

5月号

抗原—抗体の相互作用

- ◆ 準備
 - 実験に必要なサンプル情報
 - センサーチップや消耗品
- ◆ 測定系セットアップ
 - キャプチャー量の設定
 - アナライト濃度レンジ、結合・解離時間の設定
- ◆ 特異的相互作用の確認
- ◆ キャプチャー法による測定
- ◆ センサーチップの保管・装置のシャットダウン



はじめに

5月号は、はじめて抗原—抗体の相互作用を測定する場合の実験ノートです。 K_D 、 k_a 、 k_d 値の算出を目的とした測定に関する手順書となっています。抗原に関しては、水系のバッファーが溶媒であることが前提となっています。DMSOに溶解されている場合、6月号「低分子化合物—タンパク質の相互作用」をご参考にしてください。

抗原—抗体の相互作用を測定する場合、二価の抗体をリガンドとしてキャプチャー法を用いていただくことが、一般的となります。そもそも K_D 値とは1:1結合の平衡反応における親和性と定義されています。そのため、アナライト側を一価とすることで1:1結合のアッセイ系をセットアップすることが重要です。また、特に複数抗体を評価する上で、キャプチャー法を用いることが有用です。

本稿は、キャプチャー法を用いた手法によるガイドとなります。



抗体スクリーニング～抗原—抗体の相互作用の詳細に関しては、こちらの Webinar もご参考にしてください。

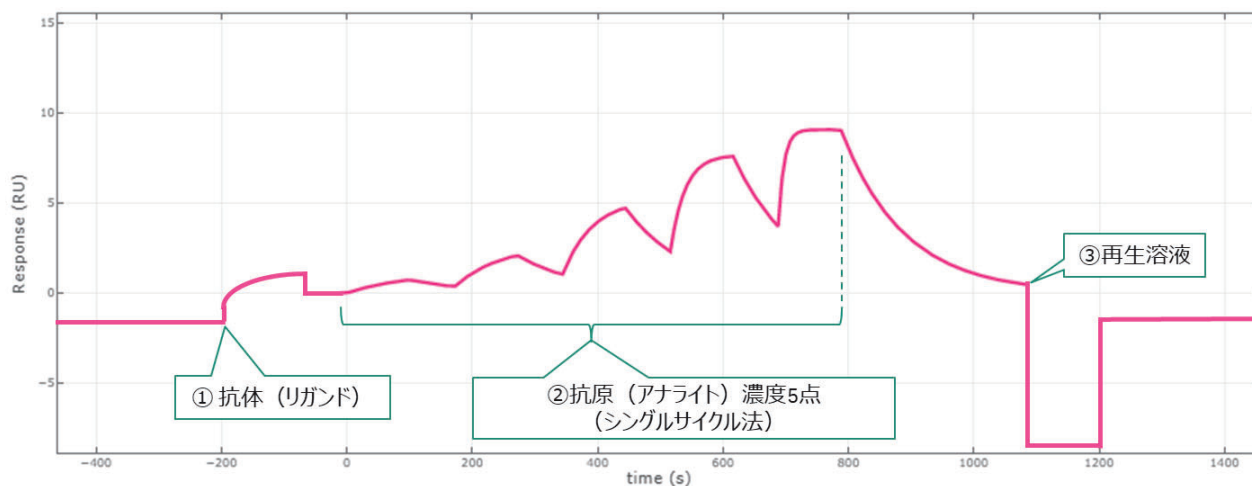
イチから始める Biacore™での抗体スクリーニング

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/contact/ondemand/ondemand-antibody-screening-biacore.html>



本測定で得られるセンサーグラム

キャプチャー法による、抗原—抗体の相互作用を測定では、以下のようなセンサーグラムが得られます。①リガンドである抗体がキャプチャーされます。②濃度5点のアナライトである抗原を連続で添加します（シングルサイクル法）。③再生溶液で①②の全てを外してベースラインに戻ります。



MEMO

準備

1. 実験に必要なサンプル情報

リガンドとアナライト

抗原—抗体の相互作用を測定する場合、二価の抗体をリガンドとしてキャプチャー法を用いていただくことが、第一選択となります。

抗体の種類

抗体をリガンドとしてセンサーチップにキャプチャーして、相互作用解析を実施する場合、Protein A、Protein G、抗ヒト抗体、抗マウス抗体をキャプチャー分子とします。そのため、抗体の動物種を明らかにしてください。



抗体用の各種センサーチップおよびキットの使い分けに関しては、こちらの記事もご参考にしてください。

Series S Sensor Chip PrismaA どんなセンサーチップ？

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/knowledge-center/sensor-chip-prisma.html>



K_D, K_a, K_d 算出を目的とする場合、Sensor Chip Protein A、Sensor Chip Protein G、Human Antibody Capture Kit、Human Fab Capture Kit、Mouse Antibody Capture Kit を用います。



分子量とストック濃度

ストック濃度はタンパク質で、数 mg/ml など可能な限り高濃度なものをご用意ください。

リガンド、アナライトそれぞれの分子量情報が必要です。

【実験メモ】

	分子名	分子量	ストック濃度	結合価数
リガンド				
アナライト				

MEMO

1. 実験に必要なセンサーチップや消耗品

抗原—抗体の相互作用で必要となるセンサーチップや消耗品を下記にまとめました。

にチェックを入れながら準備を進めていただくと確実です。

実験全体を通じて用意するもの

- 超純水 ……バッファーの希釈、洗浄水など
- 紙製のウエス（キムワイブなど）
- ピンセット
- マイクロピペット・チップ・マイクロチューブ類

センサーチップ・キット

抗体のキャプチャー法には、大きく分けて下記 1)、2) の 2 種類の方法があります。

1) Sensor Chip Protein A、Sensor Chip Protein G を用いる場合

- Series S Sensor Chip Protein A（3 枚：29127556、1 枚：29127555）
- Series S Sensor Chip Protein G（1 枚：29179315）
* Biacore 8K,8K+,T200,S200 の場合、上記いずれかを用います。
- Sensor Chip Protein A（3 枚：29127558、1 枚：29127557）
- Sensor Chip Protein G（1 枚：29179316）
* Biacore X100 の場合、上記いずれかを用います。



2) 各種 Antibody Capture Kit を用いる場合

- Series S Sensor Chip CM5（10 枚：29149603、3 枚：BR100530、1 枚：29104988）
* Biacore 8K,8K+,T200,S200 の場合
- Sensor Chip CM5（10 枚：29149604、3 枚：BR100012、1 枚：BR100399）
* Biacore X100 の場合
- Amine Coupling Kit（BR100050）
* Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 で共通
- Human Fab Capture Kit（28958325）
- Human Antibody Capture Kit（BR100839）
- Mouse Antibody Capture Kit（BR100838）
* Biacore T200,S200,X100 の場合、上記いずれかを用います。
- Human Fab Capture Kit, type 2（29234601）
- Human Antibody Capture Kit, type 2（29234600）
- Mouse Antibody Capture Kit, type 2（29215281）
* Biacore 8K,8K+の場合、上記いずれかを用います。



 各種 Antibody Capture Kit のほか、Sensor Chip CM5、Amine Coupling Kit が必要です。

MEMO

ランニングバッファー

- HBS-EP+ 0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.03 M EDTA and 0.5% v/v Surfactant P20 (Tween 20)
 - HBS-P+ 0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl and 0.5% v/v Surfactant P20 (Tween 20)
- * 第一選択は HBS-EP+ です。いずれも超純水で 10 倍希釈します。

再生溶液

- 10 mM Glycine-HCl, pH 1.5 (BR100354) * Sensor Chip Protein A、Sensor Chip Protein G 共通



各種 Antibody Capture Kit を使用する場合、再生溶液はキットに付属します。



上記は第一選択の手法です。再生が十分でない場合、IFU の Alternative regeneration procedures をご参照ください。

サンプル

- リガンド抗体
- アナライト抗原

■ 製品情報

製品	包装	コード番号
Series S Sensor Chip Protein A	3 枚	29127556
Series S Sensor Chip Protein A	1 枚	29127555
Series S Sensor Chip Protein G	1 枚	29179315
Series S Sensor Chip CM5	10 枚	29149603
Series S Sensor Chip CM5	3 枚	BR100530
Series S Sensor Chip CM5	1 枚	29104988
Sensor Chip Protein A	3 枚	29127558
Sensor Chip Protein A	1 枚	29127557
Sensor Chip Protein G	1 枚	29179316
Sensor Chip CM5	10 枚	29149604
Sensor Chip CM5	3 枚	BR100012
Sensor Chip CM5	1 枚	BR100399
Amine Coupling Kit	1 キット	BR100050
Human Fab Capture Kit	1 キット	28958325
Human Fab Capture Kit, type 2	1 キット	29234601
Human Antibody Capture Kit	1 キット	BR100839
Human Antibody Capture Kit, type 2	1 キット	29234600
Mouse Antibody Capture Kit	1 キット	BR100838
Mouse Antibody Capture Kit, type 2	1 キット	29215281
Glycine 1.5	1×100 ml	BR100354

MEMO

2. ランニングバッファの準備

Biacore 使用時には常にランニングバッファを流し続けます。抗原-抗体の相互作用では、第一選択は HBS-EP+ です。HEPES ベースに、静電的吸着を抑える NaCl、疎水結合を抑える Surfactant P20 (Tween 20)、2 価の金属イオンによるタンパク質凝集を抑える EDTA が添加されています。EDTA を除きたい場合、HBS-P+ を用います。いずれも超純水で 10 倍希釈します。

- HBS-EP+ 0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.03 M EDTA and 0.5% v/v Surfactant P20 (Tween 20)
- HBS-P+ 0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl and 0.5% v/v Surfactant P20 (Tween 20)

第一選択は HBS-EP+ です。いずれも超純水で 10 倍希釈します。



終夜運転で 1 測定を行う場合、以下のバッファ量を目安にご用意ください。

- Biacore 8K/8K+ …… 300 ml
- Biacore T200/S200 …… 200 ml
- Biacore X100 …… 150 ml



上記の組成は 10x における濃度です。いずれも 10 倍希釈時に pH 7.4 となります。要時調整でご使用ください。

Biacore X100 Base package または Biacore 3000 以前の機種をご使用の場合、脱気が必要です。



自作のバッファもご使用いただけますが、粉末から作成した場合、0.22µm フィルターろ過を行います。



各機種における Standby Flow 時のランニングバッファ消費量は以下の通りです。数日（7 日間以内）Standby Flow で置いておく際など、バッファの残量に気を付けてください。

- Biacore 8K/8K+ …… 260 ml/ 24 時間
- Biacore T200/S200 …… 65 ml/ 24 時間
- Biacore X100 …… 200 ml/ 7 日間

■ 製品情報

製品	包装	コード番号
HBS-EP+, 10x	1×1,000 ml	BR100669
HBS-EP+, 10x	4×50 ml	BR100826
HBS-P+, 10x	1×1,000 ml	BR100671
HBS-P+, 10x	4×50 ml	BR100827

MEMO

🔧 キャプチャー分子（抗 IgG 抗体など）の固定化

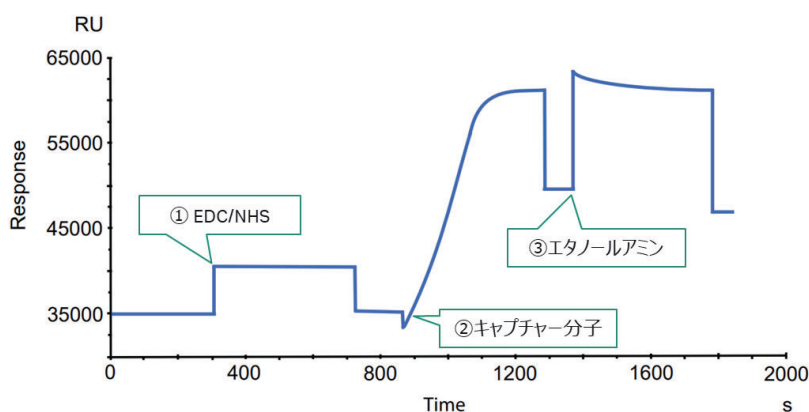
各種 Antibody Capture キットを用いる場合、はじめのステップとして Sensor Chip CM5 にキャプチャー分子（抗 IgG 抗体など）の固定化します。固定化にはアミンカップリング法を用います。

アミンカップリング法で得られるセンサーグラム

アミンカップリング法によるキャプチャー分子の固定化では、以下のようなセンサーグラムが得られます。

- ① NHS/EDC 添加によりセンサーチップのカルボキシル基が活性化します。
- ② キャプチャー分子を添加します。
- ③ エタノールアミンで、活性化したカルボキシル基の残りをブロッキングします。

Response bound と Response final のうち、小さい方が固定化量です。



1. Amine Coupling Kit の準備

Sensor Chip CM5 へのキャプチャー用抗 IgG 抗体の固定化するにはアミンカップリング法を用います。Amine Coupling Kit は 3 つのボトルで構成されます。

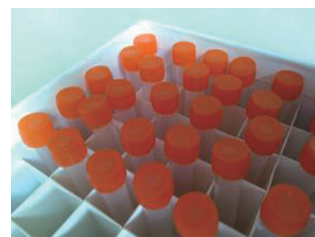


- N-Hydroxysuccinimide (NHS), 115 mg
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), 750 mg
- 1 M Ethanolamine hydrochloride-NaOH pH 8.5 (Ethanolamine), 10.5 mL

NHS、EDC は、はじめ 10 ml の超純水に溶解します。

i 溶解後の NHS、EDC は、-18℃以下で凍結保存します。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。Ethanolamine 溶液は 2-8℃の冷蔵保存です。

! NHS、EDC 溶解後の使用期間は 2 ヶ月です。



MEMO

2. センサーチップおよびシステムの準備

Sensor Chip のドック

Sensor Chip CM5 は、機種によってご使用いただくセンサーチップ形状が異なります。バッファボトルに適切なランニングバッファを準備して、Sensor Chip CM5 をドックします。



Series S Sensor chip CM5

* Biacore 8K,8K+,T200,S200 の場合



Sensor chip CM5

* Biacore X100, 3000 以前の機種の場合

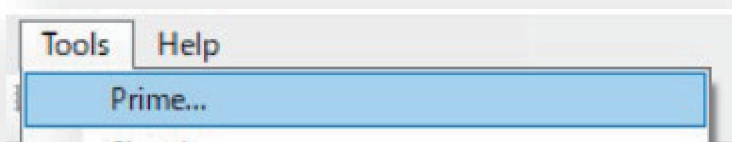
システムのバッファ置換

測定をはじめの前には、使用するランニングバッファでシステム内の溶液置換を行います。バッファ用チューブがボトルにセットされていることを確認し、以下を実行します。

Biacore 8K の場合 : Instrument Control タブから Change Solutions を選択



Biacore T200, S200, X100 の場合 : メニューバーから Tools → Prime を選択



MEMO

3. キャプチャー分子（抗 IgG 抗体など）の固定化

各種 Antibody Capture Kit に付属している Immobilization buffer でキャプチャー分子（抗 IgG 抗体など）を希釈し、各機種の方法を用いて固定化を行います。各キットの使用方法は各種 IFU をご参照ください。

Immobilization buffer による抗 IgG 抗体の希釈

各キット付属のキャプチャー分子と Immobilization buffer、および、希釈方法は以下の通りです。

- Human Fab Capture Kit (28958325)
- Human Fab Capture Kit, type 2 (29234601)
 - ・ Human Fab Binder, 0.5 mg/ml in 0.15 M NaCl
 - ・ Immobilization buffer: 10 mM sodium acetate pH 5.0

20 µg/ml Human Fab Binder に希釈します。

(例) 5 µl Human Fab binder stock solution + 120 µl immobilization buffer

- Human Antibody Capture Kit (BR100839)
- Human Antibody Capture Kit, type 2 (29234600)
 - ・ Anti-Human IgG (Fc) antibody: 0.5 mg/ml in 0.15 M NaCl
 - ・ Immobilization buffer: 10 mM sodium acetate pH 5.0

25 µg/ml Anti-Human IgG (Fc) に希釈します。

(例) 5 µl Anti-Human IgG (Fc) stock solution + 95 µl immobilization buffer

- Mouse Antibody Capture Kit (BR100838)
- Mouse Antibody Capture Kit, type 2 (29215281)
 - Anti-Mouse antibodies: 1 mg/ml in 0.15 M NaCl
 - Immobilization buffer: 10 mM sodium acetate pH 5.0

30 µg/ml Anti-Mouse antibodies に希釈します。

(例) 5 µl Anti-Mouse antibodies stock solution + 162 µl immobilization buffer



MEMO

アミンカップリングによる固定化

アミンカップリングによる固定化には、機種ごとのメソッドを用いてください。各システムの使用方法は各種マニュアルをご参照ください。

各種 Antibody Capture kit の Procedure step は以下の通りです。

Human Fab Capture Kit (28958325) および Human Fab Capture Kit, type 2 (29234601)

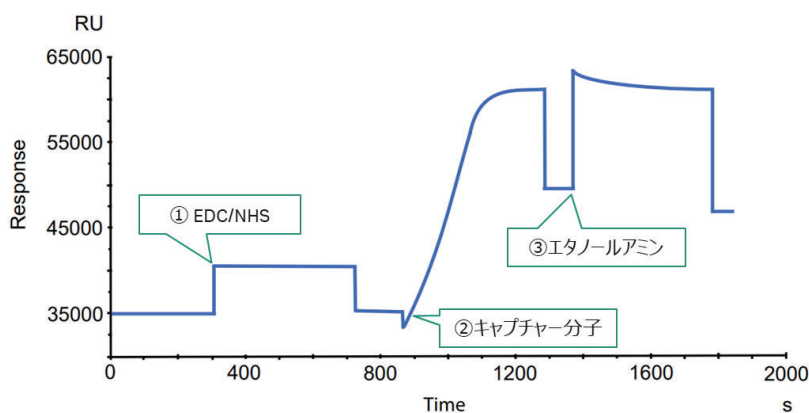
- EDC/NHS … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 7 分
- キャプチャー分子 … Biacore 8K,8K+,T200,S200 は 6 分
… Biacore X100 は 8 分
- エタノールアミン … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 7 分

Human Antibody Capture Kit (BR100839) および Human Antibody Capture Kit, type 2 (29234600)

- EDC/NHS … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 7 分
- キャプチャー分子 … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 6 分
- エタノールアミン … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 7 分

Mouse Antibody Capture Kit (BR100838) および Mouse Antibody Capture Kit, type 2 (29215281)

- EDC/NHS … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 7 分
- キャプチャー分子 … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 7 分
- エタノールアミン … Biacore 8K,8K+,T200,S200,X100 いずれも 7 分



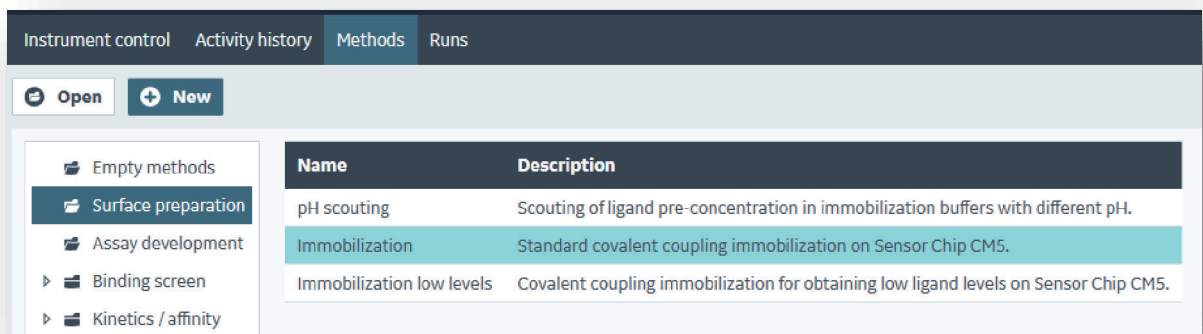
キャプチャー分子は、必ずアクティブセルおよびリファレンスセルの両方に固定化します。



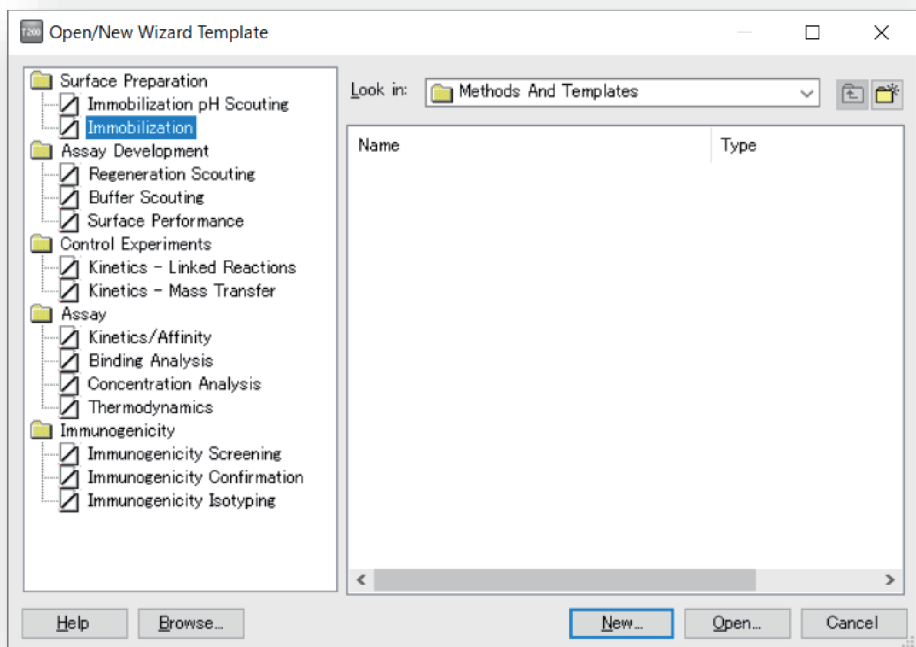
フローセル間でのキャプチャー分子の固定化量を極力揃えたい場合、2 回のランに分けて実施します。

MEMO

Biacore 8K の場合 : Method タブの New より、Surface preparation→Immobilization を選択

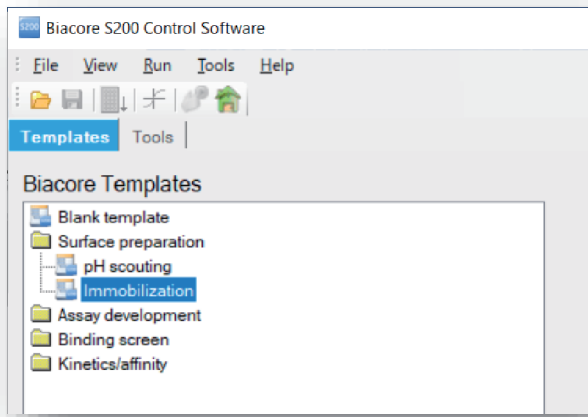


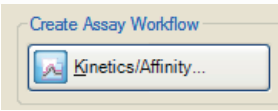
Biacore T200 の場合 : Wizards より、Surface preparation→Immobilization→New を選択

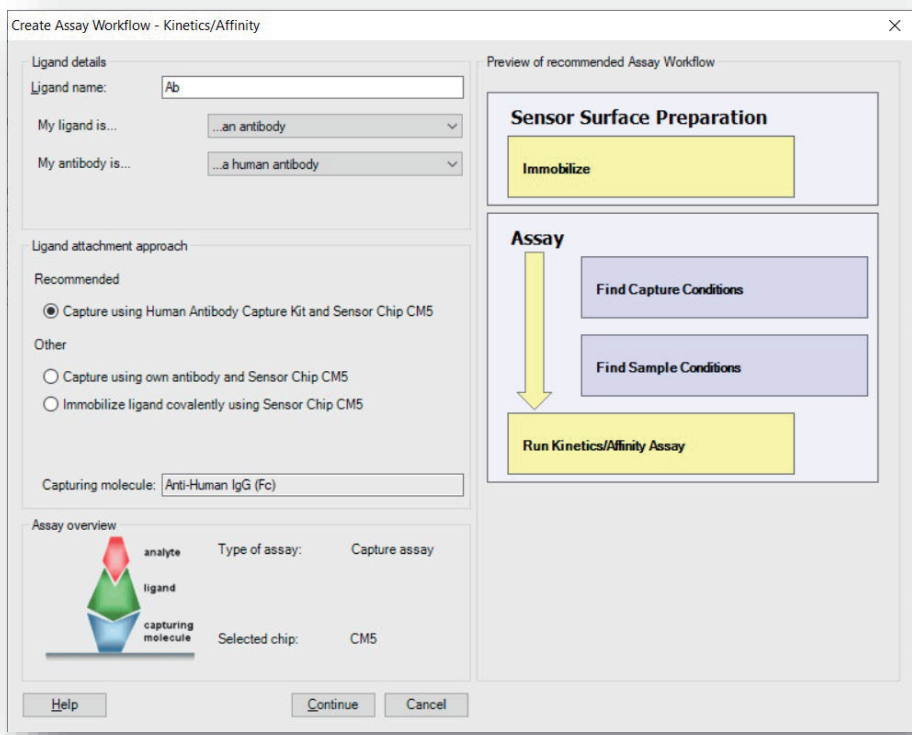



MEMO

Biacore S200 の場合 : **Templates** Template タブより、Surface preparation→Immobilization を選択



Biacore X100 の場合 :  Create Assay Workflow の Kinetics/Affinity より下図のように抗体用のワークフローを作成します。

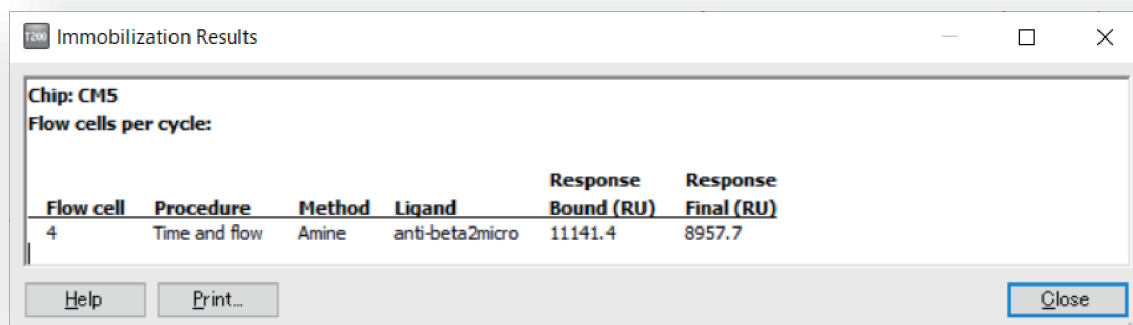


作成した Workflow から、Surface preparation→Immobilization→  Run を選択
MEMO

固定化量の確認

固定化量として Response Bound と Response Final の 2 種類が表示されます。
レスポンスが小さい方を固定化量として採用します。

- 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



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

i 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。

i 各種 Antibody Capture kit のキャプチャー分子固定化量目安は以下の通りです（Sensor Chip CM5 使用時）。

- Human Fab Capture Kit (28958325) … 9,000 to 13,000 RU
- Human Fab Capture Kit, type 2 (29234601) … 7,000 to 13,000 RU
- Human Antibody Capture Kit (BR100839) … 9,000 to 14,000 RU
- Human Antibody Capture Kit, type 2 (29234600) … 7,000 to 14,000 RU
- Mouse Antibody Capture Kit (BR100838) … 9,000 to 14,000 RU
- Mouse Antibody Capture Kit, type 2 (29215281) … 7,000 to 14,000 RU

MEMO

【実験メモ：Biacore 8K,8K+】

	キャプチャー分子固定化量 (RU)							
	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8
Fc1								
Fc2								

【実験メモ：Biacore T200,S200】

	キャプチャー分子固定化量 (RU)
Fc1	
Fc2	
Fc3	
Fc4	

【実験メモ：Biacore X100】

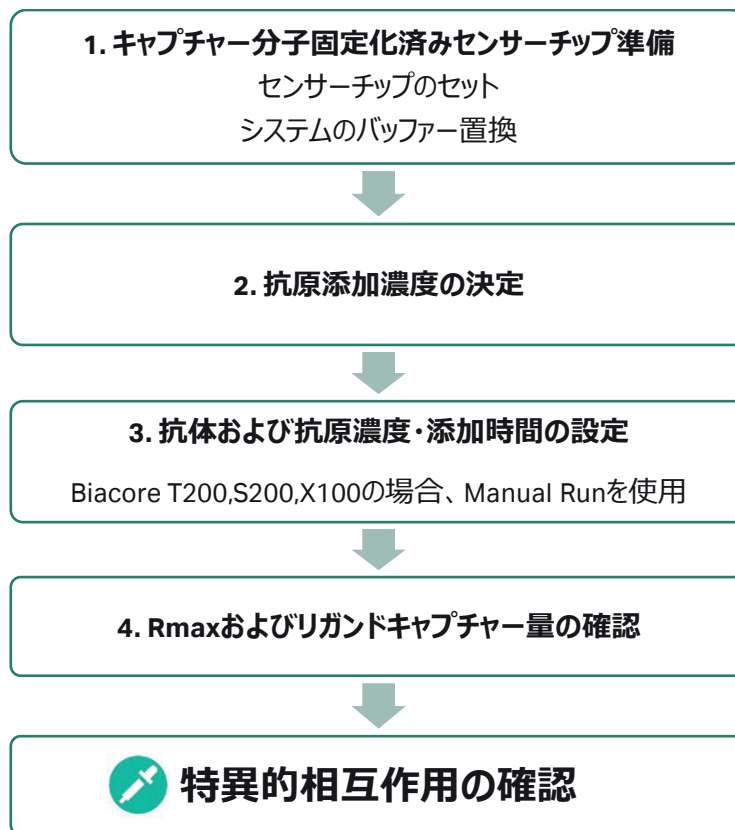
	キャプチャー分子固定化量 (RU)
Fc1	
Fc2	

MEMO

キャプチャー法による測定系セットアップ ～固定化以降

K_D 算出に適したセンサーグラムを得るためには、適切な測定系のセットアップが必要です。抗体（リガンド）をどれだけキャプチャーするか、抗原（アナライト）の添加濃度・希釈段階・添加時間といった測定条件を設定していきます。

概略は以下の通りです。



必要に応じてサンプル、ランニングバッファーなどの再検討

1. キャプチャー分子固定化済みセンサーチップ準備

各種 Antibody Capture kit を用いる場合、前章『キャプチャー分子（抗 IgG 抗体など）の固定化』をご覧ください。Sensor Chip Protein A または、Sensor Chip Protein G を用いる場合、前章のうち『2. センサーチップおよびシステムの準備』のみを実施します。

MEMO

2. 抗原添加濃度の決定

抗原（アナライト）添加濃度の目安

Rmax（最大結合量）近くでサチュレーションする濃度からギリギリレスポンスが得られる範囲、3桁程度にわたる濃度レンジで抗原を添加いただくことが望ましいです。目安は以下の通りです。

- Kinetics 解析を行う Rmax 近くでサチュレーションする濃度から 3 倍希釈で 5 点以上
- Affinity 解析（平衡値解析）を行う 2-10*KD 値を最高濃度として 2 倍希釈で 8 点以上



抗原-抗体の相互作用では多くの場合、結合、解離が緩やかであるため Kinetics 解析を実施します。Kinetics 解析では、Rmax ≤ 50RU 程度を目指します。Affinity 解析においては、十分なレスポンスが見られれば、特に制限はありません。



Kinetics 解析における抗体（リガンド）キャプチャー量は以下の式から計算します。Rmax=50 を目指す場合。

$$50RU (Rmax) = \frac{\text{抗原の分子量 (Da)}}{\text{抗体の分子量 (Da)}} \times \text{抗体のキャプチャー量 (RU)} \times \text{抗体の価数(2)}$$

【実験メモ】

	分子量 (Da)	目指す Rmax (RU) / 目指す抗体のキャプチャー量 (RU)
抗原		Rmax =
抗体		キャプチャー量 =

抗原（アナライト）添加・解離時間の目安

結合・解離の速さによって設定時間が変わります。目安は以下の通りです。

- Kinetics 解析を行う 添加時間：120 秒～300 秒程度、最高濃度で Rmax 付近でサチュレーションするのが望ましい
解離時間：結合レスポンスから 10～15%解離するまで
*ただし、長くても 60～90 分程度
- Affinity 解析（平衡値解析）を行う 添加時間：それぞれの濃度において添加中に平衡状態に達するまで（解離速度定数によるが 5 分以上になったり、場合によっては平衡状態に達さない場合もあるが、その場合は Affinity 解析はできない） 解離時間：60 秒程度

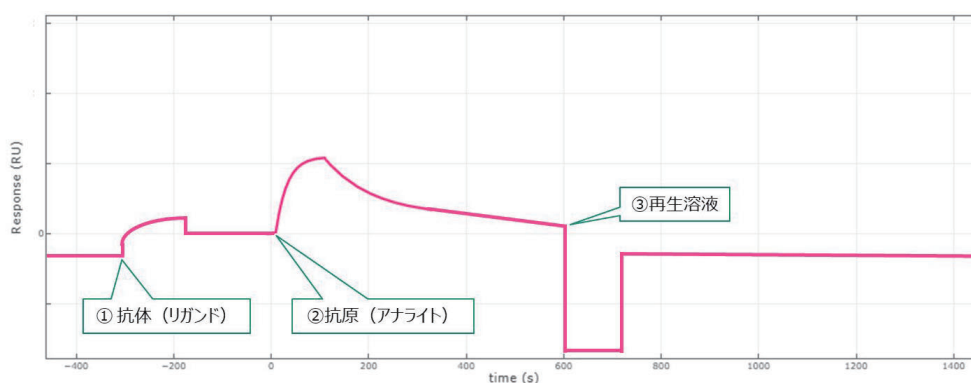
MEMO

3. 抗体およびリガンド濃度・添加時間の設定

初回は、適切なリガンドおよびアナライト濃度・添加時間が分かりません。そのため Manual Run を用いて、ひとまず想定される条件で結合レスポンスの確認を行います。

セットアップにおける初回の Manual Run 条件

- 抗体（リガンド）濃度：10～50 µg/ml
- 抗体添加時間 120 秒程度
- 抗原（アナライト）濃度：想定される KD 値から数倍程度
- 抗原添加時間：120 秒程度
- 抗原解離時間：添加終了後、結合レスポンスから 10～15%解離するまでの時間をモニターします。



Biacore T200, S200, X100 の場合、Manual Run を用いて、特異的結合の確認、そして、適切なリガンドおよびアナライト濃度・添加時間を決めます。




Biacore 8K の場合、2D Kinetics using capture で広範囲に条件を設定して、測定系セットアップと本測定を兼ねて行うことができます。



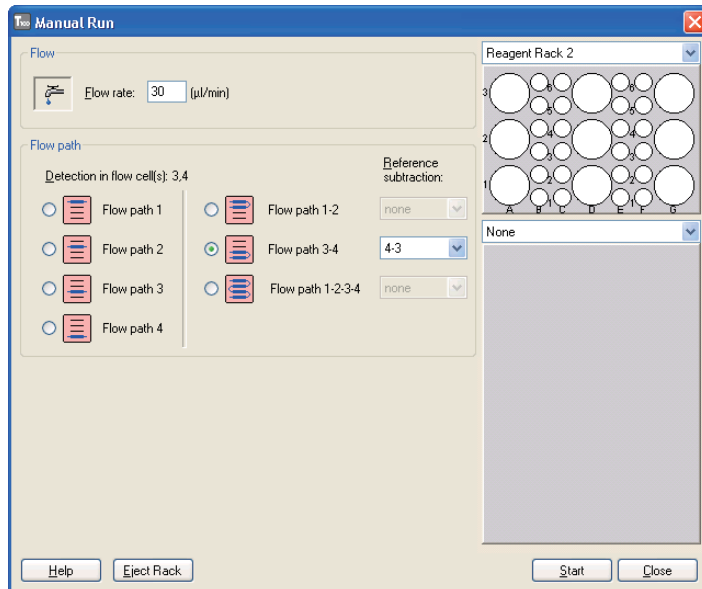
アナライトの希釈は、測定時のランニングバッファーをします。

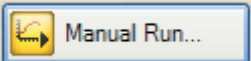
MEMO

Biacore T200 の場合 :  より、Manual Run を実行。

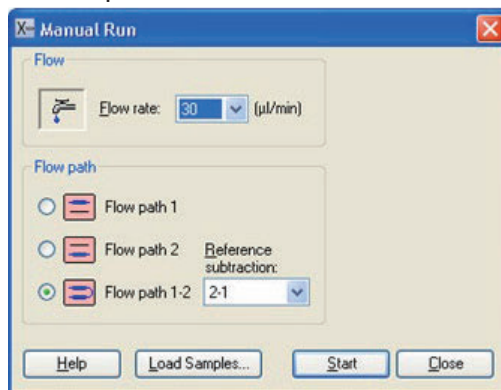
Biacore S200 の場合 :  より、Manual Run を実行。

はじめの流速（抗体インジェクションは 10 μ l/min）と使用する Flow Path（1-2 または 3-4）を選択して Start します（Biacore T200,S00 共通）。



Biacore X100 の場合 :  より、Manual Run を実行。

はじめの流速（抗体インジェクションは 10 μ l/mn.）と Flow Path 1-2 を選択して Start します。



【実験メモ】

	濃度	添加時間（秒）	解離時間（秒）
抗原			
抗体			

MEMO

特異的相互作用の確認

条件検討中に得られたセンサーグラムから様々な情報を読み取ることができます。本測定へ移る前、または本測定を実施した後に、得られたデータが特異的な相互作用を反映しているものであるか確認をしてください。

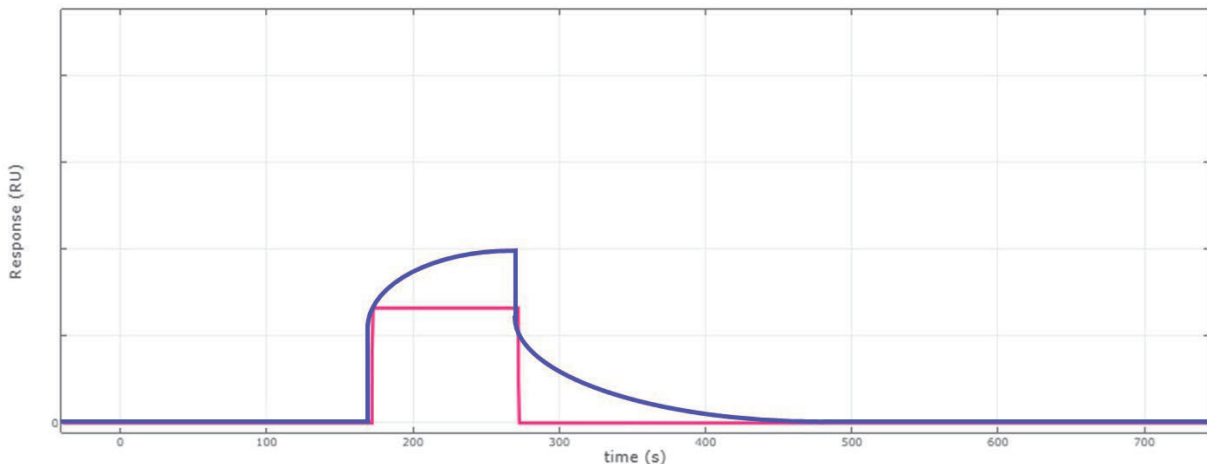
確認項目は以下二点です。

- 抗原が抗体特異的な結合であること。リファレンスセルに非特異的結合がないこと
- 結合部位特異的であること

1. 抗原が抗体特異的な結合であること。リファレンスセルに非特異的結合がないこと

リファレンスセルのセンサーグラムを確認します。抗原インジェクションの際、下図青色のようなレスポンスが見られている場合、目的抗体以外（センサーチップやキャプチャー用分子）に非特異結合が起きていると考えられます。

- ほぼレスポンス無し ⇒ 問題なし
- 下図、赤いセンサーグラムのような箱型レスポンスが見られる ⇒ 問題なし（溶液効果）
- 下図、青いセンサーグラムのように緩やかな結合解離を含む ⇒ 非特異的結合が起きています



i 赤いセンサーグラムの溶液効果（バルクエフェクト）は、ランニングバッファーとアナライト溶液の密度の違いで生じるものです（マイナスレスポンスの場合もあります）。アクティブセル-リファレンスセル（Fc2-1、Fc4-3 など）で差し引けるレスポンスですが、100RU を超えるなど極端に大きな場合、適切に差し引けないこともあります。使用時のランニングバッファーで十分に希釈して、なるべく溶液効果をおさえてください。

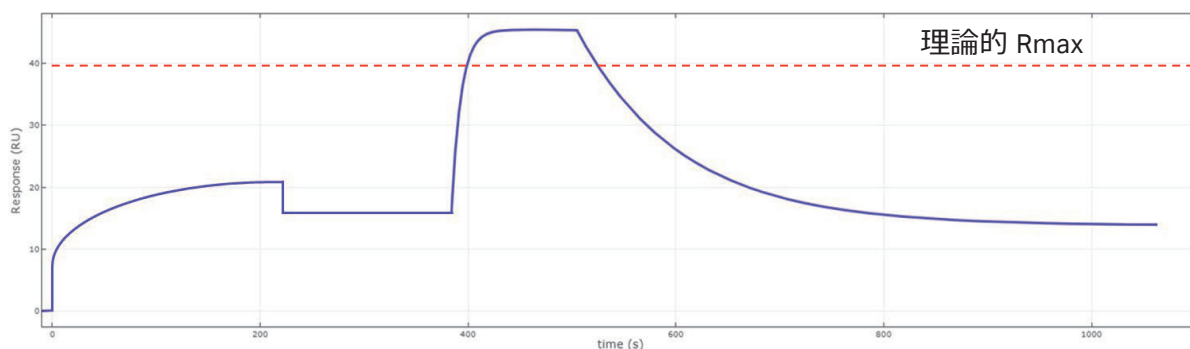
T 青いセンサーグラムの非特異結合が見られた場合、いくつかの対処方法が考えられます。

- 抗原（アナライト）の品質確認：変性タンパク質が一定以上含まれる場合、夾雑物が含まれる場合、非特異結合が起こりやすいことが考えられます。
- ランニングバッファーの選択：塩濃度で一定以上のイオン強度を得る。0.05%の Surfactant P20 (Tween 20)を添加する。添加物はなるべく少なくする。HBS-N をご使用の場合、HBS-EP+をお試しください。
- センサーチップ・固定化アプローチの選択：今回用いたキャプチャー用分子に結合する可能性が考えられる場合、他のセンサーチップや Antibody Capture kit をご使用いただく必要があります。

MEMO

2. 結合部位特異的であること

アクティブセル-リファレンスセル（Fc2-1、Fc4-3 など）のセンサーグラムを見た際に、最大レスポンスが理論的 Rmax を超えていないことをご確認ください。超えてしまう場合、部位特異的ではない結合が起きている可能性が考えられます。



- 最大レスポンスが理論的 Rmax を超えない ⇒ 問題なし
- 最大レスポンスが理論的 Rmax を超える ⇒ 結合部位特異的ではない結合が考えられます

i 最大レスポンスが理論的 Rmax を超えない場合でも、インジェクションした時点での濃度が Rmax に達していない可能性もあります。さらに高濃度をインジェクションしてみて、理論的 Rmax を超えないか確認することをお勧めします。

T 最大レスポンスが理論的 Rmax を超える場合、いくつかの対処方法が考えられます。

- ・ 抗原・抗体の品質確認：変性タンパク質が一定以上含まれる場合、夾雑物が含まれる場合、非特異結合が起こりやすいと考えられます。
- ・ ランニングバッファーの選択：塩濃度で一定以上のイオン強度を得る。0.05%の Surfactant P20 (Tween 20)を添加する。添加物はなるべく少なくする。HBS-N をご使用の場合、HBS-EP+をお試しください。

i ポジコンのアナライトがある場合、実測の Rmax からリガンドの品質（=結合活性率, Activity%）を確認することが可能です。ポジコンのアナライトが飽和濃度に達したときのレスポンス高（実測 Rmax）を取得して下式によって計算します。

$$\text{Activity\%} = 100 \times (\text{実測 Rmax} / \text{理論的 Rmax})$$

この値が高ければ、ポジコン以外のアナライトを添加しても非特異結合を起こすリスクは低くなります。またアナライトのアフィニティが弱い場合は、必然的に添加濃度が高くなりますので非特異結合のリスクが高まります。ポジコンよりアフィニティが弱いアナライトが多いと予想される場合、この Activity%をなるべく高くする環境にしようで測定された方がいいかもしれません。

MEMO


キャプチャー法による抗原-抗体測定

1. 本測定

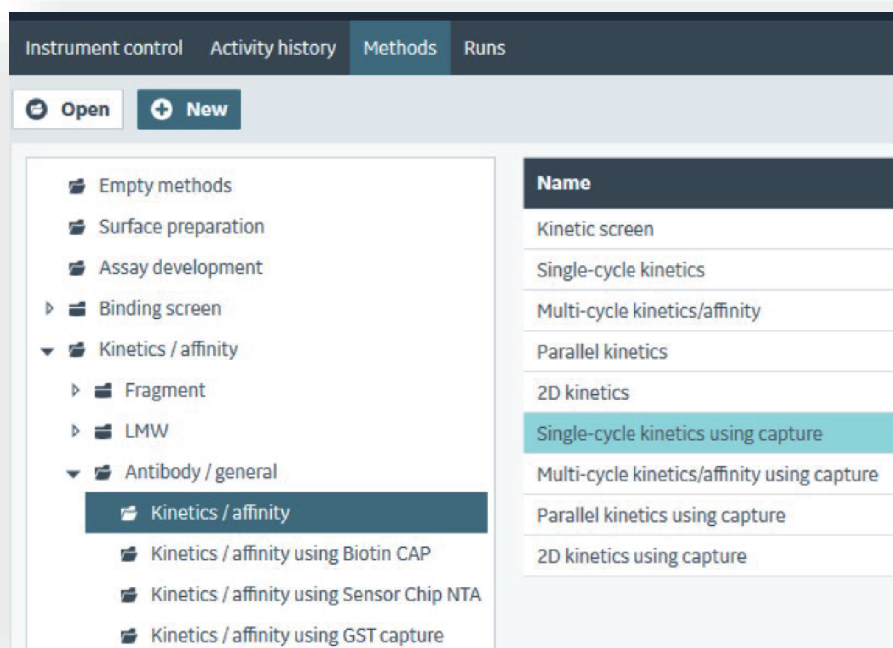
条件が整えば、本測定に移ります。キャプチャー法によるシングルサイクル法をお勧めします。

【実験メモ】

	(最高) 濃度	添加時間 (秒)	解離時間 (秒)
抗原			
抗体			

 キャプチャーを用いた本測定には、機種ごとのメソッドを用いてください。本測定では、Conditioning (1回)、Startup (3回以上)、0濃度 (通常2回)、濃度5点以上 (通常1回) を含みます。各システムの使用方法は各種マニュアルをご参照ください。

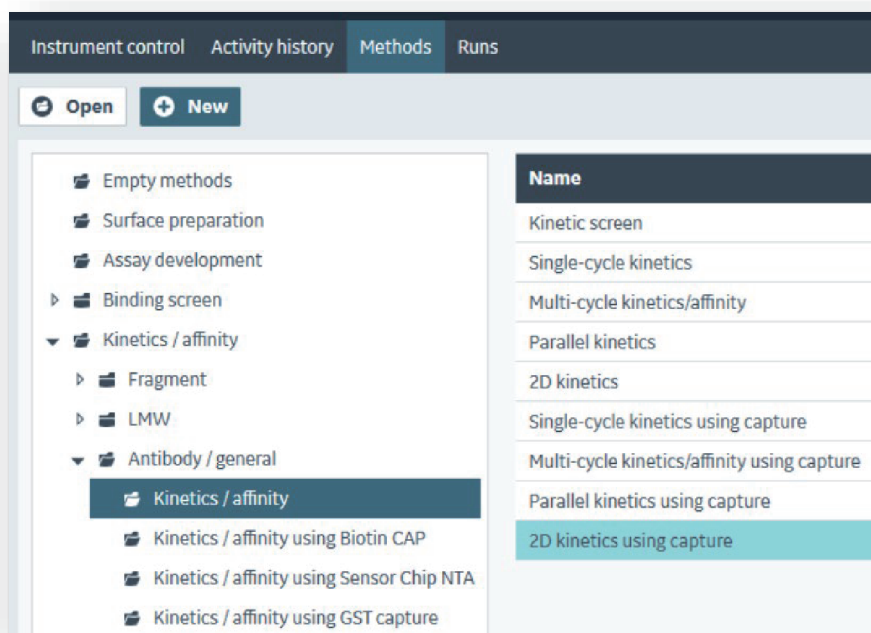
Biacore 8K の場合 : Method タブの New より、Kinetics / affinity→Antibody / general→kinetics / affinity → single-cycle kinetics using capture を選択



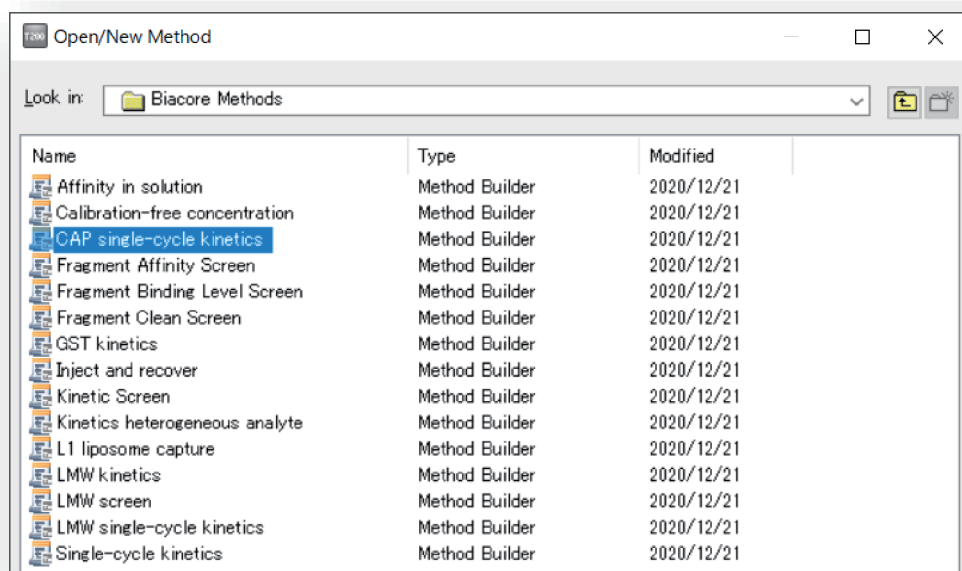
MEMO



Biacore 8K の場合、2D Kinetics using capture で広範囲に条件を設定して、測定系セットアップと本測定を兼ねて行うことができます。Method タブの New より、Kinetics / affinity→Antibody / general→kinetics / affinity →2D kinetics using capture を選択します。

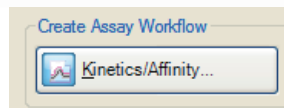
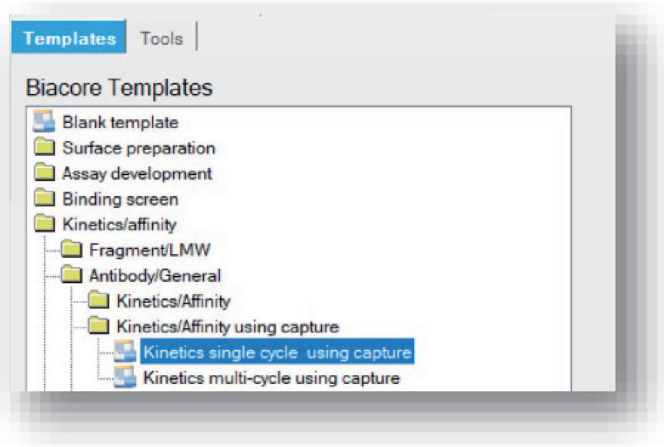


Biacore T200 の場合：Methods→Biacore Methods→CAP single-cycle kinetics または Single-cycle kinetics を選択して、編集します。

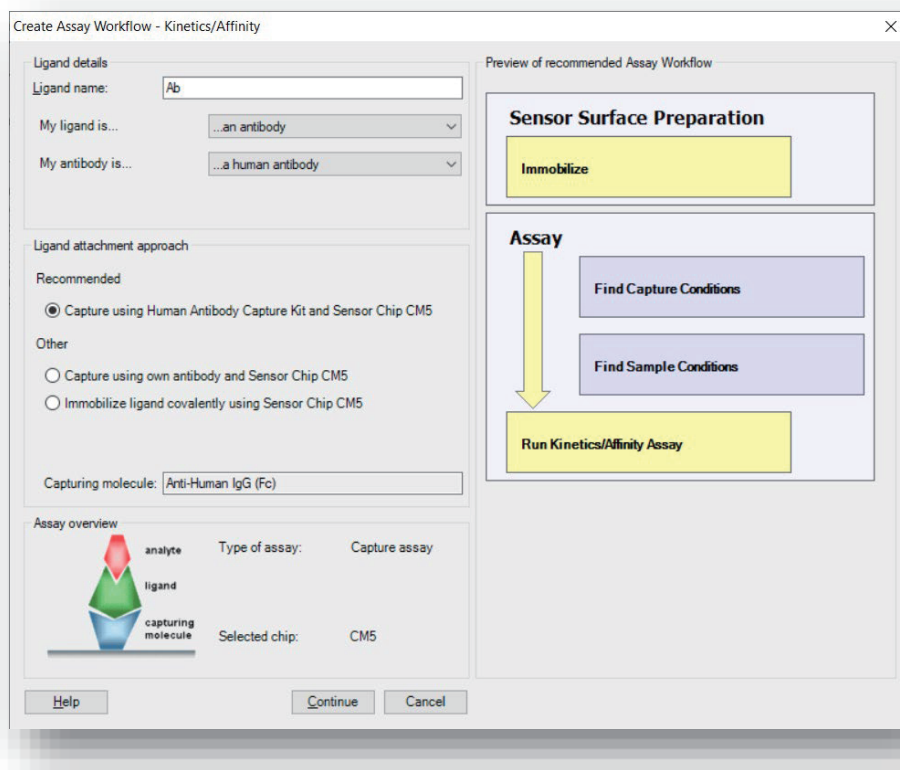


MEMO

Biacore S200 の場合 : **Templates** Templates→Kinetics/Affinity→Antibody/General→Kinetics/Affinity using capture→Kinetics single cycle using capture を選択



Biacore X100 の場合 : Create Assay Workflow の Kinetics/Affinity より下図のように抗体用のワークフローを作成します。



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

MEMO

2. 特異的相互作用の確認～データ解析

本測定終了後にも、上記『特異的相互作用の確認』の項目で、再度、非特異的な結合が生じていないか確認の上、データ解析を実行してください。K_D、k_a、k_dの算出にはシステム付属の Evaluation Software を用います。**各 Evaluation Software の使用方法は各種マニュアルをご参照ください。**

センサーチップの保管・装置のシャットダウン

使用済みの Sensor Chip は、システムから取り出した後も再使用が可能です。測定後のセンサーチップや装置の管理にはいくつか方法があります。

1. センサーチップの保管

スタンバイ状態で維持

次回、7 日以内に使用する場合、Sensor Chip をシステムにセットしたまま、Standby flow で維持しておくことも可能です。バッファボトルは測定時のランニングバッファのまま構いません。

! 各機種における Standby Flow 時のランニングバッファ消費量は以下の通りです。終夜測定を行う際などバッファの残量に気を付けてください。

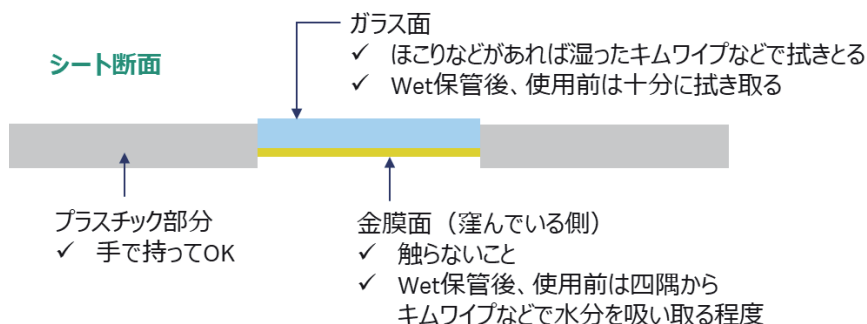
- Biacore 8K/8K+ …… 260 ml/ 24 時間
- Biacore T200/S200 …… 65 ml/ 24 時間
- Biacore X100 …… 200 ml/ 7 日間

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 のふた付きプラスチック遠心チューブ等）に分注したランニングバッファに浸し、4 °C で保存します。



i 保管していたセンサーチップを再使用する際は、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。その際、拭き取り方に注意してください。



MEMO

2. 装置のシャットダウン

Sensor Chip を装置に入れたままスタンバイで維持する際には、上記、ランニングバッファの消費量にご注意いただき、Control Software を立ち上げたまま、装置の電源は ON にしておいてください。

電源を切る場合、最低限で以下の手順が必要となります。

- 測定に使用した Sensor Chip を取り出す
- Sensor Chip Maintenance をセットする
- バッファボトルを超純水ボトルに置き換えて、システムの溶液置換を行う
 - Biacore 8K の場合 : Instrument Control タブから Change Solutions を選択
 - Biacore T200, S200, X100 の場合 : メニューバーから Tools → Prime を選択
- Sensor Chip Maintenance を取り出す
- Control Software を閉じる
- PC および装置のシャットダウン



バッファボトルを置き換える際、バッファチューブを紙製のウエスで軽く拭い、極力持ち込みをおさえます。

Biacore を安心してお使いいただくために定期的なメンテナンスが必要です。

- Desorb 週 1 回
- Desorb and Sanitize 月 1 回

メンテナンス方法の詳細は各種マニュアルをご参照ください。

そのほかご不明点などございましたら、次ページのバイオダイレクトラインまでお問い合わせください。

MEMO

■ 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 : 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 サンケンビルディング

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 2022 年 3 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。