

Easy ELISA Constructor (ab)

Antibody-detecting ELISA construction

取扱説明書

Beacle, Inc.
KYOTO JAPAN

--- 目 次 ---

(1) はじめに	2
(2) 製品内容	2
(3) 保存	2
(4) 測定原理	2
(5) 用途	2
(6) 必要な試薬、器具、機材など.....	2
(7) 操作方法	2
(8) トラブルシューティング	4
(9) お問い合わせ先	4

ご注意

1. 本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬としては使用しないでください。
2. キット受け取り後、MAD 試薬と溶解前の陽性抗原は-20℃で保存下さい。

(1) はじめに

Easy ELISA Constructor (ab) は抗体を評価するための ELISA 系を構築し、測定するキットです。条件検討も含め半日で ELISA の構築が可能で、構築した ELISA は 90 分で 1 回の測定を完了することが出来ます。また、本品の MAD 試薬を利用することで検出抗体を利用した抗体検出 ELISA の感度を大幅に上昇させることも可能です。

(2) 製品内容

本製品には以下の種類があります。本マニュアルは以下の製品に適用されます。

製品番号	製品名
BCL-EEC-01	Easy ELISA Constructor (ab)

本キットには以下のものが付属しています。

MAD試薬(HRP標識)	12 μ L	1 本	発色試薬(2液性)	各12mL	2 本
抗原固相化バッファー	25mL	1 本	3倍濃縮ブロッキング溶液	15mL	1 本
20倍濃縮洗浄バッファー	50mL	1 本	発色反応停止液	16mL	1 本
MAD反応バッファー	22mL	1 本	96wellマイクロプレート (ストリップ型)		2 枚
マウス増感試薬	12 μ L	1 本	陽性抗原(凍結乾燥品)	10 μ g	1 本
陽性抗体(ウサギ用)	10 μ L	1 本	陽性抗体(マウス用)	10 μ L	1 本

構成は予告なく変更する場合があります。

(3) 保存

キット受領後、MAD 試薬と陽性抗原は-20℃で保存下さい。他の構成成分は 4℃保存です。MAD 試薬は用事調製とし、使用後は速やかに-20℃庫へ保存下さい。

(4) 測定原理

本キットは、抗原を固相化し、抗原に結合した抗体を検出する直接法と同じ手法を利用しています。抗体検出には HRP 標識した抗体検出プローブ (MAD 試薬) を用いることで迅速、高感度の検出を達成しています。MAD 試薬は殆どの IgG を検出できますが、一部、検出能が弱い抗体種(マウス IgG1 やヤギ IgG 等)があります。ただし、マウス IgG1 は付属のマウス IgG 増感試薬を利用することで検出が可能で、測定結果は用量依存性があるので、定量的評価も可能です。

(5) 用途

- ・免疫した動物血清中の IgG の抗原特異的な結合能の評価
- ・抗体の抗原に対する結合活性が未知の IgG 抗体の抗原特異的な結合能の評価
- ・モノクローナル抗体調製時のスクリーニング
- ・その他

(6) 必要な試薬、器具及び機材など

- ・抗原(測定対象の抗体が認識する抗原)
- ・マイクロプレートリーダー(測定波長 abs=450 nm)
- ・マイクロピペット
- ・マイクロチューブ(各種試薬の希釈に用います)
- ・精製水または蒸留水
- ・8 連マルチチャンネルピペット(同、リザーバー)

(7) 操作方法

<操作手順の概要>

本キットを用いた ELISA 構築は、通常、以下の 2 つのステップで行います。

ステップ①: 条件検討(操作時間 90 分間*)

固相化する抗原濃度と抗体サンプルの希釈率の目安を決定します。また、陽性コントロールを利用した同時操作により、正常操作の確認が行えます。

【注意】: 固相化抗原とサンプルの設定濃度が分かっている場合には本ステップは不要です。

ステップ②: 検量線の確認(操作時間 90 分間*)

ステップ①で決定した条件下で、抗体サンプルの希釈系列による測定データを取得し、検量線を描きます。

【*重要】 90 分間の迅速測定のスケジュールは最大シグナルを見る設定にはなっていません。特に精密さを求める場合には各反応を文中の括弧内の時間へ延長することでシグナルを増強しより精度の高い測定が可能です。

<準備>

- ・20 倍濃縮洗浄バッファーを精製水にて 20 倍希釈して下さい。4℃保存
- ・3 倍濃縮ブロッキング溶液を精製水にて 3 倍希釈して下さい。4℃保存
- ・陽性抗原チューブに蒸留水を 100 μ L 加え溶解します。4℃保存(1ヶ月)
- ・陽性抗体チューブに 20 倍希釈した洗浄バッファーを 1mL 添加します。

<ステップ①> ELISA 構築の条件検討

1. プレートの準備

必要数のストリップを出し、残りはナイロン袋等で包み後日の使用まで保存します。条件検討時に必要なストリップ数は条件により異なりますが、下記の「2. から 4.」の条件を元に決定ください。

2. 固相化抗原の準備

サンプル抗体が認識する抗原で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液を準備します。これを原液として固相化バッファーで希釈し抗原溶液の希釈系列を作ります。各希釈系列の調製量は「2. から 4.」を元に決めて下さい。なお、固相化抗原濃度の目安は 10~0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲ですが、出来るだけ広い範囲で検討下さい。

3. ウェルの固相化

調製した抗原希釈系列を、各濃度について、4. の抗体希釈系列(ブランクも含む)の数だけ、各2ウェルに 100 μL ずつ添加し、20(60)分、37°Cで固相化します。

4. 抗体希釈系列の調製

ウェル固相化反応時間の間に操作します。洗浄バッファーで希釈して抗体サンプルの希釈系列を調製します。別途ブランクとして洗浄バッファーのみも準備します。希釈系列の濃度目安は、抗血清で 100~10000 倍希釈、抗体で数 10ng~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲ですが、出来るだけ広い濃度範囲を検討下さい。

5. ウェルの洗浄とブロッキング

固相化反応終了後、固相化溶液を捨て、300 μL の洗浄バッファーで 3 回洗浄します。洗浄後、プレートをペーパータオルへ叩き付けるようにして、ウェルに残った洗浄液を除きます。次いで、ブロッキング溶液を 200 μL 各ウェルに分注し、37°Cで 20(60)分放置した後、ブロッキング溶液を捨てます。この時、最後にプレートをペーパータオルへ叩き付けるようにして、ウェルに残った溶液を完全に除きます。

6. 抗体サンプルの添加と反応

サンプルの希釈系列(ブランクも含む)をブロッキングの終わった各ウェルに 100 μL ずつ分注します。全てのウェルへの分注が終わった後、37°Cで 20(60)分間反応させます。

7. MAD 試薬の調製

抗体サンプルの反応が終了する数分前から準備を始めます。MAD 反応バッファーを必要量(ウェル当たり 100 μL 、8 連ピペット使用時はデッドボリュームも考慮)を採り、そこへ MAD 試薬原液を反応バッファーの 1/2000 容量(5 mL の場合、2.5 μL)を添加し良く混合します。マウス抗体を検出する際には、更に、マウス増感試薬を反応バッファーの 1/2000 容量加え、良く混合します。

【注意】マウス増感試薬はウサギ抗体がサンプルの場合は添加しないで下さい。

8. MAD 試薬の反応

サンプル抗体と固相化抗原との反応が終了後、ウェルの溶液を捨て、5. で記載した手順により 300 μL の洗浄バッファーで 3 回洗浄し、ペーパータオルでウェルに残った洗浄液を除きます。次いで、準備した MAD 試薬液を各ウェルに 100 μL ずつ添加し、37°Cで 15(30)分間反応させます。

9. 発色試薬添加、反応停止、測定

反応終了後、ウェルの溶液を捨て、5. で記載した手順により 300 μL の洗浄バッファーで 5 回洗浄し、ペーパータオルでウェルに残った洗浄液を除きます。予め室温に戻した発色試薬 A 及び B を等量混合し、混合液の 100 μL を 8 連ピペットにより各ウェルへ分注します。暗所に置くなどにより遮光し、室温(25°C)で 15(30)分間、静置します。青い発色を確認後、発色反応停止液を、発色試薬を入れた時と同じ順番とスピードで 8 連ピペットを用いて 75 μL ずつ各ウェルへ添加し、反応を停止させます。反応停止後、速やかにプレートリーダー(吸収波長 450 nm)で吸光度を測定します。

10. 結果の解釈と条件決定

本ステップの測定結果から、固相化抗原の最適濃度と抗体の最適希釈濃度範囲を設定します。最適固相化抗原濃度は、抗体濃度が低い所で、吸光度が最大反応を示す固相化濃度です(良好な測定には吸光度が 1.5 以上欲しいので、最大値がそれ以下の場合は条件を変えて再検討します)。

最適抗体濃度範囲は、選択した最適固相化抗原濃度でブランクに比べ明らかに高い値を示す抗体の最低濃度を下限とし、吸光度が 2.5 を超えたところの抗体濃度を上限とします。もし検討した濃度範囲が下限や上限を外れた場合には、それらを類推して下さい。

11. 陽性コントロールを使用する場合

正しく操作が行われていることを確認するために、陽性コントロールを利用する場合は、上記の操作でコントロール用に 4 ウェルを追加します。4 ウェルは<準備>で用意した陽性抗原溶液の 5 μL を固相化バッファーで 500 μL (100 倍)へ希釈したもので固相化し、抗体として 2 つのウェルには<準備>で希釈した陽性抗体溶液をそのまま、残りの 2 つには洗浄バッファーを各々 100 μL 加えます。これらの操作は上記のサンプル抗体測定時の操作と一緒に、洗浄操作等も同様に行います。正しく行われた場合には、吸光度でブランクは 0.3 以下、2.0 以上の数値になるはずで

<ステップ②> 検量線の作成と陽性コントロールとの比較

以下の手順は<ステップ①>と異なる点について記載します。固相化、洗浄等は<ステップ①>と同じ手順で操作して下さい。

12. プレートの固相化

必要数のストリップを準備し、ステップ①で選択した条件にてプレートを抗原で固相化し、ブロッキングします。また、陽性コントロールを利用する場合には、<準備>で用意した陽性抗原溶液を固相化バッファーで 100 倍に希釈して固相化します。固相化ウェルは、サンプル(陽性抗原含む)毎にデュプリケート測定でブランクも含め 8 濃度、2 ストリップ(16 穴)分を用意して下さい。

13. 抗体サンプルの調整

検量線を描くために、陽性抗体と抗体サンプルの希釈系列を作ります。<準備>で希釈した陽性抗体溶液そのままを最高濃度とし、以下、3、10、30、100、300、1000 倍に洗浄バッファーで希釈し陽性抗体の希釈系列を調製します。同様に抗体サンプルもステップ①で得た結果を元に 7 点の希釈系列を準備します。

【重要】陽性抗体はウサギ用とマウス用の 2 種が用意されています。サンプル抗体がマウスの場合、必ずマウス用をご利用ください。ウサギ用はマウスと一部の動物種を除いて利用可能です。

14. 検量線用サンプルの添加、反応、MAD 試薬反応、発色、測定

固相化、ブロッキングが終わったプレートに準備したサンプルを 100 μL ずつ各ウェルに添加し、反応させます。以下の手順は<ステップ①>と同じです。

15. 陽性抗体との検量線の比較による抗体サンプルの ELISA やウェスタン利用濃度の目安

- ・陽性抗体より 100 倍以上強い: 非常に高い結合能、10000 倍以上の希釈で利用可能
- ・陽性抗体より 10 倍強い: 高い結合能、1000~10000 倍の希釈で利用可能
- ・陽性抗体と同等: 結合能あまり高くない、100~1000 倍の希釈で利用可能性
- ・陽性抗体の 1/10 以下: 結合能低い、100 倍希釈で利用可能性あり

【重要】目安は陽性コントロールの固相化抗原濃度(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とほぼ同じであることが条件です。ウサギ用陽性抗体は、容量反応が急な性質を持っています。

<2 次抗体との併用で感度を上昇を図る場合>

HRP 標識 2 次抗体を用いた抗体検出 ELISA の場合、本キットと併用すると感度を 10 倍以上上げることが可能です。固相化抗原とサンプル抗体との反応後、2 次抗体を添加しますが、この時に MAD 試薬を併用します。利用方法には 2 種あります。①2 次抗体を添加後、抗体溶液を捨てた後、MAD 試薬を 3 次反応として利用、②2 次抗体と MAD 試薬を予め混合し添加する。MAD 試薬は MAD 反応バッファーで希釈する必要がありますので、①の場合は MAD 試薬は MAD 反応バッファーで希釈下さい。②の場合、混合液は MAD 反応バッファーで調製下さい。何れの場合も、MAD 試薬は原液の 2000 倍希釈で利用します。その他の操作は通常の ELISA と同じです。

【ご注意】MAD 試薬が結合しにくい抗体種(マウス IgG1 やヤギ IgG 等)が 2 次抗体の時には増強効果は見られない場合があります。

【重要】付属ブロッキング溶液にて固相化プレートの長期保存が可能です。固相化プレートを空気中よく乾燥させ、ナイロン袋等に密閉して 4°C 保管すると数ヶ月以上保存可能です。

(8) トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
シグナルが弱い	1. 反応時間が短い。「操作方法」の括弧内に示した反応時間で試してください。その時間で反応させてもシグナルが弱い時は抗体と固相化抗原との反応時間を延長ください。 2. 抗原の固相化が不十分。陽性コントロールの抗原と抗体でシグナルの大きさを確認ください。陽性コントロールでは強いシグナルが出ている場合には、抗原の固相化が上手く行われていない可能性があります。ペプチド抗原も含め、弊社製品の「ペプチド抗原固相化キット」での固相化を考慮下さい。 3. 抗体の抗原に対する結合量が著しく低い。結合量はシグナル強度に比例します。この結合量は抗体の抗原に対する親和性と抗体量に依存します。抗原の親和性が非常に低い場合には抗体濃度を増やしても十分に結合しない場合があります。
ブランク値が高い	4. ブロッキングが不十分。本キットではブランク値は 0.2~0.25 程度です。高いブランク値が出る場合にはブロッキング時間を延長下さい。 5. 固相化抗原の純度が低い。固相化抗原の純度が低いと種々の反応を起こし、ブランク値を高めます。抗原純度を高めて下さい。

(9) お問い合わせ先

株式会社ビークル【製造発売元】

〒606-8305 京都市左京区吉田河原町 14-1



TEL: 075-762-5055 FAX: 075-762-3055

E-mail: technical-support@beacle.com

Website: www.beacle.com