

6月号

低分子化合物—タンパク質の相互作用

- ◆ 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
- ◆ リガンドタンパク質の Biotin 化
- ◆ リガンドタンパク質の固定化
- ◆ 測定系セットアップ
 - 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
- ◆ 本測定
- ◆ センサーチップの保管・装置のシャットダウン



はじめに

6月号は、はじめて低分子化合物—タンパク質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。結合・解離が非常に速い場合、 k_a 、 k_d 値の算出が困難なことがあり、その際には平衡値解析（Affinity 解析）により K_D のみを算出します。本稿の低分子化合物は DMSO が溶媒であることが前提となっており、測定時に溶媒補正を行います。水系のバッファーに溶解されている場合、溶媒補正は必要ありません。

低分子化合物—タンパク質の相互作用を測定する場合、Biotin 化したリガンドタンパク質を用意し、Sensor Chip NA または Sensor Chip SA を用いていただくことで、アッセイ系開発にかかる時間を最小限にすることが期待されます。

本稿は Sensor Chip NA または Sensor Chip SA を用いた手法によるガイドとなります。



低分子化合物スクリーニング～低分子化合物—タンパク質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。

必見！Biacore™戦略と測定条件のワークフロー

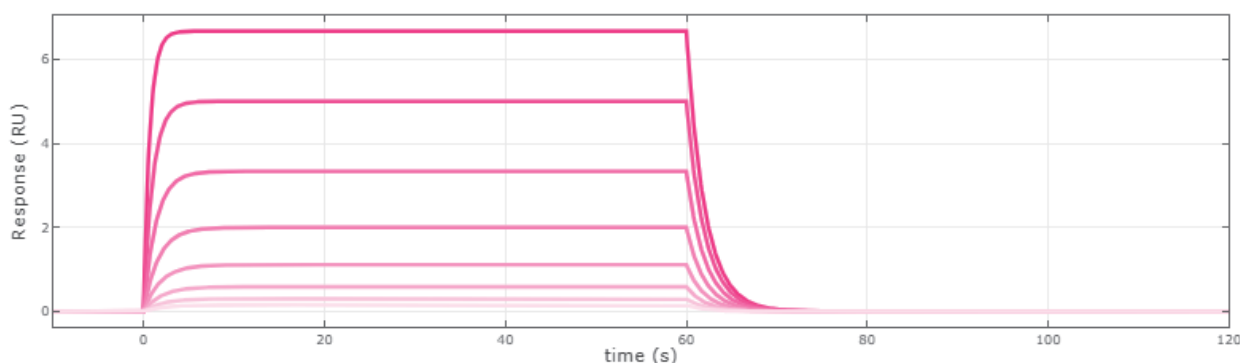
https://www.cytivalifesciences.co.jp/tech_support/webinar/biacore-strategy-and-measurement-conditions.html



Biacore X100 をご使用の場合、溶媒補正を行うには Plus Package が必要です。

本測定で得られるセンサーグラム

Sensor Chip NA または Sensor Chip SA を用いた低分子化合物—タンパク質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。固定化は測定前に別途実施します。また、多くの場合、速やかに解離するため、再生操作は行わず、濃度 8 点以上でのマルチサイクルカインेटクスを実施いただけます。




再生が必要な解離の遅い相互作用の場合には、リガンドの Biotin 化後に Biotin CAPture kit のご利用をご検討ください。

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

低分子化合物—タンパク質の相互作用を測定する場合、タンパク質をリガンドとして固定化することが、第一選択となります。

 低分子を固定化すると、タンパク質との結合に影響を及ぼす可能性が高く、また、必要な固定化量を見積もることが困難になります。


分子量とストック濃度


ストック濃度は、リガンドのタンパク質で数 mg/ml、アナライトの化合物で 10mM 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				

 アナライトの低分子化合物を有機溶媒でストックする場合は DMSO を用いてください。特に、エタノールなどの揮発性のある有機溶媒を用いるとセンサーグラムが乱れます。

 アナライトの低分子化合物が DMSO でストックされている場合、測定時は通常 5%以下の DMSO 濃度となるようランニングバッファーで希釈します。また、ランニングバッファーにも同一濃度の DMSO を添加し、各濃度のアナライト溶液と DMSO 濃度を揃えます。

MEMO

2. 実験に必要なセンサーチップや消耗品

低分子化合物—タンパク質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

Sensor Chip NA（NeutrAvidin）または Sensor Chip SA（streptavidin）を用います。

- Series S Sensor Chip NA（3 枚：29699622、1 枚：29407997）
- Series S Sensor Chip SA（10 枚：29699621、3 枚：BR100531、1 枚：29104992）
 - * Biacore 8K,8K+,T200,S200 の場合
- Sensor Chip SA（3 枚：BR100032、1 枚：BR100398）
 - * Biacore X100 の場合



! Biacore X100 に対応する Sensor Chip NA の取り扱いはありません。NA は SA に含まれる RYD 配列を持たず、アナライトの非特異結合を軽減します。ただし、酸などの耐性が低いため、主に再生不要な低分子化合物測定に用います。

固定化時に必要なコンディショニング・洗浄溶液

Sensor Chip SA を使用する場合：

- コンディショニング溶液：1 M NaCl, 50 mM NaOH
- 洗浄溶液：50% Isopropanol, 1 M NaCl, 50 mM NaOH

Sensor Chip NA を使用する場合：


- コンディショニング溶液 1：1 M NaCl, 10 mM HCl
- コンディショニング溶液 2：1 M NaCl, 50 mM NaOH
- 洗浄溶液：50% Isopropanol, 1 M NaCl, 50 mM NaOH

i はじめに 2 M NaCl, 100 mM NaOH を作成し、超純水で等倍希釈したものをコンディショニング溶液（NA の場合、コンディショニング溶液 2）、Isopropanol で等倍希釈したものを洗浄溶液とすると便利です。Isopropanol を混合した溶液は 1 週間以内にご使用ください。

MEMO


ランニングバッファー

- PBS-P+ 0.2 M phosphate buffer with 27 mM KCl, 1.37 M NaCl and 0.5% Surfactant P20 (Tween 20)
- PBS 0.1 M phosphate buffer with 27 mM KCl and 1.37 M NaCl

 第一選択は PBS-P+ です。いずれも超純水で 10 倍希釈します（上記は 10x 濃度）。アナライトの化合物が DMSO でストックされている場合、測定時にはアナライト溶液と同濃度（通常 5%以下）の DMSO を添加します。

ランニングバッファー添加および溶媒補正用の DMSO

- DMSO (Dimethyl sulfoxide)

 99.5%以上の無水 DMSO をご使用ください。吸水しやすいため使用期限に気をつけてください。

サンプル

- Biotin 化リガンドタンパク質
- アナライト低分子化合物

■ 製品情報

製品	包装	コード番号
Series S Sensor Chip NA	3 枚	29699622
Series S Sensor Chip NA	1 枚	29407997
Series S Sensor Chip SA	10 枚	29699621
Series S Sensor Chip SA	3 枚	BR100531
Series S Sensor Chip SA	1 枚	29104992
Sensor Chip SA	3 枚	BR100032
Sensor Chip SA	1 枚	BR100398
PBS-P+ 10X	1×1,000 ml	28995084
PBS 10X	1×1,000 ml	BR100672

MEMO

リガンドタンパク質の Biotin 化

ここでは NHS-Biotin を用いたリガンドタンパク質の Biotin 化例を示します。

1. 必要な試薬類

- リガンドタンパク質
- Biotin 化試薬
- PD SpinTrap G-25 ……フリー-Biotin の除去にもちいます (100~180 μ l)
- HBS-N ……Biotin 化反応時のバッファー

* Biotin 化試薬例

EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh™ Format, Thermo Fisher Scientific: A39257

EZ-Link™ NHS-LC-Biotin, Thermo Fisher Scientific: 21336

2. サンプル調整

タンパク質のビオチン標識には、モル比にしてタンパク質 : NHS-biotin = 1 : 1.5 となるよう、タンパク質溶液 90 μ L と NHS-biotin 溶液 10 μ L 程度で混合して反応させます。タンパク質の量として 10-100 μ g に対してビオチン標識を行います。

【実験メモ】

	μ g	nmol	分子量
タンパク質 (90 μ L)			
NHS-Biotin (10 μ L)			

* 質量 (μ g) / 分子量 (kDa) = 物質質量 (nmol)



以下の計算式から、NHS-Biotin を溶解する際の溶媒液量が計算できます。

$$V_w = (X \times M_{lg}) / (M_w \times C_i \times 15)$$

V_w (mL) = NHS-Biotin 試薬を希釈する溶媒液量


X (mg) = NHS-Biotin 試薬質量

M_{lg} = リガンドタンパク質の分子量

M_w = NHS-biotin の分子量

C_i (mg/mL) = 100 μ L の容量でビオチン化する際のリガンドの最終濃度

* 最後の数値は 1.5 ではなく 15 なのでご注意ください。

 DMSO による溶解が必要な Sulfo 基がない NHS-biotin は、高濃度のストックを作成してからバッファーなどに希釈します。

MEMO

3. Biotin 化反応

タンパク質のビオチン標識には、モル比にしてタンパク質：NHS-biotin = 1：1.5となるよう、タンパク質溶液 90 μ L と NHS-biotin 10 μ L の割合で混合して反応させます。

室温で 1 時間あるいは、on ice もしくは 4-8 $^{\circ}$ C で 5 時間～一晩インキュベートします。

【実験メモ】

反応開始時間	
--------	--

1. PD SpinTrap G-25 によるフリービオチンの除去

インキュベート後は未反応のフリービオチンを除去する必要があります。

以下では弊社 PD SpinTrap G-25 を用いた例を紹介します。



1. カラムをボルテックスで十分攪拌し、先端を折った後、フタを切り取った 1.5ml チューブにセットします。
2. 800g で 1 分の遠心で、保存液を除きます。チューブに回収された保存液は取り除きます。
3. HBS-N バッファーを 400 μ L 添加し、2.と同様の操作で、5 回の平衡化を行います。
 1 回目 2 回目 3 回目 4 回目 5 回目
4. カラムをコレクションチューブにセットし、100～180 μ L のサンプルを添加します。140 μ L 以下の場合、140 μ L 以上になるようバッファーを添加することを推奨します。
5. 800g で 2 分の遠心で、サンプルを精製します。付属のキャップを締めます。

i PD SpinTrap G-25 の使用方法に関しては Product booklet もご確認ください。

! タンパク質溶液にアミン系組成が含まれる場合（Glycine や Tris、アジ化ナトリウムなど）、ビオチン標識前にバッファー交換を行います。

T タンパク質の中には、ビオチン標識が困難なもの、共有結合による修飾に敏感なものがあります。このような場合はビオチン標識の度合いの最適化が必要になり、0.5-5 モル相当の比にて検証してみてください。

T リガンドが十分量キャプチャーできない場合、フリービオチンが除けていないことがあります。このような場合、複数回 PD SpinTrap G-25 を通すことをお勧めします。また、VivaSpin 500-3K などの限外ろ過を試す方法もあります。

■ 製品情報

製品	包装	コード番号
PD SpinTrap™ G-25	50 本	28918004
Vivaspin™ 500-3K	25 個	28932218

MEMO

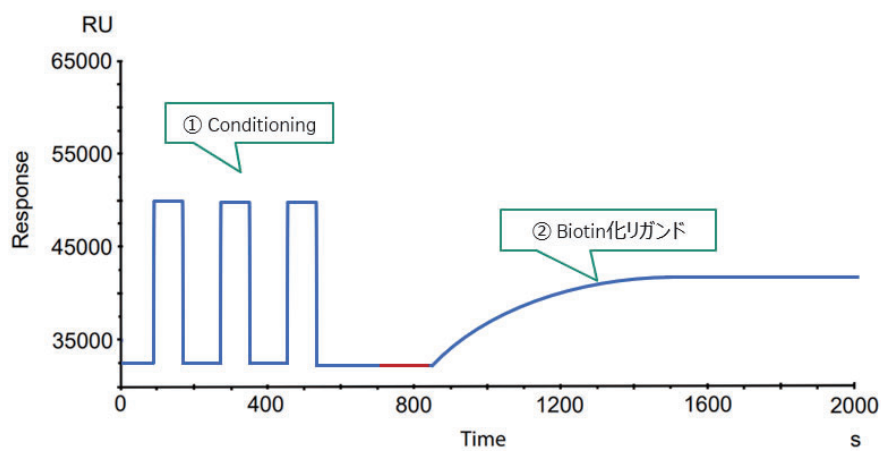
Biotin 化リガンドの固定化

Sensor Chip SA または Sensor Chip NA を用いる場合、はじめのステップとして Sensor Chip に Biotin 化タンパク質を固定化します。

1. Sensor Chip SA または Sensor Chip NA で得られるセンサーグラム

Sensor Chip SA または Sensor Chip NA を用いた Biotin 化タンパク質の固定化では、以下のようなセンサーグラムが得られます。

①コンディショニング溶液を 3 回添加します。②Biotin 化タンパク質を添加します。ベースライン（リガンド添加直前の赤線部）に対する高さの変化が固定化量です。



 洗浄溶液は、フローセル以外の流路を洗浄する目的であるため、センサーグラムにはレスポンスとして現れません。

MEMO

2. 固定化における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。低分子化合物-タンパク質の相互作用では、第一選択は PBS-P+ です。リン酸バッファベースに、静電的吸着を抑える NaCl、KCl、疎水結合を抑える Surfactant P20 (Tween 20) が添加されています。Surfactant P20 を除きたい場合、PBS を用います。いずれも超純水で 10 倍希釈します。


アナライトの低分子化合物が DMSO でストックされている場合、測定時のランニングバッファにはアナライト溶液と同一濃度の DMSO を添加しますが、固定化時のランニングバッファには DMSO を添加しません。


- PBS-P+ 0.2 M phosphate buffer with 27 mM KCl, 1.37 M NaCl and 0.5% Surfactant P20 (Tween 20)
 - PBS 0.1 M phosphate buffer with 27 mM KCl and 1.37 M NaCl
- * 第一選択は PBS-P+ です。いずれも超純水で 10 倍希釈します（上記は 10x 濃度）。

 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+ … 500 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。PBS-P+ では 10 倍希釈して 2% DMSO 添加時、PBS では 10 倍希釈して 5% DMSO 添加時に 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

MEMO

3. 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 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 をドックします。



Series S Sensor chip NA

Series S Sensor chip SA

* Biacore 8K,8K+,T200,S200 の場合



Sensor chip SA

* Biacore X100 の場合

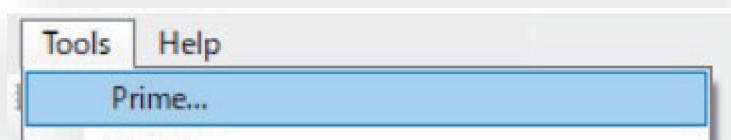
システムのバッファ置換

固定化をはじめる前には、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

4. Biotin 化タンパク質の固定化

Biotin 化タンパク質は、ランニングバッファーで希釈し、各機種の方法を用いて固定化を行います。各 Sensor Chip の使用方法は、各種 IFU をご参照ください。

低分子化合物-タンパク質の相互作用におけるリガンド固定化量の目安

- Kinetics 解析を行う 実測 Rmax ≤ 20 RU になる程度の固定化量
- Affinity 解析（平衡値解析）を行う レスポンスが見られれば、固定化量を低く抑える必要はなし



Kinetics 解析におけるリガンド固定化量は以下の式から計算します。Rmax=20 を目指す場合。

$$20RU (R_{max}) = \frac{\text{アナライトの分子量 (Da)}}{\text{リガンドの分子量 (Da)}} \times \text{リガンドの固定化量 (RU)} \times \text{リガンドの価数}$$

【実験メモ】

	分子量 (Da)	目指す Rmax (RU) / リガンドの固定化量 (RU)
アナライト		Rmax =
リガンド		固定化量 =



Kinetics 解析において、Rmax および固定化量が高すぎる場合、センサーグラムの変形が生じ、適切な解析が実施できません。

MEMO

Sensor Chip SA および Sensor Chip NA による固定化

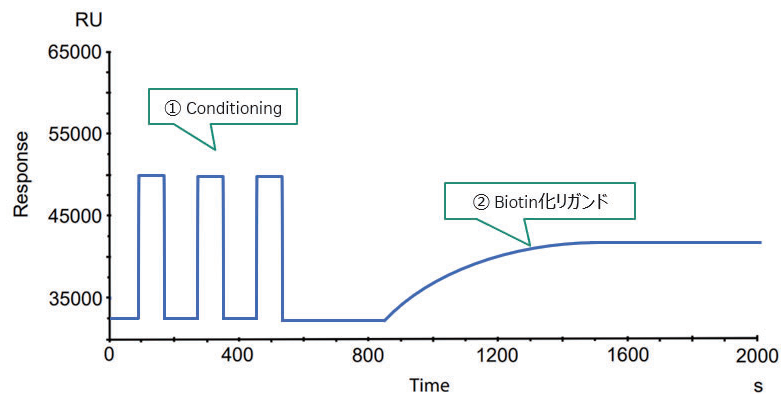
Sensor Chip SA における固定化は、機種ごとのメソッドを用いてください。Sensor Chip NA における固定化はプリセットされておりませんので編集が必要です。**各 Sensor Chip による固定化方法は各種マニュアルをご参照ください。**各種 Sensor Chip の Procedure step は以下の通りです。

Sensor Chip SA

- コンディショニング溶液：1 M NaCl, 50 mM NaOH 60 秒 x 3 回、10 μ l/min.
- Biotin 化リガンド 数 nM (≒数百 ng/mL~数 μ g/mL) で数分程度、10 μ l/min.
- 洗浄溶液：50% Isopropanol in 1 M NaCl and 50 mM NaOH 1 回

Sensor Chip NA

- コンディショニング溶液 1：1 M NaCl, 10 mM HCl 60 秒 x 2 回、10 μ l/min.
- コンディショニング溶液 2：1 M NaCl, 50 mM NaOH 60 秒 x 1 回、10 μ l/min.
- Biotin 化リガンド 数 nM (≒数百 ng/mL~数 μ g/mL) で数分程度、10 μ l/min.
- 洗浄溶液：50% Isopropanol in 1 M NaCl and 50 mM NaOH 1 回



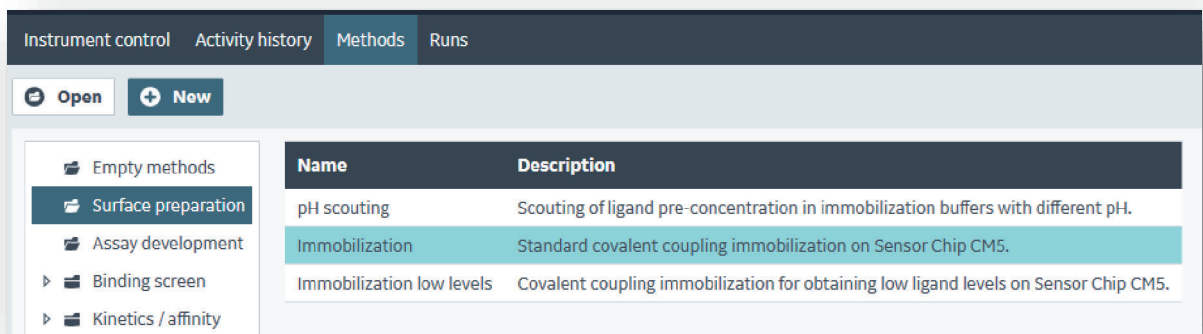
i Affinity 解析を行う場合、リガンドの結合レスポンスが飽和するまで十分に時間をとります。

! Biotin 化タンパク質 (リガンド) は、必ずアクティブセルのみに固定化します。

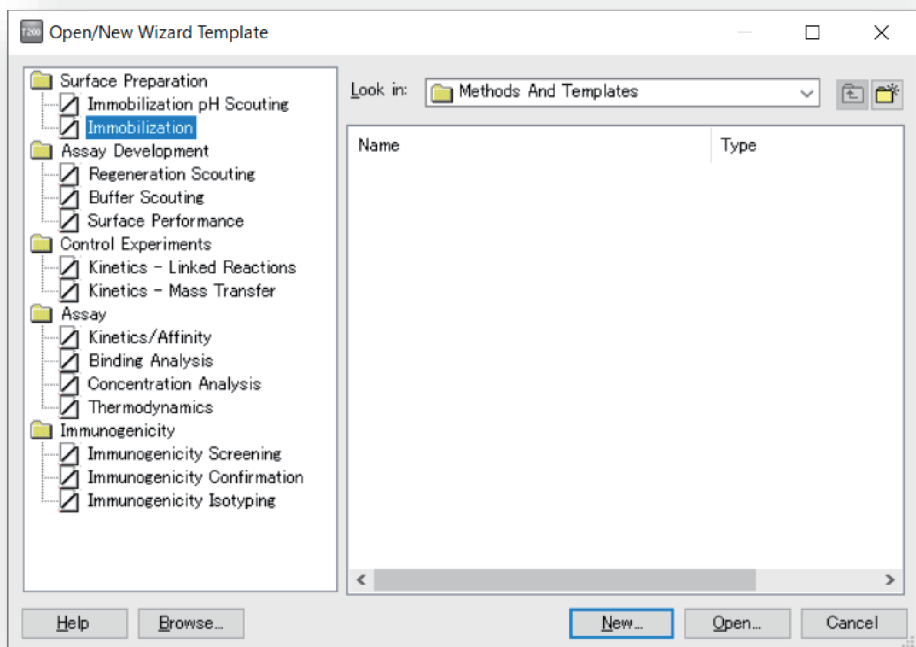
T 固定化量が十分でない場合、追加の固定化が可能です。同じメソッドを使用する場合、コンディショニング溶液としてランニングバッファーを用いてください。洗浄溶液は同様に流します。

MEMO

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

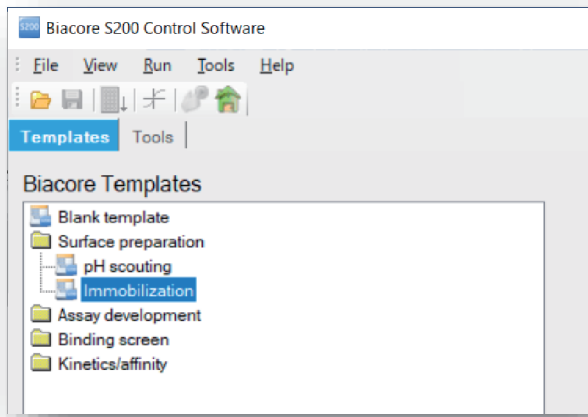


Biacore T200 の場合 : Wizards より、Surface preparation→Immobilization→New を選択

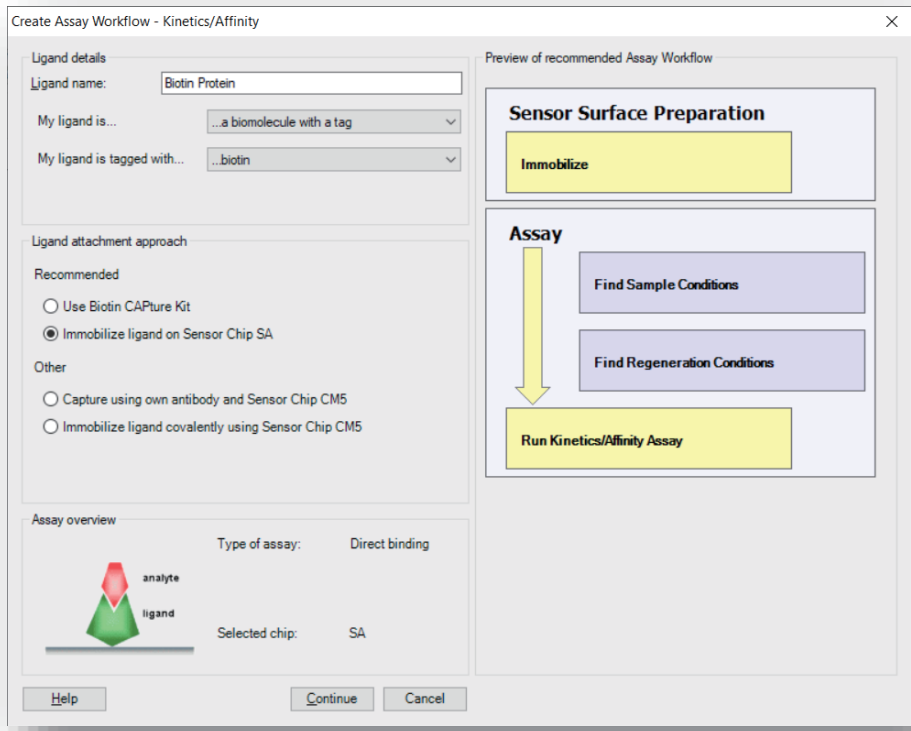


MEMO

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 Biotin 化タンパク質用のワークフローを作成します。



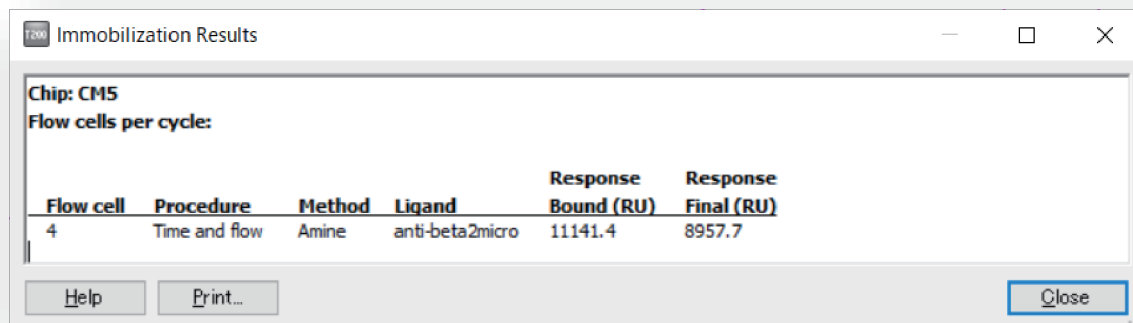
作成した Workflow から、Surface preparation→Immobilization→ **Run** Run を選択
MEMO

固定化量の確認

Biacore の機種によっては、固定化量として Response Bound と Response Final の 2 種類が表示されます。

Sensor Chip SA および Sensor Chip NA では、Response Bound 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 コンディショニング溶液添加前からリガンド添加終了後の差



Chip: CMS
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

MEMO

【実験メモ：Biacore 8K,8K+】

	リガンド分子固定化量 (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】

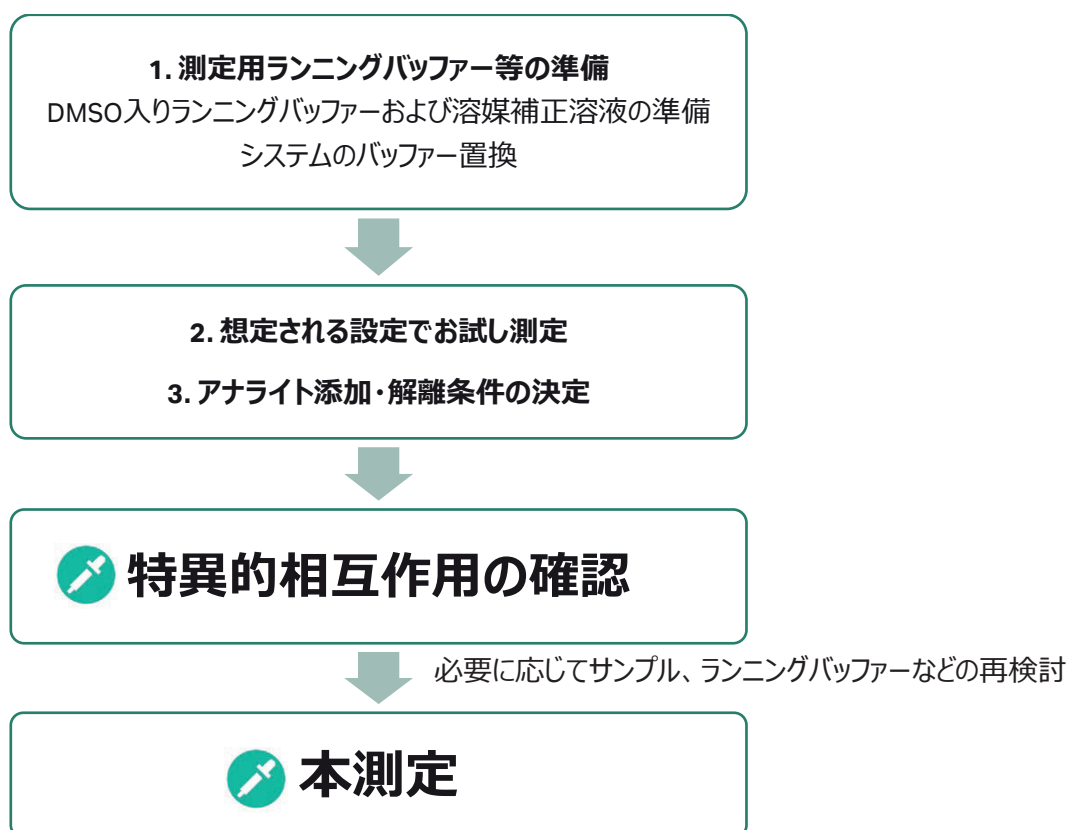
	キャプチャー分子固定化量 (RU)
Fc1	
Fc2	

MEMO

測定系セットアップ

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。リガンドの固定化以降では、主に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。また、特異的な相互作用を示しているかどうかの確認が重要です。

概略は以下の通りです。



MEMO

1. 測定用ランニングバッファー等の準備

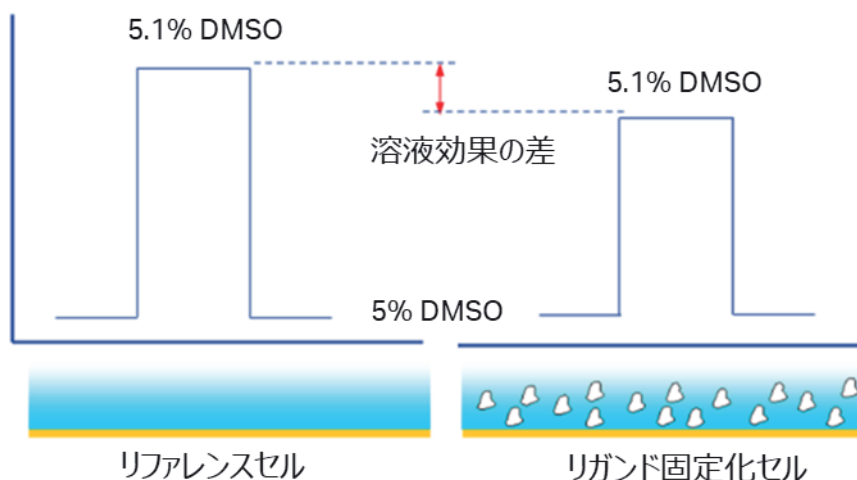
DMSO 入りランニングバッファーおよび溶媒補正溶液の準備

Biacore 測定時には常にランニングバッファーを流し続けます。固定化と同様、低分子化合物-タンパク質の相互作用では、第一選択は PBS-P+ です。

アナライトの低分子化合物が DMSO でストックされている場合、ランニングバッファーおよびそれと等しく調整する各濃度のアナライト溶液は 5% 以下程度の DMSO 濃度に抑えます。DMSO によって生じる大きな溶液効果（1% で 1200RU 程度）を極力抑えるため、**測定時のランニングバッファーとアナライト溶液の DMSO 濃度を等しく調整することが重要です。**

それでも僅かな濃度差で大きな溶液効果を生じる DMSO では、リガンド固定化セルとリファレンスセルの間に溶液効果の差が生じます。これは、リガンド固定化セルにおいて、リガンド体積分、金膜近傍の DMSO が排除されるためです。解析時には補正が必要で、これを溶媒補正と呼びます。

ご用意いただくものは、複数濃度の DMSO 入りランニングバッファーです。5% DMSO 入りランニングバッファーを使用する場合、4%~6% の間で 4~8 点程度、DMSO 濃度シリーズのバッファーを少量ずつ用意します。



! IFC（マイクロ流路カートリッジ）の DMSO 耐性は 10% 以下です。洗浄など 1~2 分のパルスインジェクションであれば 50% DMSO も使用可能です。

MEMO

(例) 5% DMSO 入りランニングバッファーおよび溶媒補正溶液の準備

以下に、5% DMSO 入りランニングバッファーおよび濃度 4 点での溶媒補正溶液を作成する例を示します。



Biacore 8K 以外のシステムでは最大 8 点程度用意いただくこともあります。

使用するバッファーの第一選択は PBS-P+ です。

- PBS-P+ 0.2 M phosphate buffer with 27 mM KCl, 1.37 M NaCl and 0.5% Surfactant P20 (Tween 20)
- PBS 0.1 M phosphate buffer with 27 mM KCl and 1.37 M NaCl



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。



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

- ① 2000 ml の 1.05x PBS-P+ の作成
210 ml の 10x PBS-P+ を、超純水で 2000 ml になるよう希釈します。
- ② 溶媒補正溶液ストックおよび 5% DMSO 入りランニングバッファーの作成
下表のように混合します。

	4.5% DMSO (\sim 10 ml)	6.0% DMSO (\sim 10 ml)	5.0% DMSO 入り ランニングバッファー(1000 ml)
1.05x PBS-P+	9.5 ml	9.5 ml	950 ml
100% DMSO	0.45 ml	0.60 ml	50 ml



残りの 1.05x PBS-P+ を固定化時のランニングバッファーとしても構いません。

- ③ 溶媒補正溶液の作成

バイアル	1	2	3	4
DMSO 濃度	6.0%	5.5%	5.0%	4.5%
4.5% DMSO	0	1500 μ l	2 x 1500 μ l	3 x 1500 μ l
6.0% DMSO	3 x 1500 μ l	2 x 1500 μ l	1500 μ l	0



終夜運転で 1 測定を行う場合、以下のバッファー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



各機種における Standby Flow 時のランニングバッファー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、バッファー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

MEMO

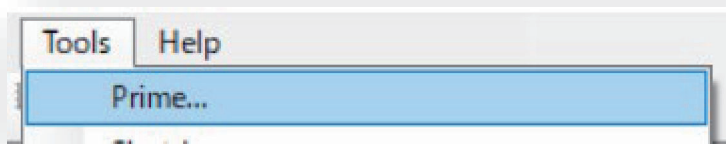
システムのバッファ置換

測定をはじめる前には、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



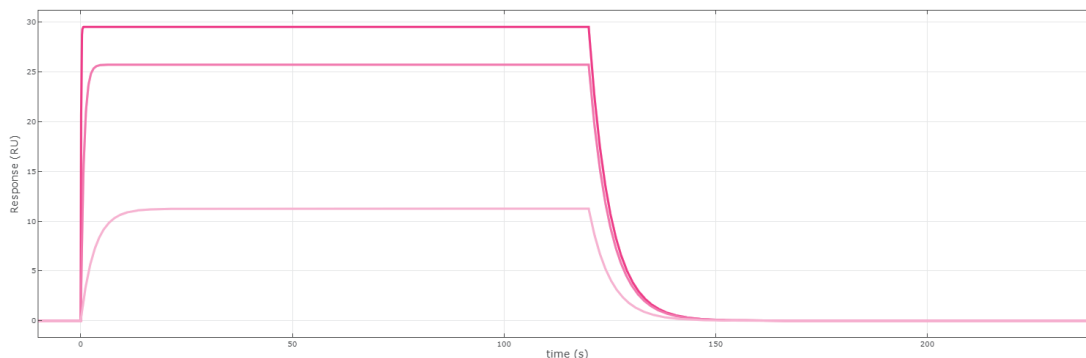
MEMO

2. 想定される設定でお試し測定

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ので、ひとまず想定される条件で、濃度 3 点程度のマルチサイクルキネティクスによる測定をお試しください。

セットアップにおける初回の測定条件

- アナライト濃度：想定される KD 値付近および 1/10 倍、10 倍の 3 点
- アナライト添加時間 120 秒程度、解離時間 120 秒程度



マルチサイクルキネティクス測定メソッドを用います。**各システムの測定メソッドの選択方法は、下記、『本測定』の項目をご参照ください。**条件設定の段階では、1 回以上 Startup、Solvent Correction（溶媒補正）に続いて、アナライト濃度を 3 点程度設定して測定を実施します。

【実験メモ】

	お試し測定濃度	添加時間（秒）	解離時間（秒）
アナライト			


MEMO


3. アナライト添加・解離条件の決定

アナライト添加濃度の目安

Rmax（最大結合量）近くからギリギリレスポンスが得られる範囲、3桁程度の添加濃度レンジでアナライト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。

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Kinetics 解析を行う | Rmax 近くから 3 倍希釈で 5 点以上 |
| <input type="checkbox"/> Affinity 解析（平衡値解析）を行う | 1/10 K_D 値付近～少なくとも 2 倍 K_D 値
できれば 10 倍 K_D 値付近までで 8 点以上 |


 低分子化合物-タンパク質の相互作用における Kinetics 解析では、 $R_{max} \leq 20RU$ 程度を目指します。Affinity 解析においては、十分な結合レスポンスが見られれば、特に制限はありません。

 アナライトは全ての濃度とランニングバッファーが同一濃度の DMSO を含むようにします。5% DMSO の場合、はじめ高濃度のサンプルを DMSO 無しのランニングバッファーで希釈して、5% DMSO を含むアナライト溶液を作成します。続いて、5% DMSO を含む測定時のランニングバッファーで希釈系列を作成します。

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。

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Kinetics 解析を行う | 添加時間：60 秒～180 秒程度
解離時間：ベースラインまで解離するまで
低分子化合物の場合、長くても 10 分程度 |
| <input type="checkbox"/> Affinity 解析（平衡値解析）を行う | 添加、解離ともに 60 秒程度 |

 ベースラインまで解離しない場合、強制的に解離させる再生操作が必要です。この場合、Biotin CAPture Kit を用いた測定方法が便利です。使用方法は、「4 月号 タンパク質（ペプチド）—タンパク質の相互作用」をご参照ください。

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。

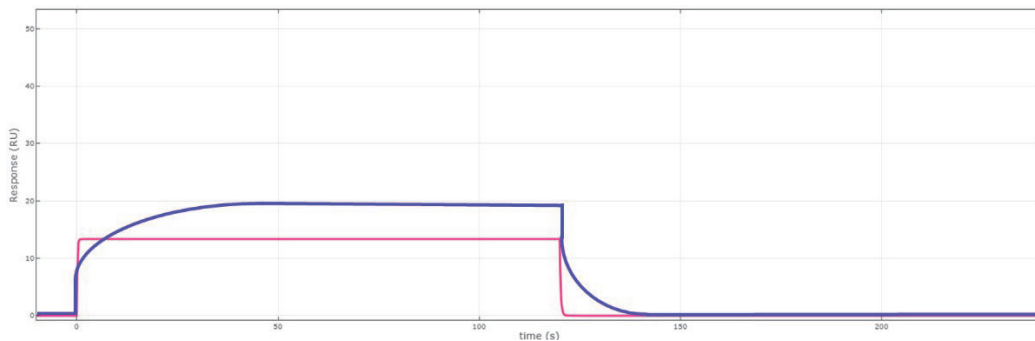
確認項目は以下二点です。

- リガンド分子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. リガンド分子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。3 濃度程度アナライトを添加した際、下図青色のようなレスポンスが見られている場合、リガンド分子以外（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、DMSO のように大きな溶液効果が生じる場合、溶媒補正が必要です。

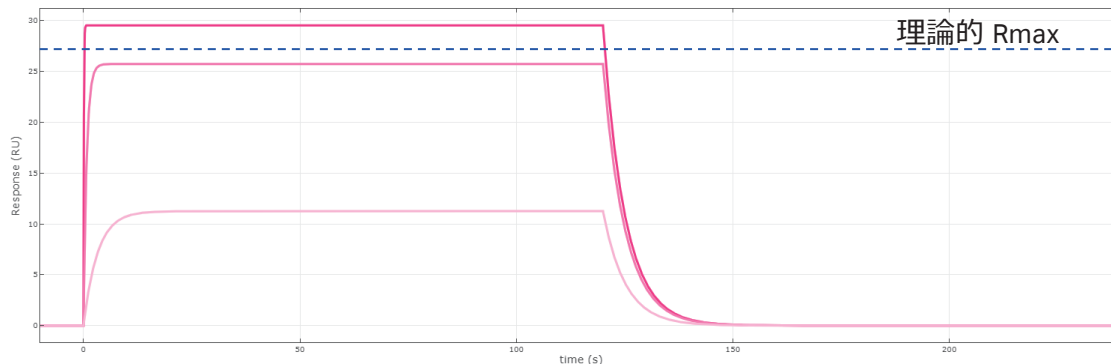
T 青いセンサーグラムの非特異結合が見られた場合、いくつかの対処方法が考えられます。

- アナライトの品質：アナライト溶液に夾雑物が含まれる場合、非特異結合が起こりやすくなります。
- 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。PBS をご使用の場合、PBS-P+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：Sensor Chip SA をご使用の場合、低分子化合物によってはストレプトアビジンに結合しやすいものがあります。その場合、Sensor Chip NA をお試しください。

MEMO

1. 結合部位特異的であること

溶媒補正後のアクティブセル - リファレンスセル (Fc2-1 corr、Fc4-3 corr 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や低分子化合物の凝集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や低分子化合物の凝集が考えられます

i 最大レスポンスが理論的 Rmax を超えない場合でも、濃度 3 点程度インジェクションした時点で最高濃度が 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。

- ・ リガンドの品質確認：変性タンパク質が一定以上含まれる場合、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。PBS をご使用の場合、PBSP+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たうえで測定された方がいいかもしれません。

MEMO


本測定

1. 本測定

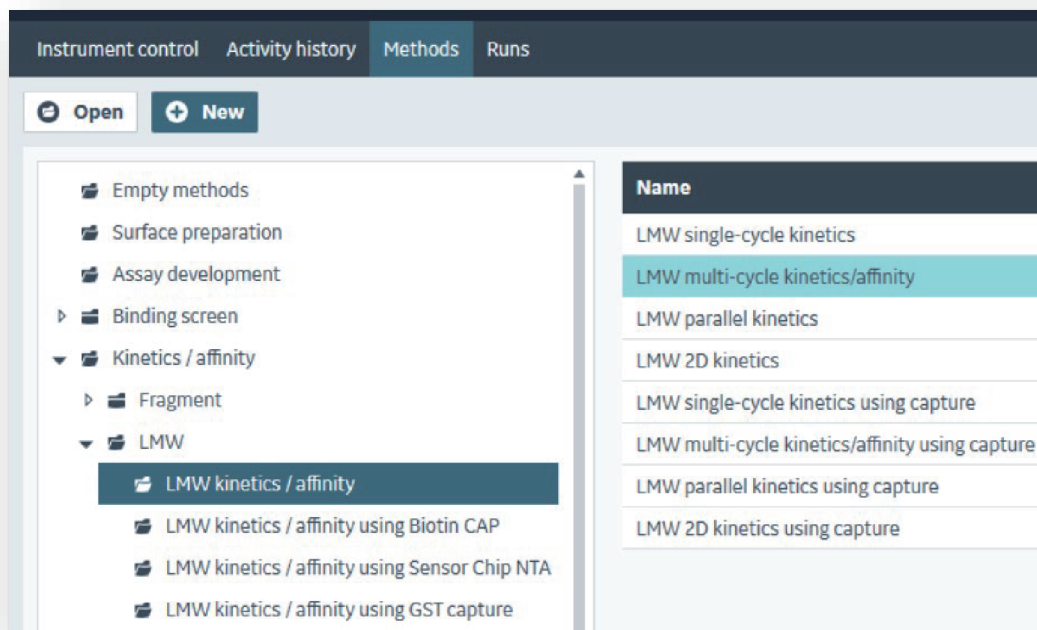
条件が整えば、本測定に移ります。解離の速い低分子化合物の場合（解離時間中にベースラインに戻る事ができる場合）、マルチサイクル法をお勧めします。

【実験メモ】


	(最高) 濃度	添加時間 (秒)	解離時間 (秒)
アナライト			

 溶媒補正を含むマルチサイクル法による本測定には、機種ごとのメソッドを用いてください。本測定では、Startup（3回以上）、0濃度（通常2回）、濃度8点以上（どこかの濃度1点を2回、再現性確認のため）を含みます。**各システムの使用法は各種マニュアルをご参照ください。**

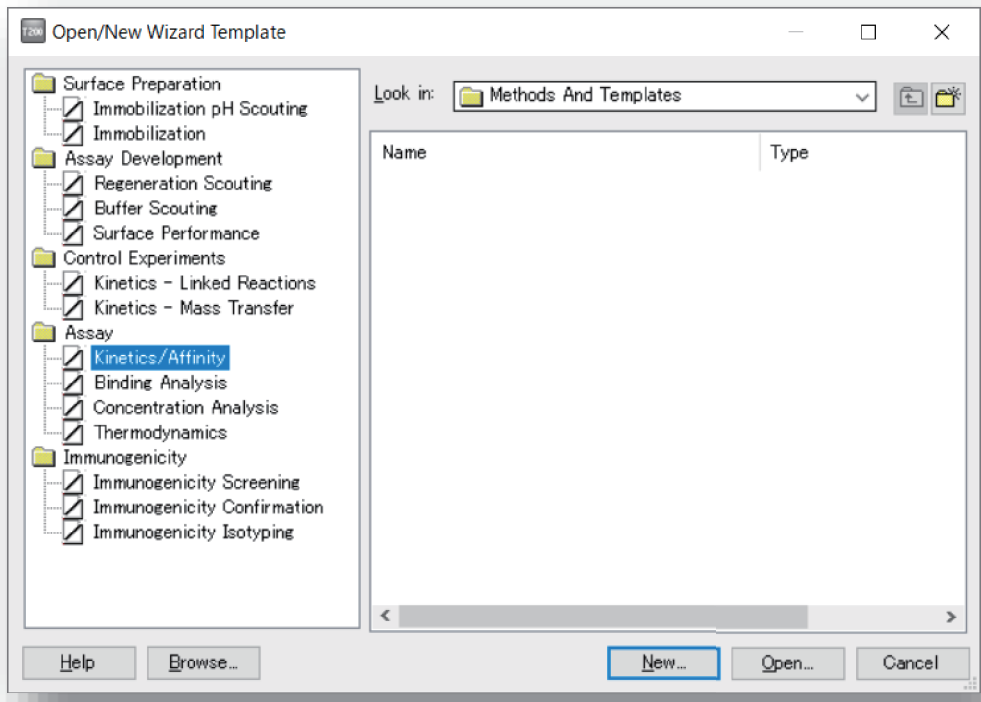
Biacore 8Kの場合：Method タブの New より、Kinetics / affinity→LMW→LMW kinetics / affinity→LMW multi-cycle kinetics を選択




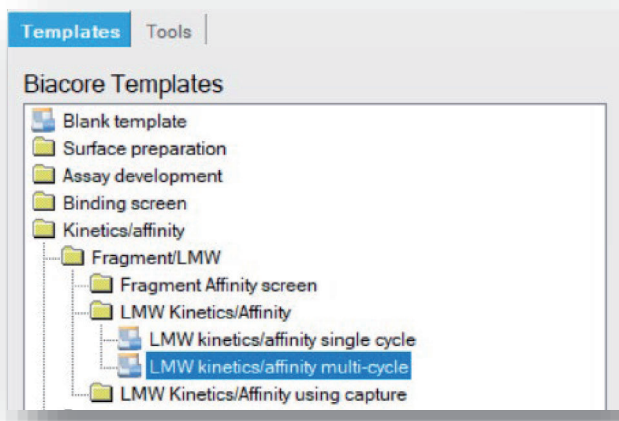
MEMO

Biacore T200 の場合：  Wizard→kinetics/Affinity を選択

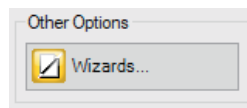
* Run solvent correction にチェックを入れます。



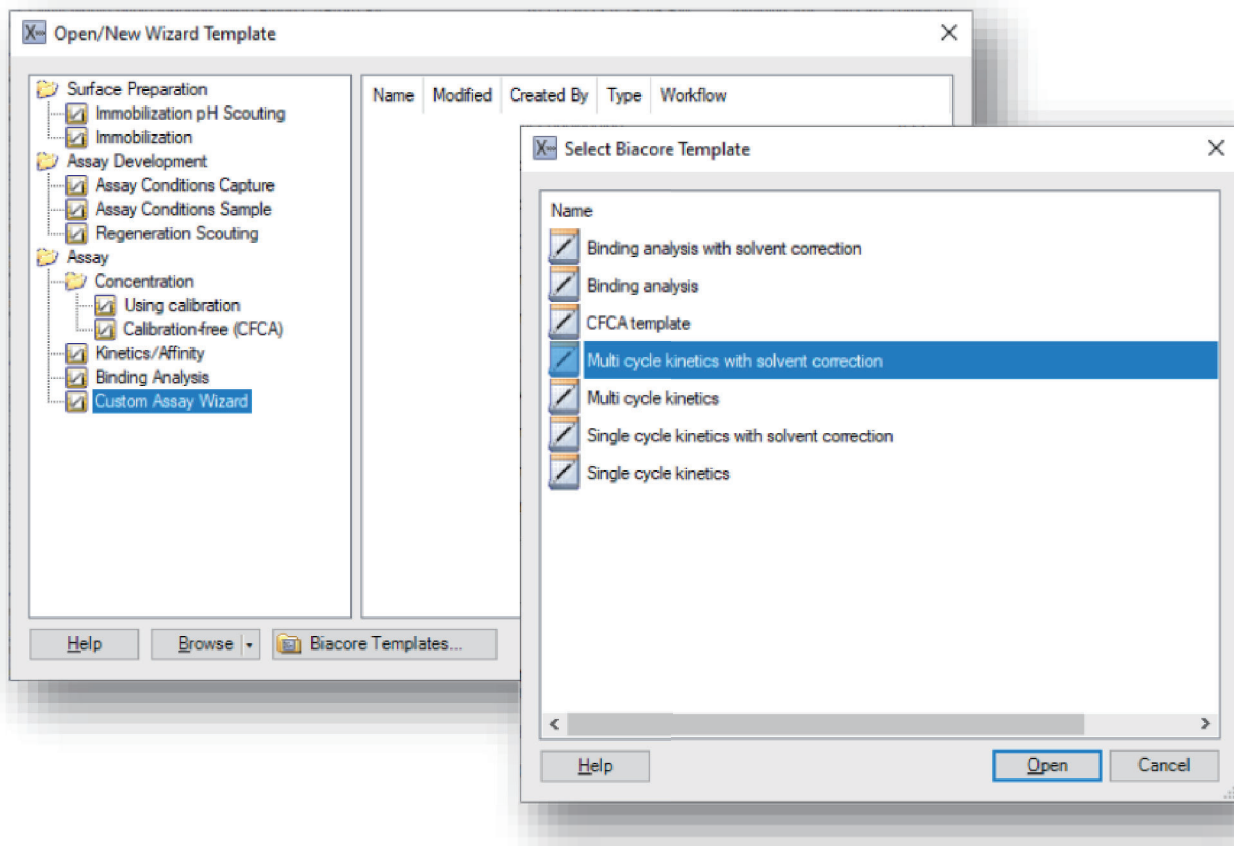
Biacore S200 の場合：  Templates→Kinetics/Affinity →Fragment/LMW→LMW Kinetics/Affinity→LMW kinetics/affinity multi-cycle を選択



MEMO



Biacore X100 の場合 : Other Options の Wizards より Custom Assay Wizard→
Biacore Templates→Multi cycle kinetics with solvent correction を選択。



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 の使用法は各種マニュアルをご参照ください。

MEMO

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。

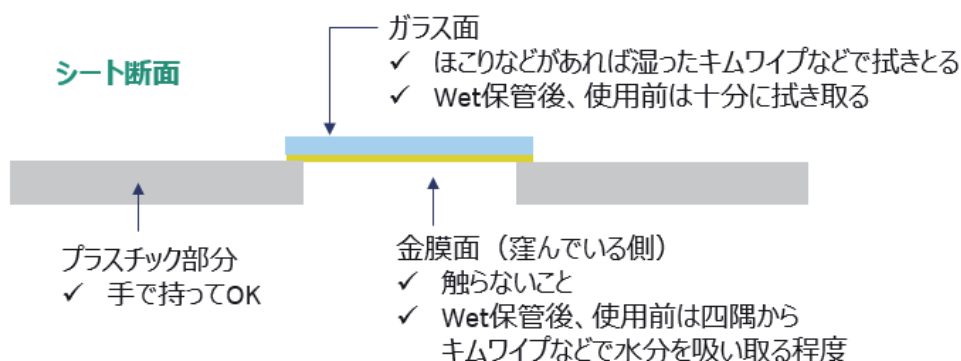
- Biacore 8K/8K+ …… 260 ml/ 24 時間
- Biacore T200/S200 …… 65 ml/ 24 時間
- Biacore X100 …… 200 ml/ 7 日間

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（DMSO 無し）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。