Bio-Plex Pro Acute Phase アッセイ クイックガイド

本資料は Bio-Plex Pro Acute Phase アッセイキットの簡易取り扱い手順を示しております。簡易資料ですので、ご使用前に必ずプロトコールの詳細および注意点について、キットの英文 Instruction Manual もご参照ください。本資料の Section とある部分は、英文 Instruction Manual の該当箇所を示しています。

アッセイ開始前に、本資料と英文 Instruction を最後までご覧になっておくことを強くおすすめします。

英文 Instruction Manual は次のアドレスからダウンロードできます。

http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10011597.pdf

キットごとの違いにご注意ください

Bio-Plex Pro アッセイキットには様々な種類をご用意しております。お使いになるキットによって、プロトコールに異なる部分がございますので、ご注意ください。

本資料では、 Bio-Plex Pro Human Angiogenesis Panel のアッセイキットについて記載しています。

それ以外のアッセイキットについては、別途資料をご用意しております。

	Acute Phase 5-plex	Acute Phase 4-plex	Human Group I, II, Cytokines	Human Diabetes
Reagent kit・Diluent kit の別途購入	必要 *1		不要	不要
血清・血漿サンプルの希釈率	100 倍	10, 000 倍	4 倍など	4 倍など
測定項目の選択(x-Plex 対応)	不可 (項目数固定)		可能	可能
Standard Vial のキット付属	2 本 *3		1本	1本
Control vial のキット付属	2 本 *3		なし	なし
ビーズの種類	磁性ビーズ		磁性ビーズ	磁性ビーズ
キット付属サンプルプレート	吸引洗浄用のみ *2		磁気用・吸引用	磁気用・吸引用
Standard の溶解時間	60 分		30 分	30 分
抗体ビズの希釈割合	X 25		X 10	X 20
検出抗体の希釈割合	X 10		X 10	X 20
測定時の PMT Setting	Low PMT		Low PMT	High PMT
Bip-Plex100/200, Luminex 100/200	測定可能		測定可能	測定可能
Bio-Plex MAGPIX/Bio-Plex 3D	測定不可		測定可能	測定可能

*1 Assay Panel (#171-A4007M, #171-A4009M) には、抗体ビーズ, 検出抗体, Standard, Control が含まれています。
測定には別途 Reagent キット(#171-304050JA)と、Diluent キット(#171-305050)が必要です。
Diluent キットには、Serum-based diluent10ml と Serum-free diluent300mlが含まれており、キットの Instruction に従って使用した場合、96well フォーマットのアッセイキット 2 箱分に使用できます。

*2 磁気洗浄に対応していますが、Reagent キットにはフィルタープレートのみ付属していますので、Bio-Plex Flat Bottom Plate を別途ご購入ください。(#171-025001 40 枚入り)

*3 Standard の S1 の溶解時間 (氷上 60 分) 、調製割合が他のキットとは異なります。S2 以降は 4 倍希釈系列で同じ割合です。
Control の測定は Option です。詳しくは、英文 Instruction(Section 8)をご参照ください。

特にご注意いただきたいこと

- サンプルやアッセイの準備をする前に、Bio-Plex システムや Washer の動作確認を必ずしておいてください。
- 測定するサンプルに応じて、Standard を溶解・希釈するための溶液およびブランクの溶液をご用意ください。(Bio-Plex acute phase diluent kit は血清および血漿サンプルを測定用です。)
- インキュベーションを行う前には、バッファー類やサンプル等を室温に戻しておいてください。
- Standard は使い切りです。凍結保存しての使用は出来ません。
- Standard のバイアルに、溶解用の溶液を添加した後は氷上に 60 分置いてください。
- 抗体ビーズのバイアルは事前に十分にボルテックスをかけ、均一な状態でご使用ください。
- 抗体ビーズおよび SA-PE は遮光してください。インキュベーション中はアルミフォイルで包んでください。
- インキュベーション中は、プレートシェーカーを使用し、規定の回転数で指定された時間で振とうしてください。
- 正しく更正されたピペットマンやマルチチャンネルピペットをご使用ください。
- フィルタープレートをお使いの場合は、液漏れやバキューム圧などについて特別に注意する必要があります。
- Bio-Plex Manager のバージョンによっては、ソフトウェアに、パネルの情報が入っていません。以下のサイトより、Protocol ファイルをダウンロードしてお使いください。http://pdbu-support.bio-rad.co.jp/bio-plex.html

お問い合わせ先(バイオ・ラッド テックコール); 電話:03-6404-0331 メール:life_ps_jp@bio-rad.com

準備

1. プレートのレイアウトを確認してください(Section 9)。本資料末尾のシートをご利用ください。
2. Bio-Plex システムの Startup/warm up (Bio-Plex Manager 6.1 をお使いの場合は Startup & Calibration) 処理をしてください。この間に、バッファー類を室温に戻しておきます。また、凍結しておいたサンプルを氷上で溶かします(Section 6)。
3. Wash Station ないし、バキュームマニフォルドの準備をしてください。
4. Bio-Plex システムの Calibration を行ってください (後のインキュベーション中でも可 (Section 10))。
5. Standard の調製 (Section 7)。血清ないし血漿サンプルの測定では、使用するキットに応じて、次の要領で Standard の希釈液を調製します。

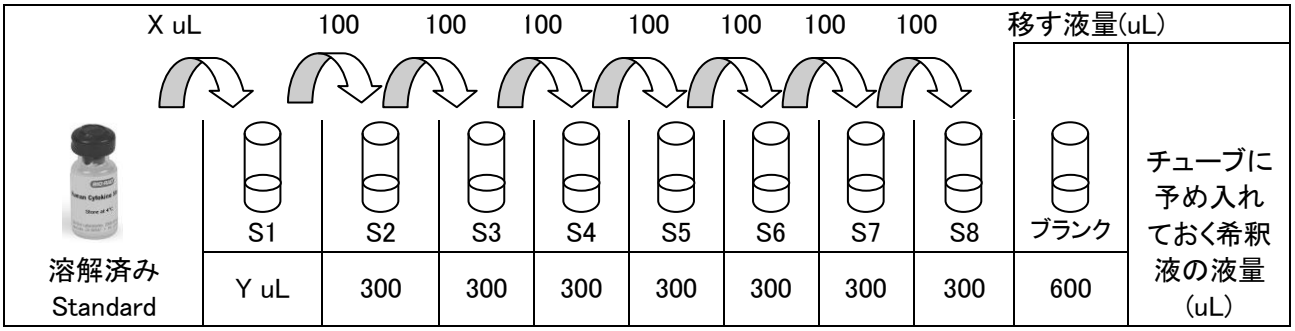
> # 5-Plex standard/control diluent: 24mL Serum-free diluent + 1ml Serum-based diluent
> # 4-Plex standard/control diluent: Serum-free diluent をそのまま使用

その後、下の表に従い、測定するサンプルの種類や組成に応じた希釈液を、Standard のバイアル1本当たり 500uL 添加します。1-3 秒間ボルテックスをかけた後、氷上で 60 分静置したのち、さらにボルテックスをかけます。

サンプルの種類ごとの、Standard/Blank の調製

サンプルの種類	Standard の希釈液/ブランク	BSA 添加の有無
血清・血漿	# 上述の diluent	不要
培養上清(血清入り)	培地	不要
培養上清(無血清)	培地	終濃度 0.5%

6. Standard の希釈系列(4 倍)と、ブランクを下図に従って調製します。5-Plex と 4-Plex で異なります。各希釈段階で 5 秒ずつボルテックスをかけてください。



5-Plex の場合: X = 200uL, Y = 200uL,　4-Plex の場合:　X = 50 uL, Y = 350uL

7. サンプルを次のようにして調製します (Section 6)。

サンプルの種類	希釈液	BSA 添加の有無	希釈率
血清・血漿	Serum-free diluent	不要	100 倍(5-plex) 10,0000 倍(4-plex)
培養上清(血清入り)	培地	不要	原液～10 倍
培養上清(無血清)	培地	終濃度 0.5%	原液～10 倍

5-Plex の場合、血清・血漿サンプル 10uL を、Serum-free diluent 990uL と混合して、100 倍希釈します。4-Plexでは、その 10uL をさらに 990uL の Serum-free diluent で希釈して、最終的に 10,000 倍希釈します。

8. 抗体ビーズを 30 秒間ボルテックスし、Bio-Plex Assay Buffer で 1x 濃度に希釈します。その後遮光しておいてください。

	測定ウェル数	25x Beads (ul) #	Assay Buffer (uL)	Total Volume (uL)
☐	96	240	5760	6000
☐	48	120	2880	3000
☐	W =	Wx2.5 =	Wx60=	Wx62.5=

(つづく)

Assay の実施 (Section 9)

すべての試薬類が室温になっていることをご確認ください。

1. バキューム洗浄用のフィルタープレートをお使いの場合は、100uL Bio-Plex assay buffer でプレウェットしておきます。磁性洗浄用のフラットボトムプレートの場合は、このステップは必要ありません。
2. 抗体ビーズ (1x) をボルテックスしたのち、アッセイプレートの各ウェルに 50uL ずつ加えます。
3. アッセイプレートの各ウェルを 100uL の Bio-Plex Wash buffer で、2 回洗浄します。
4. サンプル、スタンダード、ブランクをボルテックス後、各ウェルに 50uL ずつ加えます。
5. プレートシールをしてから、遮光して 60 分間室温にてシェーカー上でインキュベートします。
シェーカーは、液がはねないよう徐々に回転数を上げ、1100 回転で 30 秒振とうした後、300 回転にセットします。

インキュベーションの残り時間が 10 分程度のとき、検出抗体のバイアルを 5 秒ほどボルテックスしたのち、軽くスピンダウンします。下表に従い、1x に調製してください。

	測定ウェル数	10x Detection Antibody (ul) #	Detection Antibody Diluent (ul)	Total Volume (uL)
☐	96	300	2700	3000
☐	48	1500	1350	1500
☐	W =	W x 3 =	W x 27=	W x 30=

6. アッセイプレートの各ウェルを 100uL の wash buffer で 3 回洗浄します。
7. 検出抗体(x1) をボルテックスした後、各ウェルに 25uL ずつ加えます。
8. プレートシールをしてから、遮光して、30 分間室温にてシェーカー上でインキュベートします(1100 回転 30 秒の後、300 回転にセット) 。
このタイミングで、Bio-Plex Manager ソフトウェアで、測定プロトコールを準備してください。キットに添付されている Standard の S1 の濃度を間違いないよう入力してください(Section 10)。

インキュベーションの残り時間が 10 分程度のとき、SA-PE のバイアルを 5 秒ほどボルテックスしたのち、軽くスピンダウンします。下表に従い、1x に調製し、遮光しておいてください。

	測定ウェル数	100x SA-PE (ul)	Asaay Buffer (ul)	Total Volume (uL)
☐	96	60	5940	6000
☐	48	30	2970	3000
☐	W =	Wx.625 =	Wx61.875=	Wx62.5=

9. アッセイプレートの各ウェルを 100uL の wash buffer で 3 回洗浄します。
10. SA-PE(x1) をボルテックスした後、各ウェルに 50uL ずつ加えます。
11. プレートシールをしてから、遮光して、10 分間室温にてシェーカー上でインキュベートします(1100 回転 30 秒の後、300 回転にセット) 。
12. アッセイプレートの各ウェルを 100uL の wash buffer で 3 回洗浄します。
13. 各ウェルに 125uL の Assay Buffer を加えて、プレートシールをしてから、遮光して 30 秒間シェイクします(1100 回転 30 秒の後、300 回転にセット) 。
14. アッセイプレートを、Low RP1 (Bio-Plex Manager), Standard PMT (xPONENT software) で、100 beads per region) で測定します (Section 10) 。
プロトコールの設定方法について、詳しくはソフトウェアマニュアルをご覧ください。

実験メモ （実験日 ）

キット情報

・生物種： Human ・項目数： 5-plex / 4-plex
・Assay Kit ロット番号： Control # (キット外箱ラベルに記載)
・Standard ロット番号： Control # (Standard Spec Sheet に記載)
・抗体ビーズのロット番号：Control # (ビーズのバイアルラベルに記載)
・検出抗体のロット番号： Control # (検出抗体のバイアルラベルに記載)

装置情報

・最終 Validation 日： 年 月 日 (Bio-Plex Manager で Log を確認できます)
・Calibration Kit ロット番号： CAL1Control # (ボトルラベルに記載)
CAL2 Control # (ボトルラベルに記載)

使用ウェル数：

スタンダード： 8 ウェル × 2 (duplicate) = 16 ウェル
ブランク： 2 ウェル
サンプル： サンプル × = ウェル
計： ウェル

サンプルマッピング

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	B	B								
B	S2	S2										
C	S3	S3										
D	S4	S4										
E	S5	S5										
F	S6	S6										
G	S7	S7										
H	S8	S8										

注）Blank ウェルを測定しておくことを強くお勧めします。 ただし、サンプルの組成とブランクの組成によっては、マイナスの値を示すことがあります。それを避ける場合には、ブランクは“B”でなく、“X (unknown sample)”か”C (Control)”として設定します。 この設定変更は測定後でも可能です。Obs. Conc. の計算値には影響しません。

DD Gate; 5000-32000 (Bio-plex Manager の場合), Luminex xPONENT3.1 の場合は、MagPlex 10,000-22500 **Sampling volume;** 50uL, **Beads per region;** 100, **PMT Setting;** Low PMT (Standard PMT)					
項目名称(Region 番号),					
4-Plex:	Hu A2M (92)	Hu Haptoglobin (79)	Hu CRP (81)	Hu SAP (98)	
5-Plex:	Hu PCT (56)	Hu Ferritin (38)	Hu tPA (21)	Hu Fibrinogen (52)	Hu SAA (96)

Bio-Plex Manager 用の template ファイルはウェブサイトからダウンロード可能です。

お問い合わせ先（バイオ・ラッド テックコール）； 電話：03-6404-0331 メール：life_ps_jp@bio-rad.com