

Human Fibulin-5/DANCE Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

DANCEは発生期動脈に強く発現するインテグリンリガンドとして発見され、developmental arteries and neural crest EGF-like (DANCE) と名付けられました (文献1)。別名Fibulin-5とも呼ばれ、フィブリンファミリーの一員です (文献3)。

Fibulin-5/DANCEは448アミノ酸から成る分子量66kDaの分泌性タンパク質で、N末領域にRGD (arginine-glycine-aspartic acid) 配列を有し、 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, および $\alpha v\beta 5$ インテグリンと結合します。血管病変部の血管平滑筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞などで遺伝子の発現が亢進されます。

DANCE遺伝子欠損マウスでは皮膚のたるみ、肺の気腫化、動脈の蛇行などヒトの老化に似た表現型が観察されています。弾性線維の分解 劣化はこれら多くの老化関連疾患の直接原因となることが知られていますが、このマウスでは全身の弾性線維の形成不全がみられ、DANCEが本形成に必須のタンパク質であることが示唆されています (文献2)。

本キットはHuman Fibulin-5/DANCE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、Human Fibulin-5/DANCE の量に比例します。

3. 測定範囲

0.08 ~ 5.0 ng/mL

4. 使用目的

ヒトの EDTA-血漿および培養上清中の Human Fibulin-5/DANCE を測定できます。健康人 EDTA-血漿の希釈の目安は 200 倍前後です。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 DANCE 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 DANCE Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human DANCE)	0.5mL 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)
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=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 10 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。

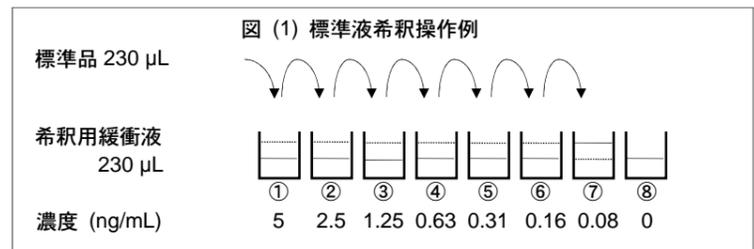
各々のテストチューブに

5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.63 ng/mL, 0.31 ng/mL, 0.16 ng/mL, 0.08 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

5 ng/mL の希釈用テストチューブに 10 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 2.5 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 5 ng/mL~0.08 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適宜希釈し測定してください。

健康人 EDTA-血漿の希釈の目安は 200 倍前後です。

200 倍希釈の実施例)

1. 190 μ L の希釈用緩衝液を入れた希釈用テストチューブに、検体 (EDTA-血漿) 10 μ L を加えよく混和する。

2. 上記の方法で希釈してできた 20 倍希釈検体を 30 μ L 取り、別のテストチューブに入れた希釈用緩衝液 270 μ L に加え、よく混和する。

3. こうして 200 倍に希釈した検体をテストサンプルとして測定する。

*上記の希釈方法により希釈標準品と 40 検体を二重測定で実施する時、添付の希釈液緩衝液 (30 mL) で実施可能です。

希釈用緩衝液が不足する場合は、製品コード 27121D (30 mL)で追加購入が可能です。

(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 ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)

試薬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 ならびに検体ブランク 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 37°C 60 分間反応

4 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

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 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用用容器にとり、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°C 60 分間反応				
4 回 (洗浄液 350 μ L 以上)*				
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				
5 回 (洗浄液 350 μ L 以上)*				
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

- 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。
- 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。

- 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。

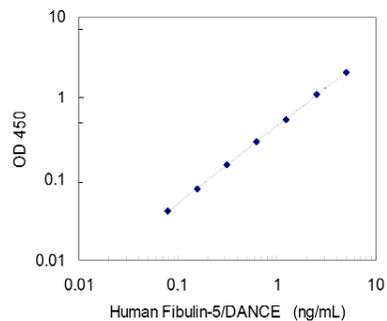
8. 測定結果の算出方法

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

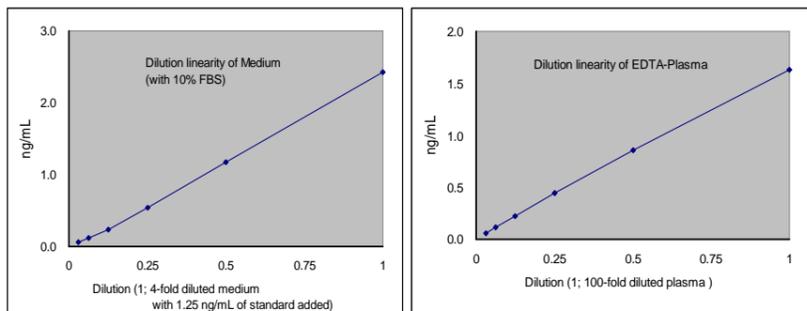
標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
5	2.096
2.5	1.102
1.3	0.542
0.63	0.295
0.31	0.156
0.16	0.081
0.08	0.045
0 (検体ブランク)	0.005



* 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)	%
血漿 (健康人) (EDTA) (x200)	2.50	3.29	3.49	106.1
	1.25	2.04	1.77	86.5
	0.63	1.42	1.35	95.1
	0.31	1.10	1.01	91.6
培地 (10%FBS 添加) (x4)	2.50	3.61	3.67	101.7
	1.25	2.36	2.20	93.1
	0.63	1.73	1.43	82.7
	0.31	1.42	1.15	80.7

(3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
0.834	0.049	5.9	24
0.298	0.021	7.0	24
0.091	0.008	8.8	24

(4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
1.101	0.080	7.3	5
0.507	0.066	13.0	5
0.248	0.026	10.5	5

(5) 感度

0.01 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。
- 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ぬ。

- 構成試薬には動物血液成分を含む場合があります。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、交換したりして使用しないでください。
- 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 27121

14. 参考文献

- Nakamura T, Ruiz-Lozano P, Lindner V, Yabe D, Taniwaki M, Furukawa Y, Kobuke K, Tashiro K, Lu Z, Andon NL, Schaub R, Matsumori A, Sasayama S, Chien KR, Honjo T. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. *J Biol Chem.* 1999 Aug 6;274(32):22476-83.
- Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross Jr J, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):171-5.
- Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):168-71.
- Hirai M, Ohbayashi T, Horiguchi M, Okawa K, Hagiwara A, Chien KR, Kita T, Nakamura T. Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *J Cell Biol.* 2007 Mar 26;176(7):1061-71.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所
(本製品は株式会社エヌビー健康研究所および関西医科大学との共同開発によるものです)

Version 3.

2016年11月更新*