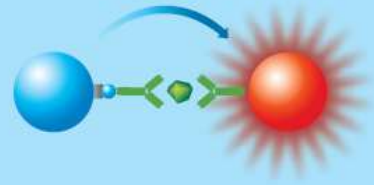


HUMAN HEALTH

ENVIRONMENTAL HEALTH

# ELISA to AlphaLISA ImmunoAssay Conversion Guide



<b>AlphaLISA アッセイの準備</b> .....	<b>3</b>
ご使用上の注意.....	3
必要な試薬や器具 .....	3
<b>AlphaLISA イムノアッセイ</b> .....	<b>7</b>
アッセイの原理.....	7
アッセイデザイン .....	8
<b>抗体の標識</b> .....	<b>10</b>
抗体の準備 .....	10
抗体のビオチン化 .....	11
アクセプタービーズへの抗体結合.....	13
少量ビーズ(1mg)への標識.....	14
大量ビーズ(>2mg)への標識.....	16
<b>アッセイのセットアップ</b> .....	<b>19</b>
セットアップの手順.....	19
1 組の抗体ペアを評価する(抗体の組み合わせ&ビオチン化抗体濃度).....	20
2 組以上の抗体ペアを評価する(抗体の組み合わせ/ビオチン化抗体濃度).....	22
スタンダードカーブ.....	25
<b>アッセイの最適化</b> .....	<b>26</b>
プロトコールの検討 .....	26
その他オプション(ビーズ濃度/反応時間/アッセイバッファー/少量化) .....	26
<b>バッファーの選択(スタンダード希釈液/アッセイバッファー)</b> .....	<b>29</b>
<b>トラブルシューティング</b> .....	<b>29</b>
<b>付録</b> .....	<b>34</b>
Appendix A: データの解析.....	34
Appendix B: アナライト除去血清の調製.....	36
Appendix C: 直線性試験と添加回収試験.....	37
Appendix D: Semi-Wash-Alpha アッセイ.....	37

## ご使用上の注意

- 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。
- AlphaLISAの測定には、Alpha測定機能を搭載した専用機が必要です。一般的なマルチプレートリーダーや時間分解蛍光、発光測定機では測定ができません。AlphaLISA測定機として、AlphaScreenモジュールを装備したEnSpire やEnVision(PerkinElmer社)を推奨しています。

## 必要な試薬や器具

表Iは、標準的なAlphaLISAイムノアッセイに使用するビーズの組み合わせです(ビオチン化抗体#1 と抗体#2 結合AlphaLISAアクセプタービーズによるサンドイッチアッセイ)。その他のビーズを使用する場合は、“アッセイのデザイン(P8)”を参考に、AlphaLISA Tool Boxから選択してください。

表 I. Alphaビーズ試薬

製品名	販売元	サイズ	製品コード	アッセイポイント*
<b>アクセプタービーズ</b>				
Unconjugated AlphaLISA Acceptor Beads (0.1M Tris-HCl pH 8.0, 0.05% ProClin-300)	PerkinElmer, Inc.	1 mg	6772001	2,000 pts
		5 mg	6772002	10,000 pts
		50 mg	6772003	100,000 pts
<b>ドナービーズ</b>				
AlphaScreen Streptavidin Donor Beads	PerkinElmer, Inc.	1 mg	6760002S	500 pts
		5 mg	6760002	2,500 pts
		50 mg	6760002B	25,000 pts

\*1ptsは、反応溶液 50 $\mu$ L/well、終濃度 10 $\mu$ g/mL(アクセプタービーズ)と 40 $\mu$ g/mL(ドナービーズ)でアッセイを行ったときの 1 well分に相当します。

## ビーズ開封時の注意

- 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。
- キャップを空ける前に、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。(軽い遠心ではビーズは沈殿しません。)
- Alphaビーズは、必ず遮光し、4 °Cにて保存してください。

# AlphaLISA アッセイの準備

表 II. AlphaLISA アクセプタービーズおよびドナ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		
アナライト、抗アナライト抗体	N/A	N/A
スタンダード希釈液	N/A	表III参照
アッセイバッファー	PerkinElmer, Inc.	表IV参照
マイクロプレート	PerkinElmer, Inc.	表V参照
TopSeal-A	PerkinElmer, Inc.	6050185
マイクロピペッター <sup>§</sup>	N/A	N/A
抗体のビオチン化		
NHS activated biotinylating reagent (ChromaLink) <sup>§§</sup>	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 <sub>3</sub> CN	Sigma-Aldrich Co.	296945(sol.) 156159(powder)
PBS	N/A	N/A
Tween-20	N/A	N/A
Tris-HCl (pH8.0)	N/A	N/A
Proclin-300(防腐剤)	N/A	N/A

<sup>§</sup> 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。

<sup>§§</sup>NHS-LC-biotinやNHS-LC-LC-biotin、NHS-PEG4-biotin(Thermo社)などもご使用いただけます。

### 表 III. スタンダード希釈液

測定するサンプル(検体)に合わせて選択します。詳細は「P29.スタンダード希釈液」を参照ください。

名称	コメント	製品コード
スタンダード希釈液		
アナライト除去血清(またはFBS)	サンプル: 血清	N/A
細胞培地	サンプル:細胞培養上清	N/A
アナライト除去血清の調製		
Streptavidin-Sepharose beads	販売元:GE Healthcare, Inc.	17-5113-01

## 表IV.アッセイバッファー

初めはAlphaLISA ImmunoAssay Buffer(AL000)の使用を推奨します。詳細は「P29.アッセイバッファーの選択」をご参照ください。

名称	販売元	製品コード
バッファー (Ready to Use)		
AlphaLISA ImmunoAssay Buffer (10X) <sup>§§</sup>	PerkinElmer, Inc.	AL000C (10 mL) AL000F (100 mL)
AlphaLISA Universal Buffer (5X) <sup>§§§</sup>	PerkinElmer, Inc.	AL001C (10 mL) AL001F (100 mL)
AlphaLISA Hiblock Buffer (10X) <sup>§§§§</sup>	PerkinElmer, Inc.	AL004C (10 mL) AL004F (100 mL)
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

<sup>§§</sup> 250mM HEPES, 1% Casein, 5% Triton X-100, 10mg/mL Dextran-500, 0.5% Proclin-300.

<sup>§§§</sup> 5xPBS, 0.5% BSA, 0.05% Proclin-300.

<sup>§§§§</sup> 250mM HEPES, 1% Casein, 10mg/mL Dextran-500, 5% TritonX-100, 5% Gelatin,0.5% Proclin-300, 5% BSA.

表V. 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	½ AreaPlate-96	6005560	180 µL	50 µL
384	AlphaPlate -384	6005350	105 µL	25-50 µL
	AlphaPlate shallow well-384	6004350	30 µL	10-20 µL
	AlphaPlate -384 HB (High Protein Binding Affinity)	6057690	105 µL	25-50 µL
1536	AlphaPlate-1536	6004350	12 µL	5-10 µL

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Vを参考にアッセイ量を変更してください。また、Semi-wash-Alpha アッセイ(Appendix D参照)を行う場合は、AlphaPlate-384 HBをご使用ください。

### 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で定量的に、再現性良く、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。目的のアナライズを、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。

標準的なAlphaLISAアッセイでは、ビオチン化抗アナライズ抗体が結合したstreptavidinドナービーズと、もう一方の抗アナライズ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(図 1)。アナライズ存在下では、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ズに結合し、2種のビーズが近接します。励起光 680nmを照射するとドナービーズ中の光感受性物質が周囲の酸素を一重項励起状態にします。一重項酸素は約 200nmまで拡散し、近接したアクセプタービーズ内で化学反応が起こり、615nmの発光が検出されます。発光シグナルはサンプル中のアナライズ量に比例し、スタンダードカーブを用いた解析により定量することができます。

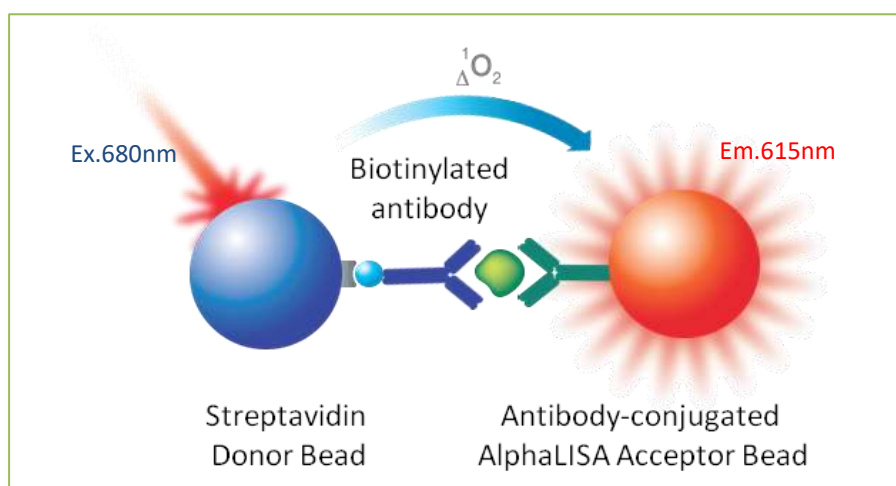


図 1. AlphaLISA 原理

### ELISAからAlphaLISAへ

AlphaLISA は高感度で洗浄操作が必要なく、ELISA のような一般的なイムノアッセイを、より効率化するアッセイ法です。このガイドブックでは、ELISA やその他イムノアッセイを AlphaLISA イムノアッセイに置換する方法を記載しています。

AlphaLISA アッセイの主な利点は下記です。

- 洗浄操作が不要で、スループットが高い。
- アッセイステップが少ないため、精度や CV 値の改善が期待できる。
- 100 以上の論文で評価されている。
- 高分子(<2000 kDa)や 結合力の弱い分子相互作用(mM)も検出することができるため用途が多様である。  
(Alpha の多様なアプリケーションについては下記 Web サイトをご覧ください)

[http://www.perkinelmer.co.jp/products\\_ls/assays\\_index.html](http://www.perkinelmer.co.jp/products_ls/assays_index.html)

## アッセイデザイン

## ダイレクトアッセイとインダイレクトアッセイ

最も標準的な AlphaLISA イムノアッセイは、抗アナライト抗体の一方はビオチン化しstreptavidinドナービーズと結合、もう一方の抗体は AlphaLISA アクセプタービーズに直接化学結合するダイレクトアッセイです(図 2-a)。

また、Protein A や Protein G、Protein L、抗 IgG でプレコートされた AlphaLISA アクセプタービーズを用いて間接的に抗体を捕捉するインダイレクトアッセイも可能です(図 2-b)。ただし、血清や血漿をサンプルとして使用する場合、サンプル中に存在する IgG 抗体の干渉を避けるためダイレクトアッセイの選択をお勧めします。

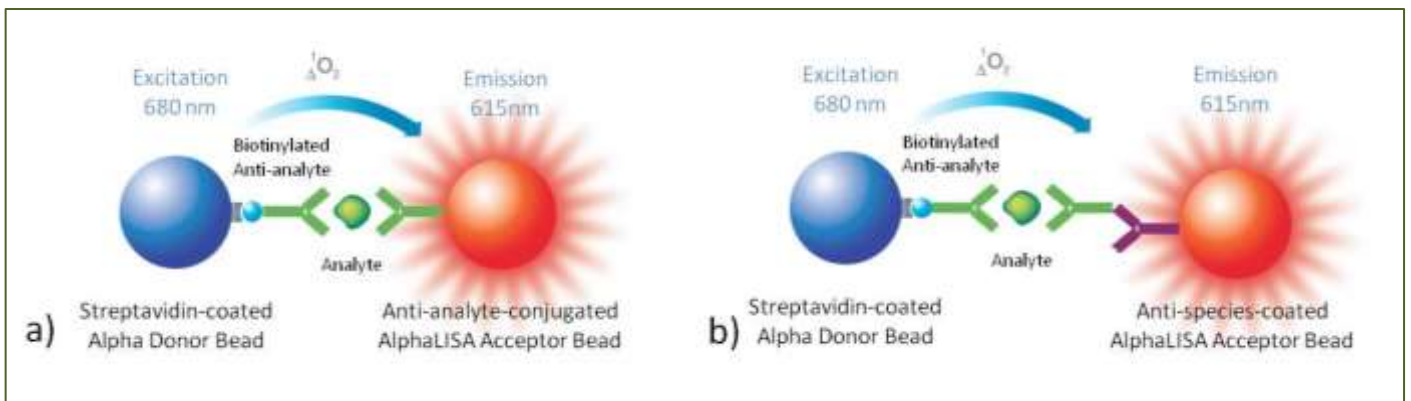


図 2. AlphaLISA サンドイッチアッセイ。a) ダイレクトアッセイ: 一方の抗体を直接 AlphaLISA アクセプタービーズに化学結合。他方の抗体はビオチン化しstreptavidinドナービーズで捕捉。b) インダイレクトアッセイ: 各抗体を、streptavidinや抗 Ig 抗体、ProteinA、Protein G、Protein L ビーズ等で間接的に捕捉。

## インダイレクトアッセイの構築

未標識ビーズの他に、あらかじめ分子結合したビーズを多数提供しています(表 1.Alpha Tool Box)。Alpha Tool Box を利用してインダイレクトアッセイを構築する場合、特に次の 2 点を考慮してください。

1. 各抗体は、ドナービーズまたはアクセプタービーズのどちらか一方にのみ結合すること。一方の抗体がドナービーズとアクセプタービーズの両方に強い結合を示すと、両ビーズを架橋し高いバックグラウンドとなる可能性があります。
2. アナライトや抗体の非存在下で、ドナービーズとアクセプタービーズが結合しないこと。(図 3, 表 2)

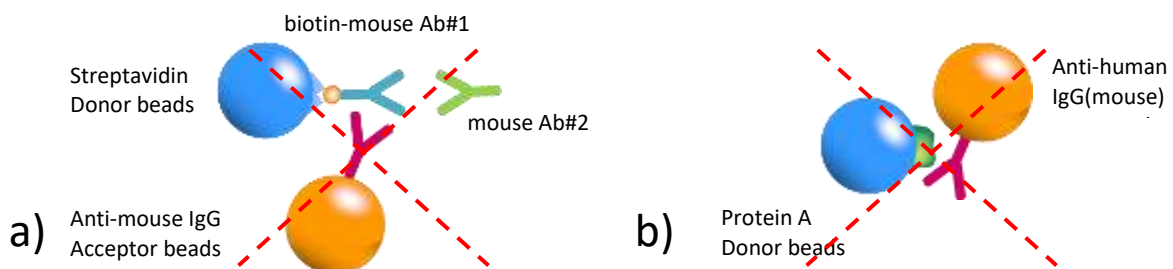


図 3. 交差反応による擬陽性シグナル a) マウス由来の抗アナライト抗体 2 種類 (Ab#1 および Ab#2) を使用した場合、ビオチン化抗アナライト抗体#1(マウス)がstreptavidinドナービーズと抗マウス IgG アクセプタービーズの両方に結合。アナライト非存在下でシグナルが発生する。b) ProteinAドナービーズがアクセプタービーズ上の抗ヒト抗体(マウス)と結合し、アナライトや抗アナライト抗体非存在下でシグナルが発生する。



# AlphaLISA イムノアッセイ

## アッセイのデザイン

表 1. Alpha Tool Box

ビーズの種類	Toolbox Alpha Donor beads	Toolbox AlphaLISA Acceptor beads
Streptavidin	6760002	AL125
Strep-Tactin®	AS106	AL136
Protein A	AS102	AL101
Protein G		AL102
Protein L		AL126
Anti-rabbit IgG	AS105*	AL104*
Anti-mouse IgG	AS104*	AL105*
Anti-human IgG		AL103*
Anti-rat IgG		AL106*
Anti-goat IgG		AL107*
Anti-sheep IgG		AL132*
Anti-mouse IgM		AL130
Anti-chicken IgY		AL131
Anti-IgG1 **Coming soon!		AL141
Anti-IgG4 **Coming soon!		AL142
Lens culinaris agglutinin **Coming soon!		AL140
Unconjugated	6762013	6772001

1\* Fc-specific antibody

2. Protein A は、ヒト IgG1, IgG2, IgG4、マウス IgG2A, IgG2B、トータルヒト IgG、トータルマウス IgG、トータルウサギ IgG と特に強く結合します。

3. Protein G は、ヒト IgG とマウス IgG のすべてのサブクラスと結合します。また、ラット、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ウサギ、ウシ、ブタ、ウマの抗体とも結合します。

4. Protein L は、トータルヒト IgG, IgM, IgA, IgE, IgD、マウス IgG、ラット IgG と結合します。マウス IgM、ウサギ IgM とは結合が弱く、ヒト IgGλ 鎖、ウサギ IgG、ヒツジ IgG、ヤギ IgG、ウシ IgG、ラット IgM とは結合しません。

詳細はデータシートを参照ください。各製品のデータシートは [www.perkinelmer.com/coa](http://www.perkinelmer.com/coa) からダウンロードできます。

表 2. Alpha Tool Box ビーズの組み合わせ(DB:ドナービーズ, AB:アクセプタービーズ)

	Protein A-DB	Anti-FLAG-DB	Anti-Mouse-DB	Anti-Rabbit-DB	Streptactin-DB	Ni chelate-DB	GSH-DB	SA-DB
SA-AB								
Protein L-AB								
Anti-FITC-AB								
Anti-His-AB								
Anti-V5-AB								
Anti-Mouse IgM-AB								
Anti-Chicken IgY-AB								
Anti-Sheep IgG-AB								
Anti-GFP-AB								
Anti-MBP-AB								
Streptactin-AB								
Protein A-AB								
Protein G-AB								
Anti-Human IgG-AB								
Anti-Rabbit IgG-AB								
Anti-Mouse IgG-AB								
Anti-Rat IgG-AB								
Anti-Goat IgG-AB								
Ni chelate-AB								
Glutathione-AB								
Anti-GST-AB								
Anti-cMyc-AB								
Anti-FLAG-AB								
Anti-Digoxigenin-AB								

この表は、ビーズのみを混ぜた時にビーズ同士の結合によるシグナルが生じる組み合わせを示しています。抗体など他のアッセイコンポーネントが含まれる場合は考慮されていません。赤や黄色で示されたビーズの組み合わせは、高いバックグラウンドが検出されるためお勧めしません。

### はじめに

標準的なAlphaLISAイムノアッセイ(ダイレクトアッセイ)の場合、一方の抗体をビオチン化し、他方はAlphaLISAアクセプタービーズに化学結合します。この章では、抗体のビオチン化と抗体をアクセプタービーズへ化学結合する方法を記載しています。

抗体のビオチン化とAlphaLISAアクセプタービーズへの結合は、両方の抗体にそれぞれ行い、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(抗体の配置によって検出感度やシグナル強度が大きく向上することがあります)。例えば、1組の抗体ペア(AとB)を用意した場合、下記2つの組み合わせをテストします。

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

既にビオチン化抗体を入手しており、直ぐに評価を行いたい場合、他方の抗体をアクセプタービーズに結合し、1つの配置のみでテストすることもできます。

(Note:抗体をAlphaLISAビーズに直接結合しないインダイレクトアッセイについてはP8-9「アッセイデザイン」を参照してください。)

### A)抗体の準備

AlphaLISAイムノアッセイのセットアップには、アナライトに結合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。

- アナライトの異なるエピトープに特異的な抗体ペア
- 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、同一抗体をご使用いただける場合もあります。)
- 抗体溶液にTris, Glycine, Bicine, Tricineなどのアミン基を有するバッファーやアジ化ナトリウムが含まれていない。これらが含まれている場合は、スピンカ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)が含まれていない。

## B) 抗体のビオチン化

### はじめに

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。(市販のビオチン化抗体も利用できません)

- 抗体濃度が 0.5 mg/mL以上。(ビオチン化効率が高くなります)
- 抗体溶液がTris, Glycine, Bicine, Tricineなどアミン基を有するバッファーでない。これらのバッファーに抗体が溶解されている場合には、PBSや炭酸塩バッファー(pH8)のような弱アルカリバッファーに置換してください。またアジ化ナトリウムも除去してください。
- 抗体以外のタンパク質や、ペプチドベースの安定剤(BSAやglatinなど)が含まれていない。
- 抗体はpH 7.0-8.0で溶解する。(ビオチン化反応はpH7.0-8.0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、12,000 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)
  - NHS-ChromaLink-ビオチン化試薬(Solid)はDMFで溶解し 10mg/mLに調製します。その後、PBSで 2mg/mLに希釈してご使用ください。
  - その他、NHS-ビオチン, NHS-LC-ビオチン またはNHS-LC-LC-ビオチンも使用可能です。
- 2 本のZeba Desalt Spin Column\*, 0.5 mL
- 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

*推奨試薬	販売元	品番
NHS activated biotinylating reagent	(ChromaLink) SoluLink Inc.	#B1001-105
Zeba desalting columns	Pierce (ThermoFisher Scientific Inc.)	#89882 (0.5 mL) #89889 (2 mL) #89891 (5 mL) #89893 (10 mL)

### Protocol:

- エッペンチューブに 100 $\mu$ L の 1 mg/mL 抗体溶液 (pH 7 以上) を加えます。
- 7.62  $\mu$ L 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。
- 92.38  $\mu$ L の PBS を加えて、総量を 200  $\mu$ L にします。
- 21 – 23  $^{\circ}$ C にて 2 時間インキュベートします。
- 2 本の Zeba Desalt Spin Column, 0.5 mL を、エッペンチューブにセットし、300 $\mu$ L の PBS などのバッファーを用いて洗浄します。

Column size	Buffer volume
0.5 mL	300 $\mu$ L
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

- 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	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

- e)~f) を 4 回繰り返す、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。
- d) の反応溶液を 100  $\mu$ L 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, 1 min
2 - 10 mL	1,000xg, 2 min

Zeba Desalt Spin Column サイズと遠心条件

- 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。

\*ビオチン化抗体濃度、およびビオチン化効率の算出方法についての詳細は、Solulink 社 HP (<http://www.solulink.com>) をご参照ください。

- 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  $C_{Ab-biotin}$  [ $\mu$ M] を算出します。

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

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

- 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。

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

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

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

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  $\mu$ L 程度に小分けし、-20  $^{\circ}$ C にて保存してください。

### c) アクセプタービーズへの抗体結合

#### 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などのアミノ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。

#### C2) 必要な試薬

製品	推奨販売元	品番
Unconjugated AlphaLISA Acceptor beads	PerkinElmer	#6772001 (1 mg)
Sodium cyanoborohydride (NaBH <sub>3</sub> CN)	Sigma-Aldrich Co.	#296945(sol.) #156159(powder)
Carboxymethylamine hemihydrochloride (CMO)	Sigma-Aldrich Co.	#C13408
Tween-20	N/A	N/A
PBS	N/A	N/A
Tris-HCl (pH 8.0)	N/A	N/A
Proclin-300(防腐剤)	N/A	N/A

#### C3) 標識ビーズ量とプロトコール

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。標識するアクセプタービーズが少量(1-2 mg)のときは重量比を 10:1 (P14.C4 参照)に、アクセプタービーズが多量(2.5 mg以上)のときは重量比 50:1 (P16.C5 参照)をお勧めします。

また、標識したAlphaLSIAアクセプタービーズを標準的なAlphaLISAイムノアッセイ量で使用する場合(総反応量 50μL、終濃度 10μg/mL)、**AlphaLISAアクセプター1mgは 2,000well分、5mgは 10,000well分に相当します。**

### C4) 1mgのAlphaLISAアクセプタービーズ調製プロトコル(重量比 10:1)

1 mgの AlphaLISAアクセプタービーズを標識するプロトコル(ビーズ:抗体=10:1)です。抗体溶液濃度が1mg/mL以上の場合に適します。より多量のビーズを標識する場合は、C5の「5mgのAlphaLISAアクセプタービーズ調製プロトコル」を参照ください。

#### Day 1:

##### Materials:

- 100  $\mu$ Lの 1 mg/mL抗体溶液(100  $\mu$ g)
- 50  $\mu$ Lの 20 mg/mL AlphaLISA Unconjugatedアクセプタービーズ(1mg)
- 1.25  $\mu$ Lの 10 % Tween-20
- 10  $\mu$ Lの 400mM(25 mg/mL) NaBH<sub>3</sub>CN溶液(用時調製、水に溶解させます。)
- PBS

##### Protocol:

1. ビーズの洗浄:
  - 50  $\mu$ LのAlphaLISAアクセプタービーズをエッペンチューブ(1.5 mL)に移し、16,000  $\times$  g (または最大回転数)で10~15分遠心分離、ピペットチップで上清を除去する (ビーズのペレットが剥がれるため、チューブを傾けないこと。)
  - 50  $\mu$ LのPBSを加え、再度遠心分離、上清を除去する。
2. ビーズへの結合
  - 5M NaBH<sub>3</sub>CN ストック溶液(12.5x)をH<sub>2</sub>Oで400mMに希釈
  - 1.で洗浄したAlphaLISAアクセプタービーズに88.75 $\mu$ LのPBSを加え、ボルテックスおよびピペッティングによりビーズを懸濁する。
  - 下記を添加する:
    - 100 $\mu$ Lの1 mg/mL抗体溶液(100  $\mu$ g)
    - 1.25  $\mu$ L の10% Tween-20
    - 10  $\mu$ L の 400 mM NaBH<sub>3</sub>CN
  - ゆっくりと回転シェーカーで浸漬しながら(6 – 10 rpm) 、37°Cで18-24時間インキュベーションする。(48時間以上反応することで標識効率が上がることもあります。)

### Day 2:

#### Materials:

- 10  $\mu\text{L}$ の 65 mg/mLカルボキシメチルアミン(CMO)溶液(用事調製、0.8 M NaOHに溶解させます。)
- 500  $\mu\text{L}$ の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)
- 200  $\mu\text{L}$ 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:

- 未反応基のブロッキング
  - 65 mg/mL carboxymethoxylamine (CMO)溶液を800 mM NaOH で調製する。
  - 調製したCMO溶液をDay2で作製したビーズ抗体溶液に10  $\mu\text{L}$ 添加し、未反応基をブロックする。
  - 回転シェーカーで浸トウしながら(6 – 10 rpm)、37°Cで1時間反応する。
- 精製
  - 16,000  $\times g$  (または最大回転速度)、4°C、10~15分間遠心 分離
  - ピペットチップで上清を除去する。沈殿したビーズを200  $\mu\text{L}$  の100 mM Tris-HCl pH 8.0で懸濁する。
  - 16,000  $\times g$  (または最大回転速度)、4°C、10~15分間遠心分離し、上清を除去する。
  - 同様に洗浄ステップ(ビーズペレットの懸濁、遠心分離、上清除去)をもう一度繰り返す。
  - 沈殿したビーズを、200  $\mu\text{L}$ の保存バッファー(PBS + 0.05% Proclin-300)に懸濁する(終濃度 5mg/mL AlphaLISAアクセプタービーズ)。
  - ボルテックスし、軽くスピンドウンした後、ビーズ溶液をソニケーションする。(プローブソニケータを用いて1秒を20回繰り返します。ソニケータのパワーは、最大の20%を超えないこと。沈殿したビーズペレットを十分に分散させるため、このステップを実施することをお勧めしますが、必須ではありません。)
  - 氷上に置く
- 保存
  - 標識したAlphaLISAビーズは不透明のバイアルで4°C保存する。

注意事項: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。

### C5) 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 µg (100 µg)使用するときのプロトコール

#### Day 1:

##### Materials:

- 100 µLの 1 mg/mL抗体溶液(100 µg)
- 250 µLの 20 mg/mL AlphaLISAアクセプタービーズ(5mg)
- 1.25 µLの 10 % Tween-20
- 10 µLの 25 mg/mL(400mM) NaBH<sub>3</sub>CN溶液(用時調製、水に溶解させます。)
- PBS

##### Protocol:

#### 1. ビーズの洗浄

- 250 µLの 20 mg/mL AlphaLISAアクセプタービーズを、16,000 xg、10~15 分間遠心分離し、上清を除去します。
- 250 µLのPBSを加え、上記洗浄操作を繰り返します。

#### 2. ビーズへ結合

- 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 NaBH<sub>3</sub>CN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  $\mu$ 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。)
- ・ 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:

#### 3. 未反応官能基のプロッキング

- 10  $\mu$ 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。

#### 4. 精製

- 16,000 xg、10~15 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  $\mu$ Lのバッファーを使用します。)
- 同様に 16,000 xg、10~15 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ーを用いて 1 秒を 20 回繰り返します。
- 氷上に置きます

#### 5. 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。

注意事項: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。

- Alpha アッセイの測定には、EnSpire や EnVision といった Alpha 機能の付いた専用の測定機が必要です。一般的なマルチプレートリーダーや時間分解蛍光、発光測定機では測定できません。
- その日の実験に必要な分だけ試薬を調製することをお勧めします。希釈したビーズ溶液は 1 日以上保存しないでください。
- ビーズ使用前にボルテックスとスピンドアウンを行ってください。長期保存によりビーズが沈殿していることがあります。軽いスピンドアウンではビーズは沈殿しません。Alpha ビーズは、デキストランコートしたラテックスで作られており、サイズは 200nm、密度は 1 に近い値を示します。ビーズをペレットにするには、16,000 x g で 10~15 分遠心が必要です。
- 添加順序の検討は、アッセイシグナルに大きな効果を示すことがあります。最初の最適化として、まずは以下のプロトコールに従うことをお勧めします。
- AlphaScreen ドナービーズは、光感受性があります。ドナービーズを扱う全てのステップは、遮光下(100 Lux 以下-曇りの日程度の暗さ)で作業を行ってください。例えば、ラボの半分の照明を落とし、窓から離れた直接光が当たらないデスクで作業を行います。インキュベート中は、反応プレートの上にもう一枚プレートを載せ引き出しに入れる、アルミホイルを巻く、などして遮光してください。
- Alpha シグナルは温度依存性があります。反応を室温以外の温度(4°C や 37°C など)で行う場合、測定前にプレートを室温に戻してください。(室温以外の反応後直ぐに室温下で測定すると、測定中にプレート内で温度が変化し、ばらつきの原因となります。)

### A) はじめに

アッセイのセットアップにあたり最初に行う条件検討は、「**抗体の組み合わせ**」と「**ビオチン化抗体濃度**」の検討です。感度やカウントのレベルが大きく異なることがあるため、使用する抗体に対して、可能な全ての組み合わせ及び配置をテストすることをお勧めします。また、ビオチン化抗体が過剰に添加され、フックポイント(飽和点)を超えると、シグナルが減少します。このため最も高いシグナルが得られる、最適なビオチン化抗体濃度を検討します。

「抗体の組み合わせ」と「ビオチン化抗体濃度」で決定した条件下で AlphaLISA アッセイを行い、スタンダードカーブを作成します(Step3)。このデータから検出限界を算出、感度やシグナルカウント、バックグラウンドなどを検出し、アッセイのパフォーマンスを確認します。

下記は、セットアップの手順を示したフローチャートです(表 3)。1 組の抗体ペアを検討する場合、抗体の組み合わせ(Step1)とビオチン化濃度(Step2)を同時に検討します。2 組以上の抗体ペアを検討する場合、抗体ペアの候補を絞った後(Step1')、ビオチン化抗体濃度(Step2')を検討します。最終的な抗体ペアは、スタンダードカーブの結果から判断します。

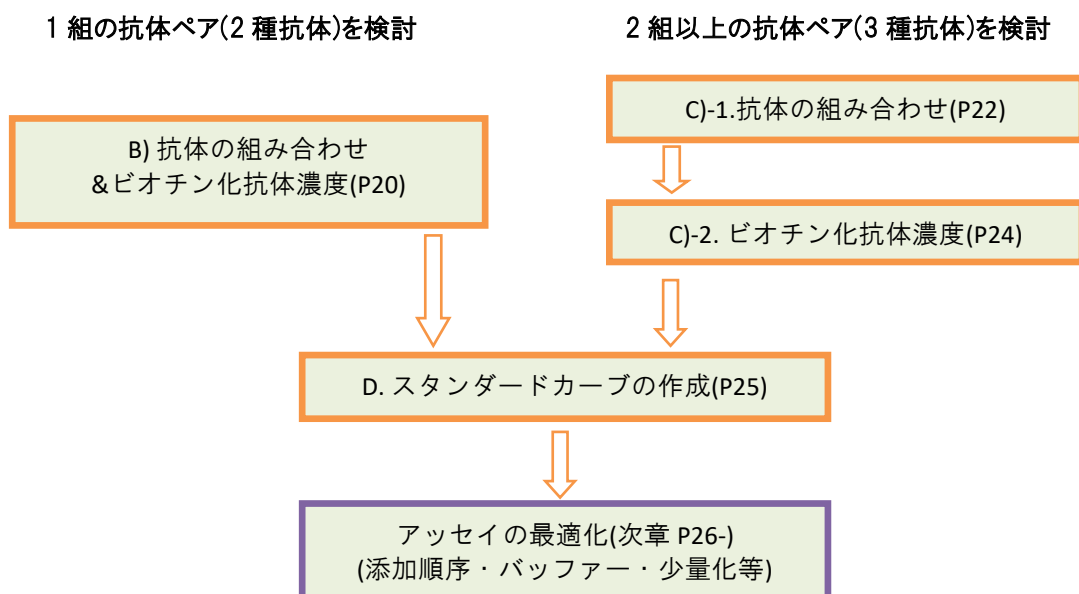


表 3.AlphaLISA セットアップの手順

## 1 組の抗体ペア(抗体の組み合わせ/ビオチン化抗体濃度)

### B) 1 組の抗体ペアを評価する

1組の抗体ペア(2種類の抗体)を使用する場合、次の組み合わせを検討してください。(2組以上の抗体ペアを評価する場合はP22-を参照してください。)

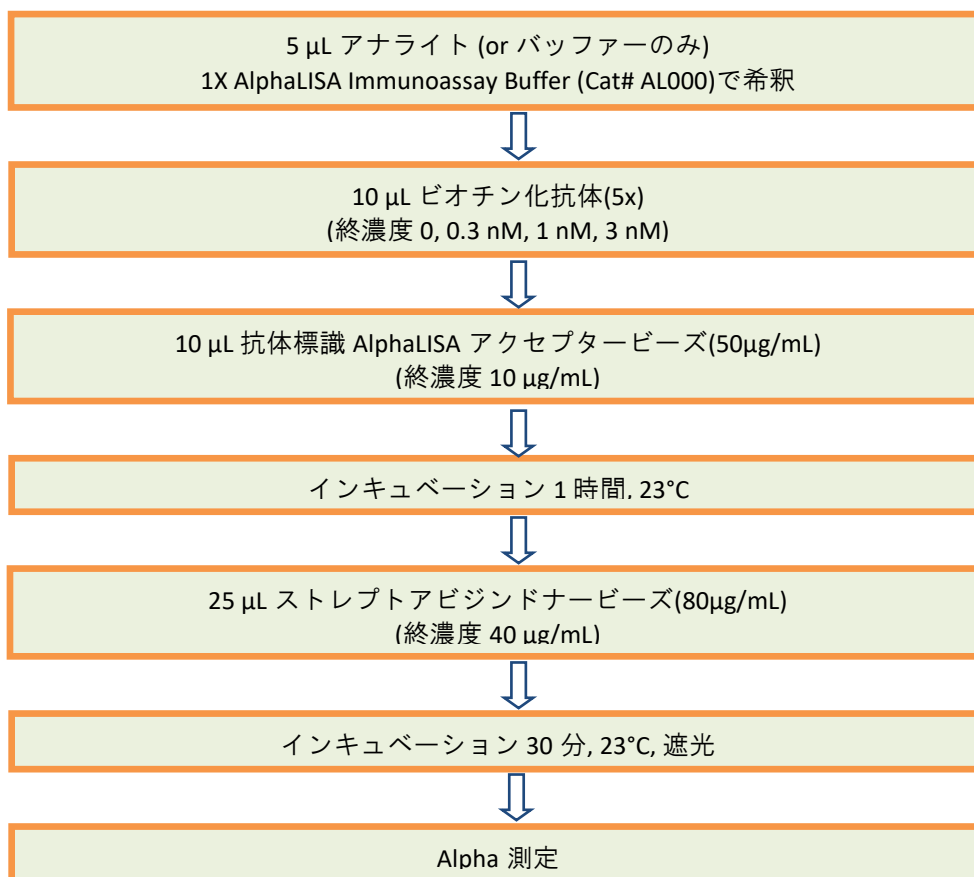
1. ビオチン化抗体 A + 抗体B-AlphaLISAアクセプタービーズ
2. ビオチン化抗体 B + 抗体A-AlphaLISA アクセプタービーズ

併せて、ビオチン化抗体の濃度を決定します。アナライト存在下および非存在下で、少なくとも4点以上の濃度のビオチン化抗体(ビオチン化抗体濃度0を含む)を調製しアッセイを行います。アナライトの濃度はアッセイレンジに入る、中レベルの濃度を使用してください。(弊社の経験として、3ng/mL程度が多くのアッセイに適します。不明な場合は、低・高濃度と2-3点ご用意することをお勧めします。)

#### Materials:

- ・ アッセイバッファー: AlphaLISA ImmunoAssay Buffer (1X) (Cat# AL000, H<sub>2</sub>Oで 10 倍希釈し調製します。)
- ・ 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。)
- ・ 1.5-15nMビオチン化抗体(アッセイバッファーで調製します。)
- ・ 50 µg/mL抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ(5mg/mLに調製したビーズを、アッセイバッファーで 100 倍希釈し調製します。)
- ・ 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で 62.5 倍希釈し調製します。)

**Protocol:** 総アッセイ量50µL, 96-well ½ AreaPlate™(白)使用



## 1 組の抗体ペア(抗体の組み合わせ/ビオチン化抗体濃度)

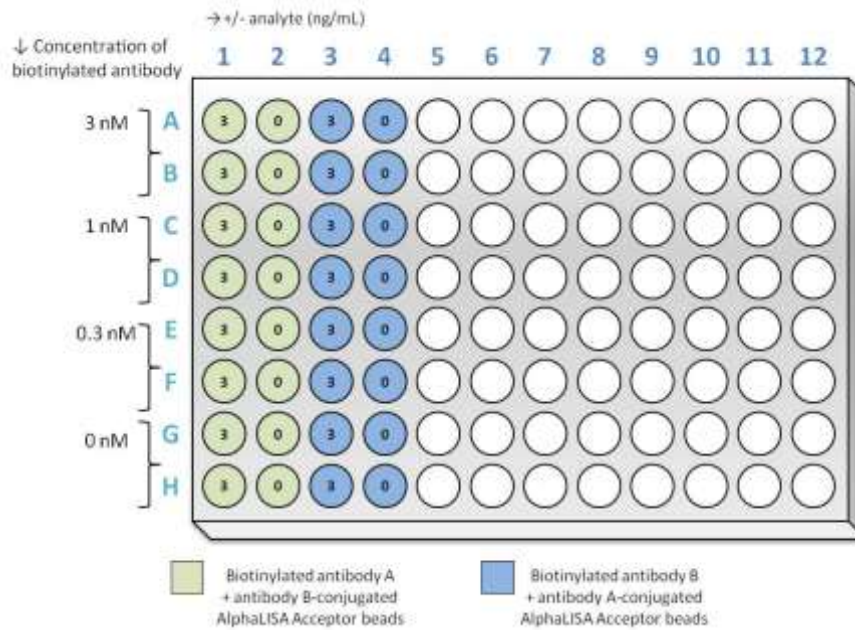


図 4. 抗体配置およびビオチン化抗体濃度検討のプレートマップ。2 パターンの抗体配置を横列に、ビオチン化抗体の希釈系列を縦列に配置、アナライト存在下(終濃度 3 ng/mL)および非存在下で評価した。

ビオチン化抗体濃度の希釈系列により、通常、釣鐘状の曲線が得られます(図5)。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ストレプトアビジン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、最適なビオチン化抗体濃度は、1 nMです。

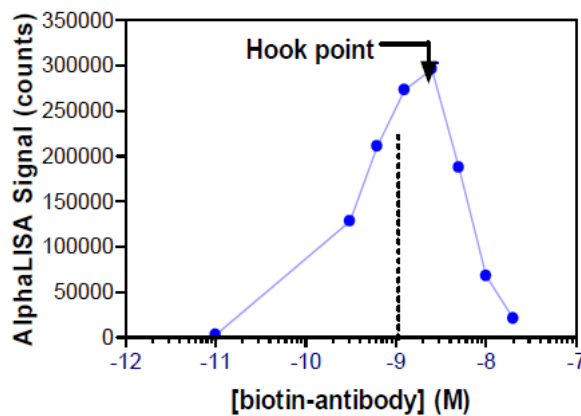


図 5.インスリンアッセイにおける抗体の希釈曲

ビオチン化抗体濃度を決定後、スタンダードカーブの作成(P34)に進んでください。

### c) 2 組以上の抗体ペアを評価する

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、抗体の組み合わせの最適化です。使用する抗体に対して、可能な全ての組み合わせを検討してください。例えば 4 種類の抗体の場合、下記 16 組(4x4)のペアを検討します。

	抗体 1- AlphaLISAビーズ	抗体 2- AlphaLISAビーズ	抗体 3- AlphaLISAビーズ	抗体 4- AlphaLISAビーズ
ビオチン化抗体 1				
ビオチン化抗体 2				
ビオチン化抗体 3				
ビオチン化抗体 4				

#### c)-1 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。)

## 2 組以上の抗体ペア(抗体の組み合わせ)

### 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/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。

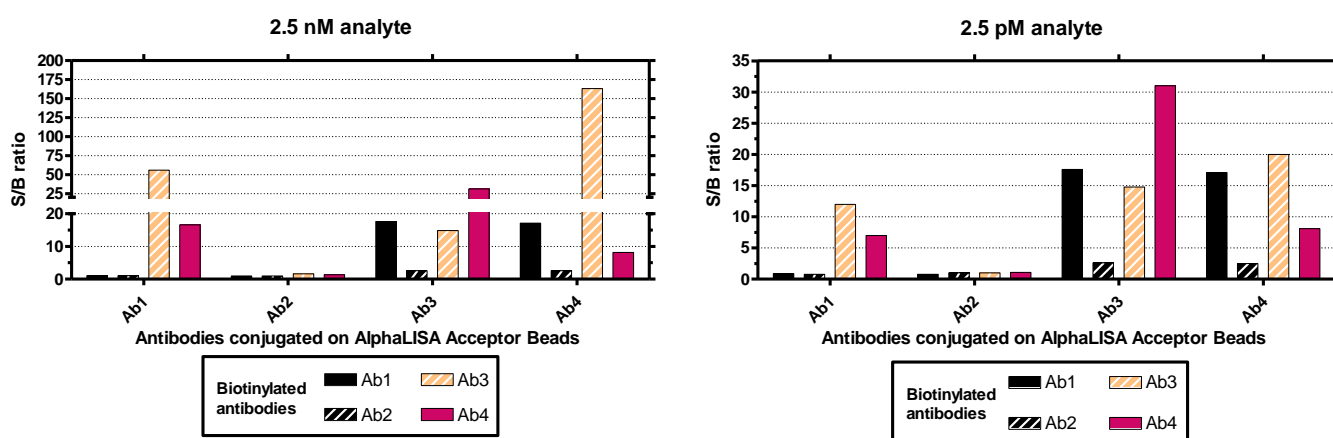


図 6: 最適な抗体の組み合わせの選別

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。

### C)-2 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 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/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。

通常、釣鐘状の曲線が得られます(図 7)。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ストレプトアビジン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。

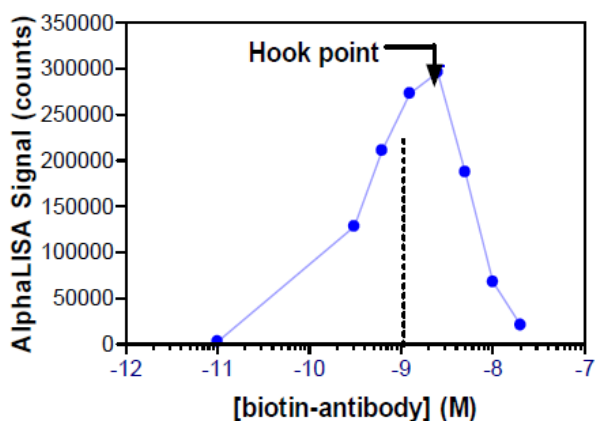


図 7: インスリンアッセイにおける抗体の希釈曲線



### D) スタンダードカーブ

アッセイのパフォーマンスは、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。スタンダードカーブを作成し、検出限界やダイナミックレンジを得ます。候補となる抗体ペアが複数ある場合、スタンダードカーブの結果によって最終的な抗体の組み合わせを決定します。スタンダードカーブは以下の条件で作成します。

#### Materials:

- ・ アッセイバッファー
- ・ スタンダード溶液
- ・ スタンダード希釈液(サンプルのマトリックスに最も近い希釈液を使用します。)
- ・ ビオチン化抗体
- ・ 抗体結合AlphaLISAアクセプタービーズ
- ・ AlphaScreenストレプトアビジドナービーズ

#### Protocol:

½ AreaPlate-96 マイクロプレートに以下の順で加えます。

- 5 µLの標準溶液またはアッセイバッファー
- 20 µLの 2.5 X Mix(終濃度: 最適なビオチン化抗体濃度、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。

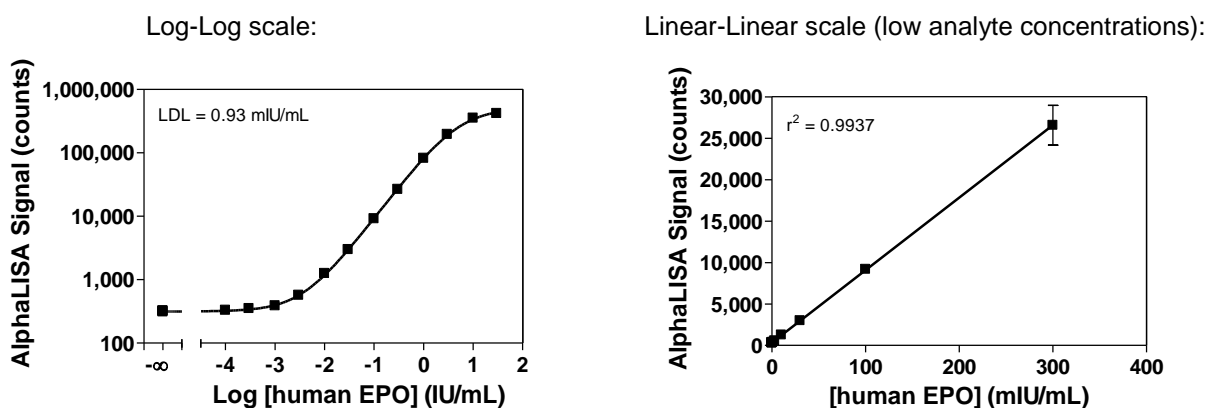


図 8: アッセイバッファー中のヒトEPOの標準曲線

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ト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)

データ解析の詳細については、Appendix A(P34)を参照ください。

### アッセイの最適化

前章「アッセイのセットアップ」で構築した系の最適化を行います。特に添加順序、「プロトコルの検討」は、大きな効果を得ることがあります。また必要に応じて、ビーズ量、反応時間、アッセイバッファー、アッセイ量などの検討も行ってください。

### プロトコルの検討

AlphaLISA イムノアッセイの標準プロトコルでは、最初に、サンプルとビオチン化抗体、抗体結合 AlphaLISA アクセプタービーズを添加して反応、その後、ストレプトアビジドナービーズを添加して反応し、測定を行います (表 4)。インダイレクトアッセイの場合、ビオチン化抗体とサンプルを反応後、一般的には一次抗体を先に添加して反応、次に 2 次抗体標識アクセプタービーズを添加反応、最後にドナービーズを添加して反応します。添加順序はアッセイの感度やダイナミックレンジ、シグナルカウントに影響することがあります。アッセイのコンポーネントを混合して一度に添加、1 ステップでアッセイを行えることもあります。各コンポーネントが反応する適切な添加順序は、アッセイによって経験的に決定されます。

プロトコルの変更点として、各ステップの添加液量を変更し、反応濃度を変える方法もあります。“標準プロトコル”の最初のステップでは、サンプル 5  $\mu\text{L}$  と、ビオチン化抗体及び AlphaLISA アクセプタービーズ混合溶液 20  $\mu\text{L}$  を反応します (表 4)。“高濃度プロトコル”では、サンプル 5  $\mu\text{L}$  と、より高濃度に調製したビオチン化抗体及び AlphaLISA アクセプタービーズ混合溶液 5  $\mu\text{L}$  を反応します。アッセイの最終濃度は同じですが、アナライトと抗体の反応における濃度が高くなり、より高い感度が期待できます。

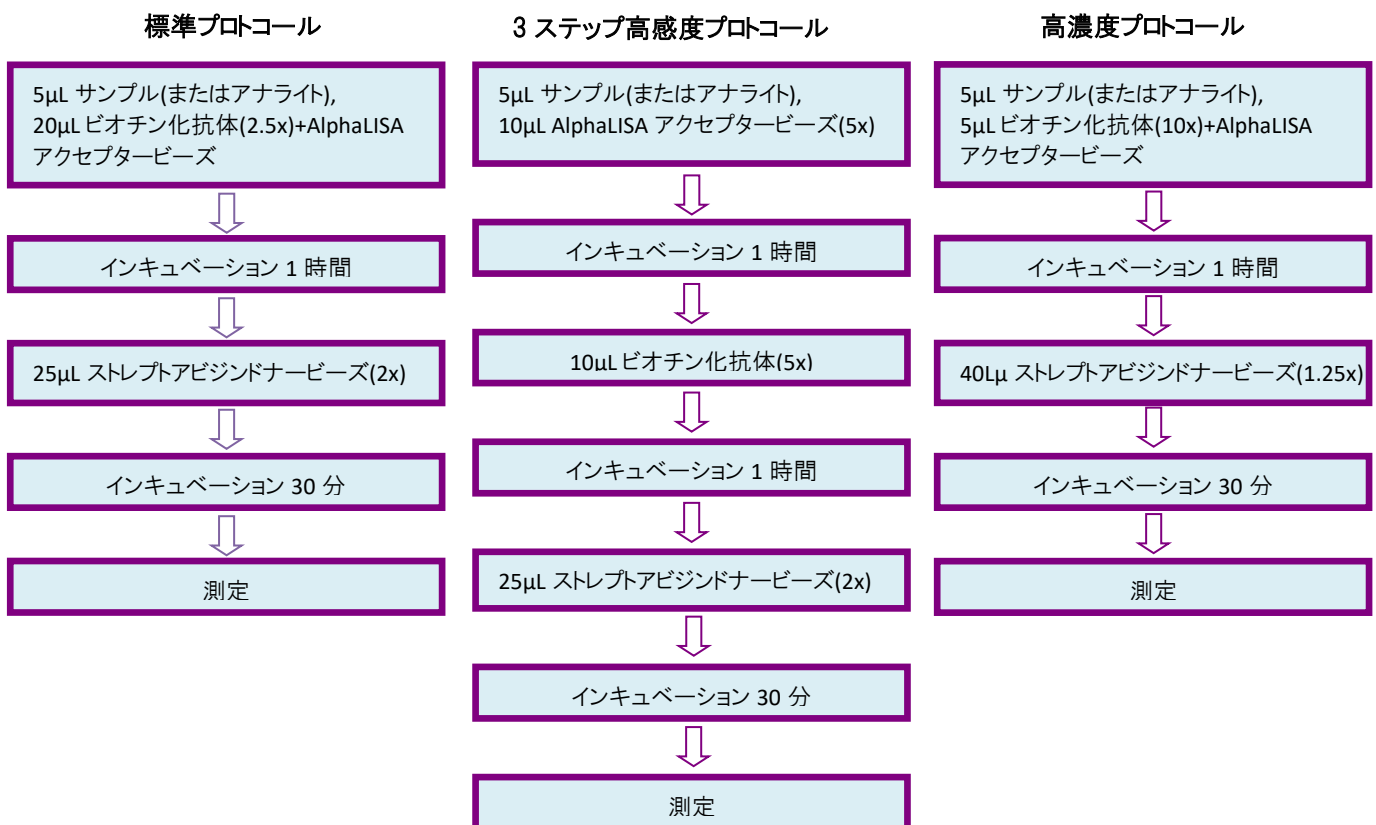


表 4. 様々な AlphaLISA イムノアッセイプロトコル

アッセイ総容量 50  $\mu\text{L}$ (終濃度; AlphaLISA アクセプタービーズ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ストレプトアビジドナービーズ 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。96well-1/2AreaPlate でのアッセイ例。

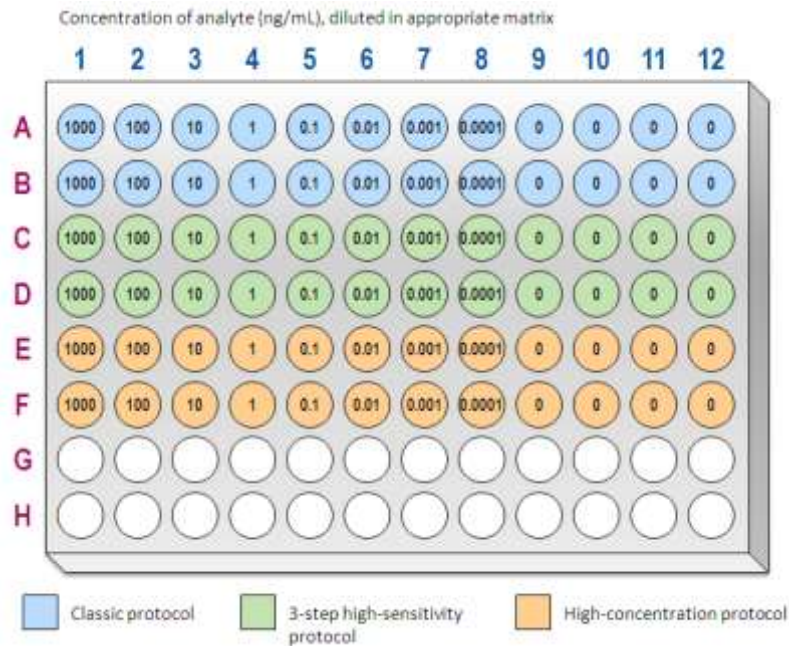


図 9. 添加順序検討のプレートマップ。3つのプロトコルを評価。0-1,000ng/mLのスタンダードアナライト希釈系列を調製(N=2)。

1. 各プロトコルで標準カーブを作成し、アッセイの感度やダイナミックレンジを評価します。(データ解析については Appendix A を参照ください。)
2. サンプルのマトリックスに近い希釈液でアナライトを希釈します(1 µg/mL ~ 0.1 pg/mL)。例えば、血清サンプルを用いる場合、アナライトを FBS などで希釈します。細胞上清を用いる場合、その細胞を培養した培地で希釈を行います。(アナライト希釈液の詳細は P29 スタンダード希釈液を参照ください。)
3. その他の試薬(ビーズとビオチン化抗体)は 1X AlphaLISA Immunoassay Buffer (Cat#AL000)で希釈します。

# アッセイの最適化

## ビーズ濃度、反応時間、アッセイバッファー、少量化

ビーズ濃度やインキュベーション時間の条件検討によって、さらにアッセイを最適化することも可能です。バックグラウンドが高い場合は、アッセイバッファーの最適化も行ってください。(これら最適化はオプションです。)

AlphaLISA 最適化パラメーター	Recommendations and Comments
ビーズ濃度	<p>推奨レンジ: 10 µg/mL から 40 µg/mL(終濃度)</p> <p>初期設定: ドナービーズ 10 µg/mL, AlphaLISA アクセプタービーズ 40 µg/mL(終濃度)</p> <p>プレートの各列または各行に、ドナービーズ(final. 10, 20, 30, and 40 µg/mL)およびアクセプタービーズ(final. 10, 20, 30, and 40 µg/mL)の希釈系列(4 列 x4 行=全 16 組)を調製し、クロスタイトレーションを行います。</p>
反応時間	<p>推奨レンジ: 30 分 – 2 時間 (各インキュベーションステップ)</p> <p>初期設定: 60 分</p> <p>反応時間は、アナライトに対する抗体結合のカイネティクスに依存します。長時間必要な場合や、逆に短時間でもよいこともあります。速い反応(例えば、streptavidin と biotin の結合)では、15-30 分の反応で平衡に達する場合もあります。遅い反応の場合は、結合のためにより長い反応時間が必要となります。</p>
アッセイバッファー (ビーズとビオチン化抗体の希釈バッファー)	<p>初期設定: 1X AlphaLISA Immunoassay Buffer (品番:AL000)</p> <p>殆どのアッセイでは、1X AlphaLISA Immunoassay Buffer で良いパフォーマンスが得られます。このバッファーにはカゼイン、デキストラン、界面活性剤などが含まれています。もしこのバッファーでバックグラウンドが高く検出された場合、1X HiBlock Buffer (Cat. No. AL004)を試してください。このバッファーには、上記物質に加え、BSA とゼラチンが含まれます。(各バッファーの詳細は「P29 アッセイバッファーの選択」を参照)</p>
アッセイ量	<p>初期設定: アッセイ総容量 50 µL (白色 96-well ½ AreaPlate (品番:6005560))</p> <p>各試薬濃度、及び、各ステップでの添加量の比を保ったまま単純にボリュームダウンすることで、384 プレートや 1536 プレートフォーマットに変更することができます。</p>

表 5.アッセイ最適化のパラメーター

# バッファーの選択

## スタンダードカーブ希釈液とアッセイバッファー

### スタンダード希釈液

サンプル中のアナライトの定量を行うには、サンプルに適した希釈液でスタンダード(アナライト標準溶液)を希釈し、スタンダードカーブを作製する必要があります。例えば、血清サンプルを用いる場合、アナライトを除去した血清、または FBS などそれに準ずるものでスタンダード希釈系列を調製し、スタンダードカーブを作成します。血清サンプルを用いたアッセイの場合、スタンダードの希釈液として FBS は便利に利用できます。(ただし、FBS の成分が使用する抗体と交差せず、アッセイに干渉しない場合に限りです。)

サンプルの種類	スタンダード希釈液
血清	FBS またはアナライト除去血清
培養液	培養に使用している培地
細胞溶解液	Lysis buffer (推奨細胞溶解バッファー:AlphaLISA Lysis Buffer, 品番 AL003)
その他一般的でないサンプル (能脊髄液, 羊水など.)	様々な希釈液を試してください。サンプルに完全に適合する溶液が見つからない、またはサンプルのマトリックスがアッセイに干渉する場合は、サンプルを希釈する必要があります。例えば、PBS + 0.1% BSA でサンプルを2倍希釈し、PBS + 0.1% BSA でスタンダードカーブを作成します。

**表 6. サンプルの種類によるスタンダード希釈液の例。**スタンダード希釈液はサンプルのマトリックスにより近い物を選択。使用した希釈液がサンプルに適合しているかを評価するために、直線性や 回収率の検証実験を行ってください。試験方法の詳細については、Appendix C (P37)を参照ください。

### アッセイバッファーの選択

アッセイバッファーは、ドナービーズやアクセプタービーズ、抗体の希釈に使用するバッファーです。複数のバッファーを試すことをお勧めします。殆どのアッセイでは、1X AlphaLISA Immunoassay Buffer(品番:AL000)を使用することで良い結果が得られます

アッセイバッファー	品番	成分	推奨ケース
AlphaLISA Immunoassay Buffer (10 X)	AL000C/F	250mM HEPES pH 7.4, 1%Casein, 5% Triton X-100, 10mg/mL Dextran-500, 0.5% Proclin	汎用性の高いバッファー
AlphaLISA HiBlock Buffer(10 X)	AL004C/F	250mM HEPES pH 7.4, 1% Casein, 5% BSA, 5% Triton X-100, 5% Gelatin, 10mg/mL Dextran-500, 0.5% Proclin-300	サンプルマトリックによる高いバックグラウンドが検出された場合に使用。
AlphaLISA NaCl Buffer(5 X)	AL007C/F	125mM HEPES pH 7.4, 2.5M NaCl, 2.5% Triton X-100, 2.5% Gelatin, 5mg/mL Dextran-500, 0.25% Proclin-300	サンプルマトリックによる高いバックグラウンドが検出されたが、BSA を使用することができない場合、AlphaLISA HiBlock Buffer(品番 AL004)の代わりに使用。
AlphaLISA Universal Buffer (5x)	AL001C/F	5xPBS, 0.5% BSA, 0.05% Proclin-300	その他、各アッセイに必要な物質を加えるなどし、自身でカスタマイズして使用。

**表 7. アッセイバッファーの種類**

# バッファーの選択

## スタンダードカーブ希釈液とアッセイバッファー

アッセイバッファーは自家調製することもできます。より高いシグナルを得るため、またはバックグラウンドを抑えるため、以下について検討します。

- バッファーの種類: Tris, HEPES とそのpH
- Dextran-500 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-500 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

- Alpha アッセイの測定には、Alpha 測定機能の付いた専用機が必要です。一般的なマルチプレートリーダーや時間分解蛍光、発光測定機では測定できません。推奨機は弊社の、Alpha 機能付 EnSpire または EnVision です。
- その日の実験に必要な分だけ試薬を調製することをお勧めします。希釈したビーズ溶液は 1 日以上保存しないでください。
- AlphaScreen ドナービーズは、光感受性があります。ドナービーズを扱う全てステップは、遮光下(100 Lux 以下-曇りの日程度の暗さ)で作業を行ってください。例えば、ラボの半分の照明を落とし、窓から離れた直接光が当たらないデスクで作業を行います。インキュベート中は、反応プレートの上にもう一枚プレートを載せ引き出しに入れる、アルミホイルを巻く、などしてきちんと遮光してください。
- Alpha シグナルは温度依存性があります。反応を室温以外の温度(4°C や 37°C など)で行う場合、測定前にプレートを室温に戻してください。(室温以外の反応後直ぐに室温下で測定すると、測定中にプレート内で温度が変化し、ばらつきの原因となります。)
- Alpha アッセイで使用するプレートは、96well-1/2AreaPlate または白灰色の AlphaPlate™, をお勧めします。(P6.表 IV 参照)

表 8. AlphaLISA イムノアッセイトラブルシューティング

現象	原因	解決法
バックグラウンドが高い	ビーズが高濃度である	ドナービーズ 40 µg/mL とアクセプタービーズ 10 µg/mL(終濃度)を推奨しています。高濃度のビーズは高いバックグラウンドを引き起こすことがあります。
	1 つの抗体がドナーとアクセプタービーズの両方に同時に架橋している	ビーズの選択を再検討してください。トラブル例) ビオチン化ウサギ IgG 抗体、streptavidin ドナービーズ、Protein A アクセプタービーズを使用している。Protein A は、ウサギ IgG 抗体に強い結合を示します。そのため、このビオチン化ウサギ抗体がドナーとアクセプター両方のビーズに架橋し、アナライト非存在下でもシグナルが検出されてしまいます。
	アッセイバッファーの選択	ビーズや抗体の希釈には、AlphaLISA Immunoassay Buffer (品番 AL000)の使用をお勧めします。このバッファーで高いバックグラウンドが生じた場合、AlphaLISA HiBlock Buffer (品番 AL004) や AlphaLISA NaCl Buffer (品番 AL007)に変えることで改善することがあります。
	ビーズの選択	ビーズの組み合わせによっては、ビーズ同士が結合することがあります。P9.(表 2)を参照ください。
	コンポーネントのプレミックス	コンポーネントによっては、プレミックスしたことで交差反応が起こり、高いバックグラウンドが生じることがあります。
	コンタミネーション	髪や唾液などに由来するアナライトが混入しないよう正しく操作してください。特にヒトアナライトを測定する場合はご注意ください。
	希釈液の干渉	別のバッファーを検討してください。
	アッセイの立体構造	抗体の配置を変える、またはプロトコール(添加順序)を検討してください。



現象	原因	解決法
シグナルカウントが低い	ドナービーズの露光	Alphaドナービーズは、光感受性があります。長時間露光してしまった場合は、新しくビーズを調製してください。
	マトリックスの干渉	マトリックスによっては、アッセイに干渉する物質を含んでいることがあります。例えば、ビオチンを含む培地はビオチン化抗体とストレプトアビジンドナービーズの結合を干渉します。その場合、可能であれば別の培地に変えるか、アッセイに干渉しないバッファーでサンプルを希釈する必要があります。
	添加順序	一方の分子との結合が、他方の分子のとの相互作用に干渉し、添加順序が重要となることがあります。プロトコル(添加順序)を検討してください。
	反応時間	抗体とターゲットの結合に時間を要することがあります。反応時間の延長を検討してください。
	アナライト濃度が高い(フック効果)	アナライトの濃度が高くなると、それに伴ってシグナルも上昇します。しかし、アナライトがフックポイントを超えサチュレートすると、シグナルは減少し始めます(P34 参照)。アッセイレンジを確認してください。アナライト濃度がレンジを超える場合、サンプルを希釈してください。
	測定機の設定	機械の設定を確認し、正常に作動しているか確認してください。
	試薬濃度の変化	可能であれば、アナライトの OD 値を測定し、調製した溶液の濃度をダブルチェックします。
	抗体の選択	抗体の配置(ビオチン化する抗体とビーズ標識する抗体の入替え)または、別の抗体を試します。(可能であれば、ELISA など別のアッセイで抗体のパフォーマンスおよび組み合わせに問題がないか確認します。)
感度が低い	添加順序	一方の分子との結合が、他方の分子のとの相互作用に干渉することがあります。プロトコル(添加順序)を検討してください。
	マトリックスの干渉	マトリックスによっては、アッセイに干渉する物質を含んでいることがあります。例えば、ビオチンを含む培地はビオチン化抗体とストレプトアビジンドナービーズの結合を干渉します。その場合、可能であれば別の培地に変えるか、アッセイに干渉しないバッファーでサンプルを希釈する必要があります。
	抗体の選択	アッセイ配置(ビオチン化する抗体とビーズ標識する抗体の入替え)または、別の抗体を試します。
	アナライトの選択	使用する抗体またはアッセイに対し、適したスタンダードアナライトを選択してください。リコンビナントアナライトには、全長、断片、活性、不活性分子など、複数種類販売されていることがあります。
スタンダードカーブがフィットしない。	シグモイドのデータをリニアカーブに合わせようとしている	AlphaLISA のデータは、通常ドーズレスポンスカーブ(シグモイドや 4 パラメーター)にフィットするようプロットします。もし、カーブのリニアな部分のみ使用したい場合は、高濃度または低濃度側のいくつかのアナライト濃度のデータを除く必要があることがあります。
	アナライト濃度が高い(フック効果)	アナライトの濃度が高くなると、それに伴ってシグナルも上昇します。しかし、アナライトがフックポイントを超えサチュレートすると、シグナルは減少し始めます(P34 参照)。高濃度側のスタンダードを省き、再度シグモイドカーブにフィットさせてください。



現象	原因	解決法
カーブが左右にシフトする	添加順序	添加順序はアッセイ間で同一にしてください。アッセイコンポーネントの添加順序を変えるとスタンダードカーブがシフトすることがあります。
	スタンダード希釈液の変更	スタンダードカーブで使用する希釈液はサンプルに類似する物を使用します。希釈液を変更すると、スタンダードカーブがシフトすることがあります。
	アナライトの変更	アナライトを変更した(ロットを変えて新ロットは糖鎖レベルが異なっていたなど)、または分解していた場合などに、カーブがシフトする可能性があります。
	アナライトの吸着	アナライトが吸着し易い場合、チューブやピペットチップに吸着し、カーブが低濃度側にシフトすることがあります。吸着しにくいチューブやチップを使用してください。
	抗体ロットの変更	ポリクローナル抗体を利用している場合、抗体ロットによるアフィニティ差により、カーブがシフトする可能性があります。
回収率(%)が異常に高い又は低い	添加濃度がアッセイのダイナミックレンジから外れている	アッセイレンジに入る添加濃度で試してください。
	スタンダード希釈液の選択	スタンダードの希釈液を検討してください。スタンダードの希釈液はできるだけサンプルに近い物を使用します。マトリックスの干渉を減らすためサンプルを希釈する必要があることもあります。
AlphaLISAの結果がELISAと一致しない	*どちらのアッセイが適切な結果であるか判別することが重要です。可能であれば、3つ目の方法で評価してください。	
	スタンダードカーブの希釈液がサンプルに適していない	スタンダードの希釈にはサンプルに近い溶液を使用してください。例えば、細胞上清サンプルを使用する場合、スタンダードはその細胞培養液で希釈しスタンダードカーブを描きます。
	抗体の違い	使用した抗体が異なると、感度や結果も異なることがあります。
	アナライトの違い	スタンダードカーブに使用するスタンダードアナライトが異なると、異なる結果が得られることがあります。
	スタンダードカーブが正しくフィットしていない(シグモイドのデータをリニアカーブにフィットさせている、など)	AlphaLISAのアッセイデータは通常シグモイドカーブにフィットするようプロットします。低濃度側でもカーブがフィットするように、データの重みづけ(1/Y <sup>2</sup> )をすることを勧めます。リニアカーブを使用したい場合は、アナライトの低濃度および高濃度のデータを省く必要があります。
	バッファーの選択	ターゲットがサンプル中の他の分子と結合した状態にあり、抗体が認識できないことがあります。この可能性がある場合、サンプル中の結合を解離するために AlphaLISA Dissociation Buffer (品番 AL006)の使用をお勧めします。
	サンプル中のアナライト濃度が高い又は低い(アッセイのダイナミックレンジを超えている)	サンプル中のアナライト濃度が高い場合、アッセイのダイナミックレンジに合わせるためにサンプルを希釈する必要があります。アナライト濃度がフックポイントを超えるとシグナルが下がります。(フック効果 P34 参照)

## データの解析

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。AlphaLISA イムノアッセイでは、広いダイナミックレンジの利点を生かすため、通常、下記式の非線形回帰分析 (4 パラメーターロジスティック回帰) を用いて解析し、シグモイド曲線を描きます。このカーブは、GraphPad Prism® のようなソルバーが搭載された標準的な解析ソフトウェアで描くことができます。スタンダードカーブのフィッティング後、実験サンプルの濃度を算出します。

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

EC50 は、Top と Bottom の中間点の濃度

詳細は NIH Genomics Center Assay Guidance Manual を参照ください。

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>

スタンダードカーブが高濃度側で下降し始めた場合、'フック効果' が起きている可能性があります (図11)。フック効果は、ビーズに対しアナライトが飽和した時に生じます。フックポイントを超える過剰のアナライトは、ドナーとアクセプタービーズ間の相互作用を妨げます。この場合、フックポイントを超える濃度のスタンダードをデータから省き、再度カーブをフィッティングさせます。

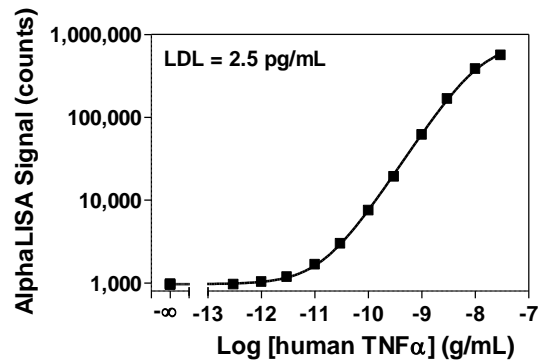


図10. AlphaLISA TNF  $\alpha$  スタンダードカーブ。スタンダードの希釈には AlphaLISA Immunoassay Buffer を使用した。データは、GraphPad Prism® を用いてドーズレスポンスカーブにフィットした。

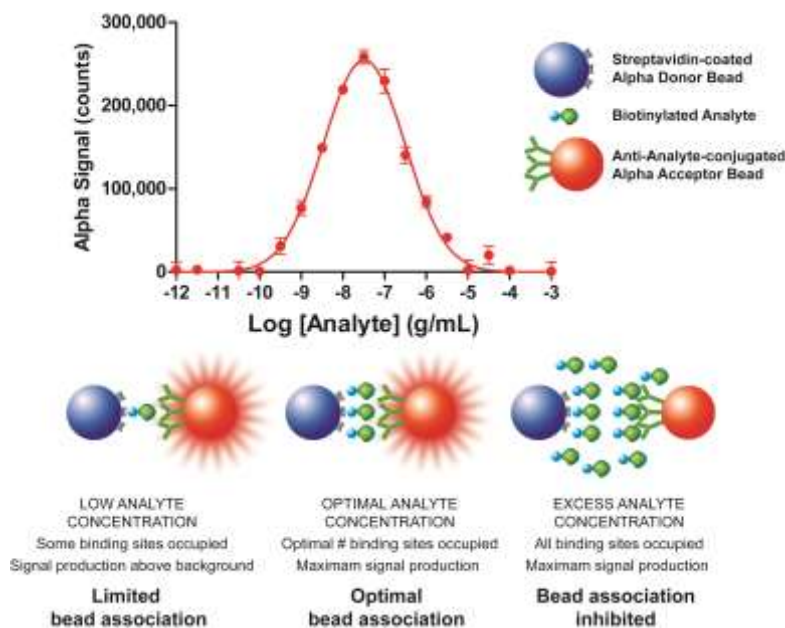


図11. フック効果。上図はAlphaLISAイムノアッセイのデータ。アナライト濃度上昇に従って、シグナルは上昇する。アナライト濃度がフックポイントに達すると、濃度上昇に伴ってシグナルは減少する。上のイラストは、アナライト濃度上昇に伴う相互作用を示したもの。飽和点を越えると、アナライトがドナーとアクセプター間の相互作用を阻害する。

### 最低検出限界(Low detection limit: LDL)の算出

スタンダードカーブから、アッセイの下限検出限界(LDL)を求めることができます。

$$\text{LDL} = \text{Average (zeroes)} + 3 \text{ SD}$$

下限検出限界 (LDL) は、アナライト濃度ゼロ(バックグラウンド)のシグナルカウント平均値に、3x標準偏差(SD)を足したシグナルカウント値を、濃度に換算した値に相当します。

#### 手順

- 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ト濃度を算出し、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(アナライト最大濃度)にかけての範囲を指します。

## 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。

## 直線性試験と添加回収試験

## 直線性試験と添加回収試験

サンプル中のアナライトを定量するには、サンプルに合った希釈液でアナライトを希釈しスタンダードカーブを作成する必要があります。使用した希釈液がサンプルに適しているか評価するために、直線性試験と添加回収試験を行います。適した希釈液を使用すると、高い直線性や回収率が示されます。

## 直線性試験

1. 検体の一つに、高濃度のスタンダードアナライトを添加します。例) 3 ng/mL
2. 添加した検体を、評価する希釈液を用いて 2 倍の希釈系列を調製します。少なくとも 5 点以上の系列を作製してください。

チューブ No.	スタンダードアナライト量	希釈液量	チューブ中のアナライト濃度*	希釈率
1	60 µL の高濃度アナライト溶液 (3 ng/mL)	0	3 ng/mL	1
2	30 µL の高濃度アナライト溶液 (3 ng/mL)	30 µL 希釈液	1.5 ng/mL	0.5
3	30 µL のチューブ No.2 溶液	30 µL 希釈液	0.75 ng/mL	0.25
4	30 µL のチューブ 3 溶液	30 µL 希釈液	375 pg/mL	0.125
5	30 µL のチューブ 4 溶液	30 µL 希釈液	187.5 pg/mL	0.0625
6	30 µL のチューブ 5 溶液	30 µL 希釈液	93.75 pg/mL	0.03125

表 9. 添加溶液の希釈系列調製

\*検体に存在しているアナライトは、添加する濃度と比較して十分低いことを想定し、ここでは考慮しません。

3. 別のチューブに、スタンダード希釈系列を希釈液で用意し、スタンダードカーブを作成します。表 10 は、AlphaLISA TNFα キットのスタンダードカーブの例です。

tube	TNFα (µL)	希釈液量(µL) *	[TNFα]	
			(g/mL in 5 µL)	(pg/mL in 5 µL)
A	100 µL human TNFα standard (100 ng/mL)		1E-07	100 000
B	60 µL of tube A	140	3E-08	30 000
C	60 µL of tube B	120	1E-08	10 000
D	60 µL of tube C	140	3E-09	3 000
E	60 µL of tube D	120	1E-09	1 000
F	60 µL of tube E	140	3E-10	300
G	60 µL of tube F	120	1E-10	100
H	60 µL of tube G	140	3E-11	30
I	60 µL of tube H	120	1E-11	10
J	60 µL of tube I	140	3E-12	3
K	60 µL of tube J	120	1E-12	1
L	60 µL of tube K	140	3E-13	0.3
M ** (background)	0	100	0	0
N ** (background)	0	100	0	0
O ** (background)	0	100	0	0
P ** (background)	0	100	0	0

表 10. TNFα スタンダードカーブの調製例

## 直線性試験と添加回収試験

4. 添加溶液(表 9)とスタンダード(表 10)の希釈系列用いて、AlphaLISA アッセイを行います。スタンダードカーブを作成し、各添加溶液の濃度を算出します。
5. 算出した添加溶液の濃度と、表 9 の希釈率(1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125)を比較プロットします。回帰直線を求め、相関係数から直線性を評価します。

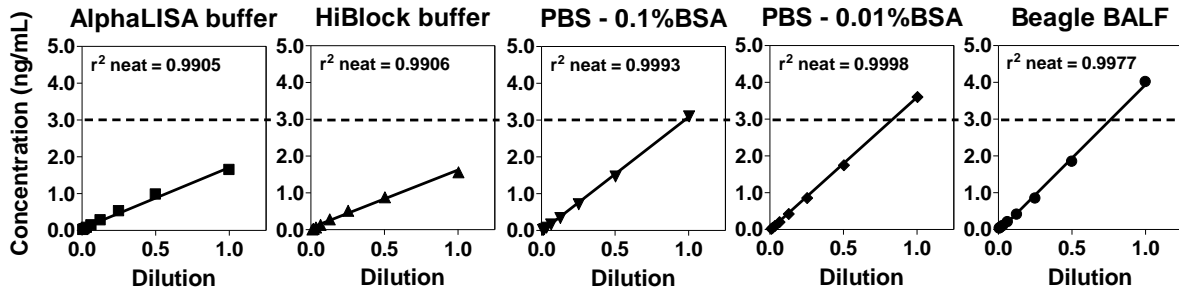


図 12. AlphaLISA による直線性試験。気管支肺胞洗浄液(BALF)サンプル中のアナライト定量のため直線性試験によるバッファーの評価を行った。5 種類のバッファー、AlphaLISA Immunoassay Buffer, HiBlock Buffer, PBS + 0.1% BSA, PBS + 0.01% BSA, Beagle BALF を希釈液として使用しそれぞれスタンダードカーブを作成、AlphaLISA アッセイを行った。PBS + 0.1% BSA, PBS+0.01%, Beagle BALF で高い直線性(>0.995%)が得られた。PBS + 0.1% BSA と Beagle BALF を用いて添加回収試験(P39)を行う。

候補のどの希釈液でも良い直線性(>0.995)が得られない場合、マトリックスの干渉を下げるためサンプルの希釈を検討してください(P29 参照)。スタンダードカーブから算出した濃度値は、希釈倍率を掛けて最終的なサンプル濃度に補正します。スタンダードはサンプル希釈に使用したバッファーと同じ溶液で希釈します。

## 添加回収試験

1. **添加検体の調製**:各チューブに検体を入れ、それぞれ、低濃度、中濃度、高濃度のアナライトを添加します(この時、アナライトを添加しない検体みのチューブ、'添加なし'も作製します)。添加するアナライトの各濃度は、アッセイのダイナミックレンジから決定します。
2. **添加希釈液の調製**:別のチューブに、使用する希釈液(直線性試験で決定したもの)を入れ、上記 1 と同じ濃度のアナライトを添加します(この時、アナライトを添加しない希釈液だけのチューブ、'添加なし'も作製します)。
3. **スタンダード希釈系列の調製**:さらに別のチューブを用意します。スタンダードカーブを作成するため、使用する希釈液でスタンダードの希釈系列を作成します
4. **AlphaLISA アッセイ**:上記 1-3 で調製した添加溶液およびスタンダード希釈系列を用いて、AlphaLISA アッセイを行います。スタンダードカーブから、添加溶液の濃度を算出します。
5. **回収率(%)の算出**:検体に添加した溶液(添加 検体溶液)と、希釈液に添加した溶液(添加 希釈溶液)の濃度を比較します。その際、'添加なし'から測定された数値を低・中・高濃度のデータから差し引いておきます。回収率(%)を下記式から求めます。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{添加 検体}}{\text{添加 希釈液}} \times 100$$

希釈液: PBS + 0.1% BSA

添加濃度 (pg/mL)	希釈液へ添加		検体へ添加(マウス BALF)	
	測定値濃度(pg/mL)	測定値濃度(pg/mL)*	測定値濃度(pg/mL)*	回収率 (%)
0	0	17.1	17.1	n/a
10	12	9.2	9.2	76
30	35.2	32.3	32.3	92
300	300.2	292.6	292.6	97
3000	3141.2	2952.1	2952.1	94

表 11: AlphaLISA イムノアッセイによる添加回収試験。マウス気管支肺胞洗浄液(BALF)中の TNF $\alpha$  定量測定のため回収率による評価を行った。PBS + 0.1% BSA をスタンダードの希釈に使用。

\* 添加濃度 10-3000 pg/mL で得られた測定値濃度は、'添加 0'の値(この場合 17.1pg/mL)を差し引いた濃度である。4 点全ての添加濃度で、十分な回収率が得られている。



**Semi-Wash-AlphaLISA アッセイ**

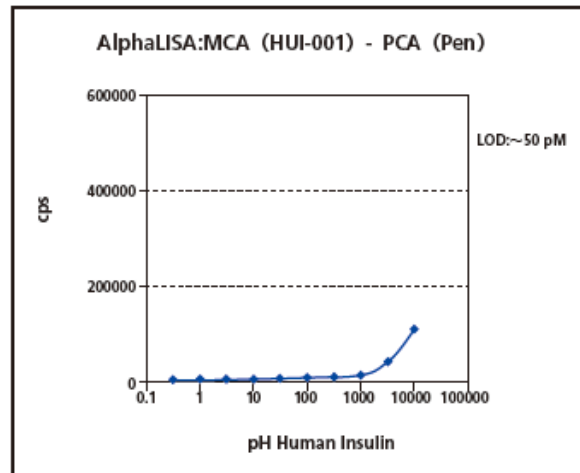
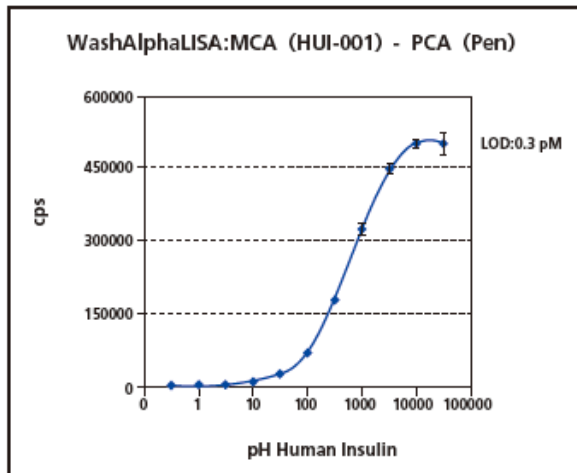
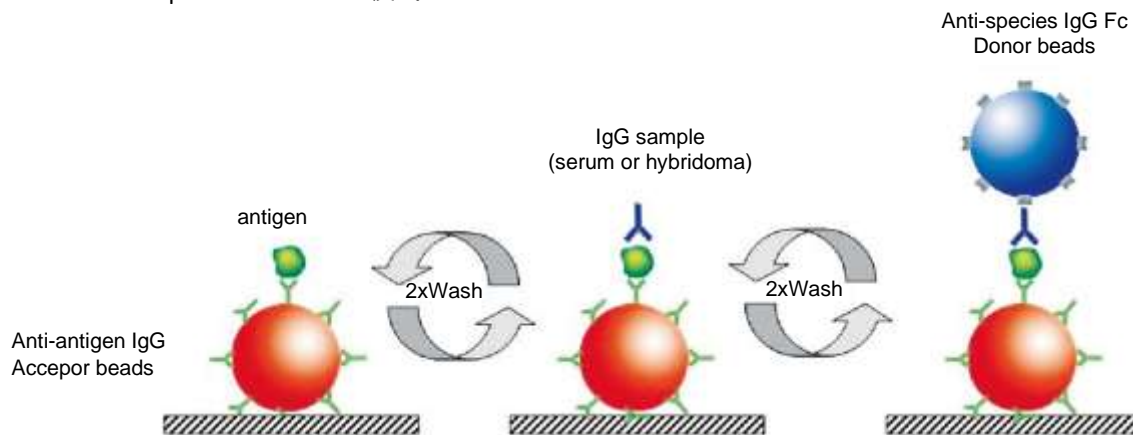
Alpha ビーズをプレートに固定化し、簡易な洗浄を行うセミ-ヘテロジニアスアッセイです。血清やハイブリドーマ中の抗原特異的抗体の選別など、サンプル中にアッセイの干渉/競合分子を含む場合に有効です。

ここでは、Semi-Wash-AlphaLISA が行われた下記文献とそのアッセイ手順を紹介します。(最適なアッセイ条件は、各アッセイによって異なりますので、ご自身による検討を行ってください。)

**参考文献**

Fritz Poulsen,

Wash-LOCI – A Semi-Heterogeneous Version of the LOCI Technology Allowing Removal of Unbound Material After Each Assay Step. Chapter 16, Trends in Immunolabelled and Related Techniques.

**Semi-Wash-AlphaLISA アッセイ模式**

インスリン(PCA-Pen)を未精製のポリクローナル抗体を使用して検出しました。左図がSemi-Washプロトコール使用、右図がまぜるだけの通常のAlphaアッセイです。Semi-Washプロトコールにより検出限界やダイナミックレンジが改善されました。



**Day1:**プレートへのアクセプタービーズ固定**Materials:**

- AlphaPlate-384HB(Cat#6057690)
- 5 $\mu$ g/mL antibody-AlphaLISA Acceptor Beads in PBS, pH7.2 :(使用量: 175 ng/well)

**Protocol :**

- 1) AlphaPlate-384 HB に、35  $\mu$ L の 5  $\mu$ g/mL antibody-AlphaLISA Acceptor beads を添加します。
- 2) 2 時間、3452xg で遠心します。
- 3) 20 時間、4 $^{\circ}$ C でインキュベーションします。

**Day2 :**Semi-Wash-AlphaLISA アッセイ**Material**

- 血漿サンプル: (使用量:3.3  $\mu$ L/well)
- ビオチン化抗体: (使用量:0.8 nmol/well)
- ストレプトアビジドナービーズ(Cat#6760002S. 使用量:1  $\mu$ g/well)
- アッセイバッファー:  
25 mM Hepes, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA tripotassium salt, 2 mg/mL Dextran 500 (Pharmacosmos), 0.5 % BSA (A-7888; Sigma-Aldrich), 0.1% bovine gamma globulin (G-5009; Sigma-Aldrich), 0.2 mg/mL mouse immunoglobulin (HBR1; Scantibodies Laboratories), 0.1 %(w/v) Tween 20, 0.01 % Proclin 300 (Sigma-Aldrich), 0.01 % gentamycin sulphate(Biological Industries), pH 7.4.
- 洗浄バッファー:  
PBS pH7.2, 0.05 % Tween-20
- ビオチン化抗体用希釈バッファー:  
アッセイバッファー + 0.2 M Na-Citrate + 1 % guinea pig serum, pH 7.4.
- サンプル用希釈バッファー:  
アッセイバッファー+ 0.015 % Triton X-100 + 0.05 % SDS

**Protocol:**

- A. 血漿サンプルをサンプル希釈用バッファーで 3 倍希釈します。(例. 3.3  $\mu$ L 血漿サンプル+6.7  $\mu$ L 希釈バッファー)
- B. ビオチン化抗体をビオチン化抗体用希釈バッファーで 80 nM に調製します。
- C. 5 mg/mL ストレプトアビジドナービーズをアッセイバッファーで 50 倍希釈し 100  $\mu$ g/mL に調製します
- D. **Day1** でビーズを固定した AlphaPlate-384 HB のウェルを洗浄バッファーで洗浄し溶液を完全に除去します。
- E. D.で用意した AlphaPlate-384 HB に以下の順で加えます。
  - 1) 10  $\mu$ L のサンプル溶液(3 倍希釈したもの)を添加します。
  - 2) プレートを振とうしながら、22  $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションします。
  - 3) ウェルを洗浄バッファーで 2 回洗浄し、溶液を除去します。
  - 4) 10  $\mu$ L の 80 nM ビオチン化抗体を添加します。
  - 5) プレートを振とうしながら、22  $^{\circ}$ C で 1 時間でインキュベーションします。
  - 6) ウェルを洗浄バッファーで 2 回洗浄し、溶液を除去します。
  - 7) 10  $\mu$ L の 100  $\mu$ g/mL ストレプトアビジドナービーズを添加します。
  - 8) プレートを振とうしながら、22  $^{\circ}$ C で 1 時間、遮光下でインキュベーションします。
  - 9) EnVision または EnSpire により Alpha 測定

**General**

Fritz Poulsen,  
Wash-LOCI – A Semi-Heterogeneous Version of the LOCI Technology Allowing Removal of Unbound Material After Each Assay Step.

Chapter 16, Trends in Immunolabelled and Related Techniques

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

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

Ullman E.F. et al.

LUMINESCENT OXYGEN CHANNELING ASSAY (LOCI™): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method.

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

**AlphaLISA immunoassays for biomarker detection**

Huertas A. et al.

Leptin and regulatory T lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension.

Eur Respir J 2012 Feb.

Freund A. et al.

p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype.

EMBO J. 2011 Apr;30(8):1536–1548.

Cauchon, E. et al.

Development of a Homogeneous Immunoassay for the Detection of Angiotensin I in Plasma Using AlphaLISA Acceptor Beads Technology.

Anal Biochem 388, 134-139 (2009)

Lai, M.T. et al.

Antiviral activity of MK-4965, A Novel Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor.

Antimicrob Agents Chemother 53, 2424-2431 (2009).

Majercak, J. et al.

LRRTM3 Promotes Processing of Amyloid-Precursor Protein by BACE1 and is a Positional Candidate Gene for Late-Onset Alzheimer's Disease.

Proc Natl Acad Sci USA 103, 17967-17972 (2006).

Petersen, S.B. et al.

Comparison of a luminescent oxygen channeling immunoassay and an ELISA for detecting insulin aspart in human serum.

J Pharm Biomed Anal 51, 217-224 (2010).

Poulsen, F. et al.

A Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay for the Determination of Insulin in Human Plasma.

J Biomol Screen 12, 240-247 (2007).

Szekeres, P.G. et al.

Development of Homogeneous 384-well High-Throughput Screening Assays for Abeta1-40 and Abeta1-42 using AlphaScreen technology.

J Biomol Screen 13, 101-111 (2008).

### **Biotherapeutics**

Houde D. et al.

Conformational comparability of factor IX-Fc fusion protein, factor IX, and purified Fc fragment in the absence and presence of calcium.

Journal of Pharmaceutical Sciences 2012 Jan.

Goetze AM. et al.

Rates and Impact of Human Antibody Glycation In Vivo.

Glycobiology 2011 Sep.

Nakamura S. et al.

Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011 May;31(5):1041–1048.

Mazella J. et al.

Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design.

PLoS Biol 2010;8(4):e1000355.

Saitoh R. et al.

Viral envelope protein gp64 transgenic mouse facilitates the generation of monoclonal antibodies against exogenous membrane proteins displayed on baculovirus.

J. Immunol. Methods 2007 Apr;322(1-2):104–117.

Lazar GA. et al.

Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2006 Mar;103(11):4005–10.

Miller MD. et al.

A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2005 Oct;102(41):14759–64.

最新の文献は、<http://citations.perkinelmer.com>をご覧ください。



---

株式会社 **パーキンエルマージャパン**

[www.perkinelmer.co.jp](http://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