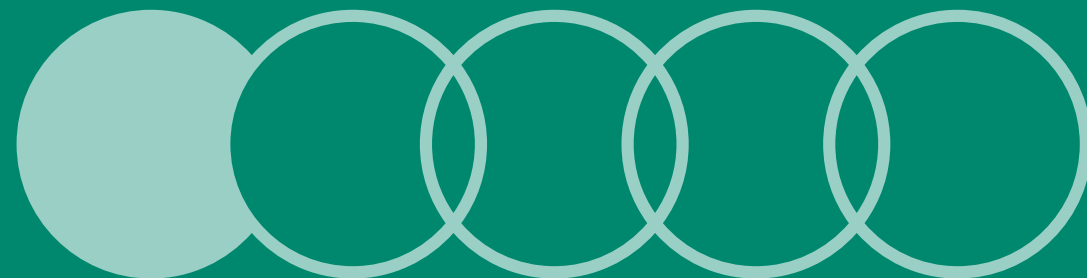
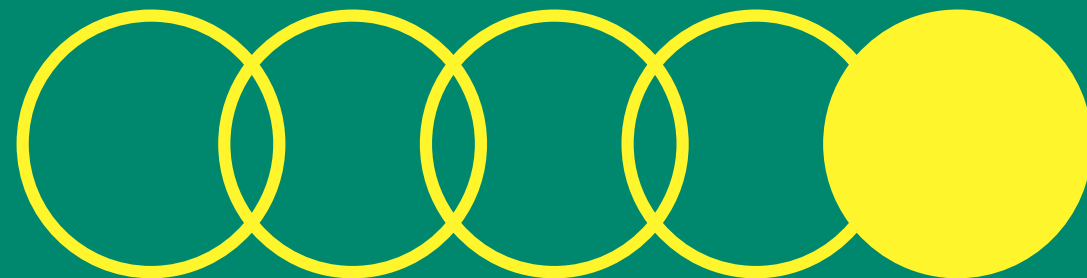
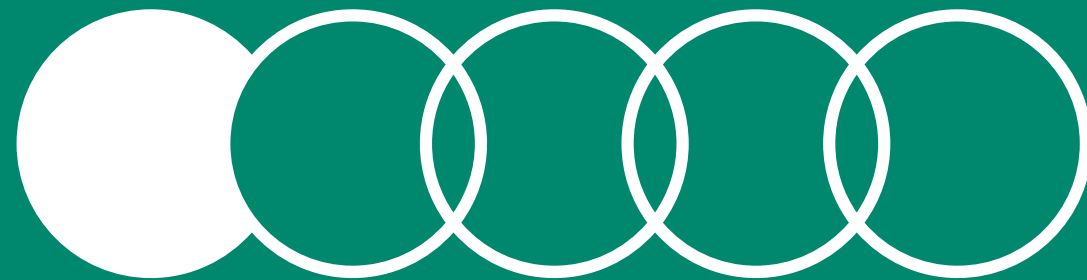


Cytiva Webinar

まもなく開始します。
もうしばらくお待ちください。

※開始時刻から30秒ほど遅れての配信となります。

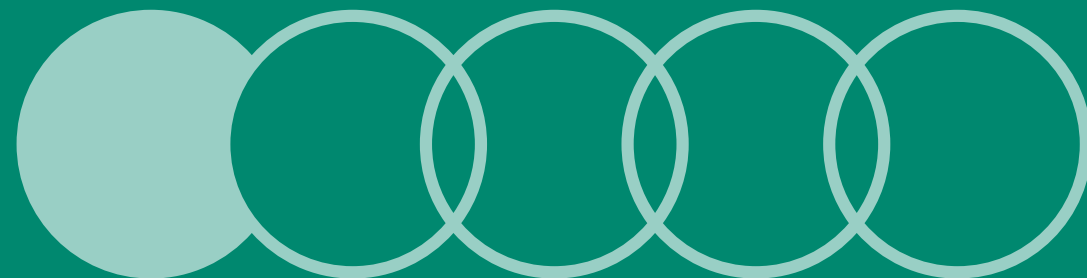
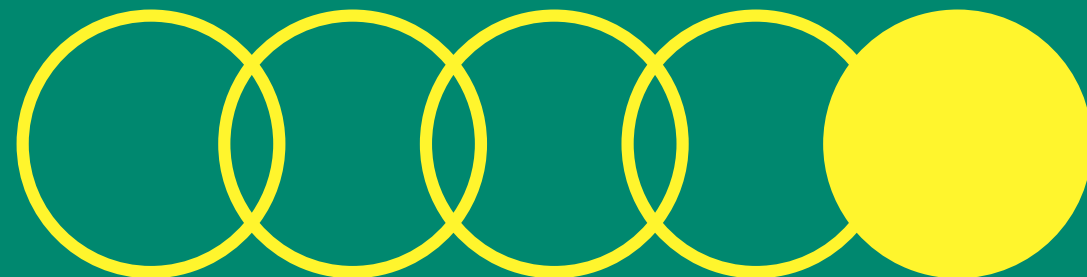
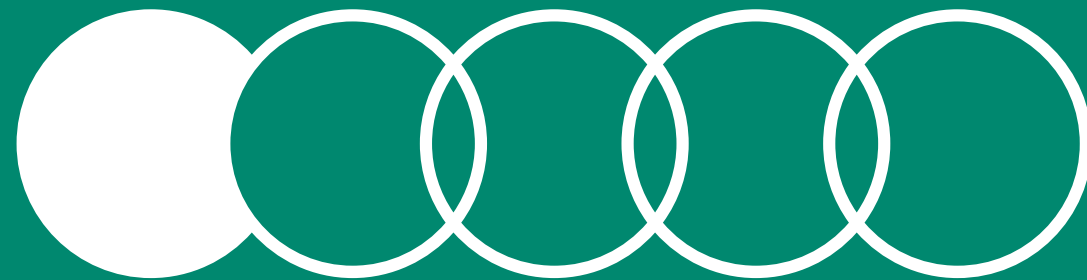


音声につきまして

- 視聴者の皆様の音声は講師、他の参加者には届きません。

ご質問につきまして

- 画面右上のはてなマークをクリックして現れる画面に質問内容を入力してください。
- 講演後まとめて講師より回答いたします。
- 入力いただいたご質問内容、質問者のお名前は、主催者にのみ公開されます。





Cytiva Webinar

活性濃度を測ってみよう。～Biacoreによる濃度定量～

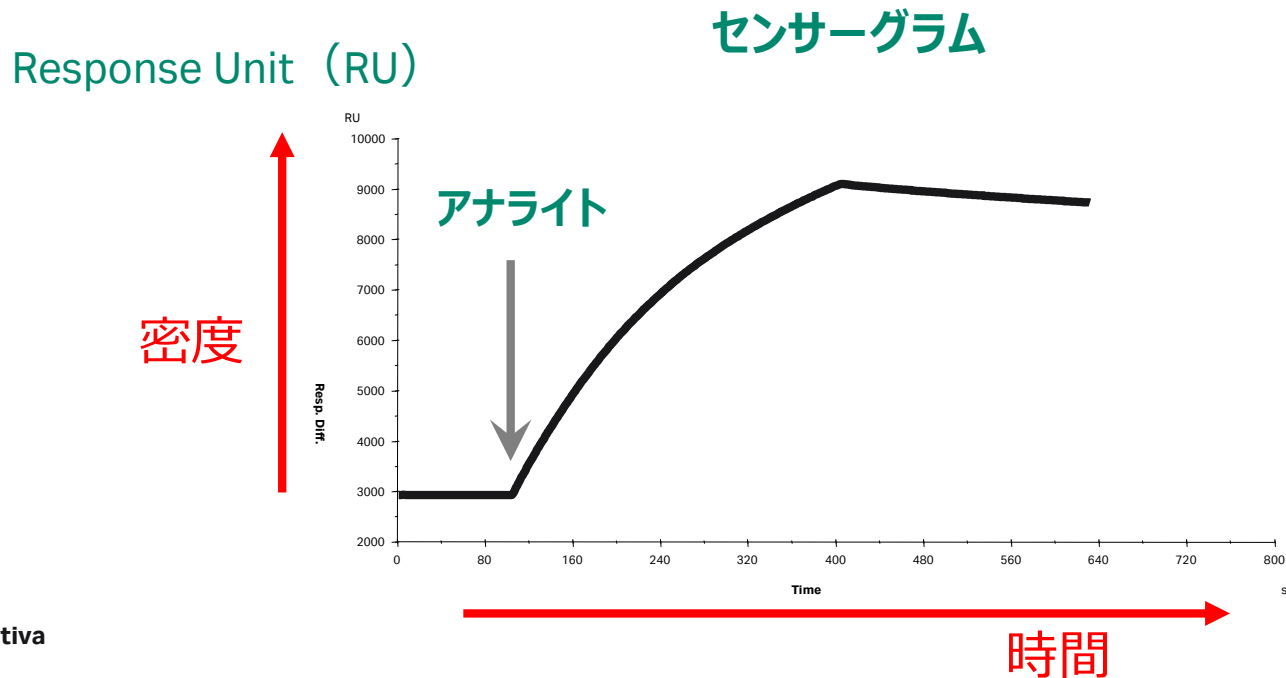
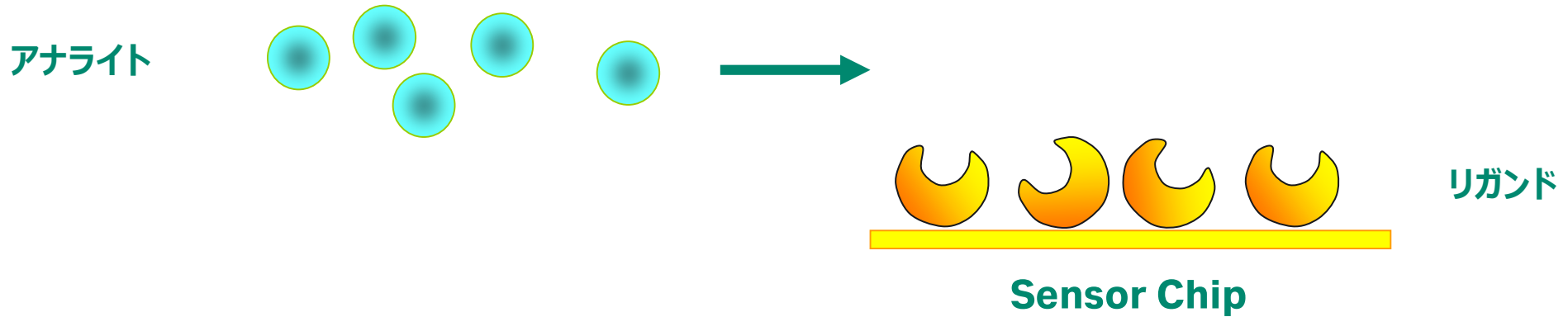
Gen Takata
December 18 2020



本日の内容

1. Biacoreで濃度定量を行うメリット
2. 各手法の特長や使い分け
3. 各手法における測定系構築の考え方

Biacoreとは



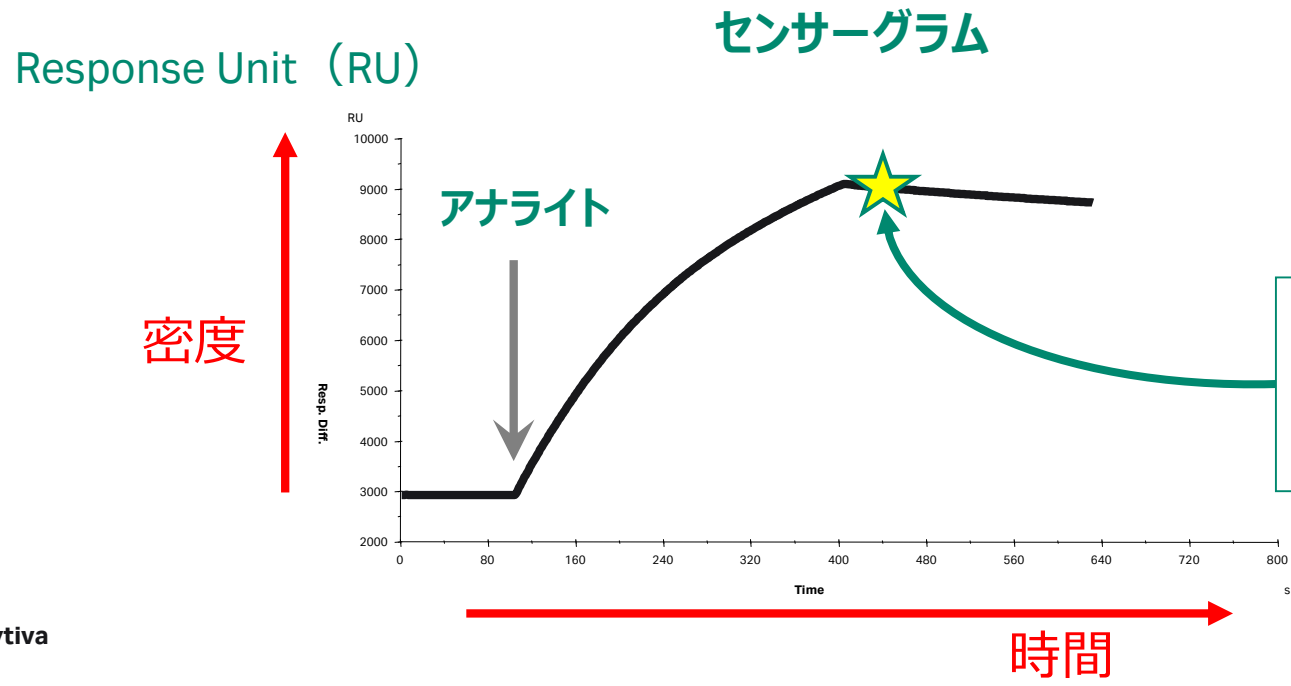
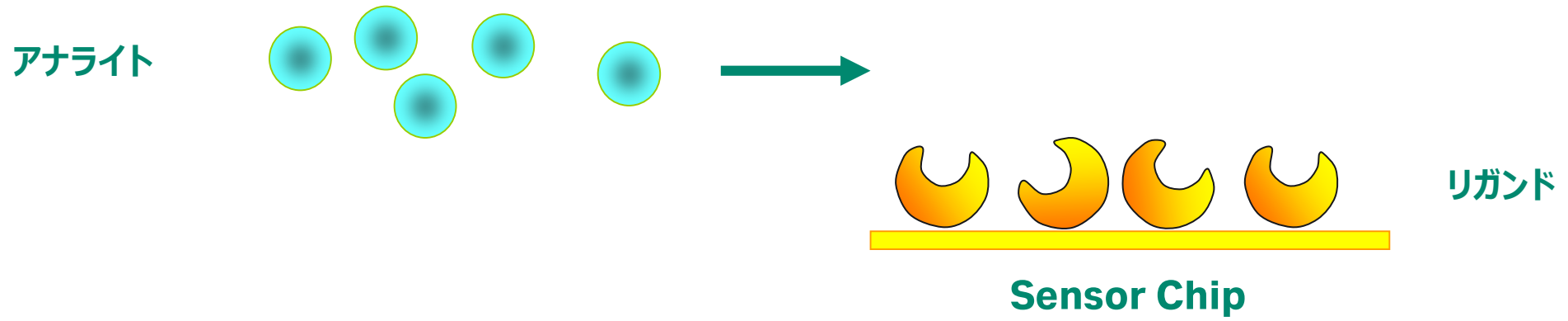
分子間相互作用を

ノンラベル

リアルタイム

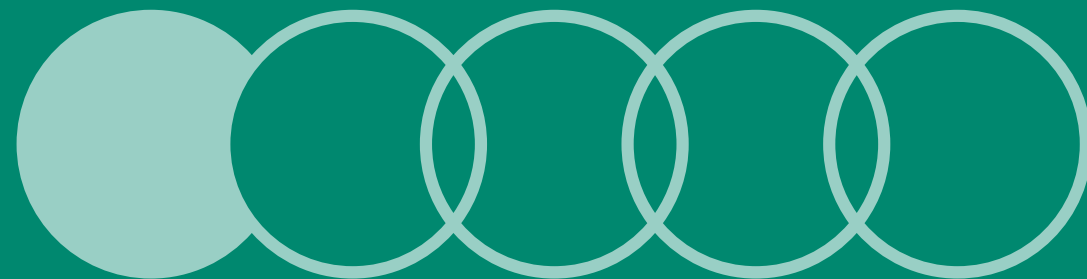
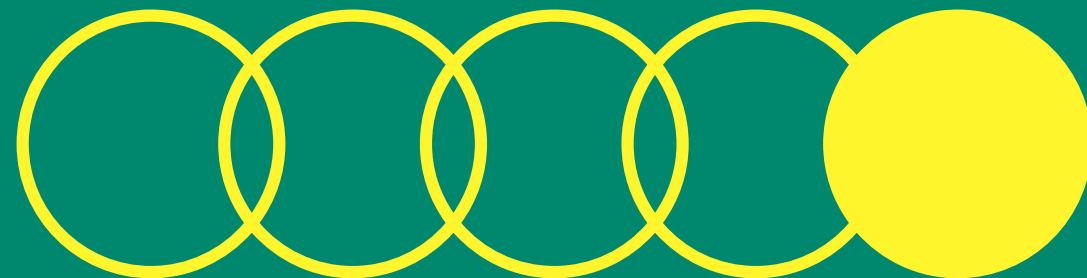
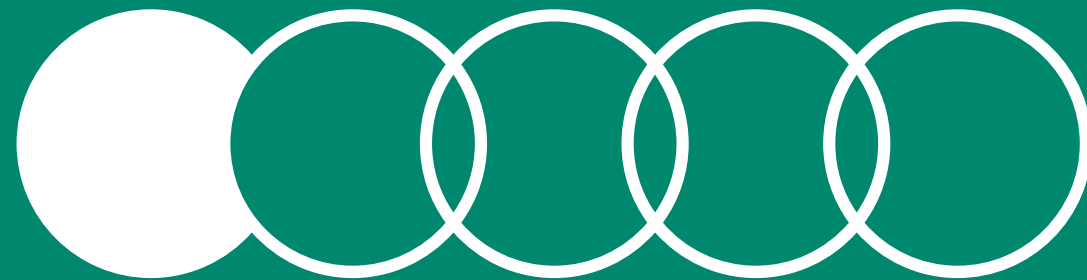
で、測定するシステムです

Biacoreとは



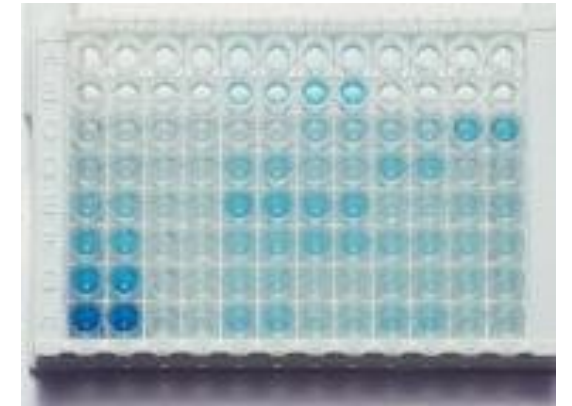
各濃度におけるレスポンスの高さ
⇒濃度定量

1. Biacoreで濃度定量を行う メリット



濃度定量 従来法の課題

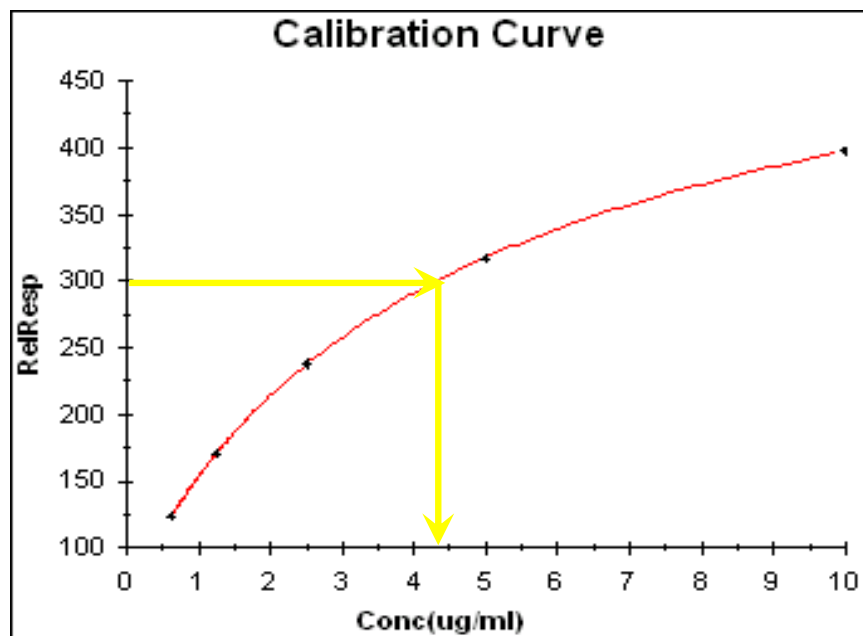
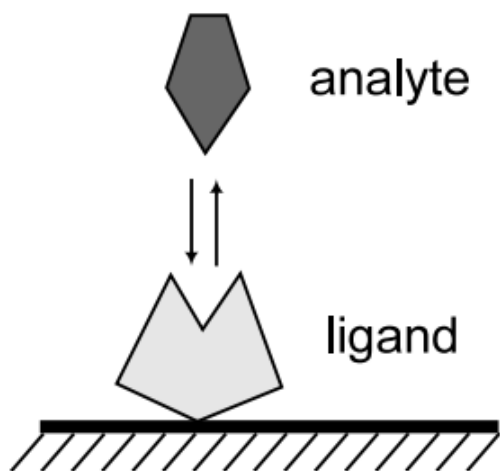
- Bradford法、Lowry法など分光光度計を用いた測定系では、全タンパク質を定量 ⇒ 失活しているタンパク質も含む
- ELISAによる濃度定量の課題
 - 各種Washステップで、測定前に検体が外れてしまう
 - 標識抗体や基質反応など手技によるばらつき
 - エンドポイントアッセイのため、各ステップのモニターができず、クオリティーコントロールが困難
- 吸光度を指標にする課題
 - 色素を持つサンプルは光の吸収や散乱と言った影響を受ける



Biacore で濃度定量を行うと活性濃度が測れます。

活性濃度定量

“本当に作用する”医薬品の濃度として、品質管理にも使用。
KD値を算出するためにも本来であれば“活性”濃度情報が必要。



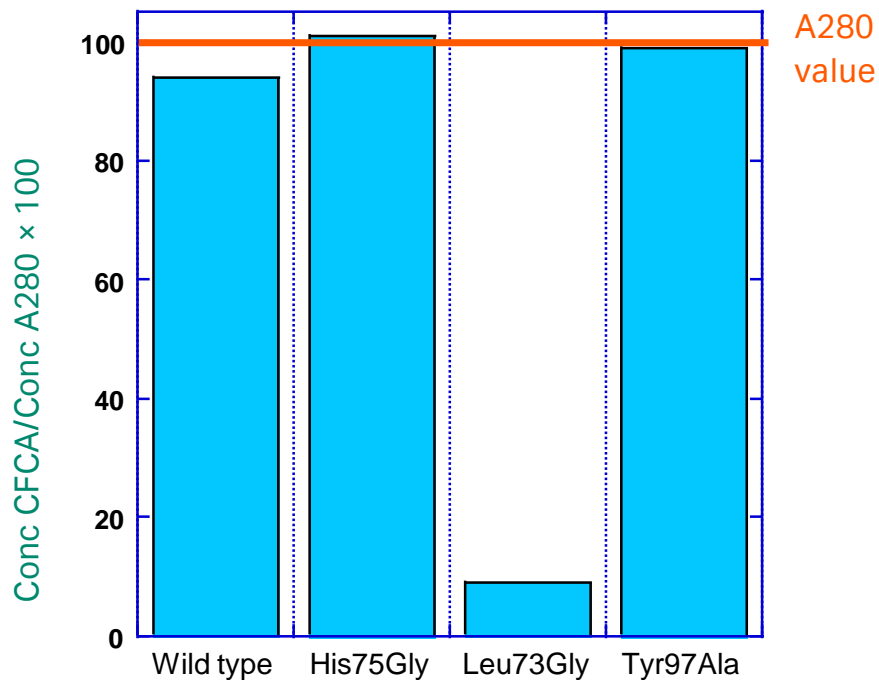
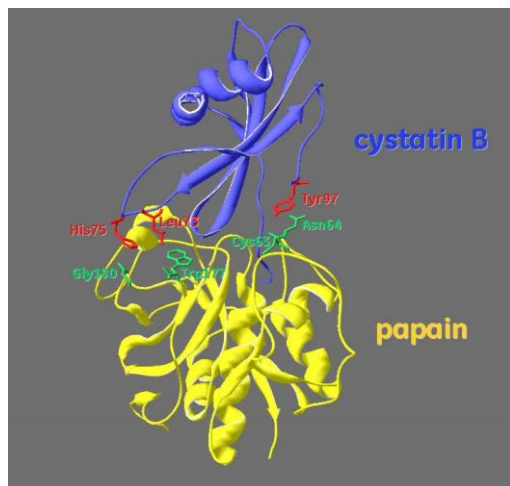
- 選択性 selectivity
- シンプル simplicity
- スピード speed
- 自動化 automation
- GxP環境 (Biacore 8K/8K+, T200)



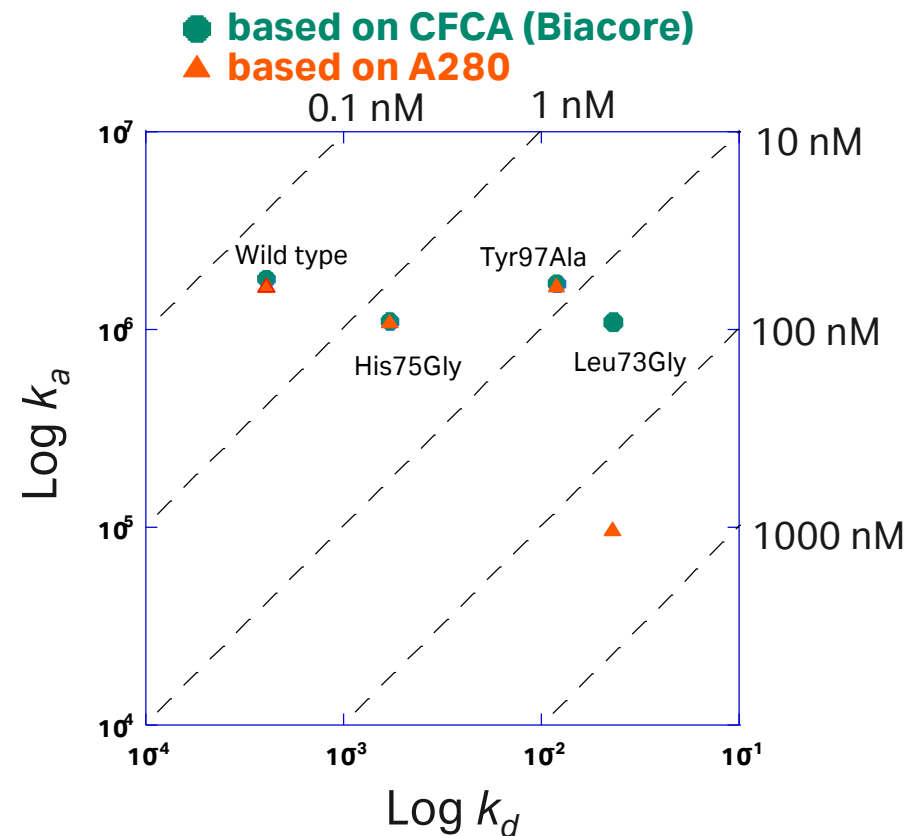
Biacore で濃度定量を行うと活性濃度が測れます。

活性濃度定量

KD値を算出するためにも本来であれば“活性”濃度情報が必要。



Cystatin B 活性濃度定量
(%、対吸光度法)

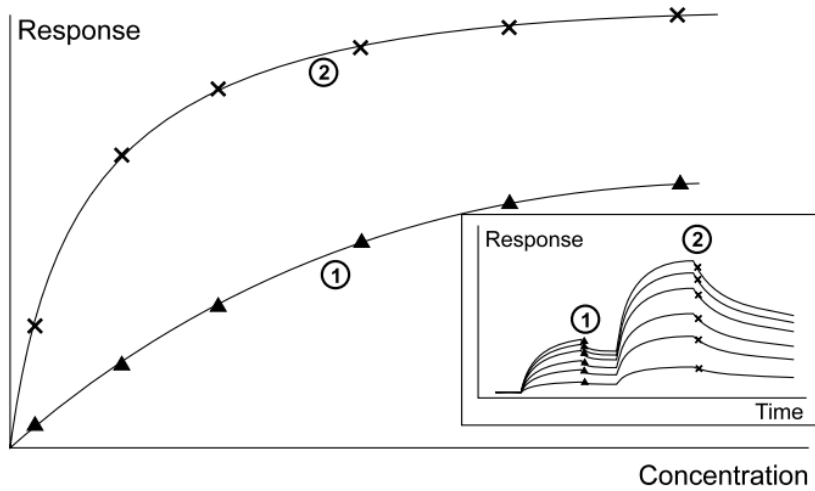


Kinetic解析結果の違い

Pol, E. and Björk I. *Biochemistry*, **38**, 10519-10526 (1999)

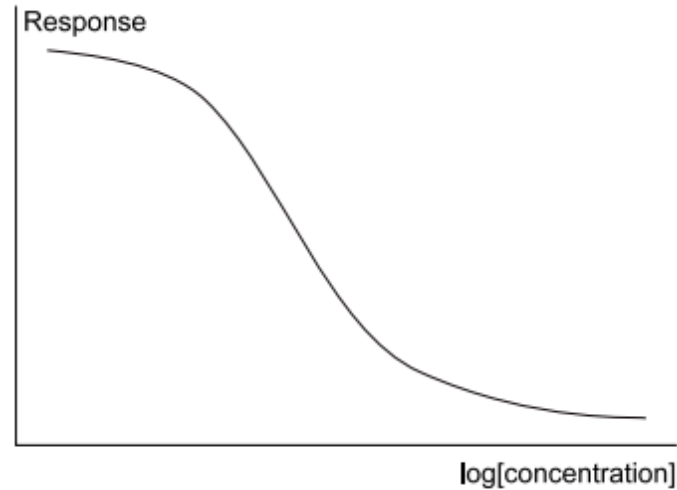
Biacore 濃度定量オーバービュー

標品による検量線を用いた濃度定量

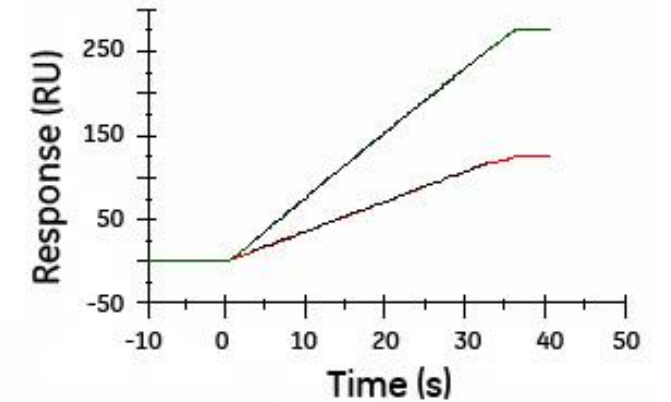


- ① 直接法
- ② 増幅試薬を用いた直接法

阻害法

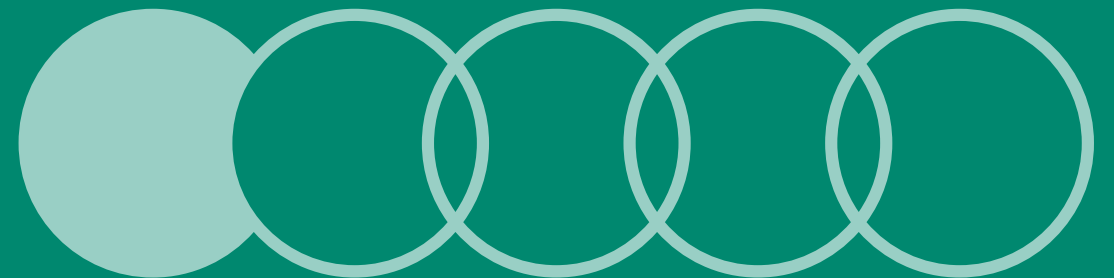
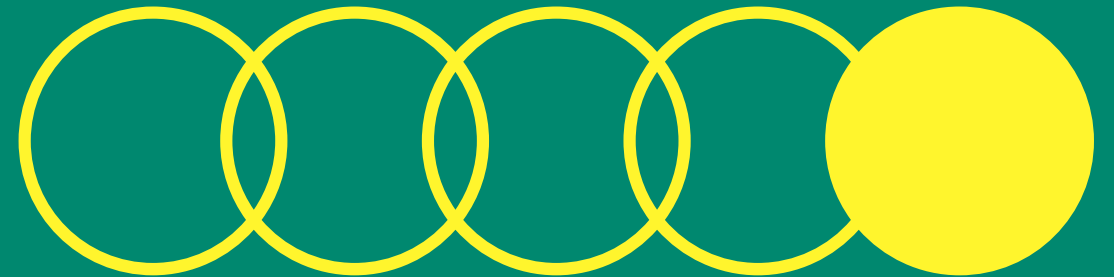
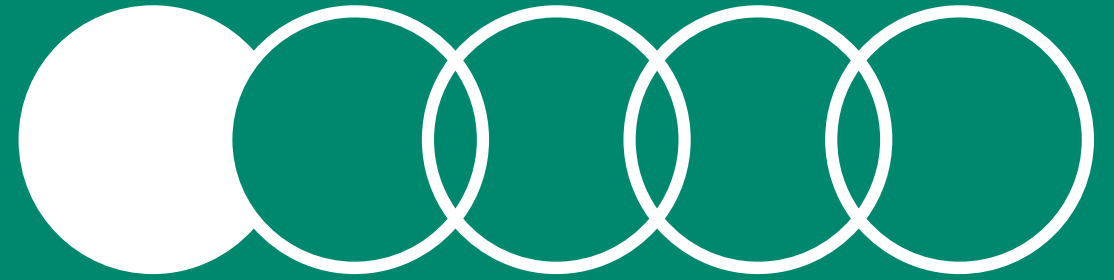


標品要らずの濃度定量



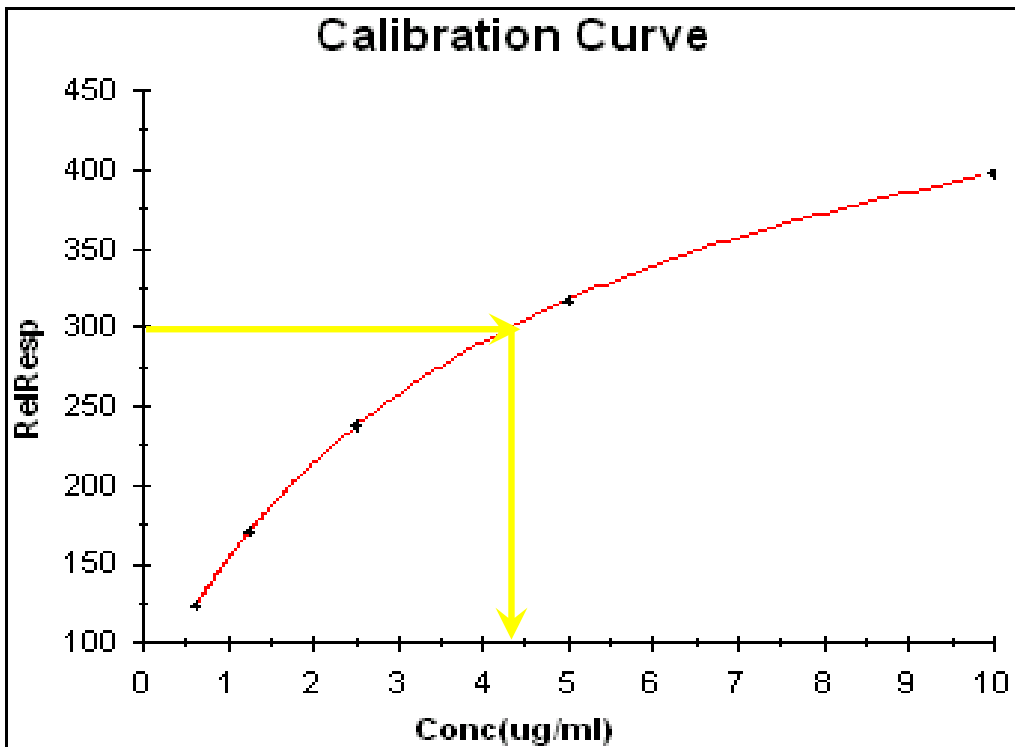
Calibration-Free Concentration Analysis (CFCA)

2. 各手法の特長や使い分け



Biacore 濃度定量 対応機種

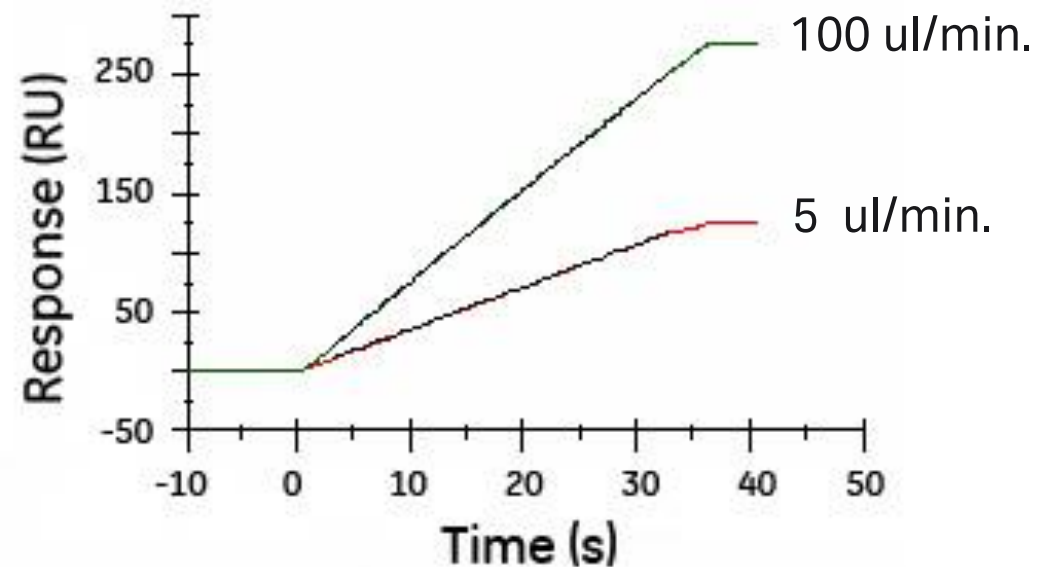
8K+(option), 8K(option), T200, X100PP,
T100, 3000, 4000



標品による検量線を用いた濃度定量

- 直接法
- 間接法 (阻害法)

T200, X100PP

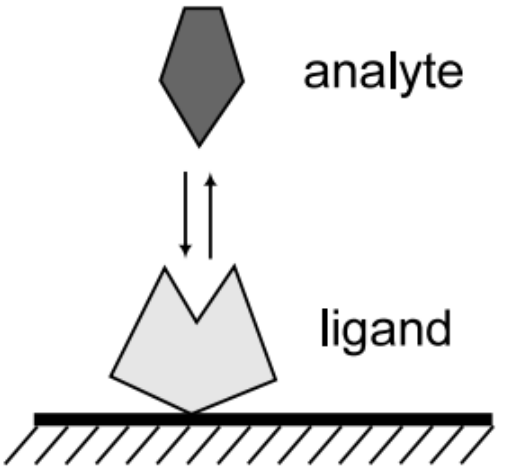


標品要らずの濃度定量

Calibration-Free Concentration Analysis (CFCA)

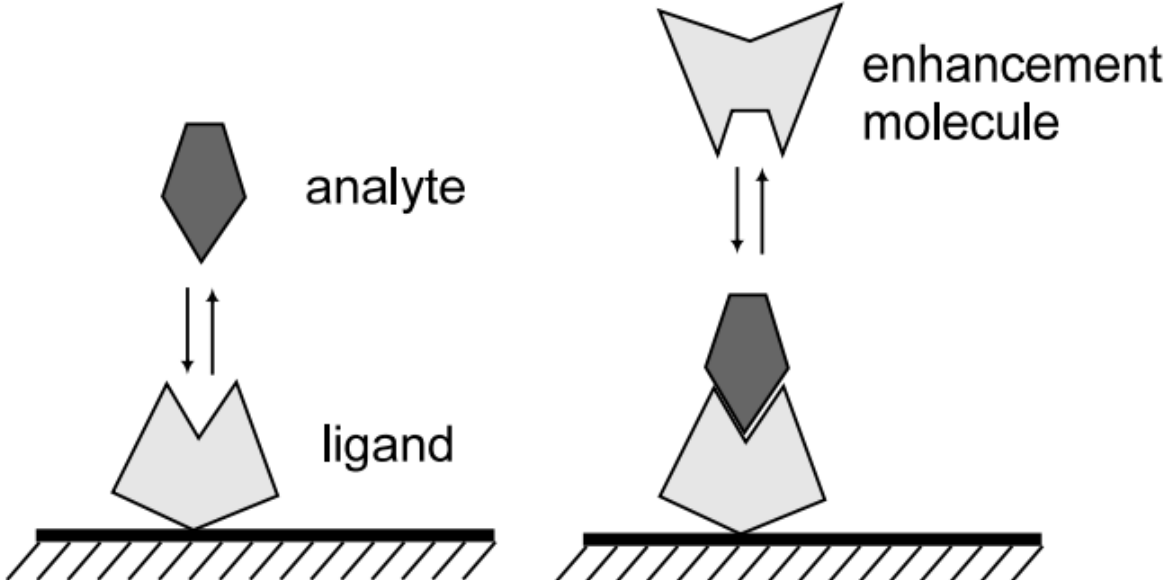
標品による検量線を用いた濃度定量

直接法 Calibrated direct binding assays



Direct binding assay

直接法



①

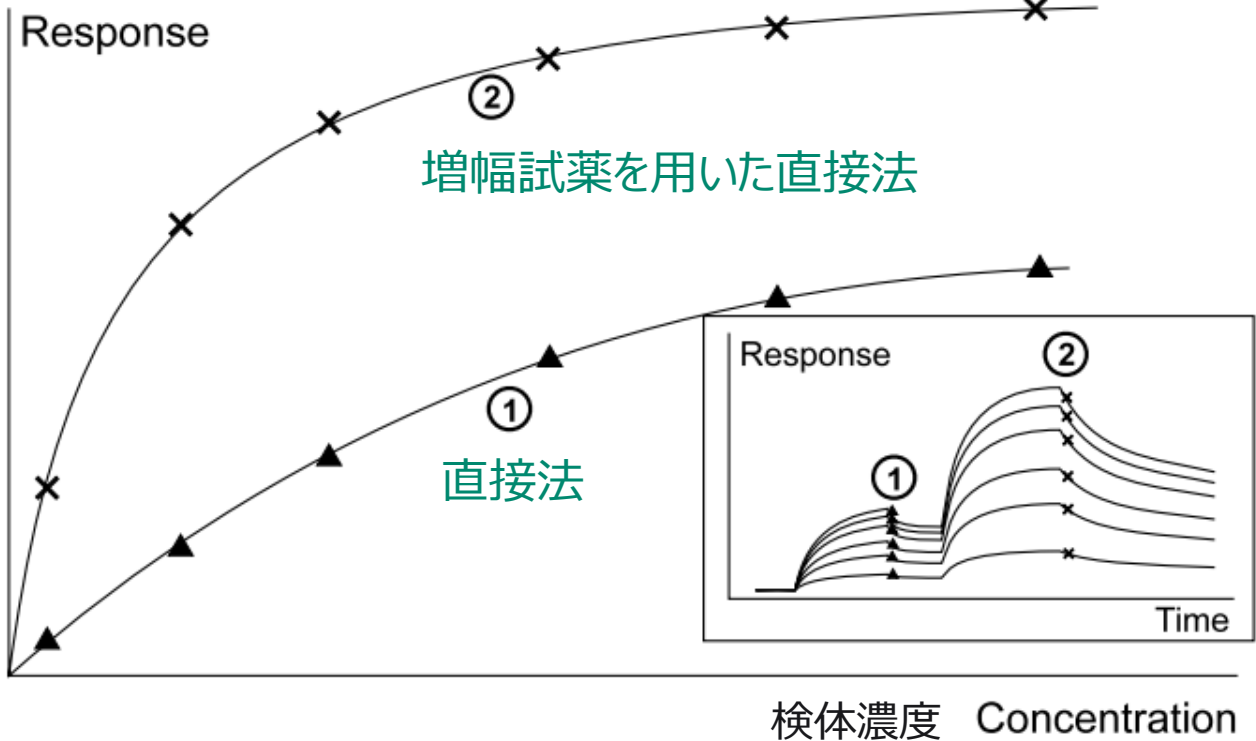
Direct binding assay with enhancement

②

増幅試薬を用いた直接法

標品による検量線を用いた濃度定量

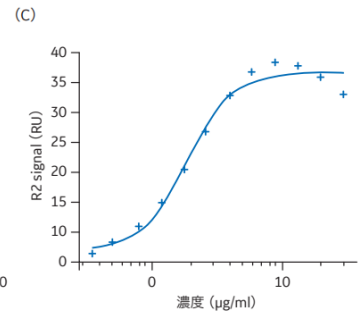
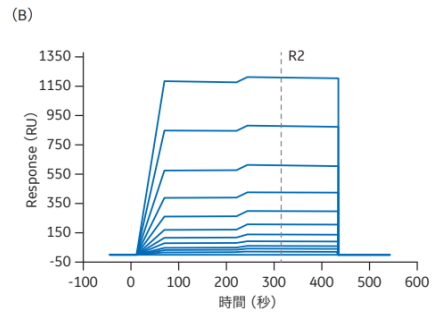
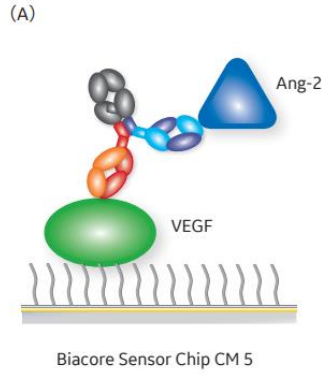
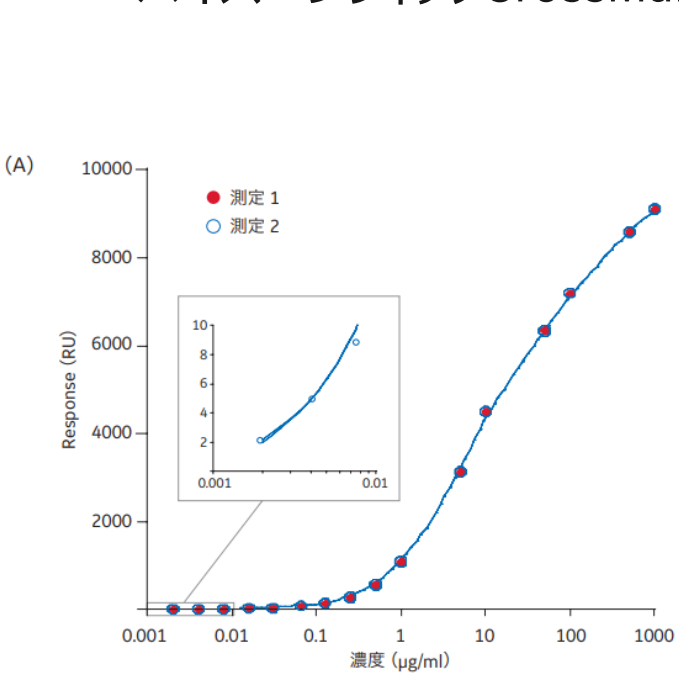

直接法 Calibrated direct binding assays



直接法を用いた検量線

標品による検量線を用いた濃度定量 直接法 Calibrated direct binding assays

- リガンド結合ベースの高精度な活性濃度測定
- オマリズマブの濃度定量 (2 ng/ml ~ 1 mg/ml)
- バイスペシフィックCrossMabの完全性評価

バイオ医薬品の後期開発および品質管理における Biacore を用いた濃度測定およびリガンド結合分析

抗体、サイトカイン、ホルモンなどのバイオ医薬品は、関節炎、がん、糖尿病などさまざまな疾患の治療に使用されています。従来の低分子薬に比べると、バイオ医薬品は構造が複雑で、1種類以上のターゲット分子に高い特異性で結合して効果を示すことができます。開発および品質管理では、バイオ医薬品の構造的完全性および活性を明らかにするために各種分析技術が用いられます。本ホワイトペーパーでは、Biacore を使用した活性濃度測定、ターゲット結合、および Fc 受容体 (FcR) 分析について概説するとともに、薬物の力価および安定性の評価における Biacore アッセイの可能性について述べます。

はじめに

一般的なバイオ医薬品のライフサイクルは、図 1 に示すとおり 30 年以上にわたります。初期開発に 5 年以上かかることがあります。後期開発での最初のプロセス開発の期間は短く、およそ 1 年です。最初の臨床試験と並行してプロセスの改良が行われます。臨床試験の期間によって前後しますが、後期開発は 3 年から 5 年かかることもしばしばです。最初の適応症が承認された後は、製造および品質管理が 20 年以上続き、その間に適応症が増える可能性もあります。リツキサン、ハーセプチン、エンブレル、レミケード、ヒュミラ、アバスタチン、およびランタスなどの成功したバイオ医薬品は、1997 年から 2004 年の間に最初に承認されており、全てこのようなタイムラインに沿っている例となります。

開発の初期では、原薬とその想定される作用機序に重点が置かれます (1)。一般的に初期のバイオ医薬品開発はターゲットベースで行われます (2)。治療用抗体の作用機序にはターゲットへの結合がありますが、FcR および補体への結合も獲得します。サイトカインおよびホルモンでは、受容体への結合が必須です。リード物質は、目的とするターゲット分子の機能的反応を引き起こし、適切なバイオアベイラビリティおよび生体内分布を示し、安全性を評価されている必要があります。

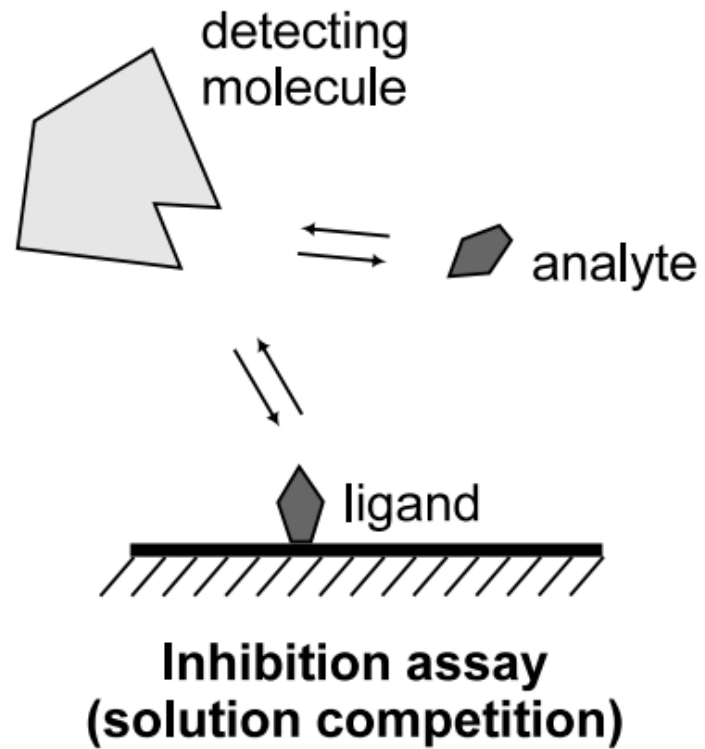
リード候補物が後期開発に入ると、いくつかの「重要品質特性」(Critical Quality Attribute: CQA)、すなわち臨床での安全性および有効性を保証する特性 (図 2) が、ターゲットタンパク質との相互作用機序のデータも含めて確立されます。

図 1. バイオ医薬品のライフサイクルにおけるイベント。各開発ブロックおよび同等性試験では CQA 分析が行われます。

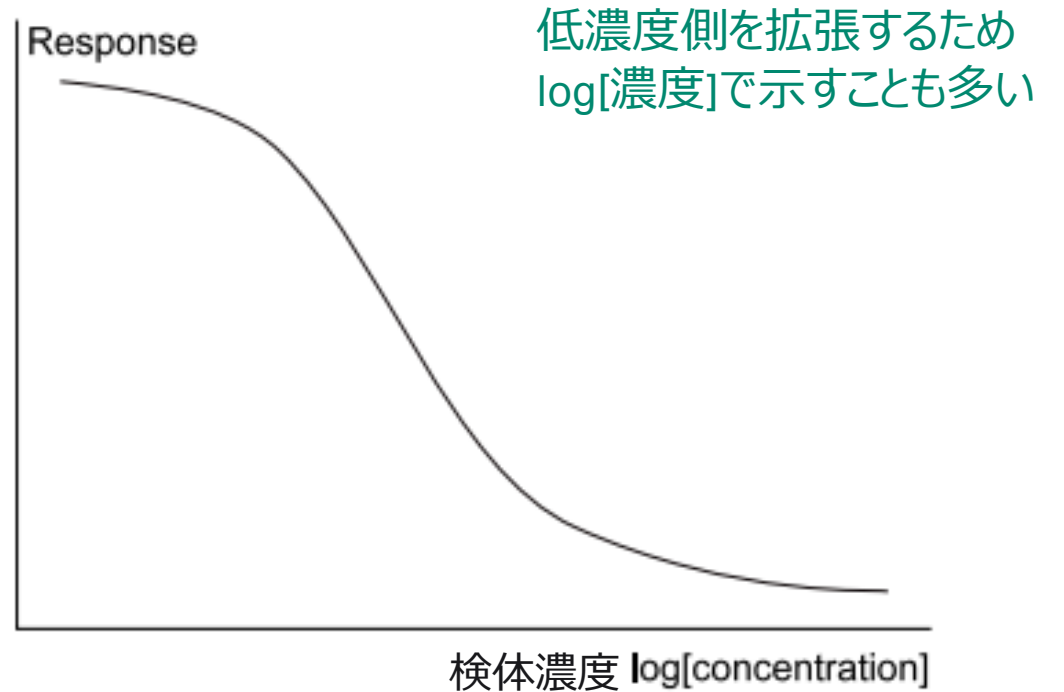
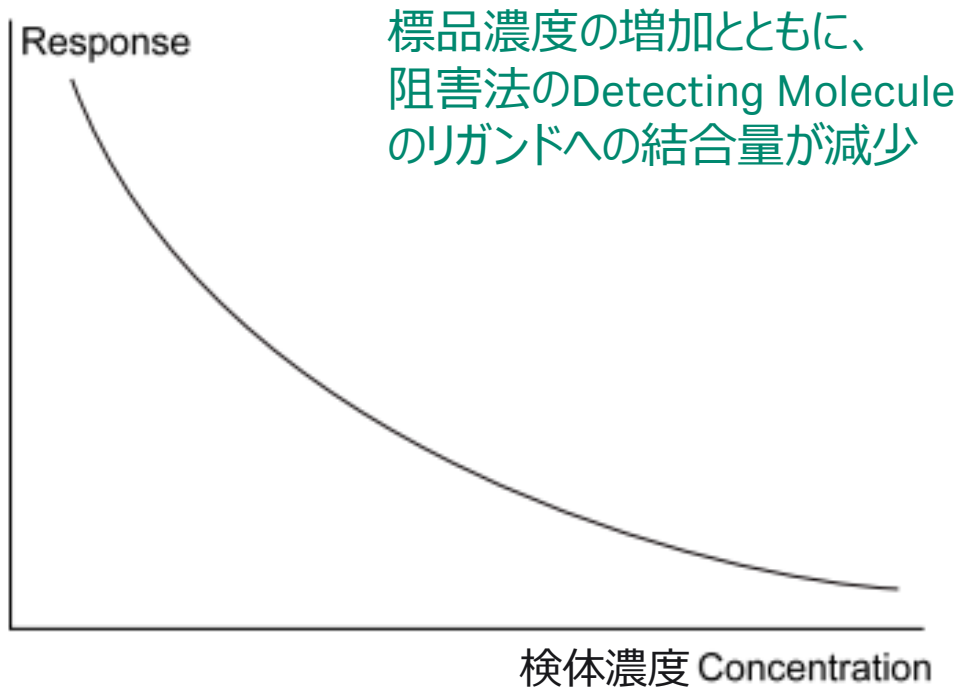
gelifesciences.com

Application note, 71-9537-11

標品による検量線を用いた濃度定量 阻害法 Inhibition assays



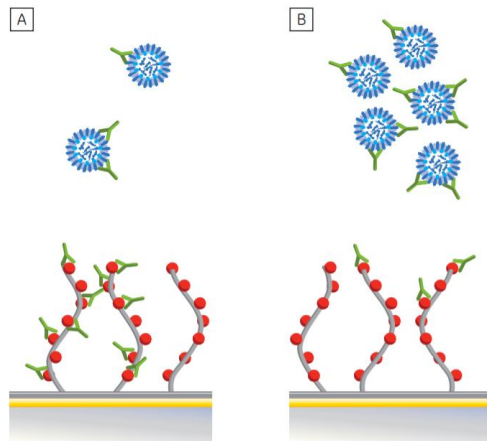
標品による検量線を用いた濃度定量 阻害法 Inhibition assays



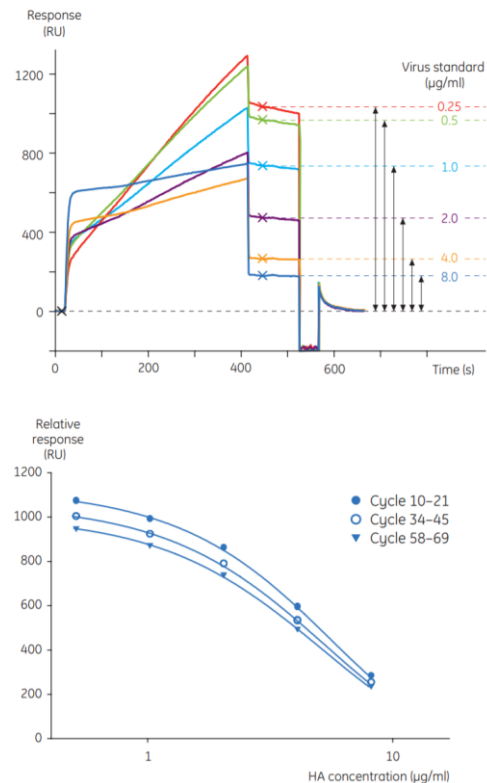
直接法を用いた検量線

標品による検量線を用いた濃度定量 阻害法 Inhibition assays

- 間接法によるインフルエンザウィルス HA の濃度定量
- 直接法によるHCPの濃度定量も



- haemagglutinin (HA)
- Y anti-influenza serum



Biacore™ biosensor assays for quantitation of influenza virus and HCP

Biacore biosensor technology is used for virus haemagglutinin (HA) and host cell proteins (HCPs) in influenza vaccines. Accurate quantitation of influenza virus is achieved using an inhibition assay. The HA method shows high precision, and recovery as compared to immunodiffusion (SRID) which is the mainstay today. In addition, the analysis time is significantly shorter than the SRID method. Assays performed on Biacore systems demonstrate higher sensitivity and specificity compared to the SRID method, as a cost-effective replacement of existing methodologies.

Introduction

In vaccine production, the quantitation of concentration and HCP impurities is critical for formulation. Most influenza vaccines are produced in fertilized eggs, but the fear of a new pandemic has also increased the demand for short cycle systems. The need for shorter cycles has also increased the demand for analytical tools. In this Application note, the quantitation of influenza virus (I) and HCP technology are described. The potency of influenza vaccines is determined by quantitation of HA using indirect methods. The most common method used is SRID where vaccine dilution is diffused through a gel containing a specific antigen. SRID is a labor-intensive method and has disadvantages including low precision and



Biacore influenza virus quantitation assay

Recombinant HA antigen was immobilized on the dextran matrix to a level of 4 000 to 10 000 response units (RU) with standard amine coupling (Fig 1). Sera-containing antibodies with affinity for the specific influenza strains were diluted to give a response of about 1000 RU for a 400 s injection over the surface. This dilution factor resulted in a dynamic range of the standard curves of 0.5 to 8 µg virus/ml (Fig 1C). To stabilize the assay, 5 to 10 start-up cycles were run first with serum only, followed by regeneration.

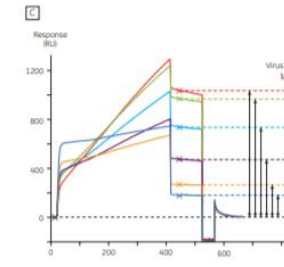
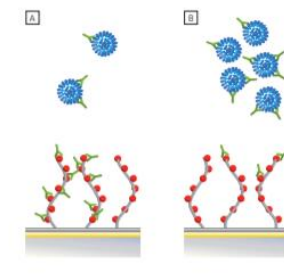


Fig 1. Inhibition assay principle. (A) HA is first immobilized on the dextran matrix (red circles). Virus is then mixed with a fixed concentration of serum and injected over the surface. Free antibodies (not bound to virus at equilibrium) bind to the surface HA, giving a response. Low concentration of virus in the sample (A) gives high antibody binding, while high virus concentration (B) results in low binding level. (C) Overlay plot showing sensorgrams of injected serum mixed with a concentration series of virus standard. Report points (marked as X) were taken before and after injection to measure response levels. The surface was regenerated after each injection to prepare for a new sample.

Samples were analyzed without pretreatment. Mixtures of virus reference antigen or a virus sample with unknown concentration and a fixed dilution of anti-influenza serum were injected for 400 s (Fig 1A and 1B), followed by regeneration of the surface using freshly prepared 50 mM HCl, 0.05% Surfactant P20 for 30 s. Process samples were diluted so that at least two dilutions per sample reached a concentration within the standard curve range. Standard curves were run first, in the middle, and last in the assays. An interpolated calibration, performed by the software, was used to ensure high precision in calculated concentrations.

In the trivalent assay, three recombinant HA proteins (A/H1N1, A/H3N2, and B) were immobilized in three different flow cells on the same sensor chip. The three corresponding reference antigens and sera were mixed to form a trivalent standard solution. The standards and samples were allowed to pass over the surfaces, analyzing all three strains simultaneously.

Biacore biosensor HCP assay

HCP from MDCK cells were quantitated using a direct binding assay. Affinity-purified rabbit antibodies against MDCK cell lysate were immobilized using standard amine coupling to a response of 7 000 RU. The samples were diluted in HBS-EP+ with 1% BSA and injected over the surface for 300 s. The surface was regenerated with 50 mM NaOH. Standard curves using MDCK cell lysate were run first, in the middle, and last in measurement series. An interpolated calibration, performed by the software, was used to ensure high precision in calculated concentrations.

SRID assay, human influenza virus

A small portion of each serum was labeled with Cy3. Unlabeled serum and Cy3-labeled serum (< 0.5% of the total serum amount; did not interfere with the precipitation) were mixed with molten agarose (1%) and cast in a mould creating holes in the gel. Samples and reference antigens were treated with Zwittergent (1%) for 30 min at -22°C and added to the holes in the gel. The gels were incubated for 15 to 18 h at -22°C, and subsequently dried and scanned at 450 nm in Typhoon. Evaluation was performed by comparing ring areas of samples with reference antigens using ImageQuant TL software.

Bradford total protein assay

The method was performed according to the manufacturer's instructions. Bradford solution (200 µl) was mixed with BSA standard or diluted samples (20 µl) in a 96-well plate format. The plate was incubated for ~1 h, and measured in a plate reader at 595 nm. The evaluation was performed in the Softmax™ Pro v5 software.

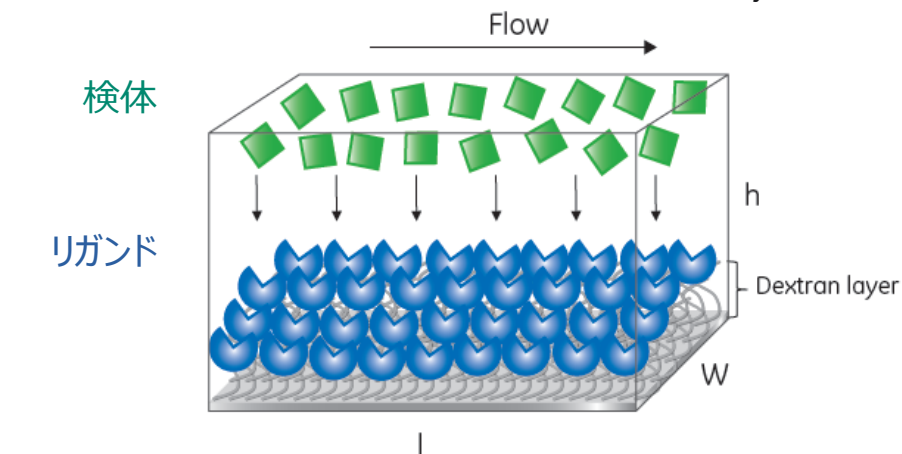
* This assay was developed as part of an MSc thesis by E. Anderson, Uppsala University, 2009.

標品要らずの濃度定量

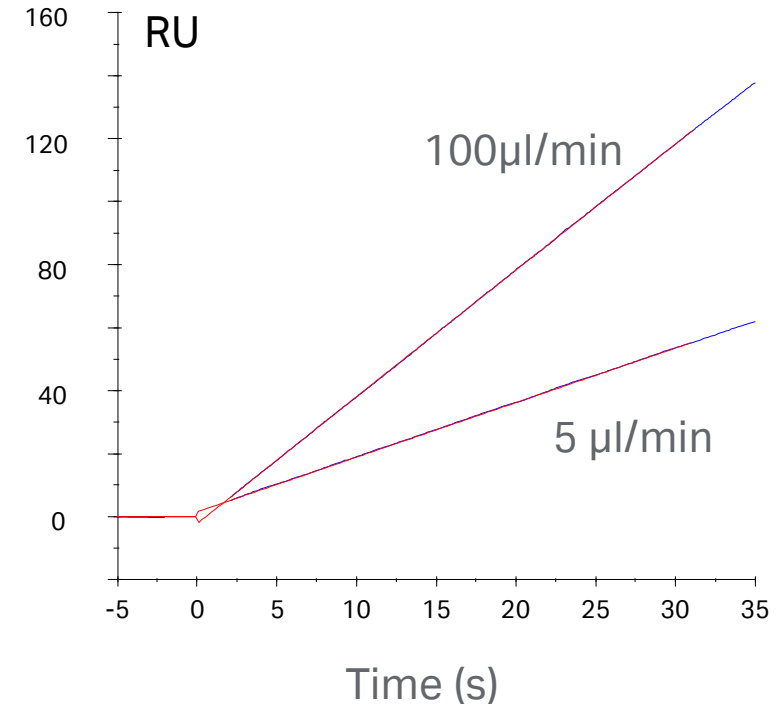
Calibration-Free Concentration Analysis (CFCA)

- 標品は不要
- フィッティングにより直接活性濃度が算出される
- センサーグラムの傾きは「分子量」「溶液中での拡散速度」「濃度」に依存することを利用する計算方法
- 適した標品がない、標品自体の評価に

Karlsson, R. Biophysical Reviews 1-12 (2016)
Pol et.al. Analytical Biochemistry 510, 88-97 (2016)



マストランスポートリミテーション環境にする。



$$\frac{dR}{dt} = f(Mw, Km, Conc)$$

Mw: 分子量 (分子固有の値)

km: mass transport coefficient (分子固有の値)

Conc: 濃度

標品要らずの濃度定量

Calibration-Free Concentration Analysis (CFCA)

- CFCA の基本的な原理の説明
- CFCA が成立するための条件
- Protein A と anti-human Fc Ab を用いたときの 8 種類の抗体の CFCA 結果の比較

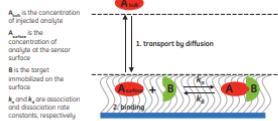
Assessment of protein concentration using a calibration-free method

Kevin Lindquist, Åsa Sporang, Robert Karlsson, Anna Sylvan, Anita Larsson, and Ewa Pol. GE Healthcare, Uppsala, Sweden.

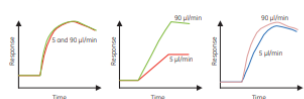
Introduction

In development and production of biotherapeutics it is important to determine the concentration of functionally active molecules in a given sample. Many established methods for protein concentration measurement do not distinguish between active and inactive molecules, or rely on comparison with a standard that may or may not be a mimic of the actual sample. The method discussed here, Calibration-Free Concentration Analysis (CFCA), provides a highly sensitive and robust biosensor-based determination of the protein concentration and does not require a standard. The method relies on measurement of analyte binding to a target immobilized on a sensor surface at varying flow rates, under conditions where the observed rate of binding is partially or completely limited by transport of analyte molecules to the sensor surface. This transport is a diffusion controlled process that depends on the analyte concentration. The concentration is obtained by running Biacore® binding experiments at different flow rates and fitting the binding data to the model describing the process.

In Biacore instruments samples are injected in a micro flow system and transported in laminar flow to the sensor surface. Molecules reach the sensor surface from bulk solution by a diffusion-controlled transport process. In addition to the concentration of analyte molecules, factors influencing the transport rate include the diffusion coefficient, flow cell dimensions, and flow rate. The balance between the transport rate and the binding rate determines whether the observed binding will be transport limited or reaction limited. For successful CFCA, the observed binding rate must be at least partially limited by transport. In this poster, we discuss how suitable flow rates, immobilization levels, and binding data are selected for successful implementation of CFCA.



How to recognize transport limited data?



- Reaction limited data
 - Binding rates are not affected by flow rate variation
 - Data not suitable for CFCA
- Transport limited data
 - Binding rates increase with increasing flow rate
 - Data suitable for CFCA
- Partially transport limited data
 - Initial binding is affected by flow rate variation
 - Late binding is less affected by the flow rate
 - Data potentially suitable for CFCA

Immobilization level and concentration range

Calibration-free concentration analysis of 2-fold dilution series of β_2 -microglobulin was performed on four surfaces immobilized to increasing levels of anti- β_2 -microglobulin antibody. Immobilization levels are expressed as response units, RU, divided by the molecular weight of interaction partner, kDa, to compensate for the difference in response between differently sized molecules. The protein solutions were injected at two flow rates, 5 and 90 μ l/min.

The concentration determined by the method is shown in each panel. Sensorgrams framed in green are obtained under experimental conditions that return the same calculated concentration after adjustment for the dilution factor. The concentration given by sensorgrams framed in red are overestimated.

The most apparent visual indicator of data suitable for CFCA is a significant separation of the binding curves obtained at high and low flow rates.

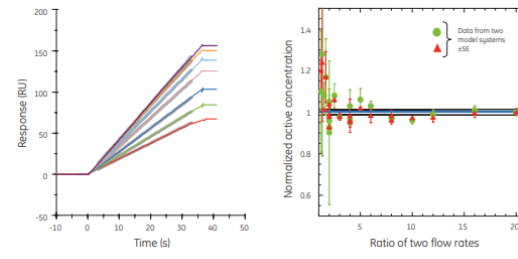
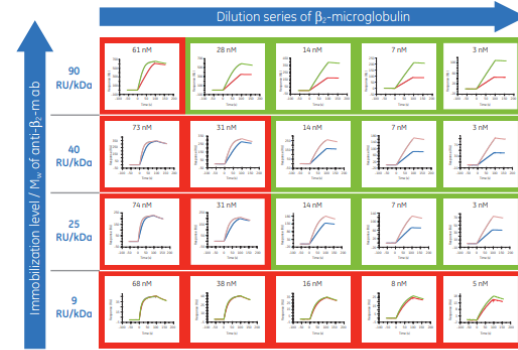
Flow rates

Concentrations were determined for two independent antibody model systems using binding data obtained at flow rates of 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 μ l/min. The binding data was analyzed in all 21 pairwise combinations of flow rates, as well as in the whole data set of 7 flow rates. Results were normalized to the value obtained from 7 flow rates (shown as value 1 with thinner lines to indicate +/- SE) to allow comparison between the model systems.

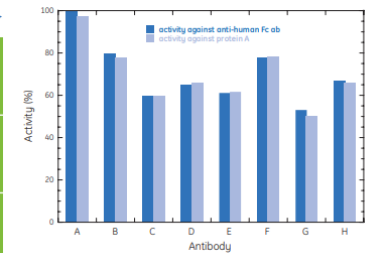
The results indicate that reliable concentration data is obtained when using two flow rates that differ by a factor of 10 or more.

References

Glosser, K.W., 1993. Anal Biochem, 213: 152-161.
 Karlsson, R., Fägerlin, L., Malmberg, M., Persson, B., 1993. J. Immunol Methods, 168: 75-86.
 Karlsson, R., Bock, M., Fägerlin, L., Persson, B., 1994. Comparison Methods Diagram, 6: 99-110.
 Christman, L. H., 1997. Anal Biochem, 249: 313-316.
 Sjöqvist, K., Malmberg, M., Bock, M., Fägerlin, L., Persson, B., 2002. Biochemistry, 41: 8263-8276.
 Hyatt, G., Horton, M., Doyle, L., and Chabon, J.H., 1997. Biophys Chem, 64: 127-137.



Concentration of 8 commercial antibodies



The CFCA of eight commercial antibodies, denoted as A to H, was performed under transport limited conditions using anti-Fc antibody and protein A. The concentration values were compared to the concentration declared by manufacturers. Activity is given as the ratio of measured and specified concentrations, respectively. The concentrations of all antibodies were in good agreement when measured against two different interaction partners although could differ as much as 50% when compared to the concentration specified by manufacturers.

Conclusions

- Calibration-free concentration analysis on Biacore systems open new possibilities for concentration measurements that relate directly to determination of the concentration of a particular binding site. Measurements are direct, label-free, and do not require a calibration standard. Robust and reliable results are obtained when experiments are performed using:
 - at least two flow rates, where the ratio between flow rates is > 10
 - a high surface concentration, typically \geq 25 RU/kDa (immobilized level/ M_w of interaction partner)
 - protein dilutions that give concentrations \leq 30 nM
- In the example, the concentrations of eight antibodies were in good agreement when measured against two interaction partners targeting the antibody Fc part. However, concentrations determined by CFCA differed by up to 50% from the values specified, depending on the method used. More work is required to explain the discrepancies.



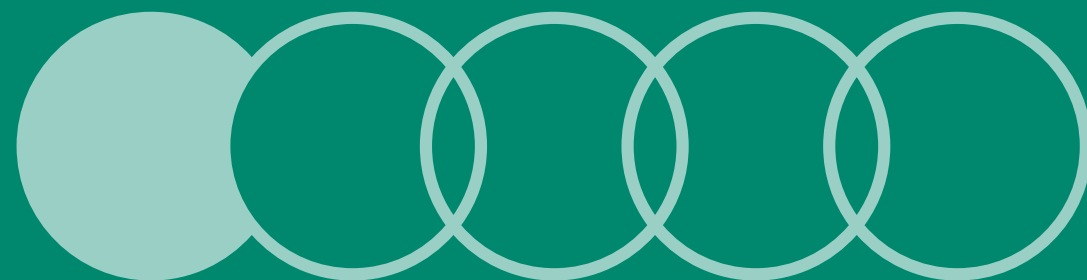
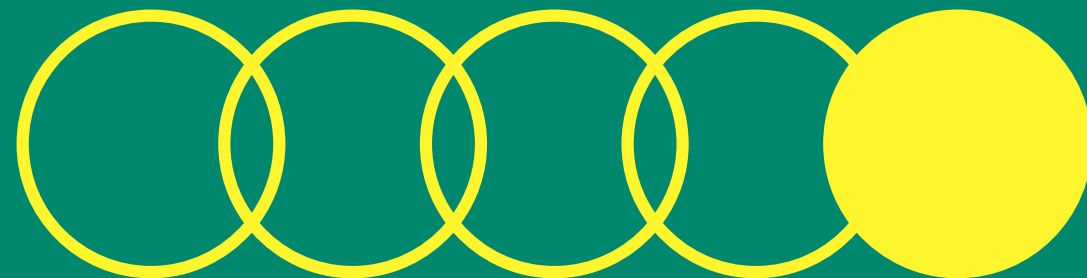
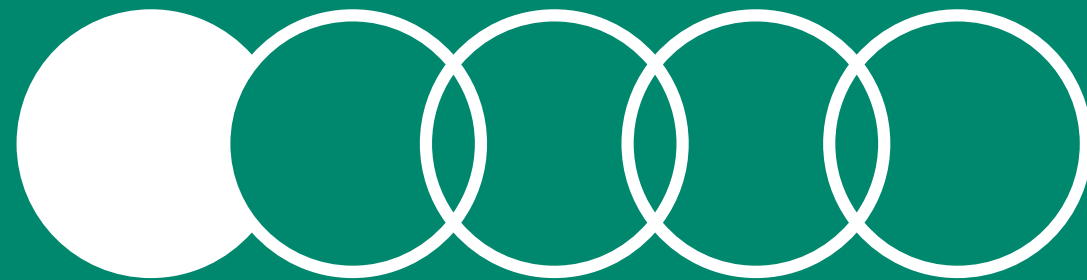
GE, the logo of GE and GE Healthcare are trademarks of General Electric Company. Biacore is a trademark of GE Healthcare Company. © 2008 GE Healthcare Company. All rights reserved.



各手法のPros/Cons

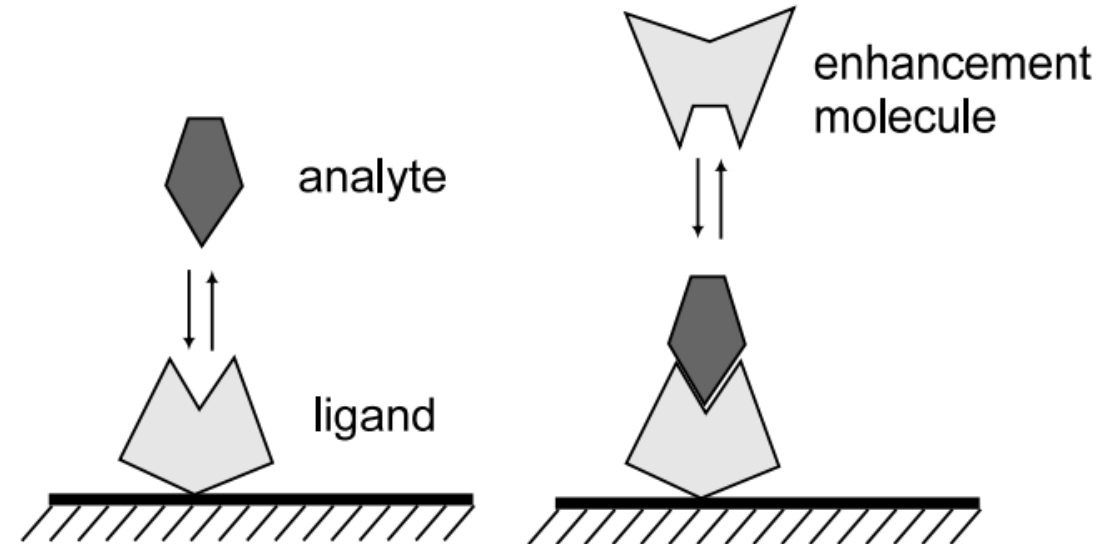
	Pros	Cons
直接法	シンプル 検体以外の試薬使用量が少ない。	分子量に依存した感度。 低分子で十分な感度が得られないケースがある。
直接法 + 増感	分子量が小さい場合に感度を増幅 完全性試験の代用 クールドなサンプルなどで非特異を抑える	増感試薬が必要 測定時間が長い
阻害法	感度が検体の分子量に依存しない	適切なDetecting Moleculeが必要
CFCA	標品が要らない 測定時間が短い	拡散係数の情報が必要 測定可能な範囲は0.05–5 µg/ml程度

3. 各手法における測定系構築 の考え方



直接法における測定系構築の考え方

1. リガンドやその他試薬の選択
2. レポートポイントの考え方
3. センサーチップおよび固定化方法
4. 繰り返し測定を行うための再生条件
5. 測定レンジの最適化



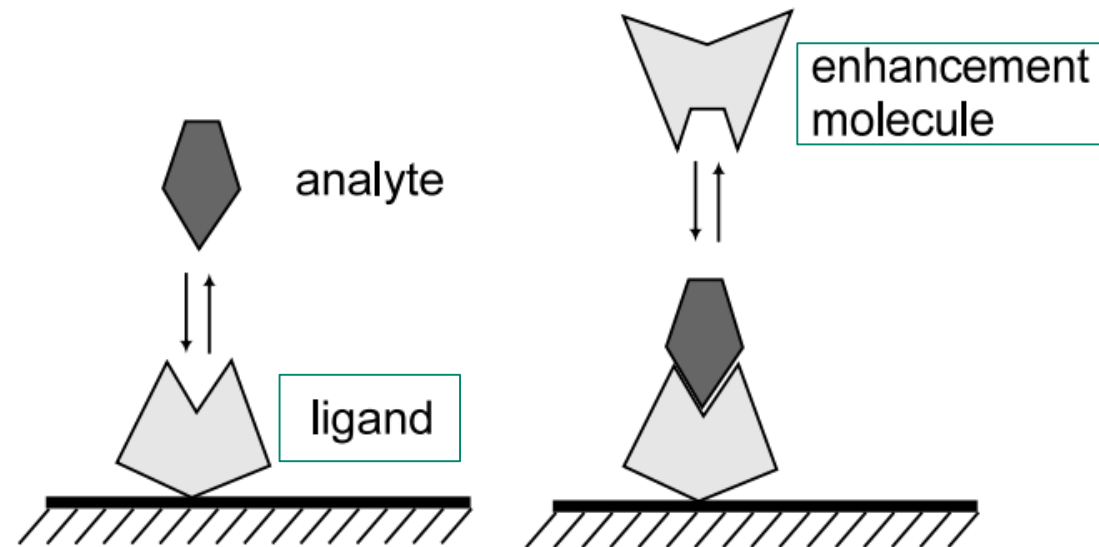
リガンドやその他試薬の選択 ～ 直接法

リガンド

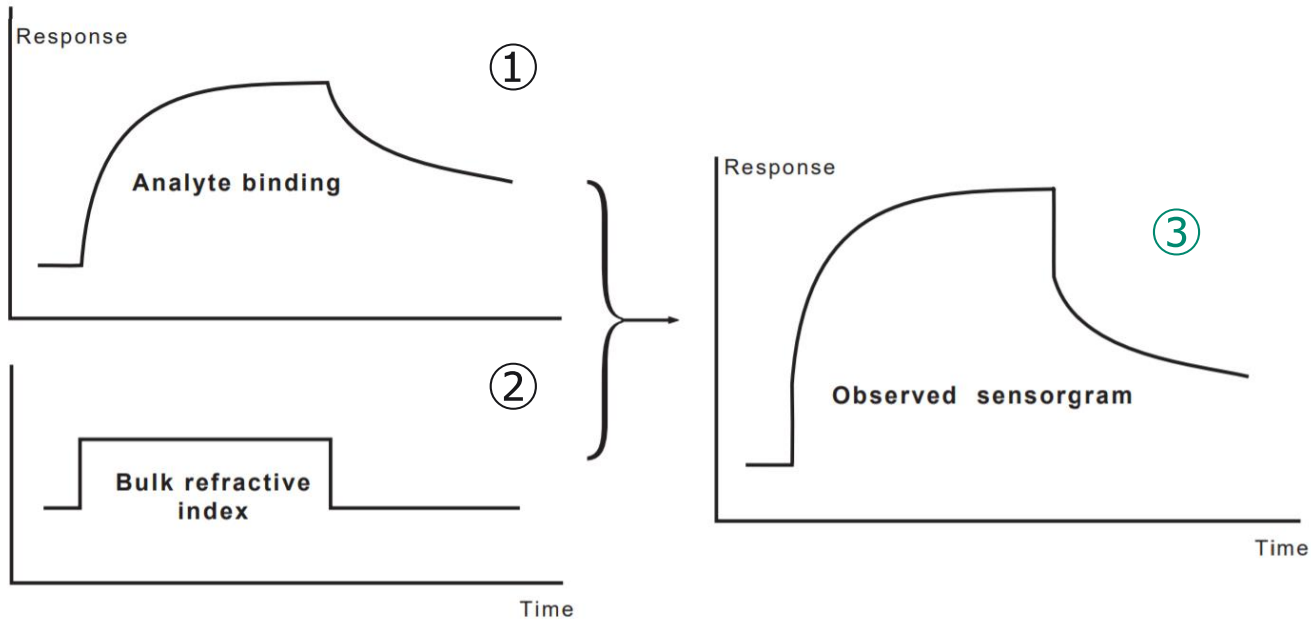
- 活性維持したまま固定化が可能で、検体の選択性、特異性が目的とする精度に見合っていること。
- 低濃度まで検出するにはAffinityの高いリガンドが望ましい。
- 活性を落とさずに再生が可能であること

増幅試薬

- 主に抗体。通常検体よりも分子量の大きい分子、または、複数サイトに結合できる分子。短いContact TimeにするためにはAffinityが高い分子のほうがいい。



レポートポイントの考え方 ~ 直接法

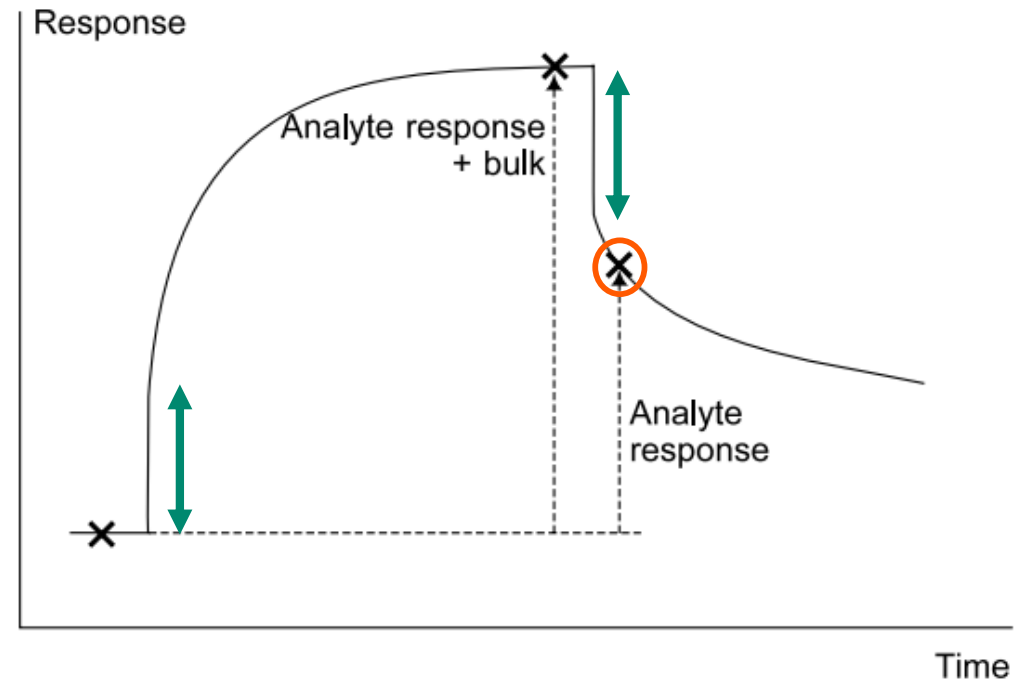


実際のセンサーグラム ③

検体の結合レスポンス ①

+

サンプルとランニングバッファー間のバルクレスポンス ②



Report Pointは、通常**Stability early**を採用

* Binding level は**バルク**を含む

レポートポイントの追加方法

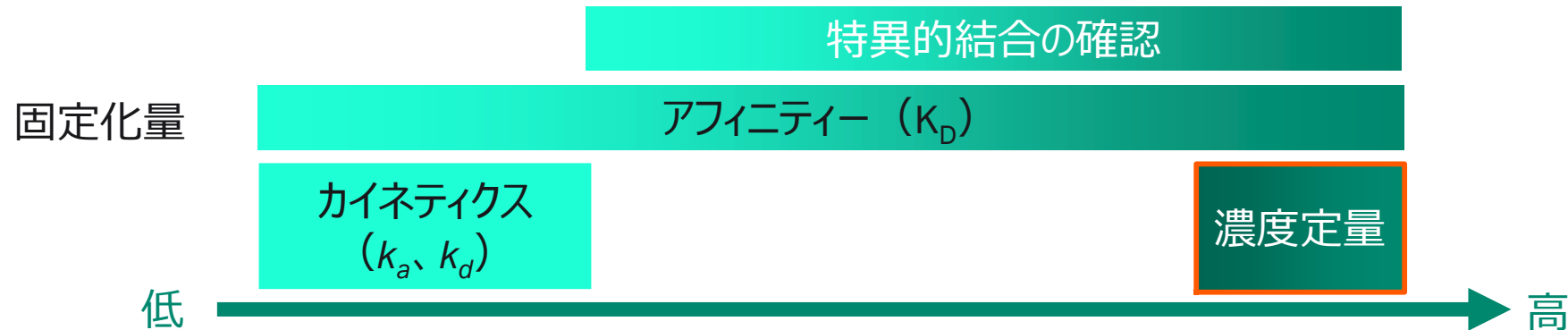
例) Stability2
検体添加終了10秒後
5秒間の平均値

Id	Position	Assay step purpose
Stability 2	10 seconds after stop of injection "Sample 1 injection"	Startup Calibration Sample Control Sample

Selected	Assay step purpose
<input type="checkbox"/>	Startup
<input checked="" type="checkbox"/>	Calibration
<input checked="" type="checkbox"/>	Control Sample
<input checked="" type="checkbox"/>	Sample

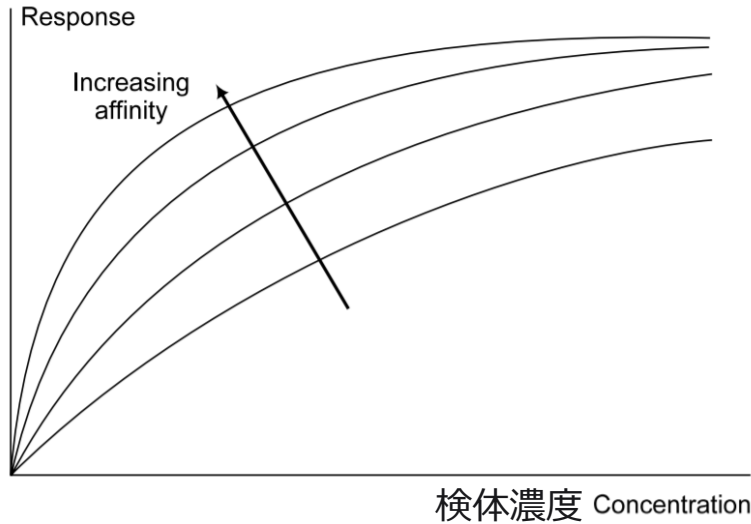
センサーチップおよび固定化方法 ～ 直接法

- タンパク質リガンドの場合、10～50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 程度
- 50～150 kDaのタンパク質の場合、7,000～15,000RUの固定化レベル程度
 - * 低濃度の検体まで濃度定量ができるように、Biacoreのアッセイとしては高い固定化量
- Sensor chip CM5 + Amine couplingが一般的ですが...
- アミンカップリングによりタンパク質の不活性化が見られる場合、Sensor Chip SA
- その他のキャプチャー法や増幅試薬を使用する測定の場合、固定化量を比較的低く設定
 - * 立体障害によるレスポンスの異常を防ぐため



測定レンジの最適化 ～ 直接法

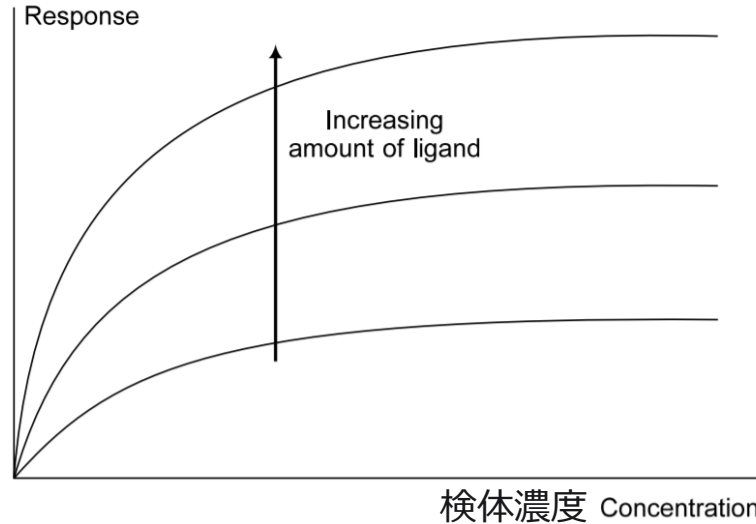
リガンドのAffinity



Affinityの違いは濃度軸に対する検量線の位置に影響する。
高Affinity ⇒ 低濃度帯へシフト

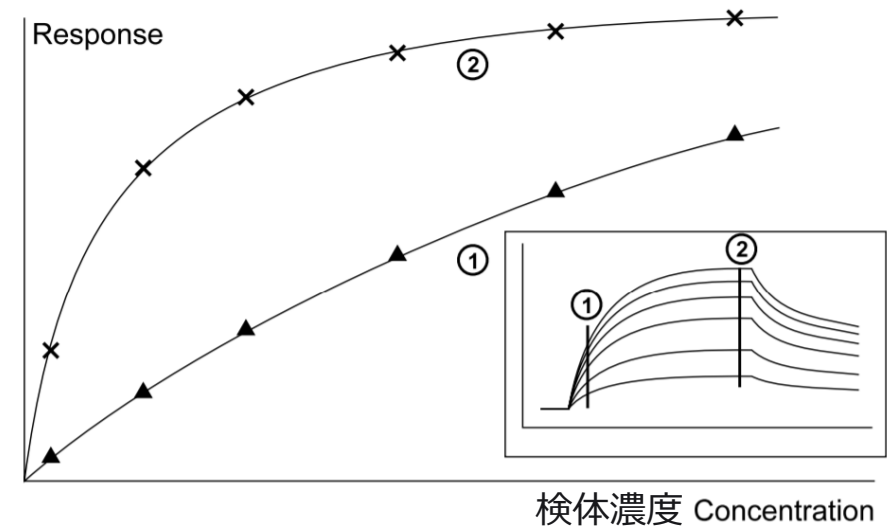
1:1 binding の場合、 $1/2 R_{max} = K_D$

リガンドの固定化量



固定化量は検量線の高さに影響。
高固定化量 ⇒ 測定レンジが広がる。
定量に適した濃度帯のシフトはない。

contact time



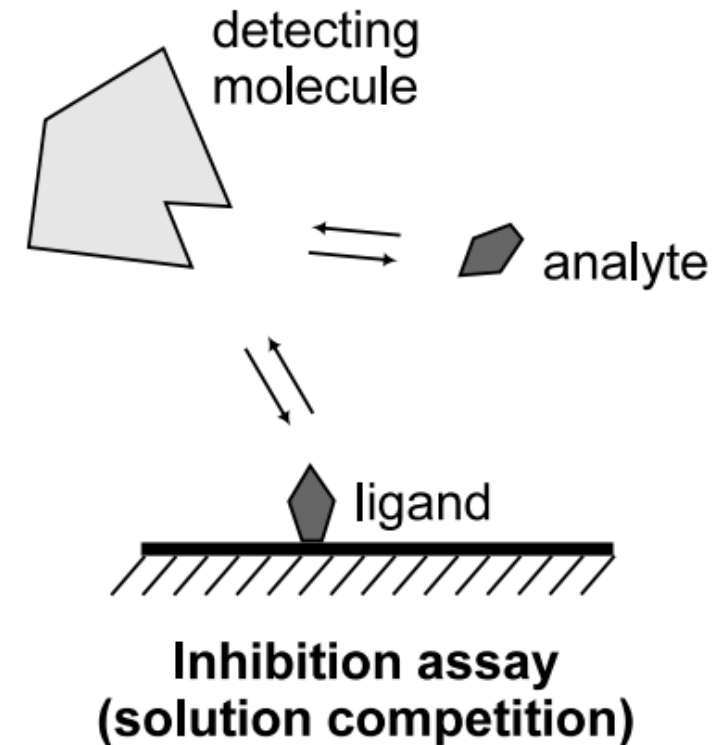
contact time は、検量線の高さと位置に影響する。

contact time が長いほど低濃度の定量に適している。

増幅試薬も同様の考え方で、Affinity、濃度、Contact timeにより測定範囲
通常は迅速に飽和させるため高濃度で使用する (KD値から1～2桁上、10～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

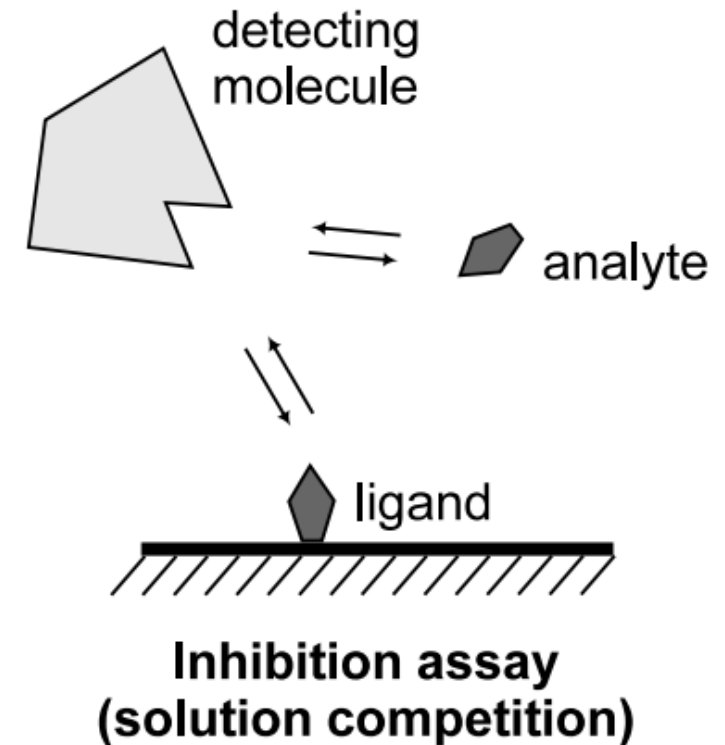
阻害法における測定系構築の考え方

1. リガンドやその他試薬の選択
2. レポートポイントの考え方
3. センサーチップおよび固定化方法
4. 繰り返し測定を行うための再生条件
5. 測定レンジの最適化



リガンドやその他試薬の選択 ～ 阻害法

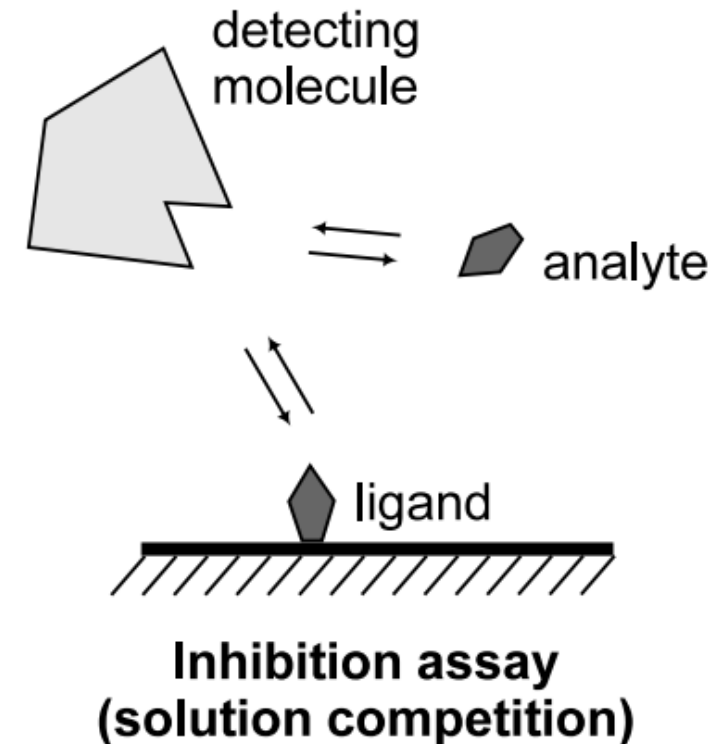
- リガンドは検体と同じもの
- 固定化に適した分子でない場合は、そのアナログを使用することも可能。
- Detecting moleculeに必要な条件は、直接法のリガンドと同じ。
- 結合の速いDetecting moleculeほどスループット向上



センサーチップおよび固定化方法 ～ 阻害法

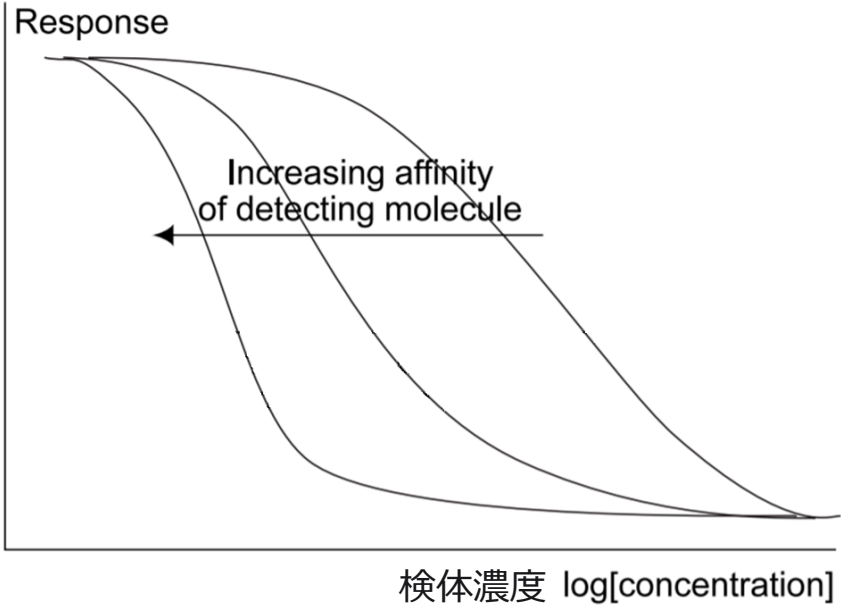
特に阻害法における低分子の固定化に関する課題

- 適切なアミンが天然分子に存在するか
 - 修飾が必要
- Detecting moleculeとの結合に影響しないか
 - スペーサーが必要
- Amine coupling時に、プレコンの効果を得られない
 - 高濃度（5-10 mM）の塩で反発を抑える
 - Borate 8.5（10 mM disodiumtetraborate pH 8.5, 1 M NaCl）
- 通常キャプチャー法は用いない
 - 検体の結合サイトを奪う
 - Biotin化を行うことはあり⇒Sensorchip SA



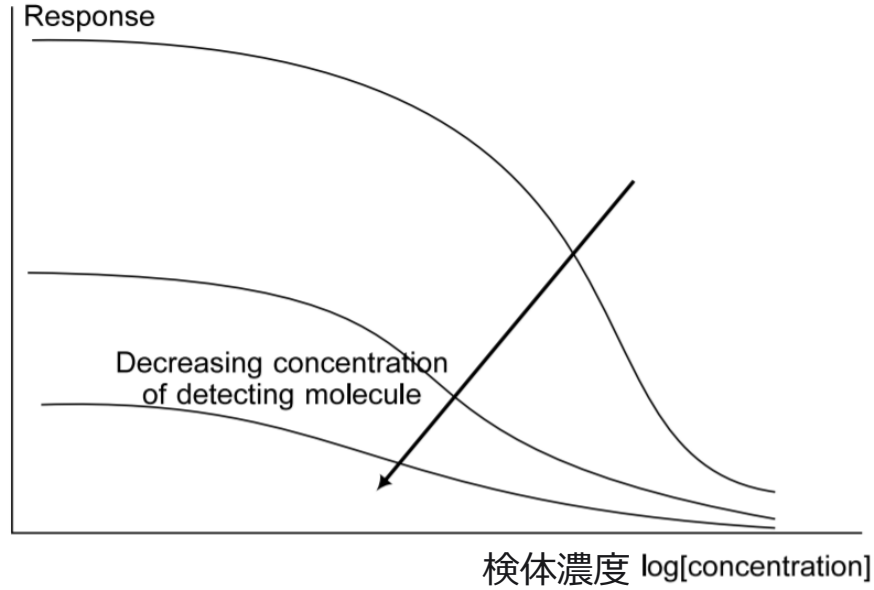
測定レンジの最適化 ～ 阻害法①

detecting molecule のAffinity

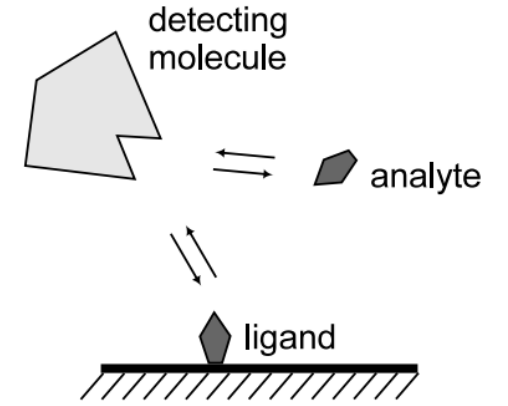


detecting molecule のAffinityが高いと低濃度の検体の定量が可能。
⇔ 定量できる範囲が狭くなる。

detecting molecule の濃度



detecting molecule の濃度を下げていくと最大レスポンスが落ちてくるが、より低濃度の検体が定量できる場合がある。



contact time

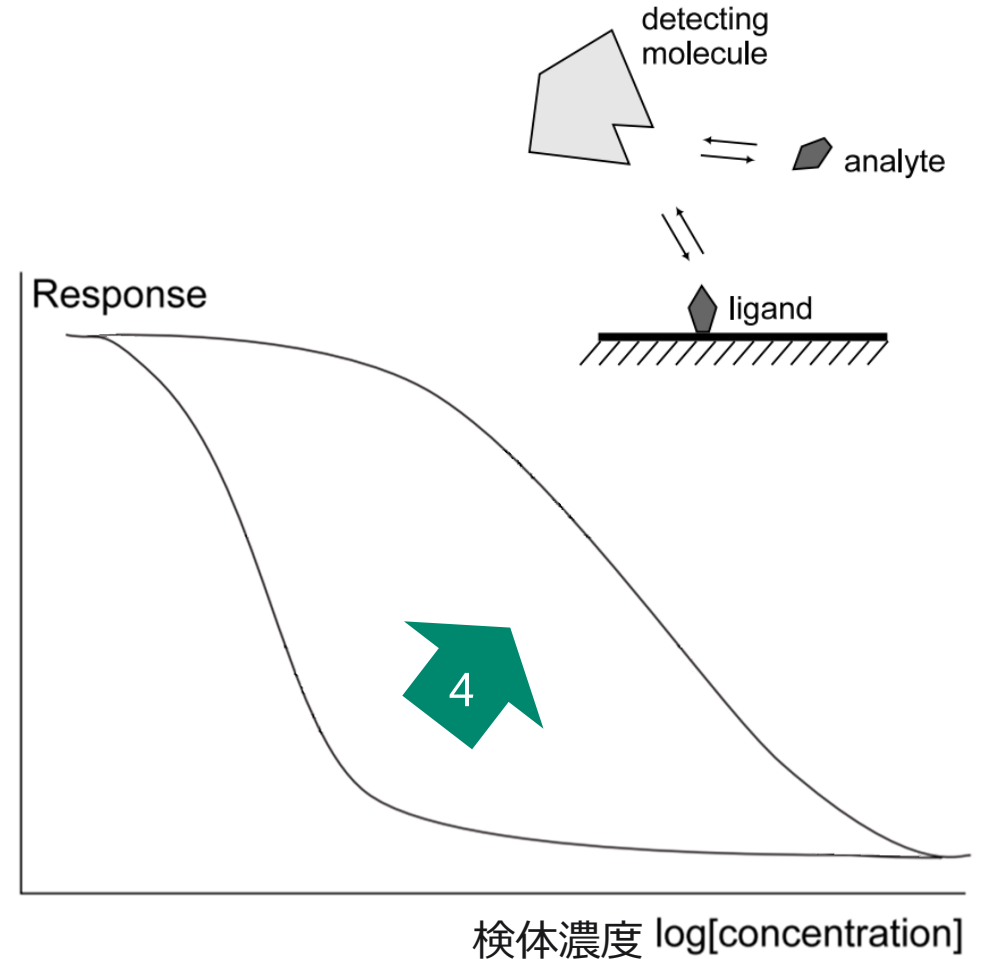
contact timeは直接法と同様、検量線の検量線の高さと位置に影響。



低濃度のdetecting molecule + 長いContact timeで、より低濃度の定量が可能となる。

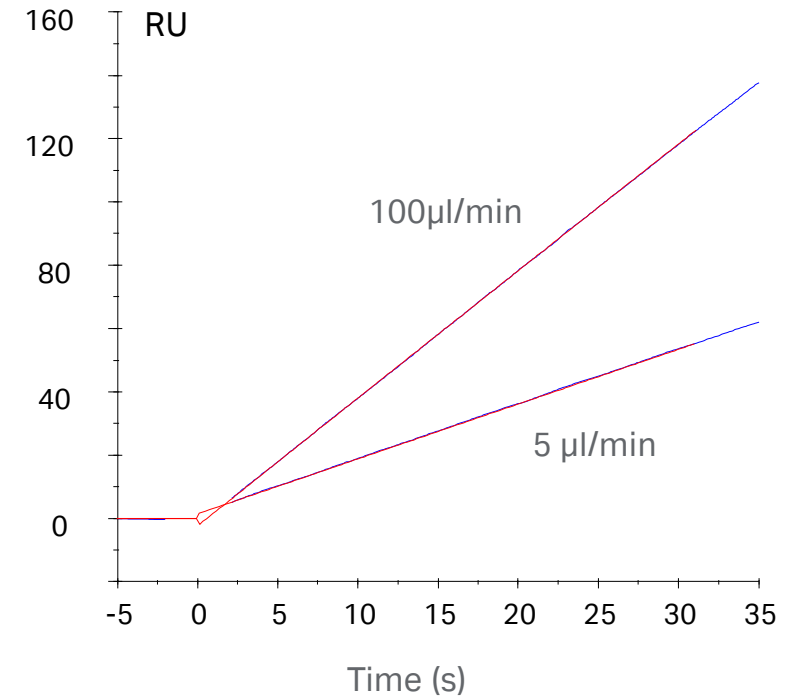
測定レンジの最適化 ～ 阻害法②

1. 検体もしくはそのアナログを固定
2. 検体は添加せず detecting molecule のみ、何点かの濃度で測定。100-2000 RU 程度のレスポンスが得られる濃度を探す。
3. 定量したい範囲で検体を添加した detecting molecule で検量線作成。
4. 検量線の全範囲が利用できない（高濃度帯がベースラインに達している）場合、detecting molecule の濃度を低くして、contact time を延ばすことで最大値の低下を抑える。
5. detecting molecule の濃度と contact time で調整ができない場合、検体に対する detecting molecule の親和性が低すぎることを考えられる。



CFCAにおける測定系構築の考え方

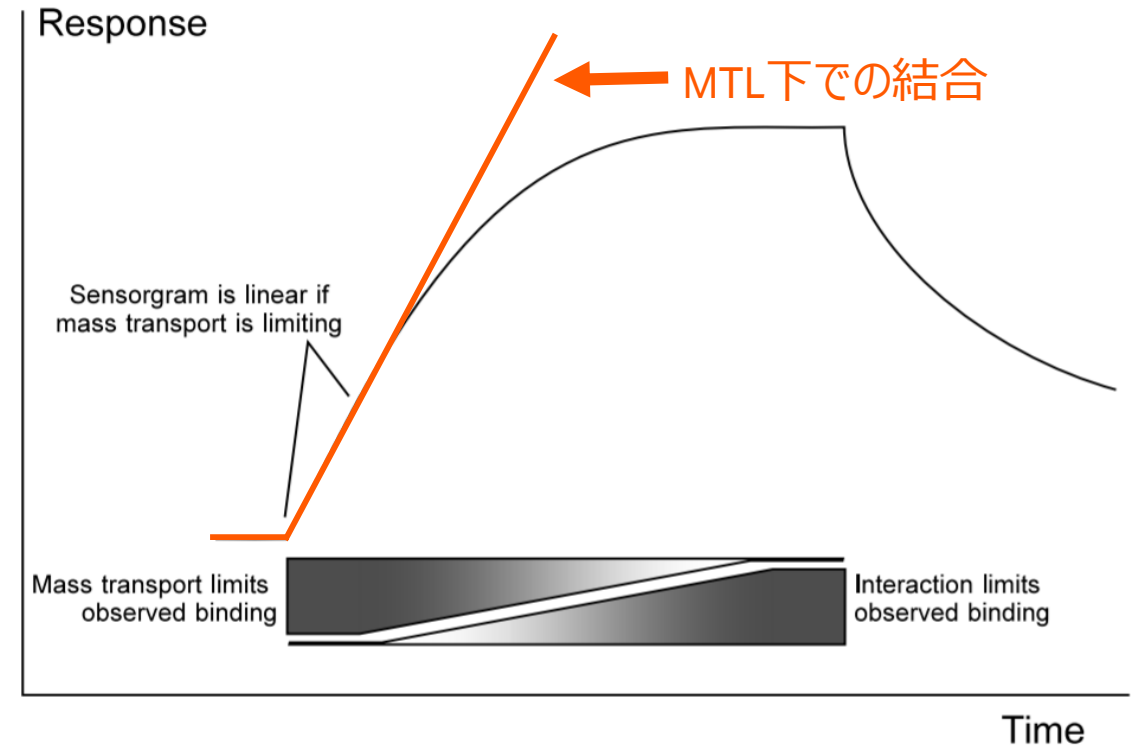
1. リガンドやその他試薬の選択
2. センサーチップおよび固定化方法
3. 繰り返し測定を行うための再生条件
4. 測定レンジの最適化
5. アッセイ系の特異性



リガンドやその他試薬の選択

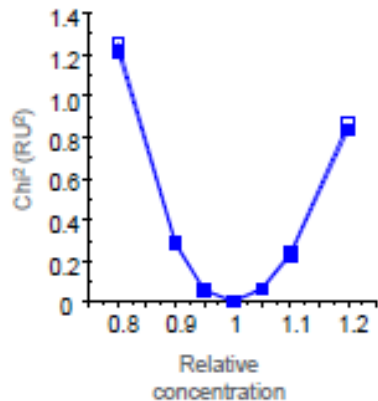
リガンド／検体

- Kinetics解析による結合速度の情報が必要
- 結合速度の遅い（およそ $k_a \leq 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ）分子や Affinityの低い（およそ $K_D \geq 10^{-6} \text{ M}$ ）分子には不向き
- 活性を落とさずに再生が可能であること
- **マスランスポートリミテーション（MTL）がおこる条件**
 - ✓ マスランスポート：分子が拡散律速でセンサーチップ表面へ輸送されること
 - ✓ 高いリガンド固定化量 \Rightarrow 検体の供給が追い付かず、リガンド近傍に到着する全ての検体が結合し、直線的な結合が生じる



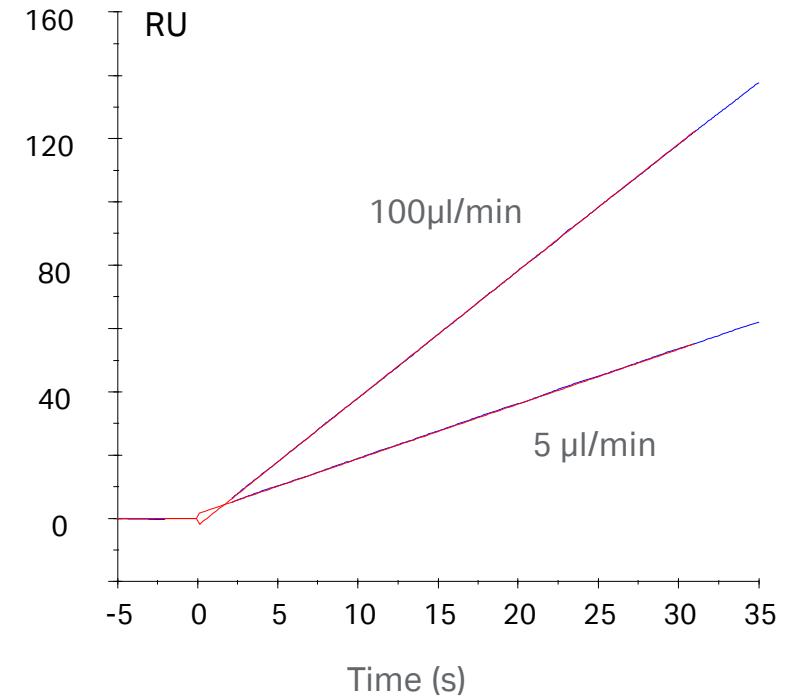
測定レンジの最適化

- 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.で流した場合、初期結合速度が 0.3–15 RU/s の濃度範囲
- 検体添加後36秒以上にわたってセンサーグラム形状が直線であること
⇒ QC Ratio、Sensitivity Check などで評価
- 測定可能な範囲は0.05–5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度。それ以上であれば希釈が必要



Sensitivity Check

良好なフィッティングが得られなかった際に実施を推奨
±5%, 10%, 20%と固定化量を変えてChi²で評価
Chi²は小さいほどFittingが良好



【Tips】拡散係数の求めかた Diffusion Coefficient Calculator / Converter

You are here: [Biacore Life Sciences](#) > [Application Support](#) > [Laboratory Guidelines etc.](#) > [Diffusion Coefficient Calculator](#)

Training Portal

- Application Support
 - Laboratory Guidelines etc.
 - Training
 - Product Support & Service
- Web Services
 - My Account

← BACK PRINT

Diffusion Coefficient Calculator / Converter

This on-line tool is designed to help you calculate diffusion coefficients for use in Calibration-Free Concentration Analysis assays. It is accessible only via a valid product key associated with the appropriate types of Biacore software.

Note that the diffusion coefficient at 20 C is entered in the run method as a variable for CFCA determination. The software converts the value to the run temperature if necessary.

Calculate diffusion coefficient at 20°C

Molecular weight: (Da) ① 分子量

Frictional ratio: Choose molecular shape > ② 摩擦率
形状の選択または数値入力
 Enter value

Viscosity relative to water at 20°C: Use standard value (1.00) ③ 20°Cにおける粘性
初期値 = 1
 Enter value

Diffusion coefficient at 20°C = (m²/s) ④ CALCULATEで算出

各手法のPros/Cons

	Pros	Cons
直接法	シンプル 検体以外の試薬使用量が少ない。	分子量に依存した感度。 低分子で十分な感度が得られないケースがある。
直接法 + 増感	分子量が小さい場合に感度を増幅 完全性試験の代用 クールドなサンプルなどで非特異を抑える	増感試薬が必要 測定時間が長い
阻害法	感度が検体の分子量に依存しない	適切なDetecting Moleculeが必要
CFCA	標品が要らない 測定時間が短い	拡散係数の情報が必要 測定可能な範囲は0.05–5 µg/ml程度







Thank you





Biacore X100で相互作用解析をはじめよう

Cytiva アプリケーションスペシャリスト 高田 元

 [Register](#)  2021年1月27日  15:00~15:50  50min

CONTENTS

Biacore X100は、小スケールの相互作用解析を行うためのエントリーモデルです。今回、アッセイ系の立ち上げに便利なBiotin CAPture Kitを用いて、実際の測定の流れをご覧ください。これから相互作用解析をはじめたいという皆さま、ぜひご参加ください。



【お問合せ先】

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

バイオダイレクトライン 内線#2をご選択ください

TEL: 03-5331-9336 / FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

本資料の使用については、お客様施設内での使用に限ります。他社への転送、譲渡等は禁じます。本資料の著作権その他の知的財産権は、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に帰属します。無断転載、無断コピー、改ざん、二次利用を禁じます。

掲載されている価格は2020年10月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は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。

弊社は、資料の掲載内容の正確性を記すべく、情報を随時更新しておりますが全ての情報が最新であることを保証するものではありません。

したがって、当資料上の掲載内容に誤りがあった場合でも弊社は責任を負いかねます。