

Human Total Angiotensinogen 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。

全般的な注意

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- Human AGT (72) Rabbit IgG A.P.固相)	96Well x 1
2	標識抗体濃縮液(30倍濃度) (HRP 標識 Anti-Human AGT (601) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質(Human Angiotensinogen*)	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

測定対象

ヒト血清、EDTA-血漿、尿(随時尿を推奨)および培養上清

※尿検体取扱注意

尿検体中のアンジオテンジノーゲンは非常に不安定です。温度変化に敏感であり、急速な劣化の恐れがありますので、採尿後速やかに測定するか、もしくは採尿後速やかに -80°C にて保存してください。尚、採尿後、常温放置した尿検体(蓄尿)は、測定値が低下する可能性がありますのでご注意ください。

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。
- 洗浄は機械洗浄(wait time 0秒)で設定し、反応後直ちにプレート洗浄してください。洗浄の浸漬時間が長くなるほど吸光度が低下する傾向があります。マルチチャンネルピペットおよび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。
- 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。
- 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ピッカー
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 ($37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)	

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) 標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液を別に用意した採取用容器にて、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。

(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 40 ng/mL となります。溶解後の標準物質は凍結保存することができます。凍結融解の繰り返しはできません。

希釈用テストチューブを 7 本用意し希釈用緩衝液を 230 μL ずつ量り取ります。20 ng/mL の希釈用テストチューブに 40 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え、混和し、その溶液 230 μL を 10 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、20 ng/mL \sim 0.31 ng/mL までの 7 点を希釈標準品とします。

Tube-1	20 ng/mL	(384.6 pmol/L)
Tube-2	10 ng/mL	(192.3 pmol/L),
Tube-3	5 ng/mL	(96.2 pmol/L)
Tube-4	2.5 ng/mL	(48.1 pmol/L)
Tube-5	1.25 ng/mL	(24.0 pmol/L)
Tube-6	0.63 ng/mL	(12.1 pmol/L)
Tube-7	0.31 ng/mL	(6.0 pmol/L)

(4) 検体の希釈方法

検体は添付の希釈用緩衝液で、下記の希釈倍率にて希釈してください。

ヒト血清及び EDTA-血漿の場合は、約 10,000 倍

ヒト尿(随時尿)の場合は、4 \sim 8 倍

培養上清の場合は、適宜

添付の希釈用緩衝液で足りない場合は、追加購入専用希釈用緩衝液(Human Angiotensinogen EIA buffer 100mL、製品番号:27412D100)の用意がごさいますので、ご利用ください。

検体の希釈例：血清または EDTA-血漿を 10,000 倍希釈する場合

希釈用テストチューブを 2 本用意し、希釈用緩衝液 990 μL を量り取ります。検体 10 μL 加えよく混和し、100 倍希釈サンプルとします。さらにこの 100 倍希釈サンプル 10 μL を、希釈用緩衝液 990 μL に加え希釈します。これで 10,000 倍希釈サンプルが 1 mL できますので、これを測定に供します。

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 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 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 μL 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 μL 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 μL 添加します。

(11) 吸光度測定

プレート底面のごみ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 \sim 650 nm

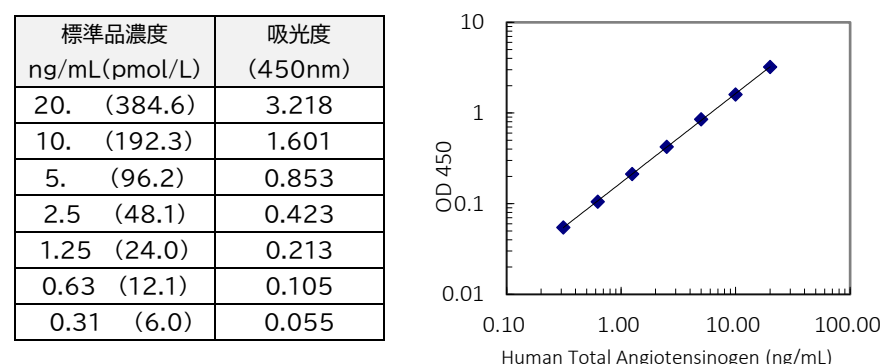
測定操作一覧

試料	検体	標準	検体ブランク
	検体 100 μL	希釈標準品 100 μL	希釈用緩衝液 100 μL
第1反応	プレートカバーをして 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 分間反応		
洗浄	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
第2反応	プレートカバーをして 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間反応		
洗浄	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
発色反応	遮光常温 30 分間反応		
停止液	100 μL	100 μL	100 μL
吸光度測定	450 nm / 600 \sim 650 nm		

測定結果の算出方法

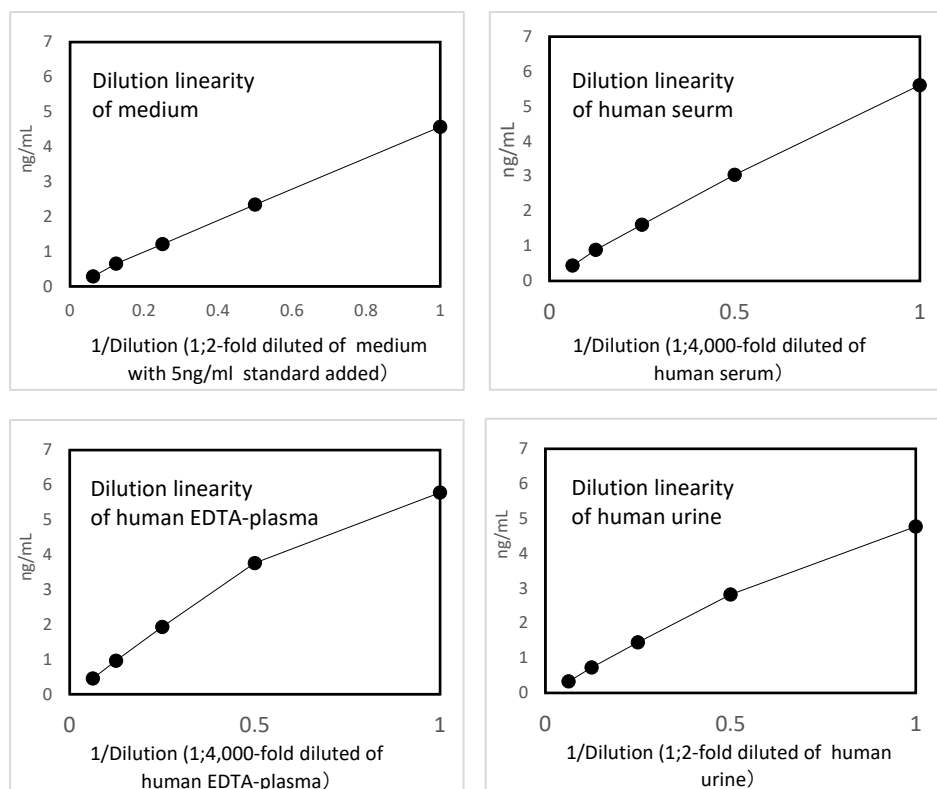
- 1 グラフの X 軸に標準物質濃度を、Y 軸にその吸光度をプロットします。各プロットに適切な回帰曲線を当てはめ(例:両対数変換の二次回帰等)、検量線を作成します。
- 2 検体の吸光度を検量線に当てはめ、濃度を読みとります。
- 3 その値に検体の希釈倍率を乗じ、検体の濃度を算出します。

測定値と検量線作成例



性能

- 1 感度
0.03 ng/mL (標準品を用いて NCCLS 法にて算出)
- 2 測定範囲
0.31 ~ 20 ng/mL (6.0~384.6 pmol/L)
モル濃度は分子量約 52KDa として計算しています。
- 3 希釈直線性



4 添加回収試験

検体	添加量 (ng/mL)	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
10%FBS added Medium (x2)	5.00	5.00	4.24	84.8
	2.50	2.50	2.17	86.8
	1.25	1.25	1.07	85.6
Human Serum (x8,000)	5.00	9.39	8.03	85.5
	2.50	6.89	6.03	87.5
	1.25	5.64	5.07	89.9
Human EDTA- plasma (x8,000)	5.00	9.29	7.70	82.9
	2.50	6.79	6.50	95.7
	1.25	5.54	4.98	89.9
Human urine (x8)	5.00	7.47	6.54	87.6
	2.50	4.97	4.69	94.4
	1.25	3.72	3.38	90.9

5 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
8.81	0.39	4.4	24
2.14	0.11	5.1	24
0.73	0.04	5.5	24

6 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
8.69	0.13	1.5	3
2.14	0.02	0.9	3
0.69	0.04	5.8	3

7 特異性

測定物質	交差率
Human Angiotensinogen	100 %
Angiotensin I	< 0.1 %
Angiotensin II	< 0.1 %
Angiotensin III	< 0.1 %
Angiotensin IV	< 0.1 %
Angiotensin (1-7)	< 0.1 %
Angiotensin (1-9)	< 0.1 %
Human albumin	< 0.1 %
Human IgG	< 0.1 %
Human Angiopoietin-like 3	< 0.1 %

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場合があります。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、2~8°C としてください。
 - (3) 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。

貯蔵方法・有効期間

2~8°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 27412

参考文献

1. Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension. J Am Soc Nephrol. 2001 Mar;12(3):431-9.
2. Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. Hypertension. 2001 May;37(5):1329-35.
3. Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary excretion of angiotensinogen reflects intrarenal angiotensinogen production. Kidney Int. 2002 Feb;61(2):579-85.
4. Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. Hypertension. 2003 Jan;41(1):42-9.
5. Kobori H, Prieto-Carrasquero MC, Ozawa Y, Navar LG. AT1 receptor mediated augmentation of intrarenal angiotensinogen in angiotensin II-dependent hypertension. Hypertension. 2004 May;43(5):1126-32.
6. Katsurada A, Hagiwara Y, Miyashita K, Satou R, Miyata K, Ohashi N, Navar LG, Kobori H. Novel sandwich ELISA for human angiotensinogen. Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Sep;293(3):F956-60.
7. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol Rev. 2007 Sep;59(3):251-87.

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:0274-50-8666 FAX:0274-23-6055
URL: <https://www.ibl-japan.co.jp> E-mail: do-ibl@ibl-japan.co.jp