

Human Amyloid β Oligomers (82E1-specific) Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

アルツハイマー病(AD)は、認知機能の低下を主症状とする神経変性疾患であり、Amyloid β (A β)ペプチドが脳に蓄積することが知られています。これまでは、凝集して不溶性の線維(フィブリル)となったA β が老人斑を形成し、これが神経細胞を変性させることで病気が発症すると考えられていました(これを「アミロイド仮説」と呼びます)。しかし最近では、凝集過程の中間体である可溶性のA β オリゴマーに強いシナプス障害作用があり、これによって認知機能が低下し、病気が発症するという「オリゴマー仮説」が有力となってきています。培養細胞から分泌された、もしくはAD患者の脳から抽出したA β オリゴマーをラットの脳に注入すると、シナプス機能障害や学習記憶障害を引き起こすことが報告されています(文献2, 3)。また実際に、AD患者の脳では健常者と比較してA β オリゴマーが増加していることも観察されています。

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次反応用Uプレートで検体と酵素標識抗体の1次反応をおこない、この反応液を抗体の固相されたマイクロプレートに添加して、2次反応をおこないます。反応後、固相抗体と結合しなかった成分を洗浄除去し、Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この呈色は、human A β のうち、N末端を特異的に認識する抗体(82E1)と2箇所以上で結合する分子の量を反映します。測定値は、A β のダイマー分子を標準とした場合の相対量として、モル濃度で表わされます。

3. 測定範囲

18.98 ~ 1,215 pmol/L

4. 使用目的

- 血清、EDTA-血漿および脳組織抽出液中のHuman A β のうち、N末特異的抗体(82E1)と2箇所以上で反応する分子(オリゴマーやタンパク質との重合体など)を検出できます。
- 測定値はA β のダイマーを標準とするモル濃度で表わされますので、検出した各種分子の重量または分子数に正比例するものではありません。

5. 構成試薬

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|
| ① 抗体プレート (抗 Human A β (N) (82E1) 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.) | 0.1mL x 1 |
| ③ 標準物質 (Human A β (1-16) dimer) | 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 |
| ⑨ 1次反応用Uプレート (シール付属) | 96 Well 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
採取用容器 (清潔な試験管など)	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	洗浄ビン
冷蔵庫 (4°C として)	

(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。(この標識抗体濃縮液は青色に着色されています)

希釈例)
1スリット (8ウェル) 使用する場合 = 160 μ L 必要(最低量)
(標識抗体濃縮液を6 μ L 取り、標識抗体用溶解液 174 μ L を加え良く混和し、20 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2,430 pmol/L 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。

標準物質の希釈は、⑨の1次反応用Uプレート上でおこないます。

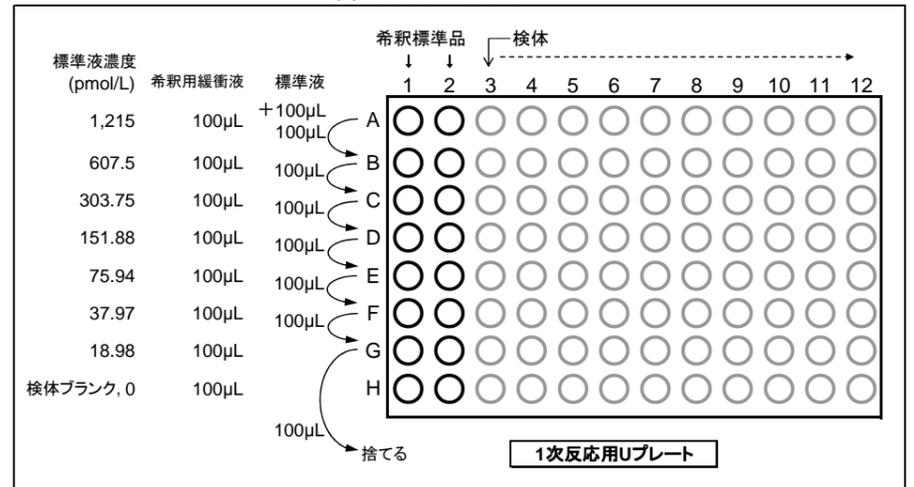
図(1)に示すように、1次反応用Uプレートの1列(A ~ H)を使用して希釈系列を作製します。

検量線作成用の希釈標準液の測定には二重測定をおすすめしていますので、同様にして2列分の希釈標準液を作製してください。

例) A1 ~ H1 と A2 ~ H2

- 1) A から H の各ウェルに希釈用緩衝液を 100 μ L ずつ入れます。
- 2) A のウェルに 2,430 pmol/L の標準物質溶液を 100 μ L 加えよく混和(10回程度ピペティング)し、その溶液 100 μ L を B のウェルに加え同様によく混和します。
- 3) 順次 G のウェルまで 2 倍連続希釈をおこない、G のウェルからは溶液を 100 μ L 取り除きます。
- 4) A から G の 7 点を 1,215 pmol/L ~ 18.98 pmol/L の希釈標準品とし、H を 0 pmol/L の検体ブランクとします。(図(1)参照)

図(1) 希釈標準液作成



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測定してください。

抗体プレートの準備

使用しないスリットをホルダーから外します。(入っていたファスナー付きアルミ袋に入れ、密封し冷蔵保存してください。使用期限まで使用できます。)

(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。

- 1 ブランクの添加 (以降図(2)参照)
1次反応用Uプレートの空いているウェルに試薬ブランクを設定し、希釈用緩衝液 120 μ L を入れます。
- 2 検体の添加
1次反応用Uプレートの空いているウェルに、検体 100 μ L を入れます。
- 3 標識抗体の添加
検体、標準、検体ブランクの各ウェルに標識抗体を 20 μ L ずつ添加します。標識抗体を添加したウェルは青く着色します。
標識抗体を添加したら、そのまま各ウェルにて十分にピペティングをおこない、よく混和してください。
- 4 プレートカバーをして 4°C 60 分間反応(1次反応)
- 5 抗体プレート(構成試薬①)への添加
1次反応用Uプレートの検体、標準、検体ブランク、試薬ブランクの各ウェルから1次反応後の溶液各 100 μ L をとり、①の抗体プレートのウェルに添加します。この際、1次反応用Uプレート内でピペティングをおこない、液を均質にしてから取り出してください。
1次反応用Uプレートの使用済みウェルには、付属のシールなどを貼り、未使用ウェルに溶液が付着しないよう注意して保存してください。
- 6 プレートカバーをして 4°C 60 分間反応(2次反応)
- 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 ずつ添加します。TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この反応の間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の容器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 μ L ずつ添加し、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、標準、検体ブランクの波長 450 nm 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
1次反応用 Uプレート	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 120 μ L
	標識抗体	20 μ L	20 μ L	20 μ L	—
	プレートカバーをして4°C 60分間反応				
抗体 プレート	1次反応済み 溶液	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
	プレートカバーをして4°C 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

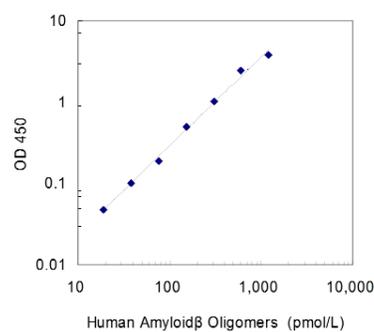
- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- 7 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。
- 8 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 (pmol/L)	吸光度 (450nm)
1,215	3.778
607.5	2.456
303.75	1.036
151.88	0.494
75.94	0.195
37.97	0.105
18.98	0.052
0 (検体ブランク)	0.004



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 (pmol/L)	理論値 (pmol/L)	%
培地 (FCS (-) RPMI- 1640)	2	504.12	607.50	83.0
	4	266.47	303.75	87.7
	8	133.73	151.88	88.0
血清 (健康人)	2	612.35	691.84	88.5
	4	309.10	353.20	87.5
	8	153.07	177.73	86.1
血漿 (EDTA) (健康人)	2	632.27	670.54	94.3
	4	294.36	341.62	86.2
	8	150.86	173.73	86.8
脳抽出液 (Tg マウス)	2	521.97	643.18	81.2
	4	280.43	345.44	81.2
	8	149.04	192.35	77.5

脳組織の抽出には CHAPS buffer を使用しています。

(2) 添加回収試験*

検体	理論値 (pmol/L)	測定値 (pmol/L)	%
培地 (FCS (-) RPMI-1640) (x2)	151.88	128.01	84.3
	75.94	64.23	84.6
	37.97	36.97	97.4
血清 (健康人) (x2)	117.42	104.26	88.8
	98.43	88.96	90.4
	88.94	83.49	93.9
血漿 (EDTA) (健康人) (x2)	100.18	82.75	82.6
	81.19	73.84	90.9
	71.70	65.98	92.0
脳抽出液 (Tg マウス) (x4)	117.44	99.64	84.8
	79.44	64.93	81.7
	60.44	56.73	93.9

(3) 同時再現性

測定値 (pmol/L)	SD 値	CV 値 (%)	n
314.24	15.62	5.0	24
88.32	2.56	2.9	24
33.66	1.83	5.4	24

(4) 測定間再現性

測定値 (pmol/L)	SD 値	CV 値 (%)	n
310.02	9.75	3.1	5
76.92	3.99	5.2	5
27.39	2.75	10.0	5

(5) 特異性

測定物質	交差率
A β (1-16) dimer peptide	100 %
A β (1-40) peptide	0.27 %
A β (N3pE-40) peptide	\leq 0.1%
A β (N3pE-42) peptide	\leq 0.1%

(6) 感度

4.41 pmol/L

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 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 27725

14. 参考文献

1. Xia W, Yang T, Shankar G, Smith IM, Shen Y, Walsh DM, Selkoe DJ. A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. Arch Neurol. 2009 Feb;66(2):190-9.
2. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature. 2002 Apr 4;416(6880):535-9.
3. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat Med. 2008 Aug;14(8):837-42.

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所 営業部