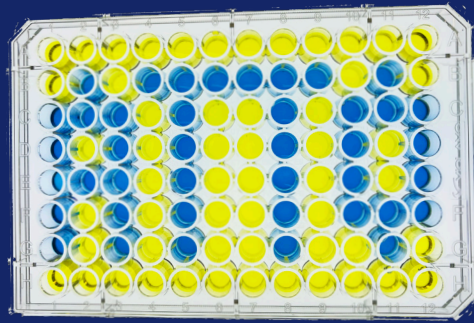


Application Note

ELISA 基本操作



ELISA 基本操作

2024年4月5日

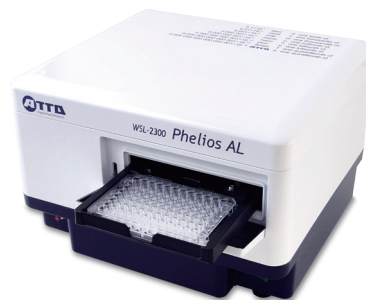
ウイルスに感染したかどうか？ワクチン接種で抗体ができたかどうか？など、ある分子（この場合、ウイルスもしくは抗体）が、サンプル中（この場合、検体や血清など）に有るか無いか？どれくらい含まれているのか？を調べる方法として、抗体を利用した免疫学的手法があげられます。もちろん PCR 検査もありますが、抗体のように根本的には同じ構造なのに多様性に富んでいる場合、ある特定の抗体だけを PCR で検出することは困難です。ELISA はウエスタンブロッティングのような手間もなく、多検体から特定の分子を検出し、定量する上で有効な手法として使用され続けています。

ELISA（エライザ/イライザ）という耳慣れない単語は、**Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay** の頭文字をとったもので、EIA 法（**Enzyme Immunoassay**）、酵素免疫測定法とも呼ばれています。血液や尿、細胞抽出液などの、様々なタンパク質が雑多に含まれる溶液サンプル中に、ある特定のターゲット分子（タンパク質、ホルモン、ペプチドなど）がどれだけ含まれているかを、抗体を利用して検出します。

一般的に、検出には西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP: **H**orse**r**adish **P**eroxidase）やアルカリフォスファターゼ（ALP: **A**lkaline **p**hosphatase）などの酵素標識抗体を使用するため、「Enzyme（酵素）」という単語が入っています。酵素標識抗体の酵素と基質との酵素反応の結果、定量的に生じる発色や発光を測定します。酵素活性の発色検出には、反応によって吸光スペクトルが変化する基質が用いられ、吸光度測定によって、ターゲット分子の量を数値化します。酵素反応により蛍光や発光を生じる基質を用いた場合は、ルミノメーター/フルオロメーター等で発光量/蛍光量を測定します。酵素を使用せずに、放射性同位体（RIA: **R**adio **I**mmuno**a**ssay）、化学発光化合物（CLIA: **C**hemiluminescent **I**mmuno**a**ssay）や蛍光色素（FIA: **F**luorescent **I**mmuno**a**ssay）を使用した方法もあります。



HRP 用発色試薬 TMB ELISA 用
WSE-7145 EzELISA TMB



吸光・発光プレートリーダー
WSL-2300 Phelios AL

1. ELISA 法の種類

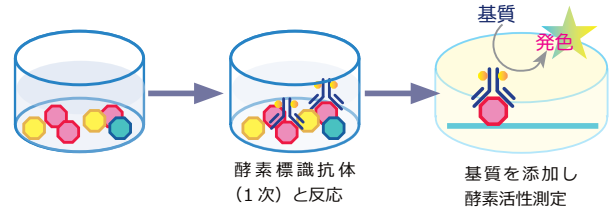
ELISA 法は、固相（プレート）にコートする抗体（あるいは抗原）と検出する標識抗体（あるいは標識抗原）の組合せや、反応方法によって、直接法、間接法、サンドイッチ法、競合法などがあります。いずれも酵素活性からターゲットの量を算出します。

必ず手袋を着用して
実験しましょう



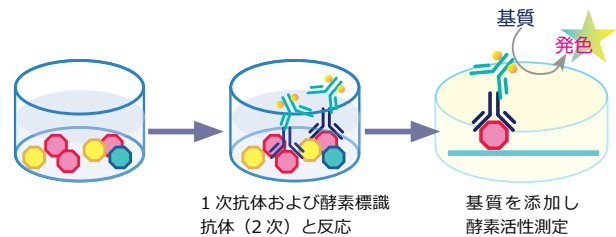
直接法 Direct ELISA

マイクロプレートに測定サンプル（抗原）をコートし、ターゲットに対する酵素標識抗体と反応させ、ターゲットと結合した標識抗体の酵素活性を測定します。抗体をコートして標識サンプルで検出する場合もあります。



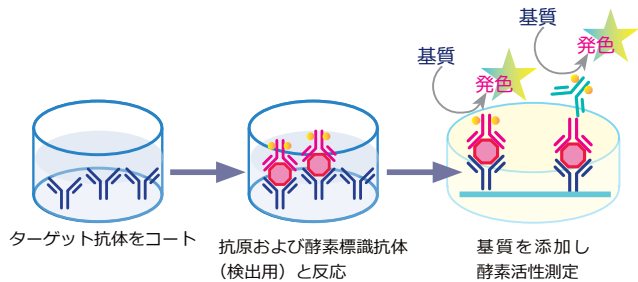
間接法 Indirect ELISA

マイクロプレートに測定サンプル（抗原）をコートして、ターゲットに対する抗体（一次抗体）と反応させ、さらに、一次抗体に対する酵素標識された二次抗体と反応させて、間接的にターゲットと結合した抗体量を測定します。一次抗体を直接標識して検出せず、酵素標識二次抗体や酵素標識アビジン-ビオチン反応等を介して間接的に検出する方法をいいます。直接法に比べて間接法は反応ステップが多くなりますが、市販の酵素標識二次抗体が使用可能で、感度も高くなります。



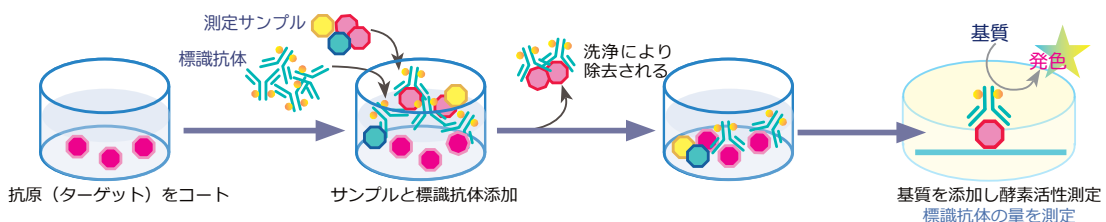
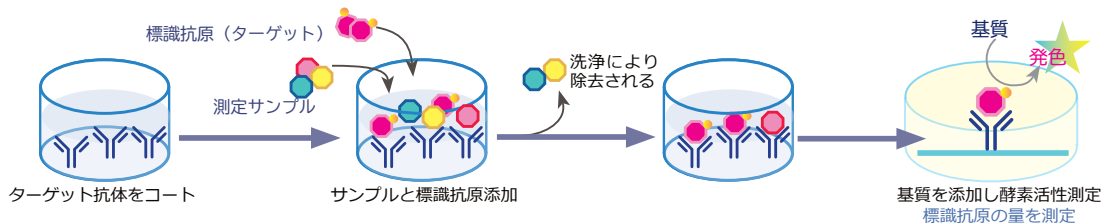
サンドイッチ法 Sandwich ELISA

マイクロプレートにターゲットに対する抗体（固相用）をコートし、測定サンプル（抗原）と反応させます。続いてターゲットに対する別の酵素標識抗体（検出用）と反応させて、ターゲットと結合した抗体の酵素活性を測定します。検出用に未標識抗体を使用した場合は、この抗体に対する酵素標識二次抗体を使用します。また検出用にビオチン化抗体を使用した場合は、酵素標識アビジンとの反応を介して検出します。固相化した抗体（紺）と検出用の抗体（ピンク）のエピトープ（抗原認識部位）は異なります。



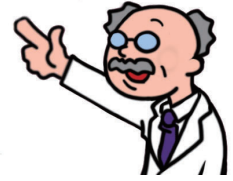
競合法 Competitive ELISA

マイクロプレートにターゲット（抗原）に対する抗体をコートし、測定サンプルと一定量の標識抗原を競合的に結合させ、コートした抗体に結合した標識抗原の量を検出し、サンプル中に含まれるターゲットの量を測定する方法です。変法として、逆に抗原（ターゲット）をコートし、測定サンプルと標識抗体（ターゲットに対する）を添加して競合的に結合させ、残った標識抗体（コートした抗原に結合）の量を検出する方法もあります。いずれもサンプル中に含まれる抗原が多い場合は、抗体と結合できる酵素標識抗原（もしくは抗原と結合できる酵素標識抗体）が減少し、発色が弱くなります。



最近はさまざまな ELISA キットが市販されていますので、それらを利用するのが一番ですが、ターゲットタンパク質や生物種が特殊で入手が困難な場合は、自ら構築する必要があります。

検出感度・測定範囲・
ターゲットに合わせて
準備しよう



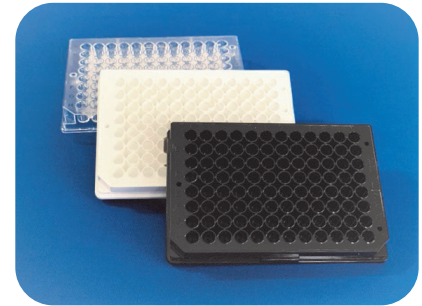
検出方法の選択

ターゲットタンパク質の検出感度や測定範囲に応じて、検出用抗体（抗原）の標識物質と基質を選択します。よく使用される代表的なものとしては西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ（ALP）が挙げられます。その他、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、アクリジニウム誘導体等があります。また DAB や NBT/BCIP のような非水溶性の基質は避けます。

固相（プレート）の選択

抗体（抗原）をコートする固相の種類としてはマイクロプレート、ポリスチレンビーズ、磁性ビーズなどがあります。ELISA では多検体の測定に便利で、高感度なマイクロプレートが使用されます。ビーズは表面積を増大させ、反応の迅速化が可能になります。ELISA 用の固相は抗原や抗体などの吸着性が変わるような表面処理が加工されています。測定するターゲットにより適した表面処理が異なりますので、実際に使用した上で、検出感度や精度など、目標に合わせた固相を選択する必要があります。

また測定装置や発色（吸光）、発光、蛍光のいずれの方法で検出するかによって、適した色の ELISA 用プレートを選択します。一般的に発色検出には透明プレートを、発光検出には反射が最大限に、自己発光が最小限となる白色プレートを、蛍光検出には蛍光測定時のバックグラウンドを最小限に抑える黒色プレートを使用します。いずれも ELISA 用に表面加工されたプレートを使用します。



コート方法の選択

プレート（固相表面）に抗体（抗原）をコート（不溶化）する方法には共有結合によるものと物理的吸着の 2 つがあります。共有結合によるコートには特殊加工された表面をもつプレートが使用されます。物理的吸着によるコート方法の方がより一般的ですが、コートするタンパク質の溶媒の pH は高い方が吸着量が多いと言われています。コートするタンパク質の可溶性に、特殊な溶剤や高濃度の界面活性剤が含まれている場合は、物理的吸着を妨げる可能性がありますので、共有結合によるコート方法を選択します。

ブロッキング剤の選択

抗体（抗原）によってプレートをコートした後も、まだコートされていない表面が残っているため、この部分を他の物質で覆って非特異的吸着を最小限におさえます。この操作をブロッキングといいます。バックグラウンドを下げ、S/N 比を向上させる上で重要です。ブロッキングには、抗原抗体反応に重要なエピトープを変性または阻害せず、ターゲットとは無関係なタンパク質や化合物の溶液を用います。代表的なブロッキング剤としては、アルブミン、カゼイン、スキムミルク、血清、ゼラチン、化合物などがあります。

アトーのブロッキング試薬

製品名	EzBlock Chemi	EzBlock BSA	EzBlock CAS
型式・コード	AE-1475・2332615	AE-1476・2332616	AE-1477・2332617
主成分	ポリマー化合物	BSA（アルブミン）	カゼイン

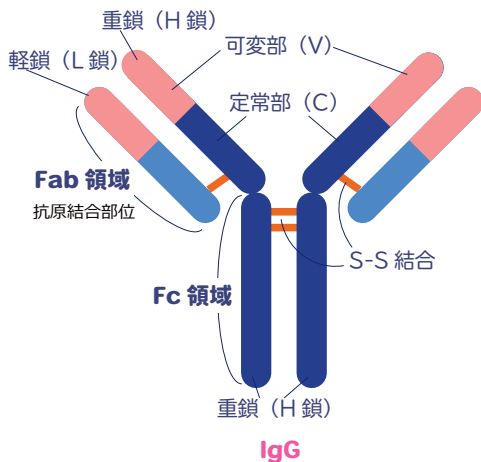
実験内容

ウェスタンブロットに使用したい	◎	◎	◎
ELISA / ビーズ抗体反応に使用したい	◎	◎	○
免疫組織 / 細胞染色に使用したい	○	◎	○
抗体の希釈液に使用したい	○	○	○
ランニングコストを抑えたい	◎	○	○
バックグラウンドを抑えたい	○	△	◎
オーバーブロッキングを防ぎたい	◎	◎	△
ストリッピングに使用したい	○	○	◎
アビジン-ビオチン検出系に使用したい	○	○	×
リン酸化の検出実験に使用したい	◎	○	×

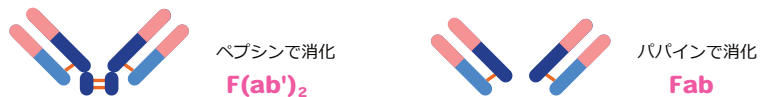


3. 抗体の選び方

抗体の構造



抗体はイムノグロブリン (immunoglobulin : Ig) ともよばれ、異物を除去するために免疫反応により作られるタンパク質で、生体防御機構の一つです。イムノグロブリン (Ig) は、構造の違いにより G (IgG)、M (IgM)、A (IgA)、D (IgD)、E (IgE)、の5つのクラスに分けられます。また、分子量約 15 万のタンパク質で、2本の重鎖 (heavy chains : H鎖、分子量約 5万) と2本の軽鎖 (light chains : L鎖、分子量約 2.5万) から構成され、互いに S-S 結合により結合しています。抗体と抗原が結合する腕の部位は Fab 領域と呼ばれ、抗原認識部位 (エピトープ) がある可変部 (V 領域) と定常部 (C 領域) から成ります。主に重鎖から成る足の部分は Fc 領域と呼ばれ、補体との結合を介した貪食作用などのエフェクター機構に関わっています。補体が含まれる血液などの生体サンプルからターゲットを検出する場合、補体との結合による影響を避けるために、イムノグロブリンの Fc 領域をペプシンやパパインで断片化処理して除いた、F(ab')₂ や Fab が使用されます。ただし F(ab')₂ や Fab にすることで、抗体の特異性や結合力が変化する場合がありますので注意します。



抗体の選択

ELISA 法で最も要となるのが抗体です。特にサンドイッチ法や競合法では、抗体の性能はもちろんのこと、抗体の組み合わせを最適化する必要があります。各抗体メーカーから公開されている相性の良いペア抗体に関する情報を参考にしたり、サンドイッチ ELISA 用のペア抗体から選択することができます。

コート (キャプチャー) 用抗体

ELISA で測定するサンプルは、ウェスタンブロッティングなどとは異なり、SDS や還元剤などによる変性 / 加熱処理や、電気泳動による分離をしないため、サンプル中のタンパク質の立体構造が、比較的、保たれた状態で存在していると考えられます。そのため抗体が認識するエピトープ部位が、ターゲットタンパク質 (コンプレックス含め) の立体構造表面に露出していないと結合できません。また、血清など補体が含まれているサンプルの場合、補体と抗体が非特異的に結合し、バックグラウンドが上昇する原因になることがあります。そのような場合は抗体が消化された、Fc 領域のない Fab や F(ab')₂ を使用します。さらに抗体以外の添加剤 (保護剤など) により、固相効率に影響が出る場合もあるので注意します。抗体を購入する際は適用用途を必ず確認し、「ELISA」用や「IP (免疫沈降)」用など非変性条件下でも結合する可能性の高いものを選択します。

検出用抗体

検出用抗体は、コート用抗体と同様に表面抗原に対する抗体であり、且つ、酵素 (蛍光) 標識されている抗体を選択します。ターゲットタンパク質に対する標識抗体がない場合は、酵素標識 2 次抗体を使用して間接法により検出するか、もしくは市販のラベリングキットなどを使用して検出用抗体を酵素標識します。また 2 次抗体は免疫動物などに注意して、交差反応が生じにくいものを選択します。

免疫動物と抗体の組み合わせ

抗体を作製するために使用した動物を免疫動物といいます。特に、2 次抗体を使用して間接法により検出する際は、検出用抗体を作製した免疫動物の抗体を認識する 2 次抗体を使用します。ただし、コート用抗体と検出用抗体が同じ免疫動物種だった場合、2 次抗体がコート用抗体にも結合してバックグラウンドが上昇する原因になります。また異なる免疫動物種由来の抗体を使用している場合、2 次抗体の交差反応により、非特異的にコート用抗体と検出用抗体に結合する場合があります。2 次抗体は、交差反応が生じないように目的の動物種以外の抗体には反応しないように、免疫吸収されたものを使用します。異なる免疫動物種でペア抗体が見つからなかった場合には、検出用抗体をビオチン化し、酵素標識ストレプトアビジンで検出する方法もあります。

抗体の非特異反応

2 次抗体の非特異反応により、本来のターゲットである抗体以外の抗原や固相などに吸着します。



二次抗体の交差反応等

二次抗体の交差反応により、検出用抗体だけではなくコート用抗体にも反応します。コート用と検出用抗体が同種の免疫動物だった場合も、同様の現象が生じやすくなります。



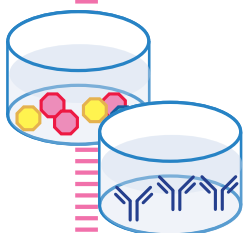
抗体の組み合わせ

コート用と検出用抗体の抗体のエピトープが近いなど、結合部位がマスクされる場合、検出用抗体が結合できなくなります。



- 1 次 (コート用抗体) : マウス IgG
 - 2 次 (検出用抗体) : ウサギ IgG
 - 3 次 (酵素標識 2 次抗体) : 抗ウサギ IgG 抗体
- 1 次 : マウス IgG
 - 2 次 : マウス IgG
 - 3 次 : 抗マウス IgG 抗体

抗体（抗原）コート



市販の ELISA プレートを準備します。
自作の場合は ELISA 用プレートに抗体（抗原）をコートします。
室温で約 1 時間反応します。

ELISA キット

ELISA kit（研究用）96 ウェルプレートフォーマット
（アルツハイマー・抗体医療・メタボリックリンドロームマーカーなど多数あります）

攪拌・遠心・振とう装置

WSC-2800	MyMiniVortex	マイミニボルテックス
WSC-2700	MyMini Spin	マイミニスピンの
WSC-2400	Seesaw Shaker atto	シーソーシェーカー atto

ブロッキング



抗体（抗原）が吸着しなかった部位をブロッキングします。
コート後のプレートに添加し、室温で約 1 時間反応します。

ブロッキング試薬

AE-1475 EzBlock Chemi	イージーブロック ケミ	(5 × Conc., 500mL)
AE-1476 EzBlock BSA ※	イージーブロック BSA	(5 × Conc., 200mL)
AE-1477 EzBlock CAS ※	イージーブロック キャス	(5 × Conc., 200mL)

※ Tween 20 添付

サンプル調製と反応

標準物質の希釈系列を作製し、目的サンプルを適宜希釈して調製します。
ブロッキング後のプレートに添加し、室温で約 1 時間反応します。

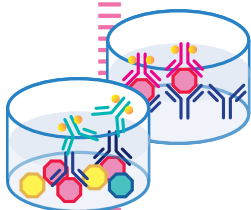
サンプル調製・希釈液

WSE-7420	EzRIPA Lysis kit	イージーリパライシスキット
WSE-7430	EzPBS(-)	イージーピービーエス (10 × Conc., 1L)

振とう装置

WSC-2400	Seesaw Shaker atto	シーソーシェーカー atto
----------	--------------------	----------------

検出抗体との反応



サンプルを除去して洗浄し、検出用抗体（抗原）を添加します。
室温で約 1 時間反応します。

洗浄液

WSE-7430	EzPBS(-)	イージーピービーエス (10 × Conc., 1L)
WSE-7230	EzTBS	イージーティービーエス (10 × Conc., 1L)
WSE-7235	EzTween	イージーツイーン (10%, 100mL)

検出と測定

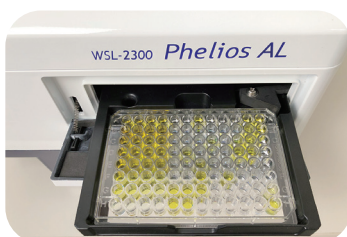
検出用抗体（抗原）を除去して洗浄し、基質を添加します。
プレートリーダー等で発光 / 蛍光 / 発色値を測定します。

HRP 用検出試薬

WSE-7145	EzELISA TMB	イージーエライザ TMB (200mL+ 停止液)
WSE-7110	EzWestLumiOne	イージーウエストルミワン (250mL)
WSE-7120L	EzWestLumi plus	イージーウエストルミ プラス (250mL × 2)

吸光・発光プレートリーダー

WSL-2300	Phelios AL	フェリオス AL
----------	------------	----------



5. 実験方法

最もよく利用されている ELISA 法であるサンドイッチ ELISA 用のプレートの作製方法からサンプル中のターゲットタンパク質の測定方法を説明します。

5-1. 試薬の調製

コート用希釈液 (約 20 mL 必要です)

50 mM Carbonate buffer (炭酸バッファー) /pH9.6

0.15 g の Na_2CO_3 と 0.29g の NaHCO_3 を蒸留水に添加して混合し 100mL にメスアップします。

ブロッキング溶液 (約 250 mL 必要です)

AE-1475 EzBlock Chemi (5 × Conc.)、AE-1476 EzBlock BSA (5 × Conc.)、AE-1477 EzBlock CAS (5 × Conc.)

原液を蒸留水で 5 倍希釈します。ELISA プレートの場合、Tween 20 を添加する必要はありません。詳細は取扱説明書をご参照ください。

※自作する場合は 1% BSA 含有 PBS などを使用します。

洗浄液 (抗体希釈にも使用可能)

WSE-7430 EzPBS(-) (10 × Conc.)、WSE-7230 EzTBS (10 × Conc.)、WSE-7235 EzTween (10%)

原液を蒸留水で 10 倍希釈し、終濃度 0.05 ~ 0.1% Tween 20 (洗浄液には必須) を添加して混合します。詳細は取扱説明書をご参照ください。

※自作する場合は 0.1% Tween 20 含有 PBS などを使用します。

検出試薬

WSE-7145 EzELISA TMB、WSE-7110 EzWestLumiOne、WSE-7120L EzWestLumi plus

使用方法は各取扱説明書をご参照ください。

※使用する検出用抗体の標識酵素に応じた基質を準備します。基質により検出方法(呈色・発光・蛍光)や測定波長が異なりますので、ご注意ください。

※自作する場合は 0.5-1 mg/mL o-phenylenediamine/50mM phosphate-citrate buffer (pH5.0)/0.03% H_2O_2 などの基質と反応停止液 (2 ~ 3 M H_2SO_4 など) を使用します。

抗体 (コート用と検出用)

コート (キャプチャー) 用抗体と検出用抗体

検出用抗体が標識されていない場合は、検出用抗体に対する標識抗体で間接的に検出します。



抗体 (抗原) のコート

チップの先端をウェルの底面に付けるようにして、ゆっくり注入します。泡が入った場合は、針などを使用して除去します。

5-2. 抗体コート

- ① コート (キャプチャー) 用抗体をコート用希釈液で 2 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して、約 10 mL に調製します。

抗体がウェルの壁面になるべく付着しないように、底面にチップの先を付けるようにして、ゆっくり入れます。96 ウェルの ELISA プレートの 1 ウェル当たりに必要な抗体量は 100 μL です。固相の表面加工によって違いますが、抗体の吸着量は 400~600 ng/ウェルといわれています。

- ② ①の希釈した抗体溶液を 96 ウェルプレートの 1 ウェル当たり 100 μL 添加します。室温で 1 時間以上、あるいは 4℃ で O/N インキュベートします。

抗体により吸着条件が異なります。温度や時間などの条件により、検出感度や測定領域などが変わる場合がありますので、ご注意ください。

- ③ コート用抗体をアスピレーターなどを使用して除去し、洗浄液 (PBS-T など) を 250 μL / ウェル添加します。洗浄液を除去し、もう一度、洗浄液を 250 μL / ウェル添加します。この操作を 3 回繰り返してプレートを洗浄します。

コートした抗体がウェルの壁面や底面以外の部位に付着しないようにするため、アスピレーターやピペットで吸引して除去します。洗浄液はウェルを逆さにして振ることで廃液することもできます。また洗浄液を入れた洗瓶などを使用し、直接各ウェルに十分量注ぎ入れて洗浄することもできます。洗浄液はペーパータオルなどにプレートを叩きつけて、十分に水切りしてください。

5-3. ブロッキング

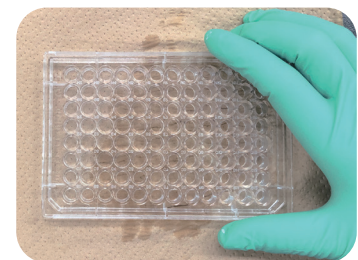
- ① ブロッキング溶液を 96 ウェルプレートの 1 ウェル当たり 250 μL 添加します。室温で約 1 時間インキュベートします。

反応温度や反応時間などの条件により、検出感度や測定領域などが変わりますので、ご注意ください。

- ② ブロッキング溶液を除去し、洗浄液 (PBS-T など) を 250 μL / ウェル添加して、上述と同様の操作で洗浄します。洗浄操作を 3 ~ 4 回繰り返してプレートを洗浄します。

ブロッキング溶液および洗浄液はペーパータオルなどにプレートを叩きつけて、十分に水切りしてください。

コートした抗体 (抗原) にも依りますが、ブロッキング液を除き、乾燥させた状態で冷蔵保存可能です。



液切りはしっかりと!

洗浄液などはペーパータオルにプレートをたたきつけて、しっかりと液切りします。プレートウォッシャーを使用した場合も同様です。

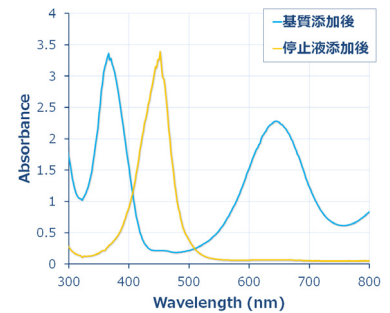


5-4. サンプル調製と反応

- ① 測定するサンプルを洗浄液などで適宜希釈します。またターゲットとなるタンパク質濃度が分かる標準物質を洗浄液などで希釈し、標準曲線を作製するための希釈系列を作製します。
- ② 標準物質の希釈系列、およびサンプルを 96 ウェルプレート の 1 ウェル当たり 100 μL 添加します。室温で約 1 時間インキュベートします。
反応温度や反応時間などの条件により、検出感度や測定領域などが変わる場合がありますので、ご注意ください。
- ③ 標準物質とサンプルをアスピレーターなどを使用して除去し、洗浄液 (PBS-T など) を 250 μL / ウェル添加して、上述と同様の操作で洗浄します。洗浄操作を 3 ~ 4 回繰り返してプレートを洗浄します。
標準物質やサンプルが他のウェルやウェルの壁面などに付着しないようにするため、アスピレーターやピペットで吸引して除去します。洗浄後の洗浄液はペーパータオルなどにプレートを叩きつけて、十分に水切りしてください。

5-5. 検出用抗体との反応

- ① 検出用の酵素標識抗体を洗浄液などで適宜希釈します。
酵素標識抗体がポリクローナル抗体や高力価の二次抗体 (IgG 等に対する) などの場合、交差反応が生じることやバックグラウンドが高くなる場合があります。ブロッキング溶液、もしくはブロッキング溶液を洗浄液で 1/2 ~ 1/10 希釈した溶液で、酵素標識抗体を希釈すると軽減できる場合があります。
- ② 検出用の酵素標識抗体を 96 ウェルプレート の 1 ウェル当たり 100 μL 添加します。室温で約 1 時間インキュベートします。
反応温度や反応時間などの条件により、検出感度や測定領域などが変わる場合がありますので、ご注意ください。
- ③ 検出用の酵素標識抗体をアスピレーターなどを使用して除去し、洗浄液 (PBS-T など) を 250 μL / ウェル添加して、上述と同様の操作で洗浄します。洗浄操作を 3 ~ 4 回繰り返してプレートを洗浄します。
酵素標識抗体が他のウェルやウェルの壁面などに付着しないようにするため、アスピレーターやピペットで吸引して除去します。洗浄後の洗浄液はペーパータオルなどにプレートを叩きつけて、十分に水切りしてください。

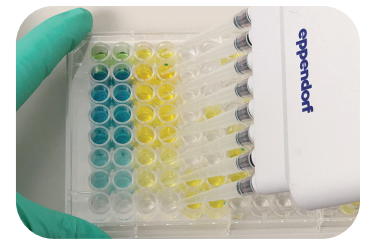


TMB 基質の波長スペクトルの変化

酵素反応が開始されると、370nm と 652nm に極大波長をもつ青色に変化します。このままでも測定可能ですが、**STOP solution** を添加すると反応が停止して、直ちに 450nm に極大波長をもつ黄色に変化します。

5-6. 検出と測定

- ① 検出用抗体の標識酵素に対する基質溶液を 96 ウェルプレート の 1 ウェル当たり 50 ~ 100 μL 添加します。
発光基質や蛍光基質を使用する場合は、基質溶液を添加してすぐに測定します。
- ② 室温 (暗所) で約 5 ~ 30 分間インキュベートします。
ご使用になる基質によって反応時間、温度などの反応条件は異なりますので、ご注意ください。
- ③ 反応停止溶液を 96 ウェルプレート の 1 ウェル当たり 50 ~ 100 μL 添加します。
ご使用になる基質によって反応時間、温度などの反応条件は異なりますので、ご注意ください。
- ④ プレートリーダー等の計測機器で吸光度 (もしくは発光 / 蛍光) を測定します。
下表は、主な基質の測定波長などが示されています。詳細はご使用になる酵素や基質の添付文書などを参照してください。



TMB 基質の発色変化

プレートの左側 2 列 (青~青緑) は反応停止前の TMB 基質の発色です。反応停止液を添加すると、直ちに黄色に変化します (3 列目から右側)。

酵素と検出条件

酵素	基質	検出法	波長 (反応中)	波長 (反応停止後)	検出感度
HRP	TMB	発色: 吸光度	370/652 nm (青)	450 nm (黄)	~5 pg/well 50 pg/mL
	ABTS	発色: 吸光度	650 nm (青)	410 nm (黄)	~250 pg/well 2.5 ng/mL
	OPD	発色: 吸光度	490 nm (緑)	450 nm (橙)	~7 pg/well 70 pg/mL
	Luminol	発光	極大波長: 410~425 nm		500 fg/well 5 pg/mL
	Amplex Red	蛍光	励起: 571 nm / 蛍光: 585 nm		~20 pg/well 2 ng/mL
ALP	PNPP	発色: 吸光度	405 nm (黄)	405 nm (黄)	~10 ng/well 100 ng/mL
	CDP-Star	発光	極大波長: 440~460 nm		~5 pg/well 50 pg/mL
	AttoPhos	蛍光	励起: 440 nm / 蛍光: 560 nm		~1 pg/well 10 pg/mL



6. 解析方法

ELISA 法の解析方法には定量的解析法、半定量的解析法と定性的解析法があります。

測定値はでたけど
解析方法は？



定量的分析 (Quantitative)

標準物質を段階希釈して得た測定値を使用して標準曲線を作成します。標準曲線からサンプル中に含まれる標的分子の濃度を換算し、定量的に解析します。標準物質がない場合、もしくは標準曲線の作成が難しい場合など、リファレンスに対して増減を相対的に評価する半定量的解析方法もあります。

定性的分析 (Qualitative)

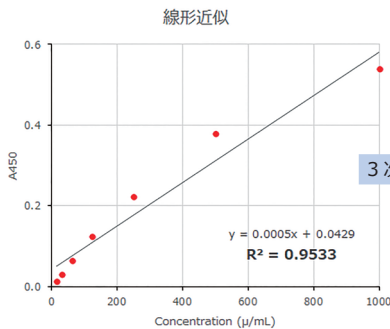
陽性・陰性判定の閾値(カットオフ値)を設定し、サンプル中に標的分子が存在するか「陽性」、しないか「陰性」を定性的に解析します。標的分子の存在の有無は、ネガティブコントロールやポジティブコントロール、あるいはキャリブレーションコントロールとサンプルの測定値を比較し、定性的に判断します。

検量線作成 (Calibration curve)

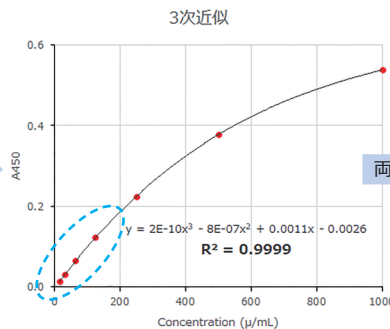
標準物質を段階希釈し(4点以上の濃度)、各濃度を3点以上、測定波長とプレート由来のバックグラウンドを減算するためのリファレンス波長を測定します。ブランクサンプル(溶媒・希釈液等)の値も測定し、各測定値からその値を減算します。一般的にELISA法では4又は5パラメーターロジスティックが使用されますが、測定範囲、標準物質の希釈率、抗体の力価、酵素の検出感度などにより、様々な検量線(標準曲線)が利用されます。データの適合性を評価するために計算される相関係数(R: correlation coefficient)は $-1 < R < 1$ の範囲の値になり、0のときは相関性がなく、1(又は-1)のときは直線上にデータが並びます。R²値が0.99以上の値を示した場合はとても適合性が高い検量線であると判断できます。

検量線で使用される主な近似線

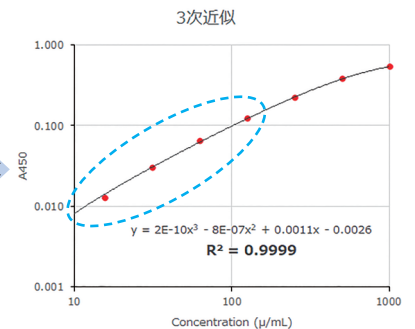
近似曲線	近似式
線形近似 (1次回帰)	$Y=a*x+b$
4次近似 (4次回帰)	$Y=a+b*x+c*x^2+d*x^3$
3次近似 (3次回帰)	$Y=a+b*x+c*x^2$
対数近似	$Y=a+b*log(x)$
指数近似	$Y=a*exp(b*x)$
4パラメーターロジスティック	$Y=d+(a-d)/(1+(x/c)^b)$



ELISA等の抗原抗体反応を利用する測定系の場合、一般的に検量線は曲線になり、広範囲の濃度を対象にした場合、R² = 0.9533と線形近似曲線にはフィットしていません。



3次近似曲線を利用するとR² = 0.9999とよくフィットした検量線になります。低濃度領域が近接しており(青点線囲み)、グラフから数値を読み取ることができません。



両対数軸にすると、直線状のカーブになり、低濃度領域のプロットも均等に分散され(青点線囲み)、グラフから数値を読み取ることができます。

測定精度と感度

測定精度は標準物質の品質、サンプルの調製法、抗体の特性、測定法や装置など様々な要因によって影響を受けます。同一のサンプルを、同一のELISAプレートで、複数ウェル測定した時の測定値のバラつきに関して評価します。精度の評価には変動係数(CV: Coefficient of Valiation)が利用されており、一般的に5%以下の値であれば精度が良いといわれています。

$$CV = \text{標準偏差 (SD)} / \text{平均値 (MEAN)} \times 100 (\%)$$

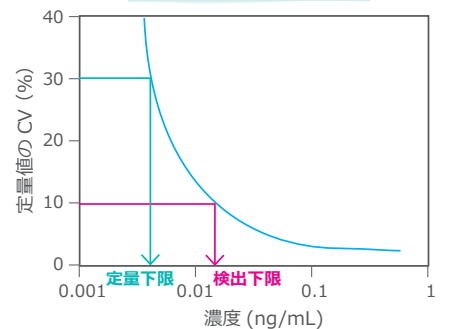
測定感度は検出下限や定量下限として評価されます。検出下限(DL: Detection Limit)はサンプルに含まれるターゲットの検出可能な最小限の量(濃度)のことで、真度や精度がなくても検出できれば良いとされています。JIS規格K0462によると、定量値のCVが30%を示すターゲットの量(濃度)を検出下限とするとされています。

$$\text{検出下限 (DL)} = 3.3 * \text{ブランク測定値の SD} / \text{検量線の勾配}$$

一方、定量下限(QL: Quantitation Limit)はサンプルに含まれるターゲットの定量可能な最小限の量(濃度)のことで、適切な精度と震度で定量できる量とされています。JIS規格K0462によると、定量値のCVが10%を示すターゲットの量(濃度)を定量下限とするとされています。

$$\text{定量下限 (QL)} = 10 * \text{ブランク測定値の SD} / \text{検量線の勾配}$$

検出下限と定量下限

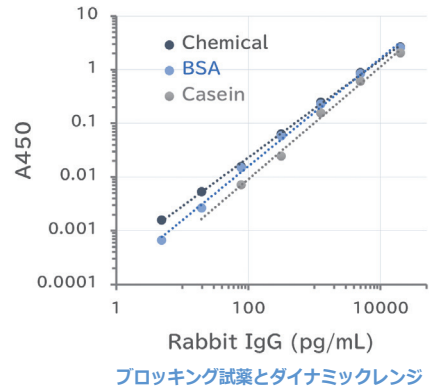




ブロッキング剤による影響 直接 ELISA 法

ウサギ IgG の 20 ng/mL からの 1/4 希釈系列を ELISA 用 96 ウェルプレートにコートし、室温で 1 時間ブロッキングしました。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体との反応後、HRP 用発色基質により検出し、450nm の吸光度を測定しました。グラフは作成した標準曲線を示しています。いずれのブロッキング試薬を使用しても同様に、広い直線性ダイナミックレンジを示しています。

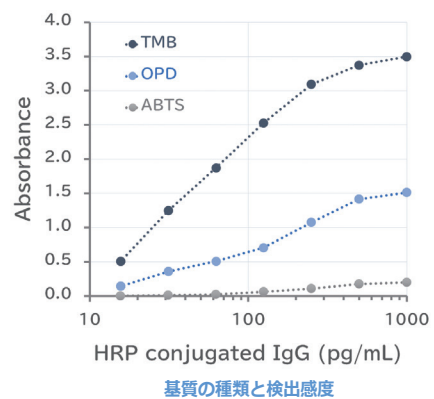
コート:	ウサギ IgG (20 ng/mL~1/4 希釈系列)	50µL/ウェル	室温 1 時間反応
ブロッキング:	EzBlock Chemi (ATTO AE-1475)		室温 1 時間反応
	EzBlock BSA (ATTO AE-1476)		室温 1 時間反応
	EzBlock CAS (ATTO AE-1477)		室温 1 時間反応
検出用抗体:	1/1000 希釈 HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体		室温 1 時間反応
基質:	EzELISA TMB (ATTO WSE-7145)		室温 10 分反応後停止
測定装置:	Phelios AL (ATTO WSL-2300)		



基質による検出感度の違い

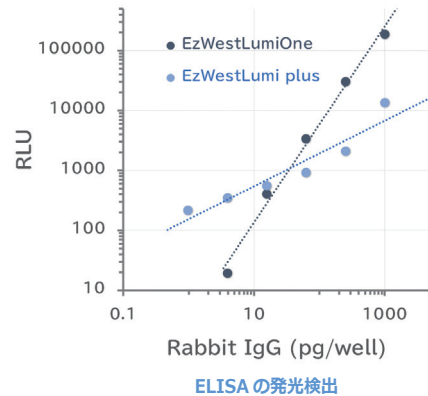
HRP 標識抗ウサギ IgG の 1000 pg/mL からの 1/2 希釈系列を作製し、50 µL/ウェル添加した後、3 種類の HRP 発色基質で検出しました。右上グラフは 30 分後に酵素反応を停止して、各基質に適した吸光度 (TMB ; 450 nm、OPD ; 490nm、ABTS ; 410nm) を測定した結果を示しています。

コート:	HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1 ng/mL~1/2 希釈系列)	100µL/ウェル	室温 1 時間反応
基質:	EzELISA TMB (ATTO WSE-7145)、OPD、ABTS		
測定装置:	Phelios AL (ATTO WSL-2300)		



ウサギ IgG の 20 ng/mL からの 1/4 希釈系列を ELISA 用 96 ウェルプレートにコートし、室温で 1 時間ブロッキングしました。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体との反応後、HRP 用発光基質により検出しました。右下グラフは Phelios AL で発光測定し、解析した結果を示しています。EzWestLumiOne は S/N 比、直線性も高く検出できます。加えて EzWestLumi plus はさらに高感度に低濃度の抗原を検出できます。

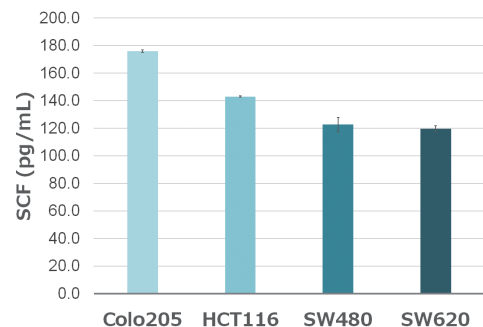
コート:	ウサギ IgG (20 ng/mL~1/4 希釈系列)	50µL/ウェル	室温 1 時間反応
ブロッキング:	EzBlock BSA (ATTO AE-1476)		室温 1 時間反応
検出用抗体:	1/1000 希釈 HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体		室温 1 時間反応
基質:	EzWestLumiOne (ATTO WSE-7110)		
	EzWestLumi plus (ATTO WSE-7120)		
測定装置:	Phelios AL (ATTO WSL-2300)		



ELISA 法による大腸がん細胞株の Human SCF の測定

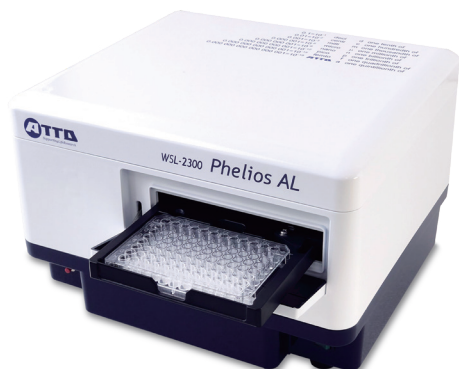
大腸がん細胞株中で発現している SCF (Stem Cell Factor) 量をサンドイッチ ELISA キットで測定した結果を示しています。SCF は血液幹細胞や他の組織 (細胞) にも発現が見られ、悪性腫瘍で過剰発現が観察されるとの報告があります。悪性度が高いといわれている Colo205 や HCT116 細胞株の方が、より発現量が高い結果が示されました。

ELISA プレート:	Human SCF Assay Kit (ATTO 6027141)		
標準物質:	Human SCF (3200 pg/mL~1/2 希釈系列)	室温 1 時間反応	
検出用抗体:	HRP 標識抗 Human SCF 抗体	室温 30 分間反応	
基質:	TMB (キット付属品)		
測定装置:	Phelios AL (ATTO WSL-2300)		



プレートリーダー

WSL-2300 Phelios AL フェリオス AL



Phelios AL 本体

WSL-2300 Phelios AL は軽量・コンパクトなボディに、波長200~999nmの範囲で吸光度測定、カインेटクス測定、スペクトル測定、エリアスキャン、さらに発光測定も可能なマルチファンクショナルなプレートリーダーです。計測容器は6/12/24/48/96/384ウェルプレートに対応するマルチプレートフォーマットです。定量的に解析する「Quantitative解析モード」を使用すれば、面倒な標準曲線作成も、濃度換算も、測定と同時に自動で行われ、その解析結果はエクセル形式で保存できます。また定性的に解析する「Qualitativeモード」を使えば、カットオフ値の設定により標的分子の陽性・陰性判定ができます。

さらにオプションの「Nano Volume plate」を使用すると、2 μLの微量サンプルから、一度に24検体の吸光度/スペクトル測定が可能になります。

オプション品
Nano Volume Plate



[製品情報はコチラ](#)

製品仕様

型式・名称	WSL-2300 Phelios AL
測定タイプ	吸光度 (ABS) ・発光
測定方式	吸光度測定：フォトダイオード 発光測定：光電子増倍管
測定モード	吸光度測定：①エンドポイント②カインेटクス③スペクトル④エリアスキャン 発光測定：①エンドポイント②カインेटクス 微量吸光度測定*：①エンドポイント③スペクトル
検出感度	吸光度測定：0 ~ 4.0 O.D. 発光測定：10 ⁻¹⁸ mole ATP (ダイナミックレンジ > 8 桁)
測定容器 (マイクロプレート)	6 / 12 / 24 / 48 / 96 / 384 ウェルプレート
測定容器 (Nano Volume Plate*)	3 × 8 (24 検体)
検出器 1：吸光用 / 波長	フォトダイオード / 200 ~ 999nm
検出器 2：発光用 / 波長	光電子増倍管 / 極大波長 420nm
波長分離方式	モノクロメータ (1nm ステップ)
吸光度測定用光源	キセノン
攪拌機能	あり：0 ~ 180 秒 (2 段階スピード)
専用アプリケーション	計測条件設定・測定・データ保存・データ解析
対応 OS	Windows 10
外部接続端子	USB × 1
寸法・質量	335mm (W) × 305mm (D) × 232mm (H) ・ 7.0kg (AC アダプター 0.5kg)
電源・消費電力	DC24V ・ 40W
AC アダプター	入力：AC100 ~ 240V 50/60Hz 140VA 出力：DC24V 65W
標準構成品	WSL-2300 Phelios AL 本体 USB ケーブル (A-B タイプ)、AC アダプター + AC ケーブル 発光測定用サポートプレート、USB メモリ (付属ソフトウェア)、取扱説明書



初心者でも簡単!

ELISA キット

※本製品は研究用試薬です。診断やその補助を目的とした使用はできません。

ELISA キットは2種類のターゲットタンパク質に対する特異抗体によるサンドイッチ法により、精度よく、再現性よく、定量する為のアッセイデザインで構築されています。アルツハイマー病関連、メタボリックシンドローム関連、がん関連等のELISA キットを豊富に取り揃えております。

アトー製品情報 抗原抗体反応

ELISA kit (研究用) 96ウェルプレートフォーマット

<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット 抗体医療用</p>  <p>【抗体医療用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>	<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット アルツハイマー病用</p>  <p>【アルツハイマー病用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>	<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット アレルギー用</p>  <p>【アレルギー用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>
<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット アンジオテンシン用</p>  <p>【アンジオテンシン用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>	<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット 糖尿病用</p>  <p>【糖尿病用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>	<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット 炎症用</p>  <p>【炎症用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>
<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット 肝臓・腎臓用</p>  <p>【肝臓・腎臓用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>	<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット 血管用</p>  <p>【血管用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>	<p>ELISAキット</p> <p>ELISAキット サイトカイン用</p>  <p>【サイトカイン用】抗原抗体発色反応を用いたELISAキットシリーズ</p>

カテゴリ

抗体医療	アルツハイマー病
アレルギー	アンジオテンシン
糖尿病	炎症
肝臓・腎臓	血管
サイトカイン	細胞接着
腫瘍	ストレス
代謝	骨
免疫	老化
血液	その他



製品情報はコチラ

<https://www.atto.co.jp/products/kougenkoutai>

各キットには①抗体プレート ②標識抗体濃縮液 ③標準物質 ④希釈用緩衝液 ⑤標識抗体用溶解液 ⑥発色基質液 ⑦反応停止液 ⑧濃縮洗浄液などが含まれております。詳しくはWEBサイトでご確認ください。

抗体反応に最適!

ELISA 関連試薬



ELISA やウェスタンブロッティングなどをはじめとする、さまざまな実験にお使いいただける高品質な試薬です。試薬調製の手間を省いて、効率よく実験ができます。

	コードNo.	型式・名称	
洗浄液	2332380	WSE-7430 EzPBS(-)	リン酸緩衝生理食塩溶液 (10×濃度、1L)
	2332625	WSE-7230 EzTBS	トリス緩衝生理食塩溶液 (10×濃度、1L)
	2332626	WSE-7235 EzTween	10%Tween溶液 (100×濃度、100 mL)
ブロッキング液	2332617	AE-1477 EzBlock CAS	カゼイン含有ブロッキング試薬 (5×濃度、200 mL)
	2332616	AE-1476 EzBlock BSA	BSA含有ブロッキング試薬 (5×濃度、200 mL)
	2332615	AE-1475 EzBlock Chemi	非タンパク質系ブロッキング試薬 (5×濃度、500 mL)
発色検出液	2332458	WSE-7145 EzELISA TMB	HRP用発色試薬 TMB溶液と反応停止液のセット (各200 mL)
	2332632	WSE-7110 EzWestLumiOne	1液系 HRP用発光基質 (各250 mL)
発光検出液	2332637	WSE-7120S EzWestLumi plus	2液系 高感度HRP用発光基質 (各50 mL)
	2332638	WSE-7120L EzWestLumi plus	2液系 高感度HRP用発光基質 大容量版 (各250 mL)
抽出液	2332336	WSE-7420 EzRIPA Lysis kit	動物細胞・組織からのタンパク質抽出液 (プロテアーゼインヒビター/ホスファターゼインヒビター込み、100 mL)
	2332319	WSE-7424 EzProteoLysis Native	動植物組織/培養細胞のネイティブタンパク質 (膜タンパク質含) 抽出試薬 (プロテアーゼインヒビター/ホスファターゼインヒビター込み、30mL)
	2332339	WSE-7423 EzBactYeastCrusher	大腸菌・酵母からタンパク質抽出液 (プロテアーゼインヒビター/DNAse込み、100 mL)



本誌記載の価格（税抜き）および製品仕様は予告なく変更する場合がありますので、ご了承ください。最新の情報などに関しましては当社ホームページでご確認ください。



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア ●電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬 ●ウエスタンブロット試薬
- ペリスタポンプ ●細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) 📠(03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 ☎(06)6136-1421(代表) 📠(06)6356-3625
若杉センタービル別館 5F
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) 📠(03)5818-7563
◆メンテナンスサービスグループ ☎(03)5818-7567(代表) 📠(03)5818-7563

■URL <https://www.atto.co.jp/>

お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームをご利用ください。