

牛アルブミンEIA定量測定キット

96テスト用

<使用説明書>

アルブミンはヒト及び動物の血清中にもつとも多く含まれている代表的な血清蛋白質である。この成分は肝臓で合成され、血液の浸透圧の調節や、種々の物質との結合能を有し各目的の場所に物質を運搬供給する、生体にとって重要な役割を担った物質である。

アルブミンは種々の疾病、疾患と密接な相関がある事が知られている。事実、肝疾患、慢性栄養障害、出血、ネフローゼ症候群、慢性感染症、潰瘍性大腸炎、無アルブミン血症等でアルブミンが減少し、脱水症、無ガンマグロブリン血症で増加する事が知られている。

本測定キットは酵素抗体法のサンドイッチ方式による測定方法で、牛の血清、分泌液等のアルブミンを微量、簡便そして短時間に定量出来るように開発された製品です。

[I]. <キットの内容>

1.	牛アルブミン抗体固定化96穴マイクロプレート	1枚
2.	基質溶液	1ml 1本
3.	酵素標識抗体溶液	5ml 1本
4.	T-PBS溶液(10倍濃縮液)	60ml 1本
5.	発色剤溶解液	1ml 1本
6.	発色剤	(96検体相当量粉末) 2本
7.	反応停止液	20ml 1本
8.	牛アルブミン標準品	(0.1mg/ml)、1ml 1本
9.	プレートシール	1枚
10.	使用説明書	1部

[II]. <使用目的>

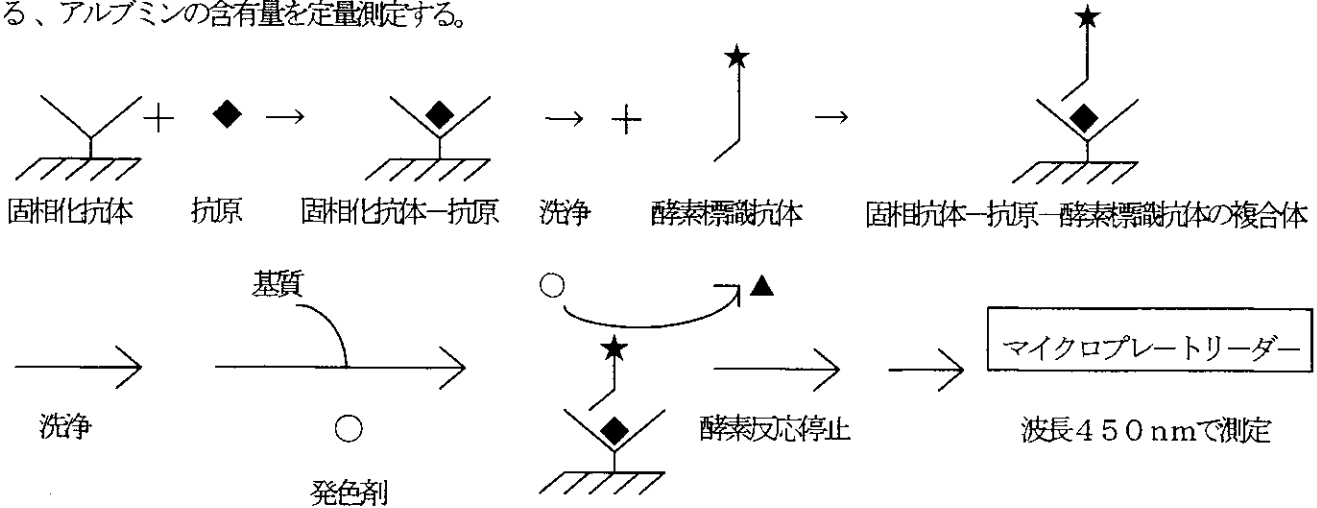
正常な牛及び感染症、腫瘍等の各種疾病、疾患の牛の血清、体液、分泌液、尿等のアルブミン含有量の定量測定。

[III]. <使用器具器材>

1. ピペット (50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 300 μ l, 500 μ l, 1ml, 5ml)
2. アスピレーター
3. メスシリンダー (1,000ml)
4. マイクロチューブ (2ml) 又は2ml試験管
5. マイクロプレートリーダー [光学フィルター: 450nm]
6. インキュベーター
7. ボルテックスミキサー
8. 純水

[IV]. <測定原理>

抗牛アルブミン抗体を、96穴マイクロプレートの各ウェルに固定化したものに、牛血清等の検体溶液又は標準の牛アルブミン溶液の抗原を特異的に結合させ、未結合成分を洗浄除去する。これに酵素標識抗体を加えることにより、固相抗体-抗原-酵素標識抗体の複合体が形成される。更に未結合の酵素標識抗体を洗浄除去後、発色剤を加える。このものに基質を添加することにより発色させ、その吸光度を450nmで測定する。測定された吸光度は、牛アルブミンの濃度に依存するので、標準の牛アルブミンを用いて作成された検量線から、検体に含まれている、アルブミンの含有量を定量測定する。



[V]. <使用試薬類の調整法>

1. 希釈T-PBS溶液：添付T-PBS溶液を精製水で10倍希釈。〔希釈液の保存期間：4℃で1ヶ月〕
2. 発色液の調製方法：発色剤入りのボトルに発色剤溶解液0.3mlを加え溶解し、保存液とする〔保存期間：4℃で1ヶ月〕。使用時この保存液の必要量を遮光容器に移し、純水で50倍に希釈し当日以内にご使用下さい。
3. 発色液-基質液の混合液：添付各試薬を「発色液：基質=50：1」の割合で混合。〔調整後1時間以内に使用して下さい。〕

[VI]. <牛アルブミン定量方法>

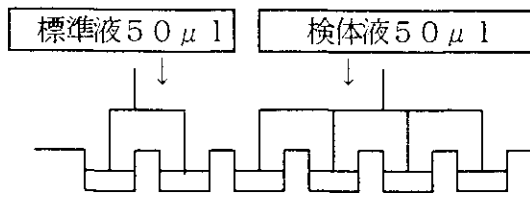
1. 検体50 μ lを牛アルブミン抗体を固定化した96穴マイクロプレートのウェルに加える。
2. プレートに蓋し30℃で1時間静置反応。
3. プレートの蓋をとりウェル中の溶液をピペット等を用いて除去後、各ウェルに希釈したT-PBSの300 μ lを加え60秒間静置洗浄除去。（同一操作を3回繰り返し洗浄する）。
4. 酵素標識牛アルブミン抗体を各ウェルに50 μ lずつ加える。蓋をし静かに攪拌後30℃で1時間静置反応。
5. ウェルの溶液を除去後、T-PBS300 μ lを各ウェルに加え60秒間静置洗浄除去。（同一操作3回行う）。
6. 基質-発色液の混合液を各ウェルに正確に100 μ l加え（3~7秒間隔で攪拌し、蓋・遮光し30℃で30分間静置反応）。
7. 反応停止液を各ウェルに150 μ lずつ加え（3~7秒間隔で攪拌し酵素反応を停止（各ウェル同じ30分後））。
8. 反応停止後、プレートの蓋をとり30分以内に、マイクロプレートリーダーにて、450nmの波長で吸光度を測定。
9. 検量線より牛アルブミンを定量。

[VII]. <測定上の注意点>

1. 検量線は出来るだけ測定ごとに作成して下さい。尚測定は二本以上で行って下さい。
2. 検体の濃度範囲を超える場合には希釈T-PBS溶液で希釈し測定して下さい。
3. 多数の検体を測定する場合には、反応時間を同一になるように調整して下さい（各ウェルに3~7秒間隔で加える）。
4. 検体にはアジ化ナトリウムを添加しないで下さい、酵素反応を阻害します。
5. 未使用ウェルがある場合には、添付してあるシートでコンタミしないようにウェルに蓋をして下さい。

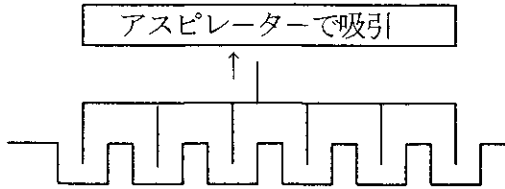
[VI]. <測定操作手順>

(A)



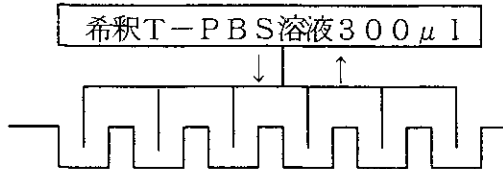
[標準液及び検体を各ウェルに50 μ l加え、30°Cで1時間静置反応]

(B)



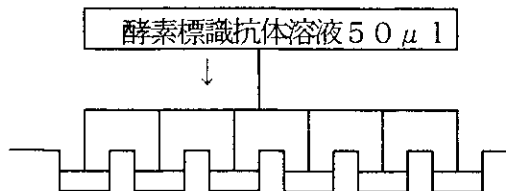
[アスピレーター、ピペット等で 溶液を除去]

(C)



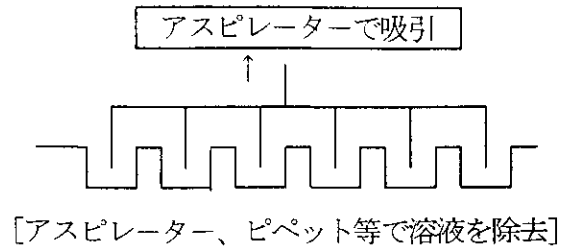
[希釈T-PBS溶液各300 μ l加え、ウェルを洗浄する。同液で3回同一洗浄操作を繰り返し未反応抗原を除去する]

(D)



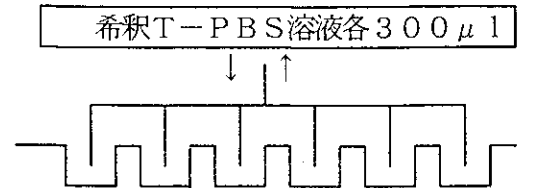
[希釈T-PBS溶液除去した各ウェルに、酵素標識抗体溶液各50 μ lずつ加え静かに攪拌後、30°Cで1時間反応]

(E)



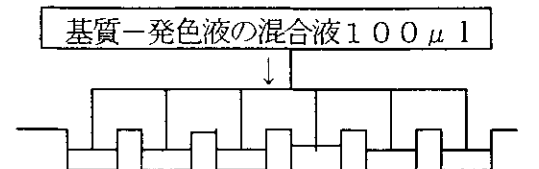
[アスピレーター、ピペット等で溶液を除去]

(F)



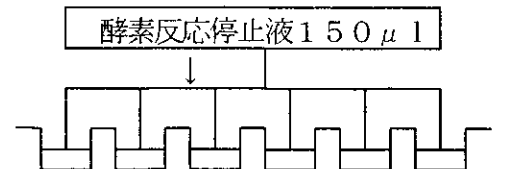
[希釈T-PBS溶液各300 μ l加え、ウェルを洗浄する。同溶液で3回同一洗浄操作を繰り返し、未反応酵素標識抗体を除去]

(G)



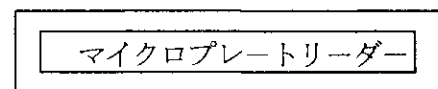
[基質-発色混合液各100 μ lを一定間隔で加え、30°Cで30分酵素反応を行う]

(H)



[酵素反応停止液を各150 μ l加え、酵素反応を停止する]

(I)

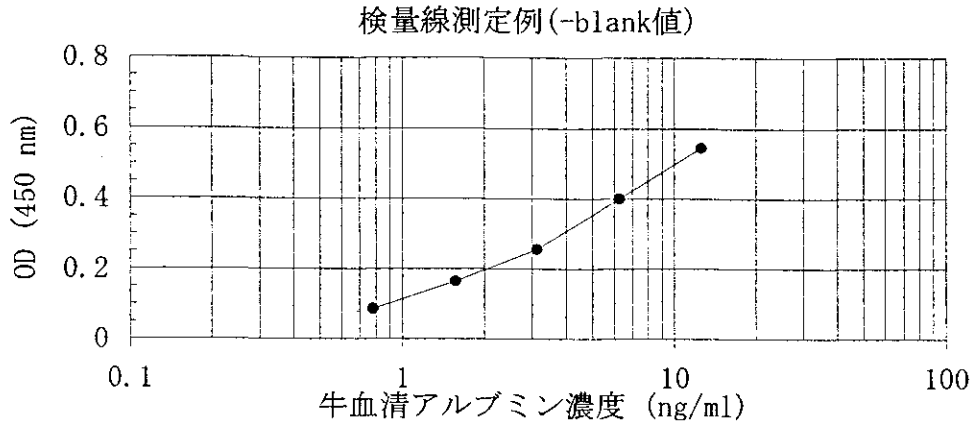


[マイクロプレートリーダーを用いて、波長450nmで吸光度を測定。検量線より検体中の牛アルブミンの含有量を求める]

[VII]. <検量線の作成方法> (例)

添付牛アルブミン標準品 (100 μg/ml) を、下記の要領でT-PBS 溶液で段階希釈し各濃度を測定後、片対数グラフ用紙に各濃度のOD (450 nm吸光度) 値をプロットし検量線を作成する。

内容	牛アルブミン濃度 (ng/ml)							
	1 μg	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
標準蛋白溶液 (ml)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
T-PBS (ml)	9.9	9.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
残量 (ml)	9.5	9.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0



[VIII]. <性能>

- 測定範囲: 0.8~12.5 ng/ml.
[成牛血清の最適希釈倍率: 4×10⁶倍。希釈T-PBSを用いて10倍段階希釈]
- 検出限界値: 0.5 ng/ml
- 回収率 (n=5):

牛アルブミン (ng/ml)	1.56
回収率平均値 (%)	100.6
標準偏差	3.1
変動係数 (%)	3.1

- 特異性: 他の牛血清成分との交差反応は認められず、牛アルブミンと特異的に反応。
- 同時再現性 (n=6):

牛アルブミン (ng/ml)	1.56
吸光度平均値	0.118
標準偏差	0.002
変動係数 (%)	1.70

- 日差再現性 (n=6):

牛アルブミン (ng/ml)	1.56
吸光度平均値	0.121
標準偏差	0.003
変動係数 (%)	2.50

製造元 : 有限会社ライフ研究所
〒990-0832 山形県山形市城西町三丁目8番3号
TEL: 023-645-1392 FAX: 023-645-1392

コスモ・バイオ株式会社