

Rat TNF- α Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

TNF (Tumor Necrosis Factor)とLT (Lymphotoxin)は、それぞれ腫瘍壊死因子、細胞障害因子として見出されました。両者は生理活性の多くを共有し、同一の受容体を介すること、アミノ酸の相同性からTNFファミリーを形成し、TNF- α 、TNF- β とも呼ばれています。TNF- α は、157個のアミノ酸からなる分子量約17kDaのタンパク質で、76アミノ酸のシグナルペプチドをもち、分泌される場合と、膜結合型となる場合があります。分子内にジスルフィド結合をもち、 β シート構造が重なったサンドイッチ状をし、ウイルス外被タンパク質にみられるjelly-roll構造と類似します。共有結合なしに円形の三量体を形成して、生物活性を示しています。TNF- α は、マクロファージをはじめ、多くの細胞で、産生されるのに対し、LTの産生は、リンパ球系に限られています。

TNF- α の持続性過剰産生、産生不良は、種々の疾患の原因や増悪をもたらします。リポタンパクリパーゼの阻害(カケクシン作用)により血中脂肪酸の提供を抑制し、細胞内脂肪分解から悪液質(カケクシア)を起こします。また、肥満細胞などの脱顆粒により大量のTNF- α が放出され、アレルギー反応を拡大しています。そのほか、敗血症ショック、移植、SLE、糖尿病、動脈硬化症など、多くの病態に関与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。この呈色は、Rat TNF- α の量に比例します。

3. 測定範囲

56.25 ~ 3,600 pg/mL

4. 使用目的

- 培養上清中のRat TNF- α の測定を測定できます。
- 組み換え体、自然体どちらのRat TNF- α も測定可能です。

5. 構成試薬

1	抗体プレート (抗Rat TNF- α (C) Raabbit 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 TNF- α Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質 (Recombinant Rat TNF- α)	1.0mL 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	グラブ用紙 (両対数)
プレートウォッシャー又は洗浄瓶*	ペーパータオル
冷蔵庫 (4°C として)	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 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 1.0 mL 加えて完全に溶解します。

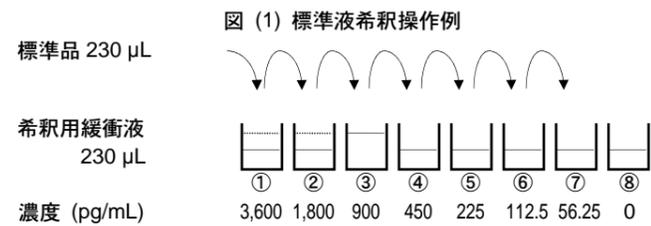
この時標準物質濃度は 7,200 pg/mL となります。

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、各々のテストチューブに

3,600 pg/mL, 1,800 pg/mL, 900 pg/mL, 450 pg/mL, 225 pg/mL, 112.5 pg/mL, 56.25 pg/mL, 0 pg/mL の表示をします。

3,600pg/mL の希釈用テストチューブに 7,200 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 1,800 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 3,600pg/mL~56.25 pg/mL までの7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で適宜希釈して測定してください。

(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 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 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 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 4°C overnight 反応				
4回 (洗浄液 350 μ L 以上) (操作上の注意 8.9 参照) *				
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) (操作上の注意 8.9 参照) *				
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*

- 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。
- 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。

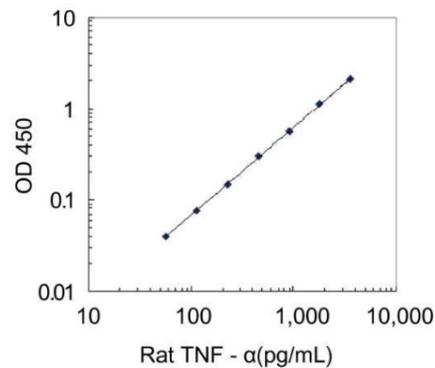
8. 測定結果の算出方法

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 (pg/mL)	吸光度 (450nm)
3,600	2.133
1,800	1.150
900	0.617
450	0.347
225	0.193
112.5	0.121
56.25	0.085
0 (検体ブランク)	0.046



* 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	1,391.64	1,600	87.0
	4	796.28	800	99.5
	8	409.48	400	102.4

(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) (x4)	1,800	1,555.68	86.4
	900	740.72	82.3
	450	380.54	84.6

(3) 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
1,490.17	64.55	4.3	24
356.74	15.53	4.4	24
119.29	7.79	6.5	24

(4) 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
1,435.88	90.95	6.3	12
346.76	22.49	6.5	12
112.03	11.39	10.2	12

(5) 特異性

測定物質	交差率
Rat TNF-α	100 %
Rat IL-6	≦ 0.1 %
Rat MCP-1	≦ 0.1 %
Rat Osteopontin	≦ 0.1 %
Rat CINC-1	≦ 0.1 %

(6) 感度

10.55 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°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をして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 27194

14. 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3月更新*