



Sandwich ELISA Protocol

LEGEND MAX™

ELISA Kit with Pre-coated Plates



**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

試薬	包装単位		容量(ボトル)
	1プレート包装	5プレート包装	
プレコート96ウエル マイクロタイタープレート	1	5	
ディテクション抗体	1	5	12ml
スタンダード	1バイアル	5バイアル	凍結乾燥
マトリックス (血清、血漿サンプル専用)	1ボトル	5ボトル	凍結乾燥
HRP標識物質 (抗体やアビジン等)	1ボトル	5ボトル	12ml
アッセイバッファー	1ボトル	5ボトル	25ml
ウォッシュバッファー (20倍濃縮)	1ボトル	5ボトル	50ml
サブストレイトソリューション	1ボトル	5ボトル	12ml
ストップソリューション	1ボトル	5ボトル	12ml
プレートシーラー	4シート	20シート	
アシディフィケーション ソリューション	1バイアル	5バイアル	1.5ml
ニュートラリゼーション ソリューション	1バイアル	5バイアル	1.5ml

※ 製品によって、マトリックス、アシディフィケーション ソリューション、ニュートラリゼーション ソリューションは、構成試薬に入っていない場合がございます。各製品の英文プロトコルでご確認ください。

必要な試薬、器具

- マイクロプレートリーダー450nmおよび570nm
- 可変式ピペット 1μL~1mL
- イオン交換水
- 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
- 両対数方眼紙もしくはデータ解析用ソフトウェア
- スタンダードを希釈に用いるチューブ
- タイマー
- 紙タオル
- プレートシェーカー(必要に応じて)
- プラスチックチューブ(必要に応じて)

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。

試薬開封もしくは調製後の保存条件	
マイクロプレートウエル	未使用のマイクロプレートストリップは枠から外して、アルミホイル袋に乾燥剤とともに入れて密閉し、4°Cで1か月まで保管することができます。
スタンダード	調整済みのスタンダードストックソリューション、マトリックスは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。
マトリックス	
ディテクション抗体	開封後は4°Cで保管し、1か月以内に使用します。
HRP標識物質	
アッセイバッファー	
ウォッシュバッファー	
サブストレイトソリューション	
ストップソリューション	
アシディフィケーション ソリューション	
ニュートラリゼーション ソリューション	

※ 製品によって、マトリックス、アシディフィケーション ソリューション、ニュートラリゼーション ソリューションは、構成試薬に入っていない場合がございます。各製品プロトコルでご確認ください。

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. サブストレートF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-70°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、-70°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、-70°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用意

Note: 全ての試薬は使用する直前に調製してください。

詳細な調製方法については、各製品のプロトコルを確認してください。

以下には、製品によって構成されていない試薬の準備方法も記載されているため、その場合は、調製する必要はありません。

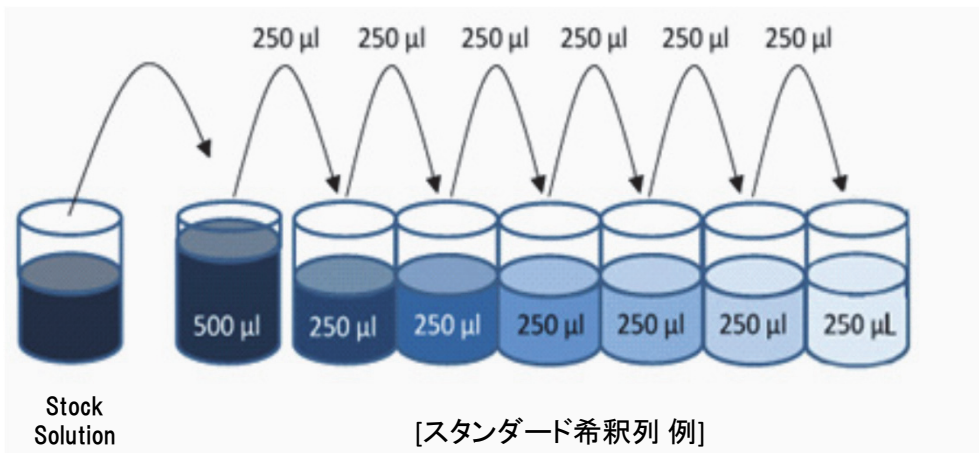
1. 20 × Wash bufferはイオン交換水で希釈します。1Lの場合は、1 × Wash bufferは50mLの20 × Wash bufferに950mLのイオン交換水を加えます。
2. 血清もしくは血漿サンプルの場合は、凍結乾燥のMatrix バイアルに2mLのイオン交換水で溶解し、15分間室温に置いた後、ボルテックスし完全に混和します。
※マトリックスのない製品は、調製の必要はありません。
3. 凍結乾燥のスタンダードは製品のバイアルラベルに記載された規定量のAssay bufferで溶解します。室温に10~20分間置いた後、軽くボルテックスして完全に混和します。
4. サンプルは通常希釈せずに測定する製品がほとんどですが、製品および実験条件によって希釈する場合は、各製品のプロトコルに従って調製してください。
また、アシディフィケーション ソリューションやニュートラリゼーション ソリューションが構成されている製品では、それらを用いて事前に活性化に対する処理を行います。

操作手順

Note: 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。

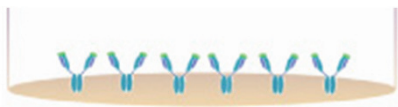
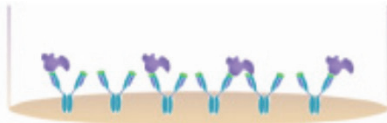
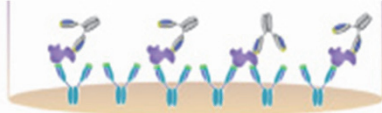
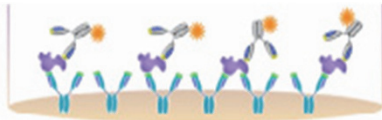
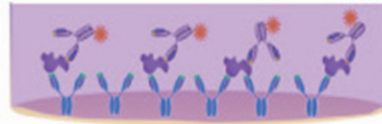
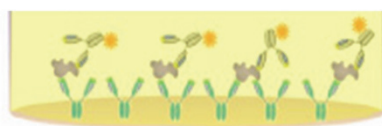
マイクロプレートストリップのすべてを使用しない場合、使用分のストリップのみ下から押し上げ、取り外します。未使用のストリップは、乾燥剤パックとともにアルミ袋内に戻して保存してください。

1. 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。
2. 50 μ LのスタンダードストックソリューションにAssay Bufferを加え希釈したものを準備します。その後、6本のチューブにAssay Bufferを加えておき、2倍希釈列を6段階希釈を行い、図の様に希釈列を作成します。ゼロスタンダードは、Assay Bufferのみとします。



3. 1 \times のWash Buffer 300 μ L/ウエルで4回洗浄し、残渣をペーパータオル上で上下に叩きし完全に除きます。各ステップの洗浄操作はいずれも同様に行います。
- 4a. マトリックスのない製品におけるサンプル、もしくは細胞培養上清サンプルの測定
全てのウエルに50 μ LのAssay Bufferを加えます。
所定のウエルに50 μ Lの希釈したスタンダードもしくはサンプルを加えます。
- 4b. マトリックスのある製品における血清および血漿サンプルの測定
希釈したスタンダードのウエルに50 μ LのMatrixを加えます。サンプルのウエルは50 μ LのAssay Bufferを加えます。
所定のウエルに50 μ Lの希釈したスタンダードもしくはサンプルを加えます。
5. 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、もしくは4 $^{\circ}$ Cで振盪せずにオーバーナイトします。
※製品によって、4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトのみを推奨する場合がございますので、各製品プロトコルをご確認ください。
6. 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。
7. 100 μ LのDetection Antibody solutionをそれぞれのウエルに加え、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。
8. 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。
9. 100 μ LのHRP標識物質溶液をそれぞれのウエルに加え、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。
10. 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。
11. 100 μ LのSubstrate solutionをそれぞれのウエルに加え、暗所で10~30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。
12. 100 μ LのStop solutionをそれぞれのウエルに加え、反応を止めます。ウエルの色は青から黄色に変わります。
13. 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。

操作手順の要約

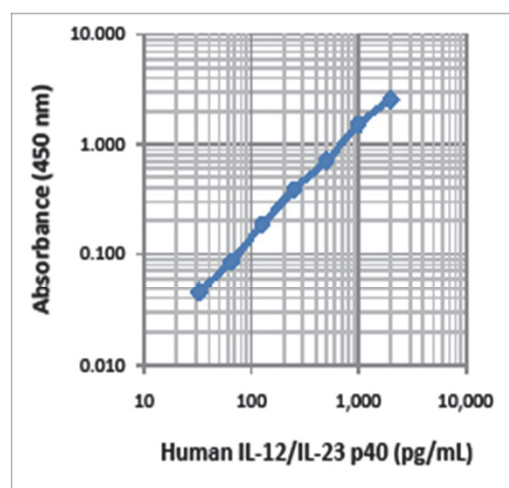
1. 洗淨4回
50 μ L アッセイバッファー、もしくはマトリックス

2. 50 μ L 希釈したスタンダード、もしくはサンプル
室温2時間振盪
もしくは
4°C、オーバーナイト(振盪なし)
※オーバーナイトのみ推奨する製品もあります。

3. 洗淨4回
100 μ L ディテクション抗体ソリューション
室温1時間振盪

4. 洗淨4回
100 μ L HRP標識物質ソリューション
室温30分間振盪

5. 洗淨5回
100 μ L サブストレートソリューション
室温暗所10~30分間

6. 100 μ L ストップソリューション

7. 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必要があります。

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。



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