

Biacore X100

アプリケーション別操作手順書

抗体編

Ver.202108



重要

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

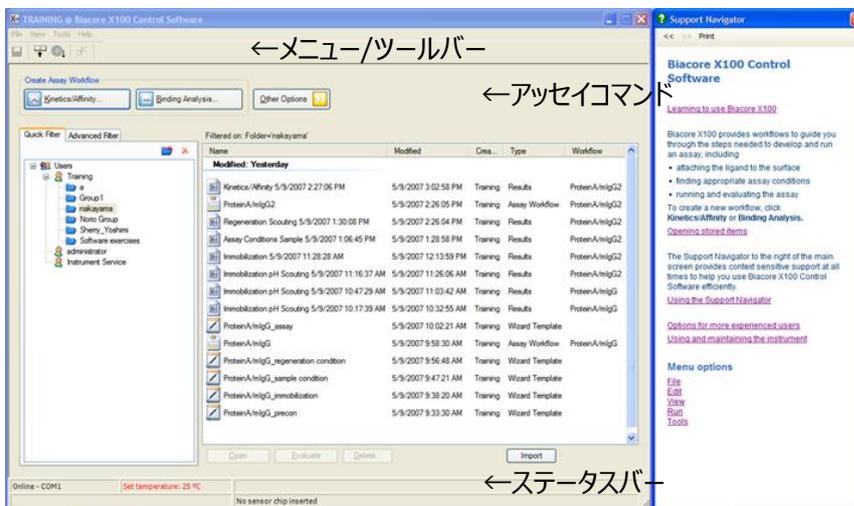
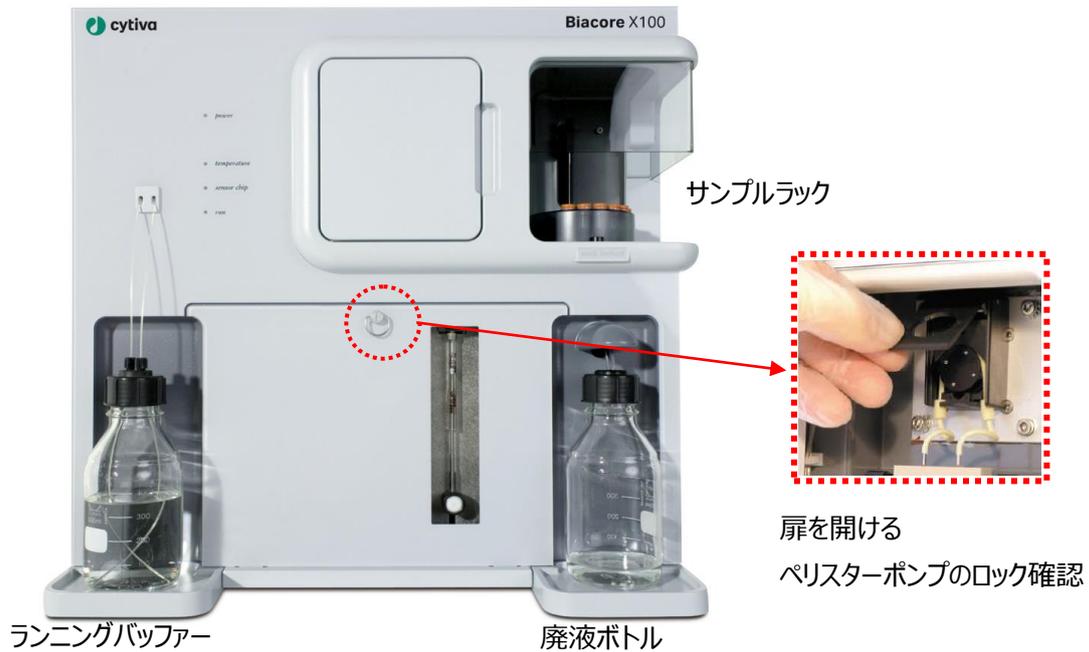
目次

1. 実験を始めるまえに	4
1-1. システムの起動	4
1-2. 測定前の基本操作・設定	5
2. 基本操作	6
2-1. サンプルラックの取り扱い	6
2-2. 3つの測定モード	7
3. 測定系のデザイン	9
3-1. 目的別の測定ワークフロー図	9
3-2. 典型的な目的別リガンド固定化法	9
3-3. 固定化法の大分類（直接法とキャプチャー法）	10
4. 抗体の目的別測定解析手順	11
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	11
4-2. 抗体のスクリーニング	13
4-3. 抗体のキャラクタリゼーション	21
5. メンテナンス・システムチェック・シャットダウン	29
5-1. メンテナンス	29
5-2. システムチェック	31
5-3. シャットダウン	33
6. 知っている と 得する TIPS	36

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 X100 Control Software デフォルト User : admin / Pass : administrator

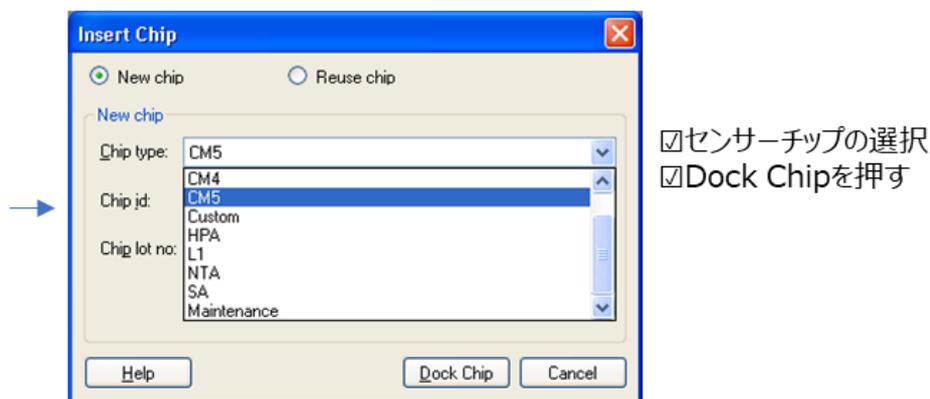


1-2. 測定前の基本操作・設定

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ーによる prime	Menu bar の Tools → Prime からスタート
③	温度設定	Menu bar の Tools → Set Temperature... *Plus Package のみ対応

センサーチップのドック手順

本体上部のセンサーチップ挿入部位の扉を開け、スライダーを手前に引きセンサーチップをセットする。スライダーを装置に挿入する。

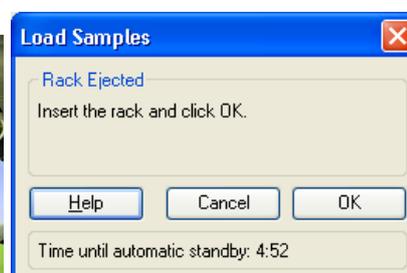
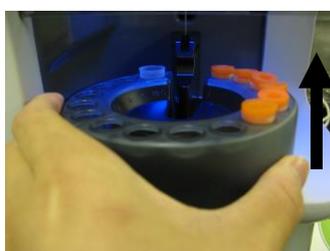
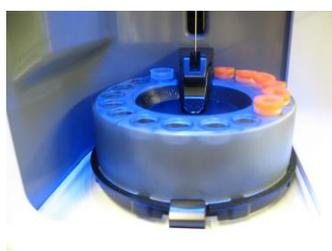


2. 基本操作

2-1. サンプルラックの取り扱い

手順	操作項目	注意点
①	ラックレイの出し入れ	<ul style="list-style-type: none"> •Toolbar の Load Samples アイコン  を押す •rack locked のランプが点灯している際は、ラックを取り出すことができないので注意。
②	対応バイアル	

ラックを真上に持ち上げ取り出す。画面上に Load Sample ウィンドウが表示される。ラックをセット後、OK をクリックする。



ラックを真上に持ち上げ取り出す。画面上に Load Sample ウィンドウが表示される。ラックをセット後、OK をクリックする。

ラックには、サンプルバイアルを 15 本とニードル洗浄に利用する超純水バイアルを 1 本セットできる。

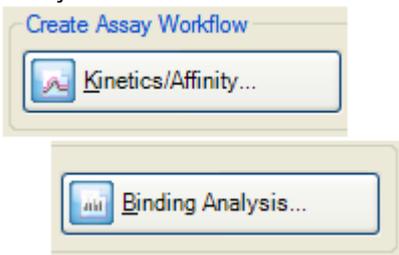
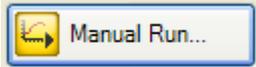
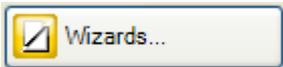
ラックには次のバイアルがセットできる。専用のキャップを利用する。パラフィルムなどニードルの穴を塞ぐ可能性のあるシールは使用しない。

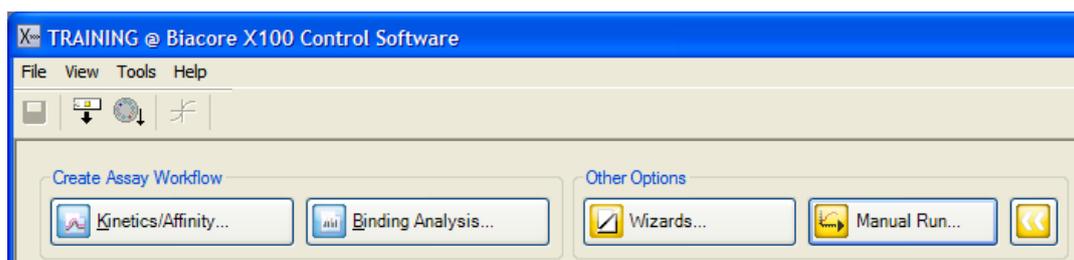


Rack position	1-15	H ₂ O
キャップ	Rubber caps, type 2 BR100411 	不要
バイアル	1.5ml Plastic Vials BR100287 	15mm Plastic Vials BR100654 

2-2.3 つの測定モード

A. 測定モードの選び方

測定モード	モード名称	特徴・用途
①	Assay Workflow 	<ul style="list-style-type: none"> ・実験ノートを使用する感覚で、実験結果を記録 ・流れに沿って各ステップのデータ取得 ・Kinetics/Affinity：詳細な分子間相互作用の評価を実施したい ・Binding Analysis：複数サンプルにおける結合の有無を評価したい。 ・DMSO を含む低分子化合物では使用しません。
②	Manual run 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。
③	Wizards 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・ワークフローより自由度の高い実験系を構築



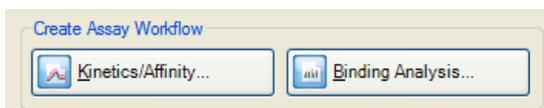
①

②

③

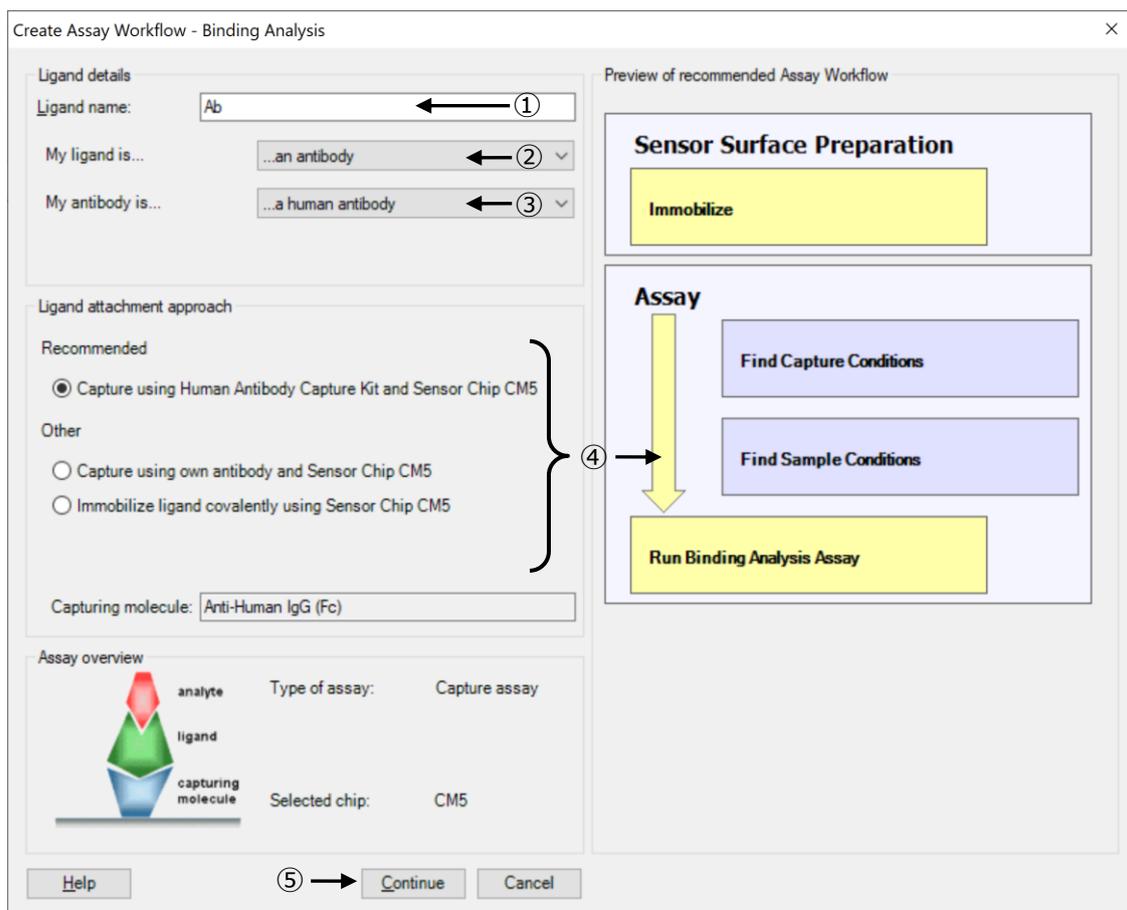
B. Assay Workflow ソフトの操作のポイント

Assay Workflow は Biacore X100 特長的な機能で、実験の全体像を、一つの実験ノートのようにまとめながら測定を進めていくことができます。



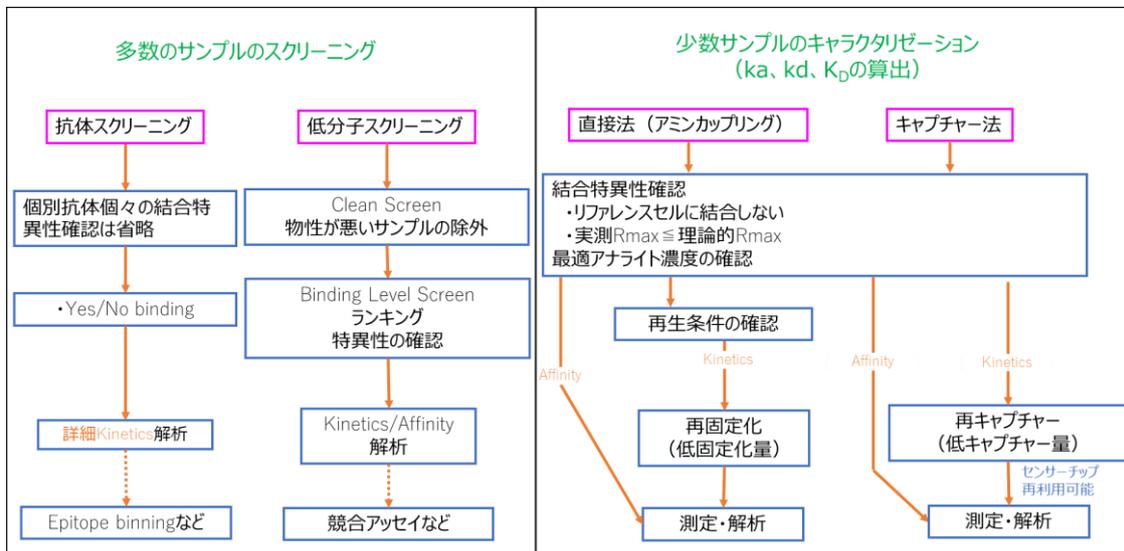
はじめに Kinetics/Affinity か Binding Analysis を選択します。

手順	操作項目	注意点・説明
①	Ligand name	リガンド分子の名称を入力します。
②	My Ligand is...	分子種、タグ付きのであるかなどの選択
③	リガンドの詳細	抗体の場合：抗体の種類を選択 タグ融合分子の場合：タグの種類を
④	Ligand attachment approach	お勧めの固定化方法の中から選択。Workflow を表示します。 下図では、Antibody Capture kit +Sensor Chip CM5 を選択。
⑤	Continue	Workflow の保存



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	キャラクタリゼーション (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

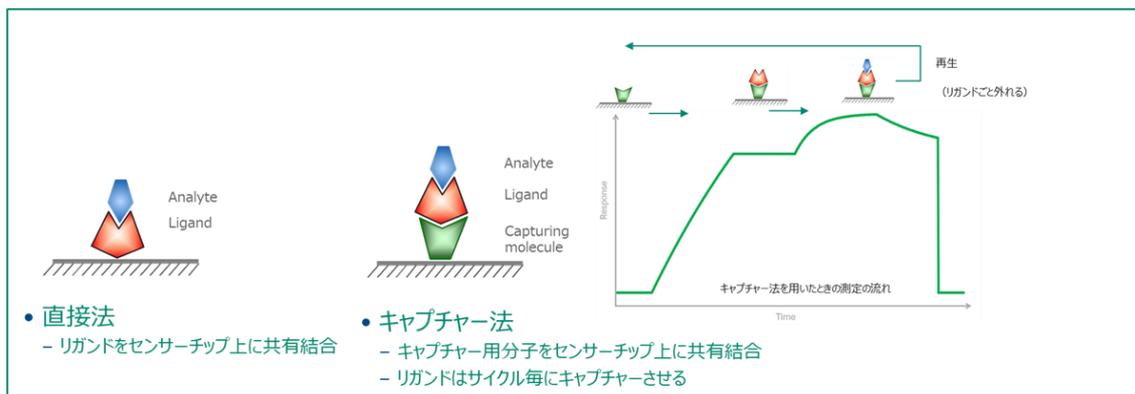
各種抗体 Capture kit の固定化⇒ [4-1 参照](#)

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。見つけられないケースがある。 リガンドの固定化時の酸に伴う変性。 → 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

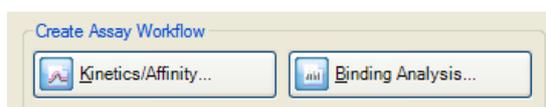
A. 手順概略

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	4-1C 参照

B. 準備する試薬・サンプル

各センサーチップおよび各種抗体 Capture kit の Instruction For Use (IFU)を併せてご参照ください

C. ソフトの操作のポイント



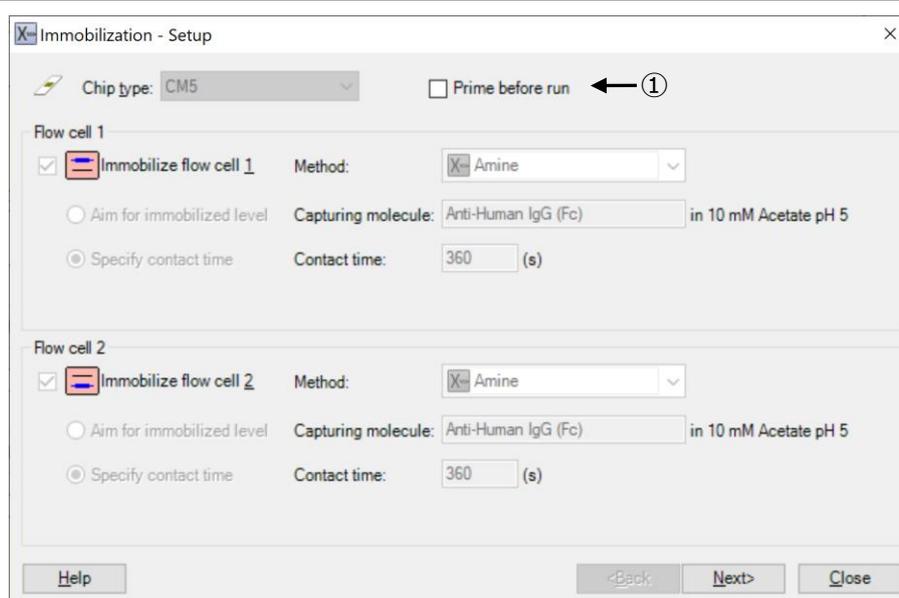
Create Assay Workflow から、

はじめに Kinetics/Affinity (キャラクタリゼーション) か Binding Analysis (結合の Yes/No) を選択し、Workflow を作成します (2-1 参照)。

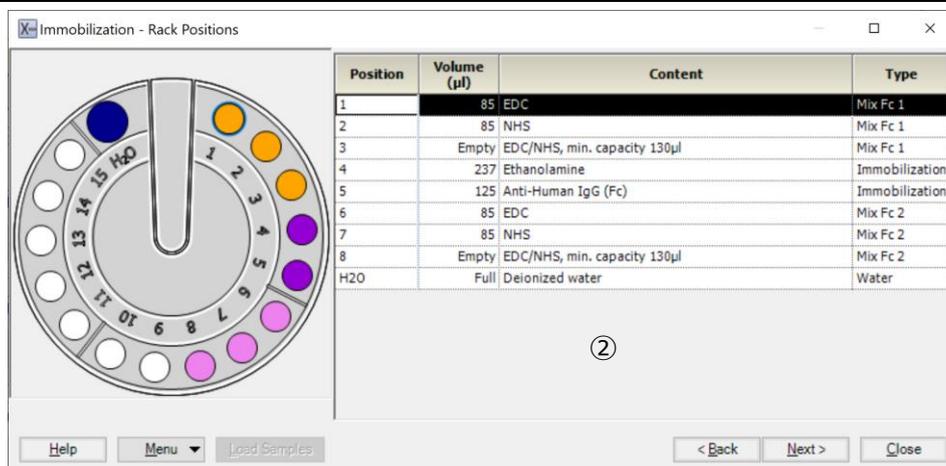
作成した Workflow から、Surface preparation→Immobilization→  Run

各種 Antibody Capture kit を用いる場合、固定化条件が決まっているため、特に設定項目はありません。

手順	操作項目	注意点・説明
①	Prime before run	起動後、Prime 実施済みであればチェックを外す。



手順	操作項目	注意点・説明
②	Rack Position	表示に従って分注 (2-1 参照) 分注後 Next→固定化開始



D 固定化量の確認

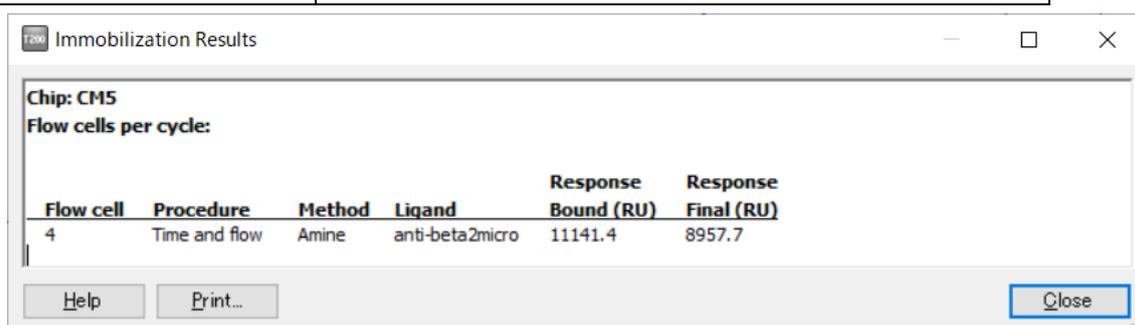
測定結果のウィンドウ（Response Bound または Response Final）で確認する。

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。

4-2. 抗体のスクリーニング

結合の有無を確認、ランキングなどを行う場合に実施します。

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	<ul style="list-style-type: none"> • Work Flow または Wizard による Binding Analysis • 抗体を、結合レスポンスの高さで選出する

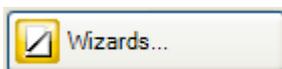
B. 準備する試薬・サンプル

	操作項目	用途、備考
必須	ランニングバッファー	メソッド作成時の画面から必要量を確認。加えて自動測定後の stanby flow での放置時間分として 200 ml / 7 days
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
オプション	ネガティブコントロール	ネガティブレスポンスの確認

C. メソッドの作成

手順	操作項目	参照
①	複数の抗体 (リガンド) を評価	Custom Assay Wizard を用いる。
②	1 種類の抗体 (リガンド) に対して、複数の抗原 (アナライト) を評価	Binding Analysis の Work Flow 作成 (2-2 参照) Workflow の Run Binding Analysis Assay→  Run から測定可能。

ここでは①の手順を示します。

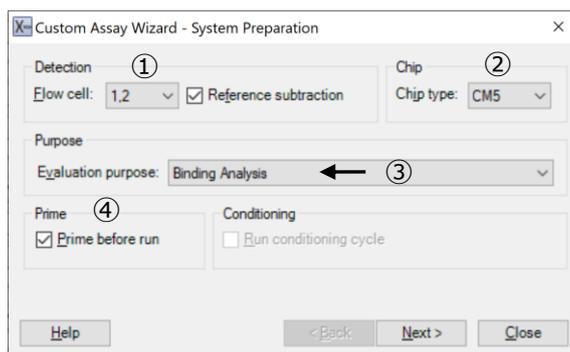


Wizards から、Assay→ Custom Assay Wizard → Biacore Template →

Binding analysis→Open

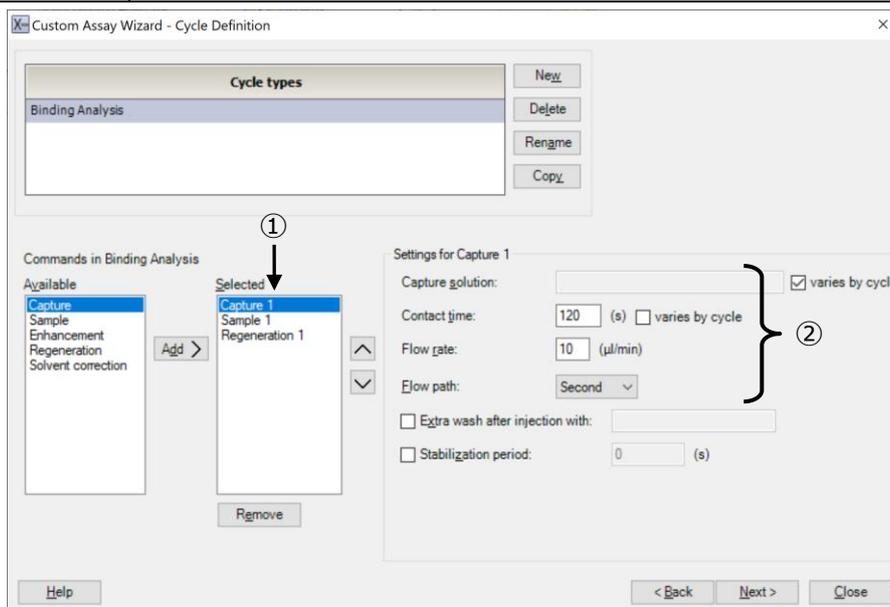
C-1. システムの準備

手順	操作項目	注意点・説明
①	Detection	<ul style="list-style-type: none"> Flow Cell に 1,2 を使用。 Reference subtraction にチェック
②	Chip	Chip type として、今回は CM5 を選択
③	Purpose	スクリーニングの場合は、Binding Analysis
④	Prime before run	起動後、Prime 実施済みであればチェックを外す



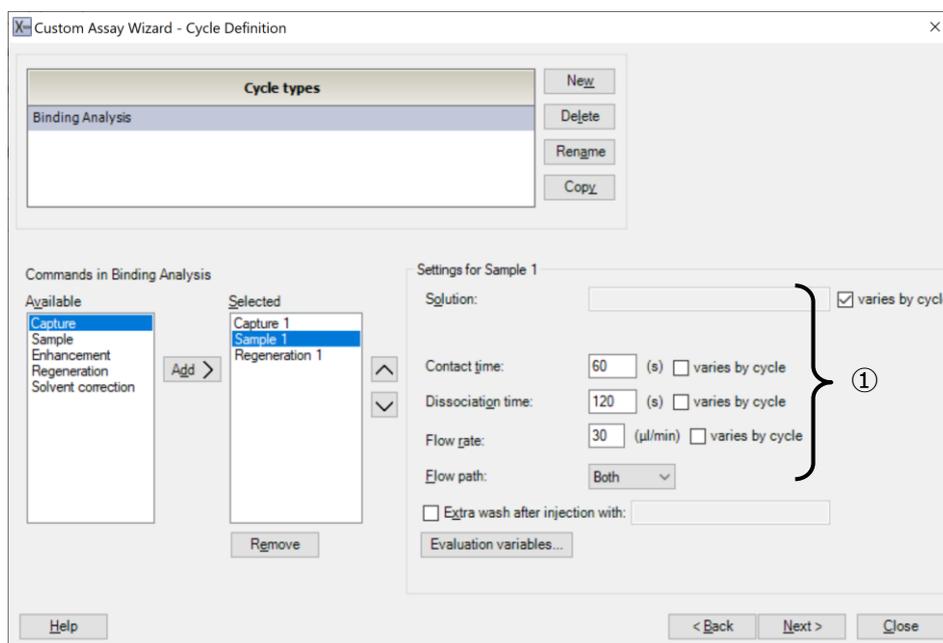
C-2. 添加条件等の設定 - Capture1

手順	操作項目	注意点・説明
①	Command in Kinetics	キャプチャー法を用いた抗体評価の場合、Sample の前に Capture1 を追加する。
②	測定条件	Capture Solution : varies by cycle をチェック（複数抗体の添加） Contact Time : 60-180 秒 / Flow rate : 10 μ l/min. / Flow Path : Second



C-3. 添加条件等の設定 – Sample/Regeneration

手順	操作項目	注意点・説明
①	測定条件	<ul style="list-style-type: none"> •Sample1（抗原の添加） Solution：抗原の名称。複数の場合 varies by cycle をチェック Contact Time：60-120 秒／Dissociation time：120-180 秒／ Flow late：通常 30 μl/min.／Flow Path：Both •Regeneration1（再生溶液） 詳細は各種 Ab Capture kit または Sensor chip IFU 参照 ／Flow Path：Both



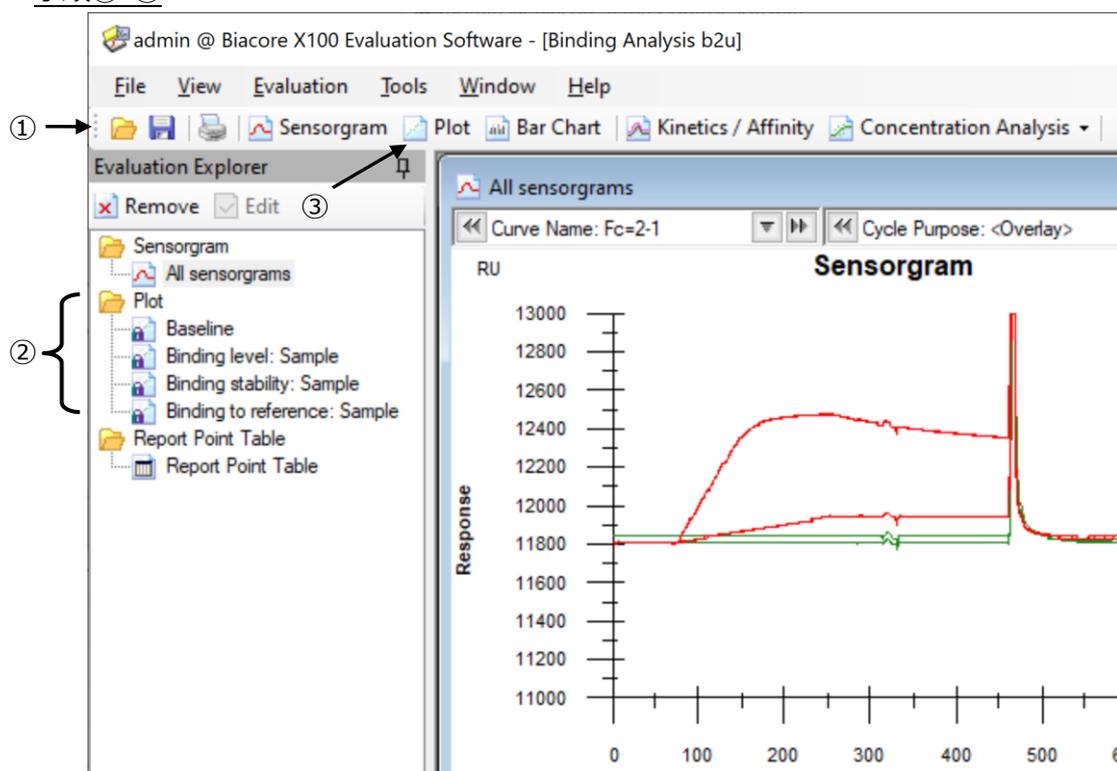
C-4. サンプル個別条件の設定

手順	操作項目	注意点・説明
①	Concentration Unit	濃度単位の選択
②	Cycle Purpose	各サイクルの目的。サンプル添加前に、Startup 3 回、Solvent correction 1 回を入れる。
③	Sample 情報	Varies とした抗体/抗原に関する、名称、濃度、分子量を入力
④	Rack Position	表示に従って分注 (2-1 参照) 分注後 Next→測定開始

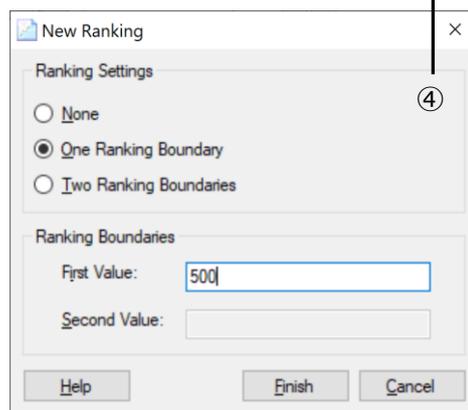
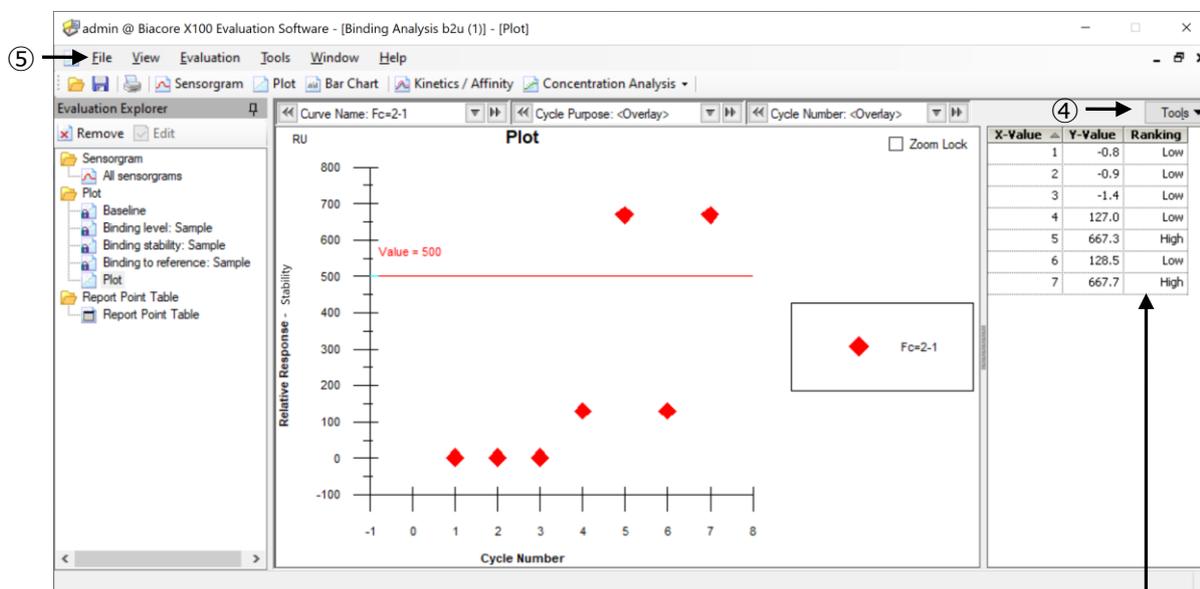
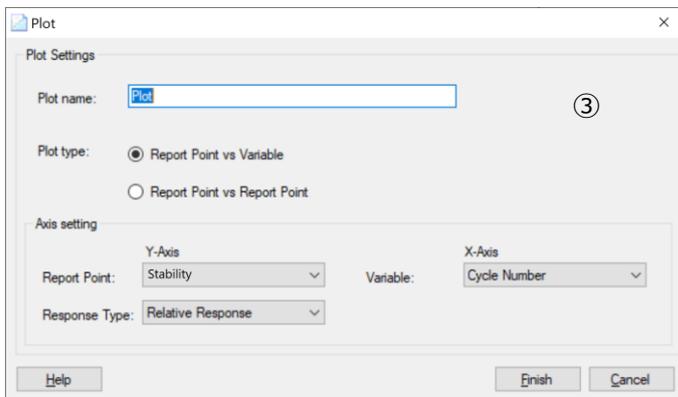
D. スクリーニングプロットのデータプロセッシングと解析

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 	<ul style="list-style-type: none"> ・解析ソフト Biacore X100 Evaluation software デフォルト User : admin / Pass : administrator ・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	<ul style="list-style-type: none"> ・③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	Plot の作成	例) Y 軸に Stability Relative response、X 軸に Cycle number
④	Ranking	Tools→Ranking を選択。 1 点または 2 点の閾値を設定して、ランキングを設定
⑤	結果のエキスポート	⑤を経たデータ Table 等を Excel 形式でのエキスポート メニューバーの File→Export

手順①~③

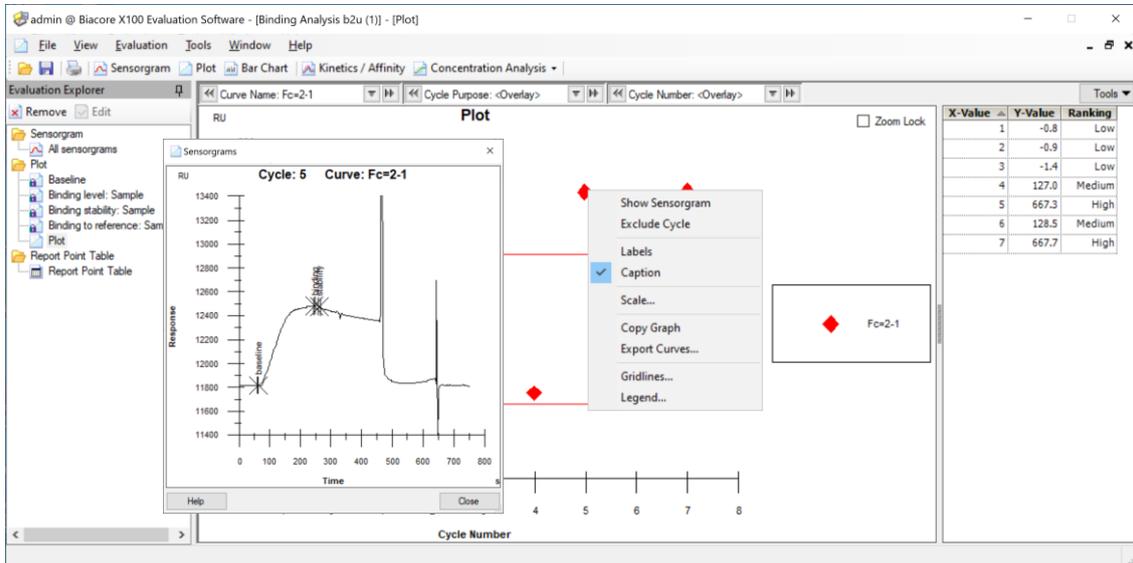


手順③～⑤データプロセッシング



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

Show Sensorgram を選択



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サンプル

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

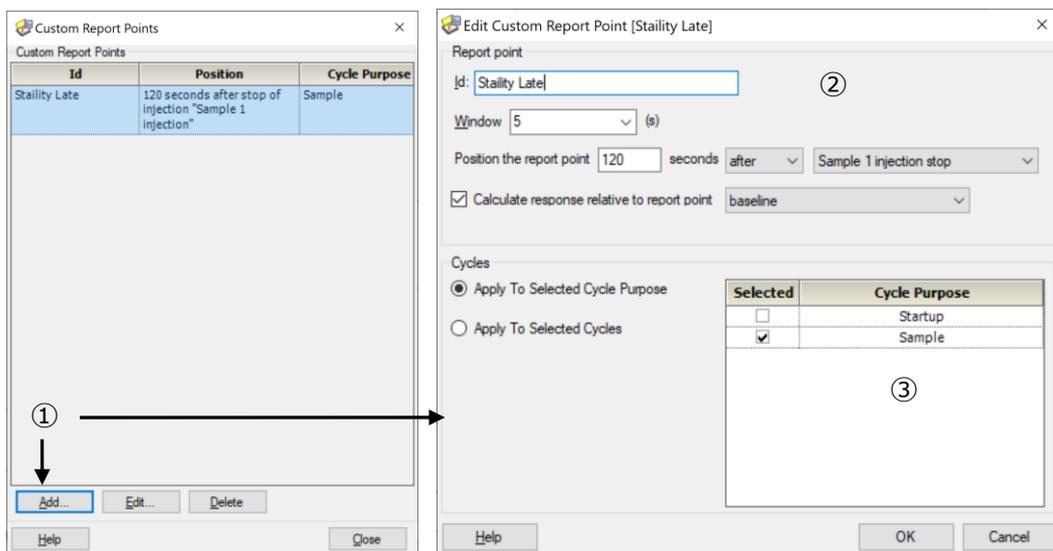
← Blankは濃度値が0のものがサンプル名に依存せず選ぶことができる

補足：Stability early vs Stability late のプロット

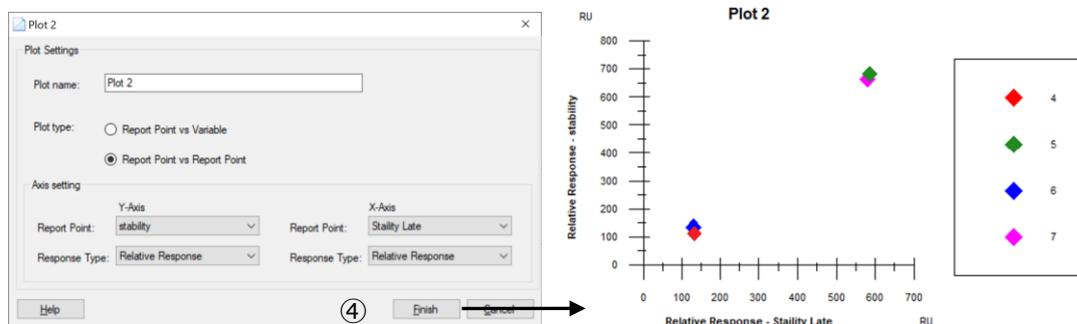
解離相の前半と後半のレポートポイントのプロットすることで、複合体の安定性の良い抗体を選別することができます。デフォルトの Stability は、インジェクション終了 20 秒後の 5 秒間平均です。

手順	操作項目	注意点・説明
①	Custom Report Points	<ul style="list-style-type: none"> メニューバーの Tools→Custom Report Points 選択 Add をクリック
②	Custom Report	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	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.	アナライトの添加濃度・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

アナライトの添加濃度・時間の設定 **(6-2 参照)**

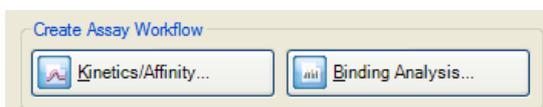
A-2

センサーチップ	用途
Sensor Chip Protein A Sensor Chip Protein G	<ul style="list-style-type: none"> ・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	<ul style="list-style-type: none"> ・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	<ul style="list-style-type: none"> ・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 200 ml/7 days
必須	抗原アナライト溶液	

C. メソッドの作成



Create Assay Workflow から、

Kinetics/Affinity (キャラクタリゼーション) を選択し、Workflow を作成します **(2-1 参照)**。

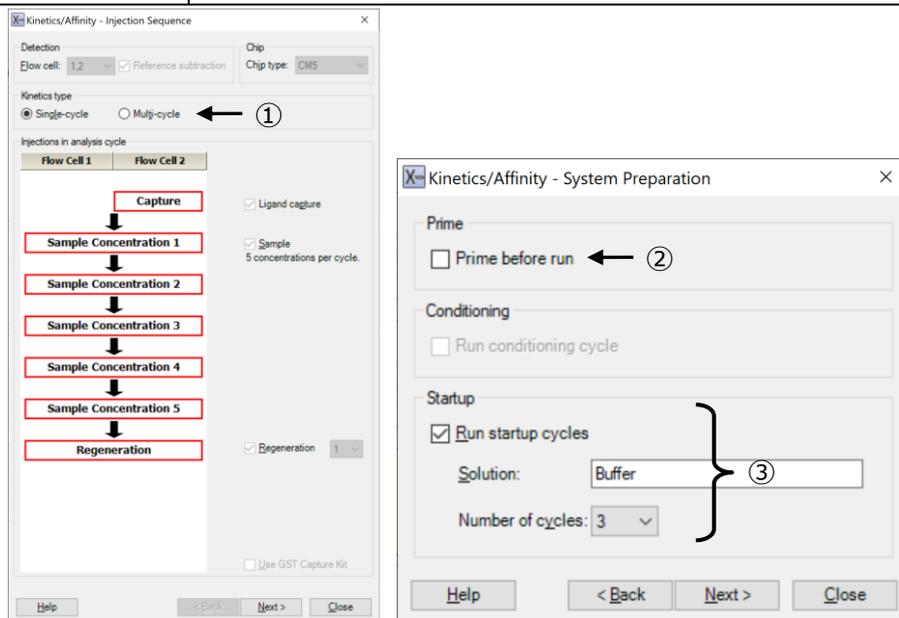
作成した Workflow から、Assay→Run Kinetics/Affinity Assay→



Run

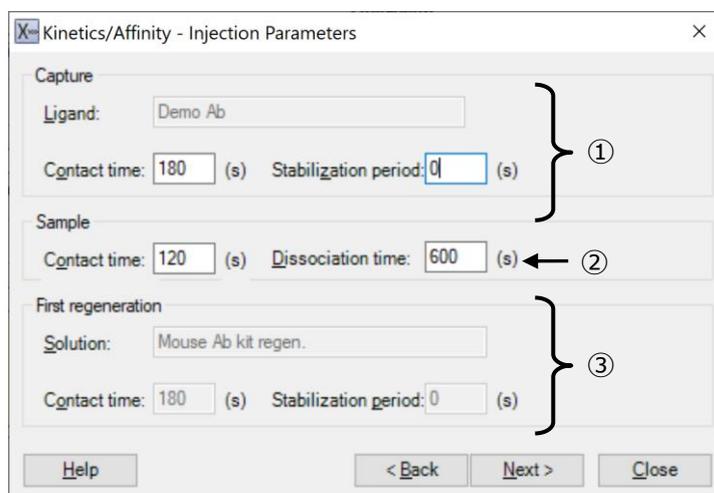
C-1. システムの準備

手順	操作項目	注意点・説明
①	Kinetics Type	<ul style="list-style-type: none"> • Single-cycle、Multi-cycle から選択 • 抗体評価では多くの場合 Single-cycle を選択
②	Prime before run	起動後、Prime 実施済みであればチェックを外す
③	Startup	通常、ランニング緩衝液で 3 回以上



C-2. 添加条件等の設定

手順	操作項目	注意点・説明
①	Capture	Contact Time：要検討（抗体リガンド添加） Stabilization period：キャプチャー後のレスポンスが不安定な場合に設定
②	Sample	Contact Time / Dissociation time：要検討（抗原アナライツ添加）
③	Regeneration	キットの場合、条件は固定



C-4. サンプル個別条件の設定

手順	操作項目	注意点・説明
①	Concentration Unit	濃度単位の選択
②	Sample ID / MW	抗原アナライトの名称と分子量
③	Concentration	<ul style="list-style-type: none"> ・0 濃度は 2 サイクル用意する ・最高濃度と希釈率を入力して、濃度 5 点設定
④	Rack Position	表示に従って分注 (2-1 参照) 分注後 Next→測定開始

Kinetics/Affinity - Samples

Samples

	Sample id	MW (Da)	Highest Concentration		Dilution	Conc (1) (nM)	Conc (2) (nM)	Conc (3) (nM)	Conc (4) (nM)	Conc (5) (nM)
			nM	µg/ml						
1	Ag1	30000	0	0	5	0	0	0	0	0
2	Ag1	30000	0	0	5	0	0	0	0	0
3	Ag1	30000	100	3.00	3	1.23	3.70	11.1	33.3	100
4										

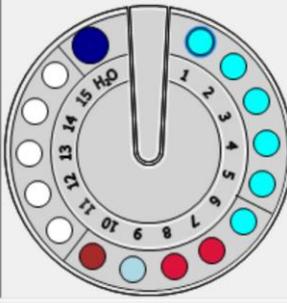
① (table header)

② (Sample id, MW, Highest Concentration)

③ (Dilution, Conc (1) to Conc (5))

Buttons: Help, < Back, Next >, Close

Kinetics/Affinity - Rack Positions



Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 MW (Da)	Sample 1 Conc (nM)
1	915	Ag1	Sample	30000	0
2	105	Ag1	Sample	30000	1.23
3	105	Ag1	Sample	30000	3.7
4	105	Ag1	Sample	30000	11.1
5	105	Ag1	Sample	30000	33.3
6	105	Ag1	Sample	30000	100
7	1275	Buffer	Startup		
8	105	Buffer	Startup		
9	255	Demo Ab	Capture		
10	345	Mouse Ab kit regen.	Regeneration		
H2O	Full	Deionized water	Water		

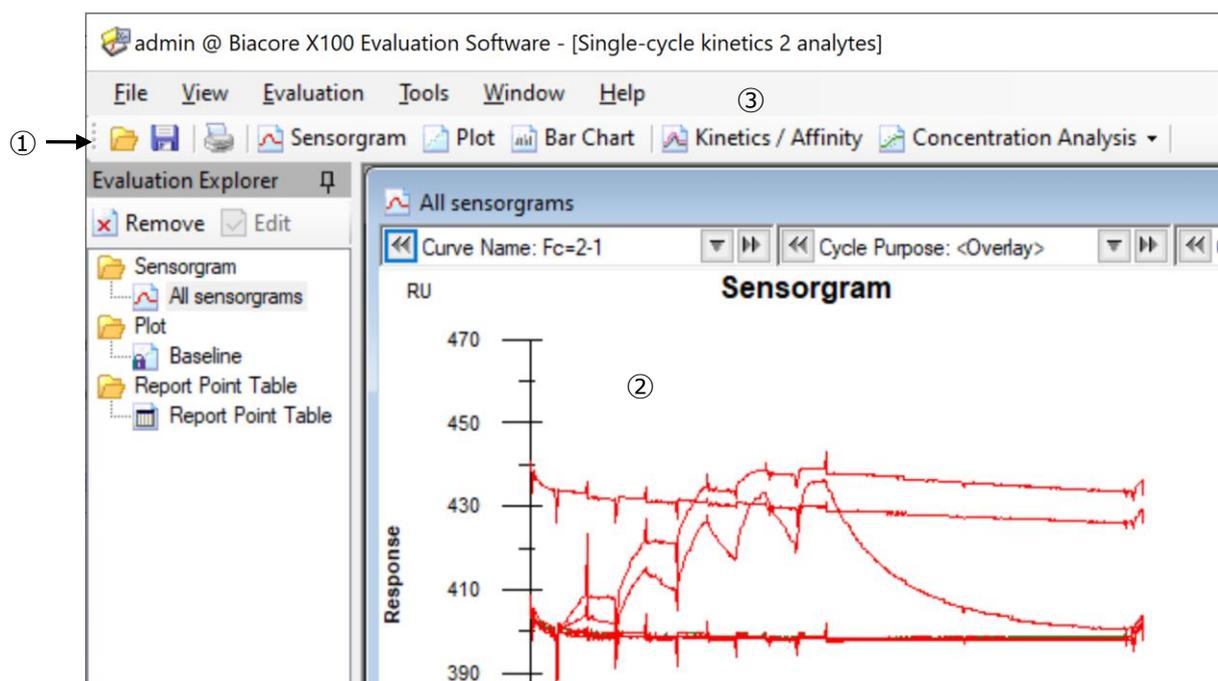
⑤ (table)

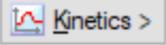
Buttons: Help, Menu, Load Samples, < Back, Next >, Close

D. 解析 (K_D , k_a , k_d の算出)

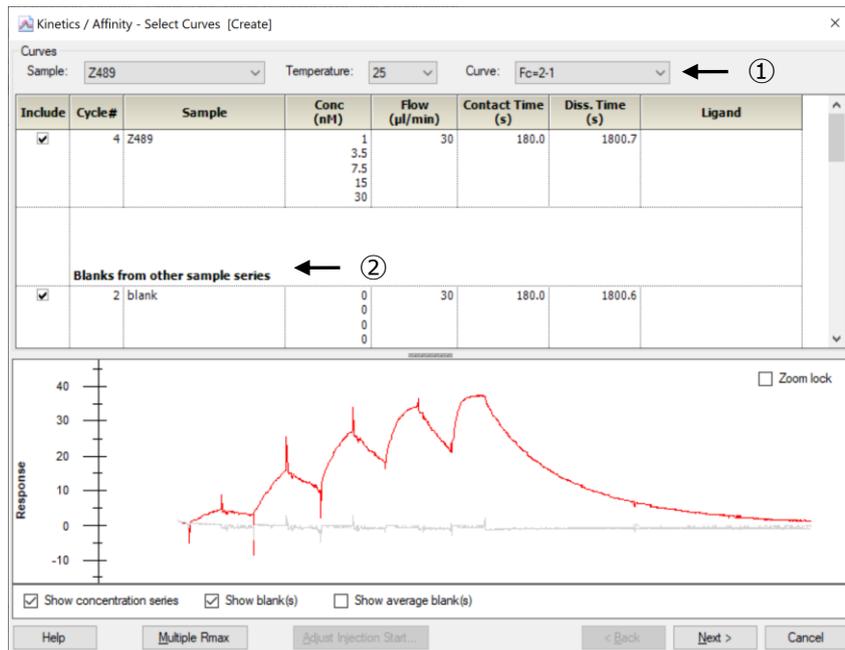
手順	操作項目	注意点・説明
①	解析ソフトで Run ファイルを開く 	<ul style="list-style-type: none"> ・解析ソフト Biacore X100 Evaluation software ・デフォルト User : admin / Pass : administrator ・run 終了時、自動的に立ち上がる ・別日に解析の場合は.blr (結果ファイル) を Open
②	特異的結合の確認	センサーグラムの確認 (6-7 参照)
③	Kinetics / Affinity →Kinetics	センサーグラムの解離相の形状が一定の遅さで降下し k_a , k_d の算出が可能な場合に適用
③	Kinetics / Affinity →Affinity	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①~③

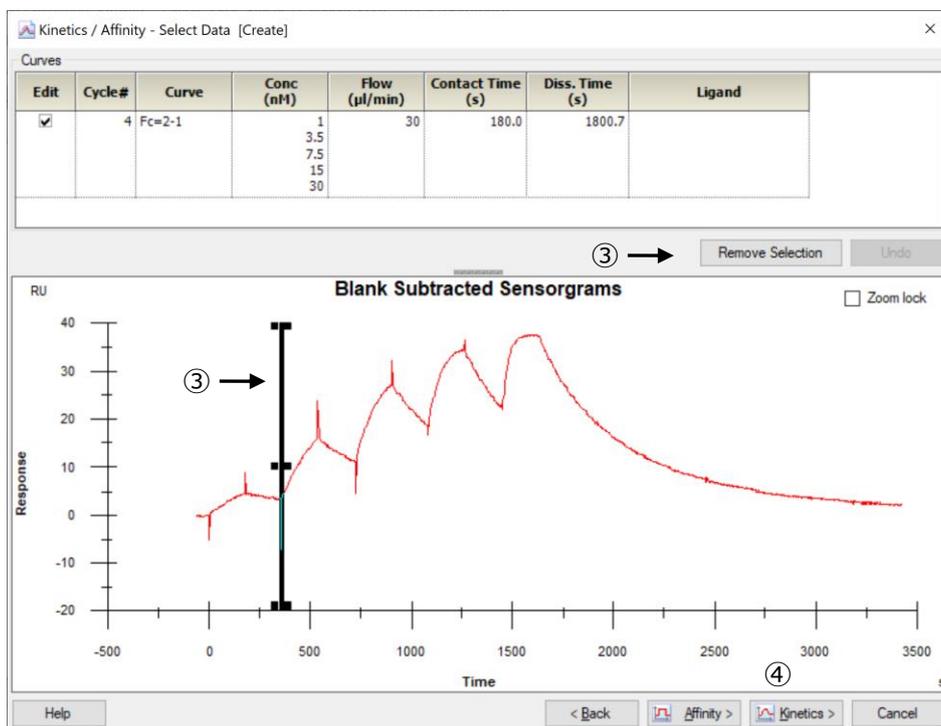


手順	操作項目	注意点・説明
①	解析対象サンプル等の選択	<ul style="list-style-type: none"> • Tool bar の  Kinetics / Affinity を選択 • Sample : 解析対象の選択 • Curve : Fc=2-1 を選択
②	ブランク (0 濃度) の選択	サンプルと同一名称の 0 濃度が無い場合、ほかのシリーズから選択
③	センサーグラムの一部削除 (オプション)	<ul style="list-style-type: none"> • アナライト添加の切り替え時に発生するスパイクノイズの削除 • 一時的に異常形状になったセンサーグラム領域の削除 右クリックで領域指定→Remove Selection
④	Kinetics	 を選択
⑤	フィッティング条件の設定→実行	<ul style="list-style-type: none"> • Model : 解析モデルの選択 (6-9-1 参照) • Parameters : (6-9-1 参照) • Fit : Fitting 対象のセンサーグラムの選択
⑥	解析結果の評価	6-10-1 参照

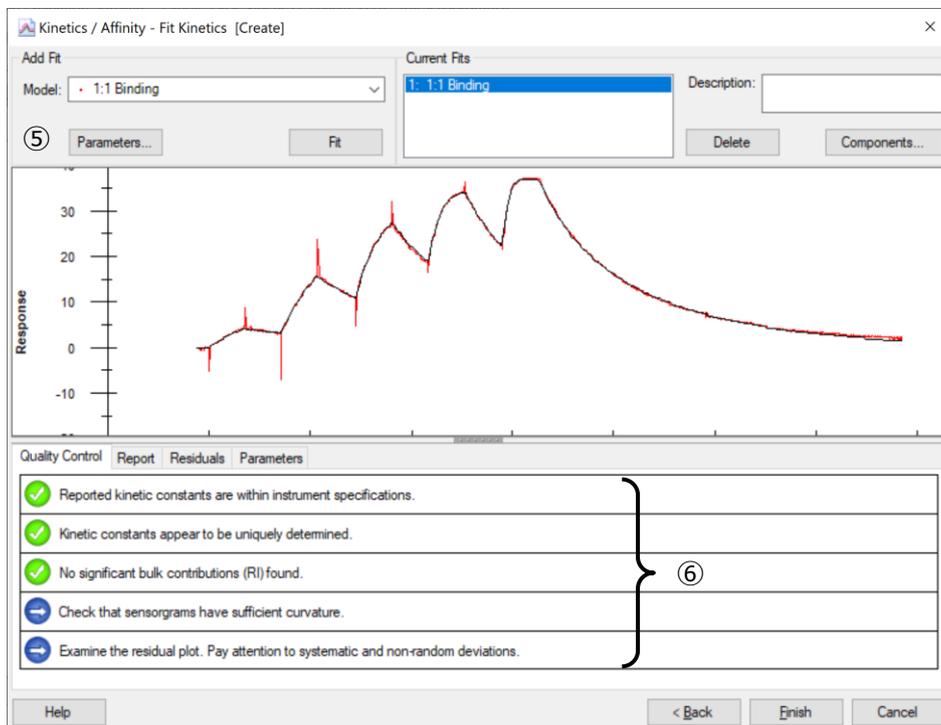
手順①～②



手順③～④



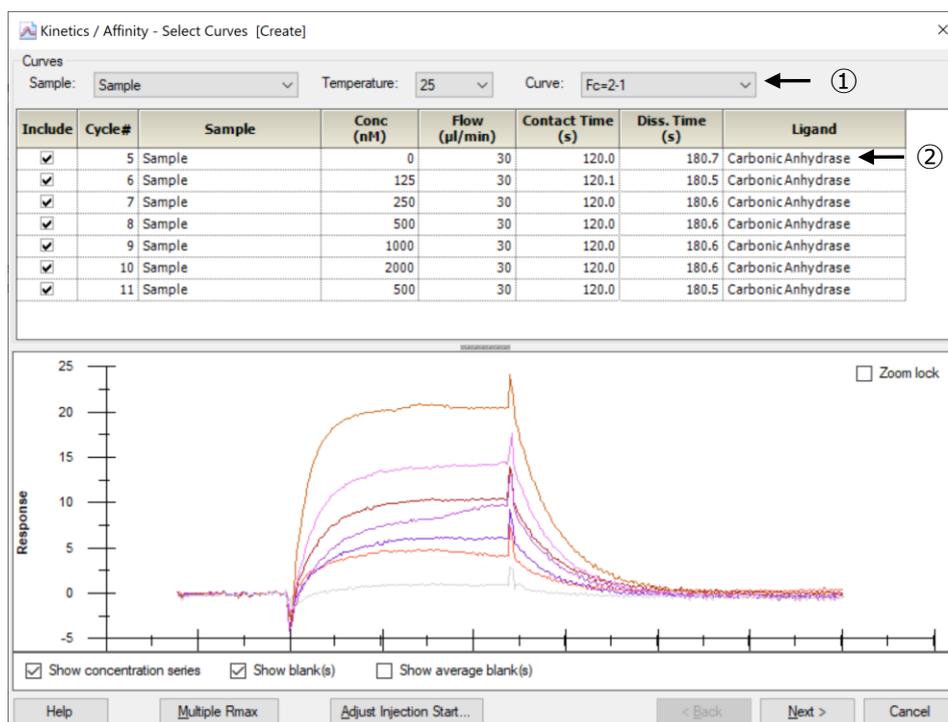
手順⑤～⑥



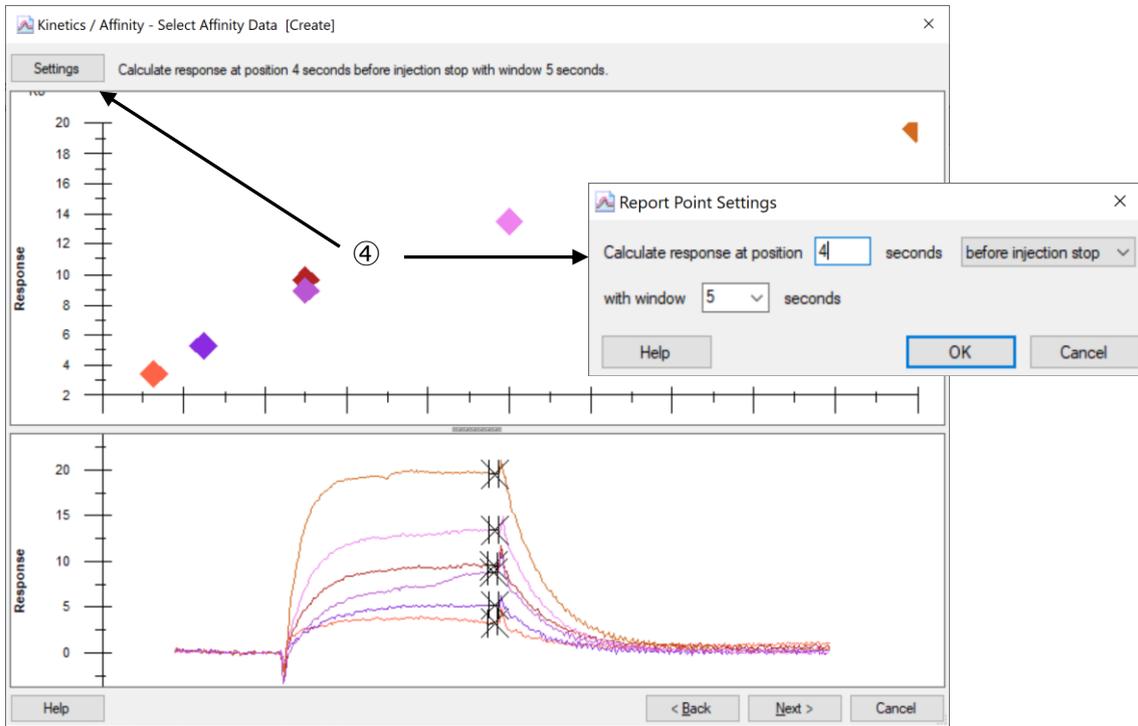
手順④-2 Affinity 解析

手順	操作項目	注意点・説明
①	解析対象サンプル等の選択	<ul style="list-style-type: none"> • Tool bar の  Kinetics / Affinity を選択 • Sample : 解析対象の選択 • Curve : Fc=2-1 を選択
②	ブランク (0 濃度) の選択	サンプルと同一名称の 0 濃度が無い場合、ほかのシリーズから選択
③	Affinity	 を選択
④	Setting	<ul style="list-style-type: none"> • 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	フィッティング条件の設定→実行	<ul style="list-style-type: none"> • Model : 解析モデルの選択 (6-9-1 参照) • Parameters : (6-9-1 参照) • Fit : Fitting 対象のセンサーグラムの選択
⑥	解析結果の評価	6-10-1 参照

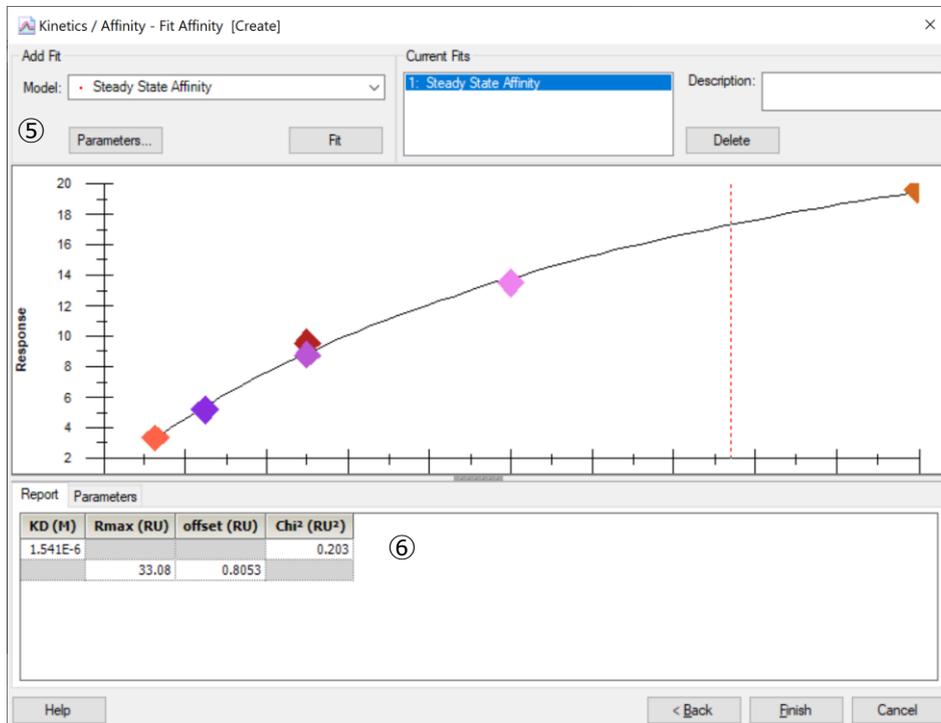
手順①～②



手順④



手順⑤~⑥

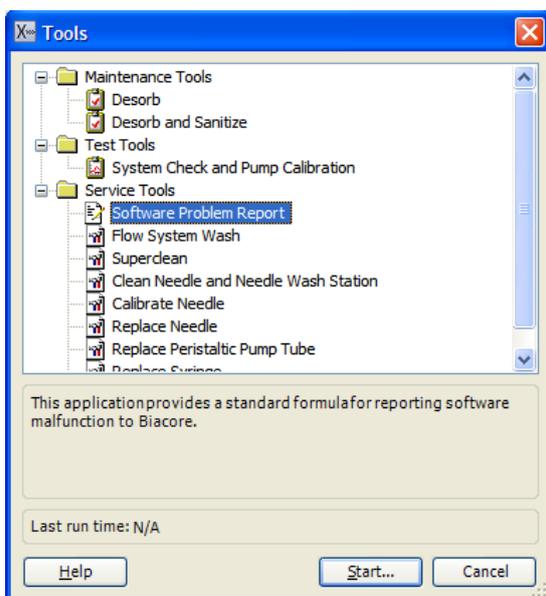


5. メンテナンス・システムチェック・シャットダウン

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	BIAmaintenance Kit ・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

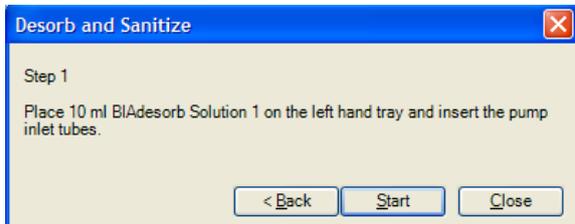
C-1. Desorb (毎週) の手順

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
ウイザードの実行	ウイザードに従い 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	<ul style="list-style-type: none"> 自動的に Stanby flow (200 ml / 7days) 次の実験前に 3-4 時間以上の Stanby flow か Prime の 3 回実施

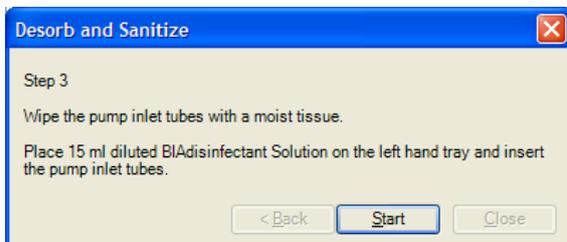
C-2. Desorb and Sanitize (毎月) の手順

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
ウイザードの実行	洗浄溶液は装置左側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	<ul style="list-style-type: none"> 自動的に Stanby flow (200 ml / 7days) 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 を装置左側のインレットチューブ用 (10ml) 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) を装置左側のインレットチューブ用 (15ml) に設置

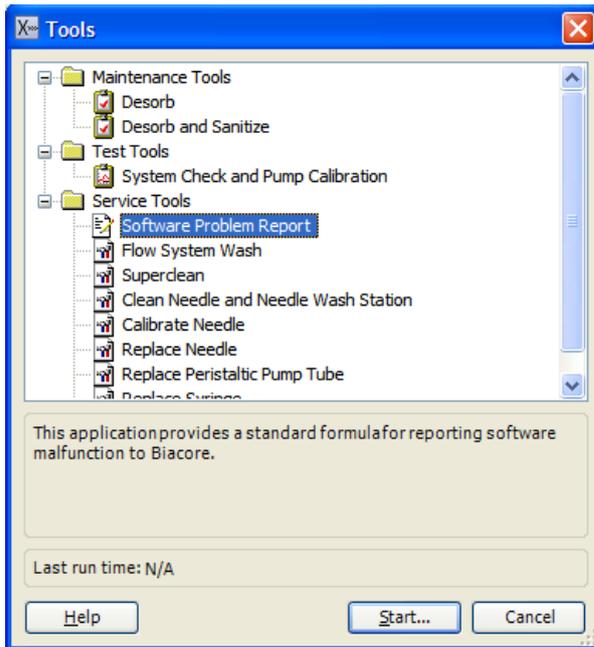


- (Step4) 同様に超純水をインレットチューブに設置

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 and Pump Calibration

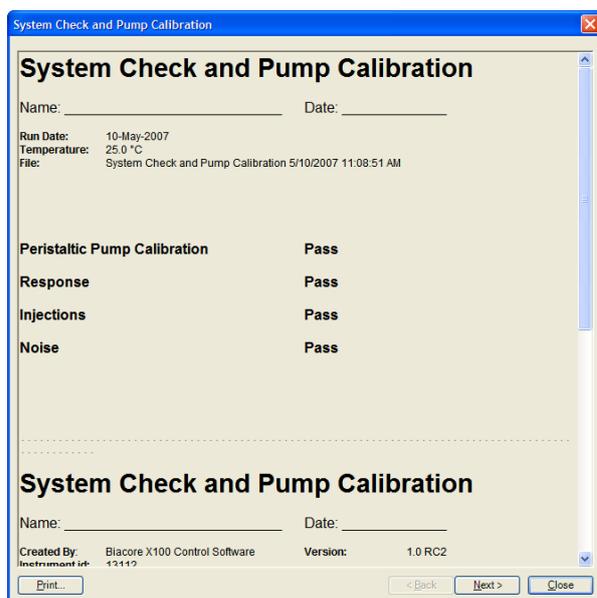


B. 準備する試薬、消耗品・注意点

Desorb : (D)	必要試薬・消耗品
Desorb and Sanitize (D&S)	
BIAtest solution	BIAmaintenance Kit 内
HBS-EP + Buffer	150 ml 程度
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-EP + をランニングバッファーとし Prime
温度設定	25°Cに設定
ウイザードの実行	
結果の確認	<p>・正常範囲内：PASS 範囲外：FAIL</p> <p>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。</p>



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。

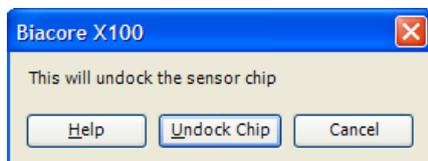
チューブ A にセットしたランニング緩衝液で、65 ml/ 24 時間の流速を最長 7 日間継続します。ランニングバッファを涸らさないように注意してください。廃液ボトルの空き容量にも注意してください。

スタンバイ状態であるか否かは、ウィンドウ下の **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** → **Undock Chip...** を選択します。



Undock Chip をクリックします。



センサーチップを取り出し、Biacore X100 control software を終了します。

Windows の Start メニューから、All Programs → Oracle Database 11g Express Edition → Stop Database を実行します。



パソコンのシャットダウン、Biacore X100 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。

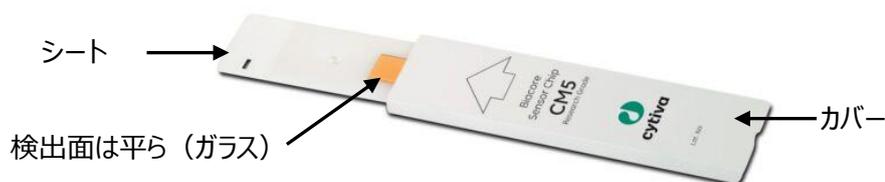
安定なサンプルを固定したセンサーチップの保存に用います。

ウェット状態での保存

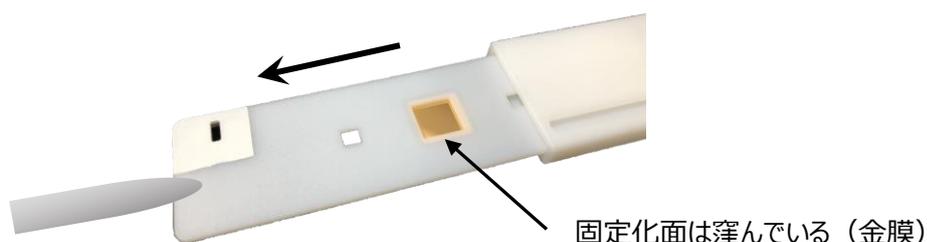
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを容器（50 ml 容のふた付きプラスチック遠心チューブ等）に分注した HBS-EP+などの緩衝液に浸し、4℃で保存します。

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

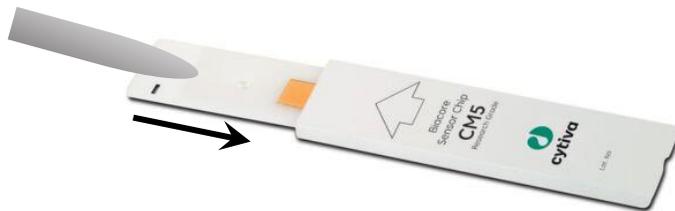
キムワイブで拭き、超純水で湿らせたキムワイブで再度拭きます。さらに乾いたキムワイブで拭きます。

固定化面

キムワイブなどを“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	37
6-2. アナライトの添加条件設定	41
6-3. 再生条件の設定	46
6-4. リガンドの Biotin 化	48
6-5. リファレンスライン	49
6-6. 溶媒 (DMSO) 補正 (Solvent Correction)	50
6-7. 特異的結合の確認	52
6-8. Keyword Table によるサンプル名、濃度などの修正	54
6-9. フィッティングモデル式と parameters の設定	55
6-9-1. Kinetics 解析	55
6-9-2. Affinity 解析	56
6-10. 解析結果の品質評価	58
6-10-1. Kinetics 解析	58
6-10-2. Affinity 解析	60
6-11. 用語集	61

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	<ul style="list-style-type: none"> ・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	<ul style="list-style-type: none"> ・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

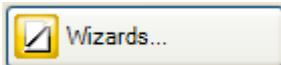
一般的に固定化するタンパク質は数十 $\mu\text{g/ml}$ オーダー程度が適当ですが、サンプルや目標とする固定化量により異なります。

* 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

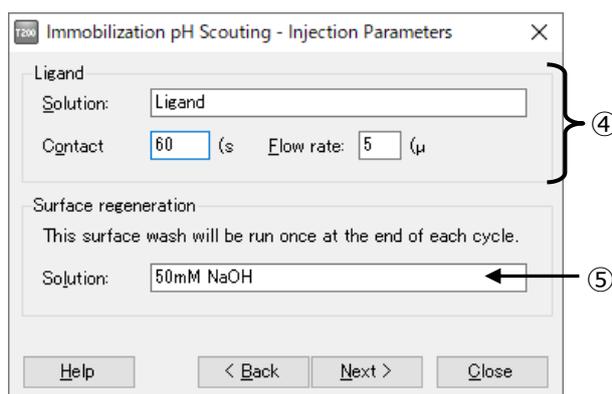
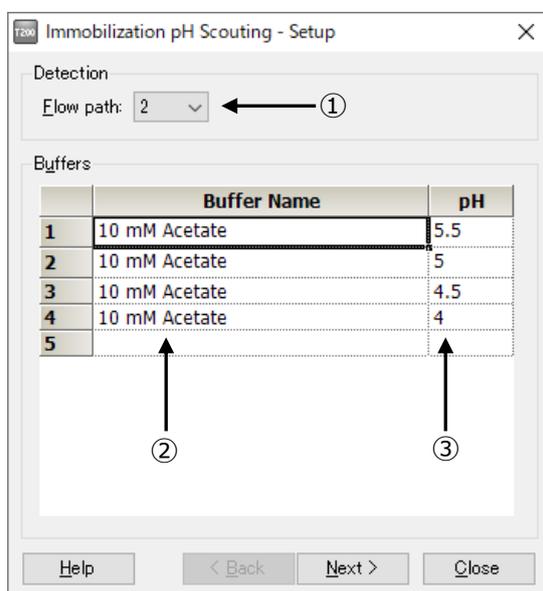
使用すべきリガンド希釈液が不明な場合、はじめに pH Scouting を行います。



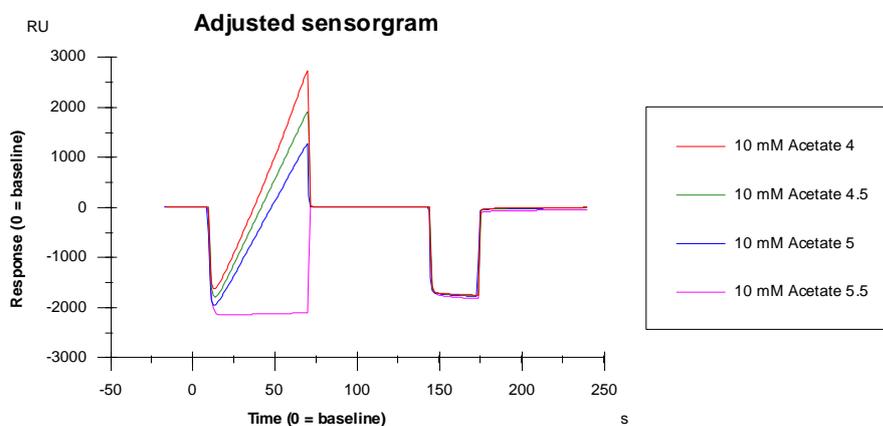
Wizards から、Surface preparation→Immobilization pH Scouting→New

Assay Workflow を作成している場合は、Find Immobilization pH→Run to find out

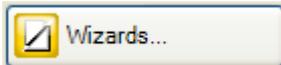
手順	操作項目	注意点・説明
①	Fc の選択	
②	Buffer name	使用する希釈液名称
③	pH	使用する希釈液の pH
④	リガンド添加時間・流速	通常 60 秒、5μl/分
⑤	センサーチップ洗浄液	通常 50mM NaOH



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。

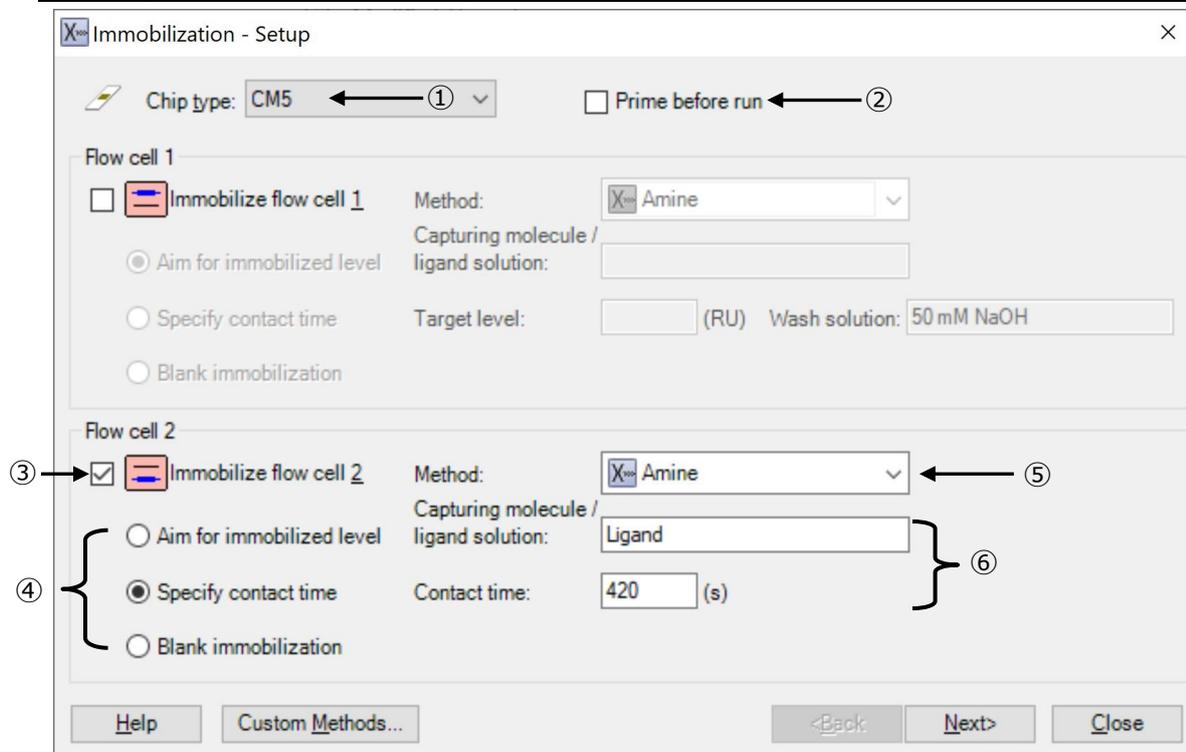


D. ソフトの操作のポイント ～ Amine Coupling



Wizards から、Surface preparation→Immobilization→New

手順	操作項目	注意点・説明
①	センサーチップの選択	
②	Prime before run	起動後、Prime 実施済みであればチェックを外す
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	リガンド名称・添加時間	通常 420 秒



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

Chip: CM5
Flow cells per cycle:

Flow cell	Procedure	Method	Ligand	Response Bound (RU)	Response Final (RU)
4	Time and flow	Amine	anti-beta2micro	11141.4	8957.7

Buttons: Help, Print..., Close

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

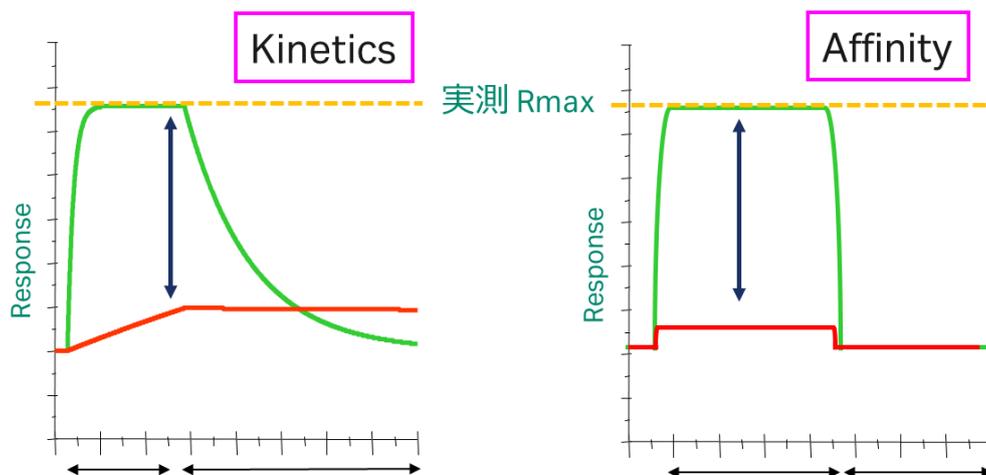
アナライト添加時に十分なレスポンスが得られるか、実際にアナライトを添加したときのレスポンスが結合部位特異的かどうかなどを見積もるために利用します。

6-2. アナライトの添加条件設定

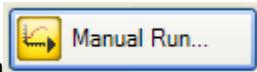
アナライトは、通常、 R_{max} 近くからギリギリレスポンスが得られる範囲で、～3桁程度の添加濃度レンジで添加します。濃度5点を取る場合、3倍希釈シリーズ程度です。

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

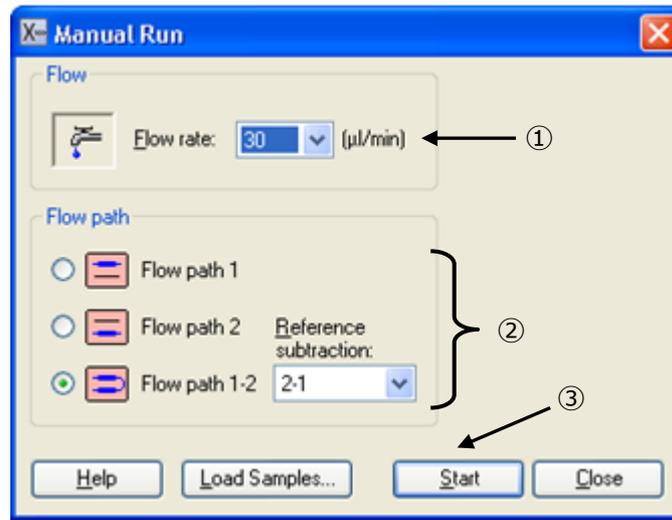


B. Manual Run による条件検討

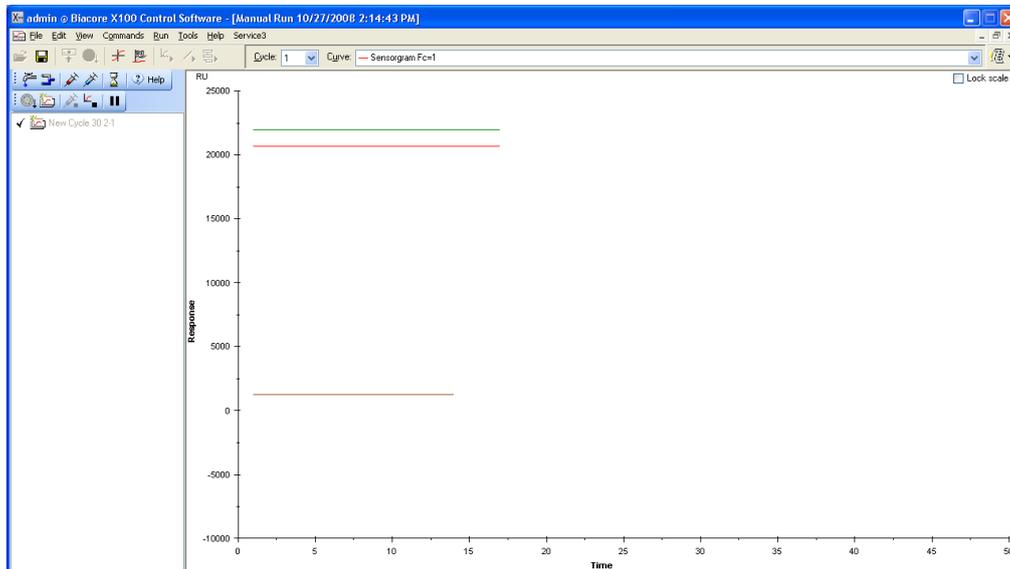


Manual run (2-2 参照) を実行します。

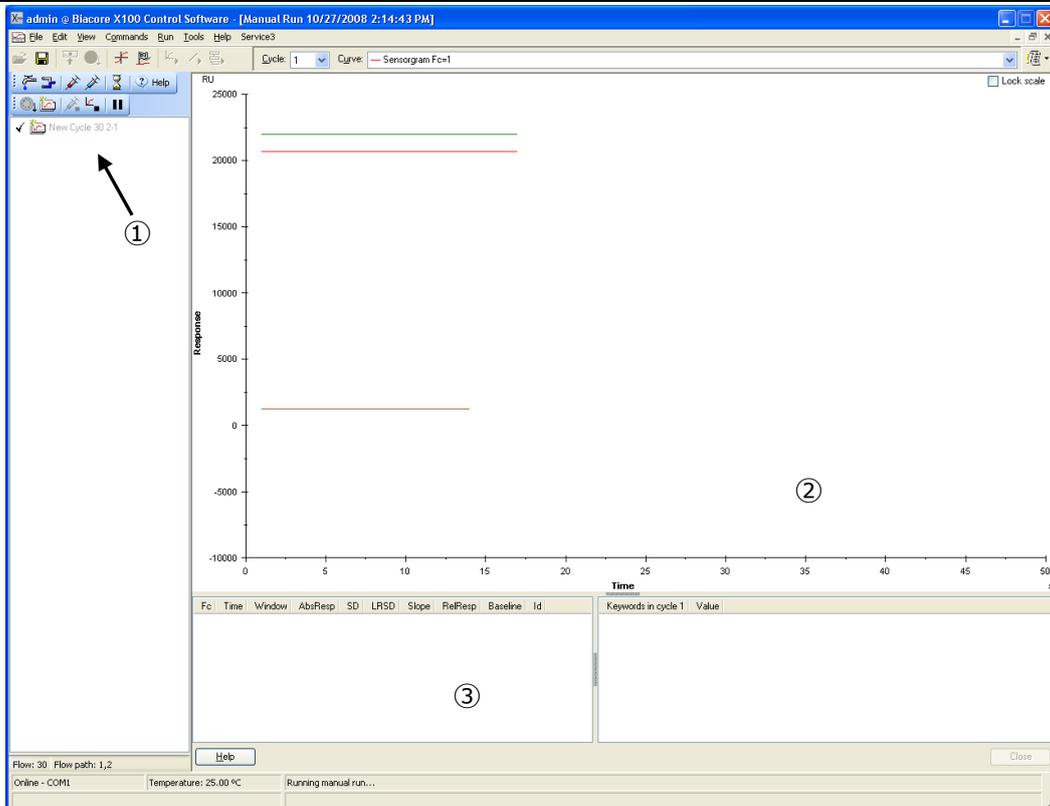
手順	操作項目	注意点・説明
①	Flow rate	はじめに添加するサンプルの流速を決めます。
②	Flow path	使用する Flow path の選択。
③	Start	測定開始



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-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 5 μ l/min.、Flow path 2-1 で開始した場合

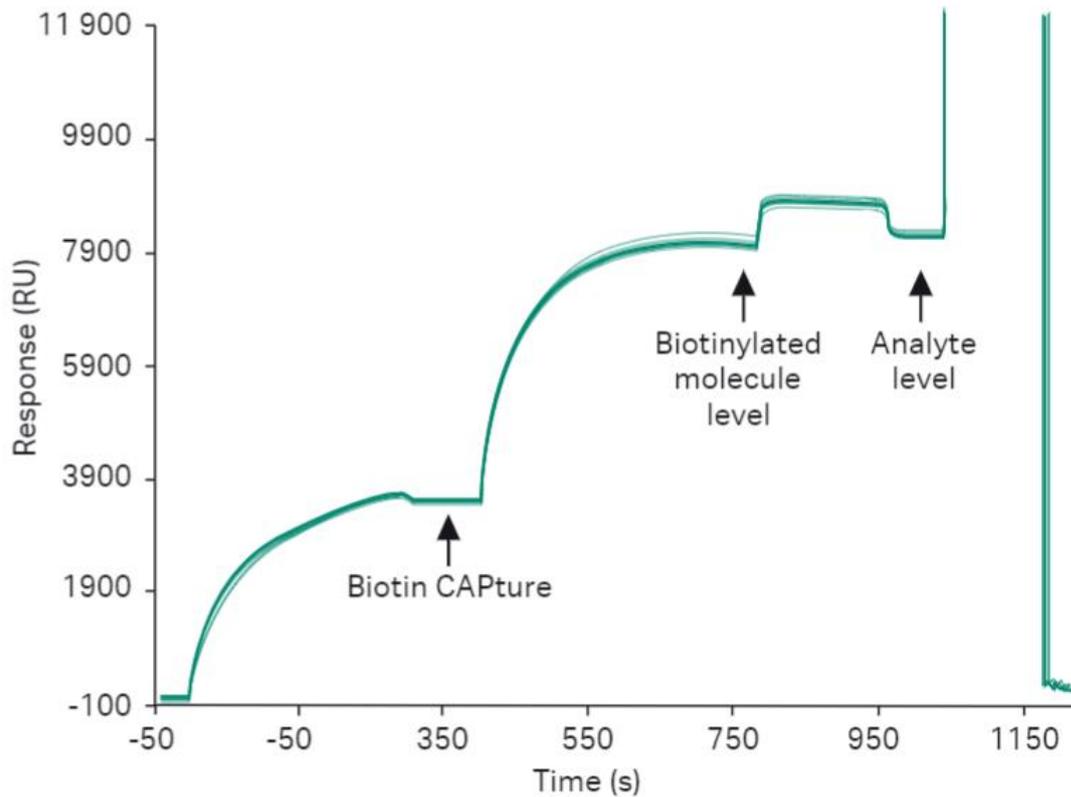
各センサーチップの Instruction For Use (IFU)を併せてご参照ください

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 (5 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 Fc1、Fc2 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 2 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 Fc2 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 Fc1 に非特異的結合がないこと、Fc2-1 で理論的 Rmax 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 Fc1、Fc2 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（Fc2）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）。情報がいない場合、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

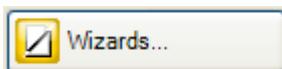
Regeneration Scouting Kit（BR100556）

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



Wizards から、Assay Development→Regeneration Scouting→New

Assay Workflow を作成している場合は、Find Regeneration Condition→Run to find out

手順	操作項目	注意点・説明
①	Injection Sequence	Fc/ Sensor Chip の選択
②	System Preparation	通常、未入力のまま
③	Injection Parameter	アナライト名称、通常 60-120 秒
④	Stabilization period	次サイクルへの待機時間
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
 Stabilization period: 0 (s) ← ④

Experimental design
 Number of conditions: 7 ← ⑤
 Number of cycles for each condition: 5 ← ⑥
 Lock: Solutions
 Contact times

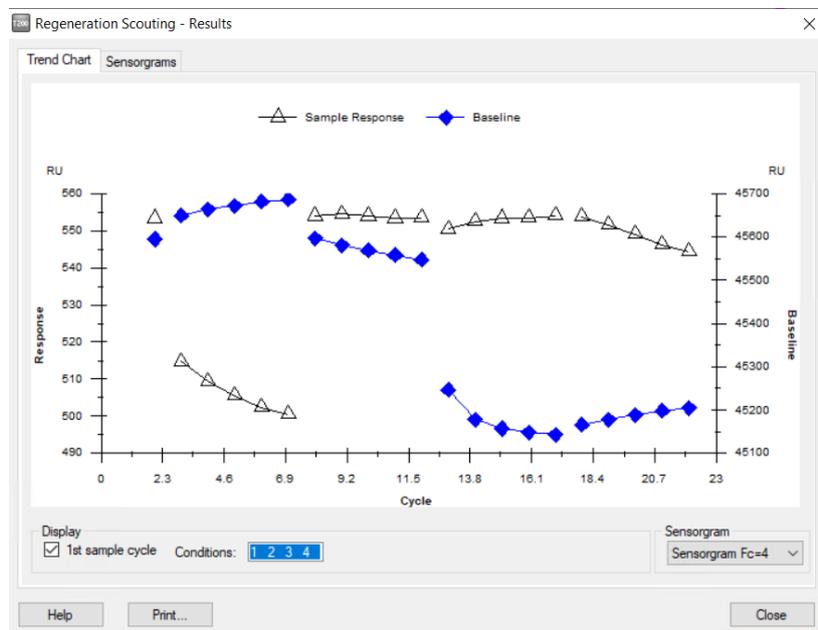
Settings

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 15mM	60
7	NaOH 30 mM	60

⑦

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	<ul style="list-style-type: none">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°C で o/n
②	遊離 Biotin の除去	<ul style="list-style-type: none">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°C 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

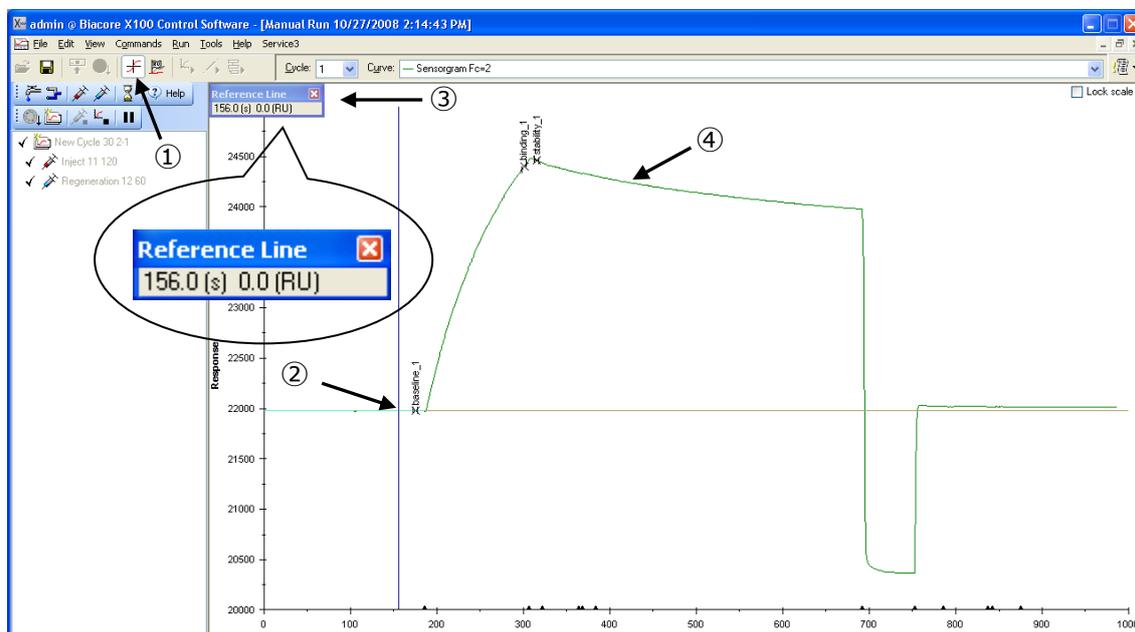
濃縮済みの溶液をマイクロチューブに回収。もとの液量になるように HBS-N を追加。

* 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。

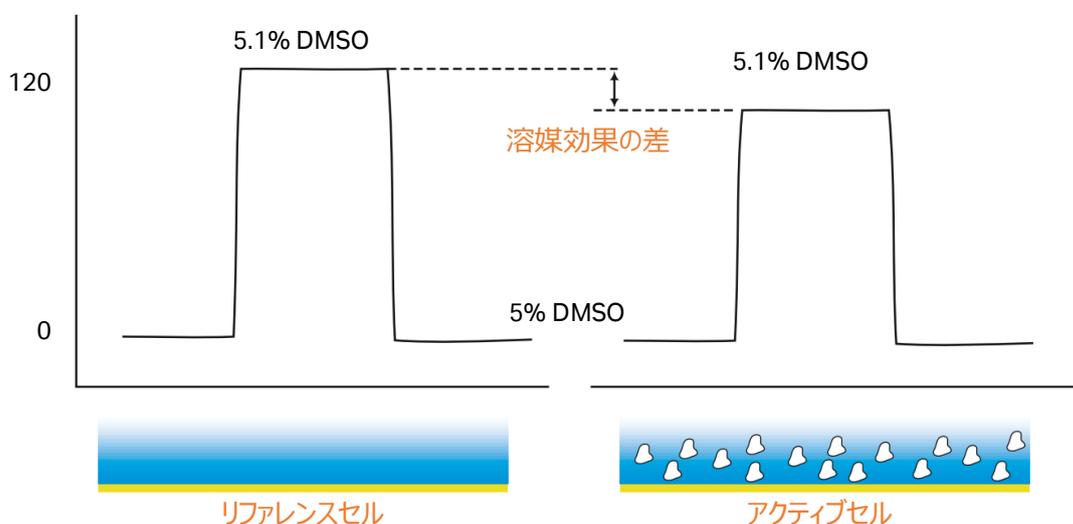
手順	操作項目	注意点・説明
①	Reference Line	 をクリックします。
②	ベースラインの選択	レスポンスを確認したいセンサーグラムベースラインをクリック
③	F9 をタップ	選択されたポジションが 0 (RU) となります。 もう一度 F9 をタップすると絶対値に戻ります。
④	レスポンスの確認	レスポンス (RU) を確認したい箇所へリファレンスラインを移動させます。③のウィンドウに数値が表示されます。



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。

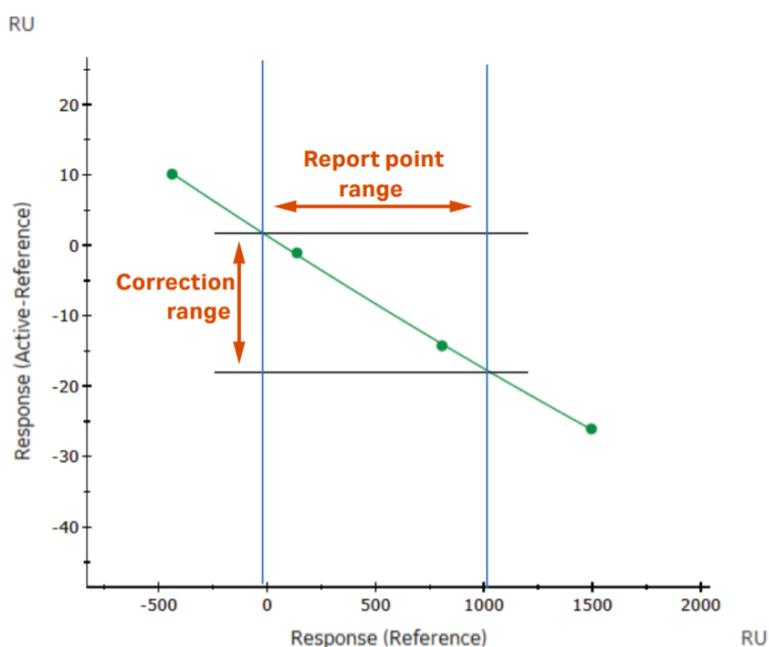
8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する場合：

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

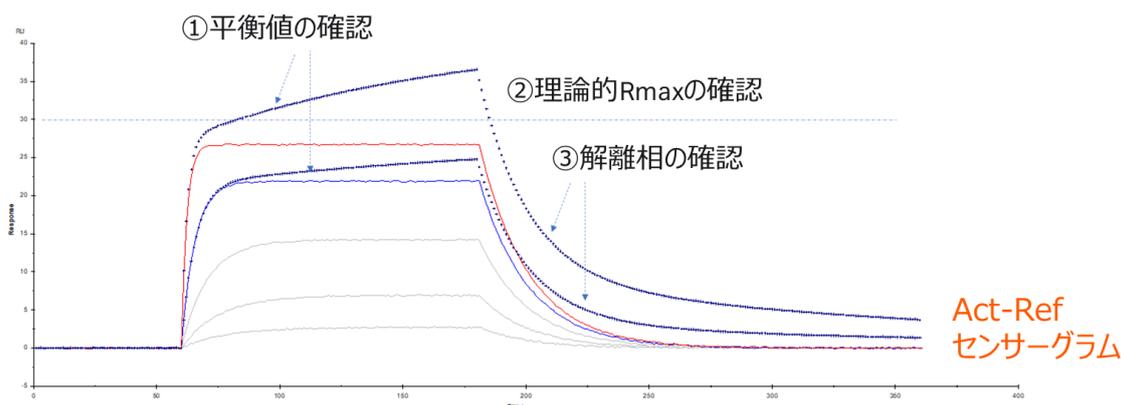
6-7. 特異的結合の確認

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

A. 差し引き後のセンサーグラムからの確認 (Fc2-1)

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

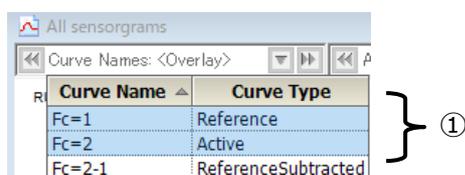
手順	確認項目	注意点・説明
①	平衡値の確認	平衡値に達しているべきセンサーグラムで、特に高濃度帯の結合相で平衡値に達しないでダラダラと上昇していないか？
②	理論的 Rmax の確認	その上昇が理論的 Rmax（これ以上結合しないという飽和点）を超えていないか？
③	解離相の確認	特に高濃度帯の解離相で最初は速やかに下降するのに、そのあとなかなかベースラインまで落ちない二相性の形状になっていないか？

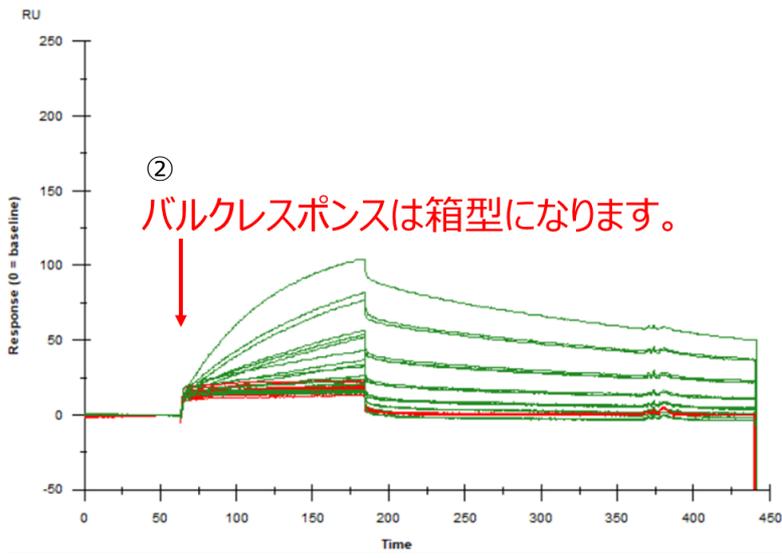


B. リファレンスセルに対する非特異的結合の確認

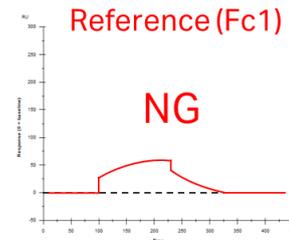
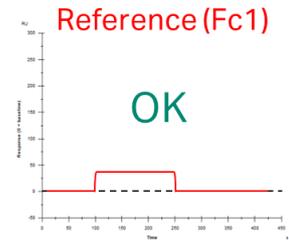
詳細を確認するためには、まず、リファレンスセルのみを確認します。

手順	確認項目	注意点・説明
①	Curve Type の選択	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。





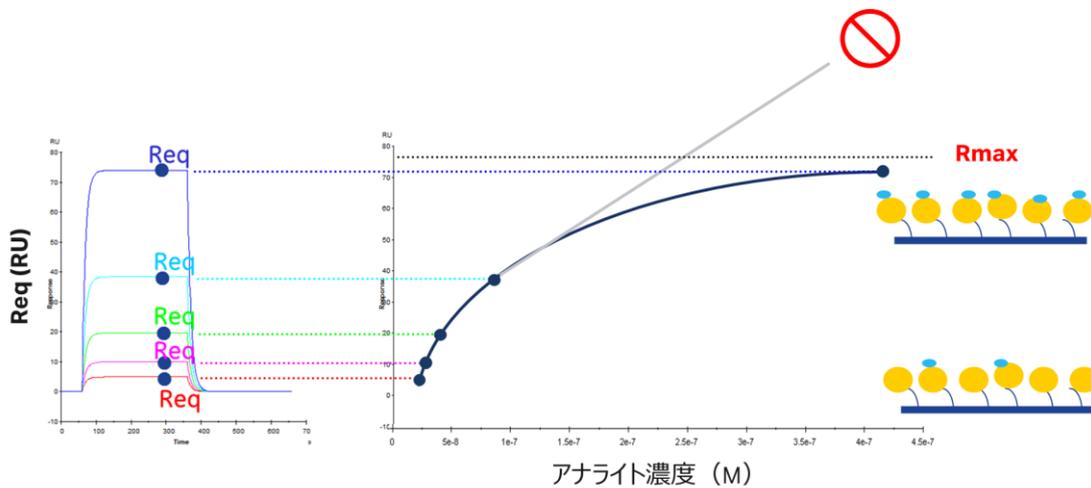
②
バルクレスポンスは箱型になります。



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。アナライトの濃度を複数点とった時に、実測 Rmax が、理論的 Rmax (4-1E 参照) 以下で飽和することを確認します。



6-8. 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。

Keyword Table

Cycle	Cycle Purpose	Sample	Conc_#1	Conc_#2	Conc_#3	Conc_#4	Conc_#5	MW [Da]
1	Startup	running buffer	0	0	0	0	0	0
2	Sample	blank	0	0	0	0	0	0
3	Sample	blank	0	0	0	0	0	0
4	Sample	Z489	1	3.5	7.5	15	30	
5	Sample	blank	0	0	0	0	0	0
6	Sample	blank	0	0	0	0	0	0
7	Sample	blank	0	0	0	0	0	0
8	Sample	Z342	0.6	1.25	2.5	5	10	
9	Sample	running buffer	0	0	0	0	0	0

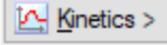
Concentration Unit: nM

Buttons: Reset All Filters, Add Keyword, Rename Keyword, Remove Keyword, Finish, Cancel, Help

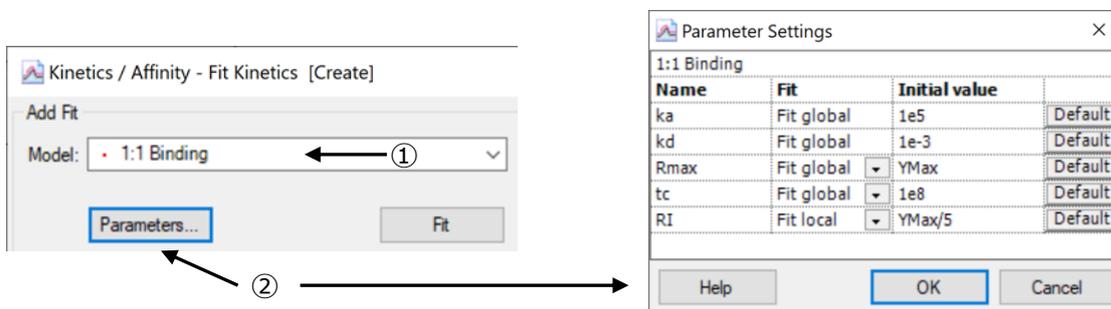
6-9. フィッティングモデル式と parameters の設定

6-9-1. Kinetics 解析

A. フィッティングモデル式と parameters の設定方法

Tool bar の  Kinetics / Affinity を選択、 Kinetics > を実行 (4-3D 参照)

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 (6-9-1B 参照)
②	Parameters	下図は Default 値 (6-9-1C 参照)



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。

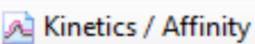
項目	説明
Fit	Fit Global : 複数濃度のセンサーグラムで 1 つの解を求めます。 Fit Local : 各濃度のセンサーグラムでそれぞれ解を求めます。 Constant : 固定値。
Initial Value	<ul style="list-style-type: none"> Fitting 解析をはじめの初期値を設定。 Constant と併せて固定値を設定。

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。

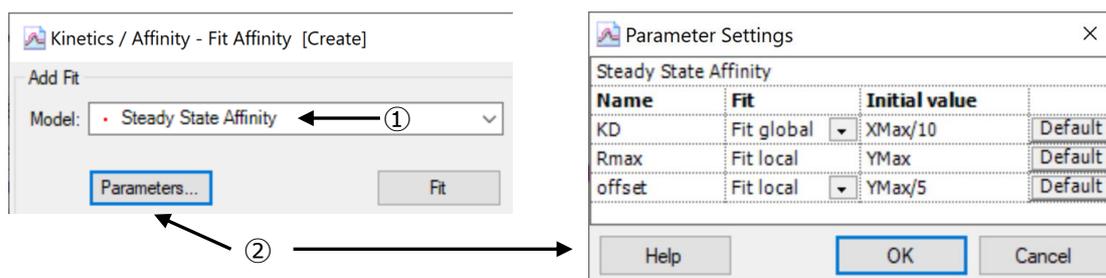
モデル式	説明
k_a	多くの場合、変更はしない。
k_d	解離が遅いもので、真値と明らかに異なる値が出た場合、 $1e-5$ くらいからはじめることもある。
Rmax	通常は Fit Global。再生が不十分でサイクルごとに Rmax が変わる際、Fit Local を使用するケースがある。
tc	多くの場合、変更はしない。
RI	箱型に近いなどセンサーグラムの形状によっては実際のレスポンスを RI として計算してしまうことがあるため、Constant 0 にしたほうが良い場合がある。

6-9-2. Affinity 解析

A. フィッティングモデル式と parameters の設定方法

Tool bar の  Kinetics / Affinity を選択、 Affinity > を実行 (4-3D 参照)

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 (6-9-2B 参照)
②	Parameters	下図は Default 値 (6-9-2C 参照)



B. Affinity 解析の反応モデル

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	$R_{eq} = \frac{CR_{max}}{K_D + C} + offset$ <p>1:1 Binding モデルで、Rmax は Fitting パラメータ。</p>

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	<ul style="list-style-type: none">• 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。

6-10. 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 **(6-7 参照)**。

6-10-1. 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ことによって 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 (6-10-1B 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。



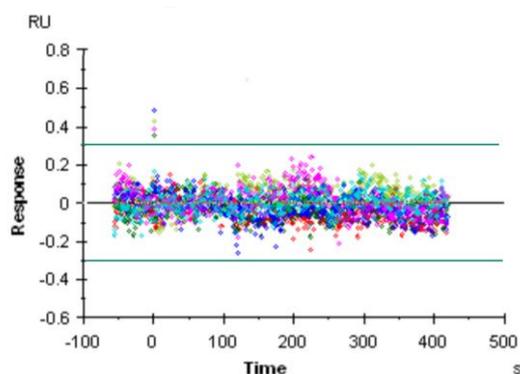
(赤) クオリティーアセスメントにパスしていません。



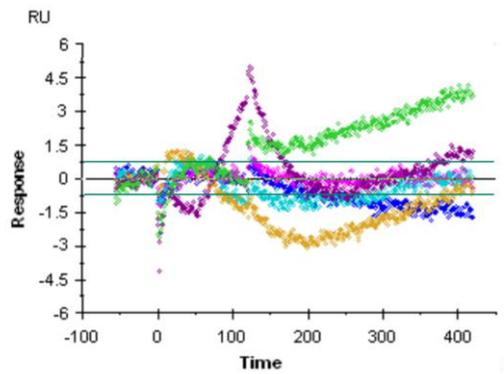
(青) 測定者が確認します。

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、ガイドライン内には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。

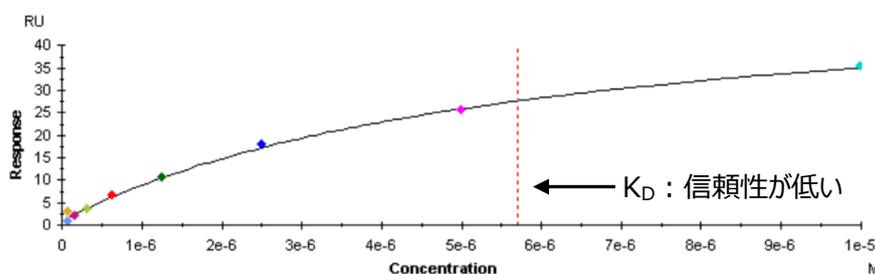
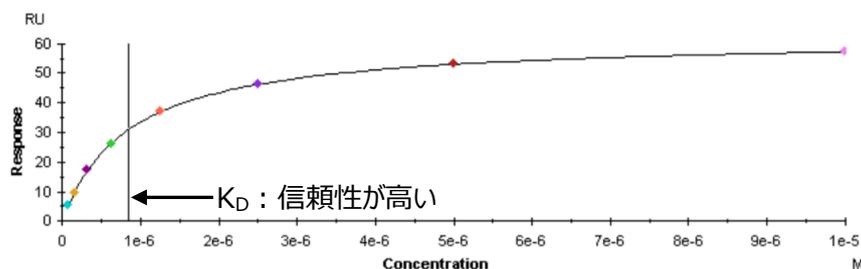
		単位	説明
1:1 binding model 式の変数	結合速度定数 k_a	1/Ms	複合体形成速度。1M の A と B を混合した際に形成する複合体の数。
	解離速度定数 k_d	1/s	複合体の安定性。複合体が 1 秒間に解離する割合。 $k_d = 0.01 \text{ s}^{-1} = 1\%$ 1 秒当たり複合体が 1% 解離する。
	解離定数 K_D	M	アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す。
	Rmax	RU	アナライトの最大結合量。
	溶媒効果 RI	RU	バルクレスポンスを引いた時に、ゼロからわずかにずれる誤差値。 * 本来は極めて 0 に近い値をとるべき値
tc 値	$\text{RU} \cdot \text{M}^{-1} \text{s}^{-2/3} \text{m}^{-1}$	$\text{tc} = \text{kt}^3 \sqrt{f}$ 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。

6-10-2. 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。

6-11. 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。
Chi ²	カイ二乗	測定データフィッティングカーブ間の差 (平均平方値) を示す。
Contact Time	添加時間	リガンド、アナライトなどをインジェクションする時間。
Desorb	デゾルブ	IFC およびサンプルチューブを洗浄するプログラム。週一回の実施を推奨。
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 Rmax	実測 Rmax	実際にアナライトを添加した時、結合量が飽和するレスポンス(RU)
Fit	フィッティング解析	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イクス	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。