

注意事項

- * 本プロトコールは簡易版です。初めてご使用の際は必ず取扱説明書をご確認ください。
- * 試料は新鮮なもの又は -20°C 以下で保存したものを使用して下さい。保存料は使用しないでください。
- * 試薬及びプレートは、使用前に必ず室温 ($20\sim 25^{\circ}\text{C}$) に戻して下さい。
- * ペムプロリズマブを含む試料は、測定値に影響を与えますので使用しないで下さい。

1. 試薬の調製

- (1) WR1 (Working Reagent 1: ビオチン標識抗ニボルマブ抗体試薬) の調製
 - ① ビオチン標識抗ニボルマブ抗体 ($100\times$) 全量を R-1 のボトルへ添加する。
 - ② R-1 のボトルラベルのチェックボックスへ印 (R-1) を付け、これを WR1: Working Reagent 1 とする。
- (2) WR2 (Working Reagent 2: HRP 標識ストレプトアビジン試薬) の調製
 - ① HRP 標識ストレプトアビジン ($100\times$) 全量を R-2 のボトルへ添加する。
 - ② R-2 のボトルラベルのチェックボックスへ印 (R-2) を付け、これを WR2: Working Reagent 2 とする。
- (3) WB (Wash Buffer: 洗浄液) の調製
 洗浄液 ($10\times$) 全量を精製水で 10 倍に希釈し、WB: Wash Buffer とする。
- (4) 標準試料
 使用直前によく攪拌し、そのまま使用する。

2. 測定試料の調製

Diluent で 400 倍に希釈し、測定試料とする。

試料の希釈例

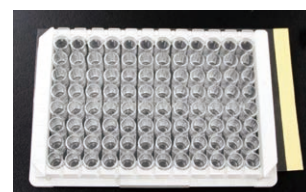
試験管 No.	希釈サンプル	試料量 (μL)	<u>Diluent</u> 量 (μL)	開始希釈倍率	希釈倍率
1	血清、血漿	10	190	-	20 倍
2	試験管 No.1	10	190	20 倍	400 倍

3. 測定

- (1) PD-1 タンパク固相化プレートに、各標準試料、測定試料を $100\ \mu\text{L}$ / ウェル分注する。(各試料 2 ウェルずつ)

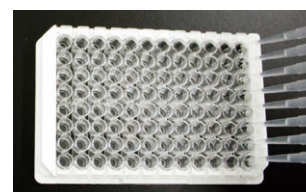


- (2) PD-1 タンパク固相化プレートにプレートシールを貼り、室温で 1 時間反応させる。

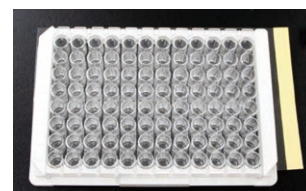


- (3) 反応液を捨て、PD-1 タンパク固相化プレートを洗浄する。(WB $300\ \mu\text{L}$ / ウェル $\times 3$ 回)

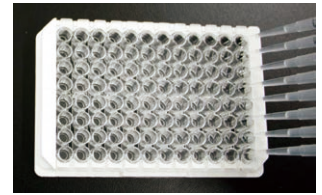
- (4) PD-1 タンパク固相化プレートに、WR1 を $100\ \mu\text{L}$ / ウェル添加する。



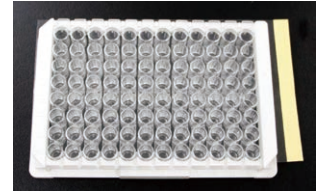
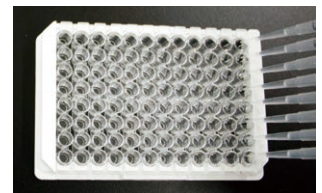
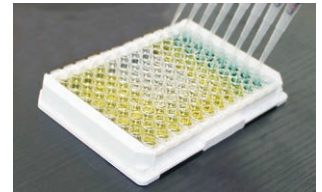
- (5) PD-1 タンパク固相化プレートにプレートシールを貼り、室温で 1 時間反応させる。



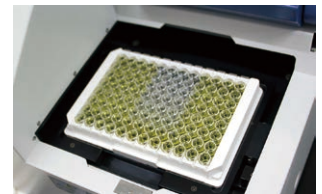
(前ページからの続き)

(6) 反応液を捨て、PD-1 タンパク固相化プレート[®]を洗浄する。(WB 300 μ L/ ウェル \times 3 回)(7) PD-1 タンパク固相化プレートに、WR2 を 100 μ L/ ウェル添加する。

(8) PD-1 タンパク固相化プレートにプレートシールを貼り、室温で 30 分間反応させる。

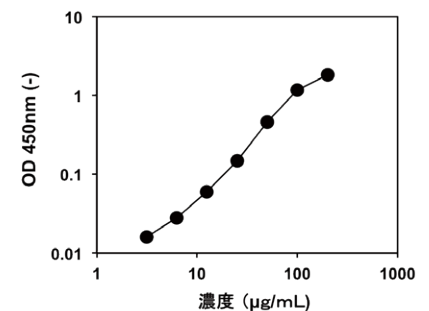
(9) 反応液を捨て、PD-1 タンパク固相化プレート[®]を洗浄する。(WB 300 μ L/ ウェル \times 3 回)(10) PD-1 タンパク固相化プレートに、R-3 を 100 μ L/ ウェル添加する。(11) PD-1 タンパク固相化プレート[®]を、マイクロプレートシェーカーなどで振とうし、遮光して室温で 30 分間反応させる。(12) PD-1 タンパク固相化プレートに、R-4 を 100 μ L/ ウェル添加する。

(13) 450 nm の吸光度を測定する。



4. 測定値の算出

- (1) 試料毎に吸光度の平均値を求める。
- (2) 検量線試料のニボルマブ濃度に対する吸光度をプロットし、検量線を作成する。
- (3) 検量線より試料中のニボルマブ濃度を読み取る。



検量線の例

製造販売業者
問い合わせ先

セルスペクト株式会社 〒020-0857 岩手県盛岡市北飯岡 1-10-82 ※クオンテスタは、セルスペクト株式会社の試薬キットの名称です。

メタロジェニクス株式会社 〒260-0015 千葉市中央区富士見 1-14-13 千葉大栄ビル

TEL : 043-227-6767 e-mail : sales@ak-j.com

FAX : 043-227-6768 URL : <http://metallogenics.co.jp/>