

Rat IL-6 (Native Form) Assay Kit - IBL

96 Well

1. はじめに

Interleukin-6 (IL-6)は、B細胞分化因子として発見されたサイトカインの一種です。IL-6は抗体産生システムだけでなく、肝細胞における急性期タンパクの合成誘導や、IL-3との相乗効果に基づいた増殖促進等の生理活性が大きな注目を集めています。IL-6は病態と関連をもつことが着実に明らかになってきています。たとえば、複数の疾患における成長因子がIL-6であることや、ミエローマ細胞自身がIL-6を産生しIL-6レセプターを発現することなどが報告されています。さらにIL-6がさまざまな炎症性疾患や自己免疫疾患へ関与していると示唆されています。

本キットにより、ラット血液中、あるいは培養細胞上清中におけるNative formのIL-6を高感度に検出することが可能になりました。

2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法によるEIA (Enzyme Immuno Assay)キットです。1次抗体は、プレートに固相されていますので、検体および標準物質を加え、1次反応をおこない洗浄後HRP標識された2次抗体を加え2次反応をおこないます。反応後、過剰の2次抗体を洗浄除去します。Tetra Methyl Benzidine (TMB)により発色させます。この発色は、Rat IL-6 (Native Form)の量に比例します。

3. 測定範囲

11.72 ~ 750 AU/mL (参考値: Mouse IL-6 に換算して 8.36~535pg/mL)

本キットにおいては標準物質の表記について、bioassayによる生物学的活性を指標としたユニット表記で定めています。すなわち、ラットIL-6依存性細胞株を用いた細胞増殖試験においてED₅₀を示す濃度を1 AU/mLと規定しています。

なお、大腸菌で発現させたrecombinant rat IL-6に対する反応性とnative formに対する反応性とは異なるためにデータの直接比較はおすすめしません。

4. 使用目的

培養上清およびEDTA-血漿中のRat IL-6 (Native Form)を測定可能です。

5. 構成試薬

| | | |
|---|--|-------------|
| 1 | 抗体プレート (抗 Rat IL-6 Rabbit IgG A.P.固相) | 96 Well x 1 |
| 2 | 標識抗体濃縮液 (30倍濃度 HRP標識抗 Rat IL-6 Rabbit IgG Fab' A.P.) | 0.4mL x 1 |
| 3 | 標準物質 (Recombinant Rat IL-6) | 0.5mL x 2 |
| 4 | 希釈用緩衝液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS) | 30mL x 1 |
| 5 | 標識抗体用溶解液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS) | 12mL x 1 |
| 6 | TMB 基質液 | 15mL x 1 |
| 7 | 停止液 (1N H ₂ SO ₄) | 12mL x 1 |
| 8 | 濃縮洗浄液 (40倍濃度リン酸緩衝液) | 50mL x 1 |

6. 用法および用量 (操作方法)

(1) 必要な器具・器材

| | |
|------------------------|------------------|
| プレートリーダー (測定波長: 450nm) | マイクロピペットおよびチップ |
| 希釈用テストチューブ | メスシリンダーおよびビーカー |
| 精製水 | グラフ用紙 (両対数) |
| ペーパータオル | 洗浄ピン |
| 冷蔵庫 (4℃として) | 採取用容器 (清潔な試験管など) |

(2) 準備

濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は、40倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液50mLに対して精製水を1,950mL加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し2週間以内に使用してください。

標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液は30倍濃度です。別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で30倍希釈してください。これを標識抗体とします。

希釈例)

1スリット (8ウェル) 使用する場合=800μL必要 (最低量)

(標識抗体濃縮液を30μLとり、標識抗体用溶解液870μLを加え良く混和し、100μLずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

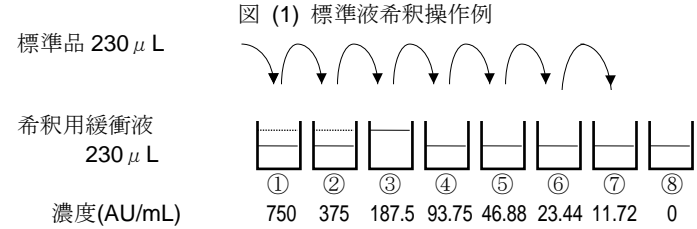
標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

標準物質の希釈方法

標準物質のバイアル瓶に精製水を0.5mL加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は1,500 AU/mLとなります。

希釈用テストチューブを8本用意し希釈用緩衝液を230μLずつ量り取り、各々のテストチューブに750 AU/mL, 375 AU/mL, 187.5 AU/mL, 93.75 AU/mL, 46.88 AU/mL, 23.44 AU/mL, 11.72 AU/mL, 0 AU/mLの表示をします。

750 AU/mLの希釈用テストチューブに1,500 AU/mLの標準物質溶液を230μL加え混和しその溶液230μLを750 AU/mLの希釈用テストチューブに加えて混和します。順次2倍連続希釈をおこない750 AU/mL~11.72 AU/mLまでの7点を希釈標準品とし、0 AU/mLを検体ブランクとします。(図(1)参照)



検体の希釈方法

検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈し測定してください。

(3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し検量線を設定してください。

1 プランクの添加 (以降図(2)参照)

試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を100μL入れます。

2 検体、希釈標準品の添加

検体100μL及び希釈標準品各100μL並びに検体ブランク100μLを入れます。

3 プレートカバーをして4℃ overnight

4 洗浄7回

洗浄操作に十分注意して測定してください。推奨する洗浄方法は、抗体プレートの各ウェルを洗浄ピンに入れた洗浄液を用いて勢良く洗い流しその後、洗浄液をウェルに満たし15~30秒間静置しプレートを逆さまにして振り払い洗浄液を完全に除去します。この洗浄操作を規定回数以上行い、ペーパータオル等の上でたたいて全ウェルの水分を完全に除去してください。

プレートウォッシャーによる洗浄は、機種により洗浄が不十分な場合がありますので洗浄後、さらに上記洗浄方法による洗浄を3回程度おこなってください。

検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々100μL添加します。

6 プレートカバーをして4℃30分間反応

7 洗浄9回

上記4洗浄と同様操作

8 TMB基質液の添加

あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルにTMB基質液を100μL添加します。TMB基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光して下さい。また、採取用容器残ったTMB基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。

9 遮光をして常温30分間反応

10 停止液の添加

すべてのウェルに停止液を100μL添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。

11 吸光度測定

プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30分以内に試薬ブランクを対照として検体及び標準並びに検体ブランクの波長450nmにおける吸光度を測定してください。

図(2) 測定操作一覧

| | 検体 | 標準 | 検体ブランク | 試薬ブランク |
|---|-------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 試料 | 検体 100μL | 希釈標準品 100μL | 希釈用緩衝液 100μL | 希釈用緩衝液 100μL |
| プレートカバーをして4℃ overnight | | | | |
| 洗浄7回 | | | | |
| 標識抗体 | 100μL | 100μL | 100μL | — |
| プレートカバーをして4℃30分間反応 | | | | |
| 洗浄9回 | | | | |
| TMB基質液 | 100μL | 100μL | 100μL | 100μL |
| 遮光常温30分間反応 | | | | |
| 停止液 | 100μL | 100μL | 100μL | 100μL |
| プレートをたたいて反応液を混和し、30分以内に試薬ブランクを対照として450nmにおける検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定 | | | | |

7. 操作上の注意事項

- 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。
- 検体は必要に応じて希釈用緩衝液にて希釈してください。
- 検体や標準物質は、2重測定することをおすすめいたします。
- 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- TMB基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。

8 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

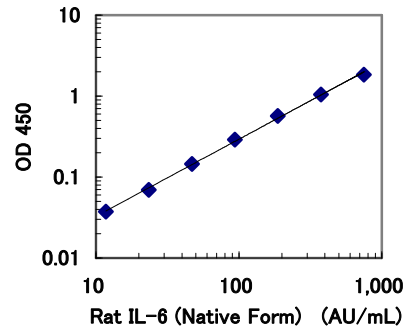
8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランク値を引いた値を取り検量線を設定します。

試料検体の吸光度値から検体ブランクの値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

9. 測定値と検量線作成例

| 標準品濃度 (AU/mL) | 吸光度 (450nm) |
|---------------|-------------|
| 750 | 1.849 |
| 375 | 1.065 |
| 187.5 | 0.584 |
| 93.75 | 0.305 |
| 46.88 | 0.159 |
| 23.44 | 0.084 |
| 11.72 | 0.052 |
| 0 (検体ブランク) | 0.014 |



* 上記検量線は作成例です。測定にあたってはその都度検量線を作成してください。

10. キットの性能

(1) 希釈試験 (標準物質を添加したサンプルを使用しています)

| 検体 | 希釈倍率 (x) | 測定値 (AU/mL) | 理論値 (AU/mL) | % |
|--------------------------|----------|-------------|-------------|-------|
| 培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) | 2 | 383.96 | 375.00 | 102.4 |
| | 4 | 200.78 | 187.50 | 107.1 |
| | 8 | 106.19 | 93.75 | 113.3 |
| 血漿 (EDTA) (ラット) | 8 | 74.55 | 93.75 | 79.5 |
| | 16 | 38.21 | 46.88 | 81.5 |
| | 32 | 19.07 | 23.44 | 81.4 |

(2) 添加回収試験

| 検体 | 理論値 (AU/mL) | 測定値 (AU/mL) | % |
|-------------------------------|-------------|-------------|------|
| 培地 (10%FCS 添加 RPMI-1640) (x2) | 375.00 | 327.46 | 87.3 |
| | 187.50 | 174.79 | 93.2 |
| | 93.75 | 90.11 | 96.1 |
| 血漿 (EDTA) (ラット) (x16) | 375.00 | 301.46 | 80.4 |
| | 187.50 | 152.21 | 81.2 |
| | 93.75 | 75.19 | 80.2 |

(3) 同時再現性

| 測定値 (AU/mL) | SD 値 | CV 値 (%) | n |
|-------------|------|----------|----|
| 297.31 | 4.94 | 1.7 | 24 |
| 71.71 | 1.39 | 1.9 | 24 |
| 34.83 | 0.80 | 2.3 | 24 |

(4) 測定間再現性

| 測定値 (AU/mL) | SD 値 | CV 値 (%) | n |
|-------------|-------|----------|----|
| 293.45 | 14.29 | 4.9 | 40 |
| 70.45 | 5.45 | 7.7 | 40 |
| 33.57 | 2.95 | 8.8 | 40 |

(5) 特異性

| 測定物質 | 交差率 |
|-------------------------|--------|
| Rat IL-6 (Native Form) | 100.0% |
| Rat GRO/CINC-1 | — |
| Rat GRO/CINC-2 α | — |
| Rat GRO/CINC-2 β | — |
| Rat GRO/CINC-3 | — |
| Rat MCP-1 | — |
| Rat IL-1 β | — |
| Rat TNF α | — |

(6) 感度

1.38 AU/mL

本キットの感度は、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) の評価方法に従い求めました。(National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA : NCCLS 参照)

11. 使用上又は取り扱い上の注意

- 1 保存は、2~8℃としてください。使用前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 2 標準物質は、凍結乾燥品です。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- 3 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服・皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 4 使用後の抗体プレートや試薬は、多量の水で洗い流してから廃棄してください。
- 5 標識抗体濃縮液は、まれに析出を認める場合がありますが、性能に問題はありません。
- 6 構成試薬には動物血液成分を含む場合があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。
- 7 ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換して使用することは避けてください。
- 8 有効期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 9 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

12. 保存方法および有効期限

2~8℃保存
使用期限は外箱に記載

13. 包装単位および製品番号

96 Well
製品番号 27197

14. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所 営業部
〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1
TEL 0274-22-2889 FAX 0274-23-6055

Version 1.