

間接ELISA

試薬および装置

- リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) タブレット：10mMリン酸緩衝液、pH7.4、150mM NaCl (シグマ P4417) および0.1%アジ化ナトリウム (シグマ S2002)
- 炭酸炭酸水素緩衝液カプセル、pH9.6 (シグマ C3041)
- 洗浄バッファー (PBS-T)：10mMリン酸緩衝液、pH7.4、150mM NaCl、0.05%Tween20 (シグマ P3563)
- モノクローナル抗体
- コントロール抗体：アイソタイプの適合した、非特異的マウス免疫グロブリン (マウスミエローマタンパク質)
- アルカリホスファターゼ標識二次抗体またはペルオキシダーゼ標識二次抗体
- アルカリホスファターゼ標識二次抗体用基質 (SIGMA FAST™pNPPタブレット、シグマ N1891など) またはペルオキシダーゼ標識二次抗体用基質 (SIGMA FAST™ OPDタブレット、シグマ P9187など)
- アルカリホスファターゼ用反応停止液 (3M NaOH) (任意) またはペルオキシダーゼ用反応停止液 (3M HClまたは3M H₂SO₄) (任意)
- マイクロタイタープレート
- マイクロタイタープレートリーダー、405nmまたは450/492nmフィルター (各pNPPまたはOPD用)

プロトコール

抗原のコーティング

- 炭酸-炭酸水素緩衝液またはPBSを用いて、適当な濃度の抗原溶液を調製します。
- マイクロタイタープレートの各ウェルに上記の溶液を0.2 mL滴下します。
- 37°Cで30分間、またはカバーをして4°Cで一晩インキュベートします。
- コーティングした溶液を除去し、PBS-Tで3回洗浄します。

注記：非特異的結合による問題が生じる場合は、ブロッキングステップ (30分間、5%BSA-PBS) の追加が必要なこともあります。詳細は、Vogt, R.F., *et al., J. Immunol. Meth.*, **101**, 43 (1987)をご参照下さい。

一次抗体反応

- モノクローナル抗体をPBS-Tで希釈します。至適希釈率は、あらかじめ希釈系列をつくって確認しておいて下さい。
- 各ウェルに希釈したモノクローナル抗体を0.2mLずつ添加します。ネガティブコントロールは、アイソタイプの適合した非特異的マウス免疫グロブリンをPBS-Tで希釈して用いて下さい。
- 室温で2時間インキュベートします。
- 抗原コーティングの4.と同様にして洗浄します。

二次抗体反応

- 酵素標識二次抗体をPBS-Tで希釈します。この溶液を各ウェルに0.2mLずつ添加します。至適希釈率は、あらかじめ希釈系列をつくって確認しておいて下さい。
- 室温で2時間インキュベートします。
- 抗原コーティングの4.と同様にして洗浄します。

基質の調製

- 最後のインキュベーションの間で使用直前に、使用方法に従って基質を調製、または室温に出します。

発色

- 用時調製した基質を各ウェルに0.2mLずつ添加します。
- 30分後、ポジティブなウェルは黄色または橙色 (各pNPPまたはOPD) に呈色します。
- 吸光度はこのまま直接マイクロプレートリーダーで測定するか (405nmまたは450nm、各pNPPまたはOPD)、適当な反応停止液を各ウェルに50 μLずつ添加して反応を停止させた後、測定します (405nmまたは492nm、各pNPPまたはOPD)。

捕獲ELISA

捕獲ELISA (サンドイッチELISA) は、マイクログラム量からピコグラム量の物質 (ホルモン、細胞シグナリング物質、感染症抗原、サイトカインなど) を定量するための高感度なアッセイ法です。様々な理由で、このタイプのELISAが直接または間接ELISAよりも必要とされます。分析する物質が細胞培養上清中のタンパク質などのときは、過度に希釈するとポリスチレンマイクロタイタープレートに結合しない場合があり、また、低分子量の有機分子などはプラスチックプレートにあまり結合しません。また、他の物質が多く混在していると、うまく結合しない場合があります。

試薬及び機器

- リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)：10mMリン酸緩衝液、pH7.4、150mM NaCl ISO-2タブレット (シグマ P4417)、0.1%アジ化ナトリウム (シグマ S2002)
- 炭酸-炭酸水素緩衝液カプセル、pH9.6 (シグマ C3041)
- 洗浄バッファー (PBS-T)：10mMリン酸緩衝液pH7.4、150mM NaCl、0.05%Tween20 (シグマ P3563)
- 捕獲抗体
- 標準曲線用コントロール抗原
- 標識検出抗体
- 基質：一般に最も感度の良い基質が用いられる (標識酵素がペルオキシダーゼの場合TMB又はOPDなど)。
- 反応停止液 (任意)
- マイクロタイタープレート
- マイクロタイタープレートリーダー

プロトコール

注記：ここに示しましたプロトコールは概要です。捕獲抗体、サンプル、コントロール、検出抗体やインキュベートの時間は経験的に決定していただくか、希釈系列を作製して検討していただく必要があります。このプロトコールに記載したような酵素標識の検出抗体をご使用いただくことをお奨めしますが、もし検出抗体が非標識体の場合、使用する二次抗体がコーティング抗体、あるいはサンプルと交差反応しないようにして下さい。適切なネガティブおよびポジティブコントロールも反応させてください。

捕獲抗体のコーティング

- 炭酸-炭酸水素緩衝液またはPBSで、捕獲抗体を至適濃度に希釈します。捕獲抗体の典型的な濃度は0.2~10 μg/mLです。
- マイクロタイタープレートの各ウェルに希釈した捕獲抗体を0.2mLずつ滴下します。
- 37°Cで1時間、(カバーした) プレートをインキュベートします。
- コーティング溶液を除去し、洗浄バッファー (PBS-T) でプレートを3回洗浄します。

コントロールおよびサンプルの反応

- 各ウェルに、希釈サンプルおよびコントロールを0.2mLずつ添加します。サンプル濃度は測定感度により上下しますが、通常10ng~10 μg/wellの範囲になるよう、PBSで希釈します。
- 室温で1時間、プレートをインキュベートします。
- サンプル又はコントロール溶液を除去し、洗浄バッファー (PBS-T) でプレートを3回洗浄します。

検出抗体の反応

- 酵素標識の検出抗体を希釈します。
- 各ウェルに、適正な濃度に希釈した検出抗体を0.2mLずつ滴下します。
- 室温で30分間、プレートをインキュベートします。
- 検出抗体溶液を除去し、洗浄バッファー (PBS-T) でプレートを3回洗浄します。
- 適当な基質溶液を添加します。
- プレート発色させ (通常30分間)、反応停止液を添加 (任意) します。
- マイクロタイタープレートリーダーを用いて、適切な波長で測定します。

ELISA トラブル・シューティングガイド

問題点	考えられる原因	解決策
シグナルが検出されない、シグナルが弱い	重要な試薬が省略されている	すべての試薬が正確な順序で添加されたか確認して下さい。
	基質の調製を誤っている、あるいは不十分か使用する基質を誤っている	ご使用の酵素標識体に対して基質の選択が適切であるかを確認して下さい。例えば、アルカリホスファターゼの場合pNPP、ペルオキシダーゼの場合OPDまたはTMBです。必要な場合は新しいH ₂ O ₂ を添加して下さい。
	洗浄の条件が厳しい	可能であれば、自動プレート洗浄機をご使用下さい。洗浄バッファー中の界面活性剤を除去、あるいは低い濃度にして下さい。
	インキュベーション時間が適切でない	インキュベーション時間は、測定系に合わせて下さい。典型的な基質の発色時間は10~30分の間で変動します。
	基質または標識体が失活しているか、活性が低い	標識体と基質の活性をテストして下さい。
	酵素阻害剤が存在している	アジ化ナトリウムはペルオキシダーゼ反応を阻害することがあります。
	プレートリーダーの設定が最適化されていない	プレートリーダーの波長とフィルター設定を確認して下さい。
	測定温度が誤っている（低い）	推奨されるインキュベーション温度でご使用下さい。使用前に基質を室温にもどして下さい。
	基質量を誤っている	ピペットで正確な量が添加されているか確認して下さい。
	ブロッキングタンパク質がコーティング溶液に入っている	コーティング溶液からブロッキングタンパク質を除いて下さい。
バックグラウンドが高い	交差反応している	検出抗体がコーティング抗体と交差反応しています。適当なコントロールをおいて下さい。
	抗体が非特異的に結合する	適切なブロッキングバッファーを使用して下さい。
	抗体濃度が高い	希釈して至適濃度を決定して下さい。
	測定系の温度を誤っている	インキュベーション温度が37℃を超えていないか確認して下さい。
	洗浄が十分でない	すべてのウェルが洗浄バッファーで満たされて、完全に吸引されているかを確認して下さい。可能であれば、自動プレート洗浄機を使用して下さい。
	サンプル中に酵素が混入している	基質のみをサンプルに入れてテストし、そのサンプル中に酵素活性が存在するかをチェックして下さい。
発色にむらがある	ウェルの洗浄が不完全である	すべてのウェルが洗浄バッファーで満たされて、完全に吸引されているかを確認して下さい。可能であれば、自動プレート洗浄機を使用して下さい。
標準曲線が滑らかでない	ウェル内の液が完全に吸引されていない	各ステップにおいて、ウェル内が完全に吸引されるようにして下さい。可能であれば、自動プレート洗浄機を使用して下さい。
	プレートがインキュベーション中に重なっている	プレートを回転させない場合は、別々に置いて下さい。
	ピペット操作を誤って、希釈系列が不完全である	ピペットの操作技術をチェックし、希釈の計算を再確認して下さい。
	試薬の混合が不完全である	試薬が完全に混合されているか確認して下さい。
	プレートに添加した試薬が不十分であるか、吸着がばらついている	試薬の均一性をチェックして下さい。選択したコーティングバッファーをチェックして下さい。通常はPBS(pH7.4)、あるいは炭酸-炭酸水素バッファー (pH9.6)を使います。インキュベーション時間の延長を試して下さい。別のプレートの使用をご検討下さい。
予想外の結果が出る	必要な試薬が省略されている	試薬を正確に調製し、正しい順に添加して下さい。
	希釈が誤っている	ピペットの操作技術をチェックし、希釈の計算を再確認して下さい。
	技術的な問題がある	正確な試薬の混合と洗浄ステップが重要です。
	使用したELISAプレートが適当でない	蛍光検出の場合、専用のプレートを使用して下さい。