

Human sAPP, Total (highly sensitive) Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

アルツハイマー病は1907年ドイツの神経病理学者A. Alzheimerによって最初に報告され、現在では老人性認知症の最も大きな原因となっています。老人性認知症に多く見られる老人斑の主要構成タンパク質であるAmyloid β (A β)は、アミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid Precursor Protein、695、751または770アミノ酸からなる膜タンパク質：APP)からまず β -セクレターゼ、続いて γ -セクレターゼの働きにより、切り出されて産生されることが知られています(文献1)。 β -セクレターゼにより切り出されて産生される可溶性のAPP β (soluble APP β : sAPP β)は、最終的にA β 産生と対をなすことから、A β 測定と並行した測定が望まれています。また、早期発症型家族性アルツハイマー病患者からAPP遺伝子の変異が報告されており、その変異のひとつにSweden変異があります。これは、APPの β -セクレターゼ切断部位よりN端側の2アミノ酸が野生型に比較して変異しているものです (Lys670→Asn、Met671→Leu)。Sweden変異は特にA β 42の産生を亢進させるとの報告もあり(文献2)、トランスジェニックマウスなども作製され(文献3)、野生型 (Wild Type)のsAPP β を測定できるのと同じように、Sweden変異 (Swedish Type)を有するsAPP β を検出することはアルツハイマー病の研究において非常に有用です。一方、APPの代謝経路は通常 β -セクレターゼよりむしろ α -セクレターゼによって始まり可溶性のAPP α (soluble APP α : sAPP α)が産生され、続いて γ -セクレターゼの働きにより、P3と呼ばれる分子が切り出されるといわれています。実際に β -セクレターゼを阻害する以外に、 α -セクレターゼの活性化をアルツハイマー病治療に応用しようという試みもなされています。

本製品は、sAPP α 、sAPP β を含むヒト可溶性APP (sAPP)を総量として測定することができます。

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 sAPPの総量に比例します。

3. 測定範囲

0.39 ~ 25 ng/mL

4. 使用目的

- 血清、EDTA-血漿、脳脊髄液および細胞培養上清中の Human sAPP の総量を測定できます。
- 検体希釈の目安として血清の場合 4 倍以上、EDTA-血漿の場合 2 倍以上、脳脊髄液の場合は 16 倍以上をおすすめします。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 Human APP (R12A1) 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 APP (R101A4) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human sAPP α Protein)	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°C として)	採取用容器 (清潔な試験管など)

(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 とし、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庫に保存してください。有

効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

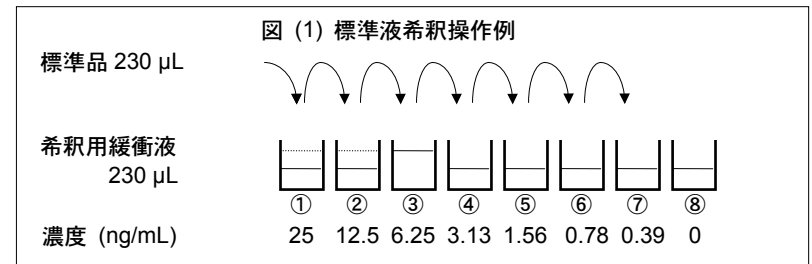
標準物質バイアル瓶に精製水を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。

この時標準物質濃度は 50 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
25 ng/mL、12.5 ng/mL、6.25 ng/mL、3.13 ng/mL、1.56 ng/mL、0.78 ng/mL、0.39 ng/mL、0 ng/mL の表示をします。

25 ng/mL の希釈用テストチューブに 50 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 12.5 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 25 ng/mL ~ 0.39 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

検体は添付の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 4°C overnight 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°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なります。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

	検体	標準	検体ブランク	試薬ブランク
試料	検体 100 μ L	希釈標準品 100 μ L	希釈用緩衝液 100 μ L	希釈用緩衝液 100 μ L
プレートカバーをして 4°C overnight 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°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。

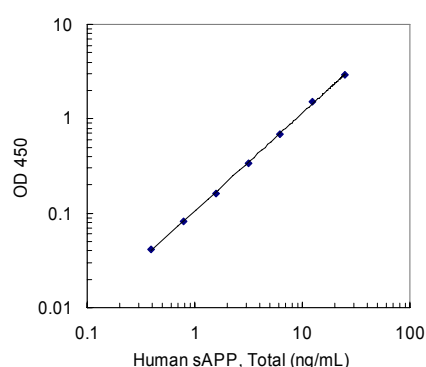
- 検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈してください。
- 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 吸光度測定は、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、横軸に検体濃度と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)
25	2.958
12.5	1.530
6.25	0.693
3.13	0.343
1.56	0.162
0.78	0.083
0.39	0.043
0 (検体ブランク)	0.001



* 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)	%
培地 (10 % FCS 添加 RPMI-1640)	2	10.90	12.50	87.2
	4	5.65	6.25	90.4
	8	2.63	3.13	84.0
血清 (健康人)	4	21.26	22.89	92.9
	8	11.64	11.25	103.5
	16	5.81	5.47	106.2
血漿 (EDTA) (健康人)	4	14.87	17.19	86.5
	8	7.74	8.43	91.8
	16	3.66	4.23	86.5
脳脊髄液	4	24.00	25.87	92.8
	8	15.42	14.20	108.6
	16	9.05	9.12	99.2

(2) 添加回収試験

検体	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
培地 (10 % FCS 添加 RPMI-1640) (x2)	12.50	12.52	100.2
	6.25	7.37	117.9
	3.13	3.51	112.1
血清 (健康人) (x8)	23.22	23.45	101.0
	16.97	17.13	100.9
	13.85	13.21	95.4
血漿 (EDTA) (健康人) (x8)	13.31	13.35	100.3
	10.19	9.98	97.9
	8.63	8.14	94.3
脳脊髄液 (x8)	26.34	26.94	102.3
	23.21	22.24	95.8
	21.65	20.11	92.9

(3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
11.71	0.53	4.5	24
3.92	0.17	4.3	24
1.36	0.06	4.4	24

(4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
11.83	0.46	3.9	4
3.85	0.50	13.0	4
1.30	0.10	7.7	4

(5) 特異性

測定物質	交差率
Human sAPP α	100 %
Human sAPP β -wild type	100 %
Human sAPP β -swedish type	100 %

(6) 感度

0.06 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をして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。
- 期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 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 27731

14. 参考文献

- Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:489-517.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 1992 Dec 17;360(6405):672-4.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996 Oct 4;274(5284):99-102.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所 営業部

Version 1.2