

Human N-ERC/Mesothelin Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

Ercは腎癌発症モデルRat (Eker Rat)の腎癌組織において、正常腎臓組織と比べて高発現している遺伝子として同定されたものです。このヒトHomologueは、MPF (megakaryocyte potentiating factor)やMesothelinと呼ばれ、特に中皮細胞で発現がみられるタンパク質です。この分子は中皮腫との関わりが示唆されており、腫瘍マーカーとしての意義が予想されます。ヒトにおいてはその他にも膀胱癌、卵巣癌、肺癌などの関わりが示唆されています。全長分子量約71kDaのGPIアンカー型膜タンパク質として発現しますが、furin 様プロテアーゼによる消化により約31kDaと約40kDaの断片になります。

弊社では、N末側の31kDa断片をN-ERC/ Mesothelin、C末側の40kDa断片をC-ERC/ Mesothelinとして、N-ERC/Mesothelinを測定するELISA系を構築しました。本製品はヒト血漿中のN-ERC/ Mesothelinを測定するキットです。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法による ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent 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 次反応をおこないます。その後、HRP 標識された 2 次抗体を加え 2 次反応をおこない、反応後過剰の 2 次抗体を洗浄除去した後、Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この呈色は、Human N-ERC/Mesothelin の量に比例します。

3. 測定範囲

0.07 ~ 4.4 ng/mL

4. 使用目的

ヒト EDTA-血漿中の N-ERC/Mesothelin を測定できます。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 Human ERC (7E7) 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 ERC (20A2) Mouse IgG MoAbFab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (凍結乾燥品, Recombinant Human N-ERC/Mesothelin)	1.0mL x 2
4 希釈用緩衝液	30mL x 1
5 標識抗体用溶解液*	12mL x 1
6 TMB 基質液	15mL x 1
7 停止液*	12mL x 1
8 濃縮洗浄液*	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ピッカー
精製水	プレートウォッシャー
ペーパータオル	採取用容器 (清潔な試験管など)
恒温器 (37°C±1°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) 使用する場合は 800 μL 必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を 30 μL とり、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL 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。

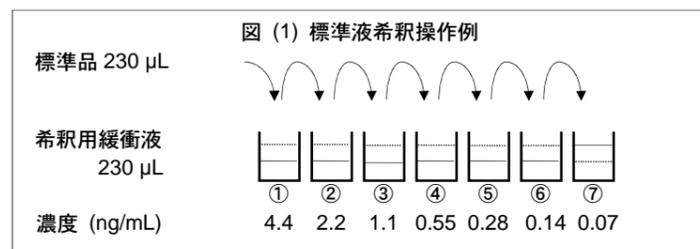
標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

標準物質バイアル瓶に精製水を 1.0 mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 8.8 ng/mL となります。

希釈用テストチューブを 7 本用意し希釈用緩衝液を 230 μL ずつ量り取り、各々のテストチューブに 4.4 ng/mL, 2.2 ng/mL, 1.1 ng/mL, 0.55 ng/mL, 0.28 ng/mL, 0.14 ng/mL, 0.07 ng/mL の表示をします。

4.4 ng/mL の希釈用テストチューブに 8.8 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 2.2 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 4.4 ng/mL~0.07 ng/mL までの 7 点を希釈標準品とします。(図(1) 参照)



検体の希釈方法

検体は添付の希釈用緩衝液で 8 倍以上に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こと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作成してください。

抗体プレートで以下の操作をおこないます。

- 1 検体ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)
検体ブランクのウェルを設定し、希釈用緩衝液を 100 μL 入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加
検体 100 μL および希釈標準品各 100 μL をそれぞれのウェルに入れます。
- 3 プレートカバーをして 37°C 60 分間反応
- 4 プレートウォッシャーを用いて、ウェルの反応液を吸引除去します。
- 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 μL 添加します。
- 6 プレートカバーをして室温 30 分間反応
- 7 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。*
- 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 μL 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 μL 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 分以内に検体ブランクを対照とした体および標準の吸光度を測定してください。
測定波長: 450 nm、
2 波長の場合は主波長: 450 nm、副波長: 600~650 nm

図 (2) 測定操作一覧

	検体	標準	検体ブランク
試料	検体 100 μL	希釈標準品 100 μL	希釈用緩衝液 100 μL
プレートカバーをして 37°C 60 分間反応			
反応液を除去			
標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL
プレートカバーをして室温 30 分間反応			
洗浄 5 回(洗浄液 350 μL)			
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL
遮光常温 30 分間反応			
停止液	100 μL	100 μL	100 μL
プレートの縁をたたいて反応液を混和し、30 分以内に吸光度を測定 450 nm / 600~650 nm			

7. 操作上の注意事項

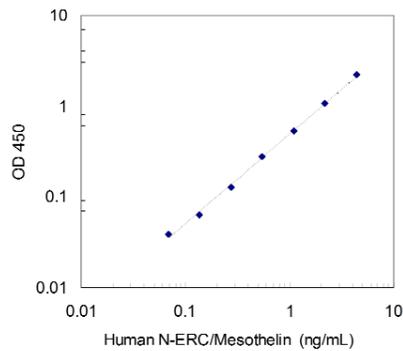
- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定をおすすめします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 1 次反応後の洗浄は必要ありませんが、4 回程度までの洗浄を実施しても結果に影響はありません。
- 7 プレートウォッシャーを用いないで洗浄する場合、洗浄液を捨てた後はプレートをペーパータオルの上でたたいて完全に水分を切ってください。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないよう注意してください。
- 8 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。
- 9 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

- 1 グラフの X 軸に標準物質濃度を、Y 軸にその吸光度をプロットします。各プロットに適当な回帰曲線を当てはめ(例: 両対数変換の二次回帰等、図参照)、検量線を作成します。
- 2 検体の吸光度を検量線に当てはめ、濃度を読みとります。
- 3 その値に検体の希釈倍率を乗じ、検体中の Human N-ERC/ Mesothelin 濃度を算出します。

9. 測定値と検量線作成例

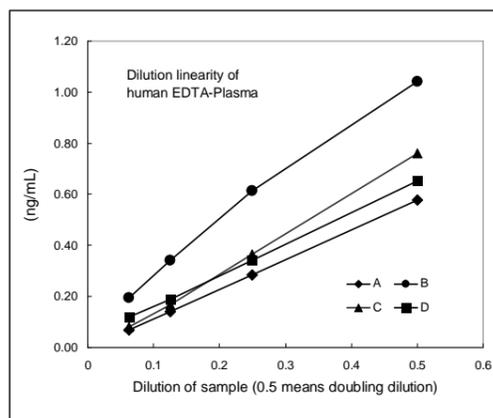
標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
4.4	2.191
2.2	1.076
1.1	0.526
0.55	0.279
0.28	0.127
0.14	0.064
0.07	0.039



* 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) 希釈直線性



(2) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
1.65	0.041	2.5	22
0.48	0.018	3.8	22
0.20	0.011	5.5	22

(3) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
1.66	0.09	5.4	6
0.46	0.03	6.5	6
0.19	0.01	5.3	6

(4) 特異性

測定物質	交差率
Human N-ERC/Mesothelin	100 %
Human C-ERC/Mesothelin	< 0.1 %
Mouse N-ERC/Mesothelin	< 0.1 %

(5) 感度

0.017 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

- 1 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。
- 2 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。
- 3 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。
- 4 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。
- 5 希釈用緩衝液、標識抗体濃縮液および濃縮洗浄液は、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。
- 6 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。
- 7 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、交換したりして使用しないでください。
- 8 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 27190

14. 参考文献

1. Kojima T, Oh-eda M, Hattori K, Taniguchi Y, Tamura M, Ochi N, Yamaguchi N. Molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor cDNA. J Biol Chem. 1995 Sep 15;270(37):21984-90.
2. Hino O, Kobayashi E, Nishizawa M, Kubo Y, Kobayashi T, Hirayama Y, Takai S, Kikuchi Y, Tsuchiya H, Orimoto K, et al. Renal carcinogenesis in the Eker rat. J Cancer Res Clin Oncol. 1995;121(9-10):602-5.
3. Shiomi K, Miyamoto H, Segawa T, Hagiwara Y, Ota A, Maeda M, Takahashi K, Masuda K, Sakao Y, Hino O. Novel ELISA system for detection of N-ERC/mesothelin in the sera of mesothelioma patients. Cancer Sci. 2006 Sep;97(9):928-32.
4. Shiomi K, Hagiwara Y, Sonoue K, Segawa T, Miyashita K, Maeda M, Izumi H, Masuda K, Hirabayashi M, Moroboshi T, Yoshiyama T, Ishida A, Natori Y, Inoue A, Kobayashi M, Sakao Y, Miyamoto H, Takahashi K, Hino O. Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma. Clin Cancer Res. 2008 Mar 1;14(5):1431-7.
5. Imashimizu K, Shiomi K, Maeda M, Aoki N, Igarashi K, Suzuki F, Koizumi M, Suzuki K, Hino O. Feasibility of large-scale screening using N-ERC/mesothelin levels in the blood for the early diagnosis of malignant mesothelioma. Exp Ther Med. 2011 May;2(3):409-411.
6. Tadashi Sato, Yohei Suzuki, Takanori Mori, Masahiro Maeda, Masaaki Abe, Okio Hino, Kazuhisa Takahashi. Modified enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin improves the diagnostic accuracy of mesothelioma. in preparation

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 2.

2016年10月更新*