

Bio-Plex Pro サイトカインアッセイ クイックガイド

(Rat Group I パネル)

本資料は Bio-Plex Pro サイトカインアッセイの、Rat の Group I パネルの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。

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/10014905.pdf>

キットごとの違いにご注意ください

Bio-Plex Pro サイトカインアッセイは Human, Mouse, Rat および TGF β といったキット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、Rat Group I パネル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。

	Rat Group I	Human Group I, II, Mouse Group I, II	Mouse Group III	TGF- β
酸によるサンプルの活性化処理	不要	不要	不要	必要
抗体ビーズ・検出抗体の希釈割合	X 20	X 10	X 20	X 20
測定時の PMT Setting	High PMT	Low PMT	Low PMT	Low PMT

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。(キット付属の Standard Diluent および Sample Diluent は血清・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、氷上に 30 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ویل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。
- ・ **回転数の指定について、先頃 850 \pm 50rpm に改定されました。これまでの指定(1100rpm と 300rpm)で行う場合は同様のアッセイパフォーマンスが期待されますが、同じ実験プロジェクト内では引き続き同一条件で実施することをお勧めします。**
- ・ 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>

準備

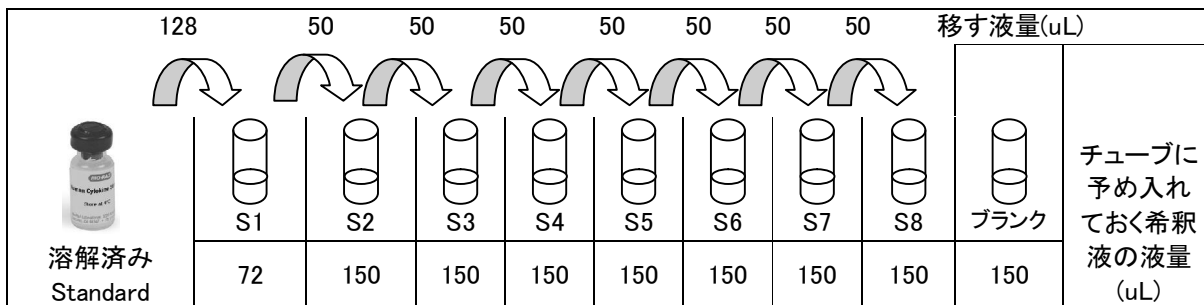
1. プレートのレイアウトを確認してください (Section 1)。本資料末尾のシートをご利用ください。
2. Bio-Plex システムの Startup/warm up (Bio-Plex Manager 6.1 をお使いの場合は Startup & Calibration) 処理をしてください。この間に、バッファー類を室温に戻しておきます。また、凍結しておいたサンプルを氷上で溶かします (Section 1)。
3. Wash Station ないし、バキュームマニフォールドの準備をしてください (Section 3)。
4. Bio-Plex システムの Calibration を行ってください (後のインキュベーション中でも可 (Section 2))。
5. 次ページの表に従い、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 500 μ L 添加します。5 秒間ボルテックスをかけた後、氷上で 30 分静置したのち、さらにボルテックスをかけます (Section 4)。

(つづく)

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	Standard 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%
その他の体液・抽出液	Sample diluent	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。
各希釈段階で 5 秒ずつボルテックスをかけてください(Section 4)。



7. サンプルを次のようにして調製します (Section 5)。

サンプルの種類	希釈液	BSA 添加の有無	希釈率
血清・血漿	Sample diluent	不要	4 倍
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
その他の体液・抽出液	Sample diluent	終濃度 0.5%	サンプルに依存

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(Section 6)。

	測定ウェル数	20x Beads (ul) #	Assay Buffer (uL)	Total Volume (uL)
<input type="checkbox"/>	96	288	5472	5760
<input type="checkbox"/>	48	144	2736	2880
<input type="checkbox"/>	W =	Wx3 =	Wx57=	Wx60=

Express Assay をご使用の場合は、各項目あたりの液量です。Total Volume が同じになるよう、Assay Buffer の量を減らして調製してください。

Assay の実施 (Section 7)

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。

- 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 でプレウエットしておきます。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。
- 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。
- 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。
- 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。
- プレートシールをしてから、遮光して 1 時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、液がはねないように徐々に回転数を上げ、**850±50 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、軽くスピンドウンします。次ページの表に従い、1x に調製してください。

(つづく)

Bio-Plex Pro サイトカインアッセイ クイックガイド (Rat Group I パネル)

	測定ウェル数	20x Detection Antibody (ul) #	Detection Antibody Diluent (ul)	Total Volume (uL)
<input type="checkbox"/>	96	144	2736	2880
<input type="checkbox"/>	48	72	1368	1440
<input type="checkbox"/>	W =	W x 1.5 =	W x 28.5=	W x 30=

Express パネルをご使用の場合は、各項目あたりの液量です。Total Volume が同じになるよう、Detection Antibody Diluent の量を減らして調製してください。

- 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。
- 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。
- プレートシールをしてから、遮光して、30 分間室温にて **850 ± 50 回転** でインキュベートします。このタイミングで、Bio-Plex Manager ソフトウェアで、測定プロトコ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 8)。

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、軽くスピンドアウンします。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)	Assay Buffer (ul)	Total Volume (uL)
<input type="checkbox"/>	96	60	5940	6000
<input type="checkbox"/>	48	30	2970	3000
<input type="checkbox"/>	W =	Wx.625 =	Wx61.875=	Wx62.5=

- 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。
 - 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。
 - プレートシールをしてから、遮光して、10 分間室温にて **850 ± 50 回転** でインキュベートします。
 - 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。
 - 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 (**850 ± 50 回転**) 。
 - アッセイプレートを、High RP1(Bio-Plex Manager), High PMT(xPONENT software)で、50 beads per region)で測定します(Section 8)。
- プロトコ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。

