



# Biacore 1 series

アプリケーション別操作手順書  
低分子編

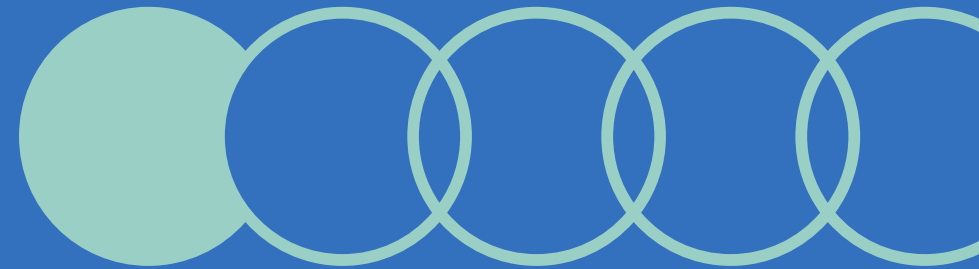
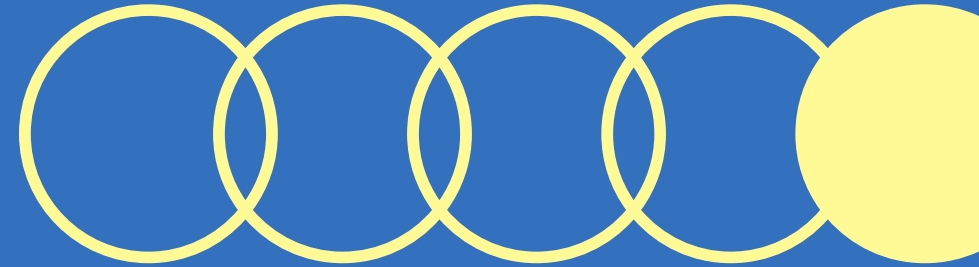
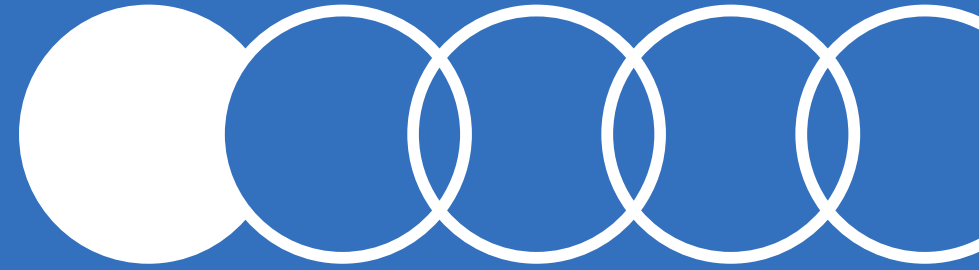
Version 1.1  
2023/09



# もくじ

1.	<a href="#">実験をはじめる前に</a>	・・・	3
2.	<a href="#">Sensor Chip SAを用いたBiotin化タンパク質の固定化</a>	・・・	20
3.	<a href="#">低分子のBinding screen</a>	・・・	26
4.	<a href="#">Biotin CAPture Kitを用いたKinetics/Affinity解析</a>	・・・	42
5.	<a href="#">各種メンテナンスおよび測定後の管理方法</a>	・・・	67
6.	<a href="#">サポート情報</a>	・・・	71

# 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

- ・測定をはじめの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

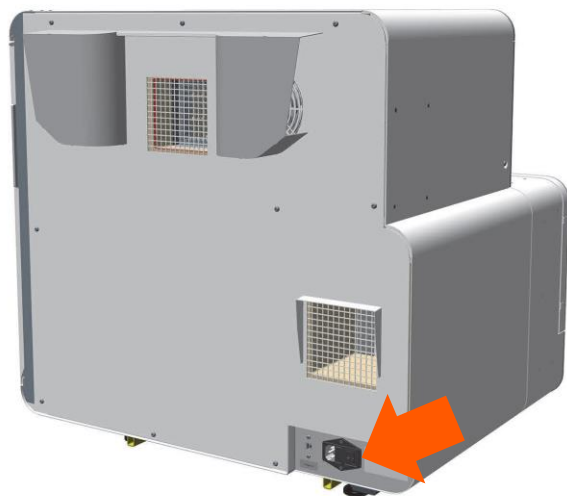
## 1-8. Method 作成画面の基本構造

- ・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

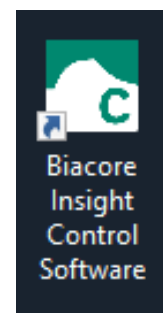
納品設置時 Biacore 1K/1K+

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

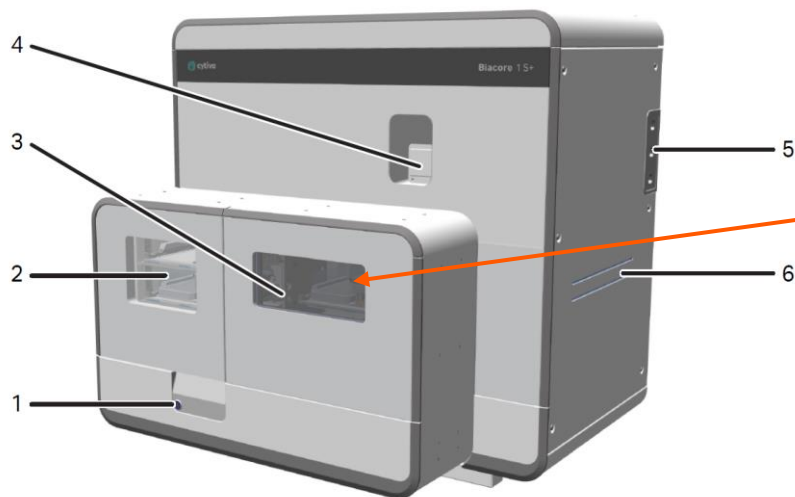
## 3. Insight Control Softwareの起動・ログイン

A screenshot of the Biacore Insight Control Software login interface. The screen displays the Cytiva logo and the software title "Biacore™ Insight Control Software" with version "Version 5.0.16.21762". There are input fields for "User id" (containing "XXXXXX / 12345"), "Domain" (containing "XXXXXX"), 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.

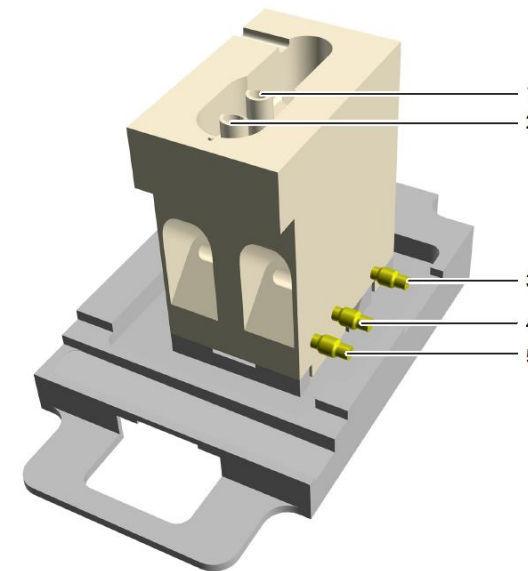
納品設置時はWindowsログインと共通（変更可）

# 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, the software name, user information, and a help menu. Below the navigation bar are four main panels, each highlighted with an orange border:

- Activity queue:** Contains a 'Change solutions' task with a 6-minute progress bar and an 'Interactive run' button. An 'Add activity' button is at the bottom.
- System setup:** Lists tasks such as 'Set flow cell temperature', 'Set sample compartment temperature', 'Change chip', 'Change solutions', 'Immobilization checkpoint', and 'Wait'.
- Maintenance:** Lists tasks such as 'Desorb', 'Desorb and sanitize', 'System check', 'Normalize', and 'Shutdown'.
- Start:** Contains 'Interactive run' and 'Method' buttons.

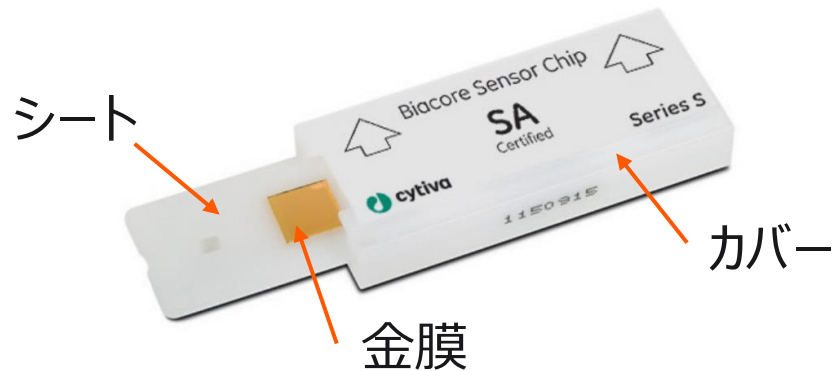
Below the panels, there are four descriptive labels in green text:

- Activity queue:** 各種コマンドの予約
- System setup:** 温度設定  
センサーチップのドック  
バッファ置換など
- Maintenance:** Desorb (週一)  
Desorb and Sanitize (月一)  
System Check (適宜)
- Instrument states:** システムの状態

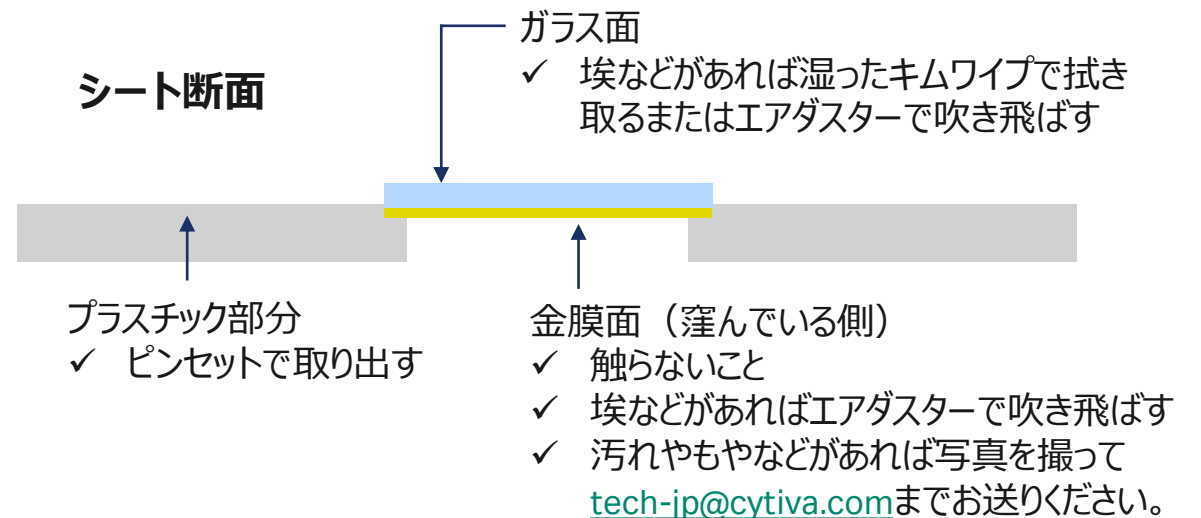
The bottom status bar shows system information: 'Running Change solutions...', 'Current buffer Buffer', 'CAP: 3/3/2023 6:09:55 PM', 'chip information', 'Flow cell 25.0 °C (25)', 'Sample compartment 25.0 °C (25)', 'Illumination on/off', and 'Hotel door is closed'.

# 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

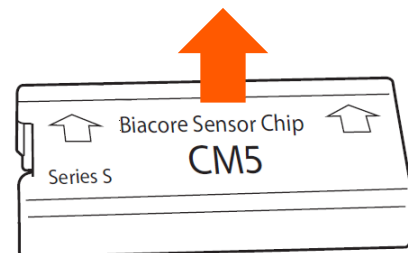
1. Change chipからOpen chip doorでポートを開ける



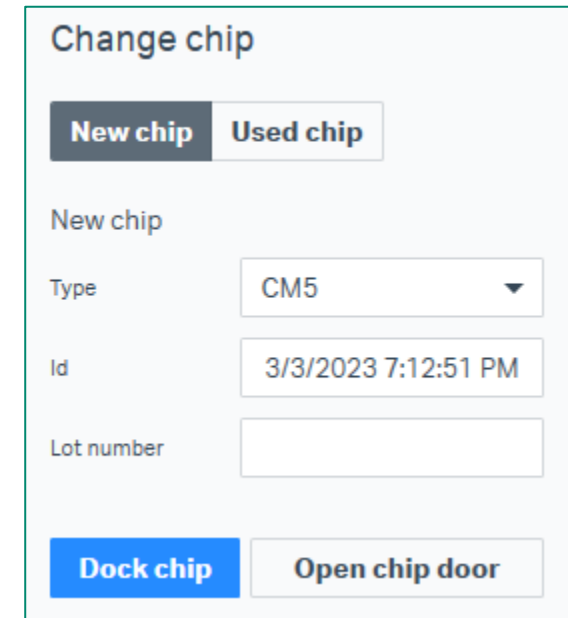
2. センサーチップをポートにセット



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



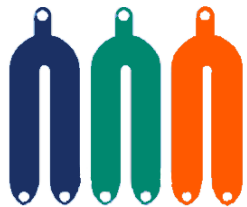
# 1-4.チップのドック～バッファー置換

Flow cellの構成

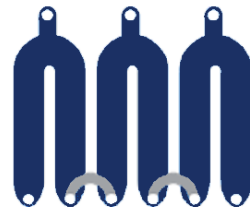
センサーチップの金膜部分は平面の一枚板

IFC channelsによってFlow cellが構成されます

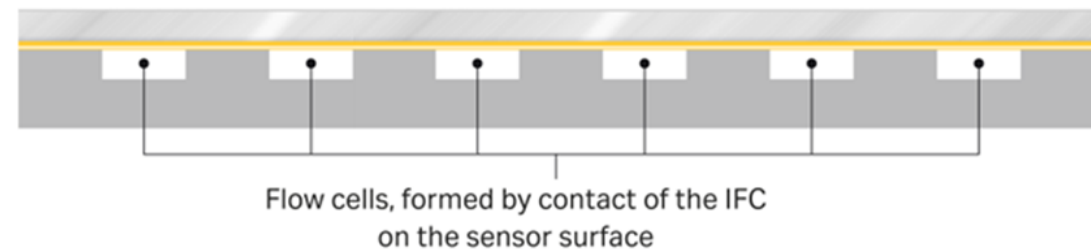
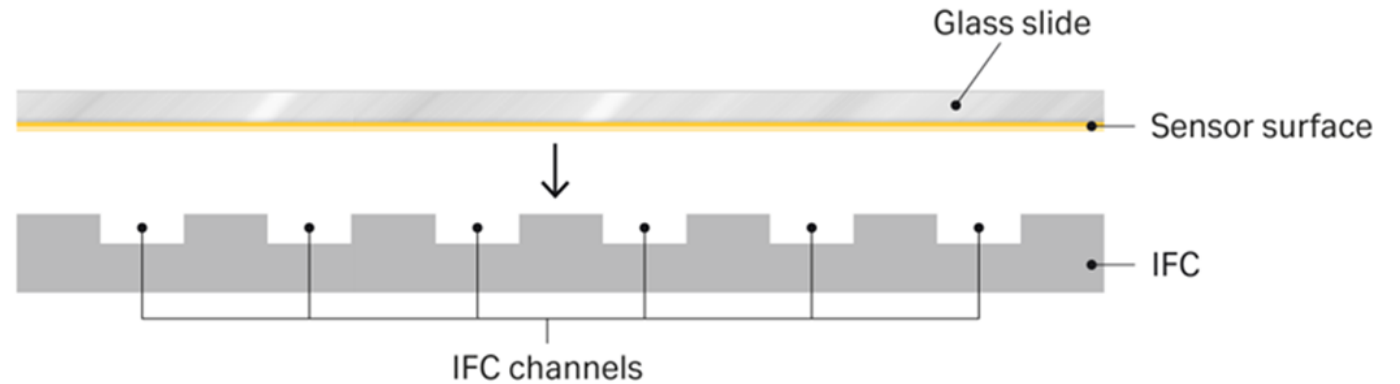
\* 1 seriesのFlow cellは6つあります













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		✓	✓
		3		✓	✓
		4		✓	✓
		5		✓	✓
	In pairs	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



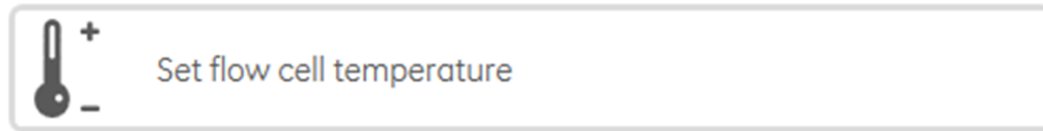
ランニングバッファーの取り扱い

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

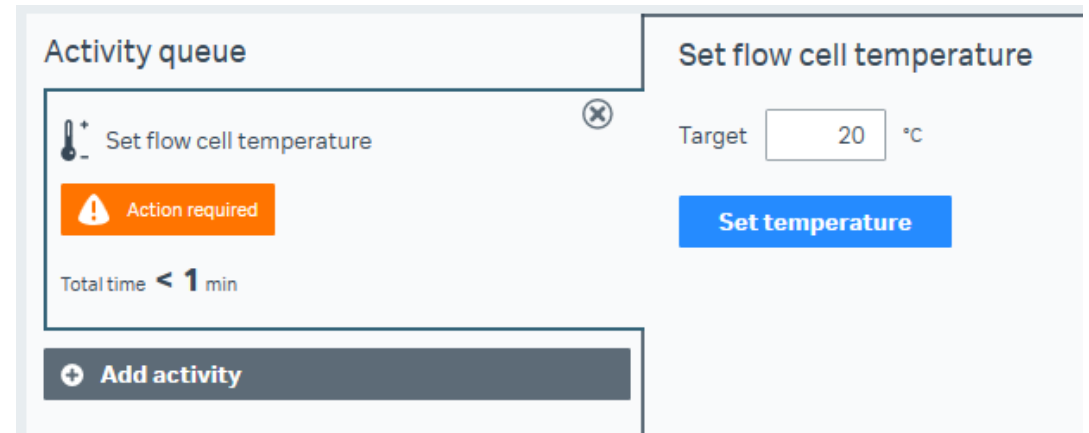
1. Flow cellの温度変更はこちらから



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。

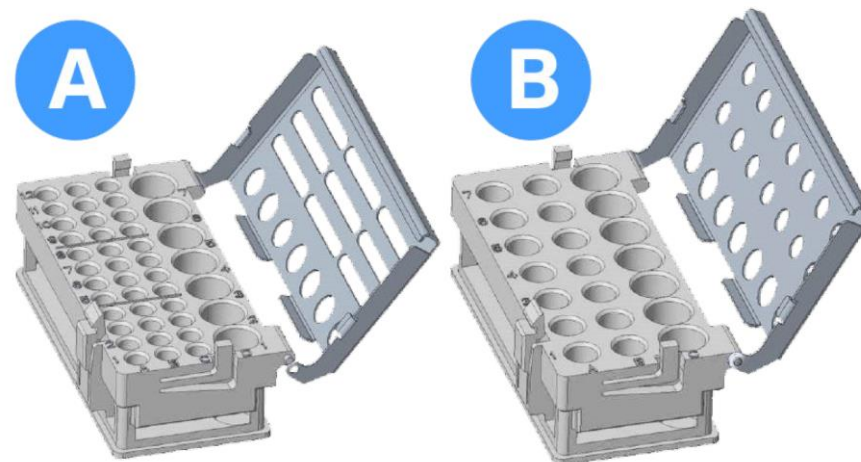


左に96/384プレート、右にサンプルラックをセットします

\* 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, $\mu\text{L}$	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。

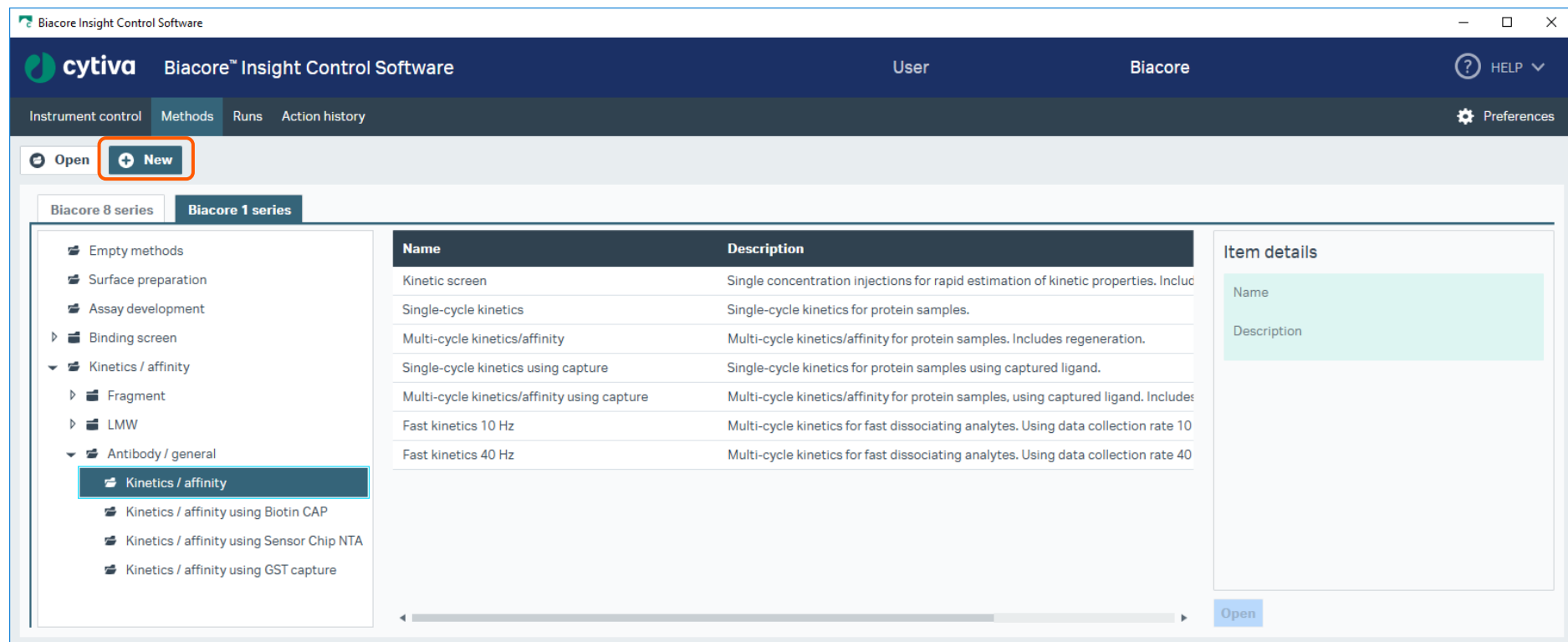


# 1-7. 各種Methodへのアクセス

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 'Methods' tab is selected in the top navigation bar. Below the navigation bar, there are 'Open' and 'New' buttons. The 'New' button is highlighted with a red box. The main content area is divided into two sections: 'Biacore 8 series' and 'Biacore 1 series'. Under 'Biacore 1 series', the 'Kinetics / affinity' folder is expanded, showing a list of method templates. A table displays the details of these templates.

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'. An 'Open' button is located at the bottom right of the interface.

# 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

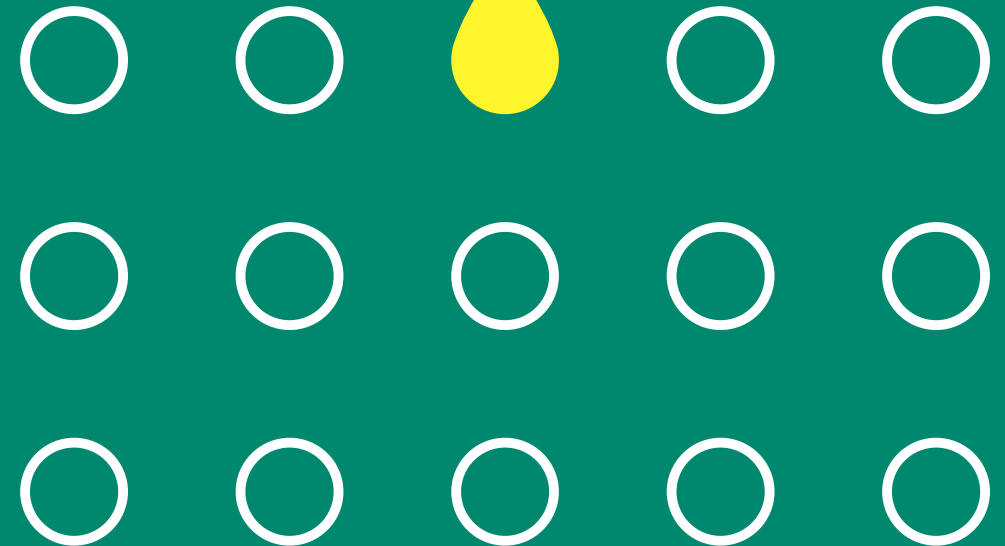
各Assay step（この場合"Analysis"）内の追加条件などの設定

以降、低分子-タンパク質の相互作用解析について、3点の手順を説明します。

2.  
Sensor Chip SAまたはNAを用いた  
Biotin化タンパク質の固定化

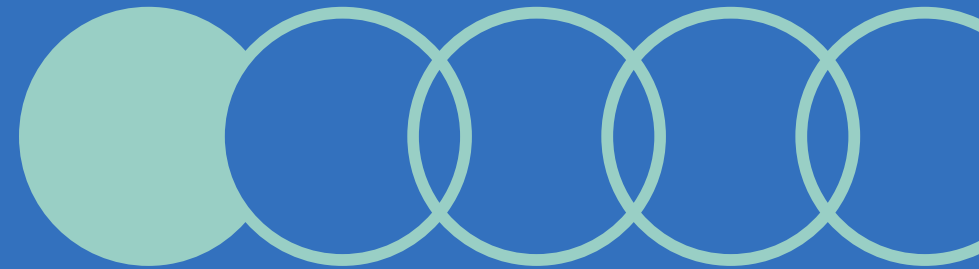
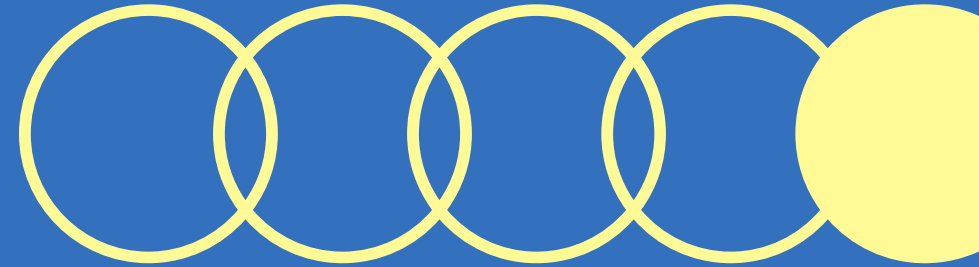
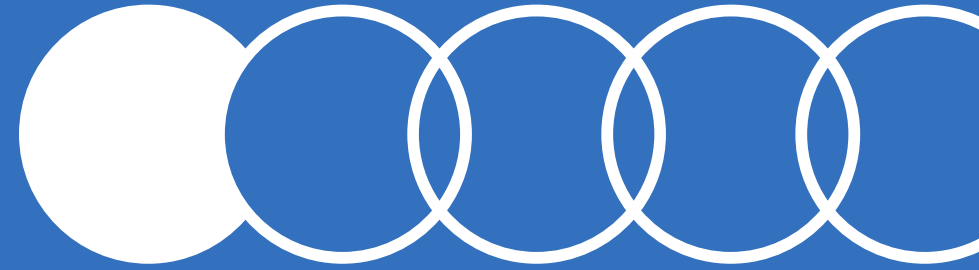
3.  
低分子のBinding screen

4.  
Biotin CAPture Kitを用いた  
Kinetics/Affinity解析



\* DMSOストックされた低分子を想定しています。

## 2. Sensor Chip SA を用いた Biotin化タンパク質 の固定化



# 2. 本章の内容

## 2-1. Series S Sensor Chip SA または NA

- 低分子スクリーニングで第一選択で使用されるセンサーチップについて

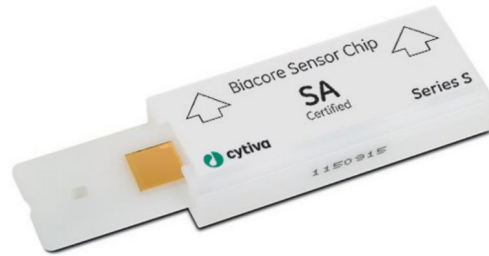
## 2-2. 固定化

- Series S Sensor Chip SA または NAにBiotin化タンパク質を固定化する手順について

# 2-1. Series S Sensor Chip SA または NA

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。

Series S Sensor Chip SA  
(10枚 29699621、3枚 BR100531、1枚 29104992)



Series S Sensor Chip NA  
(3枚 29699622、1枚 29407997)



- リガンドがBiotin化されていること
- スレプトアビジン（SA）またはニュートラビジン（NA）を利用した強い結合
- SAへのアナライトの非特異結合が問題となる場合にNAを用いる。
- NAは再生溶液によく用いられる酸への耐性が低いため再生が不要な低分子測定向け。

## 固定化時に準備が必要な溶液

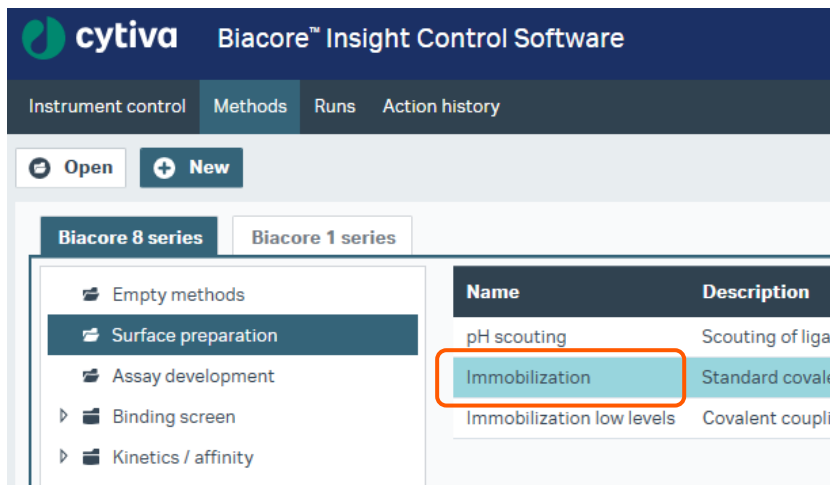
	Conditioning	Wash
SA	1 M NaCl, 50 mM NaOH	50% Isopropanol, 1M NaCl, 50mM NaOH
NA	1 M NaCl, 10 mM HCl 1 M NaCl, 50 mM NaOH	50% Isopropanol, 1M NaCl, 50mM NaOH

# 2-2. 固定化

## 1. Methodをクリック

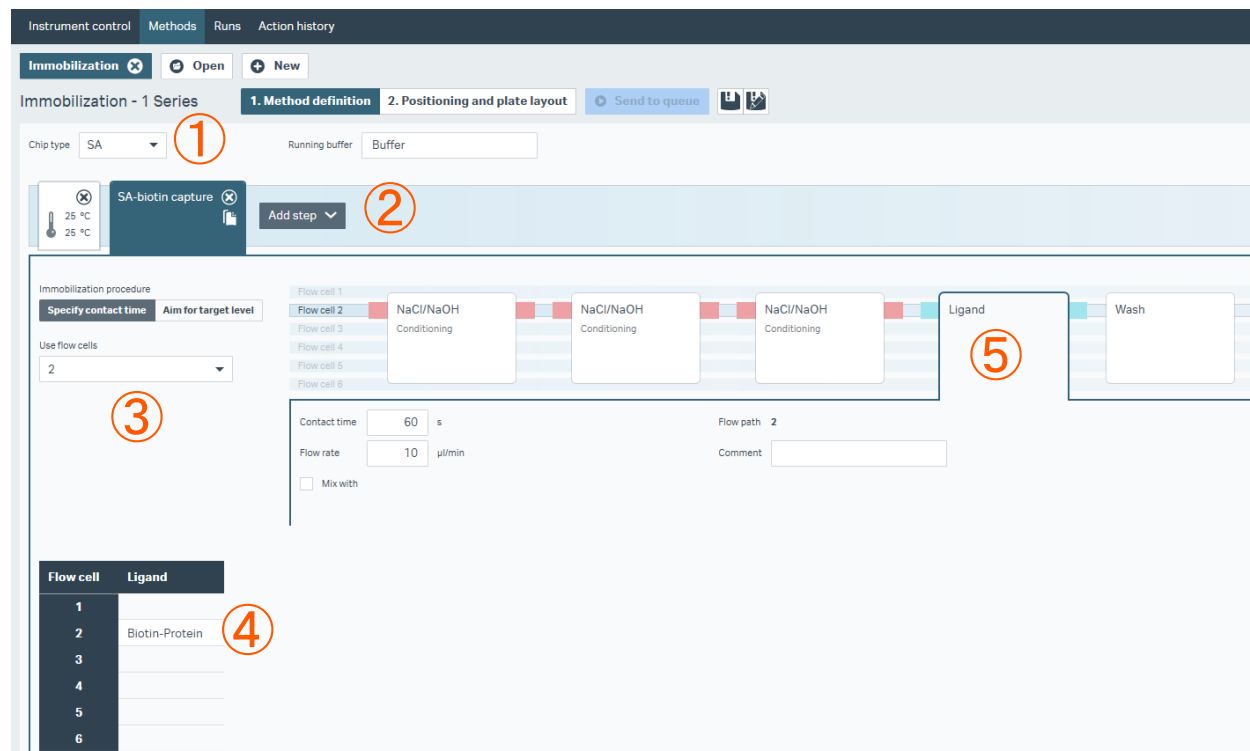


## 2. New>Surface preparation>Immobilizationを選択してOpen



	項目	説明
①	Chip type	SAまたはNAを選択
②	Add step	SA-Biotin CaptureまたはNA-Biotin Captureを選択
③	Use flow cells	固定化したいFlow Cellの指定
④	Ligand	各Fcに固定化する分子の名称を入力
⑤	リガンド添加時間・流速	デフォルト添加時間は60秒

## 3. Method definitionの設定



# 2-2. 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

Instrument control | Methods | Runs | Action history | Preferences

Immobilization | Open | New

Immobilization - 1 Series | 1. Method definition | 2. Positioning and plate layout | Send to queue | Compatibility

Bottles  
Buffer bottle 200 ml Buffer  
Water bottle 200 ml Water

View | Trays | Volume summary ①

Sort positions | Ascending | Descending ③ | Estimated run time 13 min

Rack 1

	A	B	C	D
3	50% Isopropanol/1M NaCl/50mM NaOH ● 34 µl			
2	Biotin-Protein ● 48 µl			
1	1 M NaCl / 50 mM NaOH ● 115 µl			

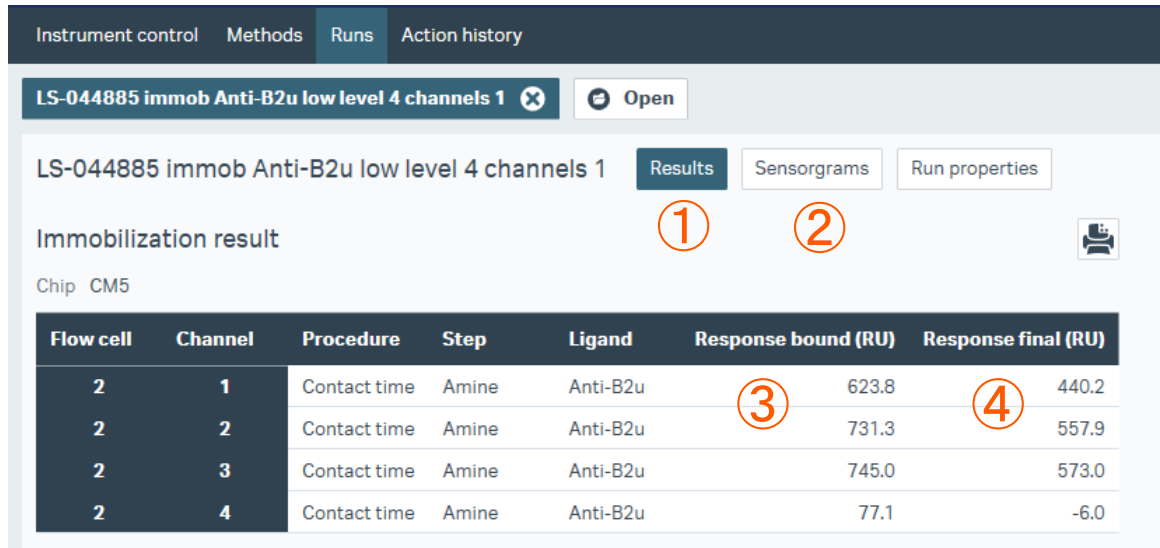
②

Positioning Settings



# 2-2. 固定化

1. 固定化が終わるとResultが表示されます。

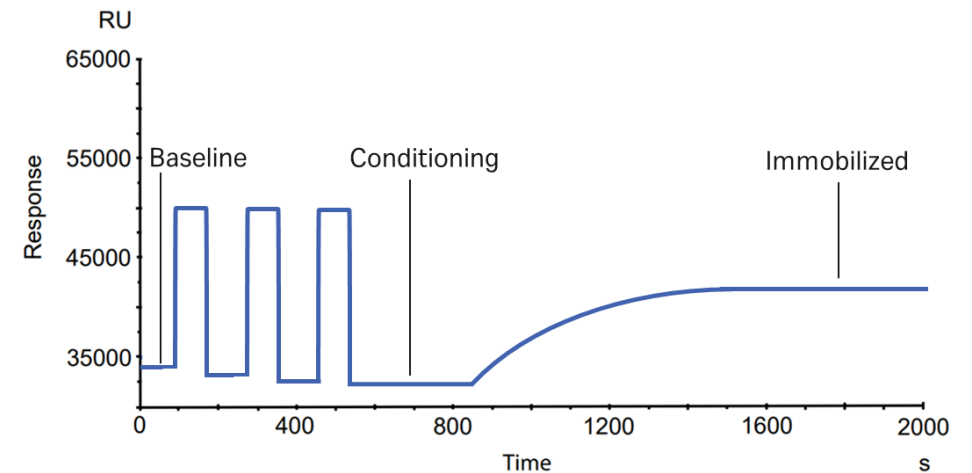


	項目	説明
①	Result	固定化量の確認
②	Sensorgram	固定化センサーグラムの確認
③	Response bound	右図ImmobilizedとConditioning差分
④	Response final	右図ImmobilizedとBaseline差分

**Response boundを固定化量として採用する。**

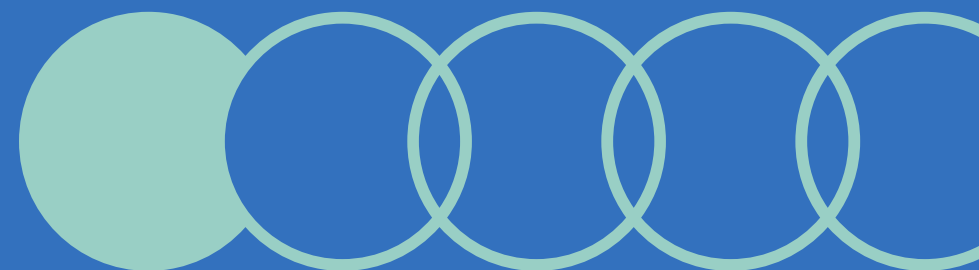
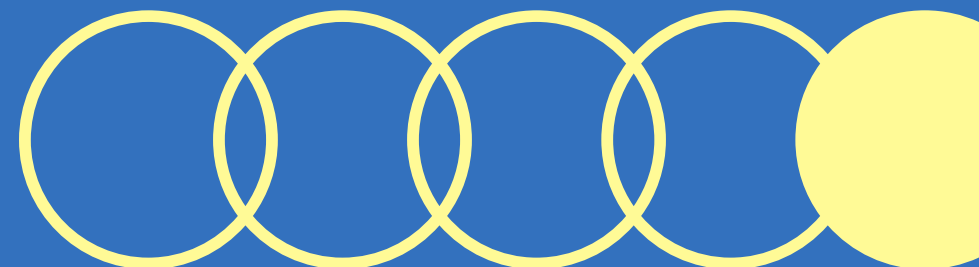
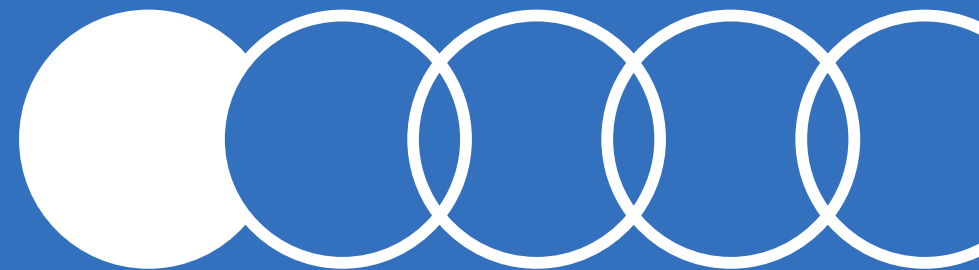
Sensor Chip に結合していないSAまたはNAが残っているため Conditioning溶液を添加後にベースラインが減少します。そのため、固定化量としてはResponse boundを採用します。

Washは、流路に残存したBiotin化リガンドを洗い流すコマンドで、溶液はセンサーチップに流れることなく、センサーグラムにはレスポンスとして現れません。



# 3. 低分子の Binding screen

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



# 3. 本章の内容

## 3-1. 低分子のBinding screen測定

- ・測定Methodの作成手順について

## 3-2. 低分子のBinding screen解析

- ・低分子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

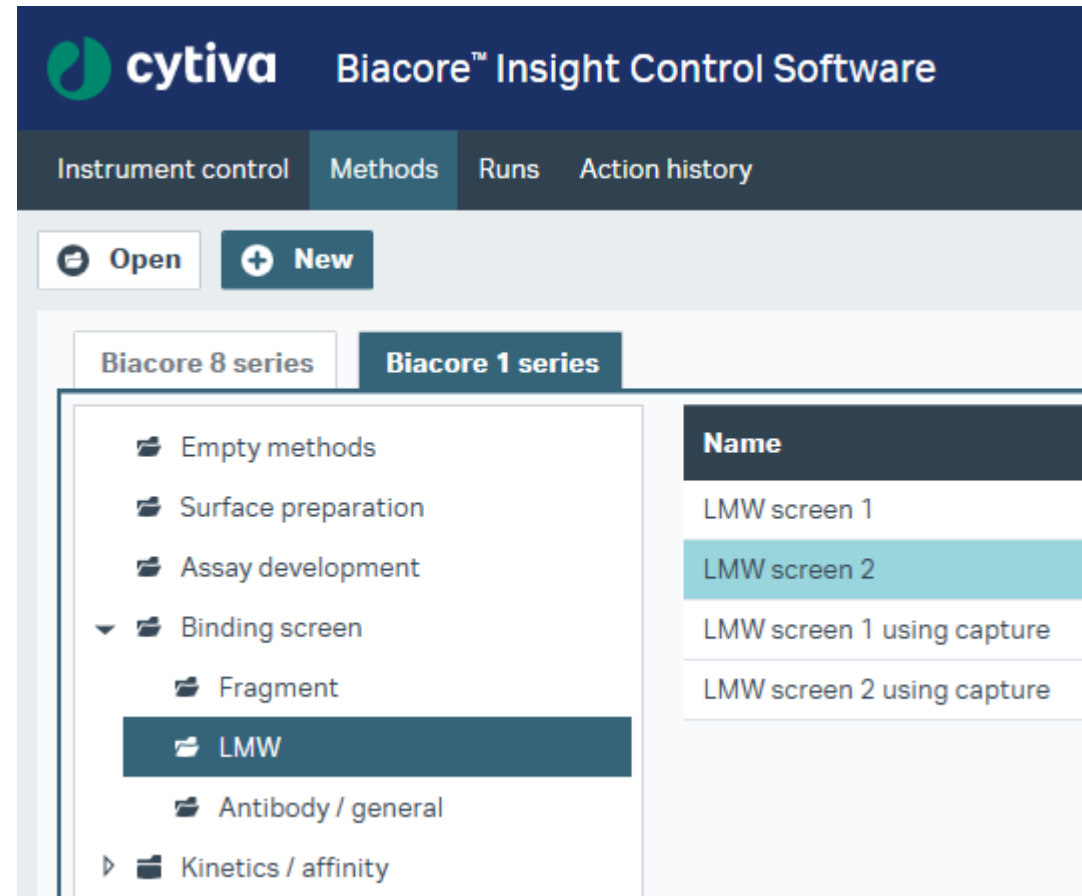
- ・Home画面から実施できることに関する補足

# 3-1. 低分子の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. 低分子スクリーニングであればLMWからLMW screen 2を選択
5. Open



# 3-1. 低分子のBinding screen測定

Control Softwareの構造～Method definitions

Instrument control Methods Runs Action history Preferences

LMW screen 2 Open New

Method Builder - 1 Series

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

測定の設定の手順  
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

General settings  
Use flow cells 1, 2  
Reference 1  
Change flow cells

Data collection rate  
1 Hz

Running buffer  
Buffer

Concentration unit varies  
Change units

Name Samples  
Purpose Analysis

Startup Samples Solvent correction Negative control Positive control Add step

④ ⑤ ⑥

Analyte 1 Wash 1 Carry over control 1 Add command

① ② ③

Property Variable Value Type  
Solution  Flow path 1, 2  
Contact time  60 s  
Dissociation time  60 s  
Flow rate  30 µl/min  
Concentration  µM  
Molecular weight  Comment

Analysisにおける各コマンド

	項目	説明
①	Analyte	Contact Time : 30-60秒 Dissociation time : 60秒程度 Flow rate : 30 µl/min.以上
②	Wash	デフォルトで50% DMSOの流路洗浄
③	Carry over control	デフォルトで30 µl/min.20秒のBuffer添加。 AnalyteのCarry Over をチェック。
④	Solvent correction	デフォルトで最初/48cycle毎/最後に溶媒補正実施。
⑤	Negative control	デフォルトで最初/16cycle毎/最後に添加。
⑥	Positive control	デフォルトで最初/16cycle毎/最後に添加。

# 3-1. 低分子のBinding screen測定

Variables and positioning

Method Builder - 1 Series

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

Settings

Actions for selected step

File

Clipboard

Manage cycles

Add cycle

Insert above

Remove cycles

Remove all

Move up

Move down

25 °C

Startup

Samples

Solvent correction

Negative control

Positive control

No	Analyte 1 - Solution	Control	Molecular Weight (Da)
1	Sample 1		324
2	Sample 2		353
3	Sample 3		567
4	Sample 4		346
5	Sample 5		75
6	Sample 6		678
7	Sample 7		1063
8	Sample 8		765
9	Sample 9		479
10	Sample 10		598
11	Sample 11		789
12	Sample 12		546
13	Sample 13		444
14	Sample 14		243
15	Sample 15		573
16	Sample 16		732
17	Sample 17		729

Plate 1

Rack 1

Type: 96 well 250 µl

Type: Reagent Rack A

Positioning settings

項目	説明
①	Analyte1 - Solution アナライツ名、分子量
②	Positioning マウス操作で配置変更
③	Positioning Setting 配置ルール変更 (32ページ)

# 3-1. 低分子のBinding screen測定

Variables and positioning

	項目	説明
①	Positive control Negative control	ポジコン、ネガコンにおける Variablesの確認
②	Analyte 1- Solution	ポジコン、ネガコンのサンプル名称入力
③	Control	SamplesはNot a control（白）、ポジコンはPositive control（緑）、ネガコンはNegative control（白）が選択されていることを確認

項目	補足説明
Negative control	特異的結合が無いと想定されるサンプル * Tableにおける分子量は0でない。
Blank	濃度0のサンプル

# 3-1. 低分子のBinding screen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			



# 3-1. 低分子のBinding screen測定

1. Plate layoutに従って分注

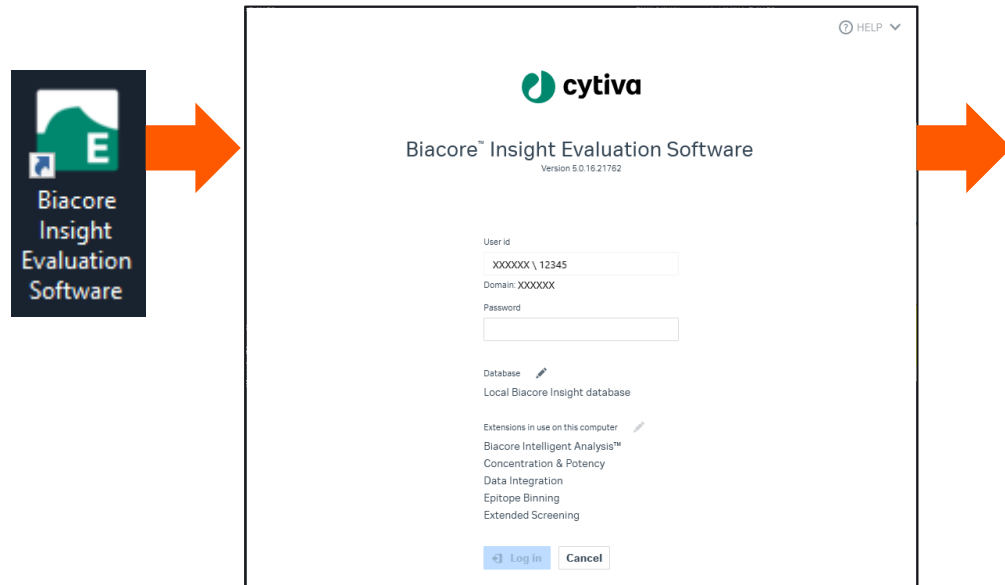
2. Send to queueで測定開始

The screenshot shows the 'Plate layout' step in the software. The 'Trays' tab is active, showing a 96-well plate layout with samples and reagents. The 'Volume summary' tab is also visible. A table below explains 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

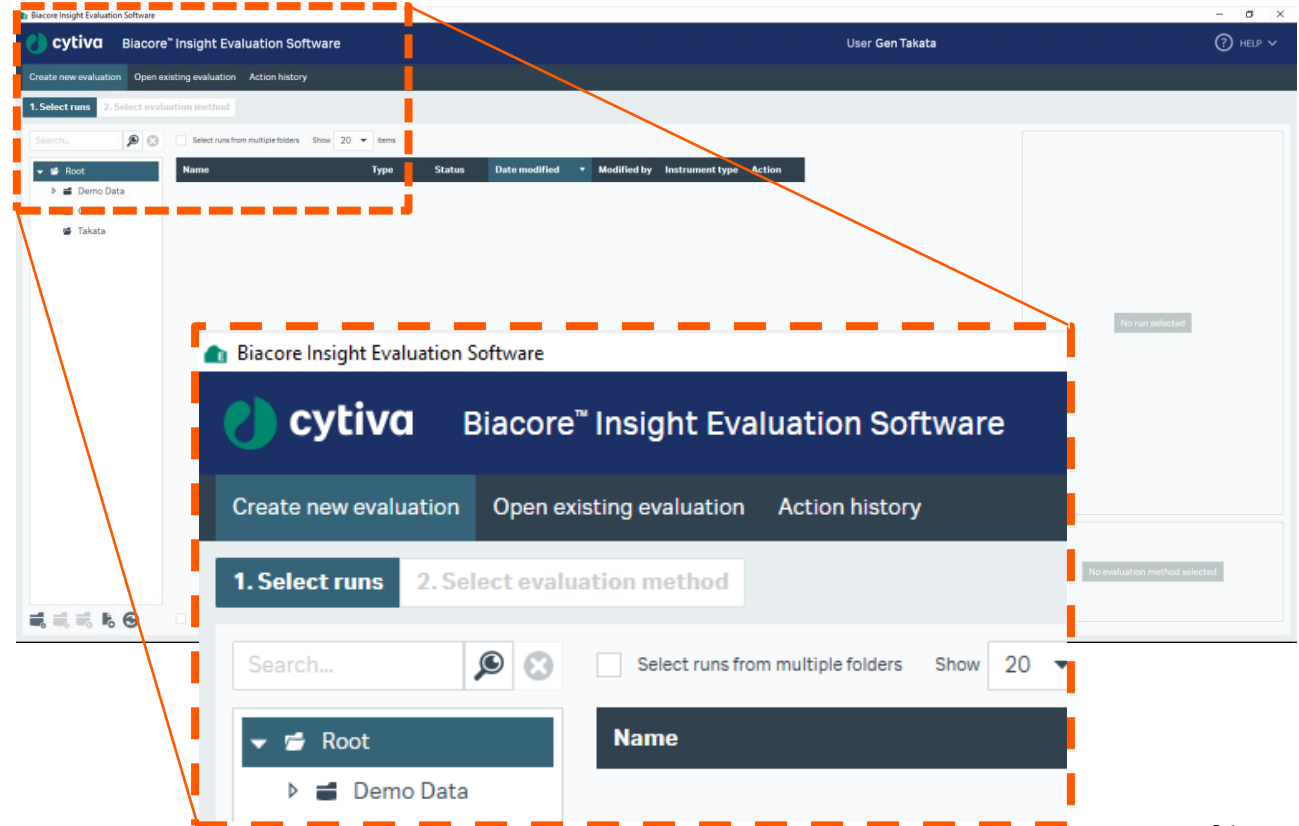
# 3-2. 低分子のBinding screen解析

## 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. 低分子の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

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software

Create new evaluation Open existing evaluation Action history

1. Select runs 2. Select evaluation method

Search...

Select runs from multiple folders Show 20 items 1-12 of 12

- Root
  - Demo Data
    - 1 series
    - Biacore 8K Demo data
      - v2**
      - v4
    - Biacore8K Training data
    - IE Concentration Demo Files
    - IE Epitope Binning Demo Files

Name
Regeneration scouting 6/21/2016 12:19:11 PM
Clean screen (large) 2016-06-03
Affinity Screen Analogues 2016-05-04
Affinity screen 2016-04-27 17:39:29
BLS (small) 2016-04-24
Clean Screen (small) 2016-04-24
<b>BLS (large) 20160316</b>
Fragment screen GX

Select evaluation method

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

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software

Create new evaluation Open existing evaluation Action history

1. Select runs 2. Select evaluation method

User defined Predefined

- Empty method
- Surface preparation
- Assay development
- Binding screen
  - Fragment
  - LMW**
  - Antibody / general
- Kinetics / affinity

Name
LMW screen - Evaluation method
LMW screen using capture - Evaluation method

Open

# 3-2. 低分子のBinding screen解析

Solvent correction

Biacore Insight Evaluation Software - BLS (small) 2016-04-24

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software User HELP

Create new evaluation Open existing evaluation Evaluation - BLS (small) 2016-04-24 Action history

Solvent correction

Included	#Excluded	Cycle	Channel	Chi² (RU²)	Y0 (RU)	Immobilization level (RU)
<input checked="" type="checkbox"/>	0	4	1	0.101	0.2	2960.9
<input checked="" type="checkbox"/>	0	12	1	0.0994	0.2	2960.9
<input checked="" type="checkbox"/>	0	4	2	0.0758	1.3	3000.7
<input checked="" type="checkbox"/>	0	12	2	0.0834	0.6	3000.7
<input checked="" type="checkbox"/>	0	4	3	0.199	0.5	2970.2
<input checked="" type="checkbox"/>	0	12	3	0.119	0.5	2970.2
<input checked="" type="checkbox"/>	0	4	4	0.125	0.0	3034.7
<input checked="" type="checkbox"/>	0	12	4	0.0581	0.4	3034.7
<input checked="" type="checkbox"/>	0	4	5	0.0568	1.0	3052.3
<input checked="" type="checkbox"/>	0	12	5	0.0210	1.5	3052.3
<input checked="" type="checkbox"/>	0	4	6	9.43e-3	0.7	2934.3
<input checked="" type="checkbox"/>	0	12	6	9.83e-3	0.4	2934.3
<input checked="" type="checkbox"/>	0	4	7	0.115	0.2	3020.4
<input checked="" type="checkbox"/>	0	12	7	0.0598	0.5	3020.4

Response (Active-Reference)

Response (Reference)

RU

Extrapolate 0 RU

Apply and close Cancel

	項目	説明
①	Sensorgram	各レスポンスがBaselineの上下に出ていることを確認。
②	補正曲線	各補正曲線が水色の線(Reference cellにおけるBaselineの最大値と最小値)を跨いでいることが理想。
③	Table	補正曲線に不具合があればIncludeのチェックを外します。
④	Extrapolate	補正曲線が水色の線を跨いでいない場合、延長も可能。
⑤	Apply and close	Solvent correctionの実行

# 3-2. 低分子のBinding screen解析

Evaluation - Binding 画面 (解析結果)

Biocore Insight Evaluation Software - BLS (large) 20160316

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software User HELP

Create new evaluation Open existing evaluation Evaluation - BLS (large) 20160316 Action history

QC - Sensorgram QC - Baseline QC - Binding to reference Evaluation - Binding Home

Settings

- Data grouping: All together (1)
- Injection assignment
- Axis settings
- Adjustments: Applied
- Boundaries: Control based
- Binder prediction: None
- Color by

Select sensorgrams

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

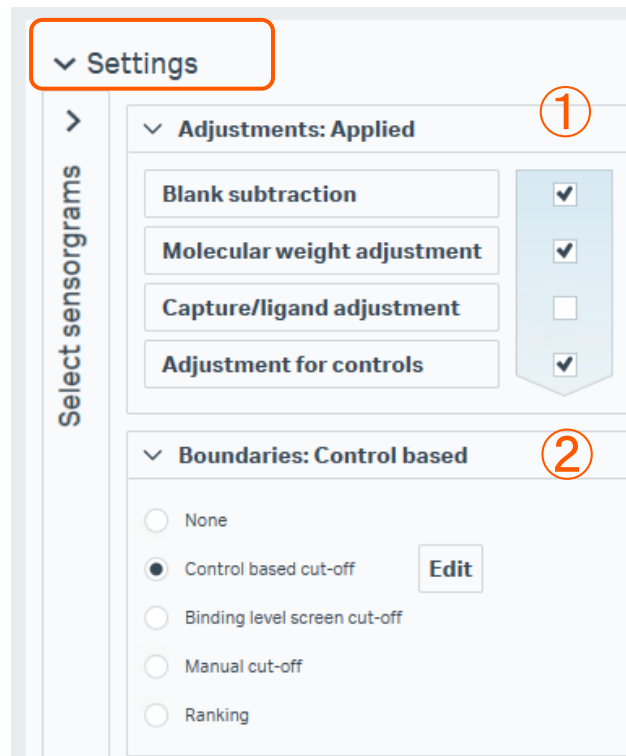
Cycle	Channel	Sensorgram type	Analysis step purpose	Analysis step name	Excluded	Curve markers	Analyte 1 Solution	Analyte binding late_1 Adjusted relative	Analyte 1 Control type	Cut-off
81	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls			Filibuvir	101.3	Positive control	Above
82	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls			DMSO	22.56	Negative control	Below
83	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls			DMSO	23.99	Negative control	Below
84	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls			DMSO	26.04	Negative control	Below
85	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls		Solvent corr. out of range	FRAG361		Not a control	
86	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls			FRAG368	154.3	Not a control	Above
87	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls			FRAG375	948.2	Not a control	Above
88	8	Corrected	Analysis	Samples and Controls			FRAG389	76.24	Not a control	Above

補正曲線範囲外データ

Settings  
解析方法  
の詳細  
36ページ

# 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。
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 × レスポンス（RU） / 分子量（Da）
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。 <b>キャプチャー法でない低分子スクリーニングでは実施しない。</b>
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 <b>詳細38ページ。</b>

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。 例) Control based cut-off、Negative Controlの3SDでCut-offを設定。
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。

# 3-2. 抗体のBinding screen解析

## 【補足】Adjustment for controls

標的タンパク質の活性の減衰などによる、コントロールサンプルのレスポンス変動をノーマライズする。

Adjustment for controls

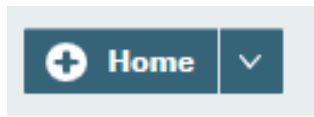
をクリック。



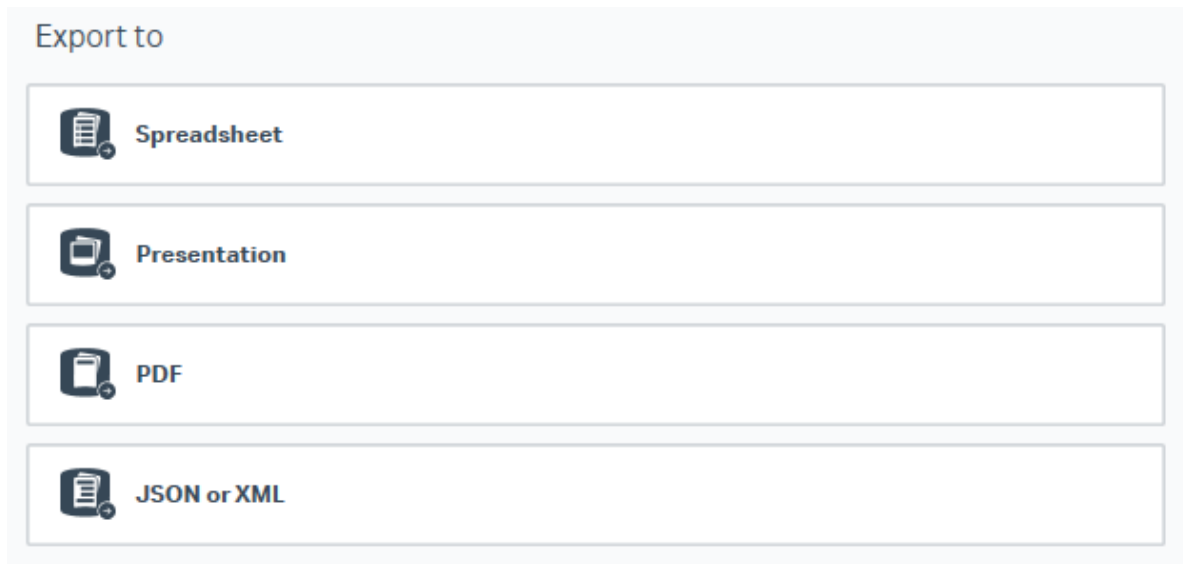
	項目	説明
①	Report point	デフォルトで Analyte binding late
②	Positive control	Positive controlの指定
③	Positive control fit	デフォルトでLinear
④	Negative control	Negative controlの指定
⑤	Negative control fit	デフォルトでLinear

# 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

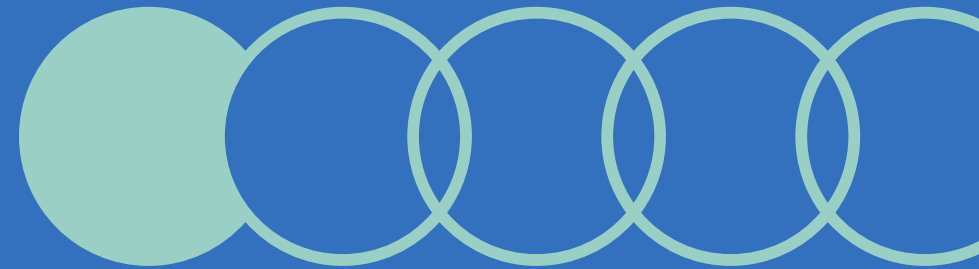
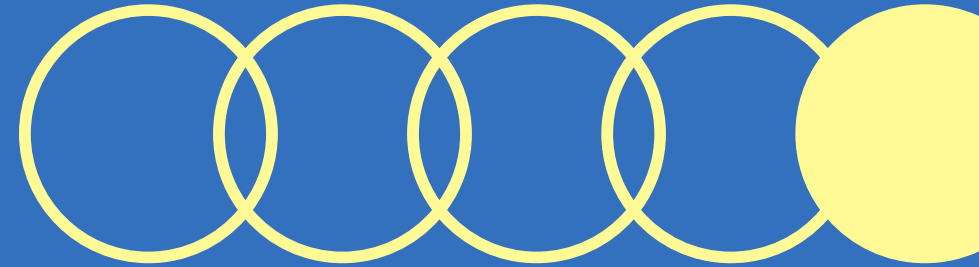
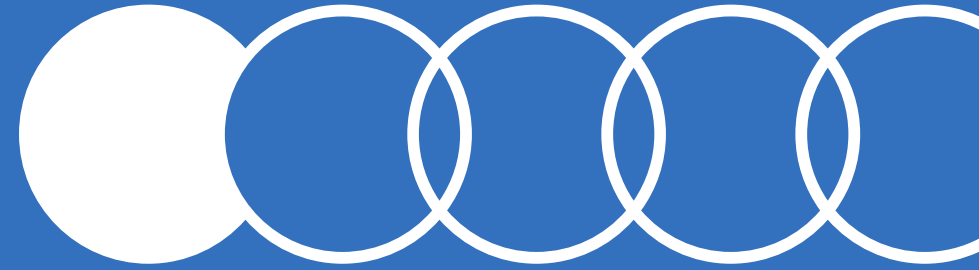
**Settings and preparation**

- **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. Biotin CAPture Kit を用いた Kinetics/Affinity解析



# 1. 本章の内容

## 4-1. Biotin CAPture Kit

- ・Biotin化リガンドを用いたキャプチャーキットについて

## 4-2. 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

## 4-3. Kinetics/Affinity (KD, ka, kd)測定

- ・測定Methodの作成手順について

## 4-4. Kinetics/Affinity (KD, ka, kd)解析

- ・分子間相互作用解析の手順について

## 4-5. Kinetics (KD, ka, kd)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

## 4-6. Affinity (KD)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

## 4-7. 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

## 4-8. 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. Biotin CAPture 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。

Biotin CAPture Kit, Series S (28920234)

- センサーチップ（CAP）を含むキャプチャーキット
- リガンドがBiotin化されていること
- ビオチン-ストレプトアビジンの強い結合であってもキット付属の再生溶液で、チップの再利用が可能。
- 固定化ステップ不要
- 再生条件検討不要
- Biotin CAPture Reagent (29423383)  
②相補鎖DNA-SAコンジュゲート単品販売あり。



再生が不要であれば、Sensor Chip SAまたはNAで Kinetics/Affinity測定を行ったほうがいい場合もあります。

# 4-2. 測定条件の設定

結合の特異性、再生条件、アナライト添加濃度などの検討には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。

# 4-2. 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	Sensorgram	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
Capture	キャプチャー法におけるLigand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

# 4-2. 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

# 4-2. 測定条件の設定

## 1. Biotin CAPture kitにおける注意点

①

② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦

詳細はBiotin CAPture kitのIFUをご確認ください。

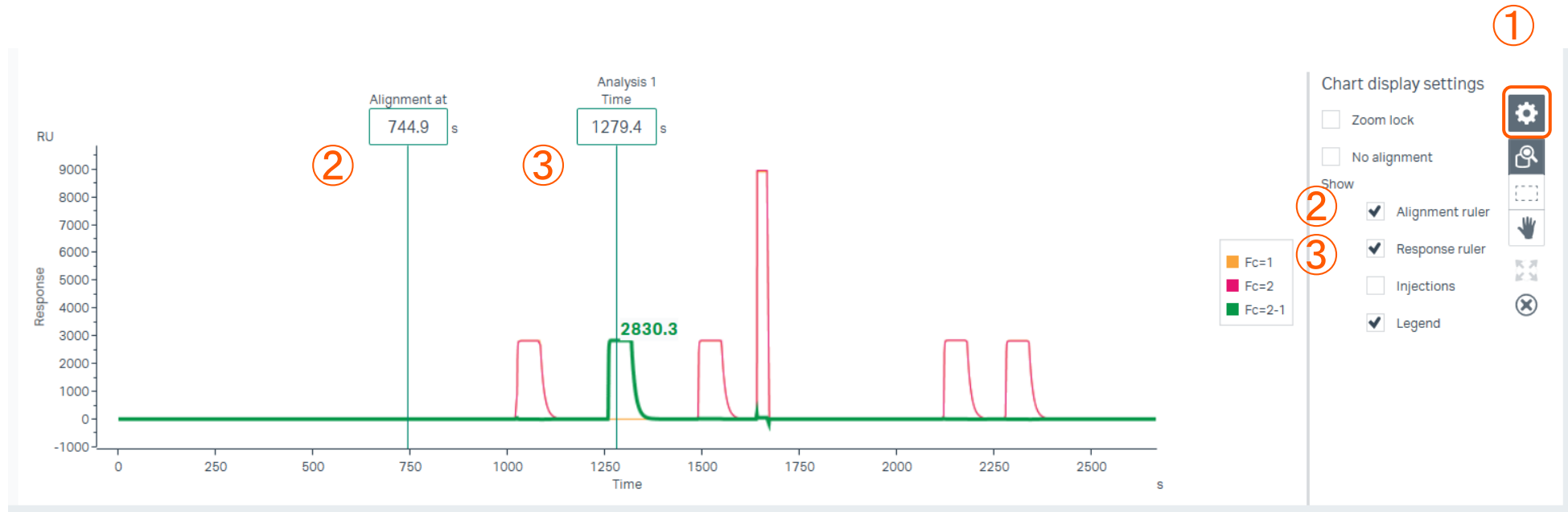
	項目	説明
①	Conditioning Cycle	Biotin CAPture kitについては、はじめにConditioningが必要です。これはKit付属の再生溶液を60秒間 x 3回添加して、最後にBufferでWashします。
②	General	Biotin CAPture Reagentを2 µl/min.の流速で300秒で添加します。
③	Capture	任意の添加時間でリガンドを添加します。 <b>CaptureのみReferenceへ添加しません。</b>
④	Analyte	任意の添加時間／解離時間でリガンドを添加します。
⑤	Regeneration	Kit付属の再生溶液を10 µl/min.の流速で120秒で添加します。
⑥	Wash 1	Bufferで洗浄します（流路に残存した再生溶液の除去）。
⑦	Wash 2	DMSOストックされた低分子の場合、50% DMSOで洗浄します（流路に残存した低分子の除去）。



# 4-2. 測定条件の設定

## 1. Reference lineの活用

	項目	説明
①	Chart Setting	⚙️ 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。

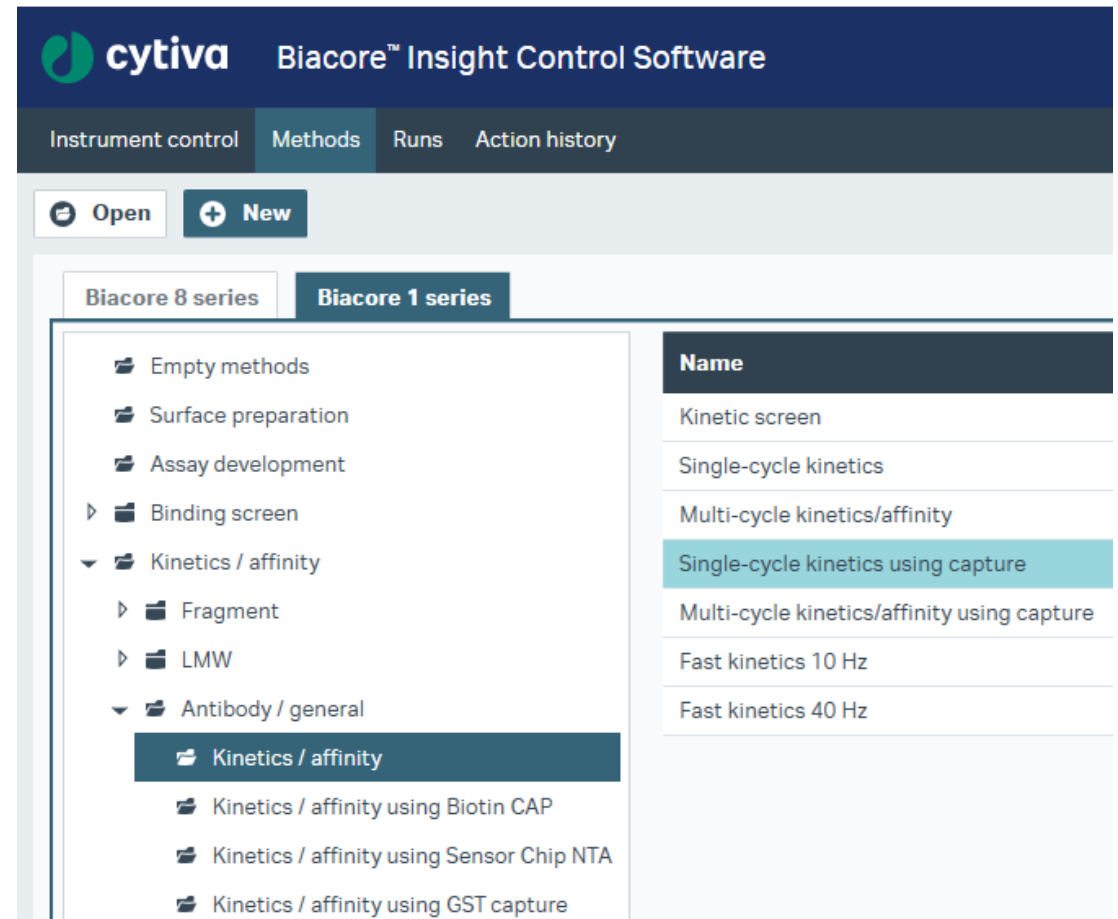


# 4-3. Kinetics/Affinity ( $K_D$ , $k_a$ , $k_d$ )測定

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. 低分子-タンパク質の相互作用であれば、LMWを選択
5. Biotin CAPture Kitであれば、LMW Single-cycle kinetics using Biotin CAPture Kitをお勧め
6. Methodを選択してOpen



# 4-3. Kinetics/Affinity ( $K_D$ , $k_a$ , $k_d$ )測定

Instrument control Methods Runs Action history Preferences

LMW single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit Open New

Method Builder - 1 Series

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

25 °C Conditioning Startup Analysis Solvent correction First/Every 48 cycles/Last Add step

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

① ② ③ ④ ⑤ ⑤ ⑥

⑦

Command type Concentration unit

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

Name: Analysis Purpose: Analysis

Flow cell 1 Ref General 1 Capture 1 Single cycle kinetics 1 Regeneration 1 Wash 1 Wash 2

Property	Variable	Value
Solution	<input type="checkbox"/>	Biotin CAPture
Contact time	<input type="checkbox"/>	300 s
Dissociation time	<input type="checkbox"/>	0 s
Flow rate	<input type="checkbox"/>	2 $\mu$ l/r
Concentration	<input type="checkbox"/>	nM
Molecular weight	<input type="checkbox"/>	Da

項目	説明
① General	Biotin CAPture Reagent 添加。デフォルトのまま
② Capture	リガンドキャプチャー：コンタクト時間を設定。流速は通常10 $\mu$ l/min.
③ Single cycle kinetics	濃度点数、コンタクト時間、解離時間を設定。流速は通常30 $\mu$ l/min. 変数にしたい項目はVariableにチェック
④ Regeneration	再生溶液添加。デフォルトのまま
⑤ Wash	ランニングバッファおよび50% DMSOで流路洗浄。デフォルトのまま
⑥ Solvent Collection	デフォルトで最初/48cycle毎/最後に溶媒補正実施。
⑦ Change units	コマンド毎に使用したい濃度単位を変更

# 4-3. Kinetics/Affinity ( $K_D$ , $k_a$ , $k_d$ )測定

Variables and positioning

The screenshot shows the 'Method Builder - 1 Series' interface. The '2. Variables and positioning' tab is active. It contains a table for 'Single cycle kinetics 1' and a well plate layout for 'Plate 1' and 'Rack 1'. The table has columns for 'No', 'Solution', 'Control', and five concentration columns. The well plate layout shows a 12x8 grid for Plate 1 and a 12x4 grid for Rack 1. A 'Positioning settings' sidebar is visible on the right.

No	Solution	Control	Concentration 1 (nM)	Concentration 2 (nM)	Concentration 3 (nM)	Concentration 4 (nM)	Concentration 5 (nM)
1	Sample 1	▼	0	0	0	0	0
2	Sample 1	▼	2.4	12	60	300	1500

項目	説明	
①	Solution	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)

# 4-3. 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			

# 4-3. 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

Method Builder - 1 Series

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

Bottles

Buffer bottle 200 ml Buffer

Water bottle 200 ml Water

View Trays Volume summary

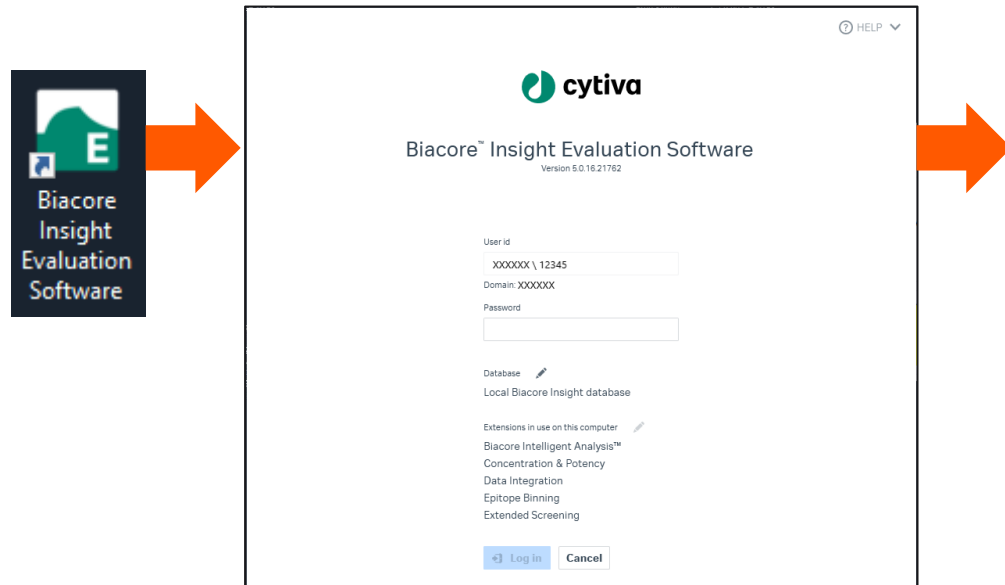
Plate 1

	A	B	C	D	E	F	G	H
10	Sample 1 1500 nM ● 103 $\mu$ l							
9	Sample 1 300 nM ● 103 $\mu$ l							
8	Sample 1 60 nM ● 103 $\mu$ l							
7	Sample 1 12 nM ● 103 $\mu$ l							
6	Sample 1 2.4 nM ● 103 $\mu$ l							
5	Sample 1 0 nM ● 103 $\mu$ l							
4	Sample 1 0 nM ● 103 $\mu$ l							
3	Sample 1 0 nM ● 103 $\mu$ l							

	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

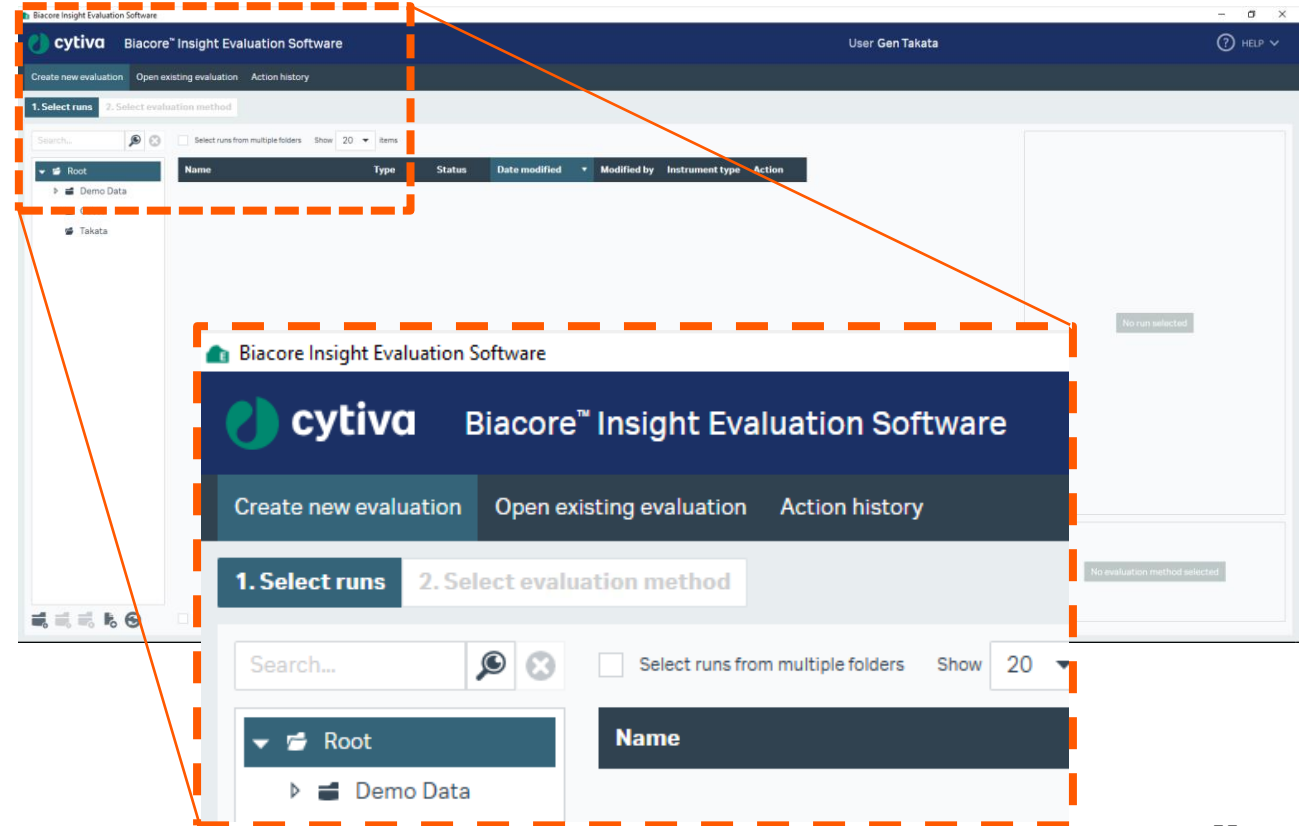
# 4-4. Kinetics/Affinity ( $K_D$ , $k_a$ , $k_d$ )解析

## 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



# 4-4. 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

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software

Create new evaluation Open existing evaluation Action history

1. Select runs 2. Select evaluation method

Search...

Select runs from multiple folders Show 20 items 1-16

- Root
  - Demo Data
    - Biacore 8K Demo data
      - Biacore8K Training data**
      - IE Concentration Demo Files
      - IE Epitope Binning Demo Files
      - IE Intelligent Analysis Demo Files

Name
System check 6/9/2017 10:29:35 AM
SCK demo 11/30/2016 1:23:47 PM
Fragment affinity screen 11/2/2016 3:33:31 PM
Fragment clean screen 11/2/2016 12:31:04 PM
Immobilization Clean Screen 11/2/2016 11:09:57 AM
<b>Single-cycle kinetics 011116 11/1/2016 3:40:51 PM</b>

Select evaluation method

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

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software

Create new evaluation Open existing evaluation Action history

1. Select runs 2. Select evaluation method

User defined **Predefined**

- Empty method
- Surface preparation
- Assay development
- Binding screen
- Kinetics / affinity**
  - Fragment
  - LMW**
  - Antibody / general

Name
LMW single-cycle kinetics - Evaluation method
LMW multi-cycle kinetics - Evaluation method
LMW multi-cycle affinity - Evaluation method
<b>LMW single-cycle kinetics using capture - Evaluation method</b>
LMW multi-cycle kinetics using capture - Evaluation method
LMW multi-cycle affinity using capture - Evaluation method

Open



# 4-4. Kinetics/Affinity ( $K_D$ , $k_a$ , $k_d$ )解析

Solvent correction

Biacore Insight Evaluation Software - 2\_CA\_drug

cytiva Biacore™ Insight Evaluation Software User ? HELP

Create new evaluation Open existing evaluation Evaluation - 2\_CA\_drug Action history

Solvent correction

Included	#Excluded	Cycle	Flow cell	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	Y0 (RU)	Immobilization level (RU)
<input checked="" type="checkbox"/>	0	5	4-3	0.427	0.9	
<input checked="" type="checkbox"/>	0	18	4-3	0.672	2.2	
<input checked="" type="checkbox"/>	0	31	4-3	0.929	2.5	
<input checked="" type="checkbox"/>	0	44	4-3	0.397	2.6	
<input checked="" type="checkbox"/>	0	57	4-3	0.308	3.1	
<input checked="" type="checkbox"/>	0	70	4-3	0.284	3.4	

項目	説明
①	Included センサーグラムや補正曲線の形状が異常な場合、チェックを外す。
②	Apply and close Solvent Correctionを適応して解析を実行。

Apply and close Cancel

# 4-4. 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
<b>1:1 binding</b> Series parameters	<b>1:1 binding</b> 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

# 4-4. 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

# 4-5. 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。

# 4-5. 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。

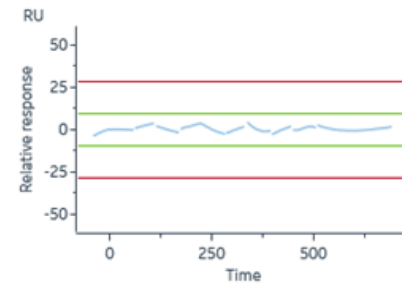
Sample table Parameters Residuals Blanks **Quality control** References

- ✔ 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

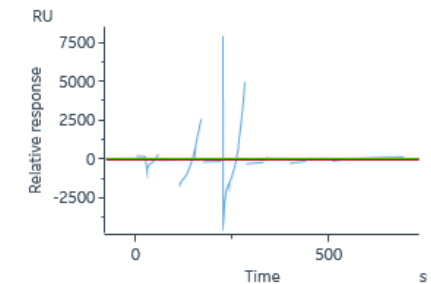
- ✔ (緑) クオリティーアセスメントにパスしています。
- ! (橙) クオリティーアセスメントの許容限界に近いです。
- ! (赤) クオリティーアセスメントにパスしていません。
- ⓘ (灰) 測定者が確認します。

	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



# 4-5. 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 <sup>2</sup>	RU <sup>2</sup>	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。

# 4-6. 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。

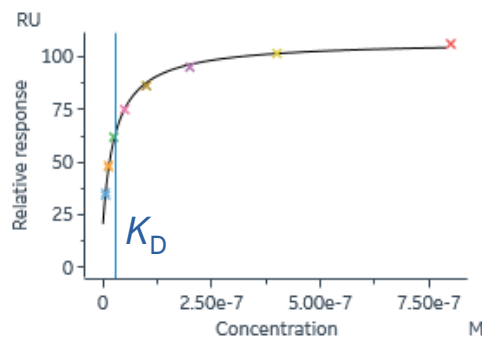
### 主な変更点 (多くの場合デフォルトのまま)

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。

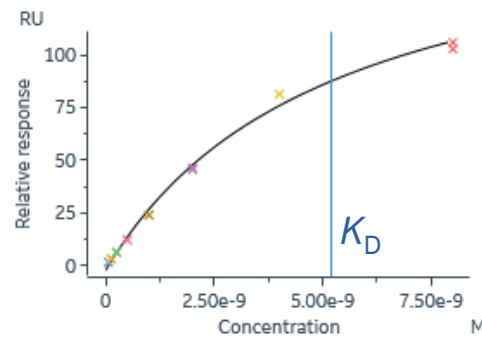
# 4-6. Affinity ( $K_D$ )解析の詳細

- Affinity解析における解析結果の信頼性  
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

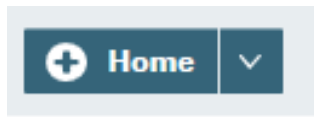
- Fitting 解に対する評価パラメーター

	単位	説明
カイ二乗 $\text{Chi}^2$	$\text{RU}^2$	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。



# 4-7. 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

# 4-8. 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

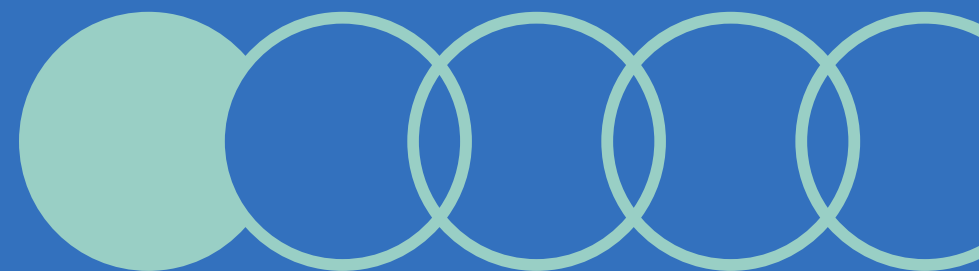
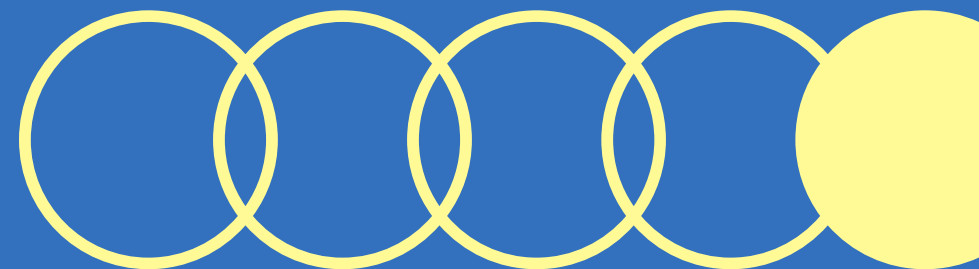
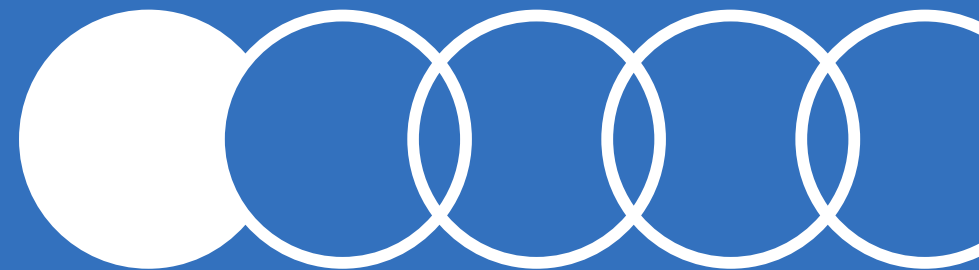
### 各種Evaluation実行

### 各種Export

### Settings and preparation

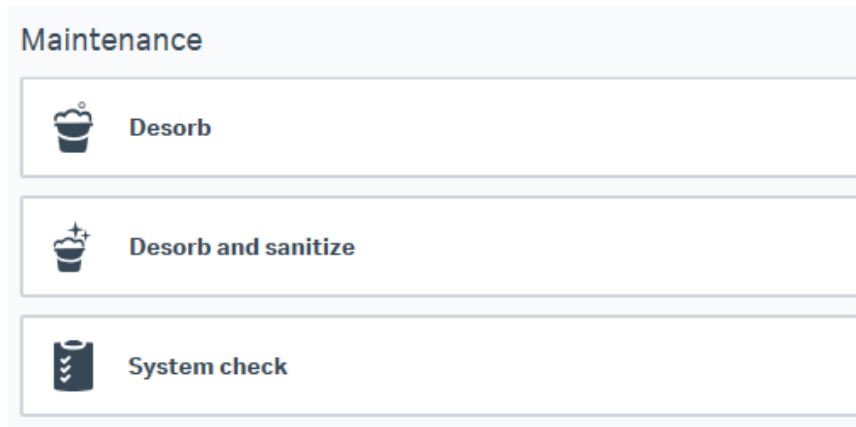
- **Properties** : データのプロパティやリガンド固定化量などの確認
- **Variables** : サンプル名、濃度値、Blank、Controlの設定などVariable項目の修正
- **Curve markers** : データにフラグを立てる場合、そのフラグの作成・編集
- **Report point** : レポートポイントの追加・削除・編集
- **Solvent Correction** : 溶媒補正の実行

# 5. 各種メンテナンス および 測定後の管理方法



# 5-1.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

# 5-2.測定後の管理

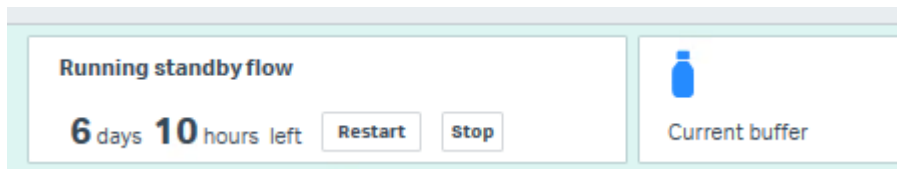
## 7日以内に再度使用する場合

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

# 5-3.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

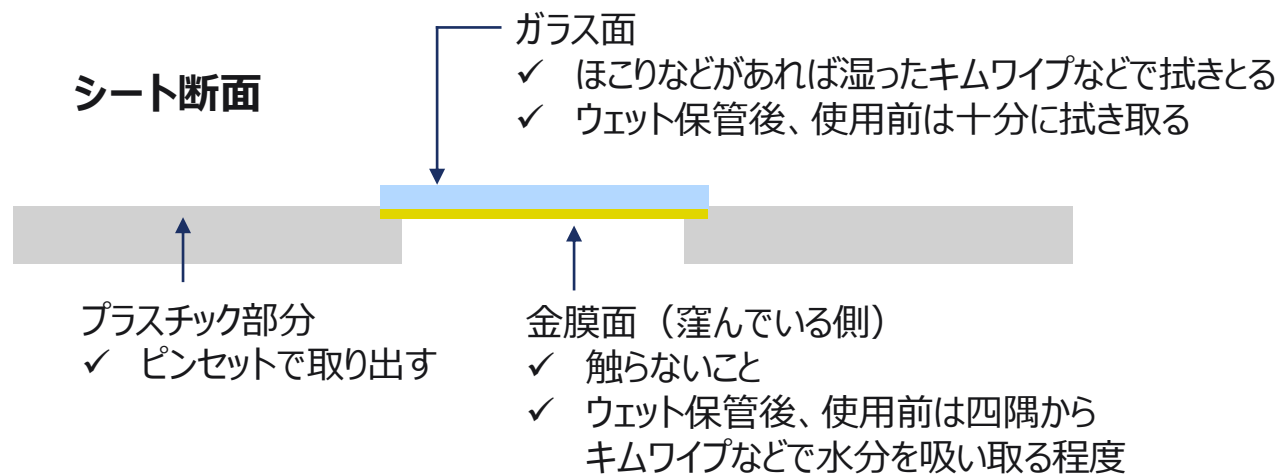
## ウェット状態での保存

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

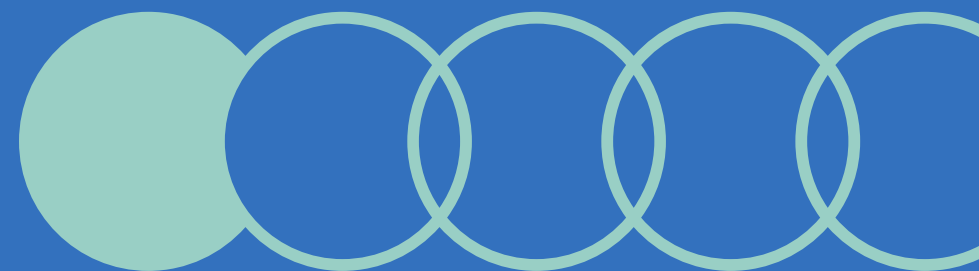
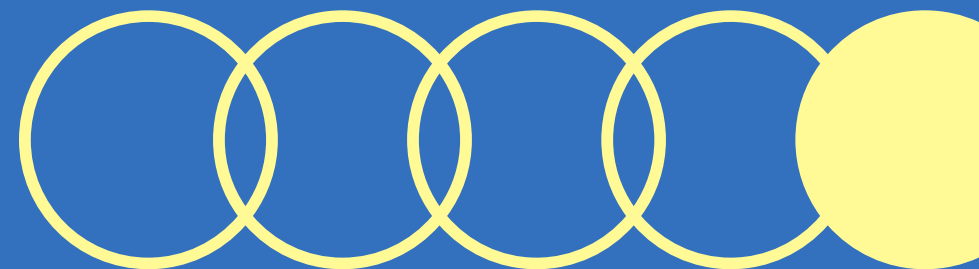
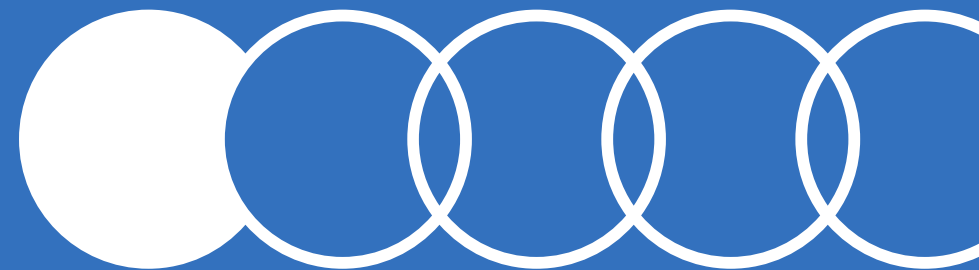


## チップの再使用

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



# 6. サポート情報



# 6-1. サポート情報

## 国内Biacoreポータルサイト

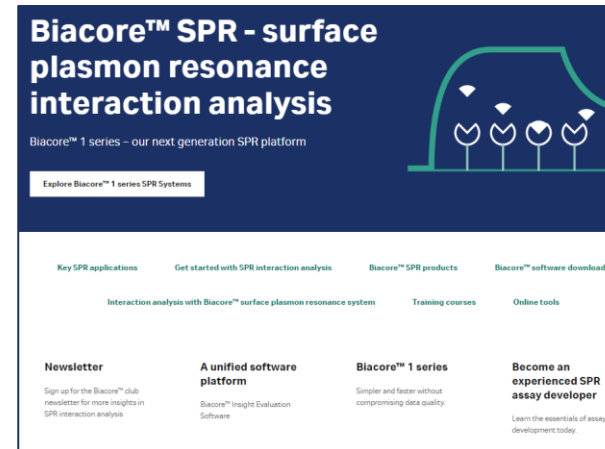
<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/>



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）



# 6-2. 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**

