

Bio-Plex Pro マウスサイトカイン GroupI と GroupII アッセイの混合方法

Bio-Plex マウス Group I(GI)サイトカイン(全 23 項目)とマウス Group II (GII)サイトカイン(全 9 項目)は、異なるアッセイパネルですが、混ぜあわせて最大 32 項目でアッセイを行うことができます。

キットの購入方法について以下の様なパターンありますが、いずれの場合においても、スタンダードおよび抗体ビーズ、検出抗体を混合してアッセイを行います。本資料では混合する手順について示しております。

【パターン1】 GI のアッセイキットと GII のアッセイキットを使用して、混ぜあわせる。

例) マウス GI 23-Plex (M60009RDPD)と、GII 9-Plex(MD000000EL)を混ぜる。

この場合、Reagent キットが 2 プレート分となりますが、1プレート分は使用しません。

プレミックスキットだけでなく、カスタムパネルアッセイキットとして、x-Plex (We-Mix)ないし Express(You-Mix)で入手される場合も同様です。

【パターン2】 GI ないし GII のアッセイキットに、他方の Group のシングルプレックスセットを追加する

例) マウス GI 8-plex パネル(M60000007A)に、VEGF(171G6008M)のシングルプレックスセットを追加し、9-Plex で測定する。

Reagent キットは、アッセイキットに付属のものを使用しますが、シングルプレックスセットに対応する Standard も入手する必要があります(次ページ参照)。

【パターン3】 シングルプレックスセットだけで組み合わせる。

例) GI より3項目、GII より2項目選択して、合計 5-Plex で測定する。

該当項目のシングルプレックスセット5本以外に、Reagent キット1プレート分と、GI と GII の Standard が1本ずつ必要です(次ページ参照)。

ポイント

- **"シングルプレックスセット"**とは単一項目の抗体ビーズおよび検出抗体をセットした製品です。アッセイを行うためには、対応する Standard と Reagent キットが必要です。
- **Express panel(You-Mix)カスタムパネル**とは、選択した項目の"シングルプレックスセット"と、対応する Reagent キットおよび Standard を組み合わせた製品です。別のプレミックスパネルキットと混ぜる前提の場合には、Reagent キットが余分となりますので、該当するシングルプレックスセットと Standard だけ入手する方が安価に入手できます。
- マウス GII に属する IL-18 のシングルプレックスセットは、IL-18 だけを Singleplex で測定する場合には販売できません。他の項目とともに購入してください。
- マウスサイトカインアッセイ GI および GII は、プレミックスアッセイもシングルプレックスセットも 10 倍濃度です。プレミックスされた製品にシングルプレックスセットで測定項目を追加する場合やシングルプレックスだけを組み合わせる場合でも、バイアル当りの液量は最終容量の 10 分の 1 量です。それゆえ、最終的な項目数によらず、混合できる本数は 10 本までです。
- 本資料に記載する抗体ビーズ調製法、検出抗体調製法、Protocol 設定以外の手順や注意点は、各アッセイパネルキットと共通です。Instruction manual やクイックガイドをご参照下さい。
次のアドレスからダウンロードできます。 <http://pdbu-support.bio-rad.co.jp/bio-plex.html>

【Reagent kit】

12002798 Bio-Plex Pro™ Reagent Kit V (磁気ビーズ用プレート付) 1x96

アッセイキットに付属している Reagent Kit の構成が 2017 年 5 月ごろより順次変更されました。変更前の Reagent Kit は下記の型番で販売しています。

171304070M Bio-Plex Pro Reagent キット(磁気ビーズ用プレート付) 1x96

171304070 Bio-Plex Pro Reagent キット(フィルタープレート付) 1x96

【Standard 単品】

171150001 マウスサイトカイン GroupI スタンダード(1 本)

171110501 マウスサイトカイン GroupI スタンダード(50 本)

171160001 マウスサイトカイン GroupII スタンダード(1 本)

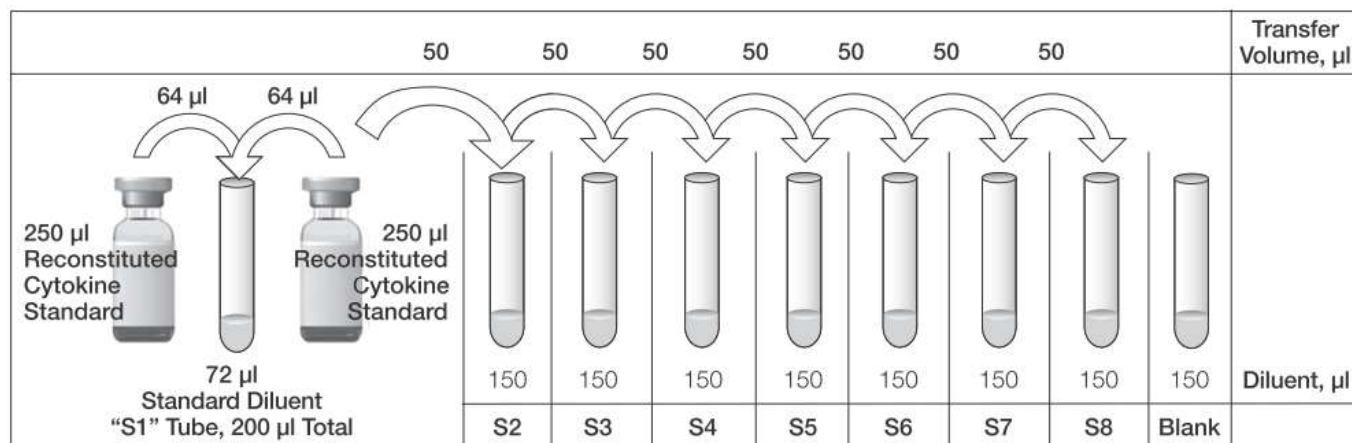
171110502 マウスサイトカイン GroupII スタンダード(50 本)

【Standard の混合について】

スタンダードのバイアルには、各 Group に含まれる全ての項目が含まれています。そのため、項目数によらず、GI と GII を混ぜて測定する場合には、GI と GII の Standard を1本ずつだけ混合します。

測定するサンプルの種類や組成に応じた希釈液を、それぞれの Standard のバイアル1本当たり 250uL 添加します。5秒間ボルテックスをかけてから、氷上で 30 分静置した後、さらにボルテックスします。Standard の希釈系列(4 倍)と、ブランクを次の手順に従って調製します。図も参考にしてください。

Standard の調製手順



- (1) マイクロチューブを 9 本用意し、S1 から S8 までと、Blank とラベルします。
- (2) S1 のチューブに、72uL の希釈液(Standard Diluent など、前項の表を参照)を加えておきます。それ以外のチューブには 150uL の希釈液を加えておきます。
- (3) それぞれの溶解済み Standard から 64uL ずつを、S1 のチューブに加えます(合計 200uL)。
- (5) S1 のチューブを5秒間ボルテックスをかけ、そこから 50uL を取って、S2 のチューブに加えます。
- (6) 以下同様にして、各希釈段階で 5 秒ずつボルテックスをかけてください。

【抗体ビーズおよび検出抗体の調製について】

マウスサイトカインアッセイ GI および GII は、プレミックスアッセイもシングルプレックスセットも 10 倍濃度です。プレミックスされた製品にシングルプレックスセットで測定項目を追加する場合やシングルプレックスだけを組み合わせる場合でも、バイアル当りの液量は最終容量の 10 分の 1 量です。それゆえ、最終的な項目数によらず、混合できる本数は 10 本までです。

注意: マウス Th17 パネル A (M6000007NY) だけは、GI ですが、例外として 20x 濃度です。添加量は最終容量の 20 分の 1 として計算し、Assay Buffer ないし Detection Antibody Diluent の量を調節してください。

各バイアルより、最終的な容量の 10 分の 1 量で加え、残りの量を Assay Buffer ないし、Detection Antibody Diluent で合わせます。下記の計算表に従って調製して下さい。

【抗体ビーズの調製】

	測定 ウェル数	バイアル 本数	バイアル当りの 10x Beads (uL)	Assay Buffer (uL)	合計 (uL)
<input type="checkbox"/>	96	X =	576	$5760 - (576 \times X) =$	5760
<input type="checkbox"/>	48	X =	288	$2880 - (288 \times X) =$	2880
<input type="checkbox"/>	W =	X =	$W \times 6 =$	$W \times 60 - (W \times 6 \times X) =$	$W \times 60 =$

【検出抗体の調製】

	測定 ウェル数	バイアル 本数	バイアル当りの 10x Detection Antibody (uL)	Detection Antibody Diluent (uL)	合計 (uL)
<input type="checkbox"/>	96	X =	288	$2880 - (288 \times X) =$	2880
<input type="checkbox"/>	48	X =	144	$1440 - (144 \times X) =$	1440
<input type="checkbox"/>	W =	X =	$W \times 3 =$	$W \times 30 - (W \times 3 \times X) =$	$W \times 30 =$

【測定項目の設定について】

Bio-Plex 100/200 システム 【Bio-Plex Manager 6.0/6.1】

1. Select Analyte 画面において、Panel のプルダウンから、Bio-Plex Pro Mo Group I Cytokine 23-Plex を選びます。
2. 測定する項目を選んでから Add...>>ボタンを押し、Selected の欄に移します。
3. 次に、同じく Panel のプルダウンから、Bio-Plex Pro Mo Group II 9-Plex を選びます。
4. 測定する項目を選んでから Add...>>ボタンを押し、Selected の欄に移します。

Bio-Plex Manager ver.4.x ないし ver.5 をお使いの場合は、Panel の rgy プルダウンリストに使用するアッセイが登録されていない場合があります。Bio-Plex システムサポートサイトよりダウンロードしてお使いください。Ver.4.x では 32-Plex の Template を用意してありますので、不要項目を Remove して下さい。

Bio-Plex MAGPIX システム 【Bio-Plex Manager MP ソフトウェア】

1. Select Analyte 画面において、Manage Assay Panels ボタンを押します。
2. Bio-Plex Pro Mo Group I Cytokine 23-Plex と Group II 9-Plex にチェックを入れます。
3. 右側の New From.. ボタンをクリックします。
4. 選択したパネルの全項目が含まれる新しいパネルが作成されます。
5. ここで不要な項目を Delete しておいても構いませんし、測定時に外すこともできます。
6. 名称を付けて、OK ボタンをクリックします。
7. 上で付けた名称がプルダウンメニューに表示されますので、選択します。
8. 測定しない項目がある場合には、チェックボックスを外します。

Bio-Plex 3D システム・Luminex100/200 システム・MAGPIX システム 【xPONENT ソフトウェア】

Protocol の Template ファイルを Bio-Plex システムサポートサイトよりダウンロードしてお使いください。

1. Protocol 画面において、ダウンロードした lxt ファイルを Import します。
2. Bio-Plex Pro Mo Group I Cytokine 23-Plex か Group II 9-Plex のどちらか一方の Protocol を選択します。
3. "Edit"機能により、不要の測定項目 (Analytes) を削除するとともに、他方のパネルの測定項目 (Analytes) を追加して下さい。追加する項目の Region Number は、Instruction Manual ないし、Standard Value のシートをご参照下さい。

以上