

## ● カスタマイズアッセイ法による生体試料中の バイオマーカー濃度測定 - ビーズアレイ法・ECL イムノアッセイ法 -

TN392

### Quantitative Determination of Biomarkers in Biological Fluids by Customized Beads Array and ECL Method

#### [概要]

ビーズアレイ法は、イムノアッセイ法をフローサイトメーターに応用したもので、マイクロビーズに捕捉抗体をカップリング後、タンパク質とフィコエリスリン（PE）等による標識抗体によりサンドイッチ複合体を形成させ、マイクロビーズの散乱光または蛍光と PE 等の蛍光を測定することで、タンパク質バイオマーカーの定性または定量分析が可能です。

電気化学発光（ECL）イムノアッセイ法（以下、ECL 法）は、専用プレートの底面電極からの電気化学的刺激による標識の発光を、イムノアッセイの検出に応用したものです。

ビーズアレイ法および ECL 法の特徴を以下に示します。サンプル量が少ない、解析項目数が多いといった場合などで、アッセイフォーマットの選択が可能です。

	サンプル量	サンプル希釈倍率	アッセイ時間	同時解析項目数
ビーズアレイ法	50 $\mu$ L	5 倍	1 日	最大 30
ECL 法	25 $\mu$ L	10 倍	2 日	最大 4 (カスタムの場合)

ビーズアレイ法および ECL 法はキット化製品以外のタンパク質を検出する際には、ユーザーでカスタマイズが必要です。当社では、フローサイトメーターまたは ECL 法を用い、カスタマイズによる生体試料中のバイオマーカー濃度測定サービスを提供しております。また、市販もしくは提供抗体の組み合わせにて、ユーザーでカスタマイズが必要な捕捉抗体へのビーズの結合および検出抗体の標識化、測定法確立、バリデーション、検体測定まで信頼性基準及び GLP に対応したサービスを承ります。

#### [測定例] ラット尿中の KIM-1 濃度測定

腎毒性マーカーである KIM-1 に関して、ビーズアレイ法 として Cytometric Beads Array 法<sup>1)</sup>（以下 CBA 法）を用い、ECL 法との検出感度、定量限界、同時再現性を比較検討しました。

##### <試験方法>

##### CBA 法

1. 試料：測定対象を含んだ 20%ラット尿
2. 方法
  - (1) 捕捉抗体を Functional beads に結合
  - (2) 検出抗体を PE (Phycoerythrin) で標識化
  - (3) 上記の調製物質と分析試料を混合し、インキュベート
  - (4) フローサイトメーターにて測定

##### ECL 法

1. 試料：測定対象を含んだ 10%ラット尿
2. 方法
  - (1) 検出抗体を Sulfo-tag 化
  - (2) 捕捉抗体をアッセイプレートに固相化
  - (3) 分析試料を添加
  - (4) Sulfo-tag 化した検出抗体を添加
  - (5) ECL 測定機器にて測定

## 定量範囲及びアッセイレンジ (図1 および図2)

アッセイフォーマット	定量範囲	100%尿換算及びアッセイレンジ
CBA 法	0.270~66.7 ng/mL (20%尿)	1.35~334 ng/mL
ECL 法	0.091~22.2 ng/mL (10%尿)	0.91~222 ng/mL

CBA 法および ECL 法は、ほぼ同等の定量下限値、アッセイレンジが得られました。CBA 法および ECL 法共に良好な同時再現性を示しました。(表1 および表2)

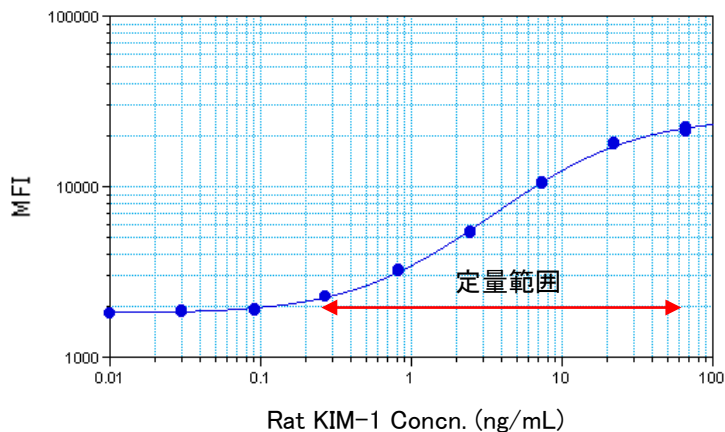


図1 CBA 法 (20%尿)

表1 CBA 法の同時再現性評価 (n = 5)

QC 試料	添加濃度 (ng/mL)	定量濃度 (ng/mL)	精度 (%)	真度 (%)
QC-L	0.85	0.88	2.9	3.1
QC-M	2.00	2.01	3.0	0.7
QC-H	50.0	58.9	9.2	17.9

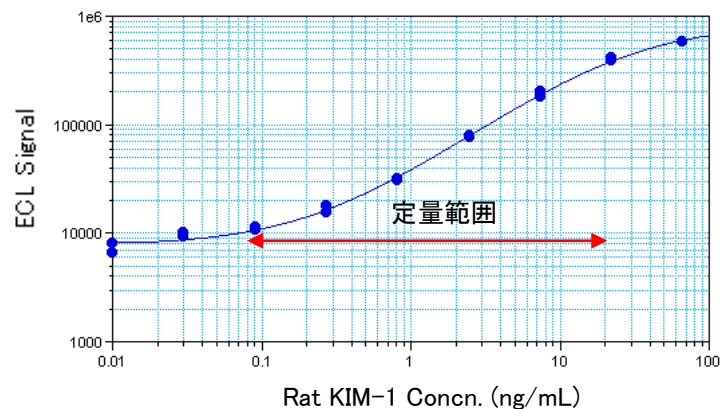


図2 ECL 法 (10%尿)

表2 ECL 法の同時再現性評価 (n = 5)

QC 試料	添加濃度 (ng/mL)	定量濃度 (ng/mL)	精度 (%)	真度 (%)
QC-L	0.30	0.27	9.0	-10.7
QC-M	2.00	1.87	5.2	-6.6
QC-H	18.0	17.5	14.3	-3.0

### [参考文献]

1)日本 BD 社ホームページ

<http://www.bdj.co.jp/index.html>

### [関連技術リンク]

ECL イムノアッセイ法を用いたタンパク医薬品の生態試料中濃度測定

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn359.pdf>