

牛ラクトフェリンEIA定量測定キット

96テスト用

<使用説明書>

ラクトフェリンは、1分子当たり2分子の3価鉄イオン結合能を有した、分子量約80,000の糖蛋白質で、ヒト及び動物の乳中に主に含まれている。ラクトフェリンは鉄の運搬体を始めとして、静菌作用、鉄吸収促進、細胞増殖能、抗酸化能、抗炎症作用、ヒスタミン誘発の抑制による抗アレルギー作用等、極めて多彩な生理活性を有した、生体にとって重要な成分である。このラクトフェリンに異常を期すと、種々の疾病を起こす事が知られている。事実乳房炎、感染症では極度にラクトフェリンの量が乳中で減少してい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、牛の乳中等のラクトフェリンを微量、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す。

[I]. <キットの内容>

- | | | |
|-----|--------------------------|-------------------|
| 1. | 牛ラクトフェリン抗体固定化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. | 牛ラクトフェリン標準品 | (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>

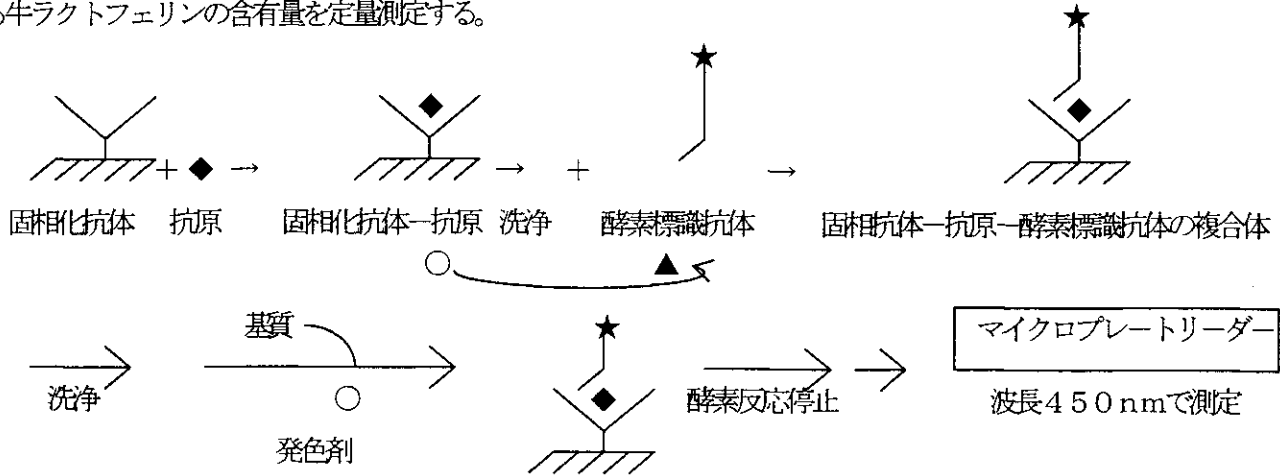
正常な牛及び感染症、腫瘍等の各種疾病、疾患の牛の乳等のラクトフェリン含有量の定量測定。

[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. インキューベーター
7. ボルテックスミキサー
8. 純水

[IV]. <測定原理>

抗牛ラクトフェリン抗体を、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ラクトフェ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、牛ラクトフェリンの濃度に依存するので、標準の牛ラクトフェ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ラクトフェリ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]. <牛ラクトフェリン定量方法>

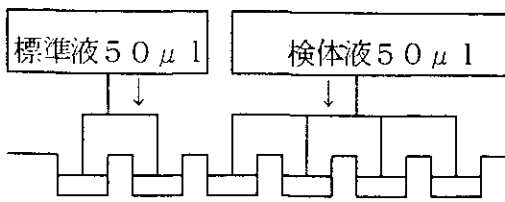
1. 検体50μlを牛ラクトフェリン抗体を固定化した96穴マイクロプレートのウェルに加える。
2. プレートに蓋し30℃で1時間静置反応。
3. プレートの蓋をとりウェル中の溶液をピペット等を用いて除去後、各ウェルに希釈したT-PBSの300μlを加え60秒間静置洗浄除去。（同一操作を3回繰り返す洗浄する）。
4. 酵素標識牛ラクトフェリン抗体を各ウェルに50μlずつ加える。蓋をし静かに攪拌後、30℃で1時間静置反応。
5. ウェルの溶液を除去後、T-PBS300μlを各ウェルに加えて60秒間静置洗浄除去。（同一操作3回行う）。
6. 基質-発色液の混合液を各ウェルに100μl加え（3～7秒間隔で）攪拌し、遮光し30℃で30分間静置反応。
7. 反応停止液を各ウェルに150μl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. 検量線より牛ラクトフェリンを定量。

[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。
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。

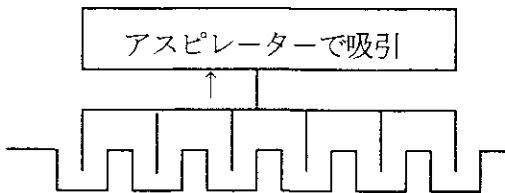
[VI]. <測定操作手順>

(A)



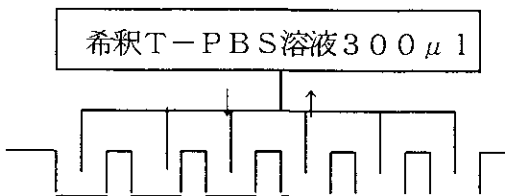
[標準液及び検体を各ウェルに50 μl加え、30°Cで1時間静置反応]

(B)



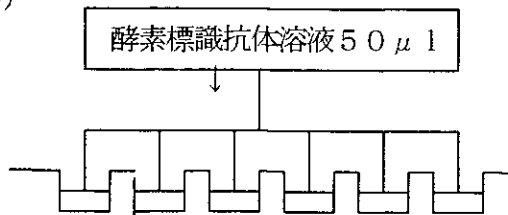
[アスピレーター、ピペット等で 溶液を除去]

(C)



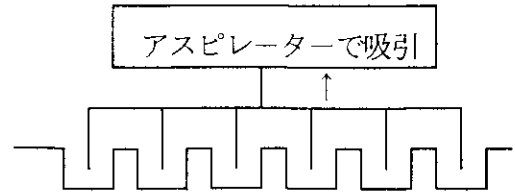
[希釈T-PBS溶液各300 μl加え、ウェルを洗浄する。同液で3回同一洗浄操作を繰り返し未反応抗原を除去する]

(D)



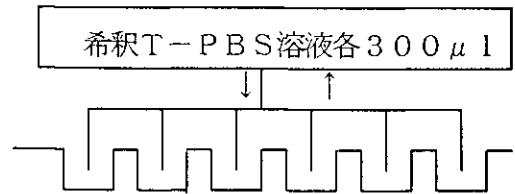
[希釈T-PBS溶液除去した各ウェルに、酵素標識抗体溶液各50 μlずつ加え静かに攪拌後、30°Cで1時間反応]

(E)



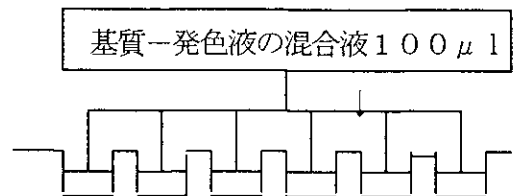
[アスピレーター、ピペット等で溶液を除去]

(F)



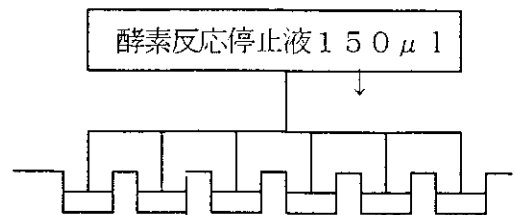
[希釈T-PBS溶液各300 μl加え、ウェルを洗浄する。同溶液で3回同一洗浄操作を繰り返し、未反応酵素標識抗体を除去]

(G)



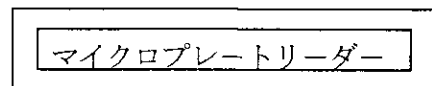
[基質-発色混合液各100 μlを一定間隔で加え、30°Cで30分酵素反応を行う]

(H)



[酵素反応停止液を各150 μl加え、酵素反応を停止する]

(I)

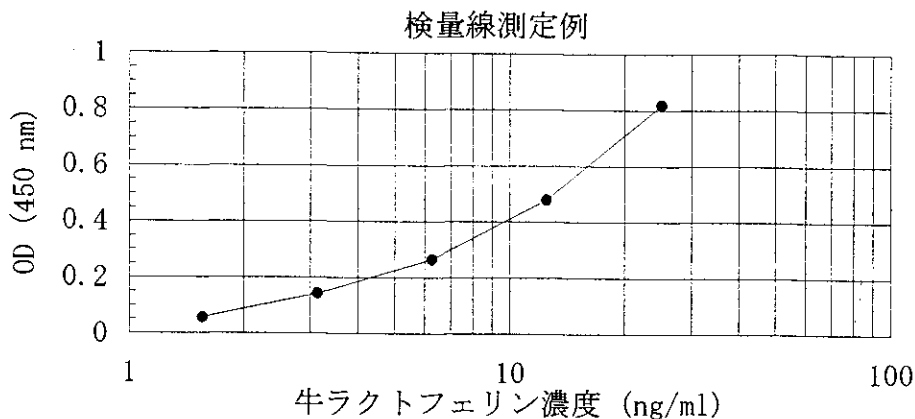


[マイクロプレートリーダーを用いて、波長450 nmで吸光度を測定。検量線より検体中の牛ラクトフェリンの含有量を求める]

[VII]. <検量線の作成方法> (例)

添付牛ラクtofフェリン標準品 (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	牛ラクtofフェリン濃度 (ng/ml)							
	1 μg	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
標準蛋白溶液 (ml)	0.1	0.1	0.5	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	0.5
残量 (ml)	9.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0



[VIII]. <性能>

1. 測定範囲: 1.5~25ng/ml.

[成牛血清の最適希釈倍率: 16倍。希釈T-PBSを用いて2倍段階希釈]

2. 検出限界値: 1 ng/ml

3. 回収率 (n=5):

牛ラクtofフェリン (ng/ml)	1.56
回収率平均値 (%)	100.5
標準偏差	1.96
変動係数 (%)	1.91

4. 特異性: 他の牛血清成分との交差反応は認められず、牛ラクtofフェリンと特異的に反応。

5. 同時再現性 (n=6):

牛ラクtofフェリン (ng/ml)	1.56
吸光度平均値	0.058
標準偏差	0.001
変動係数 (%)	1.89

6. 日差再現性 (n=6):

牛ラクtofフェリン (ng/ml)	1.56
吸光度平均値	0.063
標準偏差	0.004
変動係数 (%)	6.35

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