

# 7月号

## タンパク質—核酸の相互作用

- ◆ 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
- ◆ リガンド核酸の固定化
- ◆ 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

7月号は、はじめてタンパク質—核酸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。

タンパク質—核酸の相互作用を測定する場合、核酸をリガンド側としていただくことが第一選択です。Sensor Chip のほとんどは表面がマイナスにチャージしているため、核酸をアナライトとして流すと反発により親和性が弱く見積もられてしまいます。

末端を Biotin 修飾した核酸を用意し、Sensor Chip SA（streptavidin）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 SA を用いた手法によるガイドとなります。



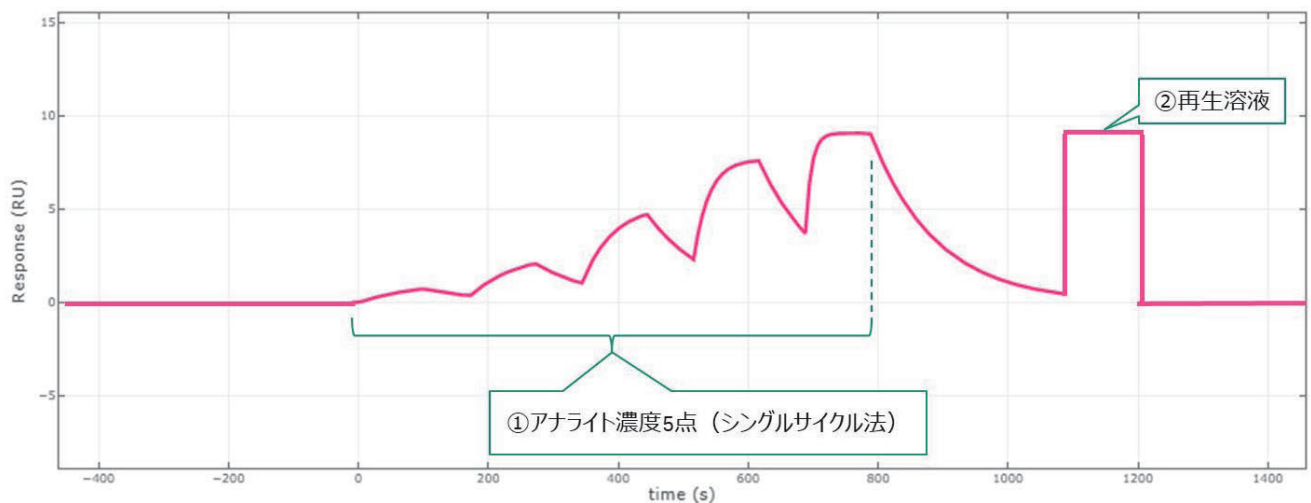
Biacore で測定対象となる核酸は、数十 mer 程度となります。200 mer を超えると測定が難しくなることがあります。



Biotin 標識のリガンドをご用意いただきますが、Biotin CAPture kit の利用は避けてください。本 kit 付属の Sensor Chip CAP にはオリゴ DNA が付加されているため、非特異結合を起こす恐れがあります。また、Sensor Chip NA に関しては酸などへの耐性が低いため、再生溶液を必要とする測定系には不向きです。

## 本測定で得られるセンサーグラム

Sensor Chip SA を用いたタンパク質—核酸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。①濃度 5 点のタンパク質アナライト連続で添加します（シングルサイクル法）。②再生溶液でアナライトを外してベースラインに戻ります。



Biotin 標識 poly A などを Sensor Chip SA に固定化することで、Poly T tail を含む核酸をリガンドとしてキャプチャーさせる手法もあります。


## 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

タンパク質—核酸の相互作用を測定する場合、核酸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。


 Sensor Chip のほとんどは表面がマイナスにチャージしているため、核酸をアナライトとして流すと反発により親和性が弱く見積もられてしまいます。

#### 分子量とストック濃度

アナライトのタンパク質は数 mg/ml など、可能な限り高濃度なものをご用意ください。リガンドの核酸は最終濃度数 + nM ~ 数  $\mu$ M 程度で固定化することが多いです。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」を併せてご参考にしてください。

#### MEMO

---

## 2. 実験に必要なセンサーチップや消耗品

タンパク質—核酸の相互作用測定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 SA を用います。

- 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



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



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、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

- HBS-EP+ 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.05% v/v Surfactant P20 (Tween 20)
- HBS-P+ 10 mM HEPES, 150 mM NaCl and 0.05% v/v Surfactant P20 (Tween 20)

**i** 第一選択は HBS-EP+ です。弊社では 10x 濃度の HBS-EP+, 10x、HBS-P+, 10x を取り扱っております。超純水で要時調整してください。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。

## サンプル

- Biotin 標識核酸
- アナライトタンパク質

## 再生溶液

- \* 次ページを参照して選択

### ■ 製品情報

製品	包装	コード番号
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
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

---

## 【補足】再生（Regeneration）に関して

本測定を Single Cycle 法で実施する場合でも、核酸固定化済みの Sensor Chip を複数回使用するためには再生を行う必要があります。もし、解離時間を長めに設定することでベースラインまで戻るのであれば、再生不要です。また、どうしても適切な再生条件が見つからない場合、Single Cycle 法であれば、Sensor Chip を使いきりで 1 度だけ  $K_D$  算出のための測定を行うことができます。

### 文献情報を確認

同じタンパク質で核酸との相互作用測定を実施している文献があれば、そちらの条件を参照します。

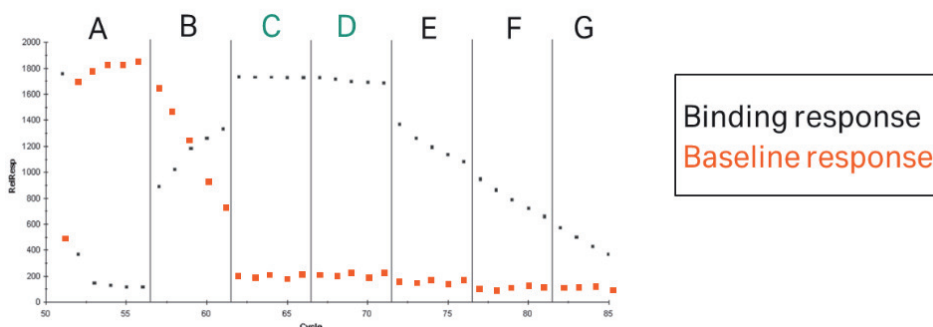
### 核酸—タンパク質でよく用いられる再生溶液

高濃度の塩（1～5 M NaCl）、イオン性界面活性剤（0.02～0.5% SDS）を使用するケースが多いです。Manual Run など、30～120 秒程度のインジェクションで再生が確認できること、再度アナライトをインジェクションした際に同等レスポンスが得られることを確認します（詳細後述）。

### Regeneration Scouting

各機種には Regeneration Scouting という Method がプリセットされています。代表的な再生溶液がセットになった Regeneration Scouting kit と併用いただくことで、複数条件を一度に評価ができます。

下図の場合、5 回の繰り返しインジェクションで C や D のような再生条件が望ましいです。



### ■ 製品情報

製品	包装	コード番号
Regeneration Scouting Kit	1 キット	BR100556

### MEMO

---

## 相補鎖を用いたキャプチャー法

Biotin 標識 Poly-A などを Sensor Chip に固定化させて、末端に Ploy-T を付加させたりリガンド核酸を用意することで、キャプチャー法による測定を行うことができます。核酸-核酸の再生には、50mM NaOH が使用されます。



**i** キャプチャー分子は 20mer 以下程度で、poly-A に限らずランダムな相補鎖配列でも構いません。GC 含量が高いと再生しづらい可能性があります。

## 二本鎖 DNA の場合は？

二本鎖 DNA がリガンドの場合、二本鎖を開裂させずにタンパク質アナライトのみを剥がす条件が必要になります。条件設定が困難な場合、上記キャプチャー法のように再生時には一本鎖にしてしまい、キャプチャー時に二本鎖をつくるアプローチも可能かと考えられます。

MEMO

---

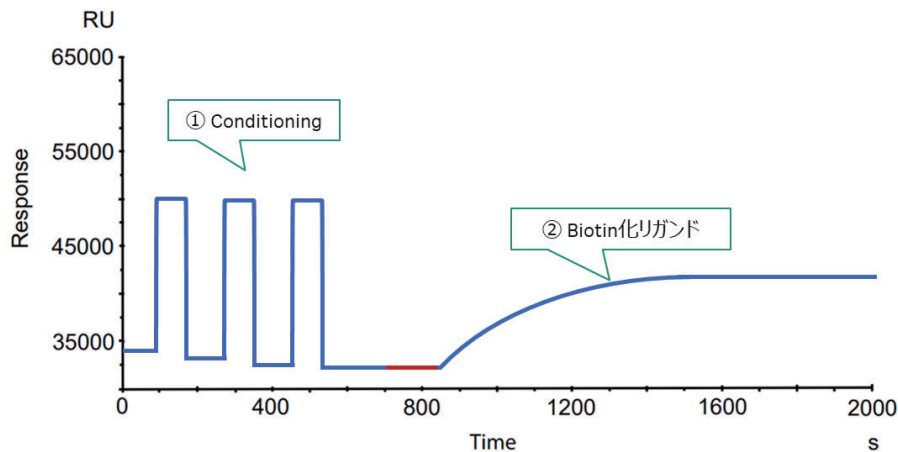
## Biotin 標識核酸（リガンド）の固定化


Sensor Chip SA を用いる場合、はじめのステップとして Sensor Chip に Biotin 標識核酸を固定化します。

### 1. Sensor Chip SA で得られるセンサーグラム

Sensor Chip SA を用いた Biotin 標識核酸の固定化では、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 化リガンドを添加します。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。



 コンディショニングによって、Sensor Chip 表面に非共有結合で残存している SA が洗い流されます。リガンドインジェクション後の洗浄溶液は、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

---



## 1. 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。タンパク質—核酸の相互作用では、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)、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+ 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.05% v/v Surfactant P20 (Tween 20)
  - HBS-P+ 10 mM HEPES, 150 mM NaCl and 0.05% v/v Surfactant P20 (Tween 20)
- \* 第一選択は HBS-EP+ です。



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+ …… 500 ml
- Biacore T200/S200 …… 200 ml
- Biacore X100 …… 150 ml



弊社では 10x 濃度の HBS-EP+, 10x、HBS-P+, 10x を取り扱っております。超純水で要時調整してください。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

---

## 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 は、機種によってご使用いただく形状が異なります。バッファーボトルに適切なランニングバッファーを準備して、Sensor Chip をドックします。



Series S Sensor chip SA

\* Biacore 8K,8K+,T200,S200 の場合



Sensor chip SA

\* Biacore X100 の場合



センサーチップは、使用する 1 時間くらい前には室温に出しておきます。

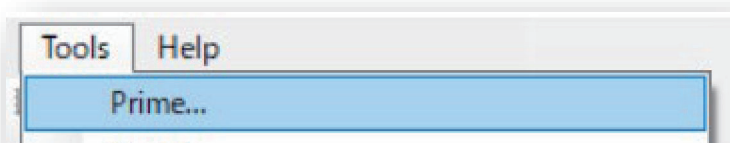
### システムのバッファー置換

固定化をはじめの前には、使用するランニングバッファーでシステム内の溶液置換を行います。バッファー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. Biotin 標識核酸の固定化

Biotin 標識核酸は、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。

#### タンパク質-核酸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  $R_{max} \leq 50$  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。 $R_{max}=50$  を目指す場合。

$$50RU (R_{max}) = \frac{\text{アナライトの分子量 (Da)}}{\text{リガンドの分子量 (Da)}} \times \text{リガンドの固定化量 (RU)} \times \text{リガンドの価数}$$

#### 【実験メモ】

	分子量 (Da)	目指す $R_{max}$ (RU) / リガンドの固定化量 (RU)
アナライト		$R_{max} =$
リガンド		固定化量 =



Kinetics 解析において、 $R_{max}$  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。



200 mer くらいまでは固定化可能ですが、その場合、塩濃度を 500~1000 mM 程度まで上げたランニングバッファーで希釈します。

#### MEMO

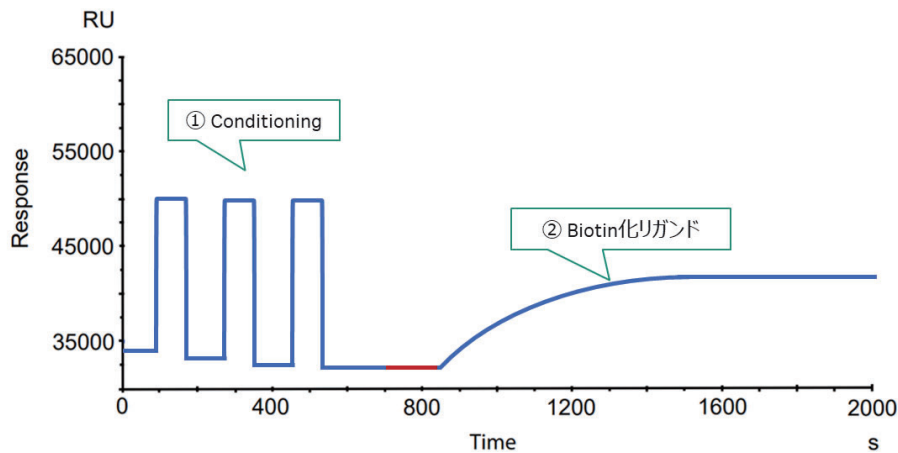
---

## Sensor Chip SA 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。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。

Sensor Chip SA の Procedure step は以下の通りです。

- コンディショニング溶液：1 M NaCl, 50 mM NaOH                      60 秒 x 3 回、10  $\mu$ l/min.
- Biotin 化リガンド    数十 nM～数  $\mu$ M で数分程度、10  $\mu$ l/min.
- 洗浄溶液：50% Isopropanol in 1 M NaCl and 50 mM NaOH              1 回



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 標識核酸 (リガンド) は、必ずアクティブセルのみに固定化します。



ビオチン標識核酸の固定化は、流路に残存するビオチン標識サンプルを洗浄するため最後に洗浄溶液 (Wash) が必要です。Manual Run では Wash は実施できないためメソッドを用いてください。

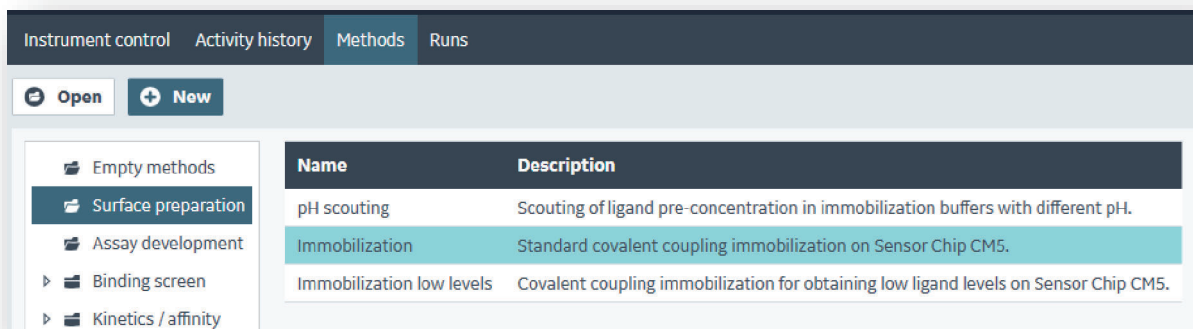


固定化量が十分でない場合、追加の固定化が可能です。同じメソッドを使用する場合、コンディショニング溶液としてランニングバッファーを用いてください。洗浄溶液は同様に流します。

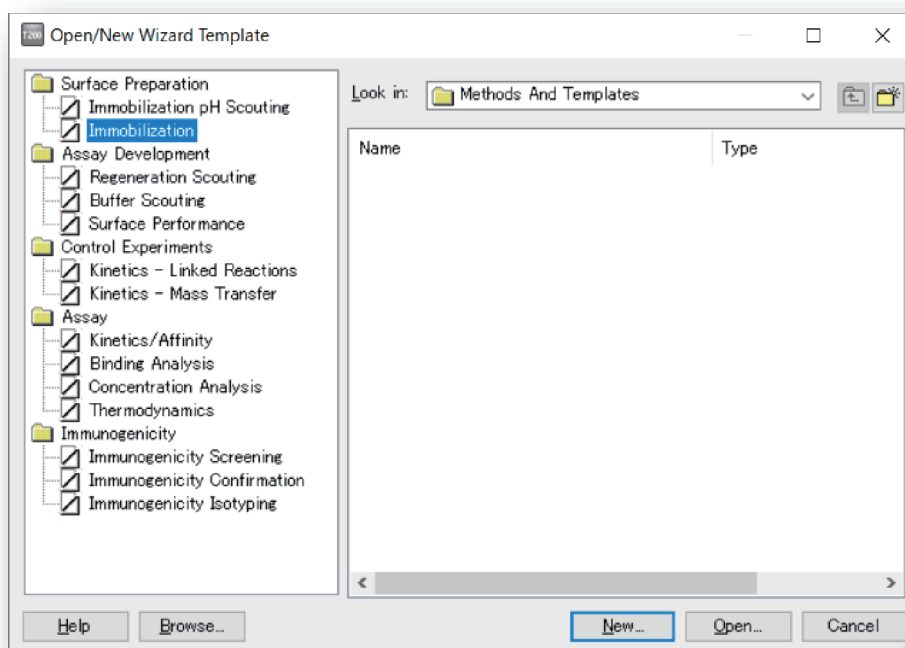
## MEMO

---

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

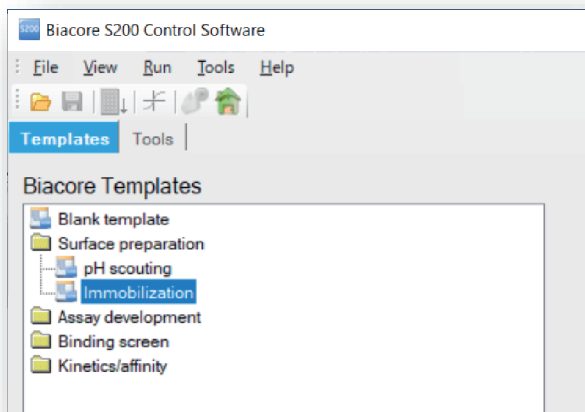


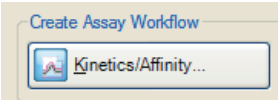
Biacore T200 の場合 : Wizards より、Surface preparation→Immobilization→New を選択

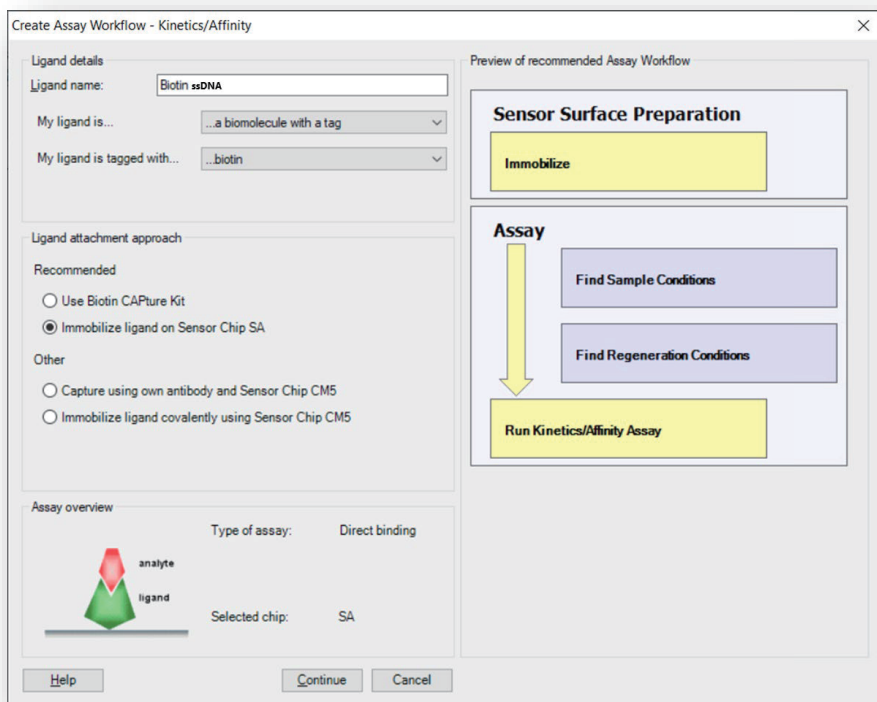



MEMO

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 標識核酸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

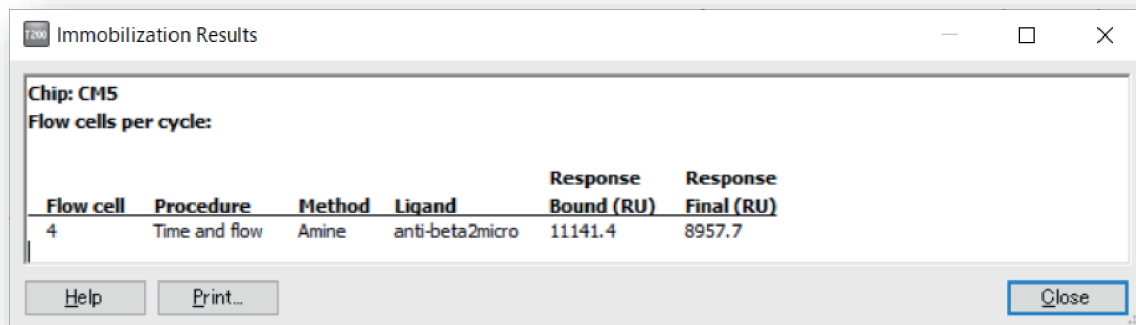
MEMO

## 固定化量の確認

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 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



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

**i** 最初の 3 回の Conditioning 溶液の添加により、非共有結合で残存している SA が剥がれ、ベースラインが低下するため、Response Bound を採用します。

## 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】

	リガンド分子固定化量 (RU)
Fc1	
Fc2	
Fc3	
Fc4	

【実験メモ : Biacore X100】

	リガンド分子固定化量 (RU)
Fc1	
Fc2	

MEMO

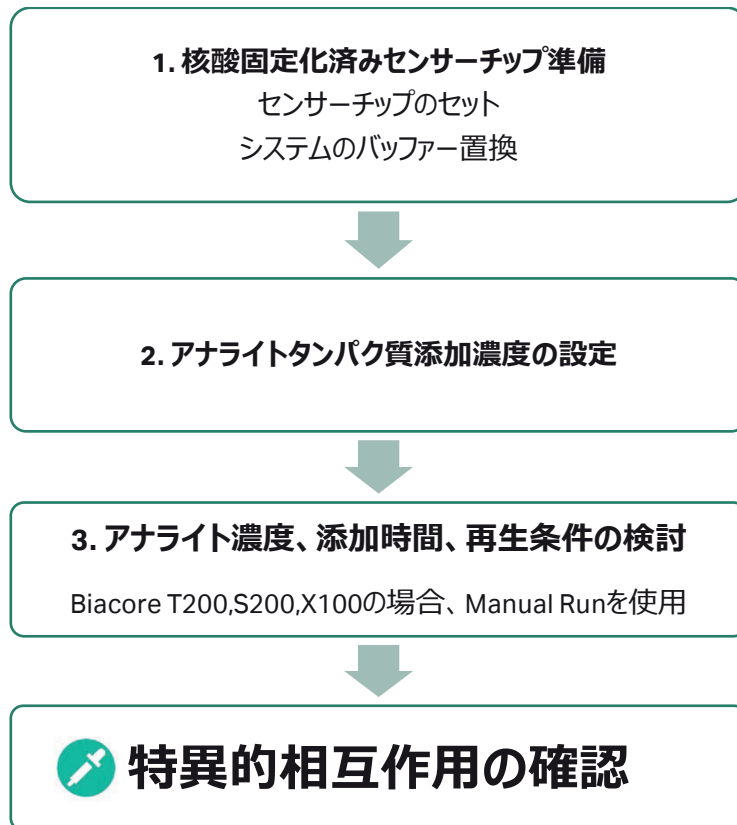
---



## 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。



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

MEMO

---

## 2. 核酸固定化済みセンサーチップ準備

前章の「3. Biotin 標識核酸の固定化」に従って、Sensor Chip SA に Biotin 標識核酸を固定化します。測定時のランニングバッファーは固定化時と同じもので構いません。固定化済みの Sensor Chip SA を新たにドックした場合には、システムのバッファー置換を行います。

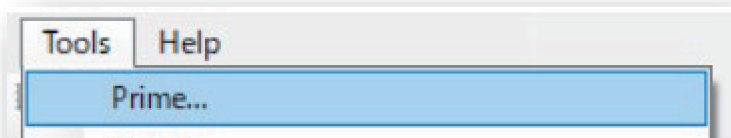
### システムのバッファー置換

測定をはじめの前には、使用するランニングバッファーでシステム内の溶液置換を行います。バッファー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. アナライトタンパク質添加濃度の設定

#### アナライトタンパク質添加濃度の目安

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 近くから 3 倍希釈で 5 点以上
- Affinity 解析（平衡値解析）を行う 1/10 K<sub>D</sub> 値付近～少なくとも 2 倍 K<sub>D</sub> 値  
できれば 10 倍 K<sub>D</sub> 値付近までで 8 点以上

**i** タンパク質-核酸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。

**i** 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=50 を目指す場合。

$$50RU (R_{max}) = \frac{\text{アナライトの分子量 (Da)}}{\text{リガンドの分子量 (Da)}} \times \text{リガンドの固定化量 (RU)} \times \text{リガンドの価数}$$

#### 【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 =

**T** 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。

#### アナライトタンパク質添加・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  
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、解離ともに 60 秒程度

#### MEMO

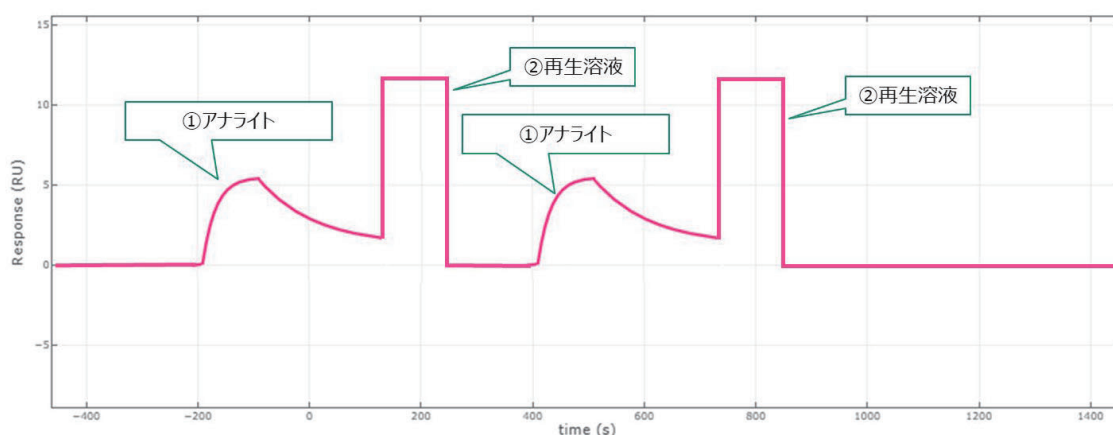
---

## 4. アナライト濃度、添加時間、再生条件の設定

初回は、アナライト濃度・添加時間、および再生条件が分かりません。そのため Manual Run を用いて、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

- アナライトタンパク質濃度：想定される  $K_D$  値から十倍ずつ数点
- アナライトタンパク質添加時間：120 秒程度
- アナライトタンパク質解離時間：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。
- 再生条件：各種再生溶液で 30～120 秒程度



Biacore T200, S200, X100 の場合、Manual Run を用いて、特異的結合の確認、そして、適切なアナライトおよび再生溶液の濃度・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用います。



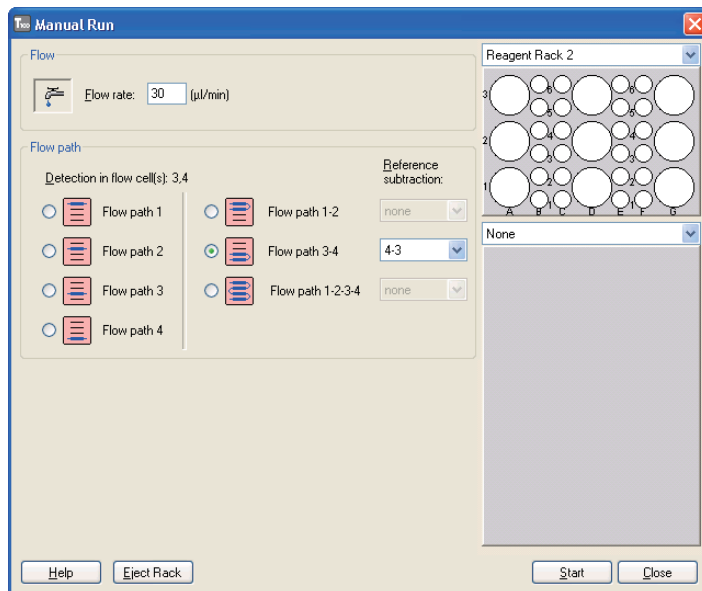
アナライトと再生溶液の添加は複数回実施します。適切な再生条件では、再生溶液添加終了後、速やかにベースラインに戻ります。続いて同じ条件でアナライトをインジェクションした際に同等レベルのレスポンスが得られます。

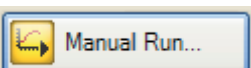
### MEMO

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

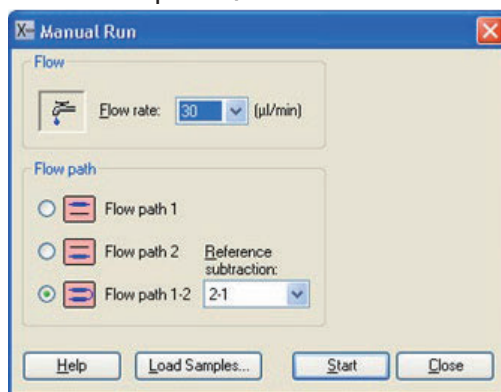
Biacore S200 の場合 :  より、Manual Run を実行。

はじめの流速（アナライトインジェクションは 30  $\mu\text{l}/\text{mn}.$ ）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（アナライトインジェクションは 30  $\mu\text{l}/\text{mn}.$ ）と Flow Path 1-2 を選択して Start します。



**【実験メモ】**

	サンプル名	濃度	添加時間（秒）	解離時間（秒）
アナライト				
再生溶液				

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。

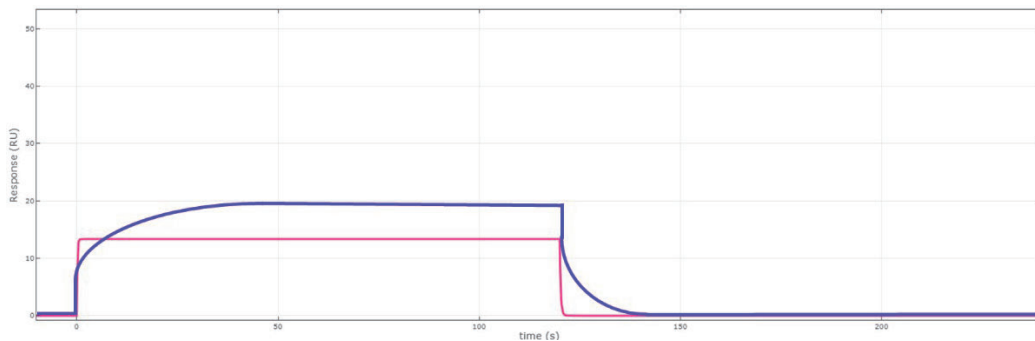
確認項目は以下二点です。

- 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。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。

**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。

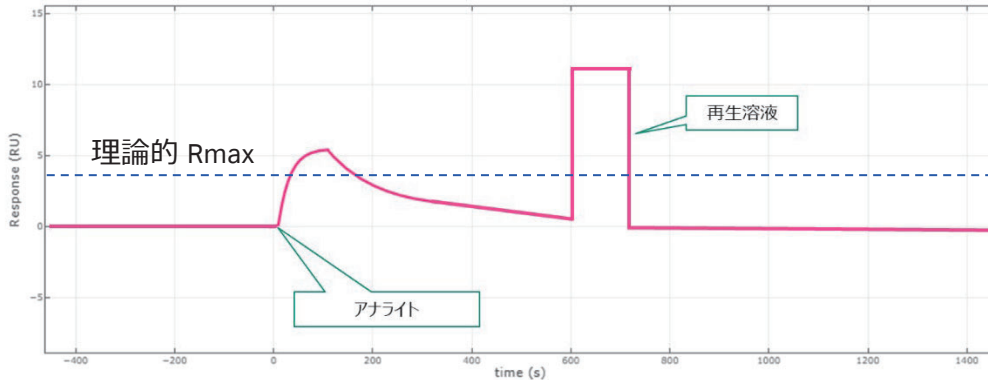
- ・ アナライトの品質：アナライト溶液に夾雑物が含まれる場合、非特異結合が起こりやすくなります。
- ・ ランニングバッファーの選択：塩濃度で一定以上のイオン強度を得る。0.05%の Surfactant P20 (Tween 20)を添加する。添加物はなるべく少なくする。HBS-N をご使用の場合、HBS-EP+をお試しください。
- ・ センサーチップ・固定化アプローチの選択：Sensor Chip SA をご使用の場合、アナライトによってはストレプトアビジンに結合しやすいものがあります。バイオダイレクトライン（最終ページ記載）までお問い合わせください。

## MEMO

---

## 1. 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** レスポンスが理論的 Rmax を超えない場合でも、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：リガンドの品質が低下している場合、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。

**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

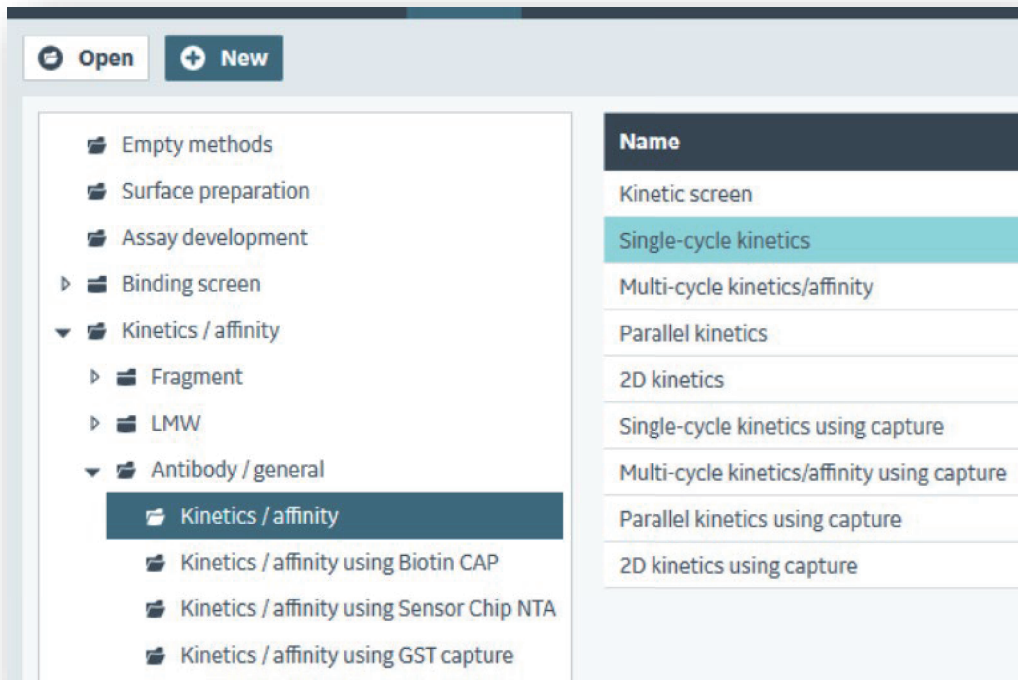
条件が整えば、本測定に移ります。シングルサイクル法をお勧めします。

#### 【実験メモ】

	サンプル名	(最高) 濃度	添加時間 (秒)	解離時間 (秒)
アナライト				
再生溶液				

 シングル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5点以上を含みます。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 を選択



 Biotin 標識 PolyA などを用いたキャプチャー法の場合、Single-cycle kinetics using capture を選択します。

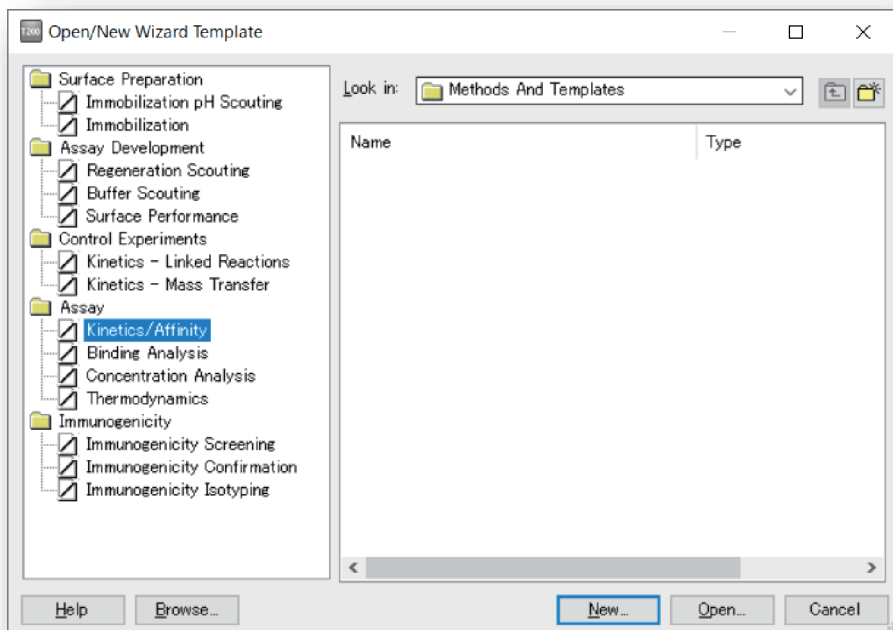
#### MEMO



Biacore T200 の場合 :



Methods→Biacore Methods→CAP single-cycle kinetics を選択します。



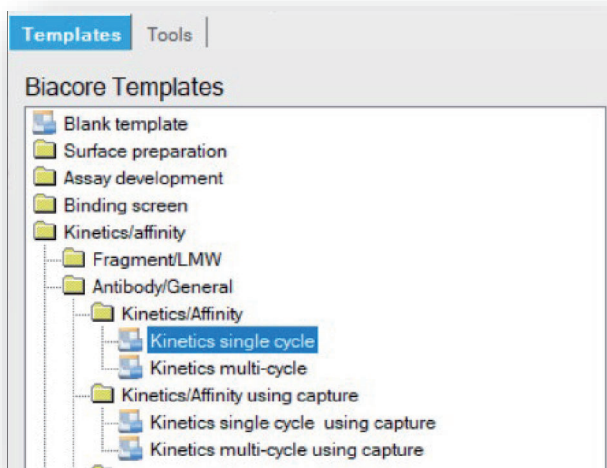
Biotin 標識 PolyA などを用いたキャプチャー法の場合、同 Method に Capture を追加します。

Biacore S200 の場合 :

**Templates**

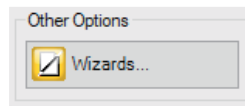
Templates→Kinetics/Affinity→Antibody/General→

Kinetics/Affinity→Kinetics single cycle を選択

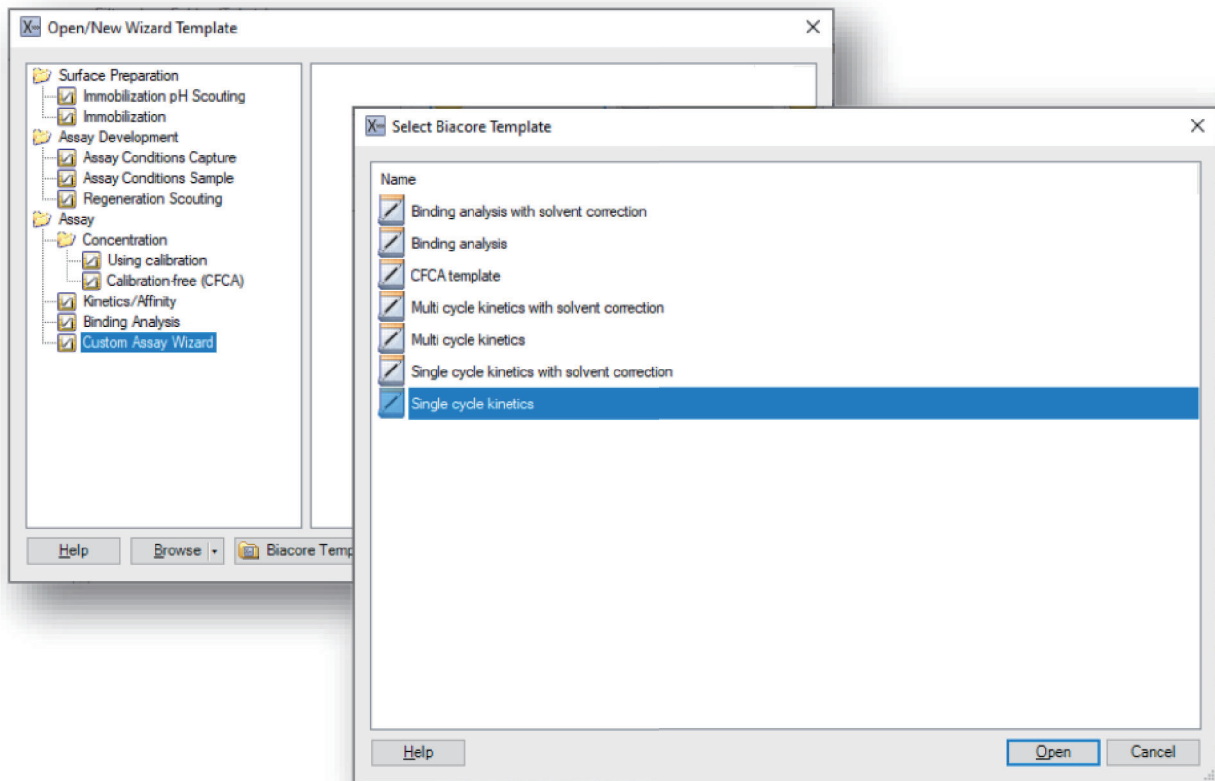


Biotin 標識 PolyA などを用いたキャプチャー法の場合、Kinetics single cycle using capture を選択します。

MEMO



Biacore X100 の場合 : Other Options の Wizards より Custom Assay Wizard→  
Biacore Templates→Single kinetics を選択。



Biotin 標識 PolyA などを用いたキャプチャー法の場合、同 Method に Capture を追加します。

## 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<sub>D</sub>、k<sub>a</sub>、k<sub>d</sub>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。**

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。

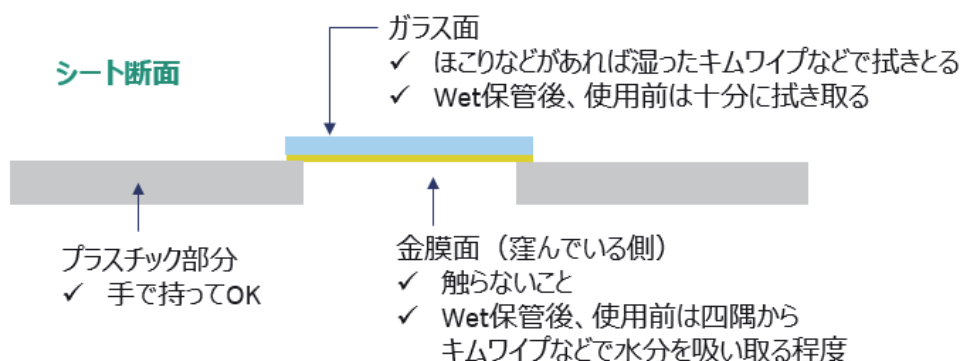
- Biacore 8K/8K+ …… 260 ml/ 24 時間
- Biacore T200/S200 …… 65 ml/ 24 時間
- Biacore X100 …… 200 ml/ 7 日間

#### 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](http://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。