

低分子結合カイネティクス



テクニカルノート

内容

このテクニカルノートでは、Octet® R2、R4、R8、RH16、およびRH96システムでタンパク質-低分子結合相互作用解析を成功させるためのメソッド設定とそのプロセスについて解説します。低分子アッセイに最適な試薬を調整するためのベストプラクティスや、データのリファレンスの手順などのデータ解析に関するヒントを提供します。

概要

ザルトリウスのOctet® R2、R4、R8、RH16、およびRH96システムは、高密度のSuper Streptavidin (SSA) バイオセンサーと組み合わせて使用することで、タンパク質-低分子の結合研究を行い、関連するカイネティクスデータと親和性定数を得ることができます。このプロセスではビオチン化タンパク質をOctet® SSAバイオセンサーに固相化する必要があります。ハイスループットスクリーニングアッセイを実行する際には、これを目的低分子の希釈系列か、単一濃度溶液に浸して測定します。リファレンスを差し引きするために、リファレンスバイオセンサーのセットも必要です。最良の結果を得るためには、目的のタンパク質と可能な限り類似のビオチン化リファレンスタンパク質が推奨され、センサー表面に同じ密度で固相化する必要があります。

Table of Contents

はじめに	3	トラブルシューティング	12
新規化合物のアッセイワークフロー	3	非特異的結合	12
メソッドテンプレート	4	界面活性剤	12
Octet® RH16およびRH96のメソッド	4	リファレンスメソッドとの相関不良	13
Octet® R8のメソッド	4	負のシグナル	13
リファレンス補正	5	二相性のレスポンス	13
リファレンスタンパク質の選択	5	ドリフト	13
タンパク質のビオチン化	5	参考文献	14
Super Streptavidinバイオセンサーへの ビオチン化タンパク質のオフライン固相化	6	添付資料A	
サンプルおよびバッファーの調製	7	K _D スカウティング：シングルランのタンパク質固相化 および低分子解析のためのプロトコール	15
低分子測定プロトコールのパラメーター	7	試薬類	15
サンプル数	7	アッセイ詳細	15
測定パラメーター	7	試験手順	15
バイオセンサー	8	K _D スカウティングのためのデータ解析	16
リファレンス	8	添付資料B	
K _D スカウティング：シングルランのタンパク質固相化 および低分子解析のためのプロトコール	8	6段階希釈系列によるK _D 値の決定：オフラインで 調製したバイオセンサーを用いた低分子アッセイの プロトコール	17
典型的な結果	8	試薬類	17
タンパク質固相化のレスポンスと低分子シグナルの 相関	8	試験手順の要約	17
オフラインで調製したバイオセンサーを用いた 低分子アッセイのプロトコール	9	試薬とサンプル	18
典型的な結果	9	アッセイバッファーによるバイオセンサーの平衡化	18
解離速度が遅い化合物の 解析プロトコール	9	バイオセンサーとサンプルプレートのシステム内への 設置	19
典型的な384ウェルプレートマップ	10	アッセイプロトコールの設定	19
データ解析	10	添付資料C	
リファレンス補正	10	オフラインでのタンパク質固相化プロトコール	19
データ解析メソッド	11	はじめに	19
Preprocessed Dataタブにおけるステップ間補正 (Inter-step correction) について	11	オフラインのタンパク質ローディングプロトコール	19
化合物スクリーニングのためにユーザーが 定義可能なレスポンスポイント（レポートポイント）	12	添付資料D	
個別の曲線のカインेटクス解析	12	ビオチン化ブロックストレプトアビジン（SAB4）の 調製	20
平衡値解析	12	試薬類	20
グローバル解析	12	複合体の調製	20
キャリーオーバー	12	複合体の試験	20
マストランスポート	12	技術に関するリソース	20
カーブフィッティングの確認	12	複合体の調製手順	20
		複合体の試験手順	20
		サンプルデータ	20

はじめに

低分子のカイネティクスはOctet® R8、RH16およびRH96システムを用いて測定することができます。典型的な試験では、ビオチン化した標的タンパク質を高密度のSuper Streptavidin (SSA) バイオセンサー表面に固相化し、マイクロプレートウェル中の低分子溶液に浸します。そうすることでバイオセンサー上の標的タンパク質と低分子との結合を経時的に測定します。次にバイオセンサーはバッファーの入ったウェルに移動し、標的タンパク質からの低分子の解離をモニターします。この結合データをもとに、結合速度(k_{on} または k_b)、解離速度(k_{off} または k_d)および解離定数(K_D)をはじめとする速度定数が算出されます。

解析を成功させるうえで、理想的には堅牢で十分に信頼できるシステムと、安定で活性な精製タンパク質、および安定で凝集しない低分子化合物が必要になります。標的タンパク質に結合する、またはしないことが分かっている化合物は、ポジティブおよびネガティブコントロールとして有用です。ビオチン化標的タンパク質は、タンパク質につき1モル当量でビオチン修飾されたものがが必要です。サンプルマトリックスは、ベースラインおよび解離で使用するアッセイバッファーと同じ組成であるときに、最良の結果が得られます。

SSAバイオセンサーへのビオチン化標的タンパク質の固相化は、オンラインで(すなわちOctet® システム内で)行い、経過をモニターすることができます。また固相化と連続して低分子アッセイも測定できます。もし多数のバイオセンサーを要する場合は、実験台上または4°Cの冷蔵庫内で、オフラインかつバッチで、最大96本のバイオセンサーを同時に調製することもできます。標的タンパク質のバッチ固相化のプロトコルは添付資料Cに記載されており、補足情報はザルトリウスのテクニカルノート『Batch Immobilization of a Biotinylated Ligand』で確認することができます。

試験対象になる化合物の溶解性は重要な要素です。凝集体を形成する化合物は、誤った解釈を招くような異常な結果を与えることがあります。さらに、サンプルの希釈に使用するサンプルマトリックスまたはバッファーと、ベースラインおよび解離データの測定に使用するアッセイバッファーは、データにアーチファクトが混入しないように同一組成であることが望ましいです。

本テクニカルノートでは、SSAバイオセンサーを用いた低分子カイネティクス特性解析法を開発するためのガイドラインを提供します。これには以下のような手順が含まれます。

- SSAバイオセンサーへのビオチン化標的タンパク質の固相化
- Octet® R8、RH16およびRH96システムによる低分子アッセイの実施
- 低分子結合データの分析と解釈(有意なデータとアーチファクトの区別の仕方など)

新規化合物のアッセイワークフロー

低分子解析を成功させるには、次の4つのフェーズが必要となります(図1に詳細を示します)。

1. 本テクニカルノート記載の手法に従って、ビオチン化タンパク質複合体を調製し、試験に使用可能か確認します。調整したビオチン化標的タンパク質はSSAバイオセンサーに飽和量まで固相化します。
2. ビオチン化標的タンパク質を固相化したSSAバイオセンサーと、ビオチンまたはビオチン化リファレンスタンパク質のいずれかで表面をブロックしたりリファレンスバイオセンサーを用意します。
3. K_D スカウティング試験を行います。アッセイバッファーで調製した10、1、0.1 μ Mの化合物について暫定的な速度定数を決定することにより、最適な化合物解析の濃度範囲を決定します。

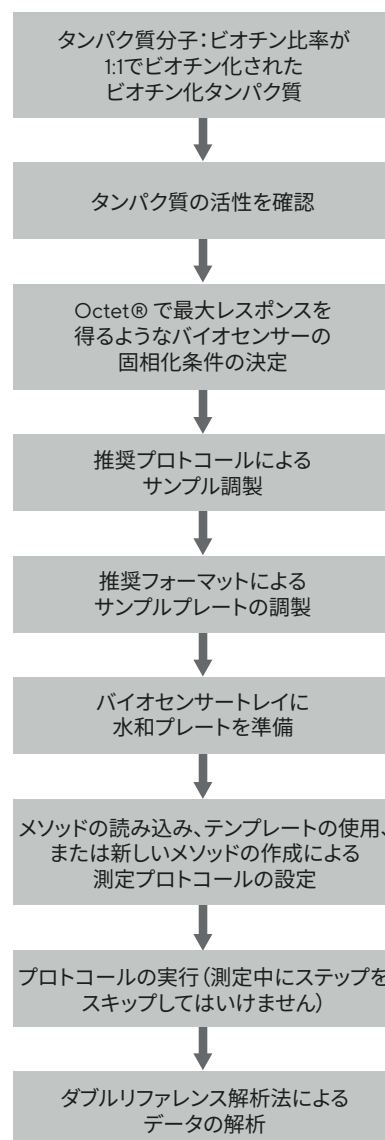


図1: Octet® R8、RH16およびRH96システムによる低分子解析のアッセイワークフロー

4. 最適な濃度範囲内で2～4倍の希釈系列を作成して、得られた結合データから速度定数を求めます。

メソッドテンプレート

Octet® ソフトウェアにはメソッドテンプレートが用意されています。これらのテンプレートは、Octet® R8、RH16およびRH96システムで推奨されるプレートマップとアッセイプロトコルを示したものです。Octet® R8システムを使用する場合、メソッドが96ウェルプレートに限定されますが、Octet® RH16またはRH96を使用する場合は、96ウェルプレートよりも384ウェルプレートのメソッドの使用が推奨されます。

Octet® RH16およびRH96のメソッド

1. **Kinetics_8CH_96W.fmf**
96ウェルプレートを用いて2倍または3倍希釈系列から速度定数を決定するための8チャンネルのメソッドです。8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（1列目）、および8本のリファレンスバイオセンサー（3列目）が必要です。バイオセンサーはOctet® ASステーションを使用してオフラインで調製するか、別途オンラインにて調製します。測定時間は約2時間です。
2. **Kinetic Characterization_8CH_384W.fmf**
384ウェルプレートを用いて2倍または3倍希釈系列から速度定数を決定するための8チャンネルのメソッドです。8本のリファレンスバイオセンサー（1列目）、および8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（3列目）が必要です。バイオセンサーはOctet® ASステーションを使用してオフラインで調製するか、別途オンラインにて調製します。測定時間は約4.5時間です。
3. **Kinetic Characterization_16CH_384.fmf**
384ウェルプレートを用いて2倍または3倍希釈系列から速度定数を決定するための16チャンネルのメソッドです。16本のリファレンスバイオセンサー（1列目と2列目）、および16本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（3列目と4列目）が必要です。バイオセンサーはOctet® ASステーションを使用してオフラインで調製するか別途オンラインにて調製します。測定時間は約2.5時間です。
4. **TW_Screening_16CH_2X384W.fmf**
384ウェルプレートを用いて単一濃度で最大288種類の化合物をスクリーニングできる16チャンネルのメソッドです。16本のリファレンスバイオセンサー（1列目と2列目）および16本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（3列目と4列目）が必要です。バイオセンサーはオフラインで調製するか、別途オンラインにて調製します。このメソッドは横に伸びるC列およびD列にサンプルを追加すれば、測定サンプル数を336種類まで拡張することができます。測定時間は約4.25時間です。
5. **Sensor prep and screening_8CH_384W.fmf**
384ウェルプレートを用いてオンラインでバイオセンサーを調製し、単一濃度の49種類の化合物（複数濃度ではより少ない化合物）をスクリーニングできる8チャンネルのメソッドです。8本のリファレンスバイオセンサー

（1列目）、および8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（3列目）が必要です。測定時間は約4時間です。

6. **Sensor prep and screening_8CH_96W.fmf**
96ウェルプレートを用いてオンラインでバイオセンサーを調製し、単一濃度で24種類の化合物（複数濃度ではより少ない化合物）をスクリーニングするための8チャンネルのメソッドです。8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（1列目）、および8本のリファレンスバイオセンサー（3列目）が必要です。測定時間は約2時間です。
7. **Sensor prep_8CH_384W.fmf**
384ウェルプレートを用いてオンラインでバイオセンサーを調製する8チャンネルのメソッドです。このメソッドでは8本のリファレンスバイオセンサー（1列目）、および8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（3列目）を調製します。測定時間は約2時間です。
8. **Sensor prep_16CH_384W.fmf**
384ウェルプレートを用いてオンラインでバイオセンサーを調製する16チャンネルのメソッドです。このメソッドでは16本のリファレンスバイオセンサー（1列目と2列目）および8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（3列目と4列目）を調製します。測定時間は約2時間です。

Octet® R8のメソッド

1. **Kinetics_8CH_96W.fmf**
96ウェルプレートを用いて2倍または3倍希釈系列から速度定数を決定するための8チャンネルのメソッドです。8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（1列目）および8本のリファレンスバイオセンサー（2列目）が必要です。バイオセンサーはOctet® ASステーションを使用してオフラインで調製するか、別途オンラインにて調製します。測定時間は約2時間です。
2. **Sensor prep and screen_8CH_96W.fmf**
96ウェルプレートを用いてオンラインでバイオセンサーを調製し、単一濃度の24種類の化合物（複数濃度ではより少ない化合物）をスクリーニングできる8チャンネルのメソッドです。8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（1列目）、および8本のリファレンスバイオセンサー（2列目）が必要です。測定時間は約3時間です。
3. **Assay development small molecule_8CH_96W**
96ウェルプレートを用いてオンラインでバイオセンサーを調製し、コントロールタンパク質分子に対する低分子濃度（アナライト）、または単一濃度で複数の低分子化合物を分析するなどの、アッセイ条件を最適化するための8チャンネルのメソッドです。8本のビオチン化標的タンパク質で標識したバイオセンサー（1列目）、および8本のリファレンスバイオセンサー（2列目）が必要です。

リファレンス補正

バックグラウンドシグナルの変動を最小限にすることは、通常シグナルが0.3 nmに満たない低分子アッセイのような、難易度の高いアプリケーションで成功を収めるための重要なパラメーターです。多くの場合、陽性シグナルの検出下限値 (LLOD) は、バックグラウンドシグナルの標準偏差の3倍高い値と定義されるため、バックグラウンド/リファレンスシグナルを再現性よく測定することは重要です。バックグラウンドシグナルの変動を抑えることで、より小さな陽性シグナルの分解能が向上し、アッセイ感度を向上させることができます。

Octet® プラットフォームの低分子アッセイでは、真度および精度の高い解析データを得るためにリファレンスの測定を必要とします。一般的には2種類のリファレンスが推奨されます。第一のリファレンスはシステムのアーチファクトやわずかなバッファーの不整合性を除くためのもので、ビオシチンまたはリファレンスタンパク質を固相化した2~8本のリファレンスバイオセンサーを使用して、標的タンパク質で標識したバイオセンサーと同じプロトコルを測定して得られます。第二のリファレンスは、標的タンパク質を固相化したバイオセンサーに由来するシグナルのドリフトを除去するものです。これは、1~2本の標的タンパク質を固相化したバイオセンサーを、サンプル測定中に並行するようにバッファーを測定して得られます。バッファーに由来するドリフトがあれば、データ解析のタイミングでベースラインの差し引きにより補正が可能です。標的タンパク質を固相化したバイオセンサーへのシグナルドリフトは、測定開始前にバイオセンサーをバッファー中で30~60分インキュベートすることで、さらに最小化されます。

リファレンスバイオセンサーは、SSAバイオセンサーに対してビオシチンまたはビオチン化リファレンスタンパク質のいずれかで、ビオチン結合部位のすべてをブロックすることによって調製することができます。ビオシチンを固相化すると、リファレンスバイオセンサーの表面の光学的特性は、標的タンパク質を固相化したバイオセンサー表面と厳密には異なります。これはおそらく標的タンパク質固相化バイオセンサー上ではタンパク質のレイヤーが存在するために、光学的な厚さの違いによって生じるものと考えられます。高感度のアプリケーションでは、この光学的特性の違いは、生データにわずかなアーチファクトをもたらし、化合物またはネガティブコントロールを評価する際のリファレンスとしての変動性を大きくする可能性があります。

ビオチン化タンパク質がリファレンスバイオセンサーに固相化される場合は、リファレンスバイオセンサーの光学的特性を、標的タンパク質固相化バイオセンサーにより近づけることができます。タンパク質をリファレンスに使用した場合、モデル実験で用いたバッファーコントロールから得られるシグナルの標準偏差は、ビオシチンをリファレンスとしたバイオセンサーから生成されるシグナルの標準偏差よりも、1~3 pm低くなることが確認されています。標準偏差1~3 pmの差は、検出下限値 (LLOD) が3~9 pm変動する

ことを意味するため、この差は重要であると言えます。これはバックグラウンドレベルに近いシグナルから、真のシグナルを見分けるのに重要となる可能性があります。

リファレンスタンパク質の選択

最適なリファレンスタンパク質とは、標的タンパク質と可能な限り同一で、測定対象の分子に結合しないタンパク質です。ある種のタンパク質には好運なことに不活性の変異タンパク質が存在し、それらはリファレンスバイオセンサーを作製するための理想的なリファレンスタンパク質となります。最良の結果を得るためには、ビオチン化したリファレンスタンパク質を、標的タンパク質と同じ密度でSSAバイオセンサーに固相化する必要があります。しかし大抵の場合、不活性型のタンパク質がなく、代用タンパク質を使用しなければならないケースが多くあります。ビオチン化とブロッキングによって修飾されたストレプトアビジン (SAB4) は有用な代用タンパク質です。SAB4の層をリファレンスとして用いるSSAバイオセンサーに重ねることで、標的およびリファレンスバイオセンサーの光学特性をより類似させることができます。SAB4の調製方法を記載したプロトコルと、リファレンスバイオセンサーとしてSAB4を固相化したSSAバイオセンサーで得られたデータの例は、添付資料Dに示されています。

タンパク質のビオチン化

低分子解析はOctet® R8、RH16およびRH96システムで、SSAバイオセンサーを用いて実施されます。標的タンパク質のビオチン化に関わるステップは、リファレンスタンパク質にも同様に適用されます。in vivoビオチン化またはBiotin-LCLC-NHSといった試薬によって標識されたタンパク質は、低分子解析を行うのに十分なS/N比を得ることができます。Biotin-LCLC-NHSを用いる場合、試薬のモル比が重要になり、1~30 μ Mのタンパク質濃度で、タンパク質1個に対してビオチン1個が結合する比率を用いることが最適となります。また、その他の試薬 (例: NHS-PEG₄-Biotin) でこれを代用することも可能です。

ビオチン化の後に、未反応のビオチンは透析またはPD10などのサイズ排除カラムや、スピンカラムを用いて取り除く必要があります。精製の後、個別のアッセイでタンパク質の活性を測定して、タンパク質の活性がビオチン化と精製の過程を経ても、大幅に変化していないことを確認してください。

ビオチン化のプロトコルの概要は、テクニカルノート「Biotinylation of Protein for Immobilization onto Streptavidin Biosensors」に概説されています。ビオチン化にはEZ-Link™ NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific社、製品番号21343) またはEZ-Link NHS-PEG₄-Biotin (Thermo Fisher Scientific社、製品番号21329) のいずれかを用いてください。

ビオチン化の後、ビオチン-タンパク質複合体を、少なくとも2本以上のバイオセンサーにオンラインで固相化し、その過程をモニターできるようにすることを推奨しています。典型的な適格性確認試験では、ビオチン化タンパク質サンプルをプレートのウェルに濃度25～50 µg/mLで分注し、SSAバイオセンサーを準備したOctet® システム内に設置します。1,000 RPMで15～30分間固相化を行えば、典型的にはバイオセンサーが飽和に達します。

Super Streptavidinバイオセンサーへのビオチン化タンパク質のオフライン固相化

タンパク質のオフラインでの固相化は、Octet® AS Offlineバイオセンサー固相化ステーションで行うのが最も望ましいです。Octet® ASステーションは、ザルトリウス社のリアルタイムラベルフリー生体分子間相互作用解析装置Octet® システムシリーズのアクセサリーです（ザルトリウス、製品番号Octet-AS）。これにより最大96本のバイオセンサーに、サンプルを同時かつ均等に固相化することが可能になります。

オンラインでのシグナルのモニタリングを必要としない標的タンパク質や試薬は、Octet® ASステーションを用いてバイオセンサーに固相化することができます。Octet® ASステーションは単独で使用することも、Octet® システムと組み合わせて使用することもできます。

タンパク質は、室温+4℃から40℃までの温度範囲で固相化することができます。タンパク質の固相化は典型的には、オンライン固相化で最適化された条件を用いてOctet® ASステーション上で実施します。Octet® ASステーションがない場合は、実験台または冷蔵庫の中でオフラインにてタンパク質の固相化を行うこともできます。オフライン固相化には低濃度や低容量のタンパク質溶液を使用することができ、インキュベーションの時間を長くとれるなど、オンライン固相化と比べていくつかメリットもあります。

タンパク質が安定であれば、バイオセンサーをバルクで調製した後、15%スクロース溶液を用いてセンサーの再コーティングを行い、再保存することができます。各バイオセンサーは固相化で数ナノグラムのタンパク質しか消費しないため、その固相化用タンパク質溶液は回収することもできれば、続けて次のバイオセンサーの固相化に使用することもできます。

注：バイオセンサーをマイクロプレート内に浸す際に、センサーチップがプレートの側面に接触しないようにしてください。また、センサーチップをトレイからトレイへと手で移す際には、手が震えないように気をつけてください。迅速なセンサーの搬送を補助するため、ザルトリウスでは8連のバイオセンサーディスペンサーであるOctet® AT（ザルトリウス、製品番号18-5016）を用意しています。

通常、タンパク質のバイオセンサーへの固相化は、そのタンパク質に最適化されたバッファー中で行い、広くPBSが用いられます。

Octet® ASステーションを使わずにオフラインでバイオセンサーを調製する場合、事前にOctet®の回転数の設定をゼロ（0 RPM）として、実験台の条件を模倣したオンライン固相化条件を実施して、結果をモニタリングすることをお勧めします。十分なシグナルを得ることのできる固相化プロトコールを作成してから、バイオセンサーをオフラインで調製します。もしオンラインで温度設定を30℃で実施していた場合、最適化した固相化時間をさらに倍にすれば、オンラインと実験台での固相化の間で、温度差に起因する固相化速度の差を十分に補うことができます。典型的には、タンパク質濃度が25～50 µg/mLあれば室温で3～5時間インキュベートする、または>10 µg/mLであれば4℃で一晩インキュベートすることで、ビオチン化タンパク質のオフライン固相化を十分行うことが可能です。

タンパク質が固相化されたバイオセンサーは、バッファー中でインキュベートする際に、シグナルドリフトを示すことがあります。このドリフトの程度はタンパク質に依存しますが、一般にリファレンスバイオセンサー（下記参照）を用いることで補正することができます。ドリフトは実験台または4℃にてバイオセンサーを平衡化することで最小限に抑えることができます。たとえば、タンパク質の固相化とビオチンのブロックの後に、バッファー中で3時間インキュベートしたバイオセンサーは、同様の固相化作業後PBS中で5分間インキュベートした場合よりも、ドリフトは最大1/8程度まで減少します。ただしドリフトと安定性はタンパク質に依存するため、タンパク質ごとにプロトコールの最適化が必要になることが考えられます。

一部のタンパク質では、ドリフトはバイオセンサーへの非特異的結合に起因し、pH依存的に得られる場合があります。こうしたケースでは、タンパク質の固相化プロトコールの最適化が必要になることがあります。例えば、100 mM Acetateバッファー（pH 4.75）、MES（pH 6.00）、HEPES（pH 7.40）およびBicineバッファー（pH 8.00）中でビオチン化炭酸脱水酵素を固相化した場合、固相化バッファーに依存するドリフトが認められます。炭酸脱水酵素の場合、Bicineバッファー中で固相化したセンサーのドリフトは、同じくHEPESで調製されたバイオセンサーで認められるドリフトの1/3であり、MESまたはAcetateバッファーで調製したバイオセンサーで認められたドリフトの1/8です。

サンプルおよびバッファの調製

低分子アッセイを成功させるためにはサンプルの調製が重要です。サンプルバッファとベースラインおよび解離に使用するアッセイバッファとの間では、ある程度の組成の違いは許容されますが、組成が一致していれば、最良の結果が得られます。DMSOは純度99.9%で無水のものを使用してください。サンプルを希釈する方法は、次の2つのうちいずれかの方法で行うのが適切です。

1. 低分子サンプル（例えば20 mMのDMSO溶液）をアッセイバッファ（DMSOを含まない）で、まず目的とするDMSO濃度（0.5～5%）になるまで希釈した後、DMSOを含むアッセイバッファ（同じくDMSO濃度0.5～5%）で目的とするサンプル濃度まで希釈を行います。
2. DMSO中で化合物の段階希釈を行った後、すべてのサンプル溶液に対してDMSOを含まないアッセイバッファで希釈して、目的のDMSO濃度になるように調製します。

標的タンパク質に使用できるバッファは、一般的にSSAバイオセンサーにも使用できます。DTTおよび0.005% Tween-20、Zwittergents Z-12 (10 mM) およびZ-14 (3 mM) といったいくつかの界面活性剤や、0.5～5% (vol/vol) のDMSOを添加したバッファを使用することができます。CHAPSは適合しません。測定サンプルを調製する場合において、サンプル希釈バッファとアッセイバッファが同一であれば、最良の結果が得られます。Triton X-100およびNP-40は、標的タンパク質の疎水性結合ポケットに結合する可能性のある疎水性側鎖を含むため、低分子相互作用を妨げる可能性があります。

DMSO濃度の違い（1～1.5%の差）は、リファレンスによる補正（後述）によって、一般的には問題なく補正することが可能です。しかしながらDMSOの組成が異なるバッファ同士は、シグナルのアーチファクトを生じさせるため、注意して使用する必要があります。サンプルは調製後すぐに使用するか、測定前にサンプルの活性が失われていないように管理または状態を把握している必要があります。

界面活性剤やその他の添加剤をサンプルバッファに添加する場合は、測定時のアーチファクトを防ぐために、サンプルバッファとアッセイバッファの組成を必ず一致させてください。

Greinerの黒色ポリプロピレン製96ウェルプレートに必要な一般的なサンプル容量は200 μ Lで、ザルトリウス製の黒色ポリプロピレン製384TWウェルプレートの最小容量（Sensor offset が3 mmの場合）は40 μ Lです。

低分子測定プロトコルのパラメーター

サンプル数

典型的なアッセイでは、サンプルプレート中の横2列をリファレンスに使用し、プレートの半分にはベースラインと解離を測定するためのアッセイバッファを入れます。この設定により、96ウェルプレート1枚につき36サンプルを個別に解析することができます。

あるいは、リファレンスを横1列のみにして、解析するサンプル数を42に増やすことも可能です（Kinetic Characterization_8CH_96W.fmf）。さらにサンプル数を増やしたい場合は、いくつかのバッファウェルを1度以上繰り返し使用することで可能になります。これが可能になるのは、バイオセンサーが一つのウェルから次のウェルへキャリーオーバーするサンプル量は、最大でもわずか80 nLと推定されるからです。ウェルのサンプル容量が200 μ Lの場合、キャリーオーバーは2500倍に希釈され、一般的な結合を確認するのに必要な濃度を十分に下回ります。

測定パラメーター

サンプルプレートの温度を測定温度で安定にするために、測定前には10分待機時間を取ることが推奨されます。予想される相互作用の親和性が約1 μ M程度の化合物ならば、ベースライン、結合および解離の時間は、それぞれ最大30秒、90秒および120秒あれば十分です。親和性が10～500 nMの化合物では、通常、解離時間は6～8分程度あれば、次のサンプル分析前に化合物が完全に解離するのに十分な長さと考えられます。

プロトコルを作成する場合、サンプルの蒸発に由来するアーチファクトを防ぐため、測定の合計時間は3～4時間以内に収める必要があります。Octet® R8システムは付属のエバポレーションカバーを使用することで、最大12時間まで測定の合計時間を延長することが可能です。攪拌速度は1000 rpmであれば、正確なカイネティクス測定には十分であり、rpmを1000以上に上昇させても、カイネティクス定数にはわずかな影響しかありません。低分子のスクリーニングアプリケーションによっては、500 rpmでより良好な結果が得られることもあります。測定温度は30°Cとすることが推奨されますが、下げることも問題ありません。プレートあたりの総アッセイ時間は、蒸発コントロール機能によりアッセイ時間を12時間まで延長できるOctet® R8システムを除き、4時間未満である必要があります。

バイオセンサー

ほとんどの低分子は親和性が1 nMを上回り、数分あれば完全に解離するため、一度ビオチン化タンパク質を固相化したバイオセンサーは複数の濃度の測定に使用することができます。例えば、横6列に入った化合物を測定するには、リファレンスバイオセンサー2本を含む計16本のバイオセンサーが必要になります。同様に、横1列に入った一組の化合物を解析するには、最低4本のバイオセンサーが必要になります。いずれのケースでも、縦列1にはビオシチンまたはビオチン化リファレンスタンパク質でブロックしたSSAバイオセンサーを置き、縦列2にはビオチン化標的タンパク質で標識されたSSAバイオセンサーを置きます。もし別の標的タンパク質を同じ測定に追加したい場合は、その標的タンパク質で標識したバイオセンサーをバイオセンサートレイの新しい列に追加してください。

リファレンス

真度および精度の高いデータを得るにはリファレンスが必要になります。一般には以下の2種類のリファレンスを測定することが推奨されます。

- システムのアーチファクトやわずかなバッファーの不一致を除外するために、ビオシチンまたはリファレンスタンパク質を固相化した2～8本のリファレンスバイオセンサーを用意し、標的タンパク質で標識したバイオセンサーで測定したのと同じプロトコルを測定します。
- 標的タンパク質に由来するシグナルのドリフトを補正するため、標的タンパク質を固相化した1～2本のリファレンスバイオセンサーで、サンプル測定を行うバイオセンサーと並行してバッファーを測定します。ドリフトがあれば、データ解析時にベースラインの差し引きによって補正されます。サンプルプレートの解析を始める前に、バイオセンサーをバッファー中で30～60分間インキュベートすると、ドリフトはさらに抑えることができます。

K_D スカウティング: シングルランのタンパク質固相化および低分子解析のためのプロトコル

このメソッドは暫定的な K_D 値を得るために使用されます。タンパク質固相化と連続して行う低分子の3倍希釈系列の測定で、正確な K_D 値を求めるために必要な濃度範囲を特定します。必要な試薬類と試験手順は添付資料Aに記載します。

典型的な結果

固相化プロトコルの典型的な結果を図2および3に示します。この例では、ビオチン化タンパク質の固相化のレスポンスが7～8 nmほどで、フロセミドの希釈系列が示す結合および解離は図3に示されています。

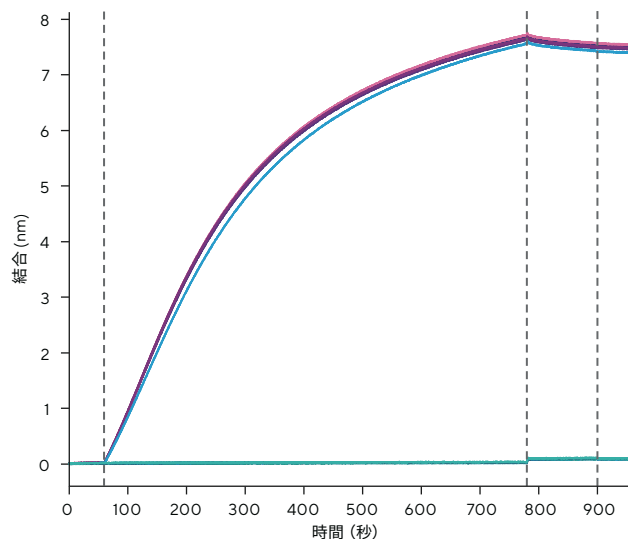


図2: 炭酸脱水酵素の固相化の生データ

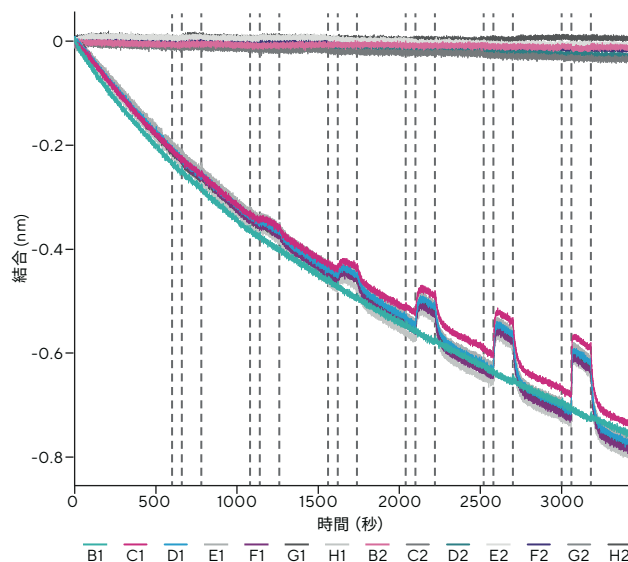


図3: Super Streptavidin (SSA) バイオセンサー上にビオチン化炭酸脱水酵素をオフラインで固相化したバイオセンサーによるフロセミド測定の実データ

タンパク質固相化のレスポンスと低分子シグナルの相関

タンパク質の固相化をモニターした後、低分子の結合レスポンスを確認すると分かりますが、低分子のレスポンスはタンパク質の固相化量に比例します。炭酸脱水酵素による実験モデルでは、分子量に対するレスポンスで正規化を行えば、スルホンアミド阻害薬に関連するシグナルを予測することが一般的に可能です。これらの比較を行うためには、センサー表面でレスポンスが濃度依存性でなくなる時点において得られる最大のシグナル、すなわち R_{max} 値を決定する必要があります。この値は典型的には、濃度に対してレスポンスをプロットしたときの飽和曲線によって示されます。炭酸脱水酵素モデルでは、スルホンアミド誘導体との関連性は直線的で、 R^2 値は0.9となります。

表 1: 炭酸脱水酵素を用いたフロセミド解析の精度

Octet® R8システムにおけるフロセミド解析の再現性

Analysis	$R_{\max}$ (Δnm)	$R_{\max}$ Error	k_{off} (1/s)	k_{on} (1/Ms)	k_{on} Error	k_D (M)	Chi ²	R ²
1	0.0975	0.0001	7.83E-02	6.49E+04	4.57E+02	1.21E-06	0.053	0.99
2	0.1017	0.0001	7.88E-02	5.75E+04	3.84E+02	1.37E-06	0.050	0.99
3	0.0951	0.0002	8.52E-02	6.76E+04	5.66E+02	1.26E-06	0.067	0.99
4	0.0976	0.0002	7.97E-02	6.20E+04	4.69E+02	1.28E-06	0.059	0.99
5	0.0931	0.0001	8.32E-02	8.72E+04	6.97E+02	9.54E-07	0.063	0.99
Avg	0.097	0.0002	0.081	67836	515	1.22E-06	0.058	0.989
SD	0.003	0.0002	0.003	11453	121	1.57E-07	0.007	0.002

たとえば、炭酸脱水酵素をシグナル7000 pmまで固相化した場合、シグナル/分子量比は7000 pm/30,000 Dalton (0.23 pm/Da) になります。このセンサー表面に対するその後のフロセミドの結合の $R_{\max}$ 値は75 pmですが、これは炭酸脱水酵素の結合に基づいて予測されます (0.23 pm/Dalton × フロセミド330 Dalton = 76 pmと計算)。非特異的結合 (NSB) や化合物の構造変化に由来する反射率の変化などで、不正確な $R_{\max}$ が得られた場合、予測は直線性から逸脱する可能性があります。

オフラインで調製したバイオセンサーを用いた低分子アッセイのプロトコール

このメソッドは一般的に、SPR法と関連するような真度および精度が高い結果を与え、解離速度定数 (k_D) が0.01/sより大きい化合物に適しています。試薬類と試験方法を添付資料Bに記載します。

この手法では、測定前にバイオセンサーを平衡化することでドリフトを最小限に抑えることができるため、バイオセンサーを同一測定中に調製する手法よりも、質の高いデータが得られます。また、より低いタンパク質固相化濃度 (約1~10 µg/mL) を用いて固相化時間を長くとることができるため、タンパク質の消費量が大幅に節約できること、加えてバイオセンサーを4°Cで固相化することも可能です。ただし、解離速度定数が0.01/sより小さければ、別の手法が必要になります (後述の「解離速度が遅い化合物の解析プロトコール」のテンプレートを参照してください)。

典型的な結果

図3は、炭酸脱水酵素に対するフロセミド (330 Dalton) の結合の生データを示しています。炭酸脱水酵素固相化バイオセンサーのデータは下方へのドリフトがみられますが、すべてのタンパク質がこうした挙動を示すわけではありません。このような場合には固相化後のバイオセンサーの平衡化の時間を長くすることで、センサーのドリフトを減らすことができます。濃度が0.12、0.37、1.1、3、10および30 µMでフロセミドの結合が確認できます。一方、ビオシチンでブロックしたりファレンスバイオセンサーは上方にプロットされており、わずかな変動しかみられません。縦の赤線はアッセイステップを区切る線で、バイオセンサーの平衡化、ベースライン、結合および解離のサイクルを分けています。表1には典型的な測定精度ならびに再現性を示します。

解離速度が遅い化合物の解析プロトコール

解離速度が0.01/sより小さい化合物は、一般的に5分以内にベースラインまで解離することではなく、希釈系列からカインेटクス定数を求めるには、それぞれの濃度につき独立したバイオセンサーを複数使用する必要があります。バイオセンサーのドリフトを最小限に抑えるために、バイオセンサーはオフラインで調製すると望ましい場合があります。バイオセンサーレイのマップを図7に示しますが、サンプルプレートのマップはこれまで説明してきたものと異なります。典型的な試験では、縦列1にバッファーを入れ、希釈系列を縦列2に入れます (0、1、3、10、30、100、300、1000 nMをそれぞれウェルA2、B2、C2に分注するなど)。プロトコールには、待機時間 (10分)、平衡化 (縦列1、10分)、ベースライン (縦列1、1分)、結合 (縦列2、3分) および解離 (縦列1、5分) を実施してください。データの解析方法は次に説明する通りです。このプロトコールでは、各濃度に対して独立したセンサーを使用しています。各センサー間の結合キャパシティにはわずかな違いがあるため、正確なカインेटクス定数を求めるために、グローバルフィッティング解析時は $R_{\max}$ に「Sensor (unlinked)」を選んでください。

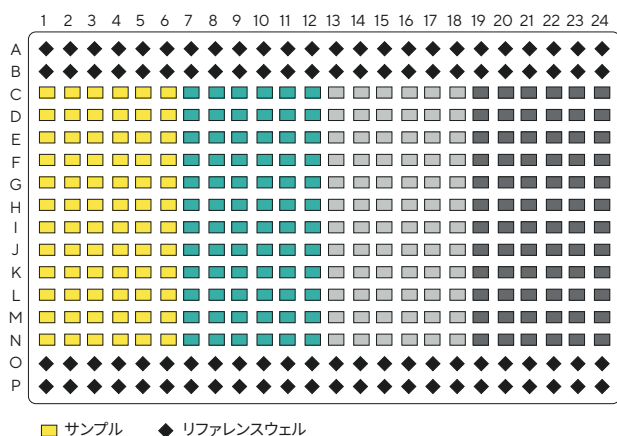


図4:2枚の384ウェルプレートを使用するプロトコルのサンプルプレートマップ。多くの場合アッセイバッファーのみを分注する2枚目の試薬プレートは図示していません。典型的なプロトコルでは、バイオセンサーはベースラインで試薬プレートのA1に移動し、続いてサンプルプレートのA1に移動して結合データを測定し、また試薬プレートのA1に戻って解離を測定します。

典型的な384ウェルプレートマップ

Octet® RH16およびRH96システムでは、384ウェルプレートが使用でき、Octet® 384ウェル傾斜底プレート(18-5166)が低分子アッセイには推奨されます。スクリーニングの場合にはサンプル処理数の観点から2プレート方式が望ましく、希釈系列からカインेटクス定数を求める場合にはプレート間差の観点から1プレート方式が望ましいです。

384ウェルプレートを2枚使用する場合、図4に示すサンプルプレートマップの使用を推奨します。2枚目のプレート(図には示していません)にはアッセイバッファーだけを分注し、ベースラインと解離の測定に使用します。図4は、横列A、B、O、Pにアッセイバッファー、残りすべてのウェルにサンプルを配置しています。Octetシステムはバイオセンサーの配置の制約上、測定は1ウェル飛ばしで行われるため、横列A、B両方にバッファーを配置する必要があります。したがって横列AのバッファーはC、E、Gなどのサンプルに対するリファレンスとして、横列BのバッファーはD、F、Hなどのサンプルに対するリファレンスとして使用されます。リファレンスバッファーは、横列全体にわたって配置する必要があります。横列AおよびBのほか、バックアップとして横列OおよびPにもリファレンスを入れることを推奨します。リファレンスとして用いる横列は、C/D、E/Fなどの位置に移動させることもできますが、B/C、D/Eなどには移動できません。バッファーが横4列で配置されている場合、測定サンプル数は最大288となります。バッファーを横2列で配置する場合は、測定サンプル数は最大336サンプルとなります。プレートを2枚使用する典型的なA1/A1プロトコルの場合、バイオセンサーはベースライン測定のために試薬プレートのA1に移動し、サンプルプレートのA1に移動して結合データを測定し、また試薬プレートのA1に戻って解離を測定します。バイオセンサーの配置の制約上、サンプルウェルは必ず1列飛ばしで測定されます(A、C、E、G、I、K、M、OまたはB、D、F、H、J、L、N、P)。

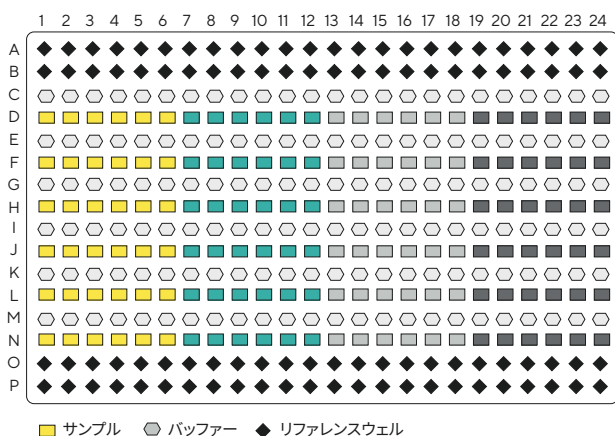


図5:1枚の384ウェルプレートを使用するプロトコルのサンプルプレートマップ。典型的なプロトコルでは、バイオセンサーはベースラインでA1に移動し、続いてB1に移動して結合データを測定し、A1に戻って解離を測定します。

カインेटクス定数を求める場合は、図5に示すようにデザインされた384ウェルプレートを1枚用いる方式が推奨されます。リファレンス列の使用ルールは、プレート2枚使用時のプロトコルと同じです。ベースライン、結合および解離を同じプレートで計測するため、バッファーとサンプルを一例おきに組み合わせることが推奨されます。このプレートマップ用の典型的なA1/B1プロトコルでは、ベースラインのデータをA1、C1、E1などで測定した後、続いて結合データをB1、D1、F1などで測定し、最後に解離データをA1、C1、E1などで測定します。

データ解析

リファレンス補正

Octet® Analysis Studioソフトウェアを使用して、真度および精度の高いカインेटクス定数を求めるには、リファレンス補正と希釈系列のグローバルフィッティング解析が必要になります。対して、個々のバイオセンサーグラムにローカルフィッティング解析を行えば、 K_D の推定値を求めることができます。その際「Partial fitting」は低分子解析に適さないで使用しないでください。

データ解析の前に、生データから潜在的な光学的アーチファクトとドリフトを除去するためにリファレンスの補正が必要になります。典型的な測定では、標的タンパク質を固相化したバイオセンサーのデータセットと、ビオチン誘導体でブロックしたリファレンスバイオセンサーのデータセットの2つが生成されます。リファレンスの補正は標的タンパク質を固相化したバイオセンサーのデータセットから、まずはリファレンスバイオセンサーのデータセットが差し引かれ、プレートからの反射に起因する光学的変動などのシステムアーチファクトと、バイオセンサーへの非特異的結合など

のアナライトに起因するアーチファクトを補正します。次に、バッファーのみを入れた横列を差し引いてドリフトの補正を行います。したがってリファレンス補正が終了したデータセットは以下のような式で表されます： $(A1-A2) - (H1-H2)$ 。このA1は、横列Aの化合物に結合するタンパク質を固相化バイオセンサーで、A2はビオシチンまたはビオチン化リファレンスタンパク質でブロックされたリファレンスバイオセンサーです。A2はバイオセンサーA1と同じウェルを続けて測定し、横列Aのシステムアーチファクトを測定します。H1は標的タンパク質を固相化したバイオセンサーで、バイオセンサーA1と並行してコントロールバッファーが入った横列を測定します。H2はリファレンスバイオセンサーで、バイオセンサーA2と並行してサンプルプレートの横列Hのシステムのアーチファクトを測定します。このように二重にリファレンスを測定するプロセスを「ダブルリファレンス解析法」と呼びます。これらの補正を行うことで、そのデータセットは低分子解析の準備が整います。

データ解析メソッド

カインेटクス定数はOctet® Analysis Studioソフトウェアを使用して、リファレンス補正およびグローバルフィッティング解析を行うことで求めることができます。

1. Homeタブでデータセットをロードし、Preprocessed Dataタブを開きます。
2. Reference Sensorで、適切なバイオセンサーを選択し、バイオセンサーをリガンドまたはリファレンスとして設定します。変更が必要な場合、右クリックから行います。リガンドバイオセンサーには標的タンパク質が、リファレンスバイオセンサーには通常はビオシチンまたはビオチン化リファレンスタンパク質が含まれます。正しく設定が終了したのち、通常は右クリックからSubtract Reference In Rowを選択します。リガンドバイオセンサーからリファレンスバイオセンサーの測定結果が横方向に差し引きされます。
3. Reference Sampleで、サンプルプレートのウェルをサンプルまたはリファレンスウェルとして設定します。変更が必要な場合、右クリックから行います。正しく設定が終了したのち、通常は右クリックからSubtract Reference In Columnを選択します。サンプルからリファレンスの測定結果が縦方向に差し引きされます。
4. Data Correctionで、Align Y AxisにはAverage of Baseline Stepを選択し、Inter-step CorrectionにはNoneを選択します。必要ならばSavitzky-Golay Filteringのチェックボックスにチェックをいれます。
5. Kinetics Analysisタブに移り、次に示す手順でカインेटクス定数を求めます。

Preprocessed Dataタブにおけるステップ間補正 (Inter-step correction) について

Inter-step correctionは、Preprocessed Dataタブで行うことができるオプションで、リファレンス補正で取り除けなかったある種のデータポイントにおけるアーチファクトを補正する機能です。低分子測定においては反応速度が速すぎて適切

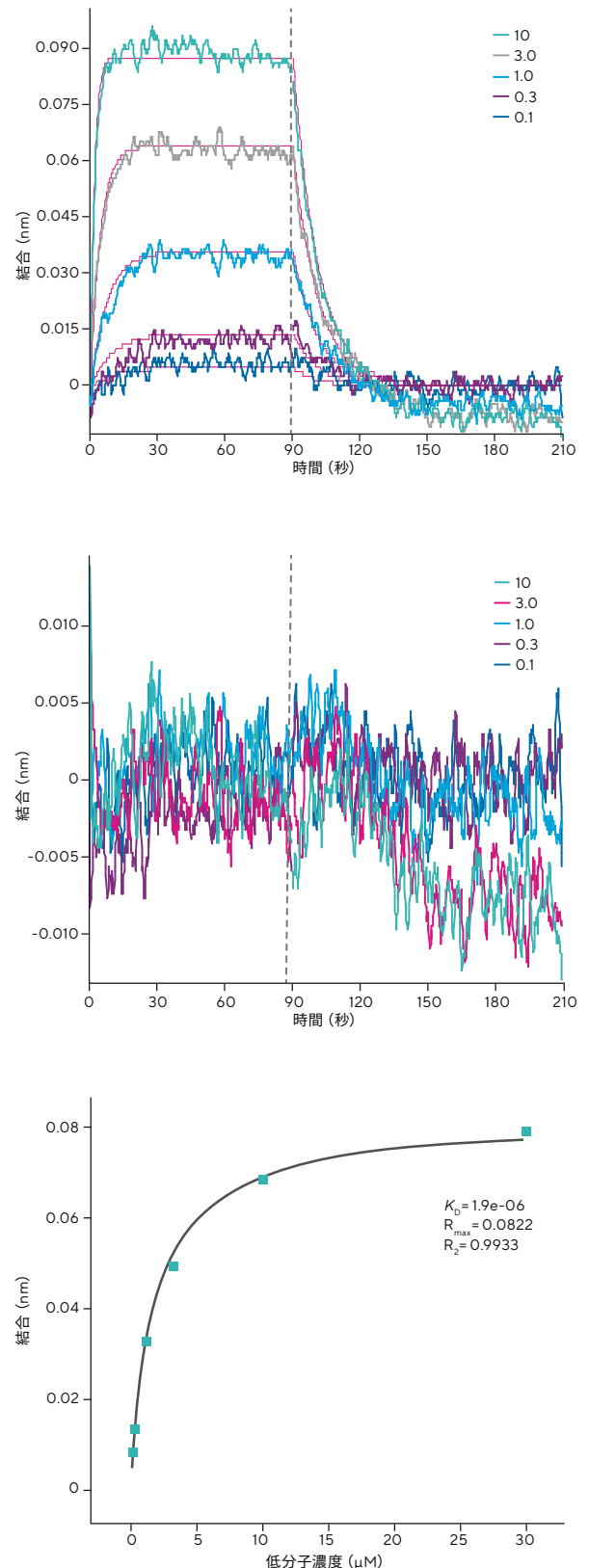


図6: 0.12~30 μMでの低分子結合データのグローバルフィッティング解析結果(上)、カーブフィッティングの残差(中央)および平衡値のプロット(下)

な補正ができない場合があるので、この機能は使用しないでください。低分子解析では通常Noneを選択します。

化合物スクリーニングのためにユーザーが定義可能なレスポンスポイント(レポートポイント)

Octet® Analysis StudioソフトウェアのReport Points機能は、化合物のスクリーニングに使用することができます。これによりユーザーは、任意の測定時間において(一つもしくは複数の)シグナルレスポンスをcsvファイルで出力することができます。このデータは他のプログラムにエクスポートやプロットすることができます。

個別の曲線のカインेटクス解析

結合および解離からなる曲線を個別に解析したい場合は、ローカルフィッティング解析を選択してデータを解析します。

平衡値解析

K_D 値は平衡状態のレスポンスから求められます。この手法では k_{on} および k_{off} 値は生成されません。解析には濃度依存的なレスポンスが必要で、最低でも2~4倍希釈で6段階の希釈系列を作製することが推奨されます。例を図6に示します。

グローバル解析

グローバル解析では、ある濃度系列における一組の結合曲線および解離曲線の R_{max} 、 k_{on} 、 k_{off} および K_D をはじめとする一組のパラメーターを求めます(詳細な情報については参考文献を参照)。この手法では、単一の濃度の結合および解離データで得られる結果よりも真度および精度の高いデータが得られます。ある希釈系列のグローバルフィッティング解析の例を図6に示します。

キャリーオーバー

一つのウェルから次のウェルに移動する際に、約80 nLがバイオセンサーの先端に付着します。溶液を200 μ Lを使用する場合、これは2500倍希釈されることに相当します。大半の解析では、この希釈でウェル内での最終濃度は検出不能になります。解離時にバイオセンサー表面から遊離する結合状態のアナライトに関しても約1 ngに相当し、これも無視できる量になります。

マストランスポート

マストランスポートはバイオセンサーの表面で起こりますが、通常、低分子の結合に影響はありません。ほとんどの化合物の結合速度はマストランスポートによって影響を受けませんが、まれに、結合速度がバイオセンサー表面へのマストランスポート速度よりも速いことがあります。このような場合、 K_D は影響を受けませんが、 k_{on} および k_{off} 値は一般的にマストランスポートモデルで解析して得られる値とは大きく異なります。

カーブフィッティングの確認

解析データに対するカーブフィッティングを視覚的に確認することは、カーブフィッティングの妥当性を評価する最もよい方法です。理想的でない挙動や、理想的でないカインेटクスを含むデータセットでは、 R^2 値からの情報だけでは誤った判断を招くおそれがあります。データに対して1:1フィッティングモデルが良好に重なる場合、その偏差は $<5\sim 10$ pmです。

トラブルシューティング

非特異的結合

バイオセンサーへの非特異的結合(NSB)は低分子解析において重大な問題になることがあります。HTRFや酵素アッセイといった一次スクリーニングアッセイは、NSBの影響を受けることがあり、ほとんどの場合、化合物はヒット化合物として二次スクリーニングへと進んでしまいます。これらの化合物の一部には、ラベルフリーアッセイで非特異的結合を示すものがあります。

NSBシグナルの大きさは、低分子シグナルで予測されるものと同等であるか、時には上回る場合があります。そのためすべての測定の生データに対して、リファレンスバイオセンサーとリガンドバイオセンサーにNSBがないかを確認する必要があります。NSBが認められる場合、それを除去するための方針としては、アナライト濃度を下げる、バッファーに界面活性剤を添加する、DMSO濃度を上げるなどがあります。しかし、その化合物が「Promiscuous binder(不特定多数と結合するバインダー)」である可能性もあります(参考文献を参照)。このような化合物は一般的に問題があり、扱いにくいサンプルであると言えます。

界面活性剤

非特異的結合が認められた場合、Tween-20 (0.005%) や Zwittergent Z-12 (10 mM) またはZ-14 (3 mM) などの界面活性剤が、凝集に起因する非特異的シグナルを減少させる場合があります。ただし、一部の化合物は強力な凝集体を作るため、非特異的結合を完全に排除できないこともあります。加えて、界面活性剤は化合物の有効濃度を低下させるため、通常、化合物の標的に結合するカインेटクス定数に影響を及ぼします。

界面活性剤を選択する際には、ポジティブコントロール化合物を用いて、標的タンパク質の安定性を確認しなければなりません。界面活性剤濃度は、一般的に臨界ミセル濃度 (CMC) 未満に設定しますが、非特異的結合を低減するため、あるいは化合物のモル濃度と合致させるために、さらに高濃度が必要になることもあります。化合物によっては、界面活性剤がBLIプラットフォームとSPRプラットフォームの両方で非特異的結合を促進させることもあります。

リファレンスメソッドとの相関不良

IC₅₀ 値はCheng-Prusoff式による阻害アッセイのK_i値と関連性があります (Biochem. Pharmacol. 22:3099-3108, 1973を参照)。K_iは対象の阻害物質のK_D、IC₅₀は対象の阻害物質のIC₅₀ 値、Dは競合リガンドの濃度、K_dは競合リガンドのK_dです。競合リガンドの濃度がこのリガンドのK_dをはるかに大きい場合には、逸脱が起こる可能性があります。その関係式は以下の通りです。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{D}{K_d}}$$

Octet® システムで得られたデータとSPRの結果との相関は一般的に良好で、K_D 値は3倍以内で一致するケースが多くあります。リガンド-低分子相互作用がマストランスポートによる影響を受けた場合、速度定数の決定に使用する解析アルゴリズムにマストランスポート条件を含めなければ、結合および解離速度定数がリファレンス法で得られるものと大幅に異なってくる可能性があります。固相化方法をはじめとする解析の構成がリファレンス法と大きく異なる場合には、さらに逸脱が起こる可能性があります。また、試薬の安定性 (標的タンパク質および化合物の安定性を含む) は、結果に大きな影響を及ぼすため、正確な比較を行うには、解析の前にこれらの問題に対処する必要があります。

化合物の溶解性も測定のパフォーマンスに大きな影響を及ぼすため、保存のマトリックスは重要です。水溶液は時間とともに沈殿または凝集を起こすことがあります。肉眼では見えない凝集を検出するため、有機化合物の水溶液中の凝集の検出には光散乱法が広く用いられます。凝集が起こると、有効濃度は予測される濃度よりも大幅に低下します。また、凝集物がバイオセンサー表面に結合し、異常かつ不正確なレスポンスを生成する可能性があります。

負のシグナル

実験によっては負のシグナルが観察されることがあります。負のシグナルの最もよくある原因は、リファレンスデータによって適切に補正されていない生データの変動です。これらのシグナルは通常0~-10 pmです。リファレンスバイオセンサーへの非特異的結合が、標的バイオセンサーへの非特異的結合を上回る場合には、これよりも大きい負のデータが認められることがあります。

まれに、低分子がタンパク質に結合した結果として、生データに負のシグナルが現れることがあります。これは、リガンド結合時に生じるタンパク質の立体構造の変化に起因する場合があります。タンパク質の結合に伴う構造変化は、MDM2のほか、ホタルルシフェラーゼやミオキナーゼについて知られており、その現象は研究対象の生物学的システムに依存するものであり、Octet® システムに由来するものではありません。

二相性のレスポンス

二相性のレスポンスは化合物の標的タンパク質への結合が非化学量論的であるか、または複雑な結合機構である場合に観察されることがあります。また、非特異的結合が起こった場合にも同様に観察されます。Octet® Analysis Studioソフトウェアでは2:1 Heterogeneous ligand (2:1 (HL)) 結合モデルを使用することで、ある種の二相性レスポンスを示す曲線に対してフィッティングを行うことができます。2:1 (HL) モデルは、溶液中の1個のアナライトがセンサー表面上の2つの異なる結合部位への結合にフィットします。カインेटクスパラメーターは2つの相互作用に対して算出されます (k_{on1}、k_{on2}、k_{dis1}、k_{dis2}、K_{D1}、K_{D2})。

ドリフト

固相化されたタンパク質がバイオセンサーから剥がれることでドリフトが生じることがあり、これは通常タンパク質依存的です。上で述べたように、タンパク質の固相化条件の最適化はドリフトに大きな影響を与えます。しかし、このドリフトは解析時にバッファーリファレンスを差し引きすることで最終データから簡単に除去することができるため、低分子データ解析では通常問題になりません。

参考文献

バイオレイヤー干渉法

1. An integrated system for optical biomolecular interaction analysis. Schmitt, Brecht, Piehler, and Gauglitz, Biosensors and Bioelectronics, Volume 12 (8), 809–816, 1997.

炭酸脱水酵素のモデル実験

2. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface-and solution-based biophysical methods. Day, Baird, Rich, Myszka, Protein Science, Volume 11, 1017-1025, 2002.
3. Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology. Myszka, Analytical Biochemistry, Volume 329, 316–323, 2004.
4. Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology. Papalia *et al*, Analytical Biochemistry, Volume 359, 94–105, 2006.

低分子医薬品の凝集

5. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. Seidler, McGovern, Doman, Shoichet, Journal of Medicinal Chemistry, Volume 46, 4477–4486, 2003.

ラベルフリーアッセイ (SPR法) における凝集化合物の影響

6. Surface Plasmon Resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors. Gianetti, Koch, Browner, Journal of Medicinal Chemistry, Volume 51, 574–580, 2008.

リガンド結合によるタンパク質の構造変化

7. Large-scale allosteric conformational transitions of adenylate kinase appear to involve a population-shift mechanism. Arora and Brooks, Proceedings of the National Academy of Sciences, Volume 104(47), 18496–18501, 2007.

グローバルフィッティングとマストランSPORT

8. Morton and Myszka, Methods in Enzymology, Volume 295, 268–294, 1998.

添付資料A

K_D スカウティング: シングルランのタンパク質固相化および低分子解析のためのプロトコール

試薬類

- Super Streptavidin バイオセンサー (ザルトリウス、製品番号 18-5065)
- Octet® R8 システム
- ビオチン化標的タンパク質 (タンパク質に対するビオチン化比率 1:1 で調製)、50~100 µg/mL
- 無水 DMSO、純度 99.9%
- タンパク質希釈バッファー
- アッセイバッファー (DMSO 含有)
- 低分子化合物 (約 20 mM の DMSO 溶液)
- 96 ウェル黒色平底ポリプロピレン製マイクロプレート (Greiner Bio-one、製品番号 655209)

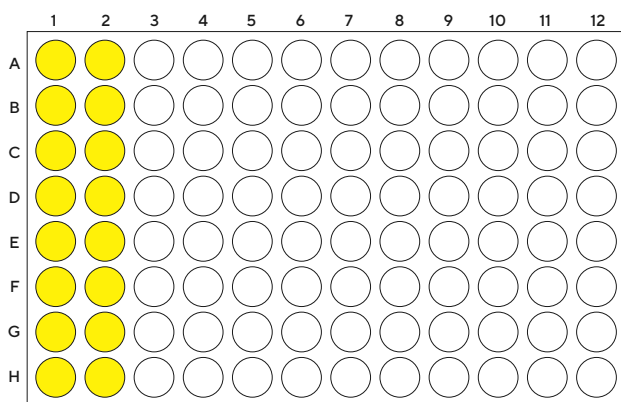
アッセイ詳細

次の例に示すように、タンパク質の固相化と続く低分子結合を一回の測定で行うことができます。タンパク質を確実に飽和まで固相化するには、典型的には 50~100 µg/mL ほどタンパク質濃度が必要です。代表的なバイオセンサーおよびサンプルプレートのマップを図 7 に示します。この手法では 2 セットの SSA バイオセンサーが使用され、ステップの種類、数、測定時間はこれらのバイオセンサーの測定プロトコール間で同一である必要があります。リファレンスバイオセンサーは、ビオチン化タンパク質溶液で固相化を行う代わりにバッファー中でインキュベーションを行います。この例では、ビオチン化標的タンパク質をバイオセンサーに固相化した後、最大 6 種類の化合物の 10 倍希釈系列をスクリーニングします。Octet® BLI Discovery ソフトウェアで Assay Definition を作成する際、プレート上のウェルとソフトウェア上の「Baseline」、

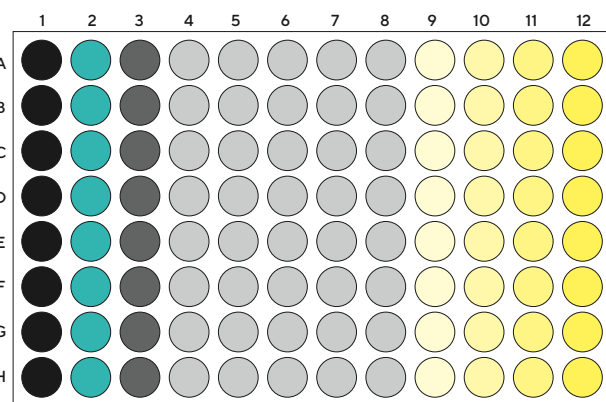
「Association」および「Dissociation」のステップタイプを正しくラベル付けし、これらのステップは削除しないでください。

試験手順

1. 試薬 (タンパク質溶液、タンパク質希釈バッファー、アッセイバッファー、低分子サンプル) を調製します。
2. バイオセンサーおよびサンプルプレートを調製します。アッセイバッファーとサンプルバッファーの組成は必ず一致させてください。
3. バイオセンサートレイ内のプレートにタンパク質希釈バッファー分注し、バイオセンサーを平衡化します。
4. Octet® システム内にバイオセンサートレイとサンプルプレートを設置します。
5. Octet® BLI Discovery ソフトウェアでアッセイプロトコールを設定するか、テンプレート「Sensor prep and screen_8CH_96W.fmf」を読み込みます。
 - a. 化合物およびバイオセンサーの情報を入力します。
 - b. テンプレートを使用しない場合は、表 2 および 3 (下記) を用いて低分子解析プロトコールを作成します。Replicate 機能を用いると、1 組目のバイオセンサーと 2 組目のバイオセンサーのプロトコールを確実に一致させることができます。ただし、2 組目のリファレンスセンサーの固相化ステップでは、バイオセンサーをビオチン化タンパク質溶液ではなくタンパク質希釈バッファー (縦列 3) に浸すように設定します。パラメーターを表 2 に、プロトコールのステップを表 3 に示します。
 - c. 標的タンパク質バイオセンサーとリファレンスバイオセンサーのプロトコールを確認します。ステップに適切なラベル付けがされているかを確認してください。ベースライン、結合、解離ステップは「Baseline」、「Association」および「Dissociation」を選択してください。
 - d. データフォルダーを作成または選択します。
 - e. 待機時間を 600 秒に設定し、測定を開始します。



● Super Streptavidin バイオセンサー



● ビオチン化タンパク質
● ビオチン
● タンパク質希釈バッファー
● アッセイバッファー (DMSO 含有)
● サンプル 0.1 µM
● サンプル 1.0 µM
● サンプル 10 µM
● サンプル 100 µM

図 7: バイオセンサートレイ (左) とサンプルトレイ (右)

表 2: アッセイ定義

Name	Time (s)	Flow rate (RPM)	Type
Loading	1200	1000	Custom
Biocytin Quenching	60	1000	Custom
Wash	1800	1000	Custom
Equilibration	300	1000	Custom
Baseline1	60	1000	Baseline
Association1	120	1000	Association
Dissociation1	300	1000	Dissociation

K_Dスカウティングのためのデータ解析

- ダブルリファレンス解析のメソッドを用いて、Octet® Analysis Studioソフトウェアでデータを処理します。
- Viewモードで生データを精査します。
 - リファレンスバイオセンサーに化合物の非特異的結合が認められますか。認められる場合はその結果を解析から除外します。
 - 化合物は標的タンパク質バイオセンサーに結合していますか。
- プロットの重なりを精査します。
 - 解離フェーズで、化合物はベースラインまで解離しましたか。
 - 解離していない場合は、解離にもう少し時間をとる必要があります。
 - 化合物の解離速度がきわめて遅い場合は、横列ではなく、縦列 (A2、B2、C2、D2、E2) に希釈系列を作成して、この化合物の再測定を実施してください。
 - レスポンスに濃度依存性がありますか。
- データを解析してカインेटクス定数を求めます。
 - 暫定的なK_D値を得るために、測定で得られたデータに対してローカルフィッティング解析を行うと (0.1、1、10、100 μM)、適切なK_D値が得られます。データセットが良好であれば、グローバルフィッティング解析を行うことができます。
 - 精度かつ真度の高い結果を得るには、2倍または3倍希釈系列でグローバルフィッティング解析が必要になります。
 - フィッティングは良好ですか。約5～10 pm以内で生データと合致している必要があります。図6を参照してください。

表 3: K_Dスカウティングのためのプロトコール。各Assayは異なるバイオセンサーのセットを使用します。Sampleはバイオセンサーが測定するサンプルの入った縦列を指します。

Assay	Sample	Step name	Step type	Biosensor type
1	1	Loading	Custom	SSA
1	2	Biocytin quenching	Custom	SSA
1	3	Wash	Custom	SSA
1	4	Equilibration	Custom	SSA
1	5	Baseline1	Baseline	SSA
1	9	Association1	Association	SSA
1	5	Dissociation1	Dissociation	SSA
1	6	Baseline1	Baseline	SSA
1	10	Association1	Association	SSA
1	6	Dissociation1	Dissociation	SSA
1	7	Baseline1	Baseline	SSA
1	11	Association1	Association	SSA
1	7	Dissociation1	Dissociation	SSA
1	8	Baseline1	Baseline	SSA
1	12	Association1	Association	SSA
1	8	Dissociation1	Dissociation	SSA
2	3	Loading	Custom	SSA
2	2	Biocytin Quenching	Custom	SSA
2	3	Wash	Custom	SSA
2	4	Equilibration	Custom	SSA
2	5	Baseline1	Baseline	SSA
2	9	Association1	Association	SSA
2	5	Dissociation1	Dissociation	SSA
2	6	Baseline1	Baseline	SSA
2	10	Association1	Association	SSA
2	6	Dissociation1	Dissociation	SSA
2	7	Baseline1	Baseline	SSA
2	11	Association1	Association	SSA
2	7	Dissociation1	Dissociation	SSA
2	8	Baseline1	Baseline	SSA
2	12	Association1	Association	SSA
2	8	Dissociation1	Dissociation	SSA

添付資料B

6段階希釈系列による K_D 値の決定：オフラインで調製したバイオセンサーを用いた低分子アッセイのプロトコール

本プロトコールは K_D スカウティング試験を行った後に、真度および精度の高い K_D 値を決定するのに使用されます。本プロトコールでは、バイオセンサーを実験台でオフラインにて調製するため、一般にはドリフトが最小限に抑えられた質の良いデータが得られます。Octet® BLI Discoveryソフトウェアでメソッドを作成する際は、ベースライン、結合および解離のステップタイプを正しくラベル付けし、これらのステップを削除しないようにしてください。

試薬類

- Super Streptavidinバイオセンサー（ザルトリウス社、製品番号18-5065）
- ビオチン化標的タンパク質（タンパク質に対するビオチン化比率1:1で調製）
- 無水DMSO、純度99.9%
- 炭酸脱水酵素
- 低分子化合物（約20 mMのDMSO溶液）
- アッセイバッファー
- 96ウェル黒色平底ポリプロピレン製マイクロプレート（Greiner Bio-one、製品番号655209）

試験手順の要約

1. 測定を行う前に、ビオチン化タンパク質をSuper Streptavidinバイオセンサーにオフラインで固相化します（添付資料C参照）。
2. 試薬（アッセイバッファー、サンプル）を調製します。サンプルバッファーとアッセイバッファーの組成は必ず一致させてください。
3. バイオセンサーとサンプルプレートを調製します。 K_D 値を挟むように2倍または3倍希釈系列を作製することが推奨されます。推奨されるプレートマップについては図8を参照してください。
4. バイオセンサートレイ内でアッセイバッファーにバイオセンサーを30分間平衡化します。
5. バイオセンサートレイとサンプルプレートをOctet® システム内に設置します。
6. Octet® BLI Discoveryソフトウェアでアッセイプロトコールを設定します。
 - a. 必要であればテンプレートまたはメソッドをロードします。化合物とバイオセンサーの情報を入力します。
 - b. 新規の手法を作成したい場合は、新たに低分子アッセイプロトコールを作成します。パラメーターは表4および5を参照してください。
 - c. 標的タンパク質バイオセンサーおよびリファレンスバイオセンサーのプロトコールを確認します。これらは同一でなければなりません。
 - d. データフォルダーを作成、または選択します。
 - e. 待機時間を600秒に設定し、測定を開始します。

典型的なバイオセンサーとサンプルプレートのマップを図8に示します。この例では、2列のバイオセンサーを使用します。最初の縦列には、リファレンスとなるビオチンでブロックしたSuper Streptavidinバイオセンサーを入れます。リファレンスバイオセンサーは、代わりにビオチン化リファレンスタンパク質を固相化したバイオセンサーも使用することができます。2つ目の縦列には、ビオチン化炭酸脱水酵素

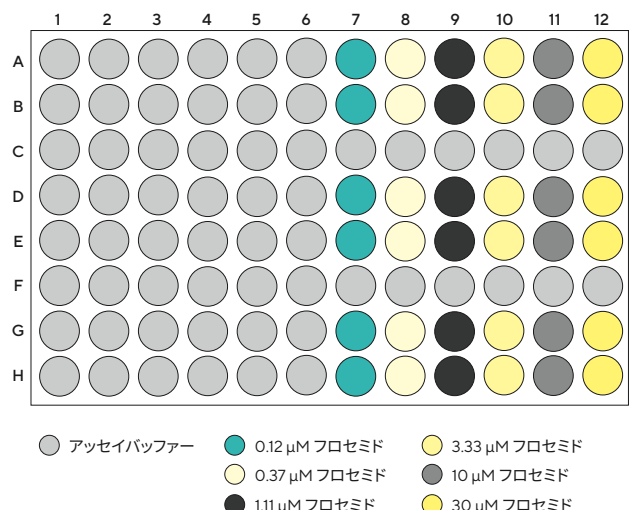
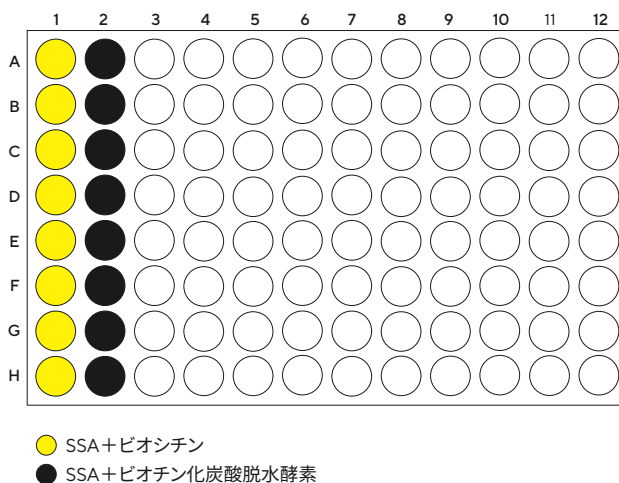


図8: バイオセンサートレイ(左)とサンプルトレイ(右)

素をあらかじめ固相化されたSSAバイオセンサーを入れます。この例では3倍希釈系列の0.12~0.30 μMのフロセミドが入っています。リファレンス補正に使用する横列は1列のみとすることができますが、リファレンスチャンネルにアーチファクトが生じ、正しくデータ解析できなくなることが時折あるため、バックアップとして2つ目のリファレンスチャンネルを設けることが推奨されます。

試薬とサンプル

典型的には、サンプルはDMSO (99.9%) に1~100 μM程度の濃度で溶解させ、さらにアッセイバッファーで希釈して、解析に必要なDMSO濃度 (5%程度まで) に調製します。その後の希釈には、目的のDMSO濃度のアッセイバッファーを使用します。たとえば、10 mM のサンプルDMSO溶液を、アッセイバッファーで20倍に希釈すると、0.5 mMサンプル5% DMSO溶液が得られます。その後、5% DMSOを含むアッセイバッファーで3倍段階希釈を行うと、0.5、0.167、0.056、0.019、0.006および0.002 mMの5% DMSO溶液の希釈系列が得られます。

アフィニティがnM程度の化合物ではさらに希釈が必要で、カインेटクスパラメーターを求めるためには典型的には2~3倍希釈が推奨されます。化合物のアフィニティが不明の場合は、10倍希釈系列 (100 μM、10 μM、1 μM、0.1 μMなど; 添付資料A) のスクリーニングを行った後、2~3倍希釈で二回目の解析を行い、より正確なカインेटクスパラメーターを測定します。

サンプルが準備できたら、96ウェル黒色平底Greinerポリプロピレン製マイクロプレートの適切な位置に分注します。

アッセイバッファーによるバイオセンサーの平衡化

使用前にバイオセンサーはアッセイバッファーで平衡化する必要があります。96ウェルマイクロプレートにアッセイバッファーを分注し、そのマイクロプレートをバイオセンサートレイホルダーに置き、バイオセンサーの先端に触れないようにしながら、そのホルダーにバイオセンサートレイを慎重に被せます。バイオセンサーをトレイから別のトレイに移す場合は、バイオセンサーの先端に、指、トレイ、マイクロプレートやその他の物が触れないように注意してください。バイオセンサーの移動にあたっては、ザルトリウス製のバイオセンサーディスペンサー Octet® AT (ザルトリウス製品番号18-5016) を使用することを推奨します。

表 4: 希釈系列からK_d値を決定するためのアッセイパラメーター

Name	Time	Flow rate	Type
Equilibration	600	1000	Custom
Baseline	30	1000	Baseline
Association	90	1000	Association
Dissociation	120	1000	Dissociation

表 5: Octet® BLI Discoveryソフトウェアでの測定プロトコール。各Assayは異なるバイオセンサーのセットを使用します。Sampleはバイオセンサーが測定する、サンプルの入った縦列を指します。

Assay	Sample	Step name	Step type
1	1	Equilibration	Custom
1	1	Baseline	Baseline
1	7	Association	Association
1	1	Dissociation	Dissociation
1	2	Baseline	Baseline
1	8	Association	Association
1	2	Dissociation	Dissociation
1	3	Baseline	Baseline
1	9	Association	Association
1	3	Dissociation	Dissociation
1	4	Baseline	Baseline
1	10	Association	Association
1	4	Dissociation	Dissociation
1	5	Baseline	Baseline
1	11	Association	Association
1	5	Dissociation	Dissociation
1	6	Baseline	Baseline
1	12	Association	Association
1	6	Dissociation	Dissociation
2	1	Equilibration	Custom
2	1	Baseline	Baseline
2	7	Association	Association
2	1	Dissociation	Dissociation
2	2	Baseline	Baseline
2	8	Association	Association
2	2	Dissociation	Dissociation
2	3	Baseline	Baseline
2	9	Association	Association
2	3	Dissociation	Dissociation
2	4	Baseline	Baseline
2	10	Association	Association
2	4	Dissociation	Dissociation
2	5	Baseline	Baseline
2	11	Association	Association
2	5	Dissociation	Dissociation
2	6	Baseline	Baseline
2	12	Association	Association
2	6	Dissociation	Dissociation

バイオセンサーとサンプルプレートのシステム内への設置

バイオセンサーとサンプルプレートをOctet® R8システム内に設置しドアを開めて、プレート測定前に最低10分間平衡化します。

アッセイプロトコルの設定

Octet® BLI Discoveryソフトウェアで、Kineticsタブに従い、化合物の情報 (IDを含む) およびバイオセンサーの情報を入力します。バイオセンサー、バッファーおよびサンプルの入ったウェルの位置を定義します (図6参照)。必要であれば、前回のメソッドまたはテンプレートをロードします。

1. Addボタンをクリックして、Step Data Listテーブル内で、4つの新しいアッセイステップを規定します。
2. ステップの名称を「biosensor EQ」、「baseline」、「association」および「dissociation」に変更します。
3. Biosensor EQの時間を600～900秒に、ベースライン、結合および解離の時間をそれぞれ30、90および120秒に設定します (注: これらの値は K_D 値が0.5 μ Mより大きい化合物を想定して設定しています)。
4. プルダウンメニューでStep Typeを、上記に合致するように変更します。平衡化 (EQ) ステップのラベルは「custom」としてください。

重要: データ解析が正確に行われるように、Step Typeのラベルは必ず指定通りに入力してください。

5. 標的バイオセンサー (タンパク質) とリファレンスバイオセンサー (ビオシチン) のアッセイを次の通りに規定します。
 - a. Step Data Listテーブルで、ステップのどれかをクリックします。
 - b. そのステップを測定したいサンプルプレートの縦列をダブルクリックします。Assay Steps Listにステップと測定位置が紐付けされたテーブルが現れます。
 - c. 残りの計測ステップについてもa～bを繰り返します。
 - d. 終了したらa～cとまったく同じプロトコルをNew Assayで複製します。その際はReplicate機能の使用を推奨します。
 - e. Assay Steps Listテーブル内の情報が、Assay番号を除いては、2組のバイオセンサー間で全く同じであるかどうかを確認します。ステップの時間が異なったり、ステップのラベルが同一でなかったりする場合、データ解析が正しく行われないため、メソッドが正しく作成されているか確認してください。
 - f. データフォルダーを作成、または選択します。
6. 「Go」ボタンを押して測定を開始します。

添付資料C

オフラインでのタンパク質固相化プロトコール

はじめに

このプロトコールは実験台上で一度にビオチン化ターゲットまたはリファレンスを最大 96 本の SSA バイオセンサーに固相化できます。それぞれのリファレンスまたは標的タンパク質に合わせて、必要があれば固相化プロトコールは変更することができます。また、すべてのステップは室温で行うこともできます。固相化時間をより長くする場合、タンパク質を4°Cで一晩固相化する、または低濃度 (約10 μ g/mL) で固相化を行うことも可能です。本プロトコールはコーティングされたバイオセンサーを調製するために使用することができます。バイオセンサートレイをコーティングステーションとして使用して、必要な各試薬を新しい96ウェルプレートに入れ、各ステップでプレートを交換するだけでセンサー表面へのコーティングが可能になります。タンパク質が安定であれば、バイオセンサーを15%スクロースバッファー (PBS) 溶液に3～5分浸した後、乾燥させることで次回使用するために保存することができます。乾燥は室温で10分、または37°Cのオープン中で1分間行ってください。

オフラインのタンパク質ローディングプロトコール

1. 以下を用いてプレートを調製します。
 - a. 縦列1: PBS (またはタンパク質希釈バッファー)
 - b. 縦列2: ビオチン化標的タンパク質またはリファレンスタンパク質 (50 μ g/mL)
 - c. 縦列3: ビオシチン (10 μ g/mL)
 - d. 縦列4: PBS (またはタンパク質希釈バッファー)
 - e. 縦列5: アッセイバッファー
2. 青色のトレイにプレートを置き、8本のバイオセンサーをバイオセンサートレイの縦列1に置き、バイオセンサーを青色のトレイに置きます。バイオセンサーを縦列間で以下のように移動させて、バイオセンサーにタンパク質を固相化します。
 - a. 縦列1 (PBSまたはタンパク質希釈バッファー): 1分間
 - b. 縦列2 (ビオチン-タンパク質): 30分間
 - c. 縦列3 (ビオシチン): 1分間
 - d. 縦列4 (PBSまたはタンパク質希釈バッファー): 30分間
 - e. 縦列5 (アッセイバッファー): 5分間
3. 同じ方法でビオシチンがコーティングされたリファレンスバイオセンサーを8本調製します。ただし、ビオチン化タンパク質のウェルは飛ばします。
 - a. 縦列1 (PBSまたはタンパク質希釈バッファー): 1分間
 - b. ビオチン化タンパク質の入っている縦列2は飛ばします。
 - c. 縦列3 (ビオシチン): 1分間
 - d. 縦列4 (PBSまたはタンパク質希釈バッファー): 5分間
 - e. 縦列5 (アッセイバッファー): 5分間

添付資料D

ビオチン化ブロックストレプトアビジン (SAB4) の調製

試薬類

複合体の調製

- ストレプトアビジン (Scripps Laboratories、製品番号 S1214)
- ビオチン (Pierce Protein Research Products、製品番号 29129)
- Biotin-LCLC-sulfo-NHS (Pierce Protein Research Products、製品番号 21338)
- PBS (Invitrogen、Gibcoまたは同等品)
- 3-12 mL Dialysis cassette, 10k MWCO (Pierce Protein Research Products、製品番号 66811)

複合体の試験

- Super Streptavidin バイオセンサー (ザルトリウス、製品番号 18-5065)
- Octet® R8 または RH16 システム
- 黒色平底マイクロプレート (96 ウェル: Greiner Bio-one、製品番号 655209; 384 ウェル傾斜底プレート: ザルトリウス、製品番号 18-5080)

技術に関するリソース

- テクニカルノート『Biotinylation of Protein for Immobilization onto Streptavidin Biosensors』

複合体の調製手順

1. ビオチン (224 Da) 2.5 mg を、PBS 25 mL に添加し、0.1 mg/mL (400 mM) の溶液を調製します。
2. ストレプトアビジン (55 k_D) 6 mg を 100 µg/mL のビオチン PBS 溶液 6 mL に溶解し、1 mg/mL のストレプトアビジン溶液 (18 mM) を調製します。
3. Biotin-LCLC-sulfo-NHS 5 mg を PBS バッファー 5 mL に添加して、1 mg/mL の溶液 (1.5 mM) を調製します。
4. 1.5 mM の Biotin-LCLC-sulfo-NHS (670 Da) 73.2 µL を 100 µg/mL のビオチン含有ストレプトアビジン溶液 6 mL に添加します。この溶液の Biotin-LCLC-sulfo-NHS の最終濃度は 18 mM です。これを室温で 1 時間インキュベーションします。
5. ビーカーに 1 L の PBS を入れ、攪拌子を入れます。
6. メーカーの指示書に従ってストレプトアビジン溶液を透析用カセットに移します。冷蔵庫内で PBS バッファーを用いて透析を行います (3 × 1 L、18 時間)。
7. 保存容器に移し、4°C で保存します。

注: この複合体を 4°C または -20°C で保存した場合の安定性は評価されていないため、使用期間が 1 週間を超える場合には凍結保存が必要になることがあります。

複合体の試験手順

本テクニカルノートで前述した方法を用いて、Octet® R8 または RH16 における SSA バイオセンサーへのビオチン化リファレンスタンパク質の固相化を試験します。最良の結果としては、ビオチン化リファレンスタンパク質の固相化によって得られるシグナル (nm シフト) と、ビオチン化標的タンパク質の固相化によって得られるシグナルが同等になります。リファレンスタンパク質の固相化量が標的タンパク質よりも多い、または少ない場合、リファレンスタンパク質の固相化条件 (濃度、固相化時間など) をさらに最適化する必要があります。

サンプルデータ

図1および2に示すバッファーのコントロールデータは、固相化された炭酸脱水酵素に対するバインダーについて低分子ライブラリーをスクリーニングする試験中に測定されたものです。このスクリーニング試験では、標的タンパク質に結合する低分子を同定するため、バックグラウンドシグナルの変動を最小限に抑えることが重要でした。そのためリファレンスタンパク質としてビオチン化され、ブロックされたストレプトアビジン (SAB4) が使用されました。

この低分子スクリーニングアッセイでは、ベースラインの変動性、すなわち LLOD を確認するため、16 本の標的バイオセンサーおよび 16 本のリファレンスバイオセンサーを用いて、Octet® RH16 システムにてバッファーの入った 384 ウェルプレートで測定を行いました。得られたデータは Octet® ソフトウェアで、ダブルリファレンス解析法で解析しました。この解析法では、リファレンスバイオセンサーとリファレンスウェルを用いて、系統的なベースラインのオフセットを補正します。理想的にはこのデータ処理後、ベースラインには不連続性が無く一定となるべきですが、実際にはウェル間の光学的变化のために小さなアーチファクトが現れます。

この例では、ビオシチンでブロックされた SSA バイオセンサーまたは SAB4 バイオセンサー (調製法は上述) のいずれかを、炭酸脱水酵素で固相化した標的センサーに対するリファレンスとして使用しました。ビオチン化炭酸脱水酵素の典型的な固相化シグナルは 6~10 nm、SAB4 複合体は 4~7 nm でした。図9は、これらのいずれかのリファレンスバイオセンサーを用いた場合の、バッファーを測定してダブルリファレンス解析を行ったデータを示します。ビオシチンブロックセンサーと SAB4 センサーを用いて得られたデータを比較すると、SAB4 センサーをリファレンスとして使用したほうがベースラインのシグナルの平均値と標準偏差はいずれも、有意に低いことがわかりました。この改善はこれらのバッファーコントロールを用いた各測定でみられたシグナルから算出された LLOD に注目するとさらに顕著です (表6)。

この試験をザルトリウス384ウェル傾斜底プレート(384TW)を使用して行った結果を図10に示します。384TWプレートとSAB4リファレンスセンサーを組み合わせ使用した場合、LLODは24から11 pmに低下しました(表6)。これは14~20 pmのシグナルがヒット化合物として特定されることになります。これらのシグナルは、ただのピオシチンでブロックしたリファレンスセンサーと、ザルトリウス製ではない通常の384ウェルプレートを使用すると、ベースラインのノイズの中に紛れてしまいます。

表 6: Octet® RH16システムを用いて、バッファーのみを入れた384ウェルプレートで、32本の標的バイオセンサーと16本のリファレンスバイオセンサーを使用し、ダブルリファレンス解析法から得られたデータの概要(各条件につきN=648)。LLODは、図9および10に示すシグナルの[平均値+3*標準偏差]として計算されました。

プレート	リファレンス バイオセンサー	平均(pm)	偏差(pm)	LLOD(pm)
384ウェル	SSA:ピオシチン ブロック	7	6	24
	SSA:SAB4	4	5	19
384ウェル 傾斜底	SSA:ピオシチン ブロック	3	4	14
	SSA:SAB4	1	3	11

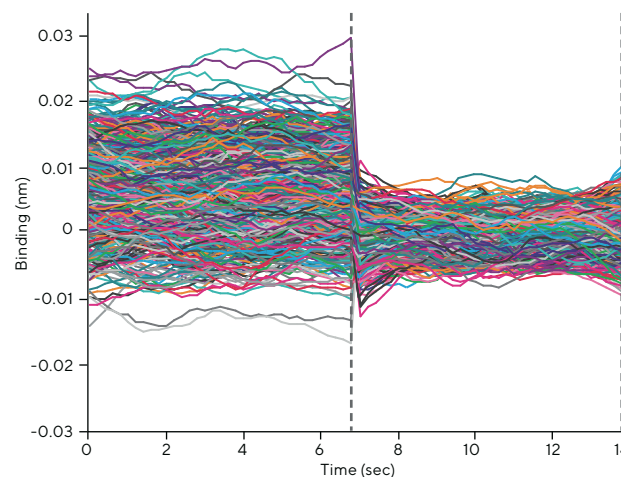
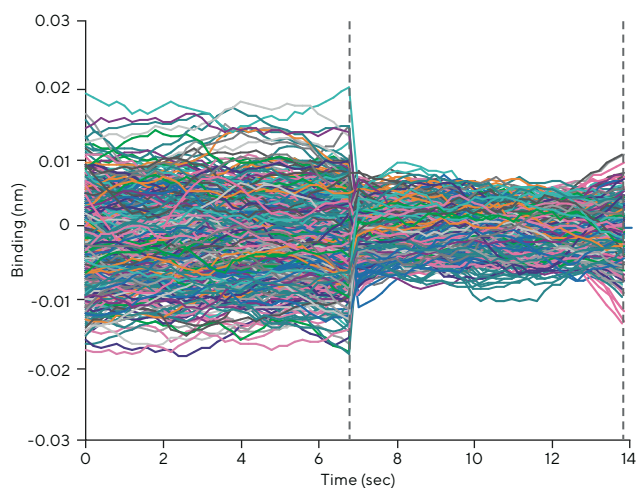


図9: PBSバッファー中の炭酸脱水酵素バイオセンサー(ネガティブコントロール)と、SAB4固相化リファレンスバイオセンサー(左のパネル)、およびピオシチンでブロックしたリファレンスバイオセンサー(右のパネル)から得られたシグナルレスポンスの比較。アッセイの測定は標準的な384ウェルプレートを用いてOctet® RH16システムで実施しました。データはデータ解析ソフトウェア(バージョン6.3)のダブルリファレンス解析法で解析しました。

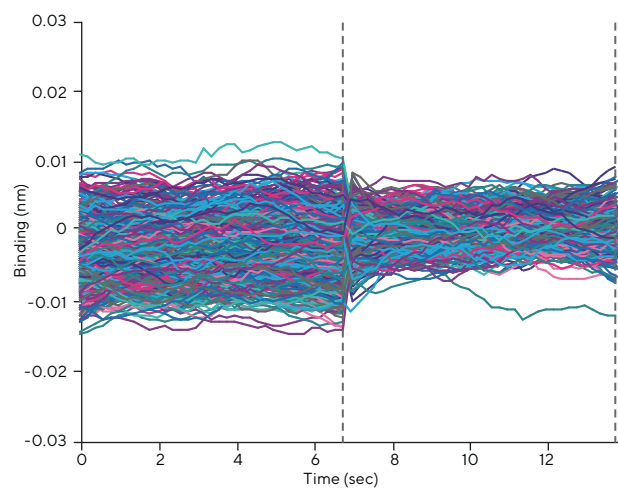
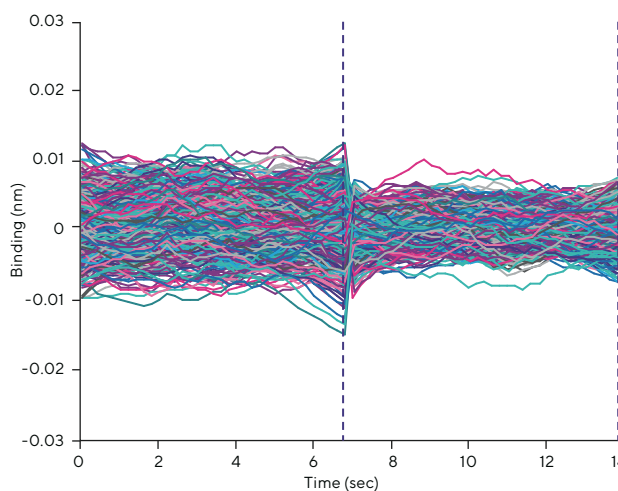


図10: ザルトリウス 384ウェル傾斜底プレートを使用して、図1の試験を繰り返したデータ。384TWプレートを使用することで、PBSのみのネガティブコントロールで見られるアーチファクトがさらに低減されます。

ザルトリウス・ジャパン株式会社
東京本社
〒140-0001
東京都品川区北品川 1-8-11
Daiwa 品川 North ビル 4 階
Phone: 03-6478-5200
Fax: 03-6478-5494
Email: info.lps@sartorius.com

名古屋営業所
〒450-6411
名古屋市中村区名駅 3-28-12
大名古屋ビルヂング 11F
Phone: 03-6478-5200

大阪営業所
〒532-0003
大阪市淀川区宮原 4-3-39
Phone: 03-6478-5203
Fax: 03-6478-5496



詳細はこちら：www.sartorius.com