

Biacore[™] 8K 日本語版マニュアル (ver 1.1.2)



内容

1. セットアップ	1
1-1. 電源およびソフトウェアの起動	1
1-1-1. 電源の立ち上げ	1
1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット	2
1-1-3. Control Software の構成	5
1-2. システムの初期化	
1-2-1. センサーチップの挿入	
1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化	
1-2-3. 試料のセットと取り出し	
2. 実験の流れと基本的な概念	
2-1. 基本的な概念	20
2-2. 留意点	21
2-3. 固定化	
2-3-1. アミンカップリング法	24
2-3-2. リガンド希釈液の pH 選択(アミンカップリング法)	27
2-3-3. 固定化量	29
2-4. 特異的結合と再生条件の検討	
2-4-1. Assay development による各種条件検討	35
2-5. 相互作用測定	
2-5-1.反応速度定数・解離定数の算出	
2-6. Solvent correction(溶媒補正)	
3. 各ステップの操作方法	45
3-1. 測定 Method のテンプレート	45
3-2. 測定 Method の概要	
3-2-1. Method Builder の階層	

3-3. Evaluation Software の概要	54
3-3-1. 解析の流れ	
3-3-2. Evaluation Home	
3-4. 解析項目の詳細設定	60
3-5. データ Export	73
4. 直接法のワークフロー	74
4-1. アミンカップリング法:リガンド希釈液の pH 確認(pH scouting)	74
4-2. アミンカップリング法:リガンドの固定化(Immobilization)	81
4-3. 2D Kinetics を用いた相互作用測定	85
4-4. 2D Kinetics の解析	87
5. キャプチャー法のワークフロー	
5-1. リガンドのキャプチャー量の条件検討	89
5-2. Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit での相互作用測定	92
4-4. Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit の解析	93
6. 抗体のスクリーニングのワークフロー	94
6-1. リガンドの準備	94
6-2. Antibody screen での相互作用測定	94
6-3. Antibody screen の解析	95
7. FBDD のワークフロー	97
7-1. Clean screen	98
7-2. Binding level screen	
5. メンテナンス	116
5-1. システムの洗浄	119
5-1-1. Desorb	119

5-	1-2. Desorb and Sanitize	
5-	1-3. System Check	
5-	1-4. Normalize	
5-	1-5. Shutdown	
6. 🗐	実験の終了	
6-1.	スタンバイ状態での放置	
6-2.	電源の落とし方	123
6-3.	センサーチップの保存	

1. セットアップ

1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1-1-1. 電源の立ち上げ

装置の電源が落ちているとき

Step Action

- 1 装置下方前面のパネルを開きペリスタポンプの全てのクランプを閉じる。
- 装置の電源を入れる。
- 3 PC を立ち上げる。
- 4 Biacore 8K Control Software を立ち上げる。
- 5 **user name, pass word** を入力する。
- 6 1 つ以上のデータベースに接続できる場合は希望のデータベースを選択する。
- 7 **Log in** をクリックする。
- 8 装置のセルフテスト、PC との接続が終わるまで待つ。完了時は装置番号が画面に表示される。

装置が Standby mode のとき

装置が Standby mode のときは画面の下方に Running standby flow と表示されています。 何らかの Activity が終わったとき、自動的に Standby mode に切り替わっています。既に Standby mode ならば上記 Step 1-8 は必要ありません。そのまま測定が可能です。

補足 1-1. ペリスタポンプのクランプについて

運転中は、3 基のシリンジポンプにより、ニードル洗浄のためにランニング緩衝液や超純水が送液されています。また必要に応じて再生溶液や洗浄溶液も送液されます。更に、フローセルや liquid supply block からの廃液も行います。

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 2 週間以上使用しな い場合は灰色(外側)と青色(内側)の両方のポンプクランプを開けます。再びシステムを使 用する場合には、使用前に両方とも閉じてください。



注)使用する際は 3 基全てのペリスタポンプについて、灰色と青色の両方のポンプクランプ が閉じていなければなりません。しばらく使用しない場合は、チューブの劣化を防ぐ目的で 全て開いておきます。

1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット

装置右から 3 本のチューブとチューブポートが利用できます。それぞれ BUFFER, WATER, REAGENT とラベルされており、装置が稼動している間、全てのチューブは溶液中に挿入され た状態にしてください。本体に向かって右側トレイにランニング緩衝液ボトル、超純水ボト ルをセットし、それぞれ BUFFER チューブ、WATER チューブを挿入してください(超純水は 4 日に 1 回程度の頻度で、ボトルごと交換してください)。REAGENT チューブは必要に応じ て使用します。使用しないときは WATER チューブに挿入してください。

廃液チューブ(WASTE チューブ)は廃液ボトルに挿入します。廃液ボトルが空であるか、測 定前に必ず確認してください。

補足 1-2. 装置の配置

Part	Function
1	Sample hotel door
2	Sample compartment window
3	Sensor chip port
4	Tubing inlet panel
5	Rails for accessory holders
6	Waste tube
7	Fittings for lifting rods
8	Adjustable feet
9	Drip tray (under instrument)
10	Peristaltic pumps
	(behind hinged cover)



Part	Function
1	Sample hotel
2	Sample hotel door
3	Lower sample tray position
4	Upper sample tray position
5	Sample loading carriage
6	Liquid supply block
7	Eight parallel injection needles
8	Sample compartment



Part	Function
1	USB connector
	(for connection to
	controlling computer)
2	Mains power connector
3	Mains fuses
4	Mains power switch
	·



補足 1-3. ランニング緩衝液の種類

ランニング緩衝液として、弊社から HBS 緩衝液および PBS 緩衝液を販売しています。

HBS-EP+ 10X (1000 ml, BR100669)

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20

HBS-P+ 10X (1000 ml, BR100671)

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20

HBS-N 10X (1000 ml, BR100670)

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl

PBS 10X (1000 ml, BR100672)

0.1 M phosphate Buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl

PBS-P+ 10X (1000 ml, 28995084)

0.2 M phosphate Buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20

・上記の 10X のランニング緩衝液は、使用前に超純水で 10 倍に希釈して使用して下さい。

・超純水で希釈後は、pH7.4 となります。

・相互作用が確認できる緩衝液組成を使用してください。(純正品以外の組成も使用可能です)

・各自で調製する場合には、0.22 µm フィルターでろ過してください。

・界面活性剤は、相互作用に影響をしないのであれば添加することをおすすめします。流路の汚れ、気泡の発生を抑制できます。使用時には、非イオン性の界面活性剤を臨界ミセル濃度(CMC)以上で添加してください。

・有機溶媒使用時には、以下の化学耐性表に従って使用してください。

Solution	Concentration	Compatibility
Acetonitrile	50%	Short term
Dimethyl formamide (DMF)	50%	Short term
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	50% 10%	Short term Long term
Ethanol	70% 10%	Short term Long term
Ethylene glycol	100%	Short term
Formic acid	70%	Short term
Formamide	40%	Long term

<u>1-1-3. Control Software の構成</u>

ここでは、基本的な構成について解説します。

Biacore 8K Control Software を起動するとスタートスクリーン画面が開きます。

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。

Instrument control Activity history Methods	Runs		
Activity queue	system setup tools	Maintenance tools	Method shortcuts
Add activity	Set flow cell temperature	Desorb	New method
	Set sample compartment temperature	Desorb and sanitize	Cpen method
	Change chip	System check	
	Change solutions	Normalize	
I		Shutdown	
Ļ			
•			
(96) F	Riacore [™] 8K (Control Soft	ware
			ware
Instrur	ment control Activity	history Methods	Runs
in Strui	Activity	Thousand a second se	

Work space	説明
Instrument control	装置の動作を決定します。
	センサーチップの Dock / Undock, 温度設定、メンテナンスの動作と
	いった定型の動作が該当します。測定にかかわる複雑な動作は
	Methods から作成しますが、この Methods へのショートカットが
	Intrument control タブ内にも配置されています。
Activity history	装置の動作履歴を表示します。Abort した Activity の履歴も残ります。
Methods	メソッドの作成、編集を行います。
Runs	測定結果を表示します。

補足 1-4. HELP 機能と画面の拡大・縮小

Biacore 8K Control Software の画面右上には Help のボタンが設定されています。概要や簡単な 操作説明が記載されていますので、作業中にお困りの際はご利用ください。また、このタブ 内で画面の拡大・縮小を行えます。作業スペースをモニターの大きさに合わせたい時にご利 用ください。

Help			
Create sy	/stem report		
About			
100 % (Э	<>	-(+)

Instrument control

Instrument control ワークスペースは3つのエリアから構成されています。

🛞 Biocore" BK Cor	ntrol Software	Unit: Francis Postory	and a second sec
Activity queue	System setup tools	Plansenance tools	Method shoricuts
C for fine of temperature	10 E Set fair sal because are	2 Davis	E. too safed
B. Outloop	Sec. If an and a second second second second	🗑 Developed Sentar	Concretical
C Statements	D, Darge (he	Synam Dark	
I that a discourt	8 A Compositions	D lineater	
surrey In Mass		8. Prime	
Samily Starting From	James Co. and Co. State		····· 🔤 🕴 👰 ····· ····· 💼 ··

<u>1. Activity queue</u>

実行中あるいは予約中の装置の動作(Activities)が並びます。

Activities とは、センサーチップの Dock/Undock, 温度設定、メンテナンスの動作、測定メソッドの実行に至る動作が該当します。

Activity は Activity queue の Add activity から追加します。

Activity queue	
+ Add activity	Add activity をクリック

追加できる Activity は以下のものです。

System setup tools

Set flow cell temperature	測定温度設定
Set sample compartment temperate	ure サンプルコンパートメント温度設定
Change chip	センサーチップの挿入/取出し
Change solutions	ランニング緩衝液によるシステムの平衡化

Maintenance tools

Ĩ	Desorb	IFC とオートサンプラー洗浄
Ť	Desorb and sanitize	フローシステム洗浄、滅菌
) >>>	System check	
tiit	Normalize	
٤	Shutdown	

Method shortcuts

New method	新規メソッド立ち上げ(Methods タブのショートカット)
Open method	既存メソッド立ち上げ(Methods タブのショートカット)

追加された Activity は Activity queue の上から順に実行され、実行後は Activity queue から 消えます。いくつかの Activity では user input が必要なものがあります。事前に入力してお くことで自動的に実行されます。

Activity は実行前なら右上の×により Remove できます。

実行中の場合は Abort ボタンにより動作を途中で停止できます。全ての動作をそのまま停止 するか、Activity によっては停止後装置を洗浄するコマンドの Abort with wash を選択できま す。



2. Main workspace

Activity queue 上の Activity が選択されていないときは実行可能な動作が表示されます。 特定の Activity を選択しているときは詳細が表示されます。

3. Instrument status

現在のシステムの状態が表示されます。いくつかの状態はこの画面から直接変更できます。

Current instrument activity

Running standby flow				
2days 23 hours left	Restart	Stop		

現在の装置の状態を表示します。センサーチップが挿入されていないと、以下に示すコマン ドを選択することができません。

Function	Description
Start standby flow	装置がアイドル状態のときに表示されます。クリックでスタンバイ状態に入ります。スタンバイ状態は7日間継続します。
Restart	装置がスタンバイ状態のときに表示されます。クリックでスタンバイフロー タイマーをリセットします。
Stop	装置がスタンバイ状態のときに表示されます。クリックでスタンバイ状態を 停止します。

Temperature



フローセル温度とサンプルコンパートメント内の温度とそれぞれの設定温度を表示します。 温度が設定温度まで到達してない場合は赤で表示されます。

この Instrument status から温度の設定を変更することはできません。Add activity から Set flow cell temperature や Set sample compartment temperature を選択し、Activity queue に 追加してください。

(注) ここで設定した sample compartment temperature と Method で設定した温度が異なる場合は、Method の設定に従います(後述)。

フローセルおよびサンプルコンパートメントの設定温度範囲は 4-40 ℃ です。範囲外の数値 を入力した場合は実行ボタンが非アクティブになります。

補足 1-5. 設定温度と実際の温度

測定は設定温度で安定した後に実施してください。

温度が完全に安定するには、ある程度時間を要します。測定温度が室温(25 ℃)と大きく異なる場合は、測定を始める前に、あらかじめ設定してください。

Sensor chip



現在ドックされているセンサーチップの情報が表示されます。

Sample hotel door



Open を選択するとロックが外れ、少しだけドアが開きますので手動で持ち上げることができ ます。また、サンプルホテルからトレイが移動しているときは実行ボタンが非アクティブと なり、開けることができません。閉めるときは手動でロックがかかるまで押し込んでくださ い。

Sample illumination



サンプルコンパートメントとホテル内の照明の on/off が可能です。

1-2. システムの初期化

ここからは測定前の装置の初期動作について流れを追っていきます。

<u>1-2-1. センサーチ</u>ップの挿入

Activity queue にセンサーチップを挿入する Activity を追加します。Instrument control workspace から Add activity を選び、右の Main workspace に表示された Change Chip を選択してください。

Instrument control Activity history Methods	Runs		
ntetivity queue	System setup tools	Maintenance tools	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	
		Shutdown	

 \downarrow

新品のセンサーチップを使用する際は、New Chip に、再利用のセンサーチップの場合は、 Existing Chip を選択し、使用する Chip type を選択します。(再利用のセンサーチップを使用 する場合は、「補足 1-7. センサーチップの固定化履歴」を参照してください。)

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

Chip id は、日付-時間:システムシリアルナンバーが自動入力されます。必要に応じて変更可 能です。必要に応じ、Lot number を入力します。センサーチップのロット番号は、センサー チップケースまたはパウチに記載しています。

Run Change solutions when dock is completed にチェックを入れると、次の項目で紹介する Change solutioins を連続して自動で実行しますので便利です。

 \downarrow

Open chip door を押し、センサーチップを挿入します。



Series S センサーチップ CM5

センサーチップを印字面の矢印の方向で、センサーチップポートに挿入します。センサーチ ップポートを手で押して閉めます。(内部のガラス基板が付着しているシートが、外部のケー スにしっかり入っていることを確認してから装置にセットしてください。)

 \downarrow

画面上の Dock Chip をクリックします。

もしチップが未挿入のまま Dock Chip をクリックしたり、<u>チップドアを閉めずに Dock chip</u> をクリックすると警告が出ますので、その際はチップを挿入しチップドアを閉め、Retry を選 択してください。



 \downarrow

Dock が完了すると自動的に Standby flow 状態になります。

Standby flow とは、セットしたランニング緩衝液を低流速で流し続けるモードです。この状態のまま放置するときは、BUFFER チューブをランニング緩衝液に挿入し、他2本のチューブは超純水に挿入してください。最長7日間継続します。Restart ボタンを押すことでタイマーを7日間に戻すことができます。

チューブ	消費量	センサーチップの上を
BUFFER	260 ml/day	流れる
WATER	175 ml/day	流れない
REAGENT	25 ml/day	流れない

補足 **1-6.** センサーチップ挿入時の注意事項

・冷蔵庫に保存しているセンサーチップは、室温に戻した後に開封してください。

・センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まってい ることを確認してから挿入してください。

・ガラス基板に埃や粒子が付着していないことを確認して Dock してください。

補足 1-7. センサーチップの固定化履歴

一度使用したセンサーチップを使用する場合は、挿入時、 Existing Chip を選択すると以下 のように表示されます。

該当のセンサーチップを選択し、センサーチップを挿入し Dock selected chip をクリックして Dock します。

センサーチップを取り出して保存する場合は、センサーチップカバーに id を書き込むと、次回使用する際に id を選択しやすくなります。

なお、固定化済みセンサーチップを再利用する際に、New chip として Dock すると、前回ま での固定化履歴が Chip Properties に登録されず、測定データの解析時に解析ソフトウェアに リガンド情報が反映されません。このため、固定化した表面を再度測定に使用する場合には、 Reuse chip で該当するチップ id を選択して Dock してください。



補足 1-8. センサーチップの種類

各センサーチップの詳細は、弊社 Web カタログ等をご参照ください。必ず Series S タイプを 使用してください。

・カルボキシル基タイプ(タンパク質、ペプチド、化合物などの固定化)

Series S Sensor Chip CM5	1枚	29104988	3枚	BR100530
	10 仪	29149603		
・カルホキシル基低密度タイフ、CM5 の約	約1/3の固	定化重		
Series S Sensor Chip CM4	1枚	29104989	3枚	BR100534
・CM デキストラン短いタイプ、CM5 の約	5 1/3 の固定	E化量		
Series S Sensor Chip CM3	1枚	29104990	3枚	BR100536
・デキストランが無いタイプ、CM5 の約	1/10 の固定	E化量		
Series S Sensor Chip C1	1枚	29104944	3枚	BR100535
・カルボキシル基高密度タイプ、CM5 の約	約3倍の固	定化量		
Series S Sensor Chip CM7	1枚	28953828	3枚	29147020
・ストレプトアビジンタイプ(ビオチン核	票識の DNA	やペプチドなどの	の固定化)	
Series S Sensor Chip SA	1枚	29104992		
Biotin CAPture Kit, Series S	1箱	28920234		
・疎水基タイプ(リン脂質、糖脂質、膜グ	タンパク質	などの固定化)		
Series S Sensor Chip HPA	1枚	29104994		
Series S Sensor Chip L1	1枚	29104993		
・金属キレートタイプ(His-tag タンパク質の固定化)				
Series S Sensor Chip NTA	1枚	28994951	3枚	BR100532
・Protein A タイプ(human antibody IgG1, IgG2, IgG4, Fc-tag タンパク質の固定化)				
Series S Sensor Chip Protein A	1枚	29127555	3枚	29127556

・Protein G タイプ (多くの IgG の固定化 -human(IgG3 を含む), rat, rabbit, mouse, guinea pig, goat, sheep) Series S Sensor Chip Protein G 1枚 29179315 ・Protein L タイプ (Fab、scFv などの抗体フラグメントの固定化 軽鎖 κ 鎖を認識)

Series S Sensor Chip Protein L 1枚 29205138

1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化

先述の Change chip の Activity の際、Run Change solutions when dock is competed にチェ ックを入れていれば本操作は不要です。実行する場合は Activity queue に Change solutions を追加するため、Add activity から Change solutions を選択してください。

(複数回実施したい場合には、Change solutions を複数回追加してください。)

 \downarrow

BUFFER チューブにはランニング緩衝液、WATER チューブには超純水、REAGENT チューブ には目的の試薬か、使用しない場合は WATER チューブと一緒に超純水に浸かっていること を確認後、Send to queue をクリックします。

 \downarrow

Change solutions 終了後は、自動的に Standby flow 状態になります。 最高のパフォーマンスで測定したい場合には、少なくとも一晩 Standby flow で放置してか ら測定を実行してください。

補足 1-9. 実験途中でのランニング緩衝液の交換

Change solutions は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で 洗浄、置換する操作です。実験の途中でランニング緩衝液を変更する場合も、必ず実行して ください。

特に、ランニング緩衝液中の界面活性剤濃度を変更した場合には、平衡化のために 24 時間の Standby flow を実行することをお勧めします。

1-2-3. 試料のセットと取り出し

すべての試料はサンプルトレイ上の 96-もしくは 384-well plate にセットし、システム内に挿入します。サンプルコンパートメント内に入っているサンプルトレイを取り出すには、 Instrument status のホテルドアの Open をクリックします。ホテルドアのロックがはずれるので手動で押し上げてトレイを取り出してくださ

補足 1-10. サンプルトレイとマイクロプレートについて

サンプルトレイには Upper と Lower にそれぞれ 2 枚のマイクロ プレートを置くことができます。マイクロプレートのポジション は L (左) と R (右) の 2 つです。下の図のようにロッキングレ バーを操作してセットします。



左下を A1 としてください。

利用できるマイクロプレートの一覧は以下の通りです。

Microplate type Microplate Foil Septa Instrument Plate compatibility height (mm) B1 96-well, normal, Microplate 96-well, 650201, Greiner А 1-7 15 U-bottom, polypropylene 96-well, deep-well, Microplate 96-well, 786201, Greiner B1 3-7 27 А V-bottom, polypropylene, 650 µL 96-well, deep-well, Microplate 96-well, 780201, Greiner 7 Α В 42 U-bottom, polypropylene, 1 mL 96-well, deep-well, Microplate 96-well, 219020, Porvair В 7 Α 44 U-bottom, polypropylene, 2 mL 384-well, normal, flat Microplate 384-well, BR100505, GE 3-7 14 С bottom, polystyrene 100-pack 384-well, Microplate 384-well, 781280, Greiner C 3-7 14 V-bottom, polypropylene Microplate 384-well, 781270, Greiner C 3-7 384-well, deep-well, 22 V-bottom, polypropylene 96-well, standard. Microplate 96-well, BR100503, GE R1 1-7 14 polystyrene, U-bottom 100-pack 96-well, standard, 96-well Microplate and Foil, BR100383, GE 1-7 14 _ polystyrene, U-bottom 50 -pack, aluminum foils for 48 wells (perforated for 6 strips for 8 wells each)

ポリプロピレン製プレートは有機溶媒を使用するときに用いてください。

¹ For Biacore 8K only.

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

Instrument

- 1 Biacore 3000
- 2 Biacore C
- 3 Biacore 4000
- 4 Biacore T100 5 Biacore T200
- 6 Biacore S200
- 7 Biacore 8K

2. 実験の流れと基本的な概念

2-1. 基本的な概念

測定したい目的に合わせて固定化の方法や実験の組み立て方が大きく変わります。装置の操 作や解析方法はあらかじめセットされているテンプレートを使用できます。

詳細は System handbook を参照してください。以下のフローチャートには英語版マニュアル (System Handbook)対応する章と簡単な説明が記述されています。



<u>2-2. 留</u>意点

- ・緩衝液フローやインジェクションは全て8 チャネルが並行に制御されます。特定のチャネ ルだけ別の動作をさせたり流速を変えたりはできません。
- ・全てのチャネルには同じランニング緩衝液が流れます。例外として A-B-A injection では、
 サンプル B 添加前後のバッファー(A)を任意に変更できます。
- ・サンプルは96/384 ウェルプレートの同じ行から取得されます。もし何もセットしないウェルが存在すると、対応するチャネルには空気が添加されることになります。使用しないチャネルに対応するプレートのウェルには、ランニング緩衝液をセットしてください。
- ・それぞれのチャネルは2つのフローセルを持ち、通常 Reference (Fc1)、Active (Fc2) として 用います。インジェクションはどちらか片方もしくは両方に流すことができます。片方の セルだけにインジェクションしている間、もう片方のセルはランニング緩衝液が満たされ ています。
- ・リファレンスセルのデータの差し引き (reference subtraction) は同じチャネル内でのみ実施 でき、差し引ける順序も Fc2-1 と決まっています。別のチャネルのデータは差し引きでき ません。また、同じチャネル内なら異なるサイクルのデータの差し引きは可能です。
- ・溶媒補正(solvent correction)は同じチャネル内でのみ実施できます。溶媒補正はランニング緩衝液中に DMSO などの有機溶媒を加える際に実施します(主に低分子・フラグメントの測定の場合に用います)。詳細は後述しています。

補足 2-1. チャネルとフローセル

フローシステムは独立した 8 個のチャネルで構成されています。それぞれのチャネルは 2 つ のフローセルを持ち (Fc1 と Fc2)、通常 Fc1 はリファレンスセルとし、Fc2 にリガンドを固定 化します。

2 つのフローセルには直列で送液(Fc1 \rightarrow Fc2)することも、個別に送液(Fc1 または Fc2)することも可能です。



番号	説明
1	チャネルを表します。8個のチャネルはそれぞれ独立です。
2	1 つのフローセルを表します。
3	検出スポットです。

2-3. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子を**リガンド**と言います。リガンドの精製度 は、結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく影響します。<u>90%以上の精製度の</u> リガンドを使用してください。

リガンドの固定化は、センサーチップに直接固定化する方法と、タグを有する場合や抗体の 場合に、結合分子(抗体など)を介して固定化する方法(キャプチャー法)があります。



ここでは、センサーチップ CM5 に化学結合で固定化する代表的な方法を記載します。

各種固定化方法

詳細は、英語版マニュアル、Biacore Sensor Surface Handbook などを参照してください。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基(N 末端アミノ基またはリジン &-アミノ基)を利 用して固定化する方法です。CM(カルボキシメチル)デキストランのカルボキシル 基を NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)で活性化し、リガンドを固定化します。 固定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングします。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて、-**S-S-**結合で固定化する方法です。

サーフェイスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介し-S-S-結合で 固定化する方法です。

マレイミドカップリング法

センサー表面にマレイミド基を導入し、リガンドの表面に存在する遊離型チオール 基を用いて固定化する方法です。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の糖を利用して固定化をする方法です。糖鎖 の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させ、アルデヒド基を作成して、ヒドラ ジンにより、ヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化します。

2-3-1. アミンカップリング法

ここでは、固定化法の中でも最も一般的なアミンカップリング法についてご紹介します。 リガンド表面に存在するアミノ基(N 末端アミノ基またはリジン &-アミノ基)を利用して固 定化します。CM デキストランのカルボキシル基を NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)で活 性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを固定化します。残った活性 NHS 基をエタノール アミンでブロッキングします。



準備するもの

アミンカップリングキット (BR-1000-50)

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれています。

- EDC (N-ethyl-N'- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)
- NHS (N-hydroxysuccinimide)

1 M ethanolamine hydrochloride 溶液 (pH 8.5)

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水 に溶解し、400mM EDC、100mM NHS を調製します。ただちに 150 µl ずつ(基本使用 量は 81 µl/チャネル)を分注し、使用直前まで-20 ℃で冷凍保存してください。全て のチャネルの Fc2 を固定化する場合は使用直前に 8 組ずつの試薬を取り出して、融 解させて使用します。融解後、試薬の再凍結はできません。エタノールアミンは、溶 液で供給されるので冷蔵(4 ℃)保存します。200 µl ずつ(基本使用量は 124 µl/チャ ネル)小分けしておくか、使用する直前に分注します。

ランニング緩衝液

1級アミンを含まない緩衝液を準備してください。

(トリスやグリシン緩衝液は、1級アミンの緩衝液です。)

リガンド

アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないものを準備してください。リガンドの 安定化目的のために混入されている BSA(ウシ血清アルブミン)等のタンパク質類 は、あらかじめ除去するか、入っていないものを準備してください。

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

リガンドの等電点より 0.5~2 低い pH の緩衝液を用いて、終濃度 5~200 µg/ml 程度 になるよう、リガンドを希釈します。等電点が中性付近であれば、希釈用緩衝液と して、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0-5.5)を用います。pH 3.5 以下のものは 使用しないでください。等電点が塩基性であれば、希釈用緩衝液として、10mM HEPES 緩衝液(pH 6.0-8.0、塩は含まない)を用います。

等電点が不明な場合や既知の場合であっても、固定化前に、あらかじめ 2-3-2 の pH scouting により、至適なリガンド希釈液の pH を確認します。

なお、濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカッ プリングもしくはリガンドをビオチン化後、センサーチップ SA または CAP(Biotin CAPture Kit)に固定化する方法を検討します。

リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 μg/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液(pH 8.5)で希釈します。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率が、pH 8.5 前後でもっとも高いためです。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施します。有機溶媒を利用する際には化学耐性を確認してください。

2-3-2. リガンド希釈液の pH 選択(アミンカップリング法)

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基が 導入されているため、表面は負に荷電しています。リガンドを正に荷電した状態で添加する と、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デ キストラン中に濃縮させることができます。この濃縮効果のことを、プレコンセントレーシ ョン効果といいます。この条件を用いることで低濃度のリガンドをセンサーチップ表面に高 濃度で供給でき、効率よく固定化することができます。



等電点が既知のリガンドの場合

等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用します。ただし、等電点が既知の場合であって も、高次構造の状態、希釈倍率、持ち込まれる溶媒成分などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に pH scouting で確認することをおす すめします。

等電点が不明な場合

pH scouting を実行し、希釈液の pH を検討します。この操作は、何も処理していな いフローセル (固定化実施予定のセル)を使用して、各 pH におけるセンサー表面へ のリガンドの濃縮度合いを評価します。この検討で、リガンドは固定化されません。 検討後、引き続き、そのセルにリガンドを固定化してください。

リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、通常は静電的に結合した リガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離します。しかし、稀に、リガンド がデキストランに非特異的吸着を起こすため、pH scouting では、リガンド添加終了 後、洗浄溶液(50 mM NaOH)を添加し、吸着したリガンドを洗浄する操作が組み込 まれています。 なお、終濃度で 50 mM 以上の塩が含まれる場合には、静電的な濃縮作用が阻害されるため、 プレコンセントレーション効果が起きなかったり、効果が低いことがあります。この場合に は、リガンド溶液の希釈倍率を上げるか、バッファー置換で塩濃度を下げてからお試しくだ さい。

2-3-3. 固定化量

実験の目的に合わせて至適な固定化量は変化します。以下の図で、目的と大まかな固定化量のイメージを捉えてください。固定化量の考え方の詳細は Biacore Assay Handbook をご参照ください。

目的	固定化量	GE Hadithcole Life Sciences
	Low 🔶 High	Biacore™ Assay Handbook
特異的結合の確認		
濃度測定		
Affinity		
Kinetics		
低分子測定		86

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となります。固定化量の下限として、理論的最大結合量 R_{max}(固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレスポンス)が、最低でも 20RU は必要です。理論的な最大結合量は、以下の式で算出できます。

アナライトの最大結合レスポンス(理論的最大結合量 R _{max})			
=アナライトの分子量 x リガ	ンドの固定化量/リナ	ガンドの分子量 xS	
(Da)	(RU)	(Da)	
※ S はリガンドのアナライト結合部位数			

(例) リガンドの分子量 50,000 Da

リガンド固定化量 1,000 RU

リガンド結合部位数 1

アナライト分子量 20,000 Da

理論的最大結合量(R_{max}) = 20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

反応速度定数(*k_a,k_d*)、解離定数(K_D)の算出

固定化量はできるだけ抑えます。マストランスポートリミテーション(固定化量が 多いことにより、アナライトの供給が追いつかない現象)を抑制するためです。マ ストランスポートリミテーションが起きていると、正しい速度定数は算出できませ ん。

至適固定化量は、以下の式から算出される最大と最小の固定化量(RU)の範囲となります。

最小固定化量(RU)	
40 x 1/S x	(リガンドの分子量/アナライトの分子量)
最大固定化量(RU)	
200 x 1/S x	、(リガンドの分子量/アナライトの分子量)
*	é s はリガンドのアナライト結合部位数

(例)	リガンドの分子量	50 kDa
	アナライトの分子量	100 kDa
	リガンド結合価数	1
	最小固定化量	40 x 1/1 x (50,000/100,000) = 20 RU
	最大固定化量	200 x 1/1 x (50,000/100,000) = 100 RU
	至適固定化量範囲	20~100RU

2-4. 特異的結合と再生条件の検討

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加す る分子を指します。血清や培養上清等のクルードなサンプルを使用できますが、不溶性の粒 子等は遠心などで除去してください。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合 は、アナライトの精製度が高く、モル濃度が既知である必要があります。

固定化が終了したら、アナライト(ポジティブコントロール)を添加し、以下のことを確認し ます。

Step	概要		
1	リナ	リガンドに選択的に結合しているかどうか	
	۶	リファレンスセルへの非特異的結合がないことの確認	
2	リナ	「ンドの結合部位特異的かどうか	
	\triangleright	複数の濃度のアナライトを添加した際に結合レスポンスが理論的 Rmax よりも	
		小さい値で飽和収束することの確認	
	۶	ポジティブコントロールとなるアナライトが入手できる場合は競合アッセイを	

ポジティブコントロールとなるアナライトが入手できる場合は競合アッセイを 行い結合部位特異性の確認(低分子・フラグメントの場合。省略される場合もあ る)

3 再生の必要性の確認

必要であれば、引き続き、再生条件を検討します。再生条件が決まったら、同一濃度のアナラ イトを添加し、再現性を確認します。なお、シングルサイクル法で1つのサンプルについて 速度定数・解離定数を算出する場合には、再生条件の検討は必要ありません。

メソッドでは、Binding test simple (再生を含む簡易な結合確認試験)、Interaction characteristics (シングルサイクル法による結合確認試験)、Buffer scouting using A-B-A (A-B-A inject を用いたランニング緩衝液検討)、および Regeneration scouting (再生条件検討)
 を使用できます。詳細は英語版マニュアル (System Handbook) をご覧ください。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈してください。希釈できない場合は、ゲルろ過等を使用し、ランニング緩衝液を用いて緩衝液交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件に合わせることが必要となります。緩衝液が異なる場合には、溶液効果(Bulk effect:ランニング 緩衝液と添加溶液(アナライトなど)の密度の差により発生するレスポンスの差)が発生し ます。反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合領域(アナライト 溶解液)と解離領域(ランニング緩衝液)が異なる緩衝液組成条件下の測定になり、解析結果 に影響を与える可能性があります。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよりますが、数十 ng/ml~数百 μ g/ml で測定しま す。反応速度定数を算出する場合には、予想される K_D(解離定数)値濃度の 1/10~10 倍の濃 度範囲で解析すると良好な結果が得られます。予備検討時は、結合が弱いことや再生条件(リ ガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定化直後の状態に再生する 操作)を検討する必要性を考慮し、高濃度(タンパク質アナライトの場合、数~数十 μ g/ml) を用いるのが望ましいです。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセル(Fc1)にもアナライトを添加してください。リファレンスセルは実験目的に応じて、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブコントロール固定化セルなどを利用します。

再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生といいます。解離が速い相 互作用では、ランニング緩衝液が流れることで、短時間でアナライトが完全に解離するため 再生の必要がありません。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液 をアナライト結合表面に 30 秒~1 分間添加し再生します。至適な再生条件(どの溶液で何分 間、何回添加するか)は、分子間ごとに異なるため、その都度検討が必要となります。以下に 述べる理想的な再生条件を目指してください。

理想的な再生条件

リガンドの活性が失われない条件

- アナライトを完全に解離する条件
- リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない条件
補足 **2-2**. 再生溶液の種類

再生溶液は通常以下のようなものが使用されます。検討の際にはマイルドな条件から検討し てください(塩溶液→酸溶液→アルカリ溶液)。添加時間は、1分以内で検討します。各セン サーチップの Instructions の Chemical resistance も併せてご確認ください。

	試薬	濃度あるいは pH
	NaCl	< 2 M
酸性条件	10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
	HCI	< 100 mM
	Phosphoric acid	< 100 mM
	Formic acid	< 20 %
アルカリ条件	10 mM Gly-NaOH	< pH 12
	NaOH	< 100 mM
	Ethanolamine	< 100 mM
	Ethanolamine-HCl	< 1 M
キレート剤	EDTA	< 0.35 M
(多価カチオン依存性反応の場合)		
界面活性剤	Surfactant P-20 (Tween 20)	< 5 %
	Triton X-100	< 5 %
	SDS	< 0.5 %
	Octylglucoside	< 40 mM
有機溶媒	Acetonitrile	< 20%
	DMSO	< 8%
	Ethylene glycol	< 100%
	Ethanol	< 20%
	Form amide	< 40%
変性剤	Guanidine-HCl	< 5M
	Urea	< 8M

2-4-1. Assay development による各種条件検討

ここでは、Assay development 内のテンプレートの目的と使用方法について説明します。

Methods タブをクリックし、New の中の Assay development から確認できます。

Binding test simple

アナライトがリガンドと結合するか、簡易的な確認を行います。メソッドの設定で条件を変 更することもできますが、デフォルトのテンプレートでは、1 濃度のアナライトを添加時間 60 s、解離時間 60 s で Fc1 と 2 に添加した後、再生溶液を添加するプロトコールになってい ます。リファレンスセルの Fc1 に非特異的結合が見られず、アクティブセルの Fc2 にのみ特 異的な結合が見られることを確認します。

再生溶液が既知のときは再生溶液も添加します。未知の場合は Regeneration のコマンドを Remove しても構いません。再生溶液を決定する場合は、後述の Regeneration scouting を実 施します。

Interaction characteristics

アナライトがリガンドと結合すると予想されるときに、濃度依存性、適切なアナライトの添加濃度範囲の確認や Rmax の情報を得るために使用します。メソッドの設定で条件を変更することもできますが、デフォルトのテンプレートでは、シングルサイクル法にて 5 濃度のアナライトを添加時間 60 s、解離時間 600 s で Fc1 と 2 に添加するプロトコールになっています。最高濃度は 1500 nM となっており、5 倍希釈系列を立て広範囲のアナライト濃度を添加しています。ここでアナライト濃度条件が決まれば、本測定に移ります。

注)「4. 2D kinetics を例としたワークフロー」で紹介している 2D kinetics 法を用いることで 条件決めと本測定を同時に行うこともできます。

Buffer scouting using A-B-A



センサーチップ表面に対する相互作用が良好に確認できる緩衝液組成(ベースとなるバッフ アー、pH、塩濃度など)の検討を行いたいときに使用します。ランニング緩衝液は BUFFER チ ューブから供給されますが、A 溶液、B 溶液はマイクロプレートからニードルで分注、添加す るので、溶液 B 添加前後の緩衝液を変えることができます。

デフォルトのテンプレートでは、Startup \rightarrow Analysis の 2 step の構成で、それぞれの step では、A-B-A \rightarrow Regeneration の 2 command が組まれています。Fc1 と 2 の両方に、1 濃度 のアナライトを A-B-A 全て 60 s ずつ添加するというプロトコールになっています。

Regeneration scouting

再生溶液の条件検討を行います。デフォルトのテンプレートでは、Fc2 にのみ 1 濃度のアナラ イトを添加後、再生溶液を添加するサイクルを、5 回繰り返すプロトコールになっています。 この操作により、再生溶液によりアナライトが完全に解離したかどうか、およびリガンドの 活性が維持されているかどうかを確認できます。

2-5. 相互作用測定

実験目的に応じたテンプレートを使用して、サンプル名、添加情報および再生条件等、必要 事項を入力して測定メソッドを組み立てることができます。

この章では、反応速度定数および解離定数算出が目的のテンプレート(シングルサイクル法) を利用した基本的な相互作用測定を中心にご紹介します。その他アプリケーションの測定方 法および解析手法は、英語版マニュアル(System Handbook)をご覧ください。

2-5-1.反応速度定数・解離定数の算出

マルチサイクル法とシングルサイクル法

1 濃度のアナライト添加とリガンドの再生操作を 1 サイクルとして、濃度が異なるアナライトを繰り返し測定し、得られたセンサーグラムから反応速度定数・解離定数を算出する方法をマルチサイクル法といいます。一方、異なるアナライト濃度系列を低濃度側から連続添加し、得られたセンサーグラムを利用して反応速度定数・解離定数を算出する方法をシングル



シングルサイクル法



なお、シングルサイクル法でも再生を実施して、多サンプル測定を行うこともできます。シ ングルサイクル法では1サイクルで、最大9濃度を連続添加できます。

<u>アフィニティーとカイネティクス</u>

分子同士が相互作用する時には、両者にはアフィニティー(親和性)があると表現します。解 離定数は、アフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、 K_D (単位 M)として 記述されます。その逆数 1/ K_D (= K_A 、単位 1/M)が用いられることもあります。解離定数は、 A+B⇔ABの1:1 Binding モデルでは、反応の平衡状態で、 K_D = [A] [B] / [AB] と定義されま す。形成される複合体の割合が多いほど、つまり、この数値が小さいほどアフィニティーは 強いと表現できます。Biacore を用いたカイネティクス解析では、アフィニティーは、その分 子間の反応速度定数から算出します($K_D = k_d / k_a$)。速い結合および遅い解離の相互作用ほど、アフィニティーは強くなります。これら反応速度(カイネティクス)に関するパラメータは、結合速度定数(k_a 、単位 $M^{-1}s^{-1}$)、解離速度定数(k_a 、単位 s^{-1})として表現されます。



解離定数(K_D)、反応速度定数(*k_a、k_d*)の算出方法

カイネティクス解析では、得られたセンサーグラムに直接反応速度式をカーブフィッティン グさせ、非線形最小二乗近似法により定数を導き出します(Kinetics 解析)。



アフィニティーの弱い(≒結合解離が速い)相互作用の場合、反応はきわめて速く平衡状態 (Req)へと移行しますが、複合体の安定性は悪いため、センサーグラムは『箱型』となりま す。結合領域および解離領域はきわめて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の 算出は困難です。



カーブフィッティングによる解析

Req vs C のプロットからの平衡値解析

このような場合、アナライト濃度(C)に対する平衡値(Req)のプロットから、親和定数(K_A) あるいは解離定数(K_D)を算出します(Affinity解析)。平衡状態では、以下の関係式が成り立 ちます。



至適アナライト濃度

良好な結果を得るためには、予想される解離定数(K_D)値の 1/10~10 倍の濃度範囲で 5 濃度 程度測定します。解離定数値が不明な場合には、1 nM~1 μM の範囲で、5 倍希釈系列の5 濃 度のアナライトで測定および解析をおこない、算出された暫定的な K_D値から至適濃度範囲を 求めるのが望ましいです。その場合、再生ができるのであれば、リガンドを再生して、至適ア ナライト濃度で再測定できます。再生ができないのであれば、リガンドを新しいフローセル に固定化し、至適アナライト濃度で再測定してください。

また、濃度0についてもアナライトと同一条件で測定します。

至適な流速

<u>30 µl/min 以上の高流速に設定します。</u>

アナライト添加時間と解離時間

通常は、添加2分程度、解離2分程度で測定します。ただし、結合速度が遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、カーブが得られるよう添加時間を伸ばします(flow rate * contact time /60 = 1-200 の範囲)。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほとんど確認できない場合には、解離時間を10~30分程度(最大1000 min = 16.7hr まで)で測定します。 Biacore 8K では Kinetics/ Affinity の算出方法として複数の方法があります。以下のテーブルを参照してください。

Approach	Considerations	
Serial mode	それぞれのチャネルに対して濃度の異なる 1 種類 のアナライトを添加する方法。シングルサイクル 法にもマルチサイクル法にも対応します。	
Palallel mode	4 つまたは 8 つのチャネルに対して濃度の異なる 複数のアナライトを添加する方法。マルチサイク ル法のみで解析します。	
2D mode	Serial mode と Palallel mode を組み合わせた方法。 広範囲の濃度条件のアナライトを添加することが できます。非常に高濃度、低濃度の解析に用いられ ないようなデータは解析時に除外することもあり ます。	

2-6. Solvent correction(溶媒補正)

ランニング緩衝液に比較的高濃度の有機溶媒(DMSO など)が含まれる場合は溶媒補正が必要になることがあります。SPR のシグナルはセンサーチップ表面での様々な屈折率(RI)の変化を反映しています。センサーチップ表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の屈折率の差、すなわち、溶媒(バルク)効果レスポンスが含まれます。

溶媒効果が小さい(100 RU 以下)実験では、リガンド固定化セルからリファレンスセルのレ スポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できます。

しかし、厳密には、リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除 されるため、リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも大きくな 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 1,500 RU のバルクレスポンスに相当します。複数あるサンプルを個々に調製する際、DMSO 濃度の誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性があります。

このように、溶液効果が大きい DMSO を用いる実験では、単純に差し引くだけではバルクレ スポンスの差を十分に排除することはできません。実際、このバルクレスポンスの差は小さ くても(通常 10 RU 以下)、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度で あるため、バルクの差を補正する必要があります。

溶媒補正は以下の3つの要因が重複した場合に必要となります。

- ・期待されるアナライトの結合レスポンスが小さい(100 RU 以下)場合
- ・リガンドを高密度(10,000 RU 以上)に固定化した場合
- ・サンプル溶液に DMSO が含まれるなど、バルクレスポンスが大きく(3000 RU 以上)、サン プル間で値が異なる場合(DMSO 濃度の"誤差"も含めて)

補足 2-3. 溶媒補正の方法

溶媒補正の手順

Biacore 8K Evaluation Software では、自動で以下の補正を実施します。

- ▶ 測定の際に、DMSO 溶液の濃度シリーズ(ランニング緩衝液に含まれる DMSO 濃度±1 % 程度)を、リガンド固定化セルおよびリファレンスセルに添加し、固定化セルとリァレ ンスセルのバルクレスポンスの差を記録します。
- リファレンスセルのレスポンスをX軸、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差をY軸にプロットして溶媒補正用曲線を作成します。
- ▶ 低分子化合物を添加した際、リファレンスセルのレスポンス(図①)を溶媒補正用曲線 に代入して、補正値を算出します(図②)。

相互作用測定で得られた結合レスポンスから補正値を差し引きます(図③)。再生溶液は通常 以下のようなものが使用されます。検討の際にはマイルドな条件から検討してください(塩 溶液→酸溶液→アルカリ溶液)。添加時間は、1分以内で検討します。



補足 2-4. 溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

以下にランニング緩衝液の DMSO 濃度が 2% の場合と 5% の場合の溶媒補正用の溶液およびランニング緩衝液の調製方法例を記載しますので参考にして下さい。

<ランニング緩衝液=2.0% DMSO, PBS-P+>

- 1. 2Lの 1.02x PBS-P+ 準備: 204mL 10x PBS-P+ を超純水で 2000mL にメスアップ
- 2.

10mL の 1.5% DMSO と 2.8% DMSO、および 1L の 2.0% DMSO, 1x PBS-P+ を調製

1.5% DMSO (~10mL)		2.8% DMSO (~10mL)	2.0% DMSO	
			running buffer (1L)	
1.02x PBS-P+	9.8mL	9.8mL	980mL	
100% DMSO	0.15mL	0.28mL	20mL	

4 点の溶媒補正用溶液を調製

Buffer	1	2	3	4
Nominal DMSO concentration	2.8%	2.3%	1.9%	1.5%
1.5% DMSO	0	1500 uL	2 x 1500 uL	2 x 1500 uL
2.8% DMSO	2 x 1500 uL	2 x 1500 uL	1500 uL	0

<ランニング緩衝液=5.0% DMSO, PBS-P+>

1. 2Lの 1.05x PBS-P+ 準備: 204mL 10x PBS-P+ を超純水で 2000mL にメスアップ

2. 10mL の 4.5% DMSO と 5.8% DMSO、および 1L の 5.0% DMSO, 1x PBS-P+ を調製

	4.5% DMSO (~10mL)	5.8% DMSO (~10mL)	5.0% DMSO	
			running buffer (1L)	
1.02x PBS-P+	9.5mL	9.5mL	950mL	
100% DMSO	0.45mL	0.58mL	50mL	

4 点の溶媒補正用溶液を調製

Buffer	1	2	3	4
Nominal DMSO concentration	5.8%	5.3%	4.9%	4.5%
4.5% DMSO	0	1500 uL	2 x 1500 uL	2 x 1500 uL
5.8% DMSO	2 x 1500 uL	2 x 1500 uL	1500 uL	0

3. 各ステップの操作方法

3-1. 測定 Method のテンプレート

Biacore 8K の測定 Method はあらかじめ保存されている各種テンプレートを元に組み立てることが可能です。ここではその各種テンプレートについてご紹介します。

Instrument control workspace o Add activity b New Method e p = 0 (b = 0) b = 0 (b = 0) (b = 0 (b = 0) (



Biacore 8K での測定は、ユーザーの測定目的に合わせ、これらのテンプレートを元にしてカス

タマイズすると便利です。

フォルダー名とそれに入っているテンプレートメソッドの説明については、画面上の Description をご覧ください。

3-2. 測定 Method の概要

ここでは、Biacore 8K Control Software の Method について解説します。

<u>3-2-1. Method Builder の階層</u>



Method Builder は図のように 1. Method definition, 2. Variables and positioning, 3. Cycle overview, 4. Plate layout、最後に Send to queue から構成されています。

1→4 の順に階層を進め、最後に Send to queue を選択して Activity queue に追加して実行す る流れになっています。Control software 上では以下のように表示されます。



1. Method definition はメソッドの動作内容を決定する階層です。

Method definition は複数の Step を順に処理していく構成になっています。

下図では Startup→Analysis という 2 つの Step 構成になっています。

Step は Add Step から追加できます。Step はその操作の目的(Purpose)に相当します。例え ば Startup は測定前のダミーラン、Analysis は解析目的のデータ、Rmax control は、ポジティ ブコントロールのアナライトを高濃度で添加することで、あらかじめリガンドとの最大結合 量を検証する手法です。



各 Step の詳細な動作は Command で設定します。Command は Add command から追加でき

ます。フローセルごと、あるいはサイクルごとに異なる値(溶液、添加時間や解離時間、流 速、濃度など)を設定したいときは Variable にチェックを入れてください。

(8 チャネルは連動するため、添加時間、解離時間や流速などはフローセルごとには設定でき ません)



↓

 \downarrow

2. Variables and positioning は **Command** で Variable にチェックをつけた溶液について **Step** ご とに異なる値を入力できます。また、マイクロプレート上のサンプルの配置も変更すること ができます。

下の図では Solution の Variable にチェックを入れた場合を表示しています。サンプル名や濃度などの情報を入力できます。



*) Kinetics 解析の場合は Blank の差引きができなくなるため、Control は設定しないで下さい。

補足 3-1. サンプル位置の Import

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプ ル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面上の Import from file もしくは clipboard を利用します。以下の例を参考にして下さい。

測定する Method によって必要なテンプレートが変わるため、2D Kinetics を例に取りご説明致 します。

- 1. Control software > Methods > New > Antibody / general > Kinetics / affinity > 2D kinetics を選択、1.Method definition は特に変更せず 2.Variables and positioning を選択
- 2. Startup と Analysis の 2 つの Step があるが、Analysis の Step を選択
- 3. No, Solution, Control, Concentration 1(nM), Concentration 2(nM), Concentration 3(nM), Action と 並ぶ灰色の行があるが、Noの直下の1をクリックし、Ctrl + A > Ctrl + C で全範囲コピー
- 4. Excel > 新しいシートで A1 セルに Ctrl + V で先程のデータを貼り付け
- 5. Excel 上の F 列全てにプレートの名称である Plate(Upper left)と入力(*)
- 6. Excel 上の G, H, I 列に下図のようにポジションの名称を入力(**)

4	A	В	С	D	E	F	G	н	1	J
1	1	Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	al	a2	a3	
2		Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	b1	b2	b3	
3		Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	c1	c2	c3	
4		Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	d1	d2	d3	
5		Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	e1	e2	e3	
6		Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	f1	f2	f3	
7		Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	g1	g2	g3	
8		Sample 1	0	0	0	Plate(Upper left)	h1	h2	h3	
9	2	Sample 1	0.17	0.34	0.69	Plate(Upper left)	a4	a5	аб	
10		Sample 1	0.51	1.03	2.06	Plate(Upper left)	Ь4	b5	b6	
11		Sample 1	1.54	3.09	6.17	Plate(Upper left)	c4	c5	сб	
12		Sample 1	4.63	9.26	18.5	Plate(Upper left)	d4	d5	d6	
13		Sample 1	13.9	27.8	55.6	Plate(Upper left)	e4	e5	e6	
14		Sample 1	41.7	83.3	166.7	Plate(Upper left)	f4	f5	f6	
15		Sample 1	125	250	500	Plate(Upper left)	g4	g5	g6	
16		Sample 1	375	750	1500	Plate(Upper left)	h4	h5	h6	
17										

(*)→今回はプレートの名称を Plate(Upper left)と記述しましたが何でも構いません。 (**)→A1, A2 のように大文字にする必要はありません。

- \downarrow
- 書き換えたデータを CSV (Comma delimited) (*.csv)で保存 (C,D,E 列は 2D kinetics の濃度 情報です。適宜書き換えても結構です。)
- 8. Control software に戻り、**Remove all cycles** を選択
- 9. Import from で file を選択し、先程保存した csv ファイルを指定
- 10. Import into step Analysis の画面が開いたら、まず Includes column headers のチェック を外す
- 11. 一番上の灰色の行のプルダウンを変更
 - 左から順に Ignore, Solution, Concentration1(nM), Concentration2(nM), Concentration3(nM), Plate id, Position1, Position2, Position3
 - なお、Plate id を選択した時に Plate selections の画面が開くが、Type で使用するプレ
 ートを、Located でラックポジションを選択(Tray1 が Upper、Tray2 が Lower 扱い)
 - ➢ 今回は Tray1, left を選択
- 12. Import into method を選択

これを参考に、各項目を書き換えて下さい。

補足 3-2. 同一ウェルからのサンプリング設定

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。

ただし、プーリング機能を使用するときは乾燥の防止とニードルのコンタミを防ぐ目的で、 専用のセプタを使用してください。また、本バージョンでは各 well への分注用量計算に誤り があるため、contact time variables は同時に使用しないで下さい。

また、サイクル毎に大量の再生溶液などを使用する場合はマイクロプレートからではなく Reagent bottle からの供給も可能です。クリック&ドラッグで該当の溶液を Reagent bottle に入 れてください。



 \downarrow

3. Cycle overview で全体の流れとおおよその測定時間を確認します。

Estimated run time 44min Single cycle kinetics 1 Cycle Step name Solution Position 1 Concentration 1 (nM) Position 2 Concentration 2 (nM) Position 3 Concentration 3 (nM) 1 Startup 2 Analysis Sample 1 Plate 1 A1 0.00 Plate 1 A2 0.00 Plate 1 A3 0.00 3 Analysis Sample 1 Plate 1 A4 0.170 Plate 1 A5 0.340 Plate 1 A6 0.690

 \downarrow

Sort positions O Ascending O Descending

Plate 1

Leftmost position	Volume µl	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	F Channel 6	G Channel 7	H Channel 8
<mark> </mark> A6	118	Sample 1 0.69 nM	Sample 1 2.06 nM	Sample 1 6.17 nM	Sample 1 18.5 nM	Sample 1 55.6 nM	Sample 1 166.7 nM	Sample 1 500 nM	Sample 1 1500 nM
A 5	118	Sample 1 0.34 nM	Sample 1 1.03 nM	Sample 1 3.09 nM	Sample 1 9.26 nM	Sample 1 27.8 nM	Sample 1 83.3 nM	Sample 1 250 nM	Sample 1 750 nM
A 4	118	Sample 1 0.17 nM	Sample 1 0.51 nM	Sample 1 1.54 nM	Sample 1 4.63 nM	Sample 1 13.9 nM	Sample 1 41.7 nM	Sample 1 125 nM	Sample 1 375 nM
A 3	118	Sample 1 0 nM	Sample 1 0 nM	Sample 1 0 nM					
A 2	118	Sample 1 0 nM	Sample 1 0 nM	Sample 1 0 nM					
— A1	118	Sample 1 0 nM	Sample 1 0 nM	Sample 1 0 nM					

Plate 2

Leftmost	Volume	A	B	C	D	E	F	G	H
position	µl	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4	Channel 5	Channel 6	Channel 7	Channel 8
A 1	118	Buffer							

Buffer bottle

Volume ml	Solution
200	Buffer

4.Plate layout でサンプルをマイクロプレートへセットする情報を確認します。この画面では 配置などを変更することはできません。サンプルが多い場合は印刷すると便利です。 Send to queue をクリックすると、Activity queue の画面に移ります。これまでのメソッドが Activity queue に追加されていることを確認してください。なお、Send to queue をクリックし てしまうと、Method Builder の画面に戻ることはできなくなりますのでクリックする前に十分 にご確認ください。

¥	

Select tray positions、Run name を決めて Ready to start をクリックすれば測定開始します。

Instrument control Activity history Methods	Runs		トレイ位置
Activity queue	Activity properties		
Method builder run	Type Method builder		Upper/Lower
User input required	Method name 2D kinetics		
Total time 35min	State User input required		
Add activity	Description Preparations	Select tray positions	
	Buffer bottle Water Reagent bottle Yet water Yet water Yet water Yet water Yet water </th <th>Name Field 1 Type 56 well 280 µl # 0 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0</th> <th>Upper v</th>	Name Field 1 Type 56 well 280 µl # 0 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 # # 0 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0 0 # # 0	Upper v
	◎ Ready to start ← データの保存場	所の決定&測定開	見始

引き続き別の activity を実行したい場合は Add activity ボタン(^{◆ Add activity})から追加し てください。先述の通り、Activity は上から順に実行されます。

補足 3-3. 測定開始後の緊急停止

現在実行中の Activity は、Activity queue 上で右端に Abort のボタンが現れます。測定開始後に 緊急停止したい場合はこちらを利用してください。システムを洗浄するかどうかも選択でき ます。

<u>3-3. Evaluation Software の概要</u>

ここでは、Biacore 8K Evaluation Software について解説します。

Biacore 8K Evaluation Software を開きます。Biacore 8K Evaluation Software は 2つのインター フェースから構成されています。



Workspace	Description
Create new evaluation	Run データを解析するときに用います。
	複数の Run データを並行して解析したい場合は Evaluation Software を複数立ち上げてください。
On an evicting evelveting	
Open existing evaluation	既に解析済みのファイルを崩くときに用います。

Create new evaluation から **Select runs** で **Run** データを選択し、**Select evaluation method** で解析メソッドを選んで解析します。



解析 Method はテンプレートを利用することもできます。また測定中のデータでも解析可能 ですが、その解析結果の保存はできません。

解析 Method は User defined と Predefined の 2 つから選択します。Predefined には、あらか じめ解析 Method テンプレートがセットされています。これらのテンプレートは、Biacore 8K Control Software の測定 Method テンプレートに対応したものが入っていますので、そのまま 利用できます。User defined ではユーザーが組み立てた解析 Method で解析する手法ですが、 解析 Method テンプレートを元にしてカスタマイズすると便利です。Predefined に保存され ているフォルダー名とそれに入っているテンプレートメソッドの説明については、画面上の Description をご覧ください。

 \downarrow

Run データを解析 Method で開くと、**Create new evaluation**、**Open existing evaluation** の隣 に、新たに **Evaluation -**〇〇(**測定メソッド名**)が現れます。



解析メソッドの詳細の確認や追加・変更は全て Home から行います (Home の詳細説明は 3-3-2 で後述)。

Home を開くと、解析項目(Item)の追加と編集ができます。解析手段(どのデータを用いて どんな方法で解析するかなど)および解析結果のエクスポートができます。ここで作成した 解析 Method を保存しておくと、次に同様の測定を行った場合、その Run データを保存した 解析 Method で開けば、同じ解析手段で解析します。 解析結果の保存は Evaluation - 〇〇の隣に出現したボタンから保存できます。保存された結果は Open existing evaluation から確認することができます。

3-3-1. 解析の流れ



3-3-2. Evaluation Home

Evaluation Home を選択すると、以下の Home workspace が表れます。ここでは、各 Tool について簡単にご説明します。

Tool は Settings and preparation、New evaluation items, After evaluation の 3 つに大別されていま す。Settings and preparation では測定の基本情報などが整理され(一部は編集可能)、New evaluation items では選ばれた item ごとの解析結果が上部のタブに表示され、After evaluation では Settings and preparation と New evaluation items で選択した情報や解析結果を Export した り、Evaluation method を保存できます。



New evaluation items fter evaluati 2 Variables Propert 6 (7)Sensorgram (11) Export re Kinetics Curve markers Report point (12) te evaluation method 8 9 X 1 5 (10)

No. ΤοοΙ Description 1 Propaties ・使用した解析メソッド名 ・センサーチップ情報 ・測定データ情報 2 Variables ・アナライト名、濃度、分子量などの情報(**編集可能**) ・サイクルの概要 3 Curve ・特に関心がある相互作用についてのフラグの設定ができる markers ・複数の evaluation items に跨って追跡可能 4 Report points ・レポートポイントの追加、編集 5 Solvent ・溶媒補正のデータの確認と適用プロットの設定 correction 6 Sensorgram ・センサーグラム情報のみ表示(解析不可) ・センサーグラムの色の選択、軸のアラインメント、差し引き 7 **Kinetics** ・Kinetics 解析 ・詳細は後述 8 Plots ・スクリーニングなどに用いる ・レポートポイントを用いてプロットを作成 ・プレートからセンサーグラムの形状確認、セレクション設定

以下は各 Tools についての簡単な説明です。

No.	ΤοοΙ	Description
9	Affinity	・Affinity 解析
		・Affinity 解析で用いる平衡値のポジション設定
		・解析手法の設定
		・Rmax を指定して解析(Steady state affinity 以外の解析)
10	Kinetics and affinity	・Kinetics 解析と Affinity 解析を同時に行う
11	Export	・1-10 で実行した解析の中からエクスポートしたいデータを選び
	results	Excel 形式で出力
12	Create	・1-11 で実行した解析メソッドの中から保存したい内容を選び新た
	method	な解析メソッドとして保存

補足 **3-4.** 測定終了後の入力情報の修正

測定が終了した後で、濃度の情報やサンプル名などを修正したい場合は、上記の Home 画面 から Variable を選択すれば編集可能です。変更後は左下の Applyand Close をクリックし、 再解析して下さい。

3-4. 解析項目の詳細設定

それぞれの解析項目を開いたときのインターフェースの詳細は、System Handbook の 9.4 Interface compornents を参照してください。

また、それぞれの解析項目の詳細は、System Handbook の 10. Evaluation Home workspace を参 照してください。

Sensorgram items、Plot items、Kinetics items でそれぞれ解析画面は異なりますが、ここでは Kinetics items についてのみ解説し、その中でもよく使用するものだけを抜き出して説明しま す。

画面は大きく左側と右側で分かれており、左側は Settings、右側は選択された Panel が表示 されます。

Predefined の中の解析 Method を使用した場合、既に解析まで完了した状態で表示されます。 初期設定のままですと、自身が解析したい Sensorgrams や解析 model が選択されているとは 限らないため、まずは左の Settings から確認や設定を行います。

Settings	٦ (Pa	anel)
Biacore™ 8K Evaluation Softwo	re	User	Resource calendar bioassay_	() HELP V
Create new evaluation Open existing evaluation Evaluation	tion - Kinetics 2D 💾 🔛 😣			
QC - Sensorgram 💙 QC - Baseline 💙 QC - Binding to referen	e 👻 Evaluation - Kinetics 💙 🔮 Home			
✓ Settings ✓ Select sensorgrams Included: 24 of 96 sensorgrams ✓ Analysis step purpose ③ Startup ④ Analysis ✓ Sensorgram type ④ Active	s s s s s s s s s s s s s s) Thumbnails を選 の Work space に影	≹択すると 表示される ™it londing	
Reference Reference subtracted Channel	0 1:1 binding; ka=1.47e+06; kd=2.10e-03	250 5; ; KD=1.42e-09	500 Time	750 1000 s
 > Cycles (Run 1) > Regeneration 1 (Solution) 	Sample table Parameters Residuals	s Blanks		
More options	Cycle Channel Sensorgram type	Cycle purpose Injection type Cont	trol type SingleCycleKinetics 1 solution	Concentration (nM) Immobilized ligand
🔯 On-off rate chart	3 1 Reference subtracted	Analysis SingleCycleKinetics Not	a control B2m	0.01 0.03 0.06
KD chart	3 2 Reference subtracted	Analysis SingleCycleKinetics Not	a control B2m	0.04 0.09 0.18
Sensorgrams	3 3 Reference subtracted 3 4 Reference subtracted	Analysis SingleCycleKinetics Not a Analysis SingleC	a control B2m a control B2m	0.13 0.26 0.53



Settings

クリックで Select sensorgrams を展開できます。Select sensorgrams からは、解析するセン サーグラムを選択できます。

Select sensorgrams

✓ Select sensorgrams	S
Included: 24 of 96 sensorgrams	
imes Analysis step purpose	
Startup	
Analysis	
✓ Analysis step name	V
🕑 Startup 1	
Analyte	
✓ Sensorgram type	•
Active	
Reference	
Reference subtracted	
> Channel	V
> Cycles (Run 1)	V
> Regeneration 1 (Solution)	∢
More options	

解析に用いるセンサーグラムを選択できます。

Data grouping

Data grouping (1)

Serial Parallel/2D

・Serial → 濃度条件を、同一チャネル内かつ複数サイクルで検討した時

・**Parallel/2D** → 濃度条件を、複数チャネルにまたがり同じサイクル (parallel) または複数 サイクル (2D) で検討した時

Serial	濃度条件を、同一チャネル内かつ複数サイクルで検討した時
Parallel/2D	濃度条件を、複数チャネルにまたがり同じサイクル(parallel)
	または複数サイクル(2D)で検討した時

Injection assignment

 Injection assignment 	
Use variable information from	SingleCycleKinetics 1 \checkmark
Use response values from	SingleCycleKinetics 1 🗸

Thumbnails panel で表示されるデータが切り替わります。

Use variable information from	Methods で Variable に設定した command が選択可能です。
Use response values from	各 injection のレスポンスが選択可能です。

Kinetics/Affinity mode

Kinetics/Affinity mode

Settings apply to selected series

Kinetics Affinity Both

Kinetics 解析、Affinity 解析、あるいはその両方を同時に実行します。

Blank settings

✓ Blank settings	
Settings apply to selected series	
Use blanks within same series	
 Include blanks from other series 	
No subtraction	

ブランク(0濃度の差し引き用データ)をどれにするか選択できます。

Fit models



解析に用いるモデル式を選択できます。モデル式の詳細は補足 3-5 をご参照下さい。

画面右の Thumbnails panel で選択されたセンサーグラムを解析できますが、未選択のものは 解析されません。

補足 3-5.反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とします。

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 $A + B \Leftrightarrow AB$

1分子同士で結合したリガンドとアナライトの解離相のみを評価するモデル。

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 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ーション変化を起こす反応モデル。

補足 3-6. Initial values

V	Initia	va	ues

Model type	Model name	Parameter	Fit	Initial value	
Kinetics	1:1 binding	ka	Fit global 🗸	1e5	Reset
Kinetics	1:1 binding	kd	Fit global 🗸	1e-3	Reset
Kinetics	1:1 binding	Rmax	Fit local 🗸	YMax	Reset
Kinetics	1:1 binding	tc	Fit global 🗸	1e8	Reset
Kinetics	1:1 binding	RI	Constant 🗸	0	Reset

解析の初期値を設定できます。センサーグラムの形状から予想される値と初期値が大きく異なる場合に、至適な値に変更して解析することで False Negative (間違った解の算出)を回避することが出来ます。

<RI 値の変更>

箱型に近いセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにも かかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI(溶液効果)とみなして解析す る場合には、RI をゼロに固定して解析する方法が有効です。この場合は、RI の Fit カラムをク リックし、Constant を選択します。Initial value は自動的に 0 が入力されます。

<R_{max}の解析方法の変更>

経時的なリガンドの活性低下や再生の不十分さが原因で、全センサーグラムで R_{max} を同一の 値とみなせない場合は、R_{max}の Fit カラムをクリックし Fit local を選択し、各センサーグラム に至適な R_{max} を個別に算出します。Parallel 解析や 2D 解析のように複数のチャネルを用いた 解析のときは、解析メソッドでは、デフォルトで Fit local が選択されています。

Panel の選択

Result table	
😥 On-off rate chart	
KD chart	
Sensorgrams	
Fit details	

選択されて青くハイライトされた Panel は画面右の Work space に配置されます。 例えば左の図では Thumbnails, Sensorgrams, Fit details のみが表示されています。

Thumbnails panel



選択されて青くハイライトされた Thumbnail のみが解析の対象となります。例えば上図では 中央と右が選択されています。

複数の Thumbnails を選択したい場合	・Ctrl+クリック
	・Shift+クリック
全ての Thumbnails を選択したい場合	・Thumbnails panel 上で Ctrl+A
	・右ののアイコン🎫 (Select all thumbnails)

General	Accept/Reject	Thumbnail settings
	Accept sel	ected
	Reject sele	ected
	Clear accepted a	nd rejected

Thumbnails panel の右のアイコン (Thumbnail settings) を展開すると Accept/Reject tab が表示できます。解析後の Thumbnails に関しては Accept できます。解析前、解析後の Thumbnails に関しては Reject できます。Accept されると Thumbnail の右下に緑色で A と表示 され、再解析ができなくなります。Reject されると Thumbnail の右下に赤色で R と表示され、以降の解析ができなくなります。Accept/Reject を解除する場合は、該当の Thumbnails を(複数) 選択し青くハイライトさせた後、右クリック→Clear accept and rejected state を選択し ます。

General	Accept/Reject	Thumbnail settings			
x-axis	y-axis	Size	Mode	Sorting	
Individu	ual 💿 Individual	Small	Sensorgrams	~	
🔘 Same	◯ Same	Standard	O Plots		
🔘 Manual	O Manual	O Detailed			

Thumbnail settings tab では Thumbnail panel に表示される図の x 軸、y 軸などを個別に設定したり、揃えたりできる他、サイズの変更や並び替えが可能です。

Result table

General Kinetics model	Curve markers	Channel	Immobilized ligand	Injection variables SingleCycleKinetics 1 Solution	Quality Kinetics Chi² (RU²)	1:1 binding ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	tc
1:1 binding	None			B2m	1.65e-01	1.47e+06	2.10e-03	1.42e-09		8.61e+07

Result table からも解析結果の Accept/Reject が可能な他、Result table に表示させる columns も 変更可能です。



デフォルトでは対数スケールで横軸として解離速度定数、縦軸として結合速度定数が描かれ、 1:1 binding model の解析結果のみをプロットさせます。斜め方向に引かれた灰色の線は、親和 力 KD を示します。向かって左上ほど親和力は強くなります。



横軸としてサンプル、縦軸として KD が描かれ、解析結果をプロットさせます。Kinetics/Affinity mode で Affinity もしくは Both を選んだときのみ表示可能です。

On-off rate chart

Sensorgrams



Thumbnails panel で最後に選択されたデータ(最も濃い青でハイライトされたデータ)が表示 されます。測定値は色付きのデータで表示されます。Kinetics/Affinity mode で解析した後なら ば、黒い実線でフィッティングの結果が重ねて表示されます。

補足 3-8. Sensorgrams の選択					
<sensorgramsの選択></sensorgramsの選択>					
選択された Sensorgrams は青くハイライトされます。					
個々の Sensorgram を選択	該当の Sensorgram 上でクリック				
複数の Sensorgrams を選択	・該当の Sensorgram 上でクリック				
	・右のアイコン 🋄 (Area select) で指定				
	・Fit details panel から Ctrl+クリックで選択				
個々の Sensorgram の選択解除	該当の Sensorgram をクリックで 1 本ずつ解除				
複数の Sensorgrams の選択解除	余 Fit details panel で該当の Sensorgrams を Ctrl+クリック				
全ての Sensorgrams の選択解除	余 ·Sensorgrams panel 上で右クリック→Deselect all				

・右のアイコン 🛞(Deselect all)

<拡大・元に戻す>

拡大	・右のアイコン 🔒 (Zoom mode) が選択されている時、Sensorgrams 以外
	の領域から、見たい領域をクリック&ドラッグ(繰り返し実行可能)(なお、
	デフォルトでは Zoom mode が選択されているため始めから青くハイライ

curves

	トされています)
Undo	拡大された状態で Sensorgrams 以外の領域をダブルクリック
元に戻す	・繰り返しダブルクリック
	・右のアイコン 🎽 (Zoom out max)





解析に用いないなどの理由で特定の Sensorgrams の一部分を削除したい場合は、<u>該当の</u> <u>Sensorgrams を選択した後</u>、**Remove range tab** を開きます。除去したい領域を2本の縦線で 挟み、以下の目的に従って指定の領域を削除します。

Remove ranges at start & end of injections	デフォルトでチェック済み 添加開始と終了時の領域が削除されます。
Remove range from selected sensorgram	現在 Sensorgrams panel に表示されており、かつ、選択済みの Sensorgramsの、Remove range に含まれる領域のみ削除されます。
Remove range in selected series with matching cycle	 チェックボックスにチェックを入れた後、Distribute range removal to selected series を選択すると、 Thumbnails panel で濃い青で選択された Thumbnail について、 ・同じサイクルの Remove range に含まれる領域のみ削除されます。
Remove range in selected series with matching channel	 チェックボックスにチェックを入れた後、Distribute range removal to selected series を選択すると、 Thumbnails panel で濃い青で選択された Thumbnail について、 ・同じチャネルの Remove range に含まれる領域のみ削除されます。
Restore all ranges in selected series	Remove range from seleceted sensorgrams/Distribute range removal to selected series で削除した領域を復元します。復元され るのは濃い青で選択された Thumbnail のみです。全ての Sensorgrams を元に復元するときは Thumbnails panel にて全 Thumbnails を選択 後、Restore all ranges in selected series をクリックします。
Fit details

Fit details panel は最後に選択されたデータ(最も濃い青でハイライトされたデータ)の情報の み表示され、4 つの tab から構成されています。

< Sample table >

Thumbnails panel で選択されたデータが詳細に表示されています。

< Paramerters >

Sample table	Parameters	Residuals	Blanks						
1:1 binding Series paran	neters	1:1 binding Sensorgram	g n parameters						
ka (1/Ms)	1.47e+06	Curve		Rmax (RU)	T(Rmax)	Conc (M)	f (µl/min)	RI (RU)	
kd (1/s)	2.10e-03			1012	21000.02			010 010 010	
te	8610,07	#3: Sensor	gram Ch=3 Fc=2-1	59.8	8.39e+02	1.3E-10 2.6E-10 5.3E-10	30	0.0 0.0 0.0	
u.	8.010+07	#3: Sensor	gram Ch=4 Fc=2-1	53.4	1.62e+03	4E-10 7.9E-10 1.58E-09	30	0.0 0.0 0.0	
Chi ² (RU ²)	1.65e-01	#3. Sensor	gram Ch=5 Ec=2-1	57.7	2 600+03	1 10E-00 2 37E-00 4 74E-00	30	000000	
T(ka)	9.60e+02	#J. Jenson		51.1	2.096+05	1.192 03 2.572 03 4.742 05	50	0.0 0.0 0.0	
T/L .I)	1 60 - 07	#3: Sensor	gram Ch=6 Fc=2-1	55.4	4.80e+03	3.56E-09 7.11E-09 1.422E-08	30	0.0 0.0 0.0	
Т(Ка)	1.080+05	#3: Sensor	gram Ch=7 Fc=2-1	53.3	7.61e+03	1.067E-08 2.133E-08 4.267E-08	30	0.0 0.0 0.0	
T(tc)	2.03e+02	#3: Sensor	gram Ch=8 Fc=2-1	54.9	1.03e+04	3.2E-08 6.4E-08 1.28E-07	30	0.0 0.0 0.0	*

フィッティングの結果と統計パラメータが表示されています。1:1 binding model での Kinetics 解析における Parameters tab における解析結果は以下の通りです。

ka (1/Ms)	結合速度定数
kd (1/s)	解離速度定数
tc	マストランスポート係数
Chi ² (RU ²)	カイ二乗
T(ka), T(kd), T(tc)	各パラメータを標準誤差(SE)で割った推定係数
Rmax (RU)	アナライトの結合最大量
T(Rmax) (RU)	Rmax を標準誤差(SE)で割った推定係数
ri (ru)	溶液効果(bulk effect)
KD (M)	解離定数

< Residuals >

残差プロットを確認できます。詳細は補足 3-12 をご覧下さい。

<Blanks>

差し引きに用いるゼロ濃度のデータの設定が可能です。

補足 3-11. フィッティングが良好でない要因

① フィッティングに採用したモデルが異なっている

(または、想定していたモデルと異なる反応が起きている)

② 箱型のセンサーグラムである

③ 経時的なリガンドの活性低下が考えられる

④ 再生が不十分である

⑤ アナライト濃度の調製ミスが考えられる 等

①が要因と考えられる場合は、妥当な反応モデルを選択して再解析してください。

②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になること があります。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからで す。この場合は、RI=0 (Constant)として再解析してください。

複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサ ーグラムにおいて ka, kd, Rmax が同一のパラメータであることが前提となります。しかし、上 記③~⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータは必ずし も一致しません。

例えば、Rmax は、リガンドに対するアナライトの最大結合量(RU)であり、理想的な実験系では、連続して同一セルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同一値 となります。ところが、リガンドの再生が不十分な場合や、再生操作によりリガンドの活性 がサイクルごとに低下している場合には、Rmax はサイクルごとに低下します。フィッティン グが良好でない要因が、測定結果から明らかに Rmax にある場合は、Rmax が同一パラメータ であることを解除し再解析してください。

補足 3-12. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッテ ィングカーブがほぼ重なります。センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッティン グは良好でないと判断します。1:1 binding で解析した場合、Parameters タブには以下の評価項 目が並びます。

tc

マストランスポートリミテーションの影響の度合いを判断する 1 つの指標です。大きいほど アナライトの拡散が速く、解析上重要なパラメータではないことを意味します。

(参考)分子量 50kDa 程度の球状タンパク質の場合 10⁸程度のオーダーをとります。

Chi² (RU²)

測定データとフィッティングカーブ間の残差の平均平方を示します。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相当します。

T(ka)、T(kd)、T(tc)

T-value と呼びます。パラメータを標準誤差(SE)で割った値です。目安として T(ka)、T(kd)は 10 以上であればフィッティングは良好なことが多いです。一方で、マストランスポートリミ テーションに関係するパラメータである tc に関しては大きな SE が得られているほうが良い ため、T(tc)は小さな値のほうが良好なフィッティングとなることが多いです。

Residuals

残差プロットを確認します。プロットが Y 軸の O に近く、ランダムに分散している場合は、 フィッティングは良好と判断します。



<u>3-5. データ Export</u>

る。

4

現在の解析項目の全てもしくは任意の範囲を Microsoft Excel[®]のフォーマットで出力できます。 それぞれの New evaluation items は Excel 上で別々の Sheet に出力されます。

Step	Action
1	Home 画面より Export results を選択する。
2	不要なセッションについてはチェックマークを外す。
3	必要があれば図の大きさ、配置方法、結果の表示方法などのセッティングを変更す

Export を選択し、ファイル名を入力する。



4. 直接法のワークフロー

ここでは、リガンドタンパク質をアミンカップリング法で直接固定化し、アナライトとの相 互作用を行い、解析するまでの一連の流れを追っていきます。それぞれのステップの詳細に ついては、前章の「3. 各ステップの操作方法」をご覧下さい。

<u>4-1. アミンカップリング法:リガンド希釈液の pH 確認(pH s</u>couting)

ランニング緩衝液に HBS 系 Buffer や PBS 系 Buffer を用意します。

Instrument control workspace \rightarrow Add activity \rightarrow New Method

あるいは Instrument control workspace \rightarrow Methods タブ

$\rightarrow\,$ New $\rightarrow\,$ Surface preparation $\,\rightarrow\,$ pH scouting

Instrument control Activity history Methods	Runs	
Copen 🔶 New		
Empty methods	Name	Description
surface preparation	pH scouting	Scouting of ligand pre-concentration in immobilization buffers with different pH.
🖆 Assay development	Immobilization	Standard covalent coupling immobilization.
👻 🖆 Binding screen	Immobilization low levels	Covalent coupling immobilization for obtaining low ligand levels.
🖆 Fragment / LMW		
🖆 Antibody/general		
← 🖆 Kinetics / affinity		
✓		
Fragment affinity screen		
LMW kinetics / affinity		
LMW kinetics / affinity using Biotin CAP		
LMW kinetics / affinity using Sensor Chip NTA		
LMW kinetics / affinity using GST capture		
👻 🖝 Antibody / general		
Kinetics / affinity		
Kinetics / affinity using Biotin CAP		
Kinetics / affinity using Sensor Chip NTA		
Kinetics / affinity using GST capture		

				\downarrow			
	Instrument control Activity history Methods Runs						
Nethod Buller Nethod Buller <td>pri scouting 💫 😋 Open 🔘 New</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	pri scouting 💫 😋 Open 🔘 New						
beterdenderer in int	Method Builder	Z. Variables and positioning S. Cycle overview 4. Plate layout Send to go					
Nor with model Me of the model is an and it. Nor with model Me of the model is and it. Nor with model is and it. Me of the model is and it. Nor with model is and it. Me of the model is and it. Nor with model is and it. Me of the model is and it. Nor with model is and it. Me of the model is and it. Nor with model is and it. Me of the model is and it. Nor with model is and it. Me of the model is and it. Nor with model is and it. Me of the model is and it.	Data collection rate 1 v Hc	Sample compartment temperature (# set to fixed25) *C	Concentration unit nH Running buffer Buffer	v			
None None Years None None None </td <td>Analysis 🛞 🗎 Add step 🛩</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	Analysis 🛞 🗎 Add step 🛩						
Naveti Image: Constraint of the second of	Name Analysia Parpose Analysia v	Now cell temperature 28 12	Repeat within				
Proprio Variable Input Name Image User database State # Huged b Underwoods Image Image Gardint II II Image Image Image Gardint II II Image Image Image Gardint II Image Image Image Image Gardint II Image Image Image Image Devolution Image Image Image Image Image Transfer II Image Image Image Image Transfer III Image Image Image Image Transfer Image Image Image Image	Row cell 1 Row cell 2 Arabite 1	Adramant 🗸					
	Pripriory Variable Value Scharet III IIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	lge (in an en formanufic) v though OctoBootha code ⊖ Revort 1 ⊛ Revort 2	© Nos		Use diffind variables Name innewbitzation buffer Or Add variable	hpe Renew Text ∨ ⊗	
			_				-

Method Builder	1. Method definition 2. Variables and positioning	3. Cycle overview 4. Plate layout	Send to queue	
Data collection rate 1 V Hz	3 Sample compartment temperature	set to fixed 25 °C	4 Concentration unit	nM v
2		\bigcirc vary with flow cell temperature	5 Running buffer	Buffer

- ① タブ 1. Method definition の編集が終わったら 2,3,4、最後に Send to queue へ進める。
- ② 1秒間のデータ取得回数。(変更不要)

1Hz: For yes/no screening assays, fragment screening and steady-state affinity analysis10Hz: For most kinetic analyses

③ サンプルコンパートメント温度設定。(殆どの場合変更不要)
 set to fixed: 4-40℃まで設定可能。小数点不可。

vary with flow cell temperature: 測定温度と同条件。

- ④ これから流すリガンドの濃度単位の設定。
- ⑤ 用いているランニング緩衝液の名称(EBS-EP+など)に編集。

Flow cell 1								
Flow cell 2	Analyte 1	(X)	Regeneration 1	×	Add com	mand 🗸		
Property	Variable	Value			Туре	Low sample consumption	~	Predip
Solution		6			Flow path	both flow cells		🗌 Mix
Contact time		180	S			◯ flow cell 1		
Dissociation time		0	S			Ilow cell 2		
Flow rate		10	µl/min					
Concentration	07)						
Molecular weight	8)						

⑥ リガンドの添加時間 <u>180s → 60s に変更</u>。

⑦⑧ チェックを入れると次のタブ(2. Variables and positioning) でリガンドの濃度情報と分子量情報を入力可能。

⑨ Sensor chip 表面を 50mM NaOH で洗浄。(変更不要)

Met	nod Builder		1. Method definition	2 Diables and positionin	g 3. Cycle overview	4. Plate layout	Send to queue	
Use	:hannels € 1 €	2 🗭 3 🗭 4 🗭 5 🗭	6 🗹 7 🗹 8					
Ar	nalysis		(13)					
				Ö				
No	Analyte 1 Solution 12	Control Immo	bilization buffer Im	nport from				
1	Ligand 1	✓ 10 m	Macetate pH 5.5	tile.				
	Ligand 1	✓ 10 m	IM acetate pH 5.0	0				
	Ligand 1	✓ 10 m	nM acetate pH 4.5	i clipboard				
	Ligand 1	✓ 10 m	M acetate pH 4.0					
	Ligand 2	✓ 10 m	Macetate pH 5.5	Add guelo				
	Ligand 2	✓ 10 m	IM acetate pH 5.0	Add Cycle				
	Ligand 2	✓ 10 m	IM acetate pH 4.5	Remove cycle				
	Ligand 2	✓ 10 m	M acetate pH 4.0	Remove all cycles				
			M	ove 1 🗸 step				
			G	Move up				
			e	Move down				
				Show more columns				

⑩ タブ移動する。

① 使用しないチャネルがある場合はチェックを外す。その場合は⑫のリガンド名称に⑤で入力した Buffer 情報が記入される。

12 リガンド名称入力。⑦にチェックを入れない場合はここにリガンド濃度情報も記載する

と良い。

③ 別のバッファーを用いるときなどは必要があれば編集可能。

					Ļ			
Instrum	ent contro	Activity history Methods Runs						
pH scouts Metho	o 😆 🤇 d Build	Open New I. Method defin	ition 2. Variables and positioning 3. Cycle of	verview 4. Plate layout Send to que				
Sort posit	ions 🔘 Asi	cending Descending				Estimated run time is 5 min	Reagent bottle, empty	Buffer bottle, 200 ml
Plote 1							Name Plate 1	Name Plate 2
Leftmost	Volume µl	A Channel 1	B Channel 2	C Channel 3	D Channel 4	E Channel 5	Type 96 well 280 µl 15	Type 96 well 280 µl
e Az	52	50 mM NaOH	1100000000	1100000000				
A1 Buffer b Volume ml 200	52 ottle Solution Buffer	Ligand 1 Immobilization buffer 10 mM acetate pH 5.5	Lügand 1 Immobilication buffer 10 mH acetate pH 5.0	Ligand 1 Immobilization buffer 10 mM acetate pH 4.5	Ligand 1 Immobilization buffer 10 mM acetate pH 4.0	Ligand 2 Immobilization buffer 10 mM acetate pH 5.5		
							Name Plate 3	Name Plate 4
							Type 96 well 280 µl	Type 96 well 280 µl
							$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c} 12 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ $

④ タブ 3. Cycle overview で測定全体にかかる時間を確認。タブ 4. Plate layout でポジションの情報を確認し、プレートに試薬をセットする。

(15) ポジションは変更不可。タブ 2. Variables and positioning に戻れば編集可能。

¹⁶ タブ 1-4 までを編集し終えたら Send to queue のボタンを選択する。ボタンを押すと

Method Builder の画面に戻れなくなる(=変更できなくなる)ので、問題ないかどうか再確認する。

 \downarrow

Send to queue

このボタンをクリックすると Method builder の画面から抜けて、Instrument control workspace に戻ります。Activity queue に作成した Method が追加されていることをご確認ください。

Instrument control Activity history Methods Runs	
Activity queue Activity queue Image: the second s	vell.

⑪ Upper:ホテルラックの上段にプレートをセットする。

Lower:ホテルラックの下段にプレートをセットする。

- 18 Browse ボタンを押して結果データ名の入力および保存場所を指定する。
- 19 Ready to start ボタンを押して測定開始する。

 \downarrow

pH Scouting 終了後、装置は Standby flow 状態になります。今回の結果ファイルは Runs に 格納されています。

測定結果の確認

Biacore 8K Evaluation Software \rightarrow 1. Select runs から先ほど実行したデータを選択します。

 \downarrow

2. Select evaluation method \rightarrow **Predefined** \rightarrow **Surface preparation** \rightarrow **pH scouting**

Create new evaluation Open existing evaluation									
1. Select runs 2. Select evaluation method									
User defined Predefined									
Empty methods	Name	Description							
🖆 Surface preparation	pH scouting - Evaluation method	Evaluation of ligand pre-concentration in immobilization buffers with different pH.							
Assay development									
🕶 🖆 Binding screen									
Fragment / LMW									
Antibody / general									
🕶 🖆 Kinetics / affinity									
Fragment / LMW									
🖨 Antibody/general									

濃縮効果が得られている、至適条件を確認します。(補足4-1参照)

詳細は Biacore Assay Handbook をご覧ください。

補足4-1. pH scoutingの評価

濃縮レベルは、添加開始直後の溶液効果によるベースライン低下位置から、添加終了直前の レスポンスの高さで評価します。

濃縮効果が確認できる、もっとも高い pH を固定化条件として採用することが望ましいです。

下の結果では、pH4 がもっとも濃縮効果が高いですが、pH が低いほど活性型 NHS 基とアミノ 基とのカップリング効率は低下します(活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5 で す)。また、タンパク質の安定性は、一般的に中性に近い程安定です。pH を変化させても、濃 縮効果(添加時の傾き)に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましいで す。上記結果では、濃縮量が妥当であれば pH5 を選択します。

なお、pH Scouting における濃縮レベル以上の固定化は困難です。

(例えば、ターゲットの固定化量が 10000 RU で、1 分当たりの濃縮量が 100 RU の場合、固定 化時にリガンドの添加時間を 7 分に設定した場合、想定される濃縮量は多くても 700 RU で、 ターゲット量を確保することはできません。)

確認した濃縮レベル(RU/min)から想定される固定化量より多くの固定化量を望む場合は、 リガンドへの影響がなければより低pHを採用するか、リガンド濃度を上げて(例50~100 µg/ml 等)、再度 pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認してください。

低 pH 条件で、センサーチップ表面にリガンドが吸着する条件は、リガンドが酸変性している 可能性があるため使用はおすすめできません。



4-2. アミンカップリング法:リガンドの固定化(Immobilization)

固定化の実行

ランニング緩衝液に HBS 系 Buffer や PBS 系 Buffer を用意します。アミン系 Buffer である、Tris や Glycine は使用できません。(固定化後はアミン系 Buffer を利用しても構いません)

Biacore 8K Control Software \rightarrow Methods $\not > \vec{ ?} \rightarrow$ Surface preparation \rightarrow Immobilization



Instrument control Activity history Methods	Runs						
Immobilization 😣 🖸 Open 💿 New	(8)						
Immobilization	ethod definition 2. Positioning and plate layout	Send to queue					
Chip type CMS	Sample compartmen	temperature 25 °C					Enter custom mode
(2)	Flow cell temperature	25 °C					
Amine 🛞							
📔 🛛 Add step 🗸							
							/
Immobilize in Flow cell 1	🔴 Wash	3					
Flow cell 1		9					
Flow cell 2 Flow cell 2	EDC+NHS	Ligand	nolamine				
Fc 1 and 2 in series	Contact time 420 s						
Fc 2, activate/deactivate in 1	Flow rate 10 µl/min						
	Mix solution with						
(F)							
⊘ All ⊘ Channel S	Channel 2	Channel 3	Channel 4	Channel 5	Channel 6	Channel 7	Channel 8
Flow cell 1 ligand name							
Flow cell 2 ligand name							
Copy editing to all channels							
Add molecular weights							
1							

① デフォルトでは CM5 が選択されている。別のチップだと推奨固定化方法が変更される。 (変更不要)

② デフォルトの固定化方法として Amine が選択されている。Add step から CM5 を用いたその他の固定化方法のテンプレートを呼び出すことができる。(変更不要)

③ Ligand のタブを選択し、添加時間や流速を確認。EDC+NHS や Ethanolamine の添加時間や 流速は変更不可。(変更する際は画面右上の Custom mode ボタンをクリック)

Mix solution with:リガンドを固定化緩衝液で添加直前に希釈する。リガンドが酸条件で 変性し易い場合などに使用。

④ Flow cell 1/2:どちらか一方のフローセルのみ固定化。

Fc1 and 2 in series:両方のフローセルに同じリガンドを固定化。

Fc2, activate/deactivate in 1:Fc2 のみリガンドを固定化、Fc1 は活性化後、リガンドは添加されずエタノールアミンでブロッキングされる。

⑤ 固定化しない Channel はチェックを外す。

⑥ リガンド名を入力。

 ⑦ 全て同じリガンドを固定化する場合は Copy editing to all channels にチェックを入れると 編集が便利になる。

⑧ タブ 2. Positioning and plate layout で確認し、プレートに試薬をセットしたら、Send to queue から固定化開始する。固定化終了後、装置は Standby mode になる。

補足 4-2. 固定化量の調節

過去の いくつかの Biacore システムでは可能だった固定化量を自動調節する方法 Aim for immobilized level は Biacore 8K では対応しておりません。8 チャネルは全て同じ動作を行う ため、固定化するサンプルの濃度や pH や添加時間を変えて対応します。または新しく追加 された Immobilization low levels のテンプレートも使用できます。追加されたこのテンプレ ートでは NHS:EDC=8:2 に混合比率を変えて活性エステルの割合を少なく、添加時間を短く することで基本プロトコールによる固定化量よりも低固定化量に抑えることができます。

測定結果の確認

Biacore 8K Control Software \rightarrow Runs タブ \rightarrow 先ほどの固定化データを選択します。

→ Sensorgrams ボタンで今回の測定データを表示します。



→ Results ボタンで今回の数値データを確認できます。

Instrument control	Activity hist	tory Meth	ods Runs						
mmobilization 1 11/1/2016 1:59:23 PM 🛞 🕑 Open									
mmobilization 1 11/1/2016 1:59:23 PM Results Sensorgram Run properties									
Immobilization result Chip CMS									
Date	Channel≜	Flow Cell≜	Chemistry	Method	Ligand	Response Bound (RU)	Response Final (RU)	Molecular Weight	
11/1/2016 1:59:32 PM	1	1	Amine custom	Immobilization 1	Activation/Deactivation				
11/1/2016 1:59:32 PM	1	2	Amine custom	Immobilization 1	Ligand 1	7255.4	7183.0		
11/1/2016 1:59:32 PM	2	1	Amine custom	Immobilization 1	Activation/Deactivation				
11/1/2016 1:59:32 PM	2	2	Amine custom	Immobilization 1	Ligand 1	6814.7	6811.5		
11/1/2016 1:59:32 PM	3	1	Amine custom	Immobilization 1	Activation/Deactivation				
11/1/2016 1:59:32 PM	3	2	Amine custom	Immobilization 1	Ligand 1	6728.8	6709.4		
11/1/2016 1:59:32 PM	4	1	Amine custom	Immobilization 1	Activation/Deactivation				
11/1/2016 1:59:32 PM	4	2	Amine custom	Immobilization 1	Ligand 1	7100.5	7093.1		

→ Run propaties で今回の測定情報を確認できます。

Instrument contro	Activity history	Methods	Runs		
Immobilization 1 11/1	/2016 1:59:23 PM Ӿ	Open			
Immobilization	1 11/1/2016 1:5	9:23 PM	Results	Sensorgram	Run properties
Run name	Immobilization 1 11/1	/2016 1:59:23	PM O	Open in Eva	luation Software
Run state	Ready	,2010 105120	(9)	opennicia	
Start date	11/1/2016 1:59:32 PM	1			
Stop date	11/1/2016 2:32:23 PM	1			
Instrument id	15016				
Chip name	11/1/2016 1:34:29 PM	1		View	chip info
Method	Immobilization 1		(10	Oper	n method

⑨ Open in Evaluation Software ボタンでこのまま解析ソフトを選択可能(Biacore 8K Evaluation
 Software を開いて Run データを選択しても良い)。

この Run データの Method を確認可能。

補足 4-3. 固定化量の確認

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

Bound リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差

Final NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差

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 より小さくなります。また、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ります。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してください。

<u>4-3. 2D Kinetics を用いた相互作用測定</u>

相互作用の測定方法としては、再生条件が決まっていれば Multi-cycle kinetics/affinity を利用で きる他、再生条件が不明、あるいは存在しない場合は Single-cycle kinetics や 2D kinetics を利 用できます。ここでは、Biacore 8K に新たに追加された機能である 2D kinetics を例にご説明し ます。

Biacore 8K Control Software \rightarrow Methods $\mathfrak{P}\mathcal{I} \rightarrow$ New \rightarrow Kinetics/Affinity

ightarrow Antibody / general ightarrow Kinetics / affinity ightarrow 2D kinetics

Instrument control Activity history	Nuns	
20 kinetics 😒 🙆 Open 🖨 New	(4)	
Method Builder	1. Method definition 2. Variables and positioning 3. Cycle overniew 4. Flate layout 🕓 Send to queue	
Data collection rate 10 V Hz	Sample compartment temperature ① set to fued Concentration unit	
Startup 🛞 Analysis	Add step ~	
Name Analysis Purpose Analysis v	Flow cell temperature 👔 🤨 🕕 Repeat within	
Flow cell 1 Single cycle kinetics 1 Flow cell 2	Ø Adt command ♥	
Property Variable Value solution Ø Contact time 120 s Dissociation time 300 s Flow rate 30 s Molecular weight	How path @ both flow cells IP redip User defined variables Immo 0 flow cell 2 Immo Type Remove Immo 0 flow cell 2 Immo Type Remove	

① Analysis を選択。

 Contact time と Dissociation time を適宜変更。Flow rate はデフォルト 30ul/min で多くの場 合変更不要。

③ Concentration per cycle を適宜変更。

④ 設定後、次のタブ(2. Variables and positioning)を選択。



⑤ Add cycle で Startup の回数を増やす。(デフォルト 1 回)推奨: 3-10 回程度。

 \downarrow

Ins	trument control	Activity histor	y Methods Run	5											
2D k	netics 🙁 🖸 🤇	Dpen O New													
Me	hod Builde	er	1. Method d	efinition 2. Variables a	nd positioning 3, Cycle	overview 4. Plate layou	Send to queue								
Use	channels 🕑 1	Ø2Ø3Ø4	₽5 ₽6 ₽7 ₽8						i Re	agent bottle, empt	у				^ \$
_									Name	Plate 1		Name	Plate 2		
	tartup	Analysis							Type	96 well 280 µl	~	Туре	96 well 280 µl	~	
									12 C	00000	00	12 (000000	0	
N	Single cycle Solution	kinetics 1 Control	Concentration 1 (nM)	Concentration 2 (nM)	Concentration 3 (nM)	Import from	0		11 C 10 C 9 C 8 C		00	11 (10 (9 (8 (0000	
	Sample 1		0	0	0	ile file		g				7 () 6 ()		000	
	Sample 1 Sample 1	\sim	6	0	0	-			4 0			40			
	Sample 1 Sample 1	\sim	•	0	0	Add cycle	(7)		2 C 1 C			2 (1 (Õ	
	Sample 1	\sim	0	0	0	Remove cycle			A	BCDEF	GH	A	BCDEFG	н	
	Sample 1	\sim	0	0	0	Remove all cycles			Name	Plate 3		Name	Plate 4		
ā	Sample 1	\sim	0.17	0.34	0.69				Туре	96 well 280 µl	~	Туре	96 well 280 µl	~	
	Sample 1		0.51	1.03	2.06				12 C	00000	00	12 (000000	0	
	Sample 1		1.54	3.09	6.17	Move 1 V step			11 0	000000	ÕÕ	11 (0000000	Õ	
	Sample 1		8	9.26	18.5	O Move up			10 (10 (
	Sample 1		41.7	27.8	55.0	O Move down			8 0	000000	ŏŏ	80	0000000	ŏ	
	Sample 1		125	250	500				70	00000	00	70		0	
	Sample 1 Sample 1	\checkmark	375	750	1500	Show more columns			6 C 5 C 2 C			6 C 5 C 4 C 2 C		000000	
I									10	000000	00	10	0000000	0	Ψ

⑥ 差し引き用の0濃度のデータ。(デフォルト1回)

Add cycle で⑥、⑧の回数を増やす。⑥推奨 2 回以上、⑧適宜。

8 アナライトの濃度シリーズ。デフォルトではチャネル内で2倍公比、チャネル間で3倍
 公比。

⑨ サンプルのポジションをクリック&ドラッグで変更可能。(図は1枚のプレートにまとめた後のもの)

 \downarrow

以降はこれまでと同様、タブ 3. Cycle overview を選択し全体の流れを確認します。

続いてタブ 4. Plate layout を選択しプレートにサンプルをセットしたら、Send to queue から測 定開始して下さい。測定終了後、装置は自動的に standby mode になります。

<u>4-4.2D Kinetics の解析</u>

Biacore 8K Evaluation Software → Create new evaluation タブ → Run データを選択

注) Biacore 8K Control Software で Runs タブから該当のデータを選び、Run propaties \rightarrow Open in Evaluation Software でも同様のことができます。

Create new evaluation	Open exis	ting evaluation									
1. Select runs 2. Select evaluation method											
Search	۲	Select runs from multiple folders	ow 20	✓ items 1-12 of 12	< First 1 Last						
🕶 🖆 Root		Name	Status	Date modified 🛛 🔻	Modified by						
APAC training 15	Nov2016pmc	Regeneration scouting 6/21/2016 12:19:11 PM	Ready	6/21/2016 1:00:29 PM	DESKTOP-S39390D\Biacore						
📑 Demo data		Clean screen (large) 2016-06-03	Failed	6/3/2016 5:00:07 AM	DESKTOP-S39390D\Biacore						
🖬 Training		Affinity Screen Analogues 2016-05-04	Ready	5/4/2016 9:31:50 AM	Resource other z8salab						
		Affinity screen 2016-04-27 17:39:29	Ready	4/27/2016 10:04:59 AM	Resource other z8salab						
		BLS (small) 2016-04-24	Ready	4/24/2016 11:10:41 AM	Resource other z8salab						
		Clean Screen (small) 2016-04-24	Ready	4/24/2016 10:29:23 AM	Resource other z8salab						
		BLS (large) 20160316	Ready	3/16/2016 3:14:26 PM	Resource other z8salab						
		Fragment screen GX	Ready	2/16/2016 11:01:51 AM	Resource other z8salab						
		BLS software exercise	Ready	2/16/2016 10:12:53 AM	Resource other z8salab						
		Kinetic screen large	Ready	1/28/2016 11:46:14 AM	Resource other z8salab						
		Kinetics 2D	Aborted	1/26/2016 8:47:05 AM	Resource other z8salab						
		Kinetics serial and parallel	Ready	12/14/2015 9:54:49 AM	administrator						

 \downarrow

次に、解析方法を選びます。Control Software のテンプレートから作成された Method ならば、 それらに対応した解析方法が Predefined にあらかじめ入っています。

Predefined \rightarrow Kinetics/affinity \rightarrow Antibody/general \rightarrow 2D Kinetics を選択します。

Create new evaluation (Open existing evaluation									
1. Select runs 2. Select evaluation	1. Select runs 2. Select evaluation method									
User defined Predefined										
Empty methods	Name	Description								
Surface preparation	Kinetic screen - Evaluation method	Evaluation of an antigen binding kinetics to various captured antibodies. Provides information on which antibody species to prioritize for further analysis.								
🖆 Assay development	Parallel kinetics using capture - Evaluation method	Evaluation of parallel kinetics for protein samples binding to captured ligand, to calculate kinetic rate constants. Sample has been diluted with one concentration per channel.								
🕶 🖆 Binding screen	2D kinetics using capture - Evaluation method	Evaluation of 2D kinetics for protein samples binding to captured ligand, to calculate kinetic rate constants. Sample has been diluted in a two-dimensional matrix.								
Fragment / LMW	Single-cycle kinetics - Evaluation method	Evaluation of single-cycle kinetics for protein samples, to calculate kinetic rate constants.								
🖆 Antibody / general	Multi-cycle kinetics - Evaluation method	Evaluation of multi-cycle kinetics for protein samples, to calculate kinetic rate constants.								
▼	Multi-cycle affinity - Evaluation method	Evaluation of multi-cycle affinity for protein samples, to calculate equilibrium dissociation constant.								
Fragment / LMW	Parallel kinetics - Evaluation method	Evaluation of parallel kinetics for protein samples, to calculate kinetic rate constants. Sample has been diluted with one concentration per channel.								
Antibody / general	2D kinetics - Evaluation method	Evaluation of 2D kinetics for protein samples, to calculate kinetic rate constants. Sample has been diluted in a two-dimensional matrix.								
	Single-cycle kinetics using capture - Evaluation method	Evaluation of single-cycle kinetics for protein samples binding to captured ligand, to calculate kinetic rate constants.								
	Multi-cycle kinetics using capture - Evaluation method	Evaluation of multi-cycle kinetics for protein samples binding to captured ligand, to calculate kinetic rate constants.								
	Multi-cycle affinity using capture - Evaluation method	Evaluation of multi-cycle affinity for protein samples binding to captured ligand, to calculate equilibrium dissociation constant.								

 \downarrow

データの QC タブでの取捨選択、Evaluation タブでの解析セッティング変更、解析結果ファイルの保存、エクスポートなどを行ってください。

解析画面の見方については本書「3-4. 解析項目の詳細設定」をご覧下さい。



5. キャプチャー法のワークフロー

ここでは、リガンドタンパク質をキャプチャー法でキャプチャーし、アナライトとの相互作 用を行い、解析するまでの一連の流れを追っていきます。それぞれのステップの詳細につい ては、前章の「3. 各ステップの操作方法」をご覧下さい。

以下では、2種類のビオチン標識済みタンパク質(リガンド)に対して、それぞれ8種類の抗 原タンパク質(アナライト)との kinetics 解析を実施する例をご紹介します。リガンドをキャ プチャーする方法はいくつかありますが、ここでは弊社の Biotin CAPture Kit, Series S (Code: 28920234)を利用した方法をご案内します。

5-1. リガンドのキャプチャー量の条件検討



Biotin CAPture Kit, Series S の instruction に従い、Series S Sensor Chip CAP の Fc1 および Fc2 に Biotin CAPture Reagent を添加しハイブリダイズさせます。その後、適切なリガンド量をキャ プチャーするために、キャプチャーされる MoAb の濃度や添加時間の条件の検討を行います。 その際、Kinetics / affinity 用のテンプレートを改変すると便利です。

Instrument control workspace \rightarrow Add activity \rightarrow New Method

あるいは Instrument control workspace → Methods タブ

- $\rightarrow\,$ New $\rightarrow\,$ Antibody / general $\rightarrow\,$ Kinetics / affinity using Biotin CAP
- ightarrow Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit

Emple cycle kinetics using Bioth CAPture kit (*) Method Builder I. Method definition I. Method definition Conditioning Startup Flow cell temperature Conditioning Flow cell Conditioning Conditioning Conditioning Conditioning Conditioning Conditioni				
Method Builder 1. Method definition 2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate layout Concentration unit Wight Conditioning Startup Analysis Flow cell Contentration Repeat within Purpose Analysis Flow cell Contraction Property Variables and positioning Conditioning Conditioning <td>Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit 😣 🥥 Open 🗗</td> <td>New</td> <td></td> <td></td>	Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit 😣 🥥 Open 🗗	New		
Data collection rate 10 v Hz Sample compartment temperature e vary with flow cell temperature Running buffer Buffer Conditioning Stortup Andlysis Flow cell 1 General 1 Flow cell 2 Capture 1 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 1 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 2 Flow cell 2 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 2 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 1 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 2 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 3 Flow cell 4 Flow cell 5 Flow cell 6 Flow cell 7 Flow cell 8 Flow cell 9 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 2 Fl	Method Builder	efinition 2. Variables and positioning 3. Cycle overview	4. Plate layout Send to queue	₽ ₽
Vary with flow cell temperature Running buffer Buffer Conditioning Startup Startup Analysis Flow cell temperature 25 °C Repeat within Purpose Analysis Flow cell 1 Sequence of the seq	Data collection rate 10 V Hz	Sample compartment temperature 🔘 set to fixed	(1) Concentration unit	µg/ml 🗸
Conditioning Startup Startup Analysis Add step Conditioning Startup Analysis Flow cell temperature 25 °C Repeat within Purpose Analysis Flow cell General 1 Sequent 1		vary with flow	cell temperature Running buffer	Buffer
Name Analysis Purpose Analysis Flow cell temperature 25 °C Repeat within Repeat within Flow cell 1 Flow cell 1 Flow cell 1 Flow cell 2 Flow cell 2 Flow cell 1 Contact time Image: Contact	Conditioning 🛞 Startup 🛞 Analysis	X Add step V		
Purpose Analysis Flow cell 1 General 1 General 1 Regeneration 1 Flow cell 2 Capture 1 Capture 1 Flow path both flow cells Predip Solution Image: Capture 1 Solution Image: Capture 1 Flow rate Image: Capture 1 Image: Capture 1 Image: Capture 1	Name Analysis	Flow cell temperature 25 °C	Repeat within	
Flow cell 1 General 1 General 1 Flow cell 2 Capture 1 Capture 1 Flow path both flow cells Property Variable Variable Variable Flow path both flow cell 1 Contact time Image: Co	Purpose Analysis V			
Flow cell 1 General 1 Regeneration 1 Flow cell 2 Property Variable Variable Variable Flow path bath flow cell 1 Contact time Image: Contact time <td< td=""><td>3 4</td><td></td><td></td><td></td></td<>	3 4			
Flow cell 2 Capture 1 (Registration of the contraction of the cell o	Flow cell 1 General 1 🛞	Regeneration 1 🛞 🕒 Wash 1 🛞		
Property Variable Value Flow path both flow cells Predip Solution flow cell 1 contact time flow cell 2 Flow rate 10 µl/min Concentration Molecular weight 	Flow cell 2		Add command 🗸	
Solution Image: Contact time Contact time Image: Concentration Concentration Image: Concentration Molecular weight Image: Concentration	Property Variable Value	Flow path 🔘 both flow cells	Predip	
Contact time Image: Contact time Flow rate Image:	Solution 🕑	flow cell 1		
Flow rate 10 µl/min Concentration I Molecular weight	Contact time 🕜	Ilow cell 2		
Concentration Molecular weight	Flow rate 10 µl/min			
	Molecular weight			

- ① Concentration Unit を ug/mL に (適宜) 変更する。
- ② Conditioning step は特に変更なし。Startup, Analysis step について後述の編集を行う。
- ③ Capture 1 command について、以下のように(適宜)変更する。

Propaty	Startup	Analysis		
Solution	Variable	Variable		
Contact time	60s	Variable		
Concentration	Variable	Variable		

④ Startup step における Analyte 1 command、Analysis step における Single cycle kinetics 1 command を削除する。

その他の step や command については変更の必要はありません。

Cor	nditioning Sta	rtup	Analysis			C	Condi	itioning	Startup	Analysis			
No	Capture 1 Solution	Control	Concentration (µg/ml)	Import from	٠	No	c s	Capture 1 Solution	Conti	ol Concentration (µg/ml)	Contact time		🔅 Import from
1 5 2	Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 2 Biotinylated ligand 2 Biotinylated ligand 2 Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 1 Biotinylated ligand 2 Biotinylated ligand 2 Biotinylated ligand 2 Biotinylated ligand 2 Biotinylated ligand 2	< < < < < < < < < < < < < < < < < < <	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Image: big board Image: big board		1		Biotinylated ligar Biotinylated ligar	nd 1	1 1 <td< th=""><th>60</th><th>*</th><th>iii iii clipboard iiii clipboard iiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii</th></td<>	60	*	iii iii clipboard iiii clipboard iiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii
						5		Biotinylated ligar Biotinylated ligar	nd 1) 5] 5	50	-	

タブ 2. Variables and positioning で Startup や Analysis について、以下のように変更します。

⑤ Channel 1-4 → Biotinylated ligand 1、Channel 5-8 → Biotinylated ligand 2 と設定。
⑥ 濃度、添加時間を適宜入力。図では 1,5 ug/mL および 30,60sec の濃度と添加時間の設定 とした。

⑥はキャプチャー量やキャプチャー後の安定性に合わせて適宜変更して下さい。以降はこれ までと同様に、タブ 3. Cycle overview、4. Plate layout、Send to queue へ進めて下さい。

↓

 \downarrow

測定後は直接 Control software から適切なキャプチャー量が得られる条件を吟味するか、 Evaluation software から確認して下さい。

 \downarrow

5-2. Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit での相互作用測定

続いて、決定したキャプチャー条件を元に、Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit にて相 互作用測定します。

Instrument control workspace \rightarrow Add activity \rightarrow New Method あるいは Instrument control workspace \rightarrow Methods タブ

→ New → Antibody / general → Kinetics / affinity using Biotin CAPture → Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit

前項「5-1. リガンドのキャプチャー量の条件検討」の①、②は同様に設定します。③は決定 したキャプチャー条件を入力します。

④は削除せず残します。Startup step の Analyte 1 command は変更しません。Analysis step の Single cycle kinetics 1 command は 300sec に(適宜)変更します。Concentrations per cycle は Single-cycle kinetics の連続添加回数の設定です。デフォルトでは 5 と設定されています。適切 な KD が不明な場合は 9 などに設定し、広い範囲のアナライト濃度のデータを取得して下さ い。

1. Method definition の設定が終われば、2. Variables and positioning に進みます。

 \downarrow

Startup の cycle 数は 3 回以上とします。Analysis step は必ず 0 濃度を測定します。

M	etho	d Builde	r	1. Me	thod definitio	n 2. Variables a	nd positioning 3. Cycle	e overview 4. Plate laye	out Send to q	ueue							
U	se cha	nnels 🕑 1 🖲	₽2₽3₽40	₫5 ፼6 ፼7	8										Reagent bottle, empty		٥
_	-		Ctart in												Name Plate 1	Name Plate 2	
	Coni	itioning	Stortup	Analy											Type 96 well 280 µl 🗸 🗸	Type 95 well 280 µl	~
															12 0 0 0 0 0 0 0 0	1200000000	
	_		<u></u>	_								_		-	11 0000000	1100000000	
		Single cycle k	kinetics 1											*		100000000	
	No	Solution	Control	Concentration :	1 (nM) Conc	centration 2 (nM)	Concentration 3 (nM)	Concentration 4 (nM)	Concentration 5 (nM)	Concentration 6 (nM)	Concentration 7 (nM)	Col	Import from				
	1	Sample 1	\leq		0	0	0	0	0	0	0	Â	🖡 file		700000000	70000000	•
		Sample 2			0	0	0	0	0	0	0		Mik cliphoard		60000000	60000000	
		Sample 3		~	0	0	0	0	0	0	0		California		400000000	40000000	
		Sample 4		(7)	0	0	0	0	0	0	0				300000000	30000000	•
		Sample 1		\mathbf{U}	0	0	0	0	0	0	0		Add cycle		20000000	20000000	
		Sample 2			0	0	0	0	0	0	0		O Deserve and to				
		Sample 3			0	0	0	0	0	0	0		C Remove cycle				
		Sample 4			0	0	0	0	0	0	0		😣 Remove all cycles		Name Plate 3	Name Plate 4	
	2	Sample 1			0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	5.2	6.4				Type 96 well 280 µl 🗸	Type 96 well 280 µl	~
		Sample 2			0.1	0.3	0.9	2.7	8.1	24.3	72.9				12 0000000	120000000	
		Sample 3			0.1	0.4	1.6	6.4	25.6	102.4	409.6		Move 1 V step		11 0 0 0 0 0 0 0 0	1100000000	5
		Sample 4		(8)	0.1	0.5	2.5	12.5	62.5	312.5	1562.5		O Move up			1000000000	
		Sample 1		<u> </u>	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4		A Moun down			:000000000	
		Sample 2			0.1	0.5	0.9	2.7	8.1	24.5	72.9		0		700000000	100000000	5
		Sample 3			0.1	0.4	1.6	6.4	25.6	102.4	409.6				60000000	60000000	
		Sample 4			0.1	0.5	2.5	12.5	62.5	312.5	1562.5		Show more columns				
	3	Sample 5			0	0	0	0	0	0	0				30000000	30000000	
		Sample 6			0	0	0	0	0	0	0					20000000	
		sample 7			U	0	0	0	0	0	0						
		Sample 8			U	0	0	0	0	0	0						
		sample 5			0	0	0	0	0	0	0						
		Sample 6			0	0	0	0	0	0	0	-					

- Analysis step は必ず 0 濃度を測定する。
- ⑧ Single cycle 法では Concentration 1 から順に高濃度のサンプルをセットする。

因みに、最低濃度を 0.1 nM と設定した時、2,3,4,5 倍公比で 9 点の濃度条件を作製すると、そ れぞれの最高濃度は 25.6, 656.1, 6553.6, 39062.5 nM となります。KD 値が不明で至適なアナラ イトの濃度が設定できない場合に参考にして下さい。

以降はこれまでと同様に、3. Cycle overview、4. Plate layout、Send to queue と進んで下さい。 測定終了後、装置は自動的に standby mode になります。

<u>4-4. Single-cycle kinetics using Biotin CAPture kit の解析</u>

Biacore 8K Evaluation Software → **Create new evaluation** タブ → Run データを選択

注) Biacore 8K Control Software で Runs タブから該当のデータを選び、Run propaties \rightarrow Open in Evaluation Software でも同様のことができます。

 $\textbf{Predefined} \ \rightarrow \ \textbf{Kinetics/affinity} \ \rightarrow \ \textbf{Antibody/general}$

 \rightarrow Single-cycle kinetics using capture

データの QC タブでの取捨選択、Evaluation タブでの解析セッティング変更、解析結果ファイルの保存、エクスポートなどを行ってください。

解析画面の見方については本書「3-4. 解析項目の詳細設定」をご覧下さい。

6. 抗体のスクリーニングのワークフロー

ここでは、細胞培養上清などのクルードなサンプル溶液中に含まれるマウスモノクローナル 抗体(mouse MoAb)をセンサーチップ上でキャプチャーし、単一濃度のアナライトとの相互 作用を行い、解析するまでの一連の流れを追っていきます。それぞれのステップの詳細につ いては、前章の「3. 各ステップの操作方法」をご覧下さい。

以下では、16 種類のハイブリドーマ細胞培養上清中の mouse MoAb(リガンド)に対して、特定の濃度の抗原タンパク質(アナライト)との相互作用測定を行い、スクリーニング解析を実施する例をご紹介します。リガンドをキャプチャーする方法として、ここでは弊社の Mouse Antibody Capture Kit, type 2(Code: 29215281)を利用した方法をご案内します。なお、 Mouse Antibody Capture Kit, type 2 は Mouse Antibody Capture Kit(Code: BR100838)と同様の製品ですが、 試薬の量が多いため、Biacore 8K に向いたパッケージです。

6-1. リガンドの準備

以降の操作で用いる細胞培養上清は、あらかじめ遠心分離やフィルトレーションにより細胞 を除去する必要があります。

測定時は、細胞培養上清中に含まれる抗体の濃度にも依存しますが、ランニング緩衝液のみ、 もしくは終濃度 1 mg/mL 程度となる濃度で調整した NSB Reducer (Code: BR100691)を混ぜた ランニング緩衝液にて 3 倍程度に希釈した細胞培養上清を使用します。(ハイブリドーマ培養 上清中の抗体濃度は 0.01 ~ 0.5 mg/ml 程度です。) NSB Reducer はデキストラン断片のため、 Series S Sensor Chip CM5 表面のカルボキシメチルデキストランに非特異的に結合する成分を 吸着します。

<u>6-2. Antibody screen での相</u>互作用測定

Mouse Antibody Capture Kit, type 2 の instruction に従い、Series S Sensor Chip CM5 などにアミン カップリング法にて抗マウス抗体を固定化した後で、以降の操作を行います。ここでは、全 Channel の Fc1 および Fc2 に抗マウス抗体をアミンカップリングした状態から以降の操作を 行います。

抗原の濃度は分子量や抗体との親和力に依存して変わります。十分なレスポンスが見られる 濃度で測定して下さい。 Instrument control workspace \rightarrow Add activity \rightarrow New Method

あるいは Instrument control workspace \rightarrow Methods タブ

 $\rightarrow\,$ New $\rightarrow\,$ Binding screen $\rightarrow\,$ Antibody / general $\rightarrow\,$ Antibody screen

Analysis step の Capture 1 command にて、Contact time を 1-3 min 程度から適宜変 更して下さい。



① Capture 1 solution として細胞培養上清を表記する。

以降はこれまでと同様に、3. Cycle overview、4. Plate layout、Send to queue と進んで下さい。 測定終了後、装置は自動的に **standby mode** になります。

↓

6-3. Antibody screen の解析

Biacore 8K Evaluation Software → Create new evaluation タブ → Run データを選択 注) Biacore 8K Control Software で Runs タブから該当のデータを選び、Run propaties → Open in Evaluation Software でも同様のことができます。

 $\textbf{Predefined} \ \rightarrow \ \textbf{Binding screen} \ \rightarrow \ \textbf{Antibody/general} \ \rightarrow \ \textbf{Antibody screen}$

データの QC タブでの取捨選択、Evaluation タブでの解析セッティング変更、解析結果ファイルの保存、エクスポートなどを行ってください。

解析画面の見方については本書「3-4. 解析項目の詳細設定」をご覧下さい。

7. FBDD のワークフロー

ここでは、Biacore における典型的な FBDD のワークフローを通して測定・解析するまでの一 連の流れを追っていきます。それぞれのステップの詳細については、前章の「3. 各ステップ の操作方法」をご覧下さい。

典型的な FBDD のワークフローは以下の図をご参照下さい。



7-1. Clean screen

Sticky な結合をするフラグメントを排除することを目的としたスクリーニングです。センサ ーチップ上のリガンドに対し、一濃度の複数のアナライト(フラグメント)とのスクリーニ ングを実施します。Baseline のレポートポイントで評価します。既に Fc2 にリガンドを固定化 済みのセンサーチップにおける方法をご紹介します。

Instrument control workspace \rightarrow Add activity \rightarrow New Method

あるいは Instrument control workspace \rightarrow Methods タブ

 $\rightarrow\,$ New $\rightarrow\,$ Binding screen $\rightarrow\,$ Fragment / LMW $\rightarrow\,$ Fragment clean screen

以下、Startup から順に、各 Step の Command の内容を確認していきます。

Startup 🛞	Analysis 🛞	Add step 🗸
-----------	------------	------------

<u>Startup</u>

Flow cell 1	Analyte 1	※ [<u></u>	Add command 🗸
Flow cell 2			
Property	Variable	Value	
Solution		Buffer	
Contact time		10	S
Dissociation tim	ie 🗌	0	S
Flow rate		30	µl/min
Concentration			
Molecular weigh	nt 🗆		

特に変更の必要はありません。

Analysis

Flow cell 1	Analyte 1	8 [<u>*</u>	Add command 🗸
Flow cell 2			
Property	Variable	Value	
Solution			
Contact time		10	S
Dissociation tim	e 🗌	0	S
Flow rate		30	µl/min
Concentration			
Molecular weigh	it 🗆		

こちらも特に変更の必要はありません。

解析

Biacore 8K Evaluation Software \rightarrow Create new evaluation タブ \rightarrow Run データを選択

注) Biacore 8K Control Software で Runs タブから該当のデータを選び、Run propaties \rightarrow Open in Evaluation Software でも同様のことができます。

Predefined \rightarrow Binding screen \rightarrow Fragment / LMW \rightarrow Fragment clean screen

%	Biacore [™] 8K Evaluation	Soft	ware					User Re	source bio	assay_tc JP				(?) HELF	P 🗸
Creat	te new evaluation Open existing evaluati	on Ev	valuation	- Clean screen (lar	ge) 2016-06-03 🔛										
QC - Se	ensorgram active 🔽 QC - Sensorgram refere	nce 🗸	QC - Bo	seline 🖌 🛛 Evalu	ation - Baseline difference	Home									
✓ Se	ettings	RU						10-							\$
>	> Data grouping: All together (1)		112	:::::		the set of a		<u>8</u>							8
s	> Injection assignment	50- [0]						* 7.5-							*
orgrai	> Axis settings	Sifference				Sen	sorgram type	54 5-							11, 17 16 34
senso	> Adjustments	aseline d			• • • • •	Ad Ad	ctive eference								(%)
elect	> Boundaries: Manual	-50-	:	· · · ·	· · · :	:		2.5 -							
Š	> Color by		<u> </u>	500 1000	1500 2000 2	2500 2000		0-							
			0	Run, C	hannel, Cycle, Curve	2300 3000			1	2 3 4	5	6 7	8	9 10	
		Cycle	Channel	Sensorgram type	Analysis step purpose	Analysis step name	Excluded	Curve markers	Analyte 1 Solution	Baseline difference (RU)	Cut-off				\$
		1	1	Active	Analysis	Clean screen		None	1	-0.3914	Below	*			Ŷ
		2	1	Active	Analysis	Clean screen		None	9	-0.5999	Below				
		3	1	Active	Analysis	Clean screen		None	17	-0.5400	Below				
	BB Three has the	4	1	Active	Analysis	Clean screen		None	25	-0.7246	Below				
	Thumbnails	5	1	Active	Analysis	Clean screen		None	33	-0.7341	Below				
	🔛 Plot	6	1	Active	Analysis	Clean screen		None	41	-0.7561	Below				
	🔼 Sensorgrams	7	1	Active	Analysis	Clean screen		None	49	-0.7644	Below				
	Table	8	1	Active	Analysis	Clean screen		None	57	-0.7655	Below				

Evaluation – Baseline difference:

解析画面上では既にアナライトを添加し終わった後のベースラインの高さの差を縦軸にした時のデータが表示されています。また、Active cell と Reference cell のそれぞれのデータが色分

けされており、デフォルトでは 5RU のレスポンスの cut-off が引かれています。 適宜 cut-off の 値を変更し、フラグメントをスクリーニングして下さい。(Table の Work space からご確認頂 くと便利です)

7-2. Binding level screen

標的リガンドに対して Primary hit となるフラグメントを同定することを目的としたスクリー ニングです。センサーチップ上のリガンドもしくはデキストランに対し、一濃度の複数のア ナライト (フラグメント) とのスクリーニングを実施します。センサーグラムの形状から、デ キストランと非特異的な結合をせず、リガンドと特異的に結合する有望なフラグメントを選 別します。

Fc2 には既にリガンドを固定化済みのセンサーチップにおける方法をご紹介します。

Instrument control workspace \rightarrow Add activity \rightarrow New Method

あるいは Instrument control workspace \rightarrow Methods タブ

 $\rightarrow\,$ New $\rightarrow\,$ Binding screen $\rightarrow\,$ Fragment / LMW $\rightarrow\,$ Fragment binding level screen 2

Fragment binding level screen 1 では添加されるフラグメントサンプルとコントロールサンプル が同じ step で実施されます。Fragment binding level screen 2 ではそれらの step が分かれてい ます。コントロールサンプルはリガンドの活性を検証するために何回かに 1 回ずつ測定する ことを推奨しています(デフォルトでは Negative control なら 16 cycles 毎、Positive control な ら 24 cycles 毎)。Fragment binding screen 1 では、Method Builder の「2. Variables and positioning」 において、それらのサイクル毎に自分で入力する必要があります。測定するフラグメント数 がそこまで多くない場合や、コントロールサンプルを用意できない場合は Fragment binding screen 1 でも構いませんが、それ以外の場合は Fragment binding screen 2 の方が便利です。

Method Builder	1. Method definition 2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate layout Send to que	NF 🔛 🔛
Data collection rate 1 V Hz	Sample compariment temperature set to fixed 25 °C vary with flow cell temperature	Concentration unit: µH v Running buffer Buffer
Startup 🛞 Samples	Solvent correction ⊗ Negative control ⊗ Positive control ⊗ // nrt/twy /4 golestart Im // nrt/twy /16 golestart Im Add step ✓	
Name Startup	Flow cell temperature 25 °C	C Repeat within
Purpose Startup 🗸		
Flow cell 1 Analyte 1 🛞	Wash 1 🛞	
Flow cell 2		
Property Variable Value	Type High performance 🗸	Predip User defined variables
Solution 🔲 Buffer	Flow path	Mix Name Type Remove
Contact time 30	s O flow cell 1	Add variable
Flow rate 30	pl/min	
Concentration		
Molecular weight		

以下、Startup から順に、各 Step の Command の内容を確認していきます。

	Startup	×	Samples	×	Solvent correction First/Every 48 cycles/Last	×	Negative control First/Every 16 cycles/Last	×	Positive control First/Every 24 cycles/Last	×	Add step 🗸
F		_									

<u>Startup</u>

Flow cell 1) Analyte 1	※	🔵 Wash 1	×	Flow cell 1	Analyte 1	×	• Wash 1	8
ow cell 2					Flow cell 2				
erty	Variable	Value			This command	washes all parts	of the flo	ow system, except	t the sen
ition		Buffer			Property	Variable	Value		
ontact time		30) S		Solution		50% DI	MSO	
sociation time		15	j s						
w rate		30) µl/min						
ncentration									
olecular weight									

Analyte 1:

特に変更の必要はありません。

Wash 1:

Solution としてデフォルトで 50% DMSO が表記されています。この Wash 1 の Solution はセン サーチップのフローセル上は流れず、流路のみを洗浄する Command となっています。Samples の Step 内にも同様の Command がありますが、同じ内容です。

Samples

Flow cell 1 Flow cell 2	Analyte 1	8 [Nash 1	(X)
Property	Variable	Value		
Solution	V			
Contact time		30	s	
Dissociation time	e 🗌	15	s	
Flow rate		30	µl/min	
Concentration				
Molecular weigh	t 🗹			

Analyte 1:

特に変更の必要はありません。分子量を記入すると、解析時に分子量での補正が可能になります。

🗷 Repeat within	Samples	~	every	48 🜲	cycles
			distribute		
			🕑 Run once first 🕑 Run onc		🕑 Run once last

Solvent correction / Negative control / Positive control 共通の設定

それぞれ、Samples の step に紐付いた step になっています。

every:

デフォルト設定では、サンプルが 48 / 16 / 24 cycles 毎にそれぞれ Solvent correction / Negative control / Positive control の cycle が挟まれるようになっています。

Run once first / Run once last:

チェックを入れると、Samples の step が始まる直前と終わる直後に実施されます。

🕑 Repeat within	Samples	~	every			
			ø distribute	3 🗢 occurences evenly		

distribute:

例えば Samples の cycle 数が 40 あった時、図のように 3 に設定すれば、40 cycles 中に 3 回の step が均等な cycle 数毎に挟まれるようになります。

Solvent correction



Solvent correction 1:

溶媒補正用の溶液をセットします。Number of solutions per cycle で Solvent correction 中に測定 する溶液の数を指定します。デフォルト設定では4回で、特に変更の必要はありません。

Negative control

Flow cell 1	Analyte 1	※	🔵 Wash 1	×
Flow cell 2				
Property	Variable	Value		
Solution	\checkmark			
Contact time		30	s	
Dissociation time	e 🗌	15	s	
Flow rate		30	µl/min	
Concentration				
Molecular weigh	t 🗹			

Analyte 1:

特に変更の必要はありません。分子量を入力すると、解析時に分子量補正が可能になります。

Positive control

Flow cell 1	Analyte 1	8 []	🔵 Wash 1	×
Flow cell 2				
Property	Variable	Value		
Solution				
Contact time		60	s	
Dissociation tin	ne 🗌	300	s	
Flow rate		30	µl/min	
Concentration				
Molecular weig	ht 🕑			

Analyte 1:

ここでも分子量を入力すると分子量補正ができるようになります。添加時間、解離時間は適 宜変更します。Positive control は他のサンプルと比較して親和力が強いことが予想されますの で、解離相においてリガンドから解離するまで十分な時間を取って下さい。

以降はこれまでと同様に、3. Cycle overview、4. Plate layout、Send to queue と進んで下さい。 測定終了後、装置は自動的に standby mode になります。

 \downarrow

 \downarrow

解析

Biacore 8K Evaluation Software → **Create new evaluation** タブ → Run データを選択

注) Biacore 8K Control Software で Runs タブから該当のデータを選び、Run propaties \rightarrow Open in Evaluation Software でも同様のことができます。

Predefined \rightarrow Binding screen \rightarrow Fragment / LMW \rightarrow Fragment binding level screen

Fragment binding level screen を選択すると、自動で Solvent correction workspace が開き、3 つの panel が表示されます。



Solvent correction:



① それぞれの Solvent correction cycle のデータが表示されている。エアーの添加などの理由 で解析から削除したい溶媒補正曲線がある場合、Included のチェックを外すと、該当の溶媒補 正曲線が削除される。

② それぞれの Solvent correction cycle のデータがプロットされ、溶媒補正曲線が赤線表示されている。プロットと溶媒補正曲線が良好に重なっているか確認する。①の Chi² 値が 2 以下を目安とする。カーブの形状や傾きは、測定条件によって大きく異なるためクオリティーの基準にはならない。青線は各 channel でのリファレンスセルにおけるレスポンスのバルク幅(最大値と最小値)が表示されており、その値が溶媒補正曲線の範囲外にあるサンプルは、

③ Extrapolate に延長する幅を入力することで溶媒補正曲線を延長できる。サンプルもしく は溶媒補正用 DMSO 溶液の調製の問題で、測定サンプルのバルクレスポンスが溶媒補正用
DMSO 溶液の範囲内に収まらなかった場合に利用できる。ただし、延長された溶媒補正用曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため補正値の取扱には注意を要する。

④ ①でチェックを入れた溶媒補正曲線の元のデータが表示されている。

⑤ Apply and close で溶媒補正を実施する。以降の解析に、溶媒補正済みのデータも選択できるようになる。

Evaluation – Binding level:

解析画面上では既に Blank subtraction, Molecular weight adjustment, Capture/ligand adjustment, Adjustment for controls の補正が実施済み、また Binding behavior によって色分けされ済みの、 溶媒補正済みデータが表示されています。



既に解析済みの結果について、Settings の Adjustments について補足します。

Blank subtraction	同 channel 内で測定したブランク用データを差し引きます。 ブランク用
	データを選択後、Nearest, Average nearest, Preceding, Following から差し
	引く方法を選んで下さい。
Molecular weight adjustment	分子量 100Da あたりのレスポンスに換算して補正します。
Capture/ligand	サイクル間のリガンド量を補正します。 リガンド量 1000RU あたりのレ
adjustment	スポンスに換算して補正します。
Adjustment for	測定中に発生したポジティブコントロール、ネガティブコントロール
controls	のサンプルのレスポンスを Linear(y = ax + b)もしくは Polynomial(y =
	ax ² +bx+c)の式でフィッティングし、その補正式に沿ってポジティブ
	コントロールのレスポンスを 100%、ネガティブコントロールのレスポ
	ンスを 0%に換算して補正します。 ネガティブコントロールを指定しな
	い場合は、ネガティブコントロールのレスポンスは 0 として扱われま
	す。Polynomial の式を適用する際は少なくとも 4 点以上のコントロール

 \downarrow

続いて Settings の Boundaries について補足します。

Color by 中の Binding behavior marker について補足します。Plot panel、Sensorgram panel に今回の解析済みのデータが表示されています。



Plot panel では、補正済みのレポートポイント Analyte binding early_1 のレスポンスがプロット されています。中央まで色が付いているプロットデータは Analyte 1 Control type が Not a control と設定したサンプル、中抜けのプロットデータは Positive control や Negative control と設定し たサンプルです。

Binding behavior marker では、センサーグラムの形状に応じた色分けを行います。また、この 選別基準は Settings → Boundaries: Binding level screen → Binding level screen cut-off の Binding behavior sensitivity から変更可能です。

Slope	サンプル添加中に著しくレスポンスが上昇する場合を指	
	す。Slope は binding early(添加開始直後)と binding late(添	Slope
	加終了直前)から決定される。	
Slow diss	サンプル添加後に迅速にサンプルが解離しない場合を指	×
	す。Slow diss はベースラインと stability early(添加終了直	Slow diss
	後)から決定される。	
]
R > Rmax	レスポンスが理論的 Rmax を超過する場合を指す。サン	
	プル添加中の最も大きなレスポンスと理論的 Rmax から	Theoretical Rmax
	決定される。サンプルの分子量や固定化量の情報がない	R>Rmax
	と算出されないが、Chip information から編集できる。ま	
	た、このパラメータはリガンドがキャプチャーされてい	
	る場合は利用できない。	
Multiple	上記が複合する場合を指す。	

Response	実際のカットオフのレスポンス。
% above	カットオフ後に残ったサンプルの割合。
% total without binding behavior	カットオフ後に残ったサンプルであり、かつ slope、slow diss、R > Rmax な
	どの望ましくない挙動のないサンプルの割合。

Binding level screen cut-off では、以下の設定も変更できます。

7-3. Affinity screen

標的リガンドに対して Primary hit となったフラグメントについて Affinity 解析を行い、親和性 を測定することを目的としたスクリーニングです。センサーチップ上のリガンドに対し、濃 度条件を振ったアナライト(フラグメント)との測定を行います。よりリガンドと強く結合 するフラグメントを選別します。

Fc2 には既にリガンドを固定化済みのセンサーチップにおける方法をご紹介します。

Instrument control workspace \rightarrow Add activity \rightarrow New Method

あるいは Instrument control workspace \rightarrow Methods タブ

ightarrow New ightarrow Kinetics / affinity ightarrow Fragment / LMW ightarrow Fragment affinity screen

Method Builder 1. Method definition 2.	2. Variables and positioning 3. Cycle overview 4. Plate layout	Send to queue
Data collection rate 1 V Hz Sample o	compartment temperature € set to fixed 25 °C Con ○ vary with flow cell temperature Run	icentration unit µM V noing buffer Buffer
Startup Solvent correction 1 S Rmax control	Analysis Positive control Solvent control FirstEvery 12 gdest.azt Every 48 gd	norrection 2 🛞 Add step 🗸
Name Rimax control Flow cell Purpose Rimax control Flow cell Flow cell Addst	Itemperature 25 ℃ OF	Repeat within
How cell 2 Property Variable Value Ty Solution Rmax control File Constactione 60 s Dissociation time 180 s Flow rate 30 µl/min Concentration Ø	pe High performance V P P low path & both flow cells P flow cell 1 flow cell 2	Predip User defined variables Mix Name Type Remove C Add variable

以下、Startup から順に、各 Step の Command の内容を確認していきます。

	Startup	8	Solvent correction 1	×	Rmax control	8	A	Analysis (8	Positive control	8	Solvent correction 2 Every 48 cycles/Last	×	Add step 🗸
F							_		_		_			

<u>Startup</u>

特に変更の必要はありません。

Solvent correction 1

特に変更の必要はありません。

Rmax control

Flow cell 1	Analyte 1	8 [🔵 Wash 1	×	Add comman	d 🗸	
Flow cell 2						_	
Property	Variable	Value			Туре	High performance	~
Solution		Rmax cor	itrol		Flow path	both flow cells	
Contact time		60	S			flow cell 1	
Dissociation tim	ne 🗌	180	S			flow cell 2	
Flow rate		30	µl/min				
Concentration	\checkmark						
Molecular weigh	nt 🕑						

標的リガンドと結合する既知分子を高濃度かつ1濃度で添加することにより、アナライトの 最大結合量を決定するために実施されます。親和力が弱いアナライトの場合、信頼性の高い steady state affinity 解析の結果を得るために必要な高濃度のアナライトが用意できないこと がありますが、そのような場合にこの既知分子から得られた Rmax の値を用いて解析するこ とで信頼性を向上させることができます。

リガンドから既知分子が解離するまでの十分な Dissociation time を適宜設定して下さい。また、Molecular weight の値も忘れずに入力して下さい。

注意点:

Rmax control で用いる分子は、この後に出てくる Positive control と同じサンプルでも構いません。ただし、Rmax が得られるよう高濃度のサンプルをご用意下さい。

Analysis / Positive control / Solvent correction 2

先述の Binding level screen を参照して下さい。Positive control や Solvent correction 2 を何回お きに実施するかを適宜変更すること以外は、特に変更の必要はありません。

解析

Biacore 8K Evaluation Software → **Create new evaluation** タブ → Run データを選択

注) Biacore 8K Control Software で Runs タブから該当のデータを選び、Run propaties \rightarrow Open in Evaluation Software でも同様のことができます。

Predefined \rightarrow Kinetics / affinity \rightarrow Fragment / LMW \rightarrow Fragment affinity screen

Fragment affinity screen を選択すると、自動で Solvent correction workspace が開きますので、 Binding level screen の場合と同様に解析して下さい。



 \downarrow

Evaluation – Rmax control:

解析画面上では既に Rmax Controls の Step で測定したデータが表示されています。得られた レスポンスに妥当性があるかどうか確認して下さい。

表示されたデータがどの Report point を参照しているか確認する場合は以下を実行します。

Settings \rightarrow Axis settings \rightarrow y-axis \rightarrow Report point

なお、各 Report point の詳細は以下を参照します。

Home \rightarrow Settings and preparation \rightarrow Report points

Rmax control のサンプル情報として分子量を入力しているはずですが、もし未入力の場合は以

下の方法にて事前に入力して下さい。

Home \rightarrow Settings and preparation \rightarrow Variables

Evaluation – Affinity:

解析画面上では既に、各アナライトにおける、濃度に対するレスポンスのグラフが描かれて います。

0 濃度のデータを取得していれば、レスポンスは既に差し引きが行われたものが表示されて います。どの 0 濃度のデータが差し引きに用いられているか確認する場合は、以下を参照し て下さい。

Settings \rightarrow Blank settings

続いてフィッティングさせるアナライトサンプルとモデル式を選択します。複数のアナライトについて別々のモデル式を選択する場合、同じモデル式で解析するアナライトサンプルを、 Thumbnails から Ctrl+ 左クリックで選択し、順番に Fit models で異なるモデル式を選んで解 析します。

1 つのアナライトサンプルについて複数のモデル式で解析したい場合は、新たな Evaluation - Affinity の Tool を立ち上げる必要があります。Evaluation - Affinity の Tool の右の矢印(下図)を クリックし、Clone を選択して下さい。新しい Evaluation - Affinity clone1 にて、別のモデルを 選択して解析して下さい。



Settings \rightarrow Fit models

から、解析するモデル式を選択して下さい。

補足 7-1. Affinity 解析における Fit models について

Affinity 解析における Fit models では、Steady state affinity、Steady state affinity (constant Rmax)、 Steady state affinity (constant Rmax and multi-site)が選択できます。最も基本的な Steady state affinity の判断基準は以下のとおりです。

・測定で得られたプロットが解析で得られたカーブとよく重なっているかどうか

・得られた Rmax に妥当性があるかどうか

一方、低分子の測定では高濃度で収束しないプロット、あるいは収束しますが理論的 Rmax を 超過するようなプロットが見られることがあります。このようなプロットを Steady state affinity で解析すると、Rmax が正しく算出されず、結果として解離定数も正しく算出されません。

Rmax が収束しない理由として、次の要因が考えられます。

アナライトが結合サイトとは別の場所に非特異的に結合している可能性や、アナライトが高 濃度で アグリゲーションしている可能性があります。また、リガンド上に強い結合サイト とは別に、弱い結合サイトが存在している可能性があります。

結合サイトとは別の場所に非特異的に結合している場合やアナライトがアグリゲーションし ている場合は、ランニング緩衝液の組成を変更するなど、実験条件の見直しが必要です。良 好な条件が見つけられず、高濃度のデータが収束しない場合には Rmax control で既知分子の Rmax から算出した Rmax を用いて、低濃度のプロットだけで解析する Steady state affinity (constant Rmax)を用いることが出来ます。

また、結合サイトが 1 つ以上ある場合は、結合が強いサイトの解離定数をより良好に解析するために Steady state affinity (constant Rmax and multi-site)を用いることができます。

	 Fit models Perform fit [24]
	Settings apply to selected series
	Affinity fit model [24] Steady state affinity (constant Rmax) 🗸
1	Constant Rmax 10 RU per 100 Da
2	Adjust Rmax for ligand decay for all series Adjustments applied
	Settings apply to selected series
	Calculate response at position
3	6 s after injection start 🗸
	with window 5 🗸 s
	Reset range to defaults Apply range [24]

〕 Rmax control から得られた 100 Da あたりのレスポンスを入力する。あるいは、Rmax control

から得られたレスポンスと分子量をそのまま入力してもよい。

 1 Run 中に Positive control を複数回測定している場合は、Positive control のレスポンスの 傾向を近似した式で調整可能。

③ レスポンスの取得するタイミングを設定できる。Apply range ボタンで適用。

④ Perform fit で選択したモデル式で解析する。[数字]は適用される Thumbnails の数。

5. メンテナンス

システム内部に設置されているマイクロ流路系(IFC)は、消耗品であり、使用するサンプルの性状や使用頻度に応じて、耐久月数が異なります。より長くマイクロ流路系を使用するために、システム使用毎のメンテナンスの実施を推奨します。

システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラムに従って実行します。プログラム は Control Software → Instrument control workspace 画面の Maintenance Tools にあります。

メンテナンス時はメンテナンス用試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンド は破壊されてしまうので、必ず Sensor Chip Maintenance(もしくは使用済みセンサーチッ プ)を使用してください。

システム温度は、25℃に設定します。

メンテナンスコマンドの呼び出し

Instrument control workspace 画面の Maintenance Tool を選択します。

Instrument control Activity history Methods	Runs		
Activity queue	System setup tools	Maintenance tools	Method shortcuts
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	1
		Shutdown	,

 \downarrow

メンテナンスに必要な試薬

通常のメンテナンスに必要な試薬の一部は、Biacore Maintenance Kit, type 3 (29229054)に含まれています。また、別途 BIAdisinfectant solution は自作する必要があります。以下にも記載してございますが、詳細は弊社ホームページからご確認ください。

https://www.cytivalifesciences.co.jp/products/change/pdf/info_191108_discon_biacore_ maintenance_kit.pdf

内容物	組成	個別に購入する際の コード番号
BIAtest solution, 65 mL 1 本	15% (w/w) sucrose in HBS-EP buffer	29207949
BIAnormalizing solution (70%), 90 mL 1 本	70% (w/w) glycerol	29207950
Series S Maintenance chip 1 枚	Series S Maintenance chip	BR100562
BIAdesorb solution 1, 500 mL 2 本	0.5% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS)	BR100823 (500mL の BIAdesorb
BIAdesorb solution 2, 500 mL 2 本	50 mM glycine-NaOH, pH 9.5	solution 1 と 2 が 1 本 ずつのセット)

Biacore Maintenance Kit, type 3 (29229054)

BIAdesorb solution 1 は 4 Cで保存すると結晶が析出します。BIAdesorb solution 1 のみ室温で 保存してください(その他のキット内試薬は、4 Cで保存してください)。

Sensor Chip Maintenance は、金表面が導入されていないチップ表面のため、SPR シグナルは検出できません。埃などの汚れが付着しないように、キット中の専用の袋に入れるか、パラフィルムで巻いて保存してください。(ガラス基板に汚れが付着したまま使用すると、検出不調の原因となります。)

キット以外で準備が必要な試薬: Sodium hypochlorite solution (8%-15%)

以下のいずれかの製品を利用するのが便利です。十分な濃度の次亜塩素酸ナトリウムでない とシステムを滅菌できません。時間の経過とともに滅菌効果がなくなるため、各製品の品質 管理後 12 ヶ月以内のものを使用してください。

製品名	容量	製造	製品コード
Sodiumhypochlorite, 10–15%	250 mL	Sigma-Aldrich	425044
Sodiumhypochlorite, 10–15%	250 mL	Acros Organics	219255000
Sodiumhypochlorite, 10–15%	500 mL	Alfa Aesar	33369

更に、Desorb & Sanitize の際には上記の溶液を Sodium hypochlorite solution, 0.6-1.0% まで希釈 して用いる必要があります。希釈は以下の容量に従ってください。

Sodiumhypochlorite, 10–15%	27 mL
超純水	360 mL

Desorb solution 1 の組成は SDS ですが、SDS はカリウムやナトリウムを含む金属イオンで沈殿 します。そのため、ランニング緩衝液はこれらを含まない溶液(超純水を推奨します)に切り 替えた上でメンテナンスを実施してください。

5-1. システムの洗浄

5-1-1. Desorb

IFC およびオートサンプラーに付着したタンパク質を洗浄するプログラムです。

1 週間に 1 回必ず実施してください。実験内容の変更ごとに実施することを推奨します。な お、クルードサンプルや不溶性サンプルを使用時には、実験終了後に実施してください。所 要時間は、約 20 分です。Desorb solution 1 中の SDS が低温で析出するため測定温度および Sample compartment 温度は、20 ℃以上で実施してください。

試薬、消耗品

BIAdesorb solution 1 BIAdesorb solution 2 96 deep well マイクロプレート x1

<u>ランニング緩衝液</u>

Sensor Chip Maintenance に切り替えた上、**Desorb** 前に超純水で **Change solutions** を 実行してください。

概要

- BIAdesorb solution 1 および 2 を 96 deep well マイクロプレートに 880 ul ずつ 8 個の ウェルに分注し Desorb を実行
- 2 3-4 時間 Standby flow 状態にしておく

5-1-2. Desorb and Sanitize

すべてのフローシステムを滅菌および洗浄するプログラムです。

<u>1 ヶ月に 1 回、必ず実施してください</u>。所要時間は、約 1 時間です。測定温度および Sample compartment 温度は、20 ℃以上で実施してください。

試薬

BIAdesorb solution 1 BIAdesorb solution 2 BIAdisinfectant solution, 0.6-1.0% HEPES または Tris 緩衝液

ランニング緩衝液

Sensor Chip Maintenance に切り替えた上、**Desorb and Sanitize** 前に超純水で **Change** solutions を実行してください。

途中から HEPES または Tris 緩衝液を用います。

概要

- 1 BIAdesorb solution 1 に 3 本全てのチューブを浸け、送液
- 2 BIAdesorb solution 2 に 3 本全てのチューブを浸け、送液
- 3 BIAdisinfectant solution, 0.6-1.0% に 3 本全てのチューブを浸け、送液
- WATER チューブ、REAGENT チューブを超純水に浸け、BUFFER チューブは HEPES または Tris 緩衝液に浸け、送液
- 5 3-4 時間 standby flow 状態にしておく

5-1-3. System Check

装置の診断を行うプログラムです。このプログラムは Desorb and Sanitize による洗浄後に実行してください。シグナルのドリフトや、エアースパイクの混入が激しい場合等に実施します。使用頻度が高い場合、定期的に実行することを推奨します。所要時間は、約1時間です。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 3 BIAtest solution

ランニング緩衝液

<u>HBS-EP+ Buffer</u>(別途純正品をご用意ください。HBS-EP+10X; コード番号 BR100669) 超純水

必要な消耗品

新品の Series S Sensor Chip CM5(System Check 後、実験で使用できます) BIAtest solution

新品のセンサーチップ CM5 を Dock 後、HBS-EP+ Buffer で Change solution を実施します。

Maintenance Tools → System Check を選択し、画面の指示通りに進めてください。

System Check が終了したら、Biacore 8K Control software 上で Runs から該当のデータを開いて 下さい。System Check の項目が Pass しなかった場合は、該当の測定データをメールで弊社へ お送りください。

Biacore 8K Control Software \rightarrow Runs タブ \rightarrow 該当の測定データ \rightarrow 画面下部 Show additional columns ボタンを選択 \rightarrow Export

補足 5-1. System Check に使用した新品の Sensor Chip CM5 について

System Check に用いた Sensor Chip CM5 は、次回の System Check への使用は推奨しません。 表面状態が新品状態と異なる可能性があるため、System Check をパスしない恐れがあります。 チップ表面には HBS-EP+ Buffer と 15% sucrose が流れましたので、塩やショ糖の析出を防ぐ目 的で、表面を超純水で洗浄した後、ドライ状態で保存してできるだけ速やかに測定に用いて 下さい。

5-1-4. Normalize

センサーチップごとの微小な差に対して検出システムを補正します。装置に最良のパフォーマンスを求める場合はセンサーチップを取り替えるたびに実施します。BIAnormalizing solution は室温に戻してから使用してください。

試薬

BIAnormalizing solution 105 ul x 8 well

ランニング緩衝液

HBS-EP+

概要

1 BIAnormalizing solution を 105 ul ずつ全てのチャネルに添加し実行

5-1-5. Shutdown

3本全てのチューブを超純水、20%エタノールで洗浄後、ラインを空気に置換するコマンドで す。7日以上システムを使用する予定が無いときに実行します。所要時間は、約22分です。

ランニング緩衝液

超純水

20%エタノール溶液 200 mL 以上

概要

- 1 200 mL 以上の超純水が入ったボトルに 3 本全てのチューブを浸け、送液
- 2 200 mL 以上の 20 %エタノールが入ったボトルに 3 本全てのチューブを浸け、送液
- 3 全てのチューブを空気中に出し、**empty flow system** を実行
- 4 実行後、センサーチップが自動で Undock されるので取り出し、チップドアを閉める
- 5 3基のペリスタポンプの灰色および青色のクランプを緩める

(次回起動時には、全てのペリスタポンプのクランプを閉めるよう警告されます)

6 装置の電源を落とす

6. 実験の終了

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

6-1. 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。

BUFFER チューブ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、Instrument Status で確認できま す(スタンバイ状態の延長も可能です)。

スタンバイを終了する際には、Stop Standby を選択してください。

6-2. 電源の落とし方

電源を落とす前には、Desorb and Sanitize で洗浄を実行してください。

Instrument control workspace の Change chip を Activity queue に追加し **Undock** を選択します。

 \downarrow

センサーチップポートが開くので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。バッファーのままだと、塩が析出して流路が詰まります。

6-3. 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。

再度、装置にセットする際には、ガラス基板上に埃や粒子などが付着していないことを確認して Dock 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+等の緩衝液に浸し、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。下 図のように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。

プラスチックの部分および検出面

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。



■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 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

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

グローバルライフサイエンステクノロジーズ 掲載されている内容は 2019年4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。