



Inhibition of Collagen-HSP47 interaction by Col003 using iMSPR-ProX & COOH-Au chip (2D)

Col003은 HSP47의 Collagen 결합 부위에 경쟁적으로 결합하여 HSP47과 콜라겐의 결합을 저해합니다. 본 application 실험에서는 iMSPR-ProX를 이용하여 여러 농도의 Col003에서 Collagen-HSP47 결합 저해 분석을 수행하였습니다.

Materials

- Instrument: iMSPR-ProX
- Sensor chip: COOH-Au chip
- Immobilization Reagent: Amine coupling kit (ACK50)
- Immobilization buffer: Acetate buffer pH5.0 (AB50)
- Regeneration buffer: 10 mM HCl
- Ligand: Collagen (6 mg/ml)
- Analyte: HSP47
- Inhibitor: Col003

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 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 Collagen 60 ug/ml (in Acetate buffer pH5.0) 300 ul를 준비하여 Ligand channel에만 10 ul/min으로 20분 주입한 후 1xHBST로 5분 동안 washing 한다.
- ④ Quenching buffer를 200 ul 준비하여 양 채널에 30ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ⑤ 양 채널에 10 mM HCl을 200 ul 준비하여 30 ul/min으로 2분동안 흘려준 후 1xHBST로 30분이상 washing하여 안정화시킨다.

Analyte binding

- ① 1xHBST에 HSP47을 희석하여 3.91nM, 7.81nM, 15.6nM, 31.3nM, 62.5nM, 125nM, 250nM, 0nM 농도로 각 200 ul씩 준비한다.
- ② 3.91nM HSP47를 30 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다.
- ③ 10mM HCl 용액을 30 ul/min으로 2분 주입하여 regeneration한 후, 1xHBST로 6분 동안 안정화시킨다.
- ④ 농도별로 ②-③을 반복수행

Inhibition

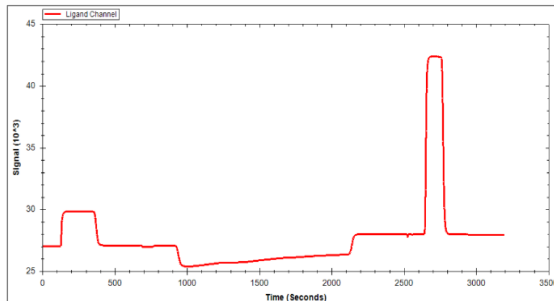
- ① 1xHBST(1% DMSO)에 희석한 HSP47 (150 nM) 75 ul와 Col003 200, 100, 50, 0 uM 75 ul를 각각 섞는다. 이 때 DMSO 농도는 1%가 유지되도록 한다. 각 샘플을 섞은 후 30분 이상 incubation한다.
- ② HSP47 (75 nM)+Col003 100 uM를 30 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 5분 동안 washing 한다.
- ③ Injection valve에 10 mM HCl 용액을 10 ul/min으로 3분 주입하여 regeneration 후, 1xHBST로 6분동안 안정화시킨다.
- ④ 농도별로 ②-③을 반복수행



Results

Results summary

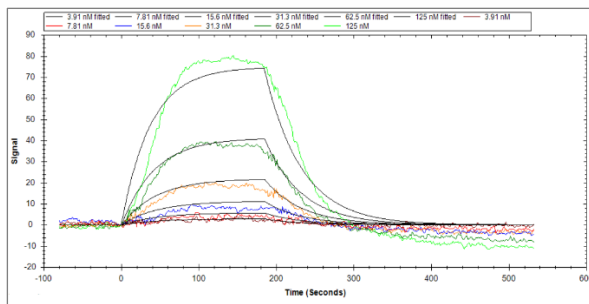
R1. Ligand 고정화



HSP47과 Collagen 결합의 확인 및 kinetic evaluation을 통해 inhibition 분석에 필요한 HSP47의 적절한 농도를 결정하였습니다.

Col003의 농도가 높을수록 Collagen에 결합하는 HSP47의 신호가 낮아짐을 확인할 수 있었습니다. 특히 100 uM의 Col003에서는 거의 대부분의 HSP47-Collagen 결합이 억제된 것을 관찰할 수 있습니다.

R2. HSP47 Curve fitting: one to one binding model



T1. HSP47 Kinetic Evaluation

Contents	Value
Immobilization Level	1457 RU
B _{max}	356 RU
K _a (Association rate, 1/M*s)	4.42 x 10 ⁴
K _d (Dissociation rate, 1/s)	2.11 x 10 ⁻²
K _D (Affinity)	4.77 x 10 ⁻⁷ M
Chi ²	16.84

R3. Inhibition

