ELISA 法（酵素免疫測定法）について

お問合せ・ご注文はこちらへ

営業２グループ

〒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

アヅマックス株式会社

ELISA（酵素免疫測定）法について

ELISA 法の原理

ELISA とは Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay の略で、酵素免疫測定法とも呼ばれている検査法（原理）です。臨床診断の分野では、もっとも幅広くまた数多く用いられており、昨今注目を浴びている PCR 法や DNA チップによる検査よりも長い歴史と数多くの実績を有する、信頼性の高い確立した技術に基づく検査法です。海外では約 20 年ほど前からこれらの検査技術を食品衛生や環境の検査に用いるべく応用研究がなされ、多くが製品化されてきました。

さて、ELISA 法は酵素免疫測定法の名からも判るとおり、免疫反応すなわち抗原抗体反応と酵素基質反応、二つの原理反応が組み合わされています。

<u>抗原抗体反応：検出対象物質の捕捉</u>

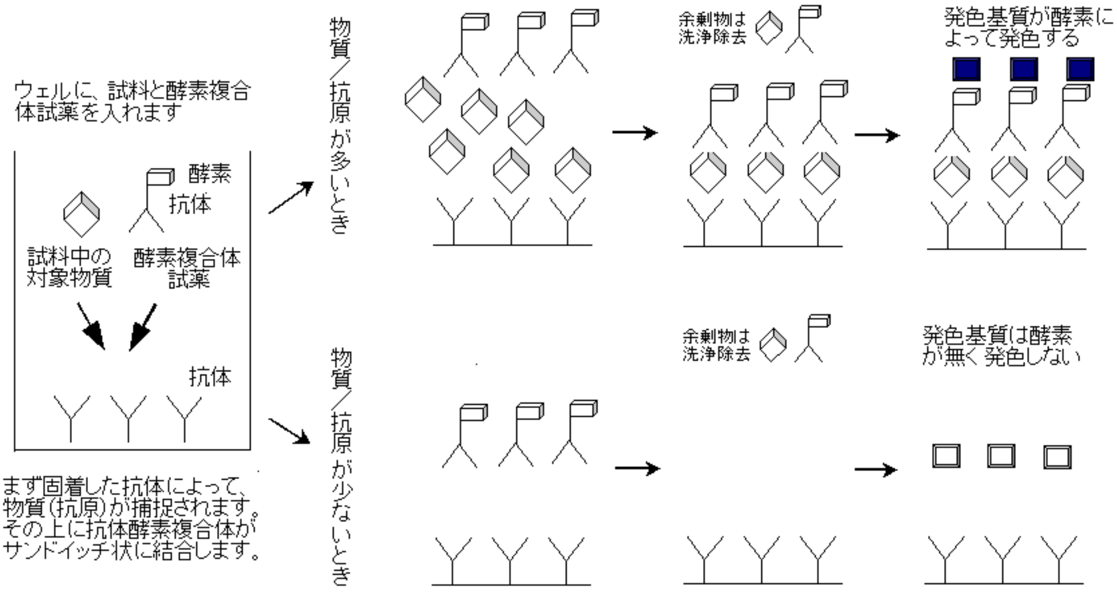
生体内に細菌・毒素、異種タンパクや化合物などいわゆる異物がはいると、生体内の免疫システムにより、その異物（抗原）にのみ特異的に作用、捕捉するタンパク（抗体）が産生されます。ELISA 法ではまず、あらかじめ検出したい異物（抗原）に対する特異抗体をマウスやウサギなどを利用して作製します。そしてこの抗体をマイクロプレートやチューブなどに固着させておいたものが、他の反応試薬とともにキット化されているわけです。

プレートやチューブに試料が滴下されると、この抗体が ELISA 法の第 1 のステップである抗原の捕捉を行います。ELISA 法が、一般的に粗抽出のみで高度な精製過程が無く、前処理操作が簡単である理由は、抗体が高度に選別捕捉する能力を元来持っているからだともいえます。また、その出来如何で目的物質をどの程度正確に反応・捕捉できるかが左右されます。

<u>酵素基質反応：発色</u>

さて、試料に抗原（検出対象物質）が含まれていたのか、あるいはどの程度だったのかは、ただ単に抗体が抗原を捕捉しただけでは測定のしようがありません。そこで酵素と発色基質（発色源液と基質液）による発色反応を利用します。すなわち酵素が多ければ濃い発色をし、少なければ薄い発色（ないしは無色）となるようにして、目視ないしは吸光度計などで比較できるようにするわけです。
そしてこの酵素の量をどのように上述の抗原抗体反応に関連づけるかには、次の 2 とおりがあります。
【サンドイッチ法】別に用意した抗体（液）にあらかじめ酵素を結合しておく方法。<u>抗体</u>酵素複合体
【競合法】検出対象物質と同じ物質（液）にあらかじめ酵素を結合しておく方法。<u>抗原</u>酵素複合体

サンドイッチ法の原理図　**（酵素は抗体との複合体）**



サンドイッチ法:

試料を加えて一定時間静置し、試料中の対象物質をプレートウェル（あるいはチューブですが、以下ウェルと表現します）内の抗体に捕捉させます。内容液を廃棄し、洗浄すると、ウェル内の壁面は、固着抗体とそれに捕捉された抗原だけになります。

そこへ、発色基質液を発色させる酵素をあらかじめ結合させた抗体すなわち抗体酵素複合体（酵素標識抗体）を加えると、再度、抗原抗体反応が起こり、結果的に壁面には、固着抗体＋抗原＋抗体酵素複合体のいわゆるサンドイッチ構造を構築することになります。もしここで、試料中に抗原が含まれていなかった場合には、抗体酵素複合体は捕捉すべき抗原がないのでサンドイッチを作らずフリーの状態になります。再度、内容液を廃棄し、洗浄すると、ウェル内には、未反応の酵素複合体はすべて除去されます。そして抗原があれば、固着抗体＋抗原＋抗体酵素複合体のサンドイッチ、なければ固着抗体のみの状態になります。すなわちウェル内にとどまる酵素の量に差が生じてきます。

その後、発色基質液を加えれば、酵素の量に応じて発色しますので、試料のなかに抗原があったか否か,どれくらいの量かといったことがわかります。

競合法:

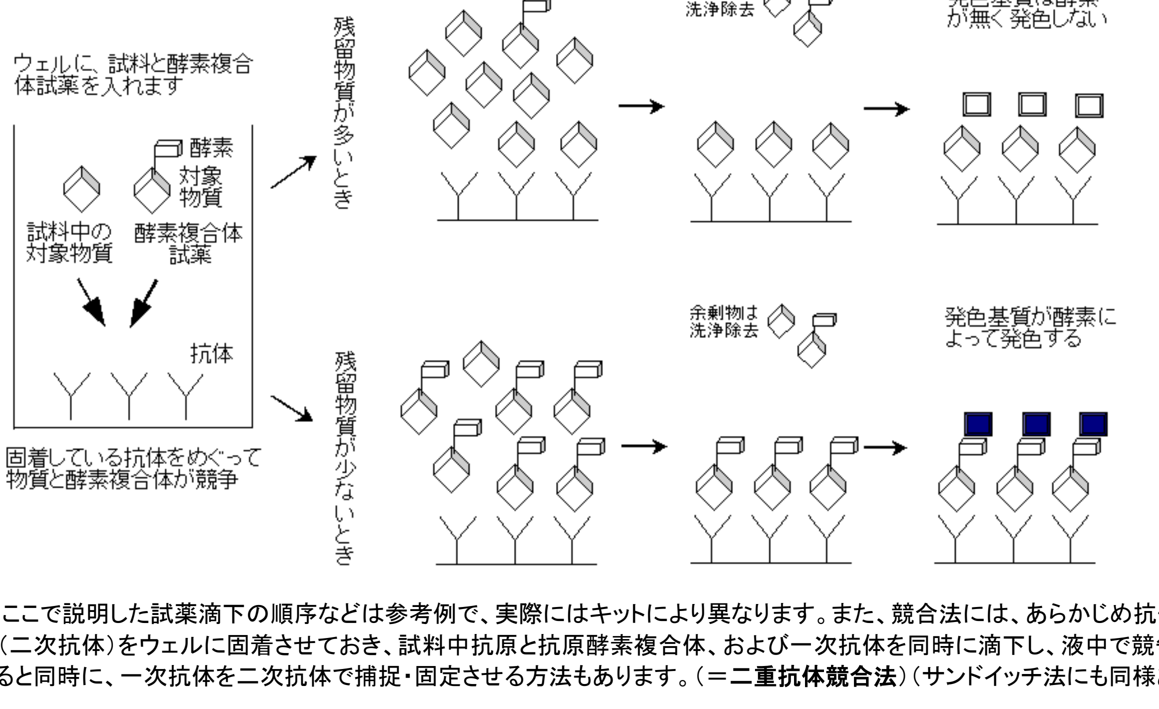
試料を加えて一定時間静置し、試料中の対象物質をウェル内の抗体に捕捉させます。内容液を廃棄し、洗浄すると、ウェル内の壁面は、固着抗体とそれに捕捉された抗原だけになります。（ここまではサンドイッチ法と同じです。）

そこへ、発色基質液を発色させる酵素をあらかじめ結合させた一定濃度の抗原（抗体ではないことに留意）すなわち抗原酵素複合体（酵素標識抗原）を加えます。ここでも同じく、再度抗原抗体反応が起こる可能性があります。しかし、試料中に抗原が多い場合には、先の反応で、ウェル内の壁面の固着抗体がすべて試料中の抗原を捕捉しており、あとで加えた抗原酵素複合体を捕捉する余裕がありませんので、抗原酵素複合体はフリーの状態になります。逆に、試料中に抗原がなければ、固着抗体は抗原酵素複合体を捕捉することができます。試料中の抗原と抗原酵素複合体が固着抗体に対して結合競争をしているわけです。

再度、内容液を廃棄し、洗浄すると、ウェル内の未反応の酵素複合体はすべて除去されます。そして抗原が（多く）あれば、固着抗体＋抗原、なければ（少なければ）固着抗体＋抗原酵素複合体の状態になります。すなわちウェル内にとどまる酵素の量に差が生じてきます。

その後、発色基質液を加えれば、酵素の量に応じて発色しますので、試料のなかに抗原があったか否か,どれくらいの量かといったことがわかります。ただし、発色程度は、サンドイッチ法と反対で、試料中の検出対象物質（抗原）が多い（＝高濃度）であれば色は薄く（無色）、少なければ（＝低濃度）色は濃くなります。

競合法の原理図（酵素は抗原（一定濃度の対象物質）との複合体）



註：ここで説明した試薬滴下の順序などは参考例で、実際にはキットにより異なります。また、競合法には、あらかじめ抗体に対する抗体（二次抗体）をウェルに固着させておき、試料中抗原と抗原酵素複合体、および一次抗体を同時に滴下し、液中で競争的に結合させると同時に、一次抗体を二次抗体で捕捉・固定させる方法もあります。（＝**二重抗体競合法**）（サンドイッチ法にも同様あり）

ELISA 法のメリット

ELISA 法には他の検査法と比較して一般的に次のような特長があります。

前処理が簡単

原理の項でも述べましたが、ELISA 法では検出したい物質を抗体で特異的・選択的に捕捉しますので、いわゆる粗抽出のみで検査を行えます。多段階精製といった多数の複雑なステップを踏む必要はありません。微量化学物質（かび毒など自然毒物も含む）でもほとんどの場合、水やリン酸バッファー、メタノール等で抽出を行えますので、有機溶媒を使用する量・ケースも極端に減少します。後述しますが、脂肪分やまれに使用する有機溶媒など極端な反応阻害物質を除いて pH 調製をするだけです。

微生物キットの場合でもおおむね前培養液を直接、試料とするだけです。

この前処理の容易さが、トータルな意味でのテストの正確さと時間短縮をもたらしているといえます。

短時間で大量処理

キットによりますがおおむね、２～３時間程度で検査が終了します。（微生物の場合の前培養を除く）最近では、定量まで 15 分程度というタイプ（RIDA スクリーン FAST シリーズ）が登場するなど操作時間はますます短縮される傾向にあります。

プレートにはテスト用ウェルが 96 個（あるいは 48 個）整然と配置されていて、ピペットのみの操作により多数の検体を同時にステップ進行させていくことで効率よく検査していくことができます。旧来型の機器分析のように 1 検体ごとに操作を完結させることはありません。また、前処理こそ機器分析同様 1 検体ずつですが、上述のとおり簡潔なだけ、大幅な時間の短縮になります。

また微生物の検査においては、おおむね前培養のみでキット操作によるテストになりますので、分離培養や確認試験の２～３日を省略して、いち早くスクリーニング検査結果を得て迅速な経営判断に役立てることができます。

正確なスクリーニング定性試験と定量

ELISA 法には二つの利用方法があります。ひとつはスクリーニング定性試験で、ある閾値濃度を設けてそれ以上であれば陽性とするもの。もうひとつは定量検査で、濃度を測定するものです。

スクリーニング定性試験でよく問われるのは、偽陰性と偽陽性です。キット自体がもつ最高検出感度ぎりぎりのところに閾値を設定すると、様々な要因で誤って判断する恐れがありますので、通常はやや上方に設定することなどで、偽陰性（ないしは偽陽性）を極力へらすように設計しています。また統計的な観点からも十分に考察されています。しかしながら、抗体自身が持つ非特異反応などによる偽陽性は完全に排除できません。スクリーニングとしては十分ですが、陽性検体については別法での確認検査も重要です。

ELISA 法による定量検査では、必ず既知濃度の参照標準を同時にテストします。最終的に試料と参照標準の結果を比較換算して濃度を測定します。したがって、試料の前処理において反応阻害や増長要因をしっかりと除去したり、あらかじめ添加回収試験を行って検体の特性を把握すれば、機器分析と同等以上の精度で定量ができることになります。とかく機器分析だけがデジタルライクで精密なイメージがありますが、検出原理はどちらもアナログです。機器分析の場合、複雑な前処理工程がややもするとトータルな意味合いでの検査精度を落としかねません。無論、ここでも抗体の非特異反応は留意しなければなりませんが、交差反応などの表示で情報が記載されていますので、その点を熟知したうえで検査・解釈すれば満足のゆくデータがえられます。

メーカー側も常に最良の抗体を求めています。ユーザーさまもピペッティングなど操作に習熟していただくことでより高い検査精度が保てます。

手軽に導入（設備・人材）

ELISA 法で一般的に必要となる器具は、粗抽出用などのガラス器具類とキット操作に用いるマイクロピペット、吸光度測定用のフォトメーターなどです。精密分析機器のような、一台何百万、何千万といったものではなく、トータルでも数十万円で検査環境が整います。また、検査項目が増えても別のキットを購入するだけですので追加投資もありません。

また、前処理法なども簡単ですので、複雑な前処理や機器を操作するようないわゆる分析化学者や微生物検査の専門家といった人物をあらたに採用しなくとも十分に対応できますので気軽に導入できます。

ELISA 操作の注意点

キットの操作は添付されている取扱説明書原文や文書をよく確認してから行って下さい。予告無く仕様や操作方法などが変更されていたり、情報が追加されている場合があります。ここでは、ELISA 法キットを操作する上でご注意していただきたい一般的事項です。もちろん個々のキットに指示がある場合はそちらを優先して下さい。

マイクロピペット

反応のバラツキや予期し得ない結果の原因の多くはピペット操作にあります。まずは、もう一度ピペットの取扱説明書を再確認していただいて、正しくすばやく滴下できるように習熟して下さい。
よくある誤操作や誤解は以下のとおりです。

●異試薬間、異試料間でのチップの交換忘れ
●チップの取り違えや不適合品の使用、不完全な装着
●ピペット目盛セットの勘違い
●不完全な吸引（チップの不均一な液面深度や底面押付け、チップ内の残存泡沫、チップ表面の付着など）
●不完全な滴下（押し込み不足、ウェル壁面とのかい離、はみ出しなど）

なお、マイクロピペットには、通常のシングルタイプのほか、
マルチチャネルタイプ＝熊手状に 8 あるいは 12 個のチップを取り付け、多数ウェルに同時に滴下できる
リピートタイプ＝シリンジ状のチップを取り付け、一定の液量を多数ウェルに連続して滴下できる
などがあります。大幅に労力を削減するだけでなく、ウェル間時差も少なくして測定自体の精度も良くすることができます。極端に高額でもありませんので、ぜひ導入されることをお勧めします。

試料・試薬のコンタミ

使用した試薬ビンはすぐにフタをしてください。
試料間で異なるチップを使用することはもちろん、同一試薬の各ウェルへの滴下時にも、チップの先端でウェル内液に触れ別ウェルや試薬ビンへの移行がないよう注意してください。ピペットチップの交換を怠ると、試料や試薬（特に標準液、発色液と基質液）間でのコンタミネーションがおこります。発色液中に基質液が混入すると、酵素がなくても反応が進むケースもあり、着色劣化の原因となります。（発色液と基質があらかじめ混合調整済のものもあります。）

また、標準液は低濃度から順次扱うほうが、万一の場合でも影響は小さいようです。

異ロット試薬・プレート

異なるロット間での試薬やプレートウェル/チューブの相互融通はしないでください。大きな仕様の変更は無くても、調合が違う場合があり結果が不正になるおそれもあります。できるだけ同一パッケージ内での使用として下さい。同一ロットでも異なる条件下で保存されていたキット間の融通は避けて下さい。

時間差

反応のバラツキをもたらす大きな要因の一つは時間差です。特に短時間（15 分程度）の操作で定量するキットの場合には重要な要素になります。（タイマーを押すタイミングなどは別途ご確認ください。）ピペット操作に習熟していただくことと、操作中の妨げとなる要因をできるかぎり排除することが必要です。

そして各試薬を滴下する際の各ウェルの順番を変えないこと、手際よく次のウェルに移ることなどに注意して、各ウェルの反応時間ができるだけ同じ程度になるように工夫することが好結果に結びつきます。

また、２連で行う同一濃度標準液のウェルは、試料ウェルの前後に配置するなど、操作ミスが起きない範囲で工夫するとよいでしょう。

試薬温度

一般に試薬類は冷蔵保管されていますので操作前には室温（20～25℃）にまで戻してください。通常、冷蔵庫からとりだし、室温にさらしても約一時間以上はかかります。使用する前にはバイアルを手でもむようにして温度をチェックする習慣を身につけるのでもよいでしょう。

反応温度

いうまでもなく各反応は温度により大きく左右されます。単純に反応系が均衡して拡大/縮小するだけでなく、結果のバラツキをももたらしかねませんので、説明書記載の条件を厳守してください。キットにより異なりますが、室温インキュベートとなっている場合には、おおむね 20～25℃前後を指すようです。冬場など、ややもすると実験室が極端に寒くなっている場合もありますのでご注意下さい。

プレートウェルの配置と記録

各プレートのウェルの配置は面倒でも必ず事前に記録しておいてください。途中で操作ミスが発生した場合など、すばやく記録しその後の操作を落ち着いて続けることができます。

また取り外し式ストリップの場合にはストリップの片端にマーク余地がありますので、必ず記号をつけるようにします。洗浄の際など脱落してストリップがわからなくなるのを防げます。

プレートウェルの扱いと保管

ストリップウェルやチューブは必要数のみ、試験直前に袋から取り出して下さい（袋にいれたまま常温に戻します)。袋から取り出して必要以上に放置すると、吸湿して劣化の原因になったり、コンタミするおそれがあります。

取り出す場合には、ウェルやチューブの底面などには素手が触れないようにしてください。指紋や油脂などがつき、光学測定に影響を及ぼすおそれがあります。

使用しないウェルストリップはすぐホイルバッグに吸湿剤とともに戻し入れ、完全に密閉してください。

反応中プレート内の混合 振とう

各試薬の滴下後にはウェル内の液がよく混合されるようにしてください。手動によるか振とう器によるかは取扱説明書の指示に従いますが、特段指示がない場合には手動でよく混合し、その後は静置します。手動による混合の場合には、液がこぼれない範囲でできるだけよく回転させるようにします。プレート全体を微かに斜めにしてしっかり持ち、かつ地面と水平方向に円周運動させるとよいようです。机上で滑らせる場合にはつっかからないように注意してください。

反応中プレートの乾燥

反応中のプレートをエアコン風下などにおきますと、インキュベーション中に蒸発するなど悪影響がでます。プレートシーラーが添付されていなければ、ラップや紙などで風除けをして下さい。

また、洗浄後のプレートも空のままで放置せず、すぐに次の操作に移るようにして下さい。

洗浄

洗浄操作はとても重要です。洗浄液の各ウェル間のコンタミを心配するよりも、洗浄不足のほうにより大きな注意を払う必要があります。特に酵素複合体の洗浄不足は、全般的な発色増加につながりますので結果を著しく不正なものにします。

１ ステップの洗浄操作は通常３－６回の廃棄および洗浄液滴下の繰り返しです。各廃棄時には、吸水紙でプレート全体をつつみ、机に強く、さらに強く叩きつけるようにし、ウェル内に水滴が見えなくなるまで、内容液を完全に捨てきって下さい。また、持つ方向を逆にしたり横にしたりするなどして全ウェル満遍なく捨てきって下さい。

最初と最後の廃棄の際には、液切りをしっかり行うことも重要です。洗浄バッファーに Tween など界面活性剤が含まれている場合や粘性のある試料の場合など、液が残った状態で吸水紙とともに叩きつけるとコンタミが起こったり、ウェル内に泡が残りやすくなります。

最後の洗浄後にはウェル外底面やプレートフレームなども水滴がついていないことを確認してください。

発色反応（遮光）

発色液は光に敏感です。保管時はもちろん、インキュベート時も遮光していただくのがベターで、直射日光下では絶対に行わないで下さい。

反応停止

反応停止液は希塩酸や希硫酸溶液であることがほとんどです。お取扱には特に注意して下さい。

反応停止液を加えても完全に発色反応が停止するわけではありません。記載されている時間内に吸光度を測定してください。長時間放置すると全体的に同じ発色程度に収斂されていきます。

吸光度測定

まず、フォトメーターの扱いによく習熟しておいて下さい。また、テスト前に異常がないかチェックされておくことをお勧め致します。

ポータブルタイプが増えていますが､測定する場所は､周囲の光量が安定している場所を選んで下さい。窓際などは測定中に光量が変化しますし、自らの影などにも配慮してください。

フィルターの波長の種類を間違えないで下さい。全体的に吸光度に差がでない、発色が悪いなどの原因の多くがフィルター設定の間違いによるものです。

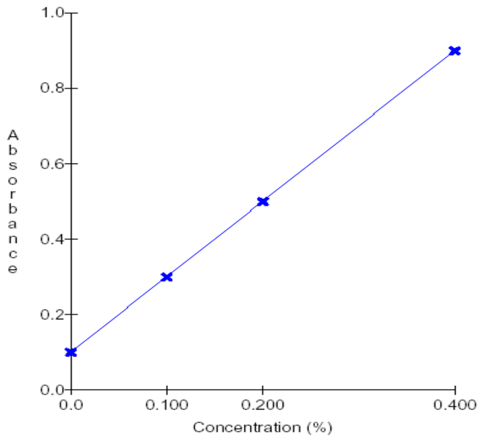
標準検量線（キャリブレーションカーブ/スタンダードカーブ）

標準液ウェルを用いた標準検量線は、たとえ同一日同一時間内であっても、必ず試験ごとに描きます。抗原抗体反応や酵素基質反応は、試薬・環境の温度や状態、操作時間のわずかな違いによっても影響をうけるため、試料ウェルと同時に試験して比較しない限り、正確な結果が得られないためです。

各標準液ウェルは、説明書に記載がなくても各濃度につき 2 つ以上で行い各々の平均値をとることをお勧めします。2 つのウェルを用いて試験測定しておけば、配置を工夫することで反応時間差を吸収することもできますし、操作ミスなどで同一標準の両ウェル間で差異が生じても、他の標準液の結果から推定し除外することができるかもしれません。また、不具合が考えられる場合などの重要な参考情報になります。もちろん試料側も同様に複数以上であることが望まれますが、目的やコストなどで適宜ご判断ください。

サンドイッチ法：

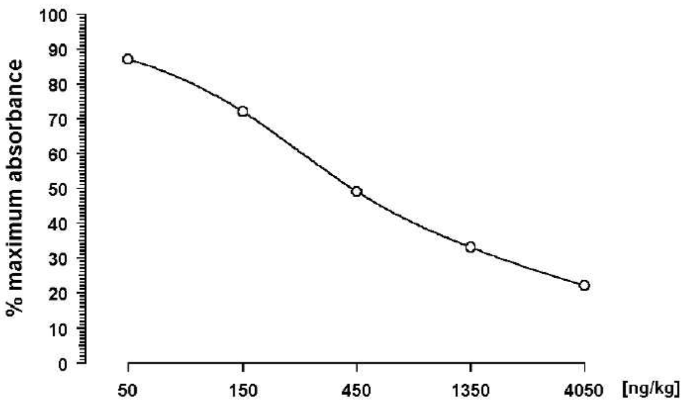
キットにより異なりますが、通常、普通の方眼紙すなわち両軸とも実数のグラフを用います。またたいていの場合、描かれる線は定量範囲内において右上がりの直線となります。



競合法：

キットにより異なりますが、通常、片方の軸が対数である片対数グラフを用います。横軸（対数軸）に濃度の対数をとり、縦軸（実数軸）に吸光度をとり、各測定値をプロットします。この場合、縦軸の吸光度は、測定値そのものではなく、%吸光度値（B/Bo%と示される場合もあり：ゼロ標準液（陰性コントロール）の吸光度値を 100%とした場合の各吸光度値の百分比率）をとることが一般的です。たいていの場合、描かれる線はゆるやかな逆 S 字（Z 字）のカーブとなります。直線となる場合もありますが、本来カーブとなる検量線のうち、直線部分だけが残るよう標準液の濃度範囲を限定している場合と考えられます。

また、最近では縦軸の%吸光度値を Logit 変換（{%吸光度値÷（100－%吸光度値）} の自然対数を縦軸にとる）してカーブを直線化する Logit-Log 式や、３次多項式などで検量曲線を描くことが求められているキットもありますが、別途お問合せいただくか、市販の計算/グラフソフトを適宜用いてください。



解釈のヒント

換算

まず標準検量線の妥当性を検証する必要があります。各標準液の測定値から求められた検量線式における相関係数は 0.98 程度以上を目安としてください。個々のプロットで著しく外れた値は、操作状況など原因が明らかな場合などは除外して修正することもできますが、試験目的や換算値への影響などから勘案し慎重に取り扱う必要があります。

そのほか、キットによっては、相関係数、陰性コントロールの吸光度値、同一試料/標準液測定値のばらつき（変動係数 CV%）、などが規定されている場合がありますので指示に従ってください。

ゼロ標準を除いた最低濃度の標準液の吸光度値は、ゼロ標準の吸光度値と有意差があることを確認してください（キットにより異なりますが、通常 10-15%程度）。ない場合には、試料中の非特異反応/吸着物質によるバックグラウンドや操作上のミスなどが考えられます。

競合法においては、50%吸光度値の濃度にも留意するとよいでしょう。キットの製造ロットごとに 50%吸光度値濃度が明示されている場合などは、計算で求められた 50%吸光度値濃度と比較し、大きくズレている（二、三割以上）場合には注意が必要かもしれません。また一般的に、50%吸光度値近辺の濃度での定量が高精度と言われており、定量換算を行う場合にも、このあたりで換算されるよう試料側を希釈することも良計です。定量範囲の上下限あたり、あるいはその外側での推定換算はできるだけ避けるべきです。

以上のことに留意していただいた上で、各試料の吸光度値・比率を検量線（式）にあてはめ、対応する濃度値を（横軸から）読み取ることで、当該試料値の濃度値を導き出します。

なお、標準液濃度は、試料調製における希釈係数を既に勘案して表示してあるものと、勘案されていないものとがあります。説明書をよく読み、取り扱ってください。

感度

キットにはそれぞれ検出限界がありますが、実際には説明書の記載より低い数値でも反応しています。原理的にはいろいろな解釈があり、たとえば陰性コントロールにおける測定値の平均プラス標準偏差 3 倍値の点を限界とするなどが一般的と思われます。しかし、市販のキットの多くでは、操作上の誤差を誤って解釈しないよう、ブランクの吸光度値と比較して 10-15%ポイントの違いがある点を限界とするケースも多いようです。定量範囲にいたっては、さらに有意差があるところに設定されているケースもあります。

交差反応

抗体はその性格上、認識部位として似たような構造（の部分）を持つ物質にもある特定の割合で反応します。検出対象を厳格に定義しそれ以外はできるだけ検出したくない場合には、その抗体の欠点として留意する必要があります。

反対にその特異性の低さを利用するケースも多くあります。ある物質が似たような構造部位を持つということは、対象の物質と同じような危害をもたらす可能性があります。そこで、特異性の低さを積極的に利用して、それら物質全体を包括的に捕捉・測定するわけです。（キットによってはいくつかの抗体をミックスする場合もあります。）このような場合、他の類似物質に対する反応度合は、中心的に検出する物質に対する反応に比べて常に一定の割合であり、その割合を交差反応（Cross Reactivity）といいます。そして、未知の試料の濃度を測定した際には、これら交差反応の可能性を常に意識する必要があります。たとえば A 用のキットが B に対しても 50%の交差反応があり、測定結果が 100ppb だったとします。この場合、A 以外に無いことが確定していれば A の濃度は 100ppb といいきれますが、不明の場合には、A が 0ppb で B が 200ppb だったり、A が 80ppb で B が 40ppb だった可能性もあります。

このようにテスト結果の解釈の際には、交差反応のデータにも十分ご配慮いただく必要があります。しかし大抵の場合、中心的に検出したい物質に照準をあわせたり、そうでない場合には一般的な検査ニーズにあうよう交差反応を意図的に調整したり、さまざまな工夫と努力がなされています。

精度管理

検査キットは各メーカーにより高度に精度管理がなされています。非常に数多くのキットがその製造国内外の公的機関より公定法として採用されていることからも証明されています。

たとえばプレート型定量検査用キットの場合、メーカー内でのキットの精度管理として、一ロットごとに標準試料による検定を行っています。通常、異なるプレートのウェルストリップで百近い標準試料を試験し、濃度と吸光度値のプロットから回帰分析を行い、回帰係数と変動係数をチェック。さらにこれを複数回独立して行う再現性試験を行い、ここでも変動係数をチェックします。メーカー・キットにより異なりますが、回帰係数は 0.98 以上、変動係数は 10%前後であることが普通です。

前処理操作の注意点

ELISA 法の長所に前処理が簡単である点が挙げられます。ほとんどの場合、試料ごとに前処理の方法が記載されているのでそれに従って下さい。記載がない場合にはご相談下さい。そのほか一般的にご留意頂きたい点を列記いたします。

pH の確認と調整

バッファー抽出が多く、基本的には注意する必要がありませんが、試料や前処理の方法によってはそうでない場合もあります。ELISA 法は通常 pH6.5～7.5 の範囲で行います。事前に pH を確認してください。

反応阻害要因と増長要因

反応を阻害する代表的なものは脂肪と有機溶媒です。
脂肪は抗体にとりつきやすく、抗原捕捉の邪魔をします。また検出対象が脂肪に吸着しやすい性質のものである場合には、通常のバッファー抽出処理ではなく有機溶媒などを使用します。しかしながら、この有機溶媒は ELISA 法にとって大敵です。抽出操作後にはかならず完全にとばして、バッファー類に再懸濁する必要があります。メタノール抽出もよく行われますが、その場合でも反応時の最終メタノール濃度は最高でも 10～15%未満です。

反応を増長するものとして、ペルオキシダーゼ類の酵素が考えられます。これはキットに含まれている酵素と同じもので、わさびなどの根菜類などに多くふくまれています。洗浄過程で取り除かれているはずですが、念のため検出物質を破壊しない範囲で加熱するなど、失活させたほうがよいでしょう。

添加回収試験と標準液･試料の溶媒濃度

試料の前処理法を確立するため添加回収試験を行うケースがあります。その際、キット付属以外の標準液を使用する場合には、溶媒濃度にご注意下さい。上述のとおり、標準液に多少でも有機溶媒が含まれていると、反応が阻害され正確な結果が得られません。また、試料の抽出にメタノール等を用いる場合でも、ウェルに加える試料液のメタノール濃度は標準液における濃度とあわせておく必要があります。