

【今更聞けない、、、ELISA や LEGENDplex の 検量曲線フィッティングモデルってどれを使ったら良いの??】

フローサイトメトリー実験に関する、今更聞けない質問にお答えする「今更聞けない、、、」ですが、今回は少し外れて、ELISA や LEGENDplex 時に作成する検量線のフィッティングモデルについてのお話をしようと思います。

BioLegend 社の [LEGENDplex](#) はフローサイトメトリーベースのビーズアッセイキットで、液体サンプル中のサイトカインやケモカインなど最大 14 項目の可溶性蛋白質の定量を行うことができます。

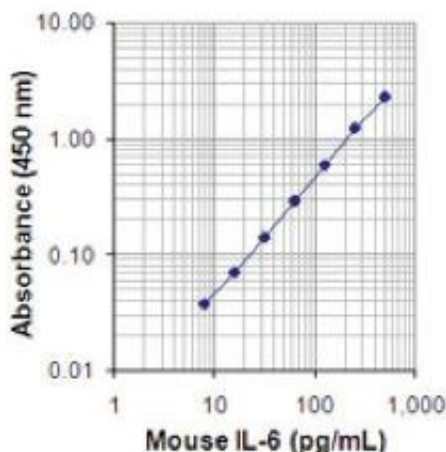
定量の際には、必ず測定ごとに標準曲線を作成し、測定値をもとにサンプル中の各因子の濃度を定量する必要があります。

標準曲線の作成には、既知の濃度の分析対象物（＝標準物質、スタンダード）を用意し、その測定値（ELISA でいうところの OD 値、LEGENDplex でいうところの PE の MFI）が必要です。



学生実験などで ELISA を行った場合には、そのプロットで直線を引いて、測定値と因子の濃度を線形回帰によって求めたことがあったかと思います。

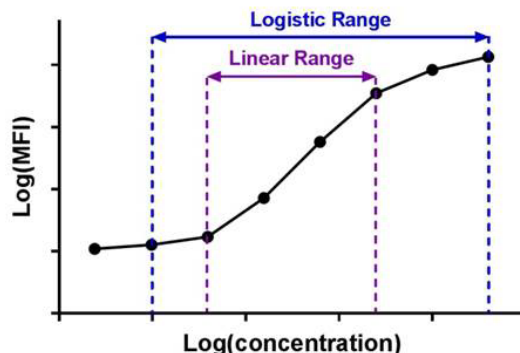
Standard Curve Generated and Using LEGEND MAX™
Mouse IL-6 ELISA Kit with Pre-coated Plates



ただし、これら免疫アッセイは生物学的測定に使用されるため、直線的な応答をすることはあまりありません。実際、測定値（OD 値や MFI）には上限、下限が存在するため、字型のシグモイド曲線（S 字曲線）を描きます。したがって、より生物学的に合致したモデリングを用意する必要があります。

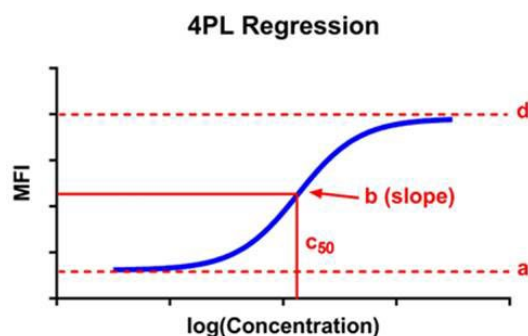
現在よく使用される非線形曲線モデルには、4パラメーターロジスティクス（4PL）と5パラメーターロジスティクス（5PL）があります。

この2つのモデルは、S字曲線に対応可能で、曲線の線形部分を超えて、定量することができます。



■ 非線形曲線モデル：4パラメーターロジスティクス（4PL）

名前の通り4つのパラメータ（a, b, c, d）を使用した下記の式で作成するシグモイド曲線です。データが対照的なS字曲線に対応できます。



4PL Equation:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

a = theoretical response at zero concentration

b = slope factor

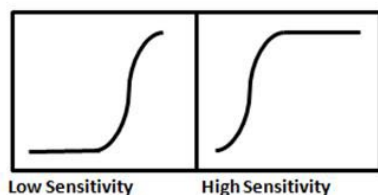
c = mid-range concentration (inflection point)

d = theoretical response at infinite concentration

■ 非線形曲線モデル：5パラメーターロジスティクス

4PLに非対称係数gを加えたフィッティングモデルです。下記のようにLow SensitivityだったりHigh Sensitivityだったりするなど非対称的なS字曲線に対応でき、定量性が上がります。

ただし、関数がかかなり複雑なため、Excelなどで組むのはかなり難しいです。



Asymmetrical 5PL Curves

5PL Equation:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^{bg}}$$

a = theoretical response at zero concentration

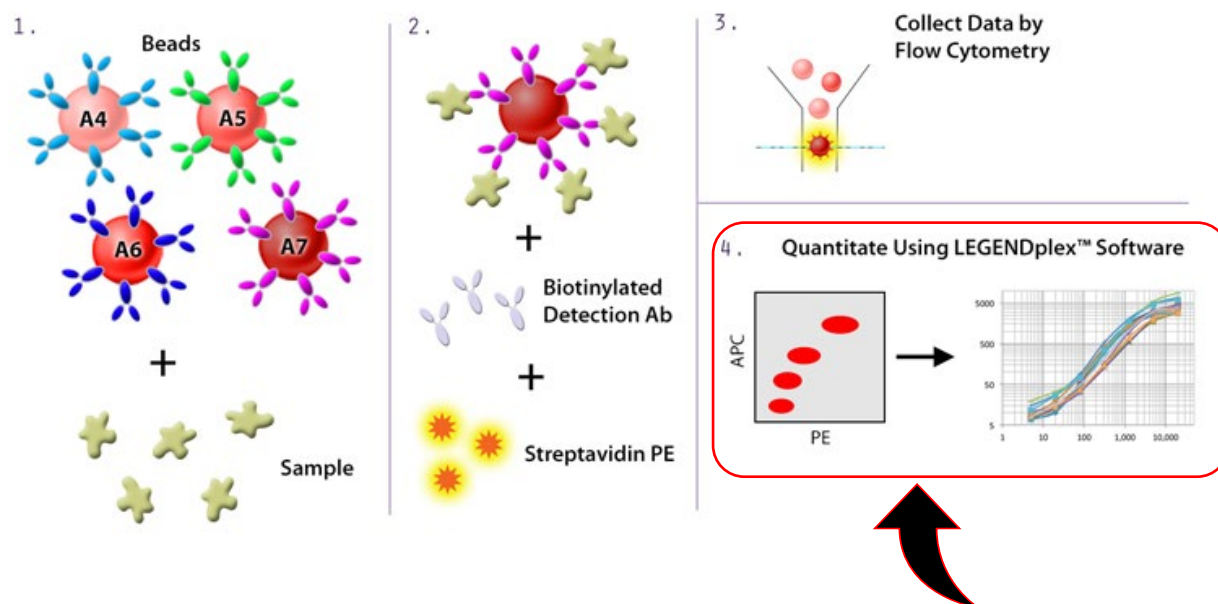
b = slope factor

c = mid-range concentration (inflection point)

d = theoretical response at infinite concentration

g = asymmetry factor

LEGENDplex™ アッセイの原理



BioLegend 社の液性因子測定キットである LEGENDplex をお使いいただいた場合、前述の 2 つのフィッティングモデルを使用できる解析ソフトを無料でお使いいただくことが可能です。最大 14 項目のサイトカインを 1 回の試験で定量できます。

[【LEGENDplex 解析用ソフトウェア（無料・クラウド版）アカウント請求】](#)

※ご利用には事前のアカウント作成が必要です。

詳細は製品ページ：<https://www.biolegend.com/ja-jp/immunoassays/legendplex>
 もしくは、弊社トミーデジタルバイオロジー(株) (support@digital-biology.co.jp) までお尋ねください。

