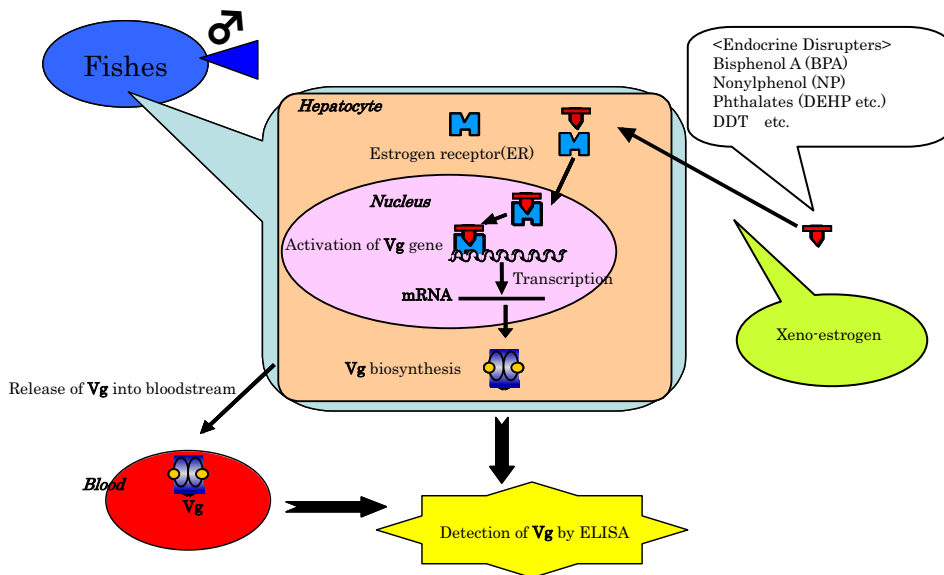




Medaka Vitellogenin (Vg) ELISA Kit

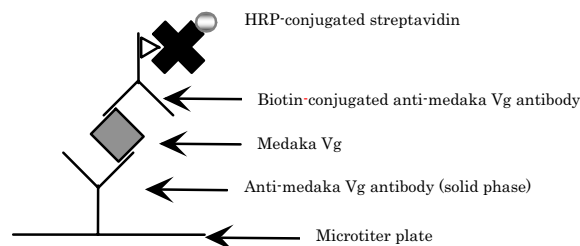
In recent years the influence of Endocrin-Disrupting-Chemicals (EDC) upon living organisms has been one of the hot topics in environmental study. However, determination of the chemical compound species that have EDC-like influence has not yet been completed, and it is absolutely necessary to take actions to complete such a task.

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



[Principle]

This kit is based on the ELISA method which is used with specific anti- medaka polyclonal antibody. Anti- medaka polyclonal antibody is coated on the microplate, so that Vg in the sample and standard is captured. After reacting biotin-conjugated anti-medaka polyclonal antibody and HRP-conjugated streptavidin, the complex of coated-antibody—antigen—antibody is formed. Finally, you could measure the Vg concentration depend on the coloring strength which has developed with enzymatic reaction.





[Kit Contents]

(1) Antibody-coated microtiter plate (8 wells×12)	1 plate
(2) The standard, Medaka Vg, lyophilized	200µl × 2
(3) Dilution solution	30mL × 2
(4) Biotin conjugated anti-medaka Vg antibody (×100)	80µl × 1
(5) HRP-conjugated streptavidin (×500)	20µl × 1
(6) OPD (o-phenylenediamin) tablets	2 tab.
(7) Substrate buffer	15 mL × 1
(8) Stop solution	6 mL × 1
(9) Wash solution (×20)	30 mL × 1

[Required Apparatuses]

- (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, upon reaching 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

Apply 300µL in each well and wait another 10 to 60 minutes.

- ③ Standard dilution

Dilute the concentrated standard solution (256 ng/mL) to make 256, 64, 16, 4, 1 ng/mL with Dilution solution.

- ④ Biotin conjugated anti-medaka Vg polyclonal antibody (×100)

The stock Biotin conjugated anti-medaka Vg polyclonal antibody can be prepared for 96 well reaction upon dilution of 60µL stock solution with 6mL Dilution solution just before use.

- ⑤ HRP-conjugated Streptavidin (×500)

The stock HRP-conjugated Streptavidin can be prepared for 96 well reaction upon dilution of 12µL stock solution with 6mL Dilution solution just before use.

- ⑥ Coloring solution

Dissolve two OPD tablets with 13 mL of Substrate buffer.

- (2) Preparation of samples to be used

The homogenate of Medaka liver should be diluted more than 10 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.

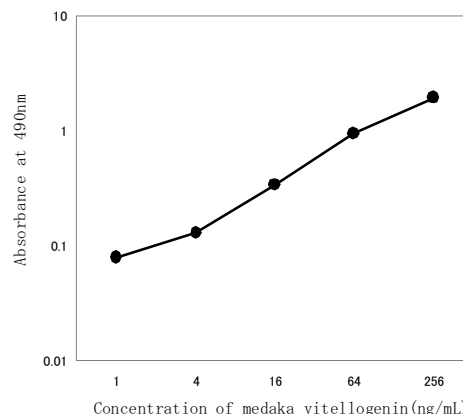
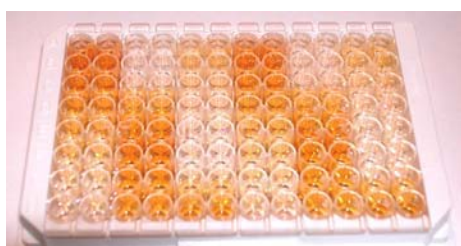
- ② Apply 50µL of each concentration of standard solution and samples into the wells and incubate for 2 hours.

- ③ After incubation, discard the reaction solution and wash with 300µL wash solution. Repeat this washing procedure another 2 times.



- ④ Apply 50 μ l Biotin conjugated anti-medaka Vg polyclonal antibody and incubate for 1 hour.
- ⑤ After the incubation, wash the well 3 times with wash solution (See ③).
- ⑥ Apply 50 μ l HRP-conjugated streptavidin and incubate for 1 hour.
Substrate buffer should be restored to room temperature from refrigerator at this time.
- ⑦ After the incubation, wash the well 3 times with wash solution (See ③).
- ⑧ Apply 100 μ l Coloring solution into each well for 5 minutes in room temperature.
- ⑨ Apply 50 μ l of Stop solution for stopping the enzymatic reaction.
- ⑩ Read absorbance with a microplate reader at 490nm or 492nm.
- ⑪ Measure the medaka Vg concentration using standard curve.

[Standard curve]



[Reproducibilities]

Inter assay (n=20)

Sample	A	B
Mean (ng/mL)	30.1	14.0
SD	1.4	0.4
CV (%)	4.7	3.1

Intra assay (n=20)

Sample	A	B
Mean (ng/mL)	32.5	14.8
SD	1.9	1.2
CV (%)	6.0	8.4

[Specificity: cross reactivity]

	Medaka	Carp	Mummichog
Immunoblotting	(+)	(-)	(+)



[Recovery test]

In the recovery study, the recovery percentages 106 was obtained for 10 times dilutions of the liver homogenate sample.

[Usage notes]

- ① The Reagents should be stored at recommended temperature.
The standard, medaka Vg: -80°C , Other reagents: $2\sim 8^{\circ}\text{C}$
- ② Do not use the reagents which is expired the date of usage.
- ③ Do not leave the standard, medaka Vg, for long time under room temperature.
- ④ Biotin conjugated anti-medaka Vg polyclonal antibody and HRP-conjugated streptavidin is not stable under sun light, so that do not leave it for long time under sun light.
- ⑤ The apparatus for making coloring solution should be clean one.
- ⑥ OPD (o-phenyldiamin) is harmful, so that take good care to it.
- ⑦ Stop solution, 2N H_2SO_4 , is strong acid, so that take good care to it.
- ⑧ The kit is constructed with well-adjusted combination for each lot. Replace combination among different lots may cause unexpected results.
- ⑨ This kit is only for research use. Do not use for medicine or any other things.
- ⑩ When using the reagents, take care to avoid them from touching to skin, mucous membrane, clothes, and getting into eye.
- ⑪ If the reagents happen to get into eye or mouth, wash out them and go to see a doctor if you need.
- ⑫ After using the kit, wash your hand very carefully.
- ⑬ If you find that the packages of the reagents are broken or something trouble, do not use them.
- ⑭ When you store the reagents, make sure to avoid them from vaporizing, falling down.
- ⑮ After using the reagents, the packages should be discarded under established rule.
- ⑯ We can not grantee for any other usage of the packages and the accompaniments.

[Strage]

The standard, medaka Vg: -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

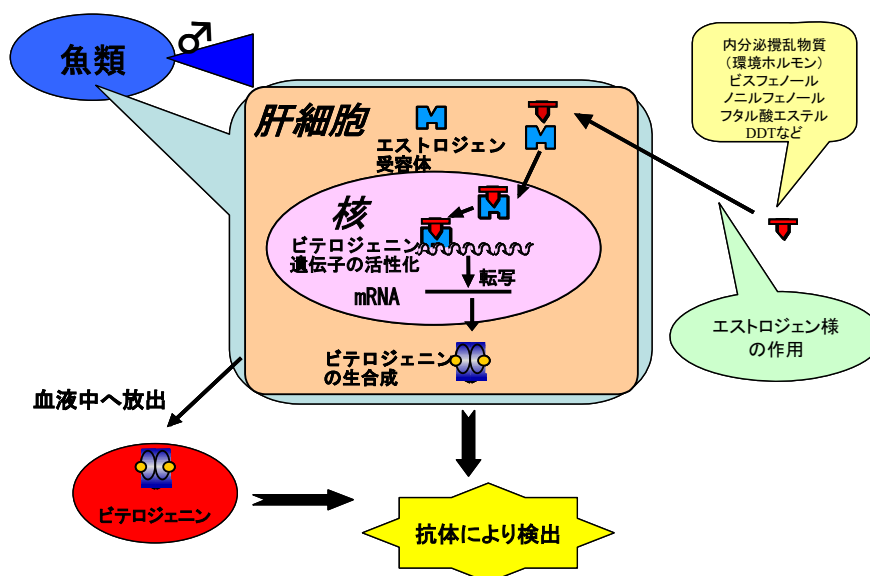
Phone : +81-3-5632-9617

FAX : +81-3-5632-9618

メダカ ビテロジェニン ELISA キット

〔はじめに〕

卵黄前駆蛋白物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、近年、河川などの環境水中にある内分泌攪乱物質のバイオマーカーとして注目されています。本 ELISA キットは、簡便に Vg を測定することができます。(環境庁も平成 10 年 5 月 7 日に報告した SPEED'98/JEA の中で唯一実態調査指標として、この「ビテロジェニン(Vg)」を挙げています)



〔キット内容〕

- | | |
|------------------------------------|--------------------------|
| 1. 抗体固相化マイクロプレート | 1 枚 |
| 2. メダカ Vg 標準品 | 200 μ L \times 2 本 |
| 3. 検体希釈液 | 30mL \times 2 本 |
| 4. ビオチン化抗メダカ Vg 抗体 (\times 100) | 80 μ L \times 1 本 |
| 5. HRP-streptアビジン (\times 500) | 20 μ L \times 1 本 |
| 6. 基質液 | 15mL \times 1 本 |
| 7. OPD(オルトフェニレンジアミン) 錠 | 2 錠 |
| 8. 濃縮洗浄液 (\times 20) | 30mL \times 1 本 |
| 9. 反応停止液 | 6mL \times 1 本 |

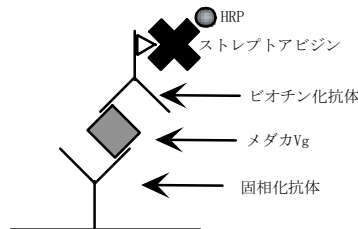
[キット以外に必要な器具・器材]

- (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。

[測定原理]

メダカ Vg に特異的な抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法



[操作法]

(1) 試薬の調製

① 洗浄液

濃縮洗浄液(×20)を室温に戻し、塩類が沈殿していないか確かめて下さい。
濃縮洗浄液(×20)を精製水で 20 倍希釈して用います。
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取り出し、洗浄液を 300 μL/ウェル加え、室温で 10~60 分間静置します。

③ 標準液

メダカ Vg 標準品は 256ng/mL の標準液となっています。この原液を検体希釈液で 4 倍段階希釈し、64、16、4、1ng/mL の各濃度を調製します。

(4倍段階希釈方法例)

濃度 (ng/mL)	64	16	4	1
標準液 (256ng/mL)	50	50	50	50
検体希釈液	150	150	150	150

④ ビオチン化抗メダカ Vg 抗体(×100) ※使用時調製して下さい。

ビオチン化抗メダカ Vg 抗体(×100) 30 μL を検体希釈液 3mL で希釈すると 48 ウェル分のビオチン化抗メダカ Vg 抗体溶液を調製することができます。

⑤ HRP-streptavidin(×500) ※使用時調製して下さい。

HRP-streptavidin(×500) 6 μL を検体希釈液 3mL で希釈すると 48 ウェル分の HRP-streptavidin 溶液を調製することができます。

⑥ 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 OPD 錠を 1 錠溶解します。(48 ウェル分)

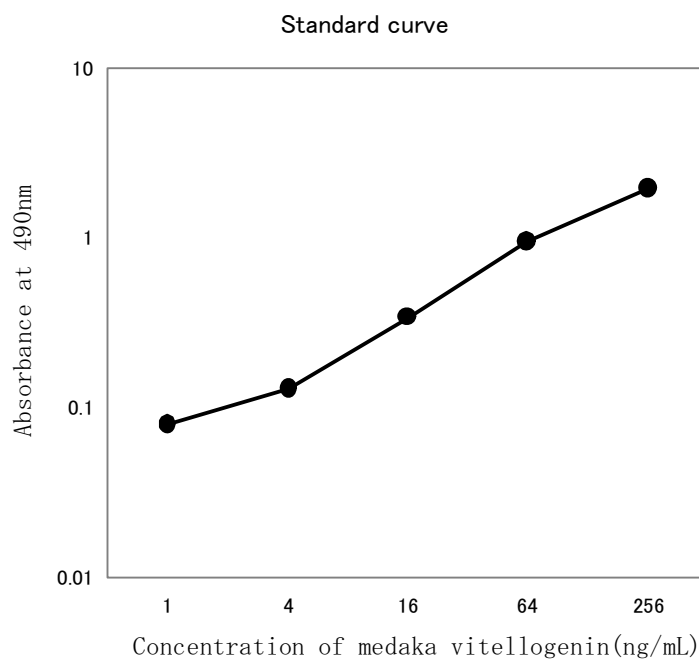
(2) 試料の調製

メダカ肝臓ホモジネート上清は検体希釈液にて 10 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。)
- ② ウェルに標準液(256~0ng/mL)及び検体を 50 μ L ずつ加え、室温で 2 時間インキュベートします。
※0ng/mL には検体希釈液を入れて下さい。
- 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 各ウェルにビオチン化抗メダカ Vg 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-ストレプトアビジン溶液を 50 μ L ずつ加え、室温で 1 時間インキュベートします。
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 ずつシステマティックに加え、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 490 あるいは 492nm の吸光度を測定します。
- ⑪ 標準曲線より、メダカ Vg の濃度を算出します。

(4) 標準曲線



〔実測範囲〕

4~256ng/mL

〔測定範囲〕

40~2560ng/mL

メダカ肝臓ホモジネート上清 10 倍希釈にて測定した場合

〔使用上の注意〕

- ① 試薬は指定された保存条件(標準品: -80°C 、その他: $2\sim 8^{\circ}\text{C}$)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 溶解したメダカ Vg 標準品は室温で放置しないで下さい。
- ④ ビオチン化抗メダカ Vg 抗体及び、HRP-ストレプトアビジン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ください。
- ⑤ 発色液を調製する器具は、よく洗浄した物を使用してください。
- ⑥ 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。
- ⑦ 反応停止液は 2N の硫酸を使用していますので取り扱いに注意して下さい。
- ⑧ 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。
- ⑨ 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なれません。
- ⑩ 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切な措置を行って下さい。
- ⑪ 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い、必要があれば医師の手当てを受けて下さい。
- ⑫ 取り扱い後には手洗いを十分に行って下さい。
- ⑬ 容器の破損、異物混入など異常が認められた物は使用しないで下さい。
- ⑭ 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。
- ⑮ 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〕 メダカ Vg 標準品 : -80°C 、その他 : $2\sim 8^{\circ}\text{C}$

〔包装〕 96 ウェル用

【参考文献】

1. H. Yokota, H. Morita, N. Nakano, IJ. Kang, H. Tadokoro, Y. Oshima, T. Honjo and K. Kobayashi (2001)
Jpn. J. Environ. Toxicol. 4(2) 87-98