

Human COX-2 Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

COX-1, COX-2 (Cyclooxygenase -1, -2) は、別名prostaglandin endoperoxide H synthaseとも呼ばれ、アラキドン酸からのプロスタグランジンH₂ (PGH₂) 合成における反応を触媒する重要な酵素です。また、COX-1とCOX-2はアミノ酸レベルで約60%のホモロジーを持っていますが、COX-1は腎臓、胃、血管平滑筋、あるいは血小板など、多くの組織に広く構成的に発現しており、いわゆるハウスキーピング的な役割を果たしていると考えられています。一方、COX-2は通常多くの組織から検出することはできませんが、種々のサイトカイン、ホルモン、腫瘍誘発剤、炎症メディエーター、およびマイトジェンなどの刺激に対して反応しマクロファージやその他の細胞で一過性に高レベル発現してくることから、炎症病態に関連したプロスタグランジン産生を担うと考えられています。このように、炎症性COXとも呼ばれるCOX-2は、急性炎症、アレルギー性炎症肉芽組織、胃潰瘍の損傷治癒、あるいは生殖系などで多彩な役割を果たしていることが報告されています。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法によるEIA (Enzyme Immuno Assay)キットです。1次抗体は、プレートに固相されていますので、検体および標準物質を加え、1次反応をおこない洗浄後HRP標識された2次抗体を加え2次反応をおこないます。反応後、過剰の2次抗体を洗浄除去します。Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、Human COX-2の量に比例します。

3. 測定範囲

1.09 ~ 70 ng/mL

4. 使用目的

- ヒト培養細胞のLysate抽出液中のCOX-2が測定できます。
(実施例)
培養細胞 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個を500 μ LのIBLysis-I (弊社製品番号19022)に加え、ボルテックス、ピペッティング等により十分に混和後、2~8 $^{\circ}$ Cにて30分間ローテーション混和をおこないます。その後10,000 rpm、2~8 $^{\circ}$ Cにて10分間遠心分離し、上清を必要に応じて希釈用緩衝液で希釈して測定に使用します。
- 使用する細胞溶解緩衝液として、IBLysis-I以外では、RIPA緩衝液が使用可能です。CHAPS緩衝液およびSucrose Monolaurateの使用はおすすめしません。
- 細胞での測定は、細胞数を合わせて測定されることをおすすめします。
- また、単位タンパク質量当たりのCOX-2の量を知るために可溶化後の総タンパク質量の測定をおこなうことをおすすめします。
- 弊社内データでは、健康人血清および血漿の測定値は測定感度以下でした。

5. 構成試薬

1	抗体プレート (抗 Human COX-2 (13H14) Mouse IgG MoAb A.P. 固相)	96Well x 1
2	標識抗体濃縮液 (30倍濃度 HRP 標識抗 Human COX-2 Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質 (Recombinant Human COX-2)	0.5mL x 2
4	希釈用緩衝液	30mL x 1
5	標識抗体用溶解液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS)	12mL x 1
6	TMB 基質液	15mL x 1
7	停止液 (1N H ₂ SO ₄)	12mL x 1
8	濃縮洗浄液 (40倍濃度リン酸緩衝液)	50mL x 1

6. 用法および用量 (操作方法)

(1) 必要な器具・器材

プレートリーダー (測定波長: 450nm)	マイクロピペットおよびチップ
希釈用テストチューブ	メスシリンダーおよびビーカー
精製水	グラフ用紙 (両対数)
ペーパータオル	洗浄ピン
冷蔵庫 (4 $^{\circ}$ Cとして)	採取用容器 (清潔な試験管など)
恒温器 (37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C)	

(2) 準備

濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は、40倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液50mLに対して精製水を1,950mL加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し2週間以内に使用してください。

標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液は30倍濃度です。別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で30倍希釈してください。これを標識抗体とします。

希釈例)

1スリット (8ウェル) 使用する場合=800 μ L必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を30 μ Lとり、標識抗体用溶解液870 μ Lを加え良く混和し、100 μ Lずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

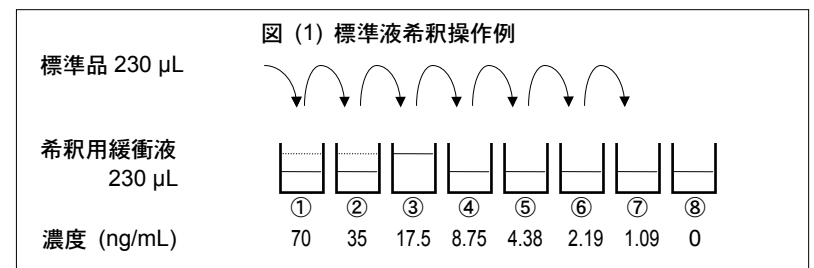
標準物質バイアル瓶に精製水を0.5 mL加えて完全に溶解します。

この時標準物質濃度は140 ng/mLとなります。

希釈用テストチューブを8本用意し希釈用緩衝液を230 μ Lずつ量り取ります。各々のテストチューブに

70 ng/mL, 35 ng/mL, 17.5 ng/mL, 8.75 ng/mL, 4.38 ng/mL, 2.19 ng/mL, 1.09 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

70 ng/mLの希釈用テストチューブに140 ng/mLの標準物質溶液を230 μ L加え混和しその溶液230 μ Lを35 ng/mLの希釈用テストチューブに加え混和します。順次2倍連続希釈をおこない70 ng/mL~1.09 ng/mLまでの7点を希釈標準品とし、0 ng/mLを検体ブランクとします。(図(1)参照)



検体の希釈方法

検体は必要に応じて希釈用緩衝液で希釈し測定してください。

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し検量線を設定してください。

- 1 ブランクの添加 (以降図(2)参照)
試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を100 μ L入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加
検体100 μ Lおよび希釈標準品各100 μ Lならびに検体ブランク100 μ Lを入れます。
- 3 プレートカバーをして37 $^{\circ}$ C 60分間反応
- 4 洗浄7回
洗浄操作に十分注意して測定してください。推奨する洗浄方法は、抗体プレートの各ウェルを洗浄ピンに入れた洗浄液を用いて勢良く洗い流しその後、洗浄液をウェルに満たし15~30秒間静置しプレートを逆さまにして振り払い洗浄液を完全に除去します。この洗浄操作を規定回数以上おこない、ペーパータオル等の上でたたいて全ウェルの水分を完全に除去してください。プレートウォッシャーによる洗浄は、機種により洗浄が不十分な場合がありますので4回洗浄後、さらに上記洗浄方法による洗浄を3回おこなってください。
- 5 標識抗体の添加
検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々100 μ L添加します。
- 6 プレートカバーをして4 $^{\circ}$ C 30分間反応
- 7 洗浄9回
上記4洗浄と同様操作
- 8 TMB基質液の添加
あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルにTMB基質液を100 μ L添加します。TMB基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光してください。また、採取用容器に残ったTMB基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。
- 9 遮光をして常温30分間反応
- 10 停止液の添加
すべてのウェルに停止液を100 μ L添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。
- 11 吸光度測定
プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30分以内に試薬ブランクを対照として検体および標準ならびに検体ブランクの波長450nmにおける吸光度を測定してください。

図(2) 測定操作一覧

試料	検体	標準	検体ブランク	試薬ブランク
	検体	希釈標準品	希釈用緩衝液	希釈用緩衝液
	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
プレートカバーをして37 $^{\circ}$ C 60分間反応				
洗浄7回				
標識抗体	100 μ L	100 μ L	100 μ L	-
プレートカバーをして4 $^{\circ}$ C 30分間反応				
洗浄9回				
TMB基質液	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
遮光常温30分間反応				
停止液	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
プレートをたたいて反応液を混和し、30分以内に試薬ブランクを対照として450 nmにおける検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定				

7. 操作上の注意事項

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定をおすすめします。

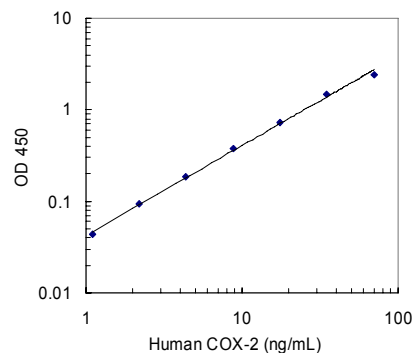
- 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値をとり検量線を設定します。
試料検体の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

9. 測定値と検量線作成例

標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
70	2.545
35	1.580
17.5	0.823
8.75	0.479
4.38	0.283
2.19	0.191
1.09	0.142
0 (検体ブランク)	0.098



* 上記検量線は作成例です。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

10. キットの性能

(1) 希釈試験 (標準物質を添加したサンプルを使用しています)

検体	希釈倍率 (x)	測定値 (ng/mL)	理論値 (ng/mL)	%
IBLysis-I	2	34.23	35.00	97.8
	4	18.58	17.50	106.1
	8	9.56	8.75	109.2
	16	4.48	4.38	102.2

(2) 添加回収試験

検体	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
IBLysis-I (x2)	17.50	16.23	92.7
	8.75	7.77	88.8
	4.38	4.19	95.6
	2.19	2.20	100.4

(3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
31.41	3.02	9.6	24
10.65	0.90	8.4	24
3.90	0.25	6.4	24

(4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
31.40	1.97	6.2	3
10.01	0.55	5.5	3
3.49	0.44	12.6	3

(5) 感度

0.25 ng/mL

本キットの感度は、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) の評価方法に従い求めました。(National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA : NCCLS 参照)

11. 使用上または取り扱い上の注意

- 保存は、2~8°C としてください。使用前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 標準物質は、凍結乾燥品です。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服 皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 使用後の抗体プレートや試薬は、多量の水で洗い流してから廃棄してください。
- 標識抗体濃縮液は、まれに析出を認める場合がありますが、性能に問題はありません。
- 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。
- ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換して使用することは避けてください。
- 有効期限切れの試薬は、使用しないでください。

9 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

12. 保存方法および有効期限

2~8°C 保存
使用期限は外箱に記載

13. 包装単位および製品番号

96 Well
製品番号 27186

14. 関連製品

製品番号	製品名	容量
19022	IBLysis-I (可溶性緩衝液)	50×0.5 mL
		50 mL

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所 営業部
〒370-0831 群馬県高崎市あら町 5-1
TEL 027-310-8040 FAX 027-310-8045

Version 1.2