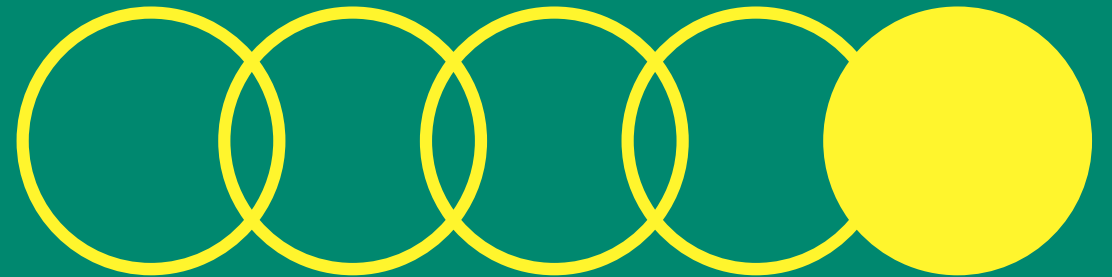
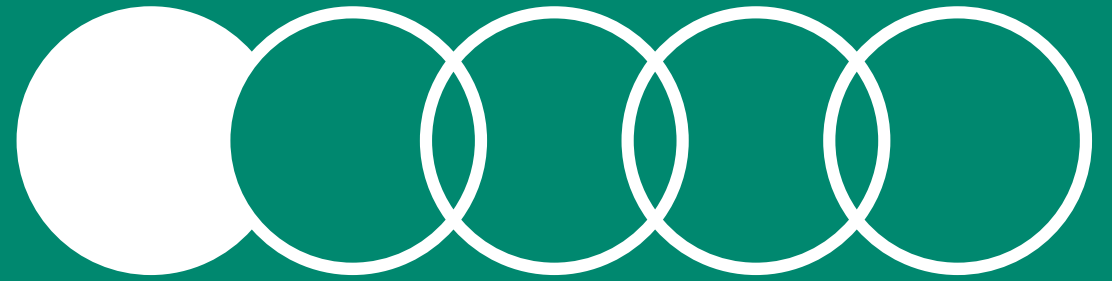


Cytiva Webinar

まもなく開始します。
もうしばらくお待ちください。

※開始時刻から30秒ほど遅れての配信となります。

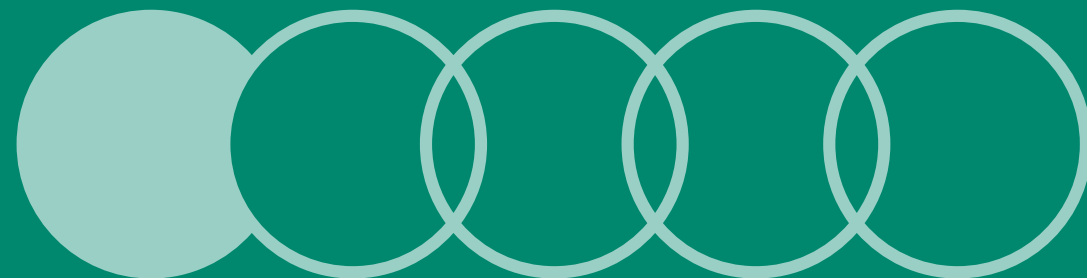
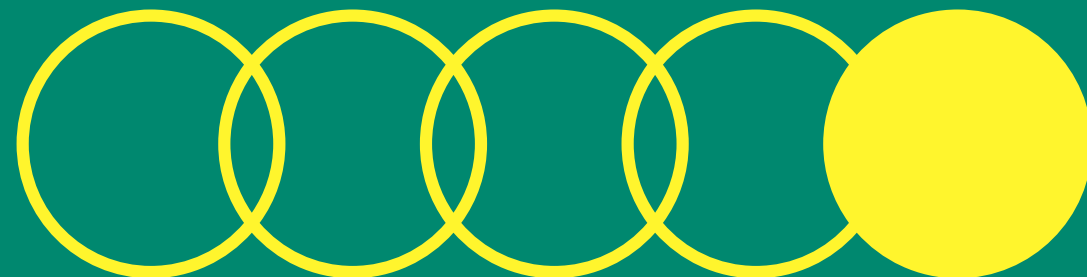
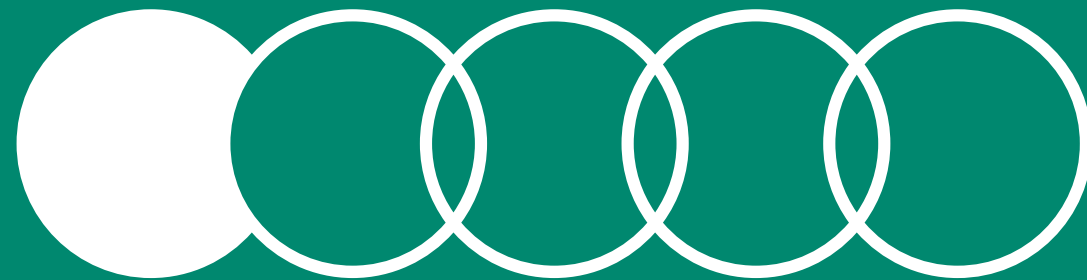


音声につきまして

- 視聴者の皆様の音声は講師、他の参加者には届きません。

ご質問につきまして

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





Cytiva Webinar

Biacore フィットリング計算の基礎と勘所②

Gen Takata
June 25 2021





本日の内容

4. Fitting結果の信頼性評価
5. あるあるケーススタディ
6. フィッティングに関する応用編TIPs

前回の内容

1. Fittingって何やっているの？
2. Fittingに適切なデータとは
3. Fitting設定の勘所

その前に、前回いただいた主なQuestion

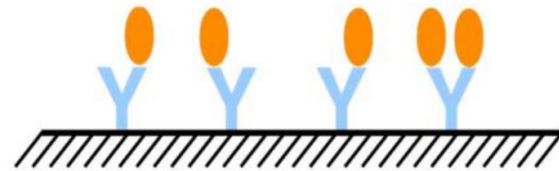
- ✓ 二価の結合サイトを持つ分子の測定方法
- ✓ そのほか多価分子や結合様式が分からない場合
- ✓ Multi cycle 法とSingle cycle 法の違い



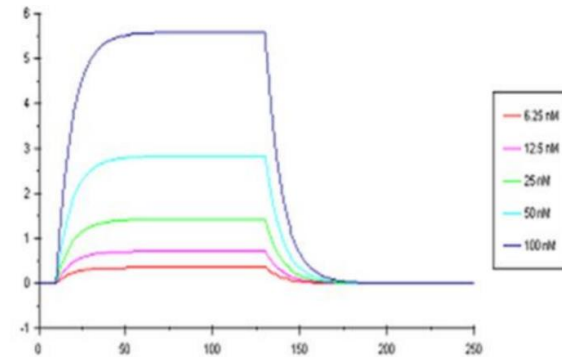
二価の結合サイトを持つ分子の測定方法

AffinityとAvidityの違い

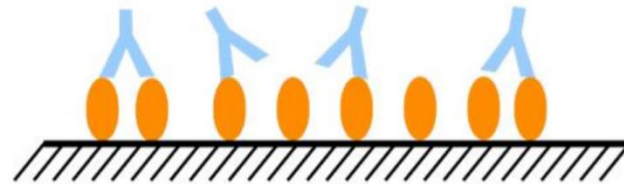
Affinity



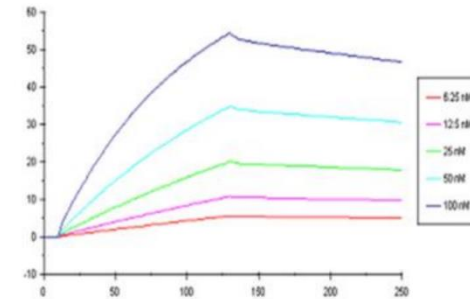
二価分子を固定化



Avidity



二価分子を流す



K_D 値

片手、両手についているものが混在しているため、見かけ上解離速度が遅くなります。

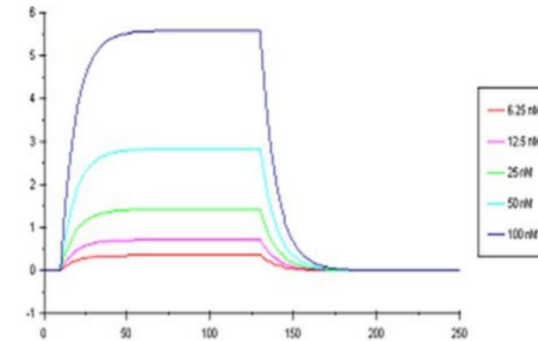
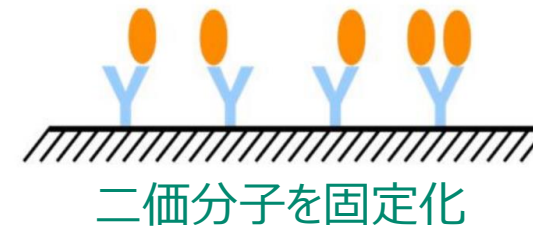
K_D 値は 1:1 binding の親和性を定義 ($K_D = [A][B]/[AB]$)。⇒なるべく1:1のセットアップ。

二価の結合サイトを持つ分子の測定方法 Bivalent Analyte のリスク

1:1 binding

$$dR/dt = f(k_a, k_d, R_{max}, \text{conc}, \dots)$$

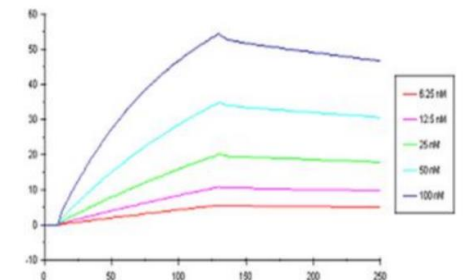
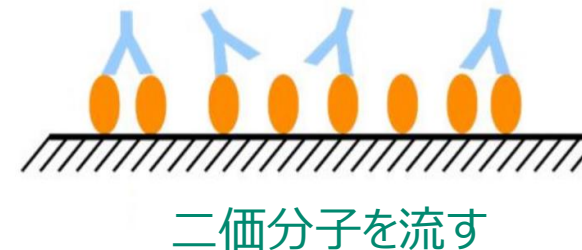
→ KD, k_a, k_d の信頼性が高い。



Bivalent Analyte

$$dR/dt = f(k_{a1}, k_{d1}, k_{a2}, k_{d2}, R_{max}, \text{conc}, \dots)$$

→ KD, k_{a1}, k_{d1} の信頼性が低い。

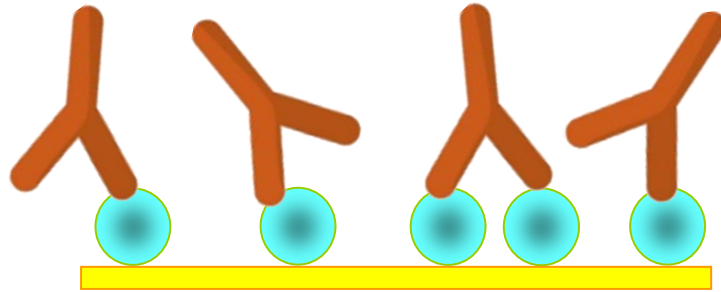


二価の結合サイトを持つ分子の測定方法

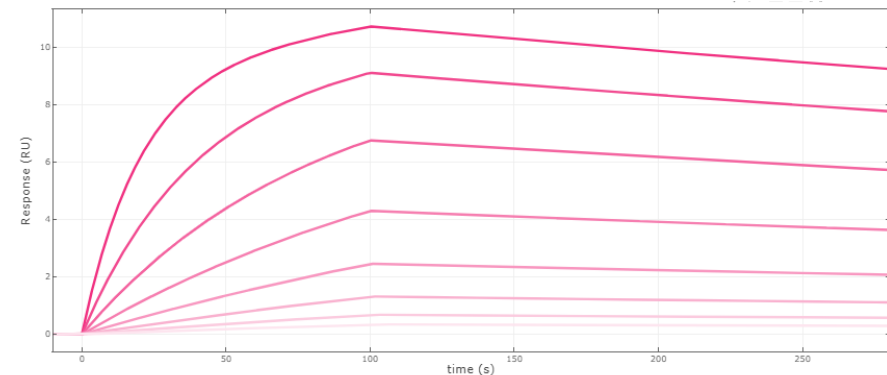
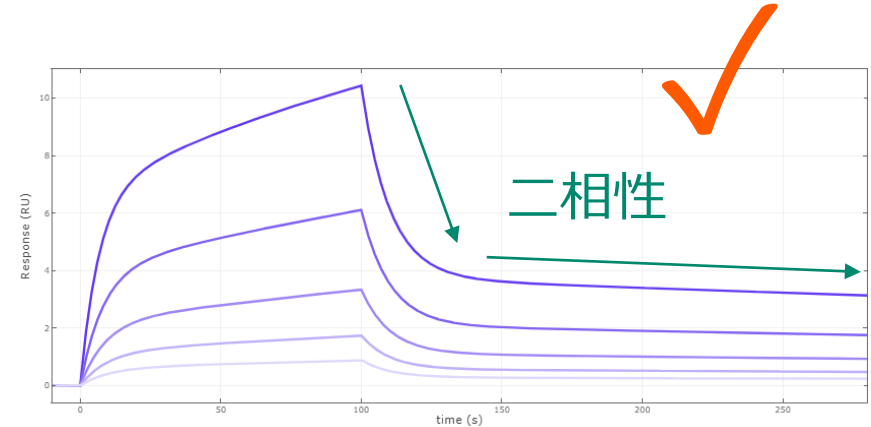
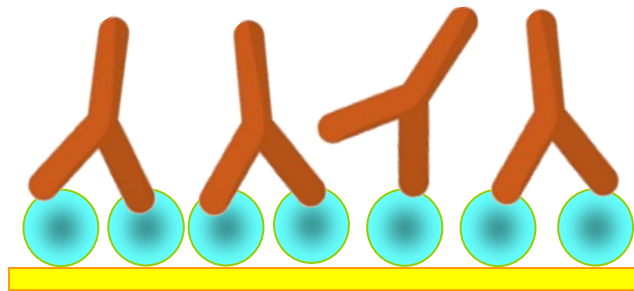
Avidity環境で測定する注意点

固定化量によって変化するAvidity環境

固定化量
少



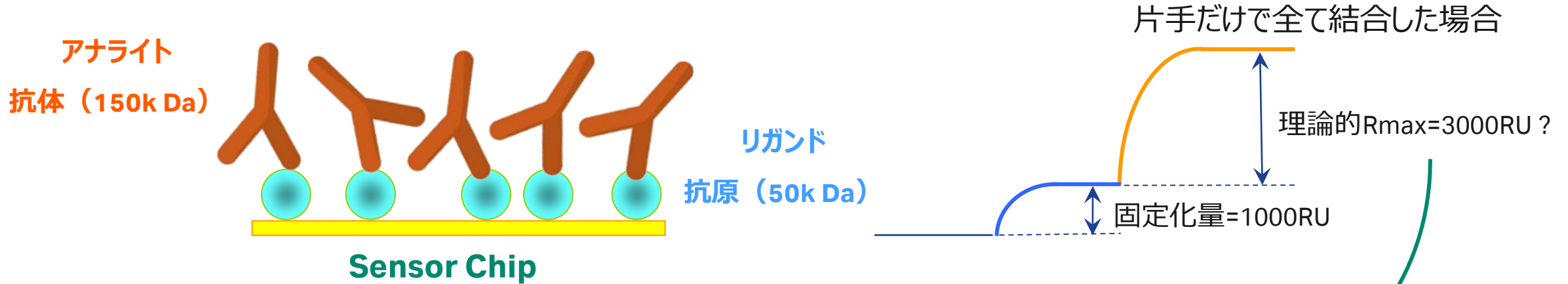
固定化量
多



Bivalent Analyteでは、Avidity環境の相互作用データから、片手で結合したと考えられる k_{a1} 、 k_{d1} を算出するモデル式
→ k_{a1} 、 k_{d1} が支配的な測定環境（固定化量が低い条件）で測定

二価の結合サイトを持つ分子の測定方法

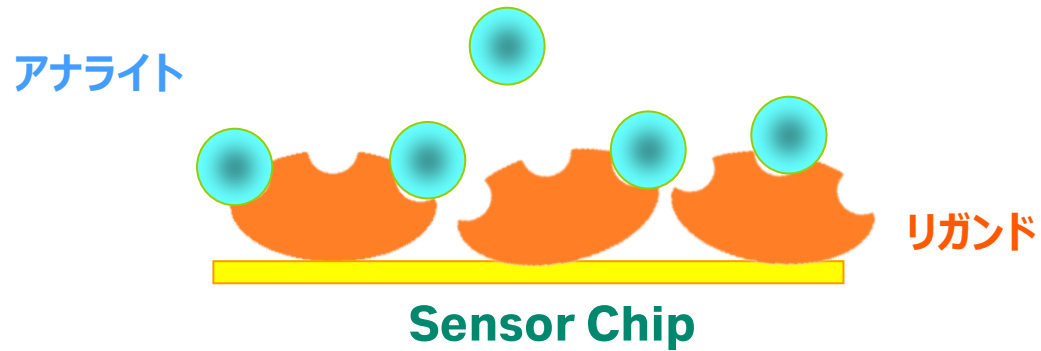
Avidity環境下における理論的Rmax算出方法



実際は、片手、両手をつく分子が混在
 実測Rmax = 2400RUの場合 ⇒ リガンドの活性率 (Activity) は80%??

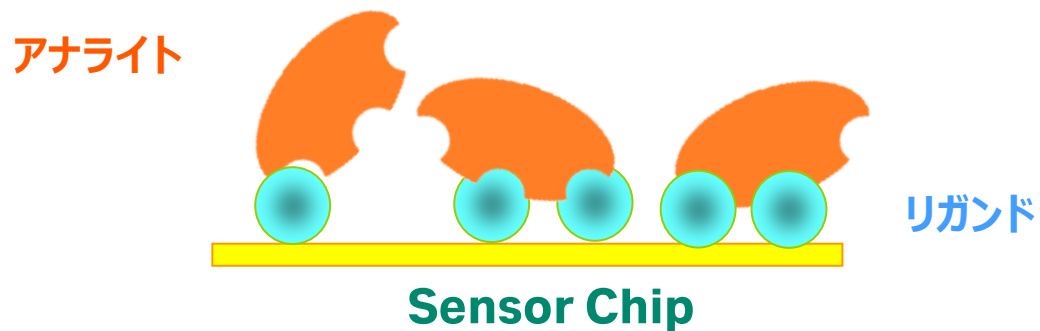
$$\text{リガンドの活性率 (Activity\%)} \stackrel{?}{=} \frac{\text{実測のRmax}}{\text{理論的Rmax}} \times 100$$

そのほか多価分子や結合様式が分からない場合 三価以上の場合は？



第一選択 ✓

多価分子の固定化 ⇒ 1:1 binding

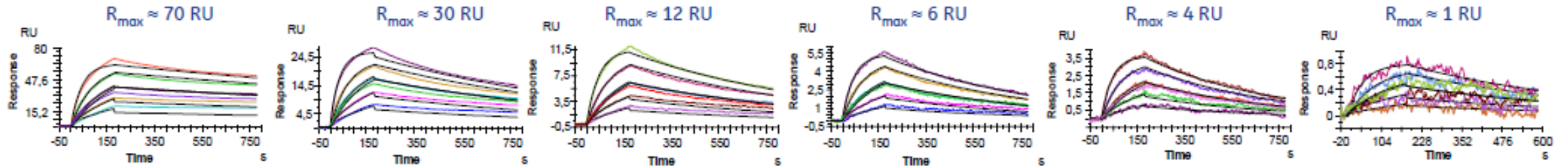


モデル式を作ることもしできるが...

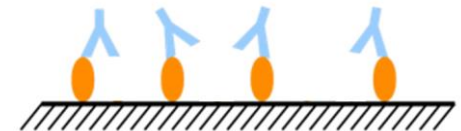
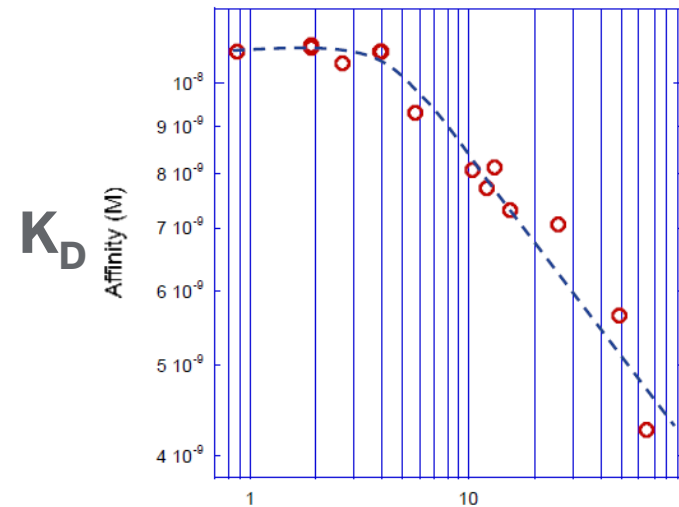
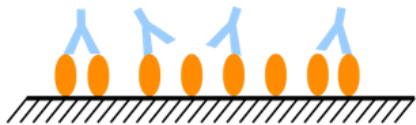
$$dR/dt = f(k_{a1}, k_{d1}, k_{a2}, k_{d2}, k_{a3}, k_{d3}, R_{max}, \text{conc}, \dots)$$

K_D, k_{a1}, k_{d1} の信頼性が極めて低くなる。

そのほか多価分子や結合様式が分からない場合 固定化量を極限まで下げると、Avidity環境ではなくなり1:1に収束



Decreasing response gives more reliable kinetic and affinity data



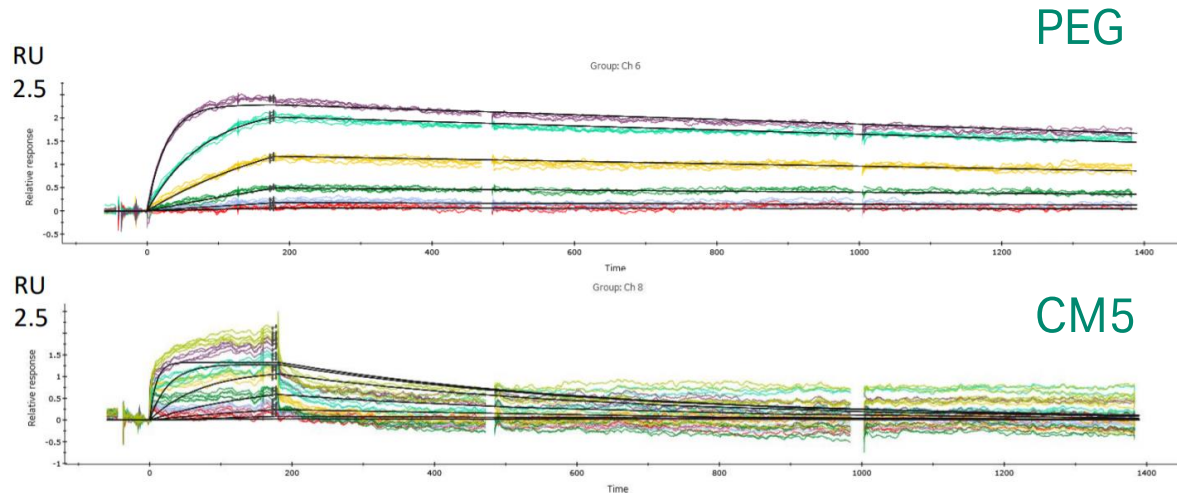
1:1 bindingで、
フィッティング解析可能

※ ヘテロオリゴマーには適応不可

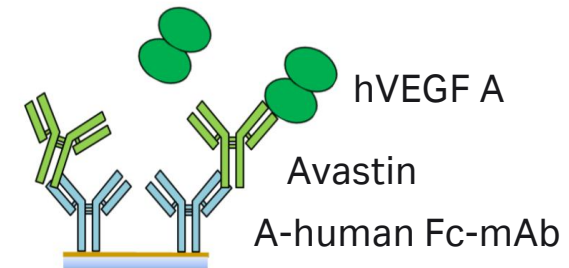
【補足】非特異を徹底的に消して小さいレスポンスを見る

センサーチップPEG

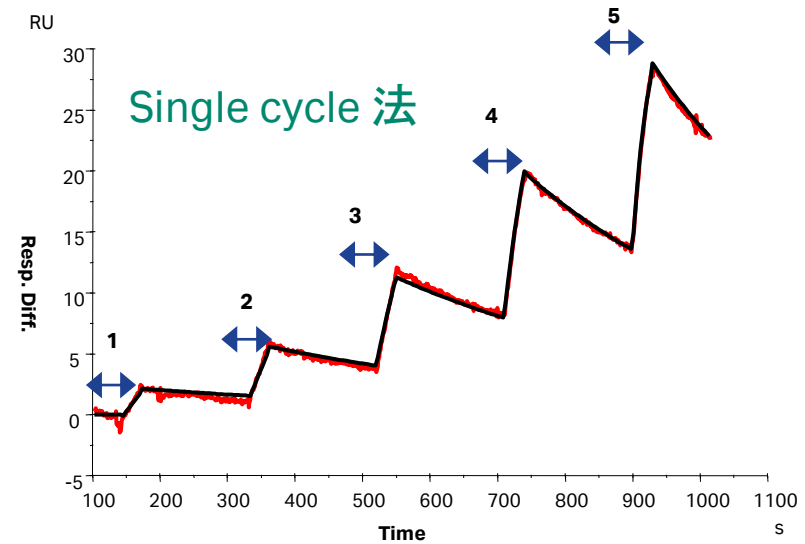
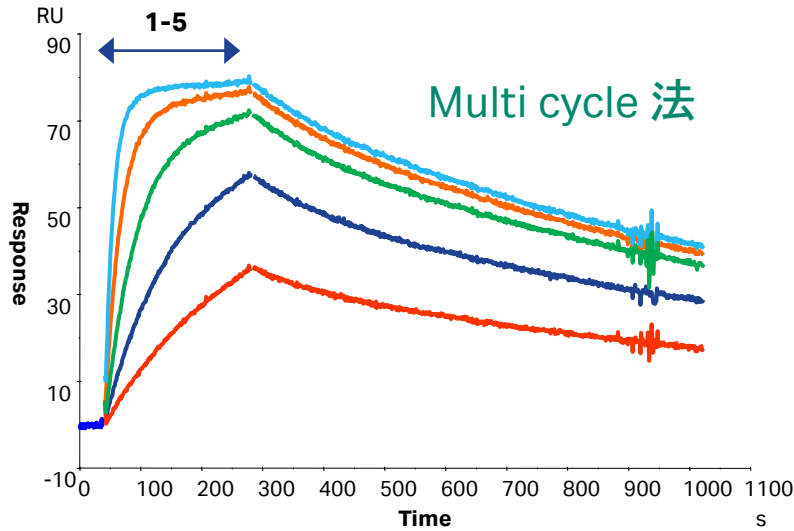
- デキストランマトリクスが問題となる場合のセンサーチップ
- 固定化量の期待値はC1相当、CM5固定化レベルの10%
- センサーチップC1と比較して、血清および血漿からの非特異的結合が大幅低減
- キャプチャーキットにも使用可 * 再生条件は要検討
- -20°C保管 * ほかのセンサーチップは全て4°C保存です。



Stickyなhomodimerを測定→感度ギリギリの固定化量
⇒センサーチップPEGでセンサーグラムの変形が改善



Multi cycle 法とSingle cycle 法の違い



Multi cycle 法 各濃度は個別サイクルで測定する		Single cycle 法 各濃度は同一サイクルで測定する
Pros	古典的方法。 アフィニティー解析にはよく使われる。	再生操作が不要。再生が困難なサンプルにも適用できる。 解離が遅いサンプルでより正確な測定ができる。 キャプチャー法におけるリガンド消費量が少ない。 1 RUNの時間短縮で、リガンド失活の影響を受けにくい。
Cons	再生条件の検討が必要。 再生困難なサンプルに適用できない。 解離の非常に遅いサンプルで低濃度データが誤差要因となる。	キャプチャー後のベースラインドリフトが問題になることがある。 (Biotin CAPture kitおすすめ)



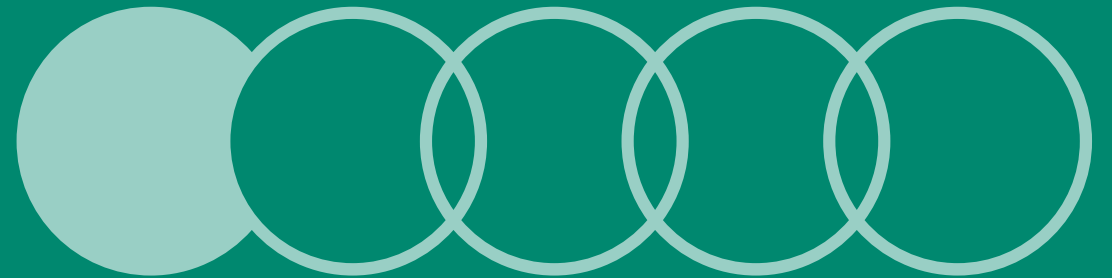
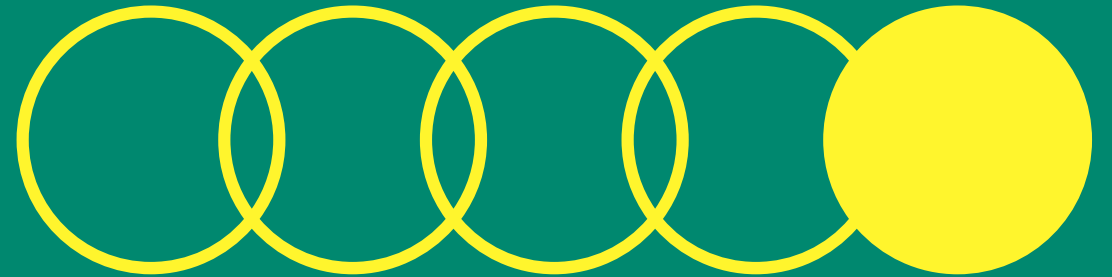
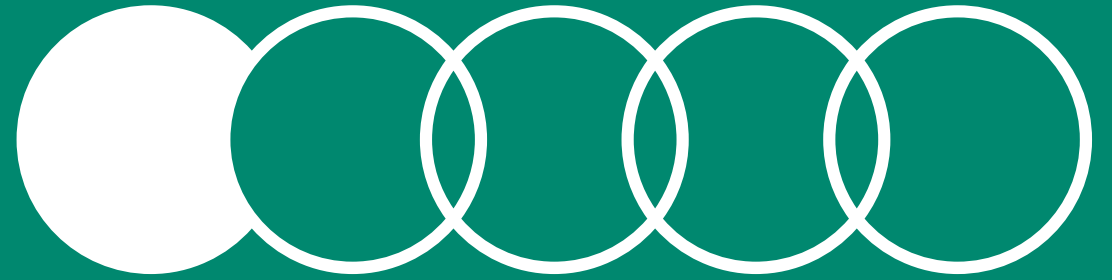
本日の内容

4. Fitting結果の信頼性評価
5. あるあるケーススタディ
6. フィッティングに関する応用編TIPs

前回の内容

1. Fittingって何やっているの？
2. Fittingに適切なデータとは
3. Fitting設定の勘所

1. Fitting結果の信頼性評価



Biacoreデータの信頼性評価とは？

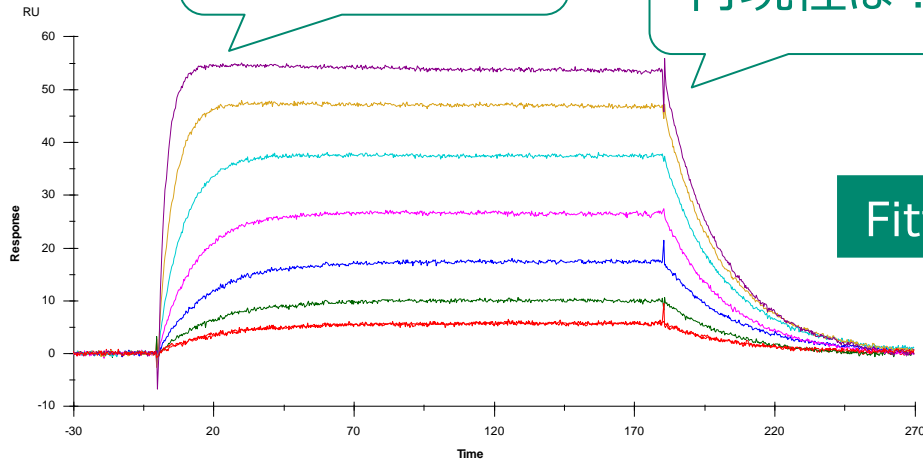
1. 見たいものを反映しているセンサーグラム形状か？

リガンド
固定化量は？

結合の
特異性は？

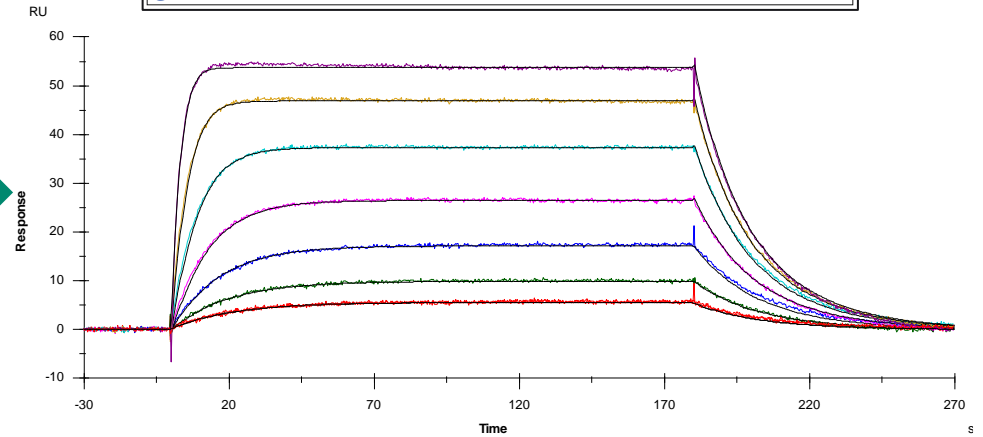
アナライタの
濃度範囲は？

再現性は？



2. フィッティング計算は適切か？

Quality Control Report Residuals Parameters	
✓	Kinetic constants are within instrument specifications.
✓	Kinetic constants appear to be uniquely determined.
✓	No significant bulk contributions (R0) found.
⚙	Check that sensorgrams have sufficient curvature.
⚙	Examine the residual plot. Pay attention to systematic and non-random deviations.



なによりアッセイセットアップが重要

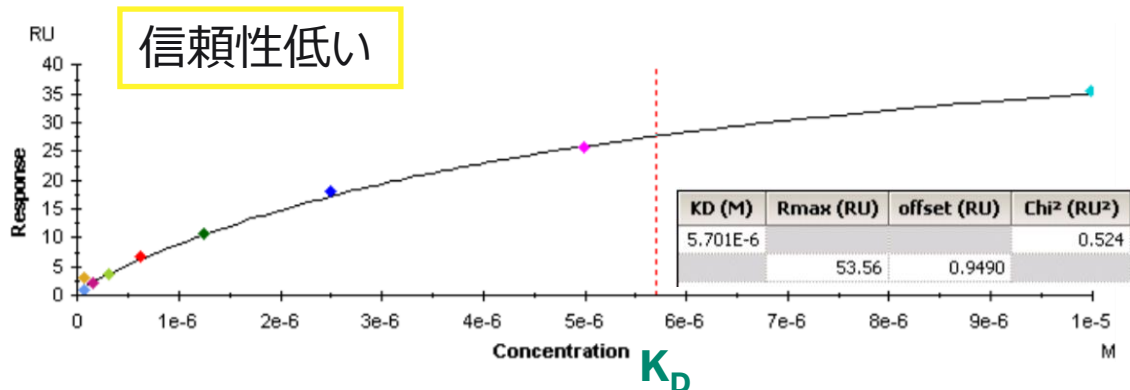
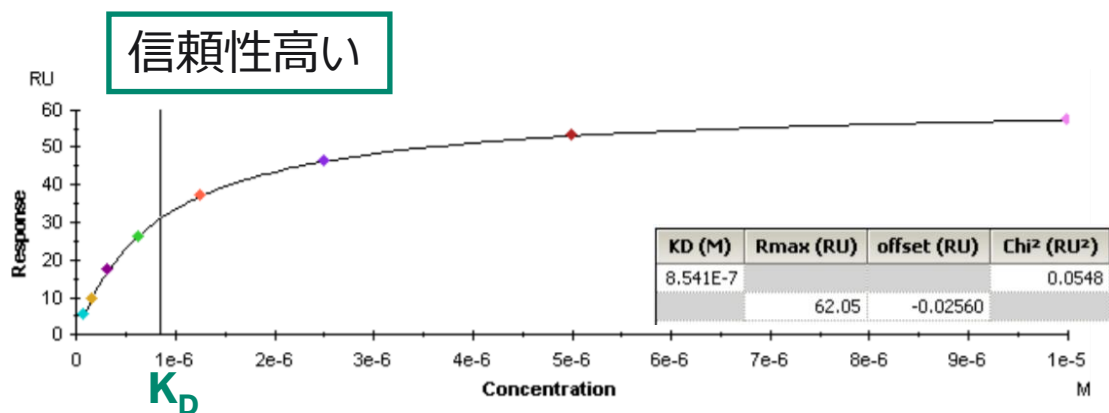
詳しくは、『Biacoreの測定系構築の勘所』

https://www.cytivalifesciences.co.jp/tech_support/webinar/key-points-of-biacore-measurement-construction.html

どちらかだけではなく
総合的に判断

アフィニティー解析におけるFitting結果の信頼性評価

信頼性の高い解析結果
 K_D 値の2倍以上の添加濃度



	単位	説明
1:1 binding model 式の変数	解離定数 K_D	M アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す。
	Rmax	RU アナライトの最大結合量。実際にアナライト添加した時、結合量が飽和するレスポンス。
	Offset	RU X = 0 の時のY 軸の値
Fitting 解に対する評価パラメーター	カイ二乗 Chi^2	RU ² 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。

カインेटクス解析におけるFitting結果の信頼性評価

	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.		

①速度定数がシステムのスペック範囲内か？

	8K/8K+	T200	S200	X100
k_a (1/Ms)	$\sim 10^9$	$10^3 \sim 10^9$	$10^3 \sim 10^9$	$10^3 \sim 10^7$
k_d (1/s)	$10^{-6} \sim 0.5$	$10^{-5} \sim 1$	$10^{-5} \sim 2$	$10^{-5} \sim 0.1$

②各パラメータが独立して算出されているか？

k_a 、 k_d および Rmax の間に相関性はない。

マストランスポートリミテーション下 $\Rightarrow k_a$ 、 k_d に相関性が見られる。

③溶液効果の値 (RI) の妥当性

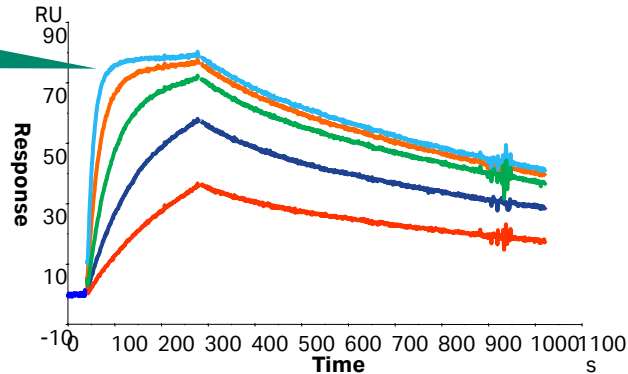
リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引き \Rightarrow RI はゼロに近い値となるはず。

カインेटクス解析におけるFitting結果の信頼性評価

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・解離領域が直線的 ⇒ Fitting結果の信頼性は低い。

高濃度サンプルに注目

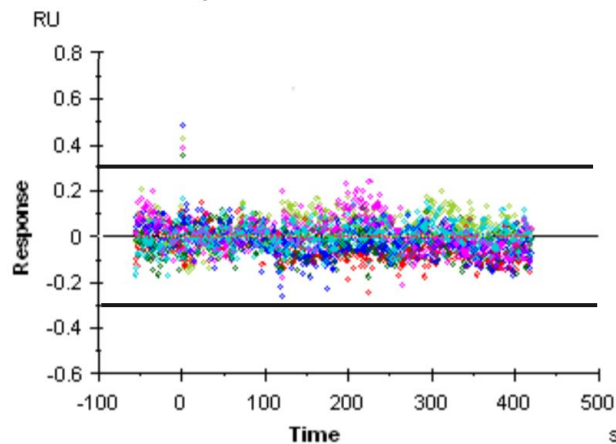


⑤フィッティングカーブに対して測定プロットがランダムに分散しているか？

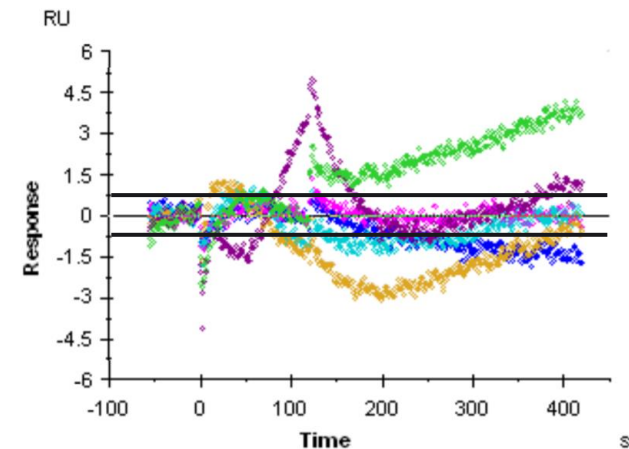
良好なフィッティング

- 1) Y軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散
- 2) ほとんどのプロットがガイドライン内

Residuals for
a good fit



Residuals for
a poor fit



カインेटクス解析 各種パラメータ

	単位	説明
1:1 binding model 式の変数	結合速度定数 k_a	1/Ms 複合体形成速度。1MのAとBを混合した際に形成する複合体の数。
	解離速度定数 k_d	1/s 複合体の安定性。複合体が1秒間に解離する割合。 kd= 0.01 s ⁻¹ = 1% 1秒当たり複合体が1%解離する。
	解離定数 KD	M アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す。
	Rmax	RU アナライトの最大結合量。
	溶媒効果 RI	RU バルクレスポンスを引いた時に、ゼロからわずかにずれる誤差値。 * 本来は極めて0に近い値をとるべき値
	tc値	RU・M ⁻¹ s ^{-2/3} m ⁻¹ tc=kt ³ √f マストランスポート (MTL) 定数 (kt) の流速非依存性コンポーネント * どれだけMTLが強くかかっているかと算出しているかの指標。この値が小さい場合、センサーチップ表面に到達するアナライトの実際の濃度は低くなっていると計算されている。
Fitting 解に対する評価パラメーター	カイ二乗 Chi ²	RU ² 測定データ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。
	U-value	- 解析値の信頼性。≤ 15問題なし。≥ 25算出された値の信頼性は低い。 * 既存の 1:1 Binding モデル使用時のみ
	標準誤差 SE	- 各パラメータについて SEを算出。 各パラメータの解析結果に対して、10%以下で一般的には問題ないと判定されることが多い。

Fitting 解に対する評価パラメーター

Chi²値

測定データの、フィッティングカーブに対するズレ
値が小さいほど望ましい。クライテリアは使用者が決定

$$\text{chi-square} = \frac{\sum_1^n (r_f - r_x)^2}{n - p}$$

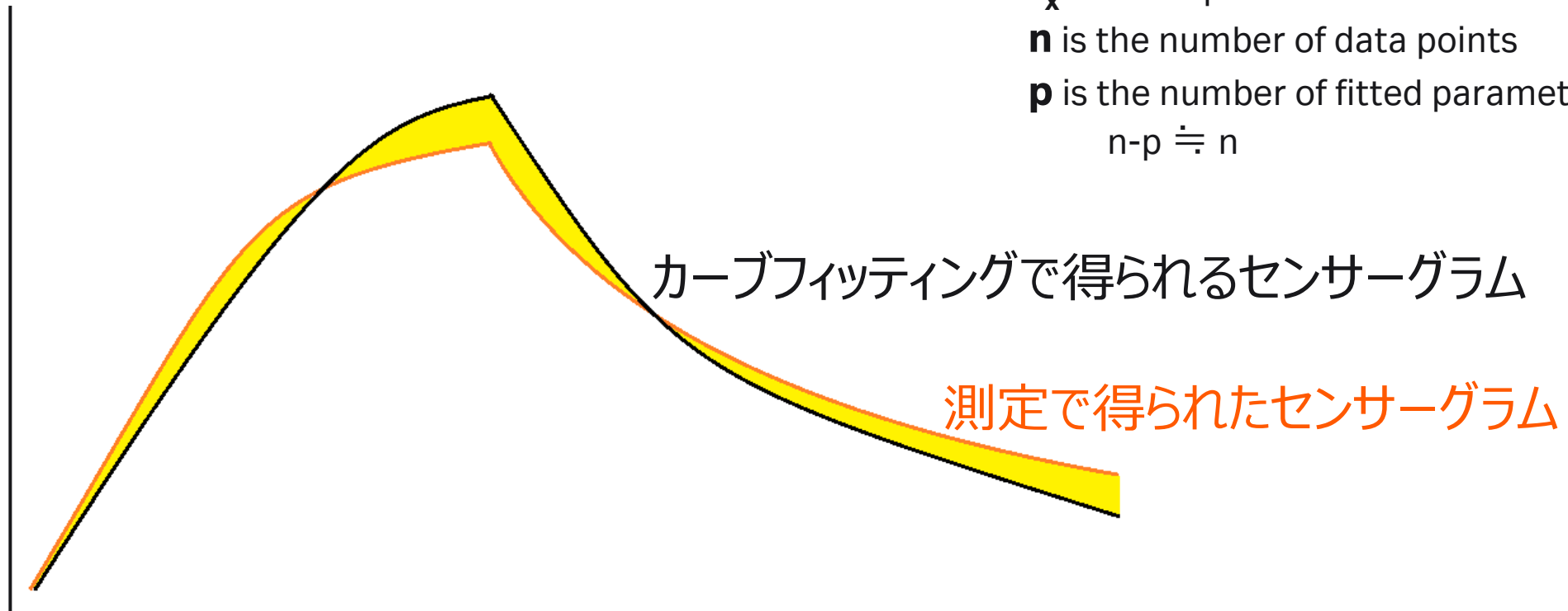
r_f is the fitted value at a given point

r_x is the experimental value at the same point

n is the number of data points

p is the number of fitted parameters

$$n - p \doteq n$$



Fitting 解に対する評価パラメーター

U-Value

k_a 、 k_d 、Rmaxなどの値が独立して算出されているか

【Kinetic constant appear to be uniquely determined】に関連する指標

マストランスポートリミテーション（MTL）環境下であることを示す一つの指標

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

- K_D は確からしい値でも k_a 、 k_d 値は無数の組み合わせが可能
- k_d 、 k_a 解が連動するようなデータは信頼性低

値が小さいほど望ましい

信頼性は低い ≥ 25 （弊社マニュアル上での基準）

$$\tilde{P}_1 = (1 \pm 0.01 \cdot U) \cdot P_1$$

$$\tilde{P}_2 = (1 \pm 0.01 \cdot U) \cdot P_2$$

P k_a 、 k_d 、Rmaxなどのパラメータ
（残差の総和が最小の時）

\tilde{P} k_a 、 k_d 、Rmaxなどのパラメータ
（残差の総和を0.5%増やした時）

U U-value (Uniqueness)

J. Mol. Recognit. 2005; **18**: 307–317

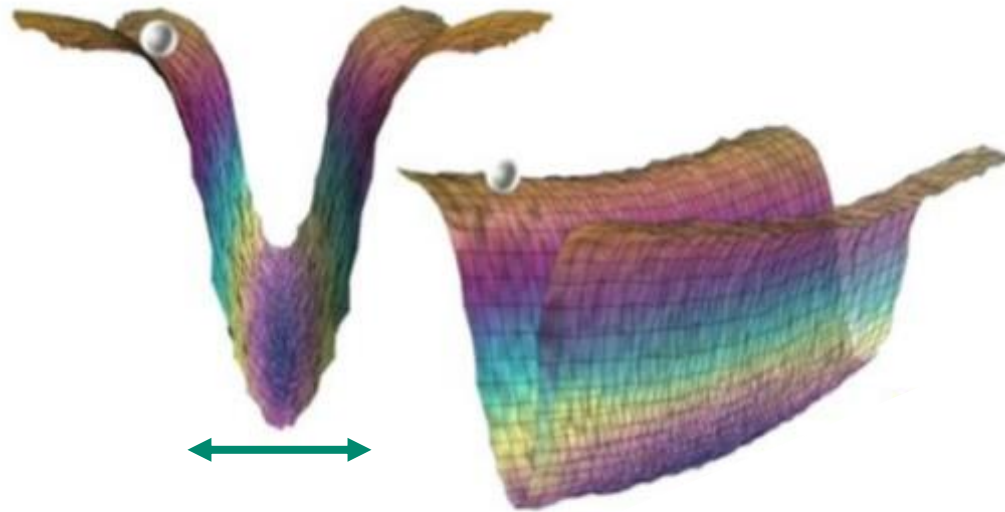
Fitting 解に対する評価パラメーター

SE値

Chi²値が最も小さくなるようにFittingされた際に取りうる各値 (k_a , k_d など) の誤差範囲

Chi²値とSE値の間に相関はない

Chi²値が大きい場合でも、その際に取りうる誤差範囲を算出



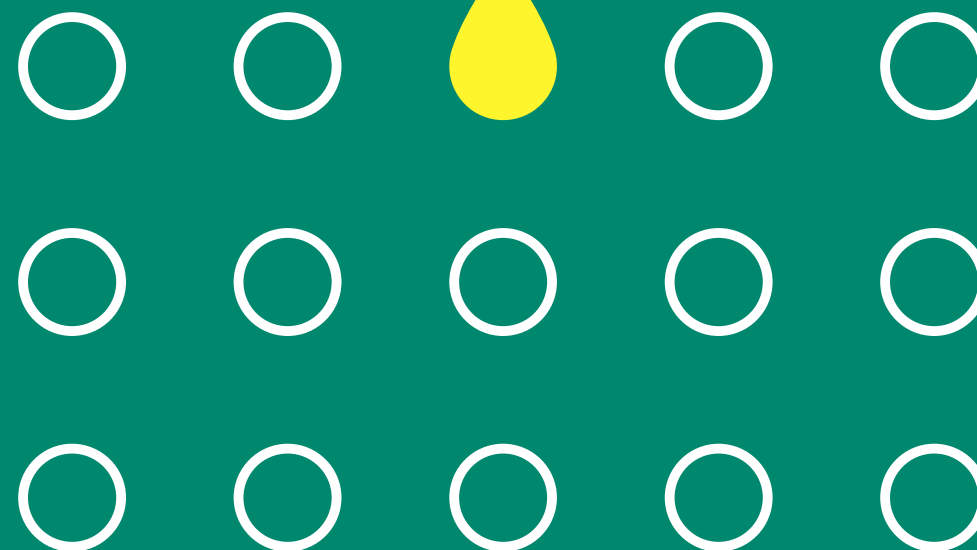
SE値（標準誤差）のイメージ

SE値が小さい：窪みが非常に鋭く深い

SE値が大きい：窪みの幅が広い

窪みの幅が広い = 取り得る解の幅が広い。
⇒ 算出された解にほとんど意味がない。

2. あるあるケーススタディ



あるあるケーススタディ

- ✓ パラメーターは良さそうだけど。。。
- ✓ Rmaxがセンサーグラムの大きさよりはるかに大きいけどいいの？
- ✓ スパイクノイズを処理する意味？（見た目だけ？数値は変わる？）
- ✓ 直線的な結合がみられる場合の対処方法

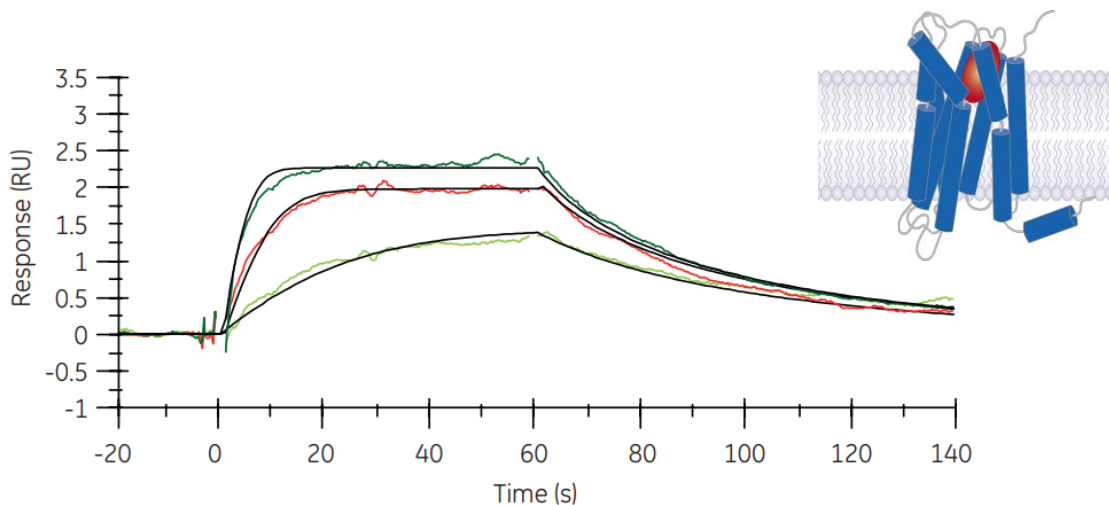


パラメーターは良さそうだけど。。。。

Chi²値

Chi²の絶対値が小さくても、KD値などの値の誤差が大きくなる傾向があるデータ例

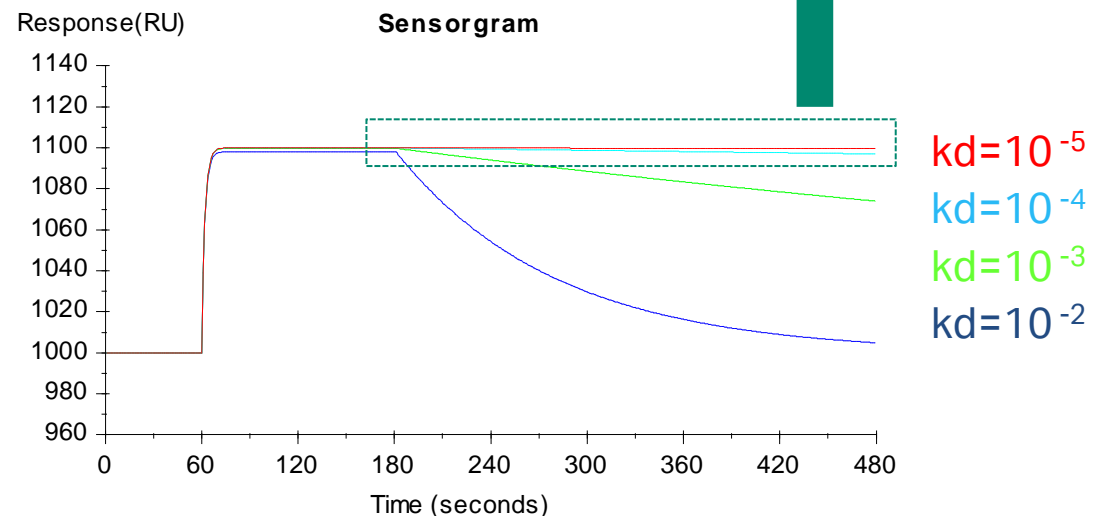
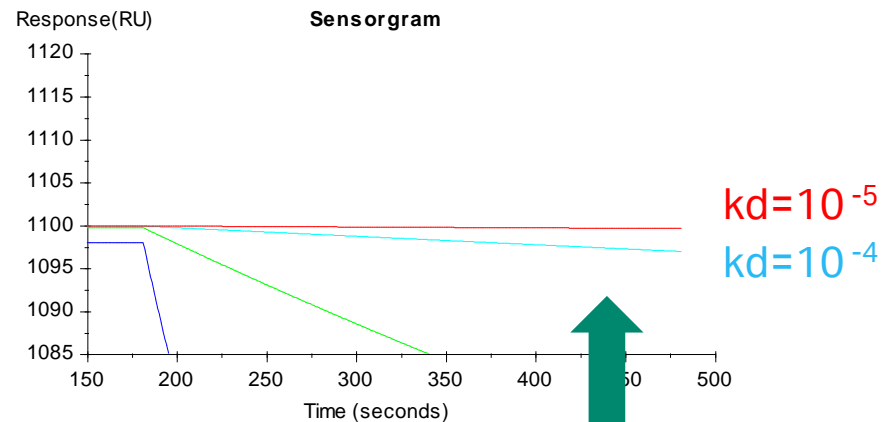
1. Rmaxの小さいサンプル（低分子、高難度標的）



Cytiva

高い再現性が必要（n=2のセンサーグラムやブランクの再現性で確認）

2. 解離の遅いサンプル（抗体）

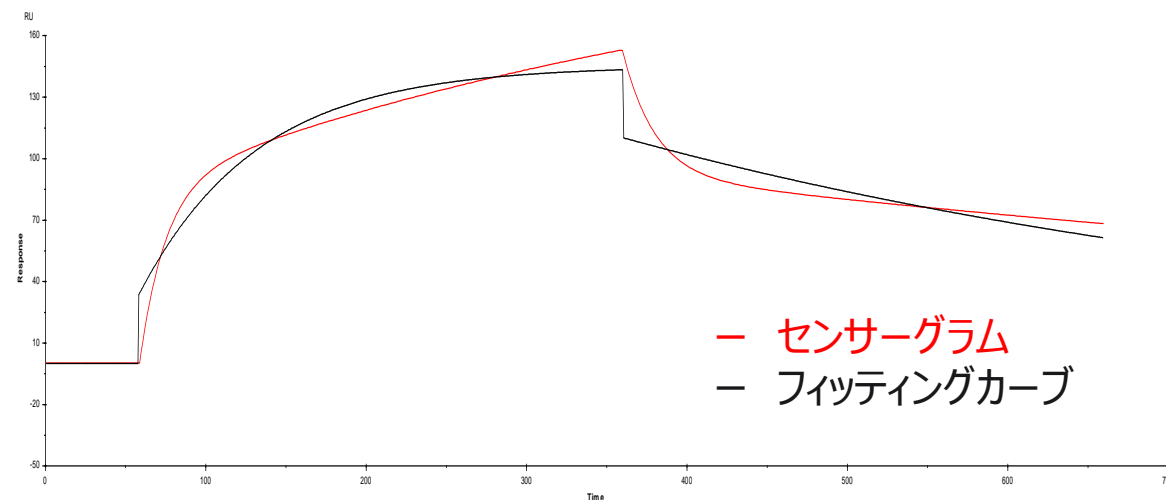


パラメーターは良さそうだけど。。。

Chi²は小さくて良さそうなんですが、RI値が大きい

RI

アナライトインジェクション前後での“段差”のパラメーター
⇒ ダブルサブトラクションをしたデータでは本来ほぼゼロ



ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)
1.17e5	1.95e-3	131	33.1

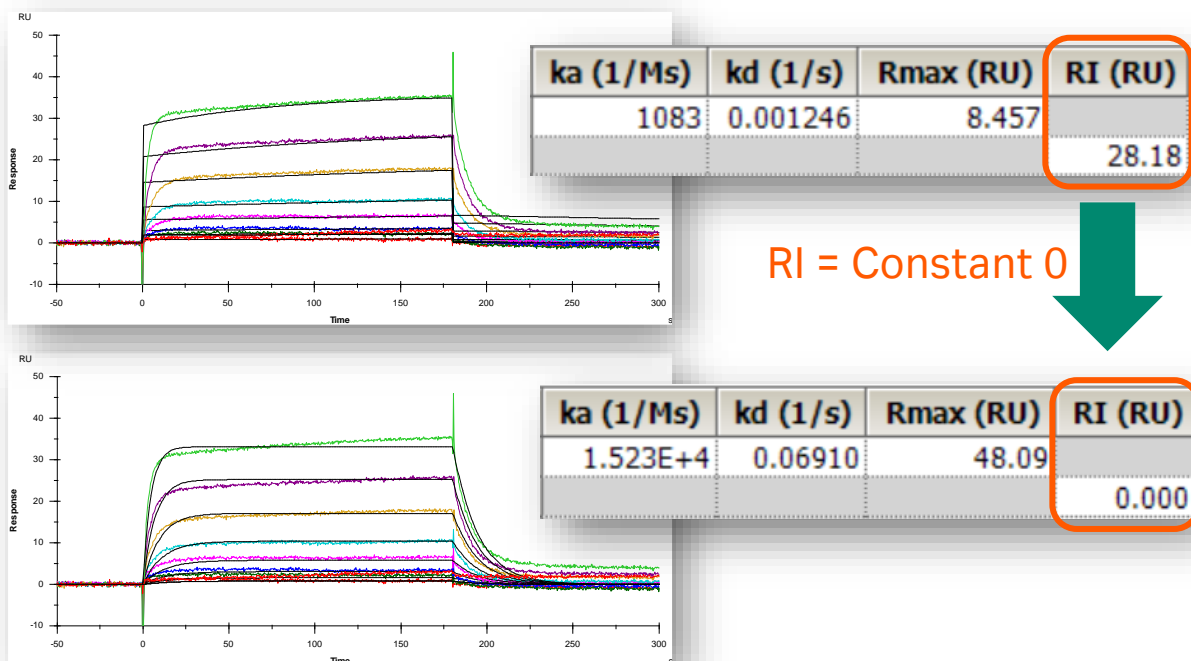
パラメーターは良さそうだけど。。。

Chi²は小さくて良さそうなんですが、RI値が大きい

RI

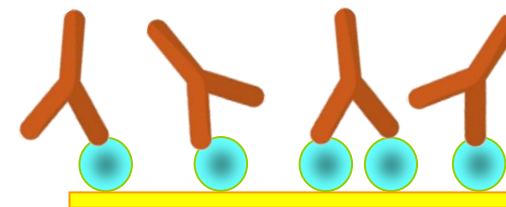
アナライトインジェクション前後での“段差”のパラメーター
⇒ ダブルサブトラクションをしたデータでは本来ほぼゼロ

- 測定誤差が小さい場合、速い結合解離を大きなRIと計算された場合
→ Parameters...より、RI = Constant 0

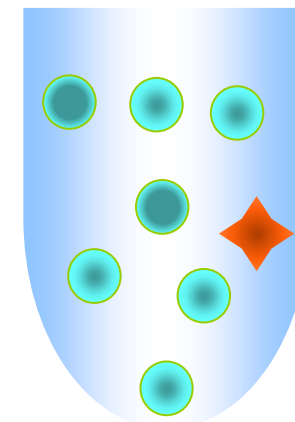


Cytiva

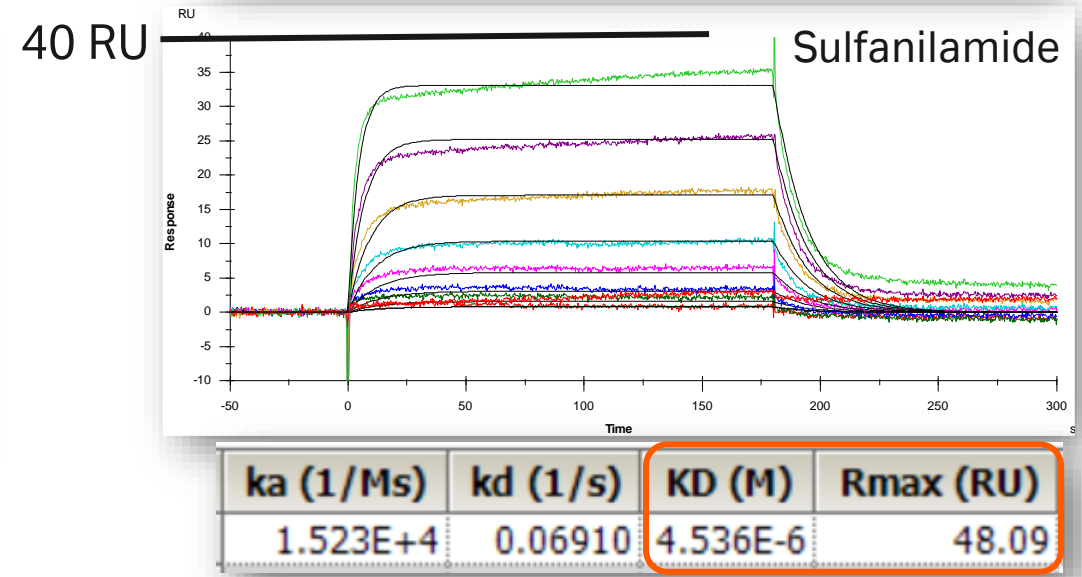
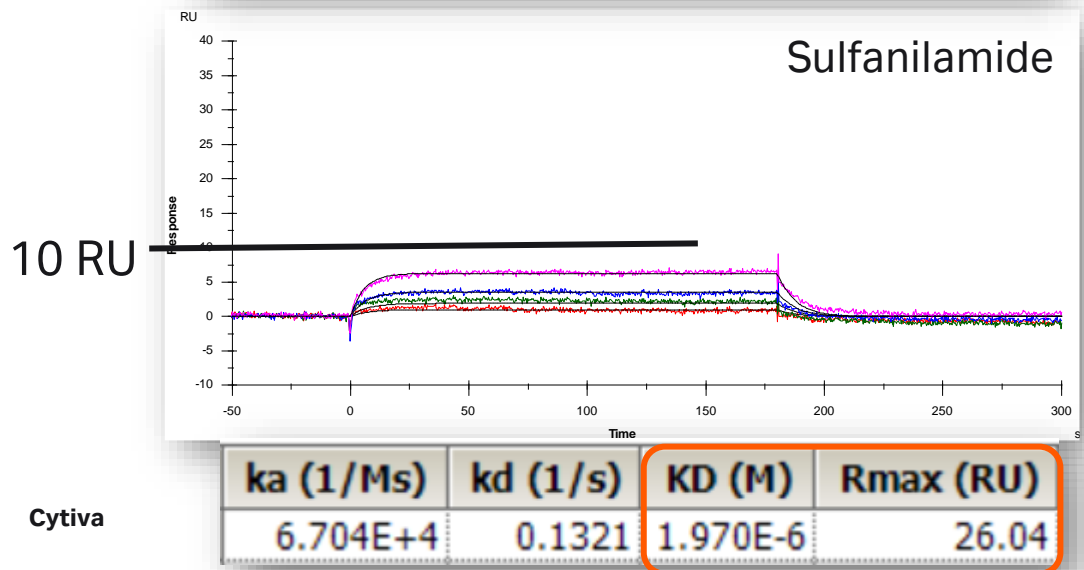
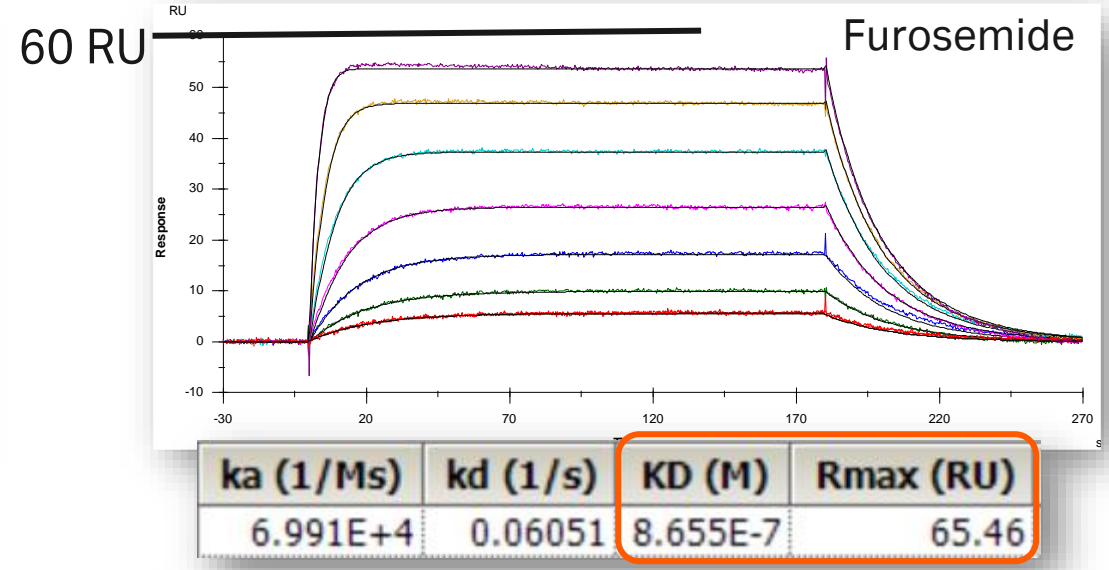
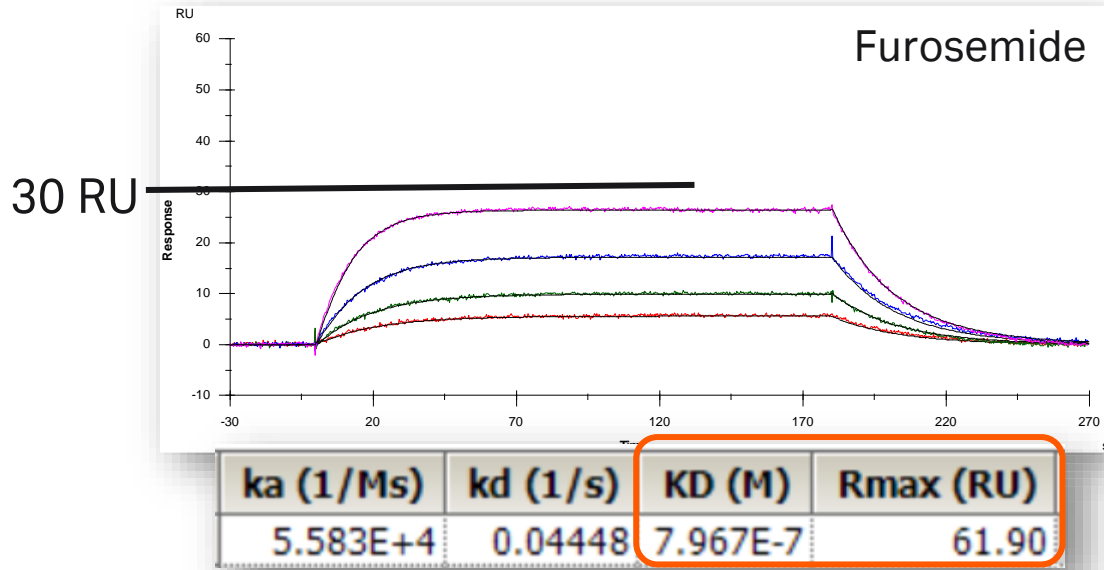
- サンプルの相互作用様式が1:2
→ Bivalent analyte モデルを用いる。



- リガンド、アナライトの品質が不均一
→ サンプルの調製法を改善
- 非特異的結合成分が混ざっている
→ サンプルの調製法を改善
→ 固定化・バッファー条件などを変更

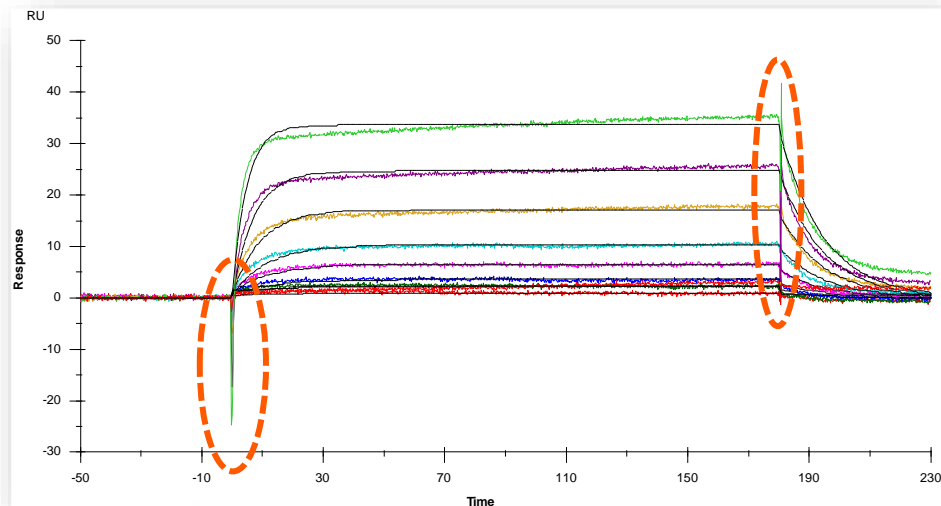


Rmaxがセンサーグラムの大きさよりかはるかに大きいけどいいの？

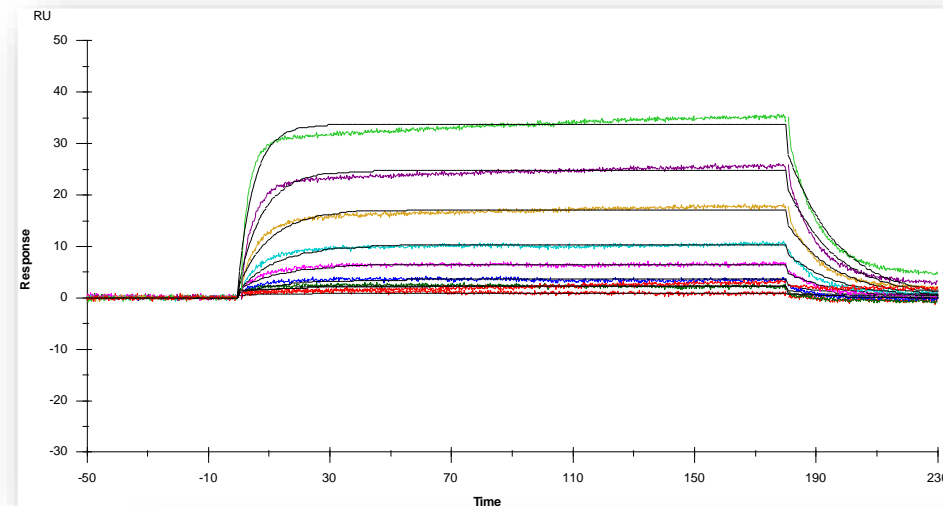


スパイクノイズを処理する意味？（見た目だけ？数値は変わる？）

スパイクノイズ除去



ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
1.405E+4	0.07000	4.981E-6	48.56



ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
1.252E+4	0.06119	4.887E-6	43.11

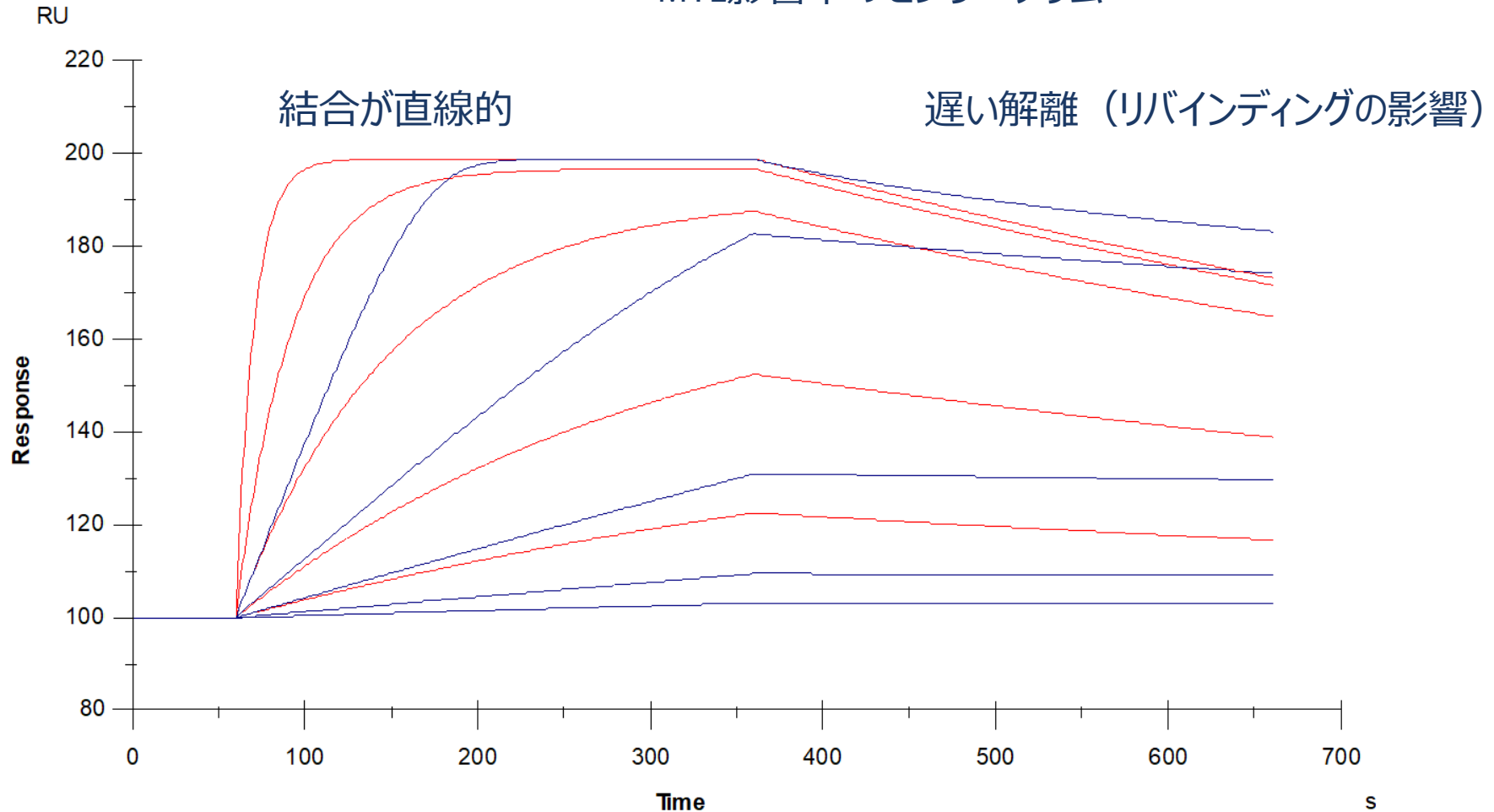
あまり変わらないケースも多い。

RIの値が高くQuality Controlがパスしない → スパイクノイズをRemove Selection

直線的な結合がみられる場合 ～マストランスポートリミテーション (MTL)

* Kinetics解析の注意点

- 理想のセンサーグラム
- MTL影響下のセンサーグラム



マストランスポートリミテーションを受けやすいサンプル、測定条件

* Kinetics解析の注意点

【MTLを特に注意するサンプル】

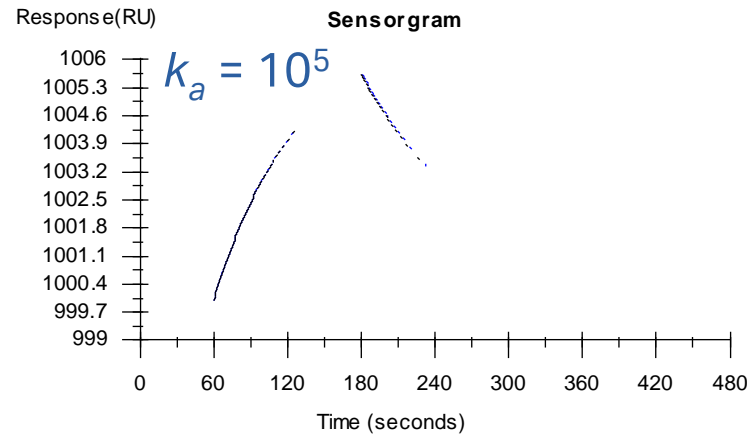
- 速い結合の相互作用
- 低分子化合物でアフィニティーが強いもの

【MTLを受けやすい測定条件】

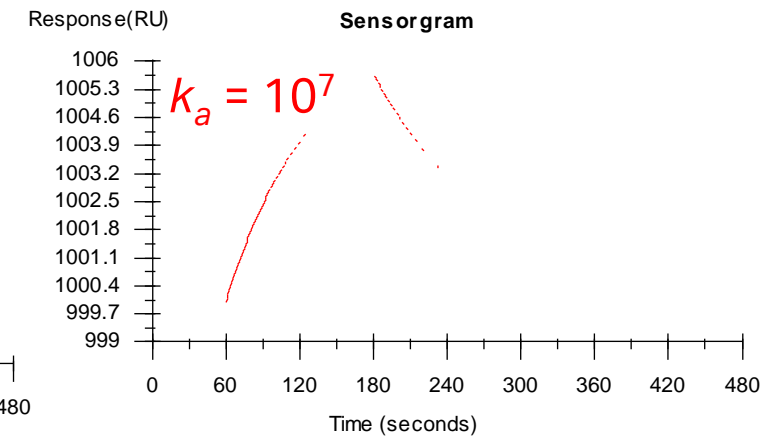
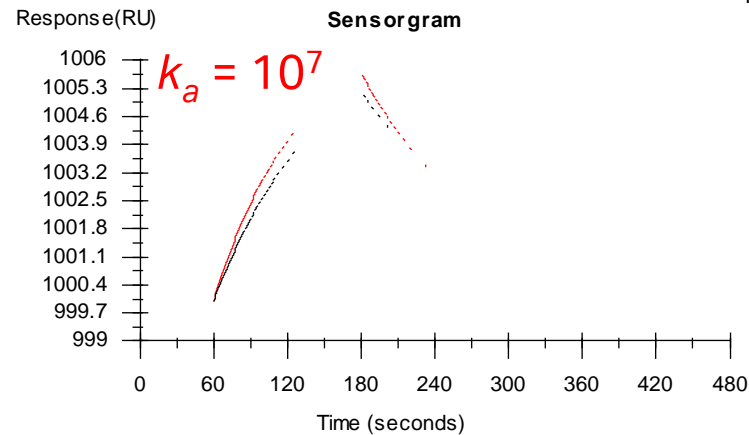
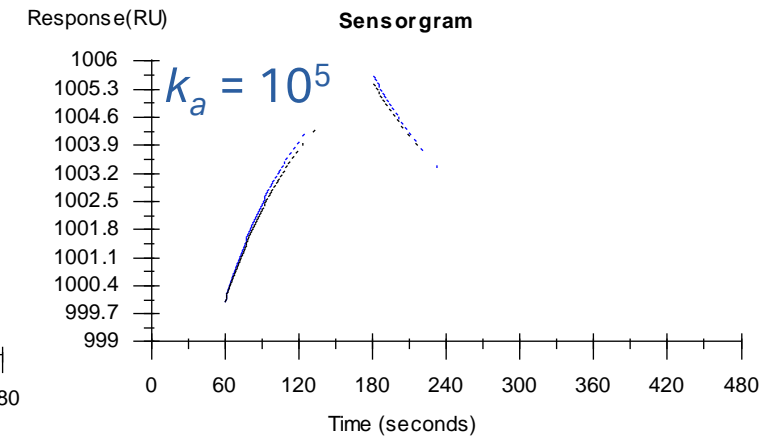
リガンド量に対してアナライトの供給量が追いつかない状況

- リガンド固定化量が過剰
⇒固定化量はなるべく少なく
- 測定時の流速が遅い
⇒30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 以上

MW = 50000



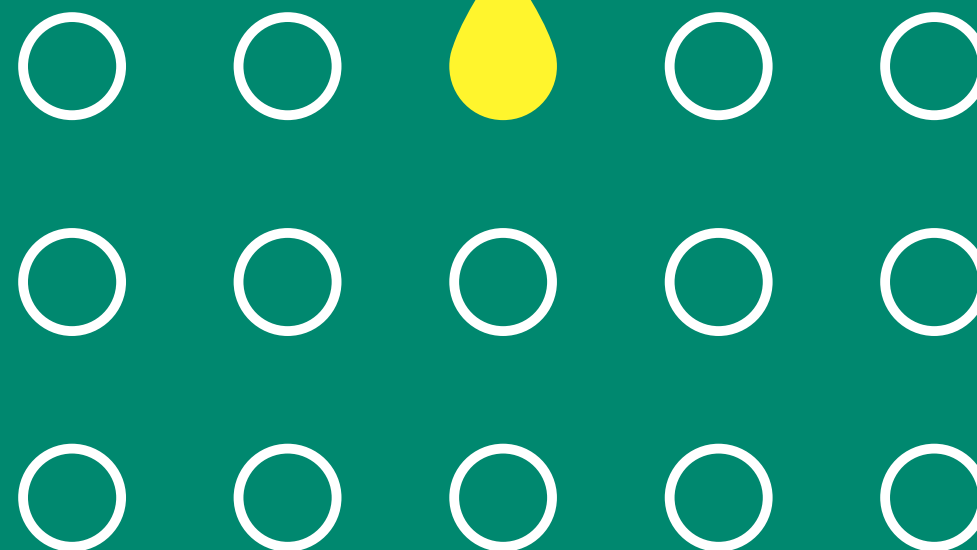
MW = 500



$$k_d = 10^{-2}$$

$$R_{\text{max}} = 20\text{RU}$$

3. フィッティングに関する応用編TIPs

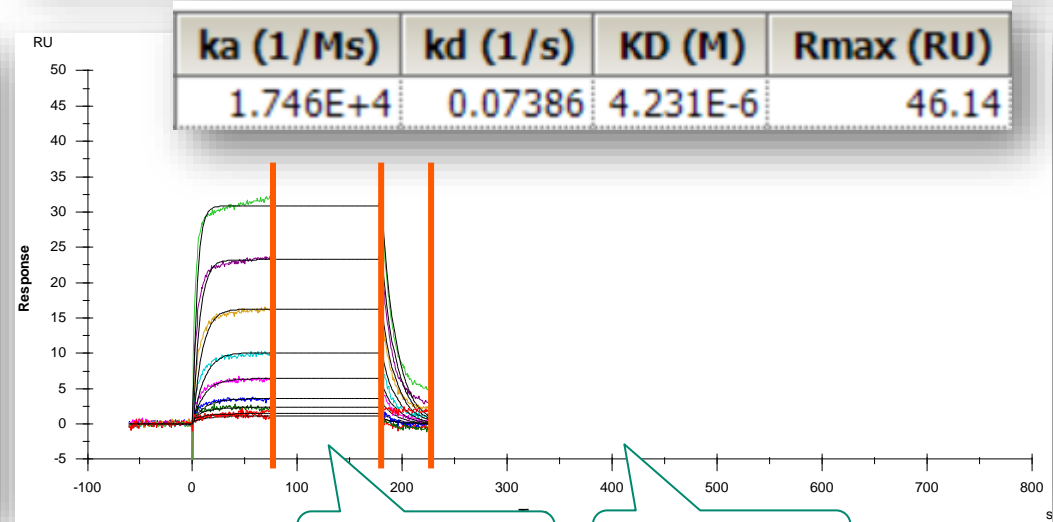
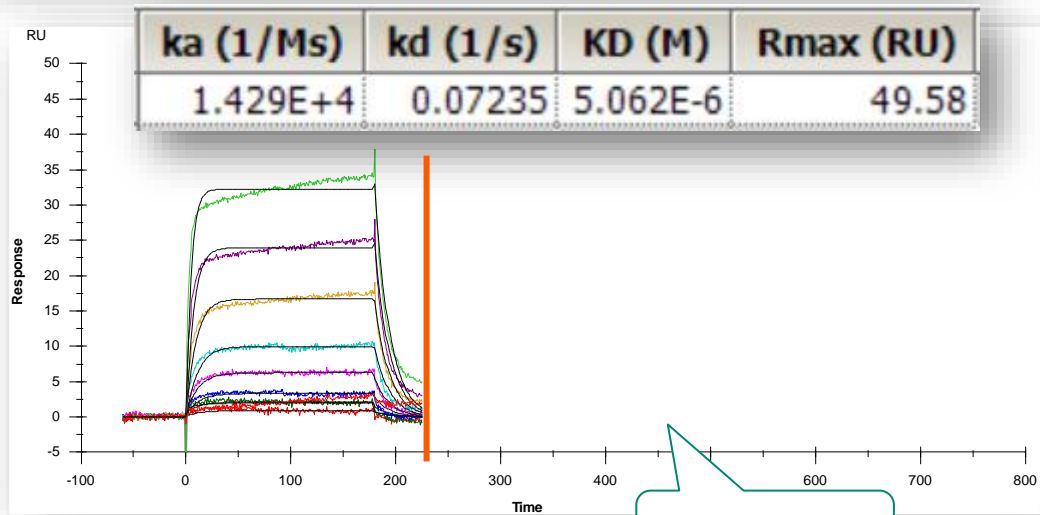
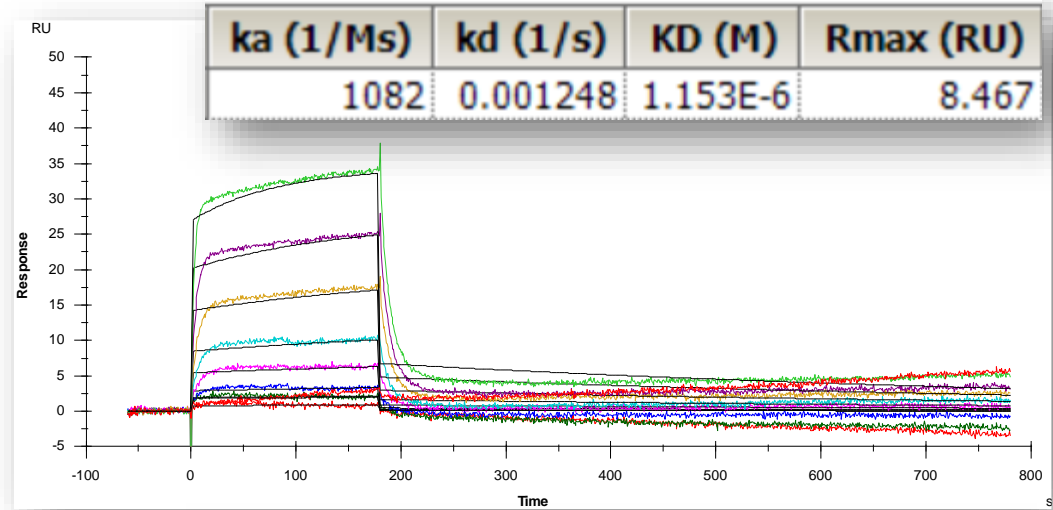
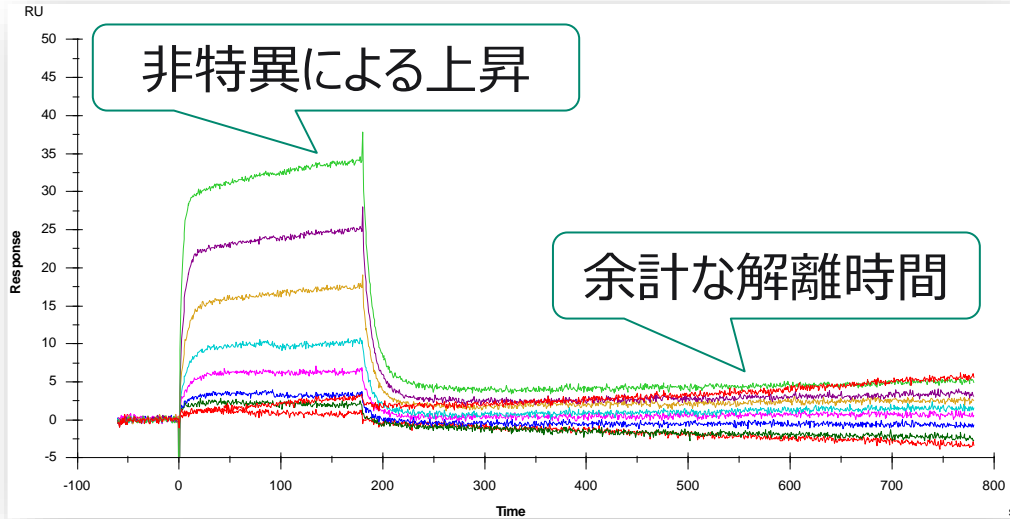


フィッティングに関する応用編TIPs

- ✓ センサーグラム之余計な部分をRemove
- ✓ 1:1 dissociation model による Off-rate ranking

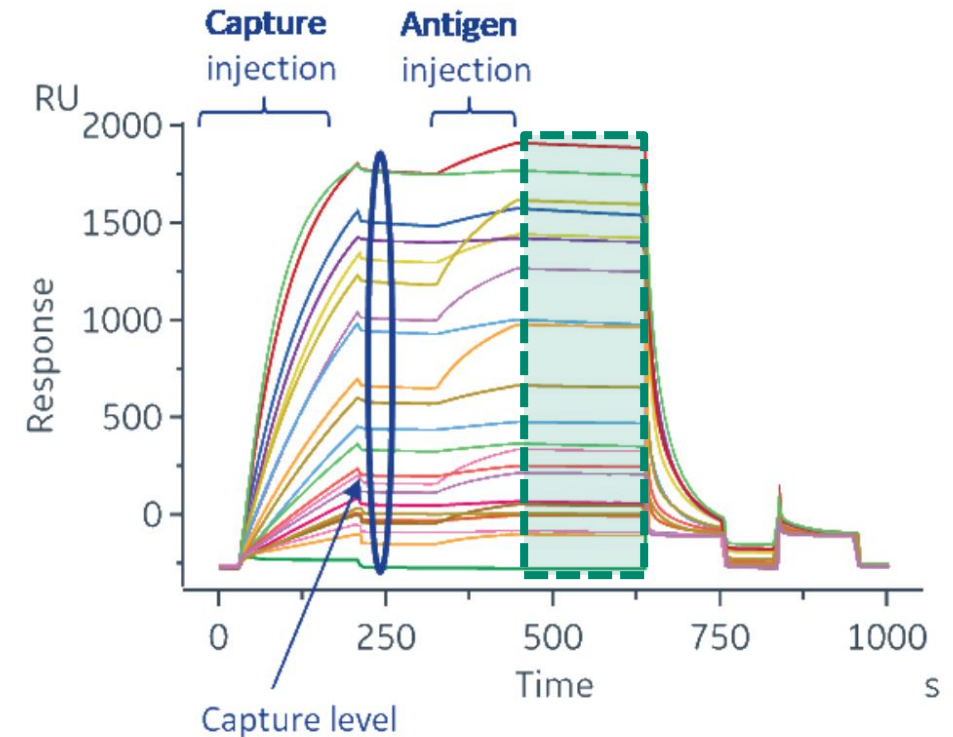
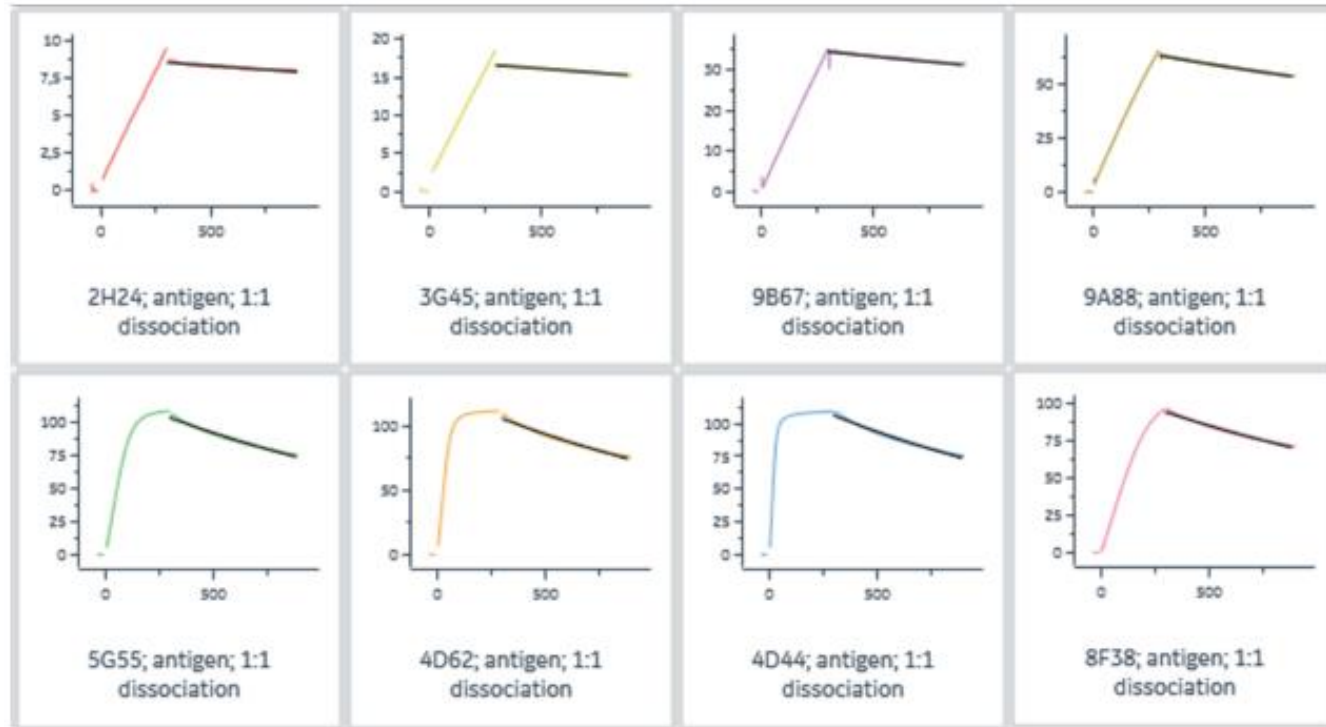


センサーグラムの余計な部分をRemove



1:1 dissociation model による Off-rate ranking

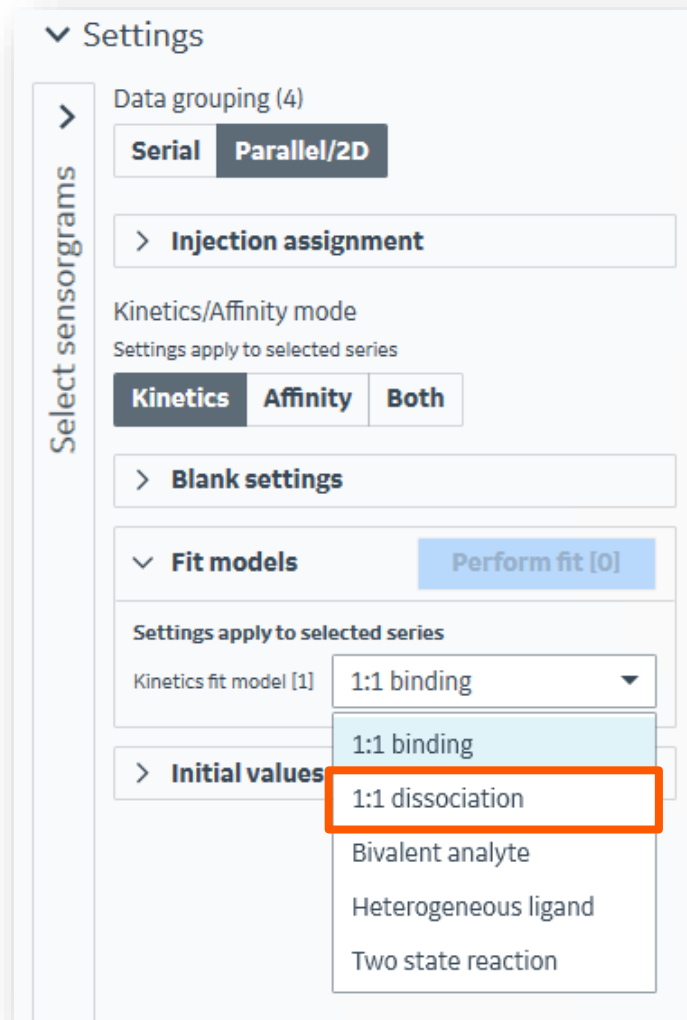
複合体の安定性の良い抗体を選別するために



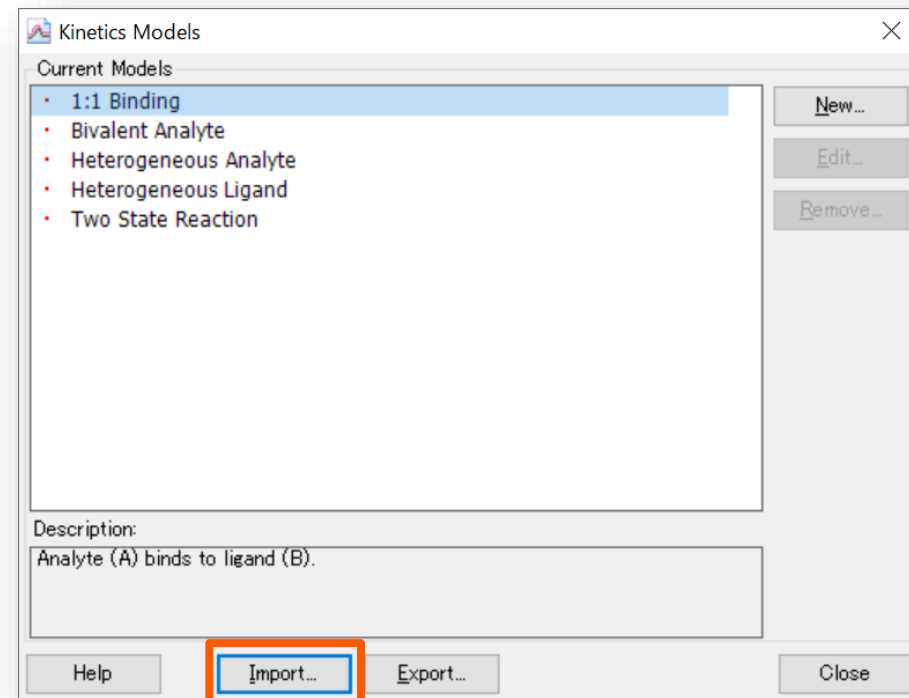
- 濃度 1 点で実施する場合にも、Blank (0濃度) のデータを差し引く必要があります。
- 抗原 (アナライト) の濃度情報は必要ありません。

【補足】 1:1 dissociation model

Biacore Insight Evaluation Software



Biacore T200/S200/X100 Evaluation Software



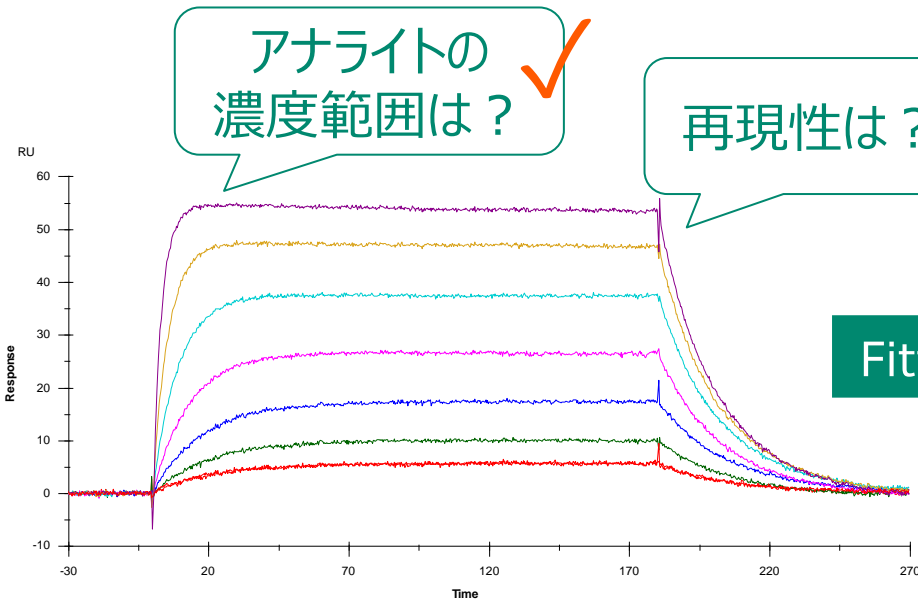
1:1 dissociation model はプリセットされていません。
メインメニューの Tools > Models > Kinetics... よりインポートします。
Multi cycle 法のみ対応。

Biacore フィットング計算の基礎と勘所② ここがポイント

1. 見たいものを反映しているセンサーグラム形状か？

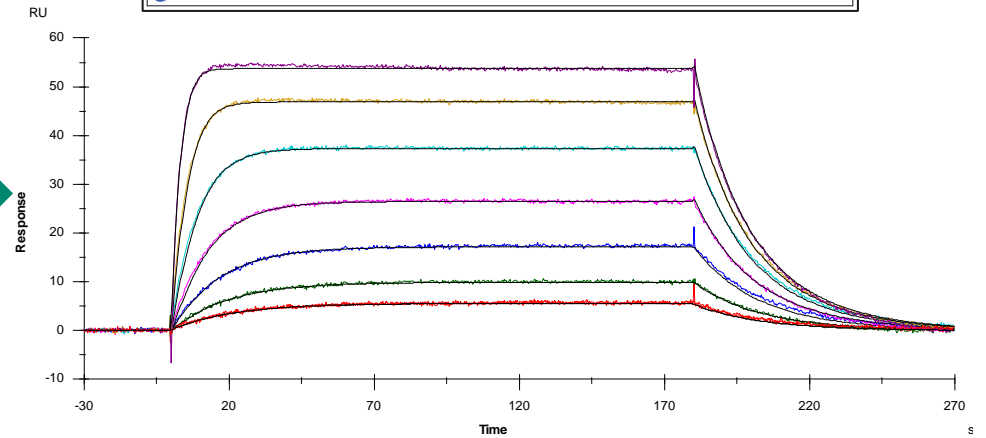
リガンド
固定化量は？

結合の
特異性は？



2. フィットング計算は適切か？

Quality Control	Report	Residuals	Parameters
✓			
✓			
✓			
⊖			
⊖			



なによりアッセイセットアップが重要

詳しくは、『Biacoreの測定系構築の勘所』

https://www.cytivalifesciences.co.jp/tech_support/webinar/key-points-of-biacore-measurement-construction.html

どちらかだけではなく
総合的に判断



Thank you





cytiva

Biacoreのメールマガジン“月刊Biacoreコンシェルジュ”のご案内

5月号サンプル

Biacore コンシェルジュ

Biacoreをとことん使いこなす！

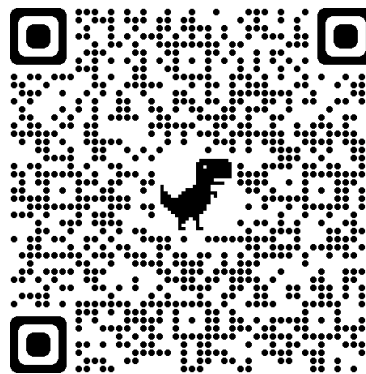
ための月刊メルマガ



- Biacoreの製品・ソフトウェアのアップデート情報
- 機器を使いこなしていただくためのTips、裏技
- ウェビナー、イベント等のご案内
- 頻出のお問合せとその回答
- Biacore関連の論文紹介

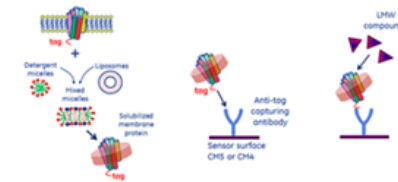
是非皆様お誘いあわせの上ご登録ください！

ご登録（無料）はこちらで検索か右のQRコードより



膜タンパク質の測定

とてもチャレンジングな標的である膜タンパク質。BindingのイベントをBiacoreで測定したいと考えたとき、何から手を付けたらよいのでしょうか。実績はあるのでしょうか？固定化の方法は？チップは？ここでは膜タンパク質を測定するにあたっての考え方、注意点を事例とともにお伝えします。

[LEARN MORE](#)

低分子スクリーニングの補正機能について

一定のカットオフで多検体のスクリーニングを行う際、各検体が公平に評価できているか重要です。時間経過に伴うレスポンスの低減、分子量の異なる検体のレスポンス比較、キャプチャー法におけるリガンドキャプチャー量の補正機能などについて確認してみましょう。

[LEARN MORE](#)

Tips・FAQs

Hisタグタンパク質固定化のトリセツ

多くの皆様Hisタグを用いたリコンビナントタンパク質で実験をされていると思います。とありますと精製に使われるHisTrapと同じ原理のセンサーチップNTAで、というのが真っ先に思いつくことだと思います。でもちょっとここで俯瞰的に様々な選択肢を見たらうえて考えませんか？

[Learn More](#)

Cytiva Webinar Biacore フィッティング 計算の基礎と勘所 1

フィッティングって結局何をやっているの？何に気を付ければ得られた数値に自信が持てるの？などをお話したいと思います。
5/28 (金) 15:00~15:30

[Learn More](#)

【無料】4社共催Webセミナー

遺伝子治療用ウイルスベクター創製

研究開発から製造・上市まで～AAVを中心に～と題し、東京大学 岡田 尚巳 先生に遺伝子治療の最新のトレンドについてお話いただくほか、遺伝子治療用ウイルスベクター開発の研究開発から将来的な製造までを見据え共催各社より関連ソリューションをご紹介いたします。
5/25 (火) 13:30~16:15

[Learn More](#)

【お問合せ先】

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

バイオダイレクトライン 内線#2をご選択ください

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

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

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

掲載されている価格は2021年6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。