

『 レビス® ELISA スキルチェック 』 別冊

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	<p>●ピペット選択について</p> <p>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ください。20 μL、50 μL、100 μL 採取時は最大 100 μL のピペットを選択してください。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ください。</p> <p>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ください。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。</p> <p>ELISA 操作上において 8 連や 12 連ピペットは弊社ではお薦めしていません。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薦めしています。また、メンテナンスされた電動ピペットもお薦めです。</p> <ul style="list-style-type: none"> ●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ください。 ●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薦めします。 ●96 ウェル使用する場合は 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薦めします。 ●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。 <p>◎ブレウエット法</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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「ブレウエット法」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。 <p>◎共洗い法</p> <p>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薦めします。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。

	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 <p>■ピペッティング時における泡の発生と対策（一例）</p> <p>プレウェッティング、共洗い法を使い分け正確な分注を行いましょ。</p> <p>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。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。固相化抗体が剥がれてしまします。いつも一定のスピードで押し下げましょ。最後にタッチ&ゴーを行いましょ。</p>
<p>温度管理</p>	<p>■エッジ現象（エッジ効果とも言う）とは？</p> <p>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> <div data-bbox="427 808 920 1167" data-label="Diagram"> </div> <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。発色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となります。</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。 ●測定開始前に試薬の温度を確認しましょ。 ●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。 ●反応温度を一定に保ちましょ。 ●洗浄液の温度管理には特に注意しましょ。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します。 ●プレートに温度が均一に伝わるようにしましょ。 ●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。 <p>*ただし、試薬の安定性は事前に確認してください。</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"> ●濃縮洗浄液が付属の場合は、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物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逆さまにして洗浄液を振り捨ててください。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。
<p>攪拌方法</p>	<p>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ください。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ください。</p>
<p>検量線の作成方法</p>	<p>標準溶液測定データから、回帰曲線を求めます。</p> <p>モデル関数</p> <ul style="list-style-type: none"> 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。 <p>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ください。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。</p>
<p>管理試料の希釈直線性確認</p>	<p>キット添付の管理試料（QC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。</p>

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ください。

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ください。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ください。

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ください。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）で行ってください。

(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、軽く振盪後捨てることを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（弊社 Web サイトの動画「洗浄操作」をご参照ください。）

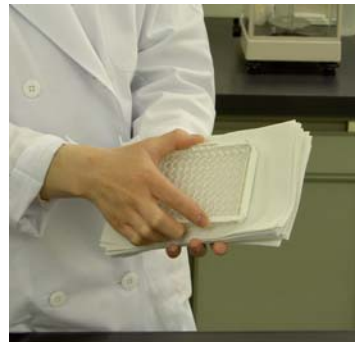
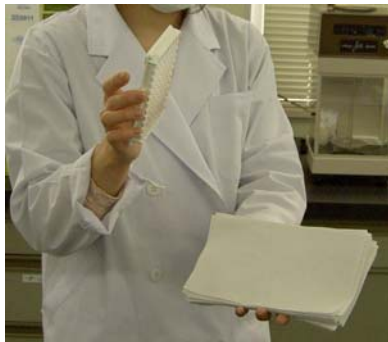
使用直前の洗浄：プレートを片手で持って1回目の洗浄液を洗浄瓶から各ウェルに満たします。軽く10秒ほど振とうし、流しの上で一気に逆さまにします。逆さまの状態でも96ウェルの反応液を流しの中に振り落とします（3回位、手が滑ってプレートを落とさないよう注意）



2回目の洗浄液をウェルに加え、振盪後廃棄します。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（チリが出ないもの）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ください。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ください（ノズル調整は事前にご確認ください）。

(3) 各ウェルにビオチン結合抗体を100 µL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（QC 試料）用ウェルに管理試料をそれぞれ10 µL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（弊社 Web サイトの動画「ピペティング」をご参照ください。）

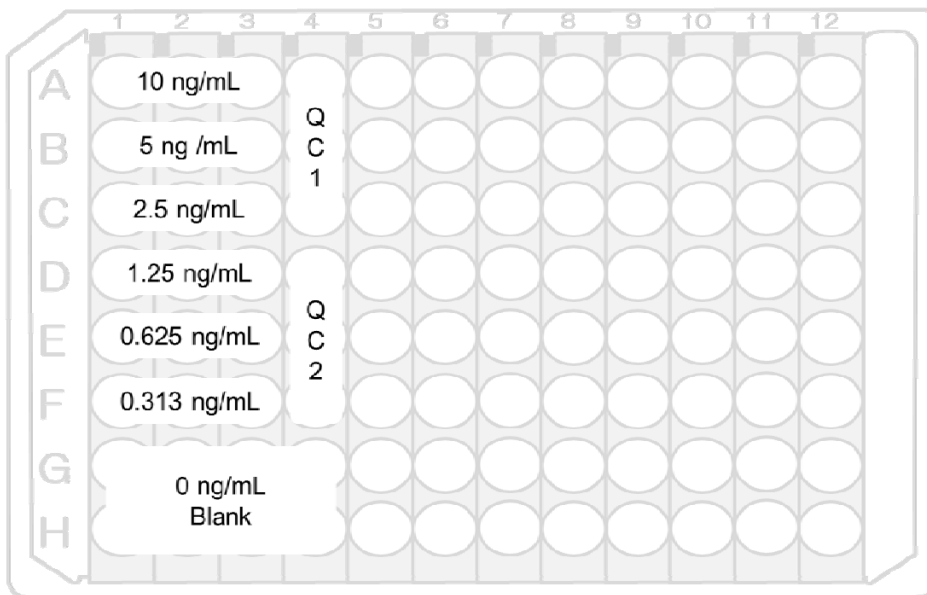
標準溶液、管理試料ごとに異なる溶液を採取添加することになるので、チップ交換式のシングルストロークピペットを使用しなければなりません。このためバラツキを最小にするために十分な注意が必要です。



ここでは下記の方法で行ってください。

「プレウェッティング」法

- 新しいチップをセットした後、採取する標準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「プレウェッティング」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ください。
(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（弊社 Web サイトの動画「攪拌操作」をご参照ください。）

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設定し、800 rpm、10 秒×3 回程度攪拌してください。

(6) プレートシールを貼り、室温 (20 °C ~ 25 °C) 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。

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ください。この際、連続添加型ピペット (後出) で洗浄液 250 μ L 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 96 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・アビジン結合物を 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。



マルチピペットの使い方

○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ください。

○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ください。ただし、ウェルの中にある液に浸けないでください。

○力を入れ過ぎないでください。また角度に注意してください (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 °C ~ 25 °C) 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) 各ウェルに発色液を 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 °C ~ 25 °C) 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) マイクロプレート用分光光度計で 450 nm (副波長 620 nm) 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：450 nm ± 10 nm、副波長：620 nm（600 nm ～ 650 nm））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	△Blank
10					
5.0					
2.5					
1.25					
0.625					
0.313					
Blank (0 濃度)					—

△Blank：Blank の平均吸光度を差し引いた値

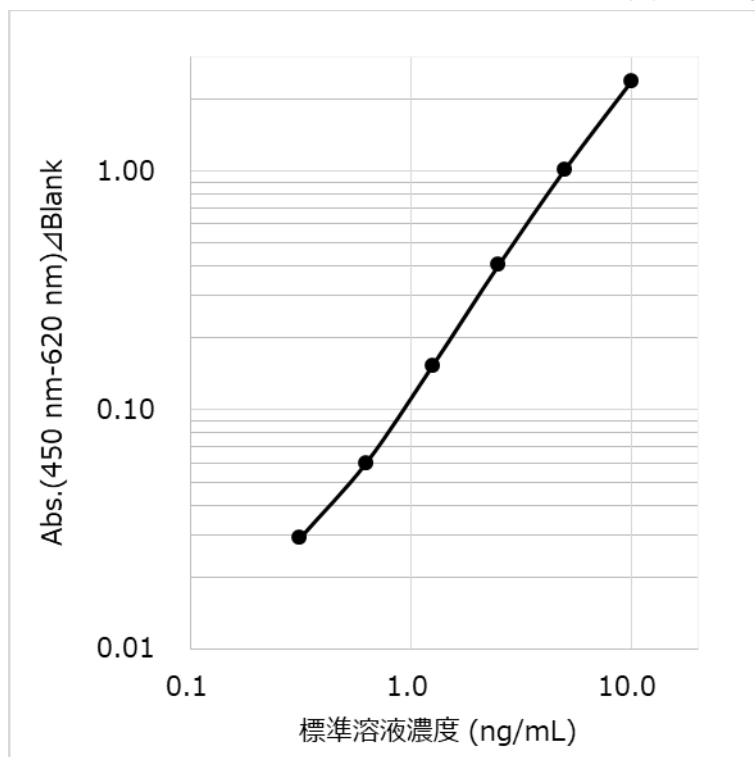
計算

(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ください。標準曲線は弊社 Web サイト「技術情報」「ELISA の標準曲線」をご参照ください。

(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 + 3.3 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 (QC 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)を計算してください。この値が測定精度を示します。下の表を完成してください。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。

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

QC 試料の測定値を弊社測定値と比較してみてください。

弊社測定値はホームページで公開しています。

<http://シバヤギ.com> にアクセスしていただき、右メニューにある「QC チェック」に進み、ご使用になられたキットの Lot.No. をクリックしていただければご確認頂くことができます。是非ご利用ください。

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と推定することになりますが、本当にそれで良いのかという疑問が残ります。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になります。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。

