

# アッセイキット技術情報

## ELISA 操作法

### Quantikine Kit 操作マニュアル

R&D Systems 社 Human VEGF Quantikine ELISA Kit (#DVE00) の操作方法概略です。一般的な ELISA キットの操作の参考にして下さい。

#### ※ご 注 意

ご使用前に必ず各製品添付のデータシートをご覧の上、その指示に従って下さい。

#### キット内容

- VEGF microplate (捕捉用抗 VEGF 抗体がコートされた 96 well マイクロストリッププレート)
- VEGF conjugate (HRP 標識検出用抗 VEGF 抗体)
- VEGF standard (VEGF スタンダード)
- Assay diluent RD1W (測定用バッファー)
- Calibrator diluent RD5K (細胞培養上清試料用希釈バッファー)
- Calibrator diluent RD6U (血清・血漿試料用希釈バッファー)
- Wash buffer concentrate (洗浄用バッファー)
- Color reagent A (安定化させた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Color reagent B (TMB : HRP の基質)
- Stop solution (反応停止液)
- Plate sealer (プレートシーラー)

#### 準備する物

- マイクロプレートリーダー (450 nm で吸光度を測定可能な物。補正波長の 540 または 570 nm が測定できる物がよい。)
- ピペット, ピペットチップ
- 蒸留水
- プレートウォッシャーまたは、プレート洗浄用ボトル
- 500 ml シリンダー
- ポリプロピレンチューブ (12 mm × 75 mm)
- 測定試料
- Human VEGF コントロール (別売品 : 必要に応じて)  
…など

#### 測定可能試料および調製法

- 細胞培養上清 (VEGF の安定化のために、少なくとも 1% の fetal calf serum を加えて下さい。)
- 血清
- 血漿 (抗凝血剤として EDTA, クエン酸, ヘパリンのいずれかで処理した試料)
- ※ 詳細は製品添付のデータシートの「SAMPLE COLLECTION & STORAGE」の項目をご覧下さい。

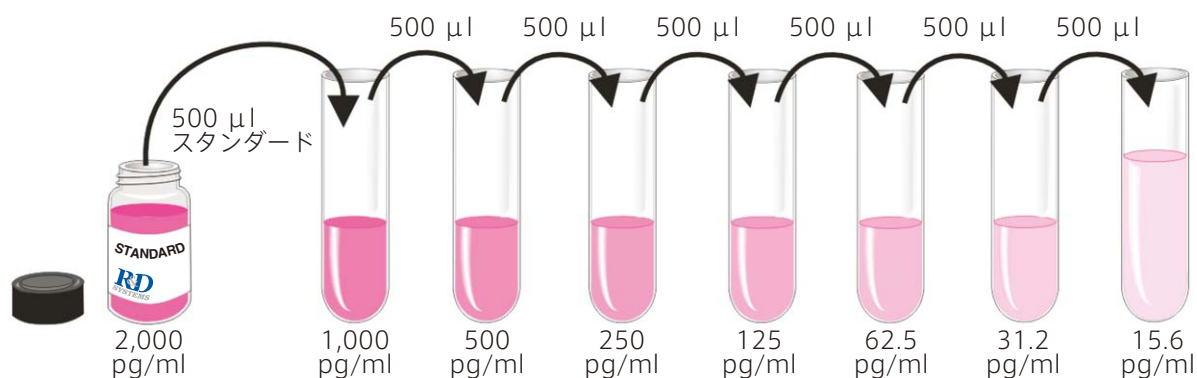
#### 試薬の調製

- ※ 使用する前に試薬はすべて室温に戻して下さい。
- 洗浄用バッファー** : バッファー中に沈殿物が生じている場合は室温に戻し、よく混合して下さい。その後、最終容量が 500 ml になるように 480 ml の蒸留水を加えて 20 ml の Wash buffer concentrate を希釈して下さい。
- 基質溶液** : 使用する 15 分前に Color reagent A・B を等量ずつ混合して下さい。各ウェルに 200 μl ずつ必要です。混合後は必ず遮光して下さい。
- VEGF スタンダード** : 測定する試料 (因子) によって希釈に使用する Calibrator diluent が異なります。添付のプロトコルをご覧下さい。希釈前に、15 分間穏やかに攪拌して下さい。
- ※ スタンダードを調製する際は、ポリプロピレンチューブ (12 mm × 75 mm) をご使用下さい。

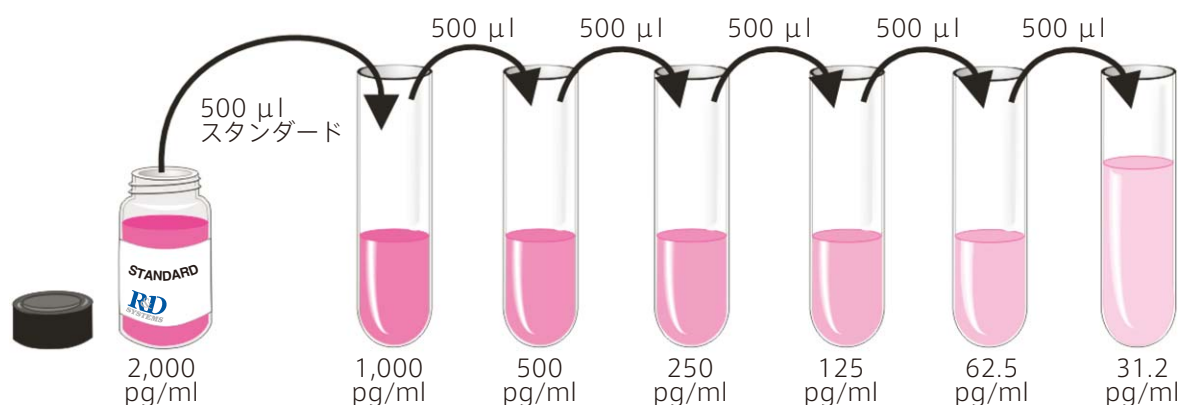
## スタンダードの調製法

\* Calibrator diluent はあらかじめ 500  $\mu$ l ずつ各チューブに分注して下さい。

細胞培養上清試料を使用する場合 (Calibrator diluent RD5K を使用\*)



血清・血漿試料を使用する場合 (Calibrator diluent RD6U を使用\*)



\* 溶液の色は異なります。

## 操作時の注意点

- すべての試料、スタンダードおよびコントロールは二重試験法でアッセイして下さい。
- タンパク質を含む試薬を取扱う際には、気泡を立てないようにして下さい。
- クロスコンタミネーションを避けるために、ピペットチップやリザーバーは試薬ごとに変えて下さい。
- インキュベーション中は必ずプレートシーラーでふたをして下さい。
- プレートウォッシャーを使用してプレート洗浄を行う場合には、プレートを 30 秒間洗浄液にソークし、次の洗浄を行う前にプレートの左右の向きを入れ替えて下さい。
- 基質溶液は使用する 15 分前に調製して下さい。調製後は必ず遮光して下さい。調製直後は青色ですが、ウェルに添加後、反応停止液を添加すると黄色に変化します。
- 基質溶液、反応停止液をウェルに添加した際に、ウェル中の溶液が緑色になってしまった場合は、プレートを軽くゆすって試薬を混合して下さい。

時間 (目安)	操 作	ポイント
開始前	1. 試薬や試料を調製する	・ 試薬および試料は、使用する前に室温に戻して下さい。
0 : 00	2. 各ウェルに Assay diluent RD1W を添加する  細胞培養上清試料の場合 : 50 $\mu$ l    血清・血漿試料の場合 : 100 $\mu$ l	・ 使用しないウェルはすぐに袋に戻して、密封後 4°C で保存して下さい。
	3. 各ウェルにスタンダード, コントロール, 試料を添加する  細胞培養上清の場合 : 200 $\mu$ l    血清・血漿の場合 : 100 $\mu$ l	
0 : 20	室温で 2 時間インキュベーションする	・ インキュベーション中は、コンタミネーションを避けるためにも必ずプレートシーラーを使用して下さい。
	4. 洗浄用バッファーを用いてプレートの洗浄を 3 回行う	・ 洗浄にはオートウォッシャーまたは、プレート洗浄用ボトルをご使用下さい。 ・ 洗浄後、ペーパータオルの上にプレートを逆さにして軽く叩きつけ、洗浄用バッファーを完全に除去して下さい。
2 : 30	5. 各ウェルに VEGF conjugate を 200 $\mu$ l ずつ添加する  室温で 2 時間インキュベーションする	・ インキュベーション中は新しいプレートシーラーを使用して下さい。
4 : 30	6. 洗浄用バッファーを用いてプレートの洗浄を 3 回行う  7. 基質溶液を調製し (試薬の調製参照), 各ウェルに 200 $\mu$ l ずつ添加する  細胞培養上清の場合 : 室温で 20 分間インキュベーションする    血清・血漿の場合 : 室温で 25 分間インキュベーションする	・ 基質添加後は必ずプレートを遮光して下さい。
5 : 00	8. 各ウェルに反応停止液を 50 $\mu$ l ずつ添加する  9. プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定 (540 nm または 570 nm で補正)	・ 反応停止液を添加すると、ウェル中の色が青色から黄色へ変化します。もしウェル中の色が緑色であったり、色の変化が見られなければ、軽くプレートをゆすって試薬を混ぜて下さい。 ・ 測定は必ず 30 分以内に行って下さい。