

Easy ELISA Constructor Multi 2ステップ法 実験例

Easy ELISA Constructor Multi を用いて抗体検出 ELISA を構築し、構築した ELISA でサンプルを測定する 2 ステップ法を用いた場合の実験例です。本実施例通りに行う必要はありませんが、参考にして下さい。

材料

測定サンプル: 新型コロナウイルス N タンパク質を投与したマウス抗血清
 抗原: N タンパク質

ステップ① ELISA 条件の検討

1) 固相化プレートの調製

a) 抗原固相化 (プレートレイアウトは右図参照)

5 ストリップをホルダに残し、他は袋等に入れて使用まで保存します。
 溶解した陽性抗原を固相化バッファーで 100 倍希釈し 4 ウェルに添加 (陽性抗体とそのブランク、各 2 ウェル)
 N タンパク質溶液を固相化バッファーで 1/100 以上に希釈し、0.01、0.1、1、10ug/mL で各 8 ウェルに添加 (各固相化濃度で、抗血清 6 とそのブランク、各 2 ウェル)
 以上を添加後、20 分 37°C で固相化

b) ブロッキング

固相化反応後のプレートから溶液を捨て、300 μL の洗浄バッファーで 3 回洗浄。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去。その後、キットのブロッキング溶液を 200 μL 添加し、20 分 37°C でブロッキング。反応後、ブロッキング溶液を捨て、プレートをペーパータオルへ叩き付けるようにして完全に除去

2) サンプル希釈と一次反応

c) サンプル希釈

d) サンプルを洗浄バッファーにて、プレートレイアウトに示した濃度に希釈 (ステップ①で決定)。陽性抗体溶液を洗浄バッファーにてプレートレイアウトで示した濃度に希釈

e) 一次反応

ブロッキングが終わったウェルに、サンプル又は陽性抗体溶液をそれぞれのウェルにデュプリケートで 100 μL ずつ分注し、37°C で 20 分間放置。この間、固相化抗原とサンプルとの一次反応が行われる。

3) MAD II 試薬の調製と二次反応

f) MAD II 試薬液の調製

MAD II 反応バッファーを必要量 (本例では、5mL)、リザーバーへ採り、そこへ MAD II 試薬原液を反応バッファーの 1/2000 容量 (本例では 2.5 μL) を添加し、良く混合。

g) 二次反応

一次反応終了後、ウェルの溶液を捨て、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去。MAD II 試薬液を各ウェルに 100 μL ずつ添加し、37°C で 15 分間反応させた。

4) 発色、反応停止、測定

反応終了後、溶液を捨て、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完全に除去。予め室温に戻した発色試薬 A 及び B からピペットにて等量をリザーバーへ採取し混合 (本例では各 2.5mL で 5mL)。混合液の 100 μL を 8 連ピペットにより各ウェルへ分注し、分注後のプレートは遮光 (本例では機の引き出し保管) し、室温で 15 分間静置。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 50 μL ずつ各ウェルへ添加し、反応を停止。速やかにプレートリーダー (吸収波長 450 nm) で吸光度を測定した。ストリップを装着するホルダはまた使いますので、保存下さい。

5) 測定結果と解釈

陽性コントロール		1	2.075	2.069
抗体希釈率	BLANK	0.286	0.291	

サンプル		固相化抗原濃度	0.01 μg/mL	0.1 μg/mL	1 μg/mL	10 μg/mL			
血清希釈率	1/100	0.298	0.320	1.564	1.563	2.388	2.355	2.658	2.601
	1/1000	0.177	0.193	0.603	0.618	1.763	1.670	2.443	2.365
	1/10000	0.150	0.170	0.275	0.287	0.368	0.310	0.914	0.874
	BLANK	0.132	0.164	0.207	0.229	0.170	0.154	0.284	0.202

解釈

a) 陽性コントロール: 吸光度約 2.0 で、ブランク値は約 0.3 のため ELISA は上手く行っている。

b) 0.01ug/mL の固相化濃度は血清の最低希釈でも吸光度が低すぎるため、10ug/mL は血清 1000 倍希釈以上で反応が飽和傾向が見られるため選択肢から排除。0.1 又は 1ug/mL のいずれかが良いが 1.0 μg を選択した。

注: 固相化抗原濃度が高い場合: サンプル高濃度では飽和するが、感度は良くなる傾向がある。逆に固相化抗原濃度が低いと、感度は落ちるが、高濃度域も含めきれいな用量反応曲線が描ける傾向がある。

固相化濃度	陽性対照	サンプル				
	1ug/mL	0.01ug/mL	0.1ug/mL	1ug/mL	10ug/mL	
希釈率	a	b	c	d	e	
	1	1/1	1/100	1/100	1/100	1/100
	2	1/1	1/100	1/100	1/100	1/100
	3	BL	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
	4	BL	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
	5		1/10000	1/10000	1/10000	1/10000
	6		1/10000	1/10000	1/10000	1/10000
	7		BL	BL	BL	BL
8		BL	BL	BL	BL	

ステップ② ELISAによる血清測定

1) 固相化プレートの調製

4ストリップを取り出し、以下の操作で抗原を固相化

h) 抗原固相化 (プレートレイアウトは右図参照)

溶解した陽性抗原を固相化バッファーで 100 倍以上に希釈し、2 ストリップ (16 ウェル) に添加(デュプリケイト測定で陽性抗体 7 濃度とのブランク)、N タンパク質溶液を固相化バッファーで 1ug/mL(ステップ①で決定)に希釈し、2 ストリップ(16 ウェル)に添加(デュプリケイト測定で抗血清 7 濃度とのブランク)

以上を添加後、60 分 37°Cで固相化

i) ブロッキング

固相化反応後のプレートから溶液を捨て、ステップ①と同様にブロッキングした。但し ブロッキング時間は 60 分で行った。

2) サンプル希釈と一次反応

j) サンプル希釈

サンプルを洗浄バッファーにて、プレートレイアウトに示した濃度に希釈(ステップ①で決定)。陽性抗体溶液を洗浄バッファーにてプレートレイアウトで示した濃度に希釈。

k) 一次反応

ブロッキングが終わったウェルに、サンプル又は陽性抗体溶液をそれぞれのウェルにデュプリケイトで 100 μL ずつ分注し、37°Cで 60 分間放置。この間、固相化抗原とサンプルとの一次反応が行われる。

3) MAD II 試薬の調製と二次反応

l) MAD II 試薬液の調製

MAD II 反応バッファーを必要量(本例では、5mL)、リザーバーへ採り、そこへ MAD II 試薬原液を反応バッファーの 1/2000 容量(本例では 2.5 μL)を添加し、良く混合。

m) 二次反応

一次反応終了後、ウェルの溶液を捨て、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去。MAD II 試薬液を各ウェルに 100 μL ずつ添加し、37°Cで 60 分間反応させた。

4) 発色、反応停止、測定

反応終了後、溶液を捨て、ステップ①と同様に、発色反応を実施し、吸光度を測定した。

5) 測定結果と解釈

測定結果を下表、下図に示す。

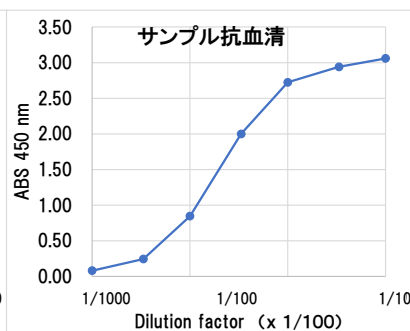
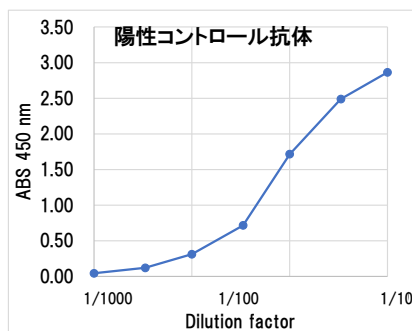
固相化濃度	陽性抗体		サンプル抗血清	
	1ug/mL		1ug/mL	
希釈倍率	a	b	c	d
	1	1/1	1/1	1/100
2	1/3	1/3	1/300	1/300
3	1/10	1/10	1/1000	1/1000
4	1/30	1/30	1/3000	1/3000
5	1/100	1/100	1/10000	1/10000
6	1/300	1/300	1/30000	1/30000
7	1/1000	1/1000	1/100000	1/100000
8	BL	BL	BL	BL

陽性コントロール

陽性抗体 希釈率	測定値		測定値 平均	測定値- BLANK
	well 1	well 2		
1	3.057	2.993	3.025	2.865
1/3	2.735	2.566	2.650	2.490
1/10	1.919	1.833	1.876	1.716
1/30	0.915	0.838	0.876	0.716
1/100	0.505	0.438	0.471	0.311
1/300	0.315	0.248	0.281	0.121
1/1000	0.222	0.188	0.205	0.045
BLANK	0.178	0.143	0.160	

サンプル血清

血清希釈率	測定値		測定値 平均	測定値- BLANK
	well 1	well 2		
1/100	3.246	3.233	3.239	3.239
1/300	3.121	3.121	3.121	3.121
1/1000	2.889	2.919	2.904	2.904
1/3000	2.171	2.188	2.179	2.179
1/10000	1.024	1.026	1.025	1.025
1/30000	0.410	0.437	0.424	0.424
1/100000	0.276	0.245	0.261	0.261
BLANK	0.177	0.182	0.180	—



解釈

- サンプル抗原の固相化濃度がやや高く、濃度反応曲線が高濃度で飽和している傾向が見られた。
- 固相化濃度は陽性対照と同じであるので、サンプル抗血清は陽性抗体より約 100 倍高いと判断される。ウェスタンや ELISA での利用は抗体を精製後、低濃度で可能と想定される。