

Human APP770 Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

アルツハイマー病は、最も代表的な老人性認知症疾患で、脳実質にAmyloid β (A β)が蓄積することが発症の主たる原因と考えられています。一方で、9割近いアルツハイマー病患者で、脳血管壁にもA β が蓄積することが確認されています。A β は、Amyloid Precursor Protein (APP) が2種類のプロテアーゼで切断されて生じることが分かっており、脳実質に蓄積するA β は、主にニューロンに発現するAPP (APP695) から生じると考えられています。これに対し脳血管内皮細胞にはニューロンと異なるAPP (APP770) が発現していることが発見され、このAPP770から産生されたA β が脳血管壁に蓄積し得ることが報告されています (文献1)。

本キットはEDTA-血漿、脳脊髄液および細胞培養上清中のAPP770を測定することができます。

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、Human APP770 の量に比例します。

3. 測定範囲

0.10 ~ 6.2 ng/mL

4. 使用目的

ヒトのEDTA-血漿、脳脊髄液および培養上清中のHuman APP770を測定できます。

5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗 Human APP OX2 (351) 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 Human APP (R101A4) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3 標準物質 (Recombinant Human APP770)	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)

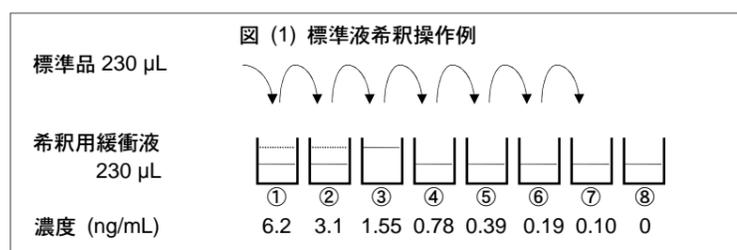
1スリット (8ウェル) 使用する場合は800 μ L必要(最低量) (標識抗体濃縮液を30 μ Lとり、標識抗体用溶解液870 μ Lを加え良く混和し、100 μ Lずつ使用します。)

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0.5mL加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は12.4ng/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6.2ng/mL, 3.1ng/mL, 1.55ng/mL, 0.78ng/mL, 0.39ng/mL, 0.19ng/mL, 0.10ng/mL, 0ng/mLの表示をします。6.2ng/mLの希釈用テストチューブに12.4ng/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3.1ng/mLの希釈用テストチューブに加えて混和します。順次2倍連続希釈をおこない6.2ng/mL~0.10ng/mLまでの7点を希釈標準品とし、0ng/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 一晩反応
- 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 一晩反応				
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 30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
プレートをつ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450nm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

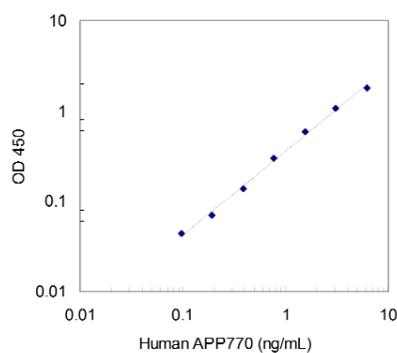
- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 2 検体は必要に応じて希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定をおすすめします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄後は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完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。
- 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

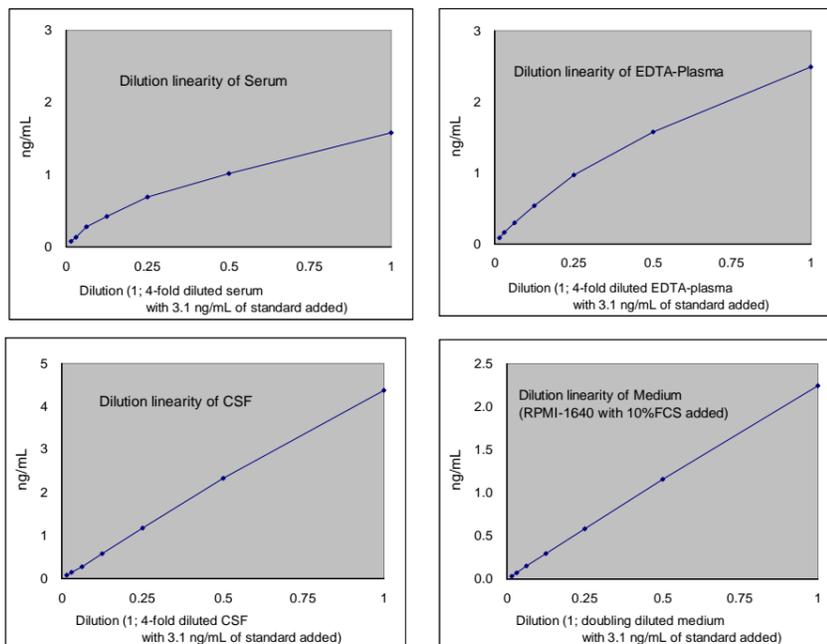
対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値をとり検量線を設定します。試料検体の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

9. 測定値と検量線作成例

標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
6.2	3.047
3.1	1.605
1.55	0.837
0.78	0.432
0.39	0.239
0.19	0.136
0.10	0.088
0 (検体ブランク)	0.030



* 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	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
血清 (健康人) (x16)	3.33	2.18	65.4
	1.78	1.15	64.6
	1.01	0.68	67.5
	0.62	0.41	65.6
血漿 (健康人) (EDTA) (x16)	3.49	2.51	71.9
	1.94	1.44	74.2
	1.17	0.87	74.4
	0.78	0.60	76.9
脳脊髄液 (x8)	3.50	3.22	92.0
	1.95	1.78	91.3
	1.18	1.04	88.1
	0.79	0.68	86.1
培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640)	3.10	2.64	85.2
	1.55	1.27	81.9
	0.78	0.57	73.1
	0.39	0.27	69.2

(3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
3.72	0.29	7.8	26
0.99	0.04	4.0	26
0.23	0.02	8.7	26

(4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	n
3.83	0.19	5.0	6
0.96	0.08	8.3	6
0.22	0.02	9.1	6

(5) 特異性

測定物質	交差率
Human APP770	100 %
Human APP695	< 0.1 %
Human APP751	< 0.1 %

(6) 感度

0.03 ng/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 希釈用緩衝液および標識抗体濃縮液は、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。
- 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、交換したりして使用しないでください。
- 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 27736

14. 参考文献

1. Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y, Wada Y, Saito T, Iwata N, Saido T, Taniguchi N Brain endothelial cells produce amyloid β from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. J Biol Chem. 2010 Dec 17;285(51):40097-103.

本製品は、独立行政法人理化学研究所 の特許(特願 2010-171122)の実施許諾を受けています。

15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version 3.

2016年11月更新*