

DELIFA FAQs

- [アッセイ上の注意](#)
- [アプリケーション](#)
 - [一般](#)
 - [イムノアッセイ](#)
 - [ラベリング](#)
- [測定機の設定](#)
- [トラブルシューティング](#)
 - [イムノアッセイ](#)
 - [細胞毒性アッセイキット](#)
 - [キナーゼアッセイ](#)

アッセイ上の注意

- DELFIA Enhancement 溶液(Cat#1244-104)は使用前に室温に戻してください。
- プレートウェルに DELFIA Enhancement 溶液または DELFIA Inducer(Cat#4013-0010)を添加後は、プレートを振盪することをお勧めします。振盪することで、シグナルはより早く、最大で安定な状態に達します。振盪速度は、DELFIA プレートシェーカーで'Slow'設定を推奨しています。これは、約 250rpm で半径約 3mm の振盪に相当し、溢流しない速度設定です。
- TopSeal-A™(Cat#6050195)やその他プレートのシールは、測定前に剥がしてください。
(Enhancement 溶液添加後はシールを貼らないでください)
- バッファーに BSA を添加する場合、DTPA-purified BSA (Cat#CR84-100)のご使用を推奨します。

アプリケーション

一般

Q. LANCE® ユーロピウム を DELFIA アッセイで使用できますか？

A. 可能です。ただし、DELFLIA Enhancement 溶液 (Cat#1244-104) または、DELFLIA Inducer (Cat#4013-0010) を添加する必要があります。LANCE ユーロピウムキレートは解離ステップを必要としない蛍光キレートですが、DELFLIA ユーロピウムと比較すると蛍光強度が低く検出されます。LANCE キレートを解離増強することなくヘテロジニアスアッセイに利用できるケースもありますが、シグナルを増強し、検出精度を改善するため、基本的には Enhancement 溶液を添加することをお勧めします。LANCE ユーロピウムの解離時間は、使用した LANCE キレートの種類に依存します。LANCE 製品を使用した場合、ユーロピウムと分子の比(分子へのユーロピウム標識率)が低い場合、感度に影響することがあります。

Q. DELFLIA ユーロピウムを LANCE アッセイで使用できますか？

A. できません。DELFLIA ユーロピウムキレートは Enhancement 溶液を添加するまで蛍光を持ちません。Enhancement 溶液を添加することで、分子からランタニドを溶液中に遊離、高い蛍光を持つ新しいキレートが形成されます。TR-FRET アッセイでは、結合したバイオマーカーからランタニドを解離し検出することはできません。TR-FRET アッセイでは LANCE ユーロピウムキレートをご使用ください。

Q. リン酸バッファーは使用できますか？

A. DELFLIA アッセイでは、Tris-HCl ベースのアッセイバッファーの方がリン酸ベースのバッファーよりもよくワークします。(リン酸バッファーを用いると、最大シグナルがより低く検出されます。) 長時間のインキュベーションを行う場合、高濃度のリン酸は N1 キレートから Eu イオン解離する可能性があります。DELFLIA DTPA キレートはリン酸バッファーの影響を受けません。

Q. シグナルが発生するのに、どれ位の時間が掛りますか？

A. Enhancement 溶液をウェルに添加した後、シグナル発生速度は振盪に依存します。DELFLIA Eu-N1-標識試薬を使用した場合、振盪を行わずに静置すると 1 時間以上掛ります。DELFLIA プレートシェーカー (Slow 設定) を使った場合、5 分の振盪で最大シグナルが得られます。他の殆どのシェーカーでは、DELFLIA プレートシェーカーとは同じ効率が得られず、増強はより遅くなります。必要な時間は、5 分振盪後測定、さらに 5 分振盪して測定など行うことで、簡単にテストすることができます。

Q. イムノアッセイを一時中断できるステップはありますか？

A. Enhancement 溶液添加後、オーバーナイトでインキュベーションすることはお勧めしません。DELIFIA アッセイは、最後の洗浄を行った後に中断することができ(Enhancement 溶液添加前。プレートは空の状態)、フタを被せ埃を避ければ、プレートは長期間保存することができます。Enhancement 溶液添加後も、蛍光は数時間安定です。直射日光や乾燥を避ければ、20 時間後でも検出は可能です。しかし、様々な外部要因でシグナルが減少する可能性を避けるため、1 時間以内に測定することをお勧めします。

Q. バックグラウンドはどの程度検出されますか？

A. パーキンエルマーのプレートリーダーで測定した時、透明のマイクロプレートを使用した場合、バックグラウンドとして約 100-200 カウントが期待されます。細胞を培養し、ユーロピウム標識抗体で反応した場合、バックグラウンドとして通常約 1000-2000 カウントが検出されます。インビトロのバイオケミカル DELFIA アッセイでは通常約 300-1000 カウントが検出されます。DELIFIA アッセイにおいてユーロピウム標識試薬反応後の洗浄は重要なステップです。DELIFIA Enhancement 溶液添加前に、結合反応していない標識試薬を十分に除去してください。

Q. Enhancement 溶液(Cat#1244-104)、Inducer(Cat#4013-0010)、Enhancer(Cat#C500-100)の違いは何ですか？

A. DELFIA Enhancement 溶液は、ユーロピウムおよびサマリウム N1 キレートに適した溶液です。イオンを速やかに解離し、シグナルを産生します。より安定な標識キレートである DTPA で極大シグナルを得るには、Enhancement 溶液添加後 30 分程度の振盪が必要です。

Inducer は N1、DTPA や LANCE W1024、W2014 を含むすべてのキレートからランタニドをより速く解離し蛍光ミセルを作ります。

Enhancement 溶液に含まれるβ⁻ジケトン、テルビウムやディスプロシウムの配位子に適しません。異なる配位子で蛍光ミセルを形成させるため、これらのランタノイドでは Enhancer を用います。多重蛍光アッセイでテルビウムを用いる場合は、Enhancement 溶液または Inducer でユーロピウムとサマリウムを解離した後、テルビウム蛍光を産生するために Enhancer を追加で添加する必要があります。

イムノアッセイ

Q. Eu 標識抗体の添加量は？

A. 標識抗体の添加量は DELIFA アッセイをセットアップする際、最適化する必要があります。一般的には、サンドイッチアッセイで 25-100 ng/well の標識抗体が使用されます。ただし、実際の最適濃度は、抗体の精製度やアフィニティ、求めるシグナルレベルにも依ります。

Q. 細胞を使うことはできますか？

A. 可能です。細胞培養用に表面処理された一般的なプレートを使用することができます。プレートの色は白や透明が一般的ですが、基本的には何色でも使用できます。弊社では、不透明の白プレート CulturePlates™を推奨しています。接着細胞を用いた DELIFA アッセイでは、ユーロピウム標識試薬を反応させるバッファーと、ユーロピウム標識試薬反応後の洗浄ステップが重要なポイントとなります。アッセイバッファーは、0.9% NaCl, 0.1-0.5% BSA, 20 μM EDTA (または DTPA)を含む、50mM Tris-HCl または HEPES バッファーを使用してください。ユーロピウム標識抗体の至適濃度は、反応時濃度 100-300 ng/mL です。洗浄バッファーは、0.9% NaCl を含む 10-20 mM Tris-HCl (pH 7.5)が適します。洗浄は 4-8 回、穏やかに行ってください。洗浄を手作業で行う場合は、各ウェルに 300-350 μL(96-well プレート)の洗浄バッファーを添加し行ってください。

- 細胞の固定に関する参考文献:

Hardcastle, A. et al. A Duplexed Phenotypic Screen for the Simultaneous Detection of Inhibitors of the Molecular Chaperone Heat Shock Protein 90 and Modulators of Cellular Acetylation." Mol Cancer Ther 6, 1112-1122 (2007).

Q.アッセイバッファーまたは洗浄バッファーに追加で化合物を添加してもよいですか？

A. アッセイに依っては界面活性剤や免疫反応のブロッキング剤を追加した方がよいケースもあります。一般的なブロッキング剤として、カゼインやゼラチンが使用されています。

ラベリング

Q. 透析によりフリーのユーロピウムを除去精製することはできますか？

A. 透析ではフリーのユーロピウムを除去することはできません。

Q. ランタニド標識した分子をスピнкаラムで精製することはできますか？

A. スピнкаラムでは、未反応キレート十分に除去することができません。0.5mg 以下の抗体標識では、Sephadex G-25 を含む脱塩カラム(PD-10, NAP-25 : GE 社) を標識精製に利用できます。このカラムを利用する場合、次項目注意してください。1) 120nmol 以上の Eu-N1 をカラムに添加しない。2)

アプライする標識反応時の液量は少なくする。50-200 μL が適し 400 μL 以上にはしない。

尚、この市販の脱塩カラムは、DELIFIA DTPA や LANCE キレートでは利用できません。

Q. どのランタニドを使用すればよいですか？

A. ユーロピウム、テルビウム、サマリウムの順でお勧めします。

**Q. DELIFA キレートの反応基 ITC(isothiocyanate)と DTA(dichlorotriazine)は何が違いますか？
どちらも一級アミノ基と反応するようですが。**

A. ITC キレートはアミノ基(-NH₂)およびスルフヒドリル基(-SH)と反応しますが、-SH 基と反応したキレートは直ちに分解します。従って、タンパク質・ペプチドの N 末端やリジン残基が標識されます。DTA キレートは、-NH₂ 基、-SH 基(安定に反応)、チロシン残基、その他アミノ酸残基とも反応します。タンパク質標識において、DTA キレートは ITC キレートの 1.5~2 倍高い反応性を持ちますが、タンパク質の様々なアミノ酸残基(リジン、システイン、アミノ基末端)と反応するため、タンパク質の活性が失われる可能性があります。

Q. ユーロピウム標識物質の保存方法を教えてください。

A. 標識したタンパク質やペプチドは高濃度で、また金属イオンやキレートを含まない状態で保存してください。保存溶液は、0.1-0.5% BSA(Cat# CR84-100)を含む Tris-HCl バッファー中で保存してください。低温でタンパク質が安定であれば、-70°Cや-20°Cで凍結保存します。+2-+8°C保存では、保存溶液にアジ化ナトリウムを添加します。このバッファー中に適切な濃度(例.抗体で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上)で保存した場合、DELIFIA 標識試薬は 1-2 年まで安定です。リン酸バッファー中での保存はお勧めしません。DELIFIA アッセイでは、リン酸バッファーを使用した場合、その最大シグナルは Tris-HCl ベースのバッファー使用時よりも低く検出されます。アッセイバッファー中に高濃度のリン酸基が含まれる程、シグナルは低くなります。また、強力なキレート剤である 20 μM DTPA を含む DELIFA アッセイバッファー (Cat#1244-106)中でも保存を行わないでください。

Q. ペプチドの末端標識は可能ですか。

A. N 末端にセリンまたはスレオニンが存在する場合は、まず酸化させ、アミノオキシ(アミノ)キレートと反応させることができます。

参考文献

Peuralahti, J. et al. Synthesis of Nonluminescent Lanthanide(III) Chelates Tethered to an Aminoxy Group and Their Applicability to Biomolecule Derivatization. Bioconjug Chem 13, 876-880 (2002).

Q. 標識反応は 4°Cで行うべきですか？

A. ペプチド(50 アミノ酸以下)の場合のみ、室温で標識が可能です。多様なポリペプチド鎖から構成される抗体を標識する場合、温度は非常に重要です。抗体の標識は、4°C、pH9.3、オーバーナイトの条件下で標識を行ってください。抗体がオーバーナイトでの標識に耐えない場合、次項目の 4 時間反応のプロトコールを利用ください。(オーバーナイトでの標識よりも 3 倍量のキレートを使用)。

反応効率は 4°Cよりも室温の方が高くなります。しかし、室温オーバーナイト条件下での標識により、タンパク質がその結合力を失うのであれば、高い標識効率も意味を成しません。

Q. 標識反応は pH9.3 で行うべきですか？ 使用する抗体はあまり安定性が高くないのですが。

A. オーバーナイト反応(4°C, pH 9.3)の代わりに、4 時間反応(4°C, pH 9.3)することで問題を回避できる可能性があります。この方法では、オーバーナイトでの標識よりも 3 倍量のキレートを使用します。その他、4 倍量のキレートを使用し、pH 8.5-8.6 条件下(4°C,オーバーナイト)で標識を行う方法も可能性があります。

測定機の設定

DELIFIA アッセイの測定には、TRF(時間分解蛍光)測定が可能なプレートリーダーが必要です。弊社では、ARVO™ X または EnVision® を推奨しています。他社プレートリーダーをご使用の際は、ユーロピウム標準溶液(Cat#B119-100)を利用し、DELIFIA Enhancement 溶液(Cat#1244-104)で希釈系列を調製することによって測定機の感度を確認できます。また、多重蛍光検出アッセイ用に、ユーロピウムの他にもサマリウム標準溶液(Cat#B115-100)とテルビウム標準溶液(Cat#C558-100)があります。

- **蛍光測定機 (フィルター式蛍光測定機) vs. モノクロメーター/スペクトロフルオロメーター**

DELIFIA アッセイの測定には、フィルター式の時間分解蛍光測定機を推奨しています。時間分解モノクロメーターは、非常に高い感度をもつ測定機であれば、アッセイによって適応する可能性があります。TRF(時間分解蛍光)測定には、フラッシュランプが搭載されている必要があります。オプションを付けることで TRF 測定が可能となる仕様のプレートリーダーもあります。TRF 測定が可能であるか、各測定機メーカーにお問い合わせください。

- フィルター式の TRF プレートリーダーは、励起用光ファイバーの前方と、検出器の前方に、フィルターを搭載しています。モノクロメーター/スペクトロフルオロメーター(回折格子式の分光蛍光測定機)は、一般的にフィルター式の蛍光測定機よりも感度が低く検出されます。また、感度のロスは TRF のような高感度を求めるアッセイでは問題となることがあります。
- TRF 測定が可能なモノクロメーター/スペクトロフルオロメーターは通常励起と検出の回折格子を搭載しており、励起光と検出光の波長域を判別します。モノクロメーター/スペクトロフルオロメーターはいくつかの DELIFIA アッセイアプリケーションで利用できる可能性もありますが、フィルター式蛍光測定機に比べ 1000 倍まで感度が落ちることがあります。
- 最新のダブルモノクロメーターは、一般的なフィルター式の測定機と同等の感度を示すと言われていています。これらは、殆どの DELIFIA アッセイに適応する可能性があります。
- 細胞ベースのアッセイでは、底面が透明なプレートでも、340nm の励起光を吸収する可能性があります。プレート上部からの励起検出をお勧めします。

- **DELIFIA ユーロピウム蛍光測定の設定**

下記は、DELIFIA ユーロピウム検出のための、一般的な設定値です。DELIFIA 測定用に推奨設定があるか、詳細は各測定機メーカーに確認することをお勧めします。

フィルター式蛍光測定機の設定:

- Excitation: 320 or 340 nm
- Emission: 615 nm

- Delay: 400 μ sec
- Window: 400 μ sec
- Cycle: 1000 μ sec
- Flash energy: high

蛍光分光式/モノクロメーターの設定:

- Excitation: 320 or 340 nm
- Emission: 615 nm
- Delay: 100 μ sec
- Integration time: 1000 μ sec (フラッシュランプが 500 kHz またはそれ以下の場合)
- Highest sensitivity, gain, Z-optimal

トラブルシューティング

イムノアッセイ

問題	原因	解決策
バックグラウンドが高い	プレートのバックグラウンドが500 カウント以上 (コーティングなし、バッファーなし、Enhancement 溶液なしの空ウェル測定時)	プレートを変える。 (推奨プレート) ・ DELFIYA Yellow Plate 96-well ・ DELFIYA Strip Plate 8x12-well
	測定前の洗浄操作が不十分	Eu 標識化合物を反応後、4-6 回の洗浄を行う
	プレートのブロッキングが不十分	室温でオーバーナイト、または37°Cで2時間インキュベートする コーティングする際に添加した抗体液量よりも、多い液量をウェルに添加してブロッキングを行う
	Eu 標識抗体がプレートへ非特異的に結合	アッセイバッファーに 0.01%-0.1% Tween 20 または Tween 40 を添加する
	コンタミネーション	ピペッティング操作に注意する
最大シグナルカウントが低い		サンプル量を増やす
		サンドイッチアッセイの場合、異なるサイトを認識する抗体を使用する
		抗体濃度を上げる
		使用する抗体を変える
再現性が低い	Enhancement 溶液添加後のインキュベーション時間が短い	測定前にシェーカーで少なくとも 5 分以上インキュベーションする。最大シグナルに達するのに必要な時間を確認する。
	抗体の凝集	抗体またはアッセイバッファーで希釈した抗体を 0.22µm フィルターに通す
	抗体のアフィニティが低い	1 ウェル当たりのトレーサー量を増やす、またはインキュベーション時間を長くする、コーティング方法を確認する

	プレートのコーティングが不均一	パーキンエルマーのマイクロプレートを試す (推奨プレート) • DELFIA Yellow Plate 96-well • DELFIA Strip Plate 8x12-well
	Enhancement 溶液添加後または測定時、プレートにシールを貼っている	Enhancement 溶液を添加したプレートはシールを貼らない
	サンプル中に微量の Eu が混入している	アッセイバッファーに 20 μM DTPA または EDTA を添加する
	Eu 標識抗体の保存温度が不適切	適した温度で保存する。(Eu 標識タンパク質の保存温度は、Eu キレートによって影響を受けない。未標識タンパク質の保存に適した温度で保存する。)
	Eu 標識抗体の保存溶液が不適切	ポリプロピレン製チューブ中に保存する(ポリスチレンチューブは標識物質が結合することがある)
標識化合物保存後、シグナルカウントが減少	BSA が重金属を含んでいる	グリセロールやグルコース、BSA(Cat#CR84-100)など、精製された安定化剤を添加する
	保存条件が不適切	Eu-標識抗体を EDTA のようなキレートを含むバッファーやリン酸ベースのバッファーで保存しない。 Tris-HCl バッファー (50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.05% NaN ₃ , pH 7.8)中で、Eu 標識抗体は希釈せずに保存する。
	抗体またはその他試薬が不安定	試薬を再調製する

細胞毒性アッセイキット

問題	原因	解決策
標識したターゲット細胞の回収率が低い	標識条件	バッファー溶液の組成,pHを確認する
		標識時間を短縮する
		細胞の洗浄に気を付ける。必要であれば、洗浄回数を3回に減らす
		血清を添加した培養液を使用してアッセイを行う
バックグラウンドが高い	洗浄	標識した細胞を使用前に5-6回洗浄する。洗浄は迅速に行う。生細胞に適したスピードで最大5分間の遠心を行う
	溶液または、ピペット操作	洗浄から次の洗浄へのキャリーオーバーを避ける
		溶液がBATDAでコンタミネーションしていないか確認する
		培養液中の干渉物を確認する
標識の取り込み率が低く、感度が低い。	標識が難しい細胞株を使用	標識濃度を高くする、または標識時の温度を上げる
	標識条件	標識時、Pluronic F-127, 0.02% (w/w)の使用を試す
		標識温度を最適化
		標識バッファーのpHを確認する
最大放出シグナル (maximum release) が低い	シグナルの消光	SDSは蛍光を消光するため、キット中のLysisバッファーまたはTriton X-100を使用する
自然放出シグナル (spontaneous release)が高い	細胞株に依存	この実験は短時間でのアッセイに適している。(4時間以内)。長時間のインキュベーションは自然放出量を上昇させる。エフェクター細胞とターゲット細胞を数分反応させた後、上清サンプルを取り、放出時間を観測する
		このアッセイは通常、 ⁵¹ Crよりも放出が速い
		標識時間を短縮する
		標識および洗浄後、細胞を放置しない
		1-10 mM probenecid または 1-10 µg/mL mitomycin Cを洗浄溶液と洗浄後細胞を希釈する培養液に添加する。 * Probenecidはこの濃度(1-10 mM)で洗浄溶液や培養液に溶解しない。初めに1M NaOHで200xストック溶液を作製し、洗浄溶液(1X PBS supplemented with 20 mM HEPES)

		で2倍希釈する。その後、100 x probenecid ストック溶液を洗淨溶液や培養液で100倍希釈して使用する。
--	--	--

キナーゼアッセイ

問題	原因	解決策
カウントが検出されない、または非常に低い	酵素活性が低い	酵素活性を確認する 酵素が基質と反応するか確認する
	Enhancement ステップでの粘着テープ使用	Enhancement 溶液を添加するステップ以降は粘着テープを使用しない
	キナーゼ反応溶液	ウェルやチューブへの化合物結合を避けるため、キナーゼ反応溶液には低濃度の界面活性剤を添加する
バックグラウンドが高い	イムノグロブリンの凝集	保存後、Eu 標識抗リン酸化チロシン抗体を 0.2µm メンブレンで透過する
	測定前の洗淨	Eu 標識抗体で反応後、DELFI Aプレート洗淨機で4-6回洗淨する。プレートを洗淨する際、各ウェルが上部まで溶液で満たされていることを確認する。洗淨後は、ウェルが乾燥していることを確認する。他の洗淨機を使用する場合、洗淨回数は最適化する必要がある。(洗淨回数はより多くなる可能性あり)
再現性が低い	測定前の洗淨	上記
	Enhancement 溶液の反応時間が短い	測定前に少なくとも5-10分シェーカーで反応する。シェーカーによって、最大シグナル検出に必要な時間は確認する
	ピペッティング操作	ピペッティング操作を確認する
感度が低い		上記'バックグラウンドが高い'を参照 酵素、基質、ATP 濃度を最適化する