

EIA法 ラットフェリチン測定キット PRA011

パナテスト®Aシリーズ **ラットフェリチン**

1. はじめに

フェリチンは1937年に Laufberger により初めて馬の脾臓より抽出・結晶化されたもので、分子量約45万、2つの異なるサブユニット（H：分子量 約21000，L：分子量 約20700）24個を種々の比率で含む鉄貯蔵蛋白です。また、分子内には4500個の鉄原子を含みます。

一般にフェリチンは、脾臓、肝臓、赤色骨髄、小腸粘膜、筋肉組織などに存在し、細胞内外の鉄代謝に関与しています。生体内でヘモグロビン、鉄含有酵素などの金属鉄の供給源となり、有害なヒドロキシラジカルを生成する反応を触媒する鉄を蛋白分子の内腔に貯蔵する役割を持っています。血清中のフェリチン量の測定は鉄代謝異常、肝疾患、悪性腫瘍の診断などに有用とされています。

2. 特長

- 1) ラットフェリチンに特異的な抗体を用いた酵素免疫測定法（EIA法）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なうことができます。
- 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（抗ラットフェリチン抗体固相化プレート）	96 ウェル×1
②標準ラットフェリチン（200 ng/mL）	2 mL 用（凍結乾燥品）×1
③濃縮検体希釈液（5倍濃縮：200 mL用）	40 mL×1
④酵素標識抗体（ペルオキシダーゼ結合抗ラットフェリチン抗体）	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 μL, 100–1,000 μL）
- 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	用時必要なウェル数を調製して下さい.
② 標準ラットフェリチン	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.	標準ラットフェリチン 200 ng/mL	冷暗所 (2~10°C) で 1 週間安定です.
③ 濃縮検体希釈液	全量 40 mL を精製水 160 mL に加え、よく混和して下さい.	検体希釈液	冷暗所 (2~10°C) で 1 週間安定です.
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)	室温で 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プレートの入っていたアルミシール内に密封して冷暗所で保存して下さい.

基質発色液は、調製後 10 分以内に使用して下さい. 撈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.

6. 測定操作法

標準ラットフェリチン溶液の調製

②標準ラットフェリチンの入ったバイアルに精製水 2.0 mL を正確に加え、これを標準液原液とします. 原液濃度は 200 ng/mL となります. この原液を③検体希釈液で倍々希釈して、100, 50, 25, 12.5, 6.25 及び 3.13 ng/mL の各濃度標準液を調製します. 0 ng/mL は③検体希釈液をそのまま使用します.

検体の調製

通常、血清を用います.

測定の際は、血清成分の影響が考えられますので、検体は 20 倍以上に希釈して下さい.

測定範囲をはずれる高濃度の検体については、③検体希釈液でさらに希釈を行なって下さい.

例) 血清 50 μ L に③検体希釈液 950 μ L を加え、20 倍に希釈します.

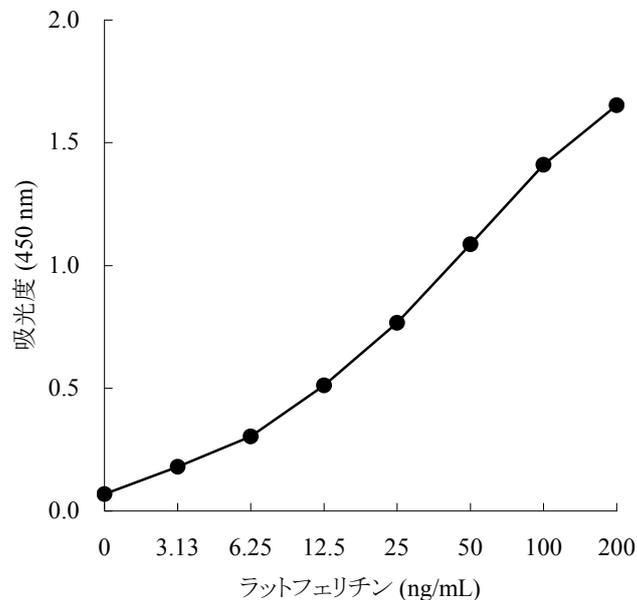
測定操作手順

測定はすべて2重以上の測定で行な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) ②標準ラットフェリチン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、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) と同様の操作をさらに2回繰り返し、洗浄します。
- 6) ④酵素標識抗体を各ウェルに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、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15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. ラットフェリチン濃度の算出法

- 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、検体中のラットフェリチン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) 多数の検体を測定する際は、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、取扱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 3.13~200 ng/mL の範囲でラットフェリチンを測定することができます。

同時再現性

標準				検体		
ラットフェリチン (ng/mL)		吸光度平均値	%C.V.	血清	吸光度平均値	%C.V.
0	(n=8)	0.058	10.3	A (n=8)	0.641	3.3
3.13	(n=8)	0.266	2.3	B (n=8)	1.101	3.5
6.25	(n=8)	0.347	4.0			
12.5	(n=8)	0.517	6.0	血清	濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
25	(n=8)	0.761	3.9	A (n=8)	18.22	6.0
50	(n=8)	1.040	2.5	B (n=8)	57.34	8.5
100	(n=8)	1.339	2.3			
200	(n=8)	1.627	2.7			

C.V.: 変動係数

日差再現性

標準				検体		
ラットフェリチン (ng/mL)		吸光度平均値	%C.V.	血清	吸光度平均値	%C.V.
0	(n=8)	0.064	7.8	A (n=8)	0.634	9.6
3.13	(n=8)	0.222	11.7	B (n=8)	1.079	7.1
6.25	(n=8)	0.337	13.1			
12.5	(n=8)	0.501	10.6	血清	濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
25	(n=8)	0.726	7.4	A (n=8)	19.26	13.5
50	(n=8)	0.998	8.2	B (n=8)	61.57	10.5
100	(n=8)	1.287	7.3			
200	(n=8)	1.570	5.9			

C.V.: 変動係数

血清 A は SD ラット (7 週齢, 雄) 血清を 20 倍希釈した検体

血清 B は SD ラット (7 週齢, 雄) 血清を 20 倍希釈したものに、標準ラットフェリチンを添加した検体

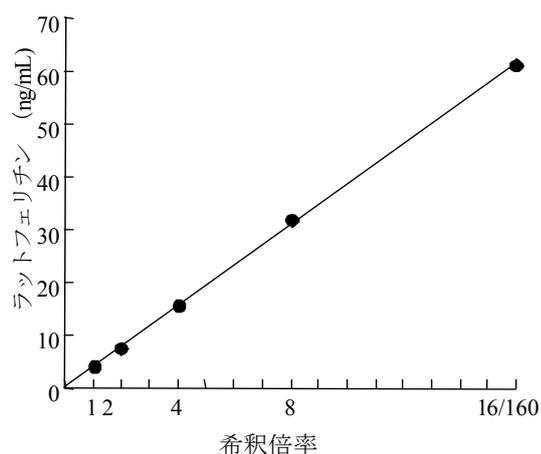
添加回収試験

20 倍以上に希釈した SD ラット（7 週齢，雄）血清に標準ラットフェリチンを添加して測定した結果

血清	添加量 (ng/mL)	実測値 (ng/mL)	理論値 (ng/mL)	回収率 (%)
1	0	20.83	-	-
	25	44.64	45.83	97.4
	50	69.68	70.83	98.4
	100	117.13	120.83	96.9
2	0	8.25	-	-
	1.56	10.23	9.81	104.3
	6.25	15.17	14.50	104.7
	25	36.30	33.25	109.2
3	0	3.75	-	-
	1.56	4.68	5.31	88.2
	3.13	7.38	6.88	107.3
	12.5	18.08	16.25	111.3

希釈試験

SD ラット（7 週齢，雄）血清を検体希釈液にて 10～160 倍に希釈した範囲で希釈直線性が得られます。



10. 貯法及び有効期間

冷暗所保存（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