



Kinetics evaluation of CAII- Small compounds using iMSPR-mini/F & HC1000M

iMSPR-mini/F는 단백질과 케미컬 결합 분석을 쉽고 빠르게 수행할 수 있는 아이클루바이오의 엔트리급 모델입니다. 본 application 실험에서는 3D 센서칩인 HC1000M을 이용하여 케미컬 의약품의 분석 모델이 될 수 있는 CAII와 acetazolamide, Furosemide의 결합 분석을 수행하였습니다. 본 실험에서 사용한 장치, 재료, 조건은 다양한 단백질-케미컬 결합 분석에 활용할 수 있습니다.

Materials

- Instrument: iMSPR-mini/F
- Sensor chip: HC1000M
- 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: Carbonic anhydrase II
- Analyte: Acetazolamide (222Da), Furosemide (331 Da)

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 50 ug/ml CAII(in Acetate buffer pH4.0) 250 ul를 준비하여 10 ul/min으로 20분 주입한 후 1xHBST로 5분동안 washing 한다. (권장 immobilization level: >5000RU)
- 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.

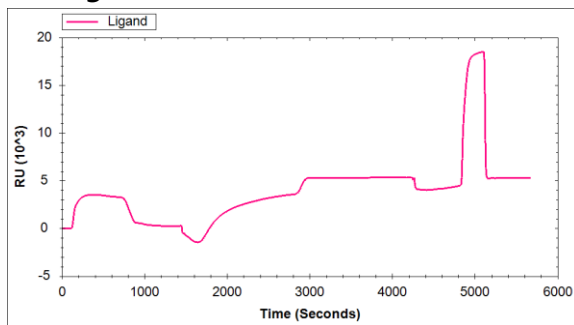
Analyte binding

- ① 2500nM, 1250nM, 625nM, 313nM, 156nM acetazolamide, furosemide (in 1xHBST buffer)를 각각 200 ul 준비한다. 실험당일 사용하고 있는 running buffer에 희석
- ② Injection valve에 2500nM Acetazolamide를 200 ul loading하여 50 ul/min으로 3분 주입한 후 1xHBST로 7분동안 washing 한다.
- ③ 농도별로 반복수행
- ④ Furosemide 를 동일하게 수행

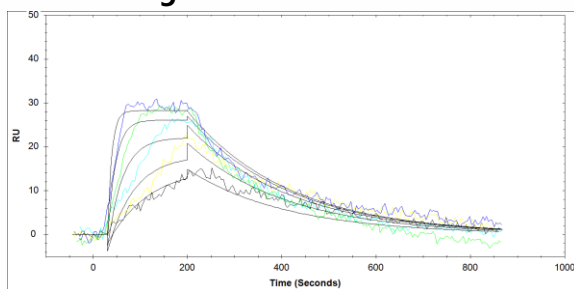


Results

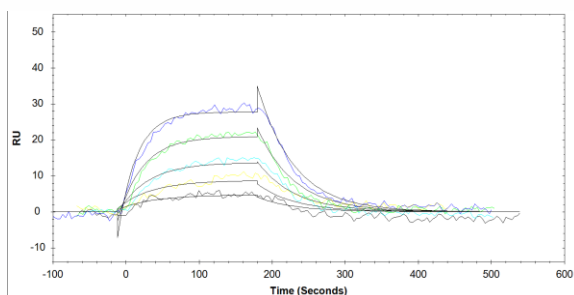
R1. Ligand 고정화



R2. Acetazolamide Curve fitting: one to one binding model



R3. Curve fitting: one to one binding model



Results summary

S1. Acetazolamide

Contents	Value
Immobilization Level	6000 RU
B_{max}	29.3 RU
K_a (Association rate, $1/M*s$)	4.32×10^4
K_d (Dissociation rate, $1/s$)	4.68×10^{-4}
K_D (Affinity)	108nM
χ^2	4.29

S1. Furosemide

Contents	Value
Immobilization Level	6000 RU
B_{max}	69.0 RU
K_a (Association rate, $1/M*s$)	8.09×10^3
K_d (Dissociation rate, $1/s$)	1.98×10^{-2}
K_D (Affinity)	2450nM
χ^2	1.83