

本品は研究用試薬です。体外診断用として使用できません。

コード No. 292-86601 (96回用)

本キットには管理試料が2濃度添付されています。弊社製品ページより、各管理試料の濃度を確認して下さい。

レビス™ ELISA スキルチェック

1. キット使用目的

ELISA の手技は一見易しそうですが、proficiency；熟練が要求される手技が必要とされます。ELISA 測定精度評価／技能評価を定期的実施することで、ELISA 測定従事者の技能を客観的に評価することができます。また、測定環境の改善点を見出す機会にすることもできます。

精度評価

技術研修

技能評価

- ・ ELISA 測定に関する測定者（室）の継続的な技能評価
- ・ 測定者（室）の問題点の把握また改善のチャンス（不適切な操作手順、使用機器、設備の校正不良）
- ・ 測定室の付加的な信頼性の担保
- ・ 測定室間差の把握
- ・ 測定者への研修の機会

2. ご使用前にご確認頂きたい技術上のヒント及び注意事項

- ・ 本キットは ELISA 測定法を熟知された指導者の方でのご使用下さい。
- ・ 準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
- ・ 試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で充分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
- ・ 本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
- ・ 本キットは動物由来の成分を含んでいます。充分注意して取り扱って下さい。
- ・ 検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウェル／1 チップのご使用をお勧めします。
- ・ TMB 溶液は 96 ウェルプレートに使用するまでは薄い青色澄明です。光を避けて保存して下さい。
- ・ 反応停止液は 96 ウェルプレートに使用するまでは無色です。測定過程で反応停止液をウェルに入れるとすぐに青から黄色に変わります。
- ・ ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温：20℃～25℃（実験台上またはインキュベータ内温度）を厳守して下さい。また、風速（エアコンの風も含む）：0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下での測定は避けて下さい。やむを得ず、測定操作を風速：0.4m/sec 以上、湿度 30% 未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。
例) インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細はお問い合わせ下さい。
- ・ 各ステップでの静置反応時には、ウェルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
- ・ 試薬類は口でピペティングしないで下さい。
- ・ ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
- ・ 使用済みの検体、使用した消耗品等は 1% ホルマリン、2% グルタルアルデヒドまたは 0.1% 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。また、使用した消耗品や未使用の薬品類は所属先施設の規定並びに各地域の法令にしたがって廃棄して下さい。

3. 構成品

構成品	状態	容量
(A) 抗体固相化プレート	洗浄後使用	96wells (8×12) / 1枚
(B) 標準品	希釈後使用	50 μ L / 1本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60mL / 1本
(D) ビオチン結合抗体溶液	希釈後使用	20 μ L / 1本
(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液	希釈後使用	40 μ L / 1本
(F) TMB 溶液	そのまま使用	12mL / 1本
(H) 反応停止液	そのまま使用	12mL / 1本
(I) 洗浄液 (10×)	希釈後使用	100mL / 1本
(K) プレートフレーム	—	2個
(L) 管理試料 1	そのまま使用	200 μ L / 1本
(M) 管理試料 2	そのまま使用	200 μ L / 1本
(J) プレートシール	—	3枚

レビス™ ELISA スキルチェックは一つのキットを3人で使用することもできます。そのため、プレートフレームが2個同梱されています。

【試薬の安定性と保存方法】

(A) 抗体固相化プレート

未使用（冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない）抗体固相化ストリップは同梱のジップシールバックに戻し、そのまま 2℃～10℃で保存して下さい。

(B) 標準品 (200ng/mL)

キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

(C) 緩衝液 及び (F) TMB 溶液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(D) ビオチン結合抗体溶液 及び (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H) 反応停止液

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

(I) 洗浄液 (10×)

洗浄液 (10×) を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

(L) 管理試料 1、(M) 管理試料 2

キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2℃～10℃で保存して下さい。

4. キット以外に必要な器具 チェックリスト

- 96 ウェルプレートリーダー (450nm ± 10nm、620nm : 600nm ~ 650nm)
- データ計算用ソフトウェア 無ければ Excel でも簡易的には計算できます
- 攪拌器 (Vortex タイプ)
- マイクロプレート振とう器 (約 600rpm ~ 1200rpm)
- 96 ウェルプレート用洗浄機 (あれば好ましい) または噴射ビン
- 標準溶液希釈用試験管
- 洗浄液希釈用ガラス器具 (メスシリンダー・ピッカー・瓶)
- チップ交換型ピペット (使い捨てチップで 10 μ L を正確にピペティングできるもの、及び 100 μ L ~ 200 μ L を正確にピペティングできるもの)
- 連続分注ピペット (例 Eppendorf の multipette plus)、100 μ L を連続分注できるもの
- ペーパータオル等の吸水性のあるもの (洗浄後にプレートに残った液を取り除く)
- 精製水 (蒸留水)

試薬の調製

- *キットの試薬は使用前に必ず室温（20℃～25℃）に戻して下さい（2時間位が目安です）。複数回に渡って測定する場合は箱ごと室温化せず、必要な試薬だけ取り出して室温化を行って下さい。
- *3.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。
- *測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい（ご不明な際にはお問い合わせ下さい）。

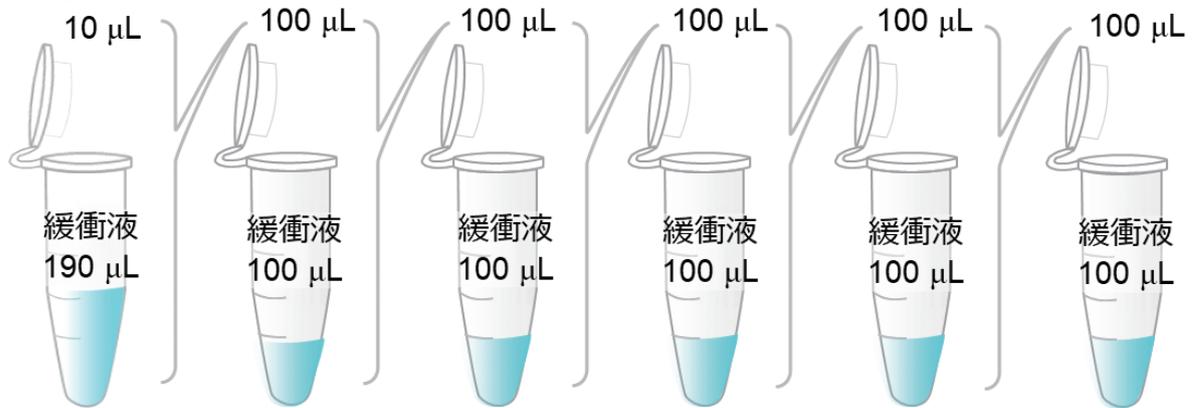
【濃縮された試薬類】

(B) 標準品（200ng/mL）；標準曲線作成用

(B) 標準品（200ng/mL）（原液）と（C）緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。下記は一例です。

標準品の容量	(C) 緩衝液	濃度 (ng/mL)
標準品原液 10 μ L	190 μ L	10
10ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	5.0
5.0ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	2.5
2.5ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	1.25
1.25ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	0.625
0.625ng/mL 溶液 100 μ L	100 μ L	0.313
0 (Blank)	100 μ L	0

標準溶液原液



調製濃度

ng/mL 10 5.0 2.5 1.25 0.625 0.313

※標準品原液を採取する際はキャップの裏側に付着している場合がございますので、軽く遠心してから採取して下さい。

(D) ビオチン結合抗体溶液

- 20 μ L を充分分取できる量をご提供しています。
- 濃縮液を（C）緩衝液で **4000 倍** に希釈して下さい。
- 2段階希釈をお勧めします。例えば、第1段階として40倍、第2段階として100倍。

(E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液

- 40 μ L を充分分取できる量をご提供しています。
- 濃縮液を（C）緩衝液で **2000 倍** に希釈して下さい。
- 2段階希釈をお勧めします。例えば、第1段階として20倍、第2段階として100倍。

(I) 洗浄液（10×）

- 洗浄液（10×）を室温化された精製水（蒸留水）で **10 倍** に希釈して下さい。
- 例：100mL の洗浄液（10×）+ 900mL の精製水（蒸留水）（96 ウェル全てを使用する場合）

5. 測定操作法

抗体固相化プレートのシールはプレートが室温に戻ってから剥がして下さい。温度が低く、シールが硬いうちに剥がすと、きれいに剥がれないことがあります。キットは室温に戻してから作業を開始して下さい。測定は必ず3重測定(1試料あたり3ウェルを使用して測定する)で行って下さい。洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

- (1) 保護液を捨て、あらかじめ調製した洗浄液を各ウェルに満たし4回洗浄(*①)します。その後ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (2) 各ウェルにビオチン結合抗体溶液を100 μ Lずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (3) 管理試料測定ウェルに管理試料1、2をそれぞれのウェルに10 μ L添加します。
 - (4) 標準品測定ウェルに各濃度の標準溶液を10 μ Lずつ分注します。
 - (5) マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (6) プレートシールを貼り、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)で2時間静置(*③)します。
 - (7) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし、4回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (8) 各ウェルにペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を100 μ Lずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (9) プレートシールを貼り、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)で30分間静置(*③)します。
 - (10) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4回洗浄(*①)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウェルに残った液を取り除きます。
 - (11) 各ウェルにTMB溶液を100 μ Lずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて攪拌(*②)します。
 - (12) プレートシールを貼り、室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)で30分間静置(*③)します。
 - (13) 各ウェルに反応停止液を100 μ Lずつ分注し、発色反応を停止します。
 - (14) 攪拌(*②)後、直ちにマイクロプレート用分光光度計で450nm(副波長620nm)での吸光度を測定します。副波長は600nm~650nmの範囲で使用できます。
- (*①)、(*②)、(*③) 9. 測定手順概要とチェックリストをご参照下さい。

ワークシート (例)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ng/mL											
B	5 ng/mL	QC 1										
C	2.5 ng/mL											
D	1.25 ng/mL											
E	0.625 ng/mL	QC 2										
F	0.313 ng/mL											
G	0 ng/mL											
H	Blank											

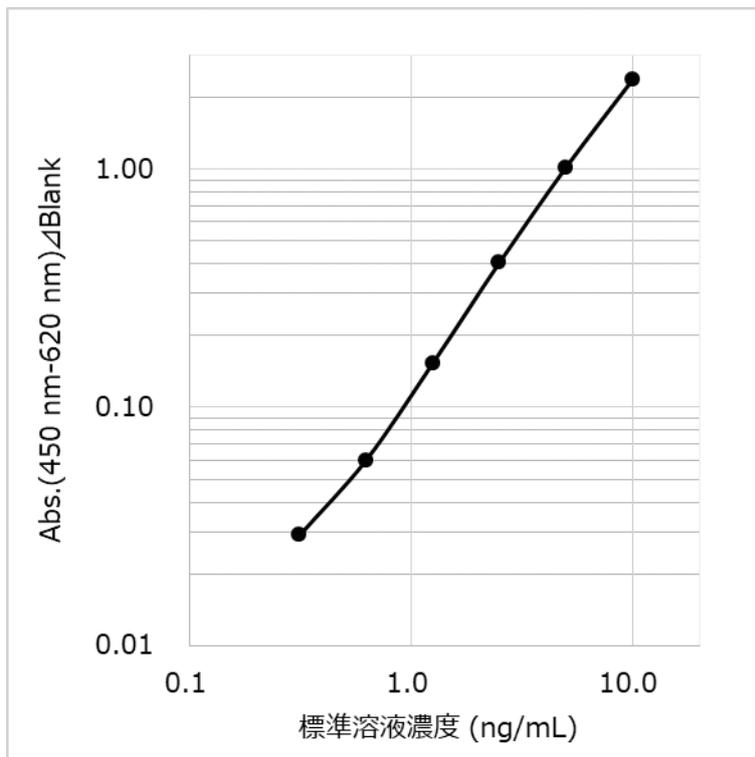
6. 計算

(1) 測定毎に標準曲線を作成します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度 (ng/mL)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作成して下さい。

(2) 標準曲線より、管理試料の吸光度に対応する濃度 (ng/mL) を読み取ります。

* 演算処理では、3 次多項式または 4 または 5 パラメーターの使用をお勧め致します。

下のグラフは標準曲線例です (吸光度は、測定環境により変動します)。



7. 測定値の観察と検討

a. 検出限界について

Blank の吸光度平均値と標準偏差 (SD) を計算しましょう。

Blank の吸光度平均値 + 3.3 SD を計算しましょう。(ICH 合意による検出限界、detection limit, DL を計算するため) (正確な判定には Blank のウェル数をかなり多くすることが必要です)

この値を先ほどの検量線から濃度に換算しましょう。この値が今回測定した測定感度、および検出限界と考えられます。

b. 定量下限について

Blank の吸光度平均値と標準偏差 (SD) を計算しましょう。

Blank の吸光度平均値 + 10 SD を計算しましょう。(ICH 合意による定量下限 (quantitation limit, QL) を計算するため)

c. 検量線の真度について

定量値 (逆回帰濃度) と理論値 (調製濃度) との一致の程度を確認しましょう。標準溶液の調製濃度 (名目濃度) を 100% としたとき、検量線の回帰式に標準溶液を測定したときの吸光度を当てはめ求めた濃度を百分率表記で表します。

d. 管理試料に関して

d.1. 測定精度の検討

平均値と標準偏差を求め、平均値に対する百分率、即ち変動係数 (Coefficient of Variation, CV) を計算して下さい。この値が測定精度を示します。下の表を完成して下さい。吸光度は Δ Blank (濃度ゼロの吸光度との差) を記入。

検体	ウェル 1 測定値	ウェル 2 測定値	ウェル 3 測定値	平均値	標準偏差	変動係数 CV (%)
(L) 管理試料 1						
(M) 管理試料 2						

変動係数 CV (%) = 標準偏差 / 平均値 × 100

d.2. 乖離度の検討

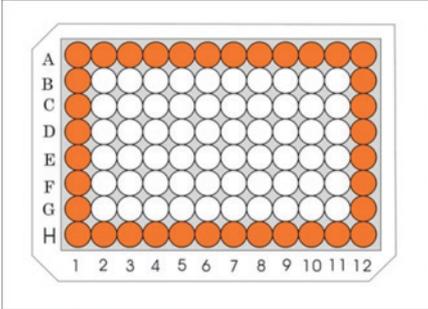
同じ試料を用いて行った定量値間の相違の程度。

乖離度 (%) = {(比較する分析の定量値) - (基準となる分析の定量値)} / (両者の平均値) × 100

8. 測定技量向上のために

例えば、1回目の測定を行ったところ3重測定した結果で、検量線の真度が< 85%、> 115%、ウェル間差がC.V.値> 15%、管理試料の乖離度が< 85%、> 115%だった場合、2回目の測定でどんなところに注意して測定してみたら良いのでしょうか？

チェック項目	ヒント
ピペッティング精度	<ul style="list-style-type: none"> ・ピペット選択について 本 ELISA キットで使用する最小採取量は 10 μL です。10 μL 採取時は最大 10 μL のピペットを選択して下さい。20 μL、50 μL、100 μL 採取時は最大 100 μL のピペットを選択して下さい。190 μL 採取時は可能なら最大 200 μL のピペットを、なければ最大 1000 μL のピペットを使用して下さい。 可変式ピペットの注意点として、適当な頻度でメンテナンスと校正を行って下さい。精度が悪くなった場合は新しいピペットのご購入をお勧めします。 ELISA 操作上において 8 連や 12 連ピペットは弊社ではお勧めしていません。理由は 96 ウェルプレートの底や底部に近い壁に 8 本または 12 本のチップの先端を擦ってしまい固相化物を剥がしてしまう可能性があるからです。また、均一な力加減で分注作業を行うには熟練が必要です。チップで擦ってしまった場合は、固相化物、ブロッキングを剥がしてしまい、そこに非特異吸着が起きる可能性があります。同一溶液を 96 ウェルの全てに分注する際には連続分注器のご使用をお勧めしています。また、メンテナンスされた電動ピペットもお勧めです。 ・正しく定量を行うためには適当な頻度でピペットのメンテナンスを行って下さい。 ・0 濃度 (Blank)、一番薄い濃度の標準溶液から分注しましょう。連続分注時においても薄い濃度のウェルから分注することをお勧めします。 ・96 ウェルを使用する場合は 20 分前後で 1 プレート全てに分注できるようにしましょう。4 列 (32 ウェル) の場合は 7、8 分を目安にしましょう。 ・連続分注時を除きチップは 1 ウェル毎に交換することをお勧めします。 ・チップ使用法のポイントに 2 つの方法がありますが、どちらか一方に統一して使用しましょう。 ◎プレウェットング法 ・新しいチップをセットした後、採取する溶液を第一ストップ(プランジャーが最初に止まる所)の範囲で 2～3 回吸い上げ、放出する「プレウェットング」を行った後、溶液を満たします。 ・チップの先端を容器の内壁に軽くタッチし先端の外側についている溶液を除去し取り出します (タッチ&ゴー)。 ・チップ先端をウェルの内壁から少し離し溶液を排出します。この時プッシュボタンを最後まで押し、液を完全に排出します (ブローアウト)。 ・ウェルの内壁でタッチ&ゴーを行ってピペットを抜き出し、チップを交換します。この時チップ先端で内壁を擦らないように注意しましょう。 ◎共洗い法 この方法は緩衝液などが既にウェルやチューブに入っている場合に適用できます。微量な検体、微量な各標準溶液分注作業時などにお勧めします。 ・新しいチップをセットし、第一ストップまでプッシュボタンを押し下げ、採取する溶液を静かに吸い上げる。 ・容器の内壁でタッチ&ゴーを行い、ピペットを取り出します。 ・緩衝液などが既に入っているウェルにチップの先端を入れて溶液を放出し、第一ストップの範囲内で 2～3 回プッシュボタンを上下して「共洗い」します。最後にブローアウトします。 ・ウェルの内壁でタッチ&ゴーを行い、ピペットを抜き出し、チップを交換します。 ・チップの先を 96 ウェルプレートの内壁に擦らないように分注しましょう。 ■ピペッティング時における泡の発生と対策 (一例) プレウェットング、共洗い法を使い分け正確な分注を行いましょう。 ブローアウトをすると泡の発生が起こる可能性があります。泡の発生に注意しましょう。分注時にウェルの底面、壁面にチップを擦らないようにしましょう。固相化抗体が剥がれてしまいます。いつも一定のスピードで押し下げましょう。最後にタッチ&ゴーを行いましょう。

<p>温度管理</p>	<p>■エッジ現象（エッジ効果とも言う）とは？ ウェルプレートの外周部に位置するウェルは、他の内側のウェルと比べて外部からの温度の影響（冷／暖）を受けやすいことから、その部分での反応が他の部分より進行し過ぎる、あるいは抑制されることを言います。</p>  <p>一般的には冷蔵庫に保管してあったウェルプレートや試薬、検体を室温より低い状態で使用すると外側が先に暖まって反応が速くなり、吸光度が高くなります。TMB 溶液の温度が低い場合は顕著に現れます。冬ではヒーターの温風またはストーブの輻射熱の影響を受け、夏ではクーラーの冷風の影響を受ける可能性があります。その結果、Blank（ゼロ濃度）の吸光度が最低濃度の標準溶液のウェルより高く（冷やされた場合は低く）なったり、Blank を含めた 2 重測定の標準品ウェルのプレート端側が常に吸光度が高いなどという現象が見られることになります。</p> <p>【エッジ現象対策】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・測定する 1 時間半から 2 時間前にウェルプレートや試薬、検体を冷蔵庫から出し反応温度に合わせましょう。 ・測定開始前に試薬の温度を確認しましょう。 ・空調機器／恒温槽／PC／人など熱源となるものの影響を直接受けないところで測定を行いましょう。 ・反応温度を一定に保ちましょう。 ・洗浄液の温度管理には特に注意しましょう。洗浄液は容量が多いので温度を合わせるのに時間がかかります。洗浄液の温度が反応温度と異なると洗浄の都度プレートの温度が変化してしまいます。 ・プレートに温度が均一に伝わるようにしましょう。 ・インキュベータを使用する場合は緩衝液や洗浄液もインキュベータに入れておきましょう。 <p>*ただし、試薬の安定性は事前に確認して下さい。</p>
<p>洗浄方法</p>	<p>ELISA 操作において洗浄はとても重要です。特に洗浄不足は非特異的反応によるブランクの吸光度が上がり測定範囲の低濃度域での感度が得られなくなります。このようなことを防ぐためにも洗浄操作を確実に行いましょう。</p> <p>【洗浄のポイント（手洗浄の場合）】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・洗浄液（10×）が付属の場合は、精製水の温度を室温に戻してから希釈しましょう。ご存じのように液体の温度は室温に比べ変化しにくいいため操作開始時に洗浄液の温度が反応温度と違う場合があります。特に汲み置きした精製水を使用する場合は注意しましょう。操作前に温度確認することをお勧めします。 ・インキュベータを使用する場合は、洗浄液もインキュベータに入れ温度を同じにしましょう。 ・検体、標準溶液を分注後指定時間反応させた後の 1 回目の洗浄については、反応液を捨て、洗浄液を各ウェルに満たす時、洗浄液が溢れ、隣りのウェルに移らないように注意しましょう。この時の洗浄液量目安は 250～300 μL/ウェルです。2 回目からは溢れても構いません。 ・洗浄液をウェルに満たす時、ある程度の水流の強さで行わないと洗浄不良を起こす可能性があります。特に 8 連、12 連ピペットで分注する場合、洗浄が弱いことがあるので注意しましょう。 ・ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の反応後の洗浄工程は重要です。ピペットでウェルに洗浄液を分注する場合には洗浄不良を起こしやすいので洗浄回数を増やすことで改善される場合があります（例えば、指定回数が 4 回の場合は 6～8 回）。 ・洗浄液をウェルに満たした後は手のひらの上で軽く水平方向に円を描くように 5～10 秒程攪拌してから一気にプレートを逆さまにして洗浄液を振り捨てて下さい。軽く攪拌することにより洗浄効果が高まります。 ・洗浄後次の試薬を分注するまでにウェルを乾燥させないように注意しましょう。ウェルの乾燥はブランクが上がる原因になります。洗浄操作を始める前に必ず次に分注する試薬を準備しましょう。

攪拌方法	ウェルプレートに試薬を分注した後は必ずプレートシェーカーを用いて攪拌を行って下さい。プレートシェーカーを用いずに攪拌を行った場合、または攪拌を行わなかった場合はウェル間差が大きくなる原因となります。また、プレートシェーカーも古くなると96ウェルが均一に攪拌されなくなることがありますので定期的にメンテナンスを行って下さい。
検量線の作成方法	標準溶液測定データから、回帰曲線を求めます。 モデル関数 一次関数（一次回帰直線）：Logit 変換の場合に実用的です 二次関数（二次回帰曲線）：曲線が1方向に曲がっている場合に有効です 三次関数（三次回帰曲線）：Logit 変換の場合特に適合しやすい。変曲点のあるシグモイド、逆シグモイド型にも対応できます。 4パラメータロジスティックモデル：シグモイド、逆シグモイド曲線に適合します。 プレートリーダー付属等の計算ソフトが導入されている場合は三次回帰曲線または4パラメータロジスティックモデルを使用し、回帰曲線の真度が全体的に良いものを選択して下さい。その際、片対数、両対数で検討してみてください。それにより真度が変わってきます。回帰式の R^2 を確認するよりも真度を確認することをお勧めします。
管理試料の希釈直線性確認	キット添付の管理試料は希釈による誤差の影響を無視できるように、希釈せずにそのまま測定していただくようになっています。これにより検量線のたて方による測定値の乖離度を確認することができます。これに対し、管理試料を希釈し測定することにより、ピペッティングによる希釈誤差を確認することができます。

2 回目は検量線の真度が90%～110%、ウェル間差がC.V. 値10%、管理試料の乖離度が90%～110%を目標に行ってみて下さい。

測定操作のポイント

抗体固相化プレートのシールはプレートが室温に戻ってから剥がして下さい。温度が低く、シールが硬いうちに剥がすと、きれいに剥がれないことがあります。キットは室温に戻してから作業を開始して下さい。

重要な操作の箇所には基本的操作法を具体的に記してありますので、その部分を参照しながら操作を実行して下さい。測定は必ず3重測定（1試料あたり3ウェルを使用して測定する）で行って下さい。

(1) プレートのシールを剥がし、ウェルストリップを4連一組としてプレートフレームにセットします。

(2) 洗浄液を各ウェルに満たし、軽く振とう後捨てることを4回繰り返して洗浄します。

洗浄の具体的な方法を説明します。

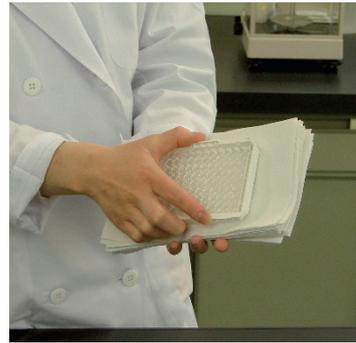
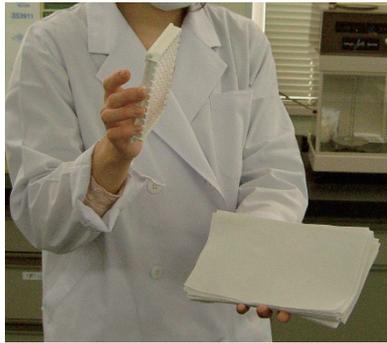
使用直前の洗浄：プレートを片手で持って1回目の洗浄液を洗浄瓶から各ウェルに満たします。軽く10秒ほど振とうし、流しの上で一気に逆さまにします。逆さまの状態でも96ウェルの反応液を流しの中に振り落とします（3回位、手が滑ってプレートを落とさないよう注意）



2回目の洗浄液をウェルに加え、振とう後廃棄します。さらに3回目、4回目の洗浄を行います。

洗浄液の完全除去

4回目の洗浄液を廃棄後、何枚か厚く重ねたペーパータオル（チリの出ないもの）上にプレートをパンパンと何度か叩きつけて、プレート底面についている洗浄液を落とします。洗浄液が残っていないことを確認して下さい。洗浄液がウェル中に多く残りますとバラツキの原因となります。



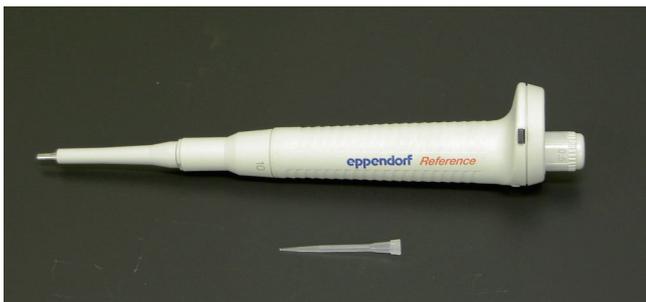
自動ウォッシャーを使用した場合でも洗浄液の完全除去まではしてくれませんのでこの操作は必要です。ウェルが乾燥しないうちに次の溶液を分注して下さい（ノズル調整は事前にご確認下さい）。

(3) 各ウェルにビオチン結合抗体溶液を $100 \mu\text{L}$ ずつ分注します。

(4) 標準品測定ウェルに希釈した各濃度の標準溶液を、管理試料用ウェルに管理試料をそれぞれ $10 \mu\text{L}$ ずつ分注します（プレート図参照）。

標準溶液と管理試料の採取と加え方

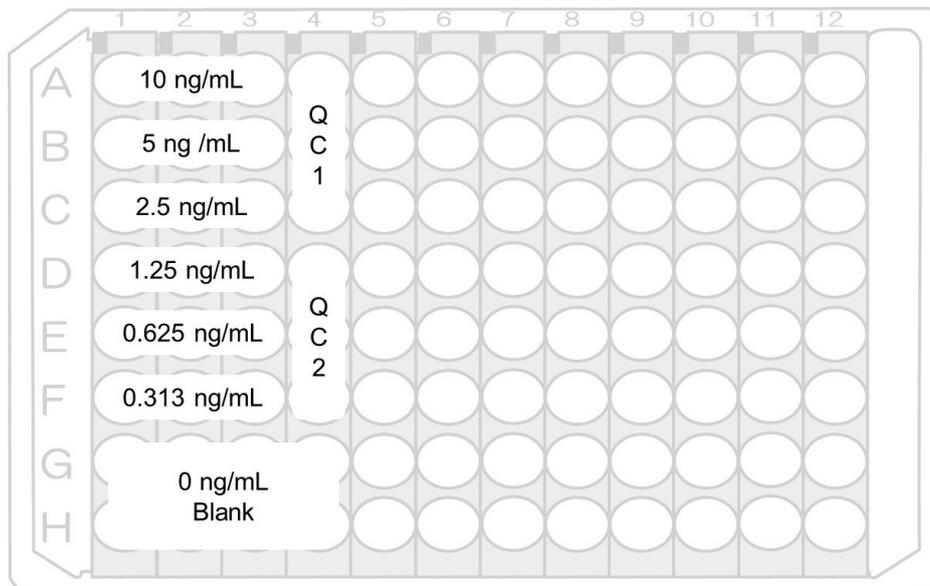
標準溶液、管理試料ごとに異なる溶液を採取添加することになるので、チップ交換式のシングルストロークピペットを使用しなければなりません。このためバラツキを最小にするために十分な注意が必要です。



ここでは下記の方法で行って下さい。

「プレウエットイング」法

- 新しいチップをセットした後、採取する標準溶液または管理試料を第1ストップの範囲で2,3回吸い上げ元に戻す「プレウエットイング」を行った後、溶液を満たします。
- チップの先端を容器の内壁に軽くタッチし先端の外側についた溶液を除去します。
- ウェルに溶液を排出します。このときプッシュボタンを最後まで押してブローアウトします。
- チップの先端をウェルの内壁にタッチしチップの外側にまわり出た溶液を除去しつつピペットを抜き出します。次の溶液が2重測定などで同じものならば、チップはそのまま使用できます。そうでない場合はチップを交換します。



それぞれの8連ストリップの上端に1～4の番号をマジックで書いて下さい。
(万一外れてバラバラになったときの備えです)

(5) マイクロプレートミキサーなどを用いて軽く攪拌します。

攪拌操作

試薬を加えた後攪拌操作が必要になりますが、液量が少ないため、短時間の攪拌で充分です。



できれば、マイクロプレートミキサー（マイクロプレートシェーカーとも言う）のような機器にプレートをセットし、800rpm、10秒×3回程度攪拌して下さい。

(6) プレートシールを貼り、室温（20℃～25℃）で2時間静置します。

(7) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし4回洗浄します。その後、ペーパータオルなどでプレートを逆さにしてウェルに残った液を取り除きます。

反応液の廃棄と洗浄：反応が終了した96ウェルプレートのウェル中の反応液を前述のような方法で廃棄します。廃棄が終わったら、乾燥に注意して洗浄に移ります。

プレートを片手で持って1回目の洗浄液を洗浄瓶から各ウェルに満たします。この場合キャリーオーバーを防ぐためにあふれないようにウェルに慎重に満たして下さい。この際、連続添加型ピペット（後出）で洗浄液250μLをウェルに分注するのもお勧めです（8連ピペットはウェルの底を引っ掻く可能性があるので推奨しません）。1回目だけが大事です。

プレートを10秒ほどゆすってから流しの上で一気に逆さまにします。逆さまの状態ですべてのウェルの洗浄液を流しの中に振り落とします。（3回位振る。手が滑ってプレートを落とさないように注意）

2回目の洗浄液をウェルに加えますが、これからはあふれてもかまいません。同様に廃棄します。さらに3回目、4回目の洗浄を行います。

最後に洗浄液の完全除去（前述）を行います。

- (8) 各ウェルに、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液を 100 μ L ずつ分注します。マイクロプレートミキサーなどを用いて軽く攪拌します。

試薬溶液の加え方

全てのウェルに共通した試薬溶液を加える際には、連続添加（マルチデリバリー）のできるピペット（例えば、Eppendorf multipette plus）が適しているので、それを使用する方が望ましいです。



マルチペットの使い方

- 試薬溶液を充たした後、空気を抜き、最初の 1、2 回は試薬溶液の容器に戻して下さい。
- ウェルに分注するにはウェルの壁にチップの先端を軽くタッチして注入して下さい。ただし、ウェルの中にある液に浸けないで下さい。
- 力を入れ過ぎないで下さい。また角度に注意して下さい（溶液が跳ねてしまいます）。

- (9) プレートシールを貼り、室温（20℃～25℃）で 30 分間静置します。

- (10) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウェルに満たし 4 回洗浄します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにしてウェルに残った液を取り除きます。

- (11) 各ウェルに TMB 溶液を 100 μ L ずつ分注します。マイクロプレートミキサーなどを用いて軽く攪拌します。

- (12) プレートシールを貼り、室温（20℃～25℃）で 30 分間静置します。

- (13) 各ウェルに反応停止液を 100 μ L ずつ分注後軽く攪拌し、発色反応を停止します。

- (14) 直ちにマイクロプレート用分光光度計で 450nm（副波長 620nm）での吸光度を測定します。

測定操作の終わった後で検討すること

○吸光度から検量線を描き測定値を求める

96 ウェルプレートリーダー（主波長：450nm \pm 10nm、副波長：620nm（600nm～650nm））で、全てのウェルの吸光度を求めましょう。副波長の設定ができれば主波長と副波長の吸光度の差を求めて使用します。副波長の設定ができなければ主波長の吸光度のみでも結構です。副波長の吸光度はウェルの不均一性、キズ等による吸光度の変化を補正するためです。

検量線用吸光度表

標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 ウェル 1	吸光度 ウェル 2	吸光度 ウェル 3	平均値	Δ Blank
10					
5.0					
2.5					
1.25					
0.625					
0.313					
Blank (0 濃度)					-

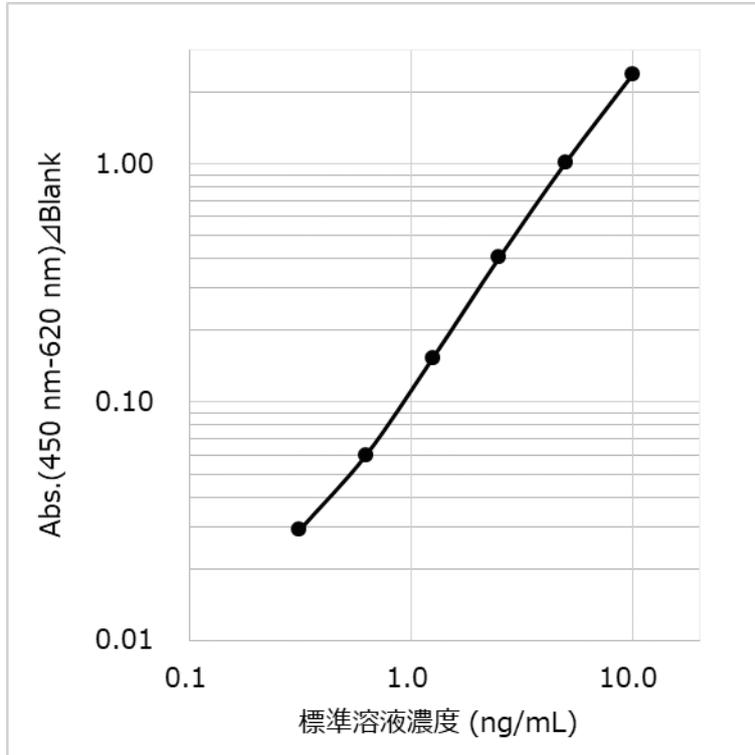
Δ Blank：Blank の平均吸光度を差し引いた値

計算

- (1) 測定毎に標準曲線を作成します。両対数を使用し X 軸を標準溶液濃度 (ng/mL)、Y 軸を吸光度の標準曲線グラフを作成して下さい。
- (2) 標準曲線より、管理試料の吸光度に対応する濃度 (ng/mL) を読み取ります。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。

*演算処理では、3次多項式または4または5パラメーターの使用をお勧め致します。

下のグラフは標準曲線例です（吸光度は、測定環境により変動します）。



測定値の観察と検討

a. 検出限界について

Blank の吸光度平均値と標準偏差 (SD) を計算しましょう。

Blank の吸光度平均値+3.3SD を計算しましょう。(ICH 合意による検出限界、detection limit, DL を計算するため) (正確な判定には Blank のウェル数をかなり多くすることが必要です) この値を先ほどの検量線から濃度に換算しましょう。この値が今回測定した測定感度、および検出限界と考えられます。

b. 定量下限について

Blank の吸光度平均値と標準偏差 (SD) を計算しましょう。

Blank の吸光度平均値+10SD を計算しましょう。(ICH 合意による定量下限 (quantitation limit, QL) を計算するため)。

c. 検量線の真度について

定量値 (逆回帰濃度) と理論値 (調製濃度) との一致の程度を確認しましょう。標準溶液の調製濃度 (名目濃度) を 100% としたとき、検量線の回帰式に標準溶液を測定したときの吸光度を当てはめ求めた濃度を百分率表記で表します。

d. 管理試料に関して

d.1. 測定精度の検討

平均値と標準偏差を求め、平均値に対する百分率、即ち変動係数 (Coefficient of Variation, CV) を計算して下さい。この値が測定精度を示します。下の表を完成して下さい。吸光度は Δ Blank (濃度ゼロの吸光度との差) を記入。

検体	ウェル 1 測定値	ウェル 2 測定値	ウェル 3 測定値	平均値	標準偏差	変動係数 CV (%)
管理試料 1						
管理試料 2						

変動係数 CV (%) = 標準偏差 / 平均値 × 100

d.2. 乖離度の検討

同じ試料を用いて行った定量値間の相違の程度。

$$\text{乖離度 (\%)} = \{(\text{比較する分析の定量値}) - (\text{基準となる分析の定量値})\} / (\text{両者の平均値}) \times 100$$

Q&A

Q：なぜ1検体1ウェルで測定してはいけないのでしょうか？

A：

○アッセイの施行法から考えると

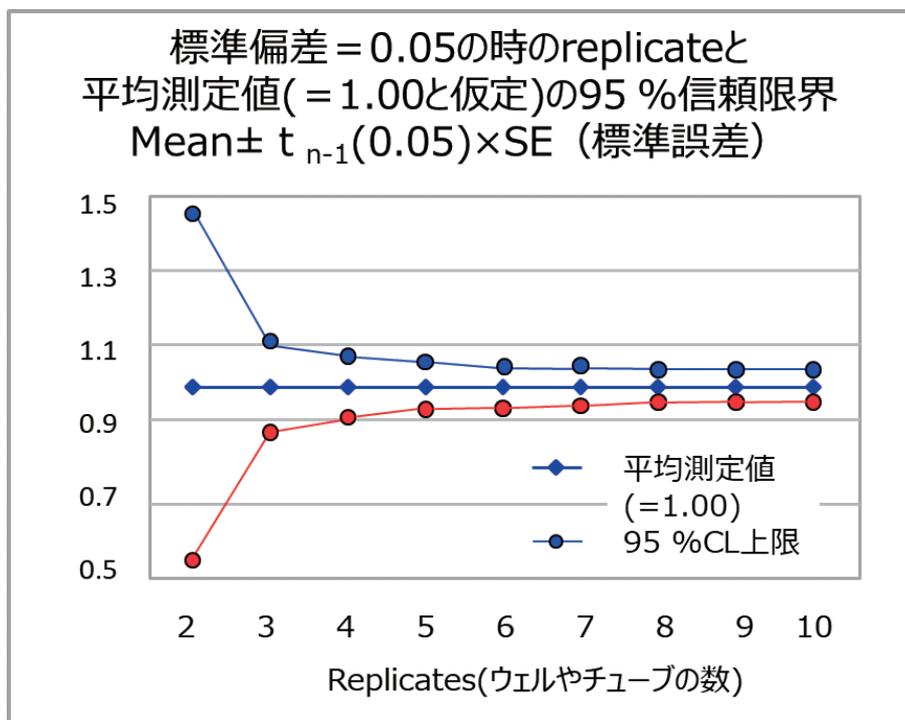
1ウェルでの測定結果をサポートする側面的データがないこと。もし測定操作で誤りやピペティングの誤差があったとしても比較検討することができません。強いて言えば、同一実験群の他の試料とかけ離れた結果でなければ一応測定操作に間違いはなかっただろうと推定することになりますが、本当にそれで良いのかと言う疑問が残ります。2重、3重測定ならばそれぞれの測定値がまとまっていれば測定操作に間違いがなかったと判定することができます。

それでは2重測定でも2つの測定値がかけ離れているときはどうするかということなのですが、2重測定の場合にはどちらが異常なのか正しいのか判らないです。強いて言うならば、同一実験群に属する他の試料との比較で考えることとなります。3重測定ならば他の2つからかけ離れている測定値は棄却することもできます。厳密に言えば棄却検定をした方が良いのですが試料数が少ないときには棄却することは難しくなります。特に2重測定では棄却検定のしようがありません。あまり変な値でなければ棄却しないで平均値を求める方が無難でしょう。

○統計学的に考えると

1ウェルの場合は自由度がゼロになります。したがって統計学的には信頼度はゼロです。2重、3重測定ならば平均値と標準誤差が計算できますので、測定値の95%信頼限界が判定できます。平均値の分布の形を示す標準誤差は試料数の平方根に反比例します。したがってレプリケートの数が多ければ平均値の信頼限界は狭くなり信用度は上がります。一方、標本の分布の形を示す標準偏差は試料数に関係なくほぼ一定なのですが、その信頼度は試料数に依存します。

次のグラフは平均測定値を1、標準偏差を0.05（つまり相対標準偏差或いは変動係数を5%と仮定した時、測定の繰り返し、即ちウェルの数と求められた平均値の95%信頼区間を示したものです。シングルアッセイは論外ですが、2重アッセイでの平均値の信頼区間は上下約50%となります。3重測定で区間は上下10%強です。2重測定は最低限行うようにしましょう。

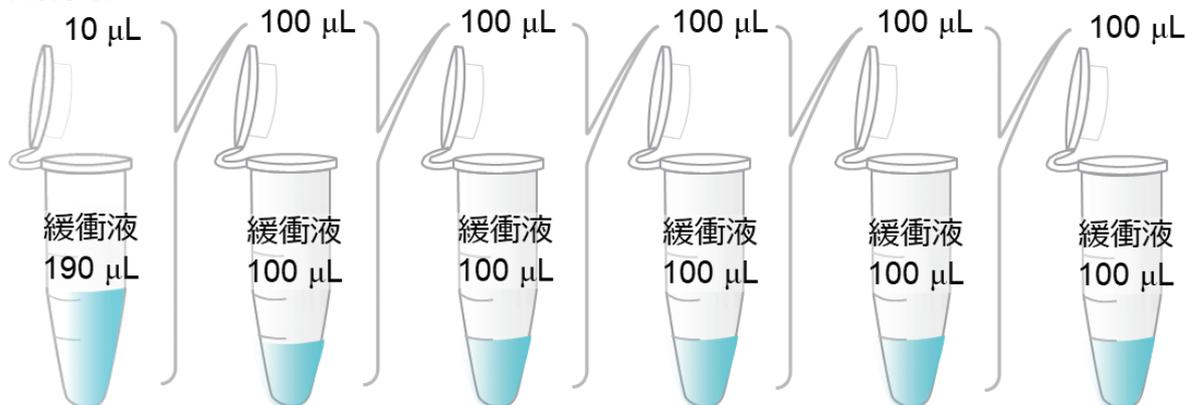


9. 測定手順概要とチェックリスト

必ず一読し、検体条件、測定条件、測定方法を確認後、測定操作を行って下さい。

- ウェルプレート、試薬類を十分に室温（20℃～25℃）に戻して下さい。室温化には2時間位必要
- (I) 洗浄液（10×）の希釈：室温化された精製水で、**10倍**に希釈して下さい。
- (B) 標準品（200ng/mL）の希釈（例）：室温化された（C）緩衝液で、希釈して下さい。

標準溶液原液



調製濃度

ng/mL 10 5.0 2.5 1.25 0.625 0.313

- (D) ビオチン結合抗体溶液の希釈
室温化された（C）緩衝液で **4000倍**に希釈して下さい。2段階希釈をお勧めします。

各操作注意事項並びに関連情報

- 抗体固相化プレート
- ↓ 洗浄 4 回（洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注） *①
- ビオチン結合抗体溶液 100 μL
- ↓ 攪拌 *②
- 管理試料または標準溶液 10 μL
- ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、2時間反応、静置 *②*③
- (E) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液の希釈。室温化された（C）緩衝液で、**2000倍**に希釈して下さい。希釈溶液の調製は第一反応中に行う。2段階希釈をお勧めします。
- ↓ 洗浄 4 回（洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注） *①
- ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液 100 μL
- ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、30分間反応、静置 *②*③
- ↓ 洗浄 4 回（洗浄液除去後、直ちに（F）TMB 溶液分注） *①
- TMB 溶液 **TMB が室温化されていることを確認** 100 μL
分注後、濃度により青色に変色
- ↓ 攪拌、室温（20℃～25℃）、30分間反応、静置 *②*③
- 反応停止液 **強酸性につき取扱注意** 100 μL
分注後、濃度により黄褐色に変色
- ↓ 攪拌（直ちに攪拌） *②
- 直ちに吸光度測定（主波長 450nm、副波長 620nm : 600nm～650nm）
副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

(*①) 洗浄液をウェルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。4 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300 μL / ウェルです。万一、最小標準溶液濃度（0.313ng/mL）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン溶液と反応後の洗浄回数 4 回を同じ流速で 5 回～8 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5mL / 分～25mL / 分（ノズルの径により異なります）です。第一反応後の初回の洗浄のみウェル間のコンタミに注意して下さい。

(*②) 攪拌の目安は 600rpm ~ 1200rpm 10 秒間、3 回。

(*③) 攪拌終了後プレートシールを貼り静置して下さい。

プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

10. キットの保存と使用期限

キットは 2℃ ~ 10℃ で保存して下さい (凍結厳禁)。使用期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

【測定名】

【所属】

【測定者】

【測定日】

【ロット番号】

【使用期限】

【備考】

【製品名】 レビス™ ELISA スキルチェック

【和光コード】 292-86601

【英語表記】 LBIS™ ELISA Skill Check

【貯法】 2 ~ 10℃ 保存

【使用期限】 ラベルに記載

【包装】 96 回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741