

Human Amyloid β (1-40) (FL) Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

アルツハイマー病は1907年ドイツの神経病理学者 A. Alzheimer によって最初に報告され、現在では老人性認知症の最も大きな原因となっています。アルツハイマー病の脳に多く現れる老人斑は Amyloid β (A β) タンパク質によって構成されています。A β は 40~42 (43) 個のアミノ酸からなるペプチドで、 β -および γ -セクレターゼの働きにより、前駆体タンパク質である APP (Amyloid precursor protein) (695, 751 または 770 アミノ酸からなる膜タンパク質) から切り出されると言われています(文献1)。

また、ヒト APP をコードした cDNA をマウス神経芽腫細胞にトランスフェクトした培養液中において、多数のバリエーション A β の存在が明らかにされています(文献2)。

本製品は、N末端側を完全に保持した A β (1-40) のみ (FL は Full Length の意) を特異的に測定できます。A β の N 末端側に特異的に反応するモノクローナル抗体 (文献4) を採用することにより、同様に全長の A β (1-40) を測定する従来の Human Amyloid β (1-40) (N) Assay Kit - IBL (Code No. 27714) よりも感度および特異性が改善されています。

本製品では、2013年2月製造分より抗体プレートの固相抗体として、弊社独自の技術である、遺伝子組換えカイコのマコの中にタンパク質を発現させる生産技術を用いて産生した、リコンビナント抗体 (ネオシルク*抗体) を使用しています。この技術を使用することにより、従来の品質・特性を保ちながら、均質な抗体のより安定的な生産が可能となりました。

*「ネオシルク」は株式会社免疫生物研究所の登録商標です。(登録第5412217号)

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 Amyloid β (1-40) (FL) の量に比例します。

3. 測定範囲

1.56 ~ 100 pg/mL (0.36 ~ 23.09 pmol/L)
A β (1-40) の分子量: 4331

4. 使用目的

- EDTA-血漿、脳脊髄液、血清、培養上清中および脳組織抽出液中の Human Amyloid β (1-40) (FL) を測定できます。
- 血清中の Amyloid β (1-40) は非常に不安定です。保存状況により測定値の減少がみられることがあります。
- 培養上清中に FBS 等が含まれていると、FBS 中の Amyloid β (1-40) 様物質を測定することがあります。培地の陰性コントロールを置くことをおすすめします。
- 本製品は組み換え体、自然体どちらの Human A β (1-40) (FL) も測定可能です。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (ネオシルク*抗 Human A β (35-40) (1A10) 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 Human A β (N) (82E1) Mouse IgG MoAb A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Human A β (1-40))	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)

(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) 使用する場合は 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

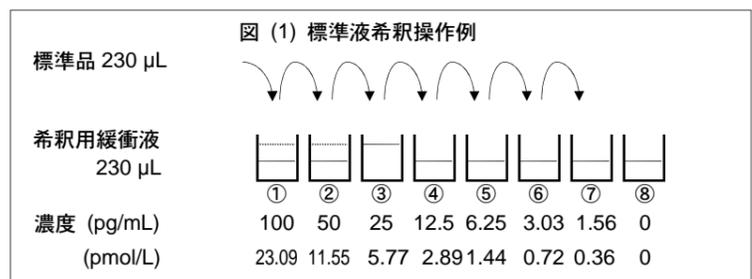
標準物質バイアル瓶に精製水を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。

この時標準物質濃度は 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 ずつ量り取ります。各々のテストチューブに

100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12.5 pg/mL, 6.25 pg/mL, 3.03 pg/mL, 1.56 pg/mL, 0 pg/mL の表示をします。

100 pg/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 μ L 加え混和しその溶液 230 μ L 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 ~ 1.56 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または PBS で適宜希釈し測定してください。

希釈の目安は EDTA-血漿が 16~100 倍、CSF が 100~1,000 倍です。

(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 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 60 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

	検体	標準	検体ブランク	試薬ブランク
試料	検体 100 μ L	希釈標準品 100 μ L	希釈用緩衝液 100 μ L	希釈用緩衝液 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)				
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 60 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

- 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 検体は必要に応じて希釈用緩衝液または PBS で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定をおすすめします。
- 4 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。
- 5 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。

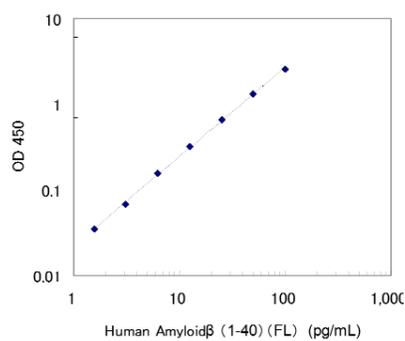
- 洗浄後は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に水分を切ってください。この時ペーパータオルがウェルの中に入らないよう注意してください。
- TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

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	2.681
50	1.406
25	0.741
12.5	0.406
6.25	0.236
3.13	0.150
1.56	0.117
0 (検体ブランク)	0.082

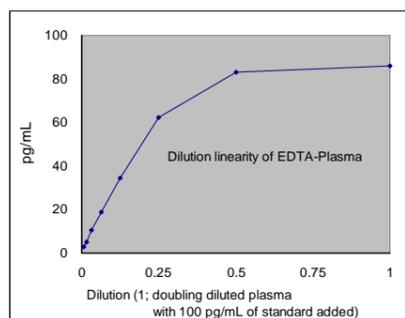
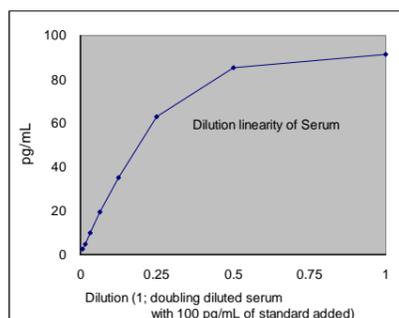
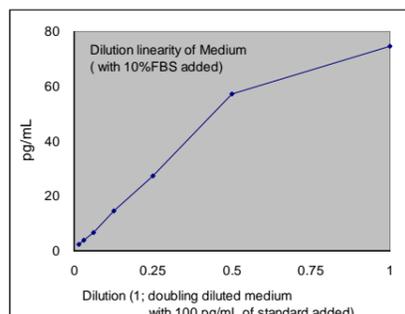
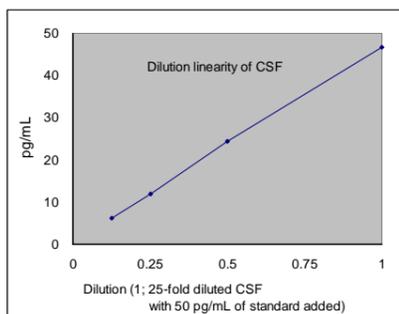


* 上記検量線は作成例です。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

*

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 (pg/mL)	理論値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	%
培地 (10%FBS 添加) (x4)	25	35.40	38.18	107.8
	12.5	22.90	21.95	95.8
	3.13	13.60	13.12	96.4
血清(健常人) (x8)	25	48.25	44.06	91.3
	12.5	35.75	32.38	90.6
	6.25	29.50	27.51	93.3
血漿 (EDTA) (健常人) (x16)	25	52.10	45.81	87.9
	12.5	39.60	36.18	91.4
	3.13	30.30	29.27	96.6
脳脊髄液 (x25)	50	50	44.30	88.6
	25	25	24.79	99.2
	6.25	6.25	6.43	102.9

(3) 同時再現性

測定値 (pg/mL)	SD (pg/mL)	CV (%)	n
27.63	2.07	7.5	21
9.19	0.59	6.4	21
4.69	0.52	11.1	21

(4) 測定間再現性

測定値 (pg/mL)	SD (pg/mL)	CV (%)	n
27.14	2.24	8.3	16
8.61	0.59	6.8	16
4.59	0.68	14.8	16

(5) 特異性

測定物質	交差率
Human Aβ (1-40)	100 %
Human Aβ (1-42)	< 0.2 %
Rat Aβ (1-40)	10 - 40 %
Human Aβ (17-40)/Aβ (p3)	< 0.1 %

(6) 感度

1.0 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

- 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ん。
- 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。
- 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 27718

14. 参考文献

- Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the β -Amyloid precursor protein. Annu. Rev. Neurosci. 17: 489-517, 1994.
- Wang R, Sweeney D, Gandy SE, and Sisodia SS. The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media. J. Biol. Chem. 271: 31894-31902, 1996.
- Saïdo T. C, Iwatsubo T, Mann D.M.A, Shimada H, Ihara Y, and Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. Neuron 14, 457-466, 1995.
- Horikoshi Y, Sakaguchi G, Becker AG, Gray AJ, Duff K, Aisen PS, Yamaguchi H, Maeda M, Kinoshita N, Matsuoka Y. Development of A β terminal end-specific antibodies and sensitive ELISA for A β variant. Biochem Biophys Res Commun. 319 (3): 733-737, 2004.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 3.

2016年11月更新*