

使用説明書  
Instruction manual

# Equol ELISA Kit

エクオール ELISA キット

Item No. EEQ-01

本製品の使用は研究目的に限られます。  
診断目的には使用できません。

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

## 製造元

株式会社ヘルスケアシステムズ

愛知県名古屋市長和区白金一丁目14番18号

TEL 03-6809-2722 FAX 050-3737-3691

<https://hc-sys.com>E-mail : [support@hc-sys.jp](mailto:support@hc-sys.jp)WEB:<https://hc-sys.com>

Healthcare Systems Co., Ltd.

1-14-18, Shirakane, Syowa-ku Nagoya-shi, Aichi 466-0058, JAPAN

TEL +81-3-6809-2722 FAX +81-50-3737-3691

E-mail:[support@hc-sys.jp](mailto:support@hc-sys.jp)WEB:<https://hc-sys.com>株式会社ヘルスケアシステムズ  
〒466-0058 愛知県名古屋市長和区白金一丁目14番18号  
TEL 03-6809-2722 FAX 050-3737-3691  
[support@hc-sys.jp](mailto:support@hc-sys.jp)

Healthcare Systems Co., Ltd.

1-14-18, Shirakane, Syowa-ku Nagoya-shi, Aichi 466-0058, JAPAN

TEL +81-3-6809-2722 FAX +81-50-3737-3691

[support@hc-sys.jp](mailto:support@hc-sys.jp)

## 目次

1. 使用目的……3
2. 測定原理……3
3. 安全上の注意……4
4. 保存条件と安定性……4
5. キットの内容……4
6. 本キット以外に必要な機器……4
7. 検体の採取と保存……5
8. 試薬の調製……5
9. 試験手順……6
10. 結果の計算……6
11. 性能特性……7
12. 文献……8

## 1. 使用目的

本製品は生体試料(尿、その他体液等)や食品に含まれるエクオール(Equol)を定量的に検出するためのELISAキットです。

本製品の使用は研究目的に限られます。診断、治療など、研究以外の目的には使用できません。

## 2. 測定原理

本製品はエクオールに特異的なモノクローナル抗体<sup>®</sup>を用いた競合ELISAを基本的な原理としています。



1. 本キットでは、あらかじめエクオールがマイクロプレートに固相化されています。

○ …固相化エクオール

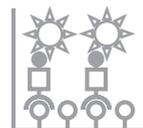


2. HRP標識抗エクオール抗体と検体を加えます。HRP標識抗エクオール抗体は、固相化エクオールと検体由来エクオールと競合的に結合します。

□ …HRP標識抗エクオール抗体 ○ …検体由来エクオール



3. 検体由来エクオールと結合したHRP標識抗エクオール抗体を洗浄により除去します。



4. 発色試薬を加える事により、反応液が青色に呈色します。さらに停止液を加える事により黄色に呈色し、吸光度を計測します。

☀ …発色試薬

### 3. 安全上の注意

1. 測定開始前に使用説明書を十分に読んで下さい。使用説明書はキットに同封の物を使用してください。
2. 本製品は使用期限以内に使用して下さい。使用期限内でも、常温保管、冷凍保管された場合は十分な精度で測定できない場合があります。
3. 測定の際は、必要に応じて白衣、保護メガネ、ラテックスグローブ等を使用して身体を保護して下さい。

### 4. 保存条件と安定性

本製品は直射日光を避け、冷蔵条件(2-8℃)で保存して下さい。冷凍はしないで下さい。測定後に余ったストリップウェルはジップ袋に密封して冷蔵保管して下さい。その他試薬類も同様に冷蔵保管して下さい。開封後のストリップウェル、試薬類は1週間以内に使い切して下さい。

### 5. キットの内容

	内容	数量
1	Pre-Coated Microplate (12×8 well strips)	1plate/ 96wells
2	Equol Standard (2500 µg/mL)	1vial / 50 µL
3	Equol Detection Antibody	1vial / 18 µL
4	Reagent Diluent	1 bottle / 50 mL
5	Wash Buffer Concentrate (10×)	1 bottle / 50 mL
6	TMB Substrate Solution	1 bottle / 12 mL
7	Stop Solution	1 bottle / 6 mL
8	Plate Seal	2 sheets

### 6. 本キット以外に必要な機器類

1. マイクロピペット(1-20 µL)及びチップ
2. マイクロピペット(50-200 µL)及びチップ
3. 8チャンネルマイクロピペット(50-200 µL)及びチップ
4. マイクロプレートリーダー(測定波長450 nm、リファレンス波長570-620 nm)

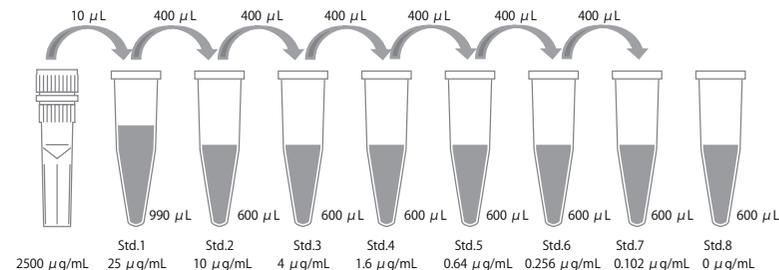
### 7. 検体の採取と保存

採取した検体を保管する場合は、-20℃以下の冷凍条件で保存して下さい。

1. 尿…希釈せずそのまま測定に供して下さい。測定値が検量線の上限値に近い場合は定量性が低下しますので、より希釈倍率を高めて再測定して下さい。尿中の総エクオール量を定量する場合は、文献等<sup>2)</sup>を参考に脱胞処理を行って下さい。  
例; 50 µLの尿検体と、50 µLのβ-グルクロニダーゼ(*Helix pomatia* 由来、125 U/100 µL 0.1 M酢酸バッファー(pH 5.0))を混合し、37℃で1時間処理。
2. 血清…血清中のエクオール濃度は尿に比べて低値のため、測定値が定量限界以下になる場合があります。必要に応じて、文献等を参考に検体を濃縮して下さい。
3. 食品等…食品の種類により、抽出方法が変わります。文献等を参考に抽出を行って下さい。

### 8. 試薬の調製

1. 測定前に全ての試薬を常温に戻して下さい。<sup>※</sup>
2. Equol Detection Antibodyを遠心機でスピンドウンし、内溶液をチューブの底に集めて下さい。Equol Detection AntibodyをReagent Diluentで400倍希釈して下さい。
3. Wash Buffer Concentrate (10×)の全量を450 mLの蒸留水で希釈して下さい。
4. 10 µLのEquol Standard (2500 µg/mL)と990 µLのReagent Diluentを混合して下さい(Std.1)。400 µLのStd.1と600 µLのReagent Diluentを混合し、これをStd.2とします。同様の操作を繰り返し、Std.7まで調製して下さい。Std.8はReagent Diluentを使用します。



#### ※[Equol Standard] 取り扱い上の注意

Equol Standardは19℃以下では固体となります。  
冷蔵庫から出した後は1時間以上室温に置いて下さい。  
室温が低い時には、25℃にセットした恒温器を用いて溶解させて下さい。  
使用前に、溶液が完全に溶けている事を確認して下さい。

## 9. 試験手順

- 「7. 検体の採取と保存」「8. 試薬の調製」の項目に従い、各試薬類を調製します。
- 希釈済み検体、段階希釈したEquol Standardを、下記レイアウト表を参考に50  $\mu$ Lずつ各ウェルに分注します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.1	Std.1	Sam-1	Sam-1								
B	Std.2	Std.2	Sam-2	Sam-2								
C	Std.3	Std.3	Sam-3	Sam-3								
D	Std.4	Std.4	Sam-4	Sam-4								
E	Std.5	Std.5	Sam-5	Sam-5								
F	Std.6	Std.6	Sam-6	Sam-6								
G	Std.7	Std.7	Sam-7	Sam-7								
H	Std.8	Std.8	Sam-8	Sam-8								

- 希釈済みEquol Detection Antibodyを50  $\mu$ Lずつ各ウェルに分注します。
- マイクロプレートを左右に振とうし混合した後、プレートをシールし、室温で1時間反応させます。
- ウェルの反応液を捨て、希釈済みのWash Bufferを300  $\mu$ Lずつ分注し、ウェル内のWash Bufferを捨てます。これを4回繰り返します。最後にマイクロプレートを上下反転させ、ウェル内のWash Bufferを可能な限り取り除きます(きれいなペーパータオルに軽く叩きつけて余分な液体を除去します)。
- 全てのウェルにTMB Substrate Solutionを100  $\mu$ Lずつ分注し、プレートをシールし、遮光下室温で15分間反応させます。
- 全てのウェルにStop Solutionを50  $\mu$ Lずつ分注し、マイクロプレートを左右に振とうし混合した後、マイクロプレートリーダー(測定波長450 nm、リファレンス波長570-620 nm)にて吸光度を測定します。

## 10. 結果の計算

標準液の濃度と吸光度から検量線を作成します。カーブフィッティングには、4係数ロジスティック曲線の使用を推奨します。

単位の变换

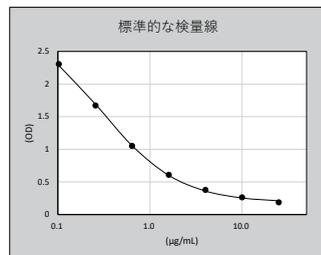
$$\text{エクオール}(\mu\text{g/mL}) \times 4.13 = \mu\text{mol/L}$$

検量線の例

参考例です。実際の計算

には使用しないでください。

エクオール ( $\mu\text{g/mL}$ )	OD (450nm/570nm)
25.00	0.187
10.00	0.264
4.00	0.377
1.60	0.610
0.64	1.051
0.26	1.670
0.10	2.305
0.00	2.979



## 11. 性能特性

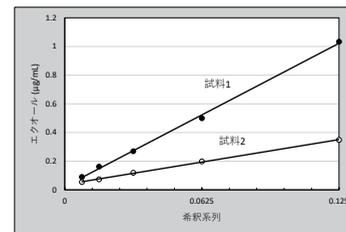
感度

検出限界	0.037 $\mu\text{g/mL}$ (0.151 $\mu\text{M}$ )	RSD>30% RSD: 相対標準偏差
定量限界	0.173 $\mu\text{g/mL}$ (0.716 $\mu\text{M}$ )	RSD>10% RSD: 相対標準偏差

精度

	平均( $\mu\text{g/mL}$ )	SD( $\mu\text{g/mL}$ )	CV(%)	N
同時再現性	10.0	1.08	10.8	6
	19.3	1.59	8.2	6
	50.3	3.06	6.1	6
日差再現性	10.4	1.06	10.2	6
	17.8	1.80	10.1	6
	39.6	5.11	12.9	6

希釈直線性



添加回収

尿検体	検体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	添加濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	予想値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	測定値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	回収率 (%)
1	9.2	23.2	32.3	31.6	97.8
1	9.2	8.2	17.4	17.3	99.5
1	9.2	3.1	12.3	12.3	100.0
2	27.2	23.2	50.3	48.3	96.0
2	27.2	8.2	35.4	38.5	108.9
2	27.2	3.1	30.3	30.8	101.9

#### HPLCとの比較

回帰式	r	N
ELISA = 0.934 × HPLC + 1.055	0.968	40

#### 抗体の特異性

物質	濃度 (μM)	交差性 (%)
S-エクオール	10	100.0
R-エクオール	10	88.2
ダイゼイン	10	ND
ゲニステイン	10	0.1
グリシテイン	10	1.6
ゲニスチン	10	ND

ND : 非検出

## 1 2. 文献

1. Niwa T., Yokoyama S., Osawa T. (2009). Preparation of soy isoflavonoids for the production of anti-equol monoclonal antibody, *Phytochemistry Letters* 2(4), 220–222.
2. Taylor JL, Grace PB, Bingham SA. (2005). Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma, *Analytical Biochemistry* 341, 220–229.

## TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE.....10
2. PRINCIPLE OF THE ASSAY.....10
3. SAFETY PRECAUTIONS.....11
4. STORAGE CONDITIONS AND STABILITY.....11
5. MATERIALS SUPPLIED.....11
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED .....11
7. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE.....12
8. REAGENT PREPARATION.....12
9. ASSAY PROCEDURE.....13
10. CALCULATION OF RESULTS.....14
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....14
12. REFERENCES .....15

## 1. INTENDED USE

The Equol ELISA Kit is an immunoassay specifically designed and validated for the quantitative measurement of equol in biological samples, including urine and other body fluids, as well as in food samples.

This kit is intended for research use only and is not intended for diagnostic or therapeutic use.

## 2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

This product is based on a competitive ELISA employing a monoclonal antibody specific for equol as its underlying principle<sup>1)</sup>



1. The microplate provided in this kit is pre-coated with equol.

 ...Solid phased equol

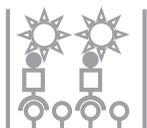


2. Samples and the Equol Detection Antibody (HRP-labeled anti-equol monoclonal antibody) are added to the wells. The HRP-labeled anti-equol antibody competitively binds to the equol immobilized on the solid phase and to the equol present in the samples.

 ...HRP-labeled anti-equol antibody       ...Equol present in samples



3. After incubation, unbound HRP-labeled anti-equol antibody, including antibody bound to sample-derived equol, is removed by washing.



4. The TMB Substrate Solution is added, resulting in the development of a blue color. The reaction is then stopped by adding Stop Solution, producing a yellow color, and the absorbance is measured.

 ...Coloring reagent

## 3. SAFETY PRECAUTIONS

1. Before starting the assay, read these instructions carefully and in their entirety. Use only the current, valid version of the package insert provided with the kit.
2. Use this product before the expiration date. Even if used within the expiration date, accurate measurement may not be ensured if the product has been stored at room temperature or frozen.
3. During the assay, wear appropriate personal protective equipment (PPE), such as a laboratory coat, protective eyewear, and latex gloves, as required.

## 4. STORAGE CONDITIONS AND STABILITY

Store the kit at 2–8°C. Protect the kit from direct sunlight and do not freeze.

After use, reseal any unused microplate strips and store them refrigerated in a sealed zip bag. Store all other reagents refrigerated as well. Once the kit has been opened, use all microplate strips and reagents within one week.

## 5. MATERIALS SUPPLIED

	Component	Quantity/Size
1	Pre-Coated Microplate (12×8 well strips)	1plate/ 96wells
2	Equol Standard (2500 μg/mL)	1vial / 50 μL
3	Equol Detection Antibody	1vial / 18 μL
4	Reagent Diluent	1 bottle / 50 mL
5	Wash Buffer Concentrate (10×)	1 bottle / 50 mL
6	TMB Substrate Solution	1 bottle / 12 mL
7	Stop Solution 	1 bottle / 6 mL
8	Plate Seal	2 sheets

## 6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Micropipette (1–20 μL) with compatible tips
2. Micropipette (50–200 μL) with compatible tips
3. 8-channel micropipette (50–200 μL) with compatible tips
4. Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with a reference wavelength of 570–620 nm

## 7. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collected specimens should be stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  or below until analysis.

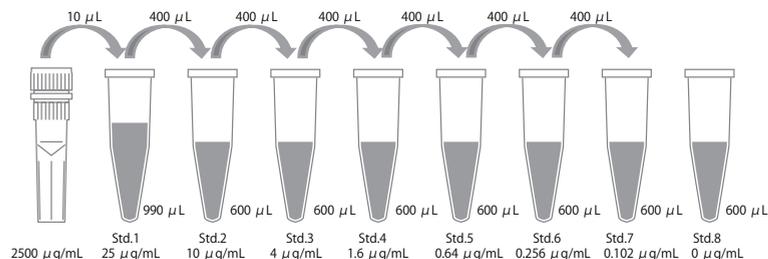
1. Urine•••Urine samples do not require dilution prior to the assay. However, if the measured value is close to the upper limit of the calibration curve, quantitative accuracy may decrease. In such cases, remeasurement with an increased dilution factor is recommended. For quantification of total equol in urine, perform deconjugation according to the literature <sup>2)</sup>.

Example: Mix 50  $\mu\text{L}$  of urine sample with 50  $\mu\text{L}$  of  $\beta$ -glucuronidase solution (derived from *Helix pomatia*, 125 U/100  $\mu\text{L}$  in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0), and incubate at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 hour.

2. Serum•••The concentration of equol in serum is lower than that in urine, and measured values may be below the limit of quantification. If necessary, concentrate the sample according to the procedures described in the relevant literature.
3. Food Samples•••Extraction methods vary depending on the type of food. Prepare extracts according to the relevant literature.

## 8. REAGENT PREPARATION

1. Bring all reagents and samples to room temperature ( $18$ – $25^{\circ}\text{C}$ ) before use. <sup>※</sup>
2. Briefly centrifuge the Equol Detection Antibody to collect the contents at the bottom of the tube. Dilute the Equol Detection Antibody 1:400 with Reagent Diluent.
3. Dilute the entire volume of the  $10\times$  Wash Buffer Concentrate with 450 mL of distilled water.
4. Prepare the equol standards as follows:  
Mix 10  $\mu\text{L}$  of Equol Standard (2,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with 990  $\mu\text{L}$  of Reagent Diluent to prepare Standard 1 (Std. 1).  
Mix 400  $\mu\text{L}$  of Std. 1 with 600  $\mu\text{L}$  of Reagent Diluent to prepare Standard 2 (Std. 2).  
Repeat this procedure to prepare Standards 3 through 7 (Std. 3–Std. 7).  
Use Reagent Diluent alone as Standard 8 (Std. 8).



※[Equal Standard] Handling precautions

Equol Standard becomes solid below  $19^{\circ}\text{C}$ .

After taking out from the refrigerator, please keep at room temperature for 1 hour or more.

When the room temperature is low, use a  $25^{\circ}\text{C}$  incubator to dissolve it.

Before use, make sure the solution is completely dissolved.

## 9. ASSAY PROCEDURE

1. Prepare all reagents, standards, and samples according to Section 7, "SAMPLE COLLECTION AND STORAGE," and Section 8, "REAGENT PREPARATION."
2. Dispense 50  $\mu\text{L}$  of each diluted sample and serially diluted equol standard into the appropriate wells, following the plate layout shown below.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.1	Std.1	Sam-1	Sam-1								
B	Std.2	Std.2	Sam-2	Sam-2								
C	Std.3	Std.3	Sam-3	Sam-3								
D	Std.4	Std.4	Sam-4	Sam-4								
E	Std.5	Std.5	Sam-5	Sam-5								
F	Std.6	Std.6	Sam-6	Sam-6								
G	Std.7	Std.7	Sam-7	Sam-7								
H	Std.8	Std.8	Sam-8	Sam-8								

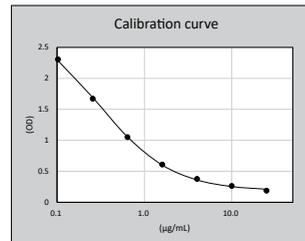
3. Add 50  $\mu\text{L}$  of diluted Equol Detection Antibody to each well.
4. Gently shake the microplate, seal it, and incubate for 1 hour at room temperature.
5. Aspirate the contents of each well and wash the wells four times with 300  $\mu\text{L}$  of diluted Wash Buffer. After the final wash, remove residual liquid as completely as possible by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
6. Add 100  $\mu\text{L}$  of TMB Substrate Solution to each well, seal the plate, and incubate for 15 minutes at room temperature in the dark.
7. Add 50  $\mu\text{L}$  of Stop Solution to each well. Gently shake the microplate to mix, then measure the absorbance using a microplate reader at 450 nm, with a reference wavelength of 570–620 nm.

## 10. CALCULATION OF RESULTS

Plot the optical density (OD) values of the standards on the y-axis (linear scale) against their concentrations on the x-axis (logarithmic scale).

We recommend fitting the data using a four-parameter logistic (4PL) regression model.

Equlol ( $\mu\text{g/mL}$ )	OD (450nm/570nm)
25.00	0.187
10.00	0.264
4.00	0.377
1.60	0.610
0.64	1.051
0.26	1.670
0.10	2.305
0.00	2.979



Unit Conversion

$$\text{Equlol } (\mu\text{g/mL}) \times 4.13 = \mu\text{mol/L}$$

The calibration curve shown is a typical example and should not be used for calculation.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

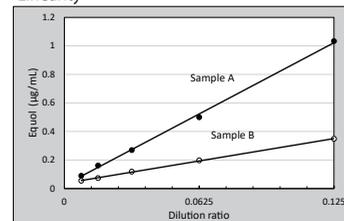
Sensitivity

Detection Limit	0.037 $\mu\text{g/mL}$ (0.151 $\mu\text{M}$ )	RSD>30% RSD: relative standard deviation
Quantitative Limit	0.173 $\mu\text{g/mL}$ (0.716 $\mu\text{M}$ )	RSD>10% RSD: relative standard deviation

Precision

	Mean ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	N
Intra-Assay	10.0	1.08	10.8	6
	19.3	1.59	8.2	6
	50.3	3.06	6.1	6
Inter Assay	10.4	1.06	10.2	6
	17.8	1.80	10.1	6
	39.6	5.11	12.9	6

Linearity



Recovery

Urine Sample	Endogenous ( $\mu\text{g/mL}$ )	Added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Expected ( $\mu\text{g/mL}$ )	Observed ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)
1	9.2	23.2	32.3	31.6	97.8
1	9.2	8.2	17.4	17.3	99.5
1	9.2	3.1	12.3	12.3	100.0
2	27.2	23.2	50.3	48.3	96.0
2	27.2	8.2	35.4	38.5	108.9
2	27.2	3.1	30.3	30.8	101.9

Method Comparison

Regression equation	r	N
ELISA = 0.934 × HPLC + 1.055	0.968	40

Antibody Specificity

Compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Cross Reactivity (%)
S-equal	10	100.0
R-equal	10	88.2
Daidzein	10	ND
Genistein	10	0.1
Glycitein	10	1.6
Genistin	10	ND

ND : Not Detected

## 12. REFERENCES

- Niwa T., Yokoyama S., Osawa T. (2009). Preparation of soy isoflavonoids for the production of anti-equal monoclonal antibody, *Phytochemistry Letters* 2(4), 220–222.
- Taylor JI., Grace PB., Bingham SA. (2005). Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma, *Analytical Biochemistry* 341, 220–229.