

ご使用に際しては、本取扱い説明書をよくお読みください。

N-Titin 測定キット-IBL

【全般的な注意】

1. 本品は医薬品医療機器法における体外診断用医薬品ではなく、疾病の診断に使用することを目的としたものではありません。
2. 測定対象である「タイチンN端フラグメント」は、試験データ等により臨床意義が確認されていません。
3. この取扱い説明書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用方法及び使用目的以外での使用については、測定値の信頼性を保証いたしかねます。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱い説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等（キットの構成）】

構成試薬名	主成分
1. 抗体プレート	: 抗 N-Titin モノクローナル抗体（マウス）
2. 標識抗体濃縮液	: HRP 標識抗 N-Titin モノクローナル抗体（マウス）
3. 標準品	: 細胞培養上清
4. 希釈用緩衝液	: リン酸緩衝液
5. 標識抗体用希釈液	: リン酸緩衝液
6. TMB 基質液	: 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン
7. 停止液	: 硫酸
8. 濃縮洗浄液	: リン酸緩衝液

【使用目的】

尿中のタイチンN端フラグメント濃度の測定

【測定原理】

本品は、固相抗体と標識抗体に抗 N-Titin モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法（ELISA 法）を原理としています。検体中のタイチンN端フラグメントは、プレートに結合している抗 N-Titin モノクローナル抗体（マウス）と抗原抗体反応を起こし、プレートにトラップされます。トラップさせたタイチンN端フラグメントに HRP 標識抗 N-Titin モノクローナル抗体（マウス）を結合させ、これに TMB 基質液を加え発色させ、この発色を吸光度として測定することにより、タイチンN端フラグメント濃度を求めます。

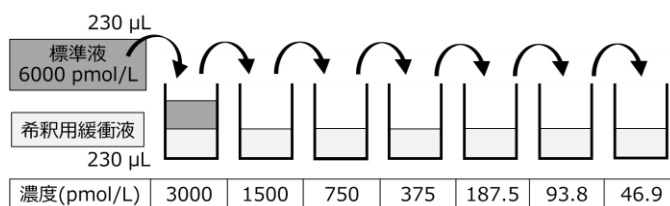
【操作上の注意】

1. 検体
検体には、尿を使用してください。
検体採取後直ちに測定できない場合は、 -20°C 以下に保存してください。凍結保存した検体は、融解後よく混和してから測定に使用してください。凍結融解は3回までとしてください。
2. 妨害物質
遊離ビリルビン 13.4 mg/dL、抱合型ビリルビン 18.6 mg/dL、ヘモグロビン 490 mg/dL、乳ビ 1155 FTU(ホルマジン濁度)まで測定に影響ありません。
3. 非特異反応
測定試料によっては非特異反応が生じる場合があります。必要に応じて他の検査方法等により測定値の信頼性を確認してください。
4. 標準品の溶解方法
 - (1) バイアル瓶を室内温度（ $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ ）に戻してください。
 - (2) アルミキャップを開封後、静かにゴム栓を開けてください。
 - (3) 希釈用緩衝液を 0.5 mL 加え、室内温度（ $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ ）で 5 分間静置してください。
 - (4) 以下の点に注意し、攪拌してください。
 - 「ボルテックスの場合」： 溶液が泡立たないように、5 秒間攪拌してください。
 - 「ピペットのの場合」： バイアル瓶の内壁を洗うように 10 回ピペティングしてください。
5. 吸光度の測定
吸光度を測定する際には、抗体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てから測定してください。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法
各試薬を使用・調製する際には、操作の前に室内温度（ $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ ）に戻してください。開封後は遮光、密栓してすぐに冷蔵庫へ戻してください。開封後はなるべく早く使用してください。
 - (1) 抗体プレート： そのまま使用します。

- (2) 標識抗体液 : 標識抗体濃縮液を必要量とり、標識抗体用希釈液で 30 倍希釈して標識抗体液とします。
 (3) 標準液 : 「【操作上の注意】4.標準品の溶解方法」に従って標準品を希釈用緩衝液で溶解したのち、下図を参考に希釈用緩衝液で 2 倍段階希釈することで各濃度の標準液を作成します。検体ブランクとしては希釈用緩衝液を使用します。



- (4) 希釈用緩衝液 : そのまま使用します。
 (5) 標識抗体用希釈液 : そのまま使用します。
 (6) TMB 基質液 : そのまま使用します。
 (7) 停止液 : そのまま使用します。
 (8) 洗浄液 : 濃縮洗浄液を必要量とり、精製水で 40 倍希釈して洗浄液とします。
 (9) 検体 : 尿検体を必要量とり、希釈用緩衝液で適宜希釈(10~160 倍)して用います。

2. 必要な器具・器材・試料等

- (1) マイクロプレートリーダー [波長 450 nm]
 (2) マイクロピペット
 (3) マイクロプレートウォッシャー
 (4) 恒温槽 [25℃、37℃]
 (5) 精製水

3. 測定 (操作) 法

- (1) 標準液および検体ブランクの添加
 各濃度の標準液 100 µL を抗体プレートのそれぞれのウェルに添加します。また、検体ブランクとして希釈用緩衝液 100 µL をウェルに添加します。(二重測定のため各々 2 ウェルずつ使用します。)
- (2) 検体の添加
 検体ウェルを設定し希釈した検体を 100 µL 添加します。
- (3) 一次反応
 37℃ で 1 時間放置します。
- (4) 洗浄
 ウェルの反応液を除去後、洗浄液を 350 µL 加え除去します。(4 回繰り返す。)(※ 1)
- (5) 二次反応
 標識抗体液 100 µL を添加後、37℃ で 30 分間放置します。
- (6) 洗浄
 ウェルの反応液を除去後、洗浄液を 350 µL 加え除去します。(5 回繰り返す。)(※ 1)
- (7) 発色反応
 TMB 基質液 100 µL を添加後、遮光をして 25℃ で 30 分間放置します。
- (8) 吸光度測定
 停止液 100 µL を添加して発色反応を停止させます。発色反応停止後 30 分以内に検体ブランクを対照とした検体および各標準液の波長 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定してください。

測定操作一覧

	標準液ウェル	検体ブランクウェル	検体ウェル
希釈用緩衝液		100 µL/ウェル	
試料	100 µL/ウェル		100 µL/ウェル
一次反応	37℃ 1 時間放置		
洗浄	反応液を除去後、ウェルを洗浄液で 4 回洗浄(※ 1)		
標識抗体液	100 µL/ウェル	100 µL/ウェル	100 µL/ウェル
二次反応	37℃ 30 分間放置		
洗浄	反応液を除去後、ウェルを洗浄液で 5 回洗浄(※ 1)		
TMB 基質液	100 µL/ウェル	100 µL/ウェル	100 µL/ウェル
発色反応	遮光をして 25℃ 30 分間放置		
停止液	100 µL/ウェル	100 µL/ウェル	100 µL/ウェル
吸光度測定	停止液添加後 30 分以内に波長 450 nm における吸光度を測定		

(※1) 洗浄は機械洗浄 (wait time 0 秒) を推奨いたします。洗浄液をウェルに素早く満たした後、浸漬時間が短くなるよう速やかに洗浄液を除去してください。この洗浄操作を規定回数おこなってください。

4. タイチンN端フラグメント濃度の算出方法

- (1) グラフの X 軸に標準液濃度を、Y 軸にその吸光度をプロットします。各プロットに適当な回帰曲線(例：両対数変換等)を当てはめ、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) 得られた濃度に「1. 試薬の調製方法」で検体を希釈した際の希釈倍率を乗じて、タイチンN端フラグメント濃度を算出してください。

5. 測定上の注意

- (1) 検体により、検体中の目的成分以外の物質との反応や妨害反応を生じることがあります。測定値や測定結果に疑問がある場合は、再検査や希釈再検査、あるいは他の検査方法により確認してください。
- (2) 測定範囲外の高値検体は、希釈用緩衝液にて適切に希釈をおこなってから再度測定してください。最大で 160 倍まで希釈倍率を上げて測定することが出来ます。

【性能】

当社試験法による性能は以下の通りです。

1. 感度

標準液 0 pmol/L あたりの吸光度は 0.15 以下です。

標準液 46.9 pmol/L と標準液 0 pmol/L の吸光度差は 0.01 以上です。

2. 正確性

濃度の異なる 3 種類の既知濃度管理検体を測定するとき、既知濃度に対する測定値は、80~120%の範囲です。

3. 同時再現性

濃度の異なる 3 種類の既知濃度管理検体を 4 回同時に測定するとき、変動係数(CV 値)は 15%以下です。

4. 測定範囲 (例示)

検量線範囲：46.9~3000 pmol/L

検体は 10~160 倍に適宜希釈をして測定します。10 倍希釈で測定した際の測定範囲は、10 倍(希釈倍率)を乗じて 469~30000 pmol/L となります。

5. 既知濃度管理検体に関する情報

既知濃度管理検体には、COS-1 細胞由来リコンビナントタイチンN端フラグメントをリン酸緩衝液に溶解したものを使用しています。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- (1) 検体は、感染の恐れがあるものとして十分に取扱いに注意してください。
- (2) 試薬は動物由来の物質を含みます。誤って目や口に入った場合、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流す等の応急措置をおこない、必要があれば医師の手当てを受けてください。
- (3) 標識抗体濃縮液、希釈用緩衝液、標識抗体用希釈液、濃縮洗浄液には防腐剤としてプロクリン 300 が含まれておりますので、皮膚等を刺激する場合があります。誤って目や口に入った場合、皮膚に付着した場合は速やかに水で十分に洗い流す等の応急措置をおこない、必要があれば医師の手当てを受けてください。
- (4) 停止液には硫酸が含まれておりますので目や皮膚につかないように注意してください。誤って目に入った場合は速やかに流水で洗眼した後、医師の手当てを受けてください。皮膚や衣服についた場合は速やかに洗い流してください。

2. 使用上の注意

- (1) 使用期限を過ぎた試薬は、測定値の信頼性を保証しかねますので使用しないでください。
- (2) 凍結した試薬は使用しないでください。
- (3) 製造番号が異なる製品の構成試薬を組み合わせ使用しないでください。また、同一の製造番号の構成試薬であっても注ぎ足して使用しないでください。
- (4) 開封した抗体プレートは、密閉後 2~10℃で保存し、5 週間以内に使用してください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体、検査に使用した器具類などを廃棄する前に、0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸すか、又はオートクレーブ (121℃、20 分間以上) で処理してください。
- (2) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規制に留意して処理してください。
- (3) 検体又は検体を含む溶液が飛散した場合は、感染を防止するために、0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液等でよく拭き取ってください。

4. その他

- (1) 容器等は他の目的に転用しないでください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法 : 2~10℃
2. 有効期間 : 製造後 17 ヶ月
使用期限(年月)は、外装に記載してあります。

【包装単位】 製品コード : 29501

包装 : 1キット (96テスト)

製品名	構成試薬名	包装
N-Titin 測定キット-IBL	抗体プレート	96 ウェル × 1
	標識抗体濃縮液	0.4mL × 1
	標準品	0.5mL用 × 2
	希釈用緩衝液	30mL × 1
	標識抗体用希釈液	12mL × 1
	TMB 基質液	15mL × 1
	停止液	12mL × 1
	濃縮洗浄液	50mL × 1

【別売品】 製品コード : 29502

包装 : 1セット

製品名	構成試薬名	包装
N-Titin 測定キット-IBL 用 コントロール	コントロール H	1mL用 × 2 (濃度はラベルに記載)
	コントロール L	1mL用 × 2 (濃度はラベルに記載)


【主要文献】

- 1) Rouillon J, Zocovic A, Leger T, Garcia C, Camadro JM, Udd B et al. Proteomics profiling of urine reveals specific titin fragments as biomarkers of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2014 Jul;476:111-116.
- 2) Maruyama N, Asai T, Abe C, Inada A, Kawauchi T, Miyashita K et al. Establishment of a highly sensitive sandwich ELISA for the N-terminal fragment of titin in urine. Sci Rep. 2016 Dec 19;6:39375.
- 3) Awano H, Matsumoto M, Nagai M, Shirakawa T, Maruyama N, Iijima K et al. Diagnostic and clinical significance of the titin fragment in urine of Duchenne muscular dystrophy patients. Clin Chim Acta. 2018 Jan;476:111-116.

【問い合わせ先】

株式会社 免疫生物研究所 営業部
〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1
電話番号 : 0274-50-8666
FAX 番号 : 0274-23-6055
E-mail : do-ibl@ibl-japan.co.jp

【販売元】

 **株式会社 免疫生物研究所**
群馬県藤岡市中 1091-1