



Biacore™ Insight Evaluation Software

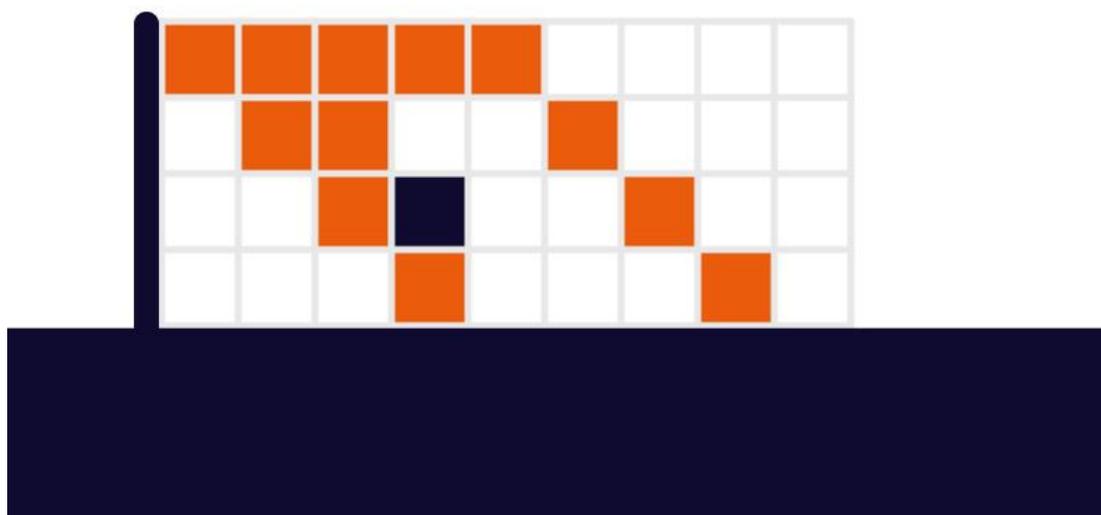
Epitope Binning マニュアル

Ver.4.0.8

2022/03

Biacore™ Insight

Epitope Binning Extension



目次

1. 本資料の目的	3
2. EPITOPE BINNING の概要	3
2-1. Epitope Binning の測定フォーマット.....	3
2-2. Epitope Binning の測定フォーマットの Pros/Cons	5
3. EPITOPE BINNING WORKSPACE	6
3-1. Epitope Binning evaluation の実行	6
3-2. Epitope Binning workspace の概観	7
3-3. Sensorgrams panel	8
4. SETTINGS	13
4-1. Sensorgram subtraction	14
4-2. Binning settings.....	15
4-3. Antibody names	15
5. BIACORE™ 8K CONTROL SOFTWARE 設定のポイント	16
5-1. Epitope Binning 測定 Method の実行.....	16
5-2. Variable and positioning	17

1. 本資料の目的

本資料は Biacore™ Insight Evaluation Software（以下 Insight）にオプションとして追加可能な Epitope Binning Extension について、その利用方法や解析方法について解説したものです。Epitope Binning Extension は Insight での解析だけでなく Biacore™ 8K/8K+ Control Software にもサポート機能が付加されます。Biacore™ T200/S200 Control Software に関してはそのサポート機能は付加されませんのでご注意ください。

本資料は Biacore™ Insight Evaluation Software User Manual を元にご案内しております。より詳細な解説は以下の web ページより正式な英語版マニュアルをダウンロードしてご確認ください。

<https://www.cytivalifesciences.com/ja/jp/support/software/biacore-downloads/Biacore-Insight-Evaluation-Software>

Epitope Binning Extension は Permanent、1 year のライセンスのいずれかをお求めいただけます。価格に関する詳細は以下の web ページをご参照ください。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/catalog/44011.html>

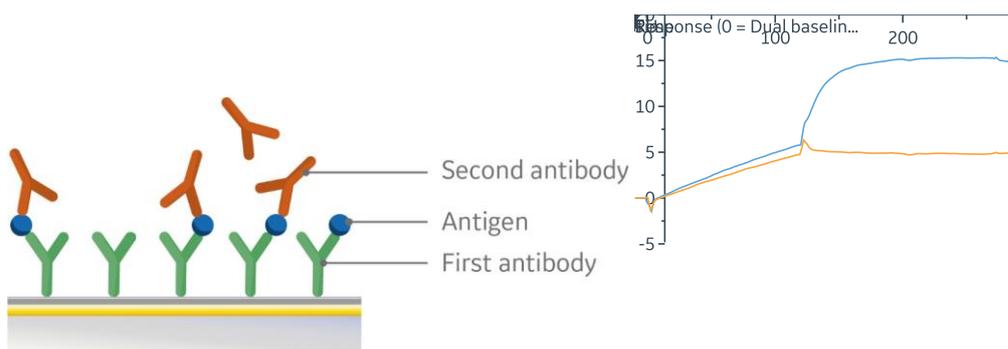
2. Epitope Binning の概要

2-1. Epitope Binning の測定フォーマット

Epitope Binning の測定フォーマットには 3 種類あります。各種方法とメリット、デメリットについて記載します。

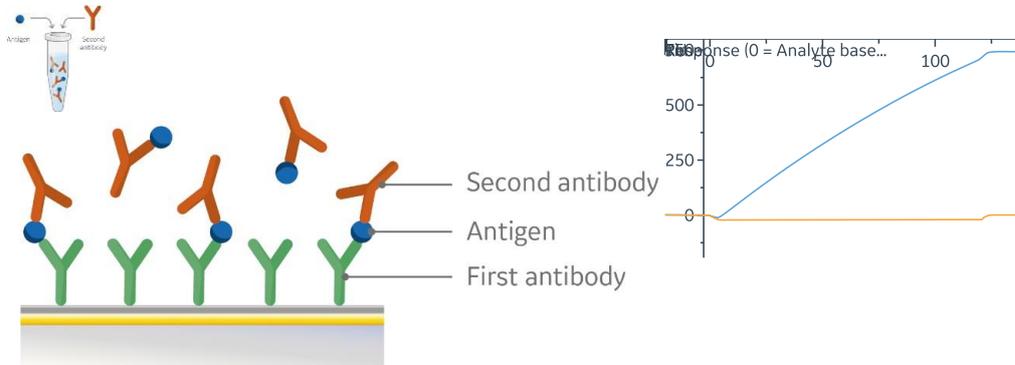
Sandwich assay

一次抗体はセンサーチップ表面に共有結合で固定化、その上に抗原を添加し、続けて二次抗体を添加する方法です。下の図では Non-blocking の場合は青色のセンサーグラム、Blocking の場合は橙色のセンサーグラムで示しています。



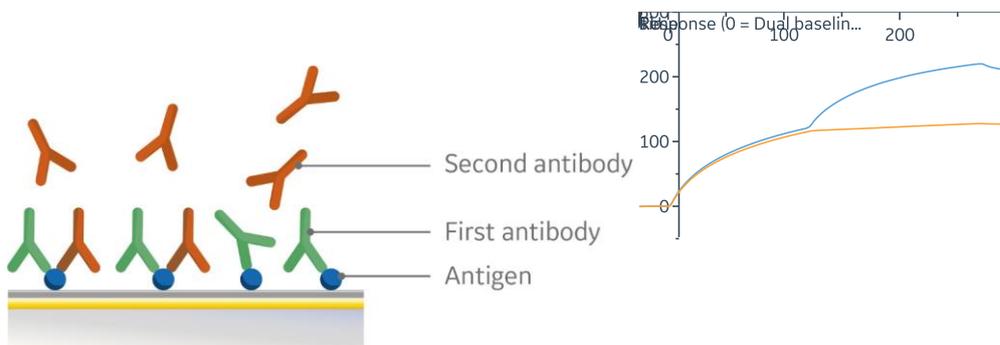
Premix assay

Sandwich assay と同様に、一次抗体はセンサーチップ表面に共有結合で固定化、抗原と二次抗体はブレミックスしたものを添加する方法です。下の図では Non-blocking の場合は青色のセンサーグラム、Blocking の場合は橙色のセンサーグラムで示しています。



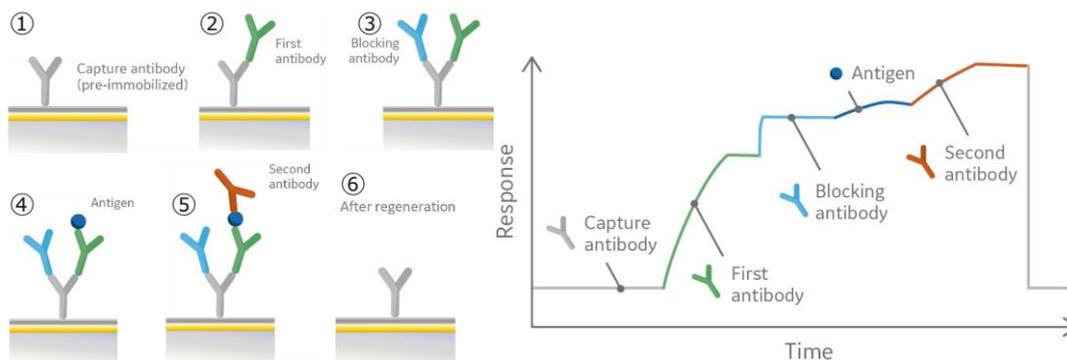
Tandem assay

センサーチップ上に抗原を共有結合またはキャプチャー、一次抗体を添加後、二次抗体を添加する方法です。下の図では Non-blocking の場合は青色のセンサーグラム、Blocking の場合は橙色のセンサーグラムで示しています。



キャプチャーフォーマットの利用

上記いずれのアッセイ系もキャプチャーフォーマットを取ることができます。一次抗体と抗原の解離条件が見つけられないときなど便利です。キャプチャー用抗体は無関係の抗体でブロッキングする必要があります。



2-2. Epitope Binning の測定フォーマットの Pros/Cons

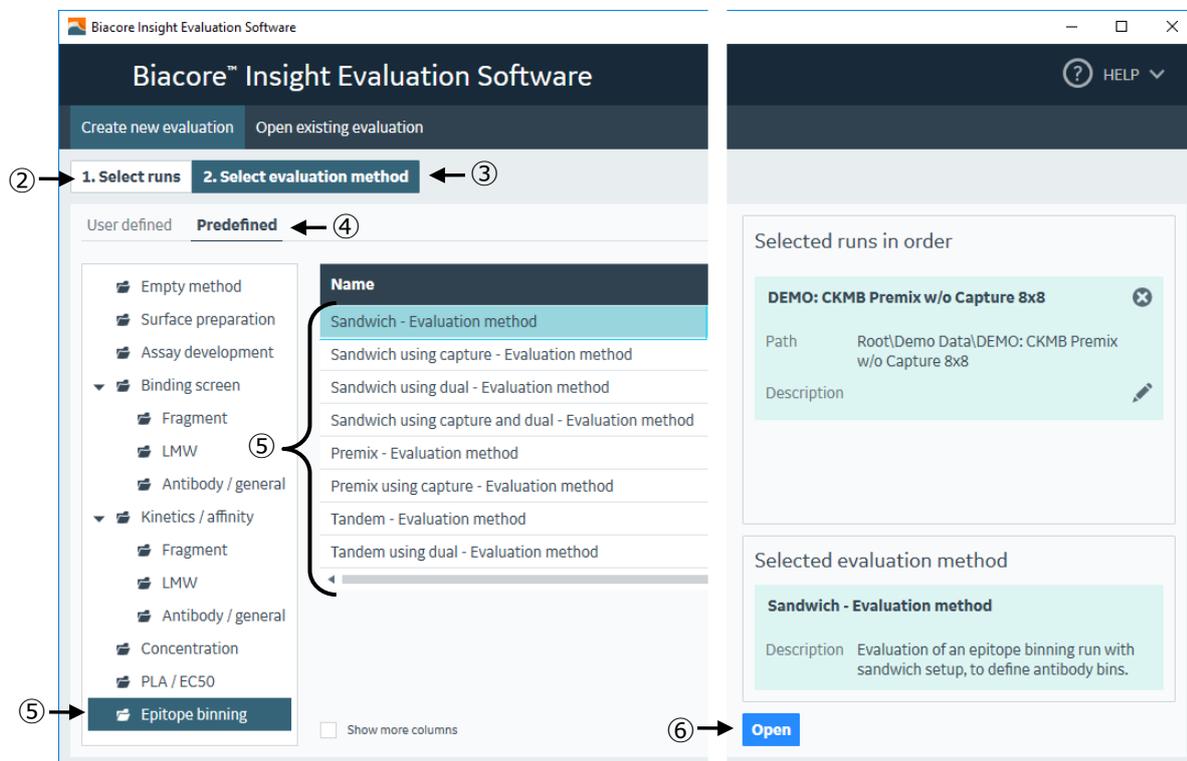
各測定フォーマットにおける Pros/Cons を下表にまとめました。

	Sandwich	Premix	Tandem
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ・ 一般的には第一選択肢 ・ 抗体の必要量も少なく済む 	<ul style="list-style-type: none"> ・ データが解釈しやすい ・ Sandwich assay の検証可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 抗原を直接固定化した場合は必要量が少なくて済む ・ 多価抗原にも互換性がある
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ・ 多価抗原の場合はブロッキングステップが必要 ・ 一次抗体の親和力が弱い場合抗原がすぐに解離してしまう 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 親和力に関するある程度の情報が必要 ・ 二次抗体が高濃度で必要 ($>10 \times K_D$) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 固定化に伴いエピトープがマスクされる可能性 ・ 固定化された抗原から抗体を解離させる再生条件の検討が面倒

3. Epitope Binning workspace

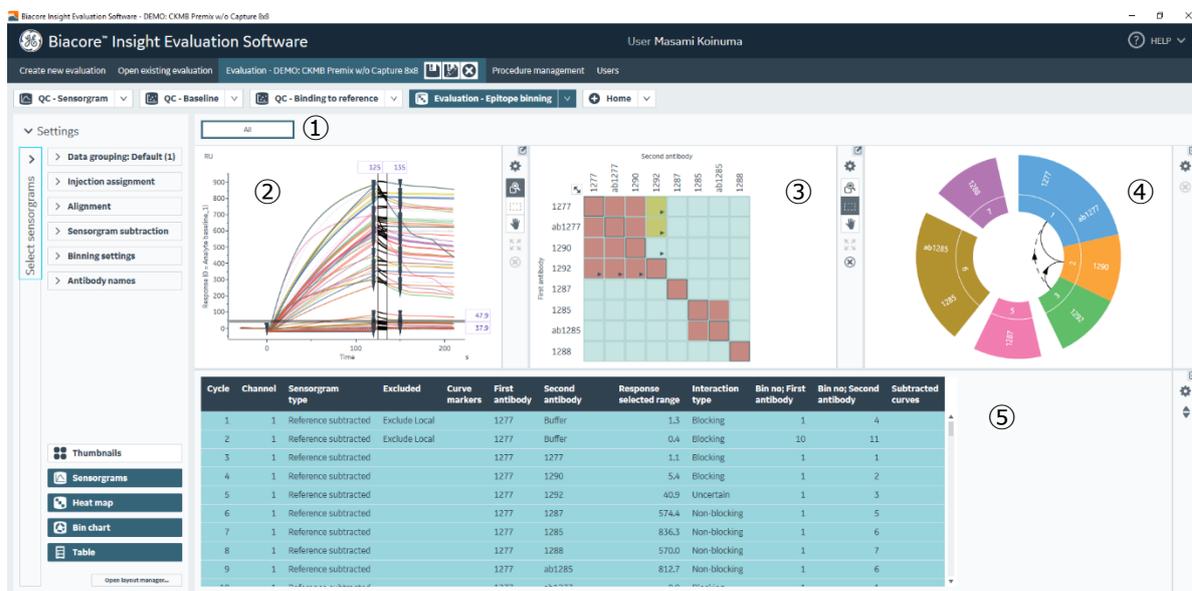
3-1. Epitope Binning evaluation の実行

プリセットされた Method で解析を実行します。



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	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	Epitope binning を選択 アッセイフォーマットに合わせた解析 Method の選択
⑥	Open	選択した Method の実行

3-2. Epitope Binning workspace の概観

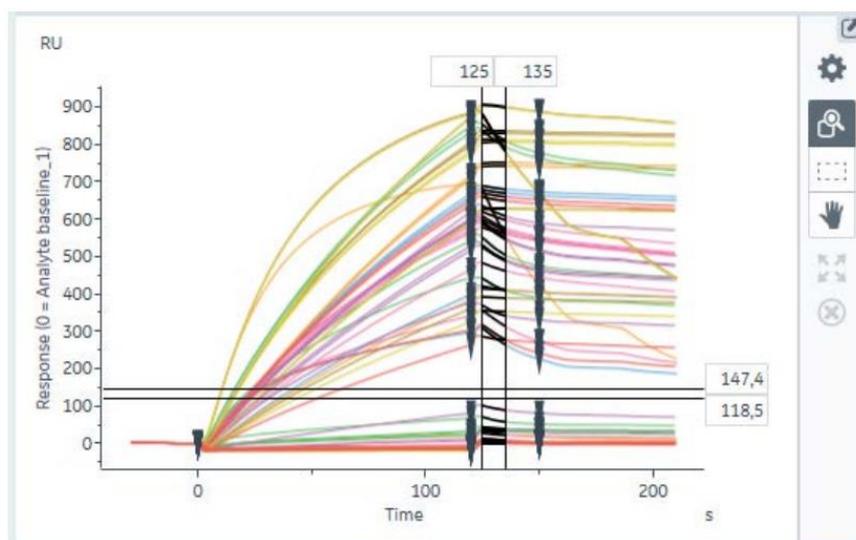


Epitope Binning 解析 Workspace は、5 つの画面から構成されています。

①	Thumbnails	Data grouping で設定したセンサーグラムが表示されます。 * 上図では非表示になっています。
②	Sensorgrams	Heat map や Table で選択されたデータのセンサーグラムを表示します。縦線が数値化する領域、横線が blocking / Non-blocking のカットオフラインとなります。
③	Heat map	それぞれの抗体ペアによる結合タイプを色分けします。こちらから選択したデータについて Sensorgrams パネルに反映されます。
④	Bin chart	全ての抗体が異なる Bin にどのようにグルーピングされているかを示しています。
⑤	Table	全てのサンプルにおける、サンプル名、レスポンス、結合タイプ、Bin などの情報を表示します。選択したデータについて Sensorgrams パネルに反映されます。

各パネルにおける、Settings  から X 軸や Y 軸合わせ、ブランクの設定などを行います（後述）。

3-3. Sensorgrams panel



Sensorgrams パネルでは、Heat map や Table 選択したセンサーグラムが表示されます。こちらのパネルで、数値化する領域や、Blocking / Non-blocking のカットオフラインを設定します。

Blocking / Non-blocking のカットオフライン設定

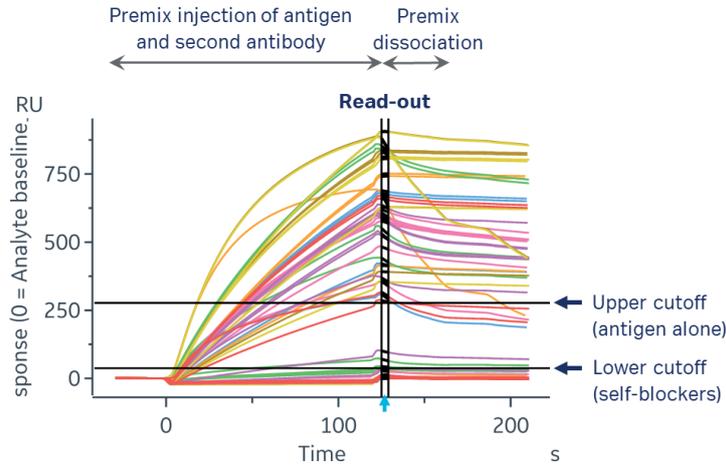
上図のように二本の横線でカットオフラインが設定されます。デフォルトでは lower cut-off は、ヒートマップ内のすべてのセルフブロッキング抗体（一次抗体と二次抗体が同一）のすぐ上に自動的に配置されます。Upper cut-off は、lower cut-off の一定距離上に自動的に配置されます。Lower cut-off よりも低いレスポンスの組み合わせは Blocking として、upper cut-off よりも高いレスポンスの組み合わせは Non-blocking として、2 つの cut-off に挟まれるレスポンスの組み合わせは Uncertain としてレポートされます。いずれのカットオフラインもドラッグあるいは **Sensorgrams** パネル内に表示されているカットオフ値自体をクリックすることで自由に変更が可能です。

なおこの値は Exclude や Settings でセンサーグラムを非表示に切り替えても最初に設定された lower cut-off の位置は自動的に変更されません（現在のところ修正されていないバグです。ただしそもそもこの基準もラフなものですから後述の「Uncertain と cut-off の変更基準の考え方」をご参考に適宜変更してください）。変更の際は Heat map の左上  アイコンをクリックすればセルフブロッキング抗体の組み合わせだけに切り替えられますので、ご利用ください。

Response read-off のカットオフライン設定

Blocking / Non-blocking を評価するレスポンスは、二本の縦線の間における中央値となります。ノイズの影響が見られる場合などに設定を変更することがあります。

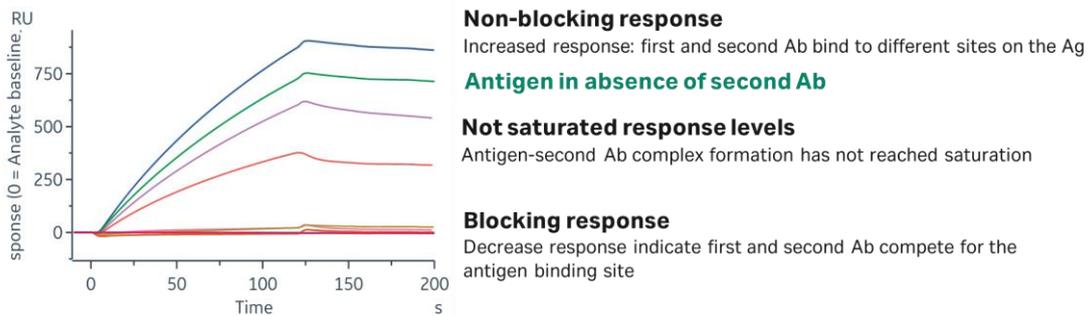
Uncertain と cut-off の変更基準の考え方



例えば premix アッセイの場合、上図のように upper cut-off をデフォルトから抗原のみを添加したときのレスポンス（図中では 255RU 程度）に変更することがあります（lower cut-off はデフォルト）。この場合の Uncertain の考え方ですが、上図のように抗原のみを添加したときと比べ明らかにレスポンスが異なるならば、lower cut-off も 100RU 程度まで引き上げて良いかもしれません。

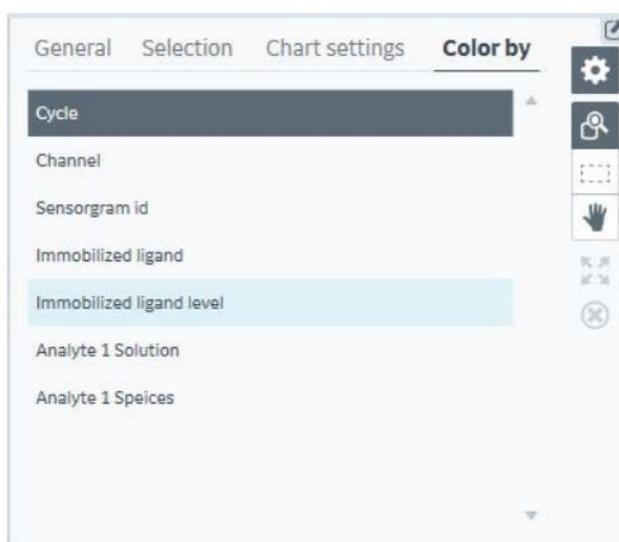
ただし、下図のように明らかなブロッキングではないレスポンスの場合は二次抗体の濃度が低いなどの理由により抗原-二次抗体複合体が平衡状態に達していない可能性があります。二次抗体の濃度を上げたり、プレミックス後の時間を延長するなどして対応するほか、より詳細にデータを確認する場合は各一次抗体のみのデータを検証していく必要があります。

なおデフォルトの lower cut-off は Read-out におけるセルフブロッキング抗体の最高のレスポンス + 1 RU、upper cut-off は lower cut-off + 10 RU とラフな値です。

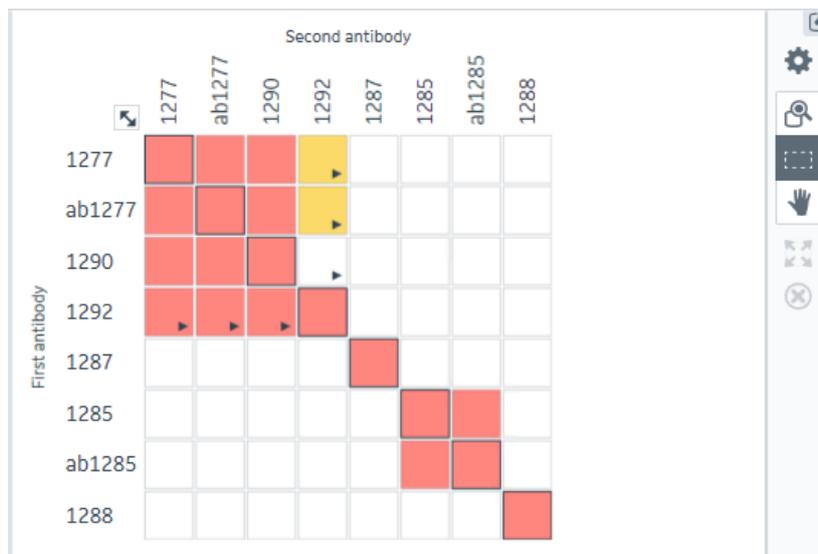


補足 Chart settings 中の Color by について

Chart settings  から各種の表示変更ができます。センサーグラムの色分け定義を変更したい場合、Color by のタブから項目を選択します。



3-4. Heat map panel

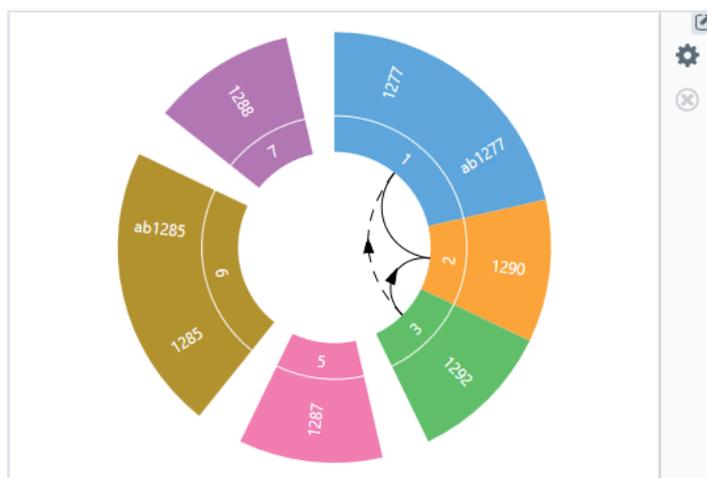


Heat map パネルはそれぞれの抗体ペアにおける相互作用タイプを色とマトリクス形式で表示しています。Heat map 中のそれぞれのセルは y 軸に示される一次抗体と x 軸に示される二次抗体の組み合わせにおける相互作用を示しています。デフォルトでは Heat map は bin ごとに自動的にソートされています。

①	黒枠	一次抗体と二次抗体が同じ抗体の場合
②	赤セル	一次抗体によるブロッキングで二次抗体が抗原に結合できない状態であり、下側のカットオフラインよりもレスポンスが低い状態（Blocking）
③	白セル	一次抗体も二次抗体も抗原に結合できる状態であり、上側のカットオフラインよりもレスポンスが高い状態（Non-blocking）
④	黄セル	不確かな相互作用であることを示し、詳細な解析が必要な状態であり、2 つのカットオフラインの間にレスポンスがある状態（Uncertain）
⑤	矢印	一次抗体と二次抗体を逆にすると赤、白、黄セルの色が変化する場合

左上  アイコンをクリックすることで、黒枠サンプルのみが選択でき、センサーグラムの選択に反映されます。Blocking 上限のカットオフラインを設定する際に用います。また各抗体の名前自体をクリックすることで該当するカラムのみを選択することも可能です。

3-5. Bin chart panel (Binning wheel)

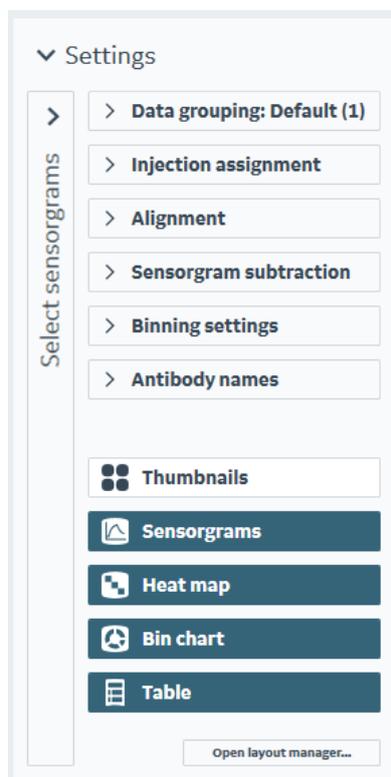


Bin chart では全ての抗体が異なる Bin にどのようにグルーピングされているかを示しています。Bin は共通の色と Bin 番号で扇形の部門（セクター）として表示されます。個々の Bin には白い隙間があり、複数の Bin が部分的に重複するブロッキングパターンを持つ場合は隣接して表示されています。

②-④は右上の **Chart settings**  を開き、**Show bin connections** にチェックを入れる则表示されます。

①	隙間	白い隙間で区切られているセクター同士は抗原上の独立したエピトープに結合可能
②	破線矢印	矢印の始点側を一次抗体、終点側を二次抗体と見た時には赤セル（Blocking）であるが逆にすると黄セル（Uncertain）になる場合 また、矢印の始点側を一次抗体、終点側を二次抗体と見た時には黄セル（Uncertain）であるが逆にすると白セル（Blocking）になる場合
③	実線矢印	矢印の始点側を一次抗体、終点側を二次抗体と見た時には赤セルであるが逆にすると白セル（Non-blocking）になる場合
④	実線	図の例では、Bin 番号 1 と 2 は赤セル（Blocking）の関係だが、3 との関係性が異なるため、同じ Bin 番号にグルーピングせず実線で結ばれる

4. Settings



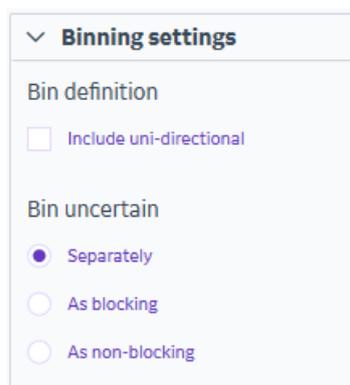
Settings では workspace 上の sensorgram、heat map や bin wheel の表示方法を変更できます。**Settings** の左端には Select sensorgrams があり、こちらでは表示させるセンサーグラムの種類を選択します。以下では **Sensorgram subtraction**、**Binning settings**、**Antibody names** についてのみ解説します。

4-1. Sensorgram subtraction

特定のサイクルにおけるセンサーグラムを他の全てのサイクルから減算することができます。減算は同一チャンネル内でのみ行われ、別のチャンネルで得られたセンサーグラムを減算処理することはできません。空白として用いるデータには二次抗体の代わりにバッファーを使用したものやネガティブコントロールサンプルを使用したものを用意します。

①	No subtraction	減算処理しない場合
②	Subtract blank	空白サイクルを用いて減算処理する場合 Preceding : 直前の空白サイクルを用いる Following : 直後の空白サイクルを用いる Nearest : 近傍の空白サイクルを用いる Median of nearest : 近傍の空白サイクルの中央値を用いる
③	Subtract Cycle	空白サイクルを用いて減算処理する場合 * 別のチャンネルで得られたセンサーグラムを減算処理することはできません

4-2. Binning settings



Bin definition の **Include uni-directional** にチェックを入れると、一次抗体と二次抗体の入れ替えに関わらずいずれかでブロッキングが見られるのであれば（赤セルの結果になるのであれば）同一の bin として扱われるようになります。これにより Heat map や Binning wheel も変化します。

Bin uncertain では 2 つのカットオフの間に挟まれ Uncertain と解析されたグループにおいて、以下のように取り扱われます。

Setting	取り扱われ方	利用方法の一例
Separately	異なる bin と判断	再解析などを目的として uncertain を分かりやすくする
As blocking	ブロッキングされている（bin が同一）と判断	明確にエピトープが異なると言える結果のみを抽出したい場合
As non-blocking	ブロッキングされていない（bin が異なる）と判断	解析後に bin の数が少ない場合に

4-3. Antibody names

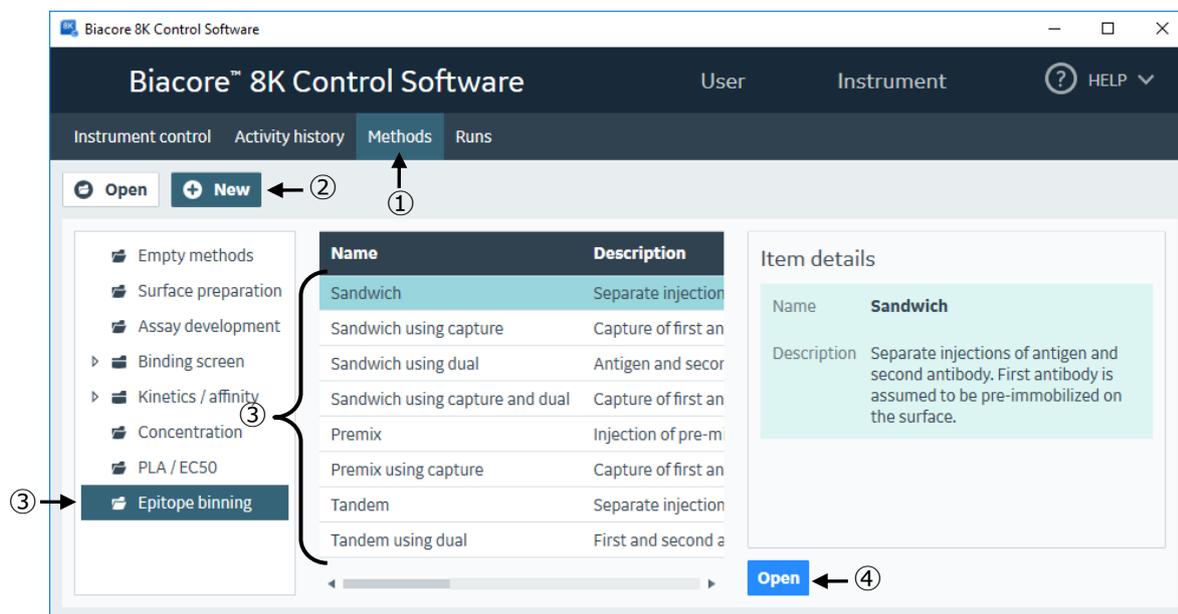
抗体の名称が長すぎる場合に自動的に振り分けられた番号で表示する設定です。



5. Biacore™ 8K Control Software 設定のポイント

5-1. Epitope Binning 測定 Method の実行

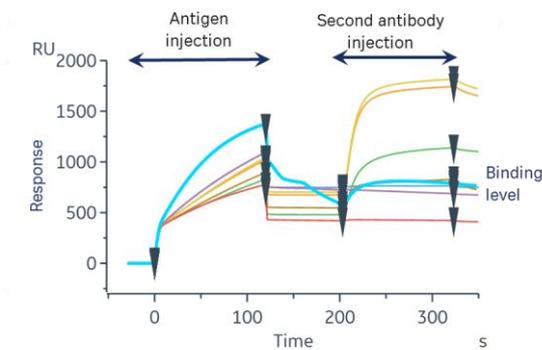
プリセットされた Method で測定を実行します。



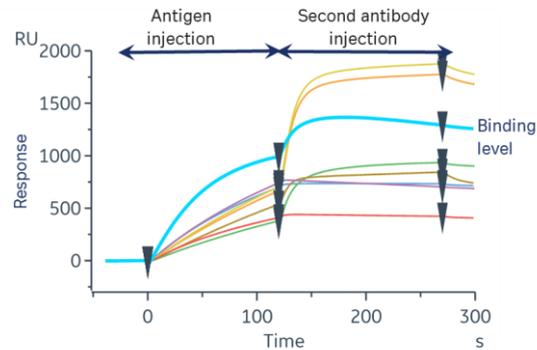
手順	操作項目	注意点・説明
①	Methods	
②	New	プリセットされた測定 Method の選択 * 編集・保存済みの Method は Open より選択
③	Method の選択	Epitope binning を選択 アッセイフォーマットに合わせた測定 Method の選択
④	Open	選択した Method を開く

補足 Using Dual について

Dual では2つの溶液を washing step を挟まずに連続して添加可能です。例えば、Sandwich 法で下図のようなデータが得られた場合、Sandwich（左図）では、抗原の解離が速すぎるため二次抗体の結合量を見積もれません。このような場合、Sandwich Using Dual（右図）を用います。



Sandwich

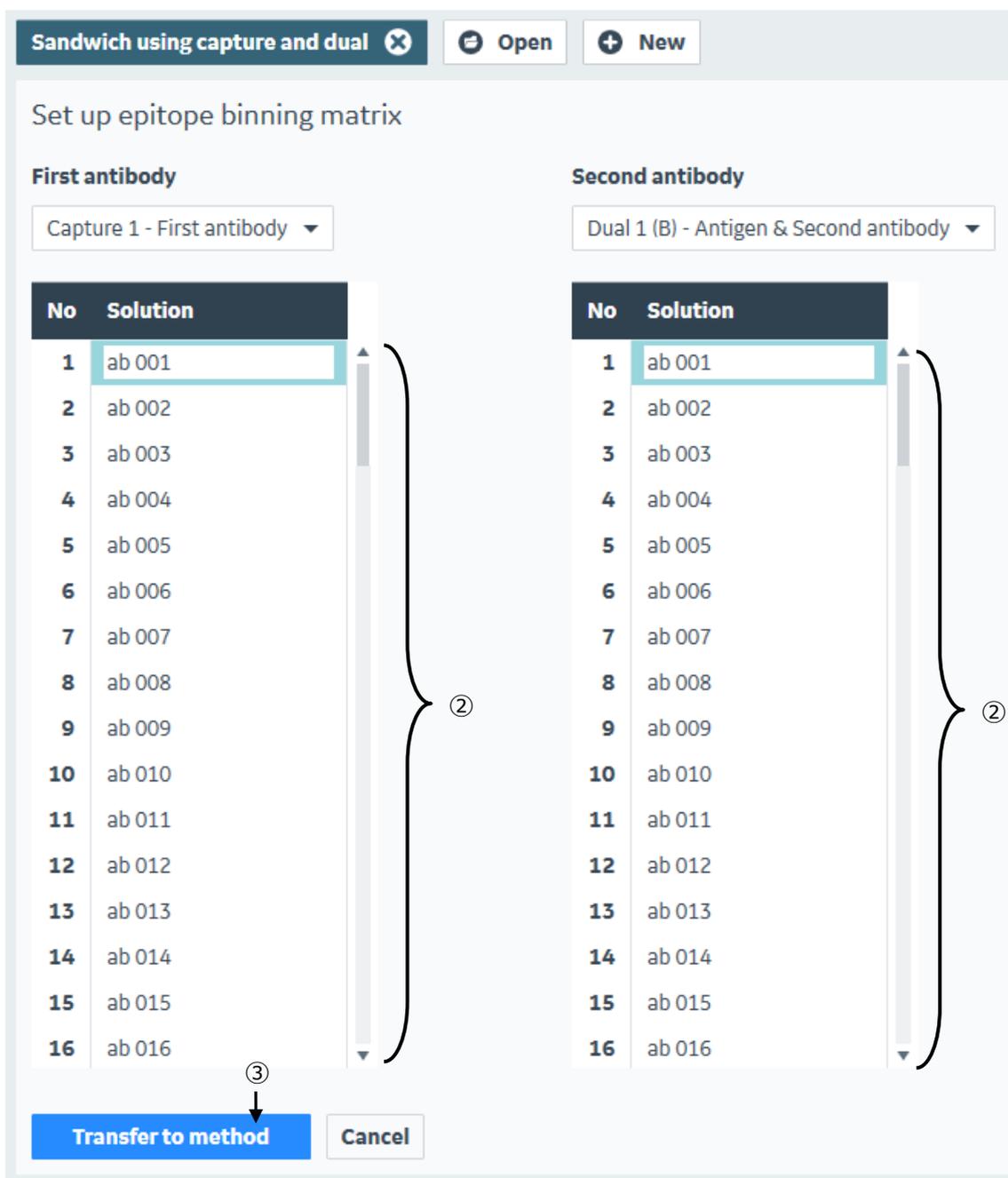


Sandwich Using Dual

5-2. Variable and positioning

多検体をマトリックスで評価する場合、サンプル名のポジションの入力が複雑になります。Epitope Binning では、専用のセットアップツール（赤枠）があります。

Capture 1 - First antibody			Dual 1 - Antigen & Second antibody		
No	Solution	Control	Solution B	Control	
1	Sample 1	▼	Sample 1	▼	
	Sample 2	▼	Sample 1	▼	
	Sample 3	▼	Sample 1	▼	
	Sample 4	▼	Sample 1	▼	
	Sample 5	▼	Sample 1	▼	
	Sample 6	▼	Sample 1	▼	
	Sample 7	▼	Sample 1	▼	
	Sample 8	▼	Sample 1	▼	
2	Sample 1	▼	Sample 2	▼	
	Sample 2	▼	Sample 2	▼	
	Sample 3	▼	Sample 2	▼	
	Sample 4	▼	Sample 2	▼	



手順	操作項目	注意点・説明
①	Epitope Binning	クリックすると画面が切り替わります。
②	サンプル名入力	評価したい抗体名を入力します * 図は Capture 法の例です。
③	Transfer to Method	Plate の推奨 Position に反映されます。

■ 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。

① : ÄKTA、クロマトグラフィー関連製品

② : 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 月現在のものです。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。