



Kinetics evaluation of Protein A – Human IgG using iMSPR-mini/F & COOH-Au chip (2D)

iMSPR-mini/F는 단백질-단백질 결합 분석을 쉽고 빠르게 수행할 수 있는 아이클루바이오의 엔트리급 모델입니다. 본 application 실험에서는 2D 센서칩인 COOH-Au-chip을 이용하여 항체의약품 분석 모델이 될 수 있는 Protein A (Ligand protein)와 Human IgG (therapeutic antibody) 결합 분석을 수행하였습니다. 본 실험에서 사용한 장치, 재료, 조건은 다양한 단백질-단백질 결합 분석에 활용할 수 있습니다.

Materials

- Instrument: iMSPR-mini/F
- Sensor chip: COOH-Au chip
- Immobilization Reagent: Amine coupling kit (ACK50)
- Immobilization buffer: Acetate buffer pH4.0 (AB40)
- Running buffer: 1xHBST (HB50)
- Regeneration buffer: Glycine-HCl pH1.5 (G15)
- Ligand: Protein A
- Analyte: Human IgG

Procedure

Ligand Immobilization

- ① Baseline: Inlet tubing으로 양 채널 (Ligand

channel, Reference channel)에 유속 30 ul/min 조건으로 5분이상 1xHBST를 흘려 주어 안정적인 baseline을 잡는다.

- ② Inlet tubing으로 양 채널에 Activation buffer (175 ul)와 EDC 용액 (175 ul)을 1:1로 혼합하여 30 ul/min의 유속으로 5분동안 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ③ Injection valve를 이용하여 Ligand channel에만 10 ug/ml Protein A (in Acetate buffer pH4.0) 120 ul를 준비하여 30 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다. (권장 immobilization level: 50~100RU)
- ④ Inlet tubing으로 양 채널에 Quenching buffer를 200 ul 준비하여 30ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ⑤ 양 채널에 Glycine pH1.5을 200 ul 준비하여 30 ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 30분이상 washing하여 안정화 시킨다.

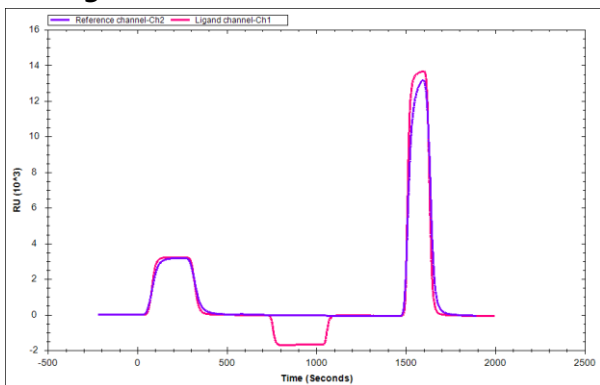
Analyte binding

- ① 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM hIgG (in 1xHBST buffer)를 각각 200 ul 준비한다. 실험당일 사용하고 있는 running buffer에 희석
- ② Injection valve에 100nM hIgG를 200 ul loading하여 50 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ③ Injection valve에 Glycine pH1.5 용액을 150 ul loading하여 50 ul/min으로 2분 주입한 후 1xHBST로 8분동안 안정화시킨다.
- ④ 농도별로 ②-③을 반복수행

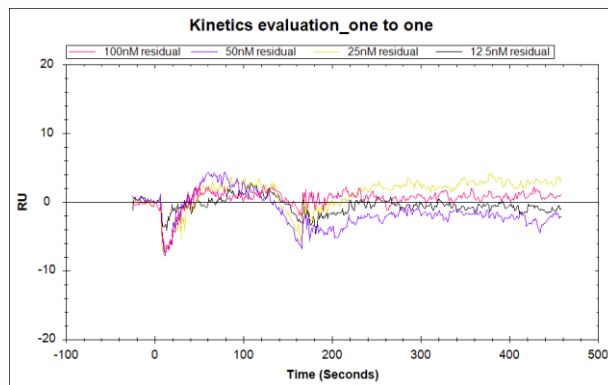


Results

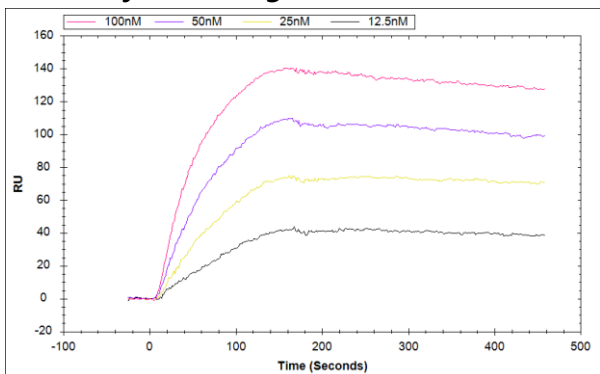
R1. Ligand 고정화



R4. Residuals



R2. Analyte Binding (Subtracted)



Results summary

Contents	Value
Immobilization Level	50 RU
B_{max}	149.5 RU
K_a (Association rate, $1/M*s$)	1.76×10^5
K_d (Dissociation rate, $1/s$)	3.10×10^{-4}
K_D (Affinity)	1.76
χ^2	4.41

R3. Curve fitting: one to one binding model

