

# Biacore S200

version 1

---

Instrument Handbook



---

日本語取扱説明書


応用編

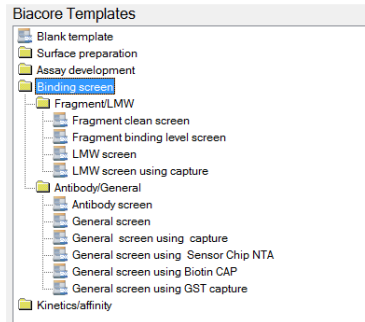
## 目次

1. スクリーニング .....	1
1-1. メソッドの設定 .....	1
1-2. データ解析 .....	14
2. 低分子化合物アナライトの相互作用測定 .....	34
2-1. メソッドの設定 .....	37
2-2. 溶媒補正方法 .....	42
3. フラグメント化合物評価 .....	47
3-1. Clean screen .....	50
3-1-1. メソッドの設定 .....	50
3-1-2. データ解析 .....	51
3-2. Binding level screen .....	53
3-2-1. メソッドの設定 .....	53
3-2-2. データ解析 .....	54
3-3. Affinity screen .....	57
3-3-1. メソッドの設定 .....	57
3-3-2. データ解析 .....	59
3-4. Competition Screen .....	61
3-4-1. メソッドの設定 .....	61
3-4-2. データ解析 .....	63
4. 熱力学的パラメータの算出 .....	65
4-1. メソッドの設定 .....	67
4-2. データ解析 .....	68

# 1. スクリーニング

## 1-1. メソッドの設定

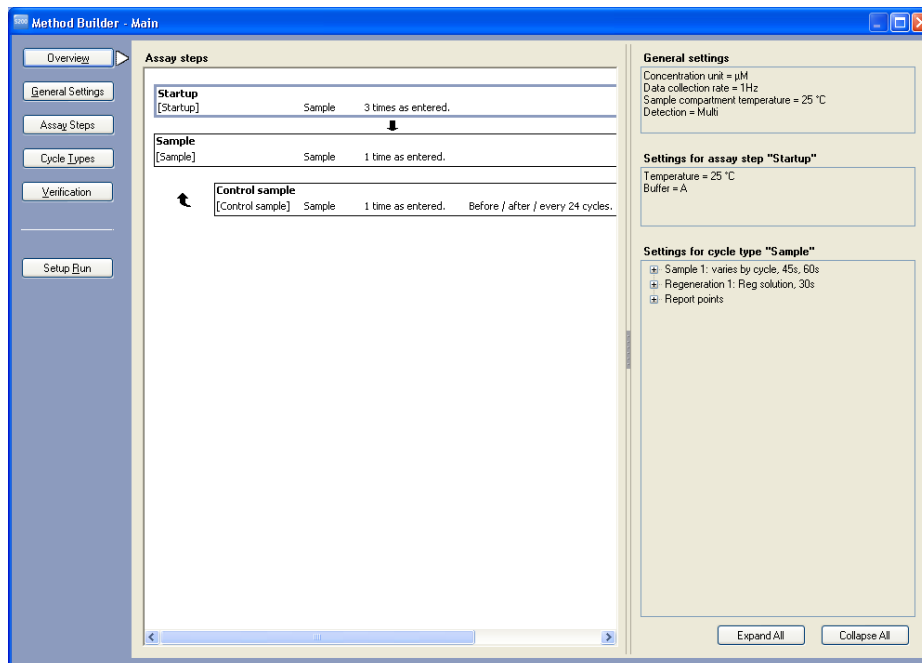
Toolbar の **Home** アイコン (  ) または Menu bar の **Run→Template...** をクリックしてスタートスクリーンに戻ります。



注意：Binding screen  
メソッドで取得した  
センサーグラムは  
Kinetics/Affinity 解析は  
実施できません。

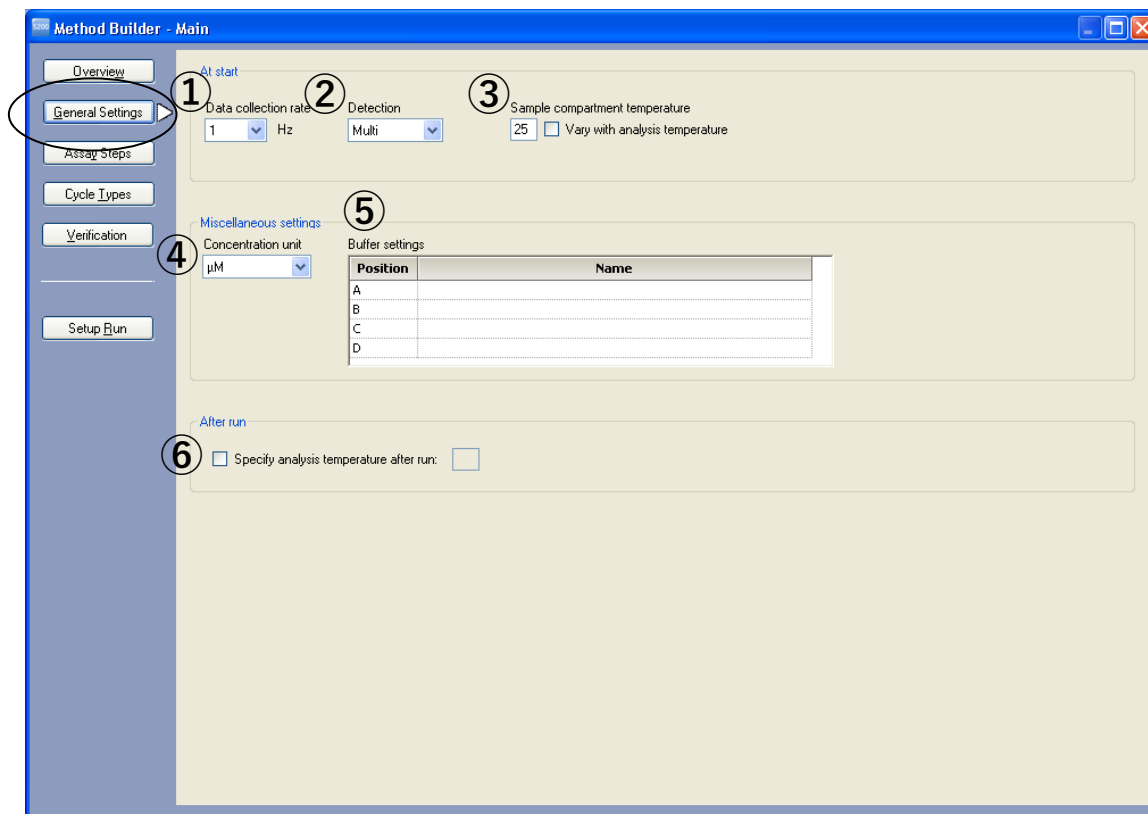
ここでは、リガンドを直接固定化して複数のアナライトとのスクリーニングを実施するメソッドについて紹介します。

**Biacore Templates** の **Binding screen→Binding Analysis→Antibody/General→General screen** を選択して、ダブルクリックまたは **Open...** をクリックします。以前にテンプレートを **C:\¥Bia Users¥Templates** フォルダに保存している場合は、右側の **My Templates** 一覧表に表示されます。別フォルダに保存したテンプレートは、**Browse...** をクリックして選択します。



Method Builder の Main ダイアログが表示され、Overview 画面には全体の設定内容が表示されます。ここでは、変更項目について紹介します。

**General Settings** をクリックします。



① **Data Collection rate**

1Hz を選択します。

② **Detection**

検出モードを以下の 3 つ (Single, Dual, Multi) から選択します。  
実際に使用するセルの設定は、Setup Run 以降で行います。

**Single** 1、2、3、4

**Dual** 1,2、3,4、2-1、4-3

**Multi** 1,2,3,4、2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度 (4~45°C) を設定します。

④ **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択します。

⑤ **Buffer settings**

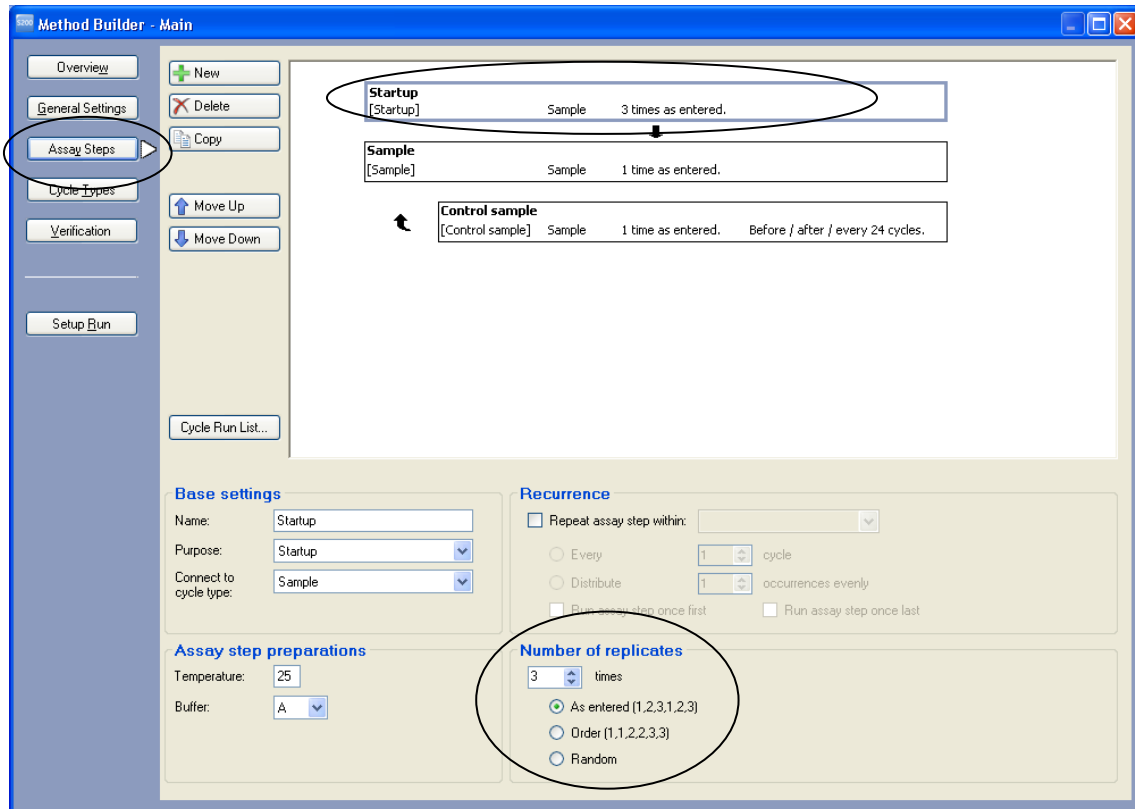
使用するランニング緩衝液名を入力します。

⑥ **After run**

チェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更されます。

設定後、**Assay Steps** をクリックします。

**Startup** を選択します。



### Number of replicates

#### Times

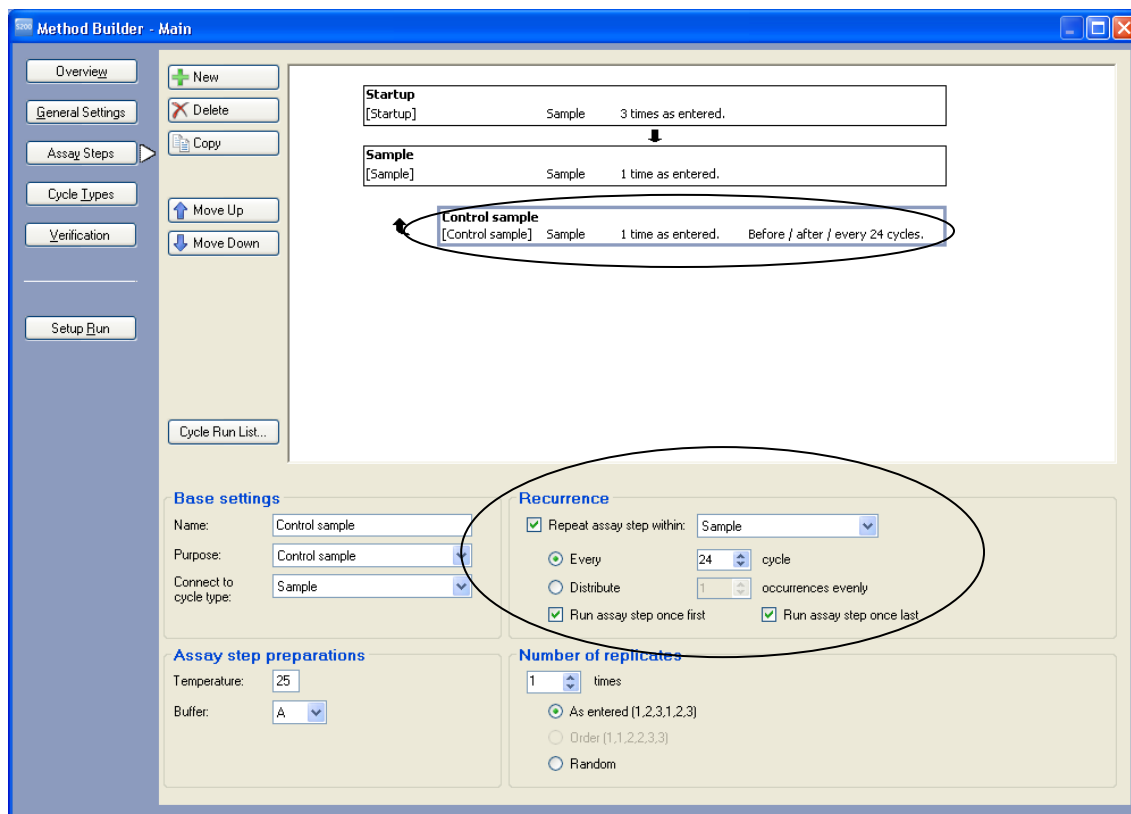
ベースライン安定化のためのスタートアップの測定回数を指定します。3回以上を推奨します。



**Control Sample** をクリックします。

定期的に測定するコントロールサンプル（ポジティブコントロール、ネガティブコントロール）の測定条件を設定します。

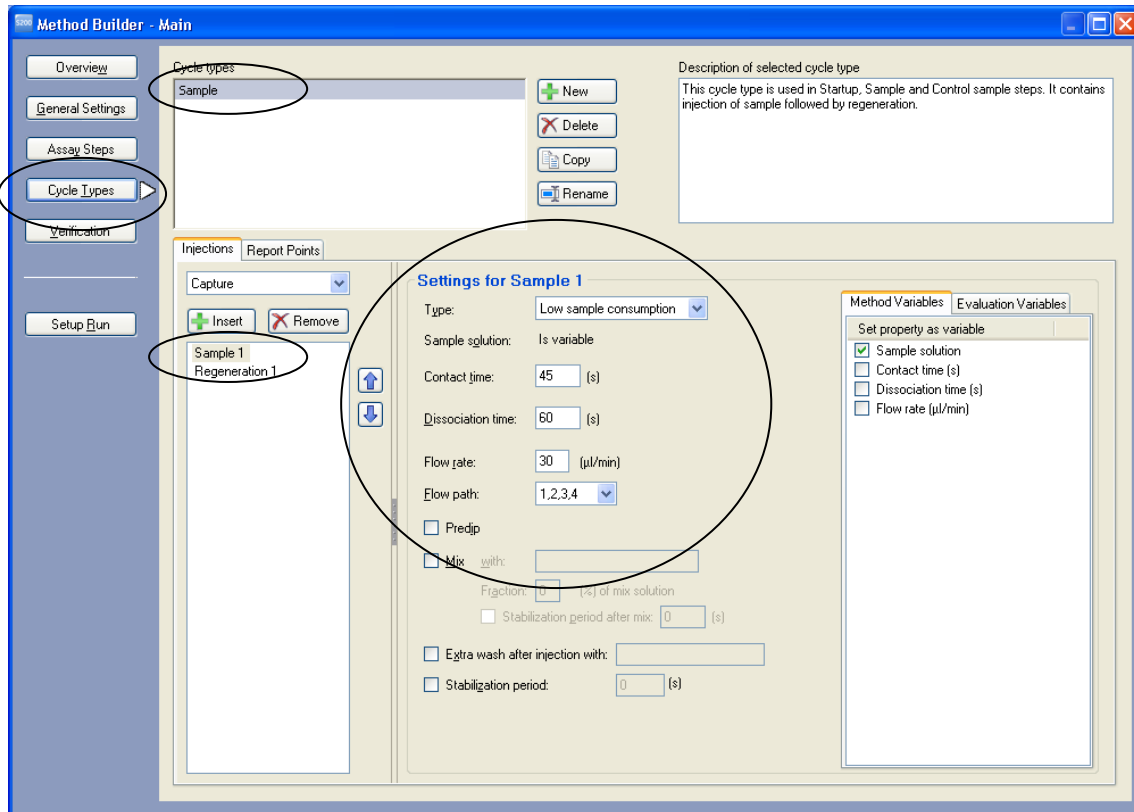
コントロールサンプルを定期的に測定しておくこと、解析時の各種 Plot で、リガンドの経時的な結合活性低下を考慮した結合量補正が行えます。



**Recurrence** の **Repeat assay step within** にチェックを入れて、プルダウンメニューで **Sample** を選択します。**Every** にチェックを入れて、何サイクルごとにコントロールサンプルを測定するかを指定します。（上記の指定では、サンプル測定 24 サイクルごとに 1 回、コントロールサンプルを測定します。）アッセイの始めと終わりにも実行したい場合には、**Run assay step once first** と **Run assay step once last** にチェックを入れます。

なお、DMSO などの有機溶媒を含む緩衝液を使用して低分子化合物測定を実施する際には、Assay Steps で溶媒補正用曲線測定（Solvent correction）を定期的の実施します。詳細は 2 章をご参照ください。

**Cycle Types** をクリックします。



**Sample** をクリックします。

**Injections** タブのリストから **Sample 1** を選択します。

**Type**

**Low sample consumption** を使用します。

**contact time**

アナライト添加時間 (秒) を入力します。

**Dissociation time**

最終濃度添加後の解離時間 (秒) を入力します。

**Flow rate**

流速 (µl/min)。通常、30 µl/min。

**Flow path**

プルダウンのリストから目的の設定を選択します。

(Both または使用するフローセルを指定。)

**Extra wash after injection with:**

チェックを入れると指定溶液でアナライト添加後に流路内を洗浄します。センサーチップ表面には流れません。

**Stabilization period**

チェックを入れると指定した解離時間後に、指定した時間ベースライン安定化のための待機時間を設定することができます。

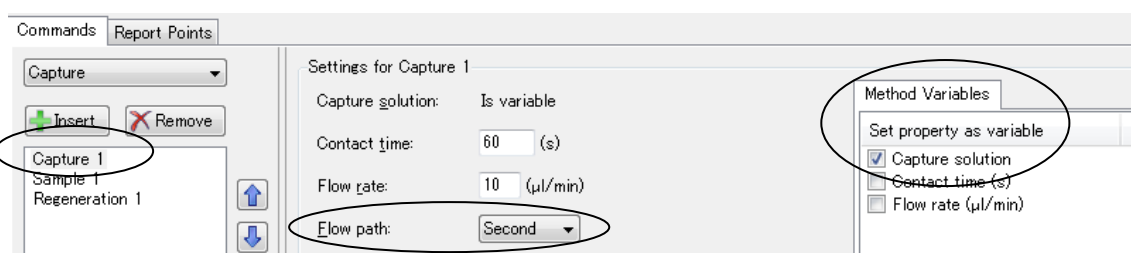
**Regeneration** コマンドも同様に設定します。再生を行わない場合には、**Regeneration** コマンドを選択後、**Remove** をクリックして削除してください。



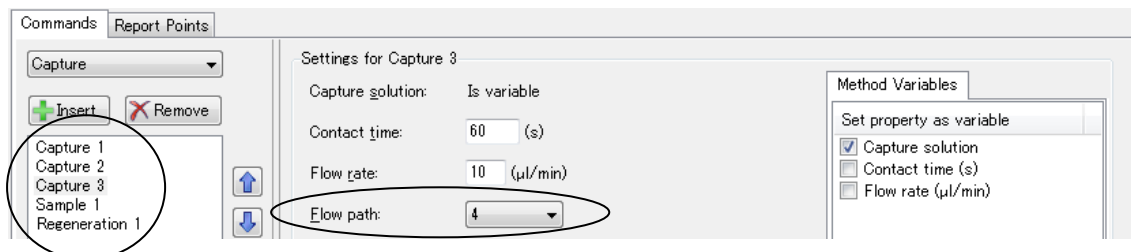
### 補足 1-1. キャプチャー法によるリガンドの固定化

各種タグ付タンパク質や抗体を、キャプチャー法で固定化するには、アナライトサンプル添加前に **Capture** コマンドを追加します。(または、キャプチャー法のためのプレートメソッドを使用してください。)

例えば、Fc1 をリファレンスセル、Fc2 にリガンドをキャプチャーする場合には、**General Settings** ステップの **Detection** で **Dual** を選択して、**Cycle Types** ステップの **Capture** コマンドの **Flow path** では **Second** (=Fc2) を設定します。ここで、**First** (=Fc1) を選択すると Fc2-1 の相互作用データが取得できないので注意してください。リガンドが複数ある場合には、Method Variables の **Capture solution** にチェックを入れます。

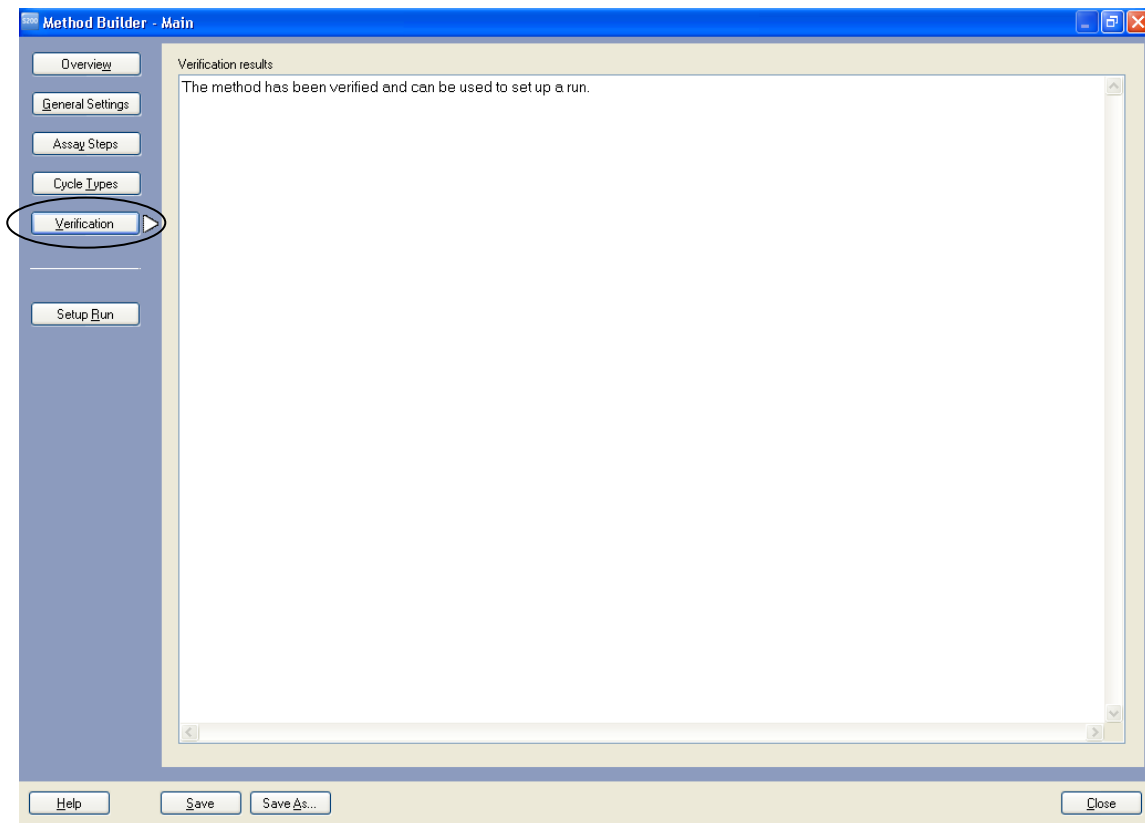


なお、Fc1 をリファレンスとして、Fc2、Fc3、Fc4 と別々のリガンドをキャプチャーして、同時にアナライトを添加することもできます。この際には、**Detection** で **Multi** を設定して、**Flow Path** は、**Capture 1** : 2、**Capture 2** : Fc3、**Capture 3** : 4、**Sample 1** : 1、2、3、4 と設定します。

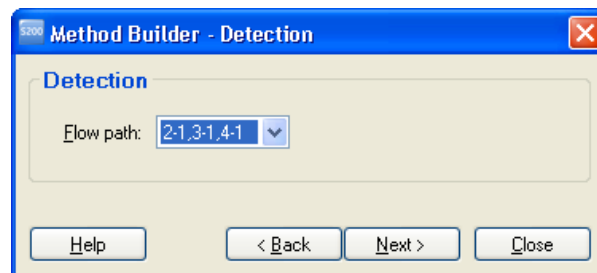




**Verification** をクリックします。



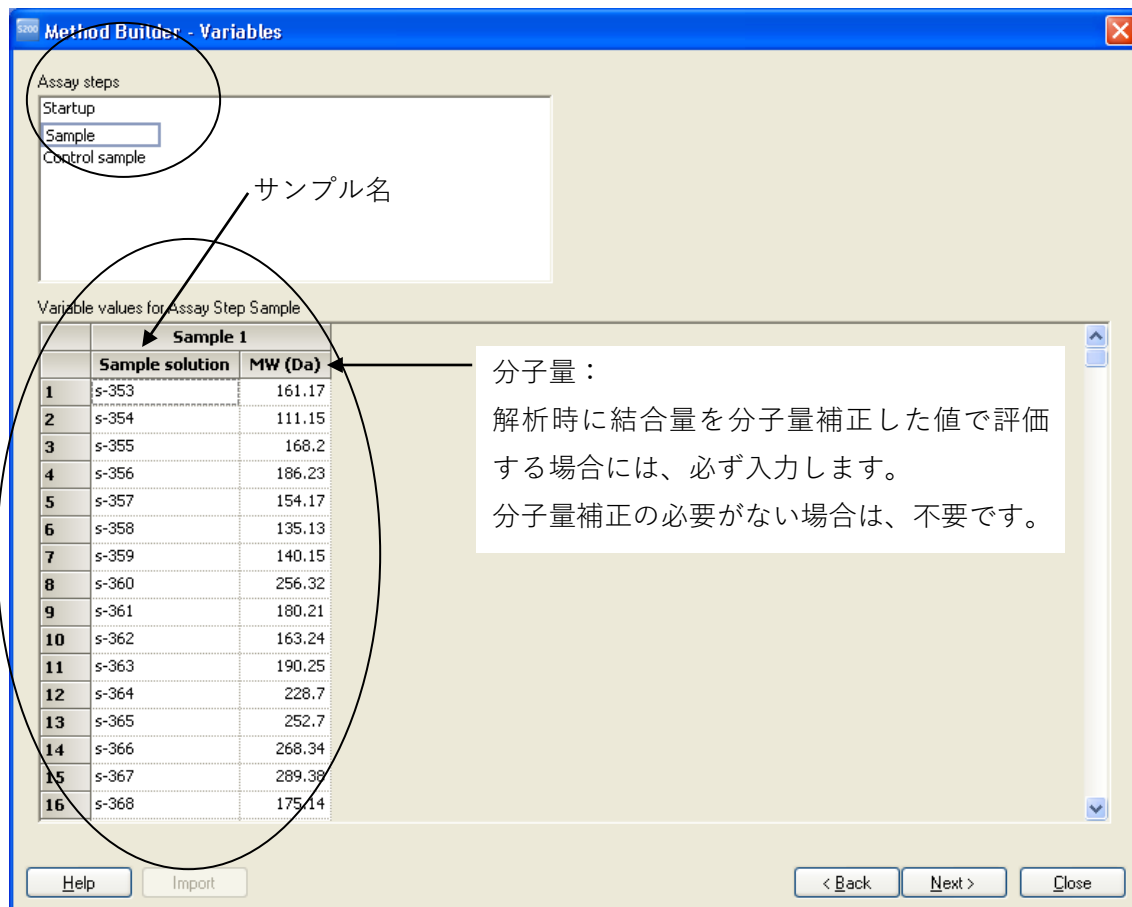
メソッドの設定に不備が無ければ**"The Method has been verified and can be used to set up a run."**と表示されます。間違いがある場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正します。確認後、**Setup Run** をクリックします。



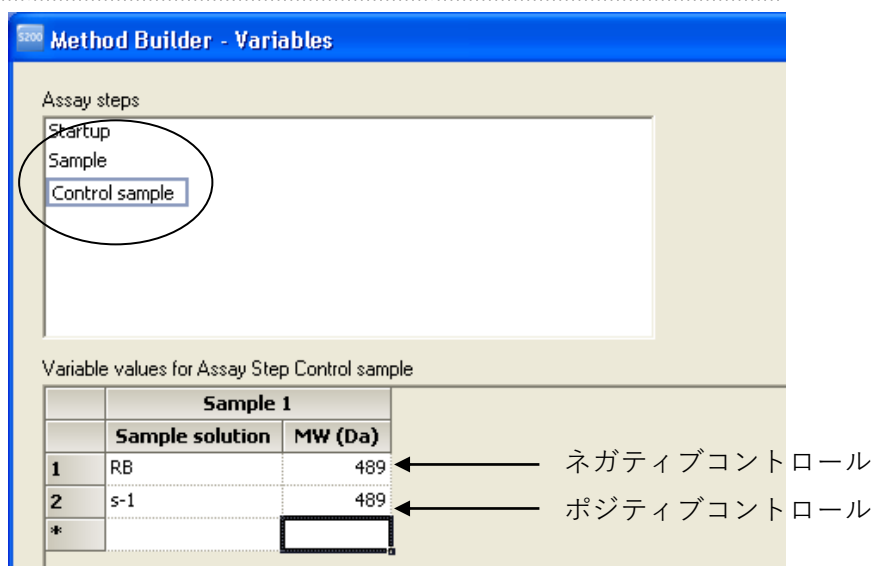
適切な **Flow path** を選択し、**Next >** をクリックします。



**Variables** ダイアログで、**Startup**、**Sample**、**Control** をそれぞれクリックし、テーブルにサンプル情報を入力します。



**Control sample** は、ポジティブコントロール、ネガティブコントロールを設定します。ネガティブコントロールは、結合しないことが明らかなサンプルか、ランニング緩衝液を使用します。解析時に分子量補正を行う場合には、ランニング緩衝液の分子量はポジティブコントロールの分子量またはアナライトの平均分子量を使用してください。



### 補足 1-2. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は **txt**）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力してください。

サンプル情報を入力後、**Next >**で進みます。



Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 MW (Da)
1	Startup	buffer	
2	Startup	buffer	
3	Startup	buffer	
4	Control sample	RB	489
5	Control sample	s-1	489
6	Sample	s-353	161.17
7	Sample	s-354	111.15
8	Sample	s-355	168.2
9	Sample	s-356	186.23
10	Sample	s-357	154.17
11	Sample	s-358	135.13
12	Sample	s-359	140.15
13	Sample	s-360	256.32
14	Sample	s-361	180.21
15	Sample	s-362	163.24
16	Sample	s-363	190.25
17	Sample	s-364	228.7
18	Sample	s-365	252.7
19	Sample	s-366	268.34
20	Sample	s-367	289.38
21	Sample	s-368	175.14
22	Sample	s-369	201.66
23	Sample	s-370	115.18
24	Sample	s-371	243.29

測定サイクルリストが表示されます。**Overview** で、全サイクル内容を確認できます。**Next >**をクリックします。



測定を始める前に、**Prime** を実施する場合は、**Prime before run** にチェックを入れます。**Next >**をクリックします。



Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 MW (Da)
R2 B1	690	RB	Control sample	489
R2 B2	690	s-1	Control sample	489
R1 A1	50	DMSO	Sample	0
R1 A2	50	DMSO	Sample	0
R1 A3	50	DMSO	Sample	0
R1 A4	50	DMSO	Sample	0
R1 A5	50	DMSO	Sample	0
R1 A6	50	DMSO	Sample	0
R1 A7	50	DMSO	Sample	0
R1 A8	50	DMSO	Sample	0
R1 A9	50	DMSO	Sample	0
R1 A10	50	DMSO	Sample	0
R1 A11	50	DMSO	Sample	0
R1 A12	50	DMSO	Sample	0
R1 A13	50	DMSO	Sample	0
R1 A14	50	DMSO	Sample	0
R1 A15	50	DMSO	Sample	0
R1 A16	50	DMSO	Sample	0
R1 A17	50	DMSO	Sample	0
R1 A18	50	DMSO	Sample	0
R1 A19	50	DMSO	Sample	0
R1 A20	50	DMSO	Sample	0
R1 A21	50	DMSO	Sample	0
R1 A22	50	DMSO	Sample	0
R1 A23	50	DMSO	Sample	0
R1 A24	50	DMSO	Sample	0
R1 B1	50	DMSO	Sample	0
R1 B2	50	DMSO	Sample	0
R1 B3	50	DMSO	Sample	0

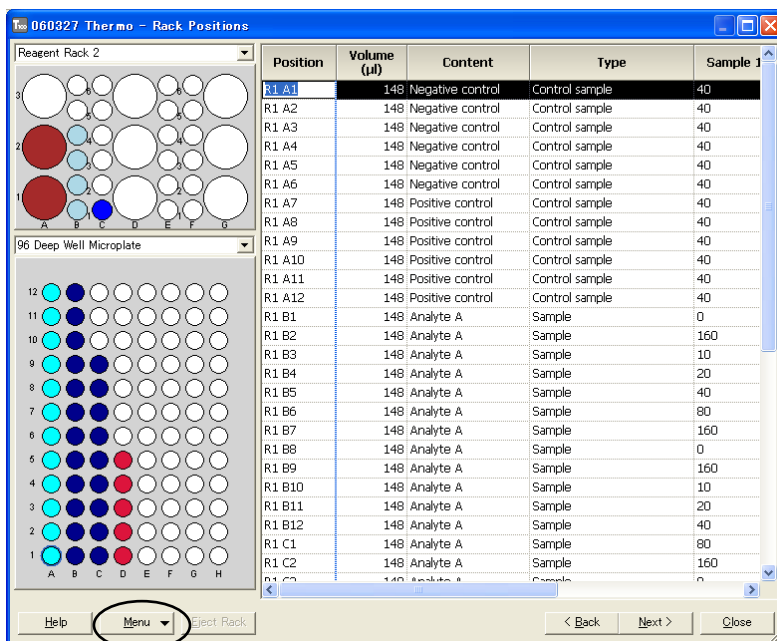
右側の表でサンプルの位置とサンプル量 (µl) を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

### 補足 1-3. サンプル位置の変更

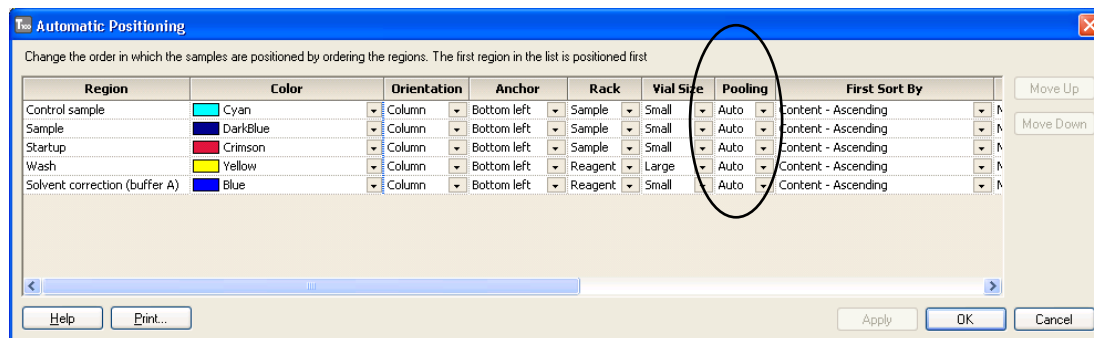
サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu→Export Positions** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu→Sample Position Import** でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

### 補足 1-4. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同一バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から **Automatic Positioning...** を選択します。



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができます。

“Pooling”の項目は、通常、**Auto** になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定などもできるので、必要に応じて適宜設定を変更します。

**Eject Rack** をクリックして、Rack tray port を開きます。



ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の **Next** をクリックします。



基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。ランニングバッファの設置、廃液容量を確認後、**Start** をクリックします。



設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。



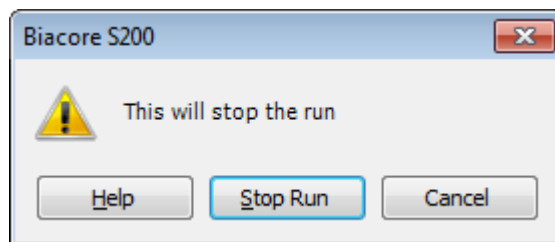
Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定が開始します。



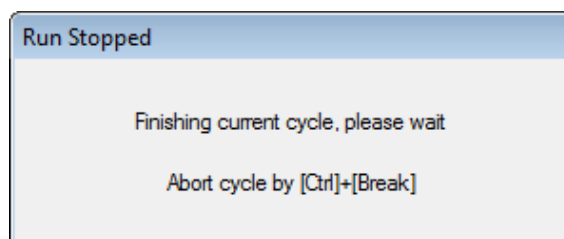
測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。測定データは入力したファイル名で自動的に保存され、Biacore S200 Evaluation Software が自動的に起動します。

### 補足 1-5. プログラムの緊急停止

**Run** → **Stop Run** をクリックします。

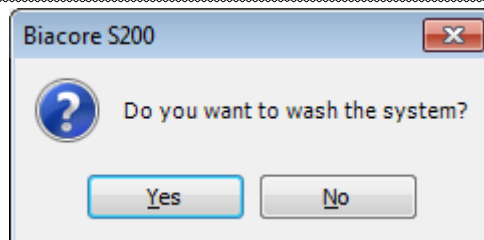


ボックス中の **Stop Run** をクリックします。



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し、終了します。

上記ウィンドウが開いている状態で、ただちにテンプレートを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押します。

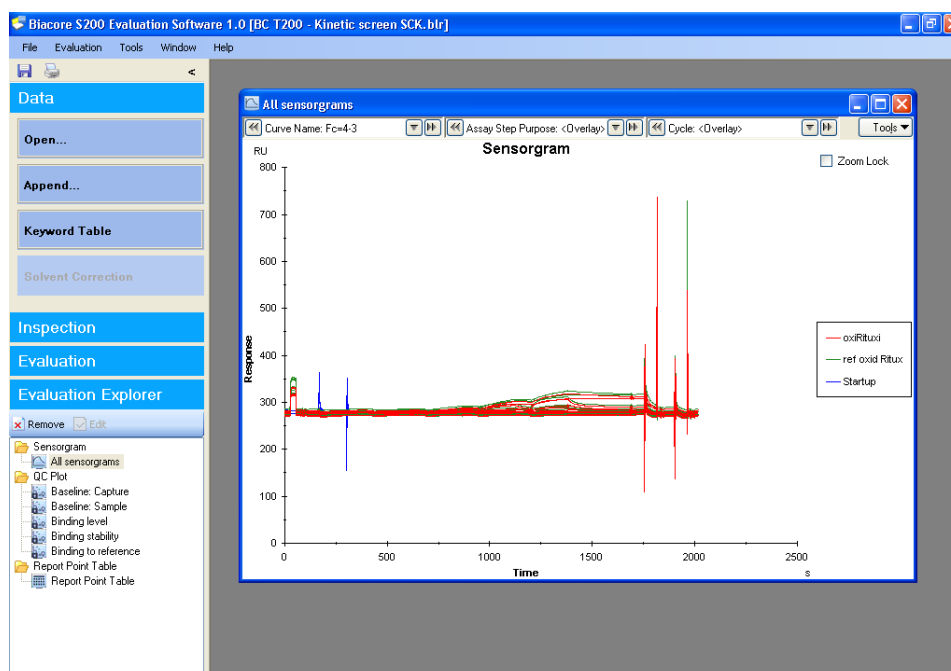


装置をランニング緩衝液で洗浄する必要がある場合は、**Yes** を選択します。必要がなければ **No** を選択します。

終了した時点までのデータが Biacore S200 Evaluation Software に移行します。

## 1-2. データ解析

メソッドを用いた測定テンプレート終了後、Evaluation Software は自動的に立ち上がり、自動保存されたデータが開きます。



解析用プロット (Result Plot) を作成する前に、センサグラムおよびクオリティーチェック用プロット (QC Plot) を見て、解析から除くデータがないかを確認します。

### 補足 1-6. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称などに入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に **Keyword table...** で変更します。画面左 **Data** の **Keyword Table** をクリックします。リガンド名、分子量の変更は、右下の **Edit Chip Information...** をクリックして、**Edit Chip Information** ウィンドウで変更します。(測定データファイルの情報は変更できません。)

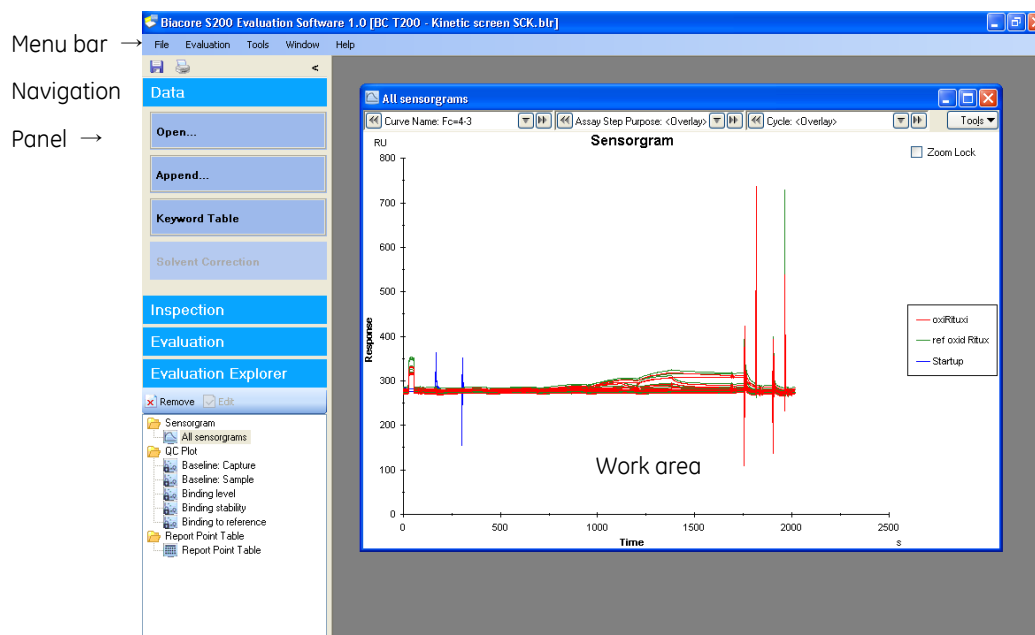
Cycle	Assay step purpose	Sample	Conc (nM)	MW (Da)
1	conditioning			
2	startup	buffer		
3	startup	buffer		
4	startup	buffer		
5	sample	antigen1	1.1	11500
6	sample	antigen1	2.2	11500
7	sample	antigen1	4.3	11500
8	sample	antigen1	8.5	11500
9	sample	antigen1	17	11500
10	sample	antigen1	1.1	11500
11	sample	antigen1	0	11500
12	sample	antigen1	0	11500
13	sample	antigen2	1.1	11500
14	sample	antigen2	2.2	11500
15	sample	antigen2	4.3	11500
16	sample	antigen2	8.5	11500
17	sample	antigen2	17	11500
18	sample	antigen2	1.1	11500
19	sample	antigen2	0	11500
20	sample	antigen3	0	11500
21	sample	antigen3	1.1	11500
22	sample	antigen3	2.2	11500
23	sample	antigen3	4.3	11500
24	sample	antigen3	8.5	11500
25	sample	antigen3	17	11500
26	sample	antigen3	1.1	11500
27	sample	antigen3	0	11500
28	sample	antigen3	0	11500

Keyword Table dialog box controls:

- Concentration Unit: nM
- Edit Chip Information...



## 補足 1-7. 画面の説明



Menu bar → すべての作業コマンドを含む各種メニューを表示

画面左の Navigation Panel には、主に使用する機能を一覧化しています。

## Data

Open	データファイルの呼び込み
Append	データファイルの追加（複数ファイルを同時解析可）
Keyword Table	キーワード（サンプル名、濃度など）のテーブル表示
Solvent Correction	有機溶媒使用時の溶媒補正

## Inspection

Sensorgram	センサーグラムウィンドウの追加
QC Plot	クオリティーチェック用 Plot の追加

## Evaluation

各種解析機能の選択

## Evaluation Explorer

センサーグラム、QC Plot、解析データ

### 複数の測定データファイルの同時解析

複数の測定データを一括して解析する場合には、解析前に全てのデータファイルを読み込みます。スクリーニングでは、最大 5,000 サンプル(1 濃度シリーズ, data correction rate; 1Hz)を同時に解析できます。

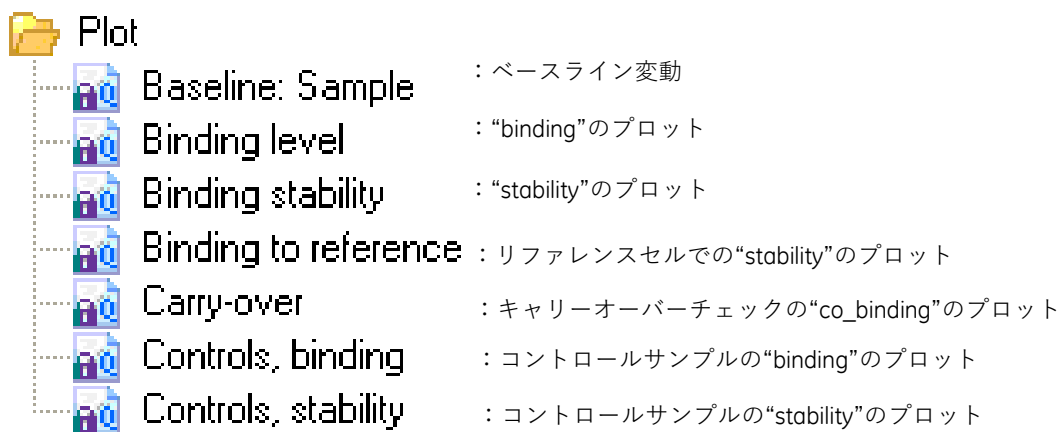
**File→Append Result File** を選択後、追加したいファイル名を選択します。この操作を繰り返してデータの追加を行います。溶媒補正が必要な場合には、すべてのデータを読み込んだ後に、**Solvent Correction** を実施します。

### プロットを使用した Quality Control (QC)

解析用プロット (Result Plot) 作成前に、自動作成された Plot または作成した QC Plot を使用して解析に持ち込むデータの選択を行います。乱れているデータや、解析に持ち込まないデータの選択を行えます。この段階で **Exclude** したデータは、Result Plot には持ち込まれません。

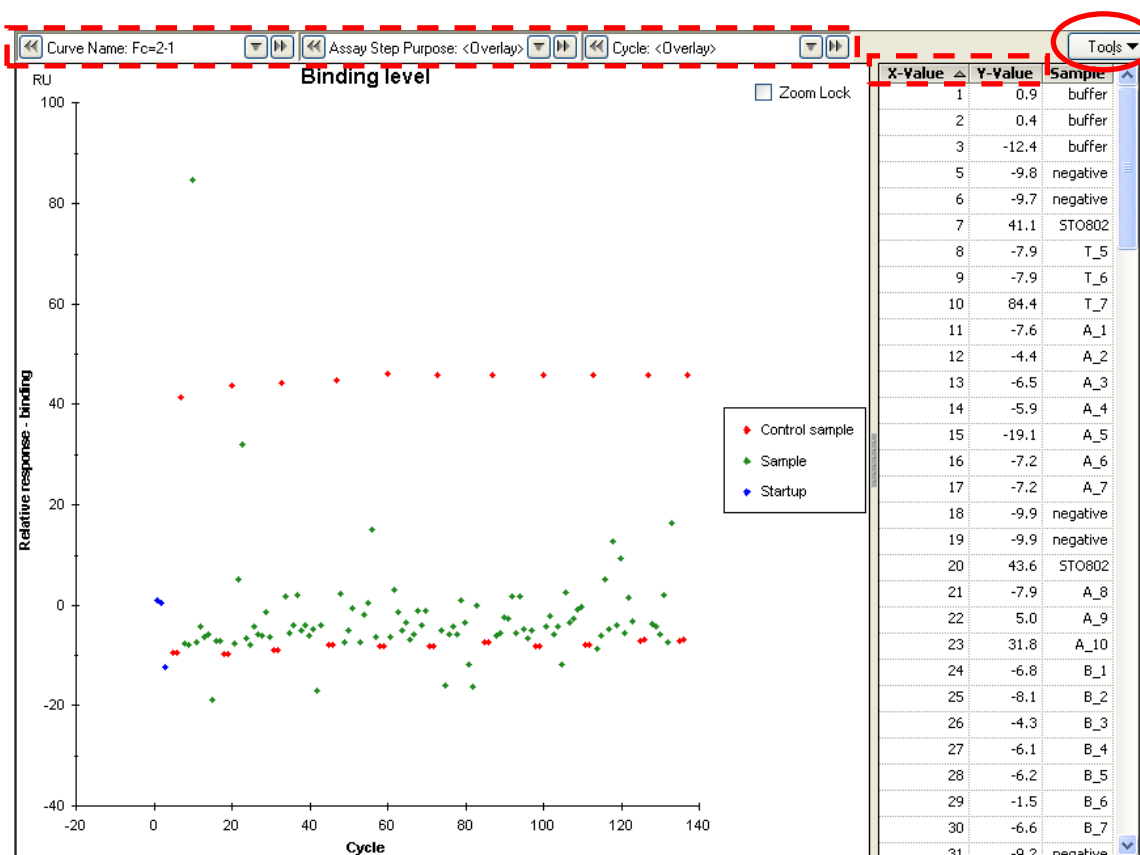
画面左の Plot フォルダ内に、各種 Plot があります。自動取得されたレポートポイントでプロットが作成されます。(測定条件によって内容は異なります。)

(例)



各 Plot を確認して、乱れがあるプロットや解析に持ち込まないプロットを確認します。

各 Plot の表示方法について Binding level の Plot で紹介します。



### データの選択

プロット上部の **Curve Name: Fc=2-1** の **◀** もしくは **▶** をクリックし、評価したいデータを選択します。

**Assay Step Purpose: <Overlay>** で、Assay Step でデータの抽出ができます。

**Cycle: <Overlay>** で、表示したいサンプルを個別に選択することができます。

プロットのポイントにマウスを移動すると、サンプル情報を確認できます。

### プロットの並べ替え

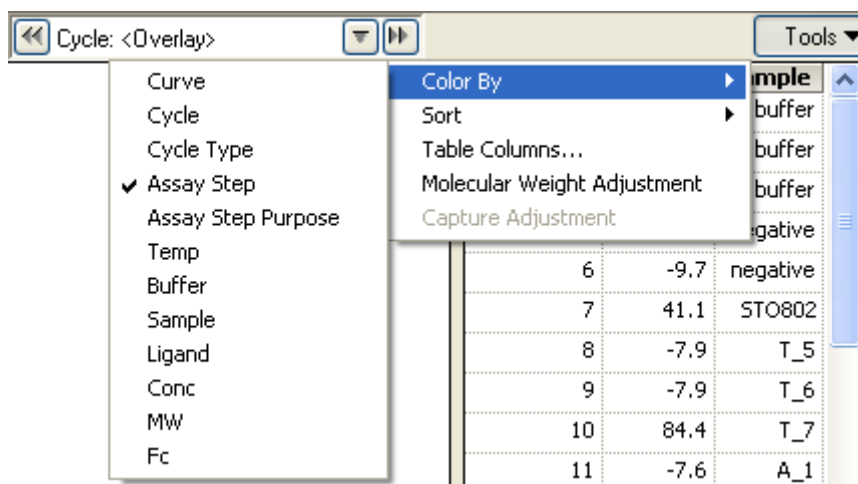
右側のテーブルの **Y-Value** をクリックします。カラムタイトルが、**Y-Value ▲** に変更され、結合レスポンスが低い順に並べ替えられます。

引き続き、**Y-Value ▲** をクリックすると、カラムタイトルは **Y-Value ▼** に変更され、高い順に並びます。

## ポイントの色の変更

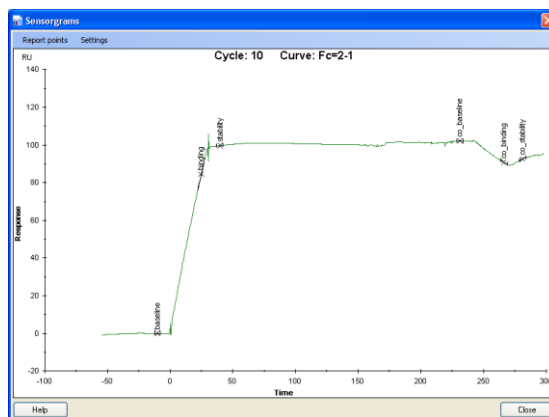
ポイントの色を変更したい場合には、右テーブル上部の **Tools** をクリックします。

**Color By** で変更方法を選択します。



## センサーグラムの表示

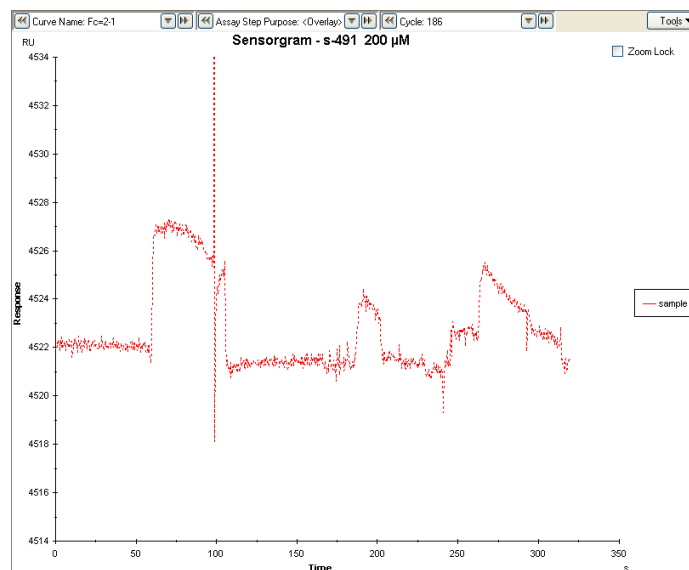
ポイント上にマウスのポインターを移動して、マウスを右クリックして **Show Sensorgram** をクリックします。Y軸=0に補正したセンサーグラムとレポートポイントが表示されます。複数のセンサーグラムを表示したい場合には、テーブルで該当のサンプルを選択後、マウス右クリック、**Show Sensorgram (S)** をクリックします。



## ポイントの削除

除きたいポイントがある場合には、ポイント上にマウスポインターを移動後、マウス右クリック、**Exclude Cycle** をクリックします。ポイントがプロットから消え、画面右のテーブルの該当サンプルが赤字に変わり、センサーグラムは破線になります。

X-Value ▲	Y-Value	Sample
266	-0.5	s-553
267	0.8	s-554
268	-0.1	s-555
269	0.2	s-556
270	0.0	s-557
271	0.4	s-558
272	0.4	s-559
273	2.2	s-560
274	98.5	s-561
275	-0.6	s-562
276	-0.3	s-563

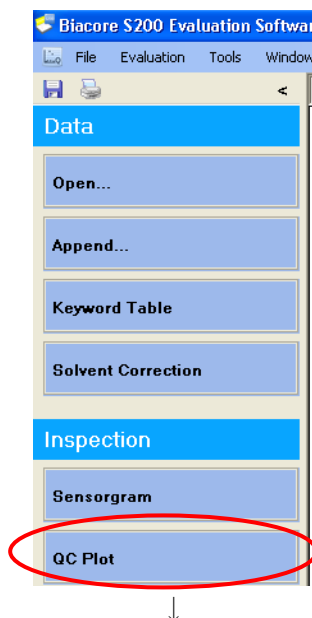


再度プロットに入れる場合には、テーブルの該当サンプルを選択後、マウス右クリック、**Include Cycle(s)**を選択します。

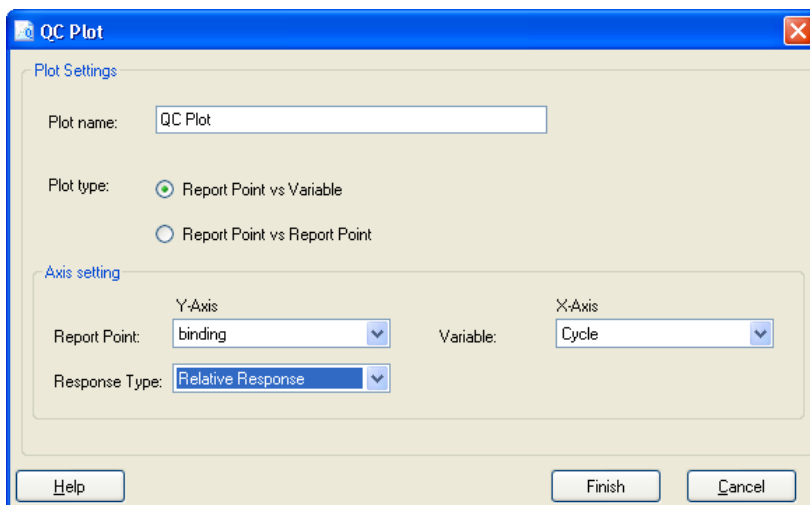
自動作成された Plot および QC Plot で Exclude したサンプルは、Result Plot には持ち込まれません。

なお、別途 Plot を作成したい場合や、分子量補正やキャプチャー量補正を行った Plot を作成したい場合には、新たに QC Plot を作成します。(分子量補正、キャプチャー量補正は、Result Plot でも行えます。)

新たに QC Plot を作成する際には、**Inspection→QC Plot** を選択します。

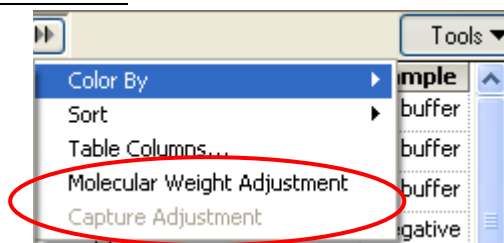


**Plot name** にプロット名を入力して、**Y-Axis**、**X-Axis** をプルダウンメニューから選択します。  
QC Plot では、**X-Axis** に各種レポートポイントを設定できます。



**Finish** をクリックします。画面左の Plot フォルダ内に QC Plot が追加されます。

#### 分子量補正、キャプチャー量補正



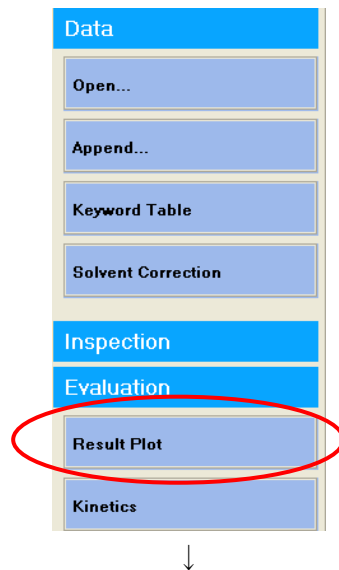
Binding level のプロットで分子量補正を行いたい場合には、**Tools** の **Molecular Weight Adjustment** を選択してください。（あらかじめ、**Keyword Table** に分子量が入力されている必要があります。）プロットの Y 軸の単位は、 $100 \times \text{RU} / \text{Da}$  に変わります。

キャプチャー法を使用している場合には、**Tools** の **Capture Adjustment** を使用すると、キャプチャー量で分子量を補正したプロットが作成されます。

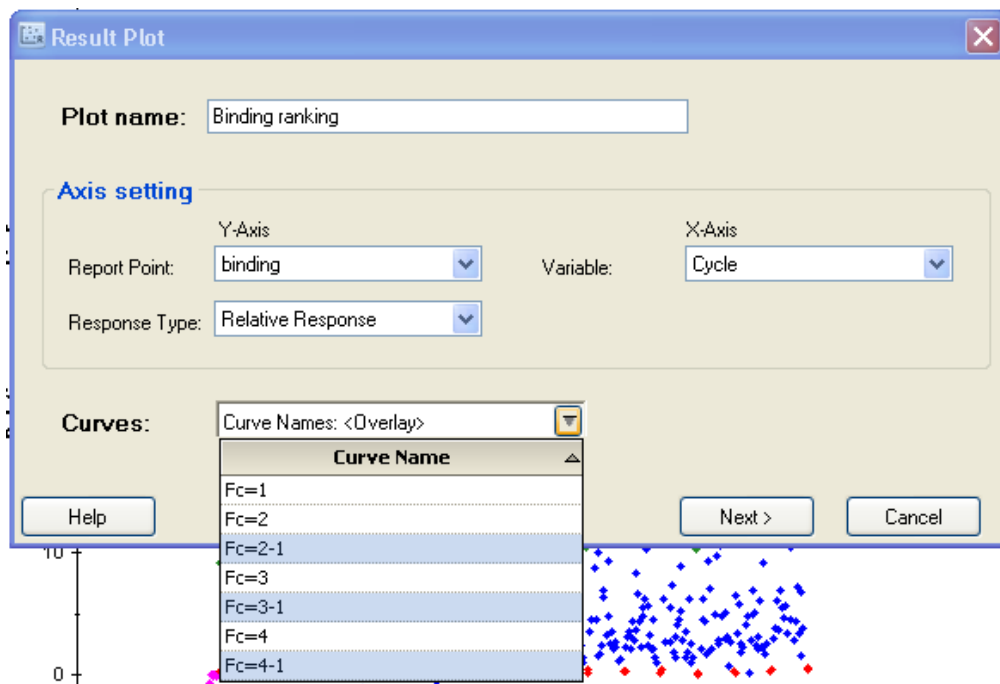
（いずれの補正もプロットのポイントに適用されますが、センサーグラムには適用されません。）



次に、解析用の **Result Plot** を作成します。Plot の **Result Plot** をクリックします。



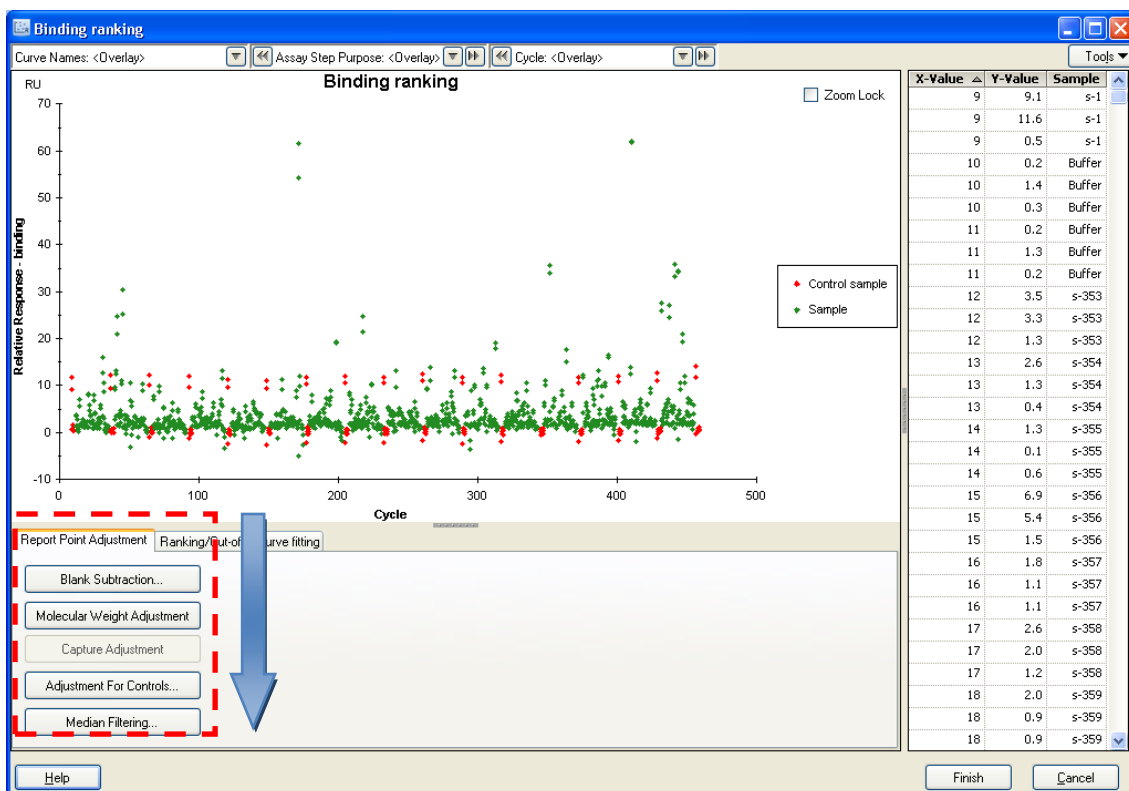
作成したいプロットの設定を行います。



**Plot name** にプロット名を入力します。**Y-Axis**、**X-Axis** と **Curves** の選択を行います。Curves では、複数の Curve name を指定できます。

**Next >** をクリックします。

**Result Plot** ウィンドウが開きます。



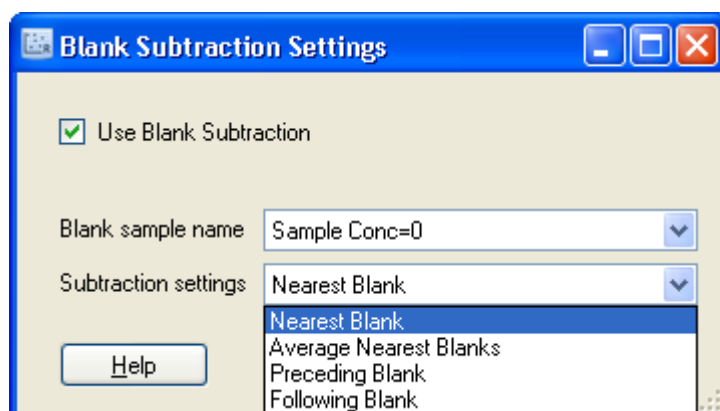
**Report Point Adjustment** タブで各種データ補正を選択します。上から順番に必要な補正を実行します。前の補正が適用された上で次の補正を実行します。

### Blank Subtraction

ブランクの差し引きを行います。ネガティブコントロール、または、サンプルのゼロ濃度がブランクとして認識されます。

**Blank Subtraction** をクリックします。**Use Blank Subtraction** にチェックを入れます。

**Blank sample name** をプルダウンメニューから選択します。ネガティブコントロール、または、サンプルのゼロ濃度 (Sample Conc=0) を選択します。



差し引き方法を **Subtraction settings** のプルダウンメニューから選択します。

**Nearest Blank:** 最も近いブランク



**Average Nearest Blanks:** サンプル測定前後の最も近いブランク 2 点の平均値  
 サンプル測定前または後にブランクがない場合には、最も近いブランクを使用します。

**Preceding Blank:** サンプル測定前の最も近いブランク  
 サンプル測定前にブランクがない場合には、最も近いブランクを使用します。

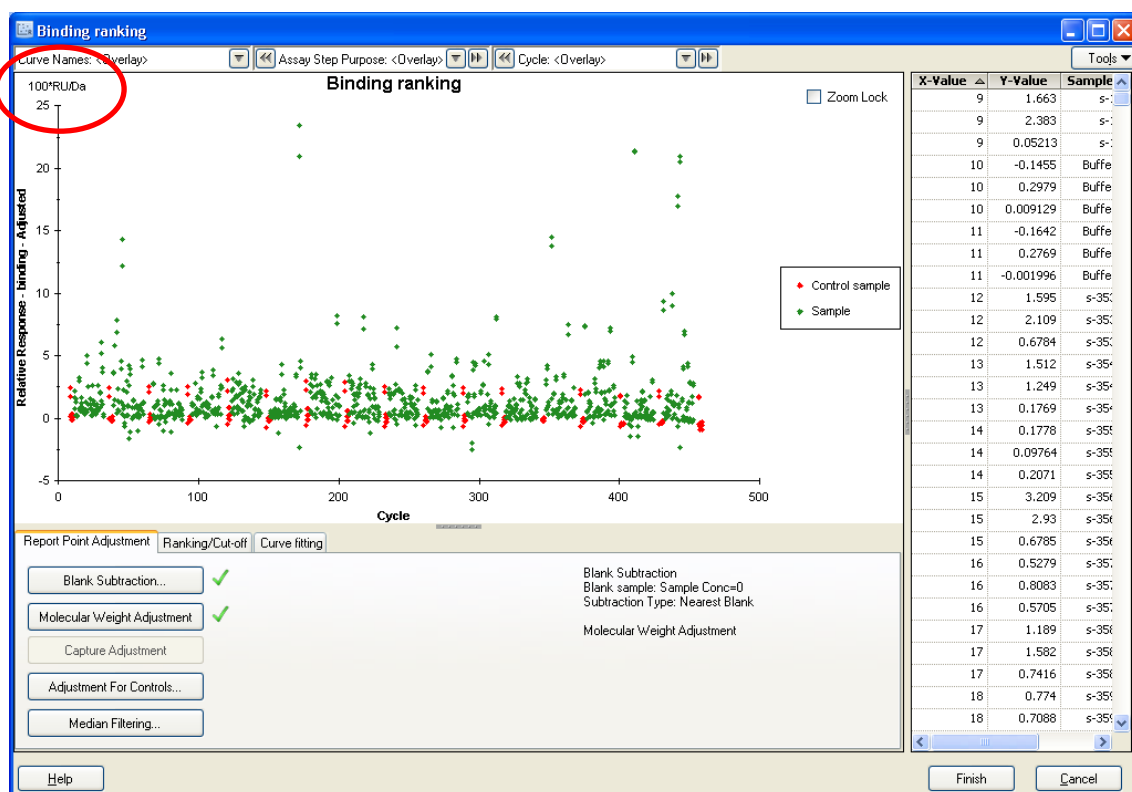
**Following Blank:** サンプル測定後の最も近いブランク  
 サンプル測定後にブランクがない場合には、最も近いブランクを使用します。

### Molecular Weight Adjustment

分子量補正を行います。化合物スクリーニングで有効です。結合が平衡状態に到達していれば、分子量補正を行うことで Affinity のランキングを行えます。同じアナライト濃度で、分子量補正をした結合量が大きいほど Affinity は強いと判断します。補正式は次の通りです。

$$100 \times \text{レスポンス (RU)} / \text{分子量 (Da)}$$

Keyword Table で分子量が入力されていないものや、ゼロと入力されている場合には、プロットから除外されます。補正後は、プロットの Y 軸の単位が  $100 \times \text{RU} / \text{Da}$  に変わります。



### Capture Adjustment

リガンドのキャプチャーを行ったデータで使用できます。次の式を使用します。

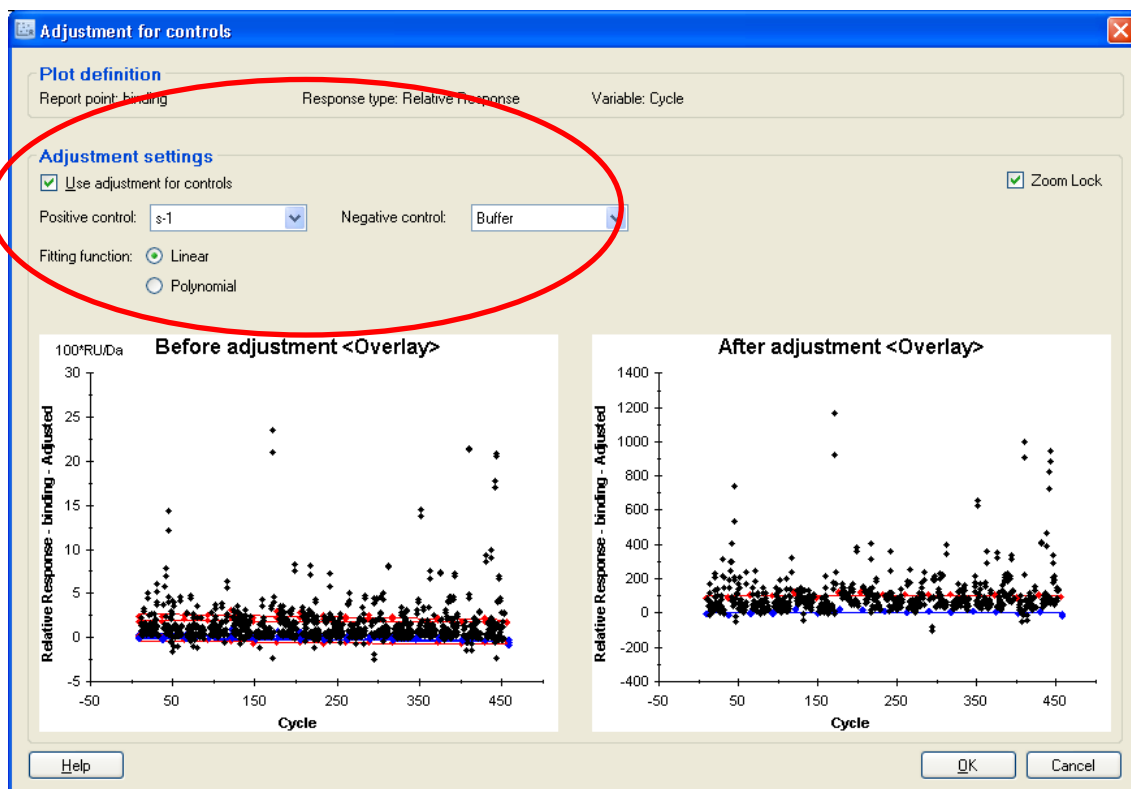
$$\text{レスポンス (RU)} / \text{リガンドのキャプチャー量 ((RU) または (100 \times \text{RU} / \text{Da}))}$$

キャプチャー量は、レポートポイントの baseline から Capture\_baseline を差し引いた値です。

### Adjustment For Controls

コントロールの結合量を利用した補正方法です。再生条件が強くりガンドの結合活性がアッセイ中に低下している場合や、リガンドが時間経過とともに失活している場合に使用します。定期的に測定したコントロールサンプルの結合量を利用して補正を行います。

**Adjustment For Controls** をクリックします。



**Use adjustment for controls** にチェックを入れます。

**Positive control** および **Negative control** をプルダウンメニューから選択します。

ネガティブコントロールを取っていない場合には、[None]を選択するとネガティブコントロールとしてゼロを使用します。(Set zero level で値を変更することもできます。)

スタートアップサイクルは自動的にプロットから排除されます。

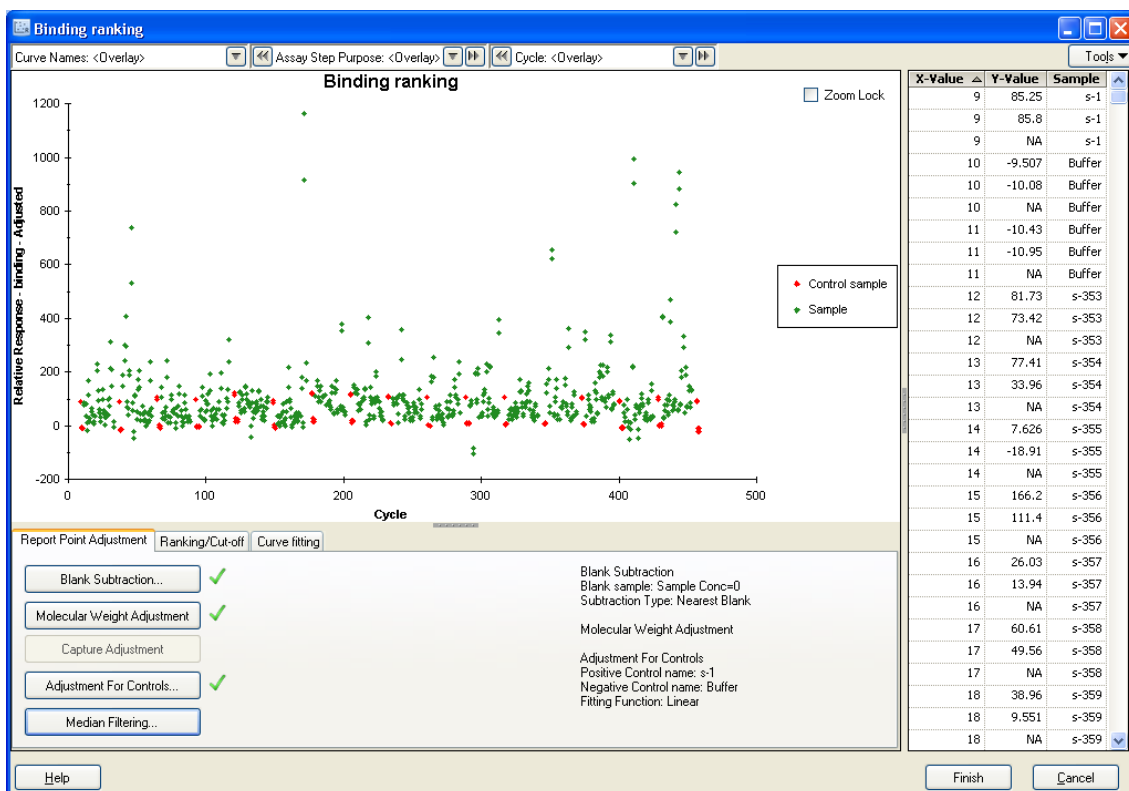
**Fitting function** で、Fitting 方法を選択します。

**Linear:**  $Y = aX + b$  (a および b は定数) を使用します。

**Polynomial:**  $Y = aX^2 + bX + c$  (a、b および c は定数) を使用します。  
コントロールサンプルのポイントが 4 つ以上必要です。

Fitting 結果が、右のプロットに表示されます。赤色ライン：ポジティブコントロール、青色ライン：ネガティブコントロールで、赤色ラインが  $Y = 100$ 、青色ラインが  $Y = 0$  になるように計算を行います。同時に各ポイントが補正されます。複数のフローセルデータを使用している場合には、各フローセルのコントロールサンプルで補正を行います。

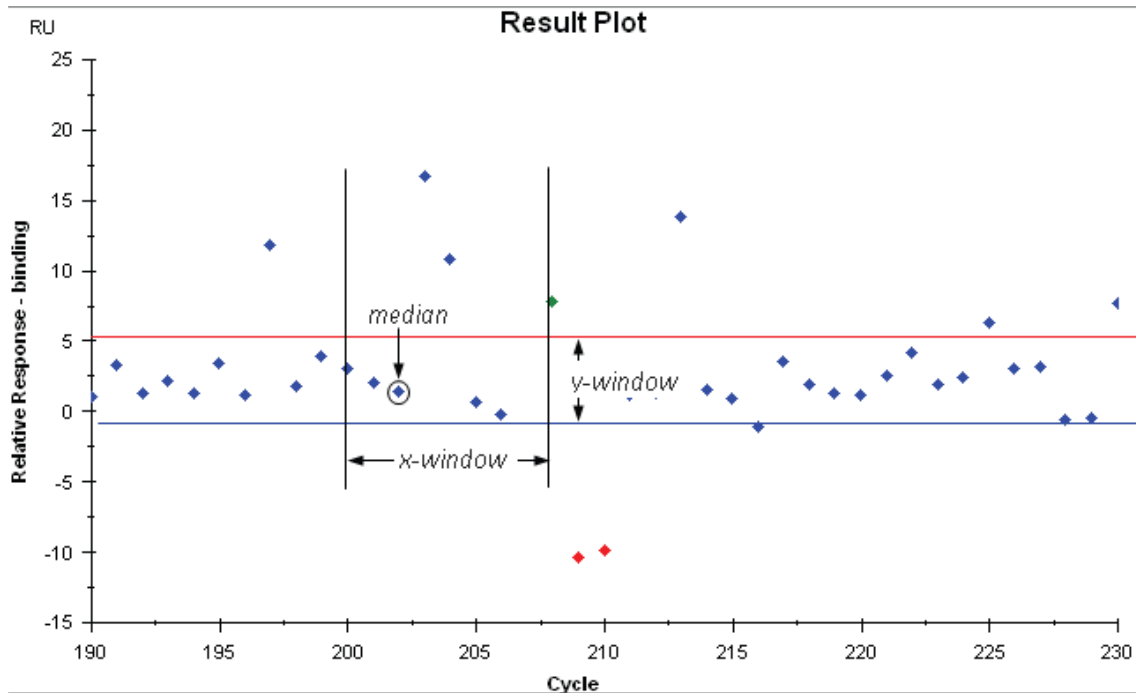
設定後、**OK** をクリックします。



### Median Filtering

メジアンフィルターを適用することで、結合レスポンスに影響を与えることなく、ノイズを低減して、プロットのドリフトを排除することができます。プロットがドリフトしている場合や、周期的にベースラインが変動している場合に有効です。

水平な Y 軸ウィンドウと、スライドする X 軸ウィンドウ（サイクル）の中央値でデータポイントの補正を設定します。Y 軸ウィンドウの設定では、推定される non-binder が含まれ、potential binder を除いた範囲に設定します。中央値は、各 X 軸ウィンドウ内で、Y 軸ウィンドウ内の中間に位置するポイントの Y 軸の値を取ります。

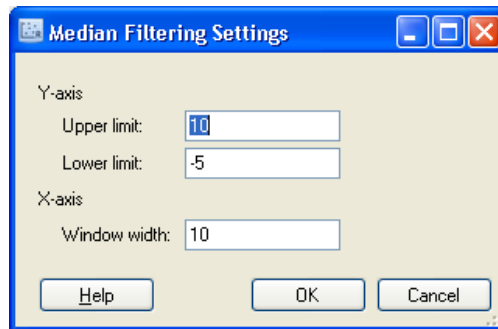


各 X 軸ウインドウの中央値を  $Y=0$  として、ベースラインを作成します。プロットの各ポイントから、各サイクルについて算出された中央値を差し引いて補正を行います。ファイルを複数呼び込んでいる場合には、各ファイルのデータを 1 グループとしてグループごとに補正を行います。

**Median Filtering** をクリックします。 **Use median filtering** にチェックを入れます。

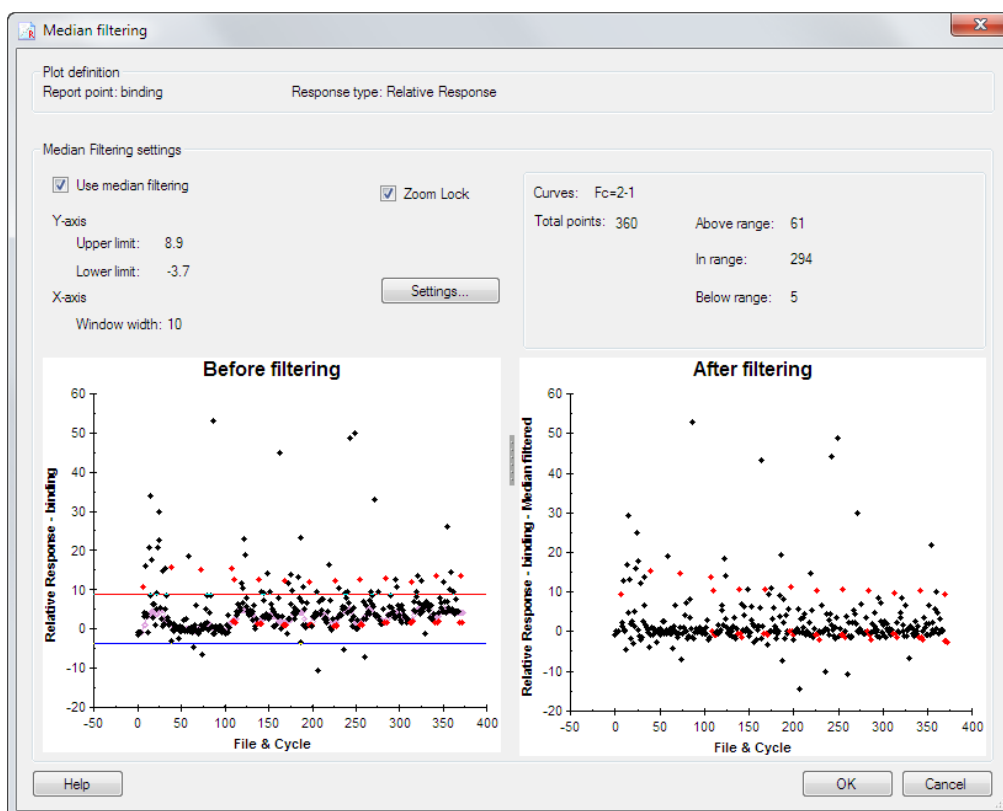
Y-axis、X-axis の設定がデフォルト表示されます。変更する際には、 **Settings** をクリックします。





Y軸ウィンドウの Upper limit と Lower limit に値(RU)を入力します。X軸ウィンドウの Window width (サイクル数) を設定します。5以上に設定します。**OK** をクリックします。

(Y軸ウィンドウは、左のプロットの赤または青ラインをマウスポインターでドラッグして設定することもできます。)



左プロットの紫色のラインは各サイクルについて算出された中央値です。Y軸の Upper limit は赤ライン、Lower line は青ラインです。右プロットでは、中央値が Y = 0 に設定され、各ポイントから中央値が引かれた値がプロットされています。

**OK** をクリックします。



設定した補正が全て適用されたプロットが表示されます。

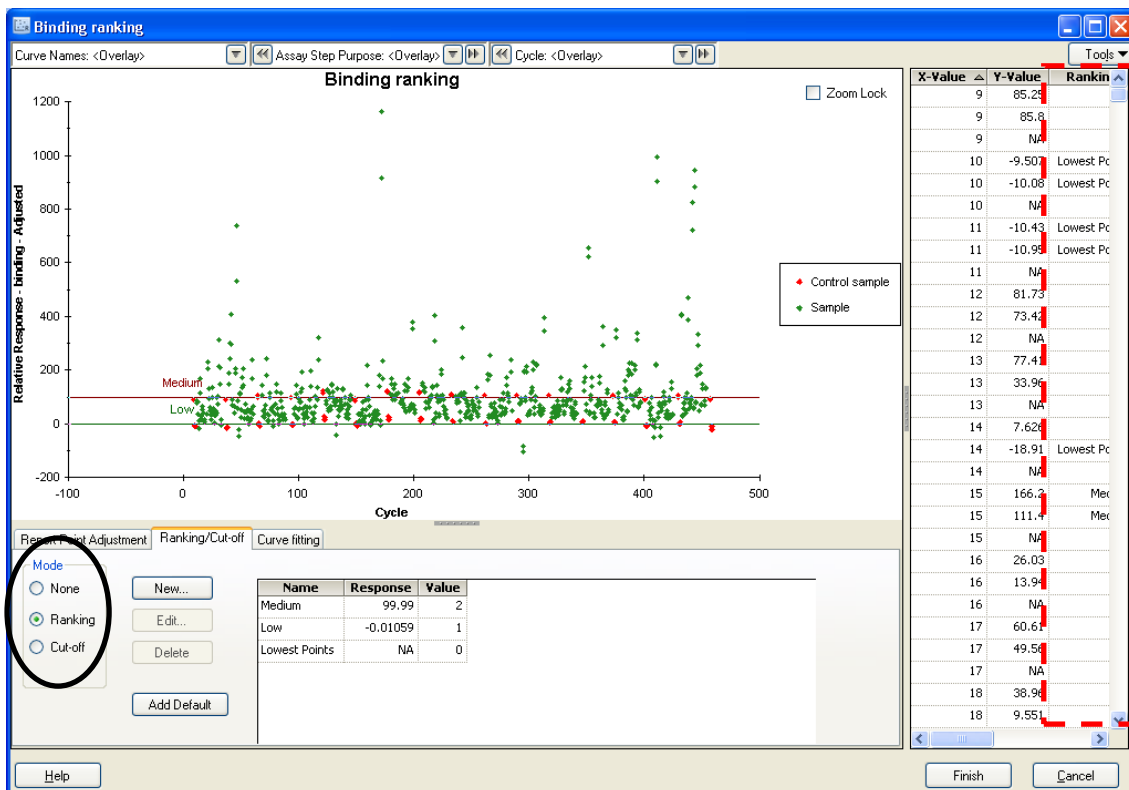


**Ranking/Cut-off** タブをクリックします。

Ranking または Cut-off の設定ができます。(Ranking と Cut-off は同時に設定できません。)

## Ranking

Mode→Ranking を選択します。



コントロールサンプルを測定している場合には、ランキングの値としてコントロールサンプルの平均値が自動設定されます。

上のプロットでは、ネガティブコントロールとポジティブコントロールの平均値で、それぞれ Low、Medium のラインが引かれています。

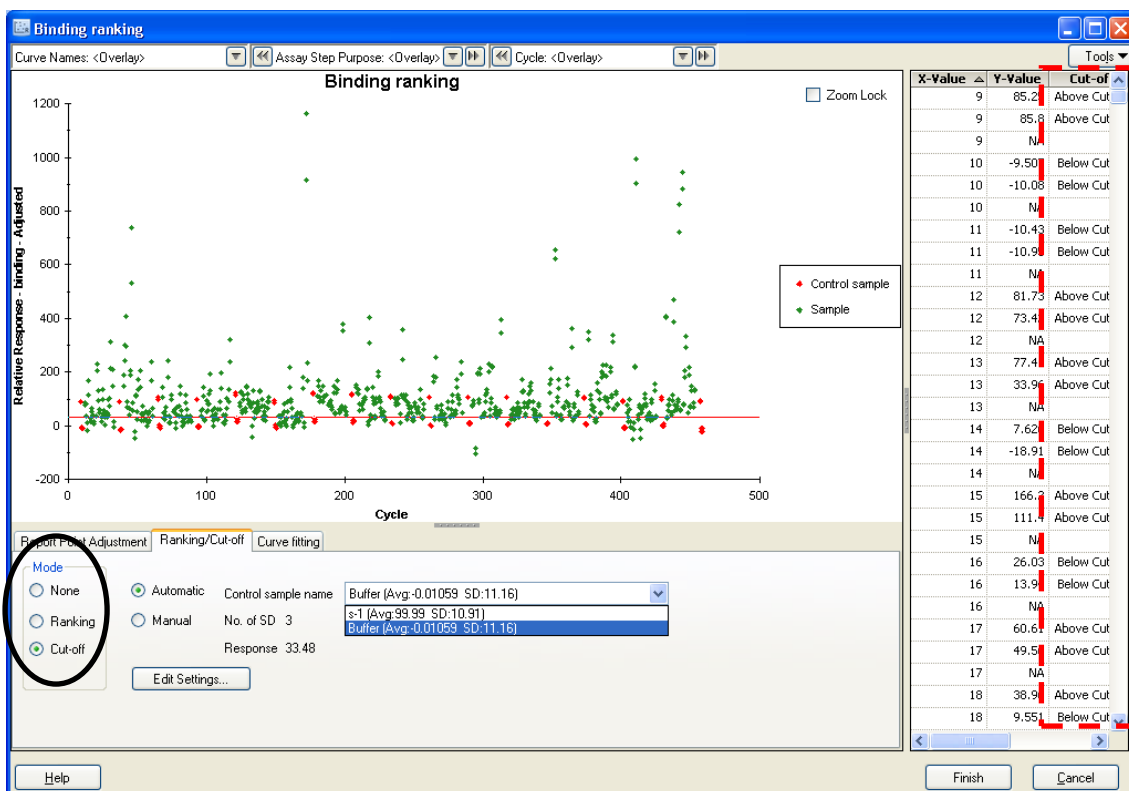
テーブルの **Ranking** に、ランキング結果が表示されます。Low 以下のポイントは Lowest Points、Medium 以下のポイントは Low、Medium より大きいポイントは Medium とランキングされます。**Value** には、ランキング用の数値が入力されています。

ランキングのレスポンス、Name および Value を変更したい場合には、プロット上のラインをマウスポインターでドラックして変更するか、下の一覧の該当する Name を選択後、**Edit** をクリックして変更を行います。ランキング項目を増やしたい場合には、**New** をクリックして追加します。

## Cut-off

Mode→Cut-off を選択します。

デフォルトでは選択したサンプル（通常、ネガティブコントロール）の 3SD に Cut-off 値が設定されています。画面下の **Edit Settings** で Cut-off 値の設定が可能です。数値で設定したい場合には、画面下の **Manual** を選択後、**Edit Settings** でレスポンスを設定します。



テーブルの Cut-off に結果が表示されます。Cut-off 以下の値は Below Cut-off、Cut-off 値より大きい値では Above Cut-off と表示されます。



テーブルの表示項目を変更したい場合には、テーブル右上の **Tools**→**Table Columns** を選択します。項目一覧で、表示したい項目にチェックを入れます。

注釈・コメントを入れたい場合には、補足 1-8 をご参照ください。



画面右下の **Finish** をクリックして、Result Plot の解析を終了します。

画面左の Plot フォルダ内に、Result Plot が追加されます。再解析を行いたい場合には、Result Plot を選択後、マウス右クリック、**Edit** を選択します。**File**→**Save as** で結果を保存します。

解析結果は、**File**→**Export**→**Result To Excel** で、テキスト形式で保存できます。

プロットは、プロット上でマウス右クリック、**Copy Graph** を選択後、Paint または WordPad に貼り付けて保存します。

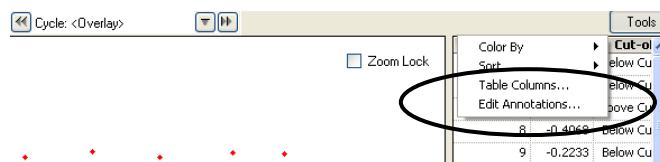
### 解析メソッドの保存・実行

同じ内容で繰り返し解析を行う場合には、設定した解析方法をメソッドとして保存して、次の解析で使用することができます。メソッドを保存する場合には、**File**→**Save Evaluation Method As** を選択して保存先と保存内容を指定します。メソッド使用時には、解析データを **File**→**Open** で呼び出し後、**File**→**Apply Evaluation Method** を選択してメソッドを呼び出し適用します。

### 補足 1-8. 注釈・コメントの追加

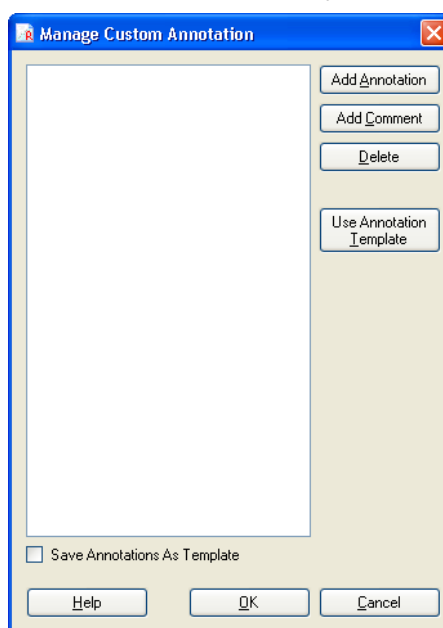
選択したポイントに対して注釈、コメントをテーブルに追加できます。

例えば、プロット確認時に、溶液効果が大きいポイントや  $R_{max}$  を超えているポイントに注釈・コメントを追加できます。



Result Plot を **Finish** する前に設定を行ってください。

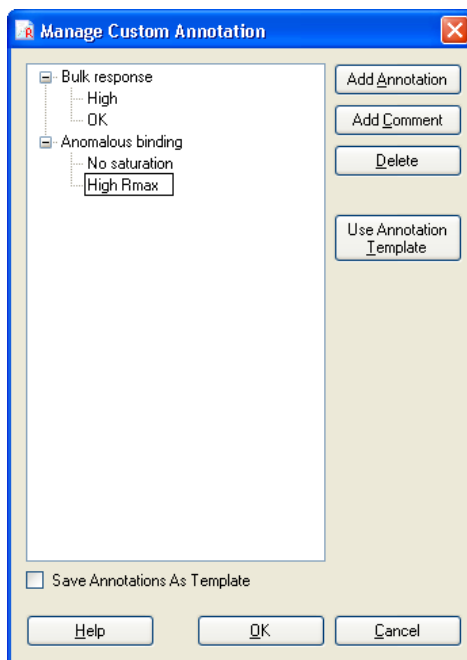
画面右の **Tools**→**Edit Annotations** をクリックします。



**Add Annotation** を選択して、注釈を入力します。また、Annotation を選択した状態で、**Add Comment** を選択して、コメントを追加します。コメントは複数追加できます。

別途、Annotation を追加する場合には、上記操作を繰り返します。



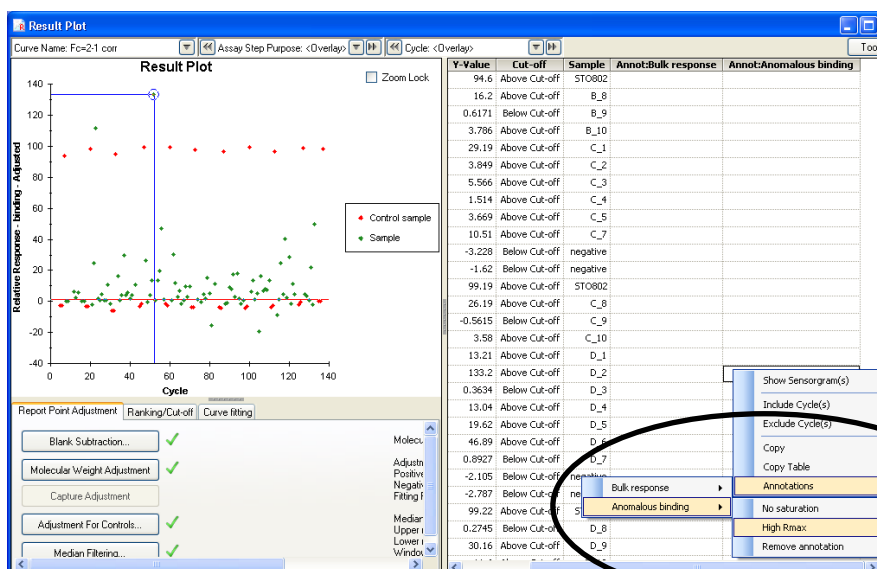


作成した Annotation を保存して、別データの解析時に使用するには、下の **Save Annotation As Template** にチェックを入れます。保存しない場合には、作成した Annotation は実行中のファイル内のみで適用されます。また、最終保存したものがテンプレートとなります。

**OK** をクリックします。

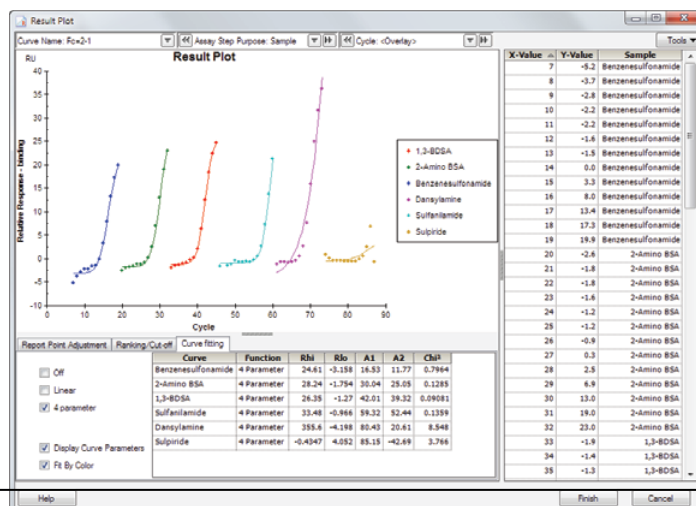


Annotation を入れる場合には、プロットのポイントを選択して、テーブルの該当サンプル上でマウス右クリック、**Annotations** を選択して、**Annotation** から **Comment** を選択します。テーブルに情報が追加されます。



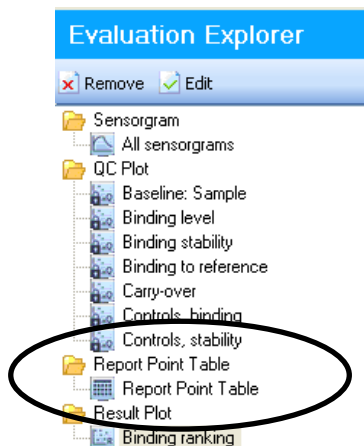
## 補足 1-9. Curve Fitting

Result Plot の Curve fitting タブでは、プロットを Linear または 4-parameter で Fitting することができます。



レポートポイントテーブルの確認

Evaluation Explorer の Report Point Table を選択します。



Work area には、全測定サイクルのデータが表示されます。

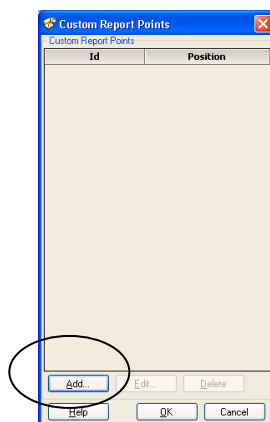
各カラム上部のフィルター  を使用し、必要データを抽出できます。

Fc	リファレンス差し引きデータ
Report Point	binding (結合レスポンスのレポートポイント名)
Assay Step	Sample (緩衝液添加サイクルなどを除きます)

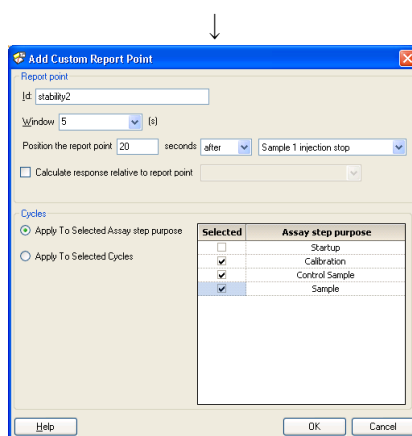
**RelResp [RU]** を 2 回クリックすると、結合レスポンスが高い順に並びます。

## 補足 1-10. レポートポイントの追加

**Tools** → **Custom Report Points...** をクリックします。

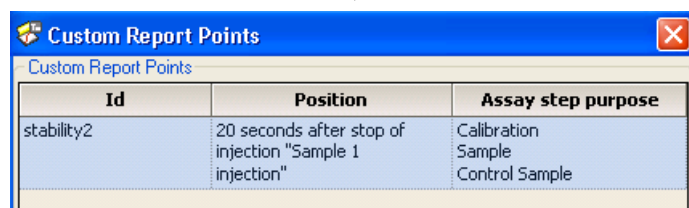


**Add...** をクリックします。



Id にレポートポイントの名前を入力します。追加する位置を設定し、Cycles でどのサイクルで記録するか設定します。

**OK** をクリックします。



初期画面に、追加したレポートポイントが表示されます。

## 2. 低分子化合物アナライトの相互作用測定

低分子化合物の溶解性の問題で有機溶媒を利用する場合には、一般的なタンパク質-タンパク質相互作用測定と異なり、ランニング緩衝液およびサンプル調製に注意が必要です。また、測定結果を評価するにあたり溶媒効果の補正が必要となります。

複数サンプルのスクリーニングのメソッドおよび解析については、1章をあらかじめご参照ください。

### アナライトの調製

アナライト溶液の DMSO の終濃度をランニング緩衝液と合わせます。化合物濃度は結合スクリーニングが目的の場合、親和性にもよりますが数十 nM～数  $\mu$ M で調製します。反応速度定数の算出が目的の場合、 $K_D$  (解離定数) 値の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度以上調製します。

### ランニング緩衝液

PBS や HEPES 緩衝液が広く使用されます。(HEPES は、ヒト血清アルブミンや各種タンパク質への結合が見られます。) 有機溶媒を使用する場合には、DMSO 含有緩衝液を使用することが多いです。 DMSO 濃度は 5%程度以下を推奨します。DMSO 濃度はリガンドの活性や化合物の溶解性を考慮し決定します。ランニング緩衝液に使用できる DMSO 濃度は 10 %までです。非特異的吸着を抑える目的で、終濃度 0.05 %程度の界面活性剤 (Surfactant P20 など) を添加することもあります。

### 補足 2-1. ランニング緩衝液調製の注意事項

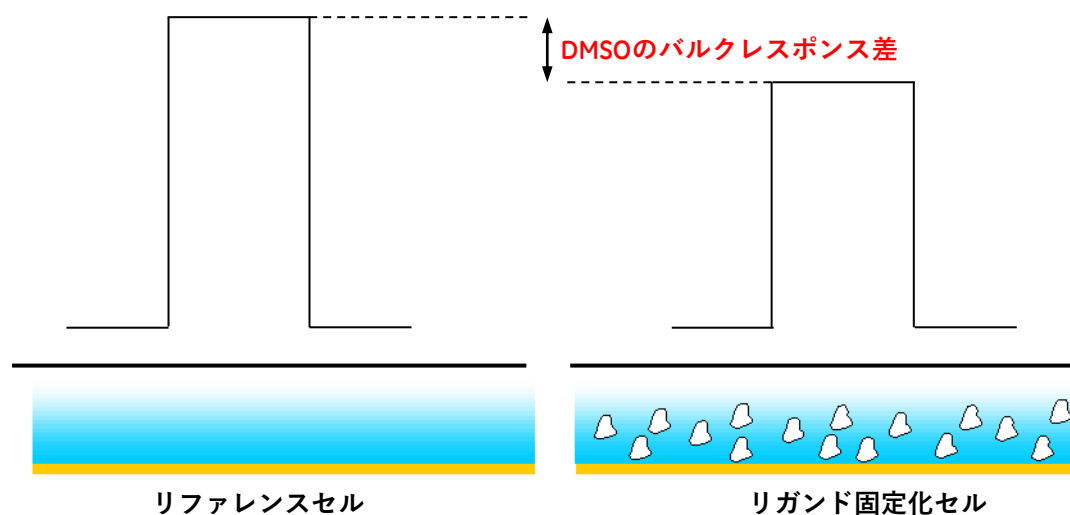
- ・ランニング緩衝液は用事調製してください。
- ・DMSO を扱う際は、耐性がある材質の容器を使用します。(ポリプロピレン製は使用可)
- ・DMSO を含む緩衝液をろ過する際には、フッ素樹脂製またはナイロン製のフィルター (0.22  $\mu$ m) を用います。酢酸セルロース製のは避けてください。
- ・DMSO 溶液中の混合物も測定に影響をおよぼす場合があるのでグレードの高いもの (UV spectrometry 用など) を使用してください。また、フレッシュなものを使用してください。
- ・DMSO 混合による pH 変動は大きいため、DMSO 混合後の pH を考慮してください。
- ・きれいなガラスボトルに保存し、装置にセットする直前までキャップはしっかり閉めてください。
- ・装置のボトルポジションにセットする際は必ず付属のスクリュウキャップを使用してください。

### 溶媒補正

SPR のシグナルはセンサーチップ表面での様々な屈折率 (RI) の変化を反映しています。センサーチップ表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の屈折率の差、すなわち、溶媒 (バルク) 効果レスポンスが含まれます。

溶媒効果が小さい (100 RU 以下) 実験では、リガンド固定化セルからリファレンスセルのレスポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できます。

しかし、厳密には、リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されるため、リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも高くなります。



ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1% の違いは約 1,500 RU のバルクレスポンスに相当します。複数あるサンプルを個々に調製する際、DMSO 濃度の誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性があります。

このように、溶媒効果が大きい DMSO を用いる実験では、単純に差し引くだけではバルクレスポンスの差を十分に排除することはできません。実際、このバルクレスポンスの差は小さくても (通常 10 RU 以下)、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度であるため、バルクの差を補正する必要があります。

溶媒補正は以下の 3 つの要因が重複した場合に必要となります。

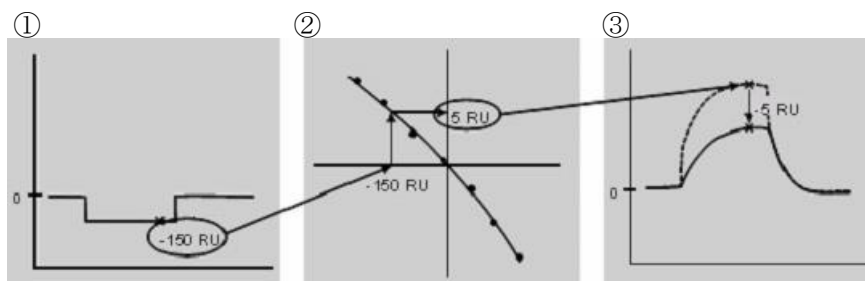
- ・ 期待されるアナライトの結合レスポンスが小さい (100 RU 以下) 場合
- ・ リガンドを高密度 (10,000 RU 以上) に固定化した場合
- ・ サンプル溶液に DMSO が含まれるなど、バルクレスポンスが大きく (3000 RU 以上)、サンプル間で値が異なる場合 (DMSO 濃度の“誤差”も含めて)

## 補足 2-2. 溶媒補正の方法

### 溶媒補正の手順

Biacore S200 Evaluation Software では、自動で以下の補正を実施します。

- ・ 測定の際に、DMSO 溶液の濃度シリーズ（ランニング緩衝液に含まれる DMSO 濃度 $\pm 1\%$ 程度）を、リガンド固定化セルおよびリファレンスセルに添加し、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を記録します。
- ・ リファレンスセルのレスポンスを X 軸、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を Y 軸にプロットして溶媒補正用曲線を作成します。
- ・ 低分子化合物を添加した際、リファレンスセルのレスポンス（図①）を溶媒補正用曲線に代入して、補正值を算出します（図②）。
- ・ 相互作用測定で得られた結合レスポンスから補正值を差し引きます（図③）。



### 溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

5% DMSO 含有サンプルを用いる場合の溶媒補正用 DMSO 溶液の作成方法を記載します。

すべての DMSO 溶液は用事調製します。

① 1x PBS (no DMSO) を調製します。

② 溶媒補正用曲線 4%、6% DMSO ストック溶液を調製します。

4% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9600 $\mu\text{l}$
	100% DMSO	400 $\mu\text{l}$
		10000 $\mu\text{l}$


6% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9400 $\mu\text{l}$
	100% DMSO	600 $\mu\text{l}$
		10000 $\mu\text{l}$

③ ストック溶液を下記表の割合で混合して、4%~6%の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製します。以下の表は 8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する際のプロトコールです。

4% DMSO		100	200	300	400	500	600	700	
6% DMSO	700	600	500	400	300	200	100		
	700	700	700	700	700	700	700	700	700 ( $\mu\text{l}$ )

## 2-1. メソッドの設定

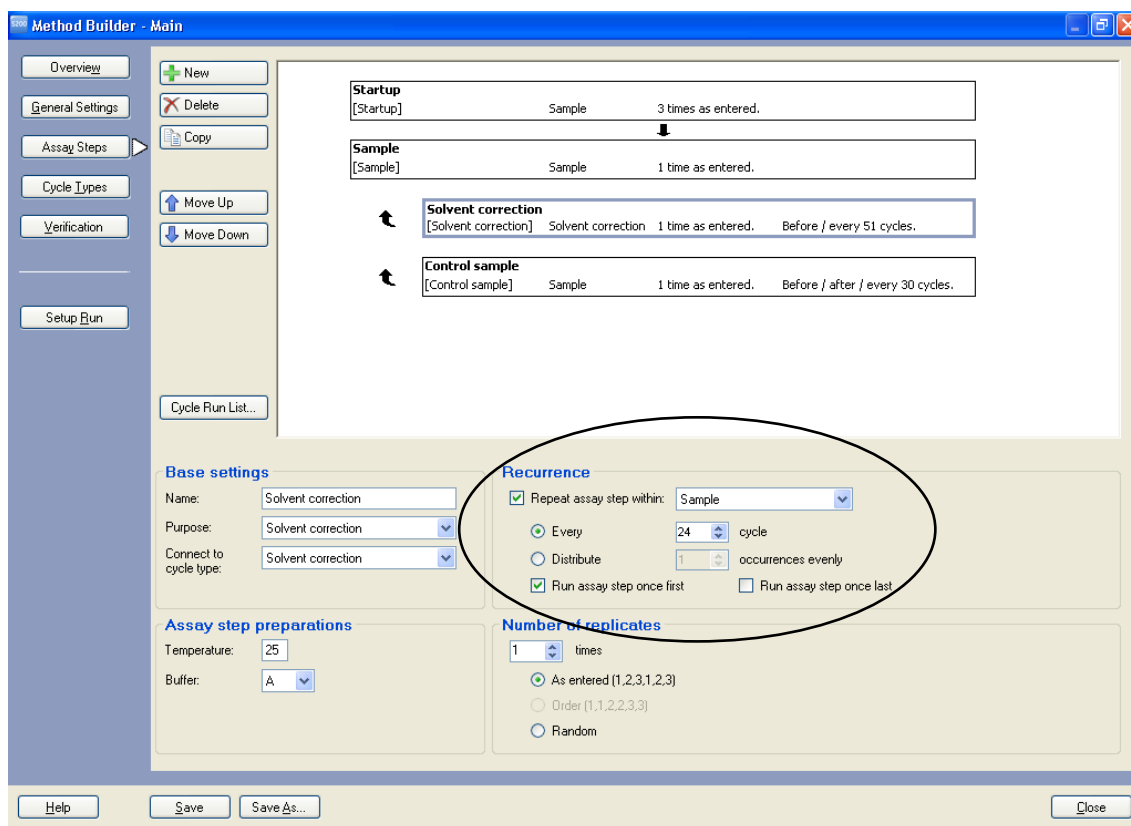
ここでは、主に1章のスクリーニングメソッドと異なる点をご紹介します。

Toolbar の **Home アイコン** (  ) または Menu bar の **Run→Template...** をクリックしてスタートスクリーンに戻ります。

**Biacore Template** の **Binding screen**→**Fragment/LMW**→**LMW screen** を選択した後、**Open** をクリックします。**Fragment/LMW** 内のメソッドは全て溶媒補正用溶液の測定が入ったメソッドです。



**Assay Steps** をクリックします。



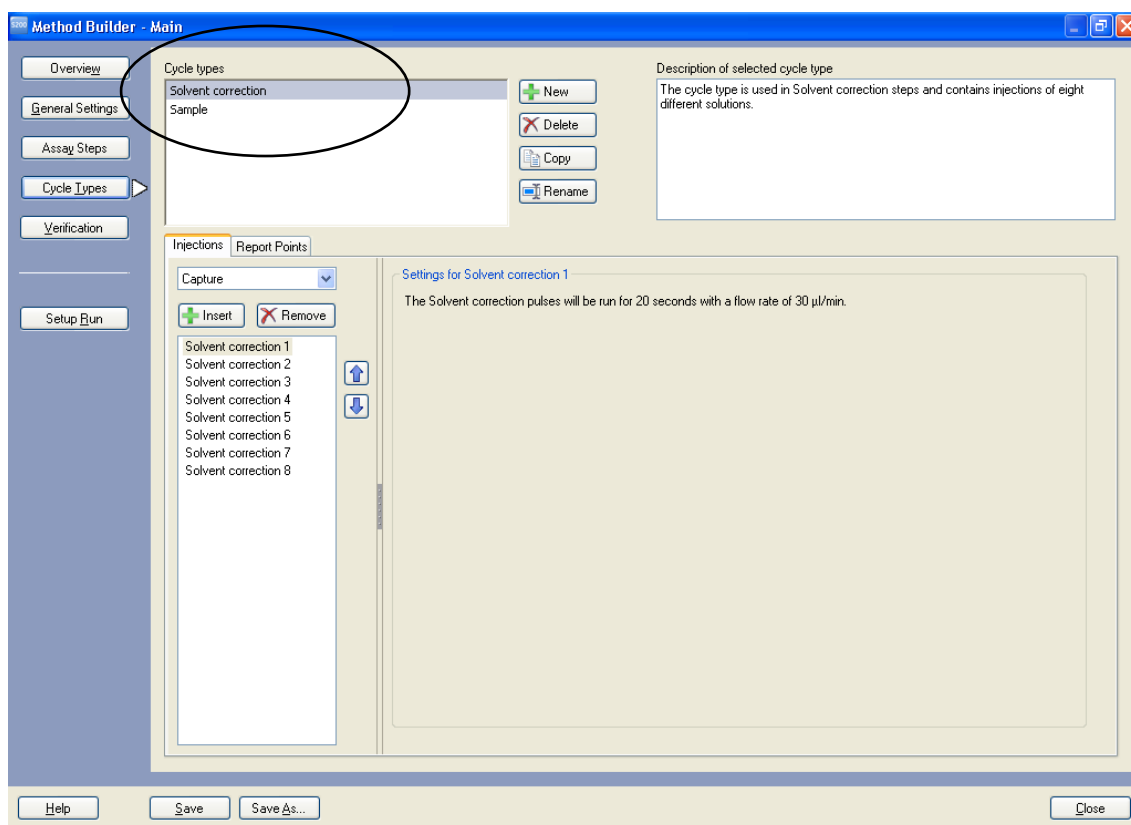
Recurrence で溶媒補正用溶液添加の頻度を指定します。

30～50 サイクルに 1 回程度の頻度で実施することをおすすめします。



**Cycle Types** をクリックします。

**Cycle types** の **Solvent correction** をクリックします。



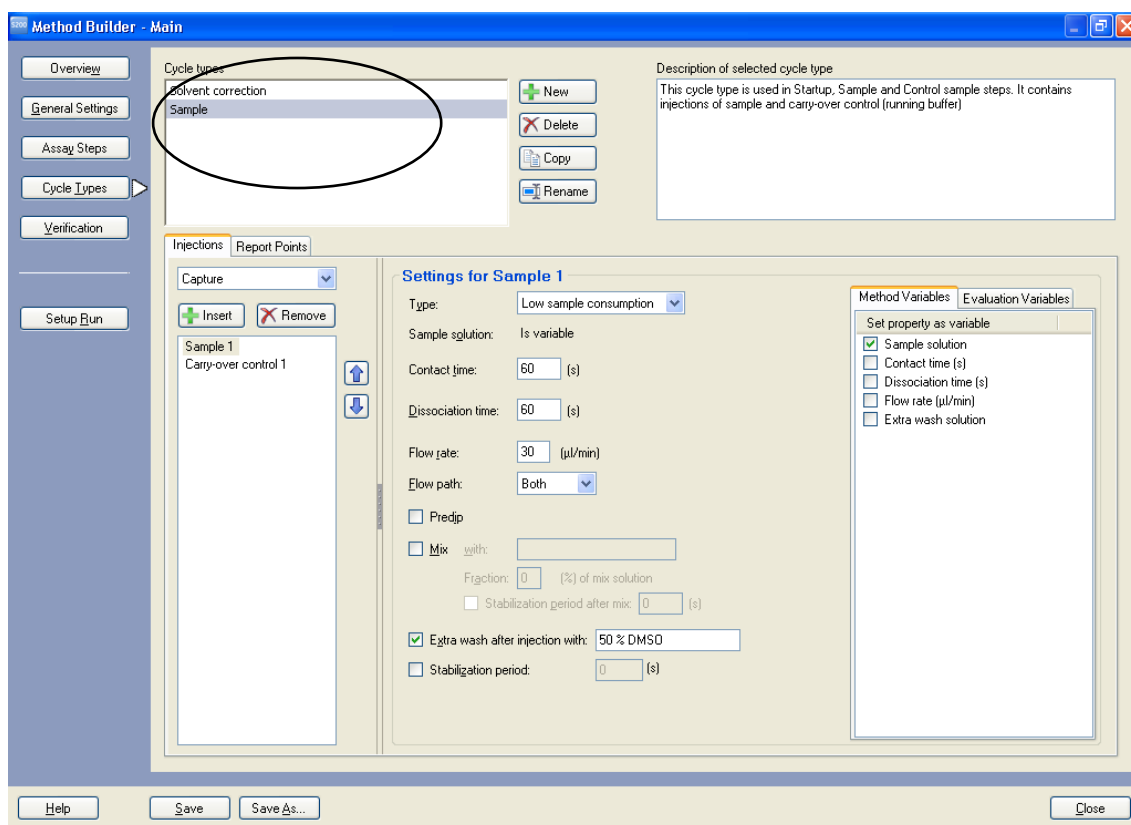
デフォルトでは、溶媒補正用溶液を 8 点添加します。少なくする際には、選択して **Remove** を選択します。溶媒補正用溶液の添加は固定条件で実施します。

なお、リガンドをキャプチャーする際には、リガンドキャプチャー後に溶媒補正用溶液を添加する必要があります。適宜、**Capture** コマンドを追加してください。

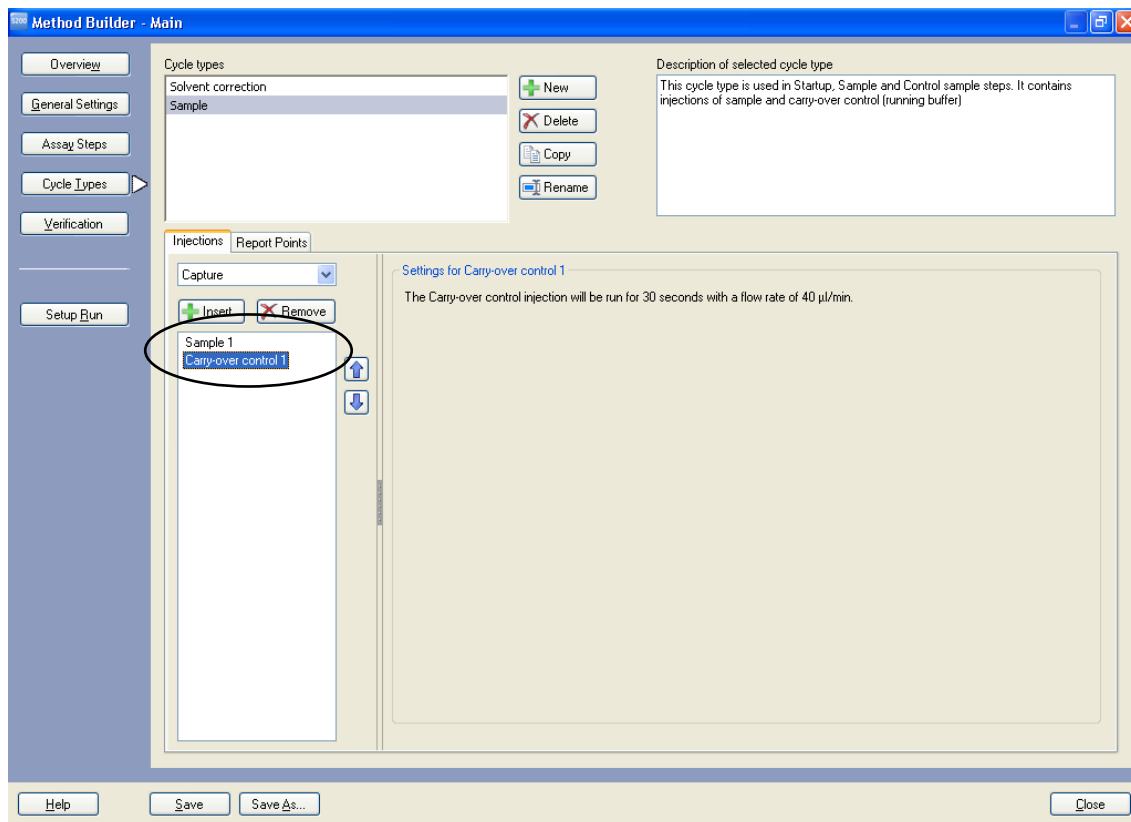




**Sample** を選択して、アナライト添加サイクルの設定を行います。



**Sample 1** を選択します。化合物の溶解性が低い場合には、デフォルトの設定に従って、50 % DMSO で Extrawash を実施します。フローセル以外の流路を 50 % DMSO で洗浄して、流路に残った化合物がキャリーオーバーすることを防ぎます。

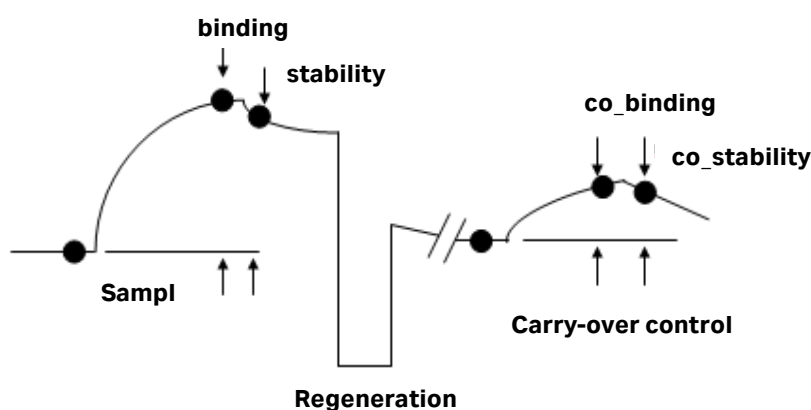


**Carry-over control** コマンドは、サンプル添加後にバッファー添加を行います。測定後に、化合物のキャリーオーバーが起きていたかを、レポートポイントで確認できます。(補足 2-3 参照。)

再生溶液を添加する際には、**Regeneration** コマンドを追加してください。  
以降の設定詳細は、1 章をご参照ください。

### 補足 2-3. レポートポイントの設定

溶媒（バルク）補正を必要とする実験では、低分子アナライトのバルクレスポンスを測定するために、アナライト添加中（添加終了直前）にレポートポイントを取得する必要があります。自動取得されるレポートポイントの名前は **binding** と付いています。添加終了直後のレポートポイントは **stability** として取得されます。また、低分子アナライト特有のニードル、流路等へのキャリーオーバーチェックのために、アナライト添加終了後、ランニング緩衝液をアナライトと同等のモードで添加して取得されるレポートポイントの名前は、頭に“co\_”が付いています。



### 補足 2-4. キャプチャー法を利用した低分子化合物の測定

リガンドをキャプチャー後のベースラインドリフトが小さい場合には、LMW screen using capture メソッドを使用して測定できます。リガンドをキャプチャーした後、連続して溶媒補正溶液を添加します。

なお、キャプチャー後のベースラインドリフトが大きい場合には、キャプチャー法の使用はおすすめできません。キャプチャーカップリング法を使用するか、リガンドを直接固定化する方法をお試しください。

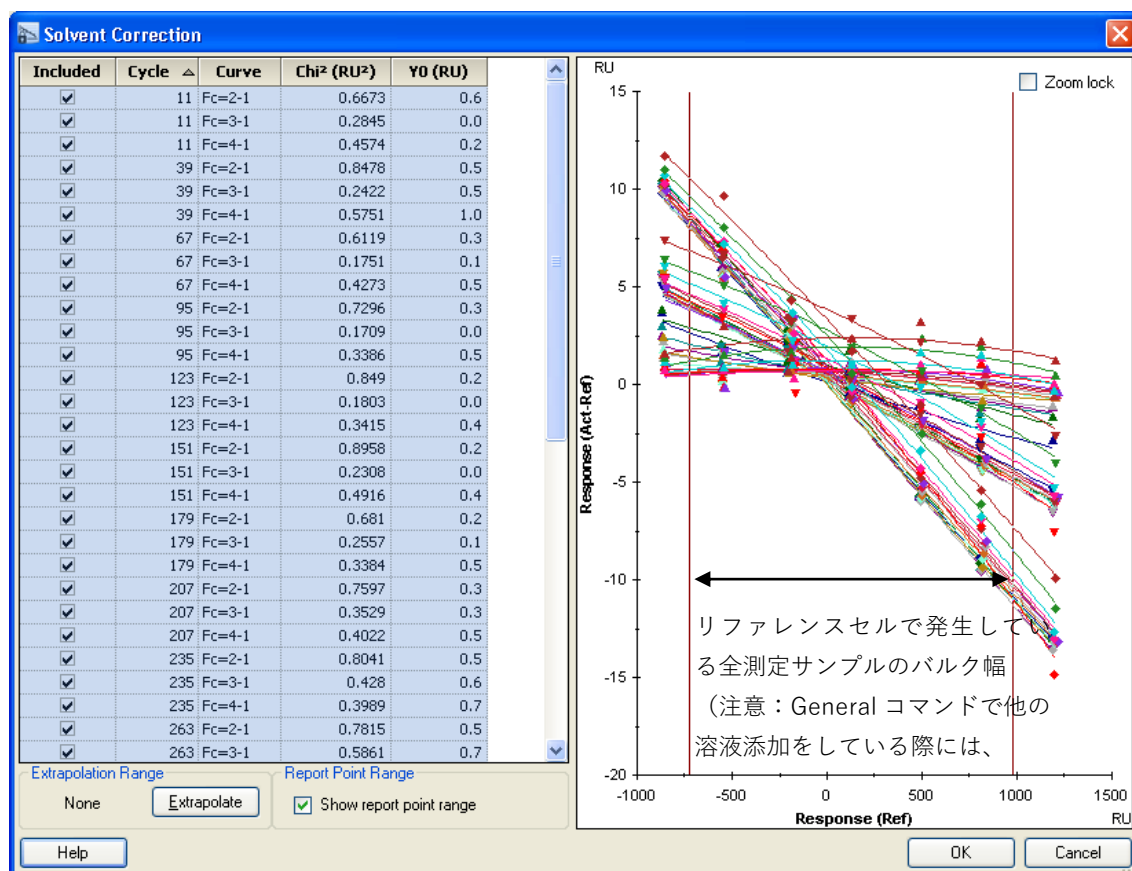
## 2-2. 溶媒補正方法

スクリーニング、反応速度定数・解離定数算出は、溶媒補正実施後に解析に進みます。  
 ここでは、溶媒補正方法までをご紹介します。解析方法は、**Biacore S200 日本語取扱説明書 基本操作編** を参照してください。スクリーニングは 1 章をご参照ください。

### 溶媒補正

ナビゲーションパネルの、**Data→Solvent Correction** をクリックします。

測定サイクル中の溶媒補正用曲線が表示されます。



画面左で使用する補正曲線にチェックを入れ、**OK** をクリックすると補正が完了します。サンプル添加とキャリーオーバー添加について補正を行います。

注意：溶媒補正用曲線に表示されるバルク幅を示す 2 本の線は、メソッド内容によってはサンプル以外の溶液添加の溶液効果も反映します。このため、線の幅が広い場合には、センサーグラムの重ね書で、サンプルの溶液効果が大きくないかを目視でも確認してください。

溶媒補正用曲線は、Evaluation Explorer 中の **Solvent Correction** フォルダに追加保存されます。

センサーグラムおよびプロットで、補正後のデータを呼び出す際には、**Curve Name** リストから、末端に **corr** が付いたものを選択します。例：Fc2-1 corr。

## データの評価

溶媒補正を実施後に解析に進みます。

複数サンプルのスクリーニングの評価は、**Biacore S200 日本語取扱説明書 応用編の1章**を参照ください。**Kinetics/Affinity** スクリーニングを実施する場合には、**基本操作編**を参照ください。

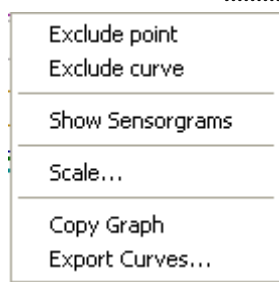
### 補足 2-5. 溶媒補正用曲線のクオリティーチェック

測定ポイントにカーブが良好に重なっているかを確認してください。 $\text{Chi}^2$  値が2以下を目安としてください。カーブから大きく外れているポイントは削除してください。

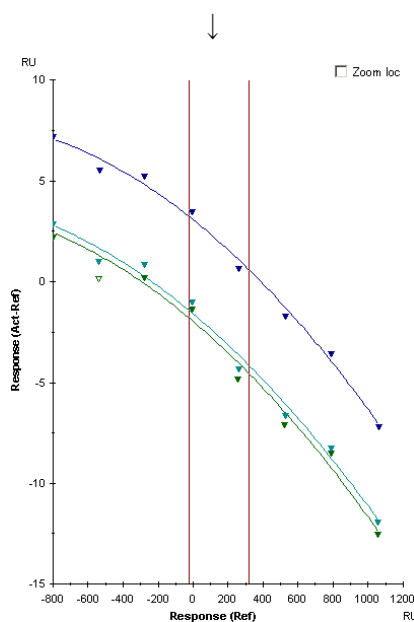
なお、カーブの形状、傾きは、測定条件によって大きく異なるためクオリティーの基準にはなりません。

### 補足 2-6. 測定ポイントの削除

エアの混入などの理由で、溶媒補正用曲線から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックします。



Exclude point をクリックします。

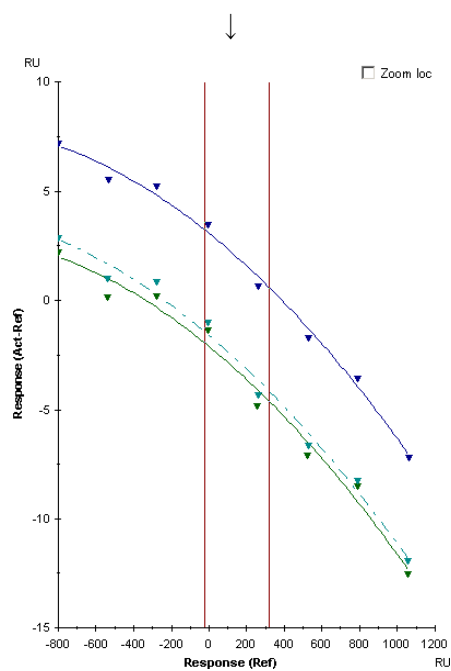


測定ポイントが削除されます。同時に、改めて残りの測定ポイントで溶媒補正用曲線が作成されます。

## 補足 2-7. 溶媒補正用曲線の削除

エアの添加などの理由で解析から削除したい溶媒補正用曲線がある場合、目的の溶媒補正用曲線について、Solvent correction 左のテーブルの **Include** カラムのチェックを外します。

Included	Cycle $\Delta$	Curve	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	YO (RU)
<input checked="" type="checkbox"/>	4	Fc=4-3	0.2299	3.1
<input checked="" type="checkbox"/>	25	Fc=4-3	0.5779	-2.1
<input type="checkbox"/>	30	Fc=4-3	0.4273	-1.6

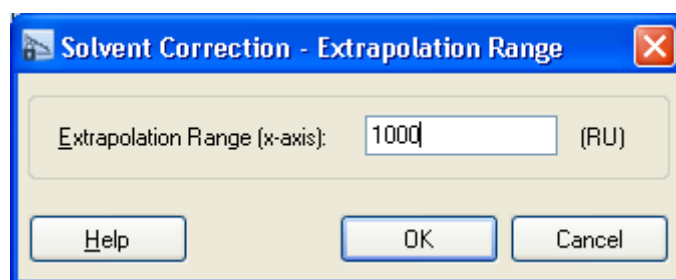


チェックを外した溶媒補正用曲線が削除されます。

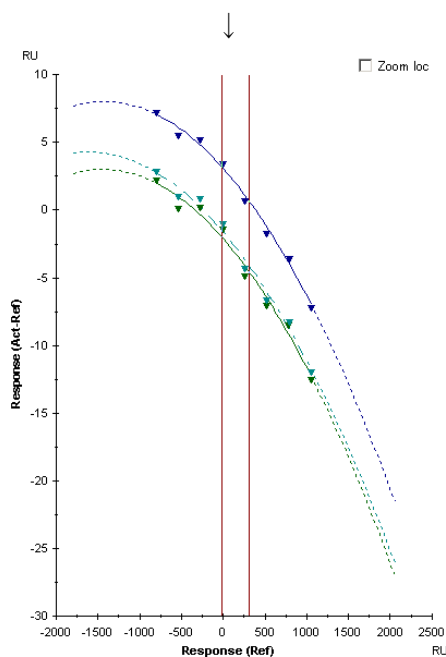
### 補足 2-8. 溶媒補正用曲線の延長

サンプルもしくは溶媒補正用 DMSO 溶液の調製の問題で、測定サンプルのバルクレスポンスが溶媒補正用 DMSO 溶液の範囲内に収まらなかった場合に、溶媒補正用 DMSO 溶液の濃度幅 (=リファレンスセルに対するバルク幅) を広げることができます。ただし、延長された溶媒補正用曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため補正值の取扱いには注意が必要です。

Solvent correction 左下の **Extrapolate** をクリックします。



延長する幅を入力します。実際の溶媒補正用曲線の測定幅の 10 %を超えないことが望ましいです。 **OK** をクリックします。



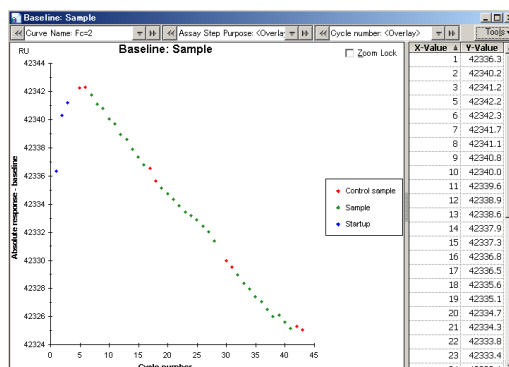
## 補足 2-9. 測定結果の正当性の評価

Evaluation Explorer の Plot を用いて、得られたデータの信頼性があるかを評価します。

### ベースライン変動

#### Baseline: Sample プロット

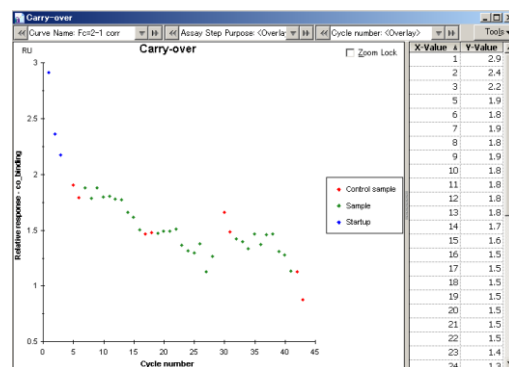
全測定サイクルの **baseline** の絶対値に対するプロットが表示されます。物理吸着しているリガンドがサイクルごとに脱離している場合、右肩下がりになります。ポジティブコントロールサンプルのレスポンスが確認できていれば問題ありません。ポジティブコントロールがない場合、全サイクルの総変動量 (RU) が固定化量の 10%以上である場合には、その点を考慮して評価する必要があります。



### キャリーオーバーチェック

#### Carry-over プロット

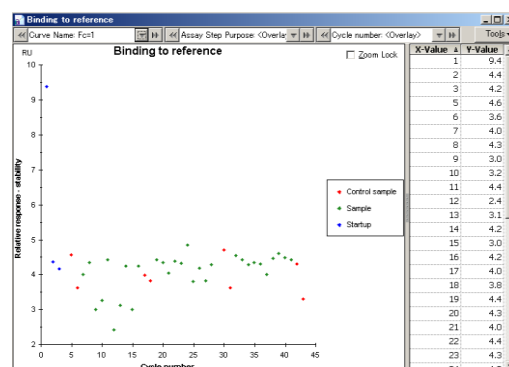
**co\_binding** の **co\_baseline** に対する相対値プロットが表示されます。ランニング緩衝液のレスポンス (画面では **Startup** サイクル) に対して、レスポンスの大きいアナライトはニードルや流路などに吸着する性質を持ちます。キャリーオーバーが激しいアナライトの次サイクルの結合レスポンスは、それを考慮して評価する必要があります。



### リファレンスセルへの非特異吸着の確認

#### Binding to reference プロット

**Stability** の **baseline** に対する相対値のプロットが表示されます。ランニング緩衝液のレスポンスを基準として評価します。ランニング緩衝液のレスポンス以上のサンプルは、センサーチップ表面へ非特異的に吸着している可能性があります。非特異的吸着が起きている場合には、溶媒補正が正しく実施できないため、データ評価時には注意が必要です。

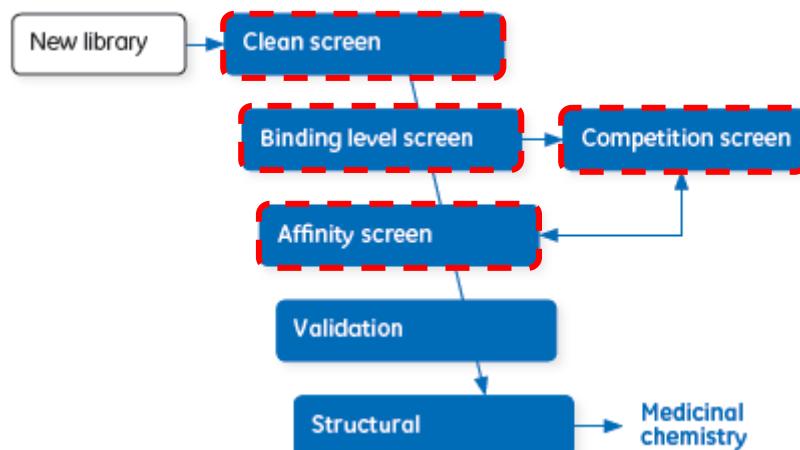


解析から除くデータはこの時点で **Exclude** します。また、気になるサンプルについては、注釈・コメント機能を使用すると良いです。(補足 1-8 を参照。)



### 3. フラグメント化合物評価

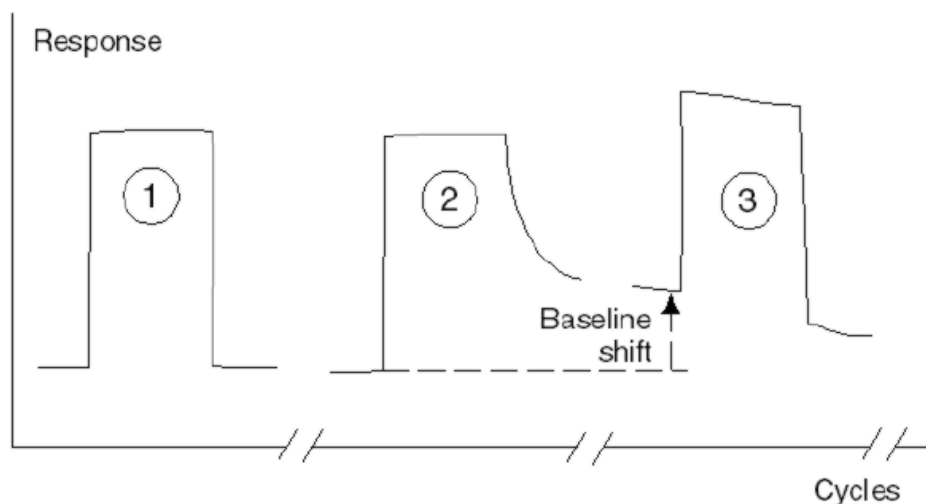
フラグメントを効率良く絞り込むために、次のコンセプトに基づいた測定メソッド・解析プロトコルを装備しています。



#### A. Clean screen

ターゲットのリガンドに強固に結合するフラグメントやネガティブコントロールのリガンドに強固に結合するフラグメントを確認して、以降の測定から排除します。

フラグメント添加前後のベースライン上昇量でフラグメントの良し悪しを見極めます。(実際にはフラグメント添加前のベースラインと次サイクルのベースラインシフト量で評価します。)



サイクル①は、多くのフラグメントで得られる、結合・解離が速い典型的な結合プロファイルです。サイクル②は、結合が強固なフラグメントパターンで、解離速度が遅いです。サイクル②の影響で、サイクル③ではベースラインシフトが起きます。Clean screen では、このベースラインシフト量をプロットして、②の挙動を示すフラグメントを確認します。

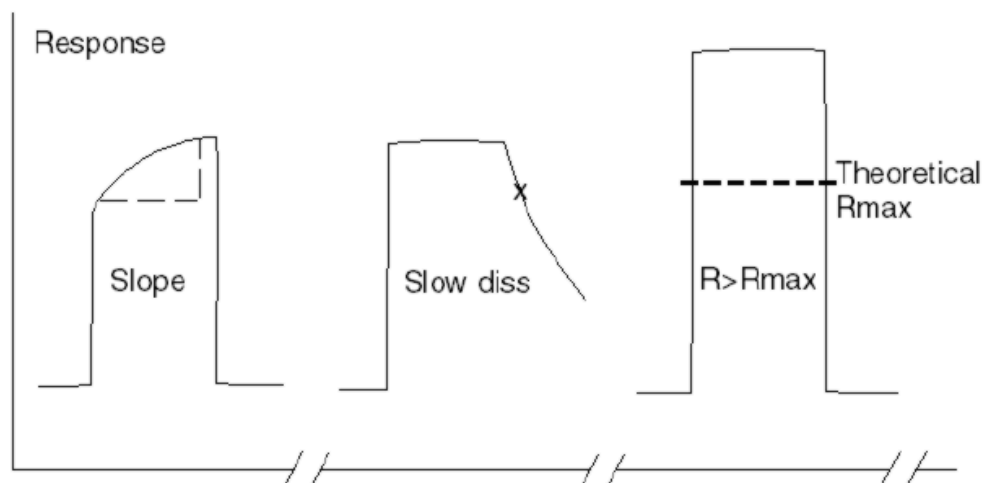
## B. Binding level screen

1 濃度の結合量、結合様式に基づいて、プロミスカスバインダーの確認を行います。

結合量、結合領域の傾き、解離速度を指標として評価します。

次の3項目に該当するフラグメントは排除します。①結合領域の傾きが大きいもの (Slope)、

②解離速度が遅いもの (Slow diss)、③結合量が理論的  $R_{max}$  ( $R > R_{max}$ ) を超えているもの。



### ① Slope (結合領域の傾き)

フラグメント添加直後から添加終了直前までのシグナル上昇の傾きを評価します。非特異的吸着や化合物がアグリゲーション、ミセル化している場合などには傾きが大きくなります。

### ② Slow diss (解離速度が遅い)

フラグメント添加終了後の結合量を評価します。非特異的吸着や化合物がアグリゲーション、ミセル化している場合などには、解離速度が遅くなります。

### ③ $R > R_{max}$ (結合量が最大結合量より大きい)

フラグメント添加時の結合量が理論的な最大結合量 ( $R_{max}$ ) を超えていないかを評価します。リガンドの固定化量と分子量、フラグメントの分子量から、1:1 Binding を想定して理論的な  $R_{max}$  を算出します。  $R > R_{max}$  の場合には、フラグメントが単分散していないか、リガンドのターゲットサイト以外にも結合しているか、非特異的吸着している可能性があります。

### C. Affinity screen

フラグメント濃度を 5 濃度以上振って、Affinity 解析を行って解離定数 ( $K_D$ ) を算出します。フラグメントの Affinity は非常に弱いため、理想的なフラグメント濃度で測定ができない場合があります。このため、Affinity 解析のフィッティングを安定化させるため Affinity screen では最大結合量 ( $R_{max}$ ) を定数としてフィッティングを行います。

$R_{max}$  の設定方法は次の通りです。

#### ① 実測した $R_{max}$

測定メソッドで、ポジティブコントロールを高濃度で測定して得られた、 $R_{max}$  を基に、各フラグメントの  $R_{max}$  を算出します。

#### ② 解析で得られた $R_{max}$

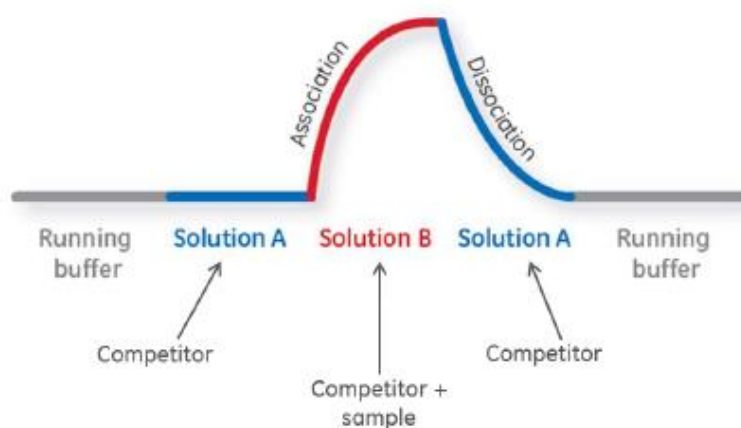
測定メソッドでポジティブコントロールを濃度を振って測定して、Kinetics/Affinity 解析で得られた  $R_{max}$  を基に、各フラグメントの  $R_{max}$  を算出します。

#### ③ 理論的 $R_{max}$

リガンド固定化量と、リガンドとポジティブコントロールの分子量比から算出した理論的な  $R_{max}$  を基に、各フラグメントの  $R_{max}$  を算出します。

### D. Competition Screen

ABA-inject コマンドを使用して、結合サイト特異的化合物との競合阻害を、レポートポイントを指標に評価します。



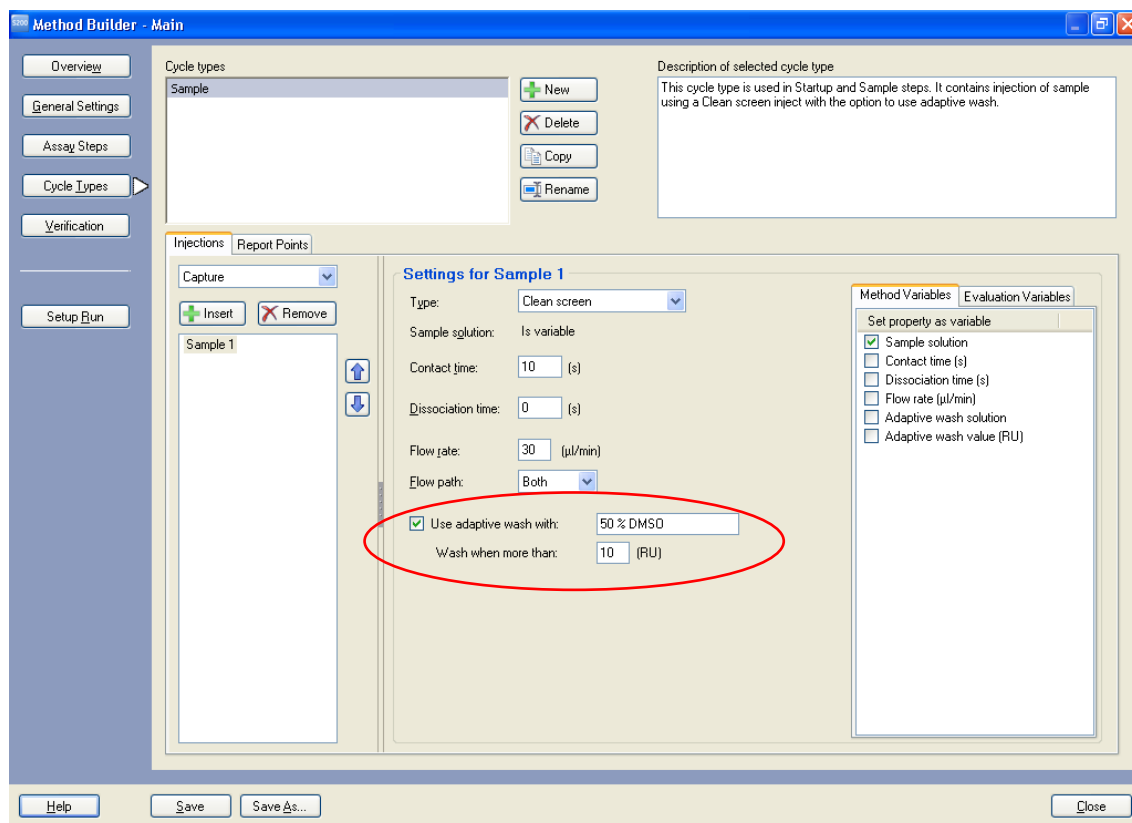
ここでは、各スクリーニングについて、基本的なスクリーニング測定・解析と異なる設定項目について説明します。基本的なメソッド作成、解析方法の詳細は 1、2 章をご覧ください。

## 3-1. Clean screen

### 3-1-1. メソッドの設定

測定メソッドは、**Binding screen**→**Fragment/LMW**→**Fragment clean screen** を使用します。必要に応じて、各種項目を変更して使用してください。

ベースラインのレポートポイント差を評価に使用するため、溶媒補正は実施しません。測定内容は、Cycle Types で確認します。デフォルトでは次の通り設定されています。



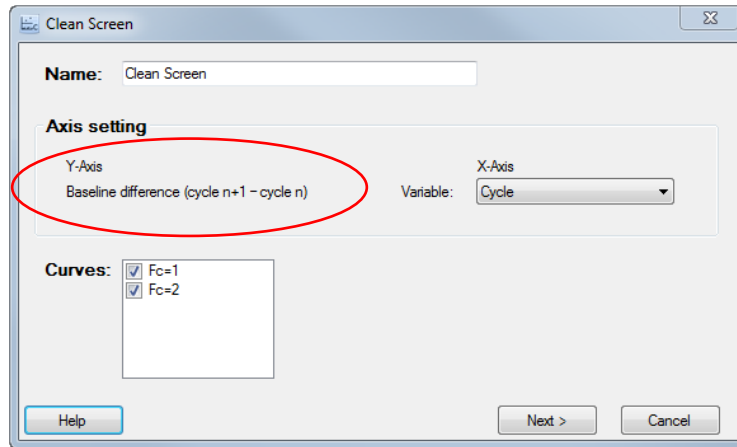
サンプル添加コマンドは、**Clean screen** を使用します。

**Wash when more than** で設定した値以上のベースライン上昇が起きた場合には、**Use adaptive wash with** で指定した試薬（50% DMSO など）でチップ表面以外の流路を洗浄します。

**Setup Run** 以降で表示される **Estimated run time**（測定時間）には、**adaptive wash** 時間は考慮されていません。

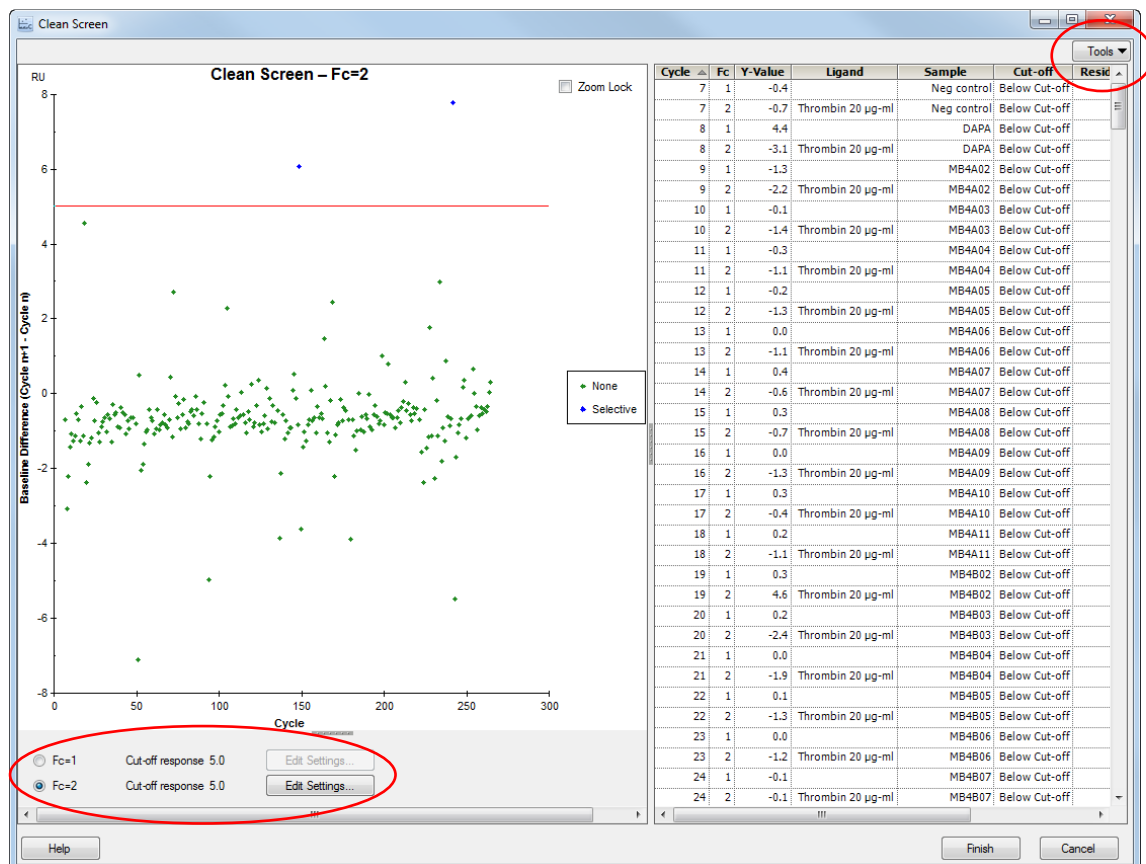
### 3-1-2. データ解析

Evaluation Software のナビゲーションパネルの **Evaluation**→**Clean Screen** を選択します。



Y-Axis は、測定サイクルと次サイクルとのベースライン差が設定されています。X-Axis は通常 **Cycle** を選択します。**Curves** で、評価する Curve を選択します。

**Next >** を選択します。



プロットと結果のテーブルが表示されます。

プロットは、画面下で Fc の切り替えが可能です。画面右上の **Tools** で、表示変更が可能です。

プロットの赤い線は **Cut-off** 値で、デフォルトでは 5 RU に設定されています。変更したい場合は、ラインをクリック・ドラッグして移動するか、プロット下の **Edit-Settings** で値を設定します。

設定後、**Finish** をクリックします。

プロットは次の項目で色分けされ、テーブルの **Residual Binding** にも結果が表示されます。

- **None** (緑)

全フローセルのベースライン差が **Cut-off** 値より低い (問題なし)

- **Selective** (青)

幾つかのフローセルのベースライン差が **Cut-off** を超えている (排除対象または要注意)

- **General** (赤)

全てのフローセルについてベースライン差が **Cut-off** を超えている (排除対象)

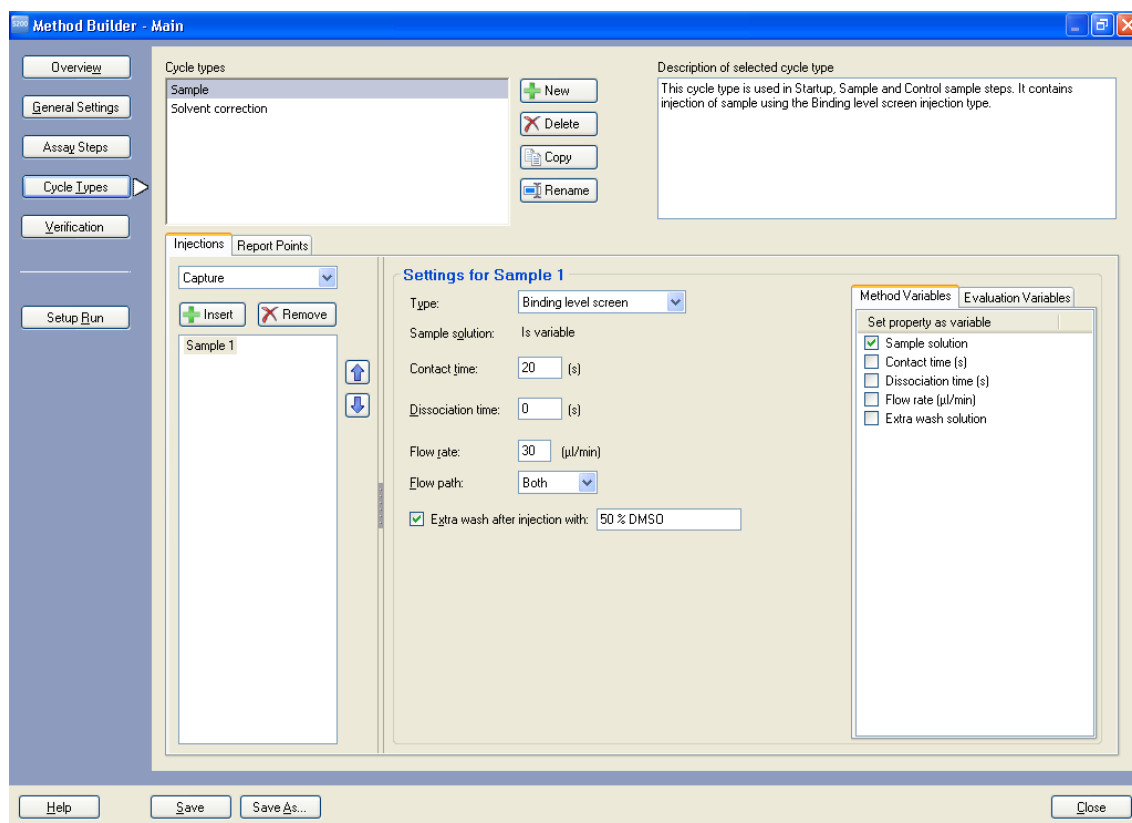
## 3-2. Binding level screen

### 3-2-1. メソッドの設定

測定メソッドは、**Binding screen**→**Fragment/LMW**→**Fragment binding level screen** を使用します。必要に応じて、各種項目を変更して使用してください。

Solvent Correction は必ず実施します。

測定内容は、Cycle Types で確認します。デフォルトでは次の通り設定されています。



サンプル追加コマンドは、**Binding level screen** を使用します。解離時間の設定は必要ありません。

**Extra wash after injection with** にチェックを入れて、指定した試薬（50% DMSO など）で、フローセル以外のライン洗浄を行ってください。

Setup Run 以降の Detection ウィンドウでは、リファレンスサブトラクションを選択してください。

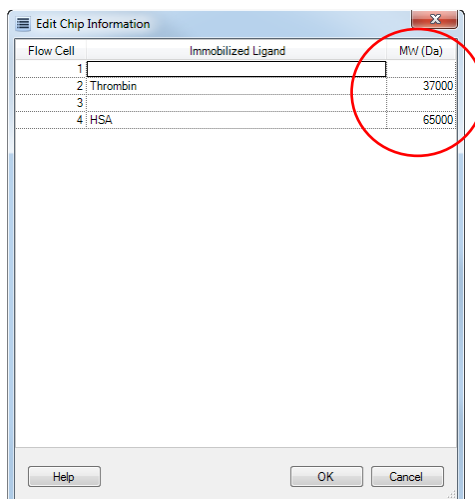
Setup Run 以降で表示される **Estimated run time**（測定時間）には、**Extra wash** 時間は考慮されていません。

### 3-2-2. データ解析

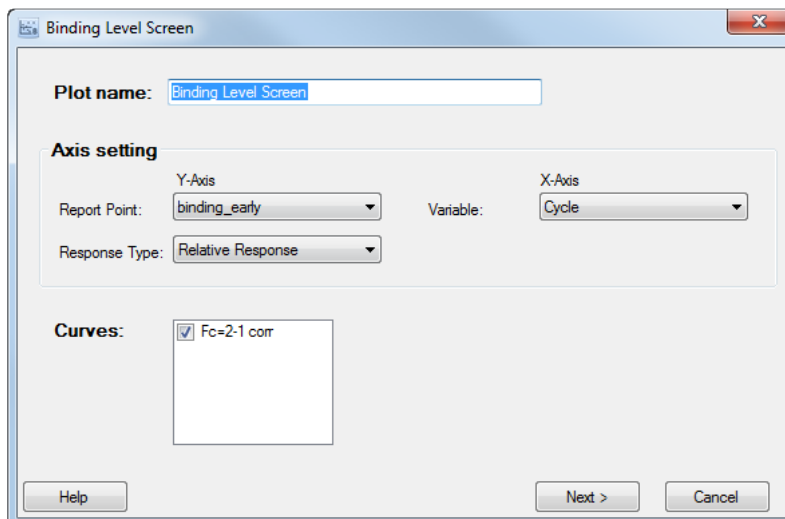
Binding behavior 評価で  $R > R_{max}$  を使用する場合には、リガンドの分子量情報が必要です。

(リガンドをキャプチャーしている場合には適用されません。)

リガンドの分子量は、固定化メソッド (Add molecular weight) で指定しておくか、Evaluation Software で、解析前に **Tools**→**Keyword Table**→**Edit Chip Information** で指定してください。



Solvent Correction 実施後に、ナビゲーションパネルの **Evaluation**→**Binding Level Screen** を選択します。

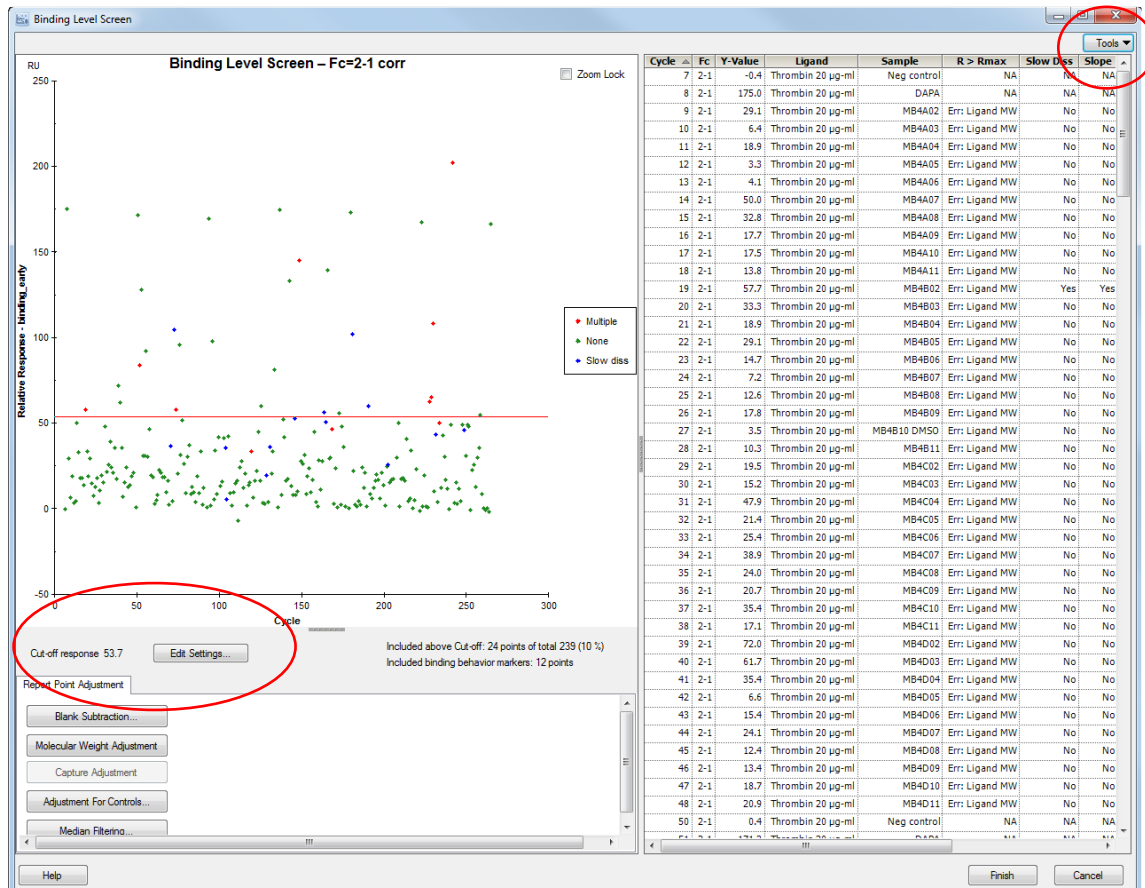


Y-Axis の Report Point は、通常 **binding\_early** (アナライト添加直後のレポートポイント) を選択します。 **Response Type** は **Relative Response** を選択します。 X-Axis は、通常 **Cycle** を選択します。 解析に進める Curve を選択します。

**Next >** をクリックします。







プロットと結果のテーブルが表示されます。プロット下で Fc の切り替えが可能です。画面右上の Tools で、表示変更が可能です。必要に応じて、Report Point Adjustment の各種補正を実施してください。

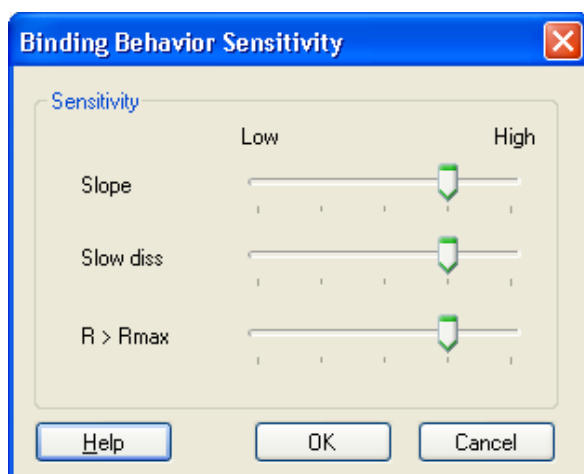
プロットの赤い線は Cut-off 値です。デフォルトでは、全測定ポイントの 10 %が Cut-off 値以上にプロットされるように設定されています。コントロールサンプルもプロットされますが、サンプル数は上記の Cut-off の計算には含まれません。

変更したい場合には、ラインをクリック・ドラッグして移動するか、プロット下の **Edit-Settings** で値を設定します。

プロットは次の結合挙動に従って、自動で色分けされます。テーブルにも結果が表示されます。

- None (緑色)                      Slope、Slow diss、R > R<sub>max</sub> に該当しないサンプル
- Slope (青色)                    結合領域で傾きが得られているサンプル
- Slow diss (黄色)                解離速度が遅いサンプル
- R > R<sub>max</sub> (水色)                理論的 R<sub>max</sub> を超える結合量のサンプル
- Multiple (赤色)                 複数の項目に該当するサンプル

色分けは、デフォルトで設定されている **Binding Behavior Sensitivity** に従います。センシティブティーを変更したい場合には、画面右上の **Tools**→**Binding Behavior Sensitivity** で変更できます。



テーブルで Cut-off : Above Cut-off、 Slope/Slow diss/  $R > R_{max}$  : No でソートを掛けて、以降の解析に持ち込むフラグメントを確認します。

設定後、**Finish** をクリックします。

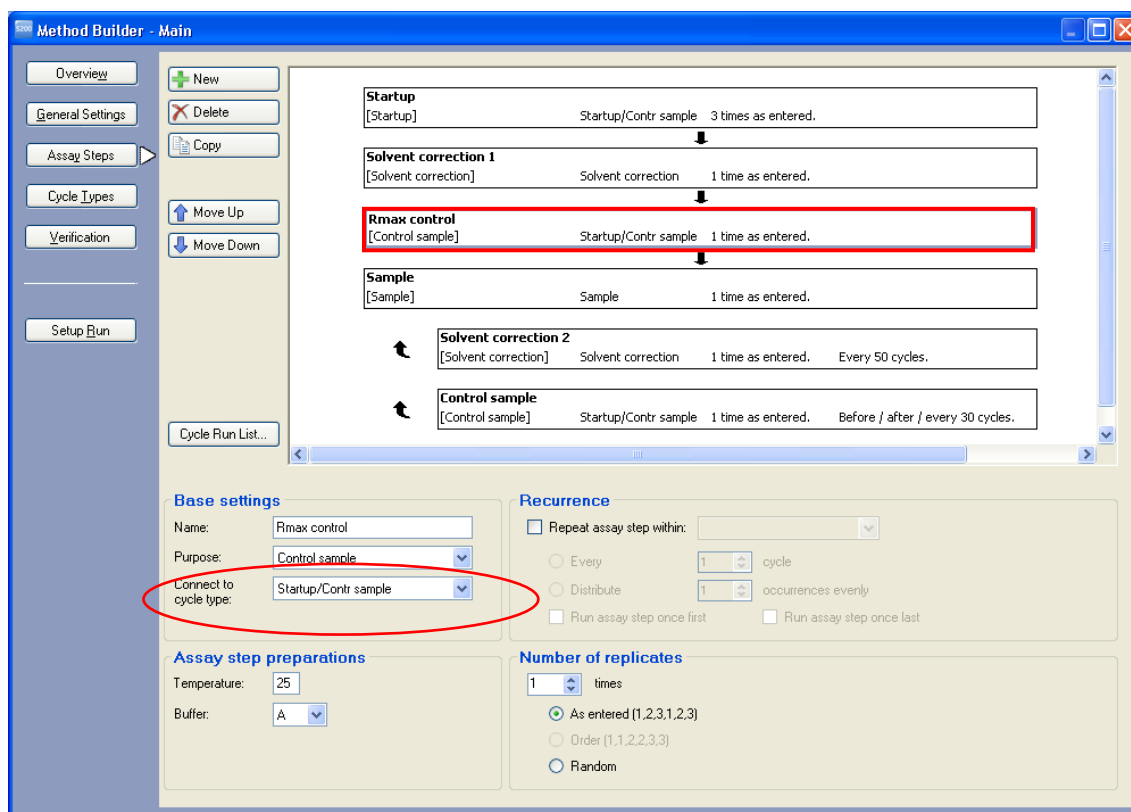
### 3-3. Affinity screen

#### 3-3-1. メソッドの設定

測定メソッドは、**Kinetics/affinity**→**Fragment/LMW**→**Fragment Affinity screen**→**Fragment Affinity screen single cycle** または **multi-cycle** を使用します。必要に応じて、各種項目を変更して使用してください。

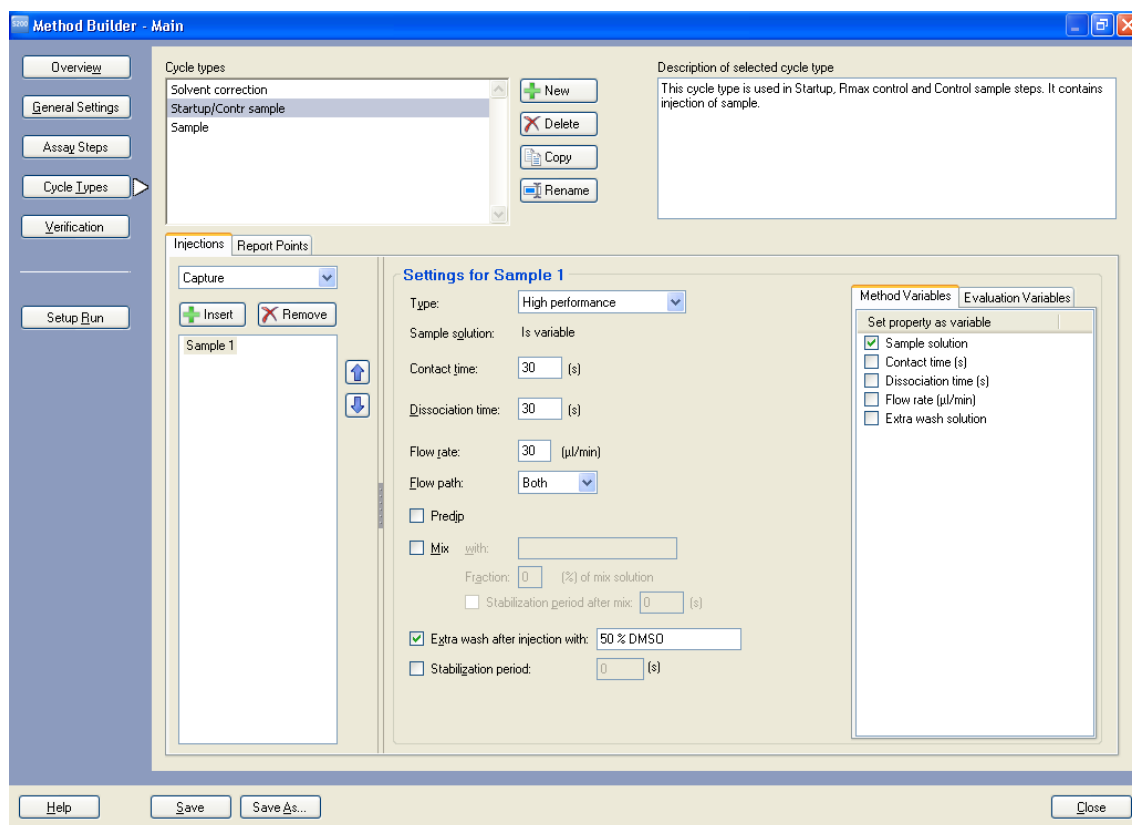
ここでは、single cycle のメソッドをご紹介します。

**Assay Steps** で確認できる通り、必要に応じて溶媒補正と **Rmax control** ステップを実施します。



**Rmax control** ステップでは、サンプル測定と同じ内容で、ポジティブコントロールを  $R_{max}$  に到達する高濃度（目安として 100  $K_D$  程度）で添加するか、Affinity 解析を行うために濃度を振って測定します。測定および解析で得られた  $R_{max}$  を Affinity 解析で利用します。なお、Affinity 解析を行う際には、Connect to cycle type を Sample に変更してください。

測定内容は、**Cycle Types** で確認します。デフォルトは次の通り設定されています。



サンプル添加コマンドは、**High performance** を使用します。解離時間の設定は必要ありません。**Extra wash after injection with** にチェックを入れて、指定した試薬 (50% DMSO など) で、フローセル以外のライン洗浄を行ってください。

Setup Run 以降の Detection ウィンドウでは、リファレンスサブトラクションを選択してください。

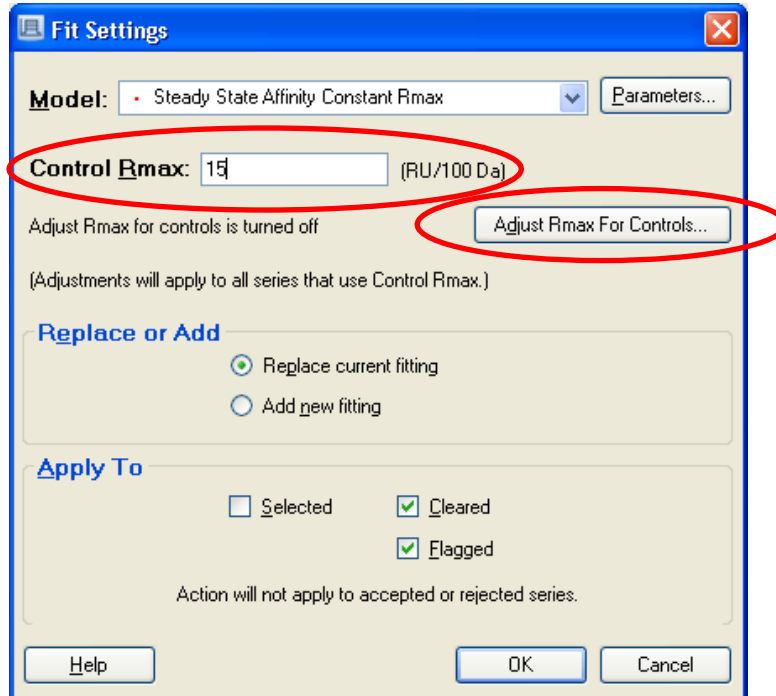
### 3-3-2. データ解析

Evaluation Software で **Solvent Correction** を実施後に、ナビゲーションパネルの **Evaluation** → **Affinity** を選択します。以降の解析方法は、日本語取扱説明書 基本操作編 5-4 章に従います。Req vs Conc プロットが直線的な場合には、次の何れかの解析モデルを使用します。

#### **Steady State Affinity Constant Rmax**

1:1 Binding モデルで、指定した  $R_{max}$  値を使用して解析を行います。

低アフィニティーでアナライト濃度を高濃度に設定できない場合に使用します。



設定する  $R_{max}$  値は、ポジティブコントロールを  $R_{max}$  に到達する高濃度で添加して得られる結合量か、ポジティブコントロールの解析結果で得られた値を  $R_{max}$  として使用します。

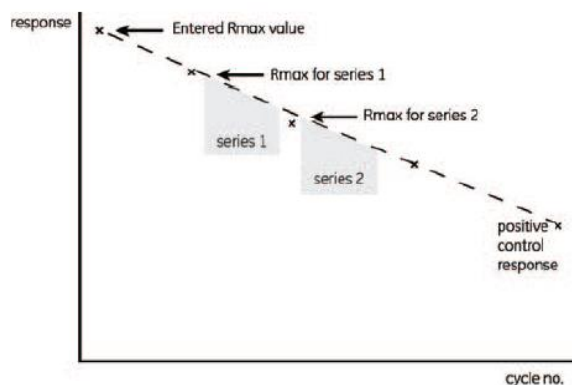
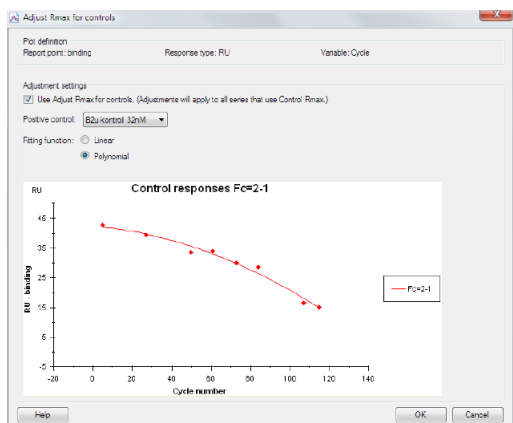
**Control Rmax** の欄に入力する値の単位は、RU / 100 Da です。

例えば、ポジティブコントロールの結合量が 30 RU で分子量が 300 Da の場合には、Control Rmax の値は、結合量 × 100 / ポジティブコントロール分子量 = 30 RU × 100 / 300 Da = 10 (RU / 100 Da) となります。

解析時には、アナライトの分子量差を次の式で補正した値を、各アナライトの  $R_{max}$  値として適用します。

$$R_{max_{analyte}} = \text{ControlRmax} \times \frac{MW_{analyte}}{100}$$

さらに、リガンドの活性低下を考慮した補正を行う場合は、**Adjust Rmax For Controls** をクリックして、補正に使用するポジティブコントロールを設定します。この際、設定するポジティブコントロールの  $R_{max}$  値 (Control Rmax に入力する値) は、サイクルはじめのポジティブコントロールの結合量 (RU / 100 Da) を入力してください。

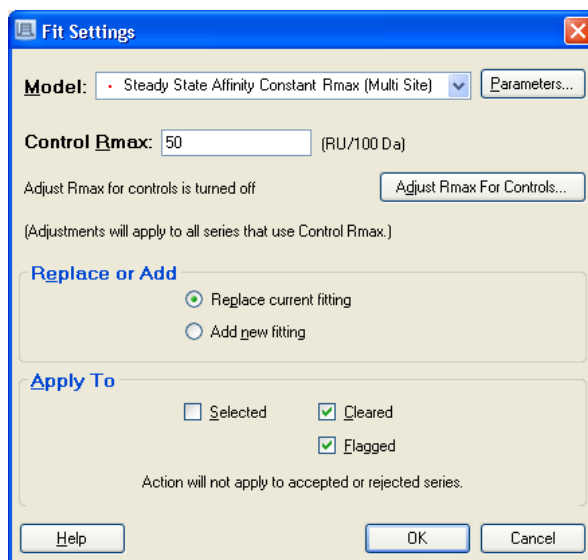


R<sub>max</sub>の補正には、全サイクルのポジティブコントロールの結合量を **Linear** または **Polynomial** で **Fitting** して得られる補正曲線を使用します。各サンプルの濃度シリーズのはじめのサイクルに対応する補正曲線の Y 軸の値を **Control Rmax** 値として使用します。濃度シリーズ内ではその値を固定値とします。

### Steady State Affinity Constant Rmax (Multi Site)

リガンド上に結合サイトが2つあることを想定したモデル。  
高濃度で低親和性の結合が確認できる場合などに使用します。

$$R_{eq} = \frac{CR_{max1}}{K_{D1} + C} + \frac{CR_{max2}}{K_{D2} + C} + \text{offset}$$



Steady State Affinity Constant Rmax と同様に、**Control Rmax** の値（R<sub>max1</sub> 値の算出に使用します。）を設定します。R<sub>max2</sub> は変数として解析を行います。  
必要に応じて、**Adjust Rmax For Controls** を使用します。

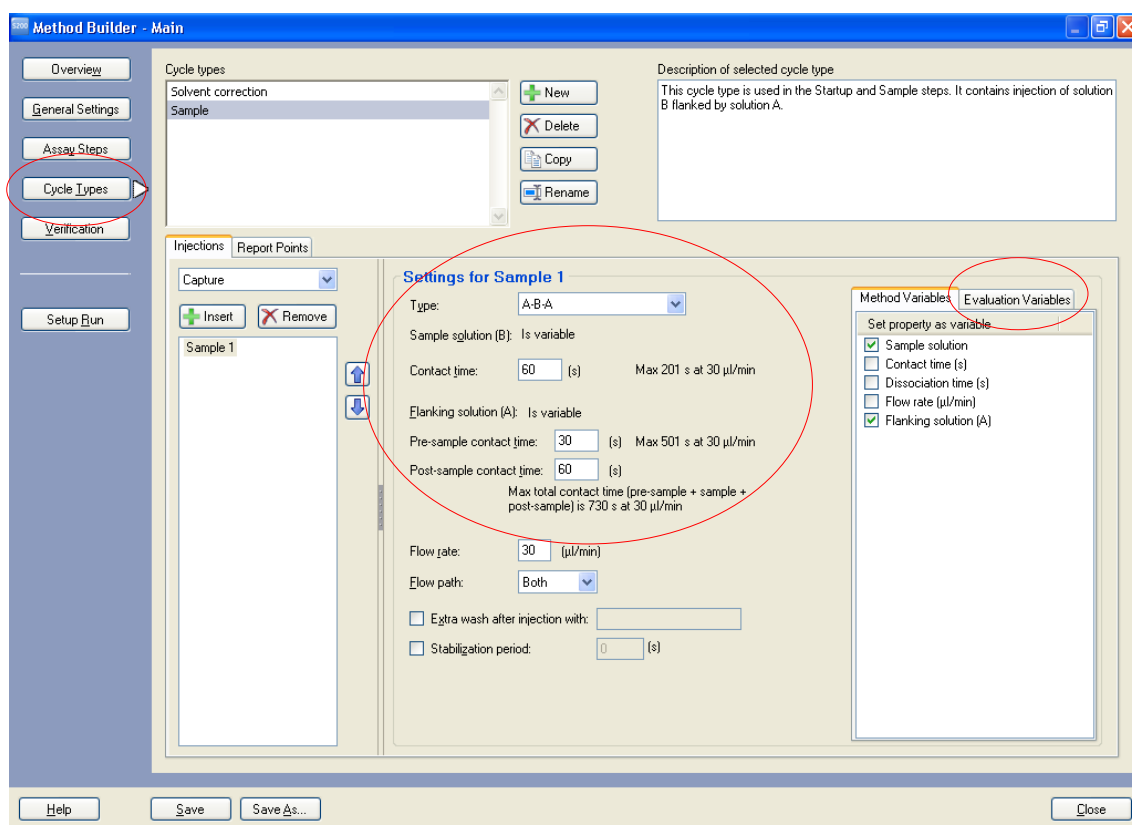
## 3-4. Competition Screen

### 3-4-1. メソッドの設定

測定メソッドは、**Binding screen**→**Fragment/LMW**→**Competition using ABA-inject** を使用します。各種項目を変更して使用してください。

必要に応じて溶媒補正を実施します。

測定内容は、**Cycle Types** で確認します。デフォルトでは次の通り設定されています。



サンプル添加コマンドは、**A-B-A** を使用します。

**Sample solution (B)**の、**Contact time** にサンプル、サンプル+阻害剤の添加時間を指定します。

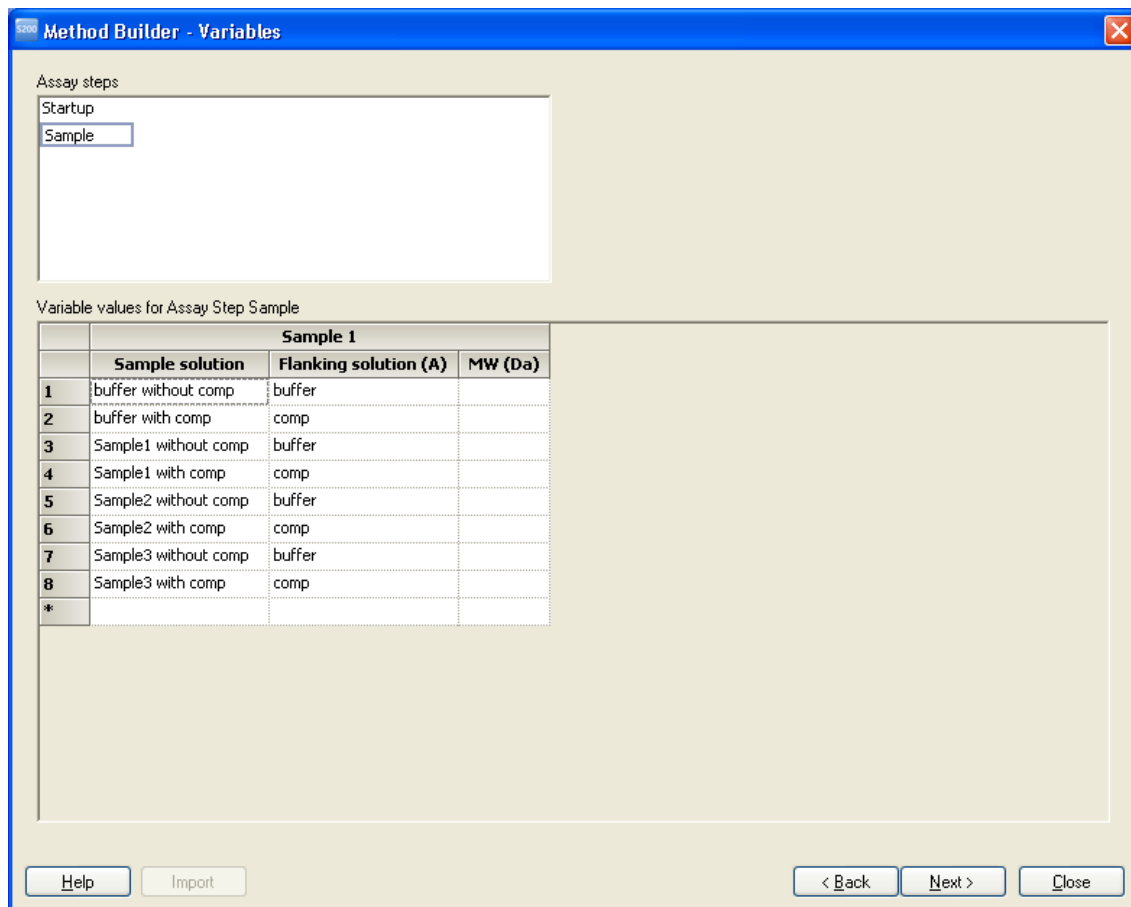
**Flanking solution (A)**の **Pre-sample contact time**、**Post-sample contact time** に阻害剤の添加時間を指定します。それぞれ、**B** 添加前、**B** 添加後の **A** の添加時間に相当します。

必要があれば、**Extra wash after injection with** にチェックを入れて、指定した試薬（50% DMSO など）で、フローセル以外のライン洗浄を行ってください。

Kinetics/Affinity 解析を行う場合には、画面右の Evaluation Variables の Evaluation purpose で Kinetics/Affinity を選択してください。 デフォルトでは **General** に設定しています。

Setup Run 以降の **Detection** ウィンドウでは、リファレンスサブトラクションを選択してください。

Variables ウィンドウの Sample 設定では、Sample solution の項目で、サンプル、サンプル+阻害剤が分かるようにサンプル名を入力します。



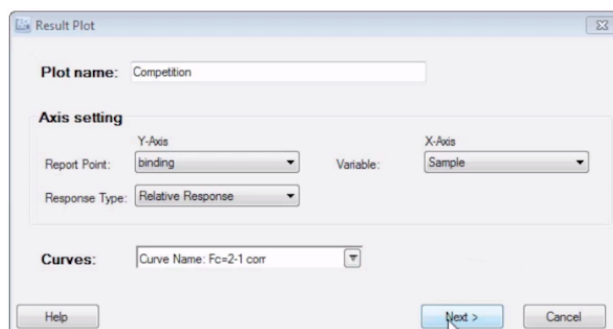


### 3-4-2. データ解析

Evaluation Software の Result Plot または Kinetics/Affinity 解析で評価を行ってください。

必要に応じて Solvent correction を実施して解析に進みます。

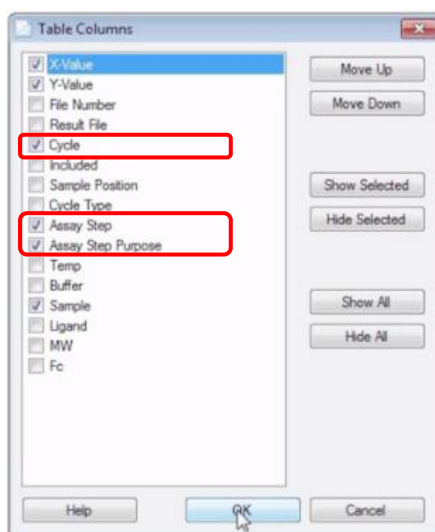
プロットを使用する際には、**Evaluation→Result Plot** をクリックします。



Y-Axis に **binding**、Response Type に **Relative Response** を選択します。X-Axis に **Sample** を設定します。Curves で解析に進める Curve を選択します。



プロットとテーブルが表示されます。画面右上の **Tools→Table Columns** をクリックします。



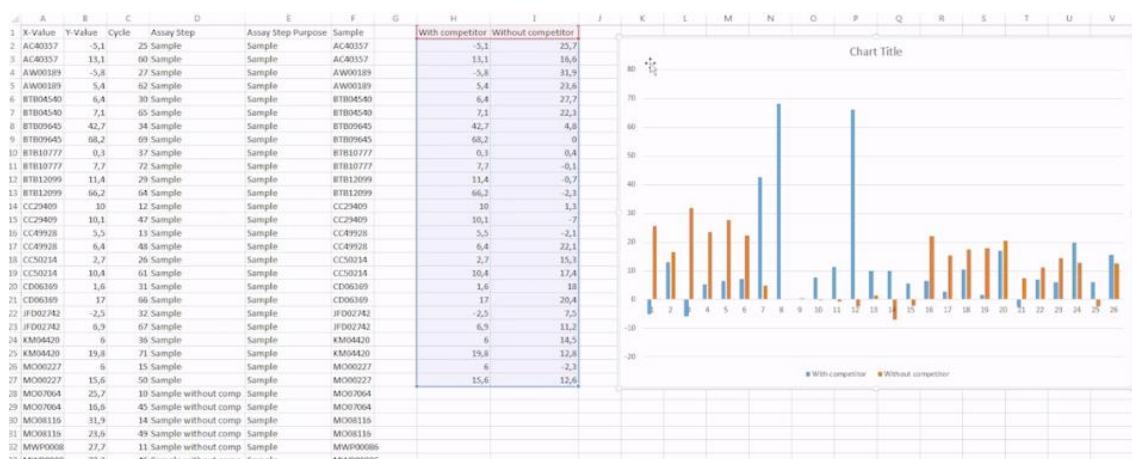
データ抽出のための、テーブルの表示項目を設定します。

Cycle、Assay Step、Assay Step Purpose にチェックを入れます。選択した項目がテーブルに追加されます。



X-Value	Y-Value	Cycle	Assay Step	Assay Step Purpose	Sample
AC0212	8.1	17	Sample		Sample AC0212
AC0212	5.1	12	Sample without comp		Sample AC0212
AC0327	7.9	18	Sample		Sample AC0327
AC0327	10.1	18	Sample without comp		Sample AC0327
AC0372	5.7	18	Sample		Sample AC0372
AC0372	5.1	18	Sample without comp		Sample AC0372
AC0394	8.7	20	Sample		Sample AC0394
AC0394	5.1	15	Sample without comp		Sample AC0394
AC0711	78.1	11	Sample		Sample AC0711
AC0711	43.8	16	Sample without comp		Sample AC0711
AC0837	6.1	21	Sample		Sample AC0837
AC0837	5.1	16	Sample without comp		Sample AC0837
AW00189	5.4	17	Sample		Sample AW00189
AW00189	5.4	12	Sample without comp		Sample AW00189
BT004540	6.4	16	Sample		Sample BT004540
BT004540	5.1	15	Sample without comp		Sample BT004540
BT004540	42.7	24	Sample		Sample BT004540
BT004540	66.2	16	Sample without comp		Sample BT004540
BT00777	5.1	17	Sample		Sample BT00777
BT00777	5.7	22	Sample without comp		Sample BT00777
BT0209	16.4	29	Sample		Sample BT0209
BT0209	66.2	14	Sample without comp		Sample BT0209
CC0414	15.2	41	Sample		Sample CC0414
CC0414	15.2	41	Sample without comp		Sample CC0414
CC0409	10.1	12	Sample		Sample CC0409
CC0409	10.1	47	Sample without comp		Sample CC0409
CC0417	10.1	11	Sample		Sample CC0417
CC0417	4.8	11	Sample without comp		Sample CC0417
CC0426	5.1	11	Sample		Sample CC0426
CC0426	6.4	11	Sample without comp		Sample CC0426
CC0414	3.7	24	Sample		Sample CC0414
CC0414	10.1	11	Sample without comp		Sample CC0414
CC0404	1.4	11	Sample		Sample CC0404
CC0404	17.1	16	Sample without comp		Sample CC0404
CF00782	5.7	17	Sample		Sample CF00782
CF00782	6.4	17	Sample without comp		Sample CF00782
KM04420	6.4	16	Sample		Sample KM04420
KM04420	19.8	21	Sample without comp		Sample KM04420
MC00227	6.1	15	Sample		Sample MC00227
MC00227	15.6	15	Sample without comp		Sample MC00227
MC07064	25.7	10	Sample		Sample MC07064
MC07064	16.6	43	Sample without comp		Sample MC07064
MC08116	31.9	14	Sample		Sample MC08116
MC08116	28.6	49	Sample without comp		Sample MC08116
MW00008	27.7	11	Sample		Sample MW00008
MW00008	22.3	46	Sample without comp		Sample MW00008
Negative control	6.4	1	Control sample	Control sample	Negative control
Negative control	5.1	21	Control sample	Control sample	Negative control

テーブル上で右クリックして、**Copy Table** をクリックして Excel に移動します。  
 または、プロットを Finish 後、**File→Export→Result To Excel** で保存します。



評価に使用する、阻害剤あり・なしの結合量を抽出してグラフを作成し、阻害の有無を評価します。

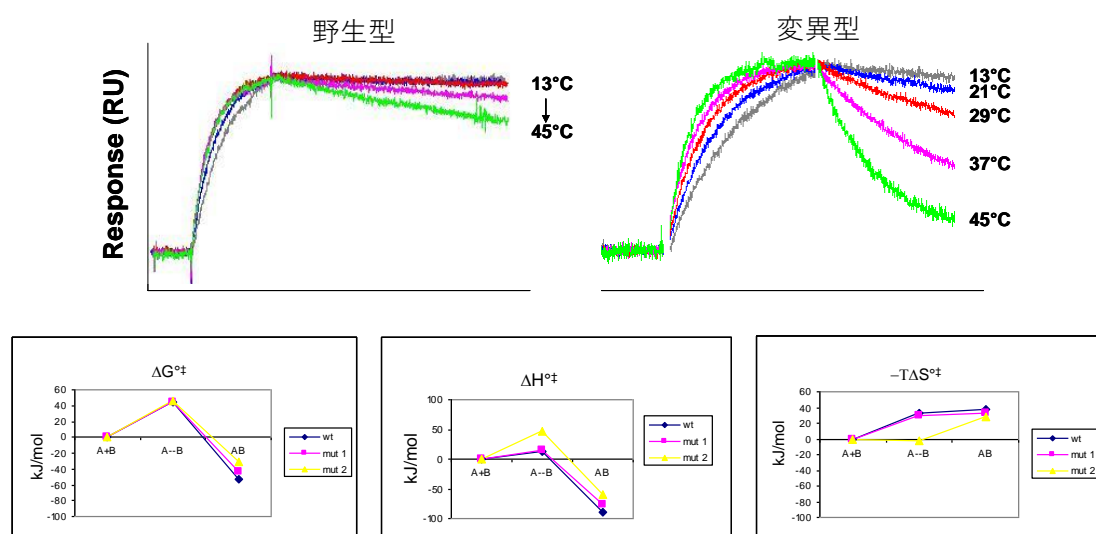
## 4. 熱力学的パラメータの算出

### 熱力学的解析

熱力学的パラメータは、分子同士の相互作用メカニズム解析に対して重要な情報を提供します。Biacore では、熱力学的パラメータは、複数の温度条件で速度論的相互作用解析を実施することで算出できます。平衡状態における熱力学的パラメータ ( $\Delta G^\circ$ 、 $\Delta H^\circ$ 、 $\Delta S^\circ$ ) のみならず、遷移状態における熱力学的パラメータ ( $\Delta G^\ddagger$ 、 $\Delta H^\ddagger$ 、 $\Delta S^\ddagger$ ) も算出することが可能です。平衡状態におけるパラメータからは“その分子同士がその強さで結合する理由”、遷移状態におけるパラメータからは“その分子同士がその速度で結合、解離する理由”を議論することができます。

例として、ある抗原と抗体（野生型と2種類の変異型）の相互作用を紹介します。

通常、速度論的解析では、ある温度で相互作用測定を実施し、算出された反応速度定数の比較から野生型と変異型の結合および解離速度の違いを知ることができます。さらに、熱力学的解析の結果からは、下図に示したように、変異型2の  $\Delta H^\ddagger$  と  $\Delta S^\ddagger$  が野生型および変異型1のそれらとは大きく異なっていることがわかります。すなわち、変異型2は野生型および変異型1とは異なった様式で相互作用していることが示唆されます。



(Application Note 80 より引用)

### 熱力学的パラメータの解析手順

数段階の温度（4段階以上）において同一分子間のカイネティクス解析を実施し、解離定数 ( $K_D$ )、反応速度定数 ( $k_a$ ,  $k_d$ ) を算出します。

平衡状態、遷移状態における熱力学的パラメータ算出には、それぞれ次式を応用しています。各温度において算出した解離定数 ( $K_D$ )、反応速度定数 ( $k_a$ ,  $k_d$ ) を代入します。

## 平衡状態における熱力学的パラメータ算出

**van't Hoff** 式を応用します。各温度における解離定数 ( $K_D$ ) を代入し、各種パラメータを算出します。線形解析と非線形解析により算出可能です。熱容量変化を伴う相互作用の場合は、非線形解析が必要になります。

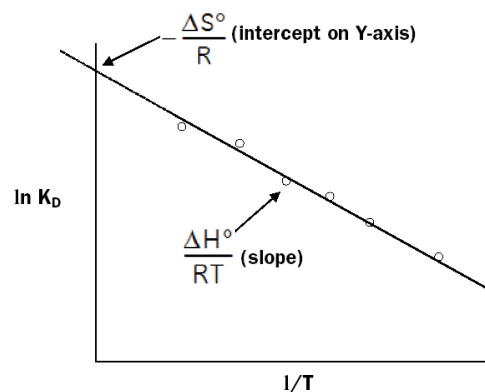
## 線形解析

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{1}{K_D} = RT \ln K_D$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

$$\ln K_D = \frac{\Delta H^\circ}{RT} - \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

$\Delta G^\circ$	自由エネルギー変化 (kJ/mol)
R	気体定数
T	絶対温度 (K)
$K_D$	解離定数 (M)
$\Delta H^\circ$	エンタルピー変化 (kJ/mol)
$\Delta S^\circ$	エントロピー変化 (J/K · mol)



## 非線形解析

$$RT \ln K_D = \Delta H_{T_0}^\circ - T\Delta S_{T_0}^\circ + \Delta C_p^\circ(T - T_0) - T\Delta C_p^\circ \ln \left( \frac{T}{T_0} \right)$$

$\Delta C_p$	熱容量変化 (kJ/K · mol)
$T_0$	基準温度 (標準状態では 25°C = 298.15 K)

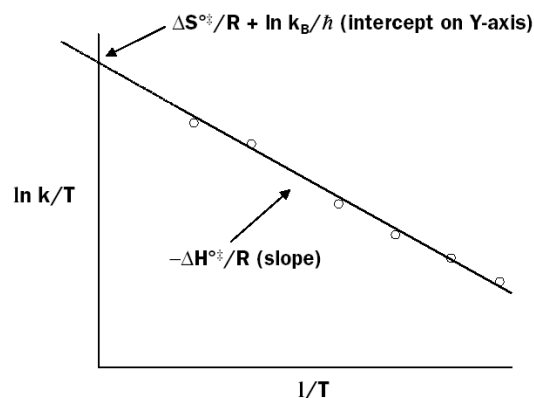
## 遷移状態における熱力学的パラメータ算出

**Eyring** 式を応用します。各温度における反応速度定数 ( $k_a$ ,  $k_d$ ) を代入し、各種パラメータを算出します。Affinity 解析の結果では、遷移状態のパラメータ算出は行えません。

$$k = \left( \frac{k_B T}{h} \right) \exp \left( \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \right)$$

$$\ln k/T = \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT + \ln k_B/h$$

k	各反応速度定数
$k_B$	ボルツマン定数
h	プランク定数
$\Delta S^\ddagger$	エントロピー変化 (J/K · mol)
R	気体定数
$\Delta H^\ddagger$	エンタルピー変化 (kJ/mol)
T	絶対温度 (K)



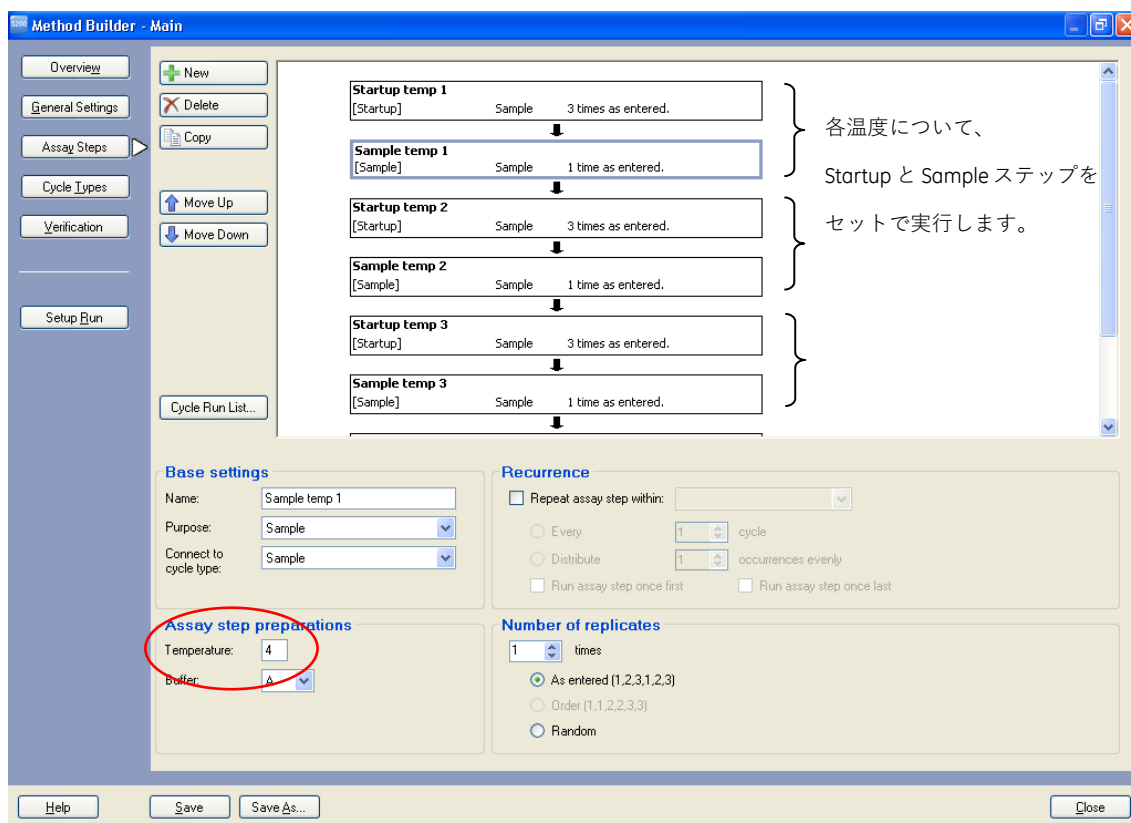
$\Delta G^\circ$  † 自由エネルギー変化 (kJ/mol)

## 4-1. メソッドの設定

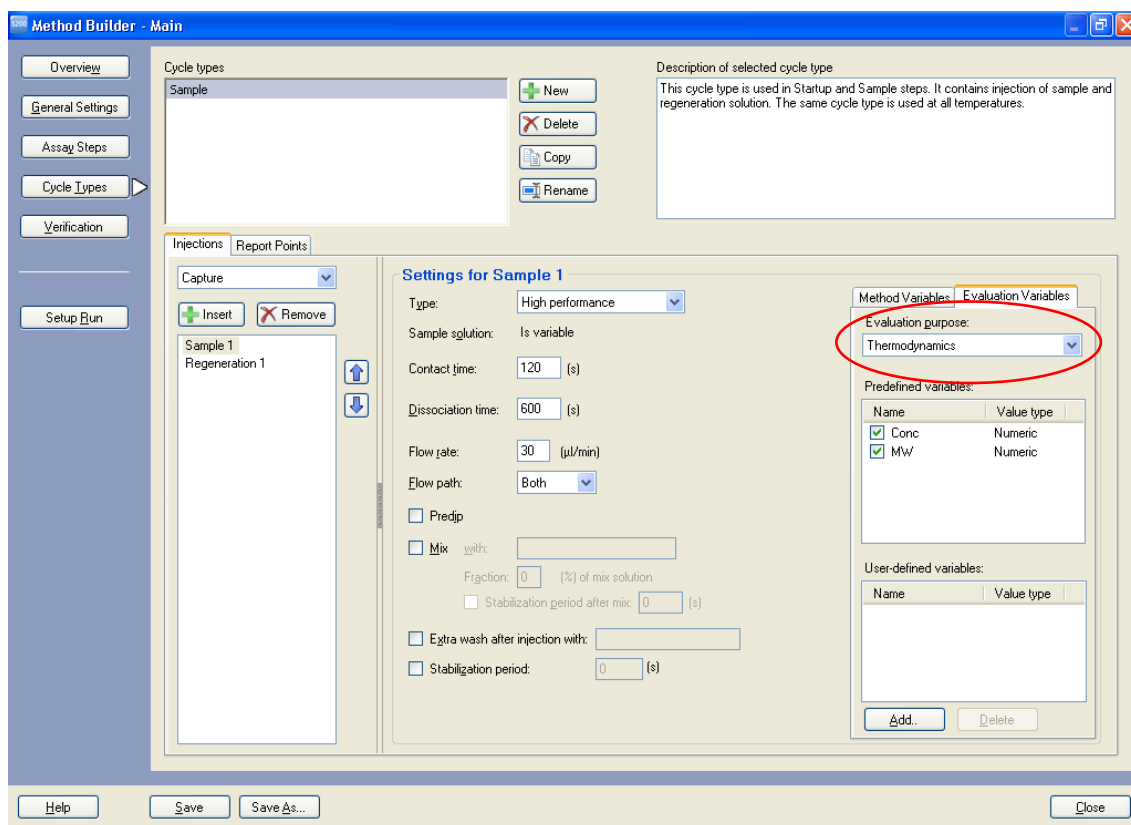
測定メソッドは、**Thermodynamics**→**Thermodynamics** または **using capture** を使用します。必要に応じて、各種項目を変更して使用してください。詳細は、日本語取扱説明書 基本操作編 5、6 章を参照ください。

また、必要に応じて **Solvent Correction** ステップを実施してください。

測定温度は、**Assay Steps** の **Assay step preparations** の **Temperature** で指定します。各温度について **Startup** ステップの温度も変更してください。(温度変更後の安定化の目的で実施します。)



**Cycle Types** で測定内容を確認します。

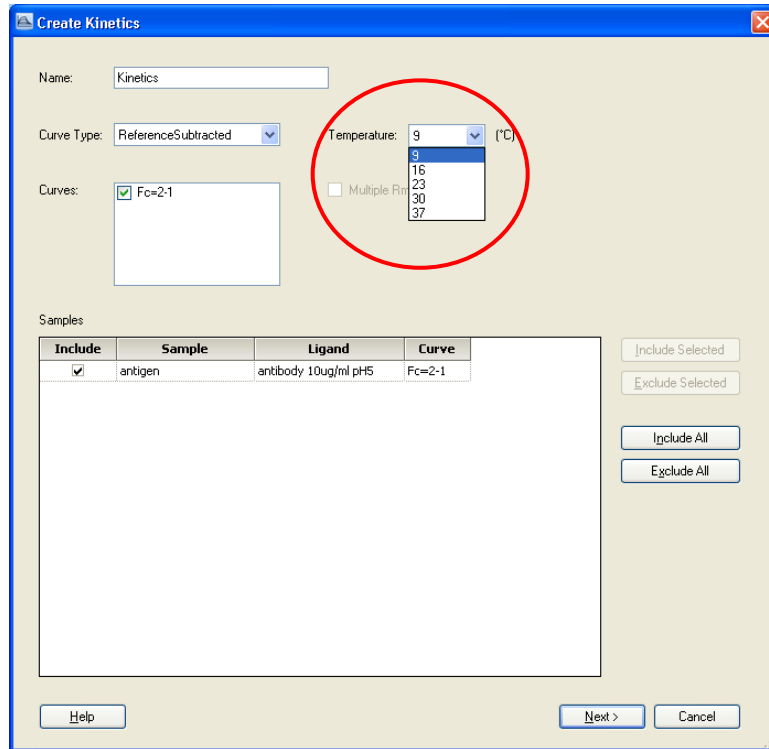


Evaluation purpose は、必ず Thermodynamics を選択します。

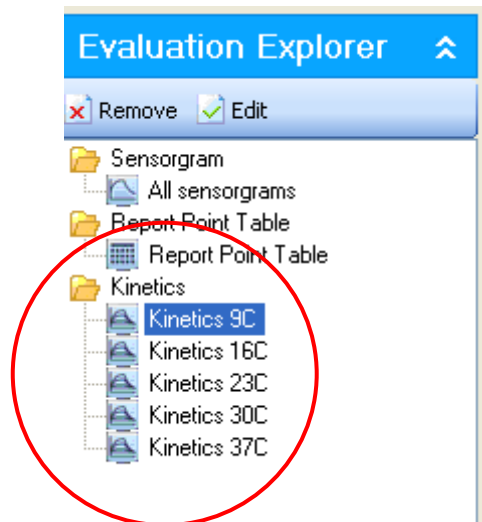
## 4-2. データ解析

Thermodynamics 解析では、はじめに各温度のデータについて Kinetics/Affinity 解析を実行します。その後、Thermodynamics 解析に進みます。

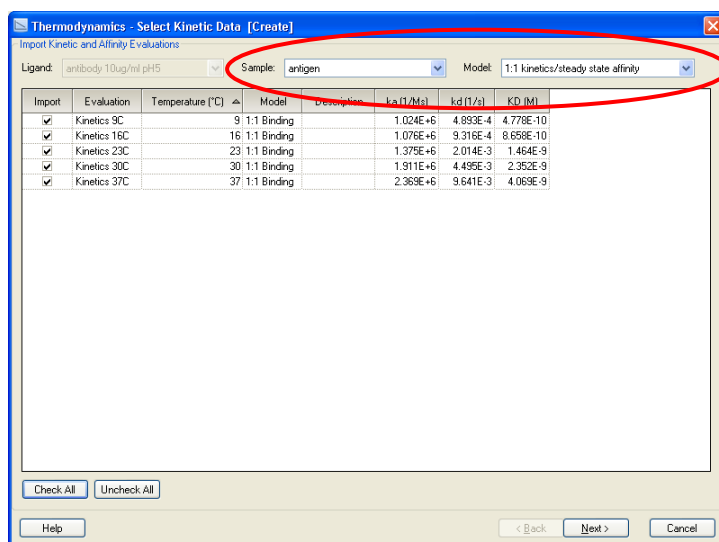
データの QC チェック後、**Evaluation**→**Kinetics**（または **Affinity**）をクリックします。



解析温度を選択して、Kinetics 解析に進みます。解析モデルは 1:1 Binding モデルを選択します。（他のモデルを使用した解析結果は Thermodynamics 解析に持ち込めません。）**Name** に温度を入力しておく、その後のデータ確認が要因になります。各温度について、同様に解析結果を取得します。

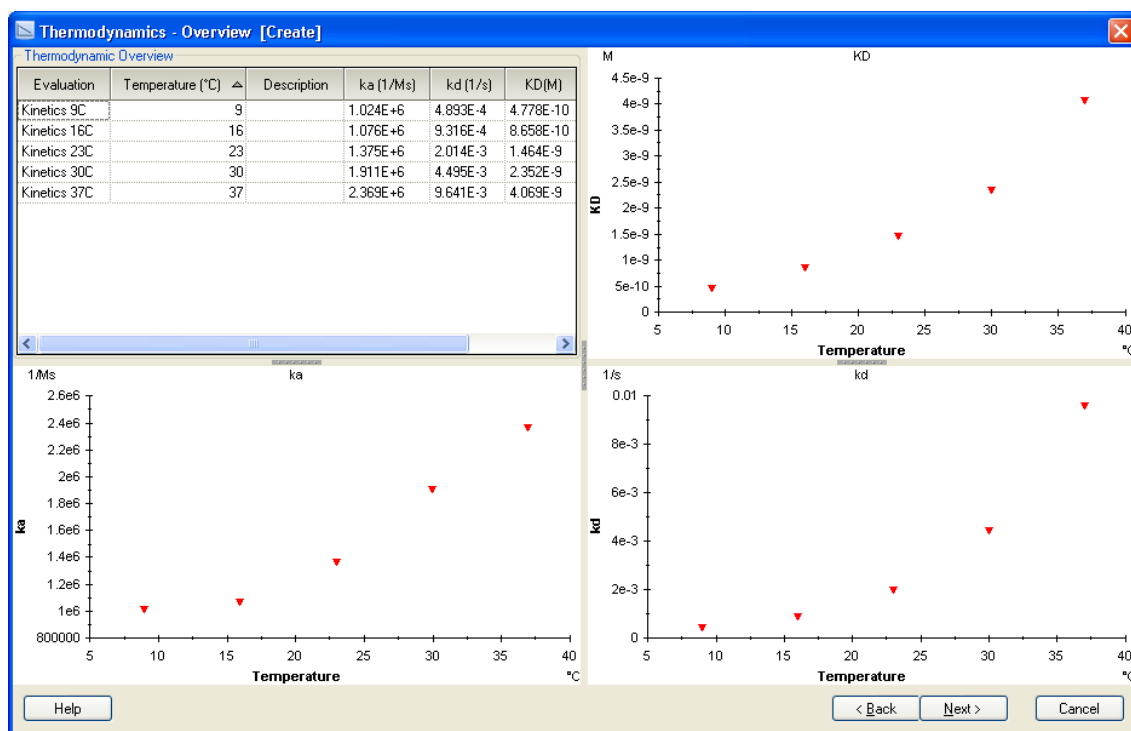


**Evaluation**→**Thermodynamics** を選択します。



**Sample**、**Model** のプルダウンメニューでサンプルを抽出します。解析に持ち込むデータを一覧で選択します。

**Next >** をクリックします。

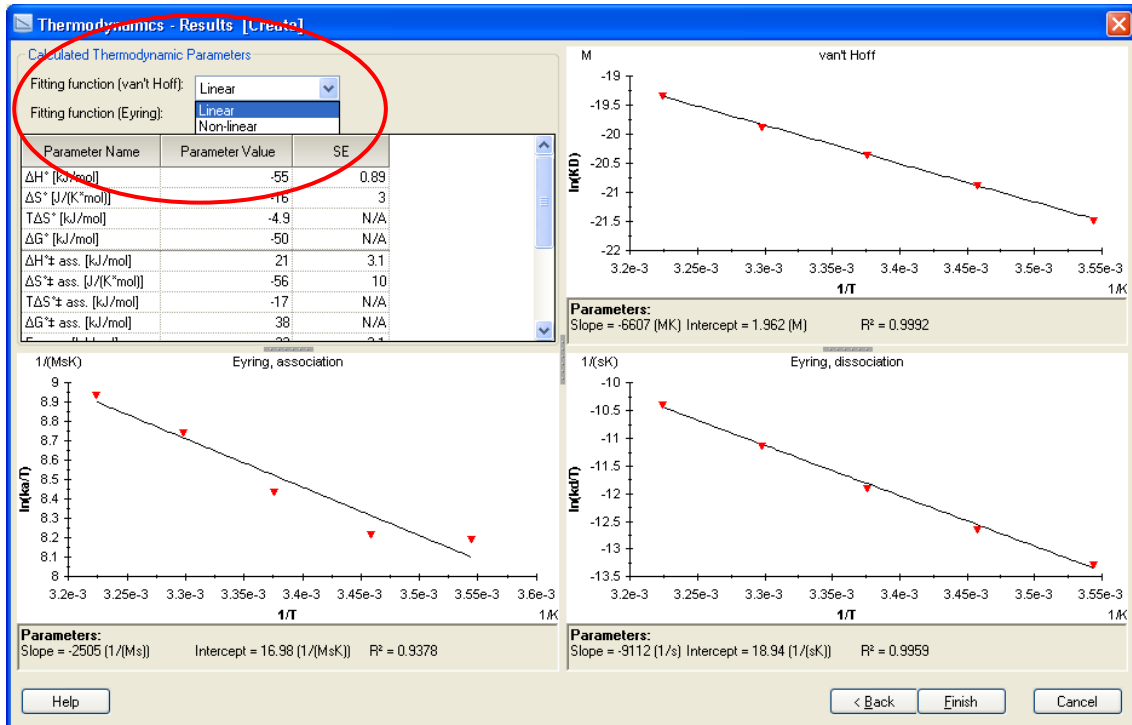


解析から除くポイントがあれば、該当のポイント上でマウスの右クリック、**Exclude Point** を選択します。

**Next >** をクリックします。







Van't Hoff プロットについて、Fitting function で、線形解析 (**Linear**) または非線形解析 (**Non-linear**) を選択します。Non-linear では、 $\Delta C_p$  値も結果に表示されます。

Eyring プロットは、常に線形解析が選択されてます。

熱力学的パラメータは 25°C の値が算出されます。

Finish をクリックして最終化します。

## ■ 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 : IN Cell Analyzer、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](http://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  
ジャパン株式会社

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂン  
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 2019 年 4 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。

Biacore S200

日本語取扱説明書