

EIA 法 ラットトランスフェリン測定キット PRG091

パナテスト® Aシリーズ **ラットトランスフェリン**

1. はじめに

トランスフェリンは血中のβ1 分画に属する分子量 7～9 万の血液中の鉄の輸送を行なうタンパク質です。赤芽球や網赤血球はトランスフェリンに結合した鉄でなければヘモグロビン合成に利用できません。また、トランスフェリンは貯蔵鉄レベルを敏感に反映します。それゆえ、トランスフェリンは鉄代謝と造血の重要な指標になります。

さらにトランスフェリンは細胞増殖・生体防御上重要な物質であり、各種病体生理を反映します。

2. 特長

- 1) ラットトランスフェリ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（抗ラットトランスフェリン抗体固相化プレート）..... | 96 ウェル×1 |
| ②標準ラットトランスフェリン（40 ng/mL）..... | 2 mL 用（凍結乾燥品）×1 |
| ③濃縮検体希釈液（10 倍濃縮：400 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トランスフェリン抗体）..... | 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 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	用時必用なウェル数を調製して下さい.
② 標準ラットトランスフェリン	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.	標準ラットトランスフェリン 40 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 360 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

標準ラットトランスフェリン溶液の調製

②標準ラットトランスフェリ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 40 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、20, 10, 5, 2.5, 1.25 及び 0.63 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

<検体が糞便の場合>

新鮮糞便を検体希釈液を用いて懸濁し、遠心分離後上清を測定検体とします. 測定検体は、測定時まで-20°C 以下に凍結保存して下さい. 糞便 1 g 中に 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.

<検体が尿の場合>

新鮮あるいは蓄積尿を遠心分離し (例: 2,500 rpm, 4°C, 15 分間), その上清を測定検体とします. 測定検体は測定時まで-20°C 以下に凍結保存してください. 尿 1 mL 当たり 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 (例: 約 500 倍希釈) して測定下さい.

<検体が血液の場合>

抗凝固剤の有無や種類は測定値に影響しません. 採血後血清も血漿もできるだけ早く血球から分離します. 血清または血漿を長期間保存する場合は、-20°C 以下に凍結保存して下さい. ヘパリン採血では保存中にフィブリンが析出する場合があります. 解凍時には水分が上層に、タンパク部分が下層に集まるのでよく撈拌混合して測定に供してください. 血清 1 mL 中に mg 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.

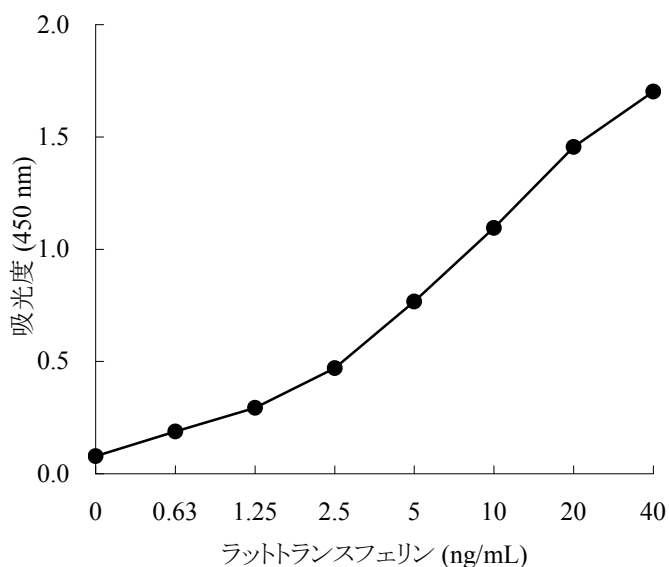
測定操作手順

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標準ラットトランスフェリン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. ラットトランスフェリン濃度の算出法

- 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、検体中のラットトランスフェリ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 0.63～40 ng/mL の範囲でラットトランスフェリンを測定することができます。

同時再現性

標準			検体		
ラットトランスフェリン (ng/mL)	吸光度平均値	%C.V.	尿	吸光度平均値	%C.V.
0 (n=8)	0.048	2.1	A (n=8)	0.169	1.8
0.63 (n=8)	0.136	2.9	B (n=8)	0.469	3.2
1.25 (n=8)	0.219	1.4			
2.5 (n=8)	0.316	3.2	尿	濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
5 (n=8)	0.512	1.8	A (n=8)	0.909	3.2
10 (n=8)	0.804	1.6	B (n=8)	4.878	4.4
20 (n=8)	1.133	1.1			
40 (n=8)	1.332	1.2			

C.V. : 変動係数

日差再現性

標準			検体		
ラットトランスフェリン (ng/mL)	吸光度平均値	%C.V.	糞	吸光度平均値	%C.V.
0 (n=8)	0.060	11.7	A (n=8)	0.173	8.7
0.63 (n=8)	0.117	8.5	B (n=8)	0.450	7.3
1.25 (n=8)	0.172	10.5			
2.5 (n=8)	0.268	9.0	糞	濃度平均値 (ng/mL)	%C.V.
5 (n=8)	0.432	8.1	A (n=8)	1.184	16.9
10 (n=8)	0.681	7.8	B (n=8)	5.234	5.8
20 (n=8)	0.980	6.3			
40 (n=8)	1.232	5.5			

C.V. : 変動係数

A は SD ラット (7 週齢, 雄) 糞 1 g を 20 mL の検体希釈液で懸濁し、さらに 100 倍希釈した検体

B は SD ラット (7 週齢, 雄) 糞 1 g を 20 mL の検体希釈液で懸濁し、さらに 100 倍希釈して標準ラットトランスフェリンを添加した検体

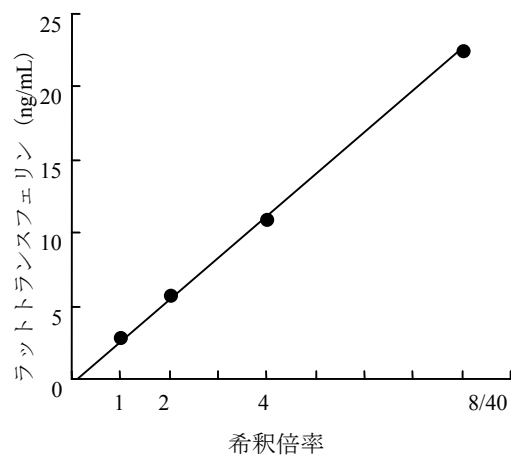
添加回収試験

SD ラット（7 週齢，雄）糞にラットトランスフェリン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 (%)
糞	0	2.17	-	-
	0.63	2.81	2.80	100
	1.25	3.46	3.42	101
	2.5	4.65	4.67	99.6

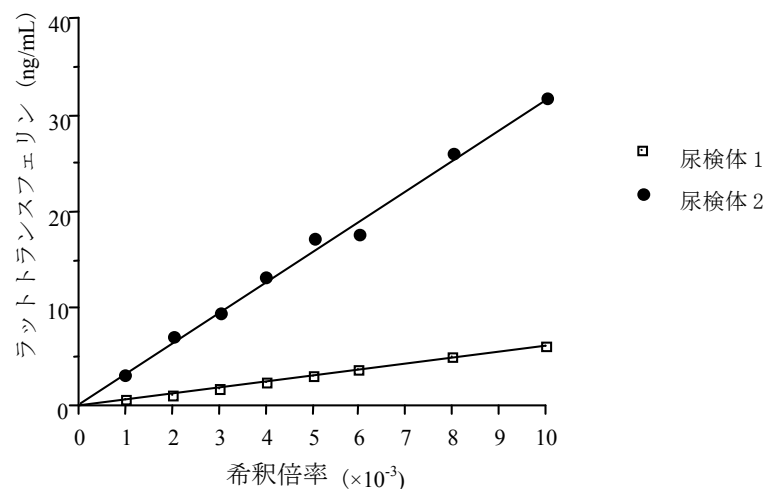
希釈試験 1

0.2 g の SD ラット（7 週齢，雄）糞を検体希釈液で懸濁し 4 mL にし，さらに検体希釈液で 5，10，20 および 40 倍希釈した結果．



希釈試験 2

SD ラット（7 週齢，雄）尿を検体希釈液で 100 倍に希釈したものをさらに希釈して測定した結果．



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