



エンゾライフサイエンス社

# ELISAキット

ELISA KITS

2016年版

ポスター型商品一覧  
トラブルシューティング  
Q & A入り保存版

キットラインアップ

- |                |                  |
|----------------|------------------|
| バイオプロセス ●      | 免疫/炎症シグナリング ○    |
| がん ●           | サイトカイン ○         |
| 心臓血管 ●         | エイコサノイド ●        |
| 細胞死 ●          | 代謝 ●             |
| 細胞シグナリング ○     | 神経科学 ●           |
| サイクリックヌクレオチド ○ | 酸化ストレス ●         |
| 内分泌学/ホルモン ○    | プロテオスタシス/シャペロン ● |
| エピジェネティクス ○    | その他 ○            |



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

## Q &amp; A

## 装置

**Q 波長補正は必要ですか？**

**A** 2波長測定は、ランプや装置、プラスチックプレートによる光学密度のずれを補正します。エンゾライフサイエンス社 (ENZ社) のプレートは、光学品質用に選択されているため、実質的に補正される値はごく小さいものです。2波長測定機能が使用できない場合でも、推奨検出波長で測定していただければ、大きな問題はありません。

**Q 分光光度計で測定することはできますか？**

**A** 製品マニュアルに分光光度計で測定可能と明記されていない限り、測定はできません。ほとんどのイムノアッセイ及びELISAキットは、マイクロタイタープレートリーダーで測定する必要があります。分光光度計で確実に測定するには、サンプルボリュームが少なすぎます。

## サンプルマトリクスとサンプル種

**Q キットの測定対象の種は？**

**A** キットの測定対象が、全ての種で保存されているような分子（例：エイコサノイド、ステロイド）の場合、種に依存せず、使用できる可能性があります。種特異的なキットの場合は、その種の名前を記載しています。もしマニュアルに種の記載がない場合、特定の種を測定対象としていません。各製品のウェブサイトに掲載しています。

**Q サンプルを希釈又は抽出する必要があるかどうかはどのように判断すればよいですか？**

**A** 各キットで示されているサンプルタイプごとの推奨最低希釈率でサンプルを希釈しても、キットの測定範囲内に測定対象物質の濃度が収まるのであれば、サンプルを希釈して測定することをお奨めします。もしサンプル濃度が定量限界より低い場合は、抽出・濃縮が必要になります。抽出が必要なキットもありますが、その場合は製品マニュアルに記載しています。

**Q サンプルの推奨最低希釈とは何ですか？希釈しなくても大丈夫ですか？**

**A** これはアッセイのマトリクス干渉を除くために必要な最低希釈のことです。特殊なサンプルの場合は、より高い倍率で希釈する必要がありますので、その場合は、お客様自身でバリデーション試験を行い決定してください。試験せずに希釈をすることはお奨めできません。もしサンプル中の対象物質が低濃度なら、抽出作業を行ったほうが正確に測定できる可能性があります。

## データ解析

**Q 培地中でのスタンダード曲線に一貫性がありません。**

**A** 多くの場合、培地中に添加された血清が問題になります。血清は水より密度が重いので、混合が不十分だと容器の底に沈んでしまいます。この影響を最小限にするには、非馴化培地を室温に戻し、スタンダードの希釈の前によく混合することが重要です。

**Q OD値がマニュアルの値と一致しません。**

**A** 実験間でOD値に若干の差があることは通常のことです。OD値は温度により、若干の影響を受けます。室温でのインキュベート時に、プレートを冷たい実験台の上やドラフトの下などに置かないように注意してください。基質のインキュベートを25~37°Cで実行すれば、シグナル値の変動の改善が期待できます。

**Q データを解析する最もよい方法は？4-PLカーブフィッティングとは？**

**A** 正確な結果を得るために、4パラメーターロジスティック (4-PL) カーブフィッティングソフトウェアを使用することを推奨します。4-PLは、近似曲線を最適化します。免疫測定において、スタンダード曲線はめったに直線になりません。得られたデータによりフィットするカーブを選択することで、最終的に正確なサンプル値を得ることができます。このソフトウェアが利用できない場合、自分でデータをプロットして値を算出する必要があります。ほとんどのマイクロプレートリーダーはソフトウェアを備えています。

## 化学発光分析

**Q どのような場合にEIAの代わりにCLIAを使用するのが適切ですか？**

**A** CLIA（化学発光免疫測定；chemiluminescent immunoassay）は、EIA（酵素免疫測定法；enzyme immunoassay）よりも高感度であるため、サンプル中に含まれる分析対象レベルがEIA検出レベルよりも低い場合に利用されます。また、マトリクス影響のない状態にまでサンプルを希釈できるため、抽出操作を省略できることも利点です。

**Q CLIAアッセイの測定に必要な装置は？**

**A** RLU（相対発光強度；relative light units）を測定するためのルミノメーターが必要です。フィルターは不要です。

## トラブルシューティング

### 発色が弱い

- **基質を正しいタイミングで加えましたか？**  
マニュアルのアッセイ手順を確認してください。
- **適切な時間に抗体と標識を加えましたか？**  
マニュアルのアッセイ手順を確認してください。抗体と標識は利便性と実験ミス削減のために色分けされています。
- **キットに添付されていたコンポーネントを使用しましたか？**  
2種類以上のキットをご購入いただいた場合、別キットのコンポーネントを使用してしまうことがあります。
- **どの程度の時間、基質をインキュベートしましたか？**  
反応停止試薬を加えるタイミングが早かった可能性があります。
- **基質をインキュベートした時の状況は？**  
室温でのインキュベートを指定されているときに、冷たい実験台の上やドラフトの下でプレートをインキュベートすると、シグナルの値（例えば吸光度）は予想よりも低くなる場合があります。
- **使用前に試薬を室温に戻しましたか？**  
使用前に全試薬を室温に戻すこと、もしくは各製品のマニュアルで指示されている通りを行うことが重要です。試薬が4℃保存されている場合、一般的にアッセイ準備の約30分ほど前に試薬を室温に置けば十分です。凍結している場合は、もう少し時間がかかります。凍結している試薬をウォーターバスで溶解することはしないでください。キットに添付されていない、別のスタンダードやサンプル希釈溶液（培地など）を使用する場合も、室温に戻してから使用してください。
- **適切な波長でプレートを測定しましたか？**  
マニュアルのアッセイ手順で指定されている波長を確認してください。また、ご使用のプレートリーダーのフィルターと測定時に使用するプログラムを再確認してください。もし別の機器をご使用の場合は、お客様の実験条件に合った設定に変更してください。
- **適切な容量の試薬を加えましたか？**  
マニュアルのアッセイ手順を確認してください。
- **インキュベートの条件はどうでしたか？**  
インキュベート時間や温度を守っていない場合、予想よりもシグナルの値が低くなる場合があります（例えば吸光度）。空調管理できる部屋では、21℃以下にならないよう注意してください。
- **インキュベート時のプレート振盪方法は適切でしたか？（振盪が必要な場合）**  
お客様がプレートシェーカーをお持ちでない場合、フラスコ用のシェーカーや他の装置をご使用になっているかと思えます。液量がウェルの高さの約3/4まで揺れ動き、こぼれることがなければ特に問題はありませぬ。もしプレートが振盪できず、手順として振盪する必要がある場合、インキュベート時間を延長して行うと良いでしょう。
- **反応停止薬を添加した後どのくらいでプレートを測定しましたか？**  
反応停止薬の添加後は可能な限りすぐにプレートを測定してください。通常10分以内でのプレート測定を推奨しています。

### スタンダード曲線の異常

- **スタンダード希釈溶液として何を使用しましたか？**  
提供されているアッセイバッファー以外の希釈溶液はスタンダード曲線に影響を及ぼす物質を含んでいる可能性があります。
- **スタンダード曲線の精度はどの程度ですか？**  
スタンダード曲線のシグナル値（例えば吸光度）の%CVが常に5%以上の場合、ピペット操作に特に注意してください。スタンダード曲線のシグナル値が許容範囲ですが、サンプルのシグナル値が許容できない場合は、問題の原因はサンプルにある可能性が高いです。「精度が低い」の項も参考にしてください。
- **Blank や NSB の値を引きましたか？**  
正味のシグナル値（例えば吸光度）を採用しない場合、シグナル値はマニュアルのサンプルデータよりも高い値を示します。
- **どのようにスタンダード希釈溶液を調製しましたか？**  
適切なサイズと材質の実験チューブを使用してください。希釈系列を調製する際にスタンダード希釈液を十分に混ぜる必要があります（例えばボルテックスなど）。スタンダードの希釈は各商品のマニュアルに書かれている時間内に調製し、使用することが重要です。調製済みスタンダード希釈液の残りは保存しないでください。

### 精度が低い

- **ウェルは十分に洗浄しましたか？**  
洗浄ステップでは全てのウェルに同じ処理を行ってください。また、洗浄が不十分なウェルがある場合、精度の低下につながります。そのため、プレートを完全に洗浄することが重要です。プレート洗浄に問題がある場合、以下に気をつけて再度アッセイを行ってください。希釈した洗浄バッファーをスクワートボトルに入れ、全ウェルをこのバッファーで満たしてください。その後プレートの中身を捨て、余分なバッファーを取り除くためにプレートを振ってください。この操作をマニュアルで推奨されている回数繰り返してください。洗浄バッファーを加えすぎることには問題はありませんが、少量だとバックグラウンドが高くなってしまいます。ウェルの中身を吸い出して、糸くずが出ないペーパータオル上でプレートをタッピングして水気をとります。プレートを過剰にタッピングしすぎるとプレートが乾きすぎて、一貫性のないアッセイになってしまいますので、数回に留めてください。

次ページに続く 

## トラブルシューティング

### 精度が低い の つづき

#### ● 洗浄後ウェルから十分に吸い出しましたか？

アスピレーション後、ウェルに極力洗浄バッファーが残っていないことがとても重要です。残留バッファーは次に加える試薬の濃度を薄めてしまいます。最後の洗浄工程の後、余分なバッファーを取り除くためにペーパータオル上で数回プレートをタッピングしてください。

#### ● どのようにウェル内で試薬をピペティングしましたか？

精度エラーをなくすために、アッセイで使用するピペットチップをすべてプレリンスしてください。エンゾライフサイエンス社 (ENZ社) ではウェルに試薬を加える前に3回ほどピペティングすることを推奨しています。ピペットキャリブレーションやメンテナンスは、チップがきちんとフィットすることや正しい容量を分注できることを保証するためには不可欠です。ピペティングの際に、試薬がウェルの外に飛び散らないように注意してください (特にピペットを繰り返し使用する際)。

### バックグラウンドが高い

#### ● プレートをどのように洗浄しましたか？

洗浄ステップでは全てのウェルに同じ処理を行ってください。また、洗浄が不十分なウェルがある場合、精度の低下につながります。そのため、プレートを完全に洗浄することが重要です。プレート洗浄に問題がある場合、以下に気をつけて再度アッセイを行ってください。希釈した洗浄バッファーをスクワートボトルに入れ、全ウェルをこのバッファーで満たしてください。その後プレートの中身を捨て、余分なバッファーを取り除くためにプレートを振ってください。この操作をマニュアルで推奨されている回数繰り返してください。洗浄バッファーを加えすぎることには問題はありませんが、少量だとバックグラウンドが高くなってしまいます。ウェルの中身を吸い出して、糸くずが出ないペーパータオル上でプレートをタッピングして水気をとります。プレートを過剰にタッピングしすぎるとプレートが乾きすぎて、一貫性のないアッセイになってしまいますので、数回に留めてください。

### エッジ効果

#### ● プレートをどこでインキュベートしましたか？

室温でのインキュベートは、予想よりも低い温度になります。特にドラフトのあるエリア、冷たい実験台上でのプレートのインキュベートは、不均一な発色につながりますので注意してください。

#### ● 複数枚のプレートを同時に操作した場合、プレートを積み重ねてインキュベートしましたか？

プレートは積み重ねずにインキュベートしてください。これによりプレート内の温度を一定に保てます。

#### ● 全体を室温でインキュベートする場合、プレートにきちんとシールを貼りましたか？

プレートシールで全てのウェルをしっかりとカバーすることで、ウェル内溶液の蒸発や、冷インキュベート条件での結露を防ぎます。

### ドリフト (溶液の蒸発)

#### ● 使用前に試薬を室温に戻しましたか？

試薬をウェルに加える前に、試薬を一定温度になっていない状態で加えると、プレートへの試薬添加のタイミングにより温度差が生じ、結果が異なります。

#### ● アッセイの準備を中断しましたか？

試薬を加える際にどこかの段階でアッセイが中断されると、中断する前と後で異なる結果が出る可能性があります。中断する前に試薬を加えられていたウェルは、後に加えたウェルよりもインキュベートの時間が長くなってしまいます。

#### 取扱店

お願い / 注意事項 記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

(希望販売価格) 記載の希望販売価格は2016年8月1日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「希望販売価格」「キャンペーン中の参考価格」は参考価格であり、販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいませ。表示価格に消費税は含まれておりません。

(使用範囲) 記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。

<http://www.cosmobio.co.jp/>



人と科学のステキな未来へ

## コスモ・バイオ株式会社

— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ —

TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)

FAX: 03-5632-9623 E-mail: nouki@cosmobio.co.jp

— 商品に関するお問い合わせ —

TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)

FAX: 03-5632-9619 E-mail: service@cosmobio.co.jp

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

