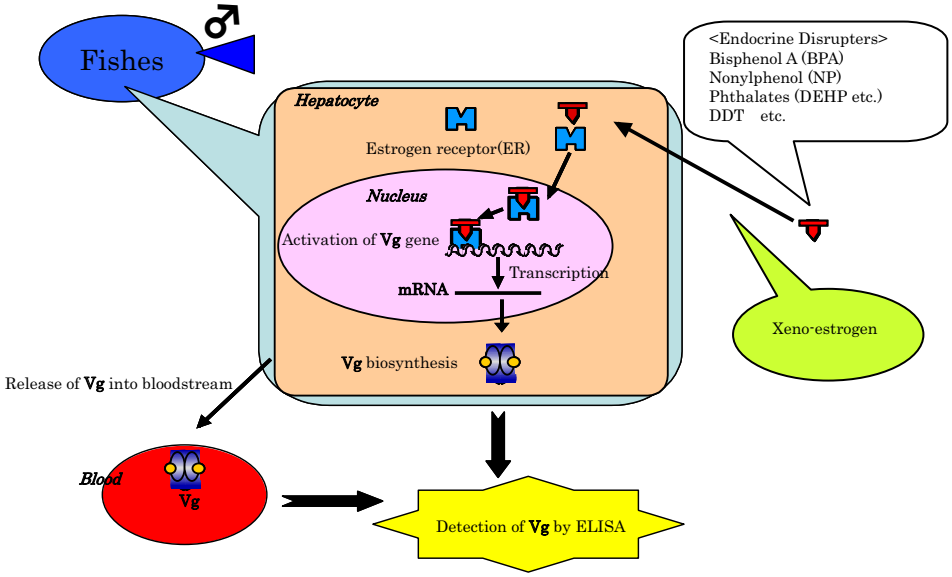
Code No.KAL-KH003

For research use only

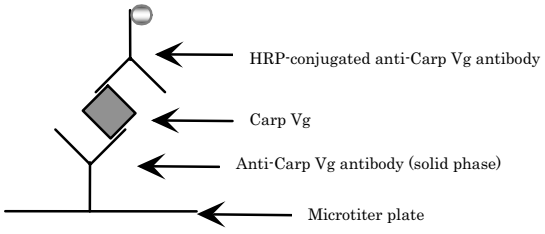
Carp Vitellogenin ELISA Kit

Vitellogenin (Vg) is a precurser of egg york and detected female serum near ovulation. Vg is not detected in male serum, but treated with 17 β -estradiol, Vg is detectable in male serum.
Carp Vg ELISA kit is constructed as a sandwich ELISA format using anti carp Vg antibodies and titrate serum carp Vg.



〔**Principle**〕

This kit is constructed using the antibodies specific to carp Vg , as both capture and secondary antibodies of sandwich ELISA format. During the assay, carp Vg in the samples is captured by the antibody, immobilized on the surface of microplate wells, and simultaneously reacts with the horseradish peroxidase (HRP) labeled antibody. Quantitation of carp Vg in samples can be made by measurement of HRP activity of the complex, which is exponential to the quantity of carp Vg.



Code No.KAL-KH003

〔Kit Contents〕

(1)	Antibody-coated microtiter plate (8wells×12)	1	plate
(2)	The standard, Carp Vg, lyophilized	2	vials
(3)	Dilution solution	30	mL
(4)	HRP-conjugated anti Carp Vg antibody (×500)	30	μL
(5)	Substrate buffer	15	mL
(6)	OPD (o-phenylendiamin) tablets	2	tab.
(7)	Wash solution (×20)	30	mL
(8)	Stop solution	6	mL

〔Required Apparatuses〕

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

〔Assay Method〕

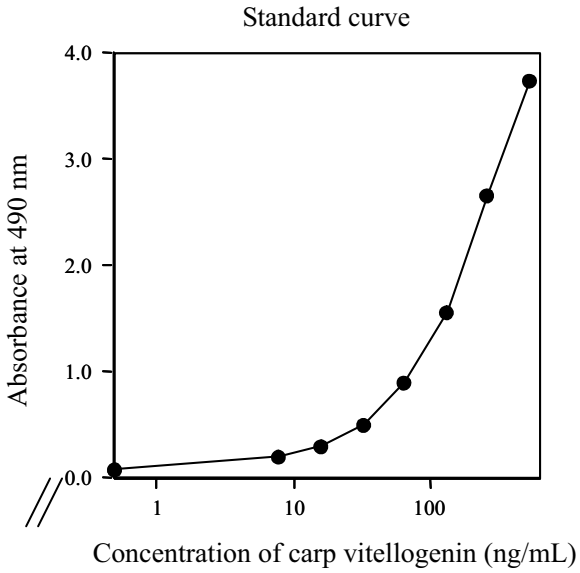
(1) Preparation of reagents to be used
① Antibody-coated microtiter plate
The 96 well microplate is coated with antibody to carp Vg, and is ready-to-use add 300μL /well of
wash solution for 10 to 60 minutes at room temperature
② Standard Carp Vg
Dissolve standard carp Vg in 300μL of distilled water.
This standard concentration is 1μg/mL. In order to make the standard dilution. 1μg/mL carp Vg solution is diluted two serial dilution from 7.8 ng/mL to 500 ng/mL with standerd diluent.
③ HRP-conjugated anti Carp Vg antibody
The stock HRP-conjugated anti carp Vg antibody can be prepared for 48 well reaction upon dilution of 0.01mL stock solution with 5 mL standard diluent just before use.
④ Substrate solution
One OPD tablet is dissolved in 6.5 mL substrate buffer.
⑤ Standard diluent
Make sure that the solution does not contain any crystalized material, upon reaching room temperature. Working solution is prepared by dilution of 30mL of the stock wash solution with distilled deionized water to 570mL. This solution is stable for 14 days when stored in a refrigerator.

(2) Assay procedure
① Discard the wash solution from the wells and dispence 100μL standard diluent into zero blank wells.
② In the assay each concentration of standard solution and serum sample dispence 100μL into each well. Incubate at room tempelature for 2 hours.
③ Discard the solution from the wells, and then wash 3 times with 30μL /well of wash solution.
④ Dispence 100μL HRP labeled anti carp Vg antibody into the wells, and incubate at room temperature for one hour.
⑤ Discard the solution from the wells, and then wash 5 times with 300μL/well of with wash solution.
⑥ Dispence100μL of substrate solution into the wells, and incubate at room temperature for 15 minutes.
⑦ Dispence 50μL of stop solution and read absorbance with a microplate reader at 490 or 492nm.

Code No.KAL-KH003

(3) The standerd curve

The standerd curve of carp Vg is obteined by measurement of the serial dilution of standerd carp Vg solution with the kit, as is shown in the figure



Features

(1) Sensitivity

Dynamic range: 7.8-500 ng/mL

(2) Reproducibilities

Intra assay (n=14)

Sample	1	2	3
Mean (ng/mL)	219.3	178.0	100.0
SD	7.5	13.1	0.4
CV(%)	3.4	7.4	4.2

Inter assay (n=9)

Sample	1	2	3
Mean (ng/mL)	250.6	195.0	118.0
SD	21.0	17.4	11.0
CV(%)	8.4	8.9	9.1

(3) Recovery of exogenous vitellogenin

Plasma Av. 95.6%

Code No.KAL-KH003

Usage notes

① Duplicate assay should be recomended for each sample.

② The standard curve should be made during each assay.

③ Serum is diluted with standerd diluent more than 5 dilutions.

④ HRP-conjugated anti-Carp Vg antibody is not stable under sun light, so that do not leave it for long time under sun light.

⑤ Dissolved carp standerd Vg should not store at room temperature.

⑥ The appalatus for making coloring solution should be clean one.

⑦ OPD (o-phenylendiamin) is harmful, so that take good care to it.

⑧ The kit is constructed with well-adjusted combination for each lot.
Replase combination among different lots may cause unexpected results.

⑨ Stop solution, 2N H_2SO_4, is strong acid, so that take good care to it.

⑩ This kit is only for research use. Do not use for medicine or any other things.

⑪ When using the regents, take care to avoid them from touching to skin,mucous membrane, clothes, and getting into eye.

⑫ If the regents happen to get into eye or mouth, wash out them and go to see a doctor if you need.

⑬ After using the kit, wash your hand very carefully.

⑭ If you find that the packages of the regents are broken or something trouble, do not use them.

⑮ When you store the regents, make sure to avoid them from vaporizing, falling down.

⑯ After using the regents, the packages should be discarded under established rule.

⑰ We can not grantee for any other usage of the packages and the accompaniments.

Strage : Keep at 2-8℃
Package : 96 well plate

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

Trans Genic Inc.

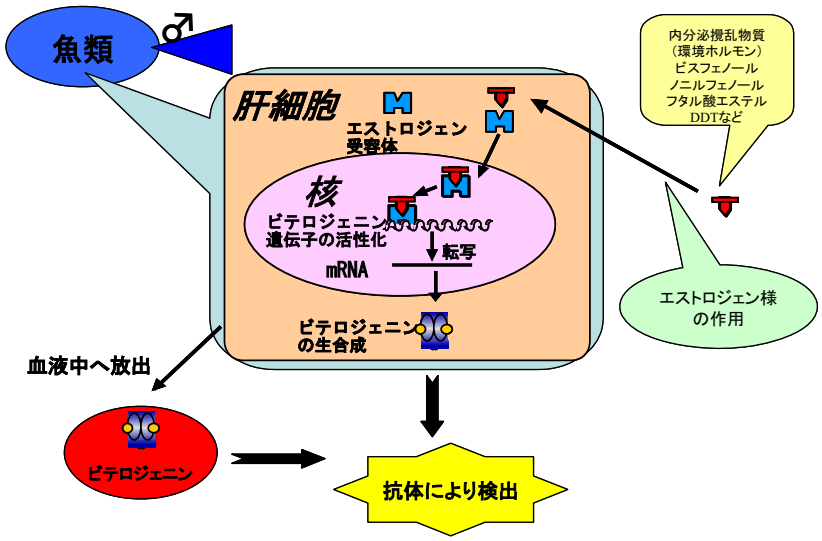
Code No.KH003

For research use only

コイ 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。本抗体、及びキットはこの Vg を測定する際に使用します。特に、ELISA キットは簡便で、世界初の商品です。(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.	コイ Vg 標準品	2 本
3.	検体希釈液	30mL×1 本
4.	HRP 標識抗コイ Vg 抗体(×500)	30μL×1 本
5.	基質液	15mL×1 本
6.	OPD(オルトフェニレンジアミン)錠	2 錠
7.	濃縮洗浄液(×20)	30mL×1 本
8.	反応停止液	6mL×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〕

本キットは、コイ Vg に特異的な抗体を用いたサンドイッチ型の固相 ELISA 法に基づいています。
マイクロプレートには抗コイ Vg 抗体がコートされており、検体及び標準液中のコイ Vg を結合します。
さらに HRP 標識抗コイ Vg 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。抗体により結合したコイ Vg は、HRP により触媒される発色反応により定量されます。

〔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、塩類が沈殿してないか確かめてください。
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を取り出し、洗浄液を 300μL/ウェル加え室温で 10～60 分間静置します。

③ 標準液

コイ Vg 標準品1本に精製水 300μL を加え、溶解すると1μg/mL の標準原液になります。
この原液を検体希釈液で2倍段階希釈し、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.81ng/mL の各濃度を調製します。溶解した標準液は冷蔵で7日間安定です。

④ HRP 標識抗コイ Vg 抗体 ※使用時調製して下さい。

HRP 標識抗コイ Vg 抗体(×500)10μL を検体希釈液 5mL で希釈すると 48 ウェル分の HRP 標識抗コイ Vg 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) 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(500～0ng/mL)及び検体を 100μL 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 300μL 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 HRP 標識抗コイ Vg 抗体溶液を 100μL 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。

⑤ 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 300μL ずつ分注し、デカントで除去します。この操作をさらに 4 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。)

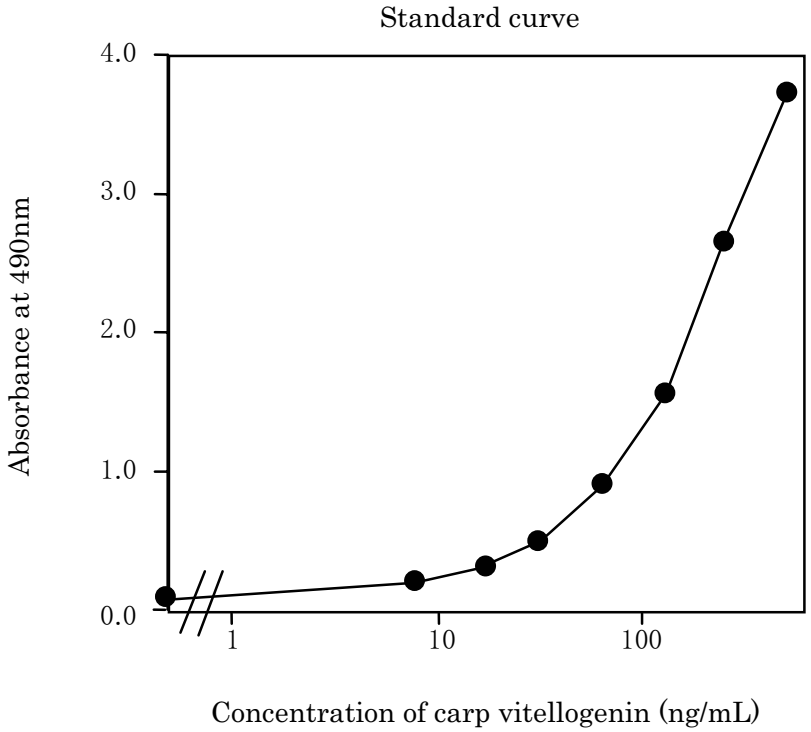
⑥ 各ウェルに発色液を 100μL ずつシステマティックに加え、室温で 15 分間反応させます。

⑦ 各ウェルに反応停止液を 50μL 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。

⑧ 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。

⑨ 標準曲線より、コイ Vg の濃度を算出します。

(3) 標準曲線



〔性能〕

(1) 感度　　標準曲線範囲 ： 7.8～500 ng/mL

(2) 再現性

日内再現性(n=14)

Sample	1	2	3
Mean(ng/mlL)	219.3	178.0	100.0
SD	7.5	13.1	0.4
CV(%)	3.4	7.4	4.2

日間再現性(n=9)

Sample	1	2	3
Mean(ng/mlL)	250.6	195.0	118.0
SD	21.0	17.4	11.0
CV(%)	8.4	8.9	9.1

(3) 添加回収
コイ血漿 ： 均 95.6%

〔使用上の注意〕

① 測定はすべて2重測定で行って下さい。
② 標準曲線は測定毎に作製して下さい。
③ コイ血漿は検体希釈液で 5 倍以上希釈して測定してください。
④ HRP 標識抗コイ Vg 抗体は特に光に不安定なので直射日光等が当たらないように注意して下さい。
⑤ 溶解したコイ Vg 標準品は室温で放置しないで下さい。
⑥ 発色液を調製する器具は、よく洗浄した物を使用して下さい。
⑦ OPD（オルトフェニレンジアミン）錠は有害物質ですので取り扱いに注意して下さい。
⑧ キットはロット毎に最適の組み合わせになっていますので、別ロットの試薬を組み合わせたり混ぜ合わせたりしないで下さい。
⑨ 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。
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切な措置を行って下さい。
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ってください。
⑭ 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。
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〕　2～8℃(冷暗所保存)

〔包装〕　96 ウェル用

〔参考文献〕

1. N. Hiramastu, M. Shimizu, H. Fukada, M. Kitamura, K. Ura, H.Fuda, and A. Hara, (1997) *Comp. Biochem Physiol*. 118C(2) 149-157
2. N. Hiramatsu and A. Hara. (1996) *Comp Biochem Physiol.* 115A(3) 243-251
3. H. Okumura, A. Hara, F.Saeki, T. Todo, S. Adachi and K. Yamauchi,(1995) *Fisheries Science*, 61(2) 283-289
4. T. Matsubara, T. Wada and A. Hara, (1994) *Comp Biochem Physiol.* 109B(4) 545-555
5. Y. Tao, A. Hara, R. G. Hodoson, L. C. Woods lll and C. V. Sullivan, (1993) *Fish Physiol. Biochem,* 12(1) 31-46
6. A. Hara, C. V. Sullivan and W.W. Dickhoff,(1993) *Zool . Sci*., 10(2), 245-256

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