

EIA 法 ラット α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AG) 測定キット PRE061パナテスト® Aシリーズ **ラット α_1 -AG**

1. はじめに

α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AG) は急性炎症の際、非特異的に血液中に増加する急性相蛋白で、急性および慢性炎症疾患、腫瘍、血液疾患、膠原病などの指標となります。

本測定キットは、ラット α_1 -AG に特異的な抗体を用いた酵素免疫測定法 (EIA 法) により、高感度で血中及び尿中の検出を行なうことができます。

2. 特長

- 1) ラット α_1 -AG 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 α_1 -AG 抗体固相化プレート) | 96 ウェル×1 |
| ②標準ラット α_1 -AG (80 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 α_1 -AG 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 0.0083w/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 (10–100 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	用時必要なウェル数を調製して下さい.
② 標準ラット α_1 -AG	精製水 2.0 mL を正確に加え、泡立えないようによく混和し溶解して下さい.	標準ラット α_1 -AG 80 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 α_1 -AG 溶液の調製

②標準ラット α_1 -AG 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 80 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、40, 20, 10, 5, 2.5 及び 1.25 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

< 検体が血液の場合 >

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 以下で保存して下さい.

検体 1 mL 中には数 10 μ g 単位で含まれていると考えられますので、必要に応じて希釈して下さい.

例) 血清 20 μ L に③検体希釈液 1 mL を加え、51 倍に希釈します. さらにそれより 20 μ L を取り③検体希釈液 1 mL を加え、2,601 倍に希釈します.

(検体の持ち越しの恐れがあるため、チップは希釈ごとに換えることをおすすめします.)

< 検体が尿の場合 >

尿は-20°C 以下で保存して下さい.

尿 1 mL 中には μ g 単位で含まれていると考えられますので、必要に応じて希釈して下さい.

例) 尿 20 μ L に③検体希釈液 2 mL を加え、101 倍に希釈します.

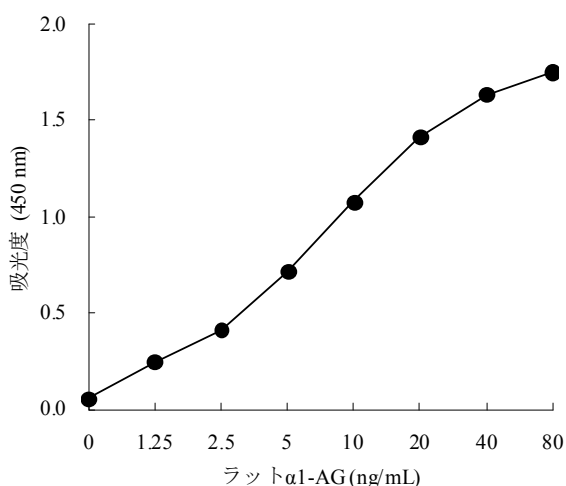
測定操作手順

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 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) ②標準ラット α_1 -AG または検体を各ウェルに 100 μ L 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 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) ④酵素標識抗体を各ウェルに 100 μ L 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 μ L 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 μ L 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 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。
- 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 α_1 -AG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 α_1 -AG 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が、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 1.25~80 ng/mL の範囲でラット α_1 -AG を測定することができます。

同時再現性

標準				検体			
ラット α_1 -AG (ng/mL)		吸光度平均値	%C.V.	血清		吸光度平均値	%C.V.
0	(n=8)	0.025	8.0	A	(n=8)	0.328	3.7
1.25	(n=8)	0.150	2.7	B	(n=8)	0.903	2.3
2.5	(n=8)	0.262	2.7	C	(n=8)	1.492	2.1
5	(n=8)	0.448	2.9				
10	(n=8)	0.740	1.5				
20	(n=8)	1.095	2.9				
40	(n=8)	1.466	2.7				
80	(n=8)	1.734	2.1				
				血清		濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
				A	(n=8)	3.33	4.6
				B	(n=8)	13.93	3.9
				C	(n=8)	42.34	6.7

C.V.: 変動係数

日差再現性

標準			検体		
ラット α_1 -AG (ng/mL)	吸光度平均値	%C.V.	血清	吸光度平均値	%C.V.
0 (n=8)	0.024	16.7	A (n=8)	0.346	5.5
1.25 (n=8)	0.143	7.0	B (n=8)	0.924	5.8
2.5 (n=8)	0.249	5.2	C (n=8)	1.548	4.2
5 (n=8)	0.438	3.9			
10 (n=8)	0.723	3.7			
20 (n=8)	1.100	2.8			
40 (n=8)	1.470	3.0			
80 (n=8)	1.734	3.1			

血清	濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
A (n=8)	3.80	7.1
B (n=8)	14.53	6.9
C (n=8)	48.43	11.0

C.V.: 変動係数

血清 A は、SD ラット (7 週齢, 雄) 血清を 10,000 倍希釈した検体

血清 B, C は、SD ラット (7 週齢, 雄) 血清を 10,000 倍希釈したものに、標準ラット α_1 -AG を添加した検体

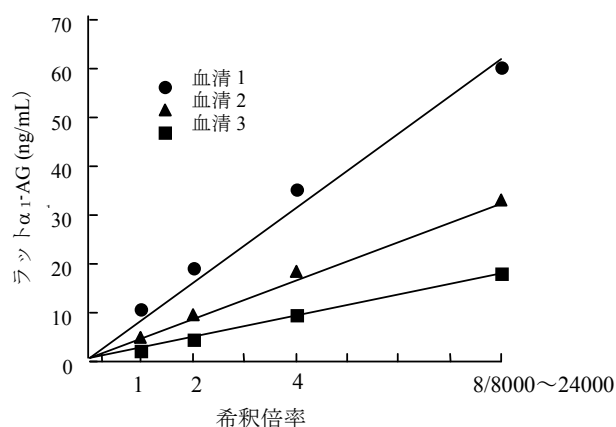
添加回収試験

2,000～8,000 倍希釈した SD ラット（7 週齢，雄）血清に標準ラット α_1 -AG を添加して測定した結果

検体	添加量 (ng/mL)	実測値 (ng/mL)	理論値 (ng/mL)	回収率 (%)
1 血清	0	29.11	-	-
	2.5	32.99	31.61	104.4
	10.0	42.04	39.11	107.5
	40.0	74.92	69.11	108.4
2 血清	0	6.81	-	-
	2.5	9.41	9.31	101.1
	10.0	16.57	16.81	98.6
	40.0	45.58	46.81	97.4

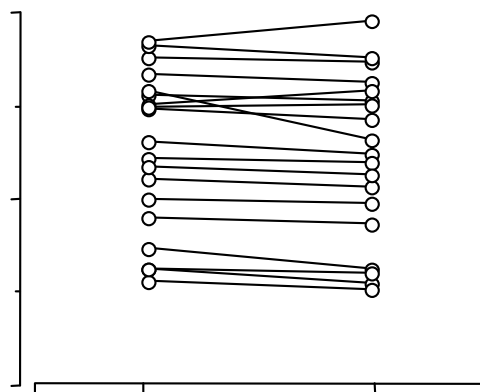
希釈試験

1,000～3,000 倍希釈した SD ラット（7 週齢，雄）血清について検体希釈液で 1, 2, 4 及び 8 倍に希釈したときの結果.



検体の安定性

SD ラット尿 19 検体について，24℃ で 24 時間放置した後も，尿中の α_1 -AG 量にはほとんど変化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