

Human Intelectin-1/Omentin-1 Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

Intelectin-1/Omentin-1はガラクトフラノースに結合する分泌型の動物レクチンで、主に腸管の杯細胞から分泌される糖タンパク質です。これまでに炎症や寄生虫感染に関与すること等が報告されています。また近年、Intelectin-1が上皮型悪性中皮腫で産生されて胸水中に分泌される一方、正常中皮細胞や肺腺癌を含むほとんどのがん細胞では発現が認められないことが報告されました(文献1)。さらに最近では、アディポサイトカインとして血中に存在することが分かり、新たな代謝関連危険因子のバイオマーカーとして期待されています。

本測定キットは、ヒトのIntelectin-1/Omentin-1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。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た後、Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、Intelectin-1/Omentin-1の量に比例します。

3. 測定範囲

0.31 ~ 20 ng/mL

4. 使用目的

- ヒトの血清、血漿および培養上清中の Human Intelectin-1/Omentin-1 を測定できます。
- 血漿検体はヘパリン採血を推奨します。EDTA 採血の血漿検体は不適です。
- 血清、血漿検体の希釈の目安は100倍です。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 Human Intelectin-1 (2D11) 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 Intelectin-1 (2D2) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (recombinant Human Intelectin-1/Omentin-1)	0.5mL x 2
4 希釈用緩衝液	50mL x 1
5 欠番 (試薬の構成上、欠番となっています)	
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	洗浄ビン
冷蔵庫 (4°C として)	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希釈用緩衝液で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、希釈用緩衝液 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

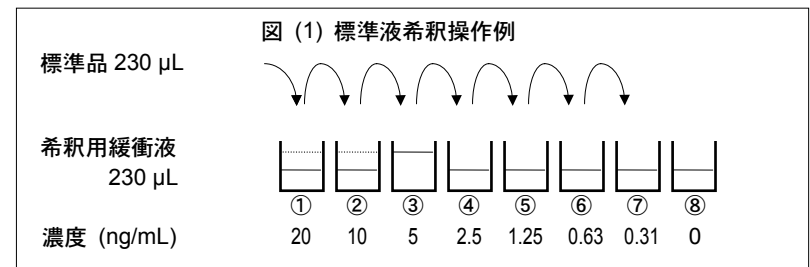
標準物質バイアル瓶に精製水を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。

この時標準物質濃度は 40 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 μL ずつ量り取ります。各々のテストチューブに

20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.63 ng/mL, 0.31 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

20 ng/mL の希釈用テストチューブに 40 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 10 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 20 ng/mL~0.31 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

検体は必ず添付の希釈用緩衝液で適宜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ご確認ください。

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 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 ならびに検体ブランク 100 μL を入れます。
- 3 プレートカバーをして 37°C 60 分間反応
- 4 反応液を捨てた後、洗浄 5 回
洗浄ビンを用いて洗浄液をウェルに満し、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おこない、ペーパータオル等の上でたたいて完全にウェルの水分を切ってください。操作は洗浄むらのないよう十分注意して行ってください。プレートウォッシャーを使用する場合も、最後の1回は上記の方法で手洗いすることを推奨します。
- 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 4°C 30 分間反応
- 7 反応液を捨てた後、洗浄 5 回
上記 4 の洗浄と同様操作
- 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 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 μL	希釈標準品 100 μL	希釈用緩衝液 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				
洗浄 5 回				
標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL	-
プレートカバーをして 4°C 30 分間反応				
洗浄 5 回				
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
遮光常温 30 分間反応				
停止液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
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 検体は必ず添付の希釈用緩衝液で希釈してから測定してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 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 洗浄後は、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。
- 7 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。
- 8 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。

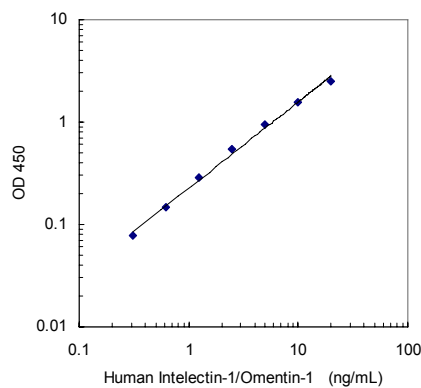
8. 測定結果の算出方法

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取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

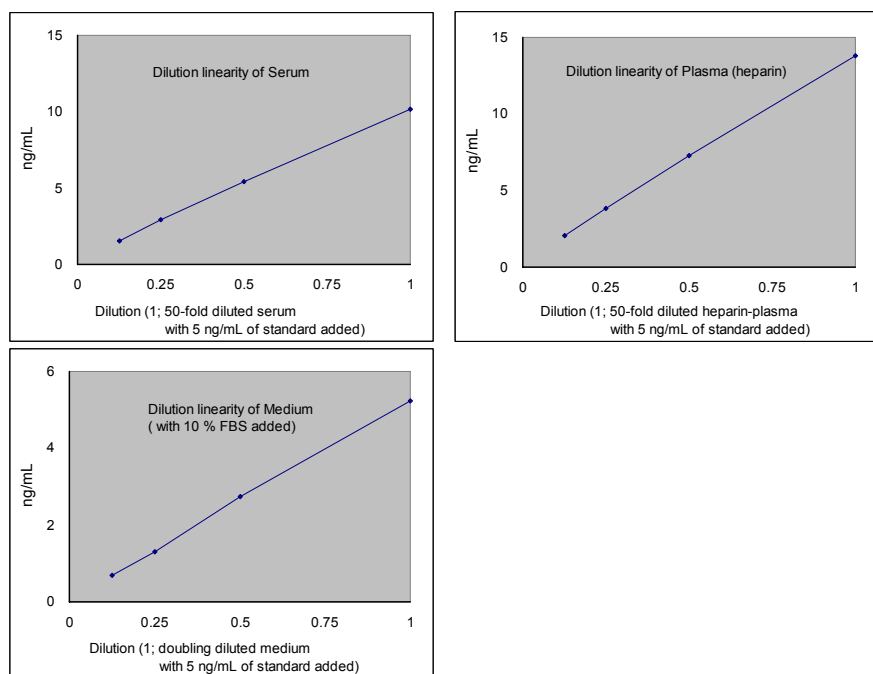
標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
20	2.532
10	1.597
5	0.969
2.5	0.565
1.25	0.309
0.63	0.165
0.31	0.096
0 (検体ブランク)	0.019



* 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) 添加回収試験

検体	添加量 (ng/mL)	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
血清 (健常人) (x100)	5.00	9.15	8.31	90.8
	2.50	6.65	6.24	93.8
	1.25	5.40	4.81	89.1
	0.63	4.77	4.28	89.7
血漿 (健常人) (ヘパリン) (x100)	5.00	10.92	10.06	92.1
	2.50	8.42	7.88	93.6
	1.25	7.17	6.26	87.3
	0.63	6.54	5.69	87.0
培地 (10%FBS 添加) (x2)	5.00	5.00	5.50	110.0
	2.50	2.50	2.33	93.2
	1.25	1.25	1.19	95.2
	0.63	0.63	0.58	92.1

(3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
3.14	0.14	4.5	24
1.47	0.08	5.4	24
0.70	0.06	7.8	24

(4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
3.21	0.23	7.2	7
1.53	0.14	9.2	7
0.68	0.05	7.4	7

(5) 感度

0.23 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 27361

14. 参考文献

1. Tsuji S, Tsuura Y, Morohoshi T, Shinohara T, Oshita F, Yamada K, Kameda Y, Ohtsu T, Nakamura Y, Miyagi Y. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. *Br J Cancer*. 2010 Aug 10;103(4):517-23.
2. Tsuji S, Yamashita M, Hoffman DR, Nishiyama A, Shinohara T, Ohtsu T, Shibata Y. Capture of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin by intelectin-1 deposited on cell surfaces. *Glycobiology*. 2009 May;19(5):518-26.
3. Tsuji S, Yamashita M, Nishiyama A, Shinohara T, Li Z, Myrvik QN, Hoffman DR, Henriksen RA, Shibata Y. Differential structure and activity between human and mouse intelectin-1: human intelectin-1 is a disulfide-linked trimer, whereas mouse homologue is a monomer. *Glycobiology*. 2007 Oct;17(10):1045-51.
4. Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, Suzuki Y, Matsuhisa A, Toyoshima K, Seya T. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):23456-63.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 1.