

EIA 法 ラットプロラクチン測定キット PRB021

パナテスト® Aシリーズ **ラットプロラクチン**

1. はじめに

プロラクチンは、脳下垂体前葉より分泌される分子量約 20000 の蛋白ホルモンで、ほ乳類では乳腺の発育分化、乳汁分泌促進等の作用を有しています。動物実験等において、その血中プロラクチン濃度を測定することにより、下垂体腺腫などの下垂体の異常、下垂体の分泌調節機構や分泌能の異常を検出することが可能となります。

プロラクチンの測定方法の面から見ると、1931 年にハトそ嚢法によるプロラクチンの生物学的測定法、1971 年にマウス乳腺の組織培養を用いた測定法が開発され、ラジオイムノアッセイによる測定も行なわれるようになりました。

本測定キットは酵素免疫測定法を用いたプロラクチン測定法で、放射能を用いず、短時間で血中プロラクチンの測定が可能です。

2. 特長

- 1) ラットプロラク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) 1 ステップ法を使用していますので短時間で測定できます。
- 4) プロゾーン現象は 2,000 ng/mL まで認められません。

3. 試薬の内容

- | | |
|--|-----------------------|
| ①固相化プレート（抗ラットプロラクチン抗体固相化プレート） |96 ウェル×1 |
| ②標準ラットプロラクチン（50 ng/mL） |1 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プロラクチン抗体） |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（20 μ L, 100–1,000 μ L）
- 2) メスピペット（1 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	用時必用なウェル数を調製して下さい.
② 標準ラットプロラクチン	精製水 1.0 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.	標準ラットプロラクチン 50 ng/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)	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. 撹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

標準ラットプロラクチン溶液の調製

②標準ラットプロラクチンの入ったバイアルに精製水 1.0 mL を正確に加え, これを標準液原液とします. 原液濃度 50 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, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 及び 0.78 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

血清および血漿 (ヘパリン加もしくは EDTA 加) を用います.

検体は-20°C 以下で保存してください.

測定範囲をはずれる高濃度の検体については, ③検体希釈液で希釈して測定して下さい.

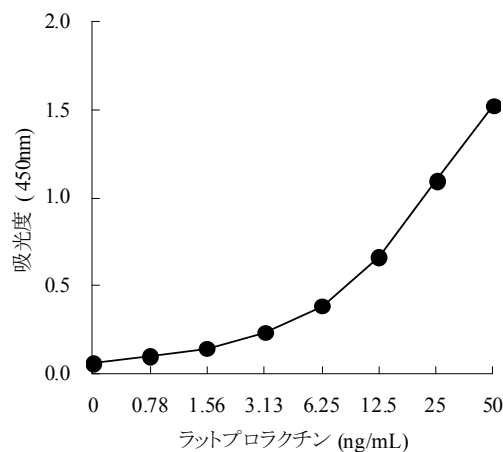
測定操作手順

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 μ L 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) ④酵素標識抗体液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、これに②標準ラットプロラクチンまたは検体を酵素標識抗体液の入った各ウェルに 20 μ L ずつ加え、プレートミキサーなどでよく攪拌後、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 μ L 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⑤⑥基質発色液を各ウェルに 100 μ L ずつ一定の順序、一定の時間間隔で加え、室温 30 分間反応させます。
- 7) ⑧反応停止液を各ウェルに 50 μ L 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。
- 8) 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. ラットプロラクチン濃度の算出法

- 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、検体中のラットプロラク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) 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 0.78～50 ng/mL の範囲でラットプロラクチンを測定することができます。

同時再現性

標準				検体			
ラットプロラクチン (ng/mL)		吸光度平均値	%C.V.	血清		吸光度平均値	%C.V.
0	(n=8)	0.029	17.2	A	(n=8)	0.101	5.9
0.78	(n=8)	0.044	9.1	B	(n=8)	0.306	3.3
1.56	(n=8)	0.066	4.5	C	(n=8)	0.716	3.6
3.13	(n=8)	0.107	4.7				
6.25	(n=8)	0.195	6.7	血清		濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
12.5	(n=8)	0.370	4.3	A	(n=8)	2.00	12.5
25	(n=8)	0.690	5.5	B	(n=8)	9.71	2.8
50	(n=8)	1.121	2.3	C	(n=8)	25.77	4.6

C.V.: 変動係数

日差再現性

標準				検体			
ラットプロラクチン (ng/mL)		吸光度平均値	%C.V.	血清		吸光度平均値	%C.V.
0	(n=8)	0.029	17.2	A	(n=8)	0.106	12.3
0.78	(n=8)	0.054	14.8	B	(n=8)	0.313	11.5
1.56	(n=8)	0.076	14.5	C	(n=8)	0.714	13.2
3.13	(n=8)	0.124	9.7				
6.25	(n=8)	0.223	9.9	血清		濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
12.5	(n=8)	0.414	8.9	A	(n=8)	1.72	14.9
25	(n=8)	0.718	10.9	B	(n=8)	8.82	9.4
50	(n=8)	1.244	8.5	C	(n=8)	24.14	10.3

C.V.: 変動係数

血清 A は、SD ラット (7 週齢, 雄) 血清を 10 倍希釈した検体

血清 B, C は、SD ラット (7 週齢, 雄) 血清を 10 倍希釈したものに、標準ラットプロラクチンを添加した検体

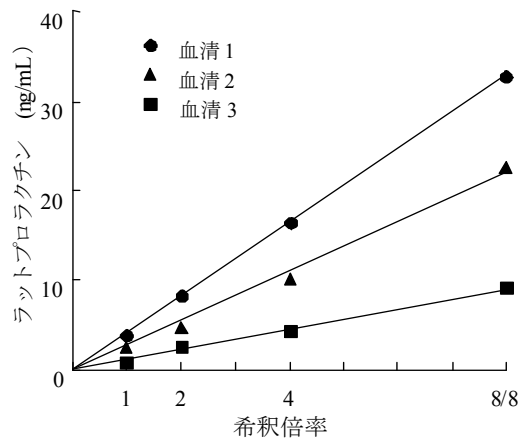
添加回収試験

SD ラット（7 週齢，雄）血清に標準ラットプロラク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 血清	0	0.91	-	-
	3.13	4.20	4.04	104.0
	12.5	14.37	13.40	107.3
	25.0	26.33	25.90	101.7
2 血清	0	14.10	-	-
	3.13	17.07	17.23	99.1
	12.5	26.86	26.60	101.0
	25.0	35.13	39.10	89.8

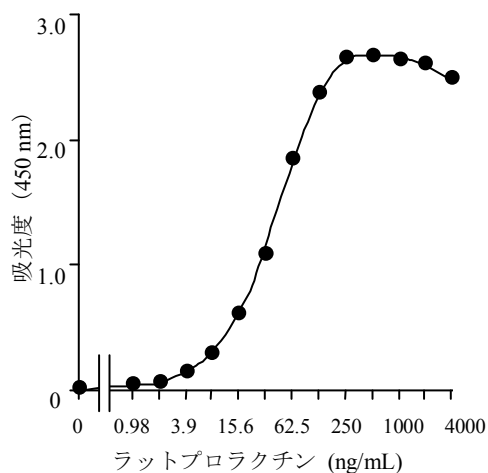
希釈試験

SD ラット（7 週齢，雄）血清を検体希釈液にて 1，2，4 及び 8 倍に希釈したときの結果



過剰抗原の影響

1～4,000 ng/mL の濃度のプロラクチンを測定したとき，2,000 ng/mL までプロゾーン現象は認められなかった。



10. 貯法及び有効期間

冷暗所保存（2～10℃）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