

豚トランスフェリンSRID定量測定キット

(単円免疫拡散法)

<使用説明書>

トランスフェリンはヒト及び動物の血清中に、多量に含まれている代表的な血清蛋白質である。この成分は主に肝臓で合成され、ヘモグロビン、ミオグロビン、ビオチン、ヘモジデリン、細胞、骨髄等に鉄イオンを運搬供給する、生体にとって重要な役割を担った物質である。又、トランスフェリンは過剰鉄イオンによる鉄中毒の防止や腸管からの鉄吸収促進としても重要である。一方この物質に異常を来すと種々の疾病、疾患を招く。事実鉄欠乏性貧血症、消化管の潰瘍・腫瘍、膀胱癌、血友病、血小板減少症、急性肝硬炎等ではトランスフェリンが増加し、ネフローゼ症候群、慢性活動性肝疾患、低蛋白症、急性及び慢性感染症、肝硬変等で減少する事が知られている。本測定キットは、単円免疫拡散法（SRID）による測定方法で、特別の施設や分析機器等が必要無く、手軽に誰でも何処でも簡便に分析出来る利点を有す。本測定キットは豚の血清・分泌液・体液等の検体中のトランスフェリンを、再現性良く短時間に定量測定出来る。

[I] . <キットの内容>

1. 豚トランスフェリン抗体ゲルプレート（17穴） 3枚
2. 希釈溶液 20ml 1本
3. 純水 3ml 1本
4. 豚トランスフェリン標準溶液[0.125・0.25・0.5・1.0・2.0、mg/ml]各20μl各1本
5. グラフ用紙 2枚
6. 使用説明書 1部

[II] . <測定原理>

豚トランスフェリン抗体を混合したアガロスゲルプレートを作製。この抗体含有ゲルプレートに一定の大きさのウェールを作製。このホールに豚血清や体液等の検体を添加し密閉後、37℃の恒温器に入れ24時間インキベーションを行う。この操作により検体に含まれているトランスフェリン抗原のゲル内拡散が起こり、ゲル内に含有している抗体と抗原抗体反応が起こる。この抗体と抗原の結合反応により不溶性の化合物が生成し、検体を入れたウェールを中心に白いリングが形成される。この円の大きさの直径の二乗が抗原蛋白の濃度に比例するので、各濃度の標準トランスフェリンの円の大きさをグラフ用紙にプロットした検量線から、未知の検体に含まれているトランスフェリン含有量の定量測定が可能である。

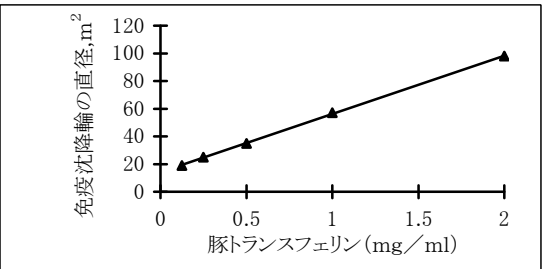
[III] . <使用目的>

正常な豚及び、感染症・腫瘍等の各種疾病疾患豚の血清・体液・分泌液等に含有する、トランスフェリン定量による、鉄バランス・健康状態、更には、疾病との関連性についての研究等。

[IV] . <使用器具器材>

1. 恒温器（インキベーター、37℃使用可能）
2. パスツールピペット
3. マイクロチューブ（1～2ml）又は1～2ml試験管
4. マイクロピペット（1～5μl）
5. スケールルーペ又はスケール(物差)

[V] . <参考資料>



SRID法によるトランスフェリン免疫沈降輪ゲルパターン

SRID法による豚トランスフェリンの検量線

[VI] . <豚トランスフェリンSRID定量測定方法>

1. ゲルプレートのテープを取り除き、プレートの蓋をとる。
2. ゲルプレートのウェールにマイクロピペットで検体3μl添加する。尚検量線作成用として、標準トランスフェリンの倍々希釈溶液の5濃度液を、ゲルプレートの真中列5ホールの各々に、各濃度の標準希釈トランスフェリン溶液の3μlずつ入れる。
3. 次にゲルプレートの周りの溝に、純水をパスツールピペットを用い満す。
4. ゲルプレートに蓋をし、更にゲルの乾燥を防止するためテープでプレートの周りを密閉する。
5. このプレートを恒温器に水平に入れ、37℃で24時間静置状態で免疫拡散反応を行う。
6. 反応終了後スケールルーペで(又物差)円の直径測定し、その二乗値検量線より読み取り検体中のトランスフェリンを定量する。
7. もし、恒温器無き場合には室温で反応させる。この場合には、抗原抗体反応が若干低下しますが測定可能です。

[VII] . <蛋白量算出方法及び測定範囲>

1. トランスフェリン量の算出法：
反応終了後ゲルプレートに生成した、免疫沈降円の直径を測定。この直径の二乗値を検量線より読み取り値を測定
2. トランスフェリン量の測定範囲：0.125～2mg/ml（最大沈降輪の直径12mm以内）
3. 正常成牛血清の希釈：血清検体を4倍前後で希釈し測定下さい（但し、直径12mm以上希釈）。

[VIII] . <使用上の注意点>

1. 検量線は出来るだけ測定ごとに作成して下さい。
2. 検体の濃度範囲を超える場合には、添付希釈容液で希釈し測定して下さい。
3. 反応中ゲルプレートを密閉し、乾燥しないようにして下さい。
4. 反応中は、ゲルプレートを水平に保ち静置状態で反応して下さい。
5. ゲルプレートは絶対に凍結しないで下さい、使用不能になります。
6. 保管中ゲルプレートを乾燥させないように、1～6℃で冷蔵保管下さい。

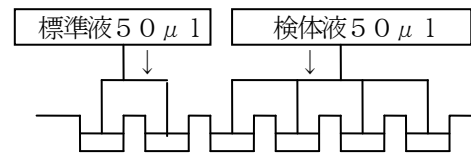
[IX] . <保存方法>

保存条件：1～6℃で冷蔵保管（早めのご使用をお勧め致します）
有効期限：製品に記載

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/FAX：023-645-1392 TEL/FAX：050-3088-1594

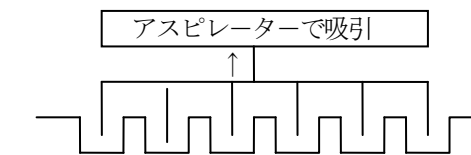
[VI] . <測定操作手順>

(A)



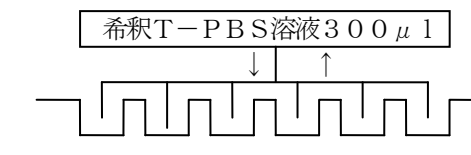
[標準液及び検体を各ウェルに50 μl 加え、30℃で1時間静置反応]

(B)



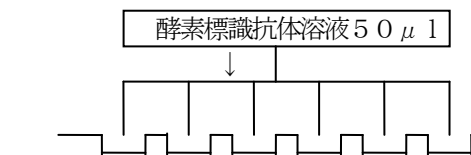
[アスピレーター、ピペット等で 溶液を除去]

(C)



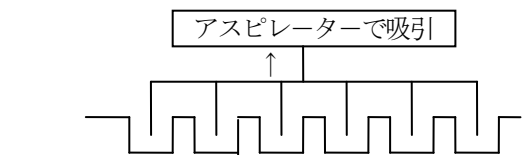
[希釈T-PBS溶液各300 μl 加え、ウェルを洗浄する。同液で3回同一洗浄操作を繰り返し未反応抗原を除去する]

(D)



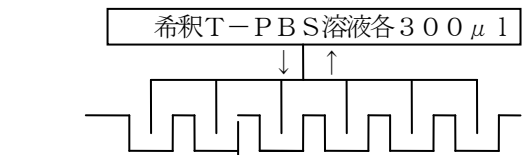
[希釈T-PBS溶液除去した各ウェルに、酵素標識抗体溶液各50 μl ずつ加え静かに攪拌後、30℃で1時間反応]

(E)



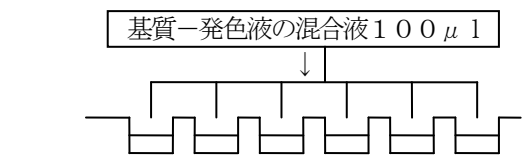
[アスピレーター、ピペット等で溶液を除去]

(F)



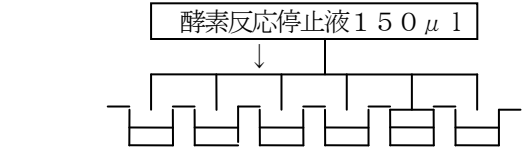
[希釈T-PBS溶液各300 μl 加え、ウェルを洗浄する。同溶液で3回同一洗浄操作を繰り返し、未反応酵素標識抗体を除去]

(G)



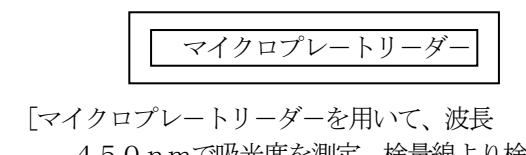
[基質-発色混合液各100 μl を一定間隔で加え、30℃で30分酵素反応を行う]

(H)



[酵素反応停止液を各150 μl 加え、酵素反応を停止する]

(I)

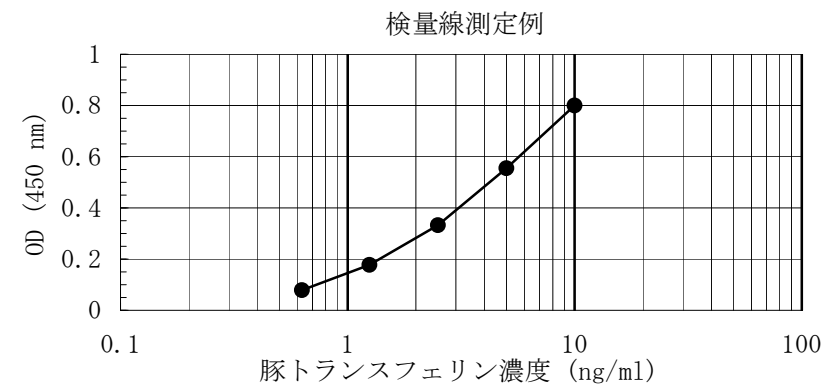


[マイクロプレートリーダーを用いて、波長450 nmで吸光度を測定。検量線より検体中の牛アルブミンの含有量を求める]

[VII] . <検量線の作成方法> (例)

添付豚トランスフェリン標準品(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 | 豚トランスフェリン濃度 (ng/ml) | | | | | |
|-------------|---------------------|-----|-----|-----|------|------|
| | 1 μg | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.63 |
| 標準蛋白溶液 (ml) | 0.1 | 0.1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| T-PBS (ml) | 9.9 | 9.9 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 残量 (ml) | 9.9 | 9.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1.0 |



[VIII] . <性能>

1. 測定範囲:0.6~10 ng/ml。

[成豚血清の最適希釈倍率:1×10⁵希釈T-PBSを用いて10倍段階希釈]

2. 検出限界値:1 pg/ml

3. 回収率(n=5):

| | |
|-------------------|-------|
| 豚トランスフェリン (ng/ml) | 1.25 |
| 回収率平均値 (%) | 100.7 |
| 標準偏差 | 0.79 |
| 変動係数 (%) | 0.78 |

4. 特異性:他の豚血清成分との交差反応は認められず、豚トランスフェリンと特異的に反応。

5. 同時再現性(n=6):

| | |
|------------------|-------|
| 豚トランスフェリン(ng/ml) | 1.25 |
| 吸光度平均値 | 0.180 |
| 標準偏差 | 0.002 |
| 変動係数 (%) | 1.11 |

6. 日差再現性 (n=6):

| | |
|-------------------|-------|
| 豚トランスフェリン (ng/ml) | 1.25 |
| 吸光度平均値 | 0.184 |
| 標準偏差 | 0.005 |
| 変動係数 (%) | 2.72 |

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

TEL : 050-3088-1594 FAX : 050-3088-1594

URL : <http://www.life-kenkyusho.co.jp>