

## Alpha FAQs

- [アプリケーション](#)
- [プロトコールと付属製品](#)
- [サンプルの影響](#)
- [トラブルシューティング](#)

## アプリケーション

### Q. AlphaLISA と Alphascreen の大きな違いは何ですか？

A. 両アッセイともドナービーズは同じ種類のものを使用します。2つのアッセイの大きな違いはアクセプタービーズの種類です。AlphaScreen アクセプタービーズは、最終的にルブレンからの発光 (520-620nm) を検出します。一方、AlphaLISA アクセプタービーズは、ユーロピウムからの発光 (615nm) を検出します。AlphaLISA アクセプタービーズの検出波長領域は狭いため、血清や血漿サンプルに含まれる干渉物の影響をより軽減し、より高い感度が得られます。(尚、AlphaScreen と AlphaLISA アッセイで EnVision や Enspire プレートリーダーのフィルターを変える必要はありません。)

### Q. Omnibeads (Cat#6760626) は何に使用しますか？

A. Omnibeads は通常測定機のコントロールとして使用します。Omnibeads には Alpha ドナービーズ内の化学物質と AlphaScreen アクセプタービーズ内の化学物質の両方が含まれています。

### Q. TruHits beads (Cat#6760627) は何に使用しますか？

A. TruHits beads は通常 AlphaScreen アッセイのコントロールとして使用します。AlphaScreen アッセイに干渉している分子、基質の特定や、疑似陽性の低分子を選別するのに使用されます。

### Q. Alpha アッセイは TR-FRET アッセイと比較してどんな特長がありますか？

A. Alpha アッセイは、ドナービーズとアクセプタービーズ間の距離が最大 200nm のサイズ範囲で分子を検出できる特性を持っているため、低分子から大きなウイルス粒子まで測定可能です。TR-FRET の検出システムはそのような特長はありません。

### Q. AlphaLISA アッセイを診断検査に使用できますか？

A. できません。AlphaLISA キットは研究用途でのみ開発されています。

### Q. Alpha アッセイは HTS 用に自動化できますか？

A. できます。洗浄ステップがなく、少量のサンプルでもアッセイが可能のため、PerkinElmer の JANUS® 自動液体分注ワークステーションを利用して、AlphaLISA アッセイの少量化および自動化を容易に行うことができます。

## プロトコールと付属品

### Q. Alpha アッセイはどの程度光感受性がありますか？

A. ストレプトアビジンコートドナービーズは光感受性があります。AlphaLISA アクセプタービーズには光感受性はありません。直射日光や強い照明光はドナービーズを励起し、放出された一重項酸素はドナービーズに結合したストレプトアビジンと反応してその効率を低下させます。不注意に過度な光を照射するとシグナル強度は低下しますが、それでも殆どの場合、アッセイではよい結果が得られます。理想的には、ドナービーズが関わるステップは 100 Lux 以下(下記表参考)の光レベルを抑えた実験室で行ってください。グリーンフィルターを照明に貼ることで代用できます。Alpha アッセイでのインキュベーションは、不透明のマイクロプレートやアルミホイルでアッセイプレートを覆い、遮光して行ってください。

100 Lux の目安

Lux level	Environment
700- Lux	窓側
320--500 Lux	ラボ内(照明直下)
30-70 lux	ラボ内(照明非直下/物影)
10 lux	机下

### Q.AlphaLISA バッファーは数種類ありますが、違いは何ですか？

A. AlphaLISA キットの殆どに、AlphaLISA Immunoassay Buffer(Cat#AL000)を適用しています。高いバックグラウンドが懸念される場合、AlphaLISA HiBlock Buffer(Cat#AL004)がキットに用意されています。これらは別途購入も可能です。AlphaLISA Immunoassay Buffer は溶解用バッファーではありませんが、界面活性剤と低濃度の塩を含むため、アッセイによっては細胞の溶解にも使用できます。AlphaLISA Immunoassay Buffer を用いた AlphaLISA アッセイにより、膜タンパクのエピトープを認識/検出できることが示されています。AlphaLISA Lysis Buffer(Cat#AL003)は、特に細胞ベースのアッセイ用に開発されました。このバッファーは細胞を溶解しタンパク質を可溶化するため、SDS を含んでいます。細胞内タンパク質を検出する際に利用します。AlphaLISA Universal Buffer(Cat#AL001)は、全ての AlphaLISA と AlphaSceen ToolBox ビーズの QC に使用されています。汎用性はありますが、全ての AlphaLISA アッセイで最適なバッファーとは限りません。

### Q. 測定前にプレートを振とうする必要はありますか？ Alpha ビーズはどれ位の大きさで、またビーズは沈殿しますか？

A. Alpha ビーズのサイズは非常に小さいです(直径 250-360nm)。沈殿したり、ピペットチップに詰まったりすることはないため、測定前に振とうする必要はありません。

**Q.Alpha アッセイはどの機械で測定できますか？手持ちのルミノメーターで測定可能ですか？**

A.Alpha アッセイは、励起用に 680nm を照射する専用レーザーが必要です。キセノンフラッシュベースのシステムやルミノメーターは、Alpha アッセイの測定に使用できません。PerkinElmer の Envision(Alpha オプション付)と Enspire が、Alpha の測定用にデザインされた測定機です。プレートリーダーARVO は、レーザーを内蔵していないため Alpha の測定には使用できません。他社測定機で Alpha 測定に適合すると記載されているものもありますが、Alpha アッセイは PerkinElmer の測定機での使用に最適化されています。

**Q.アクセプタービーズに手持ちの抗体を結合したり、発現タグ融合タンパク質を結合することはできますか？**

A.できます。未標識ビーズの他、二次抗体や発現タグを捕捉するグルタチオン、ニッケルキレートなどを標識したドナービーズ、またはアクセプタービーズを提供しています。標識のカスタムサービスも承っています。ビーズへの標識方法およびアッセイのセットアップについては['プロトコール'アッセイセットアップガイド](#)をご参照ください。

**Q.なぜ Immunoassay Buffer が泡立ちすぎます。**

A. Immunoassay buffer (Cat#AL000)は界面活性剤を含み、血清や細胞溶解液のような高濃度のタンパク質を含むサンプルからの、目的分子の検出に適しています。抗体が目的分子と適切に結合するようにデザインされており、バックグラウンドを低減します。もし分注によって激しく泡出つようであれば、消泡剤が利用できます。代わりに、界面活性剤を除去したバッファーも利用できますが、終濃度 0.01% 程度の BSA を加えてください。

**Q.Alpha ドナービーズとアクセプタービーズは、一度バッファーで希釈すると、どれ位の期間安定ですか？**

A. 希釈したビーズの安定性は長期間評価していません。しかし、少なくとも 12 時間以上は安定で、自動化したスクリーニングやその他 HTS アッセイに適用します。

**Q.温度変化はシグナルに影響しますか？**

A.影響します。AlphaLISA と AlphaScreen アッセイは温度感受性があります。インキュベーション温度は、抗体と検出分子間の相互作用が平衡に達する速度に影響する可能性があります。測定機の温度は、一重項酸素の産生と拡散速度に影響することがあります。アッセイによっては 1°C 当たり 10% のシグナル上昇が見られます。最も均一な結果を得るためには、最後のプレートインキュベーションをできるだけ測定機の傍で行ってください。

**Q.お勧めのプレートはありますか？**

A. Alpha アッセイでは、不透明の白色/薄灰色マイクロプレートをご使用ください。下記推奨製品です。

Alpha アッセイ推奨プレート

トータルアッセイ量	マイクロプレート	カタログ番号
>100 $\mu$ L	OptiPlate-96(白)	6005290
50-100 $\mu$ L	1/2 AreaPlate-96(白)	6005560
	OptiPlate-384(白)	6007290
	AlphaPlate-384(薄灰色)	6005350
20-50 $\mu$ L	AlphaPlate-384(薄灰色)	6005350
	OptiPlate-384(白)	6007290
10-20 $\mu$ L	ProxiPlate-384(白)	6008280
<10 $\mu$ L	AlphaPlate-1536(薄灰色)	6004350

## サンプルの影響

### Q.Alpha アッセイに適応しないバッファーは何ですか？

A.一般的に使用されている HEPES,PBS,Tris のようなバッファーは AlphaScreen に適応します。ただし、バッファーのパフォーマンスへの影響はアッセイにより様々です。

### Q.RPMI 培養液は AlphaLISA や AlphaScreen アッセイで使用できますか？

A.RPMI 培養液は AlphaLISA アッセイで使用できます。しかし、高濃度の遊離ビオチンを含むため、シグナルカウントや S/N 比が低下する可能性があります。また検出限界に影響する可能性もあります。ただ殆どの場合、RPMI 培養液を使用しても十分な結果が得られています。ストレプトアビジンコートドナービーズの濃度やインキュベーション時間を上げることで、RPMI 培養液中のビオチンの影響を回避することができたケースもあります。DMEM や MEM など、その他細胞培養液は Alpha アッセイに適応します。

### Q.DMSO や SDS,EDTA, sodium azide は Alpha アッセイに影響しますか？

A.AlphaScreen と AlphaLISA アッセイは、10%DMSO, 0.02%SDS, 100mMEDTA, 0.005% sodium azide まで耐性があります。この濃度以上ではシグナルが減少しますが、多くの場合許容できる結果が得られます。ただし、アッセイ上、他の物質(検出分子やタンパク質など)がこれら濃度に耐性がない場合もあります。

### Q.フェノールレッドは AlphaLISA と AlphaScreen アッセイに影響しますか？

A.フェノールレッドは AlphaLISA アッセイシグナルには影響しませんが、AlphaScreen アッセイには影響します。

### Q.ライブラリー化合物は AlphaScreen や AlphaLISA アッセイに影響しますか？

A.Alpha シグナルへの化合物干渉の主なメカニズムは、1)一重項酸素のクエンチング、2)ビオチンとストレプトアビジン間の相互作用への競合、3)インナーフィルター、があります。一重項酸素の強力なクエンチャーとしては、 $\mu\text{M}$  オーダーの遷移金属( $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Al}^{2+}$ )、アジ化物やアスコルビン酸のような抗酸化剤、チオフェンを基本構造として持つ化合物( $100 \mu\text{M}$  to  $10 \text{ mM}$ )、ヘム金属(ヘモグロビンなど)があります。ビオチンとストレプトアビジン間の相互作用に競合する物質としてはビオチン様構造物、インナーフィルターとして作用する物質としては  $520\sim 620 \text{ nm}$ (エミッション)あるいは  $680 \pm 5 \text{ nm}$ (エキサイテーション)波長を吸収する化合物(青/緑色のもの)があります。コントロールとして TruHit ビーズを使用し、化合物が AlphaScreen に干渉するかテストすることができます。

その他化合物の影響に関しては[アプリケーションノート](#) 'Alphascreen 系を阻害する物質の考察'をご参照ください。

## トラブルシューティング

問題	原因	解決策
シグナルが 検出されない	アッセイ	光暴露によるドナービーズのフォトブリーチ;ビーズの調製をし直す。 分子同士が相互作用していない。ビーズなどの立体障害の可能性;添加順序の変更などアッセイを再検討する。 バッファー中にクエンチャーが含まれている;アジ化物、遷移金属のような一重項酸素のクエンチャーや520-680nm(AlphaScreen),615nm(AlphaLISA)の光を強く吸収する化合物の使用を避ける。
	プレート	不適切なマイクロプレート(透明プレートや黒色プレートなど)を使用している;標準的な白色不透明プレートを使用する。
	測定機	測定機のエラー;測定機マニュアルを参照するか、弊社カスタマーサービスに連絡する。
シグナルが低い	アッセイ	アクセプターあるいはドナービーズ濃度が低い;10-40 µg/mLでの使用を検討する。 目的分子などアッセイに使用する分子の濃度が不適切;各分子の濃度検討を行う。 アッセイバッファーの組成が不適切;pH,緩衝能,塩濃度や、還元剤、界面活性剤、キレーター、金属コファクター、ブロッキング剤、酵素阻害剤の必要量を確認する。 目的分子、抗体など、アッセイに使用する分子やビーズの添加順序が不適切;添加順序を再検討する。 インキュベーション時間が短い;酵素反応時間や細胞刺激時間、バイndingパートナーのプレインキュベーション時間などを調整する。
	保存	保存方法が不適切、または長期保存によるドナービーズ上の分子の分解;ビーズは遮光して4°Cで保存する。
	プレート	不適切なマイクロプレート(透明プレートや黒色プレート、ポリプロピレン製プレート)を使用している;標準的な白色不透明プレートを使用する。
	測定機	測定機のエラー;測定機マニュアルを参照するか、弊社カスタマーサービスに連絡する。

	温度	測定機を設置している部屋の温度が異常に低い; 温度が 23°C 程度に保たれているか確認する。
バックグラウンドが高い	アッセイ	アッセイコンポーネント間の非特異的結合; BSA のようなブロッキング剤を高濃度(>0.1% w/v)で使用する。または Tween-20 のような界面活性剤を使用する。
	光暴露	白色または黒色プレートでカバー、またはアルミホイルなどで遮光してインキュベーションする。 研究室の照明が強い; 蛍光管チューブの使用をさけるか、使用場所を変える、照明を落とす、またはグリーンフィルターで光源を覆う。
	検出	測定前の偶発的な光暴露。アクセプタービーズは 2-3 分間自家蛍光を発する; 測定前に少なくとも 5 分間、再度暗所に置く。
	分注操作/分注機	ウェル内に気泡が存在; 電動ピペッター・自動液体分注機を使用し、また気泡が最小限になるようチップに十分なデッドボリュームがあるか確認する。
	温度	測定機が設置されている部屋の温度が高い; 室温を確認する。
シグナルのバラツキ	サンプルの蒸発	プレートエッジからの蒸発; プレートシールを均一に貼り、サンプルの蒸発を最小限にする。高温でのインキュベーションを避ける。(特に 384-well, 1536-well など少量サンプル使用時は注意)
	バッファー成分の分解	バッファー成分、特に BSA などが分解している; 新しくバッファーを調製する、バッファーは BSA を添加しない状態で 4°C で保存する、3-4 日以内に使い切る。
	光暴露	プレートエッジへの光透過; インキュベーション中、プレートが完全に遮光されているか確認する。
	プレート	歪んだプレートを使用している; プレートに大きな荷重が掛っていないか、熱源の近くに置かれていないかなど保管状態を確認。 プレートの形状や組織細胞の処理が不均一; プレートに欠陥がないか確認する。

	温度	測定前にプレートが測定機周辺温度に対して平衡でないと、測定時にプレート温度が上昇/下降し左右の傾斜が起こる; 少なくとも 30min 測定周辺かプレートスタッカーに置く、またはプレート温度をコントロールするため最後のインキュベーション時にインキュベーターを使用する。
シグナル値の大きな変動	アッセイ間差	実験手順/条件を一定に保つ。試薬調製、インキュベーション時間、温度を一定にする。
	日間差	液体蒸発によるウェル間の差; TopSeal™-A などを使用する。
		混合が不十分; 96 ウェルプレートの場合、インキュベーション時にシェーカーを使用する。高密度プレートの場合、5uL 以上で分注し、チップからの溶液排出速度が適切に混ざるのに十分であることを確認する。
		標準操作手順を確認。実験操作が日間で同じことを確認する。ビーズ調製を同じ場所で行い、インキュベーション時間や温度が変動していないことを確認する。場合によっては、室温を調整するためインキュベーターを使用する。
	分注操作/分注機	ピペッティング/分注エラー; 全てのピペットと分注機が較正されていることを確認。適したチップを使用し、分注の高さや自動分注機のプログラムを最適化する。
測定機/プレート	プレートとプレートリーダー内の温度差; プレートを測定機近傍かプレートスタッカー内でインキュベートする。測定機の温度コントロールが正しく操作されていることを確認する。	
	プレートが不均一; プレートを確認する。	
プレート全体でシグナルのグラデーションが見られる	温度	測定前のプレートの温度が低すぎる; 化学的に室温で最も良い結果が出るようにデザインされているので、測定前にプレートを冷却したり、氷上でインキュベートしない。
		プレートの温度が測定機周辺温度に対して平衡でない; プレートを測定機近傍かプレートスタッカー内で少なくとも 10 分インキュベーションする。スタッカーに多数枚積み重ねられたプレートは温度が平衡に達するまでより時間が必要なことがある。
	分注操作/分注機	ウェル内の液体分量が不均一。ディスペンサーのヘッドが詰まっている。チップの選択が間違っている。自動分注機のプログラムエラー/不精度; ロボット/リキッドハンドリングシステムを確認。