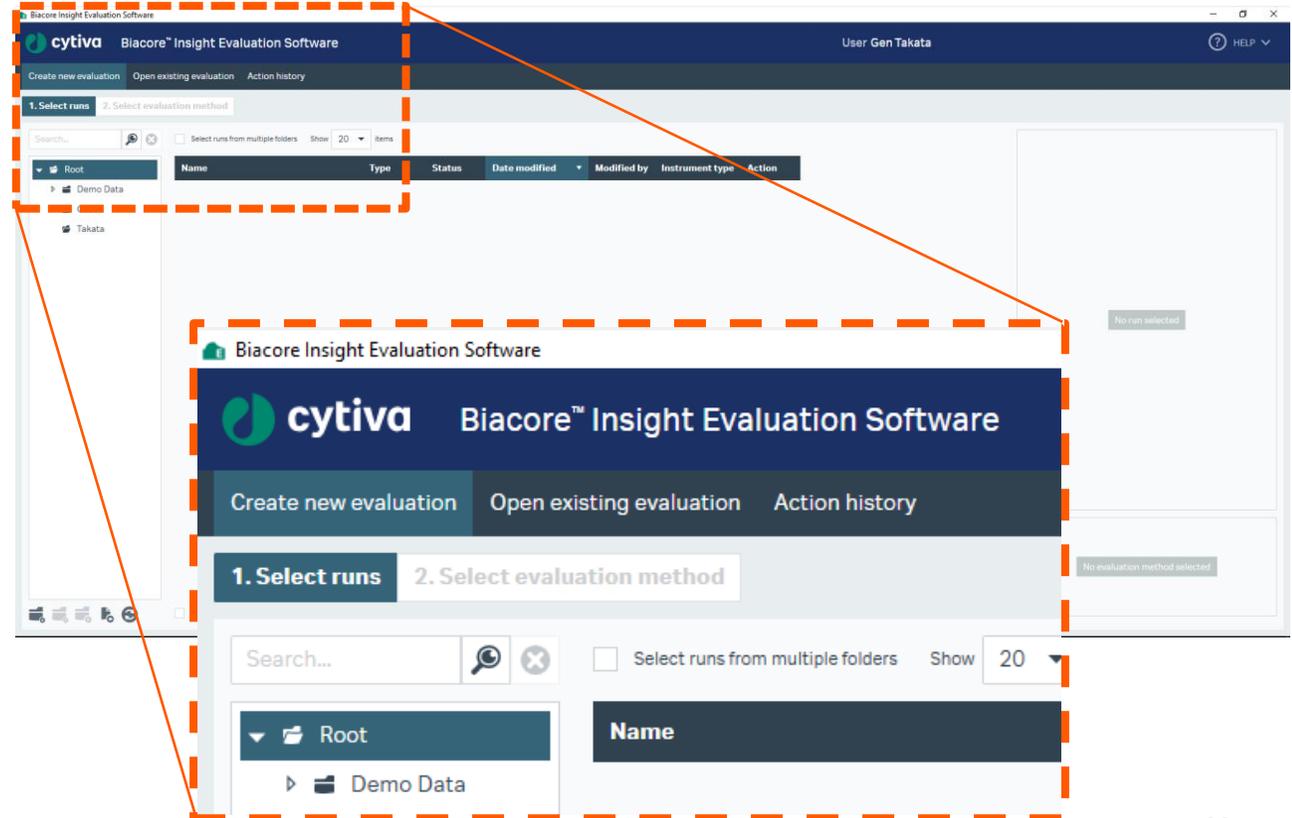
5-3. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)解析

1. Insight Evaluation Softwareの起動・ログイン



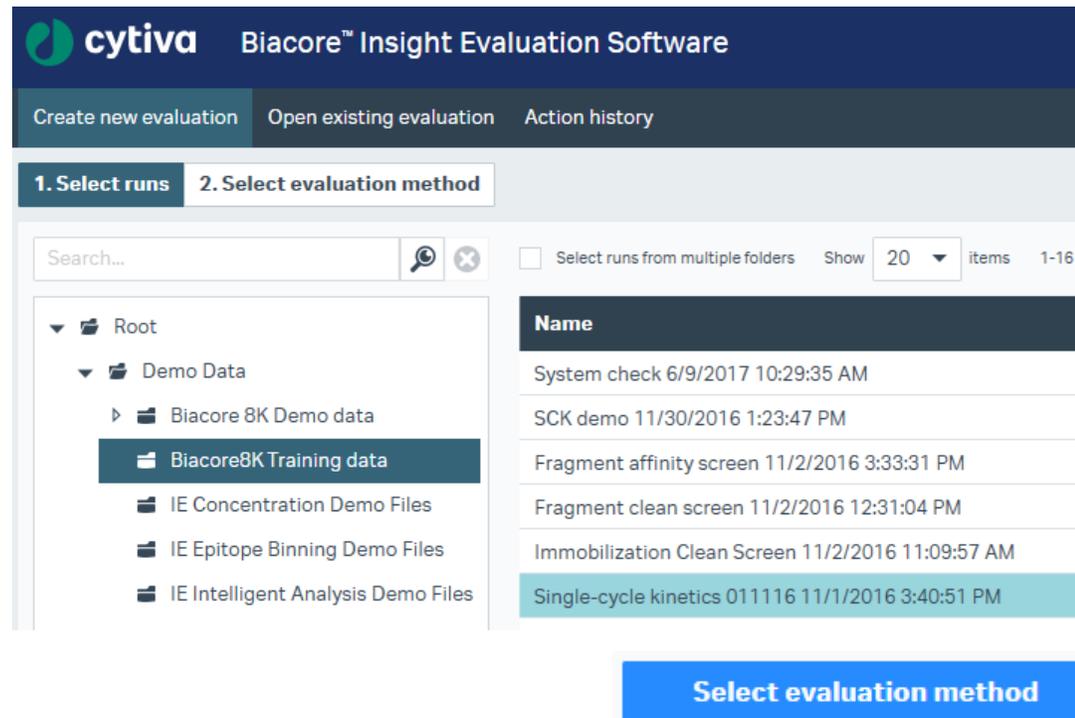
* User id、Passwordは、Insight Control Softwareログインと共通

2. Create new evaluationタブ / Select runsタブ画面で起動

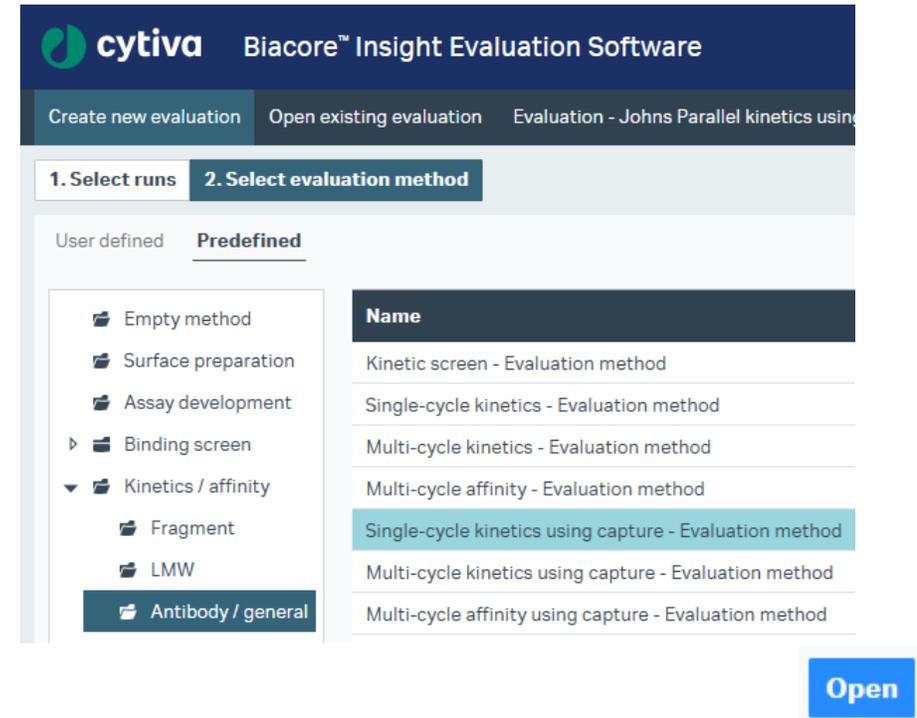


5-3. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)解析

1. Select runsタブから解析したいデータを選択して、Select evaluation methodをクリック



2. Predefinedタブから、解析方法にあったMethodを選択してOpen



5-3. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)解析

Evaluation画面 (解析結果)

Settings
解析方法の詳細
再解析次項

Settings
Data grouping (8)
Serial Parallel/2D
Injection assignment
Kinetics/Affinity mode
Settings apply to selected series
Kinetics Affinity Both
Blank settings
Fit models Perform fit [0]
Initial values
Quality prediction: None

Thumbnails
センサーグラムとフィッティングカーブの一覧

Sensorgrams
選択したデータのセンサーグラムとフィッティングカーブ

1:1 binding: $k_a=2.58e+05$, $k_d=7.99e-04$, $R_{max}=733.2$, $K_D=3.10e-09$

Sample table	Parameters	Residuals	Blanks	Quality control	References
1:1 binding Series parameters	1:1 binding Sensorgram parameters				
k_a (1/Ms)	2.58e+05				
k_d (1/s)	7.99e-04				
R_{max} (RU)	733.2				
t_c	5.87e+08				
R_I (RU)	0.0				
Drift (RU/s)	0.00e+00				

Fit detail
選択したデータの解析結果詳細
 k_a, k_d など各種パラメータ、Quality Controlなど

5-3. Kinetics/Affinity (K_D , k_a , k_d)解析

Settings

Data grouping (8)

Serial Parallel/2D

Injection assignment

Kinetics/Affinity mode

Settings apply to selected series

Kinetics Affinity Both

Blank settings

Fit models Perform fit [8]

Settings apply to selected series

Kinetics fit model [8] 1:1 binding

Initial values

	項目	説明
①	Settings	設定を変えて再解析ができます。
②	Data grouping	* 8 seriesデータ解析時のみ Serial : マルチサイクル法またはサイクル法 Parallel/2D : パラレル法または2Dカインेटイクス法
③	Kinetics/Affinity mode	Kinetics : カインेटイクス解析 (k_a, k_d, K_D の算出) Affinity : アフィニティー解析 (平衡値解析 : K_D のみ算出) Both : カインेटイクス解析、アフィニティー解析の両方を実施
④	Blank settings	Blank (0濃度) によるドリフト補正。 アナライトと同一名称、直前、直後、直近のサイクルから選択
⑤	Fit models	結合様式に従って選択 Kinetics解析では多くの場合1:1 binding * 詳細次項
⑥	Initial values	フィッティング解析の初期値 まずデフォルトで * 詳細次項
⑦	Perform fit	再設定後、解析実行

5-4. Kinetics (K_D , k_a , k_d)解析の詳細

1. Kinetics解析におけるFit model

モデル式	説明
1:1 binding	$A + B \rightleftharpoons AB$ 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。
1:1 dissociation	$A + B \rightleftharpoons AB$ 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。 * 解離相のみをフィッティングして k_d のみを算出
Bivalent analyte	$A + B \rightleftharpoons AB$, $AB + B \rightleftharpoons AB_2$ 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 ligand	$A + B_1 \rightleftharpoons AB_1$, $A + B_2 \rightleftharpoons AB_2$ 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	$A + B \rightleftharpoons AB \rightleftharpoons AB^*$ 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。

2. Kinetics解析におけるInitial Value

項目	説明
Fit	Fit Global : 複数濃度のセンサーグラムで 1 つの解を求めます。 Fit Local : 各濃度のセンサーグラムでそれぞれ解を求めます。 Constant : 固定値。
Initial values	Fitting解析をはじめる初期値を設定。 Constantと併せて固定値を設定。

変更を加える場合（多くはデフォルトのまま）

項目	説明
k_a	多くの場合、変更はしない。
k_d	解離が遅いもので、真値と明らかに異なる値が出た場合、 $1e-5$ くらいからはじめることもある。
Rmax	通常はFit Global。再生が不十分でサイクルごとにRmaxが変わる際、Fit Localを使用するケースがある。
tc	多くの場合、変更はしない。
RI	デフォルトでConstant 0。バルクが大きく、ダブルサブトラクションを行ってもアナライトインジェクション前後に段差が残る場合、Fit global、Initial Value=Ymax/5。
Drift	デフォルトでConstant 0。ドリフトが大きく、ダブルサブトラクションを行ってもベースラインが傾いている場合、Fit global、Initial Value=0。

5-4. Kinetics (K_D , k_a , k_d)解析の詳細

1. 1:1 binding modelを用いたKinetics解析結果でははじめにQuality Controlを確認します。

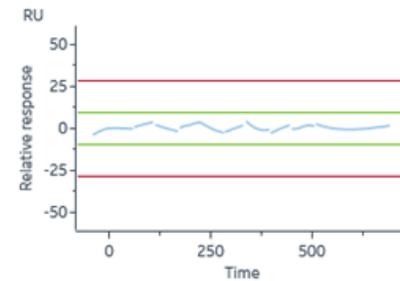
Sample table Parameters Residuals Blanks **Quality control** References

- ✓ Kinetic constants are within instrument specifications. ①
- ✓ Kinetic constants appear to be uniquely determined. ②
- ⓘ Bulk contributions (RI) were not evaluated. The RI parameter is set to constant. ③
- ⓘ Check that sensorgrams have sufficient curvature. ④
- ⓘ Examine the residual plot. Pay attention to systematic and non-random deviations. ⑤

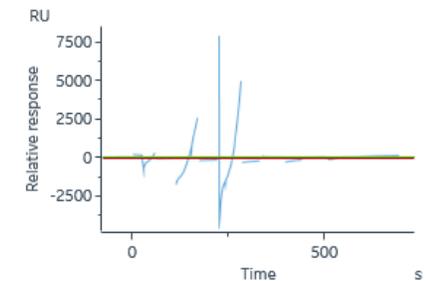
- ✓ (緑) クオリティーアセスメントにパスしています。
- ⚠ (橙) クオリティーアセスメントの許容限界に近いです。
- ❌ (赤) クオリティーアセスメントにパスしていません。
- ⓘ (灰) 測定者が確認します。

	項目	説明
①	速度定数がシステムのスペック範囲内か？	$k_a \sim 3e9$ (タンパク質)、 $\sim 5e7$ (低分子化合物) $k_d = 1e-6 \sim 1$ (Biacore 1K/1K+)、 $1e-6 \sim 6$ (Biacore 1S+)
②	各パラメータが独立して算出されているか？	k_a 、 k_d および Rmax の間に相関性はない。 マストランスポートリミテーション下で k_a 、 k_d に相関性が見られる。
③	溶液効果の値 (RI) の妥当性	デフォルトで0にしているが、アナライト添加直後に急激なレスポンス変動が起きてから特異的な結合カーブが出現していないことを目視確認する。
④	センサーグラムはカーブを描いているか？	高濃度サンプルに注目。センサーグラムの結合・解離領域が直線的な場合、Fitting結果の信頼性は低い。
⑤	フィッティングカーブに対して測定プロットがランダムに分散しているか？	Residualsタブを確認。良好なフィッティングでは、データがランダムに分散し、緑色のガイドライン内にほぼ全てのプロットが収まる。下図参照。

Residuals for a good fit



Residuals for a poor fit



5-4. Kinetics (K_D , k_a , k_d)解析の詳細

1. 1:1 binding modelを用いたKinetics解析結果

	単位	説明
結合速度定数 k_a	1/Ms	複合体形成速度。1MのAとBを混合した際、1秒間に形成する複合体の数。
解離速度定数 k_d	1/s	複合体の安定性。複合体が1秒間に解離する割合。 $k_d = 0.01 \text{ s}^{-1} = 1\%$ 1秒当たり複合体が1%解離する。
解離定数 K_D	M	アナライトを添加して平衡状態になった時、リガンドの半分が複合体を形成している時の濃度を示す。
Rmax	RU	実測のアナライト最大結合量。理論的Rmax (31ページ参照)を超えた場合、特異的な結合でないことが考えられる。
溶媒効果 RI	RU	デフォルトで0に固定されている。アナライト添加直後に急激なレスポンス変動が起きてから、特異的な結合カーブが出現していないことを目視確認する。
tc値	$\text{RU} \cdot \text{M}^{-1} \text{s}^{-2/3} \text{m}^{-1}$	分子量50kDa程度の球状タンパク質では 10^8 程度。 tcが大きい分にはMTLは考慮しなくとも良いと判断できる

2. Fitting 解に対する評価パラメーター

	単位	説明
カイ二乗 Chi ²	RU ²	測定データとフィッティングカーブ間における残差の平均平方値。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致。
U-value	-	k_a , k_d の解が連動していないか (uniqueであるか)、測定条件がMTL環境下でないかを評価するために設定されたパラメータ。 ≤15問題なし。≥25算出された値の信頼性は低い。
標準誤差 SE	-	各パラメータについてSEを算出。 k_a , k_d などの解析結果については、一般的に10%以下で問題ないと判定されることが多い。

5-5. Affinity (K_D)解析の詳細

1. Affinity解析におけるFit model

モデル式	説明
Steady State Affinity $R_{eq} = \frac{CR_{max}}{K_D + C} + offset$	1:1 Binding modelで、Rmax は Fitting パラメータ。
Steady State Affinity (constant Rmax)	高濃度側のアナライトのデータポイントを取得できないケース。Steady State Affinityと同じモデル式で、ポジコンのRmaxと分子量を代入して解析を行う。
Steady State Affinity (constant Rmax and multi-site) $R_{eq} = \frac{CR_{max1}}{K_{D1} + C} + \frac{CR_{max2}}{K_{D2} + C} + offset$	Steady stateで収束するが理論的Rmaxを超過するケース。複数の部位への結合が想定される場合、下記の式でRmax1にポジコンのRmaxと分子量を代入して解析を行う。

* Steady State Affinity (constant Rmax)および Steady State Affinity (constant Rmax and multi-site)は Extended Screening extensionが必要です。

2. Affinity解析において数値を取得する箇所を指定

3. Affinity解析におけるInitial Value

項目	説明
Fit	Fit Global : 複数濃度のセンサーグラムで 1 つの解を求めます。 Fit Local : 各濃度のセンサーグラムでそれぞれ解を求めます。 Constant : 固定値。
Initial Value	Fitting解析をはじめの初期値を設定。 Constantと併せて固定値を設定。

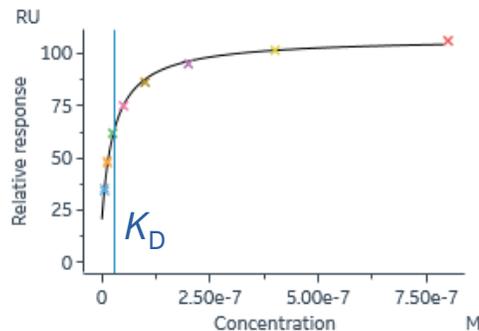
主な変更点 (多くの場合デフォルトのまま)

項目	説明
K_D	多くの場合、変更はしない。
Rmax	通常はFit Global。再生が不十分でサイクルごとにRmaxが変わる際、Fit Localを使用するケースがある。
offset	多くの場合、変更はしない。

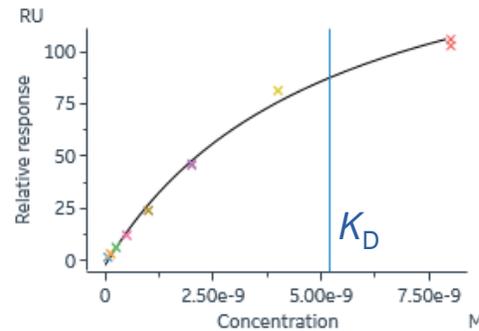
5-5. Affinity (K_D)解析の詳細

- Affinity解析における解析結果の信頼性確認
信頼性の高い解析結果を得るためには、アナライトの最高濃度が K_D 値の2倍以上で添加されていると信頼性が高い。

信頼性が高い



信頼性が低い



- Affinity解析の結果

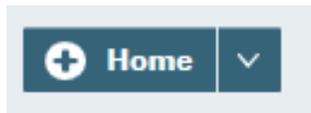
	単位	説明
解離定数 K_D	M	アナライトを添加して平衡状態になった時、リガンドの半分が複合体を形成している時の濃度を指します。
Rmax	RU	実測のアナライト最大結合量。理論的Rmax (31ページ参照)を超えた場合、特異的な結合でないことが考えられます。
Offset	RU	X = 0 の時のY 軸の値

- Fitting 解に対する評価パラメーター

	単位	説明
カイ二乗 Chi^2	RU^2	各レポートポイントのプロットとフィッティングカーブ間における残差の平均平方値。値が小さいほど良好。

5-6. データエクスポート

1. 解析後、Homeをクリック



2. Export toより任意の形式で保存。



Spreadsheet

Excel workbook (*.xlsx) : エクセル形式

Presentation

PowerPoint presentation (*.pptx) : パワーポイント形式。エクスポート後、パワーポイントで各グラフのスケール、センサーグラムの色や太さなど編集が可能。

PDF

Portable document format (*.pdf) : PDF形式

JSON or XML (オプション)

JSON file (*.json)、XML file (*.xml) : 電子実験ノート (ELN) 形式

5-7. そのほかHome画面でできること

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software

Create new evaluation Open existing evaluation Evaluation - Fragment affinity screen 11/2/2016 3:33:31 PM Action history

Home

解析Methodの別名保存

Settings and preparation

- Properties
- Variables
- Curve markers
- Report points
- Solvent correction

New evaluation items

- Sensorgram
- Plot
- Kinetics and affinity
- Kinetics
- Affinity

After evaluation

- Create evaluation method

Export to

- Spreadsheet
- Presentation
- PDF

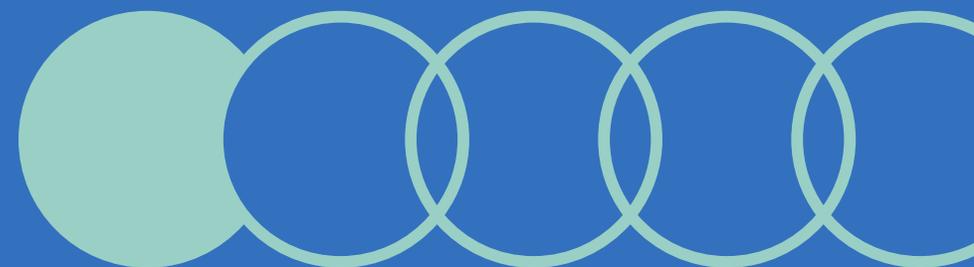
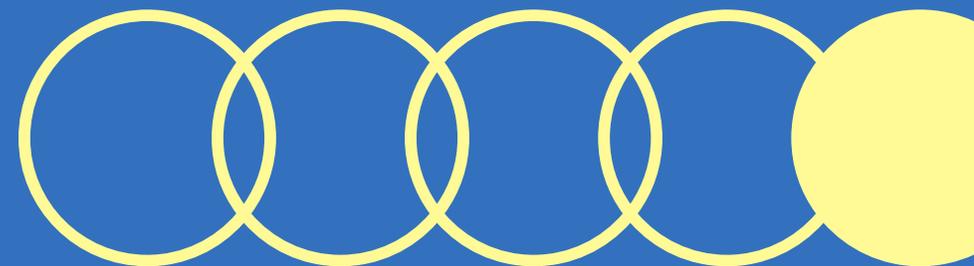
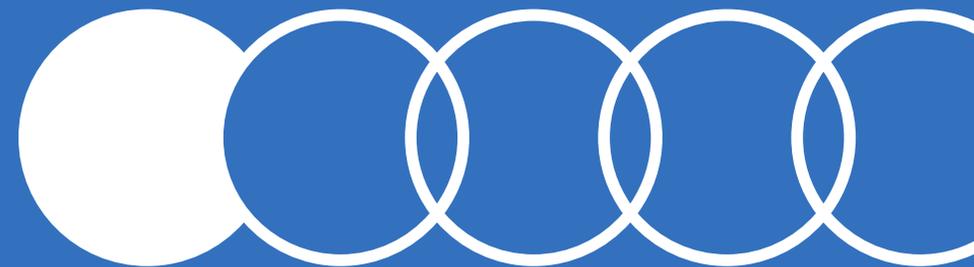
各種Evaluation実行

各種Export

Settings and preparation

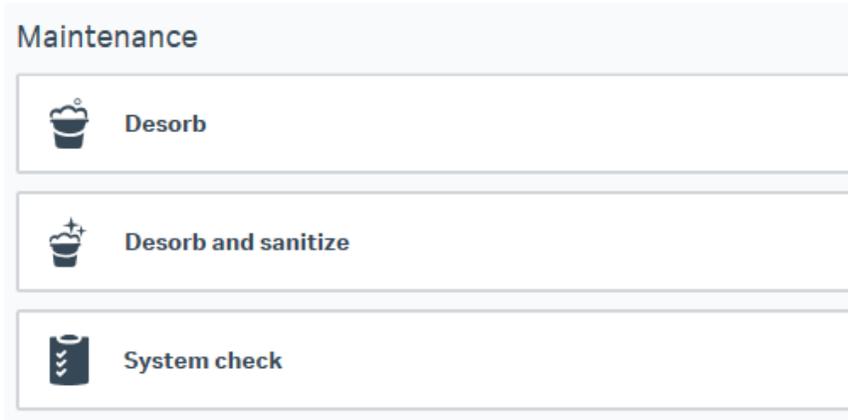
- **Properties** : データのプロパティやリガンド固定化量などの確認
- **Variables** : サンプル名、濃度値、Blank、Controlの設定などVariable項目の修正
- **Curve markers** : データにフラグを立てる場合、そのフラグの作成・編集
- **Report point** : レポートポイントの追加・削除・編集
- **Solvent Correction** : 溶媒補正の実行

6. 各種メンテナンス および 測定後の管理方法



6-1.メンテナンス・システムチェック

Instrument Control画面より定期メンテナンスを実行



Biacore Maintenance Kit, type 3 (29229054)

メンテナンス・システムチェックには本Kitが必要。

Desorb Kit (BR100823)

Desorb Solution 1, Desorb Solution 2(各500ml)のみ追加購入ができます。

Desorb : 週に1回

Series S Sensor Chip Maintenance *

Desorb Solution 1 *

Desorb Solution 2 *

バッファチューブ : 超純水

Desorb and sanitize : 月に1回

Series S Sensor Chip Maintenance *

Desorb Solution 1 *

Desorb Solution 2 *

終濃度0.6-1.0%次亜塩素酸ナトリウム

超純水、10~50mM HEPESやTris緩衝液

System Check : 異常を感じた時

Series S Sensor Chip CM5 (Check後、測定使用OK)

Biacore test solution *

バッファチューブA、C : HBS-EP+

バッファチューブB、D : 超純水

* キットに含まれるもの

6-2.測定後の管理

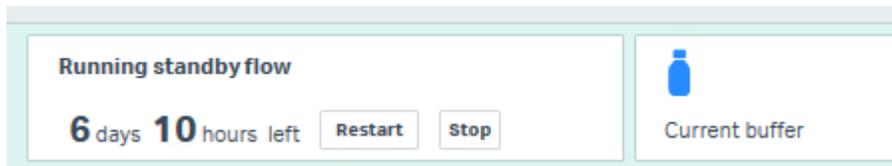
7日以内に再度使用する場合

チップを入れたままスタンバイフローが可能

バッファ消費量：130 ml/24hr

超純水消費量：95 ml/24hr

Instrument statesで経過時間を確認



システムをシャットダウンする場合

最低限以下の操作を実施します

1. バッファチューブを超純水ボトルへセット
2. Series S Sensor Chip Maintenanceをドック
3. Change Solution実施
4. Series S Sensor Chip Maintenanceをアンドック
5. Biacore Insight Softwareをクローズ
6. PCのシャットダウン
7. Biacore本体の電源を切る

6-3.チップの保管

ドライ状態での保存

取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて4°Cで保存

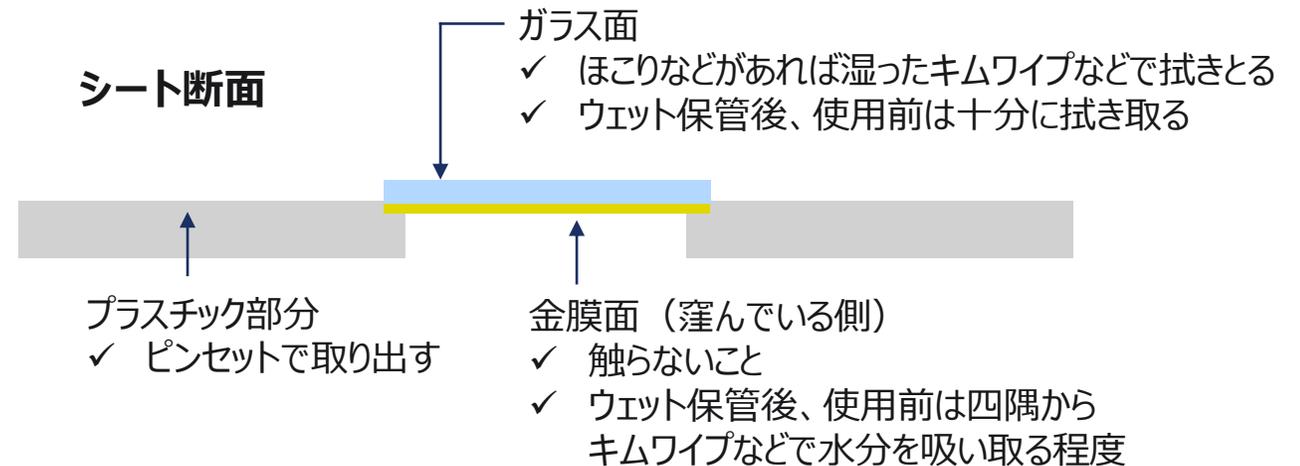
ウェット状態での保存

1. 25-50ml遠心チューブにHBS-EP+などを分注
2. センサーチップのシートをカバーから抜き取る
3. シートだけを容器中の緩衝液に浸し、4 °Cで保存

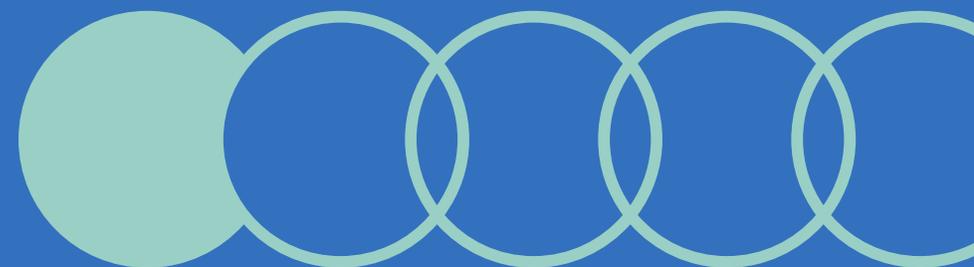
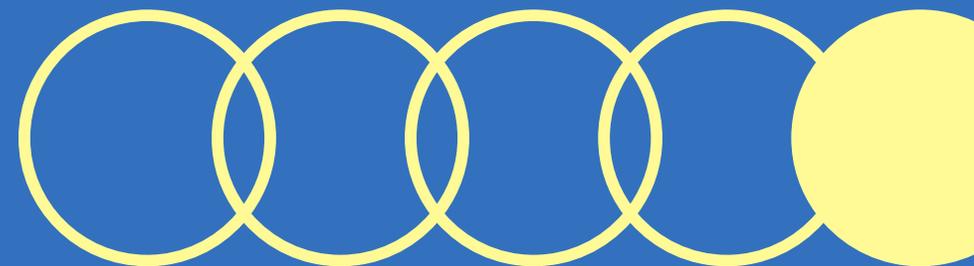
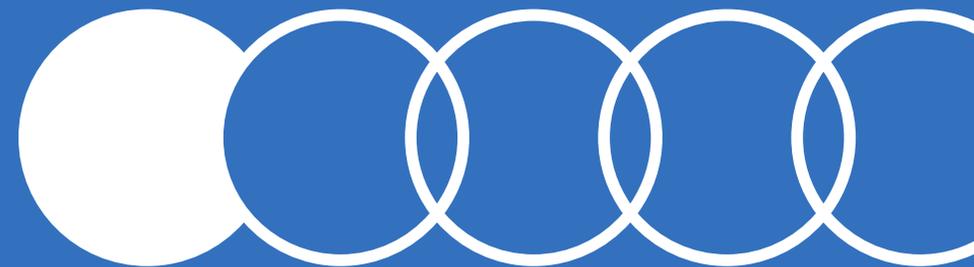


チップの再使用

緩衝液に浸したシートは緩衝液を拭き取ってカバーへ戻す
* 金膜面は触らないでください



7. サポート情報



7-1. サポート情報

国内Biacoreポータルサイト

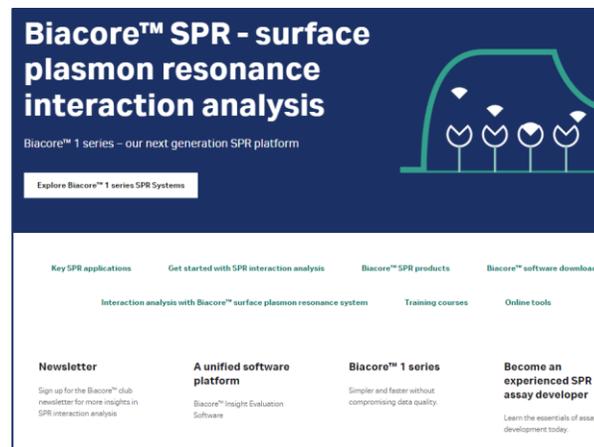
<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/>



機種別Biacore日本語マニュアル（アプリケーション別説明書）
Knowledge Center、Biacore FAQなどの日本語マテリアル

本国Biacoreポータルサイト

<https://www.cytivalifesciences.com/en/se/solutions/protein-research/interaction-analysis-with-biacore-surface-plasmon-resonance-spr>



Biacore™ software downloads（英語版マニュアル含む）
Key SPR application 資料、オンライントレーニングコース
Online tools（Simul8： k_a 、 k_d から理論的センサーグラムを描画）

7-2. サポート情報

月刊Biacoreコンシェルジュ

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/concierge/index.html>



初めてBiacore™実験ノート

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/concierge/biacore-lab-notebooks.html>



消耗品のIFU

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/knowledge-center/ifu-list-sensor-chip-kit.html>



消耗品のIFU（Instruction for Use）は、製品に付属していません。製品をご使用いただく前に、PDFファイルをご確認ください

【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

TEL: 03-5331-9336

e-mail: tech-jp@cytiva.com

<https://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2023年6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。



Thank you

