



Cytiva Webinar

ノウハウや経験がなくてもBiacoreの測定系を最速で立ち上げられる方法

Gen Takata
May 15 2020



お知らせ：GE Healthcare Life Sciences（Biopharma事業）はCytivaに変わりました

2020年3月31日をもってDanaher CorporationによるGE Healthcare Life SciencesのBioPharma事業の買収が完了しました。

4月からは **Cytiva（サイティバ）** というブランド名のもと、新たにスタートいたしました。

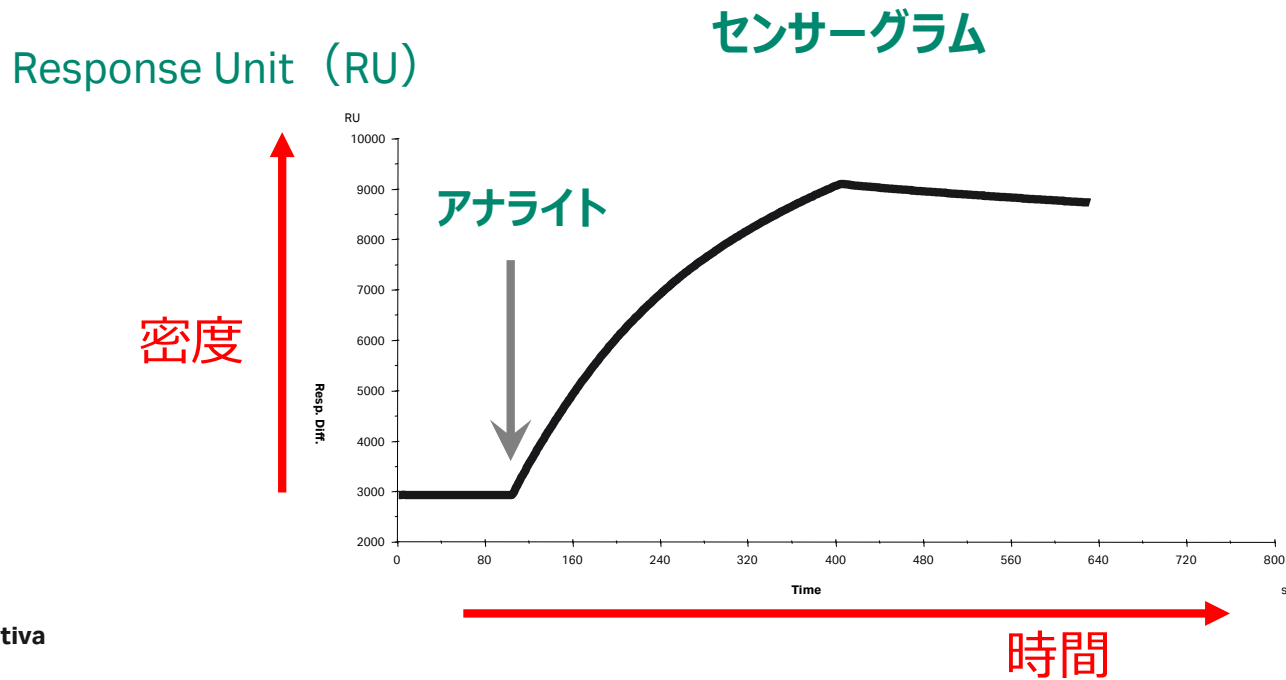
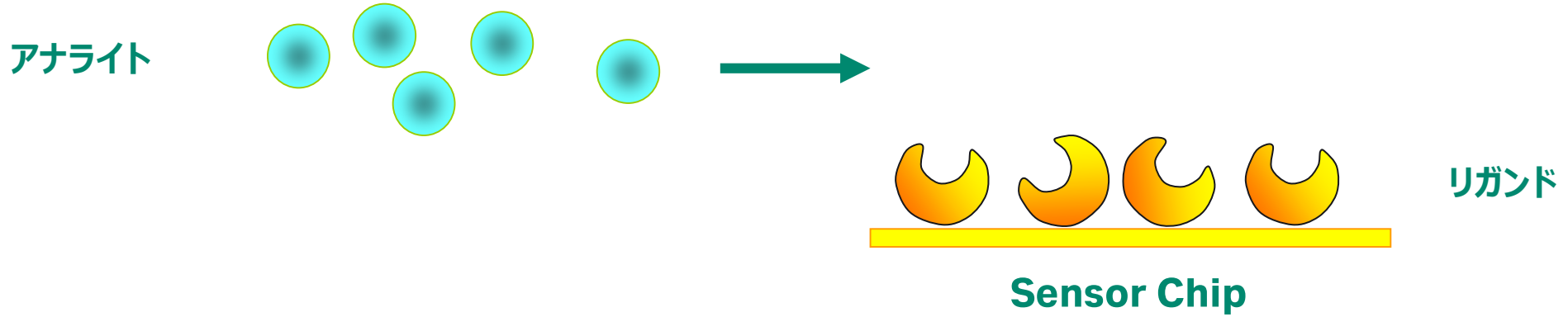
Cytivaは、これまでと変わらず、お客様の“頼れるパートナー”を目指しています。



本日の内容

- ✓ Biacoreとは
- ✓ ユーザー様の声
- ✓ Biotin CAPture Kitによる解決方法

Biacoreとは



分子間相互作用を

ノンラベル

リアルタイム

で、測定するシステムです

ユーザー様の声

「固定化方法、リガンドを希釈バッファー、再生条件など条件検討が多岐にわたるので大変」

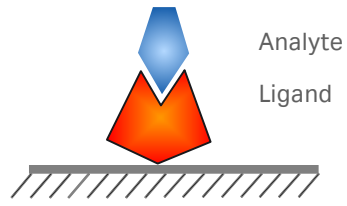
「はじめて取り組むのに、ノウハウをまず勉強するのに時間がかかる」

特に、こんなユーザー様、

- ✓ Biacoreをはじめて使用する。
- ✓ 個別の測定者の使用頻度がそれほど多くなく技術習得が困難（大学共通機器など）
- ✓ 多種類のサンプル（特にリガンド）を評価しなければいけない。
- ✓ 様々なタンパク質サンプルでワークフローを統一化して効率化したい。

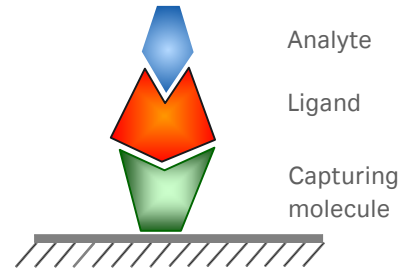


固定化について：直接法とキャプチャー法



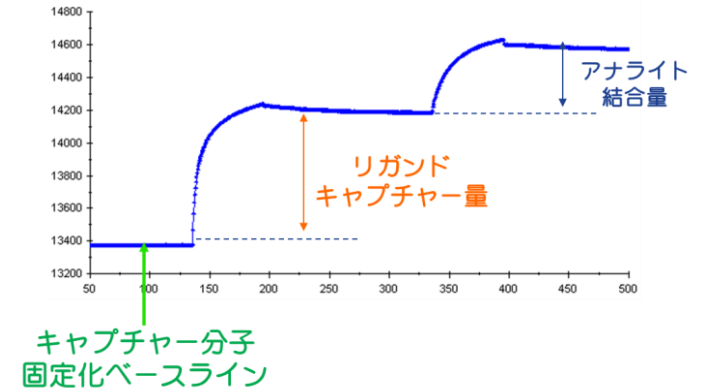
• 直接法

- リガンドをセンサーチップ上に共有結合



• キャプチャー法

- キャプチャー用分子をセンサーチップ上に共有結合
- リガンドはサイクル毎にキャプチャーさせる



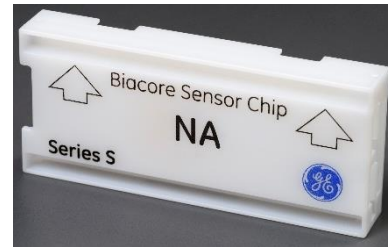
	直接法（アミンカップリング）	キャプチャー法
Pros	古典的方法。 キャプチャー法でCapturing moleculeの固定化にもよく使われる。 →アミンカップリングのページ参照。 参照論文が多い。 リガンドの消費量が少ない。	固定化によるリガンドの失活リスクがほとんどない。 再生条件の検討不要。 → 実験成功の確実性。
Cons	アナライトを剥がす再生条件の検討が必要。見つけられないケースがある。 リガンドの固定化時の酸に伴う変性。 → 実験成功の不確実性。	固定化量が比較的少ない（多くの場合問題ない）。 リガンドの消費量が多い。 リガンドのタグに依存。→Biotin化は汎用性が高い。 His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

代表的な固定化方法 ～ ビオチン化サンプルの固定化

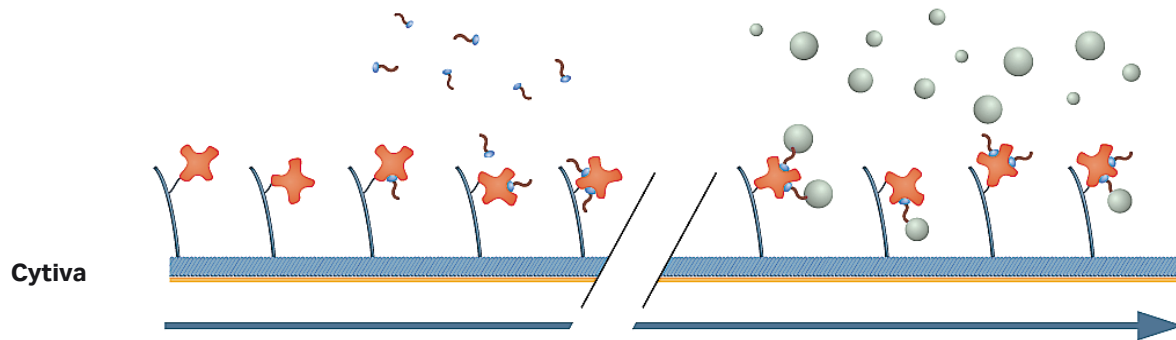
ニュートラビジン/ストレプトアビジン – ビオチンの高い親和性で安定したリガンドの固定化

センサーチップNA/SA

キャプチャー法（再生不可）



- センサーチップにニュートラビジン（NA）もしくはストレプトアビジン（SA）があらかじめアミンカップリングされている。
- 固定化は添加するのみ



Biotin CAPture Kit

キャプチャー法（再生可）

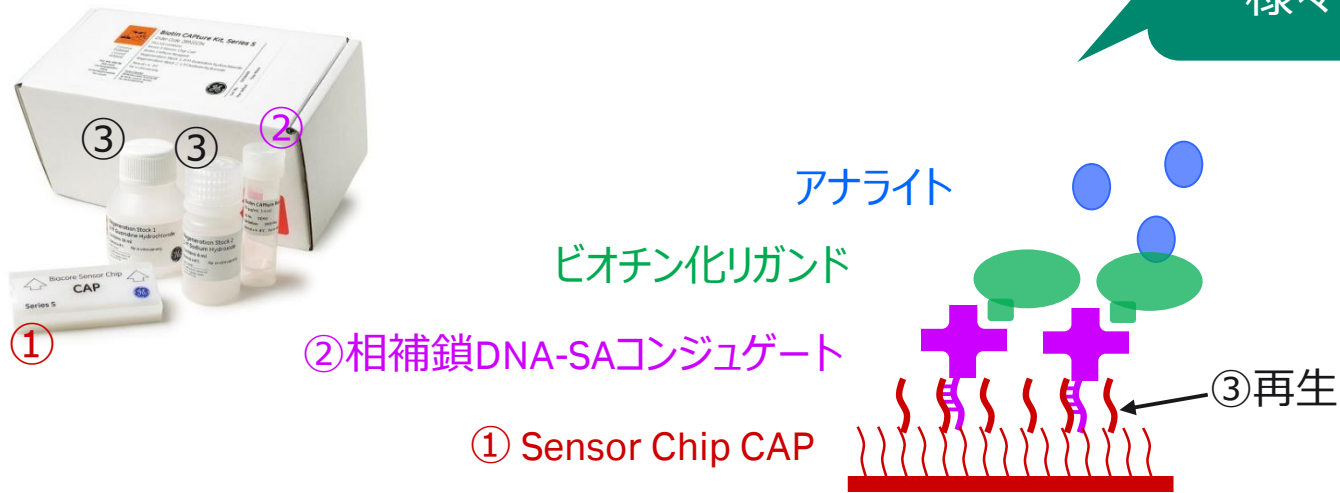


- 一本鎖オリゴDNAがプレイモビライズされたチップとストレプトアビジン(SA)修飾された相補鎖DNAを使用
- 強力なビオチン-ストレプトアビジン結合であってもリガンドの付け替えが可能



Biotin CAPture Kit 概要

条件検討に時間を使いたくない皆様へ。
様々なサンプルで成功確率が高い固定化法の第一選択。



- 一本鎖オリゴDNAがプレイモビライズされたチップ、ストレプトアビジン修飾された相補鎖DNAを使用。
- ビオチン-ストレプトアビジンの強い結合であってもKit付属の再生溶液で、チップを再利用することができます。
- Biotin CAPture Reagent（相補鎖DNA-SAコンジュゲート）の単品販売もはじまりました。

Biotin CAPture Kit	
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ビオチン - ストレプトアビジンの高い親和性。 K_Dは10^{-15} (M)。 ✓ ビオチン化されたリガンドを用意すれば固定化方法の条件検討が不要。 ✓ 他のキャプチャー法に比べ、長時間測定によるダウンドリフトが少ない。 ✓ 固定化によるリガンドの失活リスクがほとんどない。 ✓ 各サイクルでフレッシュなリガンドによる測定ができる。 ✓ 再生条件の検討不要。
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ✓ アミンカップリングと比較すると固定化量が少ない（多くの場合問題にならない）。 ✓ リガンドの消費量が多い。 ✓ 核酸の親和性、開裂を利用した系なので、核酸を測定する場合にはおすすりません。 ✓ 準備・測定時間がやや長い

製品	コード番号	対応機種 (Injection回数)
Biotin CAPture Kit	28920233	X100 (80)
Biotin CAPture Kit, Series S	28920234	8K/8K+ (100)、T200 (100)、S200 (100)
Biotin CAPture Reagent	29423383	全機種

Biotin CAPture Kit によるワークフロー

リガンドのBiotin化

- NHS-biotin試薬 (EZ-Linkなど) によるビオチン化
- Avi-Tag などによるビオチン化タンパク質の発現

センサーチップCAPのRehydration

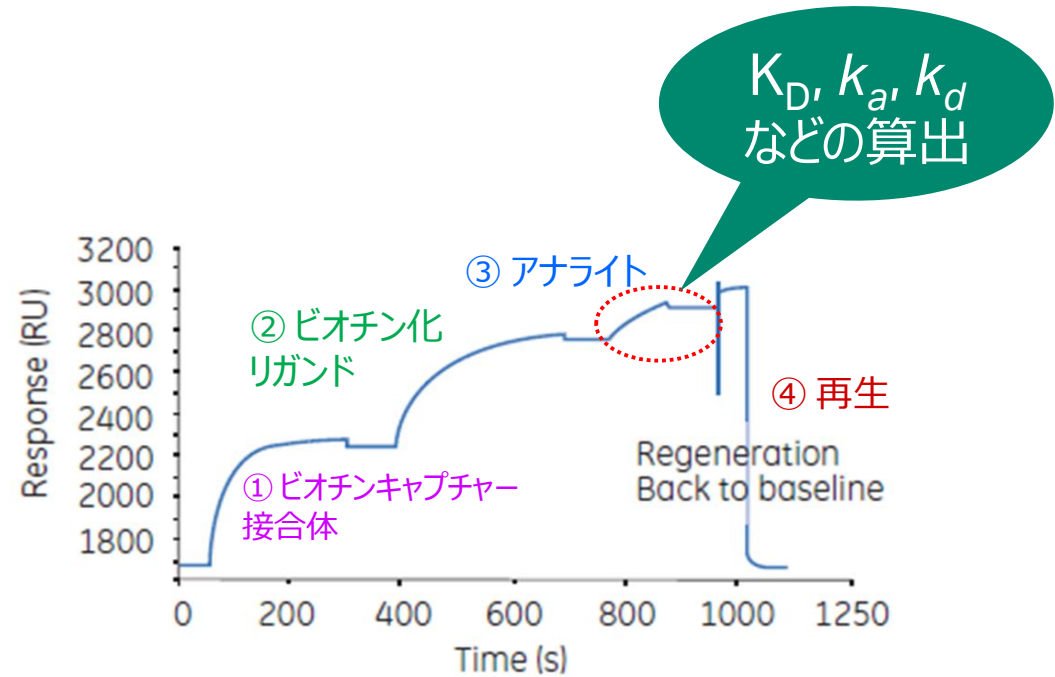
- 前日からセンサーチップCAPをBiacoreにセット。超純水やバッファーで Stand by flow。

測定/解析

- 固定化/再生条件検討ほぼ不要。右図参照。

センサーチップCAPの保存

- Standby flow のままシステム内で保管。
- 50 ml 遠沈管でHBS bufferに浸した状態で保管。4~8°C で2か月間の保存。



- ① Biotin CAPture Reagentをインジェクションして、ハイブリダイズ
- ② ビオチン化したリガンドをインジェクションして、キャプチャー
- ③ アナライトをインジェクションして、アナライトとリガンドとの結合を見ます
- ④ DNAを開裂させることで再生

ユーザー様の声

「固定化方法、リガンドを希釈バッファー、再生条件など条件検討が多岐にわたるので大変」

「はじめて取り組むのに、ノウハウをまず勉強するのに時間がかかる」

特に、こんなユーザー様、

- ✓ Biacoreをはじめて使用する。
- ✓ 個別の測定者の使用頻度がそれほど多くなく技術習得が困難（大学共通機器など）
- ✓ 多種類のサンプル（特にリガンド）を評価しなければいけない。
- ✓ 様々なタンパク質サンプルでワークフローを統一化して効率化したい。



EZ-Link™ によるBiotin化 例

【Biotin化試薬】

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

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

【リガンドタンパク質の準備】

0.1～1.0 mg/ml in HBS-N buffer

【リガンドタンパク質のBiotin化】

リガンド : biotin化試薬 = 1 : 1.5 (モル濃度)、例) 90 μ l リガンド + 10 μ l biotin化試薬 = 全量100 μ l で混和
25°Cで1時間、または4～8°Cでオーバーナイト

【余剰なbiotin化試薬の除去】

PD SpinTrap G-25 (28918004) Sample Volume 100～180 μ l

- 1 min at 800 \times g で保存溶液除去
- 1 min at 800 \times g で平衡化 (HBS-N) \times 5回
- 100 μ l Biotin化リガンド添加、140 μ lになるようにBuffer 追加 (推奨) 、2min at 800 \times g で精製 \times 1回)

Laboratory Guideline 28-9615-82 AC "Biotinylation for streptavidin-biotin capture "

https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/pdf/LabGuide_Biotinylation_VerAC.pdf



AviTag™ によるBiotin化 例

表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いた蛋白質に結合する低分子リガンドスクリーニング

¹東京大学大学院・工学系研究科・化学生命工学専攻、²東京大学・医科学研究所、³東京大学大学院・工学系研究科・バイオエンジニアリング専攻

妹尾 暁暢¹、長門石 暁²、津本 浩平^{1,2,3}

Screening of a small molecule ligand for a protein utilizing Surface Plasmon Resonance (SPR)

¹Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, ²Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ³Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo
Akinobu Senoo¹, Satoru Nagatoishi², Kouhei Tsumoto^{1,2,3}

一般社団法人 日本蛋白質科学会 Web サイト

https://www.pssj.jp/archives/protocol/measurement/SPR_01/SPR_01.html

妹尾暁暢ら, 蛋白質科学会アーカイブ, **13**, e096 (2020)



Avidity 社 AviTag™ (BirA biotin-protein ligase standard reaction kit) による
蛋白質の N 末端か C 末端を選択してビオチン化修飾する方法～Sensor Chip SAによる測定

Biacoreシリーズ

8本のニードルにより高品質測定データを短時間で

Biacore 8K/8K+



基礎研究から医薬品探索・品質管理まですべてに

Biacore T200



低分子創薬に
Biacore S200



小スケールの相互作用解析に

Biacore X100



Biacore 4000



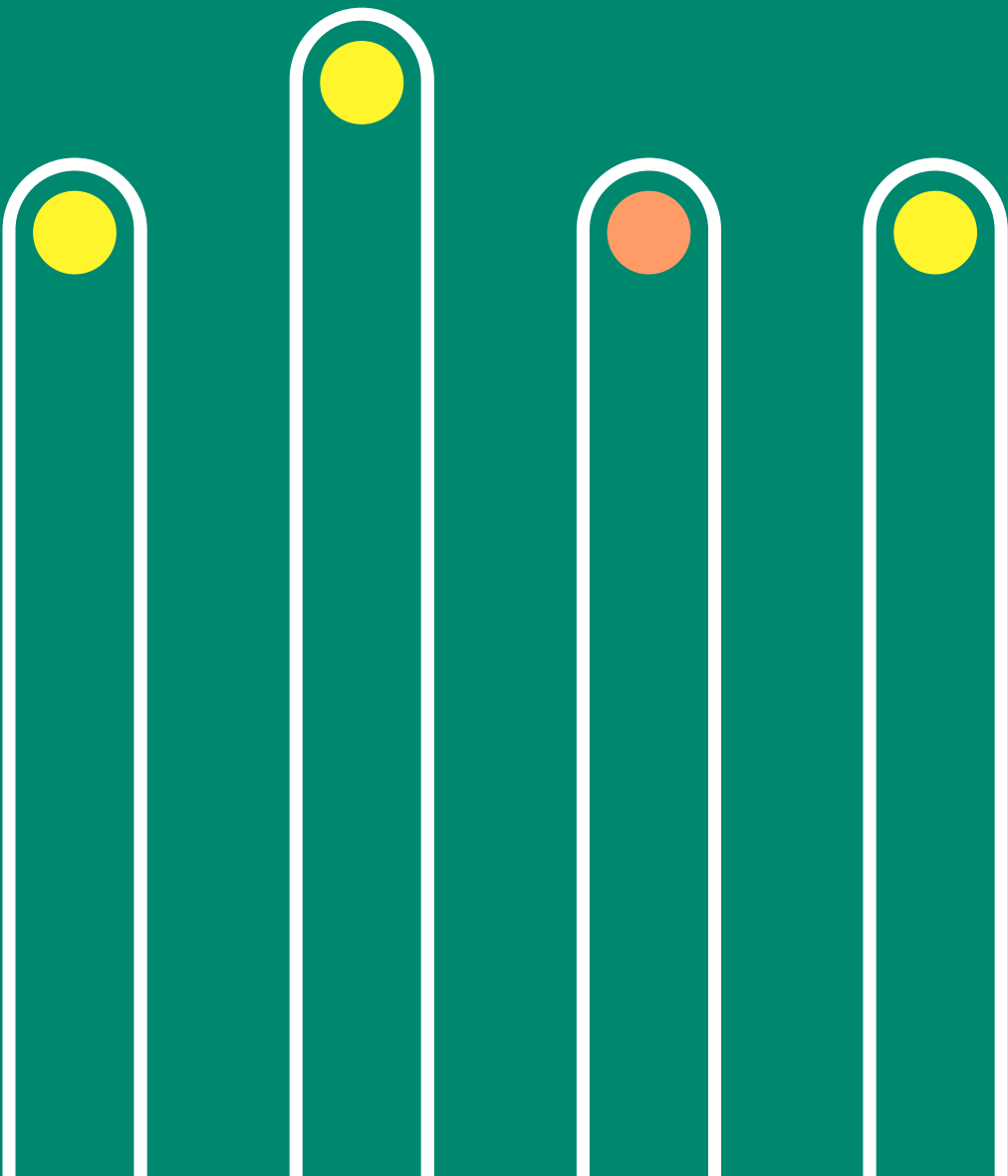
Biacore 3000



製品	コード番号	対応機種
Biotin CAPture Kit	28920233	X100、3000
Biotin CAPture Kit, Series S	28920234	8K/8K+、T200、S200、T100、4000
Biotin CAPture Reagent	29423383	全機種



Thank you



【お問合せ先】

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

バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 / FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

本資料の使用については、お客様施設内での使用に限ります。他社への転送、譲渡等は禁じます。本資料の著作権その他の知的財産権は、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に帰属します。無断転載、無断コピー、改ざん、二次利用を禁じます。

掲載されている価格は2020年5月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は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。

弊社は、資料の掲載内容の正確性を記すべく、情報を随時更新しておりますが全ての情報が最新であることを保証するものではありません。

したがって、当資料上の掲載内容に誤りがあった場合でも弊社は責任を負いかねます。