

始めよう!

イントロダクション

このガイドでは、48-Digoxigenin Cartridgeを用いたアッセイ用試薬を調製するために必要な標識手順を説明します。標識はNHS-エステルを用いており、アミノ基で分子を標識するのに適しています。ここでは、アッセイに必要な抗体の標識について説明します。

試薬と材料

白い箱 - 4 °C保存

含まれているもの	パーツ番号
48-Digoxigenin Cartridges (1)	952927
Wash Buffer (10 mL)	896055
5X Reagent Diluent (10 mL)	895182

他に知っておいて欲しいこと

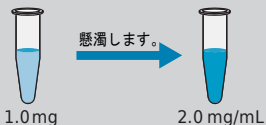
試薬	メーカー	パーツ番号
Digoxigenin標識:		
Digoxigenin NHS ester	Enzo	ENZ-45022
	Sigma-Aldrich	55865
N,N-Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich	270547
Biotin標識:		
Biotin-XX, SE	Thermo Fisher	B1606
	Sigma-Aldrich	B3295
Dimethyl Sulfoxide (DMSO), ≥ 99% pure	Sigma-Aldrich	D2650
両方の標識が必要:		
炭酸水素ナトリウム	Sigma-Aldrich	S8875
ELISA Plate-Coating Buffer - PBS	R&D Systems	DY006
Hinge-Cap Polypropylene Vials (1.7 mL)	United Laboratory Plastics	UP 2061
UV-Star® Transparent Microplates (96-well, flat bottom)	Greiner Bio-One	655801
Zeba™ Spin Desalting Columns (40K MWCO, 0.5 mL)	Thermo Fisher	87766

1. 試薬の準備

A 試薬の準備

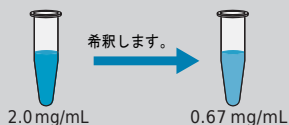
ジゴキシゲニンには急性毒性があり、DMFとDMSOは強力な有機溶媒なので、プロトコールを通して適切なPPE(個人防護用具)を使用してください。

Digoxigenin-NHS



- 500 μ LのDMFを加えます。
- 15-20 秒間ボルテックスします。
- 20 $^{\circ}$ Cで保存可能です。

Intermediate Digoxigenin-NHS



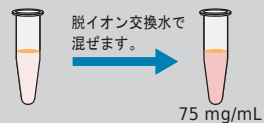
- 20 μ Lの溶かしたDigoxigenin-NHSを40 μ LのDMFに加えます。
- 15-20 秒間ボルテックスします。

Biotin-XX, SE



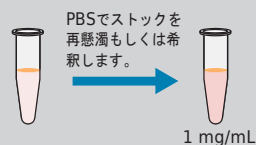
- Biotin-XXを測り、1.0 mg/mLの溶液を作ります。
- 固形物が解けるまでボルテックスします。
- 15分以内に使用します。

炭酸水素ナトリウム



- 炭酸水素ナトリウムを測り、75 mg/mLの溶液を作ります。
- 粉末状のものが消えるまで、ボルテックスします。

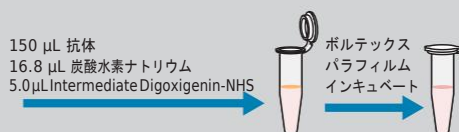
抗体



- 抗体保存液を1 mg/mLで希釈します。
- 各チューブを10秒間ボルテックスし、横に置いておきます。

B ジゴキシゲニン標識抗体

- 以下のように試薬を混ぜ、ジゴキシゲニンが抗体に対して5倍の分子数になるようにします。:
 - 150 μ Lの抗体Working solution (1 mg/mL)
 - 16.8 μ Lの炭酸水素ナトリウムWorking solution (75 mg/mL)
 - 5.0 μ LのIntermediate Digoxigenin-NHS solution (0.67 mg/mL)
- よくボルテックスし、各チューブの口をパラフィルムで巻いて閉めます。
- 室温、暗間で1時間インキュベートします。



C ビオチン標識抗体

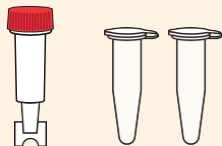
- 以下のように試薬を混ぜ、Biotin-xxが抗体に対して10倍の分子数になるようにします。:
 - 150 μ Lの抗体Working solution (1 mg/mL)
 - 16.8 μ Lの炭酸水素ナトリウム Working solution (75 mg/mL)
 - 5.6 μ LのBiotin-xx, SE溶液 (1 mg/mL)
- よくボルテックスし、各チューブの口をパラフィルムで巻いて閉めます。
- 室温、暗間で1時間インキュベートします。



2. 未反応の標識物

A カラムとバイアルの割り当て

各抗体の準備にカラム1つとチューブ2つ使用します。:



Zeba[®] スピнкаラム 蓋つきバイアル

- スピнкаラムからスナップオフチップを折り、キャップを緩めます。

B カラムの保存バッファの除去

- 各スピнкаラムを蓋つきバイアルに入れ、1500 x gで1分間遠心して保存バッファを除去します。

- コレクションバイアルの廃液を捨て、スピнкаラムをコレクションバイアルの上に戻します。
- 300 μ LのPBSを各スピнкаラムに加え、キャップを緩めに閉め、1500 x gで1分間遠心します。
- もう一度ステップ2と3を繰り返します。
- コレクションバイアルの廃液を捨て、スピнкаラムをコレクションバイアルの上に戻します。
- 300 μ LのPBSを各スピнкаラムに加え、キャップを緩めに閉め、1500 x gで2分間遠心します。
- コレクションバイアルの廃液を捨て、スピнкаラムを新しいコレクションバイアルの上に置きます。

C 未反応の標識物の除去

- 全ての標識済み抗体をカラムに加え、ゆるくねじを閉めて1500 x gで2分間遠心します。
- スピнкаラムを捨てて、標識済み抗体と一緒にコレクションバイアルをとっておきます。

3. 標識抗体の定量

A プレートへ添加

- 1~2ウェルをブランクとして、それぞれに100 μ L (0.100 mL)のPBSを分注します。
- 1ウェルあたり100 μ L (0.100 mL)の標識済み抗体サンプルを分注します。
- マイクロプレートを280 nmの吸光度で読み取ります。:
 - ブランクの吸光度を引きます。
 - Part Bで使用するのでOD値を記録しておきます。
- 各標識済み抗体サンプルを元のバイアルに戻します。

B 初期抗体濃度の計算

- 各標識した抗体のOD値を1.4で割り、初めの抗体濃度を求めます。
 - Part Eで使用するので記録しておきます。

C 抗体とバイアルをあわせた重さを測定

- 1.5 mLの空の蓋つきバイアルを用いて電子天秤のゼロ合わせをします。
- 各標識した抗体を入れたバイアルの重さを測り、抗体とバイアルをあわせた重さを測ります。
 - Part DとEで使用するので記録しておきます。

D 必要なREAGENT DILUENTの量を求めます (オプション)

Reagent DiluentにはBSAが含まれているのでCarrier proteinとして使用し、最終試薬を安定化します。

- Reagent Diluent濃縮液を5Xのままで使用し、希釈しないでください。
- Part Cで得られた各標識済み抗体の値を10で割ります。
- 各サンプルに、得られた容量 (mL) のReagent Diluentを加えます。
 - Part Eで使用するので記録しておきます。

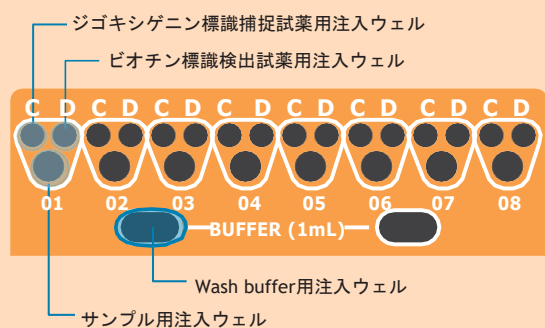
E 抗体終濃度の算出

- 次の公式を使います。:

$$\frac{\text{初期抗体濃度 (mg/mL)} \times \text{Part Cで得た重さ(容量, mL)}}{\text{Part Cで得た重さ(容量, mL)} + \text{加えたReagent Diluentの容量 (mL)}} = \text{抗体の終濃度 (mg/mL)}$$

- 4 $^{\circ}$ Cで抗体を保存します。注: 試薬の安定性は標識した分子に依ります。

4. カートリッジへ添加



より安定した結果を得るために、捕捉試薬と検出試薬を十分に加え、ウェルの底が完全に覆われていることを確認してください。

1. 付属のReagent Diluentを使用して、カートリッジ図に示されている量の試薬をカートリッジに分注します。試薬は必ずウェルの側面ではなく底に分注してください。
注: 表示している例は1つのサンプルのみです。
2. 新しいアッセイを評価する場合は、3.5 µg/mLの捕捉試薬と検出試薬で始めます。

ウェル	試薬	容量	ウェル数
C	ジゴキシゲニン-捕捉	25-50 µL	48
D	ビオチン-検出	25-50 µL	48
01-48	サンプル	50 µL	48
溝	Wash Buffer	1 mL	6

- ウェルの底を完全に覆うために50 µLを推奨しますが、GNRに入っていくのはわずか25 µLです。
3. 捕捉および検出試薬の量が50 µL未満のとき:
 - カートリッジの側面を軽く叩いてウェルの壁についている液体を取り除き、底に落としてください。カートリッジの底面をぶつけないでください。液体がこぼれることがあり、カートリッジを損傷する可能性があります。
- もしくは
- すべての液体がウェルの底に行くように、室温で15秒間、50 x gで標準プレートローターを使用してカートリッジを遠心します。保護フィルムをはがして、50 x g以上でカートリッジを遠心しないでください。

5. Ellaの開始



1. キットバーコードをスキャンします。
2. 確認のためにカートリッジバーコードをスキャンします (該当する場合)。
3. カートリッジのウェルに入れるサンプルをRunnerソフトウェア上で割り当てます。
4. Ellaの外蓋を開け、内蓋を上げます。
5. カートリッジ底面の保護シールをはがします。
6. カートリッジをEllaのカートリッジホルダーに入れます。
7. Ellaの内蓋と外蓋を閉めます。
8. Runnerソフトウェアで設定を確認しStartボタンをクリックします。
9. 測定終了後、カートリッジを廃棄します。



Toll-free: (888) 607-9692
Tel: (408) 510-5500
Fax: (408) 510-5599
info@proteinsimple.com
proteinsimple.com

© 2019 ProteinSimple. ProteinSimple, Simple Plex, Ella and the ProteinSimple logo are trademarks and/or registered trademarks of ProteinSimple.

PL0-0003 RevA