

Human Big Endothelin-1 Assay Kit- IBL

96 Well

1. はじめに

Endothelin は当初、血管内皮細胞由来の全く新しい血管収縮ペプチドとして同定されました。しかしその後、このペプチドは構造と薬理活性の異なる 3 種類のアイソペプチド、Endothelin-1, Endothelin-2, Endothelin-3 からなるファミリーを構成することが判明しました。Human Big Endothelin-1 測定キット- IBL は、固相化抗体を認識部位別に使用することにより Big Endothelin-1 と Endothelin-1 との交差反応を 0.1%以下にしています。さらに本製品は、自然体、合成ペプチドどちらの Human Big Endothelin-1 も測定可能です。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法による 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 Big Endothelin-1 の量に比例します。

3. 測定範囲

0.78 ~ 100 pg/mL

4. 使用目的

血清、血漿(EDTA)および培養上清ならびに組織抽出液中の Human Big Endothelin-1 を測定

5. 構成試薬

1	抗体プレート (抗 Big Endothelin ²²⁻³⁸ Rabbit IgG A.P.固相)	96 Well x 1
2	標識抗体濃縮液 (30 倍濃度 HRP 標識抗 Endothelin-1 Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質 (Human Big Endothelin-1)	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)	冷蔵庫(4℃として)
マイクロピペットおよびチップ	希釈用テストチューブ
プレートウォッシャー又は洗浄瓶*	精製水
メスシリンダーおよびピッカー	ペーパータオル
採取用容器 (清潔な試験管など)	グラフ用紙 (両対数)

(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。使用前に室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 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。

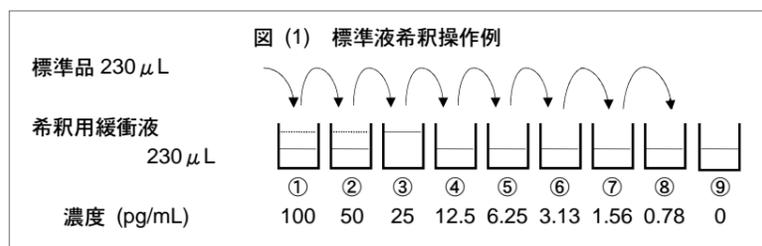
標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

標準物質のバイアル瓶に精製水を 0.5mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 200pg/mL となります。

希釈用テストチューブを 9 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、100 pg/mL, 50pg/mL, 25pg/mL, 12.5pg/mL, 6.25pg/mL, 3.13pg/mL, 1.56pg/mL, 0.78pg/mL, 0pg/mL の表示をします。

100pg/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 μL 加え混和しその溶液 230 μL 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 100 pg/mL~0.78 pg/mL までの 8 点を希釈標準品とし、0 pg/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-Pak C-18 カラムなどによる抽出操作が必要です。(12.Endothelin の抽出および濃縮操作 (IBL 社規格) 参照)

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に室温に戻し、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 プランクの添加 (以降図 (2) 参照)

試薬プ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 4℃ overnight 反応

4 洗浄 (操作上の注意 8.9 参照) *

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 μL 添加します。

6 プレートカバーをして 4℃30 分間反応

7 洗浄 (操作上の注意 8.9 参照) *

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 遮光をして室温 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 分以内に試薬プランクを対照として検体および標準ならびに検体プランクの波長 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 4℃ overnight 反応				
4 回 (洗浄液 350 μL 以上) (操作上の注意 8.9 参照) *				
標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL	-
プレートカバーをして 4℃30 分間反応				
5 回 (洗浄液 350 μL 以上) (操作上の注意 8.9 参照) *				
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
遮光室温 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 分以内に試薬プランクを対照として 450nm 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*

- 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、二重測定することをおすすめします。
- 4 測定に当たってはその都度検量線を作成してください。
- 5 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。
- 6 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。
- 7 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。
- 8 洗浄は機械洗浄 (wait time 0 秒) を推奨いたします。洗浄瓶を用いて洗浄する場合は、洗浄液をウェルに満した後、直ちにプレートを逆さまにして振り払い洗浄液を除去します。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。
- 9 洗浄操作を規定回数おこなった後に、プレートをペーパータオルの上でたたいて、完全に水分を除去してください。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。
- 10 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。

- 11 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。
- 12 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。

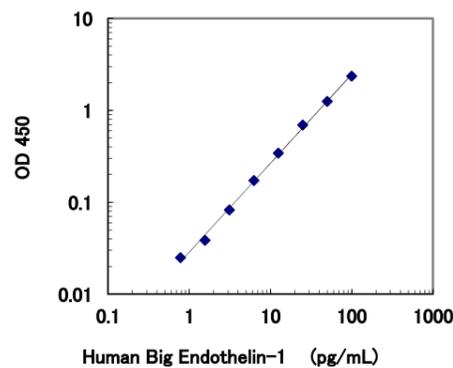
8. 測定結果の算出方法

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 (pg/mL)	吸光度 (450nm)
100	2.481
50	1.370
25	0.812
12.5	0.463
6.25	0.293
3.13	0.203
1.56	0.159
0.78	0.146
0 (検体ブランク)	0.121



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 (pg/mL)	理論値 (pg/mL)	%
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640)	2	43.34	50.00	86.7
	4	23.66	25.00	94.7
	8	12.73	12.50	101.8
血清 (健康人)	4	15.78	25.00	63.1
	8	8.57	12.50	68.6
	16	5.10	6.25	81.5
血漿 (EDTA) (健康人)	4	20.98	25.00	83.9
	8	11.90	12.50	95.2
	16	6.30	6.25	100.8

(2) 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) (x2)	50	47.02	94.0
	25	25.02	100.1
	12.5	13.14	105.1
血清 (健康人) (x16)	50	28.88	57.8
	25	16.88	67.5
	12.5	8.74	69.9
血漿 (EDTA) (健康人) (x8)	50	36.52	73.0
	25	21.06	84.2
	12.5	10.55	84.4

(3) 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
59.35	1.15	1.9	20
15.86	0.40	2.5	20
5.44	0.25	4.6	20

(4) 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
57.98	2.82	4.9	28
14.86	1.50	10.1	28
4.98	0.64	12.8	28

(5) 特異性

測定物質	交差率
Human Big Endothelin-1	100.0%
Rat Big Endothelin-1	100.0%
Endothelin-1	≤0.1%
Endothelin-3	≤0.1%

(6) 感度

0.30 pg/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℃としてください。使用前に全ての試薬は室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 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ぬ。
- 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、交換して使用することは避けてください。
- 8 有効期限切れの試薬は、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. 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、血清、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 サンプルの前処理

i) 血漿サンプル等の前処理

- 2mL の血漿に 10%酢酸 6mL を攪拌滴下

ii) 組織サンプル等の前処理

- 1 M 酢酸-20mM 塩酸液を適量添加しホモジナイズ

- 10 分間煮沸後、遠心分離 (10,000rpm, 10 分間) し上清を回収

③ 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

13. 保存方法および有効期限

2~8℃保存

使用期限は外箱に記載

14. 包装単位および製品番号

96 Well

製品番号 27168

15. 参考文献

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
3. Unoki H. *et al.* Low-density lipoproteins modulate endothelial cells to secrete endothelin-1 in a polarized pattern: a study using a culture model system simulating arterial intima. *Cell and Tissue Research*. 295(1):89-99, 1999

16. 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

Version 4.

2017年5月更新