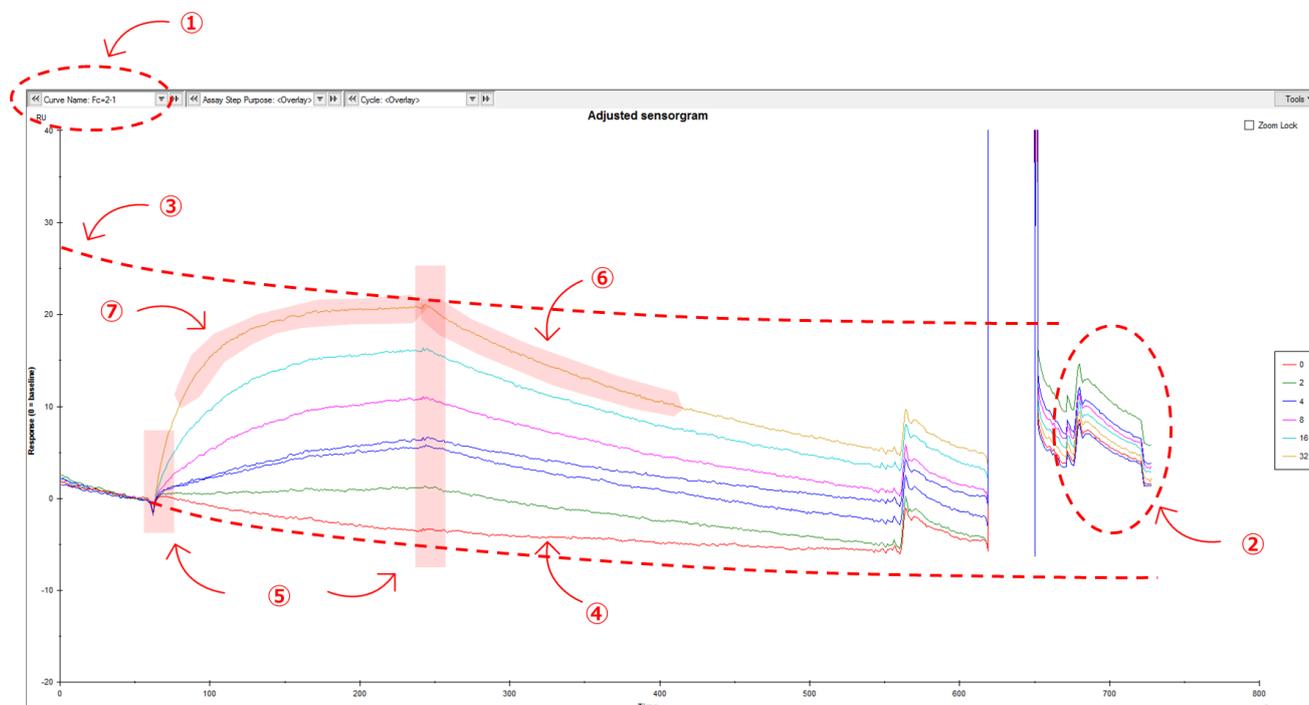


Kinetics 解析をしたい場合のセンサーグラムのチェックリスト

フィッティングを実施する前に得られたセンサーグラムを確認しましょう。マルチサイクル法の例でご紹介しますが、シングルサイクル法でも基本的に同じです。



番号	見ているところ
①	Reference cell (Fc1) での非特異的結合の確認
②	再生溶液添加後のレスポンスがベースラインに戻っているか確認
③	センサーグラムの高さの確認
④	ブランク (0 濃度) の再現性とドリフト
⑤	アナライト添加開始・終了直後に急激な段差がないこと
⑥	解離相は指数関数的なカーブを描いている (二相性ではない)
⑦	最高濃度のレスポンス高に飽和傾向があり、最低濃度のレスポンスがベースラインに近い

今回のチェックリストでは、センサーグラムを見た時に注意するポイントだけを記載しています。「変な」センサーグラムが得られたときに「どのように対策するか」は次回以降にまとめますのでご期待ください。

詳細説明

① Reference cell (Fc1) での非特異的結合の確認

フィッティングした後の Active cell – Reference cell のセンサーグラムのみでは非特異的な結合を判断することはできません。一旦解析画面は閉じて、必ず Reference cell のみでの表示 でセンサーグラムを確認します。

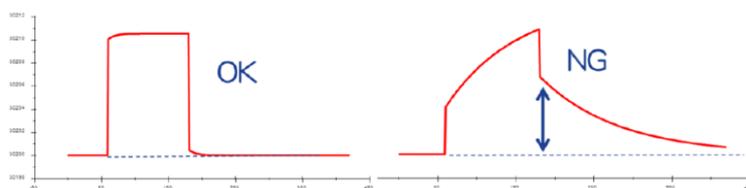


Figure 1 Reference cell におけるアナライト添加時のセンサーグラム

Reference cell において、Figure 1 の左図は理想の形です。ポイントは解離相において速やかにベースラインの高さまで戻ること、および結合相においては平坦な形状をしていることです。すなわち、**理想的な形状は箱型です**。この箱は上向きにも、下向きに出ることもあります。因みにこの急激なレスポンス変動は溶液効果（ランニング緩衝液組成と異なる溶液組成のアナライト溶液が流れることにより発生する密度変化）によるものです。どんなに気を付けてアナライト溶液を調製してもズレは必ず発生しますので、溶液効果をゼロにすることはできません。しかし、Active cell にも同様の溶液効果が発生しているため、差し引くことができます。

さて Figure 1 の右図は非特異的な結合が発生している形です。上述のポイントの真逆となり、すなわち**解離相で速やかにゼロに戻らない、結合相で平坦でない**ことで特定されます。右図は時間を置くとゼロに戻りかけていますが、全く解離しないようなセンサーグラムもよく見られます。

こうした非特異的な結合が起きている時点で、**解析値の信頼性（真度）が大なり小なり低くなります**。**非特異的な結合が起きない条件を探し再測定が必要です**。Active cell でも全く同じ量の非特異的結合が起きているとは限らないため、Active – Reference で差し引くことはできないのです。



②再生溶液添加後のレスポンスはベースラインに戻っているか？

再生溶液を添加している系に限りますが、1 ページ目のような **Active cell - Reference cell** のセンサーグラムでは評価できません（もちろんフィッティング後でも評価できません）。Reference cell のみだけでなく、Active cell のみでもそれぞれ評価していく必要があります。

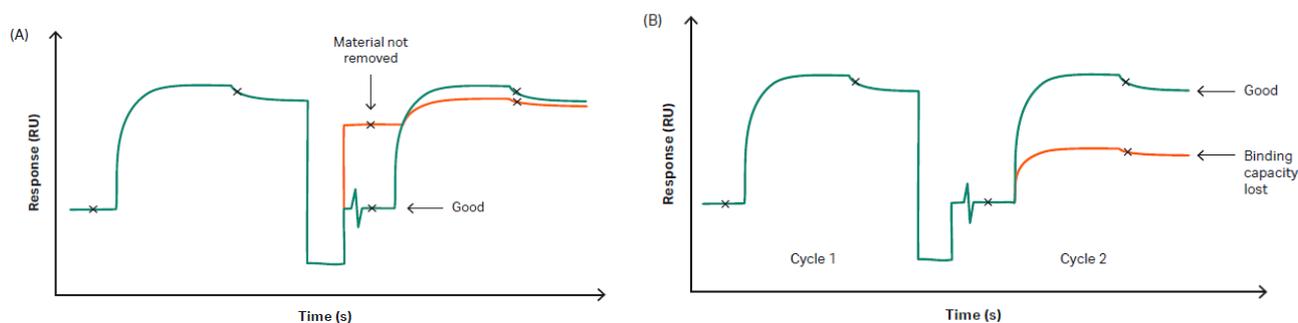


Figure 2 Active cell のセンサーグラム。緑：理想的再生条件、橙：問題のある再生条件

再生溶液は、リガンドからアナライトを完全に解離させ、かつ、同じ条件（添加濃度、時間、流速など）でアナライトを添加した時に同じセンサーグラムが描けるものが理想です。したがって Figure 2(A)の橙のように、再生溶液添加後のレスポンスが添加前のベースラインよりも高い位置に留まってしまうは避けられず、Figure 2(B)の橙のように、同条件でアナライトを添加した時に相対的に同様のセンサーグラムが得られないようではいけません。こうした再生溶液の検証は本格的な測定を実施する前に事前に見るべきものです。

事前に見る方法は？何回くらい再生の繰り返し実験をすべき？またそのレスポンスのズレは何%くらいまでなら許容される？

求める実験結果の厳密さによって変動しますので、最終的にはご研究者様にてご判断いただくことになります。一方で最近の英語版 Manual などでは以下のように記載されております（該当部分和訳）。

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

このアナライト添加と再生の検証は、もちろん Manual run（あるいは Interactive run）で実施いただいても良いですが、後々の記録に残す上では適切な method を立ち上げて検証していただく方が良いでしょう。

③ センサーグラムの高さの確認

Kinetics 解析を実施するに当たっては [マストランスポートリミテーション \(MTL\) の理解](#) と [至適な固定化量の理解](#) が必須です。MTL を抑制するため、理論上のアナライトの最大結合量である理論的 Rmax は 20~50RU 程度の間（特に低分子アナライトの場合はもっと小さくても良い）に収まっていることが、多くの相互作用において MTL が引き起こす誤差を十分に軽減できると言えます。実際にチップ上に保持されたリガンドは全てが結合活性を持つわけはありませんから、解析後に得られる算出 Rmax は理論的 Rmax を下回ることになります。

そうした状況を得るためのリガンド量は以下の式で計算できます。

$$(\text{Kinetics解析をする上での理想的なリガンド量}) = (20\sim 50) \times \frac{(\text{リガンドの分子量})}{(\text{アナライトの分子量})} \times \frac{1}{(\text{リガンドの結合価数})}$$

因みに、[こちらの web ページ](#) でリガンドとアナライトの分子量、理論的 Rmax の目標値、結合価数を入力すれば理想的なリガンド量を自動で計算してくれます。

例) アナライト (青) = 抗原 25kDa、リガンド (橙) = 抗体 150kDa を想定してみます。上の式に従うと、

$$(\text{理想的なリガンド量}) = 20\sim 50 * (150/25) * (1/2) = 60\sim 150 (\text{RU})$$

となり、橙の抗体の量が求められます。このようにキャプチャー法の場合でもリガンド量は同じ計算式になります。

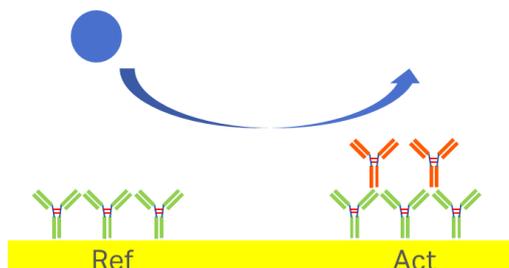


Figure 3 抗抗体（緑）を介した抗原抗体反応の kinetics 測定の一般的なセットアップ

Kinetics 解析により得られた算出 Rmax が理論的 Rmax を超えている場合、その時点で解析結果は疑わしいです。1:1 binding ではない相互作用が起きていたり、アナライトが凝集してしまっていたり、非特異的な結合が起きているのではないかな...と疑います（参考：[Rmax のトリセツ](#)）。

④ブランク（0 濃度）の再現性とドリフト

Biacore の解析はダブルサブトラクションという方式を取っています。これは、Active cell – Reference cell で 1 回目、さらに（アナライトを添加したサイクル） - （ランニング緩衝液を添加した 0 濃度のブランクサイクル）で 2 回目の差し引きを行ったセンサーグラムを解析しているという意味です。

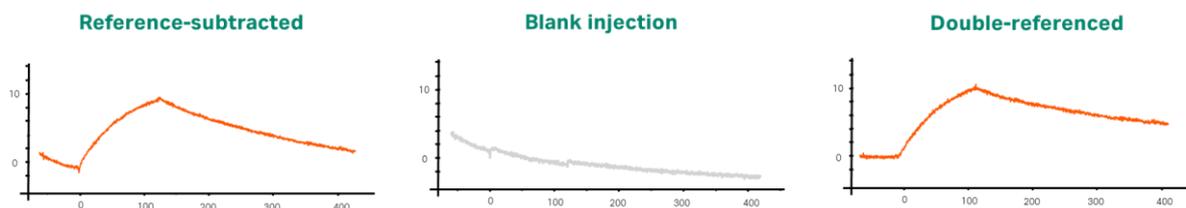


Figure 4 ダブルサブトラクションは解析の際は自動でやってくれます

さて、このダブルサブトラクションにより溶液効果やドリフト、機械ノイズなどはかなり除外されているはずであり、解析に持ち込まれるセンサーグラムは既にかなり綺麗なものになっているはずです。ところが 0 濃度のブランクのデータ自体の再現性が低いとそうもいきません。

0 濃度のブランクのデータはダブルサブトラクションに大きな影響を与えるため、複数サイクルで取得すると安心です。これはシングルサイクル法でもマルチサイクル法でも基本的に同じです（スループットを重視する場合はブランクサイクルをあえて減らしてしまうこともあります）。こうして得られた複数サイクルの 0 濃度のブランクデータの再現性を確認することで測定系が一定の測定環境を保っていることを確認します。ブランク再現性が高い測定により誤差の小さい解析が可能になります。

なお、マルチサイクル法でしたらブランクだけでなく同じ濃度のアナライトを複数回添加することを推奨しておりますから、その再現性を確認することも行ってください。こちらも同じく、測定系が一定の測定環境を保っていることの確認になります。

⑤アナライタ添加開始・終了直後に急激な段差がないこと

RI はほぼゼロか？

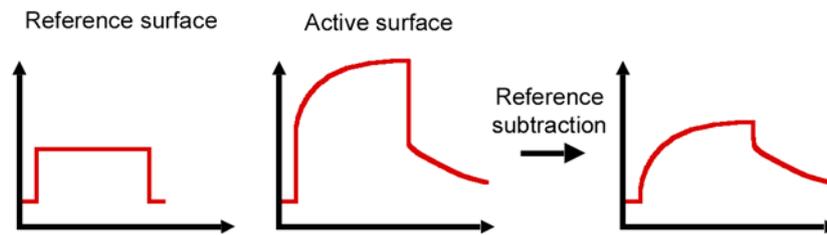


Figure 5 Ref cell と Act cell で同様に発生する溶液効果が差し引かれる様子

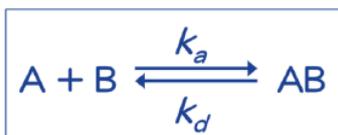
溶液効果（Bulk effect）はどんなに注意してもゼロにすることはできないと①で解説しました。しかしアナライタ添加開始・終了直後の急激な段差（= Bulk Refractive Index (RI)）は④で解説したダブルサブトラクションにより差し引かれており、**基本的に解析時には残っていないはず**です。Figure 6 は Act - Ref だけの 1 回のサブトラクションですが、この時点でもゼロ近くになっていることが分かります（よく見ると解離相直後に差し引き切れていない RI がありますね。ブランクの 0 濃度データも差し引くことで完全に除去しましょう）。

したがって RI はゼロでも良いはず。実際、Biacore™ Insight evaluation software では初期設定が RI=0 としてフィッティングが行われます。もし明確に RI が見えるのであれば、その時点でなぜ差し引き切れなかった RI があるのかをご確認いただいた方が良いでしょう。

また一方でその他の解析ソフトでは RI は各アナライタ添加毎の変数としてフィッティング計算が行われます。まれに非常に早い結合を RI と誤認して解析してしまうことがありますので、その際は [RI=0 の固定値に変更して解析する](#)などで対応する必要があります。

⑥解離相は指数関数的なカーブを描いている（二相性ではない）

1:1 binding model を考えた時、解離速度は以下のように表現できます。



結合速度：
(右向き) $\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B]$

解離速度：
(左向き) $-\frac{d[AB]}{dt} = k_d \cdot [AB]$

Biacore では[AB]（＝複合体のモル濃度）はその時間におけるレスポンス R と言い換えることができます。したがって

$$\frac{dR}{dt} = -k_d \cdot R$$

解離が始まった直後の R を R_0 と置けば、上の微分方程式を積分型に直すと以下の式になります。

$$R(t) = R_0 \times e^{-k_d t}$$

したがって解離相のレスポンスは R_0 （解離が始まった直後のレスポンス）を最大値として指数関数的に低下していく、ということになります。

これは感覚的になってしまい申し訳ないのですが、日々 Biacore の 1:1 binding のカーブを眺めていると、この指数関数的な落ち方をしているかどうかなんとなくわかるようになります。下の Figure 6 は 1:1 binding ではない解離の形（二相性）です。

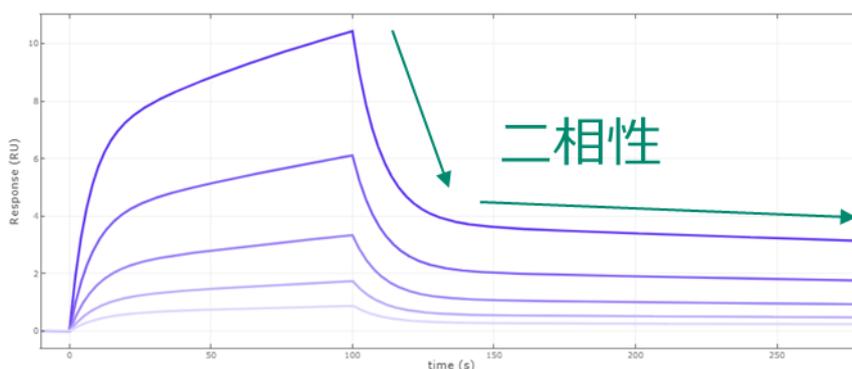


Figure 6 解離相において速い解離と遅い解離の 2 つが混じっている

こうした二相性の解離相の場合、見ただけで 1:1 binding model ではフィットしないだろうな...と想定が付きまします。速い解離と遅い解離が混じっているということは、結合様式も 2 種類以上が入り混じっているということですから、1:1 binding model でフィットしないのは当然と言えますね。

⑦ 最高濃度のレスポンス高に飽和傾向があり、最低濃度のレスポンスがベースラインに近い

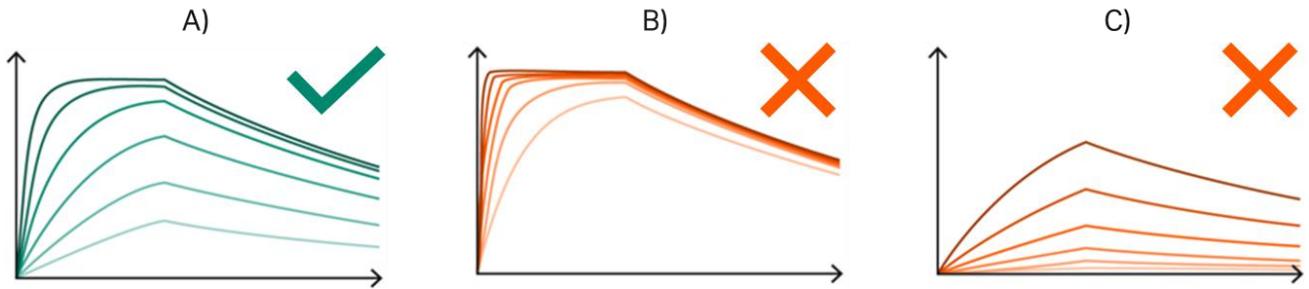


Figure 7

Kinetics 解析を行うにあたり、濃すぎる濃度帯や薄すぎる濃度帯でアナライトを準備してしまうと信頼性（真度）が大なり小なり低くなります。Figure 7 A)は理想的な濃度帯のセットアップです。すなわち、最高濃度のレスポンス高では飽和傾向が見られ、濃度依存的なセンサーグラムの変化も見られ、最低濃度のレスポンスではベースラインに近付いている様子が見られます。Figure 7 B)は最高濃度のレスポンスこそ飽和傾向が十分に見られていますが、低濃度側のデータが不足、Figure 7 C)では逆に高濃度側のデータが不足しています。

B)や C)のセンサーグラムだと解析値の信頼性がないのか？と言われると、その程度や得たい結果の厳密さにも依りますので何とも言えません。こうしたデータを解析した時に考えられることや、A)のようなデータを得るための条件などについては次回以降の資料でまとめますのでご期待ください。