

10月号

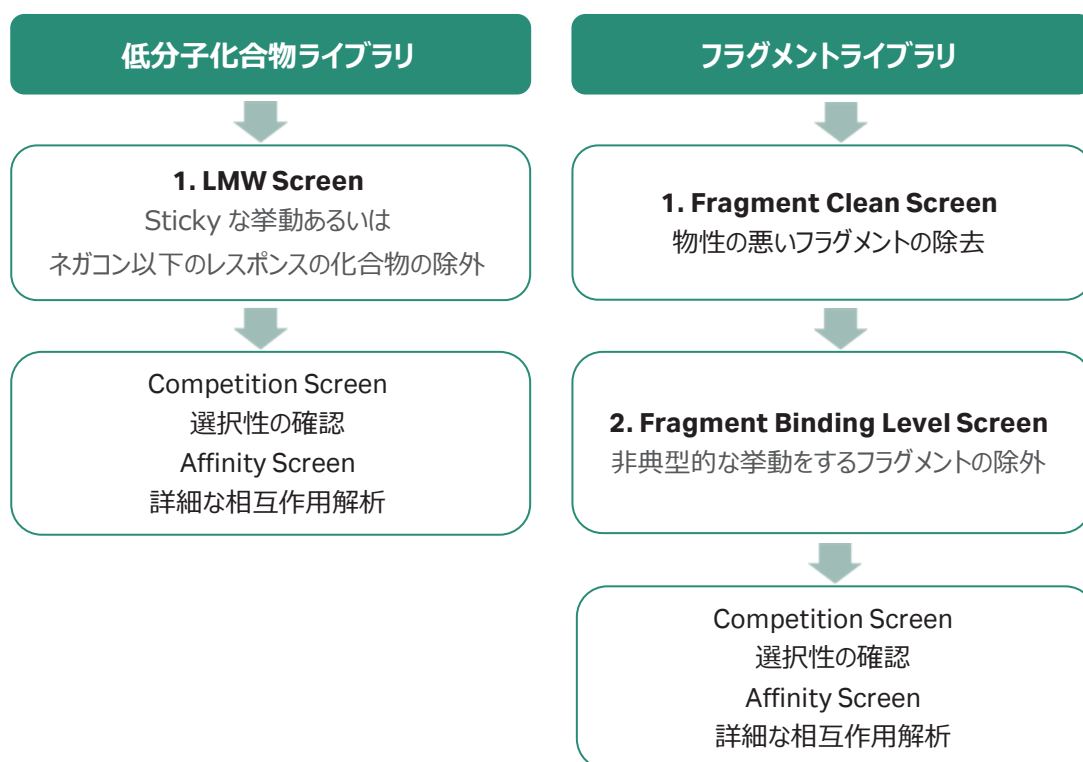
スクリーニング：低分子編

- ◆ 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
 - サンプルの希釈、測定条件の設定
- ◆ 低分子化合物スクリーニングの実施
- ◆ センサーチップの保管・装置のシャットダウン



はじめに

10月号は、はじめて低分子化合物のスクリーニングを行う場合の実験ノートです。Biacore では主に一次スクリーニング（HTS）からある程度絞られた低分子化合物ライブラリ、または、フラグメントライブラリから、ターゲットタンパク質との相互作用を指標にヒット化合物を選抜します。DMSO が溶媒である場合、アッセイ時に溶媒補正を行うこともあります。本稿では LMW Screen および Fragment Binding level screen までの手順を記載します。



低分子化合物の K_D 、 k_a 、 k_d 値の算出を目的とする場合、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。

低分子化合物スクリーニングを行う場合、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、スクリーニング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 を用いた低分子化合物スクリーニングのガイドとなります。



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

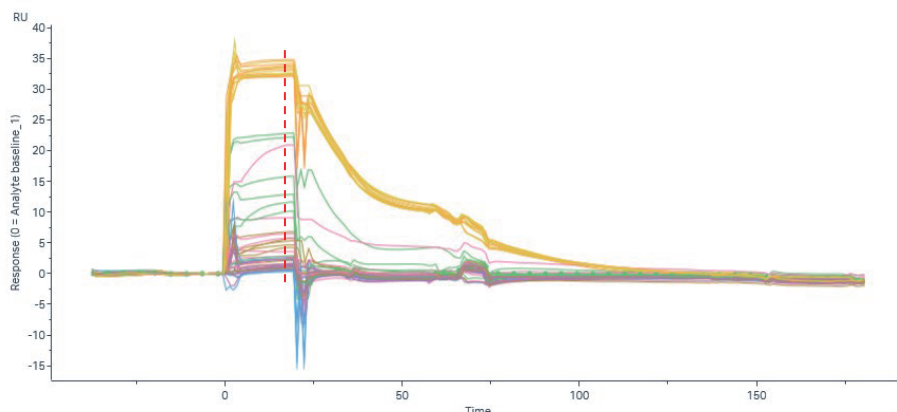


Biacore X100 をご使用の場合、溶媒補正を行うには Plus Package が必要です。ただし、設置できるバイアル数が15本と限られるため、多サンプルスクリーニングには不向きです。

MEMO

LMW Screen で得られるセンサーグラムおよびプロット

Sensor Chip NA または Sensor Chip SA を用いた低分子化合物スクリーニング（LMW Screen）では、以下のようなセンサーグラムが得られます。スクリーニングの段階では多数のサンプルを効率よく測定することが目的のため、化合物は 1 濃度だけで基本的に再生もしないで測定します。sticky なサンプルは除外し、ネガティブコントロールと比較してレスポンスが見られるかどうかで絞り込んでいきます。

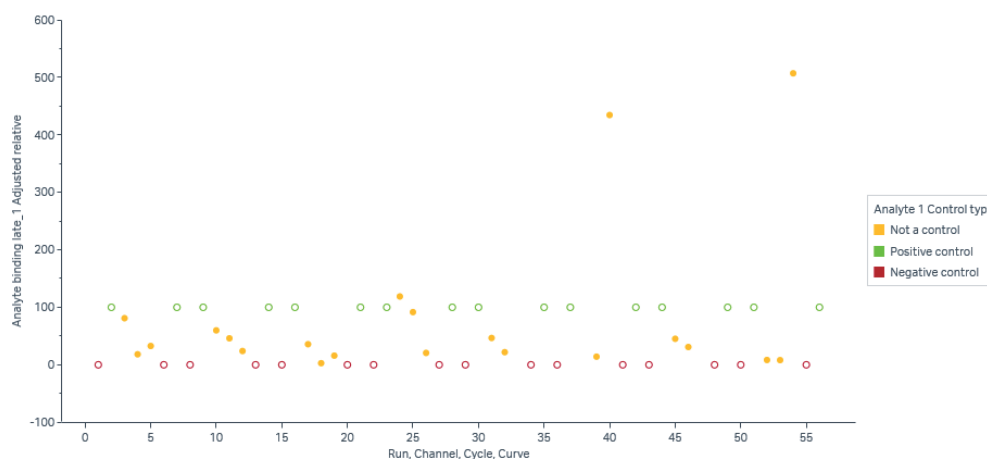


フラグメントライブラリにおける Fragment Clean Screen および Fragment Binding Level Screen の場合、典型的なフラグメントでは非常に解離が速いため、箱型形状のセンサーグラムを示します。

多サンプルの結合レスポンスを比較する場合、Evaluation Software を用いて以下のようなスキャタープロットを作成して、データを評価します。

Binding Late (Adjusted relative) vs 各サンプル

X 軸に各サンプル（Cycle、Channel など）、Y 軸に Binding late のレスポンス（上図赤破線）を設定します。低分子化合物では各種 Adjustment 機能を用いて、分子量、リガンド活性（コントロール化合物のレスポンス）の減衰などを補正し、一律の閾値でヒットが選抜できるようにします。



各種補正機能に関しては、こちらの記事もご参考にしてください。

低分子スクリーニングの補正機能について

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/contact/biacore-concierge/articles/correction-function-for-small-molecule-screening.html>



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

低分子化合物スクリーニングやフラグメントスクリーニングを実施する場合、タンパク質をリガンドとして固定化し、低分子化合物またはフラグメントをアナライトとします。


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を数 mg/ml、アナライトを各 10mM 以上など、可能な限り高濃度なサンプルをご用意ください。

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				

 低分子化合物またはフラグメント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。

 低分子化合物やフラグメントが 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

低分子化合物スクリーニング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
- 紙製のウェス（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、ただし酸などの再生溶液の添加でベースラインが乱れるため、今回のような低分子/フラグメントスクリーニングや、再生操作が要らないような解離の速い相互作用測定に用います。

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



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+, 10X 0.2 M phosphate buffer with 27 mM KCl, 1.37 M NaCl and 0.5% Surfactant P20 (Tween 20)
- PBS, 10X 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。吸湿するとセンサーグラムが乱れるので保管状態と使用期限に注意してください。

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 μl)
- 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. 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 90μL と NHS-biotin 溶液 10μL 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 ug に対してビオチン標識を行います。

【実験メモ】

	μg	nmol	分子量
タンパク質 (90 μL)			
NHS-Biotin (10 μL)			

* 質量 (μg) / 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。

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

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_l (mg/mL) = 100 μL 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

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	
--------	--

3. 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. 800 x g 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. 800 x g 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

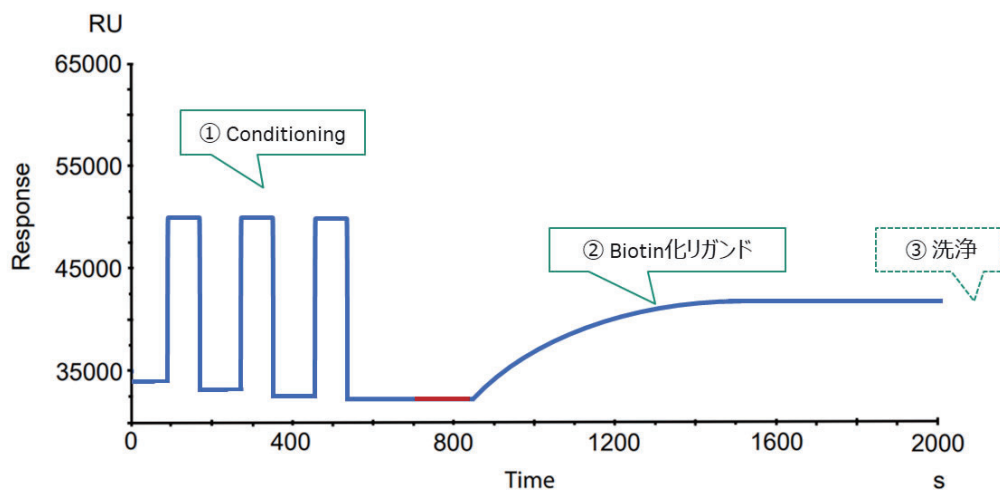
Biotin 化リガンドの固定化

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。③流路を洗浄します。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。



③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。低分子化合物スクリーニングでは、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+, 10X 0.2 M phosphate buffer with 27 mM KCl, 1.37 M NaCl and 0.5% Surfactant P20 (Tween 20)
- PBS, 10X 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）。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

 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 NA

Series S Sensor chip SA

* Biacore 8K,8K+,T200,S200 の場合



Sensor chip SA

* Biacore X100 の場合

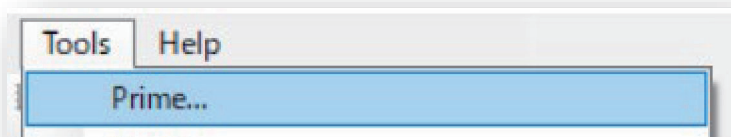
システムのバッファー置換

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

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。**

i 化合物スクリーニングにおいては得られるレスポンスが小さいため、十分量のリガンドタンパク質の固定化が必要です。スクリーニングでは可能な限り固定化します。

Sensor Chip SA および Sensor Chip NA における固定化

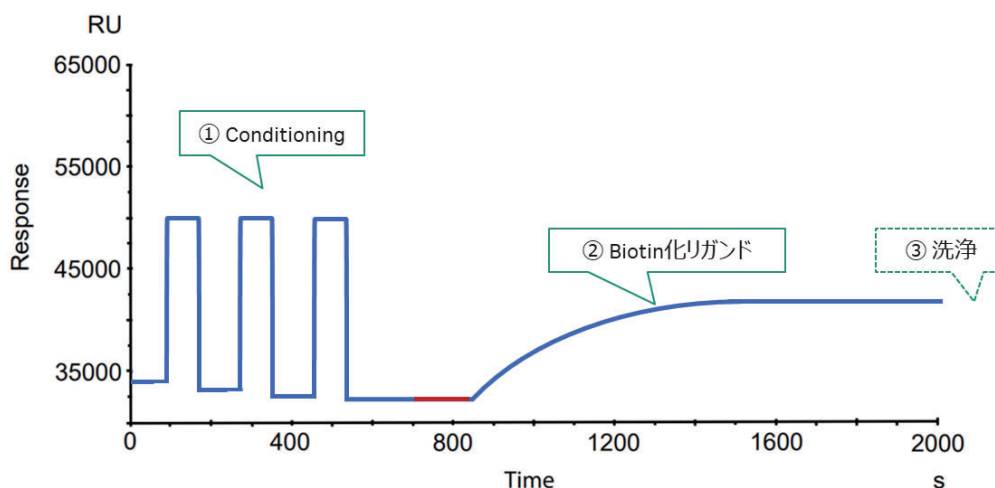
Sensor Chip SA における固定化は、機種ごとの方法を用いてください。Sensor Chip NA における固定化はプリセットされておりませんので編集が必要です。**各 Sensor Chip による固定化方法は各種マニュアルをご参照ください。** 各種 Sensor Chip の Procedure step は以下の通りです。

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 レスポンスが飽和するまで、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 レスポンスが飽和するまで、10 μ l/min.
- 洗浄溶液：50% Isopropanol in 1 M NaCl and 50 mM NaOH 1 回



i 低分子化合物スクリーニングを行う場合、リガンドの結合レスポンスが飽和するまでに十分に時間をとります。平均的なサイズのタンパク質では、8,000~10,000 RU 程度固定化されます。

MEMO

i 以下の式を参考にして、ポジティブコントロール化合物（アナライト）における理論的 Rmax を計算してみます。目安として 20RU 程度以上得られると安心です。

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

【実験メモ】

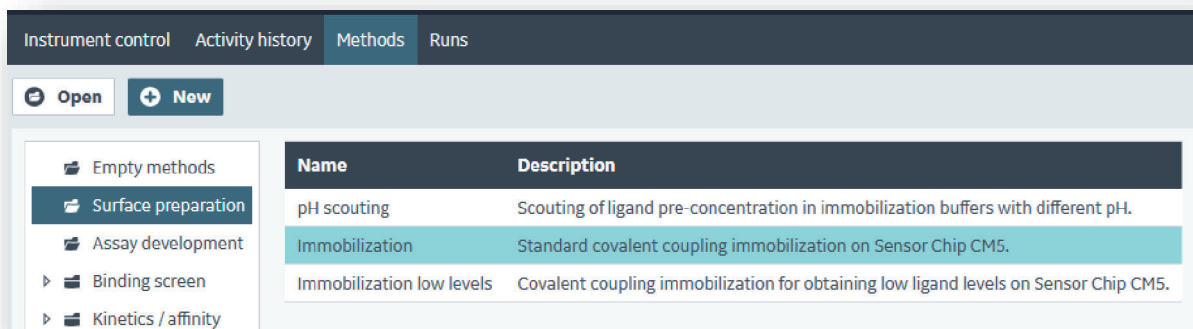
	分子量 (Da)	理論的 Rmax (RU) / リガンドの固定化量 (RU)
アナライト		理論的 Rmax =
リガンド		固定化量 =

! 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。

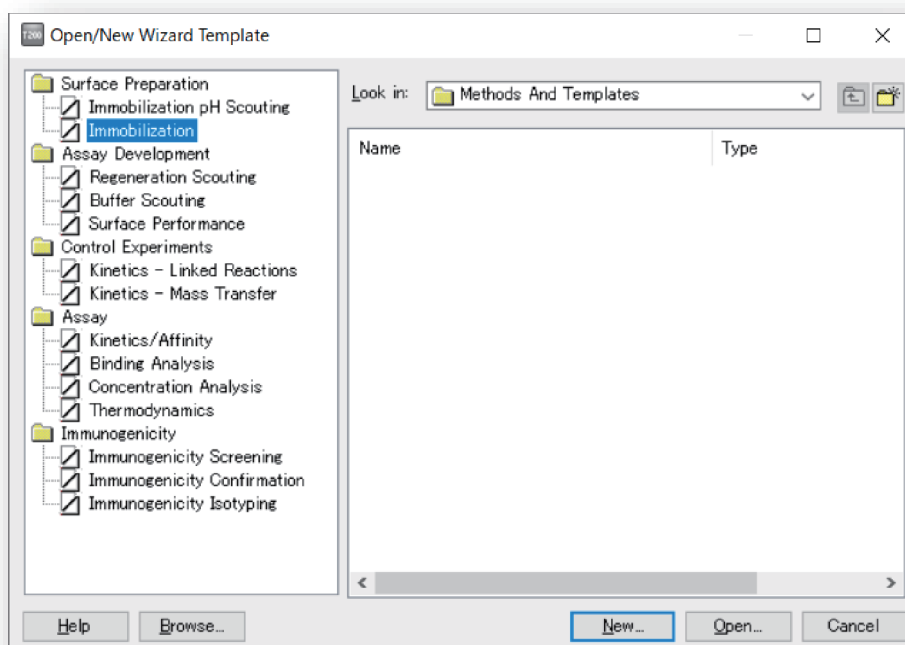
T 固定化量が十分でない場合、追加の固定化が可能です。同じメソッドを使用する場合、コンディショニング溶液としてランニングバッファーを用いてください。洗浄溶液は同様に流します。

MEMO

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

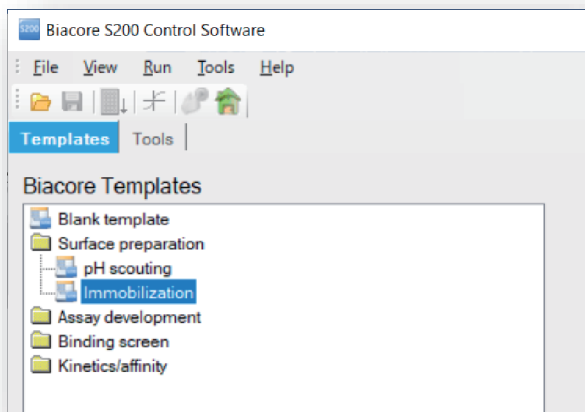


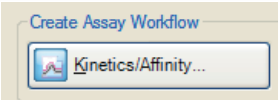
Biacore T200 の場合 : Wizards より、Surface preparation→Immobilization→New を選択

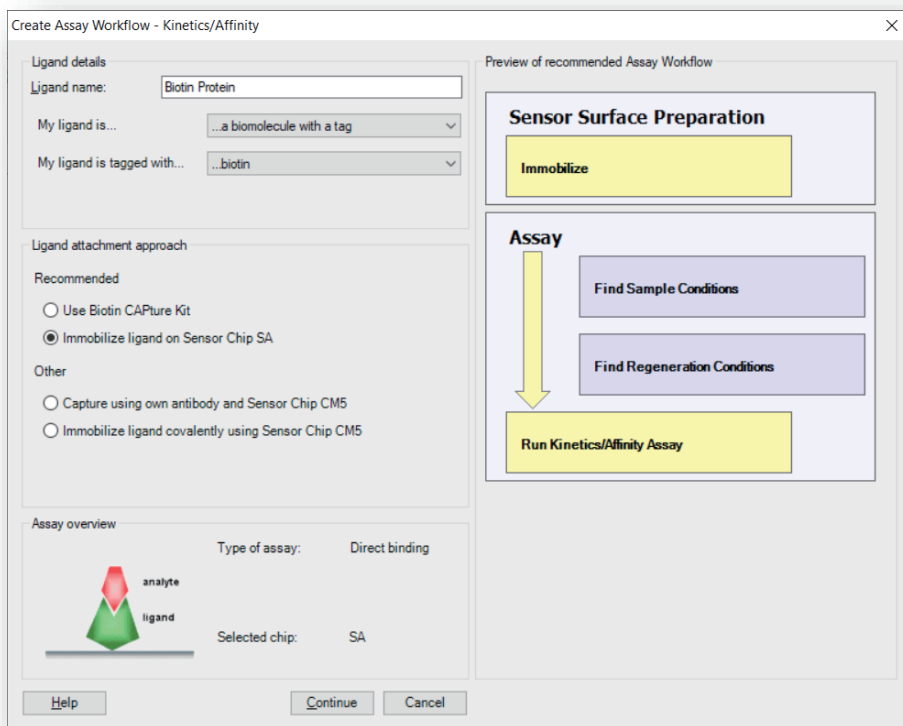



MEMO

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 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

Immobilization result							
Chip SA							
Date	Channel	Flow cell	Chemistry	Method	Ligand	Response bound (RU)	Response final (RU)
3/28/2022 5:42:41 PM	1	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation		
3/28/2022 5:42:41 PM	1	2	SA-biotin capture	Immobilization	Enzyme	8373.0	8371.3
3/28/2022 5:42:41 PM	2	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation		
3/28/2022 5:42:41 PM	2	2	SA-biotin capture	Immobilization	Enzyme	8342.4	8340.9
3/28/2022 5:42:41 PM	3	1	SA-biotin capture	Immobilization	Activation/Deactivation		
3/28/2022 5:42:41 PM	3	2	SA-biotin capture	Immobilization	Enzyme	8347.9	8338.3

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】

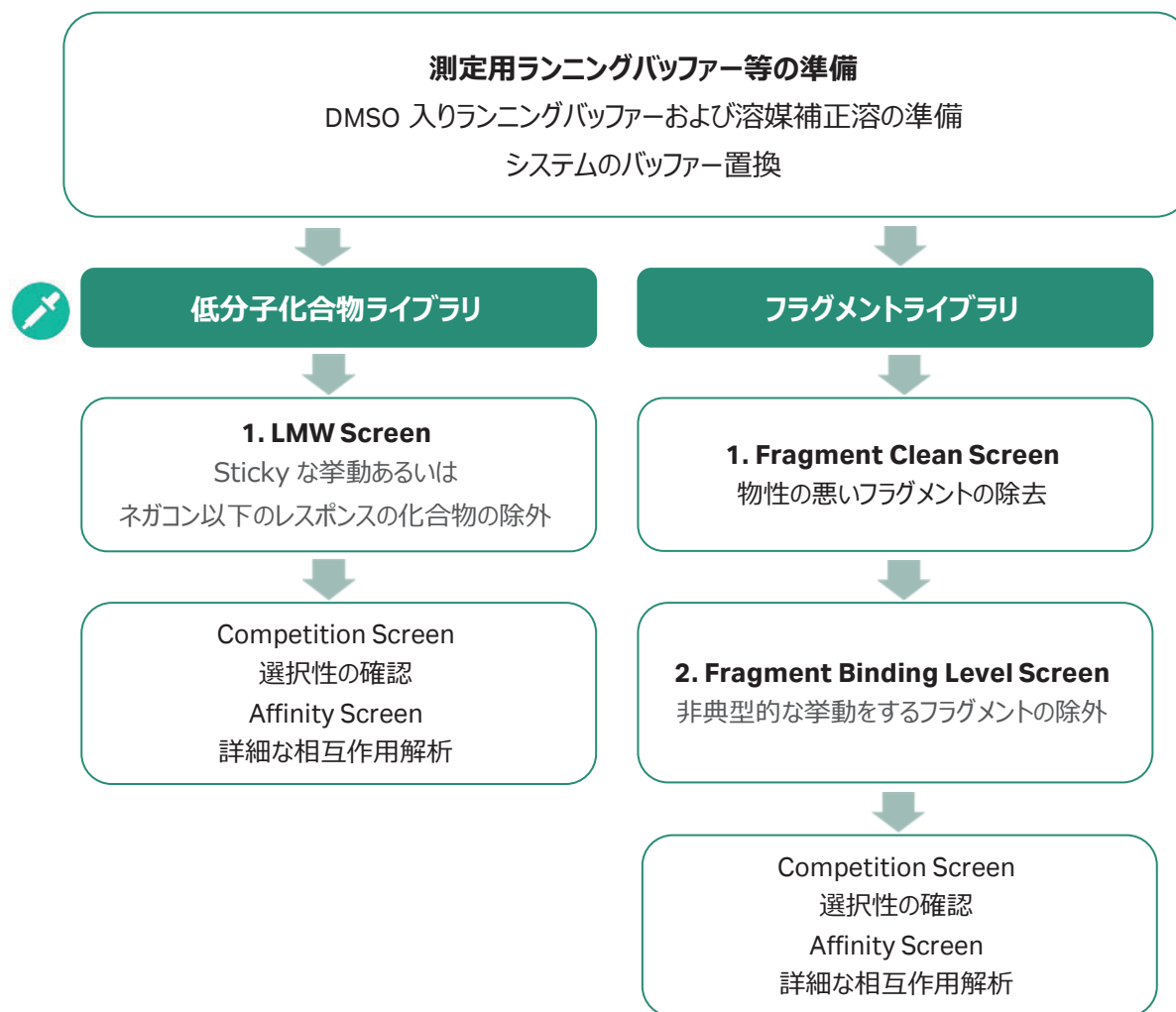
	リガンド分子固定化量 (RU)
Fc1	
Fc2	

MEMO

測定系セットアップ ～固定化以降

あらためて固定化以降のフローをご確認ください。低分子化合物ライブラリの場合、LMW Screen を実施します。フラグメントの場合、はじめのステップで物性の悪い化合物を除く Fragment Clean Screen を行います。その後、結合レベルを指標にした Fragment Binding Level screen を行います。

LMW Screen および Fragment Binding Level screen の際には DMSO 補正を行うための補正溶液などの準備が必要です。



本稿では LMW Screen および Fragment Binding Level screen までの手順を記載します。

MEMO

1. 測定用ランニングバッファー等の準備

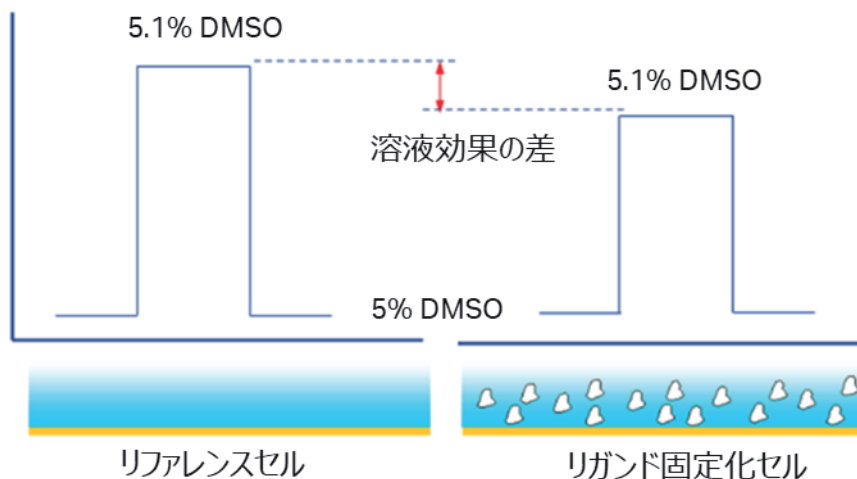
DMSO 入りランニングバッファーおよび溶媒補正溶液の準備

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、低分子化合物スクリーニングでは、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 濃度を等しく調製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+, 10X 0.2 M phosphate buffer with 27 mM KCl, 1.37 M NaCl
and 0.5% Surfactant P20 (Tween 20)
- PBS, 10X 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。要時調整でご利用ください。

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、0.22μm フィルターろ過を行います。

① 2000 ml の 1.05× 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 (~10 ml)	6.0% DMSO (~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 μl	2 x 1500 μl	3 x 1500 μl
6.0% DMSO	3 x 1500 μl	2 x 1500 μl	1500 μl	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+ … 500 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

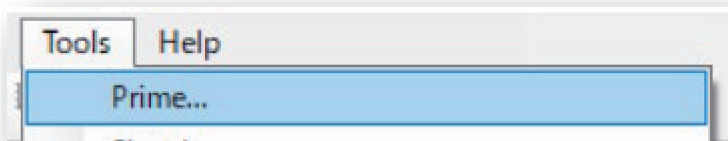
システムのバッファー置換

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

低分子化合物ライブラリのスクリーニング

1. LMW Screen における化合物濃度・添加時間の設定

低分子化合物（アナライト）の調整

LMW Screen の場合、アナライト濃度は 1 点で構いません。以下を目安にランニングバッファーで希釈します。また、DMSO ストックされたサンプルの場合、終濃度での DMSO 含有量は 5%以下程度とします。

- 低分子化合物 30 μ M 程度

【実験メモ】

	濃度	DMSO 含有量 (%)
低分子化合物		

 解析時に、各化合物の分子量情報が必要です。

 サンプルと同一濃度のコントロール化合物（ポジコン／ネガコン）を用意します。

サンプル添加・解離時間の目安

LMW Screen を行う場合の、目安は以下の通りです。

- 低分子化合物 流速：30 μ l/min.以上
 添加時間：30～60 秒
 解離時間：60 秒程度

MEMO

2. LMW Screen 実施

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

【実験メモ】

	濃度	添加時間 (秒)	解離時間 (秒)
低分子化合物			

DMSO ストックされた低分子化合物の場合、溶媒補正が必要です。ランニングバッファーで希釈した低分子化合物の DMSO 含有量が 5% の場合、ランニングバッファーで希釈した 6% DMSO と 4.5% DMSO を用意します。

【実験メモ】

	最終濃度化合物 DMSO 含有量 (%)	溶媒補正用 高 DMSO (%)	溶媒補正用 低 DMSO (%)	溶媒補正用 DMSO 濃度段階
DMSO 濃度				

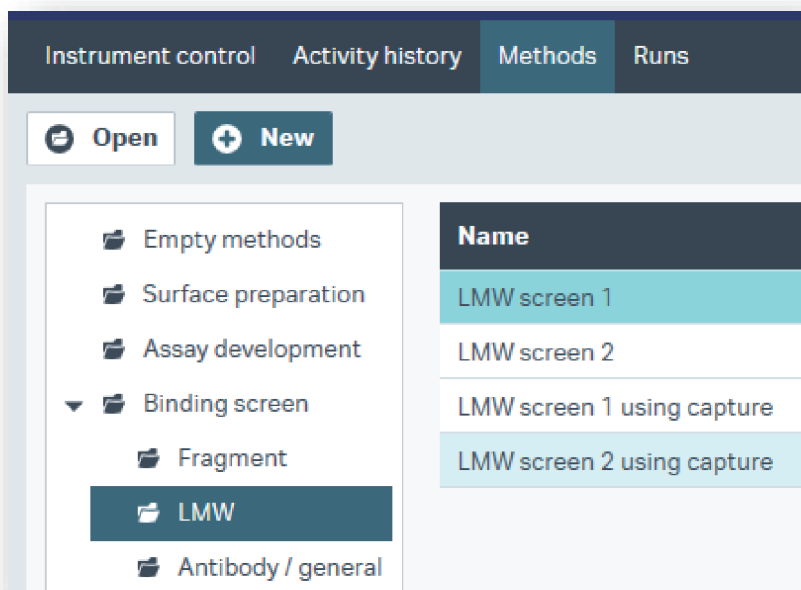
DMSO ストックされた低分子化合物の場合、各サイクルで 50% DMSO による Extra wash の実施を強く推奨します。Extra wash は、流路に残存した低分子化合物を洗い流し、次の Cycle へのキャリーオーバーを防止します。


50% DMSO

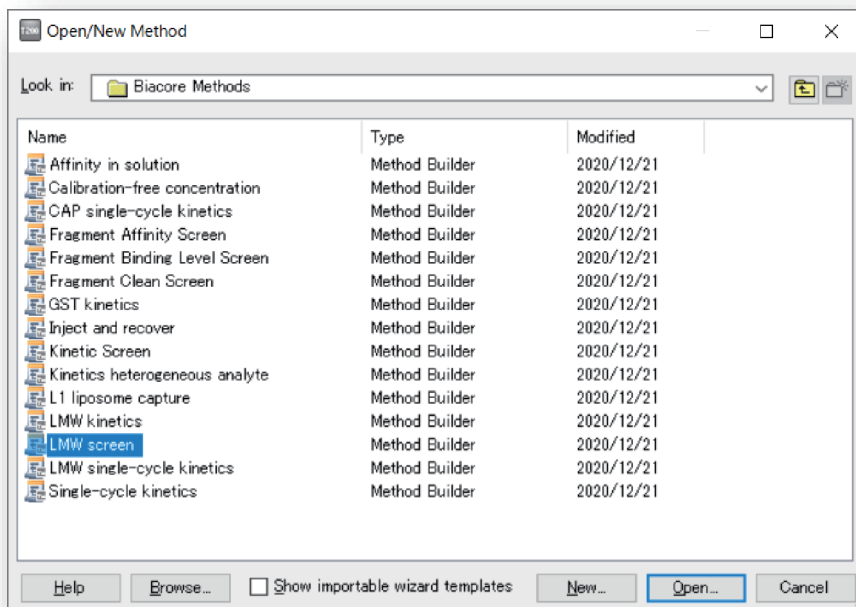
MEMO

i LMW 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 Solvent Correction（溶媒補正）、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→LMW→LMW Screen1 または 2 を選択。

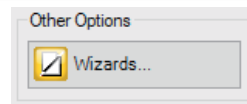
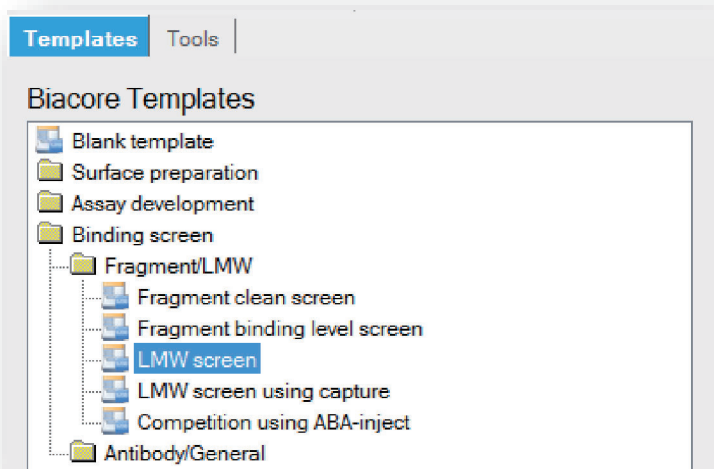


Biacore T200 の場合：  Methods→Biacore Methods→LMW screen を選択。

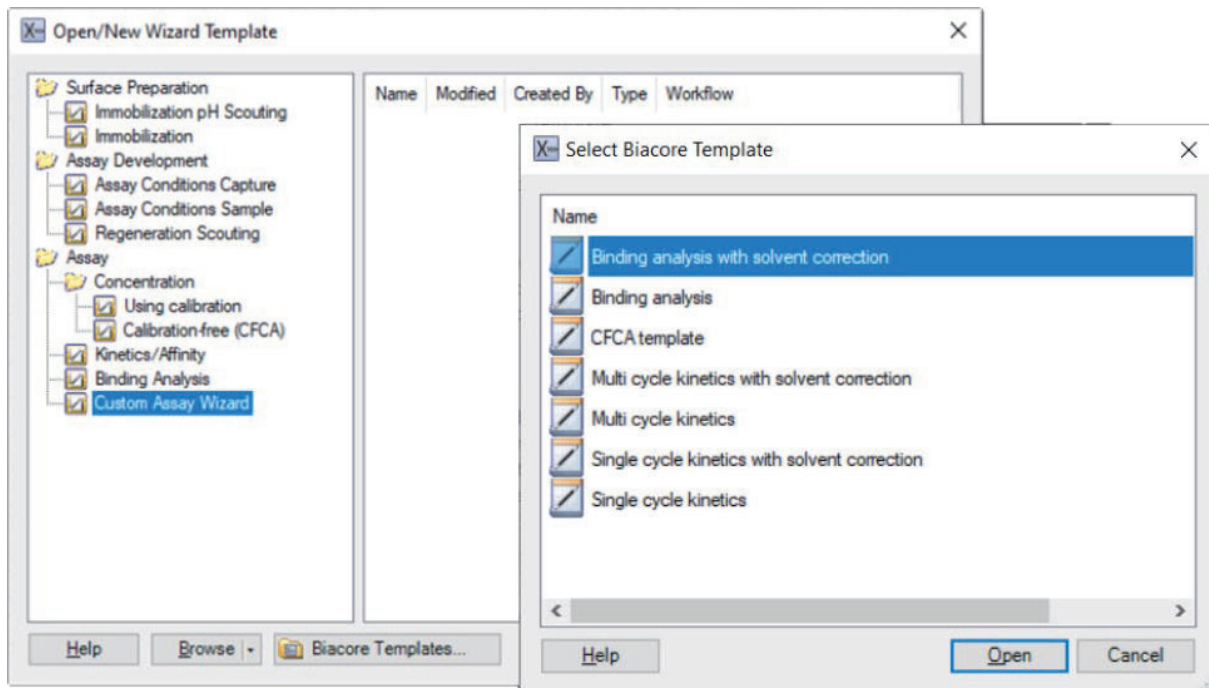


MEMO

Biacore S200 の場合 : **Templates** Templates→Binding screen→Fragment/LMW→LMW screen を
選択。



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



MEMO

3. LMW Screen 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。

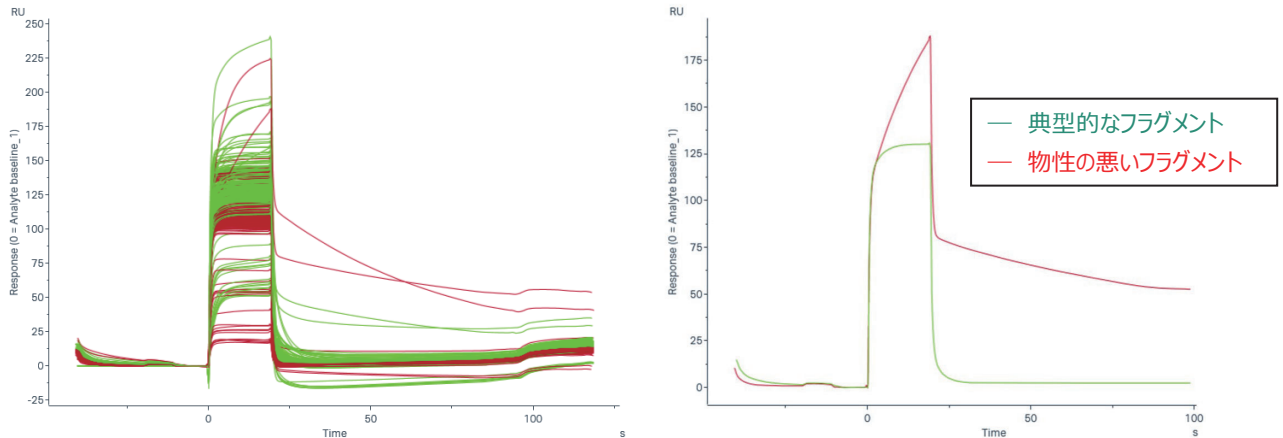
「はじめに」の章に記載された「本測定で得られるセンサーグラムおよびプロット」をあらためてご確認ください。図のようなプロットを作成して、目的の低分子化合物を選抜します。**各 Evaluation Software の使用方法是各種マニュアルをご参照ください。**

MEMO

🔍 フラグメントライブラリのスクリーニング

1. Fragment Clean Screen とは

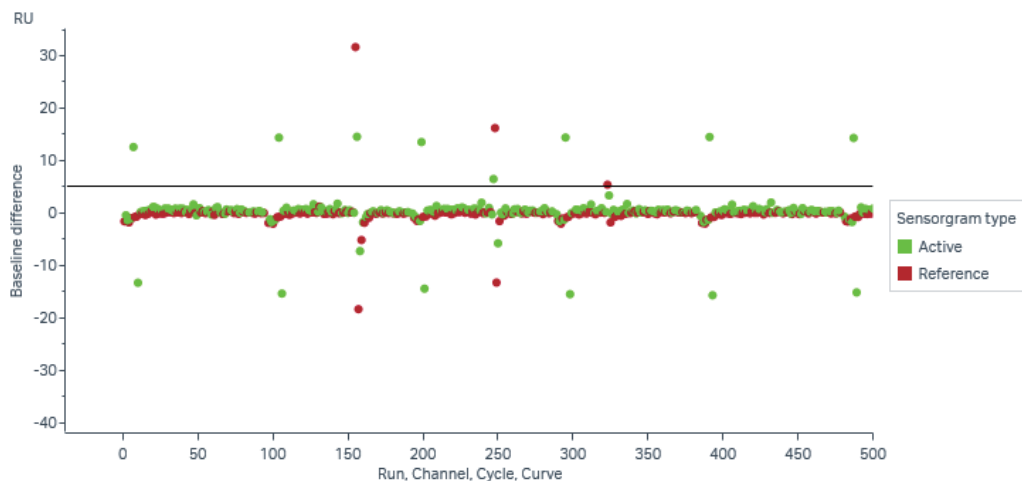
フラグメントライブラリのスクリーニングを行う場合、はじめのステップで物性の悪い化合物を除く Fragment Clean Screen を行います。濃度 1 点でフラグメントを添加し下図左のようなセンサーグラムを得ます。再生や溶媒補正も不要です。典型的なフラグメントは通常下図右の緑のように結合解離の速い箱型のセンサーグラムを示します。赤のセンサーグラムのように添加後のベースラインが高くなるフラグメントは、物性が悪いとされ、この段階で除外します。



Fragment Clean Screen では、Evaluation Software を用いて以下のようなスカッタープロットを作成して、データを評価します。

Baseline difference vs 各サンプル

X 軸に各サンプル（Cycle、Channel など）、Y 軸に Baseline difference のレスポンス（前 Cycle との Baseline 差分）を設定します。閾値を設定し、レスポンスが高いものを物性の悪いフラグメントとして除外します。



MEMO

3. Fragment Clean Screen 実施

条件が整えば、本測定に移ります。濃度 1 点で Fragment Clean Screen を実施します。

【実験メモ】

	濃度	添加時間 (秒)	解離時間 (秒)
フラグメント			

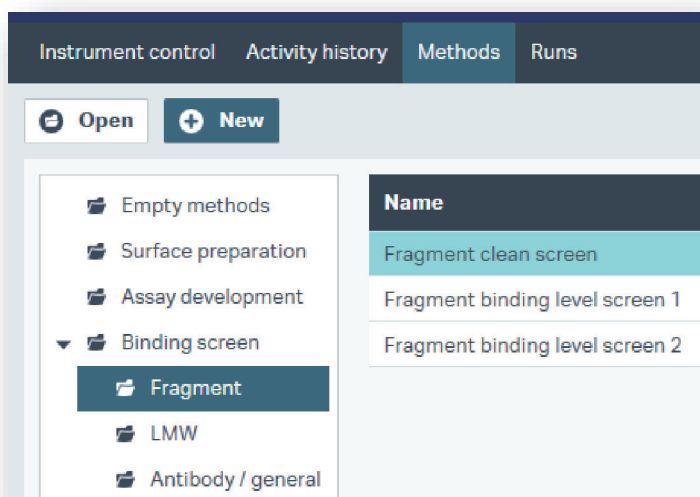
i DMSO ストックされたサンプルであっても Fragment Clean Screen では溶媒補正は必要ありません。

DMSO ストックされたのフラグメントの場合、各サイクルで 50% DMSO による Extra wash の実施を強く推奨します。Extra wash は、流路に残存した低分子化合物を洗い流し、次の Cycle へのキャリーオーバーを防止します。

50% DMSO

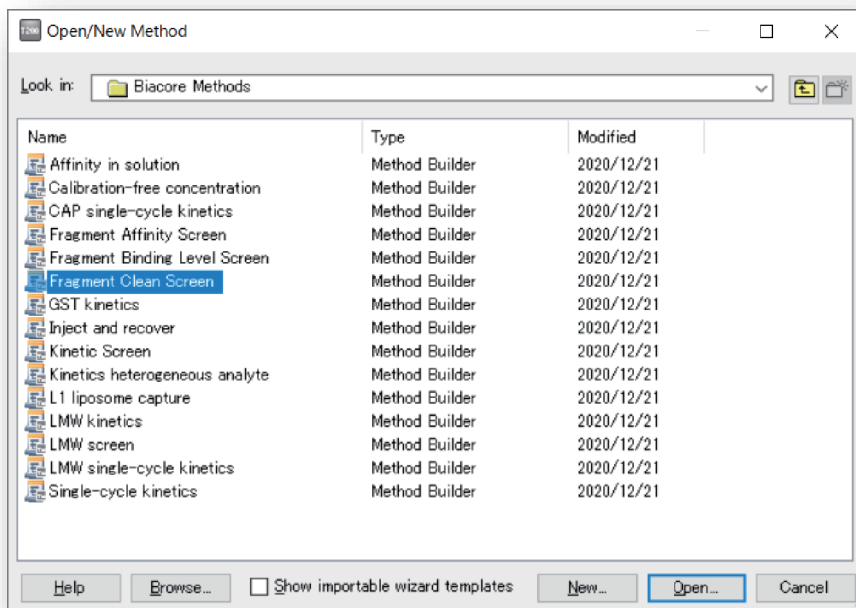
i Fragment Clean Screen を用いた測定には、機種ごとのメソッドを用いてください。本測定では、Startup (3 回以上) に続いて各サンプルを測定します。Solvent Correction (溶媒補正)、コントロールは不要です。**各システムの使用方法は各種マニュアルをご参照ください。**


Biacore 8K の場合 : Method タブの New より、Binding screen→Fragment→Fragment Clean Screen を選択

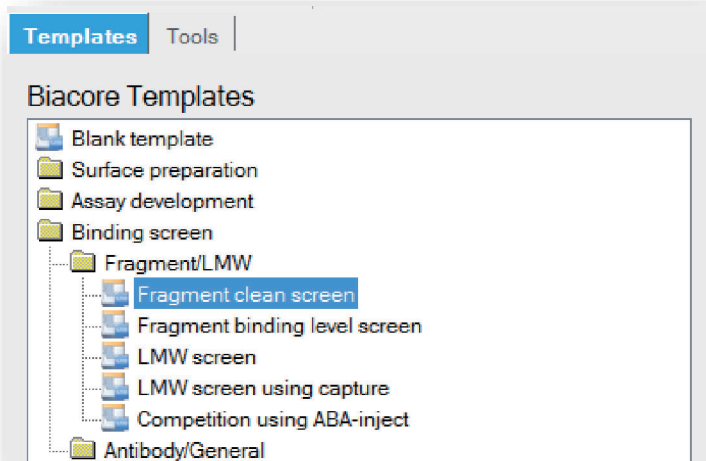


MEMO

Biacore T200 の場合：  Methods→Biacore Methods→Fragment Clean screen を選択。



Biacore S200 の場合：  Templates→Binding screen→Fragment/LMW→Fragment Clean screen を選択



4. 低分子化合物スクリーニングの評価 ～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。

本章に記載された「1. Clean Screen とは」をあらためてご確認ください。図のようなプロットを作成して、物性の悪いフラグメントを除外します。**各 Evaluation Software の使用法は各種マニュアルをご参照ください。**

MEMO

5. Fragment Binding Level Screen 実施

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

【実験メモ】

	濃度	添加時間 (秒)	解離時間 (秒)
低分子化合物			

DMSO ストックされたフラグメントの場合、溶媒補正が必要です。ランニングバッファーで希釈した低分子化合物の DMSO 含有量が 5% の場合、ランニングバッファーで希釈した 6% DMSO と 4.5% DMSO を用意します。

【実験メモ】

	最終濃度フラグメント DMSO 含有量 (%)	溶媒補正用 高 DMSO (%)	溶媒補正用 低 DMSO (%)	溶媒補正用 DMSO 濃度段階
DMSO 濃度				

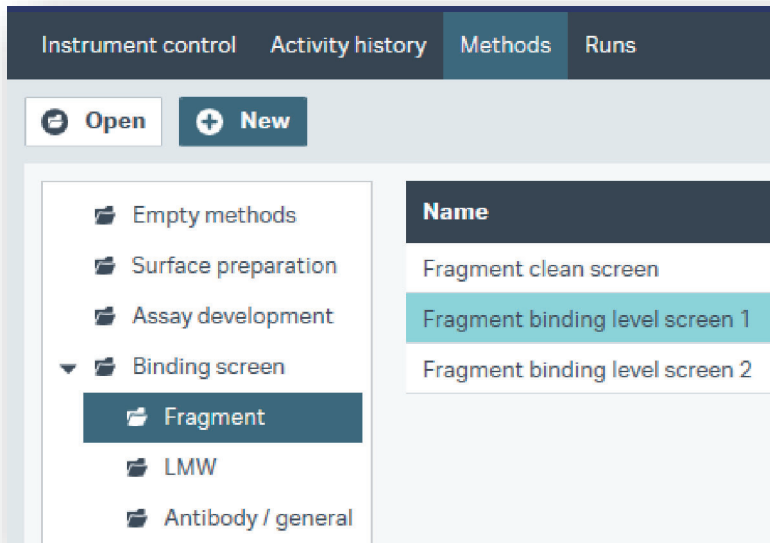
DMSO ストックされた低分子化合物の場合、各サイクルで 50% DMSO による Extra wash の実施を強く推奨します。Extra wash は、流路に残存したフラグメントを洗い流し、次の Cycle へのキャリーオーバーを防止します。

- 50% DMSO

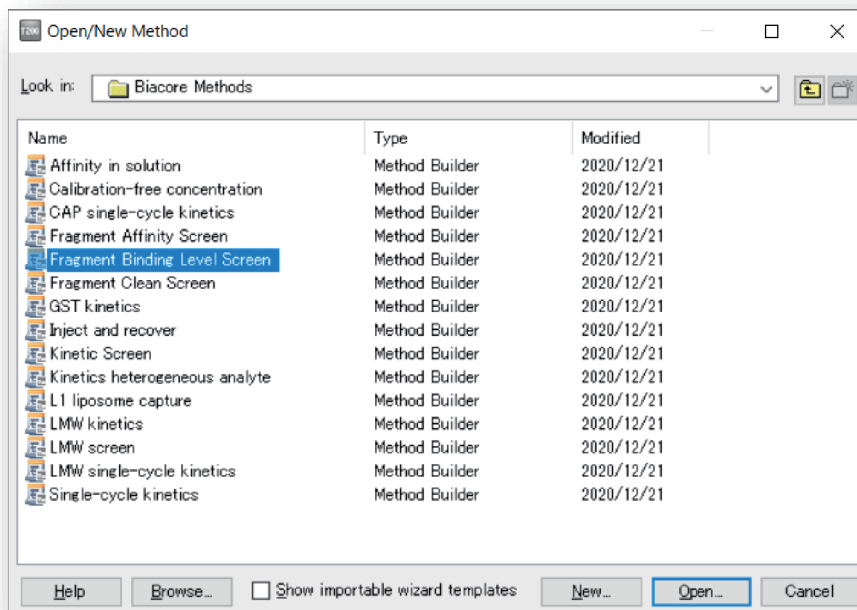
MEMO

i Fragment Binding Level 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 Solvent Correction (溶媒補正)、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→Fragment→Fragment binding level screen1 または 2 を選択

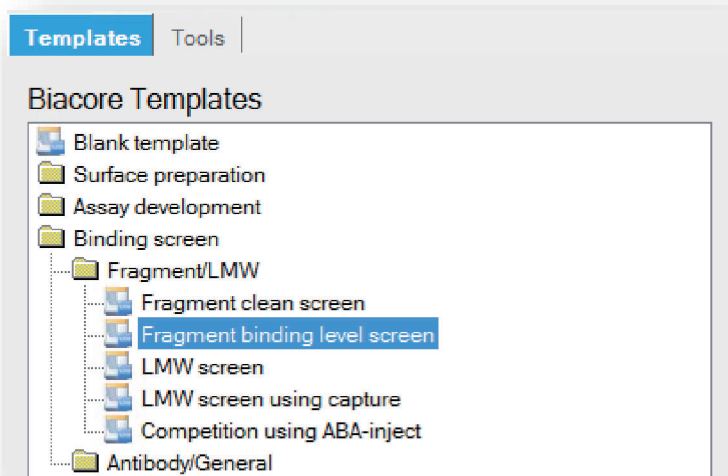


Biacore T200 の場合 :  Methods→Biacore Methods→Fragment Binding Level screen を選択。



MEMO

Biacore S200 の場合 : **Templates** Templates→Binding screen→Fragment/LMW→Fragment binding level screen を選択



MEMO

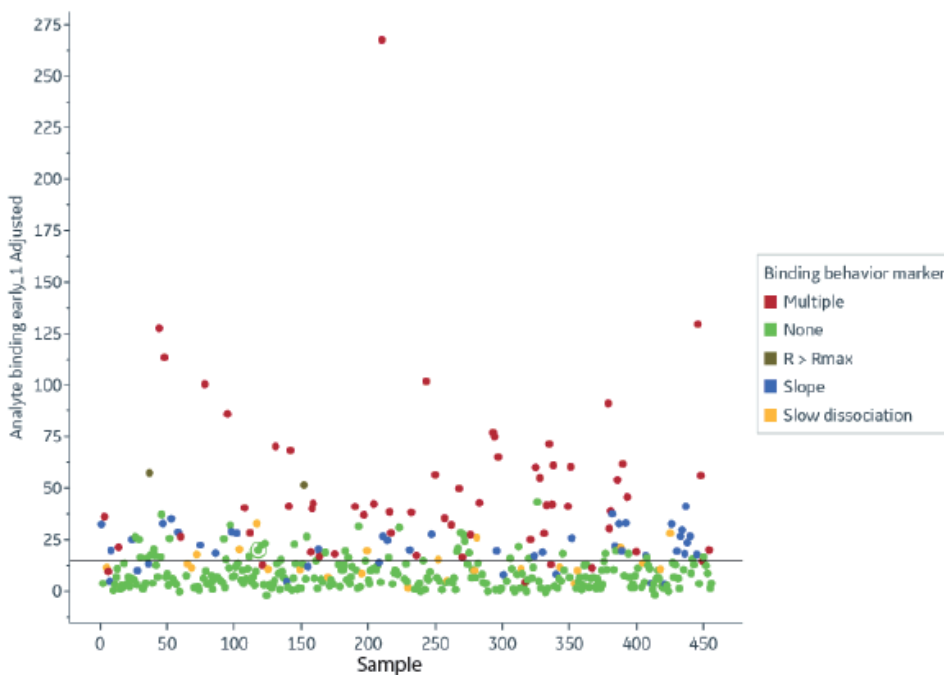
6. Fragment Binding Level Screen の評価 ～データ解析

データ解析にはシステム付属の Evaluation Software を用います。

「はじめに」の章に記載された「本測定で得られるセンサーグラムおよびプロット」をあらためてご確認ください。図のようなプロットを作成して、目的の低分子化合物を選抜します。**各 Evaluation Software の使用方法は各種マニュアルをご参照ください。**



Biacore Insight Evaluation Software や Biacore S200 Evaluation Software では、センサーグラム形状を自動判別し、フラグメント典型的な箱型形状（緑：None）センサーグラムとそれ以外にフラグを立てることができます。



MEMO

センサーチップの保管・装置のシャットダウン

スクリーニングに使用した Sensor Chip は使い切りにするケースも多いですが、システムから取り出した後に再使用することも可能です。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。

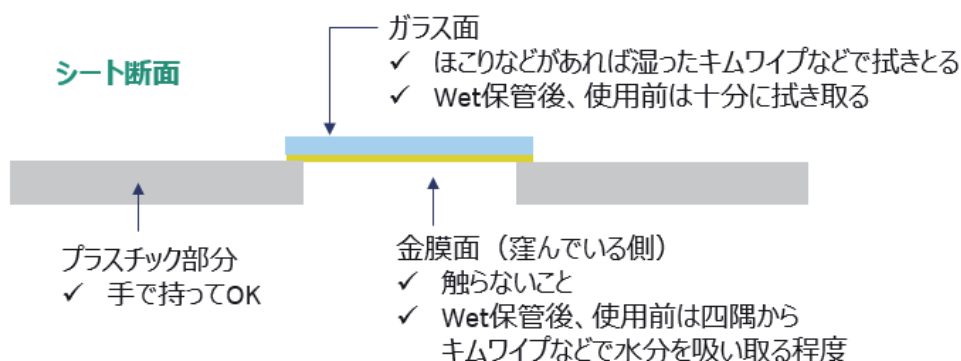
- Biacore 8K/8K+ …… 260 ml/ 24 時間
- Biacore T200/S200 …… 65 ml/ 24 時間
- Biacore X100 …… 200 ml/ 7 日間

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。