

# Easy ELISA Constructor Multi (ab)

## Antibody-detecting ELISA construction

### 取扱説明書

#### --- 目 次 ---

(1) はじめに .....	1
(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

#### (1) はじめに

Easy ELISA Constructor Multi は抗血清 (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。準備するものは抗原と測定サンプルのみです。迅速プロトコールでは 90 分で 1 回の ELISA 測定を完了することが出来ますので、手慣れれば半日で条件検討と測定の 2 回の ELISA が可能です。また、標準プロトコールでは 270 分の時間が必要ですが、より高い感度で測定することが出来ます。

本キットが想定しているサンプルは抗血清又は抗体溶液です。本キットで利用可能な動物種はマウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ウマ、ロバ、ブタ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、サル、ヒトで、これらの全サブタイプの IgG の検出が可能です。

#### 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 II 試薬と溶解前の陽性抗原は-20℃で保存下さい。

#### (2) 製品内容

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-EECM-01	Easy ELISA Constructor Multi (ab)

本キットには以下のものが付属しています。

MAD II 試薬 (HRP 標識)	1 本	発色試薬 (2 液性)	2 本
抗原固相化バッファー	1 本	3 倍濃縮ブロッキング溶液	1 本
20 倍濃縮洗浄バッファー	1 本	発色反応停止液	1 本
MAD 反応バッファー	1 本	96well マイクロプレート (ストリップ型)	2 枚
陽性抗原 (凍結乾燥品)	1 本	陽性抗体	1 本

別売りでラット増感試薬が準備されています。

#### (3) 保存

キット受領後、MAD II 試薬と陽性抗原は-20℃で保存下さい。他の構成部品は 4℃保存です。MAD II 試薬は用事調製として下さい。なお、本キットのブロッキング溶液を使った場合、抗原固相化プレートをよく乾燥させ、ナイロン袋等に密閉して 4℃保管すると数ヶ月以上保存可能です。

#### (4) 測定原理

本キットは、固相化した抗原に結合した抗体を、抗体に特異的に結合するプローブ (MAD II 試薬) で検出する直接法を利用しています。MAD II 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 II 試薬による IgG 検出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 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 など

#### (6) 必要な試薬、器具及び機材など

- ・抗原 (サンプルが認識する抗原)
- ・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 >

本キットを用いた測定では、通常、ステップ①として条件検討 (固相化抗原濃度とサンプル希釈率の決定) を行い、その結果を踏まえ、ステップ②で実際の測定を行います。なお、既に条件が分かっている場合にはステップ①は不要です。詳細は基本操作の後に記載されています。2 ステップで行う際の実験例が当社 HP からダウンロードできますので、ご利用下さい。

##### < ELISA 基本操作 >

以下では、反応時間として、迅速法 (短時間) と通常法 (長時間) の 2 つが記載されています。前者で吸光度 1.5 の時は後者では 2.5 程度になります。時間が許せば通常法を利用ください。

##### 1. 事前準備

- ・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。希釈液は 4℃保存してください。
- ・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。希釈液は 4℃保存してください。
- ・陽性抗原溶液調製: 陽性抗原チューブに蒸留水を 100  $\mu$  L 加え溶解します。濃度は 100  $\mu$  g/mL になります。抗原溶液は 4℃保存で約 1 ヶ月利用可能です。
- ・陽性抗体調製: 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。濃度は 1.2  $\mu$  g/mL になります。抗体溶液は 4℃保存で 1 ヶ月は利用可能です。

##### 2. プレートの準備

陽性コントロールとサンプルで必要なストリップを出し、残りは袋で包み後日の使用まで保存します。

##### 3. 固相化抗原の準備

サンプルが結合する抗原を PBS 等で希釈し抗原原液を調製します。抗原原液を固相化バッファーで 10 倍以上に希釈し、固相化抗原溶液を調製します。陽性コントロールを用いる時は、陽性抗原溶液を固相化バッファーで 100 倍希釈します。

#### 4. ウェルの固相化

固相化抗原溶液をサンプルの数だけ、各2ウェルに 100  $\mu$ L ずつ添加し、20(60)分、37°Cで放置し、固相化します。陽性抗原の固相化溶液も同様に固相化します。サンプルと陽性コントロールの各ブランクにも各2ウェル分、それぞれの抗原を固相化してください。

#### 5. サンプル血清や抗体の希釈系列の調製

時間短縮のため、固相化反応中に操作します。サンプルを洗浄バッファーで希釈し、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。陽性抗体は原液を最大濃度とし、1000倍希釈までの範囲で系列を作ってください。

#### 6. 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  $\mu$ L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  $\mu$ L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、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。

#### 7. サンプルの添加と反応

サンプルと陽性抗体の希釈系列(ブランク含む)をブロッキング済の各ウェルに100  $\mu$ Lずつ分注します。全ウェルへの分注が終わった後、37°Cで20(60)分間放置し、固相化抗原と反応させます。

#### 8. MAD II 試薬の調製

固相化抗原とサンプルの反応が終了する10分程度前から準備を始めます。MAD II 反応バッファーを必要量(ウェル当たり100  $\mu$ L、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 II 試薬原液を反応バッファーの1/2000容量(5 mLの場合、2.5  $\mu$ L)を添加し良く混合します。

【注意】ラット増感試薬を用いる場合は反応バッファーの1/2000容量を加え、良く混合します。

#### 9. MAD II 試薬の反応

固相化抗原への反応終了後、ウェルの溶液を捨て、300  $\mu$ L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 II 試薬液を各ウェルに100  $\mu$ Lずつ添加し、37°Cで15(30)分間反応させます。

#### 10. 発色試薬添加、反応停止、測定

反応終了後、溶液を捨て、300  $\mu$ L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  $\mu$ Lを8連ピペットにより各ウェルに分注します。分注後のプレートは遮光し、室温で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50  $\mu$ Lずつ各ウェルへ添加し、反応を停止させます。黄色に変色します。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。各濃度の測定値から対応するブランク値を引いた値を観測値とします。観測値を元にて、濃度反応曲線を描きます。

#### <ステップ①における条件検討の説明>

・固相化抗原量：固相化抗原の種々の濃度を検討し、固相化抗原濃度を決定します。

(操作) 固相化抗原濃度の幅を広くとるため、例えば10倍希釈系列を作ります。異なる濃度で固相化したプレートにてサンプルの希釈系列を測定し、その反応曲線から、最適な固相化抗原濃度を決定します。ブランク用に固相化濃度毎に固相化ウェルを準備下さい。

(解釈) サンプルの低濃度で、吸光度が十分高く(吸光度が迅速法1.3、通常法2.0程度)、且つブランク値が0.3以下の固相化濃度を選択ください。固相化抗原濃度の目安は10~0.1  $\mu$ g/mL範囲です。

・サンプル希釈倍率：サンプルの希釈倍率幅を決定します。

(操作) サンプル希釈倍率の目安を得るため10倍希釈系列など粗くても良いので出来るだけ幅広く取って下さい。ブランクも用意します。希釈倍率の目安は、血清で100~10000倍、抗体で数10ng~1  $\mu$ g/mLの範囲です。

(解釈) ブランクに比べ明らかに高い吸光度が見られる最低濃度を下限とし、吸光度が2.5程度を示すサンプル濃度を上限とします。

・陽性コントロール：陽性コントロールを利用して操作が正しく行われていることを確認します。

(操作) 陽性抗体溶液そのままブランクを利用します。各2ウェル陽性抗原を固相化します。

(解釈) 測定結果が迅速法で吸光度が1.5、通常法で3.0程度の値が得られ、ブランク値が0.3以下の場合、測定は上手く行っていると考えられます。

#### <ステップ②の操作と解釈の説明>

・サンプルの濃度を振って抗体価を調べる場合

(操作) 固相化抗原濃度とサンプル希釈倍率はステップ①で決定したものを利用します。陽性抗体は、原液(1)、以下、3、10、30、100、300、1000倍に洗浄バッファーで希釈して利用ください。ブランクも必要です。サンプルの希釈系列も陽性抗体の希釈系列に做って希釈系列を作ると良いでしょう。

(解釈) 陽性抗体との比較によるサンプルの利用目安は以下の通りです。

陽性抗体より100倍以上強い：非常に高い活性、10000倍以上の希釈で利用可能

陽性抗体より10倍強い：高い活性、1000~10000倍の希釈で利用可能

陽性抗体と同等：通常の活性、100~1000倍の希釈で利用可能

陽性抗体の1/10以下：低い活性、100倍希釈で利用可能性あり

【注】目安は陽性コントロールの固相化抗原濃度(1  $\mu$ g/mL)と同じであることが条件です。固相化抗原濃度が低い時には活性はより強く、高い時には活性はより弱いと解釈できます。

・陽性抗体を検量線として利用する場合

(操作) 固相化抗原濃度はステップ①で決定した範囲を元に適切に決定下さい。ELISAでは1濃度で測定した場合、解釈を誤る場合がありますので複数濃度で測定することをお勧めします。陽性抗体は、原液(1)、以下、3、10、30、100、300、1000倍に洗浄バッファーで希釈して利用ください。これ以外にブランクも必要です。

(解釈) 陽性コントロールで得られた濃度反応曲線を4パラメータフィットにあてはめ解析することで、サンプルの抗体濃度に換算できます。換算値は陽性コントロール抗体に対する相対量となります。なお、4パラメータフィットプログラムは通常のプレートリーダーに付属していますが、ない場合は当社HP(<https://beacle.com/download.jp/>)からエクセル作動のプログラムが無償ダウンロード可能です。解析で得られた計算値は換陽性コントロール抗体に対する相対抗体価となります。

#### <2次抗体との併用で感度を上昇させる場合の使用方法>

HRP標識2次抗体を用いた抗体検出ELISAに、本キットのMAD II 試薬を併用すると感度を大幅に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、①2次抗体溶液を捨てた後、MAD反応バッファーで希釈したMAD II 試薬を3次反応として利用する、又は、②2次抗体とMAD II 試薬をMAD反応バッファー中で予め混合し添加します。MAD II 試薬はMAD反応バッファーで希釈することが必須です。何れの場合も、MAD II 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。

#### (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。通常法の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更に延長ください。 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してください。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。ペプチド抗原の場合は固相化が難しい場合があります、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。抗体の抗原に対する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。もしブロッキング時間を延長しても改善が見られない場合は、他のブロッキング剤をお試しください。 5. ブランクはサンプル中に含まれる物質による非特異的吸着によっておこる場合もあります。抗血清の場合、プロテインAレジンなどで抗体に精製して下さい。 6. 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](mailto:technical-support@beacle.com)

Website: [www.beacle.com](http://www.beacle.com)



Beacle, Inc.