

ELISA

SUMILON® ELISA (amino)

固相化表面について (アミノ)

グルタルアルデヒドを用いたアミノプレートへの蛋白固相化条件、ブロッキング条件につきまして、当社での検討データを基に最も効率の良い条件及び反応時の注意点をご紹介いたします。

1. グルタルアルデヒドによるアミノ基の活性化：

1-1 グルタルアルデヒドの純度

グルタルアルデヒドは一般的に電子顕微鏡用の abt.20% と生化学用の 70% の 2 種類の溶液が市販されています、同一濃度に希釈して使用した場合でも純度の高い溶液を使用する方が効率良く反応する傾向が見られました。(図 1)

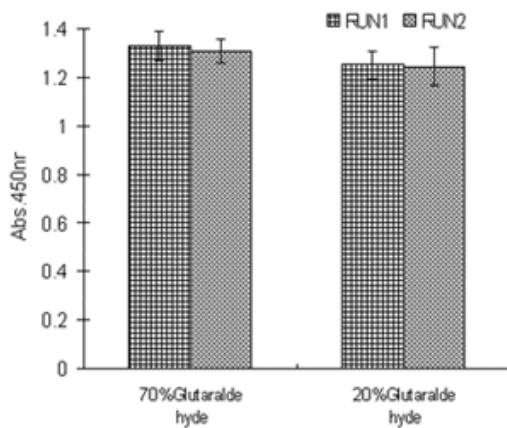


図 1：グルタルアルデヒド試薬純度と固相化量の関係

但し、その差は有意であるとは言えず変動係数も同等であることから、粘度が高く扱いにくい生化学用の 70% の溶液よりも、一般的には電子顕微鏡用 abt.20% の溶液の使用をおすすめします。

また、グルタルアルデヒドは開封後の経時劣化があるため、容量の少ない(25ml 程度)試薬を購入し、開封後 1 ヶ月以上経過した物は使用しないようにして下さい。

1-2 グルタルアルデヒドの濃度について

約 2% で理論量の 10 倍以上の濃度になり、安定した活性化が行われます。

また、2% で過剰量であるため、例えば濃度を 2 倍 (4%) 又は 1/2 倍 (1%) にしても固相化効率は変わりません。

1-3 グルタルアルデヒドの反応温度と時間について。

室温よりも 37 °C の方が効率良く活性化が行われます。(図 2)

37 °C において反応時間は 2 時間で活性化効率は平衡域に達します。

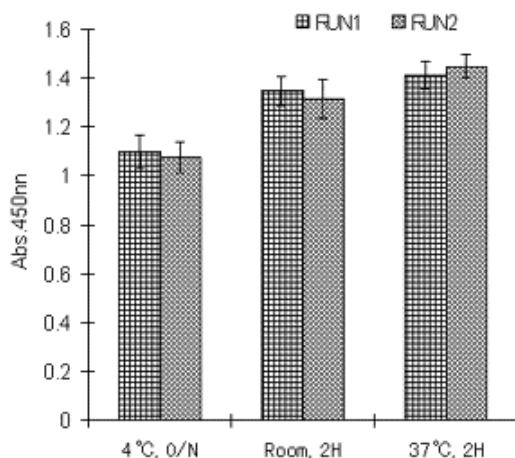


図 2 アミノ基活性化条件と固相化量の関係

1.4 グルタルアルデヒド溶液のpHについて。

グルタルアルデヒドの反応はアルカリ側で効率が良く、また反応が進むに従い溶液が酸性側に移行するため、溶媒には必ず緩衝液を用いpHは9.5(炭酸ナトリウム緩衝液)付近のものが最も良いと思われます。(図 3)

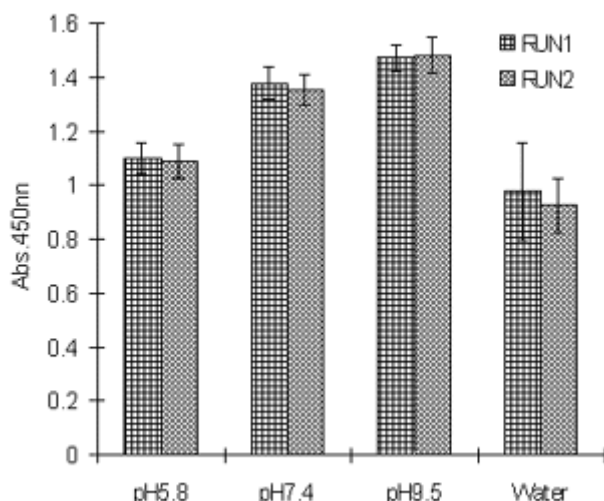


図 3 グルタルアルデヒド溶液 pH と固相化量の関係

2. アミノ基活性化後の洗浄：

アミノ基活性化後の洗浄には必ず純水を使用して下さい。(界面活性剤、緩衝液は使用しないで下さい)

3. 固相化分子の反応：

3.1 固相化分子溶液の濃度について

固相化する分子の濃度については、固相化する分子の構造、分子量、溶液のpH、イオン強度によって効率は大きく変化するため、事前に溶液濃度勾配をつけた検討を実施し、最適濃度条件をご確認して下さい。

3.2 固相化分子溶液のpHについて

アミノ基の活性化の際と同様、溶媒はpH7~9付近の緩衝液を使用することをおすすめしますが、酸性側で可溶化する蛋白を固相化する場合はpH5.5付近までであれば反応は進み、固相化する事が出来ます。

3.3 固相化温度と時間について

アミノ基の活性化の際と同様、37℃、2時間の反応が効率良く、96ウェル間のばらつきも少ない傾向です。

4. ブロッキングについて：

アミノプレートではブロッキング剤はスキムミルクが最も効果が高く、バックグラウンドを低く抑えることが出来ます。

pH7.4(リン酸緩衝液)の緩衝液で3%濃度に希釈したスキムミルクを分注し、37℃で1~2Hが一般的です。

以降通常のELISA操作を実施して下さい。

上記の検討については、アミノプレート表面のアミノ基と固相化分子をグルタルアルデヒドを用い共有結合で固相化する場合の最適な条件を検討するために、固相化には物理吸着を起こさないビオチンヒドラジド(M.W.258.34)を使用しました。

固相化する分子の分子量が10,000を超える場合には、共有結合だけでなく物理吸着によっても固相化される為、最適な条件は共有結合量と物理吸着量のバランスを考慮する必要があり、上記の条件では十分な結果が得られない場合があります。