



Pall-fortebio社 生体分子間相互作用解析装置Octetシリーズ

簡易マニュアル (カイネティクス測定)

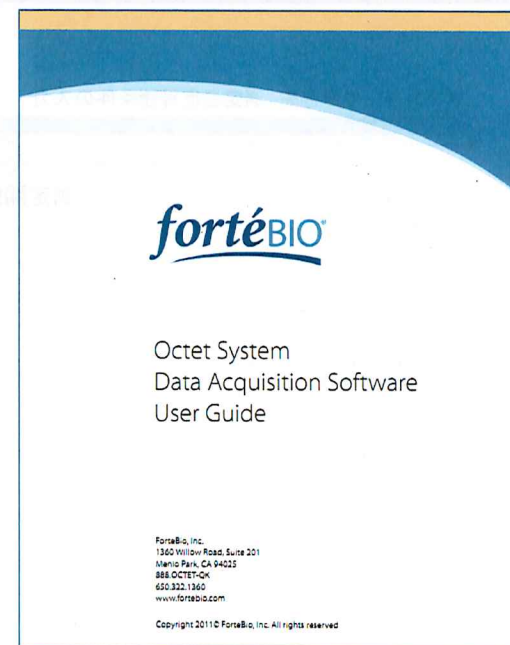


fortéBIO
A Division of Pall Life Sciences



1

マニュアルの表示方法



本資料は簡易マニュアルです。詳細な情報は正規マニュアルを参照下さい。

本資料に記載されていない細かい操作方法やTipsなどが掲載されています。

表示方法は各ソフトウェアの「Help」を押して「User Guide」を選択して下さい。PDF形式のマニュアルが表示されます。(英文です)

2

ソフトウェアの種類

Data Acquisitionソフトウェア



Octetで測定を実行しデータを取得するためのソフトウェアです。サンプル情報入力、測定アクセisstップの作成、データの保存先等を設定し、測定を実行します。

一連の入力/実行データ群を「Experiment」と呼び、.fmf拡張子の付く独自ファイルとして扱います。取得された生データは、.frd拡張子の付く独自ファイルとして記録されます。

Data Analysisソフトウェア



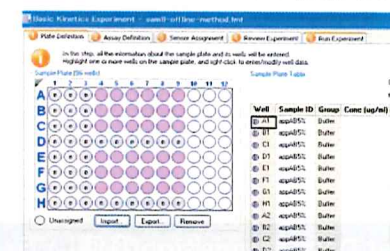
Data Acquisitionで取得されたデータを解析するためのソフトウェアです。Quantitaionでは定量値と統計値を、Kineticsでは速度定数などを算出できます。生データやExcelレポートの出力を行う際も本ソフトを使用します。

Octet独自の.fmfファイルと.frdファイルを読み込み、展開/解析/再保存することができます。

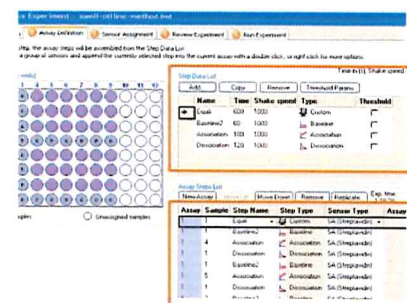
3

Data Acquisition (データ取得ソフト) 概要

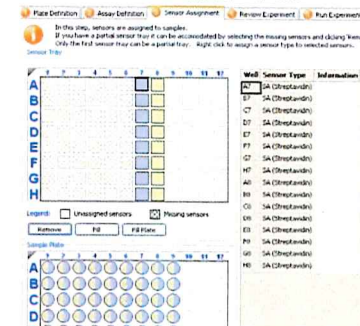
タブ1. サンプルプレートの情報入力



タブ2. アクセisstップの情報入力

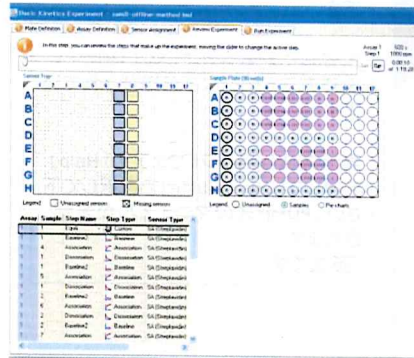


タブ3. センサー情報の入力

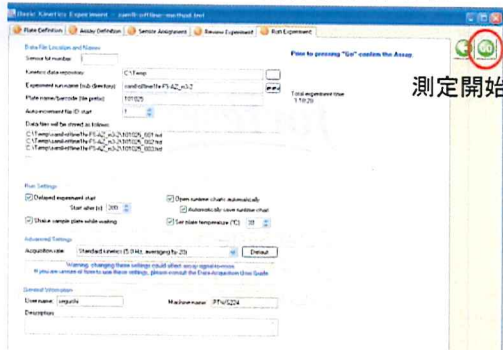


4

タブ4. 入力情報の確認



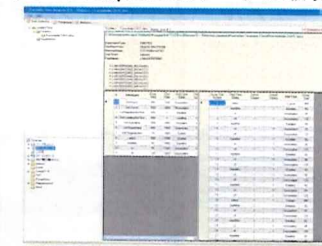
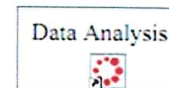
タブ5. データ保存先、測定温度等諸条件の入力



測定開始

5

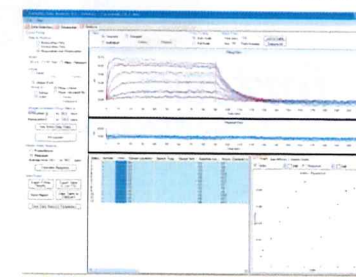
タブ1. Acquisitionデータの取り込み



タブ2. データプロセス



タブ3. カーブフィッティングにより定数を計算



6

Octet Data Acquisitionの使い方

(補足) 起動後温度の変更

Octet Data Acquisition 7.0

File View Experiment Instrument Window Help

Open Method File... (Ctrl+O)
Open Method File
Open Method File
Open All Method Files
Save Method File As...

Open Experiment...
Save Experiment As...

Print
Print Progress
Print Setup...

1 Double_ref_experiment.grimtechs.tmf
2 Installation_Octet_RED004_Quantitation.tmf
3 Tanabe_assay.tmf
4 Tanabe_loading.tmf

Options...

Exit

Options

Data Files

Quantitation data repository: C:\Temp

Kinetics data repository: C:\Temp

Use old 5.0 file format for PRD files

Startup

Temperature: 30 °C

Significant digits: 4

Web Server

Port: 8080

Automation

TCP-IP

Port: 8080

Serial (RS232)

Port: COM1

Option/Start up

通常、Octetは起動後にサンプルプレート設置面が30℃に設定されています。Octetのカイネティクス測定は通常30℃で実行されます。

Octet起動後に到達させたい温度を変更することが可能です。
(室温より+4℃以上)。

測定時温度の設定 (最後のTab4において指定します)と同じ温度かそれより1~2℃低い温度に設定して下さい。Octetは加温のみ可能で、冷却ができません。

※ユーザーや測定内容によって測定時の温度が変更される場合、起動後温度が一番低い測定時温度と同じに設定されるべきですが、これらの温度に開きがあると測定開始までに長いDelay timeが必要になる場合があります。そのため、起動後温度と測定時温度に近い方が温度平衡化が迅速になり測定が安定的に開始されます。

設定方法:
左上の「File」から「Option」を選択し、Optionウィンドウを開いて、「Startup」の温度の数字を入力して変更して下さい

温度の変更した場合は、変更を適用するためにソフトウェアの再起動を行って下さい

現在の温度は、右下に「plate temp.」として表示されます。

次回の測定以降は最後適用した設定値が用いられます。

Instrument Status

14:56:23 Waiting to initialize
14:56:24 Initializing...
14:56:26 Instrument initialized
14:56:28 Ready

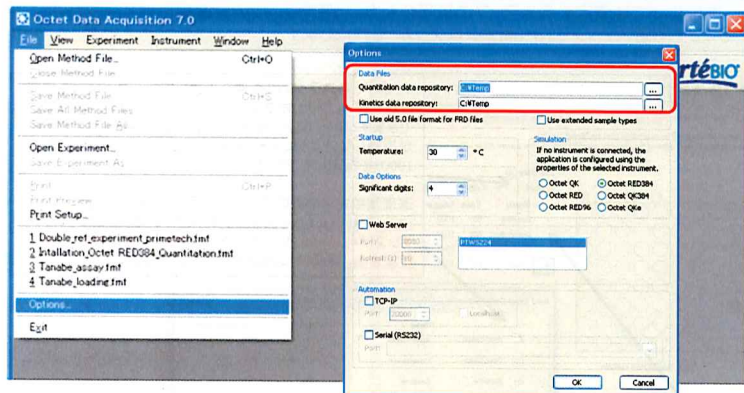
Instrument Ready

Experiment: Not Started

Plate temp: 30 °C

8

(補足) デフォルトのData repository(データ保存先)の設定



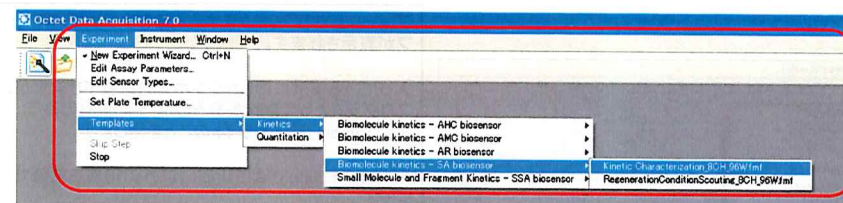
Option/Data Files

起動後温度の設定と同じウィンドウで、デフォルトのData repository(データ保存先)を設定できます。上記赤枠内の2つの欄(Quantitation用とKinetics用)にデータの保存先を設定できます。最終的には、Tab4にて再度保存先を指定することになりますが、その際ここで設定したフォルダが自動的にデフォルト入力されるようになりますので、常に決まったフォルダ内にデータを保存する場合は、ここであらかじめ決めておくとう便利です。

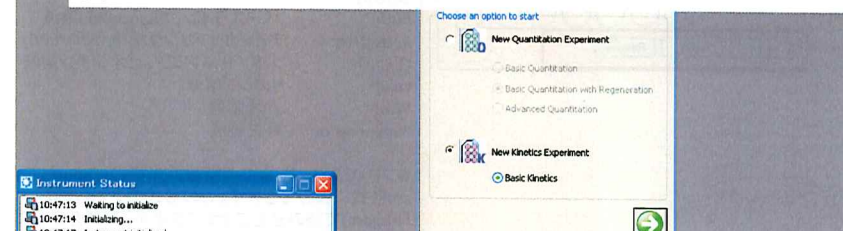
温度設定同様、変更を加えた場合はソフトウェアを再起動して下さい。

9

テンプレートを使うと便利です

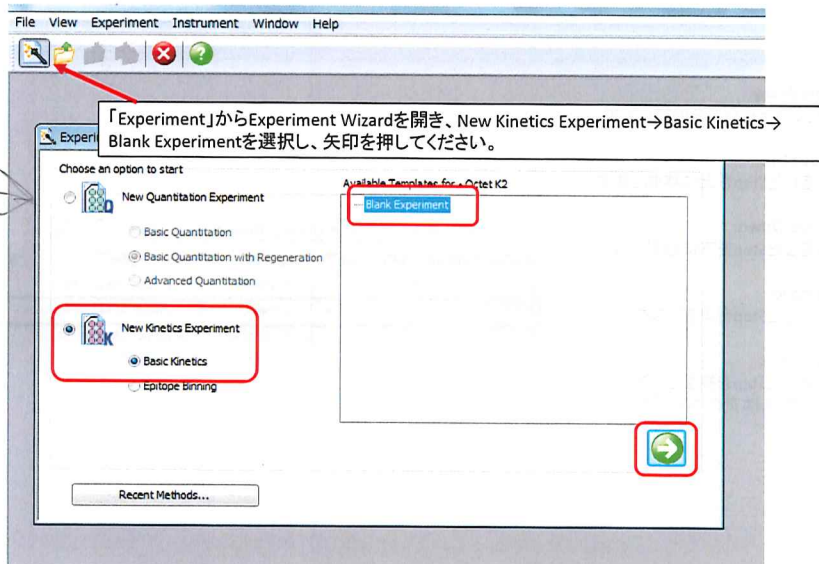


例えばExperiment>Template>Kinetics->...SA biosensor->...などで典型的なプログラムのテンプレートを展開することができます。このテンプレートを好きなように変更して使用することも可能です。次ページからはテンプレートを使わずに最初からプログラムを作成する方法を説明します。



10

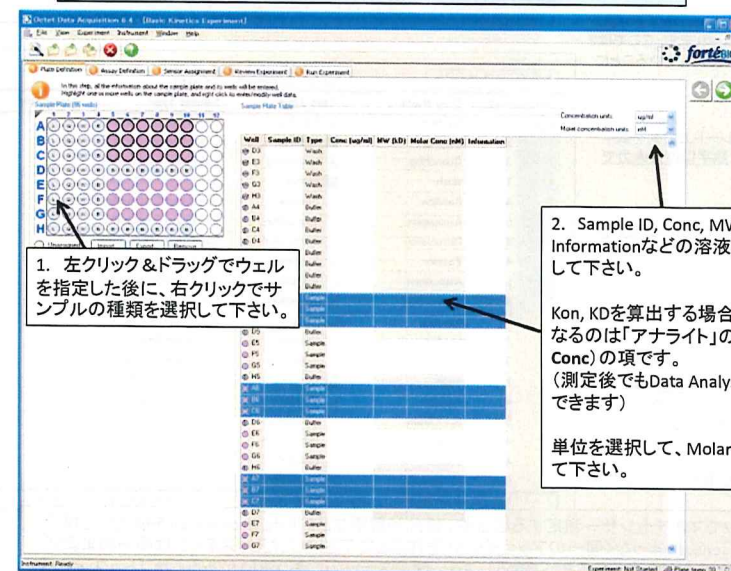
Kinetics experimentを開く



11

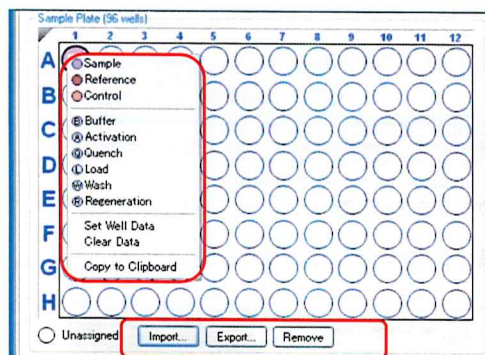
タブ① Plate Definition でサンプルプレートを定義する

Plate Definitionでは96wellプレート上のサンプルの種類と位置、サンプル名、サンプル濃度、その他の情報を入力します



12

タブ① Plate Definition (プレート上でのサンプルの種類)



プレート上で右クリックをすると左のようなポップアップが表示されます。

入っている溶液に即したシンボルを選択できますが、プログラムにとって意味があるのは「Sample」のみです。「Sample」はアナライズのことを指します。

※ Reagent plateでは「Sample」以外の溶液を定義できます。

その他は、溶液の種類を把握するためにのみ使用します。

使用例:

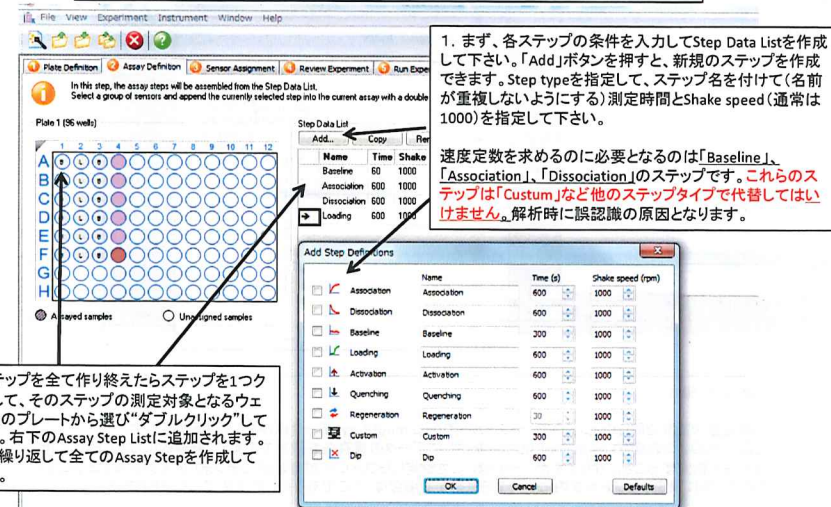
Buffer: ベースライン、Dissociation溶液
Activation: アミンカップリング溶液 (NHS/EDC)
Quench: エタノールアミン、ピオシチン溶液
Load: リガンド溶液
Wash: 洗浄溶液
Regeneration: 再生溶液

タブ①で入力した全ての情報は赤枠の「Export」でcsv形式に保存できます。この形式のファイルは「Import」で読み込むことができます。形式を崩さなければ、csvファイルを直接編集することも可能です。

13

タブ② Assay Definitionでアッセイステップリストを作成する

Assay Definitionでは測定各ステップの情報を入力し、測定ウェルの位置指定することで測定ステップリスト(測定プログラム)を作成します



1. まず、各ステップの条件を入力してStep Data Listを作成して下さい。「Add」ボタンを押すと、新規のステップを作成できます。Step typeを指定して、ステップ名を付けて(名前が重複しないようにする)測定時間とShake speed (通常は1000)を指定して下さい。

速度定数を求めるのに必要となるのは「Baseline」、「Association」、「Dissociation」のステップです。これらのステップは「Custom」など他のステップタイプで代替してはいけません。解析時に誤認識の原因となります。

2. ステップを全て作り終えたらステップを1つクリックして、そのステップの測定対象となるウェルを左のプレートから選び「ダブルクリック」して下さい。右下のAssay Step Listに追加されます。これを繰り返して全てのAssay Stepを作成して下さい。

3. 右下のこの欄にAssay Step listが表示されます(詳細は次のページへ)

14

タブ② Assay Definition _Assay Step List

Assay:
1組のセンサー(1 assayとする)毎に色分けして表示されます。ここでは2組のセンサーを使用していることになります

Sample:
測定対象のプレート上の列を数字で表示します。数字は直接入力でも変更可能です

Step Name:
Data Listで定義した、Stepの名前を表示します。変更可能です

Step Type:
Data Listで定義した、Step typeが表示されます。

Sensor Type:
使用したセンサーの種類が選べます。測定そのものに関係ありません。レポートに出力されます。

Assay time:
1 assay毎の測定時間を表示します。

Assay Step Listで表示される順番に測定が行われます。この欄でステップの編集を行い、測定プログラムを決定します。

Assay	Sample	Step Name	Step Type	Sensor Type	Assay Time
1	1	Baseline	Baseline	SSA (Super Streptavidin)	
1	2	Loading	Loading	SSA (Super Streptavidin)	
1	3	Quenching	Quenching	SSA (Super Streptavidin)	
1	1	wash	Custom	SSA (Super Streptavidin)	
1	4	Baseline	Baseline	SSA (Super Streptavidin)	
1	5	Association	Association	SSA (Super Streptavidin)	
1	4	Dissociation	Dissociation	SSA (Super Streptavidin)	
1	4	Baseline	Baseline	SSA (Super Streptavidin)	
1	6	Association	Association	SSA (Super Streptavidin)	
1	4	Dissociation	Dissociation	SSA (Super Streptavidin)	0.40.05
2	1	Baseline	Baseline	SSA (Super Streptavidin)	
2	2	Loading	Loading	SSA (Super Streptavidin)	
2	3	Quenching	Quenching	SSA (Super Streptavidin)	
2	1	wash	Custom	SSA (Super Streptavidin)	
2	4	Baseline	Baseline	SSA (Super Streptavidin)	
2	5	Association	Association	SSA (Super Streptavidin)	
2	4	Dissociation	Dissociation	SSA (Super Streptavidin)	
2	4	Baseline	Baseline	SSA (Super Streptavidin)	
2	6	Association	Association	SSA (Super Streptavidin)	
2	4	Dissociation	Dissociation	SSA (Super Streptavidin)	0.40.05

注意: K2でマルチセンサー測定する場合や、低分子解析などのReference sensorを使用する場合はLigand sensorとまったく同一のアッセイリストを作成して下さい(ただし、ステップは同一のまま測定対象ウェルだけを変えることができます)。Assay間のステップに食い違いがあるとサブトラクション処理不可やGlobal解析不可となります。

15

タブ② Assay Definition _Assay Step List

New Assay:

新しいAssay stepを追加します

Move Up:

指定したStepを上へ移動します

Move Down:

指定したStepを下へ移動します

Remove:

指定したStepを消去します

Replicate:

指定したStepを複製します。
複製方法は次のページへ

Assay	Sample	Step Name	Step Type	Sensor Type	Assay
1	1	Baseline	Baseline	SSA (Super Streptavidin)	
1	2	Loading	Loading	SSA (Super Streptavidin)	
1	3	Quenching	Quenching	SSA (Super Streptavidin)	
1	1	wash	Custom	SSA (Super Streptavidin)	

16

※ 2組のセンサーを用いた測定は100%精度で10回以上同じ結果が得られることを確認する必要がある

タブ② Assay Definition _Replicate Steps機能 (RED96/QKe)

Replicate Stepsでは、いくつかの様式でステップの複製が可能です。作成したいステップに同様の繰り返しなどがある場合に使用すると簡単にリストを作成できます。

Replication Type:

Add as a new assay:

新しいassayとして複製します

Append to current assay:

現在のアッセイのまま複製を行います

Offset steps

指定した形式でウェルをずらして複製します。

Sample steps only

Association step だけずらして複製します

All Steps

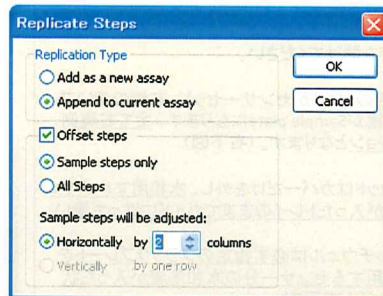
全てのStepをずらして複製します。

Sample steps will be adjusted:

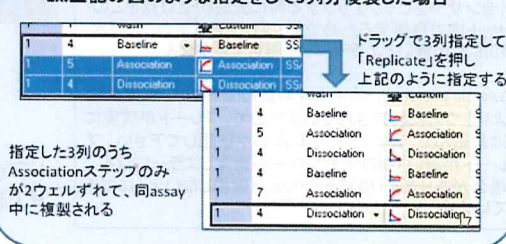
上記指定様式ですらす際に何ウェル分ずらすかを数字で指定します。

ex. 「2」→右方向に2つ

「-1」→左方向に1つ



Ex. 上記の図のような指定をして3列分複製した場合



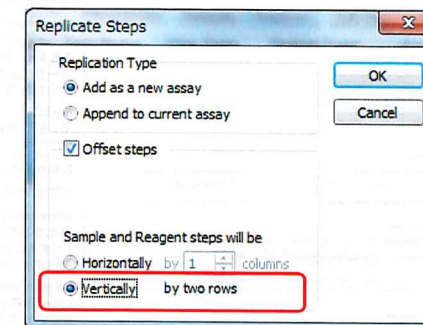
指定した3列のうち
Associationステップのみ
が2ウェルずれて、同assay
中に複製される

ドラッグで3列指定して
「Replicate」を押して
上記のように指定する

タブ② Replicate Steps機能 (K2に関して)

Verticallyについて

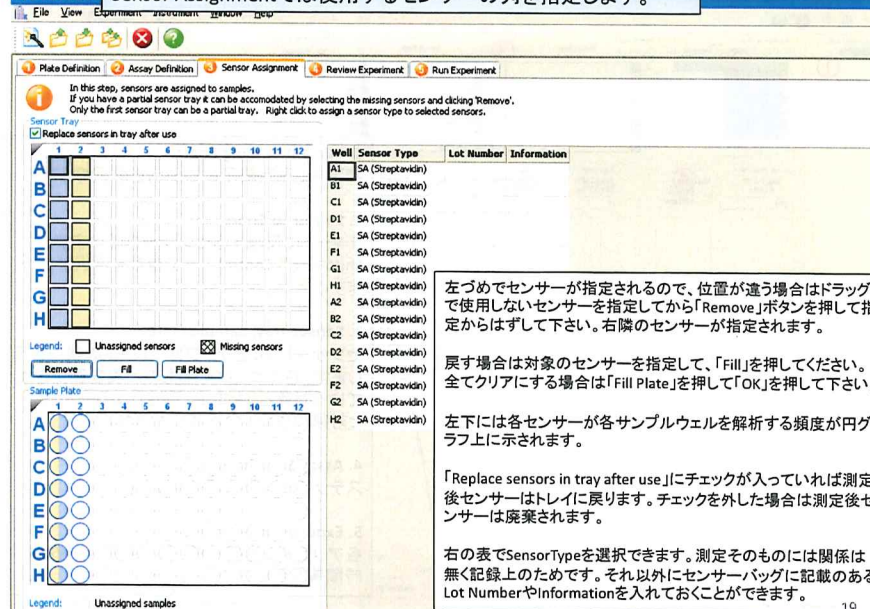
K2のマルチセンサー測定を実行する場合、Assay1でプレート上で最初の2行 (例えばA/B行) の測定Assay Stepを完成させた後に、Assay1全体を選択した後に、右図のようにReplicateにおいて「New Assay」「Vertically」を選択すると、同じ形でC/D行を完成させることが可能です。



18

③ Sensor Assignmentで使用するセンサーを指定する

Sensor Assignmentでは使用するセンサーの列を指定します。



左づめでセンサーが指定されるので、位置が違う場合はドラッグで使わないセンサーを指定してから「Remove」ボタンを押して指定からはずして下さい。右隣のセンサーが指定されます。

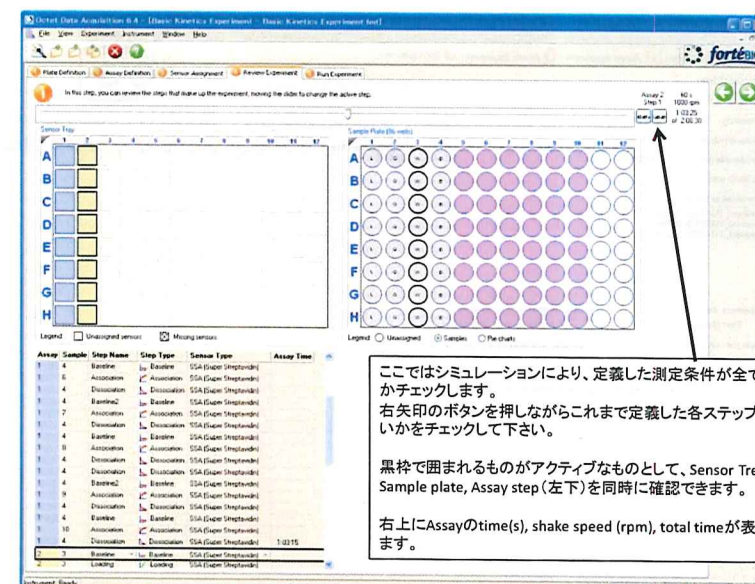
戻す場合は対象のセンサーを指定して、「Fill」を押してください。全てクリアにする場合は「Fill Plate」を押して「OK」を押して下さい。

左下には各センサーが各サンプルウェルを解析する頻度が円グラフ上に示されます。

「Replace sensors in tray after use」にチェックが入っていれば測定後センサーはトレイに戻ります。チェックを外した場合は測定後センサーは廃棄されます。

右の表でSensorTypeを選択できます。測定そのものには関係は無く記録上のためです。それ以外にセンサーバッグに記載のあるLot NumberやInformationを入れておくことができます。

タブ④ Review Experiment 測定順序をチェックする



ここではシミュレーションにより、定義した測定条件が全て正しいかチェックします。
右矢印のボタンを押しながらこれまで定義した各ステップが正しいかを確認して下さい。

黒枠で囲まれるものがアクティブなもので、Sensor Tray, Sample plate, Assay step (左下) を同時に確認できます。

右上にAssayのtime(s), shake speed (rpm), total timeが表示されます。

20

タブ⑤ Run Experimentでデータ保存先と測定中の諸条件を決める。

1. Data File Location and Names

Quantitation data repository: データを保存したいフォルダ先を指定して下さい。
 Experiment run name: 本測定に適切な任意の名前を入力して下さい。測定を開始すると同時に、repositoryで指定したフォルダ内に、この名前がフォルダが自動作成されます。測定や解析に必要な全てのデータがここに自動で保存されます。解析時にデータを探す際もこの名前を参照することになりますので、ある程度測定内容が分かる命名法が推奨です。(ex. 140101_ProA-IgG_Quant)
 さらに下の2項目はバーコード設置とロボット自動化されている場合に必要項目です(通常は使いません)

2. Run setting

測定前や測定中に設定項目です。基本的には全てチェックを入れておいて下さい。
 Delay experiment start: 測定前の待機時間で、プレート内のサンプル溶液の温度の平衡化が目的です。一般的にはStart afterに300~600secを入力して下さい(推奨600sec)。もうすでに温度が平衡化されていると予想される場合や事情によりすぐに測定したい場合はチェックを外して下さい。
 Set plate temperature: 測定時の温度設定です。ウィンドウ右下に表示されているPlate temp (現在の到達温度)と同じかそれ以上の温度を指定して下さい。一般的には30°Cが使用されます。Plate tempの温度が希望する測定温度より高い場合は冒頭の起動後温度設定からやり直して下さい。ただしPlate tempは室温のプラス4°C以上からとなりますのでご注意ください。(ここまでの入力情報を保存したい場合はFile->Save method file as にて、適当な名前を付けて、.fmfファイルにて保存しておいて下さい)

3. Advanced Setting

一般的にはデフォルトで進めてください。
 Acquisition Rateは通常Standardを使用します。測定時データポイントの取得レートを変更するためのもので、取得データの質を微調整できます。「より結合・解離の速い反応を素早くトレース」したい場合は「High concentration, 10Hz」を、「遅い反応を感度良くトレース」したい場合は「High sensitivity, 2.0Hz」を選択するとデータ品質が改善する場合があります。

Octetにセンサーセットとサンプルプレートセットする

測定を開始する前に、センサーセットとサンプルプレートをセットして下さい。

Octetのドアを開けてください。

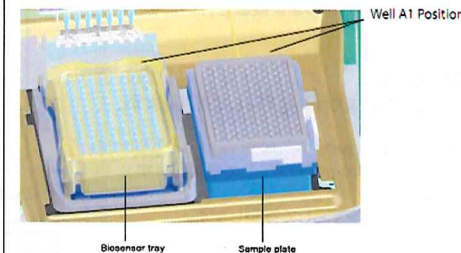
左側の銀色のトレイがセンサーセット、右側の青いプレートの位置がSample plateになります。全て右奥側がA1ポジションとなります。(右下図)

センサーセットはカバーだけを外し、水和用マルチウェルプレートが入ったトレイのままでガイドに従って置いて下さい。

水和用マルチウェルは必ず指定のブラックプレートを使用し、使用するセンサー分の水和溶液が入った状態のままセットして下さい

(センサーをピックアップする時に光源のゼロ点をこのセット内で取得するためです。プレートが無かったり水和溶液が無いとエラーになり測定できません)

Sample plateはしっかりとめ込んで下さい。固定具によりきつめに設定されていますので、プレートが確実にめ込んで、浮いたりしていないか確認して下さい。プレートが浮いてますとセンサーが衝突しエラーになる場合があります(機械そのものは破損しないようにできています)。



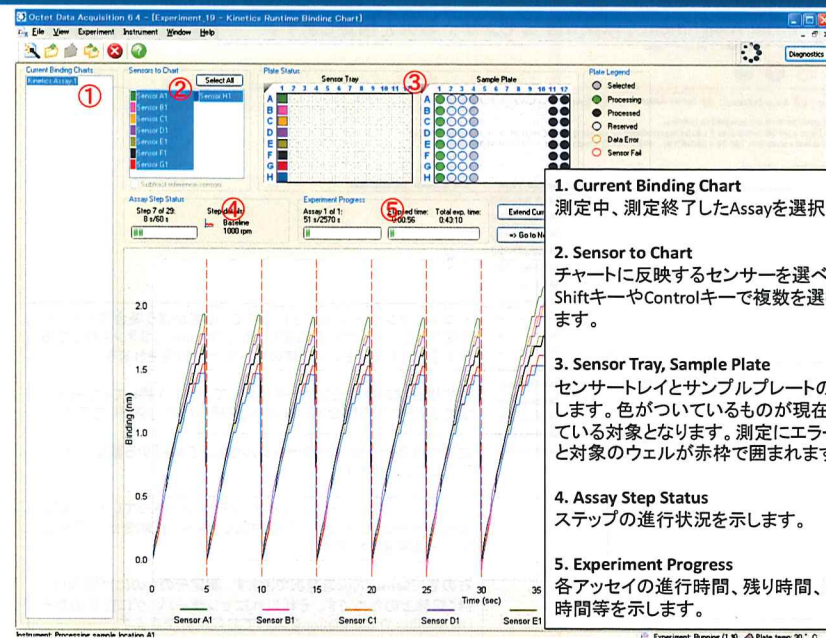
ドアを開けて測定を開始します。測定中はドアを開けないで下さい。(次のページへ)

測定スタート

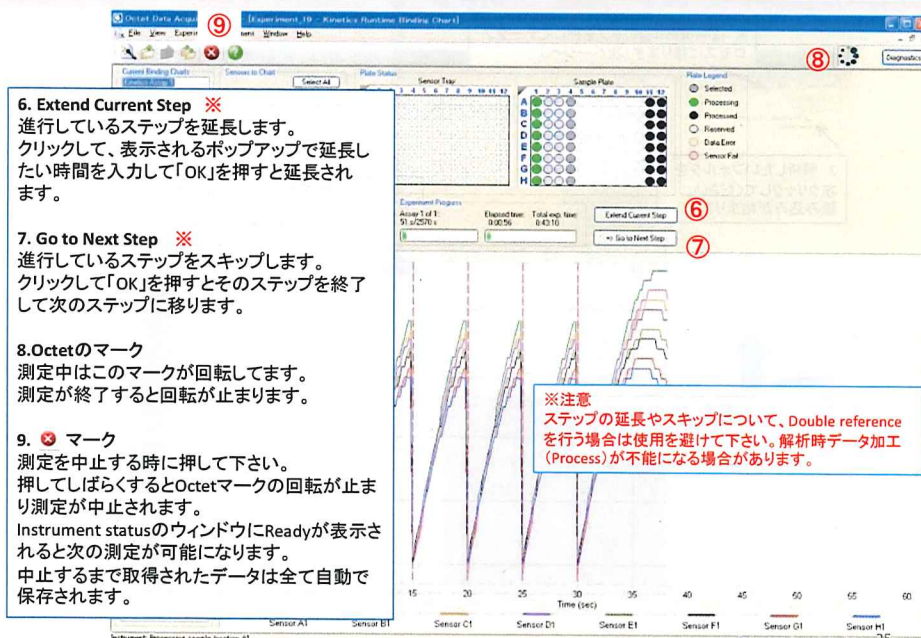
Prior to pressing "Go" confirm the Assay.

Goボタンを押して測定をスタートして下さい

Runtime chartで測定を観測する



Runtime chartで測定を観測する



6. Extend Current Step ✖
進行しているステップを延長します。
クリックして、表示されるポップアップで延長したい時間を入力して「OK」を押すと延長されます。

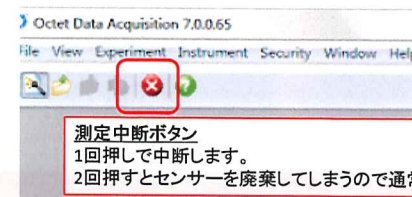
7. Go to Next Step ✖
進行しているステップをスキップします。
クリックして「OK」を押すとそのステップを終了して次のステップに移ります。

8. Octetのマーク
測定中はこのマークが回転しています。
測定が終了すると回転が止まります。

9. マーク
測定を中止する時に押して下さい。
押してしばらくするとOctetマークの回転が止まり測定が中止されます。
Instrument statusのウィンドウにReadyが表示されると次の測定が可能になります。
中止するまで取得されたデータは全て自動で保存されます。

※注意
ステップの延長やスキップについて、Double referenceを行う場合は使用を避けて下さい。解析時データ加工(Process)が不能になる場合があります。

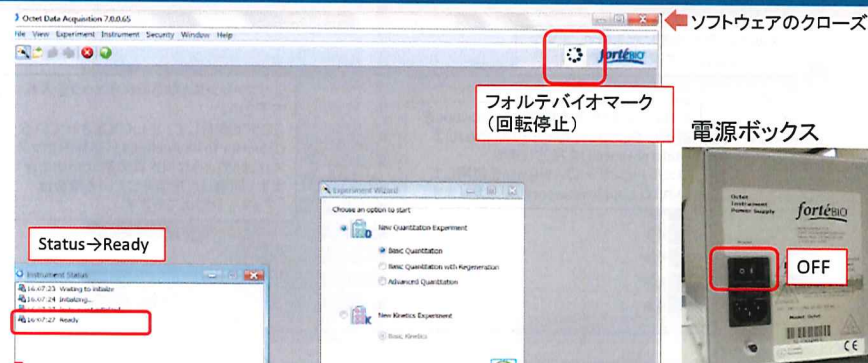
測定中にOctetを中断する



測定中断ボタン
1回押して中断します。
2回押すとセンサーを廃棄してしまうので通常は実行しないで下さい

測定中に、例えば①設定が間違っていたのでやり直したい、②測定エラーが出たので中断したい、③ドアを誤ってあけてしまいデータ取得が中断してしまった、などの理由から中断したい場合にはウィンドウ上部にある (X) ボタンを1回押してください。中断シーケンスが開始されます。1分ほどすると次ページのような「終了」のサインが確認できるので、その後は次ページの終了後手順に従って操作してください。
2回連続で押してしまうとセンサーがセンサーラックに戻らずに、センサーを廃棄ステージ(奥のほうにある)に捨ててしまうのでご注意ください。(再利用ができなくなります)

測定終了後、Octetを終了する



ソフトウェアのクローズ

フォールトバイオマーク (回転停止)

電源ボックス

Status→Ready

上図の赤枠部分の①右上のフォールトバイオマークの回転が止まっている、②左下のStatusに「Ready」が表示されていれば測定が終了しています。
指定したフォルダ内に自動で測定結果が保存されています。ユーザーで特にSaveを行う必要はありません。

Octet本体からサンプルプレートとセンサーラックを取り外して下さい。センサーやサンプルは条件的にOKであれば再利用が可能です。ただしサンプルはトータル2〜3時間を越えていると蒸発量が基準を超えているのでサンプルを作り直して新しいウェル/プレートに調整し直して下さい。

これ以降測定を行わない場合はソフトウェアをクローズして電源ボックスのスイッチをOFFにすることでOctet本体をシャットダウンしてください。24時間(おおよそ)以内に測定を再開するのであればつけ放しでもかまいません。

各測定ファイルの確認方法や再利用

測定終了後に自動保存されるファイルには右のようなものがあります。代表的なものを説明します。

1. .frdファイル:
fortebio-raw-dataの略でOctetのソフトウェアで扱えるデータです。センサーの本数分の.frdが作成されます。
これらのうちどれか一つをAcquisitionソフトにドラッグ & ドロップするとRuntime chart (測定中センサーグラム) を再現して見ることができます。別のアッセイを測定中でも比較して確認することも可能です。

2. .fmfファイル:
Fortebio-method-fileの略で、ユーザーが作成したメソッド情報が保存されています。これをAcquisitionソフトにドラッグ & ドロップすると入力した一通りのメソッドが再構成できます。そのまま再利用したり、変更して応用することができて便利です。

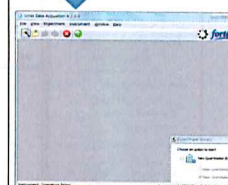
3. 各種Settings ファイル
これらはAnalysisでプロセスや解析実行するとその最後の条件が保存されます。測定後すぐは存在しません。解析状態をクリアにしたい場合にはこれらを消去してください。

※プライムテックに解析やトラブルシュートを依頼する場合などはこのフォルダ全体をZipなどで圧縮してメール等でお送り下さい(秘密保持的にOKであれば)。完全にデータを再現して確認できるのでサポートしやすくなります。

名前

- 171017_001.frd
- 171017_002.frd
- 171017_Assay_1.jpg
- 171017_ExpMethod.fmf
- OctetExperiment.log
- Plate1Definition.jpg
- SensorPlate.jpg
- Settings_DataAnalysis.ini
- Settings_WellInfo.xml

frd/fmfをドラッグ & ドロップ



※複数開いて子ウィンドウが扱いづらくなった場合は「Window」→「Cascade」で整理できます

Octet Data Analysis の使い方

② Processing

タブ②Processingではリファレンスのサブトラクション(差し引き)、Y軸補正、X軸補正スムージングなどを行い、生データを加工して解析可能なデータにまで処理します。

Step1: Data Selection
解析データの選択
入力情報の修正など

Step2: Subtraction
サブトラクションの方式の選択

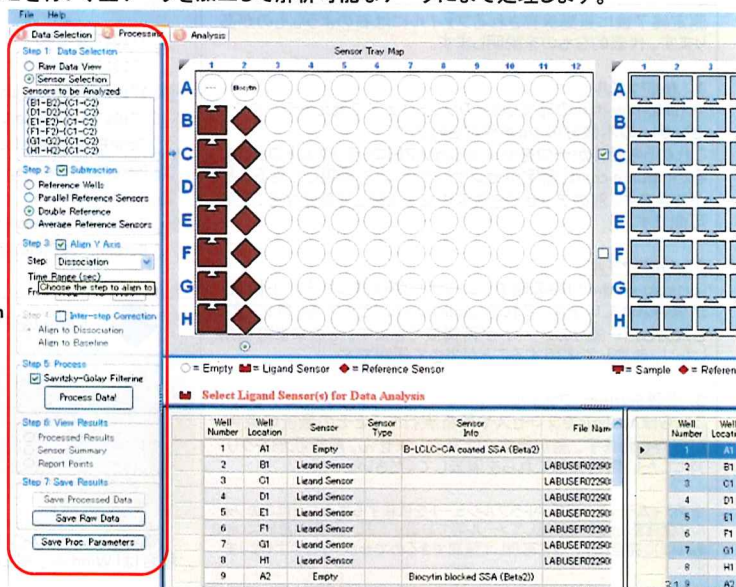
Step3: Align Y axis
Y軸補正
(ステップの選択)

Step4: Inter-step correction
ステップ間ギャップの補正

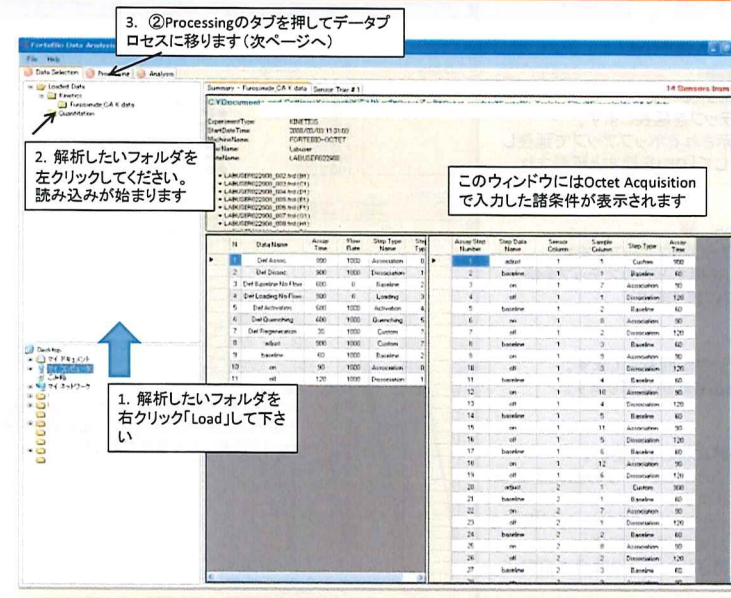
Step5: Process
スムージングの有無と
データプロセスの実行

Step6: View Results
プロセス後データの
詳細表示

Step7: Save results
プロセス後データの
保存



① Data Selection (データの読み込み)



② Processing (センサーとサンプルの定義、Subtractionの定義)

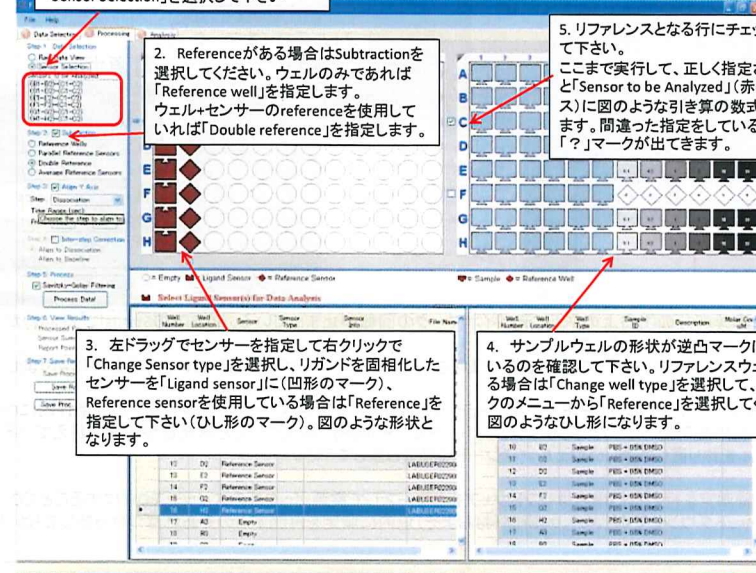
1. RawData表示画面になるので、まず「Sensor Selection」を選択して下さい

2. Referenceがある場合はSubtractionを選択してください。ウェルのみであれば「Reference well」を指定します。ウェル+センサーのreferenceを使用していれば「Double reference」を指定します。

5. リファレンスとなる行にチェックを入れて下さい。ここまで実行して、正しく指定されていると「Sensor to be Analyzed」(赤枠のボックス)に図のような引き算の数式が出てきます。「x」マークが出てきます。

3. 左ドラッグでセンサーを指定して右クリックで「Change Sensor type」を選択し、リガンドを固相化したセンサーを「Ligand sensor」に(凹形のマーク)、Reference sensorを使用している場合は「Reference」を指定して下さい(凸形のマーク)。図のような形状となります。

4. サンプルウェルの形状が凸凹マークになっているのを確認して下さい。リファレンスウェルがある場合は「Change well type」を選択して、右クリックのメニューから「Reference」を選択してください。図のような凸凹形状になります。



② Processing (Subtraction、Alignの定義とデータプロセスの開始)

もし解析対象にしたいセンサーの一部に限定したい場合はクリック&ドラッグで指定した後に「Select sensor for analysis」を選ぶことが可能です

1. Align Y Axis:
センサーグラム間のY軸のずれを補正します。Align Y Axisにチェックを入れて、基本的には「Baseline」を指定してください。後半の1秒〜5秒が適当です。対象時間は必要に応じて変更することができます。内容によってはAssociation (0.0 - 0.0sec)なども活用できます。

2. Process
一般的にはFilteringを使用します。Filteringを使用しない場合はチェックを外して下さい。
「Process Data」をクリックすると、指定したパラメーターによるデータのプロセスが開始されます。(次のページへ)

3. Inter-step Correction:
バッファショックなどによるステップ間のギャップを補正できます
Align to Association:
Dissociationの開始点をAssociationの終点に合わせる形でギャップを補正します。Align Yで「Association」を使用している場合に効果的です。
Align to Dissociation:
Associationの終点をDissociationの開始点に合わせる形でギャップを補正します。Align Yで「Baseline」を使用している場合に効果的です。
Align to Baseline:
Associationの開始点をBaselineの終点に合わせる形でギャップを補正します。Align Yで「Baseline」を使用している場合に効果的です。

33

② Processing (データプロセス)

しばらくすると、プロセス後のセンサーグラムが表示されます。この状態で各プロセスのセンサーグラムを確認できます。プロセス結果に問題が無ければ③Analysisのタブをクリックして次のステップに移行して下さい。

Raw Data

Subtracted

Align Y

Align X
(このデータをカーブフィッティングに適用します)

34

③ Analysis (カーブフィッティングと定数の算出)

1. Step to Analyze:
解析対象となるステップを選択して下さい。一般的にはAssociation and Dissociationを使用します。
Association Only: Kobs(見かけの結合定数)を計算します。解離速度が考慮されません。
Dissociation Only: Kdisのみを計算します
Association and Dissociation: Kobs, Kon, Kdis, KDを計算します

2. Model:
フィッティングモデルは基本的に「1:1」を選択します。リガンドがヘテロ2価性があり、2:1で相互作用することが分かっている場合は「2:1」を選択します。マストランスポート効果が生じている場合は「Mass Transport」が有効です。アナライトが2価(抗体など)の場合は1:2(bivalent)が使用できます。

35

③ Analysis (カーブフィッティングと定数の算出)

3. Fitting:
Local:
1つのセンサーグラムに対しFittingを行います。測定濃度が適切であればおおむね正しい結果が得られます。
Full: 解離曲線がAssociation前のBaselineに到達すると仮定して計算します(通常はこちらをご使用下さい)
Partial: baselineに依存せずに計算します
Global:
グループ分けに従って複数のセンサーグラムをまとめて同時にfittingを行います。希釈系列を解析するためLocal解析よりも正確なKD値を求めることが可能です。1つのグループに対し計算される各定数は1つになります(2:1, mass-transport, 1:2では2種類の各定数が計算されます)
Sensor: 1つのセンサーが同一サンプルかつ複数濃度を測定している場合に選択します。センサーによるグルーピングです。
color: ウィンドウ右下の表で色分けされた同一色のサンプルを1グループとして計算します。色によるグルーピングです。解析実行前にサンプルの色を付けて下さい。(3ページ後の(表の編集)を参考して下さい)
Rmax Linked: リガンドが全て均一(Rmaxが一致する)と仮定して計算します。一般的に、再生が最適化されたマルチサイクル解析などに適用します。
Rmax Unlinked By: リガンドが不均一(Rmaxが一致しない)と仮定して計算します。一般的にマルチセンサー解析に適用します。
Sensor: センサー間で不均一であるとして計算します。マルチセンサー解析ではこちらをお使い下さい。
Compound: サンプル毎に不均一であるとして計算します。マルチサイクル解析の際、時間による変化、再生不適当などが考えられる場合に使用します。

※上記の用語や解析方法については、最後の方の、「各種用語の説明、実際の測定方法について」をご参考下さい。

36

③ Analysis (カーブフィッティングと定数の算出)



5. Window of Interest

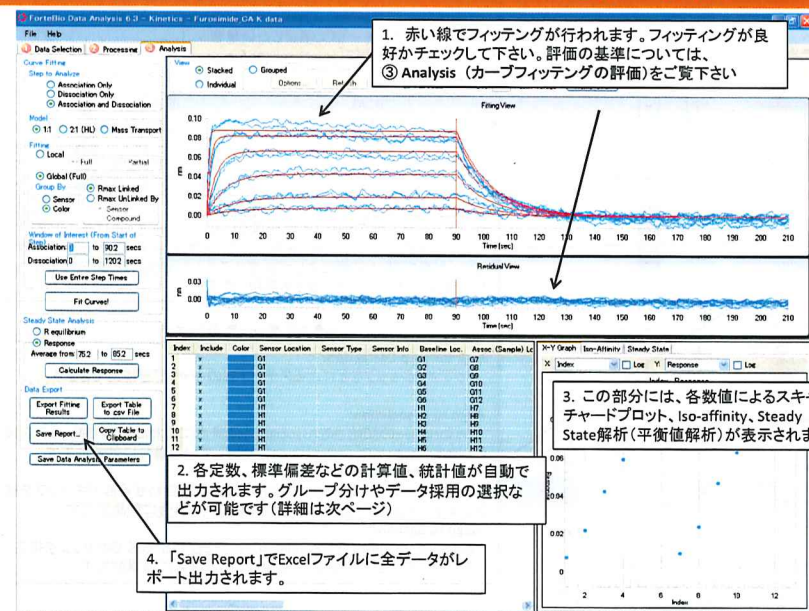
Step内で解析対象となるデータを区切る場合に使用します。fittingの対象したい区間を秒数を入力することで指定してください。特に指定しなければ全範囲が解析対象になります。
Use Entire Step Timesで全範囲指定にできます

6. Fit Curves!

このボタンを押すことでこれまでの定義によるカーブフィッティングが始まり、自動的に各定数が出力されます

37

③ Analysis (カーブフィッティングと定数の算出)



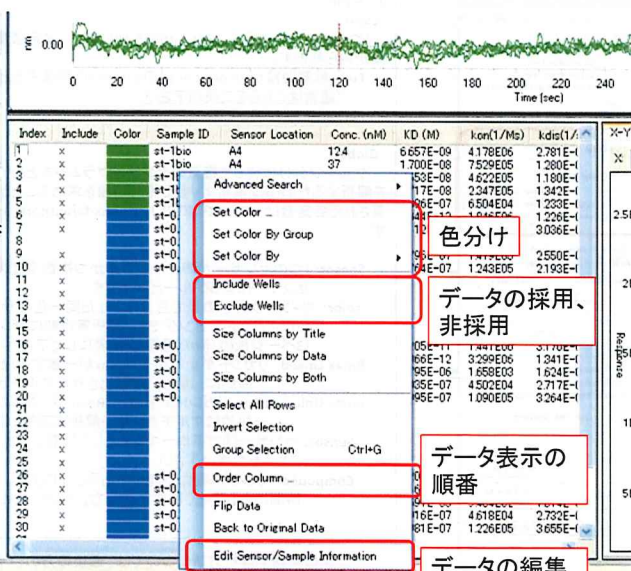
38

③ Analysis (表の編集)

表の上で左クリックでサンプルを指定した後、右クリックを押すことでポップアップが表示されます

ここで、色分け、Include、Exclude、項目の並べ替え、サンプル情報の編集などが行えます。

詳細は英文マニュアルをご参照下さい



39

③ Analysis (カーブフィッティングの評価)

SPRやQCMなどと同様、カーブフィッティングが良好かどうかというのは、いくつかの要素で総合的に評価します。評価は経験則や研究者が閾値をどこに設定するかによって大きく変わります。下記説明を参考として下さい。

1. 見た目:

センサーグラムとカーブフィッティングが見目でフィットしているかどうかを評価します。

2. 残差プロット(Residual):

センサーグラムの値からカーブフィッティングの値を差し引いたプロットです。このプロットが見目でランダムかつゼロに近いことが理想とされます。系統的变化(関数的な変化)が見られたりゼロから大きく離れているとフィッティングが不良と考えられます。

3. Full R²値:

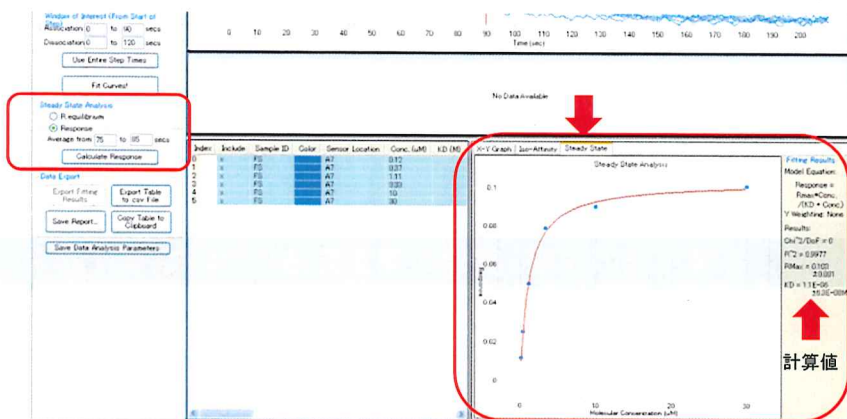
一般的な最小2乗法のR²と同じであり、1に近いとフィッティングが良好となります。Octetでは0.95以上であれば良好と考えられます。

4. Full χ^2 値(カイ2乗値):

一般的なカイ2乗と同じであり、0に近いほどフィッティングが良好となります。理想的にはS/Nと等しくなります(0.01付近)。Octetでは3以下であればある程度良いフィッティングと考えられます。

40

③ Analysis (Steady State解析)



Steady State解析 (平衡値解析):

定常状態解析、平衡値解析と呼ばれる解析です。結合相の値のエンドポイント解析になります。

カーブフィッティングにより得られた「R equilibrium」もしくは生データの「Response」(この場合は平均値を得るデータの時間を範囲指定します)を濃度ごとにプロットしカーブフィッティングによりKD値を計算します。結合もしくは解離が急激すぎてリアルタイムのカーブフィッティングができない場合(いわゆる「箱型」のセンサーグラム)などにこの解析を用います。この解析を行う時の結合相は平衡に達している(プラトーになっている)必要があります。

41

③ Analysis (グラフ表示方法、Group表示)

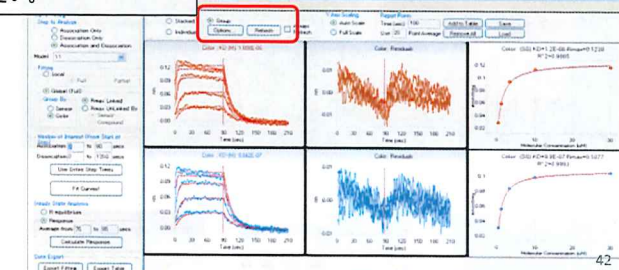
Group:

複数のデータを同時に解析したり、センサーグラム以外のグラフ(残差プロット、Steady state graphなど)がある場合、グラフを見やすくまとめて表示する方法です。

ウィンドウ上部にある「Group」をクリックすると右のようなポップアップが表示されます。

どの要素によってまとめるか(Grouped By)、何を表示するか(Additional Graphs)、色分けや「Incrude, exclude」を反映するか(Data options)、グラフの大きさ(Graph size)等を指定、選択し「OK」を押すと下図のように分類されて見やすく表示することができます。Excel reportに反映されます。

詳細は英文マニュアルを参照下さい。



42

③ Analysis (出力項目の説明)

項目	説明
Index	センサーの順番に従ったナンバリングです。データソートに利用します
Incrude	"x"マークがつけられたものを解析します。このマークがついていないものは解析対象になりません
Color	センサーグラムの色分けを示します。Global fittingのグルーピングにも利用されます
Sensor	センサートレイ上のセンサーの位置を示します
Sensor type	Acquisitionで定義したセンサーの種類を表示します
Sensor Info	Acquisitionで定義したセンサー情報を表示します
Assoc.(Sample) Loc.	サンプルウェルの位置を表示します
Sample ID	Acquisitionで定義したサンプル名を表示します
Conc. (nM)	Association stepで使用されたサンプルの濃度を示します
Response	Steady State解析(平衡値解析)で入力された区間のレスポンスを表示します
KD(M)	解離定数を表示します
Kon (1/Ms)	結合速度定数を表示します
Kon Error	結合速度定数の標準偏差を表示します
Kdis (1/s)	解離速度定数を表示します
Kdis Error	解離速度定数の標準偏差を表示します
Rmax	フィッティングカーブから予想されるRmax(最大結含量)を表示します

43

③ Analysis (出力項目の説明)

項目	説明
Rmax Error	Rmaxの標準偏差を表示します
Kobs	見かけの結合速度定数を表示します
Km	マストランSPORT速度定数を表示します
Km Error	マストランSPORT速度定数の標準偏差を表示します
Req	Steady State解析で入力された区間の平衡状態レスポンスを表示します
Req / Rmax (%)	Rmaxに対するReqの比を表示します
Full X ²	カイ2乗値を示します。カーブフィットの統計的な正しさの指標になります。ゼロに近いほどフィッティングが良好であることとなります
Full R ²	R2乗値を示します。カーブフィットの統計的な正しさの指標になります。1に近いほどフィッティングが良好であることとなります
Cycle	センサーの再生回数を表示します

44

最新のテクニカルノートや論文情報をホームページで確認できます。LEARNINGやBIOPHARM PORTALをご利用下さい。
PDFのダウンロードや詳細を閲覧するには登録が必要です(無料)。ご活用下さい。



Events **Webinars**

(GTP Management) NIH Research Festival Exhibit
2014-Sep-23 to 2014-Sep-24

CHI Discovery on Targets
2014-Oct-08 to 2014-Oct-10

SEASR 2014 Conference
2014-Oct-09 to 2014-Oct-11

HCP Analysis
96 SAMPLES*
5%-10% CVs
6.5 Minutes



NEW Application Note 16

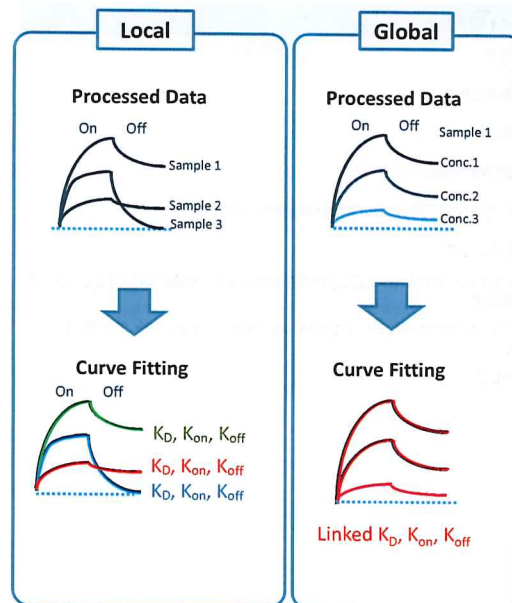
Quick Links
Support Center
Contact Us

45

各種用語の説明、実際の測定方法について

46

Local fitting と Global fitting



一般的なリアルタイムカインティクスでは、アナライトのOn/Offのみに加工されたデータ(Processed Data)に対し、数式モデルによるカーブフィッティングを行うことで結合速度定数(K_{on})、解離速度定数(K_{off})、解離定数(K_D)を算出する。

左図のように、サンプル1種類当たり1濃度のみで個別の定数を求めるものをLocal fittingによる解析、あるサンプルの希釈系列全体を充足する1つの定数を求めるものをGlobal fittingによる解析と呼ぶ。

Local解析は、測定がしやすく計算が単純なため結果が得られやすい反面、濃度が不適切な(高すぎる、低すぎる)場合は正しい速度定数とならない。そのため、Globalのための条件検討やサンプル・センサーが限定されている場合に用いることが多く、参考データとして扱うことが多い。ただしLocalでも論文データとして掲載することもある。

理想的には、Global解析により定数を求める。ただし、ダイナミックレンジをカバーした適切な希釈系列の設定が要求される。一般的には、 K_D 値のmolarを中央に置いた10倍から1/10濃度までの系列を4~6点測定することが必要となる。

47

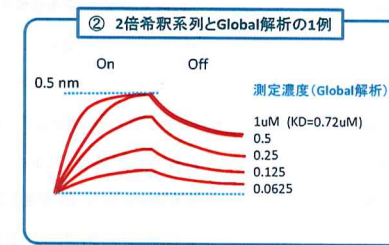
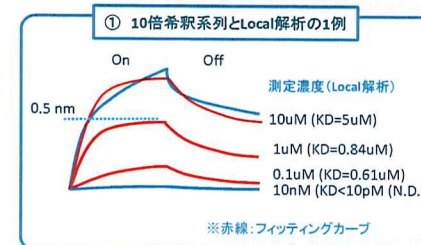
Local 解析と Global 解析の使い方

一般的な手順として、 K_D 値がまったく不明な場合は、できるだけ幅広く条件検討を行うため、10倍希釈系列を4~6点作成しLocal解析を行い「 K_D 値のあたり」をつけてから、その予想 K_D 値の示す濃度の10倍程度からスタートし、4~6段2~3倍希釈系列をGlobal解析して最終的なデータを得る。

1例として、下記の①のようなLocal解析の場合は0.1~1uM濃度の範囲での測定が最適と考えられる。この例の場合、10uM濃度測定のように高すぎる濃度での測定では非特異結合などの副次的な結合が生じセンサーグラムが2相的であり、1:1modelのカーブフィッティングが大きくずれることが多い(2:1だとフィットしやすい)。標的が1:1結合であるならば、これは不適切であり、この濃度ではあまり解析に向いていない(例外もある)。一方、10nM測定ではシグナルが無く、 K_D も計算できていない。

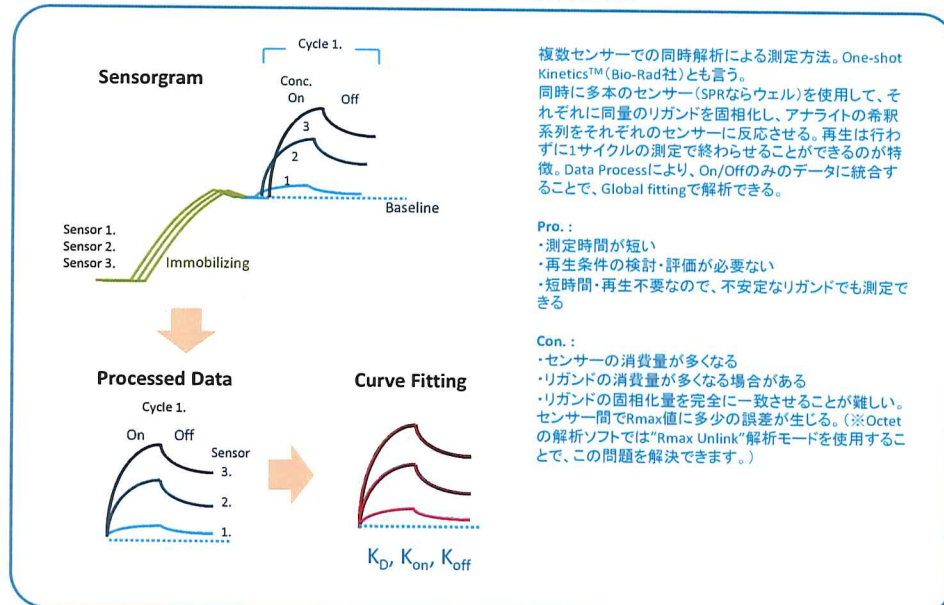
1uMと0.1uM濃度測定では見た目も1:1らしく、フィットも良好で、測定結果もお互いに近い値が出ているので、この付近の濃度での測定が適切であると判断できる。この時点で K_D 値を0.61~0.84uMと結論してもかまわない。

さらに詳細な解析を行うため、Local解析から判断し、(1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 uM)濃度の5点を測定した場合、理想的には②のようなGlobalではグループ分けでまとめられたデータを対象に唯一の K_D 値が出るように解析されるため、この例では、5つのデータから1つの K_D 値が算出される。また、この例のように、高い濃度の系列はプラトーになり飽和する傾向を示し、低濃度の系列は徐々にレスポンスが低く出ているような、ダイナミックレンジを通して分散した希釈系列が理想的とされる。これが、飽和側ばかりに詰まっていたり、逆に飽和が無い立ち上がりレンジのデータのみだと、厳密に言えば不十分なGlobal解析とされる。しかしながら、実際問題としてそこまで理想的に設定するのは難しく、単純でない性質のサンプルも存在するため、論文においても上記理想条件を完全に満たしていないデータでも許容されることが多い。



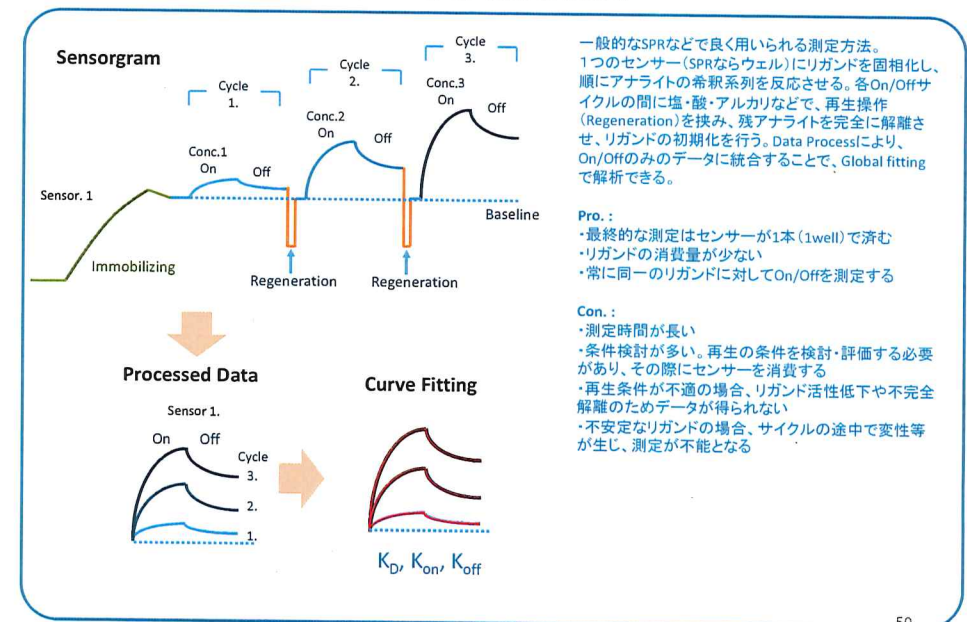
48

Multi Sensor Kinetics (マルチセンサーカインेटクス) (Octetが得意とする解析方法)



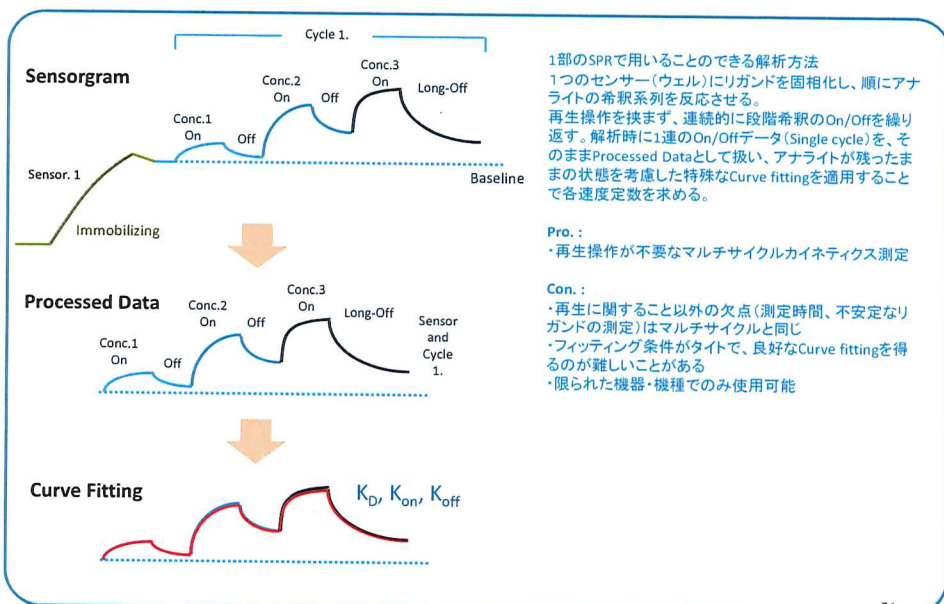
49

Multi Cycle Kinetics (マルチサイクルカインेटクス) (Octetで実行可能な解析方法)



50

Single Cycle Kinetics (シングルサイクルカインेटクス) (Octetでは不可能な解析方法)



51



プライムテック(株)
ライフサイエンス事業部
TEL: 03-3816-0851 FAX: 03-3814-5080

研究支援部 e-mail: application@primetech.co.jp
もしくは各担当者のe-mailまで、

お気軽にお問い合わせ下さい

52

