



ONEPot Immunoassay Kit <OpenGUS Method>

English ver.



Cat. #DS850	ONEPot Immunoassay Kit, Fluorescent <OpenGUS Method>	
	Recombinant GUS mixture	100 U
	Reaction Buffer	50 ml
	Fluorescent Substrate	5 ml
Cat. #DS860	ONEPot Immunoassay Kit, Colorimetric <OpenGUS Method>	
	Recombinant GUS mixture	100 U
	Reaction Buffer	50 ml
	Colorimetric Substrate	5 ml

変異体 β -glucuronidase (GUS)を用いたOpenGUS Immunoassayの原理で、抗原を検出する測定系を構築するためのキットです。

本製品は上田宏博士、北口哲也博士および朱博博士他(国立大学法人東京工業大学科学技術創成研究院(当時))の研究成果をもとに、BDLが開発、製品化しました。

保管条件

-80°C

使用期限

お手元に届いてから6カ月間

キット概要

- 任意の抗体2種類を用いて抗原をサンドイッチし、検出します。
- ELISAのようなプレートへの抗体固相化や、ウェルの洗浄は不要です。
- 抗体と検出用酵素は混合するだけでアフィニティ結合します。
- 多量体を安定して形成するタンパク質では、1種類の抗体のみで検出できる場合もあります。
- 蛍光測定用キット(Cat. #DS850)と吸光測定用キット(Cat. #DS860)があります。

注意事項

- 対象とする抗原がタンパク質の場合、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上が含まれるサンプルを推奨します。(100倍希釈して30 ng/ml として測定することを想定)
- 抗原をサンドイッチすることができる2種類のmouse IgG1が必要です。(抗原が多量体を形成する場合は、1種類の抗体のみで検出できた例もあります。(使用例に示すLactoferrin, CIAP, CRP, AAV capsid))
- サンプル溶液の組成にシグナル強度が大きく影響される場合があります。
- 検出感度は抗原および抗体によって異なります。
- ヒト血清/血漿/血液等のイムノグロブリンが多く含まれるサンプルはバックグラウンドが高くなるため、使用できません。

別途ご用意いただく試薬・機器

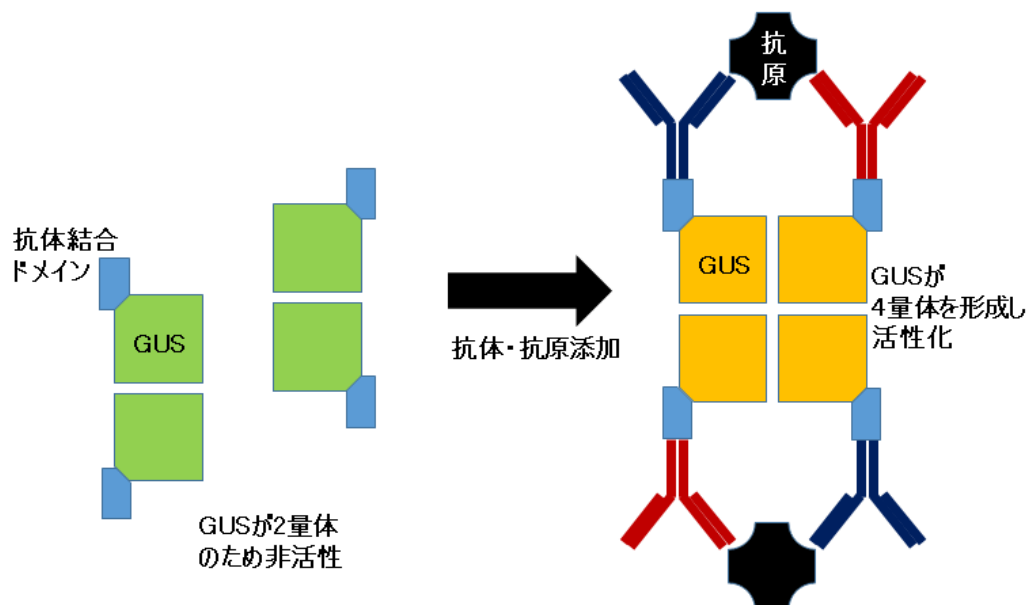
- 抗原をサンドイッチ可能なmouse IgG1抗体のペア
- 検量線用の精製抗原
- 96 well plate
 - 蛍光 (Cat. #DS850): black plate
 - 吸光 (Cat. #DS860): clear plate: Nunc™ Edge™ 96-Well, Non-Treated, Flat-Bottom Microplate (Thermo Scientific #267427)を推奨 *ウエルの外側を水で満たすことができるようになっており、ウエル間での温度の差が小さくなる。
- Microplate reader
 - 蛍光 (Cat. #DS850): 励起光 340 nm / 蛍光 450 nm
 - 吸光 (Cat. #DS860): 主波長 405nm / 副波長 660 nm
- マルチチャンネルピペッター

キット構成

Recombinant GUS mixture

β -glucuronidase (GUS)は β -グルクロニドを加水分解して β -グルクロン酸を遊離させる酵素です。大腸菌のGUSは4量体を形成することで活性を示します。本製品に用いられる変異体GUSは単量体間の親和性が低下しており、2量体は形成するものの、4量体をほとんど形成しません。

本製品コンポーネントのRecombinant GUS mixtureは抗体結合ドメインを融合させた変異体GUSです。抗原抗体反応を介して変異体GUSの2量体同士が連結し、強制的に4量体を形成することによって得られるGUSの活性を測定することで、抗原濃度依存的なシグナルを得ます。



Reaction Buffer

ONEPot Immunoassay Kitに最適化されたリン酸緩衝液ベースのバッファーです。サンプルの希釈もReaction Bufferで行います。

Substrate

蛍光基質(Cat. #DS850)または発色基質(Cat. #DS860)です。系全体の1/5量となるように添加します。

作業手順

Reaction Bufferは-80℃で凍結しています。室温で、またはチューブを水につけて(蓋までは浸からないよう)融解し、よく混合し、融け残りが無いことを確認した後、使用まで氷上で静置してください。

Substrateは-80℃で凍結しています。遮光袋に入れたまま室温で融解してください。添加30分前に使用分を分注し、遮光して室温に置いてください。

1. Reaction Bufferを必要量分注し、氷上に静置
2. Recombinant GUS mixtureを氷上で融解し、軽くボルテックス *1
3. 以下のようにpremixを調製

Premix (1 wellあたり)

Recombinant GUS mixture	1 U *2
Mouse IgG1 (No. 1)	X μ l (75 ng) *3
Mouse IgG1 (No. 2)	Y μ l (75 ng)
Reaction Buffer	Z μ l
	140 μ l/well

4. 96 well plateを氷上に置く *4
5. Premixを140 μ lずつ各ウェルに分注 *5
6. サンプルをReaction Bufferにより希釈(推奨: 10倍以上) *6 *7 *8 *9
7. サンプルを20 μ l加える
8. 4℃で60分間静置 *10
9. 室温(25℃程度)で10分間静置 *11
10. 基質を40 μ lずつ加える *12 *13
11. 蛍光(Cat. #DS850): 25℃で遮光して60分間静置
吸光(Cat. #DS860): 37℃で遮光して60分間静置(黄色の発色が確認できる)
12. 蛍光(Cat. #DS850): 励起光 340 nm / 蛍光 450 nm で測定
吸光(Cat. #DS860): 主波長 405nm / 副波長 660 nm で測定

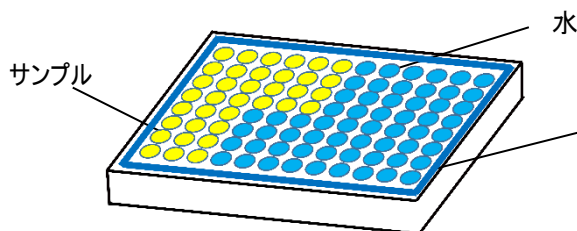
*1 Recombinant GUS mixtureは使用後すぐに-80℃に戻してください。

*2 1UあたりのRecombinant GUS mixtureの液量はロットによって異なります。チューブをご確認ください。

*3 抗原が多量体を形成する場合は、1種類の抗体のみで検出できた例もあります(『使用例』に示すLactoferrin, CIAP, CRP, AAV capsid)。その場合、抗体量は150 ng / wellとしてください。

*4 プレートを氷上に置く場合は、アルミホイルおよびポリラップを敷くとプレート底面が濡れにくくなります。

*5 基質分解反応は温度に影響を受けます。特に37℃の反応では、全てのウェルの温度が均一に上昇することが重要です。吸光測定で推奨するNunc™ Edge™ 96-Well, Non-Treated, Flat-Bottom Microplate (Thermo Scientific #267427)は、ウェルの外側を水で満たすことができるようになっており、ウェル間での温度差が小さくなります。このプレートを使用した場合でも、さらに使用しないウェルに水を200 μ l入れておくことより正確な測定結果が得られます。



Nunc™ Edge™ 96-Well, Non-Treated, Flat-Bottom Microplate (Thermo Scientific #267427) (吸光測定で推奨)は、ウェルの外側を水で満たすことができるようになっている

- *6 適切な抗原濃度では、抗原濃度依存的にシグナルが上昇しますが、抗原が適切な濃度より高濃度の場合は逆にシグナルが低下することがあります。初めて測定を行うサンプルは段階希釈を行い、濃度依存的にシグナルが上昇している点を濃度決定に用いてください。
- *7 サンプル溶液が十分に希釈されていない場合、GUSの活性に影響を与えることがあります。サンプルは段階的に希釈し、それぞれの結果を用いて、検量線で抗原濃度を算出してください。希釈倍率を掛けて算出される元のサンプル中の抗原濃度が同程度になる場合、希釈が充分であると考えられます(下記『使用例1』参照)。対象抗原が含まれないサンプルを用意できる場合は、Spike testを行うことも、適切なサンプル希釈濃度の決定に有効です(下記『Spike & Recoveryテストの方法』参照)。
- *8 生体サンプルはGUS活性を有する場合があります。サンプル、Substrate、Reaction Bufferのみを混合して、サンプル自体にGUS活性が無いことを確認してください。サンプル自体がGUS活性を有する場合、サンプル、Substrate、Reaction Bufferを混合して得られたシグナルを、バックグラウンドとして引くことができます。
- *9 測定サンプル中のバッファー組成と、検量線に用いる希釈系列のバッファー組成を等しくすることでより誤差の少ない測定が行えます。例)測定サンプルがカラム精製タンパクの場合、検量線用のスタンダード希釈系列へも溶出バッファーを添加する。
- *10 Signal/Backgroundが十分に高ければ、Substrateを加える前の4°C60分間のインキュベーションは省くことができます。ただし、この場合もサンプル添加までの作業は氷上で行ってください。
- *11 基質添加時にウェル間に温度上昇の差が生じないように、あらかじめプレートを基質反応温度に近付けます。
- *12 Substrateを入れるタイミングがずれないように、マルチチャンネルピペッターの使用を推奨します。Substrateを加えた後4回程度ピペティングして液を混ぜてください。
- *13 ウェルの中に泡が残った場合、空気を当てて泡を消してください。

FAQ

質問	回答
蛍光/吸光両方測定可能なプレートリーダーを持っている。蛍光(Cat. #DS850)と吸光(Cat. #DS860)どちらのキットを選べばいいか。	蛍光測定のキット(Cat. #DS850)の方が、若干感度が高い傾向にあるため、こちらをお勧めします。
蛍光基質の反応に使用する25°Cのインキュベーターがない。	蓋およびアルミホイルなどをかぶせて遮光し、室温で反応を行ってください。
アジ化ナトリウムが抗体に含まれているが大丈夫か。	終濃度 0.1%のアジ化ナトリウムなら大きな影響はないことを確認しています。
蛍光測定は、「励起光 340nm - 蛍光 450nm」意外ではできないのか。	励起光 360、蛍光 480でも測定できることを確認しています。ただし、感度はやや低下します。
吸光測定は、405nm でなければいけないか。	405nm 周辺であれば測定可能です。ただし、吸光度はやや低下します。バックグラウンドに使用する波長も 660nm 周辺であれば測定可能です。
Mouse IgG1 以外の抗体は使用できないか。	本品は mouse IgG1 に最適化されています。Mouse IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3 ではバックグラウンドが高くなる抗体クローンが存在することを確認しています。また Rabbit polyclonal 抗体でもバックグラウンドが高くなることを確認しています。
抗タグ抗体は使用できるか。	Anti-6xHis 抗体は使用できません。その他の抗タグ抗体については確認を行っておりません。
どの程度の濃度のタンパク質を測定できるのか。	抗原、抗体によって測定できる範囲は異なります。下記『検量線を作成できた抗原濃度範囲』のに関する表をご参照ください。

検量線を作成できた抗原濃度範囲 (基質反応時の抗原濃度)

抗原	濃度
Lactoferrin	3 – 824 ng/ml (0.04 – 10 nM)
CRP	0.06 – 57 ng/ml (0.0005 – 0.5 nM)
Cryj1	3.4 – 117 ng/ml (0.08 – 3 nM)
CIAP	66 – 4200 ng/ml (0.47 – 30 nM)
AAV2 (empty capsids)	9.4x10 ⁸ – 6.0x10 ¹⁰ copy/ml

トラブルシューティング

問題	考えられる原因	対応
シグナルが低い	<ul style="list-style-type: none"> ・抗原濃度が低い ・抗原抗体のアフィニティが低い 	基質反応時間および基質反応前の 4℃でのインキュベーション時間を伸ばすことにより、シグナルが上昇することがあります。
	<ul style="list-style-type: none"> ・抗原濃度が高すぎる 	適切な抗原濃度では、抗原濃度依存的にシグナルが上昇しますが、抗原が適切な濃度より高濃度の場合は逆にシグナルが低下することがあります。初めて測定を行うサンプルは段階希釈を行い、濃度依存的にシグナルが上昇している点を濃度測定に用いてください。
	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプル溶液が GUS の活性に影響を与えている 	サンプル溶液が十分に希釈されていない場合、GUS の活性に影響を与えることがあります。サンプルは段階的に希釈し、それぞれの結果を用いて、検量線で濃度を算出してください。希釈倍率を掛けて算出される元のサンプル中の抗原濃度が同程度になる場合、希釈が充分であると考えられます(下記『使用例 1』参照)。可能であれば、検量線に用いるスタンダードの各点にもサンプルが含有するのと同量のサンプル調製用溶液を加えてください。例)カラム精製物の場合、サンプルに含まれているのと同量の溶出バッファーを検量線用希釈系列にも加える
Signal/Background が低い	<ul style="list-style-type: none"> ・抗原濃度 ・抗原抗体のアフィニティが低い 	基質添加前の 4℃でのインキュベーションを 120 分に伸ばすことにより、Signal / Background が上昇する場合があります。
データがばらつく	<ul style="list-style-type: none"> ・ウェル間で温度が不均一 	使用しないウェルに水 200 μl を加え、各ウェルの温度上昇の差を小さくするとデータのばらつきが小さくなる場合があります。吸光測定での基質との反応を 37℃ではなく 25℃にして行い、反応時間を伸ばすことが有効な場合もあります。

Spike & Recovery テストの方法

Spike & Recovery テストは、「対象抗原が含まれないサンプル(ブランク試料)」を用意できる場合に行うことができます。[既知濃度の抗原を添加 (Spike) した希釈ブランク試料]と[同濃度の抗原を添加した Reaction Buffer]を比較して、抗原測定の誤差(% Recovery: 回収率)(サンプル液の系への影響)を評価する方法です。

1. [抗原を添加 (Spike) した希釈ブランク試料]と[同濃度の抗原を添加した Reaction Buffer]を用意する。Spike する量は、検量線の範囲内の濃度(通常、検量線が引ける中間あたりの値)。
2. [Spike した希釈ブランク試料] [希釈ブランク試料のみ] [Spike した Reaction Buffer] [Reaction Buffer のみ]のそれぞれについて本品を使用した測定を行う。
3. 次の式から% Recovery (回収率)を計算する。

$$\% \text{ Recovery} = \frac{([\text{Spike した希釈ブランク試料}] - [\text{希釈ブランク試料のみ}])}{([\text{Spike した Reaction Buffer}] - [\text{Reaction Buffer のみ}])} \times 100$$

% Recovery は 80-120%の範囲内にあることが好ましいです。

使用例

*検量線の縦軸はいずれも、[Signal - Background]の値を使用

使用例1 唾液・涙中のLactoferrin濃度の測定

唾液および涙中のLactoferrin濃度を、本品を使用して測定し、市販のLactoferrin ELISA kitを用いて得られた結果と比較した。

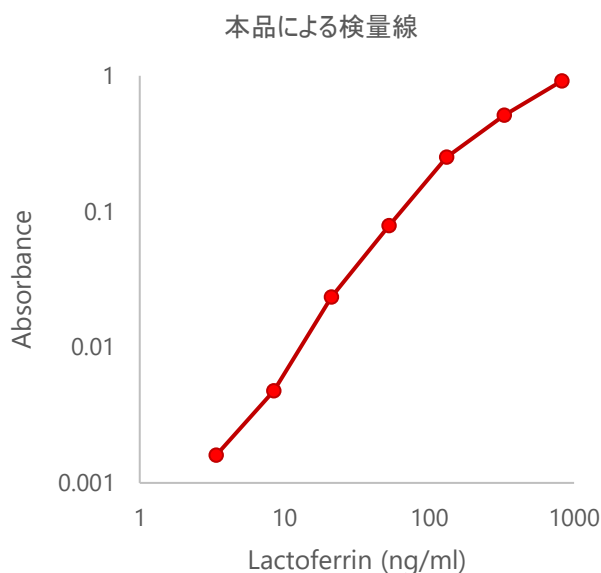
	サンプル希釈	検量線から算出した Lactoferrin 濃度
唾液	1000 倍	6.2 $\mu\text{g/ml}$
	2000 倍	5.7 $\mu\text{g/ml}$
涙	200000 倍	2158 $\mu\text{g/ml}$
	400000 倍	2175 $\mu\text{g/ml}$

市販ELISA kitによる測定

	サンプル希釈	検量線から算出した Lactoferrin 濃度
唾液	300 倍	4.2 $\mu\text{g/ml}$
	600 倍	4.4 $\mu\text{g/ml}$
涙	40000 倍	1831 $\mu\text{g/ml}$
	80000 倍	1734 $\mu\text{g/ml}$

本品による測定

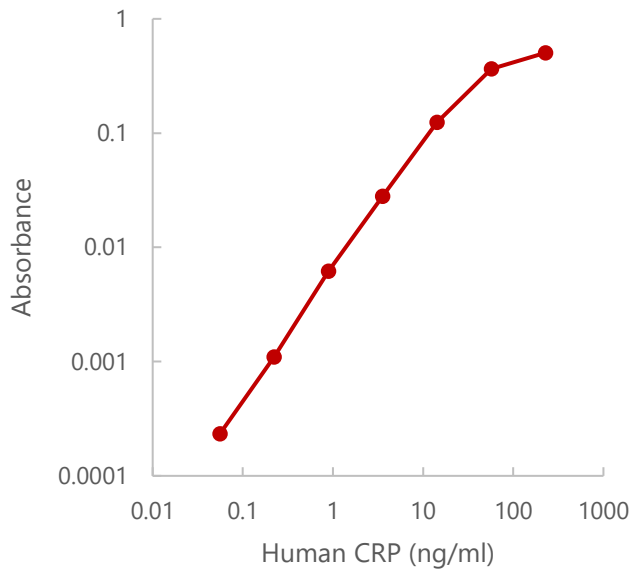
ELISAおよび本製品で近似する値が得られた



抗体: Anti-Lactoferrin, Human, Mouse-Mono(1A1) (HyTest, #4L2-1A1)

* 1種類の抗体のみで検出を行った。Lactoferrinは多量体を形成しているため、1種類の抗体のみで検出が行えたと考えている。

使用例2 精製human C-Reactive Proteinを用いて得られた検量線

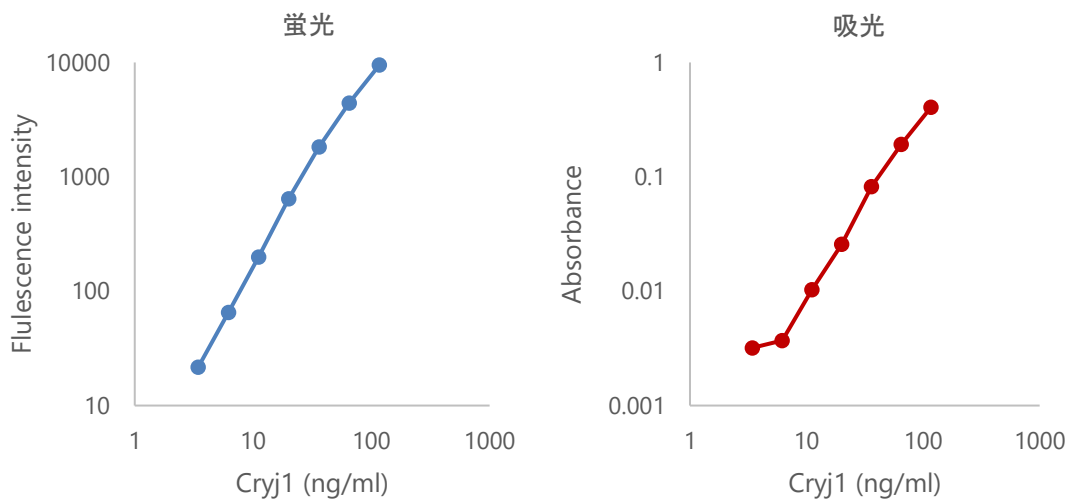


抗体: Anti-CRP, Human, Mouse-Mono(C5) (HyTest #4C28-C5)

*1種類の抗体のみで検出を行った。CRPは5量体を形成しているため、1種類の抗体のみで検出が行えたと考えている。

*本品はヒト血清でバックグラウンドが高値となるため、ヒト血清中CRPを測定することは出来なかった。

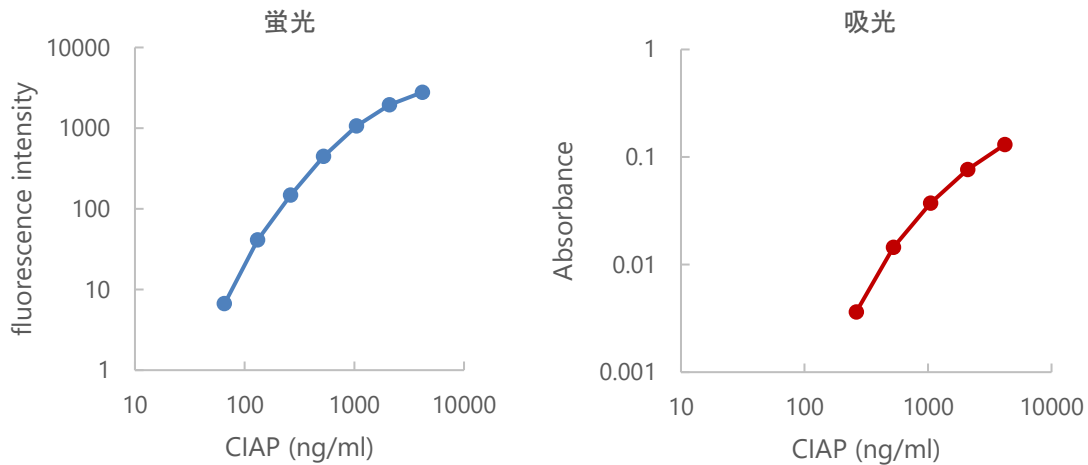
使用例3 精製Cry j 1(スギ花粉抗原タンパク質)を用いて得られた検量線



抗体: Anti-Cry j 1, Mouse-Mono(013) (BDL # HBL-Ab-1-013) および Anti-Cry j 1, Mouse-Mono(053) (BDL #HBL-Ab-1-053)

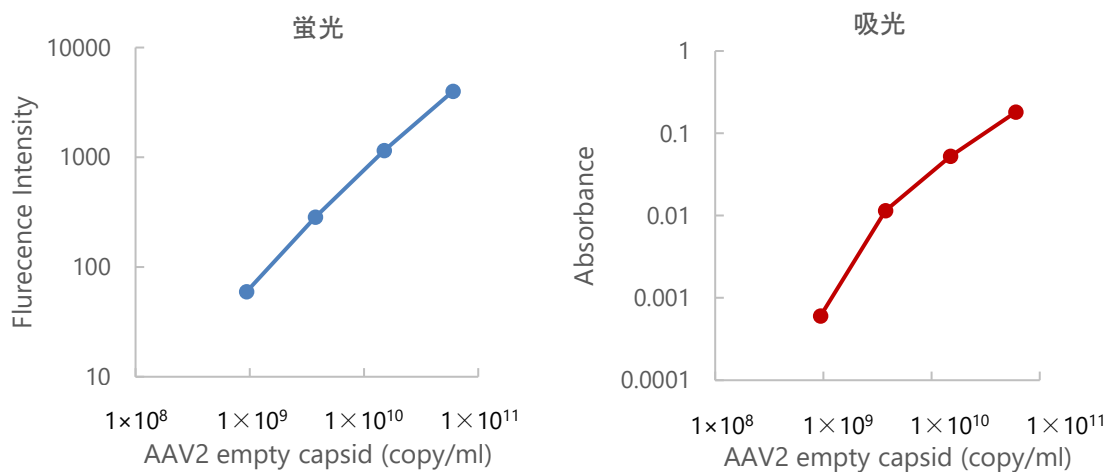
*Cry j 1濃縮サンプルからはcry j 1の測定が可能だが、環境サンプルからCry j 1を検出する感度は得られなかった。

使用例4 精製Calf-Intestinal Alkaline Phosphataseを用いて得られた検量線



抗体: Anti-Alkaline Phosphatase, Intestinal, Mouse-Mono(SPM372) (Novus Biologicals # NBP2-44961)
*1種類の抗体のみで検出を行った。CIAPは2量体を形成しているため、1種類の抗体のみで検出が行えたと考えている。

使用例5 AAV2 empty capsidsを用いて得られた検量線



抗原: AAV2 empty capsids (PROGEN #66V020)
抗体: Anti-AAV2 (intact particle) mouse recombinant, (A20R) (PROGEN #610298)
*1種類の抗体のみで検出を行った。Capsid表面に抗原が整列しているため、1種類の抗体のみで検出が行えたと考えている。

参考文献

1. J. Su, D. Jinhua, T. Kitaguchi, Y. Ohmuro-Matsuyama and H. Ueda. Noncompetitive homogeneous immunodetection of small molecules based on beta-glucuronidase complementation. *Analyst* 143, 2096-2101 (2018)
2. J. Su, C. Beh, Y. Ohmuro-Matsuyama, T. Kitaguchi, S. Hoon and H. Ueda. Creation of stable and strictly regulated enzyme switch for signal-on immunodetection of various small antigens. *J. Biosci. Bioeng.* 128, 677-682 (2019)
3. J. Su, T. Kitaguchi, Y. Ohmuro-Matsuyama, T. Seah, F.J. Ghadessy, S. Hoon and H. Ueda. Transmembrane signaling on a protocell: Creation of receptor-enzyme chimeras for immunodetection of specific antibodies and antigens. *Sci. Rep.* 9, 18189 (2019)
4. B. Zhu, C. Qian, H. Tang, T. Kitaguchi and H. Ueda. Creating a thermostable beta-glucuronidase switch for homogeneous immunoassay by disruption of conserved salt bridges at diagonal interfaces. *Biochemistry* 62, 309-317 (2023)

関連製品

DS540	BCA Protein Assay Kit
DS550	BCA Protein Assay Kit with BSA standard
HBL-C-1	Cry j 1, Cedar Pollen Allergen, Purified <精製スギ花粉抗原 Cry j 1>
HBL-Ab-1-013	Anti-Cry j 1, Mouse-Mono(013) <抗Cry j 1モノクローナル抗体013>
HBL-Ab-1-053	Anti-Cry j 1, Mouse-Mono(053) <抗Cry j 1モノクローナル抗体053>

本品のご利用について

本製品は、研究目的用에만販売しております。

本製品に関する特許が東京工業大学より出願されており、株式会社バイオダイナミクス研究所がライセンスを受け、製造販売を行っております。日本国内での商業用ライセンスに関する情報については、株式会社バイオダイナミクス研究所にお問い合わせください。

本製品またはその改変物を、株式会社バイオダイナミクス研究所の書面による事前の承諾なしに、第三者への転売、商用製品の製造、サービスの提供に使用することはできません。