

Rat COX-2 Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

COX-1, COX-2 (Cyclooxygenase -1, -2) は、別名 prostaglandin endoperoxide H synthase と呼ばれ、アラキドン酸からのプロスタグランジンH₂ (PGH₂) 合成における反応を触媒する重要な酵素です。また、近年広く用いられている非ステロイド系抗炎症薬のターゲットにもなっています。

COX-1とCOX-2はアミノ酸レベルで約60%のホモロジーを持っていますが、COX-1は腎臓、胃、血管平滑筋、血小板など、多くの組織に広く構成的に発現しており、いわゆるハウスキーピング的な役割を果たしていると考えられています。一方、COX-2は通常多くの組織から検出することはできませんが、種々のサイトカイン、ホルモン、腫瘍誘発剤、炎症メディエーター、およびマイトージェンなどの刺激に対して反応しマクロファージやその他の細胞で一過性に高レベル発現してくることから、炎症病態に関連したプロスタグランジン産生を担うと考えられています。このように、炎症性COXとも呼ばれるCOX-2は、急性炎症巣、アレルギー性炎症肉芽組織、胃潰瘍の損傷治癒、あるいは生殖系などで多彩な役割を果たしていることが報告されています。

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、Rat COX-2 の量に比例します。

3. 測定範囲

0.36 ~ 23 ng/mL

4. 使用目的

- 培養細胞、組織の Lysate 抽出液中の Rat COX-2 が測定できます。(実施例)
 - 1) 培養細胞
培養細胞 1x10⁵~1x10⁷個を 500 μL の IBLysis-I (弊社製品コード No.19022) に加え、ボルテックス、ピペッティング等により十分に混和後、2~8 °C にて 30 分間ローテーション混和をおこないます。その後 10,000 rpm、2~8 °C にて 10 分間遠心分離し、上清を必要に応じ希釈用緩衝液で希釈して測定に使用します。
 - 2) 組織
IBLysis-I に適量の組織を加え、氷上にてホモジナイザーで破碎後 2~8 °C で 4 時間静置したのち 10,000 rpm、2~8 °C にて 10 分間遠心分離し、その上清を必要に応じ希釈用緩衝液で希釈して測定に使用します。
- 細胞での測定は、細胞数を合わせて測定されることをおすすめします。組織では、可溶性後の総タンパク質量を測定し、単位タンパク質量当たりの COX-2 量として評価することをすすめます。

5. 構成試薬

1	抗体プレート (抗 Rat COX-2 (C) Rabbit IgG A.P. 固相)	96Well x 1
2	標識抗体濃縮液 (30 倍濃度 HRP 標識抗 Rat COX-2 (C251) Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質 (Recombinant Rat COX-2)	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	冷蔵庫 (4°C として)
プレートウォッシャー又は洗浄瓶*	採取用容器 (清潔な試験管など)

(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 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

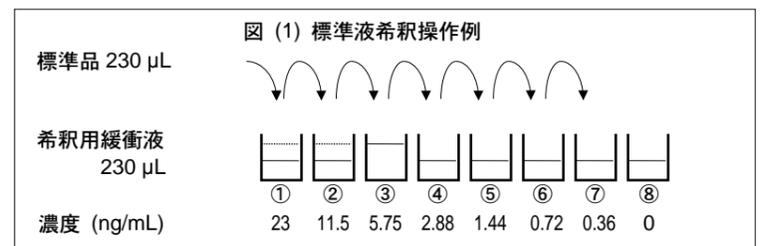
標準物質バイアル瓶に希釈用緩衝液を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。

この時標準物質濃度は 46 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

23 ng/mL, 11.5 ng/mL, 5.75 ng/mL, 2.88 ng/mL, 1.44 ng/mL, 0.72 ng/mL, 0.36 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

23 ng/mL の希釈用テストチューブに 46 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 11.5 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 23 ng/mL~0.36 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 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 4°C overnight 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 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 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 μL	100 μL	100 μL	100 μL
プレートカバーをして 4°C 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°C 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*

- 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ことを確かめてください。

ださい。

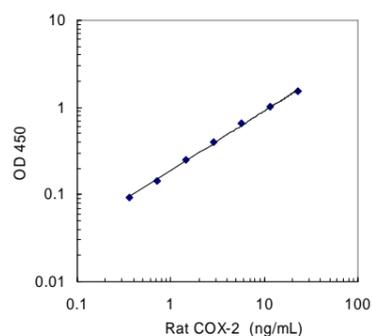
- 7 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 8 洗浄は機械洗浄 (wait time 0 秒) を推奨いたします。洗浄瓶を用いて洗浄する場合は、洗浄液をウェルに満たした後、直ちにプレートを逆さまにして振り払い洗浄液を除去します。この洗浄操作を規定回数おこなってください。操作は洗浄むらのないよう十分注意しておこなってください。
- 9 洗浄操作を規定回数おこなった後に、プレートをペーパータオルの上でたたいて、完全に水分を除去してください。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないよう注意してください。
- 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

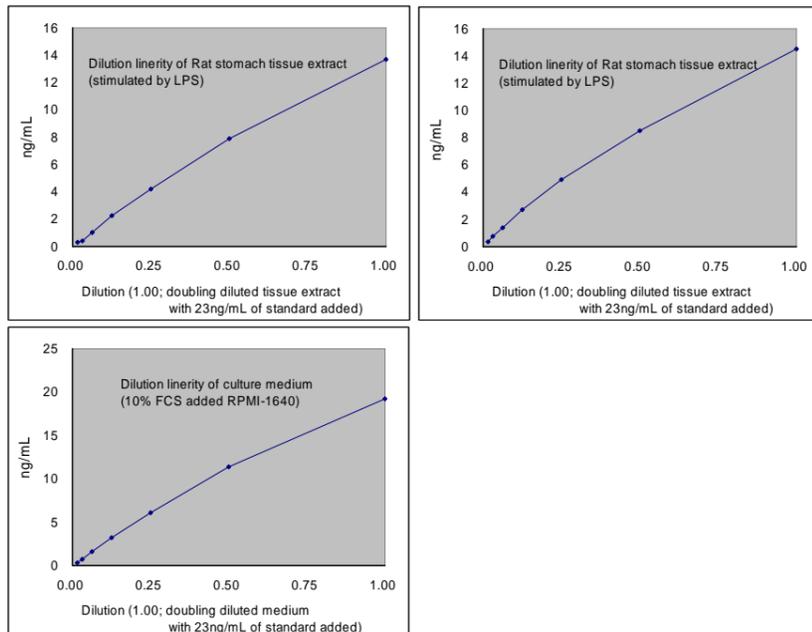
標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
23	1.618
11.5	1.101
5.75	0.747
2.88	0.497
1.44	0.343
0.72	0.241
0.36	0.189
0 (検体ブランク)	0.096



* 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(標準物質を添加したサンプルを使用しています)



(2) 添加回収試験

検体	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) (x4)	11.50	11.04	96.0
	5.75	5.56	96.7
	2.88	2.73	94.8
LPS 刺激脾臓抽出液 (SD ラット) (x4)	12.33	8.52	69.1
	6.58	4.54	69.0
	3.71	2.80	75.5
LPS 刺激胃抽出液 (SD ラット) (x4)	11.52	7.13	61.9
	5.77	3.38	58.6
	2.90	1.54	53.1

(3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
18.41	1.02	5.5	24
4.90	0.18	3.7	24
0.96	0.06	6.3	24

(4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
17.47	1.17	6.7	11
5.11	0.30	5.9	11
1.01	0.08	7.4	11

(5) 感度

0.16 ng/mL (標準品を用いて NCCLS 法にて算出)*

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 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. 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 27187

14. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 2.

2018年3月更新*