



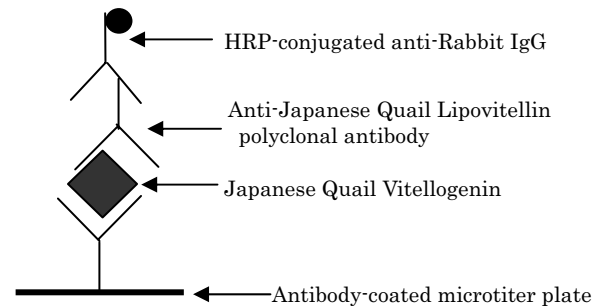
Japanese Quail Vitellogenin (Vg) ELISA Kit

In recent years, influence of Endocrine Disrupting Chemicals (EDC) upon living organisms has been one of the hot topics in the environmental science. However, evaluation methods of chemical compound species that may have EDC effects has not yet been established, and it is absolutely necessary to take action to complete such a task.

Vitellogenin (Vg), a precursor of yolk protein, is a female-specific protein that is present only in the blood of higher oviparous vertebrate organisms. Vitellogenin is normally expressed in the liver under regulation of estrogen (female sex hormone) during an egg formation process, and when it reaches a growing ovarian follicle via blood stream it contributes to the egg yolk formation. Since estrogen is known to have an effect upon male species to induce unusual expression of Vg, an ELISA screening method detecting Vg in EDC exposed male animals is the most reliable bio-screening assay system.

[Principle]

This kit is based on the ELISA method which uses two different specific anti-Japanese Quail Vg antibodies. Anti-Japanese Quail monoclonal antibody is coated on the microplate, so that Vg in the sample and standard solution is captured. Reacting with anti-Japanese Quail polyclonal antibody and HRP-conjugated anti-Rabbit IgG, the complex of coated-antibody – antigen – antibody is formed. Finally, Vg concentrations are estimated according to the coloring intensity developed with enzymatic reaction.



[Kit Contents]

(1) Antibody-coated microtiter plate (8 wells×12)	1 plate
(2) The standard, Japanese Quail Vg, lyophilized	300 μ l × 2
(3) Dilution solution	30mL × 2
(4) Anti-Japanese Quail Lipovitellin polyclonal antibody (×100)	80 μ l × 1
(5) HRP-conjugated anti-Rabbit IgG (×100)	80 μ l × 1
(6) OPD (o-phenyldiamine) tablets	2 tab.
(7) Substrate buffer	15 mL × 1
(8) Stop solution	6 mL × 1
(9) Wash solution (×20)	30 mL × 1



[Required Apparatus]

- (1) A microplate reader
- (2) A micropipet
- (3) A microplate washer

[Assay Method]

- (1) Preparation of reagents to be used

① Wash solution

Make sure that the solution does not contain any crystallized material at room temperature. Working solution is prepared by dilution of 30 mL of the stock wash solution with distilled deionized water to 570 mL. This solution is stable for 14 days when stored in a refrigerator.

② Antibody-coated microtiter plate

Add wash solution 300 μ l to each well and wait another 10 to 60 minutes.

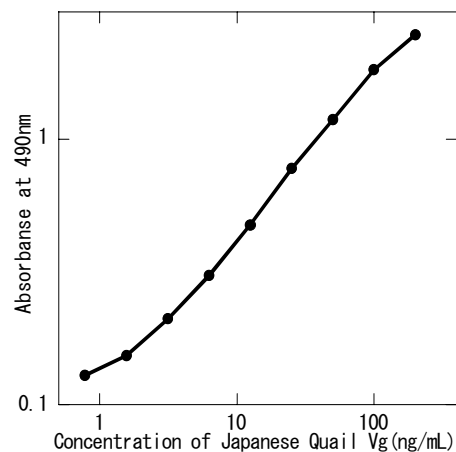
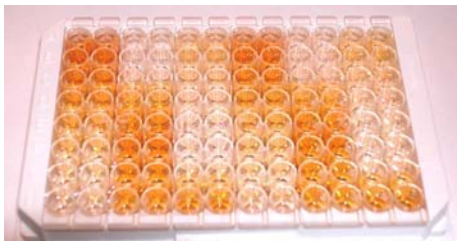
③ Standard dilution

Dilute the concentrated standard solution (200 ng/mL) to make 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 ng/mL with Dilution solution.



- ④ Anti-Japanese Quail Lipovitellin polyclonal antibody ($\times 100$)
Dilute the stock solution of $50 \mu\text{l}$ anti-Japanese Quail Lipovitellin polyclonal antibody with 5 mL of Dilution solution for 96 well reaction. Make solution just before use.
 - ⑤ HRP-conjugated anti-Rabbit IgG ($\times 100$)
Dilute the stock solution of $50 \mu\text{l}$ HRP-conjugated anti-Rabbit IgG with 5 mL Dilution solution for 96 well reaction just before use.
 - ⑥ Coloring solution
Dissolve two OPD tablets with 13 mL of Substrate buffer.
- (2) Preparation of samples to be used
The serum of Japanese Quail should be diluted more than 8 times with Dilution solution.
- (3) Assay procedure
- ① Discard the wash solution from the wells completely, but do not keep wells in dry condition for reliable data.
 - ② Apply $50 \mu\text{l}$ of each concentration of standard solution and serum samples into the wells and incubate for 1 hour.
 - ③ After the incubation, discard the reaction solution and wash with $300 \mu\text{l}$ wash solution. Repeat this washing procedure another 2 times.
 - ④ Apply $50 \mu\text{l}$ anti-Japanese Quail Lipovitellin polyclonal antibody and incubate for 1 hour.
 - ⑤ After the incubation, wash the wells 3 times with wash solution (See ③).
 - ⑥ Apply $50 \mu\text{l}$ HRP-conjugated anti-Rabbit IgG and incubate for 1 hour.
Substrate buffer should be restored to room temperature from refrigerator at this time.
 - ⑦ After the incubation, wash the wells 3 times with wash solution (See ③).
 - ⑧ Apply $100 \mu\text{l}$ Coloring solution into each well for 5 minutes in room temperature.
 - ⑨ Apply $50 \mu\text{l}$ of Stop solution for stopping the enzymatic reaction.
 - ⑩ Read absorbance with a microplate reader at 490nm or 492nm.
 - ⑪ Estimate the Japanese Quail Vitellogenin concentration of each sample using the standard curve.

[Standard curve]





[Reproducibility]

Intra- and inter-assay comparison

	N	sample	CV(%)
intra-assay	20	C	4.23
	20	D	5.69
inter-assay	20	C	8.48
	20	D	6.05

Inter-assay comparison of standard curve

	N	Vitellogenin concentration (ng/mL)	CV(%)
intra-assay	7	200	1.16
	7	100	3.23
	7	50.0	0.83
	7	25.0	1.45
	7	12.5	1.02
	7	6.25	1.93
	7	3.13	2.90
	7	1.56	2.14
	7	0.781	2.47
	7	0	2.17

[Recovery test]

In the recovery study, recoveries 99.8% and 98.3% were obtained for 8 times dilutions of the serum sample.

[Usage notes]

- ① The Reagents should be stored at recommended temperature.
The standard, Japanese Quail Vg: -80°C
Anti-Japanese Quail Lipovitellin polyclonal antibody: -80°C
HRP-conjugated anti-Rabbit IgG: -80°C
Other reagents: $2\sim 8^{\circ}\text{C}$
- ② Do not use the reagents which is expired the date of usage.
- ③ The serum of Japanese Quail should be diluted more than 8 times with Dilution solution.
- ④ Do not leave the standard, Japanese Quail Vg, for long time under room temperature.
- ⑤ Since HRP-conjugated anti-Rabbit IgG is not stable under sun light, do not leave it for long time under sun light.
- ⑥ The glassware for making coloring solution should be clean.
- ⑦ Since OPD (o-phenyldiamine) is harmful, handle with care.
- ⑧ Since Stop solution, 2N H_2SO_4 , is strong acid, handle with care.
- ⑨ The kit is constructed with well-adjusted combination in each lot. Replaced combination among different lots may cause unexpected results.
- ⑩ This kit is only for research use. Do not use for medicinal or any other purposes.
- ⑪ When using the reagents, take care to avoid them from touching to skin, mucous membrane, clothes, and getting into eye.
- ⑫ If the reagents happen to get into eye or mouth, wash out them and consult a doctor if you need.
- ⑬ After using the kit, wash your hand very carefully.



- ⑭ If you find that the packages of the reagents are broken or something wrong, do not use them.
- ⑮ When you store the reagents, make sure to avoid them from vaporizing, falling down.
- ⑯ After using the reagents, the packages should be discarded under the established rule.
- ⑰ We do not guarantee the quality of the packages and accompaniments if not used according this direction.

[Storage]

The standard, Japanese Quail Vg: -80°C

Anti-Japanese Quail Lipovitellin polyclonal antibody: -80°C

HRP-conjugated anti-Rabbit IgG: -80°C

Other reagents: $2\sim 8^{\circ}\text{C}$

Distributor



COSMO BIO Co., LTD.

Inspiration for Life Science

TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN

<http://www.cosmobio.co.jp>

e-mail : export@cosmobio.co.jp

Phone : +81-3-5632-9617

FAX : +81-3-5632-9618

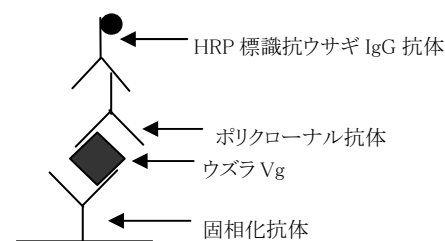
ウズラ ビテロジェニン ELISA キット

近年、内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)が生物に及ぼす影響について関心が高まっています。しかし、どのような化学物質が影響を及ぼすか明確でなく、早急に内分泌攪乱作用を持つ化学物質を確定し、有効な対策を講ずる必要があります。

卵黄前駆蛋白質であるビテロジェニン(Vg)は、卵生高等脊椎動物の血中に出現するメスに特異的な蛋白質です。Vg はエストロジェン(女性ホルモン)の作用のもとに、通常、卵黄形成期のメス肝臓で合成され、血中を介して卵内に取り込まれ卵黄蛋白質を構成します。また、エストロジェン処理をすることにより、オス血中にも誘導される蛋白質であることから、鳥類(ウズラ)を実験動物として内分泌攪乱化学物質のスクリーニング手法として注目されています。

〔測定原理〕

本キットは、ウズラ Vg に特異的な 2 種の抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法に基づいています。マイクロプレートには抗ウズラ Vg モノクローナル抗体がコートされており、検体及び標準液中のウズラ Vg と結合します。さらに、抗ウズラ Vg ポリクローナル抗体を反応させ、さらに、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を反応させると、ウェル上に固相化抗体-抗原-抗体のサンドイッチ型複合体が形成されます。よって、抗体によって結合したウズラ Vg は、HRP に触媒される発色反応により定量されます。



〔キット内容〕 注)2.4.5 は-20℃保存

1. 抗体固相化マイクロプレート	96 well	1 枚
2. ウズラ Vg 標準品 200ng/mL	300μL	2 本
3. 検体希釈液	30 mL	2 本
4. 抗ウズラ Vg ポリクローナル抗体(×100)	80μL	1 本
5. HRP-抗ウサギ IgG (×100)	80μL	1 本
6. OPD (オルトフェニレンジアミン) 錠		2 錠
7. 基質液	15 mL	1 本
8. 反応停止液	6 mL	1 本
9. 濃縮洗浄液(×20)	30 mL	1 本



〔キット以外に必要な器具・器材〕

- (1) マイクロプレートリーダー
- (2) マイクロピペット
- (3) プレートウォッシャー ※ない場合は、説明書内の操作法に従ってマニュアルで洗浄して下さい。

[使用方法]

(1) 試薬の調製

① 洗浄液

濃縮洗浄液 (×20) を室温に戻し、塩類が析出していないか確かめて下さい。

濃縮洗浄液 (×20) 20mL を精製水 380mL で希釈して用います。希釈した洗浄液は冷蔵で 14 日間安定です。

② 抗体固相化マイクロプレート

アルミシートから使用するウェルだけを取り出し、洗浄液を 300 μ L/ウェル加え室温で 10~60 分間静置します。

③ 標準液

標準品は 200ng/mL の濃度になっています。この原液を検体希釈液で 2 倍段階希釈し、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781ng/mL の各濃度を調製します。(用時調製、希釈後氷冷)

④ 抗ウズラ Vg ポリクローナル抗体 (×100) ※使用時調製して下さい。

抗ウズラ Vg ポリクローナル抗体 (×100)60 μ L を検体希釈液 6mL で希釈すると 96 ウェル分の抗体溶液を調製することができます。

④ HRP 標識抗ウサギ Vg 抗体 ※使用時調製して下さい。

HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体(×100)60 μ L を検体希釈液 6mL で希釈すると 96 ウェル分の抗体溶液を調製することができます。

⑤ 発色液 ※使用時調製して下さい。

室温に戻した基質液 6.5mL に OPD1錠を溶解します。(48 ウェル分)

(2) 試料の調製

ウズラ血清は検体希釈液にて 8 倍以上に希釈して使用して下さい。

(3) 測定操作法

① ウェル内の洗浄液を捨て、ペーパータオルなどの上でプレートを叩きよく水気を取り、速やかに次のステップに進んでください。(プレートの乾燥はデータエラーの原因になります。)

② ウェルに標準液(200~0ng/mL)及び検体を 50 μ L ずつ加え、室温で 1 時間インキュベートします。

③ 反応終了後、ウェル内の反応液を捨て、洗浄液を少なくとも 300 μ L ずつ分注し、デカントで除去します。この操作をさらに 2 回繰り返した後、ペーパータオルなどでプレートを叩きよく水気を取り、速やかに次のステップに進んで下さい。(プレートの乾燥はデータエラーの原因になります。)

④ 各ウェルに抗ウズラVgポリクローナル抗体溶液を 50 μ L ずつ加え、室温で1時間インキュベートします。

⑤ 反応終了後、③同様の洗浄操作を行います。

⑥ 各ウェルに HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体溶液を 50 μ L ずつ加え、室温で 15 分間反応させます。このとき基質液を室温に戻しておきます。

⑦ 反応終了後、③同様の洗浄操作を行います。

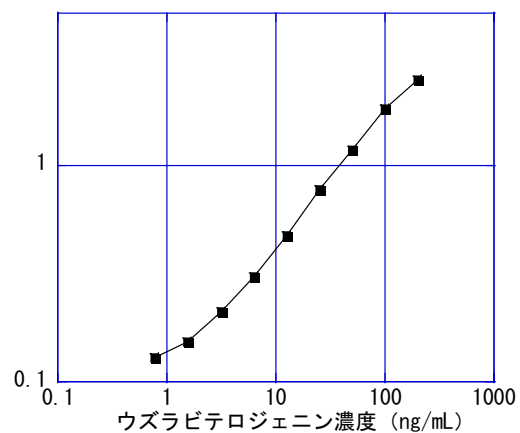
⑧ 各ウェルに発色液を 100 μ L ずつ加え、室温で 5 分間反応させます。

⑨ 各ウェルに反応停止液を 50 μ L ずつ加え、酵素反応を停止させます。各ウェルの酵素反応時間が一定になるように、発色液と同様にシステマティックに添加して下さい。反応時間が変わると発色強度に誤差が生じます。

⑩ プレートリーダーで 490nm あるいは 492nm の吸光度を測定します。

⑪ 標準曲線より、ウズラ Vg の濃度を算出します。

(3) 標準曲線



(4) 再現性

同時再現性及び日間再現性

	N	サンプル	CV (%)
同時再現性	20	C	4.23
	20	D	5.69
日間再現性	20	C	8.48
	20	D	6.05

標準曲線の同時再現性

	N	ビテロジェニン濃度 (ng/mL)	CV (%)
同時再現性	7	200	1.16
		100	3.23
		50.0	0.83
		25.0	1.45
		12.5	1.02
		6.25	1.93
		3.13	2.90
		1.56	2.14
		0.781	2.47
		0	2.17



Code No.KH049

〔添加回収試験〕

×8 ウズラオス血清に既知濃度の Vg を添加した場合:99.8%、98.3%

〔使用上の注意〕

- ① 試薬は指定された保存条件で保管して下さい。
- ② 使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
- ③ ウズラ血清は 8 倍以上に希釈して測定して下さい。
- ④ 溶解したウズラ Vg 標準品は室温で放置しないで下さい。
- ⑤ HRP 標識抗マウス IgG 抗体は特に光に不安定なので直射日光などが当たらないように注意して下さい。
- ⑥ 発色液を調製する器具は、よく洗浄したものを使用して下さい。
- ⑦ OPD (オルトフェニレンジアミン) は有害物質ですので取り扱いに注意して下さい。
- ⑧ 反応停止液は 2N 硫酸を使用していますので、取り扱いに注意して下さい。
- ⑨ 本キット内でも他のロットのものとの併用、混合による使用はしないで下さい。
- ⑩ 本品は研究用試薬であり、医薬品その他の目的にはご使用になれません。
- ⑪ 取り扱い中は皮膚、粘膜、着衣に触れたり、目に入らないように適当な措置を行なって下さい。
- ⑫ 試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流すなどの応急処置を行ない、必要があれば医師の手当てを受けて下さい。
- ⑬ 取り扱い後には手洗いを十分に行なって下さい。
- ⑭ 容器の破損、異物混入など異常が認められたものは使用しないで下さい。
- ⑮ 使用後の容器は廃棄物に関する規定に従って処理して下さい。
- ⑯ 容器、付属品などの他目的への転用は保証できません。

〔貯法〕

標準品 (STD)、抗ウズラ Vg ポリクローナル抗体(×100)、HRP-抗ウサギ IgG (×100) : 冷凍-20℃保存
その他: 2~8℃ (冷暗所保存)



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619

TEL : (03) 5632-9620