

8月号

臨床サンプルの検出


- ◆ 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
 - リガンドの固定化
 - アナライトの前処理・希釈、測定条件の設定
- ◆ 測定
- ◆ 特異的相互作用の確認
- ◆ センサーチップの保管・装置のシャットダウン




はじめに

8月号は、臨床サンプルを検出する場合の実験ノートです。**血清や尿など、ターゲットのタンパク質が単離・精製されていないサンプルを想定しています。このようなクルードなサンプルの場合、 K_D 、 k_a 、 k_d 値の算出はせず、結合の有無や濃度測定を目的とします。**

この実験ノートでは、主にタンパク質のバイオマーカーの検出を目的としています。この場合、検出用分子（抗体など）をリガンドとしてアミンカップリングで Sensor Chip CM5 に固定化し、アナライトとして臨床サンプルを流します。本稿は Sensor Chip CM5 を用いた手法によるガイドとなります。

 サンプルによっては、適切なバイオセーフティーレベルを備えた実験施設が必要となります。施設管理担当の方へご相談ください。

 濃度測定に関してはより詳細な資料がありますので、こちらの Webinar およびダウンロード資料をご参照ください。

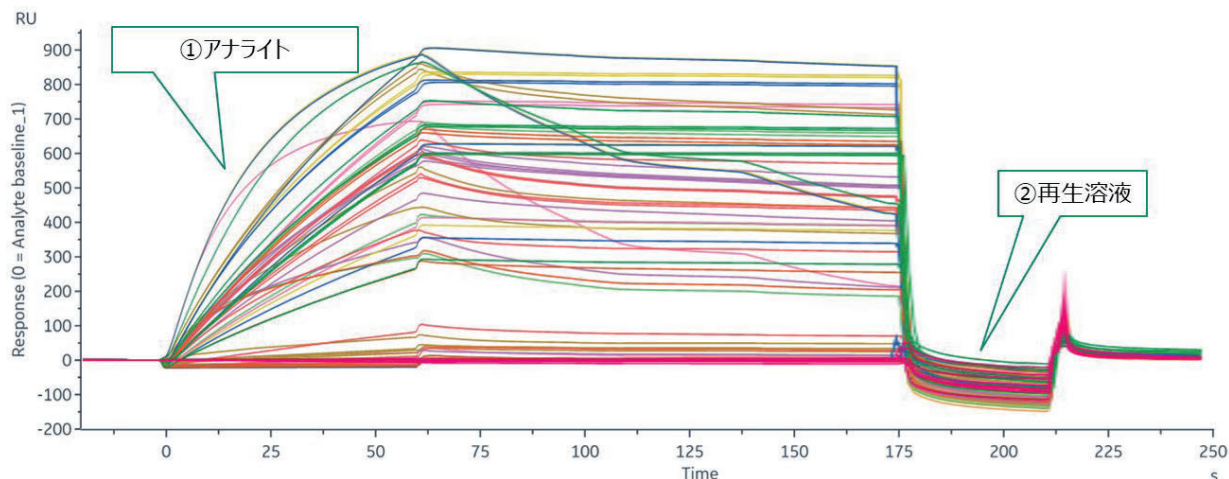
必見！ Biacore™ 戦略と測定条件のワークフロー

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



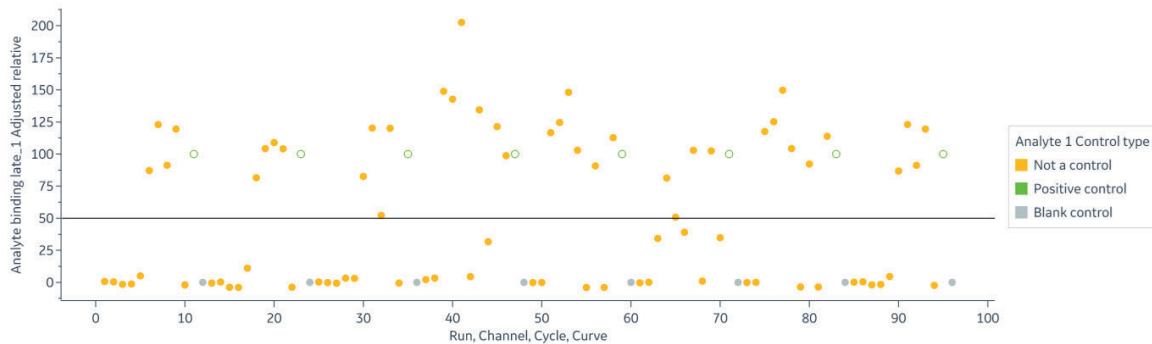
本測定で得られるセンサーグラムおよびプロット

Sensor Chip CM5 を用いた臨床サンプルの多検体測定では、以下のようなセンサーグラムが得られます。リガンドの固定化は測定前に別途実施します。①同一希釈率の臨床サンプルアナライトを添加します。②再生溶液でアナライトを全て外してベースラインに戻ります。



MEMO

多検体の結合レスポンスを比較する場合、インジェクション終了直後（Stability early）などのレポートポイントで比較します。また、定期的にコントロールサンプルを測定することで、異なるサイクルでも共通の閾値で公平に評価するための補正ができます（Control Adjustment）。



Control Adjustment は、Insight Evaluation Software (Biacore 8K/8K+)、Biacore T200、S200 で実施可能です。



ポジティブコントロールの変動率（CV%）に閾値を設定することで、1 ランで何サイクルまでの測定を許容するか範囲が決まります。



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

抗体を用いて臨床サンプル中のターゲット分子を検出する場合、抗体をリガンドとしてセンサーチップに固定化し、臨床サンプルをアナライトとして流すことが、第一選択となります。



検出用抗体を、抗 Fc 抗体や Sensor Chip Protein A、Sensor Chip Protein G、Sensor Chip Protein L などで捕捉する、キャプチャー法による測定も可能です。

分子量とストック濃度

抗体のストック濃度は数 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、アナライト（臨床サンプル中のターゲット分子）それぞれの分子量情報が分かっていると、最大で得られるレスポンス（理論的 Rmax）が算出できます。

【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

臨床サンプルの検出で、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みえ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

アミンカップリングで、リガンドとなる抗体を固定化するには以下のものがが必要です。

- 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
- Acetate 4.0（BR100349）
- Acetate 4.5（BR100350）
- Acetate 5.0（BR100351）
- Acetate 5.5（BR100352）
- NaOH 50（BR100358）



i アミンカップリングでは、リガンドをその等電点から 0.5~2.0 程度低い pH 溶液で希釈します。適切な溶液が分かっている場合、全ての Acetate と NaOH をご用意いただく必要はありません。

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。超純水で要時調製してください。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。

MEMO

サンプル


- 抗体などの検出用分子（リガンド）
- 臨床サンプル（アナライト）
- ネガティブ血清（ネガティブコントロール）
- 抗原などスパイク用マーカータンパク質（ネガティブ血清に添加してポジティブコントロールとします）

再生溶液

- * 次ページを参照して選択

オプション

- NSB Reducer（CM デキストラン溶液）

 特に血清サンプルの場合、レクチン様タンパク質（補体、コレクチン）などがセンサーチップのデキストランに結合することがあります。血清が十分に希釈できない場合、CM デキストランをプレミックスして非特異的結合する分子に吸収させます。NSB Reducer を終濃度 1mg/mL となるようプレミックスしてください。

■ 製品情報

| 製品 | 包装 | コード番号 |
|--------------------------|----------|----------|
| 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 CM5 | 10 枚 | 29149604 |
| Sensor Chip CM5 | 3 枚 | BR100012 |
| Sensor Chip CM5 | 1 枚 | BR100399 |
| Amine Coupling Kit | 1 キット | BR100050 |
| Acetate 4.0 | 1×50 ml | BR100349 |
| Acetate 4.5 | 1×50 ml | BR100350 |
| Acetate 5.0 | 1×50 ml | BR100351 |
| Acetate 5.5 | 1×50 ml | BR100352 |
| NaOH 50 | 1×100 ml | BR100358 |
| NSB Reducer | 10 ml | BR100691 |

MEMO

【補足】再生（Regeneration）に関して

アミンカップリングでリガンドとなるタンパク質分子を直接固定化する場合、タンパク質-タンパク質の相互作用は解離が遅いことが想定され、強制的に全て剥がしとる再生を行う必要があります。

文献情報を確認

同じターゲット分子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。

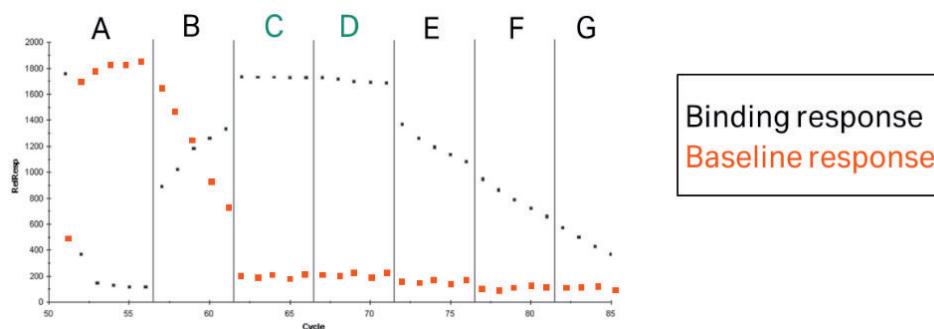
タンパク質-タンパク質相互作用でよく用いられる再生溶液

- Low pH (10 mM glycine-HCl, pH 1.5 to 3.0)
- Ethylene glycol (50%, 75%, or 100%)
- High pH (1 to 100 mM NaOH)
- High ionic strength (1 to 4 M MgCl₂ or 0.5 to 5 M NaCl)
- Ionic detergent (0.02% to 0.5% SDS)

Manual Runなどで、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。サンプルにとってマイルドな条件からお試ください（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。上記試薬を含めた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

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。臨床サンプルの検出では、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。

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

 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。いずれも 10 倍希釈時に pH 7.4 となります。要時調製でご使用ください。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

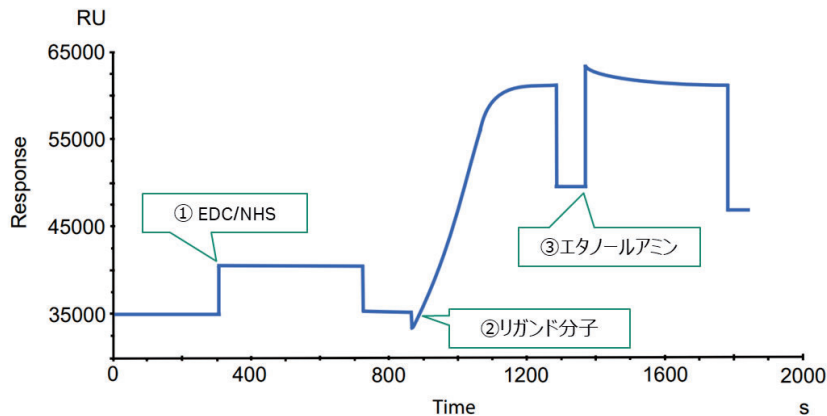
アミンカップリングによるリガンド分子の固定化

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リガンド分子の固定化では、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 リガンド分子を添加します。
- 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。

ベースラインに対する高さの変化が固定化量です。



1. Amine Coupling Kit の準備

Sensor Chip CM5 へ抗体を直接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。

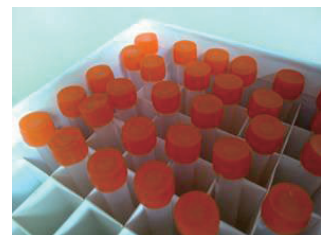


- N-Hydroxysuccinimide (NHS), 115 mg
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), 750 mg
- 1 M Ethanolamine hydrochloride-NaOH pH 8.5 (Ethanolamine), 10.5 mL

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°C 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ の冷蔵保存です。

! NHS、EDC は超純水に溶解すると、凍結保存していても 2 か月程度経過すると徐々に最大固定化量が減少してきます。



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 の場合

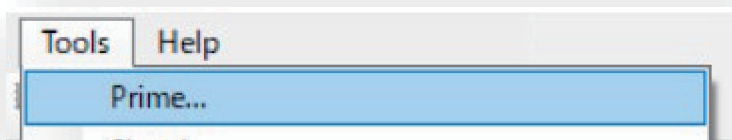
システムのバッファ置換

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



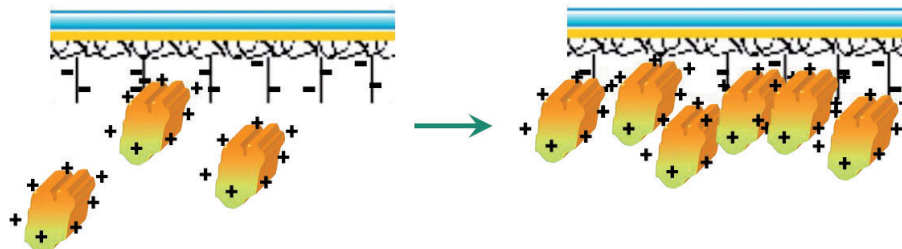
Biacore T200, S200, X100 の場合 : メニューバーから Tools → Prime を選択



MEMO

3. 適切なリガンド希釈バッファの選択 (pH Scouting)

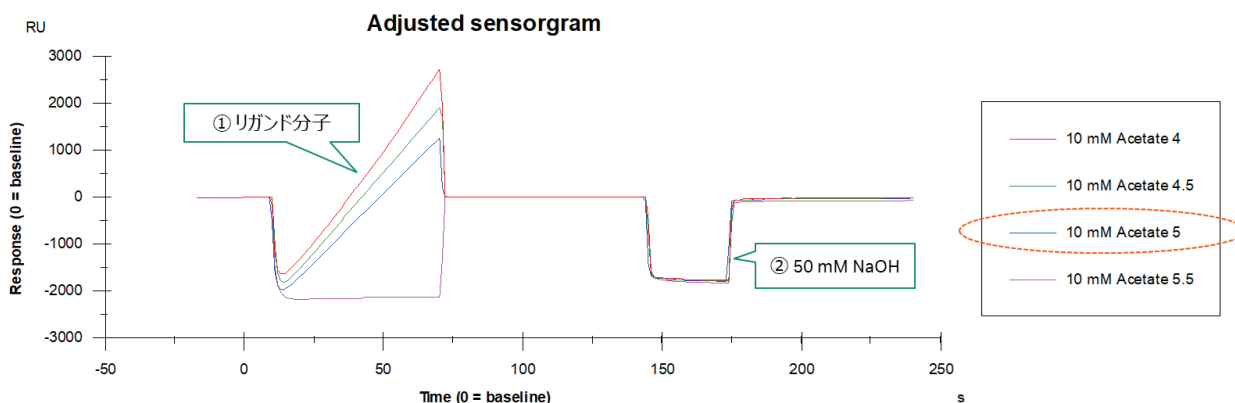
リガンド分子をその等電点より 0.5~2.0 低い pH の緩衝液で希釈すると、センサーチップ表面近傍でリガンド濃度が上昇します。これはセンサーチップ表面が負に電荷しているため、プレコンセントレーション効果と呼ばれます。アミンカップリングキットではこの効果を利用してタンパク質分子を効率的に固定化します。



リガンド分子が中性タンパク質である場合、10mM Acetate (pH5.5, 5.0, 4.5, 4.0)で希釈します。等電点が不明であれば、各 pH の Acetate で 10 倍以上希釈したリガンドを準備し、pH Scouting を行います。

pH Scouting 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各 pH の Acetate で希釈したリガンド分子をインジェクションします。②50 mM NaOH でチップ表面を洗浄します。



上図では、Acetate 5.0 以下でプレコンセントレーション効果が確認できます。この中で最も高い pH 5.0 を採用して、アミンカップリングを実施します。



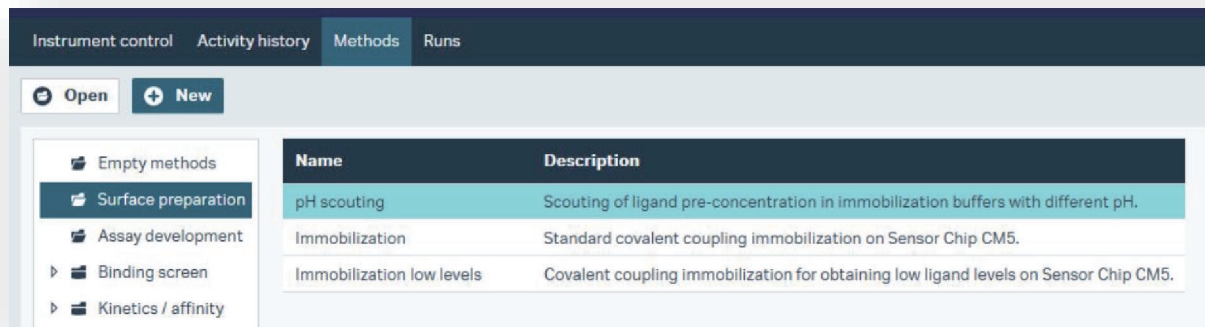
アミンカップリング自体の至適 pH は 8.5 付近であるため、pH を下げ過ぎるとカップリング効率が下がるほか、リガンドタンパク質へ悪影響を及ぼす恐れがあります。



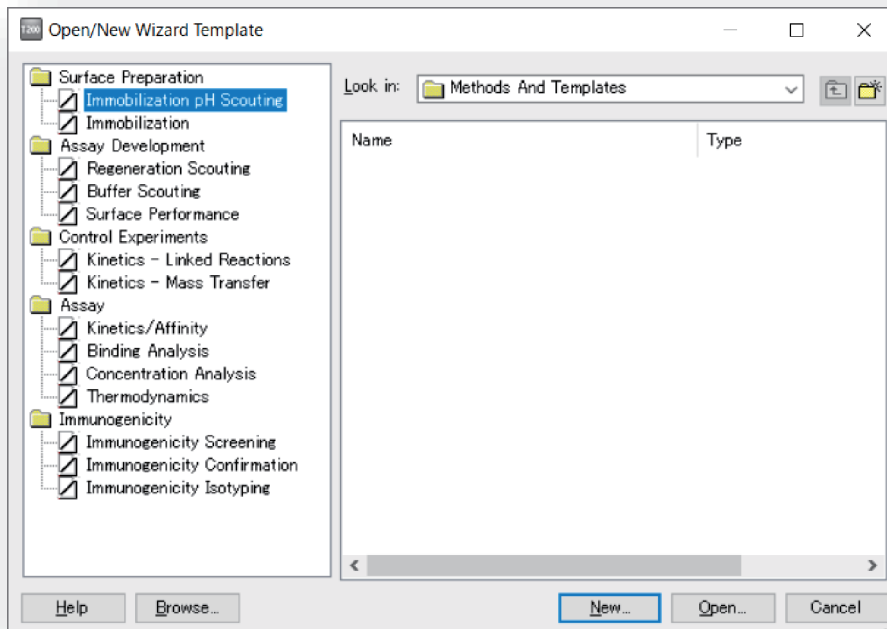
リガンド分子が塩基性タンパクの場合、非アミン系の中性緩衝液 (Tris, Glycine などは避けます) を用います。HBS-P+や HBS-EP+などは、150 mM NaCl が含まれ、静電的効果を抑制するためリガンドの希釈には使用できません。自作の 10 mM Hepes (塩なし) などを作成してください。リガンド分子がもし酸性タンパク質である場合、アミンカップリングは困難です。Biotin 化して Sensor Chip SA を用いるなど検討します。

MEMO

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

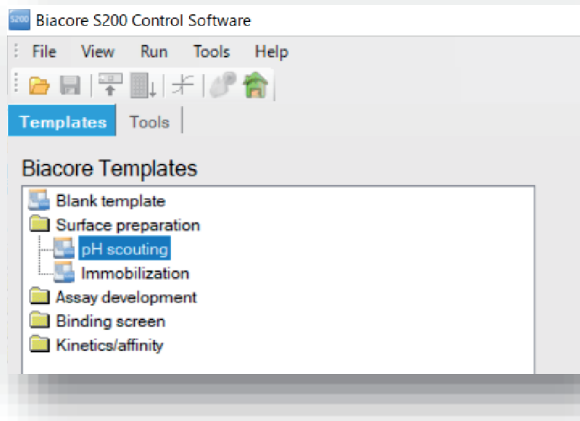


Biacore T200 の場合 : Wizards より、Surface preparation→Immobilization pH Scouting→New を選択

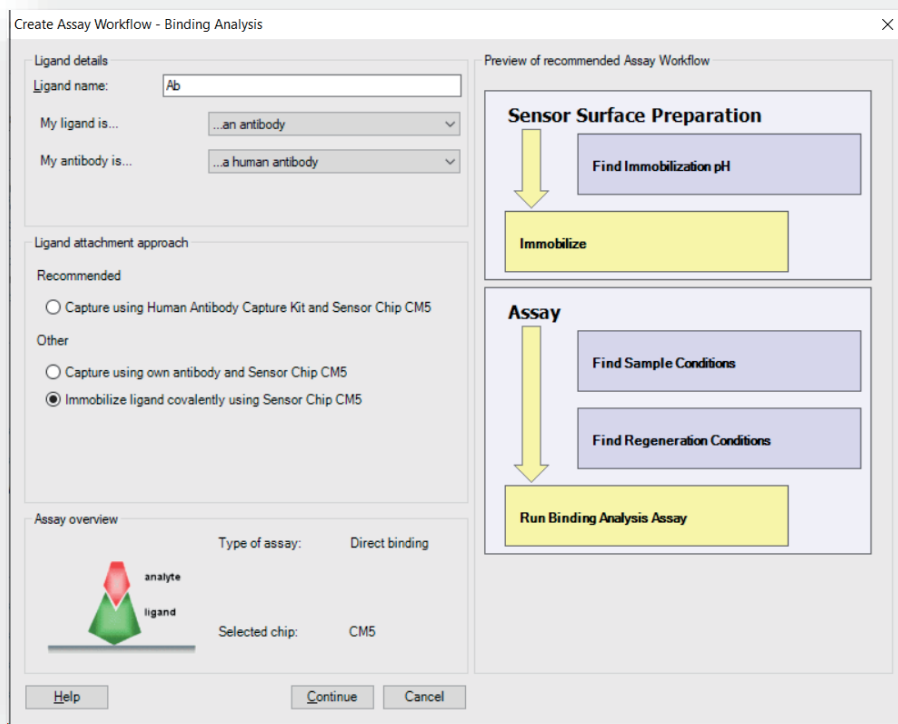


MEMO

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



Biacore X100 の場合 : **Binding Analysis...** Create Assay Workflow の Binding Analysis...より下図のよう
にワークフローを作成します。



作成した Workflow から、Sensor Surface preparation→Find Immobilization pH→ **Run to find out...** Run to find out...を選択

MEMO

4. リガンド分子の固定化

リガンド分子はプレコンセントレーション効果が得られる中で、最も中性域に近い Acetate buffer などで希釈し、Amine Coupling Kit を用いて、各機種の方法により固定化を行います。**Amine Coupling Kit の使用方法は IFU をご参照ください。**



臨床サンプルの検出において、リガンドは多めに固定化します。最終濃度で数十 $\mu\text{g/ml}$ 程度のタンパク質サンプルを用意します。150k Da の抗体の場合、Sensor Chip CM5 で最大 15,000 RU 程度得られます。

リガンドの希釈

前項の「3.適切なリガンド希釈バッファの選択 (pH Scouting)」で、確認した Acetate などのバッファでリガンドを希釈します。

【実験メモ】

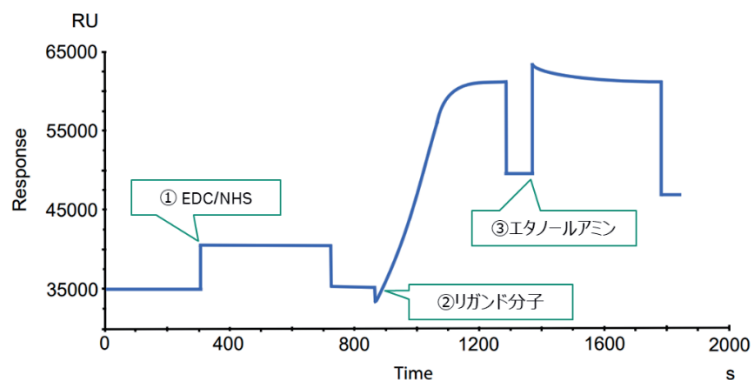
| | 希釈バッファ | 希釈倍率 | リガンド最終濃度 |
|---------|--------|------|----------|
| リガンドの希釈 | | | |

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、機種ごとの方法を用いてください。**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。**

アミンカップリングの Procedure step は以下の通りです。

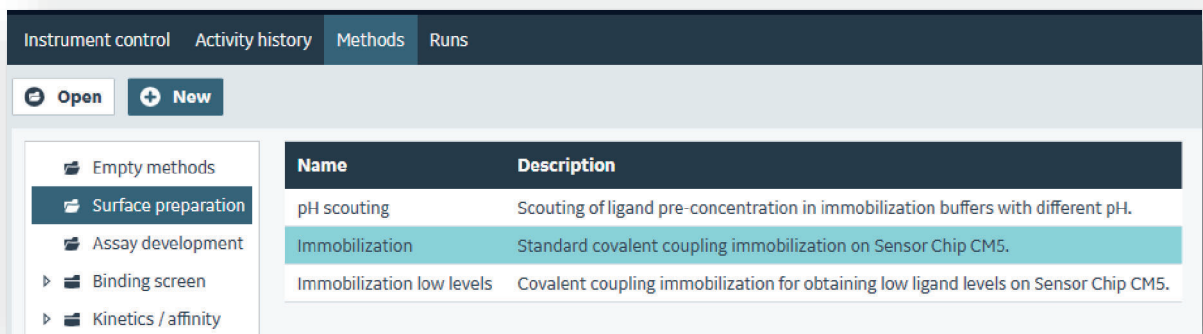
- EDC/NHS … 7 分
- リガンド分子 … 7 分
- エタノールアミン … 7 分



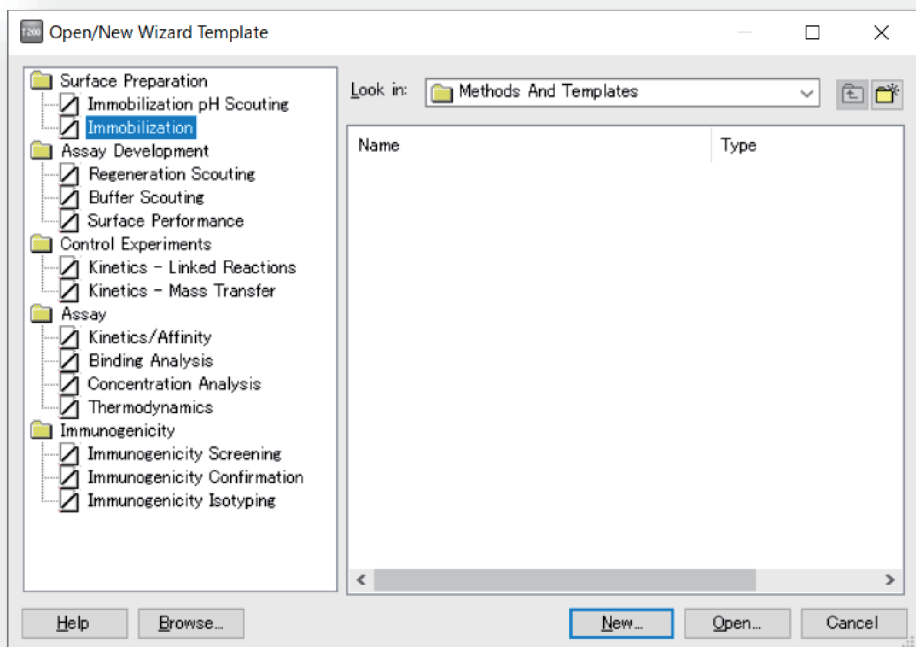
リガンド分子は、必ずアクティブセルのみに固定化します。

MEMO

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

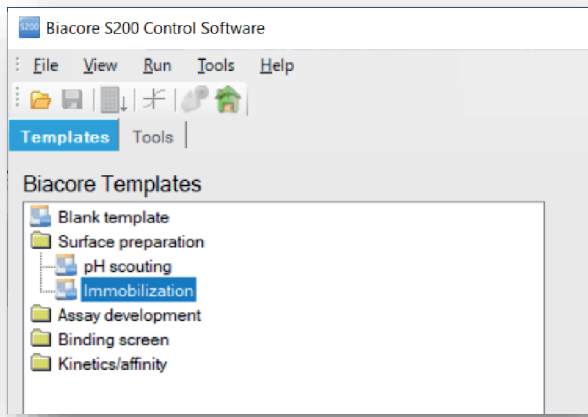


Biacore T200 の場合 : Wizards より、Surface preparation→Immobilization→New を選択

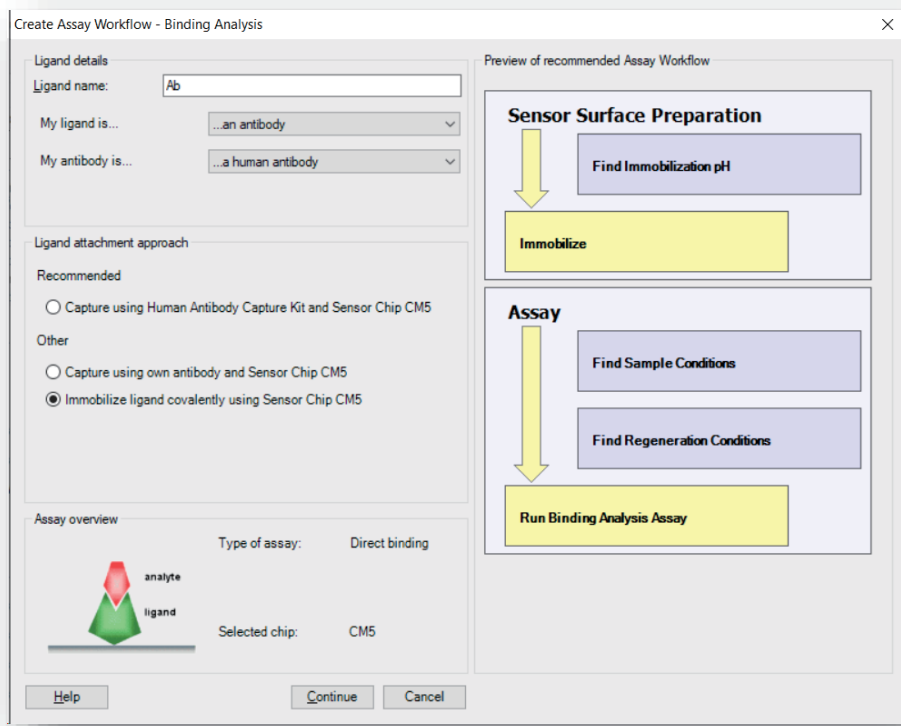


MEMO

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



Biacore X100 の場合 : **Binding Analysis...** Create Assay Workflow の Binding Analysis...より下図のよう
にワークフローを作成します。



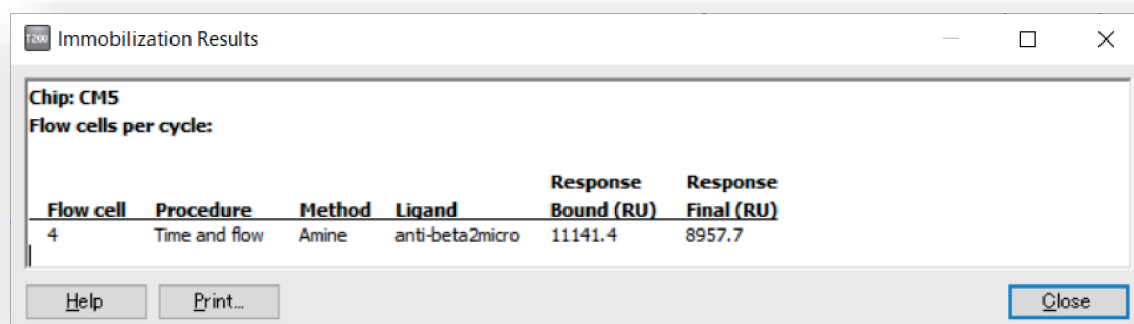
作成した Workflow から、Sensor surface preparation→Immobilization→ **Run** Run を選択
MEMO

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。

【補足】臨床サンプルの検出（および濃度定量）におけるリファレンスセルについて

臨床サンプルのようなクールドなサンプルでは、ある程度のサンプルマトリックスによる非特異的結合を避けることができません。また、アクティブセル（リガンド固定化セル）とリファレンスセル（リガンド未固定セル）に同じ量の非特異的結合が起こるとは限らないため、解析時にリファレンスセルの差し引きを行うことで、測定結果のエラーを招きかねません。

非特異結合を確認するため、測定時にリファレンスセルを設定することは望ましいですが、解析時におけるリファレンスセルの差し引きは、サンプルマトリックスの影響を大きく受けていない場合のみ実施します。

後述、「特異的相互作用の確認」もご確認ください。

MEMO

【実験メモ：Biacore 8K,8K+】

| | リガンド固定化量 (RU) | | | | | | | |
|-----|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ch1 | Ch2 | Ch3 | Ch4 | Ch5 | Ch6 | Ch7 | Ch8 |
| Fc1 | | | | | | | | |
| Fc2 | | | | | | | | |

【実験メモ：Biacore T200,S200】

| | リガンド固定化量 (RU) |
|-----|---------------|
| Fc1 | |
| Fc2 | |
| Fc3 | |
| Fc4 | |

【実験メモ：Biacore X100】

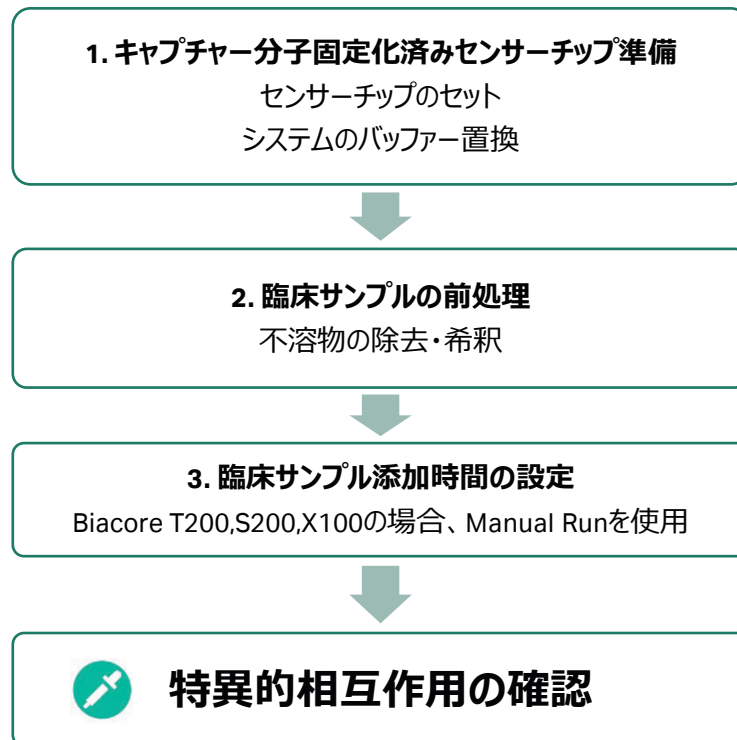
| | リガンド固定化量 (RU) |
|-----|---------------|
| Fc1 | |
| Fc2 | |

MEMO

測定系セットアップ

臨床サンプルの検出を行うためには、はじめにコントロールサンプルを用いて、十分なレスポンスが得られること、再生条件が適切であることを確認し、本測定へ移ります。

概略は以下の通りです。



必要に応じて希釈率、ランニングバッファーなどの再検討

MEMO

1. キャプチャー分子固定化済みセンサーチップ準備

前章『アミンカップリングによるリガンド分子の固定化』に従って、Sensor Chip CM5 にリガンド分子を固定化します。

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 CM5 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。

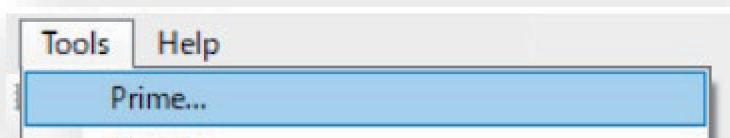
システムのバッファー置換

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

2. 臨床サンプルの前処理

血液・尿などの臨床サンプルには、不溶物や非特異的結合を引き起こす物質が多く含まれていることがあります。そのため、サンプルの前処理として以下の点を考慮します。

i 臨床サンプルのほか、コントロールサンプルとしてネガティブ血清を用意します。ネガティブコントロールとして、ネガティブ血清を、ポジティブコントロールとして抗原をスパイクしたネガティブ血清を用います。

不溶物の除去

- 遠心分離機で上清のみを回収する。10,000 x g で 10 分など。
- フィルターろ過を行う。0.45 μm シリンジフィルターなど。
* 両方行っていただくことが望ましいです。



非特異的結合の抑制

- ランニングバッファーによる希釈。可能であれば 10 倍以上。
- NSB Reducer の添加。終濃度 1mg/mL となるようプレミックス。



i NSB Reducer は多くのセンサーチップ表面に付加されている CM デキストランの溶液です。特に血清サンプルの場合、レクチン様タンパク質（補体、コレクチン）などがセンサーチップのデキストランに結合することがあります。特に血清が十分に希釈できない場合など、NSB Reducer を終濃度 1mg/mL となるようにプレミックスして非特異的結合する分子に吸収させます。

i サンプル量としては、ランニングバッファーで希釈後の溶液で 1 回のインジェクションあたり 60~100 μl 程度です。n 数によって必要量が変わります。コントロールサンプルは定期的にインジェクションするため、サイクル数が多いほどネガティブ血清の使用量は多くなります。

MEMO

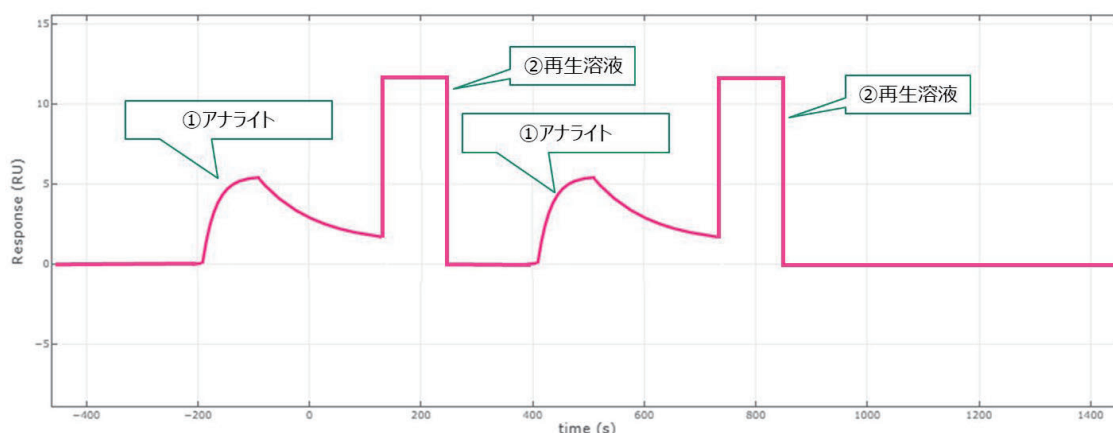
3. 臨床サンプル添加時間の設定

初回は、適切なアナライト濃度・添加時間、および再生条件が分かりません。そのためポジティブコントロールとなるサンプルを用いて、Manual Run により、想定される条件で結合レスポンスの確認を行います。

i ネガティブ血清をネガティブコントロールとし、それに抗原をスパイクしたものがポジティブコントロールとして望ましいです。

セットアップにおける初回の Manual Run 条件

- 臨床サンプル希釈率：ランニングバッファーで 10 倍以上希釈
- 臨床サンプル添加時間：60 秒程度、10 $\mu\text{l}/\text{min}$.
- 臨床サンプル解離時間：120 秒程度。添加終了後、ある程度解離が見られることをモニターします。
- 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。



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。不溶物が含まれないようにします。




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。



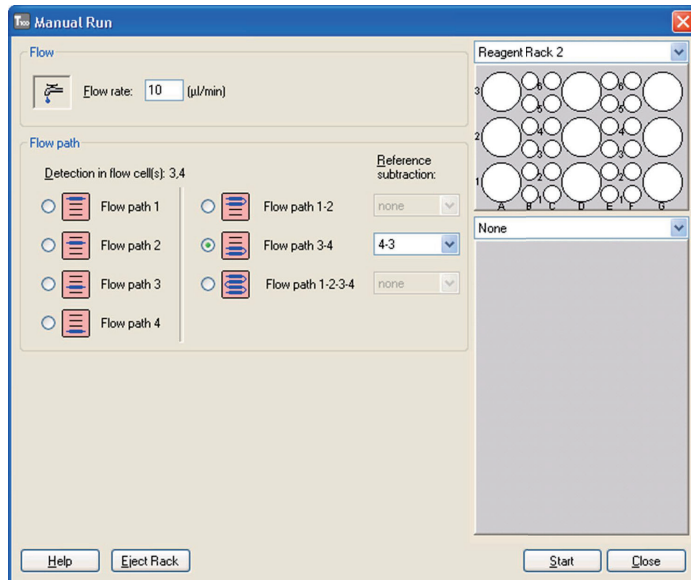
ポジティブコントロールとして、ネガティブ血清に広範囲な濃度の抗原をスパイクしたサンプルを用意いただくことで、LOQ（定量限界）を確認いただくことも可能です。この場合、後述の本測定のようにメソッドを用います。

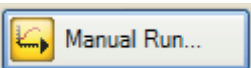
MEMO

Biacore T200 の場合：より、Manual Run を実行。

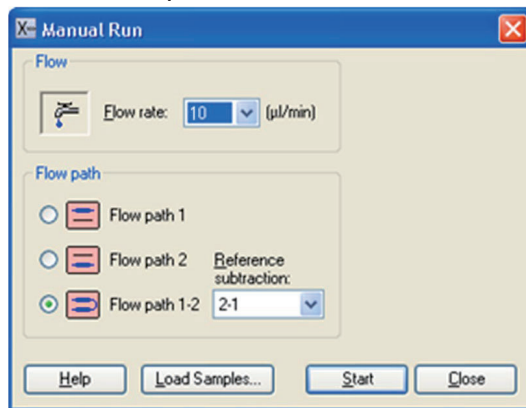
Biacore S200 の場合：より、Manual Run を実行。

はじめの流速（アナライトインジェクションは 10 $\mu\text{l}/\text{mn}.$ ）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 10 $\mu\text{l}/\text{mn}.$ ）と Flow Path 1-2 を選択して Start します。



【実験メモ】

| | サンプル名 | 希釈率／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。

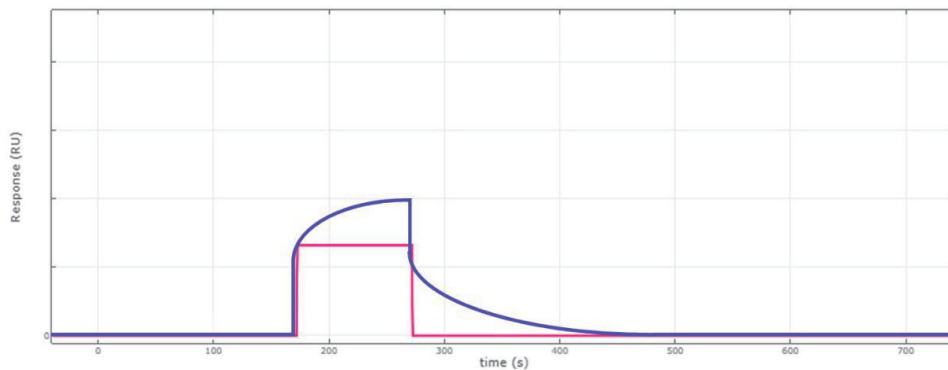
以下の非特異結合に関してチェックします。

- センサーチップに対する非特異結合
- リガンド分子に対する非特異結合

1. センサーチップに対する非特異結合

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、センサーチップに非特異結合が起きていると考えられます。ただし、前述の通り、臨床サンプルにおいてはサンプルマトリクスの影響による非特異結合をある程度避けられないことも多いです。

- 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。ランニングバッファーで可能な限り希釈して、なるべく溶液効果をおさえてください。

T 臨床サンプルではサンプルマトリクスの影響による青いセンサーグラムのような非特異結合が避けられないケースも多いですが、軽減させるためのいくつかの対処方法が考えられます（詳細次ページ）。

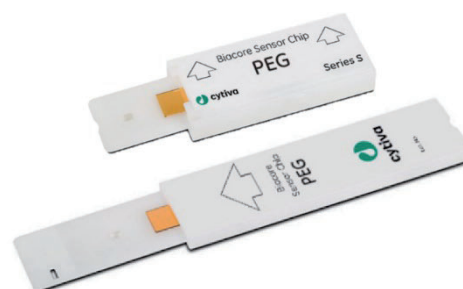
MEMO

T 青いセンサーグラムの非特異結合が見られた場合の対処方法。

- ・ 臨床サンプルの性質：特に血清サンプルの場合、レクチン様タンパク質（補体、コレクチン）などがセンサーチップのデキストランに結合することがあります。血清が十分に希釈できない場合、CM デキストランをプレミックスして非特異的結合する分子に吸収させます。下記 NSB Reducer を終濃度 1mg/mL となるようプレミックスしてください。
- ・ 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（NaCl で、～500mM 程度）。また、pH を 9.0 程度まで上昇させることで、非特異結合が抑えられたという報告があります。

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 78- 79 (2013) 224- 232
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49 (2009) 415-426

- ・ センサーチップの選択：特に血清サンプルにおいて、センサーチップ表面に結合しやすい成分が含まれている場合、Sensor Chip PEG を用いることで軽減されたという報告があります。ただし、Sensor Chip PEG のリガンド固定化量は Sensor Chip CM5 の 1/10 程度（Sensor Chip C1 相当）になりますのでご注意ください。



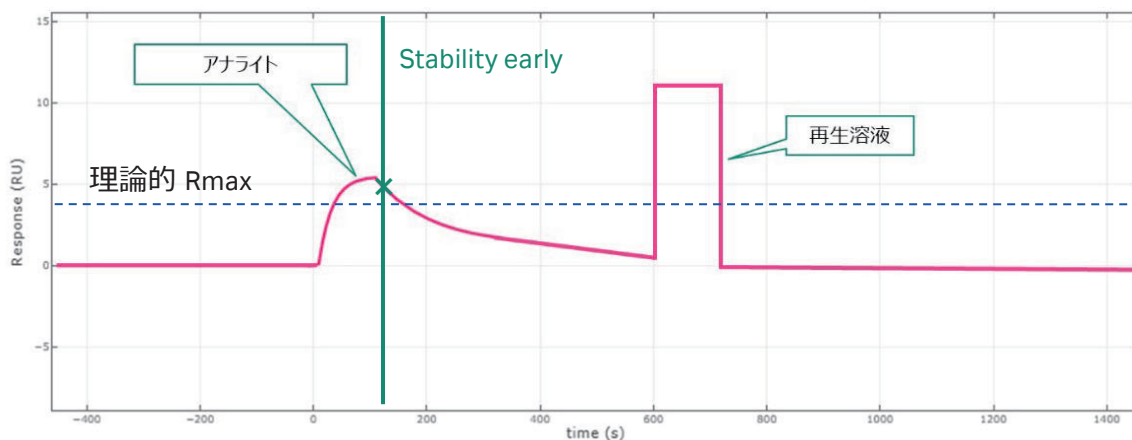
■ 製品情報

| 製品 | 包装 | コード番号 |
|--------------------------|-------|----------|
| Series S Sensor Chip PEG | 1 枚 | 29239810 |
| Sensor Chip PEG | 1 枚 | 29245706 |
| NSB Reducer | 10 ml | BR100691 |

MEMO

2. リガンド分子に対する非特異結合

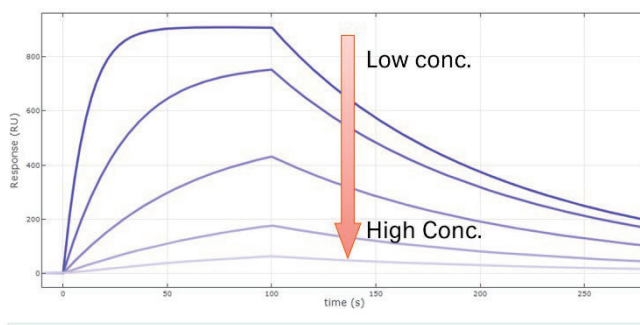
アクティブセル-リファレンスセル (Fc2-1、Fc4-3 など)、または、アクティブセルの Stability early (添加終了直後) が理論的 Rmax を超えている場合、部位特異的ではない結合が起きている可能性が考えられます。



T 臨床サンプルの場合、レスポンスが理論的 Rmax を超えることは多いです。特に、リファレンスセルへの非特異結合が大きく、アクティブセルのみで評価を行う場合、特異的結合 + 非特異結合のうちどこまでが非特異であるか判断が困難です。一方でサンプル濃度が高すぎるとも考えられますので、ランニングバッファーでさらに希釈してください。そのほか、リガンド分子の固定化量を、数千 RU 程度までさげること非特異結合が抑えられたという報告があります。また、ランニングバッファーの基礎バッファーのイオン強度を上げることで、ネガティブコントロール (ネガティブ血清) とポジティブコントロール (ネガティブ血清 + 抗原スパイク) の Z 値が改善されたという報告があります。

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 78– 79 (2013) 224– 232
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49 (2009) 415–426

i もし、理論的 Rmax を超えるサンプルについて、部位特異的な結合が含まれているか確認したい場合、競合アッセイを行います。濃度固定の臨床サンプルに、リガンドとなる検出用分子 (抗体など) を濃度何点かプレミックスしたものをアナライトとします。濃度依存的な競合阻害が確認できれば、特異的な結合を含んでいると評価できます。多数検体を測定する場合、全てチェックすることは困難ですのでコントロールサンプルでお試ください。



i ワクチンの評価や免疫原性試験 (ADA の評価) など、血中の中和抗体を評価する場合には、上記の競合アッセイのほか、結合の安定性、アイソタイプの特定といった様々な特性解析を行います。詳細はバイオダイレクトラインまでお問い合わせください。

MEMO


本測定

1. 本測定

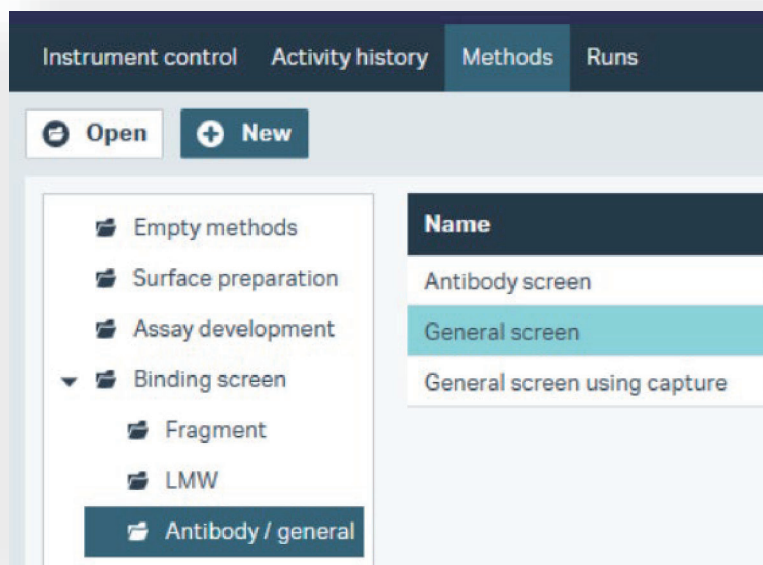
条件が整えば、本測定に移ります。通常、希釈率 1 点で Binding Screen を実施します。

【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 | | | | |

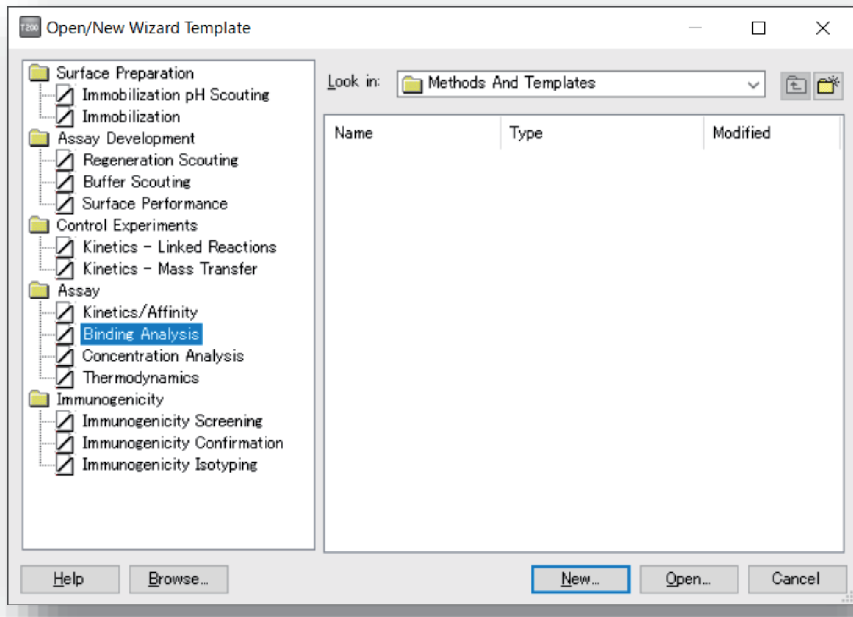
 Binding Screen を用いた本測定には、機種ごとのメソッドを用いてください。本測定では、Startup (3 回以上) に続いて各サンプルを測定します。定期的にコントロールおよび 0 濃度 (Blank) を測定します。**各システムの使用方法は各種マニュアルをご参照ください。**


Biacore 8K の場合 : Method タブの New より、Binding screen→Antibody / general→General screen を選択

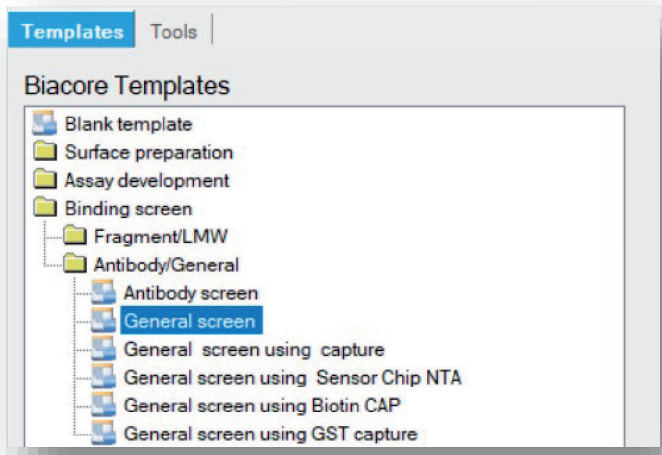


MEMO

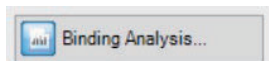
Biacore T200 の場合 :  Run Wizard→Assay→Binding Analysis を選択します。



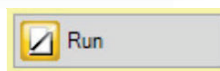
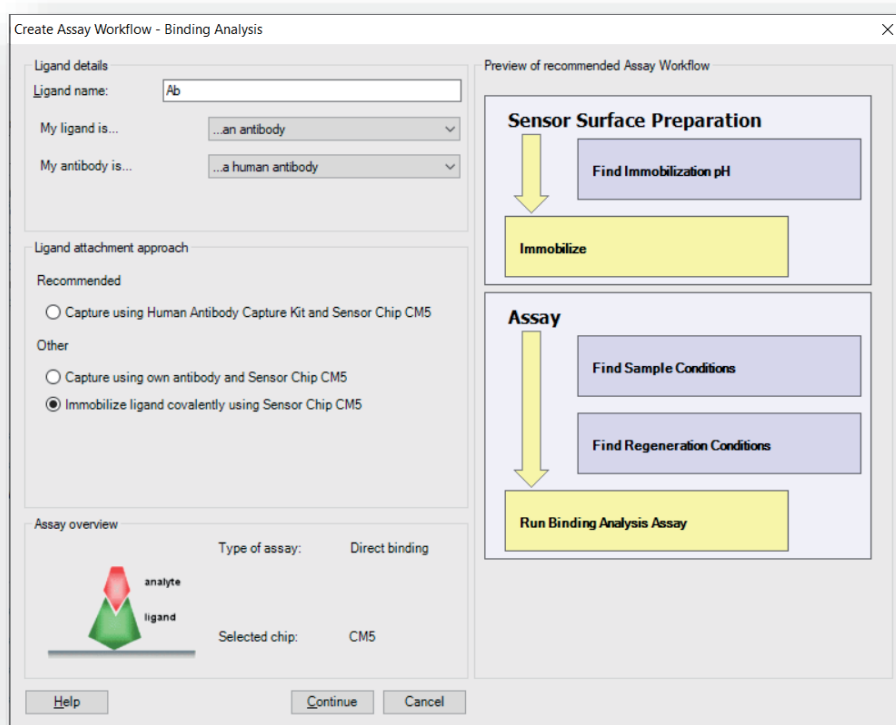
Biacore S200 の場合 :  Templates→Binding screen→Antibody/General→General screen を選択



MEMO



Biacore X100 の場合： Create Assay Workflow の Binding Analysis...より下図のようにワークフローを作成します。



作成した Workflow から、Assay→Run Binding Analysis Assay→ Run を選択

2. 臨床サンプルの評価 ～データ解析

データ解析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。

T Biacore のデータ解析では、 K_D 値の算出などではアクティブセル-リファレンスセル（Fc2-1、Fc4-3 など）のセンサーグラムが用いられますが、臨床サンプルの検出でリファレンスセルへの非特異結合が大きい場合、アクティブセルのみのセンサーグラムから Stability early のレポートポイントを比較解析することがあります。

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。バッファーボトルは測定時のランニングバッファーのまま構いません。

! 各機種における Standby Flow 時のランニングバッファー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。

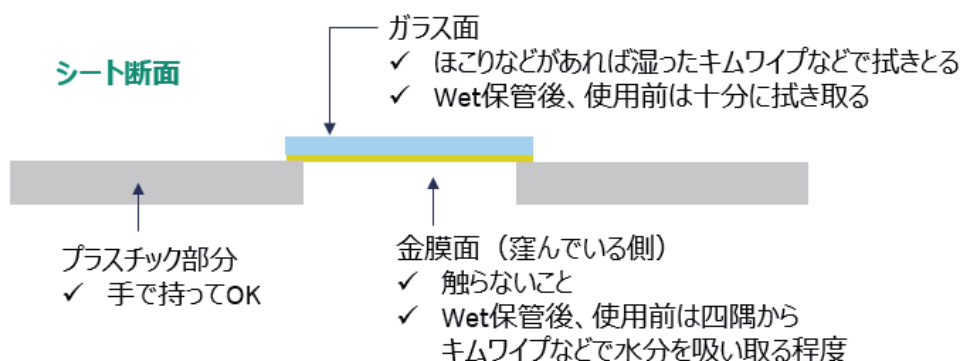
- Biacore 8K/8K+ …… 260 ml/ 24 時間
- Biacore T200/S200 …… 65 ml/ 24 時間
- Biacore X100 …… 200 ml/ 7 日間

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ーに浸し、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。

クールドなサンプルを測定した場合、電源を切る前には、Desorb and Sanitize を実施してください。

- 測定に使用した Sensor Chip を取り出す
- Sensor Chip Maintenance をセットする
- Desorb and Sanitize を実施
- Standby flow の状態で 3～4 時間放置、もしくは、超純水で溶液置換を 3 回実施
 - 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



Biacore で感染性サンプルを取り扱う際には、各ユーザー様が施設や各地域の規制に則って、適切かつ安全にサンプルの測定および廃棄を実施いただく責任があります。Cytiva からは一般的な参考情報をお届けすることはできません。必要でしたらバイオダイレクトラインにお問い合わせください。

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。