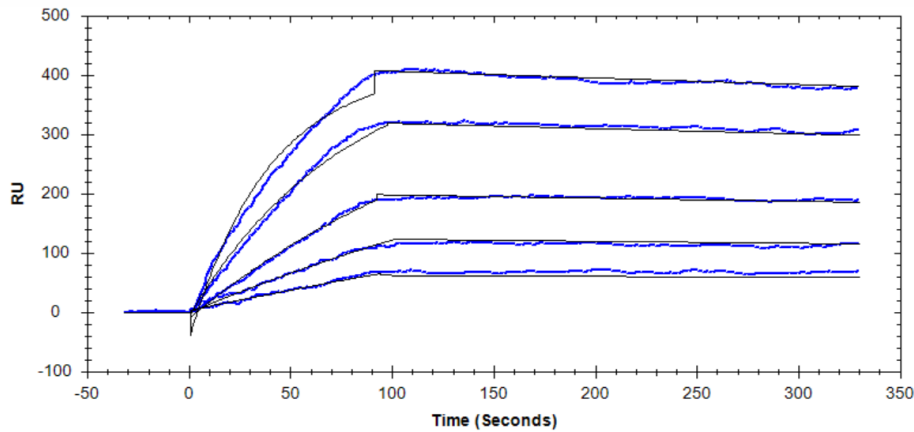




## 1:1 Binding model for Kinetic evaluation

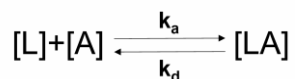


SPR 실험을 통해 얻은 sensorgram은 위와 같습니다. 이 curve들을 이용하여 kinetic evaluation을 진행하면 아래 표의 결과들을 얻게 됩니다. 이 결과를 통해 두 분자간의 결합력을 판단할 수 있습니다

Conc.	Rmax(RU)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	RI(RU)	Chi <sup>2</sup>
8 nM	456.58	1.97E+05	2.83E-04	1.43E-09	3.34	40.70
16 nM					0.50	
32 nM					-8.94	
64 nM					-3.11	
128 nM					-38.87	

위의 결과값들은 1:1 binding model을 사용하여 계산된 값들입니다. 일반적으로 SPR에서 두 분자간의 결합력을 측정할 때에는 1:1 binding model을 사용하여 계산합니다. 1:1 binding model은 Ligand 한 분자에 analyte 한 분자가 결합하는 것을 말합니다. 결합속도상수(Association rate constant,  $k_a$ )와 해리속도상수(Dissociation rate constant,  $k_d$ )를 구한 뒤, 해리속도상수를 결합속도상수로 나누면 결합친화도를 평가하는 평형해리상수(Equilibrium dissociation constant,  $K_D$ )를 구할 수 있습니다.

1:1 반응에서 두 분자간의 반응식은 다음과 같습니다.



시간에 따른 LA 결합물질의 농도의 변화는 다음과 같은 식으로 나타냅니다.

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a[L][A] - k_d[LA] \quad (1)$$



이 때, 센서칩에 고정된 ligand 양은 일정하므로 analyte를 주입하면 ligand에 analyte가 결합하며 순수 ligand 양이 줄어듭니다. 순수 ligand 농도는 아래와 같이 나타낼 수 있습니다.

$$[L] = [L]_0 - [LA] \quad (2) \quad [L]_0: \text{Ligand의 초기농도}$$

Association 구간에서 LA의 농도는 SPR 신호(RU)로 나타낼 수 있고, Ligand의 초기농도는  $R_{\max}$ 로 나타낼 수 있습니다. 주입되는 Analyte의 농도는 항상 일정하다고 가정합니다.

위의 조건들을 적용시키면 시간에 따른 LA 결합물질의 농도 변화식은 다음과 같이 변환할 수 있습니다.

$$\frac{dR}{dt} = k_a C(R_{\max} - R) - k_d R \quad (3) \quad C: \text{Analyte 농도}$$

(3)번 식을 적분하면 association 구간에서 시간(t)에 따른 SPR 신호( $R_t$ ) 식은 다음과 같습니다.

$$R_t = k_a C R_{\max} \left[ 1 - e^{-((k_a + k_d)t)} \right] \quad (4)$$

Dissociation 구간에서의 (1)번 식을 살펴보면  $[A]=0$  이므로 다음과 같이 나타낼 수 있습니다.

$$\frac{d[LA]}{dt} = -k_d [LA] \quad (5)$$

$$\frac{dR}{dt} = -k_d R \quad (6)$$

(6)번 식을 적분한 Dissociation 구간에서 시간(t)에 따른 SPR 신호( $R_t$ ) 식은 아래와 같습니다.

$$R_t = R_0 e^{-k_d t} \quad (7) \quad R_0: \text{Association이 끝나는 지점의 신호}$$

실험을 통해 얻은 curve를 association 구간에서는 (4)번 식, dissociation 구간에서는 (7)번 식으로 fitting 하여 계산식과 실험 curve가 가장 잘 맞을 때의  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_D$  값을 구합니다. 신뢰도 높은 값을 구하기 위해서는 여러 농도의 curve를 fitting해야 합니다.



이렇게 fitting을 통해 얻어지는 값은 다음과 같습니다.

**Association rate constant( $k_a$ ):** 결합 속도 상수. Biological system에서는 보통  $10^2 \sim 10^7$ 의 값을 갖습니다. 클수록 결합이 빠르게 일어남을 의미합니다. 2차 반응이기 때문에  $1/Ms$  단위를 가집니다.

**Dissociation rate constant( $k_d$ ):** 해리 속도 상수. Biological system에서는 보통  $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 의 값을 갖습니다. 낮을수록 해리가 느리게 일어남을 의미합니다. 1차 반응이므로  $1/s$  단위를 가집니다.

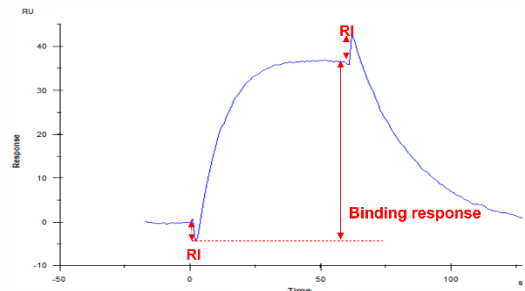
**Equilibrium dissociation constant( $K_D$ ):** 평형 해리 상수. 몰농도로 나타내며 affinity를 판단하는 parameter로 사용됩니다. 값이 낮을수록 결합친화도가 높음을 의미합니다.

**Rmax:** 모든 Ligand가 반응하였을 때 나타날 수 있는 최대 신호입니다. 이론적인 Rmax는 아래와 같이 나타낼 수 있습니다.

$$R_{max} = \frac{\text{Analyte M. W.}}{\text{Ligand M. W.}} \times \text{immobilization level} \times \text{stoichiometric ratio}$$

위의 식은 모든 Ligand가 활성 되었을 때의 Rmax로 실제 실험에서는 이론적 Rmax의 50% 이하의 값을 갖습니다.

**RI:** bulk effect로 일어나는 신호입니다. Running buffer와 analyte가 녹여져 있는 buffer의 조성이 조금이라도 다를 경우, 굴절률 차이에 의해 신호가 바뀌게 됩니다. Analyte 주입시와 주입 끝부분에 신호 차이가 생기게 되며 이 신호를 제외하여 binding 신호를 판단합니다.



**Chi<sup>2</sup>:** 실험한 curve와 fitted curve가 얼마나 일치하는 지를 측정하는 parameter 중 하나입니다. 두 curve 잔차 제곱의 평균으로 계산합니다.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_f - r_x)^2}{n - p}$$

$r_f$ : 주어진 점에서의 fitted value

$r_x$ : 주어진 점에서의 실험 값

$n$ : 데이터 값의 개수

$p$ : fitted parameter의 개수