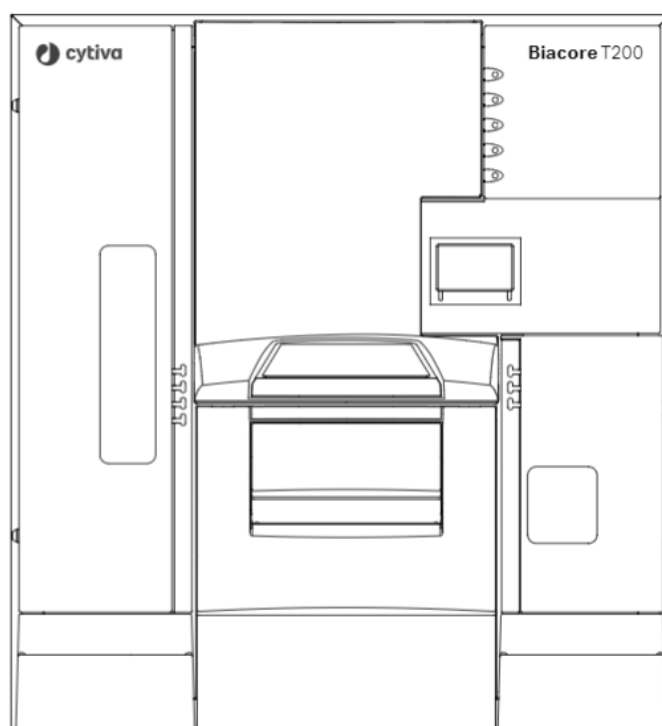


Biacore T200

アプリケーション別操作手順書

抗体編

Ver.202108



重要

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

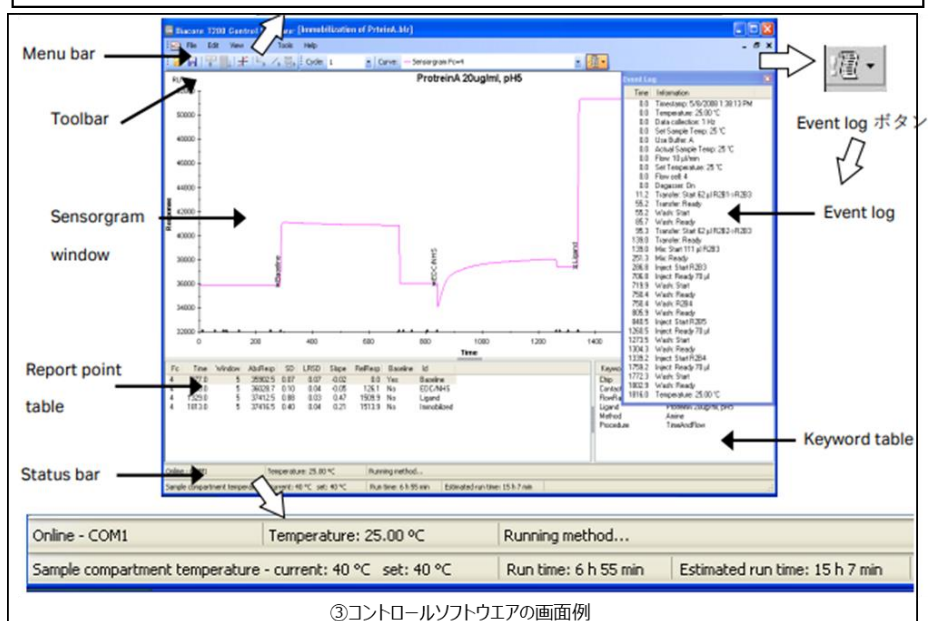
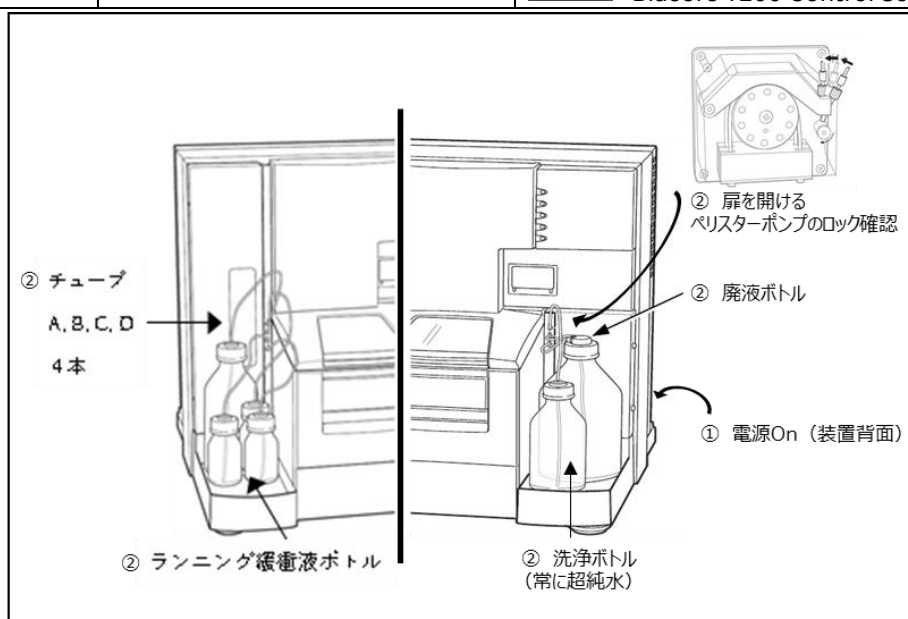
目次

1. 実験を始めるまえに	3
1-1. システムの起動	3
1-2. 測定前の基本操作・設定	4
2. 基本操作	5
2-1. サンプルラックの取り扱い	5
2-2. 3つの測定モード	6
3. 測定系のデザイン	7
3-1. 目的別の測定ワークフロー図	7
3-2. 典型的な目的別リガンド固定化法	7
3-3. 固定化法の大分類（直接法とキャプチャー法）	8
4. 抗体の目的別測定解析手順	8
4-1. センサーチップ CM5 への標的キャプチャー用抗体の固定化	8
4-2. 抗体のスクリーニング	9
5. メンテナンス・システムチェック・シャットダウン	30
5-1. メンテナンス	30
5-2. システムチェック	33
5-3. シャットダウン	35
6. 知っている と 得する TIPS	38

1. 実験を始めるまえに

1-1. システムの起動

手順	操作項目	注意点
①	電源 On	・システム本体→PC の順
②	バッファ類のセット	・A ラインが main inlet tube
③	コントロールソフトウェアの起動	 Biacore T200 Control Software



③コントロールソフトウェアの画面例

1-2. 測定前の基本操作・設定

手順	操作項目	注意点
①	センサーチップのドック	自動的にセンサーチップポートが開かない場合は、Toolbar のセンサーチップの絵のアイコンを押す。 
②	ランニングバッファによる prime	Menu bar の Tools → Prime からスタート
③	温度設定	Menu bar の Tools → Set Temperature...

① センサーチップのドックの手順

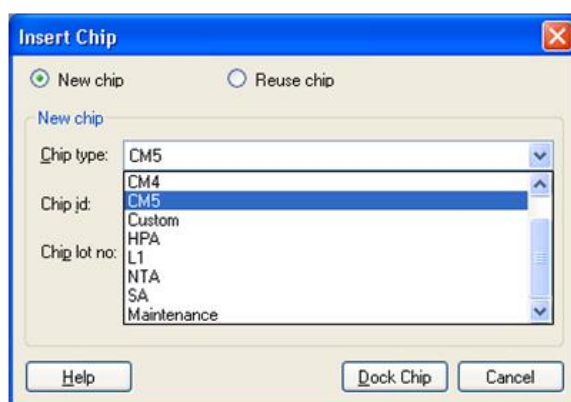
センサーチップポート



チップの矢印の向きに注意



手でポートのフタを閉める



☑ センサーチップの選択
☑ Dock Chipを押す

2. 基本操作

2-1. サンプルラックの取り扱い

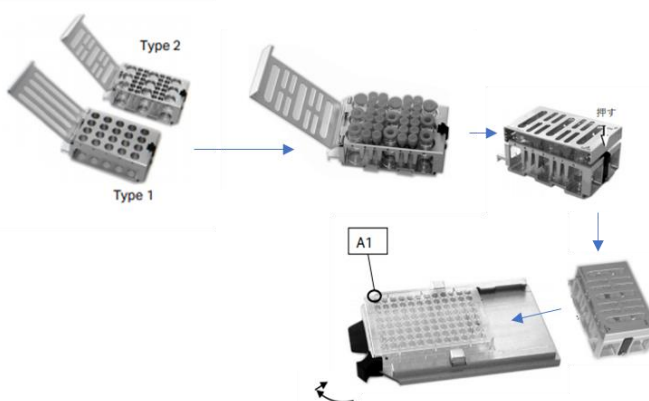
手順	操作項目	注意点
①	ラックトレイの出し入れ	・入れるときは“カチツ”と音が鳴るまで ・サンプルコンパートメントの扉は 60sec で自動的に閉まります。
②	対応バイアル	下図

① サンプルトレイの取り出し方

トレイ下部の円形の
ボタンを奥に押す



ロックが外れて引き
出せます



低分子測定でDMSO含有の溶液を使用する場合はポリプロピレン製のプレートが推奨されます。
下記の製品が良く使用されています。

Microplate 96-well, 650201, Greiner

Microplate 384-well, 781280, Greiner

Microplate 96-well (BR-1005-03) 専用シール：Microplate Foil (96 well) (28-9758-16)

Microplate 384-well (BR-1005-05) 専用シール：Microplate Foil (384 well) (BR-1005-77)

Rubber caps, type 3 BR-1005-02 	Rubber caps, type 2 BR-1004-11 	Rubber caps, type 5 BR-1006-55 
7 mm Plastic Vials BR-1002-12 	1.5 ml Plastic Vials BR-1002-87 	16 mm Glass Vials BR-1002-09 
		15 mm Plastic Vials BR-1006-54 

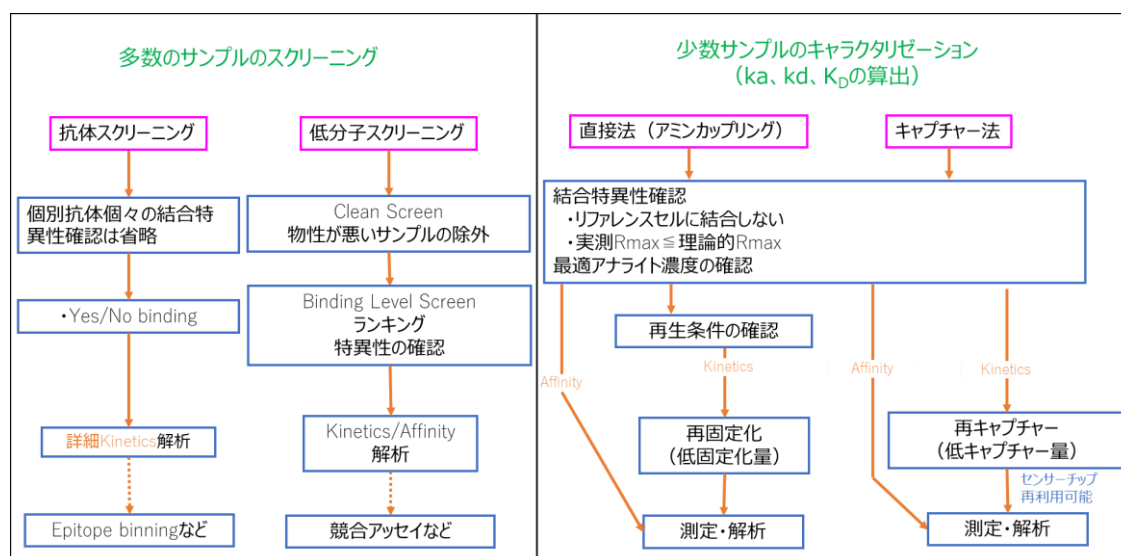
2-2.3 つの測定モード

測定モード	モード名称	特徴・用途
①	Manual run 	・1 インジェクションごとにマウス操作で行う ・サンプル消費量が少ないがラフなデータ ・ラフな条件検討用 ・低分子測定の場合は（レスポンスが小さいので）あまり使わない。 ・K_a、K_d、K_D 値などを解析ソフトウェアで解析できない。
②	Application Wizards 	・典型的な定型の測定系を Wizard テンプレート形式で作成する。 ・一般的に固定化にはこのモードを用いる。 ・以下本マニュアルでは Wizard と省略する。
③	Methods 	・一部の測定法やより複雑な測定に対して用いる ・テンプレートは存在する。 ・シングルサイクルカインेटクス法 ・複数の抗体の測定 ・フローセルを 4 つ使用した Kinetics 解析



3. 測定系のデザイン

3-1. 目的別の測定ワークフロー図



3-2. 典型的な目的別リガンド固定化法

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

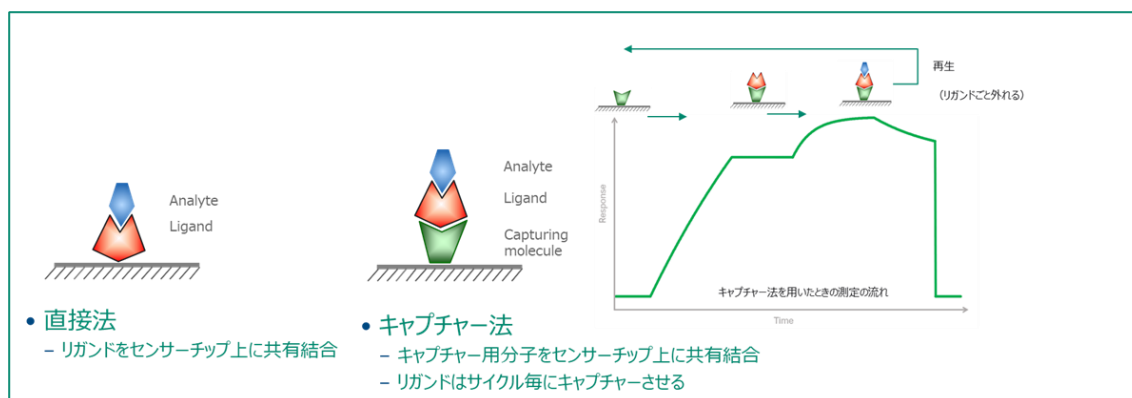
各種抗体 Capture kit の固定化⇒ **4-1 参照**

スクリーニング⇒ **4-2 参照**

各種抗体 Capture kit や Sensor Chip Protein A / Protein G を用いたキャラクタリゼーション⇒ **4-3 参照**

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

3-3. 固定化法の大分類（直接法とキャプチャー法）



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

4. 抗体の目的別測定解析手順

4-1. センサーチップ[®] CM5 への標的キャプチャー用抗体の固定化

A. 手順概略

手順	操作項目	参照
①	センサーチップの選択	
②	Wizard テンプレートを 用いた固定化	キャプチャー用抗体は使用するすべての Flow Cell に固定化します (使用するすべての Flow Cell をチェックする) 6-1 参照

B. 準備する試薬・サンプル

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

4-2. 抗体のスクリーニング

A. スクリーニング測定を始める前に

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

B. 準備する試薬・サンプル

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

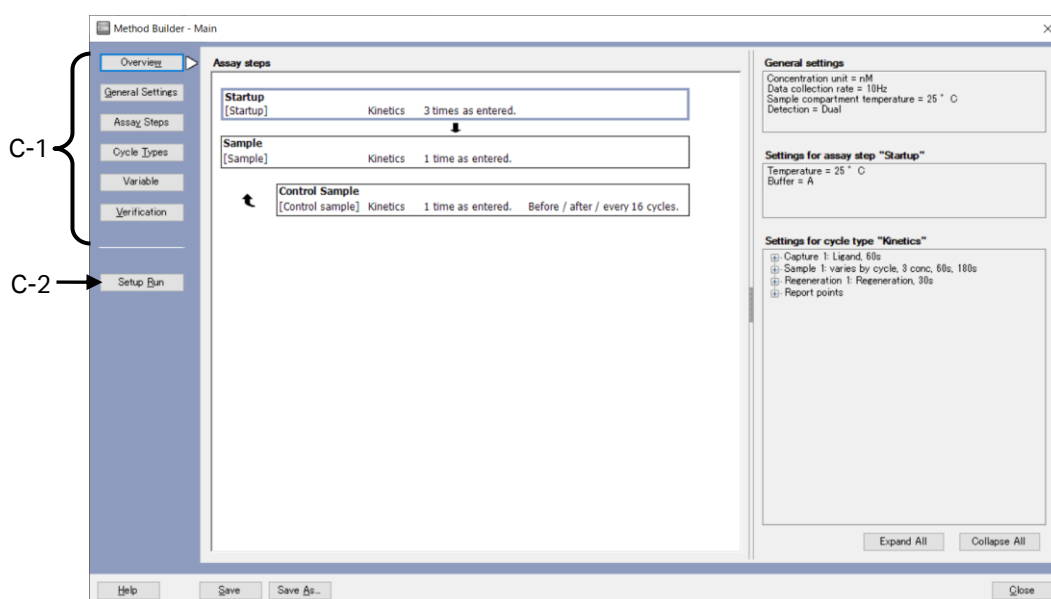
C. メソッドの作成



Methods→Biacore Methods→Kinetic Screen を選択

* 目的は Binding Screen です。Kinetic Screen をテンプレートに、編集する手順を示します。

C-1.	添加条件などの設定
C-2.	Setup Run: サンプル個別条件(Variables)の設定



C-1. 添加条件等の設定

ボタン	用途
Overview	メソッドの全体構成の確認
General Setting	•Data collection rate：スクリーニングは通常 1Hz •検出対象 Fc 数（single:1 つ、Dual：2 つ、Multi：4 つ）の設定 •温度設定 など
Assay Steps	•Assay Steps（測定フローチャートの目的別に定義された“箱”（Step））の並び順や繰り返しの設定 •各 Assay Step 内の添加条件を定義する Cycle Type の参照先の設定 など
Cycle Types	•サイクル内の添加条件パターン（Cycle Type）の設定
Variables	•各サンプル情報（サンプル名など）をメソッドの規定値にするか、Setup Run で run 毎に入力するかの設定。
Verification	•作成されたメソッドに動作上矛盾がないかを検証する。検証確認後 Setup Run の入力を始める。

ここでは Assay Steps（Control Sample 部）と Cycle Types（Sample 部）の代表的な設定条件を図で例示する。

Assay Steps

手順	操作項目	注意点・説明
①	Base Setting	Assay Step 名、測定目的、使用する Cycle Type の設定
②	Assay Step Preparations	測定温度、ランニング緩衝液の使用ライン
③	Recurrence	- 他の Assay Step の何サイクルおきにこの Assay Step を実行するか - 通常 Control Sample は定期的に測定する。
④	Number of replicates	- 繰り返し測定するか。その場合、どのような設定か。 - 通常 Startup は 3 回とする。

The screenshot shows the 'Method Builder - Main' window. On the left, a sidebar contains navigation buttons: Overview, General Settings, Assay Steps (selected), Cycle Types, Variable, Verification, and Setup Run. Below these are buttons for New, Delete, Copy, Move Up, Move Down, and Cycle Run List... The main area displays the 'Assay step properties' for a step named 'Control Sample'. The 'Base settings' section shows the Name as 'Control Sample', Purpose as 'Control sample', and Connect to cycle type as 'Kinetics'. The 'Assay step preparations' section shows Temperature as 25 and Buffer as 'A'. The 'Recurrence' section has 'Repeat assay step within' set to 'Sample', with 'Every 16 cycle' selected. The 'Number of replicates' section shows '1 times' and 'As entered (1,2,3,1,2,3)' selected. The bottom of the window has buttons for Help, Save, Save As..., and Close.

① Base settings

Name: Control Sample

Purpose: Control sample

Connect to cycle type: Kinetics

② Assay step preparations

Temperature: 25

Buffer: A

③ Recurrence

Repeat assay step within: Sample

Every 16 cycle

Distribute 1 occurrences evenly

Run assay step once first

Run assay step once last

④ Number of replicates

1 times

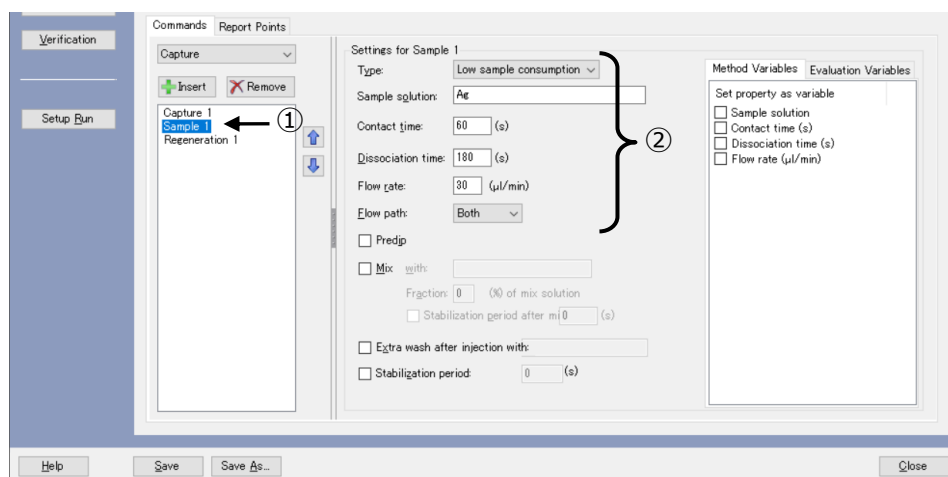
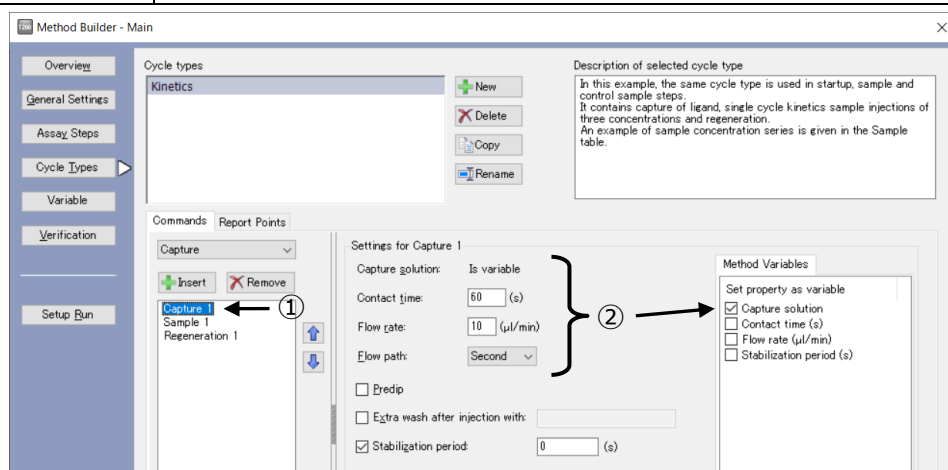
As entered (1,2,3,1,2,3)

Order (1,1,2,2,3,3)

Random

Cycle Types

手順	操作項目	注意点・説明
①	Commands	•この Cycle 内の添加コマンドの指定 •下図の場合、Capture（抗体）、Sample（抗原）、Regeneration（再生）から構成されている。
②	Setting	•Capture（抗体） Method variable の Solution をチェック（複数抗体の添加） Contact Time：60-180 秒／Flow rate：10 $\mu\text{L}/\text{min}$.／Flow Path：Second •Sample（抗原） Type：スクリーニング時は Low sample consumption Method variable の Solution をチェックを外し、抗原の名称を入力 Contact Time：60-120 秒／Dissociation time：120-180 秒／ Flow rate：通常 30 $\mu\text{L}/\text{min}$.／Flow Path：Both •Regeneration（再生溶液） 詳細は各種 Ab Capture kit または Sensor chip IFU 参照 ／Flow Path：Both



C-2. Setup Run: サンプル個別条件(Variables)の設定

Setup Run

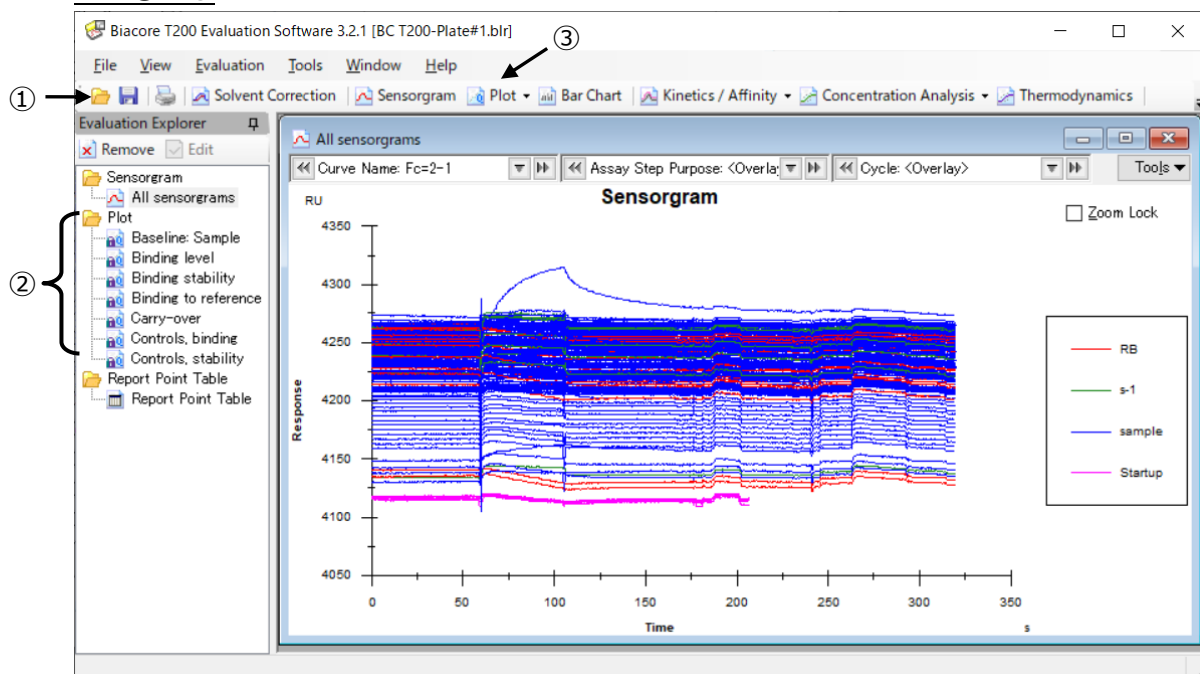
をクリック。

Wizard の設定名	設定時のポイント
Detection	リガンド固定化 Fc - リファレンス Fc
Variable values	画面上部の各 Assay Step ごとに入力
Cycle Overview	想定通りの順番でサイクルが並んでいるか確認
System Preparation	・すでに Prime 実行済みであれば✓を外す ・Normalize は通常行わない
Rack Positions	6-8 参照
Estimated buffer consumption	・十分な量のランニングバッファーがボトルにあることを確認する。(ランニングバッファーは、run 毎に調製) ・インレットチューブがボトルの底近くまで達していることを確認

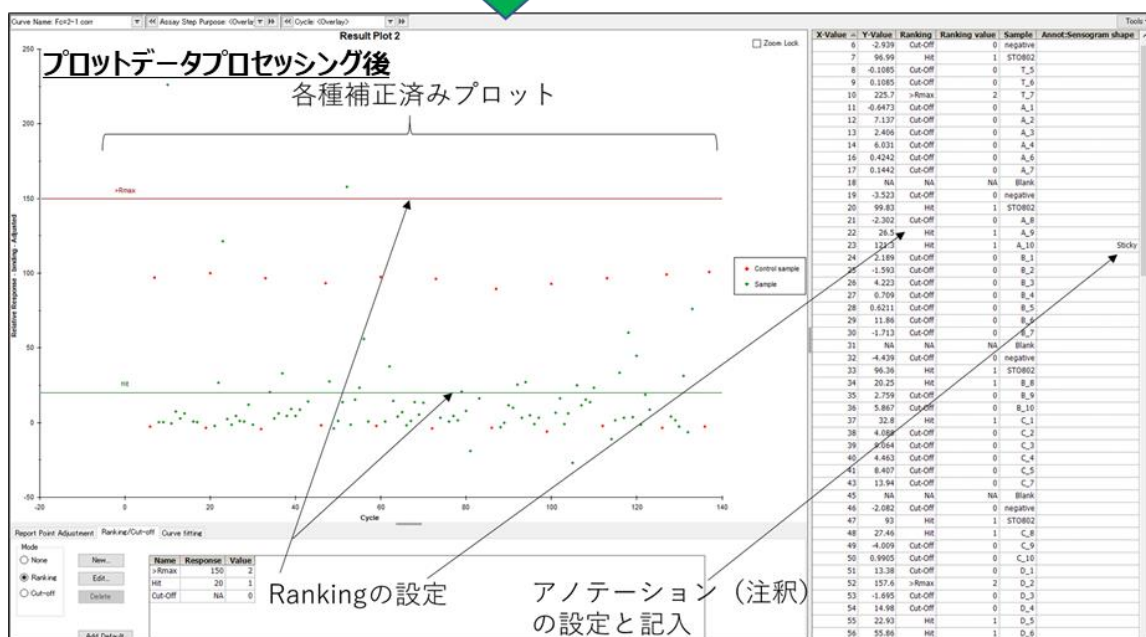
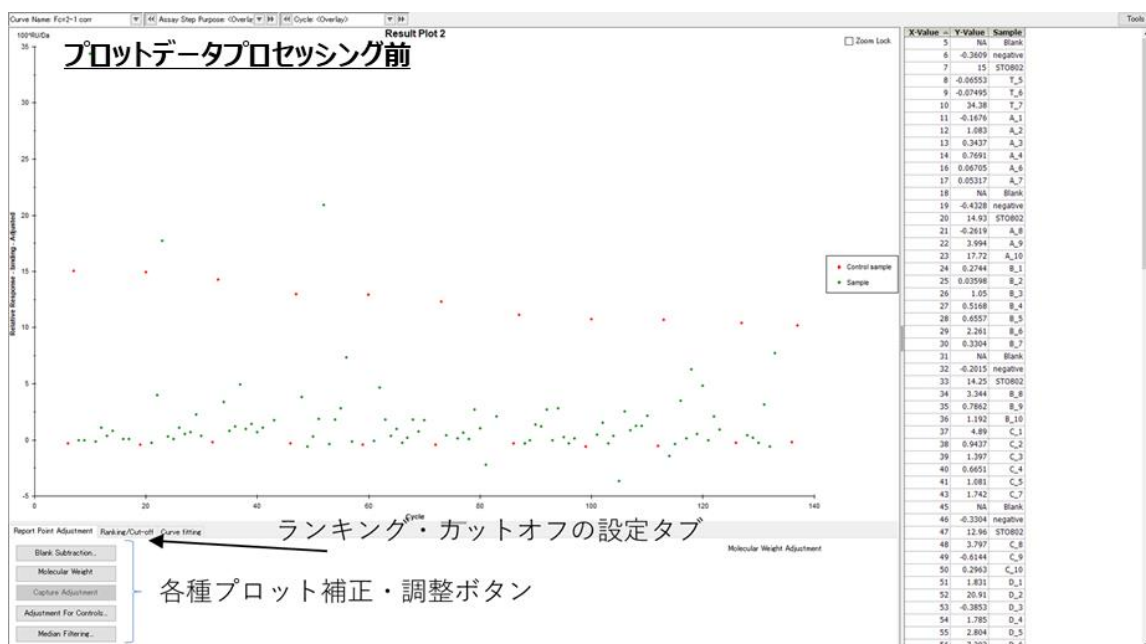
D. スクリーニングプロットのデータプロセッシングと解析

手順	操作項目	注意点・説明
①	解析ソフトで Run ファイルを開く	・解析ソフト Biacore T200 Evaluation software ・run 終了時、自動的に立ち上がる ・別日に解析の場合は.blr（結果ファイル）を Open
②	データ QC チェック	・④Result Plot で評価対象にしない異常サイクルを除外する。（右クリック→Exclude Cycle） ・例えば、Binding to reference が大きいものなど測定者の運用ポリシーに合致する基準を設定。 ・画面左側のデフォルトのプロットまたはカスタム QC プロットを利用
③	Result Plot の作成	・多くの場合“Stability”のレポートポイントデータ（例 Fc=2-1 など）を利用
④	Result Plot の補正・annotation（注釈）	・各プロットを公平に評価するための各種補正操作 ・Ranking: プロットのレスポンス高範囲別にフラグを立てる。 ・Cut-off: ネガティブコントロールの 3×SD が Automatic の初期設定。 ・プロットに対しての注釈の入力(プロット右上の Tool メニュー内 Edit Annotation から“注釈名”と対応する“コメント”を設定
⑤	結果のエクスポート	⑤のデータプロセッシングを経たデータ Table 等を Excel 形式でのエクスポート（メニューバーの File→Export）

手順①～③

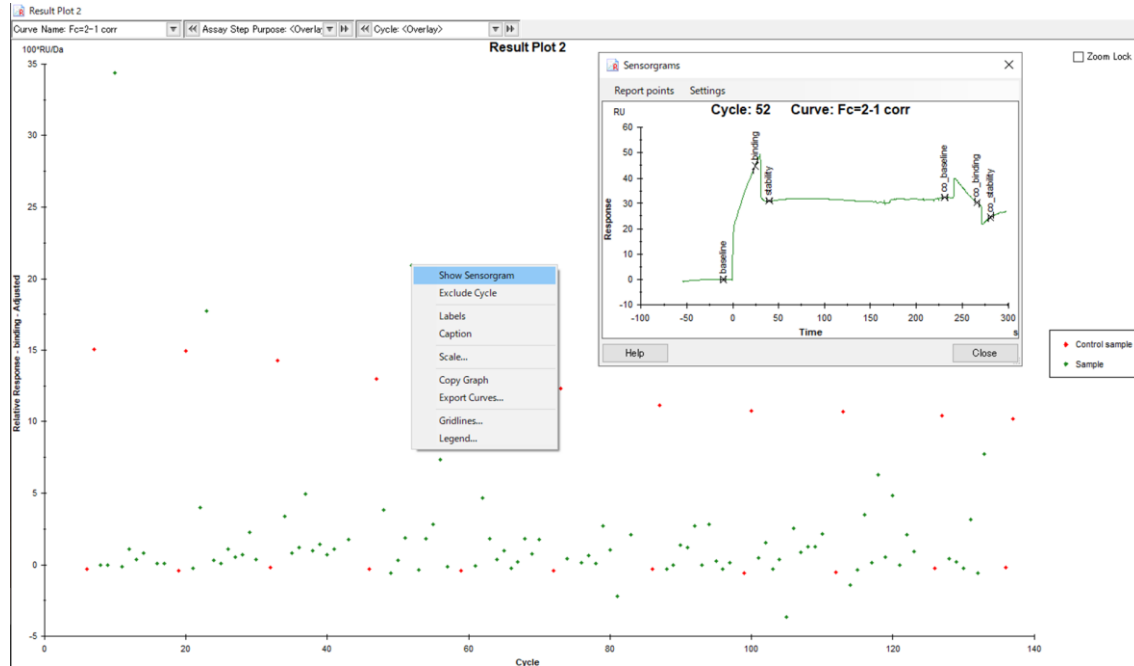


手順④データプロセッシング前後の違いおよび設定項目と補足図



各種補正ボタン・タブ	設定項目	説明
Blank Subtraction		ブランク（0 濃度）レスポンスの差し引き
	Blank sample name	ネガティブコントロール、または、サンプルのゼロ濃度（Sample Conc=0）から選択
	Subtraction settings	差し引き方法をプルダウンメニューから選択
Molecular Weight Adjustment	-	各プロットレスポンスを分子量でノーマライズ $100 \times \text{レスポンス (RU)} / \text{分子量 (Da)}$ プロットの Y 軸の単位：100 × RU / Da
Capture Adjustment		各プロットレスポンスをキャプチャー量でノーマライズ。抗体スクリーニングで良く使用される。 * 抗体スクリーニングでは抗原が同一のため通常実施しない。
Adjustment For Controls	Positive control	リガンドのサイクル（時間）経過後の結合活性の低下によるレスポンスの下降をノーマライズ 下記補足 Adjustment for controls 参照
	Negative control	下記補足 Negative control, Blank の違いと設定例参照
	Fitting function	Fitting 方法の選択 Linear: $Y = aX + b$ を適用 Polynomial: $Y = aX^2 + bX + c$ を適用
Median Filter (オプション)		プロットのベースラインのトレンドにドリフトや周期性がある場合に適用 結合分子と非結合分子を見分けやすくなる。 非結合分子のプロットレスポンス変動範囲（Y 軸方向）を定義し、任意に設定された X 軸 Window 内のレスポンスの中央値を Window 内の Plot 高から差し引く計算を行う。
Ranking/Cut-off		
	Ranking	複数の Threshold を設定。各ランキングに属するデータを返す。右 Table 中に Ranking Value を表示
	Cut-Off	単一の Threshold を設定。各ランキングを属するデータを返す。右 Table 中に above/below cut-off を表示
Annotation		
	Add Annotation	Annotation(注釈)のタイトルを入力
	Add Comment	Annotation で定義したタイトルの中でのコメントを定義する

補足：プロットの右クリックからセンサーグラム形状の確認



補足：Negative control, Blank の違いと設定例

Negative control: 特異的結合が無いと想定される化合物

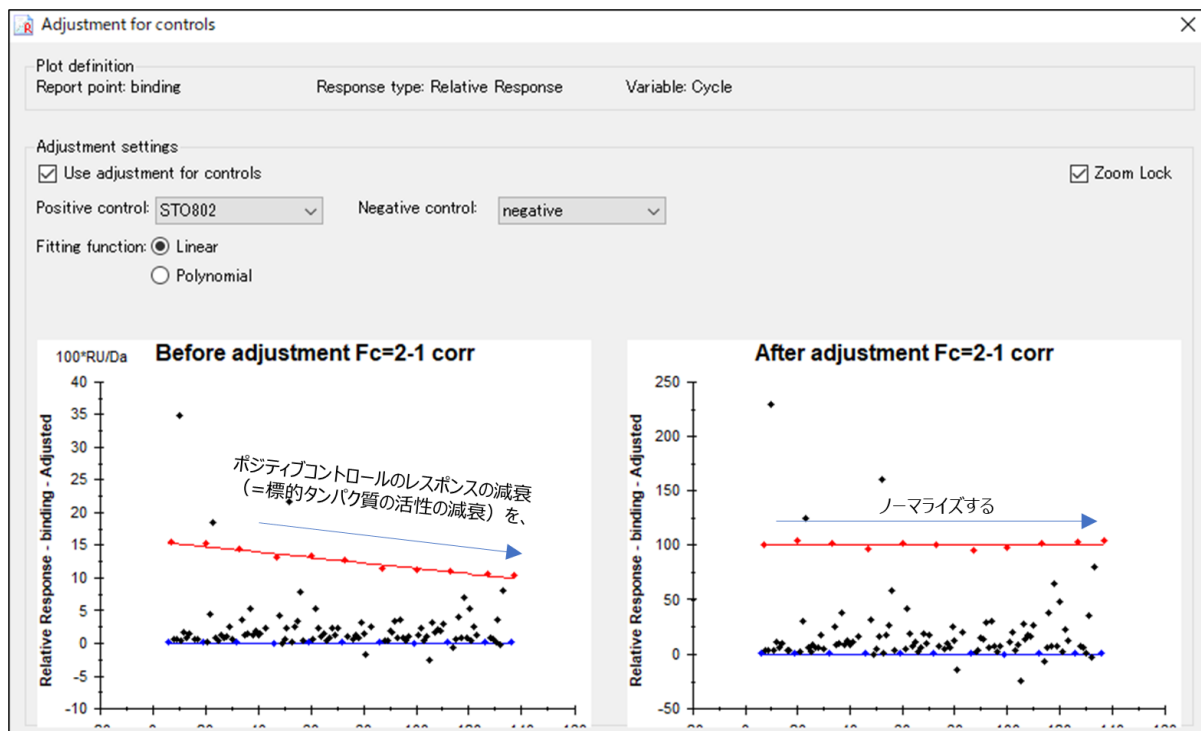
Blank: 濃度 0 の sample

Cycle	Assay step purpose	Sample	Conc (μM)	MW (Da)
1	Startup	buffer	1	1
2	Startup	buffer	1	1
3	Startup	buffer	1	1
4	Solvent correction			
5	Control sample	negative	10	300
6	Control sample	negative	10	300
7	Control sample	Positive	80	331.78
8	Sample	Blank	0	0
9	Sample	T_6	200	205
10	Sample	T_7	200	267.3
11	Sample	A_1	200	214.2233
12	Sample	A_2	200	278.322
13	Sample	A_3	200	266.293
14	Sample	A_4	200	214.609

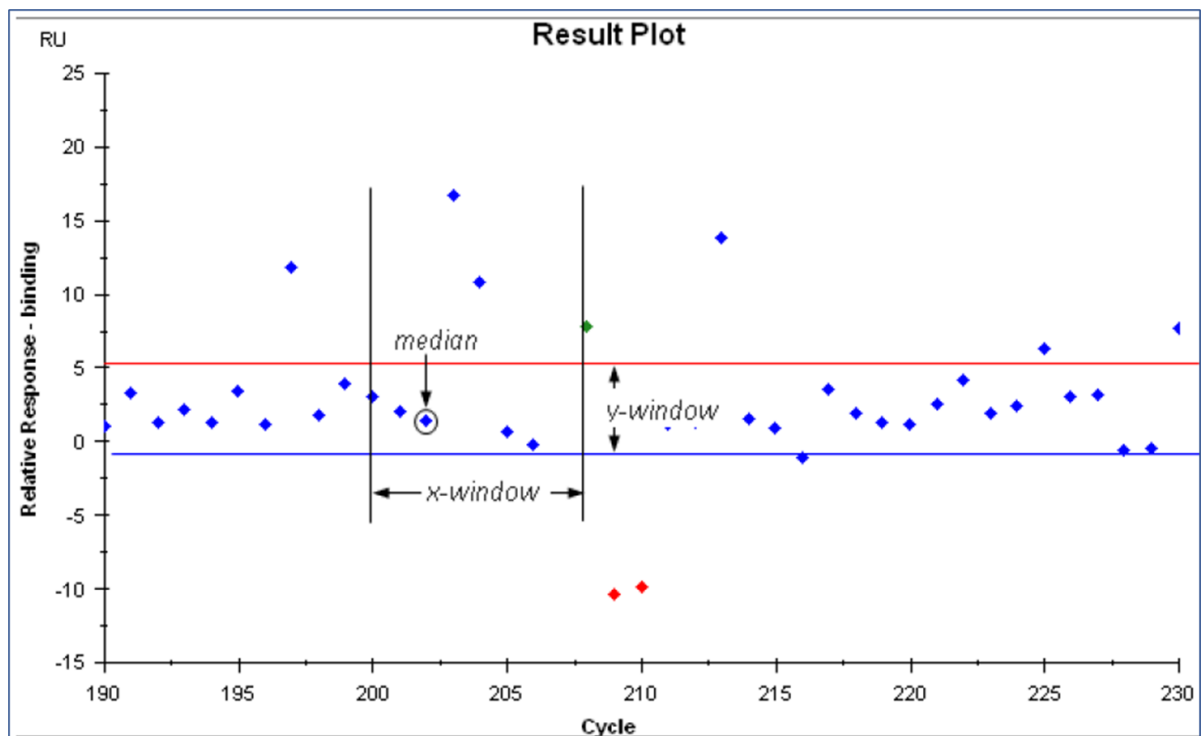
Negative Controlは分子量と濃度値は0ではない

Blankは濃度値が0のものがサンプル名に依存せず選ぶことができる

補足：Adjustment for controls



補足：Median Filter の原理図

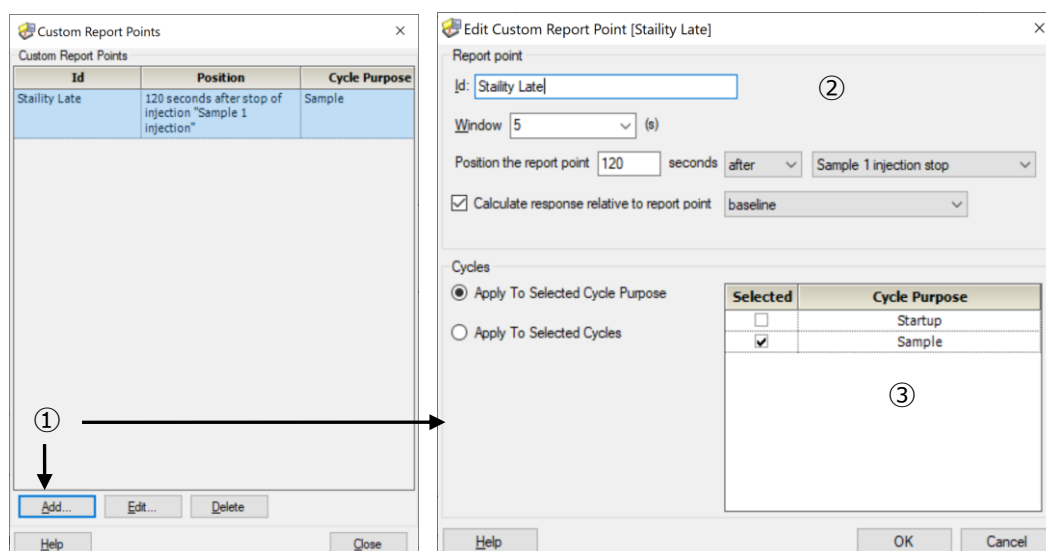


補足：Stability early vs Stability late のプロット

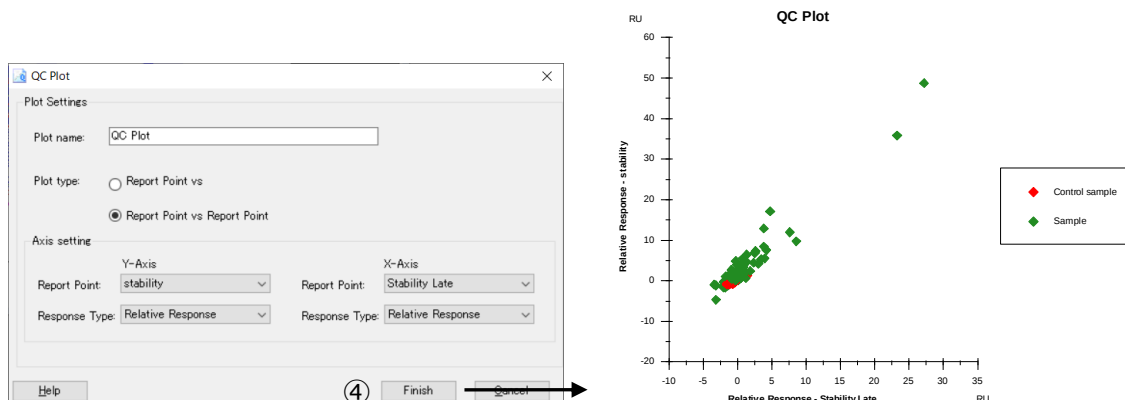
解離相の前半と後半のレポートポイントのプロットすることで、複合体の安定性の良い抗体を選別することができます。デフォルトの Stability は、インジェクション終了 10 秒後の 5 秒間平均です。

手順	操作項目	注意点・説明
①	Custom Report Points	- メニューバーの Tools→Custom Report Points 選択 - Add をクリック
②	Custom Report	- Stability Late などの名前を付ける - 下図では、インジェクション終了 120 秒目の 5 秒間平均 - Response relative として、Baseline に対する RU を設定
③	Cycles	- レポートするサイクルの設定。 - 下図では、Sample と設定されたサイクルのみレポート
④	Plot の作成	Plot→QC Plot を選択 Y 軸に Stability、X 軸に Stability Late の Relative response、

手順①～③Stability late の追加



手順④Plot の作成



4-3. 抗体のキャラクタリゼーション

A. キャラクタリゼーション測定を始める前に

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

A-1

サンプルの添加濃度・時間の設定 **6-2 参照**

A-2

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

B. 準備する試薬・サンプル

	操作項目	用途、備考
必須	抗体 Capture 分子固定化済みの Sensor chip	・Sensor Chip Protein A または Sensor Chip Protein G ・各種 Antibody Capture kit 固定化済み Sensor Chip CM5 (4-1 参照)
必須	抗体リガンド溶液	
必須	ランニングバッファー	メソッド作成時の画面から必要量を確認。加えて自動測定後の standby flow での放置時間分として 65ml/24hr
必須	抗原アナライト溶液	

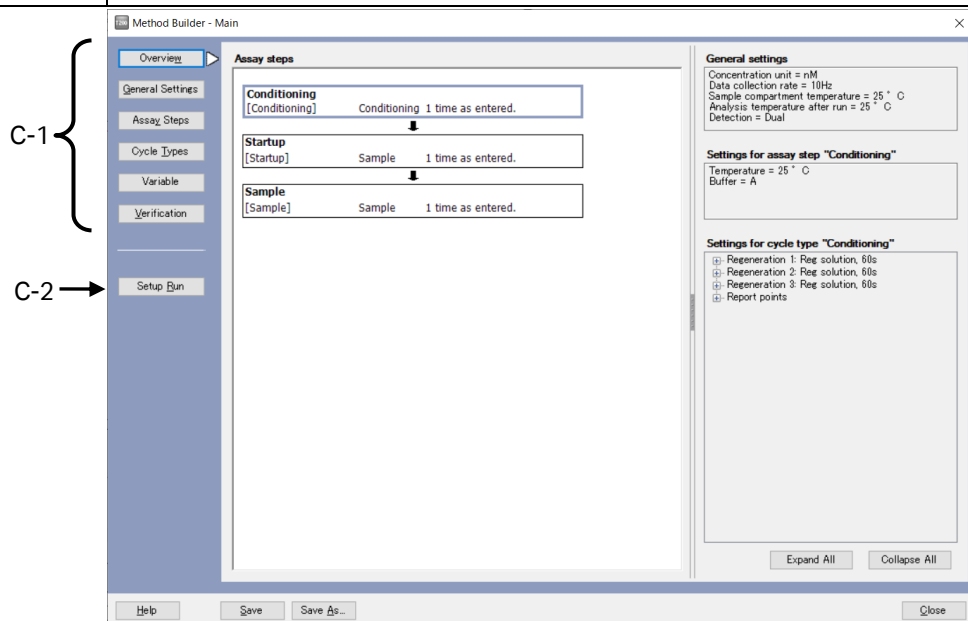
C. メソッドの作成



Methods→Biacore Methods→CAP single-cycle kinetics を選択

* Biotin CAPture kit 用の single-cycle kinetics テンプレートから、編集する手順を示します。

C-1.	添加条件などの設定
C-2.	Setup Run: サンプル個別条件(Variables)の設定



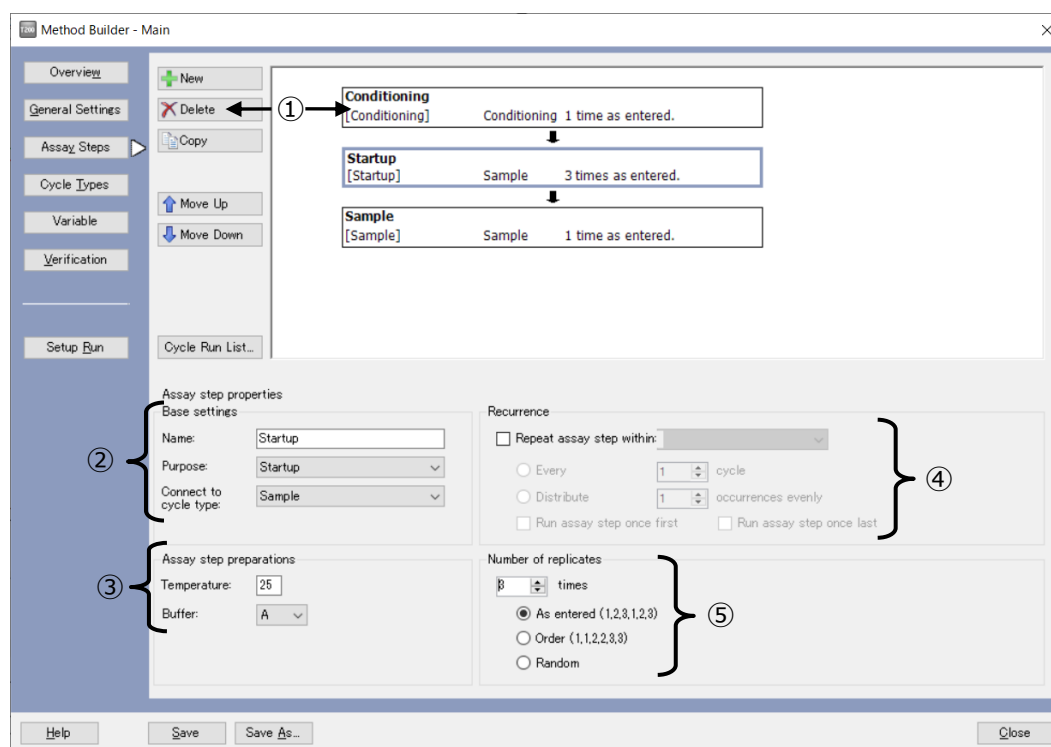
C-1. 添加条件等の設定

ボタン	用途
Overview	メソッドの全体構成の確認
General Setting	• Data collection rate : キャラクタリゼーションは通常 10Hz • 検出対象 Fc 数 (single:1 つ、Dual : 2 つ、Multi : 4 つ) の設定 • 温度設定 - など
Assay Steps	• Assay Steps (測定フローチャートの目的別に定義された“箱” (Step)) の並び順や繰り返しの設定 • 各 Assay Step 内の添加条件を定義する Cycle Type の参照先の設定 - など
Cycle Types	• サイクル内の添加条件パターン (Cycle Type) の設定
Variables	• 各サンプル情報 (サンプル名など) をメソッドの規定値にするか、Setup Run で run 毎に入力するかの設定。
Verification	• 作成されたメソッドに動作上矛盾がないかを検証する。検証確認後 Setup Run の入力を始める。

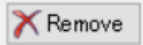
ここでは Assay Steps (Startup 部) と Cycle Types (Sample 部) の代表的な設定条件を図で例示する。

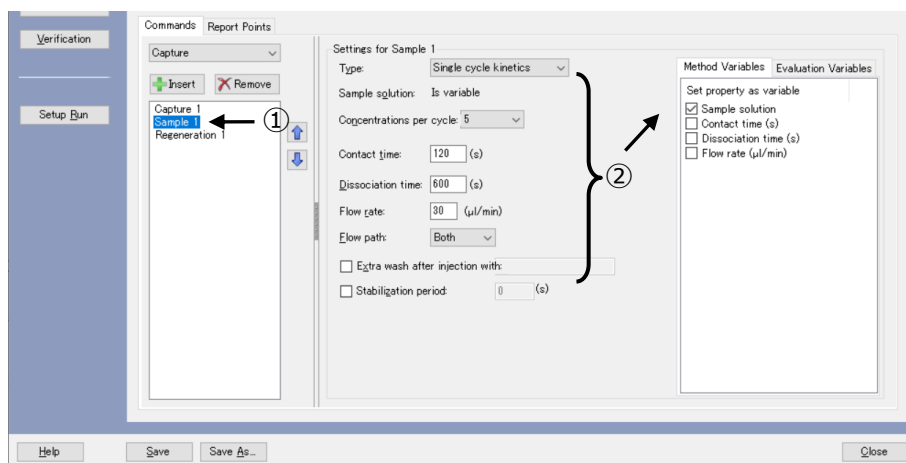
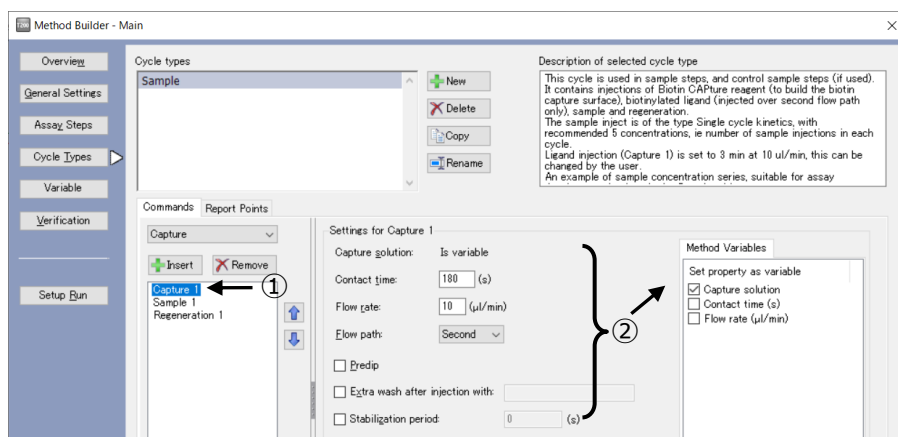
Assay Steps

手順	操作項目	注意点・説明
①	Assay Steps	抗体のキャラクタリゼーションにおいて、Conditioning は削除 
②	Base Setting	Assay Step 名、測定目的、使用する Cycle Type の設定
③	Assay Step Preparations	測定温度、ランニング緩衝液の使用ライン
④	Recurrence	•他の Assay Step の何サイクルおきにこの Assay Step を実行するか •本アッセイでは使用しないことが多い。
⑤	Number of replicates	•繰り返し測定するか。その場合、どのような設定か。 •通常 Startup は 3 回とする。



Cycle Types

手順	操作項目	注意点・説明
①	Commands	•この Cycle 内の添加コマンドの指定 •下図の場合、Capture（抗体）、Sample（抗原）、Regeneration（再生）から構成されている。
②	Setting	抗体のキャラクタリゼーションにおいて、General1 は削除  •Capture（抗体リガンド添加） Method variable の Solution をチェック（複数抗体の添加） Contact Time：要検討／Flow late：10 μl/min.／Flow Path：Second •Sample（抗原アナライト添加） Single Cycle kinetics で濃度 5 点 Contact Time／Dissociation time：要検討／Flow late：通常 30 μl/min. ／Flow Path：Both •Regeneration（再生溶液） 詳細は各種 Ab Capture kit または Sensor chip IFU 参照 ／Flow Path：Both



C-2. Setup Run: サンプル個別条件(Variables)の設定

Setup Run

をクリック。

Wizard の設定名	設定時のポイント
Detection	リガンド固定化 Fc - リファレンス Fc
Variable values	画面上部の各 Assay Step ごとに入力
Cycle Overview	想定通りの順番でサイクルが並んでいるか確認
System Preparation	・すでに Prime 実行済みであれば✓を外す ・Normalize は通常行わない
Rack Positions	6-8 参照
Estimated buffer consumption	・十分な量のランニングバッファーがボトルにあることを確認する。(ランニングバッファーは、run 毎に調製) ・インレットチューブがボトルの底近くまで達していることを確認

Variables の設定例

手順	操作項目	注意点・説明
①	Assay Step	Assay Step ごとの表示・入力選択
②	Capture1	抗体の名称の入力
③	Sample Solution	抗原の名称の入力
④	Conc/MW	適切な濃度（0 濃度サイクルを含む）、分子量の入力

Method Builder - Variables

Assay steps

Startup

Sample ← ①

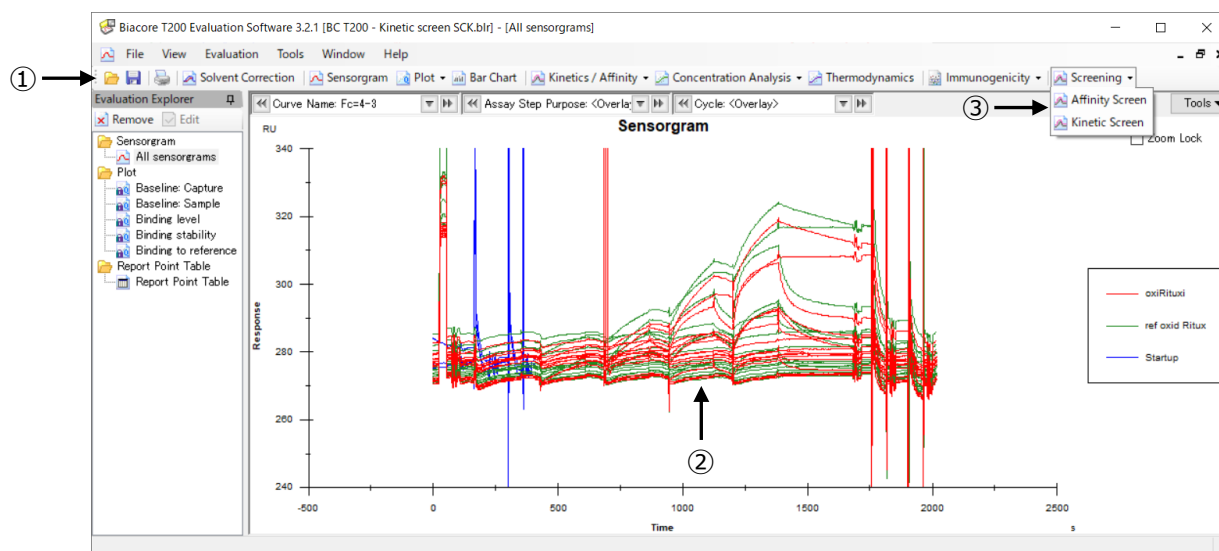
Variable values for Assay Step Sample

	Capture 1	Sample 1							
	Capture solution	Sample solution	Conc (1)	Conc (2)	Conc (3)	Conc (4)	Conc (5) (nM)	MW (Da)	
1	Ab1	Ag	0	0	0	0	0	3000	
2	Ab1	Ag	0	0	0	0	0	3000	
3	Ab1	Ag	2.4	12	60	300	1500	3000	
4	Ab2	Ag	0	0	0	0	0	3000	
5	Ab2	Ag	2.4	12	60	300	1500	3000	
6	Ab3	Ag	0	0	0	0	0	3000	
7	Ab3	Ag	2.4	12	60	300	1500	3000	

④

D. 解析 (K_D 、 k_a 、 k_d の算出)

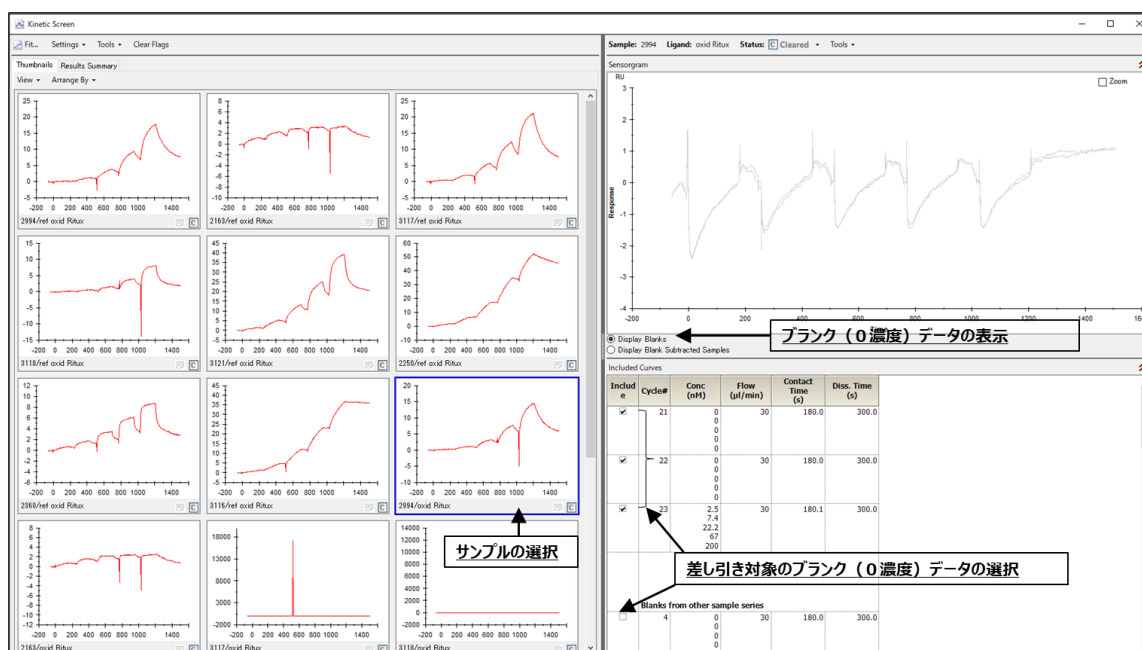
手順	操作項目	注意点・説明
①	解析ソフトで Run ファイルを開く	・解析ソフト Biacore T200 Evaluation software ・run 終了時、自動的に立ち上がる ・別日に解析の場合は.blr（結果ファイル）を Open
②	特異的結合の確認	・センサーグラムの確認 (6-9 参照)
③-1	Kinetics Screen	・センサーグラムの解離相の形状が一定の遅さで降下し k_a 、 k_d の算出が可能な場合に適用
③-2	Affinity Screen	・センサーグラムの解離相の形状が瞬時に降下して“箱型”である場合に K_D 値のみの算出を目指す場合に適用



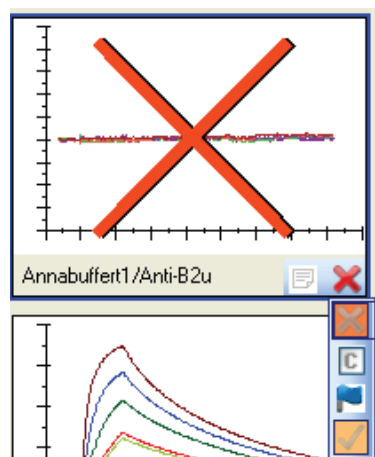
手順④-1 Kinetics Screen

手順	操作項目	注意点・説明
①	Kinetic Screen モード、解析対象サンプル等の選択	- Tool bar の  Screening →  Kinetic Screen - Name 解析結果の名前（必要に応じて変更します） - Curve Type Reference Subtraction を選択 - Table の Include で、解析対象サンプルにチェック
②	ブランク（0 濃度）の選択	下図参照
③	ステータスの設定（オプション）	 Rejected 解析に持ち込まないセンサーグラム  Cleared デフォルト設定、解析に持ち込むセンサーグラム  Flagged 解析に持ち込むが、Flag を立てるセンサーグラム
④	センサーグラムの一部削除（オプション）	- アナライツ追加の切り替え時に発生するスパイクノイズの削除 - 一時的に異常形状になったセンサーグラム領域の削除
⑤	フィッティング条件の設定	Setting → Fit Settings... - Model 解析モデルの選択 (6-13-1 参照) - Parameters (6-13-1 参照) - Apply To Fitting 対象のセンサーグラムの選択
⑤	解析結果の評価	6-14-1 参照

②ブランク（0 濃度）サイクルの再現性の確認と選択

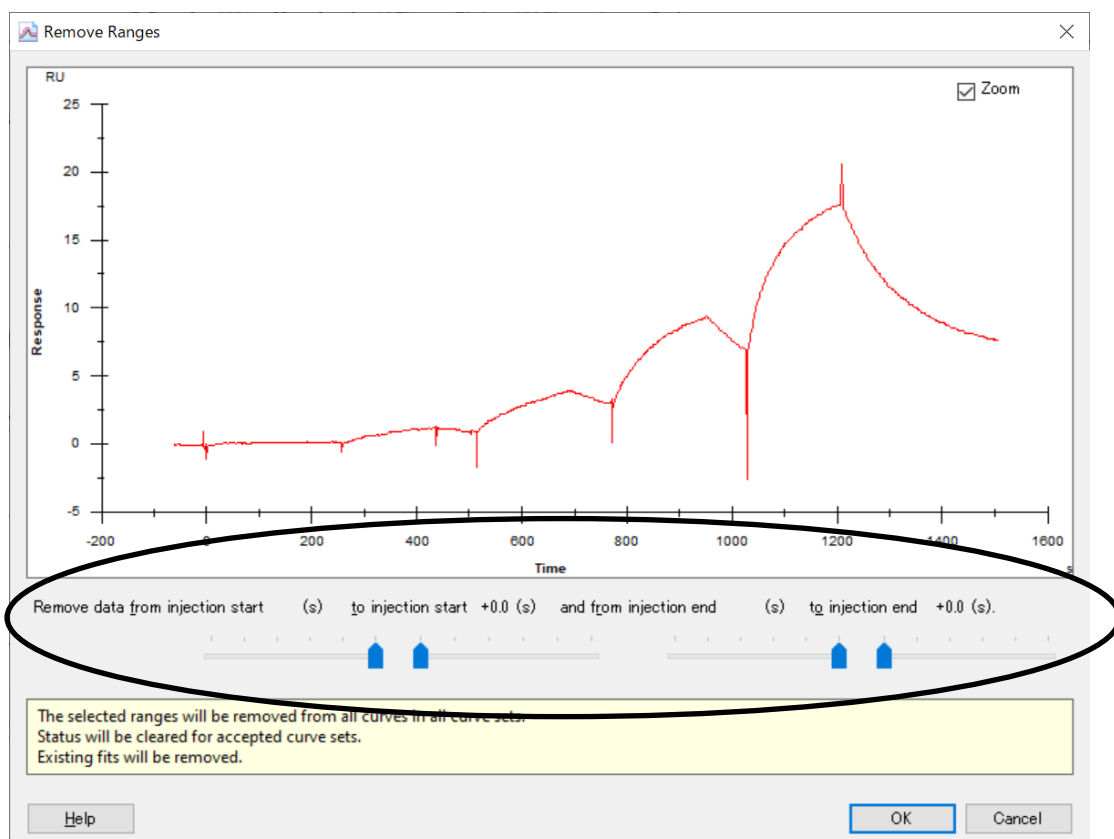


③ステータスの設定



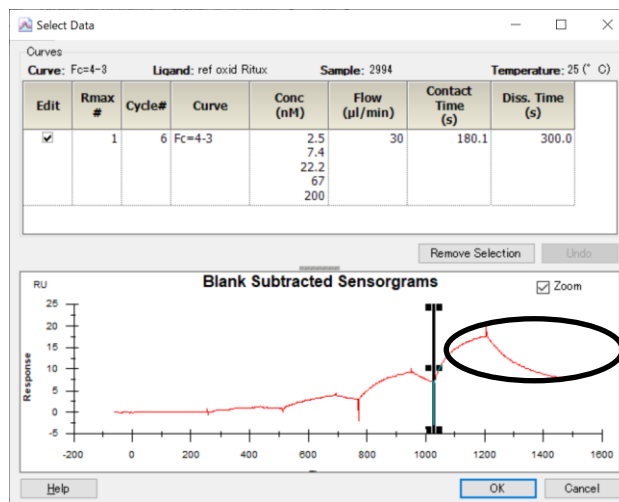
④センサーグラムの一部削除 (一括削除)

画面左上の Tools の **Remove Ranges**



(個別のセンサーグラムの一部削除)

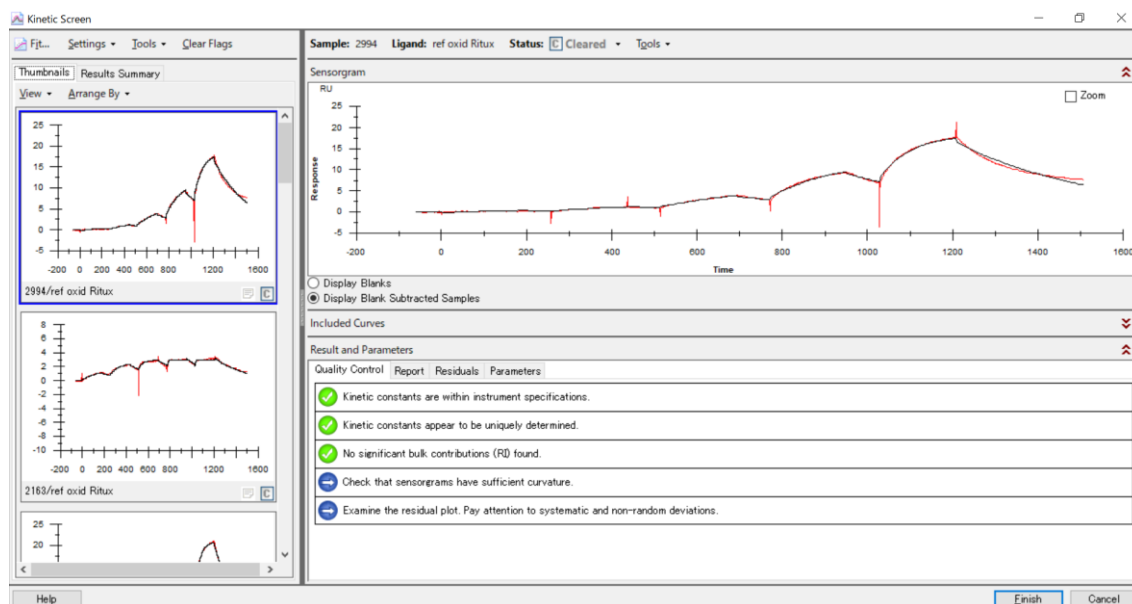
Thumbnails タブでセンサーグラムを選択後、右上の **Tools**→**Select Data**



右クリック+ドラッグ：削除範囲選択 → **Remove Selection**



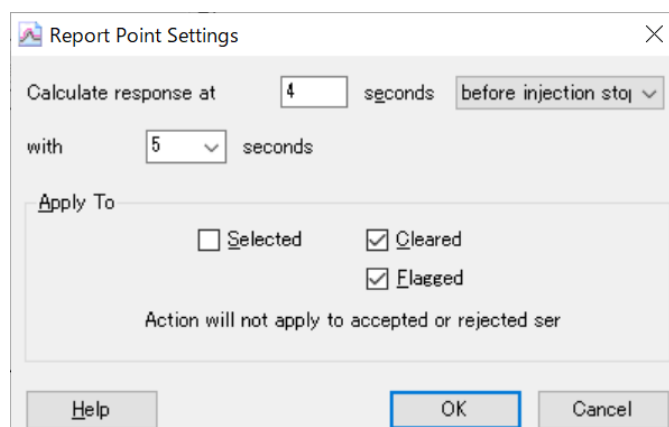
⑥解析結果の評価



手順④-2 Affinity Screen

手順	操作項目	注意点・説明
①	Affinity Screen モード、解析対象サンプル等の選択	• Tool bar の  Screening →  Affinity Screen • Name 解析結果の名前（必要に応じて変更します） • Curve Type Reference Subtraction を選択 • Table の Include で、解析対象サンプルにチェック
②	ブランク（0 濃度）の選択	• 手順④-1 kinetics screen 内 ②ブランク（0 濃度）サイクルの再現性の確認と選択図参照
③	ステータスの設定（オプション）	 Rejected 解析に持ち込まないセンサーグラム  Cleared デフォルト設定、解析に持ち込むセンサーグラム  Flagged 解析に持ち込むが、Flag を立てるセンサーグラム • 手順④-1 kinetics screen 内 ③ステータスの設定図参照
④	レポートポイントの設定	• 画面左上の Settings の Report Point Settings
⑤	フィッティング条件の設定	• Model 解析モデルの選択 （6-13-2 参照） • Parameters （6-13-2 参照） • Apply To Fitting 対象のセンサーグラムの選択
⑥	解析結果の評価	6-14-2 参照

④レポートポイントの設定



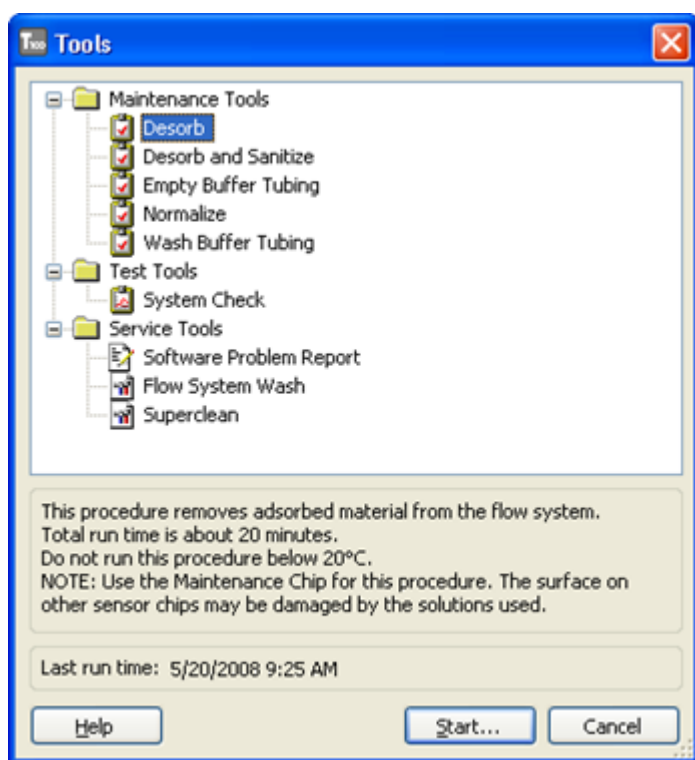
デフォルト設定：添加終了 4 秒前を必要に応じて変更

5. メンテナンス・システムチェック・シャットダウン

5-1. メンテナンス

A. 日常のメンテナンス（システム洗浄）の種類

毎週	Desorb （Menu bar の Tools → More Tools...内(下図)) に従い実行
毎月	Desorb and Sanitize （Menu bar の Tools → More Tools...内(下図))



B. 準備する試薬、消耗品・注意点

Desorb : (D) Desorb and Sanitize (D&S)	必要試薬・消耗品
D、D&S	Biacore Maintenance Kit, type 2 ・Desorb solution 1 は室温保存
D、D&S	Maintenance chip または使用済みのセンサーチップ
D&S	次亜塩素酸ナトリウム（研究用試薬） 終濃度 0.6～1.0%に用事調整。
D、D&S	ランニングバッファーまたは超純水
D&S	10-50mM の HEPES または Tris バッファー

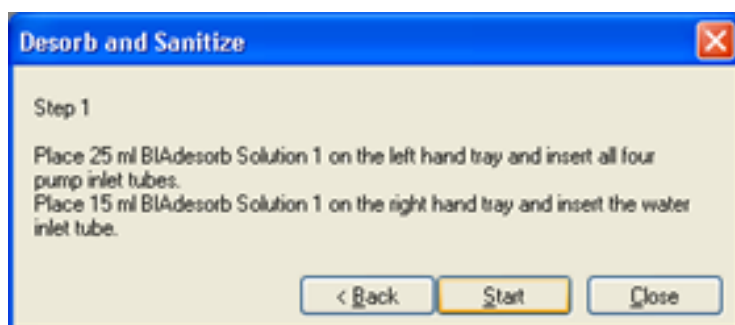
C-1. Desorb（毎週）の手順

手順	説明
チップのドック	Maintenance Chip (または使用済みセンサーチップ)の Dock
温度設定	20℃以上（通常 25℃）に設定
ウィザードの実行	ウィザードに従い Desorb solution 1, 2 をサンプルラックにセット
（所要時間）	約 20 分
実施後次の実験前	・自動的に Stanby flow（65ml/24hr） ・次の実験前に 3-4 時間以上の Stanby flow か Prime の 3 回実施

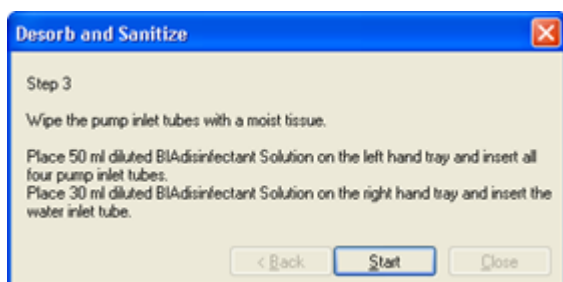
C-2. Desorb and Sanitize（毎月）の手順

手順	説明
チップのドック	Maintenance Chip (または使用済みセンサーチップ)の Dock
温度設定	20℃以上（通常 25℃）に設定
ウィザードの実行	洗浄溶液は装置左右のインレットチューブから吸引されシステム全体を洗浄（いくつかのステップを下図に例示）
（所要時間）	約 1 時間
実施後次の実験前	・自動的に Stanby flow（65ml/24hr） ・次の実験前に 3-4 時間以上の Stanby flow か Prime の 3 回実施

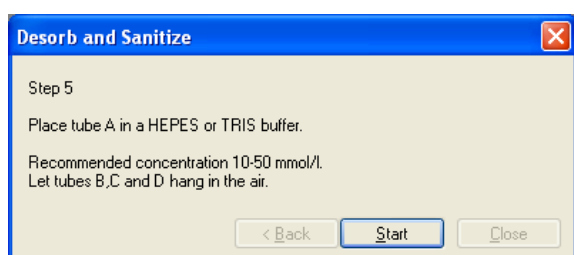
・(Step 1, 2)Desorb Solution を装置左側の 4 本のインレットチューブ用（25ml）と右側の水インレットチューブ用（15ml）に設置



・(Step3) 同様に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液（BIA Infectant solution に相当）を装置左側の 4 本のインレットチューブ用（50ml）と右側の水インレットチューブ用（30ml）に設置



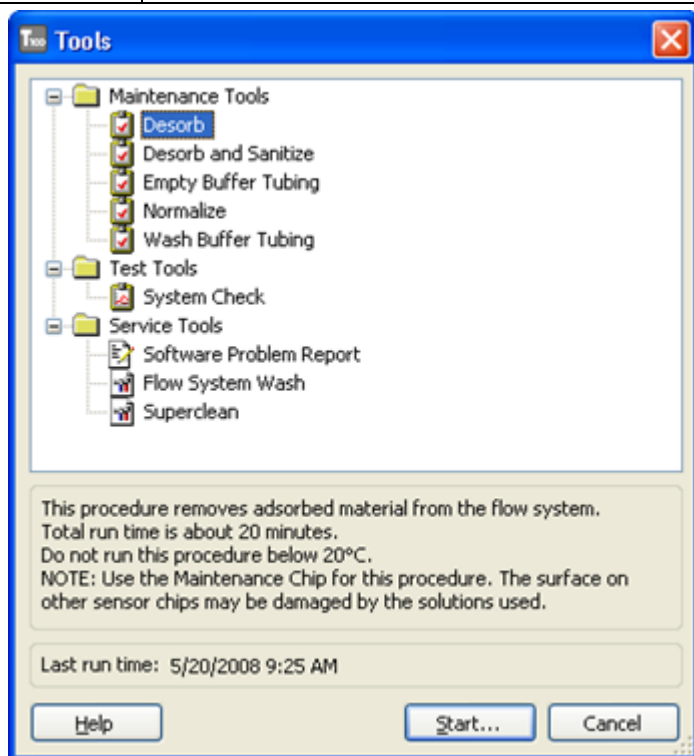
- (Step4) 同様に超純水を両側のインレットチューブに設置
- (Step5) Hepes バッファーか Tris バッファーを A ラインのインレットチューブ、B,C,D ラインは空気中にとり出しておく



5-2. システムチェック

A. 実施頻度等

実施頻度	装置の自己診断。装置の調子が悪いことが疑われるとき。実験が正しく測定できているかを担保するための定期的な実施頻度に設定
Wizard	Menu bar の Tools → More Tools...内 System Check

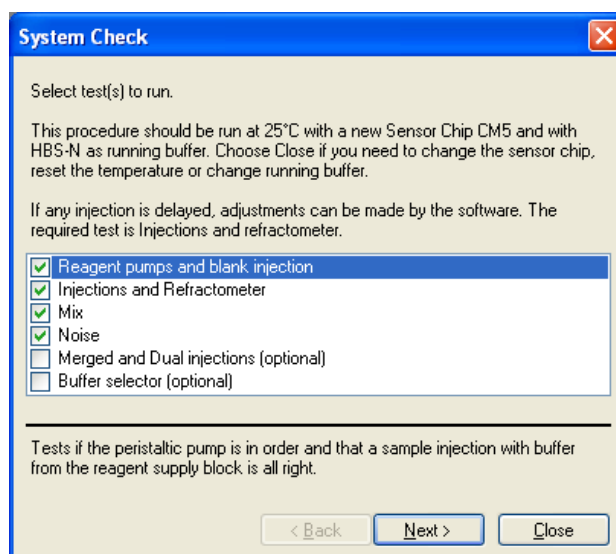


B. 準備する試薬、消耗品・注意点

Desorb : (D)	必要試薬・消耗品
Desorb and Sanitize (D&S)	
BIAtest solution	Biacore Maintenance Kit, type 2 内
HBS-N Buffer	150 ml 程度 (メンテナンスキットの 10X Buffer を希釈)
Series S Sensor Chip CM5	新品 (実行後、実験に使用可能)
超純水	

C-1. System Check の手順

手順	説明
チップのドック	新品のセンサーチップ CM5、HBS-N をランニングバッファーとし Prime
温度設定	25℃に設定
ウィザードの実行	・システムチェック項目の選択（Optional と表示されている項目で日常使用しない機能であれば実施する必要なし）
結果の確認	・正常範囲内：PASS 範囲外：FAIL FAIL の表示が出たときには弊社サポートまでご連絡ください。



5-3. シャットダウン

実験が終了した際には、次のいずれかの方法でシステムを維持できます。

スタンバイ状態で放置	7 日以内に使用する場合
電源を落として終了	7 日以上使用しない場合

5-3-1. スタンバイ状態での放置

測定が終了すると、自動的に **Standby flow** 状態になります。

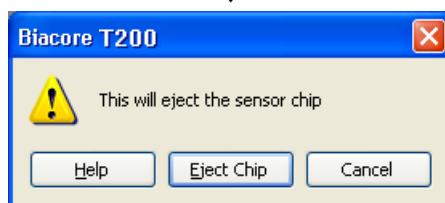
チューブ A にセットしたランニング緩衝液で、65 ml/ 24 時間の流速を最長 7 日間継続します。ランニングバッファーを涸らさないように注意してください。廃液ボトルの空き容量にも注意してください。

スタンバイ状態であるか否かは、ウインドウ下の **Status bar** で確認できます。

5-3-2. 電源の落とし方

電源を落とす前には、メンテナンスを実行してください。

Toolbar の **Eject** アイコン () または Menu bar の **Tools** → **Eject Chip...** を選択します。



Eject Chip をクリックします。

センサーチップポートが開きます。センサーチップを取り出し、Biacore T200 control software を終了します。パソコンのシャットダウン、Biacore T200 の本体電源を落とします。

注意) 電源を落とす場合は、システム内部が超純水で置き換わっているかどうか確認の上、電源を落としてください。

5-3-3. センサーチップの保存

取り出したセンサーチップは、以下の 2 つの方法で保存できます。

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

ドライ状態での保存

取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて 4℃で保存します。

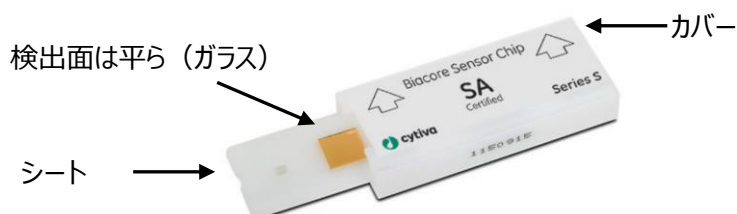
安定なサンプルを固定したセンサーチップの保存に用います。

ウェット状態での保存

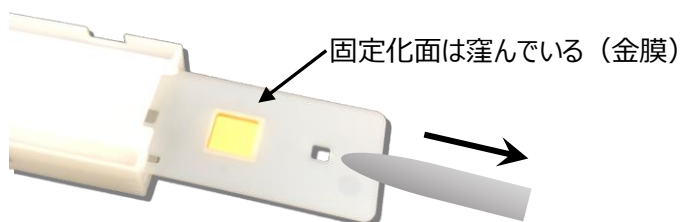
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを容器（50 ml 容のふた付きプラスチック遠心チューブ等）に分注した HBS-EP+などの緩衝液に浸し、4℃で保存します。

シートの取り出しと保存

センサーチップはカバーとシートから構成されています。



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



ピンセットにてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存します。

保存していたシートからの緩衝液成分の除去とカバーへの収納

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

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。



6. 知っていると得する TIPS

6-1. アミンカップリング	39
6-2. アナライトの添加条件設定	43
6-3. 再生条件の設定	48
6-4. リガンドの Biotin 化	50
6-5. リファレンスライン	51
6-6. 溶媒 (DMSO) 補正 (Solvent Correction)	52
6-7. メソッドの構成	54
6-8. サンプルラックポジションの設定・変更	55
6-9. 特異的結合の確認	56
6-10. Keyword Table によるサンプル名、濃度などの修正	58
6-11. ウィザードによる Kinetics/Affinity 測定	59
6-12. ウィザードからメソッド変換	61
6-13. フィッティングモデル式と parameters の設定	62
6-13-1. Kinetics 解析	62
6-13-2. Affinity 解析	64
6-14. 解析結果の品質評価	66
6-14-1. Kinetics 解析	66
6-14-2. Affinity 解析	68
6-15. 用語集	69

6-1. アミンカップリング

A. 手順概略

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

B. 準備する試薬・サンプル

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

Amine Coupling Kit (BR100050)*

各種リガンド希釈液

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

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

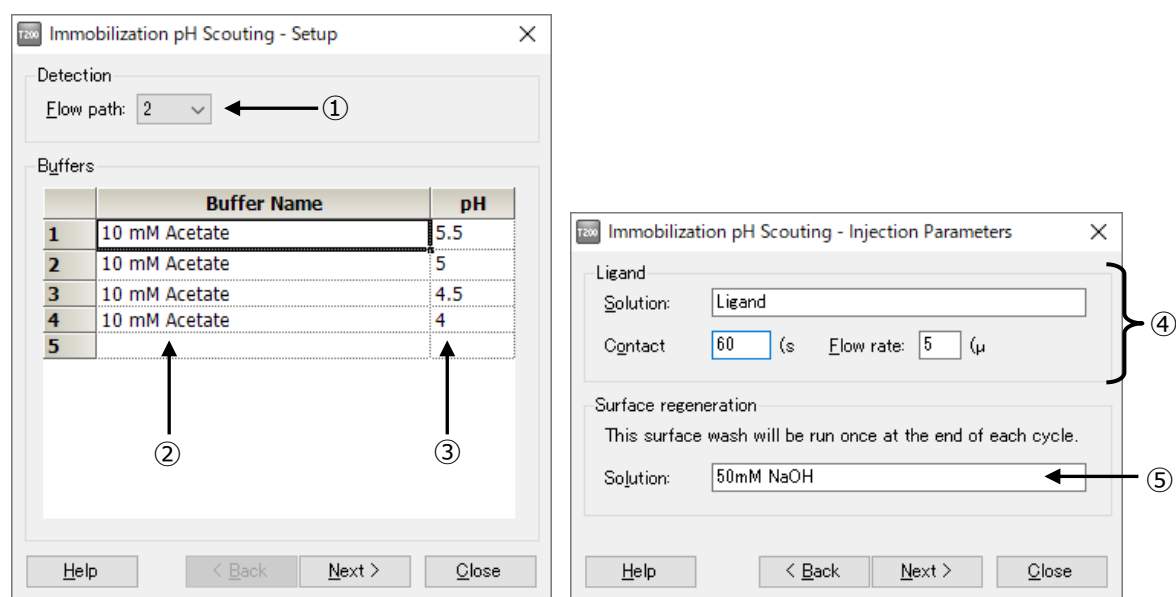


C. ソフトの操作のポイント ～ pH Scouting

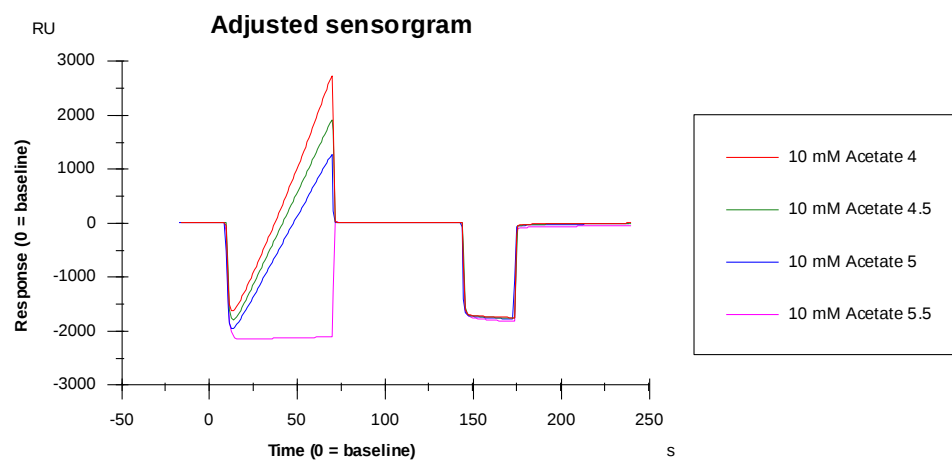
使用するリガンド希釈液が不明な場合、はじめに pH Scouting を行います。

Application Wizards (2-2 参照)→Surface preparation→Immobilization

手順	操作項目	注意点・説明
①	Fc の選択	
②	Buffer name	使用する希釈液名称
③	pH	使用する希釈液の pH
④	リガンド添加時間・流速	通常 60 秒、5μl/分
⑤	センサーチップ洗浄液	通常 50mM NaOH



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



D. ソフトの操作のポイント ～ Amine Coupling

Application Wizards (2-2 参照)→Surface preparation→Immobilization

手順	操作項目	注意点・説明
①	センサーチップの選択	
②	同時固定化 Fc 数	・本マニュアルの用途では通常用いない
③	固定化 Fc の選択	* キャプチャー用分子（抗体など）の場合は、使用する全ての Fc を選択。同一条件で固定化。
④	固定化アプローチの選択	固定化量を下げて制御したい場合は Aim・・・を使うこともある
⑤	固定化メソッドの選択	Amine を選択
⑥	リガンド添加時間・流速	通常 420 秒、10μl/分

The screenshot shows the 'Immobilization - Immobilization Setup' dialog box. The following fields are annotated with numbers:

- ①** Points to the 'Chip' dropdown menu, which is set to 'CM5'.
- ②** Points to the 'Flow cells per' dropdown menu, which is set to '1'.
- ③** Points to the 'Immobilize flow cell 2' checkbox, which is checked.
- ④** Points to the radio button group for 'Specify contact time and flow', which is selected.
- ⑤** Points to the 'Method' dropdown menu, which is set to 'Amine'.
- ⑥** Points to the 'Contact time' and 'Flow rate' input fields, which are set to '420 (s)' and '10 (μl/min)' respectively.

Other visible fields include 'Ligand Name' and 'Dilute ligand' checkbox. The bottom of the dialog has buttons for 'Help', 'Custom Methods...', '<Back', 'Next>', and 'Close'.

E. 固定化量の確認と理論的 Rmax の算出

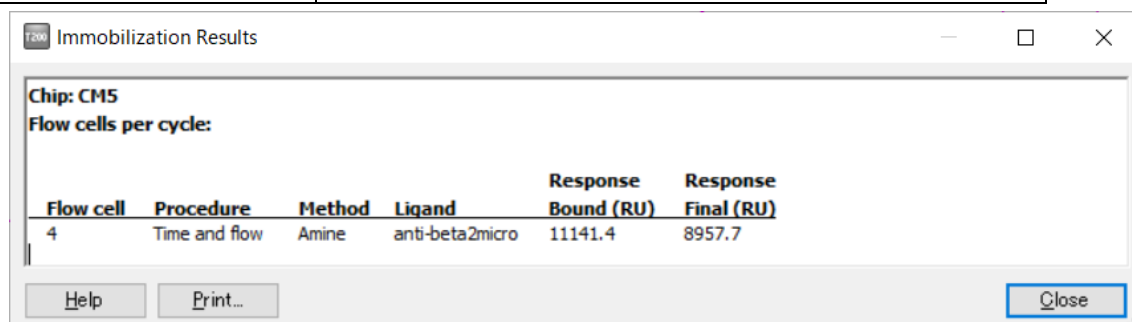
方法	状況	固定化量の確認法
①	Wizard を利用	測定結果のウィンドウ（Response Bound と Response Final）で確認する。
②	Manual run を利用	・リファレンスライン  を用いて確認する（6-5 参照）

補足. 固定化量の評価

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

レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

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



リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなる。

また、極めて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されている）エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大きくなることもある。

いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

理論的 Rmax [RU] = 固定化量 [RU] × (アナライトの分子量 / リガンドの分子量) × リガンドの結合価数

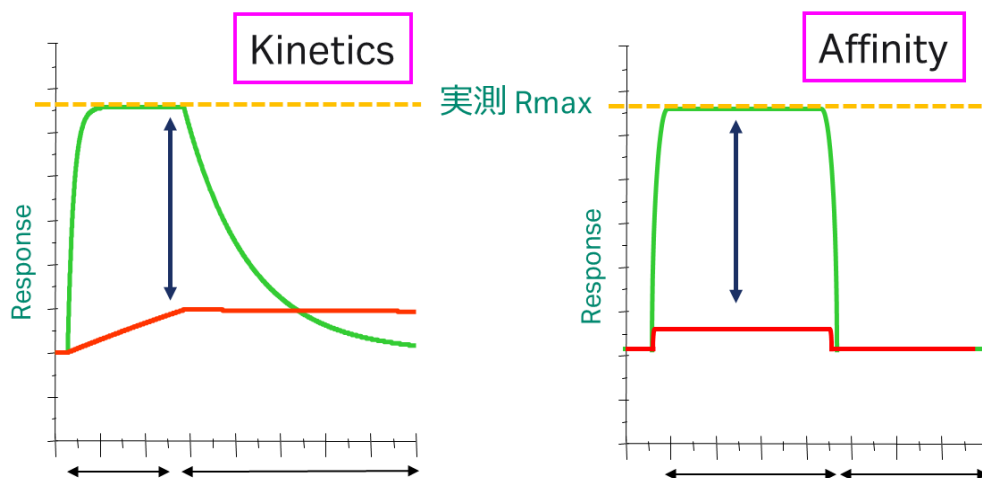
アナライト添加時に十分なレスポンスが得られるか、実際にアナライトを添加したときのレスポンスが結合部位特異的かどうかなどを見積もるために利用します。

6-2. アナライトの添加条件設定

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

A. 添加、解離時間の目安

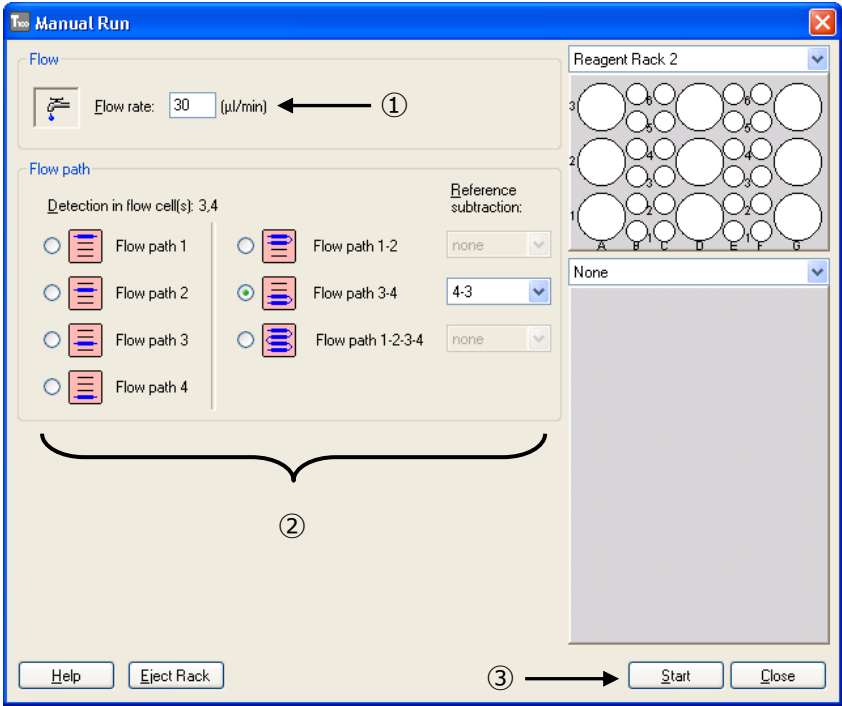
	Kinetics	Affinity
添加時間	結合・解離が緩やかなセンサーグラム： 2-5 min 箱型に近いセンサーグラム： 1-2 min	結合・解離が緩やかなセンサーグラム： (結合相で平衡にならない場合) 適用不可 箱型または箱型に近いセンサーグラム： 1-2 min
解離時間	結合・解離が緩やかなセンサーグラム： ～90 min 箱型に近いセンサーグラム： 1～2 min	不要 (30 秒程度で設定)
濃度点数	5	8 程度



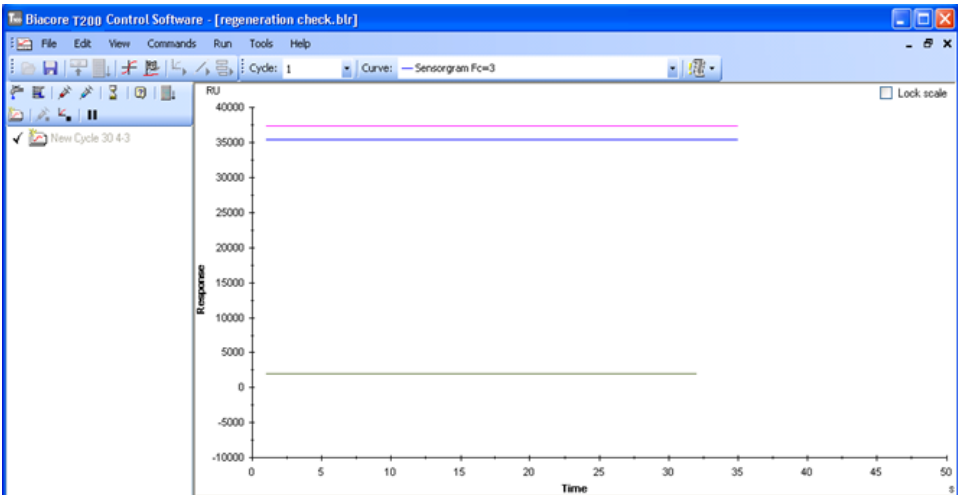
B. Manual Run による条件検討

Manual run  (2-2 参照) を実行します。

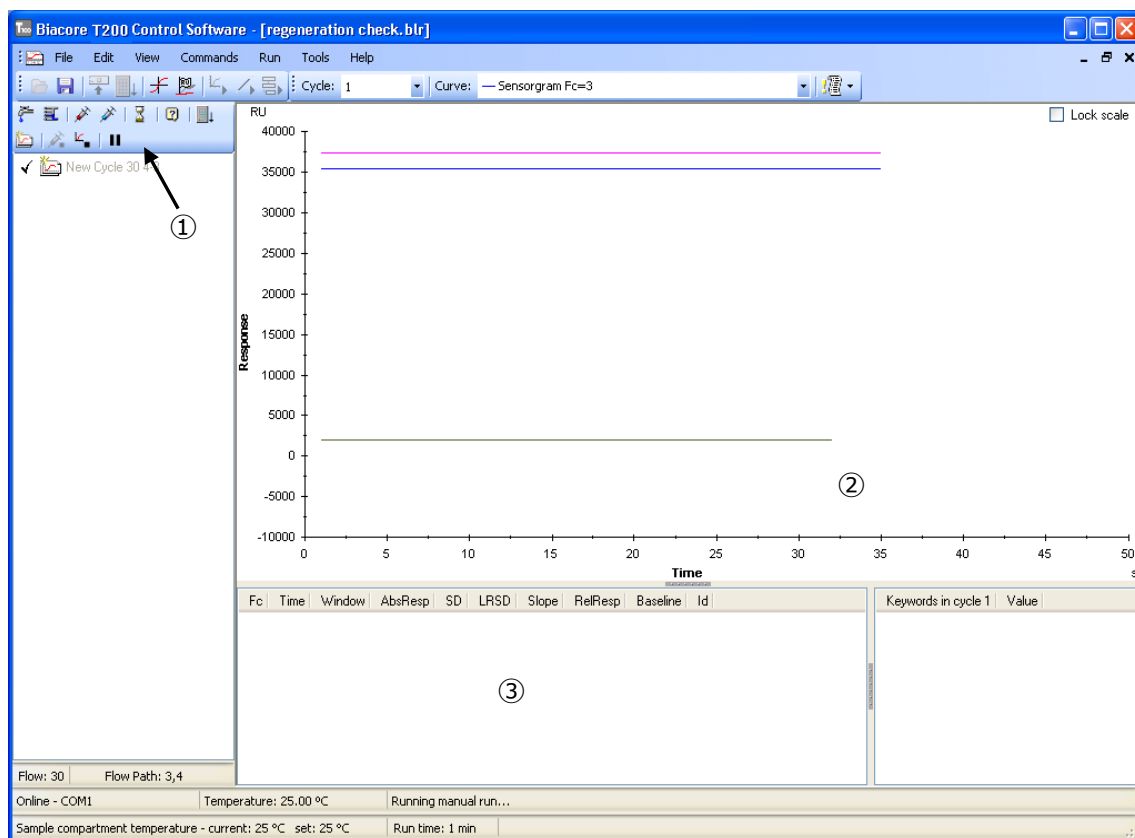
手順	操作項目	注意点・説明
①	Flow rate	はじめに添加するサンプルの流速を決めます。
②	Flow path	使用する Flow path の選択。
③	Start	測定開始



ベースラインのセンサーグラムが現れます。



	操作項目	注意点・説明
①	 流速の変更	通常、リガンドキャプチャには 10 μ l/min.、アナライト添加には 30 μ l/min.以上
	 流路の切り替え	リガンドキャプチャにはアクティブセルのみ (Fc2,4 など)、アナライト添加にはリファレンス-アクティブセル (Fc4-3、2-1 など)
	 (赤) サンプル添加	キャプチャーリエージェント、リガンド、アナライトの添加 * クリックすると、添加時間に応じた必要液量が確認できます。
	 (青) 再生溶液添加	再生溶液の添加 * クリックすると、添加時間に応じた必要液量が確認できます。
	 待機	次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定
	 ラックの取り出し	サンプルの分注を行う。
	 サイクルの切り替え	検出セルの変更も可能
	 測定の終了	
	 一時停止	
②	センサーグラム	リファレンス、アクティブ、アクティブーリファレンス
③	レポートポイント	サンプル、再生溶液添加後にレポートポイントを得ます。



(例) Biotin CAPture Kit、流速 2 μ l/min.、Flow path 4-3 で開始した場合

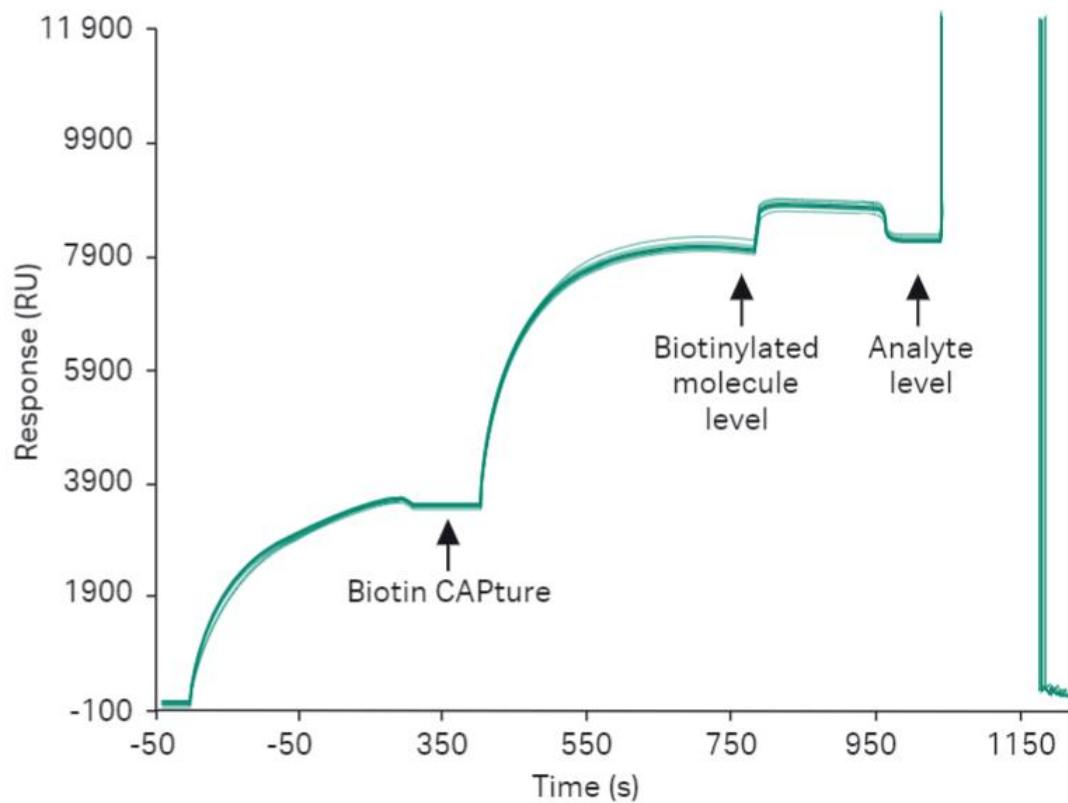
各センサーチップの Instruction For Use (IFU)を併せてご参照ください

Sensor chip CAP は初回 Rehydration、Conditioning が必要です。

- ①  をクリック、任意のバイアルで Biotin CAPture Reagent を 5 分 (2 μ l/min) 添加する際の必要量を確認。
- ②  をクリック、Biotin CAPture Reagent を必要量セット。
- ③  をクリック、②でセットしたポジションと液量に間違いがないことを確認し、OK。
- ④ Fc3、Fc4 に 2500～5000 RU 程度の Biotin CAPture Reagent レスポンスが確認できます。
- ⑤  をクリック、流路を Flow path 4 のみにします。
- ⑥  をクリック、流速を 10 μ l/min 程度とします。
- ⑦  をクリック、Biotin 化リガンドを添加する際の必要量を確認 (数十 μ g/ml、60-120sec.程度から検討)。
- ⑧  をクリック、Biotin 化リガンド溶液を必要量セット。
- ⑨  をクリック、⑧でセットしたポジションと液量に間違いがないことを確認し、OK。
- ⑩ Fc4 に目標の Biotin 化リガンドのレスポンスが出るか確認。
- ⑪  をクリック、流路を Flow path 4-3 にします。
- ⑫  をクリック、流速を 30 μ l/min 以上とします。
- ⑬  をクリック、アナライトを添加する際の必要量を確認 (濃い目の濃度で、60-120sec.程度から検討)。
- ⑭  をクリック、アナライト溶液を必要量セット。
- ⑮  をクリック、⑭でセットしたポジションと液量に間違いがないことを確認し、OK。
- ⑯ Fc3 に非特異的結合がないこと、Fc4-3 で理論的 R_{max} 近くまでレスポンスが出ていることを確認 (6-6 参照)。

- ⑰  をクリック、流速を 5~30 $\mu\text{l}/\text{min}$ とします（任意）。
- ⑱  をクリック、任意のバイアルで Biotin CAPture Kit 付属の再生溶液を 2 分添加する際の必要量を確認。
- ⑲  をクリック、アナライト溶液を必要量セット。
- ⑳  をクリック、⑲でセットしたポジションと液量に間違いがないことを確認し、OK。
- ㉑ Fc3、Fc4 で、ベースラインがはじめの高さに戻ることを確認します。

Biotin CAPture Kit では、アクティブセル（Fc4）において下図のようなセンサーグラムが得られます。



6-3. 再生条件の設定

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

再生条件として、以下の二点が重要です。

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

候補となる再生方法がある場合、マニュアルランにより確認を行います（**6-2 B 参照**）。情報がない場合、Regeneration Scouting を用います。

A. 手順概略

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

B. 準備する試薬・サンプル

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

Regeneration Scouting Kit（BR100556）

リガンド固定化済みのセンサーチップ

アナライト溶液

ランニング緩衝液

C. ソフトの操作のポイント



Run Wizard→Regeneration Scouting

手順	操作項目	注意点・説明
①	Injection Sequence	Fc/ Sensor Chip の選択
②	Setup	通常、未入力のまま
③	Injection Parameter	アナライト名称、通常 60-120 秒、30μl/分
④	Regeneration Parameters	流速、次サイクルへの待機時間など
⑤	Number of Condition	評価する再生条件の数
⑥	Number of Cycle for each	通常 5 回程度繰り返し、失活の様子などを評価する。
⑦	Setting	再生溶液名称、コンタクト時間

Regeneration Scouting - Experimental Parameters

Regeneration parameters

Flow rate: 30 μ

Stabilization period: 0 (s)

High viscosity solution: ☐

Experimental design

Number of conditions: 7

Number of cycles for each: 5

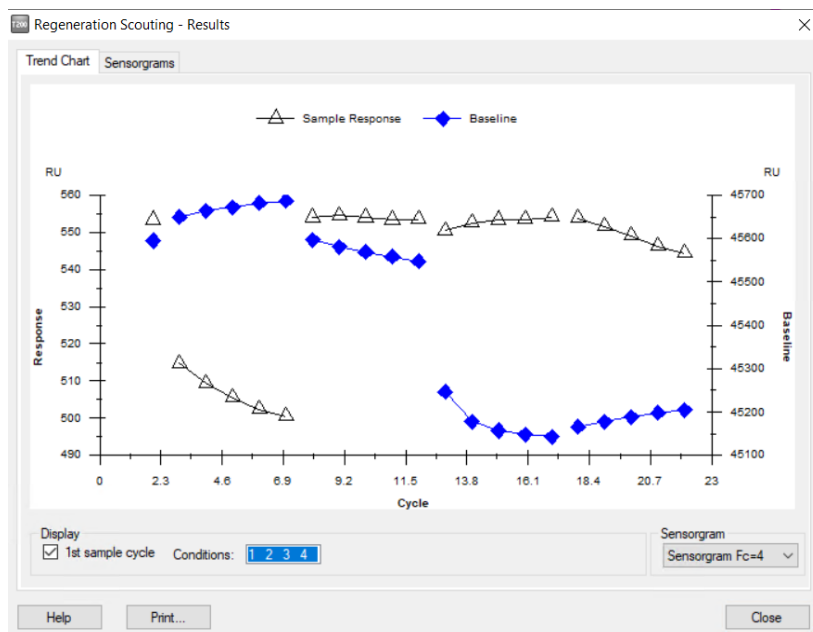
Lock: ☐ Solutions
☐ Contact times

Settings

Condition	Regeneration solution	Contact time (s)
1	Glycine-HCl pH 3.0	60
2	Glycine-HCl pH 2.5	60
3	Glycine-HCl pH 2.0	60
4	Glycine-HCl pH 1.5	60
5	MgCl ₂ 3.0 M	60
6	NaOH 15 mM	60
7	NaOH 30 mM	60

Help < Back Next > Close

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



6-4. リガンドの Biotin 化

Biotin 化試薬を用いた一例を示します。

A. 手順概略

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

B. 準備する試薬・サンプル

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

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

PD SpinTrap G-25 (28918004)

Vivaspin 500-3K (28932218)

HBS-N 10X (BR100670)

C. Biotin 化、遊離 Biotin の除去手順

① Biotin 化反応

10mM NHS-Biotin in DMSO ストック溶液作成

タンパク質サンプル:HNS-Biotin = 1:1.5 (モル比) で混和

室温 1 時間、または、4℃オーバーナイトで静置

② 遊離 Biotin の除去

②-1 PD SpinTrap G-25 によるフリービオチンの除去

Sephadex G-25 担体の入ったカラムを Vortex

先端を折って、キャップを切り取った 1.5ml チューブにセット

1 min at 800 × g で保存溶液除去

400 μl HBS-N を添加。1 min at 800 × g で平衡化。5 回繰り返す。

平衡化済みのカラムを、付属の回収用チューブにセット

Biotin 化サンプル 140-180 μl を、2 min at 800 × g で精製

カラムを除いて、付属のキャップを締める。

②-2 Vivaspin 500-3K によるフリービオチンの除去 (ビオチン化サンプルの濃縮)

Biotin 化反応後、500 μl にアップ

30 min at 12,000 × g で濃縮

残量 100 μ l 程度になるように + 10 分程度

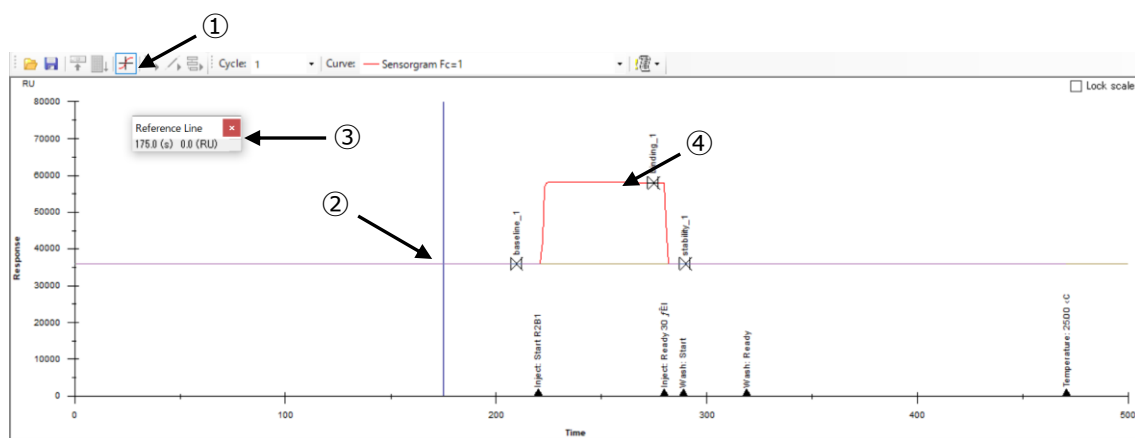
濃縮済みの溶液をマイクロチューブに回収。もとの液量になるように HBS-N を追加。

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

6-5. リファレンスライン

マニュアルによる固定化、特異的反応の確認などを行った場合、リファレンスラインを用いてレスポンスを確認します。

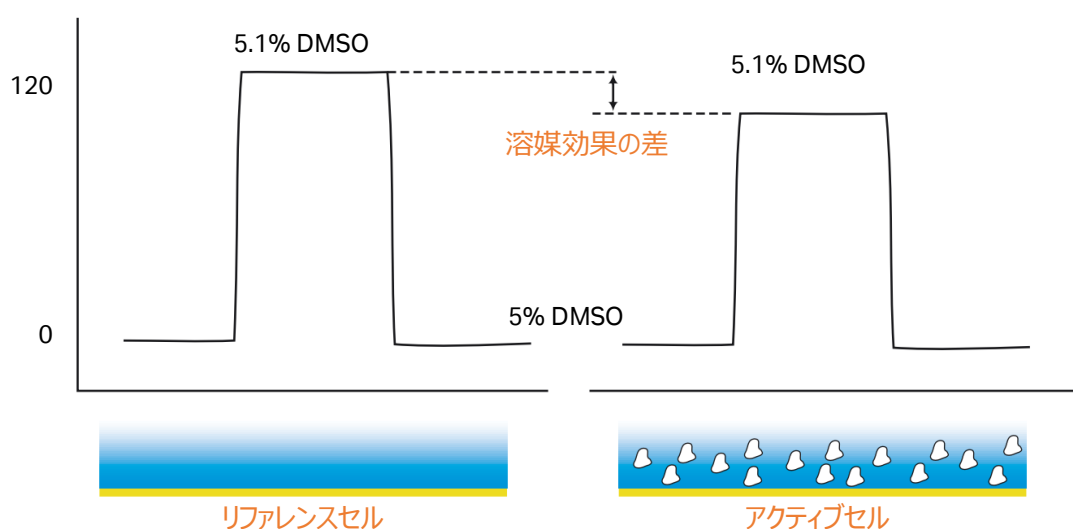
手順	操作項目	注意点・説明
①	Reference Line	 をクリックします。
②	ベースラインの選択	レスポンスを確認したいセンサーグラムベースラインをクリック
③	F9 をタップ	選択されたポジションが 0 (RU) となります。 もう一度 F9 をタップすると絶対値に戻ります。
④	レスポンスの確認	レスポンス (RU) を確認したい箇所へリファレンスラインを移動させます。③のウィンドウに数値が表示されます。



6-6. 溶媒（DMSO）補正（Solvent Correction）

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

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



A. 溶媒補正の準備

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

すべての DMSO 溶液は用事調製します。

① 1.05x PBS-P+を調製します。

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

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

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

③ストック溶液を下記表の割合で混合して、4.5%～6%の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製します。

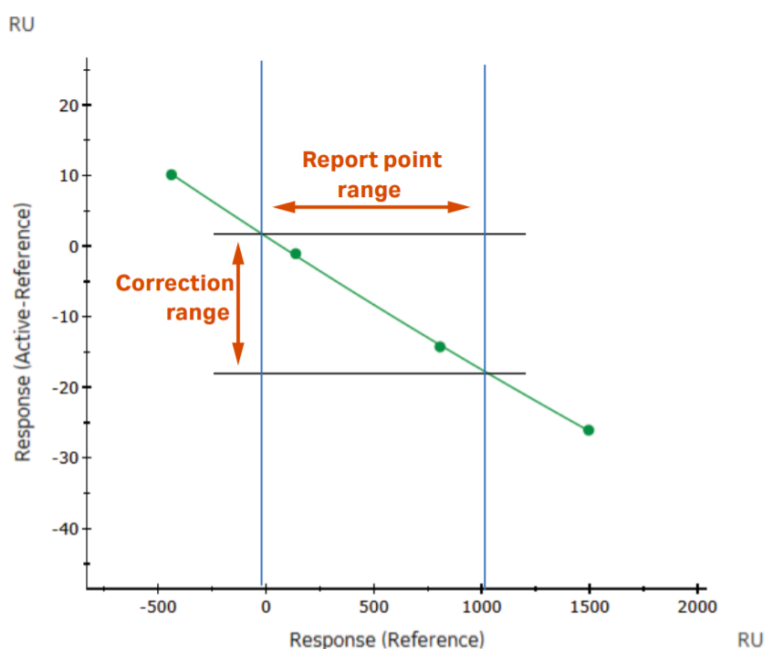
8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する場合：

4.5% DMSO		100	200	300	400	500	600	700
6% DMSO	700	600	500	400	300	200	100	
	700	700	700	700	700	700	700	700 (μl)

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

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

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



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

6-7. メソッドの構成

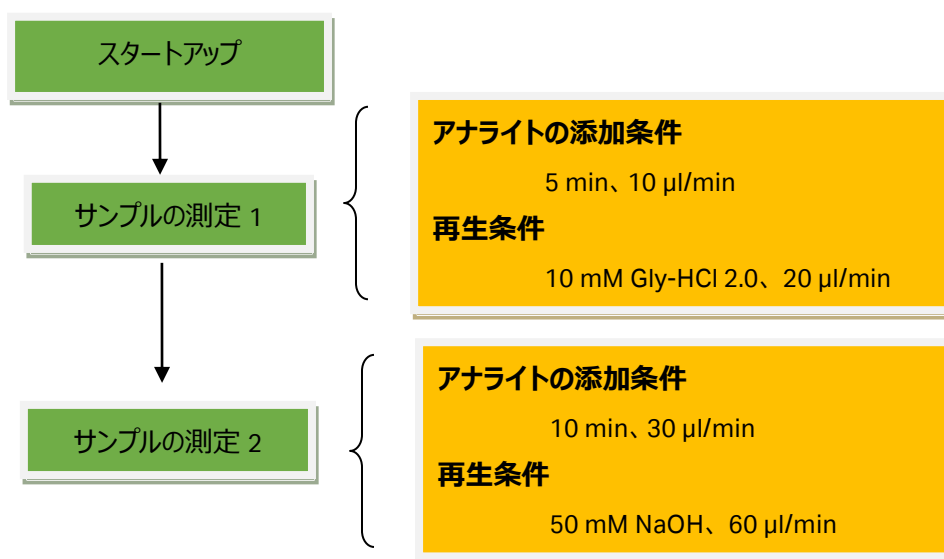
解析が実施可能な測定モードとして、Wizard と Method があります（2-2 参照）。Wizards によるプログラム作成は簡便である反面、シングルサイクルカインेटクスが選択、リファレンスの選択、再生溶液の添加回数などに制約があります。そこで、Wizard では対応できない複雑なプログラムを使用したい場合は、Method Builder を使用します。

メソッドビルダーの重要な設定項目は Assay Steps と Cycle types です。

手順	操作項目	注意点・説明
①	Assay Steps	- 測定全体のアウトラインを設定します。 - 一つもしくは複数の測定ステップを設定します。 - それぞれの測定ステップは Startup、Samples、Control Samples などの測定目的別で設定します。
②	Cycle types	測定ステップ別に詳細なプログラム（温度、流速、試料の添加順序など）を設定します。

Assay Steps

Cycle Types



6-8. サンプルラックポジションの設定・変更

Rack Position の確認しながら、バイアル、プレートに必要なサンプルを分注します。ポジションの変更にはいくつかの方法があります。

手順	操作項目	注意点・説明
①	Rack の変更	使用したい Rack の変更ができます。
②	Plate の変更	96、384、96Deep、384Deep から選択できます。
③	ウェル、バイアルの変更	・クリック&ドラッグで任意のポジションへ移動できます。 ・マウスオーバーで、必要量、デッドボリューム、ウェル/バイアルのキャパシティーが確認できます。
④	Menu→ default Positions	Rack やプレートを変更した場合、お勧めの配置を示します。
	Menu→ Automatic Positioning	自動配置のルール、Pooling の設定ができます。

Method Builder - Rack Positions

Reagent Rack 2 ← ①

96 Well Microplate ← ②

③

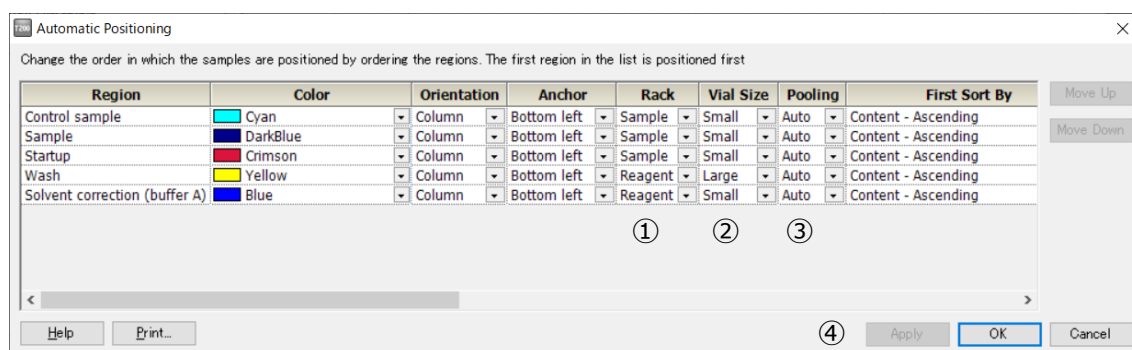
Help Menu ← ④

Position	Volume (μl)	Content	Type	Sample 1 Conc (μM)	Sample 1 MW (Da)
R1 A1	58	Negative control	Control sample		
R1 A2	58	Negative control	Control sample		
R1 A3	58	Negative control	Control sample		
R1 A4	58	Negative control	Control sample		
R1 A5	58	Negative control	Control sample		
R1 A6	58	Positive control	Control sample		
R1 A7	58	Positive control	Control sample		
R1 A8	58	Positive control	Control sample		
R1 A9	58	Positive control	Control sample		
R1 A10	58	Positive control	Control sample		
R1 B1	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B2	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B3	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B4	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B5	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B6	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B7	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B8	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B9	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B10	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B11	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 B12	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 C1	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 C2	58	Sample 1	Sample	10	400
R1 C3	58	Sample 1	Sample	10	400

< Back Next > Close

Automatic Positioning で次のウィンドウが表示されます。

手順	操作項目	注意点・説明
①	Rack	Sample（プレート）、Reagent（バイアル）へ配置します。
②	Vial Size	Small（7mm またはウェル）、Medium（1.5ml, 15mm）、Large（15mm）へ配置します。
③	Pooling	Yes/No で Pooling するか選択ができます。Auto では、再生、Start up など解析のセンサーグラムに直接関わらない用液のみ Pooling します。 * Plate での Pooling には Septa によるシールが必要です。
④	Apply、OK	Apply で変更、OK で適用します。



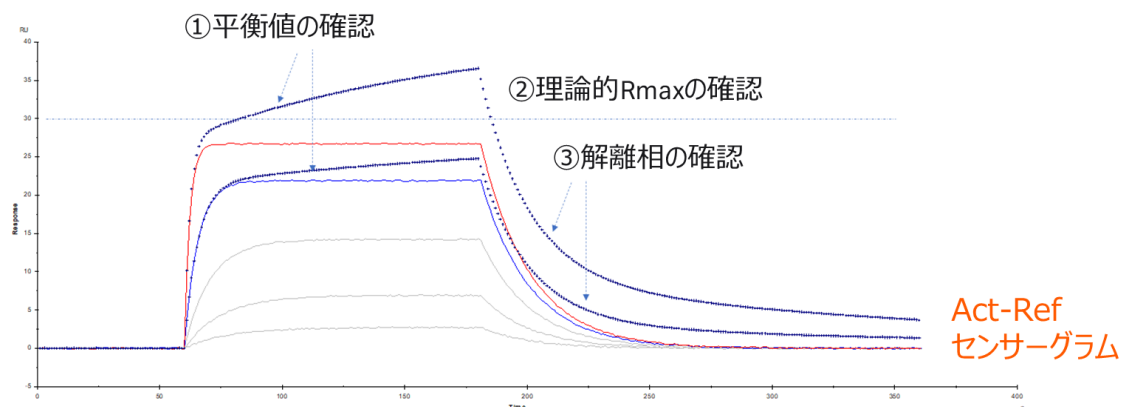
6-9. 特異的結合の確認

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

A. 差し引き後のセンサーグラムからの確認（Fc2-1、Fc4-3 など）

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

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



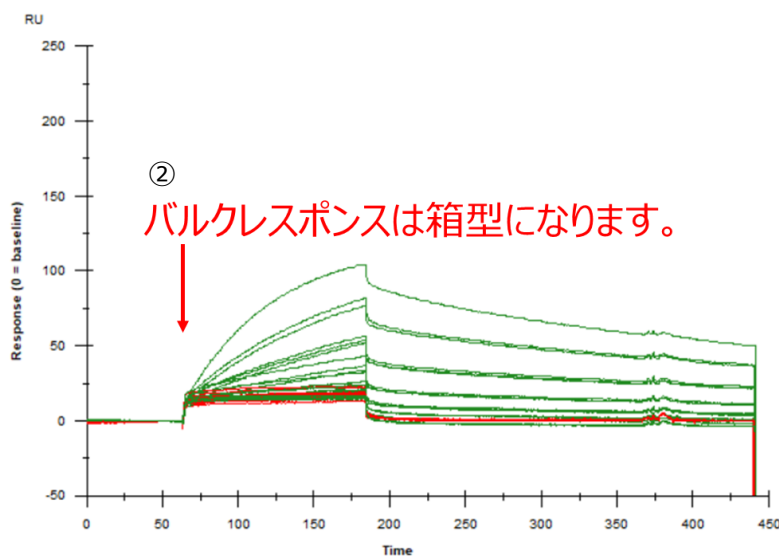
B. リファレンスセルに対する非特異的結合の確認

詳細を確認するためには、まず、リファレンスセルのみを確認します。

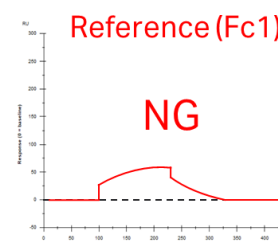
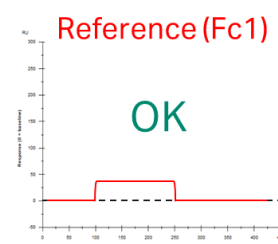
手順	確認項目	注意点・説明
①	Curve Type の選択	Curve Type として Reference と Active 個別のセンサーグラムを選択します。
②	Reference の確認	Reference のセンサーグラムに箱型のバルクレスポンス以外の、非特異結合が無いことを確認します。

All sensorgrams	
Curve Names: <Overlay>	
Curve Name	Curve Type
Fc=1	Reference
Fc=2	Active
Fc=2-1	ReferenceSubtracted

①

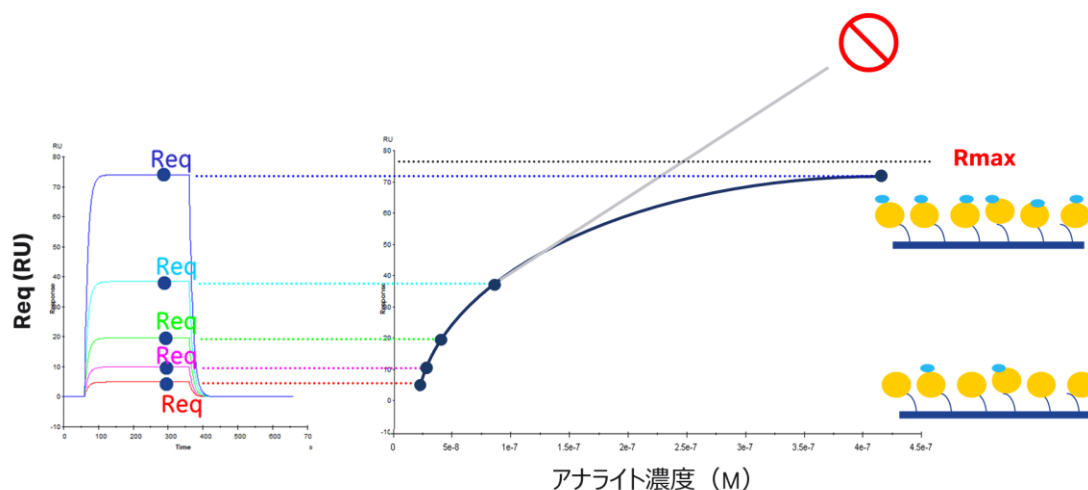


Reference (Fc1) / Active (Fc2)



c. 結合部位特異的な結合であるかの確認

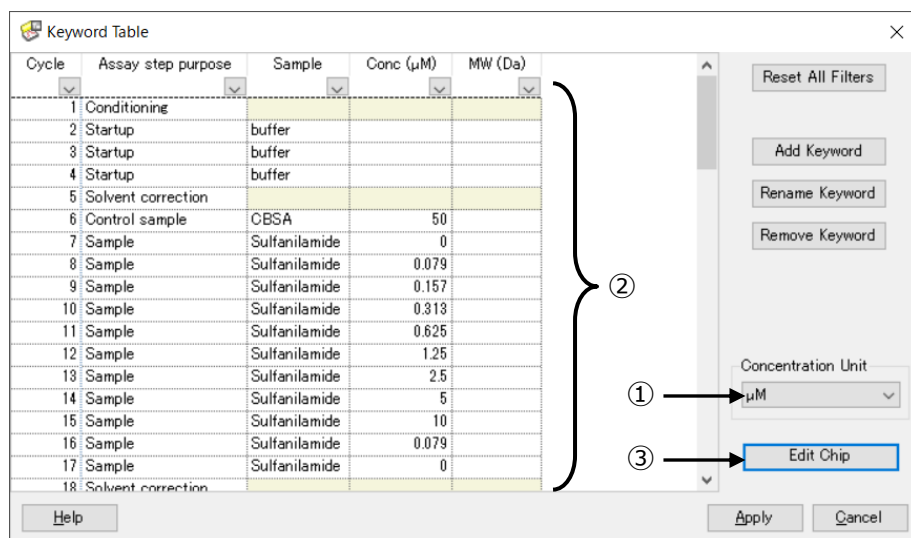
続いて、その結合が結合部位特異的なものであるかという点も重要です。アナライタの濃度を複数点とした時に、実測 Rmax が、理論的 Rmax (4-1E 参照) 以下で飽和することを確認します。



6-10. Keyword Table によるサンプル名、濃度などの修正

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

手順	確認項目	注意点・説明
①	Concentration Unit	濃度単位に入力ミスがあった場合、解析実行前に編集します。
②	Table	サンプル濃度、サンプルの名称など入力ミスがあった場合、解析実行前に編集します。
③	Edit Chip	固定化済みのリガンド名称を編集します。



6-11. ウィザードによる Kinetics/Affinity 測定

解離が速い化合物（再生が不要）の場合、Sensor Chip NA、Sensor Chip SA などを用いてリガンドを固定化し（**4-1 参照**）、Multi-Cycle kinetics を用いるケースも多いです。

解析が実施可能な測定モードとして、Wizard と Method があります（**2-2 参照**）が、この場合、Wizard を用いることが多いです。

A. 準備する試薬・サンプル

	操作項目	用途、備考
必須	リガンド固定化済みセンサーチップ	・Sensor Chip NA、Sensor Chip SA（ 4-1 参照 ） ・アミンカップリング（ 6-1 参照 ）
必須	ランニングバッファー	メソッド作成時の画面から必要量を確認。加えて自動測定後の standby flow での放置時間分として 65ml/24hr
必須	化合物アナライト溶液	
必須	50% DMSO 溶液	キャリーオーバー防止用洗浄溶液
ほぼ必須	溶媒補正用溶液	DMSO を含まないバッファーの場合は不要（ 6-6 参照 ）

B. Wizard による測定



Run Wizard→Kinetics/Affinity を選択

手順	操作項目	注意点・説明
①	Injection Sequence	・Fc/ Sensor Chip の選択 ・必要に応じて Regeneration（再生）を選択 ・Carry Over 選択すると流路への残存（次サイクルへの影響）が評価できます。
②	Setup	・Start up は Running buffer で 3 回以上 ・DMSO を含む場合 Solvent Correction を 4 回以上（ 6-6 参照 ）
③	Injection Parameter Sample	・アナライトのコンタクト/解離時間、流速は通常 30μl/min 以上 ・低分子化合物の場合、50%DMSO の Extra Wash
④	Injection Parameter Regeneration	必要に応じて設定（ 6-3 参照 ）
⑤	Samples	・Kinetics：濃度 5 点以上を推奨 ・Affinity：濃度 8 点以上を推奨 ・0 濃度 x2 点、再現性確認のためどこかの濃度をもう 1 回。
⑥	System Preparation	起動後 Prime 実施済みであれば、Prime before run のチェックを外す。
⑦	Rack Position	6-8 参照

Kinetics/Affinity - Injection Parameters

Sample

Contact time: 120 (s) Flow rate: 30 (μ Dissociation: 600 (s)

☒ Extra wash after injection 50% DMSO

Regeneration

Solution: Glycine-HCl pH15 ☐ High viscosity solution

Contact time: 30 (s) Flow rate: 30 (μ Stabilization period: 0 (s)

Help < Back Next > Close

③ ④

Kinetics/Affinity - Samples

Samples

	Sample id	MW (Da)	Concentration nM	Concentration μg/ml
1	cmpd1	300	0	0.000
2	cmpd1	300	0	0.000
3	cmpd1	300	2.4	7.200E-4
4	cmpd1	300	12	0.003600
5	cmpd1	300	60	0.01800
6	cmpd1	300	300	0.09000
7	cmpd1	300	1500	0.4500
8	cmpd1	300	12	0.003600
9				

Run order
☒ As entered ☐ Increasing concentration

Help Import... Control Samples... < Back Next > Close

⑤

6-12. ウィザードからメソッド変換

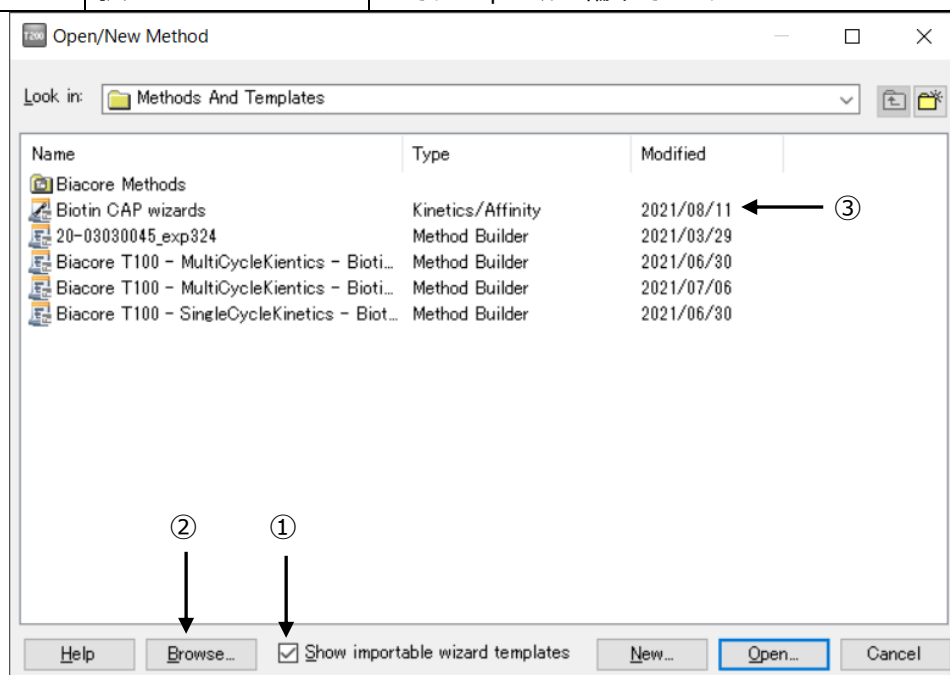
解析が実施可能な測定モードとして、Wizard と Method があります（2-2 参照）。Wizards によるプログラム作成は簡便である反面、シングルサイクルカインेटクスが選択、リファレンスの選択、再生溶液の添加回数などに制約があります。そこで、Wizards では対応できない複雑なプログラムを使用したい場合は、Method Builder を使用します。

Method Builder に使い慣れない方は、Wizard でベースを作成してから保存したファイルを Method で開き、編集することも可能です。



Run method をクリックします。

手順	確認項目	注意点・説明
①	Show importable wizard template	チェックすると保存済みの Wizard template が選択可能です。
②	Browse...	保存先へアクセス
③	Wizard template の選択	Type が Wizard template になっているものが、Wizard で作成したものです。Open から編集できます。



フィッティング解析に関しては 4-3D 参照。

6-13. フィッティングモデル式と parameters の設定

6-13-1. Kinetics 解析

A. フィッティングモデル式と parameters の設定方法

 Kinetic Screen から、Setting → Fit Settings...を選択

手順	確認項目	注意点・説明
①	Model	実際の反応様式に沿ったモデル式を選択 (6-13-1B 参照)
②	Parameters	下図は Default 値 (6-13-1C 参照)
③	Apply To	Fitting 対象のセンサーグラムの選択

Fit Settings

Model: 1:1 Binding ①

Parameters...

②

Apply To

☒ Selected

☐ Cleared

☐ Flagged

③

Action will not apply to accepted or rejected ser

Help

OK

Cancel

Parameter Settings

1:1 Binding

Name	Fit	Initial value	
ka	Fit global	1e5	Default
kd	Fit global	1e-3	Default
Rmax	Fit global	YMax	Default
tc	Fit global	1e8	Default
RI	Fit local	YMax/5	Default

Help

OK

Cancel

B. Kinetics 解析の反応モデル

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

モデル式	説明
1:1 Binding	$A + B \rightleftharpoons AB$ リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。
Bivalent Analyte	$A + B \rightleftharpoons AB, AB + B \rightleftharpoons AB_2$ アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。
Heterogeneous Analyte	$A_1 + B \rightleftharpoons A_1B, A_2 + B \rightleftharpoons A_2B$ 競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。
Heterogeneous Ligand	$A + B_1 \rightleftharpoons AB_1, A + B_2 \rightleftharpoons AB_2$ アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。
Two state Reaction	$A + B \rightleftharpoons AB \rightleftharpoons AB^*$ リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

C. Parameter Setting の使用方法

各パラメータに対して以下の設定が可能です。

項目	説明
Fit	Fit Global : 複数濃度のセンサーグラムで 1 つの解を求めます。 Fit Local : 各濃度のセンサーグラムでそれぞれ解を求めます。 Constant : 固定値。
Initial Value	• Fitting 解析をはじめの初期値を設定。 • Constant と併せて固定値を設定。

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

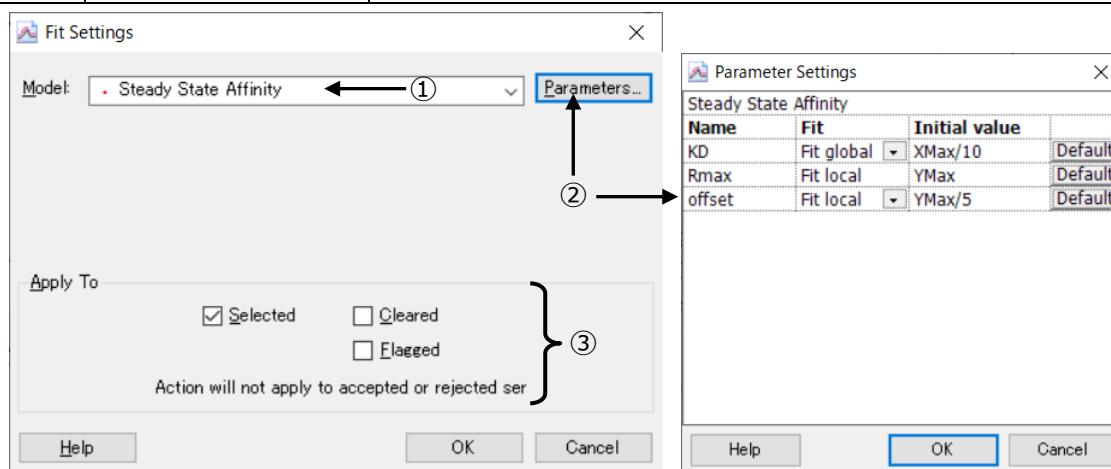
モデル式	説明
k_a	多くの場合、変更はしない。
k_d	解離が遅いもので、真値と明らかに異なる値が出た場合、 $1e-5$ くらいからはじめることもある。
Rmax	通常は Fit Global。再生が不十分でサイクルごとに Rmax が変わる際、Fit Local を使用するケースがある。
tc	多くの場合、変更はしない。
RI	箱型に近いなどセンサーグラムの形状によっては実際のレスポンスを RI として計算してしまうことがあるため、Constant 0 にしたほうが良い場合がある。

6-13-2. Affinity 解析

A. フィッティングモデル式と parameters の設定方法

 Affinity Screen から、Setting → Fit Settings...を選択

手順	確認項目	注意点・説明
①	Model	実際の反応様式に沿ったモデル式を選択 (6-13-2B 参照)
②	Parameters	下図は Default 値 (6-13-2C 参照)
③	Apply To	Fitting 対象のセンサーグラムの選択



B. Affinity 解析の反応モデル

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

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

C. Parameter Setting の使用方法

各パラメータに対して以下の設定が可能です。

項目	説明
Fit	Fit Global : 複数濃度のセンサーグラムで 1 つの解を求めます。 Fit Local : 各濃度のセンサーグラムでそれぞれ解を求めます。 Constant : 固定値。
Initial Value	•Fitting 解析をはじめの初期値を設定。 •Constant と併せて固定値を設定。

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

モデル式	説明
k_a	多くの場合、変更はしない。
Rmax	通常は Fit Global。再生が不十分でサイクルごとに Rmax が変わる際、Fit Local を使用するケースがある。
offset	多くの場合、変更はしない。

6-14. 解析結果の品質評価

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

6-14-1. Kinetics 解析

A. Quality Control タブ

手順	確認項目	注意点・説明
①	速度定数がシステムのスペック範囲内か？	Biacore T200 のスペック範囲 $k_a = 1e3 \sim 1e9$ 、 $k_d = 1e-5 \sim 1$
②	各パラメータが独立して算出されているか？	k_a 、 k_d および R_{max} の間に相関性はない。 マストランスポートリミテーション下で k_a 、 k_d に相関性が見られる。
③	溶液効果の値 (RI) の妥当性	リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引くによって RI はゼロに近い値となるはず。
④	センサーグラムはカーブを描いているか？	高濃度サンプルに注目。センサーグラムの結合・解離領域が直線的な場合、Fitting 結果の信頼性は低い。
⑤	フィッティングカーブに対して測定プロットがランダムに分散しているか？	Residuals タブを確認 (6-14-1B 参照)

Quality Control	Report	Residuals	Parameters
✓	Kinetic constants are within instrument specifications.	←	①
✓	Kinetic constants appear to be uniquely determined.	←	②
✓	No significant bulk contributions (RI) found.	←	③
→	Check that sensorgrams have sufficient curvature.	←	④
→	Examine the residual plot. Pay attention to systematic and non-random deviations.	←	⑤

ステータスマーク



(緑) クオリティーアセスメントにパスしています。



(黄) クオリティーアセスメントの許容限界に近いです。



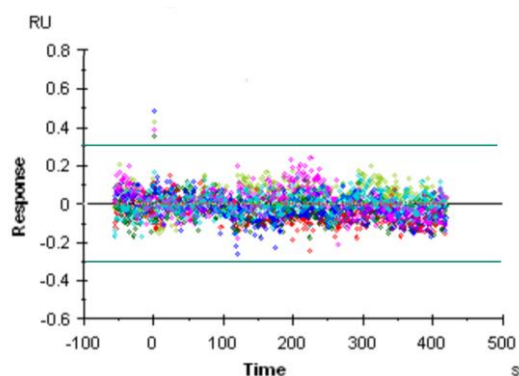
(赤) クオリティーアセスメントにパスしていません。



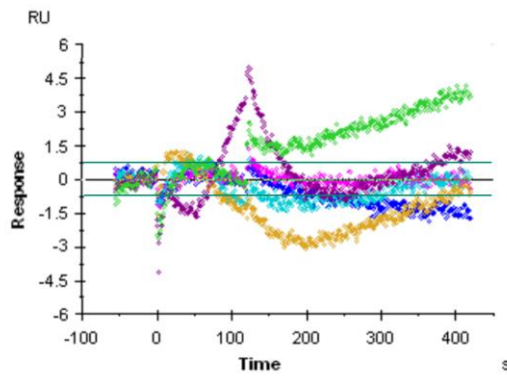
(青) 測定者が確認します。

B. Residuals タブ

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



Residuals for a good fit



Residuals for a poor fit

C. Report および Parameters タブ

解析結果として以下のパラメータが算出されます。

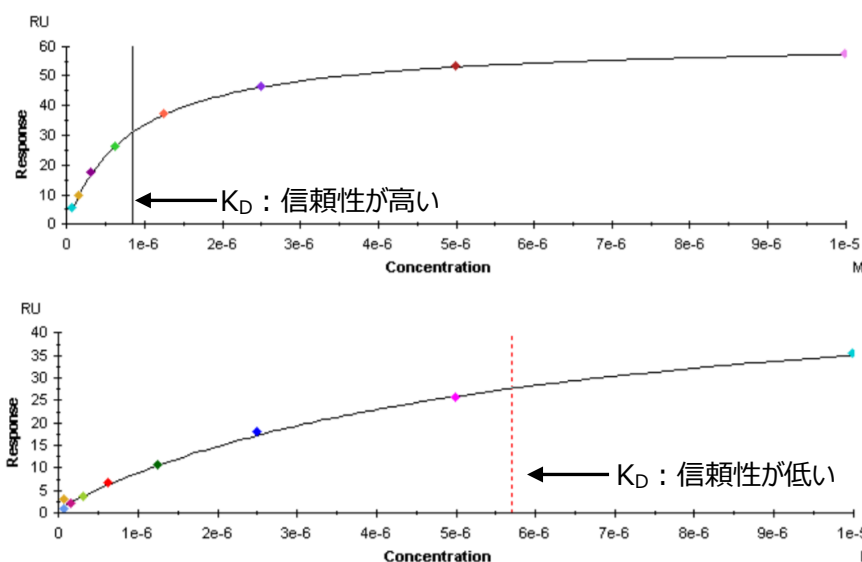
		単位	説明
1:1 binding model 式の変数	結合速度定数 k_a	1/Ms	複合体形成速度。1M の A と B を混合した際に形成する複合体の数。
	解離速度定数 k_d	1/s	複合体の安定性。複合体が 1 秒間に解離する割合。 $k_d = 0.01 \text{ s}^{-1} = 1\%$ 1 秒当たり複合体が 1% 解離する。
	解離定数 K_D	M	アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す。
	Rmax	RU	アナライトの最大結合量。
	溶媒効果 RI	RU	バルクレスポンスを引いた時に、ゼロからわずかにずれる誤差値。 * 本来は極め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

Fitting 解に対する評価 パラメーター	カイ二乗 Chi ²	RU ²	測定データフィッティングカーブ間の差を示す。 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一致。
	U-value		解析値の信頼性。≤15 問題なし。≥25 算出された値の信頼性は低い。 * 既存の 1:1 Binding モデル使用時のみ
	標準誤差 SE		各パラメータについて SE を算出。 各パラメータの解析結果に対して、10%以下で一般的には問題ないと判定されることが多い。

6-14-2. Affinity 解析

A. 信頼性の確認

信頼性の高い解析結果を得るためには、アナライトの最高濃度が K_D 値の 2 倍以上で添加されていることが必要です。この基準を満たしていない場合、 K_D 値のラインが赤色で表示されます。



B. Report および Parameters タブ

		単位	説明
1:1 binding model 式の変数	解離定数 K_D	M	アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す。
	Rmax	RU	アナライトの最大結合量。実際にアナライ添加した時、結合量が飽和するレスポンス。
	Offset	RU	X = 0 の時の Y 軸の値
Fitting 解に対する 評価パラメーター	カイ二乗 Chi ²	RU ²	測定データとフィッティングカーブ間の差を示す。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致。

6-15. 用語集

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

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

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

■ 総合お問合せ窓口

TEL : 03-5331-9336

● 機器アフターサービス

(営業日の 9:00～17:30、音声案内に従い①を選択)

FAX : 03-5331-9324 (常時受付)

● 製品技術情報に関して

(バイオダイレクトライン、営業日の 9:00～12:00、13:00～17:30)

音声案内に従い②を選択後、対象の製品別の番号を押してください。

① : ÄKTA、クロマトグラフィー関連製品

② : ビアコア関連製品

③ : 電気泳動関連製品、画像解析装置

④ : IN Cell Analyzer、ワットマン製品、その他製品

e-mail : Tech-JP@cytiva.com (常時受付)

● 納期／在庫お問合せ

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

注) お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

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

www.cytivalifesciences.co.jp

論文に掲載いただく際の名称・所在地

Cytiva / Tokyo, Japan

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社
〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ : バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336

e-mail : Tech-JP@cytiva.com

掲載されている内容は 2021 年 8 月現在のもので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。