

牛 α_2 マクログロブリンEIA定量測定キット

96テスト用

<使用説明書>

α_2 マクログロブリンは、肝臓で合成され分子量約700,000~800,000の巨大高分子の血清蛋白質で、プロテアーゼ活性阻害、細胞成長因子との結合、インスリンとの結合、細菌毒素の解毒作用等多彩な生理活性を有した、生体にとって極めて重要な役割を担なつた物質である。この物質は種々の疾病、疾患との相関が知られている。事実、ネフローゼ症候群、慢性肝炎、糖尿病、肝臓障害等で著しく増加することが報告されている。

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 α_2 マクログロブリンを微量、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、種々の研究目的に熟練技術を必要とせず手軽に利用出来ます。

[I] . <キットの内容>

- 牛 α_2 マクログロブリン抗体固定化96穴マイクロプレート 1枚
- 基質溶液 1ml 1本
- 酵素標識牛 α_2 マクログロブリン抗体溶液 5ml 1本
- T-PBS溶液(10倍濃縮液) 60ml 1本
- 発色剤溶解液 1ml 1本
- 発色剤 (96検体相当量粉末) 2本
- 反応停止液 20ml 1本
- 牛 α_2 マクログロブリン標準品 (0.1mg/ml)、1ml 1本
- プレートシール 1枚
- 使用説明書 1部

[II] . <使用目的>

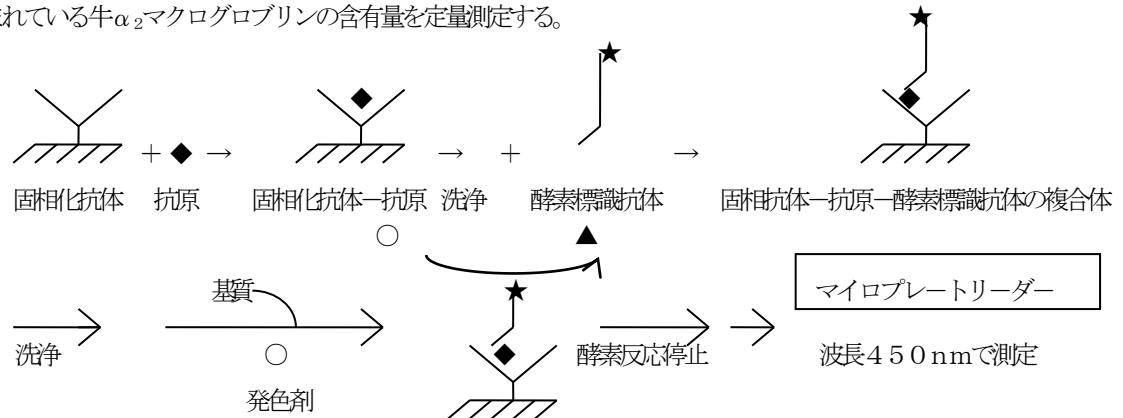
正常な牛及び感染症、腫瘍等の各種疾病、疾患の牛の血清、体液、分泌液、尿等の α_2 マクログロブリン含有量の定量測定。

[III] . <使用器具器材>

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

[IV] . <測定原理>

抗牛 α_2 マクログロブリン抗体を、96穴マイクロプレートの各ウエ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 α_2 マクログロブリ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 α_2 マクログロブリンの濃度に依存するので、標準の牛 α_2 マクログロブリンを用いて作成された検量線から、検体に含まれている牛 α_2 マクログロブリンの含有量を定量測定する。



[V] . <使用試薬類の調整法>

- 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°Cで1ヶ月]
- 発色液の調製方法: 発色剤入のボトルに発色剤溶解液0.3ml加え溶解し、保存液とする[保存期間: 4°C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。
- 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 α_2 マクログロブリン定量方法>

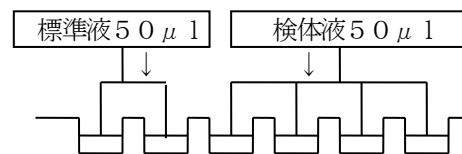
- 検体50 μ lを牛 α_2 マクログロブリン抗体を固定化した96穴マイクロプレートのウエルに加える。
- プレートに蓋し30°Cで1時間静置反応。
- プレートの蓋をとりウエル中の溶液をピペット等を用いて除去後、各ウエルに希釈したT-PBSの300 μ lを加え60秒間静置洗浄除去。(同一操作を3回繰りかえし洗浄する)。
- 酵素標識牛 α_2 マクログロブリン抗体を各ウエルに50 μ lずつ加える。蓋をし静かに攪拌後、30°Cで1時間静置反応。
- ウエルの溶液を除去後、T-PBS 300 μ lを各ウエルに加え60秒間静置洗浄除去。(同一操作3回行う)。
- 基質-発色液の混合液を各ウエルに100 μ l加え(3~7秒間隔で)攪拌し、蓋・遮光し30°Cで30分間静置反応。
- 反応停止液を各ウエルに150 μ lずつ加え(3~7秒間隔で)攪拌し酵素反応を停止(各ウエル同じ30分後に)。
- 反応停止後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。
- 検量線より牛 α_2 マクログロブリン定量。

[VII] . <測定上の注意点>

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 未使用ウエルがある場合には、添付してあるシートでコンタミしないようにウエルに蓋をして下さい。

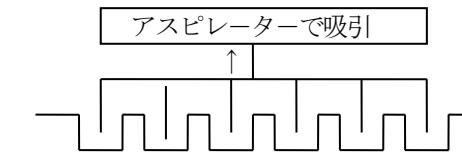
[VI] . <測定操作手順>

(A)



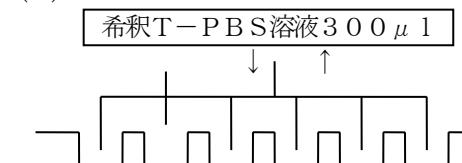
[標準液及び検体を各ウェルに50 μl加え、30℃で1時間静置反応]

(B)



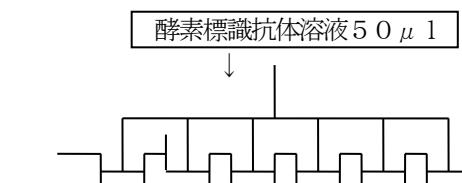
[アスピレーター、ピペット等で溶液を除去]

(C)



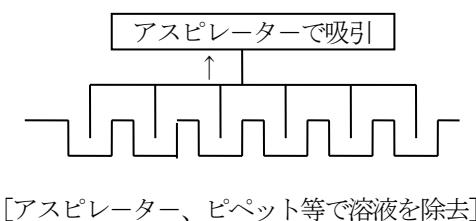
[希釈T-PBS溶液各300 μl加え、ウェルを洗浄する。同液で3回同一洗浄操作を繰返し未反応酵素標識抗体を除去する]

(D)

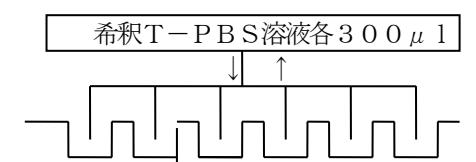


[希釈T-PBS溶液除去した各ウェルに、酵素標識抗体溶液各50 μlずつ加え静かに攪拌後、30℃で1時間反応]

(E)

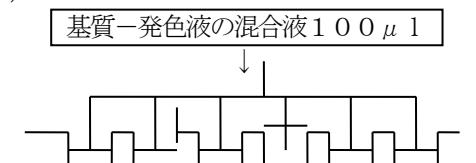


(F)



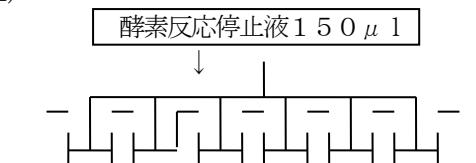
[希釈T-PBS溶液各300 μl加え、ウェルを洗浄する。同溶液で3回同一洗浄操作を繰返し、未反応酵素標識抗体を除去する]

(G)



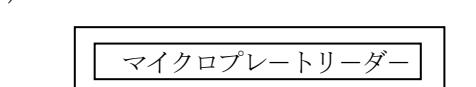
[基質-発色混合液各100 μlを一定間隔で加え、30℃で30分酵素反応を行う]

(H)



[酵素反応停止液を各150 μl加え、酵素反応を停止する]

(I)



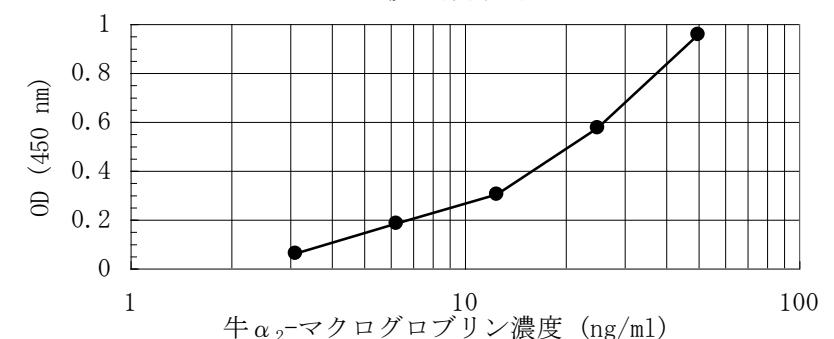
[マイクロプレートリーダーを用いて、波長450 nmで吸光度を測定。検量線より検体中の牛アルブミンの含有量を求める]

[VII] . <検量線の作成方法> (例)

添付牛 α_2 マクログロブリン標準品 (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 α_2 マクログロブリン濃度 (ng/ml)						
	1 μg	100	50	25	12.5	6.25	3.13
標準蛋白溶液 (ml)	0.1 ↗	0.1 ↗	0.5 ↗	0.5 ↗	0.5 ↗	0.5 ↗	0.5 ↗
T-PBS (ml)	9.9	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
残量 (ml)	9.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0

検量線測定例



[VIII] . <性能>

1. 測定範囲: 3.1~50ng/ml。

[成牛血清の最適希釈倍率: 4×10⁵倍。希釈T-PBSを用いて10倍段階希釈]

2. 検出限界値: 1 ng/ml

3. 回収率 (n=5):

牛 α_2 マクログロブリン (ng/ml)	6.25
回収率平均値 (%)	100.8
標準偏差	5.1
変動係数 (%)	5.0

4. 特異性: 他の牛血清成分との交差反応は認められず、牛 α_2 マクログロブリンと特異的に反応。

5. 同時再現性 (n=6):

牛 α_2 マクログロブリン (ng/ml)	6.25
吸光度平均値	0.186
標準偏差	0.009
変動係数 (%)	4.84

6. 日差再現性 (n=6):

牛 α_2 マクログロブリン (ng/ml)	6.25
吸光度平均値	0.188
標準偏差	0.011
変動係数 (%)	5.85

製造元: 有限会社 ライフ研究所

〒990-0832 山鹿市城西町三丁目8番3号

TEL: 023-645-1392 FAX: 023-645-1392

e-mail: laboratory@life-kenkyusho