



コスモ・バイオ株式会社

本プロトコールは参考用の資料になります。商品ご購入の際は必ず商品に添付されている資料をご参照ください。

研究用試薬

YK170 17 - Estradiol EIA

(環境水・培養液用)

取扱説明書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目 次

・ はじめに	2
・ 特 徵	3
・ キットの構成	4
・ 操作法	5 ~ 6
・ 操作上の注意	7
・ 基本性能	8 ~ 10
・ 貯蔵法および有効期間	11
・ 文献	11

YK170: 17 -Estradiol EIA キット（環境水・培養液用）

．はじめに

ヒトのエストロゲンとして現在、20種類以上のものが知られていますが、その中で人体に最も多量に存在するのは、エストロン(E1)、エストラジオール(E2)およびエストリオール(E3)です。これら3種類のエストロゲンが最も安定であり、他の型のエストロゲンは速やかにこれら3種類のいずれかの型に代謝されることが知られています。従来、市販のエストロゲンイムノアッセイキットはいずれも血中エストロゲンの測定用として開発されたものであります。従って河川、排水、および培養液中のエストロゲンの測定には適していませんでした。本イムノアッセイキットは環境中（特に河川、排水中）、および培養液中の17 -エストラジオールの検出、測定用に開発したものであり、簡便で特異的かつ高感度のアッセイ系であります。

YK170 17 -Estradiol EIA キット（環境水・培養液用）

17 -エストラジオール（環境水・培養液）測定用です。	内容
16.5 ~ 4000 pg/mL の範囲で測定できます。	1)測定プレート
41 検体を duplicate で測定できます。	2)標準品
測定は 17 ~ 19 時間（4 ）と 4 時間で終了します。	3)標識抗原
環境水および培養液サンプルの測定ができます。 検体量は 100 µL です。	4)特異抗体
プレートは 1 列（8 ウエル）毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。	5)SA-HRP 溶液
	6)基質溶解液
	7)OPD 錠
	8)酵素反応停止液
	9)緩衝液
	10)濃縮洗浄液
	11)プレート密閉用シール

保存と安定性 2 ~ 8 で保存してください。

製造日より 24 ヶ月間は安定です。

・ 特 徵

本キットは環境水および培養液中に含まれる 17 -エストラジオール濃度を定量的に測定するためのものです。本キットによる 17 -エストラジオールの測定は簡便でしかも特異性、定量性に優れています。なお、表示の重量は絶対量を示しております。

<特異性>

本キットはテストステロン、エストロン、プロゲステロン、エストリオールおよびコレステロールに対してほとんど交差反応性が認められません。

<測定原理>

本キットによる 17 -エストラジオールの測定は競合法に基づいて行います。測定プレート(96 ウエル)の各ウエルにはヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されています。この各ウエルにビオチン化 17 -エストラジオール、標準液または検体、ウサギ抗 17 -エストラジオール抗体を順次加えて競合反応させます。これに HRP 結合ストレプトアビシンを加え、ウエル上に HRP 結合ストレプトアビシン-ビオチン化抗原-抗体複合体を形成させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中の 17 -エストラジオール濃度を求めることができます。

・ キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1. 測定プレート		96 ウエル プレート	ヤギ抗ウサギ IgG 抗体固定化プレート
2. 標準品	凍結乾燥品	400 ng	17 -エストラジオール(ごく微量です ので目には見えません)
3. 標識抗原	凍結乾燥品		ビオチン化 17 -エストラジオール
4. 特異抗体	凍結乾燥品		ウサギ抗 17 -エストラジオール抗体
5. SA-HRP 溶液	液状	12 mL	安定剤を含むトリス塩酸緩衝液に溶解 した HRP 結合ストレプトアビジン
6. 基質溶解液	液状	24 mL	0.015% 過酸化水素を含む 0.1 M クエ ン酸緩衝液(pH 5.0)
7. OPD 錠	錠剤		o-フェニレンジアミン
8. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1M 硫酸溶液
9. 緩衝液	液状	25 mL	非特異的反応除去剤を含む リン酸緩衝液
10. 濃縮洗浄液	液状	50 mL	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
11. プレート密閉用シール			3 枚

・ 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。(注意: キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。)

< 使用器具および装置 >

1. マイクロピペットおよびチップ(25 µL ~ 1 mL); 8連または12連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計(測定波長 490 nm (492 nm でも可)で吸光度 2.5まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するポリプロピレン製の試験管またはガラス試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連續分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー(1000 mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

< 試薬の調製 >

1. 標準液の調製法: 標準品の容器に 70%エタノール(非添付)1 mL を加え内容物を溶解させる。この溶液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 9.9 mL で希釈し 4,000 pg/mL の標準液を調製する。この標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.4 mL で希釈し 1,333 pg/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、444.4、148.1、49.4、16.5 pg/mL の各標準液を調製する。0 pg/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。

< 測定範囲 > 有効測定範囲 16.5 pg/mL ~ 4,000 pg/mL

16.5 pg/mL を下回るような低値の検体が予想される場合、検出限度としてさらに 16.5 pg/mL の標準液を 3 倍希釈し、5.5 pg/mL の標準液を設けることができます。この場合、5.5 pg/mL ~ 16.5 pg/mL の範囲の測定値の精度は上記有効測定範囲ほど高くはありませんので、概算値として使用してください。

2. 標識抗原溶液の調製法: 標識抗原の容器に蒸留水 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 特異抗体溶液の調製法: 特異抗体の容器に蒸留水 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。

4. 発色剤溶液の調製法：使用時に基質溶解液 11 mL に OPD 錠 1 錠を加え溶解させ使用する。
5. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50 mL (全量)を蒸留水 950 mL にて希釀し使用する。
6. その他の試薬はそのまま <測定操作> に従って使用する。

<測定操作>

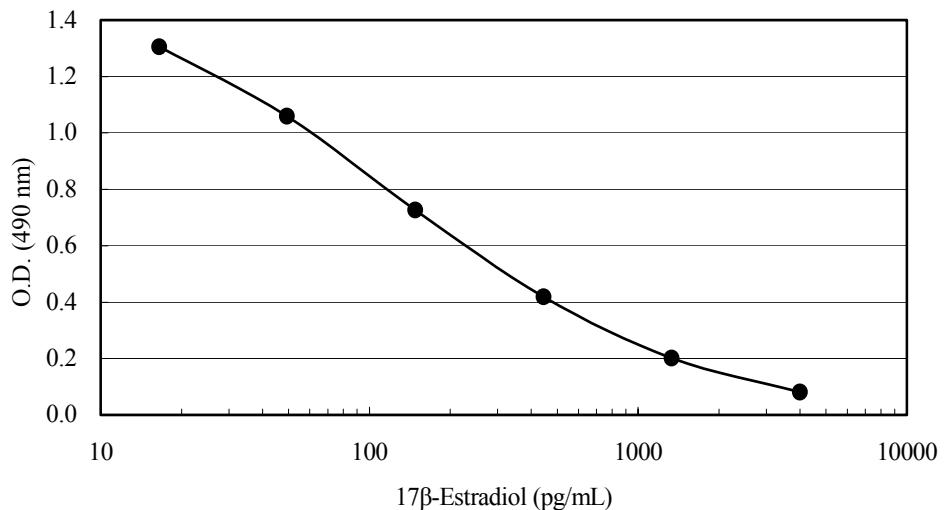
1. キット内容を室温(20~30 ℃)に戻す。
標準液、標識抗原溶液、特異抗体溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに標識抗原溶液 50 μL を入れ、ついで標準液または検体 100 μL を加え、さらに特異抗体溶液 50 μL を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、4 ℃ で一晩(17~19 時間)静置する。
5. 測定プレートを室温に戻した後(約 1 時間) 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 2 時間振とうする。
8. 7.の反応終了直前に OPD 錠を基質溶解液で溶解し、発色剤溶液を調製する。
9. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
10. 各ウエルに発色剤溶液 100 μL を加え、室温で 20 分間反応させる。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 490 nm (492 nm でも可) の吸光度を測定する。
13. 市販のソフトウェアを用いて、4 (or 5) - Parameter、もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、 $^{17}\text{-エストラジオール}$ 標準液の各濃度(7 ポイント)の測定値から標準曲線を作成し、検体の $^{17}\text{-エストラジオール}$ 濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸(Log 側)に標準液の濃度を、縦軸(linear 側)に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、 $^{17}\text{-エストラジオール}$ の濃度を読み取る。

・ 操作上の注意

1. 検体は直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は適宜小分けして、
-30℃以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないように
してください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品、標識抗原および特異
抗体は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、
調製後の標準品、標識抗原および特異抗体は適宜小分けして、-30℃以下で
凍結保存してください（約1ヶ月は安定です）。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製
時に溶解します。
4. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えるので正確に行ってください。
また検体をウエルに注入する場合は、各検体ごとに新しいチップを使い、
検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するとき
は、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
5. 4000 pg/mLを超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて
希釈して測定してください。
6. 室温で反応中は必ずマイクロプレート用振とう器を用い振とうしてください（呈色反応は除く）。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはね
ないようゆっくりと行ってください。
7. 測定はすべて2重測定で行ってください。
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
9. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度など
でわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごと
に作成してください。
10. 各試薬の保存もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意
してください。
11. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでく
ださい。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<環境水A>

Added 17β-Estradiol (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	9.6		
7.8	16.5	17.4	94.8
125.0	147.9	134.6	109.9
2000.0	2572.5	2009.6	128.0

<環境水B>

Added 17β-Estradiol (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	5.1		
7.8	14.7	12.9	114.0
125.0	132.0	130.1	101.5
2000.0	2669.1	2005.1	133.1

<培養液A(フェノールレッド+)>

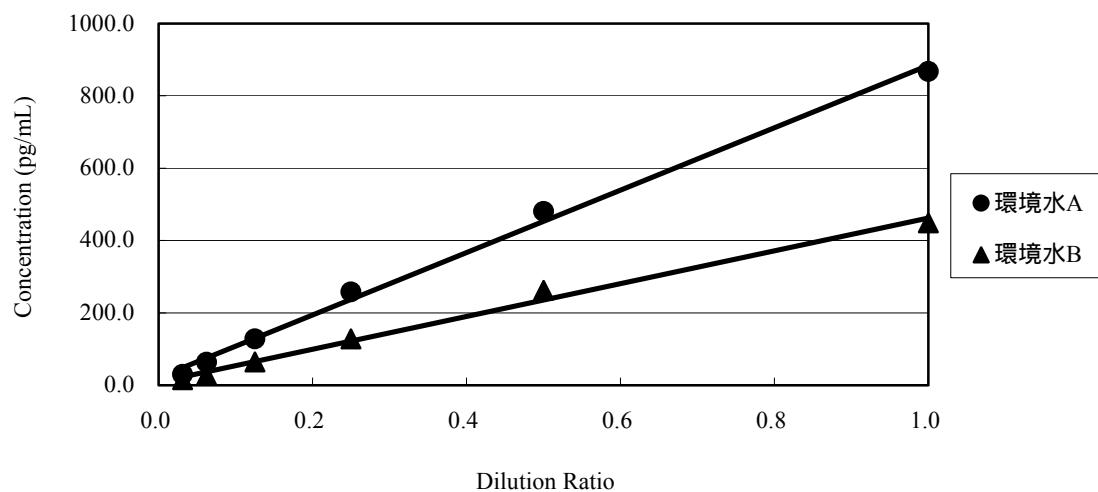
Added 17β-Estradiol (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	19.7		
20.0	35.1	39.7	88.4
100.0	112.4	119.7	93.9
1000.0	1003.9	1019.7	98.5

<培養液B(フェノールレッド-) >

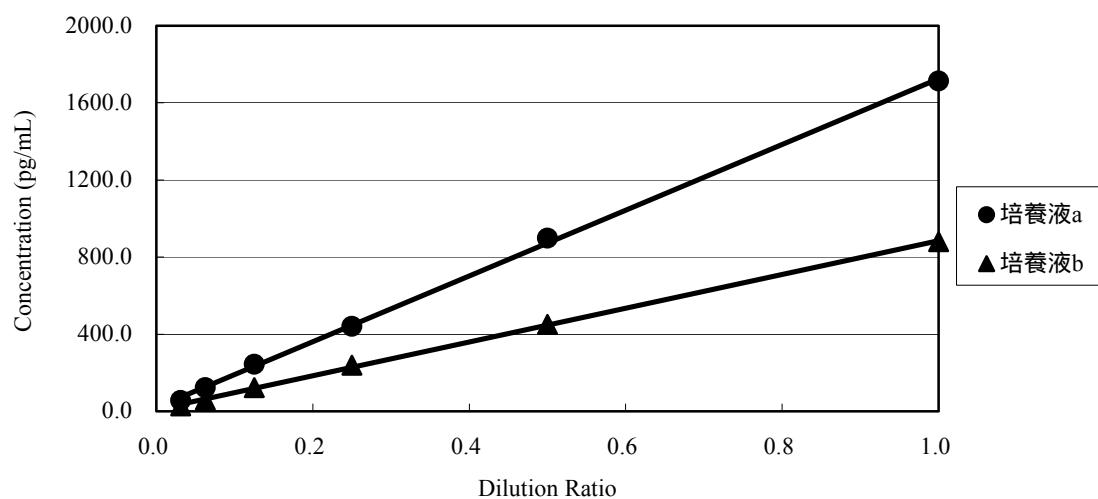
Added 17 β -Estradiol (pg/ml)	Observed (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
0.0	24.6		
20.0	41.2	44.6	92.4
100.0	127.9	124.6	102.6
1000.0	1083.4	1024.6	105.7

<希釈試験>

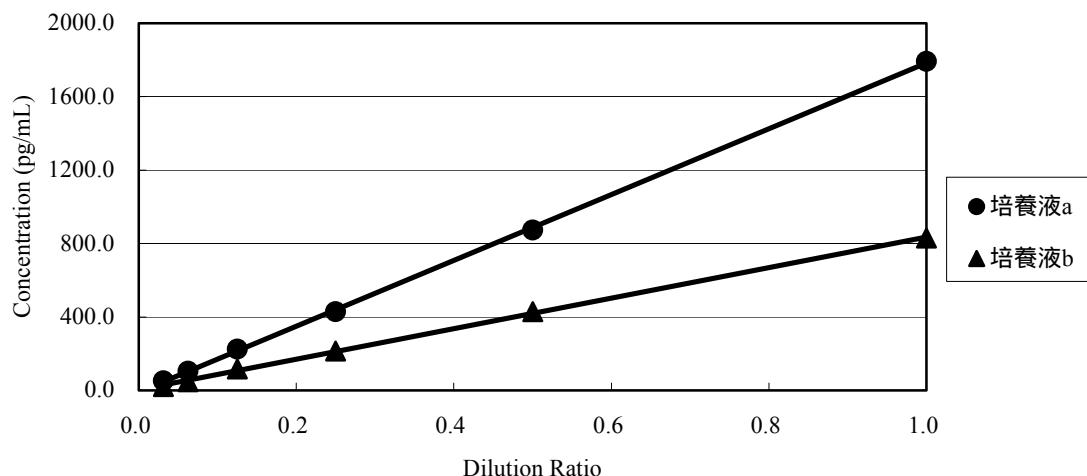
<環境水>



<培養液A(フェノールレッド+) >



<培養液B(フェノールレッド-) >



<交差反応性>

化合物	交差反応性 (%)
17 β -Estradiol	100
Testosterone	0.28
Estrone	0.94
Progesterone	0.01
d-Aldosterone	0.00
Estriol	0.16
(+)-4-Androsterone-3,17-dione	0.02
Trans-Androsterone	0.02
Mestranol	0.14
Ethyneestradiol	0.03
2-Methoxyestradiol	1.79
Hexestrol	0.00
-Estradiol 17-(β -D-Glucuronide)	0.00
-Estradiol 3-Glucuronide 17-Sulfate	0.02
-Estradiol 3-(β -D-Glucuronide)	37.44
-Estradiol 3-Sulfate	11.05
-Estradiol 3-Sulfate 17-Glucuronide	0.00
-Estradiol 3,7-Disulfate	0.00
Cholesterol	0.00

<再現性試験>

同時再現性

環境水 CV(%) 4.6 ~ 10.0

培養液 CV(%) 2.7 ~ 4.4

日差再現性

環境水 CV(%) 2.8 ~ 13.6

培養液 CV(%) 5.3 ~ 11.4

. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

遮光し、2~8 ℃にて保存してください。

<有効期間>

製造日より 24 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

<包装>

1 キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

. 文 献

1. Goda, Y. et al. : Development of the ELISA for detection of hormone-disrupting chemicals. WATER SCIENCE TECHNOLOGY 42(7-8): 81-88, 2000
2. Goda, Y. et al. : Development of the ELISA for detection of estrogenic hormones in environment. IWA 2nd World Water Congress, Berlin, Germany IWA CD-ROM: 269, 2001
3. Nichols, D. J. et al. : Runoff of estrogen hormone 17 β -estradiol from poultry litter applied to pasture. JOURNAL OF ENVIRONMENTAL QUALITY 26(4): 1002-1006, 1997

<お問合せ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX:0544-22-2770 TEL:0544-22-2771

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2010年7月8日改訂