

ONEPot-G1 Immunoassay Kit <OpenGUS Method>

製品コード DS852 ONEPot-G1 Immunoassay Kit, Fluorescent <OpenGUS Method>

OpenGUS probe G1	100 U
Reaction Buffer	50 ml
Fluorescent Substrate	5 ml

製品コード DS862 ONEPot-G1 Immunoassay Kit, Colorimetric <OpenGUS Method>

OpenGUS probe G1	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。

ヒト血清、FBSが含まれるサンプルの測定も可能となりました。

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℃

使用期限

お手元に届いてから6か月間

キット概要

- 任意の抗体(mouse IgG1)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. #DS852)と吸光測定用キット(Cat. #DS862)があります。

注意事項

- 対象とする抗原が40 nM以上含まれるサンプルを推奨します。
(200倍希釈して0.2 nM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ることもあります。(使用例に示すCRP等)
- 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。
- マウス血清等、mouse IgG1を含むサンプルには使用できません。

別途ご用意いただく試薬・機器

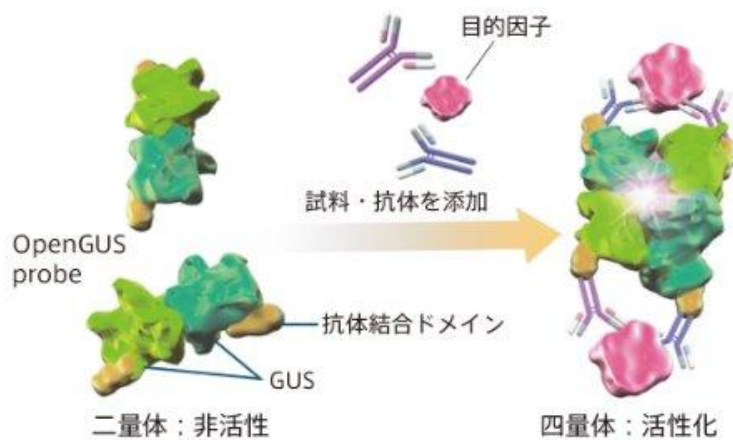
- 抗原をサンドイッチ可能なmouse IgG1抗体のペア
- 検量線用の精製抗原
- 96 well plate
 蛍光 (Cat. #DS852): black plate
 吸光 (Cat. #DS862): clear plate: Nunc™ Edge™ 96-Well, Non-Treated, Flat-Bottom Microplate (Thermo Scientific #267427)を推奨 *ウエルの外側を水で満たすことができるようになっており、ウエル間での温度の差が小さくなる。
- Microplate reader
 蛍光 (Cat. #DS852): 励起光 340 nm / 蛍光 450 nm
 吸光 (Cat. #DS862): 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

OpenGUS probe G1

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. #DS852)または発色基質(Cat. #DS862)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. OpenGUS probe G1を氷上で融解し、軽くボルテックス *1
3. 以下のようなPremixを調製

Premix (1 wellあたり)

OpenGUS probe G1	X μ l (1 U) *2
Mouse IgG1 (No. 1)	Y μ l (18.75 ng) *3
Mouse IgG1 (No. 2)	Z μ l (18.75 ng)
Reaction Buffer	140 - (X+Y+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 血清: 20-40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. 蛍光(Cat. #DS852): 25℃で20分間静置 *11
吸光(Cat. #DS862): 37℃で20分間静置
10. 基質を40 μ lずつ加える *12 *13
11. 蛍光(Cat. #DS852): 25℃で遮光して60分間静置
吸光(Cat. #DS862): 37℃で遮光して60分間静置(黄色の発色を確認できる)
12. 蛍光(Cat. #DS852): 励起光 340 nm / 蛍光 450 nm で測定
吸光(Cat. #DS862): 主波長 405nm / 副波長 660 nm で測定

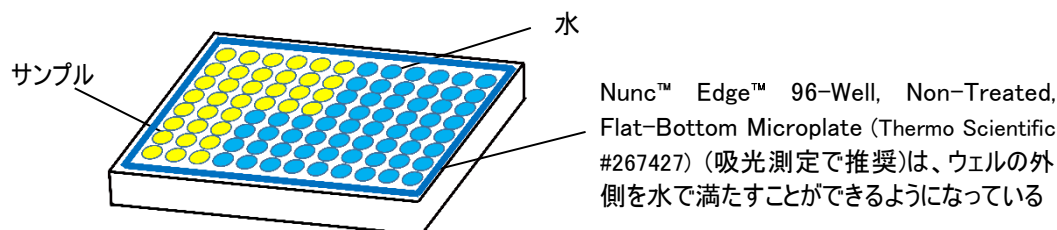
*1 OpenGUS probe G1は使用後すぐに-80℃に戻してください。

*2 1UあたりのOpenGUS probe G1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る場合もあります。その場合、抗体量は37.5 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。



- *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、異なるサンプル希釈倍率間で同程度になる場合、希釈が充分であると考えられます。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℃60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回程度ピペッ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
旧製品のONEPot Immunoassay Kit <OpenGUS Method> (Cat. #DS850, DS860と本製品、どちらを選択すればいいか。違いは何か。	まずはバージョンアップ品である本製品をご使用いただくことをお勧めします。感度はほぼ同程度ですが、抗体やサンプルによって異なります。本製品は、従来品(Cat. #DS850, DS860)と比較して特に mouse IgG1 とのアフィニティの高い抗体結合ドメインを選択しています。そのため、mouse IgG1 以外のイムノグロブリンを含む試料であるヒト血清や FBS への使用に適しています。ただし、唾液試料に関しては、本製品より Cat. #DS850, DS860 の方が適することを確認しています。
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. #DS852)と吸光(Cat. #DS862)どちらのキットを選べばいいか。	蛍光測定のキット(Cat. #DS852)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℃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 以外の抗体では使用できません。
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	使用抗体	備考
CRP	0.4 – 34 ng/ml (0.018 – 1.5 nM)	Anti-C-reactive Protein (High Sensitivity CRP), in vitro, Mouse-Mono(C2cc) (HyTest Cat. #4C28cc-C2cc)	抗原が多量体を形成しているため、1種類の抗体のみで検出できた
Transthyretin	0.3 – 21 ng/ml (0.023 – 1.5 nM)	Anti-Human Transthyretin/Prealbumin Mab (Clone 760430) (Bio-Techne Cat. #MAB7505)	抗原が多量体を形成しているため、1種類の抗体のみで検出できた
Cryj1	1.6 – 39 ng/ml (0.041 – 1 nM)	Anti-Cry j 1, Mouse-Mono(013) (BDL Cat. #HBL-Ab-1-013) および Anti-Cry j 1, Mouse-Mono(053) (BDL Cat. #HBL-Ab-1-053)	
HSP60	2.5 – 200 ng/ml (0.041 – 3.3 nM)	Anti-HSP60 Monoclonal antibody (clone 2E4) (NKMAX Cat. #AHS0815)	抗原が多量体を形成しているため、1種類の抗体のみで検出できた
Lactoferrin	4.4 – 124 ng/ml (0.054 – 1.5 nM)	Anti-Lactoferrin, Human, Mouse-Mono(1A1) (HyTest Cat. #4L2-1A1)	抗原が多量体を形成しているため、1種類の抗体のみで検出できた

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	・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。
	・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希釈倍率を濃度測定に用いてください。

	・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、異なる希釈倍率間で同程度になる場合、希釈が充分であると考えられます。 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	・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	・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。

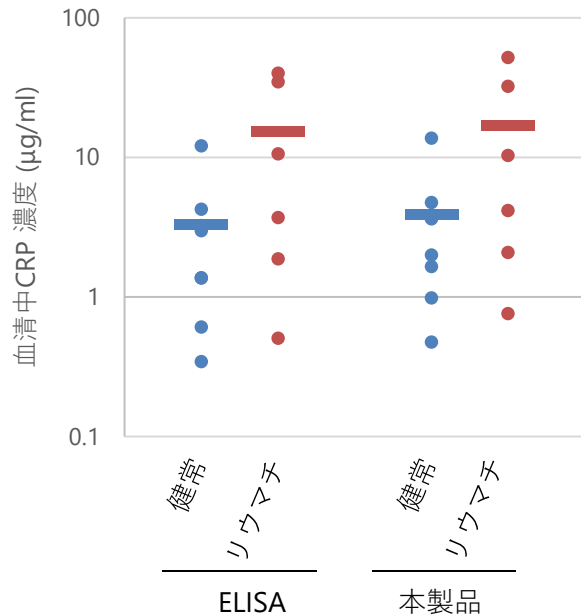
$$\% \text{ Recovery} = ([\text{Spike した希釈ブランク試料}] - [\text{希釈ブランク試料のみ}]) / ([\text{Spike した Reaction Buffer}] - [\text{Reaction Buffer のみ}]) \times 100$$

% Recovery は 80-120%の範囲内にあることが好ましい。

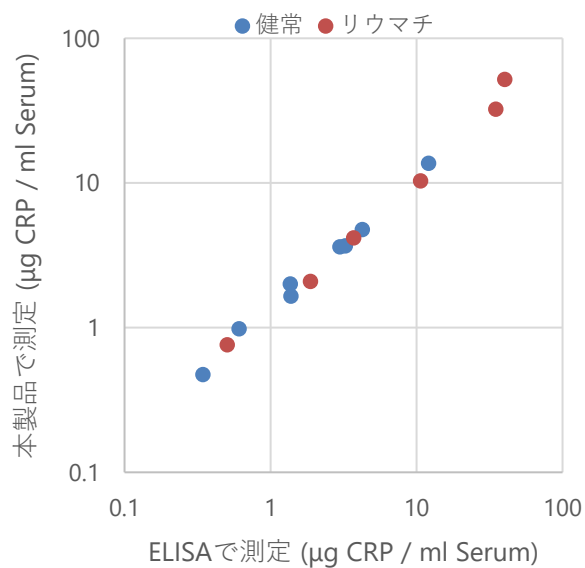
使用例

ヒト血清中のC-Reactive Protein濃度の測定

健康人血清(8名)およびリウマチ患者血清(6名)のC-Reactive Protein (CRP)濃度を、市販のELISA kitおよび本製品で測定した。



リウマチ患者の血清において CRP 濃度が上昇していることを、ELISA および本製品で同様に確認した。



ELISA および本製品で測定した血清中 CRP 濃度は高い相関を示した。

関連文献

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)
5. B. Zhu, Y. Yamasaki, T. Yasuda, C. Qian, Z. Qiu, M. Nagamine, H. Ueda and T. Kitaguchi. Customizable OpenGUS immunoassay: a homogeneous detection system using β -glucuronidase switch and label-free antibody. *Biosens. Bioelectron.* 267, 116796 (2025)

本品のご利用について

本製品は、研究目的用にのみ販売しております。

本製品は東京科学大学よりライセンスを受けて製造販売を行っております。

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。

弊社では、本製品に関連する技術のライセンスアウトを積極的に行っております。ご関心をお持ちいただけましたら、お気軽にお問い合わせください。