

Biacore 8K/8K+

アプリケーション別操作手順書

抗体編

Ver.202108



重要

本日本語マニュアルは、Biacore の用途別の典型的**基本的操作**手順を記載しています。装置の規制対応、安全性注意事項、使用するセンサーチップやキット個別の詳細条件設定等は、 cytivalifesciences.com 内各製品の Instruction For Use (IFU, 英語)を併せてご参照ください。 (各製品ページ"Related Documents"よりダウンロード)

目次

1. 実験を始めるまえに
1-1. システムの起動
1-2. 測定前の基本操作・設定
2. 基本操作5
2-1. サンプルラックの取り扱い
2-2. 測定メソッド
3. 測定系のデザイン7
3-1. 目的別の測定ワークフロー図7
3-2. 典型的な目的別リガンド固定化法7
3-3. 固定化法の大分類(直接法とキャプチャー法)8
 3-3. 固定化法の大分類(直接法とキャプチャー法)
3-3. 固定化法の大分類(直接法とキャプチャー法) 8 4. 抗体の目的別測定解析手順 8 4-1. センサーチップ CM5 への標的キャプチャー用抗体の固定化 8 4-2. 抗体のスクリーニング 9 4-3. 抗体のキャラクタリゼーション 18 5. メンテナンス・システムチェック・シャットダウン 25 5-1. メンテナンス 25 5-2. システムチェック 27
3-3. 固定化法の大分類(直接法とキャプチャー法) 8 4. 抗体の目的別測定解析手順 8 4-1. センサーチップ CM5 への標的キャプチャー用抗体の固定化 8 4-2. 抗体のスクリーニング 9 4-3. 抗体のキャラクタリゼーション 18 5. メンテナンス・システムチェック・シャットダウン 25 5-1. メンテナンス 25 5-2. システムチェック 27 5-3. シャットダウン 29

1.実験を始めるまえに

1-1. システムの起動

手順	操作項目	注意点
1	電源 On	・システム本体→PC の順
2	バッファー類のセット	・A ラインが main inlet tube
3	コントロールソフトウェアの起動	8K Biacore 8K Control Software *初期パスワードは、Biacore8K

ペリスタポンプは装置前面の下方のパネルの後にあります。システムを使用する場合は灰色(外側)と青 色(内側)の両方のポンプクランプを閉じてください。



Biacore 8K Control Software のインターフェースは4つのワークスペースから構成されています。



1-2. 測定前の基本操作・設定

Instrument Control タブをクリック。

手順	操作項目	注意点	
1	センサーチップのドック	Change Chip からセンサーチップポートを開ける。	
		Change chip	
2	ランニングバッファーによる平衡	Change solutions	
	化		
3	温度設定	Flow cell / Sample Compartment それぞれ設定可	
		能。	
		Set flow cell temperature	
		Set sample compartment temperature	

センサーチップのドック手順



Change	e chip
New chip	Existing chip
🗌 Run Char	ige solutions when dock is completed
Dock chip	
Туре	~
Id	11/17/2016 6:05:00 PM
Lot number	
Dock chip	Open chip door

- Open Chip Door をクリック
- ▶ センサーチップをセット
- ▶ センサーチップの Type を選択
- Dock Chip をクリック

2. 基本操作

2-1. サンプルラックの取り扱い

手順	操作項目	注意点
1	ラックトレイの出し入れ	・画面右下 Sample hotel door を押す
		Sample hotel door is closed Open
		・ドアが開いてサンプルトレイがセットできます。
2	対応プレート	下図
		96/384 プレートが 2 枚ずつセットできるサンプルトレイが、 8K で 2 枚、8K+で 6 枚セットできます。 図のようにロッキングレバーを操作してセットします。

Microplate type	Microplate	Foil	Septa	Plate height (mm)
96-well, normal, U-bottom, polypropylene	Microplate 96-well, 650201,Greiner	А	B1	15
96-well, deep-well, V-bottom, polypropylene, 650 µL	Microplate 96-well, 786201,Greiner	A	B1	27
96-well, deep-well, U-bottom, polypropylene, 1 mL	Microplate 96-well, 780201,Greiner	Α	В	42
96-well, deep-well, U-bottom, polypropylene, 2 mL	Microplate 96-well, 219020, Porvair	A	В	44
384-well, normal, flat bottom, polystyrene	Microplate 384-well, BR100505, GE 100-pack	C	-	14
384-well, V-bottom, polypropylene	Microplate 384-well, 781280,Greiner	C	-	14
384-well, deep-well, V-bottom, polypropylene	Microplate 384-well, 781270,Greiner	C	-	22
96-well, standard, polystyrene, U-bottom	Microplate 96-well, BR100503, GE 100-pack	А	B1	14
96-well, standard, polystyrene, U-bottom	96-well Microplate and Foil, BR1003 50 –pack, aluminum foils for 48 wells (perforated for 6 strips for 8 wells each	83, GE	-	14

Foil/Septa

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

対応可能なプレートおよびプレートシール(Foil/Septa)。有機溶媒を使用する時は、ポリプロピレン製 プレートを用います。サンプルの Pooling には Septa が必要です。

2-2. 測定メソッド

Instrument Control タブよりメソッド作成・編集をはじめる。

手順	操作項目	注意点
1	新規メソッドの作成	New method
2	既存メのソッド編集	Open method

New Method の選択で Method タブ画面へ。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。

Biacore 8K Control Software				
Biacore [™] 8K Control Softwa	re	User		
Instrument control Activity history Methods Runs				
€ Open				
Empty methods	Name	Description		
 Surface preparation 	Kinetic screen	Single concentration injections for rapid estimation of kinetic prope		
🖆 Assay development	Single-cycle kinetics	Single-cycle kinetics for protein samples.		
Binding screen	Multi-cycle kinetics/affinity	Multi-cycle kinetics/affinity for protein samples. Includes regeneration		
👻 🖆 Kinetics / affinity	Parallel kinetics	Parallel kinetics for protein samples. Injection of the entire dilution :		
Fragment	2D kinetics	Kinetic analysis of protein samples diluted in a two dimensional ma		
▷ ≝ LMW	Single-cycle kinetics using capture	Single-cycle kinetics for protein samples using captured ligand.		
👻 🖆 Antibody / general	Multi-cycle kinetics/affinity using capture	Multi-cycle kinetics/affinity for protein samples, using captured ligar		
🖆 Kinetics / affinity	Parallel kinetics using capture	Parallel kinetics for protein samples, using captured ligand. Injectior		
📹 Kinetics / affinity using Biotin CAP	2D kinetics using capture	Kinetic analysis of protein samples diluted in a two dimensional ma		
📹 Kinetics / affinity using Sensor Chip NTA				
📹 Kinetics / affinity using GST capture				
Concentration				
🖆 PLA / EC50				
🖆 Epitope binning				
	1			
	•			

3.測定系のデザイン

3-1. 目的別の測定ワークフロー図



3-2. 典型的な目的別リガンド固定化法

サンプル	スクリーニング	キャタクタライゼーション(ka、kd、KD算出のため)
抗体	各種抗体Capture kit Sensor Chip Protein A / Protein G	各種抗体Capture kit Sensor Chip Protein A / Protein G
低分子	Sensor Chip NA/SA	Biotin CAPture kit Sensor Chip NA/SA
その他	各種 Capture kit Amine Coupling Kit	Biotin CAPture kit 各種 Capture kit Amine Coupling Kit

センサーチップ NA/SA への固定化⇒ 4-1 参照

スクリーニング⇒ **4-2 参照**

Biotin CAPture kit を用いたキャラクタリゼーション⇒ **4-3 参照**

Amine Coupling を用いた固定化 (一般的にタンパク質変性リスクがやや高い)⇒ 6-1 参照

3-3. 固定化法の大分類(直接法とキャプチャー法)



	直接法(アミンカップリング)	キャプチャー法
Pros	古典的方法。 キャプチャー法でCapturing moleculeの固定化にもよく使われ る。→ アミンカップリングのページ参照。 参照論文が多い。 リガンドの消費量が少ない。	固定化によるリガンドの失活リスクがほとんどない。 再生条件の検討不要。 → <mark>実験成功の確実性。</mark>
Cons	アナライトを剥がす再生条件の検討が必要。見つけられないケー スがある。 リガンドの固定化時の酸に伴う変性。 → <mark>実験成功の不確実性。</mark>	固定化量が比較的少ない(多くの場合問題ない)。 リガンドの消費量が多い。 リガンドのタグに依存。→Biotin化は汎用性が高い。 Hisタグの場合、キャプチャー後のペースラインドリフトが問題になる ことがある。

4. 抗体の目的別測定解析手順

4-1. センサーチップ CM5 への標的キャプチャー用抗体の固定化

A. 手順概略

手順	操作項目	参照
1	センサーチップの選択	
2	Method を用いた固定化	キャプチャー用抗体は Fc1 と Fc2 の両方に固定化します
		(Immobilize in に、Fc1 and Fc2 series を選択) <mark>6-1 参照</mark>

B. 準備する試薬・サンプル

各センサーチップの Instruction For Use (IFU)を併せてご参照ください

4-2. 抗体のスクリーニング

A. スクリーニング測定を始める前に

1	ポジティブコントロールを用いた標的タンパク質の特異的結合の確認(6-9 参照)
2	・Method による Antibody Screen
	・抗体を、結合レスポンスの高さで選出する

B. 準備する試薬・サンプル

	操作項目	用途、備考
必須	ランニングバッファー	メソッド作成時の画面から必要量を確認。加えて自動測定後の
		stanby flow での放置時間分として 65ml/24hr
必須	抗体リガンド溶液	選出したいアフィニティー基準を目安に添加濃度を設定
必須	抗原アナライト溶液	
オプション	ポジティブコントロール	有れば必須。リガンド標的分子の活性確認や Control
		Adjustment 補正用として (4-2D⑤参照)
オプション	ネガティブコントロール	Control Adjustment 補正用 (4-2D ⑤ 参照)

<u>C. メソッドの作成</u>

Method タブの New より、Binding Screen→Antibody/General→Antibody Screen→Open

手順	操作項目	注意点·説明		
1	Method definition	メソッドの動作内容決定		
2	Variable and positioning	・Variable にチェックを入れた項目の値の入力		
		・サンプル配置の決定(6-8 参照)		
3	Cycle overview	全サイクルのステップ、サンプル、ポジションの確認		
4	Plate layout	マイクロプレートのサンプルポジションの確認		
5	Send to queue	Activity queue に追加(動作開始の予約)		
6	Method の保存	■ 上書き保存 ■ 別名保存		

Biacore 8K Control Software						
Biacore [™] 8K Control So	ftware			User		
Instrument control Activity history Methods	Runs					
Antibody screen 🔇 🖸 Open 🛈 Ne	w (1)	2	3	4	(5)	6
Method Builder	1. Method definition	2. Variables and positioning	3. Cycle overview	4. Plate layout	O Send to queue	₽ ₽

①~⑥の順番で Method の作成を進める。

Method definition の設定

手順	操作項目	注意点·説明
1	Data Correction rate	スクリーニングは、通常 1 Hz
2	Concentration Unit	アナライト濃度の単位
3	Running buffer	バッファー名称入力
4	Step	下図の場合、Start up → Analysis
		* 必要に応じて各タブを選択して編集



<u>捕捉:Positive Control の追加</u>

手順	操作項目	注意点·説明
1	Add Step	Add Step→Analysis を選択。Control などの名称を入力
2	Repeat within	Analysis を選択。何 Cycle 毎に測定するか数値入力。Run once first/last をチェック。
3	Add Command	・Analysis と同じ Command を設定。
		・Capture の Solution に Control Ab など仕意に名称を人力。



Method definition / 各 Command の設定

手順	操作項目	注意点·説明	
1	各 Command の選択	下図では Capture→Analyte→Regeneration	
		・Capture:抗体添加	
		Contact Time:60-180 秒/Flow late:10 µl/min.	
		・Analyte:抗原添加	
		Contact Time: 60-120 秒/Dissociation time: 120-180 秒	
		/Flow late:30 µl/min.以上	
		・Regeneration:各 Kit や Sensor Chip の IFU 参照	
2	添加条件	サンプル名、添加時間、解離時間、流速、濃度、分子量など	
		* Variable : サンプル名、分子量など Cycle 毎に異なるもの	



D. スクリーニングプロットのデータプロセッシングと解析

手順	操作項目	注意点·説明	
1	解析ソフト起動	解析ソフト Insight Evaluation software 起動	
2	Select runs	解析を実施する RUN ファイルの選択。	
3	Select evaluation method	解析を実行する Method の選択	
4	Predefined	プリセットされた解析 Method の選択	
		* 編集・保存済みの Method は User defined より選択	
5	Method の選択	解析内容、解析対象に合わせて Method を選択	
		下図では Antibody screen(抗体スクリーニング)	
6	Open	選択した Method の実行	



データプロセッシング Evaluation - Binding

手順	操作項目	注意点·説明		
1	Adjustment	・キャプチャーレベル、コントロールサンプルなどによるデータ補正		
		・下記補足 Adjustment/Boundaries 参照		
2	Boundaries	・Cut-Off、Ranking などの設定。下図では、Negative Controlの 3SD で Cut-		
		off を設定。 Plot 上に Threshold 表示。		
		・下記補足 Adjustment/Boundaries 参照		
3	Table	サンプル名、レスポンス(RU)、Cut-Off、Ranking などの結果を表示。		
4	データの	選択(水色)したプロットのセンサーグラム形状を確認。除外すべきデータは		
	Exclude	右クリックから Exclude。		
		Exclude Global:全ての Evaluation items から該当のデータを除外。		
		Exclude Local:現在開いている Evaluation item から該当のデータが除外。		
5	結果の	データプロセッシングを経たデータを Excel、パワーポイント、PDF でエクスポート。		
	Export	Home $ ightarrow$ Export to		



結果の Export

Biacore Insight Evaluation Software - BLS (large) 20160316		- o ×
Biacore [®] Insight Evaluation Software	User	() HELP Y
Create new evaluation Open existing evaluation Evaluation - BLS (large) 20160316	8	
QC - Sensorgram V 🛛 QC - Baseline V 🔄 QC - Binding to reference V	Evaluation - Binding V O Home V	5 Curve markers
Settings and preparation	New evaluation items	After evaluation
Properties	Sensorgram	Create evaluation method
Variables	Plot	Export to
Curve markers	Concentration	Spreadsheet
Report points	Epitope binning	Presentation
Solvent correction - Applied	Kinetics and affinity	POF
	Kinetics	y JSON or XML

<u> 補足:Adjustment/Boundaries</u>

各種補正ボタン・	設定項目	説明		
タブ				
Brank Subtraction		ブランク(0 濃度)レスポンスの差し引き		
	Blank	ネガティブコントロール、または、サンプルのゼロ濃度(Sample		
	Subtraction			
	settings	差しらにさり法をノルタリノメーユーかり選択		
Molecular	-	各プロットレスポンスを分子量でノーマライズ		
Weight		100 × レスポンス(RU)/ 分子量(Da)		
Aujustinente		プロットの Y 軸の単位:100 × RU / 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		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		
Adjustment		ーニングで良く使用される。		
Adjustment For	Positive control	リガンドのサイクル(時間)経過後の結合活性の低下による		
Controls		レスポンスの下降をノーマライズ		
		下記補足 Adjustment for controls 参照		
	Negative control	下記補足 Negative control, Blankの違いと設定例参照		
	Positive/Negative	Fitting 方法の選択		
	control Fit	Linear: Y = aX + b を適用		
		Polynomial: Y = aX ² + bX + c を適用		
Ranking/Cut-off				
	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		
	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 cut-off を表示		

項目	説明
Negative control	特異的結合が無いと想定されるサンプル
	⇒Table における分子量と濃度値は 0 でない。
Blank	濃度 0 のサンプル
	⇒解析時、サンプル名に依存せずに選択できる。

相走: Negative control. Blank の違いと設止的	補足	:	Negative control	Blank	の違いと設定例
-------------------------------------	----	---	------------------	-------	---------

ł	Biacore	[™] Insight Eval	uation Soft	ware					User		(?) HEL
ate n	ew evaluatio	n Open existing evalu	ation Evaluation - I	BLS (large) 2016	0316						
QC	- Sensorgra	m 🗸 🔃 QC-Ba	seline 🗸 🔝	QC - Binding to	reference	V 🗵 Eval	uation - Binding	V O Home	~		🗐 Var
tun nu	ımber Co	ncentration unit									
	μ	м 👻									
Cycle	Channel	Analysis step purpos	e Analysis step n	Analyte ame Solution	n	Analyte Concentratio	Analyte n Contact time	Analyte Dissociation time	Analyte Flow rate	Analyte Molecular weight	
5	5	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols DMSO				12	30	187	
5	6	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols DMSO	~	Not a cor	ntrol	12	30	187	
5	7	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols DMSO	~	Positive	control	12	30	187	
55	8	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols DMSO	~	Negative	control	12	30	187	
6	1	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols FRAG22	7 🗸	Plank cou	atrol	12	30	176	
6	2	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols DMSO	~	Bialik Col	ittoi	12	30	187	
6	3	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols FRAG22	8 🗸	1000	30	12	30	149	
6	4	Analysis 🗸	 Samples and Cor 	ntrols FRAG22	9 🗸	1000	30	12	30	226	
56	5	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols FRAG23	• •	1000	30	12	30	201	
6	6	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols FRAG23	1 ~	1000	30	12	30	176	
6	7	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols FRAG23	2 🗸	1000	30	12	30	123	
6	8	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols FRAG23	3 🗸	1000	30	12	30	194	
57	1	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols Filibuvir	~	0.25	60	600	30	504	
57	2	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols Filibuvir	~	0.25	60	600	30	504	
57	3	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols Filibuvir	\sim	0.25	60	600	30	504	
57	4	Analysis 💊	 Samples and Cor 	ntrols Filibuvir	\sim	0.25	60	600	30	504	
57	5	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols Filibuvir	~	0.25	60	600	30	504	
57	6	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols Filibuvir	×	0.25	60	600	30	504	
57	7	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols Filibuvir	~	0.25	60	600	30	504	
57	8	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols Filibuvir	~	0.25	60	600	30	504	
58	1	Analysis 💊	Samples and Cor	ntrols DMSO	~	1000	30	12	30	187	

Home \rightarrow Variables より、 \checkmark をクリックすると、各サンプルの目的が記録されています。

<u>補足:Adjustment for controls</u>



ポジティブコントロールの減衰(=標的タンパク質の活性の減衰)を、ノーマライズする。

補足: Stability early vs Stability late のプロット

解離相の前半と後半のレポートポイントのプロットすることで、複合体の安定性の良い抗体を選別することができます。

Analyte stability early_1 Adjus	100 - 50 -	•		4			(0								×
				'		10	2	0								
			Α	Analy	/te s	stability late	e_1 Rela	ative	RU	Capture 1 Solution	Analyte 1 Solution	Curve markers	Analyte stability early_1 Relative (RU)	Analyte stability late_1 Relative (RU)		*
						7	5	Reference	subtracted	Ligand 2	beta-2micro		0.8	1.4	1	•
						8	5	Reference	subtracted	Ligand 3	beta-2micro		2.4	4.4		
						9	5	Reference	subtracted	Ligand 3	beta-2micro	Positive	28.1	23.0		
						10	5	Reference	subtracted	Ligand 4	beta-2micro		1.1	1.8		
						11	5	Reference	subtracted	Ligand 4	beta-2micro		5.7	5.0		
						4	6	Reference	subtracted	Ligand 1	beta-2micro		1.9	3.5		
						5	6	Reference	subtracted	Ligand 1	beta-2micro		2.0	3.8		
						6	6	Reference	subtracted	Ligand 2	beta-2micro		1.0	1.8		
						7	6	Reference	subtracted	Ligand 2	beta-2micro		1.0	1.7		
						8	6	Reference	subtracted	Ligand 3	beta-2micro		2.6	4.9		
						9	6	Reference	subtracted	Ligand 3	beta-2micro	Positive	29.2	24.1		
						10	6	Reference	subtracted	Ligand 4	beta-2micro		1.2	1.9		
						11	6	Reference	subtracted	Ligand 4	beta-2micro		5.8	5.2	Ŧ	
											<u>C</u> los	e <u>H</u> elp				

手順	操作項目	注意点·説明
1	Binding vs Stability	Evaluation - Binding vs Stability を選択
2	Data の全選択	Thumbnail などからデータを全選択
3	Select Area mode	・Select Area mode 🔤 で、興味ある領域をクリック&ドラッグ。
		・選択されたプロットは水色になります。
4	Edit makers	・選択されたプロットを右クリックで Edit Marker を選択。
		・任意の名称を付けると Table の Curve markers に表示されます。



デフォルトの Analyte stability early および Analyte stability Late は下表通り。

Report point definitions						
Name	Time (s)	Relative position	Injection	Window (s)	Baseline	Actions
Analyte baseline	5	Before start	Analyte	5	Yes	× ×
Analyte binding early	6	After start	Analyte	5	No	* 🗵
Analyte binding late	5	Before end	Analyte	5	No	* 🗵
Analyte stability early	5	After end	Analyte	5	No	1
Analyte stability late	5	Before dissociation end	Analyte	5	No	* 🗵
Capture baseline	5	Before start	Capture	5	Yes	* 🗵
Capture level	25	After end	Capture	5	No	1
Regeneration baseline	5	Before start	Regeneration	5	Yes	1
Regeneration level	10	After end	Regeneration	5	No	1
• Add definition						

Home→Report points から編集が可能です。

4-3. 抗体のキャラクタリゼーション

A. キャラクタリゼーション測定を始める前に

A-1.	サンプルの添加濃度・時間の設定 (6-2 参照)
A-2.	適切なメソッドの検討(下表参照)

<u>A-1</u>

サンプルの添加濃度・時間の設定 6-2 参照

<u>A-2</u>

センサーチップ	用途	
Sensor Chip Protein A	・多くの場合はこちらで対応	
Sensor Chip Protein G	・Capture 用抗体の固定化が不要	
各種 Antibody Capture kit	・Capture 分子の微調整が必要な場合。	
	・Sensor Chip CM5 などへのアミンカップリングが必要	

B. 準備する試薬・サンプル

	操作項目	用途、備考
必須	抗体 Capture 分子固	・Sensor Chip Protein A または Sensor Chip Protein G
	定化済みの Sensor	・各種 Antibody Capture kit 固定化済み Sensor Chip CM5
	chip	(4-1 参照)
必須	抗体リガンド溶液	
必須	ランニングバッファー	メソッド作成時の画面から必要量を確認。加えて自動測定後の
		stanby flow での放置時間分として 260 ml/24 hr
必須	抗原アナライト溶液	

<u>C. メソッドの作成</u>

Method タブの New より、Kinetics / affinity→Antibody / general→kinetics / affinity→single-cycle kinetics using capture→Open *各メソッドの使い分けは 6-2B 参照

	* * *	
手順	操作項目	注意点·説明
1	Method definition	メソッドの動作内容決定
2	Variable and positioning	・Variable にチェックを入れた項目の値の入力
		・サンプル配置の決定(6-8 参照)
3	Cycle overview	全サイクルのステップ、サンプル、ポジションの確認
4	Plate layout	マイクロプレートのサンプルポジションの確認
5	Send to queue	Activity queue に追加(動作開始の予約)
6	Method の保存	▶ 上書き保存 ▶ 別名保存

🚳 Biacore 8K Control Software

Biacore ^{**} 8K Control Software							
Instrument control Activity history	Methods	Runs					
Single-cycle kinetics using capture	3 0	Open 🚺 🗘 New	2	3	4	5	6
Method Builder		1. Method definition	2. Variables and positioning	3. Cycle overview	4. Plate layout	O Send to queue	ш (У

①~⑥の順番で Method の作成を進める。

Method definition の設定

手順	操作項目	注意点·説明
1	Data Correction rate	キャラクタリゼーションは、通常 10Hz
2	Concentration Unit	アナライト濃度の単位
3	Running buffer	バッファー名称入力
4	Step	下図の場合、Start up → Analysis
		* 必要に応じて各タブを選択して編集

Data collection rate 10 -	Sample compartment temperature Set to fixed	Concentration unit nM
(4)	vary with flow cell temperature	Running buffer Buffer (3)
Startup 🛞 Analysis	Add step V	
Name Analysis	Flow cell temperature 25 °C	Repeat within
Purpose Analysis -		

Method definition / Analysis の設定

手順	操作項目	注意点・説明
1	各 Command の選択	下図では Sigle Cycle Kinetics による抗体評価。
		・Capture1:抗原リガンドの添加
		Solution は Variable にチェック。添加時間、要検討
		・Single cycle injection1:Single cycle による抗原添加②
		・Regeneration:再生溶液
		各 Kit や Sensor Chip の IFU 参照
2	抗原添加条件	抗原名称、添加時間、解離時間、流速、濃度、分子量など
		* Variable:サンプル名、分子量などが Cycle 毎に異なる場合
		にチェック
3	Concentration per cycle	各サイクルにおける Single cycle injection 濃度点数(5~9)



Variable and positioning の設定

手順	操作項目 注意点·説明	
1)	Use Channel	使用するチャンネルの選択
2	各 Cycle	変数を変更したい項目の選択(下図では Analysis)
3	Capture1 Solution	キャプチャー分子(抗体)名の入力
4	Single cycle Kinetics1 Concentration	適切な濃度(0 濃度サイクルを含む)の入力
5	Plate 設定	サンプル配置の決定(6-8 参照)



<u>D. 解析(Kp、ka、ka</u>の算出)

手順	操作項目	注意点·説明
1	解析ソフト起動	解析ソフト Insight Evaluation software 起動
2	Select runs	解析を実施する RUN ファイルの選択。
3	Select evaluation method	解析を実行する Method の選択
4	Predefined	プリセットされた解析 Method の選択
		* 編集・保存済みの Method は User defined より選択
5	Method の選択	解析内容、解析対象に合わせて Method を選択
		下図では single cycle kinetics using capture
6	Open	選択した Method の実行



解析の実行、再解析、レポーティング

結果の Export

手順操作項目注意点・説明①Thumbnail各センサーグラムのサムネイル表示②SensorgramThumbnail から選択したセンサーグラムの詳細表示③Fit detailフィッティング結果 (6-12 参照)

Home \rightarrow Export to

Metohd をアプライすることでフィッティング解析が実行されます。

Biacore Insight Evaluation Software - Single-cycle kinetics 01111	5 11/1/2016 3:40:51 PM		– ø ×
Biacore [~] Insight Evaluatio	n Software	User	(?) HELP V
Create new evaluation Open existing evaluation	valuation - Single-cycle kinetics 011116 11/1/2016 3:40:51 PM 🔛 👔	8	
🔯 QC - Sensorgram 🗸 🔣 QC - Baseline	V 🛛 QC - Binding to reference V 🔄 Evaluation - Kine	tics 🗸 🕒 Home 🗸 🗲 🕘	
✓ Settings Kinetics/Affinity mode Settings apply to stacked savas Kinetics Affinity Both Settings apply to stacked savas Kinetics Affinity Both Settings	Analytic Ligand 1:11 binding	Lill Analytic (Igned 1:11)	Analytic Ligand 2; 1:1 binding
Fit models Perform fit [0]	RU 250	Analyte; Ligand 1; 1:1 binding	۲ ۲ ۲
Result table	0 100 200	300 400 500 600 Time	700 s
🐻 KD chart	1:1 binding; ka=2.58e+05; kd=7.99e-04; Rmax=733.1; KD=3.10e-09		5
On-off rate chart	Sample table Parameters Residuals Blanks Quality contra	₫ ← 3	2
Sensorgrams	 Kinetic constants are within instrument specifications. Kinetic constants appear to be uniquely determined. Bulk contributions (RI) were not evaluated. The RI parameter is see Check that sensorgrams have sufficient curvature. 	t to constant.	

解析結果を Excel、パワーポイント、PDF でエクスポート。

結果の Export

4

Biacore Insight Evaluation Software - BLS (large) 20160316		– Ø ×
Biacore [®] Insight Evaluation Software	User	(2) HELP V
Create new evaluation Open existing evaluation Evaluation - BLS (large) 20160316	8	
QC - Sensorgram V 🛛 QC - Baseline V 🖉 QC - Binding to reference V	Evaluation - Binding Y O Home Y	Curve markers
Settings and preparation	New evaluation items	After evaluation
Properties	Sensorgram	Create evaluation method
Uariables	Plot	Export to
Curve markers	Concentration	E Spreadsheet
Report points	Epitope binning	Presentation
Solvent correction - Applied	Kinetics and affinity	C. PDF
	Kinetics	JSON or XML

再解析の実行

詳細を再設定して解析を実行しなお薄ことも可能です。

手順	操作項目	注意点·説明
1	Data grouping	6-2 参照
2	解析モード	Kinetics / Affinity / Both(両方実施)より選択
3	Blank Setting	各サンプルに採用するブランク(0 濃度)による差し引きを設定
		・Use blanks within same series:同一名称のブランク
		・Use other blank:直前、直後、直近などから選択
		・No Subtraction:通常は用いない
4	Fit model	フィッティングモデル式の選択 <mark>(6-11 参照)</mark>
5	Initial Values	フィッティング解析時の初期値設定(6-11参照)
6	Perform Fit	Thumbnail などで解析したいデータを選択し、解析実行。

~ S	fettings	
>	Data grouping (8)	
, su	Serial Parallel/2D - 1	
orgrar	> Injection assignment	
t senso	Kinetics/Affinity mode Settings apply to selected series	
select	Kinetics Affinity Both (2)	
0,	> Blank settings < 3	
	Fit models	— 6
	Settings apply to selected series	
	Kinetics fit model [1] 1:1 binding	<u> </u>
	> Initial values	← (5

5.メンテナンス・システムチェック・シャットダウン

5-1.メンテナンス

A. 日常のメンテナンス(システム洗浄)の種類

毎週	Desorb(サンプル流路の洗浄)
毎月	Desorb and Sanitize(溶液が触れる全流路の洗浄および滅菌)

Воасо	re 8K Cont	Instrument control タブへ。
	Mainte	nance
	Ŷ	Desorb
	Ŷ	Desorb and sanitize
	۹ ***	System check

B.準備する試薬、消耗品・注意点

Desorb : (D) Desorb and Sanitize (D&S)	必要試薬・消耗品
D、D&S	Biacore Maintenance Kit, type 3
	・Desorb solution 1 は室温保存
D、D&S	Maintenance chip または使用済みのセンサーチップ
D&S	次亜塩素酸ナトリウム(研究用試薬)
	終濃度 0.6~1.0%に用事調整。
D、D&S	ランニングバッファーまたは超純水
D&S	10-50mM の Hepes または Tris バッファー

<u>C-1. Desorb(毎週)の手順</u>		
手順	説明	
チップのドック	Change chip	
	Maintenance Chip (または使用済みセンサーチップ)の Dock	
温度設定	20℃以上(通常 25℃)に設定	
Method の実行	Desorb	
	Method に従い Desorb solution 1, 2 を Deep Well Plate にセット	
(所要時間)	約 20 分	
実施後次の実験前	・自動的に Stanby flow(260ml/24hr)	
	・次の実験前に 3-4 時間以上の Stanby flow か Prime の 3 回実施	

<u>C-2. Desorb and Sanitize(毎月)の手順</u>

手順	説明
チップのドック	Change chip
	Maintenance Chip (または使用済みセンサーチップ)の Dock
温度設定	20℃以上(通常 25℃)に設定
Method の実行	Desorb and sanitize
	洗浄溶液は装置右のインレットチューブから吸引されシステム全体を洗浄
(所要時間)	約1時間
実施後次の実験前	・自動的に Stanby flow(260ml/24hr)
	・次の実験前に 3-4 時間以上の Stanby flow か Prime の 3 回実施

5-2. システムチェック

A. 実施頻度等

実施頻度	装置の自己診断。装置の調子が悪いことが疑われるとき。実験が正しく測定できてい	
	るかを担保するための定期的な実施頻度に設定	
System Check	Instrument control の Maintenance→System check をクリック。	

Воасо	re 8K Cont	Instrument control タブへ。					
	Mainte	Maintenance					
	Pesorb						
	Ť	Desorb and sanitize					
	J , ,,,	System check					

<u>B.準備する試薬、消耗品・注意点</u>

Desorb : (D)	必要試薬·消耗品
Desorb and Sanitize (D&S)	
BIAtest solution	Biacore Maintenance Kit, type 3 内
HBS-EP+ Buffer 10×	500 ml 程度
Series S Sensor Chip CM5	新品(実行後、実験に使用可能)
超純水	

<u>C-1. System Check の手順</u>

手順	説明			
チップのドック	Change chip			
	新品のセンサーチップ CM5 をドック			
Change Solution	Change solutions			
	HBS-EP+をランニングバッファーとして Change Solution			
温度設定	25℃に設定			
Method の実行	System check			
	│ └── Buffer A,C チューブはバッファーボトル、Buffer B,D チューブは超純水ボトルへセ			
	Buffer A,C チューブはバッファーボトル、Buffer B,D チューブは超純水ボトルへセットして、システムチェックの実行。			
結果の確認	Buffer A,C チューブはバッファーボトル、Buffer B,D チューブは超純水ボトルへセットして、システムチェックの実行。 ・正常範囲内 : PASS 範囲外 : FAIL			

5-3. シャットダウン

実験が終了した際には、次のいずれかの方法でシステムを維持できます。
 スタンバイ状態で放置
 7日以内に使用する場合
 電源を落として終了
 7日以上使用しない場合

5-3-1. スタンバイ状態での放置

測定が終了すると、自動的に Standby flow 状態になります。 チューブ A にセットしたランニング緩衝液で、260 ml/ 24 時間の流速を最長 7 日間継続します。ランニン グバッファーを涸らさないように注意してください。廃液ボトルの空き容量にも注意してください。 スタンバイ状態であるか否かは、ウインドウ下の Instrument Status で確認できます。

5-3-2. 電源の落とし方

電源を落とす前には、メンテナンスを実行してください。



センサーチップポートが開きます。

センサーチップを取り出し、Biacore 8K control software を終了します。 パソコンのシャットダウン、Biacore 8K の本体電源を落とします。

注意)電源を落とす場合は、システム内部が超純水で置き換わっているかどうか確認の上、電源を落と してください。 5-3-3.センサーチップの保存

取り出したセンサーチップは、以下の2つの方法で保存できます。

リガンドは保存中に変性する可能性があるので、再使用の際にはポジティブコントロールサンプルのレスポンスからリガンドの活性を確認してください。また、再 Dock 時前には、検出面、固定化面に埃などの汚れが付着していないことを確認してください。

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℃で保存します。 安定なサンプルを固定したセンサーチップの保存に用います。

ウェット状態での保存

取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを容器(50 ml 容のふた付きプラ スチック遠心チューブ等)に分注した HBS-EP+などの緩衝液に浸し、4 ℃で保存します。

シートの取り出しと保存

センサーチップはカバーとシートから構成されています。



シートの金基板の窪んでいる面はリガンドが固定化されています。平らな面は検出器が接触します。リガン ド固定化面には触れないよう注意してください。



ピンセットにてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存します。

保存していたシートからの緩衝液成分の除去とカバーへの収納

再利用する際は、緩衝液に浸していたシートをカバーに収めます。シートの水分を取り除いてからカバーに 収めてください。

<u>プラスチックの部分および検</u>出面

キムワイプで拭き、超純水で湿らせたキムワイプで再度拭きます。さらに乾いたキムワイプで拭きます。

固定化面

キムワイプなどを"こより状"に細くして、金基板の中央部分に触れないように、四隅から水分を吸収します。

埃に注意しながらカバーに収めます。下図のように、検出面が表になる向きで、ピンセットにてカバーの左 側から挿入します。

*リガンド固定化面を表にして挿入した場合には最後までシートが入りません。



6.知っていると得する TIPS

6-1. アミンカップリング	33
6-2. アナライトの添加条件設定	38
6-3. 再生条件の設定	40
6-4. リガンドの Biotin 化	42
6-5. リファレンスライン	44
6-6. 溶媒(DMSO)補正(Solvent Correction)	45
6-7. Control Software の構成および Activity queue	47
6-8. サンプルラックポジションの設定・変更	48
6-9. 特異的結合の確認	50
6-10. Variables によるサンプル名、濃度などの修正	52
6-11. フィッティングモデル式と parameters の設定	53
6-11-1. Kinetics 解析	53
6-11-2. Affinity 解析	55
6-12. 解析結果の品質評価	57
6-12-1. Kinetics 解析	57
6-12-2. Affinity 解析	59
6-13. 用語集	60

6-1. アミンカップリング

A. 手順概略

手順	操作項目	参照
1	リガンド希釈液の pH 選択	・中性タンパク質:等電点の pH0.5~2.0 低い
		Acetate
		・塩基性タンパク質:トリス、グリシンなど一級アミンを
		含まない中性緩衝液。
		・酸性タンパク質:アミンカップリング不可→Biotin 化
		(6-4 参照)
		・Capture kit は付属の Acetate
		 ・不明な場合は、Wizard から pH Scouting 実施
		(6-1C 参照)
2	センサーチップの選択	・CM5→アミンカップリングの第一選択
		・C1、CM3、CM4→デキストランへの非特異を減らす。
		固定化する分子が大きい場合(細胞など)。
		・PEG→固定化を極限まで下げて、デキストランへの非
		特異を減らす
		・CM7→CM5 で固定化が足りない場合
3	Wizard テンプレートを用いた固定化	6-1D 参照

<u>B.準備する試薬・サンプル</u>

各センサーチップの Instruction For Use (IFU)を併せてご参照ください

Amine Coupling Kit (BR100050)*

各種リガンド希釈液

一般的に固定化するタンパク質は数十 µg/ml オーダー程度が適当ですが、サンプルや目標とする固定化 量により異なります。

* Amine Coupling Kit の NHS および EDC は超純水に溶解後、凍結保存します。100 µl 程度バイアル に小分けにすることをお勧めします。Biacore 8K/8K+の場合、PCR 8 連チューブが便利です。



<u>C. ソフトの操作のポイント ~ pH Scouting</u>

使用すべきリガンド希釈液が不明な場合、はじめに pH Scouting を行います。

Method タブの New より、→Surface preparation→pH Scouting→Open

手順	操作項目	注意点·説明
1	リガンド添加時間・流速	通常 60 秒、5μl/分
2	センサーチップ洗浄液	通常 50mM NaOH
3	Use Channel	使用するチャンネルにチェック
4	Ligand 名	サンプル名称入力
5	Immobilization buffer	使用する希釈液名称および pH



Insight Evaluation Software を起動し、Select runs タブより、RUN データを選択。 Select evaluation method タブの Predefined より、Surface preparation→pH Scouting→Open

下図のようなセンサーグラムが得られます。プレコンセントレーションによるレスポンスが確認できる希釈液の うち最も pH が高いものを採用します。この場合は、10 mM Acetate pH 5.0。



<u>D. ソフトの操作のポイント ~ Amine Coupling</u>

Method タブの New より、→Surface preparation→Immobilization→Open

手順	操作項目	注意点・説明
1	センサーチップの選択	・デフォルトで CM5 が選択されています
2	Immobilize in	・固定化する Fc の選択。通常は Fc2
		・キャプチャー用抗体の固定化には Fc1 and Fc2 series を選択
3	各 Command の確認	・SA-Biotin Capture を選択
(4)	リガンド添加時間・流速	・各センサーチップ IFU 参照
		・アミンカップリングは、通常 420 秒、10μl/分
		・各種 Capture Kit のキャプチャー用抗体の固定化条件は、各
		キットの IFU を参照してください。
5	Ch 選択/リガンド名	使用する Ch にチェック。リガンド名入力。

🖳 Biacore 8K Control Software

Biacore [™] 8K C	ontrol Softw	are				User	
Instrument control Activity his	story Methods Run	าร					
Immobilization 😢 🥑 Op	pen 🔿 New						
Immobilization	1. Me	ethod definition 2. Positioning	and plate layout	O Send to queue			
Chip type CM5	- 1	Sample compartment tempe Flow cell temperature	rature 25 °C 25 °C		Running buffer	Buffer	
Amine 🛞	dd step 🗸	3	3)				
Immobilize in Flow cell 1	Flow cell 1	• Wash					
Fc 1 and 2 in series	Flow cell 2	+NHS	C Ligand	e Ethanolamir	ie in the second se		
FC 2, activate/deactivate in 1	Cor Flor	ntact time 420 s w rate 10 µl/min Mix with	4				
Flow cell 1 ligand name	ZIAII ZIC	ihannel 1 🛛 🗹 Cha	annel 2	Channel 3	Channel 4	🗹 Chan	ſ
Flow cell 2 ligand name	Ligand 1	Ligand 2	Li	gand 3	Ligand 4	Ligand 5	J
Copy editing to all channels Add molecular weights							

36

E. 固定化量の確認と理論的 Rmax の算出

固定化が終了すると Immobilization Result

Results

の画面になります。

測定結果のウインドウ(Response Bound と Response Final)で確認します。

補足.固定化量の評価

固定化量として Response Bound と Final の 2 種類が表示される。

レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

固定化量	注意点·説明
Response Bound	リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差
Response Final	NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差

Biacore 8K Control Software

Biacore [™] 8K Control Software U						Use		
strument control Acti	vity history	Methods	Runs					
nmobilization SA 5/6/2	021 4:06:2	27 PM 🙁	🕒 Open					
nmobilization SA 5	6/2021	4:06:27 Pl	M Results S	ensorgram Ru	n properties			
Immobilization res	ult						<u>j</u>	
Date	Channel	Flow cell	Chemistry	Method	Ligand	Response bound (RU)	Response final (RU)	
5/6/2021 4:06:51 PM	1	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 4:06:51 PM	1	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand1_1.25	10.5	46.4	
5/6/2021 4:06:51 PM	2	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 4:06:51 PM	2	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand1_2.5	9.6	44.0	
5/6/2021 4:06:51 PM	3	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 4:06:51 PM	3	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand1_5	13.0	47.5	
5/6/2021 4:06:51 PM	4	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 4:06:51 PM	4	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand1_10	16.8	49.5	
5/6/2021 4:06:51 PM	5	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 4:06:51 PM	5	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand2_1.25	19.2	51.1	
5/6/2021 4:06:51 PM	6	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 4:06:51 PM	6	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand2_2.5	32.8	65.8	
5/6/2021 4:06:51 PM	7	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 4:06:51 PM	7	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand2_5	65.8	103.4	
5/6/2021 4:06:51 PM	8	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation			
5/6/2021 /r06-51 PM	8	2	SA-biotin capture	Immobilization	Ligand2 10	1217	154.1	

リガンドがアグリゲーション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がある。 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。 理論的 Rmax [RU] = 固定化量[RU]×(アナライトの分子量/リガンドの分子量)×リガンドの結合価数 アナライト添加時に十分なレスポンスが得られるか、実際にアナライトを添加したときのレスポンスが結合部 位特異的かどうかなどを見積もるために利用します。

6-2.アナライトの添加条件設定

アナライトは、通常、Rmax 近くからギリギリレスポンスが得られる範囲で、~3 桁程度の添加濃度レンジ で添加します。濃度 5 点を取る場合、3 倍希釈シリーズ程度です。

A. 添加、解離時間の目安

	Kinetics	Affinity	
	結合・解離が緩やかなセンサーグラム:	結合・解離が緩やかなセンサーグラム:	
添加時間	2-5 min	(結合相で平衡にならない場合)適用不可	
10100101	箱型に近いセンサーグラム:	箱型または箱型に近いセンサーグラム:	
	1-2 min	1-2 min	
	結合・解離が緩やかなセンサーグラム:		
47两件11土日日	\sim 90 min	一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一	
	箱型に近いセンサーグラム:	个安(30 秒柱度で設定)	
	1~2 min		
濃度点数	5	8 程度	



B. 2D kinetics で幅広く測定

Biacore 8K/8K+には、4つの測定モードがあります。その中でも 2D Kinetics では、はじめて相互作用を 行うサンプルでも、広範囲な濃度で一度に評価することができます。

Biacore 8K/8K+では、各種特定モード毎に Method テンプレートがセットされています。

Multi-cycle kinetics

複数アナライトの評価に。主に、再生のいらない低分子化合物のアフィニティー解析に用います。



Single-cycle kinetics

複数サンプルをより早く評価。解離の遅いサンプルも短時間で評価が可能。



* Multi-cycle kinetics および Single-cycle kinetics をまとめて Serial kinetics と呼ぶことがあります。

Parallel kinetics

小サンプルを短時間に評価。1 種類であれば再生操作不要。解離の遅いサンプルにも有用。



2D-kinetics

はじめて相互作用を行うサンプルで、広範囲な濃度で一度に評価。



6-3. 再生条件の設定

アミンカップリングによる Sensor Chip CM5 などの直接固定、または、Sensor Chip SA を用いた場合、リガンドとアナライトを完全に外す再生条件を設定する必要があります。 再生条件として、以下の二点が重要です。

- ① アナライトが完全に外れてベースラインまで戻ること。
- ② 同じアナライトをインジェクションした際に同等のレスポンスが得られる(リガンドが失活しない)こと

A. 手順概略

手順	操作項目	参照
1	リガンド固定化済みのセンサーチップを	・アミンカップリング (6-1 参照)
	用意	・Sensor Chip SA <mark>(4-1 参照)</mark>
3	Method テンプレートを用いた	6-3D 参照
	Regeneration Scouting	

B. 準備する試薬・サンプル

Regeneration Scouting Kitの Instruction For Use (IFU)を併せてご参照ください

Regeneration Scouting Kit (BR100556)

リガンド固定化済みのセンサーチップ

アナライト溶液

ランニング緩衝液

<u>C. ソフトの操作のポイント</u>

手順	操作項目	注意点·説明				
	Analyte1	アナライト名称、通常 60-120 秒、30μl/分				
2	Regeneration1	流速、コンタクト時間				
3	Use Channels	使用するチャンネルにチェック				
4	Regeneration1 Solution	再生溶液の名称				
		下図では8 チャンネルで8 種類の再生溶液を評価。				
		5 サイクルで、アナライト結合、再生を繰り返し評価。				

Method タブの New より、→Assay Development→Regeneration Scouting→Open

		8K p:	ora 91 Cantral S-ft	-		
Biacore & Control Software	əro	Blac	Riacore [*] .8K	Control	Software	
Blacole SK control Soltw			Diacore on	control		
Instrument control Activity history Methods Run	15	Instru	iment control Activity	history Metho	ods Runs	
Regeneration scouting 😒 Open 🗘 No	w	Rege	neration scouting 🛞	Open	O New	
Method Builder	thod definition 2. Variables and positioning	Met	hod Builder		1. Method definition	2. Variables and position
Data collection rate 1 💌 Hz	Sample compartment temperature set to fixed	Use ch	annels 🗸 1 🖌 2	V 3 V 4	√ 5 √ 6 √ 7 №	• 🔶 3
	Vary with flow c					
		S	tartup An	alysis		
Startup 🛞 Analysis 🛞						
	d step 🗸		Regeneration 1		Import from	11
		N	o Solution	Control	File	\$
Name Analysis	Flow cell temperature 25 °C	-	Reg solution 1	<u>`</u> ^	Clipboard	
Purpose Analysis 👻			Reg solution 2	×	Set up	
			Reg solution 3	~	Epitope binning	
U Z			Reg solution 4	~		
Flow cell 1			Reg solution 5	×	O Add cycle	
Analyte 1 🛞 🖲 Regeneration	1 (Add command V		Reg solution 6	×	Remove cycle	
Flow cell 2	fii in the second se		Reg solution 8	×	Remove all cycles	
Property Variable Value	Flow path 🔷 both flow cells		2 Reg solution 1	×		
Solution	flow cell 1		Reg solution 2	~	Move 1 🔻 step	
Contact time 30 s	(2) • flow cell 2		Reg solution 3	~	O Move up	
Flow rate 30 µl/min	Comment		Reg solution 4	~	O Move down	
	Contractor		Reg solution 5	~		
			Reg solution 6	~	Show more columns	
			Reg solution 7	~		
			Reg solution 8	× a)	
			Reg solution 1		,	
			Reg solution 2	×		
			Reg solution 4	~		
			Reg solution 5	~		
			- Reg solution 6	~		
			Reg solution 7	/ • •		

41

Insight Evaluation Software を起動し、Select runs タブより、RUN データを選択。 Select evaluation method タブの Predefined より、Assay Development→Regeneration Scouting→ Open

下図のような Result が得られます。複数回の Injection により、Baseline まで戻り、同じアナライトをイン ジェクションした際に同等のレスポンスが得られる条件を採用します。



6-4. リガンドの Biotin 化

Biotin 化試薬を用いた一例を示します。

A. 手順概	硱
--------	---

手順	操作項目	注意点·説明
1	Biotin 化反応	・タンパク質サンプル:HNS-Biotin=1:1.5(モル比)で混和
		・室温 1 時間、または、4℃で o/n
2	遊離 Biotin の除去	ゲルろ過による除去、または、限外濾過膜による濃縮

B. 準備する試薬・サンプル

EZ-Link™ NHS-LC-Biotin (21336 *Thermo Fisher, 50 mg)

EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh™ Format (A39257 * Thermo Fisher Scientific, 10 x 1 mg)

PD SpinTrap G-25 (28918004)

Vivaspin 500-3K (28932218)

HBS-N 10X (BR100670)

C. Biotin 化、遊離 Biotin の除去手順

- Biotin 化反応
 10mM NHS-Biotin in DMSO ストック溶液作成
 タンパク質サンプル:HNS-Biotin = 1:1.5 (モル比) で混和
 室温1時間、または、4℃オーバーナイトで静置
- ② 遊離 Biotin の除去

②-1 PD SpinTrap G-25 によるフリービオチンの除去
Sephadex G-25 担体の入ったカラムを Vortex
先端を折って、キャップを切り取った 1.5ml チューブにセット
1 min at 800 × g で保存溶液除去
400 µl HBS-N を添加。1 min at 800 × g で平衡化。5 回繰り返し。
平衡化済みのカラムを、付属の回収用チューブにセット
Biotin 化サンプル 140-180 µl を、2 min at 800 × g で精製
カラムを除いて、付属のキャップを締める。

②-2 Vivaspin 500-3K によるフリービオチンの除去(ビオチン化サンプルの濃縮)
 Biotin 化反応後、500 µl にアップ
 30 min at 12,000 × g で濃縮
 残量 100 µl 程度になるように + 10 分程度
 濃縮済みの溶液をマイクロチューブに回収。もとの液量になるように HBS-N を追加。

*各試薬および精製カラムの Instruction For Use (IFU)を併せてご参照ください

6-5. リファレンスライン

Insight Evaluation Software で、レスポンスの詳細な値を確認したい場合、リファレンスラインを用います。

手順	操作項目	注意点・説明
1	QC – Sensorgram	センサーグラムの詳細を確認します。
2	Alignment	各センサーグラムの位置合わせ。
		デフォルトで Y 軸は Analyte Baseline で 0 合わせされています。
3	Chart Setting	◆より、センサーグラム表示の詳細設定
4	Show reference line	リファレンスラインが現れ、マウスでドラッグすることにより、選択した
(5)		部分の時間(秒)およびレスポンス(RU)の数値が表示され
		ます。



6-6. 溶媒(DMSO)補正(Solvent Correction)

低分子化合物のストック溶液は、多くの場合 DMSO に溶解されているため、アナライト溶液として数%程度 DMSO を含んだ状態で測定することになります。ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1%の違いは約 1,200 RU のバルクレスポンスに相当するため、ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度を揃えていただくことが重要です。

それでも、下図のように 5% DMSO を含むランニング緩衝液中に 5.1% DMSO を含むアナライト溶液が流 れると、120 RU 程度のバルクレスポンスが確認できます。また、厳密に見ると、リガンドが固定化されたセ ル(アクティブセル)は、リガンド固定化分センサーチップ近傍へアクセスできる DMSO 量が減るため、溶 媒効果のずれが生まれます。これを補正する機能が、溶媒補正(Solvent Correction)です。



A. 溶媒補正の準備

5 % DMSO 含有サンプルを用いる場合の溶媒補正用 DMSO 溶液の作成方法例を記載します。4.5% ~6%のような 5%を挟んでやや高めの範囲で DMSO 溶液を 4 点~8 点程度セットすることが標準的で す。特に Biacore8K/8K+では流路構造の工夫により検量線がおおむね直線的になるため、標準設定と して 4 点になります。それ以外の機種では、設定する DMSO 濃度の範囲の広さ、検量線の直線性、測 定に求める真度と測定時間やバイアル設置個所のバランス、などの要素を考慮して濃度点数を決定して ください。

すべての DMSO 溶液は用事調製します。

①1.05x PBS-P+を調製します。

210 ml 10x PBS-P+を、超純水で 2000 ml になるように希釈します。

②溶媒補正用 4.5 %、6% DMSO 溶液および 5.0% DMSO ランニング緩衝液を調製します。

Nominal DMSO concentration	4.5% DMSO (~ 10 mL)	6.0% DMSO (~ 10 mL)	5.0% DMSO running buffer (1000 mL)
1.05× PBS-P+	9.5 mL	9.5 mL	950 mL
100% DMSO	0.45 mL	0.60 mL	50 mL

③ストック溶液を下記表の割合で混合して、4.5%~6%の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製します。 8 段階の溶媒補正田 DMSO 溶液を調製する場合・

	700	700	700	700	700	700	700	700 (µ	I)
<u>6% DMSO</u>	700	600	500	400	300	200	100		
4.5% DMSO		100	200	300	400	500	600	700	
0 F又旧())台(木)	пшπυ	150 沿位/汉	で詞表する	「る」・					

4 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する場合(主に Biacore 8K/8K+)

4.5% DMSO		1500	2x1500	3x1500
6% DMSO	3x1500	2x1500	1500	0
	4500	4500	4500	4500 (µI)

測定時に Solvent Correction を用い、解析を実行することで下図のような補正曲線の作成およびリファ レンスセル-アクティブセル間の補正が実行されます。



X 軸:リファレンスセルのレスポンス、Y 軸:リガンド固定化セルーリファレンスセルのレスポンス。Report point range:本測定の各検体が示したバルクレスポンス(リファレンスセル)の範囲、Correction range:補正される最大補正値(RU) ~最小補正値(RU)の範囲

6-7. Control Software の構成および Activity queue

Biacore 8K Control Software の基本的な構成を説明します。

下図は LMW single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit の Method を用いて、測定の設定における アナライトインジェクション条件を設定している画面です。ワークスペースはタブ区切りによる階層構造になっ ており、上から下の階層へと実施したい項目を選択し、左から右へと各ステップの確認・変更を行っていき ます。ハイライトされているのは選択されているタブです。

🜡 Biacore 8K Control Software								
Biacore [™] 8K Control Software	Biacore" 8K Control Software User							
Instrument control Activity history Methods Runs	- ① Method を作成したい							
LMW single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit 😣 🤤 🛛	🤉 💿 New 🗲 ② 使用する Me	ethod の選択						
Method Builder 1. Method definit	ion 2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate	layout 💽 Send to queue						
Data collection rate 10 💌 Hz	Sample compartment temperature 📀 set to fixed	Concentration unit nM 👻						
③Method 0	D各項目 • vary with flow cell tempe	rature Running buffer Buffer						
Conditioning 🛞 Startup 🛞 Analysis (Solvent correction (8) FreeEvery & cortex.text (1)	9 各 Cycle の設定						
Name Analysis	Flow cell temperature 25 °C	Repeat within						
Purpose Analysis	ے۔ (5) Analysis Cycle (5	おける各インジェクションステップの設定						
Flow cell 1 S Cepture 1 S Flow cell 2	Flow cell 1 General 1							
Property Variable Value	Flow path (both flow cells	Predip						
Solution	O flow cell 1	Concentrations per cycle 5 🔻						
Contact time 120 s	flow cell 2							
Dissociation time 600 s	Comment							
Molecular weight Da	うAnalyte インジェクションの設	定						

トップ画面の Instrument Control には、温度設定、チップ交換、バッファー変更、各種メンテナンス、メソッ

ドへのショートカットなどのボタンがあります。また左側 Activity queue の ^{● Add activity} をクリックすることで、各 Activity を予約することができます。 Change Chip→Change Solution→Open Mehod というように

で、各 Activitiyを予約することかできます。Change Chip→Change Solution→Open Mehod というように 並べることで、各 Activitiyの終了を待つことなく設定を進めることが可能です。

Biacore [™] 8K Control So	oftware	User DESKTOP-81KIBEB\Biacore8K	Instrument 2577041	() HELP Y
Instrument control Activity history Method	s Runs			
Activity queue	System setup	Maintenance	Method shortcuts	
O Add activity	Set flow cell temperature	Desorb	New method	
	Set sample compartment temperature	Desorb and sanitize	Open method	
	Change chip	System check		
	Change solutions	Normalize		
	Buffer selector configuration	Shutdown		
	Wait			

	項目	注意点·説明			
1	Current instrument activity	チップが挿入されると、Standby flow の経過時間を示します。			
		7 日間継続可能。			
2	Current buffer	現在使用しているバッファーチューブを示します。			
3	Sensor chip	現在ドックされているセンサーチップの情報を表示します。			
4	Temperature	フローセルとサンプルコンパートメント内の設定温度と現在の			
		温度を表示します。			
		橙:設定温度に未達。緑:設定温度を保持。			
(5)	Sample hotel door	サンプルホテルを開閉の状態を示します。Open をクリックする			
		ことで空けることができます。			
6	Sample illumination	サンプルコンパートメントとホテル内の照明 on/off ができます。			
(1					
(I					
idie Start standby flow	Î Î Î Î Î Î Current buffer Emergencia	Num Process CES C 05 Process Process </td			

また、画面下部には、システムのステータスが表示されています。

6-8. サンプルラックポジションの設定・変更

Rack Position の確認しながら、バイアル、プレートに必要なサンプルを分注します。ポジション変更は、各 Metod Builder の Variable and posotioning (または Positioning and Plate layout)で実施します。

🚳 Biacore 8K Control Software		
Biacore [™] 8K Control	Software	User
Instrument control Activity history Meth	ods Runs	
LMW single-cycle kinetics using Biotin CA	Pture kit 🕄 🙆 Open 🗘 New	
Method Builder	1. Method definition 2. Variables and positioning 5. Cycle overview 4. Plate layout	O Send to queue

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています。同一 サンプルを同ウェルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。画面右の Positioning settings で 設定します。*プーリング機能を使用時は乾燥とニードルのコンタミを防ぐため、専用のセプタを貼ります。

手順	操作項目	注意点·説明
1	Positioning Setting	ポジション変更ルールの設定
2	Pooling	・同一サンプルをプーリングする場合にチェック。
	* 96 ブレートのみ	・Microplate Septa(29192561)を使用します。
3	Positioning Direction	・どのプレートのどの方向にサンプルを配置するか決定する。
		・ ・ の場合、トレイ右側のプレートの手前に配置します。
4	Move up / Move down	Positioning Direction は、Positioning Setting 画面で上に
		表示されているものが優先されます。 📀 😌 で、優先順位
		を決めます。
5	Reagent bottle	同一の溶液をボトルから供給する場合、該当サンプルをウェ
		ルからドラッグ & ドロップします。



osit	ioning settings		①→	
lumber	oftrays Auto popul	ate 🔻		
Re	set positions	Prevent a	uto-rearrange	
/ Ke	ep concentration series to	gether within plate	e	
Vhen a	plate is full, continue with		ding plate in next tray	
		next plate i	in same tray	
iroups	in priority order			
	General 1		✓ Pooling	2
	Step Startup			3
	General 1			
	Step Analysis			
	General 1 Step Solvent correction			
\bigcirc	Capture 1		✓ Pooling	
	Step Startup			
	Capture 1			
	Step Analysis			
	Capture 1			a
	step solvent correction		00	4
	Analyte 1		✓ Pooling	
	Step Startup			

6-9. 特異的結合の確認

測定値の評価、フィッティング解析を行う前に、取得したセンサーグラムが"結合部位特異的"な相互作用 を反映したものであるか確認することが重要です。

A. 差し引き後のセンサーグラムからの確認(Fc2-1)

以下の様子が確認された場合、非特異的な背結合成分が含まれていると考えられます。

手順	確認項目	注意点·説明
1	平衡値の確認	平衡値に達しているべきセンサーグラムで、特に高濃度帯の結合相で
		平衡値に達しないでダラダラと上昇していないか?
2	理論的 Rmax の確認	その上昇が理論的 Rmax(これ以上結合しないという飽和点)を超
		えていないか?
3	解離相の確認	特に高濃度帯の解離相で最初は速やかに下降するのに、そのあとな
		かなかベースラインまで落ちない二相性の形状になっていないか?



B.リファレンスセルに対する非特異的結合の確認

詳細を確認するためには、まず、リファレンスセルのみを確認します。

手順	確認項目	注意点·説明
1	Curve Type の選択	QC – Sensorgram の Setting から、Sensorgram Type として
		ReferenceとActive 個別のセンサーグラムを選択します。
2	Referenceの確認	Reference のセンサーグラムに箱型のバルクレスポンス以外の、非特異
		結合が無いことを確認します。





C. 結合部位特異的な結合であるかの確認

続いて、その結合が結合部位特異的なものであるかという点も重要です。アナライトの濃度を複数点とった時に、実測 Rmax が、理論的 Rmax(4-1E 参照)以下で飽和することを確認します。



6-10. Variables によるサンプル名、濃度などの修正

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合、Insight Evaluation Software の Home から Tools... → Keyword Table...をクリックします。

手順	確認項目	注意点·説明
1	Concentration Unit	濃度単位に入力ミスがあった場合、解析実行前に編集します。
2	Table	サンプル濃度、サンプルの名称など入力ミスがあった場合、解析実行
		前に編集します。

Riacore	Insight Evaluation	on Software - Kinetics s	erial and	parallel					-	
	Biacore	[™] Insight Ev	alua	ation Softwa	re			User	?	HELP 🗸
Create r	new evaluation	n Open existing e	valuatio	on Evaluation - Kineti	cs serial :	and p	arallel 💾 😰 🕅	3		
QC	- Sensorgrar	m 🗸 🔣 QC	- Basel	ine 🗸 🔝 QC-F	Binding	to ref	erence 🗸 📔	Evaluation - Kinetics 🗸	Home ∨	ables
Run n	umber Cor	ncentration unit		— ①						٠
Cycle	Channel	Analysis step pur	pose	Analysis step name	Analy Soluti	te on	Analyte Concentration			
5	4	Analysis	~	antibodies	rb	~	0	`^ `		
5	5	Analysis	~	antibodies	wt	~	0.25			
5	6	Analysis	~	antibodies	r106a	\checkmark	2.5			
5	7	Analysis	~	antibodies	y52a	\checkmark	25			
5	8	Analysis	~	antibodies	rb	\checkmark	0			
6	1	Analysis	~	antibodies	wt	\checkmark	0.5			
6	2	Analysis	~	antibodies	r106a	~	5			
6	3	Analysis	~	antibodies	y52a	\sim	50	▶ 2		
6	4	Analysis	~	antibodies	rb	~	0			
6	5	Analysis	~	antibodies	wt	~	0.5			
6	6	Analysis	~	antibodies	r106a	~	5			
6	7	Analysis	~	antibodies	y52a	~	50			
6	8	Analysis	~	antibodies	rb	~	0			
7	1	Analysis	~	antibodies	wt	~	1			
7	2	Analysis	~	antibodies	r106a	~	10			
7	3	Analysis	~	antibodies	y52a	~	100	· ·		
Арр	ly and close	Cancel								

6-11. フィッティングモデル式と parameters の設定

フィッティング解析は Method を選択するとデフォルト設定で実行されますが、詳細を再設定して解析を実行しなお薄ことも可能です(4-3D 参照)。

6-11-1. Kinetics 解析

A. フィッティングモデル式と parameters の設定方法

Evaluation タブの Settings より、Kinetics または Both を選択

手順	確認項目	注意点·説明
\bigcirc	Fit models	実際の反応様式に沿ったモデル式を選択(6-11-1B 参照)
2		下図は Serial Kinetics における Default 値(6-11-1C 参照)

etics/Affinity r ings apply to sele inetics Affi	cted series					
Blank setti	ngs					
Fit models					Perf	orm fit [1]
ettings apply to netics fit model [:	selected series	•	-1			
Initial value	es elected series with the sa Model name	me fit model Parameter	Fit		Initial value	2
 Initial value hanges apply to s Model type Kinetics 	es elected series with the sa Model name 1:1 binding	mefit model Parameter ka	Fit Fit global	~	Initial value 1e5	Reset
Initial value hanges apply to s Model type Kinetics Kinetics	es elected series with the sa Model name 1:1 binding 1:1 binding	me fit model Parameter ka kd	Fit Fit global Fit global	~ ~	Initial value 1e5 1e-3	Reset Reset
 Initial value hanges apply to se Model type Kinetics Kinetics Kinetics 	es elected series with the sa Model name 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding	me fit model Parameter ka kd Rmax	Fit global Fit global Fit local	* * *	Initial value 1e5 1e-3 YMax	Reset Reset Reset
 Initial value hanges apply to se Model type Kinetics Kinetics Kinetics Kinetics Kinetics 	es elected series with the sa Model name 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding	me fit model Parameter ka kd Rmax tc	Fit global Fit global Fit local Fit global	<pre>> </pre>	Initial value 1e5 1e-3 YMax 1e8	Reset Reset Reset Reset Reset
r Initial value hanges apply to s Model type Kinetics Kinetics Kinetics Kinetics Kinetics	es elected series with the sa Model name 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding 1:1 binding	me fit model Parameter ka kd Rmax tc RI	Fit global Fit global Fit global Fit global Fit global	 <	Initial value 1e5 1e-3 YMax 1e8 0	Reset Reset Reset Reset Reset Reset

<u>B. Kinetics 解析の反応モデル</u>

K_D値は 1:1 結合の上で成り立つ数値のため、可能な限りアッセイを 1:1 の系にしていただき、 1:1 Binding のモデル式を選択することをお勧めします。

モデル式	説明
1:1 Binding	$A + B \Leftrightarrow AB$
	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	$A + B \Leftrightarrow AB$
	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 k₀のみを算出
Bivalent Analyte	$A + B \Leftrightarrow AB$, $AB + B \Leftrightarrow AB2$
	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	A1 + B \Leftrightarrow A1B, A2 + B \Leftrightarrow A2B
Analyte	競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合す
	る反応。
Heterogeneous Ligand	$A + B1 \Leftrightarrow AB1$, $A + B2 \Leftrightarrow AB2$
	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	$A + B \Leftrightarrow AB \Leftrightarrow AB^*$
	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
	- ション変化を起こす反応モデル。

<u>C. Parameter Setting の使用方法</u>

各パラメータに対して以下の設定が可能です。

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:固定值。	
Initial Value	・ 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。	

各パラメータに対する主な変更点。Defaultのまま実施するケースも多いです。

モデル式	説明
<i>k</i> a	多くの場合、変更はしない。
Ka	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	箱型に近いなどセンサーグラムの形状によっては実際のレスポンスを RI として計算し
	てしまうことがあるため、Constant O にしたほうがいい場合がある。

6-11-2. Affinity 解析

A. フィッティングモデル式と parameters の設定方法

Evaluation タブの Settings より、Affinity または Both を選択

手順	確認項目	注意点·説明
1	Model	実際の反応様式に沿ったモデル式を選択(6-11-2B 参照)
2	Calculate response at Position	Affinity 解析をする際に数値を取得する箇所。 下図の場合、アナライト添加終了 5 秒前の 5 秒間平均(Default)
3	Parameter	下図は Default 値 (6-11-2C 参照)

Kinetics/Affinity mode					
Settings apply to selected series					
Kinetics Affinity Both					
> Blank settings					
✓ Fit models			Perfor	m fit [1]	
Settings apply to selected series					
Affinity fit model [1]	Steady state affinity	• •	-1)		
Show affinity range for all series					
Settings apply to selected series					
Calculate response at position	٢				
5 s before injection en	d 🔹 🔪 (2)				
with window 5 🔹 s	Ĵ				
Reset range to defaults	Apply rang	e [1]			
✓ Initial values					
Changes apply to selected series with t	the same fit model				
Model type Model name	Parameter	Fit	Initial value		
Affinity Steady state a	affinity KD	Fit global 🗸	Y XMax	Reset	J
Affinity Steady state a	affinity Rmax	Fit global 🗸	YMax	Reset	3

B. Affinity 解析の反応モデル

通常、Steady State Affinity が選ばれます。K_D値は 1:1 結合のもとで求められる数値ですので、1:1 の結 合様式であるとしてフィッティングの計算がされます。

モデル式	説明
Steady State Affinity	$R_{eq} = \frac{CR_{max}}{K_{D} + C} + offset$
	1:1 Binding モデルで、Rmax は Fitting パラメータ。
Steady State Affinity	Steady State Affinity と同じモデル式で、ポジコンのレスポンスから計算さ
Constant Rmax	れた 100 Da あたりの Rmax を入力して、解析を行う。高濃度側のアナ
	ライト濃度のデータポイントを取得できない場合に使用。

<u>C. Parameter Setting の使用方法</u>

各パラメータに対して以下の設定が可能です。

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:固定值。	
Initial Value	 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。	

各パラメータに対する主な変更点。Default のまま実施するケースも多いです。

モデル式	説明
<i>k</i> a	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。

6-12.解析結果の品質評価

Evaluation Softwareは、フィッティングの品質評価を行う機能があります。十分に注意いただきたい点として、これはあくまでフィッティング計算における品質評価です。まずは見たいものを反映しているセンサーグラム形状になっているか、そのためのアッセイセットアップが何より重要です(6-9 参照)。

6-12-1. Kinetics 解析

|--|

手順	確認項目	注意点·説明
1	速度定数がシステムのスペック範囲	Biacore T200 のスペック範囲
	内か?	k_a =1e3 \sim 1e9, k_d =1e-5 \sim 1
2	各パラメータが独立して算出されて	k』、k』および Rmaxの間に相関性はない。
	いるか?	マストランスポートリミテーション下で ka、kaに相関性 が見
		られる。
3	溶液効果の値(RI)の妥当性	リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引によっ
		て RI は ゼロに近い値となるはず。
4	センサーグラムはカーブを描いている	高濃度サンプルに注目。センサーグラムの結合・解離領
	か?	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	Residuals タブを確認(6-12-1B 参照)
	ットがランダムに分散しているか?	

Sample table Parameters Residuals Blanks Quality control

Ø	Kinetic constants are within instrument specifications.	← (<u>1</u>)
Ø	Kinetic constants appear to be uniquely determined.	← _(2)
Ø	No significant bulk contributions (RI) found.	◄3	D
0	Check that sensorgrams have sufficient curvature.	←_@)
0	Examine the residual plot. Pay attention to systematic and non-random deviations.	←_(5)

ステータスマーク

- 🧭 (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。

<u>B. Residuals タブ</u>

フィッティングカーブをゼロ一直線にした際の各データのばらつき具合を示します。良好なフィッティングでは、 ランダムにプロットが分散しており、ガイドライン内にほぼ全てのプロットが収まっています。残差プロットに偏り が見られる場合、良好なフィッティングであるとは言えません。



Residuals for a good fit

Residuals for a poor fit

C. Report および Parameters タン	ブ
-----------------------------	---

解析結果として以下のパラメータが算出されます。

		単位	説明
	結合速度定数 <i>k</i> a	1/Ms	複合体形成速度。1MのAとBを混合した際に形成 する複合体の数。
	解離速度定数 <i>k</i> _d	1/s	複合体の安定性。 複合体が 1 秒間に解離する割合。 ka = 0.01 s-1= 1% 1 秒当たり複合体が 1%解離する。
	解離定数 K₀	М	アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が 形成されているかを表す。
1:1 binding	Rmax	RU	アナライトの最大結合量。
model 式の 変数	溶媒効果 Rl	RU	バルクレスポンスを引いた時に、ゼロからわずかにずれる 誤差値。 *本来は極めて 0 に近い値をとるべき値
	tc 値	RU · M-1s ^{-2/3} m ⁻¹	tc=kt/³√ f マストランスポート(MTL)定数(kt)の 流速非依存性コンポーネント *どれだけ MTL が強くかかっているかと算出しているかの 指標。この値が小さい場合、センサーチップ表面に到達 するアナライトの実際の濃度は低くなっていると計算され ている。

Fitting 解に	カイ二乗 Chi ²	RU ²	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。 解析値の信頼性、<15 問題なし、 >25 算出された
対する評価 パラメーター	U-value	-	値の信頼性は低い。 * 既存の 1:1 Binding モデル使用時のみ
	標準誤差 SE	-	各パラメータについて SE を算出。 各パラメータの解析結果に対して、10%以下で一般的 には問題ないと判定されることが多い。

6-12-2. Affinity 解析

A. 信頼性の確認

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ことが必要です。



<u>B. Report および Parameters タブ</u>

		単位	説明
	解離定数		アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形
1.1 binding model ++ 0	К _р	М	成されているかを表す。
T: T binding model 式()	Rmax	RU	アナライトの最大結合量。実際にアナライ添加した時、
交奴			結合量が飽和するレスポンス。
	Offset	RU	X = 0 の時の Y 軸の値
Fitting 解に対する	カイ二乗	2	測定データとフィッティングカーブ間の差を示す。良好なフ
評価パラメーター	Chi ²	RU	ィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致。

6-13.用語集

2D-kinetics	2D カイネティ	8K/8K+で用いる測定方法の一つ。複数ニードルと複数サイクルで広
	クス	範囲な濃度で一度に測定する。
Active Cell	リガンド固定	Flow Cell のうち、リガンドを固定するセル
	化セル	
Affinity	平衡値解析	各アナライト濃度の結合相における平衡値プロットから 1/2Rmax に
		相当するアナライト濃度に相当する K₀ 値を算出。結合・解離の速い
		相互作用を示すセンサーグラムの解析手法。
Affinity	アフィニティー	分子の 1:1 結合における親和力(K₀値)。
Amine Coupling	アミンカップリ	分子の一級アミンを利用して、センサーチップにリガンドやキャプチャー
	ング	分子を直接固定化する一般的な手法。
Analyte	アナライト	Biacore において送液する側のサンプル。
Association	結合	アナライトを送液して、センサーチップ上のリガンドとアナライトが結合す
		ること。
Avidity	アビディティー	多価分子のおける親和力の総量。
Bulk Effect	溶液効果	ランニング緩衝液に対して密度の異なる溶液を添加すると、レスポン
		スが生じる現象。
Capture	キャプチャー	リガンドを捕捉する分子をセンサーチップに固定化し、間接的にリガン
		ドをセンサーチップに結合させること。
Capturing	キャプチャー	センサーチップヘリガンドを間接的に固定化するための捕捉用分子。リ
molecule	分子	ガンドの再生が可能となる。
Channel	チャンネル	8K/8K+における、各ニードルに対応する測定番号。
Chi ²	カイ二乗	測定データフィッティングカーブ間の差(平均平方値)を示す。
Contact Time	添加時間	リガンド、アナライトなどをインジェクションする時間。
Desorb	デゾルブ	IFC およびサンプルチューブを洗浄するプログラム。週一回の実施を推
		一 奨。
Desorb and sanitize	デゾルブアン	すべてのフローシステムの滅菌および洗浄するプログラム。月一回の実
	ドサニタイズ	施を推奨。
Direct	直接法	センサーチップにリガンドを直接固定化する方法。主にアミンカップリン
Immobilization		「グを指す。
Dissociation	解離	アナライトの送液を止めて、センサーチップ上のリガンドとアナライトが解
		離すること。
Experimental Rmax	実測 Rmax	実際にアナライトを添加した時、結合量が飽和するレスポンス(RU)
Fit	フィッティング	非線形最小二乗法により変数となる ka、kd、Rmax などを算出する
	解析	解析方法。

Fitting Model	反応モデル	フィッティング解析を行う際のモデル式。
Flow Cell	フローセル	センサーチップ上でマイクロ流路から送液された溶液と接液する箇所。
(Fc)		反応・検出の場。通常、Active Cell と Reference Cell を持つ。
Foil	フォイル	Biacore で 96/384 ウェルプレートを用いる際のプレートシール
		(Pooling 不可)
Immobilization	固定化	センサーチップにリガンドを結合させる操作。Capture(キャプチャー)
		との総称として用いることもある。
Injection	インジェクショ	ニードルを用いたサンプルの添加。
	ン	
Integrated	マイクロ流路	カートリッジ形式のマイクロ流路系。センサーチップと接する個所にフロ
Cartridge (IFC)	系	ーセルを形成する。
k _a (k _{on})	解離速度定	複合体の安定性。複合体が1秒間に解離する割合(1/s)。
	数	k₀= 0.01 s⁻¹= 1% (1 秒当たり複合体が 1%解離する)。
KD	解離定数	平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す
		(M) 。
Kd (Koff)	結合速度定	複合体形成速度。1MのAとBを混合した際に形成する複合体の
	数	数(1/Ms)。
Kinetics	カイネティクス	反応速度論的解析。センサーグラムの形状を評価し、ka、kaを算出
	解析	する解析手法。
Ligand	リガンド	Biacore においてセンサーチップに固定化する側のサンプル。
Mass	マストランスポ	アナライトの供給が追いつかず、消費速度が上回る現象。センサーグ
Limitation	ートリミテーシ	ラムの変形が生じるため、固定化量を下げるとともに流速も高流速
(MTL)	J	(30 μI/min) にする。
Multi cycle	マルチサイク	各アナライト濃度を個別サイクルで測定する方法。
kinetics	ル法	
Parallel kinetics	パラレルカイ	8K/8K+で用いる測定方法の一つ。複数ニードルで一度に複数濃度
	ネティクス	を測定する。
Pre- Concentration	プレコンセント	アミンカップリングにおいて、リガンドの等電点より 0.5~2.0 程度低い
	レーション	pH の溶媒を用いることでセンサーチップ近傍へ静電的に濃縮させる
		効果。
Quality Control	クオリティーコ	フィッティング解析終了後に Evaluation Software が示すフィッティング
	ントロール	の品質評価。
Reference Cell	リファレンスセ	Flow Cell のうち、リガンドを固定化しないセル(溶液効果の補正
	ル	用)
Regeneration	再生	センサーチップに固定化されたリガンドからアナライトを強制的に全て解
		離させる操作。リガンドごと解離させる場合もある。

Residuals	残差プロット	Evaluation Software が示すフィッティングの品質評価の一つで、フィッ
		ティングカーブに対する測定データのズレを示す。
Resonance Unit (RU)	レゾナンスユ	Biacore の測定によって得られるレスポンスの単位。
DI		
RI	浴媒効果	ハルクレスホンスを差しらいた時に、セロからわすかにすれる誤差値。
Rmax	アールマックス	アナライトの最大結合量。Theoretical Rmax(理論的 Rmax)と
		Experimental Rmax (美測 Rmax) かめる。
Sensor Chip	センサーチップ	リガンドを固定化し、分子間相互作用の場となる Biacore 専用の消
		耗品。全 15 種類程度。
Sensorgram	センサーグラ	Biacore から得られる、結合、解離の様子を反映した測定データ。
	Д	
Septa	セプタ	Biacore で 96/384 ウェルプレートを用いる際のゴム製プレートシール
		(Pooling 可)
Serial kinetics	シリアルカイネ	8K/8K+で用いる、Single cycle kineticsとMulti cycle kineticsの総
	ティクス	称。同一のニードルで各濃度をとる。
Similarity	同等性	EC50、PLA などのポテンシーアッセイ、また、Sensorgram
		Comparison による結合様式の類似性評価。
Single cycle	シングルサイ	各アナライト濃度を同一サイクルで測定する方法。
kinetics	クル法	
Solvent	溶媒補正	アナライトに DMSO などのバルクレスポンスが大きな溶媒を含む際に生
Correction		じる、Active CellとReference Cellにおける溶液効果のズレを補正
		すること。
Surface	表面プラズモ	表面への分子の結合・解離を金膜表面近傍の屈折率変化として非
Plasmon	ン共鳴法	標識かつリアルタイムで追跡できる方法。
(SPR)		
System Check	システムチェッ	
	ク	
tc 值	ティーシー値	どれだけ MTL が強くかかっていると算出しているかの指標。この値が小
		さい場合、センサーチップ表面に到達するアナライトの実際の濃度は
		低くなっていると計算されている。
Theoretical	理 論 的	固定化したリガンド分子にアナライトが全て結合した時に得られる理
Rmax	Rmax	論上最大のレスポンス(RU)
Thermodynami	熱力学的解	Δh エンタルピー、Δs エントロピーといった熱力学的パラメーターに基づ
CS	析	いて、分子間の結合様式情報を得る解析方法。
U-Value	ユーバリュー	マストランスポートリミテーションを反映する解析値の信頼性。≦15 問
		題なし。≧25 算出された値の信頼性は低い。* 1:1 Binding モデル
		使用時のみ

■総合お問合せ窓口

TEL: 03-5331-9336

● 機器アフターサービス

(営業日の 9:00~17:30、音声案内に従い①を選択) FAX:03-5331-9324(常時受付)

● 製品技術情報に関して

(バイオダイレクトライン、営業日の 9:00~12:00、13:00~17:30) 音声案内に従い②を選択後、対象の製品別の番号を押してください。

- ●: ÄKTA、クロマトグラフィー関連製品
- ❷:ビアコア関連製品
- 3: 電気泳動関連製品、画像解析装置
- ④: IN Cell Analyzer、ワットマン製品、その他製品
- e-mail:Tech-JP@cytiva.com(常時受付)

● 納期/在庫お問合せ

(営業日の 9:00~12:00、13:00~17:30、音声案内に従い③を選択)

注)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。

注)アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

www.cytivalifesciences.co.jp

論文に掲載いただく際の名称・所在地 Cytiva / Tokyo, Japan

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 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング お問合せ:バイオダイレクトライン TEL:03-5331-9336 e-mail:Tech-JP@cytiva.com 掲載されている内容は2021年8月現在のもので予 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。お問い合わせに際してお 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。