

Title: Biacore getting started kit를 이용한 KD값 도출 방법

목차

1. 실험 목적
2. 실험개요와 필요한 시약 및 소모품
 - 2.1 실험개요
 - 2.2 필요한 시약 및 소모품
3. 실험방법과 결과
 - 3.1 pH-scouting for pre-concentration
 - 3.2 Immobilization
 - 3.3 Regeneration scouting
 - 3.4 Interaction analysis
4. References

1. 실험 목적

Biacore 입문자를 위한 system operation, experience design 및 Biacore software 사용법에 대한 이해

2. 실험개요와 필요한 시약 및 소모품

2.1 실험개요

- A. pH scouting for pre-concentration
- B. Immobilization of ligand on a chip
- C. Regeneration scouting
- D. Interaction analysis

2.2 필요한 시약 및 소모품

Getting started kit (anti-beta2u-globulin antibody, beta2u-globulin)

Product Name	Contents	Order code
Getting started kit	1mg/ml anti-beta2u-glubulin antibody 50 µl 100 µg/ml beta2u-glubulin) 50 µl	BR-1008-36
CM5 chip	Pack of 3ea Pack of 3ea	BR-1005-30 (For Biacore T200,T100) BR-1000-12 (For other system)
Amine coupling kit	750mg 1-ethy-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC), 115mg N-Hydroxysuccinimide(NHS), 10.5ml 1.0M ethanolamine-HCl pH 8.5	BR-1000-50
Acetate 4.0	1 x50 ml	BR-1003-49
Acetate 4.5	1 x50 ml	BR-1003-50
Acetate 5.0	1 x50 ml	BR-1003-51
Acetate 5.5	1 x50 ml	BR-1003-52
Regeneration scouting kit	11 ml ethylene glycol 11 ml 10mM glycine-HCl pH1.5 11 ml 10mM glycine-HCl pH2.0 11 ml 10mM glycine-HCl pH2.5 11 ml 10mM glycine-HCl pH3.0 11 ml 4.0M magnesium chloride 11 ml 0.2M sodium hydroxide 11 ml 0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS) 20 ml 10% Surfactant P20	BR-1005-56
HBS-EP+ 10X Buffer	1 x 1000ml 4 x 50ml	BR-1006-69 BR-1008-26

- Getting started kit (anti-beta2u-glubulin antibody, beta2u-glubulin)

3. 실험방법과 결과

3.1 pH-scouting for pre-concentration:

3.1.1 Purpose

Ligand가 dextran의 - charge를 가지는 chip surface에 잘 모여드는 buffer의 pH를 찾아냅니다.

Ligand의 pI > buffer pH : Ligand는 + Charge 됨

Ligand의 pI < buffer pH : Ligand는 - Charge 됨

따라서 Immobilization buffer의 pH는 3.5보다는 높아야 하며 Ligand의 pI보다는 낮아야 합니다.

pH3.5 < Immobilization buffer < Ligand pI

3.1.2 Material

200mM HBS-P+ Buffer

10mM sodium acetate, pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5

50mM NaOH

Sensor Chip CM5

1mg/ml anti-beta2 μ -glubulin antibody (getting started kit)

Ligand의 final 농도가 10 μ g/ml이 되도록 10mM sodium acetate의 pH별로 200 μ l를 준비합니다.

10mM sodium acetate pH 4.0 198 μ l + 1mg/ml antibody 2 μ l

10mM sodium acetate pH 4.5 198 μ l + 1mg/ml antibody 2 μ l

10mM sodium acetate pH 5.0 198 μ l + 1mg/ml antibody 2 μ l

10mM sodium acetate pH 5.5 198 μ l + 1mg/ml antibody 2 μ l

3.1.3 Procedure

1. System control 창에서 run menu > choose Wizard > Surface Preparation > Immobilization pH Scouting을 선택합니다.

2. Flow path 2를 선택합니다.

3. Ligand name과 injection parameters를 입력합니다.

Contact time : 120sec

Flow rate : 10 μ l/ml

4. Wash solution, 50mM NaOH 입력합니다.

(pH scouting후 Chip 표면에 정전기적 인력으로 모여있는 ligand 제거하기 위함)

Contact time : 30sec

Flow rate : 50 μ l/ml

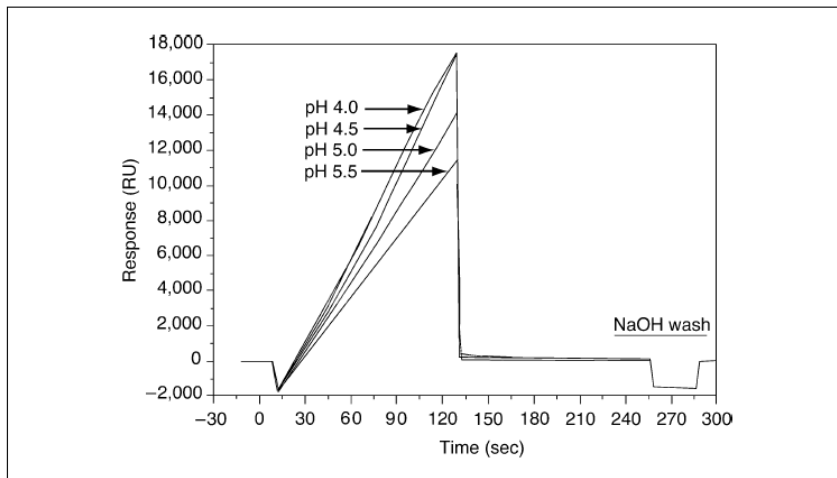
5. Run Wizard를 click하면 reagent rack이 보이며 각각의 reagents의 자리와 volume이 표기된 diagram이 보인다. 지정된 자리에 준비된 Ligand와 reagents를 넣어줍니다.

6. Wizard template와 result file을 저장하고 method를 실행시킵니다.

7. Running이 끝나면 어떤 pH에서 가장 높은 Response가 나타났는지 확인합니다.

Example>아래 그림과 같이 pH에 따른 response level을 확인한다. 비록 Pre-concentration level은 pH

가 낮을수록 높게 나타나는 현상이 있지만, immobilization 하고자 하는 target RU가 모두 도달하는 한다면 보다 mild한 조건의 pH를 선택합니다.



3-2 Immobilization

3.2.1 Purpose

pH Scouting에서 선택한 buffer의 pH를 사용하여 Immobilization 하고자 하는 RU만큼 Chip에 ligand를 고정화 하는 단계입니다.

3.2.2 Material

Amino coupling kit (100mM NHS, 400mM EDC, 1M Ethanolamine)

(NHS와 EDC는 Powder로 제공되며, 10ml의 DW로 녹여 100mM NHS, 400mM EDC농도로 만들어 각각 150 μ l로 분주하여 냉동 보관함)

50mM NaOH

Sensor Chip CM5

Ligand : 200 μ l of 10 μ g/ml anti-beta2 μ -globulin antibody in 10Mm sodium acetate, pH5.5

3.2.3 Procedure

1. System control 창에서 run menu > choose Wizard > Surface Preparation > immobilization를 선택합니다.
2. chip type을 CM5로 선택하고, blank flow cell 1, Immobilize flow cell 2를 선택합니다.

Contact time: 420 sec (7 min)

Flow rate: 5 μ l/ml

3. aim for immobilization level을 선택하고 고정화하고자 하는 RU를 입력합니다.

Immobilization level : 1200 RU

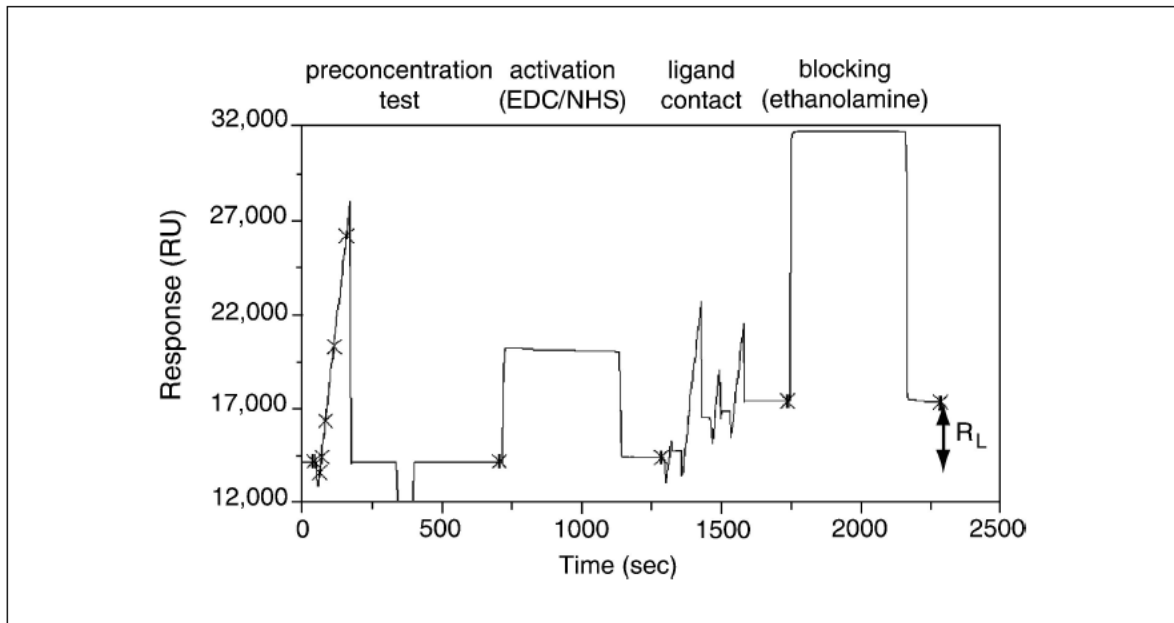
<Calculate the Rmax>

$R_{max} = \text{Immobilized RU} * \text{Stoic ration} * (\text{analyte MW} / \text{ligand MW})$

Stoic ratio: if each analyte molecule can bind 5 ligand molecules, then the ratio is 1/5.

4. Next를 click하면 reagent rack이 보이며 각각의 reagents의 자리와 volume이 표기된 diagram이 보인다. 지정된 자리에 준비된 Ligand와 reagents를 넣어줍니다.
5. Wizard template와 result file을 저장하고 method를 실행시킵니다.
6. Running이 끝나면 Immobilization하고자 하는 target RU에 도달했는지 확인합니다.

<Example>일반적인 immobilization result sensorgram



3-3. Regeneration scouting

3.3.1 Purpose

Ligand와 analyte와 binding test 후 slow dissociation rate(10^{-3} sec)이라면, immobilized ligand로부터 analyte를 제거하기 위해 regeneration이 필요합니다.

이때 사용되는 solution은 ligand의 activity에 영향을 주지는 조건을 찾아야 합니다.

3.3.2 Material

32nM beta-2 μ -globulin in HBS-P+ buffer

10mM glycine, pH 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 (Regeneration kit)

3.3.3 Procedure

1. System control 창에서 run menu > Run sensorgram을 선택합니다.
2. Multi Detection, Fc 1,2 : 2-1을 선택합니다.
Fc 1 : reference cell
Fc 2 : Immobilized ligand cell
3. Flow rate 10 μ l/ml를 선택합니다.
4. Command tab에서 Inject command를 이용하여 analyte 32nM beta-2 μ -globulin을 120 sec동안 흘려줍니다.
5. Reference line을 이용하여 injection start 전 15 sec에 baseline report point를 지정하고, injection end 전 15 sec에 binding level report point를 지정합니다.
6. Command tab에서 flow command를 이용하여 flow rate를 50 μ l/ml로 변경합니다.
7. 준비된 10mM glycine regeneration buffer를 High pH에서 Low pH순서로 injection하며, report point는 injection end 후 15 sec로 지정하여 chip표면에 남아 있는 analyte의 binding RU를 측정합니다.

<General guidance>

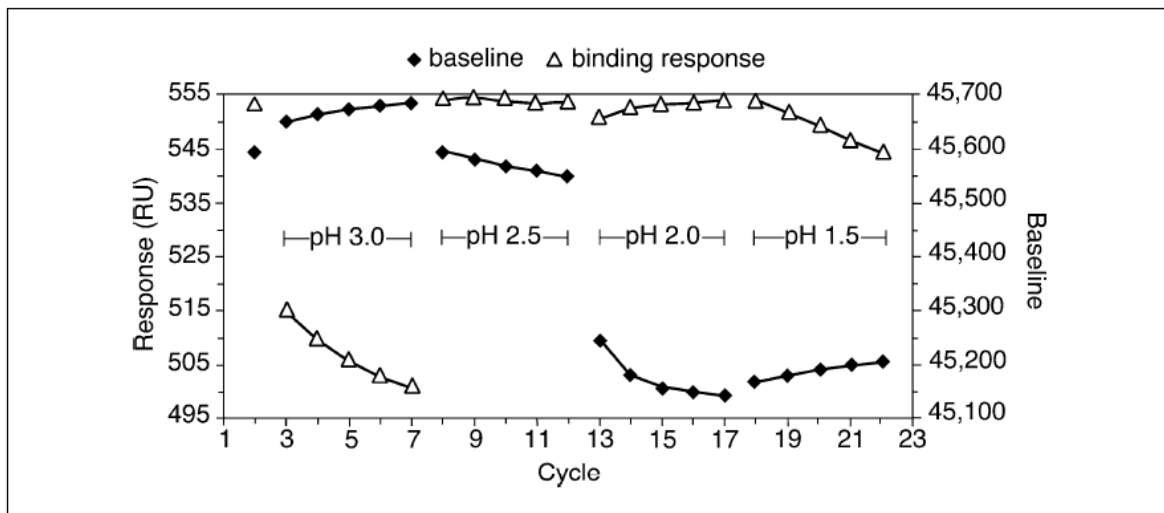
Ideal regeneration: Analyte response is consistent after repeated injections and within 10% of the level in the 1st injection

Too mild conditions: The analyte response decreases and the baseline response increases

Too harsh conditions: The analyte response decreases and the baseline response is constant or decreases

8. 적당한 regeneration buffer를 확인이 된다면 위 과정을 멈춥니다.

<Example> Binding response와 baseline이 일정하게 유지되는 pH 2.5가 적당한 regeneration조건이다.



3-4 Interaction analysis

3.4.1 Purpose

Immobilized Ligand와 analyte의 농도별 interaction을 이용하여 k_a 와 k_d 를 구하여 K_D 를 도출합니다.

3.4.2 Material

Analyte: 100 $\mu\text{g/ml}$ (8.5 μM) beta2 μ -globulin(MW 11,800 Da)

HBS-P+ buffer

10mM Glycine, pH2.5

3.4.3 Procedure

1. Sample 준비합니다.
2. Analyte의 final농도가 32nM에서 1/2 Dilution하여 2nM까지 준비하며, double reference로 0 nM(buffer only) 또한 준비합니다.
3. System control 창에서 run menu > choose Wizard > Kinetic Analysis를 선택합니다.
4. Sample Injection parameters를 입력합니다.

Multi Detection, Fc 1,2 : 2-1을 선택합니다.

Fc 1 : reference cell

Fc 2 : Immobilized ligand cell

Flow rate: 30 μ l/ml

Injection time: 120 sec

Dissociation time: 300 sec

5. Analyte name, MW 및 준비된 analyte의 농도를 입력합니다.
6. Regeneration solution name(10mM Glycine pH 2.5)과 injection parameters를 입력합니다.

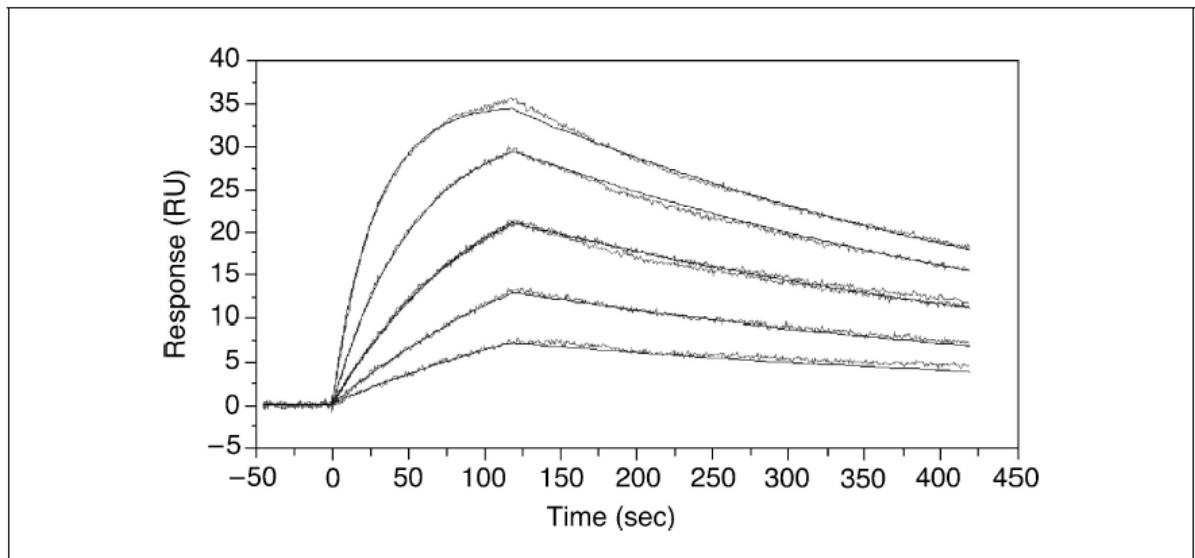
Flow rate: 50 μ l/ml

Injection time: 30 sec

Stabilization time: 60 sec

7. Next를 click하면 reagent rack이 보이며 각각의 reagents의 자리와 volume이 표기된 diagram이 보입니다. 지정된 자리에 준비된 Ligand와 reagents를 넣어줍니다.
8. Kinetic Wizard template와 result file을 저장하고 Kinetic analysis를 실행시킵니다.
9. Running이 완료되면 evaluation software를 사용하여 fitting하여 k_a , k_d 및 KD 값을 구합니다.

<Example> anti-beta2 μ -globulin antibody와 beta2 μ -globulin의 KD 값은 일반적으로 $3.0 \cdot 10^{-9}$ 정도로 나옵니다.



4. Reference

4.1 Using Biacore to Measure the Binding Kinetics of an Antibody-Antigen Interaction

Michael Murphy¹, Laure Jason-Moller¹, JoAnne Bruno¹

Biacore, Inc., Piscataway, New Jersey

Publication Name: Current Protocols in Protein Science

Unit Number: Unit 19.14

4.2 BIACORE Sensor Surface Handbook