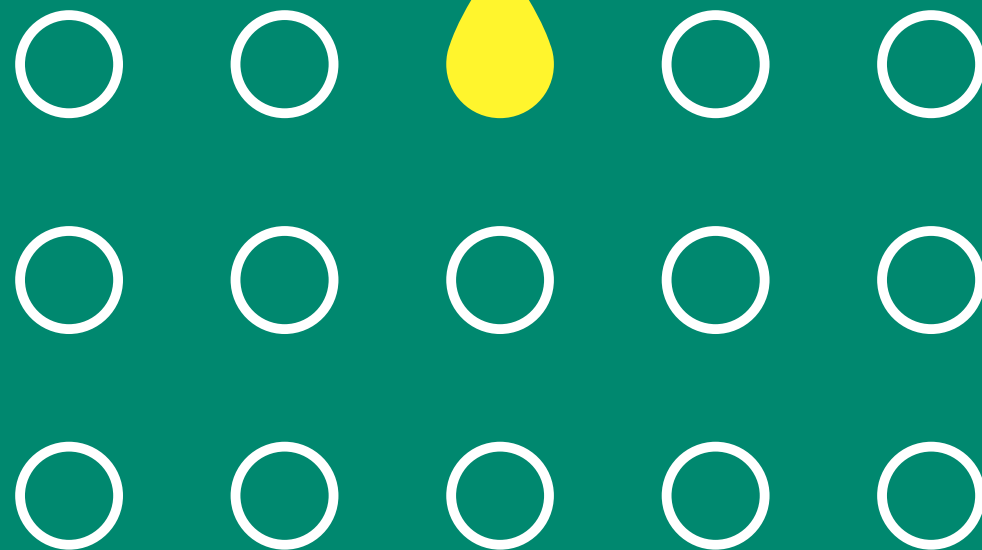


Cytiva Webinar

まもなく開始します。
もうしばらくお待ちください。

※開始時刻から30秒ほど遅れての配信となります。

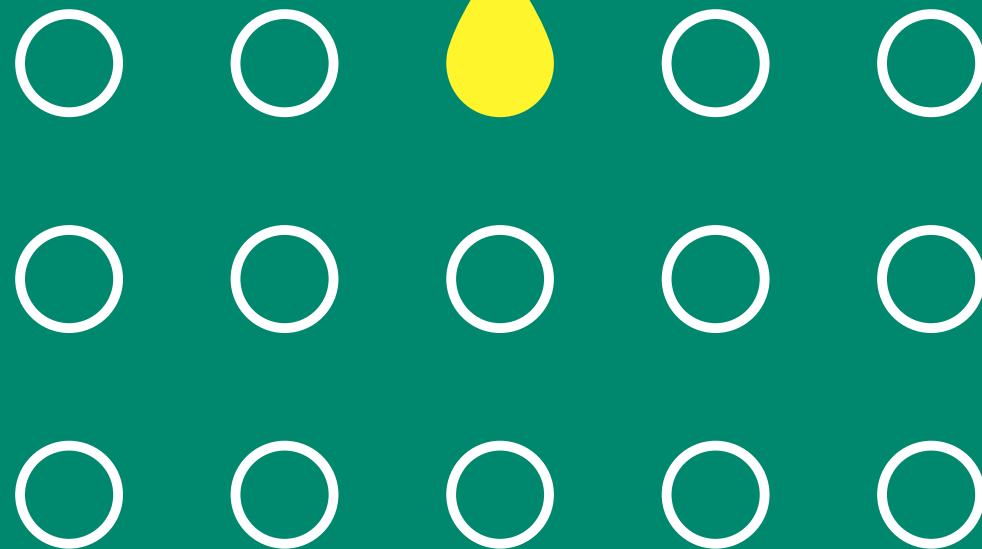


音声につきまして

- 視聴者の皆様の音声は講師、他の参加者には届きません。

ご質問につきまして

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





Biacore で 粒子を測定する

Prepared for Masami Koinuma

March 18, 2021

Agenda

1. Biacore の流路サイズと粒子サイズ
2. 粒子の評価方法
3. 実例
 - 3-1. リポソーム
 - 3-2. ラテックス、金コロイド
 - 3-3. 細胞 whole cell
 - 3-4. リソソーム
 - 3-5. VLPワクチン
 - 3-6. インフルエンザウイルスHA抗原
 - 3-7. アデノウイルス AdV
 - 3-8. アデノ随伴ウイルス AAV
 - 3-9. CFCAでの測定（ポリオウイルス）
 - 3-10. Covid-19
4. まとめ

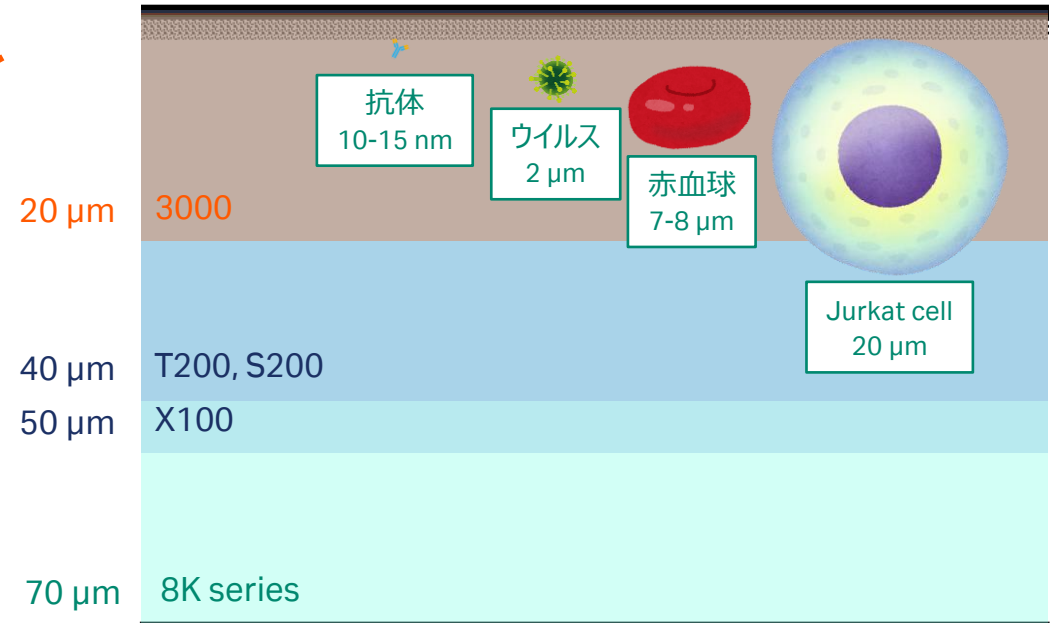
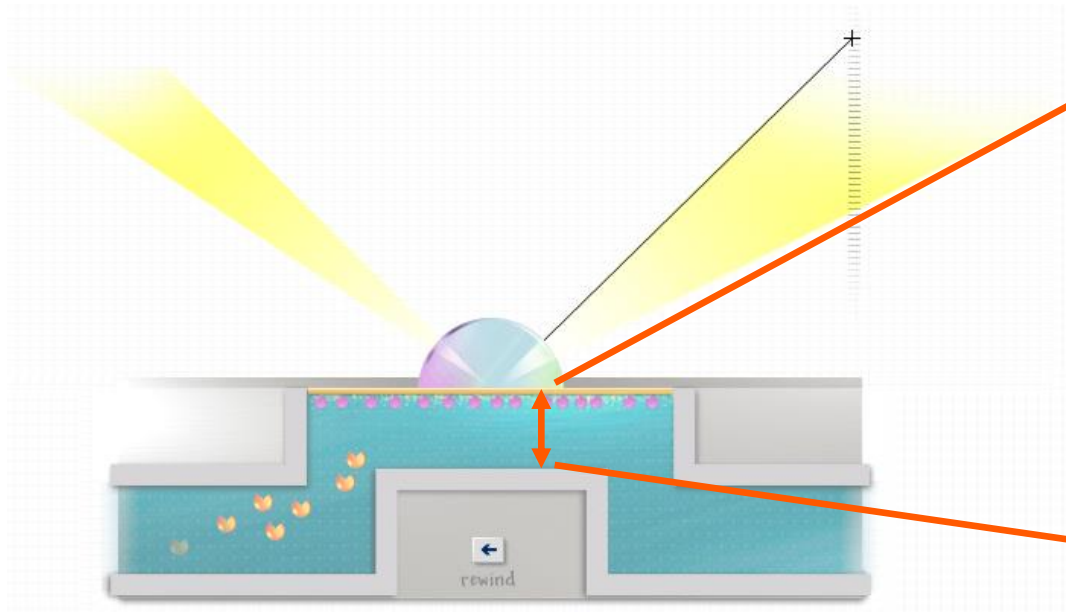


1

Biacore の 流路サイズと粒子サイズ

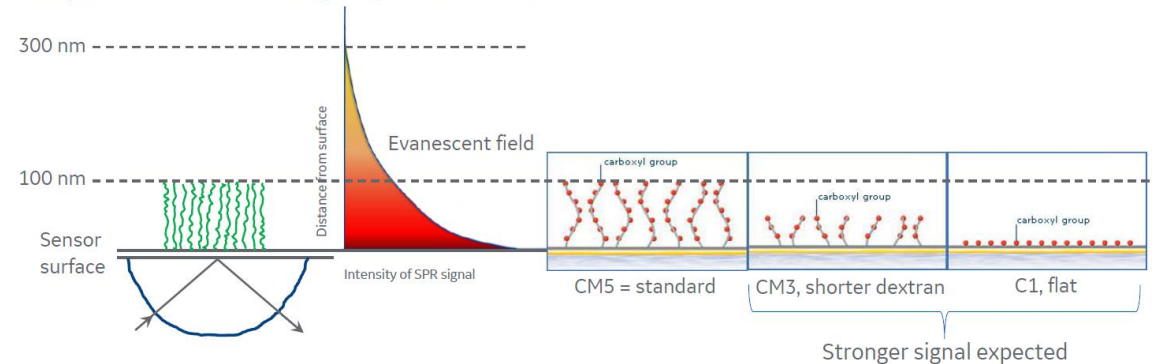
フローセルと取り扱える粒子のサイズ

装置によって異なるがいずれも粒子測定可能



因みに Biacore が鋭敏に検出できるのは金膜から 300 nm 程度
また CM5 チップのデキストラン長は HBS-EP 中で 100 nm 程度

Schematic view of a sensor surface with dextran layer and exponential decay of the evanescent field, sensing changes in refractive index.



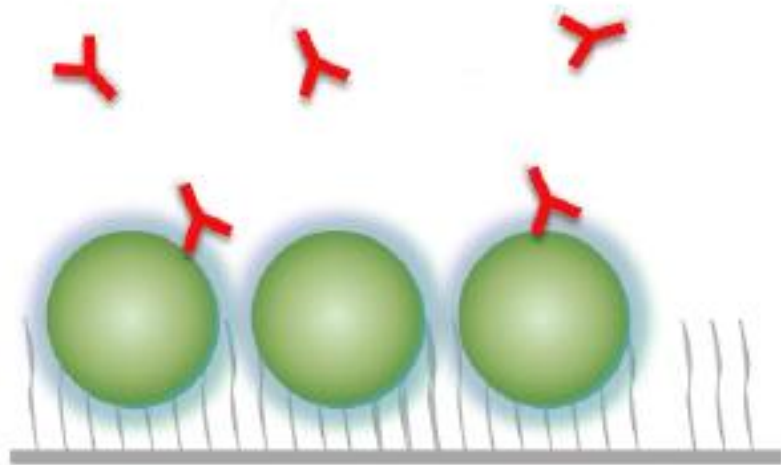
2

粒子の評価方法

粒子の評価方法

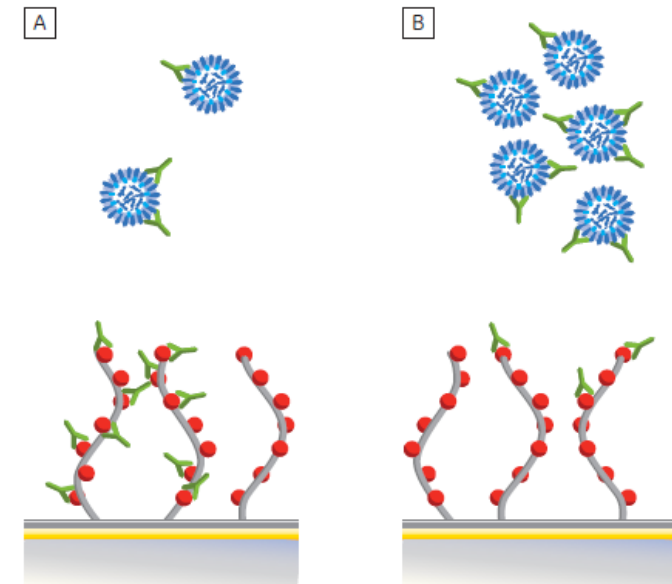
粒子をリガンドとして用いる場合

- 濃度測定（競合法）
- Kinetics 解析
- Affinity 解析



粒子をアナライトとして用いる場合

- 濃度測定（直接法、競合法、阻害法）
- **（見かけの K_D 算出）**
- **（別の粒子との）相対的な比較**



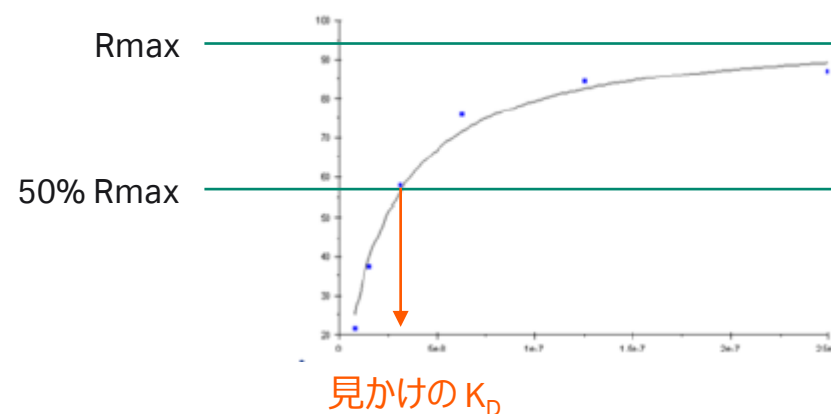
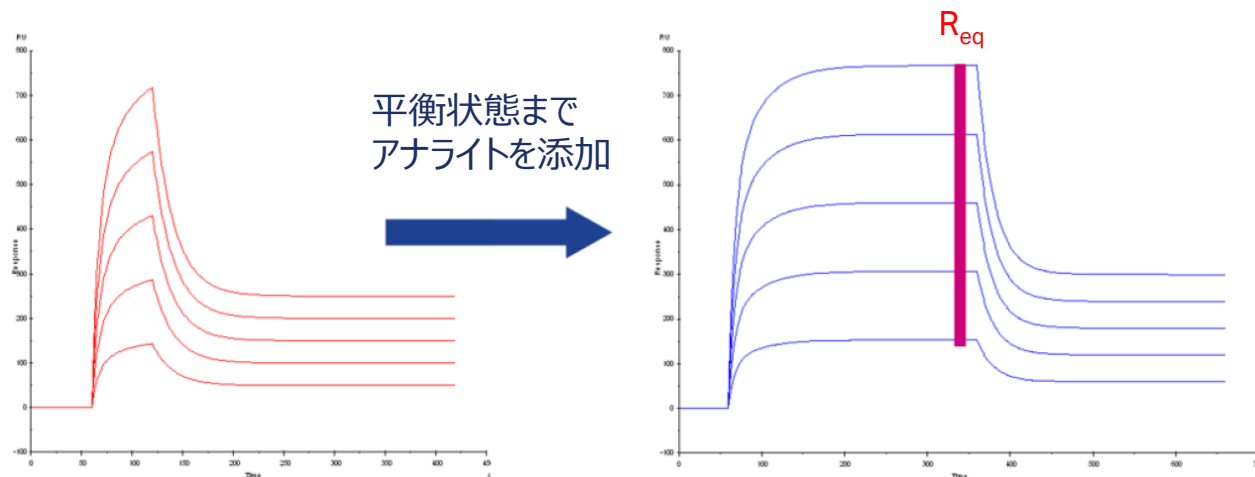
粒子をアナライトとして用いる ～見かけの K_D 算出～

平衡値を使う

- 平衡値を使って見かけの K_D を算出することがある
- 結合様式不明でも対応

問題点

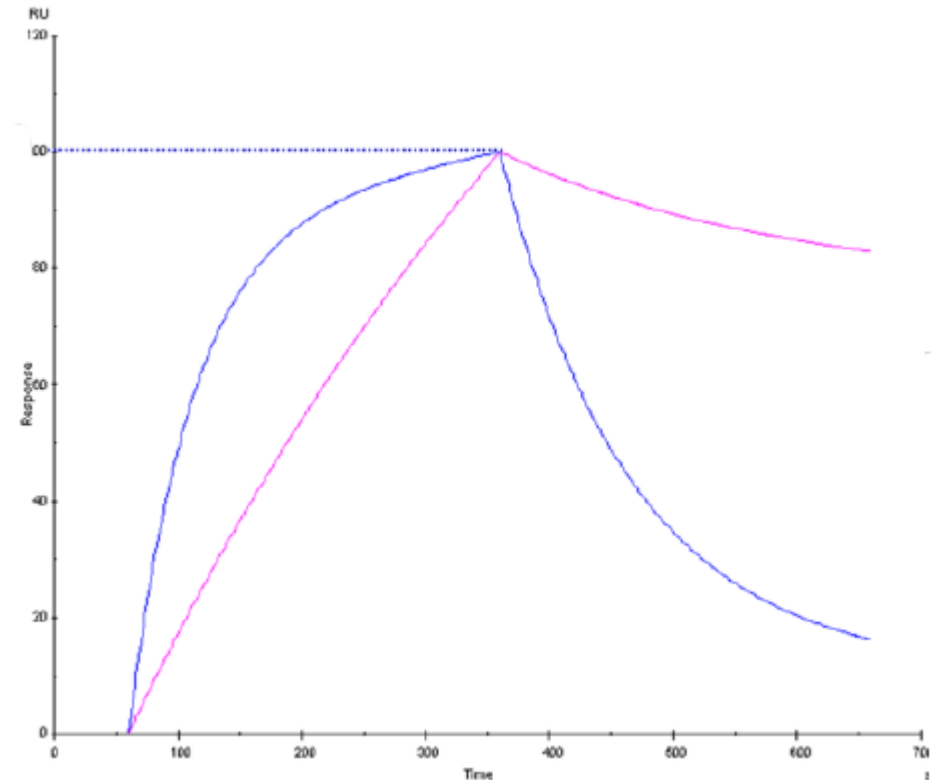
- 解離が遅く平衡状態になるまで時間がかかる
- リガンドの固定化量にも影響を受ける



粒子の評価方法 他の粒子との相対的な比較 (1)

センサーグラムの Normalize

- 最大の結合量を100として標準化
- 解離相の形状で安定性を評価
- (解析ソフト内で評価可能)
- 固定化量の影響あり



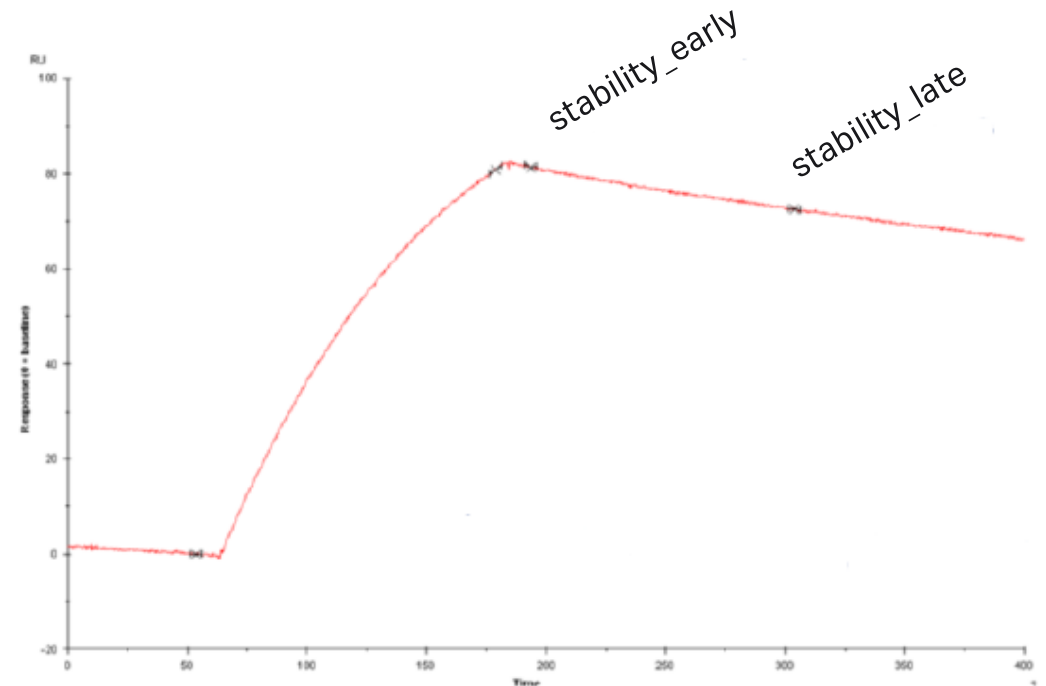
Suzuki, F., M. Goto, *et al.*(1998)
J Biol Chem 273(45): 29302-8

粒子の評価方法 他の粒子との相対的な比較 (2)

% left

- 一定の解離時間で残存する複合体割合を評価
- 固定化量の影響あり
- 式

$$\%left = 100 \times \left(\frac{stability\ late}{stability\ early} \right)$$

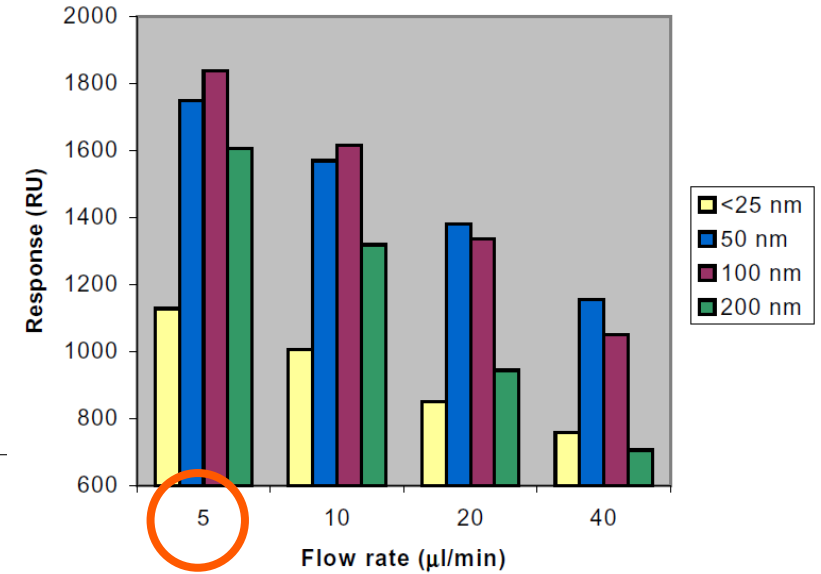
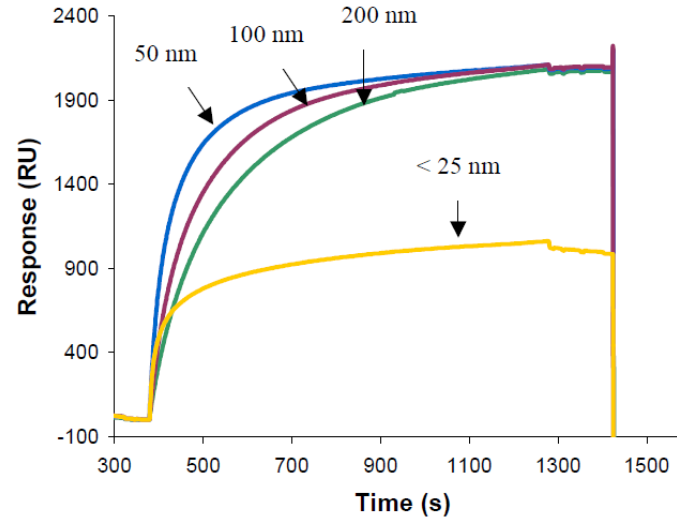
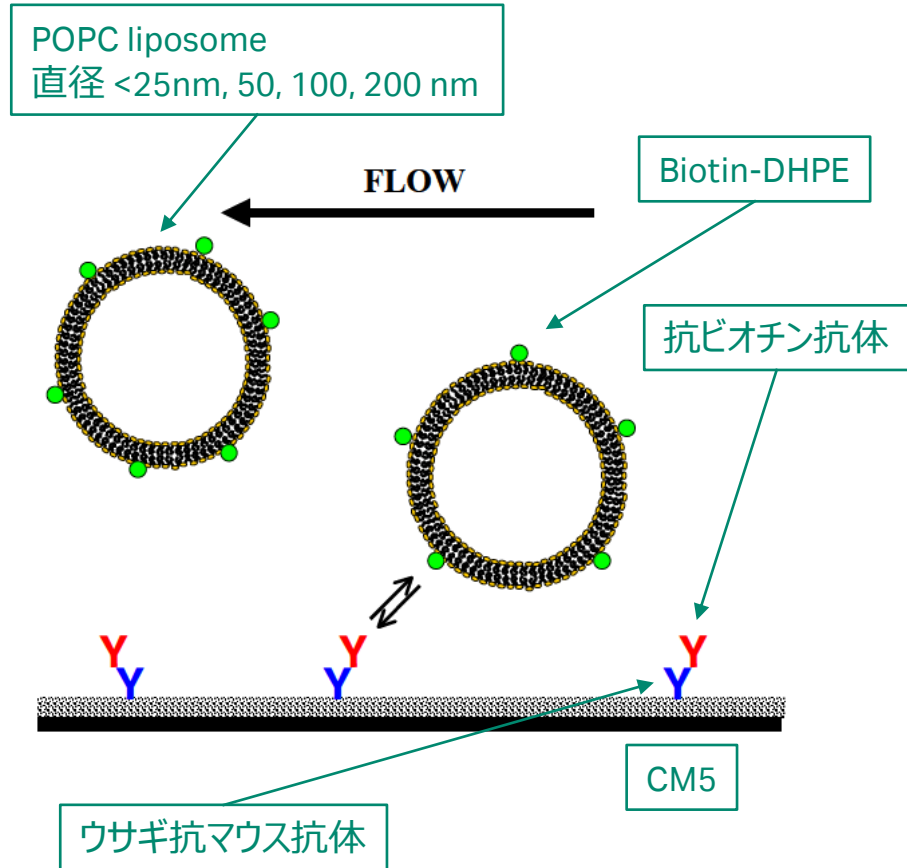


3

实例

リポソームをアナライトとして添加する (1)

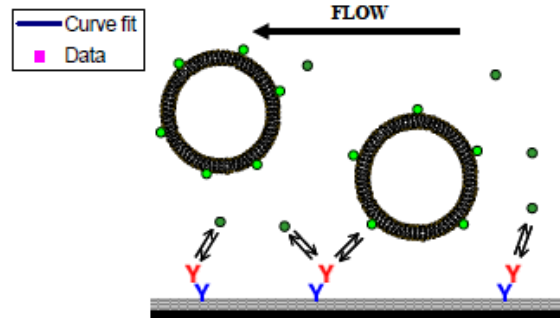
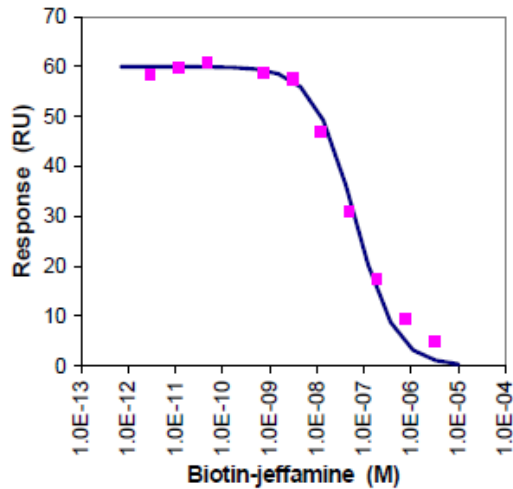
大きい粒子は流速の影響を受ける



リポソームをアナライトとして添加する (2)

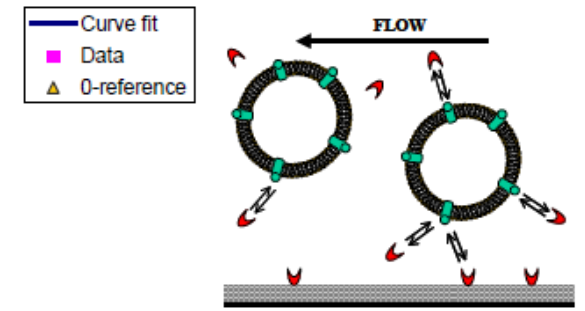
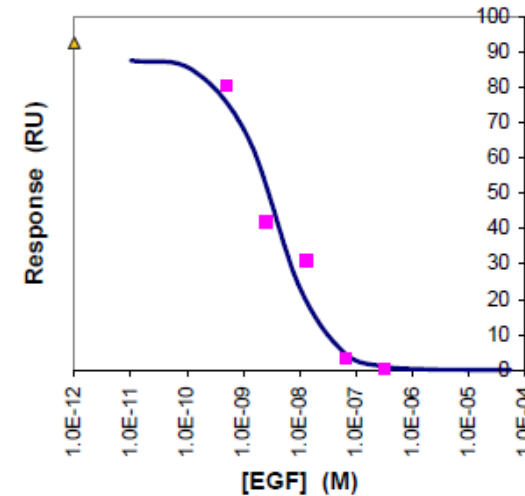
競合法

- 一定濃度のリポソームと可変濃度の Biotin-jeffamine をプレミックスして添加 (競合法)
- $IC_{50} = 60 \text{ nM}$



阻害法

- EGFをアミンカップリングでCM5チップに固定化
- EGFレセプターが埋め込まれたPOPCリポソームと濃度条件を振ったEGFをプレミックスして添加
- $IC_{50} = 3 \text{ nM}$



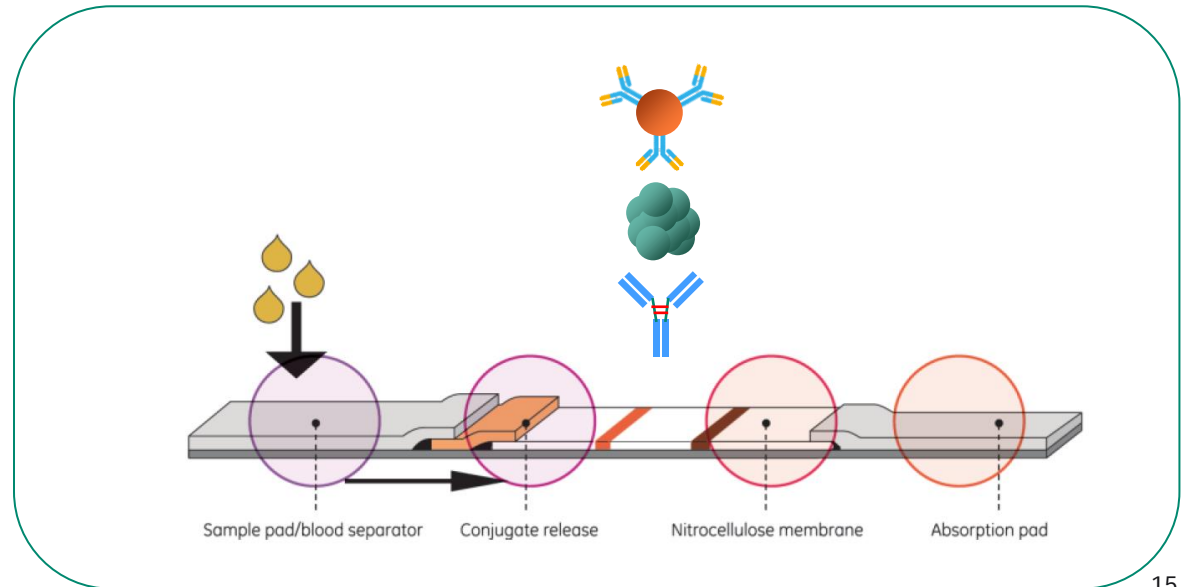
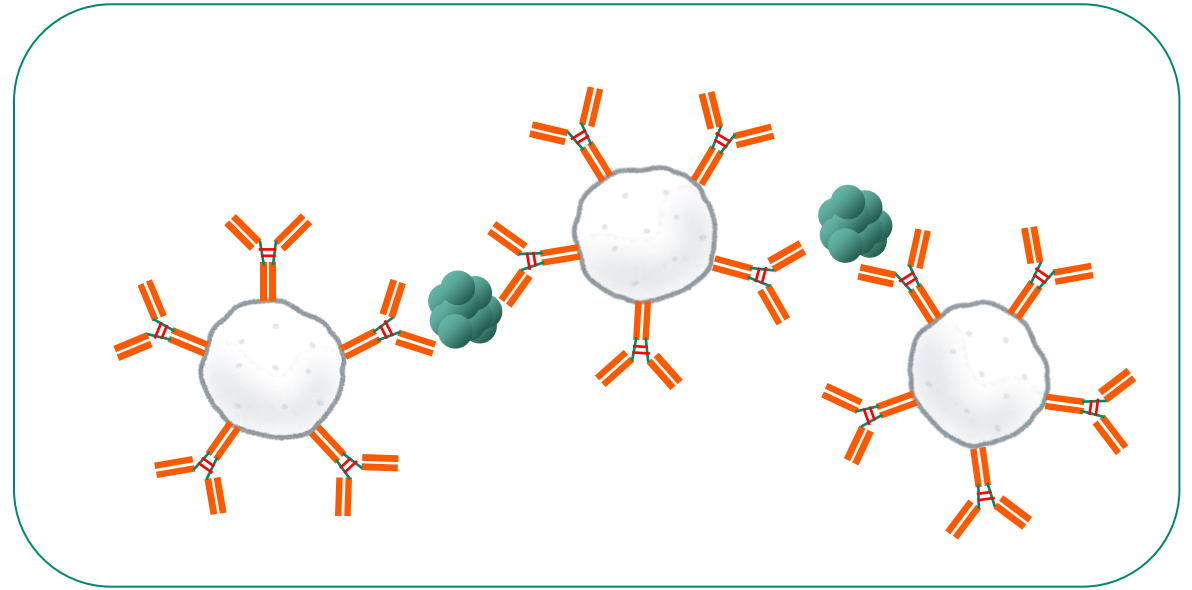
ラテックス粒子や金コロイド粒子

診断薬で用いられるキャリア

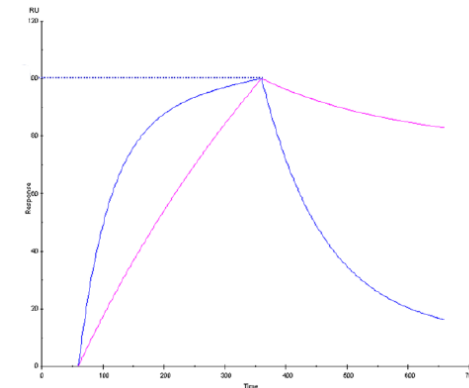
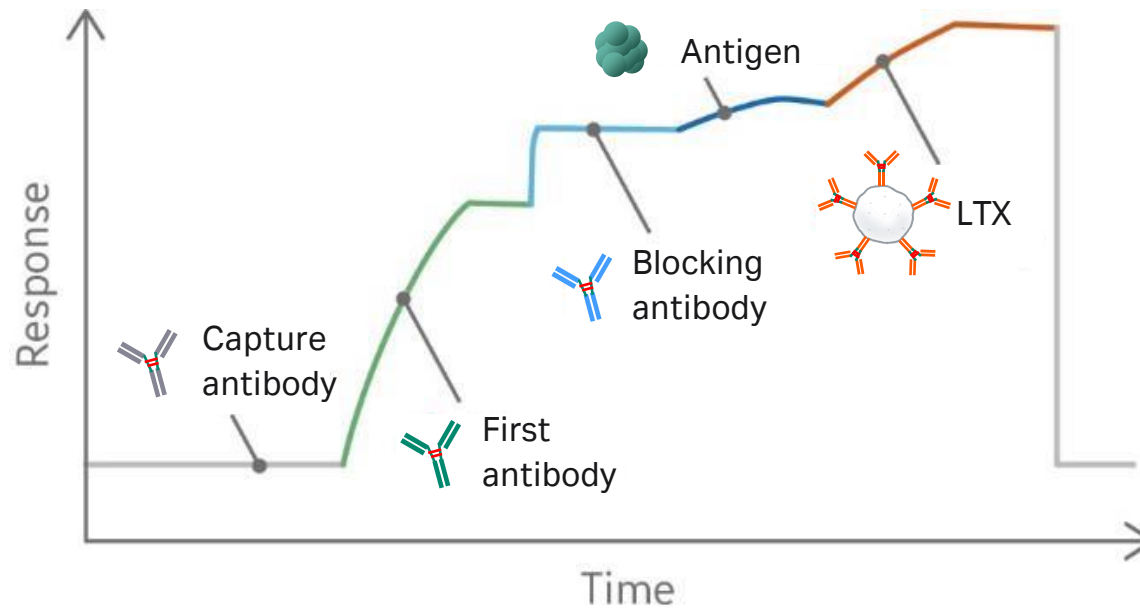
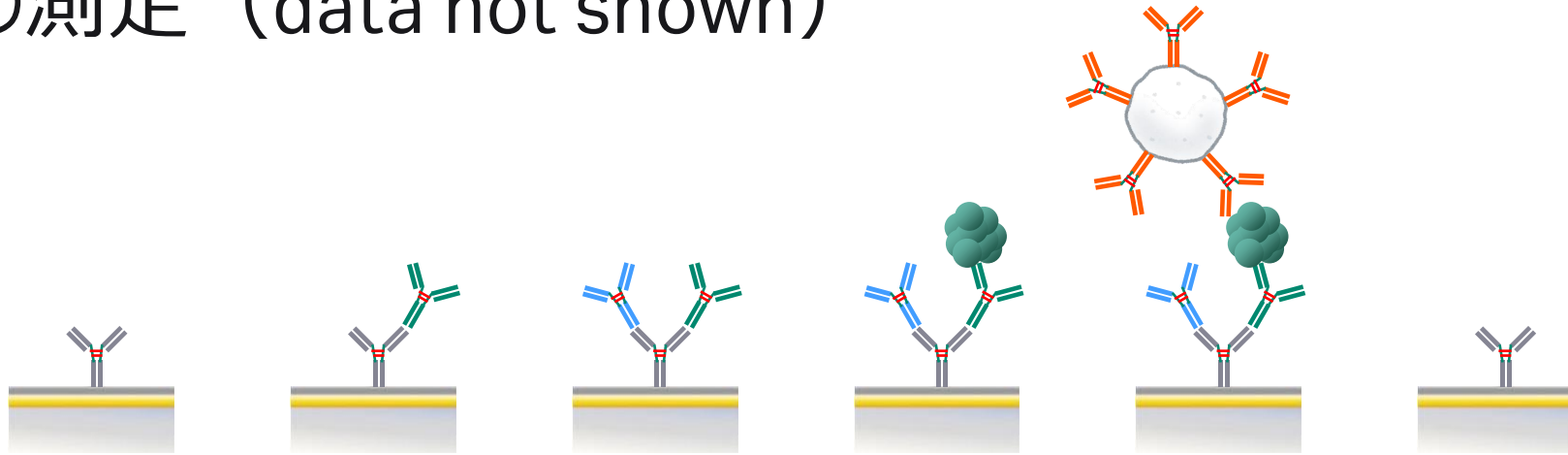
- ラテックス粒子の材料はポリスチレン系が多い
- 直径数十～数百nm程度
- 抗体などを固相化
- 粒子の凝集を確認

- 金コロイド粒子は形状様々
- 直径数十～数百nm程度
- 抗体などを固相化
- 検出はラテラルフローなど

※なおラテラルフロー用サンプルパッド、コンジュゲートリリース、メンブレン、吸収パッドなども弊社で取り扱っております



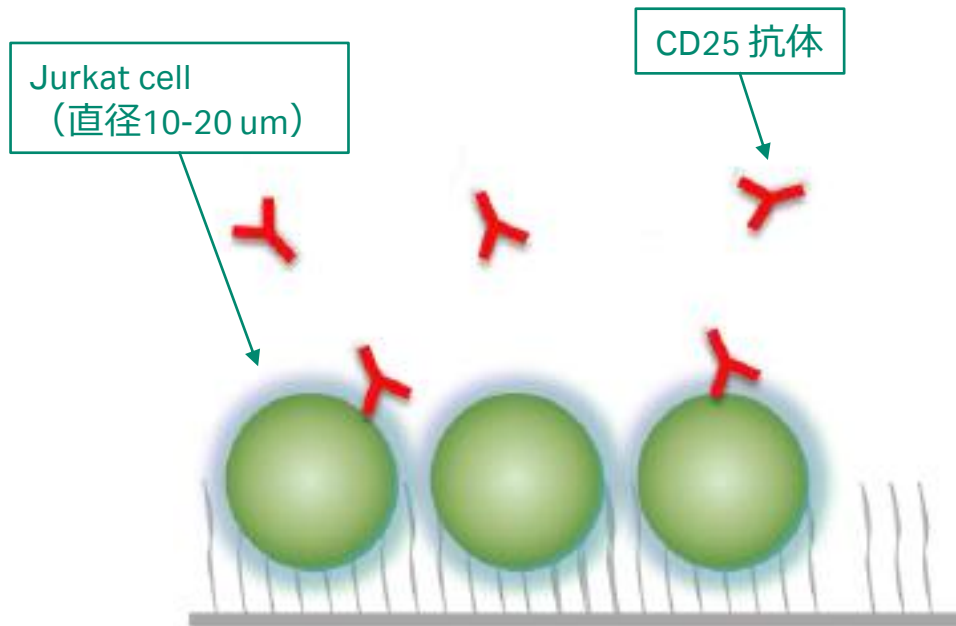
ラテックスの測定 (data not shown)



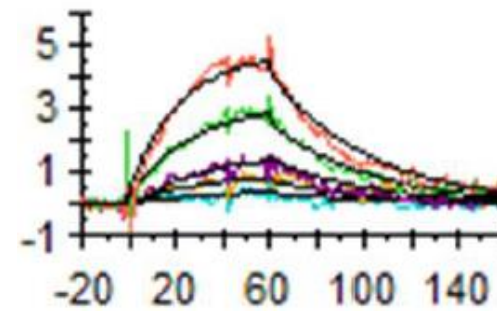
(イメージ図)

細胞の測定 (1)

アルデヒドカップリングで直接固定化可能



ランニング緩衝液の条件検討



Selected

20mM Tris, 150mM NaCl

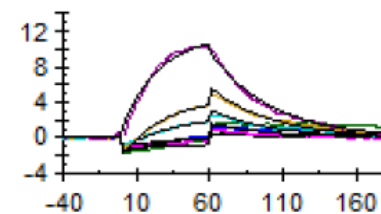
$k_a = 2.3 \text{ e}5$

$k_d = 2.4 \text{ e-}2$

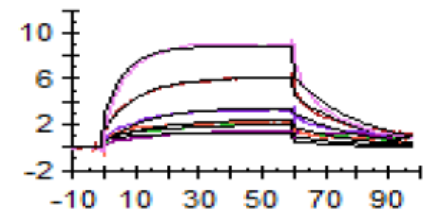
$K_D = 1.1 \text{ e-}7$

※3, 24 hr後もほぼ同様のkinetics

20mM HEPES
150mM NaCl

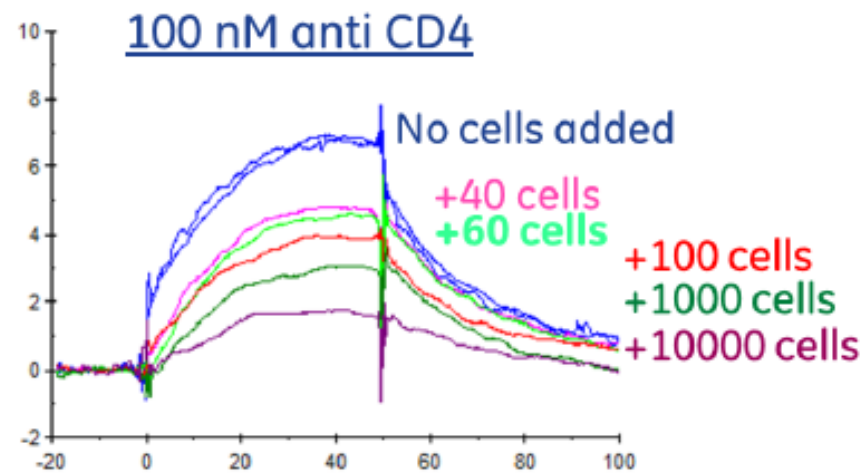
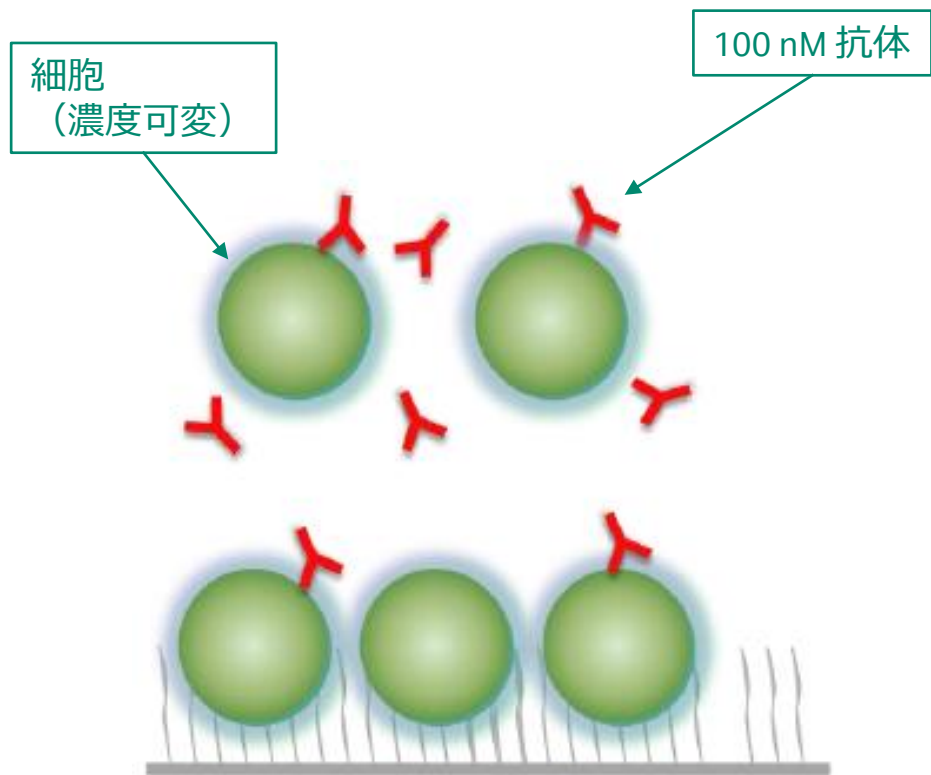


20mM PBS
150mM NaCl



細胞の測定 (2)

競合法

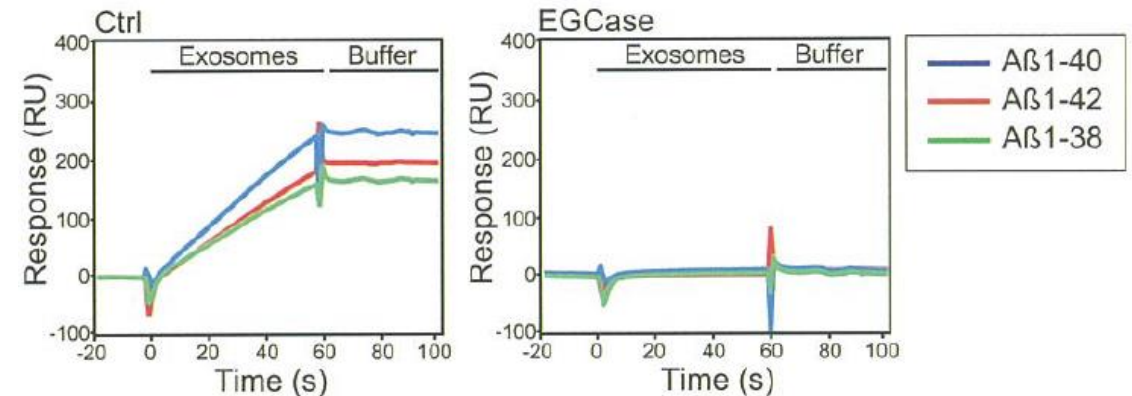
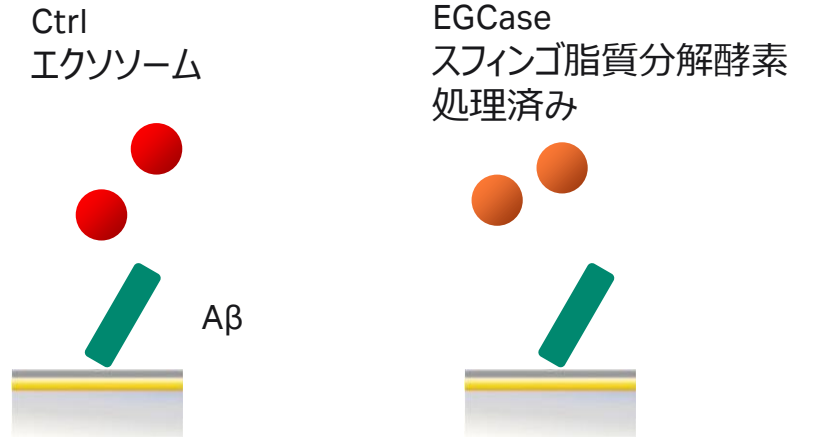


エクソソームの測定

タンパク質や RNA などを含む細胞外小胞

- 50-150 nm の粒子で表面には様々な膜タンパク質
- ニューロン由来のエクソソームの膜表面には糖脂質の一種の glycosphingolipids (GSLs) が存在
- GSLs は Amyloid β ($A\beta$) と結合
- アルツハイマー病の進行に従い血中 $A\beta$ 結合エクソソームの濃度が増加...疾病マーカーとして期待

- CM5 チップ上に $A\beta$ を固定化
- マウス神経芽細胞腫の N2a 細胞から分泌されたエクソソームを添加



J. Biol. Chem. 289(35) 24488 –24498 (2014) Yuyama et al.

子宮頸がん HPV 様 VLP ワクチン

背景

- 子宮頸がん発症の主な原因は発がん性 DNA ウィルス HPV の 16 型と 18 型に感染すること
- Capsid の L1 タンパク質に対し水酸化アルミニウムベースのアジュバンドに結合させて VLP を形成
- Native なウィルスで報告されている、立体構造に依存する重要な中和抗体誘発エピトープが VLP でも存在するかどうか検証

アッセイ法

- ビオチン抗体を固定化
- ビオチン標識 HPV-16 あるいは HPV-18 L1 VLP をキャプチャー
- 既報の立体構造認識中和抗体添加

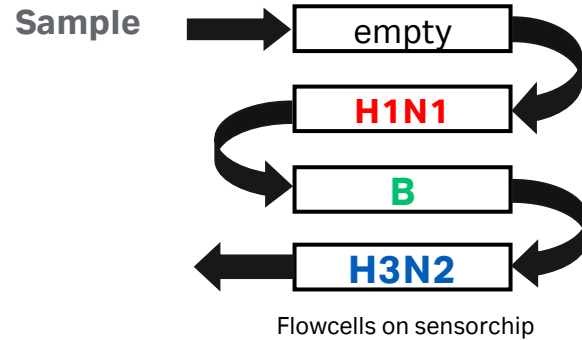
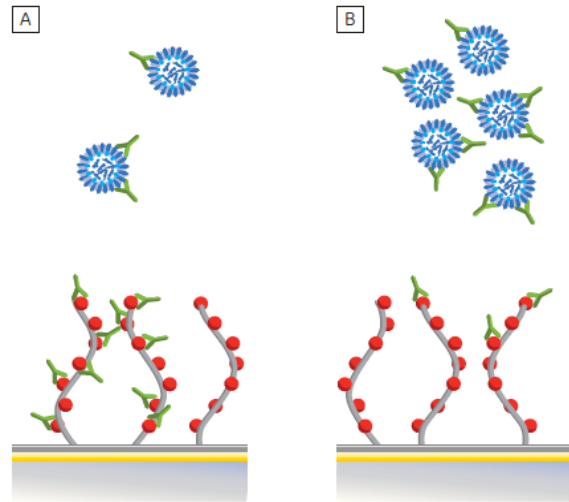


Deschuyteneer et al. Human Vaccines 6:5, 407-419; May 2010

インフルエンザヘマグルチニンの濃度定量 (1)

競合法で実施

一定濃度の抗血清
+ 可変濃度の Ref. Virus

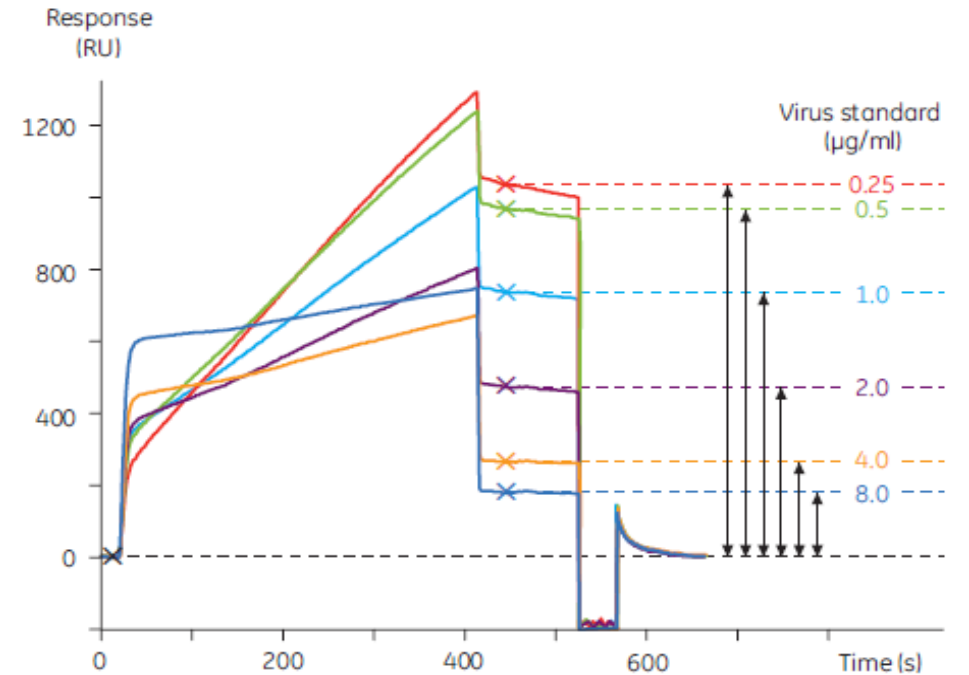


The virus in the sample



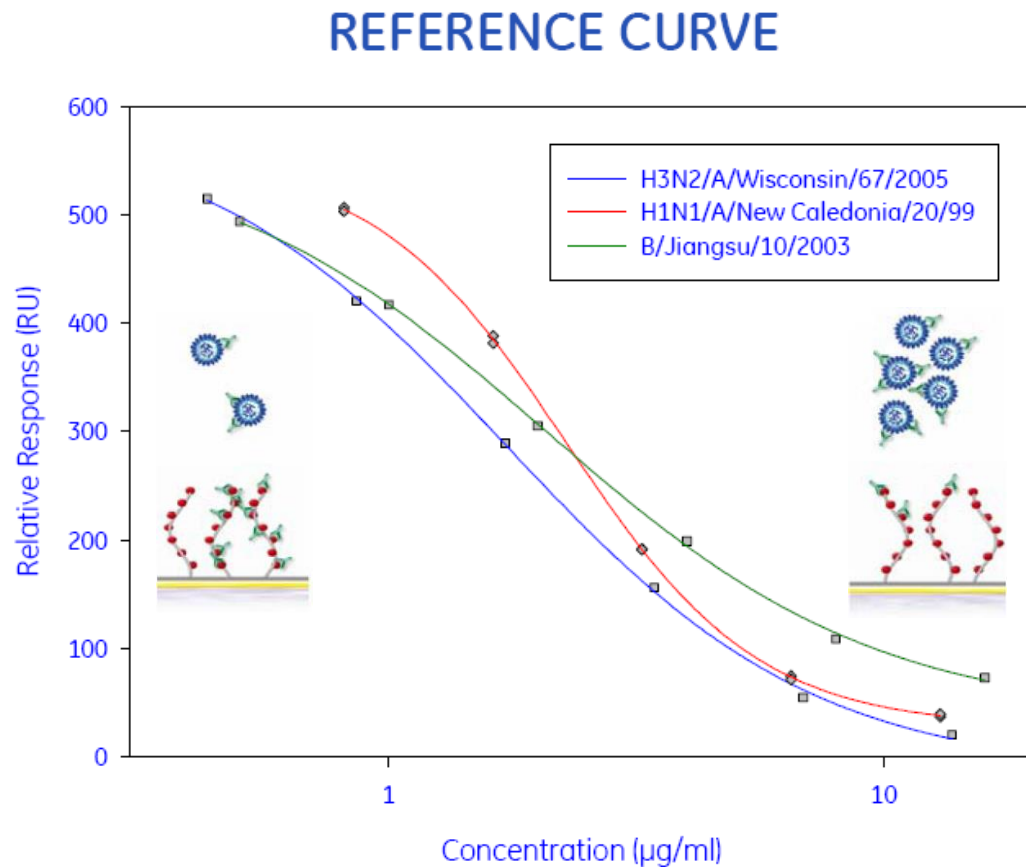
Influenza HA protein
今回はA型H1N1, B型, A型H3N2を用意

標準品の測定例



インフルエンザヘマグルチニンの濃度定量 (2)

標準曲線

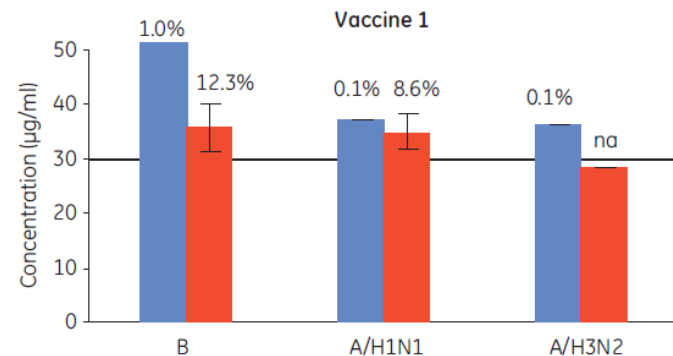
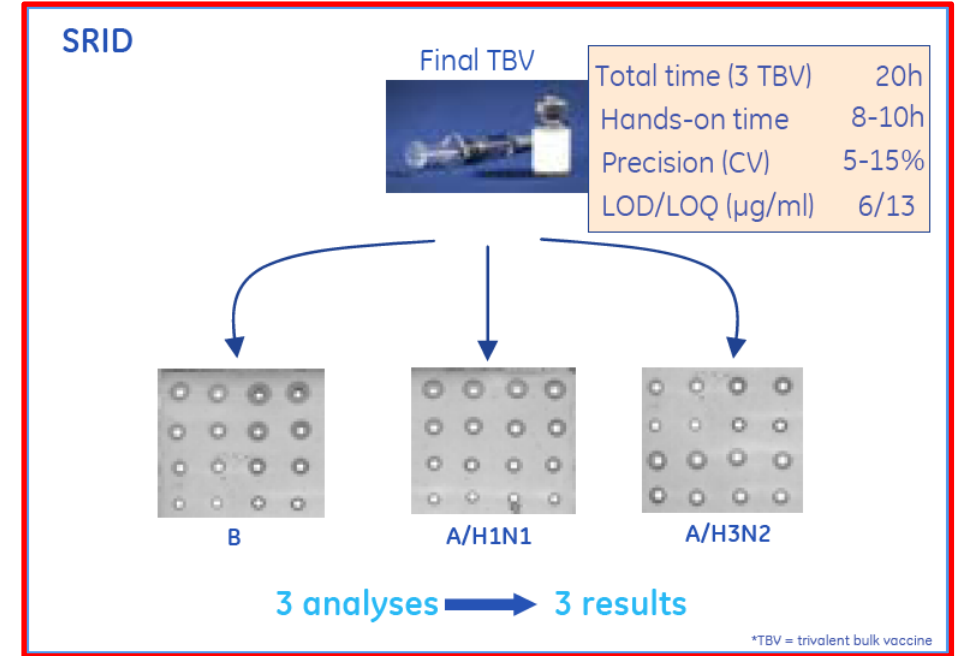
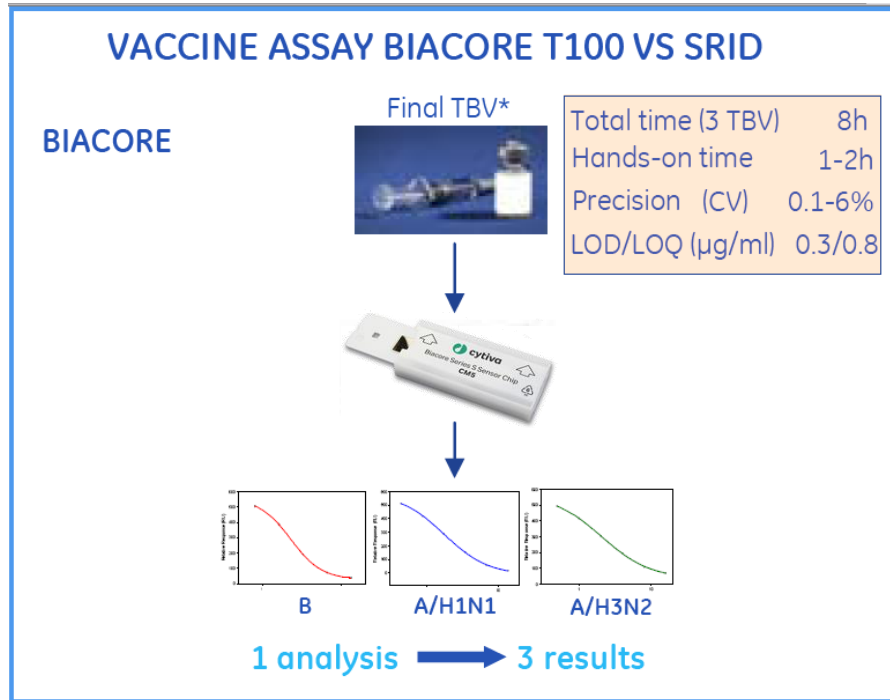


詳細な測定の流れ

- 3種類のHAをCM5チップにアミンカップリング
 - 終濃度 10 µg/mL, 10 mM Maleat, pH 6.0
- 抗体（抗血清）を 5 µL/min, 400 sec 添加
 - 抗血清 16 µL と HBS-EP+ 384 µL で希釈 (25x)
 - 25x を元に 50x, 100x, ..., 1600x 溶液を作成
 - 700-2000 RU を与える希釈率を検証
- 可変濃度の Ref. Virus + 一定濃度の抗血清で標準曲線
- 実際のウイルスサンプル（2倍希釈公比）+ 一定濃度抗血清でデータ取得、標準曲線と照合

インフルエンザヘマグルチニンの濃度定量 (3)

最終製品 TBV の測定 : SRID法との比較 (*TBV=三価ワクチン)

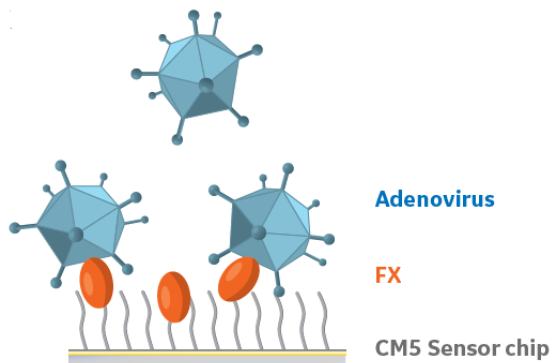
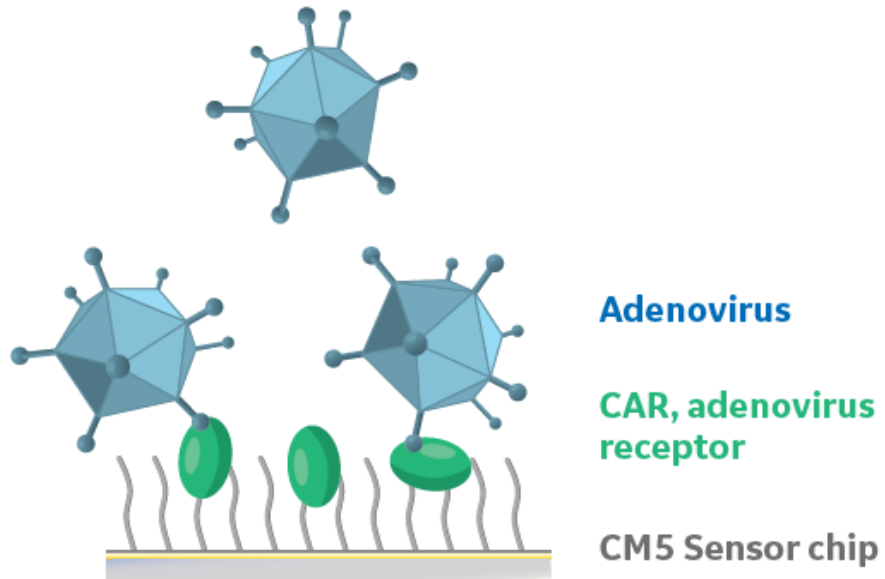


Biacore (青) とSRID (赤) の結果比較 :

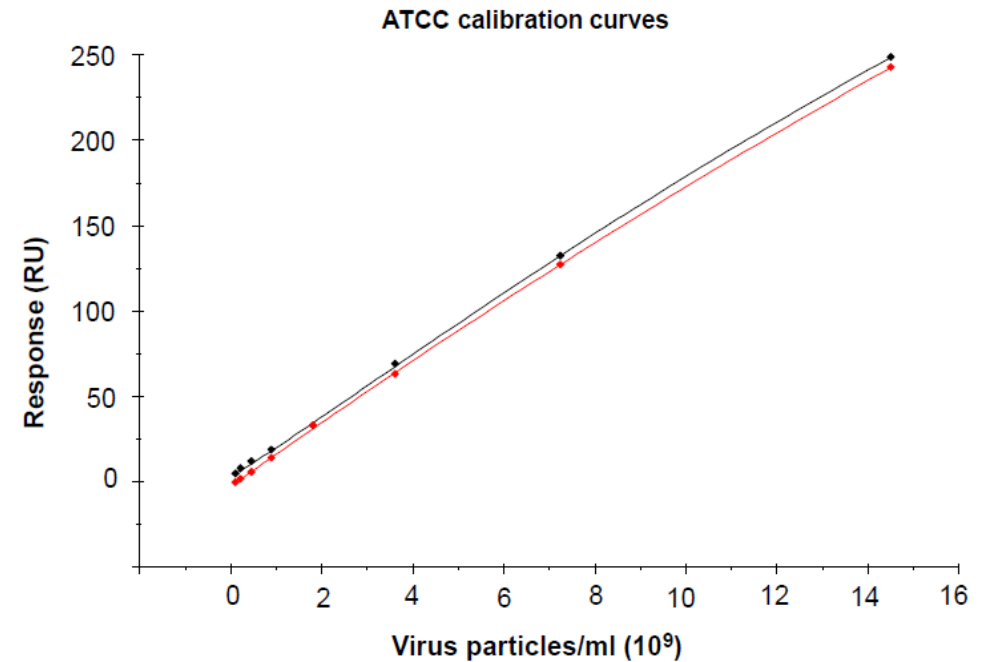
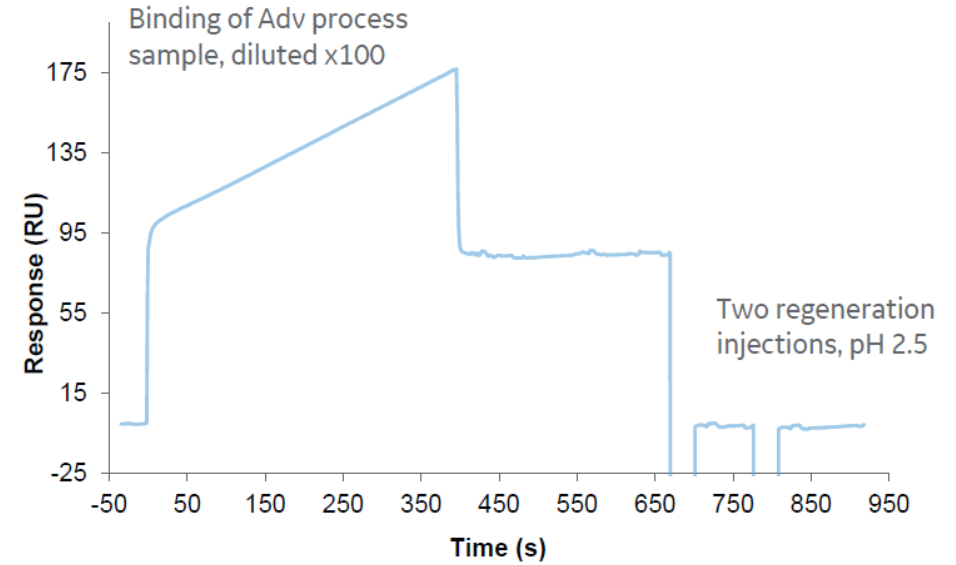
- B株が過剰に充填されている

アデノウイルス AdV の濃度定量 (1)

カプシド表面抗原と結合できるタンパク質を固定化

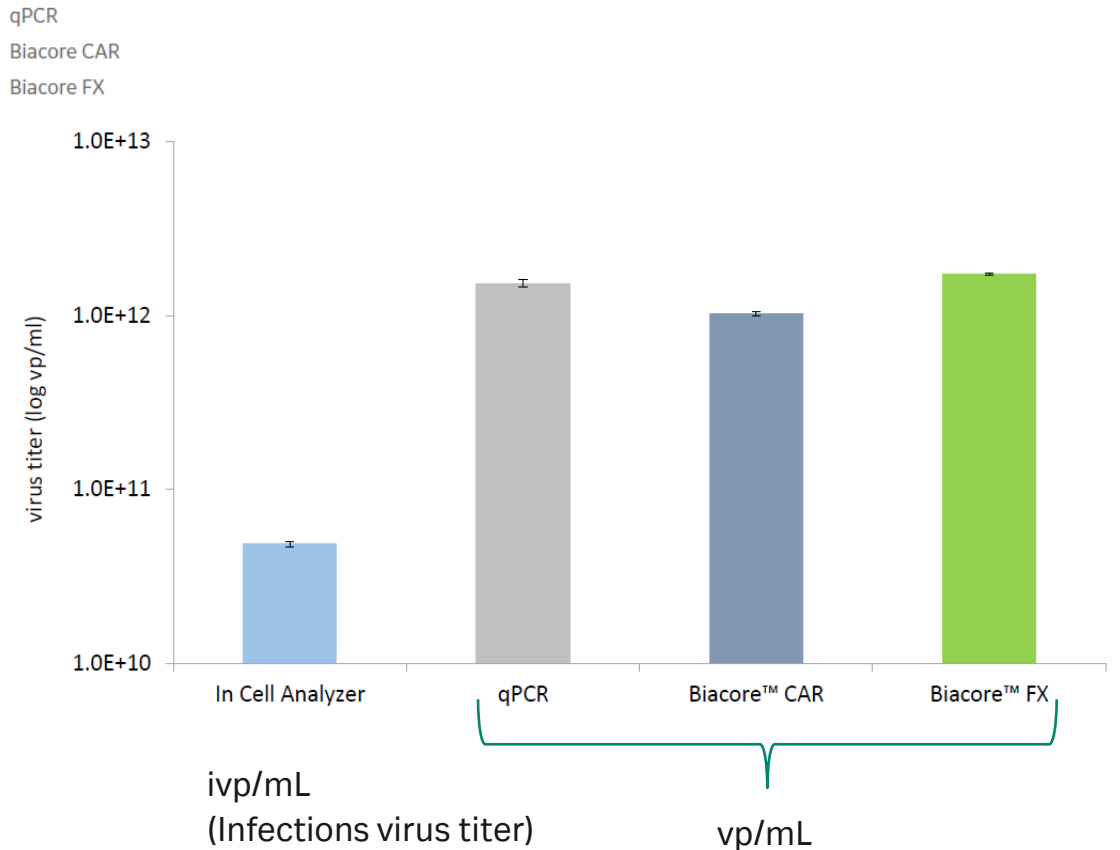
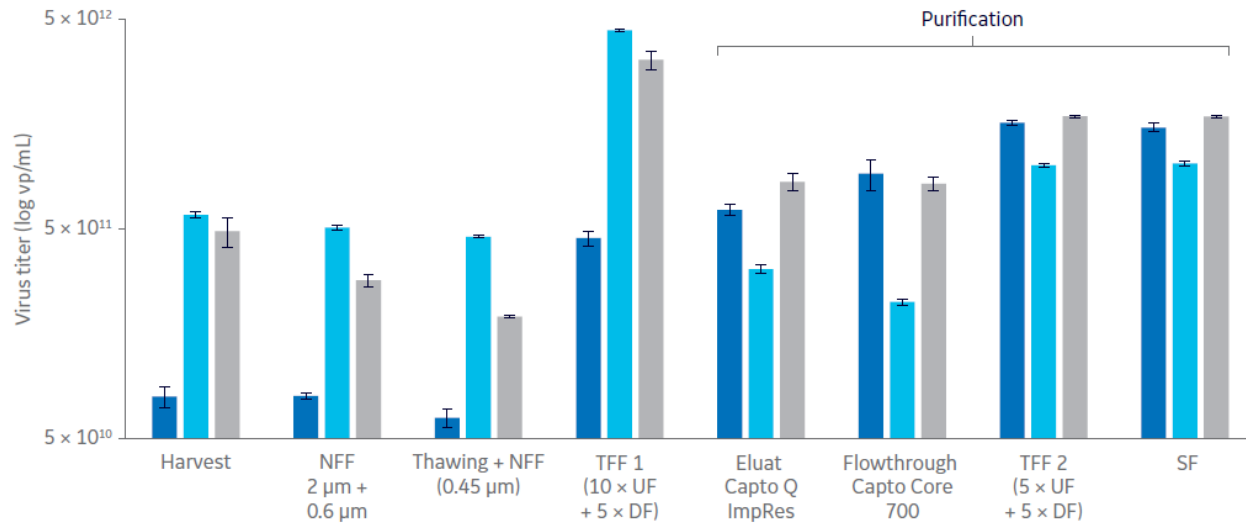


Cytiva



アデノウイルス AdV の濃度定量 (2)

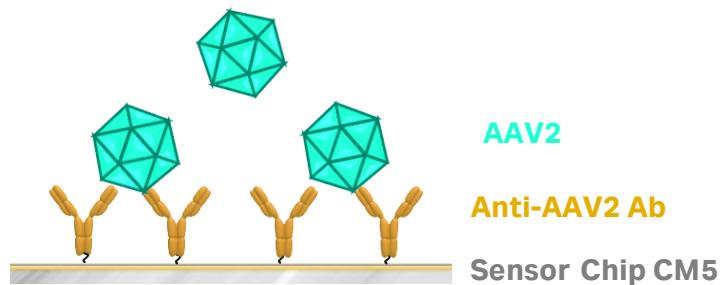
精製後のqPCRのデータと相関が取れる



アデノ随伴ウイルス AAV2 の濃度定量 (1)

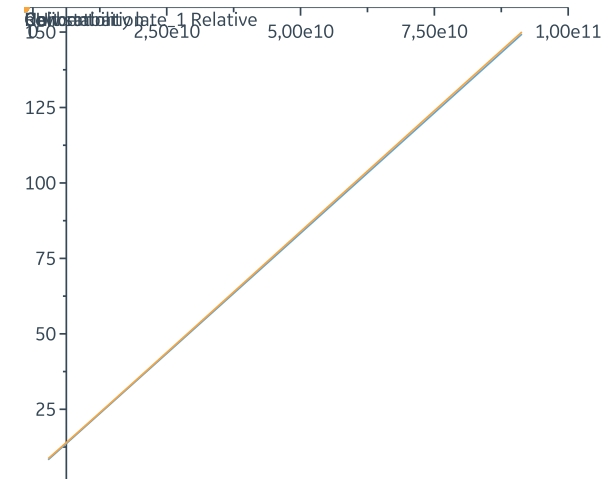
アッセイ方法

- CM5 チップに AAV2 抗体をアミンカップリング
- ランニング緩衝液 : HBS-EP+, 0.3M NaCl
- AAV2 粒子を 5-10000 倍希釈して添加

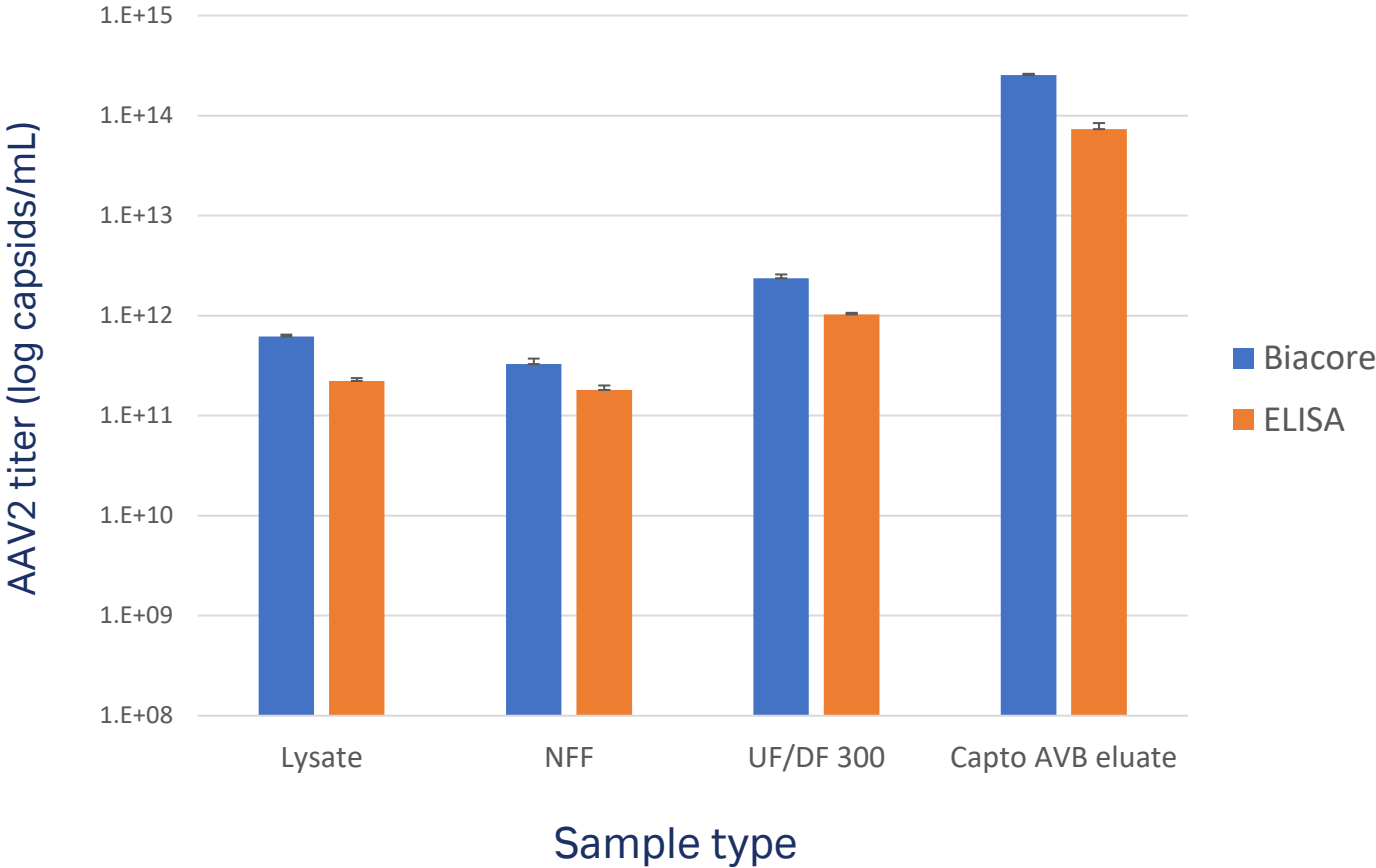


検量線

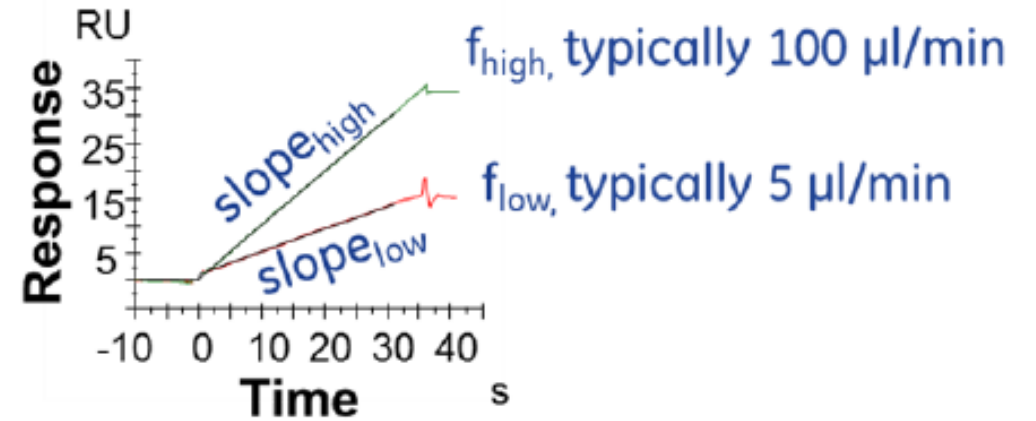
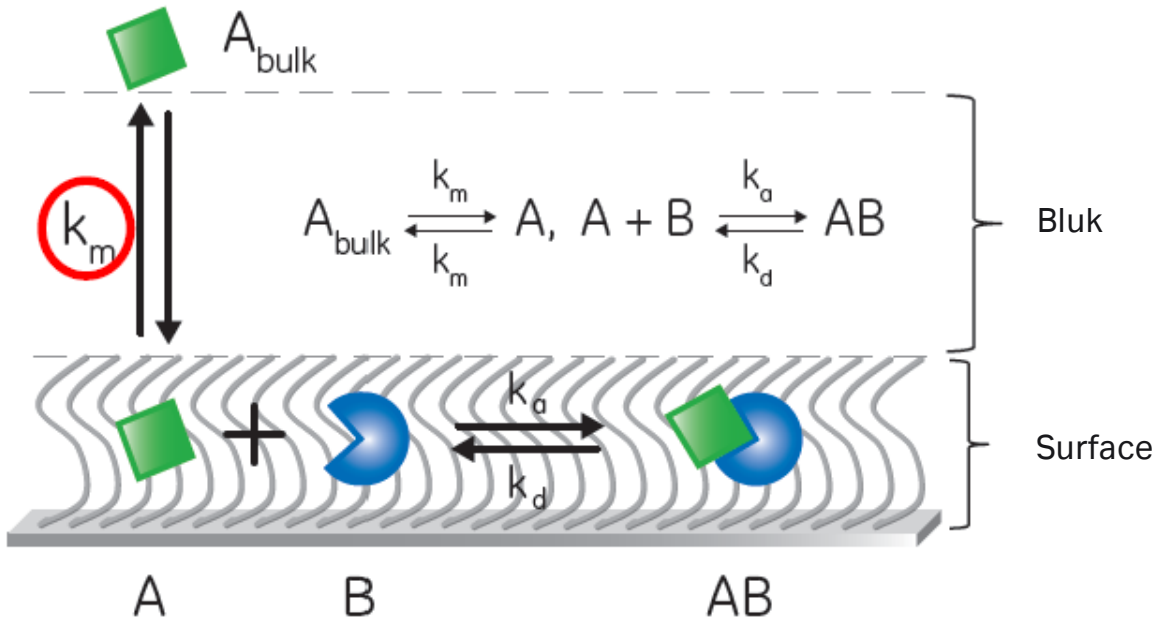
- 標準品 : ATCC reference
- 検量線範囲 : $0.3-9.2 \times 10^{10}$ vp/mL
- 下の図は 2 回の検量線の重ね書きで、間には66 サンプルを測定している



アデノ随伴ウイルス AAV2 の濃度定量 (2)



CFCA 濃度定量 (Biacore T100/200 or X100 plus package)



$$\frac{dR}{dt} = f(M_w, k_m, Conc.)$$

ポリオウイルスの濃度定量 :

Vaccine 29(18),3390-7

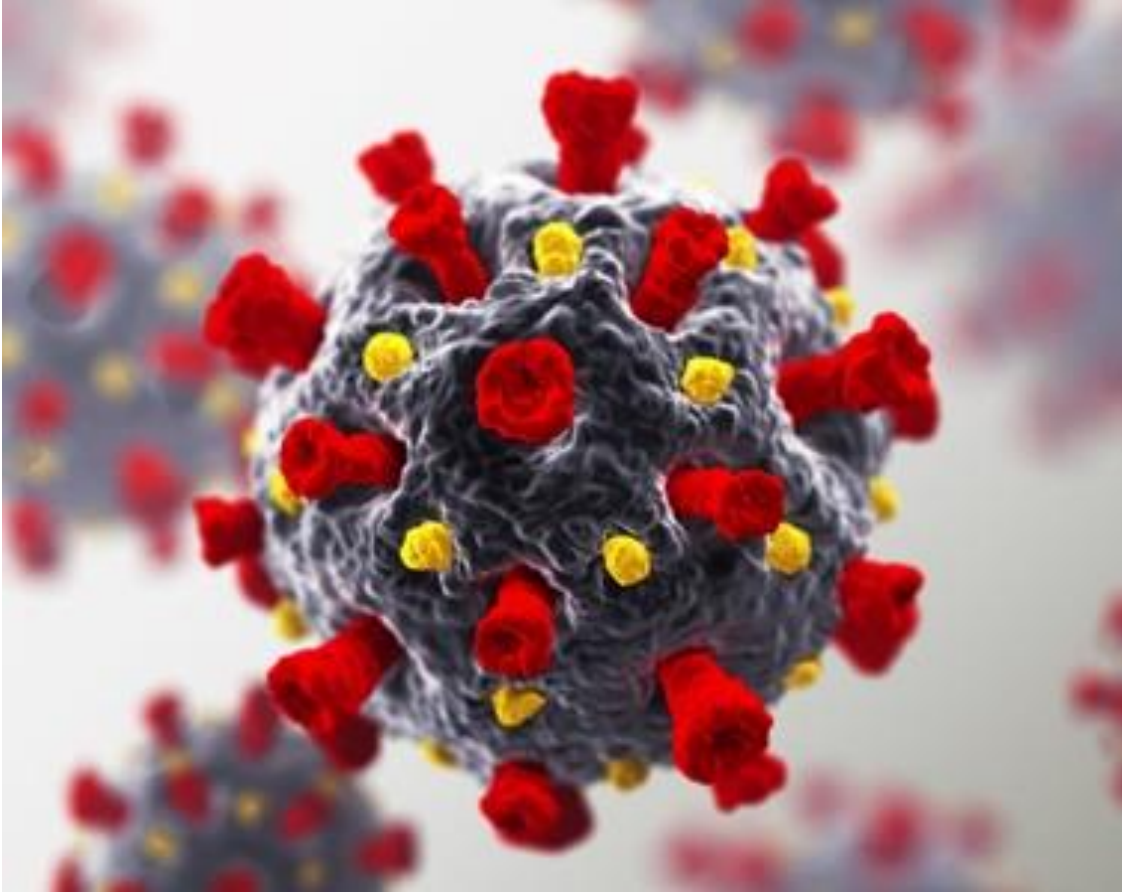
Measuring poliovirus antigenicity by surface plasmon resonance.

Application for potency indicating assays.

Poliovirus: Methods and Protocols -Chapter 16

$$k_m \propto \sqrt[3]{\frac{D^2 \times f_{rate}}{h^2 \times w \times l}}$$

Covid-19 ワクチン開発と Biacore



測定例

- mRNA-based vaccine (Moderna/NIAID, Curevac)
- DNA-based vaccines (Inovio)
- Vector-based vaccine (J&J)
- Recombinant vaccine (Sanofi/Barda)
- Adjuvants (GSK)
- VLP (Medicago)
- Peptide-based vaccine (Epivax)

まとめ

- + 測定自体は一般的なタンパク質などとあまり変わらない
- + 解析方法はやや特殊
- + whole cell 以外の粒子は普通に測定可能で実例も多い
- + 今回紹介していないが花粉、大腸菌、乳酸菌などの例もある
- + ウイルス・ワクチンでの使用例は方法論が弊社から公開されている
- + Biacore T100/T200, X100 plus packageでは CFCA という特殊な濃度測定方法がある
- + 測定後の装置洗浄はしっかりと！（別途資料あり）

＝ Biacoreでの粒子測定



Thank you

Masami Koinuma

【お問合せ先】

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

バイオダイレクトライン

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

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

本資料の使用については、お客様施設内での使用に限ります。他社への転送、譲渡等は禁じます。本資料の著作権その他の知的財産権は、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社に帰属します。無断転載、無断コピー、改ざん、二次利用を禁じます。





掲載されている価格は2020年5月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

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

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

やっと分かった！Biacore メンテナンスの方法と意味、トラブルシュートまで

Cytiva アプリケーションスペシャリスト 鯉沼 正美

 [Register](#)  2021年4月22日  15:00～15:40  40min

CONTENTS

取扱説明を受けてメンテナンスの方法もきっちり学んだ...でも、あれっ？「どうやってメンテナンスするんだっけ？」「なんか装置の調子がヘンだぞ？」「同じサンプルなのに前と結果が違う！」こんなこと、ありませんか？

このWebinarではBiacoreのメンテナンスの手技的な解説はもちろん、そもそもどこを洗浄しているのか、なぜメンテナンスの見どころも解説していきます。

またセンサーグラムの様子から、装置自体の不具合なのか、はたまたサンプル由来の問題なのかを切り分けられるような眼を養い、スムーズな問題解決ができるようにサポートいたします。

