

PerkinElmer Japan Co., Ltd.



AlphaLISA[®] ImmunoAssay Development Guide

For Laboratory Use Only
Research Chemicals for Research Purposes Only

目次

ご使用にあたっての注意

I.	はじめに.....	3
II.	使用目的.....	6
III.	アッセイの原理.....	6
IV.	アッセイセットアップ.....	7
	A) 抗体ペアの選択.....	7
	B) 抗体のビオチン化.....	7
	C) AlphaLISA アクセプタービーズへの抗体の結合.....	9
	D) 最適な抗体の組み合わせの決定.....	12
	E) アッセイバッファーの最適化.....	15
	F) アッセイ容量、インキュベーション時間、試薬の添加順の最適化.....	16
	G) 標準曲線を用いた未知サンプル中のアナライト濃度の決定.....	17
V.	参考文献.....	19

付録I. AlphaLSAアッセイの開発の概要

付録II. 血清サンプルの調製

ご使用にあたっての注意

- スレプトアビジンコートドナービーズ(スレプトアビジンドナービーズ)は、励起光によって生じる一重項酸素がスレプトアビジンのビオチン結合部位を不活化するため、光暴露により性能が低下します。スレプトアビジンドナービーズを扱う場合は、実験室の光量を 100 ルクス以下に落とすか、緑色のフィルター(#389 Chroma Green:ロスコ社)で覆った光源をご使用ください。また、スレプトアビジンドナービーズのインキュベーションは、必ず遮光下で行ってください。
- アッセイで使用する液量はごく少量です。インキュベーション中の蒸発を最小限に抑えるために、TopSeal-A(Cat# 6050195)のような粘着シールフィルムをプレート表面に張ってください。TopSeal-Aは貼ったままの状態で、プレートリーダーの読み取りを行うことができます。
- AlphaLISAアクセプタービーズは、数日程度静置すると沈降します。ご使用前に、ボルテックスを行ってください。
- スレプトアビジンドナービーズおよびAlphaLISAアクセプタービーズは、必ず遮光し、4 °Cにて保存してください。
- AlphaLISAは研究目的にのみ使用できます。人または動物の診断目的に使用することはできません。

I. はじめに

AlphaLISAアクセプタービーズを受け取ったら

お受け取りの際は、冷却材が同梱され、保冷されていることをご確認ください。

試薬のパッケージサイズと容量・アッセイポイント

AlphaLISAアクセプタービーズ 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 0.05% ProClin-300	1 mg #6772001	5 mg #6772002	50 mg #6772003
液量(濃度)	50 µL (20 mg/mL)	250 µL (20 mg/mL)	5 x 500 µL (20 mg/mL)
アッセイポイント (終濃度 10 µg/mL, 反応溶液量 50 µLのとき)	2,000 pts	10,000 pts	100,000 pts

開封時の注意

- キャップを開ける前に、軽く遠心してキャップについた液滴を落としてください。ご使用前にボルテックスでビーズを再懸濁してください。
- AlphaLISAアクセプタービーズは、必ず遮光し、4 °Cにて保存してください。

表 II. AlphaLISA アクセプタービーズ以外に必要な試薬や器具

名称	販売元	製品コード
一般		
AlphaScreen Streptavidin-Coated Donor beads	PerkinElmer, Inc.	6760002S (1 mg) 6760002 (5 mg) 6760002B (50 mg)
アナライト、抗アナライト抗体	N/A	N/A
マイクロプレート	PerkinElmer, Inc.	表III参照
TopSeal-A	PerkinElmer, Inc.	6050195
マイクロピペッター [§]	N/A	N/A
抗体のビオチン化		
NHS activated biotinylating reagent (ChromaLink)	SoluLink Inc.	B1001-105
Zeba desalt spin columns	Pierce (ThermoFisher Scientific Inc.)	89882 (0.5 mL) 89889 (2 mL) 89891 (5 mL) 89893 (10 mL)
AlphaLISAアクセプタービーズの調製		
Carboxymethylamine hemihydrochloride (CMO)	Sigma-Aldrich Co.	C13408
NaBH ₃ CN	Sigma-Aldrich Co.	156159
バッファー (Ready to Use)		
AlphaLISA ImmunoAssay Buffer (10X) ^{§§}	PerkinElmer, Inc.	AL000C (10 mL) AL000F (100 mL)
AlphaLISA Universal Buffer (10X) ^{§§§}	PerkinElmer, Inc.	AL001C (10 mL) AL001F (100 mL)
AlphaLISA Hiblock Buffer (10X) ^{§§§§}	PerkinElmer, Inc.	AL004C (10 mL) AL004F (100 mL)

[§] 10 µL以下の少量では、誤差2%以下、25-1000 µL量では誤差1%以下のピペッターのご使用をお勧めいたします。

^{§§} 25mM HEPES, 0.1% Casein, 0.5% Triton X-100, 1mg/mL Dextran-500, 0.05% Proclin-300.

^{§§§} PBS, 0.1% BSA, 0.05% Proclin-300.

^{§§§§} 25mM HEPES, 0.1% Casein, 1mg/mL Dextran-500, 0.05% TritonX-100, 0.5% Gelatin, 0.05% Proclin-300, 0.5% BSA.

名称	販売元	製品コード
バッファー (Self-made)		
ProClin-300	Sigma-Aldrich Co.	48912-U
Tween-20 (Surfact-Amps 20)	Pierce (ThermoFisher Scientific Inc.)	28320
Dextran 500 MW ~500000	Sigma-Aldrich Co.	D1037
Casein 5% Alkali-soluble solution	Novagen (EMD Chemicals Inc.)	70955
Triton-X100 (Surfact Amps X100)	Pierce (ThermoFisher Scientific Inc.)	28314
アナライト除去血清の調製		
Streptavidin-Sepharose beads	GE Healthcare, Inc.	17-5113-01

表III. 推奨マイクロプレート

アッセイ フォーマット	製品名	製品 コード	ウェル 容量	推奨アッセイ容量
96	OptiPlate™-96	6005290	400 µL	≥ 50 µL
	½ AreaPlate-96	6005560	180 µL	50 µL
384	OptiPlate-384	6007290	105 µL	25-50 µL (推奨しません。)
	AlphaPlate™-384	6005350	105 µL	25-50 µL (OptiPlate-384 よりも クロストークが低くなります。)
	ProxiPlate-384	6008280	30 µL	10-20 µL (推奨しません。)
	AlphaPlate shallow well-384	6004350	30 µL	10-20 µL (ProxiPlate-384 よりも クロストークが低くなります。)
1536	AlphaPlate-1536	6004350	12 µL	5-10 µL
	OptiPlate-1536	6004290	12 µL	クロストークが高いため、 推奨しません。

このガイドでは½ AreaPlate-96 の使用を前提としています。他のプレートを使用の場合、表IIIを参考にアッセイ量を変更してください。

アッセイにはAlphaScreen測定に適したプレートリーダーが必要です。推奨機器は、AlphaScreenモジュールを装備したEnVisionマルチラベルプレートリーダー、あるいはEnSpire Alpha、EnSpireです。

使用目的

AlphaLISAアクセプタービーズの使用目的は、抗原(このガイドではアナライトと呼んでいます)の検出、タンパク質・タンパク質相互作用、細胞内の標的分子検出です。AlphaLISAは研究目的の製品で、診断に使用することはできません。

II. アッセイの原理

AlphaLISAは、血清、血漿、細胞培養上清あるいは細胞抽出液中の目的タンパク質を高感度、定量的かつ再現よく、しかも簡便な操作で検出することを目的に開発されました。目的のアナライトを、サンドイッチアッセイによって検出することができます。

ビオチン化抗アナライト抗体が結合したstreptavidinドナービーズと、もう一方の抗アナライト抗体を化学結合させたAlphaLISAアクセプタービーズを用います。アナライト存在下では、ドナービーズとアクセプタービーズに結合した抗体がそれぞれアナライトに結合し、2種のビーズが近接します。ドナービーズが励起して一重項酸素が放出されると、近接したアクセプタービーズ内で一連の化学反応が引き起こされ、最終的に検出光が放出されます(図1)。詳細については、'A Practical Guide to Working with AlphaScreen'をご参照ください。

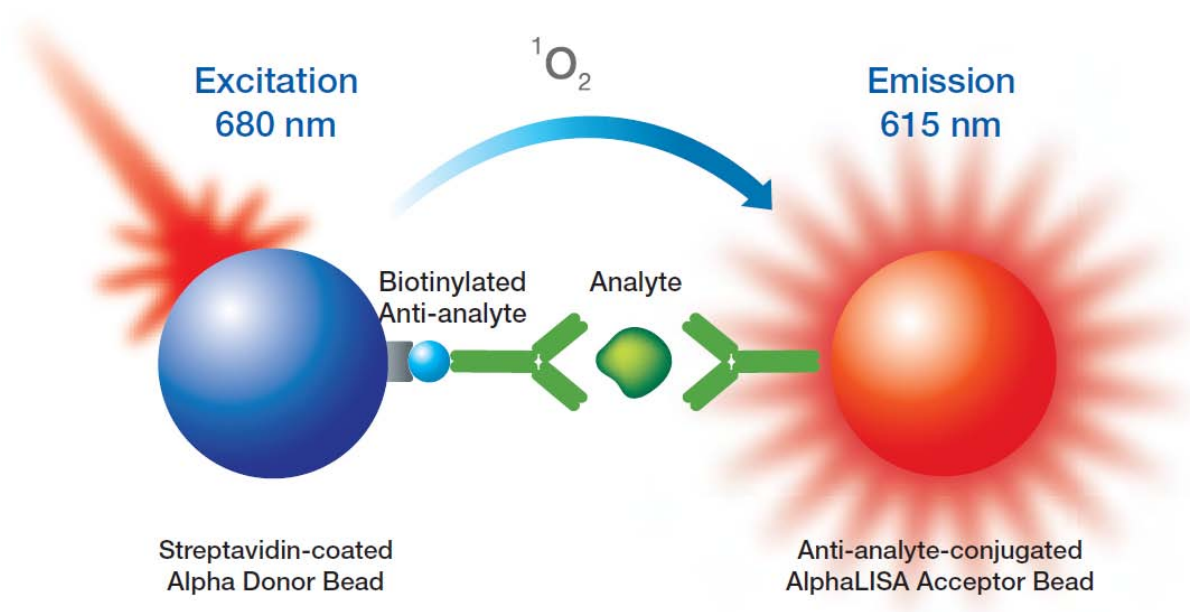


図 1: AlphaLISA原理

III. アッセイセットアップ

AlphaLISAは、複数のステップがセットアップに必要です。ここではAlphaLISAのセットアップに共通するポイントを記載しています。アナライトによっては、更なる検討が必要な場合もあります。

A) 抗体ペアの選択

AlphaLISAのセットアップには、アナライトを認識する一組の抗体ペアが必要となります。すでにELISAなどで実績のある抗体は、AlphaLISAでも使用できます。複数種の抗体を組み合わせ、アッセイに適した抗体ペアを選別します。抗体は以下を参考に選択し、抗血清は使用しないでください。

- アナライト・異なるエピトープに特異的である。
- モノクローナル抗体
- 精製したポリクローナル抗体(抗体やアッセイの種類によっては、ビオチン化・AlphaLISAアクセプタービーズへの標識に、同一種の抗体をご使用いただける場合もあります。)
- 抗体溶液にはTris, Glycine, Bicine, Tricineなどのアミン基を有するバッファー、アジ化ナトリウム含まれていない。これらのバッファーが用いられている場合は、スピнкаラムなどを使用して、PBSあるいは炭酸バッファー (pH 8)などの弱アルカリ性バッファーに置換してください。
- 抗体以外のタンパク質、安定化剤(BSA、ゼラチン)が含まれない。

一方の抗体をビオチン化して、他方はAlphaLISAアクセプタービーズに化学結合させます。例として、一組の抗体A、Bをご用意した場合、抗体の組み合わせは以下の通りです。

1. ビオチン化抗体A + 抗体B-AlphaLISAアクセプタービーズ
2. ビオチン化抗体B + 抗体A-AlphaLISAアクセプタービーズ

検出感度やシグナル強度が大きく向上することがあるため、抗体のビオチン化とAlphaLISAアクセプタービーズへの標識は、両方の抗体でそれぞれ行い、アッセイに適した組み合わせを選択することをお勧めします。

(Note: 二次抗体の結合したAlphaLISAアクセプタービーズと、二次抗体あるいはビオチン化二次抗体を使う間接法アッセイも考えられます。P22のAlphaLISA Tool Boxをご参照ください。)

B) 抗体のビオチン化

ビオチン化する抗体に関して、以下の点を事前にご確認ください。

- 抗体濃度が0.6 mg/mL以上。(ビオチン化効率が高くなります)
- Tris, Glycine, Bicine, Tricineなどのアミン基を有するバッファーは適していません。これらのバッファーに抗体が溶解している時には、PBSや炭酸バッファー (pH 8)などの弱アルカリ性バッファーに置換してください。アジ化ナトリウムも除いてください。
- 抗体以外のタンパク質や、安定化剤(BSA、ゼラチン)を含まない。
- 抗体がpH 7.0 - 8.0において溶解している。(ビオチン化反応はpH 7.0 - 8.0の弱アルカリ条件下で行います。)

1 mg/mL (6.25 μM)の抗体を 100 μg*(0.625 nmol)使用するときのプロトコール

*ビオチン化効率が 96 %の場合、AlphaLISAイムノアッセイにおいて、総反応液量 50μL、終濃度 1nMのビオチン化抗体を使用する条件では、12000 well分に相当します。

Materials:

- 100 μLの 1 mg/mL抗体溶液(pH 7 以上)
- 7.62 μLの 2 mg/mL NHS-ChromaLink-ビオチン(用時調製)
PBSを用いて希釈します。その他、NHS-ビオチン, NHS-LC-ビオチン またはNHS-LC-LC-ビオチンを使用可能です。
- 2 本のZeba Desalt Spin Column, 0.5 mL (Pierce社)
- PBS

Column size	Sample volume
0.5 mL	30 - 130 μL
2 mL	200 - 700 μL
5 mL	500 - 2,000 μL
10 mL	700 - 4,000 μL

Zeba Desalt Spin Columnサイズとサンプル量

Protocol:

- a) エッペンチューブに 100μLの 1 mg/mL抗体溶液(pH 7 以上)を加えます。
- b) 7.62 μLの 2 mg/mL NHS-ChromaLink-ビオチン溶液をa)の抗体溶液に加えます。
ビオチン化試薬と抗体の推奨モル比は、30: 1 です。ビオチン化効率の確認は、SoluLink社 HP(<http://www.solulink.com>)をご参照ください。

- c) 92.38 μLのPBSを加えて、総量を 200 μLにします。
- d) 21 - 23 °Cにて 2 時間インキュベートします。
- e) 2 本のZeba Desalt Spin Column, 0.5 mLを、エッペンチューブにセットし、300μLのPBSなどのバッファーを用いて洗浄します。
- f) バッファーを除くため、1,500 xg, 1 分間遠心し、エッペンチューブのバッファーを取り除きます。

Column size	Buffer volume
0.5 mL	300 μL
2 mL	1 mL
5 mL	2.5 mL
10 mL	5 mL

Zeba Desalt Spin Column サイズと洗浄バッファー量

- g) e)-f)を 4 回繰り返し、最後に新しいエッペンチューブにZeba Desalt Spin Columnをセットします。
- h) d)の反応溶液を 100 μLずつg)のカラムの中央にアプライし、1,500 xg, 2 分間遠心します。

Column size	Centrifugation
0.5 mL	1,500xg, 2 min
2 - 10 mL	1,000xg, 2 min

Zeba Desalt Spin Column サイズと遠心条件

- i) 得られたビオチン化抗体を 1 本のチューブに集め、濃度と、ビオチン・抗体のラベル比を算出します。
- 280 nm (A_{280})、354 nm (A_{354})、450 nm (A_{450})の吸光度を測定します(ブランクはPBSを使用)。
 - A_{450} 値が 0.1 以上の場合は、抗体が沈殿している可能性があるため、15,000 rpmで 10 分間遠心分離し、上清を使用します。
 - 以下の計算式を用いて、ビオチン化抗体の濃度 $C_{Ab-biotin}$ [μM]を算出します。

$$C_{Ab-biotin} \quad [mg / mL] = (A_{280} - (A_{354} \times 0.23)) \div 1.34$$

$$C_{Ab-biotin} \quad [\mu M] = (C_{Ab-biotin} \div 160,000) \times 10^6$$

- ビオチン・抗体のラベル比 R_{Ab} [%]を以下の計算式に従って算出します。

$$\text{ビオチンの濃度: } C_{Biotin} [\mu M] = (A_{354} \div 29) \times 1000$$

$$\text{置換率 (Molar substitution ratio): } MSR [\text{biotin}/Ab] = C_{Biotin} / C_{Ab-biotin}$$

$$\text{抗体のリカバー率: } R_{Ab} [\%] = (C_{Ab-biotin} \times V_{Ab-biotin} \times 100) \div (C_{Ab} \times V_{Ab}) \quad *V: \text{容量}[\mu L]$$

ビオチン化抗体は、PBSなどのバッファーを用いて終濃度 500 nMに調製後、25 μL程度に小分けし、-20 °C にて保存してください。

C) AlphaLISAアクセプタービーズへの抗体の結合

C1. はじめに

アクセプタービーズに結合させる抗体に関して、以下の点を事前にご確認ください。

- 効率的にアクセプタービーズに結合する抗体濃度は、1-2 mgのビーズでは 1 mg/mL以上、2.5 mg以上のビーズでは 0.53 mg/mLです。抗体濃度が低いと結合効率が低下するため、iCON Concentrator (Cat# 89886 : Pierce社)や、Microcon、Centricon (Ultracell YM-30 Cat# 4208、42409 : Millipore社)等の限界ろ過膜を使用して濃縮してください。
- Tris, Glycine, Bicine, Tricineなどのアミン基を有するバッファーは適していません。これらのバッファーに抗体が溶解している時には、PBSや 0.13 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 8)、炭酸バッファー (pH 8)などの弱アルカリ性バッファーに置換してください。アジ化ナトリウムも除いてください。
- 抗体以外のタンパク質や、安定化剤(BSA、ゼラチン)を含まない。結合効率が低下することがあります。
- 結合反応溶液に、終濃度 10 %のグリセロールが含まれると、アッセイのシグナル強度が 50 %低下します。この場合は、透析などのバッファー交換をお勧めします。

アクセプタービーズと抗体の重量比は、結合反応効率に大きく影響します。アクセプタービーズと抗体の推奨重量比は 10:1 から 50: 1 です。アクセプタービーズの量が少ないとき(1-2 mg)は重量比を 10:1(C2 参照)に、アクセプタービーズが 2.5 mg以上のときは重量比 50:1(C3 参照)をお勧めします。

C2. 1 mgのAlphaLISAアクセプタービーズの調製プロトコル(重量比 10:1)

1 mg/mLの抗体を 100 μ L (100 μ g) 使用するときのプロトコル

*AlphaLISAイムノアッセイにおいて、総反応液量 50 μ L、終濃度 10 μ g/mLのアクセプタービーズを使用する条件では、2000 well分に相当します。

Day 1:

Materials:

- ・ 100 μ Lの 1 mg/mL抗体溶液(100 μ g)
- ・ 50 μ Lの 20 mg/mL AlphaLISAアクセプタービーズ(1mg)
- ・ 1.25 μ Lの 10 % Tween-20
- ・ 10 μ Lの 25 mg/mL NaBH₃CN溶液(用時調製、水に溶解させます。)
- ・ PBS

Protocol:

洗浄

- 50 μ LのAlphaLISAアクセプタービーズを、ボルテックス後、エッペンチューブに移し、16,000 xg、15分間遠心分離し、上清を除去します。
- 50 μ LのPBSを加え、上記遠心分離操作を繰り返します。

結合

- 上清を除いたAlphaLISAアクセプタービーズに 88.75 μ LのPBSを加え、ボルテックスしビーズを懸濁させます。
- 100 μ Lの抗体溶液を加えます。
- 1.25 μ Lの 10 % Tween-20を加えます。
- 10 μ Lの 25 mg/mL NaBH₃CN溶液を加え、37 °Cにて 24 時間インキュベーションします。

Day 2:

Materials:

- 10 μ Lの 65 mg/mLカルボキシメチルアミン(CMO)溶液(0.8 M NaOHに溶解させます。)
- 500 μ Lの 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)
- 200 μ LのAlphaLISAアクセプタービーズ保存バッファー(0.05 % Proclin-300 を含むPBS)

Protocol:

未反応官能基のプロッキング

- 10 μ LのCMO溶液をDay1 の反応溶液に加え、未反応のアルデヒド官能基をブロックします。
- 37 °Cにて 1 時間インキュベートします。

精製

- 16,000 xgで 15 分間遠心分離します。
- 上清を取り除き、沈殿したビーズを 200 μ Lの 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)に懸濁します。
- 同様に 16,000 xg、15 分間遠心分離し、上清を除きます。
- 上記の洗浄操作を再度繰り返します。
- 沈殿したビーズを、AlphaLISAアクセプタービーズ保存バッファー200 μ Lに懸濁します(終濃度 5 mg/mLに調製されます)。
- ボルテックスし、軽くスピンドウンした後、ソニケーションします。ソニケーションは、プローブソニケータを用いて 1 秒を 20 回繰り返します。

保存

- 抗体を結合させたアクセプタービーズは、4°Cで保存します。
- 重要:ビーズは時間の経過と共に沈降します。使用前にボルテックスを行ってください。

C3. 5 mgのAlphaLISAアクセプタービーズの調製プロトコール(重量比 50:1)

0.53 mg/mL以上の抗体を 100 μ g (100 μ g)使用するときのプロトコール

*AlphaLISAイムノアッセイにおいて、総反応液量 50 μ L、終濃度 10 μ g/mLのアクセプタービーズを使用する条件では、10000 well分に相当します。

Day 1:

Materials:

- 100 μ Lの 1 mg/mL抗体溶液(100 μ g)
- 250 μ Lの 20 mg/mL AlphaLISAアクセプタービーズ(5mg)
- 1.25 μ Lの 10 % Tween-20
- 10 μ Lの 25 mg/mL NaBH₃CN溶液(用時調製、水に溶解させます。)
- PBS

Protocol:

洗浄

- 250 μ Lの 20 mg/mL AlphaLISAアクセプタービーズを、16,000 xg、15 分間遠心分離し、上清を除去します。
- 250 μ LのPBSを加え、上記洗浄操作を繰り返します。

結合

- 上清を除いたAlphaLISAアクセプタービーズに 88.75µLのPBSを加え、ボルテックスしビーズを懸濁させます。
- 100 µgの抗体溶液を加えます。
- 1.25 µlの 10 % Tween-20 を加えます。
- 10 µLの 25 mg/mL NaBH₃CN溶液を加え、37 °Cにて 24 時間インキュベートします。

Day 2:

Materials:

- ・ 10 µLの 65 mg/mLカルボキシメチルアミン(CMO)溶液(0.8 M NaOHに溶解させます。)
- ・ 2 mLの 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)
- ・ 1 mLのAlphaLISAアクセプタービーズ保存バッファー(0.05 % Proclin-300 を含むPBS)

Protocol:

未反応官能基のプロッキング

- 10 µLのCMO溶液をDay1 の反応溶液に加え、未反応のアルデヒド官能基をブロックします。
- 37 °Cにて 1 時間インキュベートします。

精製

- 16,000 xg、15 分間遠心分離します。
- 上清を取り除き、沈殿したビーズを 1 mLの 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)に懸濁します。(1 mgのビーズに対して 200 µLのバッファーを使用します。)
- 同様に 16,000 xg、15 分間遠心分離し、上清を除きます。
- 上記の洗浄操作を再度繰り返します。
- 沈殿したビーズを、AlphaLISAアクセプタービーズ保存バッファー1 mLに懸濁します(終濃度 5 mg/mLに調製されます。)
- ボルテックスし、軽くスピンドウンした後、ソニケーションします。ソニケーションは、プローブソニケータを用いて 1 秒を 20 回繰り返します。

保存

- 抗体を結合させたアクセプタービーズは、4°Cで保存します。

重要:ビーズは時間の経過と共に沈降します。使用前にボルテックスを行ってください。

D) 最適な抗体の組み合わせの決定

アッセイのセットアップにおいて最初に行う条件検討は、抗体ペアの組み合わせの最適化です。「A. 抗体ペアの選択」で述べたように、使用する抗体に対して、下記の組み合わせを検討してください。

1. ビオチン化抗体A + 抗体B-AlphaLISAアクセプタービーズ
2. ビオチン化抗体B + 抗体A-AlphaLISAアクセプタービーズ

D1. 最適な抗体ペアの選択

抗体濃度を一定にし、測定レンジ内における 2 ないし 3 点の異なる濃度のアナライトを、ネガティブコントロール (アナライト濃度 0) と共に実験を行います。

以下の方法は例です。使用するアナライトごとに条件を変更してください。

標準アッセイバッファー

- 25 mM HEPES (pH 7.4)
- 0.5% Triton X-100
- 0.1% Casein
- 1 mg/mL Dextran 500

このバッファーは、AlphaLISA ImmunoAssay Buffer (10X) (Cat# AL000C (10 mL)、AL000F (100 mL))として販売しています。10 倍に希釈して使用してください。

Materials:

- ・ アッセイバッファー
- ・ アナライト(アッセイバッファーで希釈し、異なる濃度に調製します。)
- ・ 1.5 - 15 nMビオチン化抗体(アッセイバッファーを用いて調製します。)
- ・ 50 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ(調製したビーズを、アッセイバッファーを用いて 100 倍に希釈し、調製します。)
- ・ 80 µg/mL AlphaScreenストレプトアビジドナービーズ(Cat; 6760002 アッセイバッファーを用いて 62.5 倍に希釈し、調製します。)

Protocol:

½ AreaPlate-96 マイクロプレートに以下の順で加えます。

- 5 µLのアナライト
- 10 µLの 1.5 - 15 nMビオチン化抗体(終濃度 0.3 - 3 nMの範囲内。推奨終濃度は 1 nMです。)
- 10 µLの 50 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ(終濃度 10 µg/mL)

23°Cにて 1 時間インキュベートした後、以下を加えます。

- 25 µLの 80 µg/mLストレプトアビジドナービーズ(終濃度 40 µg/mL)

遮光条件下において、23°Cにて 30 分間インキュベートし、プレートリーダーで測定します。

最も低いアナライト濃度において、最も高いシグナル/バックグラウンド(S/B)比を示した抗体の組み合わせが、高S/B比、高感度の組み合わせです。

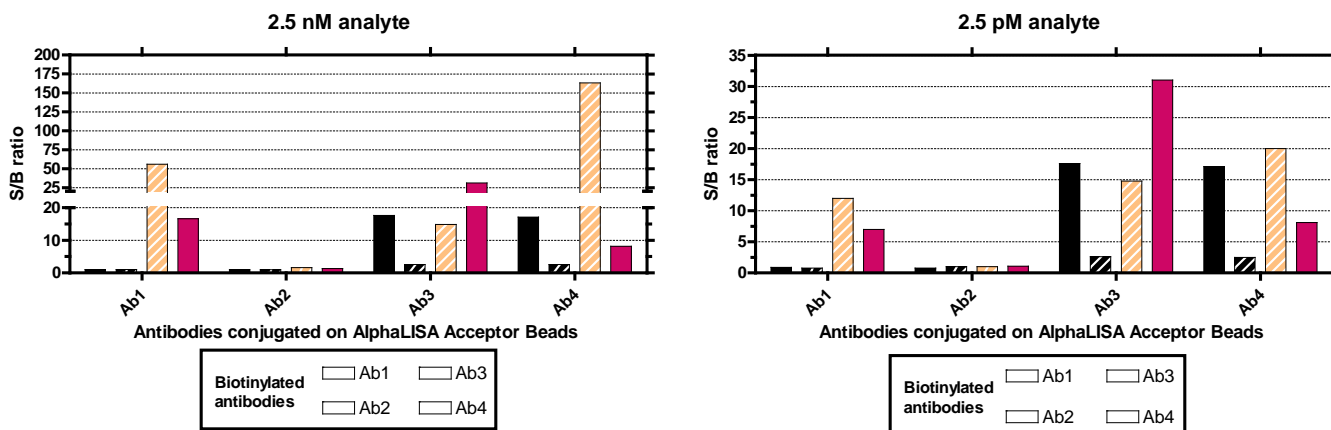


図 2: 最適な抗体の組み合わせの選別

2.5 nM、あるいは 2.5 pM アナライトにおいて、それぞれの抗体の組み合わせによるS/B比(アナライトのシグナルから、ネガティブコントロールのシグナル(バックグラウンド)を割った値です。)を得ることができます。この例では、Ab3 抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズと、ビオチン化Ab4 抗体が最も適した組み合わせとなります。

D2. 最適なビオチン化抗体濃度の決定

抗体の組み合わせが決定したら、ビオチン化抗体濃度の最適化を行います。アナライト濃度を測定レンジ内において一定濃度にして、抗体の希釈曲線を作成します。

Materials:

- ・ アッセイバッファー
- ・ アナライト(アッセイバッファーで希釈し、測定レンジ内で一定にします。)
- ・ 0.5 -500 nMビオチン化抗体(アッセイバッファーを用いて調製します。)
- ・ 50 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ(調製したビーズを、アッセイバッファーを用いて100 倍に希釈し、調製します。)
- ・ 80 µg/mL AlphaScreenstreptavidinビーズ(Cat; 6760002;アッセイバッファーを用いて62.5 倍に希釈し、調製します。)

Protocol:

½ AreaPlate-96 マイクロプレートに以下の順で加えます。

- 5 µLのアナライト
- 10 µLのビオチン化抗体(終濃度 0.1 nMから 100 nMの範囲が推奨濃度です。)
- 10 µLの 50 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ(終濃度 10 µg/mL)

23°Cにて1時間インキュベートした後、以下を加えます。

- 25 µLの 80 µg/mLstreptavidinビーズ(終濃度 40 µg/mL)

遮光条件下において、23°Cにて30分間インキュベートし、プレートリーダーで測定します。

通常、釣鐘状の曲線が得られます(図 3)。最大シグナルが得られる点は、ビオチン化抗体のフックポイント、すなわちビオチン化抗体とstreptavidinビーズとの結合が飽和する濃度です。アッセイの最適化は、フックポイントを下回るビオチン化抗体濃度で行います。この例では、最適ビオチン化抗体濃度は、1 nMです。

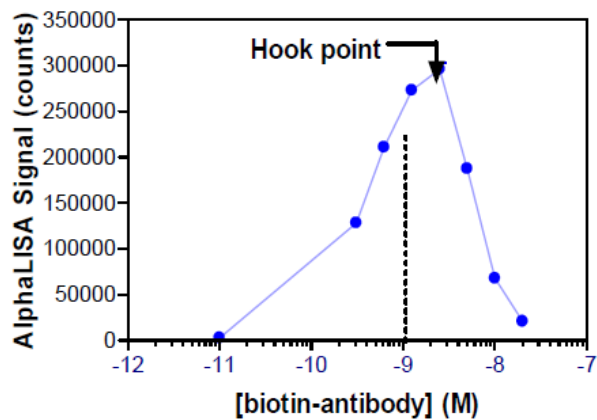


図 3: インスリンアッセイにおける抗体の希釈曲線

D3. 標準曲線

最適な抗体の組み合わせは、検出限界、アッセイウィンドウ(S/B比)とダイナミックレンジによって決定されます。標準曲線を作製し、検出限界やダイナミックレンジを得ます。標準曲線は以下の条件で作成します。

Materials:

- ・ アッセイバッファー
- ・ 標準溶液(希釈にはアッセイバッファーを用い、希釈系列として、測定レンジ内の濃度、測定レンジ以下の濃度、測定レンジ以上の濃度を、それぞれ数点ずつ調製します。)
- ・ 2.5 X Mix: 2.5 nMビオチン化抗体(セクションD2の希釈曲線から決めた抗体濃度。)と、25 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズの混合溶液(それぞれアッセイバッファーを用いて200倍に希釈し、調製します。)
- ・ 80 µg/mL AlphaScreenstreptavidinビーズ(Cat; 6760002:アッセイバッファーを用いて62.5倍に希釈し、調製します。)

Protocol:

1/2 AreaPlate-96 マイクロプレートに以下の順で加えます。

- 5 µLの標準溶液またはアッセイバッファー(アッセイバッファーはバックグラウンドとして、検出限界を求める時に使用します。希釈系列あたり3複製分(n=3)用意し、測定することをお勧めします。)
- 20 µLの2.5 X Mix(終濃度1 nMビオチン化抗体、10 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ)

23°Cにて1時間インキュベートした後、以下を加えます。

- 25 µLの80 µg/mLstreptavidinビーズ(終濃度40 µg/mL)

遮光条件下において、23°Cにて30分間インキュベートし、プレートリーダーで測定します。

最低検出限界(Low detection limit: LDL)は、以下の通り計算されます。

- 9 点のバックグラウンド値の平均と標準偏差(SD)を算出します。
- 標準偏差(SD)を 3 倍し、バックグラウンド平均値に加算した値(Average+3SD)を求めます。
- 標準曲線から、Average+3SD値に相当するアナライต์濃度を算出し、この濃度をLDLとします。

アッセイのダイナミックレンジは、標準曲線におけるLDLからフックポイント(アナライต์最大濃度)にかけての(フックポイントは含まない)範囲を指します。

データは線形あるいは非線形回帰分析により解析します。ダイナミックレンジが広い場合、すなわちAlphaLISAにおける標準曲線は、右の計算式を用いた非線形回帰分析(4パラメーターロジスティック回帰)を用いて解析された、シグモイド曲線(可変曲線)として描かれます。

$$Response = Top + \frac{(Bottom - Top)}{1 + \left(\frac{concentration}{EC_{50}}\right)^{Slope}}$$

詳細は、NIH Chemical Genomics Center manualを参照ください(http://ncgc.nih.gov/guidance/manual_toc.html)。

EC50は、TopとBottomの中間点の濃度

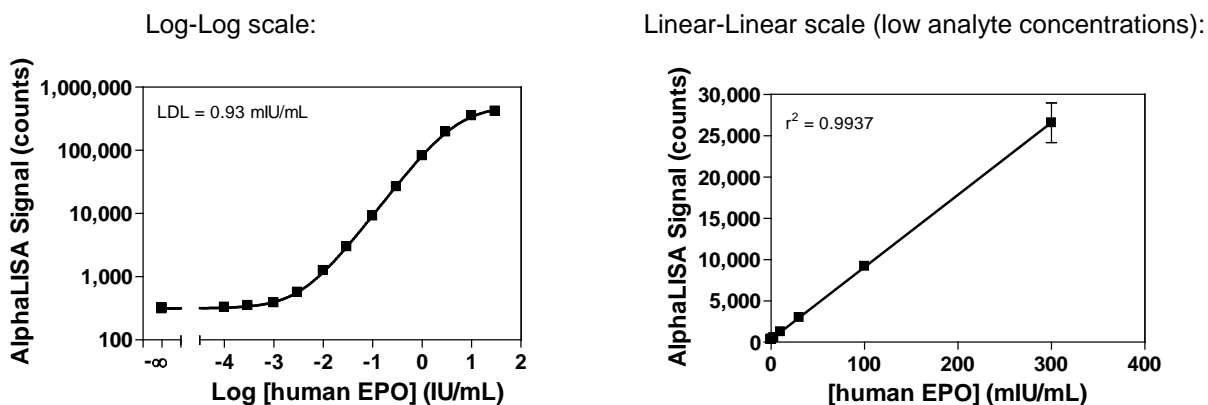


図 4: アッセイバッファー中のヒトEPOの標準曲線

シグモイド(A)あるいは直線(B)の作図が可能です。シグモイド型の方が、広いレンジのアナライต์濃度の分析に適しています。標準曲線の低い濃度領域(0.3 IU/mL以下)を直線グラフとして示しています(B)。

E) アッセイバッファーの最適化

より高いシグナルを得るための最適化では、以下の要素について検討します。

- バッファーの種類: Tris, HEPES とそのpH
- Dextran-T500 の添加: 血清や血漿サンプルでは、ビーズの非特異的な凝集を避けるため、終濃度 1 mg/mLのDextran-T500 が効果的です。
- 界面活性剤の添加: 0.01 - 1% Tween-20, CHAPSあるいはTriton X-100
- タンパク質ブロッキング剤の添加: 0.01 - 1% カゼインまたはBSA

F) アッセイ容量、インキュベーション時間、試薬の添加順の最適化

F1. アッセイ容量、サンプル容量

96-ウェルマイクロプレートでは 50-75 μL 、384-ウェルマイクロプレートでは 25-50 μL 、1536-ウェルマイクロプレートでは 5-10 μL です。

血清あるいは血漿サンプルの場合、サンプル中の成分による干渉を低減するため、サンプル容量を総液量の 10 %以下に留めることをお勧めします。最終容量 50 μL の場合、サンプル容量は 5 μL 以下です。

F2. インキュベーション時間

タイムコースを取り決定します。通常、シグナルはビーズを添加して数時間後にプラトーに達します。

F3. 試薬の添加順

殆どのアッセイでは、セクションDに述べた添加順序が適していますが、添加順序の変更により感度が向上する可能性があります。ビオチン化抗体を添加後に、インキュベーション時間をおいてからアクセプタービーズ添加すると有効な場合があります。

ビオチン化抗体ドナービーズを予め混合してから添加すると、感度が低下することがあります。

G) 標準曲線を用いた未知サンプル中のアナライト濃度の決定

血清または血漿サンプル中のアナライトを定量するため、既知濃度のアナライト溶液(標準溶液)を用いて標準曲線を作製します。標準溶液の希釈には、「マトリックス溶液(アナライトを除去した血清または血漿)」の使用をお勧めします。FBSや高濃度のBSAなどの使用が可能な場合もあります。

G1. アナライト除去血清の調製

ストレプトアビジン-セファロースビーズとビオチン化抗アナライト抗体を用いて、アナライト除去血清を調製します。

Materials:

- ・ StreptavidinSepharose:GE Healthcare, cat# 17-5113-01(抗体モル数の 20 倍のストレプトアビジン-セファロースビーズを使用します。)
- ・ Human serum: Cambrex, cat# 14-402E
- ・ ビオチン化抗アナライト抗体(アナライトの存在モル数の 100 倍のビオチン化抗体を使用します。)
- ・ PBS

Protocol:

Day 1:

StreptavidinSepharoseの調製:

- ストレプトアビジン-セファロースビーズは使用前にPBSで洗浄します。(ボルテックスは避けてください)
- 2000 rpmで5分間遠心し、沈殿を吸わないよう上清を注意深く取り除きます。
- 沈殿(セファロースビーズ)に、10 mLの1x PBSを加え、チューブを上下にひっくり返して混ぜます。(ボルテックスは避けてください)
- 2000 rpmで5分間遠心し、沈殿を吸わないよう上清を注意深く取り除きます。
- 上の操作を2回繰り返します。
- ビオチン化抗体を加え、4°Cにて2時間、攪拌します。

血清からのアナライト除去:

- 2000 rpmで5分間遠心し、沈殿を吸わないよう上清を注意深く取り除きます。
- 沈殿(SA-Sepharose)に、10 mLの1x PBSを加え、チューブを上下にひっくり返して混ぜます。(ボルテックスは避けてください)
- 2000 rpmで5分間遠心し、沈殿を吸わないよう上清を注意深く取り除きます。
- 上の操作を2回繰り返します。
- 血清をペレットに加え、4°Cにて一晩ゆっくり攪拌します。

Day 2:

- エッペンチューブにDay1の反応溶液を分注し、12,000 rpmで10分間遠心します。
- 新しいチューブに上清を移します。
- 上記の操作を繰り返します。
- 沈殿を吸わないよう上清を注意深く取り、新しいチューブに移し、13,000 rpmで10分間遠心します。
- 沈殿を吸わないよう上清を注意深く取り、新しいチューブにした後、-20°Cにて保存します。

G2. 標準曲線

マトリックス溶液を使った標準曲線の作製と、未知サンプル中のアナライト定量の、一般的な方法を以下に示します。セクションDで述べたようなアッセイ条件の最適化後に行います。

Materials:

- ・ アッセイバッファー
- ・ 標準溶液(希釈にはマトリックス溶液を使用します。希釈系列作製前の標準溶液が、マトリックス溶液を用いて調製された場合は、分注後-80°Cにて保存可能です。)
- ・ 2.5 X Mix: 2.5 nMビオチン化抗体(セクションD2の希釈曲線から決めた抗体濃度。)と、25 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズの混合溶液(それぞれアッセイバッファーを用いて200倍に希釈し、調製します。)
- ・ 80 µg/mL抗体結合Alphascreenストレプトアビジドナービーズ(、アッセイバッファーを用いて62.5倍に希釈し、調製します。)

Protocol:

½ AreaPlate-96 マイクロプレートに以下の順で加えます。

- 5 µLの標準溶液またはマトリックス溶液(マトリックス溶液はバックグラウンドとして、検出限界を求める時に使用します。希釈系列あたり3複製分(n=3)用意し、測定することをお勧めします。)
- 20 µLのビオチン化抗体と抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ(2.5 X Mix; 終濃度 1 nMビオチン化抗体、10 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ)

23°Cにて1時間インキュベートした後、以下を加えます。

- 25 µLの 80 µg/mLストレプトアビジドナービーズ(終濃度 40 µg/mL)

遮光条件下において、23°Cにて30分間インキュベートし、プレートリーダーで測定します。

標準曲線は、標準溶液の濃度をX軸に、対応するAlphaLISAシグナルをY軸にプロットします(図5)。

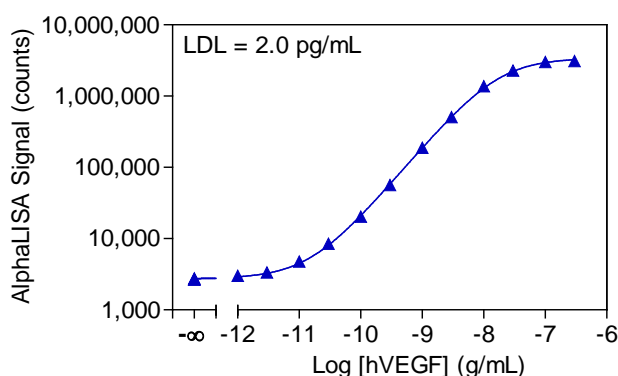


図5: マトリックス溶液中におけるヒトVEGFの標準曲線

ビオチン化抗体の終濃度は1 nM、抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズとストレプトアビジドナービーズの終濃度は、それぞれ10 µg/mLと40 µg/mLです。

この標準曲線から、未知サンプル中のアナライト量を算出します(セクションD参照)。未知サンプルのAlphaLISAシグナルを標準曲線にプロットすることにより、アナライトの濃度が算出されます。

IV. 参考文献

Myrick J.E. et al.

An improved radioimmunoassay of C-peptide and its application in a multiyear study (1989), Clin. Chem. 35, pp 37-42

Glick R.D. et al.

The effects of serum depletion and dexamethasone on growth and differentiation of human neuroblastoma cell lines.

(2000), J. Pediat. Surg. 35, pp 465-472

Raffo A.J. et al.

Overexpression of bcl-2 Protects Prostate Cancer Cells from Apoptosis in Vitro and Confers Resistance to Androgen Depletion in Vivo

(1995), Cancer Res. 55, pp 4438-4445

A PRACTICAL GUIDE TO WORKING WITH ALPHASCREEN® (PerkinElmer, Inc.).

APPLICATION NOTE (PerkinElmer, Inc.):

AlphaScreen® Insulin Detection Assay Using AlphaLISA® Acceptor beads.

LUMINESCENT OXYGEN CHANNELING ASSAY (LOCI™):

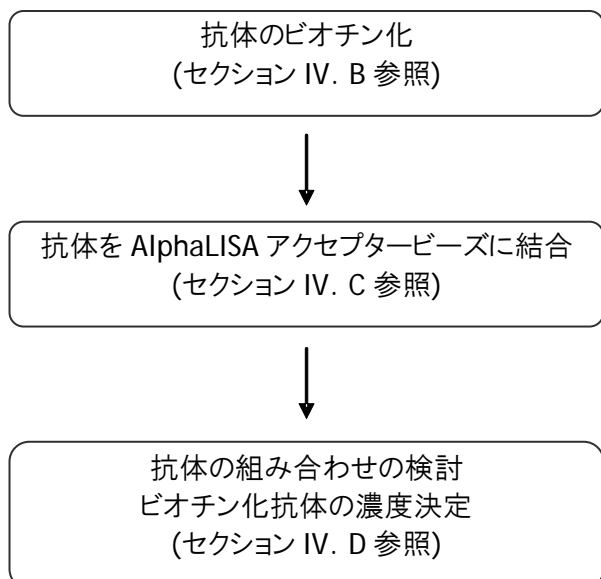
sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method:

Ullman E.F. et al.

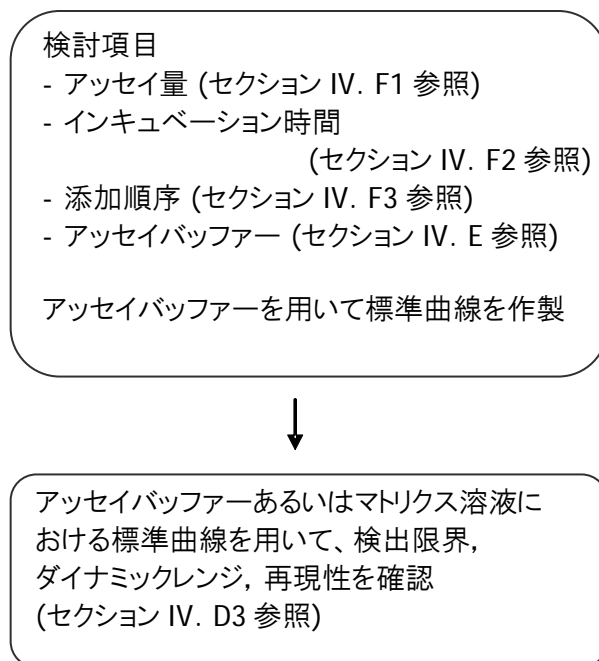
(1996), Clin. Chem. 42, pp 1518-1526.

付録 I: AlphaLISAアッセイセットアップの概要

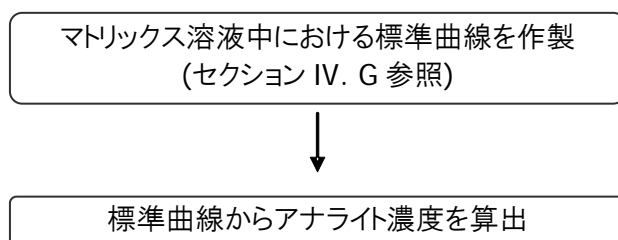
A. 最適な抗体の組み合わせの決定



B. アッセイ条件の最適化



C. 未知サンプル中のアナライト定量



付録 II: 血清サンプルの調製

- a. 抗凝固剤を含まないバキュティナ採血管(日本BD社)に採血します。室温にて 30 分間静置して、血栓を形成させます。
- b. 低温(4 +/- 2 °C)で遠心分離(2,000 - 3,000 × g)15 分間を行います。
- c. 血清を日付とサンプル名を表記した新しいチューブに移します。
- d. 直ちに使用、または-20°C以下で保存します。凍結融解の繰り返しは避けます。

AlphaLISA Tool Box

AlphaLISA未結合アクセプタービーズ

AlphaLISA Unconjugated Acceptor beads (Cat No. 6772001)

AlphaLISA IgG検出

AlphaLISA Protein A Acceptor beads (Cat No. AL101)

AlphaLISA Protein G Acceptor beads (Cat No. AL102)

AlphaLISA anti-human IgG Acceptor beads (Cat No. AL103)

AlphaLISA anti-rabbit IgG Acceptor beads (Cat No. AL104)

AlphaLISA anti-mouse IgG Acceptor beads (Cat No. AL105)

AlphaLISA anti-rat IgG Acceptor beads (Cat No. AL106)

AlphaLISA anti-goat IgG Acceptor beads (Cat No. AL107)

AlphaLISA Fusion Tag検出

AlphaLISA Nickel Chelate Acceptor beads (Cat No. AL108)

AlphaLISA Glutathione Acceptor beads (Cat No. AL109)

AlphaLISA anti-GST Acceptor beads (Cat No. AL110)

AlphaLISA anti-c-myc Acceptor beads (Cat No. AL111)

AlphaLISA anti-FLAG Acceptor beads (Cat No. AL112)

AlphaLISA anti-DIG Acceptor beads (Cat No. AL113)

AlphaScreenドナービーズ

AlphaScreen Streptavidin Donor beads (Cat No. 6760002)

AlphaScreen Nickel Chelate Donor beads (Cat No. AS101)

AlphaScreen Glutathione Donor beads (Cat No. 6765300)

AlphaScreen Unconjugated Donor beads (Cat No. 6762013)

AlphaLISAアッセイバッファー

AlphaLISA ImmunoAssay Buffer (10X) (Cat No. AL000)

AlphaLISA Universal Assay Buffer (5X) (Cat No. AL001)

AlphaLISA HiBlockBuffer (10X) (Cat No. AL004)

* Tool Box、AlphaLISAイムノアッセイキットのラインナップ最新情報は、
弊社HP (http://www.perkinelmer.co.jp/products_ls/assays/assays_0011.html)
またはカタログをご覧ください。

* AlphaLISAは試験研究目的にのみご使用いただけます。

Note:



株式会社 **パーキンエルマー** ジャパン

WWW.perkinelmer.co.jp

ライフサイエンス事業部

横浜本社 〒240-0005 横浜市保土ヶ谷区神戸町 134

横浜ビジネスパーク テクニカルセンター4F

TEL: (045) 339-5862(代) FAX: (045) 339-5872

大阪支社 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町 5-3

TEL: (06) 6386-1771(代) FAX: (06) 6386-6401

東京営業所 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町 1-7-17

CTKビル 5F

TEL: (03) 3866-2647(代) FAX: (03) 3866-2652