

Biacore X100

アプリケーション別操作手順書

低分子編

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
1-1. システムの起動
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
2-2.3 つの測定モード
3. 測定系のデザイン
3-1. 目的別の測定ワークフロー図8
3-2. 典型的な目的別リガンド固定化法8
3-3. 固定化法の大分類(直接法とキャプチャー法)9
4. 低分子化合物の目的別測定解析手順10
4-1. センサーチップ SA への標的タンパク質の固定化 10
4-2. 低分子化合物のスクリーニング 12
4-3. 低分子化合物のキャラクタリゼーション 18
5. メンテナンス・システムチェック・シャットダウン27
5-1. メンテナンス
5-2. システムチェック
5-3. シャットダウン 31
6. 知っていると得する TIPS34

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	バッファー類のセット	・A ラインが main inlet tube
3	コントロールソフトウェアの起動	Xioo Biacore X100 Control Software デフォルト User : admin / Pass : administrator



TRAINING 🔿 Biacore X100 Control So	ftware					Support Navigator
ten took Heb ₽ @L ≠	לא−בבא	ノールバ・	_			<c>> Print Rissons V100 Control</c>
Create Assay Wohlfow	g Analysis		~	アッセ	イコマン	Software Learning to use Biacore X100 Biacore X100 provides workflows to guide you
1	X Name	Modified	Crea	Type	Workflow	through the steps needed to develop and run an assay, including
B St Users	Modified: Yesterday					 attaching the ligand to the surface
🖶 🥂 Training	Kinesics/Attinity 5/3/2007 2:27:05 PM	5/3/2007 3:02:58 PM	Training	Results	Protein-A/migG2	finding appropriate assay conditions
Group1	ProteinA/migG2	5/9/2007 2:26:05 PM	Training	Assay Workflow	ProteinA/migG2	To create a new workflow, dick
Nono Group	Regeneration Scouting 5/5/2007 1 30:08 PM	5/9/2007 2:26:04 PM	Training	Results	ProteinA/inlgG2	Kinetics/Affinity or Binding Analysis.
Software exercises	Assay Conditions Sample 5/9/2007 1.06:45 PM	M 5/9/2007 1:28:58 PM Training Results Proten AlmigG2	Opening stored items			
administrator	Immobilization 5/9/2007 11:28:28 AM	5/9/2007 12:13:59 PM	Training	Results	Protein-ArteligG2	The Support Navigator to the right of the main
	Immobilization pH Scouting 5/9/2007 11:16:37 AM	5/9/2007 11:25:06 AM	Training	Results	Protein-AmigG2	screen provides context sensitive support at all times to help you use Blacore X100 Control
	immobilization pH Scouting 5/3/2007 10:47:29 AM	5/5/2007 11:03:42 AM	Training	Results	ProteinAltrigG	Software efficiently
	mmobilization pH Scouting 5/9/2007 10.17.39 AM	5/9/2007 10:32:55 AM	Training	Results	ProteinA/ImlgG	Spind the support waveloor
	ProteinA/migG_assay	5/9/2007 10:02:21 AM	Training	Waard Template		Options for more experienced users
	Protein A/migG	5/9/2007 9:58:30 AM	Training	Aasay Workflow	ProteinAnligG	Using and maintaining the instrument
	ProteinA/migG_regeneration condition	5/9/2007 9:56:48 AM	Training	Waard Template		Menu options
	ProteinA/ImlgG_sample condition	5/9/2007 9:47:21 AM	Training	Waard Template		Ello
	ProteinA/migG_immobilization	5/9/2007 9:38:20 AM	Training	Wizard Template		Edit View
	ProteinA/migG_precon	5/9/2007 9:33:30 AM	Training	Wizard Template		Run
					~	Andre
	Open Delute Delute			Import		
				7-	67 1	
ne - COM1 Set temperature	e: 25 °C		\leftarrow	-ステ-	ータスハ	+
	No sensor chip inserted					fin.

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 $\mathcal O$ Tools $ o$ 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	ラックトレイの出し入れ	・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 ウイ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 ウイ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。



2-2.3 つの測定モード

A. 測定モードの選び方

測定モー	モード名称	特徵·用途
ド		
1	Assay Workflow	・実験ノートを使用する感覚で、実験結果を記録
	Create Assay Workflow	・流れに沿って各ステップのデータ取得
	Kinetics/Affinity	・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
	binding Analysis	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	・1 インジェクションごとにマウス操作で行う
	🦾 Manual Run	・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』、kd、KD 値などを解析ソフトウエアで解析できな
		い。
3	Wizards	・典型的な定型の測定系を Wizard テンプレート形
	Wizards	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



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。

Create Assay Workflow	
Kinetics/Affinity	Binding Analysis

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	お勧めの固定化方法の中から選択。Workflow を表示します。
approac	approach	下図では、 Sensor Chip SA 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	キャタ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

センサーチップ SA への固定化⇒ 4-1 参照

スクリーニング⇒ **4-2 参照**

Biotin CAPture kit 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。 → <mark>実験成功の確実性。</mark>
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、キャプチャー後のペースラインドリフトが問題になる ことがある。

4. 低分子化合物の目的別測定解析手順

4-1. センサーチップ SA への標的タンパク質の固定化

A. 手順概略

手順	操作項目	参照
1	標的タンパク質の Biotin 化	・化学的 Biotin 修飾 (6-4 参照)
		・Avi-tag Biotin リガーゼシステムを用いた修飾→サプ ライヤーのプロトコルをご参照ください。
2	センサーチップの選択	
3	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

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

一般的に固定化する Biotin 化タンパク質は pM~nM 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。

<u>C. ソフトの操作のポイント</u>

🖉 Wizards...

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	SA を選択します。
2	Prime before run	起動後、Prime 実施済みであればチェックを外す。
3	固定化アプローチの選択	・通常 Fc2 に固定化をします
		・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
4	リガンド名称 / 添加時間	各センサーチップ IFU 参照。
5	Rack Position	表示に従って分注 (2-1 参照)
		分注後 Next→固定化開始

	X Immobilization - Setup						×
	🖉 Chip type: SA 🔶 (1 ~	Prin	ne before run 🔶	2)		
	Flow cell 1				0		
	Immobilize flow cell 1	Method:	X	SA-biotin capture	~		
	Aim for immobilized level	ligand solution:					
	 Specify contact time 	Target level:		(RU)			
	O Blank immobilization						
	Flow cell 2						
	Immobilize flow cell 2	Method:	X	SA-biotin capture	~		
3 -	O Aim for immobilized level	ligand solution:	Bioti	n Ligand		► ④	
	Specify contact time	Contact time:	60	(s)	J		
	O Blank immobilization						
	Help Custom Methods]		< <u>B</u> a	ick.	<u>N</u> ext>	<u>C</u> lose
	Ken Immobilization - Rack Positions					• _	
		Position ¥	olume (µl)	Co	ontent		Туре
		1	120 45	1M NaCl, 50mM NaOH Biotin Ligand			Immobilization
		3	31	50%Isopropanol/50mMNaO	H/1MNaCl		Immobilization
	340 - 2	H2O	Full	Deionized water			Water
						Ċ	5
	Help Menu Load Sample	25			< <u>B</u> ack	<u>N</u> ext >	<u>C</u> lose

D 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	測定結果のウインドウ(Response Final)で確認する。
2	Manual run を利用	・リファレンスライン ポ を用いて確認する (6-5 参照)

理論的 Rmax [RU]= 固定化量[RU]×(アナライトの分子量川ガンドの分子量)×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。

4-2. 低分子化合物のスクリーニング

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	Binding Analysis による Work Flow 作成 (2-2 参照)
	・低分子化合物を、結合レスポンスの高さで選出する。
	・選出アフィニティー基準(添加濃度)の目安 1µM~100µM

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	化合物アナライト溶液	選出したい化合物のアフィニティー基準を目安に添加濃度を設		
		定		
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)		
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

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

Binding analysis with solvent correction \rightarrow Open

C-1. 添加条件等の設定

手順	操作項目	注意点・説明
1	Detection	・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 SA 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。
5	Solution	複数種類を評価するため、Varies by cycle をチェック
6	測定条件	Contact Time:アナライト添加時間/Dissociation time:解離時間
		Flow late:流速。 通常 30 µl/min.
		Flow Path:通常は Both(Fc1,2 両方に流す)
\bigcirc	Extra wash	流路内アナライトのキャリーオーバーを防ぐ。低分子化合物では 50%
		DMSO を用いる。
8	Solvent correction	容媒補正溶液の濃度点数。4~8 点。(6-6 参照)
	X- Cu	stom Assay Wizard - System Preparation X

🗶 Custom Assay Wi	zard - System Preparation	×	
Detection)	Chip (2)	
Elow cell: 1.2	✓ ✓ Reference subtraction	Chip type: SA ~	
Purpose			
E <u>v</u> aluation purpose	Binding Analysis	- (3) ~	
Prime (4)	Conditioning	cle	
Heb	< <u>B</u> ack	Next > Close	
🔀 Custom Assay Wizard - Cycle Definition		•	×
Cycle types		Ne <u>w</u>	
Binding Analysis		Delete	
Solvent correction		Rename Copy	(5) I
Commands in Binding Analysis	Settings for Sample 1		
A <u>v</u> ailable <u>S</u> elected Capture Sample 1	S <u>o</u> lution:		varies by cycle
Enhancement Regeneration Add >	Contact time:	60 (s) varies by cycle	
Solvent correction	Dissociation time:	60 (s) varies by cycle	
	- Clauseter	30 (ul/min) varies by cy	
	Flow Late:		
	<u>F</u> low path:	Both ~)
	E <u>x</u> tra wash after in	jection with: 50% DMSO	◀━⑦
Remove	Evaluation variables		
Help		< <u>B</u> ack	<u>N</u> ext > <u>C</u> lose

【Tips】低分子化合物のスクリーニング時には通常再生溶液の添加は行わない(行う必要がない)。

C-2.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 type	前頁の Cycle type に対応
3	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。
4	Sample 情報	前頁⑤の Varies に関する、名称、濃度、分子量を入力
5	Rack Position	表示に従って分注(2-1 参照)
		分注後 Next→測定開始



	Position	¥olume (µl)	Content	Туре	Sample 1 Conc (µM)	Sample 1 MW (Da)
	þ	70	Sample 1	Sample	10	400
	2	70	Sample 2	Sample	10	350
	3	70	Sample 3	Sample	10	500
- HD	4	70	Sample 4	Sample	10	400
3	5	70	Sample 5	Sample	10	660
w w	6	180	Buffer	Startup		
	7	Full	Solvent correction1	Solvent correction (buffer)		1
	8	Full	Solvent correction2	Solvent correction (buffer)		
	9	Full	Solvent correction3	Solvent correction (buffer)		
	// 10	Full	Solvent correction4	Solvent correction (buffer)		-
	11	Full	Solvent correction5	Solvent correction (buffer)		
Or L	12	Full	Solvent correction6	Solvent correction (buffer)		
- 6 8	13	Full	Solvent correction7	Solvent correction (buffer)		-
	14	Full	Solvent correction8	Solvent correction (buffer)		1
	15	383	50% DMSO	Wash		
	H2O	Full	Deionized water	Water		1
	1		(5)			

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	・解析ソフト Biacore X100 Evaluation software				
	ファイルを開く	デフォルト User : admin / Pass : administrator				
	Vice	・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	溶媒補正	·6-6 参照				
	Solvent Correction	•Evaluation \rightarrow Add Solvent Correction \rightarrow OK				
3	データ QC チェック	・④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、溶媒補正検量線範囲外の Plot や 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				
4	Plot の作成	通常 Y 軸に Binding Relative response、X 軸に Cycle number				
5	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				
6	結果のエクスポート	⑤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①~④

ỡ admin @ Biacore X100 Evaluation Software - [Custom Assay Wizard 7/13/2009 9:51:18 AM] - [All sensorgrams]



手順④~⑥データプロセッシング

Plot name:	Plot			4
Plot type:	Report Point vs Variable			
0	Report Point vs Report Point			
Axis setting				
	Y-Axis		X-Axis	
Report Point:	binding	 Variable: 	Cycle Number	~
Response Type:	Relative Response	\sim		



<u>Two Ranking Bour</u>	laries	
Ranking Boundaries		
First Value:	00	
Second Value:		
Help	<u>F</u> inish	<u>C</u> ancel

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化合物

Blank: 濃度 0 の sample

牙 Keyv	vord Table				
Cycle	Assay step purpose	Sample	Conc (µM)	MW (Da)	
\sim	~		~	~	
1	Startup	buffer	1	1	
2	Startup	buffer	1	1	
3	Startup	buffer	1	1	
4	Solvent correction				Negative Controlは分
5	Control sample	negative	10	300 <	← 量と濃度値は0ではな
6	Control sample	negative	10	300	
7	Control sample	Positive	80	331.78	
8	Sample	Blank	0	0	 Blankは濃度値かりの がサンプルタに佐ちょ
9	Sample	T_6	200	205	に選ぶことができる
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	

4-3. 低分子化合物のキャラクタリゼーション

(主に Biotin CAPture kit を用いた方法を例に)

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)

<u>A-1</u>

アナライトの添加濃度・時間の設定(6-2参照)

<u>A-2</u>

センサーチップ/キット	用途
Biotin CAPture Kit	・解離が遅い化合物から速い化合物まで
(Sensor Chip CAP)	Single Cycle kinetics
Sensor Chip SA	・解離が速い化合物(再生が不要)の場合
	・Multi Cycle による Affinity 解析を行うケースが多い

B. 準備する試薬・サンプル

	操作項目	用途、備考
必須	Biotin CAPture kit	・Kit内 Biotin CAPture reagentを使い終わった場合は単品販
		売有り。
必須	Biotin 化標的タンパク	・化学的 Biotin 修飾 (6-4 参照)
	質(リガンド)	・Avi-tag Biotin リガーゼシステムを用いた修飾→サプライヤーの
		プロトコルをご参照ください。
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	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)

<u>C. メソッドの作成</u>

🖊 Wizards...

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

cycle kinetics with solvent correction \rightarrow Open

C-1.システムの準備

手順	操作項目	注意点·説明
1	Detection	・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 CAP を選択
3	Purpose	・キャラクタリゼーションの場合は、Kinetics/Affinity
4	Prime before run	起動後、Prime 実施済みであればチェックを外す
5	Conditioning	Biotin CAPture kit の場合、チェック

🗶 Custom Assay Wizard - Sys	stem Preparation		×
Detection 1 Flow cell: 1,2 V	Reference subtraction	Chip Chip type:	2) CAP ~
Purpose E <u>v</u> aluation purpose: Kinetic	es/Affinity	3	~
Prime ④	Conditioning	← (5	5)
<u>H</u> elp	< <u>B</u> aok	<u>N</u> ext >	<u>C</u> lose

C-2. 添加条件等の設定 - Capture 1/2 (Sensor Chip SA の場合は不要)

手順	操作項目	注意点·説明
1	Command in	Biotin CAPture kit の場合、Sample の前に Capture1/2 を、後ろに
	Kinetics	Regenerationを追加する。
2	測定条件	・Capture1(Biotin CAPture Reagent の添加)
		Contact Time:300 秒/Flow late:2 µl/min./Flow Path:Both
		・Capture2 (Biotin 化リガンドの添加)
		Contact Time:要検討/Flow late:10 µl/min./Flow Path:Second

Cycle types	New
Kinetics	Delete
Solvent correction	Ren <u>a</u> me Copy
Commands in Kinetics yailable Cepture Sample Enhancement Regeneration Solvent correction Add Regeneration 1 Regeneration 1 Regeneration 1	Settings for Capture 1 Capture golution: Biotin CAP Reagent varies by cycle Contact time: 300 (s) varies by cycle Flow gate: 2 (µL/min) Elow path: Both v Egtra wash after injection with: Stabiligation period: 0 (s)

手順	操作項目	注意点·説明
1	測定条件	・Sample(アナライトの添加)
		Contact Time:要検討/Dissociation time:要検討/
		Flow late:通常 30 µl/min./Flow Path:Both
		・Regeneration(Biotin CAPture Kit 付属)
		Contact Time:120 秒/Flow late:10 µl/min./Flow Path:Both
2	Solvent correction	4 点に減らす

C-3.添加条件等の設定 - S	Sample/Regeneration/Solvent	correction
------------------	-----------------------------	------------

🔄 Custom Assay Wizar	d - Cycle Definition		>
Kinetics Solvent correction	Cycle types		Ne <u>w</u> Dejete Rengme Copy
Commands in Kinetics Available Capture Sample Enhancement Regeneration Solvent correction	Selected Capture 1 Capture 2 Capture 2 Regeneration 1	Settings for Sample Sglution: Single-cycle ki Contact time: Dissociatign time: Flow <u>rate</u> : Elow path: Egtra wash afte Evaluation variat	e 1 kinetics Concentrations per cycle: 5 60 (s) varies by cycle 120 (s) varies by cycle 30 (µl/min) varies by cycle Both v fter injection with: iables
<u>H</u> elp			< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

【Tips】 Sensor Chip SA を用いた、解離の速い低分子化合物のキャラクタリゼーション時には、通常再生 溶液の添加(Regeneration)は行わない(行う必要がない)。

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 type	前頁の Cycle type に対応
3	Cycle Purpose	各サイクルの目的。サンプル添加前に、Startup 1~3 回、Solvent
		correction 1 回を入れる。
4	Sample 情報	・前頁⑤の Varies に関する、名称、濃度、分子量を入力
		・0 濃度を 2Cycle 設定する。
5	Rack Position	表示に従って分注(2-1 参照)
		分注後 Next→測定開始

Kee Custom Assay Wizard - Sample Table × Concentration unit: nM (1) v Add Row Remove Row Cycle Type Cycle Purpose Kinetics Sample 1 Startup Solvent correction Solvent correction Undefined Kinetics Sample Conc (5) (nM) Conc (1) (nM) Conc (3) (nM) Conc (2) (nM) Conc (4) (nM) 1 Cycle Solution M₩ (Da) Conditi ning 0 0 0 0 2 3 4 O O Buffer 0 \odot 0 ۲ \odot \bigcirc \bigcirc 0 0
 Image: Constraint of the state of ۲ 0 0 0 0 0 0 500 0 0 0 0 0 5 0 500 \odot 0 Õ 12 60 300 1500 2.4 500 \odot 6 7 3 2 4 <u>H</u>elp < <u>B</u>ack <u>N</u>ext > <u>C</u>lose

	Position	¥olume (µl)	Content	Туре	Sample 1 Conc (µM)	Sample 1 MW (Da)
	1	70	Sample 1	Sample	10	400
	2	70	Sample 2	Sample	10	350
	3	70	Sample 3	Sample	10	500
HP 4		70	Sample 4	Sample	10	400
- S - S	5	70	Sample 5	Sample	10	660
(m) (m) (6	5	180	Buffer	Startup		
	,	Full	Solvent correction1	Solvent correction (buffer)		1
	3	Full	Solvent correction2	Solvent correction (buffer)		
)	Full	Solvent correction3	Solvent correction (buffer)		
	.0	Full	Solvent correction4	Solvent correction (buffer)		-
	1	Full	Solvent correction5	Solvent correction (buffer)		
01 1 1	2	Full	Solvent correction6	Solvent correction (buffer)		
1	.3	Full	Solvent correction7	Solvent correction (buffer)	5 	
	.4	Full	Solvent correction8	Solvent correction (buffer)		1
	5	383	50% DMSO	Wash		
H	120	Full	Deionized water	Water		
p Menu ▼ Load Gamples	120	Full	Deionized water	Water < Back	. <u>N</u> ext >	1

21

<u>D. 解析(K_D、k_a、k_dの算出)</u>

手順	操作項目	注意点·説明
1	解析ソフトで Run ファ	・解析ソフト Biacore X100 Evaluation software
	イルを開く	デフォルト User : admin / Pass : administrator
	Yim	・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	溶媒補正	·6-6 参照
	Solvent Correction	•Evaluation \rightarrow Add Solvent Correction \rightarrow OK
3	特異的結合の確認	センサーグラムの確認(6-7参照)
4	Kinetics / Affinity	センサーグラムの解離相の形状が一定の遅さで降下し ka、ka の算出が
	→Kinetics	可能な場合に適用
4	Kinetics / 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
→Affinity		K₀値のみの算出を目指す場合に適用

手順①~④





手順④-1Kinetics解析

手順	操作項目	注意点·説明
1	解析対象サンプ	・Tool bar の 🔁 Kinetics / Affinity を選択
	ル寺の選択	・Sample:解析対象の選択
		・Curve: Fc=2-1 corr(DMSO correction を行った場合)、Fc=2-1(行
		わなかった場合)を選択
2	ブランク(0 濃	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
	度)の選択	
3	センサーグラムの	・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
	一部削除(オプ	・一時的に異常形状になったセンサーグラム領域の削除
	ション)	右クリックで領域指定→Remove Selection
4	Kinetics	<mark>还 Kinetics</mark> > を選択
5	フィッティング条件	・Model:解析モデルの選択(6-9-1参照)
	の設定→実行	•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



<u>手順③~④</u>



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	・Tool bar の 🔁 Kinetics / Affinity を選択
	ル等の選択	・Sample:解析対象の選択
		・Curve: Fc=2-1 corr(DMSO correction を行った場合)、Fc=2-1(行
		わなかった場合)を選択
2	ブランク(0 濃	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
	度)の選択	
3	Affinity	<mark>⊡ Affinity</mark> > _{を選択}
4	Setting	・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	・Model:解析モデルの選択(6-9-1参照)
	の設定→実行	・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



<u>手順④</u>



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

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	・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

<u>C-2. Desorb and Sanitize(毎月)の手順</u>

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(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

Desorb and Sanitize
Step 1
Place 10 ml BIAdesorb Solution 1 on the left hand tray and insert the pump inlet tubes.
< <u>B</u> ack Start Close

・(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

X. Tools		
Wizard	Menu bar の Tools — More Tools内 System Check and Pump Calibration	
	担保するための定期的な実施頻度に設定	
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	



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
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℃に設定	
ウイザードの実行		
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。	

Name	Date:
Run Date: 10-May-2007 Femperature: 25.0 °C File: System Check and Pump Calibrati	on 5/10/2007 11:08:51 AM
Peristaltic Pump Calibration	Pass
Response	Pass
injections	Pass
	1 433
System Check and P	ump Calibration
Name:	Date:

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(茸	¹]または Menu bar の Tools → Undoo \downarrow	:k Chip を選択します。
	Biacore X100	
	This will undock the sensor chip	
	Help Undock Chip Cancel	
		-

Undock Chip をクリックします。

 \downarrow

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ので、再使用の際にはポジティブコントロールサンプルのレスポンスからリガンドの活性を確認してください。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	35
6-2. アナライトの添加条件設定	39
6-3. 再生条件の設定	44
6-4. リガンドの Biotin 化	46
6-5. リファレンスライン	47
6-6. 溶媒(DMSO)補正(Solvent Correction)	48
6-7. 特異的結合の確認	50
6-8. Keyword Table によるサンプル名、濃度などの修正	52
6-9. フィッティングモデル式と parameters の設定	53
6-9-1. Kinetics 解析	
6-10. 解析結果の品質評価	56
6-10-1. Kinetics 解析	
6-10-2. Affinity 解析	58
6-11. 用語集	59

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

<u>B.準備する試薬・サンプル</u>

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 µg/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。



<u>C. ソフトの操作のポイント ~ pH Scouting</u>

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...

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	рН	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

T200 Imn	nobilization pH Scouting - Setup	×	
Detec <u>E</u> low	opath: 2 v (1)		
B <u>u</u> ffe	rs		
	Buffer Name	pH	
1	10 mM Acetate	5.5	Immobilization pH Scouting - Injection Parameters X
2	10 mM Acetate	5	Ligand
3	10 mM Acetate	4.5	Solution: Ligand
4	10 mM Acetate	4	
5			Contact 60 (s Flow rate: 6 (µ
	 ②	3	Surface regeneration This surface wash will be run once at the end of each cycle. Solution: 50mM NaOH
He	alp < Back Next >	<u>C</u> lose	Help < Back Next > Close

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。



<u>D. ソフトの操作のポイント ~ Amine Coupling</u>

	🔽 Wi	zards	Wizards <u>አዛ</u>	ら、Surface preparation $ ightarrow$ Immobilization $ ightarrow$ 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 ru	in	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
	X Immo	bilization - Setup		×
	Flow ce	Chip type: CM5 <	1 Methor Captur level ligand Target	
3 - 4) Aim for immobilize flow cel) Aim for immobilized) Specify contact time) Blank immobilization	I <u>2</u> Metho Captur level ligand Contac	ed: Amine (S) aring molecule / d solution: Ligand (S) for time: 420 (S)
	<u>H</u> el	Custom Me	thods	< <u>Back</u> <u>N</u> ext> <u>C</u> lose

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	測定結果のウインドウ (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 「上」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	Response Final NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差			
Immobilization Results – – – >				
Chip: CM5 Flow cells per cycle:				
Flow cell Procedure M	Response Response ethod Ligand Bound (RU) Final (RU)			
4 Time and flow Ar	nine anti-beta2micro 11141.4 8957.7			
Help Print	Γ	<u>C</u> lose		

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がある。 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、Rmax 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。

Α.	添加、	解離時間の目安
----	-----	---------

	Kinetics	Affinity
	結合・解離が緩やかなセンサーグラム:	結合・解離が緩やかなセンサーグラム:
添加時間	2-5 min	(結合相で平衡にならない場合)適用不可
小小川山山田	箱型に近いセンサーグラム:	箱型または箱型に近いセンサーグラム:
	1-2 min	1-2 min
	結合・解離が緩やかなセンサーグラム:	
47万mm土日日	\sim 90 min	不再(ag 孙阳府 无即应)
	箱型に近いセンサーグラム:	小安(30 秒程度で設定)
	1∼2 min	
濃度点数	5	8 程度



<u>B. Manual Run による条件検討</u>

Manual	run Manual Run	<mark>(2-2 参照)</mark> 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

🔀 Manual Run 🛛 🔀
Flow
<u>Ε</u> low rate: <u>30</u> μl/min) (μl/min) (μl/min)
Flow path
O 🚍 Flow path 1
Flow path 2 <u>R</u> eference subtraction:
⊙ 🚍 Flow path 1-2 2-1 💌3
Help Load Samples Start Close

ベースラインのセンサーグラムが現れます。





(例) Biotin CAPture Kit、流速 5 µl/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。

- をクリック、任意のバイアルで Biotin CAPture Reagent を 5 分(5 µl/min)添加する際の必 要量を確認。
- をクリック、Biotin CAPture Reagent を必要量セット。
- ③ **ダ**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。
- し、 そうりゅう、 加止音を Flow path 2 ののたしよう。
- ⑥ 👘 をクリック、流速を 10 µl/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 µg/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 ダクリック、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 ごをクリック、流路を Flow path 4-3 にします。
- ⑫ 🛛 🛜 をクリック、流速を 30 μl/min 以上とします。
- ③ 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。
- <u>Fc1</u> 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)。



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(6-2B 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
\bigcirc	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 <mark>(6-1 参照)</mark>
		・Sensor Chip SA <mark>(4-1 参照)</mark>
3	Wizard テンプレートを用いた Regeneration Scouting	6-3D 参照

<u>B.準備する試薬・サンプル</u>

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

<u>C. ソフトの操作のポイント</u>

Wizards...

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。
\bigcirc	Setting	再生溶液名称、コンタクト時間

X Regeneration	Regeneration Scouting - Experimental Parameters ×			
Regeneration p Stabili <u>z</u> ation p	arameters period: 0 (s)	← ④		
Experimental design Number of conditions: 7 ~ (5) Lock: Solutions Number of cycles for each condition; 5 ~ (6) 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	$\succ \overline{\mathcal{I}}$	
5	MgCl2 3.0 M	60		
<u>6</u>	NaOH 15mM	60		
Z	NaOH 30 mM	60)	
		,		
<u>H</u> elp			< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> los	se

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	

<u>B.準備する試薬・サンプル</u>

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 回繰り返し。
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 μl 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	手 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の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のウイ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。

①1.05x 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 段階の容媒補正用 DMSO 溶液を調製する場合・

	700	700	700	700	700	700	700	700 (µl))
<u>6% DMSO</u>	700	600	500	400	300	200	100		
4.5% DMSO		100	200	300	400	500	600	700	

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ー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値(RU) ~最小補正値(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)

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?		

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。



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
\bigcirc	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。





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。

ycle	Cycle Purpose	Sample	Conc_#1	Conc_#2	Conc_#3	Conc_#4	Conc_#5	MW [Da]		
\sim	~	\sim	\sim	\sim	\sim	\sim	\sim	~		Reset All Filters
1	Startup	running buffer	0	0	0	0	0			
2	Sample	blank	0	0	0	0	0			
3	Sample	blank	0	0	0	0	0			Add Keyword
4	Sample	Z489	1	3.5	7.5	15	30			
5	Sample	blank	0	0	0	0	0	C	≻(2)	Rename Keyword
6	Sample	blank	0	0	0	0	0			-
7	Sample	blank	0	0	0	0	0	C		Remove Keyword
8	Sample	Z342	0.6	1.25	2.5	5	10			
9	Sample	running buffer	0	0	0	0	0	C	ノ	
								1		Concentration Unit

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 <mark>(6-9-1C 参照)</mark>

		🚵 Parame	ter Settings		×
Kingtics / Affinity - Fit Kingtics [Create]		1:1 Binding			
Kinedes / Animty - Tit Kinedes	[Create]	Name	Fit	Initial value	
Add Fit		ka	Fit global	1e5	Default
Madela 1.1 Diadian	1	kd	Fit global	1e-3	Default
Model: • 1:1 Binding		Rmax	Fit global	 YMax 	Default
		tc	Fit global	 1e8 	Default
Parameters	Fit	RI	Fit local		Default
~ 2		Help		OK	Cancel

<u>B. Kinetics 解析の反応モデル</u>

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 の系にしていただき、 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	前明
1:1 Binding	$A + B \Leftrightarrow AB$
	リガンドとアナライトが1分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。
Bivalent Analyte	$A + B \Leftrightarrow AB$, $AB + B \Leftrightarrow AB2$
	アナライトが2価もしくはホモ2量体の反応モデル。AB複合体形成後、リガン
	ドBが2次的に結合する反応。
Heterogeneous	A1 + B \Leftrightarrow A1B , A2 + B \Leftrightarrow A2B
Analyte	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	$A + B1 \Leftrightarrow AB1$, $A + B2 \Leftrightarrow AB2$
	アナライトに対して親和性の異なる2つの結合部位を持つリガンドにアナライト
	が並行して結合する反応モデル。
Two state Reaction	$A + B \Leftrightarrow AB \Leftrightarrow AB^*$
	リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメ
	ー ション変化を起こす反応モデル。

<u>C. Parameter Setting の使用方法</u>

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:固定值。
Initial Value	 Fitting 解析をはじめる初期値を設定。
	・ Constant と併せて固定値を設定。

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
<i>k</i> a	多くの場合、変更はしない。
<i>k</i> _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 O にしたほうがいい場合がある。

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 <mark>(6-9-2C 参照)</mark>

Kinetics / Affinity - Fit Affinity [C	reate]	<u> P</u> arame	ter Settings		×
Add Fit		Steady Stat	te Affinity		
		Name	Fit	Initial value	
Model: • Steady State Affinity	\	KD	Fit global	 XMax/10 	Default
		Rmax	Fit local	YMax	Default
Parameters	Fit	offset	Fit local	▼ YMax/5	Default
2 -		Help		OK	Cancel

<u>B. Affinity 解析の反応モデル</u>

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	$R_{eq} = \frac{CR_{max}}{K_{D} + C} + offset$
	TH Binding TJ WC, Rmax & Fitting NJX-9.

<u>C. Parameter Setting の使用方法</u>

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:固定值。	
Initial Value	 Fitting 解析をはじめる初期値を設定。 	
	・ 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
Ka	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

<u>A. Quality Control タブ</u>

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	Biacore T200 のスペック範囲
	内か?	$k_a = 1e3 \sim 1e9, k_d = 1e-5 \sim 1$
2	各パラメータが独立して算出されて	k₂、k♂および Rmaxの間に相関性はない。
	いるか?	マストランスポートリミテーション下で ka、kd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	高濃度サンプルに注目。センサーグラムの結合・解離領
	か?	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	Residuals タブを確認(6-10-1B 参照)
	ットがランダムに分散しているか?	

Quality Control Report Residuals Parameters		
Kinetic constants are within instrument specifications.		
Kinetic constants appear to be uniquely determined.		
No significant bulk contributions (RD) 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。
- 8

(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。

<u>B. Residuals タブ</u>

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

<u>C. Report および Parameters タブ</u>

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
	結合速度定数 <i>ka</i>	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 <i>k</i> _d	1/s	複合体の安定性。 複合体が 1 秒間に解離する割合。 ka = 0.01 s-1= 1% 1 秒当たり複合体が 1%解離する。
	解離定数 K₀	М	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。
1:1 binding	inding Rmax	RU	アナライトの最大結合量。
model 式の 変数	溶媒効果 Rl	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	RU · M-1s ^{-2/3} m ⁻¹	tc=kt/³√ 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。

	カイ二乗 Chi ²	RU²	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。
Fitting 解に 対する評価 パラメーター	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 Ko 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、Ko 値のラインが赤色で表示されます。



<u>B. Report および Parameters タブ</u>

		単位	説明
1:1 binding model 式の 変数	解離定数	М	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
	К _р		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	カイ二乗	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
評価パラメーター	Chi ²		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	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
	クス	範囲な濃度で一度に測定する。
Active Cell	リガンド固定	Flow Cell のうち、リガンドを固定するセル
	化セル	
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 1/2Rmax に
		相当するアナライト濃度に相当する Ko 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(K₀値)。
Amine	アミンカップリ	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
Coupling	ング	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	多価分子の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	キャプチャー	センサーチップヘリガンドを間接的に固定化するための捕捉用分子。リ
molecule	分子	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
Desorb and	デゾルブアン	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
sanitize	ドサニタイズ	施を推奨。
Direct	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
Immobilization		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	非線形最小二乗法により変数となる ka、ka、Rmax などを算出する
	解析	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	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。	
(Fc)		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	ニードルを用いたサンプルの添加。	
	ン		
Integrated	マイクロ流路	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	
Cartridge (IFC)	系	ーセルを形成する。	
ka (Kon)	解離速度定	複合体の安定性。複合体が1秒間に解離する割合(1/s)。	
	数	ka= 0.01 s⁻¹= 1% (1 秒当たり複合体が 1%解離する)。	
KD	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	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	数(1/Ms)。	
Kinetics	カイネティクス	反応速度論的解析。センサーグラムの形状を評価し、ka、kaを算出	
	解析	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	マストランスポ	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	
Limitation	ートリミテーシ	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	
(MTL)	J	(30 μI/min) にする。	
Multi cycle	マルチサイク	各アナライト濃度を個別サイクルで測定する方法。	
kinetics	ル法		
Parallel	パラレルカイ	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	
kinetics	ネティクス	を測定する。	
Pre- Concentration	プレコンセント	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	
	レーション	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	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	
	ントロール	の品質評価。	
Reference Cell	リファレンスセ	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	
	ル	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
Decements		ティングカーノに対する測定テータの人しを示す。
Resonance Unit (RU)	レソナンスユ ニット	Biacore の測定によって得られるレスボンスの単位。
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	シリアルカイネ	8K/8K+で用いる、Single cycle kineticsとMulti cycle kineticsの総
	ティクス	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	各アナライト濃度を同一サイクルで測定する方法。
Calvert	クル法	
Correction	浴媒補止	アナライトに DMSO などのハルクレスホンスが大きな溶媒を含む際に生
		しる、Active Cell と Reference Cell における溶液効果のスレを補正
Surfaco	± <i>∓</i>	
Plasmon	衣面ノフスモ	衣面への方子の結合・脾離を金膜衣面近傍の出折率変化とししま 標識からしていたんで泣いてきてたけ
Resonance	ン共鳴法	標識かフリアルタイムで追跡できる万法。
(SPR)		
System Check	システムチェッ	装置の診断をおこなうプログラム。
	ク	
tc 值	ティーシー値	とれだけ 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	理 論 的	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
RIIIdX	Rmax	論上最大のレスポンス(RU)
Thermodynami	熱力学的解	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
CS	析	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。

- ●: ÄKTA、クロマトグラフィー関連製品
- ❷: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。