

# User guide

## Carboxyl modified Sensor chips & Amine coupling kit



## 관련 제품 목록들

### Sensor chip lists

목록	용량/pkg	제품번호	권장 분석물질 및 보관
COOH-Au chip	10	PCCH1000	Proteins, Vesicles, Nano-particles, Cells, Peptides, Oligomers 냉장 보관
C-dex100 chip	3	DCCH1100	Proteins, Peptides, Oligomers 냉동 보관
HC1000M chip	3	HCCH101KX	Small molecules 냉동 보관

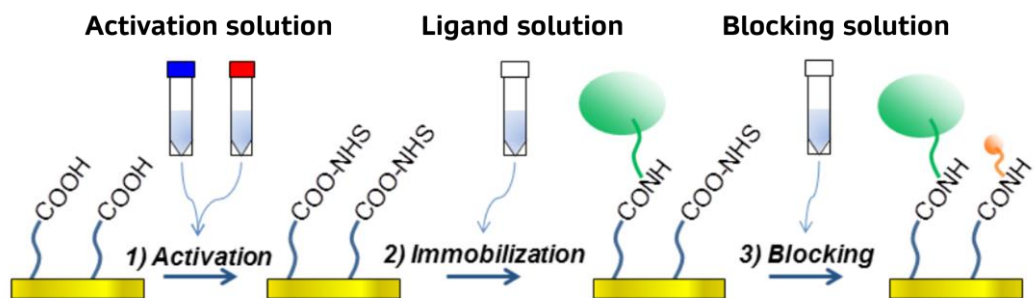
### Buffers & Reagents

목록	용량/pkg	제품번호	용도
HBST buffer (10x)	50ml	RBHT1010-50	운용 버퍼, 평형, washing, dissociation
Amine coupling kit	100 tests	IMAM1000	리간드 (단백질) 고정화
Glycine-HCl 50mM NaOH	50ml	RGGH10NNX	Regeneration

Note: 연구 목적으로만 사용해주세요.

# Amine coupling

Amine coupling은 리간드가 단백질인 경우 단백질의 amine을 COOH 센서 칩에 공유결합 시키는 방법입니다. 단백질에는 lysine, arginine 등 amine 잔기를 보유하고 있는 아미노산이 풍부하기 때문에 매우 성공적으로 COOH 센서 칩에 고정시킬 수 있습니다. 이렇게 고정된 리간드는 공유결합이 되어 있기 때문에 regeneration 단계에서 탈착되지 않으며, 단백질 활성이 감소되지 않는다면 계속 사용이 가능한 장점이 있습니다. 하지만 단백질 활성부위가 센서 칩 표면에 고정되어 활성이 저하되는 경우가 있기 때문에 positive 샘플에서도 신호가 보이지 않는다면 다른 고정화 방법 (단백질에 tag이 있다면 비공유 특이결합으로 단백질을 방향성 있게 고정시킬 수 있습니다.)을 선택할 것을 권장합니다.



## Amine coupling kit lists

제품번호	구성 품목
IMAM1000	EDC 1 g (Powder) NHS solution, 25 ml Blocking solution, 30 ml 1M NaCl borate buffer, 50 ml Acetate buffer 4.0, 25 ml Acetate buffer 5.0, 25 ml 10X HBST, 50 ml

## Amine coupling kit 분주 및 보관

구성 품목	분주 및 보관
EDC 1 g (Powder)	1. DIw 25 ml에 용해 2. 150 ul 용량으로 분주 3. 분주 후 냉동보관
NHS solution, 25 ml	1. 150 ul 용량으로 분주 2. 분주 후 냉동보관
Blocking solution, 30 ml	1. 250 ul 용량으로 분주 2. 분주 후 냉동보관
Acetate buffer 4.0, 25 ml Acetate buffer 5.0, 25 ml	1. 250 ul 용량으로 분주 2. 냉장보관
1M NaCl borate buffer, 50 ml	실온보관
10X HBST, 50 ml	실온보관

## 센서 칩 장착 및 평형 상태

- 1 냉장 보관되어 있는 센서 칩을 센서 칩 케이스에서 flat tweezer를 이용하여 조심스럽게 꺼내어 프리즘홀더에 장착합니다.

**Note:** 센서 칩 케이스에 붙어 있는 면이 프리즘홀더의 프리즘과 결합되는 면입니다. 센서 칩을 반대로 장착하면 재사용 시 100% 성능이 보장되지 않습니다.

- 2 1X HBST 버퍼로 Priming을 진행한 후 1M NaCl borate buffer를 3~5분 정도 센서 칩을 washing 해 줍니다.

**Note:** 10X HBST 버퍼는 실험 바로 전에 DIw에 10배 희석하여 준비해 줍니다.

## Ligand 고정화

- 1 냉동/냉장 보관되어 있는 EDC (150 ul), NHS (150 ul), Blocking solution (250 ul), regeneration 버퍼를 모두 실온에 준비합니다.  
  
Note: Ligand 물질은 물질 특성에 맞게 준비합니다. 실온에 준비한 후 가능한 신속하게 실험을 진행합니다.
- 2 Activation: EDC, NHS를 1:1로 혼합하여 300 ul를 준비한 후 5~10 분 센서 칩에 흘려주어 COOH 표면을 NHS 표면으로 만들어 줍니다.  
  
Note: activation 단계의 권장 유속은 10~30 ul/min 입니다.
- 3 Ligand 고정화: Ligand를 acetate buffer (pH4.0 ~ 5.5)에 1~100 ug/ml 농도로 희석하여 1~30분 동안 주입해 줍니다.  
  
Note: 목표 고정화 레벨에 따라 시간, 유속, 농도를 조절하여 고정화 단계를 수행해 줍니다.
- 4 Blocking: Blocking solution 을 5분 동안 (유속 30 ul/min) 주입해 줍니다.  
  
Note: analyte와의 결합을 수행한 결과 비특이적 흡착이 많다면 serum albumin을 100 ug/ml로 제조하여 blocking 단계전에 추가로 수행해 줍니다.
- 5 Pre regeneration: 비공유결합으로 흡착된 ligand를 탈착 시키기 위해 regeneration 버퍼를 1~5회, 3분 (유속 50 ul/min) 조건으로 수행해 줍니다. 수행 횟수는 ligand 탈착 여부를 모니터링하면서 결정합니다.

## Analytes 분석

- 1 더 이상 탈착 되는 신호가 관찰되지 않고, 센서그램 평형 상태가 관찰된다면, analyte를 분석해 줍니다. 대표농도 1~3 가지 (100 nM, 1 uM, 10 uM) 정도를 우선 주입하여 신호가 있는지 확인합니다.

Note: chemical의 경우 100 uM까지 수행해야 하는 것을 권장합니다.

- 2 신호가 감지 되었다면 포화 농도라고 판단되는 농도부터 2배씩 희석하여 5개 이상의 농도별 센서그램을 획득합니다. 농도 0 nM (러닝 버퍼) 역시 센서그램을 획득하여 결합 외 신호에 대한 보정 작업에 활용합니다.

Note: kinetics evaluation을 위해서는 유속을 50 ~70 ul/min으로 진행할 것을 권장합니다. 해리가 잘 되지 않는 결합의 경우 해리 구간을 결합구간 대비 5~10배 (일반적으로는 2배) 길게 진행해 줄 것을 권장합니다.

## Regeneration

해리가 완전히 되지 않는 결합의 경우 regeneration 버퍼를 이용한 regeneration 단계가 필요합니다. 여러 농도를 분석하기 위해서는 농도와 농도 사이에 regeneration을 수행해 줍니다. Glycine-HCl pH2.5 용액을 우선 평가한 후 완벽하게 regeneration이 되지 않는다면 pH1.5 용액으로 변경하여 수행해 줍니다. Glycine 기반의 용액으로 regeneration이 잘 되지 않는다면 NaOH로 변경하여 수행해 줍니다.

## Ligand 센서 칩 보관

아이클루바이오에서 제공하는 Storage kit을 이용하여 ligand가 고정된 센서 칩을 보관할 수 있습니다. 프리즘 홀더에 전용 storage FM을 장착한 후 glycerol buffe를 로딩해 주세요. Ligand의 특성에 따라 다르지만 1개월 이상 보관 후 사용이 가능합니다.

### Note:

1. 더 자세한 설명은 장치 구입시 제공받은 핸드북을 참고해 주세요.
2. [www.icluebio.com](http://www.icluebio.com)에서 제공되는 Application Note 1, 2, 3, 4는 모두 COOH sensor chip을 기반으로 작성되었습니다. 실험법을 참고해 주세요.

## **[www.icluebio.com](http://www.icluebio.com)**

icluebio의 센서 칩과 버퍼 및 시약류는 대한민국에서 제조되며, specialist의 정밀한 품질검사를 통해 고객에게 최종적으로 전달됩니다. 소모품 중 일부는 독일의 Xantec 사의 제품을 공급하고 있습니다.

제품문의: 031-757-6180, 학술사업팀 담당자

이메일: [sales@icluebio.co.kr](mailto:sales@icluebio.co.kr)