

Biacore X100 Plus Package Ver.2

Instrument Handbook





目 次

実験を始める前に	A
I Biacore (ドアコア) とは	Δ
I.実験の流れ	A
Ⅲ. 固定化	B
Ⅲ- i . アミンカップリング法	D
Ⅲ- ǖ.リガンド希釈液の pH 選択	F
Ⅳ. 相互作用測定	G
IV- i. 相互作用測定のための条件検討	G
IV-ⅲ.反応速度定数・解離定数の求め方	I
Ⅳ-ⅲ. 低分子化合物アナライトとの相互作用測定	K
Ⅳ-ⅳ. ビアコアを用いた濃度測定	P

1. セットアップ......1

1-1. 電源およびソフトウェアの起動1
1-1-1. 電源の立ち上げ
1-1-2. ランニング緩衝液、廃液ボトルのセット 1
1-1-3. ペリスターポンプのセット2
1-1-4. コントロールソフトウェアの起動
1-2. システムの初期化
1-2-1. センサーチップの挿入5
1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化 8
1-2-3. 温度設定
1-2-4. サンプルのセットとラックの取り出し 10
1-3. 測定モード

2. 基本操作(マニュアルモード)......13

2-1. 測定の開始	13
2-1-1. サンプルの添加	
2-1-2. レポートポイントの追加	
2-1-3. 測定の終了	
2-1-4. Standby の終了	

2-2.	ファイルの保存	23
2-3.	データの印刷	23

3-1. ワークフローの作成	24
3-2. リガンド希釈液の pH 選択	28
3-3. 固定化	
3-4. 相互作用測定	44
3-4-1. マルチサイクル法による測定	44
3-4-1-1. 特異的結合の確認および再生条件の検討	44
3-4-1-2. 測定	63
3-4-2. シングルサイクル法による測定	67
3-5. データ解析	72
3-5-1. カイネティクス解析	72
3-5-2. 平衡値解析	85

4-1. ワークフローの作成	
4-2. リガンド希釈液の pH 選択	
4-3. 固定化	
4-4. 特異的結合の確認および再生条件の検討	105
4-4-1. マニュアル測定による検討	105
4-4-2. ウィザード測定による検討	
4-5. 測定および解析	

5. 低分子化合物アナライトの相互作用測定......128

5-1.	測定	128
5-2.	データ解析	134

7. メンテナンス	
7-1. メンテナンスの準備	
7-2. メンテナンスの実行	
7-2-1. Desorb	
7-2-2. Desorb and Sanitize	
7-2-3. Superclean	
7-3. システムチェックとポンプキャリブレーション	

8. シャットダウン	
8-1. 実験の終了	
8-1-1. Standby 状態での放置	
8-1-2. 電源を落として終了	
8-2. センサーチップの保存	

9-1. 解析用ソフトウェアの起動	175
9-2. ファイルの呼び出し	175
9-3. センサーグラムの編集	177
9-3-1. センサーグラムの表示	177
9-3-2. センサーグラムの表示の変更	178
9-3-3. サンプル添加開始時間、ベースライン合わせ	178
9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除	179
9-4. グラフの編集	180
9-5. グラフの貼り付け	
9-6. データの移管	183
9-7. データの保存	

10. ユーザー管理	185
10-1. ユーザー管理	185
10-2. データバックアップの設定	188

実験を始める前に

I.Biacore (ビアコア) とは

Biacore は、表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance, SPR)という光学現象を利用し て生体分子間の相互作用をラベルなしでリアルタイムにモニターする装置である。 Biacore システムの研究対象は、タンパク質-タンパク質間相互作用に限定されず、脂質-タ ンパク質、核酸-タンパク質、核酸-核酸、細胞-タンパク質あるいは低分子化合物-タンパク 質など様々な分子間相互作用に及ぶ。

使用目的は、それら分子間の特異的結合の検討(スクリーニング)、解離定数の算出、反応 速度定数の算出、分子間の特異的結合を利用した濃度測定など、多岐にわたる。

Ⅱ.実験の流れ

データを取得するまでの実験の流れは、以下の通りである。 ①センサーチップへの分子の固定化 ②相互作用測定のための条件検討 ③相互作用測定(データ取り) ④解析 各項目について、概説する。

Ⅲ. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子をリガンドと言う。リガンドの精製度は、 結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく影響する。90%以上の精製度のリガ ンドを使用する。

各種固定化方法

センサーチップ CM5 に化学結合で固定化する代表的な方法を記載する。詳細およびその他の固定化方法については、"生体分子相互作用解析 攻略ガイド"を参照。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基 (N 末端アミノ基またはリジン ε-アミノ基) を利 用して固定化する方法。CM (カルボキシメチル) デキストランのカルボキシル基 を NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) で活性化し、リガンドを固定化する。固 定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて-S-S-結合で固定化する方法。

サーフェスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して-S-S-結 合で固定化する方法。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の糖を利用して固定化をする方法。糖鎖の 非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させアルデヒド基を作成して、ヒドラジ ンによりヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化する。

固定化量

実験の目的によって調節する必要がある。

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となる。固定化量の下限として、理論的最大結合量 Rmax(固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレ スポンス)が、最低でも 100RU は必要である(アナライトがタンパク質の場合)。理論的な

最大結合量は、以下の式で算出することができる。

アナライトの最大結合レスポンス(理論的最大結合量 Rmax)			
=アナライトの分子量 x リガンドの固定化量/リガンドの分子量 xS			
(Da)	(RU)	(Da)	
s はリガンドのアナライト結合部位数			
	_	_	

(例)	リガンドの分子量	50,000 Da
	リガンド固定化量	1,000 RU
	アナライト結合部位数	1
	アナライト分子量	20,000 Da
	理論的最大結合量	(Rmax) = 20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

濃度測定

固定化量はできるだけ多くする。目安として、タンパク質リガンドの場合、10,000RU以上 固定化する。固定化量を多くすると既知濃度アナライト測定時に得られる結合レスポンス RU vs C(濃度)をプロットした検量線の直線性が高くなる。

反応速度定数(*k_a*,*k_d*)、解離定数(K_D)の算出

固定化量はできるだけ抑える。マストランスポートリミテーション(固定化量が多いこと により、アナライトの供給が追いつかない現象)を抑制するためである。至適固定化量は、 以下の式から算出される最大と最小の固定化量(RU)の範囲となる。

最小固定化量(RU)
200 x 1/S x (リガンドの分子量/アナライトの分子量)
最大固定化量(RU)
1000 x 1/S x (リガンドの分子量/アナライトの分子量)
S はリガンドのアナライト結合部位数

(例)	リガンドの分子量	50 kDa
	アナライトの分子量	100 kDa
	アナライト結合部位数	1
	最小固定化量	200 x 1/1 x (50,000/100,000) = 100 RU
	最大固定化量	1000 x 1/1 x (50,000/100,000) = 500 RU
	至適固定化量範囲	100~500RU

Ⅲ-i.アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基 (N 末端アミノ基またはリジン ε-アミノ基)を利用して固 定化する。CM デキストランのカルボキシル基を NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド)で活 性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを固定化する。残った活性 NHS 基をエタノール アミンでブロッキングする。



(固定化センサーグラム)



準備するもの

アミンカップリングキット (BR-1000-50)

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)

NHS (N-hydroxysuccinimide)

1 M ethanolamine hydrochloride 溶液 (pH 8.5)

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の MilliQ[®] 水に溶解する。直ちに 200 ul ずつを 11 mm プラスチックバイアルにそれぞれ分注 し、ラバーキャップをして使用直前まで-20 ℃で冷凍保存する。使用直前に 1 組ず つの試薬を取り出して、融解させて使用する。融解後、試薬の再凍結はできない。 エタノールアミンは、溶液で供給されるので冷蔵(4 ℃)保存する。200 ul ずつ小 分けしておくか、使用する直前に分注する。

ランニング緩衝液

1級アミンを含まない緩衝液

(トリスやグリシン緩衝液は避ける。)

リガンド

アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないもの

(リガンドの安定化目的のために混入されている BSA (ウシ血清アルブミン)等の タンパク質類は予め除去する。)

リガンド希釈液

10 mM 酢酸緩衝液もしくは、10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液(pH 8.5)

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

濃度は 5~200 ug/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。酢酸緩衝液の pH はリガンドの等電点より 0.5~2 低い pH を使用する。希釈用緩衝液として pH 3.5 以下のものは使用しない。

等電点が不明な場合は、固定化前に、至適な 10 mM 酢酸緩衝液の pH を検討する。 濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカップリ ングもしくはリガンドをビオチン化後、センサーチップ SA に固定化する方法を検 討する。

リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 ug/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液 (pH 8.5) で希釈する。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率は、pH 8.5 前後がもっとも高い。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施する。有機溶媒を利用する際には、化学耐性を英語版マニュアル (Instrument handbook)で確認する。

Ⅲ- ii. リガンド希釈液の pH 選択

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基 が導入されているため、表面は負に荷電している。リガンドを正に荷電した状態で添加す ると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デキストラン中に濃縮することができる(この濃縮効果を、プレコンセントレーション効 果とも言う)。濃縮効果が得られる条件を用いることで、低濃度のリガンドをセンサーチッ プ表面に高濃度で供給でき、効率良く固定化できる。



等電点が既知のリガンドの場合

等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用する。ただし、等電点が既知の場合であっても、高次 構造の状態などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に、ウ ィザードの Immobilization pH Scouting により確認することをお勧めする。

等電点が不明な場合

ウィザードの Immobilization pH Scouting を実行し、希釈液の pH を検討する。この操作は、 何も処理していないフローセル(固定化実施予定のセル)を使用して、各 pH におけるセン サー表面へのリガンドの濃縮度合いを評価する。この検討で、リガンドは固定化されない。 検討後、引き続き、そのセルに固定化を行う。

リガンドは終濃度 5~200 ug/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。

Immobilization pH Scouting では、リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、 通常は静電的に結合したリガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離する。しかし、 稀に、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすため、リガンド添加終了後、洗浄 溶液(50 mM NaOH)を添加し、吸着したリガンドの洗浄を行う操作が組み込まれている。

IV. 相互作用測定

IV-i. 相互作用測定のための条件検討

リガンドの固定化が完了した後、アナライトの特異的結合の確認を行う。引き続き、再生 条件の検討を行う。再生条件が決まったら、同一濃度のアナライトを添加し、再現性の確 認を行う。

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加 する分子。血清や培養上清等のクルード(crude)なサンプルを使用できるが、不溶性の粒 子等は遠心などで除去する。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合は、精 製したモル濃度が既知のアナライトが必要となる。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈する。希釈できない場合は、ランニング緩衝液でゲルろ 過等を使用し緩衝液交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件 に合わせることが必要となる場合がある。緩衝液が異なる場合には、溶液効果(Bulk Effect:ランニング緩衝液と添加溶液の密度の差により発生するレスポンスの差) が発生する。反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合 領域(アナライト溶解液)と解離領域(ランニング緩衝液)が異なる緩衝液組成 条件下の測定になり、解析結果に影響を与える。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよるが、数十 ng/ml~数百 ug/ml で行う。 反応速度定数を算出する場合には、予想される KD (解離定数) 値濃度の 1/10~10 倍の濃度で解析すると良好な結果が得られる。予備検討時は、結合が弱いことや 再生条件(リガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定 化直後の状態に再生する操作)を検討する必要性を考慮し、高濃度アナライト(タ ンパク質アナライトの場合、数~数+ ug/ml)を用いるのが望ましい。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセルへもアナライトを 添加する。リファレンスセルは、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブ コントロールリガンド固定化セルなどを利用する。 再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生という。解離が速い相互 作用では、ランニング緩衝液が流れることで、短時間でアナライトが完全に解離するため 再生の必要がない。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液を、 アナライト結合表面に、30 秒~1 分間程度添加し再生を行う。至適な再生条件(どの溶液 で何分間、何回添加するか)は、分子間ごとに異なるため、その都度検討が必要となる。

理想的な再生条件

- リガンドの活性が失われない
- アナライトが完全に解離する
- リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない

再生溶液は通常以下のようなものが使用される。検討の際にはマイルドな条件から検討を 行う(塩溶液→酸溶液→アルカリ溶液)。添加時間は、1分以内で検討する。

武薬	濃度	ξあるいは pH
塩条件		
NaCl		< 2 M
酸性条件		
10 mM Gly-HCl HCl Phosphoric acid Formic acid		> pH 1.5 < 100 mM < 100 mM < 20 %
アルカウ余件 10mM Gly-NaOH NaOH Ethanolamine Ethanolamine-HCI		< pH 12 < 100 mM < 100 mM < 1 M
キレート剤 多価カチオン依存性反応の場合		
EDTA 田本区址刻		< 0.35 M
芥面沽性剤 Surfactant P-20 (Tween 20) Triton X-100 SDS Octylalucoside	< 5 %	< 5 % < 0.5 % < 40 mM
有機溶媒		
Acetonitrile DMSO Ethyleneglycol in HBS buffer Ethanol Formamide		< 20% < 8% < 50% < 20% < 40%
Guanidine-HCI Urea		< 5M < 8M

IV-ii.反応速度定数・解離定数の求め方

マルチサイクル法とシングルサイクル法

1 濃度のアナライト添加とリガンドの再生操作を1 サイクルとして、濃度が異なるアナライトを繰り返し測定し、得られたセンサーグラムから反応速度定数・解離定数を算出する方法をマルチサイクル法と呼ぶ。一方、異なるアナライト濃度系列を再生操作なしに連続添加し、得られたセンサーグラムを利用して反応速度定数・解離定数を算出する方法をシングルサイクル法と呼ぶ。

シングルサイクル法

マルチサイクル法



アフィニティーとカイネティクス

分子同士が相互作用する時には、両者にはアフィニティー(親和性)があると表現する。 解離定数は、アフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、K_D(単位 M)と して記述される。その逆数 1/ K_D(= K_A、単位 1/M)が用いられることもある。解離定数は、 A+B⇔AB反応の平衡状態において、K_D = [A] [B] / [AB] と定義される。形成される複合 体の割合が多いほど、つまり、この数値が小さいほどアフィニティーは強い。Biacore を用 いたカイネティクス解析では、アフィニティーは、その分子間の反応速度定数から算出す る (K_D = k_d / k_a)。速い結合および遅い解離の相互作用ほどアフィニティーは強い。これら 反応速度(カイネティクス)に関するパラメータは、結合速度定数(k_a 、単位 M⁻¹s⁻¹)、解離 速度定数(k_d 、単位 s⁻¹)として表現される。

$$A + B \xrightarrow[k_a]{k_a} AB$$

 $\mathbf{K}_{\mathrm{D}} = \mathbf{k}_{d} \, \mathbf{I} \mathbf{k}_{a}$

 $K_A = k_a / k_d$

解離定数(K<u>D</u>)、反応速度定数(*k<u>a</u>,<i>kd*)の算出方法

カイネティクス解析では、アナライト全濃度のセンサーグラムに、直接反応速度式をカー ブフィッティングさせ、非線形最小二乗近似法により、全体を通して一組の反応速度定数 を算出する、Global Fitting を用いて定数を導き出す。



アフィニティーが弱い (≒解離が速い)相互作用の場合、反応はきわめて速く平衡状態 (Req) へと移行するが、複合体の安定性は悪いため、センサーグラムは『箱型』となる。結合領 域および解離領域は極めて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の算出は困難 である。





Req vs C のプロットからの平衡値解析

このような場合、アナライト濃度(C)に対する平衡値(Req)のプロットから、親和定数 (K_A)あるいは解離定数(K_D)を算出する。平衡状態では、以下の関係式が成り立つ。



日本語取扱説明書

至適なアナライト濃度

良好な結果を得るためには、予想される解離定数(K_D)値の 1/10~10 倍の濃度範囲で測定 する。結合速度または解離速度が遅く、結合領域のセンサーグラムの傾きが直線的な場合 には、センサーグラムのカーブが得られる高濃度領域まで測定すると、良好な解析結果が 得られる。

マルチサイクル法の場合

5 段階以上の濃度系列と濃度 0(アナライトを含まない緩衝液のみ)について測定し、1 濃度については再現性の確認目的で 2回(n=2)測定する。解離定数値が不明な場合は、1 濃度解析を実行し、算出された暫定的な Ko値から、至適濃度範囲を求める。

シングルサイクル法の場合

予想される解離定数(K_b)値の 1/10~10 倍の濃度範囲で、5 段階の濃度系列と、濃度 0 を 2 回測定する。解離定数値が不明な場合には、1nM~1uM の範囲で、5 倍希釈系列の 5 濃度の アナライトで測定および解析を行い、算出された暫定的な K_b値から至適濃度範囲を求める と良い。その場合、再生ができるのであれば、リガンドを再生して、至適アナライト濃度 で再測定を行う。再生ができないのであれば、リガンドを新しいフローセルに固定化し、 至適アナライト濃度で再測定を行う。

カイネティクス解析が困難な場合

アフィニティーが弱く、箱型のセンサーグラムになり、カイネティクス解析が困難な場合 は、10 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定する。濃度範囲は高濃度側まで幅広くと ることを推奨する。

至適な流速

30~60ul/min の高流速に設定する。

アナライト添加時間と解離時間

通常は、添加 3 分程度、解離 3 分程度であれば良い。ただし、結合速度または解離速度が 遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、センサーグラムのカーブを得るため に、添加時間を 5~10 分程度にすると良い。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほ とんど確認できない場合には、解離時間を 10~30 分程度にすると良い

IV-ⅲ. 低分子化合物アナライトとの相互作用測定

BiacoreX100 の有機溶媒耐性

低分子化合物の多くは、水への溶解性が悪く、溶解するのに有機溶媒が必要となる。その 際、一般に、ジメチルスルホキシド(DMSO)がよく使われる。添加する DMSO 濃度は 3-5% 程度を推奨する。しかし、最終的な DMSO 濃度は、リガンドの活性や化合物の溶解性を考 慮し決定する。ランニング緩衝液に使用できる DMSO 濃度は、10%までである。短時間(3 分間程度)の添加であれば、50%まで耐性があるため、流路の洗浄などには使用可能である。 DMSO を扱う際、DMSO 耐性の容器を使用する必要がある。あるプラスチック類(ポリカー ボネイトやポリスルフォン)は、DMSO に溶け出すため、測定中に結合が見られることがあ る。DMSO 非耐性の容器を用いると、接触したとたんに腐食し、白濁する。常にそのような 問題を考慮し、容器の耐性テストを行うことが望ましい。

ポリプロピレン製のものは、DMSO 耐性である。

DMSO の推奨グレード

DMSO は、様々なグレードが市販されている。DMSO 溶液中の夾雑物も測定に影響を及ぼす 場合があるので、グレードの高いもの(UV spectrometry 用等)を使用することを推奨する。 Dimethyl sulfoxide(276855, Aldrich)、Dimethyl sulfoxide(D-1435, Sigma)を用いると良好な 結果が得られている。

ランニング緩衝液の調製

【例】ランニング緩衝液 ; リガンド固定化時: 1X PBS 100ml 程度 相互作用測定時: 1X PBS, 5% DMSO 400ml 程度

<調製方法>

1X PBS を 500ml 調製(50ml 10X PBS + 450ml Milli Q) ↓ ↓ 100ml 分取(リガンドの固定化に使用) * 1X PBS 400ml ↓ ↓ 20ml 分取 ** ↓ 100% DMSO を 20ml 添加

1X PBS, 5% DMSO 400ml ***

* アミンカップリングを行う際、DMSO 含有緩衝液を使用するとカップリング量が 2/3-1/2 程度に減少する。

** 1X PBS 緩衝液をサンプル希釈用に 10ml 程度取り分けておく。

*** 1X PBS, 5% DMSO 緩衝液をサンプル希釈用に 10ml 程度取り分けておく。

溶媒補正

(参照: Frostell-Karlsson, A., *et al.* (2000). "Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels." J Med Chem **43**(10): 1986-92.)

SPR シグナルは、センサー表面での様々な屈折率(RI)の変化を反映している。センサー表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液と添加サンプル(アナライト)を溶解している溶媒の屈折率差から生じる、バルクレスポンスが含まれる。

バルクレスポンスが小さい(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る。

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(下図)。この時、溶媒効果が大きい DMSO を含む溶媒の場合、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る。

このため、DMSO を含むランニング緩衝液を用いる低分子化合物をアナライトとする実験では、単純にリファレンスを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 はできない。

実際、このバルクレスポンスの差は小さい(通常 10 RU 以下)が、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、バルクレスポンスの差を補正する必要 がある。この補正を溶媒補正(Solvent correction)という。



溶媒補正が必要な実験系

溶媒補正は、以下の3つの要因が重複した際必要となる。

- 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(30,000 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)

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、バルクレスポンスの 1,500 RU 程度に相当する。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る。

溶媒補正の手順

Biacore X100 Evaluation Software では以下の補正を自動で行う。

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±1 %程度)を、リガンド固定化セル及びリファレンスセルに添加し、固定化セルとリァレンスセルのバルクレスポンスの差を記録する。

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曲線を作成する。

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)を溶媒補正曲線に代 入して、補正値を算出する(図②)。

相互作用測定で得られた結合レスポンスから、補正値を差し引く(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する。 全ての DMSO 溶液は用事調製する。

①1x PBS(no DMSO)を調製する。

②溶媒補正曲線4%、6%DMSOストック溶液を調製する。

4% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9600 ul
	100 % DMSO	400 ul
		10000 ul
6% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9400 ul
	100 % DMSO	600 ul
		10000 ul

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 溶液を調製する。 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ある。

700 ()
700
7

アナライトの調製

アナライト溶液の DMSO 終濃度を、ランニング緩衝液とあわせる。化合物濃度は、結合ス クリーニングが目的の場合、親和性にもよるが、数十 uM で調製する。反応速度定数の算出 が目的の場合、K_D(解離定数) 値濃度の 1/10~10 倍の濃度範囲で 5 濃度以上調製する。

IV-iv. ビアコアを用いた濃度測定

検量線を用いた濃度測定

定量したい分子(A)に対して親和性を持つ分 子(B)が必要となる。Bを固定化したセンサ ーチップ表面に A を添加すると、濃度に依存 した結合レスポンス(RU)が得られる。数段 階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポ ンスを得て、検量線(RU vs C)を作成する。 濃度未知の A に対しても同様に添加し、その



結合レスポンスを検量線にフィッティングすることで、濃度を算出する。また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き (Slop) も結合レスポンス同様に、添加した A の濃度を反映し、Slop vs C の検量線からも定量ができる。

(直接法)

親和性を持つ分子(B)をセンサーチップ表面に固定化し、 定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法。



(阻害法)

A もしくは A のアナログ(A')をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和 性を持つ分子 B(抗体など)を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を測定することで、 間接的に存在する A の濃度を求める方法。化合物やペプチドなど分子量が小さい分子の定 量を行う場合に利用する。



検量線不要の濃度測定

検量線を必要としない濃度測定法(CFCA; Calibration Free Concentration Analysis) は、 アナライトの拡散特性とセンサーグラムの結合領域初期における結合速度(初期結合速度) を利用して、カーブフィッティングにより、アナライト分子の絶対濃度を算出する方法で ある。適した標準分子がない場合は、CFCA を実施する。また、標準サンプルがある場合で も、吸光度計などで求められたタンパク質総量の濃度に対し、リガンドに対する結合活性 を持つ濃度を求めたい場合に有効である。厳密な速度定数と親和定数を求める目的におい ても、CFCA により絶対的な結合活性濃度を求め、カイネティクス解析に反映させることで きる。



CFCA では、リガンドをできるだけ多く固定化(例:分子量 150kDa で 5000RU 以上)し、マ ストランスポートリミテーション条件下で測定を実施する。固定化量が多い表面において、 初期結合速度は、アナライトの分子量(Mw)、マストランスポート係数(km)、アナライト 濃度(Conc)で決定される。このため、上記の初期結合速度(d[R] / dt)の関数を利用して サンプル中のアナライト濃度を算出することができる。

測定は、アナライトを最低2流速(5 および 100µl/min を推奨)で添加して、センサーグラ ムから初期結合速度を求める。マストランスポート係数(km)は、拡散係数(D)、流速、 フローセル容積から計算できる。得られた2流速でのセンサーグラムを、<u>1:1 結合モデルで</u> カイネティクス解析を行い、アナライトの分子量(Mw)、km 値を定数とし、アナライト濃 度をパラメータとしてカーブフィッティングを行うことで濃度を算出する。なお、アナラ イトが抗体(Bivalent Analyte)であっても、マストランスポートリミテーション条件下で、 カーブフィッティングが良好であれば、CFCA を実施することができる。

参考文献:

Christensen, Anal. Biochemistry (1997)249, p.153

Sigmundsson, K., et. Al., Biochemistry (2002) 41, p.8263

① アナライト	分子量 ≧ 5,000Da
② 結合速度定数(k _a)	$10^7 > k_a > 5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$
③固定化量	できるだけ多く固定化する。
	(分子量 150kDa では、5,000RU 以上は必要。)
④ アナライト濃度	CFCA で良好な結果が得られる濃度レンジは、0.5~
	50nM である。測定に用いるサンプル濃度は、1ug/ml
	程度が至適である。吸光度(280nm)による総タンパ
	ク質濃度を基準として調製する。濃度が不明な場合に
	は、10 倍希釈系列で4 濃度以上調製すると良い。
⑤ 流速	10ul/min および 100ul/min を推奨。
⑥ サンプルの性状	拡散係数や分子量が大きく異なる分子の混合溶液の場
	合には CFCA は実施できない。
	例) アナライトが IgG のポリクローナル抗体の場合には
	CFCA は可能だが、アナライトが IgG と IgM の混合溶液
	の場合には CFCA は不可能。
⑦ リファレンスセル	リファレンスセルも同時測定を行い、リファレンスセ
	ルを差し引いたセンサーグラムを利用する。

CFCA を実施するための至適条件

補足 1. マストランスポート、マストランスポートリミテーションとは

マストランスポートとは、フローセルを流れる溶液中からセンサーチップ表面への、アナ ライトの拡散現象を指す。アナライトのセンサーチップ表面への拡散(供給)速度は、次 式で求められる。

アナライトの拡散速度(mol/m²s) = アナライト濃度 × マストランスポート係数(km) マストランスポート係数は、次式で求められる。

3 .	$D^2 \times f$
$k_m = 0.98 \times \mathcal{N}$	0.3 × h ² × w × l

 D
 : 拡散係数
 f
 : 測定流速
 h : フローセルの高さ

 w
 : フローセルの幅
 I
 : フローセルの長さ

 なお、
 アナライトの拡散速度よりも、センサーチップ表面のリガンドとの結合速度が速い

 場合、マストランスポートが結合速度を制限するため、マストランスポートリミテーショ

 ンが起きているという。
 リガンドの固定化量が多い場合には、マストランスポートリミテ

ーションが起こりやすい。

補足 2. 拡散係数の求め方 CFCA を行う場合、20℃における拡散係数がパラメータとして必要である。 拡散係数は、分子のサイズと形状によって決定され、次式によって算出できる。 324.3×10⁻¹¹ $D = \frac{f \times \eta_{rel} \times M_w^{1/3}}{f \times \eta_{rel} \times M_w^{1/3}} \quad (m^2/s)$ f :摩擦率 :20℃での水に対するアナライト溶媒の粘性 η_{rel} Mw :分子量(Da) なお、以下の方法でも拡散係数を得ることができる。 Biacore ウェブの BiacoreX100 の拡散係数算出ツール ② 文献値 ③ 実験的に算出(超遠心分析や光散乱分析など) Biacore Webの Biacore X100の拡散係数算出ツールによる拡散係数の求め方 次のアドレスにアクセスする。 http://www.biacore.com/jp/lifesciences/products/systems overview/x100/service/index.html ウェブサイトからのBiacore X100のサポート Biacore X100コントロールソフトウエアに組み込まれたサポートのホットリンクを通して、Biacore ウェブサイト上の豊富なサポート情 報に直接アクセスできます。Biacore X100のシステムコントローラからインターネットへのアクセスができない場合には、このサイトか らサポート情報にアクセスできます。 このサイトにアクセスするためにはお客様登録の隙にBiacoreシステムについている「プロダクトキー」が登録されていなければなりま せん。Biacore ウェブサイトのアカウントに登録されていない方は<u>こちら</u>でサインアップしてください。 User ID: Password: FORGOT PASSWORD ? LOGIN ユーザー名(User ID)とパスワード(Password)を入力して、LOGIN をクリックする。(事 前に、ユーザー登録が必要。) ↓

Biacore X100		
ー・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	グラム、サ	ポートツール、およびインフォメーションサービスを幅広く取り揃えています。皆様が最適な
態でBiacoreシステムを最大	限にご利	用できるように万全のサポートを目指しています。
Biacore X100に関連した保	守&サーヒ	ビスについての情報は下のリストからお選びください。
お遅びださい	~	
03/2017/2017		
iffusion Coefficient Calc	ulator To	
 For the calculation of dif Only for users of Biacor 	tusion co e X100 PI	efficients in Calibration-Free Concentration Analysis assays us Package 2.0 or later (valid product key required)
Access the on-line tool	<u>here</u>	
iffusion Coefficient (Calculat	or Toolの <u>here</u> をクリックする。
		\downarrow
Diffusion Coe	fficio	nt Calculator / Converter
This on line tool is design		
assays. It is accessible o	neu to nei Inly via a v	alid product key associated with the appropriate types of Biacore software.
Calculate diffusion	coeffici	ient at 20°C
Molecular weight:	1	90000 (Da)
Frictional ratio:	(2)	Choose molecular shape > Globular (1.2)
1	E	Entervalue 1.2
1		
Viscosity relative	3	
to water at 20°C		⊖ Enter value 1.00
1 1		
		(m^2/s)
1 1 1		
Convert diffusion o	oefficie	nt from temperature T to 20°C
convert unusion c	Joennele	
Temperature T:		25 (°C)
Diattomporature 7		4.00-44 (m20)
D at temperature 1:		4.UUe-11 (m*/s)
		Diffusion coefficient at 20°C = 3.49e-11 (m²/s)

) Molecular weight:	分子量(Da)		
② Friction ratio:	摩擦率		
	〇 Choose molecular shape にチェックを入れ、		
	Globular (1.2)		
	選択する。以下の、3項目から選択できる。		
	 Globular (1.2)・・・球形のタンパク質(初期設定値) 例)抗体など Moderately elongated (1.7)・・・長いタンパク質 		
	例)フィブロネクチンやプラスミノーゲンなど		
	・ Elongated (2.5)・・・硬く、長いタンパク質		
	例)フィブリノーゲンやトロポミオシンなど		
	○ Enter value にチェックを入れると、任意の値を入力できる		
	20℃における水に対するアナライト溶媒の粘性。 〇 Use standard value (1.00) にチェックを入れると、粘性係 を 1 とする。(初期設定値)		
	○ Enter value にチェックを入れると、任意の値を入力できる		
)~③の設定が終了した	たら、 CALCULATE をクリックし計算を実行する。④に計算結果		
長示される。			
Convert diffusion coeff	icient from temperature T to 20°C		
Temperature T:	25 (°C)		
D at temperature T:	4.00e-11 (m²/s)		
	CONVERT Diffusion coefficient at 20°C = 3.49e-11 (m²/s		

∨ 実験を始める前に

1. セットアップ

1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1-1-1. 電源の立ち上げ

テーブルタップの電源 \rightarrow プリンター \rightarrow モニター画面 \rightarrow システム本体 \rightarrow コンピュー ターの順番に電源を入れる。パスワード(biacore)を入力し、Windows を立ち上げる。

注)システム本体の電源を入れると、本体の全面左上にある全てのインジケーター(LED ランプ)が数秒間点灯し、リセットされて消える。その後 power のインジケーターが点灯 し、temperature のインジケーターは点滅する。

1-1-2. ランニング緩衝液、廃液ボトルのセット

本体に向かって、左側トレイにランニング緩衝液ボトルをセットし、バッファーチューブ を2本とも挿入する。1日の実験にランニング緩衝液が約200ml必要。水分の蒸発を防ぐ ため、必ずボトルキャップをする。また、右側トレイに廃液ボトルをセットし、廃液チュ ーブを挿入しボトルキャップをする。



1-1-3. ペリスターポンプのセット

装置前面下のカバーを開け、ペリスターポンプのカバーを閉じる。



補足 1-2. ランニング緩衝液の種類

各種ランニング緩衝液を発売している。

HBS-EP+ 10X (50ml 4本, BR-1008-26)
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20
⇒使用の際には、MilliQ®水で 10 倍希釈する。

HBS-P+ 10X (50ml 4本, BR-1008-27)
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20
⇒使用の際には、MilliQ®水で 10 倍希釈する。

HBS-N 10X (50ml 4本, BR-1008-28)
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl
⇒使用の際には、MilliQ®水で 10 倍希釈する。

 HBS-EP
 (200 ml, BR-1001-88)

 0.01M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % v/v Surfactant P 20, pH7.4

 HBS-P
 (200 ml, BR-1003-68)

 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N (200 ml, BR-1003-69)

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

実験目的にあわせ、緩衝液の変更は可能である。各自で調製する場合には、0.22 um フィ ルターでろ過する。

1-1-4. コントロールソフトウェアの起動

モニターの初期画面中の左下の Start → Programs → Biacore → BIACORE X100 Control Software のアイコンをクリックする。ユーザー名とパスワードを入力する。スタートビュ ーウインドウが開く。初期設定では、ユーザー名が admin、パスワードが administrator で 設定されている。各ユーザーの登録については、第 10 章を参照する。



- ① メニューバー Biacore X100 で実行可能な殆どの操作コマンドが含まれる。
- ② ツールバー 使用頻度の高いコマンドをアイコン化しており、簡便にコマンド操作を選択できる。その時点で実行可能なコマンドのみ選択可能。
- アッセイボタン アッセイコマンドがアイコン化されている。
- ④ フィルタータブ "Quick Filter"にデータベースを表示。"Advanced Filters"でデータの検索が可能。
- ⑤ ステータスバー
 現在のシステムの状態を表示。システムとの接続状況、システム温度、センサーチップの種類、実行状態など。
- ⑥ サポートナビゲーター 用語やアイコン等の説明や実験手順、解析結果の評価等をサポート。また、ウェブにリンクし、サポート情報の入手やホームページにアクセス可能。必要がない場合には、ウインドウ右上の図をクリックすると閉じる。

Γ

補足 1-3. ファイルのアイコン
Quick Filter には、以下のファイルが表示される。 ファイルの種類によって付属のアイコンが異なる。
📝 コントロールソフトウェアで保存した測定ファイル
直 コントロールソフトウェアで保存したワークフロー
🗾 コントロールソフトウェアで保存したウィザードファイル
😪 解析ソフトウェアで保存したファイル

1-2. システムの初期化

<u>1-2-1. センサーチ</u>ップの挿入

コントロールソフトウェアを起動すると Dock Chip ダイアログが表示される。

Dock Chip	
⊙ <u>N</u> ew chip	◯ <u>R</u> euse chip
New chip -	
Chip type:	СМ5 💌
Chip <u>i</u> d:	070510-0957
Chi <u>p</u> lot no:	(optional)
<u>H</u> elp	Dock Chip Cancel

新品のセンサーチップを使用する際は、ONew chip に、再利用のセンサーチップの場合 は、OReuse chip にチェックを入れる。(再利用のセンサーチップを使用する場合は、補 足 1-4.を参照。)

 \downarrow

Chip type のプルダウンメニューをクリックして、使用するセンサーチップの種類を選択 する。Chip id は日付と時間が自動入力される(変更可能)。必要に応じて、Chip lot no を 入力する。

Ţ

本体上部のセンサーチップ挿入部位の扉を開け、スライダーを手前に引きセンサーチップをセットする。スライダーを装置に挿入する。インジケーターの sensor chip が点滅する。



Dock Chip ダイアログの Dock Chip をクリックする。



Dock が完了(インジケーターの sensor chip が点灯する)して、自動的に Standby 状態に なる。Standby とは、セットしたランニング緩衝液を低流速で流し続けるモードである。 最長 7 日間継続する。

補足 1-4. センサーチップ挿入時の注意事項

冷蔵庫に保存しているセンサーチップは、室温に戻した後に Dock する。

センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まってい ることを確認してから挿入する。

Dock 状態でセンサーチップを装置から取り出さない。

センサーチップを取り出す必要がある場合は、ツールバーの Undock sensor chip アイコン (
) をクリックする。インジケーターの sensor chip が点滅したら、センサーチップ を取り出す。

補足 1-5. センサーチップの固定化履歴

再利用のセンサーチップを使用する場合は、OReuse chip にチェックを入れる。 Reuse:で、そのセンサーチップに対応した id 番号を選択する。

Dock Chip	
O <u>N</u> ew chip	
Reuse chip -	
R <u>e</u> use:	CM5: Id=070426-1110
Chip type	e: CM5
Chip id:	070426-1110
Chip lot r	10: 1170296
	De <u>t</u> ails
<u>H</u> elp	Dock Chip Cancel

↓

Details…をクリックすると、固定化履歴が表示される。

Chip Prope	Chip Properties				
Chipid: 070426-111	J	Chip 11702		First use date: 4/26/2007	
Chip CM5		IFC type: IFC5			
Flow cel	Immobilization date	Final Response [RU]	Capturing Molecule/Ligand	Result file	
Fc=1					
Fc=2	4/26/2007	1450.3	Beta 2 Mab	Immobilization 4/26/2007 11:20:56 AM	
	_			_	
<u>H</u> elp					Close
<u>H</u> elp			↓		Close

補足 1-6. センサーチップの種類

Biacore X100 システムで使用可能なセンサーチップは以下の通り。 各センサーチップの詳細は弊社総合カタログ等を参照のこと。

カルボキシル基タイプ	タンパク	7質、ペプチド、化合物などの固定化
Sensor Chip CM5 $(certified)$	3枚	BR-1000-12
Sensor Chip CM5 $(reserch grade)$	3枚	BR-1000-14
Sensor Chip CM5 $(reserch grade)$	1枚	BR-1003-99
Sensor Chip CM4	3枚	BR-1005-39
Sensor Chip CM3	3枚	BR-1005-41
Sensor Chip C1	3枚	BR-1005-40
ストレプトアビジンタイプ	ビオチン	∠標識の DNA やペプチドなどの固定化
Sensor Chip SA	3枚	BR-1000-32
Sensor Chip SA	1枚	BR-1003-98
疎水基タイプ	リン脂質	質、糖脂質、膜タンパク質などの固定化
Sensor Chip HPA	3枚	BR-1000-30
Sensor Chip HPA	1枚	BR-1004-06
Sensor Chip L1	3枚	BR-1005-43
Sensor Chip L1	1枚	BR-1005-58
金属キレートタイプ	His-tag	タンパク質の固定化
Sensor Chip NTA	3枚	BR-1000-34
Sensor Chip NTA	1枚	BR-1004-07
金表面のみのタイプ		
Sensor Chip Au	3枚	BR-1005-42

1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化

メニューバーの Tools \rightarrow Prime...を選択する。

	Tools Help					
	Prime					
	Shutdown					
	Biacore X100 Evaluation Software					
	↓					
Prime		×				
Place a bo	ottle with buffer on the left hand tray and insert the inlet tubes.					
	< <u>B</u> ack <u>Start</u> <u>Close</u>					

ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、<u>Start</u>をクリックする。

Prime がスタートする。

_

 \downarrow

	\downarrow		
Prime			
The Prime procedure is com	pleted.		
· ·			
	Rack	Nevt >	Close
	- Pack	Inext >	

Close をクリックする。

自動的に Standby 状態になる。

補足 1-7. 実験途中のランニング緩衝液の交換

Prime は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置 換する操作である。実験開始時や実験の途中でランニング緩衝液を変更する場合には必ず 実行する。
1-2-3. 温度設定

温度設定を行う。

メニューバーの Tools \rightarrow Set Temperature...を選択する。

Tools Help				
Prime				
Shutdown				
Biacore X100 Evaluation Software				
Standby				
Stop Standby				
Load Samples				
✓ Rack Illumination				
Dock Chip				
Undock Chip				
Set Temperature				
Change Password				
Preferences				
More Tools				

Ţ

4 ℃~40 ℃の範囲で設定して、**OK**をクリックする。(ただし、実際の室温より 10℃下ま での範囲で設定する。)

Set Temperature	
Analysis <u>t</u> emperature:	25 (° C)
Help OK	Cancel

補足 1-8. 設定温度と実際の温度

設定温度に達していない場合は画面上のステータスバー中の温度表示が赤の点滅、本体イ ンジケーターの temperature ランプが橙色に点滅する。設定温度で安定した場合には、画 面上の温度の表示が黒、インジケーターの temperature ランプは点灯に変わる。 温度が完全に安定するには、ある程度時間を要する(室温より 5℃の違いで、30 分程度)。 室温が測定温度と大きく異なる場合は、あらかじめシステムの電源を入れておく。

1-2-4. サンプルのセットとラックの取り出し

すべてのサンプルは、ラックにセットする。ラックを取り出すには、ツールバーの Load Samples アイコン() をクリックする。システム本体前面の rack locked のランプ が消えるとラックを取り出すことができる。rack locked のランプが点灯している際は、ラックを取り出すことができないので注意する。

ラックを真上に持ち上げ取り出す。



画面上に Rack Ejected ダイアログが表示される。ラックをセット後、OK をクリックする。 13 秒後にロックが完了し、rack locked のランプが点灯する。 たた、ラックダ、スのライトの点灯は、Table、、 Pask Wymination で翌中可能

なお、ラックベースのライトの点灯は、**Tools** → **Rack Illumination** で選択可能。

補足 1-9. ラックとバイアル

ラックには、サンプルバイアルを 15 本
 (position 1 から position 15 まで)とニードル
 洗浄に利用する MilliQ 水バイアル (position H2O)を1本セットできる。

ラックには次のバイアルがセットできる。専 用のキャップを利用する。パラフィルムなど ニードルの穴を塞ぐ可能性のあるシールは使 用しない。



Rack position	1-15	H ₂ O
キャップ	Rubber caps, type 2 BR-1004-11	不要
バイアル	1.5ml Plastic Vials BR-1002-87	15mm Plastic Vials BR-1006-54

1-3. 測定モード

Biacore X100 システムは3つのモードで測定できる。 各測定モードは、コントロールソフトウェア上部のアイコンで選択する。

X	TRAIN	ING @	Biacore	X100	Contro	l Softwa	ire						
File	View	Tools	Help										
	.∎ ↓	0 ₁	*										
ſ	Create	Assay V	Vorkflow -					Other	Options				
	K	inetics/	Affinity		B	inding An	alysis		Wizards		Manua	al Run	

マニュアルモード

画面上のアイコンを使い、測定を行いながら操作する。簡単な検討など、数回の添加で完 了する試験を行う場合に有効。詳細は、第2章を参照。

(*取得データは、解析ソフトウェアで解析することができないので注意する。)

ワークフローモード

実験ノートを使用する場合と同じ感覚で、実験結果を記録することができる。初めてビア コアの実験をする場合でも、流れに沿って各ステップを実行すれば、データの取得までた どり着くことができる。実験の流れが表示され、さらに各ステップから実験プログラムの 作成および実行が可能である。また、得られた結果が紐付けされるので、結果の再確認で 間違えることがない。BiacoreX100 では、反応速度定数の算出実験およびスクリーニング実 験については、ワークフローが存在する。

🔀 admin 🔉 Biacore X100 Control Software	
Elle View Tools Window Help	
Assay Workflow: ProteinA_	
Assay Uverview	anternal Overview;実験結果が表示される
analyte Selected chip: 0	M5
ligand Ligend name: F	Results References ; Overview で表示さ
Sensor Surface Preparation	Overview Results reference イルに結果の生ナータが紺小けされる
Buntofindat	Yer from value
Immobilize	
Run	
Assay Find Sample Conditions	Ter Innon values
Find Regeneration Condition	
Run to find out	ter Iron value. 実験の流れ;上から順番に実行する
Run Binding Analysis Assay	
Doine - COM1 Current terror: 24 92 9C	Uote
Saron contraction of the second	Running study, remaining time: 7.0 days

ウィザードモード

ガイダンスに従いながら、任意の実験条件を入力して実行させるオートモードである。ワ ークフローに紐付けされているプログラムも、ウィザードが基本になっている。ワークフ ローを使用せず、実験内容に応じてプログラムを作成する場合、ワークフローより自由度 の高い実験系を構築する場合に有効である。

🔀 Open/New Wizard Template	×
Surface Preparation workflow Immobilization 国定化関連のウィザード Assay Development 相互作用測定のための条件検討のウィザード	
Concentration Using calibration Calibration-free (CFCA) Kinetics/Affinity Binding Analysis Custom Assay Wizard	
Help Browse Image: Biacore Templates New Open Cancel)

2. 基本操作(マニュアルモード)

2-1. 測定の開始

Other Options \mathcal{O} Manual Run...をクリックする。

🔀 TRAINING @ Biacore X100 Control Software
File View Tools Help
Create Assay Workflow Create Assay Workflow Signature Signature Wizerds
\downarrow
💹 Manual Run
Flow
Elow rate: 10 V (μl/min)
Flow path
⊙ 🚍 Flow path 1
Flow path 2 <u>Reference</u> subtraction:
O ➡ Flow path 1-2 2-1 ✓
<u>H</u> elp <u>Load Samples <u>S</u>tart <u>C</u>lose</u>

Manual Run ダイアログが表示される。

Flow rate:	► をクリックして、5、10、30ul/minより選択する。(固定化の際は 10ul/min、
	反応速度定数の算出実験の条件検討の際は 30ul/min を選択。)
Flow path:	測定を行うフローセルを選択する。
Flow path1	フローセル1のみ測定
Flow path2	フローセル2のみ測定
Flow path1-2	フローセル1および2を測定
Reference subtract	ion のプルダウンメニューで 2-1 を選択すると、自動差し引きしたセンサ

ーグラムを表示することができる。

14 2. 基本操作(マニュアルモード)

<u>L</u>oad Samples...をクリックする。

Rack Unlocked	
Rack Unlocked Insert the rack and click OK.	
Help	ОК

ロックが解除される。装置右上の"rack locked"のランプが消えてから、サンプルラックを 取り出す。ラックにサンプルをセットし、ラックを装置に戻す。OK をクリックする。 引き続き、Manual Run ダイアログの Start をクリックする。



結果の保存先を指定し、ファイル名を入力する。 Save をクリックすると、測定が開始する。

 \downarrow





センサーグラムが表示され、測定が開始する。

2-1-1. サンプルの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定する。(各コマンドの説明は補足 2-1. 17ページを参照。または、 3 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照する。)



Inject		X
Vial/well <u>p</u> osition:		ОК
<u>C</u> ontact time:	60 (s)	Cancel
		<u>H</u> elp
Minimum required	volume in vial/well for this i	njection: 50 (μl)

 \downarrow

ī.

	\downarrow	
Inject		X
Vial/well <u>p</u> osition:	1	ОК
Contact time:	60 (s)	Cancel
		<u>H</u> elp
Minimum required	volume in vial/well for this	injection: 50 (μl)

Contact time:にサンプル添加時間(秒)を入力すると、必要量がダイアログ下部に表示される。OK をクリックする。



18 2. 基本操作(マニュアルモード)

(測定を開始した後)	こ、サンプルをラックにセットする場合は、一旦、 Cancel をクリック
し、Inject ダイアログ	ブを解除する。)
1 1 1	\downarrow
Load Samples アイコ	ン 🔍 を選択する。
	Load Samples
	Rack Ejected
1 1 1 1 1	Insert the rack and click OK.
1 1 1 1 1	Help Cancel OK
	Time until automatic standby: 4:45
- ラックを取り出し、	。 必要量以上のサンプルを分注したバイアルをセットする。
ラックを再び装置に-	セットし、OK を選択する。再び、Injection command 💉 をクリック
する。	
1	\downarrow
	Inject 🛛
	Vial/well position:
	Contact time: 60 (s) Cancel
	<u>H</u> elp
	Minimum required volume in vial/well for this injection: 50 (μl)
サンプル位置および	忝加時間(秒)を入力する。



コマンドテーブルに Injection command マークが追加され、添加が開始される。

Ţ

必要に応じて、引き続きサンプルを添加する。

補足 2-2. イベントログ

センサーグラムの X 軸上には、試料添加開始・終了や流路の洗浄などのログも自動入力さ れる。センサーグラム右上の(2010)をクリックするとイベントログの詳細を確認で きる。

2-1-2. レポートポイントの追加

任意の時間におけるシグナルの値 (RU) をレポートポイントという。レポートポイントは、 レポートポイントテーブルに表示される。レポートポイントはサンプル添加前後で自動取 得されるが、任意で追加することができる。

補足 2-3. 自動取得されるレポートポイント

サンプル添加を行った場合、自動的に次の時点でのレポートポイントがレポートポイント テーブルに取得されている。

Fc

1



(レポートポイントテーブル)

s – 7	X					2	22	
Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
132.0	5	36881.6	0.09	0.10	0.00	0.0	Yes	baseline_1
197.0	5	59602.6	2.58	0.23	-1.38	22721.0	No	binding_1
212.0	5	36879.7	0.16	0.14	-0.05	-1.9	No	stability_1
ld bas	(レポ eline	ートオ 1	∛イ ∶	ント: 開始	名) 10 ¹	砂前		
		-		17 13 7 H		5 15 5		
bin	ding _	1		終了	5 利	前		
sta	bility _	1		終了	10 🕈	砂後		

"baseline 1"時のセンサーグラムの高さ (RU) は "O (ゼロ) RU" (RelResp 0.0) に自動設定 される。"binding_1"もしくは"stability_1"の RelResp は、"baseline_1"からの相対値(RU)を 示している。 2 つ目のサンプル添加時のレポートポイント名は、"baseline_2""binding_2" "stability_2"とな

り、RelResp は、"baseline_2"からの相対値(RU)となる。

Biacore®X100 Plus Package 日本語取扱説明書

ツールバーの Reference line (+) またはメニューバーの View \rightarrow Reference Line をクリックして、センサーグラム上にリファレンスラインを表示する。

Blacore	tion Control Soft	irare – [manual ru Is Belp	n_test sol]		-		-	-		-			
8 🖬	국 🏨 👫 🛛	らん島	Cycle: 1	• Curve	- Senoorgram Fc=1								• 造
891.0 (s) 41	의 7082 1 (RU)							1					C Lock scal
65000 -						2							
80000 -				ſ		X terdin							
55000 -	-					1							
50000									binding_2				
45000 -									- 26				
40000 -				(tazeline_1		C stackly_1	C teoretre_2		C venue 2				
35000 -		50	100		150	200	250	300		350	400	450	
Fc Time 1 132.0 197.0 2712.0 261.0 326.0 341.0	Window AbsRess 5 98601 5 98602 5 98677 5 98677 5 47053 5 98677	5D URSD 50 0.09 010 0 2.58 0.23 1 0.16 0.14 0 0.09 0.03 0 0.54 0.10 4 0.10 0.10 4	pe BeFenp 100 0.0 102 2721.0 105 -3.8 105 -3.8 1075 3 100 0.5	Baseline Id Yes bas No bin No stal Yer bas No bin No stal	eline, 1 ding, 1 ding, 1 eline, 2 ding, 2 dily, 2		100			Keywords i	n cycle 1 Value		
Inline - CO	41	Temperature: 25.0	0.40	Sensor chip: CP	6	201							
iample com	partment temperatur	e - current: 25 °C	set: 25 °C	Running standb	y, remaining time: 3.0 d	lays							

 \downarrow

マウスのカーソル(矢印)をリファレンスラインの縦線に合わせ、クリック後に任意の時 間までドラッグする。または、任意の時間上のセンサーグラムをクリックし、リファレン スラインを移動する。

 \downarrow

ツールバーの Add Report point アイコン (empile
e

<u>I</u> d:	J		
<u>T</u> ime:	291.0	(\$)	
<u>W</u> indow:	5	(s)	
🔽 <u>B</u> asel	ine		

ld:

レポートポイント名

Baseline;

相対値0(ベースライン)に設定する場合はチェックを入れる。

2-1-3. 測定の終了

サンプル添加終了後、End manual run アイコン($[L_n]$)またはメニューバーの Run → Stop Run…をクリックする。

Biacore X100
This will end the manual run when the last queued command is completed
OK Cancel

OK をクリックする。指定したコマンドを全て実行した後に、Standby 状態になる。

<u>2-1-4. Standby の終了</u>

Tools → Stop Standby... e^{-1}

2-2. ファイルの保存

得られたセンサーグラムは測定終了時に自動保存される。

追加したレポートポイントを上書き保存するには、メニューバーの File \rightarrow Save を実行する。

2-3. データの印刷

File → Print...をクリックする。

Print	
Printer Printer: HP Deskjet 5400	Series 💌
 ✓ File Properties ✓ Wizard Template ✓ Wizard Results 	Sensorgram None Current Cycle Range: All cycles Include event log for cycles
Help	OK Cancel

印刷したい項目にチェックを入れ、OK をクリックする。

File Properties	ファイルプロパティを印刷
Wizard Template	測定内容を印刷
Wizard Results	測定結果を印刷
Sensorgram	
None	センサーグラムの印刷なし
Current Cycle	表示されているセンサーグラムを印刷
Range	複数サイクル存在する場合に必要なセンサーグラムを
	印刷
All cycles	すべてのセンサーグラムを印刷
Include event log for cycles	イベントログを印刷

3. 反応速度定数・解離定数の算出

3-1. ワークフローの作成

Create Assay Workflow の、 🗾 Kinetics/Affinity...を選択する。

T

Create Assay Workflow - Kinetics/Affinity Choose ligand attachment approach Ugand detals Ligand name: My ligand is	Preview of recommended Assay Woldflow	×	
Ligand details Ligand name: My ligand is	ProteinA		∃定化またはキャプチャー ⁺るリガンド名を入力
	an antibody another protein a nucleic acid a vesicle/liposome something else		リガンドの種別を選択
no2 (e <u>H</u>	inue Cancel		

Kinetics/Affinity のダイアログが表示される。

上記項目を入力する。

	\downarrow	
Create Assay Workflow - Kinetics/Affinity		
Choose ligand attachment approach Ligand details Ligand name: ProteinA My ligand is Inother protein Ugand attachment approach キリガンドの種別	Preview of recommended Assay Workflow ■▼ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	
Recommended	リガンド抗体を利用したリガンドキ+	ァプチャー
Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5		
	リガンドをアミンカップリング法で	直接固定
Help Continue Car	icel	

補足 3-1. キャプチャー法によるリガンドの固定化

あらかじめセンサーチップ上に固定化したキャプチャー分子に、リガンドを補足する方法 を、キャプチャー法と呼ぶ。

ワークフロー作成の、"Ligand details"の"My ligand is..."で、以下のリガンドの種別を選択する

と、"Ligand attachement approach"に推奨する固定化方法が表示される。

• ...a biomolecule with a tag

My ligand is tagged with (リガンドのタグ名)	推奨固定化法
	・Sensor Chip SA に固定化
biotin	・Biotin CAPture kit によるキャプチャー
	(28-9242-33)
CCT	・抗 GST 抗体によるキャプチャー
651	(GST capture kit, BR-1002-23)
his	・Sensor Chip NTA に固定化
and the set of a	・抗タグ抗体によるキャプチャー
another tag	・直接固定化

• ...an antibody

My antibody is(抗体の種別)	推奨固定化法					
	・抗マウス抗体によるキャプチャー					
a mouse antibody	(Mouse Antibody Capture Kit,					
	BR-1008-38)					
	・抗ヒト抗体によるキャプチャー					
a human antibody	(Human Antibody Capture Kit,					
	BR-1008-39)					
	・抗体認識抗体によるキャプチャー					
another antibody	・直接固定化					

• ...another protein

リガンド認識抗体によるキャプチャーまたは直接固定化

キャプチャーキットを利用する場合は、キャプチャー分子の固定化の条件検討の必要がない。添付説明書に従い、Immobilize ウィザードで固定化を行う。キャプチャーキット以外のキャプチャー分子の固定化を行う場合は、直接リガンドを固定化する場合と同様に条件検討が必要となる。

なお、キャプチャー分子は、フローセル1および2に固定化を行う。ウィザードは、自動 的にフローセル1,2に固定化する設定になっている。 ここでは、Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5 を選択する。

icand dataile	NIDW - KINETCOMITINITY	- Provinu of recommended Assault (orkillou
igand name: My ligand is	ProteinAanother protein	Sensor Surface Preparation
igand attachment Recommended	approach	Immobilize
 ○ Capture usin; ⊙ Immobilize lig 	g own antibody and Sensor Chip CM5 and covalently using Sensor Chip CM5	Assay Find Sample Conditions
		Find Regeneration Conditions
ussay overview	Type of assay: Direct binding	Run Kinetics/Affinity Assay
	analyte ligand Selected chin: CM5	

ダイアログ左下に Ligand attachment overview、右側に Preview of recommended Assay Workflow が現れる。測定の流れを確認する。

 \downarrow

<u>**C</u>ontinue** $e \neq 0 \forall y \neq 0$ </u>

ve Assay Workflow As					
ave in folder:	Folder: 📄 naka	yama			
Set Users Comparison Software exercises Software ex	Name ProteinA/mlgG2 ProteinA/mlgG 2 5 4 1	Modified 5/9/2007 2:26:05 PM 5/9/2007 9:8:30 AM 5/9/2007 9:27:23 AM 5/8/2007 2:29:32 PM 5/8/2007 2:29:32 PM 5/8/2007 2:08:54 PM 5/8/2007 2:08:04 PM	Crea Training Training Training Training Training Training	Type Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow	
	Name: ProteinA	m lgG			
<u>H</u> elp				<u>S</u> ave	Cancel

作成したワークフローの保存先を指定する。

ワークフローを保存すると、その後、このワークフロー上で実施した測定条件や試験結果 等は、紐付けして記録される。**<u>S</u>ave** をクリックする。



すべてのステップにおいて、Run to find out...もしくは Run から、対応するウィザードを 呼び出して実行する。得られた結果は、Overview に表示され、Results reference からデ ータを見ることが出来る。条件検討のステップで、すでに条件が分かっている場合は、Enter known values...から条件を入力すると、Overview に表示される。

3-2. リガンド希釈液の pH 選択

リガンド希釈液の pH 選択方法の詳細については、Ⅲ- ii.(実験を始める前に F ページ)を 参照。

ワークフローの Sensor Surface Preparation のウィザードを実行する。

Sensor Surface Preparation									
Find Immobilization pH									
Immobilize									
\downarrow									

Find Immobilization pHの**Run to find out**...をクリックする。(既に固定化緩衝液が決まっている場合には、**Enter known values**...をクリックして、条件を入力する。)

(X. Immobilization pH Scouting - Setup	
	Detection	
	Elow cell: 2 ¥ 緩衝液名	緩衝液の pH
	Buffers	
	1 10 mM Acetate	5.5
	2 10 mM Acetate	5
	4 10 mM Acetate	4
	Help < Back Next >	
Novtsたクリックする		,
Next> @ > 9 9 7 9 0.		

 \downarrow

X Immobilization pH Scouting - Injecti	tion Parameters 🛛 🔀	
Prime		
✓ Prime before run ← 測定前の Prime	me実行の有無	
Ligand	ワークフローで設	
Name: ProteinA	 定した名前が自動	
Contact time: 180 (*) 通常は 60 利	少に変更入力される	
Surface regeneration		
This surface wash will be run once at the end	d of each cycle.	
Solution: 50mM NaOH	各リガンド添加後のセンサーチップ表	面洗
	浄溶液を指定する(通常は 50 mM NaC))
Help < Back Ne	ext > Close	

<u>N</u>ext>をクリックする。

		\downarrow			
X Immobilization pH Scouting - Rack Positi	ons				
	Position	Volume (µl)	Content	Туре	Sample 1 Buffer_name
	1	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 5.5
	2	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 5
	3	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 4.5
5 10 2	4	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 4
	5	135	50mM NaOH	Regeneration	
	H20	Full	Deionized water	Water	
				< <u>B</u> ack	<u>N</u> ext > <u>C</u> lose

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 <u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

確認画面が表示される。確認後、<u>S</u>tart をクリックする。

 \downarrow

30 3. 反応速度定数・解離定数の算出





上記サイクルを1サイクルとして、指定した緩衝液の測定を行う。

測定が終了すると、システムは自動的に Standby 状態となる。Standby の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。また、Results ダイアログが現れる。

Ţ



各緩衝液添加時のセンサーグラムが重ね書きで表示される。濃縮効果が確認できる最も高い pH 条件で固定化を行う。(上記の場合、pH5.0 を採用する。)

補足 3-3. リガンド希釈液の pH の選択方法

濃縮効果が確認できる最も高い pH を、固定化条件として採用する。

上記結果では、pH4 が最も濃縮効果が高いが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基 とのカップリング効率は低下する(活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5)。ま た、タンパク質の安定性は、一般的に中性に近い程安定である。pH を変化させても、濃縮 効果(添加時の傾き)に差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましい。上記結 果では、pH5 を選択する。

なお、Immobilization pH Scouting における濃縮レベル以上の固定化は困難である。確認 した濃縮レベル(RU)より多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて(例 100ug/ml等)、再度 Immobilization pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認する。

<u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

Save Settings ダイアログが表示される。



<u>S</u>ave をクリックする。

 \downarrow

admin @ Biacore X100 Cont 9 Yiew Run Tools <u>Wi</u> ndow H	trol Software Jelp Service3				
■ ₩◎↓ ≭ ⊵ '	ら <u> </u>				
ssay Workflow:	ProteinA_m lg	G			
Assay Overview	be of assav: Direct bin	lina			
analyte Liga	and name: ProteinA				
Sele	ected chip: CM5			Edit Assay Work	cflow
Sensor Surface Prep	paration	 I Ove	- 	Results reference	
Find Ima	mobilization pH un to find out	n values	n buffer 10 mM Acetate, pH 5	M Strategies all Securities Strategies (Strategies) All results	
Immobilize					
Assay Find Sau	mple Conditions	n values	rview	Results reference	
Find Re;	generation Conditions	n values			
Run Kinetics/Affinit	ly Assay				
Help					Close
ine - COM1 Tem	perature: 25.00 °C	Sensor chip: CM5			
		Running standby, remaining time:	7.0 days		

条件検討が終了すると、ワークフローシートの、Find Immobilization pH に (🗹) が 入る。Overview にリガンドの調製条件が表示され、Results reference で、Find Immobilization pH で実行した測定結果ファイルが表示される。ファイル名をクリックす ると、測定結果ファイルを開くことができる。複数のファイルがある場合には、All results... をクリックし、ファイルの確認を行う。

3-3. 固定化

固定化の詳細については、Ⅲ-i.(実験を始める前に B ページ)を参照。 Immobilize の ☑ [▲] をクリックする。

		\downarrow	
💹 Immobilization - Setup			
Z Chip type: CM5	~	☑ Prime before run < 測定前の Prime 実行の有無	
Flow cell 1 Immobilize flow cell <u>1</u> Aim for immobilized level	Method: Ligand solution:		
Specify contact time		固定化方法を選択(ここでは Amine (ア カップリング法)を選択)	ミン
Flow cell 2	Method:	ワークフローで保存 Maine 条件が自動入力	した
Aim for immobilized level	Ligand solution:	ProteinA in 10 mM Acetate, pH 5	
Specify contact time	Contact time:	420 (s) 添加時間 420(秒)を入力	
		< <u>B</u> ack <u>N</u> ext> <u>C</u> lose	

ワークフローで実施する固定化は、フローセル1がリファレンスセル、フローセル2がリ ガンド固定化セルとして設定されている。活性化およびブロッキング時間は7分間である。 <u>Next></u>をクリックする。



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従い必要サンプルをラックにセット する。

Ethanolamine	126 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
Ligand	75 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
空(NHS/EDC 混合用)	空/ 11 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わる。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットする。

<u>N</u>ext>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

 \downarrow

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。測定を緊急停止する場合は、 [Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押す。

↓



固定化が終了するとシステムは Standby 状態になる。測定データは入力したファイル名で 自動保存される。Immobilization Results ダイアログが表示される。



固定化量(Response Bound と Response Final)(RU)が表示される。

補足 3-4. 固定化量の評価

固定化量として Response Bound と Final の 2 種類が表示される。Bound は、リガンド添 加前後のセンサーグラムの高さの差、Final は、NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添 加終了後の差である。リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に 吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ 表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなる。 また、極めて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に(一部はリガンドが導入 されている)エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大き くなることがある。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

Immobilization Result ダイアログの Close をクリックする。センサーグラム右下の Close をクリックする。

œ ⊟ 1 @ :	1 5 4 5				
Assay Work	flow: ProteinA_n	lgG			
Assay Overview	w				
	Type of assay. Dir	oct binding			
analy	ne Selected chip: DV	5			
igan 💦	e Ligandiname: Pro	teinA.			
	_				
				Edu yezsek wennew.]
Sensor Surfa	ce Preparation		Overview	Results reference	
	Find Inmobilization pH		Immobilization buffer: 10 mM Acetate, pH 5	Immobilization pH Scouting 10/27/2008 11:14:12 AM	
	Bun to find out Entr	r known values		Al results	
					<u> </u>
Innobili	20		Method in fc 2. Amine	X- Immobilization 10/27/2008	
			Chip id: 081027-1043	Al results.	
	·	•			
Run Bind	Find Regeneration Condition Find Regeneration Condition Plan to Ind cot Entr ding Analysis Assay n	s known values			
Heb					

ワークフローシートの、Immobilize に ()が入る。Overview にリガンドの固定化方法、 固定化量等が表示される。Results reference に、固定化の結果ファイルが表示される。

(リガンド固定化量を、至適固定化量範囲内に抑える場合)

下記の Aim for immobilized level を実行する。ただし、低分子アナライトの場合は、至適固 定化量範囲が何千 RU になることがある。その場合は、34 ページから 36 ページの固定化 方法を実施する。

Immobilize の Run をクリックする。

		\downarrow
🐱 Immobilization - Setup		
Chip type: CM5	~	☑ Prime before run 測定前の Prime 実行の有無
Flow cell 1		
Immobilize flow cell <u>1</u>	Method:	
Aim for immobilized level	Ligand colution:	
	Ligana solution.	固定化方法を選択(ここでは Amine(アミン
 Specify contact time 		カップリング法)を選択)
CFlow cell 2		ワークフローで保存した
Immobilize flow cell 2	Method:	Amine 条件が自動入力
 Aim for immobilized level 	Ligand solution:	ProteinA in 10 mM Acetate, pH 5
 Specify contact time 	Target level:	1000 (RU) Wash solution: 50 mM NaOH
		目標固定化量を入力 50mM NaOH と入力
<u>H</u> elp		< <u>Back</u> <u>N</u> ext> <u>Close</u>

ワークフローで実施する固定化は、フローセル1がリファレンスセル、フローセル2がリ ガンド固定化セルと設定されている。活性化およびブロッキング時間は7分間である。 <u>N</u>ext>をクリックする。

	Position	Volume (µl)	Content	Туре
	1	175	ProteinA	Immobilizatio
	2	70	50 mM NaOH	Immobilizatio
	3	126	Ethanolamine	Immobilizatio
5 Hr P	4	85	EDC	Mix Fc 2
\mathbb{Y}	5	85	NHS	Mix Fc 2
	6	Empty	EDC/NHS, min. capacity 130µl	Mix Fc 2
	H20	Full	Deionized water	Water

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従い必要サンプルをラックにセット する。 38 3. 反応速度定数・解離定数の算出

Ligand	175 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
50mM NaOH	70 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
Ethanolamine	126 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
空(NHS/EDC 混合用)	空/ 11 mm プラスチックバイアル

流速を変更した場合には必要量が変わる。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットする。 Next>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、<u>Start</u>をクリックする。

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>Save</u>をクリックする。**測定を緊急停止する場合は、** [Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押す。

Ţ



注意) Aim for immobilized level を選択すると、固定化の前に、リガンドの濃縮効果の確認とチップ表面の洗浄を行う。

固定化が終了すると、システムは Standby 状態になる。 Standby の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。 Immobilization Results ダイアログが表示される。

X Immobiliz	zation Resul	ts					
Chip: CM5							
Flow cell	Procedure	Method	Ligand	Response Bound (RU)	Response Final (RU)	Target Reached	
2	Target level	Amine	ProteinA	283.3	451.3	Yes	
<u>H</u> elp	<u>P</u> rint						Close

固定化量(Response Bound と Response Final)(RU)が表示される。固定化量の評価については、補足 3-4.(36 ページ)を参照。

Ţ

Immobilization Result ダイアログの Close をクリックする。センサーグラム右下の Close をクリックする。

🔀 admin @ Biacore X100 Control Software		
Elle View Run Iools Window Help Service3		
Market 1 (1994) 1 (
Assay Workflow: ProteinA_m IgG		
Assay Overview		
Type of assay: Direct binding		
analyte Ligariu riailie. Pioteinia		
Selected chip: CM5		Edit Assay Workflow
Sensor Surface Preparation	Overview	Results reference
Find Immobilization pH	Immobilization buffer 10 mM Acetate, pH 5	Homobel action all Securities ST12007101437700 All results
Immobilize	Method in to 2. Anine Immobilized in to 2. 451.3 RU Chip 4. 07551-8339	E Insphilation St1000 H15015 AM All results.
Assay Find Sample Conditions Bun to find out Enter known values	Overview	Results reference
Find Regeneration Conditions		
Run Kinetics / Affiriðy Assay		
Шер		Cose
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C Sensor chip: CN	15	
Running standb	y, remaining time: 7.0 days	

ワークフローシートの、Immobilize に(🔽)が入る。Overview にリガンドの固定化 方法、固定化量等が表示される。Results reference に、固定化の結果ファイルが表示され る。

補足 3-5. 固定化実行中の中断

Aim for immobilized level を実行すると、NHS 活性化前に、リガンド溶液をフローセルに テスト添加する。濃縮効果が得られるかどうか、その結果から目的の固定化量に調整でき るリガンド溶液の状態であるかを判断する。

セットしたリガンド溶液に問題がある場合には、この時点でプログラムが自動的に終了す る。この場合、フローセルにはリガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製 し直して、同じフローセルに再度固定化を試みる。

Immobilization Results
Chip: CM5
Flow cell Procedure Method Response Final (RU) Target Reached 2 Target level Amine ProteinA N/A No - Preconcentration binding is too fast
Help Print Close
・濃縮効果が強すぎる場合 (Preconcentration binding is too fast)
テスト添加において濃縮効果が強すぎて、添加時間を短くしても目標のレベル以上に固定
化されてしまうと判断された場合は、Target Reached に Preconcentration binding is too fast
とメッセージが表示され、固定化操作が中断される。
この場合には、希釈緩衝液の pH を上げるか、リガンド濃度を下げることにより、濃縮量 を下げて再度固定化し直す。
・濃縮効果が不十分な場合 (Preconcentration binding is too slow)
テスト添加においてリガンド滚液の濃縮効果が観察されたかった場合、もしくけあまりに
ナ 浩
と判断された場合は、larget Reached に Preconcentration binding is too slow のメッセーンか
表示され、固定化が中断される。
この場合には、希釈緩衝液の pH を下げるか、リガンド濃度を上げることにより、濃縮量
を上げて再度固定化し直す。

オワった 田安化ニンプレート	今 亦再		
固定化の流速や活性化時間の変更	を行う際や、フローセル1への固定化やブロッキングを		
行う時には、ワークフローを閉じ、	$\boxed{\square}$ Wizards → Immobilization を実行する。		
Other options の (い)をクリッ	クする。		
$\mathbf{V} Wizards \rightarrow Immobilization$	をクリックする。New をクリックする。		
VI Insuchilization Colum			
Chip type: CM5	V Prime before run		
Row cell 1	Maked		
Aim for immobilized level	Igand solution:		
O Specify contact time	Target level: (RU) Wash solution: 50 mM NaOH		
Flow cell 2			
Immobilize flow cell 2	Method: Capturing molecule /		
Aim for immobilized level Specify contact time	Irgand solution: Target level: (RU) Wash solution: 50 mM NaOH		
O Blank immobilization			
Help Custom Methods	Close		
Chip type を選択し、固定化を行う	フローセルを選択する。		
Method:のプルダウンメニューをク	リ ックして選択する。		
	X Amine V		
	X- Aldenyde		
	X Maleimide X Surface thiol		
リリント 添加力法を選択する。			
OAIM for IMMODILIZED level	Target level に日际回走化重を八刀する。日勤で回走化 島を調整する		
Wash solution:	里で調査する。 固定化前に実施する濃縮効里確認後の チップ表面の		
Wash solution.	山とに前に天旭する展相効未確認及め、アノノ衣曲の 法海茨海を指定する 通常け 50mM NaOH を指定す		
	る。(固定化前の洗浄なので、リガンドへの影響はな		
	<i>.,</i>		
OSpecify contact time	入力した時間リガンドを添加する。		
OBlank immobilization	活性化・ブロッキングのみ行う。		
	\downarrow		
<u>N</u> ext>をクリックする。			

Rack Position ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 Next>をクリックする。 \downarrow 確認後、Start をクリックする。 ↓ X Biacore X100 Changes detected in wizard template Help Save Save As... Don't Save Cancel 作成したテンプレートを保存する場合は、Save As...で名前を付けて保存を行う。保存しな い場合は、Don't Save をクリックする。 結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。測定を緊急停止する場合は、 [Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押す。 測定が終了すると、システムは Standby 状態になる。 メソッドの変更とコマンドの追加 ① メソッドの変更 Prime before run Help Custon (Back Next) Doo Ligand thio 2 C/ \$ 3 OK Can Help

Methods:の各種固定化方法をクリックすると、テンプレートの固定化詳細が確認できる。 テンプレートの固定化条件を変更する際は、固定化方法を選択した状態で、Copy をクリ ックする。

<u>M</u> etho	ds: Copy of Ami Aldehydd Aldehydd Amine Maleimio Amine Maleimio Amine	ne e hiol te thiol			<u>N</u> ew Cop
Metho	d n <u>a</u> me: Copy of	Amine			
2.5	Command	Solution	Contact Time (s)	Flow Rate (µl/min)	Pre-conc
1	PRE-CONC	Specified in Immobilization Setup			
😬 🔊	EDCNHSINJECT	EDC + NHS (50:50)	420	10	Conditioning
	UCANDINIECT	Ethanolamine Specified in Immobilization Setup			Inject
1	INIECT	Ethanolamine	420	10	
1	10201		120	10	EDC & <u>N</u> HS
					Wash
					<u></u>
					Edit
					Delete
					201010
					👚 Move Up

Method に追加される。Method name で名前の変更が可能。

コマンドをダブルクリックまたは選択後 Edit...をクリックすると、各種設定の変更が可能。

② コマンドの追加 New Aldehyde Amine Ligand thiol <u>C</u>opy Delete imide Surface thiol Comr and Solution Contact Time (s) Flow Rate (ul/min) PRE-CONC Specified in Immobilization Setup EDCNHSINJECT EDC + NHS (50:50) 120 10 WASH Ethanolamine Ì INJECT Ethanolamine 420 10 EDC & <u>N</u>HS... 👪 Help OK Cancel ダイアログ右下のアイコンを選択して、コマンドを指定する。 **OK**をクリックする。 ↓ 変更および追加したメソッドは、Set up ダイアログの Method: で選択可能となる。

3-4. 相互作用測定

<u>3-4-1. マルチサ</u>イクル法による測定

マルチサイクル法の場合、サイクル毎にアナライトを解離させる。解離が速い場合は、完 全に落ちるまで解離時間を長く設定し、解離が遅い場合は、再生操作を実施する。

3-4-1-1. 特異的結合の確認および再生条件の検討

特異的結合の確認および再生条件の検討は、マニュアル測定でも、ワークフローからウィ ザードを使用した測定でも、両方対応できる。どちらかの測定方法を選択して条件検討を 行う。

<マニュアル測定による条件検討>

ワークフローを一旦閉じる。

	\downarrow	
💹 Manual	Run	
Flow]	
F E]ow rate: 30 💉 (μl/min)	
-Flow path-		
○☰	Flow path 1	
0 🚍	Flow path 2 <u>R</u> eference subtraction:	
0 🖃	Flow path 1-2 2-1	
<u>H</u> elp	Load Samples <u>S</u> tart <u>C</u> lose	e

Other options of \Box $e \neq 0$ $e \neq 0$, Manual Run... \Box $e \neq 0$

流速は 30ul/min、Flow path は 1-2、Reference subtraction は 2-1 を設定する。測定前にサン プルをセットする場合は、Load Samples…をクリックし、サンプルラックのロックを解除す る。ラックにサンプルをセットし、装置に戻して、再びロックする。 Start をクリックする。

↓

ファイル名を入力し、Save をクリックする。


フローセル1は赤、フローセル2は緑、2-1の差し引きは茶色のセンサーグラムで表示される。





アナライトの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定する。(各コマンドの説明は補足 3-8. 46ページを参照。または、 ③ Help をクリックしサポートナビゲーターを参照する。)



Inject		X
Vial/well <u>p</u> osition:	1	ОК
<u>C</u> ontact time:	60 (s)	Cancel
		<u>H</u> elp
Minimum required	volume in vial/well for this ir	njection: 50 (μl)

Ţ

Vial/well position:の しとクリックし、アナライトをセットした位置にマウスを移動しクリックする。

	\downarrow	
Inject		
Vial <u>p</u> osition:	11	ОК
<u>C</u> ontact time:	120 (s)	Cancel
		<u>H</u> elp
Minimum required	volume in vial for this inje	ction: 100 (μl)

Contact time:にアナライト添加時間(通常 60 秒~120 秒)を入力すると、必要量がダイ アログ下部に表示される。相互作用測定の条件検討の詳細は、Ⅳ-i.(実験を始める前に G ページ)を参照。

OK をクリックする。

<u>48</u> 3. 反応速度定数・解離定数の算出

(測定を開始した後に	、アナライトをラックにセットする場合は、一旦、 Cancel をクリッ
クし、Inject ダイアロ	ノグを解除する。)
	↓
Load Samples アイコ	ン 🔍 を選択する。
	Rack Unlocked
1 1 1 1 1	Rack Unlocked
1 1 1 1 1	
1 1 1 1 1	Help OK
	公要量分注したアナライトをセットする。
- ラックを再びシステ <i>L</i>	ュにセットし、OK をクリックする。再び、Injection command 🇪
- - クリックする。	
1 1 1	\downarrow
	Inject 🛛
	Vial/well position:
	Contact time: 60 (s) Cancel
	Help
	Minimum required volume in vial/well for this injection: 50 (µl)
_ アナライトをセットし	ンた位置および添加時間(秒)を入力する。

 \downarrow



Fc=2-1 の差し引きのセンサーグラムを表示させる。特異的結合が見られれば、サンプル添加後のセンサーグラムは上昇する。



Fc=1 のセンサーグラムを確認する。非特異的吸着があれば、サンプル添加後のセンサーグ ラムは上昇する。

再生条件の検討

Regeneration		×
Vial <u>p</u> osition:	12	OK
<u>C</u> ontact time:	60 (s)	Cancel
		<u>H</u> elp
Minimum required	d volume in vial for this i	njection: 70 (μl)

再生溶液のセット位置を選択、添加時間(s)を入力し、OK をクリックする。



(再生溶液添加後の結合量の確認)

 \downarrow



リファレンスラインの縦軸を、左ボタンのクリック&ドラッグでアナライト添加前に移動 させ、View \rightarrow Baseline をクリックする。リファレンスラインウィンドウの RU が 0 にな る。



再生溶液添加後に、リファレンスラインの縦軸を左ボタンのクリック&ドラッグで移動し、 再生後のアナライト残存量を確認する。

新規サイクルへの変更

New Cycle...アイコン () もしくは、メニューバーの Commands → New Cycle...を $0 \neq 0 \neq 0$

New Cycle	×
Flow <u>F</u> low rate: <u>30</u> (μl/min)	OK Cancel
Flow path	<u>H</u> elp
Flow path 2 <u>Reference</u> subtraction: Flow path 1-2 2-1	

流速、Flow path の設定を確認後、**OK** をクリックする。 測定サイクルが切り替わる。

測定の終了

End manual run \mathcal{P} \mathcal{P} \mathcal{P} at \mathcal{P} $\mathcal{P$

Biacor	e X100 🛛 🗙
2	This will end the manual run when the last queued command is completed
	OK Cancel

OK をクリックする。指定したコマンドを全て実行した後に、Standby 状態になる。

<ウィザード測定による条件検討>

アナライトの添加条件の検討

Assay	
	Find Sample Conditions
	Run to find out Enter known values
	Find Regeneration Conditions
	Run to find out
F	Run Kinetics/Affinity Assay
(Run

ワークフローシートの Find Sample Conditions \rightarrow Run to find out...をクリックする。(既 に条件が決まっている場合には、Enter known values...をクリックして、条件を入力する。)

Ţ

	Assay Conditions Sample - Injection Sequence	
フローセル 1,2、 Reference	Detection	ワークフローで指定したセ
subtraction が自動選択され	Elow cell: 1.2 V Reference subtraction	ンサーチップが自動選択さ
ている(リファレンスセル	Injections in analysis cycle Flow Cell 1 Flow Cell 2	れる
(フローセル 1)と固定化セ		
ル (フローセル 2) の差し引		取入5 アノイトの添加が
きセンサーグラムがリアル	Sample 2 Sample	
タイムに表示される)	Sample 3	チェックを入れると、相互作
	Sample 4	用検討後に再生溶液を添加
		することができる(初めて相
	Sample 5	互作用の検討を行う際は、次
		${\cal O}$ Find Regeneration Step
		で検討を行うことをお勧め
		する)
	Use GST Capture Kit	
	Help < <u>Back Next></u> Close]

<u>N</u>ext>をクリックする。

54 3. 反応速度定数・解離定数の算出

🔀 Assay Conditions Sample - System Preparation	×
Prime	
Conditioning	
Help < Back Next > Close	

Prime before run

測定前に Prime を実行する場合は、チェックする。

<u>N</u>ext>をクリックする。

		\downarrow			
💹 Assay Co	nditions Sample - Injec	tion Parameters	×		
Sample					
N <u>a</u> me:	mouse IgG	◆ アナライト名	3		
Contact tim	ne: 60 (s) アナラ	・ イトの添加時間(秒)	(通常 120~	~180 秒間)	
Sample	Concentration (µg/ml)	Conce	ntration <u>u</u> nit:		
1	0.002	µg/ml	~	濃度単位	
2	0.02				
3	0.2				
4	2		アナライト	濃度を入力(予測	IJ
5	20	J	される解離	定数値(M)付近の)
Hala			濃度が理想)	
<u>H</u> eip					

<u>N</u>ext>をクリックする。



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いアナライトをラックにセットする。<u>N</u>ext>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

 \downarrow

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>S</u>ave をクリックする。測定を中断する場合は、補足 3-2.(30 ページ)を参照する。





測定が終了後、Results ダイアログが表示される。システムは Standby 状態になる。 レポートポイントテーブルで結合量の確認を行う。

Next>をクリックする。

		\downarrow			
X Assay Conditions	s Sample - Save Settings				X
☑ <u>U</u> se these settings Sample	in the workflow steps	Co <u>m</u> ment:			
N <u>a</u> me:	mouse IgG				
Contact time:	60 (s)				
Dissociation time:	130 (s)				
Max concentration:	20 🖌 μg/ml				
Regeneration is ne	eded				
<u>H</u> elp			Back	<u>S</u> ave	Close

Save Settings ダイアログが表示される。

測定結果を考慮し、添加時間、解離時間、最大濃度、再生の必要性を決定する。 <u>S</u>ave をクリックする。

 \downarrow

TRAINING @ Biacore X100 Control Software		
le View Tools Help		
┯ @ ≠		
Assay Workflow: ProteinA m lgG		
Ligand Attachment Overview		
Type of assay: Direct binding		
anabite Selected chip: CM5		
Ligand name: ProteinA		
ligana		
	Edit Assay Workflow	
Course Courfe on Businessetting		
	Overview Results reference	
	All results	
Run to find out Enter known values		
	- Instaliation 5/11/2007	
	Immobilized in fc 2: 451.3 RU	
Run	Chip Id: 070511-0939 All results	
Assav	Overview Pecults reference	
Find Sample Conditions	Sample name: mouse IgG	
Run to find and	Contact time: 60 s All results All results	
	Regeneration: Needed	
Find Regeneration Conditions		
Run to find out Enter known values		
Run Kınetics/Athnity Assay		
Run		
Help		Close
line - COM1 Temperature: 25.00 °C Sensor chip: CM5		
Running standby, re	maining time: 4.0 days	
Start 🖉 🛱 🍋 » 🕅 TRAINING 🛛 Bacore 🦉 condition se	mple 9 😽 TRAINING @ Biscore	2 4 2 4 4 4 6 6 153 PM

ワークフローシートの、Assay \rightarrow Find Sample Conditions の Run to find out…に(\square) が入る。Overview にアナライト添加時間と解離時間、最大濃度等が表示される。

再生条件の検討

Find Regeneration Conditions \rightarrow **Run to find out...**をクリックする。(既に条件が決まって いる場合は、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。)

1

	\checkmark	
	X- Regeneration Scouting - Injection Sequence	
	Chip	
	Flow cell: 2 Chip type: CM5 V	
	Injections in analysis cycle	
	Flow Cell 1 Flow Cell 2	
	Sample Capture	
	Regen. Sample	
	Enhancement	
		2回までの再生溶液の添加
		 が可能
		73 . 7 . 7 . 7
	Help < Back Next > Close	
<u>N</u> ext>をクリックする。		
	. .	
		•
	Assay Conditions Sample - System Preparation	
	Prime	
	Conditioning	
	Run conditioning cycle	
	Help < Back	
Prime before run	測定前に Prime を実行する場合は、	チェックを入れる。
Novt>をクリックする		
<u>M</u> extr 2 7 7 7 7 9 0°		
	\downarrow	
	Regeneration Scouting - Injection Parameters	×
	Sample	
	Concentration: 20 µg/mi	
	Contactigme: [ov [8]	
	Help (Back Next > Close	

Injection Parameters ダイアログが表示される。

サンプルの各項目は、Find Sample Conditions で保存した条件が自動入力される。

(変更を行う場合は、Find Sample Conditions の Enter known values...をクリックして、 条件を入力する。)

<u>N</u>ext>をクリックする。

💹 Regeneratio	on Scouting - Experime	ental Parameters	
Regeneration p Stabilization p	arameters veriod: 0 (s)		
Experimental de N <u>u</u> mber of cor Number of c <u>v</u>	sign nditions: 2 cles for each condition:	v	Lock: ☐ <u>S</u> olutions ✓ Contact <u>ti</u> mes
Condition	Regeneration solution	Contact time (s)	
1	10mM Gly-HCl pH3.0	30	
2	10mM Gly-HCl pH2.0	30	
Help			< Back Next > Close

L

Experimental Parameters ダイアログが表示される。

Regeneration parameters • • • アナライト添加前のベースラインの安定化時間(秒) Stabilization period: Experimental design • • • Solutions のみにチェックを入れると、1 種類の再生溶 Lock: 液について、添加時間を変更した検討が可能。 Contact time のみにチェックを入れると、複数種類の 再生溶液について、一定の添加時間で検討が可能。 Solutions および Contact time のチェックを入れると、1 種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討。 Solutions および Contact time のチェックを外すと、再 生溶液の種類および添加時間を個別に検討可能。 再生溶液の種類の数を選択する。7種類まで選択可能。 Number of conditions: Number of cycles for each conditions: 各再生溶液を用いた相互作用測定の繰り返しサイクル 数。5 サイクルまで選択可能。 Settings · · · **Regeneration solution** 再生溶液名

Contact time(s)再生溶液添加時間(秒)再生溶液を2回添加する場合には、Regeneration solution1 および2、Contact time 1 および2のカラムが表示される。

<u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 <u>N</u>ext>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、<u>S</u>tart をクリックする。

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。測定を中断する場合は、補足 3-2.(30ページ)を参照する。



アナライト添加と再生溶液添加を1サイクルとして、指定したサイクル数実行する。



測定が終了後、Result ダイアログが表示される。システムは Standby 状態になる。

●Trend Chart タブ	
Sample Response	アナライトの結合量のプロット
Baseline	アナライト添加前のベースラインのプロット
Display · · ·	1st cycle のチェックを外すと、1 サイクル目のデータ
	が消える。
Conditions:	結果の抽出が行える。

評価方法;

横軸は、サイクルナンバー、左の縦軸は、"Sample Response"(アナライトの結合量)、右 の縦軸は"Baseline"(ベースラインの高さ)の RU を表している。1 サイクル目の Sample Response と Baseline の高さは、再生条件を検討する前の値である。上記結果は、2 サイク ル目から 4 サイクル目が、1 つめの再生条件の検討結果を表している。Baseline プロット が右肩上がりで、Sample Response プロットが右肩下がりになっていることから、アナライ トの結合が完全に解離していない様子を表す。5 サイクル目から 7 サイクル目が、2 つめ の再生条件を検討した結果である。Sample Response プロットも Baseline プロットも、5 サ イクル目のレスポンスが、2 サイクル目のレスポンスと同様の値であり、7 サイクル目ま で安定してプロットされていることから、結合したアナライトが解離し、かつ再現性よく 結合が見られていることを示す。よって、2 つめに検討した再生条件が至適条件と言える。 ●Sensorgrams タブ



Display · · ·

Cycles:

選択しているセンサーグラムの重ね書きが表示される。 測定サイクルの抽出が行える。

適当な再生条件が見つかれば、<u>N</u>ext>をクリックする。

(適当な再生条件が見つからない場合は、Close をクリックし、再度、再生条件について 検討しなおす。)

	\downarrow	
Xee Regeneration Scouting - Save Settings		4
✓ Use these settings in the workflow steps	チェックを入れると、以下の余件がワー	. יי
Stabilization period: 0	_フローに反映される Comment:	
First regeneration	ベースライン安定化時間(秒)を入力す	る
10mM Giy-HCl pH2.0 30	採用する再生条件を選択する	
Second regeneration		
Solution Contact time (s)		
<u>H</u> elp	Back Save Close	

Save をクリックする。保存条件が最終測定プログラムに反映される。

 \downarrow

Mar TRAINING @ Biacore X100 Control Software		
Assay Workflow: ProteinA_m IgG		
Ligand Attachment Overview		
Type of assay: Direct binding		
analyte Selected chip: CM5		
Ligand name: ProteinA		
	Edit Assay Workflow	
Sensor Surface Preparation	Overview Results reference	
Find Immobilization pH	Immobilization buffer 10 mM Acetate, pH 5	
Run to find out Enter known values	All results	
Immobilize	Method in fc 2: Amine Immobilization 5/11/2007	
	Chip id: 070511-0939 All results	
Assay	Overview Results reference	
Find Sample Conditions	Sample name: mouse IgG Kathara Sample Sample concentration: 20 ug/ml	
Run to find out Enter known values	Contact time: 60 s All results Dissociation time: 130 s	
	Regeneration: Needed	
Find Regeneration Conditions	Regeneration solution: 10mM Gly-HCl pH2.0	
	Contact time: 0 s All results	
Enter known values		
Run Kinetics/Affinity Assay		
Run		
Help		Close
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C Sensor chip: CM5		
Running standby, rer	naining time: 4.0 days	Friday, May 11, 200
🛃 Start 🔰 🙆 🙆 🎥 🦥 🔣 TRAINING @ Biacore 📑 reg 4 - Paint	🤣 TRAINING @ Biacore 🛅 Kinetics_ProteinA	🧟 🌒 🌋 🍕 💁 🧕 3:30 PM

ワークフローシートの、Assay → Find Regeneration Conditions の Run to find out…に ($\boxed{}$)が入る。Overview に再生溶液名、添加時間等が表示される。

3-4-1-2. 測定

Run Kinetics/Affinity Assay \rightarrow **Run** ε 2 <math><math>**Run**<math>

\downarrow	
Kinetics/Affinity - Injection Sequence	X
Detection Elow celt 1.2	Chip Chip type: CM5
Kinetics type Single-cycle Multi-cycle	
Injections in analysis cycle Flow Cell 1 Flow Cell 2	
Sample	Ligand cagture
Regeneration	✓ <u>S</u> ample
	<u>Regeneration</u>
	Use GST Capture Kit
Help < Back	Next> Dose

Injection Sequence ダイアログが表示される。**Kinetics type** で、**Multi-cycle** を選択する。 リガンドキャプチャーの有無、再生溶液添加回数を決定する。 <u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

Kinetics/Affinity - System Preparation
Prime
■ Prime before run ● 測定前の Prime 実行の有無
Conditioning
✓ Run startup cycles ← アテライト測定前のダミーランの有無
Solution: Buffer - 通常、ランニング緩衝液を使用
Number of cycles: 1 最低 3 サイクルは実施
<u>H</u> elp < <u>Back N</u> ext > <u>C</u> lose

<u>N</u>ext>をクリックする。

X Kinetics/A	ffinity - Injection Parameters	×
Sample C <u>o</u> ntact time	e: 120 (s) <u>D</u> issociation time: 120 (s)	
First regenerati	tion	
Solution:	10mM Gly-HCl pH2.0	
Contact time	: 30 (s) Stabilization <u>p</u> eriod: 0 (s)	
<u>H</u> elp	< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u>	lose

Injection Parameters ダイアログが表示される。ワークフローで決定した条件が自動入力 されている。この画面での変更は不可能。

 \downarrow

<u>N</u>ext>をクリックする。

	Eample id	Concentration Concentration		Concentration	
	Sample iu	Hw (Da)	µg/ml 🔻	μM 🔻	
	mouse IgG	150000	0	0	
	mouse IgG	150000	1.25	8.33E-3	
	mouse IgG	150000	2.5	16.7E-3	
	mouse IgG	150000	5	33.3E-3	
	mouse IgG	150000	10	66.7E-3	
	mouse IgG	150000	20	0.133	
	mouse IgG	150000	0	0	
	mouse IgG	150000	5	33.3E-3	
)					
		-			

Sample ダイアログが表示される。Sample id および Concentration は、ワークフローで検討した情報が自動入力される。アナライト濃度は、最大濃度から2倍希釈系列で5点と、 ゼロ濃度を2点、濃度系列の中1点を2回測定する設定となっている。必要に応じて変更可能。単位の変更は ▼をクリックする。詳細は、IV-ii.(実験を始める前に I ページ)を参照する。

Samples のテーブルの MW(Da)に、アナライト分子量(Da)を入力する。



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 Next>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、<u>S</u>tart をクリックする。

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>S</u>ave をクリックする。測定を中断する場合は、補足 3-2. (30 ページ)を参照する。

.....

Ļ

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になる。**Standby** の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち 上がり、取得データが開く。



補足 3-9. サンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルの場合、同一バイアルに設定されており、添加回数分の量 が設定されている。サンプリング設定を変更したい場合は、プーリング機能の設定を変更 する。

X Kinetics/Af							
		Position	Volume (µl)	Content	Туре	Sample 1 MW (Da)	Sample 1 Conc (r
		1	915	m IgG	Sample	150000	0
		2	105	m IgG	Sample	150000	2.4
		3	105	m IgG	Sample	150000	12
5		4	105	m IgG	Sample	150000	60
		5	105	m IgG	Sample	150000	300
		6	105	m IgG	Sample	150000	1500
(_)(¤		7	1275	Butter	Startup		
	/~ /~		225	10mM Clu-HCl pH2 0	Begeneration		
		2	223 Eull	Deiopized water	Water		
		<					>
	Menu Load Samples				< <u>B</u> a	ack <u>N</u> ext	:> <u>C</u> lose
enu ກ່ວ Al	itomatic Positioni	ng を退	⊈.ऽั°。 ↑				.13
enu から Au utomatic Posi Change the order	Itomatic Positioni Itioning r in which the samples ar	ngを追 e positione	≝ِرَيْ ↓ d by order	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi
enu から Au Itomatic Posi hange the orde Region	Itomatic Positioni Itioning r in which the samples ar Color	ngを追 e positione	⊈رکٽی ↓ d by order	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi
enu から Au Itomatic Posi hange the orde Region ample	itomatic Positioni itioning r in which the samples ar Color	ngを通 e positione	للاريخي» ↓ d by order Pooling	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi
enu から Au Itomatic Posi hange the orde Region ample tartup	Itomatic Positioni Itioning It	ngを追 e positione	للاريخي» ب d by order Pooling 'es ▼ 'es ▼	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au Itomatic Posi hange the order Region iample itartup	Itomatic Positioni	ngを追 e positione	للاريخي» d by order Pooling 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au Itomatic Posi hange the order Region iample itartup	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للارية d by order Pooling es • 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au Itomatic Posi hange the order Region itartup tegeneration	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للارية d by order Pooling 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au Itomatic Posi hange the order Region Region itartup	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للاريةي d by order Pooling 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au utomatic Posi ihange the order Region Gample Startup Regeneration	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للاري d by order Pooling 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au utomatic Posi Change the order Region Sample Startup Regeneration	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للارية d by order Pooling 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au utomatic Posi ihange the order Region Gample itartup Regeneration	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للاري d by order Pooling 'es ب 'es ب	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au utomatic Posi Change the order Region Sample Startup Regeneration	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للارية d by order Pooling 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow
enu から Au Itomatic Posi Change the order Region Startup Regeneration	Itomatic Positioni Itioning It	ngを通 e positione	للاري d by order Pooling 'es • 'es • 'es •	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow

"Pooling"の項目は、通常、Yes になっている。

添加回数分、分注して配置したい場合は、"Pooling"のプルダウンメニューから No を選択し、 ダイアログ右下の OK をクリックする。

3-4-2. シングルサイクル法による測定

シングルサイクル法の詳細については、IV-ii .(実験を始める前に I ページ)を参照。 Run Kineteics/Affinity Assay の 25 をクリックする。

	\downarrow	
	Kinetics/Affinity - Injection Sequence	
	Detection Chip Elow cell: 1,2 ✓ Reference subtraction Chip type: Clip type:	45
	Kinetics type Single-cycle Multi-cycle	
シングルサイクル法	Flow Cell 1 Flow Cell 2	
もしくはマルチサイ クル法の選択	Sample Concentration 1	ne
	Sample Concentration 2 Sample 5 concentration	is per cycle.
	Sample Concentration 3	
	Sample Concentration 4	
	Sample Concentration 5	
	✓ <u>R</u> egeneration	n 1 🗸
		取 総 展 反 が 加 夜 、 冉 生 を 行 う 場 合 に チェ ッ
	Lise GST Ca	pture Kit クを入れる
	Help < Back Next >	Close

アナライトを連続 5 回添加する。(ワークフローモードでシングルサイクル法を実施する 場合は、アナライト添加回数は5回で変更ができない。Wizardを用いる場合は、添加回数 を 2~5 回まで選択可能である。)



最終濃度を添加した後、リガンドを再生したい場合は(再生の詳細はIV-i (実験を始める 前に Hページ)を参照)、Regeneration にチェックを入れ、回数を決定する。

\downarrow
💹 Kinetics/Affinity - System Preparation
Prime
■ Prime before run ● 測定前の Prime 実行の有無
Conditioning
Run conditioning cycle
Startup
☑ <u>Bun startup cycles</u> ← アナライト測定前のダミーラン実行の有無
<u>Solution:</u> Buffer ← 通常、ランニング緩衝液を使用
Number of cycles: 1 v 最低3サイクルは実施
<u>H</u> elp < <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

<u>N</u>ext>をクリックする。

Kinetics/Affinity - Inj	ection Parameters 🛛 🔀
Sample Contact time: 120 (s)	Dissociation time: 600 (s)
Help	< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

 \downarrow

アナライトの添加時間、解離時間を入力する。

*ここで入力する解離時間は、最終濃度の添加後を指す。添加の間の解離時間は、添加終 了後の洗浄、次の添加の準備の時間として、プログラム上決められている。 Next>をクリックする。

 \downarrow

	Eample id	MW (Da)	Highest	Cond	centration	Dilution	Conc (1)	Conc (2)	Conc (3)	Conc (4)	Conc (5)
	Sample lu	MW (Da)	nM	•	µg/ml 📼	Dilucion	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)
m IgG		150000	0		0		0	0	0	0	0
m IgG		150000	0		0		0	0	0	0	0
m IgG		150000	1500		225	5	2.40	12.0	60.0	300	1.50E+3

Sample id:アナライト名MW (Da):アナライトの分子量 (Da)Highest Concentration:5 濃度の中で一番高い濃度
* 左列の濃度単位は変更可能。どちらかが必ずモル濃度になる。Dilution:希釈倍率
* 希釈倍率を入力すると、Conc(1)~Conc(5)の濃度が自動入力さ

ダブルリファレンスを取るために、0 濃度は必ず1サイクル実施する。また、固定化直後で、ベースラインがドリフトしている場合は、0 濃度のサイクルを複数回実施することをお勧めする。アナライト濃度は、Ko値付近が望ましいが、Ko値が不明な場合は、1.5 uMより5倍希釈系列で濃度を振り、暫定Ko値を求めた後、Ko値付近で濃度を振る。

れる。

*再生できないもしくは再生条件を決定していないアナライトで、解離時間を長くとるこ とで自然解離させることができる場合は、複数回の測定もしくは複数サンプルの測定が可 能。

<u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

Kinetics/Affinity - Rack Positions						
	Position	Yolume (µl)	Content	Туре	Sample 1 MW (Da)	Sample 1 Conc (r
	1	915	m IgG	Sample	150000	0
	2	105	m IgG	Sample	150000	2.4
	3	105	m IgG	Sample	150000	12
5 40 2	4	105	m IgG	Sample	150000	60
	5	105	m IgG	Sample	150000	300
	6	105	m IgG	Sample	150000	1500
	7	1275	Buffer	Startup		
	8	105	Buffer	Startup		
	9	225	10mM Gly-HCl pH2.0	Regeneration		
4	H2O	Full	Deionized water	Water		
	<					>
Help Menu Load Samples				< <u>B</u> a	ck <u>N</u> ext	> <u>C</u> lose

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 <u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

\downarrow	
Biacore X100	×
Changes detected in wizard template Help Save Save As Don't Save Cancel	7
Changes detected in wizard template Help Save Save Save	

作成したテンプレートを保存する場合は、Save As...で名前を付けて保存する。保存しない 場合は、Don't Save をクリックする。

Ţ

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。測定を中断する場合は、補足 3-2.(30 ページ)を参照する。

 \downarrow

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になる。**Standby** の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち 上がり、取得データが開く。

別のアナライトについても測定を行う場合には、固定化し直すことをお勧めする。リガン ドが安定な場合には、ランニング緩衝液を流し続けることで、結合したアナライトを自然 解離させ、再測定することができる。

補足 3-10. サンプリング設定

<u>H</u>elp

"Pooling"の項目は、通常、Yes になっている。

ダイアログ右下の OK をクリックする。

サンプル位置は、同一サンプルの場合、同一バイアルに設定されており、添加回数分の量 が設定されている。サンプリング設定を変更したい場合は、プーリング機能の設定を変更 する。

		Position	Volume (µl)	Content	Туре	Sample 1 MW (Da)	Sample 1 Conc (r
		1	915	m IgG	Sample	150000	0
		2	105	m IgG	Sample	150000	2.4
		3	105	m IgG	Sample	150000	12
	5 10 2	4	105	m IgG	Sample	150000	60
	w V	5	105	m IgG	Sample	150000	300
		6	105	m IgG	Sample	150000	1500
() (a)		2 7	1275	Buffer	Startup		
ala	~ /w	8	105	Buffer	Startup		
$\left \left(\right) \right ^{m}$)// 9	225	10mM Gly-HCl pH2.0	Regeneration		
		// н20	Full	Deionized water	Water		
	Automatic Positio	ninaと追	崔いい。				
		ningを連	≝ <i>、</i> 、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、				
itomatic Po	sitioning	ningをき	選 _• ぶ。 ↓				
utomatic Po	Automatic Position b <mark>sitioning</mark> der in which the samples	ning∕≿⊉ are positione	≝,S°, ↓ d by order	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi
Itomatic Po hange the ord	Automatic Position Sitioning Jer in which the samples Color	are positione	≝, Sĩ。 ↓ d by order Pooling	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi
tomatic Po hange the ord Region ample	Automatic Position Sitioning der in which the samples Color Cyan	are positione	選ູວ``。 ↓ d by order Pooling 'es ▼	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi
Itomatic Po hange the ord Region iample itartup	Automatic Position psitioning der in which the samples Color Color Cyan Cyan	are positione	ظیکتی d by order Pooling 'es ب 'es ب	ing the regions.	The first re	egion in the	e list is positioned fi Move Up Move Dow

添加回数分、分注して配置する場合は、"Pooling"のプルダウンメニューから No を選択し、

Biacore[®]X100 Plus Package 日本語取扱説明書

OK

Cancel

Apply

3-5. データ解析

3-5-1. カイネティクス解析

ここでは、シングルサイクル法で取得したデータを元に説明するが、マルチサイクル法の 場合も、解析手順および評価方法は同じである。



Biacore X100 Evaluation Software のツールバーの <u>Kinetics / Affinity</u> をクリックする。(ア ナライト情報の入力ミスがある場合は、解析前に変更を行う。補足 3-11.(73 ページ)を参 照する。)

Cycle	Cycle Purpose	Sample	Conc [µg/ml]	MW [Da]	Reset All Filt	ers
1	Startup	Buffer				
2	Startup	Buffer				
3	Startup	Buffer			Add Keywo	rd
4	Startup	Buffer				
5	Startup	Buffer			Rename Keyv	vord
6	Sample	LNFP2	0	853.8	Remove Kee	
7	Sample	LNFP2	2	853.8	Henove Rey	
8	Sample	LNFP2	3.9	853.8		
9	Sample	LNFP2	7.8	853.8		
10	Sample	LNFP2	15.6	853.8		
12	Sample		S1.20	000.00		
12	Sample	LNEP2	125	853.8	Concentration Ur	iit
14	Sample	LNFP2	250	853.8	µg/ml	*
15	Sample	LNFP2	500	853.8		
16	Sample	LNFP2	1000	853.8		
17	Sample	LNFP2	0	853.8		
18	Sample	LNFP2	250	853.8		

 \downarrow



同一アナライト名のセンサーグラムが重ね書き表示される。複数のアナライトについて同時測定している場合は、Sample:右側の [▶] をクリックし、解析したいアナライトを選択する。その中から、必要に応じて、センサーグラムの抽出を行う。補足 3-12.を参照する。

補足 3-12. センサーグラムの抽出

エアーの混入などの理由で、解析データから外したいセンサーグラムがある場合は、その センサーグラムに相当する、テーブル中の Include カラムのチェックを外す。

nclude	Cycle#	Sample	Conc (nM)	Flow (µl/min)	Contact Time (s)	Diss. Time (s)	Ligand	^
Y	2 2'	489	0 0 0 0 0	30	180.0	1800.6		
V	3 2	489	0 0 0 0 0	30	180.0	1800.7		
	4 Z	489	1 3.5 7.5 15 30	30	180.0	1800.7		

<u>N</u>ext>をクリックする。

Biacore[®]X100 Plus Package 日本語取扱説明書

74 3. 反応速度定数・解離定数の算出



濃度 0 のセンサーグラムが、全センサーグラムから差し引かれる。濃度 0 のセンサーグラ ムが複数ある場合には、平均したセンサーグラムが差し引かれる。 必要に応じて、データの部分的な削除を行う。補足 3-13.を参照する。

補足 3-13. センサーグラムの部分的な削除

エアーの混入などが理由で、センサーグラム上に削除したい領域がある場合は、マウスの 左ボタンをドラッグし、削除したい領域を拡大したのち、マウスの右ボタンをドラッグし て、削除領域を選択する。拡大図を解除する場合は、センサーグラムを含まない余白をダ ブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻る。



76 3. 反応速度定数・解離定数の算出



Model:でフィッティングに採用する反応モデルを選択する, ▼ をクリックすると、全ての 反応モデルが表示される。反応様式が不明な場合は、1:1 Binding を選択する。反応モデルに ついては、補足 3-14.を参照する。

補足 3-14. 反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とする。

• 1:1 Binding

リガンドとアナライトが一分子同士で結合する最も単純な反応モデル。

- $A + B \Leftrightarrow AB$
- Bivalent Analyte

アナライトが二価もしくはホモ二量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が二 次的に結合する反応。

 $A + B \Leftrightarrow AB$, $AB + B \Leftrightarrow AB2$

- Heterogeneous Analyte
 競合反応モデル。リガンド上の一種類の結合部位を二種類のアナライトが競合する反応。
- $A1 + B \Leftrightarrow A1B, A2 + B \Leftrightarrow A2B$
- Heterogeneous Ligand

アナライトに対して親和性の異なる二つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並 行して結合する反応モデル。

- $A + B1 \Leftrightarrow AB1$, $A + B2 \Leftrightarrow AB2$
- Two state Reaction (conformation change)

リガンドとアナライトの一分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション 変化を起こす反応モデル。

 $A + B \Leftrightarrow AB \Leftrightarrow AB^*$

選択後、Fit をクリックする。



 \downarrow

黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより作成されたフィッティングカーブです。 1:1 Binding を選択した場合、センサーグラム下に Quality Control テーブルが表示される。

補足 3-15. 解析結果の Quality Control 5項目の品質評価結果が、ステータスマークで表示される。 ステータスマーク 🔗 クオリティーアセスメントをパスしている。 🖖 クオリティーアセスメントの許容限界に近い。 😢 クオリティーアセスメントをパスしていない。 😑 ニュートラルまたは各自で確認が必要。 品質評価基準 Quality Control Report Residuals Parameters (1) Kinetic constants are within instrument specifications. (2) Kinetic constants appear to be uniquely determined. **(3**) No significant bulk contributions (RI) found. **(4**) Check that sensorgrams have sufficient curvature. **(5**) Examine the residual plot. Pay attention to systematic and non-random deviations.

Biacore[®]X100 Plus Package 日本語取扱説明書

解析結果が表示される。

78 3. 反応速度定数・解離定数の算出

①反応速度定数はシステムのスペック範囲内か?

スペック範囲 $k_a = 10^3 \sim 10^7$ (1/Ms)、 $k_d = 10^{-5} \sim 0.5$ (1/s)

②各パラメータは独立して算出されているか?

k_a、k_dおよび Rmax について、解析結果に与えるパラメータ間の相関性を確認している。マ ストランスポートリミテーション下で測定した結果は、k_aと k_dに相関性が見られる。

③溶液効果の値(RI)の妥当性は?

リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いている場合には、RI は限りなく ゼロとなるが、結合・解離速度が速くセンサーグラムが箱型の場合には、結合レスポンス を、RIと算出してしまうことがある。

④センサーグラムはカーブを描いているか?
 センサーグラムの結合・解離領域の形状が直線的な場合には、算出された各パラメータの
 信頼性は低い。

⑤フィッティングカーブに対して測定プロットは、ランダムに分散しているか? Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムに プロットが分散している場合は、良好なフィッティングと判断する。ランダムに分散して いない場合には、算出された各パラメータの信頼性は低い。



uality Cor	ntrol Report	Residuals	Parameters								
urve	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
	1.576E+6	0.003258	2.067E-9	40.00		1.641E+7				0.249	1
					1.000E-9		30.00	5.100E+7	0.1585		
					3.500E-9				0.4129		
ycle: 4					7.500E-9				-0.1520		
					1.500E-8				-0.5975		
					3.000E-8				-0.1167		

<i>k</i> a (1/Ms)	結合速度定数
<i>k</i> _d (1/s)	解離速度定数
K₀(M)	解離定数
Rmax(RU)	アナライトの結合最大量
RI(RU)	溶液効果(bulk effect)
Chi ² (RU ²)	カイ二乗

●Residuals タブ 死	浅差プロットが確認できる
-----------------	--------------

●Parameters タブ

各解析値のスタンダードエラーが確認できる

(再解析を行う場合には、引き続き解析を行う。補足 3-17.(82ページ)を参照。)

Finish をクリックする。

 \downarrow

解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。ファイル名は 自動的にアナライト名が採用される。



引き続き、同時に測定した別のアナライトについて解析する場合は、ツールバーの <u>
べKinetics / Affinity</u>をクリックする。

補足 3-16. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッ ティングカーブがほぼ重なる。特に、センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッ ティングは良好ではないと判断する。また、解析結果の RI 値が 0(RU)に近いか確認する。 統計学的には、以下の各項目を確認する。

<u>Residual</u>

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムに プロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できる。



<u>Chi²値</u>

測定データとフィッティングカーブ間の差を示す。良好なフィッティングでは、シグナル ノイズの平均平方値に一致する。

U-value

解析値が信頼できるか否かを判断する値。15 以下であれば問題ない。25 以上の場合には、 算出された値の信頼性は低い。

SE (Standard error)

Parameters タブをクリックすると、各パラメータについて SE(標準誤差)が表示される。 各パラメータの解析結果に対して、SE の値が 10%以下であれば、良好であると判断する。

フィッティングが良好ではない要因
①フィッティングに採用したモデルが異なっている
②箱型のセンサーグラムである
③経時的なリガンドの活性低下が考えられる
④再生が不十分である
⑤アナライト濃度の調製ミスが考えられる 等

①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析する。
 ②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがある。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからで
ある。この場合は、RI=O(Constant)として、再解析する必要がある。

複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセン サーグラムにおいて k_a, k_d, Rmax が同一のパラメータであることが前提となる。しかし、上 記③~⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータは必ず しも一致しない。

例えば、Rmax は、リガンドに対するアナライトの最大結合量(RU)であり、理想的な実験 系では、連続して同ーセルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同 一値である。ところが、リガンドの再生が不十分な場合や、再生操作によりリガンドの活 性がサイクル毎に低下している場合には、Rmax はサイクル毎に低下する。フィッティング が良好でない要因が、測定結果から明らかに Rmax にある場合は、Rmax が同一パラメータ であることを解除し再解析する。



果が表示される。終了後、**Finish** をクリックする。

Biacore®X100 Plus Package 日本語取扱説明書



解析パラメータ(Rmax,RI)の解析設定条件を変更し再解析する場合は、Add Fit ボックスの Parameters をクリックする。

.

1:1 Binding				
Name	Fit		Initial value	
ka	Fit global		1e5	Default
kd	Fit global		1e-3	Default
Rmax	Fit global	-	YMax	Default
tc	Fit global	-	1e8	Default
RI	Fit local	-	YMax/5	Default

経時的なリガンドの活性低下や、マルチサイクル法において、再生の不十分さが原因で、 全センサーグラムにおいて、Rmax を同一パラメータとみなせない場合、Rmax の行の Fit カ ラムの[■]をクリックし、Fit local を選択する。

箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにもか かわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の Fit カラムの▼をクリックし、Constant を選択する。Initial value は自動的に 0 が入力され る。

Parameter Setting ダイアログ中の **OK** をクリックすると、条件が適用される。 引き続き、Fit をクリックすると解析結果が表示される。

補足 3-18. 解析履歴から	の結果の消去
任意の解析結果を履歴から氵	肖去する場合は、 Current Fits ボックス中の目的のデータを選
択する。	
	Current Fits 1: 1:1 Binding 2: Two State Reaction
	Delete
Delete をクリックする。	
	\downarrow
確認ダイアログが表示される	3.
消去する場合は OK をクリッ	ックする。
	\downarrow
解析結果が Current Fits ボッ	ックスから消去される。

3-5-2. 平衡値解析

ここでは、マルチサイクル法で取得したデータを元に説明するが、シングルサイクル法の 場合も、解析手順および評価方法は同じである。



ツールバーの **Kinetics / Affinity** をクリックする。(サンプル情報の入力ミスがある場合は、 解析前に変更を行う。補足 **3-11**.(73 ページ)を参照。)

同一アナライト名のセンサーグラムが重ね書き表示される。

🙈 Kinet	ics / Affi	nity - Select Curv	es [Create]					×
Curves-								
Sample:	LNFP-	1	V Temperature:	25 💌	Curve: Fc=2-	1	~	
Include	Cycle#	Sample	Conc (µM)	Flow (µl/min)	Contact Time (s)	Diss. Time (s)	Ligand	<u>^</u>
	4	LNFP-1	0	30	60.0	60.1		
	5	LNFP-1	500	30	60.0	60.1		
	6	LNFP-1	250	30	60.1	60.0		
✓	7	LNFP-1	125	30	60.0	60.0		
	8	LNFP-1	62.5	30	60.0	60.1		
	9	LNFP-1	31.25	30	60.0	60.0		
✓	10	LNFP-1	16	30	60.0	60.1		
	11	LNFP-1	8	30	60.0	60.0		
L	12	LNFP-1	4	30	60.1	60.0		<u> </u>
35 30 25 25 30 30 - 25 - 38 5 30 - 30 - 30 - 25 - 30 - 25 - 20 - 30 - 25 - 20 - 30 - 25 - 30 - 25 - 30 - 25 - 25 - 30 - 25 - 30 - 25 - 30 - 25 - 30 - 25 - 30 - 25 - 30 - 25 - 30 - 25 - 20 - 30 - 25 - 20 - 30 - 25 - 20 - 20 - 20 - 20 - 20 - 20 - 2	enerado e	อังาร์วิจารสารรับการรับอยู่จึงสองจ 1					Slavang-Kovillanskava vov	- 2001110CK
-60		-40 -20	0 2	0 40	60	80	100	120 140
Shou	w concentr	ation series 🛛 🔽 Sh	ow blank(s) 📃 Shi	Time ow average blank	(5)			s
Help		<u>M</u> ultiple Rmax	Adjust Injection	on Start		< <u>B</u> ac	k <u>N</u> ext>	Cancel

\downarrow

必要に応じて、センサーグラムの削除を行う。補足 3-12.(74 ページ)を参照。<u>N</u>ext>をク リックする。



濃度0のセンサーグラムが、全センサーグラムから差し引かれる。

<u>A</u>ffinity>をクリックする。



アナライト添加終了直前のレスポンス(RU)を平衡値(Req 値)(RU)とし、各アナライ ト濃度における Req 値がプロットされる。

<u>N</u>ext>をクリックする。

				\downarrow				
🙈 Kine	tics / Affinity - Fit	Affinity [Create]						X
∽ Add Fit Model:	Steady State Affini	ty	Current Fits	ormed]	Description:]	
	Parameters		Rt		Delete			
RU 180 -	Ι							
160 -	1							•
140 -	-							
120 -	1			•				
100 ·	-							
Resp.	-		•					
60 -	-	•						
40 -	•							
20 -								
0.	0	2e-4	4e-4	6e Concentra	-4	8e-4	1e-3	1.2e-3
Hel;	þ			Concentra		[< <u>B</u> ack	Finish Cancel

Fit Affinity ダイアログが表示される。Model は、Steady State Affinity が自動選択される。 Fit をクリックする。



offset(RU)	溶液効果(bulk effect)
Chi ² (RU ²)	カイ二乗
●Parameters タブ	解析に利用した各種パラメータの確認が可能。

終了後、<u>F</u>inish をクリックする。

 \downarrow

Evaluation Explorer ウインドウの Kinetics/Affinity フォルダに、解析結果が追加される。ファ イル名は、アナライト名が自動入力される。

 \downarrow

引き続き、同時に測定した別のアナライトについて解析する場合は、ツールバーの <u>Kinetics / Affinity</u>をクリックする。

4. 結合の有無の確認、スクリーニング

4-1. ワークフローの作成

結合解析を行う際には、Create Assay Workflow の、 💹 Binding Analysis...を選択する。

Create Assay Workflow - Binding Analy Ligand detais Ligand name: My ligand is	Sis Preview of recommended Assay Woldflow	
Ligand details Ligand name: My ligand is	ProteinA a biomolecule with a tag an antibody another protein a nucleic acid a vesicle/liposome something else	 固定化またはキャプチャー するリガンド名を入力 リガンドの種別を選択
Нер	Continue Cancel	

Binding Analysis のダイアログが表示される。

Create Assay Workflow - Binding Analysis	
Ligand details Ligand details Preview of recommended Assay Workflow Ligand name: ProteinA	
My ligand is	
*リガンドの種別に従い固定化方法の一覧が現れる。	
Recommended リガンド抗体を利用したリガンドキャプチ	イー
Capture using own antibody and Sensor Chip CM5 Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5	
リガンドをアミンカップリング法で直接固	定
Help Continue Cancel	

補足 4-1. キャプチャー法によるリガンドの固定化

あらかじめセンサーチップ上に固定化したキャプチャー分子に、リガンドを補足する方法 を、キャプチャー法と呼ぶ。

ワークフロー作成の、"Ligand details"の"My ligand is..."で、以下のリガンドの種別を選択すると、"Ligand attachement approach"に推奨する固定化方法が表示される。

• ...a biomolecule with a tag

My ligand is tagged with (リガンドのタグ名)	推奨固定化法
	・Sensor Chip SA に固定化
biotin	・Biotin CAPture kit によるキャプチャー
	(28-9242-33)
CCT	・抗 GST 抗体によるキャプチャー
651	(GST capture kit, BR-1002-23)
his	・Sensor Chip NTA に固定化
	・抗タグ抗体によるキャプチャー
another tag	・直接固定化

• ...an antibody

My antibody is(抗体の種別)	推奨固定化法				
	・抗マウス抗体によるキャプチャー				
a mouse antibody	(Mouse Antibody Capture Kit,				
	BR-1008-38)				
	・抗ヒト抗体によるキャプチャー				
a human antibody	(Human Antibody Capture Kit,				
	BR-1008-39)				
a sa a bha an a sa b'fh a shu	・抗体認識抗体によるキャプチャー				
another antibody	・直接固定化				

• ...another protein

リガンド認識抗体によるキャプチャーまたは直接固定化

キャプチャーキットを利用する場合は、キャプチャー分子の固定化の条件検討の必要がない。添付説明書に従い、Immobilize ウィザードで固定化を行う。キャプチャーキット以外のキャプチャー分子の固定化を行う場合は、直接リガンドを固定化する場合と同様に条件検討が必要となる。

なお、キャプチャー分子は、フローセル1および2に固定化を行う。ウィザードは、自動 的にフローセル1,2に固定化する設定になっている。

a te Assay Work Jigand details	cflow - Binding Analysis		Preview of recommended Assau Workflow
igand name:	Proteiná		
gana name.	THOUTH		
My ligand is	another protein	~	Sensor Surface Preparation
			Find Immobilization pH
Ligand attachment a	approach		
Recommended			
Capture using	own antibody and Sensor Chin I	CM5	
 Capital o doing Immobilize lig: 	and acualently using Sensor Chir	- CME	Assay
	and covalently using sensor chi	J CMD	
			Find Sample Conditions
			Find Regeneration Conditions
Assay overview			Run Binding Analysis Assay
	Type of assay:	Direct binding	
	analyte Selected chip:	CM5	
	linend		
	ngano		

ここでは、Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5 を選択する。

ダイアログ左下に Ligand attachment overview、右側に、Preview of recommended Assay Workflow が現れる。測定の流れを確認する。 <u>C</u>ontinue をクリックする。

Save in folder:	Folder: 📄 na	kavama			
Software exercises System check Software exercises Software exercises	Name ProteinA/mIgC 070509 2 5 4 1	Modified 2 5/9/2007 2:26:05 PM 5/9/2007 9:58:30 AM 5/9/2007 9:27:23 AM 5/8/2007 2:31:33 PM 5/8/2007 2:9:32 PM 5/8/2007 2:9:32 PM 5/8/2007 2:08:54 PM 5/8/2007 2:08:04 PM	Crea Training Training Training Training Training Training	Type Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow Assay Workflow	
	Name: Protein	A_m lgG			

ワークフローの保存先を指定する。

ワークフローを保存すると、その後、このワークフロー上で実施した測定条件や試験結果 等は、紐付けして記録される。**<u>S</u>ave** をクリックする。



すべてのステップにおいて、Run to find out...もしくは Run から、対応するウィザードを 呼び出して実行する。得られた結果は、Overview に表示され、Results reference からデ ータを見ることが出来る。条件検討のステップで、すでに条件が分かっている場合は、Enter known values...から条件を入力すると、Overview に表示される。

4-2. リガンド希釈液の pH 選択

リガンド希釈液の pH 選択の詳細については、Ⅲ- ii.(実験を始める前に F ページ)を参照。 ワークフローの Sensor Surface Preparation のウィザードを実行する。

Sensor Surface Preparation				
	Find Immobilization pH			
	Run to find out Enter known values			
	mohilizo			
	Run			
	ļ			

Find Immobilization pH の Run to find out...をクリックする。(既に固定化緩衝液が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。)

X Imn	nobilization pH Se	couting - Setup		<∫
Detec	tion			
<u>F</u> low	cell: 2 🗸	緩衝液名	緩	衝液の pH
Buffer	rs		- 7	
	Buf	fer Name	pH	
1	10 mM Acetate		5.5	
2	10 mM Acetate		5	
3	10 mM Acetate		4.5	
4	10 mM Acetate		4	
5				
				J
<u>H</u> e	elp < B	ack <u>N</u> ext >	<u>C</u> lose]

必要に応じ、緩衝液名および緩衝液の pH を変更する。また、削除および追加設定も可能。 <u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

Ke Immobilization pH Scouting - Injection Parameters	
Prime	
■ Prime before run ◆ 測定前の Prime 実行の有無	
Ligand	ワークフローで設定
Name: ProteinA	した名前が自動入力
Contact time: 180 (s) ← 通常は 60 秒に変更	される
Surface regeneration	
This surface wash will be run once at the end of each cycle.	
Solution: 50mM NaOH ← 各リガンド添加後の	センサーチップ表面洗浄
	常は 50 mM NaOH)
<u>H</u> elp < <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose	e

<u>N</u>ext>をクリックする。

	Position	Volume (µl)	Content	Туре	Sample 1 Buffer_name
	1	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 5.5
	2	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 5
	3	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 4.5
14	4	45	ProteinA	Sample	10 mM Acetate 4
	5	135	50mM NaOH	Regeneration	
	H20	Full	Deionized water	Water	
AT OF 6 8 L					

Ţ

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 Next>をクリックする。

 \downarrow

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>S</u>ave をクリックする。測定を中断する場合は、補足 4-2.(95 ページ)を参照する。

 \downarrow

 \downarrow

補足 4-2. 測定の中断					
測定を中断する場合、ツールバーの Run → Stop Run…をクリックする。					
\downarrow					
Biacore X100					
This will stop the run Help Stop Run Cancel					
Stop Run をクリックする。					
\downarrow					
Run Stopped Finishing current cycle, please wait Abort cycle by [Ctrl]+[Break]					
測定中サイクルの全コマンドを実行後、 Standby 状態になる。					
全コマンド実行終了を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの[Ctrl]キーと					
[Break]キーを同時に押す。					
\downarrow					
Biacore X100 Image: Second state of the system? (Recommended) You have aborted the run. Do you want to wash the system? (Recommended) Yes No システムの洗浄を行う場合には、Yes をクリックする。洗浄後停止する。					



上記サイクルを1サイクルとして、指定した緩衝液の測定を行う。

Ţ

測定が終了すると、システムは自動的に Standby 状態となる。 Standby の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。また、 Results ダイアログが現れる。



各緩衝液添加時のセンサーグラムが重ね書きで表示される。濃縮効果が確認できる最も高い pH 条件で固定化を行う。(上記の場合、pH5.0 を採用する。)

補足 4-3. リガンド希釈液の pH の選択方法

濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。

上記結果では、pH4 が最も濃縮効果が高いが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基 とのカップリング効率は低下する(活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5)。ま た、タンパク質の安定性は一般的に中性に近い程安定である。pH を変化させても、濃縮効 果(添加時の傾き)に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましい。上 記結果では、pH5 を選択する。

なお、Immobilization pH Scouting における濃縮レベル以上の固定化は困難である。確認した濃縮レベル(RU)よりもっと多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて(例 100ug/ml 等)、再度 Immobilization pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認する。

濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用する。

<u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

Save Settings ダイアログが表示される。

Kernet Immobilization pH Scouting - Save Se	ttin <u>es 🛛 🕅 🗙</u>
<u>U</u> se these settings in the workflow steps <u>■ Buffer Comr </u>	チェックを入れると、保存結果がワー nen クフローシートに反映される
Buffer name pH 10 mM Acetate, pH=5.5 10 mM Acetate, pH=5 10 mM Acetate, pH=4.5 10 mM Acetate, pH=4	から、決定した pH の条件を選択する
<u>H</u> elp	< <u>B</u> ack <u>S</u> ave <u>C</u> lose

Save をクリックする。

 \downarrow

🔀 admin 💿 Biacore X100 Control Software				
File View Run Tools Help Service3				
<mark>ଜ</mark> ⊌ ¥◎ ⊁ ち 4 ち				
Assay Workflow: ProteinA_mlg	G			
Assay Overview				
Type of assay: Direct b	nding			
analyte Selected chip: CM5				
ligand Ligand name: Protein4				
			Edit Assay Workflow	
Sonsor Surface Droparation				
Find Immobilization pH	i	Immobilization buffer: 10 mM Acetate, pH 5	X Immobilization pH Scouting	i
Run to find out Enter kno	wn values		All results	
	·			
Immobilize				
Run				
Assay		Overview	Results reference	
Find Sample Conditions				
Bun to find out Enter kno	wn values			
Find Regeneration Conditions				
Enter kno	wn values			
Run Binding Analysis Assay				
Run				
Help				Ciose
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C	Sensor chip: CM5			
	Running standby, remainin	ng time: 7.0 days		

条件検討が終了すると、ワークフローシートの、Find Immobilization pH に ()が 入る。Overview にリガンドの調製条件が表示され、Results reference で、Find Immobilization pH で実行した測定結果ファイルが表示される。ファイル名をクリックす ると、測定結果ファイルを開くことができる。複数のファイルがある場合には、All results... をクリックし、ファイルの確認を行う。

Biacore®X100 Plus Package 日本語取扱説明書

4-3. 固定化

固定化の詳細については、Ⅲ-i.(実験を始める前に B ページ)を参照。 Immobilizeの ^I■■■■をクリックする。

		\downarrow
💹 Immobilization - Setup		
Chip type: CM5	~	☑ Prime before run < 測定前の Prime 実行の有無
Flow cell 1 Immobilize flow cell 1 Aim for immobilized level	Method: Ligand solution:	
 Specify contact time 		固定化方法を選択(ここでは Amine(アミン カップリング法)を選択)
Flow cell 2	Method:	ワークフローで保存した Maine 条件が自動入力
Aim for immobilized level	Ligand solution:	ProteinA in 10 mM Acetate, pH 5
 Specify contact time 	Contact time:	420 (s) 本 添加時間(420秒)を入力
		< <u>B</u> ack <u>N</u> ext> <u>Close</u>

ワークフローで実施する固定化は、フローセル1がリファレンスセル、フローセル2がリ ガンド固定化セルとして設定されている。活性化およびブロッキング時間は7分間である。 <u>Next></u>をクリックする。

.

	Position	¥olume (µl)	Content	Туре
	1	126	Ethanolamine	Immobilization
	2	75	ProteinA	Immobilization
	3	85	EDC	Mix Fc 2
5 100 - 12	4	85	NHS	Mix Fc 2
$\Box \sim 2$	5	Empty	EDC/NHS, min. capacity 130µl	Mix Fc 2
	H20	Full	Deionized water	Water

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従い必要サンプルをラックにセット する。

Ethanolamine	126 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
Ligand	75 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 ul/ 11 mm プラスチックバイアル
空(NHS/EDC 混合用)	空/ 11 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わる。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットする。 Next>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。測定を緊急停止する場合は、 [Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押す。補足 4-2.(95 ページ)を参照。

↓



固定化が終了すると、システムは Standby 状態になる。Standby の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。Immobilization Results ダイアログが表示される。

4. 結合の有無の確認、スクリーニング 101



固定化量(Response Bound と Response Final)(RU)が表示される。

補足 4-4. 固定化量の評価

固定化量として Response Bound と Final の 2 種類が表示される。Bound は、リガンド添 加前後のセンサーグラムの高さの差、Final は、NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添 加終了後の差である。リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に 吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ 表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなる。 また、極めて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に(一部はリガンドが導入 されている)エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大き くなることがある。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

Immobilization Result ダイアログの Close をクリックする。センサーグラム右下の Close をクリックする。



ワークフローシートの、Immobilize に(🗹)が入る。Overview にリガンドの固定化方法、 固定化量等が表示される。Results reference に、固定化の結果ファイルが表示される。



日本語取扱説明書

↓
Rack Position ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。
Next>をクリックする。
↓ 確認後 Start をクリックすろ
Changes detected in wizard template
Help Save Save As Don't Save Cancel
作成したテンプレートを保存するかどうか、メッセージが表示される。必要があれば、Save
As…で名前を付けて保存を行う。保存しない場合は、Don't Save をクリックする。
\downarrow
結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。 測定を緊急停止する場合は、
[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押す。補足 4-2.(95 ページ)を参照。
\downarrow
 測定が終了すると、システムは Standby 状態になる。
メソッドの亦再とコマンドの追加
Immobile for cell Markout Mar
Specify contract time
Found 2 Immobiles flow cel 2 Method: Method: Method: Copularies methods / Copularies methods /
C Andros minoblad fired Gand station Specify contact time Taget level: [PU] Wash scholar: [20 with HalbH
Heb Cuton Methods. Qost. Herb Dore
Setup ダイアログの Custom Methodsをクリックする。
Ka Custom Methods
Meetings Meeting Weight And Addrey de New Weight Annie Copy Weight Annie Copy Weight Annie Copy
Surface thick
Method ngme:
Pre-conc. 22
Injust.
EDC & LIM'S _ BA
Edt.
Biacore®X100 Plus Package

Methods:の各種固定化方法をクリックすると、テンプレートの固定化詳細が確認できる。 テンプレートの固定化条件を変更する際は、固定化方法を選択した状態で、Copy をクリ ックする。



Method に追加される。Method name で名前の変更が可能。

コマンドをダブルクリックまたは選択後 Edit...をクリックすると、各種設定の変更が可能。

```
② コマンドの追加
                                                                                             <u>N</u>ew
                                       X Aldehyde
                                                                                             <u>С</u>ору
                                       X - Amine
X - Ligand thiol
X Maleimide
                                                                                           Delete
                                       X- Surface thiol
                                    od name: Copy of Amine
                                     Command Solution
                                                              Contact Time (s) Flow Rate (µl/min)
                                  PRE-CONC Specified in Intrituuma
EDCNHSINJECT EDC + NHS (50:50)
Fthanolamine
                                             Specified in Immobilization Setup
                                                                                10
                                                                                              ning...🏈
                                  WASH Ethanolamine
                                                                                                ×
                                    INJECT
                                             Ethanolamine
                                                                                10
                                                                                         EDC & <u>N</u>HS... 选
                                                                                         4
                                                                                  OK Cancel
                                 <u>H</u>elp
ダイアログ右下のアイコンを選択して、コマンドを指定する。
OKをクリックする。
                                                                 ↓
変更および追加したメソッドは、Set up ダイアログの Method: で選択可能となる。
```

4-4. 特異的結合の確認および再生条件の検討

特異的結合の確認および再生条件の検討は、マニュアル測定でも、ワークフローからウィ ザードを使用した測定でも、両方対応できる。どちらかの測定方法を選択して条件検討を 行う。

4-4-1. マニュアル測定による検討

ワークフローを一旦閉じる。

🔀 Manual Run	X
Flow	
<u></u> <u>F</u> low rate: <u>30</u> (μl/min)	
Flow path	
O 🚍 Flow path 1	
Flow path 2 <u>R</u> eference subtraction:	
Help Load Samples <u>S</u> tart <u>C</u> lose	

流速は 30ul/min、Flow path は 1-2、Reference subtraction は 2-1 を選択する。測定前にサン プルをセットする場合は、Load Samples…をクリックし、サンプルラックのロックを解除す る。ラックにサンプルをセットし、装置に戻して、再びロックする。 Start をクリックする。

↓

ファイル名を入力し、**Save**をクリックする。



フローセル1は赤、フローセル2は緑、2-1の差し引きは茶色のセンサーグラムで表示される。

補足 4-6. センサーグラムの表示の変更 ・1 本表示 View → Show Only Current Curve 右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択する。 ・全表示 View → Show All Curves すべてのセンサーグラムが表示される。 ・種別表示 View → Show Curves of Same Type カーブリストから、各フローセルのセンサーグラムまたは差し引きセンサーグラムを選択する。



アナライトの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定する。(各コマンドの説明は補足 4-7. 参照。または、 3 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照する。)



Injection command 🗪 をクリックする。

Inject		×
Vial/well <u>p</u> osition:	1	ОК
<u>C</u> ontact time:	60 (s)	Cancel
		<u>H</u> elp
Minimum required	volume in vial/well for this in	jection: 50 (μl)

Ţ

Vial/well position:の

の
を
クリックし、アナライトをセットした位置にマウスを移動し
クリックする。

	\downarrow	
Inject		X
Vial <u>p</u> osition:	11	ОК
<u>C</u> ontact time:	120 (s)	Cancel
		<u>H</u> elp
Minimum required	d volume in vial for this inje	ection: 100 (μl)

Contact time:にアナライト添加時間(通常 60 秒~120 秒)を入力すると、必要量がダイ アログ下部に表示される。バイアルに必要量を準備し、ラックにセットする。相互作用測 定の条件検討の詳細は、IV-i.(実験を始める前に G ページ)を参照。 OK をクリックする。

Biacore®X100 Plus Package 日本語取扱説明書 4. 結合の有無の確認、スクリーニング 109

(測定を開始した後に	こ、アナライトをラックにセットする場合は、一旦、 Cancel をクリッ
」 クし、Inject ダイア□	コグを解除する。)
Load Samples アイコ	↓ ン <mark>◎↓</mark> を選択する。
	Rack Unlocked
1 1 1 1 1 1 1 1 1	Rack Unlocked Insert the rack and click OK.
	Help OK
ラックを取り出し、&	必要量以上分注したアナライトをセットする。
- ラックを再びシステ <i>L</i>	ムにセットし、OK を選択する。再び、Injection command 💉 をクリ
- ックする。 -	
	Ļ
	Inject 🔀
	Vial/well position:
	Contact time: 60 (s) Cancel
	<u>H</u> elp
	Minimum required volume in vial/well for this injection: 50 (μl)
アナライトをセットし	- た位置および添加時間(秒)を入力する。

 \downarrow



Fc=2-1 の差し引きのセンサーグラムを表示させる。特異的結合が見られれば、アナライト 添加後、センサーグラムは上昇する。



Fc=1 のセンサーグラムを確認する。非特異的吸着があれば、アナライト添加後のセンサー グラムは上昇している。

再生条件の検討

Regeneration		X	
Vial <u>p</u> osition:	12	ОК	
<u>C</u> ontact time:	60 (s)	Cancel	
		<u>H</u> elp	
Minimum required volume in vial for this injection: 70 (μ l)			

再生溶液のセット位置を選択、添加時間(s)を入力し、OK をクリックする。



(再生溶液添加後の結合量の確認)

View → Reference Line $\frac{1}{2}$ をクリックする。



リファレンスラインの縦軸を、左ボタンのドラッグでアナライト添加前に移動させ、View → Baseline をクリックする。リファレンスラインウィンドウの RU が 0 になる。



再生溶液添加後に、リファレンスラインの縦軸を左ボタンのドラッグで移動し、再生後の アナライト残存量を確認する。

新規サイクルへの変更

Cycle 🔀
Cancel
w path Help
Flow path 2 <u>R</u> eference subtraction: Flow path 1-2 2-1
Elow path 1-2 2-1

流速、Flow path の設定を確認後、**OK** をクリックする。 測定サイクルが切り替わる。

測定の終了

End manual run \mathcal{P} \mathcal{P}

Biacor	e X100
2	This will end the manual run when the last queued command is completed
	OK Cancel

OK をクリックする。指定したコマンドを全て実行した後に、システムは **Standby** 状態になる。

<u>4-4-2. ウィザード測定による検討</u>

アナライトの添加条件の検討

Assay							
	Find Sample Conditions						
	Run to find out						
	Find Regeneration Conditions						
	Run to find out Enter known values						
<u>-</u> ,							
Run Kinetics/Affinity Assay							
Run							

ワークフローシートの Find Sample Conditions \rightarrow Run to find out...をクリックする。(既 に条件が決まっている場合には、Enter known values...をクリックして、条件を入力する。)

 \downarrow

	X Assay Conditions Sample - Injection Se	quence 🛛 🕅		
フローセル 1,2 と、	Detection	Chip		ワークフローで指定したセ
Reference subtraction が自	Flow cell: 1,2 Reference subtraction	Chip type: CM5		ンサーチップが自動選択さ
動選択されている(リファレ	Injections in analysis cycle Flow Cell 1 Flow Cell 2			れる
ンスセル (フローセル 1) と				キュプイルーンオスリンド
固定化セル(フローセル 2)	Sample 1	Capture		
の差し引きセンサーグラム	Sample 2	✓ <u>S</u> ample		を固定化する場合は、チェッ
が川アルタイムに基示され	Sample 3	Recentration 1		クを入れる
	Jumple 5			
る)	Sample 4	\backslash		最大 5 アナフィトの添加か
	Sample 5			可能
			\setminus	
				チェックを入れると、相互作
				用検討後に再生溶液を添加
				することができる(初めて相
		Use GST Capture Kit		互作用の検討を行う際は、次
				$\ensuremath{\mathcal{O}}$ Find Regeneration Step
	Help < <u>B</u> ack	<u>N</u> ext > <u>C</u> lose		で検討を行うことをお勧め
<u>N</u> ext>をクリックする。				する)
	\downarrow			

X Assay Conditions Sample - System Preparation	$\mathbf{ imes}$
Prime	
Conditioning	
Run conditioning cycle	
Help < Back Next > Close	

Prime before run

測定前に Prime を実行する場合は、チェックする。

<u>N</u>ext>をクリックする。

		\downarrow		
💹 Assay Co	nditions Sample - Injec	tion Parameters	×	
Sample				
N <u>a</u> me:	mouse IgG	◆ アナライト 彳	Ż.	
Contact tin	ne: 60 *(s) アナラ	イトの添加時間(秒)	(通常 120~	~180 秒間)
Sample	Concentration (µg/ml)	Conce	entration <u>u</u> nit:	
1	0.002	μg/mi	×	濃度単位
2	0.02			
3	0.2			
4	2		アナライト	濃度を入力(予測
5	20		よして知識	
	*******	<u>^</u>	される脌離	正 叙 値 (M) 付 近 の
			濃度が理想)
<u>H</u> elp		< <u>B</u> ack <u>N</u> ext >		

<u>N</u>ext>をクリックする。



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いアナライトをラックにセットする。<u>N</u>ext>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

 \downarrow

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。測定を中断する場合は、補足 4-2.(95ページ)を参照する。






測定が終了後、Results ダイアログが表示される。システムは Standby 状態になる。 レポートポイントテーブルで結合量の確認を行う。

<u>N</u>ext>をクリックする。

		\checkmark	
X Assay Condition	s Sample - Save Settings		X
✓ <u>U</u> se these settings Sample	in the workflow steps	Comment:	
N <u>a</u> me:	mouse IgG		
Contact time:	60 (s)		
Dissociation time:	130 (s)		
Max <u>c</u> oncentration:	20 🖌 µg/ml		
✓ <u>R</u> egeneration is ne	eeded		
<u>H</u> elp			<u>Back</u> <u>Save</u> Close

L

Save Settings ダイアログが表示される。

測定結果を考慮し、添加時間、解離時間、最大濃度、再生の必要性を決定する。 Save をクリックする。

 \downarrow

TRAINING @ Biacore X100 Control Software			
e View Tools Help			
] ₩ @, <i>#</i>			
Assay Workflow: ProteinA_m lgG			
Ligand Attachment Overview			
Type of assay: Direct binding			
analyte Selected chip: CM5			
Ligand name: ProteinA			
		Edit Assay Workflow	
Comercia Conference Ducana antica			
Sensor Surface Preparation	Overview	Results reference	
	initiation baller to him Accade, prio	All results	
Run to find out Enter known values		<u>All coolor</u>	
Immobilize	Method in fc 2: Amine Immobilized in fc 2: 451.3 RU	M Inmobilization 5/11/2007 11:50:13 AM	
Run	Chip id: 070511-0939	All results	
		1	
Assay	Overview	Results reference	
Find Sample Conditions	Sample concentration: 20 µg/ml	All results	
Run to find out Enter known values	Dissociation time: 130 s Regeneration: Needed		
		!	
Find Regeneration Conditions			
Run to find out Enter known values			
Run Kinetics/Affinity Assay			
Run			
Help			Close
nline - COM1 Temperature: 25.00 °C Sensor chip: CM5			
Running standby, rer	naining time: 4.0 days		

ワークフローシートの、Assay→Find Sample Conditions の Run to find out…に(🔽) が入る。Overview にアナライト添加時間と解離時間、最大濃度等が表示される。

再生条件の検討

Find Regeneration Conditions \rightarrow **Run to find out...**をクリックする。(既に条件が決まって いる場合は、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力する。)

	\downarrow
	K Regeneration Scouting - Injection Sequence
	Detection Chip Flow cell: 2 Chip type: CM5
	/ Injections in analysis cycle
	riow Cell 1 riow Cell 2
	Regen. ≧≊mple
	Enhancement 2 回までの再生溶液の添加
	✓ Regeneration 1 ▼ ← 」 」 G C C F H 上 / H / K F / H / K F / H / K F / H / K F / H / K F / H / K / H
	Help < Back Next > Close
Next>をクリックする。	
_	\downarrow
	K Assay Conditions Sample - System Preparation
	Prime Prime before run
	Conditioning
	Run conditioning cycle
Prime before run	測定前に Prime を実行する場合は、チェックを人れる。
<u>N</u> ext>をクリックする。	
	Sample
	Contact time: 60 (s)
	Help (Back Next> Close

Injection Parameters ダイアログが表示される。

Sample の各項目は、Find Sample Conditions で保存した条件が自動入力される。

(変更を行う場合は、Find Sample Conditions の Enter known values…をクリックして、 条件を入力する。)

<u>N</u>ext>をクリックする。

		\downarrow		
X Regeneratio	on Scouting - Experime	ental Parameters		×
Regeneration p Stabili <u>z</u> ation p	arameters period: 0 (s)			
Experimental de N <u>u</u> mber of cor Number of c <u>v</u> e	nditions: 2	v	Lock: ☐ Solutions ✔ Contact times	
Settings				
Condition	Regeneration solution	Contact time (s)		
1	10mM Gly-HCl pH3.0	30		
2	10mM Gly-HCl pH2.0	30		
<u>H</u> elp			< <u>B</u> ack <u>N</u> ext >	<u>C</u> lose

Experimental Parameters ダイアログが表示される。

Regeneration parameters • • •

Stabilization period:

アナライト添加前のベースラインの安定化時間(秒)

Experimental design • • •

Lock:

Solutions のみにチェックを入れると、1 種類の再生溶
液について、添加時間を変更した検討が可能。
Contact time のみにチェックを入れると、複数種類の
再生溶液について、一定の添加時間で検討が可能。
Solutions および Contact time のチェックを入れると、1
種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討。
Solutions および Contact time のチェックを外すと、再
生溶液の種類および添加時間を個別に検討可能。
再生溶液の種類の数を選択する。7種類まで選択可能。

Number of cycles for each conditions:

各再生溶液を用いた相互作用測定の繰り返しサイクル 数。5 サイクルまで選択可能。

Settings · · ·

Number of conditions:

Regeneration solution 再生溶液名

Contact time(s)

再生溶液添加時間(秒)

再生溶液を 2 回添加する場合には、Regeneration solution1 および 2、Contact times 1 および 2 のカラムが表示される。 Next>をクリックする。



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 <u>N</u>ext>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、<u>Start</u>をクリックする。

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックする。測定を中断する場合は、補足 4-2.(95 ページ)を参照。



アナライト添加と再生溶液添加を1サイクルとして、指定したサイクル数実行する。



測定が終了後、Result ダイアログが表示される。システムは Standby 状態になる。

●Trend Chart タブ	
Response	アナライトの結合量のプロット
Baseline	再生後のベースラインのプロット
Display • • •	1st cycle のチェックを外すと、1 サイクル目のデータ
	が消える。
Conditions:	結果の抽出が行える。

評価方法;

横軸は、サイクルナンバー、左の縦軸は、"Sample Response"(アナライトの結合量)、右 の縦軸は"Baseline"(ベースラインの高さ)の RU を表している。1 サイクル目の Sample Response と Baseline の高さは、再生条件を検討する前の値である。上記結果は、2 サイク ル目から 4 サイクル目が、1 つめの再生条件の検討結果を表している。Baseline プロット が右肩上がりで、Sample Response プロットが右肩下がりになっていることから、アナライ トの結合が完全に解離していない様子を表す。5 サイクル目から 7 サイクル目が、2 つめ の再生条件を検討した結果である。Sample Response プロットも Baseline プロットも、5 サ イクル目のレスポンスが、2 サイクル目のレスポンスと同様の値であり、7 サイクル目ま で安定してプロットされていることから、結合したアナライトが解離し、かつ再現性よく 結合が見られていることを示す。よって、2 つめに検討した再生条件が至適条件と言える。 ●Sensorgrams タブ



Display · · ·

Cycles:

選択しているセンサーグラムの重ね書きが表示される。 測定サイクルの抽出が行える。

適当な再生条件が見つかれば、<u>N</u>ext>をクリックする。

(適当な再生条件が見つからない場合は、Close をクリックし、再度、再生条件について 検討しなおす。)

	\downarrow
X Regeneration Scouting - Save Settings Image: Use these settings in the workflow steps	▼ チェックを入れると、以下の条件がワーク フローに反映される
Stabilization period: 0 (s) First regeneration Solution Contact time (s) 10mM Gly-HCl pH2.0 30	comment: ベースライン安定化時間(秒) 採用する再生条件を選択する
Second regeneration Solution Contact time (s)	
Help	Back Save Close

Save をクリックする。保存条件が最終測定プログラムに反映される。

Ke TRAINING @ Biacore X100 Control Software			
File View Tools Help			
Assay Workflow: ProteinA m IgG			
Ligand Attachment Overview			
Type of assay: Direct binding			
Selected chip: CM5			
Ligand name: ProteinA			
ligand			
		Edit Assay Workflow	
Sensor Surface Preparation	Overview	Results reference	
Find Immobilization pH	Immobilization buffer 10 mM Acetate, pH 5	5/11/2007 10:14:37 AM	
Run to find out Enter known values		All results	
Immobilize	Method in fc 2: Amine	Immobilization 5/11/2007 11:50:13 AM	
	Chip id: 070511-0939	All results	
Assay	Overview	Results reference	
Find Sample Conditions	Sample name: mouse IgG Sample concentration: 20 µg/ml	X= 5/11/2007 1:20:48 PM	
Run to find out Enter known values	Contact time: 60 s Dissociation time: 130 s	All results	
	Regeneration: Needed		
Find Regeneration Conditions	Regeneration solution: 10mM Gly-HCI pH2.0 Contact time: 30 s	Keepeneration Scouting 5/11/2007 2:12:18 PM	
Run to find out Enter known values	Stabilization time: 0 s	All results	
Run Kinetics/Affinity Assay			
Run			
Help			Close
Online - COM1 Temperature: 25.00.00 Sensor chip: CM5			
Running standby, re	maining time: 4.0 days		put to come
		ination ProtainA	Friday, May 11, 200
Start 🖉 🐨 🔤 Kaining @ biacore 🦉 reg 🖬 - Paini	👽 HOADHONG @ Blacore 🦢 Ki	ineucs_proteina	2 4 A 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1

ワークフローシートの、Assay → Find Regeneration Conditions の Run to find out...に
 (
)が入る。Overview に再生溶液名、添加時間等が表示される。

4-5. 測定および解析

Run Binding Analysis Assay \rightarrow **Run** $\varepsilon 2 \neg 2 \neg 2 \neg 3$

↓	
🔀 Binding Analysis - Injection Seque	ence 🛛 🔀
Detection Flow cell: 1,2 V Reference subtraction	action Chip Chip Chip type: CM5
Injections in analysis cycle Flow Cell 1 Flow Cell 2	
Sample	Ca <u>p</u> ture
Regeneration	✓ <u>S</u> ample
	Enhancement
	✓ <u>R</u> egeneration 1
	Use GST Capture Kit
Help	< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

1

Injection Sequence ダイアログが表示される。ワークフローで決定した条件が自動選択されている。この画面での変更は不可能。

<u>N</u>ext>をクリックする。

\downarrow
💹 Binding Analysis - System Preparation
Prime
■ Prime before run ■ 測定前の Prime 実行の有無
Conditioning
Run conditioning cycle
Startup
<u>Solution:</u> Buffer ← 通常、ランニング緩衝液を使用
Number of cycles: 3 V 最低 3 サイクルは実施
<u>H</u> elp < <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

<u>N</u>ext>をクリックする。

↓
💹 Binding Analysis - Injection Parameters
First sample Contact time: 60 (s) Dissociation time: 60 (s)
First regeneration
Solution: 10mM Gly-HCl pH1.5
Contact time: 30 (s) Stabilization period: 0 (s)
Help < Back Next > Close

Injection Parameters ダイアログが表示される。ワークフローからウィザードで条件を検討 し、決定した場合は、自動入力されている。

<u>N</u>ext>をクリックする。

ampl	e table	
	Sample id 1	
1	sample1	
2	sample2	
3	sample3	
4	sample4	
5	sample5	
6	sample6	
7	sample7	
8	sample8	
9	sample9	
10	sample10	
11		

Sample ダイアログが表示される。Sample id に各アナライト名を入力する。

	Position	Volume (µl)	Content	Туре
	1	50	sample1	Sample
	2	50	sample2	Sample
	3	50	sample3	Sample
5 HT	4	50	sample4	Sample
	5	50	sample5	Sample
	6	50	sample6	Sample
	7	50	sample7	Sample
	8	50	sample8	Sample
	9	50	sample9	Sample
4 . ° ~	10	50	sample10	Sample
01 5 8 4	11	120	Buffer	Startup
	12	405	10mM Gly-HCl pH1.5	Regeneration
	H20	Full	Deionized water	Water

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 <u>N</u>ext>をクリックする。

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

 \downarrow

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>S</u>ave をクリックする。測定を中断する場合は、補足 4-2.(95 ページ)を参照。

↓

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になる。**Standby** の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち 上がり、取得データが開く。



ツールバーの 📠 Bar Chart をクリックする。



Bar Chart ダイアログが表示される。

全測定サイクル分について、アナライト(ダミーランによる緩衝液添加を含む)添加終了 直前の結合レスポンスの棒グラフとテーブルが表示される。

必要に応じて、サンプルテーブルで表示するアナライトを選択する。ポインターをクリック&ドラッグして選択するか、キーボードの[Ctrl]キーを押した状態でセルをクリックする。

Cycle #	Sample Name	Conc (µM)
1	Buffer	
2	Buffer	
3	Buffer	
4	sample1	
5	sample2	
6	sample3	
7	sample4	
8	sample5	
9	sample6	
10	sample7	
11	sample8	
12	sample9	

上記解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。



5. 低分子化合物アナライトの相互作用測定

低分子化合物アナライトを用いて、相互作用測定を行う場合は、ワークフローに紐付けされていない、専用の測定ウィザードを用いる。ワークフローを用いて、固定化まで実施し、 ワークフローを閉じ、専用の測定ウィザードで相互作用測定を実施する。測定条件など詳細については、IV-iii.(実験を始める前に Lページ)を参照。

5-1. 測定

🔀 Open/New Wizard Template		
📁 Surface Preparation	Name	Modified 🔼
Immobilization pH Scouting	Modified: Last Week	
Assay Development	kinetics_Multi_LMW	7/9/2009 5:21:10 PM
Regeneration Scouting	Modified: Two Weeks Ago	
Assay Assay Concentration Difference Concentration	For acetazolamide	6/30/2009 6:56:17 F
Calibration-free (CFCA)	Modified: March 2009	
Kinetics/Affinity Binding Analysis Custom Assay Wizard	b amyloid SCK 090318	3/18/2009 12:09:42
	HMGB1 Inhibit GFP Immob 090316	3/17/2009 7:33:00 F
	Modified: November 2008	
	Z Demo 200811111	11/11/2008 2:53:13
	1107	11/6/2008 2:20:11 F 🧹
	•	>
Help Browse 🔻 🔯 Biacon	e Templates <u>N</u> ew	Open Cancel

Custom Assay Wizard...をハイライトにすると、Biacore Templates...がアクティブになる。 Biacore Templates...をクリックする。

Name	結合の有無の確認、スクリーニング
Binding analysis	
CFCA template	
Multi cycle kinetics with solvent correction	_ 反応速度定数の算出(マルチサイクル法
Multi cycle kinetics	
Single cycle kinetics with solvent correction	━ 反応速度定数の算出(シングルサイクル
Single cycle kinetics	

上記 3 つのウィザードが、低分子化合物アナライト測定用のプログラムである。 目的の測定プログラムをダブルクリック、もしくは測定プログラムを選択後、右下の Open ボタンを使って開く。

	\downarrow	
💹 Custom Assay Wi	zard - System Preparation 🛛 🔀	
Detection Elow cell: 1,2	Chip Chip Chip Chip Chip Chip Chip Chip	
Purpose E <u>v</u> aluation purpose:	Binding Analysis	
Prime Prime before run	Conditioning Run conditioni Kinetics - heterogeneous analyte Binding Analysis	
	Concentration analysis using calibration Calibration-free concentration analysis General	
<u>H</u> elp	< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose	

Evaluation purpose に、測定プログラムの内容を選択する。 Next>をクリックする。

🔀 Custom Assay Wizard - Cycle Definition	X
Cycle types Binding Analysis ◀ 相互作用測定のプ Solvent correction 家媒補正のプログ	[°] ログラム [°] 戸グラム ブラム Copy
Commands in Binding Analysis A <u>w</u> ailable <u>S</u> elected Capture Sample	Settings for Sample 1 Solution:
Linhancement Regeneration Solvent correction コマンドの追加	Contact time: 60 (s) varies by cycle Dissociation time: 60 (s) varies by cycle Flow rate: 10 (µl/min) varies by cycle
R <u>e</u> move	Elow path: Both ♥ ■ Extra wash after injection with: Evaluation variables
Help	< <u>Back</u> <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

Cycle types の相互作用測定のプログラムをハイライトにする。①、②の画面で詳細を設定。

結合の有無の確認、スクリーニングの場合(Binding analysis)

キャプチャーや再生など、サンプル添加以外のコマンドが必要であれば、Add ボタンにて 追加する。 ②Settings for画面

サンプル添加条件;

Contact time; $30 \sim 60$ (s)

Dissociation time; $30 \sim 60$ (s)

Flowrate; 10 (ul/min)

反応速度定数の算出の場合(Multi cycle kinetics, Single cycle kinetics)

キャプチャーや再生など、サンプル添加以外のコマンドが必要であれば、Add ボタンにて 追加する。 ②Settings for画面

②Settings for国田

サンプル測定条件;

Contact time; $120 \sim 180$ (s)

Dissociation time; $120 \sim 180$ (s)

Flowrate; 30 (ul/min)

Custom Assay Wizard - Cy	cle Definition	
Pro P. Annaharia	Cycle types	
Binding Analysis Solvent correction		Rename Copy
Commands in Solvent correction Available Capture Sample Enhancement Regeneration Solvent correction	Selected Solvent correction 1 Solvent correction 3 Solvent correction 4 Solvent correction 5 Solvent correction 7 Solvent correction 8	Settings for Solvent correction 1 The Solvent correction injection will be run for 30 seconds with a flow rate of 30 µl/min.
	Remove	
Help		< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

Ţ

溶媒補正のプログラムが表示される。

<u>N</u>ext>をクリックする。

Name Sec Before/After Start of/End of Inject Window Baseline 1 baseline 10 Before Start of Sample 1 Sample 1 S Yes Sample 1 S No stability 20 After End of Sample 1 S No astability After End of Sample 1 S No astability After End of Sample 1 S No A After End of Sample 1 S No A After End of Sample 1 S No A A After End of Sample 1 S S A A<th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th>Cycle</th><th>types</th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th>							Cycle	types					
Name Sec Before/After Start of/End of Inject Window Baseline 1 baseline 10 Before Start of Sample 1 Sample 1 S Yes Imidian Before End of Sample 1 S No Stability After End of Sample 1 S No Imidian Imidian<!--</th--><th>Bind</th><th>ng Analysis</th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th>	Bind	ng Analysis											
NameSecBefore/AfterStart of/End ofInjectWindowBaseline1baseline10BeforeStart ofSample 15Yes2binding10BeforeEnd ofSample 15No3stability20AfterEnd ofSample 15No4 </th <th>5019</th> <th></th> <th>,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,</th> <th></th>	5019		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,										
1 baseline 10 Before Start of Sample 1 Sample 1 S Yes Refore End of Sample 1 Sample 1 S No After End of Sample 1 Sample 1 S No No After End of Sample 1 S No No After End of Sample 1 S No After End of End of Sample 1 S No After After End of Sample 1 Sample 1		Name	Sec	Before/#	fter	Start of/I	End of	Injec	t	Window	Baseli	ne	
2 binding 10 Before End of Sample 1 S No Sample 1 Sample 1	1	baseline	10	Before	-	Start of	-	Sample 1	•	5	Yes	-	
3 stability 20 After End of Sample 1 5 No 4	2	binding	10	Before	•	End of	•	Sample 1	•	5	No	-	
4	3	stability	20	After	-	End of	-	Sample 1	-	5	No	-	
	4				-		-		-			-	
					<u> </u>	<u></u>		<u>I</u>		<u>L</u>	<u>a</u>		

Biacore[®]X100 Plus Package 日本語取扱説明書

↓

レポートポイントの記録設定が表示される。

<u>N</u>ext>をクリックする。

0011	Cucle	Tune	o Cuclo Durposs								
	Cycle	туре		ycie Purpose Bil				Sample 1			
Cycle	Binding Analysis	Solvent correction	Startup	Solvent correction	Sample	Undefined	Solution	Conc (µM)	MW (Da)		
1	•	0	\odot	0	0	0	Buffer		5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5		
2	\odot	0	\odot	0	0	0	Buffer				
3	\odot	0	\odot	0	0	0	Buffer				
4	0	۲	0	\odot	0	0					
5	•	0	0	0	\odot	0	buffer	0			
6	•	0	0	0	\odot	0	Sample 1	10			
7	•	0	0	0	\odot	0	Sample2	10			
8	•	0	0	0	\odot	0	Sample3	10			
9	•	0	0	0	\odot	0	Sample4	10			
10	0	0	\circ	0	\odot	0	Sample5	10			
	<u> </u>										
ル毎に	、実行	」 す		サ	イク	ル毎	に、測定	目的を選払	尺(アナ		
е Туре	を選択			イ	トの	測定	は、必ず	Sample に	すること		

サンプル名、濃度、分子量を入力する。シングルサイクルカイネティクスの場合、濃度の カラムが右側に 5 つ並び、濃度が低い方から順に入力する。

<u>N</u>ext>をクリックする。

	Position	¥olume (µl)	Content	Туре	Sample 1 Conc (µM)	Sal 📤 Mi
	3	50	Sample2	Sample	10	
	4	50	Sample3	Sample	10	
	5	50	Sample4	Sample	10	
5 HE P	6	50	Sample5	Sample	10	
	7	120	Buffer	Startup		
	8	Full	Solvent correction1	Solvent correction (buffer)		
	9	Full	Solvent correction2	Solvent correction (buffer)		_
	10	Full	Solvent correction3	Solvent correction (buffer)		
	11	Full	Solvent correction4	Solvent correction (buffer)		
	12	Full	Solvent correction5	Solvent correction (buffer)		
	13	Full	Solvent correction6	Solvent correction (buffer)		
	14	Full	Solvent correction7	Solvent correction (buffer)		
	15	Full	Solvent correction8	Solvent correction (buffer)		
	H2O	Full	Deionized water	Water		~
	<]	>

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従い、サンプル等をラックにセット する。

<u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

確認画面が表示される。確認後、<u>Start</u>をクリックする。

 \downarrow

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>S</u>ave をクリックする。測定を中断する場合は、<u>Run</u> → Stop Run...をクリックする。

 \downarrow

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になる。**Standby** の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち 上がり、取得データが開く。



5-2. データ解析

補足 5-1. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがあった場合は、**Keyword Table** から入力を変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。

Cycle	Cycle Purpose	Sample	Conc [µg/ml]	MW [Da]		
~	×	· · · ·	*	~	Re	set All Filters
1	Startup	Buffer				
2	Startup	Buffer				
3	Startup	Buffer			A	d Keyword
4	Startup	Buffer				
5	Startup	Buffer			Ren	ame Keyword
6	Sample	LNFP2	0	853.8		
7	Sample	LNFP2	2	853.8	Ren	ove Keyword
8	Sample	LNFP2	3.9	853.8		
9	Sample	LNFP2	7.8	853.8		
10	Sample	LNFP2	15.6	853.8		
11	Sample	LNFP2	31.25	853.8		
12	Sample	LNFP2	62.5	853.8	Cancer	tration Unit
13	Sample	LNFP2	125	853.8	Concer	
14	Sample	LNFP2	250	853.8	µg/ml	*
15	Sample	LNFP2	500	853.8		
16	Sample	LNFP2	1000	853.8		
17	Sample	LNFP2	0	853.8		
18	Sample	LNFP2	250	853.8		
<u>H</u> elp	>				<u>_</u> inish	Cancel

溶媒補正

Evaluation \rightarrow Add Solvent correction...をクリックする。

測定サイクル中の溶媒補正曲線が表示される。



OK をクリックすると補正が完了する。

溶媒補正曲線は、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。

溶媒補正後、結合の有無の確認が目的の場合は、分子量補正(138 ページ)を行った結果 を評価する。反応速度定数の算出の目的の場合は、72 ページのデータ解析を参考にする。



補足 5-3. 溶媒補正曲線の削除

エアーの添加などの理由で解析から削除したい溶媒補正曲線がある場合、目的の溶媒補正 曲線について、Solvent correction 左のボックスの Include カラムのチェックを外すと、溶 媒補正曲線は削除される。



補足 5-4. 溶媒補正曲線の延長

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る。ただし、延長され た溶媒補正曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため、結果の評価には注意が必要で ある。

Solvent correction 左下の Extrapolate をクリックする。

	¥	
🗟 Solvent Correct	ion - Extrapolation	Range 🛛 🔀
Extrapolation Range	: (x-axis): 1000	(RU)
Help	OK	Cancel

延長する幅を入力する。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。 OK をクリックする。



分子量補正

スクリーニングに合わせて、おおよそのアフィニティーランキングをする場合は、分子量 補正を行う。結合レスポンスを分子量で割り、さらに 100 を掛けた値を、補正値として評 価する。

Evaluation \rightarrow Add Plot...をクリックする。

Plot Settings —				
Plot name:	Plot			
Plot type:	 Report Point vs Variable 			
-Axis setting-	C Report Point vs Report Point			
Report Point	Y-Axis stability	Variable:	X-Axis Cycle number	<u>•</u>
Response Ty	pe: Relative response 💌			

Plot name Plot type

Axis setting

プロットデータの名称(例;MW correction) プロット様式の設定(Report Point vs Variable) Y 軸の設定(Report Point:binding、Response type:MW adjustedresponse)

X 軸の設定(Variable:Cycle number)

📄 Plot				×
-Plot Settings -				
Plot name:	MW correction			
Plot type:	 Report Point vs Variable 			
	C Report Point vs Report Point			
-Axis setting-				
	Y-Axis		X-Axis	
Report Point	binding 💌	Variable:	Cycle number	-
Response Typ	pe: MW adjusted response 📃 💌]		
Help			<u>F</u> inish	<u>C</u> ancel

<u>Finish</u>をクリックする。



Evaluation Explorer の **Plot** フォルダに反映される。 ファイル名は、自動で **Plot** と入力されるので、任意に変更する。

Work area には、分子量補正されたデータが表示される。

Y軸の単位は、100×RU/Da に変更されている。



補足 5-5. 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どうかを評価する。

ベースラインの変動

Baseline: Sample プロット

全測定サイクルの baseline の絶対値に対するプ ロットが表示される。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 がりになるが、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良い。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%以上ある場合 には、それを考慮して評価する必要がある。

<u>リファレンスセルへの非特異吸着の確認</u> Binding to reference プロット

Stability の baseline に対する相対値のプロット が表示される。ランニング緩衝液のレスポンス を基準として評価する。ランニング緩衝液のレ スポンス以上あるサンプルは、センサーチップ 表面へ非特異的に吸着している。それを考慮し 評価する。





6. 濃度測定

<u>6-1. 濃度測定お</u>よび解析

濃度測定は、Concentration Analysis ウィザードを使用する。対応するワークフローは存在し ないが、再生条件の検討まではどの実験系も同じであるため、Binding Analysis…または Kinetics/Affinity…のワークフローを代用できる。ワークフローは、Overview で条件検討の結 果を一覧で表示できるメリットがある。濃度測定の概念は、IV-iv.(実験を始める前に- ペ ージ)を参照。

Other options $\rightarrow \boxed{\square}$ Wizards... \rightarrow Concentration \rightarrow Using Calibration $e \neq 0$ $\forall \forall p \neq 3$.

Detection <u>F</u> low cell:	Chip Chip type: CM5
Injections in analysis cycle Flow Cell 1 Flow Cell 2	
Sample	Ca <u>p</u> ture
Regeneration	✓ Sample
	<u>E</u> nhancement
	✓ <u>R</u> egeneration 1 ✓
	I lee GST Casture 44

Injection Sequence ダイアログが表示される。

Detection · · ·

<u>F</u>low cell: リガンドが固定化されているフローセルを選択する。

Chip · · ·

Chip type: センサーチップの種類を選択する。

Injections in analysis cycle • • •

Capture :	リガンドをキャプチャーする場合はチェックを入れる。
Enhancement :	アナライトの結合量が少なく、二次抗体などを添加して結合量を
	増幅する場合は、チェックを入れる。

<u>N</u>ext>をクリックする。

↓	
X- Concentration Analysis - System Preparation	×
Prime ✓ Prime before run	
Conditioning	
Startup v Run startup cycles	
Solution: buffer	
Number of c <u>v</u> cles: 5	
Help < Back Next > Clos	e

Prime • • •

測定前に Prime を実行する場合は、チェックを入れる。

Startup · · ·

Run startup cycles :

Prime before run:

測定前にダミーランを実行する場合は、チェックを入れる。少な くとも、3回は、ランニング緩衝液にて実施する。

<u>N</u>ext>をクリックする。

↓
🔀 Concentration Analysis - Injection Parameters 🔀
Sample
Contact time: [180 (s)
First regeneration
Solution: 10mM Gly-HCl pH1.5
Contact time: 60 (s) Stabilization period: 60 (s)
<u>H</u> elp < <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

Injection Parameters ダイアログが表示される。下記項目について入力する。

Sample · · ·	
Contact time:	アナライト添加時間(秒)
First regeneration • • •	
Solution:	再生溶液名
Contact time:	再生溶液添加時間(秒)
Stabilization period :	再生溶液添加後のベースライン安定化時間(秒)

<u>N</u>ext>をクリックする。

🤄 Cone	centration Analysis - Calibration Curve	×
Calibra	ition Curve	
<u>A</u> naly	/te name: <u>m lgG</u>]
Calibra	ition points	
	Concentration	^
	ng/ml 👻	
1	20	
2	10	
3	5	
4	2.5	
5	1.25	
6	0.625	
7	0.313	
8	0	
9	20	
10	10	
11	5	
12	2.5	
13	1.25	~

Calibration Curve ダイアログが表示される。下記項目について入力する。

Calibration Curve ••••

Analyte name: 検量線用アナライト(濃度既知標準サンプル)名

Calibration points \cdot \cdot \cdot

Concentration: 検量線用アナライトの濃度を、少なくとも6濃度以上入力する。 ✓ をクリックすると、濃度単位の変更が可能。 検量線を複数作成する場合は、テーブルの濃度系列をドラックし て選択し、コピー、ペーストする。テーブルに入力した順番で測 定される。

<u>N</u>ext>をクリックする。

	Sample lu	Dilución laccor	
1	sample1	1000	
2	sample2	500	
3	sample3	200	
4	sample4	50	
5	sample1	1000	
5	sample2	500	
7	sample3	200	
8	sample4	50	
9			

Samples ダイアログが表示される。下記項目について入力する。

Sample table • • •

Sample id :	アナライト(濃度未知サンプル)名
Dilution factor :	アナライト希釈倍率
	同一アナライトについて、繰り返し測定を行う場合は、測定回
	数分入力する。検量線用アナライトの測定後に、テーブルに入
	力した順番で測定を行う。

<u>N</u>ext>をクリックする。



Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 <u>N</u>ext>をクリックする。

確認後、Start をクリックする。

Biacore[®]X100 Plus Package 日本語取扱説明書



アナライト情報等を入力したウィザードをテンプレートとして保存する場合は、Save As…で 名前を付けて保存を行う。保存しない場合は、Don't Save をクリックする。

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>S</u>ave をクリックする。測定を中断する場合は、補足 6-1.を参照。

補足 6-1. 測定の中断
測定を中断する場合、ツールバーの Run → Stop Run…をクリックする。
\downarrow
Biacore X100 Image: This will stop the run Help Stop Run Cancel
Stop Run をクリックする。
\downarrow
Run Stopped Finishing current cycle, please wait Abort cycle by [Ctrl]+[Break]
測定中サイクルの全コマンドを実行後、 Standby 状態になる。
全コマンド実行を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キ
一を同時に押す。
\downarrow
Biacore X100 X You have aborted the run. Do you want to wash the system? (Recommended) Yes
システムの洗浄を行う場合には、 Yes をクリックする。洗浄後、停止する。

 \downarrow

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になる。取得データは自動保存され、解析に向け Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開く。



Biacore X100 Evaluation Software のツールバーの Incontration Analysis とクリックする。(ア ナライト情報等の入力ミスがあった場合は変更を行う。補足 6-2.を参照。)

補足 6-2. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがあった場合は、**Keyword Table** から入力を変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。

Cycle	Cycle Purpose	Sample	Conc [µg/ml]	MW [Da]		
*	~	· · ·	*	*	Reset All Fit	ers
1	Startup	Buffer				
2	Startup	Buffer				
3	Startup	Buffer			Add Keywo	rd
4	Startup	Buffer				
5	Startup	Buffer			Rename Key	vord
6	Sample	LNFP2	0	853.8		
7	Sample	LNFP2	2	853.8	Remove Key	vord
8	Sample	LNFP2	3.9	853.8		
9	Sample	LNFP2	7.8	853.8		
10	Sample	LNFP2	15.6	853.8		
11	Sample	LNFP2	31.25	853.8		
12	Sample	LNFP2	62.5	853.8	- Concentration II	-it
13	Sample	LNFP2	125	853.8	Concentration o	
14	Sample	LNFP2	250	853.8	µg/ml	*
15	Sample	LNFP2	500	853.8		
16	Sample	LNFP2	1000	853.8		
17	Sample	LNFP2	0	853.8		
18	Sample	LNFP2	250	853.8		
<u>H</u> el					<u> </u>	ancel



Calibration Curve Settings	•	•	•
----------------------------	---	---	---

F <u>l</u> ow cell :	評価するフローセルを選択する。
Report <u>P</u> oint :	評価するレポートポイントを選択する。 初期設定では stability が
	選択されている。レポートポイントの追加を行う場合には補足
	6-3.を参照する。
Response <u>T</u> ype :	濃度定量にレポートポイントのレスポンス(Relative Response)
	を採用するか、傾き(Slope)を採用するかを選択する。 通常は、
	Relative Response を選択する。
Fitting Function :	検量線のフィッティング方法を選択する。"4-Parameter"または
	"Linear"を選択できる。通常、4-Parameter を選択する。
Calibration Table $\cdot \cdot \cdot$	
Curve # :	検量線番号
Cycle# :	測定サイクル番号
Conc.:	入力した標準サンプルの濃度
Response(RU) :	結合量
Calc.Conc. :	検量線から算出された標準サンプルの濃度
CV(%):	Calc.Conc.の変動係数
	(繰り返し測定を行った場合のみ算出される)



補足 6-4. 測定サイクルの削除

Calibration Table で削除したいサイクルのセルをクリックする。マウスの右クリックを押し、 Exclude Cycle を選択する。選択したサイクルを除いて、再度フィッティングを行う。 削除したサイクルを戻す場合は、マウスの右クリックを押して、Import Cycle をクリック する。 Samples タブをクリックする。



Sample Table $\cdot \cdot \cdot$	
Cycle#:	測定サイクル番号
Sample id. :	アナライト(濃度未知サンプル)名
Dil. Fact. :	希釈倍率
Response(RU) :	結合量
Calc.Conc. :	算出された濃度
	(検量線から外れている場合には、N/A と表示)
CV(%):	Calc.Conc.の変動係数
	(繰り返し測定を行った場合のみ算出される)
Calib. Curve. :	濃度計算に利用した検量線番号

<u>Finish</u>をクリックする。

 \downarrow

上記解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。



6-2. 検量線不要の濃度測定および解析

Other options \rightarrow **Z** Wizards... \rightarrow Concentration \rightarrow Calibration Free (CFCA)をクリック する。

\downarrow	
Kernet Concentration (CFCA) - Injection Seque	ence 🔀
Detection Elow cell: 1.2 V Reference subtraction	Chip Chip type: CM5
Injections in analysis cycle	4
Flow Cell 1 Flow Cell 2	
Sample	Ligand ca <u>p</u> ture
L I	
Regeneration	✓ <u>S</u> ample
	✓ <u>R</u> egeneration 1 ✓
	🔲 Use GST Capture Kit
<u>H</u> elp < <u>B</u> ack	<u>N</u> ext > <u>C</u> lose

Injection Sequence ダイアログが表示される。各項目を設定し、<u>N</u>ext>をクリックする。

Concentration (CFCA) - System Preparation
Prime ■ Prime before run ■ 測定前の Prime 実行の有無
Conditioning
Startup ▼ <u>Bun startup cycles</u> <
<u>Solution</u> : buffer ← 通常、ランニング緩衝液を使用
Number of cycles: 3 最低3サイクルは実施
Help < Back

<u>N</u>ext>をクリックする。

🔀 Concentration (CFCA) - Injection Parameters 🛛 🔀	
Sample Contact time: 48 ◀(3) 添加時間の変更は不可	IJ
First regeneration	
Contact time: 30 (s) Stabilization period: 0 (s)	再生条件を入力
<u>H</u> elp < <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose	

 \downarrow

<u>N</u>ext>をクリックする。

	Sample Id	Dilution factor	D (20°C)	M₩ (Da)	Blank
L	Blank				✓
2	Sample	100	1.19E-10	11800	
;	sample	500	1.19E-10	11800	
4	Sample	100	1.19E-10	11800	
;	sample	500	1.19E-10	11800	
i -					

アナライト名、希釈倍率、20℃における拡散係数、分子量を入力する。Blank(0 濃度)と して測定するサンプルは、Blank カラムにチェックを入れる。

<u>N</u>ext>をクリックする。
K Concentration (CFCA) - Rack Positions							
	Position	¥olume (µl)	Content	Туре	Sample 1 MW (Da)	Sample 1 D (20°C)	Sampl Blan
	1	153	Blank	Sample			Yes
	2	291	Sample	Sample	11800	1.19E-10	No
	3	291	sample	Sample	11800	1.19E-10	No
544	4	162	buffer	Startup			
	5	405	Glycine-HCl pH2.5	Regeneration			
	H2O	Full	Deionized water	Water			
	<						>
Help Menu Load Samples				<	Back 1	Lext >	<u>C</u> lose

Rack Positions ダイアログが表示される。テーブルに従いサンプルをラックにセットする。 Next>をクリックする。

↓

確認画面が表示される。確認後、Start をクリックする。

 \downarrow

結果の保存先とファイル名を指定後、<u>S</u>ave をクリックする。測定を中断する場合は、補足 6-1.(145ページ)を参照。

 \downarrow

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になる。**Standby** の終了方法は、2-1-4. (22 ページ)を参照する。取得データは自動保存され、解析に向け Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開く。



Keyword Table				E
Cycle Cycle Purpose	Sample	Conc [µg/ml]	MW [Da]	Reset All Filters
× ×	× ×	×	×	
1 Startup	Butter			
2 Startup	Butter			
3 Startup	Butter			Add Reyword
4 Startup	Butter			Rename Kenword
5 Startup	Butter	_	050 5	Trename Reyword
6 Sample	LNFP2	0	853.8	Remove Kenword
/ Sample	LNFP2		853.8	Homove Neyword
8 Sample	LNFP2	3.9	853.8	
9 Sample	LNFP2	7.8	853.8	
10 Sample	LNFP2	15.6	853.8	
11 Sample	LNFP2	31.25	853.8	
12 Sample	LNFP2	62.5	853.8	Concentration Unit
13 Sample	LNFP2	125	853.8	
14 Sample	LNFP2	250	853.8	µg/mi 💙
15 Sample	LNFP2	500	853.8	
16 Sample	LNFP2	1000	853.8	
17 Sample	LNFP2	0	853.8	
18 Sample	LNFP2	250	853.8	
Help				<u>F</u> inish <u>C</u> ancel



画面上の表に、測定したサンプル情報が、測定サイクル順に表示される。

Cycle#	測定サイクル番号
Curve	測定フローセル
Ligand	リガンド名
Sample	アナライト名
Dilution factor	希釈倍率
Flow (ul/min)	測定流速
Initial rate (RU/s)	添加開始 10 秒後の、5 秒幅における結合速度
QC ratio prel	QC 比
Temp (°C)	測定温度
MW (Da)	分子量
D (m2/s)	測定温度における拡散係数
Blank used	ブランク(ランニング緩衝液をアナライトと同様に添加したも
	の)として利用しているセンサーグラムのサイクル番号

画面上部の Expand all cycles のチェックを外すと、サンプル情報表の表示がサンプル名別 のリストに変更する。 リファレンスセルを差し引かないセンサーグラムで解析を行う場合 は、Use reference subtraction data のチェックを外す。



Included blanks... をクリックして、ブランクの確認を行う。 画面左下の、

エアーの混入等の理由により形状が乱れているブランクは、画面上表の Include のチェック を外す。ブランクの差し引きを行わなくても解析は可能である。ブランクを利用しない場 合は、Include の全てのチェックを外す。

選択後、OK をクリックする。

解析に利用できるセンサーグラムの選択を行う。評価基準は、補足 6-6.を参照する。

補足 6-6. CFCA に利用するセンサーグラムの選択基準

CFCA では、マストランスポートリミテーション条件下のセンサーグラムを解析に利用する。 以下の評価基準を満たすセンサーグラムを解析に利用する。

- ① 低流速の初期速度(Initial rate (RU/s)) = 0.3~15 (RU/s)
 - < 0.3 RU/s では、レスポンスの上昇量が低いため良好な結果が得られない。
 - > 15 RU/s では、マストランスポートリミテーションが十分ではない危険性がある。
- 2 QC ratio \geq 0.13
- < 0.13 の場合には、マストランスポートリミテーションが十分ではない。

Biacore®X100 Plus Package 日本語取扱説明書



解析に利用しないセンサーグラムは、Include のチェックを外す。

選択したセンサーグラムを確認する場合は、画面中央の

View: Kample: mouse IgG (x1/6400) Curve: Fc=4-3

で選択する。▼をクリックしてセンサーグラムを選択する。Show blank subtracted data の チェックを外すと、リファレンスセルと差し引き前のセンサーグラムを確認できる。 <u>N</u>ext >をクリックする。



解析が開始する。



解析が終了すると、画面上部に各サンプルの結果が表示される。

Meas.Conc (M)	解析によって算出された濃度
	(▼をクリックすると単位変更が可能)
Calc.Conc (M)	希釈倍率を Meas.Conc に掛けた濃度
QC ratio fit	QC 比
Chi2 (RU2)	カイ二乗
SE (Meas.Conc)	Meas.Conc の標準誤差

解析結果の評価については、補足 6-7.を参照。

Finish をクリックする。

 \downarrow

上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。



補足 6-7. CFCA の解析結果の評価

以下の基準を満たしている場合は、良好な結果と判断する。

- カーブフィッティングが良好である フィッティングが良好な場合、カーブフィッティングによって得られた黒色のセンサー グラムが、測定センサーグラムと一致する。Chi²値が、低流速のセンサーグラムの解離 直前の結合量の 5%以下であれば、フィッティングは良好と判断する。
- ② SE (standard error) が解析結果濃度の 10%以下である
- ③ **解析結果濃度が、0.05~5ug/ml の範囲内である** 範囲外の場合は、①、②の基準にパスしていても結果の取り扱いに注意が必要である。

補足 6-8. ファイル名の変更
Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックする。
\downarrow
Crimetics / Affinity
上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイ
ル名を入力する。
\downarrow
Cinetics / Affinity

7. メンテナンス

システム内部に設置されているマイクロ流路系は、**消耗品**であり、使用するサンプルの性 状や使用頻度に応じて、耐久月数が異なる。より長くマイクロ流路系を使用するために、 システム使用毎のメンテナンスの実施を推奨する。

システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラム(メニューバーの Tools \rightarrow More Tools... \rightarrow Maintenance Tools...)を実行する。

ランニング緩衝液として、MilliQ®水を使用する。また、メンテナンス時はメンテナンス用 試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンドは変性するため、必ず Sensor Chip Maintenance(もしくは使用済みセンサーチップ)を使用する。 システム温度は 25℃に設定する。

BIA maintenance Kit (BR-1006-66)

メンテナンスに必要な試薬が含まれている。 内容:

BIAdesorb solution 1	90 ml
BIAdesorb solution 2	90 ml
BIAtest solution	65 ml
BIAdisinfectant solution (conc.)	10 ml
BIAnormalizing solution	30 ml
Sensor Chip Maintenance	1枚

*BIAdesorb solution1 は、購入後、室温保存。

*その他のキット試薬は4℃保存。

7-1. メンテナンスの準備

実験後、引き続きメンテナンスを実行する場合は、センサーチップの交換が必要である。 メニューバーの Tools → Undock Chip...またはツールバーのアイコン(😜)を選択する。

Ι

\checkmark	
Biacore X100	
This will undock the sensor chip	
Help Undock Chip Can	cel

Undock Chip をクリックする。

Ţ

インジケーターの Sensor chip が点滅したら、扉を開けセンサーチップを取り出す。メン テナンス用センサーチップをセットする。合わせて、ランニング緩衝液ボトルを MiiliQ 水 ボトルに交換する。

Dock Chip	X
⊙ <u>N</u> ew chip	◯ <u>R</u> euse chip
New chip —	
Chip type:	СМ5 💌
Chip <u>i</u> d:	070510-1014
Chi <u>p</u> lot no:	(optional)
<u>H</u> elp	Dock Chip Cancel

Chip type:に **Maintenance** を選択する。<u>D</u>ock Chip をクリックする。Dock が完了すると自動的に **Standby** 状態になる。

i.

		\downarrow
メニューバーの Tools \rightarrow Pr	ime	を選択する。
	Tools	Help
	Prin	ne
	Shu	itdown
	Biad	core X100 Evaluation Software

Prime が終了すると、システムは Standby 状態になる。

<u>7-2. メンテナンスの実行</u>

メニューバーの Tools \rightarrow More Tools...を選択する.。

\downarrow	
🔀 Tools	×
Maintenance Tools Desorb Desorb Desorb and Sanitize Test Tools System Check and Pump Calibration Service Tools Software Problem Report Flow System Wash Superclean Clean Needle and Needle Wash Station Calibrate Needle Replace Needle Replace Peristaltic Pump Tube Deslace Surjace	
This application provides a standard formula for reporting software malfunction to Biacore.	
Help Start Cancel	

Tools ダイアログが表示される。

7-2-1. Desorb

流路および、サンプルチューブに付着した汚れを洗浄する操作。少なくとも、1週間に1 回は実施する。実験者が交代する場合にも実行する。所要時間は、約25分。測定温度は、 20℃以上で実施すること。

Tools→More Tools...→Maintenance Tools→ Desorb を選択して Start...をクリックする。



内容を確認後、Next> をクリックする。



↓

内容を確認後、Next> をクリックする。

me Content Type
1000 BIAdesorb solution 1 Reagent
1000 BIAdesorb solution2 Reagent
Full Deionized water Water

BIAdesorb solution 1 および、BIAdesorb solution 2 を、それぞれ 1.5ml プラスチックバイアル に 1000 ul 分注して指定のポジションにセットする。15mm プラスチックバイアルに MilliQ 水を 4ml 入れ、ポジション H2O にセットする。<u>S</u>tart をクリックする。

Desorb が終了した後、システムは自動的に **Standby** 状態になる。**Standby** 状態で 3~4 時間放置する。**Close** をクリックし終了する。

7-2-2. Desorb and Sanitize

全てのフローシステムの滅菌および、洗浄を行う操作。少なくとも1ヶ月に1回は実施する。所要時間は、約1時間。測定温度は、20℃以上で実施すること。

Tools→More Tools...→Maintenance Tools→Desorb and Sanitize を選択して Start...をクリックする。



内容を確認後、Next> をクリックする。

\checkmark
Desorb and Sanitize
NOTE: Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used. Do not run this procedure below 20°C. Do not abort this procedure after it is started. < <u>Back</u> <u>Next></u> <u>Close</u>

L

内容を確認後、Next >をクリックする。

\downarrow
Desorb and Sanitize
Required solutions (from Maintenance Kit): BIAdesorb solution 1, about 10 ml BIAdesorb solution 2, about 10 ml BIAdisinfectant solution, about 15 ml < <u>Back</u> <u>Next</u> > <u>Close</u>

 \downarrow

T

内容を確認後、Next> をクリックする。

ステップ1;	Desorb and Sanitize			
	Step 1 Place 10 ml BIAdesorb Solution 1 on the left hand tray and insert the pump inlet tubes.			
	< <u>B</u> ack Start Close			

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、BIAdesorb Solution 1 ボトル (10ml)にセットする。Start をクリックする。所要時間 8 分程度。 ステップ1終了後、自動的にステップ2のダイアログが表示される。

ステップ2;

Desorb and Sanitize	×		
Step 2			
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.			
Place 10 ml BlAdesorb Solution 2 on the left hand tray and insert the pump			
iniet tubes.			
< <u>B</u> ack <u>Start</u> Close			

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、BIAdesorb Solution 2 ボトル (10ml) にセットする。Start をクリックする。所要時間 7 分程度。

Ţ

ステップ2終了後、自動的にステップ3のダイアログが表示される。

ステップ3;

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、希釈した BlAdisinfectant Solution (原液 1.5ml + MilliQ 水 20ml) ボトルにセットする。Start をクリックする。所要時間 23 分程度。

 \downarrow

ステップ3終了後、自動的にステップ4のダイアログが表示される。

ステップ4;



本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ2本を、Milli-Q水ボトルにセットする。 Start をクリックする。所要時間13分程度。



ステップ 4 終了後、システムは自動的に Standby 状態になる。Standby 状態で 3 ~ 4 時間 放置するか、Prime を 3 回実施する。Close をクリックし終了する。

7-2-3. Superclean

Superclean は、強力な洗浄効果を持つメンテナンスプログラムである。定期的なメンテナ ンスをしていても、システムの調子が思わしくない場合(システムチェックの結果が良好 でない場合)に実行する。所要時間は、約 100 分間。<u>40-50℃に温めた MilliQ®水をランニ</u> ング緩衝液としてセットする。洗浄溶液は、BIA maintenance Kit に含まれていないため、 用事調製する。Superclean 実施前に、Desorb and Sanitize の実行をお勧めする。

Tools→**More Tools**...→**Service Tools** → **Superclean** を選択して、**Start**...をクリックする。

↓
Superclean 🔀
This procedure cleans the flow system. Total run time is about 100 minutes.
NOTE: Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used. Put the pump inlet tubes in filtered deionized warm water (40-50°C).
< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>Close</u>

<u>N</u>ext>をクリックする。

↓
Superclean 🔀
Required solutions: 1% acetic acid 0.2 M sodium bicarbonate 6 M guanidine-HCI 10 mM HCI If small molecule assays are run, exchange the last two wash solutions for 50% DMSO and 10% DMSO respectively.
< <u>B</u> ack <u>N</u> ext > <u>C</u> lose

<u>N</u>ext>をクリックする。

 \downarrow

K Superclean - Rack Positions				
	Position	¥olume (µl)	Content	Туре
	1	1200	1% acetic acid	Reagent
	2	1200	0.2 M sodium bicarbonate	Reagent
	3	600	6 M guanidine-HCl (or 50% DMSO)	Reagent
5 12 2	4	600	10 mM HCl (or 10% DMSO)	Reagent
	5	Full	Deionized water	Reagent
Help Menu V Load Samples	, 		< <u>B</u> ack Start	<u>C</u> lose

下記試薬を準備し、指定の場所にセットする。

1% 酢酸	;1200 uL
0.2M 重炭酸ナトリウム	;1200 uL
6M グアニジン塩酸(低分子化合物使用時は 50% DMSO)	;600 uL
10mM 塩酸(低分子化合物使用時は 10% DMSO)	;600 uL
MilliQ®水;Full バイアル	
<u>S</u> tart をクリックすると、実行開始となる。	

Superclean 後は、試薬除去のため、Standby 状態で 3~4 時間放置するか、Prime を 3 回 実施する。

7-3. システムチェックとポンプキャリブレーション

システムチェックおよびポンプキャリブレーションを行うプログラムである。このプログ ラムは Desorb and Sanitize による洗浄後に実行する。シグナルのドリフトや、エアースパ イクの混入が激しい場合等に実施する。使用頻度が高い場合は、定期的に実行することを お勧めする。所要時間は、約 35 分。

(準備品)

- BIAtest solution
- HBS-EP + 10X (BR-1008-26)
- ・新品の Sensor chip CM5

HBS-EP+をランニング緩衝液としてセットし、新品のセンサーチップ CM5 を Dock し、 Prime を実行する。

メニューバーの Tools → More Tools...を選択する



Test Tools \rightarrow System Check and Pump Calibration を選択して Start...をクリックする。

System Check and Pun	np Calibration	X
Ensure that you have HBS- temperature is 25°C and a	EP+ as running buffer, the analysis new Sensor Chip CM5 is docked.	
	<back next=""> Clo</back>	se

ランニング緩衝液は、HBS-EP+(HBS-EP+ 10X を 10 倍希釈)をセットする。Next> をクリックする。



BIAtest Solution を、1.5 ml プラスチックバイアルに 123ul 分注してポジション 1 にセットする。また、ポジション H2O に MilliQ 水を 4ml セットし、**Start** をクリックする。

		\downarrow	
Save Results As			×
Save in folder:	Folder:	system check	1
Quese Coupl C	Name	Modfied Created By Type	
	Name:	System Check and Pump Calibration 5/10/2007 11:08:51 AM	
<u>H</u> elp		Save Can	cel .

続いて、測定結果の保存先を設定する。<u>N</u>ame:にファイル名を入力して、Save をクリック すると、試験がスタートする。

試験が終了すると、以下のシートが現れる。

System Check and Pump Calibration	
System Check ar	d Pump Calibration
Name:	Date:
Run Date: 10-May-2007 Temperature: 25.0 °C File: System Check and Pump	Calibration 5/10/2007 11:08:51 AM
Peristattic Pump Calibration	Pass
Response	Pass
Injections	Pass
Noise	Pass
System Check ar	d Pump Calibration
Name:	Date:
Created By: Biacore X100 Control Sof Instrument id: 13112	ware Version: 1.0 RC2
Print	< Back Next > Close

測定値が正常値範囲内であれば"Pass"が表示される。範囲外であれば"Fail"と表示される。 Fail が表示された場合は、弊社技術サービス部に連絡する。

8. シャットダウン

8-1. 実験の終了

実験が終了した際には、次の2つの方法のいずれかでシステムを維持する。

① Standby 状態での放置

② 電源を落として終了

7日以内に使用する場合には、①の Standby 状態。

7日以上使用しない場合には、MilliQ®水で洗浄後、②の電源を落として終了する。

8-1-1. Standby 状態での放置

測定を終了すると自動的に Standby 状態になる。

セットしたランニング緩衝液で、最長7日間継続する。ランニング緩衝液は、7日間で200ml 必要。

ランニング緩衝液を涸らさないように注意する。廃液ボトルの空き容量にも注意する。

ステータスバー ;

Online - COM1	Temperature: 25.00 °C	Sensor chip: CM5
		Running standby, remaining time: 7.0 days

8-1-2. 電源を落として終了

メニューバーの Tools \rightarrow Undock Chip またはツールバーのアイコン () を選択する。

↓	
Biacore X100	×
This will undock the sensor chip	
Help Undock Chip Cancel	

<u>Undock Chip</u>をクリックする。

 \downarrow

インジケーターの Sensor chip が点滅したら、扉を開けセンサーチップを取り出す。メン テナンス用センサーチップをセットする。合わせて、ランニング緩衝液ボトルを MiiliQ 水 ボトルに交換する。

Dock Chip	
⊙ <u>N</u> ew chip	O <u>R</u> euse chip
New chip -	
<u>C</u> hip type:	CM5 🗸
Chip <u>i</u> d:	070510-0957
Chi <u>p</u> lot no:	(optional)
<u>H</u> elp	Dock Chip Cancel

Chip type:で Maintenance を選択し、**Dock Chip** をクリックする。

メニューバーの Tools \rightarrow Prime...を選択する。



 \downarrow

Prime 終了後、再びセンサーチップを Undock して、BiacoreX100 control software を **Exit** する。

 \downarrow

モニター画面左下の Start をクリックして、All Programs/ Oracle Database 10g Express Edition/ Stop Database を実行する。





DOS ウインドウが表示され、『Oracle Database の終了』が始まり、数十秒後に「The OracleServiceXE service was stopped successfully.」と表示される。その後、右上のクローズ ドボックスをクリックして DOS ウインドウを閉じる。



モニターの初期画面中の左下のスタートメニューから、Windows を **Shutdown** する。 Biacore X100 本体電源を落とした後、システム前面のパネルを開け、ペリスターポンプの カバーを開けた状態にする。

(次回 PC 起動時には、自動的に Oracle Database が再スタートする。)



<u>8-2. センサーチップの保存</u>

取り出したセンサーチップは、以下の方法で保存することができる。 保存中にリガンドの活性が低下することが多いので、再使用の際は、リガンドの活性を確 認すること。

① ドライ状態での保存

取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて4℃で保存する。

② ウェット状態での保存

取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを、容器(50 ml 容のふた付きプラスチック管等)に分注した HBS-EP+等の緩衝液に浸し、4 ℃で保存する。

ーシートの取り出しと保存--

センサーチップはカバーとシートから構成されている。



ピンセットを用いてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存する。

ーシートからの緩衝液成分の除去--

再利用する際は、シートの水分を取り除いてからカバーに収める。

シート金膜の窪んでいる面はリガンド固定化面で、平らな面は検出面である。

プラスチックの部分および検出面 キムワイプで拭き、MilliQ®水で湿らせたキムワイプで 再度拭く。さらに、乾いたキムワイプで拭き、水分を 取り除く。 固定化面 キムワイプを"こより状"に細くして、金膜の中央部

キムワイプを"こより状"に細くして、金膜の中央部 分に触れないように、四隅から緩衝液を吸い取る。

ーカバーへの収納—

埃に注意しながらカバーに収める。検出面が表になる向きで、ピンセットでカバーに挿入 する。

9. センサーグラムの編集

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、解析用ソフトウェアである BiacoreX100 Evaluation Software は自動的に立ち上がり、取得データは編集・解析に向け開かれる。過去 に取得したデータを編集解析する場合は、BiacoreX100 Evaluation Software を起動し、ファ イルの呼び出しから行う。

9-1. 解析用ソフトウェアの起動

Windows 画面左下の Start メニュー→ Programs または All Programs → Biacore → Biacore X100 Evaluation Software をクリックする。

9-2. ファイルの呼び出し

🔁 もしくは File → Open…をクリックし、目的ファイルを選択し OK をクリックする。



9-3. センサーグラムの編集

Evaluation Explorer で Sensorgram フォルダから、All sensorgrams をクリックし、Work area 内に Sensorgram window を表示する。

9-3-1. センサーグラムの表示

Sensorgram window 上部のセレクションツール

Curve Name: Fc=2-1	▼ IN Cycle Purpose: <overlay></overlay>	THE Cycle: <overlay></overlay>	44 T
を使用する。			

特定のフローセルからのセンサーグラムの選択

Curve Name: Fc=2-1
 「●●のべもしくは●をクリックし、目的のフローセルを選

択する。

複数のフローセルを同時に表示する場合は、こを使用する。

Curve Name 🔺	Curve Type
Fc=1	Reference
Fc=2	Active
Fc=2-1	ReferenceSubtracted

キーボードの[Ctrl]キーを押しながら、目的のフローセルをクリックする。連続したフロー セルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。

特定のサイクルからのセンサーグラムの選択

Gycle: <Overlay>
 「●●の

 の

 の

 でまたは

 をクリックし、目的のサイクルを選択する。

複数のサイクルを同時に選択する場合は、

Included	Cycle#	Cycle Purpose	Sample Name	Conc.	MW
Yes	1	Startup	Buffer		
Yes	2	Startup	Buffer		
Yes	3	Startup	Buffer		
Yes	4	Sample	b2-micro low		
Yes	5	Sample	b2-micro high		
Yes	6	Sample	b2-micro low		
Yes	7	Sample	b2-micro high		

キーボードの"Ctrl"キーを押しながら、目的のサイクルをクリックする。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。

9-3-2. センサーグラムの表示の変更

Sensorgram window 上部のセレクションツールの左端にある

色の表示の変更

Tools → Color By → Sample をクリックする。
サンプル名ごとに、自動的にセンサーグラムの色が変更され、表示される。
その他、測定温度ごとやフローセルごとにも色を変更し表示することが可能である。

レポートポイントの表示

Tools \rightarrow **Report Point** \rightarrow **Id and Marker** prime prime

9-3-3. サンプル添加開始時間、ベースライン合わせ

Sensorgram window 上部のセレクションツールの左端にある **Tools** を使用する。

Tools \rightarrow **Sensorgram Adjustment...** $\varepsilon \rho \cup \gamma \rho \tau \delta_{\circ}$

🐴 Adjust Sen	sorgram	
- X-Adjustment -	Off Report Point (time=0) Injection Event (time=0)	v v
Y-Adjustment		
	⊙ Off	
÷	O Report Point (response=0)	~
	O Injection Event (response=0)	×
	Enable Second Y-Adjustment (Normalize)	
	Report Point (response=100)	~
	Injection Event (response=100)	✓
- Blank Subtract	on	
	Enable Blank Subtraction	<u>~</u>
Help		OK Cancel

X-Adjustment に Report point (time=0)をクリックし、 ▼で baseline を選択する。



Y-Adjustment も同様に、Report point (response=0)をクリックし、 ▼で baseline を選択する。



9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除

削除する範囲をマウスの右ボタンをクリック&ドラッグし選択する。

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックする。



```
Cut をクリックする。
```



9-4. グラフの編集

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用する。



スケールの変更

Scale...

Scale	
× Scale	Y Scale
✓ Auto	✓ Auto
□ Logarithmic	Logarithmic
Min: -100	Min: -100
Max: 400	Max: 800
	Cancel

デフォルトで Auto が選択されている。スケールを変更する場合は、 ^{✔ Auto}のチェックを外し、各軸のスケールの最小値(Min:)と最大値(Max:)を入力する。

Scale	\mathbf{X}
X Scale	Y Scale ✓ Auto Logarithmic
Min: -50	Min: -100
Max: 400	Max: 800
	Cancel

OKをクリックする。

凡例の移動と削除

Legend...

Legend	
Position O Hidden O Left O Top O Right O Bottom	OK Cancel

デフォルトで Right が選択されている。凡例の位置はグラフの上下左右に配置することが できる。移動する位置を選択し、OK をクリックする。 凡例を表示しない場合は、Hidden を選択する。 OK をクリックする。

マス目の表示

Gridlines...

Gridlines	
X Axis Major Gridlines	OK Cancel
Y Axis Major Gridlines Minor Gridlines	

大小二種類のマス目を入れることができる。

大きいマス目を表示するときは Major Gridlines、小さいマス目を表示するときは Minor Gridlines にチェックを入れる。

OK をクリックする。

9-5. グラフの貼り付け

Sensorgram window 上で、マウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用する。

Copy Graph

グラフを画像としてコピーする。

Biacore 付属のパソコンにインストールされている Word Pad、Paint などに貼り付け、貼り 付けたファイルを保存する。保存したファイルは、画像として別のパソコンに移動させる ことが可能となる。

(例) Word Pad への貼り付け



9-6. データの移管

センサーグラムの移管

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用する。

Export Curves…をクリックする。

 \downarrow

保存先を指定する。

全てのセンサーグラムをテキスト形式で保存する(拡張子:txt)。保存したファイルは、 他のパソコンの Microsoft Excel 等のグラフ化ソフトウェアで再びセンサーグラムを作成す ることが可能である。

(例)保存した text ファイル



測定データの移管

測定結果を右クリックし、Export → To other database...を選択する。

ile View Tools Help						
] ╤ •, ≭						
Create Assay Workflow	Binding Analysis.	Other Options 😥				
Quick Filter Advanced Filter		Filtered on: Folder='test'	14-38-3	Created Dr.	Turne	
		Modified: Two Weeks Ago Image: Street Control of Co	9/15/2009 5:48:28 PM 9/15/2009 3:27:18 PM	administrator administrator	Evaluation Evaluation	
		Kinetics/Affinite.9/14/2009.5-26-110.PM (1) Kinetics Kinetics Search Keys Kinetics/Affinity.9/13/2009.6-19-28 PM	9/15/2009 1:59:25 PM To other database To file 9/15/2009 1:59:23 PM	administrator tor administrator administrator	Results Results Results Results	
		Modified: February 2009	2/23/2009 6:57:01 PM	administrator	Assay Workflow	test2

ファイル名をつけて、目的の場所に保存する。

解析データの移管

 $\textbf{File} \ \rightarrow \ \textbf{Export} \ \rightarrow \ \textbf{Result To Excel...}$

保存先を指定する。

Evaluation Explorer に表示されている解析結果をテキスト形式保存する(拡張子:xls)。他のパソコンの Microsoft Excel で解析結果を開くことができる。

 \downarrow

(例)保存した xls ファイルを Microsoft Excel で開いた例

	A	В	С	D	Е	F	G	н	I	J	К	L	М	N
1	Evaluation	Kinetics / A	finity											
2	Name:	Sample												
3														
4	Sample:	Sample												
5	Temperat.	25												
6	Curve:	Fc=2-1												
7														
8	Model:	Bivalent An	ialyte											
9	Description	r:												
10														
11	Curve	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	ka2 (1/RUs	kd2 (1/s)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/m	kt (RU/Ms)	ri (ru)	Chi² (RU²)	U-value	
12		28071.45	0.019845	0.000287	0.06355	15688.84		3764036				2643.192	N/A	
13	Cycle: 2						2.4E-09		30	11695736	2.114536			
14							1.2E-08				9.153725			
15							6E-08				58.73426			
16							3E-07				219.0913			
17							1.5E-06				274.0177			
18														
19														
20														

9-7. データの保存

解析およびセンサーグラムの編集後に、結果の保存を行う。

File →Save As...をクリックする。



保存先を選択し、Name:にファイル名を入力し、Save をクリックする。

10. ユーザー管理

10-1. ユーザー管理

ユーザー管理は、Biacore X100 Control Software を<u>"Administrators</u>"権限で立ち上げた場合の み有効となる。 ユーザーグループは、"Administrators"(管理者)と"Users"(使用者)に分けられる。 初期設定では、1 名の Administrator が登録されている。

Username:	admin	
Password:	administrator	

Administrators グループ・・・	ユーザーアカウントの作成およびパスワードの設定、
	データのバックアップの設定変更ができる。データ(フ
	ォルダ)の削除には制限がない。
Users グループ・・・	"Administrators"(管理者)が作成する"ユーザー名"のフ
	ォルダ(個人用)内にのみ測定データを保有できる。
	他ユーザーのデータ閲覧には制限がない。ユーザー権
	限で作成したデータのみ削除可能。管理者および他ユ
	ーザーが作成したデータの削除は不可能。

メニューバーの Tools \rightarrow Preferences で設定を行う。Users タブをクリックする。

P	refere	ences						×
[Users	Database E	Jackup					
	Use	er name	Full name	Group	Locked	Disabled		
	8	admin	administrator	admin	No	No		
	8	BIACOREIS	biacoreis	admin	No	No		
	8	IS	Instrument Service	admin	No	No		
	8	NORIO	norio	user	No	No		
	8	TRAINING	Training	user	No	No		
		<u>A</u> dd	<u>E</u> dit <u>D</u> e	lete	<u>C</u> hang	e Password	Password Properties	
	He	elp					<u>O</u> K Cancel]

パスワードの詳細設定を行う場合は、**Password Properties…**をクリックする。 次項目の設定が可能である。

- ・最小文字数
- ・変更の期間
- ・有効期限を督促する日数

(Add User ダイアログで、□Password never expires にチェックを入れた場合は、無効となる。)

新規にユーザーアカウントを作成する場合は、Add...をクリックする。

\downarrow

	Add User				
	User name:				
	Full name:				
	Group:				
	Description:				
	User password				
	Password:				
	Retype password:				
	User cannot change password				
	Password never expires User must change password at next login				
	Account is locked				
	Help OK Cancel				
User name:	ユーザーネーム(必須)				
Full name:	ユーザーのフルネーム(必須)				
Group:	ー , , ,,,,,,, ム (ω次) プルダウンメニューで. "Δdministrators"またけ "Heore"の選択を行う				
Description:	コメントがあれば入力				
User passwor	rd···				
Password:	パスワード(必須)				
*必要に応じ	て、下記にチェックを入れる				
□User canno	ot change password				
	ユーザーによるパスワードの変更を無効にする				
□ Password n	never expires				
	パスワードに有効期限を設けない				
	(常に、チェックを入れ無期限の設定を行うことをお勧めする)				
\Box User must change password at next login					
	ユーザーが初回ログインした際にパスワードの変更を行う(パスワート				
	の管理は、ユーザーが行う)				
User account	· · ·				
□Account is locked					
	アカウントを固定する(チェックを入れないことをお勧めする)				
\Box Account is	disabled				
	アカウントを無効にする(フォルダは存在する)				
設定終了後、	OK をクリックする。				

10-2. データバックアップの設定

Biacore X100 Control ソフトウェアおよび Biacore X100 Evaluation ソフトウェアで保存した データは、全て**"Oracle Database 10g Express Edition**"のサーバー内に保存される。

初期設定では、毎週日曜日 23 時から自動バックアップされる。"Administrators"(管理 者)のみ、設定の変更が可能である。バックアップ中には測定を行わないことをお勧めす る。

注) ハードディスクの空き容量として約 2GB が必要となる。

Biacore X100 Control Software のメニューバーの **Tools** \rightarrow **Preferences** の **Database Backup** タブをクリックする。

	\downarrow					
Preference	25					
Users D	Users Database Backup					
	oday ∏Tuesda <u>y ∏W</u> ednesday ∏T <u>h</u> ursday ∏Ejiday ∏Soturday ♥S <u>u</u> nday					
Start tim	ie: 23 🗊 0 🗯 Backup now					
Backup Backup	Backup location Backup folder: C:\Program Files\Biacore\Biacore\X100 Dalabase\					
Ena						
E	Eolder.					
Number	Number of saved backups: 7					
Piestore	Festore					
Avaiabi backup	a Dackups for restore (Dased on Dackup Idider) of (created 4/1/2007 11:00:55 PM)					
Нер						
Schedule · · ·						
	曜日を指定					
_						
Start time:	開始時間を指定					
Backup location • • •						
Backup folder:	バックアップ先を指定					
	(初期状態では、C:/ProgramFiles/Biacore/BiacoreX100					
	Database/が設定されている)					
Enable secor	ıd сору					
	別途、ネットワークドライブ等へバックアップが可能					
Number of saved backu	ps:					
	バックアップの最大数を指定(デフォルトは 7)					
	*バックアップ数が指定した数に達している場合、新たにバッ					
	クアップを行うと古いバックアップが削除される					
Biacore®X100 Plus Packag 日本語取扱説明書	је					
注)

測定中にバックアップが実行された場合、測定データは C:ドライブに一時保存される。保 存されたデータをデータベースにインポートするために、測定終了後、ソフトウェアの再 起動行う。インポートするための確認画面が表示される。画面に従いインポートを行う。

Restore · · ·

指定したバックアップデータの修復が可能である。測定中に実施しないことをお勧めする。 プルダウンメニューからバックアップを選択して、Restoreをクリックする。確認画面の OK をクリックすると開始する。

注)

修復を実行すると、全データはバックアップデータに置換する。

修復中は、データベースにアクセスできない。

最終バックアップ以降に保存したデータおよびユーザーネームとパスワードは、次回修復 時に削除される。必要に応じ、データは C:ドライブに保存を行う。

測定中に修復を実行した場合、測定中のデータは C:ドライブに一時保存される。測定終了 後、データベースにインポートする。画面に従いインポートを実施する。



索引

А

Add Report point	
Administrators	
Affinity	
Aim for immobilized level	

в

Bar Chart	
Baseline	
Binding	
Binding Analysis	
Bivalent Analyte	
Blank immobilization	
Bulk Effect	G

С

Calibration Curve	
CFCA	Q
Chi ²	80
Close	6, 8, 36, 39, 61, 101, 122, 163, 165
Contact time	
Copy Graph	
crude	G
Current Fits	
Custom Methods	
Custom Report Points	

D

Desorb	
Desorb and Sanitize	
DMSO	E, H, L, N, O
Dock Chip	5, 161, 171

Е

EDC	D, 35, 38, 100
End manual run	
Evaluation Explorer	
Exclude point	
Export	
Extrapolate	

F

Flow path	
Flow rate	
G	
Gridlines	
н	
Heterogeneous Analyte	
Heterogeneous Ligand	
1	
Immobilization pH Scouting	
Immobilization Results	
Immobilize	

Injection command	
К	
<i>k</i> a	C, I, J, 78
Κ	J
k _d	
K	
Keyword Table	73 134 147 154
Kinotics	75 00
Kingtics/Affinity	
km	
KIII	Q
L	
Legend	
Load Samples	
М	
Manual Run	
Ν	
NHS	B, D, E, 32, 35, 38, 100
0	
Oracle Database	
Other options	
Overview	
P	
Password	105 106 107
Paoling	
Proferences	
Preierences	
Print	
	Σ0
Q	
Quality Control	
Quick Filter	.3.4
R	
Rack Ejected	
Rack Illumination	
rack locked	
Rack Positions	
Reference line	
Reference Line	
Reference subtraction	13, 44, 105
Regeneration Command	50 111
Polativo Posnonso	1/0
Reiresp	
Report point	
Residuals	J א גער אין דער אין דע אין דער אין דער
Response Bound	۲۵, ۲۵, ۵۲ عد
Response Boully	
Nespulise Fillal	
Results reference	
Reuse chip	
RI	
Rmax	C, J, 78, 79, 83

S	
Save	
Scale	
SE	
sensor chip	5, 6
Sensor Chip Maintenance	
Sensorgram window	
Set Temperature	
Show All Curves	
Show Curves of Same Type	
Show Only Current Curve	
Slope	
Solvent correction	M, 136, 137
Specify contact time	
Stability	
Standard error	
Standby	
Steady State Affinity	
Stop Database	
Stop Run	
Superclean	
т	
tomporeture	1.0

temperature	, y
Two state Reaction (conformation change)	76

Username	
Users	
U-value	

۱	,	

Vial/well position	6, 47, 10	38
W		

Wizards	
Work area	139, 176, 177
Workflow	

あ

アッセイボタン
アナライトB, C, G
アナライト結合部位数C
アナライトの拡散速度R
アナライトの調製G, O
アフィニティー
アミノ基B
アミンカップリングキットD
アルカリ条件H
アルデヒド基B

7			*	~	~~
1	\sim	トロン	·	9, 2	23

Biacore®X100 Plus Package 日本語取扱説明書

ð	
ウィザードモード	
え え	
エタノールアミン	D
塩条件	Н
お	
温度設定	
か	
カーブフィッティング	J
カイネティクス	1
カイネティクス解析	I, J, K, Q
界面活性剤	Н
解離速度定数	I, 79
解離定数	C, G, I, J, K, 79, 87
化学耐性	E
拡散係数	Q, R, S, U, 152
き	
キャプチャー法	
キレート剤	Н
緊急停止	
四灯 平	
クルート	
け	
結合速度定数	I, 79
検量線	C, P
Z	
固定化	B, F, P, 13, 34, 99, 101
固定化量	C, 36, 39, 101
固定化履歴	
4	
	-
 	C
円生	Н
円 生余 仟	G, H
冉生条件の検討	G, 57
冉生浴次	H, 50, 51, 59, 62, 107, 111, 119, 120, 123

最大固定化量	C
サポートナビゲーター	
残差プロット	
酸性条件	H
サンプリング設定	

L

システムチェック	
至適なアナライト濃度	K
至適な流速	K
ジメチルスルホキシド	L
初期結合速度	Q
シングルサイクル法 	
親和定数	, , , , , ,

す

フクリーニング	~
ステータスバー	3
ステータスマーク	.77
スペック	.78

せ

センサーチップの交換	<u>ب</u> 1	61
センサーチップの交換	<u>ų</u>	61

そ

阻害法	P

ち

チオール基	В
中断	
直接法	P

つ

ツールバー	3
-------	---

τ

低分子化合物	L
低分子化合物アナライト	
デキストラン	F
0	
濃縮効果	
濃度測定	C, P, 141
は	

バルクレスポンスM,	N
反応速度定数	J
反応モデル	6
反応モデルの変更	32

ひ

非特異的吸着	F, G
表面プラズモン共鳴	A
品質評価結果	77

۰Ś۰

フィッティング
フィッティングカーブ
フィルタータブ
プーリング機能
プレコンセントレーション効果F
分子量補正138

\sim

平衡值	J
ベースラインの変動140)
変性剤H	I

ほ

補正値		 	 	N
ポンプキャリブ	レーション	 	 	

ŧ

マイクロ流路系	
マストランスポート	R
マストランスポート係数	Q, R
マストランスポートリミテーション	C, Q, R, 156
マニュアルモード	11
マルチサイクル法	I, 44, 72

め

メニューバー	3
ф	
有機溶媒	E, H, L
ユーザー管理	
遊離型チオール基	B

よ

溶液効果G, 79, 88

196 索引

溶媒補正	M, N, 134
溶媒補正曲線	N, O, 135, 137
Ъ	
ラック	10
Ŋ	
リガンド	B, C, D, E
リガンド希釈液	
リガンド固定化セル	N
リガンドの調製	E
リガンド希釈液	E
リファレンスセル	G, N, 78
流速	
理論的最大結合量	C
	o
h	
レポートポイント	
連続添加	
わ	
ワークフロー	102, 114, 117, 123, 124, 141

■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。
ごÄKTA、クロマトグラフィー関連製品
ビアコア関連製品
電気泳動関連製品、画像解析装置
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

論文に掲載いただく際の名称・所在地 Cytiva Tokyo, Japan

 グローバルライフサイエンステクノロジーズ ジャパン株式会社
〒169-0073
声京都新宿区百人町 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。