

TN-cyclon™ ELISA 開発キット

研究用試薬

For Research Use Only [RUO]

操作マニュアル

目次

・ キット内容	p 3
・ キット以外に必要な試薬・機器等	p 5
・ 測定原理	p 6
・ 試薬の調製方法	p 7
・ アッセイプロトコル	p 9
・ 測定例	p13

キット内容 (96 ウェルプレート 1 枚分)

キットの内容物の一覧は表 1 を、キット内各試薬の配置は図 1 と図 2 をご確認ください。

表 1

名称 (英語)	名称 (日本語)	試薬の形状	容量	保存温度	輸送温度
96-well plate	96 ウェルプレート	-	1 プレート (8 ウェルストリップ×12 本)	常温 (15 - 30℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Adhesive Plate Seals	プレートシール	-	5 枚	常温 (15 - 30℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Capture Ab Diluent	捕捉抗体希釈液	液体	20 mL 1 本	冷蔵 (2 - 8℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Wash Buffer (20x)	洗浄液 (20 倍濃縮)	液体	50 mL 1 本	冷蔵 (2 - 8℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Sample Diluent	標準抗原希釈液	液体	20 mL 1 本	冷蔵 (2 - 8℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Blocking Reagent	ブロッキング溶液	液体	40 mL 1 本	冷蔵 (2 - 8℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Detection Ab Diluent	検出抗体希釈液	液体	30 mL 1 本	冷蔵 (2 - 8℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Enzyme Cycling Reagent 1	酵素サイクリング試薬 1	粉末	2.8 mg 4 本 (100 mM 溶液、 40 μL 相当)	冷凍 (-30 - -20℃)	冷凍 (-30 - -20℃)
Enzyme Cycling Reagent 2	酵素サイクリング試薬 2	粉末	20.4 mg 1 本 (100 mM 溶液、 300 μL 相当)	冷凍 (-30 - -20℃)	冷凍 (-30 - -20℃)
Enzyme Cycling Reagent 3	酵素サイクリング試薬 3	粉末	160 U 1 本 (1,000 U/mL 溶液、 160 μL 相当)	冷凍 (-30 - -20℃)	冷凍 (-30 - -20℃)
Enzyme Cycling Reagent 4	酵素サイクリング試薬 4	粉末	2.3 mg 1 本 (50 mM 溶液、 120 μL 相当)	冷凍 (-30 - -20℃)	冷凍 (-30 - -20℃)
Enzyme Cycling Diluent 1	酵素サイクリング試薬 調製液 1	液体	20 mL 1 本	冷蔵 (2 - 8℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
Enzyme Cycling Diluent 2	酵素サイクリング試薬 調製液 2	液体	1 mL 1 本	冷蔵 (2 - 8℃)	冷蔵 (2 - 8℃)
User Manual	操作マニュアル	-	1 部	-	-

危険表記および取扱上の注意：各試薬の成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体への接触を避けるよう十分に配慮してください。

※ 各種溶液に析出が見られる場合は、温浴で結晶を溶解させてからよく攪拌してご使用ください。

※ 酵素サイクリング試薬 4 は 17β-Methoxy-5β-androstan-3α-ol 3-phosphate (A3P) が構成成分となります。SDS は当社ウェブサイトからダウンロードしてください。

<https://www.biophenoma.com/devkit/>

《使用期限》：キット外箱に記載のラベル内容をご確認ください。

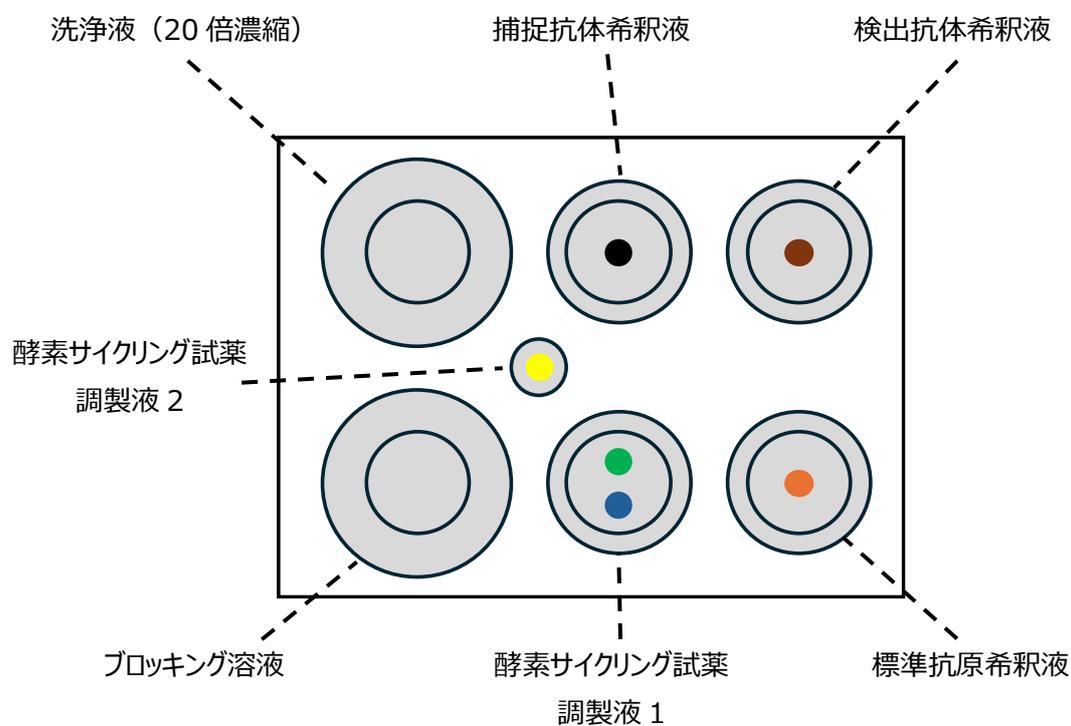


図 1 冷蔵保存試薬配置 (2 - 8℃)

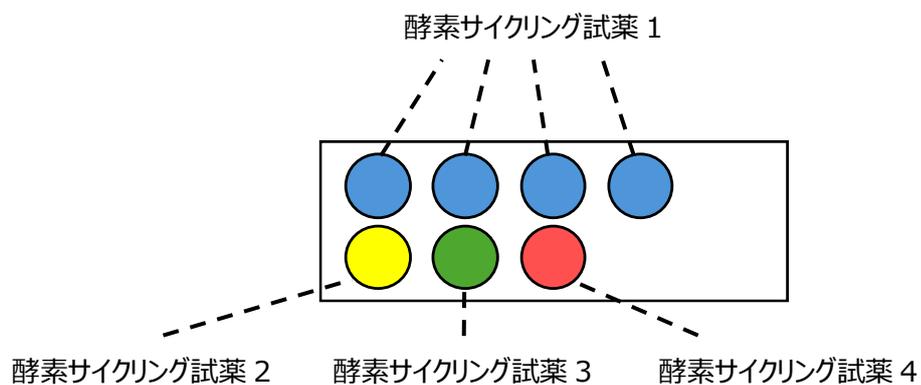


図 2 冷凍保存試薬配置 (-30 - -20℃)

キット以外に必要な試薬・機器等

- 捕捉抗体
- 検出抗体
- 標準抗原
- 超純水
- 100 μ L - 1000 μ L シングルチャンネルピペット、およびチップ
- 10 μ L - 200 μ L シングルチャンネルピペット、およびチップ
- 1 μ L - 10 μ L シングルチャンネルピペット、およびチップ
- 50 μ L - 200 μ L マルチチャンネルピペット、およびチップ
- リザーバーまたは分注する際に試薬を入れる容器
- 1.5 mL チューブおよび 15 mL、50 mL の遠沈管
- ペーパータオル
- 恒温機能付き吸光マイクロプレートリーダー（温度：37℃、測定波長：405 nm）
※ プレートリーダーに恒温機能が無い場合、37℃に恒温調整可能なホットプレートを用意してください。
- ボルテックスミキサー
- 卓上遠心機
- メスシリンダー（1 L 推奨）
- プレートシェイカー
- プレートウォッシャー
- メタノール（試薬特級）

測定原理

TN-cyclon™は、サンドイッチ ELISA 法と酵素サイクリング法を組み合わせた当社独自のタンパク質検出技術です^{1), 2)}。本手法により、従来のサンドイッチ ELISA 法と比べ高感度にタンパク質を定量することが出来ます。

TN-cyclon™の原理の概要は以下の通りです（図 3 参照）。捕捉抗体、検出抗体を用いて抗原をサンドイッチ方式で挟み込みます。検出抗体を標識しているアルカリホスファターゼ（ALP）に当社独自の ALP 基質である A3P を作用させます。A3P はリン酸基を持つため、ALP の働きにより A3P からリン酸基が外れて A3 に変化します。次に、その A3 によってサイクリング反応が起こります。この反応では、水酸化ステロイド脱水素酵素（ 3α -HSD）が中心となり、補酵素である Thio-NAD の還元と NADH の酸化を伴って、A3 の脱水素反応（酸化反応）とその反応産物（A3'）の還元反応の「サイクリング」が起きます。サイクリング反応が進行するにつれて Thio-NADH が蓄積していきます。この Thio-NADH の吸光極大波長（405 nm）の変化を測定することで、もとの抗原濃度が測定できます。詳細は参考文献等をご参照ください。

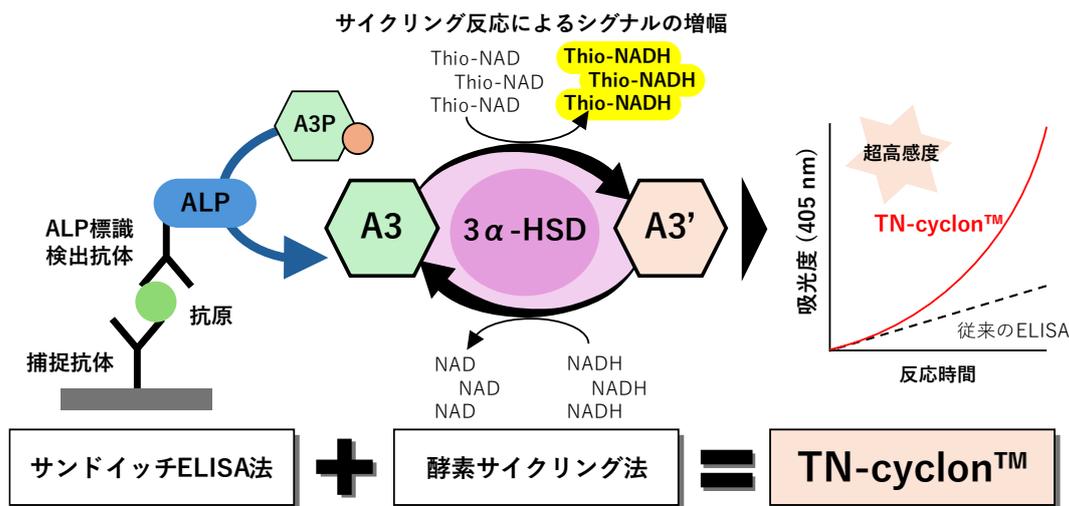


図 3 TN-cyclon™の原理

（TN-cyclon™はサンドイッチ ELISA 法と酵素サイクリング法を組み合わせたシグナル増幅手法です。）

（A3P は当社独自の基質となります。）

※ 本キットは、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。本操作マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

試薬の調製方法

・洗浄液の希釈調製

洗浄液（20倍濃縮）を超純水で20倍希釈します。

例) プレート1枚分では900 mL以上要します。900 mL作製する場合、洗浄液（20倍濃縮）45 mLに超純水855 mLを加え混合します。

- ※ 洗浄液（20倍濃縮）は室温に戻してから使用してください。
- ※ 洗浄には任意の溶液を使用できますが、TN-cyclon™ではALP標識抗体を使用するため、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline: PBS）などリン酸ベースのバッファーを使用すると測定結果に影響を及ぼす可能性がありますのでリン酸を含むバッファーは使用しないでください。ベースとなるバッファーはトリスヒドロキシメチルアミノメタン（以下、トリスまたは Tris）を用いた溶液、たとえばトリス緩衝生理食塩水（Tris-buffered saline: TBS）を推奨します。バッファーの推奨 pH は 7.5 です。

・捕捉抗体の希釈調製

お持ちの捕捉抗体を捕捉抗体希釈液により任意の希釈倍率で調製します。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。

- ※ 捕捉抗体希釈液は室温に戻してから使用してください。
- ※ 捕捉抗体を調製する際はタッピングなどによる穏やかな攪拌を推奨します。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。
- ※ 捕捉抗体の希釈調製には任意の溶液を使用できますが、その場合は 50 mM 炭酸-重炭酸緩衝液（pH9.6）を推奨します。

・標準抗原の希釈調製

お持ちの標準抗原と標準抗原希釈液を混合して任意の希釈系列を作製します。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。

- ※ 標準抗原希釈液は室温に戻してから使用してください。
- ※ 標準抗原を調製する際はタッピングなどによる穏やかな攪拌を推奨します。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。
- ※ 標準抗原の希釈調製には任意の溶液を使用できますが、その場合、ベースとなるバッファーは TBS などトリスを用いた溶液を推奨します。バッファーの推奨 pH は 7.5 です。

・検出抗体の希釈調製

お持ちの検出抗体を検出抗体希釈液により任意の希釈倍率で調製します。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。

- ※ 検出抗体は ALP 標識抗体をご使用ください。

- ※ 検出抗体の ALP 標識には Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH 試薬（同仁化学研究所社製、製品コード LK13）の使用を推奨します。
- ※ 検出抗体希釈液は室温に戻してから使用してください。
- ※ 検出抗体を調製する際はタッピングなどによる穏やかな攪拌を推奨します。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。
- ※ 検出抗体の希釈調製には任意の溶液を使用できますが、その場合、ベースとなるバッファーは TBS などトリスを用いた溶液を推奨します。バッファーの推奨 pH は 7.5 です。

・酵素サイクリング試薬の調製

表 2 のとおりに、酵素サイクリング試薬のチューブに溶媒を添加して溶解します。

溶解した酵素サイクリング試薬は、以後それぞれ「酵素サイクリング試薬 1 溶液」、「酵素サイクリング試薬 2 溶液」、「酵素サイクリング試薬 3 溶液」、「酵素サイクリング試薬 4 溶液」と表記します。

表 2

酵素サイクリング試薬 (フタの色)	試薬 1 (青色)	試薬 2 (黄色)	試薬 3 (緑色)	試薬 4 (ピンク色)
添加する溶媒 (フタ上ラベルの色)	酵素サイクリング 試薬調製液 1 (青色・緑色)	酵素サイクリング 試薬調製液 2 (黄色)	酵素サイクリング 試薬調製液 1 (青色・緑色)	メタノール 試薬特級
添加する量	40 μ L	300 μ L	160 μ L	120 μ L

- ※ 酵素サイクリング試薬は、溶解後速やかに使用してください。
- ※ 酵素サイクリング試薬調製液 1 および 2 は室温に戻してから使用してください。
- ※ 溶解直後の酵素サイクリング試薬 1 溶液は無色透明ないし薄い黄色ですが、保存期間中に変色し、黄色みが強くなる場合があります。変色した溶液は使用せず、新たに調製してください。
- ※ 溶解後の酵素サイクリング試薬 2 溶液は、遮光できるサンプルボックスなどに入れて保管してください。
- ※ 酵素サイクリング試薬 1、2、4 を溶解する際は、ボルテックスミキサーで攪拌してください。溶けづらいときはピペティングも併用してください。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。
- ※ 酵素サイクリング試薬 3 を溶解する際は、タッピングなどによりやさしく攪拌してください。ボルテックスミキサーによる強い攪拌は避けてください。攪拌後は卓上遠心機でスピンドウンしてから使用してください。
- ※ 溶解後の試薬はすべて冷蔵（2 - 8℃）にて保存してください。

アッセイプロトコル

- ※ 本プロトコルはお持ちの捕捉抗体、標準抗原、検出抗体の至適条件に基づき実施してください。
- ※ 本プロトコルは 96 ウェルプレート（もしくは、ストリップ形式の 96 ウェルプレート）を使用し、捕捉抗体溶液 100 μ L で固相化した場合（当社推奨条件）を想定しています。ウェル容量、捕捉抗体溶液の使用量を変更する場合は各溶液の使用量を適宜調整して実施してください。

1. 捕捉抗体の固相化

- ・希釈調製した捕捉抗体溶液 100 μ L を各ウェルに添加します。
 - ※ 固相化には任意の ELISA 用プレートを使用できますが、抗体の結合に最適化されたプレート（例：Thermo Fisher Scientific 社製、MaxiSorp™）の使用を推奨します。
- ・プレートシールでウェルを保護し、捕捉抗体に適した条件で一定時間反応させます。

2. 捕捉抗体の洗浄

- ・プレートウォッシャーにより捕捉抗体溶液を除き、希釈調製した洗浄液 300 μ L を各ウェルに添加します。この操作をさらに 2 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

3. ブロッキング

- ・ブロッキング溶液 300 μ L を各ウェルに添加します。
 - ※ ブロッキング溶液は、あらかじめ測定前に冷蔵庫から取出し室温に戻してから使用してください。
 - ※ ブロッキングには任意の溶液を使用できますが、その場合、ベースとなるバッファーは TBS などトリスを用いた溶液を推奨します。バッファーの推奨 pH は 7.5 です。
- ・プレートシールでウェルを保護し、室温で 1 時間静置します。
 - ※ お使いの抗体、標準抗原、サンプルに応じて反応条件は適宜調整してください。

4. ブロッキング溶液の洗浄

- ・プレートウォッシャーによりブロッキング溶液を除き、希釈調製した洗浄液 300 μ L を各ウェルに添加します。この操作をさらに 8 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

5. 標準抗原およびサンプルの添加

- ・濃度調製した標準抗原溶液およびサンプル 100 μ L を各ウェルに添加します。
- ・プレートシールでウェルを保護し、標準抗原およびサンプルに適した条件で一定時間反応させます。

6. 標準抗原溶液およびサンプルの洗浄

- ・プレートウォッシャーにより標準抗原溶液およびサンプルを除き、希釈調製した洗浄液 300 μ L を各ウェルに添加します。この操作をさらに 8 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

7. 検出抗体の添加

- ・希釈調製した検出抗体溶液 100 μ L を各ウェルに添加します。
- ・プレートシールでウェルを保護し、検出抗体に適した条件で一定時間反応させます。

8. 検出抗体の洗浄

- ・プレートウォッシャーにより検出抗体溶液を除き、希釈調製した洗浄液 300 μ L を各ウェルに添加します。この操作をさらに 8 回繰り返します。
 - ※ プレートウォッシャーがない場合は、アスピレーターを使用するか、デカントして溶液を除いてください。
- ・洗浄後はウェルを逆さまにし、ペーパータオル等に叩きつけてしっかり水気を切ってください。

9. 酵素サイクリング反応液の調製およびウェルへの添加

- ・表 3 のとおりに、酵素サイクリング試薬調製液 1 に、酵素サイクリング**試薬 1 溶液、試薬 2 溶液、試薬 3 溶液、試薬 4 溶液の順**に添加します（これを酵素サイクリング反応液と表記します）。調製量に応じて、1.5 mL チューブや 15 mL 遠沈管、50 mL 遠沈管を使用してください。
- ・均一になるように混合したのち、速やかに各ウェルに 100 μ L ずつ添加します。

表 3

試薬名 (フタ上ラベルもしくはフタの色)	100 μ L/1 ウェル あたりの調製量	例) 100 ウェル分を 調製する場合
酵素サイクリング試薬調製液 1 (青色・緑色)	95.2 μ L	9,520 μ L
酵素サイクリング試薬 1 溶液 (青色)	1.0 μ L	100 μ L
酵素サイクリング試薬 2 溶液 (黄色)	2.0 μ L	200 μ L
酵素サイクリング試薬 3 溶液 (緑色)	1.0 μ L	100 μ L
酵素サイクリング試薬 4 溶液 (ピンク色)	0.8 μ L	80 μ L

- ※ 変色した酵素サイクリング試薬 1 溶液は使用しないでください。測定データに影響を及ぼす恐れがあります。
- ※ 酵素サイクリング試薬の添加順は吸光度の測定値に影響する場合があります。必ず試薬の番号順に混合してください。
- ※ 酵素サイクリング反応液を均一にする際は、タッピングなどによりやさしく攪拌してください。ボルトエクスマキサーによる強い攪拌は避けてください。
- ※ 酵素サイクリング反応液のウェルへの添加にはマルチチャンネルピペットの使用を推奨します。マルチチャンネルピペットを使用する場合は、酵素サイクリング反応液をリザーバーに移してからウェルに添加してください。

1.0. 酵素サイクリング法による呈色反応（37℃条件下）および吸光度の測定

・37℃条件下で酵素サイクリング法による呈色反応を行い、反応開始後、任意の経過時間で405 nmの吸光度を測定します。

測定例) 測定波長を405 nm（主波長）と660 nm（副波長）に設定し、5分間隔で13回、吸光度を測定すると図4のような測定データを取得することができます。

（図4は標準PD-L1溶液を用いた場合の吸光度測定の例です）

- ※ 測定例では副波長を660 nmに設定して、[主波長吸光度] - [副波長吸光度]をThio-NADHの真の吸光度として使用しておりますが、副波長を用いなくても測定、解析することはできます。
- ※ 恒温機能付き吸光マイクロプレートリーダーがない場合は、37℃に設定できるホットプレートなどの恒温装置をご使用ください。
- ※ 恒温機能付き吸光マイクロプレートリーダーもしくはホットプレートなどの恒温装置は、反応開始までに装置内を37℃に加温してください。反応開始時点で37℃に達していない場合、測定データに影響を及ぼす恐れがあります。
- ※ ウェルをマイクロプレートリーダーで測定する前に、溶液に気泡がないことを確認してください。気泡が含まれていると測定データに影響を及ぼす恐れがあります。

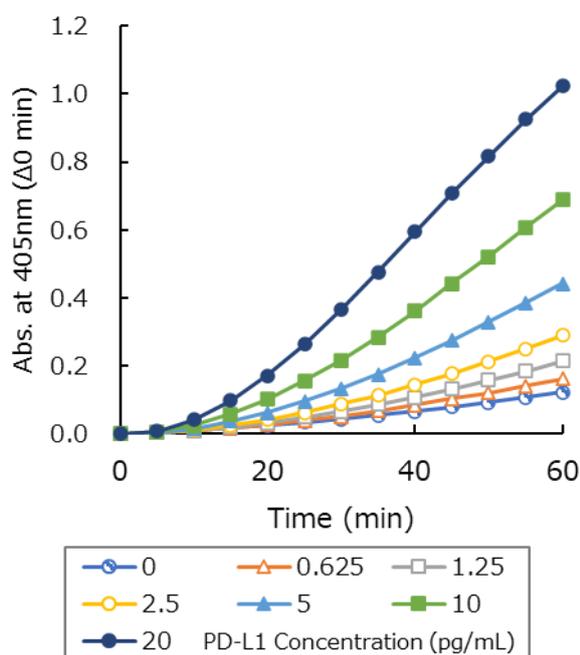


図4 標準PD-L1の測定データ

測定例：標準 PD-L1 の測定

※本操作マニュアルのプロトコルに沿って当社にて実施した標準 PD-L1 の測定結果です。選択された抗体、抗原の種類の違いなどの影響により、標準タンパク質の濃度が同じであっても、必ずしも同じ結果、数値になるとは限りません。

・ 検量線

標準 PD-L1 濃度 (pg/mL) に対する吸光度 (405 nm ($\Delta 0$ min)) の値と変動係数は表 4 のようになりました (測定波長：405 nm (主波長)、660 nm (副波長)、測定時間：55 min)。表 4 にある吸光度の値から得た検量線は図 5 のようになりました。

表 4

PD-L1 (pg/mL)	吸光度 (405 nm)			平均吸光度	変動係数 (%)
	1	2	3		
0	0.111	0.105	0.106	0.107	2.45
0.625	0.150	0.133	0.143	0.142	4.91
1.25	0.187	0.172	0.197	0.185	5.54
2.5	0.264	0.238	0.250	0.251	4.24
5	0.386	0.374	0.398	0.386	2.54
10	0.611	0.590	0.620	0.607	2.07
20	1.005	0.878	0.892	0.925	6.15

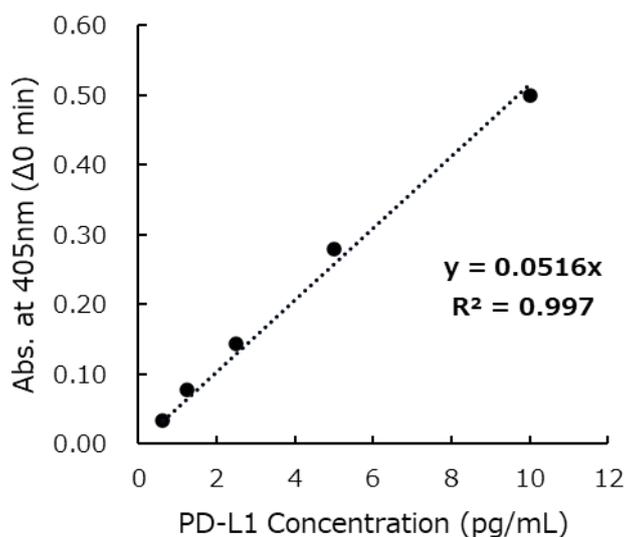


図 5 検量線

- ・ 検出感度

ブランク吸光度の標準偏差 (SD) と検量線の傾きから算出した検出限界は、0.2 pg/mL 以下 (表 4 の測定結果より、3SD を使用し 0.153 pg/mL) でした。

- ・ 添加回収試験

血清サンプルに既知濃度 (100 pg/mL) の標準 PD-L1 を添加し回収率を算出した結果は表 5 の通りでした。(血清サンプルは標準抗原希釈液により 100 倍希釈したものを使用)

表 5

サンプル (n=3)	実測濃度 (pg/mL)	添加回収率 (%)
血清 (100 倍希釈)	93.6	93.6

参考文献

- 1) Watabe S, Kodama H, Kaneda M, Morikawa M, Nakaishi K, Yoshimura T, Iwai A, Miura T, Ito E. Ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of proteins by combination with the thio-NAD cycling method. Biophysics. 2014 Sep 5;10:49-54. doi: [10.2142/biophysics.10.49](https://doi.org/10.2142/biophysics.10.49).
- 2) Kobayashi Y, Kyosei Y, Ogawa R, Okita K, Yoshimura T, Ito E. Ultrasensitive protein-level detection for respiratory infectious viruses. Front Immunol. 2024 Dec 2;15:1445771. doi: [10.3389/fimmu.2024.1445771](https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1445771).

お問い合わせ先：

株式会社 BioPhenoMA

info@biophenoma.com