

BLItzの特徴と構造

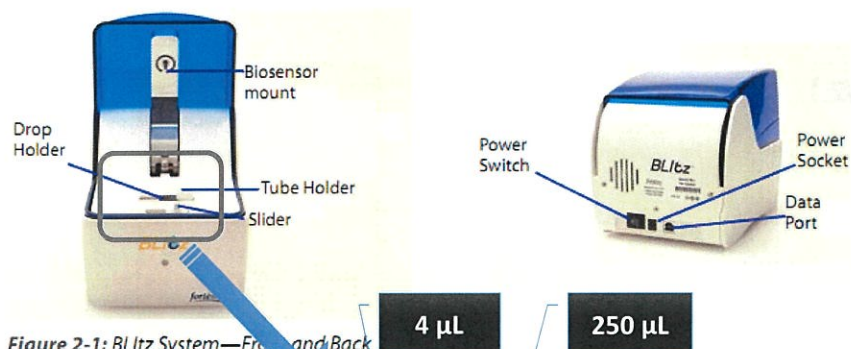
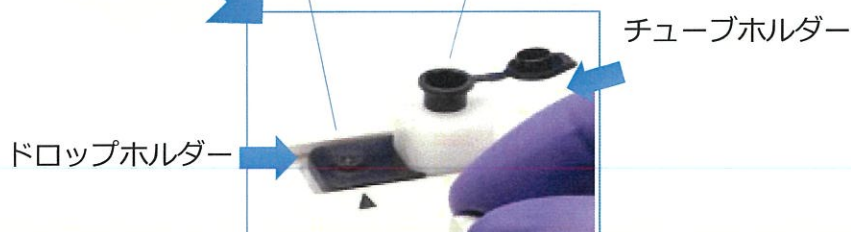


Figure 2-1: BLItz System—Front and Back

BLItzはこれまでに無い低容量の4uLで測定が可能です。

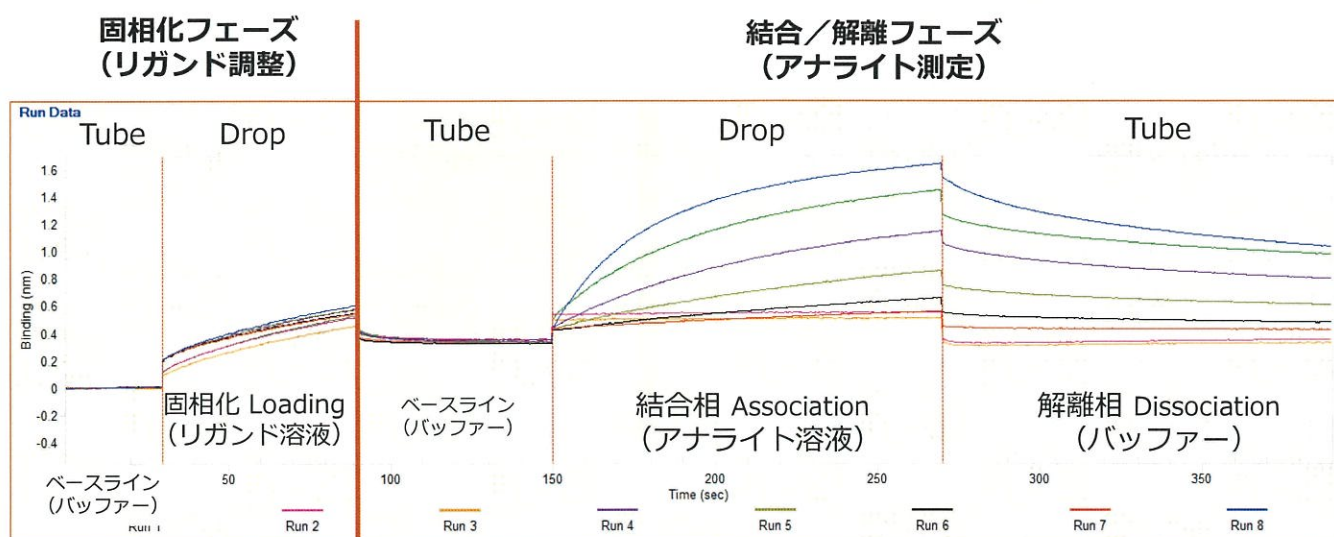
250uLで測定できるチューブホルダーも併用でき、貴重なサンプルは4uL、ベースラインや解離測定のバッファー類は250uLで測定、と使い分けることが可能です。



fortéBIO
A Division of Pall Life Sciences

フライムテック株式会社

BLItzのカイネティクス測定例 (Advanced Kinetics)



Ni-NTAセンサーにHis6-ProteinAを固相化。8本のバイオセンサーを使用。

ProteinAが固相化されているセンサーにmouse IgGを反応させて測定。8本のセンサーを使い、7点の希釈系列とリファレンス1点を測定。

fortéBIO
A Division of Pall Life Sciences

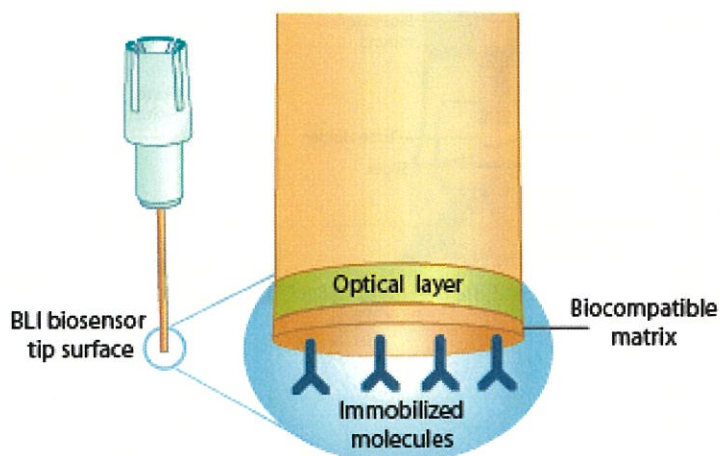
BLItzの測定原理とバイオセンサー（消耗品）

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。

消耗品であるバイオセンサーはプラスチックマウントとガラスファイバーで構成されています。

センサー先端の表面には屈折率の異なる SiO_2 と Ta_2O_5 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。



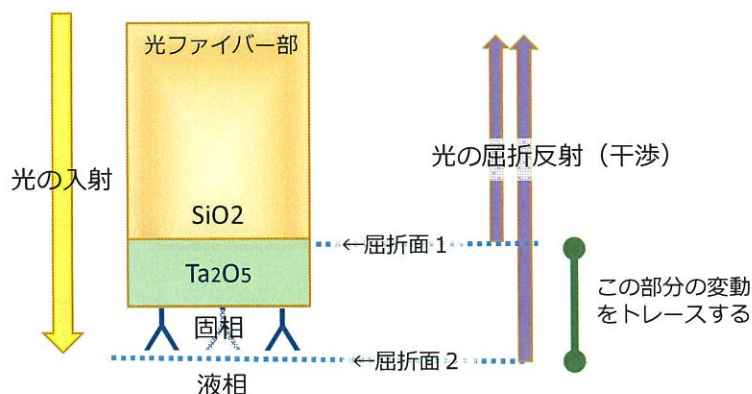
バイオレイヤー干渉法の原理

BLI法はラベルの必要のないノンラベル検出系です。分子が結合・解離する時の「**光学的厚み（光路長）の変化**」を光干渉でトレースします。

まず、センサー上部から白色光が照射され、光ファイバーに導かれ先端に光が到達します。

Optical Layerの内側境界（屈折面1）とさらにその先の固相分子/サンプル溶液の液相界面（屈折面2）から個々の屈折反射が生じ、光の干渉が生じます。（※）

この干渉は固相の増減（屈折面2の増減）によって変化します。



※ここでは2面に単純化していますが、実際はより多層で生じます。

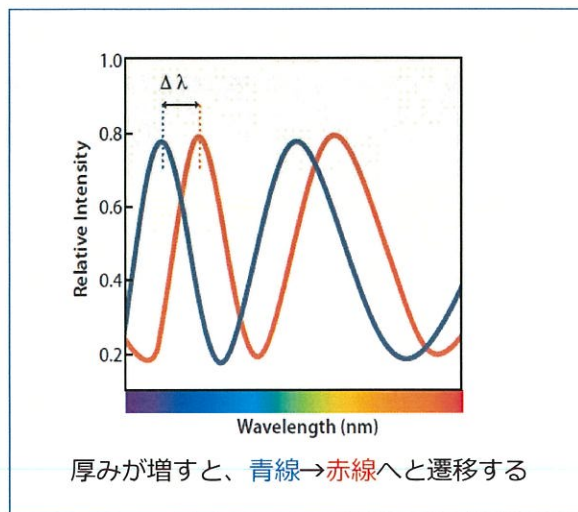
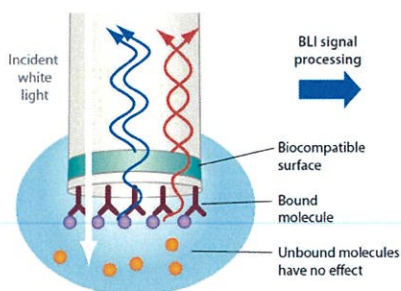
バイオレイヤー干渉法の原理（干渉スペクトル解析）

実際には検出部にスペクトロメーターを備え、分光してそれぞれの波長の干渉度を相対強度としてプロットします。

色によって波長は異なるため干渉による相対強度の違いが生じます。

色ごとの相対強度をプロットすると右のグラフの青線のようになります。（トータルスペクトル）

続いて分子が結合し「厚み」が増すと色相ごとの相対強度が遷移し、トータルスペクトルとしては、長波長側に移動する傾向を示します（赤線）。その移動度を変曲点の変化（ $\Delta\lambda$ ）としてリアルタイムトレースします。

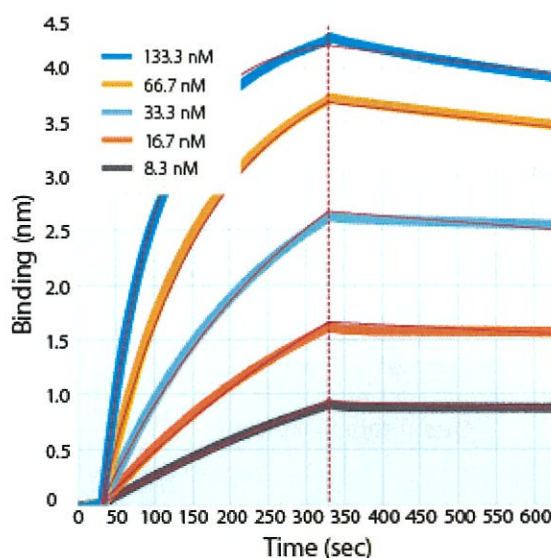


バイオレイヤー干渉法の原理（センサーグラム）

あとは、 $\Delta\lambda$ の変動を縦軸に、経過時間を横軸に取ることで右のグラフのように定量的なリアルタイム・結合/解離グラフを構成できます。このグラフは慣例に従い「センサーグラム」と呼び、ユーザーが解析に使うのは全てこのグラフとなります。

$\Delta\lambda$ は波長の単位で表現されるので、BLIのレスポンスはnm（ナノメートル）という独自の単位を使います。

このnmは先端の厚みそのものではなく、解析に用いているスペクトルにおける「波長のナノメートル」という点にご注意ください。

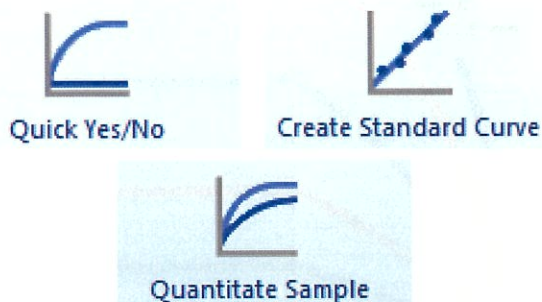


概 論

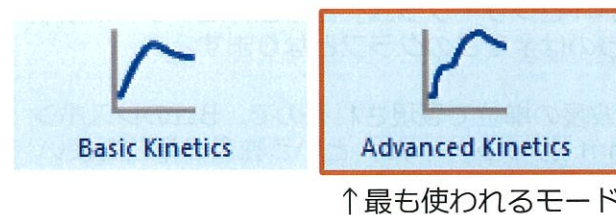
BLItzのKinetics解析モードで得られる情報とは

定量測定モードとカインेटイクス測定モード

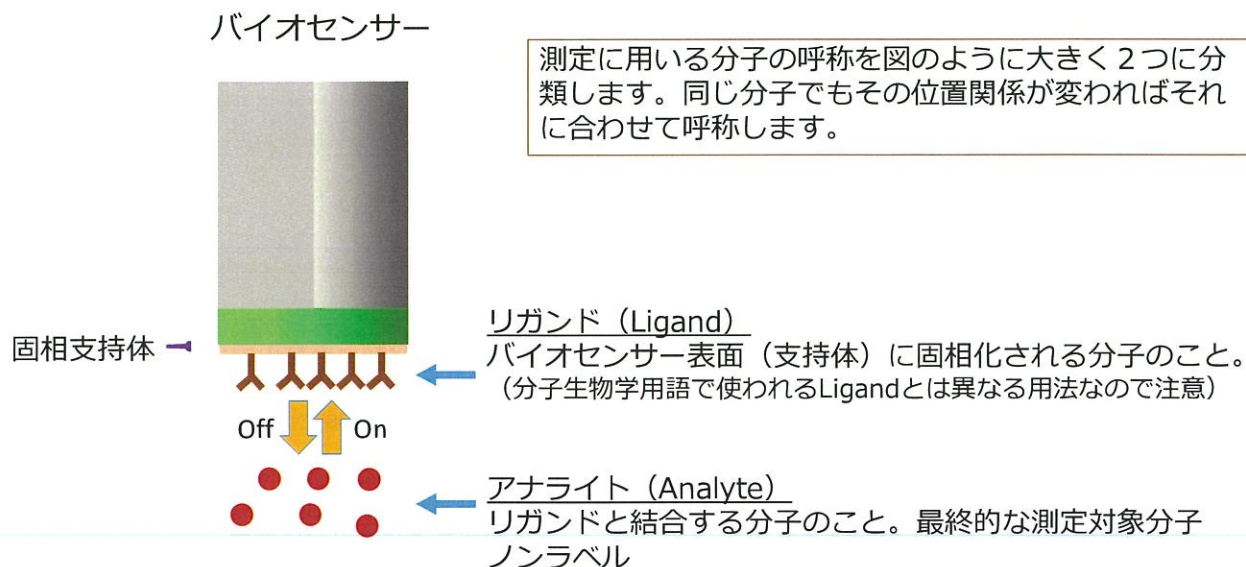
Yes/No、濃度定量
(ELISAライク)



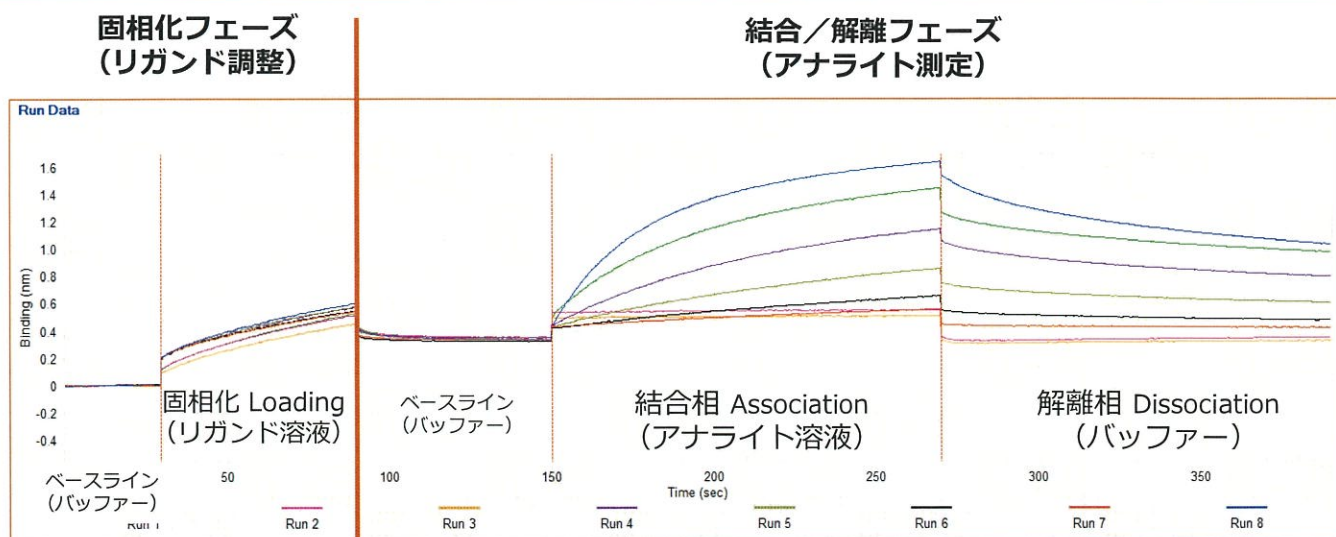
カインेटイクス
(KD、Kon、Kdis)



用語の定義（2分子の一方を固相化するBLI法やSPR法において）



BLItzのカイネティクス測定例（Advanced Kinetics）

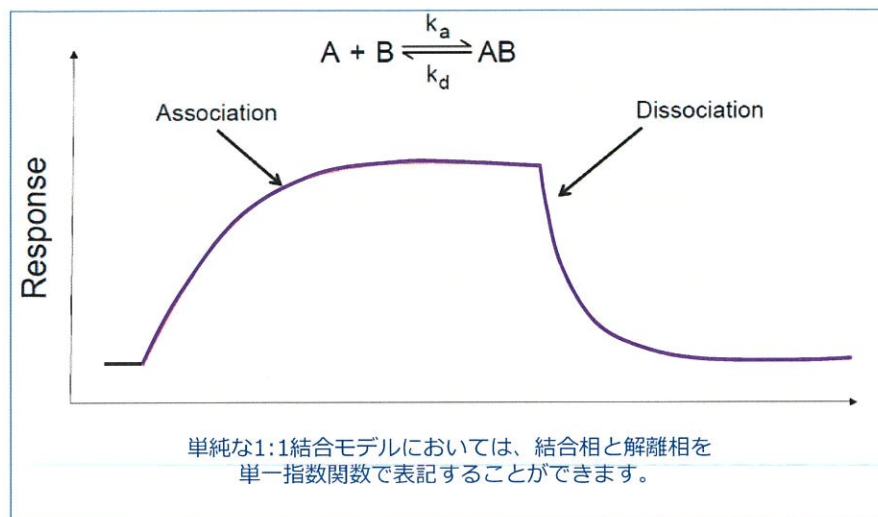


Ni-NTAセンサーにHis6-ProteinAを固相化。8本のバイオセンサーを使用。

ProteinAが固相化されているセンサーにmouse IgGを反応させて測定。8本のセンサーを使い、7点の希釈系列とリファレンス1点を測定。

リアルタイム・カインेटクス測定法

リアルタイム・カインेटクス測定では、その名の通り実時間での結合と解離を測定します。
結合相（Ka）と解離相（Kd）を分解して測定できるのがリアルタイムカインेटクス測定の最大の特徴です。



用語

KD : アフィニティの値。2分子間の親和性を示す値。ELISA等でも算出できる。

Ka (Kon、Kass) : 結合速度を示す定数。

Kd (Koff, Kdiss) : 解離速度を示す定数。古い文献等だと上記KDのことをKdと表記している場合があるので区別に注意

アフィニティ（KD）と速度定数の関係

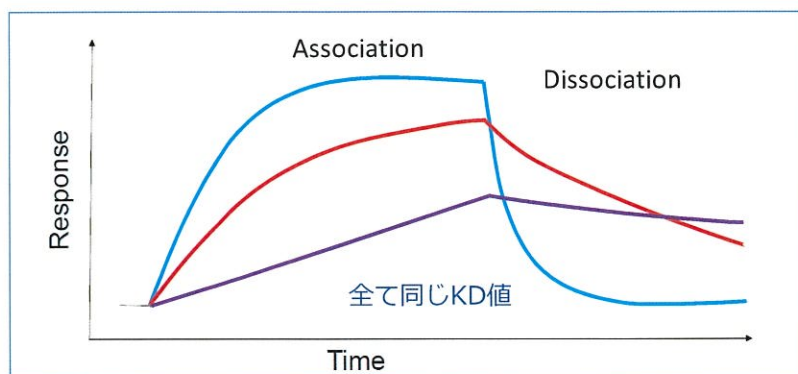
- アフィニティはKdとKaの比で表せます

$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_d}{k_a}$$

- 同一の比率を持てば、異なる速度定数であっても同じKD値を示します。

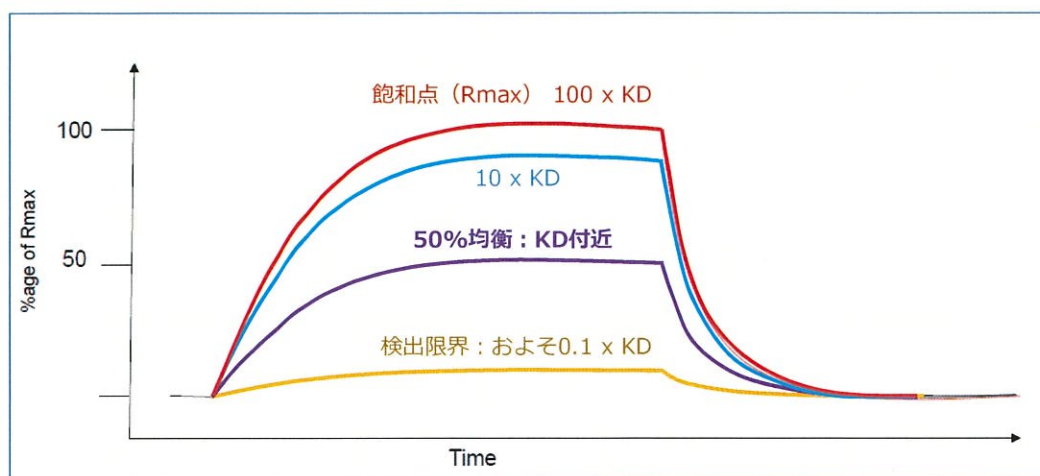
• Example:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = 1nM = \frac{10^{-3}}{10^6} = \frac{10^{-6}}{10^3}$$



右上図の3つのセンサーグラムはそれぞれ異なる結合速度と解離速度を示しますが、KD値は同一です。
このように同じ親和性であっても、その結合・解離の成分を分けて抽出できる利点が、リアルタイム解析にはあります。

実際に測定する際のアナライト濃度とKDの関係

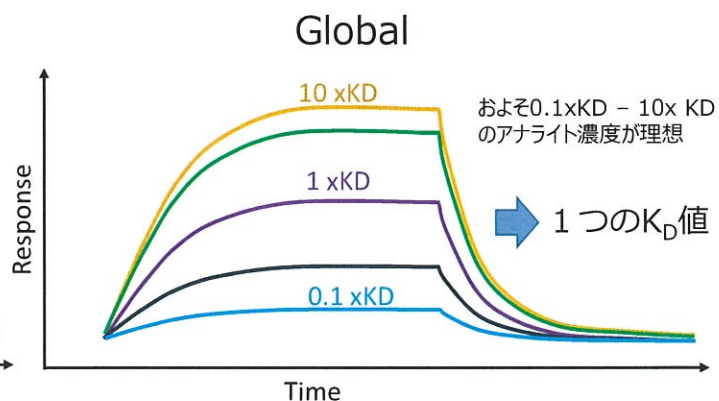
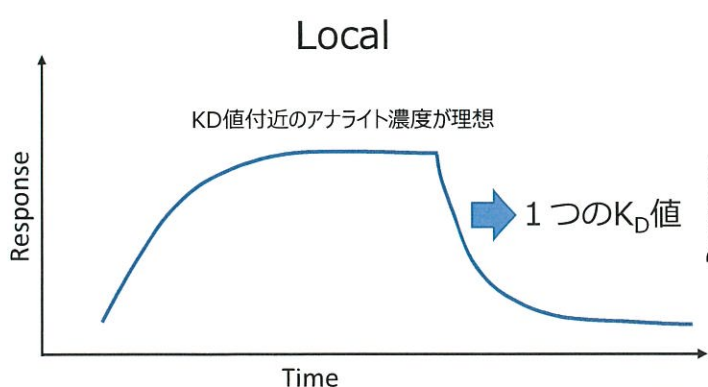


KD値は、その単位がモル濃度 (mol/L)で表記されます。

上図のようにアナライトの反応の見れる範囲は一般的に $0.1 \times KD$ 値 - $100 \times KD$ 値であり、測定は $0.1 \times KD$ 値 - $10 \times KD$ 値の濃度範囲で行われることが一般的です。

予想KD値が不明な場合は、まずは濃いアナライトから希釈系列測定を実行し、上記のような適切なレンジを探索することが必要です

Local解析とGlobal解析



アフィニティ/速度定数を算出する方法は2種類あります。Local解析とGlobal解析です。

Localはアナライト濃度1点から算出する手法で、Globalはアナライト希釈系列測定グラフの全データから平均値的な唯一の数値を算出する手法です。当然、Globalの方が質の高い結果が得られます。

Localは簡便な手法ですが測定濃度が適切でない場合、誤った数値を返す場合があります。正確な数値を取得したい場合は右グラフのようなKD値濃度を中央に置くGlobal解析を推奨します。

一般的にGlobalは4 - 6点程度で十分です。

Referenceの重要性

リファレンスは非常に重要です。ノンラベル系なので特異・非特異に関わらず結合したものはシグナルとして検出し、リアルタイム検出系なので測定過程のグラフの傾き・バルク反応は全て測定系に現れます。

BLIでは2種類のリファレンスを設定し測定系を最適化したり、解析時に補正をかけて対応します。

- **Reference Well :**

アナライト測定時にアナライトの無いバッファブランクも測定します。解析時にこのリファレンスデータのSubtractを実行しグラフに補正をかけます。

- **Reference Sensor :**

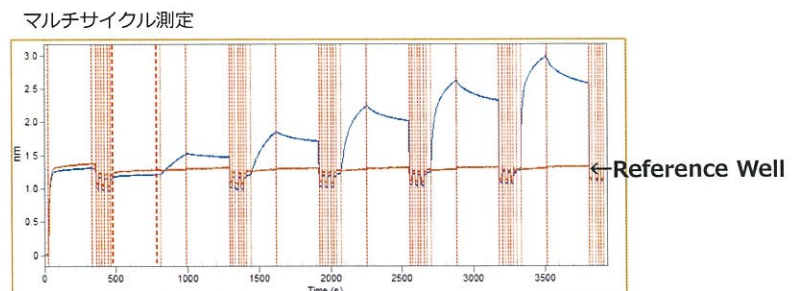
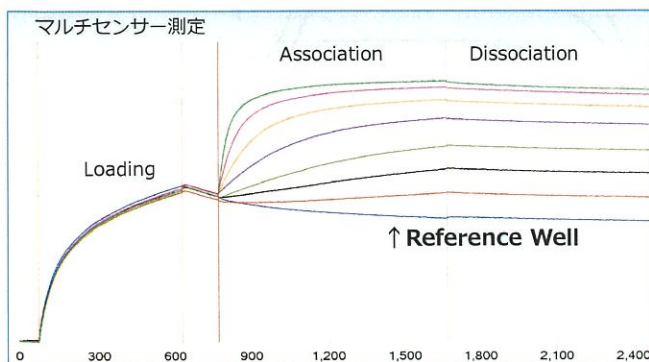
リガンドは固相化せず（もしくはネガコンを固相化し）、最も高い濃度のアナライトを測定させます。アナライトのセンサーへの非特異吸着（NSB）の有無を検出できます。NSBが大きい場合はバッファーストリンジェンシーを上げるなどの最適化を行い、NSBが小さければ解析時にSubtract補正を実行し補正できます。（ただしDouble-Subtract機能はOctetのみでBLItzでは不可）

Reference well

- **Reference Well :**

下図例ですと、一番下のAssociationが結合していないフラットなラインがリファレンス・ウェルに相当します。左図の例ですと、His-tagタンパク質を固定（Loading）した後に小さな解離が生じてグラフ全体が傾いています。右図のマルチサイクルの場合、再生操作の度に上昇ドリフトが生じています。これらグラフの変動を、データプロセスにおいてSubtraction処理を行い補正をかけてからCurve fit解析を行うことになります。

ドリフトが生じているかどうか、ということ自体もこのリファレンスが教えてくれます。



※BLI上位機種Octetでの測定例

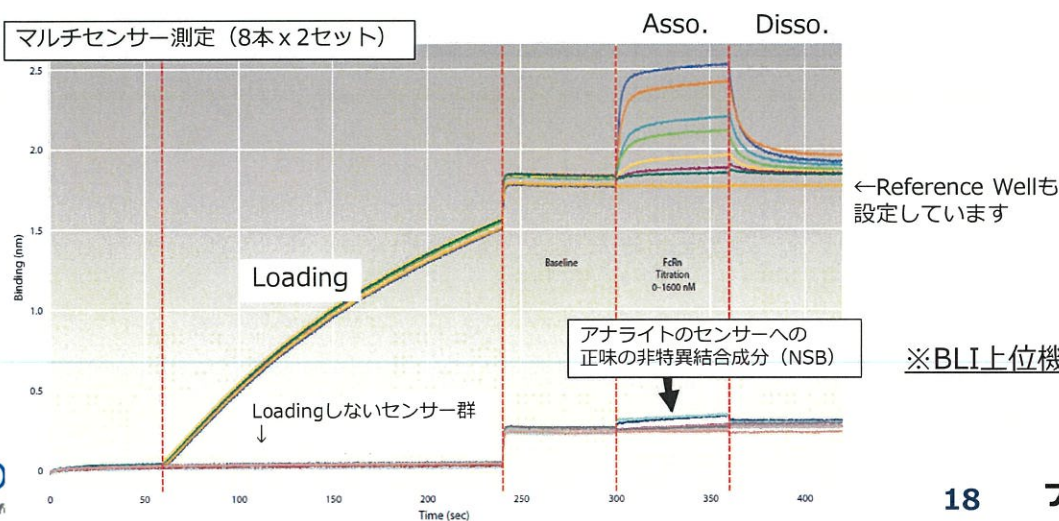
Reference sensor

• Reference Sensor :

下図は最も正確に非特異結合（NSB）を評価する様式の一例です。

通常通りリガンドをLoadingしAnalyte希釈系列のAsso./Disso.を測定した後、新しいセンサーで、今度はLoadingせずに「裸のセンサー」の状態と同じアナライトの希釈系列を測定しています。

結果、この例では高い濃度のアナライトは小さなNSBを生じていることが分かります。この例は比較的小さなNSBを示しています。



fortéBIO
A Division of Pall Life

18 フライムテック株式会社

良く使われるセンサー

センサーの種類	感度	機能	再生
SA (ストレプトアビジン)	+++	ビオチン化リガンドの固相化	リガンドは剥がせない。再生溶液でアナライトを剥がせる。
Ni-NTA	++	Hisタグリガンドの固相化	リガンドから剥がせる。Nickelの再チャージを行う
AR2G	++	アミンカップリング反応（共有結合）での固相化	リガンドは剥がせない。再生溶液でアナライトを剥がせる。
Anti-GST	+	GSTタグリガンドの固相化	リガンドを剥がせる。抗体を使っているため再生可能回数は少ない
APS	+	静電・疎水吸着でのタンパク質固相化（またはNH ₂ を利用した低分子共有結合）	再生不可

fortéBIO A Division of Pall Life Sciences			
バイオセンサー選択ガイド Biosensor Selection Guide			
バイオセンサー 略号	目的の アプリケーション	最適な用途	定量ダイナミックレンジ ²
APS	Amino-Propyl-Silane	K	静電・疎水吸着でのタンパク質固相化 （またはNH ₂ を利用した低分子共有結合）
			CM5/CM354 K2-RED296/RED384/HTX BLITZ
			N/A N/A N/A

お手元の資料にバイオセンサーのガイドがあるので購入時の参考にして下さい

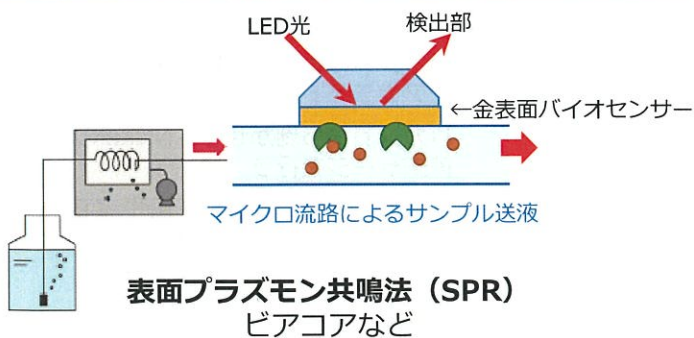
fortéBIO
A Division of Pall Life Sciences

19

フライムテック株式会社

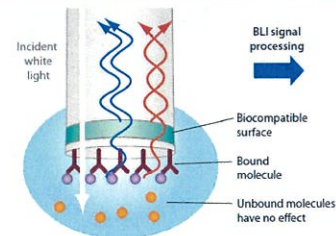
FAQ

BLI法の利点 ～使いやすく低コスト。データ品質はSPRと同等～



SPRで研究を阻害する要因：

消耗品（バイオセンサー）が1枚・2万円～数万円と高価
→最終的な結果までに数10万円かかることも
使用・不使用に関わらず、日常的な流路メンテナンスが必要で煩雑
沈殿・凝集による流路システム障害
複雑な機器操作、習熟まで時間が必要



バイオレイヤー干渉法 (BLI)

BLIによる解決：

消耗品（バイオセンサー）が1センサー・600円～と安価
→最終的な結果までに数千円～数万円程度
使用・不使用に関わらず、特別なメンテナンスは不要。不使用期間中の放置が可能
沈殿・凝集のシステムへの影響は無し。クールドサンプル測定実績が多い
単純な機器操作で習熟が容易。→共通機器にも向いている
ペプチド以上の大きさの分子であればSPRと遜色ないデータを取得できる

Q：例えば論文で、BLIとSPRのデータを並列して使用して良いのか？

- Ans. 一般的に大丈夫です。例えば抗体開発やタンパク質間相互作用において、いずれのデータも混在して一つのストーリーに用いているケースも多いです。

例

● BLIでの抗原-抗体測定Fig

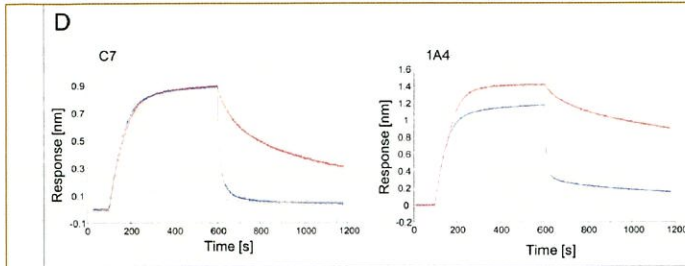


Figure 4. Characterization of candidates isolated from C7 optimization selections. (A). Inhibition of 5 nM mCXCL10-mediated

● SPRでの抗原-抗体測定Fig

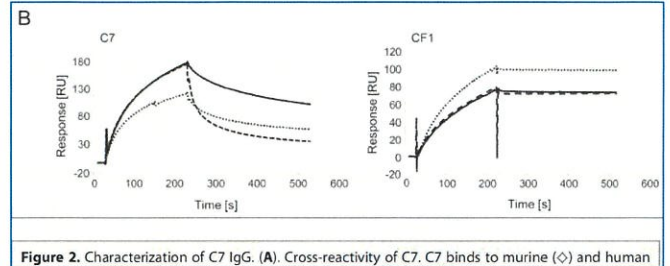


Figure 2. Characterization of C7 IgG. (A). Cross-reactivity of C7. C7 binds to murine (◇) and human

本例では同一論文にBLIとSPRの結果が示され、考察に使用されています
(上位機種Octetでの例)

本ページの図表は下記論文のFig.2, Fig.4から抜粋・切り貼りしています
MAbs. 2015;7(2):294-302. doi: 10.1080/19420862.2015.1006993.
De novo isolation of antibodies with pH-dependent binding properties.
Bonvin P et.al.

(続き) 例2 Scientific Reports (Nature姉妹誌)

例

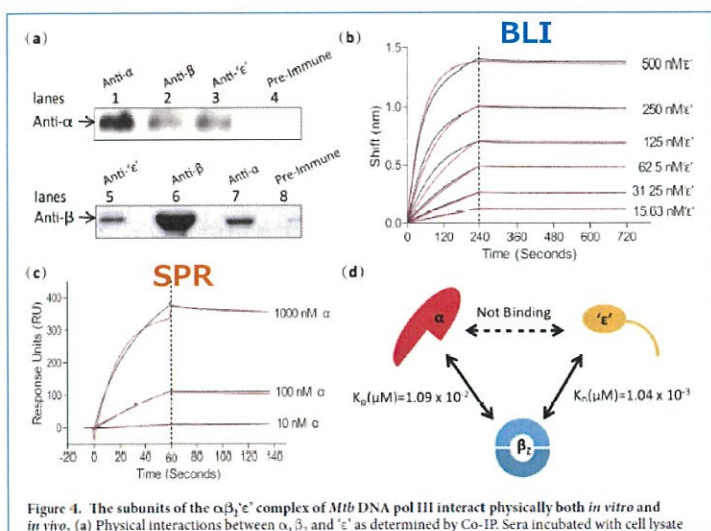


Figure 4. The subunits of the $\alpha\beta\gamma\epsilon$ complex of *Mtb* DNA pol III interact physically both *in vitro* and *in vivo*. (a) Physical interactions between α , β_2 and ϵ as determined by Co-IP. Sera incubated with cell lysate

(上位機種Octetでの例)

Nature姉妹誌、Scientific Reportsにおける報告例です。Mycobacteriumのポリメラーゼ関連タンパク質の研究です。

(b)のグラフはBLIです。AR2Gに β_2 を固定化して ϵ の結合/解離を測定・定量化しています。
(c)のグラフはSPR(biacore3000)です。CM chipに α を固定化して、 ϵ の結合/解離を測定・定量化しています。

考察時(d)には双方のデータを同列に扱っています。

本ページの図表は下記論文のFig.4から抜粋・切り貼りしています
Sci Rep. 2016 Jan 29;6:18418
The β_2 clamp in the *Mycobacterium tuberculosis* DNA polymerase III $\alpha\beta_2\epsilon$ replicase promotes polymerization and reduces exonuclease activity.
Gu S et.al.

(続き) BLIとSPRの違い

- 検出原理に違いがあります。
- 厳密な意味ではセンサー表面の構造や固相化モード・ベースに若干の違いがあります。
(例) 表面構造・官能基ベースの違いの一例：アミンカップリング系センサー：
BLItz/Octet: AR2G (アルギン酸のカルボキシル基を起点とする)
Biacore(SPR法): CM系 (カルボキシルメチルデキストランのカルボキシル基を起点とする)
- BLIは開放系測定 (ウェル内)、SPRは閉鎖系測定 (マイクロ流路送液) という環境の違いがあります。

BLItzの測定レンジなど

1. BLIのS/Nはある程度分子量に比例します

アナライトに関して、10kDa以下の分子はS/Nが極端に落ちるため、測定がしづらくなります。(不可能ではありません)。小さな分子を測定したい場合は、後述 (測定実例) の根粒菌糖鎖の論文のように分子の小さい方を固相化する方法を推奨します。

2. 測定しやすいKD値の範囲

KD=0.1nM ~ 1uMの範囲が測定推奨範囲と言われています。この範囲から外れるアフィニティは解析しづらくなります。

3. 測定バッファーは、まずはKinetics Bufferの使用を推奨します

Pall-Fortebioから販売しているKinetics buffer (#18-1092) はBSAとTween20を含み (※) 非特異吸着防止や低濃度タンパク質の安定化に寄与します。この組成がOKであればKinetics Bufferをお使い下さい。当然、使用分子に向いているバッファー類 (Tris、Hepes、酢酸、Mg、DTT、etc.) があればそちらを使用して下さい。

独自のバッファーを使用する場合はできるだけBSAやTween20のようなブロッキング効果のある分子の添加を推奨しています。

※10mM PBS (150mM NaCl) / 0.01%BSA / 0.002% Tween20

Q: その他の相互作用系の測定機器は必要なのか？

Ans. 相互作用を精査するのであれば複数の原理での測定が必要です。

その研究目的によって様々ですが、一般的に分子の相互作用は複数の手法でいわば「裏を取る」ことが推奨されます。

よく引き合いに出されるのはBLIやSPRと対をなす性質を持つ「カロリメトリー」です。Ka, KdはBLI/SPRで解析し、ストイキオメトリー (N) や熱力学パラメーターをカロリメトリーで解析する、という使い分けになります。また、カロリメトリーは双方フリー状態で測定できることが強みで、一方で大量かつ高濃度の高精製サンプルが必要となることが短所です。

双方フリーという意味では、FCS/FCCSも有効です（ただし蛍光ラベルが必要）

測定系による取得可能データの分類、測定系の選択

いずれの手法でもアフィニティやKD値という基本情報は得られますが、その周辺情報もしくはサンプルの性状・制限などによって測定系を選ぶことになります。

測定系	得られるパラメーター	利点	欠点
BLI / SPR	Kon, Koff, KD	実時間情報、KonとKoffが得られる 比較的サンプル量が少ない BLIは安価・簡便・クールドに強い BLItzは最も低容量測定系	片方を固相化する必要がある 非特異を区別する測定が必要
ITC (カロリメトリー)	KD, n, ΔH , ΔS	双方ノンラベルでフリー状態 熱力学パラメーターが得られる 化学量論比が得られる	高濃度・高精製が求められる 必要サンプル量が多い
FCS/FCCS	拡散定数、KD値	低容量で測定可能 細胞内KD値の実績がある (※京都大学)	片方もしくは双方に蛍光ラベルが必要
QCM (水晶振動)	KD (一部Kon, Koff)	過去の実績が比較的多い	ベースラインの不安定 サンプル容量が多い Kon, Koffを求めるに多点測定が必須

核酸・糖鎖の測定実例

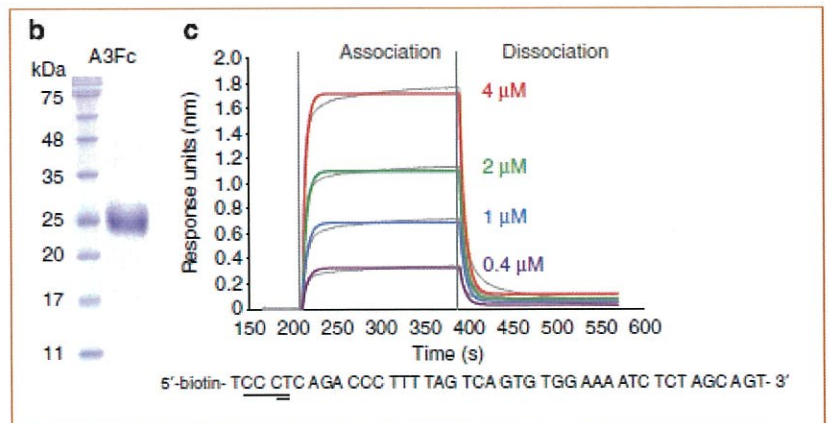
HIV関連のssDNAとタンパク質の相互作用測定



リガンド:
Biotin化ssDNA

アナライト:
A3Fc-CD2タンパク質 (25kDa)

センサー:
SAセンサー

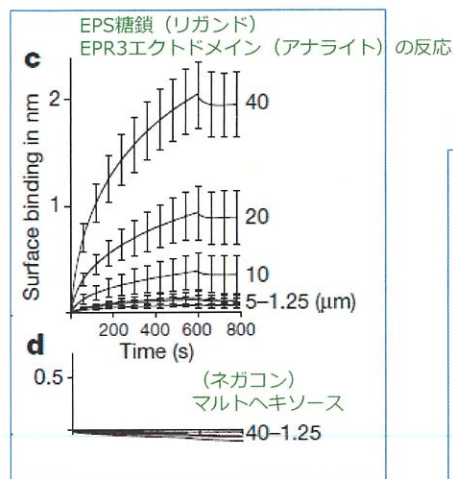


核酸とタンパク質の相互作用測定においては、ほとんどが核酸をビオチン化し、SAセンサーに固相化してタンパク質をアナライトとしています。

理由としては、SAの感度が高いこと、核酸合成の場合はビオチンを挿入しやすいこと、アナライトはタンパク質の方がS/Nが出やすいことが挙げられます。

植物系の論文（BLI法の上位機種Octetのデータ）

マメ科植物の根粒菌の外膜多糖と植物EPR3タンパク質ドメイン（25kDa）の結合を測定した報告。
SAセンサーを使用して多糖を固相化。



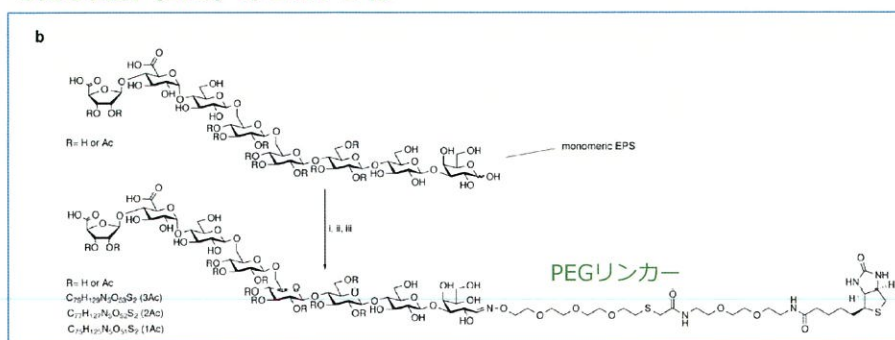
ARTICLE

doi:10.1038/nature34611

Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection

Y. Kawaharada^{1,2}, S. Kelly^{2,3}, M. Witbroe-Nielsen^{1,2}, C. T. Hjuler^{1,4}, K. Gysel^{1,4}, A. Muszynski⁵, R. W. Carlson⁶, M. B. Thygesen^{1,4}, N. Sanda^{1,2}, M. H. Asmussen^{1,2}, M. Vinter^{1,2}, S. U. Andersen^{1,2}, L. Krusell^{1,2}, S. Thirup^{1,2}, K. J. Jensen^{1,2}, C. W. Ronson^{1,2}, M. Blaise^{1,2}, S. Radstrom^{1,2} & J. Storgaard^{1,2}

8糖の糖鎖（EPS）のビオチン化



BLItz/Octetによるこれまでの実績

- ・タンパク質
- ・核酸（DNA、RNA）
- ・糖鎖
- ・ペプチド
- ・ウイルス粒子（Octetによる）
- ・リポソーム、リン脂質
- ・脂質
- ・タンパク質複合体
- ・ATP濃度定量システム

論文や実績の検索の際はPubMedやGoogle Scholar等で、「**Bio-layer Interferometry**」や「**Fortebio** (&) **BLItz**」というキーワードで検索できます。BLI法を使った上位機種Octetの論文は「Fortebio Octet」で検索できます（こちらの方が実績が多いです）OctetでS/Nの高い測定であればBLItzでも測定できる場合があるので参考になります。

BLI法は若い技術ですが、執筆の際の手法名はすでに**Bio-Layer Interferometry**で通じるようになっておりますので、ご安心下さい。

2016年現在、Octet/BLItzをあわせたBLI法の論文実績は900を超えました。