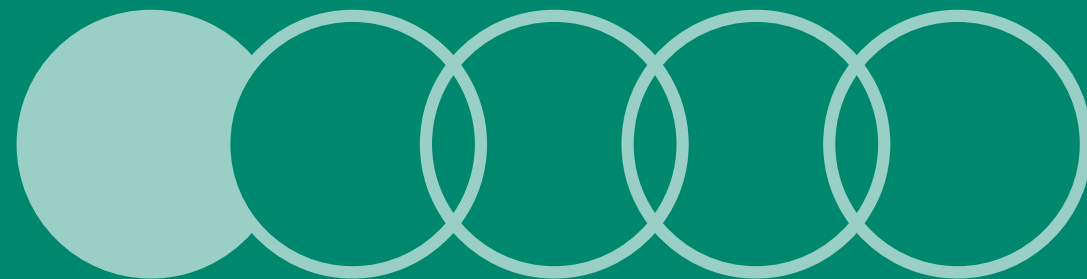
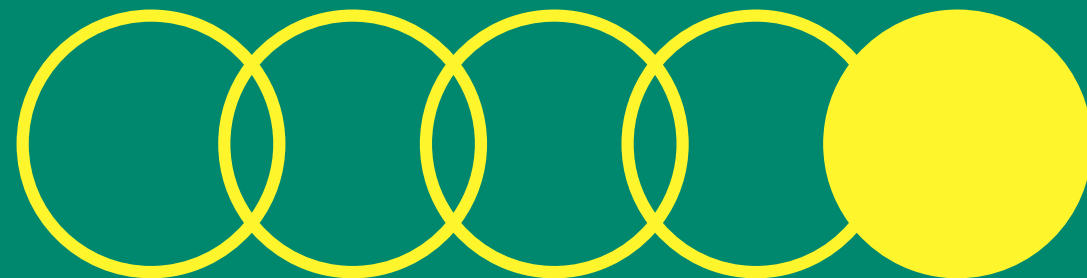
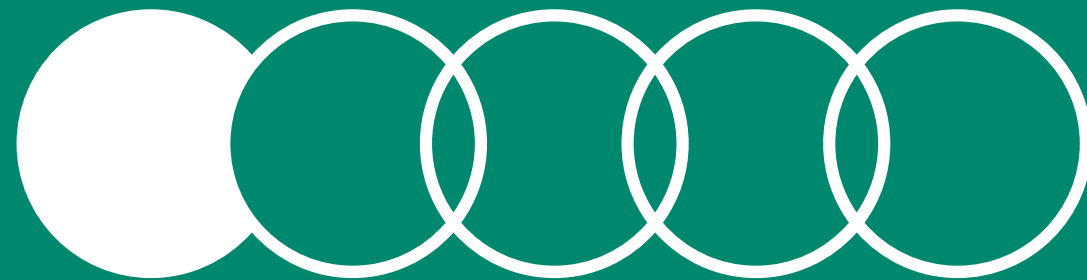


# Cytiva Webinar

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。

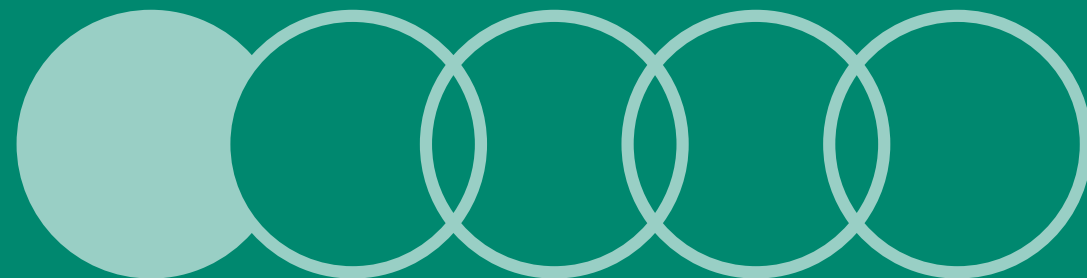
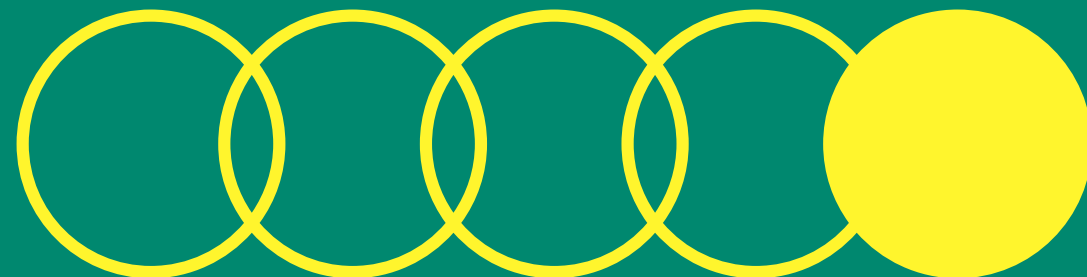
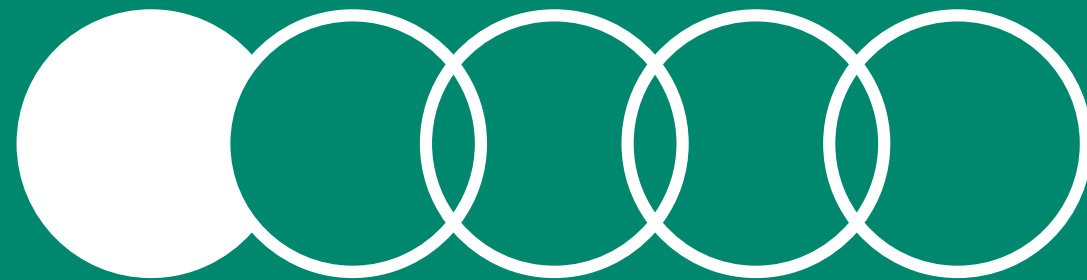


## 音声につきまして

- 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 【オンラインデモ】 Biacore X100で 相互作用解析をはじめよう

Gen Takata  
January 27 2021

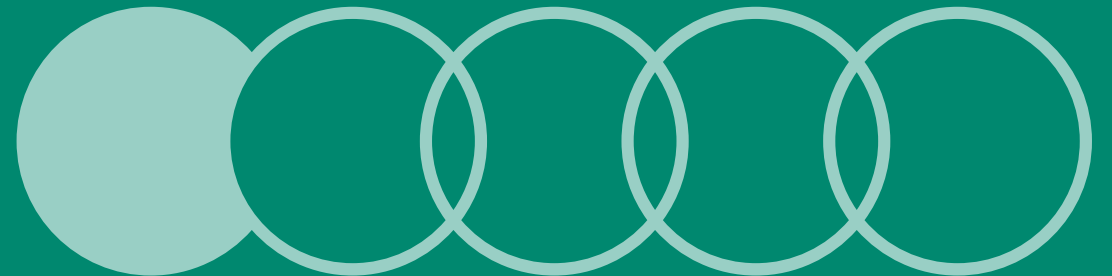
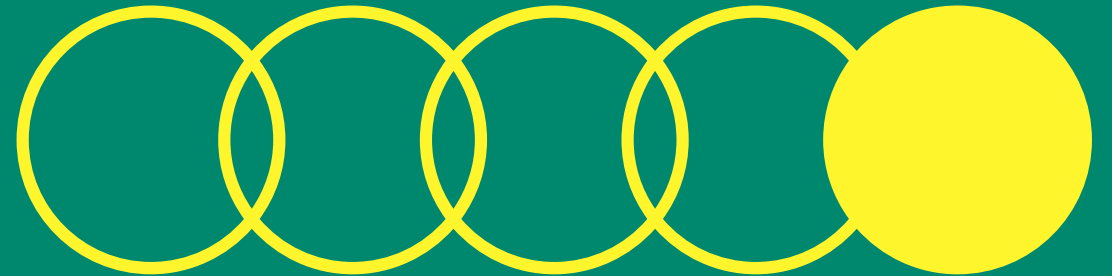
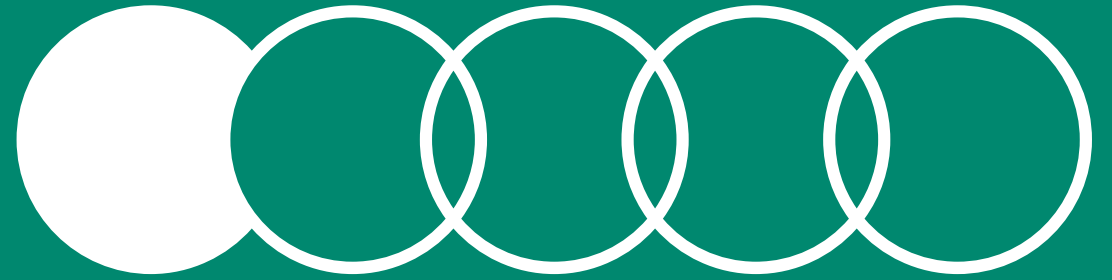




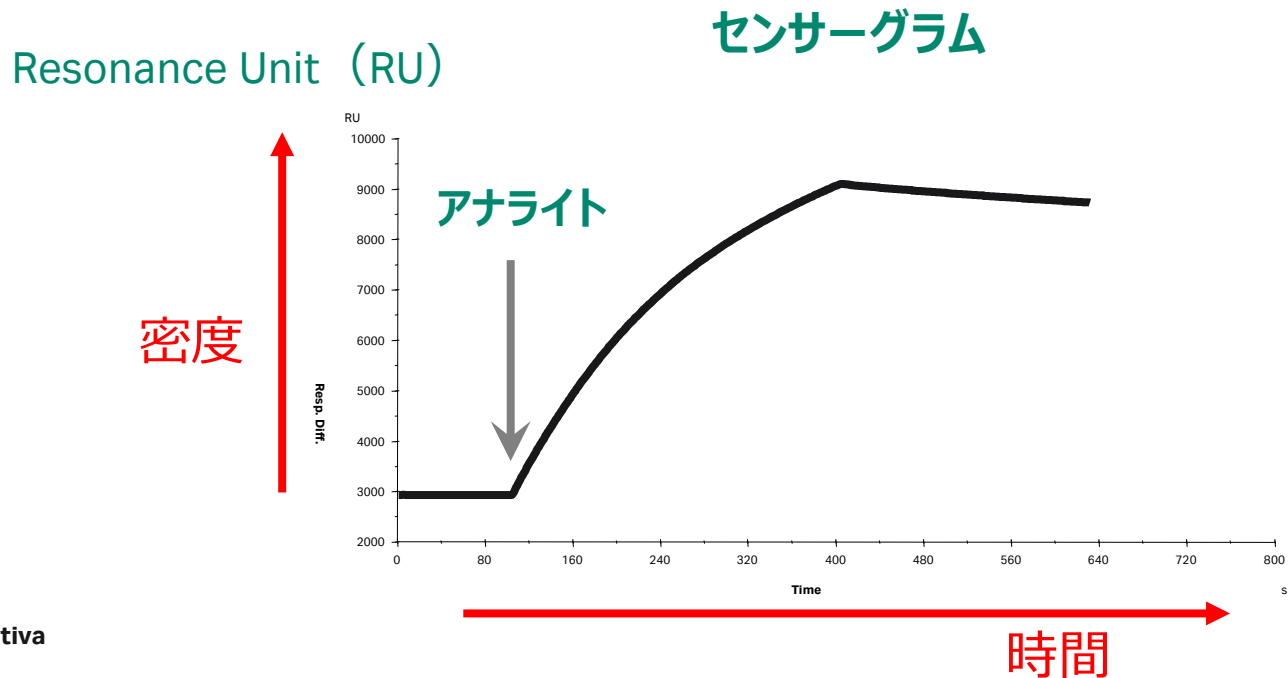
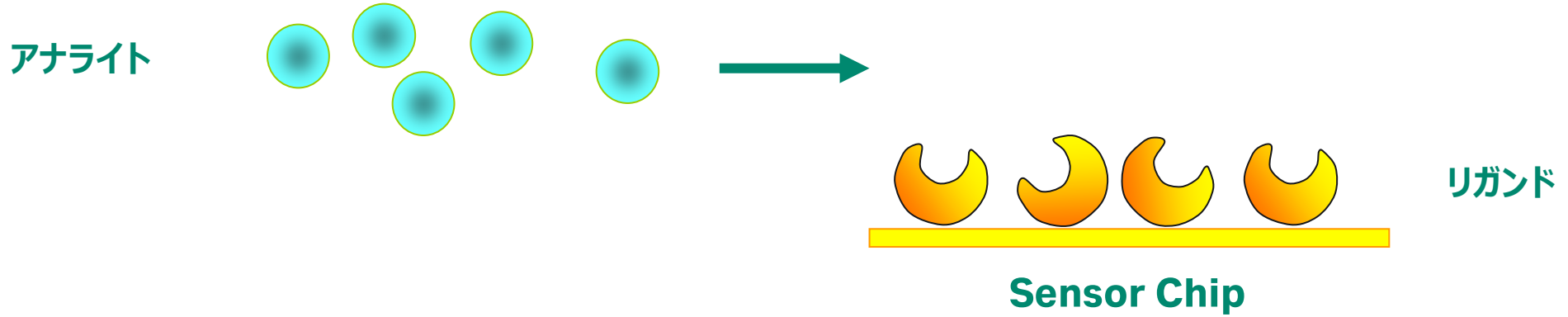
## 本日の内容

1. Biacore X100とは
2. デモンストレーション内容の説明
3. Biacore X100デモンストレーション

# 1. Biacore X100とは



# 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

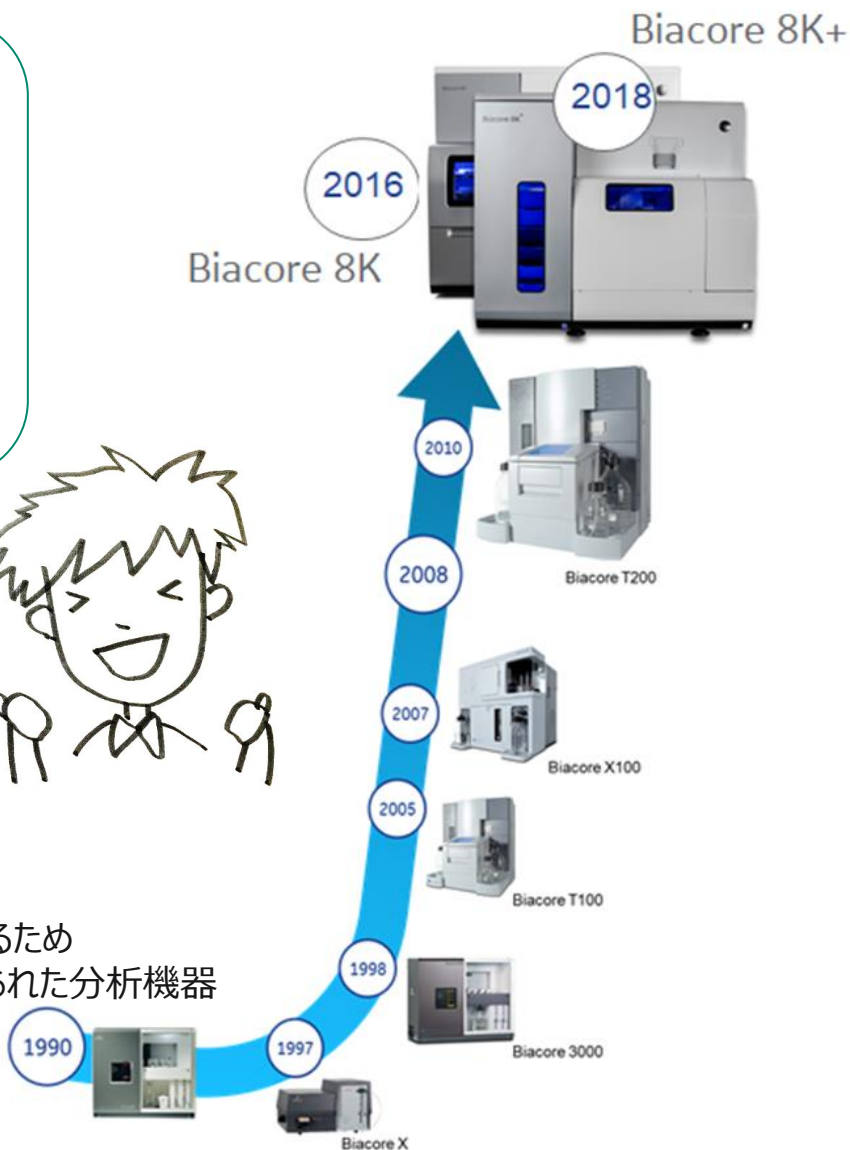
- ✓ 長い歴史を持つ  
デファクトスタンダード
- ✓ データ品質が高い
- ✓ 感度が高い



## 1990 Biacore誕生

生体分子の相互作用を研究するため  
世界で初めてSPRを応用して作られた分析機器

Cytiva



## 現行ラインナップ

8本のニードルにより  
高品質測定データを短時間で

基礎研究から医薬品探索  
品質管理まですべてに

### Biacore 8K/8K+

### Biacore T200

低分子創薬に

エントリーモデル  
小スケールの相互作用解析に

### Biacore S200

### Biacore X100

# Biacore X100とは

## エントリーモデル 小スケールの相互作用解析に

- ✓ Biacoreのデータ品質を備えたコンパクトモデル
- ✓ はじめてカイネティクス解析を行う方
- ✓ 小スケールでじっくり評価したい方
- ✓ 他機種の種類検討や予備機として
- ✓ 簡単操作のソフトウェア
- ✓ 15バイアル



## Biacore X100 Plus Package System

- ✓ 溶媒補正  
(DMSOなどのバルクレスポンス補正、おもに低分子化合物)
- ✓ 検量線を用いた濃度測定
- ✓ CFCA (検量線無しの濃度測定)
- ✓ 設定温度  
(4°C ~ 40°C \*ただし、室温より10 °C下まで)
- ✓ 流速の変更 (1 ~ 100  $\mu$ L/min)
- ✓ デガッサー (Running Buffer の脱気)



# Biacore X100 新価格のご案内

製品名	2020年10月19日までの 希望小売価格（円）	2020年10月20日からの 希望小売価格（円）	改定率
Biacore X100	13,772,400	10,457,890	25%
Biacore X100 Plus Package System	19,494,400	11,011,930	45%

※2020年10月19日時点の希望小売価格と比較した際の、2020年10月20日からの希望小売価格の改定率を示します。

## 既にBiacore X100をお持ちの方にも

- ✓ アップグレードも価格変更。  
5,767,100円 → 1,762,100円（改定率 70%）

## 消耗品類も

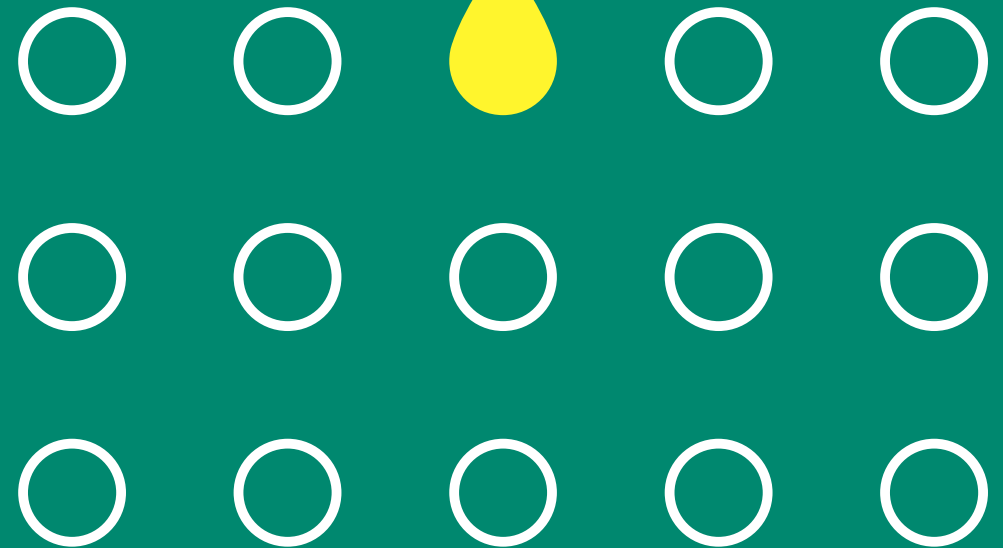
- ✓ バイアル／キャップ（改定率 15%）
- ✓ 各種センサーチップ（改定率 10%）



ずっと使いたい  
**Biacore**  
を目指して



## 2. デモンストレーション内容の説明



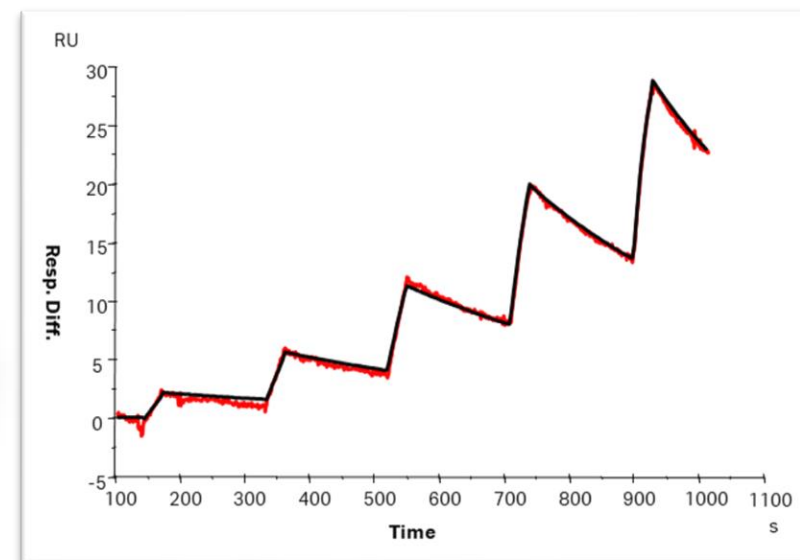
# デモンストレーション概要

## Biacore X100

### Biotin CAPture kit



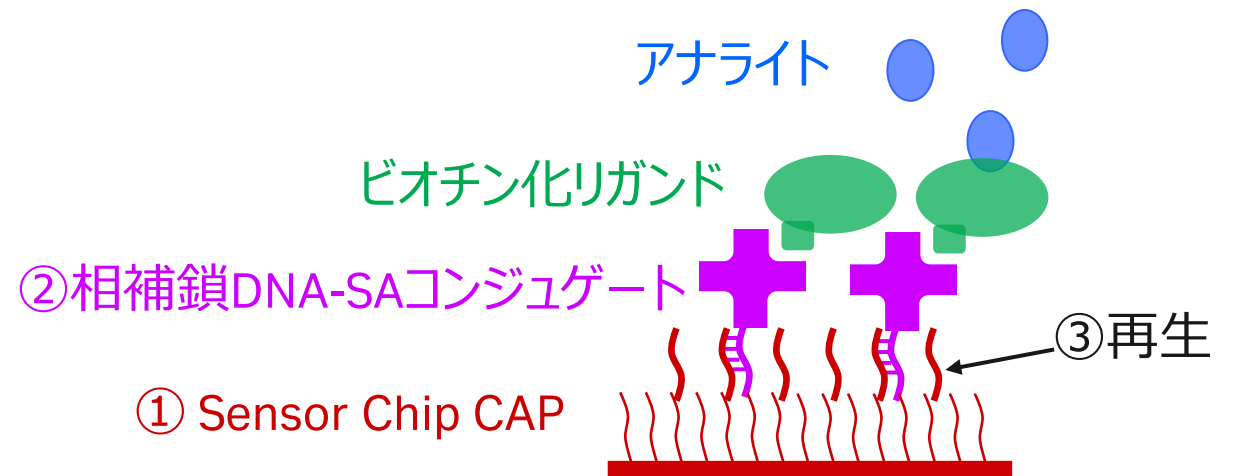
### シングルサイクルカインेटクス



# Biotin CAPture kit



- ✓ 一本鎖オリゴDNAがプレイモビライズされたチップ、ストレプトアビジン修飾された相補鎖DNAを使用。
- ✓ ビオチン-ストレプトアビジンの強い結合であってもKit付属の再生溶液で、チップを再利用することができます。
- ✓ **固定化、再生条件の分からない、はじめてのサンプルに最適**



# サンプル

- ランニング緩衝液 : PBS-P+ Buffer 10× (Cytiva : 28995084)
- リガンド : Biotin化 Carbonic Anhydrase (30 kDa)
- アナライト : Furosemide (331 Da)

## Carbonic AnhydraseのBiotin化

EZ-Link™ NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific : 21336)

Carbonic Anhydrase : Biotin = 1 : 1.5 (モル比) で混和。室温で1時間。

## フリーBiotinの除去

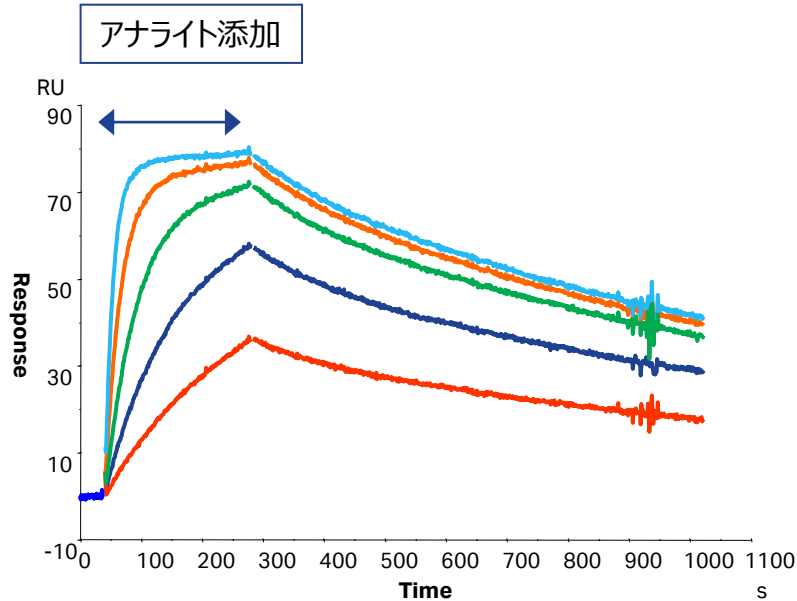
Vivaspin 500-10K (Cytiva : 28932225)

12,000 G、5分 × 3回



# 【補足】マルチサイクルカインेटクス vs シングルサイクルカインेटクス

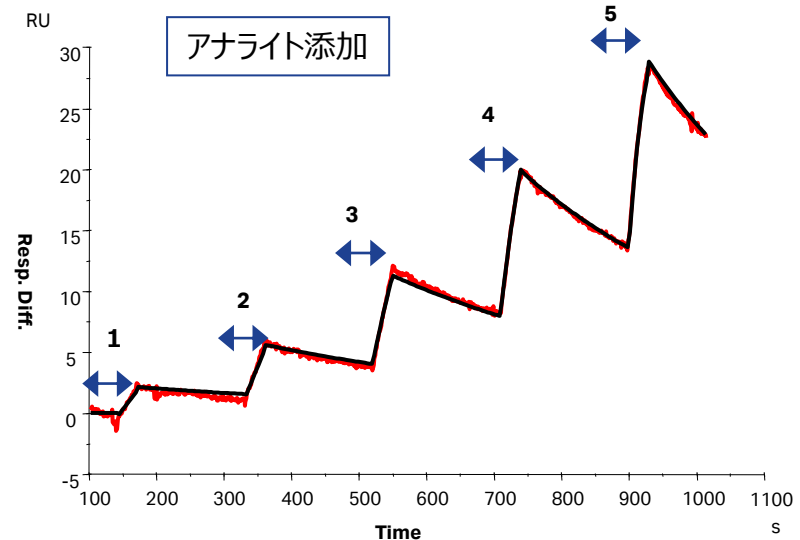
今回、シングルサイクルカインेटクスを実施します。



各濃度は個別サイクルで測定する



- 結合アナライツを取除く再生操作が必須
- 各サイクルでリガンドのアナライツ結合活性の再現性が重要
- 再生が困難なサンプルには適用できない

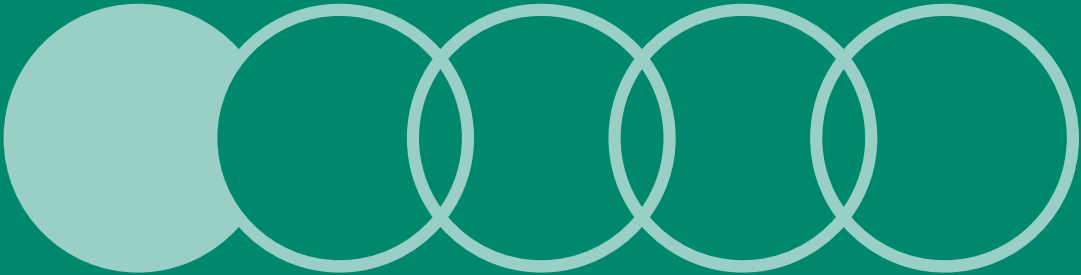
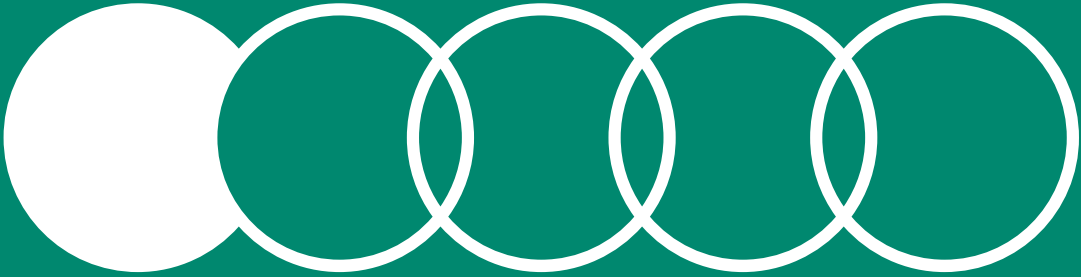


各濃度は同一サイクルで測定する

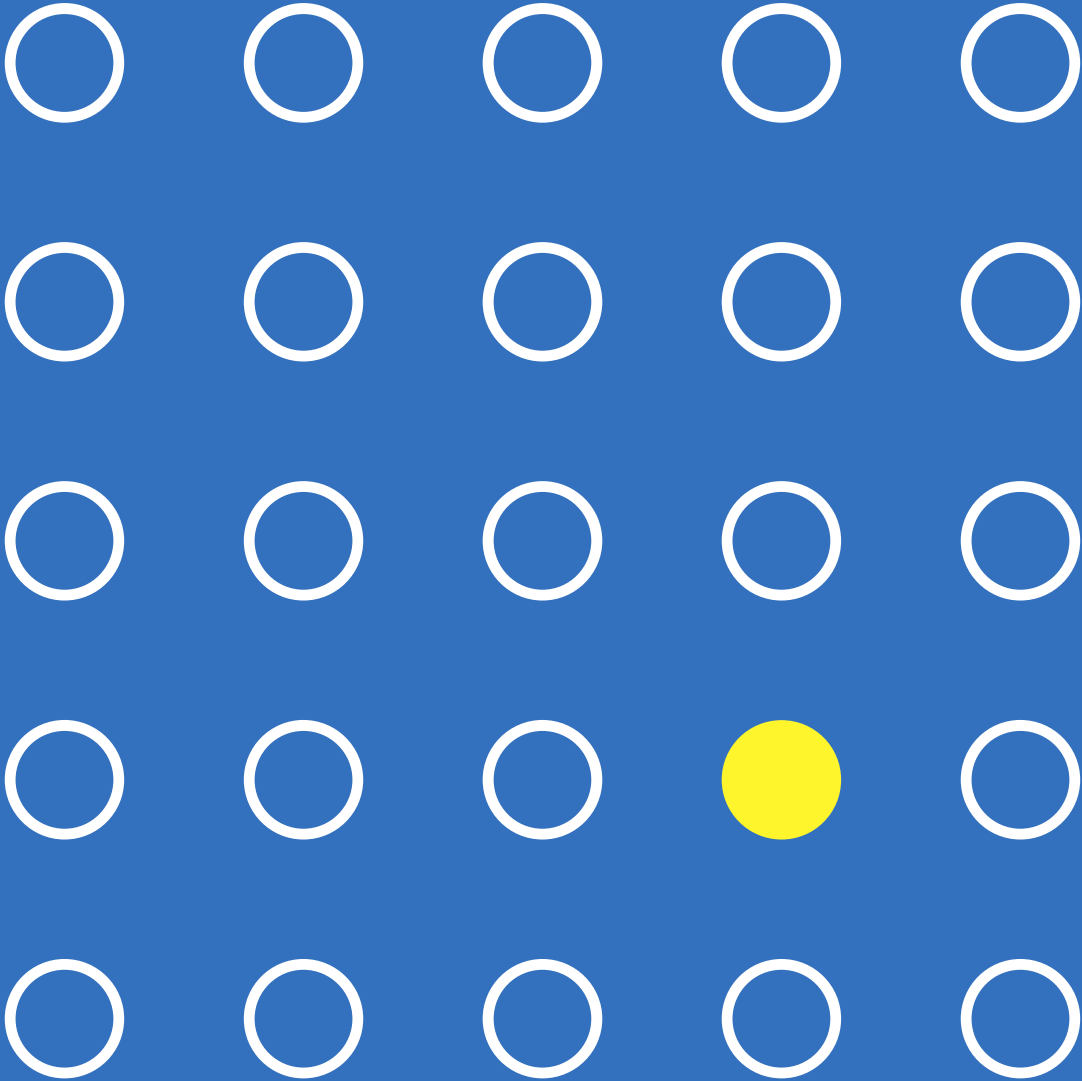


- 各濃度における再生操作が不要
- 再生が困難なサンプルに
- キャプチャー法でもリガンドの消費量が抑えられる

### 3. Biacore X100 デモンストレーション

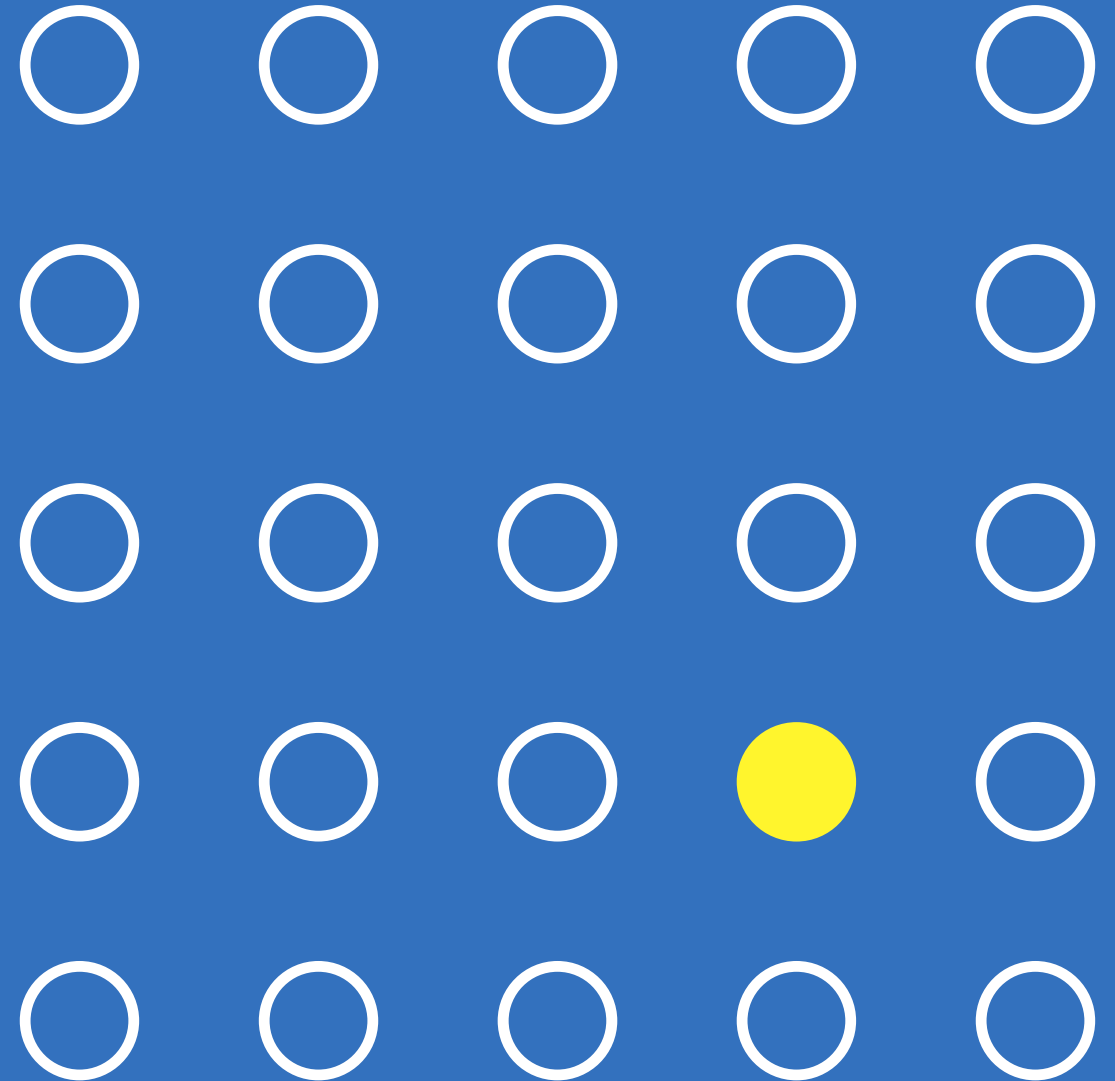


# 3-1. Biacore X100概観 ～測定準備





## 3-2. 測定設定～測定開始



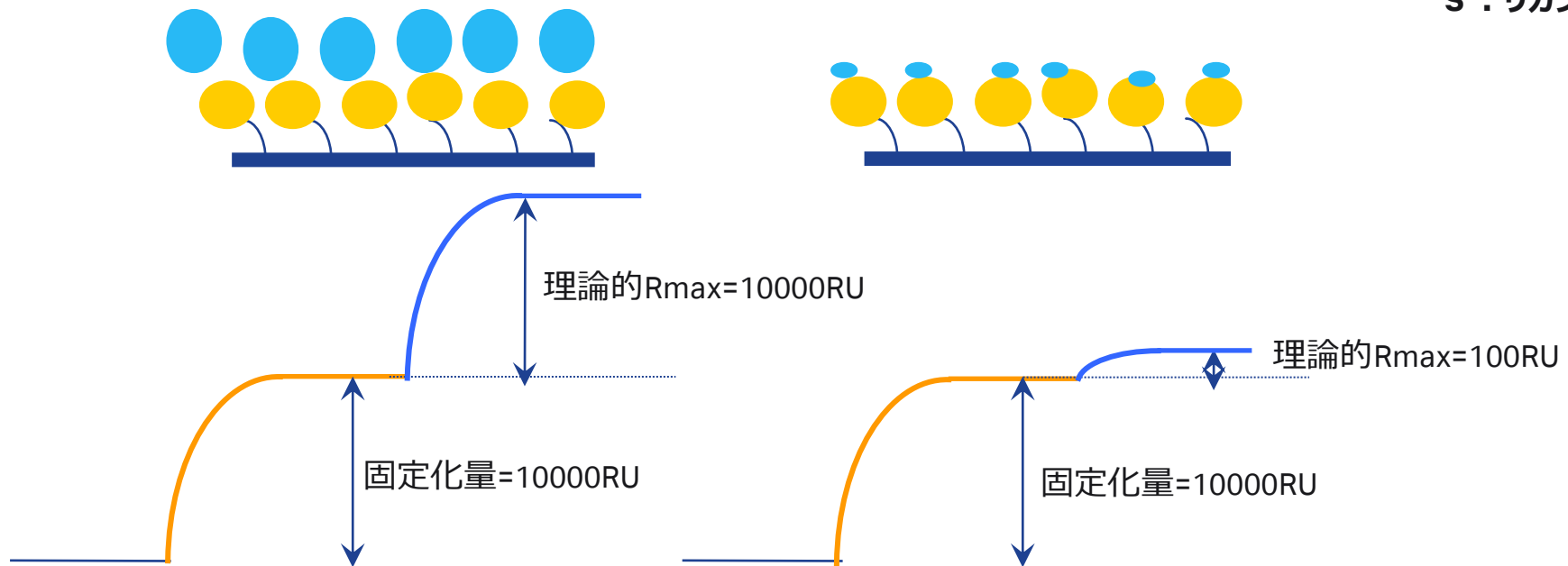
# 【補足】Rmaxの算出方法 ～ リガンド固定化量を考えるにあたって

理論的Rmax : 固定化したリガンド分子にアナライトが全て結合した時に得られる理論上最大のレスポンス(RU)

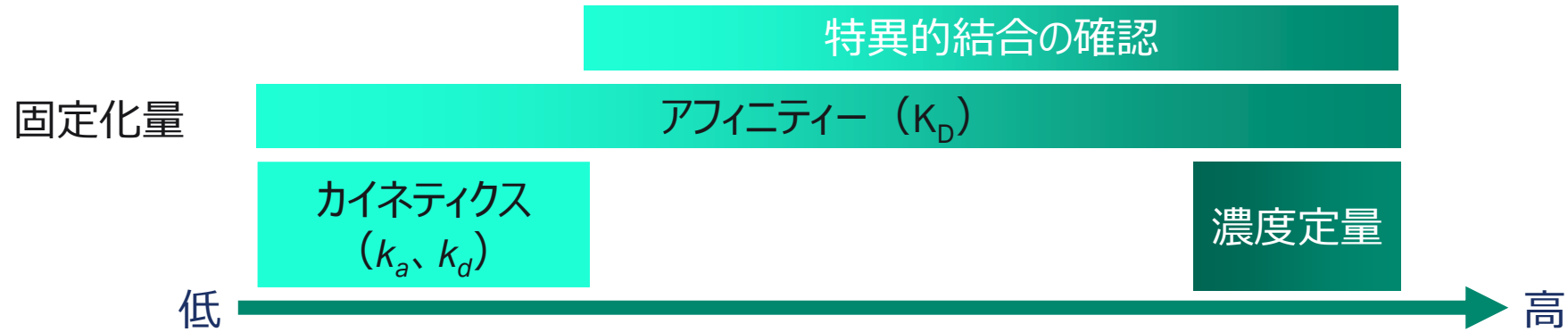
実測Rmax : 実際にアナライトを添加した時、結合量が飽和するレスポンス(RU)

$$\text{最大結合量(Rmax)} = \frac{\text{アナライトの分子量(Da)}}{\text{リガンドの分子量(Da)}} \times \text{リガンドの固定化量(RU)} \times s$$

s : リガンドの価数



# 【補足】リガンド固定化量の考え方



## 【カインेटイクスにおける目安】

タンパク質アナライト : 実測  $R_{max} \leq 50$  RUになる程度の固定化量  
 低分子アナライト : 実測  $R_{max} \leq 30$  RUになる程度の固定化量

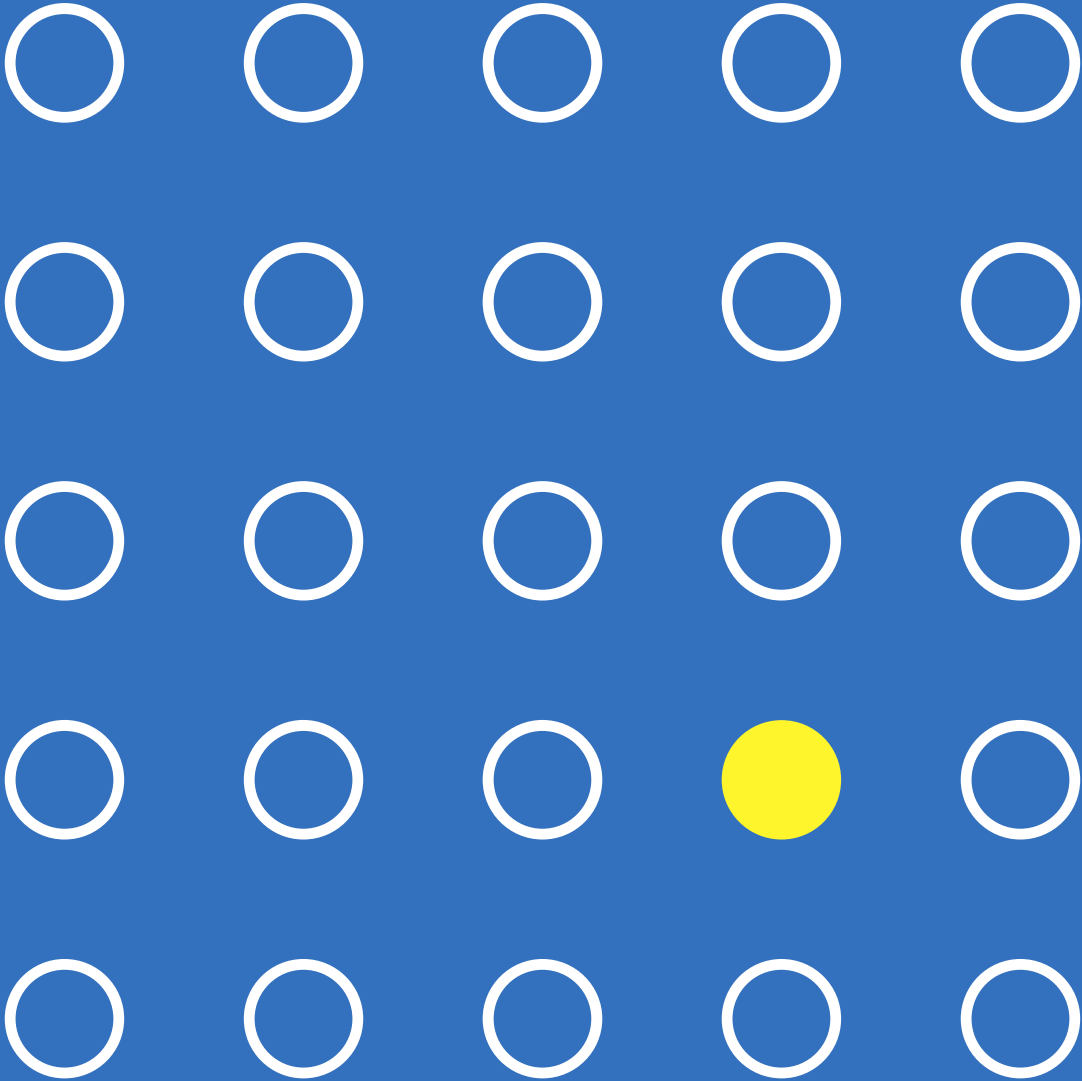
リガンド : Carbonic anhydrase (30 kDa)  
 アナライト : Furosemide (330 Da)で 10RU を目指すなら・・・

$$10 \text{ RU}(R_{max}) = \frac{330 \text{ (Da)}}{30,000 \text{ (Da)}} \times \text{リガンドの固定化量(RU)} \times 1$$

**リガンドの固定化量 = 909 RU \*)**

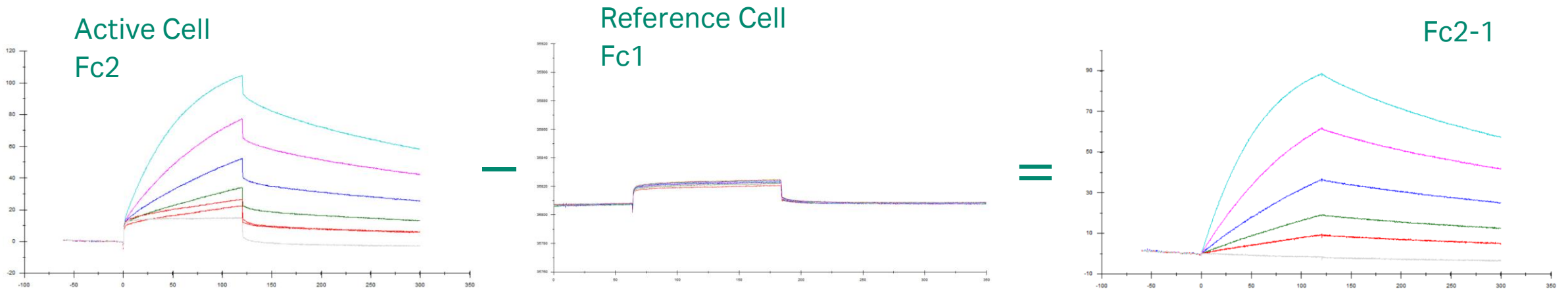
\*) リガンドが100%結合活性を保持している前提のもと

# 3-3. Kinetics解析

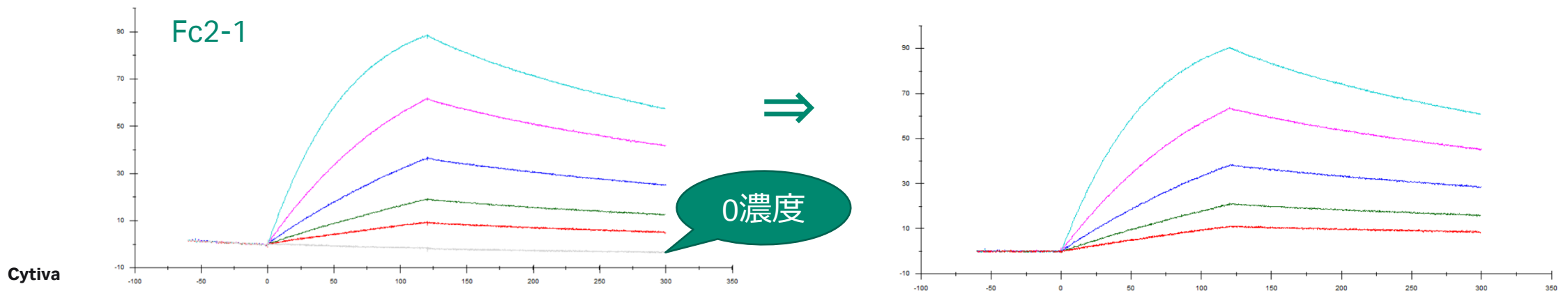


# 【補足】生データから解析対象データへの変換 -ダブルサブトラクションの考え方-

① リガンドをキャプチャー（固定化していない）セルによる溶液効果の補正。



② アナライト 0 濃度によるドリフトの補正



## 【補足】カインेटクス解析の流れ

センサーグラムの形



カーブフィッティング

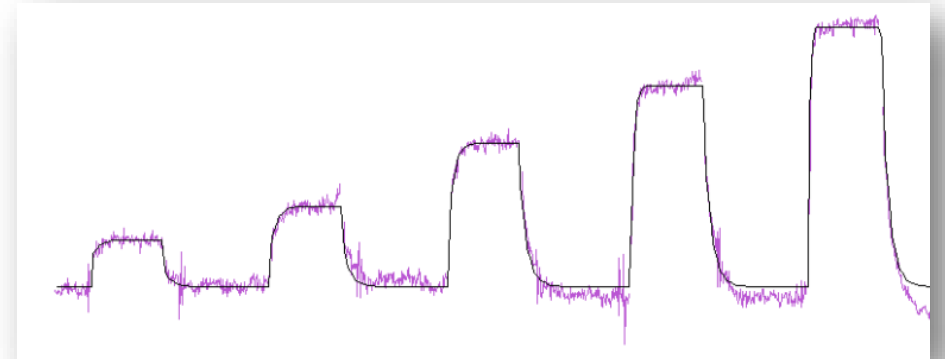
反応速度定数 ( $k_a, k_d$ )



$$K_D = k_d / k_a$$

解離定数 ( $K_D$ )

カインेटクス解析では、反応速度定数と解離定数両方求めることができる。  
(反応速度定数を使って解離定数を求める。)



“センサーグラムの形”を使って解析



平衡状態に達している必要は無い

# 解析結果

✓ Biotin化 Carbonic Anhydrase (30 kDa)のキャプチャー量 = **694 RU**

✓ Furosemide (331 Da)の理論的Rmax = **7.69 RU**

$$\text{理論的Rmax} = \frac{\text{アナライトの分子量 } \mathbf{331} \text{ (Da)}}{\text{リガンドの分子量 } \mathbf{30K} \text{ (Da)}} \times \text{リガンドの固定化量 } \mathbf{694} \text{ (RU)} \times \text{価数 } \mathbf{1}$$

✓ Furosemide (331 Da)の実測Rmax = **6.99 RU** / **Activity 90.9%**

✓ **実測Rmax = 6.99 RUという小さなレスポンスの中で、低分子化合物のKinetics解析ができました。**

# Biacore X100を用いた低分子化合物の各アプローチ

Biotin CAPture kit + SCK

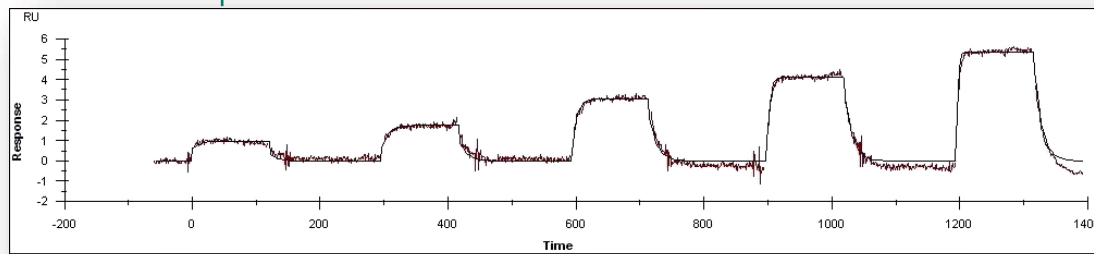
アミンカップリング + MCK

取得可能なレスポンスの大きさ

固定化の成功率・条件検討の容易さ

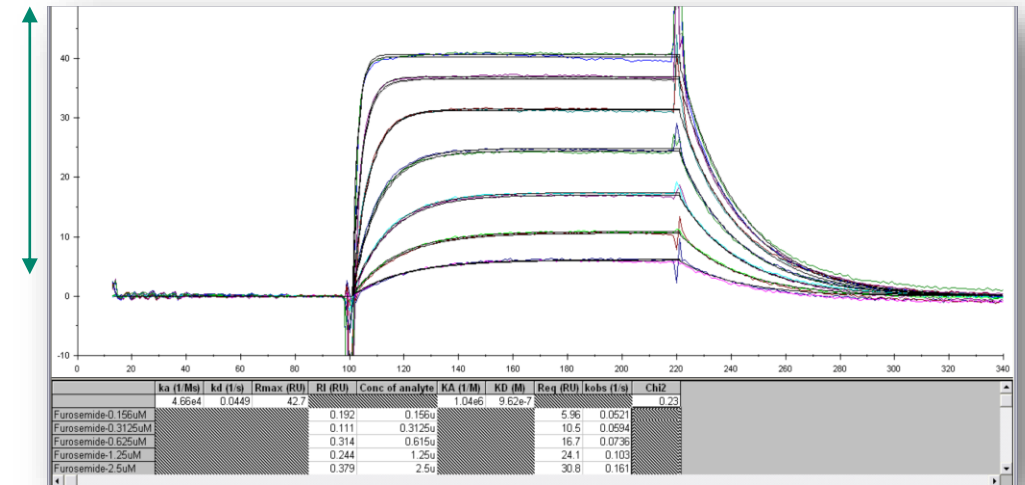
Biotin CAPture kitの固定化レンジ

5RU



Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value
	4.194E+4	0.08691	2.072E-6	6.986		1.359E+11				0.0449	4
Cycle: 7					1.230E-7				0.5765		
					3.700E-7				0.6751		
					1.110E-6				0.6175		
					3.330E-6				-0.1842		
					1.000E-5				-0.4399		

40RU



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
	4.66e4	0.0449	42.7	0.192	0.156u	1.04e6	9.62e-7	5.96	0.0528	0.23
Furosemide-0.156uM				0.111	0.3125u			10.5	0.0594	
Furosemide-0.3125uM				0.314	0.615u			16.7	0.0736	
Furosemide-1.25uM				0.244	1.25u			24.1	0.103	
Furosemide-2.5uM				0.379	2.5u			30.8	0.161	



# Biacore X100とは

## エントリーモデル 小スケールの相互作用解析に

- ✓ Biacoreのデータ品質を備えたコンパクトモデル
- ✓ はじめてカイネティクス解析を行う方
- ✓ 小スケールでじっくり評価したい方
- ✓ 他機種の種類検討や予備機として
- ✓ 簡単操作のソフトウェア
- ✓ 15バイアル



## Biacore X100 Plus Package System

- ✓ 溶媒補正  
(DMSOなどのバルクレスポンス補正、おもに低分子化合物)
- ✓ 検量線を用いた濃度測定
- ✓ CFCA (検量線無しの濃度測定)
- ✓ 設定温度  
(4°C ~ 40°C \*ただし、室温より10 °C下まで)
- ✓ 流速の変更 (1 ~ 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ )
- ✓ デガッサー (Running Buffer の脱気)



**Thank you**



## 【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](http://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。