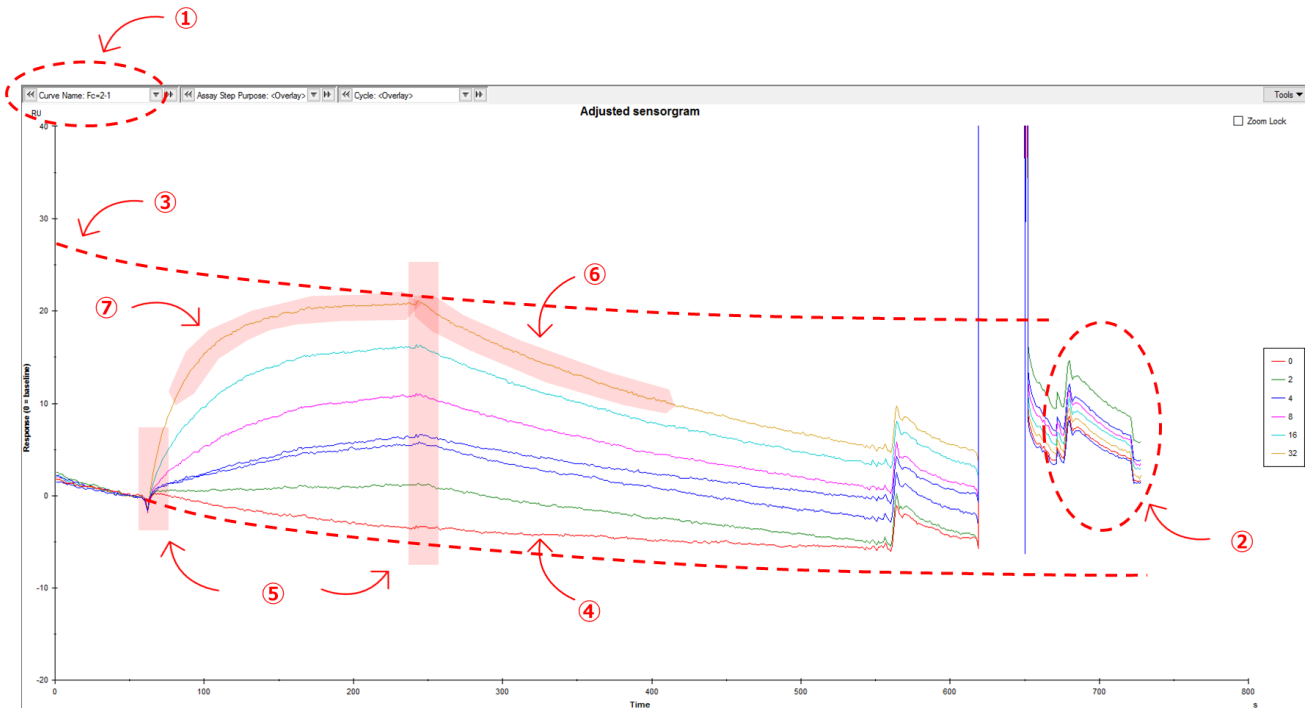


“ヘンな” センサーグラムの原因と対策(1)

非特異的結合と再生条件

先月号にて「Kinetics 解析をしたい場合のセンサーグラムのチェックリスト」を公開しました。今月号はそうした「ヘンな」センサーグラムが得られた場合にどのような原因が考えられるのか、どう対策したら良いのかを何回かにわたって解説していきます。



今回お伝えするのは①（Reference cell（Fc1）での非特異的結合の確認）と②（再生溶液添加後のレスポンスはベースラインに戻っているか？）です。残りの項目は次号以降で解説します。

① Reference cell (Fc1) での非特異的結合の確認

おさらい

前回では、いきなり Active cell – Reference cell (Fc2-1 など) のセンサーグラムを見るのはご法度！という話をしました。[Reference cell だけの表示に切り替えて](#)センサーグラムを確認し、Figure 1 左のように箱型になっていれば OK (箱型の向きは上でも下でも構わない)、右のように解離相で速やかにゼロに戻らなかったり結合相が平坦でない場合は Reference cell に非特異的結合があると判断され、結果として解析値の信頼性が低くなるという話でした。

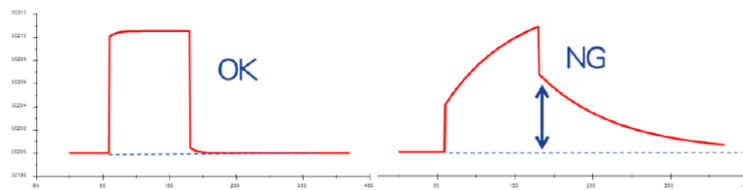


Figure 1 Reference cell におけるアナライต์添加時のセンサーグラム

対策

ではそうした非特異的結合があると判断されたなら、どう対処していけばよいのでしょうか？実は非特異的結合はこれまでの記事で解説しております。よくまとまっておりますので、ぜひ以下の記事をご確認ください。

[Biacore™あるある失敗例 フィッティングがかからない！～リファレンスへの非特異結合編～](#)

[天敵「ノンスペ」の見つけ方・退治法](#)

②再生溶液添加後のレスポンスはベースラインに戻っているか？

おさらい

良い再生とは、リガンドからアナライトを完全に解離させ、かつ、同じ条件（添加濃度、時間、流速など）でアナライトを添加した時に同じセンサーグラムが描けることでした。したがって Figure 2(A)の橙のように、再生溶液添加後のレスポンスが添加前のベースラインよりも高い位置に留まってしまうと、Figure 2(B)の橙のように、同条件でアナライトを添加した時に相対的に同様のセンサーグラムが得られないようではいけません。**こうした再生溶液の検証は最初に確認すべきなので、本格的な測定の前に Manual Run（Interactive Run）あるいは Regeneration scouting を実行すべき**なのでした。

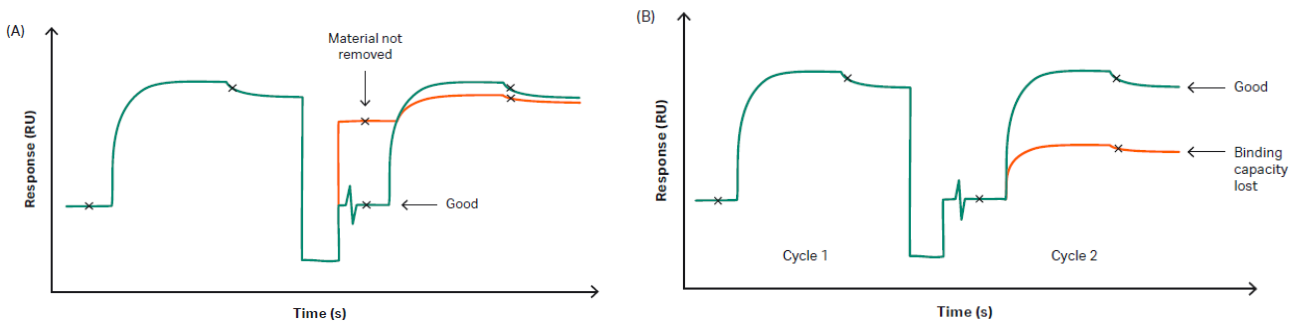


Figure 2 Active cell のセンサーグラム。緑：理想的再生条件、橙：問題のある再生条件

前提となる考え方（直接法とキャプチャー法）

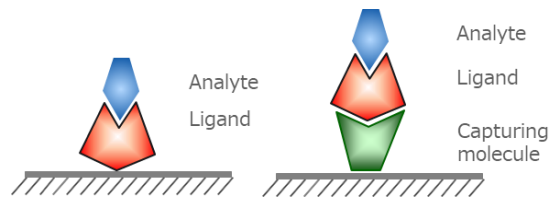


Figure 3 直接法（左）とキャプチャー法（右）

再生溶液が課題になるのは直接法の時です。キャプチャー法の場合は毎サイクルでリガンドごと解離させてしまうのでほぼ検討の必要がありません。先にキャプチャー法の場合から簡単にご案内します。

弊社から販売しているキャプチャー法用のキットには既に標準的な再生溶液が同梱されています。[IFU に詳細が記載されています](#)のでご利用前に必ずご確認ください。例えば、以下は NTA Reagent Kit の IFU の Regeneration に関する部分を抜粋してみました。ここでの Regeneration solution とは 350mM EDTA のことを指しています。このように、キットに同梱されている再生溶液でも十分に再生しきれない場合でも、additional な再生方法について詳細が記載されています。

Inject regeneration solution for 1 minute. (中略) ... 350 mM EDTA alone might not be sufficient to regenerate the sensor chip surface, and alternative or extra regeneration injections can be required. The following are examples of alternative regenerations:

- 500 mM Imidazole (60 s)
- A combination of 6 M Urea, 50 mM NaOH, and 350 mM EDTA (60 to 120 s), followed by a stabilization time of 60 s

さて直接法の場合は本格的な測定に入る前に再生溶液の条件検討が必要です。その検証には同じ濃度のアナライトを同じ時間だけ添加しては再生溶液で解離させ、そのレスポンスが同じであることの確認で行われます。

再生溶液として利用できるものは？

弊社から検討のスターティングポイントとして [Regeneration Scouting Kit \(BR100556\)](#) を提供しております。リンク先の IFU にも記載がありますが、該当部分を抜粋すると Figure 4 のようになります。記載の通り、アセトニトリル以外の溶液については Regeneration Scouting Kit に同梱されています。また、ランニング緩衝液に PBS のようなリン酸緩衝液を含む場合にはマグネシウム塩として沈殿する可能性があるため、再生溶液として $MgCl_2$ は利用しない方が無難です。

Ligand	Condition	Solution	
Protein ligand	Low pH	10 mM glycine-HCl, pH 1.5 to 3.0	
	Ethylene glycol	50%, 75%, or 100%	
	High pH	1 to 100mM NaOH	
	High ionic strength		1 to 4 M $MgCl_2$
			0.5 to 5 M NaCl
Ionic detergent		0.02% to 0.5% SDS	
Low molecular weight ligand	High pH with acetonitrile	20 to 100 mM NaOH + 30% acetonitrile ¹	
	High pH with detergent	20 to 100 + 0.5% Surfactant PO or 0.05% SDS	
	Low pH	10 mM glycine-HCl, pH 1.5 to 3.0	
	High ionic strength	1 to 4 M $MgCl_2$	
Nucleic acid ligand with protein analytes	High ionic strength	1 to 5 M NaCl	
	Ionic detergent	0.02% to 0.5% SDS	
	Low pH	10 mM glycine-HCl, pH 1.5 to 3.0	
Nucleic acids ligand with nucleic acid analytes	High pH with high ionic strength	50 mM NaOH + 1 M NaCl	

¹ Acetonitrile is not included in Regeneration Scouting Kit. Always use p.a. grade reagents. Solutions of NaOH containing acetonitrile should be used within one day of preparation.

Figure 4 提案できる再生溶液 (Regeneration Scouting Kit の IFU から抜粋)

サンプルのレスポンスの変動はどれくらい許容される？

先月号の記事の通りですが、求める実験結果の厳密さによって変動しますので、最終的にはご研究者様にてご判断いただきますが、弊社の Manual などでは以下のように考えております。

- Regeneration scouting によって適切な再生条件が示されたら、アナライトの添加と再生を多数繰り返して再生のパフォーマンスを検証することが重要です。**少なくとも 20 サイクルを推奨します。**
- 一般的な推奨事項として、**良好な再生条件では 20 サイクルに渡ってアナライトのレスポンスが 5-10%を超えて変化しないはず**です。
- **最初の数サイクルは活性が僅かに低下することが多い**ため、評価は、例えば cycle 1-20 ではなく cycle 6-25 に渡って実施する必要があります。

サンプルの濃度はどれくらいが良いの？

リガンド分子を固定化することができたなら、まずは Manual Run や Interactive Run で適当な濃度のアナライトを添加してみて、この後に続く Regeneration scouting に利用するアナライトの濃度を検討すると良いです。また同時にレスポンスが理論的 R_{max} 以内で収束するかどうかや濃度依存性があるかどうかも検討してしまいます。

方法は簡単で、薄い濃度から 10 倍ずつ濃いサンプルを適当な時間だけ添加するだけです。

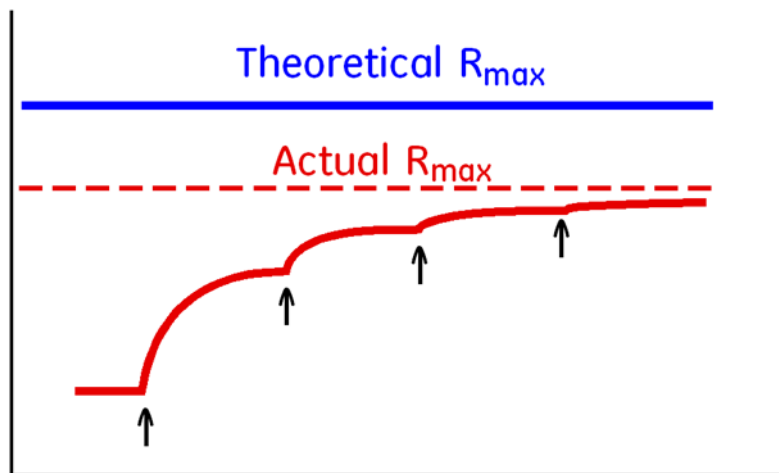


Figure 5

実際の操作は？

上記のような 20 サイクルに渡り変動のない再生溶液を見つけるために簡易的に利用できるのが Regeneration scouting の Method (wizard) です。もっと簡易的な方法が Manual Run (Interactive Run) という位置付けで良いでしょう。

Regeneration scouting では指定回数だけサンプル添加→再生溶液を繰り返します。再生溶液は複数種用意することができ、1 種類目の再生溶液での検証が終わったら 2 種類目の再生溶液の検証に切り替わります。以下では Regeneration scouting の入り口だけ示します。

Biacore X100, T200 の場合

Wizard > Assay Development > Regeneration Scouting

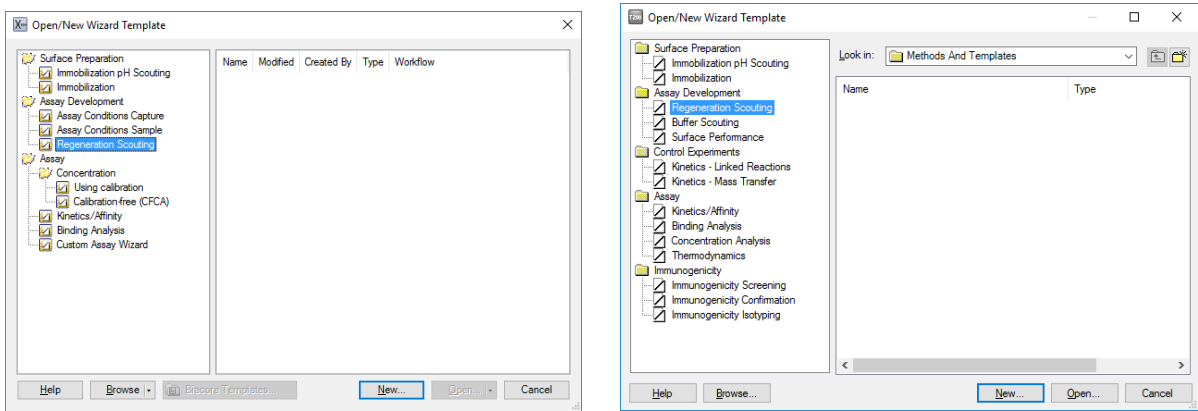


Figure 6 (左) Biacore X100 (右) Biacore T200

Biacore 1 series, 8 series の場合

Methods > Assay Development > Regeneration Scouting

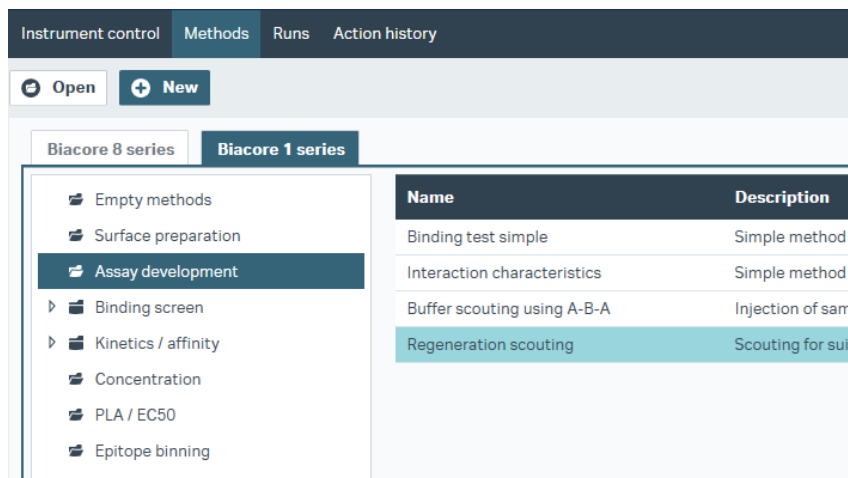


Figure 7 Biacore 1 series, 8 series

解析方法は？

解析ではアナライトを添加した後の**相対的な Sample の Response (Relative response)** と**再生溶液を添加した後の絶対的な Baseline の response (Absolute response)** を確認します。繰り返しになりますが、良好な再生条件であれば相対的な Sample の Response は安定するはずですが、一方で絶対的な Baseline の Response は、もちろん理想的には安定している方が良いですが、多少の変動は許容されます。

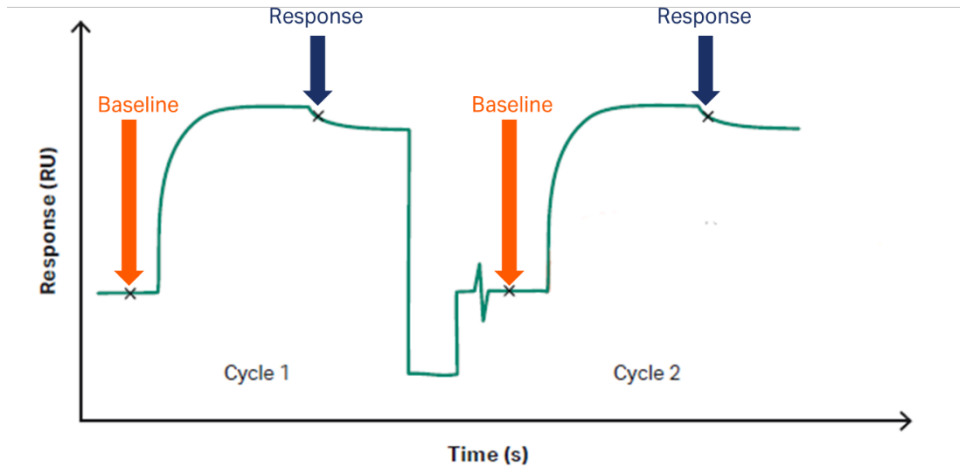


Figure 8 Regeneration scouting では Analyte を添加した後の相対的な Response と Baseline の絶対的なレスポンスをサイクルごとに並べて評価する

解析画面のイメージ

横軸にサイクル数、縦軸は 2 軸使って 1 つが Sample の Relative response (左縦軸、黄色のプロット)、もう 1 つが Baseline の Absolute response (右縦軸、緑色のプロット) です。下の Figure 9 では Cycle1 は Startup サイクルのため無視します (Insight では少し表示方法が異なりますが適宜読み替えてください)。Cycle2-6(A)は同条件で再生しており、各プロットが一連の直線で結ばれています。同様に、Cycle7-11(B)、12-16(C)、17-21(D)が同条件の再生です。

これまで述べてきたように、最優先は黄色のプロットが (0 ではなく) 水平であることで、次点で緑色のプロットは水平であることが望ましいですが多少の変動は許容されます。

(A)を見ると黄色のプロットは水平ですがほぼゼロです。これはアナライトがほとんど結合できていないことを示しています。Cycle1 では黄色のプロットはレスポンスが出ていますから、(A)の再生溶液ではほぼ解離しなかったのでしょう。

その他に黄色のプロットが水平なのは(C)だけです。緑色のプロットは再生を重ねるごとに少し下降気味ですが許容されるでしょう。したがって、この Regeneration scouting においては(C)の再生条件が良好そうであると言えます。可能であればこの後 25 サイクルくらいサンプル添加→(C)条件で再生を繰り返し、変動がないことを検証するとなお良いです。

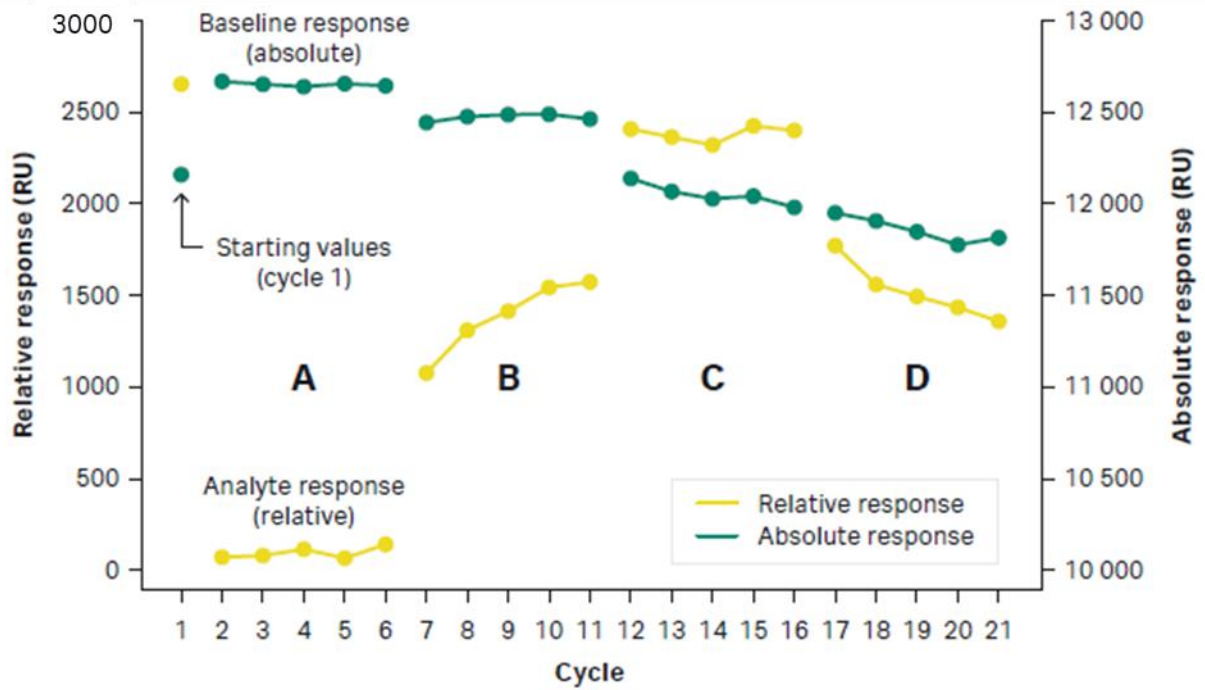


Figure 9 Regeneration scouting の基本的な解析方法

今回は「非特異的結合」と「再生条件の検討」について解説しました。次回からは③以降について解説していきますのでご期待ください。