

ELISA

SUMILON® ELISA (carboxyl)

固相化表面について (カルボ)

1. スミロン® ELISA 製品・カルボタイプ:

スミロン® ELISA 製品・カルボタイプは基材表面にカルボキシル基 (-COOH 基) を導入した製品で、このカルボキシル基を利用し、アミノ基 (-NH<sub>2</sub> 基) を持つ蛋白や核酸を共有結合により固定化できます。

本レポートでは、アミノ基を持つ分子を、水溶性カルボジイミド (WSC) を用いてカルボキシル基に固定化する際の反応条件についてご紹介いたします。

2. 固定化手順:

WSC を使用する場合、固定化には下記の 2 通りの手順が考えられます。

1 段階法	2 段階法
WSC と固定化分子を同時に分注	WSC の分注
反応	洗浄 (過剰な WSC を除く)
	固定化分子の分注
	反応

の 2 段階の方法より の 1 段階の方が洗浄工程が少ないので、簡便で、反応効率が良く、固定化量のばらつきも少なく、安定した結果が得られます。

(図 - 1 : 1 段階法、図 - 2 : 2 段階法 参照)

しかし、蛋白のように分子の中にアミノ基とカルボキシル基を持つ分子の場合は、 の 1 段階の方法では蛋白同士が結合してしまい、反応効率が低下してしまうため固定化する分子によってどちらの方法で行うか選択して下さい。

(図 - 3 : 1 段階法でアミノ基とカルボキシル基を持つ分子を固定化した場合 参照)

図 - 1 : 1 段階法

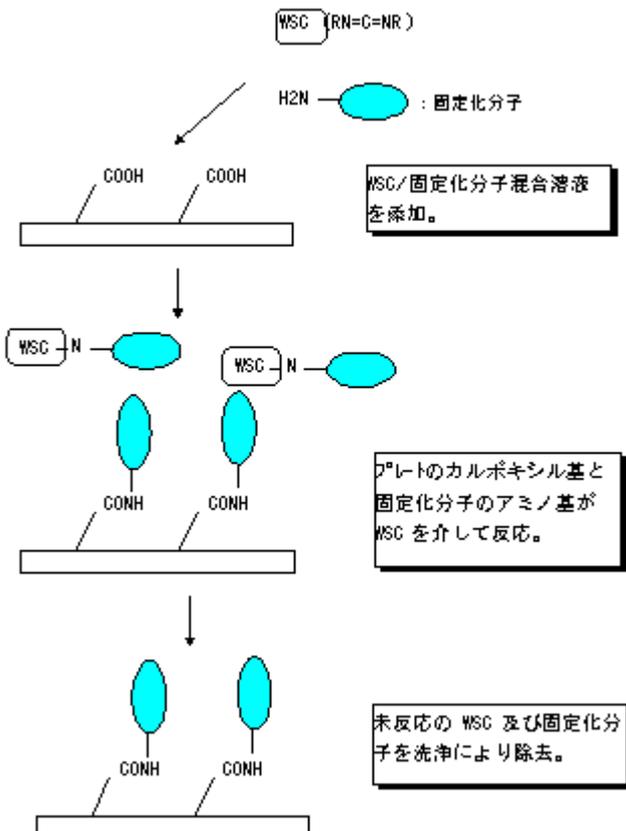


図-2: 2段階法

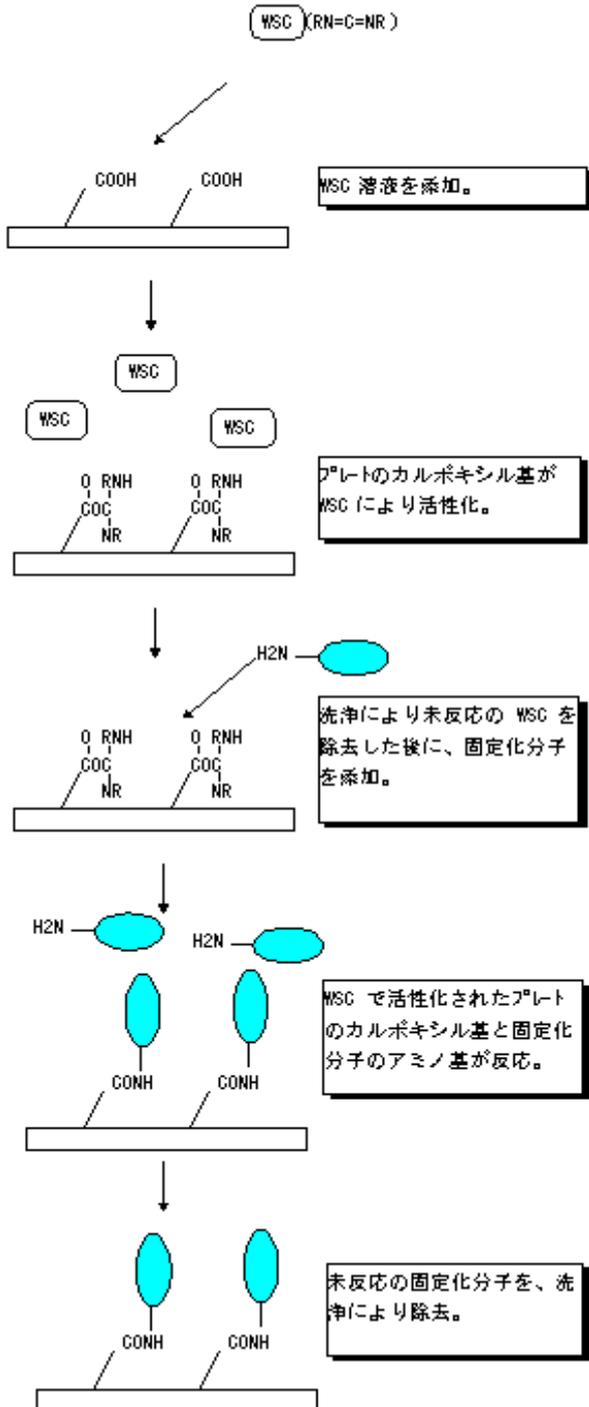
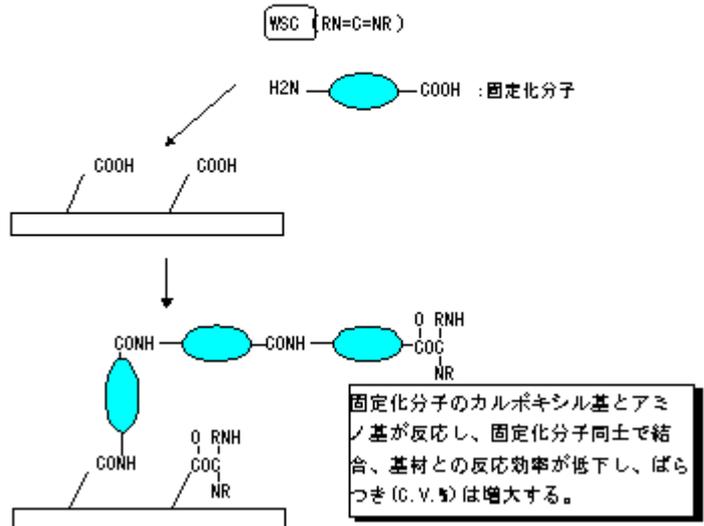


図-3: 1段階法でミノ基とカルボキシル基を持つ分子を固定化した場合。



### 3. WSC濃度について:

WSCは理論量の10倍~100倍の濃度で使用するのが一般的で、カルボプレートの場合、WSCは10mg/ml以上の濃度に調製してご使用下さい。

#### 4. 反応時のpHについて：

WSCの反応はpH 4.5～6の間が最も効率が良いのですが、反応が進むと共にpHは変化しますので、反応時の溶媒としてはpH 5.8のリン酸緩衝液（PBS）の使用が望ましいと思われます。

（図-4：WSC反応時のpHによるビオチンヒドラジド固定化量の差）

1段階法の場合はWSC、固定化分子混合溶液の溶媒に、2段階法の場合は、WSC溶液、固定化分子の溶液、洗浄液全ての溶媒にpH 5.8のPBSをご使用下さい。

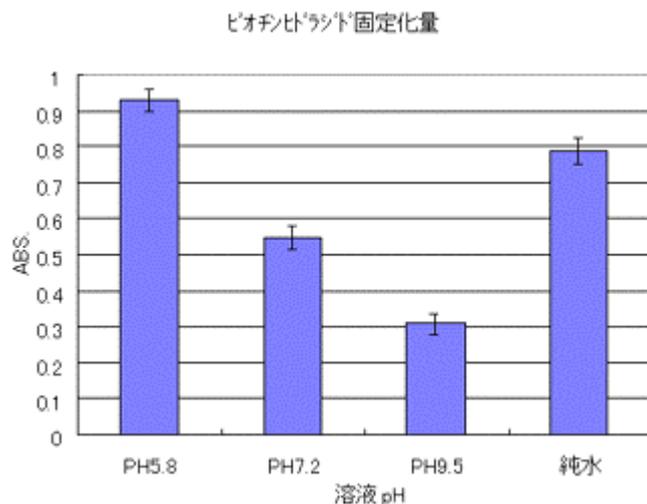


図-4：WSC反応時のpHによるビオチンヒドラジド固定化量の差

#### 5. 反応時の温度、時間について

WSCの反応温度及び時間は、4℃ overnight 又は 37℃ 1～2Hが一般的ですが、カルボプレートの場合 37℃ 2Hの処理が最適と思われます。

1段階法の場合はWSC / 固定化分子混合溶液分注後、2段階法の場合はWSC溶液分注後及び固定化分子分注後それぞれについて、37℃ 2H反応させて下さい。

（図-5：WSC反応時の温度と時間によるビオチンヒドラジド固定化量の差）

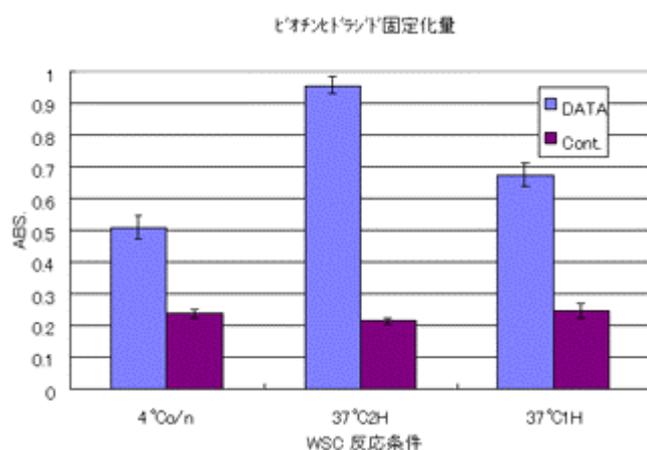
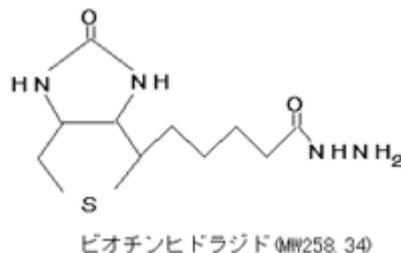


図-5：WSC反応時の温度と時間によるビオチンヒドラジド固定化量の差

（Cont.はWSCを使用せず、ビオチンヒドラジドのみを加え、非特異的吸着量を確認）

以上、WSCを用いたカルボタイププレートへの固定化方法についてご紹介いたしましたが、「4. 反応時のpH」、「5. 反応時の温度、時間」については、全ての固定化分子に対して前記の条件が最適であるとは限りません。最適な条件は、固定化したい分子の大きさや構造によっても異なる場合がありますので、初めに上記の条件で測定し、十分な結果が得られない場合は、反応時のpH及び温度、時間の条件を変えてご検討されることをお勧めいたします。

固定化分子としてヒドラジド修飾ビオチン (Biotin hydrazide) を使用した場合の1段階法、2段階法の例を示します。



## 試薬

水溶性カルボジイミド (WSC)

(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride Dojindo 製)

ビオチンヒドラジド (Dojindo 製)

希釈液 PBS (pH 5.8) PBS (pH 7.4)

### 1段階法

1) カルボキシル基活性化及びビオチンヒドラジド固定化

WSCをPBS (pH 5.8)で10 mg/mlに調製する。

ビオチンヒドラジドを上記WSC溶液で0.5 µg/mlに調製する。

プレートに100 µl/wellで分注、プレートシールした後37℃で2時間静置反応。

2) 洗浄

0.05% Tween 20含有PBS (pH 7.4) 300 µl/wellで3回洗浄。

以降通常のELISA操作へ

### 2段階法

1) カルボキシル基活性化

WSCをPBS (pH 5.8)で10 mg/mlに調製する。

プレートに100 µl/wellで分注、プレートシールした後37℃で2時間静置し反応。

2) 洗浄

PBS (pH 5.8) 300 µl/wellで3回洗浄。

3) ビオチンヒドラジド固定化

ビオチンヒドラジドをPBS (pH 5.8)で5 µg/mlに調製する。

(反応効率の問題で、1段階法の10倍の濃度が必要。)

プレートに100 µl/wellで分注、プレートシールした後37℃で2時間静置反応。

4) 洗浄

0.05% Tween 20含有PBS (pH 7.4) 300 µl/wellで3回洗浄。

以降通常のELISA操作へ