



Application Note #6

iCLUEBIO

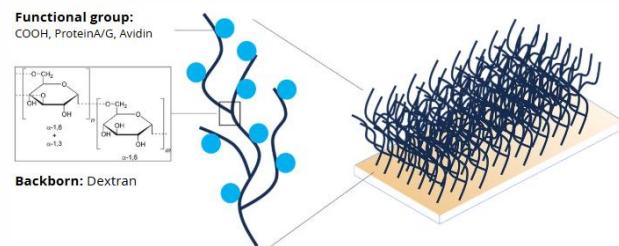
C-Dex105: 단백질 분석을 넘어 저분자 분석까지

Introduction

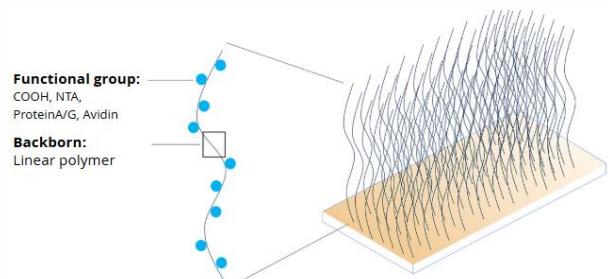
C-Dex105: Upgraded from C-Dex100

C-Dex100 센서칩은 덱스트란 매트릭스 기반의 표면 구조(Figure 1)를 갖고 있어 단백질, 항체 분석에는 널리 사용되어 왔으나, 평균 5,000 RU 수준의 높지 않은 고정화량의 한계로 인하여 저분자 화합물 분석에서의 어려움이 있었습니다. 아이클루바이오는 이러한 C-Dex100의 기존 한계를 극복하기 위하여, C-Dex100 센서칩의 생산 공정을 개선하여 단백질에서 화합물까지 넓은 범위의 분석 활용이 가능한 새로운 센서칩 C-Dex105를 개발하였습니다.

본 Application note는 표준 고정화 물질 BSA(Bovine Serum Albumin)의 이온결합 및 공유 결합 신호를 측정하고, 표준 단백질-단백질 결합샘플 (Protein A-IgG) 및 표준 단백질-화합물 결합샘플(CAlI-Furosemide)의 kinetic analysis를 수행하여 C-Dex105의 성능을 기존의 센서칩 (C-Dex100 및 HC1000)과 비교평가 하였습니다.



[Figure 1. C-Dex100과 C-Dex105 덱스트란 센서칩의 표면 특성]



[Figure 2. HC1000 폴리하이드로겔 센서칩의 표면 특성]

Materials and Methods

Materials

- Instrument : iMSPR-Pro2X [CAT#INPX2000]
- Sensor chip : C-Dex105 [CAT#CDDH1105]
- Amine coupling kit [CAT#IMAM1000]
- Running buffer : HBST [CAT#RBHT1010-500]
- Ligand : BSA / Protein A / CAlI
- Analyte : IgG / Furosemide
- Regeneration solution :
Glycine-HCl, pH 1.5 [CAT#RGGH1015]

Product	Lot number
C-Dex100	CD1002508001
C-Dex105	CD1052509001
HC1000	0423.a

[Table 1. 센서칩 제품: C-Dex100, C-Dex105, HC1000]



Application Note #6

iCLUEBIO

Preparation

1. iMSPR-Pro2X에 C-Dex105를 장착한 프리즘 홀더를 로딩하고 1X HBST를 연결한 후에 prime을 진행한다.
2. 50 mM NaOH를 30 μ l/min로 1분씩 3회 주입하여 precondition을 진행한다.

BSA

Preconcentration

1. Pro2X에 100 μ g/ml BSA in acetate buffer pH 4.0을 30 μ l/min로 3분 동안 주입한다.
2. 50 mM NaOH를 30 μ l/min로 1분씩 3회 주입하여 센서칩 표면이 baseline으로 회복되는지 확인한다.

Immobilization

1. Pro2X에 EDC/NHS 혼합 용액을 20 μ l/min로 7분 동안 주입하여 activation한다.
2. Individual mode로 ligand channel에 100 μ g/ml BSA in acetate buffer pH 4.0을 10 μ l/min로 15분간 주입한다.
3. 다시 continuous mode로 바꾸고 1M ethanolamine-HCl을 20 μ l/min으로 7분 동안 주입하여 남아 있는 COOH 작용기를 blocking한다.

Protein A-IgG

Immobilization: Protein A

1. Pro2X Ch3-4에 EDC/NHS 혼합 용액을 20 μ l/min로 7분 동안 주입하여 activation한다.
2. Individual mode로 ligand channel에 10 μ g/ml protein A in acetate buffer pH 4.0을 10 μ l/min로 10분간 주입한다.
3. 다시 continuous mode로 바꾸고 1M ethanolamine-HCl을 20 μ l/min으로 7분 동안 주입하여 남아 있는 COOH 작용기를 blocking한다.

Kinetic Analysis

1. IgG를 running buffer로 2배씩 연속 희석하여 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM, 3.125 nM, 1.5625 nM 300 μ l 준비한다.
2. 준비된 IgG 용액을 50 μ l/min으로 3분간 주입하여 association을 관찰한다. 주입이 끝난 후 running buffer가 흐르는 상태로 8분을 더 관찰하여 dissociation을 확인한다.
3. Glycine-HCl pH 1.5를 50 μ l/min으로 1분간 주입하여 regeneration한 후, 1xHBST로 3분 동안 안정화 시킨다.
4. 농도별로 5-6를 반복 수행한다.

CAII-Furosemide

Immobilization: CAII

1. 사용하지 않은 남은 채널인 Pro2X Ch1-2에 EDC/NHS 혼합 용액을 20 μ l/min로 7분 동안 주입하여 activation한다.
2. Individual mode로 ligand channel에 667 ng/ml CAII in acetate buffer pH 5.0을 10 μ l/min로 9분간 주입한다.
3. 다시 continuous mode로 바꾸고 1M ethanolamine-HCl을 20 μ l/min으로 7분 동안 주입하여 남아 있는 COOH 작용기를 blocking한다.

Kinetic Analysis

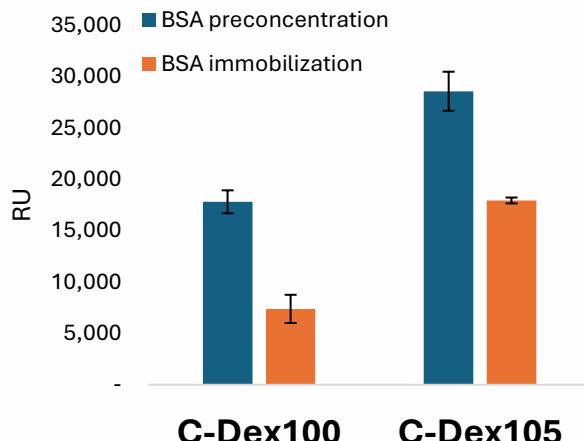
1. Furosemide를 running buffer로 2배씩 연속 희석하여 10,000 nM, 5,000 nM, 2,500 nM, 1,250 nM, 625 nM, 313 nM, 156 nM 300 μ l 준비한다.
2. 준비된 furosemide 용액을 50 μ l/min으로 2 분 간 주입하여 association을 관찰한 후 running buffer가 흐르는 상태로 6분을 더 관찰하여 dissociation을 확인한다.



Application Note #6

iCLUEBIO

Results and Discussion

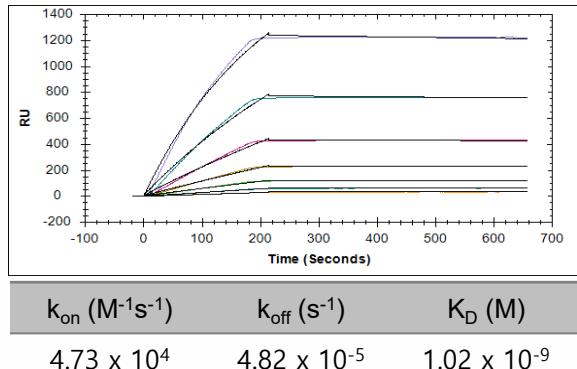


[Figure 3. C-Dex100 및 C-Dex105에서의 BSA 이온결합 및 고정화 레벨]

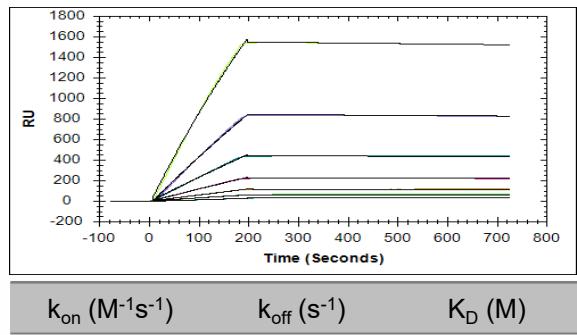
새롭게 개발된 C-Dex105 센서칩은 기존 C-Dex100 대비 고정화 성능이 크게 향상된 것을 Figure 3에서 확인할 수 있습니다. BSA의 이온결합 및 고정화 신호 비교 결과, C-Dex105는 표면 카르복실기 밀도가 효과적으로 증가하여 리간드를 보다 효율적으로 고정할 수 있음을 보여주었습니다. 그 결과, C-Dex105는 C-Dex100 대비 이온결합 신호는 약 1.6배, 공유결합 신호는 약 2.5배 높은 성능을 나타냈습니다.

본 연구에서는 C-Dex105 센서칩의 고정화 특성이 실제 결합 분석에 미치는 영향을 평가하기 위해, 단백질 및 저분자 화합물 기반의 두 가지 결합 모델에서 kinetic 분석 가능성을 검토하였습니다. 먼저 단백질-단백질 결합 모델(Protein A-IgG, Figure 4)에서 C-Dex105는 기존 C-Dex100와 비교하여 k_{on} , k_{off} 값의 유의미한 차이를 보이지 않았으며, 두 센서칩 모두 약 10^{-9} M 수준의 K_D 값을 나타냈습니다. 이는 생산 공정 최적화를 통해

(1) C-Dex100



(2) C-Dex105



[Figure 4. C-Dex100 및 C-Dex105에서의 Protein A-IgG 결합 분석 결과]

표면 카르복실기 밀도가 크게 증가하였음에도 불구하고, C-Dex105 표면이 단백질의 구조적 안정성이나 결합 접근성을 저해하지 않는다는 점을 시사합니다.

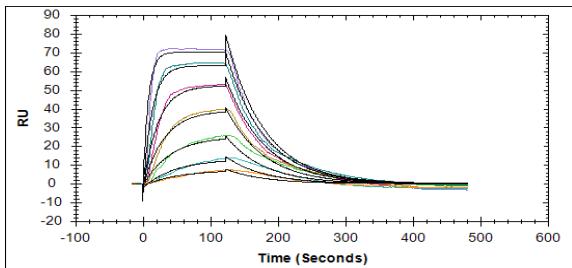
또한, C-Dex105의 강화된 결합 용량이 저분자 화합물 분석에서도 유효한지를 확인하기 위해, 저분자 분석에 적합한 HC1000 센서칩과 비교 분석을 수행하였습니다. 저분자 결합 모델(CAlI-Furosemide, Figure 5)에서도 C-Dex105와 HC1000은 약 10^{-6} M 수준의 유사한 K_D 값을 보였으며, 센서그램 형태 또한 두 센서칩 모두에서 안정적으로 유지되었습니다.



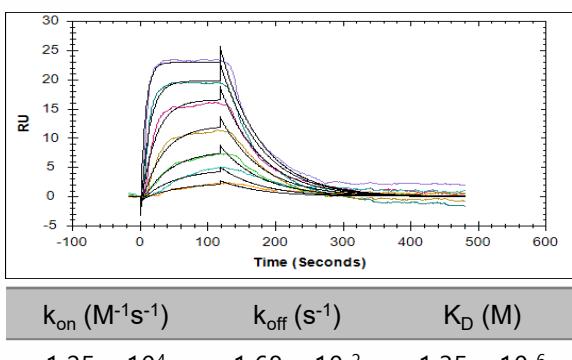
Application Note #6

iCLUEBIO

(1) C-Dex105



(2) HC1000



[Figure 5. C-Dex105 및 HC1000에서의 CAII-furosemide 결합 분석 결과]

종합적으로 C-Dex105는 단백질 결합부터 저분자 화합물 분석까지 폭넓은 분자량 범위에서 안정적이고 재현성 높은 성능을 확인했습니다. 이러한 특성으로 인해 C-Dex105는 다양한 분석 범위와 초기 조건 탐색이 요구되는 연구 환경에서 iMSPR 플랫폼의 범용(Standard) 센서칩으로 활용될 수 있을 것으로 기대됩니다.

이번 연구를 통해 C-Dex105의 활용성이 크게 확장되었지만, C-Dex105와 HC1000는 서로 다른 분석 요구를 충족하는 상호보완적 관점에서 이해되어야 합니다. HC1000은 선형

폴리카복실레이트 표면으로 인해 높은 표면 접근성, 낮은 비특이적 흡착을 유지하는 고유한 특징을 갖고 있습니다. 따라서 복합 시료, 높은 비특이적 결합 위험, 극저분자 kinetics와 같이 보다 정교한 실험조건이 요구되는 상황에서는 HC1000이 더 적합할 수 있으며, 실험자는 목적과 시료 특성에 따라 두 칩을 적절히 선택함으로써 최적의 분석 전략을 수립할 수 있습니다.