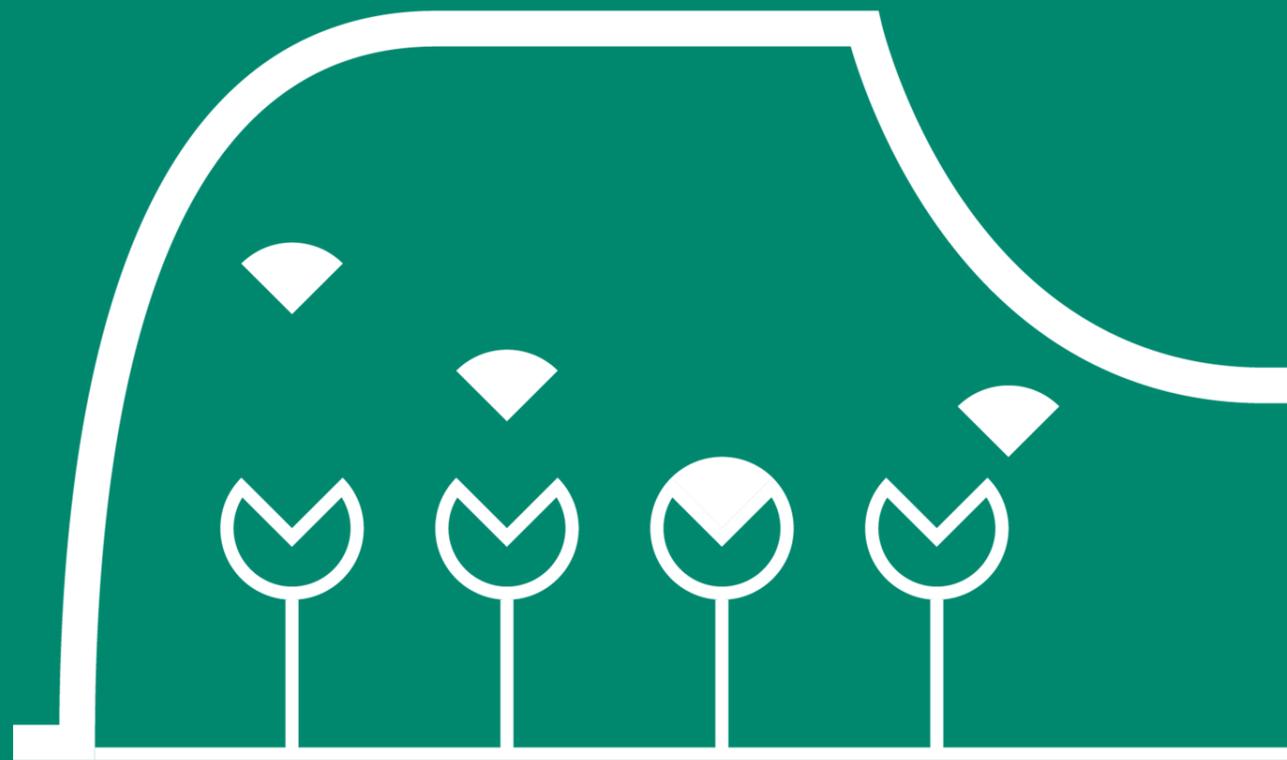




Biacore™ 測定・解析の 固定化に伴う特徴・留意点



Agenda

1. リガンドの活性維持
2. アビディティ (Avidity) の回避
3. マストランスポートリミテーション (MTL)

1

リガンドの活性維持

固定化法の2つのカテゴリー

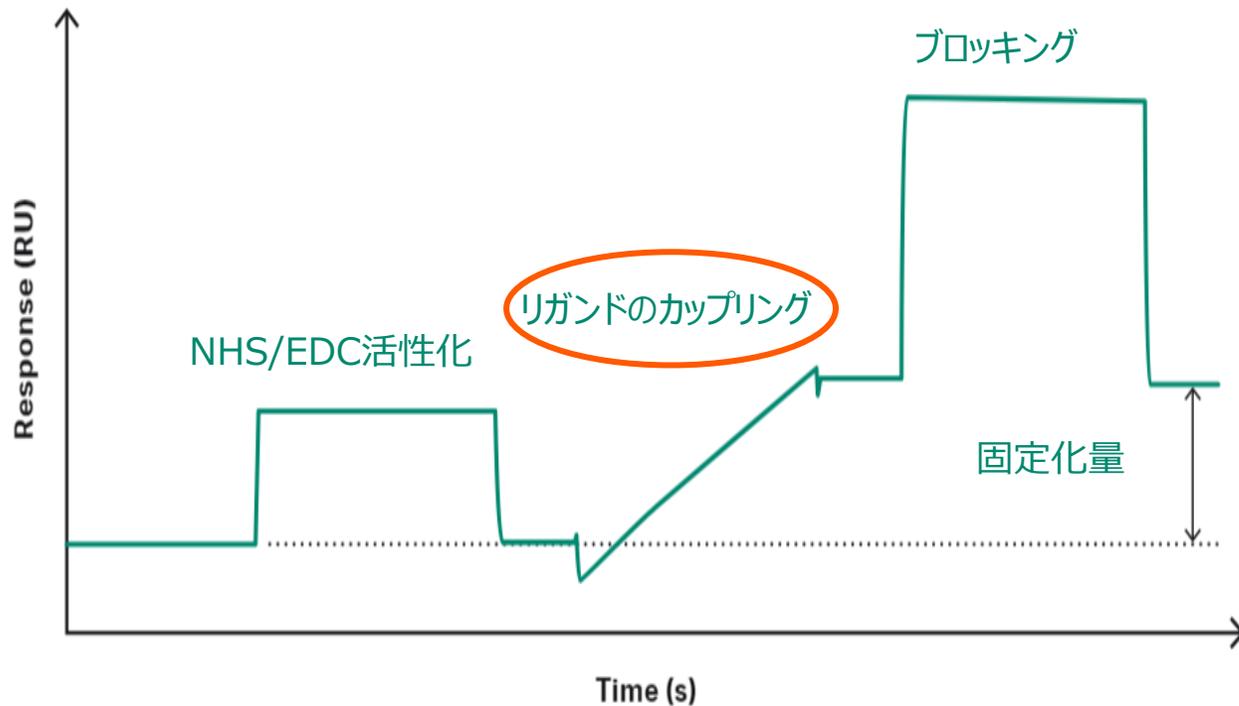
- ✓直説法（アミンカップリング法など）からキャプチャー法への適用の広がり
- ✓キャプチャー法のためのセンサーチップやキットの拡充



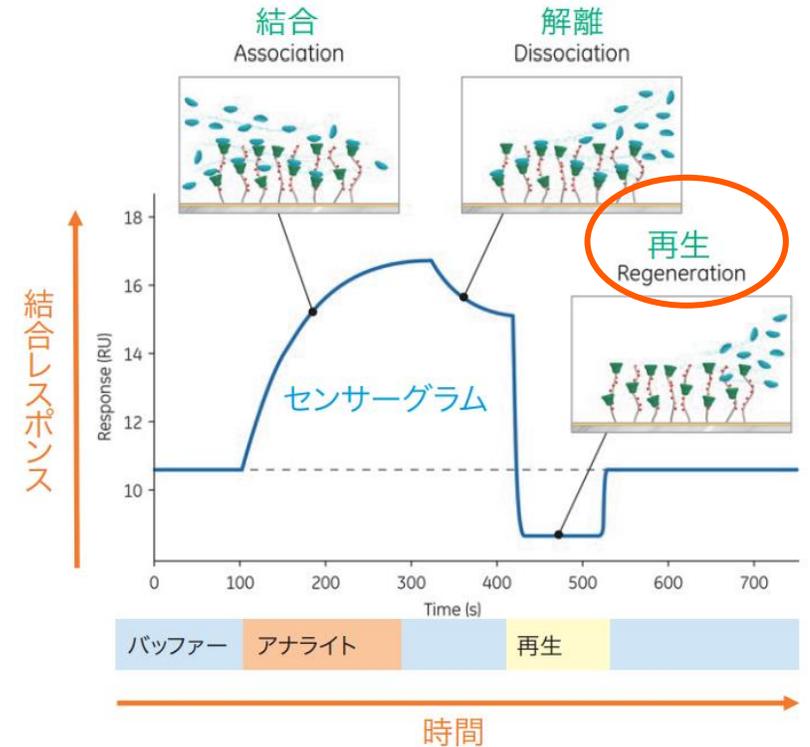
リガンド活性維持へのリスク箇所（直接法）

- ✓ 固定化時に酢酸バッファー（pH4.0～）に溶解
- ✓ 測定時に再生溶液（酸・アルカリ溶液など）を添加
- ✓ 測定温度での経時的な変性

固定化時

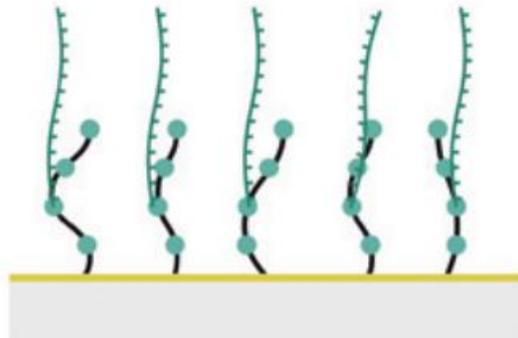


相互作用測定時

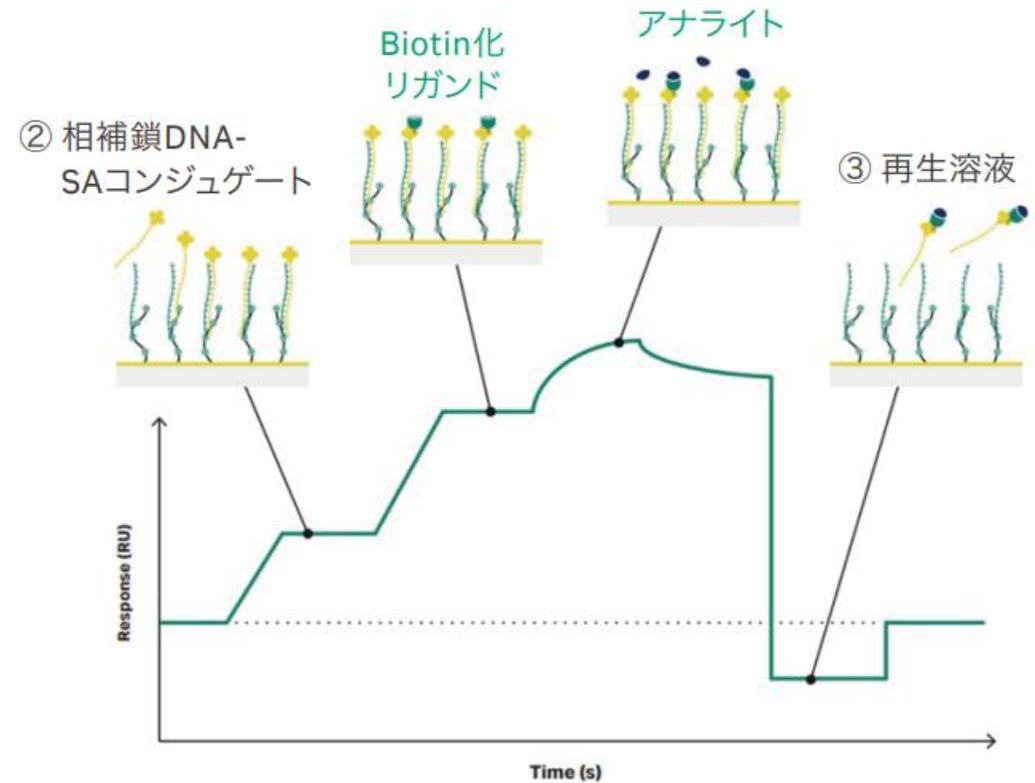


キャプチャー法による活性維持へのリスク軽減 (Biotin CAPture kitを例にとり)

- ✓リガンドは常に測定バッファー中の環境
- ✓測定サイクル毎にリガンドを付け替え
- ✓リガンドサンプルは低温環境下で待機可能



① Sensor Chip CAP



2

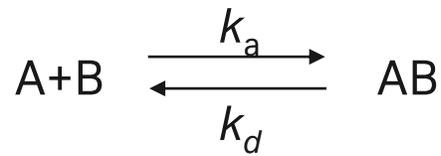
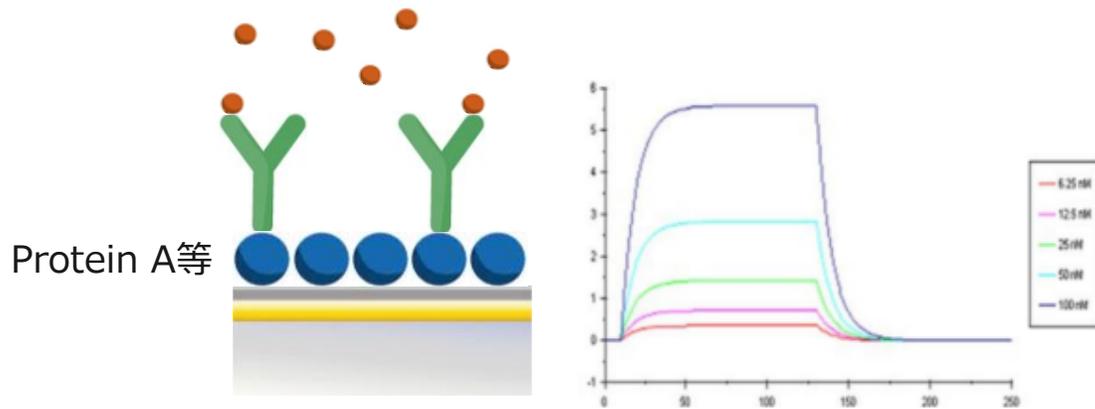
アビディティ (Avidity) の回避

AffinityとAvidity

✓多価分子（抗体）側を固定化するのが基本
→Affinity測定環境を構築する

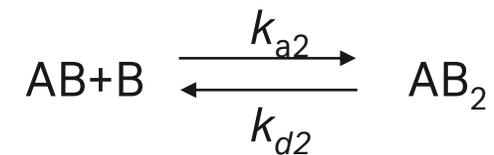
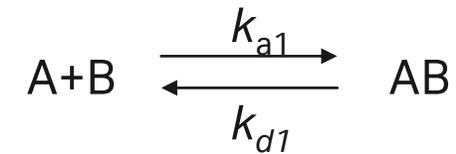
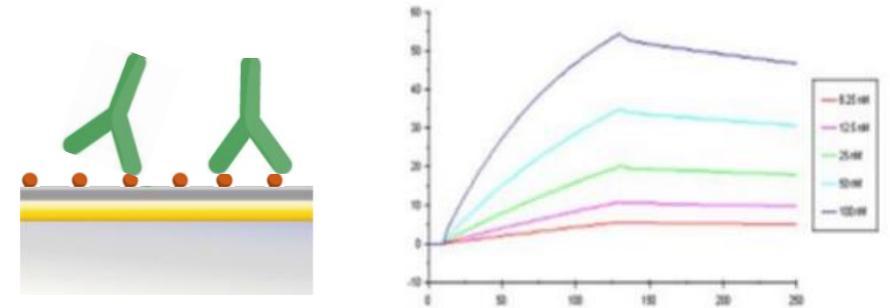
Affinity

抗体がリガンド



Avidity

抗体がアナライト



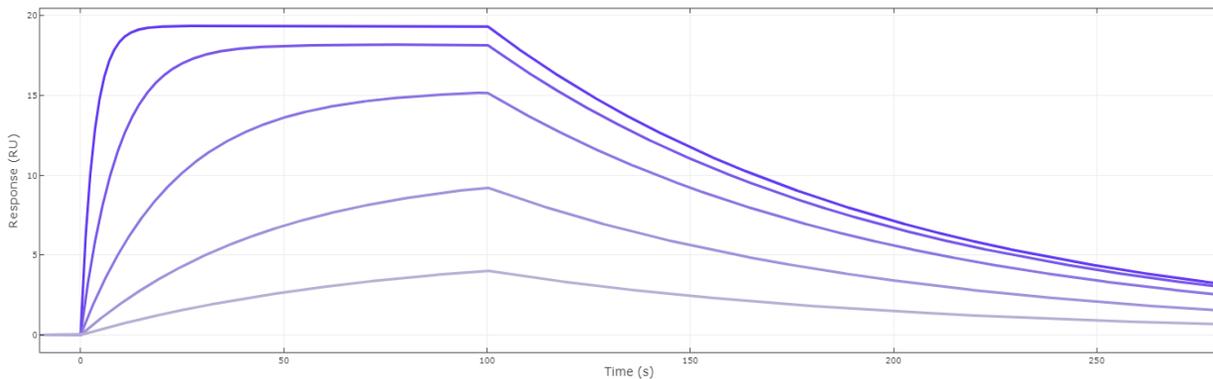
3

マストランスポートリミテーション (MTL)

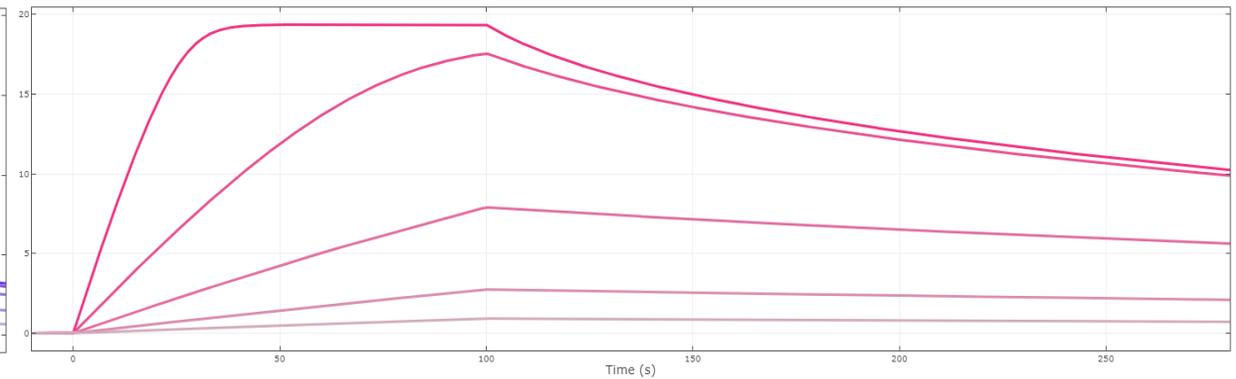
マストランスポートリミテーション (MTL) とは？～簡単には～

- ✓供給されるアナライト量が不足して、センサーグラムが変形する現象
- ✓MTLを考慮に入れたフィッティング解析モデル式を採用

MTLなし (理想系)

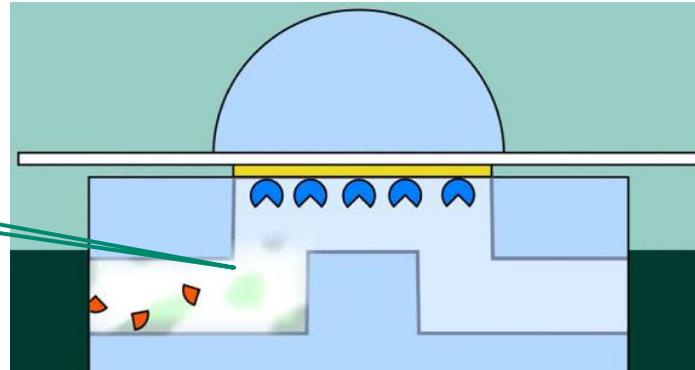


強いMTL

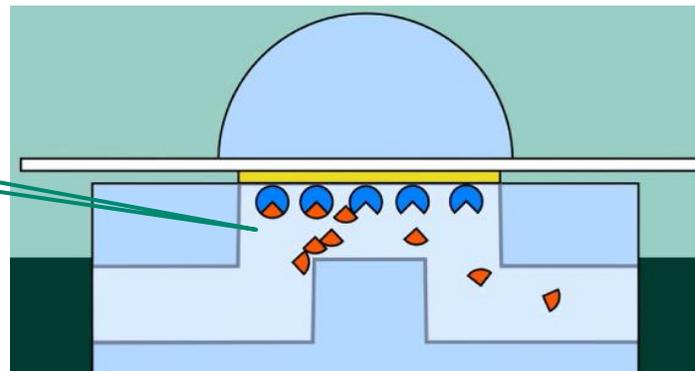


Biacoreの流路を介したサンプル供給の一般的なイメージ

横から流れてきて。。。



そのままくっつく？

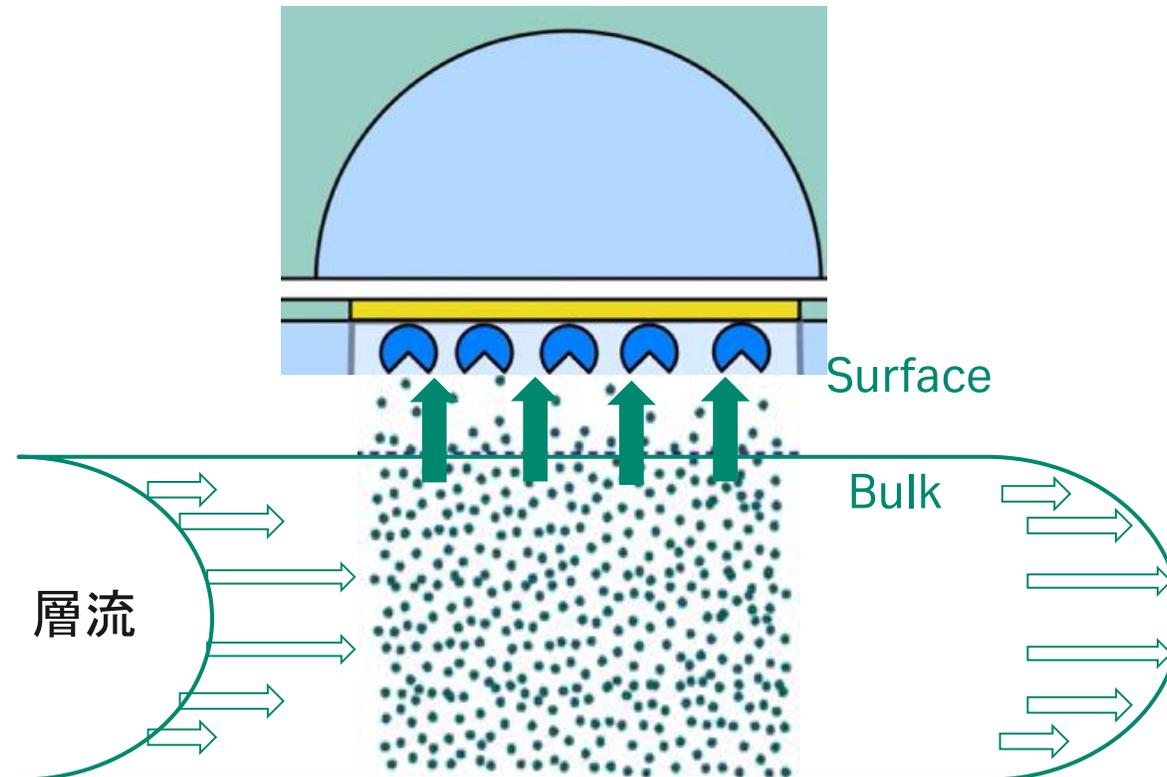


マストランスポートリミテーション (MTL) とは？ ～より正確な理解のために～

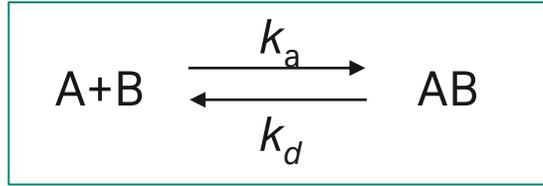
✓リガンドにアナライトが到達するまでに拡散律速プロセスが存在

= バルク溶液から表面へ物質輸送 (マストランスポート)

∴ MTLとはアナライトのBulk (添加) 濃度とSurface (センサーチップ表面) 濃度が異なる現象



マストランスポートリミテーション (MTL) とは？ ～数式での記述～



MTL環境下の関数

$$A(\text{bulk}) = \text{Conc}, A = \text{Surface conc}$$

$$A[0] = 0$$

$$dA/dt = \underline{(tc * f^{(1/3)}) * (\text{Conc} - A)} - (ka * A * B - kd * AB) \quad \text{---Aの記述}$$

(物質輸送 (マストランスポート) 項)

$$B[0] = R_{\text{Max}}$$

$$dB/dt = - (ka * A * B - kd * AB)$$

$$AB[0] = 0$$

$$dAB/dt = (ka * A * B - kd * AB) \quad \text{---この関数は全く同じ}$$

Total response:

$$AB + RI$$

理想系での関数

$$A(\text{bulk}) = A(\text{Surface conc})$$

$$dAB/dt = (ka * A * B - kd * AB)$$



MTLを低減した測定系構築が重要である理由

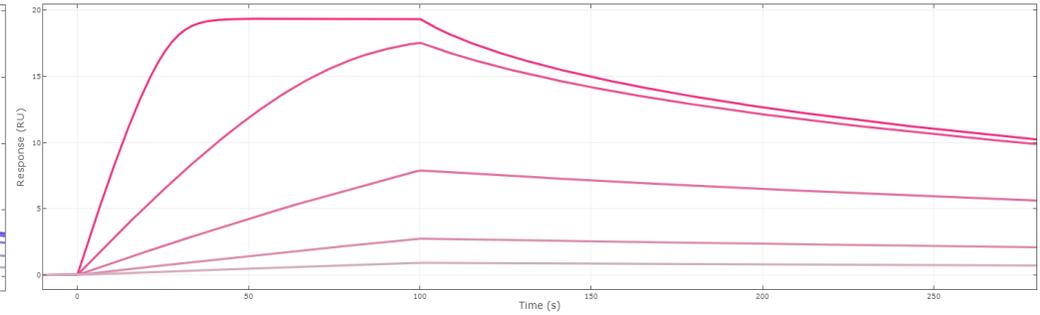
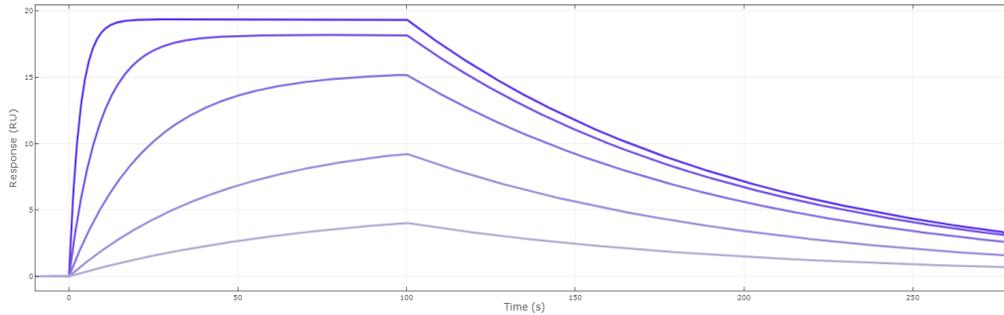
✓ 観察されるセンサーグラムは物質輸送（マストランスポート）とその分子間固有の相互作用速度の正味の結果

∴ MTLが強い環境では固有の相互作用速度が異なってもセンサーグラム形状があまり変わらない

∴ MTLが強い環境ではセンサーグラム形状の実験誤差に対して**算出値の誤差がより大きくなる**

MTLなし（理想系）

強いMTL



$$k_a = 1 \times 10^7 \text{ (1/Ms)}$$

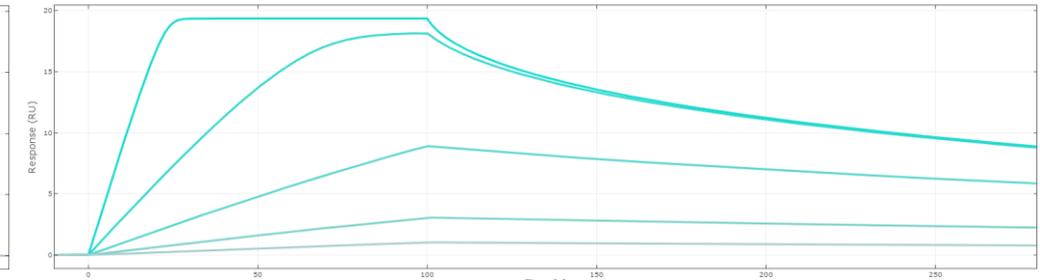
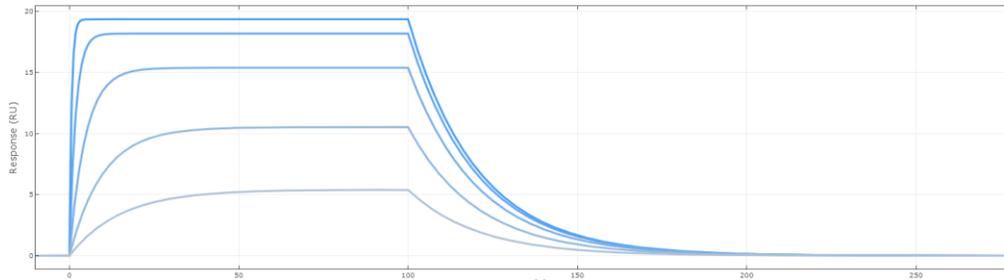
$$k_d = 1 \times 10^{-2} \text{ (1/s)}$$



それぞれ5倍にする

$$k_a = 5 \times 10^7 \text{ (1/Ms)}$$

$$k_d = 5 \times 10^{-2} \text{ (1/s)}$$



MTLは理論と各種対策・確認法の理解で恐れるに足らず～対策と確認法～

対策

✓ 固定化量を下げて、流速を上げる

一般的には流速は30 μ l/minにし、固定化量を下げる方がより有効*)

確認法 (一般的にはすべてを確認することはない)

✓ センサーグラム形状の目視

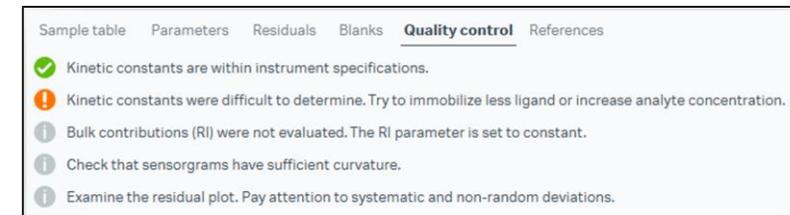
✓ ソフトウェアのQuality AssessmentやU-valueの確認

✓ Biacore™ Simul8 シミュレーションツールの確認

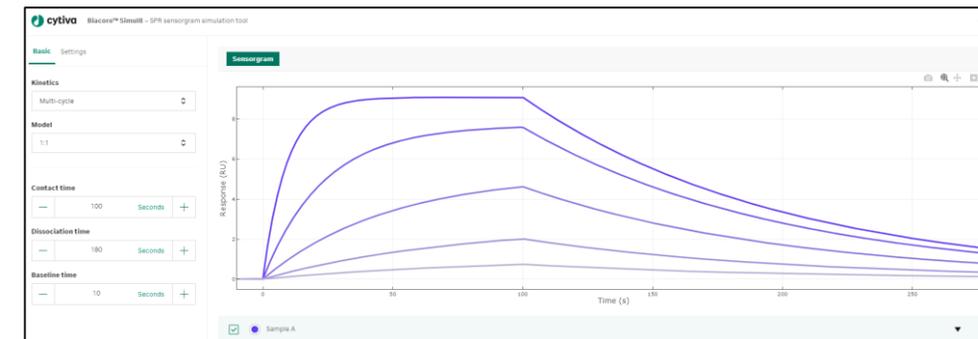
✓ 再現性の確認

✓ 流速を変えてセンサーグラム形状が変わるかの確認

など



☒ Quality Assessment



☒ Biacore™ Simul8

固定化に伴う特徴・留意点（まとめ）

1. リガンドの活性維持

➡キャプチャー法で大幅に解決

2. アビディティ（Avidity）の回避

➡多価の分子はリガンド側にするのが第一選択

3. マストランスポートリミテーション（MTL）

➡低固定量・高流速で影響を低減させる

➡理論を理解して、対策と確認法を知れば恐れるに足らず



Cytiva and the Drop logo are trademarks of Global Life Sciences IP Holdco LLC or an affiliate.
Biacore is a trademark of Global Life Sciences Solutions USA LLC or an affiliate doing business as Cytiva.

© 2020 Cytiva

All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the supplying company operating within the Cytiva business. A copy of those terms and conditions is available on request.
Contact your local Cytiva representative for the most current information.

For local office contact information, visit [cytiva.com/contact](https://www.cytiva.com/contact)