R-Biopharm AG

ELISA 実践マニュアル

R-Biopharm - Innovative Soutions for the Food & Feed Analysis

免責事項

　このELISA実践マニュアルは、R-Biopharm社のキットをご利用されてのELISA測定に準拠しての適正な実施手順や測定法を作成するためのガイドラインを提供しています。

　本マニュアルは、完全であるとはいえませんが最小の標準を用いて記述されています。そのような最小の標準では、正しい測定結果が得られることを保証できませんが、ELISA測定の質を向上させることができます。
　個々のテストキットの詳細な取扱説明書に加えてご使用してください。テストキットのご利用には、個々の取扱説明書に従い、本マニュアルよりも優先することをご理解ください。

　本マニュアルは、随時更新されますので、最新のものをご利用くださるようお願いします。

はじめに

　このELISA実践マニュアルは、ELISA測定の技術を向上させる目的で初心者から熟練者までに包括的な概論を提供します。

マニュアルは、ELISA測定のワークフローに従って３章に分かれています。

第１章では、試験の原理などの基礎知識、ELISAキットの構成及び必要な実験器具などが取り上げられています。

第２章では、試料の調製からELISAの手順までの測定方法が解説されています。

第３章では、測定したデータの処理から結果の考察までが説明されています。

目次

1 ELISA の基礎 6
1.1 抗体-抗原　検出 6
1.2 測定対象物 6
1.3 ELISA の種類 6
1.3.1 サンドイッチ ELISA法 6
1.3.2 競合 ELISA法 7
1.4 ELISA の構成 7
1.4.1 マイクロプレート (MTP) 7
1.4.2 コンジュゲートと基質 8
1.4.3 標準（キャリブレーター） 8
1.4.4 バッファー 8
1.4.5 停止液 8
1.4.6 その他 8
1.5 ラボ用機器とそのメインテナンス 9
1.5.1 ピペット(マイクロピペット) 9
1.5.2 洗浄機 9
1.5.3 ELISAリーダー(プレートリーダー) 9
1.5.4 自動化 10
1.5.5 その他の機器 10
1.5.6 一般的注意 10
1.6 優良実験所規範(GLP) 10
1.7 製品ラベル表示について 10

2 試料の調製と測定操作 11
2.1 マイクロピペットの操作 11
2.1.1 マイクロピペットの一般的操作 11
2.1.2 フォーワードピッペティング 12
2.1.3 リバースピペッティング 12
2.1.4 有機溶媒のピペッティングについて 13

2.2 試料の取扱い 14
2.2.1 未調製試料の保存 14
2.2.2 試料採取 14
2.2.3 試料調製 14
2.2.4 凍結保存試料 15
2.2.5 認証済標準物質(CRM) 15
2.3 キットの準備と取扱 16
2.3.1 キットの保存 16
2.3.2 ファーストイン-ファーストアウト 16
2.3.3 キットの使用温度 17
2.3.4 温度コントロール 17
2.3.5 試料の汚染や取り違いを防ぐために 18
2.3.6 一般的操作法 18
2.3.7 ピペッティングの時間割 19
2.3.8 正しい洗浄法 20
2.3.9 未使用分のキットの保存 21
2.3.10 キット間、ロット間での試薬の融通 21
2.3.11 安全性情報 21
2.4 反応停止とELISAの測定 22
2.5 複数のELISAの平行測定 22

3 データ処理と結果の解釈 23
3.1 検量線による未知試料の定量 23
3.2 検量線の求め方 23
3.3 サンドイッチ法、競合法の検量線 24
3.4 分光光度計とソフトウェア 25
3.5 検量線の妥当性 26
3.6 目的成分の濃度の求め方 26
3.7 測定範囲と希釈係数 27
3.8 単位と記号 28
3.9 検出限界と定量下限 28
3.10 正確性と回収率(リカバリ) 29
3.11 特異性と交差反応 30
3.12 干渉とマトリクス効果 31

1 ELISA の基礎

1.1 抗体 - 抗原　検出

抗体は、脊椎動物の形質細胞で生成されるタンパク質でもの体内に侵入した異物として認識されたもの(抗原)に対する免疫反応システムの一部となっています。

抗体は、抗原に対してイオン性や疎水性相互作用、水素架橋結合、ファンデルワールス力などの独特の方法で結合します。抗体と抗原の相互作用は、選択的かつ高度に特異的で、錠前と鍵の関係によく似ています。固相抗体免疫測定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay:ELISA)は、この選択的かつ特異的な抗体抗原認識に基づいています。多種類の定性的、定量的ELISA測定が確立されており、その選択法は以下の章で図解されています。

ELISA測定を行うためには、ある特定の抗原に対して少なくとも１つの特異的な抗体が含まれていることが必要です。主な原理は、それらの免疫学的成分の１つが固相、即ちマイクロプレートのウェルに固定されていることで、試料中の測定対象と抗体抗原反応の相互作用を生じます。この相互作用は、２次抗体や抗原に結合された酵素により可視化され、抗体抗原結合が起こっているかどうかの指標となります。添加された基質が結合した酵素により変換され色の変化を引き起こし、その変化が分光光度計で測定されます。

1.2 測定対象物

ELISAの測定対象物としては、次のようなものがあります。

1)特定の化学物質　例：アフラトキシンB1
2)特定の化学物質のグループ　例：アフラトキシンB1、B2、G1及びG2
3)特異的なタンパク質　例：スタフィロエンテロトキシンA
4)特異的なタンパク質のグループ　例：スタフィロエンテロトキシンA、B、C、D及びE
5)食品中の特定のタンパク質グループ　例：カゼイン(ミルクタンパク質の一部として)
6)食品　例：ピーナッツタンパク質

1.3 ELISA の種類

現在、以下の３種類がありますが、すべての測定は光学的密度(OD)に基づいています。

1.3.1 サンドイッチELISA法

サンドイッチ法では、試料中の特異的な抗原(測定対象物)が、マイクロタイタープレートの固定されている抗体と結合します。洗浄後、コンジュゲートされた抗体が添加され抗原(測定対象)の２次エピトープと結合します。洗浄後、基質が添加され、結果が光学的密度(OD)で測定されます。シグナルの強度は抗原(測定対象)の量に比例します。

1.3.2 競合 ELISA 法

競合ELISA法には、２種類のタイプがあります。１番目は、マイクロタイタープレートの表面に抗体を結合させたもので、測定対象と酵素コンジュゲート測定対象との間で競合が生じます。２番目は、一定量の測定対象を表面に固定したマイクロタイタープレートで、測定対象の試料が加えられると、抗体結合サイトの競合が抗体添加後に生じます。
洗浄後、基質が加えられ、測定されたOD値は、試料中の測定対象の量に反比例します。測定対象が多ければ多いほどOD値は小さくなります。この方法は、マイコトキシンや抗生物質のような分子量の小さいエピトープがひとつしかないものの測定に適しています(Figure2)。

２番目のシステム（抗体が表面に結合されたもの）では、捕捉抗体がしばしば用いられます(Figure3)。
このシステムの利点は、反応が捕捉抗体が満たされた時点から開始されることでほぼプレートすべてに対して同一のインキュベーション時間を設定できることです。

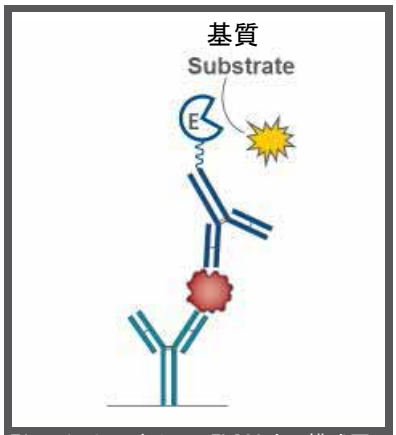


Fig. 1:サンドイッチELISA法の模式図

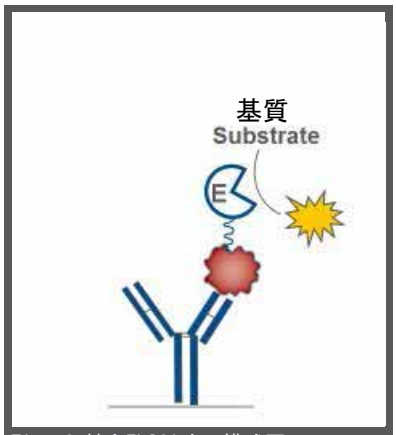


Fig. 2:競合ELISA法の模式図

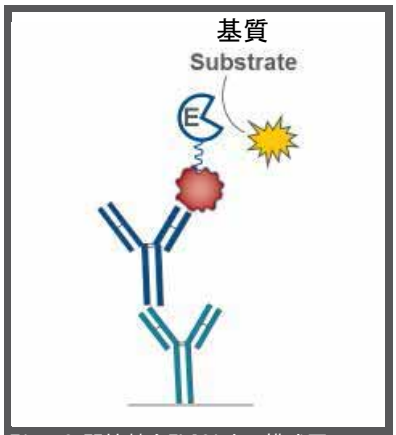


Fig. 3:間接競合ELISA法の模式図

1.4 ELISA の構成

これまでに紹介した通りELISA測定システムには次のようなものが必要です：マイクロタイタープレート、酵素コンジュゲート、スタンダード(キャリブレーター)、基質、停止液、バッファーなど。
さらに測定が正しく行われていることを確認するためのコントロールが必須となります。

1.4.1 マイクロタイタープレート (MTP:マイクロプレート)

マイクロプレート(MTP:96ウェル/48ウェル)は、測定のベースになるものです。個々のウェルには、抗体または抗原(システムによる)が表面に固定されています。最も使用されているプレートの材質は、ポリスチレンですが他の材質も利用されています。プレートは、その製造元でβ-またはγ-線照射を受けて活性化されています。この活性化をしないと抗体や抗原の固定ができないか僅かしかできません。個々のウェル内で抗原抗体反応やコンジュゲート基質反応が生起し、最後に特定の停止液で反応が停止され光学的密度(OD)が測定されます。

1.4.2 コンジュゲートと基質

抗体や測定対象物に酵素を結合したものはコンジュゲートと呼ばれます。
結合された酵素は、その特定の基質で青色を呈する物質に変換されます。基質は、通常は過酸化水素/色素の混合物で酵素コンジュゲートと反応し、その発色の光学的密度(OD)が測定されます。

1.4.3 標準(キャリブレーター)

ELISAで定量をする場合は、標準液を利用して較正を行います。その為、未知濃度の試料と既知濃度の一連の標準液を１つのプレート上で平行して測定し、標準の濃度とその測定された光学的密度(OD)から検量線(関連した数式で)が得られ、この式から試料中の測定対象の濃度が計算されます。

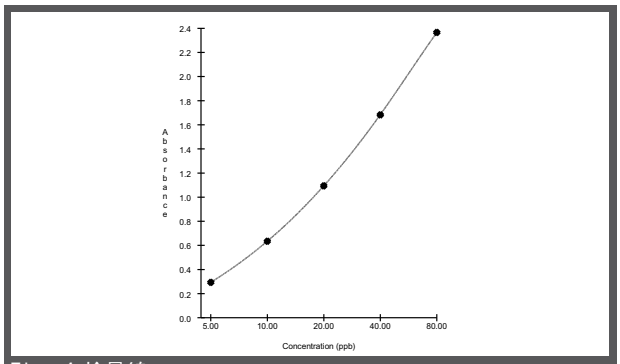


Fig. 4:検量線

1.4.4 バッファー

ELISAでは、生物的起源の成分が含まれていますので、それらの長期保存や測定中に正しく機能させるため、pHやイオン強度を一定にしておく必要があります。バッファーの成分の種類が測定キットの性能を左右することもありますので、測定キットには、即使用可または濃縮液としてバッファーが付属されています。
バッファーは、また試料の調製、プレートの洗浄にも利用されます。

1.4.5 停止液

停止液は、酵素コンジュゲート反応を停止させます。多くの場合、濃度の低い硫酸が使用されています。
反応が停止すると色は青色から黄色に変化し、10分以内の測定であれば安定しています。

1.4.6 その他

多くの場合、ポジティブコントロールの使用をお薦めします。例：スパイク溶液など。
この使用は、そのELISA測定の妥当性を評価することができます。

1.5 ラボ用機器とそのメインテナンス

測定システムでの必要条件に応じて、ピペット、プレート洗浄のための機器、温度を一定に保つ恒温槽、ELISAリーダー、濃度計算のためのコンピュータなど様々な実験器具が各ステップにおいて必要とされます。但し、すべての測定システムでここに列挙した機器が必要であるとは限りません。
いずれの場合でも使用される装置、機器の定期メインテナンスや較正が必要です。

1.5.1 ピペット(マイクロピペット)

ピペットは、決められた量の溶液を正確に例えばマイクロプレートのウェルに移動するために使用されます。ピペットは、精度の高い結果を得るために重要です。そのため専門家によるメインテナンスと適切なピペッティング技術に特に留意することが必要です。ピペットには、以下の様な種類があります。

- 固定容量のシングルチャンネルピペット　例：50μL
- シングルチャンネルピペット(例：10 – 100μLでの容量可変)；　通常、試料や標準に使用されます
- マルチステップピペット(一定量を複数回ピペットする機能)；　通常、抗体やコンジュゲート溶液の添加に使用されます
- マルチチャンネルピペット(8又は12ウェルに同時に溶液をピペットする機能)；　通常、洗浄ステップ及び抗体やコンジュゲート溶液の添加に使用されます
- ボトルトップディスペンサー(通常、洗浄ステップで使用されます)
- 全自動装置(すべてのピペッティングやインキュベーションステップが自動的に行われます)

1.5.2 洗浄機

インキュベーションステップの後は(基質のインキュベーションを除いて)、ELISAプレートは洗浄バッファーで洗浄しなければなりません。洗浄は、ELISA測定で精度の高い結果を得るためには重要です。

1.5.3 ELISA リーダー(マイクロプレートリーダー)

ELISAリーダーは、光学的密度(OD)を測定するための分光光度計で、試料中の濃度を計算します。
正しい結果を得るためには、専門家による定期的なメインテナンスが必須です。

1.5.4 自動化

ELISA測定の検討の１つの可能性は、試料の測定に際してマニュアル操作のない自動化システムの利用です。それ故、自動化システムは、測定の妥当性を評価され、キャリブレートされる必要があります。自動化システムは、ChemWell又はGEMINIで可能です。詳細についてはくはお問い合わせください。

1.5.5 その他の機器

測定中の温度を一定にするためインキュベーターが必要な測定キットもありますので、蒸発や汚染を防ぐため、シールやプレート保護カバーが必要になる場合もあります。

1.5.6 一般的注意

精度の高い測定結果を得るためには、機器は定期的に較正する必要があります。その頻度については製造元に確認しQCプランに組み込んでください。

1.6 優良実験所規範 (GLP)

取扱物質の毒性や伝染性により、作業者の健康と安全を守るための防護対策が異なりますが正しくない結果を引き起こす試料の汚染を防ぐため、基本的な保護衣は着用する必要があります。
以下の備品は、どのような実験室においても最低限必要なものです。

- 実験衣
- 手袋
- 保護メガネ
- ドラフト(必要に応じて)

さらに、SDS(MSDS)を詳しく調べて使用されているすべての化学物質を把握する必要があります。
SDS(MSDS)には、特定の化学物質の取扱いの際の危険情報、必要な保護具などが緊急時の必要な処置と共に記載されています。SDS(MSDS)は、個々の製品について準備されていますのでお申し出ください。

1.7 製品ラベル表示について

測定キットの取扱や保存については、製品に添付されている取扱説明書または使用説明書をお読みください。
キットの内容物のラベルには以下の情報が記載されています(該当する場合)。

- 製品名
- 製品番号
- 内容物の名称
- ロット番号
- 保存温度
- 濃度

有効期限は、特に重要で、それまでは内容物の有効性が保証されます。期限を過ぎると成分が劣化し、測定結果の正確性が損なわれます。

2 試料の調製と測定操作

2.1 ピペット操作

正確で精度の高いピペッティングがELISA測定では重要で、特にピッペット操作の小さなミスが最終結果に大きく影響する高感度測定では問題となります。ピッペッティングは、常に一貫した操作をして測定中にピペッティング法を変えないでください。ピペッティングを始める前に次のような準備をしておいてください：

標準液を順に並べておき、試料も同じようにピペッティングできるような一貫した法則で並べておきます。必要数のピペットチップを揃え、廃液容器も所定の場所に準備します。

2.1.1 マイクロピペットの一般的操作

可変容量タイプのピペットを使用される場合は、ピペッティングを始める前に希望の容量に調整してください。また、開始前に必ずピペットの容量を直接確認してください。(Fig.5)

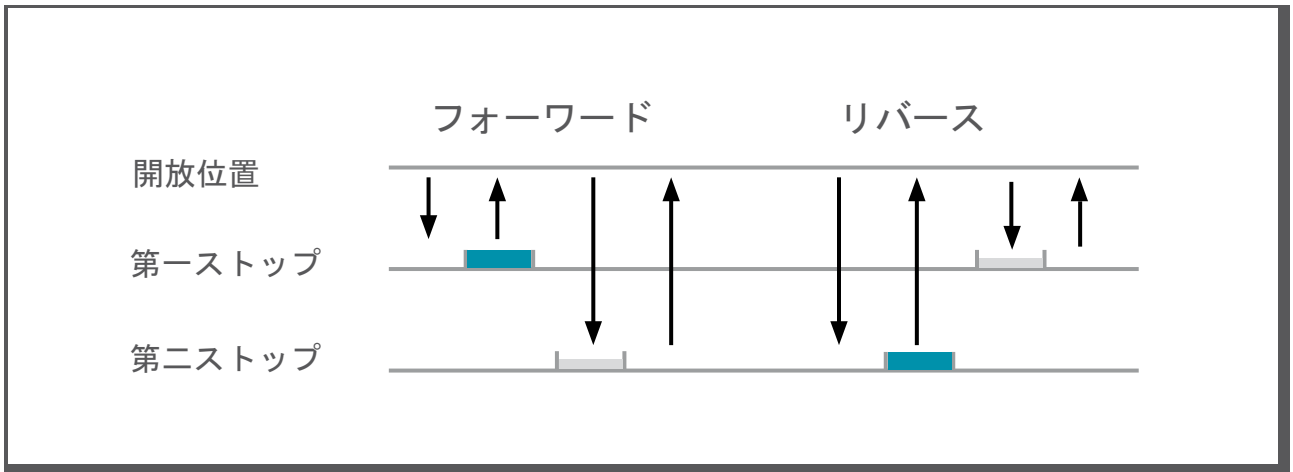


Fig. 5:シングルチャンネルピペット(ピストンピペット)を用いたフォーワードとリバースのピペッティングの模式図。青ブロックは、ピペットを吸引する液体につける位置、灰色は分注するウェルを示しています。

2.1.2 フォーワードピペッティング

1. マイクロピペットに新しいチップを装着し、しっかりとはまっていることを確認する
2. 操作ボタンを第一ストップまで押す
3. ピペットチップによっては、液体を吸引分注をする前にフラッシュが必要なものもありますので使用説明書を確認してください。不明な場合は、ピペットする前にチップをフラッシュしてください
4. 液の表面から約1cmの深さにチップの先を入れます。操作ボタンをゆっくり離し、元の位置に戻し、目的の量の液体が吸引されるのを待ちます。チップ内に気泡や泡がないことを確認します
5. チップを試験管につけるなどして、チップの外側についた液体を除きます
6. 操作ボタンを第二ストップまで押して、目的のウェルに液体を分注します
7. チップを外して廃棄します

2.1.3 リバースピペッティング

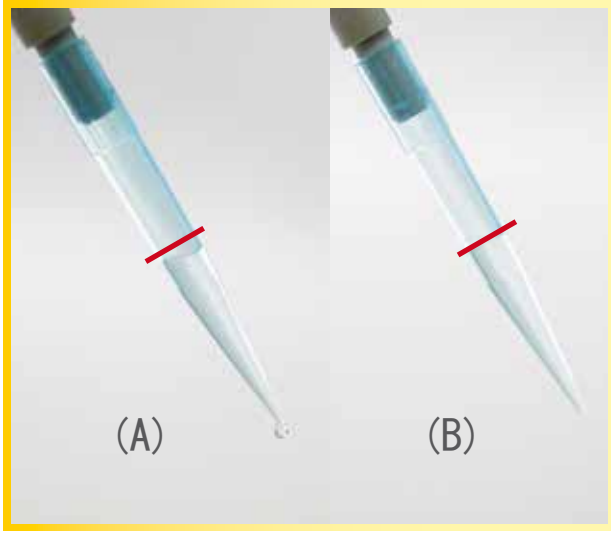
1. マイクロピペットに新しいチップを装着し、しっかりとはまっていることを確認する
2. 操作ボタンを第二ストップまで押す
3. 液の表面から約1cmの深さにチップの先を入れます。操作ボタンをゆっくり離し、元の位置に戻し、目的の量の液体が吸引されるのを待ちます。チップ内に気泡や泡がないことを確認します
4. チップの外側についた液体を除きます
5. 操作ボタンを第一ストップまで押して、目的のウェルに液体を分注します。チップの外側に液が残っていないことを確認します
6. 続けてピペッティングする場合は、操作ボタンを第一ストップで押した状態から3-5のステップを繰り返します
7. チップを外して廃棄します

2.1.4 有機溶媒のピペッティング

有機溶媒は、ピペッティングの精度に影響を与える高い蒸気圧を持っています。その為、空気での押し出しを利用したマイクロピペットでは、有機溶媒は揮散したり、チップ先端からの流出(Fig.6)を生じたりします。有機溶媒をピペッティングされる場合は以下のものを推奨します。

1. 正方向へ変位するマルチステッププピペット
2. 大きな試料量については目盛のついているセロロジカルピペット
3. ボトルトッププディスペンサー
4. 有機溶媒専用ピペット

Fig. 6: 空気移動式ピペットでの有機溶媒のピペッティングでは、特に蒸発の防止や(A)のようにチップからの流出に注意してください。ピペットを分注する前にその液体でフラッシュされると正確に分注されます(B).



シングルチャンネルピペットで有機溶媒を分注される場合は、目的の量を分注する前にピペットチップとピペット内の空気中が有機溶媒の蒸気で飽和されていることが必要です。そのためには、その有機溶媒を分注前に最低3回吸引、分注を繰り返します。

この方法の正当性は、適切なQC手順で確認してください。

2.2 試料の取扱い

2.2.1 未調製試料の保存

試料の汚染は、測定結果に大きな影響を与えますので、汚染の可能性や損傷がある場合は、その試料は使用せず、新しいものを入手してください。試料は、測定キットの取扱説明書や科学的知見に従って保存してください。
一般的に、試料は、できるだけ迅速に調製し測定するべきです。保存を避けることができない場合は、最適な保存条件を調べ、できるだけ早く測定してください。試料はすべて正確なラベルを付け、蒸発や乾燥を防ぐため密閉してください。
不適切な保存条件では、後の測定に影響を及ぼし、測定結果を変えてしまう恐れがあります。

2.2.2 試料採取

代表試料の採取は重要なステップです。代表試料の採取方法については、法令で定められているものもあります(例：マイコトキシン類)ので、それに忠実に従ってください。
規則がない場合は、試料はできるだけ均一になるようにしてください。また前もって試料の最低必要量を指示しておいてください。
試験結果の報告書には、送られてきた試料に対する結果であることを明記しておいてください。

2.2.3 試料調製

試料の調製法については、測定キットに添付されている取扱説明書(使用説明書)に従ってください。
変更や改変したりすると不正確な試験結果になることがあります。試料の調製には、適切で整備された機器を使用してください。ご不明の点があればアヅマックス㈱にお問い合わせください。
測定される項目によっては、取扱説明書に後で測定するため調製後の試料の保存について記載されています。
この取扱説明書の記載に従って頂くか又は、測定前に試料を直接調製してください。

2.2.4 凍結保存試料

使用前には、試料は完全に解凍する必要があります。凍結試料の解凍は、測定成分の安定性により４℃又は室温で行います。未調製の非液体試料については、取扱説明書で試料調製法や均一化について参照してください。
液体試料については、測定する前に完全に混合する必要があります。均一化するには、注意してVortexするか、倒立混合します。泡の発生や強い撹拌は、タンパク質を変性させることがありますので避けてください。
液体試料によっては(例：ミルクなど)、更なる試料調製が必要な場合がありますので、取扱説明書を参照してください。
試料によっては、凍結や解凍により結晶化したり凝集したりするものもあります。
試料の整合性や測定結果を改変する恐れがあるので、できるだけ凍結解凍の繰り返しは避けてください。
できれば、凍結解凍を繰り返さないため試料を-20℃で保存する前に小分けしておいてください。

2.2.5 認証済標準物質(CRM)

認証済標準物質(CRM)は、天然に汚染された均一なマトリクスでその目的成分の濃度は、正確かつ信頼性のある定量が行われています(Fig.7.)。
内部の品質管理のため、この認証済標準物質を定期的に利用されることをお薦めします。
これにより測定手順の正確さと精度や測定技術の熟練度をチェックすることができます。
参照物質がない場合は、既知濃度の目的成分をスパイクしたマトリクスを利用してください。

認証済標準物質やスパイク溶液については、
アヅマックス㈱にお問い合わせください。

Fig.7 認証済標準物質(CRM)と標準液は、QCのための必需品です。

2.3 キットの準備と取扱い

2.3.1 キットの保存

キットの外箱に表示されている使用期限日は、キットに含まれているすべての試薬に適用され、最初の使用後も有効です。
使用期限を保持するためには、外箱に記載されているキットの保存条件を遵守してください(Fig.8.)。
大部分のキットは、4℃の乾燥した場所では保存する必要があります。
キットの凍結は、避けてください。
冷蔵庫で保存される場合は、凍結を防ぐため冷蔵庫の内壁からは離しておいてください。
適切に保存されなかったキットや内容物は劣化している場合があります。
冷凍された場合は、性能が劣化したり、不正確な結果をもたらしたり、最悪の場合は機能しないことがあります。
保存が不適切だった場合は、光学的密度が減少したり、検出されなかったりして測定結果が変わってしまいます。

Fig. 8:キットの保存条件と使用期限日は、各ELISAテストキットの外箱のラベルに表示されています。

2.3.2 ファーストイン-ファーストアウト

キットの使用期限日は、キットの外箱のラベルに表示されており、この期限内であれば所定の性能を発揮します。
また、キットの個々の内容物にもキットと同じか又はよれより長い使用期限日を保有しています。

同一のキットを複数お持ちの場合は、ファーストイン-ファーストアウトの原則に従って使用してください。
この意味は、使用期限日の近いものから使用するということです。
この原則を崩さないため、キットの外側のラベルに使用開始日を記入されることをお薦めします。

ELISAキットの冷却／加温の繰り返しは、できるだけ少なくしてください。
試料をまとめられることを推奨します。多数の試料を１回で測定されることは１試料あたりの処理時間を短縮します。少数の試料を連続で測定されるより、１回で多数の試料を測定されることが望ましいです。
関連する制限事項については取扱説明書をご参照ください。

2.3.3 キットの使用温度

試薬類は、測定に使用する際には室温に戻しておく必要があります。キットからすべての内容物を取り出し、室温(20-25℃)になるまで待ちます。
大きなビンで容量が大きいものほど室温に到達するのに時間がかかります。
疑わしい場合は、必ず温度をチェックしてください(Fig.9.)。
使用後は、他のキットや他のロットと間違って混合しないように、キットの内容物をすべて元の箱に戻されることをお薦めします。
キットは、できるだけ早く指定された保存条件に戻してください(保存条件は、外箱のラベルに表示してあります)。

Fig. 9:キットを使用される前には、すべて室温に戻し20 - 25 ° C (68 - 77 ° F)で測定してください。

2.3.4 温度コントロール

ELISA測定は、温度の変化に対して影響を受けることがありますので、実験室の環境は一定に制御するようにしてください。このことは、光学測定中の温度にも適用されます。
ELISA測定は、20-25℃で実施し、急激な温度変化や蒸発の増加は避けてください。またELISA測定では、直射日光の照射や空調出口を避けてください。冷却実験機器やコールドベンチの近くも温度に影響があります。
実験台の上に適切な下敷きを敷き、その上にマイクロプレートを置くことが有効です。
最も簡単で安価な方法は、ペーパータオルを利用することです。

2.3.5 試料の汚染や取り違いを防ぐために

食品、飼料の測定では、清潔で、再現性のあるやり方が良好な結果を得るために重要です。
一般的に汚染の源となるものは、充分に洗浄されていない実験器具です。これを避けるためには、耐溶媒性のある使い捨ての実験器具を使用されることを強くお薦めします。それが利用できない場合は、実験器具は完全に滅菌され汚染のないようにしてください。
実験器具専用の自動洗浄機または同等のものを使用されることをお薦めします。汚染の程度を調べるためのQCブランク試料も使用してください。

試薬は、較正された機器、きれいなピペット、容器を使用して取扱ってください。必要な量の試薬だけを取り出すようにし、一旦取り出したものは、元の容器には戻さないでください。各々の試薬には、相互汚染を防ぐためそれぞれ異なる容器やピペットチップを用いてください。すべての容器には正しいラベリングをしてください(fig.10.)。
使い捨て実験器具は、必要なときに交換し、必ず使い捨てにしてください

Fig. 10:使用した容器に正しくラベルをし、記録を残してください

2.3.6 一般的操作法

測定を始める前に、測定キットに添付されている使用説明書をお読みください。使用説明書に従って必要な抽出溶液やバッファーを調製し、最適な結果を得るために記載されている手順に従ってください。測定を間断なく行うために、測定を始める前にピペッティングスキームを準備されていると有用です。

ELISAキットによっては、使用前に抗体やコンジュゲート溶液を希釈する必要がある場合があります。
このような希釈は使用する直前に行い、また保存はできません。汚染したり、適切に保存されていなかったコンジュゲート溶液は、酵素活性が低下したり、バックグラウンドシグナルを生起させることがあります。

最適な結果を得るためには、測定試料やコントロール試料(標準液、参照試料)は、同一の希釈液である必要があります。試料の前処理手順に確実に従ってこのことを確認してください。マイクロプレートへのピペッティングは、迅速かつ測定手順のすべてのステップで間断なく行うことが必要です。
試料の移送にはシングルチャンネルピペットを、プレ希釈プレートを使用している場合はマルチチャンネルピペットを推奨します。抗体や酵素溶液のピペッティングにはマルチステップピペットが最適です。

取扱い中は、ウェルのドライアウトは避けてください。

2.3.7 ピペッティングの時間割

ELISA測定において、標準液や試料のピペッティングは、一般的に最も時間がかかり、骨の折れるステップです。
ピッペット操作は、できるだけ一定に行い、かつピペット操作時間を最小にすることが肝要です。
特に最後の成分が添加され、反応が開始する場合は重要です(例：試料とコンジュゲートがすでに添加されている競合法ELISAで抗体を添加する場合)。最初のウェルから最後のウェルにかけてのいわゆる“光学的密度(OD)シフト”を避けるために、抗体、コンジュゲート、基質/発色剤、停止液などすべてのウェルに添加される成分については、マルチチャンネルやマルチステップピペッターを利用されることを推奨します。
しかし、間違ったウェルに添加するなどのミスをする場合があるので急いでのピペッティングはお薦めしません。

すべての試料を同じような方法で取り扱うことが重要です。
取扱説明書に記載されているピッペッティングの順序、インキュベーション時間を遵守してください。
すべてのウェルで最適な結果を得るためには、個々のウェルでのインキュベーション時間を同一にしなければなりません。

このためには、反応を開始させる成分(標準、試料、抗体溶液、コンジュゲート溶液)を最後のウェルにピペッティングしてからタイマーを開始させます。
基質/発色剤溶液については、最初のウェルにピペッティングする前にタイマーを開始します。
指定された時間後、基質/発色剤溶液が添加された同一の順序で停止液を加え基質/発色反応を停止させます。
インキュベーション時間は、取扱説明書に示された時間に合致することが非常に重要になります。

発色剤の活性は、光に対して影響を受けます。光から保護するために、褐色ビンに入れて出荷されます。
反応を停止される場合は、必ずキットに付属の停止液を使用してください。

2.3.8 正しい洗浄法

洗浄は、反応に影響を及ぼしたり、間違った結果をもたらすことのある結合しなかった成分をすべて除くために非常に重要です。洗浄には、取扱説明書で推奨されている洗浄バッファーを使用してください。
殆どのキットには、洗浄バッファーを調製するためのバッファー塩や溶液が付属されていますので、独自に試薬を秤量する手間を省いてくれています。
キットに付属される個々の洗浄バッファーの安定性や保存方法については、取扱説明書を参照してください。
他の成分と同様、洗浄バッファーも使用前には室温にしておく必要があります。
洗浄ステップの回数については、取扱説明書に記載されている推奨方法に従ってください。

インキュベーションステップが終わると、ウェル内の溶液を捨て、ウェル内の液体を完全に除くため、ペーパータオルの上で、マイクロプレートをひっくり返して叩いて水切りをします。
ペーパータオル上に、水滴の痕跡がつかなければウェル内から液体が除かれたことになります。
ELISAでは、洗浄ステップあたり１ウェルで250-300μLの洗浄バッファーが必要です。
洗浄バッファーを的確に加え、捨て、タップして水切りをします。
洗浄ステップは、3 - 5回繰り返します(取扱説明書参照)。
洗浄ステップでは、マニホルド付きのボトルトップディスペンサーのご利用をお薦めします(Fig.11)。

もし自動洗浄システムをご利用の場合は、製造元の取扱説明書に従ってご使用、サービス、メインテナンス、してください。装置には、液の流れを阻害する塩の析出がないこともご確認ください。
バッファー、チューブ類、マニホルド、洗浄ニードルなどは、微生物の汚染がないようにしてください。
汚染が疑われる場合は、マニュアルで洗浄ステップを行うか、製造元にお問い合わせください。

自動洗浄システムは、どのようなラボでも使用できるものではありませんので、洗浄ステップでは、それより安価で取り扱い易い8個又は12個のマニホルドのついたボトルトップディスペンサーのご使用を推奨します。
これ以外の洗浄ボトルなどのマニュアル洗浄では、すべてのウェルを同時に取り扱ったり、添加したりできません。

洗浄ステップは、迅速にかつ効率的、正確に行うことが必要です。
最初のウェルへの洗浄バッファーの添加から最後のウェルまでの時間は、出来る限り短くしてください。
このことがウェルが乾燥することなく、かつインキュベーション時間の差を最小にします。
迅速に作業しますが正確に行うことにも留意してください。
他のウェルへ液体が溢れることがないようにも注意してください。
疑わしい場合は洗浄ステップを追加してください。

Fig. 11:マニホルド付きボトルトップディスペンサープレート洗浄器は、正確で手頃な洗浄ステップのオプションです

2.3.9 未使用分のキットの保管

マイクロプレートは、乾燥剤と共に再密封可能なバッグに入れられて納入されます(Fig.12)。
ウェルのすべてが必要ではない場合には、残りのウェルはこのバックに戻して保管してください。
ウェルとマイクロプレートを乾燥剤と共にバックに入れ封をしてください。
すべての容器を閉じ、キャップはきつく締まっていること確認してください。
特に、標準溶液には、蒸気圧の高い有機溶媒が含まれていますので重要です。
すべてのキットの内容物を箱に戻して保管されることをお薦めします。
試薬は、すべて直立状態で記載された保管条件で保存します(Fig.13)。

Fig. 12:使用しないストリップは、乾燥剤と共に納入されてきた再密閉可能なバックに戻して保管してください

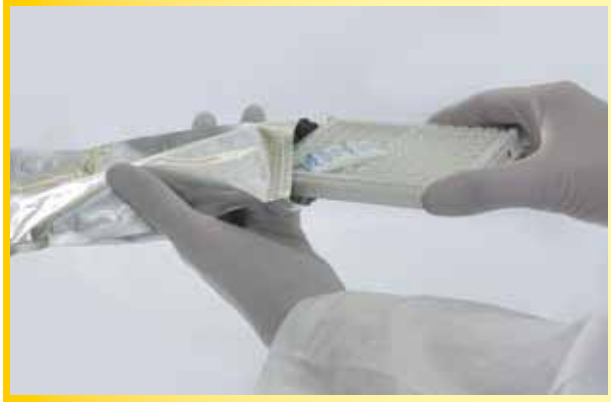


Fig. 13:次に使用するまでキットの試薬は元の箱に上向きで入れて保管してください

2.3.10 キット間、ロット間での試薬の融通

各ロットの試薬は、そのELISAキットが最適の性能を発揮するために調製されています。
これらの試薬を異なるロット間で使用することは、試験の性能を変化させますので、お止めください。
同じ製品でロットが同一の場合は、融通することは可能ですが、もとからキットに付属されていたものを使用されることをお薦めします。

2.3.11 安全性情報

ELISAキットには、有害物質が含まれる場合もあります。
物質に含まれている有害性情報については、各試薬のラベルの警告を留意し、適切なSDS(MSDS)を参照してください。
一般的に、キットの試薬の取扱には、通常の化学実験室での安全上の注意に従ってください。
測定を行う際には、実験手袋、実験着を着用し、飲食及び喫煙をせず、すべての試薬は、火気から遠ざけておいてください。
また廃液、廃棄については規則に従って適切に行ってください。

2.4 反応の停止とELISAの測定

ELISAでは、450nmの波長で測定されることが多いですが、正しい波長はキットに添付される取扱説明書の測定原理に記載されています。
測定操作の最後に、硫酸を含む停止液が各ウェルに添加されます。
酸は抗体を含むあらゆるタンパク質を変性させるので反応を停止します(Fig.14)。
停止液の添加後、直ちにマイクロプレートの測定をするようにと推奨されていますが、少なくとも取扱説明書に記載されている時間内に測定してください。
遅れた場合は、吸光度の値が変動している恐れがあります。

Fig. 14:停止液を添加すると青色から黄色に変色します

2.5 複数のELISAの平行測定

複数のELISAを平行して測定される場合は、特別に注意が必要です。
マイクロプレートや試薬のラベルが正しく、間違いやアッセイ間での試薬の取り違いのないようにしておいてください。タイマーは、個々のマイクロプレート毎に使用して下さい(Fig.15)。
異なるアッセイで、操作が重複しないように注意してください：例：ひとつのマイクロプレートが洗浄ステップの時に、もうひとつが反応を停止しないといけない。
複数の測定を始める前に、ピペット操作、洗浄、OD測定などの作業のスケジュールを調整してください。

ChemWell(Awareness Tech)やGemini(Stratec Biomedical)などの生化学自動分析装置を利用して複数のELISAの自動測定も可能です。詳細についてはお問い合わせください。

Fig. 15:複数のELISAの平行測定では、注意してスケジュールし実行する必要があります

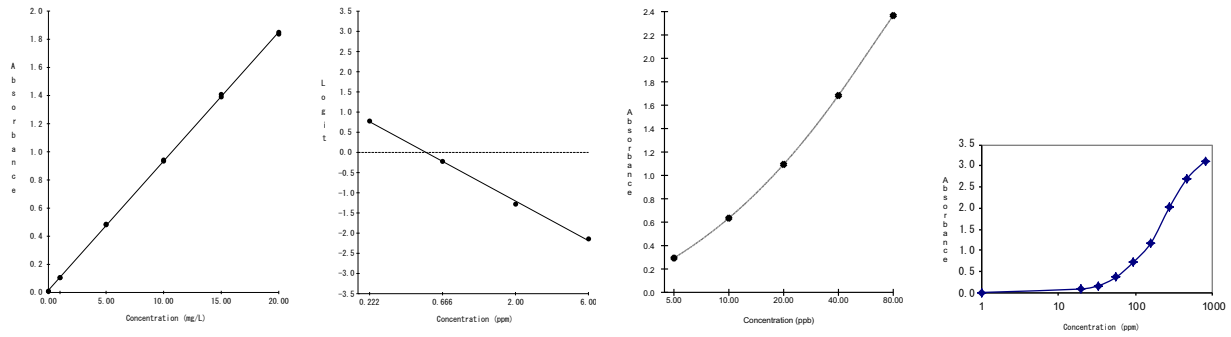
❸ データ処理と結果の解釈

3.1 検量線による未知試料の定量

未知試料中の目的成分の濃度は、濃度が既知の目的成分の標準液のシグナル強度と測定試料のシグナル強度を比較して求めることができます。
ELISA測定では、測定対象の濃度範囲をカバーする5-7点の標準で検量線が作成されます。
標準1点で提供された検量線を補正する単一検量線法(SC)を使用するELISAもあります。

3.2 検量線の求め方

アッセイによっては、検量線は異なる近似法で計算されます：
直線近似、logit-log、3次スプライン関数、4-パラメータ2次多項式(Fig. 16)



	直線近似	Logit-log	3次スプライン関数	4-パラメータ2次多項式
X-axis	Concentration	Concentration (logarithmic)	Concentration (logarithmic)	Concentration (logarithmic)
Y-axis	OD	Logit of concentration	B/B0 in %	OD
	変数yと変数xの関係は直線です。簡単な直線近似式は次の関数になります： y = mx + b	Logit-logは、直線近似モデルで解析をするため、曲線のプロットを直線にします。	3次スプライン関数は、3次の多項式を用いた部分補間の数式で各点(ノット)をスムーズに接続します。	4-パラメータは、次の４つのパラメータによる非線形近似式です: ・ 下方漸近線 ・ 上方漸近線 ・ EC50(中間点) ・ EC50におけるスロープパラメータ

Fig. 16: 検量線の近似法の種類

3.3 ELISA サンドイッチ法、競合法の検量線

それぞれのELISAに対する正しいアルゴリズムは、試験成績書(COA)に描かれていますが、RIDASOFT Win.netでは、Methodを選択するとプリセットされます。
ELISAのフォーマット(サンドイッチ法、競合法)により、検量線は異なります。

サンドイッチ法ELISAでは、標準の濃度は水平方向のx軸にプロットされ、OD値は、垂直のy軸にプロットされます。
B/Bmaxの%値が垂直のy軸にプロットされる場合もあります。
B/Bmaxの計算は、最も濃度の高い標準が100%にセットされ、それ以外の標準のB/Bmaxは、それぞれの標準の吸光度を最も高い標準の吸光度で除して計算されます。結果に%値にするための100が乗じられます(Fig.17)。

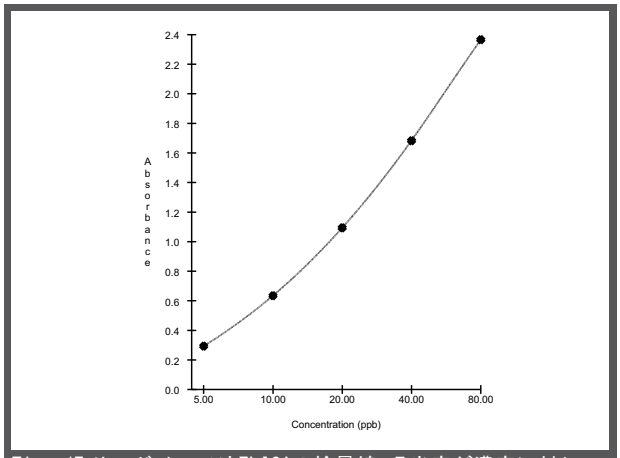


Fig. 17:サンドイッチ法ELISAの検量線 吸光度が濃度に対してプロットされます

競合法ELISAでは、標準の濃度は水平方向のx軸にプロットされ、一方B/B0の%値が垂直のy軸にプロットされます。
B/B0の計算は、目的成分を含まない標準1が100%にセットされ、それ以外の標準のB/B0は、それぞれの標準の吸光度を標準1の吸光度で除して計算されます。結果に%値にするための100が乗じられます(Fig.18)。

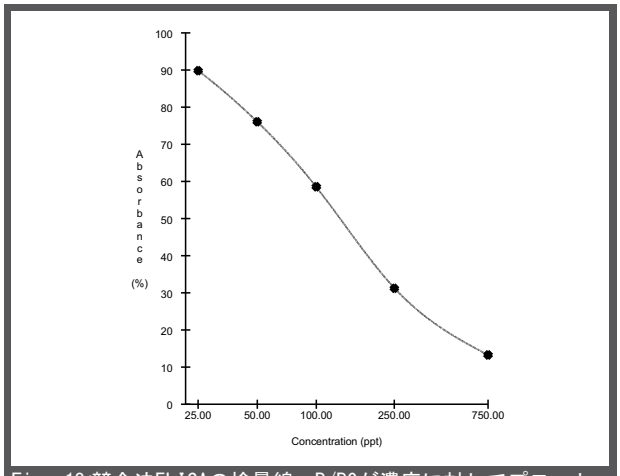
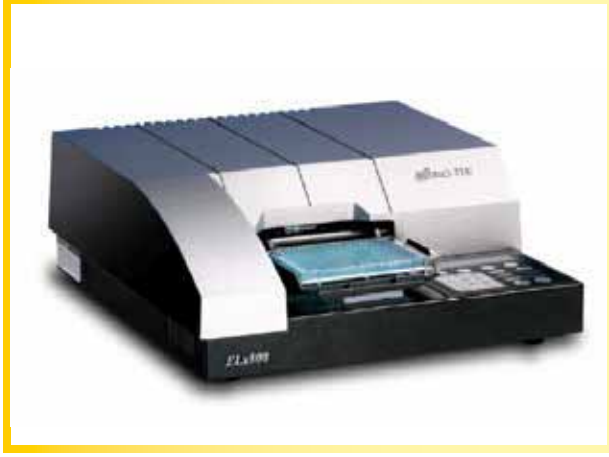


Fig. 18:競合法ELISAの検量線 B/B0が濃度に対してプロットされます

3.4 分光光度計とソフトウェア

OD値は、特定の波長でプレートリーダー(分光光度計)により測定されます。
様々なメーカーのプレートリーダー(分光光度計)が上市されています。
R-Biopharm社では、プレートリーダー(分光光度計)とRIDASOFT Win.netというR-Biopharm社のELISA測定キットに特化したソフトウェアを提供しています(Fig.19,20)。
ソフトウェアの使用法については、取扱説明書(Art.No.R9996)が準備されています。
すでにプレートリーダー(分光光度計)をお持ちの場合は、ソフトウェアとアッセイに対応可能かどうかご遠慮無くお問い合わせください。

Fig. 19:Biotek ELx800 プレートリーダー(分光光度計)



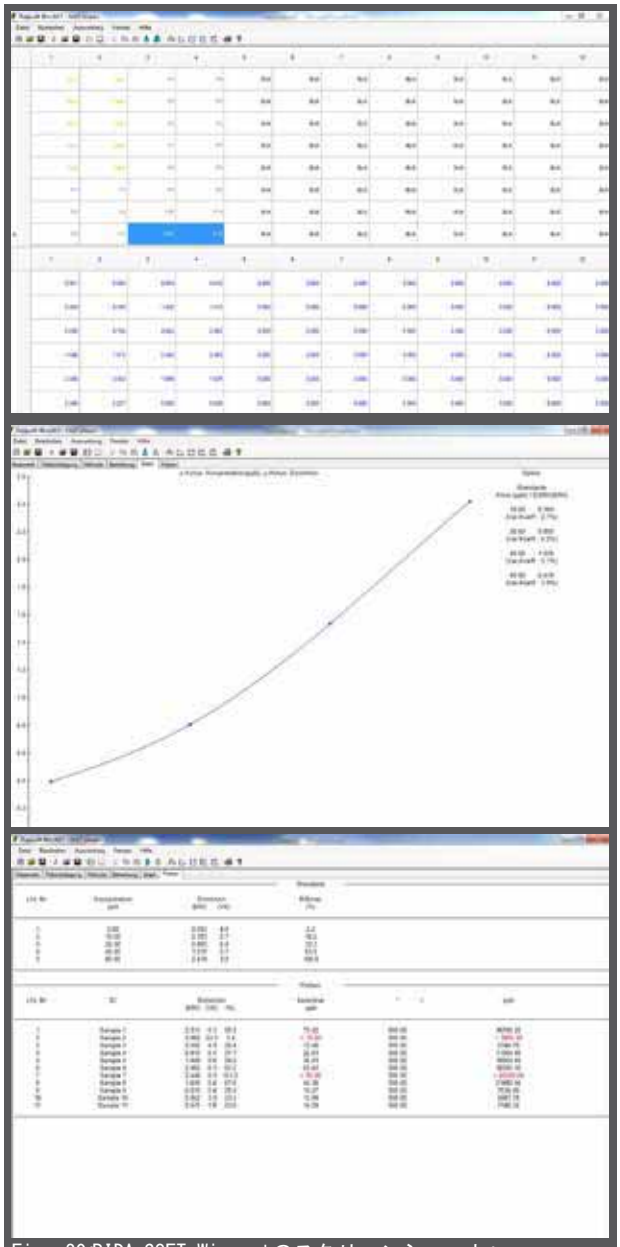


Fig. 20:RIDA®SOFT Win.netのスクリーンショット:
プレートレイアウト、検量線、測定結果

3.5 目的成分の濃度の求め方

ソフトウェアでは、検量線が作成されFig.21に示すように未知試料の目的成分の濃度が計算されます。
測定範囲外では、濃度は計算されません。

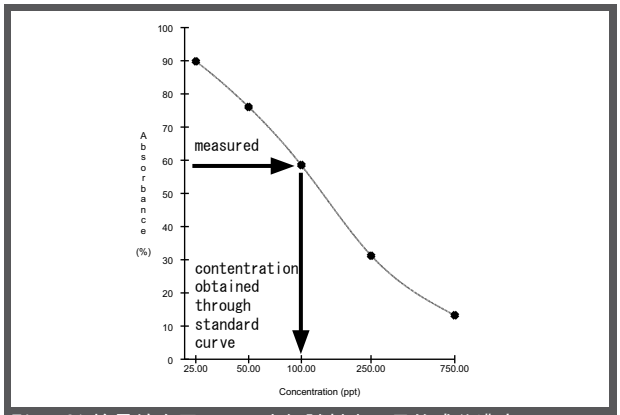


Fig. 21:検量線を用いての未知試料中の目的成分濃度の求め方

3.6 測定範囲と希釈係数

測定された吸光度やB/B0値が検量線範囲より低い又は高い時、RIDASOFT.Win.netでは標準濃度の“<”(以下)又は”>”(以上)の結果を表示します。
ソフトウェア上で濃度を外挿するオプションもありますが、それらの外挿された濃度は一般的に推定値であり信頼性に欠けています。
また、測定値が標準値の最小値または最大値から離れていればいるほど計算された濃度の不確実性は大きくなります。
最大の標準値を超えた試料については、検量線の濃度範囲に収まるように希釈し、再度測定されることをお薦めします。
ELISAの測定範囲は、標準の濃度と試料調製時の希釈率により決定されます。
例えば、ミルク試料が、ウェルに分注前に4倍(1+3)に希釈された場合は、希釈係数は、4になります。
このことは、試料中の目的成分の濃度を正しく求めるためには、検量線から読み取った値に4を掛けることを意味します。
蒸発やクリーンアップカラムなどの前処理で2倍に濃縮された試料についての希釈係数は0.5となります。
このことは、試料中の目的成分の濃度を正しく求めるためには、検量線から読み取った値に0.5を掛けることを意味します(Fig.22,23)。

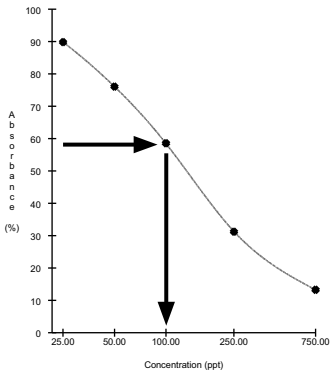


Fig. 22:ミルク試料が、ウェルに分注前に4倍(1+3)に希釈された場合は、希釈係数は、4になりますので正しい濃度を得るためには得られた結果を４倍します：
試料中の濃度 100ng/kg x 4 = 400ng/kg

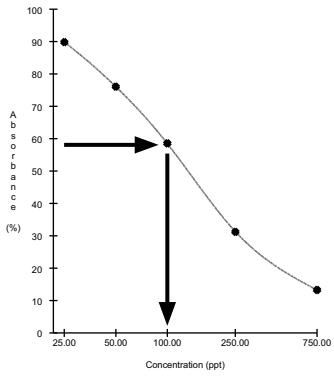


Fig. 23:食肉試料は、前処理で2倍に濃縮されたので、正しい濃度を得るためには得られた結果を0.5倍します：
試料中の濃度 100ng/kg x 0.5 = 50ng/kg

3.7 単位と記号

濃度は、SI単位で表示されていない場合があり、
”part per”で表記される次元のない様々の量も
使用されています(Fig.24)。
SI単位のご使用を推奨します。

SI-units	decimal	parts per	symbol
g/kg	10^{-3}	parts per mille	‰
mg/kg	10^{-6}	parts per million	ppm
µg/kg	10^{-9}	parts per billion	ppb
ng/kg	10^{-12}	parts per trillion	ppt
pg/kg	10^{-15}	parts per quadrillion	ppq

Fig. 24:SI単位と”part per”で表記される次元のない量

3.8 検出限界と定量下限

検出限界(LOD)は、ブランク試料の値とは明らかに区別される目的成分の最小濃度です。
LODは、最低20回のブランク試料の測定から実験的に次の式から計算され求められます：ブランク試料の平均濃度＋ブランク試料濃度の標準偏差の3倍

定量下限(LOQ)は、定量的に検出される目的成分の最小濃度です。LOQは、最低20回のブランク試料の測定から実験的に次の式から計算され求められます：ブランク試料の平均濃度＋ブランク試料濃度の標準偏差の9倍(通常)

この数値は、標準を試料に添加されて、貴社の試験装置で実証されることをお薦めします。

LOD以下の結果は、試料には目的成分が含まれていないかLOD以下の濃度であることを示します。

LOD以上でLOQ以下の結果は、定性的な結果(有無)のみを示します。
このことは、試料には目的成分は含まれているが、LOQ以下なので正確な量は定量できないことを意味しています。

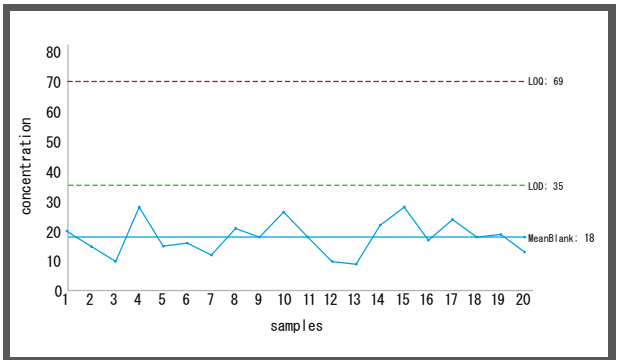


Fig. 25:ブランク試料が20回測定され、ブランク試料の平均値
= 18 ng/kg 、標準偏差 5,7 ng/kgが得られたので
LOD = 18 ng/kg + 3 x 5,7 ng/kg = 35 ng/kg
LOQ = 18 ng/kg + 9 x 5,7 ng/kg = 69 ng/kg

3.9 正確性と回収率(リカバリ)

正確性とは、試験結果で得られた値と承認された参照値との近さを意味します。正確性は、認証参照物質(CRM)によってのみ得られます。正確性は、CRMの測定濃度値を、CRMの表示濃度値で割り算して求められます。
得られた結果に100を掛けて%単位で表示されます。両者の絶対差は、”バイアス”と呼ばれます。

CRMが利用できない場合には、例えば食品中の動物由来の抗生物質など、正確性に代わって回収率が求められます。
回収率は、前処理の前に標準をスパイクされた試料を測定して実験的に求められます。
回収率は、スパイクされた試料の測定濃度値をスパイク
濃度で割り算して求められます。

得られた結果に100を掛けて%単位で表示されます。
試料の表面へのスパイクは、天然に汚染している試料とは状態が異なりますのでスパイク濃度と天然のものとは、若干異なる場合があることに留意してください。

取扱説明書に掲載されている回収率や正確性は測定試料の平均を表しています。

個々の試料の回収率は、キットの精度により変わることがあります。
試料が検量線のやや水平なところで測定された場合、その精度は、ODやB/B0の小さな変化が濃度を大きく変えるので特に高濃度域で低くなります(Fig.26)。

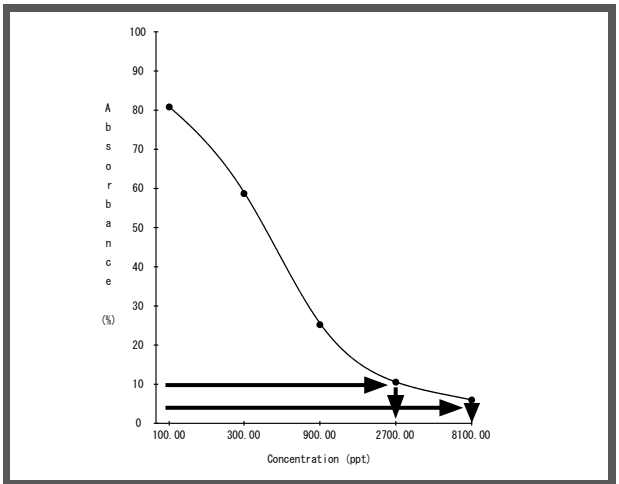


Fig. 26:検量線が水平な領域では、B/B0の小さな違いでも濃度には大きな違いを生じます:5%のB/B0では、10%のB/B0時の3倍の濃度になります。

3.10 特異性と交差反応

抗体は、特定の成分に対して非常に特異的ですが、他の分子に対して異なるアフィニティーで結合する場合もあります。

特異性や交差反応は目的成分や交差反応物質の最適な範囲での検量線の測定から求められます(Fig.27)。
目的成分や交差反応物質の50%値を計算すると特異性や交差反応は以下のように計算されます。

$$\text{特異性　又は　交差反応} = \left(\frac{\text{50 \%-dose 目的成分　又は　交差反応物質}}{\text{50 \%-dose　標準物質}} \right) \times 100\ \%$$

抗体の結合が測定対象の物質に関わっているのであれば、これはこの測定の特異性と呼ばれます。
その結合が測定対象ではなく、望ましくない物質に関連していれば、交差反応と呼ばれます。

第1例: ELISAの目的には、ミルク中のアフラトキシンM1を定量するために開発されましたと記述されています。
それ故、アフラトキシンM1に対する特異性は100%です。さらに、アフラトキシンM2に対する交差反応が10%ありますとも記載されています。

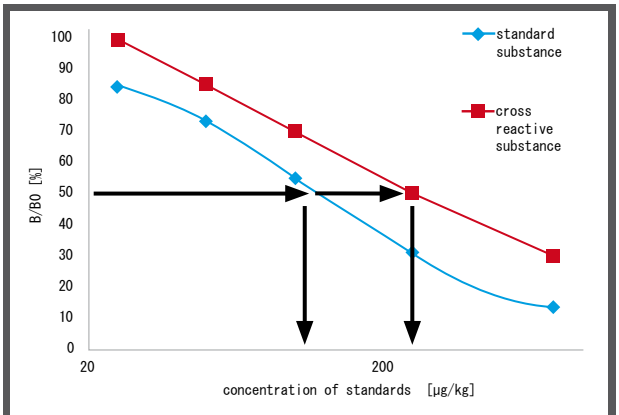


Fig. 27:検量線から標準物質(青色)の50%-dose(170 µg/kg)は、交差反応物質(赤色)の50%-dose(210 µg/kg)より感度が高いです。
交差反応物質の交差反応は次の式になります。

(170 µg/kg / 210 µg/kg) x 100 % = 81 %

ELISAの測定原理から、抗体はアフラトキシンM1に対する特異性とアフラトキシンM2に対する交差反応の区別ができません。
未知試料に両方が存在する場合は、結果は両方の物質の合計になります。
しかし、10%という低い交差反応性のため、アフラトキシンM1と同様のシグナル強度を得るためには10倍(M1と比べて)のアフラトキシンM2濃度が必要になります。
正確な定量は、試料中に１つの目的成分又は１つの交差反応物質が存在するときのみ可能です。

この場合、濃度は以下の式で計算されます。

$$\text{目的成分　又は　交差反応物質の濃度} = \frac{\dfrac{\text{測定された濃度}}{\text{特異性又は物質の交差反応　\%}}}{100\ \%}$$

第2例:テトラサイクリンELISAには、このキットは様々なマトリクスでのテトラサイクリン、クロロテトラサイクリン、ロリテトラサイクリン、デメクロサイクリンに特異的と記載されています。
標準物質は、テトラサイクリンで特異性は100%です。
ミルク試料に含まれるクロロテトラサイクリンの測定では10ug/Lの結果が得られましたが、このシステムでのクロロテトラサイクリンの特異性は70%ですので、ミルク中のクロロテトラサイクリンの濃度は14ug/Lと計算されます。

ELISAは、スクリーニングにも使用されます。陽性の結果や規定した以上の濃度は、LC-MS/MSなどの公定法により検証する必要があります。

マトリクスが未知の場合や測定対象に含まれていない新たな成分の場合には、検出下限(LOD)やその特定の試料マトリクスでの対象成分の回収率を確認する必要があります。
特異性や交差反応は、実験的にバッファー系でのみ測定されたものであることに注意してください。
というのは、すべてのマトリクスですべての成分や交差反応物質の特異性や交差反応を求めるのは非常に時間と労力が必要とされるからです。

3.11 干渉とマトリクス効果

一般的に、食品や飼料は、その複雑な成分で最も困難な試料マトリクスと考えられています。
例えば、蜂蜜は、その天然の成分(炭水化物、タンパク質、水)に加えて、重金属、放射性同位元素、有機汚染物質、農薬、病原性のバクテリア及びその毒素、遺伝子組換生物などの多数の環境汚染物質を含有している可能性があります。

試料中の天然成分や不純物が試料の前処理やELISA測定に使用される試薬に干渉することを防ぐことができないので、結果として”マトリクス効果”という現象を生じます。

R-Biopharm AG

アヅマックス株式会社
東京営業所
〒103-0025
東京都中央区日本橋茅場町3-2-10鉄鋼会館5F
Tel: 03-6661-1090　FAX: 03-6661-1091
E-mail: sales@azmax.co.jp
URL: www.azmax.co.jp

07/2015