

●表面プラズモン共鳴法を用いた結合・解離速度定数の測定

TN315

Determination of Interaction Kinetic Parameters Using Surface Plasmon Resonance Biosensor

[概要]

化合物間の親和性評価に表面プラズモン共鳴が広く利用されています。当社では、タンパク質-タンパク質間や低分子化合物-タンパク質間など様々な化合物間のカイネティクス解析を、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを使用して実施しております。

[測定の流れ]

(1) 化合物の固定化

化合物をセンサーチップ上に固定します。アミンカップリング法、アルデヒドカップリング法、チオールカップリング法、キャプチャー法など様々な固定化法を用います。

(2) 測定

- ① 測定試料をセンサーチップに連続的に添加することで結合の様子を観測した後、ランニング緩衝液に切り替えることで、解離の様子を観測します。この操作を、5回以上濃度を変えて行います。
- ② 得られたセンサーグラムに理論式によるフィッティングを行うことにより、反応速度定数 (k_a , k_d) および解離定数 (K_D) を算出します。

[測定例]

ウシカルボニックアンヒドラーゼIIと阻害剤アセタゾールアミドとのカイネティクス解析

Multi cycle kinetics (MCK) 法は試料を添加して結合・解離を観測した後、続けてセンサーチップを再生し、これを5回以上にわたって濃度を変えて繰り返す方法です。一方、Single cycle kinetics (SCK) 法は、5濃度の試料の結合・解離を、センサーチップの再生を挟まずに1回の測定で連続して観測する方法です。再生条件の最適化検討が必要でなく、またMCK法と比較して測定時間を短縮することが可能です。

今回、両者の方法を用い、ウシカルボニックアンヒドラーゼIIに対するアセタゾールアミドのカイネティクス解析を行いました(図1、2)¹⁾。両者の方法で同等のカイネティックパラメーター値が得られ、またその値は文献値と良い一致が見られました(表1)。

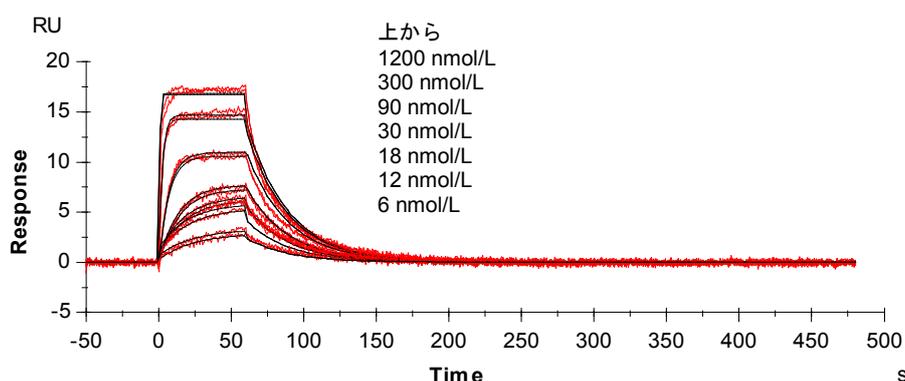


図1. MCK法で得られたセンサーグラム(赤線)とフィッティング結果(黒線)

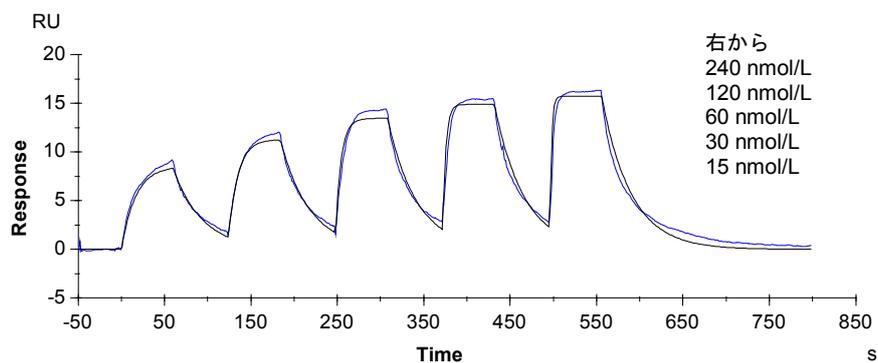


図 2. SCK 法で得られたセンサーグラム（青線）とフィッティング結果（黒線）

表 1. 各カイネティックパラメーター値

	結合速度定数 (k_a , $M^{-1}s^{-1}$)	解離速度定数 (k_d , s^{-1})	解離定数 (K_D , M)
測定値 (SCK 法)	$2.4 \pm 0.76 \times 10^6$	$3.3 \pm 0.77 \times 10^{-2}$	$1.4 \pm 0.84 \times 10^{-8}$
測定値 (MCK 法)	$1.7 \pm 0.42 \times 10^6$	$3.5 \pm 0.23 \times 10^{-2}$	$2.0 \pm 0.46 \times 10^{-8}$
文献値 ¹⁾	$3.1 \pm 1.6 \times 10^6$	$6.7 \pm 2.5 \times 10^{-2}$	$2.6 \pm 1.4 \times 10^{-8}$

[参考文献]

1) Cannon, M. J. et al. *Analytical Biochemistry* **2004**, *330*, 98-113.

[キーワード]

ビアコア、Biacore、抗体、バイオ医薬品、分子間相互作用、受託分析サービス