

EIA system (TMB solution) - IBL

96Well

1. はじめに

本測定キットは、一般的な EIA (Enzyme Immuno Assay) 法による測定キットを構築するためのバッファーセットです。本キットとは別に、目的とする標的物質に対する HRP 標識抗体と抗体固相済み 96Well マイクロプレートをご用意いただくことで、サンドイッチ ELISA 測定系を構築できます。それ以外にも、ビオチンや酵素標識した 2 次抗体を用いた抗体価の測定、ハイブリドーマのスクリーニングなどの EIA 法にも使用することができます。

2. 原理および測定方法

本製品は、一般的なサンドイッチ法による EIA (Enzyme Immuno Assay)キットを構築することができるバッファーセットです。1 次抗体をプレートに固相し、検体および標準物質を加え、1 次反応をおこない洗浄後 HRP 標識された 2 次抗体を加え 2 次反応をおこないます。反応後、過剰の 2 次抗体を洗浄除去します。Tetramethyl Benzidine (TMB) により発色させます。この呈色は標的物質の量に比例します。

3. 構成試薬

希釈用緩衝液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS)	30mL x 1
標識抗体用溶解液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS)	12mL x 1
TMB 基質液	15mL x 1
停止液 (1N H ₂ SO ₄)	12mL x 1
濃縮洗浄液 (40 倍濃度リン酸緩衝液)	50mL x 1

4. 用法および用量 (操作方法)

(1) 必要な器具・器材

抗体固相済み 96Well マイクロプレート	プレートカバー
HRP 標識抗体	標的物質の標準物質
プレートリーダー (測定波長：450nm)	マイクロピペットおよびチップ
希釈用テストチューブ	メスシリンダーおよびピッカー
精製水	グラフ用紙 (両対数)
ペーパータオル	洗浄ビン
恒温器 (37℃±1℃)	冷蔵庫 (4℃として)
採取用容器 (清潔な試験管など)	

(2) 準備

濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は 40 倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液 50mL に対して精製水を 1,950mL 加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し 2 週間以内に使用してください。

標識抗体用溶解液

必要に応じて標識抗体濃縮液の希釈にご使用ください。

(希釈方法の一例；30 倍濃度の標識抗体濃縮液の場合)

別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で 30 倍希釈してください。これを標識抗体とします。

希釈例)

1 スリット(8 ウェル) 使用する場合＝800 μ L 必要 (最低量)

(標識抗体濃縮液を 30 μ L とり、標識抗体用溶解液 870 μ L を加え良く混和し、100 μ L ずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

希釈用緩衝液

必要に応じて、標準物質、および検体の希釈にご使用ください。

(標準物質の希釈方法の一例；標準物質 A、10.4ng/mL を使用の場合)

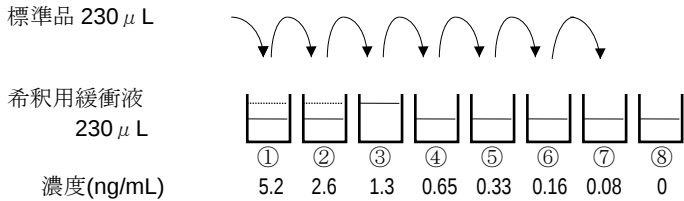
標準物質 A のバイアル瓶に規定量の精製水を加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 10.4ng/mL となります。

希釈用テストチューブを 8 本用意し希釈用緩衝液を 230 μ L ずつ量り取ります。各々のテストチューブに

5.2ng/mL, 2.6ng/mL, 1.3ng/mL, 0.65ng/mL, 0.33ng/mL, 0.16ng/mL, 0.08ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

5.2ng/mL の希釈用テストチューブに 10.4ng/mL の標準物質溶液を 230 μ L 加え混和しその溶液 230 μ L を 2.6ng/mL の希釈用テストチューブに加え混和します。順次 2 倍連続希釈をおこない 5.2ng/mL～0.08ng/mL までの 7 点を希釈標準品とし、0 ng/mL を検体ブランクとします。(図 (1) 参照)

図 (1) 標準液希釈操作例



検体の希釈方法

検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈し測定してください。

(3) 測定操作方法

(例として、1 次反応：37℃60 分間、2 次反応：4℃30 分間の場合)

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し検量線を設定してください。

1 ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)

試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を 100 μ L 入れます。

2 検体、希釈標準品の添加

検体 100 μ L 及び希釈標準品各 100 μ L 並びに検体ブランク 100 μ L を入れます。

3 プレートカバーをして 37℃ 60 分間反応

4 洗浄 7 回

洗浄操作に十分注意して測定してください。推奨する洗浄方法は、抗体プレートの各ウェルを洗浄ビンに入れた洗浄液を用いて勢い良く洗い流しその後、洗浄液をウェルに満たし 15～30 秒間静置しプレートを逆さまにして振り払い洗浄液を完全に除去します。この洗浄操作を規定回数以上行い、ペーパータオル等の上でたたいて全ウェルの水分を完全に除去してください。プレートウォッシャーによる洗浄は、機種により洗浄が不十分な場合がありますので洗浄後、さらに上記洗浄方法による洗浄を 3 回程度おこなってください。

5 標識抗体の添加

検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々100 μ L 添加します。

6 プレートカバーをして 4℃30 分間反応

7 洗浄 9 回

上記 4 洗浄と同様操作

8 TMB 基質液の添加

あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルに TMB 基質液を 100 μ L 添加します。TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光して下さい。また、採取用容器残った TMB 基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。

9 遮光をして常温 30 分間反応

10 停止液の添加

すべてのウェルに停止液を 100 μ L 添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。

11 吸光度測定

プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内に試薬ブランクを対照として検体及び標準並びに検体ブランクの波長 450nm における吸光度を測定してください。

図 (2) 測定操作一覧

	検 体	標 準	検体ブランク	試薬ブランク
試 料	検体 100 μ L	希釈標準品 100 μ L	希釈用緩衝液 100 μ L	希釈用緩衝液 100 μ L
プレートカバーをして 37℃60 分間反応				
洗浄 7 回				
標識抗体	100 μ L	100 μ L	100 μ L	—
プレートカバーをして 4℃30 分間反応				
洗浄 9 回				
TMB 基質液	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
遮光常温 30 分間反応				
停 止 液	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
プレートをたたいて反応液を混和し、30 分以内に試薬ブランクを対照として 450nm における検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定				

7. 操作上の注意事項

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめいたします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- 7 TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 8 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランク値を引いた値を取り検量線を設定します。

試料検体の吸光度値から検体ブランクの値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

11. 使用上または取り扱い上の注意

- 1 保存は、2～8℃としてください。使用の前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 2 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服・皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 3 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。
- 4 ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換して使用することは避けてください。
- 5 有効期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 6 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

12. 保存方法および有効期限

2～8℃保存
使用期限は外箱に記載

13. 包装単位および製品番号

96Well
製品番号 19903

14. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所 営業部
〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1
TEL 0274-22-2889 FAX 0274-23-6055

Version 1.1