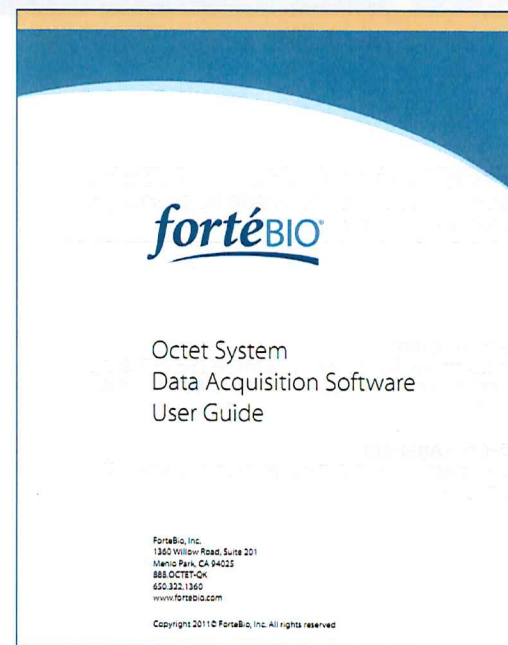




fortéBIO
A Division of Pall Life Sciences

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)

測定原理

BIOSENSORS

Dip and Read Assays

BLITZ uses FortéBio's Dip and Read™ label-free assays. These direct binding assays take place on a disposable biosensor made from a biocompatible matrix that is uniform, non-denaturing and minimizes non-specific binding (figure 2-2). Only molecules that bind directly to the biosensor surface are detected, providing exceptional specificity for individual applications, even in crude media.

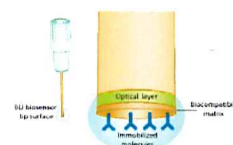


Figure 2-2: Dip and Read Assays

BLI Technology

The BLI (bio-layer interferometry) technology (figure 2-3) used by the BLITZ system provides real-time data on protein interactions. The BLITZ system emits white light down the biosensor, and then collects any light reflected back. Reflected wavelengths are affected by the thickness of the coating on the optical layer. Some wavelengths show constructive interference (blue), others show destructive interference (red).

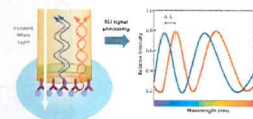


Figure 2-3: BLI Technology—Displaying Constructive and Destructive Interference

This interference is captured by a spectrometer as a unique spectral signature and is reported in relative intensity units (nm). Any change in the number of molecules bound to the biosensor causes a shift in the interference pattern that is measured in real time. This wavelength shift is a direct measure of the change in optical thickness (nm) of the biological layer.

バイオレイヤー干渉法 (bio-layer interferometry, BLI法)

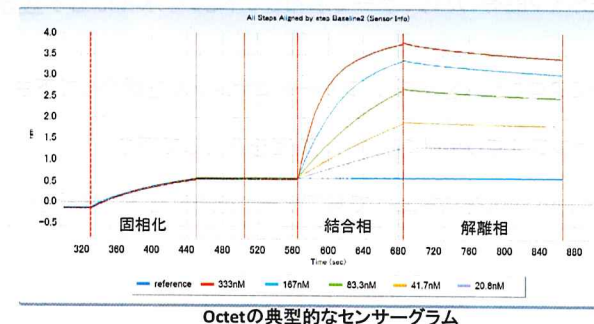
ガラスファイバー先端の薄層で起こる光の干渉をシグナルとして利用する技術です。センサー先端の表面には屈折率の異なるSiO₂とTa₂O₅のサンドイッチ層 (Optical layer) が形成されており、その先にストレプトアビジン、Ni-NTA等の生体適合層が形成されています (左図)。ここにハロゲンの白色光を照射すると各屈折面ごとに光の透過と反射が生じ、各波長によって位相シフトの異なる (強度の異なる) 反射光が取得されます。スペクトロメーターにより、波長ごとの光強度を縦軸にとると、右図のグラフの青線のような2つのピークが得られます。生体分子間に相互作用が生じ厚みが増加することにより、波長ごとの位相シフトは変化し、一般的にグラフの赤線のようにピークが右側に移動する傾向にあります。ここでのピークの差分 (Δλ) を縦軸にとり経時的に測定することで、いわゆるセンサーグラムが取得できます。Octetではこのセンサーグラムをデータとし、解析に用いています。

測定原理

Octetのセンサーグラムの縦軸は前述のようにスペクトルピークΔλを表していますので、nm (ナノメートル) という単位を与えています。この強度はセンサー先端の厚み (距離)、分子の密度、分子の屈折率 (refractive index) を掛けた、いわゆる光路長 (optical path length) に比例します。

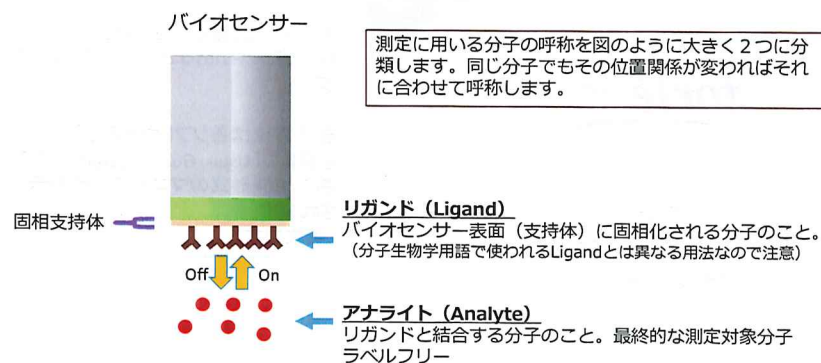
そのため質量と比例する表面プラズモン共鳴 (SPR) 法の強度とは単純に比較できませんが、およそ1nm (BLI) = 1000RU (SPR)程度と考えられています。どちらの原理も、1種類の分子の結合・解離から生じる相対的な経時レスポンスをデータとしていますので、例えばBLIのデータをSPRの解析ソフトで解析することも可能です。

この原理は、現在、査読論文においてもbio-layer interferometryという名前で採用されています。古くはRifS (反射型干渉分光法、Reflectometric interference spectroscopy) という名称で説明されていました。実際現在においてもほぼ同様のシステムで使われています。



Octetの典型的なセンサーグラム

用語の定義



5

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、測定アッセイステップの作成、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では定量値や統計値を、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台 28V

測定の準備と流れ

1. Octet本体とPCを立ち上げ、Data Acquisitionを立ち上げて下さい。3分程度で装置の初期化が始まり「Instrument Status」に「Ready」が表示されると使用可能状態になり、温度調節が設定温度になります。(5分経過しても初期化が始まらない場合はPCを再起動して下さい)。装置平衡化のためにこの状態にしてから、1時間後以降に測定を開始して下さい
2. センサーを水やPBS等のバッファーで水和して下さい。水和は必ず10分以上行ってください
3. Acquisitionでプログラムを作成し、プレートにサンプルを調整して下さい
4. センサー、サンプルをOctetにセットし、測定を開始して下さい
5. 測定終了後、Analysisを立ち上げて測定データを読み込み、解析を行います。

1時間

48時間以内

Octet電源



右、後ろ下

Octet本体の横に置いてある小さなボックスが電源ボックスです。電圧・電流等を調節しています。背面にスイッチがあるのでこれによりOctetをOn/Offが可能です。

電源ボックスは起動中に熱くなります。上にセンサーバッグやサンプルなど熱に弱いものを置かないようにご注意ください。

7

8

センサーの取り扱い



Octetのセンサーは「センサーセット」内に96本入っており密封式アルミバッグで保存されています。初めて使用する時はアルミバッグの端を切り取り、チャックを開けてセンサーセットを取り出して下さい。

センサーセットのカバーはカバーロックの取っ手を引き上げることでロックが外れます。カバーを取り付ける時はカバー固定爪(2ヶ所)を青いトレイの穴に掛けてから、カバーロック側を「カチッ」というロック音がするまで押し込んで下さい。ロックされていればカバーを引き上げても外れなくなり、センサーセットが安全に固定されます。

使用しないセンサーは必ず乾燥した状態で保存して下さい。

一般的に使用しないセンサーはセット内に保存します。センサーセットのカバーをしっかりと取り付けアルミバッグの中に乾燥剤と一緒に入れ、バッグのチャックをしっかりと閉めて密封状態で保存します。

結露による劣化を避けるため4℃保存などは避けて、常温で保存して下さい。

4℃はダメ。

センサーセットの構造

センサーセットの構造

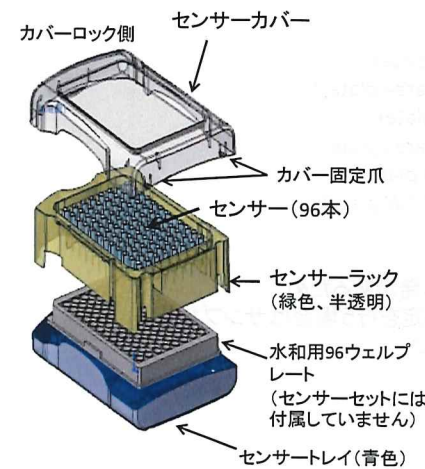
センサーカバー:
センサーセット全体を安全に固定します。保存時は必ずカバーを取り付けロック状態にして下さい。ロックが不完全だと落下などでセンサーを損傷する場合があります。

センサーラック:
センサーセット内やOctet内でセンサーを所定の位置に固定するためのラックです。間違った方向に入らないようにカバーロック側に丸い凹みがあり固定爪側に2ヶ所の切り込みがあります。丸い凹み側がマルチウェルプレートの第1列に当たります。Acquisitionでもこの様式でプログラムを行います。
センサーはラックに入っていれば先端がラック下端より上部にくるので、ラックごと平らな場所に置くことが可能です。

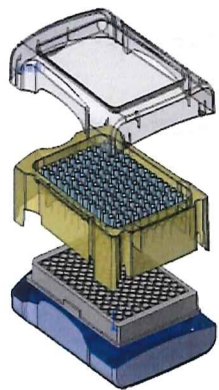
センサー:
プラスチック部とガラスファイバー部で構成されています。

水和用96ウェルプレート
Octetで使用するブラックウェルプレートを使用して下さい。

センサートレイ:
センサーセットのラックとカバーを所定の位置に固定します。センサー水和時などは、センサートレイの丸い凹み側にある「プレート固定フック」に、プレートA1-well底側の爪を差し込むことでプレートを所定の位置に固定できます。その上からラックをかぶせることでセンサーを各ウェル内の正しい位置、高さに固定できます。ウェルに200μlの溶液が入っていれば先端を溶液中に浸すことができます。



センサーの水和方法



センサーを使用する際は96wellブラックプレートを使いバッファー等による水和を行ってください。Octetに導入する時は必ず水和バッファーの入ったブラックプレートと一緒にセンサーをセットして下さい(測定開始時に光源の調整をこのセット内で行うので必ずブラックプレートを使用します)

空のセンサーセットをもう一つ用意し、それにバッファーを入れた96wellプレートをセットして使用するセンサーだけを移し替えることで水和ができます。バッファーは200μl入れて下さい

センサーはプラスチック部分を指でつまんで移し替えます。ガラス部分には触れないで下さい。センサーを移し替える際はセンサーの先端をラックなどに強く当てないように気をつけて下さい。先端を損傷すると測定に使用できなくなります。

一度に大量のセンサーを移し替えるには専用の「バイオセンサーディスペンサー」が便利です(別売り: #18-5016)

マイクロプレートについて

Octet RED96/ K2 / QKeでは以下のプレートを使用します。

・96-well, ブラック、フラット底のマイクロプレート(グライナー社#655209)

※QKeではグライナー社#675076のハーフエリアプレートも使用可能です。RED96, K2モデルにおいても使用可能ですが、メーカーでは測定値を保証しません

Octet RED384/QK384では以下のプレートを使用します。

・96-well, ブラック、フラット底のマイクロプレート(グライナー社#655209)

・96-well, ハーフエリア、ブラック、フラット底のマイクロプレート(グライナー社#675076)

・384-well, ブラック、フラット底のマイクロプレート(グライナー社#781209)

・384-well, ブラック、傾斜底のマイクロプレート

(384 well TW plate: ForteBio社#18-5076、#18-5080: SBS規格準拠)

※プレートは一般的にポリプロピレン製とポリスチレン製があります。ポリスチレンはタンパク質の非特異吸着が起き易いと考えられるので、使用する際はBSAや血清などのブロッキング剤の使用が必要な場合があります。

サンプル量と測定時間

使用可能なサンプル量の範囲:

QKe, RED96, K2:	180 – 220 µl	(96 well plate)
	80ul -160ul	(96 half area plate)
QK384, RED384:	180 – 300 µl	(96 well plate)
	80ul -160ul	(96 half area plate)
	80 – 130 µl	(384 well plate)
	40 – 100 µl	(384 well TW plate)

測定可能時間: 約3時間(サンプルの蒸発があるため)
2時間以上の長時間測定を行う場合はサンプル量を多い方で設定して下さい

2~3時間
10%蒸発
長時間なら
220ml推奨

センサーの水和後保存方法

一度水和したセンサーもしくは使用したセンサーでも、失活していなければ15%スクロースで固定化して再保存が可能です。

保存方法:

15%スクロース(in PBS, water, など)を用意する

↓
センサーラックとマルチウェルプレートを利用して1分間センサー先端をスクロース溶液に浸す

↓
プレートを取り除き15分間放置し乾燥させる。

↓
乾燥剤とともにアルミバッグに入れ室温で保存する。

一般的に上記手法で数日間~1ヶ月程度保存可能です。
ただし耐久性はリガンドに依存しますので必ずバリデーションを行って保存期間を設定してください。

PCRチューブを使ったセンサーのオフライン処理



左図のようにセンサーはPCRチューブにも適合しており、1mm程度先端を浮かせた形でセンサーを保持できます。

この仕組みを利用すればOctetを使用しなくても、少量(10ul-15ul)の容量で、装置外での操作(オフライン操作と言います)によるセンサーへの分子固相化が可能です。StreptAvidinやNi-NTAのように単純にリガンド溶液に浸すだけで固相化が進行する系であれば応用可能です。

ただし、オフラインであるため固相化量の調節は難しく、モニターもできません。長時間(例えば30分~オーバーナイト)放置により最大量固相化しても良い系で効果的です。

Octet 96タイプのクリーニング

使用している間にステージやセンサーに汚れが付いてきますので、週に1回程度の頻度で以下の要領に従ってクリーニングを行ってください。

1. Octet本体の電源をOFFにして、ドアを開けてください。
2. 30-60%のイソプロピルアルコール(他の消毒用アルコール可)をキムワイプに湿らせて下さい。
3. 下図のSample PlatformとBiosensor Platformを拭いてください。
4. 8本の金属製のbiosensor Pickup Tipsの先端部分を軽く押し当てる感じで汚れを拭き取ってください。
5. 1分ほど放置して乾かして下さい。クリーニングは終了です。測定を始めることができます。

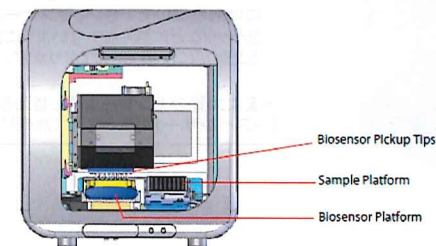
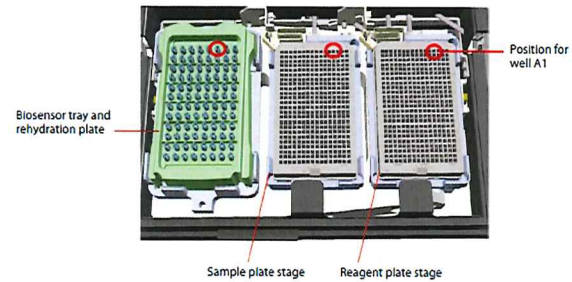


Figure 9-1: Octet Instrument

Octet 384タイプのクリーニング1

使用している間にステージやセンサーに汚れが付いてきますので、週に1回程度の頻度で以下の要領に従ってクリーニングを行ってください。

1. ステージをPresentにして、下図のようにステージが出ている状態にして電源を落として下さい
2. 30-60%のイソプロピルアルコール(他の消毒用アルコール可)をキムワイプに湿らせて下さい。
3. 下図からプレートを除いた状態にして、アルコールで2つのステージを拭いてください
4. 1分以上放置して、アルコールを蒸発させて下さい



Octet 384タイプのクリーニング2

5. ステージをPresent状態にして電源を落としたまま、下図のように側面パネルを取り外して下さい
6. 下方から覗き込むと下図のように16本の金属製のセンサー(biosensor pickup tips)が見えますので、先ほどと同様にアルコールを使い、優しくセンサーの先端を拭いてください。
7. 1分ほど乾かしてアルコールを飛ばして下さい。
8. 側面パネルを取り付けたらクリーニング終了です。電源を付けて測定することができます。

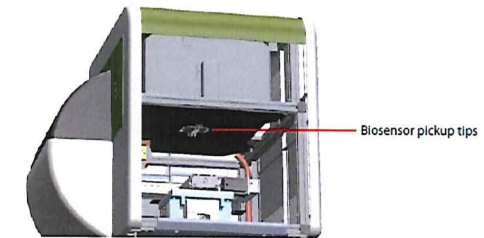


Figure 9-5: Octet Instrument Side Panel Removed

1921

1922

1923