研究用試薬

YK150　Human S-100β ELISA
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	3
Ⅲ．	キットの構成	4
Ⅳ．	操作法	5～6
Ⅴ．	操作上の注意	7
Ⅵ．	基本性能	8
Ⅶ．	貯蔵法および有効期間	9
Ⅷ．	文献	9

YK150: Human S-100β ELISA キット

Ⅰ． はじめに

S-100 たんぱく質は主として、アストログリア細胞細胞質の主要な部分を占める酸性たんぱく質であり、カルシウム結合能を有する神経系特異たんぱく質の 1 つと考えられています。本たんぱく質は分子量 21KDa であり、α鎖とβ鎖の 2 種のサブユニットで構成されていますが、生体内の存在部位によって、それらサブユニットの組合わせは異なるとされています。すなわち、S-100ββはグリア細胞とシュワン細胞に、S-100αβはグリア細胞、S-100ααは横紋筋、心臓、腎臓に見い出されています。

脳脊髄液の S-100β濃度は頭部外傷、大脳低酸素症、大脳出血、虚血性脳卒中後の脳損傷の程度を推定するための指標として有用であるとする報告があります。また、最近になり、血中 S-100βの上昇が脳における虚血、梗塞、出血及び重症頭部外傷時の脳損傷度と相関し、これら疾患の予知に有効な指標であることが報告されています。

YK150　Human S-100β ELISA キット

▼ 98～6300 pg/mL の範囲で測定できます。
▼ 測定は 15～24+2+2 時間+20 分で終了します。
▼ 40 検体を duplicate でアッセイできます。
▼ 血漿の測定が可能です。
▼ 同時再現性 CV(%)　2.33-11.54
▼ 日差再現性 CV(%)　2.91-7.77

保存と安定性
2～8℃で保存してください。
製造日より 5 ヶ月は安定です。

1） ウサギ抗ウシ S-100β抗体固相化プレート
2） 標準抗原
3） 標識特異抗体溶液
4） SA-HRP 溶液
5） 基質溶解液
6） 酵素基質剤（OPD）
7） 反応停止液
8） 緩衝液
9）濃縮洗浄液
10）プレート密閉用シール

Ⅱ．特　　徴

本 ELISA はヒト血漿に含まれる S-100βを定量的に測定するものです。
本 ELISA によるヒト S-100βの測定は簡便で、しかも特異性、定量性にすぐれ、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。

<特異性>
本 ELISA は S-100ααと 1%、S-100αβと 74%の交差反応性が認められます。

<測定原理>
本 ELISA によるヒト血漿 S-100βの測定法はサンドイッチ法に基づいています。96 ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルにウサギ抗ウシ S-100βポリクローナル抗体が固相化されています。この抗体に標準抗原または検体を反応させ、ついでビオチン化ウサギ抗ウシ S-100βポリクローナル抗体を添加し、抗原抗体複合体を形成させます。これに HRP 標識ストレプトアビジンを添加反応させた後、最後にこの複合体の HRP 活性を測定することにより、検体中の S-100β濃度を求めることができます。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1）抗体固相化プレート	プレート	1 枚	ウサギ抗ウシ S-100β抗体
2）標準抗原	凍結乾燥	6.3ng,1 本	ウシ S-100β
3）標識特異抗体溶液	液状	11mL,1 本	ビオチン化ウサギ抗ウシ S-100β抗体および非特異的反応除去剤を含むリン酸緩衝液
4）SA-HRP 溶液	液状	11mL,1 本	HRP 標識ストレプトアビジンおよび非特異的反応除去剤を含むリン酸緩衝液
5）基質溶解液	液状	26mL,1 本	0.015% 過酸化水素を含むリン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液
6）酵素基質剤	錠剤	2 錠	o-フェニレンジアミン
7）反応停止液	液状	11mL,1 本	2N H_2SO_4
8）緩衝液	液状	30mL,1 本	非特異的反応除去剤を含むリン酸緩衝液
9）濃縮洗浄液	液状	50mL,1 本	1 % Tween 20 を含む濃縮生理食塩水
10）プレート密閉用シール		4 枚	

Ⅳ． 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。
(注意：キットに含まれるすべての試薬は室温にもどしてから測定を始めてください。)

＜使用器具および装置＞

1．マイクロタイタープレートの吸光度計(プレートリーダー)、波長 492 nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置。
2．マイクロタイタープレート用振とう器。
3．マイクロタイタープレート用洗浄器、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。
4．マイクロピペットおよびチップ（50、100、200 および 1,000 μL)。8 連または 12 連のマルチチャンネルピペット。
5．標準液の調製に使用するガラス製の試験管。
6．メスシリンダー(1,000 mL)。
7．蒸留水または脱イオン水。

＜試薬の調製＞

1．標準液の調製法：
標準抗原（凍結乾燥品 6.3ng/vial ）に緩衝液を 1 mL 加えて、6300 pg/mL の標準液を調製する。この標準液から 0.2 mL をとり、緩衝液 0.2 mL で希釈し、3150 pg/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、1575、788、394、197、98 pg/mL の各標準液を調製する。0 pg/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2．酵素基質溶液の調製法：
SA-HRP 反応終了直前に基質溶解液 12 mL に酵素基質剤 1 錠を加え溶解し使用する。
3．洗浄液の調製法：
濃縮洗浄液 50 mL を 950 mL の蒸留水にて希釈し使用する。
4．その他の試薬はそのまま測定操作に従って使用する。

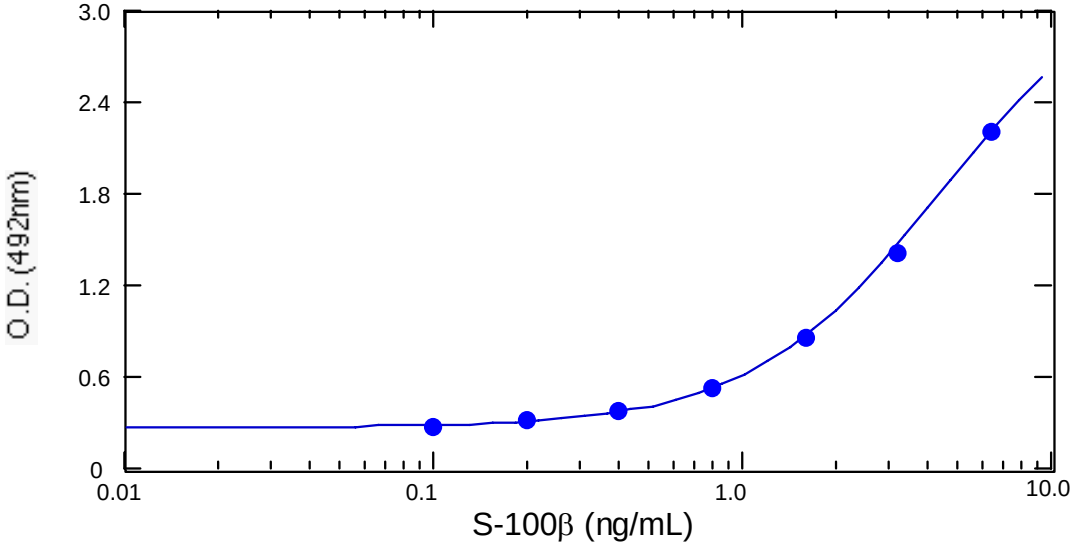
<測定操作>

1. キットの内容を室温にもどす。
2. 抗体固相化プレートの各ウエルの液を除き、各ウエルに 300 μL 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、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして完全に液を除く。この洗浄操作を合計 3 回行なう。
3. 各ウエルに緩衝液 70 μL を入れ、上記標準液調製法にて調製した標準 S-100β希釈系列（0、98、197、394、788、1575、3150、6300 pg/mL の各標準液）または検体を各ウエルに 30 μL ずつ分注する。
4. マイクロタイタープレートをシールし、4℃ で一晩(15～24 時間)静置する。
5. マイクロタイタープレートを室温に戻した後（約 30～40 分)、各ウエル中の液を除き、2)と同様の洗浄操作を 4 回行なう。
6. 各ウエル中に標識特異抗体溶液 100 μL を添加する。
7. マイクロタイタープレートをシールし、室温（20～30℃)にて 2 時間振とうする。反応中はマイクロタイタープレート用振とう器を用いてゆっくりと振とうする。
8. 各ウエル中の液を除き 2）と同様の洗浄操作を 4 回行なう。
9. 各ウエル中に SA-HRP 溶液 100 μL を入れる。
10. マイクロタイタープレートをシールし、室温（20～30℃）で 2 時間反応を行なう。反応中はマイクロタイタープレート用振とう器を用いてゆっくりと振とうする。
11. 基質溶解液 12 mL に酵素基質剤 1 錠を加え溶解する。
12. 各ウエル中の液を除き、2）と同様の洗浄操作を 5 回行なう。
13. 各ウエルに上記調製した酵素基質溶液 100 μL を入れ、室温で正確に 20 分間反応させる。
14. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を入れる。
15. マイクロタイタープレート用吸光度計で 492nm の吸光度を測定する。標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体の測定値を標準曲線に当てはめ、S-100β濃度を算出する。

Ⅴ． 操作上の注意

1. 検体はただちに測定に供すること、やむを得ない場合は小分けし、密栓して-30℃以下で凍結保存してください。なお、検体の凍結融解のくり返しはできる限り避けてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じ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。
4. 各ウエルの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行なってください。また各検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。
5. 6.3 ng/mL を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
6. 室温での反応は必ずマイクロタイタープレート用振とう器を用い振とうしてください。なお振とうはプレートシールに反応液がはねないようゆっくりと行なってください。
7. 測定はすべて２重測定で行なってください。
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行なってください。
9. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、検量線は必ず測定ごとに作成してください。
10. 各試薬の保存もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
11. 本法による測定には、異なるロットのキットを組合わせて使用しないでください。

Ⅵ. 基本性能



＜添加回収試験＞

＜ヒト血漿A＞

Added S-100β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.44		
0.35	0.91	0.79	115.19
1.05	1.72	1.49	115.44
3.15	3.91	3.59	108.91

＜ヒト血漿B＞

Added S-100β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.26		
0.35	0.76	0.61	124.59
1.05	1.59	1.31	121.37
3.15	3.83	3.41	112.32

＜ヒト血漿C＞

Added S-100β (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0.00	0.59		
0.35	1.05	0.94	111.70
1.05	1.88	1.64	114.63
3.15	4.34	3.74	116.04

＜再現性試験＞

同時再現性：CV(%) 2.33～11.54　日差再現性：CV(%) 2.91～7.77

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

＜貯法＞
遮光し、2～8℃にて保存してください。

＜有効期間＞
製造日より５ヶ月

＜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. Ingebrigtsen T,Romner B,Kongstad P,and Langbakk B (1995). Increased serum concentration of protein S-100 after minor head injury : a biochemical serum marker with prognostic value? *Psychiatry*, 103-104.

2. Missler U,Wiesmann M,Friedrich C,and kaps M (1997).S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic Stroke. *Stroke* **28,** 1956 -1960.

3. Buttner T,Weyees S,Postert T,Sprengelmeyer R,and Kuhu W (1997).S-100 protein : Serum Marker of local brain damage after ischemic terrtorial MCA in farction. *Stroke* **28**, 1961-1965.

4. Wiesmann M, Missler U, Hagenstrom H, and Gottmann D (1997).S-100 protein plasma level after aneurysmal subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* **139**, 1155-1160.

5. Woertgen Ch, Rothoerl R D, Holzschuh M, Metz Ch, and Brawanski A (1997).Comparison of serial S-100 and NSE serum measurements after severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* **139,** 1161-1165.

6. Mckeating E G, Andrews P J D, and mascia L (1998).Relationship of neuro specific enolase and protein S-100 concentration in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after tramatic brain injury. *Acta Neurochir (Suppl)* **7,** 117-119.

7. Raave A, Grolms C, Keller M, Dohnert J, Sorge O, and Seifer V (1998).Correlation of computed tomography findings and serum brain damage markers following severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* **140,** 787-792.

＜お問合せ先＞
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
www.yanaihara.co.jp　ask@yanaihara.co.jp
2009 年 10 月 7 日改訂