研究用試薬

YK100　Human/Rat　NO Synthase-I　EIA

取　扱　説　明　書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社　　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp　E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目　次

Ⅰ.	はじめに	2
Ⅱ.	特徴	2〜3
Ⅲ.	キットの構成	3
Ⅳ.	操作法	3〜4
Ⅴ.	操作上の注意	5
Ⅵ.	基本性能	6〜7
Ⅶ.	貯蔵法および有効期間	7
Ⅷ.	文献	7

YK100　Human/Rat NO Synthase-I EIA キット

Ⅰ．はじめに

NO Synthase-I は神経組織のみならず、腎緻密細胞、膵β細胞、骨格筋など多彩な組織に存在し、NO の産生に関与する酵素として知られています。

矢内原研究所では、脳 NO Synthase (NOS-I)に対する部位特異抗体を作製し、ついで組織中の免疫活性様 NOS-１の含有量を直接測定しうる EIA を確立しました。これにより組織中の NOS-1 の分布や、NOS-1 の NO 産生活性との相関などを検討する上で、有効なツールとして活用できるものであります。

YK100　Human/Rat NO Synthase-I　EIA キット	**内容**
▼　ヒトおよびラット組織抽出物中の NOS-I 測定用です。 ▼　0.133～32.4pmol/mL の範囲で測定できます。 ▼　41 検体を duplicate でアッセイできます。 ▼　測定は 18～20 時間(室温)と 1.5 時間で終了します。 ▼　検体量は 50μL です。 ▼　プレートは一列（8 ウエル）ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。 ▼　同時再現性　ＣＶ(%) 4.0～5.3 ▼　日差再現性　ＣＶ(%) 4.7～8.0	1）測定プレート 2）標準品 3）標識体 4）特異抗体 5）SA-HRP 溶液 6）酵素基質液 7）酵素反応停止液 8）濃縮洗浄液 9）緩衝液 10) プレート密閉用シール
保存性と安定性 2～8℃で保存してください。製造日より 24 ヶ月は安定です。	

Ⅱ．特徴

今までの NO Synthase 測定キットは、NO の生成量を測定することによる NO Synthase の活性を定量するキットです。本キットはラットおよびヒト組織の抽出物もしくは細胞培養液に含まれる免疫活性様 NOS-1 を直接的且つ特異的に定量するためのキットです。操作は簡便でしかも特異性・定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点があります。なお、添付の標準品 human NOS-1 (998-1024)は高純度合成品（純度 99%以上）であり、表示の重量は絶対量を示しております。また、ビオチン化 human NOS-1 は、HPLC により精製した biotinylated glycylglycyl-human NOS-1 (998-1024) を使用しています。

＜特異性＞

本 EIA キットはヒトおよびラット NOS-1 を認識します。

＜測定原理＞

本 EIA は特異性の高い NOS-1 の IgG 精製抗体を用いた競合反応にビオチンとストレプトアビジンの非常に高い親和性を利用した測定法です。

96 穴プレートの各ウエルには、ヤギ抗ウサギ IgG が固定されています。この各ウエルに標識抗原溶液、ついで標準品または検体および特異抗体溶液を順次加えて、競合反応させます。これに horseradish peroxidase 結合 streptavidin（SA-HRP）を加えると、ウエルに SA-HRP-ビオチン化抗原-抗体複合体が形成されます。最後にこの複合体中の酵素 (HRP)活性を測定することにより、検体中の免疫活性様 NOS-1 濃度を求めることができます。

Ⅲ. キットの構成

試薬	形状	規格	内容物
①測定プレート		96 穴プレート 1 枚	ヤギ抗ウサギ IgG 抗体固定化プレート
②標準品	凍結乾燥品	32.4 pmol、 1 本	合成ヒト NOS-1 (998-1024)
③標識体	凍結乾燥品	バイアル 1 本	ビオチン化ヒト NOS-1 (998-1024)
④特異抗体	液状	6mL、 1 本	ウサギ抗ヒト NOS-1 (998-1024) IgG
⑤SA-HRP 溶液	液状	12mL、 1 本	HRP に結合したストレプトアビジン
⑥酵素基質液	液状	12mL、 1 本	3,3’5,5’-テトラメチルベンジジン（TMB）
⑦酵素反応停止液	液状	12mL、 1 本	1M 硫酸溶液
⑧濃縮洗浄液	液状	25mL、 1 本	１% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
⑨緩衝液	液状	25mL、 1 本	非特異反応除去剤を含むリン酸緩衝液
⑩プレート密閉用シール		3 枚	

Ⅳ. 操作法

＜必要な器具および装置＞

1. マイクロピペットおよびチップ（50 µL～1 mL）; 8 連または 12 連マルチチャンネルピペットの使用をお薦めします。
2. マイクロプレート用吸光度計（測定波長 450 nm で、吸光度 2.5 まで測定できる装置）。
3. 標準液の調製に使用するポリプロピレン製の試験管
4. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます。
5. メスシリンダー（500 mL）。
6. 蒸留水または脱イオン水。

＜試薬の調製＞　　注意：標準品および標識抗原は、溶解後に 1 時間以内使用してください。

1. 洗浄液の調製法：25 mL (全量)を蒸留水または脱イオン水 475 mL にて希釈し使用する。
2. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 1 mL を加え、32.4 pmol/mL の標準液（Std-1）を調製する。調製した STd-1 から 0.2 mL を取り、0.4 mL 緩衝液で希釈し、10.8 pmol/mL の標準液(Std-2)を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、さらに 3.6 (STd-3)、1.2 (Std-4)、0.4 (Std-5)、0.133 (Std-6) pmol/mL の各標準液を調製する。Ｂo (0 pmol/mL)は緩衝液をそのまま使用する。
3. 標識体溶液の調製法:標識抗原の容器に緩衝液 12 mL を加え、内容物を充分溶解させてから使用する。
4. その他の試薬はそのまま＜測定操作＞に従って使用する。

＜測定操作＞

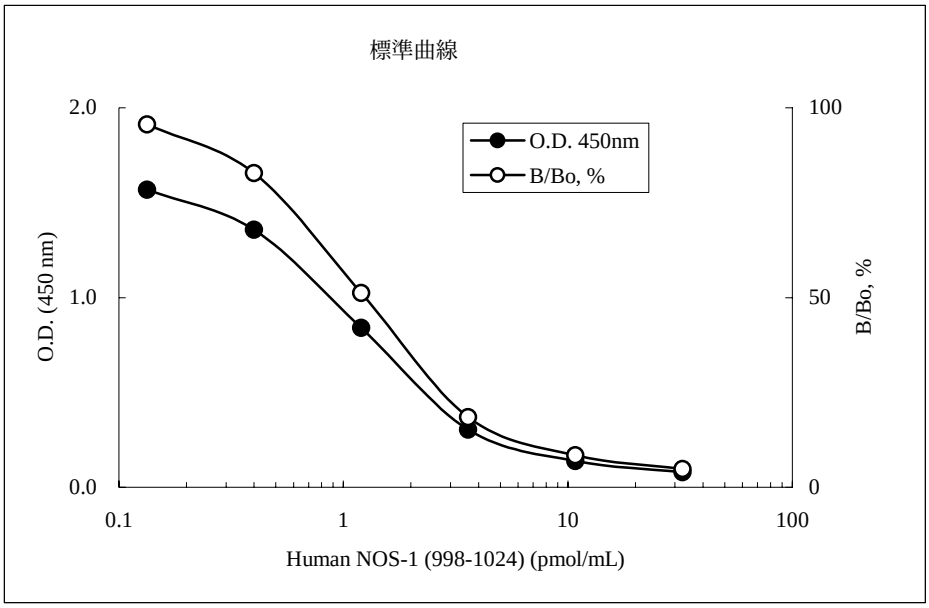
1. キット内容を室温に戻す。標準液、標識体溶液および洗浄液を調製法に従って希釈調製する。
2. プレートの各ウエルに 350μL の洗浄液を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいは液を捨てる。この操作を合計 3 回繰り返します。最後に紙タオルなどにやや強く叩き付けるようにして完全に液を除く。
3. 各ウエルに標識体溶液 100μL を加える。次いで標準品溶液または検体 50μL を加え、さらに抗体溶液 50μL を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールで密閉し、室温で 18～20 時間静置して、反応を行う。
5. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を 3 回行う。
6. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100μL を加える。
7. プレートをプレート密閉用シールで密閉し、室温で 1 時間静置する。
8. 各ウエル中の液を除き、2.と同様の洗浄操作を 5 回行う。
9. 各ウエルに酵素基質液 100μL を加え、プレートをプレート密閉用シールで密閉し、遮光の状態で室温で静置して、30 分間反応させる。
10. 各ウエルに酵素反応停止液 100μL を加える。
11. マイクロプレート吸光度計にて 450 nm の吸光度を測定する。
12. 市販のソフトウェアを用い、4（or 5）－Parameter、もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、標準液の各濃度（６ポイント）の測定値から標準曲線を作成してから、検体の濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸（Log 側）に標準液の濃度を、縦軸 (linear 側)に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、検体の濃度を読み取る。相対結合率で計算する場合、まず各標準液濃度および検体の吸光度の 0ng/mL 濃度標準液の吸光度に対する相対結合率（B/Bo%）を計算し、横軸（Log 側）に標準液の濃度を、縦軸 (linear 側)に標準液各濃度の相対結合率をプロットし、標準曲線を作成する。検体の相対結合率を標準曲線に当てはめ、検体の濃度を読み取る。

Ⅴ．操作上の注意

1. 組織は摘出後 10 mM のリン酸緩衝液(pH7.4)で 10-20 倍の量で抽出してください。必要に応じ抽出用緩衝液に酵素抑制剤（PMSF、aprotinin）などを加えてから抽出してください。抽出液は pH が中性の場合、そのまま測定に供することができますが、大きく変わっていた場合は pH を 7.0-7.4 に調整してから測定してください。抽出された検体の NOS-1 濃度が低いと予測される場合、濃縮か、抽出液を凍結乾燥したのち、キット緩衝液で再溶解してから測定してください。再溶解した検体の凍結融解の繰り返しは避けてください。
2. 各試薬（検体を含む）は、用時調製（希釈）を原則としてください。
3. 試薬調製時には、必ず各試薬（検体）ごとにチップを交換してください。標準液を希釈するとき、移す度にかならず新しいチップを使ってください。
4. 洗浄時にウエルに残液が残らないように反転したプレートをやや強くたたきつけるようにして紙タオルなどの上に充分叩いて残液が残らないように注意してください。
5. キットは分割使用が可能です。溶解（調製）した試薬（標準液および標識抗原）の残液は-30℃以下にて保存してください。
6. 2 キット（2 プレート）以上を操作する場合も、各プレートごとに標準曲線を作成して下さい。なお、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。
7. 標準品、検体ともに二重測定で行ってください。
8. 高濃度が予想されるような検体の場合は、キット緩衝液で数段階希釈してから測定（再測定）してください。
9. 発色反応はかならずプレートを遮光して行ってください。
10. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
11. 洗浄原液は保存中に沈殿を生ずることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
12. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間、プレートの振盪の程度などでわずかながら影響を受けることがありますので、必ず測定毎に検量線を作成してください。

Ⅵ. 基本性能

＜標準曲線＞



＜再現性＞

同時再現性　CV(%)　　4.0～5.3

日差再現性　CV(%)　　4.7～8.0

＜添加回収試験＞

Sample	Human NOS 1 added (pmol/mL)	Observed (pmol/mL)	Expected (pmol/mL)	Recovery (%)
Rat cerebellum	0.00	0.30		-
	0.51	0.97	0.81	120.1
	2.03	2.29	2.33	98.5
	8.11	8.65	8.41	102.8
Rat colon No. 1	0.00	0.73		-
	0.51	1.24	1.24	100.0
	2.03	2.74	2.76	98.8
	8.11	8.04	8.84	90.9
Rat colon No. 2	0.00	3.47		-
	0.51	4.76	3.98	119.8
	2.03	6.35	5.50	115.5
	8.11	13.09	11.58	113.0

＜希釈試験＞

Dilution	Undiluted	1/2	1/4
Rat cerebellum A	21.25	20.62	20.80
Rat cerebellum B	21.77	20.90	21.73
Rat colon A	20.26	19.26	20.57
Rat colon B	24.60	22.42	23.37

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

＜貯蔵＞

遮光し、2～8℃にて保存してください。

＜有効期間＞

製造日より 24 ヶ月（使用期限は外箱に表示）

＜包装＞

1 キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

Ⅷ. 文献

1. Nakane M, et al (1993): Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS* **316**, 175-180
2. Imai T, et al (1992): Expression of brain nitric oxide synthase mRNA in various tissues and cultured cells of rat. *Biomed Res* **13**, 371-374
3. Schmidt HHHW, et al (1994): Biochemistry and regulation of nitric oxide synthase, *Taniguchi Symposium on Brain Sciences* No.**17**, 3-18

＜お問い合わせ先＞

株式会社　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771

Website: http://www.yanaihara.co.jp　E-mail: ask@yanaihara.co.jp

2010 年 6 月 1 日改訂