

略号 FKA

カタログ番号 FKA-402

品名 抗 コルチゾール (Compd. F)

本製品は Cortisol-21-Succ-BSA をウサギに免疫して得た
ポリクローナル抗体です。

ヒト ウマ ウシ その他哺乳類 魚類と反応する。

内容 : 本バイアル中にRIAで2000 tubeの測定が可能な抗体量を
含む 凍結乾燥品。本バイアルに蒸留水 4ml 加えて溶解して下さい。
更に測定時に緩衝液で希釈 (抗体1ml : 緩衝液124ml) して使用して下さい。
0.25%BSA 10mM PBS (pH7.8) に調整 防腐剤を含まず。
保存 : 製品並びに溶解液は4Cで保存して下さい。溶解調整液を長期保存する場合は
分注して-20C以下にて保存して下さい。凍結融解を繰り返さないで下さい。

The Cross Reactivities of Antiserum against
Cortisol-21-succinate-BSA

Cortisol	100%
Deoxycortisone (Compd. S)	12%
Corticosterone	8%
18-OH-Deoxycorticosterone	8.5%
17 α -OH-Progesterone	5%
Progesterone	2%
Aldosterone	0.5%
Androstenedione	0.4%
Testosterone	0.1%
DHA	< 0.01%
Estradiol	< 0.01%

COSMO FKA 402 と 404 の RIA と EIA の
特性表

	COSMO FKA 402		COSMO FKA 404	
	RIA	ELISA	RIA	ELISA
抗体作成抗原 ウサギ番号 抗体希釈倍	F-21-Suc-BSA No. 18 x20,000	F-21-Suc-BSA No. 18 x40,000	F-3-CMO-BSA No. 302 x40,000	F-3-CMO-BSA No. 302 x80,000
標識	F-1,2- ³ H 10,000dpm	F-21-HRP(1:1) COSMO FKA 401 x3000	F-1,2- ³ H 10,000dpm	F-3-HRP(1:1) COSMO FKA 403 x500
B ₀ /T & O.D. F dosage of B ₀ /2	41 % 300pg	1.28 (OD) 1000 pg	35 % 390 pg	0.26 (OD) 1500 pg
ステロイド	交 差 反 応 率			
Cortisol	100 %	100 %	100 %	100 %
S	31 %	11.8 %	16.6 %	6.4 %
Cortisone	6.0 %	2.9 %	11.0 %	3.3 %
B	3.6 %	1.2 %	1.7 %	1.33 %
17 α -OHP ₄	13.0 %	8.0 %	0.9 %	1.66 %
P ₄	2.0 %	1.6 %	0.1 %	0.05 %
Aldosterone	1.0 %	0.2 %	0.03%	0.03%
P-17 α ,20 β ,21 -triol	0.26 %	0.30 %	2.2 %	0.03 %
P-17 α ,20 β - diol	0.4 %	0.55 %	1.2 %	0.05 %
11-Keto-T	0.1 %	0.0 %	0.05%	0.0 %
T	0.05 %	0.1 %	0.01%	0.01 %
18-OH-B	0.10%	0.10 %	0.09%	0.03 %
E ₂	0.01%	0.01 %	0.015%	0.01 %

ステロイドのELISA (一般的な方法)

準備するもの

マイクロプレート リーダー

分注するもの: Dispenser 連続分注できるものがあると良い

緩衝液: 0.05M Borate Buffer: 硼酸3.1gを蒸留水900mlに溶かし, NaOH液を滴下してpH 7.8まで加え, 全量を1 liter にする。Phosphate bufferよりくさらないので好んで用いている。

Assay Buffer: この Borate Buffer 100mlにBSA 0.2gとThimerosal 0.01gをくわえる。この Assay Bufferは抗体希釈や標識希釈および検体希釈に用いる。

第二抗体固相化プレートの作成。

第二抗体として

Steroidの抗体はウサギで免疫した抗体であるので, anti Rabbit IgG(H+L) Goat affinity antibodyをもちいる。メーカーはコスモバイオ 16,000(1.5mg), Tago Inc. 15,000(1ml), Bethul 17,000(1mg), EY Labo 16,000(2ml), Cappel 13,000(1mg), VEC 15,000(1.5mg), Bethul Labo. 17,000円(1mg)大体同じである。0.05MolのNa₂CO₃と0.05MolのNaHCO₃を用いてpH 9.7にする。

第二抗体をこの液で15μg/mlの液を作り, 100μlずついれて, シールを貼り15°Cで二夜(室温でも可) 放置する。この液をすいとして0.45μmメンブレンフィルターで濾過後第二抗体 20⁰μg/mlを1/10¹⁰⁰量をくわえて次のプレートに用いる。プレートは生食液で3回洗ってから, 0.1% BSA 3% Sucrose 0.05M Phosphate Buffer(pH7.4) 200μlをくわえシールをして1-2日放置してそのまま4°Cで保存するか, または液をすててかけぼした後4°Cで保存する。

標準液: Steroidをエタノールに溶かして1000μg/mlの液をつくり, Assay bufferで10,000 ng/ml, 3,000ng/ml, 1,000ng/ml, 300ng/ml, 100ng/ml, 30ng/ml, 10ng/ml, 3ng/ml, 1ng/ml, 0.3 ng/ml, 0.1ng/mlをつくる。胆汁酸ではモル濃度を用いている。

サンプル: 血清中のBinding Globulinに影響を受け安いCortisol, Corticosteroneや濃度のうすいSteroidsはetherまたはCH₂Cl₂で抽出乾固後 Assay bufferで溶かして測定に用いる

OPD 試薬: 0.2 Mol ぐえん酸Buffer pH 4.5に過酸化水素を0.01%加えたえきを作っておく。

用事 o-Phenylenediamine(OPD) 0.5mg/ml液を作る。

6N 硫酸: 蒸留水80mlを氷でひやしながらかくはんしつつ硫酸16mlを加える

予試験: 第二抗体固相化プレートにステロイドのAssay Buffer液 0.1ng, 100ng, 1000ng/mlの液 50μlを加え, HRPラベルSteroidを指定濃度とその前後の濃度を各50μl加える。最後に抗体を指定濃度とその前後の濃度を各50μl加える。標準曲線の下がりのよい条件を見つける。

ELISA

第二抗体固相化プレートにStandard Assay Buffer 0, 0.1ng, 0.3ng 1ng 3ng 10ng 30ng and 100ng/mlを50μlを加え, 次にHRPラベルSteroidの至適濃度を50μlを加える。最後に予試験で至適の抗体濃度を50μlを加え軽く振とうする。シールを貼り室温で3時間以上放置するか, 冷蔵庫で1夜放置する。2夜でも可。液を捨てた後, 生食水300mlで3回洗い, よく水切りをしOPD試薬を150μlずつ加える。30分後に6N硫酸 50μlを加え反応を止める。

マイクロプレートリーダーを用いて波長492nmで測定する。普通は二重測定(2well)で前の2列に0, 0, 0.1, 0.1, 0.3, 0.3, 1, 1, 3, 3, 10, 10, 30, 30, 100, 100ng/mlの16穴をもちい3列目からサンプルをいれる。通常はOPD試薬が無色であれば Blankは殆どゼロであるので省略できる。なおBlankは抗体を入れないものを言う。

計算: 吸光度(optical density:OD)でSteroid量をSemilogにかく。0pgのODを100%として書くと色の濃さが判らない。測定法の注意: Assay Bufferやサンプルにアジ化ナトリウムが入っているとペルオキシダーゼが失活するので不可。ペルオキシダーゼ標識Steroidと抗 Steroid 抗体液は200検体分ずつ小分けしてFreezしておく。なおHRPラベルと抗体とは組合せが悪いと感度精度がおちる。二重測定間の差はPlateとuserの手技によるので5%以下になるように, またPlasmaやincubate medium をpoolして測定値の変動をcheckしましょう

FKA 402

11/16/1994 404

A. Kambegawa.

phone:044-812-8628

コスモ・バイオ(株)
南斎部

2002. 5. 7 18:54 P. 1

404 (anti cortisol-3) の抗体は プレドニソロン と
60% Cross します。 故に プレドニソロン を投与した
とき、この 404 (cortisol-3) の抗体で コルチゾール を測ると
プレドニソロンの 血中濃度 推移が 出て、本来の コルチゾール
を測ることができません。

402 (anti cortisol-21) の抗体は プレドニソロン と前者の
抗体よりも 交叉が 少ないですが、なお 33% 交差します。
これは コルチゾール と プレドニソロン は 構造が 殆んど
同じ (二重結合が Δ^1 にあるのみ) のため 高速液体クロマト
で分けて測るより 仕方がありません。

FKA 坦史者

神戸川明