

저분자화합물(small compound)에 사용하는 버퍼와 샘플 준비

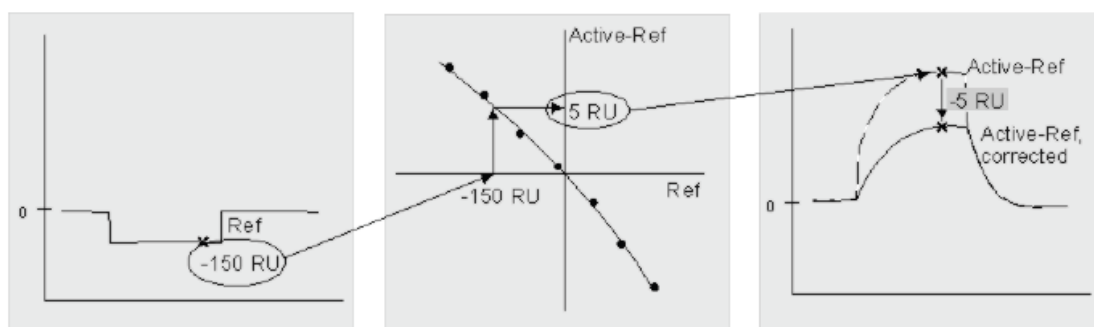
Solvent Correction Curve를 적용해야 하는 이유

Small compound를 analyte로 사용하는 실험의 경우 compound의 solubility를 높이기 위해 버퍼에 DMSO를 첨가합니다. DMSO의 경우 1%가 1,200 RU정도의 signal을 가지게 되며 보통 5% DMSO를 첨가한 버퍼를 사용한다고 하면 6,000 RU의 signal이 buffer만의 signal이 됩니다. 이는 단순히 reference cell을 빼주는 것만으로는 정확한 data를 얻을 수가 없습니다.

그래서 이때, 버퍼에 사용하는 DMSO %의 앞뒤 % 를 사용해서 Standard solution을 만들고 reference cell과 ligand가 고정화 되어 있는 cell에 흘려 각각의 RU값을 측정합니다.

예를 들어 5% DMSO가 들어있는 버퍼를 사용하는 경우에 4.5%~5.8% 의 8 points solution을 만들어서 각 cell에 흘려 보내주고 RU를 측정합니다.

이때, reference에 흘려주는 RU에 해당되는 Active-Ref. 값을 확인한 후 보정을 하면 실제 ligand와 LMW가 Binding된 RU를 확인 할 수가 있습니다. (아래 그림 참고)



Solvent Correction Curve를 적용하는 실험 방법

1. Stack phosphate buffer를 준비합니다.

→ Assay에 사용되는 특별한 buffer가 아니라면 10mM or 50mM phosphate buffer 사용을 권장합니다.

2. 2L 1.05X PBS Buffer(with 0.05% P20)를 준비합니다.

→ 210ml 10X stock, 1,780ml DW and 10ml P20를 넣고 잘 섞어 줍니다.

이 buffer는 Immobilization, solvent correction stock solutions, assay running buffer and samples 단계에 사용됩니다.

3. Solvent correction stock solutions 과 assay running buffer를 준비합니다.

→ 일반적으로 5% DMSO가 포함되어 있는 running buffer를 많이 사용을 하며, 사용하는 compound의 solubility에 따라 DMSO의 %는 조절 할 수 있습니다. 단 10% 이상은 사용하지 못합니다.

	4.5% DMSO	5.8% DMSO	5.0% DMSO Running buffer
1.05 PBS(P20)	9.50 ml	9.50 ml	950 ml
100% DMSO	0.45 ml	0.58 ml	50 ml
Final volume	~10ml	~10ml	1000 ml

4. Solvent correction working solutions을 준비합니다.

→ 앞서 만든 solvent correction stock solutions을 단계별로 희석하여 8 points 농도를 만듭니다.

Buffer/vial	1	2	3	4	5	6	7	8
4.5% DMSO	0	200	400	600	800	1,000	1,200	1,400
5.8% DMSO	1,400	1,200	1,000	800	600	400	200	0

8 points solvent correction solutions은 대략 -500RU~+1,000RU Range에 포함이 됩니다.

Assay 전에 samples 과 buffer의 range를 확인하려면, manual run을 통해서 고농도 (5.8%)에서 저농도 (4.5%)로, negative sample (5.0% DMSO)를 Chip에 흘려보면서 확인 할 수 있습니다.

주의! → Solvent correction과 sample 준비 시 Step2에서 만든 1.05 X PBS (with P20)를 사용해야 합니다.

5. Sample (compounds) 을 준비합니다.

→ 일반적으로 compound는 100% stock solution으로 만들어져 있으므로 사용하고자 하는 농도 (5%)로 희석하여 사용합니다. 이 때 희석 buffer 는 1.05X PBS(with P20)를 사용합니다. 5% DMSO로 만든 후 필요에 따라 사용하고자 하는 농도로 희석을 합니다. 희석 buffer는 step3에서 준비한 5% DMSO running buffer를 사용합니다.

Buffer/vial	200uM	100uM	50uM	40uM	30uM	10uM
10Mm sample in 100% DMSO	20	10	5	4	3	5
100% DMSO	30	40	45	45	47	245

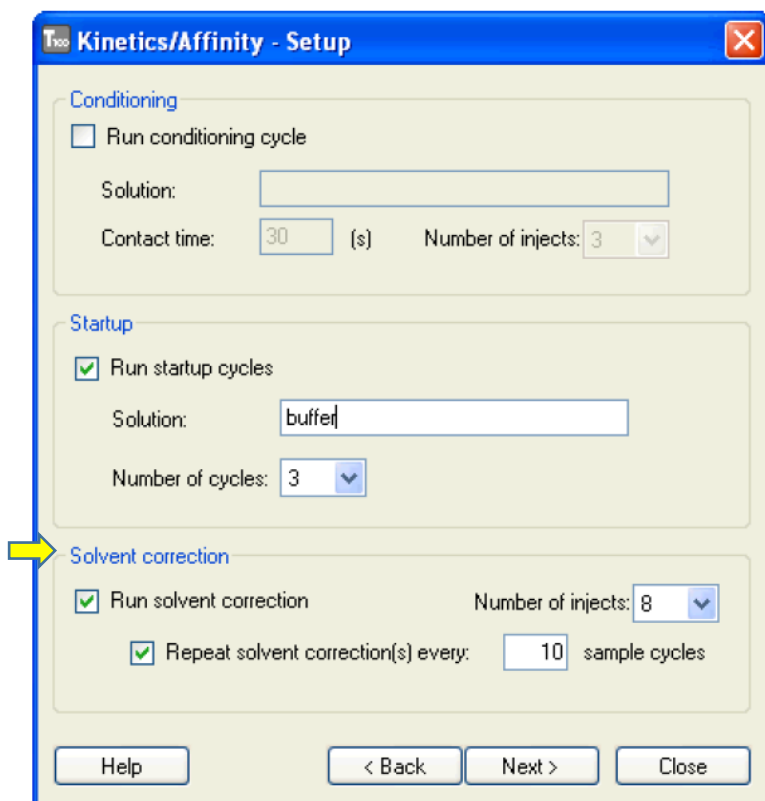
1.05X PBS(P20)	950	950	950	950	950	4750
Final volume	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml

주의! →

- ① 실험에 사용하는 모든 vessels과 equipment는 DMSO에 resistant가 있어야 합니다. Filter membrane는 Teflon or nylon을 사용하며 cellulose membrane은 사용할 수 없습니다.
- ② DMSO의 Quality에 따라 실험의 결과값에 영향을 줄 수 있으니 좋은 결과 값을 위해 analytical reagent grade, max 0.03% H₂O를 포함한 제품을 사용합니다.
- ③ 항상 0.22u filter를 사용하여 filter된 buffer를 사용합니다.

6. 준비한–running buffer, samples 그리고 solvent correction solutions을 T200에 넣고 method를 작성합니다.

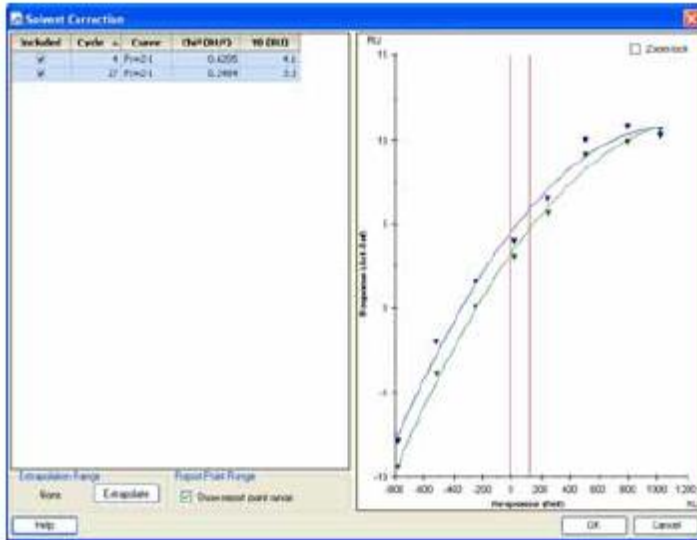
→ Solvent correction을 이용해서 method 작성시, "Run solvent correction"에 체크한 후 inject number와 적용 할 cycle을 입력합니다 (아래 그림 참고).



7. Solvent Correction을 평가하고 적용합니다.

→ 실험이 끝난 후 evaluation 창에서 solvent correct을 적용하기 위해 **Add solvent**

correction 을 클릭 한 후 아래와 같은 화면을 확인 합니다. 8 Points로 두 번 solvent correction을 했으며, 세로로 있는 두 직선 사이 값이 8 points 값 사이에 있어야 합니다.



OK를 누르게 되면 kinetics 분석시에 2-1 cor.의 항목을 선택하시면 solvent correct이 적용된 sensorgram으로 분석을 하실 수가 있습니다.