

Pall-Fortebio 社 分子間相互作用測定装置 Octet K2 クイックスタートガイド



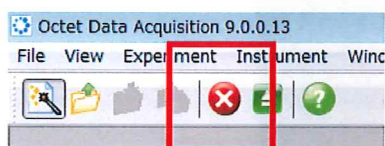
Octet K2 は BLI 法を採用した Dip&Read™ 測定様式によるリアルタイム・ノンラベル分子間相互作用測定装置です。K2 は 2 センサー同時測定までが可能です。主にカインेटィクス測定による Yes/No 判定（結合の有り無し）、KD 値（解離定数）、Kon/Ka（結合速度定数）、Koff/Kdis/Kd（解離速度定数）、抗体抗原のエピトープマッピングなどの測定・データ解析が可能です。

※Octet は測定 1 時間前に電源 ON にして暖気を行って下さい。

※センサーの水和は 10 分以上行って下さい。

※通常マルチプレートのサンプル量は 180uL – 220uL です。多少の容量の違いは問題ありません。(非公式ですが、ハーフエリアの場合は 80uL です)

※ドアのロックはありません。測定中にドアを開けるとデータ取得が中断します。誤ってドアを開けて中断してしまった場合はウィンドウ上部にある赤い X ボタンで終了プロセスを起動して下さい。Ready 状態にまで初期化すると再度最初から使えるようになります。X ボタンは 2 回押すとセンサーを廃棄口に捨ててしまうのでご注意ください。



Octet の測定停止ボタン

測定の流れ

スカウティング測定



再生条件検討測定 (※マルチサイクル測定を行う場合のみ)



Global 測定 (最終的な測定、1. マルチサイクル測定、もしくは 2. マルチセンサー測定)

測定前の準備

1. 必要な本数のセンサーを水和します。センサーラックにマルチウェルプレート (Greiner_#655209) をセットし、200uL/ウェルの測定バッファーを分注し、ラックを使ってセンサーをバッファーに浸します。

2. Octet Acquisition ソフトで「Basic Kinetics」モードを立ち上げて、サンプルウェルの定義 (タブ 1)・アッセイステップの設定 (タブ 2)・センサー位置の定義 (タブ 3)・定義全体の最終チェック (タブ 4)・データの保存先と測定温度等 (タブ 5) を設定しておきます。

3. ソフトウェア上で決めた形でマルチウェルプレート (Greiner_#655209) にサンプルを調整します。

4. 水和したセンサーとサンプルプレートを Octet にセットし、2. で作成しておいたメソッドファイルの「Go」ボタンを押して測定をスタートします。

Octet K2 における測定の仕事と流れ：

Octet K2 は 1～2 本のバイオセンサーをピックアップしてサンプルウェル中のサンプル溶液をウェル内で測定し、プログラムに従い各ウェルをプレート長辺方向に巡回していきます。そのため 2 本測定の場合、サンプルは 2 行ずつ測定することになります。2 本のセンサーはお互い固定されており別々には動きません。また測定開始後はプレートの長辺方向（1 列～12 列の向き）にのみ動作し、測定中は短辺方向には動きません。

最終的な測定様式は大きく分けて、「マルチセンサー測定」と「マルチサイクル測定」の 2 通りに分けられます。条件検討の結果や、サンプル消費量、センサー消費量の制限などの要因を勘案し、いずれか適切な測定法を選択することになります。

（次のページへ）

K2によるマルチセンサー測定のためのフォーマット

使用するセンサー

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

サンプル溶液の置き方

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	L	B									
B	B	L	B									
C	B	L	B									
D	B	L	B									
E	B	L	B									
F	B	L	B									
G												
H												

センサー2本（左図青色A/B行の2本）を使い、サンプル2行目のL（Loading）でリガンドを固相化した後、3→4（結合）→3（解離）とアナライトの結合とバッファー中解離を測定する。センサーを戻した後、今度は黄色の2本（C/D行）を使い、同じくリガンドを固相化した後に、3→4（結合）→3（解離）と対応するC/D行のアナライトを測定する。E/Fも同様である。ここではA4～E4のピンク色は同一アナライトの希釈系列を設定しておき、1センサー1濃度の測定することで最終的にGlobal解析のためのデータ（ここでは5段）を蓄積することができる。F4の赤色は測定バッファーであり、アナライト測定中のバッファーリファレンスとして扱う。

上図が「マルチセンサー測定」の一般的な設定です。この測定の利点はセンサーの再生（センサーを再利用するためのアナライト洗浄）を必要としないため煩雑な再生溶液の条件検討無しに Global 解析用のデータを取得することが可能なところです。一方でセンサーの消費量が多いことと、リガンド溶液の設定量（上記例だと6ウェル：1.2mL）が多くなることが欠点と言えます。ただし工夫をすることでリガンド設定量を減らすことも可能です。

K2によるマルチサイクル測定のためのフォーマット

使用するセンサー

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

サンプル溶液の置き方

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	L	B						R	N		
B	B	L	B						R	N		
C												
D												
E												
F												
G												
H												

センサー2本を使い、2行目のL（Loading）でサンプル（リガンド）を固相化した後、3→4（結合）→3（解離）とアナライトの結合とバッファー中解離を測定する。9行目のR（Regeneration）再生溶液でアナライトを完全解離させた後、3→5（結合）→3（解離）と続けて次のアナライトを測定する。ここでは4～8のピンク色（A行）は同一アナライトの希釈系列を設定しておき、薄い濃度順に測定することでGlobal解析のためのデータ（ここでは5段）を蓄積することができる。B行の赤色は測定バッファーであり、アナライト測定中のバッファーリファレンスとして扱う。

次に SPR 法でも良く用いられる「マルチサイクル測定」の設定です。この測定はセンサーの使用本数が基本的に2本で済むためセンサー消費量が抑えられます。また、リガンド溶液も2ウェル（400uL）なので多センサー測定より少なく済みます。一方で、事前に適切

な再生溶液を見つけ出す必要があり、再生条件が最適化できない場合はこの測定は実行できません。

いずれの測定様式においてもアナライトのセンサーに対する非特異結合（NSB）を評価する場合は倍の量のセンサーを設定する必要があります。（今回の例では、マルチセンサー測定なら 12 本、マルチサイクル測定なら 4 本）

実際の測定：

ここでは SA センサー、リガンドはビオチン化分子を使用した場合の Global 解析のための測定について簡単にご紹介します。以下は一例であり、測定内容によってユーザー側で任意に変更できます。

取扱・設定の詳細などは正規マニュアル（英語）、もしくはプライムテックで配布しております簡易マニュアル（日本語）を参考にして下さい。

（次のページへ）

スカウティング測定

(※この測定では KD 値等は算出できません。条件検討測定となります)

この測定には下記の目的があります。

- リガンドが良好に固相化されるか
- アナライトの反応がどのモル濃度で確認できるか。下限と上限の推定。
- アナライトのセンサーへの非特異結合の有無と程度の確認。

一般的に 2 本のセンサーを使用します。1 本はリガンドを固相化してアナライトを低い濃度順に測定します。もう 1 本はリガンドを固相化せずに同じアナライト濃度で測定して非特異結合を評価します。この 2 本は同時に測定されます。

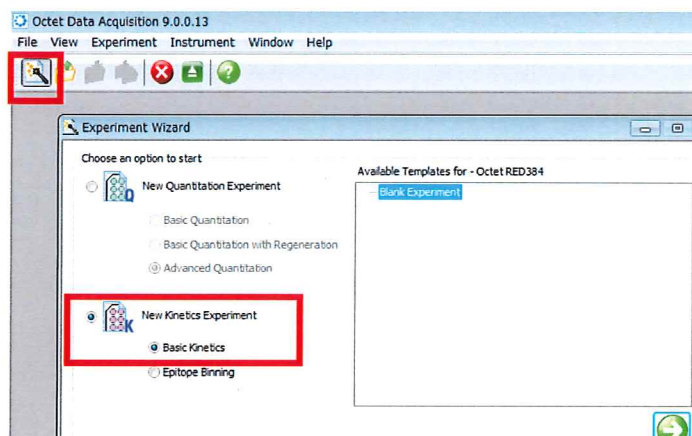
標準的なリガンド濃度 : 10 – 50ug/mL 濃度

標準的なアナライト希釈系列 : 1nM, 10nM, 100nM, 1μM, 10μM (※)

※アナライトの濃度はその分子同士の KD 値 (アフィニティ) に左右されます。強いアフィニティなら薄い濃度、弱いアフィニティなら濃い濃度の測定が必要です。

典型的なスカウティング測定のための Octet Acquisition の設定方法

右図の Wizard から「Basic Kinetics」を選択します。Wizard が閉じていた場合は左上のステッキのマークから開くことができます。



タブ① : Plate definition

ここでは、サンプルプレートの内容、位置を定義します。別紙「スカウティング測定」を参考に各ウェルのサンプル溶液を設定しておきます。

Octet Data Acquisition 9.0.0.13 - [Basic Kinetics Experiment]

File View Experiment Instrument Window Help

Plate Definition | Assay Definition | Sensor Assignment | Review Experiment | Run Experiment

In this step, all the information about the sample plate and its wells will be entered.
Highlight one or more wells on the sample plate, and right-click to enter/modify well data.

Plate 1 (96 wells) Plate 1 Table

Well	Sample ID	Replicate Group	Type	Conc (ug/ml)	MW (kD)	Molar Conc (nM)	Information
A1	Buffer		Buffer				
B1	Buffer		Buffer				
A2	Ligand		Load	20			
B2	Buffer		Buffer				
A3	Buffer		Buffer				
B3	Buffer		Buffer				
A4	Analyte		Sample			1	
A5	Analyte		Sample			10	
A6	Analyte		Sample			100	
A7	Analyte		Sample			1000	
B4	Analyte		Sample			1	
B5	Analyte		Sample			10	
B6	Analyte		Sample			100	
B7	Analyte		Sample			1000	

Unassigned Import... Export... Remove Print...

左クリック&ドラッグでウェルを指定した上で右クリックを押すとポップアップが開いてシンボルが選択できます。シンボルはどれを使っても測定に影響はありませんが、「Sample」のピンク色は後の Analyze で Association と認識してくれます。訂正可能ですので間違っても問題ありません。

2 列目の「L」（Load・リガンド固相化のこと）は片方だけ（A2 など）にします。
4 列～7 列の「Sample」には左から薄い順にアナライトの希釈系列（4 点）を 2 ウェルずつ入れて置きます。この系列の点数は任意です。

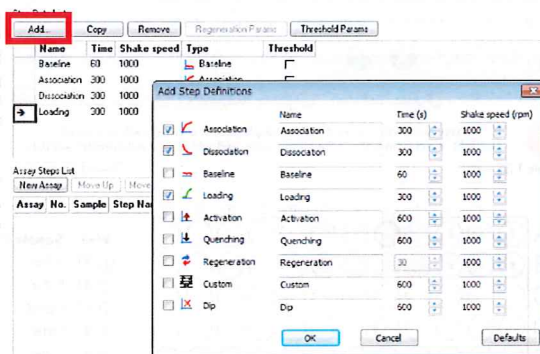
右側に展開するテーブルには情報入力が可能です。基本的に入力無しでも測定できますが、リガンドとアナライトの濃度を記録して置くと、後の参照に便利です。Global 測定（最終的な測定）の場合はアナライトのモル濃度（Molar conc.）が入力されていると自動的に KD 値が算出されます。

タブ② : Plate definition

ここでは、Assay Step を作成します。Assay Step は Octet が実行する測定プログラムに当たります。

まず初めに、右上の「Step Data List」で使用するステップを設定する必要があります。主に Type（ステップの種類）と Time（測定時間）で分類されます。

Add ボタンを押すとポップアップが開いて右のように追加するステップを選択できます。Name、Type、Time、Shake speed が変更可能です。Shake は特別理由が無い限り 1000rpm で実行します。

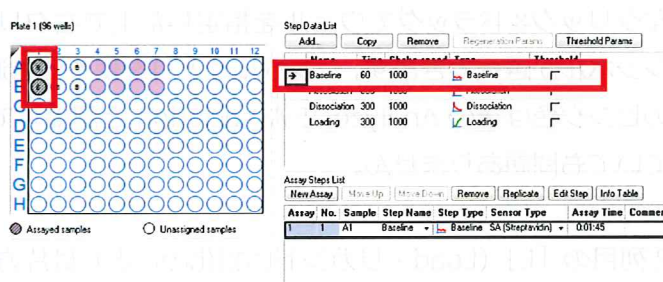


まずは、Association (300sec)、Dissociation (300sec)、Loading (300sec) を追加します。すでにある Baseline (60sec) と合わせて 4 ステップが完成します。

次に Baseline をクリックして選択し、左に表示されているサンプルプレート上の 1 列目 (Buffer) をダブルクリックして下さい。

そうすると、右下の「Assay Step List」に 1 行目が追加されます。

これにより「第 1 に Baseline (60sec) ステップをサンプルプレートの第 1 列目に対し 1 回実行する」という意味のプログラムを作成できます。



後はこの要領で測定したい順番を次々に追加することで Octet の実行プログラムを組んでいきます。初めて測定する場合は、次のページの Step を参考にして下さい。一例ですので、慣れてきたら自由に改変してご使用下さい。

Assay Steps List

New Assay Move Up Move Down Remove Replicate Edit Step Info Table

Assay No	Sample	Step Name	Step Type	Sensor Type	Assay Time	Comment
1	1	A1	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	2	A2	Loading	SA (Streptavidin)		
1	3	A1	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	4	A3	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	5	A4	Association	SA (Streptavidin)		
1	6	A4	Dissociation	SA (Streptavidin)		
1	7	A3	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	8	A5	Association	SA (Streptavidin)		
1	9	A4	Dissociation	SA (Streptavidin)		
1	10	A3	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	11	A6	Association	SA (Streptavidin)		
1	12	A4	Dissociation	SA (Streptavidin)		
1	13	A3	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	14	A7	Association	SA (Streptavidin)		
1	15	A4	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:53:51	

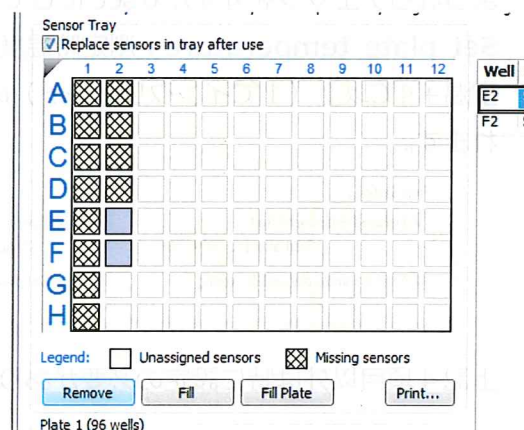
※長い繰り返しの Step を組む時は「Replicate」ボタンが便利です。

赤い枠が固相化（Loading）のフェーズ、青い枠がアナライトの測定関連のフェーズになります。ウェル3列目のバッファーは Baseline と Dissociation のために複数回繰り返し使用しています。実際の測定の動きは Scouting.fmf ファイルをデスクトップに用意しましたので、これを読み込んでタブ4「Review experiment」機能で確認してみてください。

タブ③ : Sensor Assignment

センサーの設置位置を指定します。指定方法は消去法です。使わない左側の部位をクリック & ドラッグで指定して「Remove」すると押し出され「左上詰め」の形でセンサー位置が決定します。

例えば右のような位置に指定するには A1~H1 を選択して「Remove」し、A2~D2 を選択して「Remove」します。



タブ④ : Experiment Review

いわゆるシミュレーション機能による全設定のチェックです。タブ③までに設定した内容を実際に動作させ動きを見ることができます。ここでは特に設定はありません。

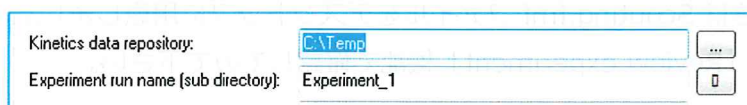
タブ⑤ : Run Experiment

最終項目の設定です。主に「データ保存先」「実験名」「Delay の設定」「測定温度」を決めて測定をスタートします。

Kinetics Data repository : データの保存先（親フォルダ）を決めます。「…」ボタンで適当なフォルダ先を指定して下さい。

Experiment run name : 本測定の名前を決めます。この名前でフォルダが上記親フォルダ内に作成されます。ここでの測定結果データは全てここに保存されます。測定後データ検索する場合はこの名前がリストとして見えるので、通しナンバー・日付・測定の種類・測定サンプル名などを入れておくと便利です。

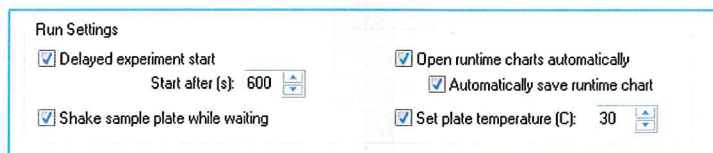
例 : 「01. 2016-01-01 Scouting (ProA and mouse-IgG)」



The screenshot shows two input fields. The first field is labeled 'Kinetics data repository:' and contains the text 'CA\Temp'. To its right is a button with three dots '...'. The second field is labeled 'Experiment run name (sub directory):' and contains the text 'Experiment_1'. To its right is a button with a folder icon.

Delayed experiment start: プレーートの暖気のための測定前遅延時間です。プレートに Octet に設置してすぐは温度が不均一なので、一般的に 300sec 程度をここで設定して測定開始までに時間を置きます。センサー水和も兼ねる場合はデフォルトの 600sec (10 分) を使います。プレートを前回の測定から使いまわしている状態など、すでに加温されているようならチェックを外すか 0 sec にしてすぐに測定をスタートすることもできます。

Set plate temperature : 測定時温度を設定します。Octet は加温しかできませんので、室温 + 4℃以上 (1℃インクリメント) の制限があります。一般的には 30℃測定が用いられます。

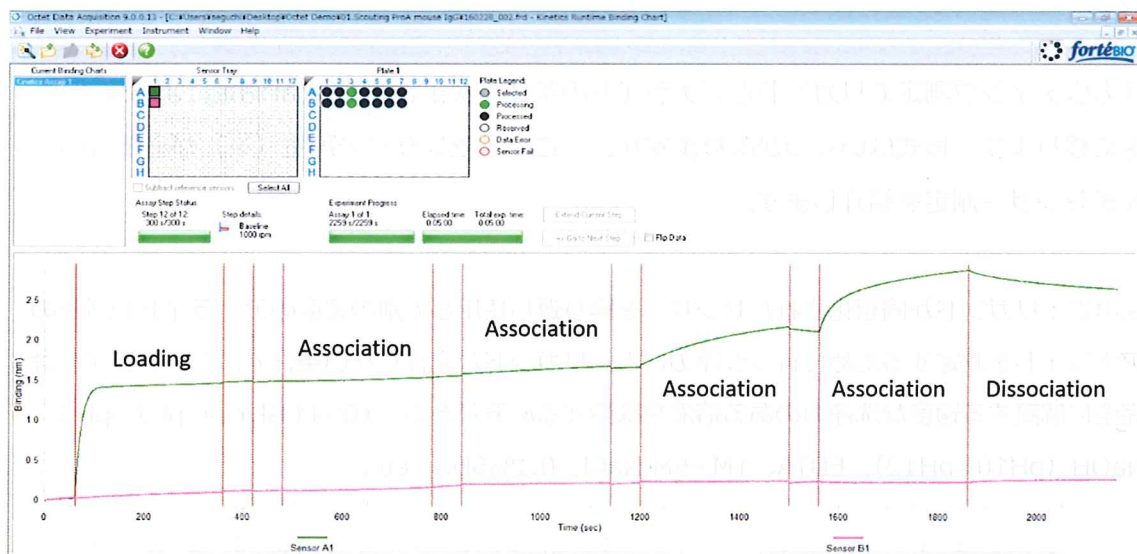


The screenshot shows a 'Run Settings' dialog box with four checked options: 'Delayed experiment start' (with a sub-field 'Start after (s):' set to 600), 'Open runtime charts automatically', 'Automatically save runtime chart', and 'Shake sample plate while waiting'. The 'Set plate temperature (C):' is set to 30.

上記 4 項目以外は特に設定の必要がありません。

右上の「Go」ボタンを押すと測定がスタートします。

スカウティング測定の実例 (SA センサー : biotin-ProteinA-mouse IgG)



※本例では途中の3系列のDissociationが省略されています。

緑色のデータが biotin-ProteinA を固相化して、mouse-IgG の結合を測定したものです。2 番目の Association で少し結合が見られ、4 番目で大きな結合が見えています。この場合は 2 番目~4 番目の濃度範囲で Global 測定が実行可能であることを示しています。またピンク色のデータは固相化せずに同じアナライトを測定していますが、いずれも反応は見られません。この場合はセンサーへの非特異結合が全く無いので今後この濃度レンジであればリファレンスセンサーが必要ないことを示しています。

もしここである程度非特異結合が見える場合は2つの選択肢があります。

- ①非特異が生じないバッファー組成（界面活性剤や塩濃度を上げる、etc.）を探索する、
- もしくは②Global 測定の際にリファレンスセンサー（固相化しないセンサー）を使い、解析時にサブトラクション（データ差し引き）を実行し補正をかける、となります。

スカウティング測定はグラフの見た目のみで判定可能であり、解析 (Analysis) ソフトは使いません。

Global 測定（マルチセンサー測定の場合）

スカウティング測定でリガンドとアナライトの条件が決まれば Global 測定による最終測定に移ります。様式はいくつかありますが、ここではセンサーの再生（※）が必要ないマルチセンサー測定を紹介します。

※再生：リガンドが固相化されたセンサーを繰り返し使用して別の濃度のアナライトや別種のアナライトを測定するために行う洗浄のこと。リガンドが変性しない条件でかつアナライトは完全に解離する適度な洗浄力のある溶液を探索する必要がある。10mM Glycine pH1~pH3、NaOH（pH10~pH12）、EDTA、1M~5M NaCl、0.1%SDS、etc.

Sensor rack		Sample well					
1	2		1	2	3	4	5
SA sensor #1	SA sensor #7	A	Buffer	Ligand	Buffer	Analyte 1	
SA sensor #2	SA sensor #8	B				Analyte 2	
SA sensor #3	SA sensor #9	C				Analyte 3	
SA sensor #4	SA sensor #10	D				Analyte 4	
SA sensor #5	SA sensor #11	E				Analyte 5	
SA sensor #6	SA sensor #12	F				Buffer	
		G					

上図のようにセンサーとサンプルプレートを用意します。第2列の6本のセンサー（#7 - #12）は非特異が生じた場合に設定するリファレンスセンサーです。スカウティングで非特異がゼロであることが確認されてない場合は、必ずリファレンスセンサーも設定して下さい。センサーの行とサンプルの行は対応しています。センサーの#1と#2はサンプルのAとBを、#3と#4はCとDを測定します。そのためこの例であれば、3回の繰り返しの測定が終了します。

Analyte 列の最下の F4 は、Analyte を含まない測定バッファーのみのウェルです。これはリファレンス・ウェルと呼び、アナライト測定中のドリフトやバルク反応を解析時補正するための基準となります。リファレンス・ウェルは基本的には必ず設定して下さい。

Octet Acquisition の設定はおおよそスカウティング測定の時と同様です。Assay Step は下図、もしくはデスクトップに用意した「multi-sensor Global.fmf」を参考にしてください。

Plate 1 (96 wells)

Legend: Assayed samples Unassigned samples

Step Data List

Name	Time	Shake speed	Type	Threshold
Baseline	60	1000	Baseline	☐
Association	180	1000	Association	☐
Dissociation	300	1000	Dissociation	☐
→ Loading	120	1000	Loading	☐

Assay Steps List

Assay No.	Sample	Step Name	Step Type	Sensor Type	Assay Time	Comment
1	1	A1	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	2	A2	Loading	SA (Streptavidin)		
1	3	A1	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	4	A3	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	5	A4	Association	SA (Streptavidin)		
1	6	A4	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	
2	1	C1	Baseline	SA (Streptavidin)		
2	2	C2	Loading	SA (Streptavidin)		
2	3	C1	Baseline	SA (Streptavidin)		
2	4	C3	Baseline	SA (Streptavidin)		
2	5	C4	Association	SA (Streptavidin)		
2	6	C4	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	
3	1	E1	Baseline	SA (Streptavidin)		
3	2	E2	Loading	SA (Streptavidin)		
3	3	E1	Baseline	SA (Streptavidin)		
3	4	E3	Baseline	SA (Streptavidin)		
3	5	E4	Association	SA (Streptavidin)		
3	6	E4	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	

※この例では Loading と Association がより短くても良いと判断され、それぞれ 120sec と 180sec に短縮されています。

Step List で「Assay」が 3 組作られそれぞれ色分けされています。色が変わる度にセンサーを付け替えることを意味しています。これを作成するには「New Assay」ボタンを押して次の Assay に切り替えるか、同じ流れのステップであれば Assay1 を全てクリック&ドラッグで選択した後、「Replicate」→ポップアップで「Add as a new assay」+「Offset steps / vertically」を選択して実行すると行を 2 つ下げた形でコピーが作成できます。Global 解析を行うには全ての Assay（上図だと 1～3）の Step は完全に一致している必要があります（当然「Sample」は異なっていて良い）。

Step (リファレンスセンサーを含む) と Sensor 位置の作成例

Assay	No.	Sample	Step Name	Step Type	Sensor Type	Assay Time	Comment
1	1	A1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	2	A2	Loading	Loading	SA (Streptavidin)		
1	3	A1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	4	A3	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	5	A4	Association	Association	SA (Streptavidin)		
1	6	A3	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	
2	1	C1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
2	2	C2	Loading	Loading	SA (Streptavidin)		
2	3	C1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
2	4	C3	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
2	5	C4	Association	Association	SA (Streptavidin)		
2	6	C3	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	
3	1	E1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
3	2	E2	Loading	Loading	SA (Streptavidin)		
3	3	E1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
3	4	E3	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
3	5	E4	Association	Association	SA (Streptavidin)		
3	6	E3	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	
4	1	A1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
4	2	A1	Loading	Loading	SA (Streptavidin)		
4	3	A1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
4	4	A3	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
4	5	A4	Association	Association	SA (Streptavidin)		
4	6	A3	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	
5	1	C1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
5	2	C1	Loading	Loading	SA (Streptavidin)		
5	3	C1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
5	4	C3	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
5	5	C4	Association	Association	SA (Streptavidin)		
5	6	C3	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	
6	1	E1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
6	2	E1	Loading	Loading	SA (Streptavidin)		
6	3	E1	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
6	4	E3	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
6	5	E4	Association	Association	SA (Streptavidin)		
6	6	E3	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)	0:14:30	

Sensor Tray												
☒ Replace sensors in tray after use												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Legend: ☐ Unassigned sensors ☒ Missing sensors

前頁の測定にリファレンス（非特異評価）を加えると上記のようになります。基本的には左の Assay Step リストのように Assay1～Assay3 を作成し、もう一度 Assay1 を Replicate する形で同じステップを作成してから「Loading」の「Sample」を「A2→A1」へ手動で書き換えて下さい。これでこのセンサーは固相化をしない（バッファーのみの A1 に居続ける）ので、裸のままアナライト測定に進むことで非特異結合のみを見ることが出来ます。（もちろんバッファーのウェルが上記例と違う場合は適宜適切な位置を指定してください。）

以下、Assay5 も Assay6 も同様に変更を加えます。赤枠の部分が変更を加えるところを示しています。

もし非特異のデータを Analysis で差し引き（Subtraction）する予定であれば、センサー位置の指定のところで、右の例のように、各センサーのセットのリガンドセンサーとリファレンスセンサーが必ず隣り合う形でセンサー位置を指定してください。センサーの実際の水和位置もこれに従うように置くようにします。

（ソフトウェアの都合上、隣り合うもの同士でしか差し引き解析ができないため）

データ解析 (KD 値等の算出)

Analysis ソフトウェアでは主に

- ・ Loading や Baseline など KD 値に必要な無いデータを削除し Association と Dissociation のみにまとめ上げる「Process (加工)」
- ・ Processed Data を元に Local/Global 解析 (非線形カーブフィット解析) を実行し KD 値・Ka・Kdisなどを算出する「Analysis」

この2点を実行します。それ以外に、

- ・ 解析結果を Excel 形式のリポートとして保存することも行います。

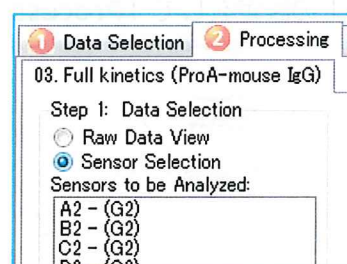
タブ① : Data selection

左下ボックスの PC 内ディレクトリから目的のフォルダをダブルクリックで上部の読み込みウィンドウに Load します。Octet データ類はフォルダがピンク色の表示になります。Load したフォルダは Kinetics と Quantitation を区別して自動で振り分けられます。Load された方の目的フォルダをもう一度ワンクリックするとデータが Analysis ソフトに読み込まれます。

対象データを読み込んだら **Processing タブ**に移行します。

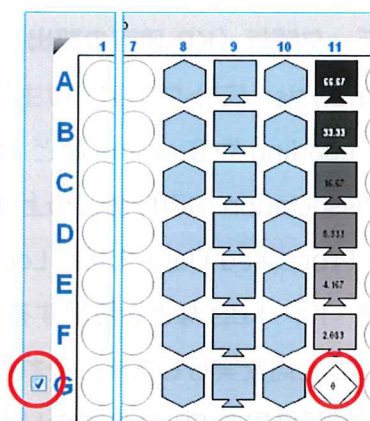
タブ② : Processing

画面左側「Sensor selection」をクリックして Sensor Tray と Sample plate を表示します。



1. ウェル上で右クリック→(ポップアップ)「**Change well type**」により、リファレンス・ウェルをひし形 (**Reference well**) に指定し、プレートイメージ横のチェックボックスを ON にする。(リファレンス・ウェルの指定) (右図)

リファレンス・センサー群が隣にある場合は、それらセンサーの方を選択して同じ要領で、全て「**Reference sensor**」に指定しておく。



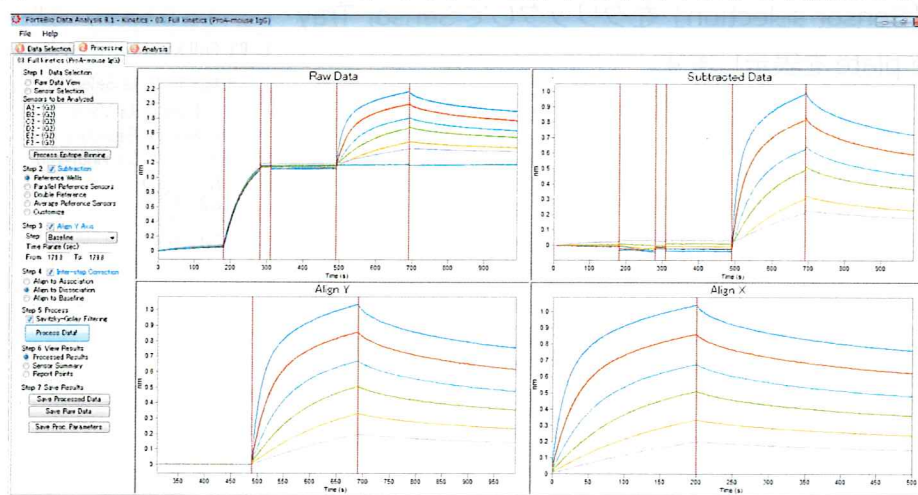
2. 次に画面左側、Subtraction では「**Reference well**」を指定する。(リファレンス・ウェルのデータを全体から差し引く)。リファレンス・センサーもある場合は、「**Double reference**」を指定する。

3. その下の Align Y では「**Baseline**」を選択し、時間は最後 1 秒 (ex. 178 – 179.xx) を指定する。(各データ Y 軸のずれを補正。この場合は Association に移るすぐ前の時点で一度 Y 軸をゼロにしている)。うまくいかない場合は「Association の 0.0-0.0sec」を指定する場合もある。

4. Inter-step Correction では「**Align to Dissociation**」を選択する。(Association と Dissociation の間に生じる意味の無いギャップを自動で補正する機能。Association の終点を Dissociation の開始点に合わせる、という指示になる)

上記 3 で「Association」を指定した場合は「Align to Association」を選択する。

以上の設定をして「**Process Data!**」のボタンを押すと下図のような状態になります。



Process 後のデータウィンドウ

前ページ図の右下の AlignX グラフが Association と Dissociation のみに加工された最終的なプロセスデータになります。これを使いカーブフィット解析を行います。

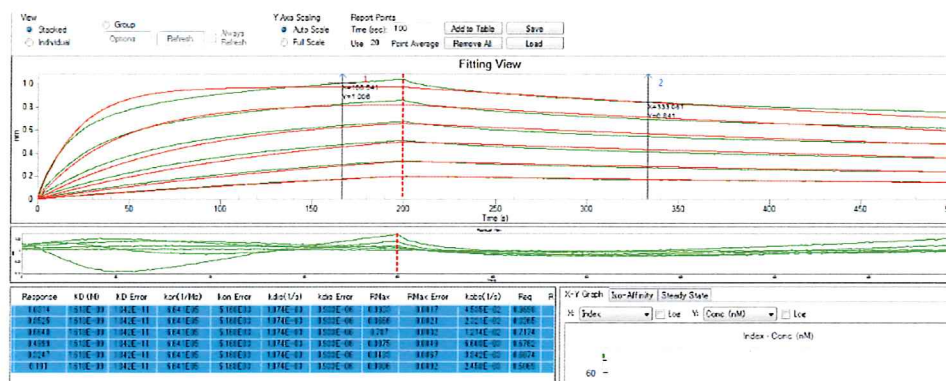
Analysis タブに移行します。

タブ③ : Analysis

1. Model は 1:1 のままで、Fitting は Global を選択します。
詳細設定で「Color」と「Rmax Unlink」選択します。
(Local の解析の場合はここで「Local」を指定します)

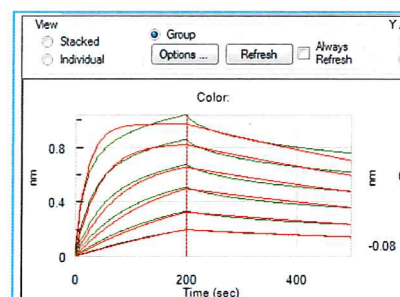
2. データテーブル上で全てのデータを選択し（青色になります）右クリックを押して「Set Color」により好きな色を選択して、全データを同じ色に揃えます。上記 1 のように「Color」を選択している場合は、全て同じデータの組み合わせと認識され Global 解析されます。複数分子組み合わせが混在している時はここで色によるグループ分けが可能です。

3. 「Fit Curve!」を押して解析を実行します。データテーブル上には KD 値・Kon 値・Kdis 値が表示され、グラフにはフィッティングカーブの赤いラインがオーバーレイされます。



解析後のグラフ

4. テーブル上に各定数が表示されます。表示されている χ^2 乗値や R^2 乗値は統計的な評価に使用します。見た目のカーブフィットがずれていて不良と思われた場合は、例えば高い濃度を除外して再解析します。「Include」からチェックを外して（次ページの図）、再度「Fit curve!」ボタンを押します。

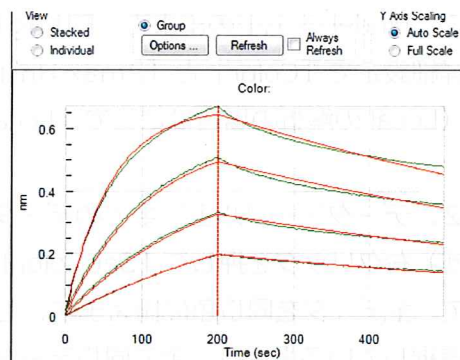


Include	Index	Color	Sensor Location	Sensor Type	Sensor Info	Replicate Group
☐	0		A2	SA (Streptavidi...		N/A
☐	1		B2	SA (Streptavidi...		N/A
☒	2		C2	SA (Streptavidi...		N/A
☒	3		D2	SA (Streptavidi...		N/A
☒	4		E2	SA (Streptavidi...		N/A
☒	5		F2	SA (Streptavidi...		N/A

Include のチェックボックス

前述の例から高い 2 つの濃度が除外された状態で Global 解析をした結果が右のようになります。大抵は KD 値等に大きな変化は見られませんが、グラフの見た目は改善します。(右図)

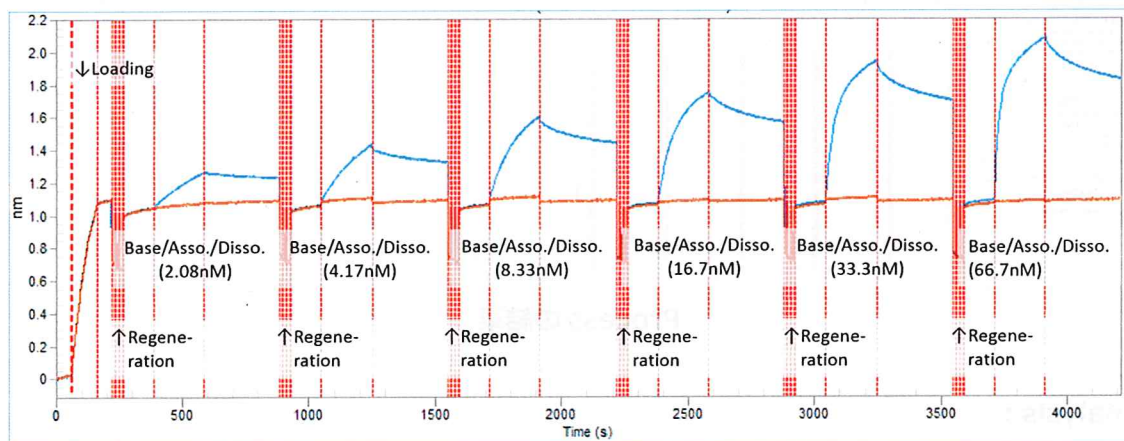
解析の最適化が終了したら「Save report」ボタンを押してその時点の結果を Excel ファイルで保存して下さい。全ての操作記録は Excel ファイルに保存されます。



(各操作の詳細は取扱説明書をご参照ください。)

Global 測定（マルチサイクル測定の場合）

この測定は1本（+1本：リファレンス・ウェル）を使い、アナライต์濃度を順次上げていって測定する方法で、古典的な SPR の測定法と同じです。センサー消費量が少ない反面、再生条件の決定に時間・コストを要します。



マルチサイクル測定の一例

上図のように Loading の後に1度再生操作を行い（順化）、それ以降薄いアナライต์から2倍希釈系列を順次測定していきます。各 Dissociation 測定の後には再生操作を挟むことで次の測定に残存アナライต์を持ち越さないようにしています。

固相化量・測定時間の調節・希釈系列範囲・リファレンス等の設定は多センサー測定の時と同じです。

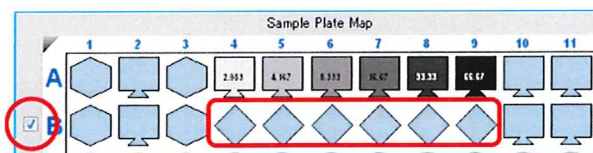
解析：

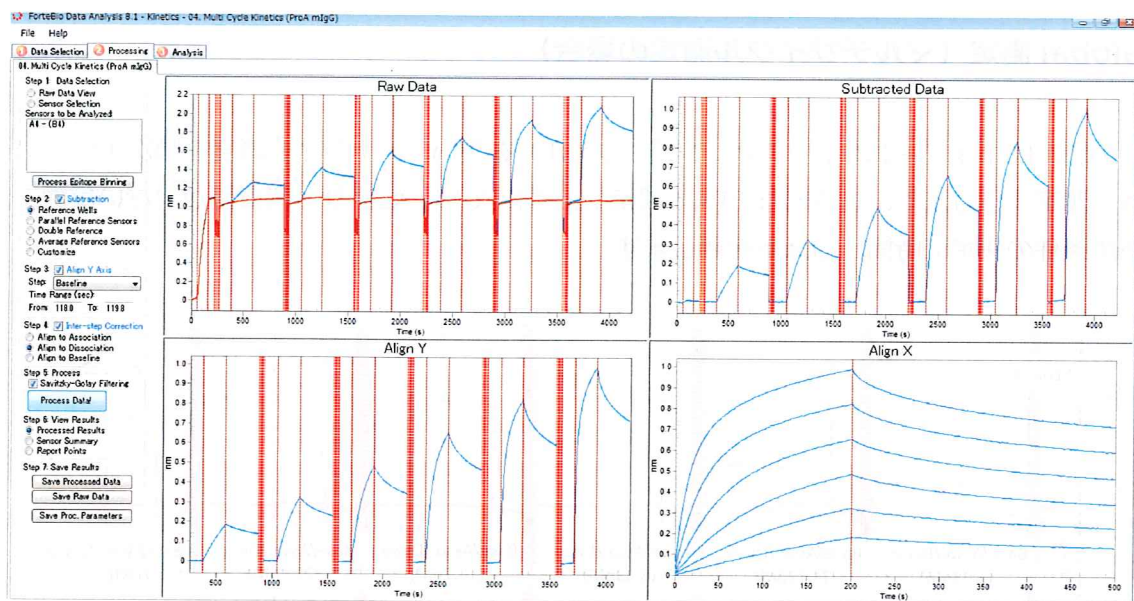
マルチセンサー測定の時とほぼ同じです。

Processing：

マルチセンサー同時測定と同じです。

リファレンス・ウェルの指定は系列分全てを選びます。

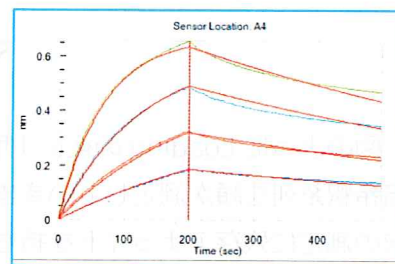




Process の結果

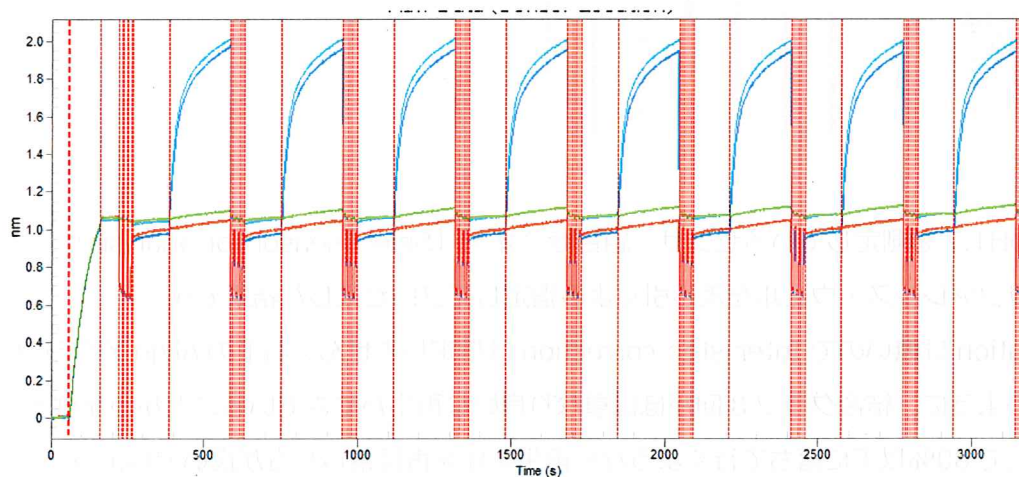
Analysis :

Global 設定の詳細において「Sensor」を選ぶところ以外は多センサー測定と同じです。右図が解析結果ですが、同じ形で結果が得られます。



再生溶液の探索

マルチサイクル測定を成功させるには再生溶液の最適化が必須です。スカウティングで用いた最も高い濃度のアナライトを、予定の系列点数以上の複数回、再生・結合測定を繰り返してカーブやレスポンスに変化無い再生溶液を探索します。90～100%維持されるのが理想的です。Octet では再生溶液洗浄とバッファー洗浄を繰り返すパルス形式の洗浄を推奨しています。

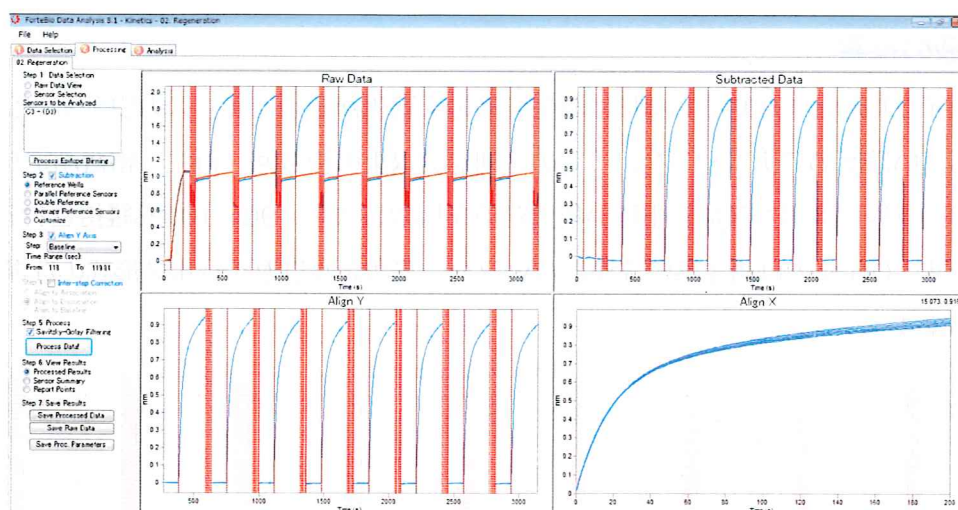


再生溶液：10 秒／バッファー5 秒 x3 回

再生条件探索のための測定の一例

上図では8回繰り返して測定しています。形式はマルチサイクル測定と同じですが、Dissociation は必要ないので設定しません。10mM Glycine pH1.7 と pH3.5 を同時に評価していますが、いずれもほぼ問題ありません。

(次ページへ)



上図は pH1.7 を測定しているセンサー組合せ 2 本を「Select sensor for analysis」で選択し、リファレンス・ウェルを差し引くよう指定してプロセスした結果です。

Dissociation は無いので Inter-step correction は指定しません。右下の Align X グラフの結果のように、結合グラフ 8 回がほぼ重なり良好な再生ができていることがわかります。ここで 80% 以下に落ちて行くようなら再生条件を再探索した方が良いでしょう。再生溶液の種類は下記のようなものがあります。SPR などの既知情報もそのまま使えることが多いので論文等で検索するのも良いでしょう。

1. 酸性溶液（グリシン、塩酸、リン酸など）
2. アルカリ溶液（NaOH など）
3. 高塩濃度（NaCl など）
4. キレート剤（EDTA など）
5. 界面活性剤（Tween20、SDS など）
6. 変性剤（チオシアネートなど）

これらのような溶液から、リガンドにできるだけ影響を与えずにアナライトが完全解離するものを見出すことが肝要です。