

EIA法 ラット CINC-1 (IL-8)測定キット PRI121

パナテスト® Aシリーズ **ラット CINC-1 (IL-8)**

1. はじめに

CINC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) は正常ラット腎細胞株である NRK-52E の培養上清から IL-8 様物質として精製されました。その後、CINC には数種類あることがわかり、それぞれ CINC-1, CINC-2 α , CINC-2 β および CINC-3 と命名されました。CINC-1 は IL-8 と同一の物質と確認され、好中球の遊走を促進する因子として作用する分子量 7845 のペプチドで、好中球の細胞内酵素の放出を引き起こすことが判明しており、炎症への関与も注目されています。本製品は、株式会社サイトシグナル研究所によって開発されました。

2. 特長

- 1) ラット CINC-1 に特異的な抗体を用いた酵素免疫測定法 (EIA) です。ラット専用ですので、特異性の高い測定を迅速かつ簡便に行うことができます。
- 2) 酵素免疫測定法を使用しているため特別な施設を必要としません。

3. 試薬の内容

①固相化プレート (抗ラット CINC-1 抗体固相化プレート)	96 ウェル×1
②標準ラット CINC-1 (1,600 pg/mL)	2 mL 用 (凍結乾燥品) ×1
③検体希釈液	40 mL ×1
④酵素標識抗体 (ペルオキシダーゼ結合抗ラット CINC-1 抗体)	12 mL 用 (凍結乾燥品) ×1
⑤発色液 (TMBZ : 3, 3', 5, 5' -tetramethylbenzidine 13.2 mg 含有 - N'N'-ジメチルホルムアミド)	0.5 mL ×1
⑥基質液 (H ₂ O ₂ 0.0083 w/v% 含有)	20 mL ×1
⑦濃縮洗浄液 (10 倍濃縮 PBS-Tween 20 : 400 mL 用)	40 mL ×1
⑧反応停止液 (1 mol/L 硫酸)	15 mL ×1

4. 必要な器具・装置

- 1) マイクロピペットおよびチップ (50 μ L, 100–1,000 μ L)
- 2) メスピペット (2 mL, 10 mL)
- 3) メスシリンダー (500 mL)
- 4) 96 ウェルマイクロプレート用洗浄器
手動の場合 : 連続分注器, アスピレーター等
- 5) 8 連式マルチチャンネルピペット
- 6) マイクロプレートリーダー (測定波長 : 450 nm)

5. 試薬の調製法

試薬	調製法	調製試薬	保存方法及び保存期間
① 固相化プレート	使用直前に洗浄液 300 μ L を各ウェルに入れ 10 分間静置する.	固相化プレート	用時調製して下さい.
② 標準ラット CINC-1	精製水 2.0 mL を正確に加え, 泡立てないようによく混和し溶解して下さい.	標準ラット CINC-1 1,600 pg/mL	冷暗所 (2~10°C) で 1 週間安定です.
③ 検体希釈液	そのまま使用します.		冷暗所 (2~10°C) で 安定です.
④ 酵素標識抗体	精製水 12 mL を正確に加え, よく混和して下さい.	酵素標識抗体液	冷暗所 (2~10°C) で 1 週間安定です.
⑤ 発色液 ⑥ 基質液	基質液 10 mL に発色液を 100 μ L 加え, よく混和して下さい.	基質発色液	用時調製して下さい.
⑦ 濃縮洗浄液	全量 40 mL を精製水 360 mL に加え, よく混和して下さい.	洗浄液 (PBS-0.05 v/v% Tween 20)	調製後 1 週間安定です.
⑧ 反応停止液	そのまま使用します.		室温で安定です.

<注意>

試薬は必ず室温に戻して使用して下さい.

固相化プレートで使用しないウェルは直ちにプレートの入っていたアルミシール内に密封し, 冷暗所 (2~10°C) に保存して下さい. 約 1 週間安定です.

基質発色液は, 調製後 10 分以内に使用して下さい. 攪拌子による混和は避けて下さい.

基質発色液は⑤, ⑥の混和後の保存はできません.

標準ラット CINC-1 および酵素標識抗体液を調製後, 凍結融解の繰り返しは避けて下さい.

6. 測定操作法

検体の調製

- ・血清, 血漿 (ヘパリン加, EDTA 加及びクエン酸加) 及び培養上清を用います.
- ・血清, 血漿は検体希釈液で 4 倍以上希釈します.
- ・培養上清中の血清蛋白 (FCS) 濃度が 10 %程度までなら原液から測定できます.
- ・検体は測定時まで, -20°C 以下で保存して下さい.

標準ラットCINC-1の調製

②標準ラット CINC-1 の入ったバイアルに精製水 2.0 mL を正確に加え, 泡立てないようゆっくり溶解します. これを標準液原液 (1,600 pg/mL) とします. この原液を③検体希釈液で倍々希釈して 800, 400, 200, 100, 50, 25 及び 12.5 pg/mL の各濃度標準液を調製します. また 0 pg/mL は③検体希釈液をそのまま使用します. 低濃度の CINC-1 は, ガラス表面に吸着する恐れがありますので, 希釈の際にはポリプロピレン製の容器を用いて下さい.

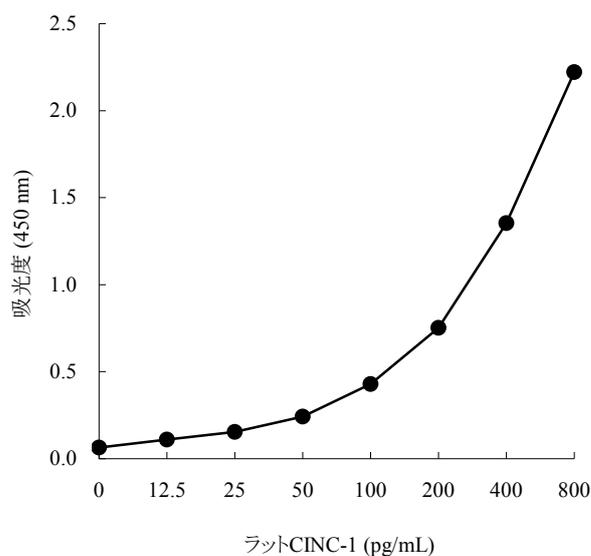
測定操作手順

測定はすべて2重以上の測定で行うことをおすすめします。

- 1) ①固相化プレートをアルミシールから取り出し、使用する各ウェルに⑦洗浄液 300 μL ずつ分注し、室温で10分間静置します(30分間までは測定に影響ありません)。
- 2) ウェル内の液をアスピレーターで吸引除去します。
- 3) 各濃度に調製した②標準ラット CINC-1 または検体を各ウェルに 100 μL ずつ加え、室温で2時間静置します。
- 4) ウェル内の液をアスピレーターで吸引除去し、⑦洗浄液を各ウェルに 300 μL ずつ分注し、さらに洗浄液を除去します。
- 5) 4) と同様の操作をさらに2回繰り返し、洗浄します。
- 6) 調製した④酵素標識抗体液を各ウェルに 100 μL ずつ加え、室温で1時間静置します。
- 7) ウェル内の液をアスピレーターで吸引除去し、⑦洗浄液を各ウェルに 300 μL ずつ分注し、さらに洗浄液を除去します。
- 8) 7) と同様の操作をさらに2回繰り返し、洗浄します。
- 9) 調製した⑤⑥基質発色液を各ウェルに 100 μL ずつ一定の順序、一定の時間間隔で加え、室温で30分間反応させます。
- 10) ⑧反応停止液を各ウェルに 50 μL ずつ基質発色液を入れたときと同一順序、同一時間間隔で加え、酵素反応を停止させます。
- 11) 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定します。

7. ラット CINC-1 濃度の算出法

- 1) 二重測定の各吸光度の平均値を算出します。
- 2) X 軸に標準液の濃度を、Y 軸に吸光度の値をとってプロットし、標準曲線を作成します。
- 3) 検体の吸光度の値を標準曲線に当てはめ、検体中のラット CINC-1 の濃度を読み取り、希釈倍率を乗じます。



8. 測定上の注意事項

- 1) 各試薬の保存期間及び保存方法を厳守して下さい。
- 2) 調製試薬は必ず室温に戻して使用して下さい。
- 3) 各試薬は完全に溶解している事を確認して使用して下さい。
- 4) 反応液を吸引除去する際、ウェルに傷がつかないように注意して下さい。
- 5) 検体数が多い場合は、各検体の反応時間が一定の時間になるように注意して下さい。
- 6) 標準曲線は測定毎に作成して下さい。
- 7) 基質発色液を調製する器具はよく洗浄したものを使用して下さい。
(器具の汚れで発色してしまうことがあります)
- 8) 固相化プレートのウェルに白色の粉末が付着していることがあります。これはブロッキング液が乾燥したもので、測定には影響ありません。
- 9) 反応停止液は 1 mol/L 硫酸ですので、取り扱いには十分注意して下さい。

9. システムの性能

測定範囲

このシステムでは 12.5~800 pg/mL の範囲でラット CINC-1 を測定することができます。

同時再現性

標準				検体			
ラット CINC-1 (pg/mL)		吸光度平均値	%C.V.	血漿		吸光度平均値	%C.V.
0	(n=6)	0.065	1.5	A	(n=6)	0.323	1.9
12.5	(n=6)	0.110	1.8	B	(n=6)	1.495	4.3
25	(n=6)	0.154	1.9				
50	(n=6)	0.243	2.5	血漿		濃度平均値 (pg/mL)	% C.V.
100	(n=6)	0.429	2.8	A	(n=6)	68.8	2.7
200	(n=6)	0.752	1.2	B	(n=6)	459.5	5.8
400	(n=6)	1.354	2.9				
800	(n=6)	2.221	2.5				

C.V. : 変動係数

日差再現性

標準				検体			
ラット CINC-1 (pg/mL)		吸光度平均値	%C.V.	血漿		吸光度平均値	%C.V.
0	(n=6)	0.066	5.5	A	(n=6)	0.311	3.0
12.5	(n=6)	0.113	3.4	B	(n=6)	1.452	3.2
25	(n=6)	0.161	3.0				
50	(n=6)	0.256	2.4	血漿		濃度平均値 (pg/mL)	% C.V.
100	(n=6)	0.444	2.5	A	(n=6)	65.3	4.7
200	(n=6)	0.788	4.0	B	(n=6)	416.2	5.6
400	(n=6)	1.431	3.3				
800	(n=6)	2.294	4.9				

C.V. : 変動係数

検体 A, B はラットヘパリン加血漿に標準ラット CINC-1 を添加した検体

添加回収試験

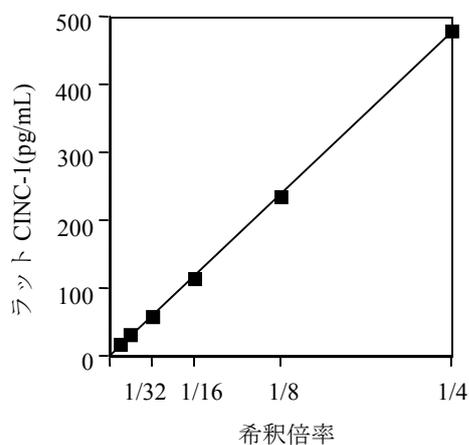
各検体にラット CINC-1 を添加し測定した結果（回収率）

検体	希釈倍率	4 倍希釈	8 倍希釈
ヘパリン加血漿		90～113%	103～117%
EDTA 加血漿		98～115%	99～142%
クエン酸ナトリウム加血漿		83～99%	75～97%
血清		92～125%	94～103%

検体	希釈倍率	原液	2 倍希釈
10%FCS 含有 DMEM 培地		99～114 %	99～100 %

希釈試験

ラット CINC-1 を添加したラット血清を検体希釈液で希釈した結果



交叉反応性

ラット CINC-2 α , CINC-2 β および MIP-2 との交叉反応性はいずれも 0.002 %未満です。

10. 貯法及び有効期間

冷蔵所保存（2～10°C）で表示された有効期限（製造後 1 年間）まで安定です。

11. 包装

96 テスト用。

三菱化学メディエンス株式会社 熊本研究所

〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町 1285

TEL 0964-23-5111 FAX 0964-23-5129