



Sandwich ELISA Protocol

ELISA MAX™ Deluxe set



トミーデジタルバイオロジー
アライアンスプロダクト
カスタマーサポート

試薬の構成

1. Capture Antibody (200倍)
2. Detection Antibody (200倍)
3. Standard
4. Avidin - HRP (1000倍)
5. Substrate solution 1種類~2種類
6. Coating Buffer A(5倍)
7. Assay Diluent (5倍)
8. Matrux Diluent ※構成されていない製品もございます。
9. NUNC Maxisorp™ 96 MicroWell Plates
10. Instruction Sheet ※構成されていない製品もございます。
11. ロット専用の取扱い説明書

準備する必要がある試薬、器具

- マイクロプレートリーダー450nm
- 可変式ピペット 2 μ L ~ 1m L
- イオン交換水
- PBS (Phosphate-Buffered Saline) :
 - 8.0 g NaCl
 - 1.16 g Na₂HPO₄
 - 0.2 g KH₂PO₄
 - 0.2 g KCl
 - 1 Lのイオン交換水で溶解
 - pH to 7.4 0.2 μ mでフィルトレーション
- ウォッシュバッファー(PBS + 0.05% Tween-20 pH7.4)
BioLegend Cat. No. 421601を推奨
- ウォッシュボトルもしくはマイクロプレートウォッシャー
- ストップソリューション(2N H₂SO₄)
- 両対数方眼紙もしくはデータ解析用ソフトウェア
- スタンドの希釈に用いるチューブ
- タイマー
- プレートシーラー
- 紙タオル

保存条件

- 未開封のキット試薬は4°Cで保管します。有効期限の過ぎたキットは使用しないで下さい。
- 凍結乾燥スタンダードは1× Assay Diluentで溶解し、ポリプロピレンチューブに小分けし-70°Cで1か月まで保管することができます。解凍再凍結は避けてください。
- 全ての試薬は使用前に室温(18~25°C)に戻してください。
- アッセイが終了後は全ての試薬は規定の保存条件で保管してください。

ヘルスハザード注意

1. 試薬に含まれる防腐剤は、誤飲、吸入、経皮吸収により有害である可能性があります。詳しくはMSDSをオンラインでご参照ください。(www.biolegend.com/support/#msds)
2. Substrate solutionは誤飲、吸引すると有害なため、皮膚、目、着衣に付着しないように注意してください。
3. 血清および血漿の取り扱いはNCCLSレギュレーションに従い、血液を介した感染の可能性を避けてください。
4. ストップソリューションは2N硫酸です。目、手、顔の保護をして下さい。
5. 実験終了後はプレートを廃棄する前に大量の水で洗い流して下さい。

サンプルの採取と取扱い

被検サンプルは溶血していないクリアなものをご使用ください。未知のサンプルの場合は可能な限り、最適な希釈倍率を決めるために複数の希釈したサンプルを事前に測定してください。

細胞培養上清

必要に応じてすべてのサンプルを遠心してデブリスを除いてください。サンプルの保管は-20°Cを推奨します。凍結融解は避けてください。

血清

血清分離用チューブを用いて30分以上凝固した後、1,000 Gで10分間、遠心して下さい。血清分離後は速やかにアッセイするか、-20°Cで保管してください。凍結融解は避けてください。

血漿

抗凝固剤はクエン酸塩、ヘパリン、EDTA入り採血管を用いてください。採血後30分以内に1,000 Gで10分間、遠心し血漿を分離して下さい。分離後は速やかにアッセイするか、-20°Cで保管してください。凍結融解は避けてください。

試薬およびサンプルの準備

異なるキットやロットの試薬を一緒に使用しないでください。メーカーの異なる試薬、抗体も本キットと一緒に使用することは避けてください。全ての試薬は使用する直前に調製してください。

1. 5× Coating Buffer はイオン交換水で1×に希釈します。
1プレートに
2.4mL の 5× Coating Buffer
9.6mLの イオン交換水
を用います。
2. 200× のpre-titrated Capture Antibodyは1× のCoating Buffer で希釈します。
1プレートに
60 μL の 1× Caputure Antibody
11.94mL の 1× Coating Buffer
を用います。

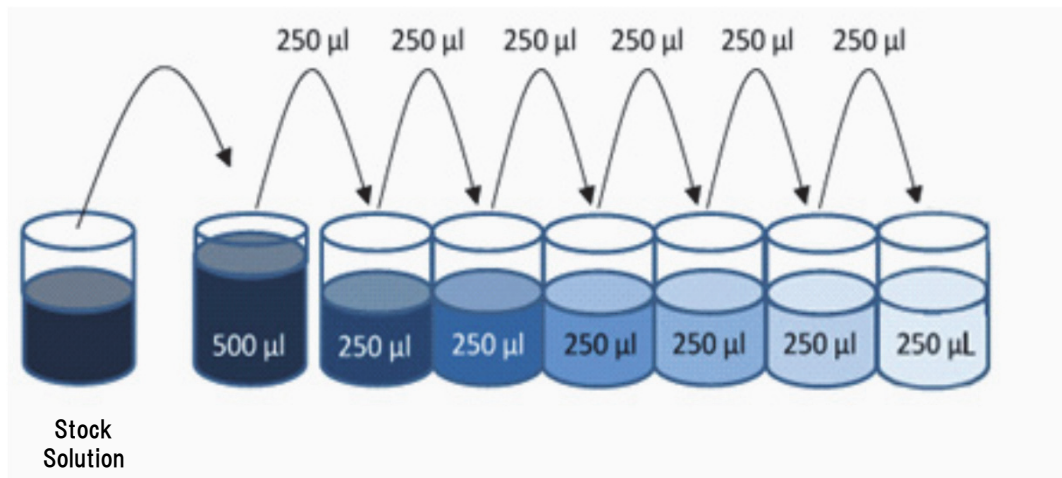
3. 5× Assay Diluent はPBS (pH7.4)で1×に希釈します。
50mlを用意する場合
10mL の 5× Assay Diluent
40mL の PBS
を用います。
5× Assay Diluent の4°C保存中に析出物が認められることがありますが、Bufferとしての性能に影響はありません。1× Assay Diluent に希釈しても大きな析出物が認められる場合はフィルトレーションして透明にすることができます。
4. 凍結乾燥のバイアルは陰圧になっています。凍結乾燥のStandardは0.2mLの 1× Assay Diluent で溶解します。室温で15分間置いた後、穏やかに混和します。
5. ロット専用の取扱い説明書に従い、Standardのストックソリューションを1× Assay Diluent で指定の濃度にします。
6. ビオチン標識Detection Antibodyを 1× Assay Diluent で200倍に希釈します。
1プレートに
60 μL の 1× Detection Antibody
11.94mL の 1× Assay Diluent
を用います。
7. Avidin - HRPを 1× Assay Diluent で1000倍に希釈します。
1プレートに
12 μL の 1× Avidin - HRP
11.99mL の 1× Assay Diluent
を用います。
8. TMB Substrate Solution は使用時に同量のSubstrate Solution AとSubstrate Solution Bを速やかに混和し調製します。容器は洗浄済みのものを用いてください。溶液は透明で色がありません。
1プレートに
6mL の Substrate Solution A
6mL の Substrate Solution B
を用います。
※ Substrate Solutionが、AとBの2種類で構成されていない製品は、この調整は行いません。

操作手順

アジ化ナトリウムはHorseradish-peroxidaseの活性を阻害するため、全てのソリューションにアジ化ナトリウムを使用できません。

1. ELISA測定の前日に“試薬およびサンプルの準備”のとおりCapture Antibodyは1×の Coating Buffer で希釈します。このセットに含まれる96ウエルプレートの全てのウエルに希釈した100 μlのCoating Buffer を加え、プレートにシールしてから4°Cでオーバーナイト(16~18時間)置きます。
2. 全ての試薬は使用前に室温に戻してから使用してください。スタンダードおよびサンプルは2重もしくは3重測定を強く推奨します。検量線はアッセイ毎に設定してください。
3. 1×のWash Buffer 300 μl/ウエルで4回洗浄し、ペーパータオルの上で上下に叩いて完全に残渣を除きます。各ステップの洗浄操作はいずれも同様に行います。
4. 非特異反応をブロックしバックグラウンドを下げるため、各ウエルに200 μlの1× Assay Diluent を加えます。
5. プレートをシールし室温1時間、プレートシャーカで200rpm振盪します。
6. ブロッキング中に必要ならサンプルおよびスタンダードの希釈を行います。

7. スタンダード ストック ソリューションに Assay Diluent を加え希釈したものを $500\ \mu\text{L}$ を準備します。“ロット専用の取扱い説明書”に従ってください) 6本のチューブに $250\ \mu\text{L}$ の Assay Diluent を加えておき、図の様に希釈列を作成します。 Assay Diluent のみをゼロスタンダードとします。





※ Matrx Diluent が構成試薬に入っている製品等は、細胞上清や血清など用いるサンプルによって、スタンダードの調整方法が異なる場合がございます。各製品プロトコルをご覧ください。


8. $1\times$ の Wash Buffer $300\ \mu\text{L}$ / ウェルで4回洗浄します。
9. 所定のウェルに $100\ \mu\text{L}$ のスタンダードおよびサンプルを加えます。サンプルの希釈が必要な場合は事前に $1\times$ Assay Diluent で希釈します。
10. プレートシーラでプレートをシールし、室温で2時間振盪します。
11. プレート内の溶液を捨て、ステップ3と同様に洗浄を4回します。
12. $100\ \mu\text{L}$ の Detection Antibody solution をそれぞれのウェルに加え、プレートにシールしてから振盪しながら室温で1時間インキュベーションします。
13. プレート内の溶液を捨て、ステップ3と同様に洗浄を4回します。
14. $100\ \mu\text{L}$ の Avidin - HRP solution をそれぞれのウェルに加え、プレートにシールしてから振盪しながら室温で30分間インキュベーションします。
15. プレート内の溶液を捨て、ステップ3と同様に洗浄を5回します。最後の洗浄の際は、30秒～1分間ほど wash buffer でウェルを浸すことによって、バックグラウンドを最小限に抑えることができます。
16. $100\ \mu\text{L}$ の Substrate solution をそれぞれのウェルに加え、暗所で15～30分間インキュベーションします。被検タンパク量に応じて青色に変わります。このステップではプレートにシールは必要ありません。
- ※ Substrate solution は、Substrate solution A と B の構成試薬の場合は、事前に調製した TMB Substrate solution として用います。
- ※ インキュベーション時間は、製品によって異なります。各製品プロトコルをご確認ください。
8. $100\ \mu\text{L}$ の Stop solution をそれぞれのウェルに加え、反応を止めます。ウェルの色は青から黄色に変わります。
9. 30分以内に 450nm で吸光度を計測します。 570nm も計測可能な場合は 570nm の吸光度から 450nm の吸光度の差分を取ることができます。

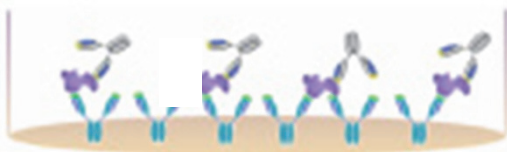
* 最適な Substrate のインキュベーション時間はラボのコンディションに、また最適な測定レンジは ELISA プレートリーダーによります。

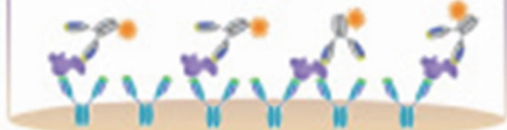
操作手順の要約


1. プレートに100 μ L Capture 抗体のコート



4°C overnight
2. 洗淨4回
200 μ L 1× Assay Diluent


室温1時間振盪
3. 洗淨4回
100 μ L 希釈したスタンダード、サンプル


室温2時間振盪
4. 洗淨4回
100 μ L Detection Antibody solution


室温1時間振盪
5. 洗淨4回
100 μ L Avidin - HRP A solution


室温30分間振盪
6. 洗淨5回
100 μ L substrate solution


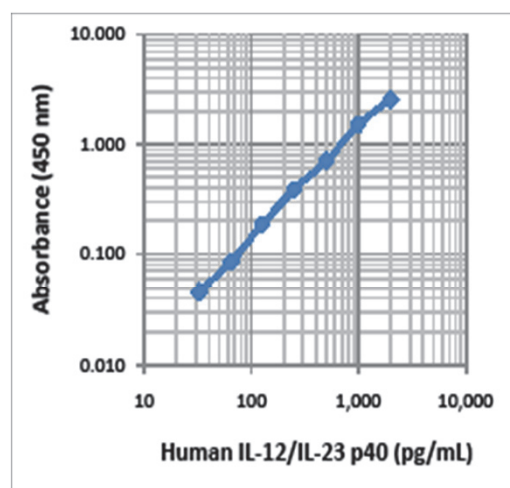
室温暗所15~30分間
7. 100 μ L Stop solution

8. 吸光度測定 450nm および570nm

結果の計算

結果の計算は5もしくは4パラメーター ロジスティクス カーブ フィッティングアルゴリズム ソフトウェア を使用するのが便利です。適当なソフトウェアが無くても両対数方眼紙を用いてサンプルの濃度を定めることができます。2重もしくは3重測定のスランダー、コントロール、サンプルのそれぞれのセットで吸光度の平均を決めます。両対数方眼紙の横軸にサイトカイン濃度を縦軸に吸光度を用いてスランダーポイントをプロットし、検量線を作成します。被検サンプルのタンパク質濃度は、吸光度の平均値を検量線上の交点から求めます。希釈したサンプルの場合は希釈倍数に応じて補正します。被検サンプルの吸光度値が検量線の直線性の範囲を超えた場合は希釈倍数を見直して再測定することが必要です。

参考データ

検量線はアッセイ毎に作成してください。下記の検量線は説明用の参考データです。



検出限界濃度や特異性

各製品プロトコルをご確認ください。

Troubleshooting Guide :

問題	推定原因	解決方法
バックグラウンドが高い	バックグラウンドのウエルにコンタミネーションが生じた	適切にシーラーを用いてウエル間のコンタミネーションを回避してください。 マルチチャンネル ピペットはプレートに触れずに使用してください。
	使用試薬中の内因性たんぱく質の影響や阻害	構成試薬のクロスリアクションの確認(例:インターロイキン モディファイド 組織培養液)
	不十分な洗浄	洗浄回数の増加。 基質溶液を加える前のウォッシュバッファーに漬け込み時間の増加
	TMB Substrate Solutionのコンタミ	TMB Substrate Solutionはウエルに加える前は透明で着色されていません。 基質溶液を用いるコンテナは洗浄したものを使用してください。
シグナルが無い	ディテクション抗体の入れ間違いもしくは入れ忘れ	適切なディテクション抗体を加えて下さい。
	Avidin-HRPの入れ忘れ	プロトコールに従いAvidin-HRPを加えてください。
	Substrate Solutionの入れ忘れ	Substrate Solutionを加えてください。
	Wash bufferにアジ化Naが添加されている	アジ化Naを添加したWash bufferは使用できません。
スタンダードカーブのシグナルが低い、弱い	スタンダードの不完全な溶解もしくは不適切な保存	プロトコールに従いスタンダードを溶解してください。 溶解後のスタンダードは適切なバイアルを用いて、-70°Cで保管してください。
	使用試薬の濃度間違い	ピペッティング エラーや試薬量を確認してください。
	インキュベーション中の不適切な温度、タイミング、振盪	アッセイ コンディションを確認してください。
スタンダードカーブのシグナルがサチレーションしている。	スタンダードの溶解量の間違い	凍結乾燥のスタンダードはプロトコールに従い規定の容量の溶液で溶解する。
	プレートのインキュベーション時間の超過	インキュベーション時間の減少
	ディテクション抗体のインキュベーション時間が長すぎる	ディテクション抗体のインキュベーション時間の減少
	Avidin-HRPのインキュベーション時間が長すぎる	Avidin-HRPのインキュベーション時間の減少
	Substrate Solutionのインキュベーション時間が長すぎる	Substrate Solutionのインキュベーション時間の減少

問題	推定原因	解決方法
サンプルの測定値が測定レンジ外	サンプルの入れ忘れもしくは検出感度以下	サンプルが測定感度以下の場合はサンプル量を増やして再測定してください。プロトコルの改変についてはテクニカルサポートにご確認ください。
	サンプル中の解析対象の濃度が検量線の範囲を超えている	サンプルを希釈して再測定してください。
サンプルおよびスタンダードの測定値のバラツキ	マルチチャンネル ピペッターの故障	キャリブレーションしてください。
	プレート洗浄が不適切もしくは不均一	ピペットチップがしっかりと取り付けられているか確認してください。 各洗浄操作で各試薬が確実に除かれているかを確認してください。
	サンプルが均一で無い	サンプルを希釈して再測定してください。ピペッティング前に良く混和してください。
	サンプルに多くの微粒子状物質の存在	遠心して微粒子状物質を除いてください。
	プレートの振盪不足	全てのインキュベーションステップでELISAプレートシェーカーを用いて振盪してください。その際はウエル中の溶液が十分に動く状態で撹ねることが無いようなスピードに設定してください。
ウエル間のコンタミネーション	プレートシーラーを再使用する場合はシーラーに試薬の付着の無いことを確認してください。 試薬の添加で同一のピペットチップを用いる際は注意して取り扱ってください。 ピペットチップはプレートに触れないように確認しながら使用してください。	



トミーデジタルバイオロジー株式会社
 アライアンスプロダクト
 カスタマーサポート
 TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813
 E-mail : biolegend@digital-biology.co.jp