

Spark™ 10M による AlphaLISA® テクノロジー の測定

Spark 10M によるヒト免疫グロブリン (IgG) の検出

緒言

AlphaLISA は、従来の ELISA アッセイに取って代わるビーズを用いたホモジニアスな洗浄不要のアッセイである。Alpha (化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ) テクノロジーに基づき、AlphaLISA は、サンドイッチタイプのアッセイまたは競合免疫タイプのアッセイとして準備し、対象となる生物学的試料の分子を検出・定量化できる(1)。

AlphaLISA のドナービーズ内のフォトセンシタイザー分子が 680 nm にて高エネルギー励起されると、周囲の酸素が一重項酸素に変換され、近接している場合は、アクセプタービーズ内の化学物質と反応する。一連のエネルギー転移ステップにより、最終的に 615 nm にて強力なシグナルが生成され、2 種類のビーズに結合した分子同士が特異的に結合したことを示している。

AlphaLISA のアクセプタービーズに組み込まれた蛍光物質により、従来の AlphaScreen®アッセイに使用されるアクセプタービーズより狭帯域信号となる。これにより、AlphaLISA は < 600 nm の波長ではそれほど信号干渉せず、アッセイの感度および頑健性が增强される。

専用の AlphaLISA 光学部品を使用することにより、血液中および血清中の標的分子を解析できるようになる。試料内のヘモグロビンの影響は激減する。さらに、このアッセイは洗浄不要であるため使いやすい。

Tecan の新しいマルチモードリーダー Spark 10M は、Alpha ドナービーズの励起用高出力レーザ光源を使用し、発光フィルター(2)とリアルタイムの温度補正機能(3)が搭載されており、Alpha Technology のための高感度検出モジュールを提供する。これにより、AlphaScreen、AlphaLISA、AlphaPlex アッセイのための妥協のない性能を提供し、発光信号の超高感度検出を実現する。

このアプリケーションノートでは、Spark 10M における AlphaLISA テクノロジーの実行およびヒト免疫グロブリン G (IgG) を検出するためのその使用 (AlphaLISA IgG アッセイキットを使用) について記述している(4)。

材料および方法

- Spark 10M マルチ検出モードプレートリーダー (Tecan, Austria)
- AlphaLISA ヒト IgG アッセイキット (PerkinElmer, USA)
- 384 ウェル白色マイクロプレート (Greiner Bio-One, Germany)

キットのプロトコルに従ってAlphaLISA IgG標準液を希釈し、白色384ウェルマイクロプレートの5ウェルにピペット分注した。アッセイ用バッファーのみ (IgGなし) で構成されるブランクウェルも対象とした。AlphaLISAのアクセプタービーズおよび抗IgG抗体は、アッセイに関する指示に従って希釈し、試料に添加して60分間インキュベートした。次にドナービーズを適宜希釈・添加し、さらに暗所で30分間インキュベートした(2)。その結果生じたAlphaLISA信号については、表1に要約した測定条件を用いて、Spark10Mにて測定した。

測定パラメータ	
プレート定義ファイル	GRE384sw
励起時間	100 msec
積分時間	300 msec
アプリケーション	AlphaLISA
波長	610-635 nm
温度補正	作動
アウトプット	Counts/sec
待機時間	0 msec

表 1: AlphaLISA 測定条件

結果

図1は Spark 10M にて AlphaLISA 法で測定した典型的な IgG の標準曲線を示す。充填量 20 μ L/ウェルを使用した。

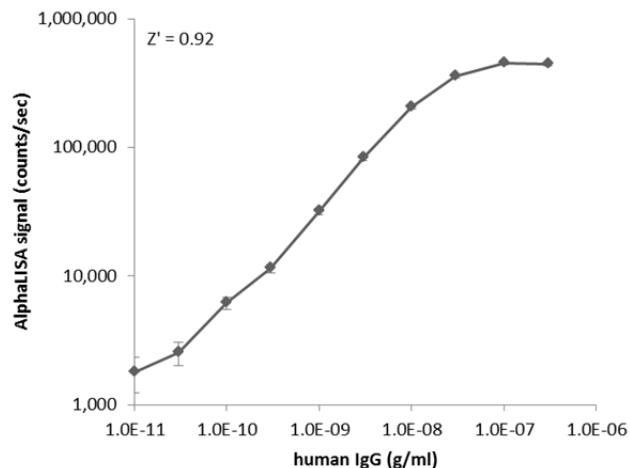


図 1: AlphaLISA 信号曲線 - 対数-対数目盛法。

低濃度の場合、線形-線形目盛法を用いて曲線を作成し、優れた測定直線性に対しよい印象が得られた。R² 値は 0,9998 とした(図 2)。

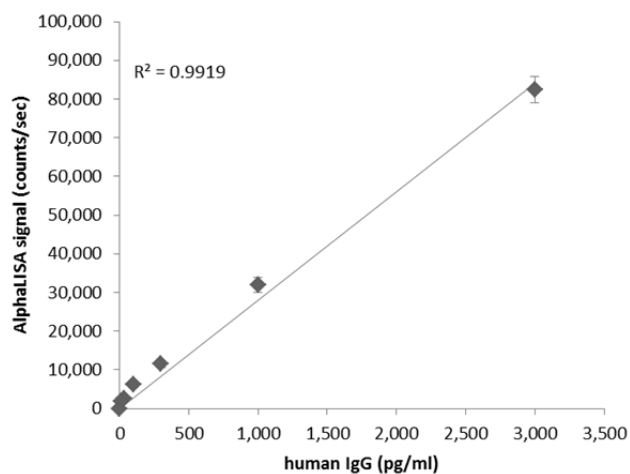


図 2: AlphaLISA 信号曲線—線形-線形目盛法。

IgG AlphaLISA を行ったところ、IgG の検出限界は 52pg/mL、Z' 値は 0.92 と優れていた。さらに、複製ウェル間差はきわめて小さかった。測定したすべての IgG 希釈液における CV は 10%未満であり、測定値の均一性はきわめて良好であった。

結論

このアプリケーションノートに要約した結果は、ヒト IgG アッセイ等、AlphaLISA を用いたアッセイについて Spark 10M の性能は優れていることを示している。Spark 10M を用いて得られた感度 (52 pg/mL) は、キットの製造会社が引用した検出限界 (240 pg/mL) を超えている。本装置専用の光学部品と Tecan の革新的な温度補正機能 (3) により、高品質な測定結果が得られ、Spark 10M は頑健かつ感受性の高い再現可能な AlphaLISA 測定に完全に適合する。

略語

Alpha	化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ
CV	変動係数
IgG	免疫グロブリン G

参考文献

- (1) A Practical Guide to Working with AlphaScreen
http://www.urmc.rochester.edu/hts/_source/alphascreeenpracticalguide.pdf
- (2) Technical Note: Unparalleled flexibility for luminescence detection with the Spark 10M multimode reader. 398597 V1.0. 12-2014.
- (3) Technical note: New Infinite[®] M1000 PRO with AlphaScreen module. 396981 V1.0. 11-2011.
- (4) AlphaLISA Human IgG Assay Kit Instructions (PerkinElmer, #AL205C)

※このテクニカルノートは Tecan (本社 スイス) が発行 (原文 英語) し、テカンジャパンが日本語翻訳したものです。翻訳文の表現等に疑義が生じた場合は、原文をご参照ください。

.....
Australia +61 3 9647 4100 **Austria** +43 62 46 89 33 **Belgium** +32 15 42 13 19 **China** +86 21 2206 3206 **Denmark** +45 70 23 44 50 **France** +33 4 72 76 04 80
Germany +49 79 51 94 170 **Italy** +39 02 92 44 790 **Japan** +81 44 556 73 11 **Netherlands** +31 18 34 48 174 **Singapore** +65 644 41 886 **Spain** +34 93 595 95 25 31
Sweden +46 31 75 44 000 **Switzerland** +41 44 922 81 11 **UK** +44 118 9300 300 **USA** +1 919 361 5200 **Other countries** +43 62 46 89 33

Tecan Group Ltd.では本文書において正確かつ最新の情報をご提供するよう最善の努力を尽くしておりますが、誤謬や脱漏が生じる可能性があります。したがって、Tecan Group Ltd.では明示的または暗示的にかかわらず、本文書における情報の正確性または完全性につき、何らの表明または保証を行うものではありません。また、本文書は予告なく変更する場合があります。記載された商標はすべて法律で保護されています。本文書に記載された仕様書の技術的詳細および詳しい手順については、テカンの担当者までご連絡ください。本文書で取り上げたアプリケーションおよび製品は一部の市場で入手困難な場合がありますので、営業担当者にお問い合わせください。

記載された商標はすべて法律で保護されています。本文書に記載された商標とデザインは、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の商標または登録商標です。完全なリストは www.tecan.com/trademarks で参照できます。リストには含まれませんが、ここに記載されている製品名および会社名はそれぞれの所有者の商標である場合があります。

Tecan は、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の登録商標です。Spark、SparkControl、Fusion Optics および Quad4 Monochromators は同商標です。

Spark 10M は研究用途向けです。診断用途ではご使用いただけません。

© 2015 Tecan Trading AG スイス 著作権所有 免責事項と商標については、www.tecan.com をご覧ください。

www.tecan.com www.tecan.co.jp/spark