

Endothelin-1 Assay Kit - IBL

96 Well

ご使用の際はこの添付文書をよく読んでから使用してください。

一般的な注意

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。

形状 構造等 (キットの構成)

1 抗体プレート(Anti- Endothelin-1 ¹⁵⁻²¹ Rabbit IgG A.P.固相)	96Well x 1
2 標識抗体 (HRP 標識 Anti-Endothelin-1 Rabbit IgG Fab' A.P.)	10.5mL x 1
3 標準物質(Endothelin-1 peptide)	0.5mL x 1
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

測定対象

血清、血漿(EDTA)および組織抽出液ならびに培養上清

測定原理

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。

操作上の注意

- 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。
- 検体は希釈用緩衝液で希釈してください。
- 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 測定に当たってはその都度検量線を作成してください。
- 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。
- 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。
- 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。
- 洗浄ピンを用いて洗浄する場合は、洗浄液をウェルに満たし、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ってください。操作は洗浄むらのないよう十分注意しておこなってください。
- 洗浄液を捨てた後に、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。
- 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。使用に際しては必要量を採取用容器にとり分けてください。
- 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。
- 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。

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	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	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)	冷蔵庫

2 準備

(1) 濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液を精製水で 40 倍希釈してください。これを洗浄液とします。必要量を調製してください。

(2) 標識抗体の希釈方法

標識抗体に標識抗体用溶解液を 10.5mL 添加し 5 分間静置し、転倒混和により完全に粉末を溶解します。この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

(3) 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 200 pg/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。

100 pg/mL の希釈用テストチューブに 200 pg/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 50 pg/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、100pg/mL~0.78 pg/mL までの 8 点を希釈標準品とします。

Tube-1	100	pg/mL
Tube-2	50	pg/mL
Tube-3	25	pg/mL
Tube-4	12.5	pg/mL
Tube-5	6.25	pg/mL
Tube-6	3.13	pg/mL
Tube-7	1.56	pg/mL
Tube-8	0.78	pg/mL

(4) 検体の希釈方法

検体は添付の希釈用緩衝液にて希釈し測定してください。また、血清、血漿および組織検体は Sep-Pac C-18 カラムなどによる抽出操作が必要です。(Endothelin の抽出および濃縮操作 (IBL 社規格) 参照)

3 測定操作方法 (測定操作一覧 参照)

(1) 検体ブランクの添加

検体ブランクのウェルを設定し、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 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第 1 反応

(4) 洗浄

ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。

(5) 標識抗体の添加

標識抗体を 100 μ L 添加します。

(6) プレートカバーをして第 2 反応

(7) 洗浄

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

TMB 基質液を 100 μ L 添加します。

(9) 遮光して発色反応

(10) 停止液の添加

停止液を 100 μ L 添加します。

(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、検体ブランクを対照とした検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

測定操作一覧

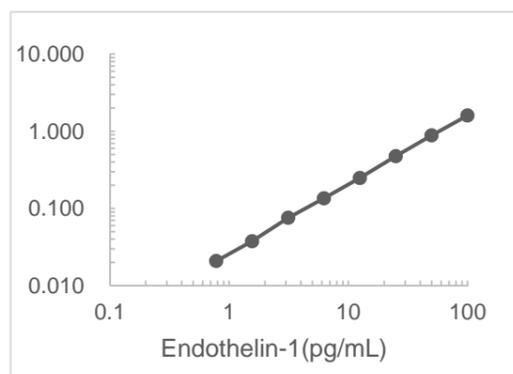
	検体	標準	検体ブランク
試料	検体 100 μ L	希釈標準品 100 μ L	希釈用緩衝液 100 μ L
第 1 反応	プレートカバーをして 2~8°C Overnight 反応		
洗浄	5 回 (洗浄液 350 μ L 以上)		
標識抗体	100 μ L	100 μ L	100 μ L
第 2 反応	プレートカバーをして 37°C 30 分間反応		
洗浄	5 回 (洗浄液 350 μ L 以上)		
TMB 基質液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
発色反応	遮光常温 30 分間反応		
停止液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
吸光度測定	450 nm / 600~650 nm		

測定結果の算出方法

- 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)、検量線を作成します。
- 検体の吸光度を検量線に当てはめ、濃度を読みとります。
- その値に検体の希釈倍率を乗じ、検体の濃度を算出します。

測定値と検量線作成例

標準品濃度 (pg/mL)	吸光度 (450nm)
100	1.599
50	0.885
25	0.475
12.5	0.248
6.25	0.135
3.13	0.076
1.56	0.038
0.78	0.021


性能
1 感度

0.39 pg/mL

2 測定範囲

0.78 ~ 100 pg/mL

3 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)	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640)	2	100	84.32	84.3
	4	50	49.73	99.5
	8	25	25.49	102.0
	16	12.5	12.04	96.3
血清 (健常人)	4	50	50	100
	8	25	24.6	98.4
	16	12.5	11.4	91.2

4 添加回収試験

検体	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640)	50	50.11	100.2
	25	26.51	106.0
	12.5	13.16	105.3
	6.25	5.89	94.2
血清 (健常人)	25	20.36	81.4
	12.5	10.66	85.3
	6.25	5.13	82.1
	3.13	2.87	91.7

5 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値 (pg/mL)	CV 値 (%)	n
55.39	1.82	3.3	8
9.95	0.29	2.9	8
5.64	0.15	2.7	8

6 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値 (pg/mL)	CV 値 (%)	n
56.19	1.19	2.1	24
9.68	0.29	3.0	24
5.67	0.14	2.5	24

7 特異性

測定物質	交差率 (%)
Endothelin-1(1-21)	100
Endothelin-2(1-21)	3.32
Endothelin-3(1-21)	≤0.1
Endothelin-1(1-31)	0.16
Endothelin-2(1-31)	≤0.1
Endothelin-3(1-31)	≤0.1
Big Endothelin-1	≤0.1
Big Endothelin-2	≤0.1
Big Endothelin-3	≤0.1
VIC(Mouse Endothelin-2)	≤0.1
Rat Big Endothelin-1	0.10

使用上または取り扱い上の注意
1 取り扱い上(危険防止)の注意

- (1) 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。
- (2) 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。

2 使用上の注意

- (1) 標準物質および標識抗体は、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。
- (2) 保存は、-20°C としてください。
- (3) 希釈用緩衝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。
- (4) 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。
- (5) 期限切れの試薬は、使用しないでください。

3 廃棄上の注意

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。

Endothelin の抽出および濃縮操作 (IBL 社規格)

本キットは細胞培養液や尿などの低タンパク濃度の検体は直接測定可能ですが血漿や細胞破砕液などの高タンパク濃度の検体では抽出および濃縮操作が必要です。

抽出および濃縮操作方法例

- ① Sep-Pak C-18 カラム¹ の前処理
4mL 純メタノールで洗浄
2mL の蒸留水で 2 回洗浄
2mL の 0.1%TFA 溶液で 2 回洗浄
- ② 血漿サンプルの前処理
2mL の血漿に 10%酢酸 6mL を攪拌滴下
- ③ 組織サンプルの前処理
1 M 酢酸-20mM 塩酸液を適量添加しホモジナイズ
1 0 分間煮沸後、遠心分離 (10,000rpm, 10 分間) し上清を回収
- ④ サンプルの抽出
前処理後のサンプルを Sep-Pak C-18 カラムに添加
3mL 蒸留水にて 3 回洗浄
2mL の抽出液² を用いて溶出し、バイアルビンに回収
回収液を凍結乾燥 (測定までは凍結保存とする)
0.1mL の溶解液⁴ にて溶解しさらに希釈用緩衝液を 0.2mL 加え混和し測定。尚、この際 pH が中性付近であるか確認してください。
回収率は、サンプルにより差があります。事前に添加回収試験をおこなうことをおすすめします。
*1 Waters 社 Part No.23501
*2 組成: 0.1% トリフルオロ酢酸³, 60%アセトニトリル含有蒸留水
*3 和光純薬工業株式会社 206-10731
*4 組成: 0.1% トリフルオロ酢酸含有 DMSO

貯蔵方法 有効期間

-20°C 保存
使用期限は外箱に記載

包装単位および製品番号

96 Well
製品番号 17165

主要文献

1. Terui N, Suzuki H. CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND BLOOD PRESSURE CONTROL 1992, *Proceedings of The 7th Workshop on "Brain and Blood Pressure Control"* p.141-148
2. Wakisaka et al., Endothelin-1 kinetics in plasma urine, and blister fluid in burn patients. *Annals of Plastic Surgery*. 37, No.3, 305-309 1996

問合せ先

株式会社 免疫生物研究所
〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1
電話: 0274-22-2889
FAX: 0274-23-6055